[19]中华人民共和国专利局

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 94194717.3

[51]Int.Cl[6]
A01N 43/04
A01N 63/00 A61K 31/70
A01K 37/00 C07K 16/00
C07K 16/18 C12N 1/08
C12N 1/21 C12N 5/00
C12N 5/06 C12N 5/16
C12N 7/00 C12N 15/09

[43]公开日 1997 年 1 月 8 日

[11] 公开号 CN 1139871A

[22]申请日 94.11.30

[30]优先权

[32]93.11.30[33]US[31]08/160,067

[32]94.10.7 [33]US[31]08/320,157

[86]国际申请 PCT/US94/13930 94.11.30

[87]国际公布 WO95/15084 英 95.6.8

[85]进入国家阶段日期 96.6.28

[71]申请人 LXR生物技术有限公司

地址 美国加利福尼亚

[72]发明人 M.C.吉夫尔 P.J.巴尔

[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 黄革生

权利要求书 5 页 说明书 26 页 附图页数 26 页

[54]发明名称 新细胞程序死亡调节蛋白质、编码该蛋白质的 DNA 以及使用该蛋白质的方法

[57]摘要

本发明提供了一组具有细胞程序死亡调节活性的新蛋白质，其核苷酸和氨基酸残基序列及其衍生物以及其使用方法。

权 利 要 求 书

1.一种组合物，该组合物包含基本上纯化的编码 Cdn 的核苷酸序列。

2.按照权利要求 1 的组合物，其中所说的核苷酸序列是从基因组 DNA 衍生的。

3.按照权利要求 1 的组合物，其中所说的 Cdn 是 Cdn－1。

4.按照权利要求 3 的组合物，该组合物具有图 3 描述的核苷酸序列。

5.按照权利要求 1 的组合物，其中所说的 Cdn 是 Cdn－2。

6.按照权利要求 5 的组合物，该组合物具有图 5 描述的核苷酸序列。

7.一种组合物，该组合物包含编码 Cdn 的重组 DNA 载体。

8.按照权利要求 7 的组合物，其中所说的 Cdn 是 Cdn－1。

9.按照权利要求 8 的组合物，其中所说的核苷酸序列是图 3 描述的核苷酸序列。

10.按照权利要求 7 的组合物，其中所说的 Cdn 是 Cdn－2。

11.按照权利要求 10 的组合物，其中核苷酸序列是图 5 描述的核苷酸序列。

12.按照权利要求 7 的重组 DNA 载体，其中编码 Cdn 的序列的表达在诱导型启动子控制下。

13.一种组合物，该组合物包含用编码 Cdn 的重组 DNA 载体转染的细胞。

14. 按照权利要求 13 的组合物，其中所说的 Cdn 是 Cdn－1。

15. 按照权利要求 14 的组合物，其中所说的核苷酸序列是图 3 描述的核苷酸序列。

16. 按照权利要求 13 的组合物，其中所说的 Cdn 是 Cdn－2。

17. 按照权利要求 16 的组合物，其中所说的核苷酸序列是图 5 描述的核苷酸序列。

18. 一种转基因动物，该转基因动物包含编码 Cdn 的重组 DNA 载体。

19. 按照权利要求 18 的转基因动物，其中所说的 Cdn 是 Cdn－1。

20. 按照权利要求 19 的转基因动物，其中所说的 Cdn 核苷酸序列是图 3 描述的核苷酸序列。

21. 按照权利要求 18 的转基因动物，其中所说的 Cdn 是 Cdn－2。

22. 按照权利要求 21 的转基因动物，其中所说的 Cdn 核苷酸序列是图 5 描述的核苷酸序列。

23. 一种组合物，该组合物包含基本上纯化的 Cdn 蛋白质。

24. 按照权利要求 23 的组合物，其中所说的蛋白质是 Cdn－1。

25. 按照权利要求 24 的组合物，其中所说的核苷酸序列是图 3 描述的核苷酸序列。

26. 按照权利要求 23 的组合物，其中所说的 Cdn 是 Cdn－2。

27. 按照权利要求 26 的组合物，其中所说的核苷酸序列是图 5 描述的核苷酸序列。

28. 按照权利要求 23 的组合物，其中所说的蛋白质由重组 DNA

表达。

29.按照权利要求23的组合物，其中所说的蛋白质是天然蛋白质。

30.一种组合物，该组合物包含按照权利要求23的蛋白质和药学上可接受的缓冲液。

31.按照权利要求30的组合物，其中所说的蛋白质以治疗有效量存在。

32.一种组合物，该组合物包含识别Cdn，但基本上不与Bcl族的其它成员反应的单克隆或多克隆抗体。

33.一种在生物样品中检测Cdn蛋白质存在的方法，该方法包括以下步骤：

a)获得细胞样品；

b)溶解细胞或使细胞对抗体透化；

c)向细胞样品中添加抗－Cdns－特异性抗体；

d)在使抗体与Cdn复合的条件下保存细胞样品；和

e)检测形成的抗体－Cdn复合物。

34.按照权利要求33的方法，其中所说的Cdn是Cdn－1。

35.按照权利要求34的方法，其中所说的核苷酸序列是图3描述的核苷酸序列。

36.按照权利要求33的方法，其中所说的Cdn是Cdn－2。

37.按照权利要求36的方法，其中所说的核苷酸序列是图5描述的核苷酸序列。

38.按照权利要求32的方法，其中所说的细胞样品包含T细胞。

39. 一种在生物样品中检测Cdn基因表达的方法，该方法包括识别编码所述Cdn的RNA存在的步骤。

40. 按照权利要求39的方法，其中识别Cdn－1或Cdn－2 mRNA的方法是Northern印迹法。

41. 一种识别Cdn mRNA的方法，该方法包括以下步骤：

a)获得细胞样品；

b)从细胞样品获得RNA；

c)用相应于Cdn特定区的引物在RNA上进行聚合酶链反应；和

d)检测聚合酶链反应产物的存在。

42. 一种调节诱导细胞程序死亡性细胞死亡的方法，该方法包括调节Cdn内源水平。

43. 按照权利要求40的方法，其中所说的Cdn是Cdn－1。

44. 按照权利要求43的方法，其中所说的核苷酸序列是图3描述的核苷酸序列。

45. 按照权利要求42的方法，其中所说的Cdn是Cdn－2。

46. 按照权利要求45的方法，其中所说的核苷酸序列是图5描述的核苷酸序列。

47. 按照权利要求41的方法，其中Cdn经调节内源Cdn基因的表达而增加。

48. 按照权利要求46的方法，其中表达的Cdn基因被重组基因编码。

49. 按照权利要求48的方法，其中所述基因的表达在诱导型启动子控制下。

50. 按照权利要求49的方法，其中所说的基因是体外转染的，该

方法还包括将转染细胞重新引入到动物中。

51.按照权利要求50的方法，其中所说的细胞是T淋巴细胞。

52.按照权利要求49的方法，其中所说的重组基因被转染进细胞体内。

53.一种在需要处理细胞程序死亡的病人中处理细胞程序死亡的方法，该方法包括给病人使用治疗有效量的Cdn。

54.按照权利要求53的方法，其中所说的Cdn是Cdn－1。

55.按照权利要求54的方法，其中所说的核苷酸序列是图3描述的核苷酸序列。

56.按照权利要求53的方法，其中所说的Cdn是Cdn－2。

57.按照权利要求56的方法，其中所说的核苷酸序列是图5描述的核苷酸序列。

58.按照权利要求53的方法，其中对需要超氧化物歧化酶的任何病症施用Cdn。

59.一种检测Cdns和特异性结合到Cdns上的蛋白质之间的相互作用的方法，该方法包括以下步骤：

a)使纯化的Cdn与含蛋白质的胞溶物接触，所述蛋白质在允许蛋白质和Cdn结合的条件下可以结合到Cdn上；

b)分离Cdn；

c)使分离的Cdn在允许结合配偶体和Cdn结合的条件下与对蛋白质特异的结合配偶体接触；和

d)测定结合到所述蛋白质上的结合配偶体的量。

60.按照权利要求59的方法，其中的胞溶物是酵母溶解物。

61.按照权利要求59的方法，其中的结合配偶体是抗体。

说　　明　　书

新细胞程序死亡调节蛋白质、编码该蛋白质的DNA以及使用该蛋白质的方法

本申请是卷号为08/320,157的美国专利申请的部分继续申请，后者又是1993年11月30日提交的卷号为08/160,067的美国专利申请的部分继续申请。

发明领域

本发明涉及具有细胞程序死亡调节活性的新蛋白质、编码该蛋白质的重组DNA、含有该蛋白质的组合物以及使用该蛋白质的方法。

发明背景

细胞程序死亡是引起个体细胞死亡的正常生理过程。这一编程性细胞死亡过程涉及各种正常现象和致病生物学现象，并且可以被大量非相关的刺激诱导。在衰老过程中也出现细胞程序死亡生物学调节的变化，这些变化引起许多与衰老有关的病态和疾病的发生。有关细胞程序死亡的最近的研究已表明，导致细胞死亡的普通代谢途径可以被许多信号(包括激素、血清生长因子丧失、化疗剂、电离辐射和人免疫缺陷病毒(HIV)感染)引发(Wyllie (1980), Nature 284:555-556; Kanter et al. (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 118:392-399; Duke and Cohen (1986)

Lymphokine Res. 5:289-299; Tomei et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 155:324-331; Kruman et al. (1991) J. Cell. Physiol. 148:267-273; Ameisen and Capron (1991) Immunology Today 12:102; and Sheppard and Ascher (1992) J. AIDS 5:143)。因此，在很多情况下调节细胞程序死亡生物学控制的药剂具有治疗实用性。

细胞程序死亡性细胞死亡以细胞萎缩、染色质凝聚、胞质水泡状生长、膜通透性增加和核小体内 DNA 断裂为特征(kerr et al.(1992) FASEB J. 6:2450；和 Cohen and Duke(1992) Ann. Rev. Immunol. 10:267)。形成的泡(从细胞程序死亡的细胞表面脱落的小的膜包裹的球状物)可以继续产生超氧化物自由基(损害周围细胞组织)，并可以引起痰症。

bcl－2 在导致其异常过度表达的滤泡淋巴瘤中的染色体转运位点 t(14:18)上被发现(Tsujimoto et al, (1984) Science 226:1097－1099；和 Cleary et al.(1986)Cell 47:19－28)。bel－2 的正常功能是阻止细胞程序死亡。人们认为bcl－2 在 B 细胞中表达失调导致增殖性 B 细胞数量的增加(可能是淋巴瘤形成的关键因素)(McDonnell and Korsmeyer (1991) Nature 349:254－256；综述可见于 Edgington (1993) Bio/Tech. 11:787－792)。bcl－2 也能阻断 γ 辐射诱导的细胞死亡(Sentman et al.(1991) Cell 67 879－888 和(Strasser(1991) Cell 67:889－899)。现在已知bcl－2 抑制大多数类型的细胞程序死亡性细胞死亡，并且bcl－2 被认为是通过调节抗氧化途径(在自由基产生位点)和 C_a^{2+} 流动(经过内质网)起作用(Lan et al, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 91:6569－6573；Hockenbery et al.(1993) Cell 75:

241－251)

尽管细胞程序死亡是一种正常的细胞现象，但它也能被病理状态和多种损伤诱导。细胞程序死亡在许多种疾病中涉及到，这些疾病包括但不限于心血管病、癌消退、免疫调节、病毒病、贫血、神经性紊乱、胃肠病(包括但不限于腹泻和痢疾)、糖尿病、脱发、器官移植排斥、前列腺肥大、肥胖、眼障碍、紧张和衰老。

bcl－2是其中某些已被克隆和测序的一族蛋白质(Williams and Smith(1993) Cell 74:777－779)。本文前后引用的参考文献在此一并在本文中参考。

发明概述

提供了编码新Bcl－2同系物(称为Cdn－1、Cdn－2和Cnd－3和其衍生物)的基本上纯化的DNA、以及表达Cdn－1和Cdn－2核苷酸序列的重组细胞和转基因动物。也提供了基本上纯化的Cdn－1和Cdn－2蛋白质以及它们的组合物。也提供了利用所述的核苷酸序列和蛋白质的诊断和治疗方法。也提供了筛选刺激或调节Cdn－1和Cdn－2表达和蛋白质活性和相互作用的药剂的方法。还提供了筛选与Cdns相互作用的蛋白质的方法。

附图简要说明

图1描述了用于分离Cnd－1探针的Bcl－2族PCR引物。

图2描述了由实施例1的方法获得的Cdn－1克隆。

图3描述了Cdn－1 cDNA的核苷酸序列和编码的Cdn－1蛋白质的氨基酸序列。

图 4 描述了用对Bcl－2 和Cdn－1 两者特异性的探针进行的多种组织的 Northern 印迹分析的结果。

图 5 表示了Cdn－2 基因序列和侧翼序列以及相应的推定的 Cdn－2 蛋白质的氨基酸序列。

图 6 表示了 Cdn－1、Cdn－2 和已知的 Bcl－2 族成员的 N－末端氨基酸序列的比较。

图 7 表示了Cdn－3 基因的核苷酸序列和推定的 Cdn－3 蛋白质的氨基酸序列。

图 8 表示了在 0.1%FBS 中Cdn－1 和其某些衍生物在 WI－L2 转化体的血清丧失诱导细胞程序死亡中的抗细胞程序死亡作用。

图 9(WI－L2 转化体对抗－Fas－Induced Apoptosis(50ng/ml 抗 －FAS)的反应)表示了Cdn－1 和其某些衍生物在 WI－L2 细胞的 FAS－诱导细胞程序死亡中的抗细胞程序死亡作用。

图 10 表示在 FL5.12 细胞中由Cdn－1 和Cdn－2 产生的细胞程序死亡调节作用。

图 11 描述了Cdn－1 衍生物蛋白质△1、△2 和△3。用箭头表示出了 N—末端残基。衍生物蛋白质的剩余部分与全长 Cdn－1 相同。

发明详述

本发明包括基本上纯化的编码新 Bcl－2 类似物(Cdn－1 和 Cdn2)的核苷酸序列、该序列编码的蛋白质、包含Cdn－1 和Cdn－2 核苷酸序列或蛋白质的组合物以及它们的使用方法。要注意，在共同未决美国专利申请 08/160,067 号中，Cdn－1 被称为cdi－1；在共

同未决美国专利申请08/320,157中,Cdn被表示为cdn,Cdn被表示为CDN;尽管名称已改变,但核苷酸和氨基酸序列保持相同。本发明还包括携带克隆Cdn－1或Cdn－2基因的重组细胞和转基因动物。图3表示出了Cdn－1的核苷酸序列和推断的由其编码的氨基酸残基序列;图5中表示出了Cdn－2的这些序列。现在已经发现,由Cdn基因编码的蛋白质能够调节细胞程序死亡。在EB病毒(EBV)转化体类淋巴母细胞系中,Cdn－1表现出使Fas－介导的细胞程序死亡降低。在小鼠祖代B细胞系FL5.12中,Cdn－2和Cdn－1的衍生物的表达降纸IL－3诱导的细胞程序死亡,而Cdn－1的表达稍微增加细胞程序死亡。因此,依据细胞类型、被表达的Cdn的衍生物或类型、以及诱导细胞程序死亡的方式,可以通过控制Cdns的表达和Cdns的浓度以高度特异生的方式调节细胞程序死亡。

这里使用的"Cdns"或"Cdn"指本文所述的核酸分子(核苷酸序列)(Cdn－1、Cdn－2、Cdn－3和其衍生物),"Cdns"或"Cdn"指由上述分子编码的蛋白质(Cdn－1、Cdn－2、Cdn－3和其衍生物)。本发明包含Cdn－1和Cdn－2核苷酸序列。所述的核苷酸序列包括但不限于Cdn－1 cDNA、基因组衍生的DNA和合成或半合成的核苷酸序列(例如编码的和与编码区互补的DNA和RNA)。所述核苷酸序列可以与编码至少一种cdns片段的mRNA和能够结合到编码所述Cdns的DNA或mRNA上的其它核苷酸序列互补。这些互补核苷酸序列包括但不限于能够形成三股螺旋和反义核苷酸序列的核苷酸序列。所述互补核苷酸序列可以被本文描述的一种载体内源性地表达,或者也可以用本领域公知的寡核苷酸治疗法(Reed et al.(1990) Cancer Res. 50:6565－6570)外源性地添加。图3表示了标示出限

制性内切核酸酶位点位置的Cdn－1 cDNA的核苷酸序列。如本文实施例1所述，已通过Northern印迹分析在各种人器官和组织中检测Cdn－1 mRNA。这些器官包括肝、心、骨胳肌、肺、肾和胰，如图4所示。

类似地，Cdn－2 cDNA、基因组DNA和合成或半合成核苷酸序列是本发明另外的实施方案。图5中给出了Cdn－2基因的核苷酸序列，同时也给出了推断的Cdn－2蛋白质的氨基酸序列和限制性内切核酸酶识别位点的位置。

本文给出的实施例说明，Cdn－1在人染色体6上，Cdn－2在人染色体20上。也存在在人染色体11上的Cdn－3族成员。荧光原位杂交(FISH)表明Cdn－1的大概位置在6p21－23。可能Cdn－2和Cdn－3是假基因。尽管它们可能不被内源性表达，但在合适的启动子序列作用下，它们能被重组载体表达。因此，本发明包含了Cdn－2和Cdn－3两者的核苷酸序列，以及它们的重组构建体和由它们编码的蛋白质。

基因和蛋白质的衍生物包括保持细胞程序死亡调节活性的蛋白质或编码所述蛋白质的核苷酸序列的任何部分。图11描述了已表现出保持细胞程序死亡调节活性的Cdn－1的三种这样的衍生物。本发明包括了衍生物Cdn1－△1、Cdn1－△2和Cdn1－△3和由它们编码的蛋白质。

本发明包括对Cdn DNA序列的修饰(例如缺失、取代和添加)，特别是在基因组DNA的非编码区进行的这些修饰。这些改变对促进克隆和改善基因表达是有用的。

本发明还包括各种取代的核苷酸序列。可在编码区内进行取

代，该取代不改变编码的氨基酸残基，或者形成保守取代的氨基酸残基。不改变编码氨基酸残基的核苷酸取代对在不同系统中使基因表达最佳化是有用的。合适的取代对本领域技术人员是公知的，例如，为了在特定的表达系统中反映较好的密码的使用而进行合适的取代。

本发明还包括可以增强、降低或不明显影响 Cdns 性质的Cdns功能性等价变体的衍生物。例如，不改变编码的氨基酸序列的 DNA 序列中的变化和形成氨基酸残基保守取代的这种变化、一个或几个氨基酸缺失或添加、和用氨基酸类似物进行的氨基酸残基的取代产生不明显影响其性质的变体和衍生物。

可被相互保守取代的氨基酸残基包括但不限于：甘氨酸/丙氨酸；缬氨酸/异亮氨酸/亮氨酸，天冬酰胺/谷氨酰胺；天冬氨酸/谷氨酸；丝氨酸/蛋氨酸；赖氨酸/精氨酸；和苯丙氨酸/酪氨酸。本发明包含任何不明显影响 Cdns 性质的保守氨基酸取代。

本发明还包括 Cdns 突变体，当被表达时，该突变体影响内源性表达的 Cdns 的活性。这种突变体可用本领域公知的任何方法制备，并且通过其影响天然 Cdns 活性的能力进行活性筛选。

对本发明的实施有用的核酸操作技术是本领域公知的，在许多参考文献中都有描述，这些文献包括但不限于Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd ed., Vol1 - 3, eds. Sambrooketal. Cold Spring Harbor laboratory press(1989)；和Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., Green Publishing and Wiley - Interscience: New York (1987)和定期修订本。

本发明还包括其中已克隆Cdn 核苷酸序列的各种 DNA 载体。

合适的载体在本领域是公知的，它们包括但不限于那些用于细菌、哺乳动物、酯母和昆虫表达系统的载体。特异性载体是本领域公知的，不需要在此详细描述。

载体也可以提供表达Cdn核苷酸序列的诱导型启动子。诱导型启动子是那些基本上不允许基因的组成型表达或者说仅在某些条件下允许表达的启动子。这些启动子可以被许多刺激诱导，所述刺激包括但不限于含有载体的细胞与配体，金属离子、其它化学品接触和改变温度。所述启动子也可以是细胞特异性的，即仅在特定的细胞类型且通常仅在特定的时间期限是可诱导的。所述启动子还可以是细胞周期特异性的，即仅在细胞周期的特定阶段被诱导或是可诱导的。所述启动子还可以既是细胞类型特异性的又是细胞周期特异性的。任何本领域公知的诱导型或非诱导型启动子均适用于本发明。所使用的启动子最好是诱导型启动子。

本发明还包括各种用载体转染的表达系统。合适的表达系统包括但不限于细菌、哺乳动物、酵母和昆虫。特定的表达系统和其使用是本领域公知的，在此不作详细描述。

本发明包括用Cdn核苷酸序列进行的体外转染。其中用含有Cdn核苷酸序列的载体转染从包括人在内的动物移取的细胞，并再引入到动物中。

合适的转染细胞包括单个细胞或包含在整个组织内的细胞。此外，体外转染可以包括得自动物的细胞(而而细胞最后要引入其中的动物或人受试者)的转染。这种移植包括但不限于同种异体移植、异种移植和胎组织移植。此外，可以使用体内转染，例如，经各适载体的肺部施用。

基本上可以用这一方式处理任何细胞或组织类型。合适的细胞包括但不限于心肌细胞和淋巴细胞。例如，用重组 DNA 转染移取的淋巴细胞，并重新引入到 HIV－阳性病人中，可以增加重新引入的 T 细胞的半寿期。

作为一个例子，在用上述方法处理 HIV－感染的病人中，从病人移除白血细胞，选来产生 CD^{4+} 细胞。然后，用含有Cdn 核式酸的载体转染 CD^{4+} 细胞，并重新引入到病人中。另一种方法是，可以在细胞特异性启动子的控制下，用具有至少一种Cdn 核苷酸的重组载体转染未选择的淋巴细胞，以便仅 CD^{4+} 细胞表达所述的核苷酸。

此外，本发明包括用载体体内转染的细胞。体内转染的合适方法是本领域公知的，这些方法包括但不限于 Zhu et al(1993) Science 261:209－211 所述的方法。体内转染作为对患动脉粥样硬化病人的一个预防性治疗方法可能是特别有用的。Cdn 水平的调节可以用来预防引起大脑和心肌梗塞形成的细胞程序死亡相关的再输注(reperfusion)损坏。在这些具有中风和心脏病发作的很大的危险性的病人中，与动脉阻塞相关的细胞程序死亡和再输注损坏可被阻止或至少被减轻。

由于产生肉眼可见的坏死区的栓子、血栓或压力，梗塞由动脉或静脉供血的突然不足引起。心、脑、脾、肾、肠、肺和睾丸很可能受影响。细胞程序死亡发生在因所述区的血再输注发生的梗塞周围的组织上。因此，调节 Cdn 水平会有效降低由心脏病发作和中风引起的损害严重程度，调节 Cdn 水平是经体内转染或反义治疗，以内说产生方式由生物修饰剂诱导的变化实现的。

本发明也包括含有重组 DNA 载体的转基因动物，所述载体包

含核苷酸序列。制备转基因动物的方法是本领域公知的，不需在此详细描述。为了回顾用于制备转基因动物的方法，可参见例如 PCT 出版物 WO93/04169。这种动物最好在细胞特异性（尤其是细胞周期特异性）启动子控制下表达重组 Cdns。

在另一实施方案中，诊断方法被提供来检测蛋白质水平上或 mRNA 水平上的 Cdns 表达。任何特异性识别 Cdns 的抗体均适用于 Cdn 诊断中。有患有与不适当的细胞程序死亡相关的疾病的病人的组织中很可能发现异常水平的 Cdns。因此，诊断方法对检测和监测与这种细胞程序死亡缺陷相关的生物学状态是有用的。检测方法在监测 Cdn－相关治疗是否成功上也是有用的。

由重组 DNA 表达的或从生物说（例如组织）获得的 Cdns 的纯化或分离可用本领域公知的任何方法完成。蛋白质纯化方法是本领域公知的。一般来说，基本上纯化的蛋白质是无其它沾污细胞的物质（特别是蛋白质）的那些蛋白质。纯化的 Cdns 的纯度优选地为大于 80%，最优选地为大于 95%。为了以下所述的临床用途时，Cdns 最好是高度纯化的，纯度至少约 99%，且不含有热原质和其它污染物。

合适的蛋白质纯化方法是本领域公知的，这些方法包括但不限于亲合层析、免疫亲和层折，大小排阻层折、HPLC 和 FPLC。不引起蛋白质实质上降解的任何纯化方案均适用于本发明。

本发明也包括分别具有图 3 和 5 描述的氨基酸残基序列的基本上纯化的 Cdns。本发明包含 Cdns 的功能性等价变体（不明显影响 Cdns 的性质）和保持相同的总体氨基酸序列但具有增强的或降低的活性的变体。例如，氨基酸残基的保守取代、一个或几个氨基酸缺失

或添加，由氨基酸类似物取代氨基酸残基均在本发明的范围内。本发明包括不明显影响Cdns性质的任何保守氨基酸取代。

用Cdns或最好用包含Cdn区的肽为抗元产生合适的抗体，所述区缺乏与其它Bcl－2族基因产物的基本的同源性。用抗体检测蛋白质和用蛋白质或合成多肽产生抗体的方法是本领域公知的，在此不作详述。

也可以通过测定Cdn mRNA的水平来监测Cdn蛋白质的表达。检测特定mRNA种类的任何方法均适用于这一方法。用聚合酶链反应(PCR)容易完成这一方法。选择来进行PCR的引物最好相应于Cdn基因区，所述基因区缺乏与Bcl基因族其它成员的基本的同源性。另外，经采用对Cdns特异性的探针，Northern印迹也可用于检测Cdn mRNA。采用PCR和Northern印迹的方法是本领域公知的，在此不作详述。

处理Cdns的方法也包括通过提高或降低mRNA或蛋白质的水平调节Cdns的细胞表达。调节Cdn细胞表达的合适方法包括但不限于用生物修饰剂增加内源表达；用含有Cdn核苷酸的载体转染细胞以便Cdn基因被过度表达或者反义核苷酸被表达；表达干扰内源Cdn与其它蛋白质(例如Bcl－2族的其它成员)相互作用的突变型Cdns。细胞转染已在以上讨论过，并且是本领域公知的，调节Cdn内源水平的合适标志包括但不限于恶性肿瘤和心脏特异性表达。心脏特异性表达特别适用于指示包括但不限于易患心脏病并事先经心脏中毒性治疗(包括但不限于化疗，例如阿霉素化疗)以获得心脏保护的病人。

可以通过将细胞露置于生物修饰剂下来完成调节Cdns的内源

表达。所述修饰剂通过调节Cdns表达或通过调节Cdn mRNA降解直接或间接改变Cdns水平。合适的生物修饰剂包括但不限于分子和其它细胞。合适的分子包括但不限于药物、细胞因子、小分子、激素、白介素的组合体、凝集素和其它刺激剂(例如PMA、LPS)、双特异性抗体和修饰细胞功能或蛋白质表达的其它试剂。优选地,合适的生物修饰剂是在HT－29细胞中增加Cdn表达水平的γIFN。而且,生物修饰剂包括Cdn核苷酸(它修饰内源Cdn的表达)和突变型Cdns(它干扰内源Cdns的活性)。将细胞露置于生理学有效浓度的生物修饰剂中,相对于不露置于生物修饰剂中的对照测定cdns的表达。相对于对照来说改变Cdns表达的那些生物修饰剂选来进行进一步的研究。

降低Cdns内源水平的方法包括但不限于反义核苷酸治疗、将有义核苷酸传送到反义构建体上和用生物修饰剂使表达下调。
反义治疗是本领域公知的,其应用对本领域技术人员而言是显而易见的。

通过将细胞露置于生物修饰剂下来筛选治疗有效的生物修饰剂。所述修饰剂可通过改变Cdn mRNA或Cdns的表达或改变它们的半寿期直接或间接地调节Cdns的水平。该生物修饰剂也可以干扰Cdn－1与其它Bcl－2族成员和其它基因产物(例如蛋白酶)两者的相互作用。合适的生物修饰剂包括但不限于分子和其它细胞。合适的分子包括但不限于药物、细胞因子、小分子、激素、白介素的组合、凝集素和其它刺激剂(例如PMA、LPS)、双特异性抗体、Cdn核苷酸、Cdn突变体和修饰细胞功能或蛋白质表达的其它试剂。将细胞在已知使至少一种Cdn(最好是Cdn－1)表达的条件下培养,露置

于生理学有效浓度的这类生物修饰剂F，相对于未露置于生物修饰剂下的对照测定Cdns的表达。相对于对照来说改变Cdns表达的那些生物修饰剂选来进行进一步的研究。也监测细胞的生存力，以确保改变的cdn表达不是由于细胞死亡引起的。

在测定生物修饰剂调节（增强或降低）Cdn表达的能力中，可以检测内源表达水平或者可以检测在Cdn－特异性启动子序列控制下的重组融合蛋白的水平。所述融合蛋白由报道基因编码。

报道基因在本领域是公知的，它包括但不限于氯霉素乙酰转移酶（CAT）和β－半乳糖苷酶。Cdn－1和Cdn－2的表达可以按以上所述通过蛋白质或mRNA水平来监测。报道基因的表达可以通过酶促试验或基于抗体的试验（类似ELISAs和RIAs）来监测，这些也是本领域公知的。潜在的药剂可以是本领域已知的任何治疗剂或化学品，或者是来自天然源（例如真菌培养液和植物提取物）的任何未确定特征的化合物。合适的药剂最好是那些缺乏基本细胞毒性和致癌力的药剂。

调节Cdns内源水平的合适病症是其中涉及Cdn－介导的细胞程序死亡的任何病症。这些病症包括但不限于各种恶性肿瘤和导致细胞生长失控的其它紊乱（例如湿疹）或正常编程性细胞死亡缺陷（例如恶性肿瘤，它包括并不限于B细胞淋巴瘤）。

本发明也包括用生物修饰剂调节Cdns表达的有关病人治疗的治疗方法和组合物。有效浓度和用药方案可以经验性地推断出，这种推断在本领域技术人员的知识范围内，它取决于，例如，病人的年龄、体重和性别以及疾病的类型和严重程度。另一种方法是，病人可以直接用天然或重组Cdns处理。所述Cdns应是基本上纯的且不含

热原。为了保证正确的糖基化，用哺乳动物细胞系产生重组 Cdns 比较好。也可以用昆虫细胞系产生 Cdns。

就治疗组合物而言，将治疗有效量的基本上纯的 Cdn 或调节其表达或活性的生物修饰剂或寡核苷酸悬浮到生理学可接受的缓冲溶液（包括但不限于盐水和磷酸盐缓冲的盐水（PBS））中，并给病人用药。较好的用药方式是静脉内给药。其它的用药方法包括但不限于皮下、腹膜内，胃肠给药和直接对特定器官（例如为治疗与心肌梗塞相关的细胞死亡，对心脏内）给药。

合适的缓冲溶液和用药方法是本领域公知的。Cdn 和其生物修饰剂的有效浓度需要经验性地确定，它取决于疾病的类型和严重程度，病程和病人的健康状态。这种确定在本领域技术人员的知识范围内。

人们认为Bcl－2 在抗氧化途径中起作用（Veis et al.（1993）Cell 75:229－240）。因此，涉及Cdns 的治疗法适用于其中涉及超氧化物的病态。Cdn 表达调节剂的使用导致增加的 Cdns 细胞间浓度，这被认为提供了直接抑制可以由与细胞程序死亡相关的泡产生的超氧化物积累。因此，所述治疗方法包括但不限于抑制超氧化物介导的细胞损伤。

Cdns 或其生物修饰剂治疗用途的合适病症是涉及游离自由基介导的细胞死亡的那些，它包括但不限于以前被认为可用超氧化物歧化酶治疗的病态。这类病症包括但不限于 HIV 感染、自体免疫病、心肌病、神经元疾病、肝炎和其它肝脏疾病、骨质疏松症和休克综合症（包括但不限于败血症）。

克隆Cdn DNA 与得自脑各区的信使 mRNA 杂交表明Cdn－1

在所研究的各区的高水平表达。因此，神经疾病是Cdns表现出治疗用途的另一领域。

本发明还包括试验Cdns与特异性结合到Cdns上的蛋白质之间相互作用的方法。该试验是使纯化的Cdns与含蛋白质的细胞溶解物接触，并试验所述蛋白质的存在，其中的细胞溶解物在足以使蛋白质结合的条件下可以结合到Cnds上。

典型的试验步骤涉及将蛋白质与特异生结合的配偶体(例如可被直接或间接标记的抗体)接触。合适的试验包括ELISA(它采用直接针对蛋白质的抗体、体外翻译的Cdn和含有蛋白质的细胞溶解物)。酵母遗传系统(例如Matchmaker (Clontech))也适用于所述试验中。

提供下列实施例用于说明但不用于限制本发明。除非有别的说明，所有克隆技术均基本上按Sambrook等(1989)描述的技术，所有试剂均按制造者的说明使用。

实施例1

Cdn－1 cDNA的识别和克隆

6个已知的Bcl－2族成员的氨基酸序列比较(图6)揭示出具有很大的序列一致性的两个区，称为氨基酸144－150和191－199。在识别新Bcl－2族成员的尝试中，设计基于这些区中的序列的简并的PCR引物(图1)，用人心脏cDNA和人β类淋巴母细胞系(WI－L2)cDNA进行PCR。采用Hot Start/Ampliwax技术(Perkin Elmer Cetus)进行PCR。PCR引物和模板cDNA的最终浓度分别为4μM和0.1－0.2ng/ml。cDNA合成的条件与以下描述的用于cDNA文

库的第一条 cDNA 链合成的条件相同。除前 10 个循环期间的退火和延伸温度为 36℃ 外，按 Kiefer et al.（1991）Biochem. Biophys. Res. Commun. 176：219－225 描述的方法在 Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler 中进行 PCR。PCR 后，将样品在地 37℃ 下用 5 单位 DNA 聚合酶 I 克列诺片段处理 30 分钟，然后轻 7% 聚丙烯酰胺、1×TBE(Tris/硼酸盐/EDTA)胶上的电泳分级分离。从凝胶上切下在 170－210 碱基对间迁移的 DNA，用在 10mM Tris－Hcl (PH7.5)、1mMEDTA(TE)中轻轻振动被动洗脱 16 小时，经 Elutip－D 柱(Schleicher and Schuell)上的通道纯化，连接到 pCR－Script 载体(Stratagene)上并且纯化。将该 cDNA 亚克隆进 pBlsc 并测序。心脏 cDNA 也编码Cdn－1。

图 3 示出了 W7 DNA 序列以及推断的氨基酸残基序列。也比较了推断的 Cdn－1 氨基酸序列与其它 Bcl－2 族成员的最大序列一致性，并在图 6 中表示出。可以看出，Cdn－1 和其它族成员间氨基酸 100 到 200 有很大的序列一致性。在这一中心区之外，序列保守明显降低。与 Bcl－2 一样，Cdn－1 显示出是一种细胞内蛋白质，其中不含有疏水信号肽或 N－连糖基化位点。Cdn－1 确实含有疏水 C－末端(从除 LMW5－HL 外的所有 Bcl－2 族成员也观察到)，表明其抗细胞程序死亡活性位点与 Bcl－2 的一样，位于结合细胞器的膜(例如线粒体膜、内质网膜或核膜)上(Hockenbery et al.(1990)；Chen－Levy et al.(1989) Mol. Cell. Biol. 9. 701－710；Jacobsen et al.(1993) Nature 361：365－369；和 Monighan et al.(1992) J. Histochem. Cytochem. 40：1819－1825)。

实施例 2

cDNA 克隆的 Northern 印迹分析

按照 Lehrach et al. (1977) Biochem. 16: 4743 - 4651 和 Thomas (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201 - 5205 中描述的方法进行 Northern 印迹分析。此外,从 Clontech 购得人多种组织 Northern 印迹。用 Feinberg and Vogelstein (1984) Anal. Biochem. 137:226 - 267 描述的随机引导法标记Bcl - 2 和Cdn - 1 cDNA 编码区。按 Kiefer 等 (1991)描述的方法进行杂交和洗涤。具体地说,将 Bcl - 2 和Cdn - 1 克隆的克列诺标记的片段以每个探针 1×10^6 cpm/ml 的终浓度杂交到多种人组织 Northern 印迹(Clontech 7760 - 1)上。在高度严格的条件下洗涤印迹。

图 4 给出的结果表明,Cdn - 1 在所有受试器官(心、脑、胎盘、肺、肝、骨胳肌、肾和胰)中被表达,而Bcl - 2 而不被表达或在心、脑、肺和肝中被低水平地表达。因此Cdn - 1 表现出被通过人器官表达比Bcl - 2 更广泛,在调节这些组织中的细胞程序死亡中可能更重要。

实施例 3

重组 Cdn - 1 的表达

为了在杆状病毒系统中表达重组 Cdn - 1,按实施例 1 描述的 PCR 方法,采用来源于含有促进克隆的限制位点的基因的 3'和 5'侧翼区的引物,将实施例 1 中产生的Cdn - 1 cDNA 用于产生新的 Cdn - 1 载体。用测序试剂盒(USB, Sequenase version 2.0)和内引物经双脱氧终子法(Sanger et al., 1977)对该质检测序。这是为了证实无 PCR 引起的突变。

经所述质抗的重叠序列与 AcNPV 野生型杆状病毒间的体内同说重组用一个克隆产生重组病毒。在昆虫Spodoptera frugiperda 克隆 9(SF9)细胞中 48 小时后转染后，收集重组病毒，用 PCR 识别并进一步纯化。进行重组杆状病毒的选择、筛选和增殖的标准过程(Invitrogen)。将在杆状病毒系统中产生的蛋白质在十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺胶电泳(SDS－PAGE)上的分子质量与按照氨基酸序列推定的 Cdn－1 分子质量比较。

此外，可以通过任何本领域公知的方法在酵母细胞内表达系统中优先表达类似的克隆，所述方法包括 Barr et al. (1992) Transgenesis ed. JAH Murray, (Wiley and Sons) pp. 55－79 中描述的方法。

实施例 4

Cdn－1 在哺乳动物系统中的表达

从实施例 1 产生的质粒切下Cdn－1 编码序列，并在匹配限制酶位点引入到质粒 pCEP7、pREP7 和 pcDNA3(Invitrogen)。通过用 XbaI/Asp718 除去 pREP7 的 RSV3′－LTR 和从 pCEP4(Invitrogen)取代 CMV 启动子产生 pCEP 7。将 25mg 各种含Cdn－1 的质粒电穿孔进 B 淋巴母细胞系 WI－L2，选择表达Cdn－1 的稳定的潮霉素抗性转化体或 G418 抗性转化体(pcDNA3 构建体，图 8)。

也可以将Cdns 编码区连接进能稳定整合进其它细胞类型(包括但不限于心肌细胞、神经细胞系(例如 GTI－7)和 TNF 敏感细胞(例如人结肠腺癌细胞系 HT297)的表达载体中，以提供监测Cdn－1 调节细胞程序死亡的试验系统。

实施例 5

Cdn－1 和其衍生物在野生型 β 类淋巴母细胞系 WI－L2－729HF2 和表达过量 Cdn－1 的转化细胞中的抗细胞程序死亡的作用

将用按实施例 4 所述的编码 Cdn－1 的载体转化的 2x105 WI－L2 和 WI－L2 细胞在 RPMI 中生长，所述 RPMI 补加有 10％胎牛血清（用于抗－fas 实验）或 0.1％FBS（用于血清丧失实验）。在抗－fas 实验的情况下，在用新鲜培养基洗涤后，将细胞悬浮在补加有 10％FBS 的 RPMI 中，露置于抗－fas 抗体下，用带 FACScan 的流动细胞计数器分析应答细胞程序死亡诱导剂的细胞死亡动力学。在血清丧失实验的情况下，将 WI－L2 细胞悬浮在补加有 0.1％FBS 的 RPMI 中，按 Henderson et al.（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：8479－8483 中所述的方法监测细胞程序死亡。诱导细胞程序死亡的其它方法包括但不限于初级心肌细胞中的氧丧失、神经细胞系 GII－7 中的 NGF 退隐和谷胱甘肽排除或 TNF 添加到 HT29 细胞系。通过检测细胞死亡期间的细胞收缩和对碘化丙锭（PI）的通透性来估测细胞程序死亡。此外，也可以使用估测细胞程序死亡性细胞死亡的其它方法。

图 9 示出了各种 WI－L2 转化体对抗－Fas 处理的抗细胞程序死亡应答。图 8 示出了各种 WI－L2 转化体对血清丧失的抗一细胞程序死亡应答。在图 9 中，将重复试验孔中的 3×105 细胞与 50ng/ml 东细胞的抗－Fas 抗体一起温育 24 小时。然后用带 FACS can 的流动细胞计数器分析细胞死亡。从各构建体表达的蛋白质表示在柱状体的下面。因为许多构建体是截短或缺失变体，所以也表示出了

表达的精确氨基酸。可以看出，与含有单独的 pREP7 载体的对照转化体比较，所有转化体均具有某些保护作用。最强细胞程序死亡抗性的转化体是Cdn－1△2 表达细胞系，其中抗－fas 处理后 90％以上的细胞存活。在表达全长cdn－1(1－211)和Cdn－1△1 转化体以及Bel－2△和Bcl－2 表达细胞系中也观察到明显的保护作用。

Cdn－1△1 和Cdn－1△2 分别缺乏编码全长 Cdn－1 的 N－端 59 和 70 氨基酸的核苷酸。在阻断细胞程序死亡上Cdn－1△2 的表达比全长Cdn－1 的表达更有效的观察结果表明较小的截短的 Cdn－1 分子可能是有效的治疗剂。

实施例 6

其它 Cdn 基因的测定和 Cdn－2 基因的克隆

人基因组 DNA 和一系列人/啮齿动物体细胞 DNA 的 Southern 印迹分析表明有至少 3 种Cdn 相关基因，且它们位于染色体 6、11 和 20 上。三种杂交 DNA 的 PCR/序列分析表明Cdn－1 位于染色体 6 上，另外两个密切相关的序列位于染色体 20(指定为Cdn－2)和染色体 11(指定为Cdn－3)上。我们已克隆了 Cdn－2 和 Cdn－3 基因并对它的测序。有趣的是，Cdn－2 和Cdn－3 两者均不含有内含子并具有已回复到基因组的处理基因的所有特征。Cdn－3 具有核苷酸缺失，导致读框移位和早期终子，因此很可能是假基因。然而，当用Cdn－2 和Cdn－3 识别的探针经 northern 印迹分析时，两者具有启动子元件[CCAAT，TATAAA 盒]但很可能不被转录。

用含有Cdn－1 完全编码区的 950 bp BglⅡ－HindⅢ CDNA 探针筛选在粘粒载体 pWE15(Stratagene，La Jolla，CA)中的来源于人

胎盘的 900,000 个克隆的基因组文库。探针是按照 Feinberg and Vogelstein(1984)Anal. Biochem. 137:266－267 所述方法 32p－标记的。在按 Sambrook et al.(1989) Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring harbor laboratory Press 描述的高度严格的杂交和洗涤条件下处理和筛选文库。经重新铺成平板和进行以上的筛选进一步纯化 10 个双阳性的克隆。按供给者(Promega Corp., Madison, WI)的描述用 Wizard Maxiprep DNA 纯化系统纯化质粒 DNA,并且用 Eco RI 限制酶作图和 Southern 印迹法分析。用于 Southern 印迹法和杂交步骤的探针与以上的相同。

当用Eco RI 限制分析和 Southern 印迹分析判断时,粘粒克隆分成两组。粘粒克隆(cos)1－4 和 7 显示出Eco RI 产生的 DNA 片段的一个不同的模式,并含有单个 6.5 kb 杂交Eco RI DNA 片段。Cos2 和Cos9 落于第二组(以 5.5kb 杂交 EcoRI DNA 片段为特征)。用标准的分子生物学技术(Sambrook et al. 同上)将Cos2 的 6.5kb DNA 片段和cos9 的 5.5kb DNA 片段亚克隆进 pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, CA)中。分离质粒 DNA,用Bam HI、Hind Ⅲ和EcoRI 对两个亚克隆 A4(来自Cos2)和 C5(来自Cos9)的 DNA 插入物进行作图,并按以上的描述进行 Southern 印迹分析。将两种克隆的较小的限制片段亚克隆进 MB 测序载体,并测定 DNA 序列。

A4 序列含有显示与Cdn－1 97% 氨基酸一致性的开放读框(图 5)。这一基因与Cdn－1 的高度的序列一致性表明,它是一个新的 Cdn－1 相关基因,因此将被称作Cdn－2。图 6 示出了编码的Cdn－2 蛋白质和Bcl－2 族其它成员的序列比较。Cdn－2 含有保守区 BH1 和 BH2(这是Bcl－2 族的特点)并显示出与其它成员的低和总

体序列一致性(~20－30%)(这也是 Bel 一族的特征)。Cdn－3 具有读框移位(产生短的非相关的多肽),并且因此不含有Cdn－1、Cdn－2 或其它Bcl－2 族成员的结构特征。

实施例 7

Cnd－1、Cdn－2 和 Cdn－3 基因的染色体定位

将一系列人/啮齿动物体细胞杂交 DNA(Panel 2 DNA,从 the WIGMS, Camden, NJ 获得)的 Southern 印迹分析和中期染色体的萤光原位杂交(FISH)用于人染色体Cdn 基因的作图。进行 Southern 印迹分析时,将 5mg 杂交组 DNA 用EcoRI 或BamHI/Hind Ⅲ 消化,在 0.8%或 1%琼脂糖凝胶上分级分离,转移到硝基纤维素上并用 Cnd－1 探针杂交。按以上描述进行杂交和洗涤。进行 FISH 时,将 Cdn－2 亚克隆 A4 用 Bionick Labeling System(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)进行生物素酰化,并按 Viegas－Pequignot in In Situ Hybridization, A Practical Approch, 1992, ed. D. G. wilkinson, pp. 137－158, IRL Press, Oxford 描述的方法杂交到正常人成纤维细胞的中期染色体上。按 Pinkel et al.(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9138－9142 描述的方法,用 FITC－缀合的亲和素和生物素化的山羊抗一亲和素进行探针检测。

在人 DNA 对照中,Southerns 印迹分析显示三个杂交EcoRI 带,其长度约 12kb、11kb 和 5.5kb。体细胞杂交 DNA 分析表明,12kb 带在两个不同的样品中,这两个样品是 NA10629(仅含人染色体 6)和 NA07299(含人染色体 1 和 X 两者,且更重要地含染色体 6 端粒到 p21 的部分。11kb 带在 NA13140(含人染色体 20)中。5.5kb 杂

交带仅在样品 NA10927A(含人染色体 11)中发现。用Cdn－1、Cdn－2 或Cdn－3 引物进行的这些杂交 DNA 样品的 PCR/DNA 测序分析显示出在 NA10629(含染色体 6 的杂交 DNA)和 NA07299(染色体 1、X 和 6pter＞含 p21 的杂交 DNA)中存在Cdn－1 序列，这说明Cdn－1 基因位于染色体 6(端粒到 p21)上。Cdn－2 序列在 NA13140 中发现，表明Cdn－2 基因位于染色体 20 上。Cdn－3 序列在 NA10927A 中发现，表明Cdn－3 基因位于染色体 11 上。

实施例 8

在 FL5.12 细胞中 Cdn－1 和 Cdn－2 对细胞程序死亡的调节作用

FL5.12 是一种 IL－3 依赖性淋巴祖细胞系(Mckearn et al. (1985)Proc. Natl. Acad. SciUSA 82:7414－7418)，已阐明该细胞系经历细胞程序死亡，接着是 IL－3 退隐，但由Bcl－2 过度表达阻止细胞死亡(Nunez et al. (1990)J. Immuno. 144:3602－3610；和 Hockenbery et al. (1990) Nature 348:334－336)。为了估价Cdn－1 和Cdn－2 调节细胞程序死亡的能力，将 cDNA 编码Cdn－1、Cdn－2、Cdn－1 的两种截短形式(以下描述)和Bcl－2 连接到哺乳动物表达载体(pcDNA3, Invitrogen, San Diego, CA)上，并用电穿孔引入到小鼠祖代 B 淋巴细胞系 FL5.12 中，然后在含抗生素 G418 的培养基上选择。然后按以下的描述在集团转化体上进行试验。

在 IL－3 退隐后的不同时间检测过度表达的基因对 FL5.12 细胞生存力的影响，并示于图 10 中。在流动细胞计数器(Becton Dickinison FACScan)上用碘化丙锭排阻估测细胞生存力。当与载体对

照比较时，Bcl－2 表达明显阻止细胞死亡，而Cdn－1 显得增加细胞死亡。Cdn－2 表达在早期时对细胞死亡具有低水平的阻止作用，但在后期的各点上不明显。令人感兴趣的是，Cdn－1△2 给出阻止细胞死亡的中等水平。尽管比Bcl－2 水平低，Cdn－1－112（一种含 Cdn－1 N 末端 112 个氨基酸的分子）也表现出对 FL5.12 细胞的部分保护。

如实施例 7 所示，Cdn－1 和Cdn－1△2 在 WI－L2 细胞中的表达在应答抗－Fas－介导的细胞程序死亡和血清退隐中导致细胞存活的增加。总之，这些数据表明，各种Cdn 分子均能以正的或负的方式调节细胞程序死亡，正负方式取决于细胞类型和细胞程序死亡的刺激物。因此，它们在例如心脏的局部缺血后的再输注组织损伤中阻止细胞死亡上或者在已不受细胞程序死亡控制的细胞（各种癌中正是这种情况）中诱导细胞亡上是有效的。

实施例 9

IFN－γ 诱导 Cdn－1m RNA 在 HT－29 细胞中表达

已阐明，人结肠癌细胞系 HT－29 仅在用 IFN－γ 处理后对抗－Fas 抗体或 TNF 的细胞毒作用敏感（Yonehara et al.（1989）J. Exp. Med. 169：1747－1756）。这些 IFN－γ 处理过的细胞在血清去除（deviation）或放线菌酮处理后也表现出增加的细胞程序死亡。HT－29 细胞对细胞程序死亡刺激的这一诱导的敏感性可能部分由于表现为 IFN－γ 处理后的 TNF 受体和 Fas 抗原的伴随性上调（up-regulation）（yonehare et al.（1989））。然而，血清去除或放线菌酮处理后观察到增加的细胞死亡说明 IFN－γ 可能诱导其它细胞程序死

亡机制。

IFN－γ对Bcl－2族成员水平的调节作用是诱导HT－29细胞对细胞程序死亡刺激的敏感性的另一种可能的机制。Cdn－1、Bax或Bcl－x表达增加和/或Bcl－2或Bcl－XL表达降低可能会导致细胞对杀细胞剂增加的敏感性。为了试验这种可能性，用实施例2中所述的方法和条件经Northern印迹分析检测未处理的和IFN－γ处理的HT－29细胞中Bcl－2族成员的mRNA水平。在用IFN－γ诱导后Cdn－1 mRNA水平增加约10倍。而Bax和Bel－x mRNA水平保持不变。在未处理的和IFN－γ处理的细胞两者中，Bcl－2 mRNA低于可检测的水平。有一种可能性是，经IFN－γ处理，Bcl－Xs对Bcl－Xl转录物的比率可能已增加，但由于转录物间大小的小的不同，该比率可能不能被Northern印迹分析检测。Boise等((1993)Cell 74:597－608)用未刺激的对PMA加离子霉素刺激的胸腺细胞进行的测定就是这种情况。用半定量PCR，它们表现出刺激后Bcl－Xs对Bcl－Xl的比率增加。采用类似的PCR技术说明，在HT－29细胞用IFN－γ处理后，Bcl－Xs对Bcl－Xl mRNA的比率保持不变，主要的转录物是Bel－Xl(79％)

因此，IFN－γ处理后Cdn－1转录物和HT－29细胞系的上调与细胞死亡敏感性的增加之间存在正相关。这些结果表明，在肿瘤细胞中存在Cdn－1的正调节剂，当与合适的细胞程序死亡诱导剂共同给药时，它们在治疗某些肿瘤上可能是有用的。

尽管为清楚说明的目的以说明和实施例的方式用某些详细的内容描述了本发明，但本领域技术人员清楚，可以进行某些变化和修改。因此，所描述和实施例不构成对所附权利要求描绘的本发明发

明范围的限制。

说　明　书　附　图

5'- AGATCTGAATTC AA(C/T) TGG GGI (C/A)GI (A/G)TX GTX GC -3'

Bclx 1-32

5'- AGATCTAAGCTT GTC CCA ICC ICC XTG XTC (C/T)TG (A/T/G)AT CCA -3'

Bclx 2-39

图 1

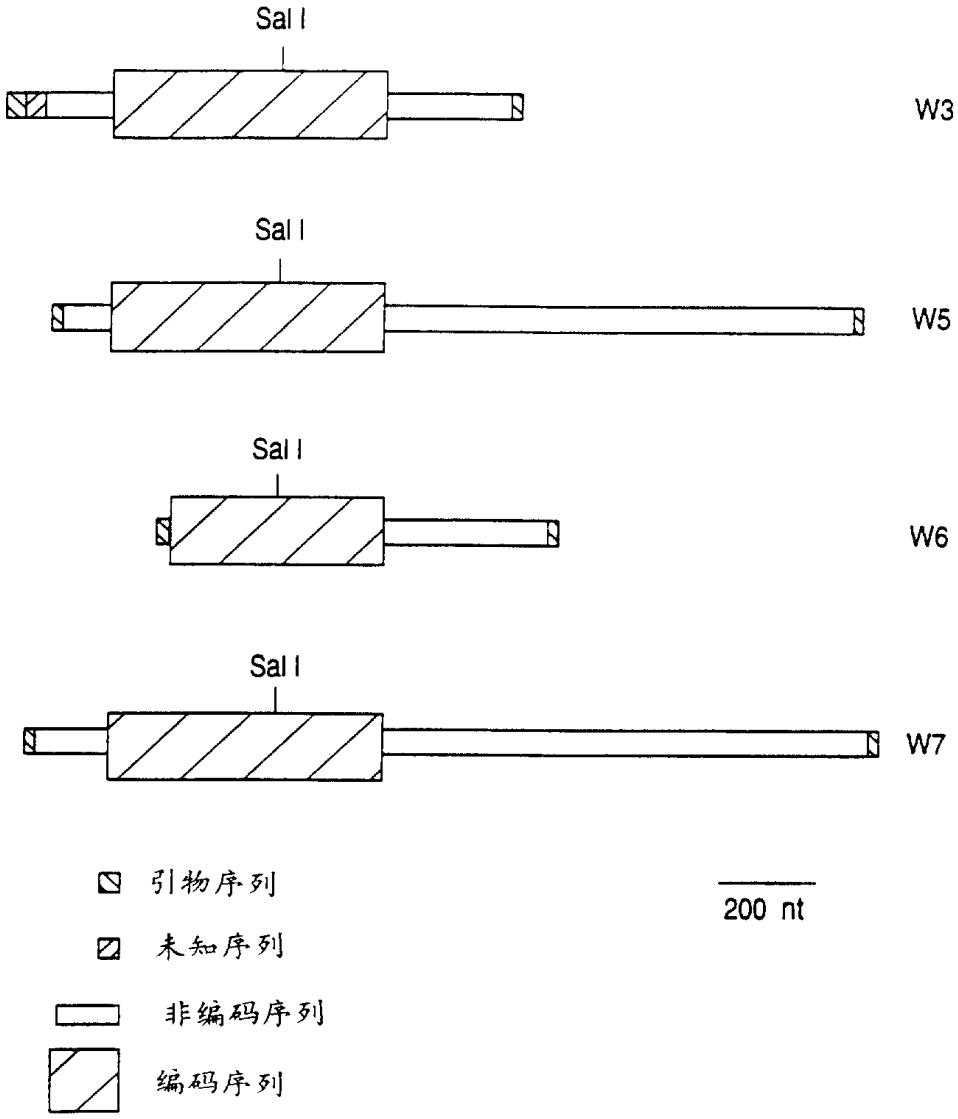


图 2

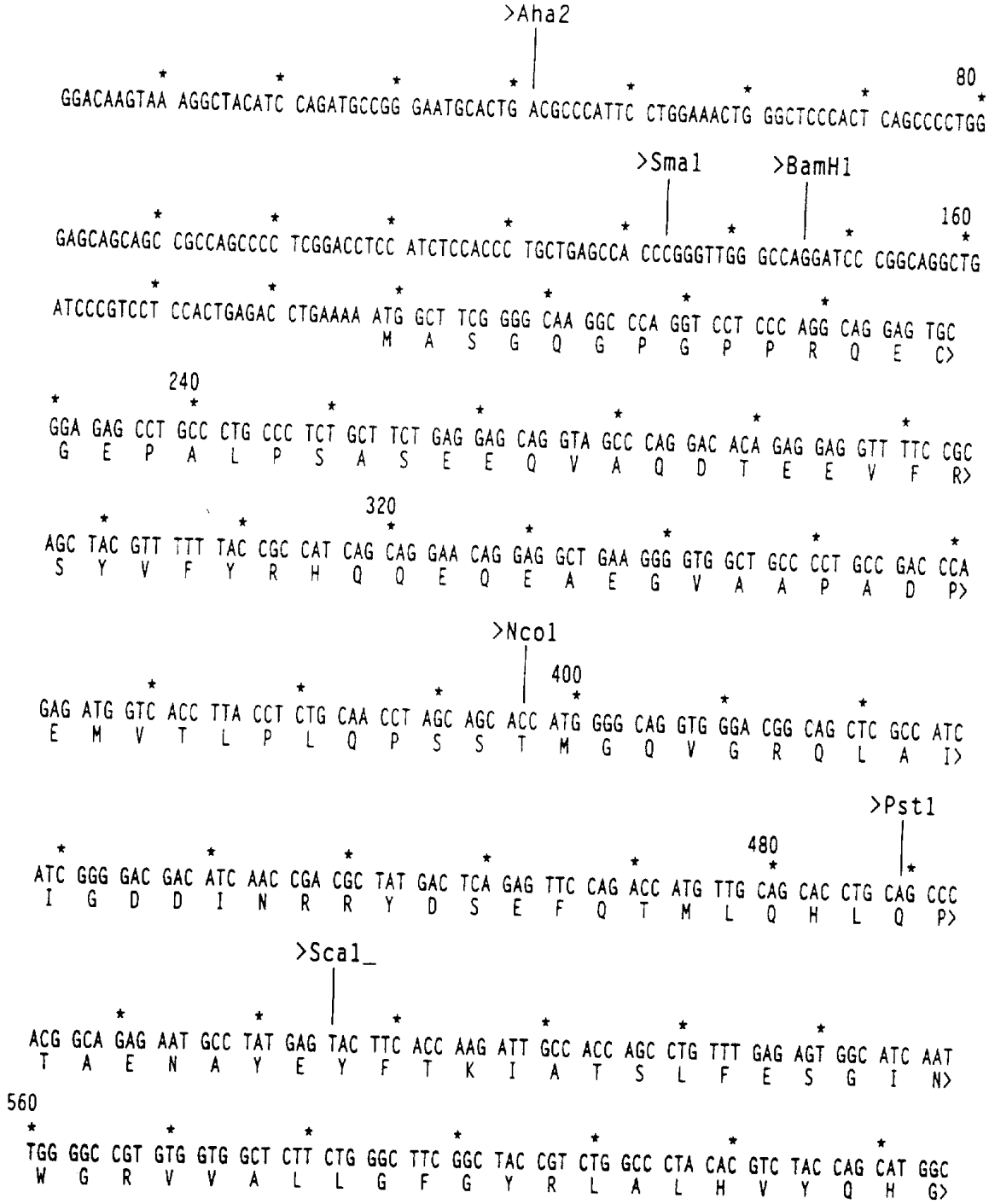

>Aha2
80
GGACAAGTAA AGGCTACATC CAGATGCCGG GAATGCACTG ACGCCCATTC CTGGAAACTG GGCTCCCACT CAGCCCCTGG
>Sma1
>BamH1
160
GAGCAGCAGC CGCCAGCCCC TCGGACCTCC ATCTCCACCC TGCTGAGCCA CCCGGGTTGG GCCAGGATCC CGGCAGGCTG
ATCCCGTCCT CCACTGAGAC CTGAAAA ATG GCT TCG GGG CAA GGC CCA GGT CCT CCC AGG CAG GAG TGC
M A S G Q G P G P P R Q E C>
240
GGA GAG CCT GCC CTG CCC TCT GCT TCT GAG GAG CAG GTA GCC CAG GAC ACA GAG GAG GTT TTC CGC
G E P A L P S A S E E Q V A Q D T E E V F R>
320
AGC TAC GTT TTT TAC CGC CAT CAG CAG GAA CAG GAG GCT GAA GGG GTG GCT GCC CCT GCC GAC CCA
S Y V F Y R H Q Q E Q E A E G V A A P A D P>
>Nco1
400
GAG ATG GTC ACC TTA CCT CTG CAA CCT AGC AGC ACC ATG GGG CAG GTG GGA CGG CAG CTC GCC ATC
E M V T L P L Q P S S T M G Q V G R Q L A I>
>Pst1
480
ATC GGG GAC GAC ATC AAC CGA CGC TAT GAC TCA GAG TTC CAG ACC ATG TTG CAG CAC CTG CAG CCC
I G D D I N R R Y D S E F Q T M L Q H L Q P>
>Sca1_
ACG GCA GAG AAT GCC TAT GAG TAC TTC ACC AAG ATT GCC ACC AGC CTG TTT GAG AGT GGC ATC AAT
T A E N A Y E Y F T K I A T S L F E S G I N>
560
TGG GGC CGT GTG GTG GCT CTT CTG GGC TTC GGC TAC CGT CTG GCC CTA CAC GTC TAC CAG CAT GGC
W G R V V A L L G F G Y R L A L H V Y Q H G>

图 3A

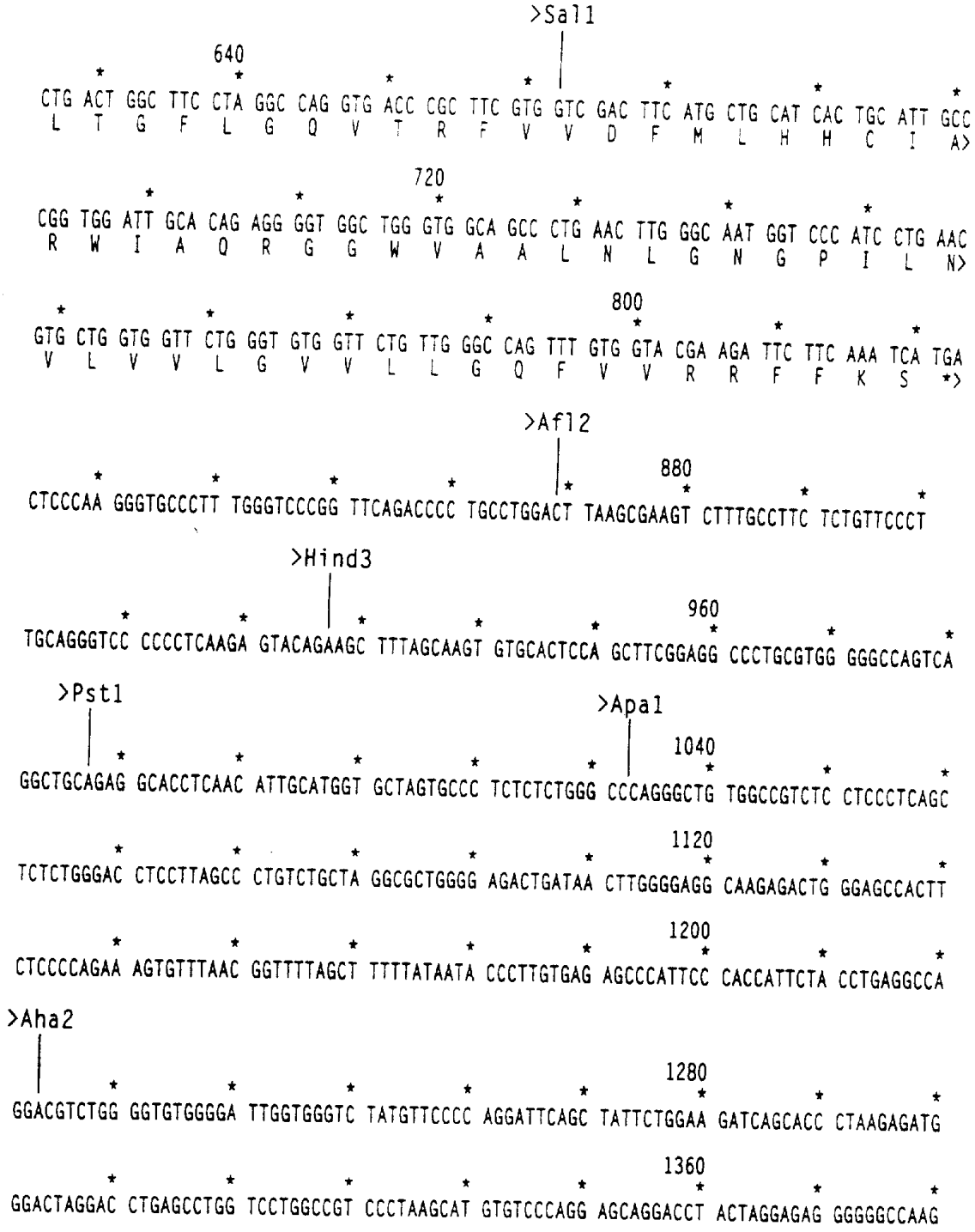

>Sal1
640
CTG ACT GGC TTC CTA GGC CAG GTG ACC CGC TTC GTG GTC GAC TTC ATG CTG CAT CAC TGC ATT GCC
L T G F L G Q V T R F V V D F M L H H C I A>
720
CGG TGG ATT GCA CAG AGG GGT GGC TGG GTG GCA GCC CTG AAC TTG GGC AAT GGT CCC ATC CTG AAC
R W I A Q R G G W V A A L N L G N G P I L N>
800
GTG CTG GTG GTT CTG GGT GTG GTT CTG TTG GGC CAG TTT GTG GTA CGA AGA TTC TTC AAA TCA TGA
V L V V L G V V L L G Q F V V R R F F K S *>
>Afl2
880
CTCCCAA GGGTGCCCTT TGGGTCCCGG TTCAGACCCC TGCCTGGACT TAAGCGAAGT CTTTGCCTTC TCTGTTCCCT
>Hind3
960
TGCAGGGTCC CCCCTCAAGA GTACAGAAGC TTTAGCAAGT GTGCACTCCA GCTTCGGAGG CCCTGCGTGG GGGCCAGTCA
>Pst1
>Apa1
1040
GGCTGCAGAG GCACCTCAAC ATTGCATGGT GCTAGTGCCC TCTCTCTGGG CCCAGGGCTG TGGCCGTCTC CTCCCTCAGC
1120
TCTCTGGGAC CTCCTTAGCC CTGTCTGCTA GGCGCTGGGG AGACTGATAA CTTGGGGAGG CAAGAGACTG GGAGCCACTT
1200
CTCCCCAGAA AGTGTTTAAC GGTTTTAGCT TTTTATAATA CCCTTGTGAG AGCCCATTCC CACCATTCTA CCTGAGGCCA
>Aha2
1280
GGACGTCTGG GGTGTGGGGA TTGGTGGGTC TATGTTCCCC AGGATTCAGC TATTCTGGAA GATCAGCACC CTAAGAGATG
1360
GGACTAGGAC CTGAGCCTGG TCCTGGCCGT CCCTAAGCAT GTGTCCCAGG AGCAGGACCT ACTAGGAGAG GGGGGCCAAG

图 3B

1440

GTCCTGCTCA ACTCTACCCC TGCTCCCATT CCTCCCTCCG GCCATACTGC CTTTGCAGTT GGACTCTCAG GGATTCTGGG

1520

CTTGGGGTGT GGGGTGGGGT GGAGTCGCAG ACCAGAGCTG TCTGAACTCA CGTGTCAGAA GCCTCCAAGC CTGCCTCCCA

1600

AGGTCCTCTC AGTTCTCTCC CTTCCTCTCT CCTTATAGAC ACTTGCTCCC AACCCATTCA CTACAGGTGA AGGCTCTCAC

1680

CCATCCCTGG GGGCCTTGGG TGAGTGGCCT GCTAAGGCTC CTCCTTGCCC AGACTACAGG GCTTAGGACT TGGTTTGTTA

1760

TATCAGGGAA AAGGAGTAGG GAGTTCATCT GGAGGGTTCT AAGTGGGAGA AGGACTATCA ACACCACTAG GAATCCCAGA

>BamH1

1840

GGTGGATCCT CCCTCATGGC TCTGGCACAG TGTAATCCAG GGGTGTAGAT GGGGGAACTG TGAATACTTG AACTCTGTTC

1920

CCCCACCCTC CATGCTCCTC ACCTGTCTAG GTCTCCTCAG GGTGGGGGGT GACAGTGCCT TCTCTATTGG CACAGCCTAG

2000

GGTCTTGGGG GTCAGGGGGG AGAAGTTCTT GATTCAGCCA AATGCAGGGA GGGGAGGCAG ATGGAGCCCA TAGGCCACCC

CCTATCCTCT GAGTGTTTGG AAATAAACTG TGCAATCCCC TCAAAAAAAA AA

图 3C

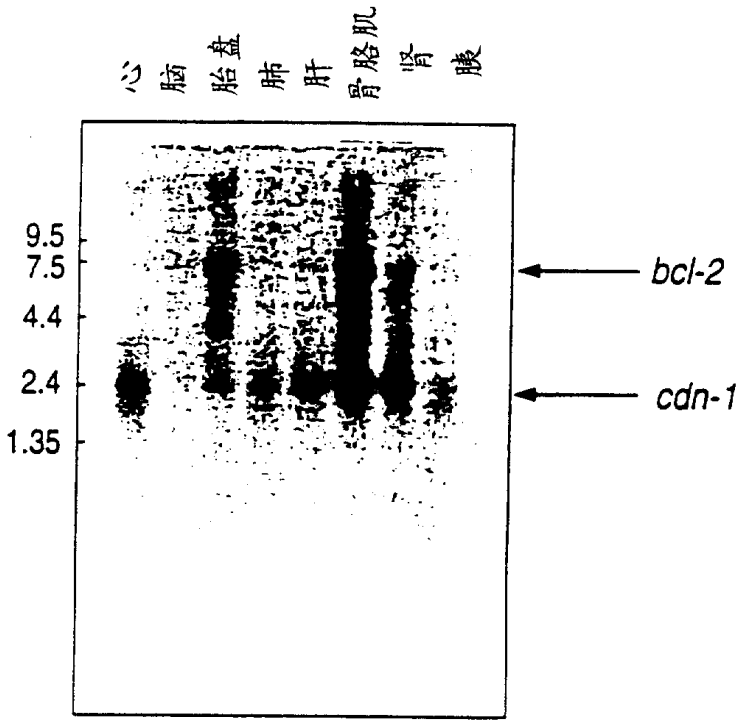


图 4

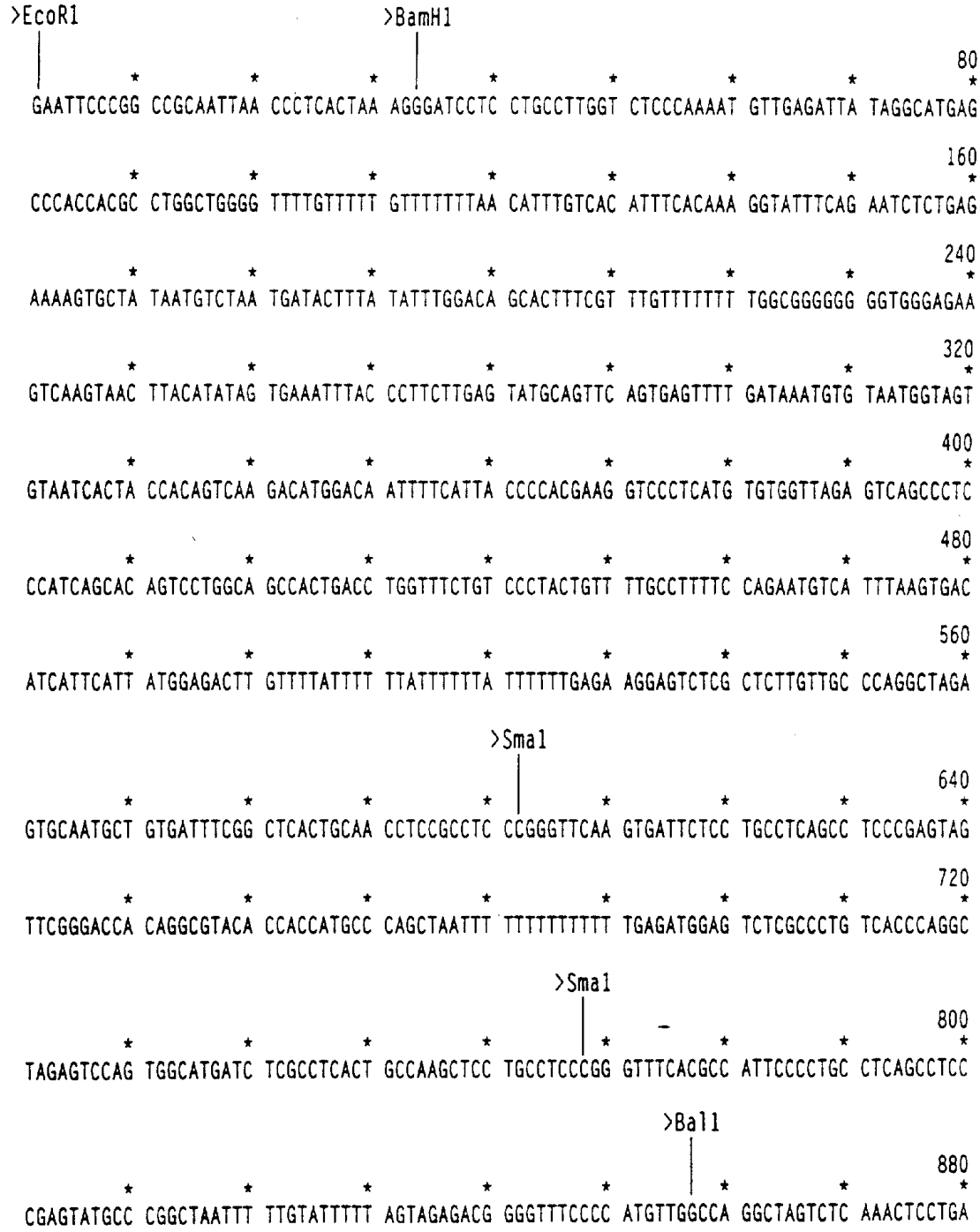

>EcoR1
>BamH1
80
GAATTCCCGG CCGCAATTAA CCCTCACTAA AGGGATCCTC CTGCCTTGGT CTCCCAAAAT GTTGAGATTA TAGGCATGAG
160
CCCACCACGC CTGGCTGGGG TTTTGTTTTT GTTTTTTTAA CATTTGTCAC ATTTCACAAA GGTATTTCAG AATCTCTGAG
240
AAAAGTGCTA TAATGTCTAA TGATACTTTA TATTTGGACA GCACTTTCGT TTGTTTTTTT TGGCGGGGGG GGTGGGAGAA
320
GTCAAGTAAC TTACATATAG TGAAATTTAC CCTTCTTGAG TATGCAGTTC AGTGAGTTTT GATAAATGTG TAATGGTAGT
400
GTAATCACTA CCACAGTCAA GACATGGACA ATTTTCATTA CCCCACGAAG GTCCCTCATG TGTGGTTAGA GTCAGCCCTC
480
CCATCAGCAC AGTCCTGGCA GCCACTGACC TGGTTTCTGT CCCTACTGTT TTGCCTTTTC CAGAATGTCA TTTAAGTGAC
560
ATCATTCATT ATGGAGACTT GTTTTATTTT TTATTTTTTA TTTTTTGAGA AGGAGTCTCG CTCTTGTTGC CCAGGCTAGA
>Sma1
640
GTGCAATGCT GTGATTTCGG CTCACTGCAA CCTCCGCCTC CCGGGTTCAA GTGATTCTCC TGCCTCAGCC TCCCGAGTAG
720
TTCGGGACCA CAGGCGTACA CCACCATGCC CAGCTAATTT TTTTTTTTTT TGAGATGGAG TCTCGCCCTG TCACCCAGGC
>Sma1
800
TAGAGTCCAG TGGCATGATC TCGCCTCACT GCCAAGCTCC TGCCTCCCGG GTTTCACGCC ATTCCCCTGC CTCAGCCTCC
>Ball
880
CGAGTATGCC CGGCTAATTT TTGTATTTTT AGTAGAGACG GGGTTTCCCC ATGTTGGCCA GGCTAGTCTC AAACTCCTGA

图 5A

960
CCTCAAGTAA TCCGCCTGCC TTGGCTCCCA AAGTGCTGGG ATTACAGGTG TGAGCCACCG CGCCCAGCCC ATTATGTAGC

>Spe1

1040
TTTTTGTGCC CCACTTCTCC CACTTAGCAT AATGCTTTTT GAGATTCATC TGTATTACTA GTGCATCTGT AGTTCTTTCC

1120
TTTTTATGGC TTGGGTTGTT TTTTGTTTTT GTTTTTGTTT TTGAGATAGG GTCTCACTCT GTTGCCCAGG GTGGAGTGCA

>EcoR5

1200
CTATCGCAGC TCTCCGCAAC CTCCACCTCC CAGGCTCAAG ATATCCTCCC ACCTCAGCCT CCTGAGTAGC TGGAAATACA

>Nco1

1280
AGTGTGTGTG CCACCATGCC GGTTAATTTT TTTTTCTTTT TTTTTTTTTT TTTTCAATTT TTGTTGGAAG CACCATGGAG

>Ba11

>Sph1

1360
CCGCCTGAGC CTGGCTGAGC CTAAAAGCCC TGTGGTGCAT GCCTGGCCAA TTTTTGTATT TTTTAGTAGA GACGGGATTT

1440
TGCCATGTCG CCCAGGCTGG TCTGGAACTC CTGGTCTCAG GTGATTCTCC TGCTTCGGCC TCCCAAGTAG CTGGGGTTAC

1520
AGGCATGTGC CACCATGCTC AGCCCTCCCG TCAGCACAGT CCTGGCAGCC ACTGGCCTGG TTTCTGTCCC TACTGTTTTG

1600
CCTTTTACTG GTCTCCATGC TCACCTAAAT TTTTTTTTAT TTTTTGTAGA GACAGATTCT CGCAATGTTG CTCAGGCTAG

1680
TCTCGAACTC CCGGCTTCAA GCAATCCTCC CACCTCAGTC CTCCAAAGTT CTGGAATTAC AGGCATGAAT CACTGTGCCA

图 5B

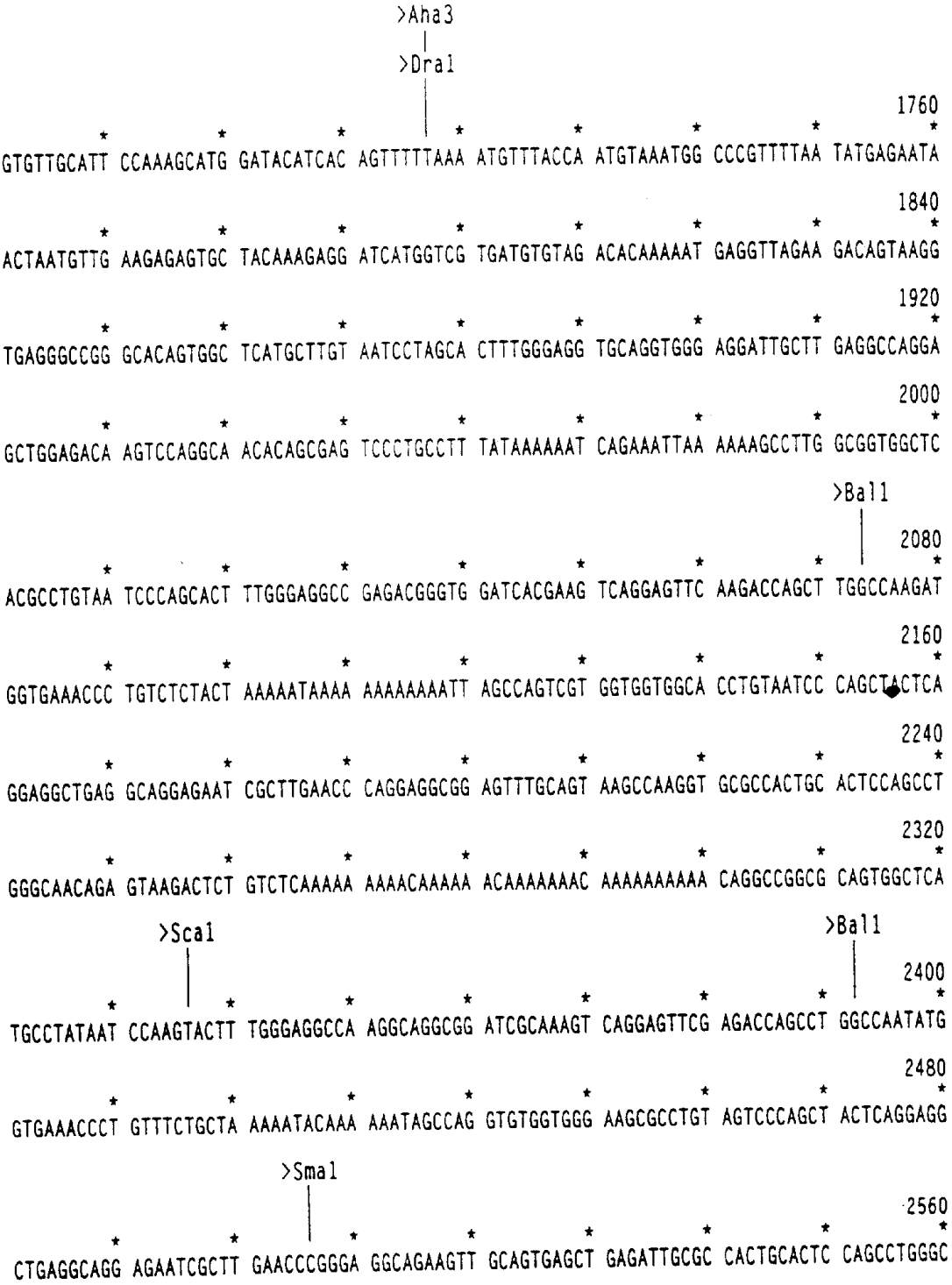

>Aha3
>Dra1
1760
GTGTTGCATT CCAAAGCATG GATACATCAC AGTTTTTAAA ATGTTTACCA ATGTAAATGG CCCGTTTTAA TATGAGAATA
1840
ACTAATGTTG AAGAGAGTGC TACAAAGAGG ATCATGGTCG TGATGTGTAG ACACAAAAAT GAGGTTAGAA GACAGTAAGG
1920
TGAGGGCCGG GCACAGTGGC TCATGCTTGT AATCCTAGCA CTTTGGGAGG TGCAGGTGGG AGGATTGCTT GAGGCCAGGA
2000
GCTGGAGACA AGTCCAGGCA ACACAGCGAG TCCCTGCCTT TATAAAAAAT CAGAAATTAA AAAAGCCTTG GCGGTGGCTC
>Ball
2080
ACGCCTGTAA TCCCAGCACT TTGGGAGGCC GAGACGGGTG GATCACGAAG TCAGGAGTTC AAGACCAGCT TGGCCAAGAT
2160
GGTGAAACCC TGTCTCTACT AAAAATAAAA AAAAAAAATT AGCCAGTCGT GGTGGTGGCA CCTGTAATCC CAGCTACTCA
2240
GGAGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAACC CAGGAGGCGG AGTTTGCAGT AAGCCAAGGT GCGCCACTGC ACTCCAGCCT
2320
GGGCAACAGA GTAAGACTCT GTCTCAAAAA AAAACAAAAA ACAAAAAAAC AAAAAAAAAA CAGGCCGGCG CAGTGGCTCA
>Sca1
>Ball
2400
TGCCTATAAT CCAAGTACTT TGGGAGGCCA AGGCAGGCGG ATCGCAAAGT CAGGAGTTCG AGACCAGCCT GGCCAATATG
2480
GTGAAACCCT GTTTCTGCTA AAAATACAAA AAATAGCCAG GTGTGGTGGG AAGCGCCTGT AGTCCCAGCT ACTCAGGAGG
>Sma1
2560
CTGAGGCAGG AGAATCGCTT GAACCCGGGA GGCAGAAGTT GCAGTGAGCT GAGATTGCGC CACTGCACTC CAGCCTGGGC

图 5C

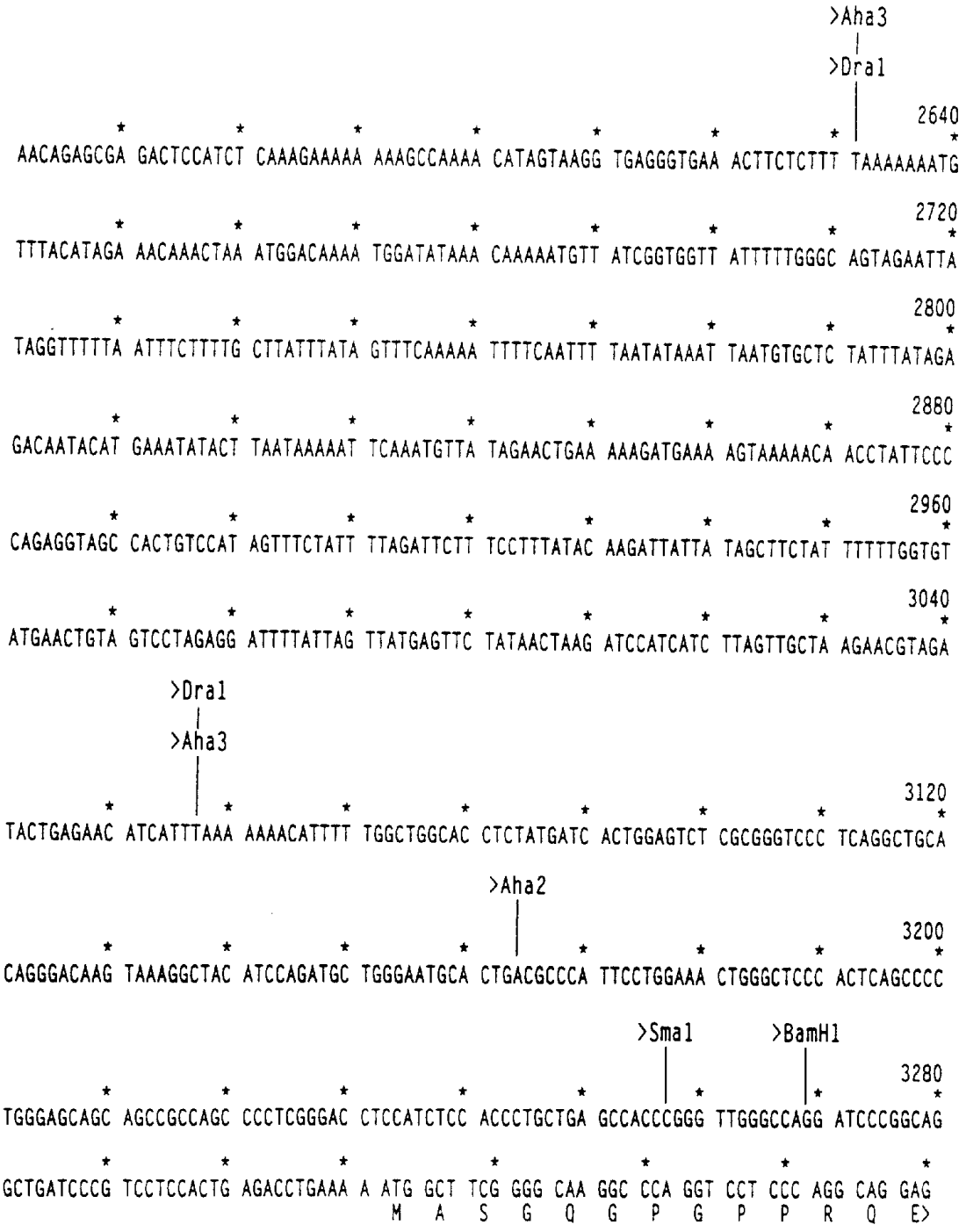

>Aha3
>Dra1
2640
AACAGAGCGA GACTCCATCT CAAAGAAAAA AAAGCCAAAA CATAGTAAGG TGAGGGTGAA ACTTCTCTTT TAAAAAAATG
2720
TTTACATAGA AACAAACTAA ATGGACAAAA TGGATATAAA CAAAAATGTT ATCGGTGGTT ATTTTTGGGC AGTAGAATTA
2800
TAGGTTTTTA ATTTCTTTTG CTTATTTATA GTTTCAAAAA TTTTCAATTT TAATATAAAT TAATGTGCTC TATTTATAGA
2880
GACAATACAT GAAATATACT TAATAAAAAT TCAAATGTTA TAGAACTGAA AAAGATGAAA AGTAAAAACA ACCTATTCCC
2960
CAGAGGTAGC CACTGTCCAT AGTTTCTATT TTAGATTCTT TCCTTTATAC AAGATTATTA TAGCTTCTAT TTTTTGGTGT
3040
ATGAACTGTA GTCCTAGAGG ATTTTATTAG TTATGAGTTC TATAACTAAG ATCCATCATC TTAGTTGCTA AGAACGTAGA
>Dra1
>Aha3
3120
TACTGAGAAC ATCATTTAAA AAAACATTTT TGGCTGGCAC CTCTATGATC ACTGGAGTCT CGCGGGTCCC TCAGGCTGCA
>Aha2
3200
CAGGGACAAG TAAAGGCTAC ATCCAGATGC TGGGAATGCA CTGACGCCCA TTCCTGGAAA CTGGGCTCCC ACTCAGCCCC
>Sma1
>BamH1
3280
TGGGAGCAGC AGCCGCCAGC CCCTCGGGAC CTCCATCTCC ACCCTGCTGA GCCACCCGGG TTGGGCCAGG ATCCCGGCAG
GCTGATCCCG TCCTCCACTG AGACCTGAAA A ATG GCT TCG GGG CAA GGC CCA GGT CCT CCC AGG CAG GAG
M A S G Q G P G P P R Q E>

图5D

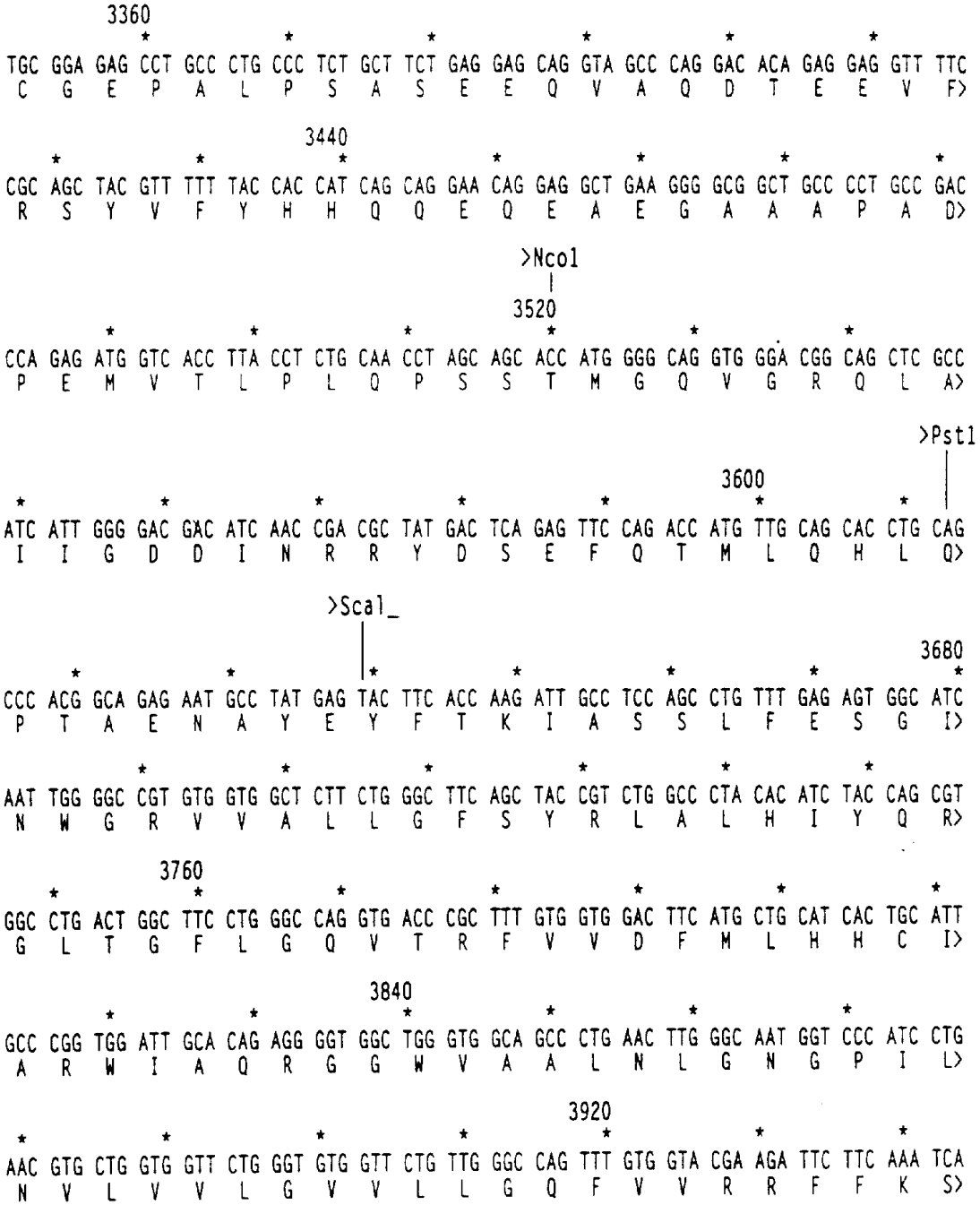

3360
TGC GGA GAG CCT GCC CTG CCC TCT GCT TCT GAG GAG CAG GTA GCC CAG GAC ACA GAG GAG GTT TTC
C G E P A L P S A S E E Q V A Q D T E E V F>
3440
CGC AGC TAC GTT TTT TAC CAC CAT CAG CAG GAA CAG GAG GCT GAA GGG GCG GCT GCC CCT GCC GAC
R S Y V F Y H H Q Q E Q E A E G A A A P A D>
>Nco1
3520
CCA GAG ATG GTC ACC TTA CCT CTG CAA CCT AGC AGC ACC ATG GGG CAG GTG GGA CGG CAG CTC GCC
P E M V T L P L Q P S S T M G Q V G R Q L A>
>Pst1
3600
ATC ATT GGG GAC GAC ATC AAC CGA CGC TAT GAC TCA GAG TTC CAG ACC ATG TTG CAG CAC CTG CAG
I I G D D I N R R Y D S E F Q T M L Q H L Q>
>Sca1_
3680
CCC ACG GCA GAG AAT GCC TAT GAG TAC TTC ACC AAG ATT GCC TCC AGC CTG TTT GAG AGT GGC ATC
P T A E N A Y E Y F T K I A S S L F E S G I>
AAT TGG GGC CGT GTG GTG GCT CTT CTG GGC TTC AGC TAC CGT CTG GCC CTA CAC ATC TAC CAG CGT
N W G R V V A L L G F S Y R L A L H I Y Q R>
3760
GGC CTG ACT GGC TTC CTG GGC CAG GTG ACC CGC TTT GTG GTG GAC TTC ATG CTG CAT CAC TGC ATT
G L T G F L G Q V T R F V V D F M L H H C I>
3840
GCC CGG TGG ATT GCA CAG AGG GGT GGC TGG GTG GCA GCC CTG AAC TTG GGC AAT GGT CCC ATC CTG
A R W I A Q R G G W V A A L N L G N G P I L>
3920
AAC GTG CTG GTG GTT CTG GGT GTG GTT CTG TTG GGC CAG TTT GTG GTA CGA AGA TTC TTC AAA TCA
N V L V V L G V V L L G Q F V V R R F F K S>

图 5E

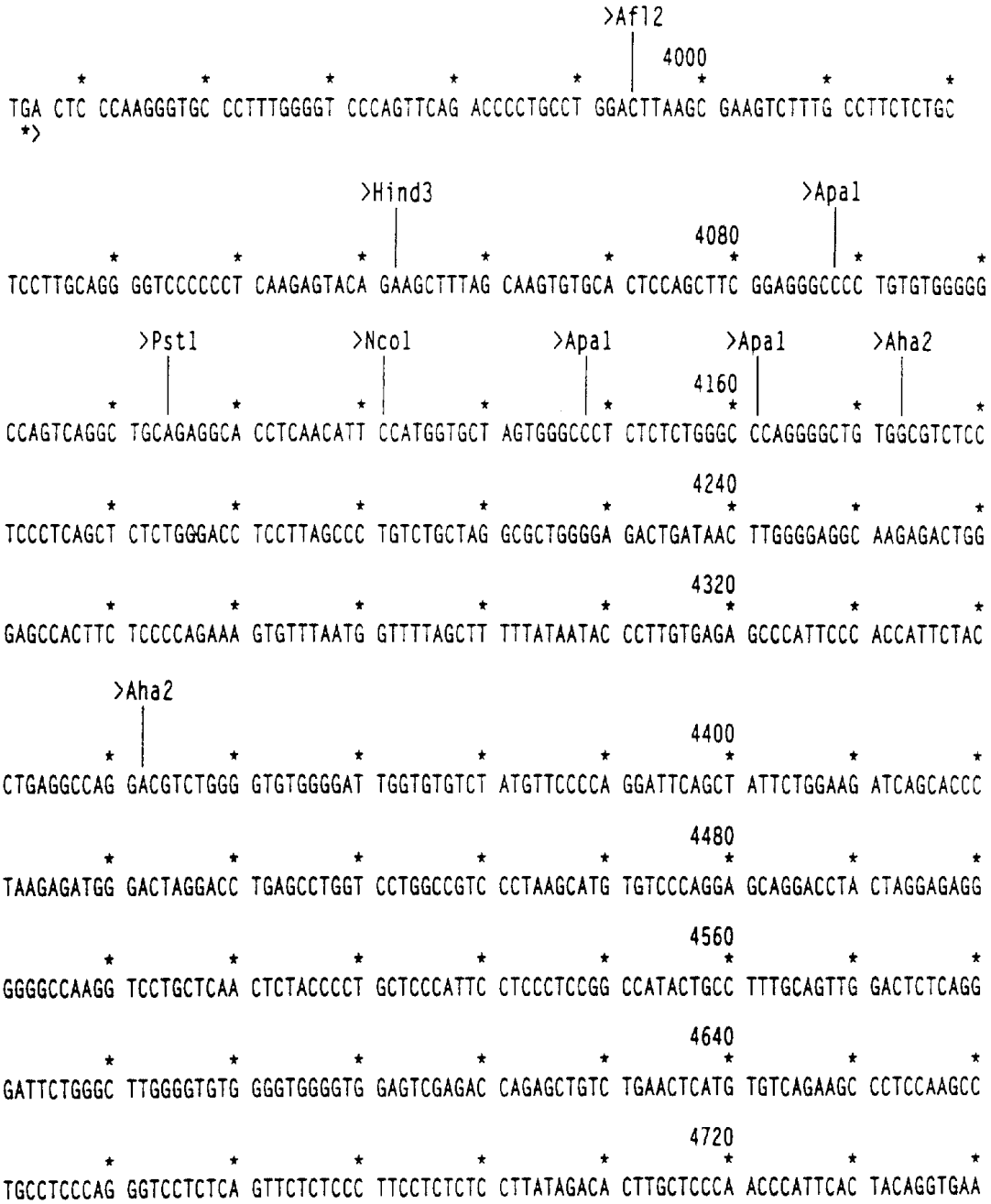

>Af12
4000
TGA CTC CCAAGGGTGC CCTTTGGGGT CCCAGTTCAG ACCCCTGCCT GGACTTAAGC GAAGTCTTTG CCTTCTCTGC
*>
>Hind3
>Apa1
4080
TCCTTGCAGG GGTCCCCCCT CAAGAGTACA GAAGCTTTAG CAAGTGTGCA CTCCAGCTTC GGAGGGCCCC TGTGTGGGGG
>Pst1
>Nco1
>Apa1
>Apa1
>Aha2
4160
CCAGTCAGGC TGCAGAGGCA CCTCAACATT CCATGGTGCT AGTGGGCCCT CTCTCTGGGC CCAGGGGCTG TGGCGTCTCC
4240
TCCCTCAGCT CTCTGGGACC TCCTTAGCCC TGTCTGCTAG GCGCTGGGGA GACTGATAAC TTGGGGAGGC AAGAGACTGG
4320
GAGCCACTTC TCCCCAGAAA GTGTTTAATG GTTTTAGCTT TTTATAATAC CCTTGTGAGA GCCCATTCCC ACCATTCTAC
>Aha2
4400
CTGAGGCCAG GACGTCTGGG GTGTGGGGAT TGGTGTGTCT ATGTTCCCCA GGATTCAGCT ATTCTGGAAG ATCAGCACCC
4480
TAAGAGATGG GACTAGGACC TGAGCCTGGT CCTGGCCGTC CCTAAGCATG TGTCCCAGGA GCAGGACCTA CTAGGAGAGG
4560
GGGGCCAAGG TCCTGCTCAA CTCTACCCCT GCTCCCATTC CTCCCTCCGG CCATACTGCC TTTGCAGTTG GACTCTCAGG
4640
GATTCTGGGC TTGGGGTGTG GGGTGGGGTG GAGTCGAGAC CAGAGCTGTC TGAACTCATG TGTCAGAAGC CCTCCAAGCC
4720
TGCCTCCCAG GGTCCTCTCA GTTCTCTCCC TTCCTCTCTC CTTATAGACA CTTGCTCCCA ACCCATTCAC TACAGGTGAA

图 5F

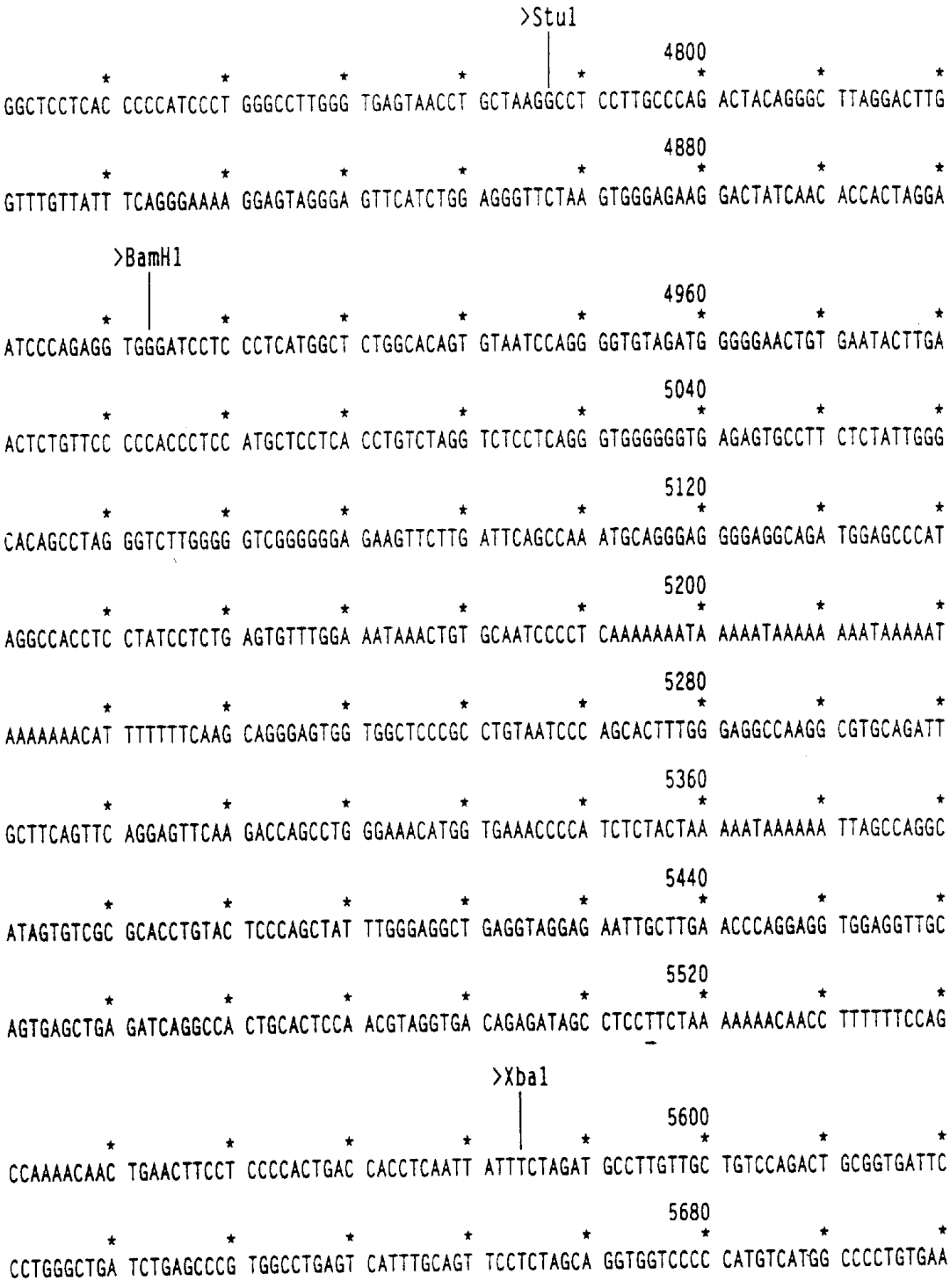

>StuI
4800
GGCTCCTCAC CCCCATCCCT GGGCCTTGGG TGAGTAACCT GCTAAGGCCT CCTTGCCCAG ACTACAGGGC TTAGGACTTG
4880
GTTTGTTATT TCAGGGAAAA GGAGTAGGGA GTTCATCTGG AGGGTTCTAA GTGGGAGAAG GACTATCAAC ACCACTAGGA
>BamH1
4960
ATCCCAGAGG TGGGATCCTC CCTCATGGCT CTGGCACAGT GTAATCCAGG GGTGTAGATG GGGGAACTGT GAATACTTGA
5040
ACTCTGTTCC CCCACCCTCC ATGCTCCTCA CCTGTCTAGG TCTCCTCAGG GTGGGGGGTG AGAGTGCCTT CTCTATTGGG
5120
CACAGCCTAG GGTCTTGGGG GTCGGGGGGA GAAGTTCTTG ATTCAGCCAA ATGCAGGGAG GGGAGGCAGA TGGAGCCCAT
5200
AGGCCACCTC CTATCCTCTG AGTGTTTGGA AATAAACTGT GCAATCCCCT CAAAAAAATA AAAATAAAAA AAATAAAAAT
5280
AAAAAAACAT TTTTTTCAAG CAGGGAGTGG TGGCTCCCGC CTGTAATCCC AGCACTTTGG GAGGCCAAGG CGTGCAGATT
5360
GCTTCAGTTC AGGAGTTCAA GACCAGCCTG GGAAACATGG TGAAACCCCA TCTCTACTAA AAATAAAAAA TTAGCCAGGC
5440
ATAGTGTCGC GCACCTGTAC TCCCAGCTAT TTGGGAGGCT GAGGTAGGAG AATTGCTTGA ACCCAGGAGG TGGAGGTTGC
5520
AGTGAGCTGA GATCAGGCCA CTGCACTCCA ACGTAGGTGA CAGAGATAGC CTCCTTCTAA AAAAACAACC TTTTTTCCAG
>XbaI
5600
CCAAAACAAC TGAACTTCCT CCCCACTGAC CACCTCAATT ATTTCTAGAT GCCTTGTTGC TGTCCAGACT GCGGTGATTC
5680
CCTGGGCTGA TCTGAGCCCG TGGCCTGAGT CATTTGCAGT TCCTCTAGCA GGTGGTCCCC CATGTCATGG CCCCTGTGAA

图 5G

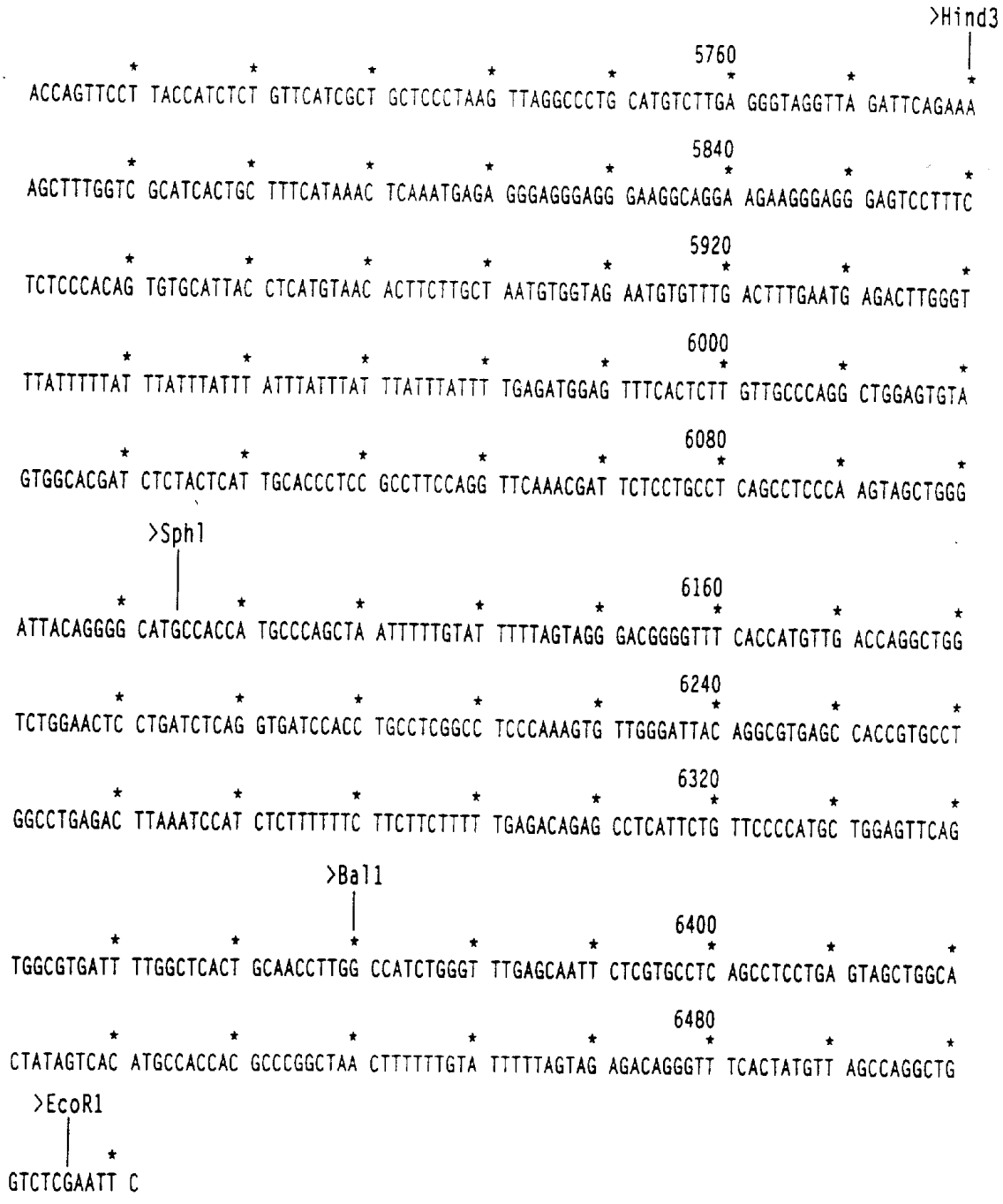

>Hind3
5760
ACCAGTTCCT TACCATCTCT GTTCATCGCT GCTCCCTAAG TTAGGCCCTG CATGTCTTGA GGGTAGGTTA GATTCAGAAA
5840
AGCTTTGGTC GCATCACTGC TTTCATAAAC TCAAATGAGA GGGAGGGAGG GAAGGCAGGA AGAAGGGAGG GAGTCCTTTC
5920
TCTCCCACAG TGTGCATTAC CTCATGTAAC ACTTCTTGCT AATGTGGTAG AATGTGTTTG ACTTTGAATG AGACTTGGGT
6000
TTATTTTTAT TTATTTATTT ATTTATTTAT TTATTTATTT TGAGATGGAG TTTCACTCTT GTTGCCCAGG CTGGAGTGTA
6080
GTGGCACGAT CTCTACTCAT TGCACCCTCC GCCTTCCAGG TTCAAACGAT TCTCCTGCCT CAGCCTCCCA AGTAGCTGGG
>Sph1
6160
ATTACAGGGG CATGCCACCA TGCCCAGCTA ATTTTTGTAT TTTTAGTAGG GACGGGGTTT CACCATGTTG ACCAGGCTGG
6240
TCTGGAACTC CTGATCTCAG GTGATCCACC TGCCTCGGCC TCCCAAAGTG TTGGGATTAC AGGCGTGAGC CACCGTGCCT
6320
GGCCTGAGAC TTAAATCCAT CTCTTTTTTC TTCTTCTTTT TGAGACAGAG CCTCATTCTG TTCCCCATGC TGGAGTTCAG
>Ball
6400
TGGCGTGATT TTGGCTCACT GCAACCTTGG CCATCTGGGT TTGAGCAATT CTCGTGCCTC AGCCTCCTGA GTAGCTGGCA
6480
CTATAGTCAC ATGCCACCAC GCCCGGCTAA CTTTTTTGTA TTTTTAGTAG AGACAGGGTT TCACTATGTT AGCCAGGCTG
>EcoR1
GTCTCGAATT C

图 5H

```
cdn1                                                                masgqgpgpprqecgepalpsaseeqvaqdteevfrsyvfyrhqqeqeaegvaapadpemvt
cdn2                                                                masgqgpgpprqecgepalpsaseeqvaqdteevfrsyvfyHhqqeqeaegAaapadpemvt
bcl2                                                 mahagrtgyDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWdagdvgaappgaapapgifssqpghtphtaasrdpvartsplqtpaapgaa
bax                                                                 mdgsgeqprgggptsseqimktgalllqgfiqdragrmggeap
bcl-x                                                     msqSNRELVVDFLSYKLSQKGYSWsqfsdveenrteapegtesemetpsaingnpswhladspavngatghsssl
mcl-1                                          ...(+123 aa)eldgyepeplgkrpavlpllelvgesGnntstdgslpstpppaeeeedelyrqsleiisrylreqatgakdtk
A1                                                                                                  maeselmhihslaehylqyvlq
bhrf                                                                                              maystreillalcirdsrvhgngtlhpvlelaar
LMW5-HL                                                                                                 megeeliyhniineilvgy
ced9      mtrctadnsltnpayrrrtmatgemkeflgikgteptdfginsdaqdlpspsrqastrrmsigesidgkindweeprlDIEGFVVDYFTHRIRQNGMEWfgapg

cdn1      lplqpsstmgQVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQTMLQHLQPTAENAYEYFTKIATSLFESGI-NWGRVVALLGFGYRLALHVYQHGLTGFLGQVTRFVVDFMLHH
cdn2      lplqpsstmgQVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQTMLQHLQPTAENAYEYFTKIASSLFESGI-NWGRVVALLGFSYRLALHIYQRGLTGFLGQVTRFVVDFMLHH
bcl2      agpalspvppVVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSRQLHLtpftargRFATVVEELFRDGV-NWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEY-LNR
bax       elaldpvpqdastkklseclkrigdeldsnmelqrmiaavdtdsprevFFRVAADMFSDGNFNWGRVVALFYFASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDF-LRE
bcl-x     darevipma-AVKQALREAGDEFELRYRRAFSDLTSQLHITPGTAYQSFEQVVNELFRDGV-NWGRIVAFFSFGGALCVESVDKEMQVLVSRIAAWMATY-LND
mcl-1     pmgrsgatsrkalETLRRVGDGVQRNHETVFQGMLRKLDIKNEDDVKSLSRVMIHVFSDGVTNWGRIVTLISFGAFVAKHLKTINQESCIEPLAESITD-VLVR
A1        vpafesapsqacrvlqrvafsvqkeveknlksylddfhvesidtariiFNQVMEKEFEDGIINWGRIVTIFAFGGVLLKKLpqeqialdvcaykqvssfvaefi
bhrf      etplrlspedtvvlryhvlleeiiernsetftetwnrfithtehvdldfnsvfleifhD-LINWGRICGFIVFSARMAKYCKDANn-HLESTVITTAYNF-SEG
LMW5-HL   ikyymndihelspyqqqikkiltyydeclnkqvtitfsltnaqeiktQFTGVVTELFKrgdpslgralawmawcmhacrtlccnqstpyyvvdlsvrgmleaM-
ced9      lpcgvqpehemmrvmgtifekkhaenfetfceqLlavprisfslyqdvvrtvgnaqtdqcpMSYGRLIGLISFGGFVAAKMmesvelqgqvrnlfvytslfIKT

cdn1      CIAR--WIA-QR-GGWVAALNLGngpilnvlvvlgvvllgqfvvrrffks
cdn2      CIAR--WIA-QR-GGWVAALNLGngpilnvlvvlgvvllgqfvvrrffks
bcl2      HLHT--WI--QDNGGWDAFVELYgpsmrplfdfswlslktllslalvgacitlgaylghk
bax       RLLG--WI--QDQGGWDGLLSYFgtptwqtvtifvagvltasltiwkkmg
bcl-x     HLEP--WI--QENGGWDTFVELYgnnaaaesrkgqerfnrwfltgmtvagvvllgslfsrk
mcl-1     TKRD--WLVKQ--RGWDGFVEFFhvedleggirnvllafagvagvgaglaylir
A1        MNNTGEWI-RQ-NGGWEdgfikkfepksgwltflqmtgqiwemlfllk
bhrf      -LDG--WIHQG--GGWStliednipgsrrfswtlflagltlsllvicsylfisrgrh
LMW5-HL   KHNLLPWMISH--GGQEEFLAFslhsqiysvifnikyflskfcnhhflrscvqllrkcnli
ced9      -RIRNNWKE-H-NRSWDDFMTLgkqmkedyeraeaekvgrrkqnrrwsmigagvtagaigivgvvvcgrmmfslk
```

序列识别：

cdn1/cdn2 = 97%

图6

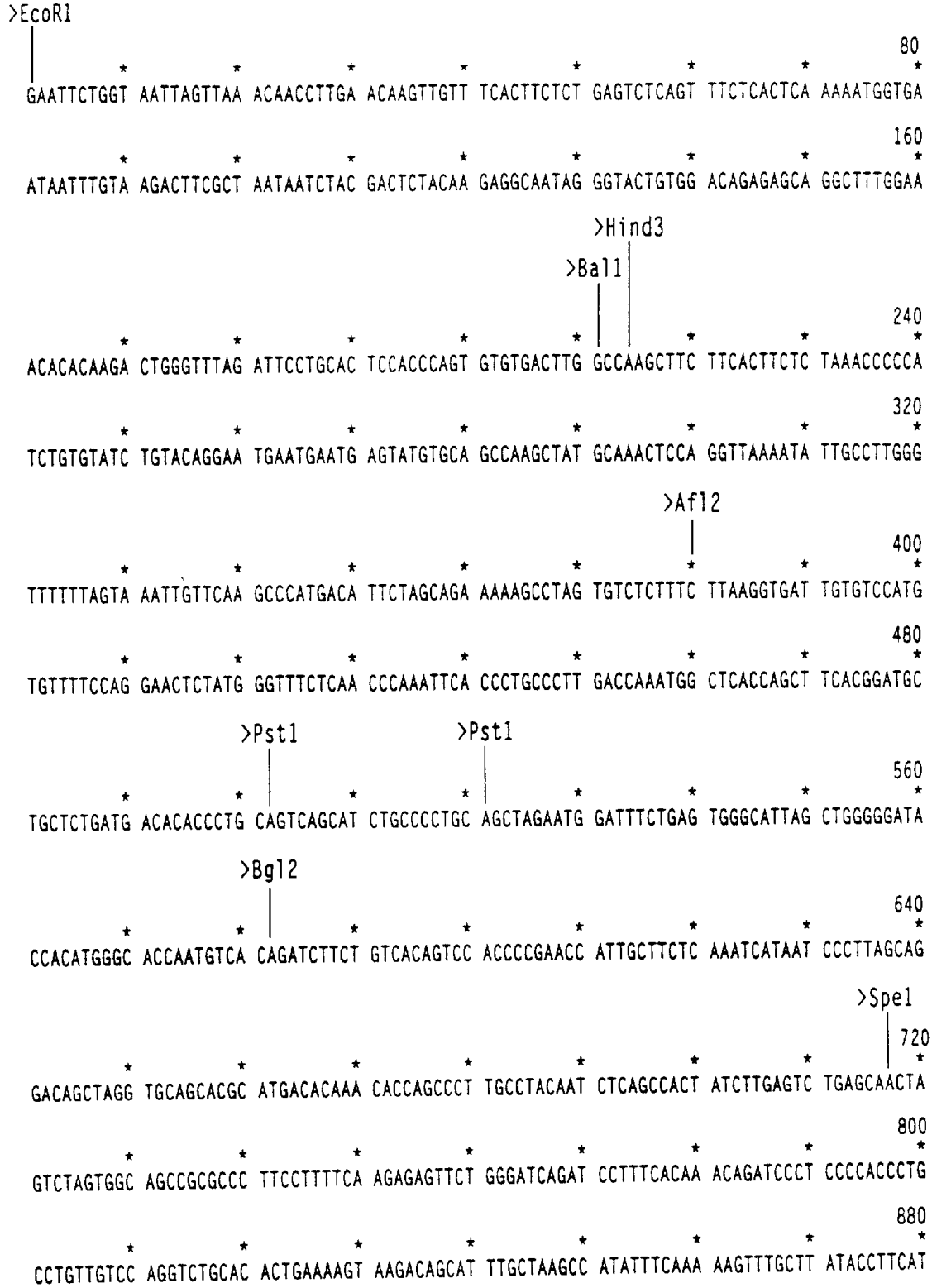

>EcoR1
80
GAATTCTGGT AATTAGTTAA ACAACCTTGA ACAAGTTGTT TCACTTCTCT GAGTCTCAGT TTCTCACTCA AAAATGGTGA
160
ATAATTTGTA AGACTTCGCT AATAATCTAC GACTCTACAA GAGGCAATAG GGTACTGTGG ACAGAGAGCA GGCTTTGGAA
>Hind3
>Ball
240
ACACACAAGA CTGGGTTTAG ATTCCTGCAC TCCACCCAGT GTGTGACTTG GCCAAGCTTC TTCACTTCTC TAAACCCCCA
320
TCTGTGTATC TGTACAGGAA TGAATGAATG AGTATGTGCA GCCAAGCTAT GCAAACTCCA GGTTAAAATA TTGCCTTGGG
>Af12
400
TTTTTTAGTA AATTGTTCAA GCCCATGACA TTCTAGCAGA AAAAGCCTAG TGTCTCTTTC TTAAGGTGAT TGTGTCCATG
480
TGTTTTCCAG GAACTCTATG GGTTTCTCAA CCCAAATTCA CCCTGCCCTT GACCAAATGG CTCACCAGCT TCACGGATGC
>Pst1
>Pst1
560
TGCTCTGATG ACACACCCTG CAGTCAGCAT CTGCCCCTGC AGCTAGAATG GATTTCTGAG TGGGCATTAG CTGGGGGATA
>Bgl2
640
CCACATGGGC ACCAATGTCA CAGATCTTCT GTCACAGTCC ACCCCGAACC ATTGCTTCTC AAATCATAAT CCCTTAGCAG
>Spe1
720
GACAGCTAGG TGCAGCACGC ATGACACAAA CACCAGCCCT TGCCTACAAT CTCAGCCACT ATCTTGAGTC TGAGCAACTA
800
GTCTAGTGGC AGCCGCGCCC TTCCTTTTCA AGAGAGTTCT GGGATCAGAT CCTTTCACAA ACAGATCCCT CCCCACCCTG
880
CCTGTTGTCC AGGTCTGCAC ACTGAAAAGT AAGACAGCAT TTGCTAAGCC ATATTTCAAA AAGTTTGCTT ATACCTTCAT

图7A

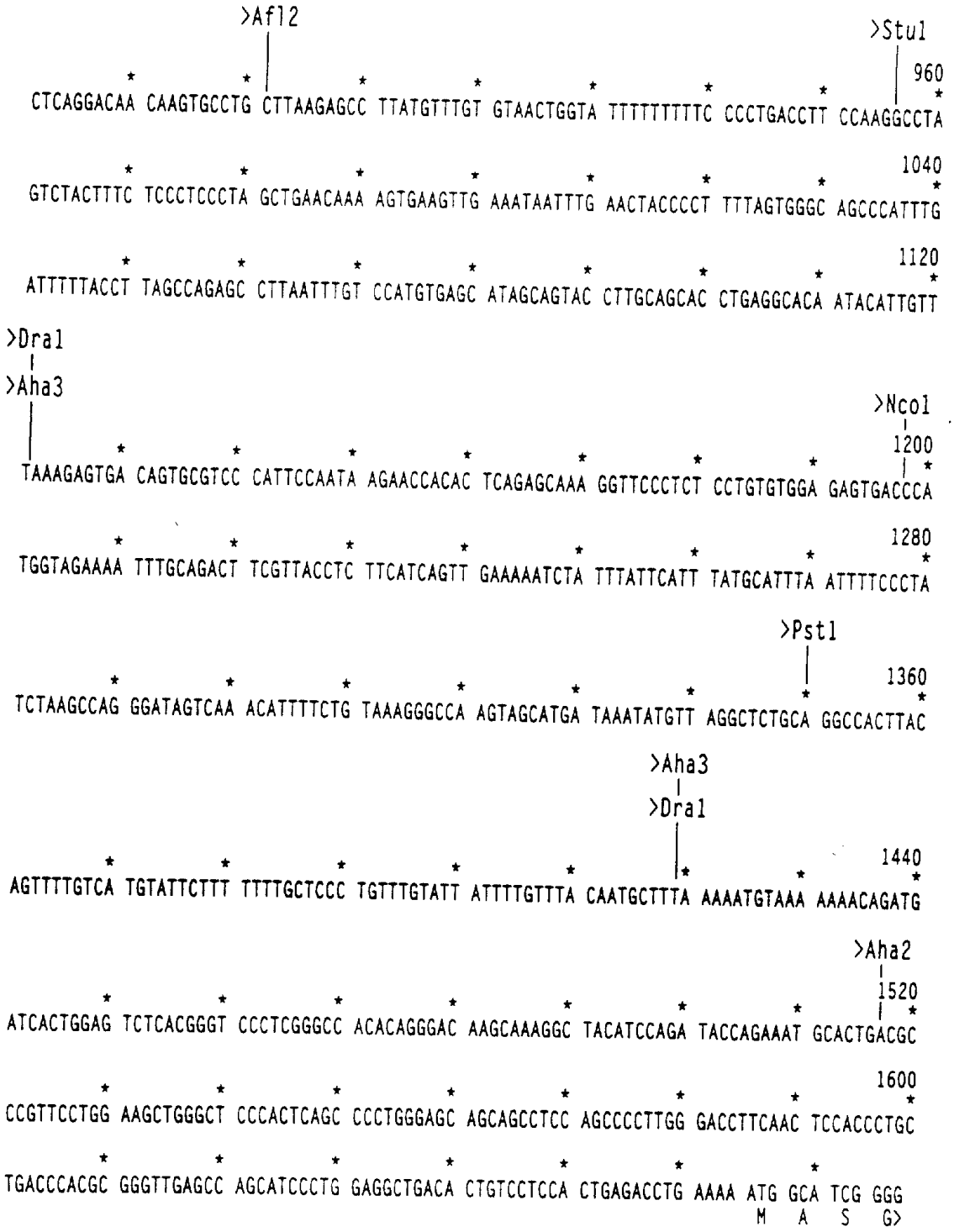

>Af12
>Stu1
960
CTCAGGACAA CAAGTGCCTG CTTAAGAGCC TTATGTTTGT GTAACTGGTA TTTTTTTTTC CCCTGACCTT CCAAGGCCTA
1040
GTCTACTTTC TCCCTCCCTA GCTGAACAAA AGTGAAGTTG AAATAATTTG AACTACCCCT TTTAGTGGGC AGCCCATTTG
1120
ATTTTTACCT TAGCCAGAGC CTTAATTTGT CCATGTGAGC ATAGCAGTAC CTTGCAGCAC CTGAGGCACA ATACATTGTT
>Dra1
>Aha3
>Nco1
1200
TAAAGAGTGA CAGTGCGTCC CATTCCAATA AGAACCACAC TCAGAGCAAA GGTTCCCTCT CCTGTGTGGA GAGTGACCCA
1280
TGGTAGAAAA TTTGCAGACT TCGTTACCTC TTCATCAGTT GAAAAATCTA TTTATTCATT TATGCATTTA ATTTTCCCTA
>Pst1
1360
TCTAAGCCAG GGATAGTCAA ACATTTTCTG TAAAGGGCCA AGTAGCATGA TAAATATGTT AGGCTCTGCA GGCCACTTAC
>Aha3
>Dra1
1440
AGTTTTGTCA TGTATTCTTT TTTTGCTCCC TGTTTGTATT ATTTTGTTTA CAATGCTTTA AAAATGTAAA AAAACAGATG
>Aha2
1520
ATCACTGGAG TCTCACGGGT CCCTCGGGCC ACACAGGGAC AAGCAAAGGC TACATCCAGA TACCAGAAAT GCACTGACGC
1600
CCGTTCCTGG AAGCTGGGCT CCCACTCAGC CCCTGGGAGC AGCAGCCTCC AGCCCCTTGG GACCTTCAAC TCCACCCTGC
TGACCCACGC GGGTTGAGCC AGCATCCCTG GAGGCTGACA CTGTCCTCCA CTGAGACCTG AAAA ATG GCA TCG GGG
M A S G>

图 7B

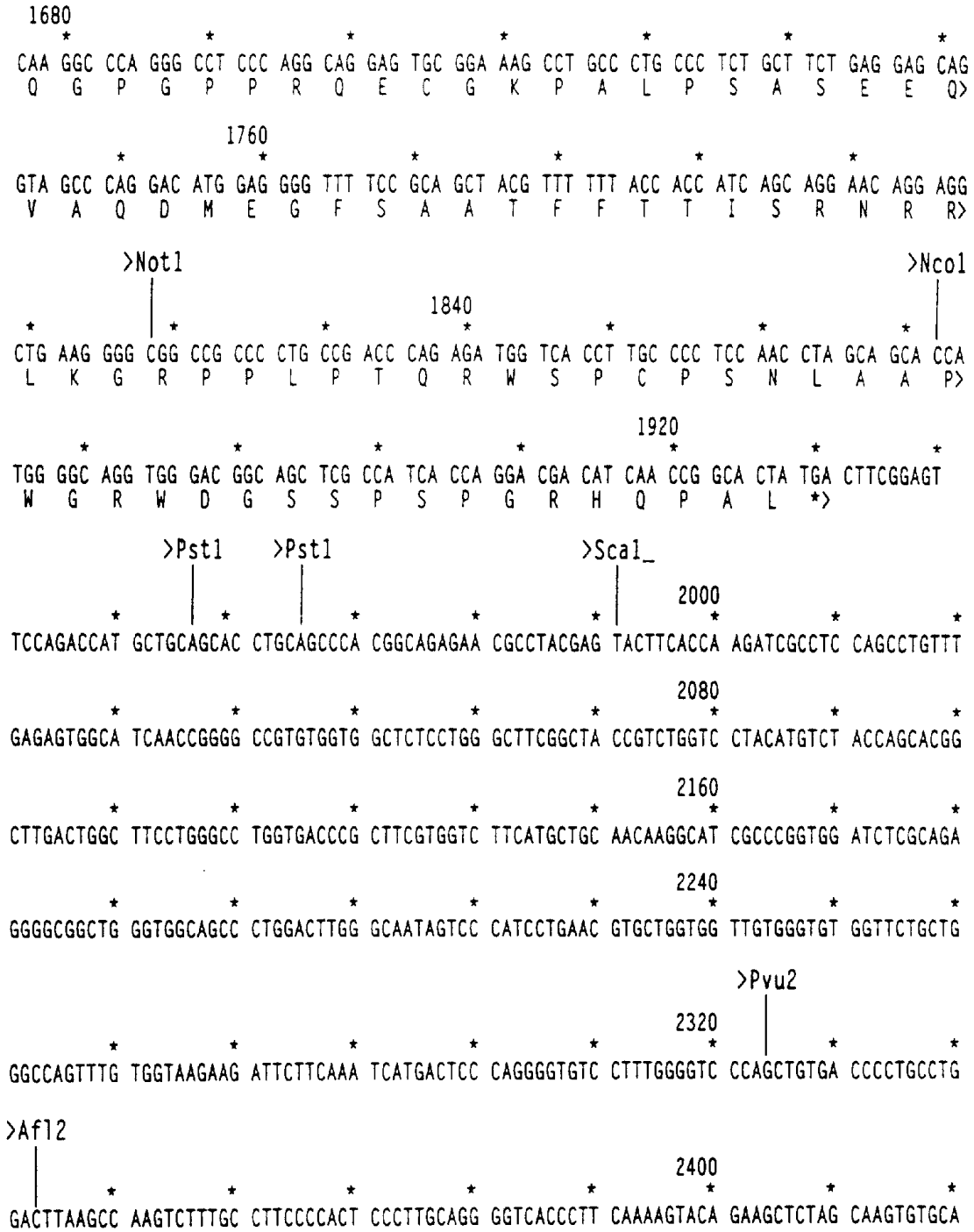

1680
CAA GGC CCA GGG CCT CCC AGG CAG GAG TGC GGA AAG CCT GCC CTG CCC TCT GCT TCT GAG GAG CAG
Q G P G P P R Q E C G K P A L P S A S E E Q>
1760
GTA GCC CAG GAC ATG GAG GGG TTT TCC GCA GCT ACG TTT TTT ACC ACC ATC AGC AGG AAC AGG AGG
V A Q D M E G F S A A T F F T T I S R N R R>
>Not1
>Nco1
1840
CTG AAG GGG CGG CCG CCC CTG CCG ACC CAG AGA TGG TCA CCT TGC CCC TCC AAC CTA GCA GCA CCA
L K G R P P L P T Q R W S P C P S N L A A P>
1920
TGG GGC AGG TGG GAC GGC AGC TCG CCA TCA CCA GGA CGA CAT CAA CCG GCA CTA TGA CTTCGGAGT
W G R W D G S S P S P G R H Q P A L *>
>Pst1
>Pst1
>Sca1_
2000
TCCAGACCAT GCTGCAGCAC CTGCAGCCCA CGGCAGAGAA CGCCTACGAG TACTTCACCA AGATCGCCTC CAGCCTGTTT
2080
GAGAGTGGCA TCAACCGGGG CCGTGTGGTG GCTCTCCTGG GCTTCGGCTA CCGTCTGGTC CTACATGTCT ACCAGCACGG
2160
CTTGACTGGC TTCCTGGGCC TGGTGACCCG CTTCGTGGTC TTCATGCTGC AACAAGGCAT CGCCCGGTGG ATCTCGCAGA
2240
GGGGCGGCTG GGTGGCAGCC CTGGACTTGG GCAATAGTCC CATCCTGAAC GTGCTGGTGG TTGTGGGTGT GGTTCTGCTG
>Pvu2
2320
GGCCAGTTTG TGGTAAGAAG ATTCTTCAAA TCATGACTCC CAGGGGTGTC CTTTGGGGTC CCAGCTGTGA CCCCTGCCTG
>Af12
2400
GACTTAAGCC AAGTCTTTGC CTTCCCCACT CCCTTGCAGG GGTCACCCTT CAAAAGTACA GAAGCTCTAG CAAGTGTGCA

图 7C

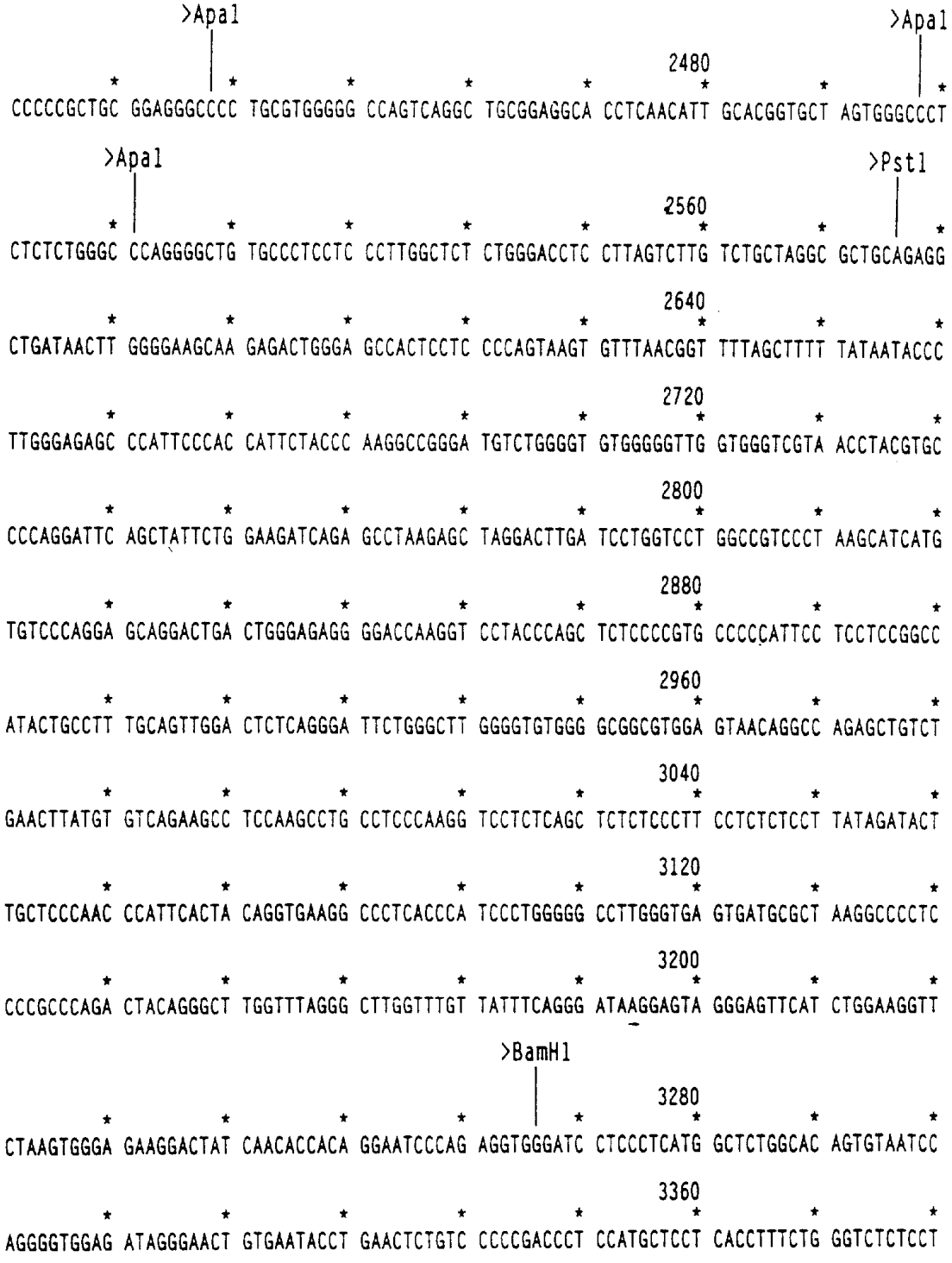

>Apa1
>Apa1
2480
CCCCCGCTGC GGAGGGCCCC TGCGTGGGGG CCAGTCAGGC TGCGGAGGCA CCTCAACATT GCACGGTGCT AGTGGGCCCT
>Apa1
>Pst1
2560
CTCTCTGGGC CCAGGGGCTG TGCCCTCCTC CCTTGGCTCT CTGGGACCTC CTTAGTCTTG TCTGCTAGGC GCTGCAGAGG
2640
CTGATAACTT GGGGAAGCAA GAGACTGGGA GCCACTCCTC CCCAGTAAGT GTTTAACGGT TTTAGCTTTT TATAATACCC
2720
TTGGGAGAGC CCATTCCCAC CATTCTACCC AAGGCCGGGA TGTCTGGGGT GTGGGGGTTG GTGGGTCGTA ACCTACGTGC
2800
CCCAGGATTC AGCTATTCTG GAAGATCAGA GCCTAAGAGC TAGGACTTGA TCCTGGTCCT GGCCGTCCCT AAGCATCATG
2880
TGTCCCAGGA GCAGGACTGA CTGGGAGAGG GGACCAAGGT CCTACCCAGC TCTCCCCGTG CCCCCATTCC TCCTCCGGCC
2960
ATACTGCCTT TGCAGTTGGA CTCTCAGGGA TTCTGGGCTT GGGGTGTGGG GCGGCGTGGA GTAACAGGCC AGAGCTGTCT
3040
GAACTTATGT GTCAGAAGCC TCCAAGCCTG CCTCCCAAGG TCCTCTCAGC TCTCTCCCTT CCTCTCTCCT TATAGATACT
3120
TGCTCCCAAC CCATTCACTA CAGGTGAAGG CCCTCACCCA TCCCTGGGGG CCTTGGGTGA GTGATGCGCT AAGGCCCCTC
3200
CCCGCCCAGA CTACAGGGCT TGGTTTAGGG CTTGGTTTGT TATTTCAGGG ATAAGGAGTA GGGAGTTCAT CTGGAAGGTT
>BamH1
3280
CTAAGTGGGA GAAGGACTAT CAACACCACA GGAATCCCAG AGGTGGGATC CTCCCTCATG GCTCTGGCAC AGTGTAATCC
3360
AGGGGTGGAG ATAGGGAACT GTGAATACCT GAACTCTGTC CCCCGACCCT CCATGCTCCT CACCTTTCTG GGTCTCTCCT

图 7D

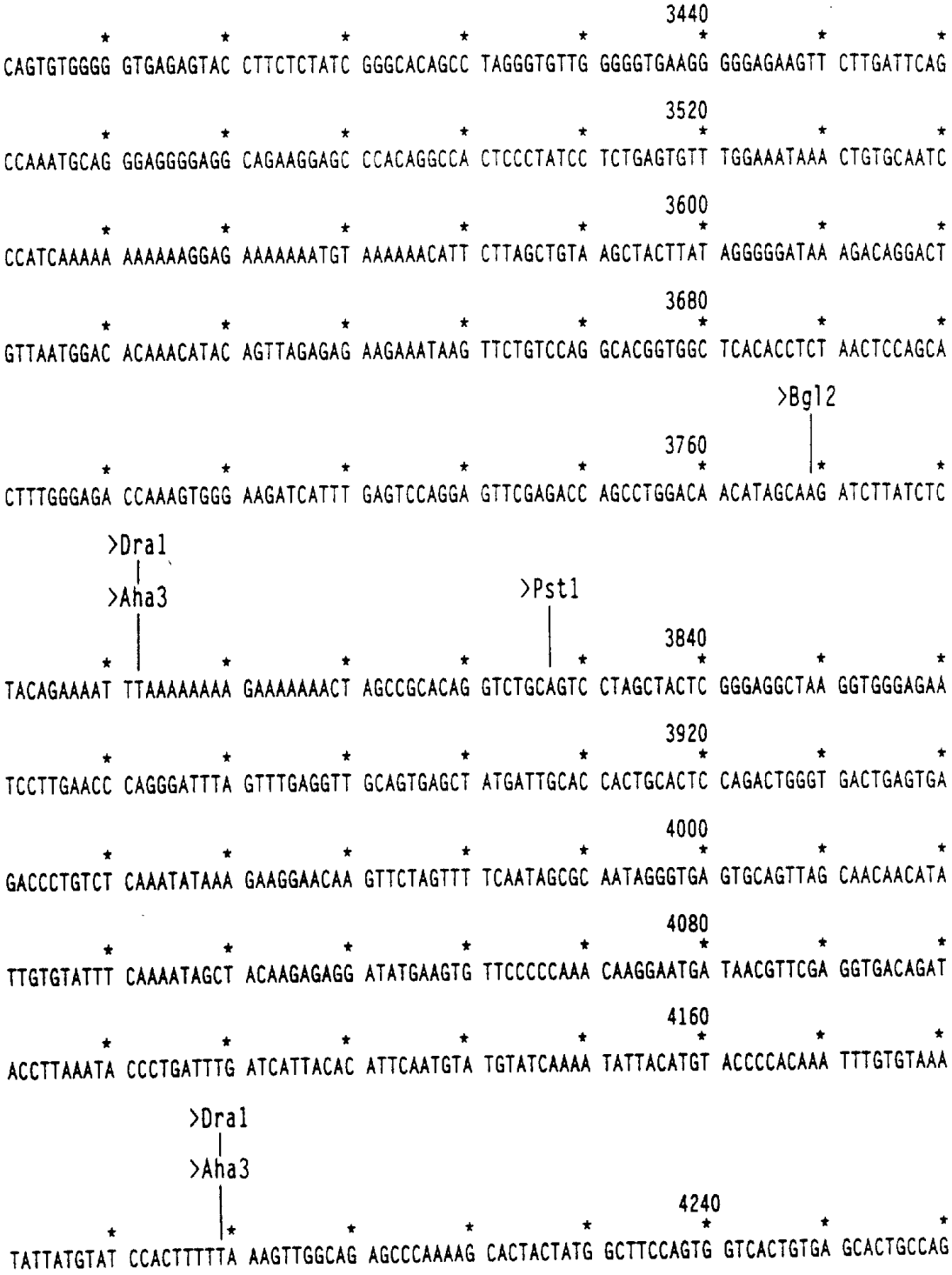

3440
CAGTGTGGGG GTGAGAGTAC CTTCTCTATC GGGCACAGCC TAGGGTGTTG GGGGTGAAGG GGGAGAAGTT CTTGATTCAG
3520
CCAAATGCAG GGAGGGGAGG CAGAAGGAGC CCACAGGCCA CTCCCTATCC TCTGAGTGTT TGGAAATAAA CTGTGCAATC
3600
CCATCAAAAA AAAAAAGGAG AAAAAAATGT AAAAAACATT CTTAGCTGTA AGCTACTTAT AGGGGGATAA AGACAGGACT
3680
GTTAATGGAC ACAAACATAC AGTTAGAGAG AAGAAATAAG TTCTGTCCAG GCACGGTGGC TCACACCTCT AACTCCAGCA
>Bgl2
3760
CTTTGGGAGA CCAAAGTGGG AAGATCATTT GAGTCCAGGA GTTCGAGACC AGCCTGGACA ACATAGCAAG ATCTTATCTC
>Dra1
>Aha3
>Pst1
3840
TACAGAAAAT TTAAAAAAAA GAAAAAAACT AGCCGCACAG GTCTGCAGTC CTAGCTACTC GGGAGGCTAA GGTGGGAGAA
3920
TCCTTGAACC CAGGGATTTA GTTTGAGGTT GCAGTGAGCT ATGATTGCAC CACTGCACTC CAGACTGGGT GACTGAGTGA
4000
GACCCTGTCT CAAATATAAA GAAGGAACAA GTTCTAGTTT TCAATAGCGC AATAGGGTGA GTGCAGTTAG CAACAACATA
4080
TTGTGTATTT CAAAATAGCT ACAAGAGAGG ATATGAAGTG TTCCCCCAAA CAAGGAATGA TAACGTTCGA GGTGACAGAT
4160
ACCTTAAATA CCCTGATTTG ATCATTACAC ATTCAATGTA TGTATCAAAA TATTACATGT ACCCCACAAA TTTGTGTAAA
>Dra1
>Aha3
4240
TATTATGTAT CCACTTTTTA AAGTTGGCAG AGCCCAAAAG CACTACTATG GCTTCCAGTG GTCACTGTGA GCACTGCCAG

图7E

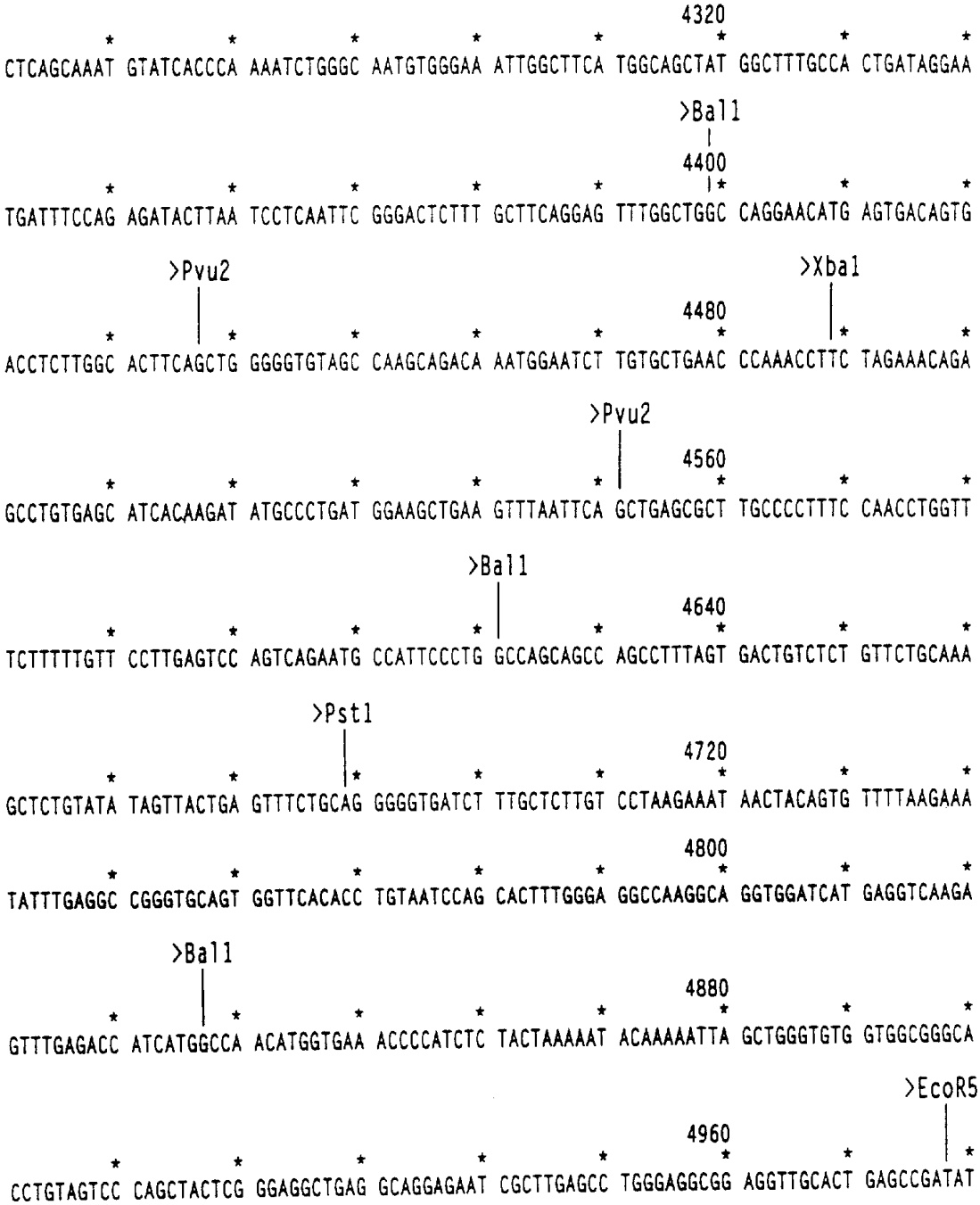

4320
CTCAGCAAAT GTATCACCCA AAATCTGGGC AATGTGGGAA ATTGGCTTCA TGGCAGCTAT GGCTTTGCCA CTGATAGGAA
>Ball
4400
TGATTTCCAG AGATACTTAA TCCTCAATTC GGGACTCTTT GCTTCAGGAG TTTGGCTGGC CAGGAACATG AGTGACAGTG
>Pvu2
>Xbal
4480
ACCTCTTGGC ACTTCAGCTG GGGGTGTAGC CAAGCAGACA AATGGAATCT TGTGCTGAAC CCAAACCTTC TAGAAACAGA
>Pvu2
4560
GCCTGTGAGC ATCACAAGAT ATGCCCTGAT GGAAGCTGAA GTTTAATTCA GCTGAGCGCT TGCCCCTTTC CAACCTGGTT
>Ball
4640
TCTTTTTGTT CCTTGAGTCC AGTCAGAATG CCATTCCCTG GCCAGCAGCC AGCCTTTAGT GACTGTCTCT GTTCTGCAAA
>Pstl
4720
GCTCTGTATA TAGTTACTGA GTTTCTGCAG GGGGTGATCT TTGCTCTTGT CCTAAGAAAT AACTACAGTG TTTTAAGAAA
4800
TATTTGAGGC CGGGTGCAGT GGTTCACACC TGTAATCCAG CACTTTGGGA GGCCAAGGCA GGTGGATCAT GAGGTCAAGA
>Ball
4880
GTTTGAGACC ATCATGGCCA ACATGGTGAA ACCCCATCTC TACTAAAAAT ACAAAAATTA GCTGGGTGTG GTGGCGGGCA
>EcoR5
4960
CCTGTAGTCC CAGCTACTCG GGAGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAGCC TGGGAGGCGG AGGTTGCACT GAGCCGATAT

图 7F

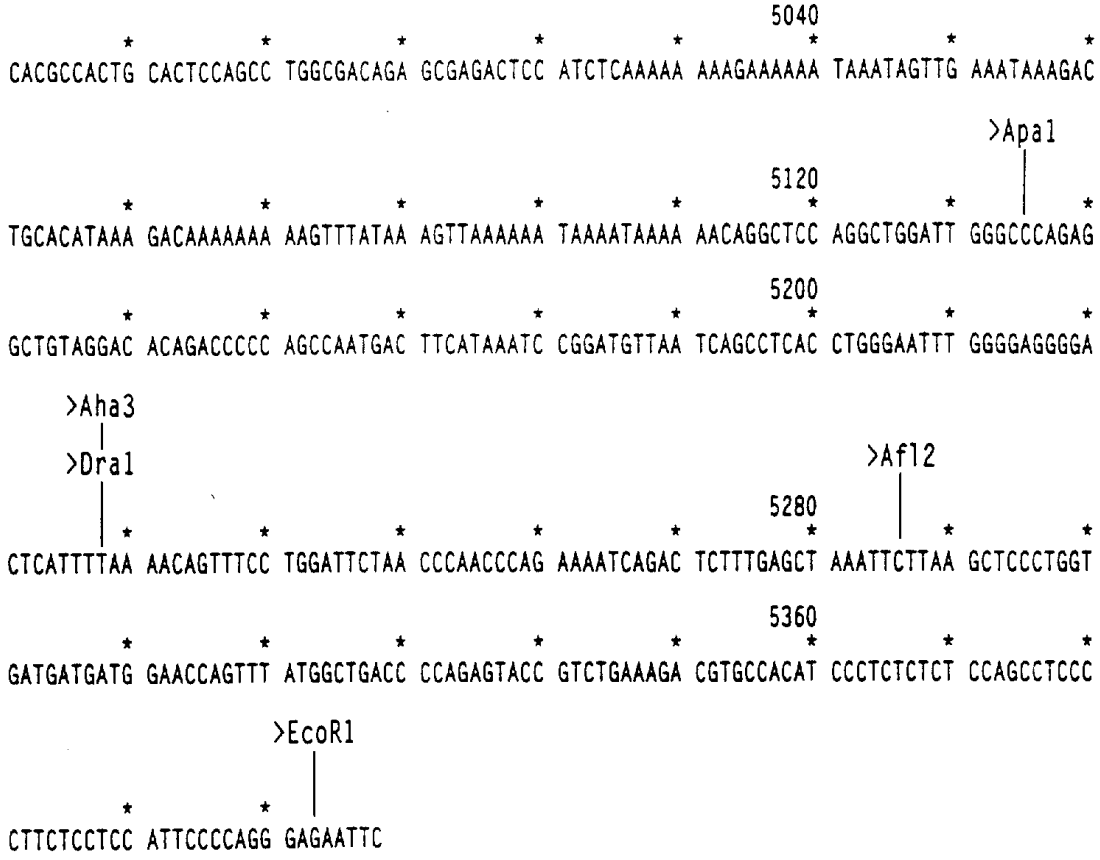
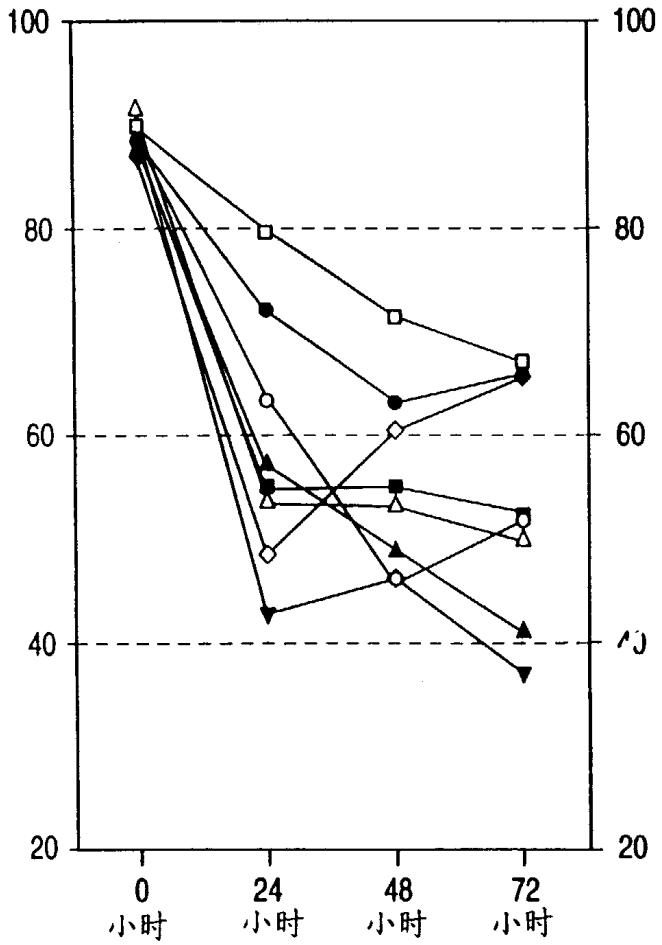

5040
CACGCCACTG CACTCCAGCC TGGCGACAGA GCGAGACTCC ATCTCAAAAA AAAGAAAAAA TAAATAGTTG AAATAAAGAC
>Apa1
5120
TGCACATAAA GACAAAAAAA AAGTTTATAA AGTTAAAAAA TAAAATAAAA AACAGGCTCC AGGCTGGATT GGGCCCAGAG
5200
GCTGTAGGAC ACAGACCCCC AGCCAATGAC TTCATAAATC CGGATGTTAA TCAGCCTCAC CTGGGAATTT GGGGAGGGGA
>Aha3
>Dra1
>Af12
5280
CTCATTTTAA AACAGTTTCC TGGATTCTAA CCCAACCCAG AAAATCAGAC TCTTTGAGCT AAATTCTTAA GCTCCCTGGT
5360
GATGATGATG GAACCAGTTT ATGGCTGACC CCAGAGTACC GTCTGAAAGA CGTGCCACAT CCCTCTCTCT CCAGCCTCCC
>EcoR1
CTTCTCCTCC ATTCCCCAGG GAGAATTC

图 7G


100
80
60
40
20
0
小时
24
小时
48
小时
72
小时
柱 1

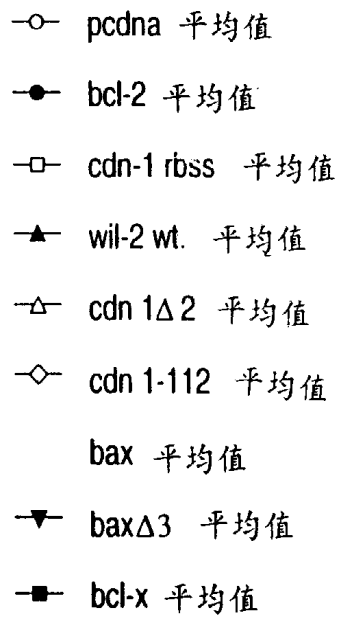

pcdna 平均值
bcl-2 平均值
cdn-1 rbss 平均值
wil-2 wt. 平均值
cdn 1Δ2 平均值
cdn 1-112 平均值
bax 平均值
baxΔ3 平均值
bcl-x 平均值

图 8

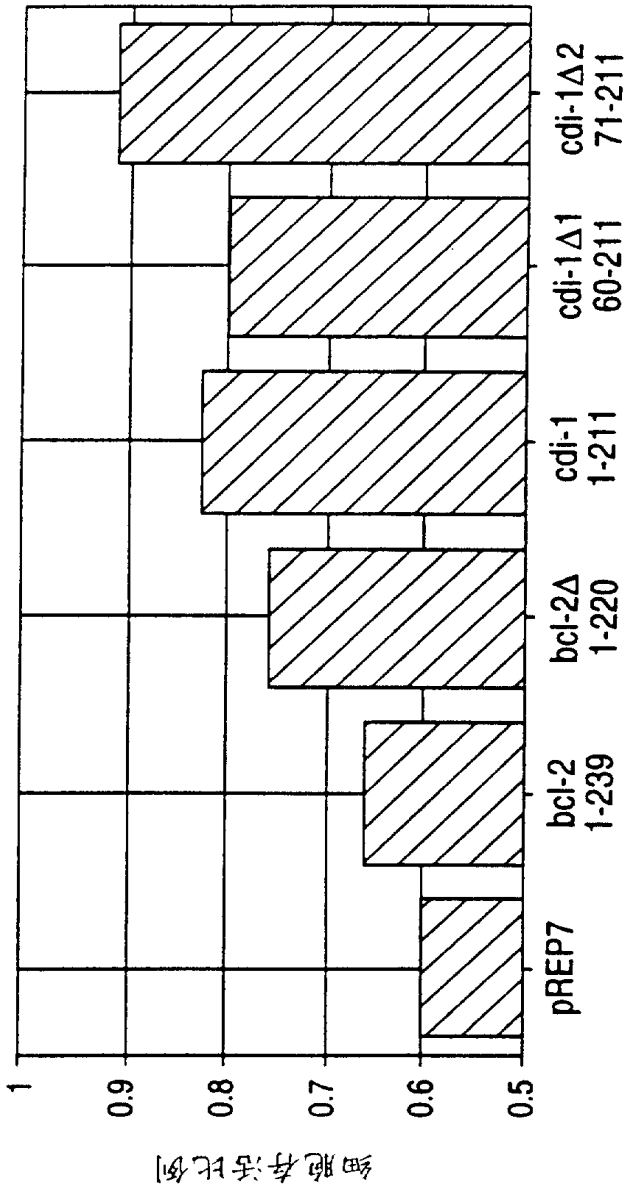

细胞存活比例
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
pREP7
bcl-2 1-239
bcl-2Δ 1-220
cdi-1 1-211
cdi-1Δ1 60-211
cdi-1Δ2 71-211

图 9

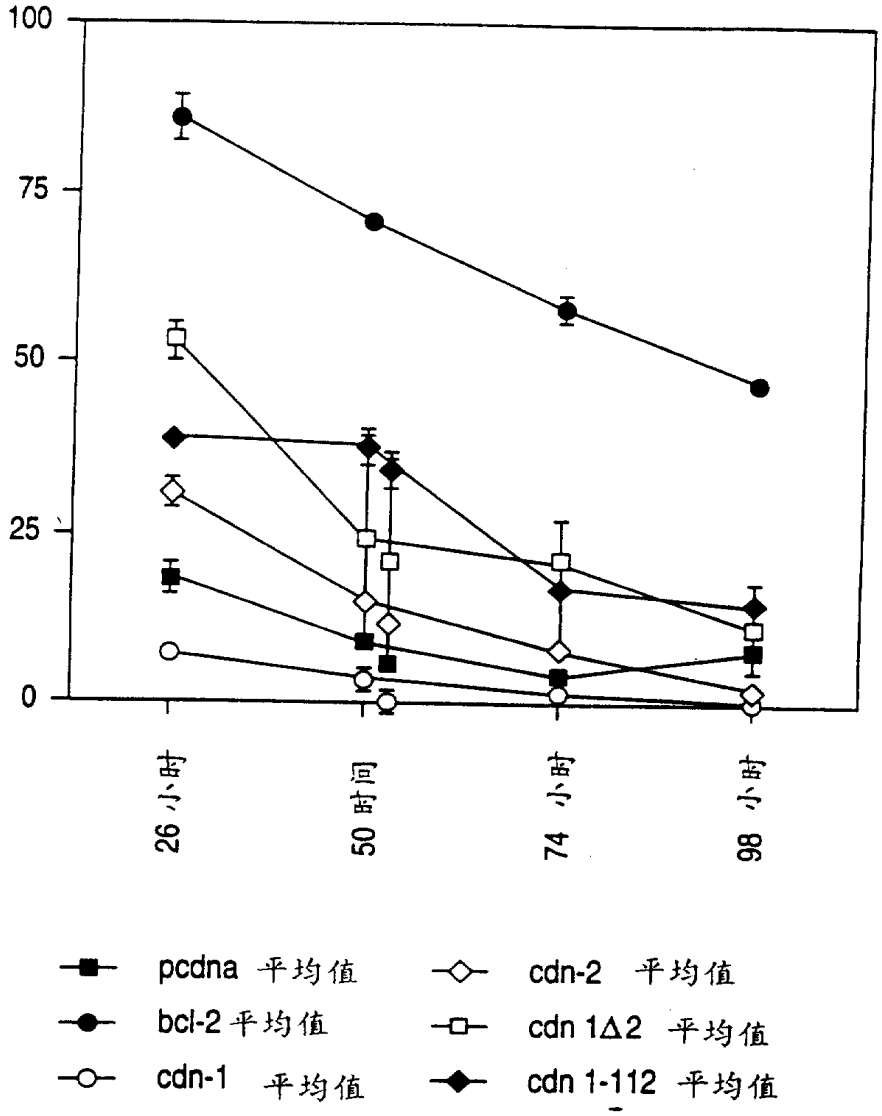

100
75
50
25
0
26 小时
50 时间
74 小时
98 小时
pcdna 平均值
bcl-2 平均值
cdn-1 平均值
cdn-2 平均值
cdn 1Δ2 平均值
cdn 1-112 平均值

图 10

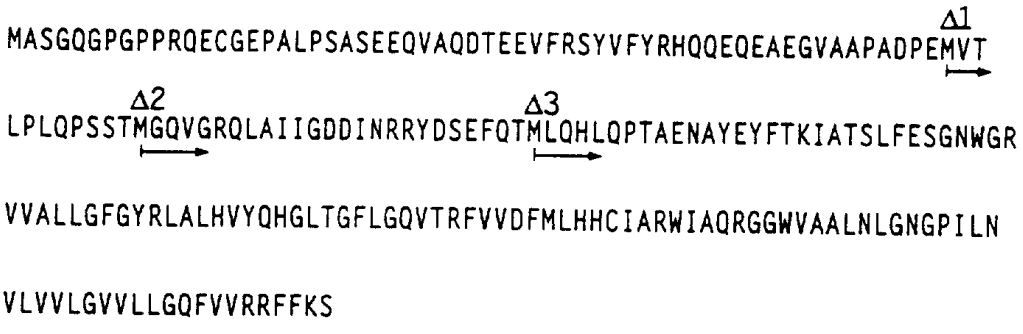

Δ1
MASGQGPGPPRQECGEPALPSASEEQVAQDTEEVFRSYVFYRHQQEQEAEGVAAPADPEMVT
Δ2
Δ3
LPLQPSSTMGQVGRQLAIIGDDINRRYDSEFQTMLQHLQPTAENAYEYFTKIATSLFESGNWGR
VVALLGFGYRLALHVYQHGLTGFLGQVTRFVVDFMLHHCIARWIAQRGGWVAALNLGNGPILN
VLVVLGVVLLGQFVVRRFFKS

图11