

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/12



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/82 C07K 14/47

C07K 14/435 C12N 5/10

C12Q 1/68 G01N 33/533

G01N 33/68 A01H 5/00

[21] 申请号 01807095.7

[43] 公开日 2003 年 5 月 21 日

[11] 公开号 CN 1419603A

[22] 申请日 2001.2.7 [21] 申请号 01807095.7

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 10 [33] US [31] 09/502,528

[86] 国际申请 PCT/US01/04071 2001.2.7

[87] 国际公布 WO01/59108 英 2001.8.16

[85] 进入国家阶段日期 2002.9.24

[71] 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 布鲁斯·D·哈莫克 黄齐宏

前田进

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 30 页 序列表 3 页

[54] 发明名称 凋亡抑制剂

[57] 摘要

本发明主要涉及凋亡蛋白的抑制剂(IAP), 编码 IAP 的核酸分子, 包含 IAP 的病毒载体、重组杆状病毒, 含有 IAP 核酸的转基因植物, 以及检测与 IAP 结合的化合物的方法。通常, 本发明的 IAP 核酸与 SEQ ID NO: 1 有 85% 或更高的同一性, 本发明的 IAP 与 SEQ ID NO: 3 有 90% 或更高的同一性。

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

1. 一种分离的核酸构建体，其包含与 SEQ ID NO:1 有至少 85% 相同的多核苷酸序列。
- 5 2. 权利要求 1 的分离的核酸构建体，其中所述多核苷酸序列与 SEQ ID NO:1 有至少 95% 相同。
3. 权利要求 2 的分离的核酸构建体，其中所述多核苷酸序列是 SEQ ID NO:1。
4. 一种分离的多肽，所述多肽包含：
 - 10 a. 与 SEQ ID NO:1 所编码的多肽有至少 90% 相同的多肽；和
 - b. 至少 50 个氨基酸。
5. 权利要求 4 的分离的多肽，其中所述多肽与 SEQ ID NO:3 有至少 95% 相同。
6. 权利要求 5 的分离的多肽，其中所述多肽是 SEQ ID NO:3。
- 15 7. 一种宿主细胞，其包含重组表达盒，该表达盒含有启动子，该启动子可操作连接至一种与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同的多核苷酸。
8. 权利要求 7 的宿主细胞，其中所述多核苷酸与 SEQ ID NO:1 至少 95% 相同。
9. 权利要求 7 的宿主细胞，其中所述多核苷酸是 SEQ ID NO:1。
- 20 10. 权利要求 7 的宿主细胞，其中所述启动子是诱导型启动子。
11. 权利要求 7 的宿主细胞，其中所述启动子是组成型启动子。
12. 权利要求 7 的宿主细胞，其为昆虫细胞。
13. 权利要求 7 的宿主细胞，其为植物细胞。
14. 一种重组表达盒，其含有与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同的多核苷酸序列。
- 25 15. 权利要求 14 的重组表达盒，其中所述多核苷酸与 SEQ ID NO:1 至少 95% 相同。
16. 权利要求 14 的重组表达盒，其中所述多核苷酸是 SEQ ID NO:1。
17. 权利要求 14 的重组表达盒，其中所述启动子是诱导型启动子。
- 30 18. 权利要求 14 的重组表达盒，其中所述启动子是组成型启动子。
19. 一种重组杆状病毒，其包含权利要求 1 所述核酸。

20. 一种重组杆状病毒，其包含权利要求 2 所述核酸。
21. 一种转基因植物，其包含权利要求 1 所述核酸。
22. 一种转基因植物，其包含权利要求 2 所述核酸。
23. 一种体外分析能特异性结合 IAP 的化合物的方法，其中该方法包
5 括，使 IAP 与受试化合物混合，分析该受试化合物是否与 IAP 特异性结合；
其中所述 IAP 具有与 SEQ ID NO:3 至少 95% 相同的序列。
24. 一种体外分析 IAP 活性调节剂的方法，其中该方法包括，使 IAP
与受试化合物混合，分析该受试化合物是否能增强或减弱 IAP 与 caspase 多
肽的特异性结合。
- 10 25. 一种体外分析 IAP cDNA 的存在的方法，包括使所述 cDNA 与权利
要求 1 的核酸杂交，或与该核酸上至少 20 个核苷酸的一个连续部分杂交，
并检测所述杂交，其中所述杂交的检测可指示所述 IAP cDNA 的存在。
26. 权利要求 25 的方法，其中所述杂交在固体支持物上进行。
27. 一种体外分析 IAP 的存在的方法，包括使 IAP 与能特异性结合该
15 IAP 的抗体结合，或与该抗体仍保留针对该 IAP 的特异性的片段结合，并检
测该结合，其中所述检测可指示所述 IAP 的存在。
28. 权利要求 27 的方法，其中所述抗体或其片段的结合以及所述 IAP
的结合是通过酶联免疫吸附试验(ELISA)来检测的。

凋亡抑制剂

5 相关申请的交叉参考

无可适用。

关于联邦政府资助的研究与开发获得发明专利权的声明

10 本发明是由政府资助完成的，具体是国立环境卫生科学研究所(National Institute of Environmental Health Sciences)的 RO1 ES 02710 号基金以及美国农业部(the United States Department of Agriculture)的 97 35302 4406 号基金。

发明领域

本发明涉及编码凋亡抑制剂的多核苷酸。所述多核苷酸可用于在靶细胞中控制凋亡。

15

发明背景

凋亡是指一种程序性细胞死亡类型，其中细胞核萎缩，遗传物质(DNA)进行性降解，细胞萎缩(参见，例如，Kawabe 等，*Nature* 349:245-248 (1991))。在众多生物中，凋亡在发育、组织内环境稳定、受病毒感染的细胞的清除、以及其它事件中发挥重要的生理作用(Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. & Currie, A. R. (1980) *Int. Rev. Cytol.* 68, 251-306)。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)是负责执行凋亡程序的细胞内蛋白酶家族(Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. (1997) *Cell* 91, 443-446)。它们最初合成为无活性酶原形式，通过蛋白裂解加工而活化，产生必需的大、小亚单位，它们包含有活性的 caspase 酶。

20 Caspase 在各种昆虫、植物、以及动物物种内诱导凋亡时功能的保守性使得它们成为影响凋亡过程的合适标靶。

某些病毒携有编码 caspase 抑制蛋白的基因，因此可抑制宿主防御机制，否则，受病毒感染的细胞将由于凋亡而被消除。病毒性 caspase 抑制剂的实例包括杆状病毒 p35 蛋白(Clem, R. J.等, (1991) *Science* 254, 1388-1390)和痘病毒科牛痘病毒的 crmA 蛋白(Ray, C.等, (1992) *Cell* 69, 597-604)。IAP 家族的蛋白首先是在杆状病毒中发现的(Birnbaum, M.等, (1994) *Journal of*

30

Virology 68:2521-2525; Crook, N. E.等, (1993) *J. Virol.* 67:2168-2174)。遗传互补分析显示, CpGV 以及 OpMNPV 杆状病毒的凋亡蛋白抑制剂(“IAP”)基因可以挽救 p35-缺陷型病毒, 使宿主细胞维持存活, 从而病毒得以成功复制 (Birnbaum, M. (1994), 同上; Crook, N. E.等, (1993), 同上)。杆状病毒 IAP 包含杆状病毒抑制重复(BIR)结构域的两个串联拷贝, 其后接一个 C 末端 RING 结构域。诱变研究提示, 它们在昆虫细胞中发挥抗凋亡功能时必需有 BIR 和 RING 结构域。基于最初的这些发现, 在众多动物物种, 包括果蝇 (*Drosophila*)、哺乳动物、以及人类中, 发现了细胞性 IAP 同系物(综述见(Miller, L. (1999) *Trends in Cell Biology* 9:323-328; Deveraux, Q. & Reed, J. C. (1998) *Genes Dev.* 13:239-252))。所有细胞性 IAP 包含杆状病毒抑制重复(BIR)结构域的 1-3 个拷贝, 大多数还在靠近其 C 末端处包含一个 RING 结构域。IAP 家族的蛋白的一种机制据报道是, 多种人类 IAP, 包括 XIAP, cIAP1, cIAP2, 可以直接结合并抑制某些 caspase, 包括 caspase-3, -7 和-9 (Deveraux, Q.等 (1999) *EMBO J.*, in press.; Deveraux, Q. & Reed, J. C. (1998)同上; Deveraux, Q.等, (1997) *Nature* 388:300-303; Roy, N.等, (1997) *EMBO J.* 16, 6914-6925)。随后的缺失研究表明, BIR 的第二个结构域(BIR2)足以抑制哺乳动物 caspase-3 和-7(Roy, N.等, (1997)同上; Takahashi, R.等, (1998) *J. Biol. Chem.* 273:7787-7790)。但是, 最近发现, 一种包含第三个 BIR 结构域(BIR3)及 RING 结构域的 XIAP 片段特异性抑制哺乳动物 caspase-9 (Takahashi, R.等, (1998), 同上)。因此, 在哺乳动物的各种 IAP 中, 这些蛋白的不同区域倾向于介导与特定 caspase 的抑制性相互作用。

尽管未排除其它类型的机制, 但有观点认为果蝇和杆状病毒的 IAP 也可能抑制某些 caspase。已显示果蝇 IAP1 (DIAP1)能在昆虫细胞和酵母中抑制 drICE 和 DCP-1 (Kaiser, W.等, (1998) *FEBS Lett.* 440, 243-248; Hawkins, C.等, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2885-2890)。此外还显示 CpIAP 和 OpIAP 在杆状病毒诱导 Sf-21 细胞凋亡期间抑制 Sf-caspase-1 活化的作用需要 BIR 和 RING 这两种结构域(Seshagiri, S. & Miller, L. K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13606-13611)。

有趣的是, 在果蝇中已鉴定出一组编码 IAP 结合蛋白的凋亡诱导基因, 包括 *reaper*, *hid*, 和 *grim* (White, E. & Cipriani, R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9886-9890)。Reaper, Hid, 和 Grim 蛋白包含一个同源的约 14 个氨基

酸的N-末端结构域,它是结合DIAP1和诱导凋亡的必要和充分因素(Vucic, D.等,(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10183-10188; Vucic, D.等,(1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 3300-3309)。尽管最初有争议(参见 Deveraux, Q. & Reed, J.C. (1998) *Genes Dev.* 13, 239-252; Miller, L. (1999) *Trends in Cell Biology* 9, 323-328 的综述),但近期的信息提示, Reaper, Hid, 和 Grim 通过抑制 IAP 来干扰 IAP 介导的对 caspase 的抑制,从而诱导凋亡(Wang, S.等,(1999) *Cell* 98, 453-463)。

发明简述

10 本发明提供了来自草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*) (秋粘虫)的凋亡蛋白抑制剂(“IAP”)的 cDNA (SEQ ID NO:1), 以及与该 cDNA 有 85% 或更多相同的核酸。此外,本发明提供了与由 SEQ ID NO:1 编码的多肽(该多肽是 SEQ ID NO:3)至少 90% 相同的多肽。在优选实施方案中,所述多肽与 SEQ ID NO:3 至少 95% 相同。

15 本发明还提供了包含重组表达盒的宿主细胞,所述表达盒包括与多核苷酸可操作相连的启动子,所述多核苷酸与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同,至少 95% 相同,或所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:1。启动子可以是诱导型或组成型。宿主细胞可以是昆虫细胞,植物细胞,哺乳动物细胞。本发明提供了包含以下多核苷酸的重组表达盒,所述多核苷酸与 SEQ ID NO:1 有 85% 相同,有 95% 相同,或所述多核苷酸包含 SEQ ID NO:1。所述重组表达盒通常包含启动子,该启动子可以是诱导型或重组型启动子。

20 本发明还提供了重组杆状病毒,它们经过改造后,包含与 SEQ ID NO:1 有 85% 或更多相同的核酸,与 SEQ ID NO:1 有 95% 或更多相同的核酸,或者包含 SEQ ID NO:1。本发明还提供了转基因植物,它们包含与 SEQ ID NO:1 有 85% 或更多相同的核酸,与 SEQ ID NO:1 有 95% 或更多相同的核酸,或者包含 SEQ ID NO:1。

25 本发明还提供了体外分析能特异性结合 IAP 的化合物的方法,其中该方法包括,将 IAP 与受试化合物混合,并分析该受试化合物是否与 IAP 特异性结合,其中 IAP 具有与 SEQ ID NO:3 至少 90% 或更多相同的序列。在优选实施方案中,IAP 具有与 SEQ ID NO:3 至少 95% 或更多相同的序列。可

以将 IAP 固定在固体支持物上或配制成水溶液。在某些实施方案中，受试化合物可与固体支持物结合并与 IAP 接触。

5 本发明还提供了体外分析 IAP 活性调节物的方法，其中该方法包括，将 IAP 与受试化合物混合，并分析受试化合物是否能增强或减弱 IAP 与 caspase 多肽的特异性结合。可以将 IAP 固定在固体支持物上或配制成水溶液。在某些实施方案中，受试化合物可与固体支持物结合并与 IAP 接触。

10 本发明还提供了体外分析 IAP cDNA 存在与否的方法，包括使所述 cDNA 与有 85% 或更多相同于 SEQ ID NO:1 的核酸或与 SEQ ID NO:1 的至少 20 个核苷酸的一段毗连部分杂交，然后检测该 cDNA 与该核酸的杂交，其中所述杂交的检测可指示所述 IAP cDNA 的存在。本发明还提供了体外分析 IAP 的存在的方法，包括使 IAP 与能特异性结合所述 IAP 的抗体结合，或与该抗体的保留了针对该 IAP 之特异性的片段结合，然后检测这种结合，其中所述检测可指示 IAP 的存在。这种检测可以是 ELISA，Western 印迹，或本领域已知的其它方法。

15

具体实施方案的描述

介绍

20 凋亡，或程序性细胞死亡，是多细胞生物正常发育和体内稳态的必经过程。它在多种生物，如昆虫、植物和高等动物(包括哺乳动物)的抗病性中起着重要作用。例如，在昆虫中，对病毒感染的抗性包括使受到感染的细胞凋亡，从而限制该入侵病原体的扩散。类似地，在植物中，感染细胞的凋亡限制了病毒和其它感染扩散的能力。植物的这种通过使受感染细胞凋亡而针对感染反应的倾向性事实上被某些真菌加以利用，以产生损伤，使外露的植物组织更易感于真菌入侵。在哺乳动物，如人类中，凋亡将杀死那些经历
25 G2/M 关卡时其 DNA 遭到破坏的细胞。很多癌症之所以能生长是因为它们能避开这种控制机制。因此，调节凋亡(即，根据需要增强或减弱凋亡)的能力可用于调节植物和昆虫和其它动物对抗病原体和癌症的能力。

30 秋粘虫是苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(Autographa Californica Nuclear Polyhedrosis Virus, AcMNPV) (杆状病毒家族成员之一)的鳞翅目宿主。尽管秋粘虫衍生的细胞广泛用于研究杆状病毒对凋亡的调节(参见 Miller, L. (1999) *Trends in Cell Biology* 9, 323-328 的综述)，但除了 Sf-caspase-1 以外，

尚未在这些昆虫细胞中鉴定出内源性凋亡调节基因(Ahmad, M., Srinivasula, S., Wang, L., Litwack, G., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 1421-1424)。

本发明证实了对秋粘虫的细胞性 IAP (SfIAP)的克隆和鉴定。SfIAP 已存
5 放在 GenBank, 待提交了本说明书后, 公众就可以通过登记号 AF186378 而
得到它。SfIAP 与杆状病毒 IAP (vIAP)有相当大的序列相似性, 提示这些病
毒从它们的宿主细胞获得 vIAP。对 SfIAP 和 CpIAP 蛋白的分析表明, 它们
直接抑制哺乳动物 caspase-9, 这提示 IAP 家族蛋白功能的进化保守性, 也
10 解释了此前关于杆状病毒 IAP 能抑制哺乳动物细胞中很多刺激所诱导的凋
亡的一些报道(Hawkins, C. J., Uren, A. G., Hacker, G., Medcalf, R. L. & Vaux, D.
L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,13786-13790; Hawkins, C., Ekert, P.,
Uren, A., Holmgreen, S. & Vaux, D. (1998) *Cell Death and Differentiation* 5,
569-576; Uren, A. G., Pakusch, M., Hawkins, C. J., Puls, K. L. & Vaux, D. L.
(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4974-4978)。在 GenBank 中还可找到其
15 它 IAP, 登记号为 U45880 (人), U75285 (人), U45879 (人), U45878 (人),
NM 009689 (小鼠), NM009688 (小鼠), L05494 (杆状病毒), 和 L224564 (杆
状病毒)。

对应于 Grim 的 N-末端 IAP 结合结构域的肽消除了 SfIAP 和 CpIAP 体
外抑制哺乳动物 caspase 的能力, 这表明类似于果蝇中的机制可被用于调节
20 秋粘虫和杆状病毒的 IAP。

本发明的 IAP 提供了一种简便的筛选能调节凋亡的化合物的新方法。
另外, 还可将编码本发明 IAP 的重组病毒用于感染不想要的昆虫。这些 IAP
随后将减弱所述昆虫限制所患感染的能力, 使死亡率提高。此外, 本发明的
IAP 可用于转染植物, 使这些植物对一些真菌和其它生物的易感性降低, 这
25 里所述的真菌和其它生物是那些利用植物的正常凋亡应答而使其更易于被
入侵的真菌和其它生物。此外, 本发明的 IAP 可在动物中用于抗争各种有凋
亡在其中起作用的疾病。在优选实施方案中, 所述动物是哺乳动物。在特别
优选的应用中, 所述哺乳动物是人类。

本发明可以以多种方式应用。本发明的多肽可以作为治疗制剂直接给
30 药。用于动物, 如人类时, 所述多肽可以静脉给药, 或者将它们包在囊内口
服给药。可以用能与编码 IAP 的核酸结合并阻断它们表达的反义寡核苷酸来

转染细胞。能阻断 IAP 与 caspase 的结合的小分子化学化合物可用于干扰 IAP 的正常活性。

本发明的 IAP 也可用于体外监控 IAP cDNA 的表达。这可以通过将本发明 IAP 的核酸固定在固体支持物，如“芯片”上，以该核酸为探针来筛选 cDNA 文库或目标样品的 cDNA 而方便地实现。通常，作为探针使用的本发明 IAP 的核酸，其长度足以允许本发明 IAP 的 cDNA 相对于其它 IAP 能发生特异性杂交。较为方便的是，这类探针有 20 个或更多核苷酸，或 25, 30, 35, 40, 45, 50, 或甚至更长，以允许对靶 cDNA 进行特异性检测。

在另一组实施方案中，本发明的 IAP 可用于检测和监控样品中 IAP 的存在。通常，先制备出针对本发明 IAP 的抗体。根据试验的目的，所述抗体可以是能检测所有 IAP 的抗体，或可以用其它已知 IAP 吸附所述抗体，从而消除能识别除本发明 IAP 以外的其它 IAP 的抗体。制备抗体的方法是本领域众所周知的。一般优选单克隆抗体。也可以使用保留了对所述 IAP 的结合特异性的抗体片段。片段，如单链 Fv (scFv)，二硫键稳定的 Fv (dsFv)，Fab，和 Fab' 都是本领域已知的。利用这类抗体进行的试验，如 ELISA 和 Western 印迹也是本领域已知的。

定义

“IAP”通常指凋亡蛋白抑制剂，在本文中更特别指本发明凋亡蛋白的抑制剂。具体含义可根据上下文清楚判定。本发明的 IAP 一般至少与 SEQ ID NO:3 基本相同。“SfIAP”具体指从秋粘虫克隆得到的本发明 IAP。所有细胞性 IAP 包含杆状病毒抑制重复(BIR)结构域的 1-3 个拷贝，大多数还在靠近其 C 末端处包含一个 RING 结构域。SfIAP 包含两个 BIR 结构域，随后有一个 RING 结构域靠近其 C-末端。SfIAP 的 BIR 和 RING 区域与杆状病毒 CpIAP 的有 85% 氨基酸同一性(90% 相似性)，与 OpIAP 有 70% 同一性(80% 相似性)。

“凋亡”指程序性细胞死亡。它是多细胞生物，如哺乳动物、昆虫和植物中正常发育和体内稳态的必经过程。凋亡不同于由毒素或缺血事件造成的一般性细胞死亡之处在于，细胞按照一系列事件的特定控制模式来关闭。

“诱导凋亡的化学物质”是指启动程序性细胞死亡的化学物质。这种化学物质可以直接给与植物或通过分泌病原体而间接给药。

“异源基因”是指通过重组技术引入宿主细胞的基因，这种基因并非宿主细胞中天然存在的基因，或者这种基因代表了宿主细胞中内源基因的额外拷贝，或者这种基因与天然状态下并不与其相连的启动子可操作地连接在所述宿主细胞中。

5 “诱导型植物启动子”是指指导基因表达的启动子，其中所述表达的水平可以受各种因素，如温度、pH、转录因子和化学物质的影响而改变。

“杀昆虫蛋白”是指一大类被昆虫摄入后能使昆虫死亡的化合物。实例有苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的结晶蛋白或 δ 内毒素。

10 “病毒性植物抗病性”是指植物预防或抑制病毒性病原体成功感染的能力。

“可操作地相连”是指核苷酸序列以特定方式相连，使它们各自的功能彼此互补。实例有启动子，转录终止子，增强子或活化因子，以及被转录并被适当翻译后能产生功能性产物(即蛋白，核酶或反义构建体)的异源基因。

15 “植物”包括完整植物、植物器官(如叶、茎、根等)、种子和植物细胞，以及它们的子代。可用于本发明的植物类别总体上与能适应转化技术的高等植物类别范围同样宽，包括双子叶植物和单子叶植物。

“植物病原体”是指感染植物并对植物生长和健康有负面影响的真菌，细菌，病毒和昆虫。

“启动子”是指与结合RNA聚合酶，启动转录有关的DNA区域。

20 “转化率”是指那些在其基因组中成功掺入了异源基因并存活的细胞的百分比。

“转染”是指将异源基因导入细胞的过程。

术语“蛋白”在本文中“多肽”和“肽”互换使用。

25 “核酸”是指脱氧核糖核酸或核糖核酸和它们的聚合物，为单链或双链形式。该术语涵盖了含有已知核苷酸类似物或被修饰的骨架残基或连接的核酸，它们可以是合成的，天然产生的，和非天然产生的，可以与参照核酸有相似的结合特性，并且以类似于参照核酸的方式代谢。这类类似物的实例包括，但不限于，硫代磷酸酯，氨基磷酸酯，甲基磷酸酯，手性-甲基磷酸酯，2-O-甲基核糖核苷酸，肽-核酸(PNA)。

30 除非另有说明，具体的核酸序列也暗指涵盖它们的保守修饰的变体(如简并密码子取代)和互补序列，以及明确指明的序列。具体地，简并密码子

取代可通过制备以下序列来实现，这些序列中一或多个选定的(或全部)密码子的第三个位置被混合碱基和/或脱氧肌苷-残基取代(Batzer等(1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka等(1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; Rossolini等(1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98)。术语核酸与基因，cDNA, mRNA, 寡核苷酸，以及多核苷酸互换使用。

包含本发明融合蛋白的多核苷酸序列在严谨条件下可与编码该融合蛋白中每种多肽的相应核苷酸序列分别杂交。编码该融合多肽中每种多肽的多核苷酸序列因此包括保守修饰的变体，多态性变体，等位基因，突变体，亚序列，以及种间同系物。

10 “序列同一性百分比”通过在一个对比窗口内比较两个最佳对比排列的序列来确定，其中在该对比窗口中的多核苷酸序列当与参照序列(不包含添加或缺失)进行最佳对比排列时，其某一部分可能包含添加或缺失(如缺口)。百分比如下计算：确定在上述两种序列中相同核酸碱基或氨基酸残基位置的数目，得到匹配位置数，除以该对比窗口中的位置总数，将结果乘以 100，
15 得到序列同一性百分比。

术语多核苷酸序列“基本相同”是指多核苷酸包含具有至少 85% 序列同一性的序列。或者，同一性百分比可以是 85% 到 100% 之间的任何整数。更优选的实施方案包括用本文所述程序(优选 BLAST，使用标准参数，如下述)与参照序列对比时，至少：85%，90%，95%，或 99% 或更高。本领域
20 技术人员应认识到，通过考虑密码子简并性，氨基酸相似性，读框位置等因素，可以对这些值作适当调整，以确定由两种核苷酸序列编码的蛋白质的同一性。用于此目的的氨基酸序列“基本相同”通常是指至少 87% 的序列同一性。优选的多肽同一性百分比可以是 85% - 100% 之间的任何整数。更优选的实施方案包括至少 87%，90%，95%，或 99% 的同一性。“基本相似”
25 的多肽具有如上所述的序列，但不相同的残基位置可能由于保守氨基酸的改变而不同。保守氨基酸取代是指具有相似侧链的残基的可替换性。例如，具有脂肪族侧链的一组氨基酸为甘氨酸，丙氨酸，缬氨酸，亮氨酸，和异亮氨酸；具有脂肪族羟基侧链的一组氨基酸是丝氨酸和苏氨酸；具有包含酰氨的侧链的一组氨基酸是天冬酰胺和谷氨酰胺；具有芳香族侧链的一组氨基酸是
30 苯丙氨酸，酪氨酸，和色氨酸；具有碱性侧链的一组氨基酸是赖氨酸，精氨酸和组氨酸；具有含硫侧链的一组氨基酸是半胱氨酸和甲硫氨酸。优选的保

守氨基酸取代是：缬氨酸 - 亮氨酸 - 异亮氨酸，苯丙氨酸 - 酪氨酸，赖氨酸 - 精氨酸，丙氨酸 - 缬氨酸，天冬氨酸 - 谷氨酸，天冬酰胺 - 谷氨酰胺。

用于进行比较的最佳序列对比排列可如下进行：如 Smith 和 Waterman (1981) *Add. APL. Math.* 2:482 所述的局部同一性算法，如 Needleman 和 Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443 所述同一性对比排列算法，如 Pearson 和 Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 所述的相似性搜索方法，这些算法通过计算机执行(GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, 和 TFASTA, 见 Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI), 或通过观察进行。

10 各种算法中，适于确定序列同一性和序列相似性百分比的优选实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法，分别参见 Altschul 等(1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 和 Altschul 等(1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410。使用 BLAST 和 BLAST 2.0，用本文所述的参数，确定本发明核酸和蛋白质的序列同一性百分比。用于 BLAST 分析的软件公众可以从 National Center for Biotechnology
15 Information ([http://www. Ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/))得到。使用参数 M (一对匹配残基的得分；总是 > 0)和 N (错配残基的罚分；总是 < 0 = 来计算核苷酸序列的累积分值。对于氨基酸序列而言，使用评分矩阵计算累积分值。当出现以下情况时，每一方向上字符匹配状态的延伸就终止：累积的对比分值受变量 (quantity) X 影响而从其最大获得值下降；累积的对比分值为 0 或更低，这是
20 由于一或多个阴性分值的残基对比的累积。BLAST 算法参数 W, T, 和 X 确定了对比排列的敏感性和速度。BLASTN 程序(用于核苷酸序列)使用以下缺省值：字符长(W)为 11，预期值(expectation)(E)为 10，M=5，N=-4，且对两条链都进行比较。在氨基酸序列的情况下，BLASTP 程序使用以下缺省值：字符长(W)为 3，预期值(E)为 10，BLOSUM62 评分矩阵(参见 Henikoff 和
25 Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915)对比排列(B)为 50，预期值(E)为 10，M=5，N=-4，且对两条链都进行比较。

两种分子彼此，或与第三种核酸，在中度，优选高度严谨条件下杂交是核苷酸序列基本相同的另一种指示。严谨条件取决于序列，在不同环境中将有不同。较长的序列在较高的温度下特异性杂交。核酸杂交的较全面指南参
30 见 Tijssen, *Techniques in Biochemistry 和 Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and Strategy of nucleic

acid assays” (1993) (Elsevier Science, Inc., New York)。一般情况下，所选的严谨条件比特定序列在限定的离子强度和 pH 下的解链温度(T_m)低大约 5 - 10 °C。 T_m 是(在限定的离子强度和 pH 下)50%的靶序列与完全匹配的探针杂交时的温度。通常，严谨条件是，在 pH 7.0-8.3 时，盐浓度低于约 1.0 M 钠离子，通常约 0.01 - 1.0 M 钠离子浓度(或其它盐)，且对于短探针(如 10 - 50 个核苷酸)而言温度至少约 30 °C，对于长探针(如 50 个以上的核苷酸)而言温度至少约 60 °C。严谨条件也可通过添加去稳定剂(如甲酰胺)而实现。在进行选择性或特异性杂交时，阳性信号是至少两倍于背景，优选 10 倍于背景的杂交。

- 10 严谨杂交条件的实例如下：50% 甲酰胺，5x SSC 和 1% SDS，在 42 °C 温育，或 5x SSC，1% SDS，在 65 °C 温育，并且在 65 °C 的 0.2x SSC 和 0.1% SDS 中洗涤。

为本发明的目的，适当的“中度严谨条件”包括，例如，在 5x SSC，0.5% SDS，1.0 mM EDTA (pH 8.0) 的溶液中预洗，在 50 - 65 °C，5x SSC 中杂交过夜，然后分别在 2X，0.5X 和 0.2X SSC(含 0.1% SDS)中 65 °C 洗 20 分钟，共两次。这类杂交的 DNA 序列也包括在本发明的范围内。

对 IAP 结合活性的筛选

本发明提供了体内和体外分析 IAP 活性调节剂的方法，即鉴定特异性结合 IAP，并因此影响 IAP 活性的分子。本发明并不限制 IAP 活性用何种手段来抑制，具体实施方案包括分析 IAP 与 caspase 家族成员的结合，如本文所述。本发明的方法还包括筛选针对 IAP 的抗体或 IAP 的小分子结合剂。为了分析假定的调节分子的特异性结合，IAP 可以是溶液或者结合至已固定的基质。在某些实施方案中，IAP 固定在固体支持物上，以便进行高通量筛选或柱层析。

25 结合本发明 IAP 的候选制剂的高通量筛选

传统上，具有有效特性的新的化学实体可如下制备：鉴定具有某些所需特性或活性的化学化合物(称为“引导化合物”)，产生该引导化合物的变体，评估这些变体化合物的特性和活性。目前的趋势是缩短新药发现中所有方面所耗费的时间。高通量(HTS)方法由于具备快速和有效地大量测试的能力，
30 正取代传统的引导化合物鉴定方法。

5 在一个实施方案中,高通量筛选方法可用于鉴定特异性结合 IAP 和调节其活性的组合物。这涉及提供一个包含大量潜在化合物(候选化合物)的文库。然后在一或多项试验中筛选这种“组合的化学文库”,鉴定出与 IAP 结合的那些文库成员(具体的化学类或亚类)。如此鉴定出的化合物可作为传统的“引导化合物”或本身就作为潜在的或真正的试剂。

组合的化学文库

10 组合的化学文库是通过组合多种化学“结构单元”如试剂而化学合成或生物合成的广泛多种化学化合物的集合。例如,线性组合型化学物质文库如多肽文库可通过,将一组被称为氨基酸的化学结构单元,以每一种可能的方式,组合成给定化合物的长度(即多肽化合物中氨基酸的数目)来组建。上百万的化学化合物可通过化学结构单元的这种组合而合成。例如,100个可互换的化学结构单元的系统性组合,理论上可以合成10亿个四聚体化合物或100亿个五聚体化合物(参见,例如, Gallop (1994) 37:1233-1250)。

15 组合型化学物质文库的制备和筛选是本领域已知技术。这类组合型化学物质文库包括,但不限于,肽文库(参见,例如美国专利 5,010,175, Furka (1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487-493, Houghton (1991) *Nature*, 354: 84-88)。肽合成绝不是可用于实施本发明的唯一方法。也可以使用能产生化学多样性文库的其它化学方法。这些化学方法包括,但不限于:肽类似物(peptoid) (PCT 公开号 WO 91/19735, 1991年12月26日),编码的肽(PCT 公开号 WO 20 93/20242, 1993年10月14日),随机生物-寡聚体(PCT 公开号 WO 92/00091, 1992年1月9日),苯并二氮杂(美国专利 5,288,514),多样性(diversomer)如乙内酰脲,苯并二氮杂和二肽(Hobbs (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913)乙酰化(vinylogous)多肽(Hagihara (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568),具有 β -D-葡萄糖支架的非肽类的肽模拟物(nonpeptidal 25 peptidomimetics) (Hirschmann (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218),小分子化合物文库的模拟有机合成(Chen (1994) *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661),寡氨基甲酸酯(Cho (1993) *Science* 261: 1303),和/或肽基磷酸酯(Campbell (1994) *J. Org Chem.* 59: 658)。总体参见 Gordon (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1385,核酸文库,肽核酸文库(参见,例如美国专利 5,539,083),抗体文库(参见,例如 Vaughn (1996) *Nature Biotechnol* 14 : 309-314),和 PCT/US96/10287),炔类文库(参见,例如 Liang (1996) *Science* 274: 1520-1522, 和美国专利 30

5,593,853), 以及有机小分子文库(参见, 例如苯并二氮杂, Baum (1993) C & EN, 1 月 18 日, 33 页, 类异戊二烯美国专利 5,569,588, 噻唑烷酮(thiazolidinone)和间噻嗪烷酮(metathiazanone)美国专利 5,549,974, 吡咯烷酮(pyrrolidine)美国专利 5,525,735 和 5,519,134, 4-吗啉代化合物, 美国专利 5,506,337, 苯并二氮杂 5,288,514)。

用于制备组合文库的装置已有商品出售; 参见, 例如 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY; Symphony, Rainin, Woburn, MA; 433A Applied Biosystems, Foster City, CA; 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA; 每天能筛选超过 100,000 种化合物的超高通量筛选系统(Ultra-high Throughput Screening System, UHTSSTM), Aurora BioSciences, San Diego, CA。

针对溶液相化学方法也已开发出多种已知的自动系统。这些系统包括自动工作站, 如由 Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japan)开发的自动合成仪, 很多自动系统利用了机械臂(Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, MA; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA.), 这些机械臂可以模仿由化学专业人员进行的手工合成操作。上述任一种装置都适用于本发明。(必要时)对这些装置进行改进, 使它们可以如本文所述进行操作, 这样的改进的种类和执行对于相关领域普通技术人员而言都是明显的。此外, 有很多组合文库本身就有商品(参见, 例如 ComGenex, Princeton, NJ; Tripos, Inc., St. Louis, MO; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD)。

20 化学物质文库的高通量分析

本文所述的, 对能结合 IAP 或和/或调节 IAP 活性的化合物进行的任一种分析都应该能适用于高通量筛选。这些系统(实例如上文所述)可以自动完成所有步骤, 包括对样品和试剂的移取, 液体的分配, 定时保温以及最后在适于该分析的检测仪中对微滴板的读数。这些可配制的系统保证了高通量和快速启动以及高度适应性和专用化。

使 IAP 与固体支持物结合

可将全长 IAP 或其亚序列(例如, BIR 结构域或 RING 结构域)与各种固体支持物结合。可用于本发明方法中的固体支持物包括聚合物珠, 膜(例如, 硝酸纤维素膜或尼龙膜), 微量滴定平皿(例如, PVC 或聚苯乙烯), 试管, 浸量尺(dip stick)(例如, 玻璃, PVC, 聚丙烯等), 微量离心管, 玻璃珠, 硅珠, 塑料珠, 金属珠或诸如纸等基质。

IAP “靶”分子与所述固体支持物的结合可以是直接的(即直接接触到所述支持物)或间接的(使一种或多种特定的化合物与所述支持物结合, 而 IAP 则与该化合物结合, 而不是与所述固体支持物结合)。化合物的固定可以是共价结合形式, 例如, 利用半胱氨酸残基的单个反应性巯基(参见, 例如
5 Colliud (1993) *Bioconjugate Chem.* 4: 528-536)。或者, 化合物的固定可以是非共价的, 但却是特异性的, 例如, 借助固相抗体(参见上述), 如 Schuhmann (1991) *Adv. Mater.* 3: 388-391; Lu (1995) *Anal. Chem.* 67: 83-87 所述; 或, 借助生物素/链亲和素系统, 如参见 Iwane (1997) *Biophys. Biochem. Res. Comm.* 230: 76-80); 或金属螯合剂, 如 Langmuir-Blodgett films (Ng (1995) *Langmuir*
10 11: 4048-4055; Schmitt (1996) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35: 317-20; Frey (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4937-41; Kubalek (1994) *J. Struct. Biol.* 113: 117-123; 或, 金属螯合剂自我装配的单层, 参见, 例如 Sigal (1996) *Anal. Chem.* 68: 490-497, 用于结合多聚组氨酸融合蛋白。

IAP 的间接结合可利用各种连接物实现, 其中很多种连接物都有商品。
15 反应性末端可以是多种功能基中的任一种, 例如, 氨基反应性末端如 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)活性酯, 醛, 环氧化物, 异氰酸酯, 和硝基芳基卤化物; 巯基反应性末端如吡啶基二硫化物, 马来酰亚胺, 和活性卤素。异型双功能交联试剂具有两个不同的反应性末端, 例如, 一个氨基-反应性末端和一个巯基-反应性末端, 而同型双功能试剂具有两个相似的反应性末端, 例如,
20 双马来酰亚胺己烷(BMH), 它能使含有巯基的化合物交联。间隔区可以是脂肪族的或芳香族的。市售同型双功能交联试剂包括, 但不限于, 酰亚胺酯如二甲基己二酰亚胺酯二氢氯化物(DMA), 二甲基庚二酰亚胺酯二氢氯化物(DMP); 和二甲基辛二酰亚胺酯二氢氯化物(DMS)。异型双功能试剂包括市售活性卤素-NHS 活性酯偶联剂, 如 N-琥珀酰亚胺氨基溴乙酸酯, N-琥珀酰
25 亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(SIAB), 磺基琥珀酰亚胺基衍生物如磺基琥珀酰亚胺基(4-碘乙酰基)氨基苯甲酸酯(磺基-SLAB) (Pierce Chemicals, Rockford, IL)。另一组偶联剂是可裂解巯基的异型双功能试剂, 如 N-琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP) (Pierce)。

通过操控固体支持物以及 IAP 靶分子与该支持物的结合模式, 有可能
30 控制 IAP 的方向。因此有可能, 例如, 使 IAP 分子与一表面结合, 其结合方

式能使“尾部”游离，从而能与其它分子发生相互作用，例如，带有用于与柱结合的非-IAP 标签(例如，FLAG, myc, GST, polyHis, 等)的 IAP 融合蛋白。

一旦发生结合，可以用各种试验筛选 IAP 调节剂。例如，可将 IAP 与固体支持物结合，使第二种分子与包被了所述 IAP 的支持物接触，检测所述
5 第二种分子与所述 IAP 的结合，从而鉴定出与 IAP 结合结构域发生相互作用的分子。然后，洗脱与目标相互作用或结合的分子，从而分离出与所述 IAP 相互作用的分子。

试验

用于检测能结合 IAP 的化合物和组合物的多种不同试验都可用于本发
10 明。不同类型的结合试验的总体描述参见，BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 第 7 版(D. Stiles 和 A. Terr, 编) (1991) ; ENZYME IMMUNOASSAY, E. T. Maggio, 编, CRC Press, Boca Raton, Florida (1980);

“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays” in P. Tijssen, LABORATORY
TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier
15 Science Publishers, B. V. Amsterdam (1985)。

在竞争结合试验中，受试化合物与第二种化合物(已知其特异性结合 IAP)竞争位于附着在固体支持物上的 IAP 分子上的特异性结合位点。结合通过评估与已被固定的 IAP 分子结合的第二种化合物的量来确定。在这种结合试验中，第二种化合物与 IAP 结合的量与受试化合物的竞争能力成反比。

20 受试化合物对带有标记的第二种化合物的结合进行抑制或刺激的量取决于结合试验的条件以及标记的分析物与所用受试化合物的浓度。在特定的试验条件下，如果所结合的第二种化合物的量相对于对照样品(不含受试化合物)减少了 50% 或更多，则认为受试化合物能抑制第二种化合物与 IAP 靶化合物的结合。

25 此外，还可以分析各种已知或未知化合物，包括蛋白质，碳水化合物等，直接并特异性地结合固相靶 IAP 的能力。在一个实施方案中，使来自各种组织的样品与 IAP 接触。在另一个实施方案中，使用小分子文库和高通量筛选方法来鉴定与靶结合的化合物。然后将结合 IAP 的分子用任何方法，如柱层析技术，洗脱下来。

30 本发明核酸的分离

本发明的核酸可以用于制备重组蛋白和转基因生物，以用于多种目的。总而言之，下述重组 DNA 技术中的命名法和实验室操作都是本领域已知和常用的。使用标准技术进行克隆，DNA 和 RNA 分离，扩增和纯化。涉及 DNA 连接酶，DNA 聚合酶，限制性内切核酸酶等等的酶反应一般按照厂家说明书操作。这些技术以及各种其它技术主要参照 Sambrook 等，*Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, (1989)或 *Current Protocols in Molecular Biology Volumes 1-3*, John Wiley & Sons, Inc. (1994-1998)。

核酸的分离可通过多种技术实现。例如，可使用基于本文公开的序列的寡核苷酸探针鉴定基因组 DNA 文库中的所需基因。为了构建基因组文库，通过随机片段化，例如使用限制性内切核酸酶，来产生较大的基因组 DNA 片段，然后将它们与载体 DNA 连接，形成可包装进适当载体的连环体。

然后使用基于本文公开的克隆化 IAP 基因序列的探针来筛选基因组文库。可以用探针与基因组 DNA 序列杂交，从而在相同或不同物种中分离出同源基因。或者，可使用针对多肽(如本发明 IAP)的抗体来筛选表达文库。针对所选抗原的抗体的制备是本领域已知的。

或者，可使用扩增技术从核酸样品扩增目标核酸。例如，可使用聚合酶链反应(PCR)技术，直接从基因组 DNA 或从 cDNA 文库扩增 IAP 基因的序列。也可以使用 PCR 和其它体外扩增方法来，例如克隆能编码被表达的蛋白的核酸序列，制备能作为探针用于检测样品中所需 RNA 的存在的核酸，用于核酸测序，或用于其它目的。PCR 综述参见 *PCR Protocols : A Guide to Methods and Applications*. (Innis, M, Gelfand, D., Sninsky, J.和 White, T., eds.), *Academic Press*, San Diego (1990) 。可用于从组织鉴定序列的适宜引物和探针根据本文提供的序列(如 SEQ ID NO: 1, 等)的比较来制备

多核苷酸可利用技术文献中描述的已知技术来合成。参见，例如 Carruthers 等，*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47: 411-418 (1982),和 Adams 等，*J. Am. Chem. Soc.* 105: 661 (1983)。然后，可合成互补链并使这些链在适当条件下退火，或者用 DNA 聚合酶以及适当的引物序列补加互补链，从而获得双链 DNA 片段。

在原核细胞和真核细胞中的表达

为了获得克隆基因，如编码本发明 IAP 的多核苷酸的高水平表达，通常将编码所述 IAP 的多核苷酸亚克隆至表达载体中，该载体包含了能指导转录的强启动子，转录/翻译终止子，以及对于编码蛋白质的核酸而言，用于翻译起始的核糖体结合位点。适当的细菌启动子是本领域已知的，参见，例如，Sambrook 等和 Ausubel 等。用于表达 IAP 的细菌表达系统有，例如，大肠杆菌(*E. coli*)，芽孢杆菌(*Bacillus sp.*)和沙门氏菌(*Salmonella*) (Palva 等，*Gene* 22: 229-235 (1983); Mosbach 等，*Nature* 302: 543-545 (1983)。有关这类表达系统的试剂盒已有商品。用于哺乳动物细胞，酵母和昆虫细胞的真核表达系统是本领域已知的，也有商品。

10 对用于指导异源核酸表达的启动子的选择取决于具体的应用。优选启动子距异源转录起始位点的距离约等于其在天然状态下距其转录起始位点的距离。但是，正如本领域已知的，在不损失启动子功能的前提下，所述距离可以变动。

除了启动子，表达载体通常还包含转录单元或表达盒，其含有在宿主细胞中表达 IAP 编码核酸所需的所有其它元件。因此，一种典型的表达盒包含一个启动子，该启动子可操作地连接编码 IAP 的核酸序列以及转录子有效聚腺苷酸化所需的信号，核糖体结合位点，和翻译终止。所述盒的其它元件可能包括增强子，以及当使用基因组 DNA 作为结构基因时，还包括带有功能性剪接供体和受体位点的内含子。

20 除了启动子序列，表达盒还应在结构基因下游包含转录终止区，以便提供有效的终止。这种终止区可从启动子序列的来源基因获得，或者从其它基因获得。

用于将遗传信息转运至细胞的具体表达载体并不是特别关键。任何常规用于在真核或原核细胞中表达的载体都可以使用。标准的细菌表达载体包括质粒(如基于 pBR322 的质粒，pSKF, pET23D)，以及融合表达系统如 GST 和 LacZ。可在重组蛋白上添加表位标签(如 c-myc)，以便提供方便的分离方法。

含有真核病毒调节元件的表达载体通常用于真核表达载体中，例如，SV40 载体，乳头瘤病毒载体，以及衍生自 Epstein-Barr 病毒的载体。真核载体的其它实例有 pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5, 杆状病毒 pDSVE，以及任何其它能在下述启动子指导下表达蛋白的载体：CMV 启动子，SV40 早期启动子，SV40 晚期启动子，金属硫蛋白启动子，鼠乳腺肿瘤

病毒启动子, 劳氏(Rous)肉瘤病毒启动子, 多角体蛋白启动子或其它对于真核细胞中的表达有效的启动子。

某些表达系统具有能提供基因扩增的标记, 如胸苷激酶和二氢叶酸还原酶。另外, 与基因扩增无关的高产表达系统也是合适的, 如在昆虫细胞中使用杆状病毒载体, 以及在多角体蛋白启动子或其它强效杆状病毒启动子的指导下的 IAP 编码序列。

表达载体中通常包括的元件还有能在大肠杆菌中发挥功能的复制子, 编码抗生素抗性的基因(因此能筛选带有重组质粒的细菌), 位于质粒的非必需区域中的唯一限制性位点(以便插入真核序列)。选择何种抗生素抗性基因并不是关键, 本领域已知的很多种抗性基因中任何一种都可以。必要时, 优选所选的原核序列不干扰真核细胞中 DNA 的复制。

可使用标准转染方法产生能表达大量 IAP 的细菌、哺乳动物、酵母或昆虫细胞系, 然后将所得 IAP 用标准技术纯化(参见, 例如 Colley 等, *J. Biol. Chem.* 264: 17619-17622 (1989); *Guide to Protein Purification, in Methods in Enzymology*, vol. 182 (Deutscher 编, 1990))。真核和原核细胞的转化按照标准技术操作(参见, 例如 Morrison, *J. Bact.* 132: 349-351 (1977); Clark-Curtiss & Curtiss, *Methods in Enzymology* 101: 347-362 (Wu 等编, 1983))

将外源核苷酸序列引入宿主细胞的任何已知方法都可以使用。这些方法包括, 使用磷酸钙转染, polybrene, 原生质体融合, 电穿孔, 脂质体, 显微注射, plasma 载体, 病毒载体, 以及任何用于将克隆化基因组 DNA, cDNA, 合成的 DNA 或其它外源遗传物质导入宿主细胞的已知方法(参见, 例如 Sambrook 等, 出处同上)。唯一的要求是, 所用的具体基因工程方法能成功地将至少一个基因导入能表达 IAP 的宿主细胞。

将表达载体导入细胞后, 可以将转染细胞在适于表达 IAP 的条件下培养, 然后用标准技术从培养物中回收 IAP。纯化重组多肽时, 可以使用多种方法。例如, 可以使具有确定的分子粘附特性的蛋白质与所述多肽可逆地融合。只要有相应的配体, 就可以将多肽选择性吸附至纯化柱上, 然后从该柱上以相对纯的形式释放。融合蛋白随后利用酶活性取出。最后, 可以用免疫亲和层析柱纯化所述多肽。

30 转基因植物的产生

本发明的 IAP 可用于增强植物的抗病性。更具体地, IAP 可用于延迟、遏止或抑制植物的凋亡应答。多种植物病原体, 尤其非病毒性植物病原体在植物中诱导凋亡, 以此作为其感染过程的一个部分。当植物用本发明的 IAP 转化后, 该植物对病原体诱导的凋亡不再易感, 并产生抗性表型。

5 本发明的 DNA 构建体可通过各种传统技术导入目标植物宿主的基因组中。例如, 可以利用诸如电穿孔和向植物细胞原生质体进行显微注射等技术将 DNA 构建体直接导入植物细胞的基因组 DNA 中, 或者可以利用弹射(ballistic)法, 如 DNA 粒子轰击, 将 DNA 构建体直接导入植物组织。

10 显微注射技术为本领域已知, 在科学和专利文献中有详细记载。DNA 构建体利用聚乙二醇沉淀进行的导入见 Paszkowski 等(1984) *EMBO J.* 3: 2717-2722。电穿孔技术参见 Fromm 等(1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824。弹射转化技术参见 Klein 等(1987) *Nature* 327: 70-73。

15 或者, 可将 DNA 构建体与适当的 T-DNA 侧翼区结合, 再导入传统的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)宿主载体。当根癌农杆菌宿主感染细胞时, 该细菌的毒力功能将指导构建体及其邻接的标志物插入植物细胞 DNA 中。根癌农杆菌介导的转化技术, 包括二元载体(binary vector)的解除和应用, 都已经详细记载在科学文献中, 例见 Horsch 等 *Science* 233: 496-498 (1984), Fraley 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803 (1983)和 *Gene Transfer to Plants*, Potrykus 编(Springer Verlag, Berlin 1995)。

20 经上述任一种转化技术产生的转化植物细胞经过培养, 可再生为完整植物, 该植物具有转化的基因型, 并因此具有所需表型, 如种子量(seed mass)增加。这类再生技术依赖于在组织生长培养基中对特定植物激素的操作, 通常依赖于已经与目标核苷酸序列一起导入的杀生物剂和/或除草剂标志物。从培养的原生质体再生植物的技术参见 Evans 等, *Protoplasts Isolation and*
25 *Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; 和 Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985。再生也可以从植物愈伤组织、外植体、器官、或其部分来实现。这类再生技术主要参见 Klee 等 *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38 : 467-486 (1987)。

30 本发明的核酸可用于为几乎任何植物赋予所需特性。因此, 本发明可用于广泛多种植物, 包括以下属的种: 腰果属(*Anacardium*), 落花生属(*Arachis*),

天门冬属(*Asparagus*), 颠茄属(*Atropa*), 燕麦属(*Avena*), 芸苔属(*Brassica*), 柑桔属(*Citrus*), 西瓜属(*Citrullus*), 辣椒属(*Capsicum*), 红花属(*Carthamus*), 椰子属(*Cocos*), 咖啡属(*Coffea*), 香瓜属(*Cucumis*), 南瓜属(*Cucurbita*), 胡萝卜属(*Daucus*), 油棕属(*Elaeis*), 草莓属(*Fragaria*), 大豆属(*Glycine*), 棉属(*Gossypium*), 向日葵属(*Helianthus*), *Heterocallis*, 大麦属(*Hordeum*), 天仙子属(*Hyoscyamus*), 莴苣属(*Lactuca*), 亚麻属(*Linum*), 黑麦草属(*Lolium*), 羽扇豆属(*Lupinus*), 番茄属(*Lycopersicon*), 苹果属(*Malus*), 木薯属(*Manihot*), *Majorana*, 苜蓿属(*Medicago*), 烟草属(*Nicotiana*), 木樨榄属(*Olea*), 稻属(*Oryza*), 黍属(*Panicum*), *Pannisetum*, 鳄梨属(*Persea*), 菜豆属(*Phaseolus*), 黄莲木属(*Pistachia*), 豌豆属(*Pisum*), 棠梨属(*Pyrus*), 李属(*Prunus*), 萝卜属(*Raphanus*), 蓖麻属(*Ricinus*), 黑麦属(*Secale*), 千里光属(*Senecio*), 白芥属(*Sinapis*), 茄属(*Solanum*), 高粱属(*Sorghum*), *Theobromus*, 胡卢巴属(*Trigonella*), 小麦属(*Triticum*), 野豌豆属(*Vicia*), 葡萄属(*Vitis*), 豇豆属(*Vigna*), 和玉蜀黍属(*Zea*)。

15 技术人员将认识到,一旦表达盒稳定地引入转基因植物并经证实可以进行操作之后,就可以通过有性杂交将它引入其它植物。多种标准培育技术中的任何一种都可以使用,这取决于将要用于杂交的物种。

技术人员可利用已知方法筛选本发明的植物,即检测转基因植物中 IAP mRNA 或蛋白的增加或减少。检测和定量 mRNA 或蛋白的手段是本领域已知的。

此外,对植物细胞中凋亡的调节可以控制。植物中的凋亡具有与动物细胞类似的途径。现有两种分子分析工具,已证实它们可用于确定植物(以及动物细胞)中凋亡的发生,这种凋亡是区别于致死性毒素(如毒性水平的 Fe_2SO_4)或低含氧情况所致细胞死亡的。首先是证实细胞 DNA 的有序片段化。这些称为 DNA 序列梯,利用各种电泳技术很容易对它们进行分析。具体的凝胶或电泳条件并不关键。适当的电泳条件参见 Wang 等(1996), *Cell*, 8: 375-391。

或者,凋亡期间 DNA 的片段化可通过能与核小体单元上暴露的 3'羟基反应的试剂进行原位检测。该试验的过程涉及用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)将 DNA 片段用偶联至可检测标志物的 UTP 进行末端标记。此方法称为

(TUNEL), 详见 Wang 等(出处同上)。最后, 可以肉眼识别包含片段化 DNA 的凋亡小体, 它是凋亡的特征之一。

技术人员也可以用传统方法分析抗病性。这些方法涉及肉眼观察病原体对宿主植物的影响。可以观察到的症状包括, 枯萎, 腐烂, 矮小生长, 颜色改变和 菌丝状生长。可以在重复试验中对这些症状的严重程度进行评分, 5 试验重复的次数应足以获得具有统计学意义的信息。对植物中感染和抗性的可重复性研究的通用实验参数是已知的。

重组载体的制备

为了用分离的序列转化植物, 制备了适于转化植物细胞的重组 DNA 载 10 体。用于转化较广范围的高等植物种类的技术是已知的, 在科技文献中有记载。参见, 如 Weising 等 *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477 (1988)。优选将编码所需多肽的 DNA 序列, 如编码全长蛋白的 cDNA 序列与转录和翻译起始调节序列相结合, 所述调节序列可指导基因在转化植物的目标组织中转录其序列。

15 例如, 为了进行过表达, 可利用能指导基因在再生植物的所有组织中表达的植物启动子片段。这种启动子在本文中称为“组成型”启动子, 它们在绝大多数环境条件和发育状态或细胞分化情况下有活性。组成型启动子实例包括, 花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 转录起始区, 衍生自根癌农杆菌 T-DNA 的 1'-或 2'-启动子, 本领域技术人员已知的各种植物基因的转录起始区。所 20 述基因例如, 拟南芥属(*Arabidopsis*)的 *ACT11* (Huang 等 *Plant Mol. Biol.* 33: 125-139 (1996)), 拟南芥属的 *Cat3* (GenBank 号 U43147, Zhong 等, *Mol. Gen. Genet.* 251: 196-203 (1996)), 编码欧洲油菜(*Brassica napus*)硬脂酰基-酰基载体蛋白去饱和酶的基因(Genbank 号 X74782, Solocombe 等 *Plant Physiol.* 104: 1167-1176 (1994)), 玉米的 *GPc1* (GenBank 号 X15596, Martinez 等 *J. Mol. Biol.* 25 208: 551-565 (1989)), 以及玉米的 *Gpc2* (GenBank 号 U45855, Manjunath 等, *Plant Mol. Biol.* 33: 97-112 (1997))。

备选地, 植物启动子可以指导核酸在特定组织、器官或细胞类型中表达 (即组织特异性启动子), 或者可以受更精确的环境或发育条件控制(即诱导型启动子)。可能影响诱导型启动子启动的转录的环境条件包括, 厌氧条件, 30 温度升高, 有光照, 或喷洒了化学物质, 激素。在一个优选实施方案中, 启动子因病原体的感染而被特异性地诱导。组织特异性启动子可以是诱导型

的。与此类似，组织特异性启动子可以仅在发育阶段的特定时间段启动该组织的转录。其它组织特异性启动子可以在特定组织的整个生命周期中都有活性。技术人员将认识到，组织特异性启动子有可能在除了该靶组织以外的其它组织中驱动可操作相连的序列表达。因此，如本文所用，组织特异性启动子是优选在靶组织或细胞类型中驱动表达，但也能在其它组织中引起表达的那些。

多种组织特异性启动子可用于本发明。例如，在叶、根或花中指导核酸表达的启动子可用于增强对感染这些器官的病原体的抗性。为了在植物的气生营养器官中表达 IAP，可使用光合成器官特异性启动子，如 RBCS 启动子 (Khouidi 等, *Gene* 197: 343, 1997)。IAP 多核苷酸的根特异性表达可在根特异性 *ANRI* 启动子的控制下实现(Zhang & Forde, *Science*, 279: 407, 1998)。任何强效组成型启动子，如 CaMV 35S 启动子，都可用于在整个植株中表达 IAP 多核苷酸。

如果需要正确表达多肽，应在编码区的 3'-端包含一个聚腺苷酸化区域。所述聚腺苷酸化区域可以来自天然基因，来自各种其它植物基因，或来自 T-DNA。

包含本发明基因的序列(例如，启动子或编码区)通常包含一种标记基因，它赋予植物细胞以一种可选择的表型。例如，该标记可能编码杀生物剂抗性，尤其抗生素抗性，如对卡那霉素、G418、博莱霉素、潮霉素的抗性，或除草剂抗性，如对 chlorosulfuron 或 Basta 的抗性。

重组杆状病毒中的表达

IAP 多核苷酸的另一种应用是用于构建能作为杀虫剂的重组杆状病毒。已知凋亡是昆虫防御杆状病毒感染的机制之一。因此，含有本发明 IAP 多核苷酸的重组杆状病毒可用于克服这种防御机制。

绝大多数杆状病毒表达载体系统的构建，都是基于将多角体蛋白基因或其它编码区取代为受控于多角体蛋白基因启动子或其它启动子而转录的外源基因(Pennock 等, *Mol. and Cell. Bio.* 4: 399-406 (1984); Smith 等 *Molecular and Cell. Biol.* 3: 2156-2165 (1983))。杆状病毒是农业上重要的多种昆虫害虫的天然病原体(Wood,和 Granados, *Ann. Rev. Microbiol.* 45: 69-87 (1991))。因此，越来越多的兴趣在于，利用重组杆状病毒表达外源蛋白，这种蛋白能增强天然杆状病毒的杀虫剂特性(参见，如 Carbonell 等, *Gene* 73: 409-418

(1988); Hammock 等, *Nature* 344: 458-461 (1990); Maeda, S., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 165: 1177-1183 (1989); Maeda 等, *Virology* 184: 777-780 (1991)和美国专利 5,908,785)。

IAP 抑制剂, 各种 IAP, IAP 核酸以及抗-IAP 核酸作为药物的给与

5 凋亡在发育、病毒致病性、癌症、自身免疫病以及神经变性疾病中起主要作用。凋亡的不适当增加可能导致或引起各种疾病, 包括 AIDS, 神经变性疾病(如阿尔茨海默氏病(Alzheimer's Disease), 帕金森氏病(Parkinson's Disease), 肌萎缩性侧索硬化(ALS), 色素性视网膜炎和视网膜的其它疾病, 骨髓发育不良综合征(如, 再生障碍性贫血), 毒素诱导型肝脏疾病(如, 酒精中毒)和缺血损伤(如, 心肌梗塞, 休克和再灌注损伤)。此外, 对天然发生的

10 凋亡的破坏与某些癌症(如滤泡性淋巴瘤, p53 癌和激素依赖性肿瘤), 自身免疫病(如红斑狼疮和多发性硬化症)和病毒感染(如疱疹病毒, 痘病毒和腺病毒感染)的进展有关。参见, 例如 Korneluk, 美国专利 5,919,912。

本发明提供了 IAP 活性的调节剂(如抑制剂)以及它们的治疗性给药。所

15 述化合物包括用本发明方法发现的那些。可用于治疗的调节剂还包括抗体以及能结合 IAP, 从而抑制其结合 caspases 的能力的小分子。在另一种实施方案中, 调节剂是 IAP 活性的肽抑制剂。本发明的肽, 多肽和其它组合物可以与可药用载体(赋形剂)一起给药, 从而形成药用组合物。

用于, 例如肽和多肽的可药用载体和配制剂为本领域技术人员所熟知,

20 在科学和专利文献中有详细记载, 例如, 最近版的 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton, PA ("Remington's"); Banga; Putney (1998) *Nat. Biotechnol.* 16: 153-157; Patton (1998) *Biotechniques* 16: 141-143; Edwards (1997) *Science* 276: 1868-1871; Ho, 美国专利 5,780,431; Webb, 美国专利 5,770,700; Goulmy, 美国专利 5,770,201。

25 用于本发明方法的组合物可以单独运送或作为药用组合物经本领域已知的任何手段运送, 如全身性, 部位内(regionally)或局部(locally); 动脉内, 鞘内(IT), 静脉内(IV), 非胃肠道, 胸膜腔内, 表面局部(topical), 口服或局部(local)给药, 为皮下, 气管内(如通过气溶胶形式)或经粘膜(如颊面粘膜, 膀胱粘膜, 阴道粘膜, 子宫粘膜, 直肠粘膜, 鼻粘膜)。运送组合物的真正

30 方法对本领域技术人员而言是已知的或很显然的, 详见科学和专利文献, 例如, Remington's。

药用组合物可以用任何方案并以各种单元剂型给药，这取决于给药方法，是否与化疗剂一起给药，等等。典型的肽和多肽类药用组合物的剂量是本领域技术人员已知的。这种剂量通常事实上是可以咨询的(advisorial in nature)，可以根据各种因素，如具体治疗内容，患者健康状况等进行调整。

5 足以产生所需应答的组合物或肽的量被定义为“治疗有效剂量”。用药时间表及其有效量，即“用药方案”取决于多种因素，包括将要治疗的疾病所处的阶段；一起给药的其它试剂的时间表；患者的总体健康状态；患者的生理状态；年龄；药物配制等。用药方案还要考虑药物动力学，如肽类药用组合物的吸收速率，生物可利用性，代谢，清除等等，参见，例如 Remington。

10 用药可凭经验，如根据症状的减轻或改善，根据客观指标，对血液或组织学标本的分析(活检中凋亡的量)，等等。

用于治疗性给与编码 IAP 的核酸或抗 IAP 核酸(如反义分子)的载体可以是病毒性的或非病毒性的。病毒载体通常作为病毒的一个组成部分导入患者。能在其中掺入核酸的那些病毒载体如基于腺病毒的载体(Cantwell (1996) *Blood* 88: 4676-4683; Ohashi (1997) *Proc. Nat'l. Acad. Sci USA* 94: 1287-1292)，基于 Epstein-Barr 病毒的载体(Mazda (1997) *J. Immunol. Methods* 204: 143-151)，腺伴随病毒载体，新培斯病毒载体(Strong (1997) *Gene Ther.* 4: 624-627)，单纯疱疹病毒载体(Kennedy (1997) *Brain* 120: 1245-1259)和逆转录病毒载体(Schubert (1997) *Curr. Eye Res.* 16 : 656-662)。

20 编码可用于基因治疗的产物的非病毒载体可通过，诸如脂转染，生物弹射(biolistics)，病毒体，脂质体，免疫脂质体，聚阳离子:核酸偶联物，裸露 DNA 注射，人工病毒体，DNA 的试剂-增强性吸收，回体(*ex vivo*)转导等手段，导入动物。脂转染见，例如，美国专利 5,049,386, 4,946,787; 和 4,897,355)，脂转染试剂有商品出售(例如，TransfectamTM 和 LipofectinTM)。适合于多核苷酸的有效受体-识别脂转染的阳离子和中性脂质包括 Felgner, WO 91/17424 和 WO 91/16024 所述的那些。裸露 DNA 基因疫苗参见，例如，美国专利 5,589,486。

实施例

30 以下实施例旨在举例说明，并非限制本发明或所附权利要求的范围。

实施例 1. SflAP 的克隆

用来自 Qiagen 的试剂盒从 Sf-21 分离 mRNA。根据杆状病毒 IAP 和果蝇 IAP 的共有氨基酸序列设计简并引物, 5'GC(A/C/G/T)GA(A/C/G/T)GC(A/C/G/T)GG(A/C/G/T)TT(T/C)TT(T/C)TA3' 和 5'AC(A/C/G/T)AC(A/G)TG(A/C/G/T)CC(A/G)CA(A/C/G/T)GG3'。用来自 TakaRa 的 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR, 条件如下: 94°C 1 分钟, 42°C 1.5 分钟, 72°C 1 分钟, 共 40 个循环。使扩增的片段钝端化, 克隆至 pTZ19 的 HincII 位点, 然后测序。为获得全长 SflAP cDNA, 用分别来自 Gibco BRL 和 TakaRa 的试剂盒从 Sf-21 mRNA 进行 5'RACE 和 3'RACE, 将 5'CACTTGGTTTTGTCTCCCTGACC3' 和 5'ACTCAAAGTTGTGTAAAATCTG3' 作为内部 PCR-引物。

10 实施例 2. 质粒的构建

包含完整的开放读框(ORF)的全长 SflAP cDNA 的一部分经 PCR 扩增, 亚克隆至 pcDNA3-myc 和 pGEX4T-1 载体的 EcoRI-XhoI 位点, 所述载体分别用于在哺乳动物细胞中表达为带有 myc-表位标记的蛋白, 和在大肠杆菌中表达为 GST-融合蛋白。将 CpIAP 的完整 ORF 亚克隆至 pcDNA3-myc 的 EcoRI-EcoRV 位点或 pGEX4T-1 的 EcoRI-SalI 位点。编码 SflAP 和 CpIAP 片段的质粒用含有相应起始或终止密码子的引物进行 PCR 扩增, 然后亚克隆至 pcDNA3-myc 或 pGEX4T-1 质粒中, 所述 SflAP 和 CpIAP 片段包括 BIR1+2 (对于 SflAP 而言是氨基酸 1-323, 对于 CpIAP 而言是氨基酸 1-220) 和 RING (对于 SflAP 而言是残基 324-377, 对于 CpIAP 而言是残基 221-275)。

20 实施例 3. 蛋白表达和纯化

将 pGEX4T-1-SflAP 和 pGEX4T-1-CpIAP 质粒引入含有质粒 pT-Trx 的大肠杆菌菌株 BL21 (DE3)。通过与 0.05 mM IPTG 在 25°C 温育 8 小时而获得 GST 融合蛋白, 然后用谷胱甘肽-Sepharose 纯化, 基本如(Deveraux, Q., Welsh, K. & Reed, J. *Methods of Enzymology* in press)所述。含有 C-末端 His6-标签的 Caspases-3 和-7, 含有 N-末端 His6-标签的 caspase-8 如前述纯化(Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272,25719-25723; Stennicke, H.等, (1998) *J. Biol. Chem.* 273,27084-27090; Stennicke, H.等, (1999) *J. Biol. Chem.* 274,8359-8362)。缺乏 CARD 结构域的 Caspase-9 (Δ CARD-caspase-9)通过将 cDNA 截短, 并导入一个起始密码子取代 Val 139 而构建。将所得 cDNA 亚克隆至 pET-23b 并在 BL21 (DE3) 中表达, 当细胞达到 OD₆₀₀=0.6 时用 0.2 mM IPTG 诱导 4 小时, 产生完全加工的酶 (Stennicke, H., Deveraux, Q., Humke, E.,

Reed, J., Dixit, V. & Salvesen, G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274,8359-8362)。所有表达的 caspases 通过 Ni-整合亲和层析方法纯化,如所述(Stennicke, H.等, (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 8359-8362; Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272,25719-25723; Stennicke, H.等, (1998) 出处同上)。纯化的酶的浓度根据 280 nm 处的吸光度来确定(该值是基于摩尔吸光系数): caspase-3 (A₂₈₀ = 26, 000M⁻¹ cm⁻¹), caspase-7 (A₂₈₀=24,500 M⁻¹ cm⁻¹), caspase-9 (A₂₈₀=30,010M⁻¹ cm⁻¹)。

实施例 4. 蛋白结合试验

[³⁵S]原-caspase-9 在有 [³⁵S] L-甲硫氨酸的情况下,用来自 Promega 的 TNT 试剂盒体外转录并翻译。使蛋白脱盐,并通过 Bio-spin P-6 柱(Bio-Rad)的交换进入缓冲液(20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA 和 1 mM DTT)中。将固定在谷胱甘肽-Sepharose (5μl)上的 GST-SfiAP, GST-CpIAP, GST-XIAP 或 GST-XIAPBIR1 (10μg), 与体外翻译的原-caspase-9 (4 u l), 在 100μl 总体积中, 与 caspase 试验缓冲液(20 mM HEPES, pH7.4, 10% 蔗糖, 0.1% CHAPS, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl)一起温育。在 4℃ 温育 1 小时后,通过离心取出珠子,用 0.5 ml 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM DTT 洗两次, 然后进行 SDS-PAGE 和放射自显影分析。

实施例 5. 酶分析

Caspase 活性通过 7-氨基-4-三氟甲基香豆素(AFC)从含有 Ac-DEVD 或 Ac-LEHD 的合成肽(Calbiochem)的释放来分析,使用连续-阅读仪,如所述(Quan, L. T.等, (1995) *J. Biol. Chem.* 270: 10377-10379)。

实施例 6. 细胞提取物

胞质提取物使用人胚肾(HEK) 293 细胞如所述制备(Deveraux, Q., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. (1997) *Nature* 388,300-303)。细胞用经过冰冷却的缓冲液 A (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA 和 1 mM DTT)洗涤,悬浮在 1 倍体积的缓冲液 A 中,于冰上静置 20 分钟,然后 15 次通过 26 号针头而使细胞破碎。细胞提取物通过在 15000g 离心 12 分钟而纯化,将上清保存在-80℃。在开始 caspase 活化时,向提取物中加入 100 nM 纯化的重组 caspase-8 或 1μM 马心脏细胞色素 c (Sigma)以及 1 mM dATP (Deveraux, Q. L.等, (1998) *EMBO J.* 17, 2215-2223)。

实施例 7. 细胞培养, 转染, 以及凋亡试验

将 Sf-21 昆虫细胞于 27°C 维持在添加了 2.5% 胎牛血清的 Excell 401 培养基(JHR Bioscience)中。使 vP35del(在 p35 基因中有缺失)在 TN-368 细胞中繁殖(Clem, R. J.等, (1991) *Science* 254, 1388-1390)。用来自 Gibco 的 Lipofectin, 将编码全长 SflAP 或其缺失突变体的质粒(1 μ g), 与 1 μ g vP35del 病毒 DNA 共转染至 Sf-21 细胞中。转染 3 天后, 在光学显微镜下观察包涵体的形成。

将 HEK293 和 293T 细胞维持在添加了 10% 胎牛血清, 1 mM L-谷氨酰胺以及抗生素的 DMEM (Irvine Scientific)中。293 细胞(10^6)用 0.1 μ g 绿色荧光蛋白 (GFP) 标记质粒 pEGFP (Clontech), 0.25 μ g pcDNA3-Bax 或 pcDNA3-Fas, 及 1.5 μ g pcDNA3myc-SflAP 或 pcDNA3myc-CpIAP 用 Superfect 共转染。或者, 所述细胞用 0.35 μ g pcDNA3-caspase-9-Flag 和 2.1 μ g SflAP 或 CpIAP 共转染。转染 24-36 小时后, 收获漂浮的以及贴壁的细胞, 将它们集中, 通过用 0.1 mg/ml DAPI 染色来确定表现出核凋亡形态的 GFP-阳性细胞的百分比(平均值 \pm S.D.) (Deveraux, Q.等(1997) *Nature* 388,300-303; Deveraux, Q. L.等, (1998) *EMBO J.* 17, 2215-2223; Roy, N.等(1997) *EMBO J.* 16,6914-6925; Takahashi, R.等(1998) *J. Biol. Chem.* 273,7787-7790)。在某些情况下, 从转染细胞制备裂解物, 将总蛋白含量标准化, 通过 SDS-PAGE/免疫印迹进行分析, 如所述(Deveraux, Q.等, (1997) 出处同上; Deveraux, Q. L.等(1998) 出处同上; Roy, N.等(1997) 出处同上; Takahashi, R.等, (1998), 出处同上)。

实施例 8. 对 SflAP 进行克隆的结果

用 RT-PCR 从 Sf-21 细胞的 mRNA 扩增 SflAP 片段。进行 5'RACE 和 3'RACE 以获得全长 cDNA。全长 SflAP cDNA (SEQ ID NO : 1)包含编码 377 个氨基酸(SEQ ID NO : 3)的蛋白的一个连续 ORF (SEQ ID NO : 2)。该 ORF 始于位于翻译有利范围的 AUG, 接着是所有三个阅读框中的上游终止密码子。与杆状病毒 IAP 相似, 预测的 SflAP 包含两个 BIR 结构域, 后面在其 C-末端是一个 RING 结构域。在 BIR 和 RING 区域内, SflAP 与杆状病毒 CpIAP 有 85% 的氨基酸同一性(90% 相似性), 与 OpIAP 有 70% 同一性(80% 相似性)。鳞翅目细胞 IAP 与杆状病毒 IAP 之间的这种序列相似性提示, 杆状病毒 IAP 可能来自宿主 IAP 基因。

实施例 9. SflAP 在 Sf-21 细胞中挽救 AcNPV p35-缺失型病毒

此前的研究显示, CpiAP 和 OpIAP 在 Sf 细胞中挽救 AcMNPV p35-缺失型病毒时需要它们的 BIR 以及 RING 结构域(Clem, R. J. & Miller, L. K. (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14,5212-5222)。对 SfiAP 进行检验, 以查明其是否也能弥补 p35-缺陷, 通过这种突变病毒阻止凋亡, 从而允许该病毒在昆虫细胞中复制。

5 含有全长 SfiAP 或 SfiAP 片段(包含两个 BIR 或 RING 结构域)的质粒与 AcMNPV p35 突变的病毒 DNA 共转染至 Sf-21 细胞中。转染 72 小时后观察细胞。根据在 Sf21 细胞中包涵体的形成证实, 全长 SfiAP 能弥补 p35 缺陷, 使该突变病毒得以复制, 但 SfiAP 的 BIR 和 RING 截短突变体不能在该试验中起挽救作用。因此, 与 CpiAP 和 OpIAP 类似, SfiAP 在抑制由 AcMNPV

10 p35 突变病毒引起的凋亡的时候, 需要 BIR 和 RING 结构域的组合。

实施例 10. SfiAP 和 CpiAP 在哺乳动物细胞中抑制 Bax-诱导的、而非 Fas-诱导的凋亡

已有报道说, 杆状感病毒 IAP 能保护哺乳动物细胞不受某些凋亡刺激的影响(Hawkins, C. J.等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13786-13790;

15 Hawkins, C.等, (1998) *Cell Death and Differentiation* 5, 569-576; Uren, A. G. 等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,4974-4978)。通过检验证实, SfiAP 是否也能在哺乳动物细胞范围内行使凋亡抑制剂的功能。在这些实验中, 通过 Fas 或 Bax (它们代表了能触发另外的凋亡途径的原型(prototypical)凋亡刺激)的过表达在 HEK293 细胞中诱导凋亡。TNF 家族受体成员 Fas 将原

20 -caspase-8 募集至受体复合体并诱导它的活化。然后, Caspase-8 裂解并活化 caspase-3 以及其它能引起凋亡的下游 caspases。相比之下, Bax 诱导细胞色素 c 从线粒体释放。然后, 细胞色素 c (cyto c)与 Apaf-1 结合, 诱导原-caspase-9 向细胞色素 c/Apaf-1 复合体集中, 导致 caspase-9 活化。活化的 caspase-9 再裂解并活化 caspase-3 和其它下游 caspases。

25 将编码各种 IAP 的质粒与 Bax 或 Fas 共转染至 293 细胞中, 24-36 小时后测定 % 凋亡。SfiAP, CpiAP 和人的 XIAP 抑制 Bax-诱导的凋亡。相比之下, SfiAP 和 CpiAP 的 BIR 和 RING 截短突变体不能象来自其它杆状病毒株的全长 IAP (OpIAP ; AcIAP)那样, 抑制 Bax 所诱导的凋亡。与 Bax 不同, SfiAP 和 CpiAP 不能有效抑制 HEK293 细胞中 Fas-诱导的凋亡(图 2B), 而

30 XIAP 则能提供对抗 Fas 的保护作用。免疫印迹分析证实了所述多种 IAP 的产生, 排除了这些蛋白质的水平的总体差异, 作为对所得结果的一种解释。

因此, SflAP 和 CpIAP 能抑制哺乳动物凋亡途径, 但它们仅能抑制一个亚组的细胞死亡途径, 这些途径由它们的人类配对物 XIAP 抑制。

实施例 11. 重组 SflAP 和 CpIAP 体外抑制 cyto c 诱导的 caspase 活化

5 为了进一步探讨 SflAP 和 CpIAP 抑制哺乳动物细胞凋亡的机制, 使用一种无细胞系统, 在该系统中, 外源添加的活性 caspase-8 或 cyto c 诱导 caspase-3 和类似蛋白酶的活化, 其指标为 Ac-DEVD-AFC 的水解(Quan, L. T. 等, (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 10377-10379)。Caspase-8 和 cyto c 在提取物中启动的凋亡途径与由 Fas 和 Bax 在完整细胞中启动的途径相同。在用 cyto c 处理的细胞提取物中, 重组 SflAP, CpIAP 和 XIAP 完全阻断 Ac-DEVD-AFC
10 的水解。一种由 XIAP 的 BIR1 结构域组成的对照蛋白不干扰 caspase 活性, 这证实了上述结果的特异性。与此对照, 重组 SflAP 和 CpIAP 对已经用 caspase-8 处理过的细胞提取物中裂解 DEVD 的蛋白酶没有影响。

caspase-3 处理的免疫印迹分析证实了蛋白酶试验中的发现。在被 cyto c 或活性 caspase-8 活化的细胞提取物中, 约 33 kDa 的原 caspase-3 经处理产生
15 约 17-20 kDa 的大亚单位形式, 其指示活性 caspase-3 (caspase-3 的约 12 kDa 的亚单位用这种抗-caspase3 抗体无法检测)。重组 SflAP 和 CpIAP 在 cyto c-处理过但未经 caspase-8-处理的提取物中抑制对原-caspase-3 的加工, 而 XIAP 在这两种情况下都有抑制作用。综合考虑, 这些数据表明, SflAP 和 CpIAP 抑制由 cyto c 途径活化的 caspase 级联反应中位于 caspase-3 上游的一个步骤,
20 但不抑制由 caspase-8 启动的级联反应。

实施例 12. Grim 肽负调节 SflAP

有建议认为, 果蝇凋亡诱导剂如 Grim 可作为 IAP 的负调节剂起作用 (Deveraux, Q. & Reed, J. C. (1998) *Genes Dev.* 13, 239-252; Wang, S.等(1999) *Cell* 98, 453-463)。检验对应于 Grim 中 IAP-结合结构域(Grim 的前 18 个氨基酸)
25 的肽对 cyto c-刺激的细胞提取物中由 SflAP-介导的对 caspases 的抑制作用的影响。重组 SflAP 能抑制胞质提取物中由 cyto c-诱导的 DEVD 裂解性 caspases 的活化, 加入 Grim 肽则以浓度依赖性方式消除了 SflAP 的这种抑制效应, Grim 肽相对于 SflAP 5 倍过量时, 可以完全恢复 caspase 的活性。相比之下, 具有类似长度的多种对照肽不具有这种效应。这些结果支持以下
30 假设: 蝇类凋亡诱导剂 Grim 是秋粘虫(*S. frugiperda*)和杆状病毒 IAP 的抑制剂。

实施例 13. SflAP 和 CplAP 直接结合并抑制哺乳动物 caspase-9

SflAP 和 CplAP 抑制由 Bax 诱导的凋亡并阻断由 cyto c 诱导的 caspase 活化, 这一发现提示, 这些 IAP 可能抑制 caspase-9, 这是线粒体/cyto c 途径中的最终(pinnacle) caspase。为了检验这种假说, 用编码原-caspase-9 的质粒单独, 或与 SflAP 和 CplAP 一起, 转染 293T 细胞。24-36 小时后分析 caspase 活性和凋亡。SflAP 和 CplAP, 以及人的 XIAP (作为阳性对照) 都显著抑制由于 caspase-9 过表达所诱导的下游 DEVD-裂解性 caspase 的活性, 还抑制 caspase-9 诱导的凋亡。相比之下, OpIAP 和 AcIAP 不能抑制 caspase 活化或凋亡, 这表明了上述结果的特异性。免疫印迹证实, IAP-家族的所有这些蛋白以彼此相当的水平表达。与全长 SflAP 和 CplAP 不同, 这些 IAP 的仅含 BIR 结构域的片段不能抑制由于原-caspase-9 过表达所致的 DEVD-裂解性 caspases 的活化。更有甚者, SflAP 和 CplAP 的仅含 RING 结构域的片段反而增强, 而不是抑制 caspase 活化和由于原-caspase-9 过表达所诱导的凋亡。

为了直接检查 SflAP 和 CplAP 抑制 caspase 9 的可能性, 使用细菌产生的重组活性 caspase-9, 重组纯化型 SflAP 和 CplAP, 并以 Ac-LEHD-AFC 作为 caspase-9 的底物, 进行酶抑制试验。SflAP 和 CplAP 以浓度依赖方式抑制重组活性 caspase-9。SflAP 和 CplAP 相对于 caspase-9 的、能对蛋白酶活性产生约 50% 抑制的摩尔过量分别为 8 倍摩尔过量和 12 倍摩尔过量, 这与此前对 caspase 家族成员 XIAP 的抑制作用的报道结果相似(Deveraux, Q. L. 等, (1998) *EMBO J.* 17,2215-2223)。

SflAP 和 CplAP 也可以与 caspase-9 结合, 可通过实验证实这一点, 在这样的实验中, 使^[35S]-原-caspase-9 与 GST-SflAP, GST-CplAP, GST-XIAP 和 GST-XIAP-BIR1 一起温育。放射自显影显示, GST-SflAP, GST-CplAP 和 GST XIAP 与原-caspase-9 结合。相比之下, 多种 GST-融合蛋白对照, 包括 XIAP-BIR1, 不能结合 caspase-9, 由此说明上述结果的特异性。

与 caspase-9 不同, SflAP 和 CplAP 既不结合也不抑制重组纯化型 caspases-3 和-7。相比之下, 人的 XIAP 是 caspases-3 和-7 的强效体外抑制剂, 这说明 XIAP 比 SflAP 和 CplAP 抑制更多种的哺乳动物 caspases。

实施例 14. 转基因植物的产生

含有 SflAP 的转基因西红柿可通过常规技术产生。使用农杆菌 (*Agrobacterium*) 作为载体, 将外源基因导入植物。

本说明书中引用的所有出版物，专利，以及专利申请都引入作为参考，相当于具体且单独地指明将每一出版物，专利，或专利申请引入作为参考。

尽管上述发明通过举例说明和实施例进行了详细说明，以便于澄清理
5 解，但对本领域技术人员而言，根据本发明的教导，完全可以在不背离所附权利要求的精神或范围的前提下，进行改变和修饰。

序列表

AGTTTTAGTC CGAACGCCGA CGAGTGACGC ATGTTACGAG CCTACTGTAC
 TGACTIONACT CGAACGCCGA TCGATCGTGG ACCGCTGTAA ACGTCACTTC
 GTTTCGTTCG TTAGTCGCGA GTTTCGCACT CATGTTGGAG AGTTGTGTTG
 TTTGTTTATC AGTCCGTTAA CGTTTGACCA GTGAGAGTGA GAACAGTTTT
 TAAAACCTAG TCATAAACAA TCAATTTGAT GTGGTCGTGT TCCTTACCTT
 GTTGAATAC AAAAAATCT GGATTACAAA TGGATATTAC CAAAGTGGCA
 TCCAATGGCT CCTCCTCAAC ATTAACGCTA TTCAAGAGCG GATCGCTTGA
 GGCTAAAATT CGACCTCTCG CGCCACTAAT GCTGCCGACG CCAAGTTACG
 ACTCCAACGC CGGCTCTCCA TCTTTGTCTC CATCCACGCC TTGCTCTTCA
 TCTTCTTTCT CCATTGATAA AACCGACAAC CACGACACCT TCGGCTTCAG
 TGCGGACACA GTTGATATGA GAAAAGAGGA TGAACGTATG AAAACATTTG
 AAAAATGGCC CGTAAGTTTT CTATCCGGAG AGCAACTTGC TCGAAATGGA
 TTTTACTACC TCGGCCGTAG AGATGAAGCC CGTTGCGCTT TCTGTAAAGT
 GGAGATTATG AGGTGGGTGG AGGGCGATGA CCCTGCGAAG GACCATCAGC
 GTTGGGCGCC ACAGTGCCCA TTTGTGCGCA AATTGAACGG TACTGCAGCA
 GCAGACACGG GTAGTTCGGG CCAGGACGAG TGTGGTGCCC GCGCCGCTCC
 CTCCGGTACC TCTCCGCCGC GTATGGCCGG TCCCGTGCAC CCACGATATG
 CATCTGAAGC CGCACGACTA CGCAGTTTTA AAGACTGGCC ACGATGCATG
 CGACAAAAC CTGAAGAACT CGCCGAGGCT GGCTTTTTTTT ACACTGGTCA
 GGGAGACAAA ACCAAGTGTT TTTATTGCGA TGGTGGATTA AAAGATTGGG
 AGAACCATGA CGTACCCTGG GAACAACACG CAAGGTGGTT TGACCGTTGC
 GCCTACGTGC AATTGGTGAA GGGTCGAGAA TACGTTCAA AGGTGATTTT
 TGAAGCTTGT GAGGTATCCG CGTCAGAAGC GGAACGTGAT GTAGCACCCG
 CACGGACTGC CGAGCCAAGC CCGCCAGCAG AGGCGCCAGA AAACCTCAGTC
 GATGACTCAA AGTTGTGTAA AATCTGTTAT GCTGAAGAGC GTAACGTGTG
 CTTCGTGCCG TCGGCCACG TGGTGGCTTG CGCCAAGTGC GCGCTGGCGG
 CCGACAAGTG CCCCATGTGC CGCAGGACGT TTCAAATGC AGTGCGGTTA
 TATTTCTCGT GAGAAGAGCC ACCAATTTGC AGGCTCAATT CTAGTCTTAA
 GGGACGACCG GACAGAGCTG TGTGCTGAAA CCATGAGCTC GTATGTCACG
 TTTCCACAGG CGGAGAAACC TATTAAACT TATTGTTTGA TGGTTTCGAT
 AGGAACTCGC TCGCTAGTGT AGCAAAAGAC GAAATTGAAA GGTTCCCTCAG
 GAGTAAGACA GATATACTTA GTTATAGTGA ATTATAAAAT ACATAGCATA
 CATTAAGATT ATATATTGAT GACGCTTATT ACTTTAATTC ACGTTCCAAT

TTGACGTGTT ATTACAATTA TTTATTTTAC ACAGATGTAA CGAAAACFTT
GTGTGAGATG TAACATTTAC ACCGAAAAA AAAAAAAA_

SEQUENCE ID NO:1

(SfiAP 核苷酸序列, 包括 5' 和 3' 非翻译区)

ATGTGGTCGT GTTCCTTACC TTGTTGGAAT ACAA AAAAAT CTGGATTACA AATGGATATT
ACCAAAGTGG CATCCAATGG CTCCTCCTCA ACATTAACGC TATTCAAGAG CGGATCGCTT
GAGGCTAAAA TTCGACCTCT CGCGCCACTA ATGCTGCCGA CGCCAAGTTA CGACTCCAAC
GCCGGCTCTC CATCTTTGTC TCCATCCACG CCTTGCTCTT CATCTTCTTT CTCCATTGAT
AAAACCGACA ACCACGACAC CTTCGGCTTC AGTGCGGACA CAGTTGATAT GAGAAAAGAG
GATGAACGTA TGAAAACATT TGAAAAATGG CCCGTAAGTT TTCTATCCGG AGAGCAACTT
GCTCGAAATG GATTTTACTA CCTCGGCCGT AGAGATGAAG CCCGTTGCGC TTTCTGTAAA
GTGGAGATTA TGAGGTGGGT GGAGGGCGAT GACCCTGCGA AGGACCATCA GCGTTGGGCG
CCACAGTGCC CATTGTGCG CAAATTGAAC GGTACTGCAG CAGCAGACAC GGGTAGTTCG
GGCCAGGACG AGTGTGGTGC CCGCGCCGCT CCCTCCGGTA CCTCTCCGCC GCGTATGGCC
GGTCCCGTGC ACCCACGATA TGCATCTGAA GCCGCACGAC TACGCAGTTT TAAAGACTGG
CCACGATGCA TCGACAAAA ACCTGAAGAA CTCGCCGAGG CTGGCTTTTT TTACACTGGT
CAGGGAGACA AAACCAAGTG TTTTTATTGC GATGGTGGAT TAAAAGATTG GGAGAACCAT
GACGTACCCT GGAACAACA CGCAAGGTGG TTTGACCGTT GCGCCTACGT GCAATTGGTG
AAGGGTCGAG AATACGTTCA AAAGGTGATT TCTGAAGCTT GTGAGGTATC CGCGTCAGAA
GCGGAACGTG ATGTAGCACC CGCACGGACT GCCGAGCCAA GCCCGCCAGC AGAGGCGCCA
GAAAACCTCAG TCGATGACTC AAAGTTGTGT AAAATCTGTT ATGCTGAAGA GCGTAACGTG
TGCTTCGTGC CGTGCGGCCA CGTGGTGGCT TGCGCCAAGT GCGCGCTGGC GGCCGACAAG
TGCCCCATGT GCCGCAGGAC GTTTCAAAT GCAGTGCGGT TATATTTCTC GTGA

SEQUENCE ID NO:2

(SfiAP 核苷酸序列 (仅有读框))

MWSCSLPCWNTKKSGLQMDITKVASNGSSSTLTLFKSGSLEAKIRPLAPLMLPTPS
YDSNAGSPSLSPSTPCSSSSFSIDKTDNHDTFGFSADTVDMRKEDERMKTFEKWP
VSFLSGEQLARNGFYLLGRRDEARCAFCCKVEIMRWVEGDDPAKDHQRWAPQCPF
VRKLNGTAAADTGSSGQDECGARAAPSGTSPPRMAGPVHPRYASEAARLRSFKD
WPRCMRQKPEELAEAGFFYTGQGDKTKCFYCDGGLKDWENHDVPWEQHARWF
DRCAYVQLVKGREYVQKVISEACEVSASEAERDVAPARTAEPSPPAEAPENSVD
SKLCKICYAEERNVCFVPCGHVVACAKCALAADKCPMCRRTFQNAVRLYFS *

SEQUENCE IN NO:3

SfAP 氨基酸序列

专利名称(译)	凋亡抑制剂		
公开(公告)号	CN1419603A	公开(公告)日	2003-05-21
申请号	CN01807095.7	申请日	2001-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
当前申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
[标]发明人	布鲁斯D哈莫克 黄齐宏 前田进		
发明人	布鲁斯·D·哈莫克 黄齐宏 前田进		
IPC分类号	C07K14/435 C07K14/47 C12N15/12 C12N15/82 C12N5/10 C12Q1/68 G01N33/533 G01N33/68 A01H5/00		
CPC分类号	C07K14/4747 C07K14/43563 C12N2799/026 C12N15/8263		
优先权	09/502528 2000-02-10 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明主要涉及凋亡蛋白的抑制剂(IAP)，编码IAP的核酸分子，包含IAP的病毒载体、重组杆状病毒，含有IAP核酸的转基因植物，以及检测与IAP结合的化合物的方法。通常，本发明的IAP核酸与SEQ ID NO：1有85%或更高的同一性，本发明的IAP与SEQ ID NO：3有90%或更高的同一性。