

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/12

C07K 14/47 G01N 33/53

C07K 16/18 C07K 16/30

A61K 39/395



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01813558.7

[43] 公开日 2003 年 9 月 24 日

[11] 公开号 CN 1444653A

[22] 申请日 2001.5.30 [21] 申请号 01813558.7

[30] 优先权

[32] 2000.5.30 [33] GB [31] 0013105.2

[86] 国际申请 PCT/GB01/02397 2001.5.30

[87] 国际公布 WO01/92521 英 2001.12.6

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.29

[71] 申请人 布里斯托尔大学

地址 英国布里斯托尔

[72] 发明人 G·布劳恩 N·麦克希尼

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 徐雁漪

权利要求书 3 页 说明书 24 页

[54] 发明名称 治疗化合物

[57] 摘要

本发明涉及用于治疗的，能够调节 hr44 活性和/或表达的化合物。

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

1. 一种能够调节 hr44 的活性、表达和/或亚细胞结构的用于治疗的化合物。
- 5       2. 根据权利要求 1 的化合物，它调节 hr44 mRNA 的可变剪接。
3. 根据权利要求 2 的化合物，它为反义 hr44 核酸。
4. 根据权利要求 1 的化合物，它能够调节 hr44 与体内结合配偶体之间的相互作用。
5. 根据权利要求 4 的化合物，它能够调节 hr44 与下列一种或一
- 10   种以上的物质之间的相互作用：hnRNPE1，YP4，MI-丙酮酸激酶，M2-丙酮酸激酶和 fibrillarin。
6. 根据上述权利要求中任何一项的化合物，它能够调节 hr44 相关的代谢变化。
7. 根据权利要求 4 至 6 中任何一项的化合物，它能够特异性地
- 15   与 hr44 的特定的组织特异性变异体相互作用。
8. 根据权利要求 4 至 7 中任何一项的化合物，其中所述化合物为一种抗体。
9. 一种药用组合物，它含有根据上述权利要求中任何一项的化合物。
- 20   10. 一种化合物，它包括抗 hr44 特异性抗体和缀合分子。
11. 根据权利要求 10 的用于治疗的化合物。
12. 根据权利要求 10 或权利要求 11 的化合物，它引导所述复合分子传递到一种或一种以上的细胞内区室。
13. 根据权利要求 10 至 12 中任何一项的化合物，所述化合物由
- 25   包括编码抗-hr44 抗体的序列及编码缀合化合物的序列的 DNA 序列表达。
14. 一种在患者中治疗和/或预防疾病的方法，该方法包括给予所述患者根据权利要求 1 至 8 或 10 至 13 中任一项的化合物，或根据

权利要求 9 的药用组合物的步骤。

15. 根据权利要求 14 的治疗和/或预防疾病的方法, 该方法包括将根据权利要求 7 的化合物向所述患者的特定组织靶向给药步骤。

16. 根据权利要求 14 或 15 的治疗和/或预防疾病的方法, 该方法用于预防和/或治疗与一种或多种下列失调有关的疾病: 脂肪酸代谢和/或转运; 前列腺素/阴离子代谢和/或转运; 糖酵解; 及脂肪生成。

17. 根据权利要求 14 或 15 的治疗和/或预防疾病的方法, 其中所述疾病为血管性疾病。

18. 根据权利要求 14 或 15 的治疗和/或预防疾病的方法, 其中所述疾病为癌症。

19. 一种鉴定用于治疗化合物的方法, 它包括:

- (i) 筛选大量的化合物; 和
- (ii) 筛选与 hr44 结合和/或调节 hr44 的活性和/或表达的化合物。

20. 一种制备用于治疗化合物的方法, 它包括:

- (i) 筛选大量的化合物;
- (ii) 选择与 hr44 结合和/或调节 hr44 的活性和/或表达的化合物;

和

- (iii) 合成所选定的化合物。

21. 一种诊断哺乳动物患者的疾病的方法, 它包括检测或测定患者的 hr44 的表达的步骤。

22. 根据权利要求 21 的方法, 其中在从患者体内取出或排出的体液或组织中, 检测 hr44, 或测定 hr44 的表达。

23. 一种监控疾病发展的方法, 它包括测定 hr44 的表达的步骤。

24. 一种多核苷酸, 它包括如 SEQ ID No. 1 所示序列或其衍生物、片段、变异体或同系物。

25. 一种多肽, 它包括如 SEQ ID No. 2 所示序列或其衍生物、片段、变异体或同系物。

26. 一种诊断疾病的存在和/或进展的诊断试剂, 所述试剂分析

生物样品中的 hr44 水平。

27. 根据权利要求 26 的诊断试剂，它为抗 hr44 抗体。

28. 根据权利要求 26 或权利要求 27 的诊断试剂，它用于恶性肿瘤的诊断。

5        29. 一种肿瘤特异性抗 hr44 抗体。

## 治疗化合物

5            本发明涉及用于治疗化合物。特别是，本发明涉及能够调节 hr44 活性和/或表达的治疗化合物。

          本发明还涉及筛选这些治疗化合物的方法以及这些化合物的各种治疗应用。

          本发明还涉及以检定或测量 hr44 表达为基础来监控疾病进展或  
10        诊断疾病的方法。

## 背景

          hr44 已经从人视网膜组织中克隆(Braun G.等(1995) J. Exp. Med. 182: 1121-1132-登记号 X91103 或 Q15333)。牛的 hr44 同系物已经  
15        由 Frank 等鉴定，并于 2000 年 12 月 7 日录入 EMBL/GenBank /DDBJ 数据文库(library)中(原始登记号 CAC16354)。蛋白一级结构分析表明 hr44 是具有氨基端胞外结构域、跨膜结构域和很短的由碱性残基组成的羧基端胞质片段的 I 型膜蛋白。hr44 可溶于水溶液并且被定位于细胞质和细胞核中。hr44 也具有钙结合位点，酪氨酸激酶、蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶 II 的磷酸化位点。  
20       

          hr44 表达于代谢活跃的细胞和组织，例如，心脏，骨骼肌；某些神经元和许多上皮细胞，包括皮肤、纤毛上皮、肾脏近曲小管，和室管膜；贮脂组织，例如，肝脏和脂肪组织中。它高度表达于类固醇生成组织，例如，肾上腺和睾丸及其它腺体组织如 haderian 腺和胰腺中。它存在于胆汁、血浆和胰液中。hr44 似乎以组织特异性形式以及组织特异性表达水平表达。  
25       

          hr44 曾经作为由热带盘尾丝虫感染所致的盘尾丝虫病引起的潜在自身免疫性眼病发展中的自身抗原被研究(McKechne 等 (1997) J.

Infect. Dis. 176:1334-43)。然而，此前 hr44 的生物学功能没有被鉴定。

#### 本发明概述

5 本发明者已经揭示 hr44 与大量的细胞质和细胞核蛋白相互作用。尤其是，已发现 hr44 与涉及下列代谢活性的蛋白相互作用：

- i) 调节脂肪酸代谢的酶；
- ii) 前列腺素和/或相关底物的转运；
- iii) 肿瘤特征性的变化的糖酵解模式；以及
- iv) 转录调节，包括与 i、ii 和 iii 相关的基因的调节。

10 因此，能够调节 hr44 活性和/或表达的化合物可应用于治疗疾病，尤其是与糖酵解、脂肪酸形成/转运及代谢、以及前列腺素/前列腺素样分子转运改变相关的疾病。已经发现与 hr44 相互作用的所有蛋白均涉及代谢的致癌性转变。因此，这些化合物特别适用于预防和/或治疗癌症。

15 此外，已经确认 hr44 以多种形式存在，它们分为两种基本类别：与细胞质膜、内质网或内体区室(endosomal compartments)相关的 hr44 分子，和与细胞核相关的 hr44 分子。这些不同形式的 hr44 通过 hr44 转录的可变剪接产生。将 hr44 定位于内体区室的特殊序列已经鉴定。

20 此外，hr44 的糖基化根据其来源而不同。糖基化形式的差异与癌，尤其是结肠腺瘤和癌特别相关。

因此，在第一个方面，本发明涉及新的治疗化合物。特别是，本发明涉及能够调节 hr44 的活性、表达和/或亚细胞定位的化合物。

25 本发明者已经发现 hr44 与下列蛋白相互作用：M2-型和 M1-型丙酮酸激酶；异源性细胞核糖核蛋白 hnRNPE1；蛋白 YP4(本发明者鉴定的一种新的蛋白，它与前列腺素转运蛋白及有机阴离子转运蛋白共享一定的同一性)；及 fibrillarin。因此，在一种优选实施方案中，根据本发明第一方面的化合物能够调节 hr44 与 M1-型/M2-型丙酮酸激酶和/或 hnRNPE1 和/或 YP4 和/或 fibrillarin 的相互作用。

本发明者还发现 hr44 具有同源二聚的能力。

本发明第一个方面的化合物具有多种治疗和预防应用。因此，在第二个方面，本发明提供包括本发明第一个方面的化合物的药用组合物。本发明的第三个方面涉及采用本发明第一个方面的化合物或根据本发明第二个方面的药用组合物治疗和/或预防疾病的方法。

在第四个方面，本发明涉及鉴定用于治疗化合物的方法。特别是通过筛选大量化合物并选择与 hr44 结合、或调节 hr44 的活性或表达的化合物可鉴定这样的化合物。

本发明者还发现 hr44 的存在是许多疾病的特征，并且 hr44 水平是这些疾病发展阶段的指征。因此本发明还涉及以检测或测量 hr44 表达水平为基础的诊断方法，及监控疾病发展过程的方法。

特别地，本发明提供可以特异性检测肿瘤如结肠腺瘤和癌中的 hr44 的不同糖基化形式的抗体。

本发明者已鉴定出一种与 hr44 结合的新的蛋白(术语“YP4”)，并且得到了它的部分 cDNA 和氨基酸序列。本发明还涉及新的多核苷酸和多肽。特别地，本发明涉及包括部分 YP4 cDNA 序列的多核苷酸，以及包括部分 YP4 氨基酸序列的多肽。

本发明详述

在第一个方面，本发明涉及能够调节 hr44 的活性和/或表达的化合物。

化合物

术语“化合物”指化学上的化合物(天然存在的或合成的)，例如生物大分子(例如，核酸，蛋白，肽，碳水化合物或有机分子)，或从生物材料如细菌、植物、真菌、或动物(尤其是哺乳动物)细胞、组织

中获得的提取物，或者甚至是无机元素或分子。

根据本发明第一个方面的化合物优选通过筛选候选化合物文库

来鉴定。本发明第四个方面的筛选方法特别适合于在多孔培养板(例如, 96 孔培养板)中筛选化合物文库, 各个孔中含不同的检测化合物。尤其是, 侯选化合物文库可以是组合文库。各种各样的随机序列的寡核苷酸、多肽或合成寡聚体的组合文库已经提出并且已经建立了大量的  
5 的小分子文库。寡聚体的组合文库可以由各种液相或固相方法形成, 其中不同亚单位的混合物被逐步添加到生长的寡聚体或母体化合物上, 直至达到所需的寡聚体大小(典型为六肽或七肽)。用这种方法可以形成复杂度逐渐增加的文库, 例如, 每个添加的亚单位的步骤中合并多种所选择的试剂。或者, 所述库可以通过固相合成方法  
10 形成, 其中含有形成所述文库的不同序列寡聚体的珠交替混合和分离, 在各个步骤中将选定数量的亚单位之一添加到各组分离的珠中。所述文库, 包括组合文库可以从制药公司或专买文库供应商经商业购得。

对 hr44 的活性和/或表达有所需作用的文库的化合物的身份可以通过常规方法确认, 例如用迭代合成法, 其中仅在一个亚单位位置  
15 含有已知残基的子文库被确认为含有活性化合物。

## 调节

“调节”指使 hr44 活性和/或表达增加或降低至少 10%、15%、  
20 20%、25%、50%、100%或更多的能力; 这种增加或降低的发生可能基于特定事件的发生, 例如激活/抑制信号转导途径, 和/或细胞内蛋白的激活或失活和/或细胞蛋白的转运相关。这些活动在特殊细胞类型中可以选择性地表现出来。

## hr44 活性的调节

本发明者发现 hr44 与 YP4 相互作用, 后者是本发明者鉴定并命名的新的蛋白。YP4 与已知的前列腺素转运蛋白(PGTs)具有 54%的同源性和 36%的同一性。已知 PGTs 互相之间比较时具有大约相同

百分比的同源性和同一性。这些分子是完整的膜蛋白，推测其介导有机阴离子的释放、摄取、上皮转运或代谢清除(例如前列腺素及其衍生物，结合的类固醇及甲状腺激素—Schuster VL, 1998, *Annu. Rev. Physiol.* 60:221-242)。因此认为 hr44 与前列腺素类和/或相关物质的调节和/或转运有关。

本发明者还发现 hr44 与 hnRNPE1(异源性细胞核核糖核蛋白)相互作用。作为转录阻断剂，HnRNPE1 抑制脂氧化酶 15-LOX-1 的形成(Ostareck D H 等, 1997, *Cell* 89:597-606)。与 5-LOX 及 12-LOX 类似，15-LOX-1 属于使脂肪酸如亚油酸及花生四烯酸代谢的脂氧化酶家族。15-LOX-1 的直接代谢物之一是 13-HODE(羟基十八碳二烯酸)。

hr44 与 YP4 及 hnRNPE1 的相互作用可能构成了脂肪酸代谢和转运的调节机理。虽然不希望受理论的限制，但本发明者提出 hr44 通过与 hnRNPE1 相互作用并稳定其对脂氧化酶形成的抑制作用而抑制脂肪酸代谢。这减少细胞内 13-S-HODE 库(pool)并可能增加花生四烯酸库，后者为前列腺素的前体。通过与 YP4 的相互作用，hr44 影响这些分子的跨膜转运(从细胞内摄取及释放)。

本发明者也已发现 hr44 与 M1-型及 M2-型丙酮酸激酶相互作用。丙酮酸激酶是糖酵解中的关键酶并且在肿瘤发生组织中主要表达的是 M2-型(Yamada K 和 Noguchi T, 1999, *Biochemical Journal* 337:1-11)。M2-型丙酮酸激酶介导丙酮酸降解成乳酸。它以两种形式存在，低亲和力的二聚体形式和具有较高底物特异性的四聚体形式(Eigenbrodt E, 等, 1997, *Anticancer Res.* 17:3153-3156)。

本发明者已发现 hr44 高度表达于结肠癌组织中。hr44 与 M2-型丙酮酸激酶的相互作用可能稳定了二聚体形式的酶并导致磷酸代谢产物的储集。丙酮酸可以通过乙酰辅酶 A 途径(2)结合到脂肪酸中而 hr44 可能因此导致促进脂质生成。

因此提出 hr44 通过两条途径升高脂肪酸浓度：

i) 通过调节代谢途径中糖酵解和脂肪酸形成之间重要的转换点

(switch points); 和

ii) 通过抑制脂肪酸代谢途径。

5 本发明者还发现 hr44 与 fibrillarin 相互作用。Fibrillarin 因为与 RNA 复合体相关也被描述为异源性细胞核核糖核蛋白。与其它核糖核蛋白(例如, hnRNPE1)类似, 它涉及转录水平的基因表达。在对热休克(及可能还有其它信号)的反应中, fibrillarin 可以从细胞核中重新定位至细胞质(用黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)的 fibrillarin 同系物 NOP1p 表明的, (Liu Y, 等, 1996, EMBO JOURNAL 15:6750-6757))。hr44 被认为通过与 fibrillarin 相互作用而参与调节基因表达。  
10 因此 hr44 被认为涉及到与脂肪酸代谢相关的非 15-LOX1 的基因表达。

因此, 这些化合物可能通过调节 hr44 与 YP4, 和/或 hnRNPE1 和/或丙酮酸激酶和/或 fibrillarin 的相互作用的能力而影响 hr44 的活性。所述化合物可能因此影响脂肪生成、脂肪酸代谢及信号活动。

15 能够调节 hr44 活性的化合物可以用作所述活性的激动剂或拮抗剂。拮抗剂化合物应当能够以更高的结合亲和性与 hr44 结合, 因而成功地竞争 hr44 与生理上的或“体内的”结合配偶体的相互作用。由于已经证实 hr44 能够与自身相互作用, 同源二聚体形成的干扰或稳定可以抑制或取消 hr44 的功能。

20 hr44 是与细胞质膜相关的 I 型蛋白。一种绿色荧光蛋白(gfp)标记的形式的 hr44 在内体中积累, 因为它能够与运铁蛋白受体, 一种内体区室的标记物, 共同定位。通过可变剪接而产生的 hr44 形式, 能够定位于某些组织(尤其是有管腺体)的细胞核并且 gfp 标记的 hr44 的可变剪接形式定位于转染细胞的细胞核。

25 与膜相关的 hr44 形式被高度糖基化并且在许多方面类似于某些粘着分子和 glue 蛋白, 并且属于与肿瘤生长有关的总称为 LAMPS(溶酶体相关膜蛋白)的 I 型膜蛋白家族。肿瘤分化和转移与这些肿瘤相关分子的剪接变异体的比率及糖基化的剧烈变化有关。

大多数获得的抗 hr44 的单克隆抗体是针对在细菌系统中的表达的 hr44 产生的，因而缺乏任何真核细胞的翻译后修饰。根据本发明的一种抗体不能识别正常的结肠上皮组织，但能够识别结肠腺瘤中的 hr44。这意味着肿瘤中 hr44 有不同的糖基化。因此存在 hr44 的肿瘤特异性糖基化变异体，这可以通过根据本发明的单克隆抗体的限定性识别方式而标明。

hr44 还在结肠腺瘤中显著上调并且其表达的增加与肿瘤大小的增加有很好的相关性。用识别多种不同组织中的 hr44 的单克隆抗体已经证实了这一点。hr44 也存在于腺癌中。

hr44 的表达受低氧调节。这说明表达水平与实体瘤大小呈正相关。它还解释了 hr44 在其它组织中的分布。苗勒氏细胞、快(大)肌纤维、及实体瘤都在低氧条件下(不完全的糖酵解)发挥作用。实体瘤中的 hr44 的上调在涉及适应变化的代谢需求以及在涉及获得辐射抗性方面有助于低氧环境下的细胞存活。

对辐射敏感的肿瘤不出现任何 hr44 表达；例如，成视网膜细胞瘤是 hr44 阴性的。相应地，包括 hr44 下调和放射治疗的联合疗法在治疗常规放射抗性肿瘤中是有效的。

此外，hr44 在化疗药物的排出中发挥重要作用，后者是肿瘤细胞的一种不需要的特性。hr44 位于细胞表面，是细胞胞吐通道(内质网和高尔基体)的组成部分，并在细胞胞吞囊泡中定向于内体。内体和循环囊泡在调节细胞内 pH 值中是重要的。完整膜上的泵通常使内体和循环囊泡酸化，形成一个  $H^+$  离子的接受器。这些囊泡酸化的一个重要结果是它们摄入弱碱性化疗药物(例如，蒽环类(anthracyclines)和长春花生物碱类)。这些酸性细胞器中的浓缩物以及随后它们通过分泌途径从细胞内的排出可能促成了化疗药物的抗性。

#### hr44 表达的调节

在本领域内已知可以通过多种机理调节蛋白的表达。

通过源于异源启动子的蛋白自身的表达可以增加特殊细胞内的蛋白表达。例如，细胞可以用含有基因的载体转染，它表达独立于内源性基因表达的蛋白。或者，可以调节与控制基因转录有关的一种或一种以上细胞组分的活性或表达。

- 5       直接干扰基因转录和/或翻译可以减少蛋白的表达，例如，采用反义技术。在这个方面，本化合物可以是能够与 hr44 mRNA 序列杂交的核酸序列。因此能够依据 hr44 的核酸序列设计可用于抑制 hr44 的候选化合物。

- 10       RNA 印迹分析表明存在出现于正常组织中的 hr44 组织特异性的变异体，并且一种变异体是多种肿瘤所共有的。在一种优选的实施方案中，所述化合物能够特异性地与特定的组织特异性 hr44 变异体相互作用。尤其是，这种组织特异性变异体对一种或一种以上的肿瘤为特异性的。

本发明的第一个方面的一种实施方案中，该化合物是抗体。

15

#### 抗体

抗体可以通过标准技术，例如用 hr44 或其片段免疫，或采用噬菌体文库展示来产生。

- 20       针对本发明目的，除另有相反规定外，术语“抗体”包括但不限于，多克隆的，单克隆的，嵌合的，单链的，Fab 片段和通过 Fab 表达文库产生的片段。这些片段包括保留结合靶物质活性的完全抗体的片段，Fv，F(ab') 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段，以及单链抗体(scFv)，含有抗体的抗原结合位点的融合蛋白和其它合成的蛋白。此外，如 EP-A-239400 中所述，抗体或它们的片段可以是人源化抗体。中和抗体，  
25       即，那些抑制所述物质的氨基酸序列的生物学活性的抗体，特别优选用于诊断和治疗。

#### 治疗

本发明的化合物可以适合应用于治疗。

术语“治疗”是指治疗或预防医学疾病。特别地，治疗涉及通过给予治疗用或预防用组合物而治疗或预防疾病。

## 5 药用组合物

在第二个方面，本发明提供含有本发明第一个方面的化合物的药用组合物。

该组合物可以任选含有药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或辅料。药用载体、赋形剂或稀释剂可以根据预定的给药途径及标准药学实践进行选择。该药用组合物可以包括(或添加)载体、赋形剂或稀释剂、任何合适的粘合剂、润滑剂、助悬剂、包衣材料、助溶剂，和其它可以协助或促进药物进入靶体位点的载体物质(例如脂质传递系统)。

在合适的时候，该药用组合物可以通过一种或一种以上的途径给药：吸入，以栓剂或阴道栓剂的形式，以洗剂、溶液、霜剂、软膏剂或细粉的形式局部给药，采用皮肤贴剂，以含有赋形剂如淀粉或乳糖的片剂形式、或单独或与赋形剂混合的胶囊或软胶囊剂、或酏剂、含有矫味剂或着色剂的溶液或混悬液的形式口服给药，或者它们可以经胃肠外，例如腔内、静脉内、肌肉或皮下注射。对于胃肠外给药，该组合物最好采用无菌水溶液形式，它可以含有其它物质，例如足够的盐或单糖以使溶液与血液等渗。对于颊内和舌下给药，该组合物可以片剂或锭剂形式给药，它们可以用常规方法配制。

在第三个方面，本发明涉及处理和/或预防疾病的方法，该方法包括给予患者根据本发明第一个方面的化合物。

25

## 疾病

本发明化合物特别适合用于治疗与下列一种或一种以上的紊乱有关的疾病：糖酵解、脂肪生成、脂肪酸代谢/转运及前列腺素形成/

转运。

食物中的脂肪酸(主要为亚油酸和花生四烯酸)在提供代谢能量和心肌和骨骼肌收缩能量以及对于合成贮存于脂肪组织的脂肪细胞和肝脏细胞中的细胞内甘油三酯是必需的。

5 大多数细胞依靠来源于血液输送的脂肪酸满足它们对氧化能量的需求。脂肪酸是合成磷脂、前列腺素、胆固醇酯和类固醇激素所必需的。脂肪酸还作为信号转导蛋白通过调节离子通道、突触传递以及与脂质代谢和细胞分化有关的基因表达而发挥作用。脂肪酸通过脂氧化酶(LOX, 包括 5-LOX、12-LOX 和 15-LOX)及环加氧酶相关途径代谢。

10 15-LOX1 酶活性与血管疾病有关具有可靠的实验证据(Cornicelli J A 和 Trivedi B K, 1999, Current Pharmaceutical Design 5: 11-20; Bailey J M, 等, 1995, Atherosclerosis 113:247-258)。在动物模型中已经发现 15-LOX1 的化学抑制剂预防动脉粥样硬化损害。动脉粥样硬化是严重疾病如缺血性心脏病、中风和心肌梗塞的病因。

15 hr44 与 hnRNPE1 作用, 后者抑制 15-LOX 的形成。因此能够调节 hr44 活性和/或表达的化合物有益于治疗血管性疾病, 特别是与动脉粥样硬化有关的那些疾病。本发明化合物可以用于治疗或预防血管性疾病如缺血性心脏病、中风和心肌梗塞。

20 当脂肪酸代谢物在肿瘤的发展中也起重要作用时, 本发明化合物还可以用于治疗某些类型的癌症。前列腺素(脂肪酸花生四烯酸的衍生物)形成的化学抑制剂(非甾体类抗炎药)在动物模型中是有效的预防药并能够使人的结肠直肠癌发病率下降一半的事实证明了这一点。花生四烯酸代谢的脂氧化酶和环加氧酶途径与肿瘤促进作用和

25 恶化有关。

人结肠肿瘤看来与环加氧酶 2 的上调有关。胰腺癌与 5-LOX 及 12-LOX 上调有关。已经发现 15-LOX1 在结肠肿瘤中下调(Fosslien E, 2000, Annals of CLINICAL & Laboratory Science, 30:3-21; Xian-Zhong

Ding 等, 1999, Biochem. Biophys. Res. Communications 266:392-399; Shureiqi I 等, 1999, Carcinogenesis, 20:1985-1995)。15-LOX1 的代谢产物是 13-S-HODE。13-S-HODE 在转化的结肠上皮细胞中抑制细胞增殖并诱导凋亡(Shureiqi I 等, 1999, Carcinogenesis 20:1985-1995)。因此  
5 缺乏该产物可能促进某些肿瘤的发展。

此外, 肿瘤细胞具有特殊需求并且它们的发展与高速率的葡萄糖摄取及糖酵解有关(Chi V Dang 和 Lemenza GL, 1999, TIBS 24:68-72)。细胞增殖增加对高能量的需求需要糖酵解来代替并且糖酵解的磷酸代谢产物(phosphometabolites)是核酸、磷脂等生物合成所需要的。调节磷酸代谢产物库的关键酶是丙酮酸激酶。丙酮酸激酶有四种类型, M1-、M2-、L-和 R-型。M1 出现于不同组织如骨骼肌、心脏和脑中, L 出现于葡萄糖异生组织如肝脏中, R 出现于红细胞及造血组织中。M2-型主要出现于肿瘤组织中(Yamada K 和 Noguchi T, 1999, Biochem J 337:1-11)。肿瘤对低氧反应的代谢变化与 M1 型丙酮酸激酶逐渐被 M2 型替代有关并且 M2 同工酶被视为肿瘤转化的标记  
10 (Guminska M 等, 1997, Acta Biochimica Polonica 44:711-724)。低亲和性的二聚体形式的 M2-型丙酮酸激酶在肿瘤中聚集(Eigenbrodt E, 等, 1997, Anticancer Res. 17: 3153-3156)。新近已经报道该二聚体形式通过乳头瘤病毒(papillomavirus, HPV)的 E7 癌蛋白质而稳定化并被认为  
15 有助于细胞转化(Zwerschke W, 等, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 96:1291-1296)。

hr44 在肿瘤中过度表达, 而本发明者提出与二聚体形式的 M2 丙酮酸激酶形成的复合体使其具有生物合成活性, 借此丙酮酸可以经乙酰 CoA 途径被结合到脂肪酸中, 增加前列腺素前体库。在乳房  
25 (Kuhajda F, 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6279-6383)、前列腺(Shurbji M, 等, 1996, Hum. Pathol. 27:917-921)、结肠直肠癌(Reston M, 等, 1992, Lab. Invest. 66:47)肿瘤及卵巢(Gansler T, 等, 1997, Hum. Pathol. 28:686-692)和子宫内膜癌(Pizer E, 等, 1996, Cancer Res.

56:2745-2727)中脂肪生成显著增强。脂肪生成被确认为不良预后的指征。hr44 还被认为促进 15-LOX1 翻译的负调节和 13-HODE 的清除而具有减少凋亡和促进肿瘤生长的作用。

- 5 在本发明的第三个方面的方法中，患者可以是人或动物患者。优选的患者是哺乳动物患者，更优选人类患者。通常，最适合个体患者的精确用量由医师决定并且随年龄、体重和特定患者的反应而变化。

#### 筛选方法

- 10 在第四个方面，本发明涉及通过筛选大量化合物并选择具有所需活性的化合物来鉴定根据本发明第一个方面的化合物的方法。这些化合物可能具有调节 hr44 与体内的结合配偶体之间相互作用的能力。

- 15 筛选结合 hr44 的体内配偶体

- 可以采用酵母菌的双杂交分析法(two-hybrid assay)鉴定体内与 hr44 相互作用的细胞内蛋白。该方法以这样的发现为基础，即大多数真核转录激活蛋白(activators)为模块式蛋白，即，所述激活蛋白通常含有激活转录的激活结构域，以及将激活蛋白定位于合适的 DNA 分子区域的 DNA 结合结构域。在双杂交系统中，第一个融合蛋白含有与 DNA 结合区融合的一对相互作用蛋白之一(例如 hr44)，而第二个融合蛋白含有与转录激活结构域融合的一对相互作用蛋白中的另一个(例如体内结合配偶体)。这两个融合蛋白在同一细胞内独立地表达，而融合蛋白的“相互作用蛋白”部分之间的相互作用重新构成转录激活因子的功能，它通过报道基因的转录激活而检测。可以采用该系统，例如通过在细胞内来自表达 hr44 的组织的 cDNA 文库，  
25 筛选在体内与配偶体结合的大量候选物(candidate)。

已经建立了至少两种不同的基于细胞的双杂交蛋白-蛋白相互作用

用分析系统。建立酵母 GAL4 双杂交系统，以便根据 GAL1-lacZ 报道基因的激活，检测基于 GAL4 (一种来源于酵母菌的转录激活蛋白) 的功能重组的蛋白-蛋白的相互作用。与其它几种转录激活因子类似，GAL4 蛋白含有两个截然不同的结构域，一个 DNA 结合结构域和一个转录激活结构域。每种结构域可以作为由所述结构域和第二种“诱饵(bait)”相互作用蛋白组成的融合蛋白的部分而独立地表达。然后这两种融合蛋白都在细胞中独立表达。当这两种 GAL4 结构域通过这两种“相互作用”蛋白的结合相互作用而结合到一起时，在 GAL4 转录控制下的报道基因的转录开始启动。这种报道基因通常具有一个含有 L4GA 蛋白结合位点的启动子(GAL 上游激活序列，UASG)。

第二个双杂交系统采用与合适的操纵基因紧密结合的天然大肠杆菌(E. coli) LexA 阻抑蛋白。采用质粒表达与 LexA 融合的一对相互作用蛋白之一(“诱饵”蛋白)。该质粒表达的 LexA-融合的诱饵蛋白被用于转化酵母的报道株，例如 EGY48。在这种菌株中，LexA 的结合位点定位于两种报道基因的上游。在第一个报道系统中，所述染色体 LEU2 基因--为亮氨酸(Leu)生物合成途径所必需--的上游的激活序列被带有 lexA 操纵基因的 EGY48 所代替，使得当细胞被置于缺乏 Leu 的培养基中时能够进行生存选择。在第二个报道系统中，EGY48 存在(harbours)于质粒 pSH18-34(它含有 LexA 操纵基因-lacZ 融合基因)中，使得当酵母生长于含 Xgal 的培养基时，能够基于颜色进行识别。

本发明描述了采用 GAL4 双杂交系统检测 hr44 的四种体内结合配偶体(实施例 1)。

## 25 筛选与 hr44 结合的化合物

可以采用下文描述的方法筛选大量的候选化合物。尤其是，这些方法可以适用于筛选化合物文库。

当候选化合物是蛋白时，尤其是抗体或肽类，候选化合物文库

可以采用噬菌体展示技术筛选。噬菌体展示技术是一种利用重组噬菌体筛选分子的方案。该技术涉及用编码候选化合物文库的基因转化噬菌体,以使每种噬菌体或噬菌粒表达特殊的候选化合物。转化的噬菌体(优选将其固定于固态载体)表达合适的候选化合物并将其展示于它们的噬菌体衣壳(coat)中。能够与 hr44 相互作用的特异的候选化合物通过基于亲和力相互作用的选择策略而富集。然后对成功的候选药物进行鉴定。噬菌体展示技术具有优于标准亲和配体筛选技术的优点。噬菌体表面展示三维构型的候选药物,与其天然呈现的构型更加相似。对于筛选目的来说,这使得结合具有更好的特异性和更高的亲和性。

上述酵母双杂交系统可以用于筛选与 hr44 结合的多肽。例如,来源于表达 hr44 组织的人 cDNA(它可以用于鉴定体内的结合配偶体)可以用来源于不同组织或物种的 cDNA 文库,或合成寡核苷酸的组合文库代替。

另一种筛选化合物文库的方法是利用以表达化合物文库的重组 DNA 分子稳定转化的真核或原核宿主细胞。这些细胞,无论是活细胞或是固定化形式,可以用于标准的配偶体结合分析。还见于 Parce 等. (1989) Science 246:243-247; 和 Owicki 等 (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:4007-4011, 它们描述了检测细胞反应的灵敏方法。竞争分析法是特别有用的,其中表达化合物文库的细胞与已知与 hr44 结合的标记抗体例如,  $^{125}\text{I}$ -抗体,以及试验样品如待测定对结合组合物的结合亲和力的候选化合物共同孵育。然后分离 hr44 结合的和游离的标记结合配偶体,以评价 hr44 结合的程度。试验化合物结合的数量与结合 hr44 的标记的抗 hr44 抗体的量呈反比。

可以采用许多技术中的任何一种从游离的结合配偶体中分离结合的配偶体以分析结合程度。这种分离步骤通常可以涉及一种程序例如粘附于滤膜继而洗涤,附着于塑料制品(adhesion to plastic)继而洗涤,或将细胞膜离心。

另一种方法是利用从表达 hr44 的哺乳动物细胞或从转染的真核或原核宿主细胞中提取溶解的(solubilized)、非纯化的 hr44 或溶解的、纯化的 hr44。这使得“分子”结合分析具有增加特异性、能够自动化,和药物检测高通量的优点。

5           另一种筛选候选化合物的技术涉及提供高通量(throughput)筛选例如,对 hr44 具有合适的结合亲和力的新化合物的方法,并且详细描述于 1984 年 9 月 13 日公布的国际专利申请号 WO 84/03564 (Commonwealth Serum Labs.)中。首先,大量不同的小分子肽类试验化合物在固相基质,例如,塑料钉(plastic pins)或某些其它适宜的表面上合成;参见 Fodor 等(1991)。然后所有塑料针与溶解的 hr44 反应并洗涤。其下一个步骤涉及检测对 hr44 的结合。可以采用 hr44 的单克隆抗体进行检测(本发明者已经采用标准步骤制备了大量抗体)。由此可以鉴定与 hr44 特异性相互作用的化合物。

15           可能与 hr44 相互作用的候选化合物的合理设计可以基于 hr44 和/或其体内结合配偶体的分子形状的结构研究。与其它特异性蛋白相互作用的位点的测定方法之一是物理结构的检测,例如,X-射线晶体学或二维 NMR 技术。这些将提供关于哪些氨基酸残基构成了分子接触区的指导。至于蛋白结构检测的详细描述,参见,例如,Blundell 和 Johnson (1976), Protein Crystallography(蛋白晶体学), Academic Press, New York。特别地,这些将提供关于参与同源二聚体形成,以及参与与丙酮酸激酶、hnRNPE1、YP4 及 fibrillar protein 相互作用的 hr44 多肽区段的信息,反之亦然。

#### 筛选调节 hr44 活性的化合物

25           如上文所述,化合物可以调节 hr44 与 hr44 的体内结合配偶体的相互作用的能力。体内结合配偶体一旦被鉴定,就有许多本领域内已知的方法,通过这些方法根据化合物调节 hr44 与其结合配偶体之间的相互作用,或相互作用的生理学作用的能力来筛选化合物。

例如, 采用固定化的 hr44 或结合配偶体(见上文)的体外竞争结合分析可以用于研究待测化合物文库抑制或促进 hr44-结合配偶体相互作用的能力。

或者, 如上文所述的酵母双杂交系统可以用于鉴别那些影响 hr44-结合配偶体相互作用的化合物。例如, 第一种融合蛋白(包括转录激活因子的 DNA 结合结构域和 hr44)和第二种融合蛋白(包含转录激活结构域和结合配偶体)可以在酵母细胞内表达。当发生 hr44: 结合配偶体相互作用时, 在转录激活蛋白的转录控制下的报道基因的转录被启动。因此, 相对于使用者定义的阈值增强或降低报道基因表达(例如, 增强五倍或降低五倍)的化合物由此被检定为相互作用调节剂。

本发明者已经发现下列蛋白是 hr44 的体内结合配偶体: hnRNPE1; M1 和 M2 型丙酮酸激酶; YP4; 和 fibrillarin。

化合物对 hr44 与这些蛋白中任何一个之间的相互作用的调节能力可以通过上述标准技术测定。如下文所述, 还可以通过检测这种相互作用所介导的生理学作用而测定对相互作用的调节。这些生理学作用包括: (i) 脂肪酸, 尤其是亚油酸或花生四烯酸代谢; (ii) 丙酮酸代谢; 和/或 (iii) 前列腺素的转运。

可以通过在细胞分析中测定 13-S-羟基十八碳二烯酸(13-HODE)或 15-羟基二十碳四烯酸(15-HETE)而测定化合物对 hr44 与 hnRNPE1 相互作用的影响。13-S-HODE 和 15-HETE 分别是亚油酸和花生四烯酸的产物, 两者都是 15-LOX1 酶活性的产物。这些代谢产物的产生可以通过 ELISA(采用商业上可获得的试剂)、放射免疫分析法和/或气相色谱法定量。

化合物对 hr44 与 M2 型丙酮酸激酶相互作用的影响能力的测定可以在细胞培养分析法中用已知方法测定代谢产物(例如丙酮酸和乳酸) (Huge F 等 1992, J. of Cell. Physiol. 153:539-549; Bergmeyer, HU, 主编 1974, Methoden der enzymatischen Analyse, Vol I 和 Vol II, 第 3 版, Verlag Chemie, Weinheim, Germany)的浓度来测定。化合物对结合

的干扰能力可以通过早先描述的凝胶过滤法测定(Zwerschke W, 等 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 96:1291-1296)。

5 hr44 与前列腺素转运蛋白的相互作用及其对前列腺素转运的影响, 无论进还是出细胞, 可以采用氘标记的前列腺素(可以得自 NEN, LifeScience Products)测定。

为达到比较之目的, 筛选调节 hr44 活性的化合物可以在用重组 hr44 转染的培养组织细胞、未转染的细胞、以及用 hr44 反义序列处理的细胞中进行。

10 hr44 可以与自身相互作用而形成同源二聚体。这两种形式的 hr44 可以是有活性的(即能够与体内结合配偶体相互作用)或无活性的。这样的化合物可以通过抑制或促进 hr44 的二聚化能力而调节其活性。干扰二聚化的化合物可以通过凝胶过滤法分析(Zwerschke W, 等 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 96:1291-1296)。

15 筛选调节 hr44 表达的化合物

适合测定 hr44 表达的方法有许多种, 如通过测定基因表达或蛋白表达。

20 可以采用聚合酶链反应(PCR)测定 hr44 基因表达, 例如采用 RT-PCR。在设计阻断 hr44 基因转录的候选化合物中 RT-PCR 可以是有用的技术。或者, 可以采用 RNA 印迹法测定 hr44 mRNA 的存在与数量。如果所设计的候选化合物通过导致 hr44 mRNA 降解而起作用, 则 RNA 印迹技术特别适合。例如, 如果候选化合物是反义序列, 它可以通过酶如 RNA 酶 H 导致目标 mRNA 降解。

25 hr44 蛋白表达可以通过多种已知技术检测或测定, 包括 RNA 印迹法、免疫沉淀、免疫细胞化学技术、免疫组织化学、原位杂交、ELISA、放射免疫标记、荧光标记技术(荧光测定法、共聚焦显微镜)和分光光度测定。

### 合成方法

在第五个方面，本发明提供制备根据本发明第一个方面的化合物的方法。

例如，可以通过本发明第五个方面的方法鉴定能够调节 hr44 活性和/或表达的化合物，然后以更大的规模合成。

合成已鉴定化合物的合适的方法应当以其性质为基础。例如，如果化合物为简单的有机分子，可以采用有机化学技术合成它。如果化合物为肽，可以采用肽合成仪合成它。对于更长的肽类，多肽和蛋白，采用本领域内所熟知的重组技术合成该化合物通常更容易。或者，可以从原料(source)中分离蛋白以及通过蛋白降解由它们产生多肽/肽。核酸可以通过合成方法合成，或由基因表达。当成功的候选化合物为一种核酸序列时，可以用已知技术(如 PCR)通过候选化合物的扩增而合成该化合物。

### 15 诊断方法

根据本发明的第七个方面，本说明书提供通过检定或测定 hr44 的表达而诊断疾病的方法。

上文给出了可以测定 hr44 基因或蛋白表达的合适方法。

本发明第八个方面的诊断方法有利于诊断那些与 hr44 异常表达有关的疾病。例如，一种特定的疾病可能与 hr44 表达的增加或减少相关。或者，这些疾病可能与 hr44 表达的分布变化有关，例如细胞内、或组织分布的变化。

在一个实施方案中，所述疾病与局部区域中的 hr44 的表达增加有关。这些局部区域可能是，例如是肿瘤或动脉粥样硬化斑。

25 若以非侵入性(non-invasive)技术测定 hr44 表达则是方便的。可以在从身体中取出或分泌的体液或组织中鉴定/测定这种表达。例如，可以用患者的血液、唾液、尿液或粪便样本测定 hr44 的表达。在这个方面，hr44 由细胞输出并且已知可以在血浆、胆汁和胰液中检测

到, 因此检测血液样本和/或粪便是可行的。

本发明提供的单克隆抗体(见实施例 3)尤其适合用于 ELISA-型捕获分析法, 以检测(定量)体液中的 hr44。

5 hr44 的表达与多种疾病有关, 并且根据疾病的进程而变化。因此, hr44 的表达可以用作指示具体疾病发展阶段的诊断工具。

根据本发明的第八个方面, 本说明书提供监控疾病发展的方法, 该方法包括测定 hr44 表达的步骤。

10 如前文所述, 本领域内有多种可以测定 hr44 表达的已知方法。例如免疫组织学和原位杂交技术特别适合于本发明的第八个方面的方法。

可以用这种方法监控的疾病的实例包括癌症和血管性疾病。在结肠癌中, 已经发现 hr44 的表达与腺瘤的大小成比例并因此与细胞增殖速率和/或形成恶化前的损伤中的细胞凋亡减少成比例。随着分化良好的腺体瘤发展到低分化的腺体瘤, hr44 的表达是可变的。

15

#### 多核苷酸和多肽

根据本发明的第九个方面, 本发明提供多核苷酸, 它包括如 SEQ ID No.1 所示序列或其衍生物、片段、变异体或同系物。

20 涉及本发明的核苷酸 SEQ ID No.1 的术语“衍生物、片段、变异体或同系物”包括在该序列中一个(或一个以上的)核酸的任何取代、修饰、替换、删除或增加, 条件是所生成的核苷酸序列或其表达产物具有结合 hr44 的能力。特别地, 术语“同系物”涵盖功能方面的同源性。至于序列同源性(即相似性), 优选具有与 SEQ ID No.1 所示序列的至少 75%、更优选至少 85%、更优选至少 90%的同源性。更加优选具有与 SEQ ID No.1 所示序列的至少 95%, 例如至少 98%的同源性。

25

根据本发明的第十个方面, 本发明提供包括 SEQ ID No.2 所示序列或其衍生物、片段、变异体或同系物的多肽。

涉及本发明的 SEQ ID No.2 蛋白的术语“衍生物、片段、变异体或同系物”包括在该序列中一个(或一个以上的)氨基酸的任何取代、修饰、替换、删除或增加,条件是所生成的氨基酸序列具有结合 hr44 的能力。特别地,术语“同系物”涵盖功能方面的同源性。至于序  
5 列同源性(即相似性),优选具有与 SEQ ID No.2 所示序列的至少 75%、更优选至少 85%、更优选至少 90%的同源性。更加优选具有与 SEQ ID No.2 所示序列的至少 95%,例如至少 98%的同源性。

### 实施例

#### 10 实施例 1 证实 hr44 与各种细胞质蛋白和核蛋白相互作用

采用检定酵母中的特异性蛋白-蛋白相互作用的检测法分析体内与 hr44 相互作用的蛋白(例如从商业上得自 Clontech 的 Matchmaker GAL4 双杂交系统)。将 hr44 (如 Braun G 等(1995), J. Exp. Med. 182: 1121-1132 所述,从人视网膜 cDNA 文库中提取)亚克隆到 pGBDT7  
15 中并在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 AH109 中表达。这种转化的酵母菌株与可以从商业上获得的已经用源于人睾丸的匹配标记(matchmaker) cDNA 文库预转化的酵母菌株(酿酒酵母菌株 Y187, Clontech 实验室)杂合(mated)。这种来源于四种独立克隆的 cDNA 被分离并测序。采用 FASTA 和 BLAST 程序用多种 DNA 数据库的条  
20 目比较被检定的 cDNAs。这四个克隆被鉴定为表达 hnRNPE1、M2 型丙酮酸激酶、fibrillarin 和新的蛋白 YP4,后者与前列腺素转运蛋白及有机阴离子转运蛋白共享一定的同一性。

酵母双杂交系统还显示 hr44 形成同源二聚体。采用 Proscan 序列分析软件包,发现 hr44 含有 Myc-型螺旋-环-螺旋二聚化结构域。

25 YP4 的部分 DNA 和氨基酸序列采用常规技术获得并采用可以从 [www.Expasy.ch/tools/](http://www.Expasy.ch/tools/) 获得或由 Hixton, Cambridge 的 Human Genome Mapping Project 提供的软件分析。YP4 的序列及推断的一级结构如 SEQ ID No.1 所示。

hr44 与上述蛋白的相互作用通过用 pGBKT7-hr44 双重转化的酵母 AH109 和由 pACT2 表达的相应的克隆所证实。如下进行作为对照的双重转化：非重组的 pGBKT7 与在 pACT2 中相应的 cDNA 克隆一起以及 pGBDT7-hr44 与非重组的 pACT2 一起。

5

#### 实施例 2 hr44 蛋白在正常和肿瘤组织中的表达和分布研究

获取人结肠的正常和肿瘤样品并与戊二醛或甲醛混合。通过采用由针对重组 hr44 产生的单克隆抗体的免疫组织学测定 hr44 的表达。正常人的结肠染色显示，在上皮细胞中，hr44 的表达仅限于隐窝基底部分的细胞以及结肠的粘膜的上皮细胞。通过对小、中和大的腺瘤的检查，显示 hr44 的表达与腺瘤大小的增加相关。在腺癌中的形成肿瘤的上皮细胞中检测到高水平的 hr44 的表达，尽管总体表达变化很大。

15

#### 实施例 3 识别和鉴定与 hr44 结合的化合物

按照 Braun 等, 1995, J. Exp. Med. 182:1121-1132 所描述的方法制备和鉴定针对 hr44 的单克隆抗体。简要地说，在用重组 hr44 免疫后，采用 P3 X63 Ag8.653 细胞系作为来源于免疫的 Balb/c 小鼠的脾细胞的融合配偶体产生杂交瘤。该杂交瘤采用 hr44 通过 ELISA 鉴定。所述单克隆抗体命名为 44/13A2、44/31B2、44/33A5、44/33D3 和 44/72C2。

20

对单克隆抗体所识别的 hr44 抗原决定表位制作图谱如下。代表从氨基端到羧基端的 hr44 一级结构的一组 83 个肽(购自 Chiron Mimotopes Peptide Systems (Victoria, Australia))被用于对抗原决定表位制作图谱。所述肽由十二个氨基酸组成，有 8 个残基重叠，并布置在“钉头(pin-heads)上”。用 ELISA 类的分析法进行小鼠免疫血清和抗 hr44 的单克隆抗体分析。为鉴定 hr44 的 B 细胞抗原决定表位的构象，制备了表达各种大小的 hr44 片段的一系列截短的融合体。通

25

过 RNA 印迹法检测单克隆对截短的融合体的识别能力。

mAb 44/72C 识别定位于 hr44 的第 100 和 219 位残基之间的 B-细胞的构象抗原决定表位。

5 mAbs 44/13A2、44/33A5、44/31B2 和 44/33D3 识别 hr44 的线性肽链序列。44/13A2 识别包含在 hr44 氨基端的序列 (YSTTPRIDEWRDKGYR) 中的决定簇。44/33A5 也识别序列中 (EWRDKGYRLVED) 的接近氨基端的线性抗原决定表位。44/31B2 识别决定簇 (NYD DNDDVEQIFIVKL)。44/33D3 识别 hr44 羧基端的线性序列 (DVTPEPKTVDTSETPKATPVKT)。该肽含有重复序列  
10 DVT(X)ETPK, 它被鉴定为 44/33D3 所识别的抗原决定表位。

实施例 4 采用竞争结合分析法筛选调节 hr44 与 hnRNPE1 之间相互作用的化合物

为了评价实施例 3 所述抗体对 hr44 与 hnRNPE1 之间相互作用的  
15 干扰作用的能力, 进行了竞争结合分析法。将纯化的 hr44 包被于多孔培养板的培养孔中并任其附着在塑料壁上(plastic)。洗去过量的 hr44 溶液, 并以含牛血清白蛋白(BSA)的溶液处理培养板以封闭非特异性结合位点。向各个孔中加入  $^{125}\text{I}$ -标记的 hnRNPE1 溶液, 并孵育足够长的时间使 hr44: hnRNPE1 结合得以发生。然后彻底洗涤细胞以移出  
20 未结合的  $^{125}\text{I}$ -标记的 hnRNPE1。然后以单克隆抗体, 或含无关对照蛋白(BSA)的等体积溶液处理各个孔。洗涤后, 采用平板计数器测定  $^{125}\text{I}$ -标记的 hnRNPE1 置换量。与 hr44 结合并以这种方式拮抗 hr44: hnRNPE1 相互作用的抗体使得计数量与对照孔相比显著减少。

25 实施例 5 采用酵母双杂交分析法筛选调节 hr44 与 hnRNPE1 之间相互作用的化合物

被鉴定为表达 hnRNPE1 的实施例 1 中鉴定的克隆被用于检定能够干扰 hr44:hnRNPE1 相互作用的化合物。来源于所述克隆的细胞生

长于 96-孔培养板并且各个孔中各等份细胞用可以从商业上获得的有机小分子组合文库的单个化合物处理，或不受处理(对照)。将细胞从 96-孔格式板转移到 Whatman 滤纸上(VWR 级)。使用在液氮中冻-融 (Freeze-thawing)滤纸以捕获所述细胞。然后滤纸被转移到另一个滤纸上，在含有巯基乙醇和 0.033%的 X-gal 的磷酸氢二钠/磷酸二氢钠为基础的缓冲液中预浸泡。通过颜色变蓝鉴别 $\beta$ -半乳糖苷酶生产细胞。浅兰色或白色的细胞菌落表明报道基因的表达减少。由此证明处理这些细胞的化合物能够干扰 hr44:hnRNPE1 的相互作用。

上述申请书中提及的所有出版物均通过参考结合到本申请书中。在不背离本发明的范围和精神下的本发明所述方法和系统的各种修饰和改变对于本领域内的技术人员是显而易见的。尽管本发明已经用相关的特别优选的实施方案予以说明，但是应当理解，本发明的权利要求不应当受到这些特定实施方案的限制。事实上，对于生物化学和生物技术或相关领域内的技术人员所显而易见的所述实施本发明方法的各种修饰均打算包括在下列权利要求的范围之内。

## SEQ ID No.1

## YP4 编码 cDNA 的部分序列

```

1  GAAGAGATGA TATTGAATAT TTTTCTCCCT GCTTTGCAGG GTGTACATAT
51  TCTAAAGCAC AAAACCAAAA AAAGATGTAC TACAATTGTT CTTGCATTAA
101 AGAAGGATTA ATAACTGCAG ATGCAGAAGG TGATTTTATT GATGCCAGAC
151 CCGGGAAATG TGATGCAAAG TGCTATAAGT TACCTTTGTT CATTGCTTTT
201 ATCTTTTCTA CACTTATATT TTCTGGTTTT TCTGGTGAC CAATCGTCTT
251 GGCCATGACG CGGGTTGTAC CTGACAAACT GCGTTCTCTG GCCTTGGGTG
301 TAAGCTATGT GATTTTGAGA ATATTGGGA CTATTCCTGG ACCATCAATC
351 TTTAAAATGT CAGGAGAAAC TTCTTGATT TTACGGGATG TTAATAAATG
401 TGGACACAGA GGACGTTNNT GGATATATAA CAAGACAAAA ATGGCTTTCT
451 TAATGGTANG AATATGTTTC TTGCAAACT AAGCACTATC ATCTTCACTA
501 CTATTGCATT TTCATATACA AACGTCGTCT AAATGAGAAC ACTGACTTCC
551 CAGATGTTAC TGTGAAGAAT CCCAAAAGTT AAAGAAAAAA GAAGAACTG
601 GACTTGTAAC TGGATNAACA ATGNANTCTC NAAGATNTGG TTCTGTGNCC
651 AAACCTTCAA NAAGAGGAAA ATCACACATT AAGTTTACAT AAANTNGCAA
701 AAATNTATTT ATGGGGATCG GCATTTCAAN AATNAAAGTG TT

```

5

## SEQ ID No.2

所述 cDNA(1 位至 417 位, 见 SEQ ID No.1)编码下面的 YP4 部分肽序列

```

1  RDDIEYFSPC FAGCTYSKAQ NQKKMYNCS CIKEGLITAD AEGDFIDARP
51  GKCDAKCYKL PLFIAFIFST LIFSGFSGVP IVLAMTRVVP DKLRLALGV
101 SYVILRIFGT IPGPSIFKMS GETSCILRDV NKCGHRGR

```

|                |                                                                        |         |            |
|----------------|------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 治疗化合物                                                                  |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1444653A</a>                                             | 公开(公告)日 | 2003-09-24 |
| 申请号            | CN01813558.7                                                           | 申请日     | 2001-05-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 布里斯托尔大学                                                                |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 布里斯托尔大学                                                                |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 英国布里斯托大学                                                               |         |            |
| [标]发明人         | G布劳恩<br>N麦克希尼                                                          |         |            |
| 发明人            | G·布劳恩<br>N·麦克希尼                                                        |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/18 C12N15/12 G01N33/68 A61K39/395 C07K14/47 C07K16/30 G01N33/53 |         |            |
| CPC分类号         | C07K16/18 A61K2039/505 G01N33/68 G01N2500/00                           |         |            |
| 优先权            | 2000013105 2000-05-30 GB                                               |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                         |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及用于治疗的，能够调节hr44活性和/或表达的化合物。