



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102504025 A

(43) 申请公布日 2012.06.20

(21) 申请号 201110351822.0 *C12N 1/21* (2006.01)
(22) 申请日 2005.03.10 *C12N 15/12* (2006.01)
(30) 优先权数据 *C12Q 1/68* (2006.01)
60/552,067 2004.03.10 US *A61K 39/395* (2006.01)
60/643,469 2005.01.13 US *A61P 35/00* (2006.01)
(62) 分案原申请数据 *G01N 33/68* (2006.01)
200580007467.8 2005.03.10 *G01N 33/53* (2006.01)
(71) 申请人 克赖顿大学
地址 美国内布拉斯加州
(72) 发明人 王兆一
(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有限公司 11111
代理人 杨颖 张一军
(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 35 页
序列表 12 页 附图 14 页

(54) 发明名称

雌激素受体和使用方法

(57) 摘要

本发明提供了分离的多肽,其氨基酸序列与 SEQ ID NO:20 具有至少 70% 同一性,其中该多肽具有 ER- α 36 活性。本发明还提供了鉴别能结合这样的多肽的试剂的方法,检测这样的多肽的方法,和改变这样的多肽的活性的方法。还提供了能特异性地结合 SEQ ID NO:1 所述的氨基酸序列,或其免疫原性片段的抗体,和制备和使用这样的抗体的方法。

1. 分离的抗体, 其能特异性地结合 SEQ ID NO :1 所述的氨基酸序列的免疫原性片段, 所述免疫原性片段含有至少 5 个连续氨基酸。

2. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体是单克隆抗体。

3. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体是多克隆抗体。

4. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体是人源化的抗体。

5. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体是抗体片段。

6. 权利要求 1 的抗体, 其中所述抗体共价附着到化合物。

7. 权利要求 6 的抗体, 其中所述化合物是化疗剂。

8. 权利要求 6 的抗体, 其中所述化合物是检测标记。

9. 权利要求 8 的抗体, 其中所述检测标记是荧光标记。

10. 组合物, 其包含权利要求 1 的抗体。

11. 权利要求 10 的组合物, 还包含药学上可接受的载体。

12. 制备抗体的方法, 其包括:

给动物施用包含 SEQ ID NO :1 所述的氨基酸序列的免疫原性片段的多肽, 和从该动物分离抗体,

其中所述免疫原性片段含有至少 5 个连续的氨基酸, 所述分离的抗体能特异性地结合该免疫原性片段。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所述多肽共价附着到载体多肽上。

14. 权利要求 12 的方法, 其中所述分离包含从动物得到能产生该抗体的细胞, 该方法还包含使用该细胞制备能产生单克隆抗体的杂交瘤。

15. 通过权利要求 12 的方法生产的多克隆抗体。

16. 通过权利要求 14 的方法生产的单克隆抗体。

17. 包含外源编码区的细胞, 其中所述编码区能编码包含 SEQ IDNO :20 的第一个多肽, 或包含与 SEQ ID NO :20 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的第二个多肽, 其中所述第二个多肽具有 ER- α 36 活性。

18. 权利要求 17 的细胞, 其中所述编码区可操作地连接到组成型启动子上。

19. 权利要求 17 的细胞, 其中所述细胞是真核细胞。

20. 权利要求 17 的细胞, 其中所述细胞是原核细胞。

21. 能表达外源多肽的细胞, 其中所述多肽包含 SEQ ID NO :20, 或包含与 SEQ ID NO :20 具有至少 90% 同一性且具有 ER- α 36 活性的氨基酸序列。

22. 权利要求 21 的细胞, 其中所述编码区可操作地连接到组成型启动子上。

23. 权利要求 21 的细胞, 其中所述细胞是真核细胞。

24. 权利要求 21 的细胞, 其中所述细胞是原核细胞。

25. 鉴别能结合多肽的试剂的方法, 该方法包含:

组合包含 SEQ ID NO :1 所述的氨基酸序列的多肽和试剂, 和检测试剂和多肽之间的复合物形成。

26. 权利要求 25 的方法, 其中通过选自下述的方法, 检测所述试剂与多肽的结合: 直接检测试剂与多肽的结合, 和使用竞争结合测定检测试剂与多肽的结合。

27. 权利要求 25 的方法, 还包含, 确定试剂是否能结合包含 SEQ ID NO :18 的多肽。

28. 权利要求 25 的方法,还包含,确定试剂是否能抑制多肽的 ER- α 36 活性。

29. 检测多肽的方法,其包括:

提供离体细胞,

确定所述细胞中是否表达具有 36kDa 分子量且具有如 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列或与 SEQ ID NO:20 具有至少 90% 同一性的多肽,所述分子量如按照十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯酰胺凝胶上的电泳测得。

30. 检测多肽的方法,其包括:

提供离体细胞,

确定所述细胞中是否表达具有 36kDa 分子量且含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列的多肽,所述分子量如按照十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯酰胺凝胶上的电泳测得。

31. 权利要求 29 或 30 的方法,其中所述细胞是肿瘤细胞。

32. 权利要求 31 的方法,其中所述肿瘤是乳腺肿瘤。

33. 权利要求 29 或 30 的方法,其中所述确定包括,使细胞接触能特异性地结合 SEQ ID NO:1 所述的氨基酸序列,或其免疫原性片段的抗体。

34. 权利要求 33 的方法,其中所述抗体共价附着到检测标记上。

35. 权利要求 34 的抗体,其中所述检测标记是荧光标记。

36. 权利要求 29 或 30 的方法,其中所述确定包括,扩增 mRNA 多核苷酸,以形成扩增的多核苷酸,其中所述扩增包含,使从细胞得到的多核苷酸接触引物对,后者能扩增 mRNA 多核苷酸,其包括 SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:25,或其组合,其中扩增的多核苷酸的存在表明该细胞表达多肽。

37. 权利要求 36 的方法,其中引物对的一个引物选自 SEQ ID NO:22 的核苷酸,与 SEQ ID NO:25 的核苷酸互补的核苷酸,或其组合,且其中每个引物具有至少 15 个核苷酸。

38. 抑制细胞的 ER- α 36 活性的方法,其包括:使能表达包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列的多肽的细胞,接触能抑制 ER- α 36 活性的化合物。

39. 权利要求 38 的方法,其中所述化合物包含权利要求 1-9 任一所述的抗体。

40. 权利要求 39 的方法,其中所述化合物包含能特异性地结合包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列的多肽的抗体。

41. 权利要求 38 的方法,其中所述细胞是离体的。

42. 权利要求 38 的方法,其中所述细胞是 ER- α 66 阴性的。

43. 权利要求 38 的方法,其中所述细胞是 ER- α 46 阴性的。

44. 权利要求 38 的方法,其中所述化合物不是抗-雌激素药。

45. 在体外抑制细胞中的 ERK1/2 或 MEK1/2 磷酸化的方法,其包括:使细胞接触权利要求 1-9 任一所述的抗体;

其中,所述细胞能表达具有 36kDa 分子量、能结合雌激素且包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列的多肽,所述分子量如按照十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯酰胺凝胶上的电泳测得,且所述抗体的剂量能够抑制雌激素和 SEQ ID NO:20 的结合。

46. 权利要求 45 所述的方法,其中所述抗体能特异性地结合包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列的多肽。

47. 分离的多肽,其由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-27 所述的氨基酸序列或其修饰的序列组成,所述修饰的序列是通过添加、取代或缺失一个或多个邻接的或不邻接的氨基酸来修饰的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-27,并且所述修饰的序列能够刺激产生结合 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1-27 的抗体。

48. 分离的多肽,其由 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列或其修饰的序列组成,所述修饰的序列是通过添加、取代或缺失一个或多个邻接的或不邻接的氨基酸来修饰的 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27,并且所述修饰的序列能够刺激产生结合 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 的抗体。

49. 分离的多肽,含有共价附着到载体多肽上的权利要求 47 或 48 所述的多肽。

50. 分离的多核苷酸,其编码权利要求 47-49 任一所述的多肽。

51. SEQ ID NO:1 的免疫原性片段,含有 SEQ ID NO:1 中的至少 5 个连续氨基酸。

52. 试剂盒,其包含权利要求 1-9 任一所述的分离的抗体和包装材料。

53. 权利要求 1-9 任一所述的抗体用于制备诊断试剂的用途,所述诊断试剂用于区分雌激素阳性和雌激素阴性的癌症。

54. 权利要求 53 的用途,所述区分雌激素阳性和雌激素阴性的癌症是通过检测细胞中是否表达具有 36kDa 分子量且能够结合雌激素或抗雌激素的多肽,所述分子量如按照十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯酰胺凝胶上的电泳测得。

55. 权利要求 1-9 任一所述的抗体用于制备药物的用途,所述药物用于治疗个体中雌激素相关的癌症,其中所述抗体能够抑制雌激素与细胞的 SEQ ID NO:20 的结合。

雌激素受体和使用方法

[0001] 本申请是申请号为 200580007467.8 (PCT/US2005/007857), 申请日为 2005 年 3 月 10 日的中国发明专利申请“雌激素受体和使用方法”的分案申请。

[0002] 继续申请数据

[0003] 本申请要求享有 2004 年 3 月 10 日提交的美国临时申请系列号 60/552,067 和 2005 年 1 月 13 日提交的 60/643,469 的利益, 其每篇都在这里引作参考。

[0004] 政府资助

[0005] 本文所述的发明是在健康和人类服务部 (Department of Health and Human Services) 资助号 CA84328 的支持下完成的。美国政府享有本发明的某些权利。

[0006] 发明背景

[0007] 雌激素是在卵巢、睾丸和可能的肾上腺皮质中形成的类固醇化合物的总称。雌激素和具有雌激素活性的化合物的实例包括二乙基己烯雌酚、己烯雌酚二磷酸酯、己雌酚、聚磷酸雌二醇、溴苯雌酚、氯烯雌醚、己二烯雌酚、二乙基己烯雌酚、丙甲雌酚、双醋羟雌酮、6,9-去氢马烯雌酮、马烯雌酮、雌二醇、雌三醇、雌酮、乙炔雌二醇、美雌醇、mexestrol、雌三醇环戊醚和炔雌醚。雌激素调节生殖组织和乳房、心血管、骨、肝和脑组织中的多种生理过程。雌激素也用在口服避孕药中。雌激素的其它用途包括, 缓解绝经的不适, 抑制泌乳, 和治疗骨质疏松症、先兆流产和各种功能性卵巢病症。抗雌激素药被用于治疗转移性乳腺癌和晚期前列腺癌。

[0008] 雌激素的作用由雌激素受体介导。在 1986 年克隆了首个雌激素受体 (ER) (Green 等, *Nature*, 320 :134(1986) 和 Greene 等, *Science*, 231 :1150(1986))。在 1995 年之前, 认为仅有一个负责天然的和合成的雌激素和抗雌激素药的所有生理和药理作用的雌激素受体。然而, 在 1995 年, 克隆了第二个雌激素受体 (Kuiper 等, *PNAS*, 93 :5925(1996))。发现的首个雌激素受体现在称作雌激素受体- α (ER- α), 而第二个雌激素受体称作雌激素受体- β (ER- β)。

[0009] ER- α 和 ER- β 共有共同的结构体系 (Zhang 等, *FEBS Letters*, 546 :17(2003) 和 Kong 等, *Biochem. Soc. Trans.*, 31 :56(2003))。二者都由 3 个独立的但是能相互作用的功能结构域组成: N-末端 A/B 结构域、C 或 DNA-结合结构域和 D/E/F 或配体-结合结构域 (图 1)。ER- α 的 N-末端结构域编码独立于配体的激活功能 (AF-1), 即参加与辅激活物的相互作用和靶基因的转录活化的区域。DNA-结合结构域或 C 结构域含有 2 个锌指结构, 其在受体二聚化和与特定的 DNA 序列的结合中起重要作用。C-末端 D/E/F 结构域是一种配体-结合结构域, 其能介导配体结合、受体二聚化、核转位和配体-依赖性的反式激活功能 (AF-2)。AF-1 和 AF-2 对转录控制的相对贡献以细胞特异性的和 DNA 启动子特异性的方式变化 (Berry 等, *EMBO J.*, 9 :2811(1990) 和 Tzukerman 等, *Mol. Endocrin.*, 8 :21(1994))。

[0010] 已经表明, 缺少 ER- α 基因的全长基因产物的前 173 个氨基酸的 46-kDa ER- α 同种型 (A/B 或 AF-1 结构域), 源自跳过外显子 1 的 ER- α 基因的可变剪接 (Flouriot 等, *EMBO J.*, 19 :4688(2000))。该可变剪接事件会产生 mRNA, 其在有利于翻译起始的 Kozak 序列内具有与原始可读框的剩余部分符合读框的 AUG。因此, ER- α 的该新同种型称作 ER- α 46, 而原

始同种型称作 ER- α 66 (Flourirot 等, EMBO J., 19:4688 (2000))。ER- α 46 形成同二聚体, 并结合雌激素反应元件 (ERE), 且它也可以与 ER- α 66 形成异二聚体 (Flourirot 等, EMBO J., 19:4688 (2000))。与 ER- α 66 同二聚体相比, ER- α 46 同二聚体表现出更高的对 ERE 的亲合力。而且, ER- α 46/66 异二聚体比 ER- α 66 同二聚体优先形成, 且 ER- α 46 竞争地起作用, 以抑制由结合了配体的 ER- α 66 的 AF-1 结构域介导的反式激活, 但是不影响 AF-2 依赖性的反式激活 (Flourirot 等, EMBO J., 19:4688 (2000))。因此, 认为 ER- α 46 是天然产生的 ER- α 同种型, 其调节由 ER- α 66 的 AF-1 结构域介导的雌激素信号传导。

[0011] ER- α 能在大约 15-30% 内腔 (luminal) 上皮细胞中表达, 但是根本不在正常人乳房中的任何其它细胞类型中表达。双标记免疫荧光技术揭示, 在正常的人和啮齿动物乳腺中, ER- α 表达细胞能与用增殖标记物标记的细胞分开 (Clarke 等, Cancer Res., 57:4987 (1997))。在导管增生的最早期, ER- α 表达会增加, 甚至随着异型的增加而增加更多, 从而在低和中等核级的不典型导管增生和原位导管癌中的大部分细胞含有 ER- α (Khan 等, Cancer Res., 54:993 (1994) 和 Lawson 等, Lancet, 351:1787 (1994))。随着 ER- α 表达的增加, 受体表达和细胞增殖之间的反相关变得调节异常 (Shoker 等, Amer. Jour. Path., 155:1811 (1999))。大约 70% 的侵入性乳腺癌表达 ER- α , 且这些肿瘤中的大部分含有 ER- α 阳性的增殖细胞 (Clarke 等, Cancer Res., 57:4987 (1997))。

[0012] 雌激素受体是能控制许多生理过程的配体-活化的转录因子核受体超家族的成员。该控制经常通过调节基因转录来发生 (Katzenellenbogen 和 Katzenellenbogen, Breast Cancer Res., 2:335 (2000); Hull 等, J. Biol. Chem., 276:36869 (2001); McDonnell 和 Norris, Science, 296:1642 (2002))。雌激素受体使用多种机理, 以激活或抑制它的靶基因的转录。这些机理包括: (a) 在雌激素反应元件处, 配体-占据的受体与 DNA 的直接相互作用, 随后是转录辅调节物 (coregulator) 或介质复合物的募集, (b) 配体-占据的 ER 与其它转录因子相互作用, 所述其它转录因子例如 AP-1 (Kushner 等, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 74:311 (2000))、Sp1 (Safe, Vitam. Horm., 62:231 (2001)) 或 NF- κ B (McKay 和 Cidlowski, Endocr. Rev., 20:435 (1999)), 或 (c) 通过隔离一般的 / 普通的转录组分, 间接调节基因转录 (Harnish 等, Endocrinology, 141:3403 (2000) 和 Speir 等, Circ. Res., 87:1006 (2000))。另外, 雌激素受体通过这些不同的机理调节转录的能力, 似乎是细胞类型特异性的, 可能是由于在每种细胞类型中可得到的转录辅调节因子的补体的差异 (Cerillo 等, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 67:79 (1998); Evans 等, Circ. Res., 89:823 (2001); Maret 等, Endocrinology, 140:2876 (1999))。同样, 转录调节依赖于配体的性质, 其中各种天然的和合成的选择性的雌激素受体调节剂, 通过这些不同机理中的每一种, 起雌激素受体激动剂或拮抗剂的作用 (Shang 和 Brown, Science, 295:2465 (2002); Katzenellenbogen 和 Katzenellenbogen, Science, 295:2380 (2002); Margeat 等, J. Mol. Biol., 326:77 (2003); Dang 等, J. Biol. Chem., 278:962 (2003))。

[0013] 存在由雌激素介导的另一个信号传导途径, 也称作“非经典的”、“非基因组的”或“膜信号传导”途径, 其包含胞质蛋白、生长因子和其它膜-启动的信号传导途径 (Segars 等, Trends Endocrin. Met., 13:349 (2002))。已经表明, 几种细胞内的信号传导途径能与快速的雌激素-启动的作用通讯: 腺苷酸环化酶途径 (Aronica 等, PNAS, 91:8517 (1994))、磷脂酶 C 途径 (Le Mellay 等, J. Cell. Biochem., 75:138 (1999))、G-蛋白-偶联的受体-活

化的途径 (Razandi 等, Mol. Endocrin., 13 :307 (1999)) 和促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径 (Watters 等, Endocrinology, 138 :4030 (1997))。但是, 迄今为止描述的所有膜形式, 都与 ER- α 有关, 但与 ER- β 无关 (Segars 等, Trends Endocrin. Met., 13 :349 (2002))。

[0014] 病理上, 雌激素信号传导已经与乳腺癌和子宫内膜癌的高风险相关联 (Summer 和 Fuqua, Semin. Cancer Biol., 11 :339 (2001) ; Turner 等, Endocr. Rev., 15 :275 (1994) ; Farhat 等, FASEB J., 10 :615 (1996) ; Beato 等, Cell, 83 :851 (1995) ; Dobrzycka 等, Endo. Rel. Cancer, 10 :517 (2003))。结果, 已经发现雌激素受体是大多数这样的癌症的开始和发展所必需的。雌激素受体-阳性的乳腺癌的当前内分泌疗法主要针对雌激素水平、雌激素受体水平或雌激素和雌激素受体的活性设计。在早期乳腺癌的管理中, 部分的抗雌激素药他莫昔芬的使用, 已经清楚地证实了无疾病和总存活的增加。另外, 近期的研究证实, 他莫昔芬可以用作激素-依赖性的乳腺癌的化学预防剂。使用他莫昔芬的长期疗法的主要问题是它的亲子宫作用, 这会导致子宫内膜癌的高风险, 和他莫昔芬的获得性临床抗性。这已经导致了对更好的选择性雌激素受体调节剂 (SERM) 的迫切寻求, 所述调节剂在各种雌激素反应靶组织中表现出最佳的激动或拮抗活性。

[0015] 因此, 需要可以用于筛选能调节雌激素信号传导的其它方法和材料, 以及可以用于调节雌激素信号传导的方法和材料。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明提供了分离的抗体, 其能特异性地结合 SEQ ID NO :1 所述的氨基酸序列, 或其免疫原性片段, 优选地, SEQ ID NO :1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列。抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。任选地, 抗体是人源化的抗体。抗体可以共价地附着化合物, 例如, 化疗剂或检测标记例如荧光标记。抗体可以存在于组合物中, 且组合物可以包含药学上可接受的载体。还提供了试剂盒, 其包含本发明的抗体。

[0018] 本发明也提供了制备抗体的方法。抗体可以是多克隆的或单克隆的。该方法包括, 给动物施用具有 SEQ ID NO :1 所述的氨基酸序列的多肽, 或其免疫原性片段, 优选地, SEQ ID NO :1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列。该方法还包括从动物分离抗体, 其中该分离的抗体能特异性地结合氨基酸序列。多肽或其免疫原性亚基可以共价地附着载体多肽。分离可以包括, 从动物得到产生该抗体的细胞, 和使用该细胞制备能产生单克隆抗体的杂交瘤。本发明还包括通过该方法生产的多克隆抗体和通过该方法生产的单克隆抗体。

[0019] 本发明也涉及包含外源编码区的细胞, 其中该编码区编码包含 SEQ ID NO :20 的多肽。编码区可以编码具有与 SEQ ID NO :20 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列的多肽, 其中该多肽具有 ER- α 36 活性。编码区可以可操作地连接到组成型启动子。细胞可以是真核细胞或原核细胞。本发明还提供了表达这样的多肽的细胞。

[0020] 本发明还提供了鉴别结合多肽的试剂的方法。该方法包括, 组合包含 SEQ ID NO :1 所述的氨基酸序列的多肽和试剂, 检测试剂和多肽之间的复合物形成, 检测多肽活性的改变, 或其组合。通过直接检测试剂与多肽的结合, 使用竞争结合测定检测试剂与多肽的结合, 或其组合, 可以检测试剂与多肽的结合。任选地, 该方法也包括, 确定试剂是否结合包含 SEQ ID NO :18 的多肽。

[0021] 本发明还提供了检测多肽的方法。一方面, 该方法包括提供细胞, 分析细胞中具有 ER- α 36 活性和 36kDa 分子量的多肽, 所述分子量如按照在十二烷基硫酸钠 (SDS)-聚丙烯

酰胺凝胶上电泳测得的,和确定细胞是否表达该多肽。细胞可以是离体的(ex vivo)或体内的。细胞可以是,例如,肿瘤细胞,例如乳腺肿瘤细胞。分析可以包括,使细胞接触能特异性地结合 SEQ ID NO:1 所述的氨基酸序列,或其免疫原性片段的抗体。分析可以包括,扩增 mRNA 多核苷酸,以形成扩增的多核苷酸。扩增包括,使从细胞得到的多核苷酸接触引物对,后者能扩增 mRNA 多核苷酸,其包括 SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:25,或其组合,其中扩增的多核苷酸的存在表明该细胞表达多肽。引物对的一个引物可以选自 SEQ ID NO:22 的核苷酸,与 SEQ ID NO:25 的核苷酸互补的核苷酸,或其组合。

[0022] 本发明也提供了抑制细胞的 ER- α 36 活性的方法。该方法包括,使表达具有 SEQ ID NO:1 所述的氨基酸序列的多肽的细胞接触能抑制 ER- α 36 活性的化合物。这样的化合物可以是能特异性地结合具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列的多肽的抗体。细胞可以是体内的或离体的,且任选地可以是 ER- α 66 阴性的, ER- α 46 阴性的,或其组合。在有些方面,化合物不是抗雌激素药。

[0023] 本发明还提供了分离的多肽,其包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列,优选地 SEQ ID NO:1 所述的氨基酸序列,更优选地, SEQ ID NO:20 所述的氨基酸序列。在另一个方面,分离的多肽与 SEQ ID NO:20 具有至少 70% 同一性,其中该多肽具有 ER- α 36 活性。本发明也包括 SEQ ID NO:1 的免疫原性片段。

[0024] 当这些术语出现在说明书和权利要求书中时,术语“包含”和其变体不具有限制含义。除非另有限定,可互换地使用“一个(a)”、“一个(an)”、“该(the)”和“至少一个”,且指一个或多个。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1 解释了人雌激素受体 - α (ER- α) 同种型的结构域结构代表。显示了结构域(用 A-F 标记的)、氨基酸序列编号、AF-1 和 AF-2、DNA 结合结构域、配体 - 结合结构域和二聚化结构域。也指示了磷酸化位点和每个结构域的功能。

[0027] 图 2 是证实 ER- α 的膜和基因组信号传导途径之间的可能的通讯的示意图。Cav-1 代表小窝蛋白 -1, ER- α , 雌激素受体 - α ; RTK, 受体酪氨酸激酶; Ras, Ras 癌基因; Mek, MAP/ERK 激酶; MAPK, 促分裂原活化蛋白激酶; PI3K, 磷酸肌醇 - 三磷酸激酶; AKT, 蛋白激酶 13; PDK1, 磷酸肌醇 - 依赖性的蛋白激酶; RSK, p90 核糖体 S6 激酶。

[0028] 图 3 是显示在有雌二醇(E2)存在下, pRET- 感染的 MCF10A 细胞在软琼脂中生长成大菌落的照片。ST1 克隆在含有 E2 的软琼脂中表现出快速生长。分别包括 MCF7 和 MCF10A 细胞作为阳性和阴性对照。

[0029] 图 4 是显示 pRET- 感染的 MCF10A 细胞中的小窝蛋白 -1 (Cav-1) 表达的下调的蛋白印迹。通过使用兔抗 -Cav-1 抗体 (N20) 的蛋白印迹, 分析来自不同细胞系的等量的全细胞提取物。用箭标指示 Cav-1 的位置, 且在每个泳道上面指示在每个泳道中分析的细胞提取物。

[0030] 图 5 是显示 pRET- 感染的 MCF10A 细胞中的 ER- α 表达的下调的蛋白印迹。通过使用针对 ER- α (H222) 和 ER- β 的抗体的蛋白印迹, 分析来自不同细胞系的等量的全细胞提取物。用箭标指示 ER- α 和 ER- β 的位置, 且在每个泳道上面指示在每个泳道中分析的细胞提取物。

[0031] 图 6 是显示 pRET- 感染的 MCF10A 细胞中的 ERK1/2 磷酸化的活化的蛋白印迹。通

过使用针对 ERK1/2 和磷酸化的 ERK1/2 的抗体的蛋白印迹,分析来自细胞系的等量的全细胞提取物。

[0032] 图 7 是显示 3 种 ER- α 蛋白在 Cav-1 单倍体不足 (haploinsufficient) 细胞 ST1 和 ST3 和 MCF7 乳腺癌细胞中的存在的蛋白印迹。通过使用针对 ER- α 的 H222 抗体的蛋白印迹,分析来自细胞系的等量的全细胞提取物。用箭标指示 ER- α 66、ER- α 46 和 ER- α 36 的位置,且在每个泳道上面指示在每个泳道中分析的细胞提取物。

[0033] 图 8 描绘了人 ER- α 基因的基因组组织。用箭标指示多个启动子的位置。用 AUG 和 UGA 指示翻译起始和终止位置。用编号的框显示外显子。也用框中的外显子 1' 显示内含子 1。下图显示了 ER- α 同种型的 mRNA 结构。用 AAA 指示聚腺苷酸化位点。

[0034] 图 9 是琼脂糖凝胶的图片,它显示了通过 PCR 分离能编 ER- α 36 的可读框的 cDNA。用箭标指示 cDNA 在凝胶中的位置。

[0035] 图 10 显示了 ER- α 36 可读框的预测的氨基酸序列。用氨基酸序列 (SEQ ID NO : 20) 左侧的编号,指示氨基酸位置。ER- α 36 独有的最后的 27 个氨基酸标有下划线 (SEQ ID NO : 1)。

[0036] 图 11 显示了 ER- α 66、ER- α 46 和 ER- α 36 的蛋白印迹分析。标记为 ER- α 66、ER- α 46 和 ER- α 36 的泳道代表着用能编码所述的雌激素受体同种型的表达质粒转染、并在转染后 2 天裂解的 HEK 293 细胞的分离的培养物。用抗 -ER- α 抗体 (H222),免疫检测每种转染子的裂解物。来自 MCF7 细胞的细胞提取物用作阳性对照。用箭标指示 ER- α 66、ER- α 46 和 ER- α 36 的位置。

[0037] 图 12 显示了:(a) 能编码 ER- α 36 且包含 ER- α 36 启动子的基因的 5' 侧翼序列的 DNA 序列 (SEQ ID NO : 22),和 (b) 能编码 ER- α 36 且包含由外显子 9 编码的核苷酸的基因的 3' 侧翼序列的 DNA 序列 (SEQ ID NO : 25)。在 5' 侧翼序列中,推定的转录结合位点标有下划线,且也指示了能结合核酸序列的蛋白。也用箭标指示了 cDNA 的起始位点。

[0038] 图 13 显示了不同的乳腺癌细胞 MCF10A、T47D、MCF7 和 MDA-MB-231 中的 ER- α 36 的 RNA 印迹分析。用箭标指示了 ER- α 36 和肌动蛋白的位置。

[0039] 图 14 显示了 ER- α 36 对 ER- α 66 和 ER- β 的 AF-1 和 AF-2 结构域介导的转录反式激活活性的抑制。(+E2), E2 处理的细胞 ; (-E2), 未用 E2 处理的细胞。

[0040] 图 15 显示, ER- α 36 能介导由 E2 刺激的膜 - 启动的 MAPK 激酶途径。(a) 蛋白印迹显示了用雌二醇 -17 β (E2 β) 处理 ER 36-293 细胞,会诱导 Mek1/2 和 ERK1/2 的快速磷酸化。P-Mek1/2 和 P-ERK1/2, 分别是 Mek1/2 和 ERK1/2 的磷酸化形式。(b) 血清 (而不是 E2 β) 会诱导对照载体 -293 细胞中的 ERK1/2 的磷酸化。P-ERK1/2 是 ERK1/2 的磷酸化形式。(c) 不同的雌激素和抗雌激素药会诱导 ER36-293 细胞中的 ERK1/2 的快速磷酸化。P-ERK1/2 是 ERK1/2 的磷酸化形式。(d) 他莫昔芬处理能组成型地刺激 ER36-293 细胞中的 ERK1/2 磷酸化。P-ERK1/2 是 ERK1/2 的磷酸化形式。

[0041] 图 16 表明, ER- α 36 能介导 E2 β 诱导的 MAPK 激酶核信号传导,并刺激细胞生长。(a) E2 β 对 MAPK 激酶核信号传导的作用。用 5XGal4-LUC, 即含有 5 个 Gal4 DNA 结合位点的萤光素酶报告质粒,和含有与 Gal4DNA 结合结构域融合的 ELK 转录活化结构域的 Gal1-ELK 表达载体 (上图),瞬时转染了 ER36-293 和对照载体 -293 细胞。转染后,将细胞培养物维持在没有雌激素的培养基中 36 小时,然后加入 E2 β (1nM 或 10nM) 12 小时。具有标准差的萤

光素酶活性代表着一式两份进行的超过 3 次实验。(b)E2 β 和抗雌激素药能刺激 ER36-293 细胞的生长。显示了在 490nm 的吸光度数据。平均了超过 5 次独立实验的结果；显示了平均值和 SEM。还通过成对的 t- 检验,评价了这些结果的统计学显著性。ER36-293 和载体 -293 细胞的 P- 值小于 0.001。

[0042] 图 17 表明,ER- α 36 主要是基于膜的雌激素受体。(a) 蛋白印迹分析 ER- α 36 在不同的确立的乳腺癌细胞系中的表达。剥离相同的印迹,并用抗-肌动蛋白抗体探测,以确保等量装载。(b)ER- α 36 在 ER- α 36 转染的 293 细胞中的亚细胞定位。用 ER- α 36 特异性的抗体,免疫印迹不同的亚细胞级分中的 ER- α 36。W,全细胞裂解物;PM,质膜;C,胞质溶胶;N,核。通过免疫印迹质膜、胞质溶胶、核和高尔基体的各种蛋白标记,检查亚细胞级分纯度。5' NT,5' 核苷酸酶;D4-GDI, GDP 解离抑制剂;mSin3A,组蛋白重构复合物的组分;COPB, β 外被蛋白。

[0043] 图 18 表明,E2 β 能促进 ER- α 66 阴性的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 在软琼脂中的生长。在不存在 E2 β (0)、存在 10nM E2 β (E2)、存在 10nM E2 β 和 10nM 他莫昔芬 (E2+TAM) 和存在单独的 10nM 他莫昔芬 (TAM) 的情况下,使 MDA-MB-231 细胞在软琼脂上生长 3 周。

[0044] 图 19 表明,E2 β 能诱导 ER- α 66 阴性的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中的膜启动的雌激素信号传导。用雌二醇 -17 β (E2 β) 处理 MDA-MB-231 细胞,会诱导 ERK1/2 的快速磷酸化。用 E2 β (10nM) 处理细胞不同的时间点,使所述细胞裂解,并使用磷酸化依赖性的和非依赖性的抗体,通过蛋白印迹进行分析。

[0045] 本发明的优选实施方案的详述

[0046] 已经发现,小窝蛋白 -1 (Cav-1) 系统的下调会组成型激活促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 途径,激活雌激素受体 - α (ER- α) 的表达,和触发正雌激素信号传导。该发现首次提供了活化的 MAPK 信号传导和乳房肿瘤发生 (尤其是由雌激素刺激的乳腺癌发展) 之间的清楚的联系。该发现有力地提示,Cav-1 通过协调 MAPK 和雌激素信号传导途径之间的通讯,在维持乳房上皮细胞的正常生长中起重要作用,且它的下调可能有助于这 2 个重要途径的调节异常,这最终导致乳腺肿瘤发生。图 2 显示了雌激素信号传导途径和 MAPK 信号传导途径的示意图。

[0047] 还已经鉴别和克隆了雌激素受体 - α 同种型。从位于原始的 66-kDa ER- α (ER- α 66) 基因的第一个内含子中的启动子,产生了雌激素受体 - α 的该 36-kDa 同种型 (ER- α 36)。ER- α 36 不同于 ER- α 66,因为它缺少 2 个转录活化结构域 (AF-1 和 AF-2),但是保留了 DNA- 结合、二聚化和大部分的配体-结合结构域。ER- α 36 的结构表明,ER- α 36 是雌激素信号传导的调节剂。ER- α 36 也可以介导雌激素信号传导的膜作用,因为它主要在质膜上表达,且也在胞质溶胶和核中表达。

[0048] 已经将 ER- β 视作 ER- α 66 介导的雌激素信号传导的组成型调节剂。发现缺少 AF-1 结构域的 ER- α 46 可以二聚化成 ER- α 66,并抑制由 ER- α 66 的 AF-1 结构域介导的反式激活活性,这表明 ER- α 46 在由 ER- α 66 的 AF-1 结构域介导的功能活性中起调节作用。ER- α 36 缺少 AF-1 和 AF-2 结构域。因而,认为 ER- α 36 会抑制由 ER- α 66 的 AF-1 和 AF-2 介导的生物功能,以及由 ER- α 46 的 AF-2 介导的功能。利用 ER- α 36 和 ER- α 46 介导的调节,其二者可能在不同的组织中以不同的水平表达,ER- α 66 可以在不同的靶组织中不同地起作用。认为这样的机理能解释不同生物过程中的雌激素信号传导的多效性作用。

[0049] 本发明的多肽和肽模仿物 (peptidomimetic)

[0050] 本发明提供了多肽。如本文使用的,术语“多肽”泛指通过肽键连接到一起的 2 个或更多个氨基酸的聚合物。术语肽、寡肽和蛋白都包含在多肽的定义中,且这些术语可互换地使用。应当理解,这些术语不意味着氨基酸聚合物的特定长度,它们也无意暗示或区分多肽是否由重组技术、化学或酶促合成生成,或是天然产生。本文公开和描述了本发明范围内的多肽的多个实例。在天然产生的多肽或多核苷酸的情况下,优选地,分离这样的多肽或多核苷酸,并任选地纯化。“分离的”多肽或多核苷酸是从它的天然环境分开和分离的多肽或多核苷酸。“纯化的”多肽或多核苷酸是至少 60% 地不含、优选地 75% 地不含和最优选地 90% 地不含它们天然地伴随的其它组分的多肽或多核苷酸。认为在它们天然发生的生物外面生产 (例如,通过化学或重组方法) 的多肽和核苷酸,是定义的分离的和纯化的,因为它们从未存在于天然环境中。“外源多肽”指外来多肽,即通常不存在于细胞中的多肽,或通常存在于细胞中、但是已经通过实验方法导入细胞中 (例如,通过导入能编码该多肽的多核苷酸) 的多肽。

[0051] 本发明的多肽可以是生物活性的。这样的生物活性在本文中称作“ER- α 36 活性”。可以用于确定本发明的多肽是否是生物活性的生物测定的实例包含,使能表达该多肽的细胞接触雌激素或抗-雌激素药,并测定在有雌激素或抗-雌激素药存在的情况下,与不表达本发明的多肽的对照细胞中的 MAPK 活性相比,MAPK 途径的活性是增高还是降低。优选地,MAPK 活性是 ERK 1/2 和 Mek 1/2 的磷酸化,且优选地,在有抗-雌激素药存在的情况下,本发明的多肽诱导的 ERK1/2 的磷酸化不减少。优选地,ER- α 36 活性是膜启动的。通过暴露能表达具有对不同配体的 ER- α 36 活性的多肽的细胞,可以测量 ER- α 36 活性。可以使用的配体的实例,包括但不限于,雌酮 (E1)、17 α -雌二醇 (E2 α)、17 β -雌二醇 (E2 β)、雌三醇 (E3)、雌四醇 (estetrol) (E4) 或附着到不可透过膜的分子,例如牛血清清蛋白 (BSA) 的雌激素。通常,当待测 ER- α 36 活性限于膜启动的 ER- α 36 活性时,使用附着到不可透过膜的分子上的雌激素。使用的雌激素的量可以变化,且优选地,在 1nM 至 10nM 的范围内。暴露于雌激素的细胞优选地是休眠细胞。该暴露允许发生 5-90 分钟,然后裂解细胞,并通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离存在于细胞中的多肽。将分离的多肽转移到膜上后,使用针对非磷酸化和磷酸化形式的 ERK 1/2 和 Mek 1/2 的抗体,评价 MAPK 途径的活化。任选地,可以包括抗-雌激素药,例如他莫昔芬、4OH-他莫昔芬或 ICI-182,780,以确定 ERK 1/2 的磷酸化是否对抗雌激素药不敏感。

[0052] 本发明提供了具有 SEQ ID NO:20 所述的氨基酸序列的多肽。该多肽,和本文所述的有关多肽,在本文中也称作 ER- α 36、ER- α 36 同种型和 ER 受体 α 36-亚基。如图 1 所示,当与 ER- α 66 同种型相比较时,ER- α 36 同种型缺少氨基-末端氨基酸残基 1-183,羧基-末端氨基酸残基 430-595,且在它的 C-末端具有 27 个氨基酸残基的添加 (见表 1)。雌激素受体 α 异构体包括 ER- α 36、ER- α 46、ER- α 66。雌激素受体 β 异构体包括 ER- β 。本发明也提供了雌激素受体,其包括 ER- α 36 同种型。无意进行限制,认为 ER- α 36 同种型能通过 ER- α 66、ER- α 46 或 ER- β 形成二聚体,通过调节雌激素受体功能,来调节细胞对雌激素的反应。而且,认为 ER- α 36 缺少活化因子 1 (AF-1) 和活化因子 2 (AF-2) 活性,并因而缺少内在的转录活性。但是,认为 ER- α 36 保留了完整的二聚化结构域,其允许 ER- α 36 与 ER- α 46、ER- α 66 或 ER- β 二聚化。认为该相互作用允许 ER- α 36 调节含有雌激素受体的

ER- α 46、ER- α 66 和 ER- β 的活性。

[0053] 表 1

[0054] 氨基酸和核苷酸序列

[0055]

SEQ ID NO和描述	氨基酸和核苷酸序列
SEQ ID NO : 18, ER- α 66, 登记号 M12674, AAA52399	MTMTLHTKASGMALLHQIQGNELEPLNRPQLKIPLERPL GEVYLDSSKPAVYNYPEGAAYEFNAAAAANAQVYGQTGL PYGPGSEAAAFGSNGLGGFPPLNSVSPSPLMLLHPPPQL SPFLQPHGQQVPYYLENEPSGYTVREAGPPAFYRPNSDN RRQGGRERLASTNDKGSMAKESAKETRYCAVCNDYASGY HYGVWSCEGCKAFFKRSIQGHNDYMCPATNQCTIDKNRR KSCQACRLRKCYEVGMMKGGIRKDRRGGRMLKHKRQRDD GEGRGEVGSAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSLTA DQMVSAALLDAEPPILYSEYDPTRPFSEASMMGLLTNLAD RELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLCAWLEILMIG LVWRSMEHPVKLLFAPNLLDRNQKCVCEGMVEIFDMLL ATSSRFRMMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKS LEEKDHIHRVLDKITD'TLIHLMAKAGLTLOQQHQRLAQL LLILSHIRHMSNKGMEHLYSMCKKNVPLYDLLEMLDA HRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGSTSSHSLQKYYIT GEAEGFPATV

SEQ ID NO:19,
ER-066,
登记号
M12674,
AY425004

ATGACCATGACCCTCCACACCAAAGCATCTGGGATGGCCCTACTGCATCA
GATCCAAGGGAACGAGCTGGAGCCCCTGAACCGTCCGCAGCTCAAGATCC
CCCTGGAGCGGCCCTGGGCGAGGTGTACCTGGACAGCAGCAAGCCCGCC
GTGTACAACCTACCCGAGGGCGCCGCTACGAGTTCAACGCGCGGGCCGC
CGCCAACGCGCAGGTCTACGGTCAGACCGGCCTCCCTACGGCCCCGGGT
CTGAGGCTGCGGCGTTTCGGCTCCAACGGCCTGGGGGGTTTCCCCCACTC
AACAGCGTGTCTCCGAGCCCGCTGATGCTACTGCACCCGCGCCGAGCT
GTCCCTTTCTTGACGCCCCACGGCCAGCAGGTGCCCTACTACCTGGAGA
ACGAGCCCAGCGGCTACACGGTGCGCGAGGCGGCCCGCCGGCATTCTAC
AGGCCAAATTGAGATAATCGACGCCAGGGTGGCAGAGAAAGATTGGCCAG
TACCAATGACAAGGGAAGTATGGCTATGGAATCTGCCAAGGAGACTCGCT
ACTGTGCAGTGTGCAATGACTATGCTTCAGGCTACCATTATGGAGTCTGG
TCCTGTGAGGGCTGCAAGGCCTTCTTCAAGAGAAGTATTCAAGGACATAA
CGACTATATGTGTCCAGCCACCAACCAGTGCACCATTGATAAAAACAGGA
GGAAGAGCTGCCAGGCCTGCCGGCTCCGCAAATGCTACGAAGTGGGAATG
ATGAAAGGTGGGATACGAAAAGACCGAAGAGGAGGGAGAATGTTGAAACA
CAAGCGCCAGAGAGATGATGGGGAGGGCAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTG
GAGACATGAGAGCTGCCAACCTTTGGCCAAGCCGCTCATGATCAAACGC
TCTAAGAAGAACAGCCTGGCCTTGTCCCTGACGGCCGACCAGATGGTCAG
TGCCCTTGTGGATGCTGAGCCCCCATACTCTATTCCGAGTATGATCCTA
CCAGACCCCTTCAGTGAAGCTTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCA
GACAGGGAGCTGGTTTCACATGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTT
TGTGGATTGACCCCTCCATGATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCCTGGC
TAGAGATCCTGATGATTGGTCTCGTCTGGCGCTCCATGGAGACCCAGTG
AAGCTACTGTTTGCTCCTAACTTGCTCTTGACAGGAACCAGGGAAAATG
TGTAAGGGCATGGTGGAGATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTC
GGTTCCGCATGATGAATCTGCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCT
ATTATTTTGCTTAATTCTGGAGTGTACACATTTCTGTCCAGCACCTGAA
GTCTCTGGAAGAGAAGGACCATATCCACCGAGTCTTGACAAGATCACAG
ACACTTTGATCCACCTGATGGCCAAGGCAGGCCTGACCCTGCAGCAGCAG
CACCAGCGGCTGGCCCAGCTCCTCCTCATCCTCTCCACATCAGGCACAT
GAGTAACAAAGGCATGGAGCATCTGTACAGCATGAAGTGAAGAAGCTGG
TGCCCCCTATGACCTGCTGCTGGAGATGCTGGACGCCACCGCCTACAT
GCGCCCACTAGCCGTGGAGGGGCATCCGTGGAGGAGACGGACCAAAGCCA
CTTGGCCACTGCGGGCTCTACTTCATCGCATTCTTGCAAAGTATTACA
TCACGGGGGAGGCAGAGGGTTTCCCTGCCACAGTCTGA

[0056]

[0057]

SEQ ID NO:21,
ER- α 36,
登记号 BX640939
的核苷酸
234-1166

ATGGCTATGGAATCTGCCAAGGAGACTCGCTACTGTGCAGTGTGCAATGA
CTATGCTTCAGGCTACCATTATGGAGTCTGGTCCTGTGAGGGCTGCAAGG
CCTTCTTCAAGAGAAGTATTCAAGGACATAACGACTATATGTGTCCAGCC
ACCAACCAGTGCACCATTGATAAAAAACAGGAGGAAGAGCTGCCAGGCCTG
CCGGCTCCGCAAATGCTACGAAGTGGGAATGATGAAAGGTGGGATACGAA
AAGACCGAAGAGGAGGGAGAATGTTGAAACACAAGCGCCAGAGAGATGAT
GGGGAGGGCAGGGGTGAAGTGGGGTCTGCTGGAGACATGAGAGCTGCCAA
CCTTGGCCAAGCCCGCTCATGATCAAACGCTCTAAGAAGAACAGCCTGG
CCTTGTCCCTGACGGCCGACCAGATGGTCAGTGCCTTGTGGATGCTGAG
CCCCCATACTCTATTCCGAGTATGATCCTACCAGACCCCTTCAGTGAAGC
TTCGATGATGGGCTTACTGACCAACCTGGCAGACAGGGAGCTGGTTTACA
TGATCAACTGGGCGAAGAGGGTGCCAGGCTTTGTGGATTGACCCCTCCAT
GATCAGGTCCACCTTCTAGAATGTGCCTGGCTAGAGATCCTGATGATTGG
TCTCGTCTGGCGCTCCATGGAGCACCCAGGGAAGCTACTGTTTGCTCCTA
ACTTGCTCTTGGACAGGAACCAGGGAATGTGTAGAGGGCATGGTGGAG
ATCTTCGACATGCTGCTGGCTACATCATCTCGGTTCCGCATGATGAATCT
GCAGGGAGAGGAGTTTGTGTGCCTCAAATCTATTCTTTTGCTTAATTCTG
GTATCTCACATGTAGAAGCAAAGAAGAGAATCCTGAACCTGCATCCTAAA
ATATTTGGAACAAGTGGTTTCTCGTGTCTAA

[0058] 本发明的多肽包括与 SEQ ID NO:20 具有至少 70% 同一性的氨基酸序列的多肽。这样的多肽包括与 SEQ ID NO:20 具有超过 70% 的至少单个百分比的同一性的氨基酸序列的多肽, 例如与 SEQ IDNO:20 具有 71%、72%、73% 的同一性, 等等, 直到 100% 的同一性。优选地, 多肽包括且有如下氨基酸序列的多肽, 所述氨基酸序列以递增的优选等级, 与 SEQ ID NO:20 具有至少约 80% 同一性、至少约 90% 同一性或至少约 95% 同一性。优选地, 多肽是生物活性的。优选地, 多肽具有 36kDa 的分子量, 如按照十二烷基硫酸钠 (SDS)- 聚丙烯酰胺凝胶上的电泳测得的。一般, 参与 ER- α 66 的磷酸化的残基, 例如 S236、K302 和 K303 是保守的, 参与 ER- α 66 的 DNA 结合结构域、配体结合结构域和二聚化结构域的功能的那些残基也是如此。在 DNA 结合、配体结合和 / 或二聚化中起作用的残基是本领域已知的。

[0059] 通常, 通过比对 2 个氨基酸序列的残基, 确定 2 个多肽序列之间的百分比同一性, 以最优化沿着它们的序列长度的相同氨基酸的数目; 在进行比对时允许任一个或 2 个序列中有缺口, 以最优化相同氨基酸的数目, 尽管每个序列中的氨基酸必须保持它们的正确次序。优选地, 使用 BLAST 2 搜索算法的 Blastp 程序, 版本 2.0.9, 如 Tatusova 等 (FEMS Microbiol. Lett., 174, 247-250 (1999)) 所述, 且可以在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html> 从环球网上得到, 来对比 2 个氨基酸序列。优选地, 使用所有 BLAST 2 搜索参数的缺省值, 包括矩阵 (matrix) = BLOSUM62; 开放缺口罚分 (open gap penalty) = 11, 延伸缺口罚分 (extension gap penalty) = 1, gap x_dropoff = 50, 期望 (expect) = 10, 字长 (wordsize) = 3, 并任选地, 过滤器处于开。在使用 BLAST 搜索算法对比 2 个氨基酸序列时, 结构相似性称作“同一性”。

[0060] 本发明也提供了作为 ER- α 36 雌激素受体同种型的片段的多肽。优选地, 片段是免疫原性的。在有些方面, 片段具有 ER- α 6 活性。免疫原性片段的实例是, SEQ ID NO:1 的氨基酸 13-27 所述的氨基酸序列, 更优选地, SEQ ID NO:1 的 1-27。这样的片段可以用于制备能特异性地结合 ER- α 36 雌激素受体同种型的抗体。片段的实例包括已经在 N- 末端或 C- 末端或两末端截短 1 个或多个氨基酸的雌激素受体同种型, 只要该片段含有至少 5 个

邻接氨基酸,更优选地至少 7 个邻接氨基酸,甚至更优选地至少 10 个邻接氨基酸,和最优选地至少 12 个邻接氨基酸。

[0061] 本发明提供了融合多肽,其具有偶联到本发明的多肽上的载体多肽。载体多肽可以用于增加或降低融合多肽的溶解度。载体多肽也可以用于增加融合多肽的免疫原性,以增加能结合本发明的多肽的抗体的生产。例如,载体多肽可以融合到本发明的多肽片段上,以促进能特异性地结合 ER- α 36 的抗体的生产。这样的片段的实例是具有 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 13-27 的多肽。本发明不受用于生成本发明的融合多肽的载体多肽类型的限制。载体多肽的实例包括匙孔血蓝蛋白、牛血清清蛋白、卵清蛋白、小鼠血清清蛋白、兔血清清蛋白等。载体多肽也可以用于分离或检测融合多肽。这样的载体蛋白的实例包括谷胱甘肽-S-转移酶、麦芽糖-结合蛋白、壳多糖-结合蛋白和具有下述氨基酸序列的多肽: QFFGLM (SEQ ID NO: 2)、EQKLISEEDL (SEQ ID NO: 3)、KADESS (SEQ ID NO: 4)、YPYDVPDYA (SEQ ID NO: 5)、DYKDDDDK (SEQ ID NO: 6)、YTDIEMNRLGK (SEQ ID NO: 7)、MASMTGGQQMG (SEQ ID NO: 8)、DTYRYI (SEQ ID NO: 9)、TDFYLK (SEQ ID NO: 10)、HHHHHH (SEQ ID NO: 11)、HPOL (SEQ ID NO: 12)、QYPALT (SEQ ID NO: 13)、QRQYGDVFKGD (SEQ ID NO: 14)、EYMPME (SEQ ID NO: 15)、EFMPME (SEQ ID NO: 16) 和 RYIRS (SEQ ID NO: 17)。因此,通过与结合融合多肽的载体多肽部分的其它组分的相互作用,可以检测或分离融合多肽。例如,通过使用已知的方法,可以用生物素检测或分离具有作为载体多肽的抗生物素蛋白的融合多肽。载体多肽也可以用于造成融合多肽在细胞中表达后形成内含体。载体多肽也可以是输出信号,其能造成融合多肽输出细胞,或把融合多肽导向细胞中的隔室,例如周质。

[0062] 本发明也提供了本发明的 2 种或更多种多肽,其连续连接进单个氨基酸链中。这样的多肽在本文中称作多肽。多肽可以通过接头连接(见 Stahl 等,美国专利号 6,558,924)。可以分离这样的多蛋白,然后切割,以生成本发明的多肽或偶联多肽。通过使用许多方法,例如化学或蛋白酶切割,可以切割多蛋白。因此,可以将接头设计成被特定的蛋白酶或化学试剂切割。可以用于切割本发明的多蛋白的化合物的实例包括化学试剂和酶。化学试剂的实例包括溴化氰、甲酸和加热、羟胺和加热、溶于醋酸中的亚碘酰基苯甲酸-2-(2-硝基苯基)-3-甲基-3-溴代假吲哚等。酶的实例包括 A1a-64 枯草杆菌蛋白酶、梭菌蛋白酶、胶原酶、肠激酶、凝血因子 Xa、肾素、 α -凝血酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、烟草蚀纹病毒蛋白酶等。多蛋白可以用于增加本发明的多肽的生产效率。生产多蛋白的方法是本领域已知的(见 Coolidge 等,美国专利号 6,127,150)。

[0063] 本发明的多肽包括已经通过添加、取代或缺失一个或多个邻接的或不邻接的氨基酸来修饰的类似物,或已经被化学地或酶促地修饰的类似物,例如通过报告基团的附着,通过 N-末端、C-末端或其它官能团修饰或衍生,或通过环化,只要该类似物能保留生物活性或能刺激结合 ER- α 36 的抗体的生产。类似物因而可以在多肽的一个或两个末端包括其它的氨基酸。优选地,类似物是免疫原性的,更优选地,类似物是免疫原性的,且具有 ER- α 36 活性。在有些方面,本发明提供了非类似物的多肽。

[0064] 本发明的多肽中的氨基酸取代优选地是保守取代,其选自该氨基酸所属类别的其它成员。例如,蛋白生物化学领域众所周知,属于具有特定大小或特征(例如电荷、疏水性和亲水性)的氨基酸组的氨基酸,通常可以取代为另一种氨基酸,而基本上不改变多肽的结构。例如,非极性的(疏水的)氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯

丙氨酸、色氨酸和酪氨酸。极性的中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷的（碱性）氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电荷的（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。优选的保守取代的实例包括 Lys 取代 Arg，反之亦然，以维持正电荷；Glu 取代 Asp，反之亦然，以维持负电荷；Ser 取代 Thr，以维持游离的 -OH；和 Gln 取代 Asn，以维持游离的 NH_2 。有关的氨基酸（例如 3-羟脯氨酸、4-羟脯氨酸、高半胱氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基庚二酸、 γ -羧基谷氨酸、 β -羧基天冬氨酸）、氨基酸酰胺（鸟氨酸、高精氨酸、N-甲基赖氨酸、二甲基赖氨酸、三甲基赖氨酸、2,3-二氨基丙酸、2,4-二氨基丁酸、高精氨酸、肌氨酸和羟赖氨酸）和取代的苯丙氨酸、正亮氨酸、正缬氨酸、2-氨基辛酸、2-氨基庚酸、statine、 β -缬氨酸、萘基丙氨酸、四氢异喹啉-3-羧酸和卤化的酪氨酸，可以被交换成类似的氨基酸。

[0065] 本发明提供了本发明的多肽的肽模仿物。肽模仿物指这样的多肽，其中至少一个肽键已经被替换为非肽键，例如在制药工业中经常用作非肽药物的那些，其具有与模板多肽类似的性质 (Fauchere, J., *Adv. Drug Res.*, 15:29 (1986), Evans 等, *J. Med. Chem.*, 30:1229 (1987), 和 Janda 等, 美国专利号 6,664,372)。肽模仿物在结构上类似于具有肽键的多肽，但是具有一个或多个通过本领域已知的方法任选地被下述键替代的肽键：例如， $-\text{CH}_2\text{NH}-$ 、 $-\text{CH}_2\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-$ （顺式和反式）、 $-\text{COCH}_2-$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2\text{SO}-$ 。肽模仿物胜过天然多肽实施方案的优点包括，更经济的生产，更高的化学稳定性，改变的特异性和增强的药理性质，例如半衰期、吸收、效价和功效。

[0066] 用相同类型的 D-氨基酸取代多肽或肽模仿物中的一个或多个氨基酸（例如，D-赖氨酸替代 L-赖氨酸），可以产生多肽和肽模仿物，其例如更稳定，且更能抗内源蛋白酶。

[0067] 通过在氨基-末端和 / 或羧基-末端添加能减少体内降解的封闭剂，可以修饰本发明的多肽和肽模仿物用于体内用途。这可以用于这样的情形，其中多肽末端倾向于被蛋白酶体内降解。这样的封闭剂包括但不限于，可以附着到本发明的多肽或肽模仿物的氨基和 / 或羧基末端残基的其它的有关的或无关的肽序列。这可以在化学合成过程中完成，或通过一般技术的人员熟悉的方法，通过重组 DNA 技术完成。或者，封闭剂例如焦谷氨酸，或本领域已知的其它分子，可以附着到氨基和 / 或羧基末端残基上，或氨基末端的氨基或羧基末端的羧基可以替换为不同的部分。因此，本发明提供了被封闭的多肽和肽模仿物，和氨基末端、羧基末端或其组合。

[0068] 通过使用许多表达系统，包括但不限于，用其中已经插入了本发明的多核苷酸的重组载体转化的细胞或微生物，可以小规模或大规模地生产本发明的多肽。下面描述了这样的重组载体和其应用方法。这些载体可以用于转化许多生物。这样的生物的实例包括，细菌（例如，大肠杆菌 (*E. coli*) 或枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)）；酵母（例如，糖酵母属 (*Saccharomyces*) 和毕赤氏酵母属 (*Pichia*)）；昆虫（例如，杆状病毒）；植物；或哺乳动物细胞（例如，COS、CHO、BHK、293、VERO、HeLa、MDCK、W138 和 NIH 3T3 细胞）。直接从用载体转染的哺乳动物得到的原代或次生细胞，也可以用作宿主细胞。

[0069] 合成方法也可以用于生产本发明的多肽和肽模仿物。这样的方法是本领域已知的和常规的。例如，固相肽合成方法是确定的且广泛使用的方法。通过在免疫亲和或离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相 HPLC、硅石或阴离子交换树脂例如 DEAE 上的色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、使用例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤、配体亲和色谱等，可以

容易地纯化多肽。通过使融合多肽结合分离介质,然后切割融合多肽以释放纯化的多肽,也可以容易地纯化多肽。例如,可以生成包含在多肽和载体多肽之间的凝血因子 Xa 切割位点的融合多肽。融合多肽也可以结合亲和柱,后者上面结合了融合多肽的载体多肽部分。然后,可以用凝血因子 Xa 切割融合多肽,以释放多肽。这样的系统已经与凝血因子 Xa 去除试剂盒组合使用,用于纯化本发明的多肽。

[0070] 多核苷酸

[0071] 本发明提供了能编码本发明的多肽的多核苷酸。术语“多核苷酸”泛指以 5' 至 3' 方向共价连接的 2 个或更多个核苷酸的聚合物。多核苷酸可以包括具有不同功能的核苷酸序列,包括例如编码序列,和非编码序列,例如调节序列。编码序列、非编码序列和调节序列如下面定义。术语核酸、核酸分子和寡核苷酸包含在多核苷酸的定义内,且这些术语可互换地使用。应当理解,这些术语不意味着核苷酸聚合物的特定长度,它们也无意暗示或区分多核苷酸是否由重组技术、化学或酶促合成生成,或是天然产生。

[0072] 多核苷酸可以是单链的或双链的,且第二个互补链的序列由第一链的序列决定。因此,术语“多核苷酸”应当广义地理解为包括单链的核酸聚合物,它的互补体,和由此形成的双链体。多核苷酸的“互补性”指 2 个单链多核苷酸彼此碱基配对的能力,其中一个多核苷酸上的腺嘌呤与另一个上的胸苷(或尿嘧啶,在 RNA 的情况下)碱基配对,而一个多核苷酸上的胞苷与另一个上的鸟嘌呤碱基配对。当一个多核苷酸上的核苷酸序列与第二个多核苷酸上的核苷酸序列碱基配对时,2 个多核苷酸彼此互补。例如,5' -ATGC 和 5' -GCAT 是完全互补的,5' -GCTA 和 5' -TAGC 也是如此。

[0073] 本发明的多核苷酸的一个实例是 SEQ ID NO:21(见表 1,也即存在于 GenBank 登记号 BX640939 中的核苷酸序列的核苷酸 234-1166)。优选的本发明的多核苷酸也包括具有与能编码根据本发明的多肽的核苷酸序列“基本上互补的”核苷酸序列的多核苷酸,或这样的核苷酸序列的互补体。“基本上互补的”多核苷酸可以包括至少一个碱基对错配,但是 2 个多核苷酸仍然具有杂交的能力。例如,2 个 DNA 分子 5' -AGCAAATAT 和 5' -ATATATGCT 中的每一个的中间核苷酸不能碱基配对,但是这 2 个多核苷酸仍然是如本文定义的基本上互补的。如果它们在 55°C、2X SSC(SSC:150mM NaCl,15mM 柠檬酸三钠,pH7.6) 示例的杂交条件下杂交,则 2 个多核苷酸是基本上互补的。用于本发明目的的基本上互补的多核苷酸优选地共有至少一个至少 20 个核苷酸长的区域,该共有区域具有至少 60%核苷酸同一性、优选地至少 80%核苷酸同一性、更优选地至少 90%核苷酸同一性和最优选地至少 95%核苷酸同一性。特别优选的基本上互补的多核苷酸共有许多这样的区域。优选地,多核苷酸与 SEQ ID NO:21 具有至少 70%同一性的核苷酸序列。更优选地,多核苷酸具有如下核苷酸序列,所述核苷酸序列与 SEQ ID NO:21 具有超过 70%的至少单个百分比的同一性,例如与 SEQ ID NO:21 具有 71%、72%、73%的同一性,等等,直到 100%的同一性。甚至更优选地,多核苷酸具有与 SEQ ID NO:21 具有至少 80%同一性、至少 90%同一性或至少 95%同一性的核苷酸序列。最优选地,多核苷酸具有与 SEQ ID NO:21 具有 100%同一性的核苷酸序列。与 SEQ ID NO:21 具有至少 70%同一性的多核苷酸具有 ER- α 36 活性。

[0074] 通常,通过比对 2 个多核苷酸序列的碱基,确定 2 个多核苷酸序列之间的百分比同一性,以最优化沿着它们的序列长度的相同碱基的数目;在进行比对时允许任一个或 2 个序列中有缺口,以最优化相同碱基的数目,尽管每个序列中的碱基必须保持它们的正确次

序。优选地,使用 BLAST 2 搜索算法的 Blastn 程序,版本 2.0.11,也如 Tatusova 等 (FEMS Microbiol. Lett, 174, 247-250 (1999)) 所述,且可以在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html> 从环球网上得到,来对比 2 个多核苷酸序列。优选地,使用所有 BLAST2 搜索参数的缺省值,包括匹配奖分 (reward for match) = 1,错配罚分 (penalty for mismatch) = -2,开放缺口罚分 = 5,延伸缺口罚分 = 2, gap x_dropoff = 50,期望 = 10,字长 = 11,并任选地,过滤器处于开。使用 CLUSTALW 多序列比对软件 (J. Thompson 等, Nucl. Acids Res., 22:4673-4680 (1994)),其可以在 www.ebi.ac.uk/clustalw/ 从环球网上得到,也可以容易地确定 2 个多核苷酸序列之间的核苷酸序列同一性的位置和水平。

[0075] 应当理解,能编码本发明的多肽的多核苷酸不限于含有天然产生的基因组或 cDNA 核苷酸序列的全部或部分的多核苷酸,而是也包括由于遗传密码的简并性,能编码这样的多肽的多核苷酸类别。例如,天然产生的多核苷酸序列 SEQ ID NO:21 只是能编码具有氨基酸 SEQ ID NO:20 的多肽的核苷酸序列类别的一个成员。能编码选择的多肽序列的核苷酸序列类别很大但是有限,且参考标准的遗传密码,其中已知不同的核苷酸三联体 (密码子) 能编码相同的氨基酸,本领域的技术人员能容易地确定类别中的每个成员的核苷酸序列。

[0076] 能“编码”本发明的多肽的多核苷酸任选地包含编码区和非编码区,且因此应当理解,除非另有相反说明,能“编码”多肽的多核苷酸在结构上不限于能编码多肽的核苷酸序列,而是也包括编码区以外 (即,5' 或 3') 的其它核苷酸序列。“编码区”或“编码序列”是能编码多肽的核苷酸序列,且当置于适当的调节序列的控制下时,其能表达编码的多肽。编码区的边界通常由在它的 5' 端的翻译起始密码子和在它的 3' 端的翻译终止密码子决定。“外源编码区”指外来编码区,即通常在细胞中不存在的编码区,或通常存在于细胞中、但是已经通过实验方法导入细胞中、可操作地连接到它通常不可操作地连接的调节区的编码区,或其组合。

[0077] 本发明的多核苷酸在拓扑学上可以是线状的或环状的。多核苷酸可以是,例如,载体的一部分。载体可以提供进一步克隆 (多核苷酸的扩增),即克隆载体,或提供由编码区编码的多肽的表达,即表达载体。载体可以包括,但不限于,质粒、噬菌粒、F 因子、病毒、粘粒或噬菌体。载体可以是双链或单链的线状或环状形式。通过整合进细胞基因组或存在于染色体外 (例如,作为具有复制起点的自主复制质粒),载体也可以转化原核或真核宿主。载体中的多核苷酸可以在适当的启动子或用于体外转录或在宿主细胞中转录的其它调节序列的控制下,并与其可操作地连接,所述宿主细胞例如真核细胞,或微生物,例如细菌。优选的真核细胞实例包括 MDA-MB-231、HeLa、CHO 和 MCF10A 细胞系。调节序列,或调节区,指位于编码序列的上游、中间或下游的核苷酸序列,且可操作地连接编码序列。调节序列的实例包括增强子、启动子、翻译前导序列、内含子和多腺苷酸化信号序列。它们包括天然的和合成的序列,以及可以与合成的和天然的序列相组合的序列。调节序列不限于启动子。但是,在本发明中的一些合适的调节序列包括,但不限于,组成型启动子、组织-特异性的启动子、发育-特异性的启动子、诱导型启动子和病毒启动子。术语“可操作地连接”指组分的并列,以便它们处于允许它们以目标方式发挥作用的关系。当以在与调节序列相容的条件下实现编码区的表达的方式连接时,调节序列“可操作地连接”到编码区。

[0078] 载体可以是能在多种宿主中起作用的穿梭载体。载体也可以是克隆载体,其一般含有一个或少数限制性内切核酸酶识别位点,外来 DNA 序列可以在这里以可确定的方式插

入。可以发生这样的插入,而不丧失克隆载体的基本生物功能。克隆载体也可以含有标记基因,其适用于鉴别和选择用克隆载体转化的细胞。标记基因的实例是四环素抗性或氨苄青霉素抗性。许多克隆载体可以商业上得到(例如 Stratagene, New England Biolabs, Clontech)。载体可以是含有调节序列的表达载体,所述调节序列能指导插入表达载体的多核苷酸的表达。许多载体可以商业上得到,且是本领域已知的(Stratagene, La Jolla, CA; New England Biolabs, Beverly, MA)。表达载体可以用于体外转录和翻译测定。

[0079] 将多核苷酸导入载体的方法,是本领域众所周知的(Sambrook 等, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001))。简而言之,用一种或多种限制酶(限制性内切核酸酶)处理要插入多核苷酸的载体,生成线性化的载体,其具有平端,具有 5' 或 3' 突出端的“粘性”末端,或上面的任意组合。也可以用限制酶处理载体,随后用另一种修饰酶处理,例如聚合酶、外切核酸酶、磷酸酶或激酶,以生成线性化的载体,其具有对将多核苷酸连接进载体有用的特征。用一种或多种限制酶处理要插入载体的多核苷酸,以生成线性化的片段,其具有平端,具有 5' 或 3' 突出端的“粘性”末端,或上面的任意组合。也可以用限制酶处理多核苷酸,随后用另一种 DNA 修饰酶处理。这样的 DNA 修饰酶包括,但不限于,聚合酶、外切核酸酶、磷酸酶或激酶,以生成多核苷酸,其具有对将多核苷酸连接进载体有用的特征。

[0080] 然后,根据本领域已知的方法,将处理的载体和多核苷酸连接到一起,以形成含有多核苷酸的构建体(Sambrook 等, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001))。简而言之,可以在有合适的缓冲液和连接酶存在下,组合处理的核酸片段和处理的载体。然后,在适当的条件下,温育混合物,以允许连接酶将核酸片段连接进载体。

[0081] 本发明还提供了制备本发明的多肽的方法和制备能编码它们的多核苷酸的方法。方法包括生物的、酶促的和化学的方法,以及其组合,且是本领域众所周知的。例如,使用标准的重组 DNA 技术,可以在宿主细胞中表达多核苷酸,使用无细胞的基于 RNA 的系统,可以体外地酶促合成它,或使用化学技术,例如固相肽合成,可以合成它。当使用重组 DNA 技术时,宿主细胞可以是,例如,细菌细胞、昆虫细胞、酵母细胞或哺乳动物细胞。

[0082] 本发明也提供了具有启动子活性的多核苷酸。一方面,本发明的启动子包括 SEQ ID NO :22 所述的核苷酸序列,或其一部分。在另一个方面,本发明的启动子具有如下核苷酸序列,所述核苷酸序列与 SEQ ID NO :22 具有超过 70% 的至少单个百分比的同一性,例如与 SEQ ID NO :22 具有 71%、72%、73% 的同一性,等等,直到 100% 的同一性。本文描述了确定百分比同一性的方法。甚至更优选地,启动子具有与 SEQ ID NO :22 具有至少 80% 同一性、至少 90% 同一性、或至少 95% 同一性的核苷酸序列。本发明的启动子具有雌激素受体(ER)调节的活性。如本文使用的,ER 调节的活性指在有 ER- α 66 存在下,优选地,在有能结合雌激素的 ER- α 66 存在下,可操作地连接的编码区的增强表达。本发明的启动子以依赖于和非依赖于雌激素的方式表达。本发明的启动子可以可操作地连接到能编码多肽(包括标记多肽)的编码区。标记多肽的实例包括检测标记(例如,荧光蛋白、酶、抗原标记等)和选择标记(能造成药物抗性、药物易感性或营养缺陷或纠正营养缺陷的多肽等)。

[0083] 抗体

[0084] 本发明提供了能特异性地结合本发明的多肽和肽模仿物的抗体。如本文使用的,

“能特异性地结合”多肽的抗体是这样的抗体,其仅仅能与诱导该抗体合成的抗原的表位相互作用,或能与结构上有关的表位相互作用。甚至在有多种潜在结合靶存在下,“能特异性地结合”表位的抗体也能在适当的条件下,与表位相互作用。在有些方面,本发明的抗体能特异性地结合 ER- α 36 或其一部分,且不特异性地结合 ER- α 66 或 ER- α 46。

[0085] 因此,本发明的多肽和肽模仿物和其片段可以用作抗原,来生产抗体,包括脊椎动物抗体、杂合抗体、嵌合抗体、人源化的抗体、改变的抗体、单价抗体、单克隆和多克隆抗体、Fab 蛋白和单结构域抗体。例如,具有 SEQ ID NO :1 的多肽或其片段,例如 SEQ ID NO :1 的氨基酸 13-27,可以用于产生能特异性地结合 ER- α 36 的抗体。通过将它们共价连接到免疫原性载体上,例如匙孔血蓝蛋白 (KLH)、牛血清清蛋白、卵清蛋白、小鼠血清清蛋白、兔血清清蛋白等,可以修饰本发明的多肽或肽模仿物或其片段。

[0086] 如果需要多克隆抗体,则可以用需要的抗原免疫选择的动物(例如,小鼠、兔子、山羊、马或鸟,例如鸡)。根据已知且常规的方法,收集并处理来自免疫的动物的血清。如果含有针对本发明的多肽的多克隆抗体的血清,含有对其它抗原的抗体,则可以通过免疫亲和色谱,纯化多克隆抗体。本领域已知用于生产和加工多克隆抗血清的技术(见,例如,Harlow 等, *Antibodies :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pub. 1988)。

[0087] 本领域的技术人员也可以容易地生产针对本发明的多肽或肽模仿物或其片段的单克隆抗体。通过杂交瘤制备单克隆抗体的一般方法是众所周知的(见,例如,Harlow 等, *Antibodies :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pub. 1988)。通过细胞融合,且也可以通过其它技术,例如用致癌 DNA 直接转化 B 淋巴细胞,或用 EB 病毒转染,可以生成无限增殖化的抗体生产性细胞系(杂交瘤)。可以筛选针对本发明的多肽和肽模仿物生产的单克隆抗体组的各种性质,例如表位亲和性。制备抗体的其它众所周知的方法,包括使用噬菌体显示技术(见,例如, Kay 等, *Phage display of peptides and proteins :A laboratory manual*. San Diego :Academic Press(1996))。

[0088] 本发明的抗体可以衍生自“人源化的”单克隆抗体。通过将小鼠互补决定区从小鼠免疫球蛋白的重和轻可变链转移进入可变结构域,然后取代鼠对应物的构架区的人残基,可以生产人源化的单克隆抗体。使用源自人源化的单克隆抗体的抗体组分,消除了与鼠恒定区的免疫原性有关的潜在问题。描述了用于克隆鼠免疫球蛋白可变结构域的一般技术(Orlandi 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86 :3833(1989), 且也描述了生产人源化的单克隆抗体的技术(Jones 等, *Nature*, 321 :522(1986) ;Riechmann 等, *Nature*, 332 :323(1988))。

[0089] 通过常规的已知方法,包括抗体的蛋白水解,或通过能编码该片段的多核苷酸在大肠杆菌中的表达,可以制备本发明的抗体片段。通过常规方法(用例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)消化完整的抗体,可以得到抗体片段。例如,通过用胃蛋白酶酶促切割抗体,提供称作 F(ab')₂ 的 5S 片段,可以生产抗体片段。使用硫醇还原剂和任选的由二硫键的切割产生的巯基的封闭剂,可以进一步切割该片段,以生成 3.5SFab' 单价片段。或者,使用胃蛋白酶的酶促切割,会直接产生 2 个单价的 Fab' 片段和 1 个 Fc 片段。

[0090] 也可以使用切割抗体的其它方法,例如分离重链,以形成单价的轻-重链片段,进一步切割片段,或其它的酶促的、化学的或遗传技术,只要该片段能结合可由完整的抗体识别的抗原。

[0091] 可以筛选抗体,以确定它们所结合的表位的同一性。表位指抗原(例如本发明的

多肽)上的抗体互补位结合的部位。表位通常由分子的化学活性的表面基团例如氨基酸或糖侧链组成,且可以具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。可以用于鉴别表位的方法,是本领域已知的(Harlow 等, *Antibodies :A Laboratory Manual*, page319 (Cold Spring Harbor Pub. 1988))。

[0092] 可以筛选抗体特异性地结合本发明的多肽或肽模仿物的能力。例如,通过使用本领域的常规方法,可以选择能特异性地结合 ER- α 36 同种型或其部分、但是不能结合 ER- α 46 或 α 66 同种型的抗体(见 Kitajima 等,美国专利号 6, 534, 281, 和 Harlow 等, *Antibodies :A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pub. 1988)。

[0093] 可以将本发明的抗体偶联到多种化合物上。化合物的实例包括检测标记。这样的检测标记的实例包括荧光标记、酶、放射性同位素等,例如抗生物素蛋白或生物素,其允许检测抗体。本领域已知将抗体偶联到检测标记的方法,和有用的检测标记。这样的抗体可以用于检测 ER- α 36 的自动系统中。抗体可以共价地附着到化疗剂。本领域已知可用于治疗癌症例如乳腺癌和前列腺癌的化疗剂。化疗剂的实例包括苯并二氢吡喃、代马孕酮酯、屈洛西芬、艾多昔芬、他莫昔芬、雷洛昔芬、托瑞米芬、氟维司群(fulvestrant)和 faslodex、二膦酸盐、降钙素、tribolone、甲状旁腺素或雷尼酸锶(strontium ranelate)。其它实例包括细胞因子,或毒素,例如白喉毒素 A 链。

[0094] 组合物

[0095] 本发明也提供了组合物,其包含本发明的多核苷酸、肽模仿物或抗体。这样的组合物一般包含药学上可接受的载体。如本文使用的“药学上可接受的载体”包括与药物施用相容的盐水、溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。也可以将其它活性化合物整合进组合物中。

[0096] 可以将本发明的组合物制备成许多形式,包括片剂、硬或软胶囊、水溶液、悬浮液和脂质体,和其它缓释制剂,例如成形的聚合凝胶。可以配制经口剂型,从而使多肽、肽模仿物或抗体在经过胃后释放进肠中。这样的制剂记载在 Hong 等,美国专利号 6, 306, 434 和其中包含的文献中。

[0097] 经口的液体组合物可以是下述形式:例如,水性的或油性的悬浮液、溶液、乳剂、糖浆或酏剂,或可以作为干燥产品存在,以在使用前与水或其它合适的载体配制。这样的液体组合物可以含有常规添加剂,例如悬浮剂、乳化剂、非水载体(其可以包括食用油)或防腐剂。

[0098] 组合物可以配制成用于肠胃外施用(例如,通过注射,例如,快速浓注或连续输注),且可以以单位剂型存在于安瓿、预装注射器、小体积输注容器或具有添加的防腐剂的多剂量容器中。组合物可以采取下述形式:在油性或水性载体中的悬浮液、溶液或乳剂,且可以含有配制试剂,例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0099] 可以将适用于直肠施用的组合物制备成单位剂量栓剂。组合物中可以包含的合适的载体包括盐水溶液示例的那些,和本领域经常使用的其它材料。

[0100] 对于吸入施用,可以从吹入器、喷雾器或加压包或其它方便的递送气溶胶喷雾剂的工具,方便地递送组合物。加压包可以包含合适的推进剂例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体。在加压的气溶胶的情况下,通过提供阀门来递送计量的量,可以确定剂量单位。

[0101] 或者,对于通过吸入或吹入施用,组合物可以采取干粉组合物的形式,例如,调节剂和合适的粉末基质(例如乳糖或淀粉)的粉末混合物。粉末组合物可以以单位剂型存在,例如在胶囊或药筒中,或例如,明胶或硬质泡沫塑料衬垫包装,在吸入器或吹入器的辅助下,可以从其中施用粉末。对于鼻内施用,可以通过液体喷雾施用组合物,例如通过塑料瓶喷雾器。

[0102] 可以将组合物配制成用于经皮施用。也可以将组合物配制成水溶液、悬浮液或分散体、水性凝胶、油包水乳剂或水包油乳剂。通过将组合物被囊化在聚合物中,也可以制备经皮制剂。可以将剂型直接应用于皮肤,作为洗剂、乳膏、油膏,或通过使用贴剂。

[0103] 本发明的组合物也可以含有其它成分,例如调味剂、着色剂、抗微生物剂和防腐剂。另外,本发明的组合物可以包含药学活性成分,例如激素、抗坏死剂、血管扩张剂、药物试剂等。

[0104] 通过细胞培养物或实验动物中的标准的药学方法,例如测定 LD_{50} (对 50% 群体致死的剂量) 和 ED_{50} (对 50% 群体治疗上有效的剂量),可以确定这样的组合物的毒性和治疗功效。毒性和治疗作用之间的剂量比率,是治疗指数,且其可以表达为比率 LD_{50}/ED_{50} 。能表现出高治疗指数的化合物是优选的。

[0105] 从细胞培养测定和动物研究得到的数据,可以用于配制一定范围的人用剂量。这样的化合物的剂量,优选地在循环浓度的范围内,其包括具有较少或无毒性的 ED_{50} 。依赖于采用的剂型和使用的施用途径,剂量可以在该范围内变化。对于在本发明的方法中使用的化合物,可以从细胞培养测定,初步估计治疗上有效的剂量。可以在动物模型中配制剂量,以达到包含 IC_{50} 的循环血浆浓度范围(即,能达到症状的半数最大抑制的实验化合物的浓度),如在细胞培养中测定的。这样的信息可以用于更准确地确定在人类中有用的剂量。可以测量血浆中的水平,例如通过高效液相色谱。一方面,人用的剂量范围是足以产生至少 10 微摩尔(μM , 优选地至少 25 μM , 更优选地 50 μM 的血清浓度的量。

[0106] 可以每天 1 次或多次至每周 1 次或多次施用组合物,包括每隔一天 1 次。熟练的技术人员能明白,某些因素可能影响有效地治疗受试者所需的剂量和时间选择,包括但不限于疾病或障碍的严重性,以前的治疗,受试者的总体健康和 / 或年龄,和存在的其它疾病。而且,用有效量的组合物治疗受试者,可以包括单一治疗,或优选地,包括系列治疗。

[0107] 检测方法

[0108] 本发明提供了检测本发明的多肽的方法。该方法一般包括,提供细胞,分析细胞中的本发明的多肽,和确定细胞是否表达该多肽。细胞可以是离体的或体内的。如本文使用的,术语“离体”指已经从受试者的身体取出(例如,分离)的细胞。离体细胞包括,例如,原代细胞(例如,最近已经从受试者取出,且能在组织培养基中进行有限的生长或维持的细胞)和培养的细胞(例如,能在组织培养基中进行长期生长或维持的细胞)。如本文使用的,术语“体内”指在受试者体内的细胞。体内细胞可以是存在于器官或肿瘤中的细胞。细胞优选地是哺乳动物细胞,例如,小鼠、大鼠或灵长类动物(例如,猴子,人),优选地,人。优选的细胞的实例包括乳房细胞,例如乳腺肿瘤细胞,和前列腺细胞,例如前列腺肿瘤细胞。通过例如,人乳房或前列腺组织的活组织检查,可以从受试者得到细胞。可以使用从几乎所有类型的组织得到的样品。根据本领域已知的方法,可以体外培养对照细胞。不能表达 ER- α 36kDa 雌激素受体并因而可以用作阴性对照的细胞包括 HEK293 细胞。阳性对照细胞

包括,在有血清和 BRCA1 阴性细胞存在下,可以以低细胞密度生长的细胞。优选地,细胞在有血清存在下以低密度生长。通过例如活组织检查,也可以从组织样品得到对照细胞。

[0109] 一方面,该方法包括,通过使细胞接触本发明的抗体来分析细胞。使用常规的且本领域已知的检测方法,可以测定细胞是否能表达本发明的多肽。免疫测定的实例包括,竞争性的和非竞争性的测定、例如,放射免疫测定、免疫酶测定、免疫荧光测定或酶免疫测定。也可以使用利用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或其它化学发光检测剂的化学发光方法。在本发明的方法中,也可以使用蛋白印迹和色谱测定。用于检测本发明的多肽的本发明的抗体可以偶联检测标记,并从而直接检测,或可以使用第二抗体。当使用允许检测不同细胞区域中的多肽的检测方法时,当多肽主要与质膜和细胞质有关、且少于 20% 信号与核有关时,一般认为能表达 ER- α 36 的细胞是 ER- α 36 阳性的。

[0110] 在另一个方面,该方法包括,通过扩增多核苷酸,优选地, RNA 多核苷酸(例如, mRNA),以形成扩增的多核苷酸,来分析细胞。优选地,通过聚合酶链反应(PCR)扩增多核苷酸,优选地,通过逆转录酶(RT)PCR。从 RNA 多核苷酸合成 DNA 多核苷酸的方法,是本领域已知的和常规的。使从细胞得到的多核苷酸接触引物对,后者能扩增多核苷酸,包括 SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:25,或其组合。由这样的引物对产生的扩增的多核苷酸的存在,指示着细胞能表达雌激素受体。如本文使用的,术语“引物对”指设计用于侧接要扩增的多核苷酸区域的 2 个寡核苷酸。一个引物与存在于在要扩增的多核苷酸的一端的有义链上的核苷酸互补,而另一个引物与存在于在要扩增的多核苷酸的另一端的反义链上的核苷酸互补。要扩增的多核苷酸可以称作模板多核苷酸。引物与其互补的多核苷酸的核苷酸可以称作靶序列。引物可以具有至少约 15 个核苷酸,优选地,至少约 20 个核苷酸,最优选地,至少约 25 个核苷酸。通过 PCR 扩增多核苷酸的条件,依赖于使用的引物的核苷酸序列而变化,且用于确定这样的条件的方法,是本领域常规的。

[0111] 扩增后,可以确定扩增的多核苷酸的存在,例如通过凝胶电泳。通过染色(例如,用溴化乙锭)或用本领域的技术人员已知的合适的标记(包括放射性的和非放射性的标记)进行标记,可以显现扩增的多核苷酸。一般的放射性标记包括 ^{32}P 。非放射性的标记包括,例如,配体例如生物素或洋地黄毒苷,以及酶例如磷酸酶或过氧化物酶,或各种化学发光剂(chemiluminescer)例如萤光素,或荧光化合物如荧光素和它的衍生物。

[0112] 任选地,也可以测定 ER- α 66 多肽、ER- α 46 多肽、ER- β 或其组合在细胞中的存在。检测 ER- α 66、ER- α 46、ER- β 或其组合的存在的方法包括,使用基于抗体或多核苷酸的检测方法,例如多核苷酸的扩增,来应用免疫检测。当使用允许检测不同细胞区域中的多肽的检测方法时,当多肽主要与细胞核有关,例如超过 90% 的信号与核有关时,一般认为能表达 ER- α 66 或 ER- α 46 的细胞是 ER- α 66 或 ER- α 46 阳性的。

[0113] 所有乳腺癌中的大约 70-80% 能表达 ER- α 66,且称作 ER- 阳性的乳腺癌。这些肿瘤通常更缓慢地生长,更好地分化,且与更好的总体预后有关(Clark, In: Harris JR, editor. Diseases of the breast, volume 2. Lippincott Williams & Wilkins, 38: 103-116 (2000))。检测本发明的多肽的存在的方法,可以作为诊断标记,用于区分雌激素-阳性的和雌激素-阴性的癌症,优选地,乳腺癌。在本文的实施例中公开的结果强烈表明,由 ER- α 36 介导的雌激素信号传导有助于乳房肿瘤发生,并暗示 ER- α 36 可能参与 ER- α 66 阴性的乳腺癌的肿瘤发生。在本文的实施例中公开的结果也表明,能高度表达本发

明的多肽的细胞,比能表达高水平的 ER- α 66、但是更低水平的 ER- α 36 的细胞,更能耐受低剂量的抗-雌激素药,例如,他莫昔芬。因而,检测本发明的多肽的存在的方法,允许鉴别新的患者类型,即 ER- α 66-阴性的和 ER- α 36-阳性的。检测本发明的多肽的存在的方法,也可以用于测定细胞对抗-雌激素药的敏感性,并提供关于例如测定个体的适当的治疗进程的信息。例如,医生可以决定,具有 ER- α 36-阳性的乳腺肿瘤细胞的受试者,可能需要更高剂量的他莫昔芬,以克服对更低水平的抗性。

[0114] 检测 ER- α 66、ER- α 46、ER- α 36、ER- β 或其组合的存在,也允许对比雌激素受体的比率。测定 2 种或更多种雌激素受体的比率,允许预测细胞对抗-雌激素药(例如,他莫昔芬)的敏感性。例如,在本发明的该方面,测定细胞中 ER- α 36 与 ER- α 46 的比率、ER- α 36 与 ER- α 66 的比率、ER- α 36 与 ER- β 的比率或其组合,并与对照细胞中的对应比率进行对比。这样的比率在本文中称作 ER- α 36 比率。在一个实施例中,对照细胞可以用抗-雌激素药难以治疗的细胞。在另一个实施例中,对照细胞是用抗-雌激素药不难治疗的细胞。如果在实验细胞中测定的上述 ER- α 36 比率与在对照细胞中所述的 ER- α 36 比率相同,则根据对照细胞的状态,分类实验细胞。例如,如果实验细胞中 ER- α 36 与 ER- α 66 的比率与已知能耐他莫昔芬治疗的对照细胞中 ER- α 36 与 ER- α 66 的比率相同,则将实验细胞归入耐他莫昔芬治疗的。但是,如果实验细胞中 ER- α 36 与 ER- α 66 的比率与不能耐他莫昔芬治疗的对照细胞中 ER- α 36 与 ER- α 66 的比率相同,则将实验细胞归入不耐他莫昔芬治疗的。在另一个实例中,将在实验细胞中测定的 ER- α 36 比率与已知能耐他莫昔芬治疗的对照细胞中的对应比率进行对比,并与已知不能耐他莫昔芬治疗的对照细胞中的比率进行对比。然后如上所述,将实验细胞归入耐他莫昔芬治疗的,或不耐他莫昔芬治疗的。已知不耐他莫昔芬治疗的对照细胞的一个实例是 MCF7 (ATTC 保藏登记号 HTB-22)。已知耐低剂量他莫昔芬治疗的对照细胞的一个实例是 MDA-MB-231。通过对比实验细胞中的 ER- α 36 比率,也可以将已知耐他莫昔芬治疗的乳腺癌细胞用作对照细胞。

[0115] 鉴别能结合本发明的多肽的试剂

[0116] 本发明也提供了鉴别能结合本发明的多肽的试剂的方法。这样的方法也称作筛选测定。该方法包括,组合本发明的多肽和试剂,和测定该试剂是否结合多肽。一般,测定试剂是否结合多肽,包括检测试剂和多肽之间的复合物形成。测定复合物的方法包括,例如,直接检测试剂与多肽的结合,和使用竞争结合测定,检测试剂与多肽的结合。测定可以是无细胞的测定。可以在有或没有雌激素或抗-雌激素药存在下,进行测定。任选地,该方法也包括,测定试剂是否结合 ER- α 66 多肽,例如具有 SEQ ID NO :18 所述的氨基酸序列的多肽。优选地,试剂不能结合 ER- α 66 多肽。

[0117] 使用本领域已知的组合文库方法中的许多方法的任一种,包括生物学文库,空间上可寻址的平行固相或液相文库,需要解卷积的合成文库方法,“一个珠子一种化合物(one-bead one-compound)”文库方法,和使用亲和色谱选择的合成文库方法,可以得到试剂。生物文库方法包括肽文库,而其它 4 种方法适用于肽、非肽寡聚物或小分子化合物文库(Lam, Anticancer Drug Des. 12 :145(1997))。在本领域可以找到关于合成分子文库的方法的实例(见,例如 DeWitt 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6909(1993); Erb 等. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :11422(1994); Zuckermann 等 J. Med. Chem. 37 :2678(1994); Cho 等 Science 261 :1303(1993); Carrell 等 Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33 :2059(1994);

Carell 等 *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33 :2061(1994) ; 和 Gallop 等 *J. Med. Chem.* 37 :1233(1994))。要筛选的潜在试剂的来源包括,例如,细菌和真菌的发酵培养基,和植物和其它增殖体的细胞提取物。

[0118] 化合物文库可以存在于例如溶液中(例如 Houghten *Bio/Techniques* 13 :412-421(1992)),或珠子上(Lam *Nature* 354 :82-84(1991)),芯片上(Fodor *Nature* 364 :555-556(1993)),细菌(美国专利号 5,223,409),孢子(美国专利号 5,571,698 ;5,403,484 ;和 5,223,409),质粒(Cull 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 :1865-1869(1992)),或噬菌体(Scott 等 *Science* 249 :386-390(1990) ;Devlin *Science* 249 :404-406(1990) ;Cwirla 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 :6378-6382(1990) ;和 Felici *J. Mol. Biol.* 222 :301-310(1991))。

[0119] 通过例如用放射性同位素或酶标记偶联试剂,从而可以通过检测复合物中的标记的化合物,测定试剂与本发明的多肽的结合,来确定试剂结合本发明的多肽的能力。例如,可以用 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H 直接地或间接地标记试剂,并通过直接计数 radioemission 或通过闪烁计数,检测放射性同位素。或者,可以用例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或萤光素酶,酶促地标记试剂,并通过测定适当的底物向产物的转化,检测酶标记。

[0120] 以类似的方式,人们可以测定试剂改变(例如,刺激或抑制)本发明的多肽与多肽的已知配体(例如,本发明的多肽能天然地结合或与其相互作用的分子)的结合的能力。这样的配体的实例是雌激素,以及抗-雌激素药,例如他莫昔芬。在一个优选的方面,通过监控本发明的多肽的活性,可以测定试剂改变本发明的多肽与配体的结合的能力。

[0121] 在另一个方面,本发明的测定包括,使本发明的多肽接触试剂,和测定试剂结合多肽的能力。如上所述,可以直接或间接地测定试剂与多肽的结合。在一个优选的方面,测定包括使本发明的多肽接触配体,已知后者能结合本发明的多肽,以形成测定混合物,并使测定混合物接触试剂,和测定试剂优先结合多肽(与配体相比)的能力。

[0122] 在另一个方面,测定包括,使本发明的多肽接触试剂,和测定试剂改变(例如,刺激或抑制)本发明的多肽的活性的能力。

[0123] 在另一个方面,测定包括,筛选能改变(例如,刺激或抑制)本发明的多肽调节雌激素反应元件的转录反式激活的能力的试剂,所述反式激活包括,例如,由 ER- α 66 的 AF-1 和 / 或 AF-2 结构域介导的活性。优选地,使用融合多肽,其包含本发明的多肽和具有转录活化结构域或转录阻遏结构域的多肽。具有转录活化结构域的多肽的一个实例是 VP-16,且具有转录活化结构域或转录阻遏结构域的其它有用多肽是本领域已知的。一般,这样的融合多肽与多核苷酸组合使用,后者具有位于启动子上游的雌激素反应元件,和可操作地连接的编码序列。可以使用许多启动子,包括,例如,胸苷激酶启动子。优选地,可操作地连接的编码区能编码检测标记,例如萤光素酶,或荧光多肽例如绿色荧光蛋白。一方面,在不存在试剂的情况下,在能促进多核苷酸上存在的编码区的表达的条件下,组合具有转录活化结构域的融合多肽、多核苷酸和试剂,并测定试剂改变转录的作用。任选地,ER- α 66 多肽和 / 或 ER β 多肽也可以存在,且使用该测定来鉴别试剂,后者能改变(例如,刺激或抑制)本发明的多肽调节依赖于配体的和不依赖于配体的 ER- α 66 多肽或 ER β 的转录活性的能力。优选地,细胞中存在融合多核苷酸,和包含位于启动子上游的雌激素反应元件和可操作地连接的编码序列的多核苷酸。无意进行限制,预期能改变本发明的多肽调节转录反式激

活的能力的试剂,可以包括能改变本发明的多肽的构象的试剂。

[0124] 在测定中,可能需要固定化本发明的多肽,它的配体,或试剂,以促进分离复合的和非复合形式的一种或2种分子,以及实现测定的自动化。在一个实施方案中,可以提供融合蛋白,其能添加结构域,后者允许本发明的多肽结合到基质上。例如,具有谷胱甘肽-S-转移酶的融合多肽可以被吸附到谷胱甘肽琼脂糖珠子(Sigma Chemical, St. Louis, Mo.)或谷胱甘肽-衍生的微量滴定板上,其再与试剂结合,并在有助于复合物形成的条件下(例如对于盐和pH在生理条件下),温育混合物。温育后,可以洗涤珠子或微量滴定板孔,以去除任何未结合的组分,并直接或间接地测量复合物形成,例如,如上所述。或者,可以从基质解离复合物,并测定结合水平。

[0125] 在本发明的筛选测定中,也可以使用用于将多肽固定化到基质上的其它技术。例如,使用生物素和链霉抗生物素蛋白的缀合物,可以固定化本发明的多肽。使用本领域众所周知的技术(例如,生物素化试剂盒, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.),使用生物素-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺),可以生物素化本发明的多肽,和例如,将所述多肽固定化在链霉抗生物素蛋白-涂覆的96-孔平板(Pierce Chemicals)的孔中。或者,可以将能与本发明的多肽反应的抗体衍生到平板的孔中,并通过抗体缀合,将未结合的本发明的多肽捕获进孔中。除了上述的GST-固定化的复合物的那些方法外,检测这样的复合物的方法包括,使用能与特异性地结合本发明的多肽的抗体反应的抗体,免疫检测复合物。

[0126] 本发明也包括通过上述筛选测定鉴别出的新试剂,及其在本文所述的治疗中的用途。

[0127] 治疗方法

[0128] 本发明还涉及治疗受试者中的某些疾病的方法。该受试者是哺乳动物,优选人。如本文使用的,术语“疾病”指显示特征性症状或一组症状的受试者的部分、器官或系统或其组合的正常结构或功能的任何背离或中断。疾病包括依赖于通过类固醇化合物激素受体(例如雌激素受体)的信号传导的癌症。这样的疾病的实例称作雌激素-有关的癌症,且包括乳腺癌和前列腺癌。一般,通过评价与疾病有关的症状,确定受试者是否患有疾病,和受试者是否能对治疗作出响应。如本文使用的,术语“症状”指存在于受试者中的疾病的客观证据。在本文中提及的与疾病有关的症状和这样的症状的评价,是本领域常规的和已知的。依赖于通过类固醇化合物激素受体的信号传导的癌症的症状的实例包括,例如,肿瘤的存在和大小,和生物标记的存在和量。生物标记是存在于受试者中的化合物,一般是多肽,且指示着癌症的进展。生物标记的实例包括,例如,Her-2表达,和细胞周期蛋白D1表达。

[0129] 疾病的治疗可以是预防性的,或者,可以在疾病发展后开始。预防性的治疗,例如在受试者表现出疾病症状之前开始,在本文中称作处于疾病发展的“危险”中的受试者的治疗。处于疾病发展的危险中的受试者的实例,是具有与疾病有关的危险因素(例如遗传标记)的人。能指示受试者具有发展某些癌症(例如乳腺癌或前列腺癌)的素因的遗传标记的实例包括, BRAC1 和/或 BRAC2 基因的改变。在发生本文所述的疾病之前、过程中或之后,可以进行治疗。在发展疾病之后开始的治疗,可能减轻状况之一的症状的严重性,或完全消除症状。

[0130] 在有些方面,该方法一般包括,使细胞接触组合物,后者包含有效量的能抑制本发明的多肽的活性的试剂,例如,使用本文所述的方法鉴别出的试剂。优选地,这样的试剂能

结合本发明的多肽。在有些方面,试剂优选地不是抗-雌激素药。如本文使用的,“有效量”是能有效地在细胞中抑制本发明的多肽的活性、减少与疾病有关的症状、或其组合的量。一方面,组合物可以包括有效量的本发明的抗体。优选地,使抗体共价附着于化疗剂,例如,他莫昔芬。组合物可以任选地包含其它化疗剂。使用离体模型和动物模型,可以评价能否预期试剂或抗体(优选地,抗体)在本发明的该方面起作用。这样的模型是本领域已知的,且通常被公认为疾病或治疗人的方法的代表。这样的动物模型的优选实例是裸鼠。例如,可以将乳腺癌细胞接种进切除卵巢的雌性裸鼠的乳房脂肪中,随后形成损害,并通过例如触诊、游标卡尺测量和肿瘤重量进行评价。转基因动物模型也可以得到。例如,用于研究前列腺癌模型例如 TRAMP 模型(见,例如,Greenberg 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 2429-3443(1995))和用于研究乳腺癌模型例如 MMTV-Wnt-1 模型(见,例如,Tsukamoto 等,Cell, 55: 619-625(1988)),被普遍公认为人疾病的模型。

[0131] 在另一个方面,使细胞接触包含多核苷酸的组合物,其中多核苷酸会造成能编码本发明的多肽的编码区的转录后沉默。这样的多核苷酸在本文中称作沉默多核苷酸。可以将该沉默多核苷酸作为 RNA 多核苷酸,或作为包含能编码和表达 RNA 多核苷酸的 DNA 多核苷酸的载体,导入细胞中。可以施用超过一种类型的多核苷酸,例如,可以在本文的方法中,组合和使用设计用于沉默相同的 mRNA 的 2 种或更多种多核苷酸。或者,可以一起使用 2 种或更多种多核苷酸,其中每种多核苷酸各自设计用于沉默不同的 mRNA。

[0132] 如本文使用的,术语“多核苷酸”指任意长度的核苷酸(核糖核苷酸、脱氧核苷酸或其组合)的聚合形式,且包括单链分子和双链的双链体。多核苷酸可以从天然来源直接得到,或可以在重组、酶或化学技术的辅助下制备。优选地,分离本发明的多核苷酸。如本文使用的,“靶编码区”和“靶编码序列”指被沉默多核苷酸抑制其表达的编码区。如本文使用的,“靶 mRNA”是由靶编码区编码的 mRNA。靶编码区的实例是,能编码 ER- α 36 的核苷酸序列(SEQ ID NO:21)、5' 侧翼核苷酸序列(SEQ ID NO:20)或 3' 侧翼核苷酸序列,包括由外显子 9 编码的核苷酸序列(SEQ ID NO:25)。

[0133] 沉默多核苷酸包括双链 RNA(dsRNA)多核苷酸。沉默多核苷酸的序列包括在本文中称作有义链的一条链,其具有 16 至 30 个核苷酸,例如,16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个核苷酸。有义链与靶 mRNA 基本上相同,优选地相同。如本文使用的,术语“相同”指有义链的核苷酸序列具有与靶 mRNA 的部分相同的核苷酸序列。如本文使用的,术语“基本上相同”指有义链的序列与靶 mRNA 的序列存在 1、2 或 3 个核苷酸、优选地 1 个核苷酸的差异,且剩余的核苷酸与 mRNA 的序列相同。有义链的这 1、2 或 3 个核苷酸称作非互补的核苷酸。当沉默多核苷酸包含基本上与靶 mRNA 相同的有义链时,1、2 或 3 个非互补的核苷酸优选地位于有义链的中央。例如,如果有义链是 21 个核苷酸长,则非互补的核苷酸一般在核苷酸 9、10、11 或 12 处,优选核苷酸 10 或 11 处。dsRNA 多核苷酸的另一条链,在本文中称作反义链,与有义链互补。术语“互补”指 2 个单链多核苷酸彼此碱基配对的能力,其中一个多核苷酸上的腺嘌呤与第二个多核苷酸上的胸腺嘧啶或尿嘧啶碱基配对,而一个多核苷酸上的胞嘧啶与第二个多核苷酸上的鸟嘌呤碱基配对。沉默多核苷酸也包括与 dsRNA 多核苷酸相对应的双链 DNA 多核苷酸。还包括与本文公开的有义链和反义链相对应的单链 RNA 多核苷酸和单链 DNA 多核苷酸。应当理解,通过用尿嘧啶核苷酸替代每个胸苷核苷酸,可以将本文作为 DNA 序列公开的序列从 DNA 序列转化成 RNA 序列。无意进

行限制,本发明的多核苷酸会造成靶编码区的转录后沉默。在沉默中使用的多核苷酸的修饰,是本领域已知的,且可以如此修饰沉默多核苷酸。

[0134] 也可以共价附着本发明的 dsRNA 沉默多核苷酸的有义和反义链,一般通过由核苷酸制成的间隔区实现。这样的多核苷酸在本领域中经常称作短发夹 RNA (shRNA)。在有义和反义链的碱基配对后,间隔区区域形成环。组成环的核苷酸的数目可以变化,且已经报道了 3 至 23 个核苷酸的环 (Sui 等, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 99, 5515-5520 (2002), 和 Jacques 等, *Nature*, 418, 435-438 (2002))。

[0135] 沉默多核苷酸能造成靶编码区表达的转录后抑制,也称作沉默。不希望受理论的限制,导入细胞后,沉默多核苷酸会与靶 mRNA 杂交,并触发细胞的内切核酸酶以切割靶 mRNA。结果是,抑制由 mRNA 编码的多肽的表达。通过例如测量细胞中靶 mRNA 的量的减少,测量由 mRNA 编码的多肽的量的减少,或通过测量由 mRNA 编码的多肽的活性的降低,可以确定是否抑制了靶编码区的表达。沉默多核苷酸可以存在于载体中。沉默多核苷酸也可以作为 2 个分开的互补的多核苷酸存在于载体中,其中的每一个都可以被表达,以产生 dsRNA 的有义和反义链,或作为含有有义链、环区和反义链的单个多核苷酸存在于载体中,其可以被表达,以产生具有 dsRNA 的有义和反义链的 RNA 多核苷酸。

[0136] 使用本领域常规且已知的方法,可以设计沉默多核苷酸。例如,通过扫描编码区 AA 二核苷酸序列,可以鉴别沉默多核苷酸;每个 AA 和 mRNA 的下游 (3') 连续的 16 至 30 个核苷酸可以用作候选多核苷酸的有义链。候选多核苷酸是用于测试以确定其能否降低本发明的多肽之一的表达的多核苷酸。候选多核苷酸可以与位于能编码多肽的区域、或位于 mRNA 的 5' 或 3' 非翻译区中的核苷酸相同。任选地且优选地,修饰候选多核苷酸,以包含 1、2 或 3,优选地 1 个不互补的核苷酸。其它方法是本领域已知的,且常规地用于设计和选择候选多核苷酸。沉默多核苷酸可以,但不必,在有义链的 5' 端以二核苷酸 AA 开始。候选多核苷酸也可以包含 1、2 或 3 个核苷酸的突出端,一般在有义链、反义链或二者的 3' 端。一般,使用可公开得到的算法 (例如, BLAST),筛选候选多核苷酸,以对比候选多核苷酸序列和编码序列。基于其它考虑,一般消除可能与非-靶编码区表达的 mRNA 形成双链体的那些。然后,可以测试剩余的候选多核苷酸,以确定它们是否能抑制本文所述的多肽之一的表达。

[0137] 通常,通过将候选多核苷酸导入能表达本发明的多肽的细胞,单个地测试候选多核苷酸。可以体外地制备候选多核苷酸,然后导入细胞。体外合成的方法包括,例如,用常规的 DNA/RNA 合成仪进行化学合成。合成多核苷酸和用于这样的合成的试剂的商业供应商是众所周知的。体外合成的方法也包括,例如,使用在无细胞系统中的环状或线状载体的体外转录。

[0138] 通过将能编码候选多核苷酸的构建体导入细胞,也可以制备候选多核苷酸。这样的构建体是本领域已知的,且包括例如,能编码和表达候选多核苷酸的有义链和反义链的载体,和包含能编码候选多核苷酸的有义链和反义链的序列的 RNA 表达盒,所述序列侧接可操作地连接的调节序列,例如 RNA 聚合酶 III 启动子和 RNA 聚合酶 III 终止子,其会导致 RNA 多核苷酸的生产。细胞可以是离体的或体内的。也可以在动物模型中测试候选多核苷酸。

[0139] 当评价候选多核苷酸是否能起抑制本文所述的多肽之一的表达的作用时,可以测量含有候选多核苷酸的细胞中的靶 mRNA 的量,并与不含有候选多核苷酸的相同类型的细

胞相对比。测量细胞中的 mRNA 水平的方法,是本领域已知的和常规的。这样的方法包括定量 RT-PCR。用于扩增 mRNA 的引物和特定条件,依赖于 mRNA 而变化,且可以由熟练的技术人员容易地确定。其它方法包括,例如, RNA 印迹和阵列分析。

[0140] 用于评价候选多核苷酸是否能起抑制本文所述的多肽之一的表达的作用的其它方法包括监控多肽。例如,可以使用测定来测量由 mRNA 编码的多肽的量,或测量由 mRNA 编码的多肽的活性的降低。用于测量多肽量的减少的方法包括,测定存在于含有候选多核苷酸的细胞中的多肽,并与不含有候选多核苷酸的相同类型的细胞相对比。例如,本发明的抗体可以用于例如蛋白免疫印迹、免疫沉淀或免疫组织化学。针对本文所述的多肽中的每一种的抗体都是可商业上得到的。也可以使用能测量本发明的多肽之一的活性降低的方法。

[0141] 试剂盒

[0142] 本发明提供了试剂盒,其含有可以用于本发明的方法中的试剂,所述方法包括,例如,测定细胞是否能表达本发明的多肽。这样的试剂盒可以含有包装材料和本发明的抗体。医学人员也可以将这样的试剂盒用于配制含有本发明的抗体的组合物,例如药物组合物。

[0143] 包装材料能为抗体提供保护环境。例如,包装材料可以使抗体免受污染。另外,包装材料可以将抗体保持在溶液中,以避免变干。可以用作包装材料的合适的材料的实例包括,玻璃、塑料、金属等。可以使这样的材料硅烷化,以避免抗体向包装材料的粘附。

[0144] 在一个实例中,本发明提供了一种试剂盒,其包含包装材料,能特异性结合本发明的多肽的第一抗体,和能特异性结合 ER- α 66 多肽的第二抗体。试剂盒可以任选地包含其它组分,例如缓冲液、反应容器、第二抗体和注射器。

实施例

[0145] 实施例 1

[0146] 小窝蛋白 -1 单倍体不足产生正常乳房上皮细胞的 ER- α 表达的激活和雌激素刺激的转化

[0147] 使用从 Harvard Medical School 的 Dr. Philip Leder 的实验室得到的聚腺苷酸 (poly-A) 捕获逆转录病毒载体 (RET) (Ishida 等, Nucl. Acid Res., 27:580 (1999)), 制备了来自正常人乳房上皮 MCF10A 细胞的细胞克隆的基因 - 捕获文库。简而言之,该载体使用改进的聚腺苷酸捕获策略,以有效地鉴别功能基因,而无论它们在靶细胞中的表达状态。强剪接受体和有效的多腺苷酸化信号的组合,确保了“捕获的”基因的功能的完全破坏。在 RET 载体中包含无启动子的 GFP cDNA, 允许在活细胞中容易地监控捕获的基因的表达模式。使用含有 RET 载体的逆转录病毒,感染 MCF10A 细胞。然后,筛选细胞的 G418- 抗性,以确立基因 - 捕获的 MCF10A 细胞文库。通过 G418 选择 3 周后,监控在“捕获的”基因的内源性启动子控制下的 GFP 表达,然后选择 G418 抗性和 GFP 表达克隆。该文库代表着 3×10^5 独立的感染的克隆,其中 RET 载体破坏了功能基因的一个等位基因。

[0148] 认为具有肿瘤抑制活性的基因的表达的丧失,会将转化的表型赋予正常的 MCF10A 细胞。进行软琼脂克隆测定,并鉴别来自获得的无贴壁依赖性生长 (转化的表型的一个特征) 的基因 - 捕获的细胞文库的细胞。超过 100 个来自 G418- 抗性的细胞文库的阳性菌落 (≥ 30 细胞) 能在软琼脂中生长,而亲本 MCF10A 细胞不能。分离 20 个细胞克隆,扩增,然后再在软琼脂中选择 3 周,该软琼脂含有正常血清 + 10^{-8} M 17 β 雌二醇 (E2) 和糊精包被的活

性炭吸附的血清,其缺少类固醇激素。分离和扩增能在含有额外的 E2 的软琼脂中表现处加速生长的 4 个细胞克隆 (ST1、ST3、ST4 和 ST6) (图 3)。

[0149] 使用 3' -RACE,其允许捕获未知的位于候选基因的外显子和聚腺苷酸尾巴之间的 3' mRNA 序列,来克隆潜在的基因,该基因的破坏会导致 MCF10A 细胞转化。认为 MCF10A 细胞的转化,是由于正雌激素信号传导。克隆由 RACE 方法产生的纯化的 PCR 片段,并测序。使用 BLASTN 搜索,来自 2 个克隆 (ST1 和 ST3) 的 DNA 序列相同地匹配位于染色体 7 上的小窝蛋白-1 (Cav-1) 外显子-3 的序列 (GenBank 登记号 XM048940)。该结果表明,在至少 2 个克隆中破坏了 Cav-1 基因的等位基因。除了 Cav-1 以外,使用相同的技术,鉴别了 2 个其它的基因。在克隆 ST4 中破坏的基因是 SPRR1B (GenBank 登记号 NT-004441.5),即参与角质化细胞膜的结构组织的角质蛋白 / 小脯氨酸-富集的蛋白家族的成员。来自克隆 ST6 的另一个基因是推定的新基因 (GenBank 登记号 6599139),尚不知其功能。

[0150] 在亲本 MCF10A 细胞中分析 Cav-1 蛋白水平,以测试 Cav-1 的表达水平是否在 cav-1 基因捕获的细胞中降低。分析了上述的 4 个细胞克隆 (ST1、3、4 和 6) 和 MCF10A-Ha-ras (被 Ha-ras 突变体转化的 MCF10A 细胞)。与亲本 MCF10A 细胞中的水平相比,Cav-1 蛋白水平为所有转化的细胞的约 1/2,如蛋白印迹分析所证实的 (图 4)。该数据与当仅仅 cav-1 基因的一个功能等位基因在 ST1 和 ST3 细胞中有功能时降低的 Cav-1 表达相一致。这表明,通过“基因捕获”产生的 Cav-1 单倍体不足,会导致 E2 刺激的转化。该数据也表明,Cav-1 的下调,也参与由 ST4 和 ST6 细胞中的其它基因的破坏引起的转化。

[0151] 为了确定 Cav-1 单倍体不足产生雌激素-刺激的细胞生长和转化的机理,检查上述转化的细胞中 ER- α 和 ER- β 的表达水平。发现所有 4 种转化的细胞克隆都能以可与 Ha-ras 转化的细胞相当的水平,表达 ER- α ,而亲本 MCF10A 细胞和 HBL-100 细胞 (另一种正常的乳房上皮细胞系),表达不可检测水平的 ER- α (图 5)。在所有测试的细胞中,ER- β 表达没有任何变化 (图 5)。该数据表明,ER- α 表达被激活,且这些转化的细胞中的雌激素信号传导负责软琼脂上的雌激素-刺激的细胞生长。此前已经表明,Ha-ras 转化的细胞中的 ER- α 表达和雌激素信号传导都被激活 (Shekhar 等, Int. J. Oncol., 13 :907 (1998) 和 Shekhar 等, Am. J. of Pathol., 152 :1129 (1998))。该结果表明,Ras/MAPK 途径参与调节 ER- α 表达和正雌激素信号传导。

[0152] 使用磷酸-特异性的抗体,通过检查 ERK1/2 的磷酸化水平,分析这些转化的细胞中的 MAPK 途径的激活。发现 ERK1/2 在所有转化的细胞中都是高度地且组成型地磷酸化的,但是在 MCF10A 细胞中不是 (图 6)。

[0153] 总之,这些数据表明,在人乳腺癌发展过程中,Cav-1/Ras/MAPK 途径参与 ER- α 表达的激活,并与雌激素信号传导途径协作,以刺激转化的细胞增殖。

[0154] 实施例 2

[0155] 雌激素受体 α 的一个同种型 (ER- α 36) 的鉴别、克隆、表达和表征

[0156] 在上述工作的过程中,使用来自 Research Diagnostic, INC. 的大鼠抗-ER- α 抗体 (克隆 H222),在蛋白印迹分析中连续观察到 3 个蛋白条带 (66-kDa、46-kDa 和 36-kDa)。H222 抗体能识别 ER- α 的配体-结合结构域。为了排除 46-kDa 和 36-kDa 蛋白条带是 ER- α 66 的降解产物的可能性,如以前报道所暗示的 (Abbondanza 等, Steroids, 58 : 4 (1993)),使用含有 8M 脲的缓冲液,在培养平板中裂解细胞,并通过蛋白印迹分析进行测

试。在 Cav-1 单倍体不足的细胞 ST1 和 ST3, 和 MCF7 乳腺癌细胞中, 能容易地观察到 3 个不同的条带 (图 7)。这些结果指示着共有能被抗体 H222 识别的类似表位的 ER- α 同种型的存在。

[0157] 通过文献检索, 发现已经克隆了 ER- α 的 46-kDa 同种型, 其能起由 ER- α 66 的 AF-1 结构域介导的反式激活的显性负抑制剂的功能 (Flouriot 等, EMBO J., 19 : 4688 (2000))。后续检索鉴别出了来自正常人子宫内膜 cDNA 文库 (RZPD 克隆编号 : DKFZp686N23123) 的克隆, 其含有 5.4kb cDNA。该 cDNA 克隆携带 310 个氨基酸可读框, 其理论上可以生产预测分子量为 35.7kDa 的蛋白。可读框的 cDNA 序列与 ER- α 66 基因的外显子 26 的 DNA 序列 100% 匹配。cDNA 的 5' 非翻译区 (5' UTR) 表现出与 ER- α 66 基因的 第一个内含子 DNA 序列 734-907 的 100% 同源性 (ER- α 66 基因的 34, 233bp 第一个内含子的第一个碱基对称作 1)。因而, 确认 ER- α 36 的转录物是从 ER- α 66 基因的 第一个内含子中的以前没有鉴别的启动子开始的。

[0158] 来自 ER- α 66 基因的 第一个内含子 734-907 的小的、非编码的新外显子称作“外显子 1'”。然后, 将外显子 1' 直接剪接进 ER- α 66 基因的外显子 2, 并从 ER- α 66 基因的外显子 2 延续到外显子 6。然后, 将外显子 6 剪接到位于 ER- α 66 基因下游 64, 141bp 的外显子 (GeneBank 登记号 AY425004, 见表 1)。能编码最后 27 个氨基酸和 4, 293bp 3' 非翻译区的 cDNA 序列与来自染色体 6q24.2-25.3 (GeneBank 登记号 AL078582) 上的克隆 RP1-1304 的基因组序列的连续序列 100% 匹配, 从而表明该新 ER- α 同种型的剩余 cDNA 序列是从位于以前报道的 ER- α 66 基因下游的一个 4, 374bp 外显子转录的。因而, 该外显子称作外显子 9, 以反映超过以前报道的 8 个外显子的额外的外显子 (图 8)。通过鉴别剪接接合点处的完美的剪接供体和受体, 支持了所有这些剪接事件。蛋白 ER- α 36 可以由位于第二个外显子中的完美的 Kozak 序列生产, 即有于生产 ER- α 46 的相同的起始密码子 (Flouriot 等, EMBO J., 19 : 4688 (2000))。ER- α 36 与 ER- α 66 的区别在于, 缺少转录活化结构域 AF-1 和 AF-2, 但是保留了二聚化、DNA- 结合和局部的配体-结合结构域。它也具有额外的、独特的 27 氨基酸结构域, 以替代由 ER- α 66 的外显子 7 和 8 编码的最后 138 个氨基酸 (图 1)。在这里, ER- α 的该新的同种型称作 ER- α 36。

[0159] 根据生产商所述的方法, 使用从人胎盘 RNA 制备的 Marathon Ready cDNA (Clontech) 的 PCR, 得到能编码 ER- α 36 的可读框。根据 DKFZp686N23123 的 cDNA 序列, 设计 PCR 引物对。5' 引物是在末端具有 EcoRI 位点的 5' -CGGAATTCCGAAGGGAAGTATGGCTATGGAATCC-3' (SEQ ID NO : 23), 且 3' 引物是在末端具有 BamHI 位点的 5' -CGGGATCCAGAGGCTTTAGACACGAGGAAAC-3' (SEQ ID NO : 24)。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶上的电泳, 并观察到预期的 1.1kb DNA 片段 (图 9)。纯化 DNA 片段, 用 EcoRI 和 BamHI 消化, 克隆进 pBluescript 载体 (pBS-ER- α 36), 并完全测序。序列表现出与 cDNA 克隆 DKFZp686N23123 的 100% 同一性, 表明 ER- α 36 是可以从另一种来源克隆的 ER- α 的天然产生的同种型。图 10 显示了由可读框编码的预测的氨基酸序列。

[0160] 使用含有 ER- α 66、ER- α 46 和 ER- α 36 的表达载体, 在人胚肾 293 细胞中进行瞬时转染测定, 以测试克隆的 cDNA 是否能生产 ER- α 36 蛋白。将来自这些转染的细胞和 MCF7 细胞的全细胞提取物进行蛋白印迹分析, 其中单克隆抗体 H222 针对 ER- α 的配体-结合结构域 (Abbondanza 等, Steroids, 58 : 4 (1993))。在 ER- α 36 载体转染的细胞中, 生成了能被

H222 抗体识别的 36kDa 蛋白 (图 11)。该蛋白的大小,和它不能与针对 ER- α 66 的 B- 结构域的抗体 H226 反应,以及不能与识别 ER- α 66 的 C- 末端的抗体 HC 20 反应,表明 ER- α 同种型缺少 ER- α 66 的 N- 末端和 C- 末端,从而导致缺少 AF-1 和 AF-2 结构域的 ER- α 。

[0161] 在 ER- α 36 蛋白上,进行一系列的计算机搜索。FindMod 和 SCANPROSITE 算法预测了 ER- α 36 中的 3 个豆蔻酰化位点,表明它可能位于外周膜。这与 k- 毗邻 (PSPORT II) 算法相一致,后者预测 21.7%、34.8%、17.4% 和 26% 的 ER- α 36 分别位于核、细胞质、线粒体和膜级分中。这与关于 ER- α 46 的预测类似 (分别是 26.1%、30.4%、17.4% 和 26.1%)。相反地,73.9% 8.7%、0.1% 和 17.3% 的 ER- α 66 具有可对比的预测。因而,ER- α 66、ER- α 46 和 ER- α 36 的有差异的区室化,表明每个受体的功能位点和主要作用可能是不同的。

[0162] 还在位于 ER- α 66 基因的第一个内含子中的能编码 ER- α 36 的基因的推定的 5' 侧翼区上,进行了计算机搜索。发现 TATA 结合蛋白 (TBP) 识别序列位于 cDNA 起始位点的上游,且几个 Sp1、NF- κ B 和 Ap1 结合位点位于 5' 侧翼区 (图 12)。在 ER- α 36 的 5' 上游区,鉴别出了完美的半雌激素反应元件 (ERE),表明 ER- α 36 能进行 E2- 介导的转录调节。

[0163] 实施例 3

[0164] ER- α 36 介导膜 - 启动的雌激素信号传导,并在 ER- 阴性的乳腺癌中表达

[0165] 方法

[0166] 细胞培养,稳定的细胞系的确立,和用 E2-BSA-FITC 进行膜标记。从位于 Detroit, MI 的 Karmanos Cancer Institute,得到 MCF10A 细胞,并从 ATCC 得到人胚肾 293 细胞和所有乳腺癌细胞。在适当的组织培养基中,在 37°C、5% CO₂ 气氛中维持所有细胞。为了确立能表达重组 ER- α 36 的稳定的细胞,以 1×10^5 细胞 / 60-mm 皿的密度,铺平板 HEK293 细胞,24 小时后,使用 FuGene6 转染剂 (Roche Molecular Biochemicals),用由巨细胞病毒 (CMV) 启动子驱动的 ER- α 36 表达载体转染。通过将来自 pBS-ER- α 36 的 ER- α 36 的 1.1-kbEcoRI-BamHI cDNA 片段克隆进哺乳动物表达载体 pCB6+ 的 EcoRI 和 BamHI 位点,构建 ER- α 36 表达载体。也将空载体转染进细胞,以用作对照。转染后 48 小时,重新铺平板细胞,并用 500 μ g/ml G418 (Invitrogen) 选择 2 周。扩增得到的未克隆的 G418- 抗性的细胞群体,以产生用于进一步分析的细胞。为了标记能表达重组 ER- α 36 的稳定细胞的细胞表面,在 4°C,用共价附着到 E2 β - 半琥珀酸酯上的 1 μ M 异硫氰酸荧光素 (FITC) - 标记的 BSA (Sigma),标记细胞 15 分钟,在新鲜制备的 4% 多聚甲醛中固定,并用含有 DAPI 的封固溶液进行封固,以用于显微镜评价。

[0167] 用雌激素和抗雌激素药进行细胞刺激,和 MTT 测定。处理前,在含有 2.5% 糊精包被的活性炭吸附的胎牛血清的无酚红培养基中,培养细胞 48-72 小时,然后用 PBS 洗涤,并置于新鲜的无酚红的、无血清的含有 0.1 μ g/ml BSA 和 5 μ g/ml 胰岛素的培养基中 12 小时。在 37°C,在无血清的培养基中刺激休眠细胞不同的时间段。不同的雌激素和抗雌激素药购自 Steraloids Inc.。BSA-E2 β 购自 Sigma。

[0168] 对于 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2- 基)-2,5- 联苯基四唑 鎓 溴化物 (MTT) 测定,将悬浮细胞加入 96- 孔培养板的每个孔中,达到 1×10^3 细胞 / 孔的终浓度,并在 37°C,在 CO₂ 培养箱中培养 24 小时。将含有 10nME2 β 、10nM 他莫昔芬或 40H- 他莫昔芬或 7.2nM U0126 (Calbiochem) 的培养基加入每个孔中 48 小时。如生产商推荐的,用

CellTiter96Aqueous One Solution 细胞增殖测定试剂盒 (Bio Rad) 进行 MTT 测定。使用微量平板读数器 (Promega) 来测量在 490nm 的吸光度。

[0169] 细胞分级分离测定。如 Marquez 等 (Oncogene, 20, 5420-5430 (2001)) 所述, 进行细胞分级分离。

[0170] 蛋白印迹分析, 间接免疫荧光和抗体。对于蛋白印迹分析, 用 RIPA 缓冲液破碎细胞, 在凝胶装载缓冲液中煮沸, 并在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离。电泳后, 将蛋白转移到 PVDF 膜 (Millipore)。用各种抗体探测滤器, 并用适当的 HRP- 缀合的第二抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 和 ECL 试剂 (Perkin Elmer Life Sciences) 显现。

[0171] 针对 ERK1/2 (K-23) 的抗体购自 Santa Cruz Biotechnology。用于分析 MAP 激酶途径的活化的抗体包括磷酸化形式的 Mek1 和 ERK1/2, 且购自 Cell Signaling Technology。大鼠抗 -ER- α 抗体 (H222) 购自 Research Diagnostic Inc.。COPB (Y-20) 的抗体、mSin3A (AK-11) 和 5' 核苷酸酶 (H-300) 购自 Santa Cruz biotechnology Inc.。D4-GDI (克隆 97A1015) 购自 Upstate Biotechnology。

[0172] 在兔子中, 产生了多克隆抗 -ER- α 36 抗体, 其针对根据 ER- α 36 独有的 ER- α 36 C- 末端区域的最后 15 个氨基酸的合成肽抗原 (Alpha Diagnostic Inc.)。使用用于产生抗体的合成肽的亲柱, 纯化抗体。还已经在不能表达内源 ER- α 36 的 ER- α 36 表达载体转染的 HEK293 细胞中, 测试了抗体的特异性。免疫荧光测定表明, 仅仅在具有 ER- α 36- 表达载体的瞬时转染子中, 检测到抗 -ER- α 36 抗体的免疫反应信号, 但是在能表达缺少 C- 末端的突变体 ER- α 36 的转染子中没有检测到, 表明 ER- α 36 抗体是高度特异性的。

[0173] DNA 转染和萤光素酶测定。对于瞬时转染测定, 使亚接种 (subseed) 在 6 孔皿中的 HEK293 细胞, 在无酚红、含 2.5% 无类固醇胎牛血清的培养基中生长至 60-70% 汇合。洗涤细胞, 并用共 5 μ g 质粒 (2 μ g 报告质粒 2X ERE-tk-Luc, 以及 1.5 μ g 表达载体 pSG5, 单独的 1.5 μ g pSG hER α 66 或 1.5 μ g pSG hER β , 或连同 1.5 μ g ER- α 36 表达载体) 和 FuGene6 试剂 (Roche Molecular Biochemicals) 瞬时转染。使用含有 2 个置于胸苷激酶启动子上游的 ERE (鸡卵黄原蛋白 A2 基因的 -331 至 -289 序列) 的报告质粒 (2XERE-tk-Luc, 从 Katarine Pettersson 博士, Karolinska Institute, 瑞典得到)。也从 Katarine Pettersson 博士得到含有 ER- α 66 和 β 的表达载体。从 Zafar Nawaz 博士 (Creighton University Medical Center, Omaha, Nebraska) 得到 ER- α 46 的表达载体。在测定萤光素酶活性之前, 用或不用 E2 (10nM) 处理细胞 12 小时。使用来自 Promega 的萤光素酶测定试剂盒, 进行萤光素酶测定。值对应着超过 3 个分开的转染实验的平均值 $\pm$ 标准差。

[0174] RNA 提取和 RNA 印迹分析。根据生产商的说明, 使用 Trizol (Invitrogen) 分离了总细胞 RNA。通过电泳, 在 1.2% 甲酰胺 / 甲醛凝胶上分离 10 μ g 总 RNA, 并印迹在尼龙膜 (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) 上。使印迹预杂交 1 小时, 并在 65°C, 在 Quick-Hybridization 溶液 (Amersham Pharmacia Biotech) 中杂交 2 小时。探针包含来自 ER- α 36 独有的 ER- α 363' 非翻译区的 410bp cDNA 片段, 和来自 BD Clontech 的 β -肌动蛋白 DNA 探针。用 32P dCTP 和 Rediprime II DNA 标记试剂盒 (Amersham Biotech) 标记 DNA 探针。使用在 -70°C 过夜的增感屏, 使印迹放射自显影。剥离相同的膜, 并用标记的 β -肌动蛋白 DNA 探针重新探测, 以证实等量装载。

[0175] 乳腺癌标本和免疫组织化学测定。从中国杭州劭逸夫医院病理科得到石蜡 - 包

埋的人乳腺癌标本。根据生产商的说明,使用 UltraSensitive S-P 试剂盒 (Maixin-Bio, 中国),进行免疫组织化学染色,其中分别使用 ER- α 66 特异性的抗体 (LabVision Corporation, 美国) 和 ER- α 36 特异性的抗体作为第一抗体。

[0176] 结果

[0177] 为了进一步证实 ER- α 36 是 ER- α 66 的天然产生的同种型,对来自正常乳房上皮细胞系 MCF10A,和 ER- 阳性的和 - 阴性的 (即, ER- α 66- 阳性的和 - 阴性的) 乳腺癌细胞的总 RNA 进行 RNA 印迹分析。使用 RT-PCR 方法,用根据 ER- α 36 独有的 ER- α 363' 非翻译区设计的引物对 (5' GCAAAGAAGAGAATCCTGAACTGTCATCCT (SEQ ID NO:26) 和 5' TTAGTCAGG TATTTAATAACTAGGAATTG (SEQ ID NO:27)),合成 DNA 探针。RNA 印迹分析表明,在 ER- 阳性的 (即, ER- α 66- 阳性的) 乳腺癌细胞 MCF7 中,鉴别出了估计大小为 5.6kb 的单个的 mRNA,但是在 MCF10A 细胞中没有 (图 13)。令人惊奇地, ER- α 36 也在 MDA-MB-231 细胞中表达,后者是众所周知的 ER- 阴性的 (即, ER- α 66- 阴性的) 乳腺癌细胞系 (图 13)。该数据表明,在乳腺癌细胞中,且甚至在缺少 ER- α 66 的乳腺癌细胞中,能表达 ER- α 36mRNA 的预测大小的转录物。

[0178] ER- α 36 能抑制结合配体的 - 和未结合配体的 -ER- α 66 和 - β 的反式激活活性。我们首先测试,缺少 AF-1 和 AF-2 结构域的 ER- α 36 是否能保留任何转录活性。使用能表达萤光素酶的报告构建体,其含有 2 个位于胸苷激酶启动子上游的雌激素反应元件 (ERE) (2XERE-tk-Luc),在 HEK293 细胞中进行瞬时转染测定。选择 HEK293 细胞系,是因为以前报道, ER- α 66 的 AF-1 和 -2 能在 HEK293 细胞中同样较好地起作用 (Denger 等, Mol. Endocrinol., 15, 2064-2077 (2001))。如图 14 所示,我们发现,在有和没有 E2 β 存在下, ER- α 36 没有表现出内在的转录活性,这与 ER- α 36 缺少转录活化结构域的发现相一致。然后,我们估计了 ER- α 36 在由 ER- α 66 的 AF-1 和 -2 结构域介导的转录反式激活活性中的调节功能。在有和没有 E2 β 存在下, ER- α 36 的共表达,强烈抑制了 ER- α 66 的反式激活活性 (图 14),表明 ER- α 36 能抑制由 ER- α 66 的 AF-1 和 -2 结构域介导的反式激活活性。而且, ER- α 36 也能抑制 ER- β 的依赖于配体的和不依赖于配体的反式激活活性 (图 14)。

[0179] ER- α 36 能介导膜 - 启动的雌激素信号传导途径。以前的报道已经表明, E2 β 能刺激 MAPK/ERK 途径的迅速活化 (Razandi 等, Mol. Endocrinol., 13, 307-319 (1999), Watters 等, Endocrinol., 138, 4030-4033 (1997), 和 Migliaccio 等, EMBO J., 15, 1292-1300 (1996))。为了确定 ER- α 36 是否参与该信号传导途径,我们在不能表达内源 ER- α 的 HEK293 细胞中,确立了能表达外源 ER- α 36 的稳定细胞。用不可透过膜的异硫氰酸荧光素 (FITC) - 缀合的 E2 β -BSA (E2 β -BSA-FITC),温育全部 ER- α 36 转染的 HEK293 细胞。用 E2 β -BSA-FITC,牢固地标记 ER- α 36 转染的细胞的细胞表面,且不用 E2 β -BSA-FITC 标记用空载体转染的对照细胞。从用或不用 E2 β (10nM) 处理各种时间长度的休眠细胞,制备细胞裂解物。通过使用依赖于和不依赖于磷酸化状态的抗体的免疫印迹,测量 ERK 活化。在 5 分钟内,在用 ER- α 36 表达载体转染的细胞中,观察到持续约 45 分钟的 ERK1/2 的磷酸化的 10- 倍增加,但是在用空载体转染的对照细胞中没有 (图 15a 和 15b)。但是,在这些对照细胞中,血清 (20%, 10 分钟) 能激活 ERK1/2 (图 15b),表明 MAPK 信号传导途径在这些细胞中没有总体缺陷。而且,在 ER- α 36 转染的细胞中,对 E2 β 响应也能激活 Mek1,即能磷酸化和激活 ERK1/2 的激酶 (图 15a)。为了进一步证实膜 - 启动的雌激素信号传导能

激活 ERK1/2, 还用 E2 β -BSA (不可透过膜的形式 E2 β) 处理了 ER- α 36 转染的细胞。在 E2 β -BSA 处理的细胞中, 也观察到了 ERK1/2 磷酸化的强烈活化 (图 15a)。

[0180] ER-36 能介导由不同雌激素和抗雌激素药刺激的 MAPK 信号传导途径的活化。我们还用雌酮 (E1)、17 β -雌二醇 (E2 β)、17 α -雌二醇 (E2 α)、雌三醇 (E3) 或雌四醇 (E4), 处理 ER- α 36 转染的细胞 10 分钟, 并发现除了 E1 以外的所有这些雌激素都能以非常类似的水平激活 ERK1/2 磷酸化, 表明 ER- α 36 可以以类似的水平识别这些雌激素 (图 15c)。然后, 我们在实验中包含了抗雌激素药, 包括他莫昔芬、4OH-他莫昔芬、ICI-182,780, 以测试 ER- α 36 介导的雌激素信号传导是否对抗雌激素药敏感。他莫昔芬、4OH-他莫昔芬和纯抗-雌激素药 ICI-182,780 不能阻断由 ER- α 36 介导的 ERK1/2 活化。相反地, 与单独的 E2 β 介导的作用相比, 该作用甚至更强烈 (图 15c)。当用单独 1 μ M 他莫昔芬 (可以钝化 ER- α 66 和 β 的浓度) 处理 ER- α 36 转染的细胞时, 观察到了持续超过 8 小时的强烈的且持久的 ERK1/2 活化 (图 15d)。但是, 相同浓度的他莫昔芬在用空表达载体转染的对照 293 细胞中没有作用。

[0181] ER- α 36 能介导 E2-刺激的细胞增殖。为了进一步确定 ER- α 36 介导的雌激素活化的 MAPK 途径是否可以导致细胞核中的转录信号传导, 我们检查了膜-启动的雌激素信号传导激活转录因子 Elk (MAPK/ERK 信号传导途径的下游效应物) 的能力。我们使用 ERK-反应性的 GAL-Elk 嵌合转录因子, 其由融合到人 Elk1 的 ERK-反应性的反式激活结构域上的酵母转录因子 GAL4 的 DNA-结合结构域组成, 瞬时转染了能表达 ER- α 36 的 293 细胞, 并在有 E2 β 存在下, 测量它对 GAL4-结合报告基因的表达的体内活性。报告基因是 5X Gal4-LUC, 即含有 5 个 Gal4 DNA 结合位点的萤光素酶报告质粒。使用细菌 β -半乳糖苷酶表达载体来控制转染效率。转染后, 将细胞培养物维持在无雌激素的培养基中 36 小时, 然后加入 E2 β (10nM) 12 小时。具有标准差的萤光素酶活性代表着超过 3 个一式两份地进行的实验。ER- α 36 转染的细胞的雌激素治疗, 会诱导 Elk/Gal4 融合蛋白-介导的报告基因的反式激活的约 2 倍增加, 而 E2 β 对用空载体转染的对照细胞中的 Elk/Gal4 融合蛋白的转录活性没有作用 (图 16a)。

[0182] 我们接着研究了 ER- α 36 是否可以介导雌激素-刺激的细胞增殖。通过 MTT 测定, 评价了在有和没有 E2 β 存在下, ER- α 36 转染的细胞和对照细胞的增殖。E2 β 处理能刺激 ER- α 36 转染的细胞的增殖, 而 E2 β 对用空表达载体转染的对照细胞的生长没有作用 (图 16b)。包含抗雌激素药, 包括他莫昔芬和 4OH-他莫昔芬, 不能阻断 E2 β -刺激的细胞生长 (图 16b)。单独的他莫昔芬或 4OH-他莫昔芬, 能强烈刺激 ER- α 36 转染的细胞的生长。但是, MAPK 途径的特异性的抑制剂 U0126, 能强烈抑制 E2 β 刺激的细胞的生长。这些数据表明, ER- α 36-介导的膜雌激素信号传导能通过 MAPK/ERK 信号传导途径的活化, 刺激细胞生长。数据也表明, 抗雌激素药也能通过 ER- α 36 刺激细胞生长。

[0183] ER- α 36 主要是基于膜的雌激素受体。为了进一步表征 ER- α 36, 我们已经成功地开发了多克隆抗-ER- α 36 抗体, 它针对 ER- α 36 独有的 ER- α 36C-末端区域的 15 个氨基酸。使用用于产生抗体的合成肽的亲合柱, 纯化抗体。使用该抗体蛋白印迹分析从正常的乳房上皮细胞和确定的乳腺癌细胞系制备的蛋白, 证实一些乳腺癌细胞中有 37-kDa 分子量的单个蛋白条带, 但是在正常的乳房上皮细胞中没有 (图 17a)。ER- α 36 在 MDA-MB-231、MDA-MB436 和 HB3396 细胞, 3 个众所周知的 ER- α 66 阴性的乳腺癌细胞系中表达, 且也

在 ER- α 66 阳性的乳腺癌细胞 MCF7 中表达,但是在 T47D 中不表达(图 17a),这与我们的 ER- α 36 在 ER- α 66 阴性的乳腺癌细胞中表达的 RNA 印迹数据相一致。为了进一步评价 ER- α 36 在 ER- α 66 阴性的乳腺癌细胞中表达的可能性,使用抗-ER- α 36 特异性的抗体在透化的 MDA-MB-231 细胞中的间接免疫荧光测定和共聚焦显微镜术,表明 ER- α 36 在 ER- α 66 阴性的乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的质膜、细胞质和核上表达。

[0184] 为了进一步估计细胞中的 ER- α 36 区室化,进行亚细胞分级分离测定,以从 ER- α 36 转染的 HEK293 细胞分离核、质膜和胞质溶胶。通过免疫检测,从不同的级分鉴别 ER- α 36。高百分比的 ER- α 36(约 50%)位于质膜上,且低百分比位于胞质溶胶(约 40%)和核(约 10%)中。为了排除不同级分的交叉污染,用不同的标记蛋白,包括 mSin3A(核)、GDP 解离抑制剂(胞质溶胶)、5' 核苷酸酶(质膜)和 β -COP(高尔基体),通过蛋白印迹分析,检查级分纯度。这些结果证实,在不同的级分中没有污染。该实验证实,ER- α 36 主要是基于膜的雌激素受体(图 17b)。

[0185] ER- α 36 在 ER- α 66 阴性的乳腺癌标本中表达。为了进一步确定 ER- α 36 与人乳腺癌的关联,我们使用特异性的抗-ER- α 36 抗体,通过免疫组织化学测定,检查了人乳腺癌标本中的 ER- α 36 表达模式。人乳房组织的原位分析表明乳腺癌中 ER- α 36 的上调。对 ER 蛋白阳性的细胞被染成褐色,且核被苏木精染成蓝色。在 35 个检查的乳腺癌标本病例中,其中的 21 个(60%)是对 ER- α 36 染色阳性的,且其中的 21 个(60%)是对 ER- α 66 阳性的(表 2)。与我们的 RNA 和蛋白印迹分析相一致,对 ER- α 66 染色阴性的 14 个中的 11 个(78%)乳腺癌标本是对 ER- α 36 染色阳性的,表明大部分 ER- 阴性的(即,ER- α 66- 阴性的)乳腺癌仍能表达 ER- α 36。在人导管癌中发现的正常组织切片中的 ER- α 36 的原位染色,表明 ER- α 36 仅仅在内腔上皮细胞中表达,且主要定位于细胞质和质膜。肿瘤切片来自人浸润性导管癌和侵入性导管癌。所有 21 个 ER- α 36 阳性的标本病例都表现出主要在细胞核以外的 ER- α 36 免疫染色模式,这与 ER- α 66 的主要核染色相反。类似于 ER- α 66,在临近的正常组织中的一些内腔上皮细胞也是对 ER- α 36 染色阳性的。这些结果证实,类似于 ER- α 66,ER- α 36 在 2/3 检查的人乳腺癌中表达,并表明,ER- α 36 可能参与 ER- α 66- 阴性的乳腺癌的发展。

[0186]

表2. ER- α 36和66表达: 人乳腺癌中的免疫染色研究

病例号	ER- α 66	ER- α 36
04-06108D	+++	+
04-06278G	+++	+
03-19482D	+++	++
03-13610E	+++	+
01-09182B	++	+
02-17950B	++	+
02-07748H	++	+
01-13537G	++	+
00-0319D	++	+/-
03-04069G	+	+/-
00-02787D	++	-
02-18513F	++	-
04-08474J	++	-
02-01265M	++	-
03-07870E	+	-
02-04206F	++	-
02-12985F	+++	-
03-08862G	++	-
02-09537B	+++	-
03-22792D	++	-
04-10881D	+	-
03-10071F	-	++
03-22971M	-	+
01-08119D	-	+/-
02-02018D	-	+
02-04567E	-	+
04-07055E	-	+
03-05946C	-	+
03-22586I	-	+
01-02877A	-	+
01-17570C	-	+/-
00-08489G	-	+/-
00-02202F	-	-
98-03898D	-	-
03-04898B	-	-

[0187] 在该研究中,已经鉴别、克隆和表征了ER- α 的新变体ER- α 36。该ER- α 同种型是从ER- α 66基因的第一个内含子中的以前未鉴别的启动子开始的转录产物。推定的ER- α 36的启动子区含有位于ER- α 36cDNA起始位点上游的TATA结合蛋白(TBP)识别序列,和几个Sp1、NF- κ B和Ap1结合位点(图12)。我们已经克隆了ER- α 36的5'侧翼区,并证实它具有强启动子活性。而且,在ER- α 36的5'侧翼区,鉴别出了完美的半个ERE位点,表明ER- α 36进行了ER-介导的转录调节。

[0188] ER- α 36蛋白与由ER- α 66基因的外显子2-6编码的ER- α 66蛋白相同。该同种型没有以前鉴别出的具有反式激活活性的结构域,AF-1和-2。实际上,ER- α 36反式激活活性的分析,证实ER- α 36缺少内在的转录活性。但是,ER- α 36能有效地抑制由结合配体的-和未结合配体的-ER- α 66和- β 的AF-1和-2结构域介导的反式激活活性,表明

ER- α 36 是基因组雌激素信号传导的有效抑制剂。该发现类似于以前的报道,即缺少 AF-1 结构域的 ER- α 46 能起抑制 ER- α 66 的 AF-1 活性的有力竞争剂的功能。

[0189] 能触发迅速的雌激素信号传导的基于质膜的 ER 的存在,是长期有争议的,这是因为尚未确立该受体的分子同一性。以前,Razandi 使用转染测定,报道了 ER- α 66 和 - β 都可以启动膜雌激素信号传导,尽管其中仅仅非常小的百分比在细胞表面上表达 (Razandi 等, *Mol. Endocrinol.*, 13, 307-319 (1999)), 表明除了它们在基因组雌激素信号传导中的传统作用以外,这些 ER 可能参与膜 - 启动的雌激素信号传导。最近,ER- α 的 46-kDa 同种型定位在细胞表面,且发现它能介导雌激素 - 刺激的 eNOS 磷酸化 (Li 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 4807-4812 (2003))。在这里,我们证实了,另一种 ER- α 变体 ER- α 36 主要定位在质膜上,并介导由膜 - 启动的雌激素信号传导诱导的 MAPK/ERK 途径的激活。而且,由于 ER- α 36 完全缺少内在的反式激活活性,且仅仅起基因组雌激素信号传导的调节剂的作用,所以 ER- α 36 可能主要起基于膜的雌激素受体的作用,以介导膜 - 启动的雌激素信号传导。以前,已经报道,一些 E2 β - 介导的迅速作用发生在 ER- α 基因敲除的 (aERKO) 小鼠的神经元中,且这些作用不能被 ICI 182,780 阻断 (Gu 等, *Endocrinology*, 140, 660-666 (1999)), 表明存在超过一种膜 - 启动的雌激素信号传导途径。我们在这里证实,抗雌激素药不能阻断 ER- α 36 - 介导的 MAPK/ERK 激活,表明 ER- α 36 参与以前描述的抗 - 雌激素药不敏感的信号传导途径。由于通过小鼠 ER- α 基因的第二个编码外显子 (在产生 ER- α 36 的转录物时跳过的的外显子) 的插入破坏生成了 α ERKO 小鼠,所以 ER- α 36 的小鼠对应物的生产,可能在这些敲除的小鼠中保持正常。因而,ER- α 36 可能有助于在这些小鼠中观察到的剩余的雌激素作用。近来,Toran-Allerand 等 (*J. Neuroscience* 22, 8391-8401 (2002)) 报道了估计分子量为 63-65kDa 的新的质膜 - 有关的雌激素受体 (ER-X) 的存在。ER-X 表现出与 ER- α 36 的一些相似性,例如与 ER- α 66 的配体 - 结合结构域的抗体反应,和对 E2 α 和 β 同样好地响应。但是,这 2 种受体的分子同一性期待着 ER-X 的克隆和测序。

[0190] 我们还已经表明,ER- α 36 能促进 MAPK/ERK 途径的膜 - 启动的激活,该激活会导致雌激素 - 刺激的细胞增殖。因而,缺少内在的转录活性的 ER- α 36,足以促进雌激素 - 刺激的细胞生长,这支持了以前的报道,即 ER- α 66 的转录上无活性的突变体会诱导 DNA 合成。这些数据一起表明,可能不需要 ER 的转录活性,来促进雌激素 - 刺激的细胞生长。令人惊奇地,我们也观察到,在实验阶段 (48 小时),抗雌激素药例如他莫昔芬,能强烈激活 MAPK/ERK 信号传导,并刺激细胞生长。该发现与下述观点很好地符合,即他莫昔芬起雌激素信号传导的激动剂和拮抗剂的作用,并暗示 ER- α 36 也可能参与膜 - 启动的抗 - 雌激素药信号传导。

[0191] 众所周知,具有 ER- α 66 阳性表型的乳腺癌细胞 (ER- 阳性的乳腺癌) 是更分化的,且具有比 ER- α - 阴性的肿瘤更低的转移潜力 (McGuire, W. L. *Prognostic factors in primary breast cancer. Cancer Surv.* 5, 527-536 (1986))。有趣地,ER- α 36 不仅仅在 ER- α 66 - 阳性的乳腺癌亚型中表达,而且在大多数检查的 ER- α 66 阴性的乳腺癌中表达。为确认这些结果,已经报道雌激素信号传导能在 MDA-MB-231 细胞中诱导 PI3K/Akt 途径的迅速激活,其不能被雌激素拮抗剂阻断 (Tsai 等, *Cancer Res.* 61, 8390-8392 (2001)), 这可以解释为通过不依赖于 ER 的途径的雌激素信号传导。还已经表明,高浓度的他莫昔芬能诱导 MDA-MB-231 细胞的细胞凋亡 (Mandleker 等, *Apoptosis* 6, 469-477 (2001))。这些数据

有力地表明,ER- α 66- 阴性的乳腺癌仍然可能保持由膜 - 启动的信号传导介导的雌激素或抗 - 雌激素药作用。

[0192] 通过用独特的 27 氨基酸结构域替代 ER- α 66 的 12 个螺旋中的最后 5 个螺旋 (螺旋 8-12),其可以改变 ER- α 36 的配体 - 结合特异性和亲和力,ER- α 36 也具有独特的配体 - 结合结构域。实际上,我们发现 ER- α 36 能引起膜 - 启动的信号传导,这与对 E2 α 和 β ,E 3 和 E4 的响应一样好。因而,ER- α 36 似乎具有比 ER- α 66 更广的配体 - 结合谱,这使得 ER- α 36 成为促有丝分裂的信号传导的潜在地更有效的介质。ER- α 36 的配体 - 结合特异性和亲和力的进一步分析,有助于设计对 ER- α 36 特异性的抗雌激素药,所述药可以用于治疗 ER- α 阴性的 (即,ER- α 66- 阴性的) 乳腺癌。

[0193] 实施例 4

[0194] E2 β 能促进 ER- α 66 阴性的 MDA-MB-231 细胞在软琼脂中的生长

[0195] 为了确定在有和没有组合的或分开的 E2 β 和他莫昔芬存在下,在软琼脂中的无贴壁依赖性的生长,将 500MDA-MB-231 细胞悬浮在 3ml 3.5% (wt/vol) 琼脂中,后者含有无酚红的添加了 10% 无 E2 的胎牛血清的 DMEM/F12 培养基。然后,将细胞覆盖到 5 个复制的 60mm 皿中的 0.7% (wt/vol) 琼脂上,后者含有无酚红的添加了 10% 无 E2 的胎牛血清的 DMEM/F12 培养基。给软琼脂上的细胞覆盖添加了 10% 无 E2 的胎牛血清的培养基,其含有或没有 1nM E2 β ,或与 1nM 他莫昔芬相组合。3 周后,使用倒置显微镜,给菌落打分。如图 18 所示,我们发现, E2 处理能强烈促进 ER- α 66 阴性的 MDA-MB-231 细胞在软琼脂中的无贴壁依赖性的生长,而抗 - 雌激素药他莫昔芬会抑制 E2 β 的作用,表明 ER- α 66 阴性的 MDA-MB-231 细胞能保持对雌激素信号传导的响应性,推测是通过 ER- α 36。

[0196] 实施例 5

[0197] E2 β 能诱导 ER- α 66 阴性的 MDA-MB-231 细胞中的膜 - 启动的雌激素信号传导

[0198] 为了确定 E2 β 是否能诱导 ER- α 66 阴性的 MDA-MB-231 中的膜 - 启动的雌激素信号传导,用 1nM E2 β 处理血清饥饿的 MDA-MB-231 细胞不同的时间段。对于蛋白印迹分析,用 RIPA 缓冲液破坏细胞,在凝胶装载缓冲液中煮沸,并在 10% SDS-PAGE 凝胶上分离。电泳后,将蛋白转移到 PVDF 膜 (Millipore)。用针对 ERK1/2 (K-23) 的抗体 (Santa Cruz Biotechnology),或针对磷酸化形式的 ERK1/2 使用的抗体 (Cell Signaling Technology),探测滤器。如图 19 所示,用雌二醇 -17 β (E2 β) 处理 MDA-MB-231 细胞,会诱导 ERK1/2 的快速磷酸化。这些数据有力地提示, E2 β 能刺激 ER- α 66 阴性的 MDA-MB-231 细胞中的 MAPK 途径的激活。

[0199] 所有出版物、专利和专利申请,都在本文中引作参考。尽管已经参照其中的某些优选的实施方案,描述了本发明的前面的说明书,且已经阐述了许多细节用于解释目的,但本领域的技术人员能够明白,其它实施方案也能实现本发明,且可以明显改变本文所述的某些细节,而不脱离本发明的基本原理。

[0001]

CPCH0663261P.sequence listing

序列表

<110> CREIGHTON UNIVERSITY
<120> 雌激素受体和使用方法
<130> 180.0012 0201
<140> PCT/US 2005/007857
<141> 2005-03-10
<150> 60/552,067
<151> 2004-03-10
<150> 60/643,469
<151> 2005-01-13
<160> 27
<170> PatentIn version 3.2
<210> 1
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> SEQ ID NO:20的C-末端
<400> 1
Gly Ile Ser His Val Glu Ala Lys Lys Arg Ile Leu Asn Leu His Pro
1 5 10 15
Lys Ile Phe Gly Asn Lys Trp Phe Pro Arg Val
20 25
<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 载体蛋白
<400> 2
Gln Phe Phe Gly Leu Met
1 5
<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 载体蛋白
<400> 3
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1 5 10
<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 载体蛋白

[0002]

CPCH0663261P.sequence listing

<400> 4

Lys Ala Glu Asp Glu Ser Ser
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体蛋白

<400> 5

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体蛋白

<400> 6

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体蛋白

<400> 7

Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体蛋白

<400> 8

Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly
1 5 10

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体蛋白

<400> 9

Asp Thr Tyr Arg Tyr Ile
1 5

[0003]

CPC0663261P.sequence listing

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 载体蛋白

<400> 10
Thr Asp Phe Tyr Leu Lys
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 载体蛋白

<400> 11
His His His His His His
1 5

<210> 12

<400> 12
000

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 载体蛋白

<400> 13
Gln Tyr Pro Ala Leu Thr
1 5

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 载体蛋白

<400> 14
Gln Arg Gln Tyr Gly Asp Val Phe Lys Gly Asp
1 5 10

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 载体蛋白

<400> 15
Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

[0004]

CPCH0663261P. sequence listing

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 载体蛋白

<400> 16

Glu Phe Met Pro Met Glu
1 5

<210> 17
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 载体蛋白

<400> 17

Arg Tyr Ile Arg Ser
1 5

<210> 18
<211> 595
<212> PRT
<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 18

Met Thr Met Thr Leu His Thr Lys Ala Ser Gly Met Ala Leu Leu His
1 5 10 15

Gln Ile Gln Gly Asn Glu Leu Glu Pro Leu Asn Arg Pro Gln Leu Lys
20 25 30

Ile Pro Leu Glu Arg Pro Leu Gly Glu Val Tyr Leu Asp Ser Ser Lys
35 40 45

Pro Ala Val Tyr Asn Tyr Pro Glu Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Asn Ala
50 55 60

Ala Ala Ala Ala Asn Ala Gln Val Tyr Gly Gln Thr Gly Leu Pro Tyr
65 70 75 80

Gly Pro Gly Ser Glu Ala Ala Ala Phe Gly Ser Asn Gly Leu Gly Gly
85 90 95

Phe Pro Pro Leu Asn Ser Val Ser Pro Ser Pro Leu Met Leu Leu His
100 105 110

Pro Pro Pro Gln Leu Ser Pro Phe Leu Gln Pro His Gly Gln Gln Val
115 120 125

Pro Tyr Tyr Leu Glu Asn Glu Pro Ser Gly Tyr Thr Val Arg Glu Ala
130 135 140

Gly Pro Pro Ala Phe Tyr Arg Pro Asn Ser Asp Asn Arg Arg Gln Gly
145 150 155 160

[0005]

CPCH0663261P. sequence listing

Gly Arg Glu Arg Leu Ala Ser Thr Asn Asp Lys Gly Ser Met Ala Met
 165 170 175
 Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn Asp Tyr Ala
 180 185 190
 Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala Phe
 195 200 205
 Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala Thr
 210 215 220
 Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys Gln Ala Cys
 225 230 235 240
 Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Ile Arg
 245 250 255
 Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg Gln Arg Asp
 260 265 270
 Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala
 275 280 285
 Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn
 290 295 300
 Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu
 305 310 315 320
 Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro
 325 330 335
 Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg
 340 345 350
 Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val
 355 360 365
 Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu
 370 375 380
 Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Val
 385 390 395 400
 Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys
 405 410 415
 Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser
 420 425 430
 Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu
 435 440 445
 Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser
 450 455 460

[0006]

CPCH0663261P. sequence listing

Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp
465 470 475 480

Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr
485 490 495

Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser
500 505 510

His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met
515 520 525

Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu
530 535 540

Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val
545 550 555 560

Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser
565 570 575

His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro
580 585 590

Ala Thr Val
595

<210> 19
<211> 1788
<212> DNA
<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 19
atgacctga cctccacac caaagcatct gggatggccc tactgcatca gatccaaggg 60
aacagagctgg agccctgaa ccgtccgcag ctcaagatcc ccttgagcgc gccctgggc 120
gaggtgtacc tggacagcag caagcccgcc gtgtacaact accccgaggg cgcgcctac 180
gagttcaacg ccgcggccgc cgcacaacgc caggctctacg gtcagaccgc cctccctac 240
ggccccgggt ctgaggtgc ggcgltcggc tccaacggcc tggggggitt cccccactc 300
aacagcgtgt ctccgagccc gctgatgcta ctgcacccgc cgcgcagct gtgcctttc 360
ctgcagcccc acggccagca ggtgccctac tacttgagga acgagccag cggtacacg 420
gtgcgcgagg ccggcccgcc ggcattctac aggcacaatt cagataatcg acgccagggt 480
ggcagagaaa gattggccag taccaatgac aagggaagta tggctatgga atctgccaa 540
gagactcgtc actgtgcagt gtgcaatgac tatgcttcag gctaccatta tggagtctgg 600
tcctgtgagg gctgcaagge cttcttcaag agaagtattc aaggacataa cgactatatg 660
tgtccagcca ccaaccagtg caccattgat aaaaacagga ggaagagctg ccaggcctgc 720
cggtccgca aatgctacga agtgggaatg atgaaagtg ggatacgaag agaccgaaga 780
ggaggagaaa tgttgaaaca caagcccgag agagatgatg gggagggcag gsgtgaagt 840
gggtctgctg gagacatgag agctgccaac ctttggccaa gcccgctcat gatcaaacgc 900
tctaagaaga acagcctgge cttgtccctg acggccgacc agatgggtcag tgccttgtg 960

[0007]

CPCH0663261P. sequence listing

```

gatgctgagc cccccatact ctattccgag tatgatacta ccagaccett cagtgaagct 1020
tcgatgatgg gcttactgac caacctggca gacaggggagc tggttcacat gatcaactgg 1080
gcgaagaggg tgccaggctt tgtggatttg accctccatg atcagggtcca ccttctagaa 1140
tgtgccctggc tagagatcct gatgatitggc ctgctctggc gctccatgga gcaccacgtg 1200
aagctactgt ttgctcctaa ctgctctctg gacaggaacc agggaaaatg tgtagagggc 1260
atgggtggaga tcttcgacat gctgctggct acatcatttc ggttccgcat gatgaatctg 1320
cagggagagg agtttgtgtg cctcaaatct attattttgc ttaattctgg agtgtacaca 1380
tttctgtcca gcacctgaa gtctctggaa gagaaggacc atatccaccg agtcctggac 1440
aagatcacag acactttgat ccacctgatg gccaggcag gcctgacct gcagcagcag 1500
caccagcggc tggcccagct cctctcctc ctctcccaca tcaggcacat gactaactaa 1560
ggcatggagc atctgtacag catgaagtgc aagaactgg tgcccctcta tgacctgtg 1620
ctggagatgc tggacgcca ccgctacat gcgcccacta gccgtggagg ggcatccgtg 1680
gaggagacgg accaaagcca ctggccact gcgggctcta cttcatcgca ttcttgcga 1740
aagtattaca tcacggggga ggcagagggt ttccctgcca cagtctga 1788

```

<210> 20
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 20

```

Met Ala Met Glu Ser Ala Lys Glu Thr Arg Tyr Cys Ala Val Cys Asn
1           5           10           15

```

```

Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys
20           25           30

```

```

Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys
35           40           45

```

```

Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Lys Asn Arg Arg Lys Ser Cys
50           55           60

```

```

Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly
65           70           75           80

```

```

Gly Ile Arg Lys Asp Arg Arg Gly Gly Arg Met Leu Lys His Lys Arg
85           90           95

```

```

Gln Arg Asp Asp Gly Glu Gly Arg Gly Glu Val Gly Ser Ala Gly Asp
100          105          110

```

```

Met Arg Ala Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser
115          120          125

```

```

Lys Lys Asn Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser
130          135          140

```

```

Ala Leu Leu Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro
145          150          155          160

```

[0008]

CPCH0663261P. sequence listing

Thr Arg Pro Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu
165 170 175

Ala Asp Arg Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro
180 185 190

Gly Phe Val Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys
195 200 205

Ala Trp Leu Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu
210 215 220

His Pro Gly Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn
225 230 235 240

Gln Gly Lys Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu
245 250 255

Ala Thr Ser Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe
260 265 270

Val Cys Leu Lys Ser Ile Leu Leu Leu Asn Ser Gly Ile Ser His Val
275 280 285

Glu Ala Lys Lys Arg Ile Leu Asn Leu His Pro Lys Ile Phe Gly Asn
290 295 300

Lys Trp Phe Pro Arg Val
305 310

<210> 21
<211> 933
<212> DNA
<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 21
atggctatgg aatctgceaa ggagactcgc tactgtgcag tgtgcaatga ctatgcttca 60
ggctaccatt atggagtctg gtctgtgag ggctgcaagg ccttcttcaa gagaagtatt 120
caaggacata acgactatat gtgtccagcc accaaccagt gcaccatiga taaaaacagg 180
aggaagagct gccaggcctg ccggctccgc aaatgctacg aagtgggaat gatgaaaggt 240
gggatacgaa aagaccgaag aggagggaga atgttgaac acaagcgcca gagagatgat 300
ggggagggca ggggtgaagt ggggtctgct ggagacatga gagctgcaa cctttggcca 360
agcccgctca tgatcaaacg ctctaagaag aacagcctgg ccttgctcct gacggccgac 420
cagatggtea gtgccttgtt ggatgctgag cccccatac tctattccga gtatgatcct 480
accagaccct tcagtgaagc ttcgatgatg ggcttactga ccaacctggc agacagggag 540
ctggttcaca tgatcaactg ggcgaagagg gtgccaggct ttgtggattt gacctccat 600
gatcaggctc acctcttaga atgtgcctgg ctagagatcc tgatgattgg tctcgtctgg 660
cgctccatgg agcaccaggg gaagctactg ttigtctcta acctgctctt ggacagggaac 720
cagggaaaat gtgtagaggg catggtggag atcttcgaca tgctgctggc tacatcatct 780
cggttccgca tgatgaatct gcaggagag gagtttgtgt gcctcaaatc tattcttttg 840

[0009]

CPC0663261P. sequence listing

cttaattctg gtatctcaca tgtagaagca aagaagagaa tectgaactt gcatcctaaa	900
atatttgga acaagtgggt tectctgtgc taa	933
<210> 22	
<211> 752	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo Sapiens)	
<400> 22	
ggtacccgcg cccgcgcgcg ccgtcgggggt ggccgcgcgcg cccggcagga gggagggagg	60
gaggggagga gaagggagag cctagggagc tgcgggagcc gcgggacgcg cgacccgagg	120
gtgcgcgcag ggagcccggg gcgcgcggcc cagcccgggg gttctgcgtg cagcccgccg	180
tgcgttcaga gtcaagttct ctgcgcgggc agctgaaaaa aacgtactct ccacccactt	240
accgtccgtg cgagaggcag acccgaaagc ccgggcttcc taacaaaaca cacgttgga	300
aaccagacaa agcagcagtt atttgtggg gaaaacacct ccaggcaaat aaacacgggg	360
cgtttgagt cacttgga ggtctgcctc ttggcattta aagttggggg tgtttggagt	420
tagcagagct cagcagagtt ttatttatcc ttttaattgt ttgttttaatt gtgctcccca	480
aatttccttt catctagact atttgattgg aaatatgtca gctatgatga tgactttctg	540
ggaagcgatt cctgtcaccg gtttccctt cctccccacc ccacgtcctg gggctttaga	600
gagcgattgg gagtgaatg ggtctgattt cggagtttagc tggttgagtc cgcgctggag	660
cggattgctg gcatgtgact tetgacagcc ggaaatttgt aggtgtcccg cgagtttaaa	720
acaagccata tggaagcaca agtgcttaaa aa	752
<210> 23	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 23	
cggaattccg aagggaagta tggtatgga atcc	34
<210> 24	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 24	
cgggatccag aggttttaga cagaggaaa c	31
<210> 25	
<211> 4359	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo Sapiens)	
<400> 25	
ctggtatctc acatgtagaa gcaagaaga gaatctgaa ctgcatcot aaaatatttg	60
gaaacaagtg gtttctctgt gtctaaagcc tetggtcata aggeetcaca gtatcctgca	120
gatcatcaaa tccgtgtgtg gacgtgggga cattttgttt tgaggcagtt acatgacct	180

[0010]

CPC0663261P. sequence listing	
gggcaagtgg attggtctct ctggccttca gttttctcat ttgcaatgat tcaatggttt	240
gccttaaagt gtcttaagaa ggataggata gotacccaca aactttggat caaattttct	300
tcaaacatc cttccctga ctttaaaata tgccctggca accaaccctc aacacccgta	360
gctagatgag ttataacaga gtgactgaag agagctccca caattcctag ttattaaata	420
cctgactaat ttctattagg agacatttaa gaactttagt gatgggaaga ttacatata	480
taattgatag tacaatctga cagagctgaa tagctctgt ttgtcaactg ttaaattctt	540
tgtgcaatta ggtcaaagat caagatcaaa acaagggtg cccattgacc tgttcactcc	600
tgagaaaaat ggcaaacctat tgaatcataa atcatgacag ccaaaataat tttaggatat	660
taatgcacc ctcactttg caagtgaaga aactgaaggc cagagagact aatttacttg	720
cccattttg ataaaaatgt caccatttac agaattgtga ctcttatgtt ggagtctgtt	780
gaaggacatg gcacatttaa cagcatcaga gcatttttta ttaaaattta atttgtcat	840
gacttctaatt gctgaagaac gccaaagctag gaagaagtc tgggtgaga tggggacaga	900
gagaacacac aatattcagt gactgtcgt gcagctggct gcccttgaaa atatecgaac	960
tatccactgg gaaaatgctt gtcccttgg gtaattacc agagtttcaa catgccccaa	1020
gtgctctcat cttcagggg aacttgttct agcgatttta gtatcaagaa gctaatggtc	1080
ccagggaag ggttattttt aatatttagc tactgtgcta aaaatcacct aagtttctag	1140
agtcttggga aatttcataa gggaaagaac aaaggcaact tgttgactac ccactggtea	1200
ttctctctg gtcttattac atacatggat gccagtttag attgtgttta tataggaaaa	1260
tttaaatgtg tgagcctct taaggaacat catcaataga gatatatcag atagtctgt	1320
ccagcaaaaa acgtgcttat ttgtacaag taaattttta tttatttttc tcacttccct	1380
cactccttca aatttccagg taaatagctg cccaggagtt gcttcacttc tgtcccaaaa	1440
tacttagaca attgcgggat aaggagaatg gcaggaggag agtagtggt aaaaacacac	1500
ccttcaaaag aaagtgtgta ggacacacaa ttgtgagaag tctgaatgcc atgcacatag	1560
ggtatgactc actttgaaaa ttgtttataa tcaaggaaat gaaaatgagt taatttcgtg	1620
catgcatcat ttaaagccaa atgagaagaa acttctaatt tattttgtta cttttcggt	1680
aacactggca gtatgtaaca gatttatttt gcagaaacat ctgattgtc cgtgatcttg	1740
atctgcccc tatgtgctt gtcttggaa cccagtggtt cctggatata tgggtcagga	1800
gacaagtttc cagaatcaag ttaggaccca ggtcttcttt ttttccaaac caaacattct	1860
tgetaatctt aaactacctg aggcagcctg tgggtggctc agctctaaaa ccattgttta	1920
aagcttctta cccatcaatg gcccttcagc agagtggtac ggtaacggg gtagggtctg	1980
gagtcagggg agacctgggt tcaaatccta catctttaca cctctaacc ccagtgctct	2040
tgctctataa ttgggaatat agccatgtca tgggattctt gtgagggtta aatgaggtaa	2100
aacacataga atgcttagca tgtatacaat taagcactaa ataattgaaa cacatttaagt	2160
actaaatgaa gtgcagcage ttatcactat tatctgtata atgataccaa ggggtgtccg	2220
actcataccc ttaggggttg gctggattcg gccttttctc tcgggaaaa acaccigatt	2280
tattaatagt gctttcaage atgtgataaa tttctcaaac tgctgtctt gtccctaga	2340
aacaccagga aggcctacct caaatagcaa cagagaaacc tatcggagcc ttacctaca	2400
gctttccttg gggcacgggt gagcaatctg ccttagaggg gagaggctct gtgctgaggc	2460

[0011]

CPCH0663261P. sequence listing

```

tctttgaatg ctttgaataa atagatcccc agataatgaa aagacttcaa aacaaattct 2520
acaagaaact gagtagtgtt tatagtgagg cectagtgtg catgcaaaaa acccccactg 2580
cccttgctta aatgtatctg attaacttga atacattttt aaatgagggc ttttttccc 2640
tctttcagtg tttcgccag tcatttgcga ctctcattc catcttagtt ctctgtaaag 2700
aaggtgccag agacctagg tgcccaaggc aattttgcat tttacaattc taagetttag 2760
aatgaagtea tcaatttget acatccggac tacagtgcga ttattccttt gccttctgtg 2820
aaattggagt gaaatctttc tagctgtcaa ttccaactca gttgcagtag tgttttgaag 2880
aattaatgga gataaggta gaaaatttta agtcaaacgt agggaaaaag taccagctag 2940
accatcataa gcatttgcct tgaagcatg ctctcaaatg gtgtttaacc tcaaataaca 3000
gtcacaataa tggttattat gaatgtatgc acagattttt atgtttctaa ttttaagaag 3060
ttctaggtag ctccctgtaa cgatttaggg aatctctaga ttctgatata ctgcaagtct 3120
tttaattgta ggaatcacat tgaattaatt ttgtaggccc agggcctaaa tttagtaggt 3180
gttcagtacc tattggcacc aattcatatg taggtttaaa atactgtatg aagatacaga 3240
atcaccacca tcaaatcaaa ttgaaatatg taacaggcta gtataatatt aacatctgac 3300
tttaaacac aacaaagaaa ccaaatgagt aactcctccc ttcaactaa tagtcagttt 3360
cttccaacte agtctcttct tctctcagg aagaatgct atctaaaaat tcccattgc 3420
agactgctgg aaacaacatt ctaaactatt tatgctctg caataacctt tccaatttgc 3480
tggaccagtg caagattaaa cagcagatat ctcaagtctc aatgtaaagg aacaccacga 3540
cagcctggac tgtgggtgaa gtctattctt ccccagcaga ctctgctttt cattctcggg 3600
gttgggtgtg ccccaaacag aggtaccgac ggtaacgaag cccaagaatg ttcaaccaca 3660
acctgtctgt gaagggtgtg gatgacgttt gccattcagg tgaagattat ttatgttcca 3720
gtcccacctg agtagcaaa gaaacactgt gctgaatgct cagaagatg ttaatgaacc 3780
gtgctggaca gagcagagct gaaaggcgcc ttgcgagtgt cgtagtgaga atgtggctgt 3840
cccagctgca aagccctgtt aggaggcatg aggaagcact tgctgcccta agaaacgatg 3900
cttcgacat ttcaaaaaga tctatgttgc tgtctgaaac aatgcggaga gcagatagac 3960
gcaatatttg ggaaccaaag agtgactgct gttggcgttg catcataaca taagcgcttt 4020
ccccctctc gtcactatca ttgtatcaa ccaacgaact gatctctggt atctctgaag 4080
gaatgctgtg gggatattct tcactctgt tcattgtaca tcagcaattt gtggggaaaa 4140
gatggactat ataacacaat gatctgccta aaagaaactg tcctactta taggggctg 4200
agcaaacctt agagcatctg cggatgctcg tcattatctt caaaagtccc caagagtttt 4260
tctccatact ttattattgc tttttgttt aggetagaaa aaaaaaaaaa tcataaaatt 4320
gtcttcaaac caaaccaaag gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4359

```

<210> 26
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 26

[0012]

	CPCH0663261P. sequence listing	
gcaaagaaga gaatcctgaa cttgcaccc		30
<210> 27		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 引物		
<400> 27		
ttagtcaggt atttaataac taggaattg		29

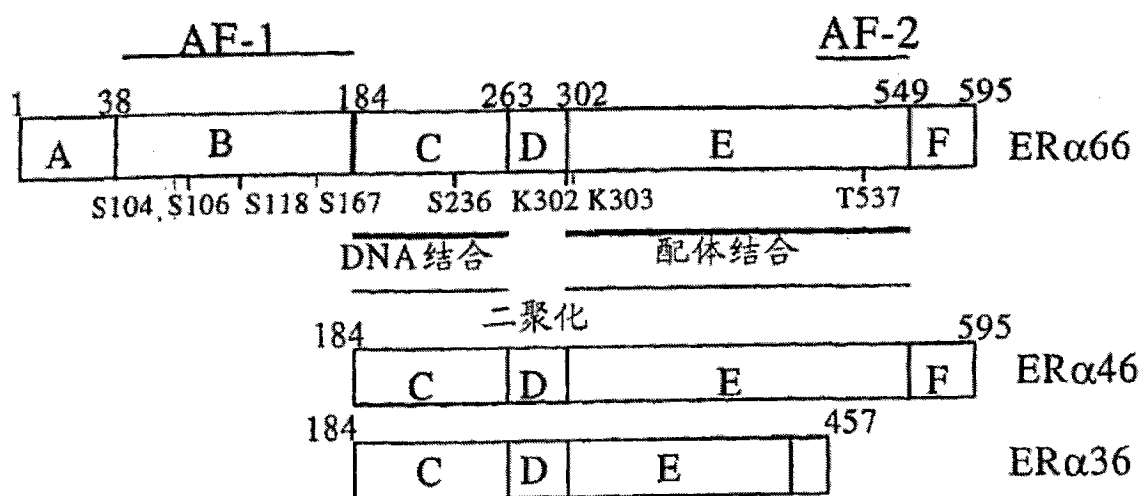


图 1

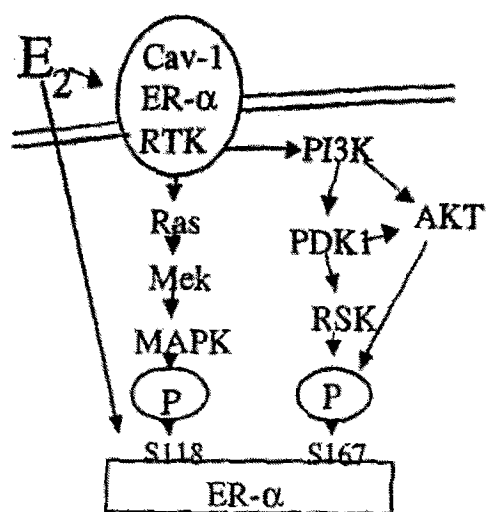


图 2

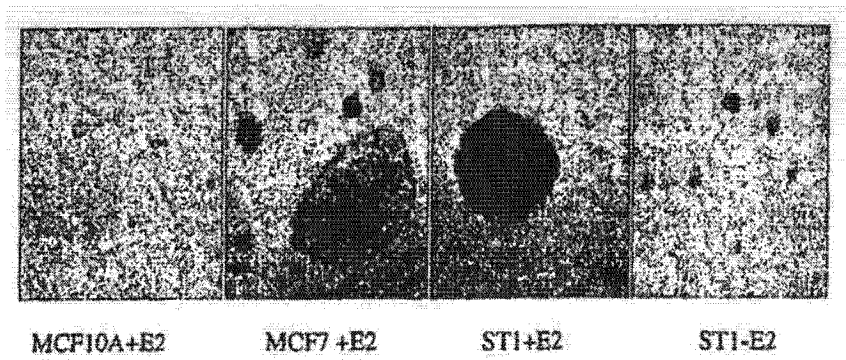


图 3



图 4

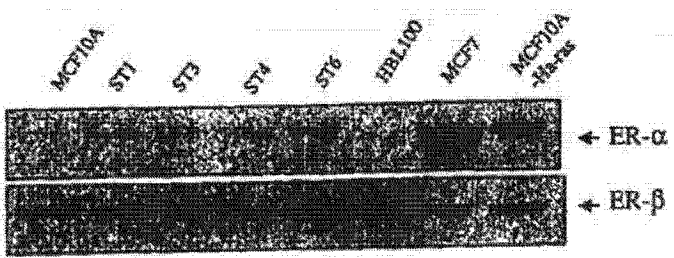


图 5

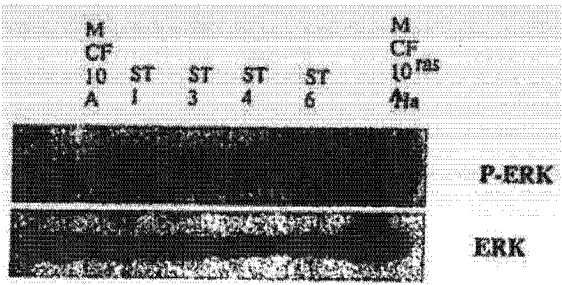


图 6

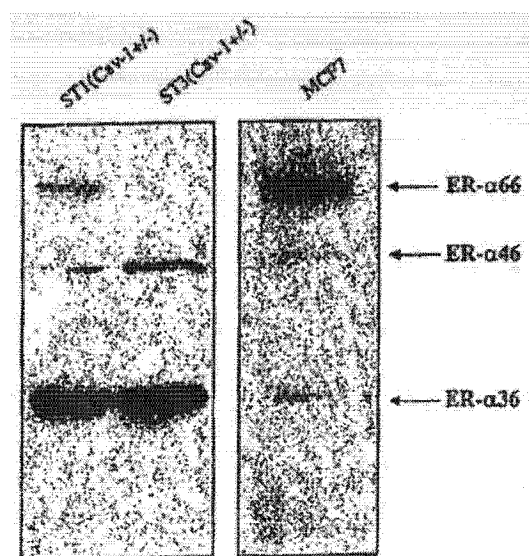


图 7

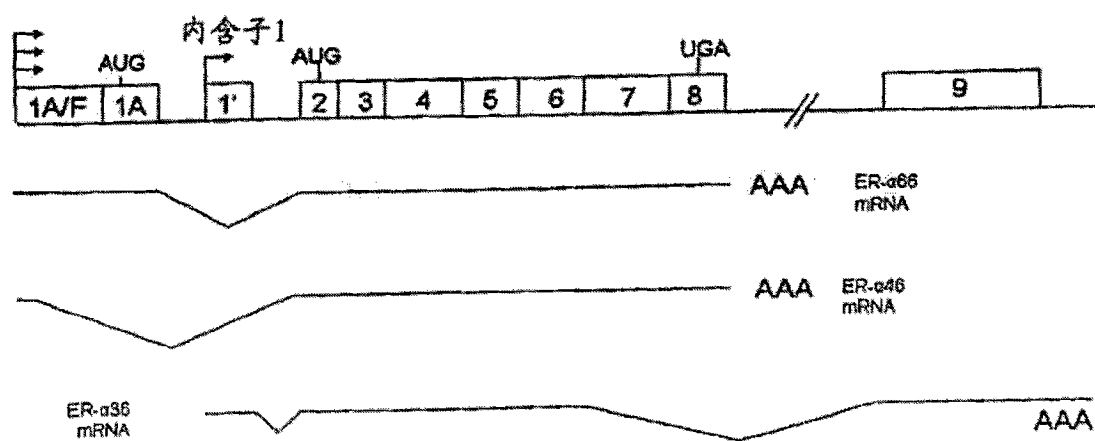


图 8

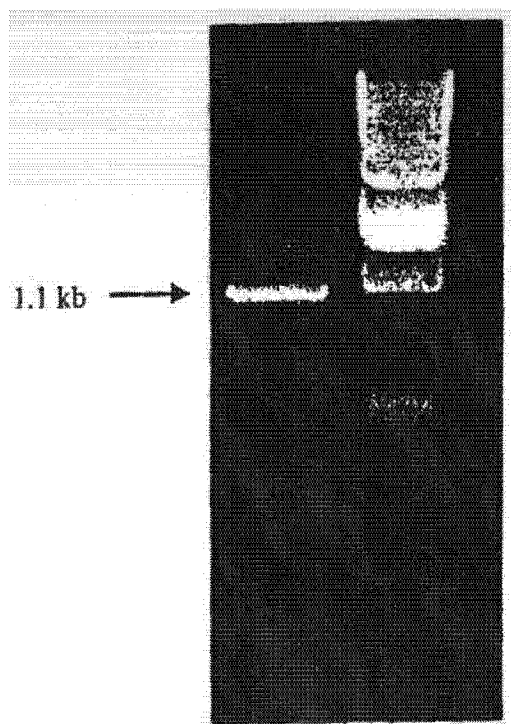


图 9

1 MAMESAKETRYCAVCNDYASGYHYGVWSCGCKAFFKRSIQGHNDYMCPATNQCTIDKNR
 61 RKSCQACRLRKCYEVGMMKGGIRKDRRGGRMLKHKRQRDDGEGRGEVGSAGDMRAANLV
 121 PSPLMIKRSKKNSLALSLTADQMVSALLDAEPPILYSEYDPTTRPFSEASMMGLLTNLADRE
 181 LVHMINWAKRVPGFVDLTLDQVHLLCAWLEILMIGLVWRSMEHPGKLLFAPNLLDRN
 241 QGKCVEGMVEIFDMLLATSSRFRMMNMQGEEFVCLKSILLNSGISHVEAKKRILNLHPK
 301 IFGNKWFPRV

图 10

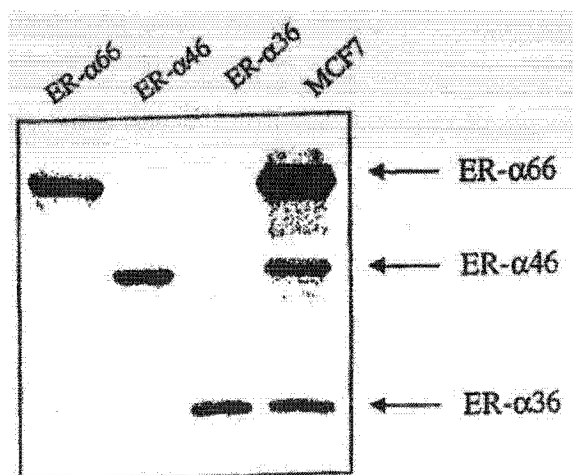


图 11

GGTACCCGCGCCCGCGCCGCGCCGTCGGGGTGGCCGCGCGCCCGGCAGGAGGGAGGGAGGG
 AGGGAGGGAGAGGGAGAGCCTAGGGAGCTGCGGGAGCCGCGGGACGCGCGACCCGAGGGT
 GCGCGCAGGGAGCCCGGGGCGCGCGCCAGCCCGGGGGTTCTGCGTGCAGCCCGCGCTGC
 GTTCAGAGTCAAGTTCTCTCGCCGGCAGCTGAAAAAACGTACTCTCCACCCACTTACCGTCCG
 TGCGAGAGGCAGACCCGAAAGCCCGGGCTTCTAACAACACACGTTGGAAAACAGACAAAG
 CAGCAGTTATTTGTGGGGGAAACACCTCCAGGCAAATAAACACGGGGCGCTTGAGTCACTTG
 GGAAGTCTCGCTCTTGGCATTAAAGTTGGGGGTGTTTGGAGTTAGCAGAGTCTAGCAGAGTTT
 TATTTATCCCTTTTAATGTTTTGTTAATGTGCTCCCAAAATTCCTTTCATCTAGACTATTTGATTG
 GAAATATGTCAGCTATGATGATGACTTTCTGGGAAGCGATTCTGTACCCCGCTTTCCCTCCTC
 CCCACCCACGTCCTGGGGCTTTAGAGAGCGATTGGGAGTTGAATGGGTCTGATTCGGAGTTA
 GCTGGCTGAGTCCGCGCTGGAGCGGATTGCTGGCATGTGACTTCTGACAGCCGGAAATTTGTAG
 GTGTCCCGCGAGTTTAAACAAGCCATATGGAAGCACAAAGTGCTTAAAAA

Sp1 AP-2 Krox-20 Sp1
 Sp1 Sp1 Ahr
 WT1
 YYY c-Fos
 NF-κB
 OR NF-κB GATA-1 AP-1 c-Jun AP-1 ER
 NF-κB
 TBP
 cDNA

图 12a

ctggtatctcacatgtagaagcaaagaagagaatcctgaactgcatcctaaaatatttgaaacaagtggltccctcgt
gtctaaagccctcggcataagggcctcacagtatcctgcagaicacaaatccgigtgtggacgtggggacatttggtt
tgaggcagttacatgacctgggcaagtggallggctctcctggccttcagttttcatttgcaatgaltcaatgggtt
gccttaagtgcttaagaaggataggatagctaccacaaactttggatcaaattttcttcaaaacatccttcccctga
ctttaaataatgcccctggcaaccaacacacacacccgtagctagatgagttataacagagtgactgaagagagctccca
caattccctagttattaaatacctgactaattttcattaggagacatttaagaactttagtgatgggaagatttacatata
taattgatagiacaatctgacagagcigaatagctcctgtttgtcaactgttaattccttggcaattagggtcaagat
caagatcaaaaacagggtgcccattgacctgttcacacctgagaaaaatggcaaccattgaatcataaatcatgacag
ccaaaataatttaggatattatgcacccctcatcttgcagtgagaaaaactgaaggccagagagactaatttacttg
ccatttttgataaaaatgtcaccaattacagaatgtggactcctatgttgagtgctgtgaaggacatggcacattta
cagcatcagagcattttttaaaaatttaattgtgcatgacttctaattgctgaagaacgccaagctaggaagaagta
tgggctgagatggggacagagagaacacacaatttcagtgactgtccgtgcagctggctgcccctgaaaataccgaac
tatccactgggaaaaatgctgtcccctggggtaattaccagagttcaacatgcccacagctgcccctcatctcaggggg
aacttgcttagcgtatttagtatcaagaagctaattgggtccaggggaaagggtatttttaatttagctactgtgcta
aaaatcacctaagtttctagagcttgggaaattcataagggaagaacaaaggcaacttgtagtaccactgggtca
ttctcctcgtgctttattacatacatggatgccagtttagattgtgtttataggaataattaaatgtgtgagccctct
taaggaaatcatcaatacagatatacagatagttctgtccagcaaaaaacgtgcttatttgctacnaagtaatttta
tttattttctcacttcccctcactccttcaaatctcaggtaaatagctgccaggagtgcttcactctgtcccaaaa
tacctagacaattgcgggataaggagaatggcaggggaggtagtggtctaaaatcacaccttcaaaagaaagtgtgta
ggacacacaattgtgagaagctgaatgccatgcacatagggtatgactcactttgaaaattgtttataatcaaggaaat
gaaaatgagtttaattcgtgcatgcatcatttaagccaaatgagaagaacttcaatttatttggttacttttcggct
aacactggcagtagtaacagatttttgcagaaacatctagattgtccgtgatcttgatcctgcccattatgtgctt
gtcttgaaacccagtggttccctggatataatgggtcaggagacaagtttcagaatcaagttaggaccacaggtctctt
tttccaaacaaacattcttgctaatcctaaactacctgaggcagcctgttggtggcctcagctctaaaaccattgtta
aaggcttctacccatcaatggcccctcagcagagtggtacgggttaacggggtagggctggagtcaggggagacctgggt
tcaaatcttcatctttacaccttaatccccagtgctctgtctataaattgggaatatagccatgtcatgggtactt
gtgaggggttaaatgaggttaaaacacatacaatgcttagcatgtatacaattaaagcactaaataattgaacacattaagt
actaaatgaatgtcagcagcttactattatctgtataatgatccaagggtgtgctcagctatacccttaggggttg
gctggaltcggcctttctctcgggaaaacatacctgatttataatagtgctttcaagcatgtataaatttctcaaac
tgccctgtcttggccttagaaacaccaggaaggccctacctcaaatagcaacagagaacacatcggagccctaccctaca
gctttccttggggcacgggtgagcaatctgccttagaggggagaggcctgtgtgctgaggtctttgaatgcttgaataa
atagatccccagataatgaaaagactcaaaacaaattctacaagaaactgagtaggtttatagtgaggcccttagtga
catgcaaaaaacccccactgcccctgcttaaatgtatctgalttaacttgaatacatttttaaalgagggtttttccc
ctttcagtggttggccagtcatttggcacttctcattccatcttagttctgttaaagaagggtccagagacctaaagg
tgcccaaggcaattttgcattttacaattctaagctttagaatgaagtcataatttctacatccggactacagtgcac
ttattccttggcctgttggaattggagtgaaactttctagctgtcaatttcaactcagtgtagtaggttttgaag
aattaatggcgataagggttagaaaaatttaagtcacacgtagggaagaaagtaccagctagaccatcataagcatitgctt
tgaaagcatgcttctaaagtgtgttaacctcaataacagtcacaaatattggttattatgaatgtatgcagattttt
atgtttctaatttaagaagtttagggagctccctgtaacgatttagggaaactcttagattctgatatactgcaagct
tttaalggttaggaatcacattgaattattttagggccagggtcctaaatttagtaggtgttcagtlacctattggcatc
aattcalatgtaggtttaaaatactgtatgaagatacagaatcaccacatcaaatcaaatgaaatgtacagggtta
gtataatattaacatctgactttaaacaacaacaaagaaacaaatgagtaactcctcccctcaactaataagtcagtt
cttccaactcagttcttctcctctcaggaagaatgcgtatctaaaaatttccattgcagactgttggaacaacatt
ctaaactattatgcttctgaataacctttccaatttgcgtggaccagtgcaagattaaacacgagatatctcaagctc

图 12b

```

aatgtaaaggaacaccacgacagcctggactgtgggtgaagttcattctccccagcagactctgcctttcattctcggg
gttgggtgtgccccaaacagaggtaccgacggtaacgaagcccaagaatgttcaaccacaacctgtctgtgaaggtgtt
gatgacgtttgccattcagggtgaagattatgttccagtcaccctgagtagcaaagtgaacactgtgctgaatgct
cagaaagatgitaatgaaccgtgctggacagagcagagctgaaaggcgccctgagtgctgtagtgagaatgtggctgt
cccagctgcaaagccctgttagggagcatgaggaagcacttgccttaagaaacgatgccttcgacatttcaaaga
tctatgtggctgtctgaacaatgcggagagcagatagacgaatatttgggaaccaagagtgaactgctgttggcgtt
catcataacataaagcgctttcccccttctcgtcactatcatttgtatcaaccaaagaactgatccttggtatcctcgaag
gaatgctgtggggatattcttcatctctgttcatggtacatcagcaatttggggaaaagatggactatataacacaat
gatctgcctaaaagaaactgtctctactatagggggctgagcaaaccttagagcatctgcggatgctcgtcattatctt
caaaagtcccaagagttttctccatactttattattgctattttgttttaggctagaaaaaaaaaaaaactcataaaatt
gtcttcaaaccaaccaaaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 12b

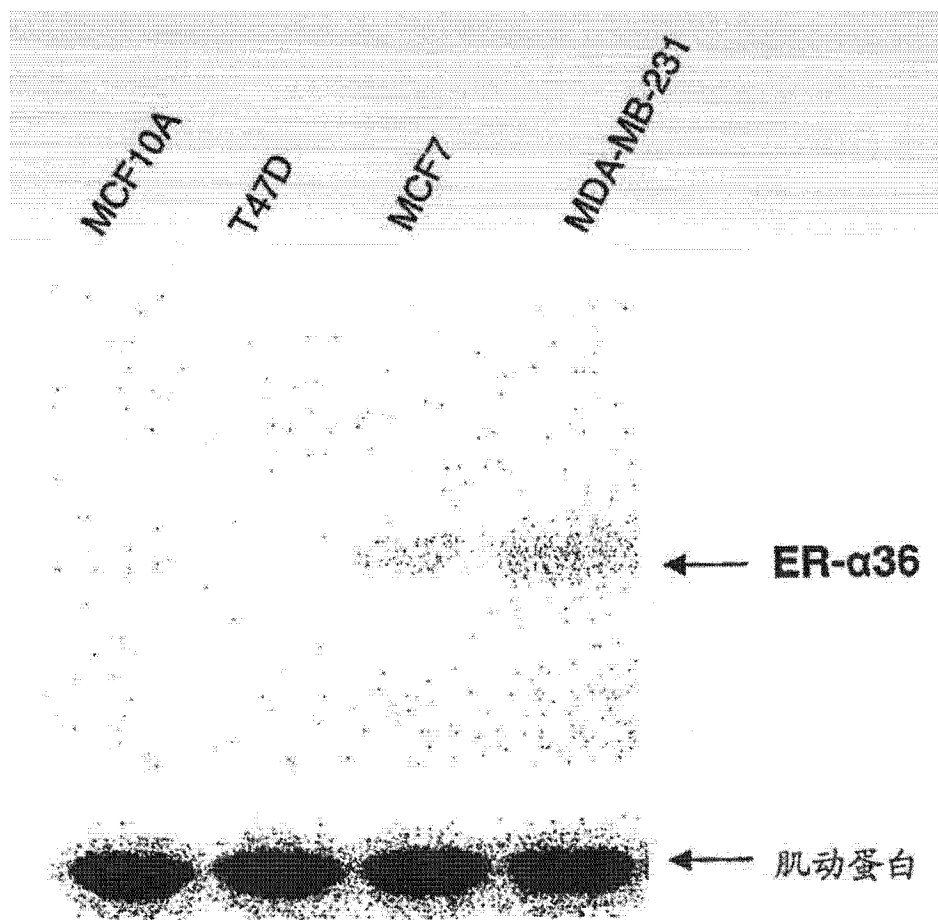


图 13

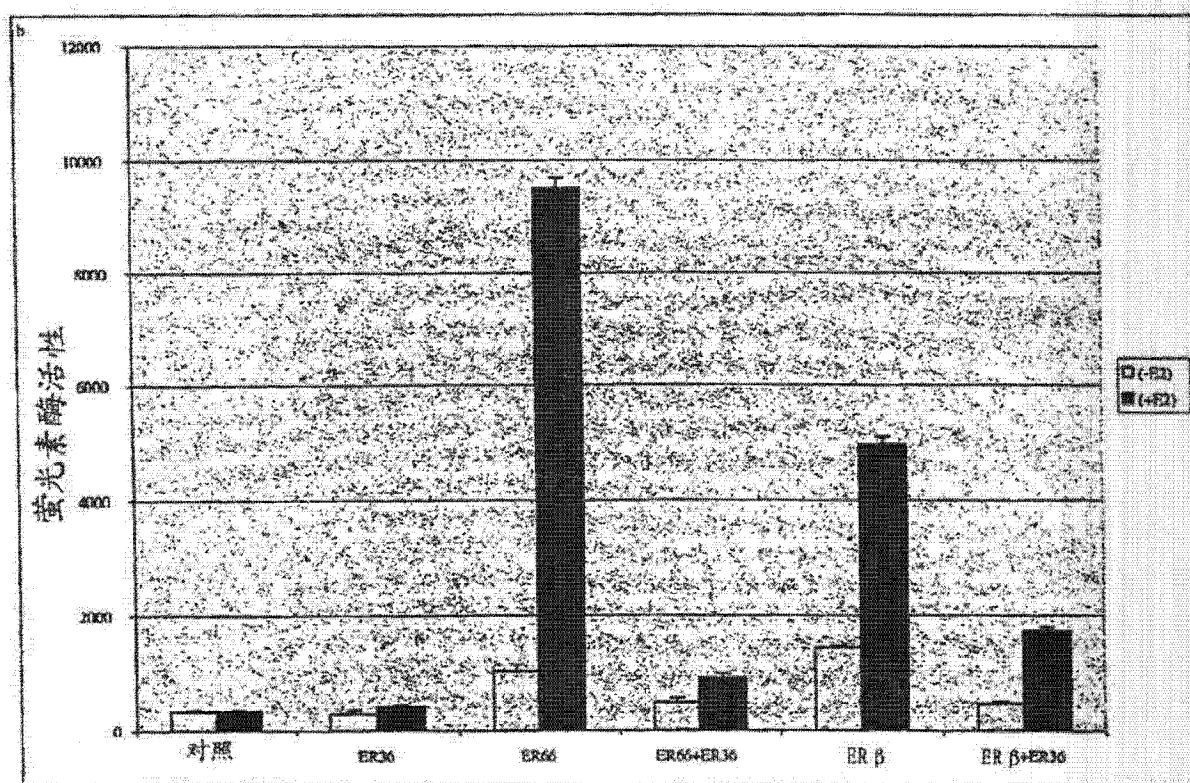


图 14

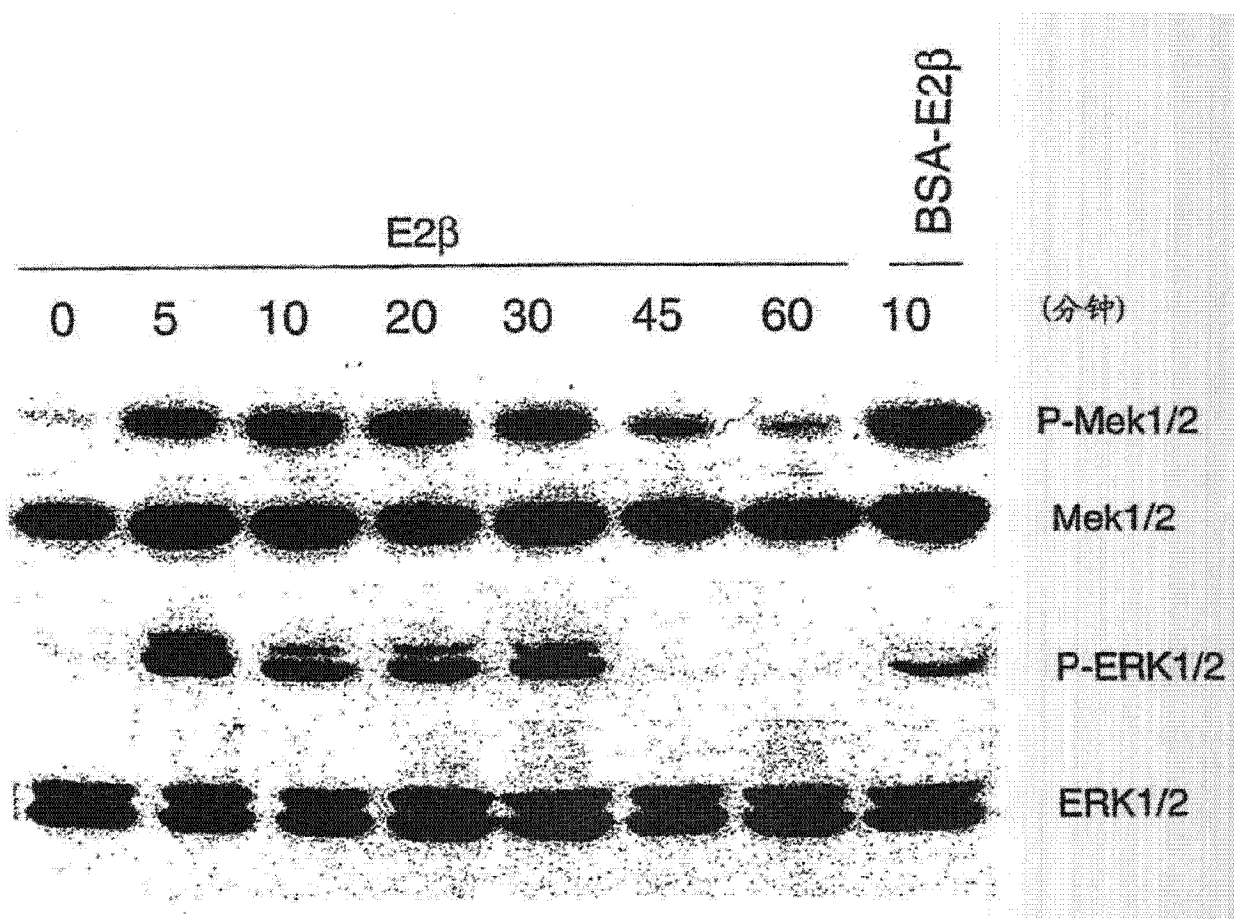


图 15a

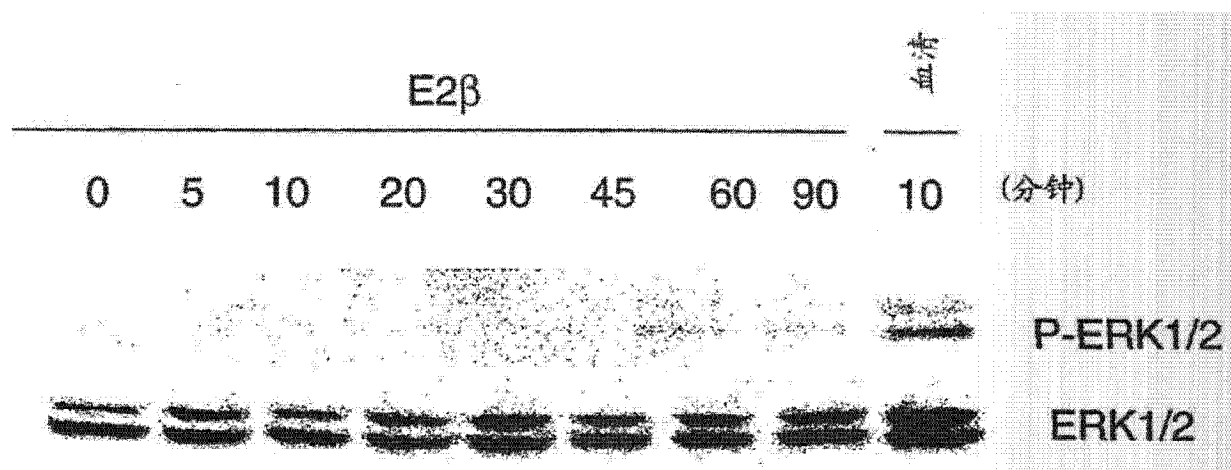


图 15b

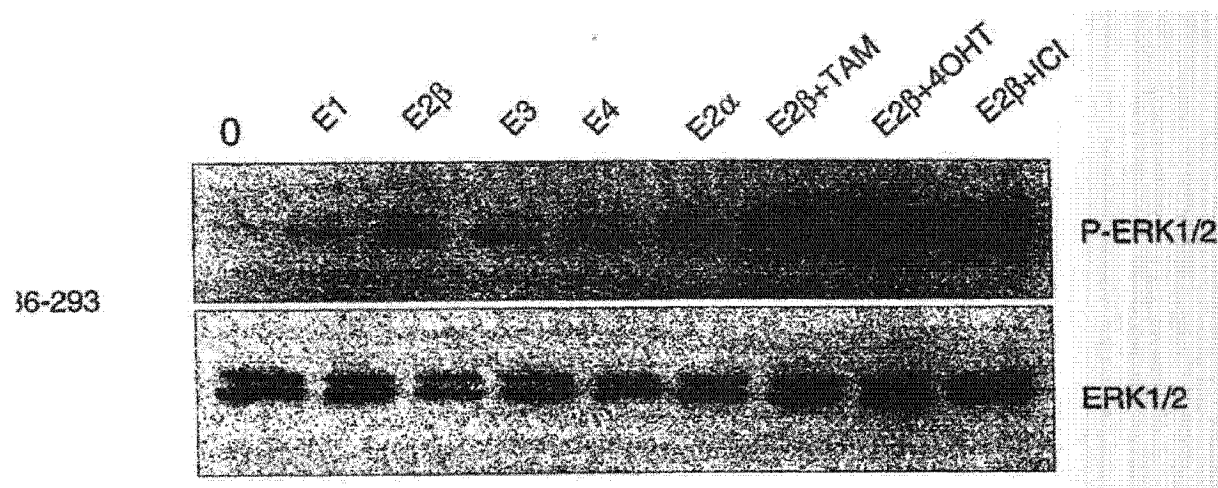


图 15c

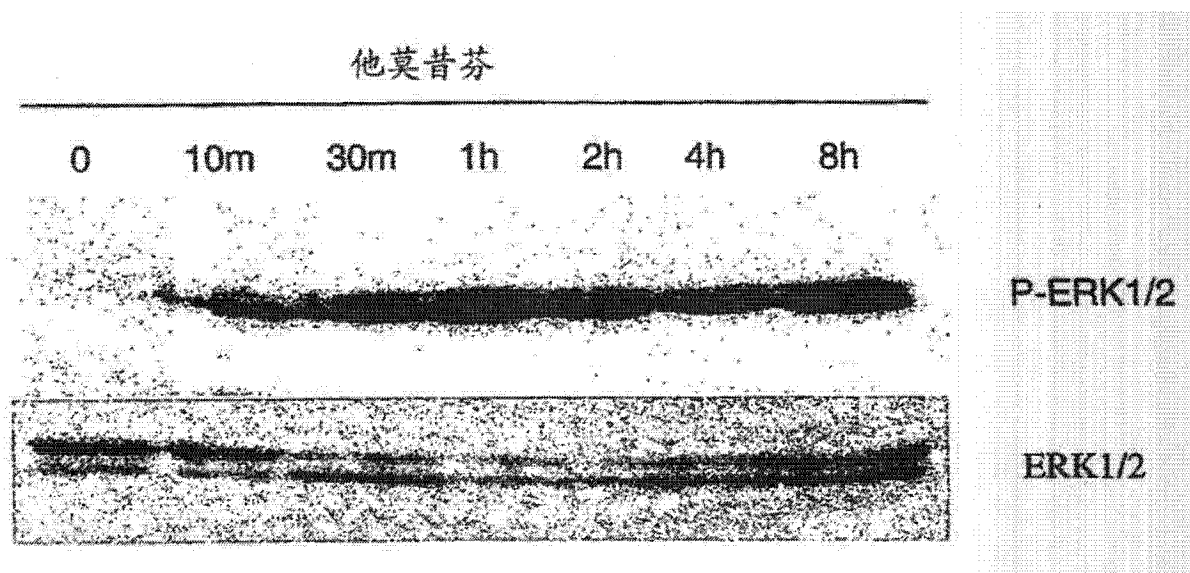
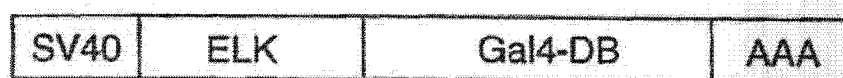


图 15d

表达载体:



报告质粒:

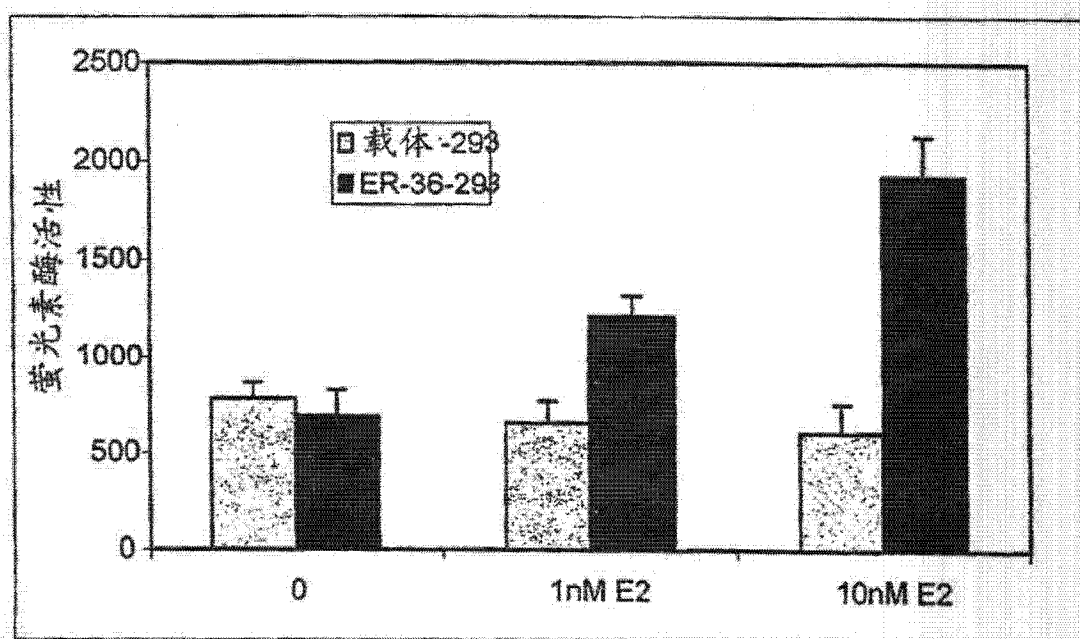


图 16a

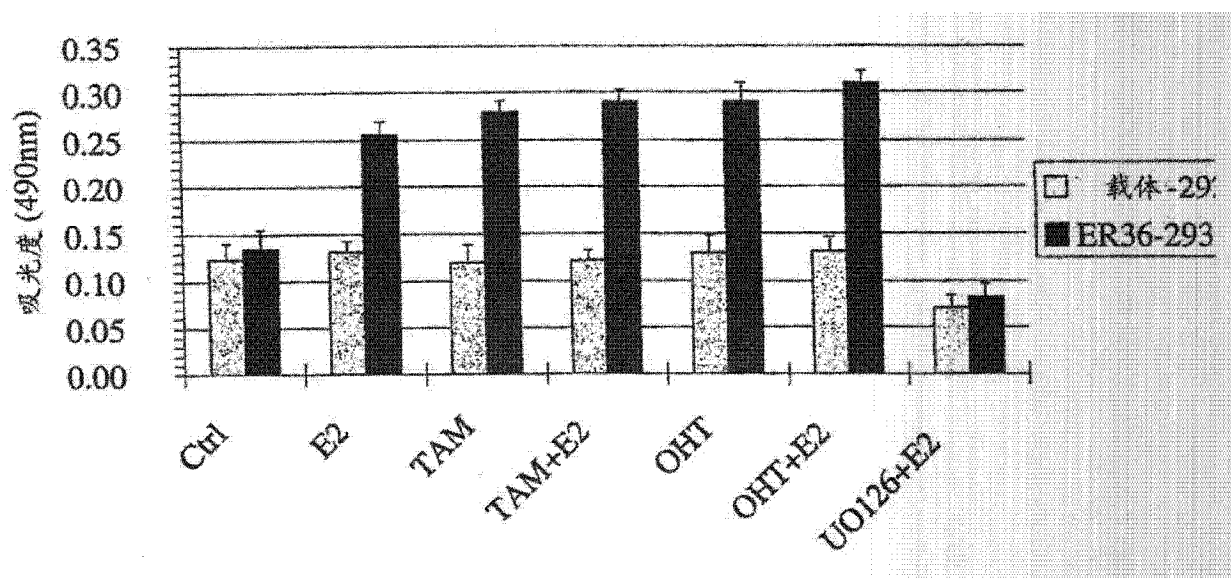


图 16b

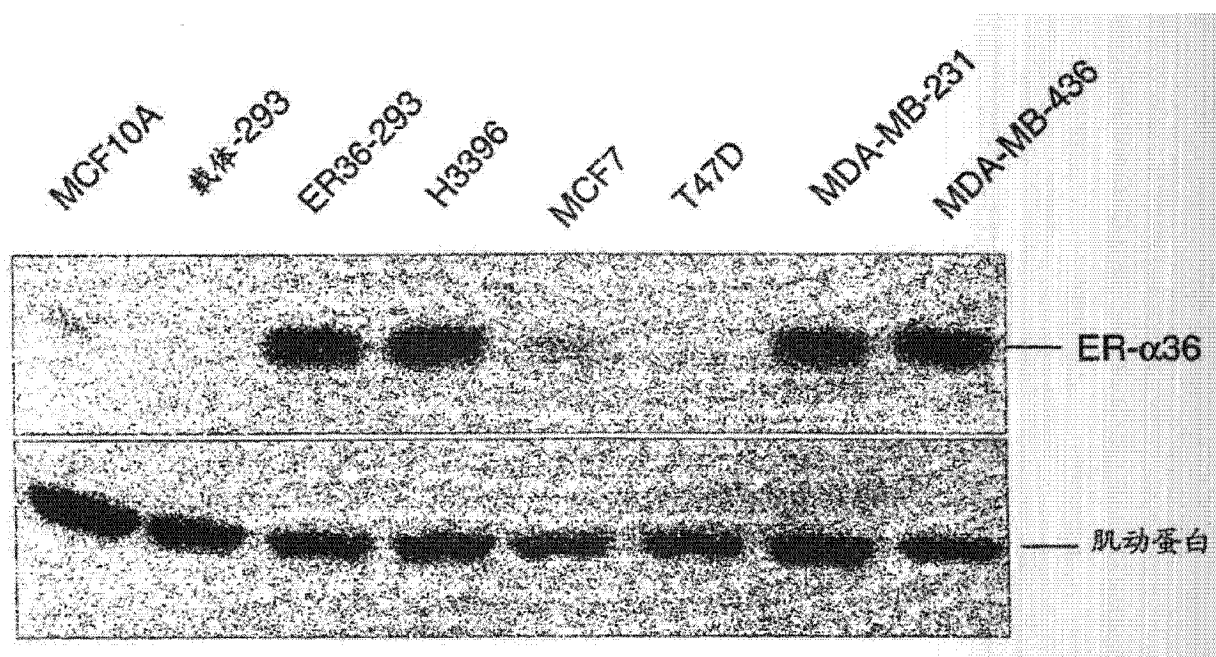


图 17a

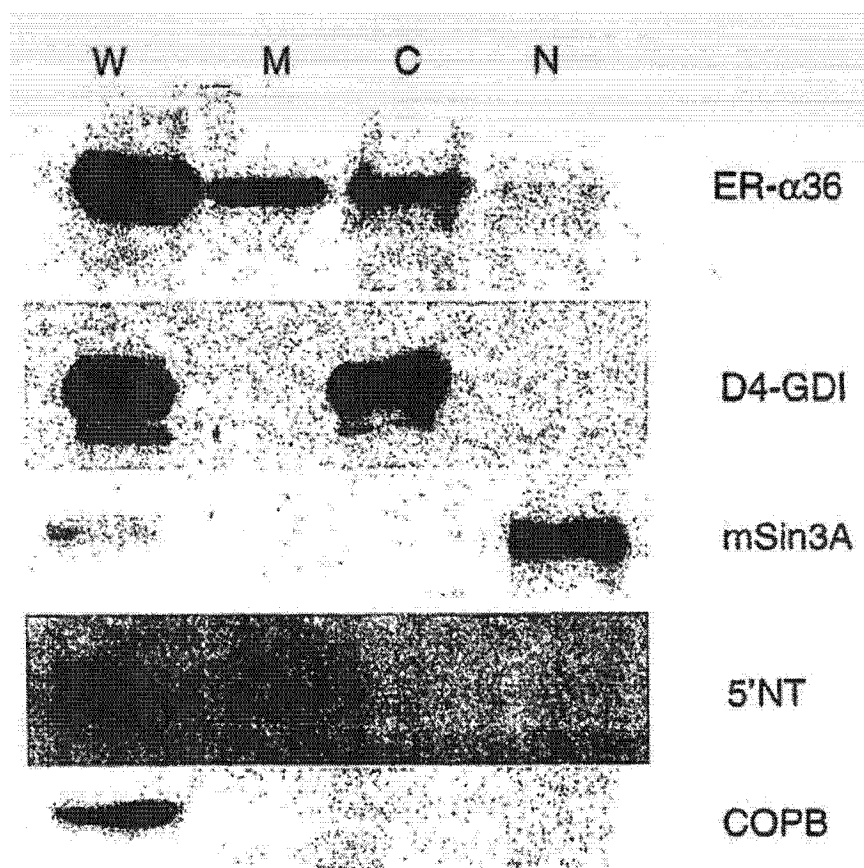


图 17b

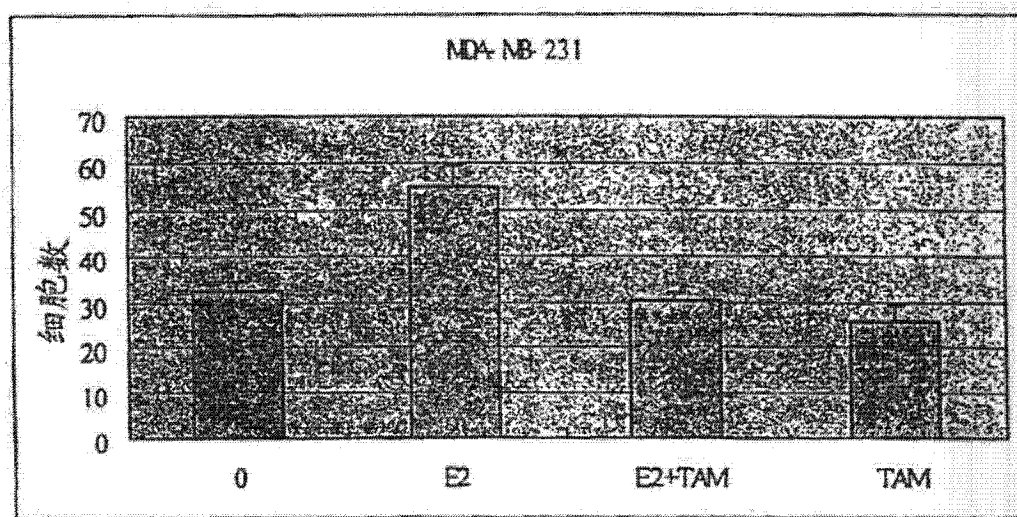


图 18

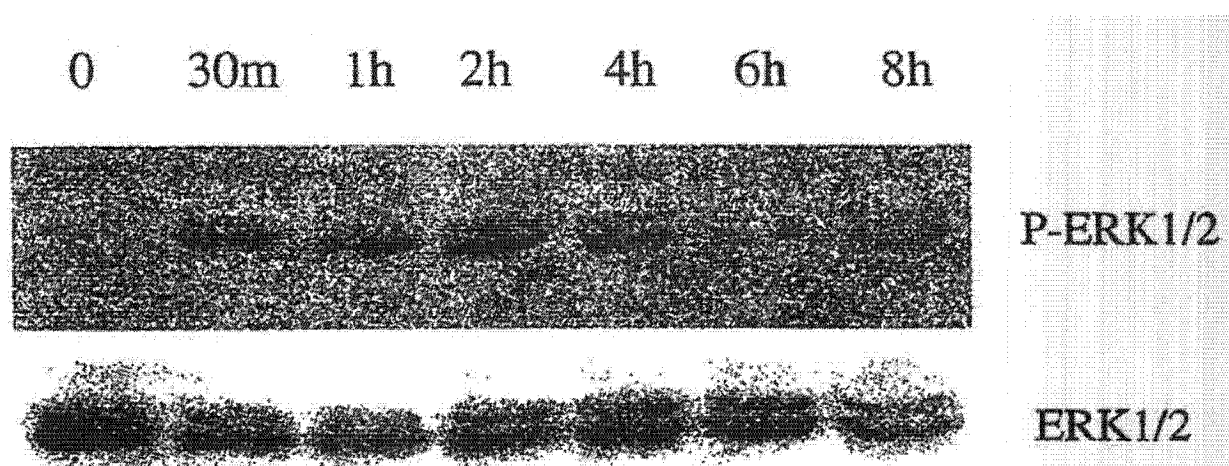


图 19

专利名称(译)	雌激素受体和使用方法		
公开(公告)号	CN102504025A	公开(公告)日	2012-06-20
申请号	CN201110351822.0	申请日	2005-03-10
申请(专利权)人(译)	克赖顿大学		
当前申请(专利权)人(译)	克赖顿大学		
[标]发明人	王兆一		
发明人	王兆一		
IPC分类号	C07K16/28 C07K14/705 C07K17/00 C12N5/10 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N15/12 C12Q1/68 A61K39/395 A61P35/00 G01N33/68 G01N33/53 C07K16/00		
CPC分类号	C07K14/721 G01N2500/04 G01N33/743 C07K16/2869 A61K38/00 A61K2039/505 A61K39/00 A61P15/00 A61P15/06 A61P15/12 A61P15/18 A61P19/10		
代理人(译)	杨颖 张一军		
优先权	60/552067 2004-03-10 US 60/643469 2005-01-13 US		
其他公开文献	CN102504025B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了分离的多肽，其氨基酸序列与SEQ ID NO：20具有至少70%同一性，其中该多肽具有ER-α36活性。本发明还提供了鉴别能结合这样的多肽的试剂的方法，检测这样的多肽的方法，和改变这样的多肽的活性的方法。还提供了能特异性地结合SEQ ID NO：1所述的氨基酸序列，或其免疫原性片段的抗体，和制备和使用这样的抗体的方法。

SEQ ID NO和描述	氨基酸和核苷酸序列
SEQ ID NO：18, ER-α66, 登记号 M12674, AAA52399	MTMTLHTKASGMALLHQIQGNELEPLNRPQLKIPLERPL GEVYLDSSKPAVINYPEGAAYEFNAAAAAQAQVYGGTGL PYGPGSEAAAFSGNGLGGFPPLNSVSPSPMLLHPPQQL SPFLQPHGQQVPYYLENEPSGYTVREAGPPAFYRPNNDN RRQGGRRERLASTNDKGSMMESAKETRYCAVCNDYASGY HYGVWSCGCKAFFKRSIQGHNDYMCPTNQCTIDKNRR KSCQACRLRKCCEVGMKGGIRKDRRGGRLKHKRQRDD GEGRGVGSAGDMRAANLWPSPLMIKRSKKNLALSLTA DQMVSALLDAEPPILYSEYDPTRPFSSEASMMGLLTNLAD RELVHMINWAKRVPGFVDLTLDQVHLLCAWLEILMIG LVWRSMHEHPVKLLFAPNLLDRNQKCEVGMVEIFDMLL ATSSRFMRMNLQGEFVCLKSIILLNSGVYTFLSSTLKS LEEKDHIHRVLDKITDTLIHLMAKAGLTQQQHQLAQL LLILSHIRHMSNKGMEHLYSMCKNVVPLYDLLEMLDA HRLHAPTSRGGASVEETDQSHLATAGTSSHSIQKYYIT GEAEGFPATV