

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/12

C07K 14/47 C07K 16/14

C07K 16/18 G01N 33/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00809310.5

[43]公开日 2002年7月3日

[11]公开号 CN 1357041A

[22]申请日 2000.6.14 [21]申请号 00809310.5

[30]优先权

[32]1999.6.22 [33]EP [31]99112024.7

[86]国际申请 PCT/EP00/05457 2000.6.14

[87]国际公布 WO00/78947 英 2000.12.28

[85]进入国家阶段日期 2001.12.21

[71]申请人 默克专利股份有限公司

地址 德国达姆施塔特

[72]发明人 I·丹达阿斯 V·费施尔

C·赛费尔德

L·温枚尔音尼尔

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

代理人 李 瑛

权利要求书 3 页 说明书 31 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 头部创伤诱导的胞质钙结合蛋白

[57]摘要

本文公开了 ANIC - BP 多肽和多聚核苷酸以及通过重组技术产生这样的多肽的方法,也公开了在诊断试验中利用 ANIC - BP 多肽和多聚核苷酸的方法。

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

权利要求书

1. 一种选自下组的分离的多肽:

- (a) 一种由包含 SEQ ID NO: 1 序列的多聚核苷酸编码的分离多肽;
- (b) 一种包含与 SEQ ID NO: 2 的多肽序列具有至少 95%的等同性的多肽序列的分离多肽;
- (c) 一种与 SEQ ID NO: 2 的多肽序列具有至少 95%的等同性的分离多肽;
- (d) SEQ ID NO: 2 的多肽序列, 和
- (e) (a) 至 (d) 中这些多肽的片段或变异体。

2. 如权利要求 1 所要求的分离多肽, 其包含 SEQ ID NO: 2 的多肽序列。

3. 如权利要求 1 所要求的分离多肽, 该多肽是 SEQ ID NO: 2 的多肽序列。

4. 一种选自下组的分离的多聚核苷酸:

- (a) 一种分离的多聚核苷酸, 它含有与 SEQ ID NO: 1 的多聚核苷酸序列具有至少 95%的等同性的多聚核苷酸序列;
- (b) 一种与 SEQ ID NO: 1 的多聚核苷酸具有至少 95%的等同性的分离多聚核苷酸;
- (c) 一种分离的多聚核苷酸, 该多聚核苷酸包含编码与 SEQ ID NO: 2 的多肽序列具有至少 95%的等同性的多肽序列的多聚核苷酸序列;
- (d) 一种分离的多聚核苷酸, 该多聚核苷酸具有编码与 SEQ ID NO: 2 的多肽序列具有至少 95%的等同性的多肽序列的多聚核苷酸序列;
- (e) 一种分离的具有至少 100 个核苷酸的核酸序列的多聚核苷酸, 该分离的多聚核苷酸是在严紧杂交条件下, 用标记的、具有 SEQ ID NO: 1 序列的或具有它的至少 15 个核苷酸片段的探针通过筛选文库而获得的;
- (f) 一种多聚核苷酸, 该多聚核苷酸是 (a) 至 (e) 中的多聚核苷酸对等的 RNA; 或者是与所说的分离的多聚核苷酸互补的多聚核苷酸, 以

及上面提到的多聚核苷酸的变异体和片段的多聚核苷酸，或者是与上面提到的多聚核苷酸在其全长范围上互补的多聚核苷酸。

5. 如权利要求 4 所要求的分离的多聚核苷酸，其选自下组：

- (a) 一种包含 SEQ ID NO: 1 多聚核苷酸的分离的多聚核苷酸；
- (b) SEQ ID NO: 1 的分离的多聚核苷酸；
- (c) 一种分离的多聚核苷酸，该多聚核苷酸含有编码 SEQ ID NO: 2 的多肽的多聚核苷酸；和
- (d) 一种分离的编码 SEQ ID NO: 2 的多肽的多聚核苷酸。

6. 一种表达系统，当所说的载体存在于相容的宿主细胞中时，该表达系统含有能够产生权利要求 1 的多肽的多聚核苷酸。

7. 一种含有权利要求 6 的表达载体的重组宿主细胞或者一种表达权利要求 1 的多肽的该细胞膜。

8. 一种产生权利要求 1 的多肽的方法，该方法包括在可充分产生所说的多肽和从培养基中回收该多肽的条件下，培养如权利要求 7 中限定的宿主细胞的步骤。

9. 一种由免疫球蛋白 Fc-区和权利要求 1 的任何一种多肽组成的融合蛋白。

10. 一种对权利要求 1 至 3 之任一权利要求的多肽具有免疫特异性的抗体。

11. 一种用于筛选以便鉴定能够刺激或者抑制权利要求 1 的多肽的功能或水平的化合物的方法，该方法包括选自下组的方法：

- (a) 直接或间接地通过一种与候选化合物相关的标记，定量或定性地测量或检测候选化合物与多肽（或与表达该多肽的细胞或膜）或与它的一种融合蛋白的结合；
- (b) 在一种标记的竞争剂存在的情况下，测量一种候选化合物与多肽（或与表达该多肽的细胞或膜）或与它的一种融合蛋白的结合；
- (c) 利用对表达该多肽的细胞或细胞膜合适的检测系统，检验候选化合物是否导致由该多肽激活作用或抑制作用产生的信号；
- (d) 把含有权利要求 1 的多肽的一种溶液与候选化合物混合，以形成混

合物，测定该混合物中多肽的活性，以及与不含候选化合物的对照混合物比较该混合物的活性；或

(e) 检测候选化合物对编码所述多肽的 mRNA 或细胞中所述多肽产生的影响效果，例如，用 ELISA 分析，以及

(f) 按照生物工程或化学标准技术生产所说的化合物。

头部创伤诱导的胞质钙结合蛋白

发明所属技术领域

本发明涉及人类急性神经元的诱导的钙结合蛋白和鉴定及编码该蛋白质的多聚核苷酸 (ANIC-BP)。本发明还提供了表达载体, 宿主细胞和抗体。此外, 本发明提供了用于产生该蛋白质的方法及治疗和预防与该蛋白质的表达有关的疾病。本发明还涉及抑制或者激活这种多聚核苷酸和多肽的作用。

发明背景

中风和急性头部创伤, 多发性硬化以及脊髓伤害是迄今为止没有任何现成疗法的疾病。中风是第三大死亡原因, 对患者以及社会负担巨大。如果发生占中风大部分的局部中风的话, 脑部血管堵塞是初发事件。头创伤事故是西方世界年青人的主要疾病, 很少数量的病人受由机械撞击和动脉破裂引起的出血性中风的影响, 一个共有的特征是批准的药物很少可供使用。当前可供使用的治疗方法是建立在病理生理概念之上的, 该概念来源于病灶性大脑局部缺血的实验工作。这些方法包括动脉再造管术, 对炎症过程的抑制和神经保护的药理学策略。用动脉再灌注策略的进一步研究正在进行之中。正在完成用依赖于多形核白细胞的内皮粘连受体拮抗药的早期临床研究, 但尚需提出策略。然而, 只解决局部缺血级联过程中单一步骤的任何策略可能仅仅产生一个不大的疗效。因此, 未来的疗法最适当地将基于结合疗法。低剂量的乙酰水杨酸和释放改进的双嘧达莫醇的结合在中风的次级预防中已表明具有累加效应。(Tijssen 等. 国际临床学者杂志增刊. 91, 14-16, 1997)。目前提出的供临床评价的另一组合是 tPA 加上一种有效的神经保护因子。然而, 这些研究的结果还远远不是非常有效的。因此, 急需了解更多的病理生理机制以便提供药物目标, 该目标可被用来研制新的药物和建立更通用的治疗患有急性神经损伤和疾病如多发性硬化的患者的方法。

本发明确实是集中于 Ca^{2+} 钙结合蛋白质，因为对 Ca^{2+} 结合蛋白质在神经保护中的作用有大量的证据。虽然钙结合蛋白质 (CaBPs) 的精确功能还不肯定，但已提出了钙结合蛋白的作用是可缓冲细胞间 Ca^{2+} 的水平 (浓度)。由于钙离子的过度负荷激活了导致蛋白水解作用和线粒体功能紊乱的生化过程，钙结合蛋白的这一缓冲能力对兴奋中毒的神经元损伤可能有保护效果 (Heizmann 等 TINS, 15, 259-64, 1992)。存在各种各样的证据，支持钙结合蛋白的这一假设的、在钙水平的调节中和神经保护中的作用。

在中枢神经系统中表达的 (小白蛋白 (parvalbumin), 钙结合蛋白-D28K, 和钙视网膜蛋白) 主要 Ca^{2+} 结合蛋白 (CaBPs) 在各种神经元群体中具有十分不寻常的和选择性的表达模式。在确实表达 CaBPs 的神经元中，大部分只表达一种类型，虽然少量的神经元表达不止一种的主要钙结合蛋白。有不断增加的证据表明，在特殊的细胞类型中，存在或者缺乏钙结合蛋白 (CaBPs) 是构成被称为选择易受伤性这一现象的基础。选择易受伤性是一种特殊类型的神经元对中枢神经系统 (CNS) 损伤反应而死亡的性质。例如，CA1 海马神经元是有选择地易受球面局部缺血的损伤，小脑浦肯野氏 (purkinje) 细胞有选择地易受头部创伤，中风，胎儿酒精暴露的损伤，同时在黑质中的神经元在帕金森疾病中是有选择地易受损伤的。已经努力地把选择性的神经元易受伤性与各种 CaBPs 表达模式联系起来，有些作者报告在选择性地易受损伤的神经元的群体中发现了高浓度的 CaBPs，而其它则报告对损伤选择性抵抗的神经元群体中有较高浓度的 CaBP。例如，据报导，高水平表达的小白蛋白 (parvalbumin) 的神经元选择性地易受 AMPA-诱导的毒性的损伤 (Weiss 等. 神经学, 40, 1288-1292, 1990)，而表达高水平的钙结合蛋白 -D28K 的培养的海马神经元据报导对谷氨酸诱导的毒性有选择性的抵抗性 (Baimbridge 等. TINS, 15, 303-8, 1992)。类似地，表达高水平的钙视网膜蛋白的海马神经元能抵抗有毒性剂量的兴奋毒素谷氨酸，NMDA，红藻酸和使君子氨酸 (Winsky 等，在《新的钙结合蛋白质》中，277-300, 1991)。

CaBPs 也被发现在各种 CNS 疾病状态下的表达被改变，但是，关于

CaBP 的表达是否与选择性的易受伤性或对伤害的选择性的抵抗力有关, 结果也不一致。表达钙结合蛋白-D28K 的神经元据报导在阿尔茨海默 (Alzheimers) 病中 (Iacopino 等, PNAS, 87, 4078-82, 1990, Hof 等, 实验神经学, 111, 293-301, 1991) 和亨廷顿舞蹈 (Huntington) 病中 (Kiyama 等. 大脑研究, 526, 303-07, 1990) 是有选择地易受损伤的, 虽然在帕金森病中, 在黑质中的表达钙结合蛋白-D28K 的神经元不是有选择地易受损伤的 (Yamada 等. 大脑研究, 526, 303-07, 1990)。在球面局部缺血的沙土鼠模型中, 一定的海马细胞类型中小白蛋白的存在表明了与存活呈正相关 (Tortosa 等. 神经科学. 1, 33-43, 1993), 虽然其它的研究提出表达海马神经元的小白蛋白在阿尔茨海默 (Alzheimer) 病中是有选择地易受损伤的 (Brady 等. 神经科学, 80, 1113-25, 1997)。

钙结合蛋白基因失效的小鼠表现出功能缺陷 (例如共济失调), 表明正常表达这一 CaBP 的神经元中的严重功能失调 (例如, 小脑浦肯野细胞), 尽管这些神经元在形态上似乎是正常的。这一发现表明 CaBPs 对细胞活动模式是至关重要的 (Airaksinen 等, PNAS, 94, 1488-93, 1997)。此外, 具有钙结合蛋白-D28k 的运动神经元的逆转病毒侵染表明对由肌萎缩的侧硬化病人的 IgG 诱导的毒性具有神经保护作用 (Ho 等, PNAS, 93, 6796-801), 用钙结合蛋白-D28k 进行的转染表明可保护 PC12 细胞免于因血清提取, 谷氨酸暴露和神经毒素 MPP⁺而产生的毒性作用 (McMahon 等, 分子大脑研究, 526, 303-07, 1998)。

总之, 关于钙结合蛋白质在神经退化中的作用有大量的信息。可以肯定的是某些 CaBPs 提供保护, 其它的 CaBPs 则造成选择性的易受伤性, 然而, 尚不清楚的是, 在不同神经元群体中, 一定的 CaBPs 的表达是否导致一种给定的 CaBP 的不同功能反应。另一种观察后的意见认为不同类型的 CNS 伤害的严重度可以影响 CaBPs 的明显的神经保护功效, 即在包括温和损伤的损伤模型中, CaBP 可以赋予抵抗力, 但在更严重的 CNS 损伤中, 不能缓冲 Ca²⁺的增加。因此, 有相当的证据表明, 在 CNS 损伤过程中, CaBPs 既可赋予抵抗力, 也可赋予易受伤性, 但这种复杂情况的机制

和反应的调节还需要研究。

最近从小鼠来源的 cDNA 文库中分离了包含功能尚未鉴定的基因 (MO25) 的一个基因家族 (Miyamoto 等, 分子繁殖发育, 34, 1-7, 1993)。该文库是由从一种早期胚胎小鼠中分离的 RNA 进行构建的。对 MO25 预测的氨基酸序列揭示 MO25 基因与钙结合蛋白具有结构上的同源性, 缺乏跨膜结构域, 表明该蛋白可能参与了未受精卵的胞液发育。然而, 该蛋白质的真正的功能仍然是未知的。另一种类似于 Mo25 的基因已经从果蝇的 cDNA 文库中克隆出来 (Nozaki 等, DNA 细胞生物学, 15, 505-09, 1996)。其推导的 Mo25 cDNA 的氨基酸序列与鼠 MO25 的同系物有 69.3 % 的同源性。酿酒酵母中的一种同源染色体在钙调磷酸酶 B 亚基基因附近的一个可读框内编码。最近, 另一种基因从曲霉属的 *hym A* 突变体中分离出来 (Karos 等, Mol. Gen Genet, 260, 510-521, 1999), 结果显示该基因对应于酵母, 植物, 蝇类, 蠕虫, 鱼类, 鼠和人类的同源染色体。在任何描述的生物中还没有定义 Hym 蛋白的细胞功能。至于只是部分地理解其功能的很多其它的蛋白质, 药物发现的过程当前正在经历一个基本的革命, 因为它包含“功能性基因组学”, 即, 高通量的基因组或基于基因的生物学。该方法作为鉴定基因和作为治疗靶标的基因产物的一种手段, 正在迅速地超过早期的基于“定位克隆”的方法。可以鉴定出表现型, 即一种生物学功能或遗传疾病, 再根据其遗传图谱位置可把这一结果追索到其相应的基因。功能基因组学主要依赖于高通量 DNA 测序技术和生物信息学各种工具, 从目前可供使用的很多分子生物学数据库来鉴定具有潜在意义的基因序列。继续需要鉴定和进一步描述基因的以及它们的作为药物发现靶标的相关多肽/蛋白质的特征。

发明概要

本发明涉及 ANIC-BP, 具体地说涉及 ANIC-BP 多肽和 ANIC-BP 多聚核苷酸, 重组材料以及它们的产生方法。对这些多肽和多聚核苷酸的兴趣在于其与一定疾病的治疗方法有关, 这些疾病包括但不限于中风和急性头部创伤, 多发性硬化和脊髓损伤, 在下文称作“本发明的疾病”。另一方面, 本发明涉及利用本发明所提供的材料鉴定兴奋剂和拮抗剂 (如,

抑制剂)和用被鉴定的化合物治疗与 ANIC-BP 不平衡相关的疾病。另一方面,本发明还涉及检测与不适当的 ANIC-BP 活性或者水平相关的疾病的诊断分析。

发明描述

一方面,本发明涉及 ANIC-BP 多肽,这样的多肽包括:

- (a) 一种由包含 SEQ ID NO:1 序列的多聚核苷酸编码的分离多肽;
- (b) 一种分离多肽,该多肽包含与 SEQ ID NO:2 的多肽序列具有至少 95%, 96%, 97%, 98%或者 99%同源性的多肽序列;
- (c) 一种包含 SEQ ID NO:2 的多肽序列的分离多肽;
- (d) 一种与 SEQ ID NO:2 的多肽序列具有至少 95%, 96%, 97%, 98%或者 99%同源性的分离多肽;
- (e) SEQ ID NO:2 的多肽序列; 和
- (f) 一种分离多肽,该多肽与 SEQ ID NO:2 的多肽序列相比,具有或包含同源性指数为 0.95, 0.96, 0.97, 0.98 或 0.99 的多肽序列;
- (g) (a) 至 (f) 中这种多肽的片段或变体。

本发明的多肽被认为是钙结合蛋白多肽家族的成员。因此它们具有意义是因为它们能作为一个新奇的药物靶子。

ANIC-BP 的生物学性质在下文称作“ANIC-BP 的生物学活性”或者“ANIC-BP 活性”。优选地,本发明的多肽显示至少一种 ANIC-BP 的生物活性。

本发明多肽也包括前面提到的多肽的变体,包括所有的等位形式和剪接变体。这种多肽通过可以是保守的或非保守的、或任意结合的插入,缺失和替换与参照多肽有所不同。特别优选的变异是那些其中几个氨基酸,例如,从 50 到 30,从 30 到 20,从 20 至 10,从 10 至 5,从 5 至 3,从 3 至 2,从 2 至 1 种或者 1 个氨基酸被插入,替换或缺失或其任意结合的变体。

本发明多肽的优选片段包括一种包含具有至少 30 个,50 个或者 100 个 SEQ ID NO:2 氨基酸序列中的连续氨基酸的氨基酸序列的分离多肽,或者包括一种包含具有至少 30 个,50 个或者 100 个从 SEQ ID NO:2 的

氨基酸序列中截短或缺失的、连续氨基酸的氨基酸序列的分离多肽。优选片段是介导 ANIC-BP 的生物活性的生物活性的片段，包括那些具有相似活性或活性提高，或降低的不理想的活性的片段。优选片段还包括那些在动物中，尤其是在人体中具有抗原作用或致免疫性的片段。

通过肽的合成，本发明的多肽片段可以被用来产生相应的全长多肽；因此，这些变体可以被用作产生本发明的全长多肽的中间体。本发明的多肽可以以“成熟”蛋白质的形式或者可以是更大的蛋白质的一部分，如前体物或者融合蛋白质。包含附加的氨基酸序列常常是很有利的，该附加的氨基酸序列包含分泌或引导序列，前序列，或者是有助于提纯的序列，例如多个组氨酸残基，或者是为了增加在重组生产期间的稳定性的附加序列。

本发明的多肽能以任何合适的方式进行制备，例如，从自然存在的来源中分离，从包含表达系统（见下文）的遗传工程宿主细胞中分离，或通过化学合成，例如用自动肽合成仪合成，或者这些方法的结合。制备这些多肽的方法是本领域的技术人员所熟知的。

另一方面，本发明涉及 ANIC-BP 多聚核苷酸。这样的多聚核苷酸包括：

(a) 一种分离的多聚核苷酸，该多聚核苷酸包含与 SEQ ID NO:1 的多聚核苷酸序列具有至少 95%，96%，97%，98%或者 99%同源性的多聚核苷酸序列；

(b) 一种包含 SEQ ID NO:1 的多聚核苷酸的分离多聚核苷酸；

(c) 一种与 SEQ ID NO:1 的多聚核苷酸具有至少 95%，96%，97%，98%或者 99%同源性的分离多聚核苷酸；

(d) SEQ ID NO:1 的分离多聚核苷酸；

(e) 一种分离的多聚核苷酸，该多聚核苷酸包含编码与 SEQ ID NO:2 的多肽序列具有至少 95%，96%，97%，98%或者 99%同源性的多肽序列的多聚核苷酸序列；和

(f) 一种分离的多聚核苷酸，该多聚核苷酸包含编码 SEQ ID NO:2 的多肽的多聚核苷酸；

(g) 一种分离的多聚核苷酸，该多聚核苷酸具有编码与 SEQ ID NO:2 的多肽序列具有至少 95%，96%，97%，98% 或者 99% 同源性的多肽序列的多聚核苷酸序列；和

(h) 编码 SEQ ID NO:2 多肽的分离多聚核苷酸序列；

(i) 一种分离的多聚核苷酸，该多聚核苷酸与 SEQ ID NO:2 的多聚核苷酸序列相比，具有或包含同源性指数为 0.95，0.96，0.97，0.98 或 0.99 的多聚核苷酸序列；

(j) 一种具有或包含多聚核苷酸序列的分离多聚核苷酸，该多聚核苷酸序列编码的多肽序列与 SEQ ID NO:2 的多肽序列相比具有 0.95，0.96，0.97，0.98 或 0.99 的同源性指数；以及上面提到的多聚核苷酸的片段或变异体的多聚核苷酸、或者是与上面提到的多聚核苷酸的全长互补的多聚核苷酸。

本发明的优选聚核苷酸片断包括一种含有具有至少 15，30，50 或 100 个来源于 SEQ ID NO:1 序列的连续核苷酸的核苷酸序列的分离多聚核苷酸，或一种含有至少 30，50 或 100 个来源于 SEQ ID NO:1 序列的截短的或缺失的连续核苷酸的序列的分离多聚核苷酸。

本发明多聚核苷酸的优选变异体包括拼接变异体，等位变异体和多态性，包括具有一种或更多种单核苷酸多态性 (SNPs) 的多聚核苷酸。

本发明的多聚核苷酸还包括编码多肽变异体的多聚核苷酸，该多肽变异体含有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列和其中几个氨基酸残基，例如从 50 到 30，从 30 到 20，从 20 至 10，从 10 至 5，从 5 至 3，从 3 至 2，从 2 至 1 种或者 1 个氨基酸可以被替换，缺失，或插入或以任何组合的形式。

另一方面，本发明提供了为本发明 DNA 序列的 RNA 转录物的多聚核苷酸。因此，提供一种 RNA 多聚核苷酸：

(a) 包含一种编码 SEQ ID NO:2 多肽序列的 DNA 序列的 RNA 转录物；

(b) 是编码 SEQ ID NO:2 多肽序列的 DNA 序列的 RNA 转录物；

(c) 包含一种 SEQ ID NO:1 的 DNA 序列的 RNA 转录物；或

(d) 是 SEQ ID NO:1 的 DNA 序列的 RNA 转录物；和与其互补的 RNA 多聚核苷酸。

SEQ ID NO:1 的多聚核苷酸序列显示与 Hym A (Nozaki 等, DNA 细胞生物学, 15, 505-09, 1996) 和 Mo25 (Karas 等, 普通分子遗传学 (Mol. Gen. Genet), 260, 510-521, 1999) 的同源性。SEQ ID NO:1 的多聚核苷酸序列是编码 SEQ ID NO:2 多肽的 cDNA 序列。编码 SEQ ID NO:2 多肽的多聚核苷酸序列与编码多肽的 SEQ ID NO:1 序列可能是完全相同的, 或者可能是除 SEQ ID NO:1 之外的序列, 该序列由于遗传密码的冗余性 (简并性) 也编码 SEQ ID NO:2 的多肽。该 SEQ ID NO:2 的多肽与钙结合蛋白家族的其它蛋白有关, 具有与 Hym A 蛋白和 Mo25 蛋白的同源性和/或结构相似性。

本发明的优选多肽和多聚核苷酸预期特别具有与其同源多肽和多聚核苷酸相似的生物学功能/性质。此外, 本发明的优选多肽和多聚核苷酸至少具有 ANIC-BP 活性。

利用标准的克隆和筛选技术, 从来源于人的中枢神经系统的 mRNA 细胞的 cDNA 文库可以获得本发明的多聚核苷酸, (参见例如, Sambrook 等, 分子克隆: 实验室手册, 第二版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约 (1989))。从自然来源中如基因组 DNA 文库也可获得、或者利用熟知的或市售的技术能够合成本发明的多聚核苷酸。

当本发明的多聚核苷酸被用于本发明的多肽的重组生产时, 多聚核苷酸本身可以包括成熟多肽的编码序列, 或带有其它编码序列的阅读框中的成熟多肽的编码序列, 如编码引导或分泌序列, 前蛋白, 原蛋白或前原蛋白序列或其它的融合肽部分的编码序列。例如, 可以编码有利于提纯融合多肽的标记序列。在本发明这一方面的一定的优选实施方案中, 标记序列是一种六个组氨酸肽, 如同 pQE 载体中提供的 (Qiagen 公司) 和 Gentsz 等描述的 (美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci USA) (1989) 86: 821-824), 或者是 HA 标记物。多聚核苷酸也可以包含非编码的 5' 端和 3' 端序列, 如转录的, 非翻译的序列, 拼接的和聚腺苷酸化的信号序列, 核糖体结合位点和稳定 mRNA 的序列。

完全相同的, 或者与 SEQ ID NO:1 多聚核苷酸序列有充分的同源性的多聚核苷酸可被用作 cDNA 和基因组 DNA 的杂交探针, 或用于核酸扩增

反应的引物（例如，PCR）。这些探针和引物可以用来分离本发明的全长 cDNA 和编码多肽的基因组克隆，并且分离其它基因的 cDNA 和基因组克隆（包括编码从人类来源的共生同源基因产物（paralogs）和除人以外的其它物种来源的直向同源基因产物（orthologs）和共生同源基因产物（paralogs）的基因），该其它基因与 SEQ ID NO:1 有很高的序列相似性，典型地至少有 95 % 的同源性。优选的探针和引物一般包括至少 15 个核苷酸，优选地至少 30 个核苷酸，如果不是至少 100 个核苷酸的话，可能具有至少 50 个核苷酸。特别优选的探针将在 30 个和 50 个核苷酸之间。特别优选的的引物将在 20 和 25 核苷酸之间。

编码本发明多肽的一种多聚核苷酸，包括除人以外的物种来源的同系物，可以由包含下列步骤的方法获得：在严紧的杂交条件下，用一种具有 SEQ ID NO:1 的序列或其片段，优选地具有至少 15 个核苷酸的片段的标记探针筛选文库；和分离包含所说的多聚核苷酸序列的全长 cDNA 和基因组克隆。这种杂交技术是技术人员熟知的。优选的严紧杂交条件包括在 42℃ 下在包含以下成分的溶液中过夜培养：50% 的甲酰胺，5 倍的 SSC (150mM 的氯化钠，15mM 的柠檬酸三钠)，50mM 的磷酸钠 (pH7.6)，5 倍的 Denhard't 溶液，10% 的葡聚糖硫酸盐，和 20 微克/毫升的变性的、剪切的鲑精 DNA；紧接着在 0.1x SSC 中、于大约 65℃ 下洗涤滤膜。这样，本发明也包括所分离的多聚核苷酸，优选地是具有至少 100 个核苷酸的核苷酸序列，在严紧的杂交条件下，用具有 SEQ ID NO:1 的序列或其片段，优选地具有至少 15 核苷酸的片段的标记探针筛选文库可获得这些多聚核苷酸。

熟练的技术人员将意识到，在许多情况之下，一种分离的 cDNA 序列将是不完全的，因为编码多肽的区域并不一直延伸至 5' 端。这是逆转录酶，一种本质上具有较低的“持续合成能力”（在聚合反应过程中，酶保持附着在模板上的能力测定）的酶，在第一条链的 cDNA 合成期间不能完成 mRNA 模板的一个 DNA 拷贝的结果。

有可供使用和本领域的技术人员熟知的几个方法获得全长的 cDNA，或者延伸的短 cDNA，例如根据 cDNA 末端快速扩增的方法（RACE）获得的

那些方法(例如,参见Frohman等,美国国家科学院院刊 85, 8998-9002, 1988)。例如,以马拉松(Marathon)(商标)技术(Clontech 实验室公司)为例的该技术最近的改进明显地简化了对较长的 cDNA 的搜索。在马拉松(商标)技术中,由从选择的组织中提取的 mRNA 和连接到两端的“接头”序列制备 cDNA。然后用基因特异的和接头特异的寡聚核苷酸引物组合进行核酸扩增以扩增“丢失的”cDNA 5' 端。然后用“嵌套”引物,即在扩增产物内设计用于退火的引物(典型地,在接头序列的 3' 进一步退火的接头特异引物,和在已知基因序列的 5' 进一步退火的基因特异引物)重复 PCR 反应。然后通过 DNA 序列测定和全长的 cDNA 可分析该反应的产物,该全长的 cDNA 的构建可通过把产物直接地连接到现有的 cDNA 以产生一完整的序列或者用为 5' 引物设计的新的序列信息进行单独的全长 PCR。

由本领域中熟知的方法,从包含表达系统的遗传工程宿主细胞中可以制备本发明的重组多肽。因此,另一方面,本发明涉及含有本发明的多聚核苷酸或多种多聚核苷酸的表达系统,涉及经遗传工程改构的含有这些表达系统的宿主细胞,和涉及通过重组技术产生本发明的多肽。也可以使用无细胞翻译系统,用来源于本发明的 DNA 构建体的 RNA 产生这样的蛋白质。

为了重组生产,宿主细胞可通过遗传工程方法插入用于本发明的多聚核苷酸的表达系统或其部分。用在许多标准的实验室手册中描述的方法,可把多聚核苷酸导入宿主细胞,如 Davis 等,分子生物学的基本方法(1986),以及 Sambrook 等(出处同上)。把多聚核苷酸导入宿主细胞的优选的方法包括,例如,磷酸钙转染,DEAE-葡聚糖介导的转染,转位,微注射,阳离子脂介导的转染,电穿孔,转导,刮削输入(scrape loading),基因枪导入或者感染。

适当的宿主的代表例子包括细菌细胞,如链球菌,金黄色葡萄球菌,大肠杆菌,链霉菌和枯草杆菌细胞;真菌细胞,如酵母细胞和曲霉属细胞;昆虫细胞,如果蝇 S2 细胞和夜蛾 Sf9 细胞;动物细胞如 CHO, COS, 海拉细胞, C127, 3T3, BHK, HEK 293 和 Bowes 黑瘤细胞;和植物细

胞。

可以利用各种各样的表达系统，例如，染色体的，附加型的和病毒来源的系统，例如，从细菌质粒来源的载体，从噬菌体，从转座子，从酵母附加体，从插入因子，从酵母染色体因子，从病毒如杆状病毒，乳多空病毒，如 SV40，牛痘病毒，腺病毒，禽痘病毒，假狂犬病毒和逆转病毒，以及由其组合来源的载体，如来源于质粒和噬菌体遗传因子的载体，如粘粒和噬菌粒。表达系统可以包含调节和产生表达的控制区域。一般地，可以使用任何能够维持，繁殖或者表达多聚核苷酸、以在宿主中产生多肽的系统或者载体。通过任何多种多样的熟知的和常规操作技术，例如，象 Sambrook 等（出处同上）陈述的那些技术，可把合适的多聚核苷酸序列可以插入到表达系统中。合适的分泌信号可以渗入到所需的多肽中，以使翻译的蛋白质分泌到内质网腔，周质空间或胞外环境中。这些信号可以是该多肽内生的，或者它们可以是异源的信号。

如果本发明的多肽准备表达用于筛选分析，一般优选的是在细胞的表面产生该多肽。在这种情况下，可以在筛选分析使用之前收获这些细胞。如果多肽是分泌到培养基中，可以去除培养基以便回收和提纯多肽。如果这些多肽是产生在细胞内的，回收多肽之前必须对细胞进行裂解。

通过熟知的方法从重组细胞培养物中可以回收和纯化本发明的多肽，这些方法包括：硫酸胺或乙醇沉淀，酸提取，阴离子或阳离子交换层析，磷酸纤维素层析，疏水作用层析，亲和层析，羟基磷灰石层析和凝集素层析。最优选的是，使用高效液相色谱提纯多肽。在细胞内合成，分离和/或提纯多肽的过程中，当多肽被变性时，可以用一些熟知的重新折叠蛋白的技术产生有活性的构象。

通过检测相关基因的突变，本发明的多聚核苷酸可以用作诊断的试剂。对在 cDNA 和基因组序列中的具有 SEQ ID NO:1 的多聚核苷酸特征的突变形式基因（该基因与功能失调有关）的检测，可以提供诊断工具，该诊断工具能增加对，或限定疾病的诊断，或对疾病的易感性诊断，该疾病是因为该基因过低的表达，或过高的表达，或改变的时空表达引起的。

通过多种本领域熟知的技术，可以在 DNA 水平上检测携带基因突变的个体。

供诊断的核酸可以从一个受实验者的细胞中获得，如从血，尿，唾液，活组织检查或尸体解剖材料中获得。基因组 DNA 可直接用于检测，或者在分析之前，通过 PCR，优选地用 RT-PCR，或其他的扩增技术进行酶促扩增。RNA 或 cDNA 也可以类似的方式使用。与正常的基因型相比，通过扩增产物大小的变化可以检测缺失和插入。通过把扩增的 DNA 与标记的 ANIC-BP 核苷酸序列杂交，能够鉴定点突变。通过 RNA 酶消化或熔点温度的区别可以从错配的双螺旋中区别开完美匹配的序列。通过加有或没有变性剂的凝胶上 DNA 片段电泳迁移率的改变，或者通过直接的 DNA 序列测定（例如，参见，Myers 等，科学（1985）230：1242）也可以检测 DNA 序列的差异。通过核酸酶保护实验，如 RNA 酶和 S1 核酸酶保护或化学切割方法（参见 Cotton 等，美国国家科学院院刊（1985）85：4397-4401）也可以揭示特定位置的序列变化。

可以构建一组阵列的包含 ANIC-BP 多聚核苷酸序列或者其片段的寡聚核苷酸探针，来进行有效的筛选，如遗传突变的筛选。这些阵列优选地是高密度的阵列或栅格。阵列技术方法是熟知的，而且具有一般的适用性，可以用来解决分子遗传学上各种各样的问题，包括基因表达，遗传连锁，和遗传变异性，参见，例如，M Chee 等，科学，274，610-613(1996)和其中引用的其它参考文献。

多肽或者 mRNA 表达水平不正常的减少或增加的检测也可用于诊断或测定一个受实验者对本发明的疾病的敏感性。利用任何本领域熟知的定量分析多聚核苷酸方法，例如，象核酸扩增，如 PCR，RT-PCR，RNA 酶保护，Northern 印迹和其它的杂交方法，在 RNA 水平可以测定减少的或者增加的表达。

能够用来测定来源于宿主的样品中的蛋白质水平，如本发明的多肽的分析技术是本领域的技术人员熟知的。这些分析方法包括放射免疫分析，竞争结合分析，Western 印迹分析，和酶联免疫吸附测定（ELISA）分析。

因此，另一方面，本发明涉及一种诊断试剂盒，它包括：

- (a) 一种本发明的多聚核苷酸，优选地为 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列，或者是它的片段或 RNA 转录物；
- (b) 一种与 (a) 的多聚核苷酸序列互补的核苷酸序列；
- (c) 一种本发明的多肽，优选地为 SEQ ID NO:2 的多肽或其片段；
- (d) 一种本发明的多肽的抗体，优选地为 SEQ ID NO:2 的多肽的抗体。

可以理解的是，在任何这样的试剂盒中，(a)，(b)，(c) 或 (d) 可以包括一个实质上的组成部分。这种试剂盒在诊断疾病或对疾病的敏感性时，尤其是本发明的一些疾病中将具有用途。

本发明的多聚核苷酸序列对染色体定位研究是有价值的，该序列特异性地瞄准单个人体染色体上面的特定位置，并且能与其杂交。把一些相关序列作图到本发明的染色体上，在研究那些序列与基因相联系的疾病的相关性方面是重要的第一步。一旦一种序列作图到染色体的精确位置上，该序列在染色体上的物理位置能够与遗传图谱数据相互联系起来。例如，在人类的 V. McKusick, 孟得尔遗传中发现了这样的数据(通过 Johns Hopkins 大学 Welch 医学图书馆网上可查到)。然后通过连锁分析(物理位置上邻近的基因的共遗传)鉴定已作图到相同的染色体区域的基因与疾病的相互关系。使用辐射杂合体 (RH) 作图 (Walter, M. Spillet, D., Thomas, P., Weissenbach, J., 以及 Goodfellow, P., (1994) 用于构建整个基因组的辐射杂合体作图的方法, 自然遗传学, 7, 22-28) 可以确定基因组序列 (基因片段, 等等) 的准确的人类染色体定位。从美国遗传研究所 (Huntsville, 美国阿拉巴马洲) 可以得到一些辐射杂合体作图面板, 例如 GeneBridge4 辐射杂合体作图面板 (人类分子遗传学, 1996, 3 月; 5(3):339-46, 人类基因组的辐射杂合体作图。Gyapay G, Schmitt K, Fizames C, Jones H, Vega-Czarny N, Spillet D, Muselet D, Prud Homme JF, Dib C, Auffray C, Morissette J, Weissenbach J, Goodfellow PN)。利用这一面板为了确定基因的染色体位置, 利用由 RH DNAs 的目的基因设计的引物, 进行 93 次 PCR。每种这些 DNA 含有保持在仓鼠背景下 (人/仓鼠杂合体细胞系) 的随机的人类基因组片段。这些 PCR

产生 93 个结果，表明目的基因的 PCR 产物的存在或者缺乏。把这些结果与利用已知位置的基因组序列来源的 PCR 产物的结果进行比较。该比较可以在 <http://www.genome.wi.mit.edu> 上进行。

本发明的多聚核苷酸序列对组织表达研究也是有价值的工具。这些研究可以测定本发明的多聚核苷酸的表达类型，通过检测编码这些多肽的 mRNA，该测定指明组织中编码的多肽的表达类型。这些使用的技术是本领域的技术人员熟知的，包括在栅格上排列的克隆杂交技术，如 cDNA 微阵列杂交 (Schena 等, 科学, 270, 467-470, 1995 以及 Shalon 等, 基因组研究 (Genome Res), 6, 639-645, 1996) 和核苷酸扩增技术如 PCR。一种优选的方法是利用由 Perkin Elmer 公司提供的 TAQMAN (商标) 技术。这些研究结果可以表明生物体中的多肽的正常功能。此外，通过与另一种形式的相同基因编码的 mRNA 的表达模式 (例如，在编码潜在的或一种调节的突变的多肽方面有改变的基因) 比较研究 mRNAs 的正常表达模式，可以深刻地理解本发明的多肽的作用，或者它们在疾病中不合适的表达所起的作用。这种不合适的表达可以是时空性的，或者只是定量性质的。本发明的多肽在人脑中表达。

本发明的另一方面涉及抗体。本发明的多肽或者它们的片段，或者表达它们的细胞，可以用作免疫原来产生对本发明多肽具有免疫特异性的多种抗体。术语“免疫特异性的”是指与对现有技术中的其它相关多肽的亲和性相比，所述抗体对本发明的多肽本质上有更大的亲和性。

利用常规的实验流程，通过向一种动物，优选地为非人类的动物施用多肽或携带抗原决定簇的片段或细胞，可以获得针对本发明的多肽产生的抗体。为了制备单克隆抗体，可以使用任何能提供由连续不断的细胞系培养产生的抗体的技术。例子包括杂交瘤技术 (Kohler, G, Milstein, C, 自然 (1975) 256 :495-497), trioma 技术, 人类 B-细胞杂交瘤技术 (Kozbor 等, 当代免疫学 (Immunology Today) (1983) 4: 72) 和 EBV-杂交瘤技术 (Cole 等, 单克隆抗体以及癌疗法, 77-96, Alan R. Liss 公司, 1985)。

用于单链抗体产生的技术，如在美国专利 4,946,778 中描述的那些

技术，也可适用于产生针对本发明多肽的单链抗体。也可使用转基因鼠或其它生物，包括其它哺乳动物来表达人源化抗体。

以上描述的抗体可被用来分离或鉴定表达多肽的克隆，或者通过亲和层析提纯多肽。也可用本发明多肽的抗体治疗本发明中的疾病。

本发明的多肽和多聚核苷酸也可以用作疫苗。因此，另一方面，本发明涉及在哺乳动物中诱导免疫反应的方法，该方法包括用本发明的多肽接种哺乳动物，足以产生抗体和/或者 T 细胞免疫的反应，包括，例如产生细胞因子的 T 细胞或者细胞毒性 T 细胞，以便使所述动物免于疾病，不管那种疾病是否已经建立在个体之内。哺乳动物中的免疫反应也可通过这样一种方法诱导，该方法包括通过在活体内指导多肽表达和编码多肽的载体提供本发明的多肽，以诱导这样的免疫反应来产生抗体保护所说的动物不受本发明的疾病的侵袭。给动物施用该载体的方法是在粒子颗粒上涂一层膜、使之加速进入所需的细胞中，或者是其它方法。这样的核酸载体可以包括 DNA，RNA，修饰的核酸，或者 DNA/RNA 杂合体。为了用作疫苗，通常地多肽或核酸载体以疫苗的配方剂型提供（组合物）。该配方还可以包含一个合适的载体。由于多肽可以在胃中分解，优选地是不经过肠道施药（例如，皮下注射，肌肉注射，静脉注射或皮内注射）。适合于非肠道施用的配方剂型包括水溶液和非水溶液的无菌注射液，该注射液可包含提供与受体血液等渗的剂型的抗氧化剂，缓冲液，制菌剂以及溶质；以及水溶液和非水溶液的无菌悬浮液，该悬浮液包括悬浮剂和增稠剂。这些配方剂型盛装在一个单位剂量或多种单位剂量的容器中，例如，密封的安瓿和小瓶并且可在冷冻干燥的条件下储藏，只需要在使用之前直接添加无菌的液体载体。疫苗配方也包括增强配方免疫原性的佐剂系统，如水包油系统和其它的本领域中熟知的系统。剂量将取决于疫苗的比活性，并且可以通过日常的实验方法迅速地予以测定。

本发明的多肽有一种或多种生物学功能，该生物学功能在一种或多种疾病状态方面，特别是上文论及的本发明的疾病方面具有相关性。因此，鉴定刺激或者抑制多肽的功能或者水平的化合物是有用的。因此，另一方面，本发明提供筛选化合物的、以确定刺激或者抑制多肽的功能或者

水平的方法。这些方法鉴定可用作治疗和预防上文论及的本发明的这些疾病的兴奋剂和拮抗剂。从各种各样来源可以鉴定化合物，例如，细胞，无细胞的制备物，化合物文库，收集的化合物，和天然产物混合物。通过这样鉴定的兴奋剂或拮抗剂可以是天然的或修饰的底物，配体，受体，酶，等等，如，可以是多肽，其结构的或功能的模拟物（参见 Coligan 等，免疫学现代流程 1 (2): 第 5 章(1991)）或者一个小的分子。

筛选方法可以借助于直接或者间接地与候选化合物相结合的标记，简单地测量候选化合物与多肽，或细胞或携带多肽的膜，或其融合蛋白的结合能力。或者，筛选方法可以包括测量或检测（定性地和定量地）候选化合物与标记的竞争物（例如，兴奋剂或拮抗剂）对多肽的竞争结合。此外，利用对携带多肽的细胞合适的检测系统，这些筛选方法可以检验候选化合物是否导致由于多肽的激活或者抑制而产生的信号。一般地，在已知的兴奋剂存在的情况下分析激活作用的抑制剂，并且通过在候选化合物存在时观察兴奋剂对激活作用的影响。此外，筛选方法可以简单地包括以下步骤：把候选化合物与包含本发明多肽的溶液相混合，形成混合物，和在混合物中测量 ANIC-BP 活性，并且把混合物的 ANIC-BP 活性与不包含任何候选化合物的对照混合物相比较。

本发明的多肽可以被用于常规的低容量筛选方法中，也可以高通量的筛选 (HTS) 形式使用。这些高通量的筛选 (HTS) 形式不仅包括已公认的 96 孔微板的使用，最近，还包括 384 个孔的微量滴定板的使用，而且还包括一些新出现的方法，如 Schullek 等描述的纳孔（毫微孔）方法 (Anal Biochem, 246 , 20-29, (1997))。

融合蛋白质，如由 Fc 部分和在上文描述的 ANIC-BP 多肽制备的那些融合蛋白质也可以用于高通量的筛选分析，以鉴定本发明的多肽的拮抗剂（参见 D. Bennett 等，分子识别杂志，8: 52-58 (1995)；和 K. Johanson 等，生物化学杂志，270 (16): 9459-9471 (1995)）。

筛选方法

多聚核苷酸，多肽和本发明多肽的抗体也可以用于具体的筛选方法，来检测附加的化合物对细胞中 mRNA 和多肽的产生的效应。例如，用在本

领域中熟知的标准方法，利用单克隆和多克隆抗体，可以构建 ELISA 分析，以便测量分泌的或者细胞相关水平的多肽。这可以用来发现一些介质，该介质可能抑制或者提高（也分别称为拮抗剂或兴奋剂）从合适地操纵的细胞或者组织产生的多肽。

通过在本领域中熟知的标准的受体结合技术，如果有的话，可以用本发明的多肽来鉴定膜结合的或者可溶解的受体。这些技术包括，但不限于，配体结合和交联分析，其中多肽被标记上放射性同位素（例如 ^{125}I ），被化学修饰（例如，生物素化的），或融合到适宜于检测或提纯的多肽序列上，和与一定来源的可能受体（细胞，细胞膜，细胞上清液，组织提取液，体液）培养。其它方法包括生物物理技术如胞质基因共振和光谱学。如果有任何的话，这些筛选方法也可以用来鉴定多肽的兴奋剂和拮抗剂，这些兴奋剂和拮抗剂与多肽结合到其受体上竞争。进行这样的分析的标准方法在本领域中是熟知的技术。

本发明多肽的拮抗剂的例子包括抗体，或者，在某些情况下，包括寡聚核苷酸或蛋白质，该蛋白质与配体、底物、受体、酶等紧密相关，如同有的情况，是关于多肽的，例如，配体、底物、受体、酶等的一个片段；或者是结合到本发明多肽上，但不引发反应的一个小分子，因此可抑制该多肽的活性。

筛选方法也可以包括利用转基因技术和 ANIC-BP 基因。构建转基因动物的技术已充分建立。例如，ANIC-BP 基因通过微型注射可以导入受精卵母细胞的雄性原核中，通过逆转病毒转移至移植前的胚或移植的后胚中，或者通过遗传上修饰的注射，如电穿孔，把胚胎干细胞注射到宿主的胚泡中。特别有用的转基因动物是所谓的“knock-in”动物，在该动物中，一个动物基因在该动物基因组内被人类等同的基因所取代。knock-in 转基因动物在药物发现过程中对作用靶标的证实是有用的，化合物对人体的靶标作用是特异性的。其它有用的转基因动物是所谓的“基因失效（knock-out）”动物，在该动物中，本发明多肽的动物直向同源基因的表达和细胞中内源 DNA 序列编码基因表达被部分地或者完全废止失效。基因失效可瞄准特定的细胞或组织，由于该技术的局限性的，基

因失效可能只在一定的细胞或者组织之中发生，或者在所有的或基本上所有的动物细胞中发生。转基因动物技术也提供一个完整的动物表达克隆系统，其中导入的基因被表达，产生大量的本发明的多肽。

用于上述方法的筛选试剂盒构成本发明的另一方面，这样的筛选试剂盒包括：

- (a) 一种本发明的多肽；
- (b) 一种表达本发明的多肽的重组细胞；
- (c) 一种表达本发明的多肽的细胞膜；或
- (d) 一种本发明的多肽的抗体；

其中，多肽优选地是 SEQ ID NO:2 的多肽。

可充分理解的是，在任何这样的试剂盒中，(a)，(b)，(c)，或 (d) 可包含一种实质上的组成部分。

术语解释

提供下列定义以便理解在上文中经常使用的某种术语。

本文所使用的“抗体”包括多克隆抗体和单克隆抗体，嵌合的，单链，和人源化的抗体，以及 Fab 片段，包括 Fab 或者另一种免疫球蛋白表达文库的产物。

“分离的”是指从自然状态中，“通过人的手”改变的，即，如果它存在于自然界，从它的原来的环境中已经被改变或者被撤走，或者兼有这两种情况。例如，在一个活着的生物体中天然存在的多聚核苷酸或者多肽不是“分离的”，但是从其天然状态共存的材料中分离出来的相同的多聚核苷酸或者多肽是“分离”的，正如此处使用的术语一样。而且，通过转化，遗传操作或通过任何其它的重组方法导入到生物体的多聚核苷酸或者多肽是“分离”的，即使它还存在于所说的生物体中，该有机体可以是存活着的或者非存活着的。

“多聚核苷酸”一般地是指任何多聚核糖核苷酸 (RNA) 或多聚脱氧核糖核苷酸 (DNA)，它们可以是没有修饰的或者是修饰的 RNA 或 DNA。“多聚核苷酸”包括，但没有限制，单链的和双链的 DNA，单链和双链区域的混合物的 DNA，单链的和双链的 RNA，单链和双链区域的混合物的 RNA，

以及包含 DNA 和 RNA 的杂合分子，该 DNA 和 RNA 可以是单链的，更典型地是双链的、或者是单链和双链区域的混合物。此外，“多聚核苷酸”是指包含 RNA 或 DNA 或 RNA 和 DNA 两者的三链区域。术语“多聚核苷酸”也包括含有一种或多种的修饰碱基的 DNA 或 RNA，和为稳定性或其它原因带有修饰的主链（骨架）的 DNA 或 RNA。“修饰的”碱基包括，例如，三苯甲基化的碱基和稀有碱基，如次黄嘌呤核苷。对 DNA 和 RNA 可进行多种多样的修饰，因此，“多聚核苷酸”包括化学上地，酶促地，代谢上的修饰形式的、如同自然界发现的多聚核苷酸，以及具有病毒和细胞特征的 DNA 和 RNA 的化学形式。“多聚核苷酸”也包括相对较短的多聚核苷酸，经常称作寡聚核苷酸。

“多肽”是指包含两种或者多种通过肽键或修饰的肽键、即同位的肽键彼此相连的氨基酸的任何多肽。“多肽”还涉及短链，一般地称作肽，寡肽或寡聚体，和长链，一般地称作蛋白质。多肽可以含有除 20 种基因-编码的氨基酸以外的氨基酸。“多肽”包括通过自然过程修饰的，如翻译后加工或者本领域熟知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列。这些修饰作用在基本的教科书和更详细的专著，以及大量的研究文献中有充分的描述。修饰作用可以在多肽中的任何地方发生，包括肽的主链，氨基酸侧链和氨基或羧基末端。将充分理解的是，同一类型的修饰可以相同或不同程度存在于的给定的多肽的几个位置。还有，一种给定的多肽可以包含多种类型的修饰。多肽因遍在蛋白化作用可以分支，并且它们可以是环状的，有或者没有分支。环状的，分支的或者分支环状的多肽可能因翻译后的自然加工或者通过合成的方法产生。修饰作用包括乙酰化作用，酰化作用，ADP-核糖基化作用，酰胺化作用，生物素化作用，黄素的共价连接，血红素部分的共价连接，一个核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接，脂类或脂类衍生物的共价连接，磷脂酰肌醇的共价连接，交联作用，环化作用，二硫键形成，脱甲基作用，共价交联的形成，胱氨酸的形成，焦谷氨酸的形成，甲酰基化作用， γ -羧化作用，糖基化作用，GP1 锚状物形成，羟基化作用，碘化作用，甲基化作用，豆蔻酰化作用，氧化作用，蛋白质的水解加工，磷酸化作用，异戊烯化作用，消旋作用，

硒代化作用，硫酸脂化作用，转移 RNA 介导的氨基酸向蛋白质的添加，如精氨酰化作用和遍在蛋白化作用（参见，例如，蛋白质-结构和分子特性，第二版，T.E. Creighton，W.H. Freeman and Company，纽约，1993；Wold, F., 翻译后蛋白质的修饰：观点和展望，1-12，蛋白质的翻译后共价修饰，B. C. Johnson，编辑，学术出版社，纽约，1983；Seifter 等，“蛋白质的修饰和非蛋白质共因子的分析”，酶学方法学，182，626-646，1990，以及 Rattan 等，“蛋白质合成：翻译后修饰和衰老”，纽约学术科学年报 (Ann NY Acad Sci)，663，48-62，1992)。

多肽序列的“片段”是指比参考序列更短，但保持与参考序列基本上相同的生物功能或者活性的多肽序列。多聚核苷酸的“片段”是指比 SEQ ID NO:1 的参考序列短的多聚核苷酸序列。

“变异体”是指不同于参考多聚核苷酸或者多肽，但保持其基本特性的多聚核苷酸或者多肽。多聚核苷酸的典型的变异体在核苷酸序列方面不同于参考多聚核苷酸。变异体的核苷酸序列的变化可能或者不能改变参考多聚核苷酸编码的多肽的氨基酸序列。正如下面所讨论的，核苷酸的改变可以导致参考序列编码的多肽中氨基酸的替换，添加，缺失，融合和截短。多肽的典型变异体在氨基酸序列方面不同于参考多肽。一般地，这些改变是有限的，因此，参考多肽和变异体的序列总体上是密切类似的，在很多区域是相同。变异体和参考多肽在氨基酸序列方面通过任何组合形式中的一种或多种的替换，插入，缺失而表现不同。替换的或插入的氨基酸残基可以是或者不是遗传密码编码的。典型的保守替换包括甘氨酸，丙氨酸；缬氨酸，异亮氨酸，亮氨酸；天冬氨酸，谷氨酸；天冬酰胺，谷氨酰胺；丝氨酸，苏氨酸；赖氨酸，精氨酸；和苯丙氨酸，酪氨酸。多聚核苷酸或者多肽的变异体可以是如等位基因天然存在的，或者也可以是尚不知道的天然存在的变异体。非天然存在的多聚核苷酸和多肽的变异体可通过突变技术或通过直接合成产生。作为变异体还包括具有一种或多种的翻译后的修饰，例如，糖基化作用，磷酸化作用，甲基化作用，ADP 核糖基化作用，等等。实施方案包括 N-端氨基酸的甲基化作用，丝氨酸和苏氨酸的磷酸化作用，以及 C-端的甘氨酸的修饰。

“等位基因”是指存在于基因组中一个给定基因座的基因的两种或更多种替换形式中的一个。

“多态性”是指一个种群中，在基因组中一个给定位置上的核苷酸序列（和编码的多肽序列，如果有关的话）的变异。

“单核苷酸多态性”(SNP)指在一个种群中，基因组中单核苷酸位置上的核苷酸变异性的发生。在一个基因之内或在基因组的基因间区域内可以存在一个单核苷酸多态性(SNP)。利用等位基因特异的扩增(ASA)能够分析 SNP。该过程至少需要 3 种引物。普通的引物被用于对被分析的多态性的逆互补。该普通引物可以是来自多态性碱基的介于 50 到 1500 个碱基对之间。其它两种(或多种)引物彼此相同，除最后的 3' 碱基摆动以便与两个(或多个)构成多态性的等位基因中的一个匹配之外。然后对样品 DNA，进行两种(或多种)PCR 反应，每种反应用普通引物和其中等位基因特异引物。

本文所使用的“剪接变异体”指最初从相同的基因组 DNA 序列转录的 RNA 分子中产生的 cDNA 分子，但它经历了可供选择的 RNA 剪接方式。当最初的 RNA 转录物一般为了去掉内含子而经历剪接，产生不止一种 mRNA 分子，每种 mRNA 分子编码不同的氨基酸序列时，即出现了另一种 RNA 剪接。术语剪接变异体也指上面 cDNA 分子编码的蛋白质。

“同一性”反映两个或多个多肽序列，或者两个或多个多聚核苷酸序列之间的相互关系，这种相互关系是通过比较序列而确定的。一般来说，同一性分别指两种多聚核苷酸序列或两种多肽序列在其被比较的序列长度上的准确的核苷酸对核苷酸或氨基酸对氨基酸的对应性。

“%同一性”-对没有准确对应性的序列，可以测定“%同一性”。一般来说，要比较的两种序列进行排列对比，产生最大的序列之间的相关性。这可以包括在一个或两个序列中插入的“缺口”，以增加排列对比的程度。在每种被比较的整个长度序列上可以测定“%同一性”(所谓的完全排成一行)，这特别合适于相同的或者长度十分相似的序列，或者在较短的，限定的长度序列上测定“%同一性”(所谓的局部排成一行)，这更合适于长度不相等的序列。

“相似性”是进一步的，更复杂地测定两个多肽序列之间的相互关系。一般来说，“相似性”是指比较两个多肽链的氨基酸，在残基对残基的基础上，不仅考虑每种比较（对同一性）序列的一对残基之间的准确对应性，也考虑在没有准确对应性的地方，是否在进化的基础上，一种残基可能替换其它的残基。这种可能性有相关联的“得分”，然后从其中可以确定两种序列的“%相似性”。

比较两种或多种序列同一性和相似性的方法是本领域所熟知的。例如，在一整套威斯康星序列分析软件中可供使用的程序，9.1 版本 (Devereux Jeta 等，核酸研究，12，387-395，1984，由遗传学计算机小组(集团)提供，Madison，威斯康星，美国)，和例如 BESTFIT 和 GAP 程序，可用来测定两种多聚核苷酸之间的%同一性和两种多肽序列之间的%同一性和%相似性。BESTFIT 使用 Smith 和 Waterman 的“局部同源性”算法(分子生物学杂志，147，195-197，1981，应用数学进展，2，482-489，1981) 并且寻找两种序列之间的相似性的最佳单一区域。BESTFIT 更适宜于比较长度不相似的两种多聚核苷酸或者两种多肽序列，该程序假定较短的序列代表较长序列的一部分。GAP 是把两种序列排成行对比，根据 Needleman 和 Wunsch 的算法(分子生物学杂志，48，443-453，1970)，寻找“最大限度的相似性”。GAP 更适合于比较长度大致相同的序列，并预期在遍及整个长度的序列上进行排列对比。优选地，用于每个程序中的参数“缺口权重”和“长度权重”对于多聚核苷酸序列和对于多肽序列分别是 50 和 3，以及 12 和 4。优选地，当所比较的两种序列最适地的排成队列时，对%同一性和相似性进行测定。

其它的测定序列之间的同一性和/或相似性的程序在本领域中也是熟知的，例如 BLAST 程序家族(Altschul S F 等，分子生物学杂志，215，403-410，1990，Altschul S F 等，核酸研究，25: 389-3402，1997，由国家生物工程信息中心(NCBI)提供，Bethesda，马里兰，美国和通过 NCBI 的主页 www.ncbi.nlm.nih.gov 也可进入)和 FASTA(Pearson W R，酶学中的方法，183，63-99，1990；Pearson W R 和 Lipman D J，美国国家科学院院刊，85，2444-2448，1988，可以提供作为威斯康星序列分析软

件包的一部分)。

优选地, BLOSUM62 氨基酸替换矩阵 (Henikoff S 和 Henikoff J G, 美国国家科学院院刊, 89, 10915-10919, 1992) 被用于多肽序列比较, 包括在比较之前, 核苷酸序列首先地被翻译为氨基酸序列的地方。

优选地, 程序 BESTFIT 被用来测定疑问多聚核苷酸或者多肽序列与参考多聚核苷酸或多肽序列的%同一性, 疑问和参考序列进行了最佳排列比较, 且如上文中描述的, 该程序的参数设定了违约值 (default value)。

“同一性指数”是序列相关性的度量, 它可以用来比较候选序列 (多聚核苷酸或者多肽) 和参考序列。例如, 与参考多聚核苷酸序列相比, 具有 0.95 同一性指数的候选多聚核苷酸序列, 除了候选多聚核苷酸序列可以包括每 100 个参考序列的多聚核苷酸中平均多达 5 个核苷酸差异之外, 与参考序列相比是相同的。这些差异选自下组: 至少一种核苷酸的缺失, 替换, 包括转换和颠换, 或插入。这些差异可发生在参考多聚核苷酸序列的 5' 或 3' 端位置, 或者是介于这些末端位置的任何地方, 单独散布在参考序列的核苷酸之中, 或者在参考序列之内的一种或多种邻接的集团中。换句话说, 正如上文所描述的, 与参考多聚核苷酸序列相比, 要获得有 0.95 的同一性指数的多聚核苷酸序列, 在参考序列的每 100 个核苷酸中平均多达 5 个核苷酸可以被缺失, 替换, 或者插入, 或者它们的任何组合。在细节上已作必要的修正, 同样的情形也实用于同一性指数的其它值, 例如 0.96, 0.97, 0.98, 0.99。

同样地, 对于多肽, 例如, 与参考多肽序列相比, 具有 0.95 的同一性指数的候选多肽序列, 除了可以包括每 100 个参考序列的氨基酸中平均多达 5 个氨基酸差异之外, 与参考序列相比是相同的。这些差异选自下组: 至少一种氨基酸缺失, 替换, 包括保守的非保守的替换, 或者插入。这些差异可发生在参考多肽序列的氨基端或羧基端的位置, 或者是介于这些末端位置的任何地方, 单独散布在参考序列的氨基酸之中, 或者在参考序列之内的一种或多种邻接的集团中。换句话说, 正如上文所描述的, 与参考多肽序列相比, 要获得 0.95 的同一性指数的多肽序列, 在参考序列的每 100 个氨基酸中平均多达 5 个氨基酸可以被缺失, 替换,

或者插入，或者它们的任何组合。在细节上已作必要的修正，同样的情形也实用于同一性指数的其它值，例如 0.96, 0.97, 0.98, 0.99。

核苷酸或氨基酸差异的数量和同一性指数之间的相互关系可以以下列方程表示：

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot I)$$

其中：

n_a 是核苷酸或氨基酸差异的数量，

x_a 分别是 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 的核苷酸或者氨基酸的总数量。

I 是同一性指数，

• 是乘法的符号，和

其中， x_a 和 I 的任何非整数的积在从 x_a 减去之前四舍五入为最近的整数。

“同系物”是用于本领域来表明具有与参考序列高度的序列相关性的多聚核苷酸或者多肽序列的一个普通术语。这样的相关性可以通过测定如上文解释的两种序列之间的同一性和/或相似性的程度作定量分析。属于这一普通术语的还有术语“直向同源物”，以及“共生同源物”。“直向同源物”指与另一物种中的多聚核苷酸或者多肽的功能对等的多聚核苷酸或者多肽。“共生同源物”指同一物种之内功能相似的多聚核苷酸或者多肽。

“融合蛋白质”指由两个不相关的，融合的基因或其片段编码的蛋白质。在专利 US 5541087, US 5726044, EP 574395, EP 493418, 以及 EP 0232 262 中公开了一些实施例。对 Fc-ANIC-BP 来说，使用免疫球蛋白 Fc 区域作为融合蛋白的一部分对完成 Fc-ANIC-BP 的功能表达是有利的，当用于治疗时以提高这样一种融合蛋白质的药物动力学性质，以及产生二聚体的 Fc-ANIC-BP。Fc-ANIC-BP DNA 构建体在 5' 到 3' 方向，包含分泌盒，即从哺乳动物细胞激发起输出的信号序列，编码作为融合伙伴的免疫球蛋白的 Fc 区域片段的 DNA，和编码 Fc-ANIC-BP 的 DNA。在某些用途方面，非常理想的是通过突变功能性 Fc 的侧面，而不触动该融合蛋白的其它部分，或者在表达之后完全缺失掉 Fc 部分，能够改变内在

的功能性质（补体结合，Fc-受体结合）。

本说明书引用的所有的出版物与参考文献，包括但不限于专利和专利申请，被本文全面一并参考，即使每种个别的出版物或参考文献正如已充分陈述的、本文具体地或单独地予以参考。被本申请要求了优先权的专利申请以上述描述的出版物和参考文献的方式在此一并参考。

附图说明：

图 1

在小脑半球损伤侧面的对侧中、显示差异调节条带的代表性 mRNA 的差别显示凝胶。箭头指差异表达的条带。

图 2

大鼠 Mo25 小脑的 270 个碱基对基因片段在 TBI（创伤的脑部损伤）之后分别在 5, 10, 15, 20, 25 和 30 个循环的 RT-PCR。注意第 2 泳道在 20, 25, 和 30 个循环的强烈表达。

L2: TBI 大鼠非损伤侧面的 cDNA; R2: TBI 大鼠损伤侧面的 cDNA。

图 3

经 TBI 之后，用放射性 ^{32}P 标记大鼠 Mo25 小脑 mRNA 的 270 个碱基对基因片段的斑点印迹分析。

检查了六只单独的大鼠，3 个创伤的脑部损伤处理的和 3 个模拟手术动物。

图 4

用放射性 ^{32}P 标记的大鼠 Mo25 的 270 个碱基对基因片段在 8 个大鼠组织上杂交的多个组织的 Northern 印迹（Clontech 实验室公司，Palo Alto, 美国加州）。

图 5

大鼠脑横切片的原位杂交。利用对 SICCBP 和 Mo25 特异的正义和反义探针。用反义探针监测到的照亮有髓神经束（胼胝体，视束，嗅束中间体，小脑前连合）的强烈信号。

图 6

大鼠脑部损伤 7 天之后，ANIC-BP 的实时 TaqMan PCR 表达。比较模

拟手术的大鼠大脑和实验之后死亡 7 天的脑组织中的非损伤的皮层侧面，损伤的皮层侧面和小脑。误差条是标准的平均误差 (S. E. M.)。

更多的实施例

实施例 1

创伤的脑部损伤模型

用侧面流体方法在大鼠中研究对创伤的脑部损伤 (TBI) 反应过程中的上或下调节基因的鉴定。在雄性 Sprague-Dawley 大鼠中用侧面流体撞击方法诱导集中于右侧膜皮层的温和创伤的脑部损伤。创伤的脑部损伤 5 天之后，大鼠死亡，并用差别显示分析解剖的脑组织。用 RT-PCR 证实创伤脑部的小脑中的蛋白质的上调节。

对照大鼠进行麻醉，并且缩回颞肌，但不实行开颅手术。存活 5 天后，麻醉并杀死所有的大鼠，解剖大鼠的大脑，并于液氮中冷冻。

第 2 组 TBI 处理的老鼠用于组织化学和免疫组织化学染色。在 TBI (创伤的脑部损伤) 后一周，麻醉这些老鼠，并灌注盐水，再灌注 3% 的多聚甲醛。脑组织在一个冷冻切片机上切成 30 微米的冠状切片。

实施例 2

免疫组织化学

小脑切片用钙结合蛋白质的单克隆抗体标记。免疫复合物用亲和素-生物素/DAB 方法观测。作为正对照，钙结合蛋白质-D (28KD) 被用作小脑浦肯野氏细胞的可靠的标记。

实施例 3

原位杂交

根据本领域技术人员熟知的标准方法设计选自序列 No. 1 (正义, 反义) 的寡聚脱氧核苷酸。根据本领域中熟知的方法, 这些探针用于老鼠脑组织切片的原位杂交。在柯达 BioMax 胶片上曝光 5 天后观察放射自显影。

实施例 4

从创伤的脑部损伤的大鼠中提取 RNA

mRNA 差式显示被研发作为鉴定和分析任何真核细胞中 mRNA 水平上改

变的基因表达的方法 (Liang 和 Pardee, 科学 257, 967, 1992)。在本发明中, 我们利用这一方法来研究对创伤的脑部损伤反应中的上调和下调基因, 以便对 CNS 伤害的分子影响获得更好的了解 (den Daas 等, 美国神经科学学会会议, 华盛顿 D.C., 美国, 1998)。创伤的脑部损伤的动物模型称为侧面流体撞击模型, 并且实施如下: 在雄性 Sprague-Dawley 大鼠中用侧面流体撞击方法诱导集中于大脑右侧膜皮层的温和创伤的脑部损伤。对照大鼠被麻醉, 并且缩回颞肌, 但不实行开颅手术。经存活 5 天后, 麻醉并杀死所有的大鼠, 解剖大鼠的大脑, 并于液氮中冷冻。研磨匀浆整个脑部组织, 提取总 RNA (Sambrook 等, 1989)。

差式显示

通过 RNA 差式显示分析获得的 RNA。用具有两种另外核苷酸的、以所有可能组合方式的寡聚-dT 引物 (下游引物; 13 节) 对 mRNAs 进行逆转录, 从而把反应固定在聚腺苷酸尾的前端。用相同的 3' 端引物和第二个具有十个碱基的随机的 5' 引物进行 cDNA 的扩增。扩增产物在非变性的 10% 的聚丙烯酰胺凝胶 (Amersham Pharmacia Biotech, 德国) 上分析。DNA 通过银染色观察。染色之后, 凝胶在室温下干燥一小时 (图 1)。从凝胶上切下差式表达的条带。把 DNA 洗脱下来, 再扩增并亚克隆到 pCR2.1 载体上 (Invitrogen, 美国)。亚克隆片段通过 Sanger 法 (Sanger F., 等, PNAS, 美国 74, 5463-5467) 进行序列分析, 并且把其序列与基因组数据库相比较。用逆转录 PCR (RT-PCR) 验证获得的基因片段。为了证实差式表达的大鼠 Mo25, 用特异的 19 节和 21 节引物, 利用大力神试管 (Titan one tube) RT-PCR 系统 (Boehringer 曼海姆, 德国) 通过 RT-PCR 分析序列。一微克的从对照和 TBI 处理的动物中提取的总 RNA 用于 RT-PCR。用大鼠 Mo25 的探针进行点杂交技术和人的 Mo25 探针进行 Northern 印迹分析可以验证更多的基因。

逆转录 PCR (RT-PCR)

为了证实差式表达的中风诱导的钙结合蛋白质, 用特异的 19 节和 21 节引物, 利用大力神试管 RT-PCR 系统 (Boehringer 曼海姆, 德国) 通过 RT-PCR 分析序列。一微克的从对照和 TBI 处理的动物中提取的总 RNA 用

于 RT-PCR.

实时 PCR

用实时 TaqMan PCR 技术在 ABI 棱晶 7700 序列检测系统 (PE, 应用生物系统, 德国) 中检查头部创伤之后 ANIC-BP 在大鼠大脑中的分布。利用这一技术, 可以高灵敏度地测定 mRNA 的绝对浓度。设计了具有 25 和 29 个碱基对长度的引物以及一种 32 节的 TaqMan 探针(报告染料: FAM/猝灭剂染料: TAMRA)。

Ca²⁺结合

由 SDS-PAGE 分离的蛋白质被印迹到硝酸纤维素膜上, 并用 Maruyama 等 (J. Biochem. 95: 511-519, 1984) 描述的方法分析放射性标记的 Ca²⁺ 的结合。经温育之后, 洗去多余的同位素, 把膜曝光于柯达 XOMAT. TM 胶片上一段合适的时间。在结合蛋白的位置上显影出一个条带。通过使用对结合蛋白特异的抗体和通过 Western 印迹的方法施用抗体证实结合蛋白的存在, 该方法是本领域熟知的技术。

序列表

<110> Merck Patent GmbH

<120> 急性神经元钙结合蛋白

<130> ANICBPJDDWS

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1026

<212> DNA

<213> 人类

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1026)

<400> 1

```

atg ccg ttc ccg ttt ggg aag tct cac aaa tct cca gca gac att gtg      48
Met Pro Phe Pro Phe Gly Lys Ser His Lys Ser Pro Ala Asp Ile Val
      1              5              10              15

aag aat ctg aag gag agc atg gct gtt ctg gaa aag caa gac att tct      96
Lys Asn Leu Lys Glu Ser Met Ala Val Leu Glu Lys Gln Asp Ile Ser
              20              25              30

gat aaa aaa gca gaa aag gct aca gaa gaa gtt tcc aaa aat ctg gtt      144
Asp Lys Lys Ala Glu Lys Ala Thr Glu Glu Val Ser Lys Asn Leu Val
              35              40              45

gcc atg aaa gaa att ctg tat ggc aca aat gaa aaa gag cct cag aca      192
Ala Met Lys Glu Ile Leu Tyr Gly Thr Asn Glu Lys Glu Pro Gln Thr
      50              55              60

gaa gca gta gct caa ctt gct caa gaa ctc tat aat agt ggg ctc ctt      240
Glu Ala Val Ala Gln Leu Ala Gln Glu Leu Tyr Asn Ser Gly Leu Leu
      65              70              75              80

agc acc ctg gta gct gat tta cag ctc att gac ttt gag ggc aaa aaa      288
Ser Thr Leu Val Ala Asp Leu Gln Leu Ile Asp Phe Glu Gly Lys Lys
              85              90              95

gac gtg gct caa att ttc aac aat att ctc aga aga caa att ggt acg      336
Asp Val Ala Gln Ile Phe Asn Asn Ile Leu Arg Arg Gln Ile Gly Thr
              100              105              110

aga act cct act gtt gaa tac atc tgc acc caa cag aat att ttg ttc      384
Arg Thr Pro Thr Val Glu Tyr Ile Cys Thr Gln Gln Asn Ile Leu Phe
              115              120              125

atg tta ttg aaa ggg tat gaa tct cca gaa ata gct cta aat tgt gga      432
Met Leu Leu Lys Gly Tyr Glu Ser Pro Glu Ile Ala Leu Asn Cys Gly
      130              135              140

```

ata atg tta aga gaa tgc atc aga cat gaa cca ctt gca aaa atc att	480
Ile Met Leu Arg Glu Cys Ile Arg His Glu Pro Leu Ala Lys Ile Ile	
145 150 155 160	
ttg tgg tcg gaa cag ttt tat gat ttc ttc aga tat gtc gaa atg tca	528
Leu Trp Ser Glu Gln Phe Tyr Asp Phe Phe Arg Tyr Val Glu Met Ser	
165 170 175	
aca ttt gac ata gct tca gat gca ttt gcc aca ttc aag gat tta ctt	576
Thr Phe Asp Ile Ala Ser Asp Ala Phe Ala Thr Phe Lys Asp Leu Leu	
180 185 190	
aca aga cat aaa ttg ctc agt gca gaa ttt ttg gaa cag cat tat gat	624
Thr Arg His Lys Leu Leu Ser Ala Glu Phe Leu Glu Gln His Tyr Asp	
195 200 205	
aga ttt ttc agt gaa tat gag aag tta ctt cat tca gaa aat tat gtg	672
Arg Phe Phe Ser Glu Tyr Glu Lys Leu Leu His Ser Glu Asn Tyr Val	
210 215 220	
aca aaa aga cag tca ctg aag ctt ctc ggt gaa cta cta cta gat aga	720
Thr Lys Arg Gln Ser Leu Lys Leu Leu Gly Glu Leu Leu Leu Asp Arg	
225 230 235 240	
cac aac ttc aca att atg aca aaa tac atc agt aaa cct gag aac ctc	768
His Asn Phe Thr Ile Met Thr Lys Tyr Ile Ser Lys Pro Glu Asn Leu	
245 250 255	
aaa tta atg atg aac ctg ctg cga gac aaa agt cgc aac atc cag ttt	816
Lys Leu Met Met Asn Leu Leu Arg Asp Lys Ser Arg Asn Ile Gln Phe	
260 265 270	
gag gcc ttt cac gtt ttt aag gtg ttt gta gcc aat cct aac aag acg	864
Glu Ala Phe His Val Phe Lys Val Phe Val Ala Asn Pro Asn Lys Thr	
275 280 285	
cag ccc atc cta gac atc ctc ctc aag aac cag gcc aaa ctc ata gag	912
Gln Pro Ile Leu Asp Ile Leu Leu Lys Asn Gln Ala Lys Leu Ile Glu	
290 295 300	
ttc ctc agc aag ttt cag aac gac agg acg gag gat gag cag ttt aac	960
Phe Leu Ser Lys Phe Gln Asn Asp Arg Thr Glu Asp Glu Gln Phe Asn	
305 310 315 320	
gac gag aag acc tat tta gtt aaa cag atc agg gat ttg aag aga cca	1008
Asp Glu Lys Thr Tyr Leu Val Lys Gln Ile Arg Asp Leu Lys Arg Pro	
325 330 335	
gct cag caa gaa gct taa	1026
Ala Gln Gln Glu Ala	
340	

<210> 2
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 2

Met	Pro	Phe	Pro	Phe	Gly	Lys	Ser	His	Lys	Ser	Pro	Ala	Asp	Ile	Val
1				5					10					15	
Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Glu	Lys	Gln	Asp	Ile	Ser
		20					25						30		
Asp	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Ala	Thr	Glu	Glu	Val	Ser	Lys	Asn	Leu	Val
		35					40					45			
Ala	Met	Lys	Glu	Ile	Leu	Tyr	Gly	Thr	Asn	Glu	Lys	Glu	Pro	Gln	Thr
	50					55					60				
Glu	Ala	Val	Ala	Gln	Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Tyr	Asn	Ser	Gly	Leu	Leu
65					70					75					80
Ser	Thr	Leu	Val	Ala	Asp	Leu	Gln	Leu	Ile	Asp	Phe	Glu	Gly	Lys	Lys
				85					90					95	
Asp	Val	Ala	Gln	Ile	Phe	Asn	Asn	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Ile	Gly	Thr
			100					105					110		
Arg	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Ile	Cys	Thr	Gln	Gln	Asn	Ile	Leu	Phe
		115					120					125			
Met	Leu	Leu	Lys	Gly	Tyr	Glu	Ser	Pro	Glu	Ile	Ala	Leu	Asn	Cys	Gly
	130					135					140				
Ile	Met	Leu	Arg	Glu	Cys	Ile	Arg	His	Glu	Pro	Leu	Ala	Lys	Ile	Ile
145					150					155					160
Leu	Trp	Ser	Glu	Gln	Phe	Tyr	Asp	Phe	Phe	Arg	Tyr	Val	Glu	Met	Ser
				165					170					175	
Thr	Phe	Asp	Ile	Ala	Ser	Asp	Ala	Phe	Ala	Thr	Phe	Lys	Asp	Leu	Leu
			180					185					190		
Thr	Arg	His	Lys	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Phe	Leu	Glu	Gln	His	Tyr	Asp
		195					200					205			
Arg	Phe	Phe	Ser	Glu	Tyr	Glu	Lys	Leu	Leu	His	Ser	Glu	Asn	Tyr	Val
	210					215					220				
Thr	Lys	Arg	Gln	Ser	Leu	Lys	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Arg
225					230					235				240	
His	Asn	Phe	Thr	Ile	Met	Thr	Lys	Tyr	Ile	Ser	Lys	Pro	Glu	Asn	Leu
				245					250					255	
Lys	Leu	Met	Met	Asn	Leu	Leu	Arg	Asp	Lys	Ser	Arg	Asn	Ile	Gln	Phe
			260					265					270		
Glu	Ala	Phe	His	Val	Phe	Lys	Val	Phe	Val	Ala	Asn	Pro	Asn	Lys	Thr
		275					280					285			
Gln	Pro	Ile	Leu	Asp	Ile	Leu	Leu	Lys	Asn	Gln	Ala	Lys	Leu	Ile	Glu
	290					295					300				
Phe	Leu	Ser	Lys	Phe	Gln	Asn	Asp	Arg	Thr	Glu	Asp	Glu	Gln	Phe	Asn
305					310					315					320
Asp	Glu	Lys	Thr	Tyr	Leu	Val	Lys	Gln	Ile	Arg	Asp	Leu	Lys	Arg	Pro
				325					330					335	
Ala	Gln	Gln	Glu	Ala											
				340											

说明书附图

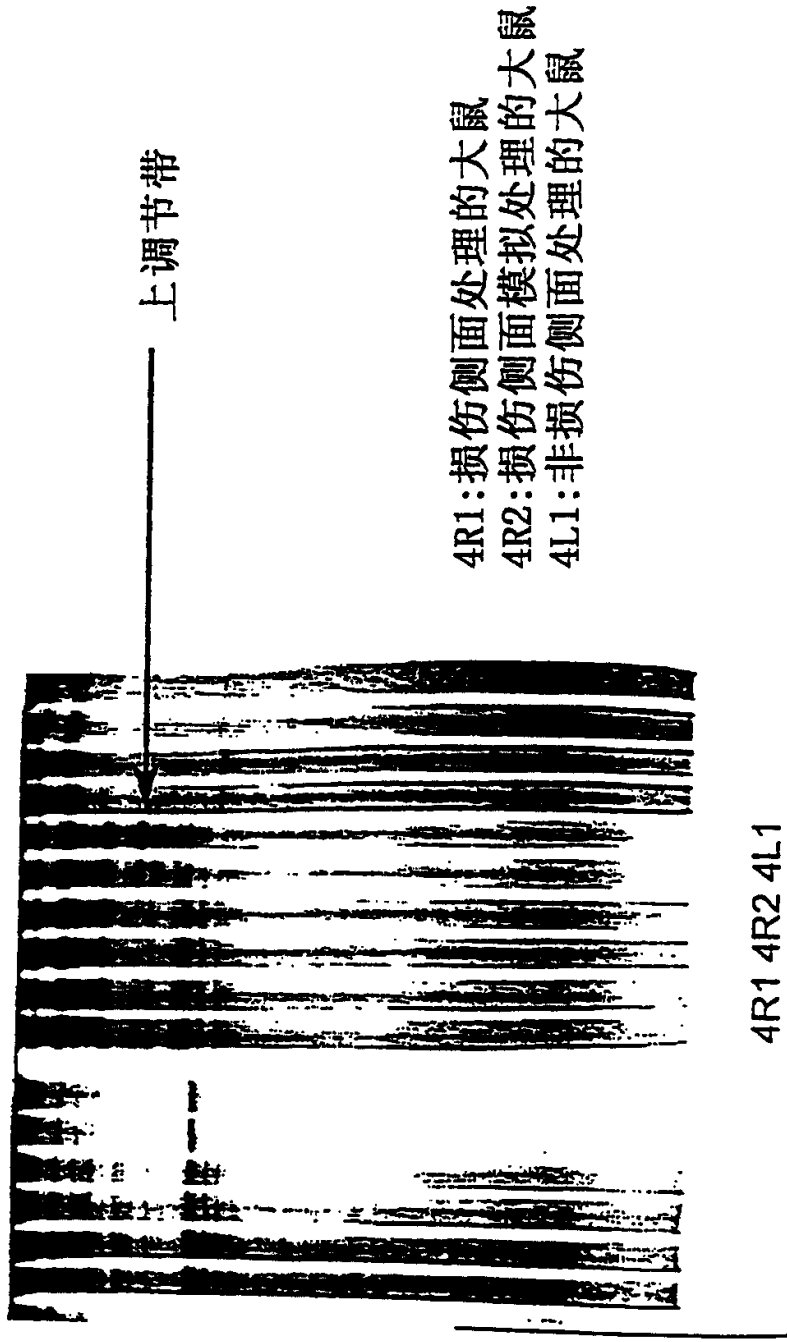


图 1

500个碱基对的标记

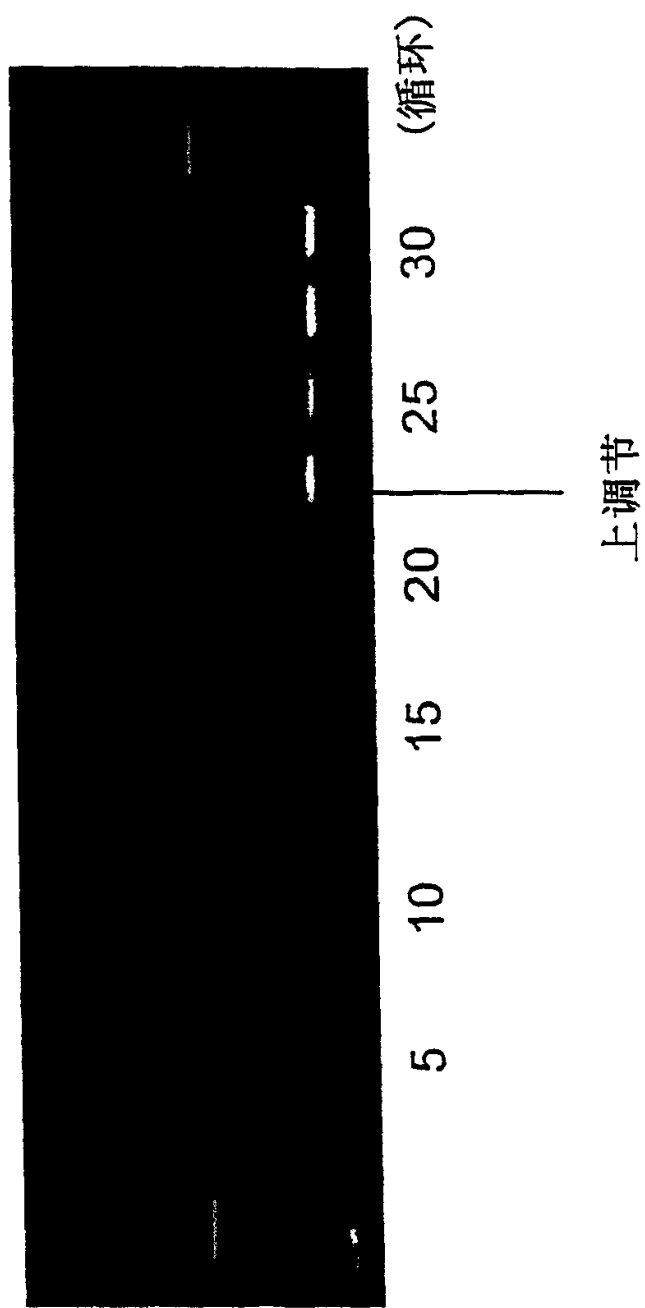


图 2

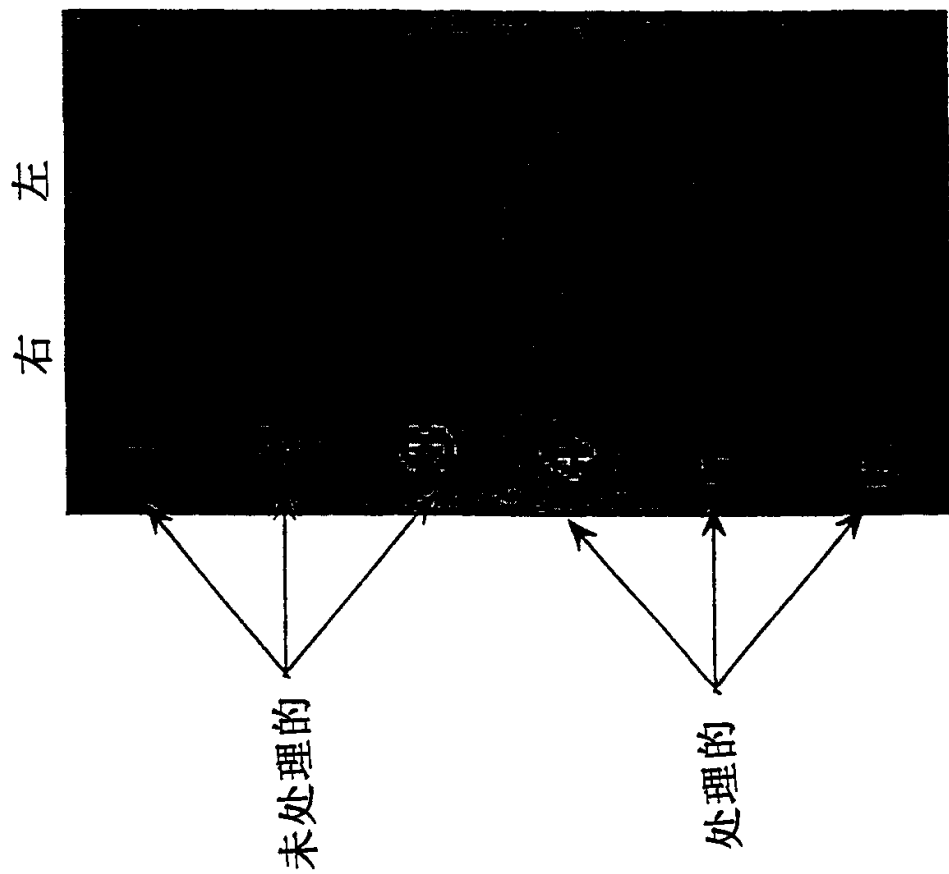


图 3

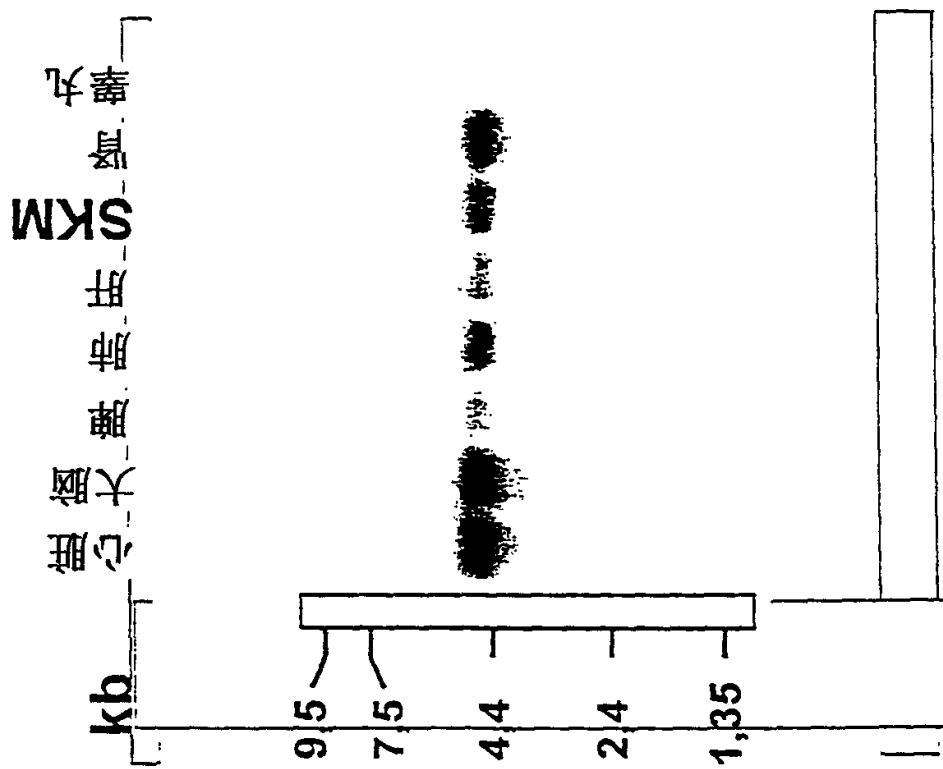
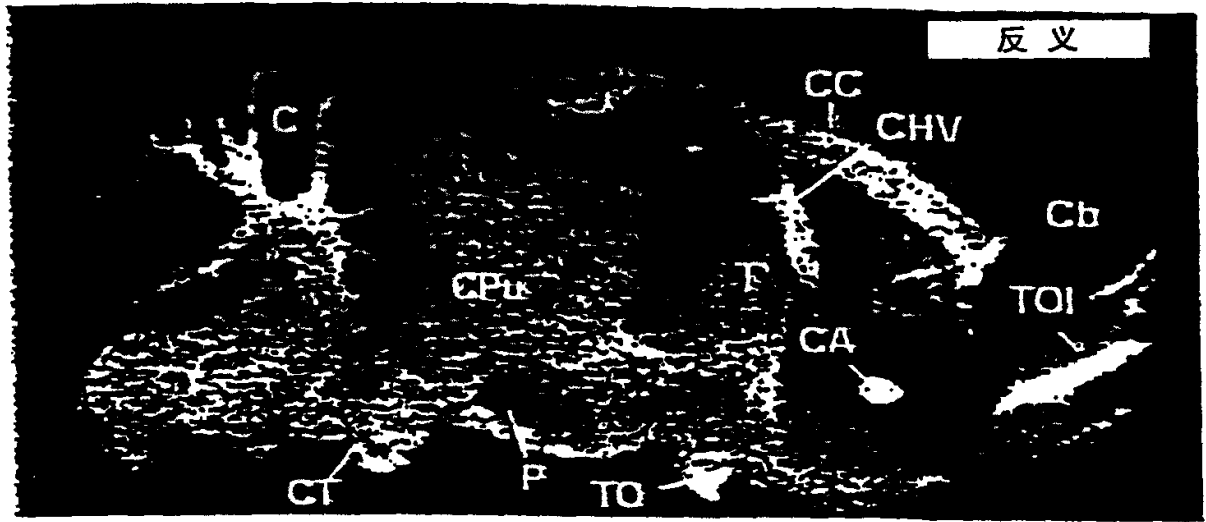


图 4



- | | | | |
|-----|--------|-----|-------|
| C | 小脑 | CT | 斜方体 |
| CA | 前连合 | FL | 背侧纵束 |
| Cb | 大脑 | NT | 三叉神经 |
| CC | 胼胝体 | P | 脑桥 |
| CHV | 海马腹连合 | SM | 髓纹丘脑 |
| Cl | 下丘 | T | 丘脑 |
| CPu | 尾状核/核壳 | TO | 视束 |
| CS | 上丘 | TOI | 嗅束中间体 |

图5

头部创伤之后ANIC-BP的表达

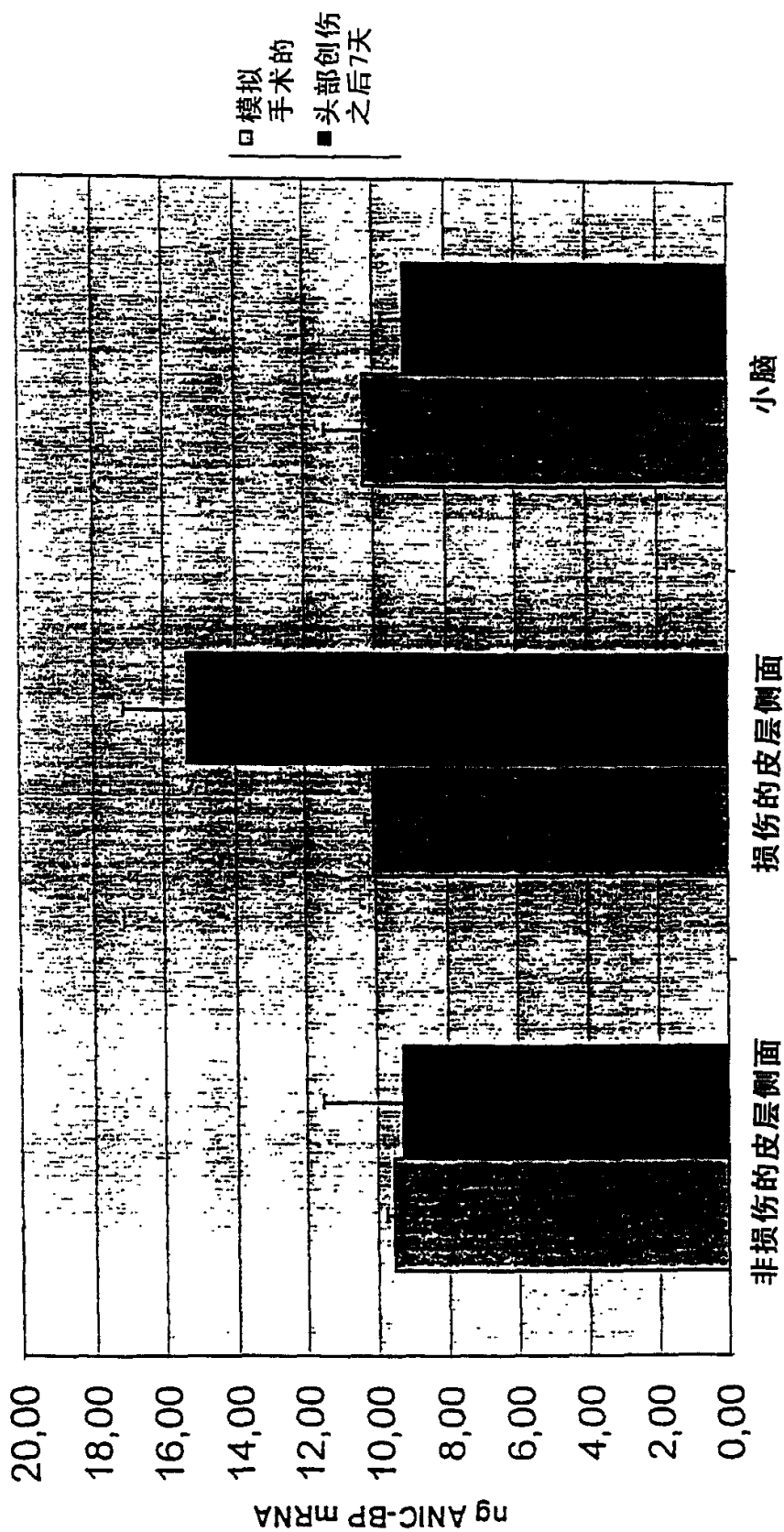


图 6

专利名称(译)	头部创伤诱导的胞质钙结合蛋白		
公开(公告)号	CN1357041A	公开(公告)日	2002-07-03
申请号	CN00809310.5	申请日	2000-06-14
申请(专利权)人(译)	默克专利股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	默克专利股份有限公司		
[标]发明人	I·丹达阿斯 V·费施尔 C·赛费尔德 L·温枚尔·雷尼尔		
发明人	I·丹达阿斯 V·费施尔 C·赛费尔德 L·温枚尔·雷尼尔		
IPC分类号	G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/68 C07K16/14		
CPC分类号	C07K2319/00 C07K14/4728		
代理人(译)	李瑛		
优先权	1999112024 1999-06-22 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本文公开了ANIC - BP多肽和多聚核苷酸以及通过重组技术产生这样的多肽的方法,也公开了在诊断试验中利用ANIC - BP多肽和多聚核苷酸的方法。

