

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/46 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780024026.8

[43] 公开日 2009 年 7 月 8 日

[11] 公开号 CN 101479295A

[22] 申请日 2007.5.3

[21] 申请号 200780024026.8

[30] 优先权

[32] 2006.5.4 [33] US [31] 60/797,703

[86] 国际申请 PCT/US2007/068180 2007.5.3

[87] 国际公布 WO2007/131133 英 2007.11.15

[85] 进入国家阶段日期 2008.12.25

[71] 申请人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 阿维·J·阿什克纳齐 里斯·哈特
埃丽卡·克拉茨 基兰·穆克亚拉

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
代理人 封新琴

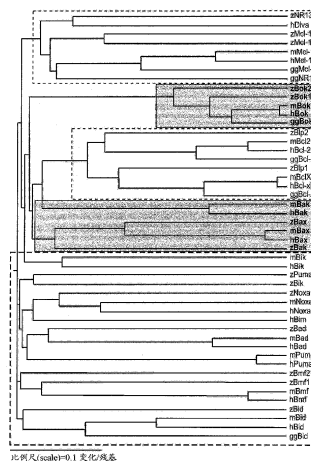
权利要求书 5 页 说明书 106 页 序列表 20 页
附图 13 页

[54] 发明名称

涉及 ZPA 多肽的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供了 ZPA 多肽，与 ZPA 多肽相关的抗体、核酸分子、拮抗剂、激动剂、增效剂和组合物，以及鉴定、制备和使用它们的方法，这些可用于治疗和预防疾病，以及医学诊断和研究。本发明还为内在凋亡途径提供了模型系统。



比例尺(scale)=0.1 变化/残基

1. 一种多肽，其具有选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列或其变体，其中所述多肽是斑马鱼Bcl-2相关(B2R)多结构域促凋亡多肽或斑马鱼B2R仅含BH3的促凋亡多肽。
2. 一种多核苷酸，其具有选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的核苷酸序列或其变体，其中所述多核苷酸编码斑马鱼B2R仅含BH3的促凋亡多肽。
3. 一种转基因斑马鱼，其中一种或多种由选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的核苷酸序列编码的多核苷酸是缺失的。
4. 一种转基因斑马鱼，其中一种或多种选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的多核苷酸的表达相对于野生型斑马鱼中所述一种或多种多核苷酸的表达是受到调控的。
5. 权利要求4的转基因斑马鱼，其中所述表达是升高的。
6. 权利要求4的转基因斑马鱼，其中所述表达是降低的。
7. 一种转基因斑马鱼，其中一种或多种选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的多肽是不表达的。
8. 一种转基因斑马鱼，其中一种或多种选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的多肽的表达相对于野生型斑马鱼中所述一种或多种多肽的表达是受到调控的。
9. 权利要求8的转基因斑马鱼，其中所述表达是升高的。
10. 权利要求8的转基因斑马鱼，其中所述表达是降低的。
11. 一种转基因斑马鱼，其中一种或多种内源性斑马鱼促凋亡(ZPA)基因是用变体ZPA基因或用来自另一种生物体的ZPA基因对应物替换的。
12. 权利要求11的转基因斑马鱼，其中所述对应物是哺乳动物的。
13. 权利要求11的转基因斑马鱼，其中所述对应物是人的。
14. 权利要求11的转基因斑马鱼，其中所有内源性ZPA基因是用来自另一种生物体的ZPA基因对应物替换的。
15. 一种转基因斑马鱼，其中一种或多种内源性内在凋亡途径基因是用内在凋亡途径基因变体或来自另一种生物体的内在凋亡途径基因对应物替换的。
16. 权利要求15的转基因斑马鱼，其中所述对应物是哺乳动物的。

17. 权利要求15的转基因斑马鱼，其中所述对应物是人的。
18. 权利要求15的转基因斑马鱼，其中所有内源性内在凋亡途径基因是用来自另一种生物体的内在凋亡途径基因对应物替换的。
19. 权利要求11或权利要求15的转基因斑马鱼，其中所述一种或多种内源性ZPA基因选自SEQ ID NO: 2、6、8和10。
20. 一种凋亡模型系统，其包含权利要求3-19中任一项的斑马鱼。
21. 一种体外凋亡模型系统，其包含至少一种由选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的核苷酸序列编码的多核苷酸。
22. 权利要求20或权利要求21的模型系统，其中所述凋亡模型系统是内在凋亡途径的模型系统。
23. 一种体外凋亡模型系统，其包含一种或多种选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的多肽。
24. 权利要求23的凋亡模型系统，其中所述模型系统是内在凋亡途径的模型系统。
25. 权利要求23的凋亡模型系统，其中所述模型系统是外在凋亡途径的模型系统。
26. 一种鉴定结合ZPA多肽的化合物的方法，其包括使ZPA多肽与化合物接触，并测定该化合物是否结合该ZPA多肽。
27. 一种鉴定调控ZPA多肽活性的化合物的方法，其包括使ZPA多肽与化合物接触，并测定该化合物是否调控该ZPA多肽的活性。
28. 一种鉴定降低或防止凋亡的药剂的方法，其包括对斑马鱼施用至少一种药剂，并测定是否降低或防止了凋亡。
29. 权利要求28的方法，其进一步包括在施用所述至少一种药剂之前测定斑马鱼中凋亡的存在或量。
30. 权利要求28的方法，其进一步包括在施用所述至少一种药剂之前在斑马鱼中刺激凋亡。
31. 权利要求28的方法，其中所述药剂降低或防止通过内在凋亡途径的凋亡。
32. 权利要求28的方法，其中所述药剂降低或防止通过外在凋亡途径的凋亡。
33. 权利要求28的方法，其中所述斑马鱼中一种或多种ZPA蛋白的表达和/

- 或活性相对于野生型斑马鱼中该一种或多种ZPA蛋白的表达和/或活性是升高的。
34. 权利要求28的方法,其中所述斑马鱼中一种或多种ZPA蛋白是不表达的。
 35. 权利要求28的方法,其中所述斑马鱼中一种或多种ZPA蛋白的表达和/或活性相对于野生型斑马鱼中该一种或多种ZPA蛋白的表达和/或活性是降低的。
 36. 权利要求28的方法,其中所述作用剂选自抗体、抗体片段、适体和小分子。
 37. 权利要求28的方法,其中所述斑马鱼是幼体斑马鱼。
 38. 权利要求28的方法,其中所述测定步骤包括显微镜检查细胞生存力。
 39. 权利要求28的方法,其中所述测定步骤包括测定胱天蛋白酶活化。
 40. 一种鉴定起始和/或刺激凋亡的药剂的方法,其包括对斑马鱼施用至少一种药剂,并测定是否起始或升高了凋亡。
 41. 权利要求40的方法,其进一步包括在施用所述至少一种药剂之前测定斑马鱼中凋亡的存在或量。
 42. 权利要求40的方法,其进一步包括在施用所述至少一种药剂之前在斑马鱼中防止和/或降低凋亡。
 43. 权利要求40的方法,其中所述药剂起始和/或刺激通过内在凋亡途径的凋亡。
 44. 权利要求40的方法,其中所述药剂起始和/或刺激通过外在凋亡途径的凋亡。
 45. 权利要求40的方法,其中所述斑马鱼中一种或多种ZPA蛋白的表达和/或活性相对于野生型斑马鱼中该一种或多种ZPA蛋白的表达和/或活性是升高的。
 46. 权利要求40的方法,其中所述斑马鱼中一种或多种ZPA蛋白是不表达的。
 47. 权利要求40的方法,其中所述斑马鱼中一种或多种ZPA蛋白的表达和/或活性相对于野生型斑马鱼中该一种或多种ZPA蛋白的表达和/或活性是降低的。
 48. 权利要求40的方法,其中所述药剂选自抗体、抗原结合性抗体片段、适体和小分子。
 49. 权利要求40的方法,其中所述斑马鱼是幼体斑马鱼。

50. 权利要求40的方法，其中所述测定步骤包括显微镜检查细胞生存力。
51. 权利要求40的方法，其中所述测定步骤包括测定胱天蛋白酶活化。
52. 一种治疗凋亡相关病症的方法，其包括对患者施用至少一种由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽。
53. 一种治疗凋亡相关病症的方法，其包括对患者施用由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的至少一种多肽的拮抗剂。
54. 权利要求53的方法，其中所述拮抗剂选自适体、抗体、抗原结合性抗体片段和小分子。
55. 一种治疗凋亡相关病症的方法，其包括对患者施用由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的至少一种多肽的激动剂。
56. 一种治疗凋亡相关病症的方法，其包括对患者施用至少一种选自下组的多肽：由SEQ ID NO: 2、6、8和10的多核苷酸序列编码的多肽。
57. 权利要求52-56中任一项的方法，其中所述凋亡相关病症选自细胞增殖性病症、病毒性凋亡病症、自身免疫性病症、血液学病症和神经学病症。
58. 一种鉴定防止或降低凋亡的药剂的方法，其包括使至少一种由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽与所述药剂接触，并测定该药剂阻断或降低所述至少一种多肽的活性的能力。
59. 一种鉴定起始或刺激凋亡的药剂的方法，其包括使至少一种由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽与所述药剂接触，并测定该药剂刺激或提高所述至少一种多肽的活性的能力。
60. 一种鉴定防止或降低凋亡的药剂的方法，其包括使包含至少一种由选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的核苷酸序列编码的多核苷酸的细胞与所述药剂接触，并测定该药剂防止或降低所述至少一种多核苷酸的表达的能力。
61. 一种鉴定起始或刺激凋亡的药剂的方法，其包括使包含至少一种由选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的核苷酸序列编码的多核苷酸的细胞与所述药剂接触，并测定该药剂刺激或提高所述至少一种多核苷酸的表达的能力。
62. 一种提高凋亡的组合物，其包含由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽或其激动剂。
63. 一种降低或防止凋亡的组合物，其包含SEQ ID NO: 1、5、7和9中一种

或多种的拮抗剂。

64. 权利要求63的组合物，其中所述拮抗剂选自抗体、抗原结合性抗体片段、适体和小分子。
65. 一种降低或防止凋亡的组合物，其包含降低或抑制SEQ ID NO: 2、6、8和10中一种或多种的表达的药剂。
66. 权利要求62-65中任一项的组合物，其进一步包含药学可接受载体。
67. 一种治疗需要治疗的受试者中凋亡相关病症的方法，其包括对所述受试者施用权利要求62-65中任一项的组合物。
68. 权利要求67的方法，其中所述凋亡相关病症选自细胞增殖性病症、病毒性凋亡病症、自身免疫性病症、血液学病症和神经学病症。
69. 一种检测凋亡相关病症的存在或严重性或检测对凋亡相关病症的素因的方法，其包括检测有风险发生凋亡相关病症的受试者中ZPA多肽同系物的存在或量。
70. 一种检测凋亡相关病症的存在或严重性或检测对凋亡相关病症的素因的方法，其包括检测有风险发生凋亡相关病症的患者中ZPA多核苷酸同系物的存在或表达量。
71. 一种试剂盒，其包含权利要求62-65中任一项的组合物和对用途的说明。
72. 一种试剂盒，其包含权利要求21-25中任一项的体外凋亡模型系统和对用途的说明。
73. 一种制品，其包含：(a) 权利要求62-65中任一项的组合物，(b) 装有所述组合物的容器；和(c) 贴在所述容器上的标签或包括在所述容器中的包装插页，其涉及所述组合物在治疗凋亡相关病症中的用途。

涉及ZPA多肽的方法和组合物

发明领域

本发明致力于ZPA多肽，与ZPA多肽相关的抗体、核酸分子、拮抗剂、激动剂和组合物，以及制备和使用它们的方法，包括用于诊断和治疗哺乳动物中的凋亡相关病症的方法。本发明还致力于内在凋亡途径的模型系统。

发明背景

不受控制的细胞生长是多种细胞类型中许多疾病的原因。例如，当衍生自正常组织的异常性或赘生性的细胞（它们增殖形成肿瘤块）的数目增加时即发生癌。肿瘤细胞常常侵入邻近组织，而且能经由称为转移的过程通过血液或淋巴系统扩散至局部淋巴结和较远的部位。在癌性生长中，细胞在正常细胞不会生长的条件下增殖。癌本身表现为极其多种形式，以不同程度的侵入性和攻击性为特征。恶性肿瘤（癌）是美国第二位死因，仅次于心脏病(Boring等, CA Cancer J. Clin. 43: 7 (1993))。

已经有许多研究致力于发现细胞增殖性病症（诸如癌）的新治疗方法。尽管有最新的进展，但是非常需要鉴定和理解调控细胞增殖的新细胞靶物的功能，也非常需要开发备选的或更多的有效治疗方法以及治疗剂和诊断剂。还需要开发备选的疗法和方法用于治疗特定细胞类型和用于治疗由异常细胞增殖引起的或与之相关的疾病，诸如癌。开发抗癌疗法的一种方法是研究凋亡机制，其也称为程序性细胞死亡。

对决定细胞命运的凋亡机制的有力控制是生物体发育、体内稳态和细胞损伤应答所需要的。此类途径的失调常常导致严重的疾病。例如，许多癌选择性抑制促凋亡途径和/或增强促存活途径，从而规避宿主以调节生长为意图的应答(Kirkin等, Biochim Biophys Acta 1644(2-3): 229-249 (2004); LeBlanc等, Nature Med. 8: 2 274-281 (2002); Cory和Adams, Trends Biochem. Sci. 26: 61-66 (2001))。因此，了解和治疗多种疾病，包括癌症、自身免疫性疾病和变性病症，必需了解凋亡(Strasser, Nat. Rev. Immunol. 5: 189-200 (2005); Strasser等, Biochim Biophys Acta 1333: F151-178 (1997))。

已经描述了哺乳动物中的两种凋亡信号传导途径(Anderson等, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4(5): 399-409 (2005)): 外在途径(extrinsic pathway), 通常由TNF家族的死亡诱导性配体起始; 和内在途径(intrinsic pathway), 其主要响应于由Bcl-2家族介导的胞内刺激(Strasser等, *Nat. Rev. Imm.* 5: 189-200 (2005); Borner, *Mol. Immunol.* 39: 615-647 (2003)), 但是也由外在途径的组分激活。

Bcl-2蛋白的特征在于四个独特的 α -螺旋序列基序, 称为Bcl-2同源性(BH)结构域BH1 - BH4。在有些情况中, Bcl-2蛋白还具有使它们定位至线粒体外膜、核被膜或内质网三者的胞质面的C-末端跨膜区(Borner, *Mol. Immunol.* 39: 615-647 (2003))。Bcl-2蛋白家族成员可以分为三组: (i) 促存活Bcl-2样蛋白(例如Bcl-2、Bcl-x_L、Bcl-w、Mcl-1、A1/Bfl-1、NR-13、BHRF1、LMW5-HL、ORF16、v-Bcl-2(KSHV)、E1B-19K、CED-9、Boo/DIVA/Bcl2-L-10和Bcl-B); (ii) 促凋亡多结构域蛋白(例如Bax、Bak、Bok/Mtd和Bcl-x_S); 和(iii) 仅含BH3的促凋亡蛋白(例如Bik/Nbk、Blk、Hrk/DP5、BNip3、BimL/Bod、Bad、Bid、EGL-1、Noxa、Puma/Bbc3和Bmf)(出处同前)。大多数促存活成员含有所有四种BH结构域, 而大多数多结构域促凋亡蛋白缺乏BH4结构域。

在未受刺激的细胞中, 促存活和促凋亡多结构域家族成员之间的相互作用阻止Bax样蛋白在线粒体膜上寡聚化, 并且阻止其起始凋亡程序。在受到刺激后, 仅含BH3的蛋白通过与促存活蛋白二聚化而减轻对Bax样蛋白的抑制, 这释放促凋亡多结构域蛋白来中和(compromise)线粒体膜电位并起始凋亡。先前的实验已经证明Bcl-2家族的数个成员对于正常发育至关重要(Lindsten等, *Mol. Cell.* 6: 1389-1399 (2000); Motoyama等, *Science* 267: 1506-1510 (1995); Veis等, *Cell* 75: 229-240 (1993); Rinckenberger等, *Genes Dev.* 14: 23-27 (2000))。然而, 该蛋白家族在发育过程中的功能大部分是未知的: 即使在具有显著发育效应的Bcl-2相关基因敲除中, 起始性凋亡信号和响应于该信号而激活的仅含BH3的蛋白也都是未知的。

通过与Bcl-2的序列相似性, 已经在脊椎动物中鉴定出Bcl-2家族的许多新成员, Bcl-2是该家族中以其在B细胞淋巴瘤中的作用来命名的齐名成员(eponymous member)(Tsujimoto等, *Science* 228: 1440-1443 (1985))。然而, 由于Bcl-2家族成员对于发育和调节至关重要, 该蛋白家族中一个或多个成员的畸变或缺失常引起阻止它们的功能重要性得以表征的病理, 或导致一开始就无法存活的动物。能从生长的最早阶段起监测发育和调节变化的模型系统

将为解决涉及Bcl-2基因家族在凋亡中作用的问题提供关键的工具。

斑马鱼(*Danio rerio*)已经用作多种生物学途径的有用模型系统。斑马鱼可以充当研究凋亡的优越模型,这不仅因为鱼发育迅速,而且斑马鱼胚胎在胚胎发生的大部分时间始终保持透明,还因为存在可用的展示异常凋亡的突变型斑马鱼品系(参见例如Cole和Ross, *Devel. Biol.* 240: 123-142 (2001))。因为已经检查过斑马鱼中的凋亡模式,所以凋亡细胞的检测和凋亡的一般动力学在该生物体中是已知的(出处同前)。然而,负责斑马鱼中那些凋亡模式的生化途径尚未表征。仍未解决的问题是内在凋亡途径在斑马鱼中是否发挥功能。

将斑马鱼建立为通过内在途径进行凋亡信号传导的模型的先决条件是证明Bcl-2家族的主要成员存在于斑马鱼中。已有数项研究试图鉴定斑马鱼中的Bcl-2家族成员。Inohara和Nunez发现了许多斑马鱼基因与哺乳动物和鸟类外在途径成员(诸如胱天蛋白酶)同源,但是只鉴定出八个推定与内在途径Bcl-2家族中仅仅六个成员(Bcl-x_L、Mcl-1、NR-13、Bax、BNIP3和Bad)有关的斑马鱼基因(Inohara和Nunez, *Cell Death Diff.* 7: 509-510 (2000))。Coultas等通过tblastn彻底搜索了斑马鱼非冗余和EST GenBank数据库,仅仅鉴定出另外三个仅含BH3的Bcl-2家族成员: Bid、Noxa和Bmf(Coultas等, *Cell Death Differ.* 9: 1163-1166 (2002))。事实上,该小组特别评论了使用翻译的BLAST搜索(translated BLAST search)在斑马鱼中鉴定Bik、Bim和Puma的失败(出处同前)。在Aouacheria等使用PSI-BLAST和tblastn彻底搜索了Ensemble和GenBank核苷酸和蛋白质序列之后,他们最近确认了这一观察结果(Aouacheria等, *Mol. Biol. Evol.* 22(12): 2395-416 (2005))。

发明概述

本发明提供了用于调查体内和体外凋亡的新模型系统(model system),并且提供了用于鉴定调控凋亡的药剂(agent)的方法。本发明还提供了新的治疗剂、诊断剂,以及通过靶向凋亡,特别是内在凋亡途径,来治疗或预防凋亡相关疾病(包括癌)的方法。

在某些实施方案中,本发明提供了斑马鱼促凋亡("ZPA")多肽和多核苷酸。在一个实施方案中,提供了具有选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽是斑马鱼Bcl-2相关("B2R")促凋亡多肽。在另一

个实施方案中,提供了具有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽是斑马鱼B2R多结构域促凋亡多肽。在另一个实施方案中,提供了具有选自SEQ ID NO: 5、7和9的氨基酸序列的多肽,其中所述多肽是斑马鱼B2R仅含BH3的促凋亡多肽。在另一个实施方案中,提供了具有选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码斑马鱼B2R促凋亡多肽。在另一个实施方案中,提供了具有SEQ ID NO: 1的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码斑马鱼B2R多结构域促凋亡多肽。在另一个实施方案中,提供了具有选自SEQ ID NO: 6、8和10的核苷酸序列的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码斑马鱼B2R仅含BH3的促凋亡多肽。

在其它实施方案中,本发明提供了一种或多种凋亡相关蛋白是转基因的斑马鱼。在一个实施方案中,提供了转基因斑马鱼,其中一种或多种选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的多核苷酸是缺失的。在另一个实施方案中,提供了转基因斑马鱼,其中一种或多种选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的多核苷酸的表达相对于野生型斑马鱼中的所述一种或多种多核苷酸的表达是受到调控的。在一个方面,所述表达是升高的。在另一个方面,所述表达是降低的。在另一个实施方案中,提供了转基因斑马鱼,其中一种或多种选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的多肽是不表达的。在另一个实施方案中,提供了转基因斑马鱼,其中一种或多种选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的多肽的表达相对于野生型斑马鱼中所述一种或多种多肽的表达是受到调控的。在一个方面,所述表达是升高的。在另一个方面,所述表达是降低的。

在另一个实施方案中,提供了转基因斑马鱼,其中一种或多种内源性B2R基因是用来自另一种生物体的B2R基因对应物(counterpart)替换的。在一个方面,所述对应物是哺乳动物的。在另一个方面,所述对应物是人的。在另一个方面,所有内源性B2R基因是用来自另一种生物体的B2R基因对应物替换的。在一个方面,所述对应物是哺乳动物的。在另一个方面,所述对应物是人的。在另一个实施方案中,提供了转基因斑马鱼,其中一种或多种内源性内在凋亡途径基因是用来自另一种生物体的内在凋亡途径基因对应物替换的。在一个方面,所述对应物是哺乳动物的。在另一个方面,所述对应物是人的。在另一个方面,所述一种或多种内源性内在凋亡途径基因选自SEQ ID NO: 2、6、8和10。在另一个实施方案中,提供了转基因斑马鱼,其中所有内源性内在凋亡途径基因是用来自另一种生物体的内在凋亡途径基

因对应物替换的。在一个方面，所述对应物是哺乳动物的。在另一个方面，所述对应物是人的。在另一个方面，所述内源性内在凋亡途径基因包括SEQ ID NO: 2、6、8和10。

在某些实施方案中，本发明提供了凋亡模型系统。在一个实施方案中，提供了凋亡模型系统，其包含如任一前述实施方案中所述的斑马鱼。在一个方面，所述模型系统是内在凋亡途径的模型系统。在另一个实施方案中，提供了体外凋亡模型系统，其包含至少一种由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽。在一个方面，所述模型系统是内在凋亡途径的模型系统。在另一个方面，所述模型系统是外在凋亡途径的模型系统。在另一个实施方案中，提供了体外凋亡模型系统，其包含至少一种由选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的核苷酸序列编码的多核苷酸。在一个方面，所述模型系统是内在凋亡途径的模型系统。在另一个方面，所述模型系统是外在凋亡途径的模型系统。

在某些实施方案中，本发明提供了鉴定结合ZPA多肽的化合物的方法，包括使ZPA多肽与化合物接触，并测定该化合物是否结合ZPA多肽。在某些实施方案中，本发明提供了鉴定调控ZPA多肽活性的化合物的方法，包括使ZPA多肽与化合物接触，并测定该化合物是否调控ZPA多肽的活性。

在某些实施方案中，本发明提供了鉴定调控凋亡的药剂的方法。在一个实施方案中，提供了鉴定降低或阻止凋亡的药剂的方法，包括对斑马鱼施用至少一种药剂，并测定是否降低或阻止了凋亡。在一个方面，所述方法进一步包括在施用所述至少一种药剂之前测定斑马鱼中凋亡的存在或量。在另一个方面，所述方法进一步包括在施用所述至少一种药剂之前在斑马鱼中刺激凋亡。在另一个方面，所述药剂降低或阻止通过内在凋亡途径的凋亡。在另一个方面，所述药剂降低或阻止通过外在凋亡途径的凋亡。在另一个方面，所述斑马鱼中一种或多种B2R蛋白的表达和/或活性相对于野生型斑马鱼中所述一种或多种B2R蛋白的表达和/或活性是升高的。在另一个方面，所述斑马鱼中一种或多种B2R蛋白是不表达的。在另一个方面，所述斑马鱼中一种或多种B2R蛋白的表达和/或活性相对于野生型斑马鱼中所述一种或多种B2R蛋白的表达和/或活性是降低的。在另一个方面，所述药剂选自抗体、抗原结合性抗体片段、适体(aptamer)和小分子。在另一个方面，所述斑马鱼是幼体(larval)斑马鱼。在另一个方面，所述测定步骤包括显微镜检查细胞生存

力(viability)。在另一个方面,所述测定步骤包括测定胱天蛋白酶活化。

在另一个实施方案中,提供了鉴定起始和/或刺激凋亡的药剂的方法,包括对斑马鱼施用至少一种药剂,并测定是否起始或升高了凋亡。在一个方面,所述方法进一步包括在施用所述至少一种药剂之前测定斑马鱼中凋亡的存在或量。在另一个方面,所述方法进一步包括在施用所述至少一种药剂之前在斑马鱼中阻止和/或降低凋亡。在另一个方面,所述药剂起始和/或刺激通过内在凋亡途径的凋亡。在另一个方面,所述药剂起始和/或刺激通过外在凋亡途径的凋亡。在另一个方面,所述斑马鱼中一种或多种B2R蛋白的表达和/或活性相对于野生型斑马鱼中所述一种或多种B2R蛋白的表达和/或活性是升高的。在另一个方面,所述斑马鱼中一种或多种B2R蛋白是不表达的。在另一个方面,所述斑马鱼中一种或多种B2R蛋白的表达和/或活性相对于野生型斑马鱼中所述一种或多种B2R蛋白的表达和/或活性是降低的。在另一个方面,所述药剂选自抗体、抗原结合性抗体片段、适体和小分子。在另一个方面,所述斑马鱼是幼体斑马鱼。在另一个方面,所述测定步骤包括显微镜检查细胞生存力。在另一个方面,所述测定步骤包括测定胱天蛋白酶活化。

在某些实施方案中,本发明提供了鉴定用于调控凋亡的药剂的其它方法。在一个实施方案中,提供了鉴定用于阻止或降低凋亡的药剂的方法,包括使至少一种由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽与药剂接触,并测定该药剂阻断或降低所述至少一种多肽活性的能力。在另一个实施方案中,提供了鉴定用于阻止或降低凋亡的药剂的方法,包括使包含至少一种由选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的核苷酸序列编码的多核苷酸的细胞与药剂接触,并测定该药剂阻止或降低所述至少一种多核苷酸表达的能力。

在另一个实施方案中,提供了鉴定用于起始或刺激凋亡的药剂的方法,包括使至少一种由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽与药剂接触,并测定该药剂刺激或提高所述至少一种多肽活性的能力。在一个实施方案中,提供了鉴定用于起始或刺激凋亡的药剂的方法,包括使包含至少一种由选自SEQ ID NO: 2、6、8和10的核苷酸序列编码的多核苷酸的细胞与药剂接触,并测定该药剂刺激或提高所述至少一种多核苷酸表达的能力。

在某些实施方案中,本发明提供了治疗方法。在一个实施方案中,提供了治疗凋亡相关病症的方法,包括对患者施用至少一种由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽。在另一个实施方案中,提供了治疗凋

亡相关病症的方法,包括对需要此类治疗的患者施用有效量的至少一种由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽,由此治疗所述患者中的凋亡相关病症。在另一个实施方案中,提供了治疗凋亡相关病症的方法,包括对患者施用由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的至少一种多肽的激动剂。在另一个实施方案中,提供了治疗凋亡相关病症的方法,包括对需要此类治疗的患者施用有效量的由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的至少一种多肽的激动剂,由此治疗所述患者中的凋亡相关病症。在另一个实施方案中,提供了治疗凋亡相关病症的方法,包括对患者施用由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的至少一种多肽的拮抗剂。在另一个实施方案中,提供了治疗凋亡相关病症的方法,包括对需要此类治疗的患者施用有效量的由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的至少一种多肽的拮抗剂,由此治疗所述患者中的凋亡相关病症。在一个方面,所述拮抗剂选自适体、抗体、抗原结合性抗体片段和小分子。在另一个方面,所述凋亡相关病症选自细胞增殖性病症(cell proliferative disorder)、病毒性凋亡病症(viral apoptosis disorder)、自身免疫性病症(autoimmune disorder)、血液学病症(hematologic disorder)和神经学病症(neurological disorder)。在一个方面,所述凋亡相关病症是癌。在另一个实施方案中,提供了治疗凋亡相关病症的方法,包括对患者施用至少一种选自下组的多肽:由SEQ ID NO: 2、6、8和10的多核苷酸序列编码的多肽。在一个方面,所述凋亡相关病症选自细胞增殖性病症、病毒性凋亡病症、自身免疫性病症、血液学病症和神经学病症。在一个方面,所述凋亡相关病症是癌。

在某些实施方案中,本发明提供了用于调控凋亡的组合物。在一个实施方案中,提供了用于提高凋亡的组合物,该组合物包含由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽。在一个方面,所述组合物进一步包含药学可接受载体(pharmaceutically acceptable carrier)。在另一个实施方案中,提供了用于提高凋亡的组合物,该组合物包含由选自SEQ ID NO: 1、5、7和9的氨基酸序列编码的多肽的激动剂。在另一个实施方案中,提供了用于降低或阻止凋亡的组合物,该组合物包含SEQ ID NO: 1、5、7和9中一种或多种的拮抗剂。在一个方面,所述拮抗剂选自抗体、抗原结合性抗体片段、适体和小分子。在另一个方面,所述组合物进一步包含药学可接受载体。在另一个实施方案中,提供了用于降低或阻止凋亡的组合物,该组合物包含降低或

抑制SEQ ID NO: 2、6、8和10中的一种或多种表达的药剂。在一个方面，所述组合物进一步包含药学可接受载体。

在某些实施方案中，本发明提供了治疗需要治疗的受试者中凋亡相关病症的方法，包括施用至少一种本发明的组合物。在某些实施方案中，本发明提供了治疗需要治疗的受试者中凋亡相关病症的方法，包括施用有效量的至少一种本发明的组合物，由此治疗所述患者中的凋亡相关病症。在某些实施方案中，所述凋亡相关病症选自细胞增殖性病症、病毒性凋亡病症、自身免疫性病症、血液学病症和神经学病症。

在某些实施方案中，本发明提供了检测受试者中的凋亡相关病症的存在、严重性和/或对凋亡相关病症的素因(predisposition)的方法。在一个实施方案中，凋亡相关病症的存在通过检测来自受试者的细胞中ZPA多肽的存在或量来检测。在另一个实施方案中，对凋亡相关病症的素因通过检测来自受试者的细胞中ZPA多肽的存在或量来检测。在另一个实施方案中，凋亡相关病症的严重性通过检测来自受试者的细胞中ZPA多肽的存在或量来检测。在另一个实施方案中，凋亡相关病症的存在通过检测来自受试者的细胞中ZPA多肽同系物(homolog)的存在或量来检测。在另一个实施方案中，对凋亡相关病症的素因通过检测来自受试者的细胞中ZPA多肽同系物的存在或量来检测。在另一个实施方案中，凋亡相关病症的严重性通过检测来自受试者的细胞中ZPA多肽同系物的存在或量来检测。在某些方面，所述凋亡相关病症选自细胞增殖性病症、病毒性凋亡病症、自身免疫性病症、血液学病症和神经学病症。

在另一个实施方案中，凋亡相关病症的存在通过检测来自受试者的细胞中ZPA多核苷酸的存在或表达量(presence or amount of expression)来检测。在另一个实施方案中，对凋亡相关病症的素因通过检测来自受试者的细胞中ZPA多核苷酸的存在或表达量来检测。在另一个实施方案中，凋亡相关病症的严重性通过检测来自受试者的细胞中ZPA多核苷酸的存在或表达量来检测。在另一个实施方案中，凋亡相关病症的存在通过检测来自受试者的细胞中ZPA多核苷酸同系物的存在或表达量来检测。在另一个实施方案中，对凋亡相关病症的素因通过检测来自受试者的细胞中ZPA多核苷酸同系物的存在或表达量来检测。在另一个实施方案中，凋亡相关病症的严重性通过检测来自受试者的细胞中ZPA多核苷酸同系物的存在或表达量来检测。在某些方面，

所述凋亡相关病症选自细胞增殖性病症、病毒性凋亡病症、自身免疫性病症、血液学病症和神经学病症。

在某些实施方案中，本发明还以任何有用组合提供了本文所述化合物和组合物的试剂盒和制品。在一个实施方案中，提供了包含一种或多种本发明的组合物和对用途的说明或用法说明书(instructions for use)的试剂盒。在一个方面，所述用途是治疗用途。在另一个方面，所述用途是诊断用途。在另一个方面，所述用途是研究用途。在另一个实施方案中，提供了包含体外内在凋亡途径模型系统并对其用途的说明或用法说明书的试剂盒。在一个方面，所述用途是诊断用途。在另一个方面，所述用途是研究用途。在另一个实施方案中，提供了包含斑马鱼内在凋亡途径模型系统并对其用途的说明或用法说明书的试剂盒。在一个方面，所述用途是诊断用途。在另一个方面，所述用途是研究用途。在另一个实施方案中，本发明提供了制品，该制品包含：(a) 包含一种或多种ZPA多肽、激动剂和拮抗剂的组合物，(b) 装有所述组合物的容器；和(c) 贴在容器上的标签(label)或包括在容器中的包装插页(package insert)，其涉及所述组合物在治疗凋亡相关病症中的用途。

附图简述

图1显示隐蔽马尔科夫模型(Hidden Markov Model, HMM)的查准率-查全率(precision-recall)图，其从PROSITE样式和矩阵构建，如实施例1(b)所述。PROSITE样式的查准率和查全率由菱形表示；将不同得分时的样式衍生HMM的查准率和查全率绘制成线；沙漏表示本文中所使用的HMM分数阈值时的查准率和查全率。

图2显示已知的和候选的Bcl-2相关(“B2R”)蛋白的BH3结构域比对，如实施例2所述。具有相似物理化学性质的氨基酸用类似的阴影标示，与标准ClustalX颜色样式(color pattern)一致。

图3A描述已知的和候选的斑马鱼B2R蛋白与人(h)、小鼠(m)和鸡(gg)对应物的比对，如实施例2(g)所述。促存活蛋白表现为最顶部和中部无阴影的部分；仅含BH3的蛋白表现为最底部无阴影的部分；而剩下的有阴影的部分是多结构域促凋亡蛋白。图3B显示根据基因分组的人、小鼠和斑马鱼仅含BH3的蛋白的BH3结构域比对，如实施例2所讨论。具有相似物理化学性质的氨基酸用类似的阴影标示。图3C和3D描述的是实施例3(a)所述实验的结果。

图3C描述的是时期(stage)特异性RT-PCR的电泳结果,其显示直至受精后(hpf) 72小时,大多数斑马鱼Bcl-2家族成员以与母体基值一致的水平(at consistent levels form the maternal contribution)表达。图3D描述的是组织特异性RT-PCR的电泳结果,其显示多个斑马鱼Bcl-2家族成员在多种成体斑马鱼组织中的表达。

图4A和4B描述的图显示体内异位斑马鱼B2R蛋白表达的结果,如实施例3(b)所述。除了zBad、zBok1和zBok2,各个促凋亡zBcl-2家族成员的异位表达以剂量依赖性方式诱导死亡。图4C显示亮视野显微图像(左侧小图)和对注射了合成斑马鱼B2R蛋白或绿色荧光蛋白(GFP)对照的斑马鱼胚胎中活化的胱天蛋白酶-3的免疫荧光染色(右侧小图),如实施例3(b)所述。图4D显示的图描绘自实施例3(c)所述实验得到的数据。将存活胚胎的百分比相对于异位表达的斑马鱼B2R蛋白的所示组合作图。图示的顶部显示对于每种组合检验的胚胎总数。

图5A-5F描述实施例3(d)所述实验的结果。图5A显示对异位表达斑马鱼促存活B2R蛋白(zB1p1、zMcl-1a、zMcl-1b或zB1p2)之一或对照(WT(未注射)或GFP)的未处理的(左侧小图)或经伽马照射的(右侧小图)斑马鱼胚胎中胱天蛋白酶-3活性的免疫染色。图5B显示对注射了单独的p53的吗啉代(morpholino)或单独的对照吗啉代或与zBax或zBak的吗啉代的组合的未处理的(左侧小图)或经伽马照射的(右侧小图)斑马鱼中胱天蛋白酶-3活性的免疫染色。图5C显示定量来自zBax和zBak的单敲低和双敲低(knockdown)的荧光的图。图5D显示对注射了对照吗啉代或斑马鱼仅含BH3的B2R蛋白(zBid、zBad1、zBmf1、zNoxa、zPuma或zBik)的吗啉代的未处理的(左侧小图)或经伽马照射的(右侧小图)斑马鱼胚胎中胱天蛋白酶-3活性的免疫染色。图5E显示对未注射或注射了对照吗啉代或p53的吗啉代的未处理的(左侧小图)或经伽马照射的(右侧小图)斑马鱼胚胎中胱天蛋白酶-3活性的免疫染色。图5F以图描述对未处理或经对照或p53吗啉代处理的经伽马照射的斑马鱼胚胎中zPuma或zNoxa转录增加的定量PCR分析结果。

图6A描述实施例3(e)所述实验的结果。该图显示的图描述经过吗啉代敲低zMcl-1a、zMcl-1b和/或B1p2的斑马鱼胚胎的百分比存活。图6B和6C描述实施例3(f)所述实验的结果。该图显示的图描述经过吗啉代敲低zMcl-1a和/或zMcl-1b以及Apo2L诱导的凋亡(用斑马鱼Apo2L直向同系物DL1b,或者用

另一种Apo2L途径相关分子诸如zDL1a、zDL2、zDL3、zTNF1、zTNF2或zFasL)的斑马鱼胚胎的百分比存活。

发明详述

申请人使用定制的搜索技术鉴定了先前未知的与Bcl-2蛋白家族相关的五个斑马鱼基因，其中四个代表先前未在斑马鱼中鉴定的Bcl-2家族成员：Bak、Bik、Puma和Bim。申请人还在本文中首次表征了某些斑马鱼Bcl-2相关(“B2R”)蛋白的功能活性，并且证明了斑马鱼中内在凋亡途径的存在和功能，以及将斑马鱼用作内在凋亡途径的模型系统的效用。申请人的发明允许鉴定阻止、降低、起始和/或刺激凋亡的新药剂和治疗剂(therapeutics)，以及研究Bcl-2基因和/或内在凋亡途径在凋亡相关病症中的作用的方法。申请人的发明还提供了治疗与异常凋亡有关或由异常凋亡引起的疾病或病症的新治疗剂和方法。

如本文所述，SEQ ID NO: 1、3、5、7和9(分别由SEQ ID NO: 2、4、6、8和10编码)与涉及内在凋亡途径的Bcl-2蛋白家族的某些人成员同源。SEQ ID NO: 1是与人Bak(一种多结构域促凋亡蛋白)具有序列同一性的斑马鱼蛋白。SEQ ID NO: 3是与人Bad(一种仅含BH3的促凋亡蛋白)具有序列同一性的斑马鱼蛋白。SEQ ID NO: 5是与人Bik(一种仅含BH3的促凋亡蛋白)具有序列同一性的斑马鱼蛋白。SEQ ID NO: 7是与人Puma(一种仅含BH3的促凋亡蛋白)具有序列同一性的斑马鱼蛋白。SEQ ID NO: 9是与Bmf(一种仅含BH3的促凋亡蛋白)具有序列同一性的斑马鱼蛋白。申请人还鉴定了人Bim(一种仅含BH3的促凋亡蛋白)的斑马鱼同系物，但是如实施例2(d)所述，该基因由于当前斑马鱼基因组构建中的明显错误(apparent error)而无法克隆。

SEQ ID NO: 2、6、8和10(编码SEQ ID NO: 1、5、7和9的蛋白质)先前作为斑马鱼基因组计划的一部分得到鉴定，但是在申请人的工作之前尚未：(1)将它们鉴定为编码人Bcl-2家族成员的同系物，或(2)暗示它们编码一种或多种凋亡途径的成员。如本文所述，申请人通过序列同一性/相似性和通过功能分析二者，将SEQ ID NO: 1、5、7和9分别鉴定为人Bak、Bik、Puma和Bmf的斑马鱼同系物。

因此，在一个实施方案中，本发明提供了：选自SEQ ID NO: 1、3、5、

7和9的蛋白质，所述蛋白质是斑马鱼B2R多结构域促凋亡蛋白或仅含BH3的促凋亡蛋白；含有所述蛋白质的组合物；和使用所述蛋白质和组合物的方法。在另一个实施方案中，本发明还提供了：选自SEQ ID NO: 2、4、6、8和10的多核苷酸，所述多核苷酸编码斑马鱼B2R多结构域促凋亡蛋白或仅含BH3的促凋亡蛋白；包含所述多核苷酸的组合物；和使用所述多核苷酸和组合物的方法。在另一个实施方案中，提供了变体蛋白质，其相对于选自SEQ ID NO: 1、3、5、7和9的序列包含一处或多处氨基酸添加、缺失或突变。在另一个实施方案中，提供了变体多核苷酸，其相对于选自SEQ ID NO: 2、4、6、8和10的序列包含一处或多处核苷酸添加、缺失或突变。

本发明的蛋白质、变体蛋白质、核酸和变体核酸可以用于治疗目的。例如，本发明的一种或多种ZPA（“斑马鱼促凋亡”）蛋白或其变体可以用作治疗剂来治疗期望提高凋亡的凋亡相关病症（例如细胞增殖性病症）。本发明还提供了组合物，其包含本发明的一种或多种ZPA和药学可接受载体，任选包括一种或多种其它治疗剂。在另一个实施方案中，本发明的一种或多种ZPA核酸或其变体可以用作治疗剂来治疗期望提高凋亡的凋亡相关病症，例如通过在需要此类治疗的受试者中表达所述核酸，使得一种或多种ZPA蛋白在患者细胞中表达。将斑马鱼的蛋白质和核酸用作治疗剂可能优于任何哺乳动物同系物，例如因为触发抗自身反应的风险较小。

本发明的ZPA蛋白还可用在鉴定起始、刺激、抑制或阻断凋亡的药剂的方法中。可以通过其起始或刺激内在凋亡途径中的一种或多种ZPA蛋白活性的能力来鉴定所述一种或多种ZPA蛋白的激动剂。此类刺激可以是例如通过活化ZPA蛋白或通过干扰正常情况下抑制ZPA蛋白活性的一种或多种分子，合适的激动剂包括但不限于抗体和小分子。相反，可以通过其阻断或抑制内在凋亡途径中的一种或多种ZPA蛋白活性的能力来鉴定所述一种或多种ZPA蛋白的拮抗剂。此类抑制可以是例如通过阻止ZPA蛋白结合一种或多种配体或靶物或通过阻止ZPA蛋白本身的活性，合适的拮抗剂包括抗体和抗原结合性抗体片段、适体和小分子。测量内在凋亡途径中ZPA蛋白活性的某些适宜测定法在本文中有描述。可以使用ZPA蛋白激动剂作为治疗剂来治疗期望提高凋亡的凋亡相关病症，而可以使用ZPA蛋白拮抗剂作为治疗剂来治疗期望降低凋亡的凋亡相关病症。

内在凋亡途径响应于指导程序性细胞死亡的胞内信号。该途径的失调能

导致不适当的凋亡或凋亡的不适当缺乏，两者中的任何一种都可能导致病症（诸如癌）。因此，需要更好的了解凋亡途径，以及能扰动其中一种或多种途径成分的表达和/或活性并能方便地检验反响的模型系统。在本文所述的对ZPA蛋白的鉴定和分析之外，申请人还证明了斑马鱼中存在内在凋亡途径，其类似于先前在哺乳动物中表征的内在凋亡途径。

因此，本发明还提供了使用斑马鱼作为模型系统来研究凋亡的方法。在有些实施方案中，提供了转基因斑马鱼，其中一种或多种ZPA蛋白的表达和/或活性相对于野生型斑马鱼是受到调控的。此类转基因斑马鱼可以服务于阐明斑马鱼凋亡途径的正常运转方式，并且提供在筛选具有激动性或拮抗性凋亡活性的药剂中使用的工具。在其它实施方案中，本发明提供了转基因斑马鱼，其中一种或多种ZPA蛋白是用来自其它生物体的其对应物替换的，由此产生模型系统来评估辅因子、环境因素、或序列和结构中的修饰是否影响特定凋亡途径组分的机能以及影响达到何种程度。在有些实施方案中，所有斑马鱼内在凋亡途径蛋白（即所有B2R蛋白）是用来自另一种生物体（即哺乳动物或人）的内在凋亡途径组分遗传替换的。此类转基因斑马鱼提供了用于研究内在凋亡途径的工具，对其进行检验和操作远远易于在其它生物体中能进行的。

在有些实施方案中，检验在缺失可能干扰分析的其它途径或刺激时内在凋亡途径成员之间的生化相互作用可能是有用的。因此，本发明还提供了体外模型系统，由此在体外重建斑马鱼内在凋亡途径，任选伴有一种或多种辅因子、试剂、抑制剂和/或刺激物(stimulator)。在一个方面，体外模型系统包含在活性或量方面经修饰的一种或多种ZPA蛋白。在另一个方面，体外模型系统包含在活性或量方面经修饰的一种或多种B2R蛋白。在另一个方面，体外模型系统包含一种或多种ZPA蛋白变体。在另一个方面，体外模型系统包含一种或多种B2R蛋白变体。在另一个方面，体外模型系统缺乏至少一种ZPA蛋白。在另一个方面，体外模型系统缺乏至少一种B2R蛋白。在另一个方面，至少一种ZPA蛋白是用来自另一种生物体的对应物蛋白替换的。在另一个方面，至少一种B2R蛋白是用来自另一种生物体的对应物蛋白替换的。

本文所述ZPA蛋白和核酸也可用于检测受试者中的凋亡相关病症。在一个实施方案中，通过检测来自受试者的细胞中ZPA多肽或ZPA多肽同系物的存在或量来检测凋亡相关病症的存在。在另一个实施方案中，通过检测来自

受试者的细胞中ZPA多肽或ZPA多肽同系物的存在或量来检测对凋亡相关病症的素因。在另一个实施方案中，通过检测来自受试者的细胞中ZPA多肽或ZPA多肽同系物的存在或量来检测凋亡相关病症的严重性。

在另一个实施方案中，通过检测来自受试者的细胞中ZPA多核苷酸或ZPA多核苷酸同系物的存在或表达量来检测凋亡相关病症的存在。在另一个实施方案中，通过检测来自受试者的细胞中ZPA多核苷酸或ZPA多核苷酸同系物的存在或表达量来检测对凋亡相关病症的素因。在另一个实施方案中，通过检测来自受试者的细胞中ZPA多核苷酸或ZPA多核苷酸同系物的存在或表达量来检测凋亡相关病症的严重性。

本发明还以任何有用组合提供了本文所述化合物和组合物的试剂盒和制品。例如，提供了试剂盒，其包含一种或多种本发明的组合物和对用途（例如治疗、诊断和/或研究用途）的说明。在另一个实例中，提供了试剂盒，其包含体外或斑马鱼内在凋亡途径模型系统，以及对其在研究中或在筛选调控凋亡的药剂中的用途的说明。

本文提供了这些方法、组合物、模型系统、试剂盒和制品的详细内容。

定义

术语“Bcl-2相关蛋白”、“Bcl-2相关多肽”和“B2R蛋白”在用于本文时包括天然序列多肽、多肽变体、及天然序列多肽和多肽变体的片段（其在本文中有进一步定义），除非另有说明。B2R蛋白可以从多种物种（例如人类）获得，通过使用依照本发明的抗体，或通过重组或合成方法，包括使用保藏的核酸分子。在某些实施方案中，B2R蛋白是从斑马鱼得到的。从斑马鱼得到的B2R蛋白称为“zB2R蛋白”。B2R蛋白包括但不限于Bcl-2样存活因子（包括但不限于Bcl2、Bcl-x_L、Bcl-w、Mcl-1、A1/Bfl-1、NR-13、BHRF1、LMW5-HL、ORF16、v-Bcl-2(KSHV)、E1B-19K、CED-9、Boo/DIVA/Bcl2-L-10、Bcl-B）；促凋亡的多结构域因子（包括但不限于Bax、BpR、Bak、Bok/Mtd、Bcl-Rambo、Bcl-x_S、和Bcl-G）；和促凋亡的仅含BH3的因子(BH3-only factor)（包括但不限于Bik/Nbk、Blk、Hrk/DP5、BNIP3、BimL/Bod、Bad、Bid、EGL-1、Noxa、PUMA/Bbc3、Bmf、Bnip1、Bnip2、和Bnip3）。zB2R蛋白包括但不限于促存活因子（包括但不限于zBclp1、zBclp2、zMcl-1a、zMcl-1b、和zNR13）；促凋亡的多结构域因子（包括但不限于zBak、zBax、zBok1、和zBok2）；和促凋

亡的仅含BH3的因子（包括但不限于zBad1、zBad2、zBid、zBik、zBmf1、aBmf2、zNoxa、zPuma、和zBim）。

术语“斑马鱼促凋亡蛋白”、“斑马鱼促凋亡多肽”、“ZPA多肽”和“ZPA蛋白”在本文中可互换使用，包括天然序列多肽、多肽变体、及天然序列多肽和多肽变体的片段（其在本文中有进一步定义），除非另有说明。ZPA蛋白可以从斑马鱼获得，通过使用依照本发明的抗体或通过重组或合成方法，包括使用保藏的核酸分子。ZPA蛋白包括本文中所鉴定的斑马鱼蛋白，例如zBak (SEQ ID NO: 1)、zBik (SEQ ID NO: 5)、zBim、zPuma (SEQ ID NO: 7)、和zBmf2 (SEQ ID NO: 9)。

术语“内在凋亡途径”或“内在途径”在本文中可互换使用，指胞内起始的、导致细胞凋亡的细胞生化途径。

术语“外在凋亡途径”和“外在途径”在本文中可互换使用，指胞外起始的、导致细胞凋亡的细胞生化途径。

在用于本文时，术语“斑马鱼”指认为属于斑马鱼(*Danio rerio*)属和种的任何鱼或鱼品系。

“天然序列”多肽或“天然”多肽指与衍生自自然界的多肽（例如抗体）具有相同氨基酸序列的多肽。“天然序列”多肽指与衍生自自然界的多肽（例如抗体）具有相同氨基酸序列的多肽。此类天然序列多肽可以从自然界分离，或者可通过重组或合成手段生成。如此，天然序列多肽可以具有天然存在人类多肽、斑马鱼多肽、或来自任何其它物种的多肽的氨基酸序列。“天然序列”ZPA多肽或“天然”ZPA多肽包含与衍生自自然界的相应ZPA多肽具有相同氨基酸序列的多肽。例如，在一个实施方案中，编码天然序列斑马鱼ZPA蛋白zPuma的核酸序列可见于SEQ ID NO: 8和实施例2(e)。

此类ZPA多肽可以从自然界分离，或者可通过重组或合成手段生成。术语“天然序列”或“天然”ZPA多肽或蛋白明确涵盖ZPA蛋白的天然存在的截短或分泌形式、天然存在的变体形式（例如可变剪接形式）和天然存在的等位变体。在某些实施方案中，本文中所公开的天然序列ZPA多肽是包含本文所列全长氨基酸序列的成熟的或全长的天然序列多肽。

本文中所公开的各种ZPA多肽的“信号肽”的大致位置可见于本说明书和/或附图。还认识到，在有些情况中，从分泌型多肽上切割下信号序列不是全然一致的，导致超过一种的分泌性种类。本发明涵盖这些成熟多肽及编码

它们的多核苷酸，其中信号肽在本文中所鉴定的信号肽C端边界任一侧不超过大约5个氨基酸内遭到切割。

“ZPA多肽变体”或“ZPA蛋白变体”指与本文中所公开的全长天然序列ZPA多肽序列或本文中所公开的全长ZPA多肽序列的任何片段（诸如那些由仅仅代表全长ZPA多肽的完整编码序列一部分的核酸编码的）具有至少约80%氨基酸序列同一性的ZPA多肽。此类ZPA多肽变体包括例如在全长天然氨基酸序列的N-或C-末端添加或删除一个或多个氨基酸残基的ZPA多肽。通常，ZPA多肽变体与本文中所公开的全长天然序列ZPA多肽序列或本文中所公开的全长ZPA多肽序列的任何明确限定片段具有至少约80%的氨基酸序列同一性，或者至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。通常，ZPA变体多肽的长度为至少约10个氨基酸，或者长度为至少约20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210个氨基酸，或更多。任选的是，ZPA变体多肽与天然ZPA多肽序列相比具有不超过一处保守氨基酸替代，或者与天然ZPA多肽序列相比具有不超过2、3、4、5、6、7、8、9或10处保守氨基酸替代。

关于本文中所鉴定的ZPA多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后，且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时，候选序列中与特定ZPA多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以本领域技术范围内的多种方式进行，例如使用公众可得到的计算机软件，诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可决定用于测量对比的适宜参数，包括对所比较序列全长获得最大对比所需的任何算法。然而，为了本发明的目的，%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2获得的。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech公司编写，源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局(US Copyright Office, Washington D.C., 20559)，并以美国版权注册号TXU510087注册。公众可通过Genentech公司(South San Francisco, California)得到ALIGN-2程序，或者可以自公众可得到的源代码汇编。ALIGN2程序应当编译成在UNIX操作系统（例如数码UNIX V4.0D）上使用。所有序列比较

参数由ALIGN-2程序设定且不变。

在采用ALIGN-2来比较氨基酸序列的情况中，给定氨基酸序列A相对于(to)、与(with)、或针对(against)给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性（或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A）如下计算：

$$\text{分数} X/Y \times 100$$

其中X是由序列对比程序ALIGN-2在该程序的A和B对比中评分为相同匹配的氨基酸残基数，且其中Y是B中的氨基酸残基总数。可以领会，若氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等，则A相对于B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另有具体说明，本文中所使用的所有%氨基酸序列同一性值都是如上一段所述使用ALIGN-2计算机程序获得的。

在用于本文时，“保守同线性”(conserved synteny)指自斑马鱼基因座进化得到的人类基因座的证据，例如ZPA基因和认为与该ZPA基因同源的人类基因的一侧或两侧的相似邻近基因。

“ZPA变体多核苷酸”或“ZPA变体核酸序列”意指编码本文中所定义的ZPA多肽(优选活性ZPA多肽)且与编码本文中所公开的全长天然序列ZPA多肽序列或本文中所公开的全长ZPA多肽序列的任何片段的核苷酸序列具有至少约80%核酸序列同一性的核酸分子。通常，ZPA变体多核苷酸与编码本文中所公开的全长天然序列ZPA多肽序列或本文中所公开的全长ZPA多肽序列的任何片段的核酸序列具有至少约80%的核酸序列同一性，或者至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的核酸序列同一性。变体不涵盖天然核苷酸序列。

通常，ZPA变体多核苷酸的长度为至少约5个核苷酸，或者长度为至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、

500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620或625个核苷酸，其中在此语境中，术语“约”意指所述核苷酸序列长度加上或减去该所述长度的10%。

关于本文中所鉴定的ZPA编码核酸序列的“百分比(%)核酸序列同一性”定义为对比序列并在必要时引入缺口以获取最大百分比序列同一性后，候选序列中与感兴趣ZPA核酸序列中的核苷酸相同的核苷酸的百分率。为测定百分比核酸序列同一性目的的序列对比可以本领域技术范围内的多种方式进行，例如使用公众可得到的计算机软件，诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)软件。然而，为了本发明的目的，%核酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2获得的。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech公司编写，源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局(US Copyright Office, Washington D.C., 20559)，并以美国版权注册号TXU510087注册。公众可通过Genentech公司(South San Francisco, California)得到ALIGN-2程序，或者可以从公众可得到的源代码汇编。ALIGN2程序应当编译成在UNIX操作系统（例如数码UNIX V4.0D）上使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不变。

在采用ALIGN-2来比较核酸序列的情况中，给定核酸序列C相对于(to)、与(with)、或针对(against)给定核酸序列D的%核酸序列同一性（或者可表述为具有或包含相对于、与、或针对给定核酸序列D的某一%核酸序列同一性的给定核酸序列C）如下计算：

$$\text{分数} W/Z \quad \text{乘} \quad 100$$

其中W是由序列对比程序ALIGN-2在该程序的C和D对比中评分为相同匹配的核苷酸数，且其中Z是D中的核苷酸总数。可以领会，若核酸序列C的长度与核酸序列D的长度不相等，则C相对于D的%核酸序列同一性将不等于D相对于C的%核酸序列同一性。除非另有具体说明，本文中所使用的所有%核酸序列同一性值都是如上一段所述使用ALIGN-2计算机程序获得的。

在其它实施方案中，ZPA变体多核苷酸指编码ZPA多肽且能够例如在严格杂交和洗涤条件下与编码本文中所公开的全长ZPA多肽的核苷酸序列杂交的核酸分子。ZPA变体多肽可以是那些由ZPA变体多核苷酸所编码的。

术语“全长编码区”在述及编码ZPA多肽的核酸使用时指编码本发明全长ZPA多肽的核苷酸序列（在本文中常常在起始和终止密码子之间（含起始

和终止密码子)显示)。

“分离的”，在用于描述本文中所公开的各种ZPA多肽时，意指已经鉴定且与/自其天然环境的一种成分分开和/或回收的多肽。多肽的天然环境的污染物成分指通常会干扰其诊断或治疗用途的物质，可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在某些实施方案中，将多肽纯化至 (1) 足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度，或 (2) 根据使用考马斯蓝和/或银染色的非还原性或还原性条件下的SDS-PAGE，达到同质。既然ZPA多肽的天然环境的至少一种成分不会存在，那么分离的多肽包括重组细胞内的原位多肽。然而，分离的多肽通常通过至少一个纯化步骤来制备。

“分离的”ZPA多肽编码核酸或其它多肽编码核酸指已经鉴定且与多肽编码核酸的天然来源中通常与之关联的至少一种污染物核酸分子分开的核酸分子。分离的多肽编码核酸分子不同于在自然界中发现它时的形式或背景。分离的多肽编码核酸分子因此与存在于天然细胞中时的特定多肽编码核酸分子有区别。然而，分离的多肽编码核酸分子包括通常表达该多肽的细胞中所包含的多肽编码核酸分子，例如当所述核酸分子在所述细胞中的染色体定位不同于它在天然细胞中的染色体定位时。

术语“控制序列”指在特定宿主生物体中表达可操作连接的编码序列所必需的DNA序列。例如，适于原核生物的控制序列包括启动子、任选的操纵基因序列、和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号、和增强子。

若一段核酸与另一段核酸序列处于功能性相互关系中，则它是“可操作连接的”。例如，若前序列(presequence)或分泌前导(secretory leader)的DNA表达成参与多肽分泌的前蛋白质(preprotein)，则它与该多肽的DNA可操作连接；若启动子或增强子影响编码序列的转录，则它与该序列可操作连接；或者，若核糖体结合位点的位置促进翻译，则它与编码序列可操作连接。一般而言，“可操作连接的”意味着相连的DNA序列是相邻的，而且在分泌前导的情况下意味着相邻且处于阅读状态。然而，增强子不必相邻。连接可以通过在方便的限制性位点处的连接来实现。若没有此类位点，则依照常规实践使用合成的寡核苷酸接头或接头。

杂交反应的“严格性”容易为本领域普通技术人员所确定，并且通常取

决于探针长度、洗涤温度和盐浓度凭经验计算。一般而言,较长的探针需要较高的温度用于正确的退火,而较短的探针则需要较低的温度。当互补链存在于低于它们解链温度的环境中时,杂交通常取决于变性DNA重新退火的能力。探针和可杂交的序列之间的期望同源性程度越高,就可使用越高的相对温度。作为结果,推出,更高的相对温度趋向于使反应条件更加严格,而更低的温度则更不严格。对于杂交反应的严格性的补充细节及解释参见 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)。

如本文中所定义的,“严格条件”或“高严格条件”可以定义如下: (1) 对于洗涤使用低离子强度和高温,例如0.015M 氯化钠/0.0015M 柠檬酸钠/0.1% 十二烷基硫酸钠, 50°C; (2) 在杂交期间使用变性剂,诸如甲酰胺,例如, 50% (v/v)甲酰胺及0.1% 牛血清清蛋白/0.1% Ficoll/0.1% 聚乙烯吡咯烷酮/50mM磷酸钠缓冲液pH 6.5及750mM氯化钠, 75mM柠檬酸钠的, 42°C, 或(3) 在使用50% 甲酰胺, 5x SSC (0.75M NaCl, 0.075M 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠 (pH6.8), 0.1% 焦磷酸钠, 5x Denhardt氏溶液, 超声处理的鲑精DNA (50µg/ml), 0.1% SDS和10% 硫酸右旋糖苷的溶液中于42°C杂交过夜,于42°C在0.2x SSC (氯化钠/柠檬酸钠)中洗涤10分钟,接着是于55°C由含有EDTA的0.1x SSC组成的10分钟高严格洗涤。

“中等严格条件”可规定为如 Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989所描述的,而且包括使用与上文所述那些相比较不严格的洗涤溶液和杂交条件(例如温度、离子强度和%SDS)。中等严格条件的一个例子是在含: 20% 甲酰胺、5x SSC (150mM NaCl, 15mM 柠檬酸三钠)、50mM 磷酸钠(pH7.6)、5x Denhardt氏溶液、10% 硫酸右旋糖苷和20mg/ml 变性的剪切的鲑精DNA的溶液中于37°C温育过夜,然后于约37-50°C在1x SSC中洗涤滤膜。本领域熟练技术人员应当认识到如何根据适应诸如探针长度等因素的需要来调整温度、离子强度等。

术语“带表位标签的”在用于本文时指包含ZPA多肽或抗ZPA抗体且其与“标签多肽”融合的嵌合多肽。标签多肽具有足够残基以提供表位而可制备针对其的抗体,但又足够短使得其不干扰与其融合的多肽的活性。在某些实施方案中,标签多肽还是相当独特的,使得其抗体基本上不与其它表位发

生交叉反应。合适的标签多肽通常具有至少6个氨基酸残基，通常在约8个和约50个氨基酸残基之间（在某些实施方案中，在约10个和约20个氨基酸残基之间）。涵盖带表位标签的本发明多肽和抗体。

关于ZPA多肽的“有生物学活性的”和“生物学活性”和“生物学特征”指(1)具有在体内或回体启动或刺激凋亡的能力；(2)具有特异性结合内在凋亡途径的上游和/或下游成员的能力；和/或(3)具有以其它方式调控ZPA信号传导或ZPA活性的能力，除非另有说明。

关于经修饰ZPA多肽的“有生物学活性的”和“生物学活性”和“生物学特征”指(1)具有在体内或回体启动或刺激凋亡的能力；(2)具有特异性结合内在凋亡途径的上游和/或下游成员的能力；和/或(3)具有以其它方式调控ZPA信号传导或ZPA活性的能力，除非另有说明。

关于本发明的抗ZPA抗体的“有生物学活性的”和“生物学活性”和“生物学特征”指(1)具有部分或完全阻断、抑制或中和天然ZPA多肽的生物学活性的能力（或是拮抗方式或是阻断方式）；(2)具有特异性结合ZPA多肽的能力；和/或(3)具有调控ZPA信号传导或ZPA活性的能力，除非另有说明。在一个实施方案中，本发明的抗体以至少1 μ M或更低、100nM或更低、50nM或更低、10nM或更低、5nM或更低、1nM或更低的亲和力结合ZPA蛋白。在用于本文时，“抗体可变域”指抗体分子的轻链和重链中包含互补决定区(CDR；即CDR1、CDR2、和CDR3)和框架区(FR)氨基酸序列的那部分。 V_H 指重链可变域。 V_L 指轻链可变域。依照本发明所使用的方法，归为CDR和FR的氨基酸位置是依照Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987和1991定义的。抗体或抗原结合片段的氨基酸编号方式也依照Kabat的。

在用于本文时，“密码子集”指用于编码期望变体氨基酸的一套不同核苷酸三联体序列。可以通过例如固相合成来合成一套寡核苷酸，其包括呈现密码子集所提供的核苷酸三联体的所有可能组合并编码一组期望氨基酸的序列。一种标准形式的密码子命名是IUB代码，其是本领域已知的且在本文中有描述。

“异源DNA”指导入宿主细胞的任何DNA。DNA可以衍生自多种来源，包括基因组DNA、cDNA、合成DNA、及这些的融合物和组合物。DNA可以包括来自与宿主或受体细胞相同的细胞或细胞类型的DNA，或者来自不同细

胞类型（例如来自哺乳动物或植物）的DNA。DNA可以任选的包含标志物或选择基因，例如抗生素抗性基因、温度抗性基因等。涵盖包含编码本发明多肽和抗体的异源DNA的宿主细胞及其用途。

在用于本文时，“文库”或“库”指众多多肽（例如抗体或抗体片段序列），或者编码这些序列的核酸，这些序列在根据本发明方法导入这些序列的变体氨基酸组合方面是不同的。

“噬菌体展示”是一种将变体多肽作为与外壳蛋白的融合蛋白展示在噬菌体（例如丝状噬菌体）颗粒表面上的技术。噬菌体展示的效用在于能对随机化蛋白质变体的大型文库快速且高效分选那些以高亲和力结合靶分子的序列的实情。肽和蛋白质文库在噬菌体上的展示已经用于对数以百万计的多肽筛选那些具有特异性结合特性的多肽。多价噬菌体展示法已经用于展示小随机肽和小蛋白质，其通过与丝状噬菌体的基因III或基因VIII融合来实现。Wells和Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3:355-362 (1992), 及其中所引用的参考文献。在单价噬菌体展示中，将蛋白质或肽文库与基因III或其一部分融合，并在存在野生型基因III蛋白时以低水平表达，使得噬菌体颗粒展示一个拷贝的融合蛋白或者不展示融合蛋白。亲合效应(avidity effect)相对于多价噬菌体得到了降低，使得分选基于内在的配体亲和力，而且使用噬菌粒载体，这简化了DNA操作。Lowman和Wells, *Methods: A companion to Methods in Enzymology* 3:205-0216 (1991)。

“噬菌粒”是具有细菌复制起点（例如ColE1）和一个拷贝的噬菌体基因区间的质粒载体。噬菌粒可利用任何已知噬菌体，包括丝状噬菌体和λ类噬菌体。质粒一般也包含抗生素抗性的可选择标志物。克隆入这些载体的DNA区段可以像质粒一起而扩增。在给容纳这些载体的细胞提供生成噬菌体颗粒所必需的所有基因时，质粒的复制模式变成滚环复制，以生成质粒DNA的一条链的拷贝，并包装噬菌体颗粒。噬菌粒可形成感染性或非感染性噬菌体颗粒。此术语包括这样的噬菌粒，它们包含与异源多肽基因连接成基因融合物的噬菌体外壳蛋白基因或其片段，使得异源多肽展示在噬菌体颗粒的表面上。

术语“噬菌体载体”指包含异源基因且能够复制的双链复制型噬菌体。噬菌体载体具有容许噬菌体复制和噬菌体颗粒形成的噬菌体复制起点。噬菌体可以是丝状噬菌体，诸如M13、f1、fd、Pf3噬菌体或其衍生物，或者是λ类

噬菌体, 诸如 λ 、21、 ϕ 80、 ϕ 81、82、424、434等或其衍生物。

术语“蛋白聚糖”指如下分子, 其中至少一个糖胺聚糖侧链共价附着至该分子的蛋白质核心。依照本发明的蛋白聚糖合成缺陷细胞系包括半乳糖基转移酶I缺陷的细胞系。依照一个实施方案, 所述细胞系是CHO-psbg细胞系。

术语“拮抗剂”指部分或完全阻断、抑制或中和天然ZPA多肽的生物学活性和特异性结合天然ZPA多肽的任何分子。依照一个实施方案, 拮抗剂是多肽。依照另一个实施方案, 本发明的抗体可抑制拮抗剂结合天然ZPA多肽。

术语“小分子拮抗剂”指分子量为1500道尔顿或更低且是依照本发明的拮抗剂的任何分子。依照一个实施方案, 小分子拮抗剂小于大约500道尔顿。

依照一个实施方案, 拮抗剂在表达至少一种天然ZPA多肽的细胞中阻断、抑制、降低或中和凋亡。合适的拮抗剂包括天然ZPA多肽的氨基酸序列变体、抗体、抗原结合性抗体片段、本发明的肽、适体等。用于鉴定ZPA多肽的拮抗剂的方法可包括使ZPA多肽接触候选拮抗剂分子并测量一种或多种与ZPA多肽有关的生物学活性的可检测变化。

术语“适体”指能够结合靶分子(诸如ZPA多肽)的核酸分子。适体的生成和治疗用途是本领域已完全确立的。参见例如美国专利No. 5,475,096, 以及Macugen® (Eyetechnology, New York)用于治疗年龄相关黄斑变性的治疗功效。

术语“强化剂”(potentiator)和“激动剂”指增强天然ZPA多肽的生物学活性的任何分子, 其中所述强化剂启动和/或刺激凋亡。在一个实施方案中, 激动剂特异性结合天然ZPA多肽并增强该天然ZPA多肽的生物学活性。在另一个实施方案中, 激动剂刺激编码天然ZPA多肽的多核苷酸的转录和/或翻译, 使得天然ZPA多肽的表达升高。在另一个实施方案中, 激动剂抑制天然ZPA多肽的抑制剂的正常发挥功能。应当理解, 前述实施方案并不互相排斥, 使得激动剂可以例如特异性结合天然ZPA多肽并增强该天然ZPA多肽的生物学活性, 同时还抑制天然ZPA多肽的抑制剂的正常发挥功能。用于鉴定ZPA多肽的激动剂的方法可包括使结合ZPA的分子接触ZPA多肽和候选激动剂并测量一种或多种与ZPA多肽有关的生物学活性的可检测变化(例如胱天蛋白酶活化升高或凋亡的速率或量增加)。

“处理”或“治疗”或“缓和”指治疗性处理及预防性或防范性措施二者, 其中目标是预防或减缓(减轻)所针对的病理学状况或病症。需要治疗的受试者包括早就患有病症的受试者以及倾向于患上病症的受试者或要预

防病症的受试者。这些术语表明，如果本文中的治疗性和预防性用途改善、减轻或降低与疾病有关的症状、并发症或其它问题，或者改善、减轻或降低与疾病有关的症状、并发症或其它问题的发作机会或频率，那么它们是成功的。

如果在依照本发明的方法接受治疗量的拮抗剂后，患者在如下一项或多项中显示出可观察和/或可测量的降低或消失，那么受试者或哺乳动物成功“治疗”了癌症：癌细胞数降低或癌细胞消失；肿瘤体积缩小；癌细胞浸润入周围器官（包括癌传播入软组织和骨）受到抑制（即一定程度的减缓，优选停止）；肿瘤转移受到抑制（即一定程度的减缓，优选停止）；肿瘤生长受到一定程度的抑制；和/或一种或多种与特定癌症有关的症状得到一定程度的减轻；发病率和死亡率降低；及生命质量提高。就抗ZPA抗体或ZPA结合性寡肽可预防癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞而言，它可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。这些征候或症状的减轻还可以由患者感受到。

如果在依照本发明的方法接受治疗量的拮抗剂或激动剂后，患者在一项或多项与异常凋亡有关的症状中显示出可观察和/或可测量的凋亡调控和/或一定程度的缓解，和生活质量的改善，那么受试者或哺乳动物成功“治疗”了凋亡相关病症。

用于评估疾病的成功治疗和改善的上述参数可以容易的通过内科医师所熟悉的规程来测量。对于癌症疗法，可通过例如评估疾病进展时间(time to disease progression, TTP)和/或测定响应率(response rate, RR)来测量功效。转移可通过分期测试(staging test)来测定，及通过骨扫描及钙水平和其它酶的测试以测定是否传播到骨。还可进行CT扫描以查明是否传播到骨盆及该区域中的淋巴结。分别使用胸腔X射线和通过已知方法进行的肝酶水平测量来查明是否转移到肺和肝。用于监测疾病的其它已知方法包括经直肠超声检查(TRUS)和经直肠针吸活组织检查(TRNB)等其它本领域公知的方法。

“长期”施用指与短期模式相反，以连续模式施用药剂，从而将初始治疗效果（活性）维持较长一段时间。“间歇”施用指不是无间断连续进行的治疗，而是本质上周期性的。

为了治疗癌症、减轻癌症症状或诊断癌症目的，“哺乳动物”指归入哺乳类的任何动物（也称作“患者”），包括人，家畜和牲畜，及动物园、运动或宠物动物，诸如犬、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、家兔等。在某些实施方

案中，哺乳动物指人。

与一种或多种其它治疗剂“联合”施用包括同时（共同）施用和任何次序的序贯施用。

“载体”在用于本文时包括药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂，它们在所采用的剂量和浓度对暴露于它们的细胞或哺乳动物是无毒的。通常，生理学可接受载体是pH缓冲水溶液。生理学可接受载体的例子包括缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量（少于约10个残基）多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如EDTA；糖醇，诸如甘露醇或山梨醇；成盐反荷离子，诸如钠；和/或非离子表面活性剂，诸如TWEEN®、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS®。

“固相”或“固体支持物”意指本发明的抗体、拮抗剂或多肽可粘着或附着其上的非水性基质。本文中所涵盖的固相的例子包括那些部分或完全由玻璃（例如可控孔径玻璃）、多糖（例如琼脂糖）、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和聚硅氧烷(silicone)制成的固相。在某些实施方案中，根据语境，固相可包括测定板的孔；在其它实施方案中，它指纯化柱（例如亲和层析柱）。此术语还包括离散颗粒的不连续固相，诸如美国专利No. 4,275,149中所记载的。

在用于本文时，术语“免疫粘附素”指将异源蛋白质（“粘附素”）的结合特异性与免疫球蛋白恒定域的效应器功能联合起来的抗体样分子。在结构上，免疫粘附素包括不同于抗体的抗原识别和结合位点（即是“异源”的）、具有期望结合特异性的氨基酸序列和免疫球蛋白恒定域序列的融合物。免疫粘附素分子的粘附素部分典型的是至少包含受体或配体的结合位点的连续氨基酸序列（诸如天然ZPA蛋白的一部分）。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定域序列可以从任何免疫球蛋白获得，诸如IgG-1、IgG-2、IgG-3或IgG-4亚型、IgA（包括IgA-1和IgA-2）、IgE、IgD、或IgM。

“脂质体”指由各种类型的脂质、磷脂和/或表面活性剂构成的，可用于对哺乳动物投递药物（诸如ZPA多肽、ZPA抗体或ZPA结合性寡肽）的小囊泡。脂质体的成分通常排列成双层形式，与生物膜的脂质排列相似。

本文中所公开的多肽、抗体、拮抗剂或组合物的“有效量”指足以实现明确规定的目的的量。“有效量”可以凭经验和通过与所规定的目的有关的已知方法来确定。

术语“治疗有效量”指在哺乳动物（也称作受试者）中有效“治疗”疾病或病症的本发明抗体、多肽或拮抗剂的量。在癌症的情况中，药物的治疗有效量可降低癌细胞数；缩小肿瘤体积；抑制（即一定程度的减缓，优选停止）癌细胞浸润入周围器官；抑制（即一定程度的减缓，优选停止）肿瘤转移；一定程度的抑制肿瘤生长；和/或一定程度的减轻一种或多种与癌症有关的症状。参见本文中“治疗”的定义。就药物可预防癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的程度而言，它可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。

本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物的“细胞毒性量”指能够在体外或在体内引起细胞（尤其是肿瘤，例如癌细胞）破坏的量。本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物为了抑制例如赘生性细胞生长的“细胞毒性量”可以凭经验和通过本领域已知方法来确定。

术语“抗体”以最广义使用，明确覆盖例如单一抗ZPA多肽单克隆抗体（包括激动性、拮抗性和中和性抗体）、具有多表位特异性的抗ZPA多肽抗体组合物、多克隆抗体、单链抗ZPA多肽抗体、及抗ZPA多肽抗体片段（见下文），只要它们特异性结合天然ZPA多肽和/或展现出本发明的生物学活性或免疫学活性。短语抗体的“功能性片段或类似物”指与所述及的抗体具有共同的定性生物学活性的化合物。例如，抗ZPA多肽抗体的功能性片段或类似物可以是能特异性结合ZPA分子的功能性片段或类似物。在一个实施方案中，抗体能阻止或实质性降低ZPA分子诱导凋亡的能力。术语“免疫球蛋白”（Ig）在本文中与“抗体”可互换使用。

“分离的抗体”指已经鉴定且与/自其天然环境的一种成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染物成分指将会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质，可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在某些实施方案中，将抗体纯化至(1)根据Lowry法的测定，抗体重量超过95%，最优选重量超过99%，(2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度，或(3)根据还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE及使用考马斯蓝或优选的银染色，达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在，那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而，分离的

抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

基本的4链抗体单元是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的异四聚体糖蛋白(IgM抗体由5个基本的异四聚体单元及称作J链的另外多肽组成,因此包含10个抗原结合位点;而分泌型IgA抗体可聚合而形成包含2-5个基本的4链单元及J链的多价装配物)。在IgG的情况中,4链单元通常是约150,000道尔顿。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而两条重链通过一个或多个二硫键彼此相连,二硫键的数目取决于重链的同种型。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫键。每条重链在N-末端具有一个可变域(V_H),接着是三个(对于 α 和 γ 链)或四个(对于 μ 和 ϵ 同种型)恒定域(C_H)。每条轻链在N-末端具有一个可变域(V_L),接着是其另一端的一个恒定域(C_L)。 V_L 与 V_H 排列在一起,而 C_L 与重链第一恒定域(C_{H1})排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变域之间形成界面。一个 V_H 和一个 V_L 一起配对而形成一个抗原结合位点。关于不同类别抗体的结构和性质,参见例如Basic and Clinical Immunology,第8版, Daniel P. Stites, Abba I. Terr和Tristram G. Parslow (编), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第71页和第6章。

根据其恒定域氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的轻链可归入两种截然不同类型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。根据其重链恒定域(C_H)氨基酸序列,免疫球蛋白可归入不同的类别或同种型。有五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别具有称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。根据 C_H 序列和功能的相对较小差异, γ 和 α 类可进一步分为亚类,例如人类表达下列亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

术语“可变的”指可变域中的某些区段在抗体间序列差异广泛的实情。V结构域介导抗原结合并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。然而,变异性并非均匀分布于可变域跨越的110个氨基酸。事实上,V区由15-30个氨基酸,称作框架区(FR)的相对不变异的区段及将框架区分开的每个长度为9-12个氨基酸,称作“高变区”的极度变异的较短区域组成。天然重链和轻链的可变域各自包含四个FR,它们大多采取 β -折叠片构象,通过三个形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠片结构一部分的高变区连接。每条链中的高变区通过FR非常接近的保持在一起,并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda,

MD (1991))。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应器功能,诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)中抗体的参与。

术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区一般包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如V_L中的大约残基24-34 (L1)、50-56 (L2)和89-97 (L3)附近及V_H中的大约残基31-35 (H1)、50-65 (H2)和95-102 (H3)附近(在一个实施方案中,H1在大约残基31-35附近);Kabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))和/或那些来自“高变环”的残基(例如V_L中的残基26-32 (L1)、50-52 (L2)和91-96 (L3)及V_H中的残基26-32 (H1)、53-55 (H2)和96-101 (H3); Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。

术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各抗体个体是相同的,除了可以以极小量存在的可能的天然存在突变形式外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。在它们的特异性之外,单克隆抗体的优点在于它们可以在未受到其它抗体污染的情况中合成。修饰语“单克隆”不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,可用于本发明的单克隆抗体可通过最初由Kohler等, *Nature* 256:495 (1975)记载的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组DNA方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备(参见例如美国专利No. 4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用例如Clackson等, *Nature* 352:624-628 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)和下文实施例中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

单克隆抗体在本文中包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出本发明的生物学活性(参见美国专利No. 4,816,567; Morrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类动物(例如旧大陆猴类(Old World Monkey)、猿等)的可变域抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化”抗体。

“完整抗体”指包含抗原结合位点以及 C_L 和至少重链恒定域 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 的抗体。恒定域可以是天然序列恒定域（例如人天然序列恒定域）或其氨基酸序列变体。在某些实施方案中，完整抗体具有一项或多项效应器功能。

“抗体片段”包含完整抗体的一部分，优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段；双抗体；线性抗体（参见美国专利No. 5,641,870，实施例2；Zapata等，Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)）；单链抗体分子；及由抗体片段形成的多特异性抗体。

表述“线性抗体”一般指Zapata等，Protein Eng, 8(10):1057-1062 (1995)中所描述的抗体。简言之，这些抗体包含一对串联的Fd区段(V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1})，该区段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段，称作“Fab”片段，和一个残余“Fc”片段，其名称反映了它易于结晶的能力。Fab片段由一条完整轻链及一条重链的可变域(V_H)和第一恒定域(C_{H1})组成。每个Fab片段对于抗原结合是单价的，即它具有一个抗原结合位点。胃蛋白酶处理抗体产生一个较大 $F(ab')_2$ 片段，它粗略相当于两个通过二硫键相连的Fab片段，具有二价抗原结合活性且仍能够交联抗原。Fab'片段因在 C_{H1} 结构域的羧基末端增加了少数残基而与Fab片段有所不同，包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定域半胱氨酸残基携带游离硫醇基的Fab'的称谓。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为成对Fab'片段生成的，在Fab'片段之间具有铰链半胱氨酸。还知道抗体片段的其它化学偶联。

Fc片段包含通过二硫键保持在一起的所有两条重链的羧基末端部分。抗体的效应器功能是由Fc区中的序列决定的，该区还是受到在某些类型的细胞上找到的Fc受体(FcR)所识别的部分。

“Fv”是包含完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该片段由紧密、非共价结合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠结构中散发出六个高变环（重链和轻链各3个环），其贡献出供结合抗原的氨基酸残基并赋予抗体以抗原结合特异性。然而，即使是单个可变域（或是只包含三个对抗原特异性的CDR的半个Fv）也具有识别和结合抗原的能力，只是亲和力低于完整结合位点。

“单链Fv”，也可缩写为“sFv”或“scFv”，是包含连接成一条多肽链的抗体V_H和V_L结构域的抗体片段。在某些实施方案中，sFv多肽在V_H和V_L结构域之间还包含多肽接头，使得sFv形成抗原结合期望的结构。关于sFv的综述参见Plückthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第113卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315, 1994; Borrebaeck 1995, 见下文。

术语“双抗体”指通过在V_H和V_L结构域之间使用短接头(约5-10个残基)构建sFv片段(见上一段)而制备的小型抗体片段,由于接头短,使得V结构域实行链间而非链内配对,导致二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉”sFv片段的异二聚体,其中两种抗体的V_H和V_L结构域存在于不同多肽链上。双抗体更完整的描述于例如EP 404,097; WO 93/11161; Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)。

非人(例如啮齿类)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人抗体的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用具有期望抗体特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠、家兔或非人灵长类)的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones等, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann等, Nature 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)。

“物种依赖性抗体”(例如哺乳动物抗人IgE抗体)指如下抗体,其对来自第一哺乳动物物种的抗原的结合亲和力强于其对该抗原来自第二哺乳动物物种的同系物的结合亲和力。通常,物种依赖性抗体“特异性结合”人类抗原(即具有不超过约 1×10^{-7} M、不超过约 1×10^{-8} M、和不超过约 1×10^{-9} M的结合亲和力(Kd)),但是对该抗原来自第二非人哺乳动物物种的同系物具有比其对人类抗原的结合亲和力弱至少约50倍、或至少约500倍、或至少约

1000倍的结合亲和力。物种依赖性抗体可以是上文定义的各种类型抗体，而且在某些实施方案中，是人源化抗体或人抗体。

“ZPA结合寡肽”指结合，优选特异性结合本文所述ZPA多肽的寡肽。ZPA结合寡肽可使用已知的寡肽合成方法学而化学合成，或者可使用重组技术来制备和纯化。ZPA结合寡肽的长度通常是至少约5个氨基酸，或者长度为至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100个氨基酸或更多，其中此类寡肽能够结合，优选特异性结合本文所述ZPA多肽。ZPA结合寡肽可使用已知技术无需过多实验就得以鉴定。在这点上，注意到用于对寡肽文库筛选能够特异性结合多肽靶物的寡肽的技术是本领域已知的(参见例如美国专利 No. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; PCT公开号WO 84/03506和WO 84/03564; Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 3998-4002 (1984); Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 178-182 (1985); Geysen等, 于 Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen等, J. Immunol. Meth. 102: 259-274 (1987); Schoofs等, J. Immunol. 140: 611-616 (1988); Cwirla, S. E.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378 (1990); Lowman, H. B.等, Biochemistry 30: 10832 (1991); Clackson, T.等, Nature 352: 624 (1991); Marks, J. D.等, J. Mol. Biol. 222: 581 (1991); Kang, A. S.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8363 (1991); 及 Smith, G. P., Current Opin. Biotechnol. 2: 668 (1991))。

“结合”感兴趣抗原例如ZPA多肽的本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物指以足够亲和力结合该抗原，使得该多肽、抗体、拮抗剂或组合物可作为诊断剂和/或治疗剂用于靶向表达该抗原的细胞或组织且不显著与其它蛋白质发生交叉反应的多肽、抗体、拮抗剂或组合物。在此类实施方案中，根据荧光激活细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)的测定，多肽、抗体、拮抗剂或组合物结合“非靶物”蛋白质的程度将小于该多肽、抗体、拮抗剂或组合物对其特定靶物蛋白质的结合的约10%。对于多肽、抗体、拮抗剂或

组合物对靶分子的结合，术语“特异结合”或“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶物上的表位或对其“特异”意味着该结合与非特异相互作用有可测量的差异。特异结合可通过例如测定分子的结合并与对照分子的结合比较来测量，所述对照分子通常是结构相似但没有结合活性的分子。例如，特异结合可通过与对照分子的竞争来测定，所述对照分子与靶物相似，例如过量的未标记靶物。在这种情况下，若经标记靶物与探针的结合受到过量未标记靶物的竞争性抑制，则指示特异结合。术语“特异结合”或“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶物上的表位或对其“特异”在用于本文时可表现为例如分子对靶物的 K_d 为至少约 10^{-4} M，或至少约 10^{-5} M，或至少约 10^{-6} M，或至少约 10^{-7} M，或至少约 10^{-8} M，或至少约 10^{-9} M，或至少约 10^{-10} M，或至少约 10^{-11} M，或至少约 10^{-12} M或更大。在一个实施方案中，术语“特异结合”指如下结合，其中分子结合特定多肽或特定多肽上的表位，而基本上不结合任何其它多肽或多肽表位（例如非ZPA蛋白）。应当理解，特异性结合斑马鱼天然ZPA多肽的抗体也可结合ZPA多肽的非斑马鱼多肽同系物。

“抑制（肿瘤细胞）生长”的多肽、抗体、拮抗剂或组合物或者“生长抑制性”多肽、抗体、拮抗剂或组合物指导致可测量的癌细胞生长抑制的多肽、抗体、拮抗剂或组合物。在某些实施方案中，生长抑制性多肽、抗体、拮抗剂或组合物与适宜对照相比对肿瘤细胞生长的抑制超过20%、大约20%到大约50%、和超过50%（例如大约50%到大约100%），所述对照通常是未用所测试的多肽、抗体、拮抗剂或组合物处理的肿瘤细胞。在一个实施方案中，生长抑制可以在细胞培养物中的抗体浓度为大约0.1-30 μ g/ml或大约0.5nM到200nM时测量，其中生长抑制在肿瘤细胞暴露于抗体后1-10天测定。体内肿瘤细胞生长抑制可以以多种方式测定，诸如下文实验实施例部分所描述的。如果抗ZPA抗体大约1 μ g/kg到大约100mg/kg体重的施用导致在距首次施用抗体大约5天到3个月内（例如大约5-30天内）肿瘤体积缩小或肿瘤细胞增殖减少，那么该抗体在体内是生长抑制性的。

抗体“效应器功能”指那些可归于抗体Fc区（天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区）且随抗体同种型而变化的生物学活性。抗体效应器功能的例子包括：C1q结合和补体依赖性细胞毒性；Fc受体结合；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体（例如B细胞受体）下调；和B细胞活化。

“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指其中结合到某些细胞毒性细胞（例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性细胞和巨噬细胞）上存在的Fc受体(FcR)上的分泌型Ig使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞，随后用细胞毒素杀死靶细胞的细胞毒性形式。该抗体“武装”(arm)细胞毒性细胞，而且是此类杀伤作用绝对要求的。介导ADCC的主要细胞，NK细胞，只表达FcγRIII，而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)第464页表3总结了造血细胞上的FcR表达。为了评估感兴趣分子的ADCC活性，可进行体外ADCC测定法，诸如美国专利No. 5,500,362或5,821,337中所记载的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外，可在体内评估感兴趣分子的ADCC活性，例如在动物模型中，诸如Clynes等，*PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中所披露的。

“Fc受体”或“FcR”描述结合抗体Fc区的受体。在某些实施方案中，FcR是天然序列人FcR。此外，FcR可以是结合IgG抗体的FcR(γ受体)，包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体，包括这些受体的等位变体和可变剪接形式。FcγRII受体包括FcγRIIA(“活化受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”)，它们具有相似的氨基酸序列，区别主要在于其胞质结构域。活化受体FcγRIIA在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体FcγRIIB在其胞质结构域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(综述参见Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR的综述参见Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel等, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); 及de Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341 (1995)。术语“FcR”在本文中涵盖其它FcR，包括那些未来将会鉴定的。该术语还包括新生儿受体，FcRn，其负责将母体IgG转移给胎儿(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。

“人效应细胞”指表达一种或多种FcR并行行使效应器功能的白细胞。在某些实施方案中，该细胞至少表达FcγRIII并行行使ADCC效应器功能。介导ADCC的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性细胞，优选PBMC和NK细胞。效应细胞可以从天然来源分离，例如血液。

“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指存在补体时对靶细胞的溶解。经

典补体途径的激活是由补体系统第一组分(C1q)结合如下抗体(适宜亚类的)起始的,该抗体结合至其关联抗原。为了评估补体激活,可进行CDC测定法,例如如Gazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)中所记载的。

“凋亡相关病症”指由异常或失调凋亡引起的、因异常或失调凋亡延长的、或以异常或失调凋亡为特征的生理疾患或疾病状态。凋亡相关病症包括但不限于细胞增殖性病症、病毒性凋亡病症、自身免疫性病症、血液学病症、神经学病症、和以凋亡速率不当的高或低为特征的其它病症。

术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”指与一定程度的异常细胞增殖有关的病症。在一个实施方案中,细胞增殖性病症指癌症。异常凋亡是异常细胞增殖的一个原因。已经将许多癌症与一种或多种促凋亡蛋白(例如p53和fas)的失活或促存活蛋白(例如Bcl-2)的过度生成或失调联系起来。

术语“癌症”和“癌性”指向或描述特征通常为细胞生长不受调控的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤、脑瘤和脑癌、以及头颈癌、及相关转移。

“肿瘤”在用于本文时指所有赘生性细胞生长和增殖,无论是恶性的或者是良性的,及所有癌前的和癌性的细胞和组织。

术语“病毒性凋亡病症”指向或描述患者中由病毒感染引起的或作为病毒感染结果的异常凋亡。该术语包括由感染性病毒直接引起的异常凋亡(例如降低的或阻断的凋亡),以及由应答病毒感染而发生的或因病毒自身而发生的过度、不受控制或错误靶向的免疫系统功能引起的异常凋亡(例如升高的细胞死亡)二者。由感染性病毒直接引起的异常(降低的)凋亡的例子包括但不限于埃巴二氏病毒所致Bcl-2样蛋白(促存活B2R多肽)和Bcl-2生成刺激物的生成,使得受感染细胞不发生凋亡;乳头瘤病毒所致p53(促凋亡多肽)的失活或降解,使得受感染细胞不发生凋亡;和牛痘病毒所致促凋亡ICE样蛋白酶抑制物的生成,使得受感染细胞不发生凋亡。由病毒感染引起的异

常（升高的）凋亡的例子有fas在受感染辅助T细胞表面的不当表达，这引起那些细胞发生过早凋亡，由此消除免疫系统的重要成分。由应答病毒感染而发生的过度、不受控制或错误靶向的免疫系统功能引起的异常凋亡的例子包括无意地(inadvertent)杀死受感染细胞附近的未感染细胞，因为附近的细胞可能也已被诱导而在细胞表面表达fas，如此成为循环中细胞毒性T淋巴细胞所致凋亡途径活化的破坏作用的靶物。

术语“自身免疫性病症”指源于且针对个体自身组织的非恶性疾病或病症。自身免疫性病症典型的是特征为自身反应性免疫细胞不能被免疫系统破坏；自身反应性淋巴细胞已经鉴定为过表达或以其它方式提高促存活凋亡因子的活性，或者降低促凋亡因子的表达或活性。自身免疫性疾病在本文中明确排除恶性或癌性疾病或疾患，尤其排除B细胞淋巴瘤、急性成淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病和慢性骨髓细胞白血病。自身免疫性疾病或病症的例子包括但不限于炎性应答，诸如炎性皮肤病，包括银屑病和皮炎（例如特应性皮炎）；系统性硬皮病和硬化；与炎性肠病有关的应答（诸如克罗恩氏(Crohn)病和溃疡性结肠炎）；呼吸窘迫综合征（包括成人呼吸窘迫综合症(ARDS)）；皮炎；脑膜炎；脑炎；葡萄膜炎；结肠炎；肾小球肾炎；过敏状况，诸如湿疹和哮喘及牵涉T细胞浸润和慢性炎性应答的其它状况；动脉粥样硬化；白细胞粘着缺陷；类风湿性关节炎；系统性红斑狼疮(SLE)（包括但不限于狼疮肾炎、皮肤狼疮）；糖尿病（例如I型糖尿病或胰岛素依赖性糖尿病）；多发性硬化；雷诺氏(Reynaud)综合征；自身免疫性甲状腺炎；桥本氏(Hashimoto)甲状腺炎；变应性脑脊髓炎；斯耶格伦氏(Sjogren)综合征；幼发型糖尿病；通常在结核病、结节病、多肌炎、肉芽肿病和血管炎中发现的与细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏感性有关的免疫应答；恶性贫血（阿狄森氏(Addison)病）；牵涉白细胞渗出的疾病；中枢神经系统(CNS)炎性病症；多器官损伤综合征；溶血性贫血（包括但不限于冷球蛋白血症或库姆斯氏(Coombs)阳性贫血）；重症肌无力；抗原-抗体复合物介导的疾病；抗肾小球基膜病；抗磷脂综合症；过敏性神经炎；格雷夫斯氏(Graves)病；朗-伊二氏(Lambert-Eaton)肌无力综合症；大疱性类天疱疮；天疱疮；自身免疫性多种内分泌腺病；莱特氏(Reiter)病；僵人综合症；贝切特氏(Behcet)病；巨细胞动脉炎；免疫复合物肾炎；IgA肾病；IgM多神经病；免疫性血小板减少性紫癜(ITP)或自身免疫性血小板减少症

等。

术语“血液学病症”指向或描述特征为血细胞异常生成或不当血流的疾病或病症。血液学病症包括但不限于与慢性疾病有关的贫血、再生障碍性贫血、慢性嗜中性细胞减少、和骨髓增生异常综合征、心肌梗死等等。

术语“神经学病症”或“神经学疾病”指向或描述典型特征为神经组织衰退或神经组织的细胞间通讯衰退的中枢和/或周围神经系统和/或特定神经元疾病或病症。神经学病症的例子包括但不限于神经变性疾病（包括但不限于Lewy体疾病、脊髓灰质炎后综合征、Shy-Draeger综合征、色素性视网膜炎(retinitis pigmentosa)、橄榄体脑桥小脑萎缩、帕金森氏病、脊髓性肌萎缩、多系统萎缩、肌萎缩侧索硬化、纹状体黑质变性、 τ 病（包括但不限于阿耳茨海默病和核上性麻痹）、朊病毒病（包括，但不限于，牛海绵样脑病、绵羊瘙痒病、克-雅二氏(Creutzfeldt-Jakob)综合征、库鲁病、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、慢性消耗性疾病、和致命性家族性失眠症)、延髓性麻痹、运动神经元疾病、和神经系统异型变性疾病（包括但不限于卡纳万(Canavan)病、亨廷顿氏(Huntington)病、神经元蜡样脂褐质沉积症、亚历山大氏(Alexander)病、图雷特氏(Tourette)综合征、Menkes卷发综合征、科凯恩(Cockayne)综合征、Halervorden-Spatz综合征、拉福拉(Lafora)病、Rett综合征、肝豆状核变性、Lesch-Nyhan综合征、和Unverricht-Lundborg综合征)、痴呆（包括但不限于皮克氏(Pick)病）、脊髓小脑性共济失调、缺血性和缺氧性脑损伤、及外伤性和兴奋性中毒性脑损伤。

“诱导细胞死亡”或“诱导凋亡”的本发明多肽、抗体、拮抗剂或组合物指引起可存活细胞变得不能存活的多肽、抗体、拮抗剂或组合物。在某些实施方案中，所述细胞是癌细胞，例如乳房/乳腺、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰或膀胱细胞。体外细胞死亡可在不存在补体和免疫效应细胞时测定，以区分由抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)诱导的细胞死亡。如此，用于细胞死亡的测定法可使用热灭活血清（即不含补体）在不存在免疫效应细胞时进行。为了确定本发明的多肽、抗体、拮抗剂或组合物是否能够诱导细胞死亡，可相对于未处理细胞评估膜完整性的丧失，它是通过碘化丙啶(propidium iodide)(PI)、锥虫蓝(参见Moore等, Cytotechnology 17: 1-11 (1995))或7AAD的摄取来评估的。

“表达ZPA的细胞”指表达内源的或转染的ZPA多肽的细胞。“表达ZPA的癌”指包含生成ZPA多肽的细胞的癌。“过表达”ZPA多肽或其同系物的癌指与同一组织类型的非癌性细胞相比，具有显著更高水平的ZPA多肽或其同系物的癌。此类过表达可以是由基因扩增或者是由转录或翻译升高引起的。可在诊断或预后测定法中通过评估细胞中的ZPA蛋白质或ZPA蛋白质同系物水平的升高（例如通过免疫组织化学测定法等）来确定ZPA多肽或ZPA多肽同系物过表达。或者/另外，可测量细胞中编码ZPA多肽或ZPA多肽同系物的核酸或mRNA水平，例如通过荧光原位杂交，使用对应于编码ZPA的核酸或其互补链的基于核酸的探针（FISH；参见WO 98/45479，1998年10月公布）；Southern印迹；Northern印迹；或聚合酶链式反应(PCR)技术，诸如实时定量PCR (RT-PCR)。在上述测定法之外，熟练从业人员可利用多种体内测定法。例如，可以将哺乳动物身体内的细胞暴露于内在化抗体，该抗体任选用可检测标记物（例如放射性同位素）标记，并评估该抗体对哺乳动物中ZPA多肽或ZPA多肽同系物的结合，例如通过对放射性的外部扫描或分析取自先前暴露于抗体的哺乳动物的活检。

术语“标记物”在用于本文时指与多肽、抗体、拮抗剂或组合物直接或间接偶联，以生成“带标记物的”或“经标记的”多肽、抗体、拮抗剂或组合物的可检测化合物或组合物。标记物可以是自身可检测的（例如放射性同位素标记物或荧光标记物），或者在酶标记物的情况中，可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或防止细胞的功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括：放射性同位素，例如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和Lu的放射性同位素；化疗剂，例如甲氨蝶呤(methotrexate)、阿霉素(adriamycin)、长春花生物碱类(vinca alkaloids)（长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide)）、多柔比星(doxorubicin)、美法仑(melphalan)、丝裂霉素(mitomycin) C、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂；酶及其片段，诸如溶核酶；抗生素；和毒素，诸如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素，包括其片段和/或变体；及下文披露的各种抗肿瘤药或抗癌药。下文记载了其它细胞毒剂。杀肿瘤药引起肿瘤细胞的破坏。

“化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂

类(alkylating agents), 诸如塞替派(thiotepa)和CYTOXAN®环磷酰胺(cyclophosphamide); 磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates), 诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan); 氮丙啶类(aziridines), 诸如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa); 乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines), 包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine); 番荔枝内酯类(acetogenins) (尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone)); 喜树碱(camptothecin) (包括合成类似物托泊替康(topotecan)); 苔藓抑素(bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物); 隐藻素类(cryptophycins) (特别是隐藻素1和隐藻素8); 多拉司他汀(dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189和CB1-TM1); 艾榴塞洛素(eleutherobin); pancratiostatine; sarcodictyin; 海绵抑素(spongistatin); 氮芥类(nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chloronaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard); 亚硝脲类(nitrosoureas), 诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素(enediynes) (例如加利车霉素(calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II和加利车霉素 ω II (参见例如Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994))); 蒽环类抗生素(dynemicin), 包括dynemicin A; 二碳磷酸盐化合物(bisphosphonate), 诸如氯膦酸盐; 埃斯波霉素(esperamicin); 以及新制癌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(anthracycline)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C (cactinomycin)、carubicin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D (dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比

星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨喋呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨喋呤(methotrexate)、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine); 嘧啶类似物, 诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine); 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、表硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸(folinic acid); 醋葡醛内酯(aceglatone); 醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶(eniluracil); 安吖啶(amsacrine); bestrabucil; 比生群(bisantrene); 依达曲沙(edatraxate); 地磷酰胺(defosfamide); 地美可辛(demecolcine); 地吖醌(diaziquone); elfornithine; 依利醋铵(elliptinium acetate); 埃坡霉素(epothilone); 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟脲(hydroxyurea); 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 美登木素生物碱类(maytansinoids), 诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin); 米托胍脲(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 二胺硝吖啶(nitracrine); 喷司他丁(pentostatin); 蛋氨酸芥(phenamet); 吡柔比星(pirarubicin); 洛索蒽醌(losoxantrone); 鬼臼酸(podophyllinic acid); 2-乙基酰肼(ethylhydrazide); 丙卡巴肼(procarbazine); PSK®多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生(razoxane); 根

霉素(rhizoxin); 西佐喃(sizofiran); 螺旋锗(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid); 三亚胺醌(triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类(trichothecenes)(尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verrucarin) A、杆孢菌素(roridin) A和蛇行菌素(anguidin)); 乌拉坦(urethan); 长春地辛(vindesine); 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露莫司汀(mannomustine); 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇(mitolactol); 哌泊溴烷(pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷(arabinoside) (“Ara-C”); 环磷酰胺(cyclophosphamide); 塞替派(thiotepa); 类紫杉醇类(taxoids), 例如TAXOL®帕利他塞(paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™帕利他塞的无克列莫佛、清蛋白改造的纳米颗粒剂型(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和TAXOTERE®多西他塞(doxetaxel) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥(chlorambucil); GEMZAR®吉西他滨(gemcitabine); 6-硫鸟嘌呤(thioguanine); 巯基嘌呤(mercaptopurine); 甲氨喋呤(methotrexate); 铂类似物, 诸如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin); 长春碱(vinblastine); 铂(platinum); 依托泊苷(etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺(ifosfamide); 米托蒽醌(mitoxantrone); 长春新碱(vincristine); NAVELBINE®长春瑞滨(vinorelbine); 能灭瘤(novantrone); 替尼泊苷(teniposide); 依达曲沙(edatrexate); 道诺霉素(daunomycin); 氨基蝶呤(aminopterin); 希罗达(xeloda); 伊本膦酸盐(ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 类视黄酸类(retinoids), 诸如视黄酸(retinoic acid); 卡培他滨(capecitabine); 及任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物。

该定义还包括作用于调控或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂诸如抗雌激素类和选择性雌激素受体调控物类(SERM), 包括例如他莫昔芬(tamoxifen) (包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)和FARESTON®托瑞米芬(toremifene); 抑制在肾上腺中调控雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂, 诸如例如4(5)-咪唑、氨基鲁米特(aminoglutethimide)、MEGASE®醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、福美坦(formestane)、法偭唑(fadrozole)、RIVISOR®伏罗唑(vorozole)、FEMARA®来曲唑(letrozole)和ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole); 抗雄激素类, 诸如氟他米特(flutamide)、

尼鲁米特(nilutamide)、比卡米特(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin); 以及曲沙他滨(troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制牵涉异常(aberrant)细胞增殖的信号途经中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如PKC- α 、Raf和H-Ras; 核酶, 诸如VEGF表达抑制剂(例如ANGIOZYME®核酶)和HER2表达抑制剂; 疫苗, 诸如基因疗法疫苗, 例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗; PROLEUKIN® rIL-2; LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂; ABARELIX®rmRH; 及任何上述物质的药学可接受盐、酸或衍生物。

“生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞, 尤其是癌细胞生长的化合物或组合物。因此, 生长抑制剂可以是显著降低处于S期的细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(处于S期以外的位置)的药剂, 诸如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春药类(vincas) (长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine))、紫杉烷类(taxanes)、和拓扑异构酶II抑制剂诸如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。那些阻滞G1的药剂也溢出进入S期停滞, 例如DNA烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和ara-C。更多信息可参见The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn和Israel编, 第1章, 题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antieoplastic drugs”, Murakami等, WB Saunders, Philadelphia, 1995, 尤其是第13页。紫杉烷类(帕利他塞(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel))是衍生自紫杉树的抗癌药。衍生自欧洲紫杉的多西他赛(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)是帕利他塞(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。帕利他塞和多西他赛促进由微管蛋白二聚体装配成微管并通过防止解聚使微管稳定, 导致对细胞中有丝分裂的抑制。

“多柔比星(Doxorubicin)”是一种蒽环类抗生素。多柔比星的完整化学名是(8S-顺式)-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- α -L-来苏-吡喃己糖基)氧基]-7,8,9,10-四氢-6,8,11-三羟基-8-(羟基乙酰基)-1-甲氧基-5,12-萘二酮。(8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione

术语“包装插页”用于指通常包括在治疗用产品的商业包装中的说明书，它们包含有关涉及此类治疗用产品应用的适应征、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。

本发明的组合物和方法

ZPA多肽变体

在本文所述全长天然序列ZPA多肽之外，涵盖可制备ZPA多肽变体。ZPA多肽变体可通过将适宜的核苷酸改变引入ZPA核酸和/或通过合成期望ZPA多肽来制备。本领域技术人员将领会，氨基酸改变可改变ZPA多肽的翻译后加工，诸如改变糖基化位点的数目或位置或者改变膜锚定特征。

可在本文所述天然全长序列ZPA多肽中或在ZPA多肽的各个结构域中进行变异，例如使用例如美国专利No. 5,364,934所述的保守和非保守突变的任何技术和指导方针。变异可以是编码ZPA多肽的一个或多个密码子的替代、删除或插入，其导致ZPA多肽的氨基酸序列与天然序列ZPA多肽相比的改变。任选的是，变异是通过ZPA多肽的一个或多个结构域中至少一个氨基酸为任何其它氨基酸所替代。通过比较ZPA多肽的序列与同源已知蛋白质分子的序列，并将高同源区中进行的氨基酸序列改变的数目最小化，可发现确定哪些氨基酸残基可插入、替代或删除而不会对期望活性有不利影响的方针。氨基酸替代可以是将一种氨基酸用具有相似结构和/或化学特性的另一种氨基酸替代的结果，诸如用丝氨酸替代亮氨酸，即保守氨基酸替代。插入或删除可任选在约1个至5个氨基酸的范围内。可通过在序列中系统进行氨基酸插入、删除或替代，并对所得变体测试由全长或成熟天然序列展示的活性来确定可容许的变异。

在具体的实施方案中，感兴趣的保守替代见表1标题“优选替代”下所示。如果此类替代导致生物学活性的改变，那么可引入表1中称为“例示替代”的更实质性改变，或者如下文关于氨基酸类别进一步所述的，并筛选产物。

表1

<u>原始残基</u>	<u>例示替代</u>	<u>优选替代</u>
Ala(A)	val; leu; ile	val
Arg(R)	lys; gln; asn	lys

Asn(N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp(D)	glu	glu
Cys(C)	ser	ser
Gln(Q)	asn	asn
Glu(E)	asp	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸	leu
Leu(L)	正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; 正亮氨酸	leu

对ZPA多肽的功能或免疫学身份的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来实现：(a) 替代区域的多肽主链的结构，例如作为折叠片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或(c) 侧链的体积。根据共同的侧链特性，天然存在残基可如下分组：

- (1)疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2)中性、亲水性的：Cys、Ser、Thr；
- (3)酸性的：Asp、Glu；
- (4)碱性的：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- (5)影响链取向的残基：Gly、Pro；和
- (6)芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

非保守替代将需要用这些类别之一中的一个成员替换另一个类别的。还可以将此替代残基引入保守替代位点，或者引入剩余（非保守）位点。

变异可使用本领域知道的方法来进行，诸如寡核苷酸介导的（定点）诱

变、丙氨酸扫描、及PCR诱变。可对所克隆的DNA进行定点诱变(Carter等, Nucl. Acids Res. 13: 4331 (1986); Zoller等, Nucl. Acids Res. 10: 6487 (1987))、盒式诱变(Wells等, Gene 34: 315 (1985))、限制性选择诱变(restriction selection mutagenesis)(Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317: 415 (1986))或其它已知技术以产生ZPA变体DNA。

还可采用扫描氨基酸分析来鉴定沿着邻近序列的一个或多个氨基酸。在某些实施方案中,扫描用氨基酸中有相对较小的中性氨基酸。此类氨基酸包括丙氨酸、甘氨酸、丝氨酸和半胱氨酸。丙氨酸通常是这组中的优选扫描用氨基酸,因为它消除了 β -碳上的侧链,而且不大可能改变变体的主链构象(Cunningham和Wells, Science 244: 1081-1085 (1989))。丙氨酸通常也是优选的,因为它是最常见的氨基酸。另外,常常在隐蔽位置和暴露位置都能发现它(Creighton, The Proteins, W.H. Freeman & Co., N.Y.; Chothia, J. Mol. Biol. 150: 1 (1976))。如果丙氨酸替代不产生足够量的变体,那么可使用等排(isoteric)氨基酸。

ZPA多肽的修饰

对ZPA多肽的共价修饰包括在本发明的范围内。一种类型的共价修饰包括使ZPA多肽的靶氨基酸残基与有机衍生化试剂反应,该有机衍生化试剂能够与ZPA多肽的选定侧链或者N-或C-末端残基起反应。用双功能试剂进行的衍生化可用于例如使ZPA多肽与不溶于水的支持基质或表面交联,以用于抗ZPA抗体的纯化方法,反之亦然。常用的交联剂包括例如1,1-双(重氮-乙酰基)-2-苯乙烷、戊二醛、N-羧基琥珀酰亚胺酯例如与4-叠氮水杨酸形成的酯、同双功能亚氨酸酯包括二琥珀酰亚氨基酯诸如3,3'-二硫代双(琥珀酰亚氨基丙酸酯)、双功能马来酰亚胺诸如双-N-马来酰亚氨基-1,8-辛烷和诸如3-[(对-叠氮苯基)二硫代]丙酰亚氨酸甲酯等试剂。

其它修饰包括谷氨酰胺酰基和天冬酰胺酰基残基分别脱酰胺为相应的谷氨酰胺和天冬酰胺残基,脯氨酸和赖氨酸的羟基化,丝氨酸或苏氨酸残基的羟基的磷酸化,赖氨酸、精氨酸和组氨酸侧链的 α -氨基的甲基化(T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), N-末端胺的乙酰化,及任何C-末端羧基的酰胺化。

本发明范围内所包括的对ZPA多肽的另一类共价修饰包括改变多肽的天然糖基化样式。“改变天然糖基化样式”在本文中意图指删除一个或多个在天然序列ZPA多肽中发现的碳水化合物模块(moiety)(或是通过消除潜在糖基化位点,或是通过以化学和/或酶促手段删除糖基化),和/或添加一个或多个在天然序列ZPA多肽中不存在的糖基化位点。另外,此短语包括天然蛋白质糖基化中的定性改变,牵涉所存在的各种碳水化合物模块的本质和比例的改变。

向ZPA多肽中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列而实现。改变可通过例如向天然序列ZPA中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于O-连接的糖基化位点)。可任选通过DNA水平的变化来改变ZPA氨基酸序列,特别是通过在预先选择的碱基处突变编码ZPA多肽的DNA,从而产生将翻译成期望氨基酸的密码子。

增加ZPA多肽上碳水化合物模块数的另一种方法是通过使糖苷与多肽化学或酶促偶联。本领域对此类方法有描述,例如1987年9月11日公布的WO 87/05330及Aplin和Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)。

消除ZPA多肽上存在的碳水化合物模块可通过化学或酶促方法来实现,或者通过编码充当糖基化靶物的氨基酸残基的密码子的突变替代来实现。化学脱糖基化技术是本领域已知的,而且记载于例如Hakimuddin等, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987)及Edge等, Anal. Biochem. 118: 131 (1981)。酶促切割多肽上的碳水化合物模块可通过使用多种内切和外切糖苷酶来实现,记载于Thotakura等, Meth. Enzymol. 138: 350 (1987)。

对ZPA多肽的另一类共价修饰包括,以美国专利No. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192或4,179,337所列方式,将ZPA多肽与多种非蛋白质性质的聚合物之一连接,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化亚烷基(polyoxyalkylene)。

还可以形成嵌合分子的方式修饰本发明的ZPA多肽,所述嵌合分子包含与另一种异源多肽或氨基酸序列融合的ZPA多肽。

在一个实施方案中,此类嵌合分子包括ZPA多肽与将该ZPA多肽靶向投递至各种组织的蛋白质转导结构域的融合物。一方面,将ZPA多肽靶向脑,穿越血脑屏障,使用例如人免疫缺陷病毒TAT蛋白的蛋白质转导结构域(Schwarze等, 1999, Science 285: 1569-72)。

在另一个实施方案中,此类嵌合分子包括ZPA多肽与标签多肽的融合物,所述标签多肽提供了抗标签抗体可选择性结合的表位。表位标签通常位于ZPA多肽的氨基或羧基末端。此类带表位标签形式的ZPA多肽的存在可使用针对所述标签多肽的抗体来检测。而且,表位标签的提供使ZPA多肽易于使用抗标签抗体或另一类结合所述表位标签的亲基质通过亲和纯化来纯化。多种标签多肽及其各自抗体是本领域已知的。例子包括多组氨酸(poly-his)或多-组氨酸-甘氨酸(poly-his-gly)标签;流感HA标签多肽及其抗体12CA5 (Field等, Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)); c-myc标签及其抗体8F9, 3C7, 6E10, G4, B7和9E10 (Evan等, Molecular and Cellular Biology 5: 3610-3616 (1985)); 及单纯疱疹病毒糖蛋白D (gD)标签及其抗体(Paborsky等, Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990))。其它标签多肽包括Flag肽(Hopp等, BioTechnology 6: 1204-1210 (1988)); KT3表位肽(Martin等, Science 255: 192-194 (1992)); α -微管蛋白表位肽(Skinner等, J. Biol. Chem. 266: 15163-15166 (1991)); 及T7基因10蛋白肽标签(Lutz-Freyermuth等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6393-6397 (1990))。

在一个备选实施方案中,嵌合分子可包括ZPA多肽与免疫球蛋白或免疫球蛋白特定区域的融合物。对于二价形式的嵌合分子(也称为“免疫粘附素”),此类融合物可以是与IgG分子Fc区的融合。在一个实施方案中,免疫球蛋白融合物包含IgG1分子的铰链区、CH2区和CH3区,或者包含IgG1分子的铰链区、CH1区、CH2区和CH3区。关于免疫球蛋白融合物的制备还可参见美国专利No. 5,428,130。

ZPA多肽的制备

下面的描述主要涉及通过培养用包含编码ZPA多肽的核酸的载体转化或转染的细胞来生成ZPA多肽。当然涵盖可采用本领域已知的备选方法来制备ZPA多肽。例如,可使用固相技术通过直接肽合成来生成ZPA多肽序列或其部分(参见例如Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA, 1969; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149-2154 (1963))。体外蛋白质合成可使用手工技术或通过自动化来进行。自动化合成可例如使用Applied Biosystems肽合成仪(Foster City, CA)依照制造商的说明书来完成。ZPA多肽的各个部分可分开化学合成,并使用化学或酶促方法组合以生成全

长ZPA多肽。

宿主细胞的选择和转化

将宿主细胞用本文所述用于ZPA多肽生成的表达或克隆载体转染或转化，并在为了诱导启动子、选择转化子、或扩增编码期望序列的基因而恰当调整的常规营养培养基中培养。培养条件，诸如培养基、温度、pH等等，可以由熟练技术人员无需过多实验就选择。通常，用于使细胞培养物生产力最大化的原理、方案和实用技术可参见Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler编, IRL Press, 1991和Sambrook等，见上文。

转染方法是普通技术人员所知道的，例如CaPO₄处理和电穿孔。根据所用宿主细胞，转化使用对此类细胞适宜的标准技术进行。采用氯化钙的钙处理，如Sambrook等，见上文所述，或电穿孔通常用于原核生物或具有坚固细胞壁屏障的其它细胞。使用根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)进行的感染用于某些植物细胞的转化，如Shaw等, Gene 23: 315 (1983)和1989年6月29日公布的WO 89/05859所述。对于没有此类细胞壁的哺乳动物细胞，可采用Graham和van der Eb, Virology 52: 456-457 (1978)的磷酸钙沉淀法。哺乳动物细胞宿主系统转化的一般情况参见美国专利No. 4,399,216。进入酵母的转化通常依照Van Solingen等, J. Bact. 130: 946 (1977)和Hsiao等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76: 3829 (1979)的方法来进行。然而，也可使用用于将DNA导入细胞的其它方法，诸如核显微注射、电穿孔、细菌原生质体与完整细胞的融合、或聚阳离子例如polybrene或聚鸟氨酸。关于用于转化哺乳动物细胞的多种技术见Keown等, Methods in Enzymology 185: 527-537 (1990)和Mansour等, Nature 336: 348-352 (1988)。

适于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞包括原核生物、酵母或高等真核细胞。合适的原核生物包括但不限于真细菌，诸如革兰氏阴性或阳性生物体，例如肠杆菌科，诸如大肠杆菌。多种大肠杆菌菌株是公众可获得的，诸如大肠杆菌K12菌株MM294 (ATCC 31,446); 大肠杆菌X1776 (ATCC 31,537); 大肠杆菌菌株W3110 (ATCC 27,325); 和K5 772 (ATCC 53,635)。其它合适的原核生物宿主细胞包括肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)，诸如埃希氏菌属 (*Escherichia*) 例如大肠杆菌或大肠埃希氏菌 (*E. coli*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、变形

菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*) 例如粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*)、和志贺氏菌属 (*Shigella*)，以及芽孢杆菌属 (*Bacilli*) 诸如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) (例如1989年4月12日公布的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌41P)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 诸如铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)、和链霉菌属 (*Streptomyces*)。这些例子是例示性的而非限制性的。在一个实施方案中，菌株W3110是宿主或亲本宿主，因为它是用于重组DNA产物发酵的常用宿主菌株。在某些实施方案中，宿主细胞分泌最小量的蛋白水解酶。例如，可以修饰菌株W3110，在编码对宿主而言内源的蛋白质的基因中产生遗传突变，此类宿主的例子包括大肠杆菌W3110菌株1A2，其具有完整基因型 $tonA$ ；大肠杆菌W3110菌株9E4，其具有完整基因型 $tonA\ ptr3$ ；大肠杆菌W3110菌株27C7 (ATCC 55,244)，其具有完整基因型 $tonA\ ptr3\ phoA\ E15\ (argF-lac)169\ degP\ ompT\ kan^r$ ；大肠杆菌W3110菌株37D6，其具有完整基因型 $tonA\ ptr3\ phoA\ E15\ (argF-lac)169\ degP\ ompT\ rbs7\ ilvG\ kan^r$ ；大肠杆菌W3110菌株40B4，它是具有非卡那霉素抗性 $degP$ 删除突变的菌株37D6；及具有1990年8月7日公告的美国专利No. 4,946,783中公开的突变型周质蛋白酶的大肠杆菌菌株。或者，体外克隆方法，例如PCR或其它核酸聚合酶反应也是合适的。

在原核生物以外，真核微生物，诸如丝状真菌或酵母也是ZPA多肽编码载体的合适克隆或表达宿主。酿酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是常用的低等真核宿主微生物。其它的包括粟酒裂殖糖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) (Beach和Nurse, Nature 290: 140 (1981); EP 139,383, 1985年5月2日公布); 克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主(美国专利No. 4,943,529; Fleer等, Bio/Technology 9: 968-975 (1991))诸如例如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt等, J. Bacteriol. 154(2): 737-742 (1983))、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、*K. waltii* (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906; Van den Berg等, Bio/Technology 8: 135 (1990))、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*)、和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*)；亚罗酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402,226)；巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070; Sreekrishna等,

J. Basic Microbiol. 28: 265-278 (1988)); 假丝酵母属 (*Candida*); 瑞氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) (Case 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5259-5263 (1979)); 许旺酵母属 (*Schwanniomyces*) 诸如许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) (EP 394,538, 1990年10月31日公布); 和丝状真菌诸如例如脉孢菌属 (*Neurospora*)、青霉属 (*Penicillium*)、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) (WO 91/00357, 1991年1月10日公布)、和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主诸如构巢曲霉 (*A. nidulans*) (Balance等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 112: 284-289 (1983); Tilburn等, Gene 26: 205-221 (1983); Yelton等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474 (1984)) 和黑曲霉 (*A. niger*) (Kelly和Hynes, EMBO J. 4: 475-479 (1985))。甲基营养型酵母 (Methylotropic yeast) 适于本发明, 包括但不限于能够在甲醇上生长的、选自以下属的酵母: 汉逊氏酵母属 (*Hansenula*)、假丝酵母属 (*Candida*)、克勒克氏酵母属 (*Kloeckera*)、毕赤氏酵母属 (*Pichia*)、糖酵母属 (*Saccharomyces*)、球拟酵母属 (*Torulopsis*)、和红酵母属 (*Rhodotorula*)。作为这类酵母的例子的具体物种列表可参见 C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)。

适用于表达ZPA多肽编码核酸的宿主细胞衍生自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括昆虫细胞诸如果蝇S2和夜蛾Sf9, 以及植物细胞。有用哺乳动物宿主细胞系的例子包括中国仓鼠卵巢(CHO)和COS细胞。更具体的例子包括用SV40转化的猴肾CV1系 (COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾系 (293或为了在悬浮培养中生长而亚克隆的293细胞, Graham等, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); 中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR (CHO, Urlaub和Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)); 小鼠塞托利(sertoli)细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 和小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL 51)。认为适宜宿主细胞的选择在本领域技术范围内。

复制型载体的选择和使用

可以将编码本发明多肽或抗体的核酸 (例如cDNA或基因组DNA) 插入复制型载体用于克隆 (DNA扩增) 或表达。多种载体是公众可得到的。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒颗粒或噬菌体的形式。可以通过多种规程将适

宜的核酸序列插入载体。通常，使用本领域已知的技术将DNA插入适宜的限制性内切核酸酶位点。载体构件通常包括但不限于下列一种或多种：信号序列（如果所述序列要分泌的话）、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。包含一种或多种这些构件的合适载体的构建采用技术人员已知的标准连接技术。

本发明多肽或抗体不仅可以直接重组生产，而且可以作为与异源多肽的融合多肽来生成，所述异源多肽可以是在成熟蛋白质或多肽的N-末端具有特定切割位点的信号序列或其它多肽。通常，信号序列可以是载体的构件，或者它可以是插入载体的多肽或抗体编码DNA的一部分。信号序列可以是原核信号序列，选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定的肠毒素II前导序列。为了酵母分泌，信号序列可以是例如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列（包括糖酵母和克鲁维酵母的 α 因子前导序列，后者见美国专利No, 5,010,182）、或酸性磷酸酶前导序列、白色假丝酵母葡糖淀粉酶前导序列（EP 362,179, 1990年4月4日公布）、或1990年11月15日公布的WO 90/13646中记载的信号。在哺乳动物细胞表达中，可以使用哺乳动物信号序列来指导蛋白质的分泌，诸如来自相同或相关物种的分泌型多肽的信号序列，以及病毒分泌前导序列。

表达和克隆载体都包含使载体能够在一种或多种所选择的宿主细胞中复制的核酸序列。已知多种细菌、酵母和病毒的此类序列。来自质粒pBR322的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌，2 μ 质粒起点适合于酵母，而各种病毒起点（SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV）可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。

表达和克隆载体通常将包含选择基因，也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质：(a)赋予抗生素或其它毒素抗性，例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素；(b)补足营养缺陷；或(c)提供不能由复合培养基获得的关键营养物，例如编码芽孢杆菌D-丙氨酸消旋酶的基因。

适于哺乳动物细胞的选择标志的例子是能够鉴定有能力摄取多肽或抗体编码核酸的细胞的选择标志，诸如DHFR或胸苷激酶。在采用野生型DHFR时，适宜的宿主细胞是DHFR活性缺陷的CHO细胞系，其制备和繁殖记载于Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)。适用于酵母的选择基因为存在于酵母质粒YRp7中的基因(Stinchcomb等, Nature 282: 39 (1979);

Kingsman等, Gene 7: 141 (1979); Tschemper等, Gene 10:157 (1980))。 *trp1* 基因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株, 例如ATCC No. 44076或PEP4-1提供了选择标志(Jones, Genetics 85: 12 (1977))。

表达和克隆载体通常包含与本发明多肽或抗体编码核酸序列可操作连接的启动子以指导mRNA合成。受到多种潜在宿主细胞识别的启动子是已知的。适用于原核宿主的启动子包括 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统(Chang等, Nature 275: 615 (1978); Goeddel等, Nature 281: 544 (1979))、碱性磷酸酶、色氨酸(*trp*)启动子系统(Goeddel, Nucleic Acids Res. 8: 4057 (1980); EP 36,776)、和杂合启动子诸如tac启动子(deBoer等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25 (1983))。用于细菌系统的启动子还将包含与编码本发明多肽或抗体的DNA可操作连接的Shine-Dalgarno (S.D.)序列。

适用于酵母宿主的启动序列的例子包括3-磷酸甘油酸激酶(Hitzeman等, J. Biol. Chem. 255: 2073 (1980))或其它糖酵解酶(Hess等, J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry 17: 4900 (1978))的启动子, 诸如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡糖激酶。

作为具有由生长条件控制转录的额外优点的诱导型启动子的其它酵母启动子是醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、与氮代谢有关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适用于酵母表达的载体和启动子进一步记载于EP 73,657。

在哺乳动物宿主细胞中由载体转录核酸受到例如自病毒诸如多瘤病毒、禽痘病毒(1989年7月5日公布的UK 2,211,504)、腺病毒(诸如腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和猿病毒40 (SV40)基因组得到的启动子; 异源哺乳动物启动子例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子; 及热休克启动子的控制, 倘若此类启动子与宿主细胞系统相容的话。

可通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核生物对编码本发明多肽或抗体的DNA的转录。增强子是DNA顺式作用元件, 通常大约10至300bp, 作用于启动子以提高其转录。现在知道来自哺乳动物基因(球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)的许多增强子序列。然而, 通常使用来

自真核细胞病毒的增强子。例子包括SV40复制起点晚期一侧的增强子 (bp 100-270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期一侧的增强子、和腺病毒增强子。可以将增强子剪接入载体, 位于本发明多肽或抗体编码序列的5'或3'位置, 但是优选位于启动子的5'位点。用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人、或来自其它多细胞生物体的有核细胞)的表达载体还将包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可以自真核或病毒DNA或cDNA非翻译区的5'端和偶尔的3'端获得。这些区域包含在编码多肽或抗体的mRNA的非翻译部分中转录成多腺苷酸化片段的核苷酸区段。

适合在改动后在重组脊椎动物细胞培养物中合成本发明多肽或抗体的其它方法、载体和宿主细胞记载于Gething等, Nature 293: 620-625 (1981); Mantei等, Nature 281: 40-46 (1979); EP 117,060; 及EP 117,058。

检测基因扩增/表达

基因的扩增和/或表达可以在样品中直接测量, 例如根据本文提供的序列, 使用适宜的标记探针, 通过常规的Southern印迹、对mRNA转录定量的Northern印迹(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201-5205 (1980))、点印迹(DNA分析)或原位杂交。或者, 可采用能识别特定双链体的抗体, 所述双链体包括DNA双链体、RNA双链体、及DNA-RNA杂合双链体或DNA-蛋白质双链体。继而可标记抗体, 并可进行测定法, 其中将双链体结合至表面, 从而在双链体在表面上形成时, 可检测与双链体结合的抗体的存在。

或者, 可通过免疫学方法测量基因表达, 诸如细胞或组织切片的免疫组化染色和细胞培养物或体液的测定法, 以直接对基因产物的表达定量。可用于免疫组化染色和/或样品液体测定法的抗体可以是单克隆的或多克隆的, 而且可以在任何哺乳动物中制备, 或者可以是合成的(例如本发明的单克隆抗体)。方便的是, 可针对天然序列ZPA多肽或针对基于本文提供的DNA序列的合成肽或针对与ZPA多肽编码DNA融合且编码特定抗体表位的外源序列来制备抗体。

ZPA多肽的纯化

可以从培养液或从宿主细胞裂解物中回收各种形式的ZPA多肽。如果是

膜结合的,那么可使用合适的去污剂溶液(例如Triton-X™ 100)或通过酶促切割使其自膜释放。ZPA多肽编码核酸表达中所采用的细胞可通过多种物理或化学手段破裂,诸如冻融循环、超声处理、机械破裂、或细胞溶解剂。依照一个实施方案,期望从重组细胞蛋白质或多肽纯化ZPA多肽。下面的规程是合适纯化规程的例示:在离子交换柱上的分级;乙醇沉淀;反相HPLC;在硅土或阳离子交换树脂诸如DEAE上的层析;层析聚焦;SDS-PAGE;硫酸铵沉淀;使用例如Sephadex G-75的凝胶过滤;蛋白A Sepharose柱以除去污染物诸如IgG;及用以结合带表位标签形式ZPA多肽的金属螯合柱。可采用多种蛋白质纯化方法,此类方法是本领域已知的,并记载于例如Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)。纯化步骤的选择将取决于例如所用生成过程的性质和所产生的具体ZPA多肽。依照一个实施方案,ZPA多肽使用本发明抗体通过亲和层析来纯化。

测定对细胞增殖的抑制

本发明的一种或多种ZPA多肽和/或激动剂对细胞生长和增殖的抑制活性可以使用本文所描述的测定法和本领域已知的其它测定法来测量。

肿瘤和癌症(例如乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌等)的动物模型包括非重组的和重组的(转基因的)动物二者。非重组动物模型包括例如啮齿类,例如鼠模型。此类模型可使用标准技术将肿瘤细胞导入同基因小鼠来生成,例如皮下注射、尾静脉注射、脾植入、腹膜内植入、肾囊下植入、或同位(orthopin)植入,例如将结肠癌细胞植入结肠组织。参见例如1997年9月18日公布的PCT公开号WO97/33551。肿瘤学研究中最常用的动物物种大概是免疫缺陷型小鼠,特别是裸鼠。具有胸腺发育不全/不发育的裸鼠可成功充当人肿瘤异种移植物宿主的观察结果导致其用于该目的的广泛应用。已经将常染色体隐性 nu 基因导入裸鼠的极其多种独特同基因异系品系,包括例如ASW、A/He、AKR、BALB/c、B10.LP、C17、C3H、C57BL、C57、CBA、DBA、DDD、I/st、NC、NFR、NFS、NFS/N、NZB、NZC、NZW、P、RIII和SJL。另外,在裸鼠以外已经培育了极其多种具有遗传性免疫学缺陷的其它动物并用作肿瘤异种移植物的接受者。更多详情参见例如The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven和B. Winograd编, CRC Press, Inc., 1991。

导入此类动物的细胞可以衍生自己知的肿瘤/癌细胞系,诸如任何上文所列肿瘤细胞系及例如B104-1-1细胞系(经*neu*原癌基因转染的稳定NIH-3T3细胞系);经*ras*转染的NIH-3T3细胞;Caco-2(ATCC HTB-37);或中等分化的II期人结肠腺癌细胞系HT-29(ATCC HTB-38);或者衍生自肿瘤和癌。可以使用标准条件从接受手术的患者获得肿瘤或癌细胞的样品,其中牵涉在液氮中冷冻和保存。Karmali等, Br. J. Cancer, 48: 689-696 (1983)。

可以通过多种规程将肿瘤细胞导入动物,诸如裸鼠。小鼠中的表皮下(subcutaneous, s.c.)空间非常适于肿瘤植入。可以表皮下移植实心块、针吸活检(通过使用套管针)、或细胞悬浮液形式的肿瘤。对于实心块或套管针植入,将合适大小的肿瘤组织碎片导入表皮下空间。自原发瘤或稳定肿瘤细胞系新鲜制备细胞悬浮液,并表皮下注射。也可以以真皮下(subdermal)植入物的形式注射肿瘤细胞。在此位置,接种体沉积在真皮结缔组织的下部与表皮下组织之间。

乳腺癌的动物模型可以通过例如将大鼠成神经细胞瘤细胞(*neu*癌基因最初就是自其分离的)或经*neu*转染的NIH-3T3细胞植入裸鼠来生成,基本上如Drebin等, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83: 9129-9133 (1986)所述。

类似的,结肠癌的动物模型可以通过使结肠癌细胞在动物(例如裸鼠)中传代而导致肿瘤在这些动物中出现来生成。人结肠癌在裸鼠中的同位移植模型已有记载,例如Wang等, Cancer Research 54: 4726-4728 (1994)及Too等, Cancer Research 55: 681-684 (1995)。此模型基于所谓的“METAMOUSE™”(AntiCancer, Inc., San Diego, California)。

可以切下在动物中生成的肿瘤并在体外培养。然后将来自体外培养物的细胞传给动物。此类肿瘤可充当进一步测试或药物筛选的靶物。或者,可以分离源自传代的肿瘤,并对来自传代前细胞和一轮或多轮传代后分离的细胞的RNA分析感兴趣基因的差异表达。此类传代技术可以用任何已知的肿瘤或癌细胞系来实施。

例如, Meth A、CMS4、CMS5、CMS21和WEHI-164是BALB/c雌性小鼠的化学诱导纤维肉瘤(DeLeo等, J. Exp. Med., 146: 720 (1977)), 其为研究各种药剂的抗肿瘤活性提供了高度可控制的模型系统。Palladino等, J. Immunol., 138: 4023-4032 (1987)。简言之,使肿瘤细胞在细胞培养物中在体外繁殖。在注射入动物前,将细胞系在缓冲液中清洗和悬浮,细胞密度为大约 10×10^6 到

10×10^7 细胞/ml。然后给动物皮下感染10-100 μ l细胞悬浮液,肿瘤出现需要1-3周。

另外,小鼠Lewis肺(3LL)癌(其是最彻底研究的实验肿瘤之一)可以用作调查用肿瘤模型。在此肿瘤模型中的功效已经与在诊断有小细胞肺癌(SCCL)的人类患者治疗中的有益效果联系起来。在注射来自患病小鼠的肿瘤碎片或在培养物中维持的细胞后,此肿瘤可以导入正常小鼠。Zupi等, Br. J. Cancer, 41: suppl. 4, 30 (1980)。有证据表明,肿瘤可以始自甚至单一细胞的注射,而且非常高比例的受感染肿瘤细胞存活。关于此肿瘤模型的更多信息参见Zacharski, Haemostasis 16: 300-320 (1986)。

评估测试化合物在具有所植入肿瘤的动物模型中的功效的一种方式是在治疗前后测量肿瘤的大小。传统上,所植入肿瘤的大小用游标卡尺在二维或三维上测量。限于二维的测量不能精确反映肿瘤的大小;因此,通常使用数学公式将其换算成相应的体积。然而,肿瘤大小的测量是非常不精确的。药物候选物的治疗效果可以更好的通过治疗诱导的生长延迟和比生长延迟(specific growth delay)来描述。肿瘤生长描述中的另一项重要变量是肿瘤体积倍增时间。用于计算和描述肿瘤生长的计算机程序也是可获得的,诸如Rygaard和Spang-Thomsen, Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals, Wu和Sheng编, Basel, 1989, p. 301所报告的程序。然而,应当注意,治疗之后的坏死和炎性应答实际上可导致肿瘤大小的增大,至少在最初时。因此,需要通过形态测定方法和流式细胞术分析的组合来仔细监测这些变化。

另外,重组(转基因)动物模型可使用用于生成转基因动物的标准技术通过将本文中所鉴定的ZPA基因的编码部分导入感兴趣动物的基因组来改造。可充当转基因操作对象的动物包括但不限于小鼠、大鼠、家兔、豚鼠、绵羊、山羊、猪、斑马鱼和非人灵长类,例如狒狒、黑猩猩和猴。本领域已知的用于将转基因导入此类动物的技术包括原核显微注射(pronucleic microinjection)(美国专利No. 4,873,191);逆转录病毒介导的基因转移入种系(例如Van der Putten等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6148-615 (1985));胚胎干细胞中的基因寻靶(Thompson等, Cell, 56:313-321 (1989));胚胎电穿孔(Lo, Mol. Cell. Biol., 3:1803-1814 (1983));及精子介导的基因转移(Lavitrano等, Cell, 57:717-73 (1989))。综述参见例如美国专利No.

4,736,866。

为了本发明的目的，转基因动物包括那些只在其部分细胞中携带转基因的动物（“马赛克动物”或“镶嵌动物”）。转基因可作为单一转基因或者串联物例如头-头或头-尾串联物整合。还可能如下将转基因选择性导入特定细胞类型，例如Lasko等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6232-636 (1992)的技术。转基因在转基因动物中的表达可通过标准技术来监测。例如，Southern印迹分析或PCR扩增可用于验证转基因的整合。然后可使用诸如原位杂交、Northern印迹分析、PCR或免疫细胞化学的技术分析mRNA表达水平。对动物进一步检验肿瘤或癌症发生/发展的征候。

或者，可构建具有缺陷的或改变的编码本文中所鉴定的ZPA多肽的基因的“敲除”动物（例如斑马鱼），原因是编码ZPA多肽的内源基因和导入动物胚胎细胞的编码同一多肽的改变的基因组DNA之间的同源重组。例如，编码特定ZPA多肽的cDNA可依照已建立的技术用于克隆编码该多肽的基因组DNA。可以将编码特定ZPA多肽的基因组DNA的一部分删除或用另一基因替换，诸如可用于监测整合的、编码选择标志的基因。类似的，可以构建具有缺陷的或改变的编码ZPA多肽内源同系物的基因的、斑马鱼以外的敲除动物，原因是编码ZPA同系物的内源基因和导入动物胚胎细胞的编码同源ZPA多肽的改变的基因组DNA之间的同源重组。典型的，载体中包含数千碱基未改变的侧翼DNA（5'和3'末端都有）。关于同源重组载体的描述参见例如Thomas 和 Capecchi, Cell, 51: 503 (1987)。将载体导入胚胎干细胞系（例如通过电穿孔），并选择其中所导入DNA与内源DNA发生同源重组的细胞（参见例如Li等, Cell, 69: 915 (1992)）。然后将所选细胞注射入动物（例如小鼠或大鼠）的胚胎以形成聚集嵌合体（参见例如Bradley, 于 Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson编, IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152）。然后将嵌合胚胎植入合适的假孕雌性代孕动物，并使胚胎足月产生“敲除”动物。在其生殖细胞中包含同源重组DNA的后代可通过标准技术鉴定，并用于繁殖其中动物的所有细胞都包含同源重组DNA的动物。敲除动物可以在例如由于缺乏一种或多种ZPA多肽而形成病理状况和具有抵御某些病理状况的能力方面表征。

可以构建“敲除”动物（例如斑马鱼），其中选择性阻止编码ZPA多肽的基因进行转录和/或翻译。例如，可以使用沉默RNA或吗啉代(morpholinos)

来阻断一种或多种ZPA多肽的翻译。在此类动物中, 编码ZPA多肽的基因保持完整, 但是该基因所编码的蛋白质没有生成。

特异性结合本文中所鉴定的ZPA多肽的抗体和其它药物候选物的功效也可以在自发性动物肿瘤的治疗中测试。适于此类研究的靶物是猫口腔鳞状细胞癌(SCC)。猫口腔SCC是高度侵入性的恶性肿瘤, 是最常见的猫口腔恶性肿瘤, 占此物种中所报告的口腔肿瘤的超过60%。它罕见转移至远处部位, 尽管此低转移发生率可仅仅反映具有此肿瘤的猫的短存活时间。这些肿瘤通常不适于手术, 主要因为猫口腔的解剖。目前, 此肿瘤没有有效的治疗方法。在进入研究前, 每只猫进行完整临床检查和活检, 并进行计算断层照相法(CT)扫描。将诊断有舌下口腔鳞状细胞肿瘤的猫排除出研究。舌可因为此类肿瘤而变得瘫痪或麻痹, 而且, 即使治疗杀死了肿瘤, 动物可能不能自己进食了。每只猫在更长的一段时间里重复治疗。在治疗期间的每天和每次后续复查时拍摄肿瘤照片。治疗后, 每只猫进行另一次CT扫描。此后每8周评估CT扫描和胸透照片。对数据评估存活、应答和毒性与对照组相比的差异。阳性应答可要求肿瘤消退的证据, 优选有生活质量的改善和/或寿命延长。

另外, 也可以测试其它自发性动物肿瘤, 诸如犬、猫和狒狒的纤维肉瘤、腺癌、淋巴瘤、软骨瘤或平滑肌肉瘤。其中, 犬和猫中的乳腺腺癌是优选的模型, 因为它的外观和表现与人的非常相似。然而, 此模型的应用受限于此类型肿瘤在动物中的罕见发生。

转基因斑马鱼的构建

转基因斑马鱼可以如本文所描述的或者如本领域所公知的来构建(参见例如Westerfield, The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio). 第4版, Univ. of Oregon Press: Eugene, 2000)。可以将转基因构建物导入斑马鱼细胞(例如在1-4个细胞的发育阶段), 然后让所注射的胚胎发育, 直至时间上适于检验转基因的效果。转基因构建物可以是线性的或环状的多核苷酸, 而且任选可以包括本文中其它地方所描述的调控序列。将转基因构建物导入斑马鱼胚胎细胞的方法包括但不限于显微注射、电穿孔、颗粒枪轰击、病毒感染、和经脂质体。转基因构建物中可以包括报告分子, 以易于测定转基因在成年斑马鱼中的存在(例如GFP或一些其它可容易鉴定的标记物); 在构建物中不包括报告物的情况中, 可以对斑马鱼核酸(例如自

成年斑马鱼的尾部切样分离的)检验转基因的存在,通过众所周知的遗传方法(genetic method),诸如PCR或Southern印迹。

任何品系和/或品种的实验室或商品化斑马鱼都可用于本文所述方法。在一些实施方案,斑马鱼来自自交系(包括但不限于SJD、C32和WIK)。在一些实施方案中,通过使用具有其它突变的斑马鱼来便于转基因活性的显现,例如基本上没有载黑色素细胞沉积(例如白化突变体)或irridiphore沉积(例如roy orbison,透明突变体)的“非着色”(non-pigmented)突变型斑马鱼。

用于评估凋亡活性的测定法

可用于测量本发明激动剂、前身、和拮抗剂的促凋亡或抗凋亡活性的测定法包括实施例3的测定法或本领域已知的其它合适测定法,诸如下文所包括的那些。

凋亡活性的测定法包括例如细胞毒性测定法(例如测量膜通透性升高的辐射度测量或非辐射度测量测定法,或测量线粒体代谢活性降低的色度测量测定法);测量DNA断裂的测定法(包括但不限于原位缺刻翻译(ISNT)和TdT介导的X-dUTP缺刻末端标记(TUNEL)(Cole和Ross, Devel. Biol. 240: 123-142 (2001));测量作为细胞死亡先兆的细胞组织和包装变化(例如膜不对称的改变)的测定法(包括但不限于磷脂酰丝氨酸的易位(Nicoletti等, “Common Methods for Measuring Apoptotic Cell Death by Flow Cytometry”, The Purdue Cytometry CD-ROM Volume 3, J. Parker, C. Stewart, Guest编, J. Paul Robinson, Publisher. Purdue University, West Lafayette, 1997, ISBN 1-890473-02-2),及细胞色素C或AIF自线粒体进入细胞质的释放);及测量一种或多种导致凋亡的生化级联的测定法(包括但不限于胱天蛋白酶活化(见例如实施例3)和聚-ADP-核糖聚合酶(PARP)的切割)。凋亡活性的测定法可以对单细胞和/或细胞群实施。

抗体结合研究

抗体结合研究可使用已知测定法进行,诸如竞争性结合测定法、直接和间接三明治式测定法、及免疫沉淀测定法。Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., 1987, pp. 147-158。

竞争性结合测定法依赖于经标记标准品与测试样品分析物竞争与有限

量的抗体结合的能力。测试样品中靶蛋白质的量与变成与抗体结合的标准品的量成反比。为了便于测定变成结合的标准品的量，可以使抗体在竞争之前或之后不溶解，使得与抗体结合的标准品和分析物可方便的与仍然未结合的标准品和分析物分开。

三明治式测定法牵涉使用两种抗体，各自能够结合待检测蛋白质的不同免疫原性部分或表位。在三明治式测定法中，使测试样品分析物受到固定化在固相支持物上的第一抗体的结合，此后使第二抗体结合分析物，如此形成不溶性三元复合物。参见例如美国专利No. 4,376,110。第二抗体自身可以用可检测模块标记的（直接三明治式测定法），或者可以使用用可检测模块标记的抗免疫球蛋白抗体测量（间接三明治式测定法）。例如，三明治式测定法的一种类型是ELISA测定法，在这种情况下可检测模块是酶。

可以实施竞争性ELISA测定法以对多肽、激动剂或拮抗剂筛选特异性结合ZPA多肽的多肽、激动剂或拮抗剂，该结合可以被本发明的单克隆抗体所抑制。

在一个例子中，可以遵循本领域已知方法进行竞争性ELISA测定法。可以将全长或截短形式的天然ZPA蛋白（2ug/ml，在PBS中）在微量滴定板上4°C过夜或室温2小时包被。可以将孔封闭，即通过添加65μl 1% BSA达30分钟，接着40ul 1% Tween 20达另30分钟。接着，可以将孔用PBS - 0.05% Tween 20清洗5次。可以将各种浓度的抗体（在ELISA缓冲液中）在孔中于室温温育30分钟。然后，可以将待测试的多肽或抗体添加至不同的孔达10分钟，其浓度通常会在缺乏抗体时产生90%结合能力。接着，可以将孔用PBS - 0.05% Tween 20清洗5次。结合可以通过本领域已知方法来定量。

对于免疫组化，组织样品可以是新鲜的或冷冻的，或者可以是例如在石蜡中包埋的且用防腐剂诸如福尔马林固定的。

基于细胞的肿瘤测定法

增殖性病症（诸如肿瘤）的基于细胞的测定法和动物模型可用于检验本发明拮抗剂的抑制活性。适宜的测定法是本领域已知的。例如，可以将已知牵涉增殖性病症的细胞类型的细胞用一种或多种本文所述ZPA cDNA转染，并分析这些cDNA在存在或缺乏拮抗剂时抑制生长的能力。如果增殖性病症是癌症，那么合适的肿瘤细胞包括例如稳定的肿瘤细胞系，诸如B104-1-1细

胞系（经*neu*原癌基因转染的稳定NIH-3T3细胞系）和经*ras*转染的NIH-3T3细胞，其可以用ZPA序列转染并监测肿瘤发生性生长。然后此类经转染细胞系可用于测试多克隆或单克隆抗体或者抗体组合物通过对经转化细胞的生长发挥细胞抑制性或细胞毒性活性或者通过介导抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)而抑制肿瘤发生性细胞生长的能力。

另外，衍生自转基因动物（如上文所述）中的肿瘤的原代培养物可用于本文中的基于细胞的测定法，尽管优选稳定的细胞系。从转基因动物衍生连续细胞系的技术是本领域已知的（参见例如Small等，Mol. Cell. Biol., 5: 642-648 (1985)）。

基因疗法

下文描述了可改善疾病症状的方法和组合物。本文所述ZPA多肽（包括ZPA多肽变体）、及本发明的拮抗剂和抗体可依照本发明通过各自的体内表达（其常常称为基因疗法）而得以采用。例如，可以使用这些方法在细胞中表达ZPA多肽变体。依照一个实施方案，用于表达ZPA多肽（包括变体）的方法或载体牵涉靶向剂的使用，以将包含ZPA多肽或核酸分子的媒介指导至期望组织。

有两种主要方法使核酸（任选包含在载体中）进入哺乳动物的细胞，即体内(*in vivo*)和回体(*ex vivo*)。对于体内投递，通常在需要ZPA多肽的部位（即ZPA多肽的合成部位（如果知道的话）和需要ZPA多肽生物学活性的部位（例如伤口））将核酸直接注射入哺乳动物。对于回体治疗，取出哺乳动物的细胞，将核酸导入这些分离的细胞，并将经过修饰的细胞或是直接施用于哺乳动物，或是例如装入多孔膜内并植入哺乳动物（参见例如美国专利No. 4,892,538和5,283,187）。有多种技术可用于将核酸导入可存活细胞。这些技术根据是将核酸转移入体外培养细胞还是体内转移入感兴趣宿主的细胞而有所变化。适于在体外将核酸转移入哺乳动物细胞的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、转导、细胞融合、DEAE-右旋糖苷、磷酸钙沉淀法等。转导牵涉复制缺陷型重组病毒（包括但不限于逆转录病毒）颗粒与细胞受体的结合，接着颗粒所包含的核酸导入细胞。常用于回体投递基因的载体是逆转录病毒。

常用的体内核酸转移技术包括用病毒或非病毒载体（诸如腺病毒、慢病

毒、I型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒(AAV))和基于脂质的系统(可用于脂质介导的基因转移的脂质有例如DOTMA、DOPE和DC-Chol;参见例如Tonkinson等, *Cancer Investigation*, 14(1): 54-65 (1996))进行的转染。此类载体用于合成可用作投递药剂(诸如本发明的拮抗剂和核酸分子)的媒介的病毒。基因疗法中最常用的载体是病毒,例如腺病毒、AAV、慢病毒或逆转录病毒。病毒载体(诸如逆转录病毒载体)包含至少一种转录启动子/增强子或基因座限定元件(locus-defining element)、或通过其它手段(诸如可变剪接、核RNA输出、或信使的翻译后修饰)控制基因表达的其它元件。另外,病毒载体(诸如逆转录病毒载体)包含在存在编码ZPA多肽的基因的情况下转录时与其可操作连接且充当翻译起始序列的核酸分子。此类载体构建物还包含包装信号、长末端重复(LTR)或其部分、及适于所用病毒的正链和负链引物结合位点(如果病毒载体中原先没有这些的话)。另外,此类载体通常包含信号序列,供ZPA多肽自它所在宿主细胞分泌。在某些实施方案中,用于此目的的信号序列是哺乳动物信号序列,包括但不限于ZPA多肽的天然信号序列。任选的是,载体构建物还可包含指导多腺苷酸化的信号,以及一种或多种限制性位点和翻译终止序列。举例而言,此类载体通常会包含5' LTR、tRNA结合位点、包装信号、第二条DNA链合成的起点、和3' LTR或其部分。可使用非病毒的其它载体,诸如阳离子脂质、聚赖氨酸和树状聚体。

在有些情况中,希望与靶向靶细胞的药剂一起提供核酸源,所述药剂诸如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异的抗体、靶细胞上受体的配体等。在采用脂质体时,与胞吞作用相关细胞表面膜蛋白结合的蛋白质可用于靶向和/或促进摄入,例如对特定细胞类型具有向性的衣壳蛋白或其片段、在循环中发生内在化的蛋白质的抗体、及靶向细胞内定位和延长细胞内半衰期的蛋白质。受体介导的胞吞技术记载于例如Wu等, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987); Wagner等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3410-3414 (1990)。关于目前已知的基因标记和基因治疗方案的综述参见Anderson等, *Science* 256:808-813 (1992)。还可参见WO93/25673及其引用的参考文献。

合适的基因疗法和制备逆转录病毒颗粒和结构蛋白的方法可参见例如美国专利No. 5,681,746。

检测ZPA突变

本发明还涉及编码ZPA多肽的基因作为诊断剂的用途。检测到突变型ZPA多肽可指示发生凋亡相关病症的倾向。检测到斑马鱼组织中的ZPA多肽水平超过正常斑马鱼中相同组织的水平也可指示发生凋亡相关病症的倾向。类似的,在斑马鱼以外的生物体中检测到突变型ZPA多肽同系物可指示发生凋亡相关病症的倾向。检测到生物体(例如哺乳动物)组织中的ZPA多肽同系物水平超过正常生物体中相同组织的水平也可指示发生凋亡相关病症的倾向。

在编码ZPA多肽人同系物的基因中携带突变的个体可通过多种技术在DNA水平检测。用于诊断的核酸可以自哺乳动物的细胞获得,诸如血液、尿液、唾液、组织活检、和尸检材料。基因组DNA可以直接用于检测,或者可以在分析前通过PCR酶促扩增(Saiki等, *Nature*, 324: 163-166 (1986))。RNA或cDNA也可以用于相同目的。例如,与编码ZPA多肽的核酸互补的PCR引物可用于鉴定和分析ZPA多肽人同系物中的突变。例如,删除和插入可以通过扩增产物与正常基因型相比的大小变化来检测。点突变可以通过所扩增DNA与放射性标记的编码ZPA多肽的RNA或放射性标记的编码ZPA多肽的反义DNA序列的杂交来鉴定。可以通过RNA酶A消化或解链温度差异而将完全匹配序列与错配双链体区分开。

基于DNA序列差异的遗传测试可通过检测DNA片段在有或无变性剂的凝胶中的电泳泳动率改变来实现。小段序列删除和插入可通过高分辨率凝胶电泳来显现。不同序列的DNA片段可以在变性甲脒梯度凝胶上区分开,其中不同DNA片段的泳动率根据其特定解链或部分解链温度而在凝胶中不同位置受到阻滞。参见例如Myers等, *Science*, 230: 1242 (1985)。

特定位置的序列变化也可以通过核酸酶保护测定法(诸如RNA酶和S1保护)或化学切割法(例如Cotton等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4397-4401 (1985))来揭示。

如此,特定DNA序列的检测可以通过下列方法来实现,诸如杂交、RNA酶保护、化学切割、直接DNA测序、或限制酶的使用(例如限制性片段长度多态性(RFLP))、和基因组DNA的Southern印迹。

在更常规的凝胶电泳和DNA测序之外,ZPA多肽中的突变也可以通过原位分析来检测。

检测ZPA多肽或核酸水平

ZPA多肽或核酸分子的水平可以例如使用本文中所公开的试剂联合本领域已知方法（诸如原位杂交、RT-PCR、Northern印迹、Western印迹）或者使用本文中所提供的实施例和试剂来检测。类似的，与ZPA多肽或核酸分子同源的多肽或核酸分子的水平可以例如使用本文中所公开的试剂联合本领域已知方法（诸如原位杂交、RT-PCR、Northern印迹、Western印迹）或者使用本文中所提供的实施例和试剂来检测。

可以采用竞争测定法，其中将对ZPA多肽特异性的抗体附着至固体支持物，并让经标记的ZPA多肽和衍生自宿主的样品（其包含至少一种与一种或多种ZPA多肽同源的多肽）经过固体支持物，可以将所检测到的附着至固体支持物的标记物的量与样品中至少一种与一种或多种ZPA多肽同源的多肽的数量联系起来。在一个实施方案中，使用特异性结合本文所述ZPA多肽的抗体来监测ZPA多肽水平或ZPA多肽同系物水平。

药物候选物的筛选测定法

本发明涵盖筛选化合物以鉴定模拟ZPA多肽活性（激动剂）或阻止ZPA多肽效应（拮抗剂）的化合物的方法。一般而言，通过各种条件下的温育或接触，使ZPA多肽暴露于药物候选物。拮抗剂药物候选物的筛选测定法设计成鉴定与天然ZPA多肽特异性结合或复合的化合物。此类筛选测定法包括可适应化学文库高通量筛选，使之特别适于鉴定小分子药物候选物的测定法。

测定法可以多种形式进行，包括蛋白质-蛋白质结合测定法、生化筛选测定法、免疫测定法和基于细胞的测定法，联合ZPA多肽、其片段、或表达ZPA多肽或其片段的细胞。

拮抗剂的所有测定法的共同之处在于它们要求使药物候选物接触由本文中所鉴定的核酸编码的ZPA多肽，接触的条件和时间足以容许这两种成分相互作用。

在结合测定法中，相互作用指结合，而且可分离或检测反应混合物中形成的复合物。例如，可以在有或无候选拮抗剂时实施ZPA多肽与在一种或多种生化途径中在正常情况下与之相互作用的多肽的结合来评估拮抗剂是否阻断ZPA多肽与在正常情况下与之相互作用的多肽的结合。在另一个实施方案中，将由本文中所鉴定的基因编码的ZPA多肽或药物候选物通过共价或非

共价附着固定化在固相(例如微量滴定板)上。非共价附着通常是通过用ZPA多肽溶液包被固相并干燥来实现的。或者,可以使用对待固定化ZPA多肽特异性的固定化抗体(例如单克隆抗体)将它锚定至固相表面。测定法如下进行,将非固定化成分(它可以用可检测标记物标记)添加至固定化成分(例如含锚定成分的经包被表面)。当反应完成时,除去未反应成分,例如通过清洗,并检测锚定在固相表面上的复合物。若最初非固定化的成分携带可检测标记物,则检测到固定化在表面上的标记物指示发生了复合。若最初非固定化的成分不携带标记物,则可通过例如使用经过标记的特异性结合固定化复合物的抗体来检测复合。

如果候选化合物与特定ZPA多肽相互作用但不结合它,那么它与该多肽的相互作用可通过已知用于检测蛋白质-蛋白质相互作用的方法来测定。此类测定法包括传统方法,诸如例如交联、免疫共沉淀、及经由梯度或层析柱的共纯化。另外,蛋白质-蛋白质相互作用可通过使用Fields及其同事描述的基于酵母的遗传系统(Fields和Song, *Nature (London)*, 340: 245-246 (1989); Chien等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991))如Chevray和Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991)所公开的来监测。许多转录激活物(诸如酵母GAL4)由两个物理上离散的模块结构域组成,一个起DNA结合结构域的作用,另一个发挥转录激活结构域的功能。前述出版物中记载的酵母表达系统(通常称为“双杂交系统”)利用了这种特性,采用两种杂合蛋白,在其中之一中靶蛋白质与GAL4的DNA结合结构域融合,在另一中候选活化蛋白质与激活结构域融合。GAL1-*lacZ*报道基因在GAL4激活的启动子控制下的表达依赖于GAL4活性经蛋白质-蛋白质相互作用的重建。含相互作用多肽的菌落用 β -半乳糖苷酶的显色底物来检测。使用双杂交技术来鉴定两种特定蛋白质之间的蛋白质-蛋白质相互作用的完整试剂盒(MATCHMAKER™)可从Clontech购得。此系统还可延伸至对参与特定蛋白质相互作用的蛋白质结构域的作图以及指出对这些相互作用至关重要的氨基酸残基。

干扰ZPA多肽与另一蛋白质(包括另一ZPA多肽)间结合的化合物可如下测试:通常在足以容许两种蛋白质相互作用和结合的条件和时间下制备包含ZPA多肽和另一蛋白质的反应混合物。为了测试候选化合物抑制结合的能力,在缺乏和存在测试化合物时进行反应。另外,可以向第三份反应混合物

中加入安慰剂,作为阳性对照。如上所述监测混合物中存在的ZPA多肽和另一多肽之间的结合(复合物形成)。对照反应中形成复合物但含有测试化合物的反应混合物中没有形成复合物表明,该测试化合物干扰ZPA多肽与另一多肽的相互作用。

依照一个实施方案,实施本文所述测定法以测试本发明的拮抗剂。或者,可以通过将ZPA多肽和潜在拮抗剂与未标记的ZPA多肽在适于竞争性抑制测定法的条件下混合来检测拮抗剂。ZPA多肽可以诸如通过放射性或比色法来标记,使得所结合的ZPA多肽分子的数目可用于测定潜在拮抗剂的效力。ZPA多肽可以通过多种手段来标记,包括碘化或包含位点特异性蛋白质激酶的识别位点。在固定和温育后,将载玻片进行放射自显影分析。

药物候选物包括抗ZPA抗体,包括但不限于多克隆和单克隆抗体和抗体片段、单链抗体、抗独特型抗体、和嵌合或人源化形式的此类抗体或片段、以及人抗体和抗体片段。或者,药物候选物可以是密切相关的蛋白质,例如竞争性抑制内源ZPA多肽或内源ZPA多肽同系物的作用的突变形式ZPA多肽。

施用方案、进度表、剂量和配制剂

本文中的分子及其拮抗剂在药学上可用作上文所列各种病症和疾病的预防剂和治疗剂。

本发明的多肽、激动剂或拮抗剂的治疗用组合物如下制备供贮存,即以冻干剂型或水溶液的形式,将具有适宜纯度的期望分子与任选的药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol,A.编,1980)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖

类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐相反离子, 诸如钠; 金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子表面活性剂, 诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

此类载体的其它例子包括离子交换剂、矾土(氧化铝)、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白质诸如人血清清蛋白、缓冲物质诸如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质诸如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、硅胶、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、和聚乙二醇。用于表面或局部的或基于凝胶的形式的激动剂或拮抗剂的载体包括多糖诸如甲基纤维素或羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酸酯、聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇、和木蜡醇。对于所有施用, 适当使用常规贮存(depot)形式。此类形式包括例如微胶囊、纳米胶囊、脂质体、硬膏剂、吸入形式、鼻腔喷雾、舌下片剂、和持续释放制剂。ZPA多肽或激动剂或拮抗剂通常在此类媒介中以大约0.1 mg/ml到100 mg/ml的浓度进行配制。

另一种配制剂包括将ZPA多肽或其激动剂或拮抗剂掺入所形成颗粒。此类颗粒可用于调控内皮细胞生长和血管发生。另外, 肿瘤侵入和转移可以用这些颗粒来调控。

将用于体内施用的ZPA多肽或激动剂或拮抗剂应当是无菌的。这可容易的通过在冻干和重建之前或之后经无菌滤膜过滤来实现。ZPA多肽通常以冻干形式或以溶液贮存, 如果全身施用的话。如果是冻干形式, ZPA多肽或其激动剂或拮抗剂通常联合其它成分一起配制, 临使用时用适当的稀释剂重建。ZPA多肽或激动剂或拮抗剂的液体配制剂的例子是装在单剂药瓶中用于皮下注射的无菌、清澈、无色、无防腐处理(unpreserved)的溶液。主要根据多肽的类型和适应症, 适于重复使用的经过防腐处理的药物组合物可包含例如以下各项:

- a. ZPA多肽或其激动剂或拮抗剂;
- b. 能够将pH维持在多肽或其它分子在溶液中的最大稳定性的范围内(例如大约pH 4-8)的缓冲剂;
- c. 洗涤剂/表面活性剂, 主要用于稳定多肽或分子免于搅动诱导的聚集;
- d. 等渗调控剂(isotonifier);
- e. 防腐剂, 选自酚、苯甲醇和苯乙铵卤化物, 例如氯化物; 和

f. 水。

如果所采用的洗涤剂是非离子型的,那么它可以是例如聚山梨醇酯(例如 POLYSORBATE™ (TWEEN™) 20、80等)或泊洛沙姆(例如 POLOXAMER™ 188)。非离子型表面活性剂的使用容许配制剂暴露于剪切面应力而不引起多肽变性。另外,此类含表面活性剂配制剂可用于气雾剂装置,诸如肺部给药和无针头喷射注射枪(参见例如EP 257,956)中所使用的那些。

可以存在等渗调控剂以确保ZPA多肽或其激动剂或拮抗剂的液体组合物的等渗性,等渗调控剂包括多羟基糖醇,例如三羟基的或更高级的糖醇,诸如甘油、赤藓糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。这些糖醇可以单独的或联合的使用。或者,可以使用氯化钠或其它适宜无机盐,使得溶液等渗。

缓冲剂可以是例如乙酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐或磷酸盐缓冲液,取决于期望的pH。本发明的一种类型的液体配制剂的pH缓冲在大约4-8的范围内,优选大致生理pH。

防腐剂,酚、苯甲醇和苯乙铵卤化物(例如氯化物)是可采用的已知抗微生物剂。

治疗用ZPA多肽、激动剂、和/或拮抗剂组合物通常置于具有无菌存取口的容器中,例如具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或药瓶。在某些实施方案中,配制剂可以以重复的静脉内(i.v.)、皮下(s.c.)或肌肉内(i.m.)注射,或者作为适于鼻内或肺内投递的气雾剂剂型(关于肺内投递参见例如EP 257,956)来施用。

ZPA多肽、其激动剂、和/或拮抗剂还可以持续释放制剂的形式施用。持续释放制剂的合适例子包括含有蛋白质的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质以定型产品的形式存在,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯),如Langer等, J. Biomed. Mater. Res., 15: 167-277 (1981)和Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)所述,或聚(乙烯醇)、聚交酯(美国专利No. 3,773,919; EP 58,481)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物(Sidman等, Biopolymers, 22: 547-556 (1983))、不可降解的乙烯-乙酸乙烯(Langer等, 见上文)、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如Lupron Depot™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)、及聚

-D-(-)-3-羟基丁酸 (EP 133,988)。

虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子100天以上,但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当胶囊化蛋白质在体内长时间维持时,它们可能由于暴露于37℃的潮湿环境而变性或聚集,导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可根据相关机制来设计蛋白质稳定化合理策略。例如,如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换而形成分子间S-S键,那么可通过修饰巯基、自酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

持续释放的ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂组合物还包括用脂质体捕获(entrapped)的ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂。包含ZPA多肽、抗体、激动剂和/或拮抗剂的脂质体通过本身已知的方法来制备: DE 3,218,121; Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692 (1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4034 (1980); EP 52,322; EP 36,676; EP 88,046; EP 143,949; EP 142,641; 日本专利申请83-118008; 美国专利No. 4,485,045和4,544,545; 及EP 102,324。任选的是,脂质体是小的(大约200-800埃)单层的类型,其中脂质含量大于大约30 mol. %胆固醇,所选择的比例根据最佳疗法进行调整。

ZPA多肽、其激动剂和/或拮抗剂的治疗有效剂量当然会取决于某些因素有所变化,诸如待治疗(包括预防)的病症,施药的方法,用于治疗的化合物的类型,所牵涉的任何辅疗法或共疗法(co-therapy),患者的年龄、体重、一般医学状况、医学史等,而且它的确定完全在执业医师的技术范围内。因而,治疗学家有必要根据获得最大治疗效果的需要而确定剂量和调整施用路径。临床医师会施用ZPA多肽、其抗体、激动剂和/或拮抗剂,直至达到对所讨论疾患的治疗实现期望效果的剂量。例如,如果目标是治疗癌症,那么所述量应是抑制癌生长的量。

根据上述指导方针,有效剂量一般在大约0.001到大约1.0mg/kg、大约0.01-1.0mg/kg、和/或大约0.01-0.1mg/kg的范围内。

对于治疗凋亡相关病症时的非口服使用,以大约0.01-50mg、大约0.05-20mg、和/或大约1-20mg每kg体重,每天1-3次,静脉内注射的形式施用ZPA多肽、其激动剂和/或拮抗剂是有利的。对于口服施用,在某些实施方案中,以大约5mg - 1g和/或大约10-100mg每kg体重,每天1-3次施用基于ZPA

多肽、激动剂和/或拮抗剂的分子。应当领会，内毒素污染应保持在最低限度，即安全水平，例如少于0.5ng/mg蛋白质。此外，对于人类施用，配制剂优选达到FDA办公室和生物制剂标准关于无菌、热原性、一般安全性、和纯度的要求。

有待用于组织再建的包含ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂的药物组合物的剂量方案由主治医师确定，要考虑影响多肽作用的各种因素，例如期望形成的组织重量的量，损伤的部位，受损伤组织的状况，伤口的大小，受损伤组织的类型（例如骨），患者的年龄、性别和食谱，任何感染的严重程度，施药时间，和其它临床因素。剂量可以随用于重建的基质的类型和在药物组合物中包含其它蛋白质而变化。例如，向最终组合物中添加其它已知生长因子（诸如IGF-I）也会影响剂量。可以通过定期评估组织/骨生长和/或修复，例如X射线、组织形态测定和四环素标记来监测进展。

ZPA多肽、拮抗剂和/或激动剂的施用路径依照已知方法，例如通过注射或输注，经由静脉内、肌肉内、大脑内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、眼内、关节内、滑膜内、鞘内、口服、表面或吸入路径，或者通过下文所述持续释放系统。也适当的是，ZPA多肽、其激动剂和/或拮抗剂通过肿瘤内、肿瘤周围、损伤内/病灶内、或损伤周围/病灶周围路径施用，以发挥局部以及全身治疗效果。

如果采用肽或小分子作为拮抗剂或激动剂，那么它优选以液体或固体的形式口服的或非口服的施用给哺乳动物。

形成盐且可用于下文的分子的药学可接受盐的例子包括碱金属盐（例如钠盐、钾盐）、碱土金属盐（例如钙盐、镁盐）、铵盐、有机碱盐（例如吡啶盐、三乙胺盐）、无机酸盐（例如盐酸、硫酸、硝酸）、和有机酸盐（例如乙酸盐、草酸盐、对甲苯磺酸盐）。

在制备和施用多肽、激动剂和/或拮抗剂时要考虑本发明的ZPA多肽、其激动剂和/或拮抗剂的期望作用的位置。当期望作用位于细胞内时，本发明的某些实施方案提供了要被导入细胞的多肽、激动剂和/或拮抗剂。在一个实施方案中，多肽、蛋白质性质的激动剂和/或蛋白质性质的拮抗剂的胞内表达通过将编码多肽、蛋白质性质的激动剂和/或蛋白质性质的拮抗剂的核酸（缺少在正常情况下与编码此类分子的基因相连的野生型前导序列和分泌信号）导入靶细胞来实现。可使用任何将核酸导入细胞的标准方法，包括但不限于显

微注射，弹道式注射(ballistic injection)，电穿孔，磷酸钙沉淀，脂质体以及使用携带感兴趣核酸的逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒和痘苗病毒载体进行的转染。

在另一个实施方案中，提供了内在化分子。多肽可具有某些增强将其投递入细胞的特性，或可被修饰以具有此类特性。用于实现这一目的的技术是本领域已知的。例如，阳离子化、脂转染或脂质体可用于将抗体投递入细胞。将pH（低）插入肽(“pHLIP”)与待易位的分子偶联（例如通过二硫键，参见例如Reshetnyak等, Proc. Natl. Acad. Sci. 103(17): 6460-6465 (2006)）并降低细胞外pH也可促进分子进入细胞的易位。在使用片段时，履行期望功能的最小片段通常是有利的。例如，缺乏膜锚区但保留抗凋亡活性的ZPA多肽可能是有利的，因为细胞内导入优于野生型多肽。此类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术产生。

可通过本领域已知的方法增强调控物多肽、激动剂和拮抗剂进入靶细胞。例如，某些序列诸如衍生自HIV Tat或触角足(Antennapedia)同源结构域蛋白的那些序列能够指导异源蛋白穿过细胞膜从而有效地摄入。参见例如Chen等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:4325-4329 (1999)。

当ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂的期望活性的位置在脑中时，本发明的某些实施方案提供了穿越血脑屏障的ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂。某些神经变性疾病与血脑屏障通透性升高有关，使得抗体或抗原结合片段能容易的导入脑中。当血脑屏障保持完整时，本领域存在着一些用于转运分子穿越该血脑屏障的已知方法，包括但不限于物理方法、基于脂质的方法以及基于受体和通道的方法。

将ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂转运穿越血脑屏障的物理方法包括但不限于完全绕过血脑屏障或通过血脑屏障中产生开口。绕过方法包括但不限于直接注射入脑(参见例如Papanastassiou等, Gene Therapy 9: 398-406 (2002))、间质输注/对流增强的投递(convection-enhanced delivery)(参见例如Bobo等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994))和在脑中植入投递装置(参见例如Gill等, Nature Med. 9: 589-595 (2003); 及Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical)。在屏障中产生开口的方法包括但不限于超声波(参见例如美国专利公开号2002/0038086)、渗透压（例如通过施用高渗的甘露醇 (Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, 卷

1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989))、通过例如缓激肽或透化剂A-7透化(参见例如美国专利No. 5,112,596; 5,268,164; 5,506,206和5,686,416)、及用包含编码ZPA多肽、蛋白质性质的激动剂和/或蛋白质性质的拮抗剂的基因的载体转染跨越血脑屏障的神经元(参见例如美国专利公开号2003/0083299)。

基于脂质的将ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂转运穿越血脑屏障的方法包括但不限于将ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂包囊入偶联有与血脑屏障血管内皮上的受体结合的抗体结合片段的脂质体(参见例如美国专利申请公开号20020025313),以及将ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂包被在低密度脂蛋白颗粒(参见例如美国专利申请公开号20040204354)或载脂蛋白E(参见例如美国专利申请公开号20040131692)中。

基于受体和通道的将ZPA多肽、激动剂和/或拮抗剂转运穿越血脑屏障的方法包括但不限于使用糖皮质激素阻断剂来提高血脑屏障的通透性(参见例如美国专利申请公开号2002/0065259; 2003/0162695; 和2005/0124533); 活化钾通道(参见例如美国专利申请公开号2005/0089473); 抑制ABC药物运载体(参见例如美国专利申请公开号2003/0073713); 用转铁蛋白包被所述分子并调控一种或多种转铁蛋白受体的活性(参见例如美国专利申请公开号2003/0129186); 以及阳离子化所述分子(参见例如美国专利No. 5,004,697)。

组合疗法

ZPA多肽或其激动剂或拮抗剂在预防或治疗凋亡相关病症中的效力可以通过系列施用活性剂或联合另一种对那些目的有效的药剂(或是在同一组合物中或是作为分开的组合物)施用活性剂来提高。

例如,对于细胞增殖性病症的治疗,ZPA多肽和/或ZPA多肽激动剂疗法可以联合细胞增殖的其它抑制剂的施用,诸如细胞毒剂。

另外,用于治疗癌症的ZPA多肽和/或激动剂可以联合上文所述细胞毒剂、化疗剂、或生长抑制剂。而且,对于癌症治疗,合适的是,ZPA多肽和/或其激动剂系列施用,或者联合放射治疗,无论牵涉照射或施用放射性物质。

如果是治疗癌症,那么可能希望还施用针对肿瘤相关抗原的抗体,诸如结合ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4或VEGF受体中的一种或多种的抗体。或者/另外,两种或多种结合本文中所公开的同一抗原或者两种或多种不同抗原的抗体可以共施用于患者。有时,还给患者施用一种或多种细胞因子可能是

有益的。在一个实施方案中,将本文所述ZPA多肽和/或其激动剂与生长抑制剂共施用。例如,可以首先施用生长抑制剂,接着是本发明的ZPA多肽和/或其激动剂。然而,也涵盖同时施用或首先施用本发明的ZPA多肽和/或其激动剂。生长抑制剂的合适剂量就是当前所用的那些,而且可以由于生长抑制剂与本文所述多肽和激动剂的联合作用(协同)而降低。

在一个实施方案中,在组合疗法中攻击肿瘤的血管形成。将本发明的ZPA多肽和/或其激动剂与抗体(例如抗VEGF)以治疗有效剂量施用于携瘤患者,所述治疗有效剂量是通过例如观察到肿瘤或其转移灶(如果有的话)的坏死而确定的。继续此疗法,直至不再观察到进一步的有益效果或临床检查没有显示出肿瘤或任何转移灶的痕迹的时间。然后,单独的或联合辅助剂的施用TNF,所述辅助剂诸如 α -、 β -或 γ -干扰素、抗HER2抗体、heregulin、抗heregulin抗体、D-因子、白介素-1 (IL-1)、白介素-2 (IL-2)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、或促进肿瘤中微血管凝结(coagulation)的药剂(诸如抗蛋白C抗体、抗蛋白S抗体、或C4b结合蛋白(参见1991年2月21日公布的WO 91/01753))、或者加热或辐射。

与ZPA多肽或其拮抗剂联合施用的治疗剂的有效量取决于医师或兽医的判断。完成剂量施用和调整以实现对待治疗疾患的最大控制。剂量还取决于诸如待使用的治疗剂的类型和所治疗的特定患者等因素。典型的是,所采用的量与所给予的治疗剂在没有ZPA多肽时施用所使用的剂量相同。

制品

包含可用于诊断或治疗上文所述病症的一种或多种ZPA多肽或其激动剂或拮抗剂的制品(诸如试剂盒)包括至少一个容器和标签。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器和试管。容器可以由各种材料制成,诸如玻璃或塑料。容器中装有有效诊断或治疗疾患的组合物,而且可具有无菌存取口(例如容器可以是具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小管)。组合物中的活性剂是一种或多种ZPA多肽或其激动剂或拮抗剂。容器上或与容器相关的标签指明该组合物用于诊断或治疗所选择的疾患。制品还可包括第二容器,其中装有药学可接受缓冲剂,诸如磷酸盐缓冲盐水、林格氏(Ringer)溶液和/或右旋糖溶液。它还可包括商业和使用者立场上所期望的其它物质,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头、注射器和带有使用说明书的包装插

页。制品还可以包括装有另一种上文所述活性剂的第二或第三容器。

多克隆抗体

用于制备多克隆抗体的方法是本领域普通技术人员已知的。多克隆抗体可在哺乳动物中生成，例如通过一次或多次注射免疫剂和根据需要的佐剂。通常，免疫剂和/或佐剂将通过多次皮下或腹膜内注射而注射到哺乳动物中。免疫剂可包括ZPA多肽或其融合蛋白。将免疫剂与已知在所免疫哺乳动物中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的。此类免疫原性蛋白质的例子包括但不限于匙孔蛾血蓝蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白和大豆胰蛋白酶抑制剂。可采用的佐剂的例子包括弗氏完全佐剂和MPL-TDM佐剂（单磷酸基脂质A或合成的海藻糖dicorynomycolate）。免疫方案可以由本领域技术人员无需过多实验做出选择。

单克隆抗体

抗ZPA抗体可以是单克隆抗体。单克隆抗体可以例如使用杂交瘤法制备，诸如Kohler和Milstein, Nature 256: 495 (1975)所记载的，或者可以通过重组DNA方法（美国专利No. 4,816,567）来制备，或者可通过本文实施例部分中所描述的方法来生成。在杂交瘤法中，小鼠、仓鼠或其它适宜的宿主动物通常用免疫剂免疫以引发生成或能够生成将特异性结合免疫剂的抗体的淋巴细胞。或者，可以在体外免疫淋巴细胞。

免疫剂将通常包括ZPA多肽或其融合蛋白。通常，或是使用外周血淋巴细胞(“PBL”)，若希望人起源的细胞，或是使用脾细胞或淋巴结细胞，若希望非人哺乳动物来源。然后，使用合适的融合剂，诸如聚乙二醇，将淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, New Your, Academic Press (1986), pp. 59-103)。永生化细胞系通常是转化的哺乳动物细胞，特别是啮齿类、牛和人起源的骨髓瘤细胞。通常，采用大鼠或小鼠骨髓瘤细胞系。杂交瘤细胞可在合适的培养基中培养，所述培养基含有抑制未融合的永生化细胞生长或存活的一种或多种物质。例如，如果亲本细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT)，那么用于杂交瘤的培养基通常将含有次黄嘌呤、氨基喋呤和胸苷(“HAT培养基”)，这些物质阻止HGPRT缺陷细胞生长。

例示性的永生化细胞系是那些高效融合、支持选定的抗体生成细胞稳定的高水平表达抗体、并对诸如HAT培养基等培养基敏感的细胞系。在某些实施方案中，永生化细胞系是鼠源骨髓瘤系，可从例如索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA)和美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA)获得。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已有描述(Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York (1987) pp. 51-63)。

然后可对杂交瘤细胞在其中培养的培养基测定针对ZPA多肽的单克隆抗体的存在。在某些实施方案中，通过免疫沉淀或通过体外结合测定法，诸如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)，测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。此类技术和测定法是本领域已知的。单克隆抗体的结合亲和力可通过例如Munson和Pollard, Anal. Biochem. 107: 220 (1980)的Scatchard分析来测定。

在鉴定得到期望的杂交瘤细胞后，该克隆可通过有限稀释规程进行亚克隆，并通过标准方法进行培养(Goding, 见上文)。适于这一目的的培养基包括例如Dulbecco氏改良的Eagle氏培养基和RPMI-1640培养基。或者，杂交瘤细胞可在哺乳动物中作为腹水进行体内培养。

可通过常规免疫球蛋白纯化流程，诸如例如蛋白A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析，将亚克隆分泌的单克隆抗体自培养基或腹水分离或纯化。

单克隆抗体还可通过重组DNA技术来生成，诸如美国专利No. 4,816,567中所述。编码本发明单克隆抗体的DNA易于使用常规规程分离和测序(例如使用能够特异性结合编码鼠源抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。本发明的杂交瘤细胞可充当此类DNA的来源。一旦分离，可将DNA置于表达载体中，然后将该表达载体转染到不另外产生免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中，诸如猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞，以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。还可以修饰DNA，例如通过替代，即用人重链和轻链恒定域的编码序列替换同源鼠源序列(美国专利No. 4,816,567; Morrison等, 见上文)，或者通过共价接合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白

白多肽的整个或部分编码序列。可用此类非免疫球蛋白多肽替代本发明抗体的恒定域,或者可用它替代本发明抗体的一个抗原结合位点的可变域以产生嵌合二价抗体。

抗体可以是单价抗体。用于制备单价抗体的方法是本领域已知的。例如,一种方法牵涉免疫球蛋白轻链和经修饰重链的重组表达。重链通常在Fc区中的任何点截短,从而防止重链交联。或者,相关半胱氨酸残基用另一种氨基酸残基替代或者删除,从而防止交联。

体外方法也适于制备单价抗体。消化抗体以生成其片段,特别是Fab片段,可使用本领域已知技术来实现。

人抗体和人源化抗体

抗ZPA抗体还可以包括人源化抗体或人抗体。非人(例如鼠)抗体的人源化形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(诸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其它抗原结合子序列)。人源化抗体包括人免疫球蛋白(受体抗体)中的CDR残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠或家兔的CDR残基替换的抗体。在有些情况中,将人免疫球蛋白的Fv框架残基用相应的非人残基替换。人源化抗体还可包含在受体抗体和输入CDR或框架序列中都没有发现的残基。通常,人源化抗体会包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域,其中所有或基本上所有CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,且所有或基本上所有FR是人免疫球蛋白共有序列的FR。人源化抗体还可包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区(Jones等, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann等, Nature 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992))。

用于人源化非人抗体的方法是本领域已知的。通常,人源化抗体中引入了一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变域。人源化可基本上遵循Winter及其同事的方法进行(Jones等, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann等, Nature 332: 323-327 (1988); Verhoeyen等, Science 239: 1534-1536 (1988)),即用啮齿类CDR或CDR序列替代人抗体的相应序列。因而,此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利No. 4,816,567),其中基本上少于整个人可变域用来

自非人物种的相应序列替代。在实践中,人源化抗体通常是其中一些CDR残基和可能的一些FR残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

作为人源化的替代方法,可生成人抗体。例如,现在有可能生成这样的转基因动物(例如小鼠),它们在缺乏内源性免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成人抗体完整全集。例如,已经记载了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(JH)基因的纯合删除导致内源性抗体生成的完全抑制。将大量人种系免疫球蛋白基因转移入此类种系突变小鼠将导致在抗原攻击后生成人抗体。参见例如Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2551 (1993); Jakobovits等, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann等, *Year in Immuno.* 7:33 (1993); 美国专利No. 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669 (都属于GenPharm); 5,545,807; 及WO 97/17852。或者,可以如下生成人抗体,即将人免疫球蛋白基因座导入转基因动物,例如内源免疫球蛋白基因已经部分或完全灭活的小鼠。在攻击后,观察到人抗体的生成在所有方面与在人中看到的密切相似,包括基因重排、装配、和抗体全集。这种方法记载于例如美国专利No. 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 和5,661,016, 及下列科学出版物: Marks等, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg等, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg和Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)。

或者,噬菌体展示技术(McCafferty等, *Nature* 348:552-553 (1990))可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变域(V)基因全集生成人抗体和抗体片段。依照这种技术,将抗体可变域基因以符合读码框的方式克隆入丝状噬菌体诸如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因,并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状噬菌体颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝,以抗体的功能特性为基础进行的选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因得到选择。如此,噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以以多种形式进行,综述参见例如Johnson, Kevin S.和Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)。V基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson等, *Nature* 352:624-628 (1991)从衍生自经免疫小鼠脾的小型V基因随机组合文库中分离出大量不同的抗噁唑酮抗体。可基本上遵循Marks等, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)或Griffith等, *EMBO J.* 12:725-734

(1993)所记载的技术, 自未免疫人供体构建V基因全集和分离针对大量不同抗原(包括自身抗原)的抗体。还可参见美国专利No. 5,565,332和5,573,905。

如上所述, 还可通过体外活化B细胞来生成抗体(参见美国专利No. 5,567,610和5,229,275)。

人抗体还可以使用本领域已知的多种技术来生产, 包括噬菌体展示库(Hoogenboom和Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991))。Cole等和Boerner等的技术也可用于制备人单克隆抗体(Cole等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)及Boerner等, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991))。

双特异性抗ZPA抗体

双特异性抗体指对至少两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体, 任选单克隆的人抗体或人源化抗体。在本案中, 结合特异性之一是针对ZPA多肽, 结合特异性之另一是针对任何其它抗原。

用于构建双特异性抗体的方法在本领域是已知的。传统上, 双特异性抗体的重组生产基于两对免疫球蛋白重链/轻链的共表达, 其中两种重链具有不同的特异性(Millstein和Cuello, *Nature* 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配, 这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))生成10种不同抗体分子的潜在混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤来进行正确分子的纯化。类似的规程披露于1993年5月13日公布的WO 93/08829及Traunecker等, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991)。

可以将具有期望结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变域与免疫球蛋白恒定域序列融合。在某些实施方案中, 与包含至少部分铰链、CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定域进行融合。在某些实施方案中, 在至少一种融合物中存在包含轻链结合所必需的位点的重链第一恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物和, 在需要时, 免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体, 并共转染入合适的宿主生物体。关于生成双特异性抗体的进一步详情参见例如Suresh等, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)。

还记载了从重组细胞培养物直接生成和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如, 已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny等, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)。将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合

与两种不同抗体的Fab'部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原以形成单体，然后重新氧化以形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)记载的“双抗体”技术提供了构建双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的VH和VL，所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因而，迫使一个片段上的VH和VL结构域与另一个片段上的互补VL和VH结构域配对，由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链Fv (sFv)二聚体构建双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)。

涵盖具有超过两个效价的抗体。例如，可制备三特异性抗体。Tutt等, J. Immunol. 147:60 (1991)。

异源偶联抗体

异源偶联抗体由两种共价连接的抗体构成。此类抗体建议例如用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞（美国专利No. 4,676,980）及用于治疗HIV感染（WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089）。涵盖可在体外使用合成蛋白质化学的已知方法制备抗体，包括那些涉及交联剂的方法。例如，可使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。适于此目的的试剂的例子包括亚氨基硫醇酯 (iminothiols) 和 4-巯基丁酰亚氨酸甲酯 (methyl-4-mercaptobutyrimidate) 及例如美国专利No. 4,676,980中所公开的。

效应器功能工程改造

可能希望在效应器功能方面修饰本发明的抗体，从而增强例如抗体在治疗癌症中的效力。例如，可向Fc区中引入半胱氨酸残基，从而使得在该区中形成链间二硫键。如此生成的同二聚体抗体可具有改善的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。参见Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及Shopes, J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)中描述的异双功能交联剂来制备。或者，抗体可改造成具有双重Fc区，由此可具有增强的补体溶解和ADCC能力。参见Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)。

免疫偶联物

本发明还关于包含偶联有细胞毒剂的抗体的免疫偶联物,所述细胞毒剂诸如化疗剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段)或放射性同位素(即放射偶联物)。

上文已经描述了可用于生成此类免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白(ricin)A链、相思豆毒蛋白(abrin)A链、蒴莲根毒蛋白(modeccin)A链、 α -帚曲霉素(sarcin)、油桐(*Aleurites fordii*)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(*Phytolacca americana*)毒蛋白(PAPI、PAPII和PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(*saponaire officinalis*)抑制物、白树毒蛋白(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(enomycin)和单端孢菌素(trichothecenes)。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。例子包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备,诸如N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP),亚氨基硫烷(IT),亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对-重氮苯甲酰基)乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见WO 94/11026。

在另一个实施方案中,可将抗体与“受体”(诸如链霉亲和素)偶联从而用于肿瘤预先靶向,其中对患者施用抗体-受体偶联物,接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶联物,然后施用与细胞毒剂(例如放射性核苷酸)偶联的“配体”(例如亲合素)。

免疫脂质体

本文中所公开的抗体还可配制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体可通过本领域已知方法来制备, 诸如参见Epstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); 及美国专利No. 4,485,045和4,544,545。循环时间延长的脂质体披露于美国专利No. 5,013,556。

可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物通过反相蒸发法生成特别有用的脂质体。将脂质体挤过具有设定孔径的滤器, 产生具有期望直径的脂质体。可如Martin等, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)中所述, 将本发明抗体的Fab'片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联。任选在脂质体中包含化疗剂(诸如多柔比星(Doxorubicin))。参见Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)。

抗体的药用组合物

本文所述特异性结合ZPA多肽的抗体以及通过上文公开的筛选测定法鉴定的其它分子, 可以药用组合物的形式施用以治疗上文和下文所述各种病症。

可使用脂转染试剂(lipofectin)或脂质体将本发明的多肽、核酸分子、抗体、拮抗剂或组合物投递入细胞。在使用抗体片段时, 可以使用特异性结合靶蛋白质的结合结构域的最小抑制性片段。例如, 基于抗体的可变区序列, 可设计保留结合靶蛋白质序列的能力的肽分子。此类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术生成(参见例如Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893 (1993))。

本文中的配制剂还可含有超过一种所治疗具体适应症所必需的活性化合物, 优选活性互补且彼此没有不利影响的。或者/另外, 组合物还可包含增强其功能的药剂, 诸如例如细胞毒剂、化疗剂或生长抑制剂。合适的是, 此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物投递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如Remington's

Pharmaceutical Sciences, 见上文。

用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质, 该基质是定型产品的形式, 例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利No. 3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子达100天以上, 但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当胶囊化抗体在体内长时间维持时, 它们可能由于暴露于37°C的潮湿环境而变性或聚集, 导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可以根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如, 如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换而形成分子间S-S键, 那么可通过修饰巯基、自酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

使用抗ZPA抗体或其片段的治疗方法

涵盖ZPA多肽的抗体可用于治疗上文所述多种凋亡相关病症。应当领会, 抗ZPA多肽抗体的抗原结合片段也可用于下述方法。

依照已知方法将本发明的抗体施用于哺乳动物(例如人类), 诸如静脉内施用(像推注或持续一段时间的连续输注)、肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、静脉内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、表面、或吸入路径。

在制备和施用抗体时要考虑本发明抗体的结合靶物的位置。当结合靶为细胞内分子时, 本发明的某些实施方案提供了要被导入结合靶所处的细胞的抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中, 本发明的抗体可以作为胞内抗体(intrabody)在细胞内表达。术语“胞内抗体”在用于本文时指一种在细胞内表达且能够与靶分子选择性结合的抗体或其抗原结合部分, 如Marasco, Gene Therapy 4: 11-15 (1997); Kontermann, Methods 34: 163-170 (2004); 美国专利No. 6,004,940和6,329,173; 及美国专利申请公开号2003/0104402和PCT公开号WO2003/077945中所述。胞内抗体的细胞内表达通过将编码期望抗体或其

抗原结合部分的核酸(缺少在正常情况中与编码抗体或抗原结合片段的基因相连的野生型前导序列和分泌信号)导入靶细胞来实现。可使用任何将核酸导入细胞的标准方法,包括但不限于显微注射,弹道式注射(ballistic injection),电穿孔,磷酸钙沉淀,脂质体以及使用携带有感兴趣核酸的逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒和痘苗病毒载体进行的转染。可将一种或多种编码整个或部分本发明抗ZPA抗体的核酸投递至靶细胞,使得一种或多种胞内抗体得以表达,从而能够在细胞内与ZPA蛋白结合并调控一条或多条ZPA介导的细胞途径。

在另一个实施方案中,提供了内在化抗体。抗体可具有某些增强将抗体投递入细胞的特性,或可被修饰以具有此类特性。用于实现这一目的的技术是本领域已知的。例如,已知抗体的阳离子化能促进其被细胞摄取(参见例如美国专利No. 6,703,019)。脂转染或脂质体也可用于将抗体投递入细胞。在使用抗体片段的情况中,与靶蛋白结合域特异性结合的最小抑制性片段通常是有利的。例如,基于抗体的可变区序列,可设计保留与靶蛋白序列结合的能力的肽分子。此类肽可化学合成和/或通过重组DNA技术产生。参见例如 Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)。

可通过本领域已知的方法增加抗体进入靶细胞。例如,某些序列(诸如衍生自HIV Tat或触角足(Antennapedia)同源结构域蛋白的那些序列)能够指导异源蛋白穿越细胞膜的有效摄入。参见例如Chen等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:4325-4329 (1999)。

当结合靶位于脑中时,本发明的某些实施方案提供了穿越血脑屏障的抗体或其抗原结合片段。某些神经变性疾病与的血脑屏障通透性升高有关,使得抗体或抗原结合片段能容易的导入脑中。当血脑屏障保持完整时,本领域存在着一些用于转运分子穿越该血脑屏障的已知方法,包括但不限于物理方法、基于脂质的方法、以及基于受体和通道的方法。

将抗体或抗原结合片段转运穿过血脑屏障的物理方法包括但不限于完全绕过血脑屏障或通过血脑屏障中产生开口。绕过方法包括但不限于直接注射入脑(参见例如Papanastassiou等, Gene Therapy 9: 398-406 (2002))、间质输注/对流增强的投递(convection-enhanced delivery)(参见例如Bobo等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994))和在脑中植入投递装置(参见例如Gill等, Nature Med. 9: 589-595 (2003); 及 Gliadel Wafers™, Guildford

Pharmaceutical)。在屏障中产生开口的方法包括但不限于超声波(参见例如美国专利公开号2002/0038086)、渗透压(例如通过施用高渗的甘露醇(Neuwelt, E. A., Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation, 卷1 & 2, Plenum Press, N.Y. (1989))、通过例如缓激肽或透化剂A-7透化(参见例如美国专利No. 5,112,596, 5,268,164, 5,506,206和5,686,416)、及用包含编码抗体或抗原结合片段的基因的载体转染跨越血脑屏障的神经元(参见例如美国专利公开号2003/0083299)。

基于脂质的将抗体或抗原结合片段转运穿过血脑屏障的方法包括但不限于将抗体或抗原结合片段包裹入偶联有与血脑屏障血管内皮上的受体结合的抗体结合片段的脂质体(参见例如美国专利申请公开号20020025313), 以及将抗体或抗原结合片段包被在低密度脂蛋白颗粒(参见例如美国专利申请公开号20040204354)或载脂蛋白E(参见例如美国专利申请公开号20040131692)中。

基于受体和通道的将抗体或抗原结合片段转运穿越血脑屏障的方法包括但不限于使用糖皮质激素阻断剂来提高血脑屏障的通透性(参见例如美国专利申请公开号2002/0065259; 2003/0162695; 和2005/0124533); 活化钾通道(参见例如美国专利申请公开号2005/0089473); 抑制ABC药物运载体(参见例如美国专利申请公开号2003/0073713); 用转铁蛋白包被抗体并调控一种或多种转铁蛋白受体的活性(参见例如美国专利申请公开号2003/0129186), 以及阳离子化抗体(参见例如美国专利No. 5,004,697)。

可以将其它治疗方案与如上所述本发明抗体的施用组合。例如, 如果抗体用于治疗癌症, 那么有待用此类抗体治疗的患者还可接受放疗。或者/另外, 可以将化疗剂施用于患者。可依照制造商的说明书使用此类化疗剂的制备和服药时间表, 或者凭熟练技术人员的经验确定。此类化疗剂的制备和服药时间表还可参见Chemotherapy Service, M.C. Perry编, Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1992。化疗剂可以在抗体施用之前或之后, 或者可以同时给予。抗体可以联合抗雌激素化合物诸如他莫昔芬或EVISTATM或者抗孕酮诸如奥那司酮(参见EP 616812), 采用此类分子的已知剂量。

如果抗体用于治疗癌症, 那么它们可以任选与针对一种或多种肿瘤相关抗原的抗体(诸如结合ErbB2、EGFR、ErbB3、ErbB4或VEGF受体中的一种或多种的抗体)一起施用。这些还包括上文所列药剂。而且, 合适的是, 抗

体系列施用，或者联合放射治疗，无论牵涉照射或施用放射性物质。或者/另外，两种或多种结合本文中所公开的同一抗原或者两种或多种不同抗原的抗体可以共施用于患者。在一个实施方案中，将本文中的抗体与生长抑制剂共施用。例如，可以首先施用生长抑制剂，接着是本发明的抗体。然而，也涵盖同时施用或首先施用本发明的抗体。生长抑制剂的合适剂量就是当前所用的那些，而且可以由于生长抑制剂与本文抗体的联合作用（协同）而降低。

在一个实施方案中，在组合疗法中攻击肿瘤的血管形成。将抗ZPA多肽抗体和另一种抗体（例如抗VEGF）以治疗有效剂量施用于携瘤患者，所述治疗有效剂量是通过例如观察到肿瘤或其转移灶（如果有的话）的坏死而确定的。继续此疗法，直至不再观察到进一步的有益效果或临床检查没有显示出肿瘤或任何转移灶的痕迹的时间。然后，单独的或联合辅助剂的施用TNF，所述辅助剂诸如 α -、 β -或 γ -干扰素、抗HER2抗体、heregulin、抗heregulin抗体、D-因子、白介素-1 (IL-1)、白介素-2 (IL-2)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、或促进肿瘤中微血管凝结(coagulation)的药剂（诸如抗蛋白C抗体、抗蛋白S抗体、或C4b结合蛋白，参见1991年2月21日公布的WO 91/01753）、或者加热或辐射。

由于辅助剂的效力有所不同，因此可能希望通过常规形式的矩阵筛选(matrix screening)来比较它们对肿瘤的影响。重复抗ZPA多肽抗体和TNF的施用，直至实现期望的临床效果。或者，将抗ZPA多肽抗体与TNF和任选的辅助剂一起施用。在实体瘤发现于四肢或易于与大循环(general circulation)分离的其它部位的情况中，将本文所述治疗剂施用至分离的肿瘤或器官。在其它实施方案中，将FGF或PDGF拮抗剂（诸如抗FGF或抗PDGF中和性抗体）与抗ZPA多肽抗体一起施用于患者。

为了预防或治疗凋亡相关病症，本发明的抗体的合适剂量取决于所要治疗的病症的类型（如上文所限定的）、疾病的严重程度和病程、施用抗体是出于预防目的还是治疗目的、之前的治疗、患者的临床史和对抗体的应答、以及主治医师的判断。抗体适合于在一次或一系列的治疗中施用于患者。

例如，取决于病症的类型和严重程度，约 $1\mu\text{g/kg}$ - 50mg/kg （例如 $0.1\text{-}20\text{mg/kg}$ ）抗体是施用于患者的初始候选剂量，无论是例如通过一次或多次分开的施用或通过连续输注。取决于上述因素，典型的日剂量或周剂量可在约 $1\mu\text{g/kg}$ - 100mg/kg 或更多的范围内。对于持续数天或更长时间的重复施

用，取决于病情，治疗重复或持续直至出现病症症状得到期望的抑制为止。然而，可使用其它剂量方案。通过常规技术和测定法（包括例如放射线照相肿瘤成像）易于监测该治疗的进展。

具有抗体的制品

还提供了制品，其包括装有抗体的容器和标签。此类制品在上文中有描述，其中活性剂是抗ZPA抗体。

使用抗体对凋亡相关病症的诊断和预后

针对一种或多种ZPA多肽的抗体可用于凋亡相关病症的诊断和/或预后确定。例如，针对一种或多种ZPA多肽的抗体可用作肿瘤诊断剂或预后剂。

例如，抗体（包括抗原结合性抗体片段）可定性地或定量地用于检测基因（包括编码ZPA多肽的基因）的表达，或是在完整细胞中或是在细胞裂解物中。在某些实施方案中，抗体配备有可检测标记物，例如荧光标记物，而且结合可以通过显微镜检查术、流式细胞术、荧光测定法、或其它本领域已知技术来监测。此类结合测定法基本上如上所述实施。

本文中所引用的所有出版物（包括专利和专利申请）都完整收入本文作为参考。

除非另有说明，实施例中提及的商品化试剂依照制造商的说明书使用。下文实施例和整篇说明书中以ATCC编号所鉴别的那些细胞的来源是美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, VA)。除非另有说明，本发明采用重组DNA技术的标准规程，诸如上文和以下教科书中所记载的：Sambrook等，见上文；Ausubel等，Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innis等，PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlow等，Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan等，Current Protocols in Immunology, 1991。

贯穿本说明书和权利要求书，词语“包含”、“包括”、“含有”或其变化

形式应当理解为意味着包括所述成分或成分组，但不排除任何其它成分或成分组。

认为前述书面描述足以使本领域技术人员能够实施本发明。提供以下实施例仅出于例示目的，并非意图以任何方式限制本发明的范围。实际上，根据上面的描述，在本文所显示和描述之外，本发明的多种修饰对于本领域技术人员是显而易见的，而且在所附权利要求的范围内。

实施例

实施例1：推定的斑马鱼Bcl-2家族成员的鉴定

先前已经使用传统序列搜索方法学在斑马鱼中鉴定了人Bcl-2家族中某些成员的同系物(Inohara和Nunez, Cell Death Diff. 7: 509-510 (2000); Coultas等, Cell Death Diff. 9: 1163-1166 (2002); Aouacheria等, Mol. Biol. Evol. 22(12): 2395-2416 (2005))。尽管经过数个小组的巨大努力，哺乳动物内在凋亡途径中多种重要蛋白质的等同物尚未在斑马鱼中发现(出处同前)。申请人怀疑斑马鱼中新的和分歧的(divergent) Bcl-2基因的存在不会在最常用的序列数据库中出现并且无法通过传统的基于序列的搜索轻易地发现。因此对这些序列进行了全面搜索，该搜索既使用传统BLAST和PROSITE搜索定制的序列数据库，又使用定制的隐蔽马尔科夫模型连同Unison数据库(<http://unison-db.org>)进行基于特征的数据库探矿(database mining)。。

a. BLAST/PROSITE数据库探矿

先前由其它小组进行的BLAST和PROSITE搜索未能鉴定包括Bak、Bik、Bim和PUMA在内的数种Bcl-2家族成员的斑马鱼同系物(Inohara和Nunez, Cell Death Diff. 7: 509-510 (2000); Coultas等, Cell Death Diff. 9: 1163-1166 (2002); Aouacheria等, Mol. Biol. Evol. 22(12): 2395-2416 (2005))。为了调查用于这些在先研究的数据库是否不够大，构建了包含136,655个斑马鱼氨基酸序列的定制数据库。通过标准BLAST (2.2.10版)和PROSITE (版本18)搜索技术，使用缺省自变量(default argument)和Bcl-2家族的已知人、小鼠和鸡成员作为查询对象来查询所述定制数据库。

此搜索鉴定了多个序列，其中两个在先前对斑马鱼中Bcl-2相关序列的类似搜索中未得到鉴定。第一个序列(Ensembl:ENSDARP00000040899 (SEQ ID NO: 1))与人Bax在51%的序列上为33%同一的，e值为1e-14。没有PROSITE

BH模式可与ENSDARP00000040899比对(align), 并且Ensembl数据库(可从www.ensembl.org获得; Birney等, Nucleic Acids Res. 34: D556-561 (2006))将该基因注释为假设的(hypothetical)。第二个序列(XP_693331 (SEQ ID NO: 3))与人Bad在68%的序列上是33%同一的, e值为1.3。

使用PROSITE样式进行的搜索未鉴定出任何已知的斑马鱼Bcl-2家族成员, 并且使用单独的PROSITE样式未鉴定出新的斑马鱼序列。

b. 基于特征的数据库探矿

即使使用为斑马鱼序列量身定制的序列数据库(实施例1(a)中所述), 也仅仅鉴定了一个新的推定的Bcl-2家族成员。因为标准BLAST和PROSITE数据库搜索显然无法鉴定其它斑马鱼Bcl-2成员, 所以考虑到一种可能性, 即家族成员在斑马鱼和人中可能具有差异显著的整体碱基序列, 但是仍然享有共同的功能。为了论证(address)这种可能性, 采用了基于特征的序列探矿。基于特征的探矿可鉴定与一组具体特征匹配的序列。

(1)基于特征的探矿序列源

在Unison数据库中进行基于特征的探矿。简而言之, Unison包含来自许多源数据库的无冗余序列概览(non-redundant compendium of sequences)和在相关数据库内经过广泛预先计算的蛋白质组学预测(<http://unison-db.org>)。Unison计划、非专有数据和预测、工具和互联网界面已经Academic Free License授权发布, 并且可以从<http://unison-db.org>/下载或使用。在本研究进行时, Unison包括650万个不同序列, 包括136,655个不同斑马鱼序列, 其来自RefSeq数据库(Wheeler等, Nucl. Acid Res. 34: D173-180 (2006))、UniProt/Swiss-Pro和UniProt/TrEMBL数据库(Wu, Nucl. Acids Res. 34: D187-191 (2006))、及Ensembl版本35 (Birney等, Nucleic Acids Res. 34: D556-561 (2006))。

(2)用于Bcl-2和BH结构域的定制隐蔽马尔科夫模型的构建

从PROSITE样式和矩阵构建了多重序列比对(Sigrist等, Brief Bioinform. 3: 265-274 (2002))。对于样式PS01080 (BH1)、PS01258 (BH2)、PS01259 (BH3)和PS01260 (BH4), 并且对于矩阵PS50063 (BH4), 将假阴性序列手动掺入得自PROSITE网站(<http://us.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.po?pdocus00829>)的真阳性序列的比对。对于PS50062 (Bcl-2)矩阵, 对所述三个假阴性的手动比对不明显, 因此只使用了真阳性。使用来自HMMER v.23.2的hmmbuild (隐蔽马尔科

夫模型建立)和hmmcalibrate (隐蔽马尔科夫模型校准)程序(Eddy, Bioinformatics 14:755-763 (1998)), 结合缺省自变量, 将所述比对用于建立“总体”隐蔽马尔科夫模型(HMM)。为了评估查全率(recall)和查准率(precision), 也为了测定合适的得分阈值, 将六个构建的HMM与UniProt/Swiss-Prot序列数据库比对(图1)。结果证明了所构建的HMM在合适的得分阈值下具有改进的查全率且不损失查准率。从该结果如下选择HMM比对得分截留值: BH1: 21; BH2: 13; BH3: 12; BH4: 22; BH4矩阵: 20; 和Bcl2矩阵: 20。

使用Unison的基于簇的更新框架(cluster-based update framework)对全部136,655个斑马鱼序列运行hmmsearch (隐蔽马尔科夫模型搜索)结果。计算对全部斑马鱼序列的HMM比对并且使用Unison的自动更新工具加载入Unison的内部拷贝。还使用TMHMM v. 2.0c (Krogh等, J. Mol. Biol. 305: 567-580 (2001))以缺省选项进行跨膜结构域分析。一旦加载了结果, 基于特征的探矿即会牵涉框架化SQL查询以呈现预先计算的蛋白组学预测结果的合理结合(conjugation)。使用以上定义的得分标准创建查询来鉴定与任何HMM比对的全部斑马鱼序列。该查询鉴定出每一个与已知的Bcl-2家族成员在基因组上有交叠的序列。进一步分析了四个最有希望的候选基因, 先前未将这些基因鉴定为斑马鱼Bcl-2家族成员。

实施例2: 所鉴定序列的分析

进一步分析每个推定的Bcl-2相关(“B2R”)斑马鱼基因(实施例1(a)中描述的自BLAST搜索鉴定的ENSDARP00000040899和XP_693331, 和实施例1(b)中描述的自基于特征的探矿鉴定的ENSDARP00000066976、FGENESH00000065416、FGENESH00000065416和FGENESH00000082230)以指派具体身份, 即作为Bcl-2家族的特定成员。对每个序列进行BLAST搜索, 并且与最同源的已鉴定的序列比对, 得到e值、得分、百分比同一性和百分比覆盖率(参见表2)。测定在所编码蛋白质内推定的跨膜结构域的存在或缺失。还检查了斑马鱼基因组内的邻近基因, 从而能评估任何保守的同线性(参见表2)。

a. zBak (ENSDARP00000040899)

BLAST搜索(实施例1(a)中所述)鉴定了序列ENSDARP00000040899与人Bax在51%的序列上是33%同一的, 具有 $1e-14$ 的e值(参见表2)。

ENSDARP00000040899的氨基酸序列及其编码核苷酸序列如下所示。

ENSDARP00000040899:

MACEASQDDQIGEALLIGVVRQELMEVMEVTEGNAAPPALPEAKPISNSQ
DQILVQQLANTIKVIGDKLDQDQAFNDMIDGLVKVADKSSFVKLVEKVF
TDGQINWGRIIVLFYSVGKLSAKMVVARLPRIVSDILSLSLDYFKRNLLQ
WIRTVGGWMNSIPALACFSVDQFSGSSMRKYSPYVGVVFAFTGGLLLGG
FIVSRFQKT (SEQ ID NO: 1)

ENSDARG00000030881:

ATGGCTTGTGAAGCCTCACAGGATGATCAGATTGGAGAGGCACTCTTA
ATAGGGGTAGTAAGGCAGGAGCTAATGGAGGTGATGGAGGTGACTGA
AGGAAATGCAGCTCCTCCAGCTCTTCCTGAAGCTAAACCAATAAGCAA
CAGCCAGGACCAGATTCTGGTTCAGCAGCTGGCGAACACAATCAAAG
TGATCGGTGACAACTCGACCAGGATCAAGCATTTAACGACATGATCG
ATGGCTTAGTAAAGGTAGCTGATAAAAGCAGTTTCTGGAACTTGTGG
AAAAGGTGTTTCACAGATGGCCAGATCAACTGGGGCAGAATTATCGTGC
TGTTTTATTCTGTTGGAAAAGTGTGAGCCAAAGATGGTCGTCGCTCGCCT
ACCCAGAATTGTTTCAGATATTTTATCATTAAGTCTTGATTACTTCAAAA
GGAATCTGTTGCAGTGGATTCGCACAGTAGGAGGATGGATGAACAGTA
TCCCTGCACTGGCCTGTTTCTCTGTTGACCAATTTTCTGGTTCTTCAATG
AGAAAATATTCTCCTTACGTTGGAGTTGTGTTTGCCTTCACTGGTGGCC
TACTGCTGGGTGGCTTCATCGTCTCGAGATTTTCAGAAAACCTGA (SEQ
ID NO:2)

Ensembl将ENSDARP00000040899注释为假设的，没有归于任何身份。没有PROSITE BH样式可与该序列比对。在实施例1(b)构建的各HMM中，Bcl-2、BH1、BH2和BH3 HMM各自与该序列比对，这些比对具有分别为33、14、6.1和2.4的得分，以及分别为7.5e-7、0.031、110和1300的e值。还将该序列与数种已知的或建议的(proposed) Bcl-2家族成员的BH3结构域比对，并且使用Jalview 2.05 (Clamp等, Bioinformatics 12: 426-427 (2004))检查(图2)。尽

管BH3 HMM与ENSDAR00000040899的比对得分不佳,但是该序列显示出与其它Bcl-2家族成员BH3结构域在性质上的良好相似性,以及在全部非保守的位置上看似合理的(plausible)氨基酸替代(参见图2)。TMHMM分析还预测了所述序列在大约氨基酸180-202含有跨膜结构域。

通过使用公众可获得的ENSEMBL数据库(在www.ensembl.org上可得到; Birney等, Nucleic Acids Res. 34: D556-561 (2006)), 将斑马鱼基因的侧翼基因与人功能性同系物的侧翼基因比较, 来检查ENSDAR00000040899和本文描述的全部其它序列是否存在保守同线性关系。若在斑马鱼基因的一侧或两侧存在多于一个侧翼基因具有同样在人基因侧翼的人等同物, 则认定该斑马鱼基因与人基因享有保守同线性关系。ENSDAR00000040899与人Bak不呈保守同线性关系, 但是与人Bax为保守同线性关系。

ENSDAR00000040899还包含在候选斑马鱼Bcl-2家族成员针对人Bcl-2序列的比对以及反向的比对中, 使用BLAST来鉴定互逆最佳BLAST比对(reciprocal best BLAST alignment)、成对同一性(pairwise identify)和比对覆盖率(alignment coverage)(表2)。尽管候选序列与人Bax的比对获得了最佳e值, 但是最佳的整体序列覆盖率却由与人Bak的比对获得。尽管BH2和BH3 HMM比对的得分不突出, 但是将以下结果结合在一起, 即在Bcl-2和BH1的得分出众的背景下存在这些结构域, 不存在预测的BH4结构域, BH3结构域与其它Bcl-2成员的BH3结构域有相似性, 预测有TM结构域, 以及互逆BLAST分析, 则说明ENSDAR00000040899是Bcl-2家族的促凋亡成员, 最可能是Bak的功能同系物。

b. zBad2 (XP_693331)

如实施例1(a)所述, 通过BLAST搜索定制的斑马鱼序列数据库还鉴定了XP_693331。XP_693331的氨基酸序列和编码它的mRNA序列如下所示。

XP_693331:

MENTSHDHQDDSSLTDEKERSHLKGTIKNHGQHQRDTSANISPQGRVRLY
SESQVYTVSRWQDTETQDGASVEENGDGLPFRGRSQSAPAALWKAKKY
GRQLRRMSDEFDTWLDKGEVKRANSQKQTYRGWFSFLWSPKEEEGRE
(SEQ ID NO: 3)

XM_688239 (核苷酸367-804):

ATGGAGAACACCTCGCATGACCATCAAGATGATTCCAGCACCTTGGAT
GAAAAAGAGAGATCACATCTGAAAGGGACAATCAAGAACCATGGACA
ACATCAGGATCGAACATCGGCCAACATTTCTCCTCAAGGGCGTGTGCG
GCTCTATTTCGGAATCTCAAGTGTATACAGTCAGCCGCTGGCAGGACAC
AGAGACCCAGGATGGAGCATCGGTGGAGGAGAACGGAGATGGACTTC
CATTCAGGGGTCGTTCTCAATCAGCACCTGCTGCACTGTGGAAAGCAA
AAAAGTATGGCCGTCAGTTGAGGAGAATGAGCGATGAATTTCGACACAT
GGCTCGATAAAGGGGAGGTCAAGAGAGCGAACAGCCAGAAACAGAC
CTACCGAGGATGGTTTTTCGTTCTCTGGAGTCCCAAAGAAGAAGAGGG
CAGAGAATGA (SEQ ID NO: 4)

XP_693331的GenBank注释预测该序列与仅含BH3的促凋亡蛋白Bad相似。XP_693331与人Bad的比对显示这两种蛋白质在72%的序列上具有33%同一性。相对于BH3结构域的HMMer得分是12.6, e值为1.3。对XP_693331的TMHMM分析显示预测在该序列中没有跨膜结构域, 与人Bad类似。获得了XP_693331的克隆(Open Biosystems), 并且在斑马鱼基因组内鉴定了周围的序列。

与XP_693331相邻的基因不同于与人Bad相邻的基因, 因此XP_693331与人Bad没有保守同线性关系。然而, 先前将另一个斑马鱼基因(AI332008)鉴定为与人Bad具有显著同源性和与人bad是同线性的(Inohara和Nunez, Cell Death Diff. 7: 509-510 (2000); Coultas等, Cell Death Diff. 9: 1163-1166 (2002))。XP_693331与上述先前鉴定的序列是大约32%同一的。因此, 上述数据说明XP_693331是与人Bad有关的Bcl-2家族成员。因为先前已知一个与人Bad具有序列相似性和保守同线性的斑马鱼基因, 所以将XP_693331命名为“zBad2”, 作为第二个与人Bad具有同一性的斑马鱼基因。

c. zBik (ENSARP00000066976)

通过如实施例1(b)所述基于特征的数据库探矿将斑马鱼序列ENSARP00000066976鉴定为B2R蛋白。ENSARP00000066976的氨基酸序列和编码它的核苷酸序列如下所示。

ENSDARP00000066976:

MVEETRQQKNATTLQAGPAEVDHSNLYAFNMRVTQTIGRQLAQIGDEMD
NKWRQEPPVPWQNLNFGIYPYVLSRRVFSGRILANLWGSKIMPIFRTSWL
LPQLQNGCQEARWAAWVSNLHVSDWSRSTTYTLASALLLVTVSIFLVN
WNEYEG (SEQ ID NO: 5)

ENSDARG00000045549:

ATGGTGGAAGAACTAGACAGCAGAAAAACGCCACAACCCTGCAGGC
TGGACCTGCTGAGGTTGACCACAGTAATCTCTATGCATTCAATATGAGA
GTCACCCAGACTATCGGACGACAGCTGGCTCAAATAGGGGACGAAATG
GACAATAAATGGCGCCAAGAACCGCCTGTCCCATGGCAGAACCTGAAT
TTCGGGATTTATCCTTATGTCCTAAGTAGGAGAGTGTTCTCTGGAAGAA
TCCTCGCTAATCTTTGGGGGTCTAAGATTATGCCGATATTCAGGACGTCC
TGGTTGCTTCCACAGCTTCAAAATGGCTGTCAGGAGGCTAGAAAGTGG
GCAGCTTGGGTGTCCAACCTTGCATGTTTCTGACTGGTCTCGCAGCACT
ACATACACCCTGGCATCTGCTTTACTACTGGTCACTGTGTCTATCTTCCT
TGTAAACTGGAATGAGTATGAAGGCTGA (SEQ ID NO: 6)

BLAST搜索定制的斑马鱼序列数据库(如实施例1(a)中所述)未鉴定出 ENSDARP00000066976。对该序列的TMHMM分析预测了跨膜结构域的存在,自大约氨基酸130-149。ENSDARP00000066976与BH1、BH2和BH4 HMM不匹配。该序列确实与BH3 HMM匹配,得分为18, e值为0.023。BH3相关区和跨膜结构域的存在以及BH1、BH2和BH4相关区的缺失说明了 ENSDARP00000066976可能是Bcl-2蛋白中促凋亡的仅含BH3的亚家族的成员。

斑马鱼基因组中的ENSDARP00000066976序列与人Bik享有保守同线性关系。将ENSDARP00000066976推定的BH3区与先前已知的人斑马鱼Bcl-2基因比较(参见图2)。ENSDARP00000066976的BH3结构域与人Bid的BH3结构域最相似,尽管与人Bik具有同线性和BLAST相似性(图3B)。然而,基于对两个序列的比较,ENSDARP00000066976缺乏推定的胱天蛋白酶切割位点,而人Bid含有该位点。BH3结构域的存在、BH结构域的缺失、对跨膜结

构域的预测、整体的序列相似性、和同线性关系分析均说明了 ENSDARP00000066976 是与人 Bik 直向同源的斑马鱼促凋亡的仅含 BH3 的 Bcl-2 亚家族成员。

d. zBim (FGENESH00000065416)

通过如实施例 1(b) 所述基于特征的数据库探矿将斑马鱼序列 FGENESH00000065416 鉴定为 B2R 蛋白。BLAST 搜索定制的斑马鱼序列数据库 (如实施例 1(a) 所述) 未鉴定出 FGENESH00000065416。FGENESH00000065416 与 BH1、BH2 和 BH4 HMM 不匹配。该序列确实与 BH3 HMM 匹配, 得分为 18, e 值为 0.023。BH3 相关区和跨膜结构域的存在以及 BH1、BH2 和 BH4 相关区的缺失说明了 FGENESH00000065416 可能是 Bcl-2 蛋白中促凋亡的仅含 BH3 的亚家族的成员。

与 FGENESH00000065416 序列的 BLAST 比对显示, 该序列 N-末端的一半与人 Bim 在人 Bim 的 47% 上是 32% 同一的, e 值为 $9e-7$, 进一步支持了将 FGENESH00000065416 认定为 Bcl-2 蛋白中促凋亡的仅含 BH3 的亚家族的成员。然而, FGENESH00000065416 的 C-末端的一半与发育调控的 RNA 结合蛋白 1 最相似 (32% 同一性), 发育调控的 RNA 结合蛋白 1 是小鼠和大鼠的 RNA 结合蛋白, 推定与神经发育有关。

在同一连续区域内并列有 Bim 同源性和与无关蛋白/功能的同源性可能归因于斑马鱼基因组内的装配错误。事实上, 无法从所述完整序列或单独的 Bim 样片段扩增 RNA 产物。尽管存在明显的装配错误, 但是 BH3 结构域的存在、其它 BH 结构域的缺失、和序列相似性说明了至少 FGENESH00000065416 的 N-末端部分与人 Bim 同源。

e. zPuma (FGENESH00000078270)

通过如实施例 1(b) 所述基于特征的数据库探矿将斑马鱼序列 FGENESH00000078270 鉴定为 B2R 蛋白。FGENESH00000078270 的氨基酸序列和编码它的核苷酸序列 (登录号 CN323956) 如下所示。

FGENESH00000078270:

MTLCFLNTSAALADEEGDPLPTALINSLDLAVNQPVSGSGFCKLKLANEQ
TVVTLQQLATREPMGDEEEVQGFQSTDPHGTTVCGMARPEMESRVDEH
NSGTPNSCRMEVLRQDAWPNGSIIQPCHRRRTIATQTSTLSAPLPHIPSHDA

FSLDSVQQQDSLRLDNSGTEQEVSRLPLPDLLADNQSSSEESTSSSSSTAE
EDPTLEEQAVERVAVQLRTIGDEMNAVFLQRNAVPHWQNWRLGLYRGLMA
LVSDTINALYQHGLR (SEQ ID NO: 7)

FGENESH00000078270:

ATGACTTTGTGCTTTTAAACACAAGCGCAGCGCTCGCTGATGAAGAG
GGCGATCCTCTGCCCCACTGCTCTGATAAACAGTCTTGACCTAGCAGTG
AATCAGCCGGTGTGTCAGGTTCTGGCTTTTGTAAGTCAAAGTGGCCAAT
GAGCAAAGTGTGACTCTCCAACAATTAGCAACAAGAGAACCCATG
GGGGATGAAGAGGAGGTGCAGGGCTTTCAGAGCACAGACCCACACGG
GACAACTGTATGTGGAATGGCCCGACCAGAGATGGAAAGCAGAGTGG
ACGAACATAACTCTGGCACGCCGAACAGCTGCAGGATGGAGGTGCTG
CGTCAGGACGCCTGGCCAAATGGCAGCATCATCCAGCCCTGCCATCGA
CGCCGAACCATTGCCACTCAAACCAGCACTCTCTCTGCACCACTGCCC
CACATCCCCTCACATGATGCCTTCAGCTTGGACAGCGTCCAGCAGCAG
GACAGTCTACTCAGGGACAATTCAGGAACAGAACAGGAAGTGTCCAG
GCCTCTTCCTCTGCCAGATCTGCTAGCAGACAACCAGAGCTCCTCAGA
GGAGTCCACGTCCAGCAGCAGCTCGACCGCTGAGGAGGACCCACAC
TGGAGGAGCAGGCTGTGGAGAGGGTGGCCGTACAAGTGGAGACAATT
GGGGACGAGATGAACGCTGTCTTCCTTCAGAGGAATGCCGTCCCGCAC
TGGCAGAACTGGAGAGGCCTGTACCGCGGGCTCATGGCGCTGGTCTCG
GACACCATCAATGCCCTCTACCAGCACGGCCTCAGATGA (SEQ ID
NO:8)

BLAST搜索定制的斑马鱼序列数据库(如实施例1(a)所述)未鉴定出FGENESH00000078270。TMHMM分析预测此序列无跨膜结构域。FGENESH00000078270与BH1、BH2和BH4 HMM不匹配。该序列确实与BH3 HMM匹配,得分为13, e值为0.77。根据BLAST比对,FGENESH00000078270与人Puma相似,显示出25%的同一性和2.1e1的e值。对斑马鱼基因组中FGENESH00000078270周围的基因的鉴定说明了FGENESH00000078270与人Puma享有保守同线性关系。

BH3相关区的存在以及BH1、BH2和BH4相关区和跨膜结构域的缺失，再结合序列相似性和保守同线性，有力地说明了FGENESH00000078270是Bcl-2蛋白中促凋亡的仅含BH3的亚家族的成员，更具体而言与人Puma直向同源。

f. zBmf2 (FGENESH00000082230)

通过如实施例1(b)所述基于特征的数据库探矿将斑马鱼序列FGENESH00000082230鉴定为B2R蛋白。FGENESH00000082230的氨基酸序列和编码它的核苷酸序列如下所示。

FGENESH00000082230:

MDDEEDEQLPRCCETPLRNKRSEKRDAHGGDVGQTAHRHASTQTAGSV
LNSARDADMAPFQGSQREASSLCRVVGARTAFRAPCGTGGLVSLTMGPG
ARGGPRALFHGNAGFRAHFPALFEPALDGLQNAEQREQDEGRPEEKEED
RDAGISVEVQIGRKLREMGDQFQQEHLQLILDETRYRI (SEQ ID NO: 9)

FGENESH00000082230:

ATGGATGATGAGGAGGATGAACAGCTTCCTCGCTGCTGTGAAACGCCG
CTAAGAAACAAGCGCTCAGAGAAGAGAGACGCCACGGTGGAGACG
TGGGACAAACAGCTCACAGACACGCATCCACACAGACTGCTGGCTCT
GTCCTCAATTCAGCGAGAGACGCAGATATGGCACCATTCCAGGGCTCA
CAGAGAGAAGCATCATCTCTTTGCAGAGTTGTGGGTGCTAGGACTGCA
TTCAGGGCTCCCTGTGGAAGTGGGGGCCTTGTGTCACTTACTATGGGC
CCCGGAGCCCGGGGTGGGCCAAGAGCACTTTTTCATGGAAACGCTGG
ATTTCGTGCACACTTCCCTGCGCTGTTCGAACCCGCCCTGGATGGCTTA
CAAAACGCCGAACAGAGAGAGCAGGACGAAGGCAGACCAGAAGAAA
AAGAAGAGGATCGCGACGCAGGGATTAGCGTGGAGGTTTCAGATTGGA
CGTAAATTACGTGAAATGGGGGATCAGTTTCAGCAAGAGCATCTTCAG
CTGATTATATTAGATGAAACCAGATACAGGATTAA (SEQ ID NO: 10)

BLAST搜索定制的斑马鱼序列数据库(如实施例1(a))所述未鉴定出FGENESH00000082230。TMHMM分析预测此序列无跨膜结构域。

FGENESH00000082230与BH1、BH2和BH4 HMM不匹配。该序列确实与BH3 HMM匹配, 得分为18.6, e值为0.02。根据BLAST比对, FGENESH00000082230与人Bmf相似(在该分子的42%上有41%同一性, e值为2.1e1)。比对还显示了FGENESH00000082230含有推定的动力蛋白轻链结合结构域, 类似于人Bmf (Day 等, Biochem J. 377:597-605 (2004))。对斑马鱼基因组中FGENESH00000082230周围的基因的鉴定说明了FGENESH00000082230与人Bmf还享有保守同线性关系。BH3相关区的存在以及BH1、BH2和BH4相关区和跨膜结构域的缺失, 再结合序列相似性和保守同线性, 有力地说明了FGENESH00000082230是Bcl-2蛋白中促凋亡的仅含BH3的亚家族的成员, 更具体而言与人Bmf直向同源。

已经在斑马鱼中鉴定了与人Bmf同源的另一个斑马鱼基因(Coultas等, Cell Death Diff. 9: 1163-1166 (2002); 登录号BI891121)。但是该基因与人Bmf不享有保守同线性, 不像FGENESH00000082230。FGENESH00000082230和BI891121之间的相似性在该分子的27%上为43%。因此, 将FGENESH00000082230命名为zBmf2以将其与较早鉴定的基因区别开来。

表2: 斑马鱼中推定的Bcl-2家族成员的特征

指派	蛋白质登录号	e值	得分	% 同一性	% 覆盖率	人 基因	是否为 同线性
zBim	FGENESH00000065416	9e-7	55	32	47	Bim	是
zBak	ENSDARP00000040899	4e-5	50	25	86	Bak	否
		1e-14	81	33	51	Bax	是
zBax	ENSDARP00000023687	2e-6	54	29	68	Bak	否
		2e-47	189	51	98	Bax	否
zBik	ENSDARP00000066976	1.41e4	20	47	12	Bik	是
zPuma	FGENESH00000078270	2.1e1	30	25	49	Puma	是
zBmf2	FGENESH00000082230	0.011	42	41	42	Bmf	是
zBad2	XP_693331	8e-12	64	33	72	Bad	否

g. 关于斑马鱼B2R基因的综合观察

总的来说, 先前已知的和本文鉴定的Bcl-2家族基因的斑马鱼同系物与它

们的人对应物非常相像(表3), 其中多结构域Bcl-2家族成员具有最高的相似程度(图3A)。仅含BH3的斑马鱼蛋白与人基因趋异最大(图3A), 整体相似性范围从27% (zPuma)到46% (zBad和zBmf2)(参见表3)。但是, 已知的是仅含BH3的蛋白与脊椎动物Bcl-2亚家族趋异最大。而就BH3结构域本身观察到了程度高得多的相似性, 范围在66-79%(表3; 图3B)。

表3: 斑马鱼和人B2R蛋白的比较

斑马鱼 基因	哺乳动物 同系物	% 同源性	登录号	鱼 染色体	人 染色体	是否有 同线性
促存活的						
zBclp1	Bcl-x _L	67%	AF317837	5	20q11.21	是
zBclp2	Bcl-2	57%	NM_001030253.1	24	18q21.33	否
zMcl-1a	Mcl-1	43%	NM_131599	19	1q21.2	是
zMcl-1b	Mcl-1	38%	NM_194394.2	16	1q21.2	是
zNR13	Boo/DIVA	30%	AF441285	18	15q21.2	是
促凋亡的仅含BH3的						
zBad1	Bad	46% (79%)	BC097099.1	7	11q13.1	是
zBad2	Bad	35% (66%)	XP_693331	21	11q13.1	是
zBid	Bid	30% (66%)	XM_698543.1	18	22q11.21	否
zBik	Bik	38% (66%)	ENSDARP0000006697	4	22q13.2	是
zBmf1	Bmf	46% (72%)	XM_695596.1	23	15q15.1	否
zBmf2	Bmf	38% (66%)	FGENESH00000082230	20	15q15.1	是
zNoxa	Noxa	27% (66%)	DV595521.1 (EST)	19	18q21.32	否
zPuma	Puma	86%	FGENESH00000078270	16	19q13.32	是
zBim	Bim	ND	FGENESH00000065416	13	2q13	ND
促凋亡的多结构域的						
zBak	Bak	41%	ENSDARP00000040899	3	6p21.31	与hBax
zBax	Bax	73%	ENSDARP00000023687	ND	19q13.33	否
zBok1	Bok	81%	NM_001003612.1	ND	2q37.3	ND
zBok2	Bok	74%	BC053218.1	2	2q37.3	是

ND表示未测定。括号内的百分比表示仅就BH3结构域内的%同源性。

实施例3: Bcl-2候选基因的实验验证

实施例1和2中的研究论证了以上鉴定的蛋白质与某些Bcl-2家族成员享有同源性,并且可能是内在凋亡途径的成员。为了确认这些命名指派,在斑马鱼中评估每个蛋白质的功能。

a. 斑马鱼B2R基因的表达模式

为了评估先前已知的和本文鉴定的斑马鱼B2R蛋白的正常表达,在特定发育阶段和特定成体组织中通过RT-PCR分析编码各个蛋白质的mRNA (图3C和3D)。从斑马鱼国际资源中心(Zebrafish International Resource Center)获得成体图宾根长鳍鱼(Tubingen long-fin fish)。鱼的饲养依照斑马鱼手册(Westerfield, The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio), 第4版, Univ. of Oregon Press, Eugene (2000))进行。依照制造商的说明书,在指定的时间点从脱去绒毛膜的野生型斑马鱼胚胎分离了RNA (100 ng),使用QiaShredder (Qiagen)进行30个循环,继而用RNAeasy Mini试剂盒(Qiagen)纯化,使用DNA酶I消化。从成体雌性斑马鱼分离了成体组织,以类似于从胚胎组织提取的方式从这些组织提取了RNA (50 ng)。将GAPDH作为输入RNA量(amount of input RNA)的对照包括在内。在0.8%的e凝胶(e-gel, Invitrogen)上解析所得产物并照相。

除了zBik和zBok,所有所检验的斑马鱼B2R基因均进行母体表达(在1000个细胞的阶段) (图3C)。在合子转录起始之后(受精后大约5小时),以相当一致的(consistent)水平表达了zBad1、zBik、zBad、zBmf1、zNoxa、zBax、zMcl-1a、zMcl-1b、zB1p1和zNR13 (图3C)。相反, zBak、zBmf2和zB1p2的转录显著降低,之后在发育中的晚些时候再次升高(图3C)。zBok2进行了强烈的母体表达,但是在稍后的胚胎发育中基本上不存在(图3C)。

在所检验的七种成体斑马鱼组织中,卵巢显示出了对每个基因的大量转录,除了zBmf2 (图3D)。相反,肝仅显示出了对zBid、zMcl-1a和zMcl-1b的微弱表达(图3D)。斑马鱼仅含BH3的基因中的数个仅在少数几种组织中表达(图3D)。

b. 推定的斑马鱼B2R蛋白的体内凋亡效应

对每种先前已知的和本文鉴定的斑马鱼B2R基因激活内在凋亡途径的

能力进行了评估。使用标准方案将斑马鱼cDNA定向克隆入表达载体pCS108 (Fletcher 等, Gene Expr. Patterns 5(2):225-30 (2004); http://tropicalis.berkeley.edu/home/genomic_resources/Ests/vectors/cs108.pdf, 日期为2001年8月13日)。用于克隆的引物如下(均为5'到3'):

zBak正向: GGGGGTTGTTGTAAAGTACAGTGG (SEQ ID NO: 65)

zBak反向: TCAGGTTTTCTGAAATCTCGAGACG (SEQ ID NO: 66)

zBik正向: ACTGTACTGAGACACATCACAGCAACA (SEQ ID NO: 67)

zBik反向: TCAGCCTTCATACTCATTCCAG (SEQ ID NO: 68)

zPuma正向: CTAAGTGAAGTACTCATCTAATGAATTAACACCGCT (SEQ ID NO: 69)

zPuma反向: TCATCTGAGGCCGTGCTGGTAGAG (SEQ ID NO: 70)

zBmf1正向: ATGGATGAGGACGAGGATGAT (SEQ ID NO: 71)

zBmf1反向: TCACCTGCGGTTCTCTCTG (SEQ ID NO: 72)

zBmf2正向: ATGGATGATGAGGAGGATGAAC (SEQ ID NO: 73)

zBmf2反向: TTAAATCCTGTATCTGGTTTCATCTA (SEQ ID NO: 74)

zBad1正向: CTTCCACAACACTTCCACTGGATAC (SEQ ID NO: 75)

zBad1反向: TTCCTGTCAGTCACTCTGCGGGGC (SEQ ID NO: 76)

zBlp1正向: GCCGAATTCCACCATGTCTTACTATAACCGAGAACTG (SEQ ID NO: 77)

zBlp1反向: GGCCTCGAGTCACAGGCGTTTCTGTGCAATGAGTCC (SEQ ID NO: 78)

zBlp2正向: ATGGCTAACGAAATTAGC (SEQ ID NO: 79)

zBlp2反向: TCACTTCTGAGCAAAAAAGGC (SEQ ID NO: 80)

zBok1正向: ATGGAGATGTTGCGCCGCT (SEQ ID NO: 81)

zBok1反向: TCATTTCTCTCTCAGCAGGTAGAAAAC (SEQ ID NO: 82)

zBok2正向: ATGAACGTGTTGCGCGCT (SEQ ID NO: 83)

zBok2反向: GCGCAAGTCTACTTCGTCAGGTA (SEQ ID NO: 84)

zMcl-1a正向: AAGGGGCTGCAGCTGGACG (SEQ ID NO: 85)

zMcl-1a反向: AGCGGGGCTCAGGTCAGTACAG (SEQ ID NO: 86)

zMcl-1b正向: CATCTTCGATTGATTTGATT (SEQ ID NO: 87)

zMcl-1b反向: ATAGTTTGAAAGTTCTGAATCC (SEQ ID NO: 88)

zNR13正向: ATGTCCTGTTGGTTGAGGG (SEQ ID NO: 89)

zNR13反向: TCAGCGTACTAAGAGGAAGGT (SEQ ID NO: 90)

zBad2的克隆从Open Biosystems获得。

通过Ambion mMessage mMachine™ (Ambion)依照制造商的说明生成zBid、zBad1、zBmf1、zBmf2、zPuma、zBik、zNoxa、zBak和zBax的加帽合成mRNA, 并经由NucAway离心柱(spin column) (Ambion)纯化。将所得信使RNA在含0.2%酚红的1x Danieau氏溶液中稀释至适当浓度(范围在0.11 mg/mL至 3.5×10^{-5} mg/mL)。给1-4细胞阶段的胚胎使用Nanoliter 2000 (World Precision Instruments)微量注射器注射4.6 nL所述稀释的mRNA溶液。赋予(cast to)卵裂球的淡粉色是来自注射溶液的残留酚红。

注射编码大多数仅含BH3的促凋亡蛋白或多结构域促凋亡Bcl-2蛋白的合成mRNA导致了剂量依赖性凋亡, 其特征在于卵裂球和卵黄细胞的裂变(图4A和4B)。在注射了多至500 pg这些合成mRNA的早期胚胎中, zBad、zBok1和zBok2未诱导显著的凋亡。

为了确认斑马鱼促凋亡B2R基因的异位表达通过调用(engage)凋亡途径杀死了胚胎, 给胚胎注射低剂量的各种合成mRNA, 并通过免疫组织化学来监测凋亡效应物胱天蛋白酶-3的活化程度。

在1-4细胞阶段给斑马鱼胚胎注射500 pg GFP、500 pg zBad、100 pg zBid、20 pg zBik、0.8 pg zBmf1、4 pg zBmf2、20 pg zNoxa、20 pg zPuma、20 pg zBak或20 pg zBax。将经注射的胚胎在受精后10小时在4%多聚甲醛的PBS溶液中在室温固定大约4小时或在4°C固定过夜。接着将胚胎在甲醇中脱水至少2小时。再水化之后, 用水洗涤胚胎, 在丙酮中于-20°C透化7分钟, 再次用水洗涤。将胚胎用含有0.5% Tween的PBS (PBST)再洗涤几次。将洗过的胚胎在含有5%胎牛血清、2mg/mL BSA的PBST中在室温封闭2小时。将胚胎与按照1:500在封闭溶液中稀释的家兔抗活化胱天蛋白酶-3抗体(PharMingen)一起在4°C温育过夜。其后将胚胎在PBST中洗涤几次, 之后与按照1:500在封闭溶液中稀释的二抗在室温温育2小时, 所述二抗为山羊抗家兔Cy3 (Jackson Immunology)。再用PBST洗涤胚胎, 之后用Leica MZFL3荧光显微镜显像。

与野生型和模拟注射的(mock-injected)胚胎相比, 促凋亡B2R蛋白的异位表达导致了胱天蛋白酶-3活性的剧烈升高, 说明了Bax样和仅含BH3的B2R蛋白的异位表达启动了斑马鱼胚胎中的凋亡程序(图4C)。仅有的例外是zBad、zBok1和zBok2, 它们在异位表达时同样没有启动凋亡(图4A和4C)。

c. 斑马鱼B2R蛋白诱导的凋亡的拯救

如果斑马鱼胚胎中斑马鱼促凋亡B2R蛋白的异位表达经由类似于哺乳

动物凋亡途径的机制诱导了凋亡,那么应该有可能通过共表达促存活B2R蛋白来防止致死。使用实施例3(b)中所列的引物和方案克隆了zMcl-1a、zMcl-1b、zBclp1和zBclp2中的每一个。同样依照实施例3(b)中所述的方案,为zMcl-1a、zMcl-1b、zBclp1和zBclp2中的每一个制备了合成mRNA,并共注射入斑马鱼胚胎,B2R蛋白mRNA注射量如下:500 pg 每种促存活mRNA、500 pg zBid、20 pg zBmf1、100 pg zBmf2、50 pg zNoxa、100 pg zBcl、100 pg zPuma、100 pg zBax和100 pg zBak。结果示于图4D。与zMcl-1a、zMcl-1b、zBclp1或zBclp2的共表达拯救了因zBid、zBcl、zBmf1、zBmf2、zNoxa、zPuma或zBax的异位表达而诱导的凋亡(图4D)。然而,zBak的异位表达得到了与zMcl-1a、zMcl-1b或zBclp1的共表达的拯救,而未得到与zBclp2的共表达的拯救(图4D),说明了zBak不与zBclp2进行相互作用。人Bclp2是已知的Bcl-2同系物。先前的研究已经表明人Bak不与人Bcl-2进行相互作用。因此,zBclp2无法拯救zBak诱导的凋亡进一步支持了将ENSDARP00000040899定为人zBak的斑马鱼直向同系物的指派。

d. 体内响应于伽马辐射的斑马鱼B2R基因

为了调查斑马鱼B2R基因在对外源凋亡刺激物的应答中的作用,对胚胎进行伽马照射。已知伽马照射在哺乳动物细胞中经由内在途径触发凋亡,导致胱天蛋白酶-3活性以p53依赖性方式升高(Gong等, Cell Growth Differ. 10(7): 491-502 (1999))。因此对斑马鱼促存活分子保护斑马鱼胚胎免于伽马辐射介导的凋亡的能力进行了检查。

在受精后大约7小时在1mL胚胎培养基中用50 Gy伽马照射剂量照射胚胎。其后将胚胎移至组织培养皿中极大量的胚胎培养基中并在28.5°C温育直至进一步的分析。每种斑马鱼促存活B2R基因(zBclp1、zMcl-1a、zMcl-1b和zBclp2)的异位表达,如实施例3(b)中所述(调整为500 pg注射),保护了胚胎免于伽马照射诱导的凋亡(图5A)。因此伽马辐射经由内在途径触发了斑马鱼胚胎中的凋亡,类似于其在哺乳动物细胞中的效应。

为了测定哪些斑马鱼B2R基因负责介导伽马辐射对斑马鱼胚胎的凋亡效应,使用吗啉代方法对促凋亡B2R斑马鱼基因进行了翻译敲低。基于它们消除关联mRNA介导的拯救异位表达的zNoxa的能力,对每种促存活B2R基因的吗啉代进行选择。基于它们拯救关联mRNA异位表达的能力,对每种促凋亡B2R基因的吗啉代进行选择。由于对于zBcl1、zBcl2或zBad无法验证吗

啉代的功效(因为这些基因在异位表达时未诱导凋亡, 参见图4A和4C), 在敲低分析中不包括这些基因。

吗啉代设计在每种转录物的翻译起始位点周围(Nasevicius和Egger, Nat. Genet. 26: 216-220 (2000)), 并从GeneTools获得。吗啉代(“MO”)序列如下(均为5'至3'):

zMcl-1a MO:	GCCTAAAATCCAAACTCAGAGCCAT	(SEQ ID NO: 91)
zMcl-1b MO:	TGTCGTTGTTTCTTCCAGCGAACAT	(SEQ ID NO: 92)
zBclp1 MO:	AGGTTGTTGCTCGTTCTCCGATGTC	(SEQ ID NO: 93)
zBclp2 MO:	GTCATAGCTAATTTCGTTAGCCATG	(SEQ ID NO: 94)
zBax MO:	TGAAAATAAGCGAACTGAAGAAGAC	(SEQ ID NO: 95)
zBak MO:	ATTTTTCGGCTAAAACGTGTATGGG	(SEQ ID NO: 96)
zBid MO:	GGTCAAAGTTCCTGTTGAAGTCCAT	(SEQ ID NO: 97)
zBmf MO:	ACACATCATCCTCGTCCTCATCCAT	(SEQ ID NO: 98)
zNoxa MO:	CTTTCTTCGCCATTTTCAGCAAGTTT	(SEQ ID NO: 99)
zPuma MO:	TGCTTTCCATCTCTGGTCGGGCCAT	(SEQ ID NO: 100)
zBik MO:	CTACAAACAAGGACACAATGGTGGA	(SEQ ID NO: 101)
p53 MO:	GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG	(SEQ ID NO: 102)
对照 MO:	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA	(SEQ ID NO: 103)

对照吗啉代设计成恢复正常人 β 珠蛋白mRNA序列信息, 其含有突变的 β 珠蛋白生成障碍性贫血(beta thalassemia)剪接位点, 并且预期这种对照吗啉代在斑马鱼胚胎中没有效果。p53吗啉代依照Langheinrich等, Curr. Biol. 12: 2023-2028 (2002)。

将吗啉代在1X Danieuv氏溶液+ 0.2%酚红中稀释至1mg/mL。注射总共4.6ng或9.2ng吗啉代。在使用了两种吗啉代的组合的实验中, 每种吗啉代注射4.6ng。当实验包括与双重吗啉代注射样品的比较时, 向单一吗啉代注射添加额外的4.6ng对照吗啉代, 使得每种样品均注射9.2ng吗啉代。使用Nanoliter 2000 (World Precision Instruments)微量注射器给1-4细胞阶段的胚胎注射4.6nL稀释的吗啉代。

在大多数哺乳动物细胞类型中, 需要Bax或Bak来转导大多数凋亡刺激物(Wei等, Science 292: 727-730 (2001))。为了测定zBax和zBak在斑马鱼中是否在功能上是冗余的, 将针对zBax和zBak的吗啉代单独地或成对地注射入胚

胎,继而对胚胎进行伽马照射。zBax的翻译敲低足以保护胚胎免受伽马辐射的影响(图5B和5C)。在小部分的卵(clutches)中,需要zBax和zBak二者的敲低来消除伽马照射诱导的胱天蛋白酶-3活化。一些胱天蛋白酶-3活性保留在了注射了zBax和zBak吗啉代的经照射胚胎中(图5B和5C),可能是因为不完全的敲低或胚胎中存在的母体蛋白质的功能。zBax似乎主要负责响应于伽马照射来执行凋亡程序。

数种仅含BH3的促凋亡基因的翻译敲低揭示了当zPuma翻译受损时,胱天蛋白酶-3的活化响应于伽马照射而剧烈降低(图5D)。zNoxa受损也大大降低了胱天蛋白酶-3的活化,但并不像zPuma失活那样彻底。这种效应反映了p53敲低的保护作用(图5E),并且得到在哺乳动物细胞中进行的先前研究的支持,这些研究表明Puma是伽马照射诱导的凋亡的主要介导体(Erlacher等, Blood 106: 4131-4138 (2005); Jeffers等, Cancer Cell 4: 321-328 (2003))。

采取定量PCR分析来更好地了解zNoxa和zPuma在伽马照射过程中的作用。使用7500 Real Time PCR System (实时PCR系统) (Applied Biosystems)依照制造商的说明书来进行Taqma分析。用于每个基因的引物和探针序列如下所示(5'至3'):

zGAPDH正向: TCGTTCGTCTCTGTAGATGT (SEQ ID NO: 104)

zGAPDH反向: GCCTGTGGAGTGACACTGA (SEQ ID NO: 105)

zGAPDH探针: TGTGTGTGTGTGTTAGTTTCTTTTGACAGTATTTG (SEQ ID NO: 106)

zNoxa正向: CGAACCTGTGACAGAACTTG (SEQ ID NO: 107)

zNoxa反向: CTGCGCGCACTCTACTACA (SEQ ID NO: 108)

zNoxa探针: CGGTTTGCTCTTTCTTCGCCATTTC (SEQ ID NO: 109)

zPuma正向: GAACACACGGGTTACAAAAGAC (SEQ ID NO: 110)

zPuma反向: GAAAATTCCCAGAGTCTGTAAGTG (SEQ ID NO: 111)

zPuma探针: ACGAGTGCAGGCGCTCTCCTT (SEQ ID NO: 112)

在受精后大约30分钟收集胚胎并保持在胚胎培养基中用于进一步的分析。使用OneStep RT-PCR试剂盒(Qiagen)依照制造商的说明通过RT-PCR扩增了每种B2R基因的编码区。对多个RT-PCR产物进行测序以核实正确的编码序列。通过Topo TA (Invitrogen)克隆入质粒pCRII (Invitrogen)来克隆每种扩增序列。在受精后7小时用50 Gy照射胚胎,并在受精后10小时收集RNA。

定量PCR分析揭示了在zNoxa转录上调3-4倍时, zPuma转录响应于伽马

照射上调了几乎100倍(图5F)。没有其它斑马鱼的仅含BH3的基因显示出响应于伽马照射的转录增加。zPuma的上调是p53依赖性的(图5F),使得p53的敲低降低了zPuma的上调。这说明了在斑马鱼中伽马照射诱导了p53活性, p53活性继而在转录上上调了zPuma。已知在哺乳动物系统中Puma上调可活化Bax和Bak (Liu等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 310(3): 956-62 (2003)), 结合以上数据说明zBax对于响应于伽马照射诱导凋亡是关键的。因此, 伽马照射斑马鱼胚胎触发了内在凋亡途径, 该途径特别由p53、zPuma和zBax介导。

e. 在正常发育过程中敲低斑马鱼促存活B2R蛋白

已经确定了内在凋亡途径在斑马鱼中存在并有功能, 将斑马鱼内在凋亡途径与已知的哺乳动物内在途径系统比较。对斑马鱼促存活B2R基因进行吗啉代敲低, 并监测获得的对发育中的胚胎的效应。依照实施例3(d)中描述的方法学, 使吗啉代针对zMcl-1a、zMcl-1b和zBlp2的翻译起始位点。

zBlp2的敲低对早期斑马鱼发育没有明显的影响(图6A)。zBlp2敲低的鱼的总体形态学正常。没有因为zBlp2敲低而存在胱天蛋白酶-3活性的升高。类似地, zMcl-1a或zMcl-1b的敲低也对鱼胚胎的存活没有明显作用。然而, 同时敲低zMcl-1a和zMcl-1b导致了在受精后8小时可变的但却是显著的生存力降低(图6A)。任一zMcl基因与zBlp2组合的成对敲低对存活没有影响(图6A)。因此, 只有同时削弱zMcl-1的两个拷贝的转录才会显著影响经注射的斑马鱼胚胎的存活。值得注意的是, 先前的研究已经证明了在小鼠中哺乳动物Mcl-1的敲除是植入前致死的(pre-implantation lethal) (Rinkenberger等, Genes Dev. 14: 23-27 (2000))。

f. 斑马鱼促存活B2R蛋白和Apo2L信号传导

注射了zMcl-1a和zMcl-1b吗啉代二者的斑马鱼胚胎显示出了大范围(significant range)的生存力(实施例3(e))。这种生存力的范围似乎随着一窝卵(clutch)的整体“健康”而改变。关于可变性的一种可能的解释是zMcl-1a/b可能保护早期斑马鱼胚胎免受内源或环境凋亡刺激。先前已经暗示了Mcl-1在数种细胞系中介导对Apo2L诱导的凋亡的敏感性(Henson等, J. Cell Biochem. 89:1177-1192 (2003); Taniguchi等, Cancer Res. 64: 3517-3524 (2004); Wirth等, Cancer Res. 65: 7393-7402 (2005); Kobayashi等, Gastroenterology 128: 2054-2065 (2005))。因此, 研究了zMcl-1a和zMcl-1b敲低对Apo2L诱导的外在凋亡途径的影响。

如实施例3(e)中所述进行了zMcl-1a和zMcl-1b的敲低。如实施例3(b)中所述使用以下引物序列克隆了斑马鱼Apo2L同系物zDL1b和其它TNF相关基因:

zDL1a正向: ACCATGATGGTCCCGGCGAACAGCCGC (SEQ ID NO: 113)

zDL1a反向: ACTTTACAGATCCAATCGGAAAGCTCC (SEQ ID NO: 114)

zDL1b正向: ATCATGGTGCAGCCTAAAAATCGT (SEQ ID NO: 115)

zDL1b反向: CCCTCAGAGGTCAAACAGGAAGGC (SEQ ID NO: 116)

zDL2正向: CACGCGATGGTCAGCATGACAAGC (SEQ ID NO: 117)

zDL2反向: TACTGACTAGCTCACCAGAAATGC (SEQ ID NO: 118)

zDL3正向: ACCATGACATCCAACCTTCCTATCGGT (SEQ ID NO: 119)

zDL3反向: AGTTTATTTAATCATGAATGCCCAA (SEQ ID NO: 120)

zFasL正向: ATGAGTGCTAACTTCGGCCACTCG (SEQ ID NO: 121)

zFasL反向: TCAGTGGATCTTAAAGAGGCCGAA (SEQ ID NO: 122)

zTNF1正向: GCAACCATGAAGCTTGAGAGTCGGGCGTTT (SEQ ID NO: 123)

zTNF1反向: TTTCGTTACAAACCAAACACCCCAAAGAA (SEQ ID NO: 124)

zTNF2正向: ATGGTGAGATACGAAACAACATTA (SEQ ID NO: 125)

zTNF2反向: ATTAAATCACAACGCGAACACCCCGAAGAA (SEQ ID NO: 126)

如实施例3(b)中所述生成了合成的zDL1b mRNA并将其注射入斑马鱼胚胎。

在野生型胚胎中, 斑马鱼Apo2L直向同系物zDL1b的异位表达对早期胚胎生存力的影响很小(图6B)。然而, 当将zMcl-1a和zMcl-1b的敲低与zDL1b的异位表达组合时, 胚胎迅速经受大量的凋亡性死亡(图6B)。该效应为zMcl-1a和zMcl-1b的情况所特有, 因为将zMcl-1a或zMcl-1b中任何一个的敲低与zB1p2联合没有提高对zDL1b诱导的凋亡的敏感性(图6B)。

用zDL1b之外的其它Apo2L/TNF相关分子获得了不同的效果(参见图6C)。例如, zDL1a异位表达与zMcl-1a和zMcl-1b双重翻译敲低联合导致了与zDL1b几乎一样强烈的斑马鱼胚胎存活的降低(图6C)。双重敲低还显著地降低了异位表达zDL3时的存活(图6C)。当zDL2、zTNF1或zTNF2表达与双重zMcl-1a/b翻译敲低配对时, 在存活百分比上获得了显著较少的降低(图6C)。单独的zFasL或与zMcl-1a和zMcl-1b的敲低组合的zFasL均未诱导凋亡。胚胎细胞上zTNF1、zTNF2和zFasL的受体的表达尚未确定。

因此, zMcl-1a和zMcl-1b共同保护了斑马鱼胚胎免于zDL1a和zDL1b

(Apo2L)诱导的凋亡，并且具有虽然小一些但仍然是显著的免于zDL3诱导的凋亡的保护作用。

<110> 健泰科生物技术公司 (Genentech, Inc.)

<120> 涉及 ZPA 多肽的方法和组合物

<130> P2322R1 PCT

<141> 2007-05-03

<150> US 60/797,703

<151> 2006-05-04

<160> 126

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 1

Met Ala Cys Glu Ala Ser Gln Asp Asp Gln Ile Gly Glu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ile Gly Val Val Arg Gln Glu Leu Met Glu Val Met Glu Val
20 25 30

Thr Glu Gly Asn Ala Ala Pro Pro Ala Leu Pro Glu Ala Lys Pro
35 40 45

Ile Ser Asn Ser Gln Asp Gln Ile Leu Val Gln Gln Leu Ala Asn
50 55 60

Thr Ile Lys Val Ile Gly Asp Lys Leu Asp Gln Asp Gln Ala Phe
65 70 75

Asn Asp Met Ile Asp Gly Leu Val Lys Val Ala Asp Lys Ser Ser
80 85 90

Phe Trp Lys Leu Val Glu Lys Val Phe Thr Asp Gly Gln Ile Asn
95 100 105

Trp Gly Arg Ile Ile Val Leu Phe Tyr Ser Val Gly Lys Leu Ser
110 115 120

Ala Lys Met Val Val Ala Arg Leu Pro Arg Ile Val Ser Asp Ile
125 130 135

Leu Ser Leu Ser Leu Asp Tyr Phe Lys Arg Asn Leu Leu Gln Trp
140 145 150

Ile Arg Thr Val Gly Gly Trp Met Asn Ser Ile Pro Ala Leu Ala
155 160 165

Cys Phe Ser Val Asp Gln Phe Ser Gly Ser Ser Met Arg Lys Tyr
170 175 180

Ser Pro Tyr Val Gly Val Val Phe Ala Phe Thr Gly Gly Leu Leu
185 190 195

Leu Gly Gly Phe Ile Val Ser Arg Phe Gln Lys Thr
200 205

<210> 2

<211> 624

<212> DNA

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 2

atggcttgtag aagcctcaca ggatgatcag attggagagg cactcttaat 50

aggggtagta aggcaggagc taatggaggt gatggaggtg actgaaggaa 100

atgcagctcc tccagctctt cctgaagcta aaccaataag caacagccag 150
gaccagattc tggttcagca gctggcgaac acaatcaaag tgatcggta 200
caaactcgac caggatcaag catttaacga catgatcgat ggcttagtaa 250
aggtagctga taaaagcagt ttctggaaac ttgtggaaaa ggtgttcaca 300
gatggccaga tcaactgggg cagaattatc gtgctgtttt attctgttg 350
aaaactgtca gccaaagatg tcgtcgctcg cctaccaga attgtttcag 400
atatattatc attaagtctt gattacttca aaaggaatct gttgcagtgg 450
attcgcacag taggaggatg gatgaacagt atccctgcac tggcctgttt 500
ctctgttgac caattttctg gttcttcaat gagaaaatat tctccttacg 550
ttggagtgtt gtttgccttc actgggtggc tactgctggg tggcttcac 600
gtctcgagat ttcagaaaac ctga 624

<210> 3

<211> 145

<212> PRT

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 3

Met	Glu	Asn	Thr	Ser	His	Asp	His	Gln	Asp	Asp	Ser	Ser	Thr	Leu
1				5					10					15
Asp	Glu	Lys	Glu	Arg	Ser	His	Leu	Lys	Gly	Thr	Ile	Lys	Asn	His
			20						25					30
Gly	Gln	His	Gln	Asp	Arg	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Ser	Pro	Gln	Gly
			35						40					45
Arg	Val	Arg	Leu	Tyr	Ser	Glu	Ser	Gln	Val	Tyr	Thr	Val	Ser	Arg
			50						55					60
Trp	Gln	Asp	Thr	Glu	Thr	Gln	Asp	Gly	Ala	Ser	Val	Glu	Glu	Asn
			65						70					75
Gly	Asp	Gly	Leu	Pro	Phe	Arg	Gly	Arg	Ser	Gln	Ser	Ala	Pro	Ala
			80						85					90
Ala	Leu	Trp	Lys	Ala	Lys	Lys	Tyr	Gly	Arg	Gln	Leu	Arg	Arg	Met
			95						100					105
Ser	Asp	Glu	Phe	Asp	Thr	Trp	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Val	Lys	Arg
			110						115					120
Ala	Asn	Ser	Gln	Lys	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Trp	Phe	Ser	Phe	Leu
			125						130					135
Trp	Ser	Pro	Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Arg	Glu					
			140						145					

<210> 4

<211> 438

<212> DNA

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 4

atggagaaca cctcgcatga ccatcaagat gattccagca ccttggatga 50
aaaagagaga tcacatctga aagggaacaat caagaacat ggacaacatc 100
aggatcgaac atcgccaac atttctctc aaggcggtgt gcggtcttat 150
tcggaatctc aagtgtatc agtcagccgc tggcaggaca cagagacca 200

ggatggagca tcggtggagg agaacggaga tggacticca ttcaggggtc 250
 gtcttcaatc agcacctgct gcactgtgga aagcaaaaaa gtatggccgt 300
 cagttgagga gaatgagcga tgaattcgac acatggctcg ataaagggga 350
 ggtcaagaga gcgaacagcc agaaacagac ctaccgagga tggttttcgt 400
 tcctctggag tcccaaagaa gaagagggca gagaatga 438

<210> 5

<211> 154

<212> PRT

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 5

Met	Val	Glu	Glu	Thr	Arg	Gln	Gln	Lys	Asn	Ala	Thr	Thr	Leu	Gln
1				5					10					15
Ala	Gly	Pro	Ala	Glu	Val	Asp	His	Ser	Asn	Leu	Tyr	Ala	Phe	Asn
				20					25					30
Met	Arg	Val	Thr	Gln	Thr	Ile	Gly	Arg	Gln	Leu	Ala	Gln	Ile	Gly
				35					40					45
Asp	Glu	Met	Asp	Asn	Lys	Trp	Arg	Gln	Glu	Pro	Pro	Val	Pro	Trp
				50					55					60
Gln	Asn	Leu	Asn	Phe	Gly	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Val	Leu	Ser	Arg	Arg
				65					70					75
Val	Phe	Ser	Gly	Arg	Ile	Leu	Ala	Asn	Leu	Trp	Gly	Ser	Lys	Ile
				80					85					90
Met	Pro	Ile	Phe	Arg	Thr	Ser	Trp	Leu	Leu	Pro	Gln	Leu	Gln	Asn
				95					100					105
Gly	Cys	Gln	Glu	Ala	Arg	Lys	Trp	Ala	Ala	Trp	Val	Ser	Asn	Leu
				110					115					120
His	Val	Ser	Asp	Trp	Ser	Arg	Ser	Thr	Thr	Tyr	Thr	Leu	Ala	Ser
				125					130					135
Ala	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Leu	Val	Asn	Trp	Asn
				140					145					150

Glu Tyr Glu Gly

<210> 6

<211> 465

<212> DNA

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 6

atggtggaag aaactagaca gcagaaaaac gccacaaccc tgcaggctgg 50
 acctgctgag gttgaccaca gtaatctcta tgcattcaat atgagagtca 100
 cccagactat cggacgacag ctggctcaaa taggggacga aatggacaat 150
 aaatggcgcc aagaaccgcc tgtcccatgg cagaacctga atttcgggat 200
 ttatccttat gtcctaagta ggagagtgtt ctctggaaga atcctcgcta 250
 atctttgggg gtctaagatt atgccgatat tcaggacgtc ctggttgctt 300
 ccacagcttc aaaatggctg tcaggaggct agaaagtggg cagcttgggt 350
 gtccaacttg catgtttctg actggtctcg cagcactaca tacaccctgg 400

catctgcttt actactgggtc actgtgtcta tcttccttgt aaactggaat 450

gagtatgaag gctga 465

<210> 7

<211> 266

<212> PRT

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 7

Met Thr Leu Cys Phe Leu Asn Thr Ser Ala Ala Leu Ala Asp Glu
1 5 10 15

Glu Gly Asp Pro Leu Pro Thr Ala Leu Ile Asn Ser Leu Asp Leu
20 25 30

Ala Val Asn Gln Pro Val Ser Gly Ser Gly Phe Cys Lys Leu Lys
35 40 45

Leu Ala Asn Glu Gln Thr Val Val Thr Leu Gln Gln Leu Ala Thr
50 55 60

Arg Glu Pro Met Gly Asp Glu Glu Glu Val Gln Gly Phe Gln Ser
65 70 75

Thr Asp Pro His Gly Thr Thr Val Cys Gly Met Ala Arg Pro Glu
80 85 90

Met Glu Ser Arg Val Asp Glu His Asn Ser Gly Thr Pro Asn Ser
95 100 105

Cys Arg Met Glu Val Leu Arg Gln Asp Ala Trp Pro Asn Gly Ser
110 115 120

Ile Ile Gln Pro Cys His Arg Arg Arg Thr Ile Ala Thr Gln Thr
125 130 135

Ser Thr Leu Ser Ala Pro Leu Pro His Ile Pro Ser His Asp Ala
140 145 150

Phe Ser Leu Asp Ser Val Gln Gln Gln Asp Ser Leu Leu Arg Asp
155 160 165

Asn Ser Gly Thr Glu Gln Glu Val Ser Arg Pro Leu Pro Leu Pro
170 175 180

Asp Leu Leu Ala Asp Asn Gln Ser Ser Ser Glu Glu Ser Thr Ser
185 190 195

Ser Ser Ser Ser Thr Ala Glu Glu Asp Pro Thr Leu Glu Glu Gln
200 205 210

Ala Val Glu Arg Val Ala Val Gln Leu Arg Thr Ile Gly Asp Glu
215 220 225

Met Asn Ala Val Phe Leu Gln Arg Asn Ala Val Pro His Trp Gln
230 235 240

Asn Trp Arg Gly Leu Tyr Arg Gly Leu Met Ala Leu Val Ser Asp
245 250 255

Thr Ile Asn Ala Leu Tyr Gln His Gly Leu Arg
260 265

<210> 8

<211> 801

<212> DNA

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 8

atgactttgt gctttttaaa cacaagcgca gcgctcgctg atgaagaggg 50

cgatcctctg cccactgctc tgataaacag tcttgacctg gcagtgaatc 100
 agccgggtgtc aggtttctggc ttttgtaaac tcaaactggc caatgagcaa 150
 actgtttgiga ctctccaaca attagcaaca agagaaccca tgggggatga 200
 agaggagggtg cagggctttc agagcacaga cccacacggg acaactgtat 250
 gtggaaatggc ccgaccagag atggaaagca gaggggacga acataactct 300
 ggcacgccga acagctgcag gatggagggtg ctgcgtcagg acgcctggcc 350
 aaatggcagc atcatccagc cctgccatcg acgccgaacc attgccactc 400
 aaaccagcac tcctcttgca ccaactgccc acatcccctc acatgatgcc 450
 ttcagcttgg acagcgtcca gcagcaggac agtctactca gggacaattc 500
 aggaacagaa caggaagigt ccaggcctct tcctctgcca gatctgctag 550
 cagacaacca gagctcctca gaggagtcca cgtccagcag cagctcgacc 600
 gctgaggagg accccacact ggaggagcag gctgtggaga ggggtggcgt 650
 acaactgagg acaattgggg acgagatgaa cgctgtcttc cticagagga 700
 atgccgtccc gcaactggcag aactggagag gcctgtaccg cgggctcatg 750
 gcgctggtct cggacacat caatgccctc taccagcacg gcctcagatg 800
 a 801

<210> 9

<211> 185

<212> PRT

<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 9

Met	Asp	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Gln	Leu	Pro	Arg	Cys	Cys	Glu	Thr	1	5	10	15
Pro	Leu	Arg	Asn	Lys	Arg	Ser	Glu	Lys	Arg	Asp	Ala	His	Gly	Gly	20	25	30	
Asp	Val	Gly	Gln	Thr	Ala	His	Arg	His	Ala	Ser	Thr	Gln	Thr	Ala	35	40	45	
Gly	Ser	Val	Leu	Asn	Ser	Ala	Arg	Asp	Ala	Asp	Met	Ala	Pro	Phe	50	55	60	
Gln	Gly	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Leu	Cys	Arg	Val	Val	Gly	65	70	75	
Ala	Arg	Thr	Ala	Phe	Arg	Ala	Pro	Cys	Gly	Thr	Gly	Gly	Leu	Val	80	85	90	
Ser	Leu	Thr	Met	Gly	Pro	Gly	Ala	Arg	Gly	Gly	Pro	Arg	Ala	Leu	95	100	105	
Phe	His	Gly	Asn	Ala	Gly	Phe	Arg	Ala	His	Phe	Pro	Ala	Leu	Phe	110	115	120	
Glu	Pro	Ala	Leu	Asp	Gly	Leu	Gln	Asn	Ala	Glu	Gln	Arg	Glu	Gln	125	130	135	
Asp	Glu	Gly	Arg	Pro	Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Asp	Arg	Asp	Ala	Gly	140	145	150	
Ile	Ser	Val	Glu	Val	Gln	Ile	Gly	Arg	Lys	Leu	Arg	Glu	Met	Gly	155	160	165	
Asp	Gln	Phe	Gln	Gln	Glu	His	Leu	Gln	Leu	Ile	Ile	Leu	Asp	Glu				

170 175 180

Thr Arg Tyr Arg Ile
185

<210> 10
<211> 558
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 10
atggatgatg aggaggatga acagcttcct cgctgctgtg aaacgccgct 50
aagaaacaag cgctcagaga agagagacgc ccacggtgga gacgtgggac 100
aaacagctca cagacacgca tccacacaga ctgctggctc tgtcctcaat 150
tcagcgagag acgcagatat ggcaccattc cagggctcac agagagaagc 200
atcatctctt tgcagagttg tgggtgctag gactgcattc agggctccct 250
gtggaactgg gggccttgtg tcacttacta tgggccccgg agcccggggt 300
gggccaagag cactttttca tggaaacgct ggatttcgtg cacacttccc 350
tgcgctgttc gaaccgccc tggatggctt acaaaacgcc gaacagagag 400
agcaggacga aggcagacca gaagaaaaag aagaggatcg cgacgcaggg 450
attagcgtgg aggttcagat tggacgtaaa ttacgtgaaa tgggggatca 500
gtttcagcaa gagcatcttc agctgattat attagatgaa accagataca 550
ggatttaa 558

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 11
Met Glu Asp Cys Leu Ala His Leu Gly Glu Lys Val Ser Gln Glu
1 5 10 15

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 12
Ile Glu Asp Ser Leu Ala Val Leu Gly Asp Arg Val Ser Arg Asp
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 13
Phe Asp Leu Glu Leu Lys Ala Leu Val Gln Asp Val Asn Glu Cys
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 14
Ile Pro Glu Cys Ile Lys Gln Val Asp Gln Glu Leu Asn Gly Lys
1 5 10 15

<210> 15

```

<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 15
Ile Val Glu Leu Leu Lys Tyr Ser Gly Asp Gln Leu Glu Arg Lys
 1             5             10             15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 16
Ala Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val Gln Arg Asn
 1             5             10             15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 17
Val Leu Ser Thr Met Arg Arg Val Val Asp Asn Leu Ala Val Lys
 1             5             10             15

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 18
Ala Ile Pro Thr Met Lys Arg Val Val Asp Asn Ile Leu Val Lys
 1             5             10             15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 19
Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp Arg Ser
 1             5             10             15

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 20
Ile Gly Arg Gln Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp Asn Lys
 1             5             10             15

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 21
Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser
 1             5             10             15

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 22
Leu Ser Glu Cys Leu Lys Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser Asn
 1             5             10             15

<210> 23

```

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 23
 Leu Ala Gln Cys Leu Gln Gln Ile Gly Asp Glu Leu Asp Gly Asn
 1 5 10 15

 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 24
 Leu Ala Asn Thr Ile Lys Val Ile Gly Asp Lys Leu Asp Gln Asp
 1 5 10 15

 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

 <400> 25
 Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
 1 5 10 15

 <210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 26
 Ile Gly Gln Lys Leu Gln Leu Ile Gly Asp Gln Phe Tyr Gln Glu
 1 5 10 15

 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

 <400> 27
 Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg Arg
 1 5 10 15

 <210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

 <400> 28
 Val His Leu Thr Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg
 1 5 10 15

 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

 <400> 29
 Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe Asn Ala Tyr
 1 5 10 15

 <210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 30
 Val Ala Arg Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe Asn Arg Leu
 1 5 10 15

 <210> 31

```

<211> 15
<212> PRT
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 31
Val Ala Val Gln Leu Arg Thr Ile Gly Asp Glu Met Asn Ala Val
  1             5             10             15

<210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 32
Cys Ala Gln Gln Leu Arg Asn Ile Gly Asp Leu Leu Asn Trp Lys
  1             5             10             15

<210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 33
Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val Asp Ser
  1             5             10             15

<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 34
Tyr Gly Gln Gln Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Asp Lys Gly
  1             5             10             15

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 35
Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln
  1             5             10             15

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 36
Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu Phe Glu Leu Arg
  1             5             10             15

<210> 37
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 37
Leu His Gln Ala Met Arg Ala Ala Gly Asp Glu Phe Glu Thr Arg
  1             5             10             15

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 38
Val Lys Glu Ala Leu Arg Asp Ser Ala Asn Glu Phe Glu Leu Arg
  1             5             10             15

<210> 39

```

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 39
 Leu Tyr Arg Val Leu Arg Asp Ala Gly Asp Glu Ile Glu Arg Ile
 1 5 10 15

 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

 <400> 40
 Thr Ala Ala Arg Leu Lys Ala Leu Gly Asp Glu Leu His Gln Arg
 1 5 10 15

 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

 <400> 41
 Val Cys Ala Val Leu Leu Arg Leu Gly Asp Glu Leu Glu Met Ile
 1 5 10 15

 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 42
 Val Ser Val Val Leu Leu Lys Leu Gly Asp Glu Leu Glu Cys Met
 1 5 10 15

 <210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 43
 Met Ala Ala Glu Leu Ile Arg Ile Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ser
 1 5 10 15

 <210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

 <400> 44
 Thr Lys Glu Ser Leu Ala Gln Thr Ser Ser Thr Ile Thr Glu Ser
 1 5 10 15

 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 45
 Glu Ala Glu Ala Val Ala Arg Ile Ser Asp Trp Ser Ser Arg Pro
 1 5 10 15

 <210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

 <400> 46
 Leu Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Val Ser
 1 5 10 15

 <210> 47

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 47
 Val Ala Leu Arg Leu Ala Cys Ile Gly Asp Glu Met Asp Leu Cys
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 48
 Ile Gly Arg Gln Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp Asn Lys
 1 5 10 15

<210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 49
 Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp Arg Ser
 1 5 10 15

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 50
 Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp His Asn
 1 5 10 15

<210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 51
 Met Ala Ala Glu Leu Ile Arg Ile Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ser
 1 5 10 15

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 52
 Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 53
 Ile Ala Arg Lys Leu Gln Cys Ile Ala Asp Gln Phe His Arg Leu
 1 5 10 15

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 54
 Ile Gly Gln Lys Leu Gln Leu Ile Gly Asp Gln Phe Tyr Gln Glu
 1 5 10 15

<210> 55

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 55
 Ile Gly Arg Lys Leu Arg Glu Met Gly Asp Gln Phe Gln Gln Glu
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 56
 Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Val Asp Ser
 1 5 10 15

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 57
 Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Glu Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 58
 Tyr Gly Gln Gln Leu Arg Arg Met Ser Asp Glu Phe Asp Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 59
 Cys Ala Thr Gln Leu Arg Arg Phe Gly Asp Lys Leu Asn Phe Arg
 1 5 10 15

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 60
 Glu Cys Ala Gln Leu Arg Arg Ile Gly Asp Lys Val Asn Leu Arg
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 61
 Cys Ala Gln Gln Leu Arg Asn Ile Gly Asp Leu Leu Asn Trp Lys
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 62
 Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln
 1 5 10 15

<210> 63

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

 <400> 63
 Ile Gly Ala Gln Leu Arg Arg Met Ala Asp Asp Leu Asn Ala Gln
 1 5 10 15

 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 64
 Val Ala Val Gln Leu Arg Thr Ile Gly Asp Glu Met Asn Ala Val
 1 5 10 15

 <210> 65
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 65
 gggggtgtt gtaaagtaca gtgg 24

 <210> 66
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 66
 tcaggttttc tgaaatctcg agacg 25

 <210> 67
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 67
 actgtactga gacacatcac agcaaca 27

 <210> 68
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 68
 tcagccttca tactcattcc ag 22

 <210> 69
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 69
 ctaactgagt actcatctaa tgaattaaca ccgct 35

 <210> 70
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 70
 tcatctgagg ccgtgctggt agag 24

 <210> 71
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 斑马鱼 (Danio rerio)

 <400> 71
 atggatgagg acgaggatga t 21

<210> 72
<211> 19
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 72
tcacctgcgg ttctctctg 19

<210> 73
<211> 22
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 73
atggatgatg aggaggatga ac 22

<210> 74
<211> 26
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 74
ttaaattcctg tatctggttt catcta 26

<210> 75
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 75
cttcacacaac acttcactg gatac 25

<210> 76
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 76
ttcactgtca gtcactctgc ggggc 25

<210> 77
<211> 37
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 77
gccgaattcc accatgtctt actataaccg agaactg 37

<210> 78
<211> 36
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 78
ggcctcgagt cacaggcgtt tctgtgcaat gagtcc 36

<210> 79
<211> 18
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 79
atggctaacg aaattagc 18

<210> 80
<211> 21
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 80
tcacttctga gcaaaaaagg c 21

<210> 81
<211> 19
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 81
atggagatgt tgcgccgct 19

<210> 82
<211> 27
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 82
tcatttctct ctacgcaggt agaaaac 27

<210> 83
<211> 19
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 83
atgaacgtgt tcgcgcgct 19

<210> 84
<211> 23
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 84
gcgcaagtct acttcgtcag gta 23

<210> 85
<211> 19
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 85
aaggggctgc agctggacg 19

<210> 86
<211> 22
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 86
agcggggctc aggtcagtac ag 22

<210> 87
<211> 20
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 87
catcttcgat tgatttgatt 20

<210> 88
<211> 22
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 88
atagtttgaa agttctgaat cc 22

<210> 89
<211> 19
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 89
atgtcctgtt ggttgaggg 19

<210> 90
<211> 21
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 90
tcagcgtact aagaggaagg t 21

<210> 91
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 91
gcctaaaatc caaactcaga gccat 25

<210> 92
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 92
tgtcgttggt tcttccagcg aacat 25

<210> 93
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 93
aggttggtgc tcgttctccg atgtc 25

<210> 94
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 94
gtcatagcta atttcgtag ccatg 25

<210> 95
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 95
tgaaaataag cgaactgaag aagac 25

<210> 96
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 96
atttttcggc taaaacgtgt atggg 25

<210> 97
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 97
ggtcaaagtt cctgttgaag tccat 25

<210> 98
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 98
acacatcatc ctcgtcctca tccat 25

<210> 99
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 99
ctttcttcgc catttcagca agttt 25

<210> 100
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 100
tgctttccat ctctggtcgg gccat 25

<210> 101
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 101
ctacaaacaa ggacacaatg gtgga 25

<210> 102
<211> 23
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 102
gcgccattgc ttgcaagaa ttg 23

<210> 103
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 103
cctcttacct cagttacaat ttata 25

<210> 104
<211> 21
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 104
tgcgttcgtc tctgtagatg t 21

<210> 105
<211> 19
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 105
gcctgtggag tgacactga 19

<210> 106
<211> 35
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 106
tgtgtgtgtg tgtagtttc ttttgacagt atttg 35

<210> 107
<211> 21
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 107
cgaacctgtg acagaaactt g 21

<210> 108
<211> 19
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 108
ctgcgcgcac tctactaca 19

<210> 109
<211> 25
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 109
cggtttgctc tttcttcgcc atttc 25

<210> 110
<211> 22
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 110
gaacacacgg gttacaaaag ac 22

<210> 111
<211> 24
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 111
gaaaattccc agagtctgta agtg 24

<210> 112
<211> 21
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 112
acgagtgcag gcgctctcct t 21

<210> 113
<211> 27
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 113
accatgatgg tcccggcgaa cagccgc 27

<210> 114
<211> 27
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 114
actttacaga tccaatcgga aagctcc 27

<210> 115
<211> 24
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 115
atcatgggtgc agcctaataaa tcgt 24

<210> 116
<211> 24
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 116
ccctcagagg tcaaacagga aggc 24

<210> 117
<211> 24
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 117
cacgcgatgg tcagcatgac aagc 24

<210> 118
<211> 24
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 118
tactgactag ctcaccagaa atgc 24

<210> 119
<211> 27
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 119
accatgacat ccaaccttcc tatcggt 27

<210> 120
<211> 27
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 120
agtttattta atcatgaatg ccccaaa 27

<210> 121
<211> 24
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 121
atgagtgccta acttcggcca ctgc 24

<210> 122
<211> 24
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 122
tcagtggatc ttaaagaggc cgaa 24

<210> 123
<211> 30
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 123
gcaaccatga agcttgagag tcgggcgttt 30

<210> 124
<211> 30
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 124
tttcgttcac aaaccaaaca ccccaaagaa 30

<210> 125
<211> 24
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 125
atggtgagat acgaaacaac atta 24

<210> 126
<211> 30
<212> DNA
<213> 斑马鱼 (Danio rerio)

<400> 126
attaaatcac aacgcgaaca ccccgaaaga 30

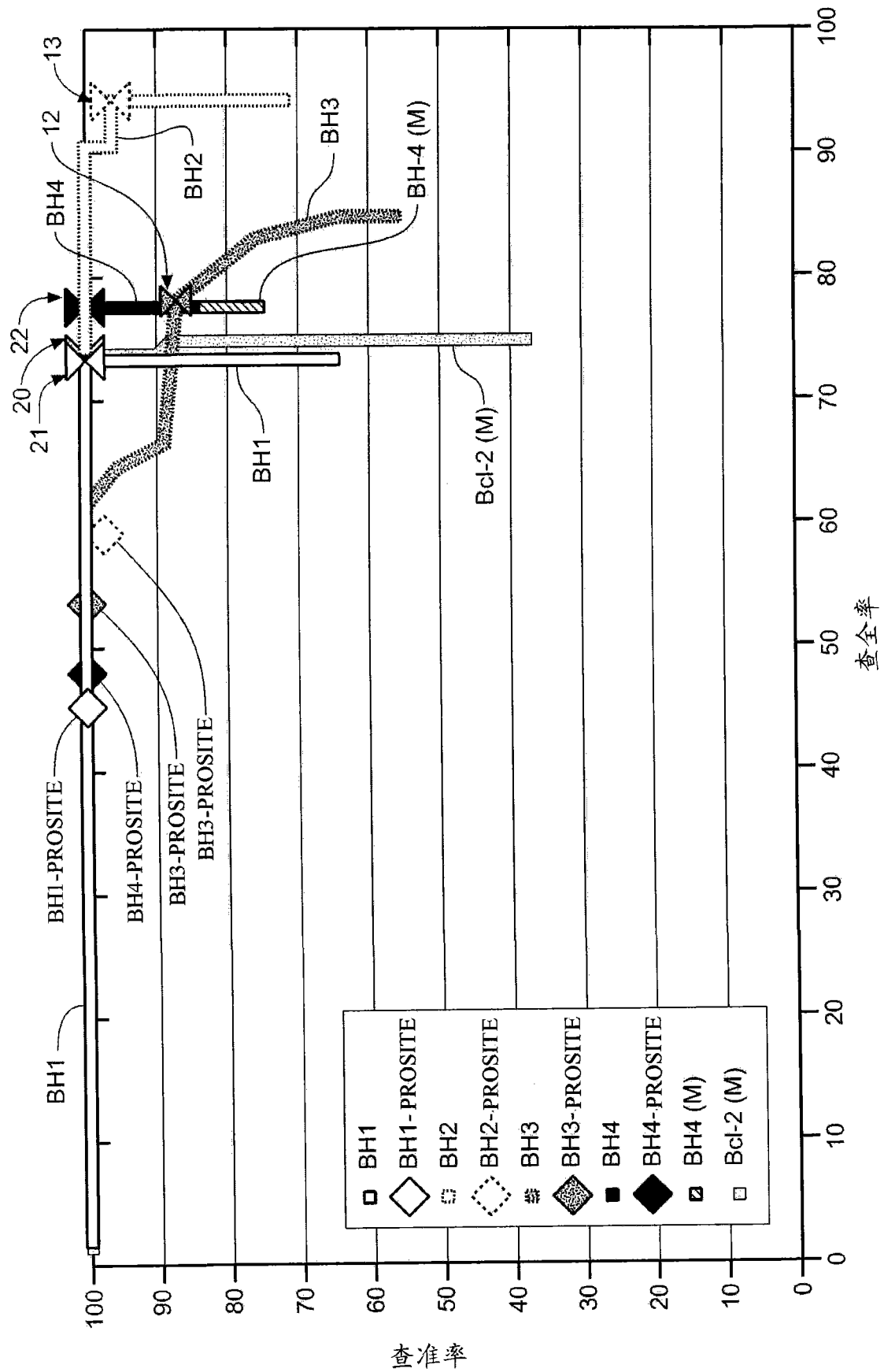


图 1

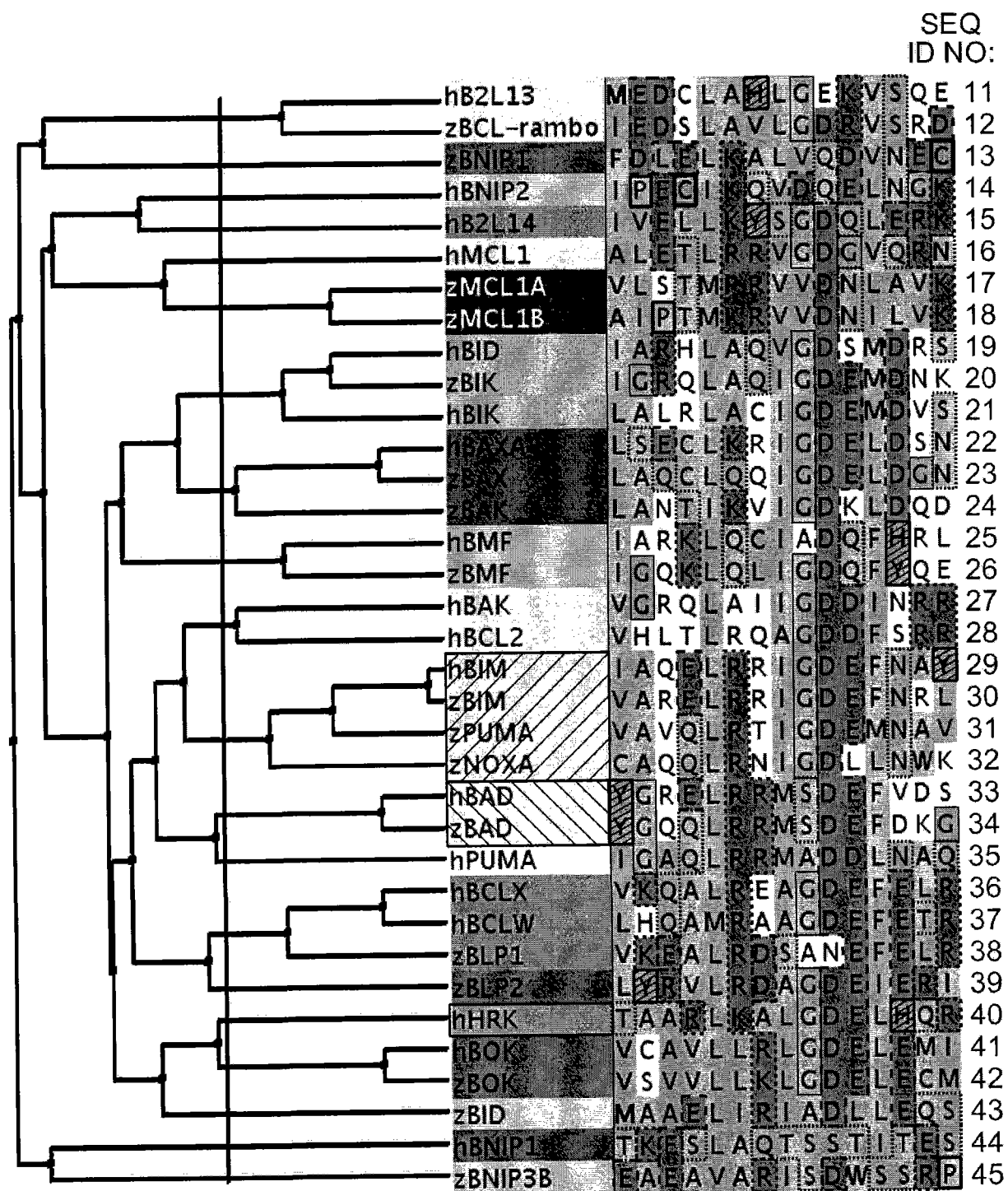


图 2

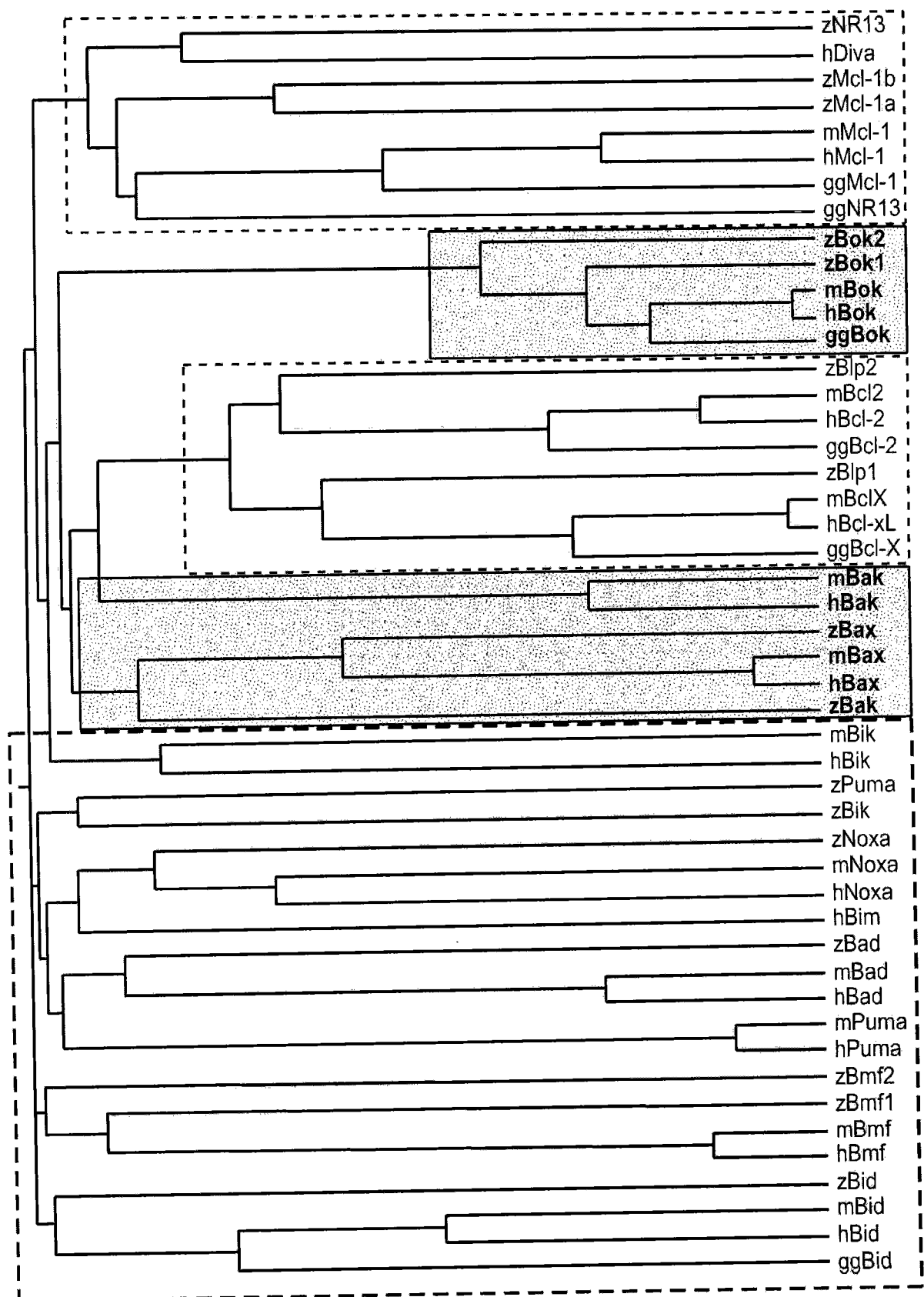


图 3A

SEQ ID NO:

hBik	L	A	L	R	L	A	C	I	G	D	E	M	D	V	S	46
mBik	V	A	L	R	L	A	C	I	G	D	E	M	D	L	C	47
zBik	I	G	R	Q	L	A	Q	I	G	D	E	M	D	N	K	48
hBid	I	A	R	H	L	A	Q	V	G	D	S	M	D	R	S	49
mBid	I	A	R	H	L	A	Q	I	G	D	E	M	D	H	N	50
zBid	M	A	A	E	L	I	R	I	A	D	L	L	E	Q	S	51
hBmf	I	A	R	K	L	Q	C	I	A	D	Q	F	H	R	L	52
mBmf	I	A	R	K	L	Q	C	I	A	D	Q	F	H	R	L	53
zBmf1	I	G	Q	K	L	Q	L	I	G	D	Q	F	Y	Q	E	54
zBmf2	I	G	R	K	L	R	E	M	G	D	Q	F	Q	Q	E	55
hBad	Y	G	R	E	L	R	R	M	S	D	E	F	V	D	S	56
mBad	Y	G	R	E	L	R	R	M	S	D	E	F	E	G	S	57
zBad	Y	G	Q	Q	L	R	R	M	S	D	E	F	D	K	G	58
hNoxa	C	A	T	Q	L	R	R	F	G	D	K	L	N	F	R	59
mNoxa	E	C	A	Q	L	R	R	I	G	D	K	V	N	L	R	60
zNoxa	C	A	Q	Q	L	R	N	I	G	D	L	L	N	W	K	61
hPuma	I	G	A	Q	L	R	R	M	A	D	D	L	N	A	Q	62
mPuma	I	G	A	Q	L	R	R	M	A	D	D	L	N	A	Q	63
zPuma	V	A	V	Q	L	R	T	I	G	D	E	M	N	A	V	64

图 3B

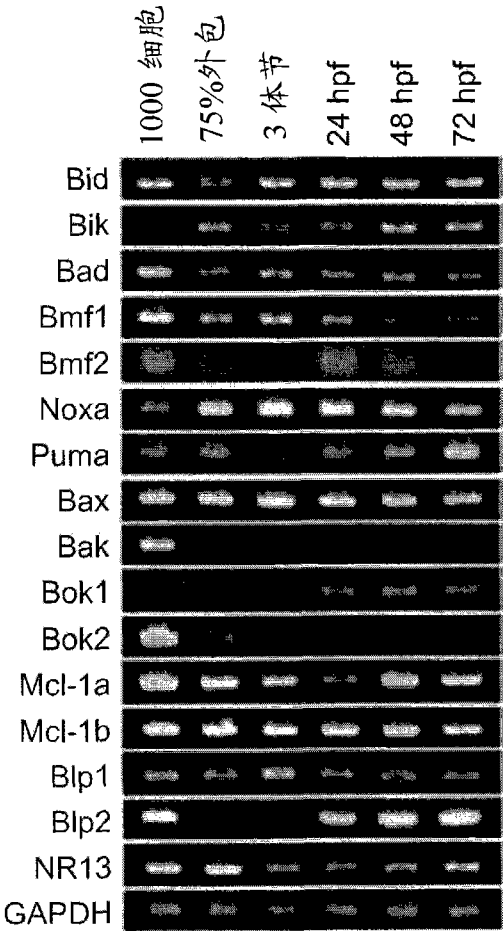


图 3C

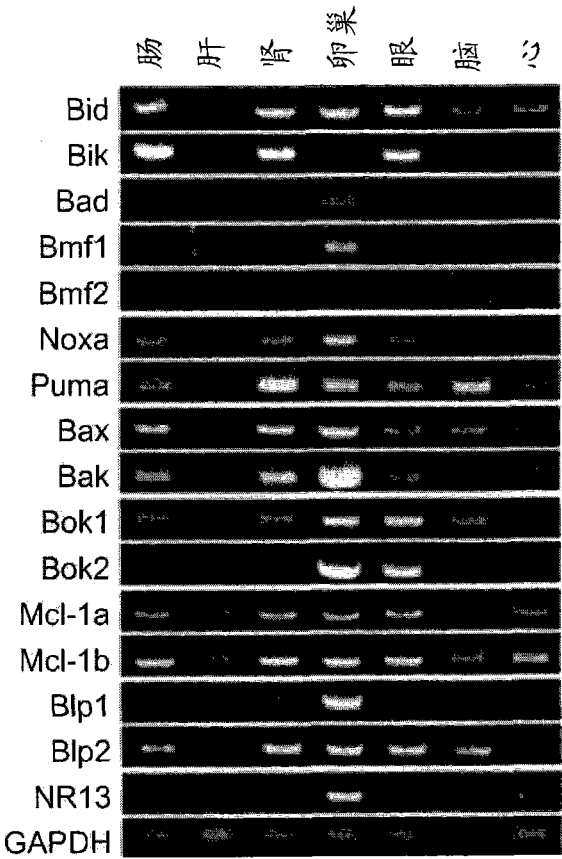


图 3D

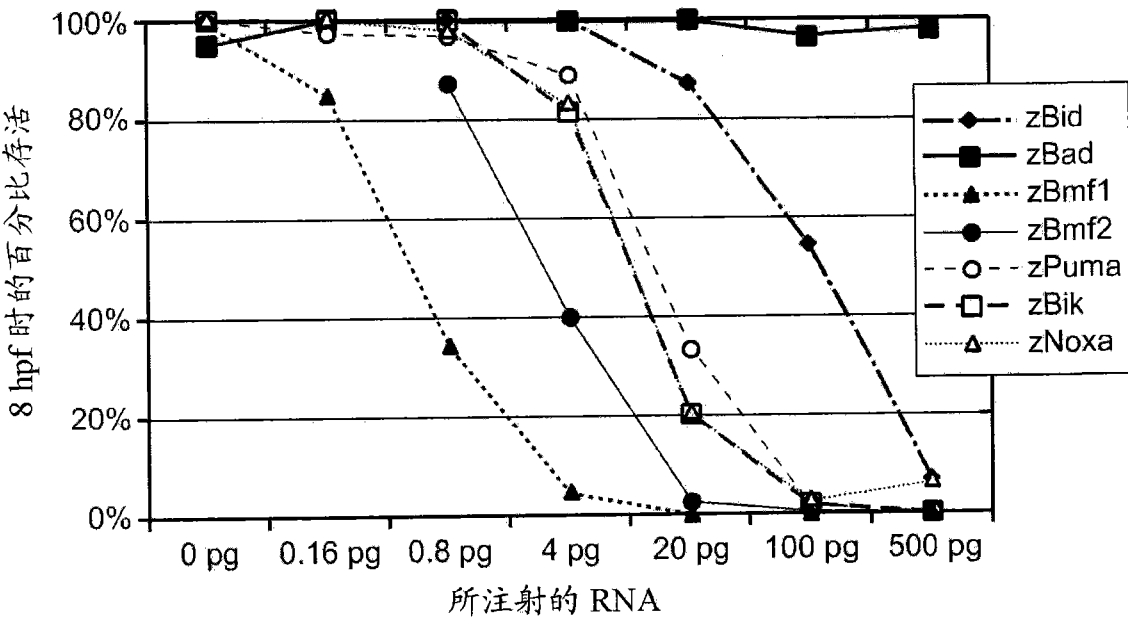


图 4A

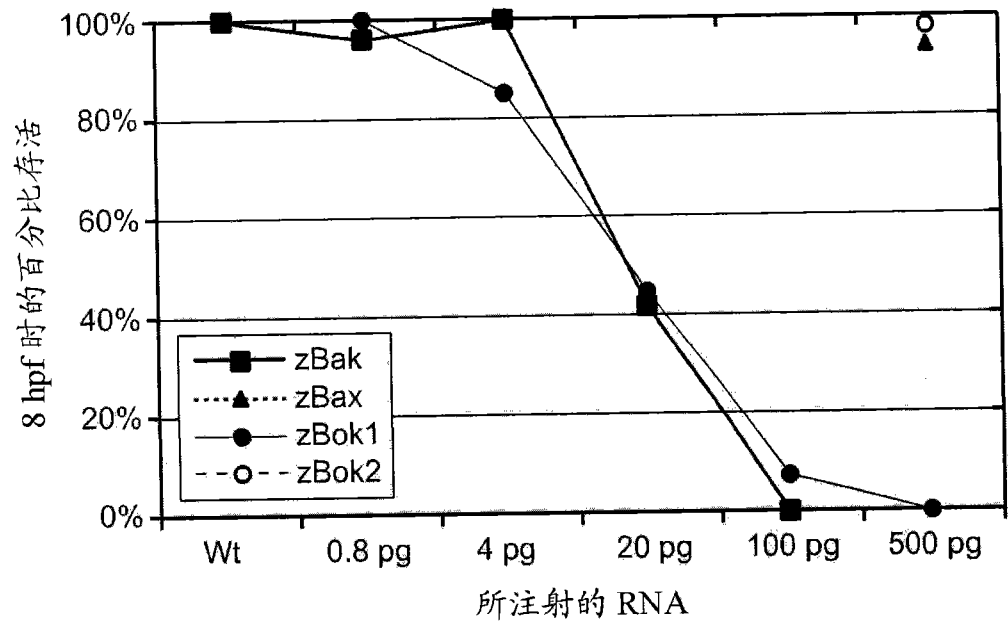


图 4B

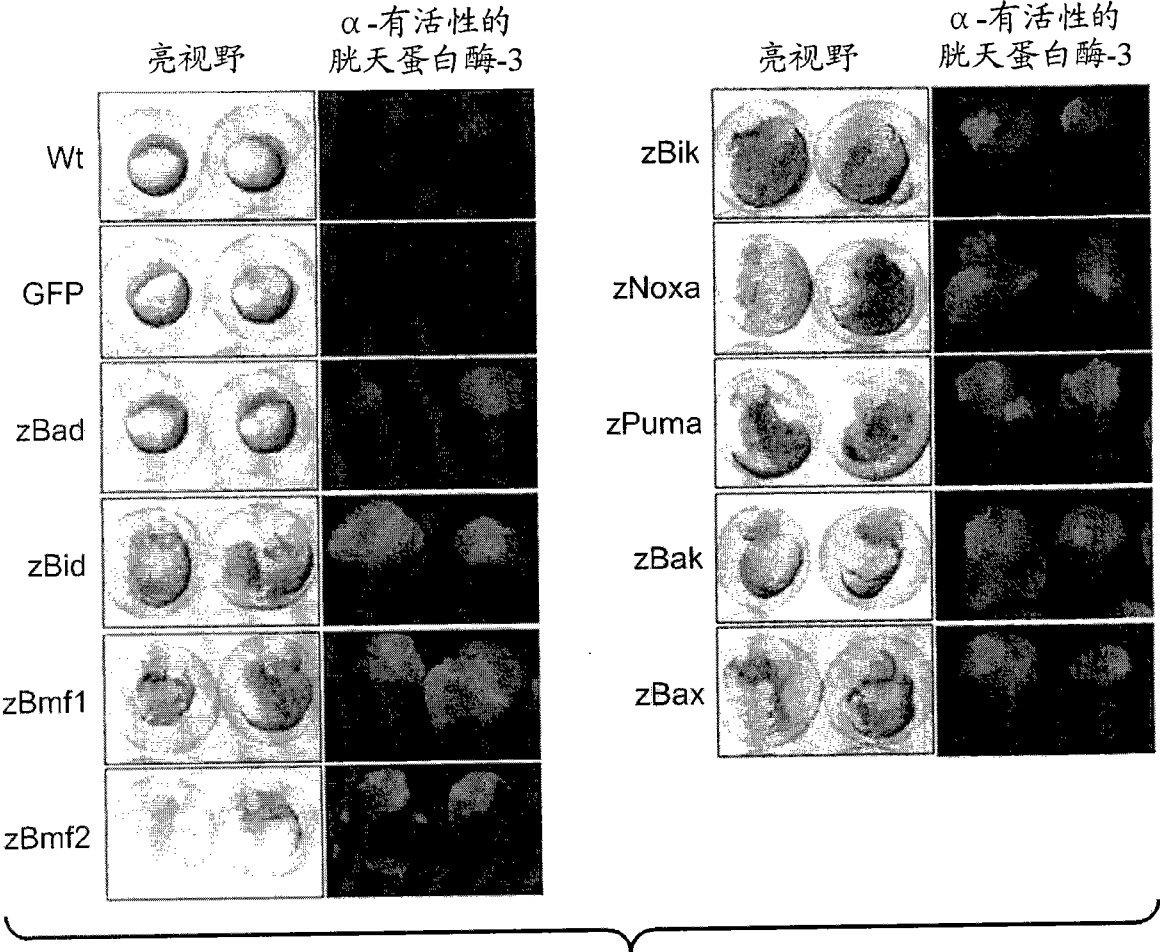


图 4C

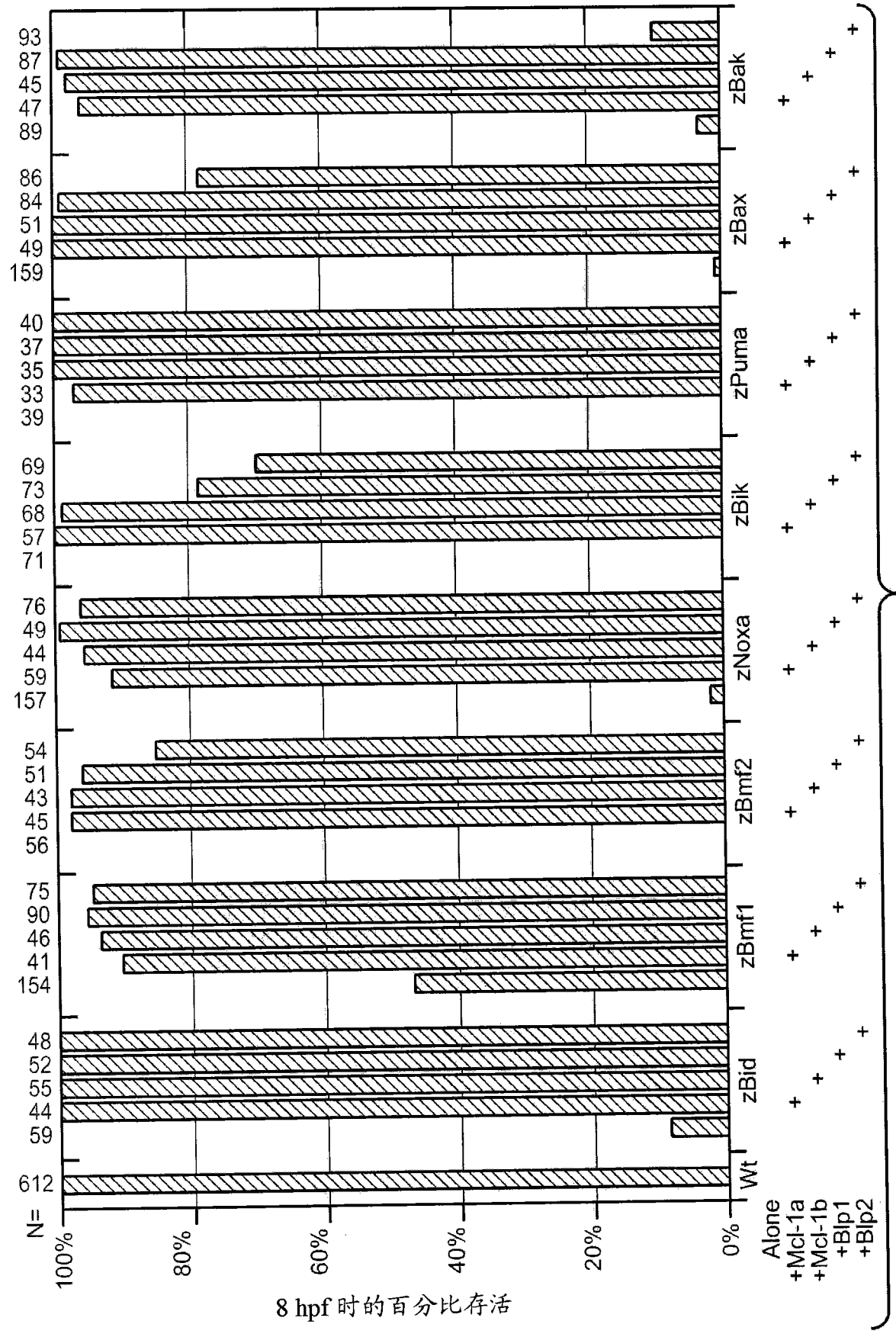


图 4D

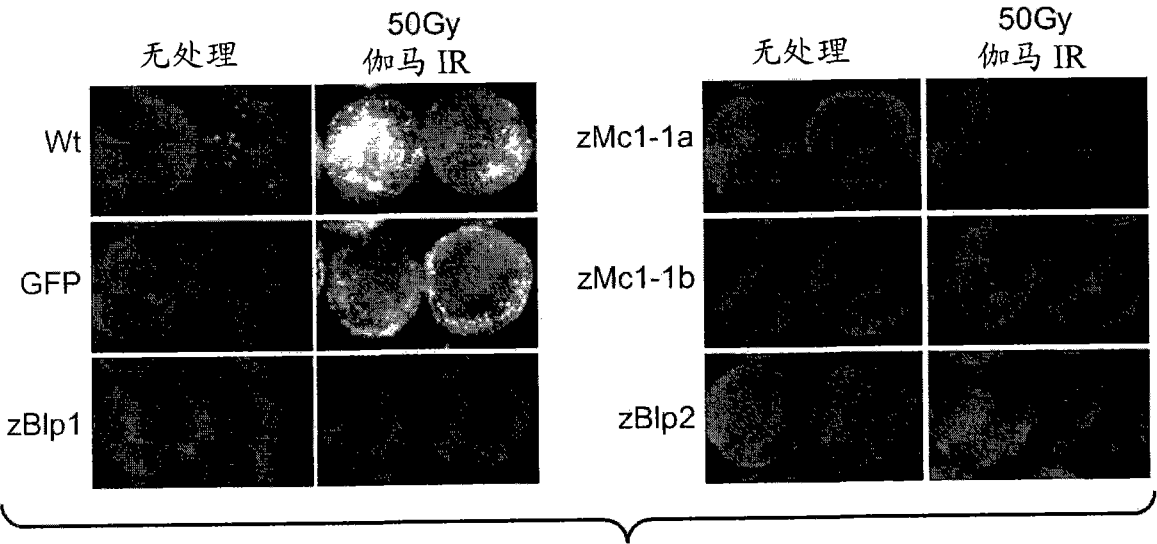


图 5A

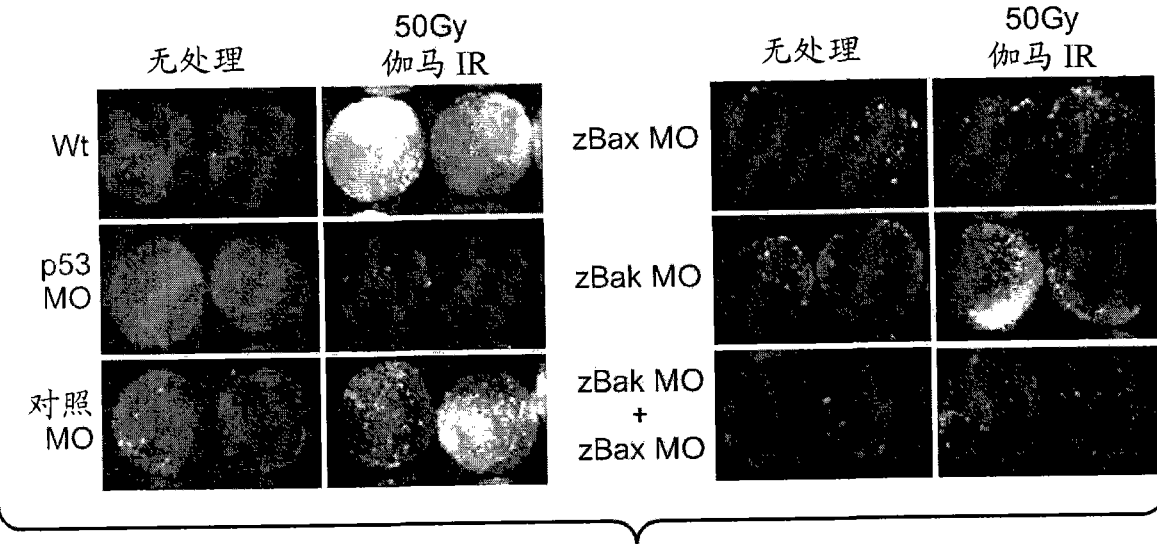


图 5B

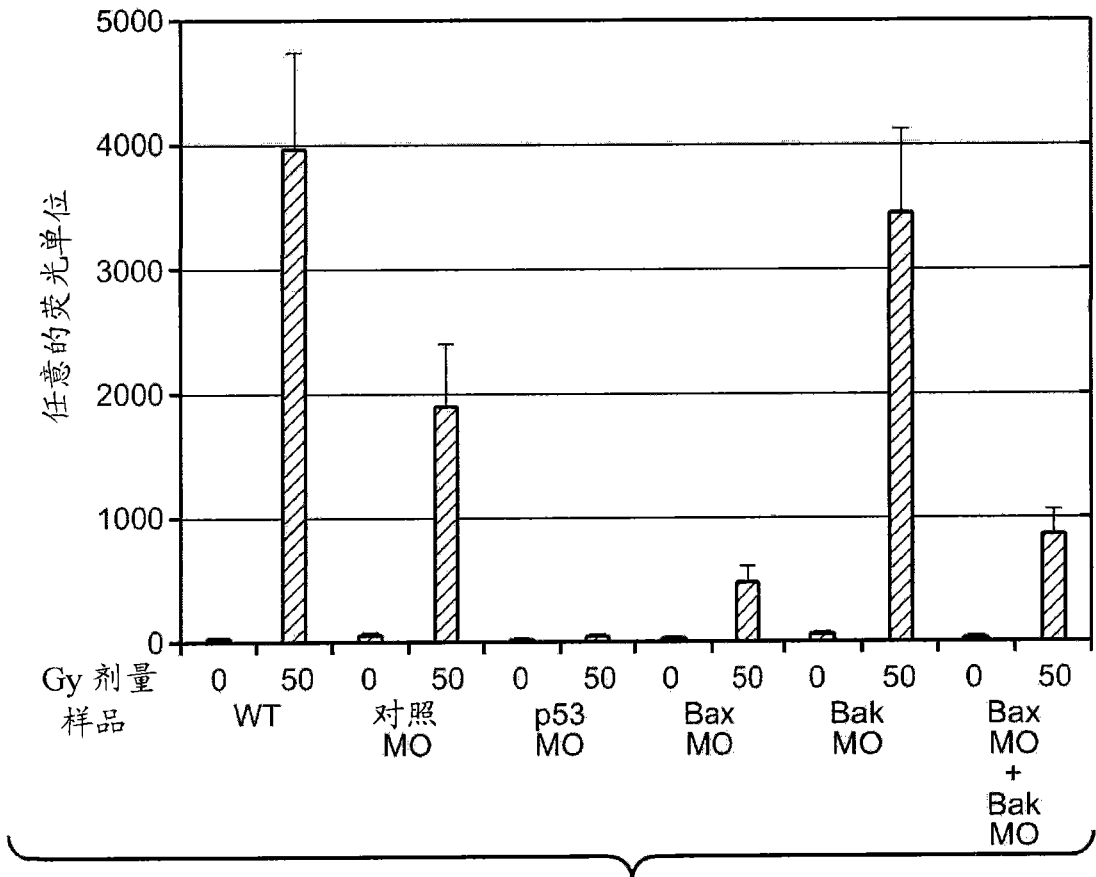


图 5C

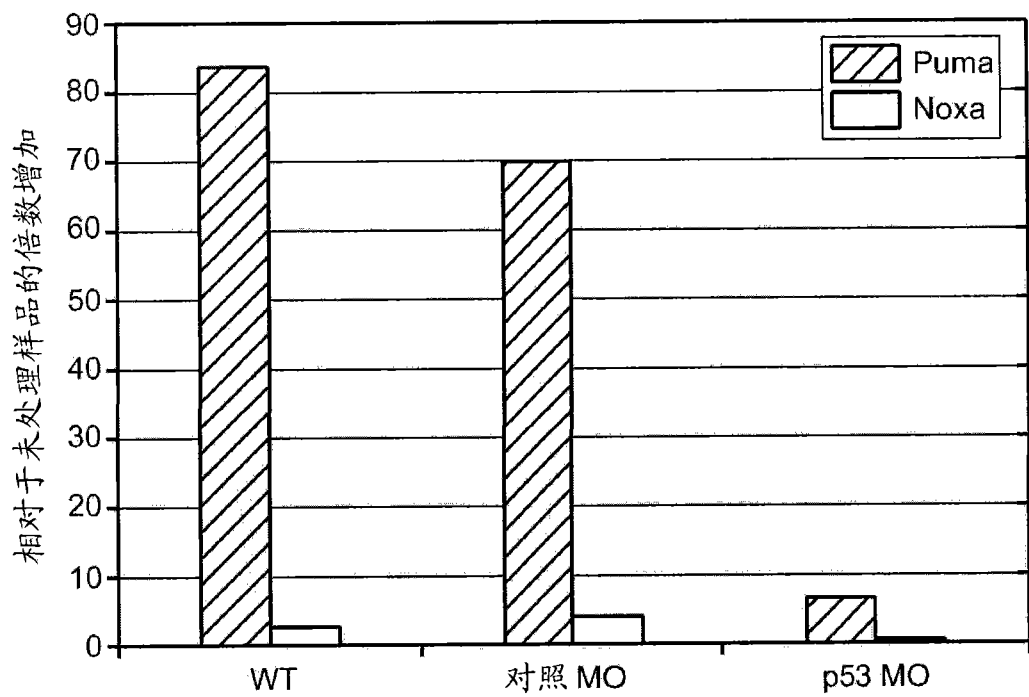


图 5F

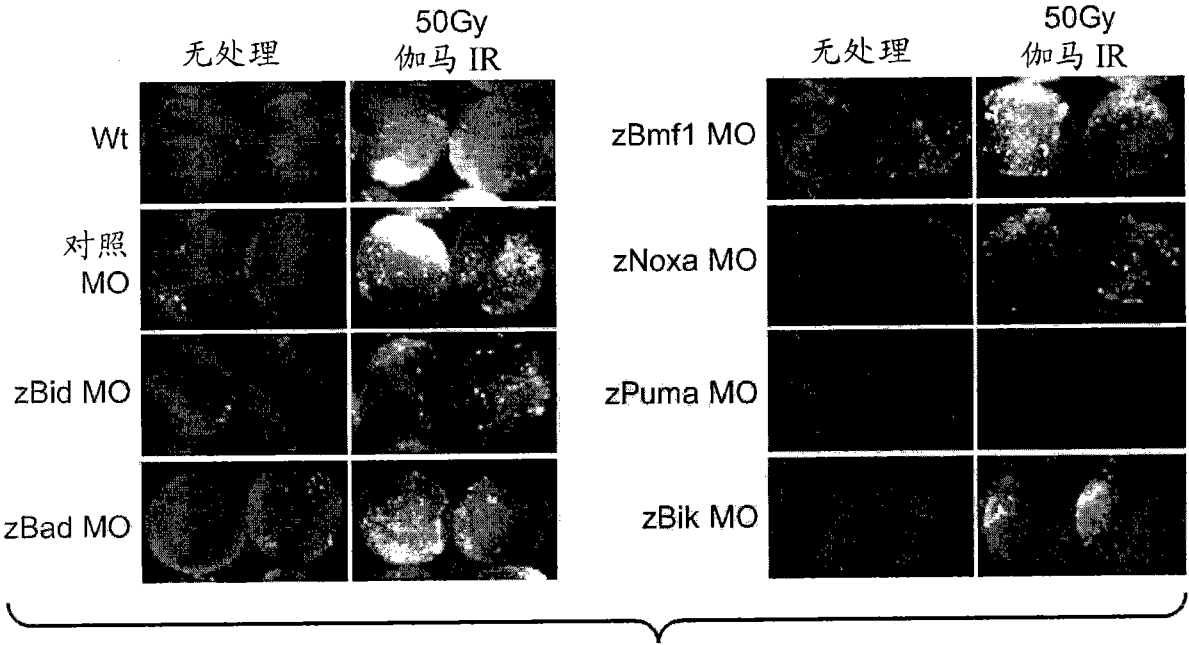


图 5D

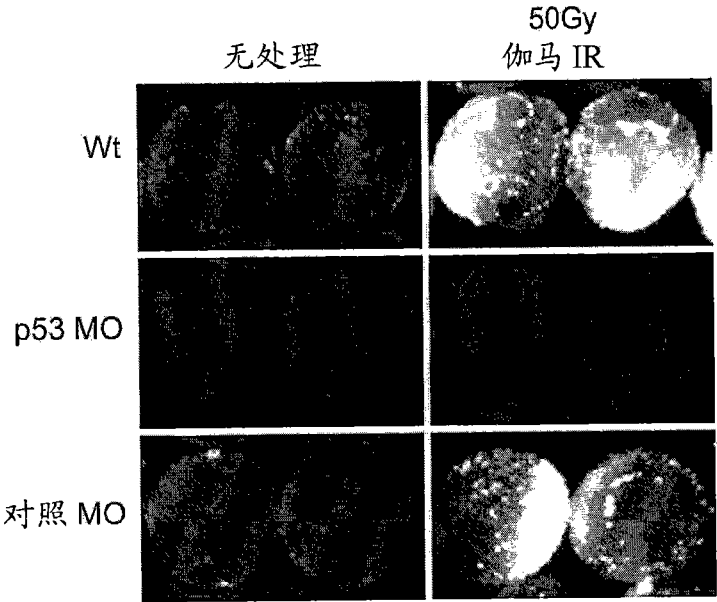


图 5E

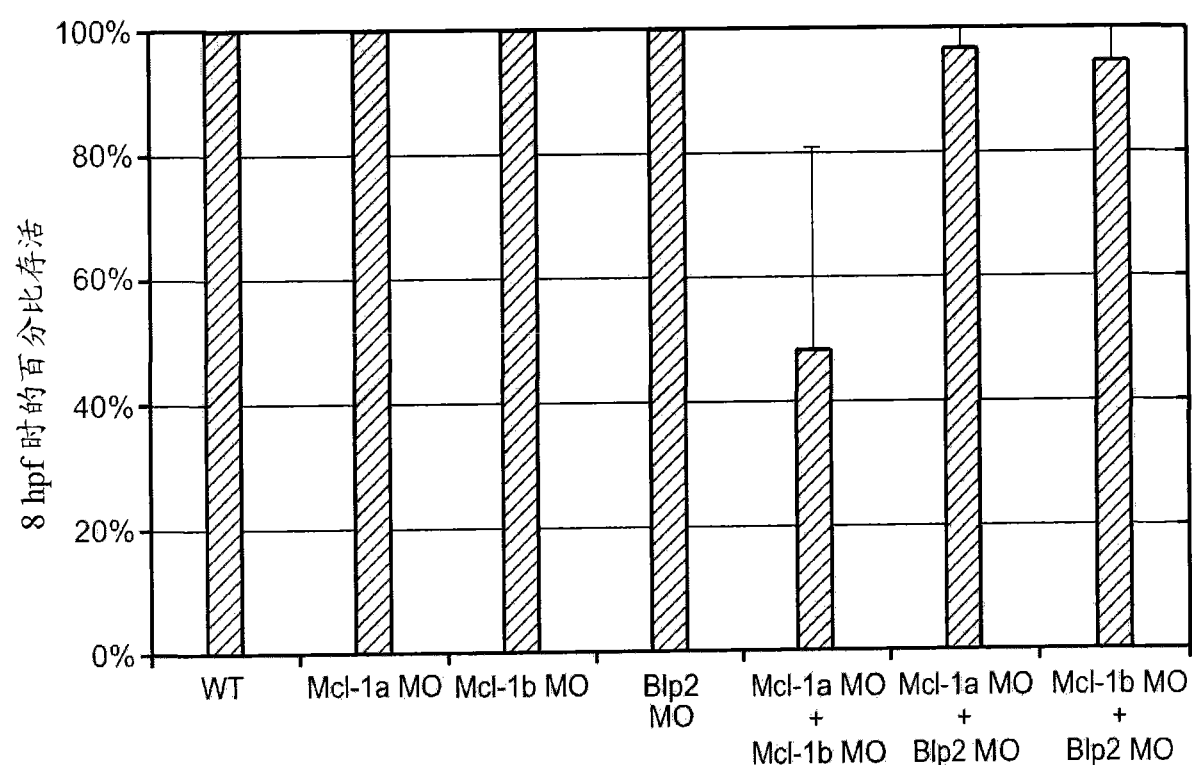


图 6A

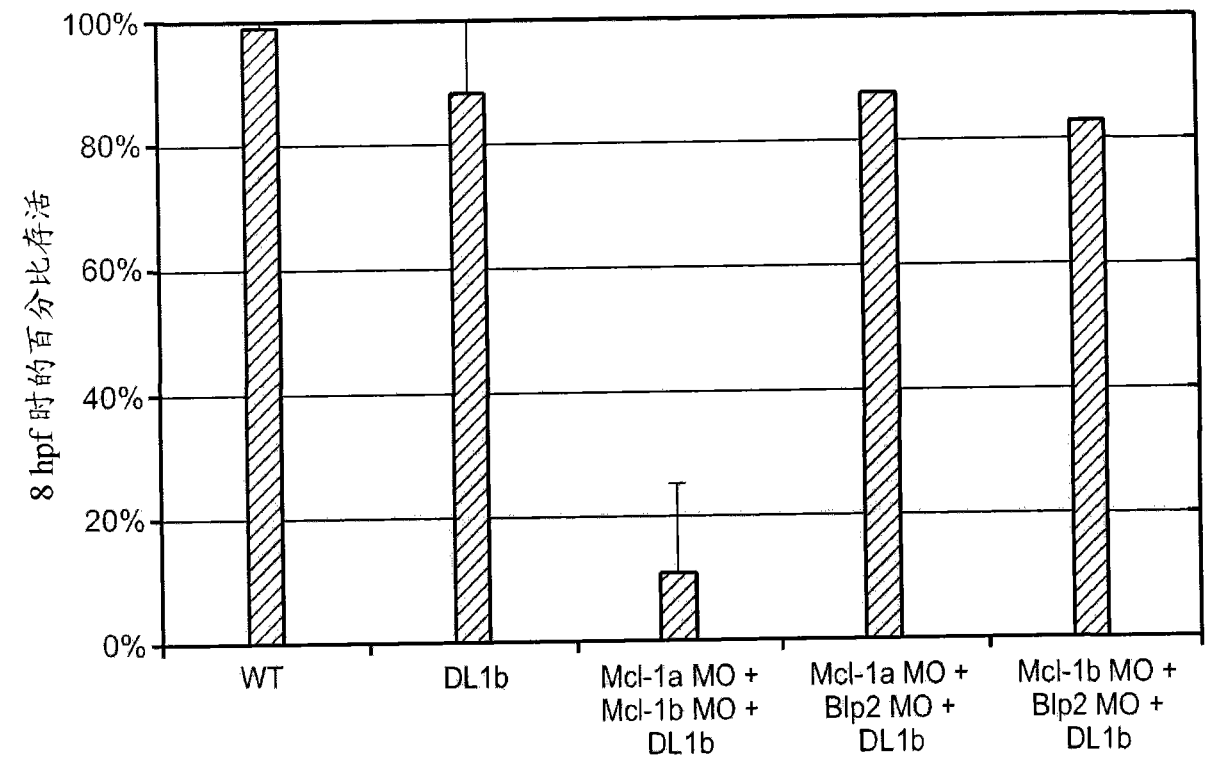


图 6B

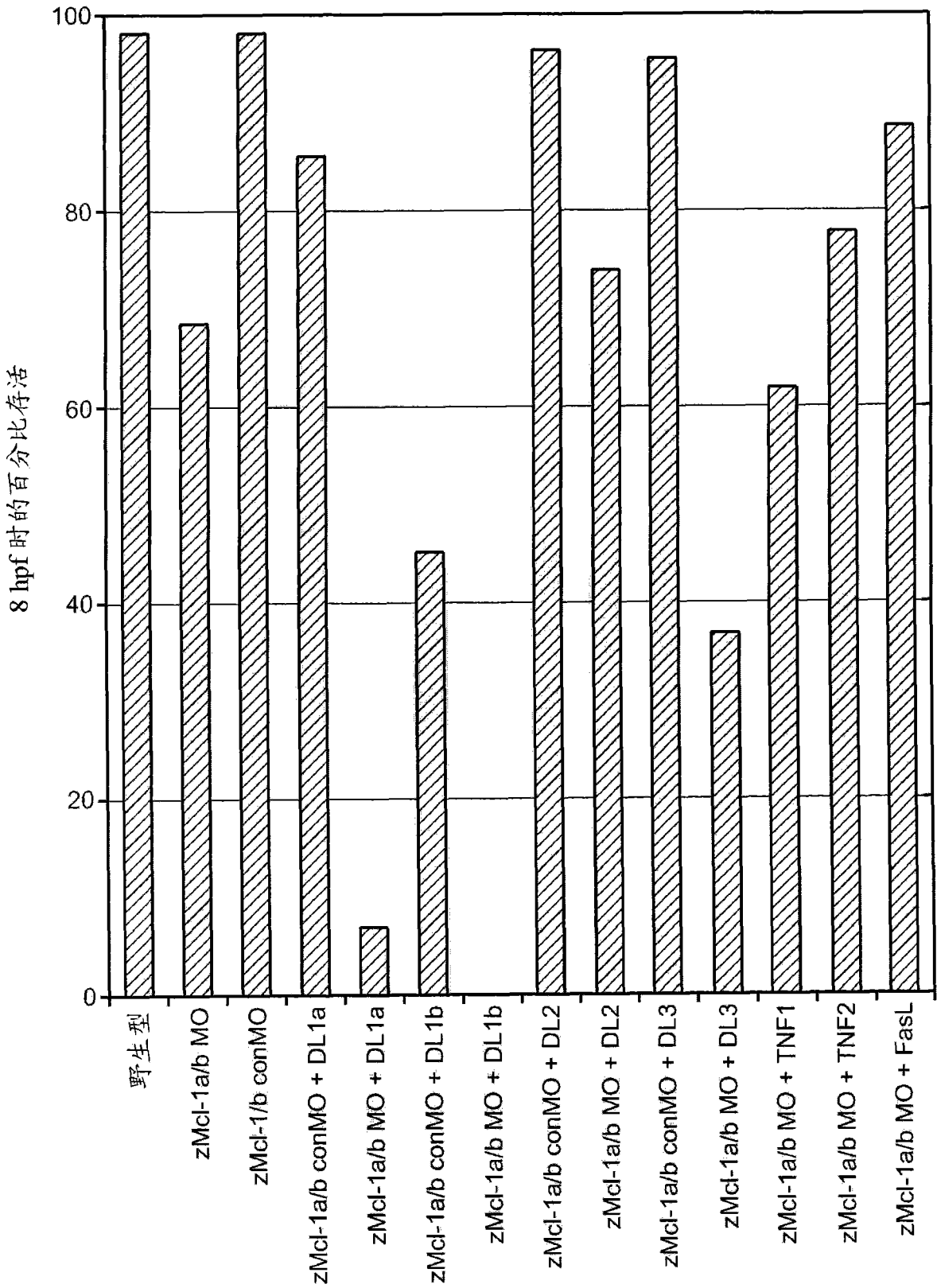


图 6C