

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

C12N 15/09

C12N 9/99



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03819395.7

[43] 公开日 2005 年 9 月 28 日

[11] 公开号 CN 1675543A

[22] 申请日 2003. 8. 15 [21] 申请号 03819395. 7

[30] 优先权

[32] 2002. 8. 16 [33] US [31] 60/404,008

[32] 2002. 12. 16 [33] GB [31] 0229244. 9

[86] 国际申请 PCT/US2003/025766 2003. 8. 15

[87] 国际公布 WO2004/016223 英 2004. 2. 26

[85] 进入国家阶段日期 2005. 2. 16

[71] 申请人 安万特药物公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 李竹吟 熊俊杰 J·S·萨伯尔
Y·H·马

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 4 页 说明书 22 页 序列表 4 页
附图 10 页

[54] 发明名称 检测化合物或试剂降低微粒体前列腺素 E 合酶或造血前列腺素 D 合酶活性的能力的方法

[57] 摘要

本发明提供的是一种新颖和有用的方法，用于评估化合物或试剂降低微粒体前列腺素 E 合酶或造血前列腺素 D 合酶产生其相应前列腺素产物之活性的能力。

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

1.用于确定化合物或试剂是否可降低前列腺素合酶与底物反应形成前列腺素产物这一活性的方法，其中所述前列腺素合酶选自微粒体前列腺素E合酶(mPGES)和造血前列腺素D合酶(hPGDS)，所述方法包括以下步骤：

(a) 将前列腺素合酶与底物、辅因子及所述化合物或试剂混合；

(b) 将步骤(a)的混合物与终止液一起孵育，所述终止液含有阻止所述底物自发转化为前列腺素产物的试剂；

(c) 将步骤(b)的混合物与检测试剂一起孵育，所述检测试剂含有以荧光标记物标记的前列腺素产物以及以该前列腺素产物作为免疫原的抗体；

(d) 用平面偏振光照射步骤(c)的混合物和对照混合物，其中所述平面偏振光的波长可以激发荧光标记物，并测量步骤(c)的混合物和对照混合物的荧光偏振值；以及

(e) 比较步骤(d)的测定结果，

其中当发现混合物(c)的荧光偏振测量值大于对照混合物的荧光偏振测量值，则表明该化合物或试剂降低了前列腺素合酶的活性。

2.根据权利要求1的方法，其中所述前列腺素合酶是微粒体前列腺素E合酶(mPGES)，底物是前列腺素H₂(PGH₂)，辅因子是谷胱甘肽(GSH)，前列腺素产物是前列腺素E₂(PGE₂)。

3.根据权利要求2的方法，其中所述微粒体前列腺素E合酶是人mPGES，其含有SEQ ID NO: 2的氨基酸序列。

4.根据权利要求1的方法，其中所述前列腺素合酶是造血前列腺素D合酶(hPGDS)，底物是PGH₂，辅因子是谷胱甘肽(GSH)，前列腺素产物是前列腺素D₂(PGD₂)。

5.根据权利要求4的方法，其中所述造血前列腺素D合酶是人造血前列腺素D合酶，其含有SEQ ID NO: 4的氨基酸序列。

6.根据权利要求1的方法，其中所述终止液的试剂是FeCl₂。

7.根据权利要求 1 的方法,其中所述荧光标记物包含荧光素、藻红蛋白(PE)、得克萨斯红(TR)、罗丹明、游离的镧系盐、螯合的镧系盐、BODIPY、ALEXA 或 CyDye。

8.根据权利要求 7 的方法,其中所述荧光标记物是得克萨斯红(TR)。

9.根据权利要求 2 的方法,其中所述终止液的试剂是 FeCl_2 。

10.根据权利要求 9 的方法,其中所述孵育步骤(b)的持续时间为至少 30 秒,孵育步骤(c)的持续时间为至少 3 分钟。

11.根据权利要求 10 的方法,其中所述荧光标记物包含荧光素、藻红蛋白(PE)、得克萨斯红(TR)、罗丹明、游离的镧系盐、螯合的镧系盐、BODIPY、ALEXA 或 CyDye。

12.根据权利要求 11 的方法,其中所述荧光标记物是得克萨斯红(TR),平面偏振激发光的波长是 580 ± 20 nm。

13.根据权利要求 4 的方法,其中所述终止液的试剂是 FeCl_2 。

14.根据权利要求 13 的方法,其中所述荧光标记物包含荧光素、藻红蛋白(PE)、得克萨斯红(TR)、罗丹明、游离的镧系盐、螯合的镧系盐、BODIPY、ALEXA 或 CyDye。

15.根据权利要求 14 的方法,其中所述荧光标记物是得克萨斯红(TR),且平面偏振激发光的波长是 580 ± 20 nm。

16.用于确定化合物或试剂是否可降低前列腺素合酶与底物反应形成前列腺素产物这一活性的方法,其中所述前列腺素合酶选自造血前列腺素 D 合酶(hPGDS)和微粒体前列腺素 E 合酶(mPGES),所述方法包括以下步骤:

(a) 将前列腺素合酶与底物、辅因子及所述化合物或试剂混合;

(b) 将步骤(a)的混合物与终止液一起孵育,其中所述终止液含有防止未反应的底物自发转化为前列腺素产物的试剂;

(c) 将步骤(b)的混合物与检测试剂一起孵育,其中所述检测试剂含有以得克萨斯红标记的前列腺素产物以及以前列腺素产物作为免疫原的抗体;

(d) 用波长为 580 ± 20 nm 的平面偏振光照射步骤(c)的混合物和对照混合物, 并在 620 ± 20 nm 测量步骤(c)的混合物和对照混合物的荧光偏振; 以及

(e) 比较步骤(d)的测定结果,

其中当发现步骤(c)的混合物的荧光偏振测量值大于对照混合物的荧光偏振测量值, 则表明该化合物或试剂降低了前列腺素合酶的活性。

17.根据权利要求 16 的方法, 其中所述前列腺素合酶是人微粒体前列腺素 E 合酶(mPGES), 其含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列, 底物是前列腺素 H_2 (PGH_2), 辅因子是谷胱甘肽, 前列腺素产物是前列腺素 E_2 (PGE_2).

18.根据权利要求 17 的方法, 其中所述终止液的试剂是 $FeCl_2$.

19.根据权利要求 18 的方法, 其中用得克萨斯红标记的所述前列腺素产物包含一个与该前列腺素产物和得克萨斯红连接的接头分子。

20.根据权利要求 19 的方法, 其中所述接头分子选自氨基丁酸、氨基己酸、7-氨基庚酸、8-氨基辛酸、Fmoc-氨基己酸、一个或多个 β -丙氨酸、异硫氰酸酯基、琥珀酰亚胺酯、卤代二乙基砷、以及碳二亚胺。

21.根据权利要求 20 的方法, 其中所述接头分子是碳二亚胺。

22.根据权利要求 16 的方法, 其中所述前列腺素合酶是人造血前列腺素 D 合酶(hPGDS), 其含有 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列, 底物是 PGH_2 , 辅因子是谷胱甘肽, 前列腺素产物是前列腺素 D_2 (PGD_2).

23.根据权利要求 22 的方法, 其中所述终止液的试剂是 $FeCl_2$.

24.根据权利要求 23 的方法, 其中用得克萨斯红标记的所述前列腺素产物包含一个与该前列腺素产物和得克萨斯红连接的接头分子。

25.根据权利要求 24 的方法, 其中所述接头分子选自氨基丁酸、氨基己酸、7-氨基庚酸、8-氨基辛酸、Fmoc-氨基己酸、一个或多个 β -丙氨酸、异硫氰酸酯基、琥珀酰亚胺酯、卤代二乙基砷、以及碳二亚胺。

26.根据权利要求 25 的方法, 其中所述接头分子是碳二亚胺。

27.用于确定化合物或试剂是否可降低人微粒体前列腺素 E 合酶(mPGES) 与其前列腺素 H_2 (PGH_2)底物反应而形成前列腺素 E_2 (PGE_2)这

一活性的方法，其中所述人微粒体前列腺素 E 合酶含有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列，所述方法包括以下步骤：

- (a) 将 mPGES 与 PGH₂、谷胱甘肽及所述化合物或试剂混合；
- (b) 将步骤(a)的混合物与含有 FeCl₂ 的终止液一起孵育；
- (c) 将步骤(b)的混合物与检测试剂一起孵育，所述检测试剂含有以得克萨斯红标记的 PGE₂ 以及以 PGE₂ 作为免疫原的抗体；
- (d) 用波长为 580±20 nm 的平面偏振光照射步骤(c)的混合物和对照混合物，并测量步骤(c)的混合物和对照混合物的荧光偏振值；以及
- (e) 比较步骤(d)的测定结果，

其中当发现步骤(c)的混合物的荧光偏振测量值大于对照混合物的荧光偏振测量值，则表明该化合物或试剂降低了 mPGES 的活性。

28. 用于确定化合物或试剂是否可降低人造血前列腺素 D 合酶 (hPGDS) 与其前列腺素 H₂ (PGH₂) 底物反应形成前列腺素 D₂ (PGD₂) 这一活性的方法，其中所述人造血前列腺素 D 合酶含有 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列，所述方法包括以下步骤：

- (a) 将 hPGDS 与 PGH₂、谷胱甘肽及所述化合物或试剂混合；
- (b) 将步骤(a)的混合物与含有 FeCl₂ 的终止液一起孵育；
- (c) 将步骤(b)的混合物与检测试剂一起孵育，所述检测试剂含有以得克萨斯红标记的 PGD₂ 以及以 PGD₂ 作为免疫原的抗体；
- (d) 用波长为 580±20 nm 的平面偏振光照射步骤(c)的混合物和对照混合物，并测量步骤(c)的混合物和对照混合物的荧光偏振值；以及
- (e) 比较步骤(d)的测定结果，

其中当发现步骤(c)的混合物的荧光偏振测量值大于对照混合物的荧光偏振测量值，则表明该化合物或试剂降低了 hPGDS 的活性。

检测化合物或试剂降低微粒体前列腺素 E 合酶或 造血前列腺素 D 合酶活性的能力的方法

发明领域

本发明涉及一种检测化合物或试剂降低前列腺素合酶活性的能力的新颖和有用的方法。更具体地说，本发明涉及一种检测化合物或试剂降低微粒体前列腺素 E 合酶 (mPGES) 活性或造血前列腺素 D 合酶 (hPGDS) 活性的能力的方法。

发明背景

前列腺素是一类在疼痛、发烧和炎症过程中起重要作用的类花生酸 (eicosanoids)。它们在体内从花生四烯酸合成，具有一个构成花生四烯酸碳链一部分的五元碳环。前列腺素不是激素，仅在被合成部位附近起局部作用。

PGE₂ 和 PGD₂ 这两种前列腺素在发烧、疼痛和炎症中均起着特别重要的作用。尤其是，在抗原刺激下肥大细胞产生的 PGD₂ 水平升高，而 PGD₂ 是呼吸道过敏性疾病的一种主要介质。尤其是，除了其它症状之外，它可引起支气管收缩、支气管机能亢进、鼻塞、以及嗜曙红细胞和 TH₂ 细胞浸润。PGE₂ 是一种疼痛介质，已被证明在诱导痛觉过敏、发烧、血管舒张和水肿中起着一定的作用。

在体内合成过程中，磷脂酶 A₂ 将磷脂转化为花生四烯酸 (在体内以酯的形式存在)。随后，前列腺素内过氧化物合成酶再将花生四烯酸转化为前列腺素 G₂ (PGG₂)。前列腺素内过氧化物合成酶还可催化 PGG₂ 中过氧化物基团的还原反应，而形成前列腺素 H₂ (PGH₂)，其中 PGH₂ 是 PGE₂ 和 PGD₂ 的前体。在产生 PGE₂ 的情况下，前列腺素 E 合酶 (PGES)

在辅因子谷胱甘肽 (GSH) 存在时将 PGH_2 转化为 PGE_2 。至少存在两种 PGE_2 合成酶, 即细胞质 PGES (cPGES) 和微粒体 PGES (mPGES)。这两种 PGES 被广泛地表达在许多组织中并重叠分布。mPGES 可被炎性刺激物例如脂多糖 (LPS)、IL-1 和 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导, 而 cPGES 的表达则是组成性的。此外, 已经证明 mPGES 与 COX-2 活性有关联 [Murakami 等, *J. Biol. Chem.* 275:32783 (2000)]。

PGD_2 的产生是前列腺素 D 合成酶 (PGDS) 将 PGH_2 转化为 PGD_2 的结果。已知有两种类型的 PGD_2 合酶。第一种是载脂型 (lipocalin-type) PGDS (L-PGDS), 主要见于中枢神经系统内; 第二种是造血型 PGDS (hPGDS), 主要见于外周组织。L-PGDS 不依赖于谷胱甘肽 (GSH), 而 hPGDS 则依赖于 GSH, 并具有 GST 活性。此外, L-PGDS 和 hPGDS 两者之间几乎没有结构同源性。

由于 PGD_2 和 PGE_2 在发烧、疼痛和炎症过程中起着重要作用, 人们已经作出许多努力来建立各种检测方法, 以检测那些可能降低甚至抑制其产生的化合物。尤其是, 为了测定某种化合物或试剂降低或抑制前列腺素合酶活性的能力, 许多技术例如 HPLC、ELISA 或 RIA 等已被用于定量分析 PGD_2 和 PGE_2 的产生。然而, 这些技术都具有一定固有的局限性。例如, 它们需要多个洗涤步骤、纯化步骤和/或使用放射性物质。还有, 这些方法比较费时, 日通量只有几十 (HPLC) 到几百 (ELISA 和 RIA) 个数据点。因此, 它们不能用于高通量筛选。

荧光偏振技术是一种用于研究分子间相互作用的技术。这项技术的原理取决于被鉴定分子的大小。尤其是, 当用平面偏振光照射荧光分子的时候, 被测分子中处于基态的电子跃迁到激发态。在大约 4-5 纳秒之后, 这些激发态电子又跃迁回到基态。正是在此衰变过程中, 该待测分子发射出荧光信号。在荧光偏振过程中, 只有在被测分子在整个激发态始终保持静止的情况下, 才能在同一平面上检测到这种荧光发射。如果该分子在激发态期间发生运动或旋转, 则所发射的荧光将处于与激发该电子的偏振光不同的平面上。结果, 将检测不到荧光发射。已经普遍接受的是, 分子越小

则其运动性和旋转性越大。因此，小分子产生的信号将比大分子小得多，因为大分子在激发态期间将保持相对的静止。荧光偏振利用的正是分子的这种性质。尤其是，在荧光偏振法分析某种配体的过程中，该配体、示踪剂（即以荧光标记物标记的配体）和与该配体结合的受体被置于溶液中。于是，该配体和示踪剂为了结合到受体上而互相竞争。然后，用平面偏振光照射该溶液，再进行信号检测。如果溶液中没有多少配体，则所存在的大多数受体将结合示踪剂。由于受体是一种大分子（相对于配体而言），故可获得一种来自标记物荧光的信号，而且可获得很强的荧光偏振信号。相反，如果存在大量的配体，则大部分受体将与该配体结合。结果，如果有信号产生的话，由示踪剂单独产生的荧光偏振信号将明显小于前述由结合受体的示踪剂所产生的信号。正是这些信号之间的差异，使得本技术领域一位普通的技术人员即能确定该配体是否存在并能测定其浓度。荧光偏振按毫荧光偏振度，或 mP 为单位测量。

因此，荧光偏振比 ELISA、HPLC 和 RIA 等检测方法用起来更为简便有效。而且，它可容易地用于在很短的时间内高通量筛选大量的化合物或试剂。

所以，所需要的正是一种荧光偏振方法，用于评价化合物或试剂降低或甚至抑制前列腺素合酶活性的能力，尤其是评价某种试剂或化合物是否能够降低或抑制 mPGES 产生 PGE₂ 的能力，以及评价某种试剂或化合物是否能够降低或抑制 hPGDS 产生 PGD₂ 的能力。

所需要的还有一种高通量系统，用于评价化合物或试剂降低或抑制前列腺素合酶的活性尤其是 mPGES 或 hPGDS 的活性的能力。降低或甚至抑制造血前列腺素 D₂ 合酶（hPGDS）或可诱导的微粒体前列腺素 E₂ 合酶（mPGES）活性的化合物也许可用于治疗炎症和过敏症状，如关节炎、哮喘以及鼻炎等，此处只举几个例子。此外，疼痛和/或发烧可能也能用这样的化合物或试剂来治疗。

本文对任何参考文献的引用不应被解释为是承认这类参考文献是本申请的“现有技术”。

发明概述

按照本发明，我们提供一个新的有效方法，用于评价化合物或试剂降低或甚至抑制 mPGES 或 hPGDS 产生各自的前列腺素产物之活性的能力，该方法不使用放射性同位素，不需要繁多的洗涤步骤，而且可以体外操作后输回体内的方式，以体外操作的方式，或以细胞为基础的方式实施，也可以分离的方式实施。此外，本发明的方法可很容易地以高通量的方式实施。

广义地，本发明可引申为一种方法，用于确定一种化合物或试剂是否能够降低前列腺素合酶与其底物反应形成前列腺素产物的活性。其中该前列腺素合酶选自微粒体前列腺素 E 合酶 (mPGES) 和造血前列腺素 D 合酶 (hPGDS)。本发明的这种方法包括以下步骤：将前列腺素合酶与其底物、辅因子和待测化合物或试剂混合，使得酶促反应能够发生；然后将该混合物与终止液一起孵育，该终止液含有阻止未反应的底物自发转化为前列腺素产物的试剂；然后再将该混合物与一种这样的检测试剂一起孵育，该检测试剂含有荧光标记物（即一种示踪剂）标记的前列腺素产物，以及以前列腺素产物作为免疫原所产生的抗体；随后，用平面偏振光照射该混合物和以同一方式处理但不含待测化合物或试剂的对照混合物，该平面偏振光的波长为荧光标记物所发出荧光的波长。测定并比较待测混合物与对照混合物的荧光偏振值。如果待测混合物的偏振值大于对照混合物的偏振值，则表明所测化合物或试剂可以降低前列腺素合酶活性。因此，这样的化合物或试剂可以容易地用于治疗患有炎症、过敏、疼痛和发烧或这些病症的任意组合的受试者，此处仅为几个例子而已。

此外，本发明可延伸至如上所述的一种方法，其中前列腺素合酶是可诱导的微粒体前列腺素 E 合酶 (mPGES)，底物是前列腺素 H_2 (PGH_2)，辅因子是谷胱甘肽 (GSH)，前列腺素产物是前列腺素 E_2 (PGE_2)。本发明之方法所用的 mPGES 可以来源于牛、羊、啮齿类动物、马、狗、人、猫等等。在一具体实施方案中，mPGES 来源于人，其氨基酸序列如图 9B

和 SEQ ID NO:2 所示。此外，应用于本发明方法的 mPGES 不必为纯化形式。

本发明可进一步延伸为这样的方法，如本申请书所述，用于确定一种化合物或试剂是否能够降低前列腺素合酶与其底物反应而形成一种前列腺素产物的活性。其中前列腺素合酶是造血前列腺素 D 合酶 (hPGDS)，底物是 PGH_2 ，辅因子是 GSH，前列腺素产物是前列腺素 D_2 (PGD_2)。正如 mPGES 一样，应用于本发明方法的 hPGDS 可以有众多的来源。在一具体实施方案中，hPGDS 是人 hPGDS，其氨基酸序列如图 10B 和 SEQ ID NO:4 所示。而且，hPGDS 不必为纯化形式。

正如上文所述，在本发明方法中，终止液含有阻止未反应的底物自发转化为前列腺素产物的试剂。尤其是，如上所述的两种前列腺素合酶的底物 PGH_2 含有过氧化物基团。虽然无义务解释其机制，当然也不想受任何解释的限制，但据认为 mPGES 和 hPGDS 可催化 PGH_2 的过氧化物基团的氧键断裂，并将 PGH_2 分别转化为 PGE_2 和 PGD_2 。然而， PGH_2 也会自发转化为 PGE_2 或 PGD_2 。这种自发转化可以干扰并改变对化合物或试剂降低 mPGES 或 hPGDS 活性之能力的分析结果。因此在本发明方法中，将待测混合物与终止液一起孵育，该终止液含有阻止 PGH_2 自发转化为 PGD_2 或 PGE_2 的试剂。这种试剂的一个具体例子是浓度约为 20 mM 的 FeCl_2 。然而，本技术领域一位普通的技术人员就可以容易地熟悉可阻止这种同步转化的其它试剂，而这类试剂也包括在本发明方法中。而且，这种孵育的持续时间可以改变，但必须长得足以阻止任何剩余的未反应 PGH_2 转化为前列腺素产物。

此外，本发明可延伸至这样的方法，用于确定一种化合物或试剂是否能够降低前列腺素合酶，尤其是 mPGES 或 hPGDS，与其底物反应形成一种前列腺素产物的活性。其中该待测混合物与终止液一起孵育之后，再与检测试剂一起孵育，该检测试剂含有用荧光标记物标记的前列腺素产物和以前列腺素产物作为免疫原的抗体。本技术领域那些普通技术人员都知道的众多荧光标记物均可应用于本发明之方法。这些荧光标记物的例子包

括荧光素、藻红蛋白 (PE)、得克萨斯红 (Texas red, TR)、罗丹明、游离的镧系元素盐、螯合的镧系元素盐、CyDye (Amersham Biotech 公司产品)、BODIPY (Molecular Probes 公司产品) 和 ALEXA (Molecular Probes 公司产品) 等, 此处仅为几个例子而已。在一具体实施方案中, 荧光标记物是得克萨斯红。此外, 荧光标记物可以直接结合前列腺素产物上, 或者备选地先结合到一个接头分子上, 通过该接头分子再结合到前列腺素产物上。本发明所用的具体的接头分子包括, 但当然不限于, 氨基丁酸、氨基己酸、7-氨基庚酸、8-氨基辛酸、Fmoc-氨基己酸、一个或多个 β -丙氨酸、异硫氰酸酯基团、琥珀酰亚胺酯、卤代二乙胺或碳二亚胺等, 此处仅为几个例子而已。在本发明的一具体实施方案中, 该前列腺素产物先结合到一个碳二亚胺接头上, 通过该接头再结合到荧光标记物如得克萨斯红上。

此外, 本发明可延伸至这样的方法, 用于确定一种化合物或试剂是否能够降低或抑制可诱导的微粒体前列腺素 E 合酶 (mPGES) 与其底物前列腺素 H_2 (PGH_2) 反应生成前列腺素 E_2 (PGE_2), 此方法包括以下步骤:

(a) 将 mPGES 与 PGH_2 、谷胱甘肽 (GSH) 和待测化合物或试剂混合至少 30 秒;

(b) 步骤 (a) 之混合物与含有 $FeCl_2$ 的终止液一起孵育;

(c) 将步骤 (b) 之混合物与一种检测试剂一起孵育, 该检测试剂含有用得克萨斯红标记的 PGE_2 和以 PGE_2 作为免疫原的抗体;

(d) 用波长为 580 ± 20 nm 的平面偏振光照射步骤 (c) 之混合物和对照混合物, 并测定步骤 (c) 之混合物和对照混合物的荧光偏振值;

(e) 比较步骤 (d) 的测定结果。

如果含有被测化合物或试剂的混合物的荧光偏振测定值大于对照混合物的荧光偏振测定值, 则表明该化合物或试剂可降低 mPGES 的活性。在一具体实施方案中, mPGES 是人 mPGES, 其氨基酸序列如图 9B 和 SEQ ID NO:2 所示, PGE_2 和得克萨斯红通过碳二亚胺接头连接。得克萨斯红的激发波长是 580 nm。然而, 此波长可以在 $580 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ 范围内。类似地, 得克萨斯红的荧光发射波长通常被认为是 620 nm。然而, 这个波长可

以在 $620\text{ nm} \pm 20\text{ nm}$ 的范围内变化。激发波长和发射波长的这种变化被包括在本发明中。而且，正如前面所说明的，mPGES 不必为纯化形式。

此外，本发明可延伸至这样的方法，用于确定一种化合物或试剂是否能够降低造血前列腺素 D 合酶 (hPGDS) 与其底物前列腺素 H_2 (PGH_2) 反应形成前列腺素 D_2 (PGD_2)，此方法包括以下步骤：

(a) 将 hPGDS 与 PGH_2 、GSH 和待测化合物或试剂混合至少 30 秒；

(b) 将步骤 (a) 之混合物与含有 FeCl_2 的终止液一起孵育；

(c) 将步骤 (b) 之混合物与一种检测试剂一起孵育，该检测试剂含有得克萨斯红标记的 PGD_2 和以 PGD_2 作为免疫原的抗体；

(d) 用波长为 $580 \pm 20\text{ nm}$ 的平面偏振光照射步骤 (c) 之混合物和对照混合物，并测定步骤 (c) 之混合物和对照混合物的荧光偏振值；

(e) 比较步骤 (d) 的测定结果。

如果含有被测化合物或试剂的混合物的荧光偏振测定值大于对照混合物的荧光偏振测定值，则表明该化合物或试剂可降低 hPGDS 的活性。在一具体实施方案中，hPGDS 是人 hPGDS，其氨基酸序列如图 10B 和 SEQ ID NO:4 所示，得克萨斯红和 PGD_2 通过碳二亚胺接头以化学键连接。

此外，本发明可延伸至这样的方法，用于确定一种化合物或试剂是否能够降低前列腺素合酶如 mPGES 或 hPGDS，产生前列腺素产物的活性，而且这种方法是高通量方式进行的。

因此，本发明的一个方面是提供一种方法，用于评价化合物或试剂降低或甚至抑制前列腺素合酶，如 mPGES 或 hPGDS 的活性的能力。所以，本发明的方法使得本技术领域一位普通的技术人员能够鉴定可应用于治疗受试者疼痛、炎症、发烧、或这些病症的某种组合的化合物或试剂。

本发明的另一个方面是提供一种方法，用于评价化合物或试剂降低或抑制 mPGES 或 hPGDS 的活性的能力，而且这种方法不需要洗涤步骤或利用放射性同位素。

本发明还有一个方面是提供一种方法，用于评价化合物或试剂降低或

抑制前列腺素合酶如 mPGES 或 hPGDS 的活性的能力，而且这种方法可以体外操作后输回体内的方式，以体外操作的方式，或以细胞为基础的方式实现，也可以分离的方式实施。

本发明还有另一个方面是提供一种方法，用于评价化合物或试剂降低或抑制前列腺素合酶的活性的能力，而且这种方法可以高通量方式进行。

通过参考以下附图和本发明之详细说明，将能更好地理解本发明的这些方面及其它方面。

附图简述

图 1 是底物 PGH_2 转化为 PGE_2 的酶促转化反应与 PGH_2 转化为前列腺素产物 PGD_2 或 PGE_2 的自发转化反应之间的竞争示意图，其中所用的酶是 mPGES，防止该自发转化反应的试剂是 FeCl_2 。

图 2 是本发明之一种方法的示意图，其中前列腺素合酶是 mPGES，前列腺素产物是 PGE_2 。

图 3 是底物 PGH_2 转化为 PGD_2 的酶促转化反应与 PGH_2 转化为前列腺素产物 PGD_2 或 PGE_2 的自发转化反应之间的竞争示意图，其中所用的酶是 hPGDS，防止该自发转化反应的试剂是 FeCl_2 。

图 4 是本发明之一种方法的示意图，其中前列腺素合酶是 hPGDS，前列腺素产物是 PGD_2 。

图 5 显示了 MK-886 的化学结构。MK-886 是一种已知的 mPGES 抑制剂，用于证明本发明的方法使我们能够确定一种化合物或试剂是否能够降低或抑制前列腺素合酶的活性。

图 6 是利用前列腺素合酶 mPGES 和已知的抑制剂 MK-886 而绘制的本发明之方法的浓度反应曲线示意图。IC₅₀ = 27.5 μM 。这些结果表明，本发明的方法使本技术领域一位普通的技术人员能够确定一种化合物或试剂是否能够降低前列腺素合酶的活性。此例中的前列腺素合酶是 mPGES。

图 7 显示了 HQL 79 的化学结构。

图 8 是一个柱形图，显示了由 HQL 79 所引起的 hPGDS 活性下降可以通过本发明的方法来检测。

图 9A 和 9B 显示了用于下文实施例 I 中的人 mPGES 的核苷酸序列和氨基酸序列（分别为 SEQ ID NO: 1 和 2）。

图 10A 和 10B 显示了人 H-PGDS 的核苷酸序列和氨基酸序列（SEQ ID NO: 分别为 3 和 4）。

发明详述

本发明基于这样一个出乎意料的惊人发现：荧光偏振可用于鉴定那些可降低前列腺素合酶（如 mPGES 或 hPGDS）产生前列腺素（如 PGD₂ 或 PGE₂）的活性的化合物或试剂。因此广义地说，本发明可延伸至这样的方法，用于确定一种化合物或试剂是否能够降低前列腺素合酶与其底物反应生成前列腺素产物的活性，其中所述前列腺素合酶选自 mPGES 或 hPGDS，此方法包括以下步骤：

- (a) 前列腺素合酶与其底物、辅因子和待测化合物或试剂混合；
- (b) 将步骤 (a) 之混合物与终止液一起孵育，该终止液含有阻止该底物自发转化为前列腺素产物的试剂；
- (c) 将步骤 (b) 之混合物与检测试剂一起孵育，该检测试剂含有以荧光标记物标记的前列腺素产物，以及以该前列腺素产物作为免疫原的抗体；
- (d) 用线性偏振光照射步骤 (c) 之混合物和对照混合物，该偏振光的波长为荧光标记物所发出荧光的波长，并测定步骤 (c) 之混合物和对照混合物的荧光偏振值；以及
- (e) 比较步骤 (d) 的测定结果，

上述步骤中如果步骤 (d) 之混合物的荧光偏振测定值大于对照混合物的荧光偏振测定值，则表明该化合物或试剂可降低前列腺素合酶的活性。

贯穿本说明书和所附权利要求书的众多术语与短语之定义如下，即：

本文中所用的术语“化合物”或“试剂”指的是目前已知的或以后发

现的任何化学成份。本发明所用的化合物或试剂的例子包括有机化合物(例如人造的或天然存在的)、肽(人造的或天然存在的)、糖类、核酸分子等等。

本文中所用的术语“酶”指的是这样的生物分子,例如可催化特定化学反应的蛋白质或RNA。酶不影响催化反应的平衡,而是通过降低活化能的方式来提高反应速度。

本文中所用的术语“前列腺素合酶”指的是可催化前列腺素 H_2 (PGH_2) 转化为前列腺素产物的酶。应用于本发明的前列腺素合酶的具体例子包括可诱导的微粒体前列腺素 E 合酶(mPGES),该酶在辅因子谷胱甘肽(GSH)存在的情况下将前列腺素 H_2 转化为前列腺素 E_2 (PGE_2)。另一个例子是造血前列腺素 D 合酶(hPGDS),该酶在辅因子 GSH 存在的情况下将前列腺素 H_2 转化为前列腺素 D_2 (PGD_2)。

本文中所用的术语“底物”指的是在酶的作用下以产生反应产物的化合物。本发明所用底物的例子是 PGH_2 。

本文中所用的术语“辅因子”指的是对酶活性所需的有机分子、无机分子、肽或蛋白质。在本发明的一具体实施方案中,前列腺素合酶是 mPGES 或 hPGDS,辅因子是谷胱甘肽(GSH)。

本文中所用的术语“前列腺素产物”指的是由于前列腺素合酶作用于前列腺素合酶的底物而生成的反应产物。因此,对于 mPGES,该前列腺素产物是 PGE_2 ; 对于 hPGDS,该前列腺素产物是 PGD_2 。

本文中所用的术语“荧光标记物”指的是当用特定波长的光照射时可发出荧光的物质,该物质可直接结合到目的化合物上或者先结合到一个接头分子上,通过该接头再结合到目的化合物上。应用于本发明方法的荧光标记物的例子包括,但当然不限于,荧光素、藻红蛋白(PE)、得克萨斯红(TR)、罗丹明、游离的镧系元素盐、螯合的镧系元素盐、BODIPY、ALEXA、CyDye 等。应用于本发明之方法的一种特定的荧光标记物是得克萨斯红。

本文中所用的术语“接头”和“接头分子”可互换使用,指的是与荧

光标记物和前列腺素产物结合的化学部分。应用于本发明的接头的具体例子包括氨基丁酸、氨基己酸、7-氨基庚酸、8-氨基辛酸、Fmoc-氨基己酸、一个或多个 β -丙氨酸、异硫氰酸酯基团、琥珀酰亚胺酯、卤代二乙砷或碳二亚胺等，此处仅为几个例子而已。应用于本发明的接头的的一个具体例子是碳二亚胺基团。

本文中所用的术语“对照混合物”指的是与含有被测化合物或试剂的混合物相比，含有同样数量的同样试剂、化合物、细胞等物质的混合物，并且以与含有被测化合物或试剂的混合物一样的方式处理，所不同的是，该对照混合物不含被测化合物或试剂。

抗体

正如上文所解释，本发明的方法使用了具有以前列腺素产物例如 PGD_2 或 PGE_2 作为免疫原的抗体。这种抗体可以是单克隆抗体、多克隆抗体、乃至嵌合抗体。本技术领域已知的许多方法都可用于制备 PGE_2 或 PGD_2 的多克隆抗体。为了制备抗体，可通过注射前列腺素产物使多种宿主动物免疫，这些宿主动物包括但不限于兔、小鼠、大鼠、绵羊、山羊等。在一具体实施方案中， PGE_2 或 PGD_2 可以连接至免疫原性载体上，例如牛血清白蛋白(BSA)或匙孔血蓝蛋白(KLH)。可使用多种佐剂以提高免疫应答，根据宿主的物种，可用的佐剂包括但不限于弗氏佐剂(完全和不完全)、氢氧化铝等矿物凝胶、溶血卵磷脂等表面活性物质、复合多元醇(Pluronic polyols)、多聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔血蓝蛋白、二硝基酚、卡介苗(*bacille Calmette-Guerin*, BCG)或小棒杆菌(*Corynebacterium parvum*)。

对于制备针对前列腺素产物的单克隆抗体，任何通过培养的传代细胞系制备抗体分子的技术都可以使用。这些技术包括但不限于最初由Kohler和Milstein开发的杂交瘤细胞技术[Nature 256:495-497 (1975)]、trioma技术、人类B细胞杂交瘤细胞技术[Kozbor等, Immunology Today 4:72 (1983); Cote等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030 (1983)]，以及制备人源单克隆抗体的EBV-杂交瘤技术[Cole等, 在 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc.一书中的 77-96 页

(1985)]。此外，单克隆抗体还可以利用专利 PCT / US90 / 02545 中所述的技术在无菌动物体内制备。为制备“嵌合抗体”而开发的技术也可以利用 [Morrison 等, J. Bacteriol. 159:870 (1984); Neuberger 等, Nature 312:604-608 (1984); Takeda 等, Nature 314:452-454 (1985)], 该技术将前列腺素产物特异的小鼠抗体分子基因剪接到具有适当生物学活性的人源抗体分子基因上。

条件

正如上文所解释，本发明的方法可以体外操作后输回体内的方式，以体外操作的方式实施；或以分离的方式实施，其中所有的试剂、酶、底物等先分离出来并保存于 TRIS、TRIS 盐酸、HEPEs、或磷酸盐这样的缓冲液中；也可以细胞为基础的方式实施。此外，在本发明的方法中，前列腺素合酶不必经过纯化。

在以细胞为基础的分析中，本发明的方法用于确定被测化合物或试剂是否能够防止或减少细胞分泌前列腺素产物，而在体外方法中，细胞可以在使用本发明的方法之前裂解，使得可以在胞内介质中待测化合物或试剂。

搜索化合物库寻找可降低或抑制前列腺素合酶活性的候选化合物或试剂

按照惯例，产生具有有用性质的新化合物实体要经过以下步骤：鉴定具有某些所需性质或活性的化合物（称为先导化合物(lead compound)），制备该先导化合物的变体，以及评价这些化合物变体的性质和活性。然而，目前的趋势是缩短药物开发所有阶段所需的时间。由于高通量筛选（HTS）法能够快速有效地进行大批量试验，所以这种方法取代了传统的先导化合物鉴定法。

在一具体实施方案中，高通量筛选法涉及提供一批含有大量潜在治疗性化合物（候选化合物）的化合物。然后，利用本发明的方法筛选这种“历史性（historic）化合物群”，以鉴定这批化合物中显示了所需特征活性的那些化合物（特定的化合物类别或亚类）。如此鉴定的化合物可以用作为传统的“先导化合物”或其本身即可用作为潜在的或实际的治疗剂。

组合化合物库

组合化合物库是一种帮助产生新的先导化合物的首选方法。组合化合物库是通过组合许多化学“结构单元”例如试剂而以化学或生物学方式合成的各种各样化合物的集合。例如，线性组合化合物库如多肽库，是由一组被称为氨基酸的化学结构单元按照预定的化合物长度（即多肽化合物中氨基酸的数量）以多种可能的方式组合而成的。几百万种化合物可以通过这种化学结构单元组合性混合而合成。例如，一位评论员注意到系统性地组合混合 100 个可互换的化学结构单元，在理论上可合成一亿种四聚体化合物或 100 亿种五聚体化合物 (Gallop 等, 应用组合技术进行药物发现 2. 组合的有机合成, 文库筛选策略和未来方向, *J. Med. Chem.* (1994) 37(9): 1233-1251)。

组合化合物库的制备对于本技术领域那些普通技术人员来说是众所周知的。这种组合化合物库包括但不限于肽库(参阅, 如美国专利 5,010,175, Furka (1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37: 487-493, Houghton 等(1991) *Nature*, 354: 84-88)。肽的合成决不是所预见和计划用于本发明的唯一方法。其它产生化学多元库的化学物质也可以使用。这样的化学物质包括但不限于: 类肽 (peptoids) (PCT 公开号 WO 91/19735, 1991 年 12 月 26 日)、编码肽 (encoded peptides) (PCT 公开 WO 93/20242, 1993 年 10 月 14 日)、随机生物寡聚体 (PCT 公开 WO 92/00091, 1992 年 1 月 9 日)、苯二氮革类 (benzodiazepines) (美国专利号 5,288,514)、多样体类 (diversomers) 例如乙内酰脲类、苯二氮革类和二肽等 (Hobbs 等, (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 69096913)、插烯多肽 (vinylogous polypeptides) (Hagihara 等(1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568)、具有 β -D-葡萄糖骨架的非肽类拟肽 (Hirschmann 等, (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 92179218)、小化合物库类似的有机合成体 (Chen 等 (1994) *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661)、寡聚氨基甲酸酯 (oligocarbamates) (Cho 等, (1993) *Science* 261:1303), 和/或磷酸肽酯 (Campbell 等, (1994) *J. Org. Chem.* 59: 658)。这类组合化合物库包括合成库 (参阅 Gordon 等, (1994)

J. Med. Chem. 37:1385)、核酸库、肽核酸库(参阅美国专利 5,539,083 等)、抗体库(参阅 Vaughn 等(1996) Nature Biotechnology, 14(3): 309-314) 和 PCT/US96/10287)、糖类库(参阅 Liang 等 (1996) Science, 274: 1520-1522 和 美国专利 5,593,853), 以及小有机分子库(例如关于苯二氮革类可参阅 Baum (1993) C&EN, 1月18日, 33页, 关于异戊二烯类可参阅美国专利 5,569,588, 关于噻唑烷酮类(thiazolidinones)和间噻嗪酮类(metathiazanones)可参阅美国专利 5,549,974, 关于吡咯烷类可参阅美国专利 5,525,735 和 5,519,134, 关于吗啉代化合物类可参阅美国专利 5,506,337, 关于苯二氮革类可参阅 5,288,514 等)。

制备组合库的设备可经商业途径购得(参阅如 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA)。

业已开发了一系列用于液相化学物质的熟知机器人系统。这些系统包括自动化工作站, 如 Takeda Chemical Industries, LTD. (日本大阪) 开发的自动合成仪器, 以及许多利用机器手的机器人系统(Zymate II, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.), 这些自动化工作站可模仿化学工作者进行的手工合成操作。上述的任何设备均适合用于本发明。为使这些设备可以按照本文所讨论的方式运转, 可对这些设备进行改造。而这些改造(如果有的话)的本质和实施办法对于有关技术领域中那些精通技术的人员来说是显而易见的。此外, 许多组合库本身已经商业化(参阅 ComGenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd., Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, 等)。

化合物库的高通量分析

自然, 采用荧光偏振技术的本发明方法可以很容易地适应高通量筛选。高通量筛选系统已经商业化(参阅如 Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Fullerton, CA;

Precision Systems Inc., Natick, MA 等)。这些系统一般可以使整个程序自动化,包括样品和试剂的吸移、液体的分配、计时的孵育、适合于该分析的检测器中微孔板的最后读数等。这些可灵活装配的系统可实现高通量分析、可快速启动、具有高度的操作弹性并可实现高度的专用化。这类系统的制造商为各种各样的高通量分析提供了详细的方案。例如, Zymark 公司为检测基因转录的调控、配体结合等用途的筛选系统提供了技术通讯。

通过参考以下作为本发明示范性例子的非限制性实施例,对本发明将会有更透彻的理解。提供以下的实施例是为了更充分地阐明本发明优选的实施方案。然而,它们决不应该被解释为是限制本发明的广大范围。

实施例 I

可诱导的微粒体前列腺素 E 合酶(mPGES)的荧光偏振试验

前列腺素 E₂ (PGE₂)是涉及炎症和疼痛的一种主要介质。微粒体前列腺素 E 合酶(mPGES)在谷胱甘肽存在时可催化 PGH₂ 向 PGE₂ 的转化。它在许多炎症性疾病中诱导了 mPGES 的表达。因此,可降低或抑制 mPGES 活性的化合物将是治疗炎症、疼痛、发烧、或这些病症组合的有效药物,此处只列举几种疾病或异常。

业已开发了一种通过可诱导微粒体 PGE₂ 合酶来测定 PGH₂ 向 PGE₂ 转化的试验方法。该试验方法是根据荧光偏振原理而设计的。将该酶与 PGH₂、谷胱甘肽以及被评价的化合物或试剂一起孵育。经过一个短期孵育(至少 30 秒),加入含有 FeCl₂ 和柠檬酸的终止液以淬灭任何剩余的 PGH₂,否则它将自发转化为 PGD₂ 或 PGE₂,并因此而干扰 PGH₂ 向 PGE₂ 酶促转化的定量分析(图 1)。然后,加入含有荧光标记(得克萨斯红)的示踪剂(PGE₂)和抗 PGE₂ 抗体的检测溶液,以产生与 PGE₂ 的产生成反比的特殊信号(图 2)。从该酶促反应产生的 PGE₂ 将特异竞争该抗体,并释放出荧光标记示踪剂。PGE₂ 合酶活性的抑制将导致 FP 值的增加。

材料

谷胱甘肽(GSH):

购自 Sigma (产品目录#G-6529)。

PGH₂

购自 Caymen Chemicals, Inc. (产品目录#17020)。

PGE₂ 单克隆抗体

购自 Assay Designs, Inc. (产品目录#915-057)

PGE₂:

购自 Caymen Chemicals, Inc. (产品目录#14010)

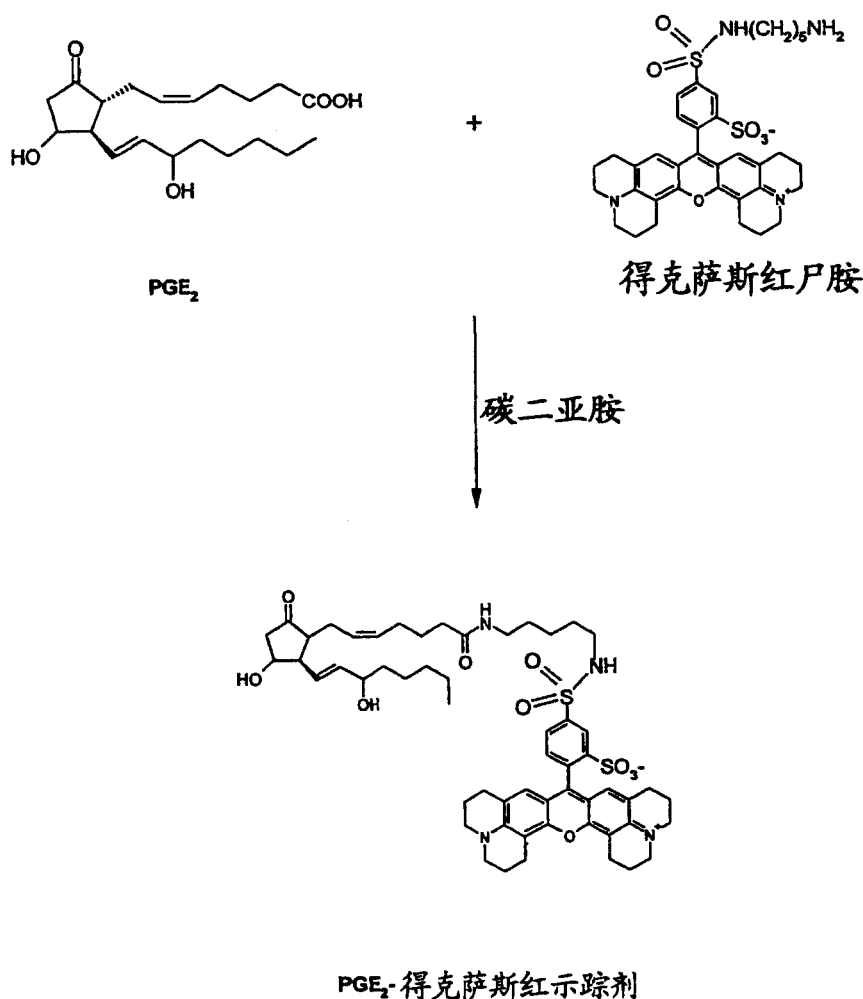
人 mPGES 酶的表达

人 mPGES 酶是采用以下文献中所述的细菌表达系统以及步骤表达的: [Jakobsson, P.等(鉴定人前列腺素 E 合酶: 为一种依赖微粒体谷胱甘肽的可诱导性酶, 构成了潜在的新药物靶, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:7220-7225 (June, 1999))。因此, 在此实施例中所用的 mPGES 不是采取纯化的形式, 而是包含在取自表达 mPGES 的细菌的膜级分内。用于此实施例的编码人 mPGES 的 DNA 序列如图 9A 和 SEQ ID NO: 1 所示。用于此实施例的人 mPGES 的氨基酸序列如图 9B 和 SEQ ID NO: 2 所示。

荧光标记的前列腺素产物 PGE₂

如上所述, 许多荧光标记物用于本发明的方法。在一具体实施方案中, 荧光标记物的得克萨斯红连接通过一个接头分子与前列腺素 E₂ (PGE₂) 连接。在这一具体实施方案中, 以得克萨斯红标记的 PGE₂ 是 Combinix (San Mateo, California) 公司合成的。产生这一分子的机理如下所述:

PGE₂ 示踪剂合成



在这一合成过程中，将得克萨斯红尸胺 (Molecular Probes 公司产品) 加入无水二氯甲烷中的前列腺素 E₂ (Cayman Chemicals) 溶液。加入二环己基碳二亚胺 (Sigma Aldrich)，在氮气气氛下于黑暗中搅拌反应物 24 小时。通过反向 HPLC 色谱法进行纯化，使用水/乙腈梯度且以 0.05 % TFA 作为改性剂。用于这一合成过程的接头分子可以有所变化。

方法

首先，用含有 K₂HPO₄ 和 KH₂PO₄ 的反应缓冲液稀释该含酶的膜级分，以制备磷酸盐缓冲的酶溶液。然后将待测的化合物或试剂放入该酶溶液内。任选地，也可进一步孵育此溶液。在这一具体实施方案中，孵育此溶液约 30 分钟。然后将底物 PGH₂ 的丙酮溶液和辅因子 GSH 置于另一 4 °C 的容器内。再将酶溶液加入含有 PGH₂ 的容器以开始反应。孵育此混合物约 30

秒钟。然后，将含有浓度为 20 mM 的 FeCl_2 的终止液加入该混合物，以防任何剩余的 PGH_2 自发转化为 PGE_2 。然后，将含有抗 PGE_2 抗体和 PGE_2 - 得克萨斯红示踪剂的检测溶液加入该混合物，并孵育整个混合物。在这一具体实施方案中，该孵育期约为 120 分钟。但是，熟悉此技术者可以改变此实施例所述的任何孵育期的长短而仍可获得有用的结果。对照混合物除了不含该化合物或试剂之外，与此混合物完全相同，且受到同样的处理，也就是说，它含有同样的试剂，孵育了同样的时间，等等。然后，用波长为 580 nm 的平面偏振光照射整个混合物和对照混合物，并用激发波长和发射波长分别设定为 580 nm 和 620 nm 的荧光过滤器测量此混合物和对照混合物的荧光偏振值。在该测量仪器处于 FP 模式的情况下进行测量。然后将这两次测量值进行比较，以确定含有该化合物或试剂的混合物其荧光偏振测量值是否大于对照溶液的荧光测量值。若该混合物的测量值大于对照混合物的测量值，则表明该化合物或试剂降低了 mPGES 的活性。

结果

上述的试验通过使用一种已知的 mPGES 抑制剂而得到了验证。这种抑制剂 MK-886 可购自 Biomol Research Laboratories, Inc. (Plymouth Meeting, PA, Catalog #EI-266)，化学文摘登记号为 CAS#118414-82-7。其结构如图 5 所示。此实验的结果如图 6 所示。这些结果显示了该 mPGES 试验的浓度反应曲线，并清楚地表明，此方法可用于检验某化合物或试剂降低、甚至抑制 mPGES 活性的能力。

实施例 II

造血前列腺素 D 合酶(hPGDS)的荧光偏振分析

抗原性刺激将在气管过敏性疾病中增加 PGD_2 的产生。由于造血前列腺素 D 合酶(hPGDS)使 PGH_2 转化为 PGD_2 而产生的 PGD_2 ，与 D 型前列腺素受体(DP)和 Th2 细胞的趋化因子受体(CRTH2)两者结合，并增加支气管狭窄、血管舒张和鼻粘膜扩张。由此而引起的支气管机能亢进、鼻阻塞和嗜曙红细胞和 Th2 细胞浸润导致过敏反应。所以，降低或抑制 hPGDS 活性的化合物或试剂可以容易地作为治疗剂使用。

对测量 hPGDS 活性的荧光偏振(FP)试验(图 3 和 4)也进行了研究。该试验是根据荧光偏振原理而设计的。将 hPGDS 与 PGH₂、谷胱甘肽以及被评价的化合物或试剂一起孵育。经过一个短的孵育期(约 30 秒),加入含有 FeCl₂(20 mM)的终止液以淬灭任何剩余的 PGH₂, 否则它将自发转化为 PGD₂ 和 PGE₂ 的混合物, 并因此而干扰 PGH₂ 向 PGD₂ 酶促转化的定量分析(图 3)。然后, 加入含有荧光标记(得克萨斯红)的示踪剂 (PGD₂)和抗 PGD₂ 抗体的检测溶液, 以产生与 PGD₂ 的产生成反比的特殊信号(图 4)。从该酶促反应产生的 PGD₂ 将特异竞争该抗体, 并释放出荧光标记示踪剂。出于上述原因, PGD₂ 合酶活性的下降或抑制将导致荧光偏振(FP)值的增加。

材料

hPGDS 的表达

人的造血 PGD₂ 合酶是采用按照以下文献中所述的细菌表达系统以及步骤来表达的: Kanaoka 等 (*Structure and Chromosomal Localization of Human and Mouse Genes for Hematopoietic Prostaglandin D Synthase*. Eur. J. Biochem. 267:3315-3322 (2000))。编码该酶的核苷酸序列如图 10A 和 SEQ ID NO: 3 所示。扩增该编码核苷酸序列并插入 pT7-7 载体, 然后用于转化大肠杆菌 FL21(DE3) 菌株的细胞。然后将最终浓度为 0.6 mM 的硫代-β-D-半乳糖苷加入该转化的细胞, 以诱导人 hPGDS 酶的生产。人 hPGDS 是用 GSH-琼脂糖(Sepharose)4B 柱色谱法进行纯化的。此实施例中所用的人 hPGDS 的氨基酸序列如图 10B 和 SEQ ID NO: 4 所示。

GSH:

购自 Sigma (产品目录#G-6529)。

PGH₂:

购自 Caymen Chemicals, Inc. (Ann Arbor, Michigan) (产品目录 #17020)。

抗 PGD₂ 抗体:

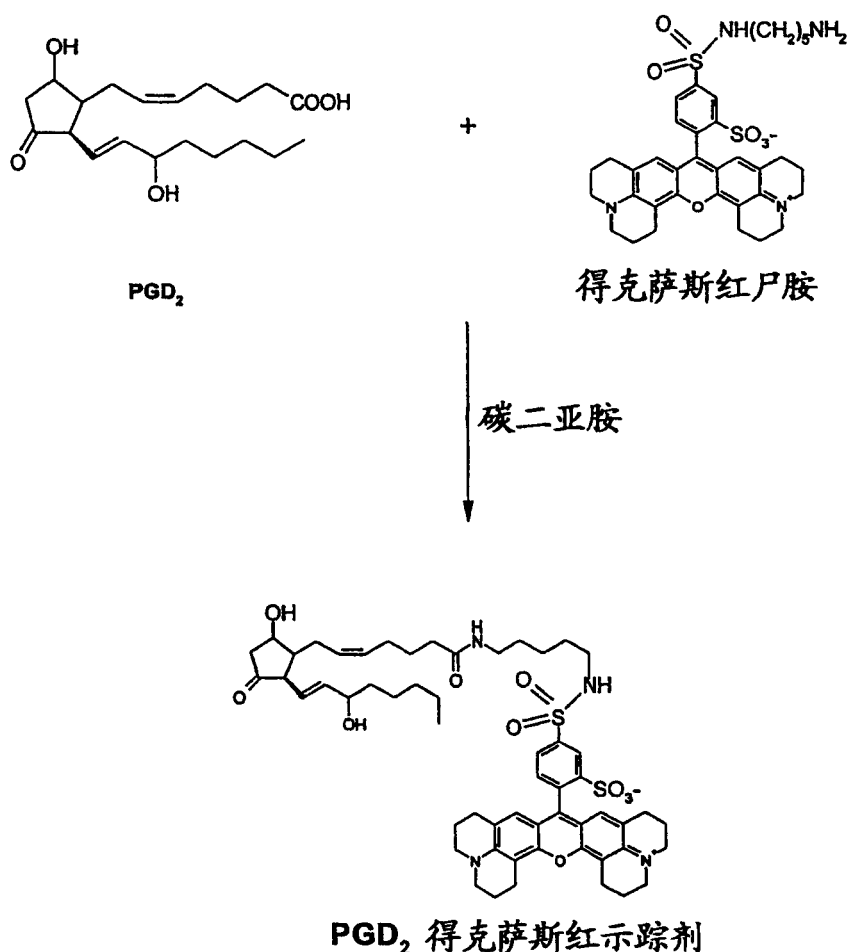
单克隆抗 PGD₂ 抗体购自 Institute Pasteur (目录号 0465328)。

PGD₂:

购自 Cayman Chemicals, Inc. (Ann Arbor, Michigan) (产品目录 #12010)。

荧光标记的前列腺素产物 PGD₂

正如上述实施例 1，使用得克萨斯红作为荧光标记物。以得克萨斯红标记的前列腺素 D₂ (PGD₂)是 Combinix (San Mateo, California)公司生成的。生成这一分子的机理如下所述：

PGD₂ 示踪剂合成

在这一合成过程中，将得克萨斯红尸胺 (Molecular Probes 公司产品) 加入无水二氯甲烷中的前列腺素 D₂ (Cayman Chemicals) 溶液。加入二环己基碳二亚胺 (Sigma Aldrich)，在氮气气氛下于黑暗中搅拌反应物 24 小时。通过反向 HPLC 色谱法进行纯化，使用水/乙腈梯度且以 0.05 % TFA 作为

改性剂。当然，所用的接头分子可以改变。

方法

除了所用的酶是 hPGDS 以外，此方法与实施例 I 所用的相同，前列腺素产物是 PGD₂。因此，如上所述，用含有 K₂HPO₄ 和 KH₂PO₄ 的反应缓冲液稀释该酶和 GSH，以制备酶溶液。然后将待测的化合物或试剂加入该磷酸盐缓冲的酶溶液。任选地，也可进一步孵育此溶液。此孵育期可从几分钟至一小时以上。在这一具体实施例中，孵育此酶溶液约 30 分钟。

然后将底物 PGH₂ 的丙酮溶液置于另一 4 °C 的容器内。再将酶溶液加入含有 PGH₂ 的容器以开始反应。孵育此混合物约 30 秒钟。然后，将含有 FeCl₂ 和柠檬酸的终止液加入该混合物，以防任何剩余的 PGH₂ 自发转化为 PGE₂ 或 PGD₂。然后，将含有以 PGD₂ 为免疫原的抗体和以得克萨斯红标记的 PGD₂(示踪剂)的检测溶液加入该混合物，并孵育整个混合物。在这一实施例中，孵育该混合物约 120 分钟。但是，这一孵育期以及此例中所述的其它孵育期均可以变化，取决于试剂的浓度。

制备与含酶混合物相同的对照混合物，且以与处理含酶混合物的同样方式处理该对照混合物，也就是说，孵育了同样的时间，等等。但是，该对照混合物不含待评价的化合物或试剂。然后，用波长为 580 nm (即得克萨斯红被激发的波长)的平面偏振光照射整个混合物和对照混合物，并用激发波长和发射波长分别设定为 580 nm 和 620 nm 的荧光过滤器测量此混合物和对照混合物的荧光偏振值。在该测量仪器处于 FP 模式的情况下进行测量。自然，所用的波长将取决于此方法所用的荧光标记物。然后将这两次 FP 测量值进行比较，以确定含有该化合物或试剂的混合物其荧光偏振测量值是否大于对照溶液的荧光测量值。若该混合物的测量值大于对照混合物的测量值，则表明该化合物或试剂降低了 hPGDS 的活性。

结果

上述的试验通过使用一种已知的 hPGDS 抑制剂 HQL79 而得到了验证。HQL79 在 WO 95/01350 专利中已有叙述。HQL79 的结构如图 7 所示。

此实验的结果如图8所示。这些结果清楚地显示,本发明的方法发现HQL79降低了hPGDS的活性。

结论

实施例I和II明显地显示,本发明的方法简单易行,不需要众多的洗涤步骤或放射性同位素,并可容易地用于高通量的方式,用于确定一种化合物或试剂是否能降低或抑制前列腺素合酶尤其是hPGDS或mPGES的活性。

本发明的范围将不受此处所述的特定具体实施方案的限制。确实,除了此处所述的内容之外,通过以上的叙述和附图,本发明的各种各样的改进对于熟悉该技术者将变得很明显。这样的改进意欲包括在所附的权利要求范围之内。

本文引用了各种各样的出版物,它们的公开内容作为参考而整体引用于此。

- <110> 安万特药物公司
- <120> 检测化合物或试剂降低微粒体前列腺素E合酶或造血前列腺素D合酶活性的能力的方法
- <130> USAV2002/0098 WOPCT
- <140> 未获得
- <141> 2003-08-15
- <150> US 60/404,008
- <151> 2002-08-16
- <150> GB 0229244.9
- <151> 2002-12-16
- <160> 4
- <170> PatentIn 版本 3.2
- <210> 1
- <211> 459
- <212> DNA
- <213> 人 (Homo sapiens)
- <400> 1
- atgcctgccc acagcctggt gatgagcagc cggccctcc cggccttct gctctgcagc 60
- acgctgctgg tcatcaagat gtacgtggtg gccatcatca cgggccaagt gaggctgcgg 120
- aagaaggcct ttgccaacc cagagatgcc ctgagacacg gaggcccca gtattgcagg 180
- agcgaccccg acgtggaacg ctgcctcagg gcccaccgga acgacatgga gaccatctac 240
- cccttccttt tctgggett cgtctactcc tttctgggtc ctaacccttt tgtcgcctgg 300
- atgcacttcc tggcttctct cgtgggccgt gtggcacaca ccgtggccta cctggggaag 360
- ctgcgggcac ccatccgtc cgtgacctac accctggccc agctcccctg cgcctccatg 420
- gctctgcaga tcctctggga agcggcccgc cacctgtga 459

<210> 2

<211> 152

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Met Pro Ala His Ser Leu Val Met Ser Ser Pro Ala Leu Pro Ala Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Ser Thr Leu Leu Val Ile Lys Met Tyr Val Val Ala Ile
 20 25 30

Ile Thr Gly Gln Val Arg Leu Arg Lys Lys Ala Phe Ala Asn Pro Glu
 35 40 45

Asp Ala Leu Arg His Gly Gly Pro Gln Tyr Cys Arg Ser Asp Pro Asp
 50 55 60

Val Glu Arg Cys Leu Arg Ala His Arg Asn Asp Met Glu Thr Ile Tyr
 65 70 75 80

Pro Phe Leu Phe Leu Gly Phe Val Tyr Ser Phe Leu Gly Pro Asn Pro
 85 90 95

Phe Val Ala Trp Met His Phe Leu Val Phe Leu Val Gly Arg Val Ala
 100 105 110

His Thr Val Ala Tyr Leu Gly Lys Leu Arg Ala Pro Ile Arg Ser Val
 115 120 125

Thr Tyr Thr Leu Ala Gln Leu Pro Cys Ala Ser Met Ala Leu Gln Ile
 130 135 140

Leu Trp Glu Ala Ala Arg His Leu
145 150

<210> 3

<211> 600

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

atgccaaact acaaactcac ttattttaat atgaggggga gagcagaaat tattcgttac 60
atatttgctt atttgacat acagtatgaa gaccacagaa tagaacaagc tgactggcct 120
gaaatcaaat caactctccc atttgaaaa atccccattt tggaagttga tggacttact 180
cttcaccaga gcctagcaat agcaagatat ttgacaaaa acacagattt ggctggaaac 240
acagaaatgg aacaatgtca tgttgatgct attgtggaca ctctggatga tttcatgtca 300
tgttttcctt gggcagagaa aaagcaagat gtgaaagagc agatgttcaa tgagctgctc 360
acgtataatg cgctcatct tatgcaagac ttggacacat atttaggggg gagagaatgg 420
cttattggta actctgtaac ttgggcagac ttctactggg agatttgcag taccacactt 480
ttggctctta agcctgacct gttagacaac catccaagge tggtgacttt acggaagaaa 540
gtccaagcca ttctgccgt cgctaactgg ataaaacgaa ggccccaac caaactctag 600

<210> 4

<211> 199

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Met Pro Asn Tyr Lys Leu Thr Tyr Phe Asn Met Arg Gly Arg Ala Glu
1 5 10 15

Ile Ile Arg Tyr Ile Phe Ala Tyr Leu Asp Ile Gln Tyr Glu Asp His
20 25 30

Arg Ile Glu Gln Ala Asp Trp Pro Glu Ile Lys Ser Thr Leu Pro Phe
 35 40 45

Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Val Asp Gly Leu Thr Leu His Gln Ser
 50 55 60

Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Leu Thr Lys Asn Thr Asp Leu Ala Gly Asn
 65 70 75 80

Thr Glu Met Glu Gln Cys His Val Asp Ala Ile Val Asp Thr Leu Asp
 85 90 95

Asp Phe Met Ser Cys Phe Pro Trp Ala Glu Lys Lys Gln Asp Val Lys
 100 105 110

Glu Gln Met Phe Asn Glu Leu Leu Thr Tyr Asn Ala Pro His Leu Met
 115 120 125

Gln Asp Leu Asp Thr Tyr Leu Gly Gly Arg Glu Trp Leu Ile Gly Asn
 130 135 140

Ser Val Thr Trp Ala Asp Phe Tyr Trp Glu Ile Cys Ser Thr Thr Leu
 145 150 155 160

Leu Val Phe Lys Pro Asp Leu Leu Asp Asn His Pro Arg Leu Val Thr
 165 170 175

Leu Arg Lys Lys Val Gln Ala Ile Pro Ala Val Ala Asn Trp Ile Lys
 180 185 190

Arg Arg Pro Gln Thr Lys Leu
 195

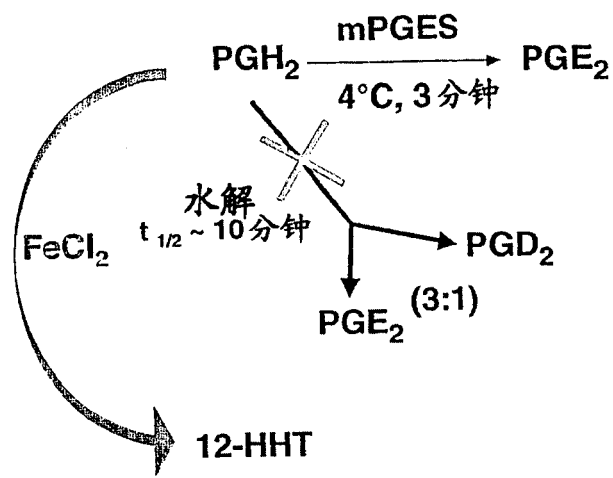


图1

基于FP的mPGE合酶试验

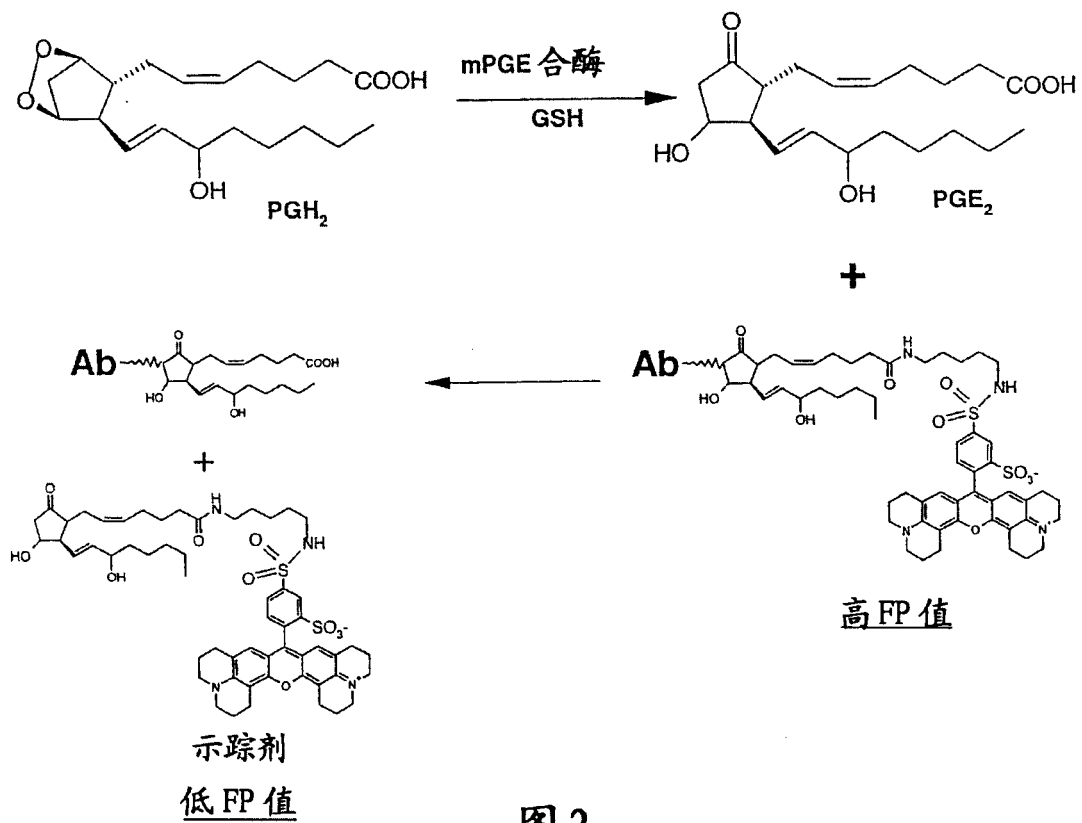


图2

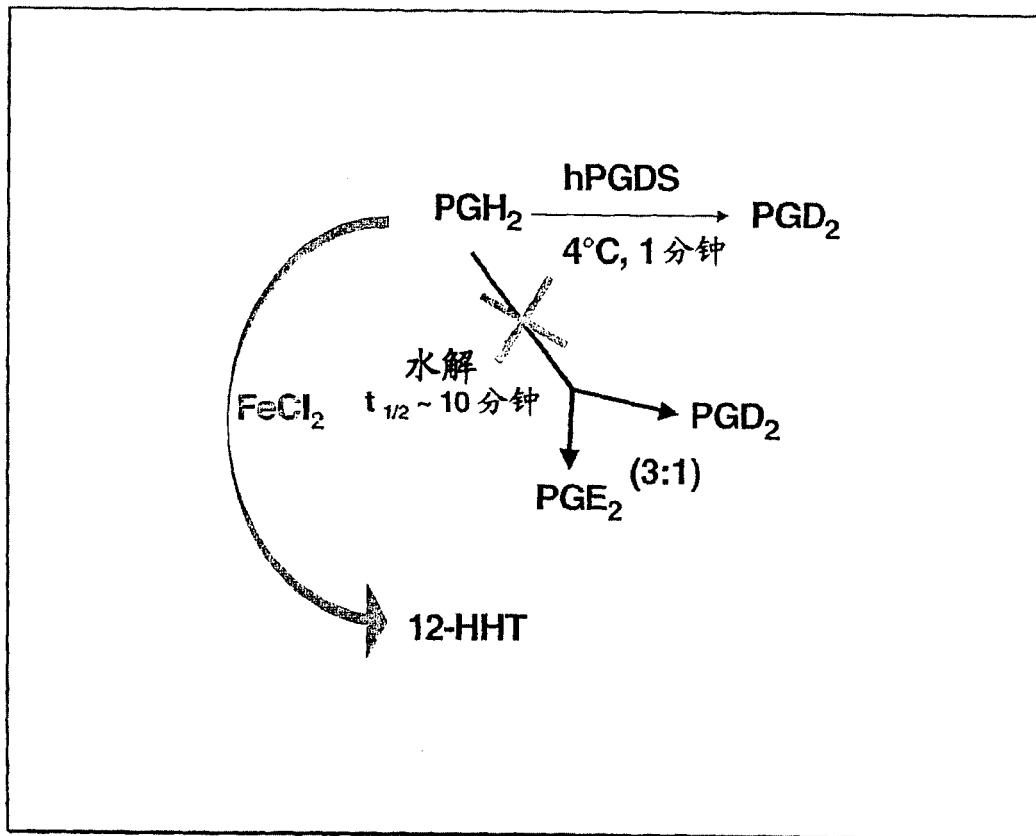


图 3

基于FP的hPGD合酶试验

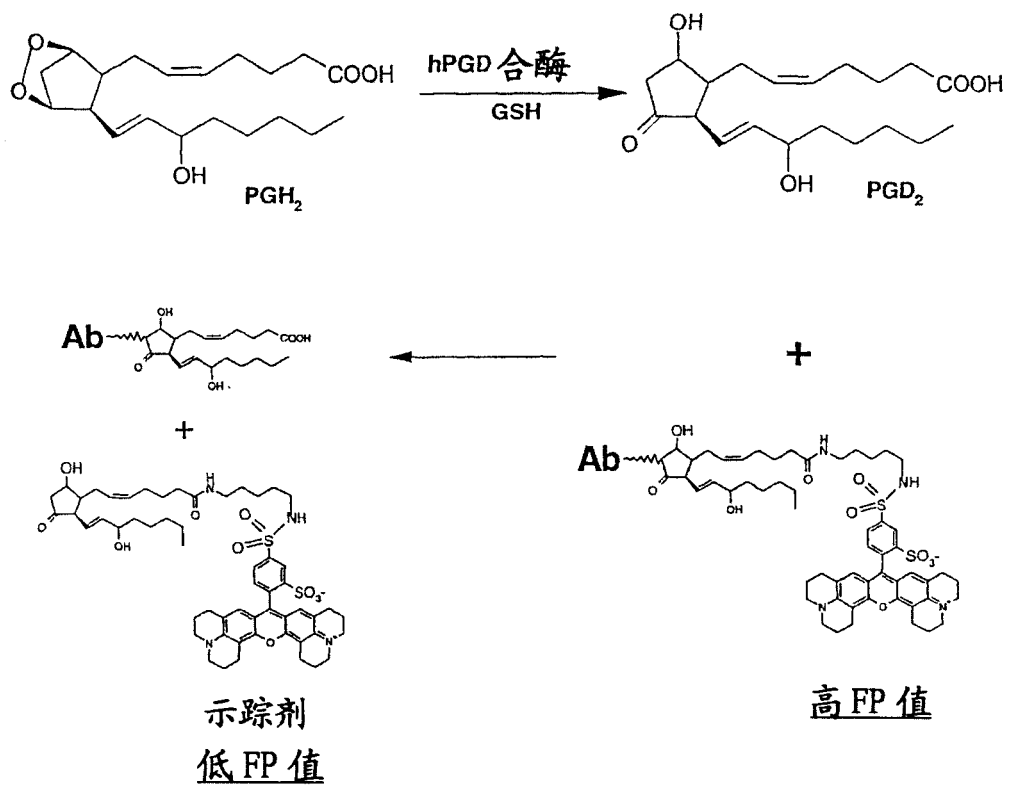


图 4

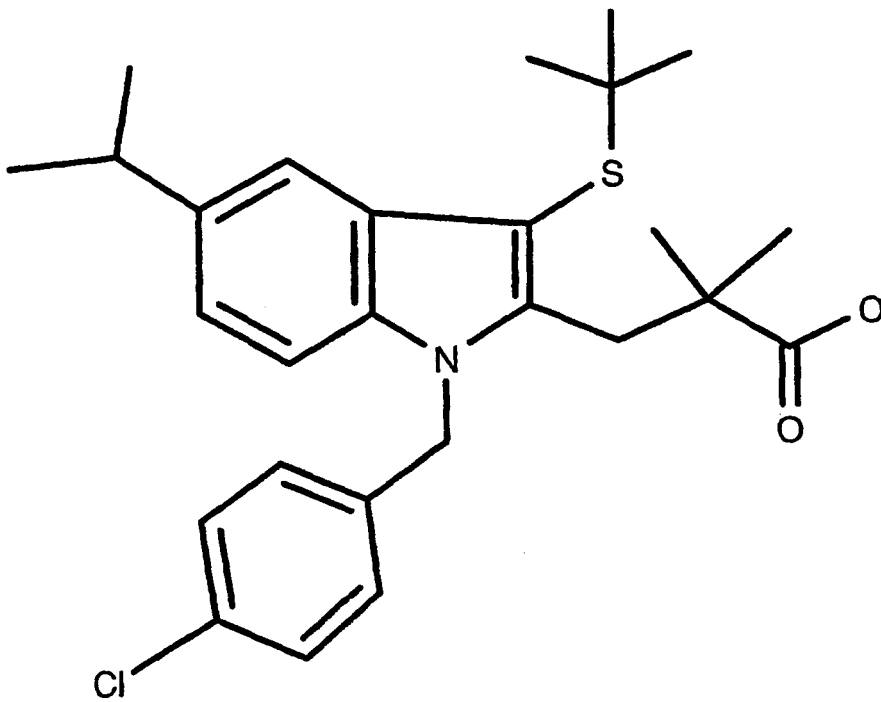


图 5

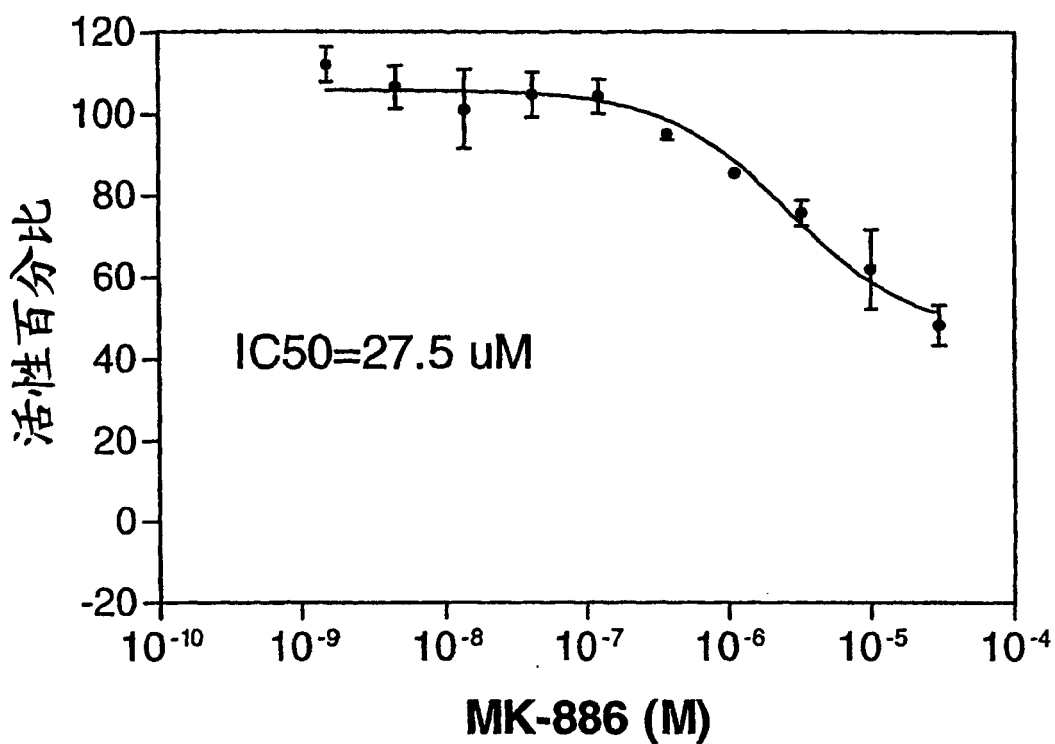


图 6

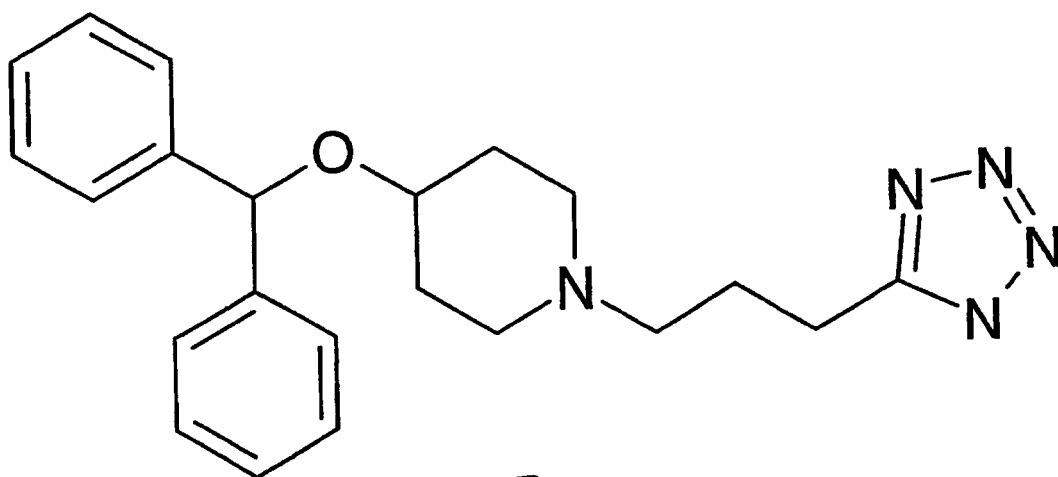


图 7

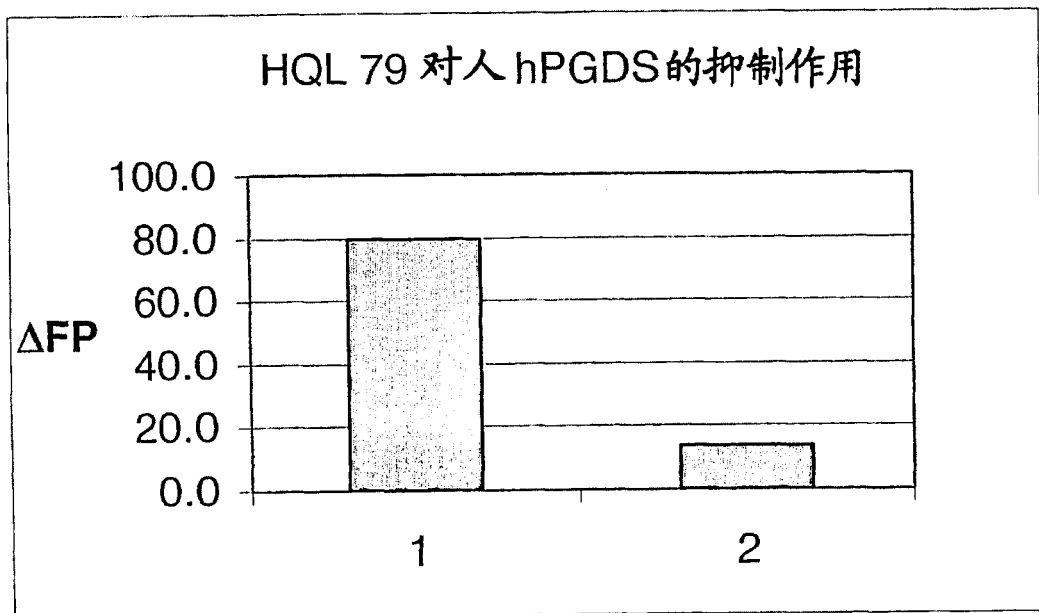


图 8

atgcctgcccacagcctggtgatgagcagcccggccctcccggccttctgctctgcagcagcctgctggatcaag
atgtacgtggtggccatcatcacggccaagtgaggctgcggaagaaggcctttgccaaccccaggatgccctga
gacacggaggccccagtaattgcaggagcgcacccgacgtggaacgctgcctcagggcccaccggaacgacatg
gagaccatctacccctcctttcctgggctcgtctactcctttctgggtcctaaccctttgtcgcctggatgcactcctggt
cttctcgtgggcccgtgtggcacacaccgtggcctacctggggaagctgcgggcaacctccgctccgtgacctacac
cctggcccagctcccctgcgctccatggctctgcagatcctctgggaagcggcccgccacctgtga

图 9A

MPAHS LVMSSPALPAFLLCSTLLVIKMYVVAIITGQVRLRKKAF
ANPEDALRHGGPQYCRSDPDVERCLRAHRNDMETIYPFLFLG
FVYSFLGPNPFVAWMHFLVFLVGRVAHTVAYLGKLRAPIRSVT
YTLAQLPCASMALQILWEARHL

图 9B

atgccaaactacaaactcactattttaatatgagggggagagcagaaattatcgttacatattgctt
attggacatacagatgaagaccacagaatagaacaagctgactggcctgaaatcaaatcaactc
tccatttgaaaaatccccatttggagttgatggacttactctcaccagagcctagcaatagcaa
gatattgacaaaaacacagatttggctggaaacacagaaatggaacaatgtcatgttgatgctatt
gtggacactctggatgattcatgtcatgtttccttgggcagagaaaaagcaagatgtgaaagagc
agatgtcaatgagctgctcacgtataatgcgctcatcttcatgcaagactggacacatattaggggg
gagagaatggcttattgtaactctgtaactgggcagacttctactgggagattgcagtaccacact
ttggctttaagcctgacctgttagacaacctccaaggctggtgactttacggaagaaagtccaagcca
ttcctgccgtcgttaactggataaaaacgaaggccccaaccaactctag

图 10A

MPNYKLTYFNMRGRAEIIRYIFAYLDIQYEDHRIEQADWPEIKSTLPGKIPILEVDGLT
LHQSLAIARYLTKNTDLAGNTEMEQCHVDAIVDTLDDFMSCFPWAEKKQDVKEQMF
NELLTYNAPHLMQDLDTYLGGREWLIGNSVTWADFYWEICSTLLVFKPDLLDNHP
RLVTLRKKVQAIPAVANWIKRRPQTKL

图 10B

专利名称(译)	检测化合物或试剂降低微粒体前列腺素E合酶或造血前列腺素D合酶活性的能力的方法		
公开(公告)号	CN1675543A	公开(公告)日	2005-09-28
申请号	CN03819395.7	申请日	2003-08-15
[标]申请(专利权)人(译)	安万特药物公司		
申请(专利权)人(译)	安万特药物公司		
当前申请(专利权)人(译)	安万特药物公司		
[标]发明人	李竹吟 熊俊杰 JS萨伯尔 YH马		
发明人	李竹吟 熊俊杰 J·S·萨伯尔 Y·H·马		
IPC分类号	C12Q1/00 A61K C12N9/99 C12N15/09 C12Q1/533 G01N33/53		
CPC分类号	G01N2500/04 C12Q1/533 A61P29/00 A61P43/00		
优先权	60/404008 2002-08-16 US 2002029244 2002-12-16 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供的是一种新颖和有用的方法，用于评估化合物或试剂降低微粒体前列腺素E合酶或造血前列腺素D合酶产生其相应前列腺素产物之活性的能力。

