

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02810014. X

C12Q 1/00

G01N 33/53

G01N 33/574

A61K 49/00

A61K 39/00

A01N 61/00

[43] 公开日 2005 年 4 月 27 日

[11] 公开号 CN 1610751A

[22] 申请日 2002. 3. 19 [21] 申请号 02810014. X

[30] 优先权

[32] 2001. 3. 20 [33] US [31] 60/277,252

[86] 国际申请 PCT/US2002/008383 2002. 3. 19

[87] 国际公布 WO2002/074924 英 2002. 9. 26

[85] 进入国家阶段日期 2003. 11. 17

[71] 申请人 奥索·麦克尼尔药品公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 J·M·卡顿 M·R·德安德雷

D·J·厄林格

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 徐雁漪

权利要求书 5 页 说明书 38 页 附图 17 页

[54] 发明名称 用于测量哺乳动物组织丝氨酸棕榈酰转移酶的方法及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种用于比较性测量哺乳动物组织中正常与过度增殖性丝氨酸棕榈酰转移酶表达水平的方法及其应用。

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

1. 一种用于测量哺乳动物细胞丝氨酸棕榈酰转移酶表达水平的方法，所述方法包括：

5 (a) 使丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物与一种哺乳动物细胞接触，形成大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物；

(b) 通过检测存在的所述复合物，测量由所述细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平。

10 2. 一种用于测量哺乳动物细胞丝氨酸棕榈酰转移酶表达的方法，所述方法包括：

(a) 使丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物与以基础水平表达丝氨酸棕榈酰转移酶的第一种哺乳动物细胞接触，形成第一种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物；

15 (b) 使丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物与过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的第二种哺乳动物细胞接触，形成第二种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物；

(c) 通过检测存在的所述第一种和第二种大量复合物，测定所述第一种和第二种细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平；

20 (d) 测量所述第一种和第二种细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平差异。

3. 一种用于组织体内成象的方法，所述方法包括：

(a) 给予哺乳动物一种丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物，其中所述化合物包含一个可检测标记，并且其中所述化合物与过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞结合；

25 (b) 通过对所述可检测标记成象，确定在哺乳动物组织内的细胞定位。

4. 权利要求2的方法，所述方法还包括下述步骤：应用所测得的所述第一种和第二种细胞表达丝氨酸棕榈酰转移酶的水平差异检测、

诊断癌症，诊断癌症的转移潜力，监测癌症的预后和进程，或者监测癌症治疗的治疗功效。

5 5. 权利要求4的方法，其中所述癌症选自乳腺癌、结肠癌、类癌、胃癌、神经胶质瘤、肝细胞瘤、平滑肌肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、未分化癌和白血病。

10 6. 权利要求2的方法，所述方法还包括下述步骤：应用所测得的所述第一种和第二种细胞表达丝氨酸棕榈酰转移酶的水平差异检测或诊断是否存在血管损伤。

7. 权利要求6的方法，其中所述血管损伤为再狭窄。

8. 权利要求2的方法，所述方法还包括下述步骤：应用所测得的所述第一种和第二种细胞表达丝氨酸棕榈酰转移酶的水平差异检测或诊断是否存在炎症。

15 9. 权利要求8的方法，其中所述炎症为以下疾病的炎症：溃疡性结肠炎、炎性肠综合征、节段性回肠炎、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、中风或哮喘。

10. 一种用于筛选抑制丝氨酸棕榈酰转移酶的治疗上有效的化合物的方法，所述方法包括：

20 (a) 使丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物与过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的第一种哺乳动物细胞接触，形成第一种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物；

25 (b) 使一种潜在的丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂化合物与过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的第二种哺乳动物细胞接触，形成第二种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物；

(c) 通过检测存在的所述第一种和第二种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物，测定所述第一种和第二种细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平；

(d) 测量所述第一种和第二种细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平差异，以确定所述潜在抑制剂化合物是否抑制丝氨酸棕榈酰转移酶表达。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物选自与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的化合物、与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的单特异性抗体和与丝氨酸棕榈酰转移酶 mRNA 杂交的核酸。

12. 权利要求 2 的方法，其中所述丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物选自与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的化合物、与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的单特异性抗体和与丝氨酸棕榈酰转移酶 mRNA 杂交的核酸。

13. 权利要求 3 的方法，其中所述丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物选自与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的化合物、与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的单特异性抗体和与丝氨酸棕榈酰转移酶 mRNA 杂交的核酸。

14. 权利要求 10 的方法，其中所述丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物选自与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的化合物、与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的单特异性抗体和与丝氨酸棕榈酰转移酶 mRNA 杂交的核酸。

15. 权利要求 1 的方法，其中所述表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞选自肾上腺细胞、脑细胞、乳腺细胞、结肠细胞、上皮细胞、内皮细胞、心脏细胞、免疫细胞、肾细胞、肝细胞、肺细胞、卵巢细胞、胰腺细胞、前列腺细胞、皮肤细胞、脾细胞、胃细胞、睾丸细胞、甲状腺细胞、子宫细胞和血管细胞。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述上皮细胞选自内皮细胞、非神经胶质神经元细胞、结肠细胞、乳腺细胞、肾近端小管细胞、前列腺平滑肌细胞、子宫平滑肌细胞和睾丸平滑肌细胞。

17. 权利要求 15 的方法，其中所述免疫细胞选自多形核白细胞、单核细胞、巨噬细胞、上皮样细胞、巨细胞、小神经胶质细胞、枯否氏细胞和肺泡巨噬细胞。

18. 权利要求 2 的方法，其中所述以基础水平表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞选自肾上腺细胞、脑细胞、乳腺细胞、结肠细

胞、上皮细胞、内皮细胞、心脏细胞、免疫细胞、肾细胞、肝细胞、肺细胞、卵巢细胞、胰腺细胞、前列腺细胞、皮肤细胞、脾细胞、胃细胞、睾丸细胞、甲状腺细胞、子宫细胞和血管细胞。

19. 权利要求 2 的方法，其中所述过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞选自上皮细胞、内皮细胞、癌细胞、免疫细胞和肿瘤微环境内的细胞。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述癌细胞选自乳腺癌、结肠癌、类癌、胃癌、神经胶质瘤、肝细胞瘤、平滑肌肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、未分化癌和白血病。

21. 权利要求 19 的方法，其中所述上皮细胞选自内皮细胞、非神经胶质神经元细胞、结肠细胞、乳腺细胞、肾近端小管细胞、前列腺平滑肌细胞、子宫平滑肌细胞和睾丸平滑肌细胞。

22. 权利要求 19 的方法，其中所述免疫细胞选自多形核白细胞、单核细胞、巨噬细胞、上皮样细胞、巨细胞、小神经胶质细胞、枯否氏细胞和肺泡巨噬细胞。

23. 权利要求 19 的方法，其中所述肿瘤微环境内的细胞选自基质成纤维细胞、基质单核细胞和肌成纤维细胞。

24. 一种用于治疗其需要患者丝氨酸棕榈酰转移酶介导性疾病的方法，所述方法包括将治疗有效量的丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂化合物药用制剂给予所述患者；其中任选的是，所述丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂化合物具有细胞毒性。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂化合物是一种丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物。

26. 权利要求 24 的方法，其中所述丝氨酸棕榈酰转移酶介导性疾病选自癌症、炎症和血管损伤。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述癌症选自乳腺癌、结肠癌、类

癌瘤、胃癌、神经胶质瘤、肝细胞瘤、平滑肌肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、未分化癌和白血病。

- 5        28. 权利要求 26 的方法，其中所述炎症是以下疾病的炎症：溃疡性结肠炎、炎性肠综合征、节段性回肠炎、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、中风或哮喘。

29. 权利要求 26 的方法，其中所述血管损伤是再狭窄性血管损伤。

- 10       30. 权利要求 25 的方法，其中所述丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物选自任选用细胞毒性剂标记的单特异性抗体和与丝氨酸棕榈酰转移酶 mRNA 任选杂交的核酸。

31. 权利要求 24 的方法，其中将所述药用制剂涂被在气囊导管或支架上并且以时间依赖性方式释放。

## 用于测量哺乳动物组织丝氨酸棕榈酰转移酶的方法及其应用

5

### 相关申请的交叉引用

本发明要求于 2001 年 3 月 20 日申请的美国临时申请顺序号 60/277,252 的权益，所述临时申请通过引用结合到本文中。

### 发明领域

10

本发明提供一种用于测量哺乳动物细胞中丝氨酸棕榈酰转移酶表达水平的方法及其应用。更具体地讲，本发明提供一种用于比较性测量正常哺乳动物细胞和过度增殖性哺乳动物细胞中丝氨酸棕榈酰转移酶表达水平的方法及其应用。

15

### 发明背景

膜脂组成是不同膜高度特异性的并且取决于细胞的生理状态，因此对了解这些现象的调节是重要的 (Merrill, A.H., Jr., Characterization of serine palmitoyltransferase activity in Chinese hamster ovary cells (中国仓鼠卵巢细胞中丝氨酸棕榈酰转移酶活性的表征), *Biochimica et Biophysica Acta*, **1983**; 754, 284-91)。鞘脂是真核细胞膜而不是原核细胞膜的遍在组分。除给细胞和细胞器膜提供结构完整性之外，越来越多的证据证明鞘脂参与调节各种细胞功能。鞘脂代谢中间体例如鞘氨醇、鞘氨醇-1-磷酸(S-1-P)和神经酰胺参与调节细胞生长和分化、衰老性细胞周期和增殖性细胞凋亡(D.K. Perry, J. Carton, A.K. Shah, F. Meredith, D.J. Uhlinger 和 Y.A. Hannun, Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis (丝氨酸棕榈酰转移酶在依托泊苷诱导的细胞凋亡期间调节从头神经酰胺的产生), *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 9078-

84)。其它信号转导功能包括抑制细胞内的 DAG/PKC 途径、Ca<sup>2+</sup>活化化和 K<sup>+</sup>流入。鞘脂的这些功能和其它功能着重指出鞘脂代谢在生理上重要的现象例如肿瘤抑制、组织发育、损伤和萎缩中的潜在重要性(有关综述参见 Y.A. Hannun, Sphingolipid second messengers: Tumor suppressor lipids: Eicosanoids and Other Bioactive Lipids (鞘脂第二信使: 肿瘤抑制脂质: 类花生酸和其它生物活性脂质), *Cancer, Inflammation and Radiation Injury* 1997, 2; 305-312)。

调节鞘脂代谢的酶在保持细胞稳态方面是关键性的, 并且其活性的破坏可以引起疾病。由于污染串珠镰孢菌素真菌毒素而抑制神经酰胺合酶的动物饲料, 引起马脑白质软化和猪肺水肿。通过 HDL 降低 TNF- $\alpha$ 诱导的内皮细胞中的 S-1-P 产生降低粘着蛋白的表达, 因此增加抵抗动脉粥样硬化的保护作用。因此, 调节鞘脂代谢的酶是控制细胞现象的鞘脂介导的调节中的关键因子。

各种鞘脂的骨架从长链碱基二氢鞘氨醇、鞘氨醇产生, 而在酵母中从植物二氢鞘氨醇产生。长链碱基合成的第一个独特关键反应涉及通过丝氨酸棕榈酰转移酶(SPT; 棕榈酰辅酶 A; L-丝氨酸 C-棕榈酰转移酶(脱羧作用))使 L-丝氨酸与脂肪酸酰基辅酶 A 的缩合, 产生 3-酮二氢鞘氨醇(Merrill, 1983)。微粒体膜内在蛋白 SPT 由至少两种亚基 SPT1 和 SPT2 组成。SPT 的催化亚基被认为是 SPT2, 而调节活性被认为是 SPT1 亚基。在酵母中, LCB 活性既需要 LCB1 亚基又需要 LCB2 亚基, 而 Tsc3p 对最佳 LCB 功能是必不可少的。

由于 SPT 是从头鞘脂生物合成中的关键性调节酶, 因此预期 SPT 活性的改变将会影响细胞功能的鞘脂介导的调节。在酵母中, SPT 与热和高渗应激反应有关。培养的人角质细胞, 当用 UV 照射时, 正调节 SPT 活性并且显示 SPT2 mRNA 和蛋白质水平相应增加。SPT 活性在细胞凋亡期间增加并且在用化疗药依托泊苷处理的细胞中控制从头神经酰胺合成(Perry, 2000)。用多球壳菌素抑制 SPT 活性在猪肾细胞 LLCK-1 中逆转神经酰胺合酶抑制剂串珠镰孢菌素的细胞凋亡

和抗增殖作用。

最近, SPT 表达与病理生理病症密切相关。诸如血管成形术的手术导致血管损伤, 并且起始对该损伤的应答—统称为再狭窄的事件的级联。据报道气囊损伤性大鼠颈动脉增生性血管平滑肌细胞和成纤维细胞中 SPT1 和 SPT2 两者的表达均增加 (D.J. Uhlinger, J.M. Carton, D.C. Argentieri, B.P. Damiano 和 M.R.D'Andrea, Increased Expression of Serine Palmitoyltransferase (SPT) in Balloon-injured Rat Carotid Artery (气囊损伤性大鼠颈动脉中丝氨酸棕榈酰转移酶(SPT)的表达增加), *Thromb. Haem.*, 2001, 86, 1320-6)。

脂质代谢途径的变化属于正常细胞去分化重要过程。所进行的研究已经表明, 与正常肝细胞相比, 在肝细胞瘤的细胞膜中存在较高百分比的鞘脂(Williams RD, Nixon DW, Merrill AH, Jr., Comparison of serine palmitoyltransferase in Morris hepatoma 7777 and rat liver (丝氨酸棕榈酰转移酶在 Morris 肝细胞瘤 7777 和大鼠肝脏中的比较), *Cancer Research*, 1984, 44(5), 1918-23)。

本发明的方法证明, SPT 在某些肿瘤中恶性肿瘤细胞周围在培养的增殖性成纤维细胞和宿主“反应性”基质成纤维细胞中是高丰度表达的, 这一现象在正常组织的周围基质成纤维细胞没有观察到。在许多侵袭性癌中见到突出的基质反应(结缔组织生成), 提示基质细胞在癌症发病机理方面起作用(M. Gregoire, B. Lieubeau, The role of fibroblasts in tumor behavior (成纤维细胞在肿瘤行为中的作用), *Cancer Metastasis Rev.*, 1995, 14(4), 339-50)。反应性成纤维细胞, 也被称为肌成纤维细胞, 通常与起源上皮的不同癌症相关并且影响癌细胞的侵入和转移潜力(M. Gregoire, 1995)。本发明的方法还证明, SPT 亚基在若干已建立的人类肿瘤细胞系和原位人类恶性肿瘤细胞中高度表达。另外, 观察到在增殖性成纤维细胞和恶性肿瘤细胞中的 SPT 亚细胞定位变化。

目前, 核脂质代谢在信号转导级联中的作用变得显而易见。已

经表明二酰甘油激酶——一种参与磷脂代谢的酶定位于细胞核并且参与核信号转导。也已经表明鞘氨醇激酶(SPHK)在促细胞分裂刺激 24 小时内定位于 3T3 细胞的细胞核,并且在所述处理后核 SPHK 活性增加(Kleuser B., Maceyka M., Milstien S.和 Spiegel S., Stimulation of  
5 nuclear sphingosine kinase activity by platelet-derived growth factor (用血小板衍生生长因子刺激核鞘氨醇激酶活性), *FEBS Lett.*, 2001, 503(1), 85-90)。已经表明鞘脂代谢物存在于核制备物中并且在其中有活性,支持鞘脂在介导细胞核内的细胞活性中起调节作用的构思。我们的研究工作证明了 SPT 在增殖性成纤维细胞和恶性肿瘤细胞中的核相关  
10 性。这代表参与刺激时与细胞核相关的鞘脂代谢的第二种酶。这些数据表明,鞘脂作为除先前报道的、在胞质信号级联中的活性之外在细胞核内作为信号分子以及作为胞间信号分子的作用。

由于 SPT 活性随细胞生理状态的变化而改变,因此必须测定该酶在正常组织中的基础水平。SPT1 亚基和 SPT2 亚基的分布可以用作细胞活性的潜在标记,其中高水平的所述酶可以反映出代谢活性(例如嗜中性粒细胞和/或巨噬细胞浸润、神经元传递、胞吐作用)或细胞  
15 增殖增加。在正常组织和细胞类型中测定的 SPT1 和 SPT2 水平可以随后用来分析异常状态下的细胞类型。病理生理状态下例如癌症、炎症(例如溃疡性结肠炎、炎性肠综合征、节段性回肠炎、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、中风、哮喘)和血管损伤(例如再狭窄) SPT 表达增加的相关性,使其为激发性治疗靶。因此, SPT 的调节可以广泛涉及细胞反应和病理学,因为其作为催化鞘脂代谢级联的关键  
20 步骤和限速步骤的酶的突出位置所致。

美国专利 6,090,565 描述了一种鉴定特殊鞘糖脂种类(准确的说  
25 是选自 N-二十四酰(木素酰)-糖基神经酰胺、N-二十四酰(神经酰)-糖基神经酰胺、N-二十二酰-糖基神经酰胺和 N-亚麻酰-糖基神经酰胺的糖基神经酰胺)及其导致增强的抗肿瘤药化学敏感性降低的方法,所述鞘糖脂种类为某些类型的癌细胞(选自淋巴瘤、黑素瘤、肉

瘤、白血病、成视网膜细胞瘤、肝细胞瘤、骨髓瘤、神经胶质瘤、间皮瘤或癌)中多药耐药性的特征。鉴定方法包括色谱法;使癌细胞与在免疫学上与所述鞘糖脂种类的表位结合的抗体或含抗体组分的混合物接触;或者使癌细胞与与糖基神经酰胺有免疫反应的纯化抗体接触。

5 美国专利 6,190,894 描述了一种增强生理活性物质穿入用于经皮或透皮递药的方法和制剂,所述方法包括用上皮屏障破坏量的至少一种选自以下的药物破坏上皮屏障功能:神经酰胺合成抑制剂、葡糖基神经酰胺合成抑制剂、酰基神经酰胺合成抑制剂、鞘磷脂合成抑制剂、脂肪酸合成抑制剂、胆固醇合成抑制剂、磷脂和鞘糖脂(包括葡糖基神经酰胺、酰基神经酰胺和鞘磷脂)降解的抑制剂、游离脂肪酸、神经酰胺、酰基神经酰胺、葡糖基神经酰胺和鞘磷脂)降解酶的抑制剂或者游离脂肪酸、神经酰胺和胆固醇代谢酶的抑制剂和/或刺激剂。

15

### 发明概述

在一个实施方案中,本发明提供一种用于测量哺乳动物细胞丝氨酸棕榈酰转移酶表达水平的方法,所述方法包括:

20 (a) 使丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物与一种哺乳动物细胞接触,以形成大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物;且

(b) 通过检测存在的所述复合物,测量由所述细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平。

在第二个实施方案中,本发明提供一种用于测量哺乳动物细胞丝氨酸棕榈酰转移酶表达的方法,所述方法包括:

25 (a) 使丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物与以基础水平表达丝氨酸棕榈酰转移酶的第一种哺乳动物细胞接触,以形成第一种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物;

(b) 使丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物与过度增殖性地表达丝

氨酸棕榈酰转移酶的第二种哺乳动物细胞接触，以形成第二种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物；

(c) 通过检测所述第一种和第二种大量复合物的存在，测定由所述第一种和第二种细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平；且

5 (d) 测量所述第一种和第二种细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平差异。

所测得的所述第一种和第二种细胞表达丝氨酸棕榈酰转移酶的水平差异用来例如检测或诊断癌症、诊断癌症的转移潜力、监测癌症的预后和进程、或者监测癌症治疗的治疗功效。所述癌症包括但不限于乳腺癌、结肠癌、类癌瘤、胃癌、神经胶质瘤、肝细胞瘤、  
10 平滑肌肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、未分化癌和白血病。

所测得的所述第一种和第二种细胞表达丝氨酸棕榈酰转移酶的水平差异也可以用来检测或诊断包括但不限于再狭窄在内的血管损伤的存在。  
15

所测得的所述第一种和第二种细胞表达丝氨酸棕榈酰转移酶的水平差异还用来检测或诊断包括但不限于由以下疾病引起的炎症在内的炎症的存在：溃疡性结肠炎、炎性肠综合征、节段性回肠炎、  
20 类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、中风或哮喘。

在另一个实施方案中，本发明的方法提供一种用于对组织进行体内成象的方法，所述方法包括：

(a) 给予哺乳动物一种丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物，其中所述化合物包含一个可检测标记，并且其中所述化合物与过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞结合；且  
25

(b) 通过对所述可检测标记进行成象，确定在所述哺乳动物组织内的细胞位置。

在再一个实施方案中，本发明提供一种用于筛选抑制丝氨酸棕

桐酰转移酶的治疗上有效的化合物的方法，所述方法包括：

(a) 使丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物与过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的第一种哺乳动物细胞接触，以形成第一种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物；

5 (b) 使一种潜在的丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂化合物与过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的第二种哺乳动物细胞接触，以形成第二种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物；

(c) 通过检测所述第一种和第二种大量的化合物-丝氨酸棕榈酰转移酶复合物的存在，测定由所述第一种和第二种细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平；且

10 (d) 测量所述第一种和第二种细胞表达的丝氨酸棕榈酰转移酶水平差异，以确定所述潜在抑制剂化合物是否抑制丝氨酸棕榈酰转移酶表达。

本发明包括的丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物包括但不限于与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的化合物、与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的单特异性抗体或与丝氨酸棕榈酰转移酶 mRNA 杂交的核酸。

表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞包括但不限于肾上腺细胞、脑细胞、乳腺细胞、结肠细胞、上皮细胞、内皮细胞、心脏细胞、免疫细胞、肾细胞、肝细胞、肺细胞、卵巢细胞、胰腺细胞、前列腺细胞、皮肤细胞、脾细胞、胃细胞、睾丸细胞、甲状腺细胞、子宫细胞或血管细胞。优选的表达丝氨酸棕榈酰转移酶的上皮细胞包括但不限于内皮细胞、非神经胶质神经元细胞、结肠细胞、乳腺细胞、肾近端小管细胞、前列腺平滑肌、子宫平滑肌或睾丸平滑肌。优选的表达丝氨酸棕榈酰转移酶的免疫细胞包括多形核白细胞

25 (PMN)、单核细胞、巨噬细胞、上皮样细胞、巨细胞、小神经胶质细胞、枯否氏细胞或尘细胞。

以基础水平表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞包括但不限于肾上腺细胞(皮质、髓质(嗜铬性))、脑细胞(神经元、星形胶质细

胞、少突细胞或浦肯野细胞)、乳腺细胞(上皮)、结肠细胞(上皮、粘膜巨噬细胞或平滑肌)、上皮细胞、内皮细胞、心脏细胞(心肌细胞或肌内膜)、免疫细胞、肾细胞(肾小球内皮细胞或上皮(远端小管或近端小管))、肝细胞(肝细胞或内皮)、肺细胞(上皮、内皮或巨噬细胞(尘细胞))、卵巢细胞(上皮、皮层基质或肌成纤维细胞)、胰细胞(胰岛或腺泡细胞)、前列腺细胞(上皮或平滑肌)、皮肤细胞(表皮或真皮)、脾细胞(窦样内皮、淋巴细胞、巨噬细胞或 PMN)、胃细胞(上皮、粘膜巨噬细胞或平滑肌)、睾丸细胞(生精上皮、支持细胞或莱迪希氏细胞)、甲状腺细胞(上皮)、子宫细胞(上皮或子宫肌膜)或血管细胞(内皮或平滑肌)。

过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞包括但不限于上皮细胞、内皮细胞、癌细胞(选自乳腺癌、结肠癌、类癌瘤、胃癌、神经胶质瘤、肝细胞瘤、平滑肌肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、间皮瘤、骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、未分化癌或白血病)、免疫细胞或肿瘤微环境内的细胞。

本发明方法的再一实施方案包括一种用于治疗其需要患者的丝氨酸棕榈酰转移酶介导性疾病的方法，所述方法包括将治疗有效量的一种丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂化合物的药用制剂给予所述患者；其中任选所述丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂化合物有细胞毒性。优选的丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂化合物包括但不限于丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物。在本发明该方面的一个优选实施方案中，将所述药用制剂涂在气囊导管或支架上并让其以时间依赖性方式释放。

25

### 附图简述

图 1 显示免疫印迹分析的结果，用于评价针对人 SPT1 和 SPT2 产生的肽特异性多克隆抗体的特异性。

图 2 显示正常人脑组织中的 SPT 表达(放大 600 倍)。

图 3 显示正常人结肠组织中的 SPT 表达(放大 600 倍)。

图 4 显示正常人肾上腺组织中的 SPT 表达(放大 600 倍)。

图 5 显示正常人肾脏组织中的 SPT 表达(放大 600 倍)。

5 图 6 显示正常人子宫组织中的 SPT 表达(放大 600 倍)。

图 7 显示 SPT1 和 SPT2 分别与正常人结肠组织中的拓扑异构酶的共表达(放大 600 倍)。

图 8 显示分会合成纤维细胞中的 SPT1 和 SPT2 表达(放大 300 倍, 图 8A 和图 8B; 放大 600 倍, 图 8C 和图 8D)。

10 图 9 显示休眠成纤维细胞和创伤成纤维细胞中的 SPT1 和 SPT2 表达(放大 300 倍, 图 9A-9F; 放大 600 倍, 图 9G-9L)。

图 10 显示成纤维细胞的双重染色(IF: IF) (放大 1500 倍)。

图 11 显示人类肿瘤细胞系中的 SPT 表达(放大 900 倍)。

15 图 12 显示人类恶性结肠癌组织、未分化癌组织、甲状腺癌组织和肉瘤组织中的 SPT 表达(放大 600 倍)。

图 13 显示 14 天内的大鼠气囊血管成形术模型血管损伤的表征。

图 14 显示血管成形术后 1 天、3 天、7 天和 3 个月的血管损伤反应的时程。

20 图 15 显示肌成纤维细胞在对所述血管成形术应答时在血管外膜和基质重建模时的去分化和增殖。

图 16 显示炎性结肠中的活化巨噬细胞和嗜中性粒细胞浸润。

图 17 显示从头鞘脂合成途径。

### 发明详述

25 如上所述, 以基础水平表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞包括但不限于肾上腺细胞(髓质(嗜铬性))、脑细胞(神经元或浦肯野细胞)、乳腺细胞(上皮)、结肠细胞(上皮、粘膜巨噬细胞或平滑肌)、上皮细胞、内皮细胞、心脏细胞(肌内膜)、免疫细胞、肾细胞(肾小

球内皮细胞或上皮(近端小管))、肝细胞(内皮)、肺细胞(上皮、内皮或巨噬细胞(尘细胞))、卵巢细胞(皮层基质或肌成纤维细胞)、胰细胞(腺泡细胞)、前列腺细胞(上皮或平滑肌)、皮肤细胞(表皮)、脾细胞(窦样内皮、巨噬细胞或 PMN)、胃细胞(上皮、粘膜巨噬细胞或平滑肌)、  
5 睾丸细胞(生精上皮、支持细胞或莱迪希氏细胞)、甲状腺细胞(上皮)、子宫细胞(上皮或子宫肌膜)或血管细胞(内皮或平滑肌)。

以基础水平表达丝氨酸棕榈酰转移酶的优选哺乳动物细胞包括肾上腺细胞(髓质(嗜铬性))、脑细胞(神经元或浦肯野细胞)、乳腺细胞(上皮)、结肠细胞(上皮、粘膜巨噬细胞或平滑肌)、上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞、肾细胞(肾小球内皮细胞或上皮(近端小管))、肝细胞(内皮)、肺细胞(上皮、内皮或巨噬细胞(尘细胞))、卵巢细胞(皮层基质或肌成纤维细胞)、胰细胞(腺泡细胞)、前列腺细胞(上皮或平滑肌)、脾细胞(窦样内皮、巨噬细胞或 PMN)、胃细胞(上皮、粘膜巨噬细胞或平滑肌)、睾丸细胞(莱迪希氏细胞)、甲状腺细胞(上皮)、  
10 子宫细胞(上皮或子宫肌膜)或血管细胞(内皮或平滑肌)。

以基础水平表达丝氨酸棕榈酰转移酶的更优选哺乳动物细胞包括肾上腺细胞(髓质(嗜铬性))、脑细胞(神经元)、结肠细胞(粘膜巨噬细胞)、上皮细胞、内皮细胞、免疫细胞、肾细胞(上皮(近端小管))、肺细胞(巨噬细胞(尘细胞))、卵巢细胞(皮层基质)、脾细胞(窦样内皮)  
20 或胃细胞(上皮或粘膜巨噬细胞)。

再如上所述，过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的哺乳动物细胞包括但不限于上皮细胞、内皮细胞、癌细胞(选自乳腺癌、结肠癌、类癌瘤、胃癌、平滑肌肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾细胞癌、肉瘤、未分化癌或白血病)、免疫细胞或肿瘤  
25 微环境内的细胞。

过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的优选哺乳动物细胞包括上皮细胞、内皮细胞、癌细胞(选自乳腺癌、结肠癌、胃癌、平滑肌肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肾细胞癌、肉瘤、

未分化癌或白血病)、免疫细胞或肿瘤微环境内的细胞。

5 过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的更优选哺乳动物细胞包括上皮细胞、内皮细胞、癌细胞(选自乳腺癌、结肠癌、平滑肌肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、甲状腺癌、肉瘤或未分化癌)、免疫细胞或肿瘤微环境内的细胞。

特别优选的过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的上皮细胞包括内皮细胞、非神经胶质神经元细胞、结肠细胞、乳腺细胞、肾近端小管细胞、前列腺平滑肌、子宫平滑肌或睾丸平滑肌。

10 关于过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的免疫细胞, 优选的细胞包括 PMN、单核细胞、巨噬细胞、上皮样细胞、巨细胞、小神经胶质细胞、枯否氏细胞或尘细胞。

优选的过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的肿瘤微环境内的细胞包括基质成纤维细胞、基质单核细胞或肌成纤维细胞。

15 如上所述, 优选的丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物包括任选用细胞毒性剂标记的单特异性抗体或任选与丝氨酸棕榈酰转移酶 mRNA 杂交的核酸。

20 本发明首次提供所述丝氨酸棕榈酰转移酶在某些组织疾病状态下被正调节的证据。具体地说, 构成 SPT 酶的 SPT1 (一种登记号为 NP006406 的多肽)和 SPT2 (或者称为 LCB2, 一种登记号为 NP004854 的多肽)两种蛋白亚基在发生细胞过度增殖的疾病状态下被正调节或者在非调节性过量表达 SPT1 或 SPT2 的细胞中被正调节(因而进一步使细胞过度增殖)。

25 因此, 检测细胞中 SPT1 或 SPT2 的存在并测量 SPT1 或 SPT2 的量或者检测体内 SPT1 或 SPT2 的存在提供一种用于诊断或监测疾病状态的方法, 所述疾病状态包括但不限于癌症和肿瘤转移、炎症或血管损伤(如再狭窄)。因此, 抑制 SPT1 或 SPT2 的正调节或非调节性过量表达提供一种用于治疗由 SPT1 或 SPT2 表达介导的疾病状态的方法。

在所述癌症相关疾病中的许多疾病的特征为丝氨酸棕榈酰转移酶的过量表达，如在过度增殖性上皮细胞、过度增殖性间充质细胞、某些免疫细胞或肿瘤微环境细胞中。

其中 SPT1 和/或 SPT2 以高于正常细胞中的量表达的特定过度增殖性上皮细胞包括但不限于内皮细胞、非神经胶质神经元细胞、结肠细胞、乳腺细胞、肾近端小管或前列腺、子宫或睾丸的平滑肌。

其中 SPT1 和/或 SPT2 以高于正常细胞中的量表达的特定过度增殖性间充质细胞包括但不限于肉瘤癌细胞。

表达升高量的丝氨酸棕榈酰转移酶的特定免疫细胞包括但不限于 PMN、单核细胞、巨噬细胞和特化巨噬细胞例如上皮样细胞、巨细胞、小神经胶质细胞、枯否氏细胞或尘细胞。

其它非常接近过度增殖性地表达丝氨酸棕榈酰转移酶的转移性肿瘤微环境内的细胞包括但不限于基质成纤维细胞、基质单核细胞或肌成纤维细胞。

使用本发明描述的方法或者通过本领域熟知的其它方法，可以检测其它过度增殖性地表达 SPT1 和/或 SPT2 的过度增殖性上皮细胞、间充质细胞(mesenchymal)或免疫细胞。

术语“细胞”是指适合于所述检测方法灵敏度的至少一种细胞，但包括多种细胞或某部分细胞。适合于本发明的细胞可以作为分离的、纯化的细胞群体存在或者作为机体构造组织活组织检查的一部分存在。细胞部分可以是独立部分，例如活组织检查的组织切片细胞部分。

本文所用的术语“正调节”或“过度增殖性地表达”是指，与参比样品相比，在靶组织中可以检测到较高量的 SPT1 或 SPT2 基因产物。本文所用的“参比样品”是指证明无可检测疾病的样品，可以包括例如得自组织档案的保藏的组织切片。具体地说，参比样品可以是档案样品，其中 SPT 的量用来确定疾病状态的进程。样品可以是含有丝氨酸棕榈酰转移酶的单个细胞或细胞碎片，或者样品可

以是较大组成的组分，例如活组织检查的组织切片，其中目标细胞可能属于不同细胞类型视野中的一种或多种细胞亚型。

5 短语“丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物”是指例如与丝氨酸棕榈酰转移酶结合的亲和力是与其它蛋白质或核酸结合的亲和力的20倍或20倍以上的合成或天然氨基酸多肽、蛋白质、合成有机小分子或脱氧核糖核酸或核糖核酸序列。例如但不限于针对所述丝氨酸棕榈酰转移酶蛋白或其肽片段产生的多克隆抗体或单克隆抗体(包括经典或噬菌体展示抗体)或者与丝氨酸棕榈酰转移酶 mRNA 杂交的核酸适合用于本发明。

10 对于本发明实施方案的蛋白质测量和体内成象，化合物可以通过直接检测方法或者是通过间接检测方法例如通过第二标记化合物检测的标记化合物。对于涉及治疗 SPT 介导疾病的方法，所述 SPT 特异性化合物可以是抑制剂、反义核苷酸或用细胞毒性剂标记的化合物。小分子抑制剂是已知的并且一般基于与丝氨酸或鞘氨醇的结构同源性。

15 丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂化合物的实例包括但不限于多球壳菌素(CAS 注册号为 35891-70-4)、3-氯-D-丙氨酸(CAS 注册号为 39217-38-4)、L-环丝氨酸(CAS 注册号为 339-72-0)和 D-丝氨酸(312-84-5)。用测量丝氨酸棕榈酰转移酶酶活性的方法发现了多种新型抑制剂。用细胞毒性剂标记的化合物包括例如用细胞毒性剂标记且与丝氨酸棕榈酰转移酶有免疫学反应的抗体。用细胞毒性剂标记抗体的方法是本领域众所周知的。

25 短语“标记化合物”是指能够测量的部分，包括放射性原子、酶、荧光分子或替代标记例如生物素。用本领域众所周知的技术，将蛋白质、肽、糖和核酸与可检测标记缀合，描述于例如 G.T. Hermanson 的 *Bioconjugate Techniques*, Academic Press 出版社, 1996。在本发明中可用作标记的具体放射性同位素是  $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{88}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{66}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、

<sup>115</sup>In 或 <sup>10</sup>B 及本领域已知的其它放射性同位素。通过本领域技术人员已知的常规方法，例如酪氨酸残基的碘化、丝氨酸或苏氨酸残基的磷酸化或者利用放射性氨基酸前体加入氙、碳或硫，可以在多肽中引入放射性同位素。利用在多肽上交联金属螯合部分的双功能螯合剂引入其它放射性原子。适合用于本发明的酶的具体实例是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶。可检测标记的优选实例是切割底物以产生显色产物或发光产物的酶。可用于本发明方法的荧光分子的具体实例包括但不限于香豆素、咕吨染料诸如荧光素、对甲氨基酚和罗丹明、试卤灵、花青染料 bimanes、吡啶、异吲哚、丹酰染料、氨基邻苯二甲酰肼诸如鲁米诺和异鲁米诺衍生物、氨基邻苯二甲酰亚胺、氨基萘二甲酰亚胺、氨基苯并咪唑、氨基喹啉、dicanohydroquinones 以及铀和铯络合物和相关化合物。通过观察放射性原子或荧光(flourogenic)分子的存在，或者通过观察显色底物或发光底物的酶活性，进行直接测量。通过将包括标记在内的额外化合物加入到试验样品中以便其可以与结合所述试验样品的化合物相互作用，进行间接测量。众所周知的实例是当所述标记化合物包含生物素而第二化合物包含抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白和可检测标记时。众所周知第二个实例是当第一抗体用来与所述丝氨酸棕榈酰转移酶蛋白结合并且用包含一种可检测标记的第二抗体进行检测。

本发明的一个实施方案涉及用于测量细胞过度增殖性地表达的 SPT1 或 SPT2 的方法，所述方法包括使所述细胞与一种丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物接触，并且测量或检测作为所述 SPT 结合化合物的结果形成的丝氨酸棕榈酰转移酶-化合物复合物。通过将所述细胞中丝氨酸棕榈酰转移酶的量的变化与参比样品进行比较，可以进一步定义丝氨酸棕榈酰转移酶的检测方法。最好是采用本文描述的方法，SPT1 或 SPT2 的表达可以用来确定组织是否含有在所述细胞中过度增殖性地表达 SPT1 或 SPT2 的细胞。在一个实施方案中，

本发明的方法用来诊断癌症或转移性肿瘤、监测肿瘤转移的预后和进程或者监测癌症或转移性肿瘤的任何干预或治疗的治疗功效。在其它实施方案中，本发明的方法用来诊断血管损伤(如再狭窄中)或炎症的存在或者监测再狭窄或炎症的任何干预或治疗的治疗功效。

5           本发明中描述的新方法描述了在各种病理生理状态下如何可以显现 SPT1 或 SPT2 蛋白的正调节。显现这种正调节的方法也可适用于 SPT1 或 SPT2 核酸，并且可以用本领域熟知的方法来进行，所述本领域熟知的方法包括但不限于标记核酸探针的杂交技术或定量  
10 RT-PCR。用本领域熟知的方法，包括但不限于亲和检测法、蛋白质印迹法、荧光流式细胞术方法或免疫组织学/免疫细胞学方法，可以进行显现 SPT1 或 SPT2 蛋白的其它方法。

一般而言，在这些技术中，目标蛋白用特异性探针进行标记并且通过在所述样品中掺入探针的程度进行检测。在流式细胞术中，分析溶液中的细胞，而在细胞成象技术中，比较细胞视野内的探针  
15 结合量。在一个总的来讲优选的实施方案中，将抗体作为探针使用并用可检测探针例如放射性原子或荧光分子进行标记。

本发明的另一个实施方案涉及通过体内成象检测 SPT。因此，将一种经标记的丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物给予哺乳动物，所述标记化合物与 SPT1 或 SPT2 结合并且测量所述标记化合物的位置，作为一种对过度增殖性细胞的位置进行成象的方法。  
20

在本发明的一个具体实施方案中，用放射性原子标记抗体，用所述标记抗体测量体内 SPT1 或 SPT2 蛋白的存在，这是本领域众所周知的。采用该方法，通过自动放射技术或者采用将光子发射转换成听觉报告的装置通过听觉信号，对转移性肿瘤的存在和位置进行  
25 可视成象，如 Martin 等的美国专利 4,782,840 中所描述的。在另一个实施方案中，可以用吸收约 300nm 至约 1300nm 范围内的光的生色团标记探针(特别是抗体)，从而所述 SPT1 或 SPT2 可以用荧光检测进行成象。吸收 300-1300 nm 范围内的光的生色团种类描述于 Towler

等的 PCT 申请 PCT/GB98/02833。

本发明的另一方面涉及治疗因过度增殖性细胞中存在正调节的 SPT 而介导的疾病状态。疾病的治疗方法包括抑制 SPT 酶活性、降低所述细胞内 SPT 表达的量或者使所述过度增殖性细胞与一种细胞  
5 毒性丝氨酸棕榈酰转移酶化合物接触。在一个实施方案中，所述抑制剂是丝氨酸棕榈酰转移酶酶活性的一种小分子抑制剂。

在本发明的另一个实施方案中，限制或阻止转移性肿瘤的进程的方法包括给予一种降低丝氨酸棕榈酰转移酶表达的化合物。在一个具体实施方案中，用与或者 SPT1 mRNA 或者所述 SPT2 mRNA 杂交的反义核酸来降低所述丝氨酸棕榈酰转移酶的表达。  
10

在另一个实施方案中，所述过度增殖性细胞用一种经标记的细胞毒性丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物进行治疗。在一个具体实施方案中，用所述细胞毒性丝氨酸棕榈酰转移酶特异性化合物限制或阻止转移性肿瘤的进程。

15 最好将丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂和至少一种其它含有和不含铂的抗肿瘤药给予恶性肿瘤患者。例如但并不限制本发明，可以在一个给药方案中给予抗丝氨酸棕榈酰转移酶化合物和诸如 DNA 烷化剂的细胞毒性化合物或抗血管生成化合物。优选的抗肿瘤药选自克拉屈滨(2-氯-2'-脱氧-(β)-D-腺苷)、苯丁酸氮芥(4-[双(2-氯乙基)氨基]苯丁酸)、DTIC-Dome (5-(3,3-二甲基-1-三氮烯基)-咪唑-4-甲酰胺)、铂  
20 化疗药和非铂化疗药。含铂的抗肿瘤药包括但不限于顺铂(顺式-二氯双胺铂)。不含铂的抗肿瘤药包括但不限于环磷酰胺、氟尿嘧啶、表柔比星、甲氨蝶呤、长春新碱、多柔比星、博来霉素和依托泊苷。每种抗肿瘤药都以治疗有效量给予，这些是本领域众所周知的，并且  
25 根据所使用的药物、恶性肿瘤的类型和其它因素而变化。

在另一个实施方案中，将丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂涂在气囊导管或支架上致使其以定点和时间依赖性方式释放。这样的装置可用于通过抑制丝氨酸棕榈酰转移酶而防止再狭窄的出现，从而防止

内皮的过度增殖。SPT 介导的疾病的治疗方法包括将小分子治疗药或抑制剂化合物直接或间接传递或“接种”到其中细胞过度增殖出现时 SPT 表达被正调节的疾病状态的组织或非调节性过量表达 SPT 的细胞中。

5           本发明的药用组合物按照常规制药技术来制备。在本发明的组合物中可以使用药学上可接受的载体。所述组合物可以采用多种多样的形式，这取决于给药所需的制剂形式，包括但不限于静脉内(快速注射和输注)给药、口服给药、经鼻给药、透皮给药、闭合或不闭合的局部给药、腹膜内给药、皮下给药、肌内给药或胃肠外给药，  
10 所有使用形式是药学领域技术人员众所周知的。在制备口服给药形式的组合物时，可以使用常用的药用载体中的一种或多种，例如就口服液体制剂(例如混悬剂、酏剂和溶液剂)而言为水、二醇类、油、醇类、矫味剂、防腐剂、着色剂、糖浆等；或者例如就口服固体制剂(例如散剂、胶囊剂和片剂)而言为淀粉、糖、稀释剂、制粒剂、润  
15 滑剂、粘合剂、崩解剂等载体。

另一方面，所述丝氨酸棕榈酰转移酶抑制性化合物可以通过注射由溶于惰性液体载体中的有效成分组成的制剂而胃肠外给予。所述注射用制剂可以包括与合适的惰性液体载体混合的有效成分。可接受的液体载体包括植物油，例如花生油、棉籽油、芝麻油等；  
20 以及有机溶剂，例如 solketal、甘油甲缩醛等。作为一个替代方案，也可以使用水性胃肠外制剂。例如，可接受的水性溶性包括水、Ringer 氏溶液和等渗水性盐溶液。此外，通常可以使用无菌非挥发性油作为所述水性制剂中的溶剂或悬浮剂。所述制剂通过将所述有效成分溶于或悬浮于所述液体载体中来制备，使所述制剂含有 0.005-10%  
25 (重量)有效成分。适当时可以使用其它添加剂，包括防腐剂、等渗剂、增溶剂、稳定剂和镇痛剂。

本发明的方法中所使用的化合物也可以以脂质体递药系统的形式给予，所述脂质体递药系统例如小单层脂质体、大单层脂质体和

多层脂质体。本领域众所周知的含脂质体的递药系统用各种各样的磷脂例如胆固醇、硬脂酰胺或磷脂酰胆碱来制备。

5 本文所用的本发明药用组合物或其中的化合物的“治疗有效量”，是指抑制所述丝氨酸棕榈酰转移酶活性的功能的量。本发明的药用组合物一般每剂量单位(例如一片、一粒胶囊、一包散剂、一个注射剂、一茶匙等)含有约 0.001 mg/kg 至约 100 mg/kg。在一个实施方案中，本发明的药用组合物每剂量单位含有约 0.01 mg/kg 至约 50 mg/kg 化合物，优选含有约 0.05 mg/kg 至约 20 mg/kg。用于确定本发明药用组合物的治疗有效量的方法是本领域已知的。将所述药用组  
10 合物给予人类的有效量例如可以根据动物研究的结果用数学方法确定。此外，可以通过局部应用合适的鼻内载体或者通过透皮途径，采用本领域技术人员熟知的那些透皮贴剂形式，以鼻内形式给予本发明的化合物。为了以透皮递药系统的形式给药，整个给药方案中，给药当然将是连续的而不是间歇性的。

15

### 生物学实施例

以下实施例说明本发明，然而并不是用来限制本发明的范围。

#### 实施例 1

##### 20 细胞标识抗体

##### 抗体生产

运用通过 Hopp/Woods 的算法预测的抗原肽序列，产生抗所述 SPT 亚基的兔多克隆抗体。针对人 SPT1 亚基(登记号为 Y08685)的抗体生产所用的肽是：SEQ.ID.NO.:1 (KLQERSDLTVKEKEEC，对应于  
25 残基 45-59)；和 SEQ.ID.NO.:2 (KEQEIEDQKNPRKARC，对应于残基 222-236)。作为人 SPT2 亚基(登记号为 Y08686)的抗原使用的肽是：SEQ.ID.NO.:3 (CGKYSRHRLVPLDRPF，对应于残基 538-552)；和 SEQ.ID.NO.:4 (CGDRPFDETTYEETED，对应于残基 549-561)。

将一个半胱氨酸和一个甘氨酸加入到这些肽的氨基末端，可供

用于 KLH 缀合并且减少进行偶联时的位阻。分别针对每种 SPT 亚基的肽产生兔多克隆抗体。合并所得的免疫血清，将混合的多克隆抗血清用作针对所述特异性 SPT 亚基的抗体源。使用 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  IgG 部分。

5

### 抗体表征

通过免疫印迹分析，评价所述兔抗 SPT1 多克隆抗体或兔抗 SPT2 多克隆抗体的特异性。制备 HEK 293 细胞的微粒体膜。50 微克微粒体膜蛋白在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的 4 条泳道的每条泳道中进行分级分离。在转移到硝化纤维素膜后，所述膜用如上所述制备的以 1:1000 稀释的肽特异性多克隆抗体探测。用碱性磷酸酶缀合的山羊抗兔 IgG (Santa Cruz) 检测结合的抗体。

10

图 1 表明所述抗体识别 HEK293 微粒体膜制备物中预测分子量的 SPT1 和 SPT2 蛋白并且不与所述制备物中所含有的其它蛋白反应。

15

在正常人体组织中使用表 1 中所示的抗波形蛋白的初次单克隆抗体和多克隆抗体，来证明组织的抗原性和试剂质量。阴性对照包括用同一种 IgG 同种型非免疫血清取代所述初次抗体。

表 1

名称	类型	效价	销售商
非免疫血清	多克隆抗体, IgG	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Vector Labs, CA
非免疫血清	单克隆抗体, IgM	2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Vector Labs, CA
免疫前血清	多克隆抗体, IgG	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	RWJPRI, NJ
SPT1	多克隆抗体, IgG	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	RWJPRI, NJ
SPT2	多克隆抗体, IgG	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	RWJPRI, NJ
平滑肌肌动蛋白	单克隆抗体, IgM	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Dako, CA
波形蛋白	单克隆抗体, IgM	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Dako, CA

20

在过度增殖性人体组织中使用表 2 中所示的抗波形蛋白的初次

单克隆抗体和多克隆抗体，来证明组织的抗原性和试剂质量。阴性对照包括用同一种 IgG 同种型非免疫血清取代所述初次抗体。另外，作为另一阴性对照，所述抗体用其 10 倍效价过量的抗原中的特异性抗原预吸附过夜。

5

表 2

名称	类型	效价	销售商
拓扑异构酶 II $\alpha$	单克隆抗体, IgM	1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Pharmingen, CA
巨噬细胞(CD68)	单克隆抗体, IgM	1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Dako, CA
免疫前血清(SPT-1)	多克隆抗体, IgG	2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	RWJPRI, NJ
免疫前血清(SPT-2)	单克隆抗体, IgM	1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	RWJPRI, NJ
SPT-1	多克隆抗体, IgG	2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	RWJPRI, NJ
SPT-2	多克隆抗体, IgG	1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	RWJPRI, NJ
平滑肌肌动蛋白	单克隆抗体, IgM	2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Dako, CA
波形蛋白	单克隆抗体, IgM	2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Dako, CA

### 实施例 2

#### 正常人体组织的免疫组织化学(IHC)

10 市售的人正常和肿瘤棋盘组织玻片(Dako, Carpenteria, CA; Biomeda, Foster City, CA)进行脱蜡、水合和加工, 供常规 IHC 用。简而言之, 玻片在 Target (Dako)中经微波处理, 冷却, 先置于磷酸缓冲盐溶液(pH 7.4, PBS)中, 然后置于 3.0%  $\text{H}_2\text{O}_2$  中。通过抗生物素蛋白-生物素封闭系统, 按照生产商的说明(Vector Labs, Burlingame, CA), 对玻片进行处理, 然后将其置于 PBS 中。所有试剂的保温和

15 洗涤都在室温下进行。让正常封闭血清(Vector Labs)在所有玻片上保留 10 分钟。在 PBS 中进行简单地冲洗后, 让初次抗体(表 1)在各玻片上保留 30 分钟。洗涤所述玻片, 让生物素化第二抗体山羊抗兔(多克隆抗体)或马抗小鼠抗体(单克隆抗体)在所述组织切片上保留 30 分

钟(Vector Labs)。在 PBS 中冲洗后, 加入抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶-生物素复合物试剂(ABC, Vector Labs)达 30 分钟。洗涤玻片, 用色素原 3,3'-二氨基联苯胺(DAB, Biomed)处理, 在蒸馏水中冲洗, 然后用苏木精进行复染。

5

### 双重免疫组织化学标记(IHC:IHC)

同时双重免疫组织化学标记(IHC:IHC)方案先前已经发表并且与单免疫组织化学标记所述的方案相似, 只是玻片在第一抗原检测方案的第二个色素原步骤之后不进行复染。而是将玻片置于 PBS 中。

10

通过碱性磷酸酶-固红(Vector Labs, CA; Dako, CA)系统检测第二抗原。将初次抗体在室温下在所述玻片上保留 30 分钟。在简单洗涤后, 在室温下加入第二生物素化抗体达 30 分钟。然后将所述玻片在 PBS 中洗涤, 然后将所述链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶(Vector Labs, CA)试剂在室温下在所述玻片上保留 30 分钟。洗涤后, 将所述固红色素原(Dako, CA)在所述玻片上保留 2 次 5 分钟。接下来, 所述玻片在苏木精中进行常规复染, 洗涤, 然后在基于水的封固剂(Dako, CA)中覆盖, 以便在 BX-50 Olympus 光学显微镜下观测。

15

进行多个对照, 以确保所述玻片上的标记得到恰当解释。初次抗体用正确种同种型取代, 以控制所述检测系统。就另一组对照而言, 省去第一初次抗体而对第二初次抗体进行加工, 反之亦然。

20

### SPT1 抗体和 SPT2 抗体的特异性

产生对两种人 SPT 亚基特异性的兔多克隆抗体, 并且在图 1 所示的免疫印迹中证明所述抗体的特异性。

25

50 微克 HEK 293 微粒体膜蛋白在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的 4 条泳道上进行分级分离。在将所述蛋白转移到硝化纤维素膜后, 切下这 4 条泳道, 分别用以 1:1000 稀释的来自以下的 G 蛋白纯化抗体探测: SPT1 免疫前血清(Pre SPT1)、SPT1 抗血清(SPT1)、SPT2 免疫前血清(Pre SPT2)或 SPT2 抗血清(SPT2)。用 1:2000 稀释的碱性磷酸

酶缀合的山羊抗兔 IgG 检测结合的抗体。图 1 显示一条预期分子量的 SPT1 (55 kD)和 SPT2 (65 kD)条带。

5 从野生型 HEK 细胞获得的微粒体膜部分通过 SDS-PAGE 分离，蛋白质印迹或者用免疫前血清或者用 SPT 特异性多克隆抗体探测。观察到预期分子量的单免疫反应性条带，准确地说，对于 SPT1 而言 Mr ~ 55 kDa (第 3 泳道)，而对于 SPT2 而言 Mr ~ 65 kDa (第 5 泳道)；用免疫前血清没有观察到非特异性结合(第 2 泳道和第 4 泳道)。

### SPT1 和 SPT2 的组织分布

10 用 IHC 获得正常人体组织中 SPT1 和 SPT2 蛋白表达的分析，SPT1 和 SPT2 在人体组织中的分布示于表 3 中。表 3 没有反映出 SPT1 和 SPT2 免疫标记之间观察到的差异。

15 福尔马林固定的、石蜡包埋的组织以多组织形式使用，以消除潜在的染色人为因素，例如玻片间及操作间的变异性。表 1 列举了除实验抗体以外的阳性对照和阴性对照。阳性标记由褐色染色强度限定，并且依照以下标准评价：1)无免疫反应性评价为阴性(N)；2)浅褐色免疫反应性评价为弱(W)；3)褐色免疫反应性评价为中度(M)；而 4)深褐色免疫反应性评价为强(S)。阴性对照不产生可观察标记。正常人体组织中 100 倍视野内 SPT1 和 SPT2 的标记细胞数为 n = 2-  
20 10)；阴性(N)没有标记细胞；弱(W)有 1-10 个标记细胞；中度(M)有 11-20 个标记细胞；强(S)有大于 20 个标记细胞。

表 3

组织	细胞类型	SPT1	SPT2
肾上腺	皮质	N	N
	髓质(嗜铬性细胞)	S	S
脑	神经元	S	S
	星形胶质细胞	N	N

	少突细胞	N	N
	浦肯野细胞	M	M
乳腺	上皮	M	M
结肠	上皮	M	M
	粘膜巨噬细胞	S	S
	平滑肌	M	M
心脏	心肌细胞	N	N
	肌内膜	W	W
肾脏	肾小球内皮细胞	M	M
	上皮: 远端小管	N	N
	上皮: 近端小管	S	S
肝脏	肝细胞	N	N
	内皮	M	M
肺	上皮	M	M
	内皮	M	M
	巨噬细胞(尘细胞)	S	S
卵巢	上皮	N	N
	皮层基质	S	S
	肌成纤维细胞	M	M
胰腺	胰岛	N	N
	腺泡细胞	M	M
前列腺	上皮	M	M
	平滑肌	M	M
皮肤	表皮	W	W
	真皮	N	N
脾脏	窦样内皮	S	S
	淋巴细胞	N	N
	巨噬细胞、PMN	M	M

胃	上皮	S	S
	粘膜巨噬细胞	S	S
	平滑肌	M	M
睾丸	生精上皮	W	W
	支持细胞	W	W
	莱迪希氏细胞	M	M
甲状腺	上皮	M	M
子宫	上皮	M	M
	子宫肌膜	M	M
血管	内皮	M	M
	平滑肌	M	M

一般而言，位于人体组织中的血管内皮细胞和平滑肌细胞对 SPT1 和 SPT2 的免疫阳性为中度。除所述卵巢上皮之外，所有被测组织中的上皮细胞对 SPT1 和 SPT2 的免疫阳性为中度至强。另外，来自结肠、肺和胃的粘膜巨噬细胞对 SPT1 和 SPT2 的免疫阳性为强。在脾脏中，除所述巨噬细胞外，观察到所述淋巴细胞中的多形核细胞(PMN)对 SPT1 和 SPT2 的染色均为阳性，便没有观察到反应性。结肠、肺、前列腺、胃、甲状腺、子宫和血管组织对 SPT1 和 SPT2 的免疫阳性为中度至强。然而，在皮肤和心脏组织中，SPT1 和 SPT2 弱存在或者完全不可检测。

图 2-7 表示通过免疫组织化学测试 SPT1 和 SPT2 表达的某些正常人体组织。

图 2 显示分别用免疫前血清(图 2A)、SPT1 特异性抗体(图 2B)和 SPT2 特异性抗体(图 2C)免疫标记的正常大脑。在大脑皮质中，锥形神经元对于 SPT1 和 SPT2 显示阳性胞内免疫反应性。SPT1 和 SPT2 均位于神经元胞质内并且两个亚基的表达水平似乎相似。人小脑中发现的浦肯野细胞对 SPT1 和 SPT2 的免疫阳性为中度(数据未显示)。

相反, SPT1 和 SPT2 在其它神经元细胞类型例如星形胶质细胞、小神经胶质和少突胶质细胞中不可检测。

图 3 显示分别用免疫前血清(图 3A)、SPT1 抗体(图 3B)和 SPT2 抗体(图 3C)免疫标记的正常人大肠。上皮细胞(小箭头)和巨噬细胞(大箭头)对 SPT1 (图 3B)和 SPT2 (图 3C)的胞内免疫反应性为阳性。同在神经元中一样, SPT1 和 SPT2 的表达主要为胞质性的。与 SPT2 在上皮细胞中的中度表达相比, 粘膜巨噬细胞表现出对 SPT2 的免疫反应性强得多。在用免疫前血清染色时在任何细胞类型中都没有观察到免疫反应性(3A)。SPT 在结肠(图 3A 和图 3B)和胃的粘膜巨噬细胞及尘细胞(肺泡巨噬细胞)中的高表达(表 3)可能是由于这些巨噬细胞与易暴露于环境并因此可能被激活的组织相关的事实。

图 4 显示分别用免疫前血清(图 4A)或者 SPT1 特异性抗体(图 4B)和 SPT2 特异性抗体(图 4C)免疫标记的正常人肾上腺。肾上腺髓质的嗜铬性细胞(大箭头)、血管平滑肌细胞(箭头)和内皮(小箭头)对 SPT1 和 SPT2 显示强阳性胞质免疫反应性。SPT1 和 SPT2 表达在肾上腺皮质中不可检测。内皮和嗜铬性细胞中的 SPT2 表达比 SPT1 的表达高。另外, 除胞质外, 在嗜铬性细胞核中还可以清楚地观察到 SPT2 表达。可检测的 SPT1 或 SPT2 免疫标记在支持基质成纤维细胞中不存在。

图 5 显示用免疫前血清(图 5A)、SPT1 特异性抗体(图 5B)和 SPT2 特异性抗体(图 5C)免疫标记正常人肾。近端小管(箭头)对 SPT1 和 SPT2 显示阳性免疫反应性。SPT1 代表不同于 SPT2 在相同细胞类型中的点状标记模式的近端小管上皮细胞中的弥散性胞内标记模式。SPT1 表达在胞质中是弥散性的, 而 SPT2 免疫染色点状更多, 但总体较 SPT1 弱。用免疫前血清没有观察到免疫反应性。图 5C 显示位于内质网细胞溶胶一侧的 SPT 活性及 SPT2 表达在肾近端小管上皮中的点状出现, 因此提示 SPT2 表达与内质网相关。

图 6 显示分别用免疫前血清(图 6A)或者 SPT1 特异性抗体(图 6B)和 SPT2 特异性抗体(图 6C)免疫标记的几种正常人子宫组织样品。子

宫基质性平滑肌细胞(大箭头)和内皮(小箭头)对 SPT1 和 SPT2 显示阳性免疫反应性, 在内皮细胞中 SPT2 表达较高(与 SPT1 相比)。用免疫前血清没有观察到免疫反应性。

5 本发明的方法表明 SPT1 和 SPT2 在下述细胞中被表达: 代谢活性细胞(例如在自主神经刺激时分泌肾上腺素和去甲肾上腺素的肾上腺嗜铬性细胞)和神经元和卵巢皮层基质细胞。由于在增殖性细胞类型例如胃、肺(数据未显示)、肾近端小管和结肠腔上皮中观察到 SPT1 和 SPT2 阳性标记, 因此对人大肠进行双重免疫组织化学标记。

10 图 7 显示用抗拓扑异构酶 II $\alpha$  的抗体(红色)(一种细胞增殖和 SPT1 的标记)(图 7A)和 SPT2 特异性抗体(褐色)(图 7B)双重免疫组织化学标记人大肠。箭头显示红色和褐色标记细胞的共定位, 表明 SPT1 和 SPT2 在增殖性上皮细胞(大箭头)中被表达。小箭头显示在巨噬细胞中存在 SPT1(图 7A)和 SPT2(图 7B)。

## 15 结果

本发明的方法表征了丝氨酸棕榈酰转移酶亚基 SPT1 和 SPT2 在正常人体组织中的分布并且深入了解了 SPT1 和 SPT2 的相似性和可能的功能。在 SPT1 和 SPT2 表达时观察到的差异表明, SPT 的定位和表达水平可能与细胞的生理状态相关。

20 代谢活性细胞和增殖性细胞表达高水平的 SPT。同一组织内的相同细胞类型在 SPT1 和 SPT2 表达之间的差异提示, 每个亚基一定有特异性、可能独立的功能, 实现 SPT 活性。与酵母不同, 鼠 SPT2 仅在人 HEK293 细胞中的过量表达导致 SPT 活性的相应增加, 而仅 SPT1 不增加 SPT 活性(Weiss 和 Stoffel, 1997)。除 SPT1 和 SPT2 外,  
25 人 SPT 也可能具有额外的组分, 如酵母中的 Tsc3p 蛋白。另外, SPT2 在细胞核中的定位可能表明, SPT2 与其它核蛋白相关或者被修饰并且被转运到细胞核。因此, 分析 SPT1 和 SPT2 表达的动力学差异将有助于阐明 SPT 活性。

正常细胞中 SPT 表达的知识可以用于测量增生性疾病例如癌症的异常细胞活性。SPT 表达的绝对水平和酶活性的定位可能为细胞生理学发生改变的特征。在病理生理病症例如血管增生(D.J. Uhlinger、J.M. Carton、D.C. Argentieri、B.P. Damiano 和 M.R. D'Andrea, Increased Expression of Serine Palmitoyltransferase (SPT) in Balloon-injured Rat Carotid Artery (气囊损伤性大鼠颈动脉中丝氨酸棕榈酰转移酶(SPT)的表达增加), *Thromb. Haem.*, 2001, 86,1320-6)、伤口愈合和肿瘤中观察到的 SPT 活性增加提示针对 SPT 的治疗潜力。在这些病症中抑制或降低 SPT 活性可能影响与所述病症相关的症状。在猪上皮肾细胞 LLC-PK1 中, 串珠镰孢菌素诱导的细胞毒性和抗增殖效应在用 SPT1 特异性抑制剂如多球壳菌素治疗所述细胞后被降低。在同一研究中, 将多球壳菌素腹腔内给予 BALB/C 小鼠, 降低游离鞘氨醇累积, 在肾脏中降低 60%而没有明显的临床副作用。因此, SPT 抑制剂例如多球壳菌素在治疗增生性疾病例如癌症中可能具有重要的治疗潜力并且可能影响与诸如炎症和血管损伤的病症相关的各种病理生理。

本发明的方法提供 SPT1 和 SPT2 表达在正常人体组织中的首次直接免疫定位和比较并且是针对阐明 SPT 活性在所述细胞中的复杂性的关键性步骤。了解这些组分在 SPT 活性中的作用在确定在各种疾病状态例如癌症和再狭窄中调节多种关键性的鞘脂介导的细胞功能和应答是必不可少的。

### 实施例 3

#### 过度增殖性人体组织的免疫组织化学

采用实施例 2 的 IHC 程序, 利用 IHC 在福尔马林固定的、石蜡包埋的组织上定位 SPT1 和 SPT2 蛋白。正常人体组织和恶性人体组织同时以多组织形式进行分析, 以消除染色人为因素, 例如玻片间及操作间的易变性。

### 细胞培养

人类新生儿皮肤成纤维细胞及其培养基得自 Clonetics/BioWhittaker (Walkersville, MD)。将细胞悬浮液( $5 \times 10^4/\text{mL}$ )接种到 4 孔分室玻片(NUNC, Naperville, IL)中, 供免疫细胞化学用。

- 5 为了模拟体外经分化的休眠成纤维细胞的体内活化, 使用刮伤模型。简而言之, 将细胞孵育 2 天(接近会合, 增殖状态)、9 天(过度会合, 休眠状态), 或者将第 9 天休眠培养物用移液管管尖机械刮伤。为了评价创伤反应时的表达, 将所述细胞在创伤后再培养 5 天。

### 10 免疫细胞化学(ICC)

4 室培养玻片用 10%中性缓冲福尔马林在室温下固定 10 分钟, 在 PBS 中冲洗, 然后分析 ICC。用含有 tween-20 (Research Genetics, Huntsville, AL)的自动装置缓冲液, 进行所有洗涤步骤。

### 15 双重免疫组织化学(IHC:IHC)

为了测定 SPT 是否在增殖性细胞中共定位, 使用 IHC:IHC 同时检测 SPT1 或 SPT2 表达并且检测增殖标记即增殖性细胞核抗原(PCNA)。简而言之, 如上所述, 将玻片根据单 IHC 标记方案首先处理, 以检测 SPT-1 或 SPT-2。不用苏木精处理所述玻片, 而将 PCNA 抗体(Pharminigen, San Diego, CA)在组织上保留 30 分钟。在用 PBS 洗涤数次后, 将生物素化马抗小鼠第二抗体(Vector Labs)进行相似地保温。用碱性磷酸酶检测系统, 通过与碱性磷酸酶缀合的 ABC (Vector Labs)一起保温, 然后用固红色素原(Sigma)显色, 显现 PCNA 阳性细胞的存在。然后玻片进行常规复染和固定。

- 20 表 4 表示 SPT1 和 SPT2 在各种各样的人恶性肿瘤组织中的免疫定位。阳性标记由呈现褐色染色限定, 并且在 18 种不同人类肿瘤中、在放大 100 倍的视野中根据 SPT1 和 SPT2 的标记细胞数评价。5 种癌(结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状腺癌、未分化癌)和 2 种肉瘤都证明这两种 SPT 亚基的强过量表达。阴性对照不产生可观察标记。在

恶性人体组织中、在放大 100 倍的视野中 SPT1 和 SPT2 的标记细胞数为  $n = 2-10$ ); 阴性(N)没有标记细胞; 弱(W)有 1-10 个标记细胞; 中度(M)有 11-20 个标记细胞; 强(S)有大于 20 个标记细胞。

5

表 4

组织	SPT-1	SPT-2
乳腺癌	N	N
结肠癌	S	S
类癌瘤	W	W
胃癌	M	M
平滑肌肉瘤	S	S
肝癌	N	N
肺癌	N	N
淋巴瘤	N	N
黑素瘤	N	N
间皮瘤	N	N
卵巢癌	S	S
胰腺癌	S	S
前列腺癌	N	N
甲状腺癌	S	S
肾细胞癌	N	N
横纹肌肉瘤	N	N
肉瘤	S	S
未分化癌	S	S

图 8-12 表示通过免疫组织化学测试 SPT1 和 SPT2 表达的某些过度增殖性人体组织。

图 8 显示通过 ICC 免疫标记分会合人皮肤成纤维细胞, 以观察

SPT1 和 SPT2 的细胞表达和定位。分别与阴性对照标记细胞(图 8A)和 PCNA 标记细胞(图 8B)相比, SPT1 标记细胞(图 8C)和 SPT2 标记细胞(图 8D)的结果表明, SPT1 和 SPT2 过量表达与增殖性成纤维细胞的细胞核相关。

5 图 9 显示分化的休眠成纤维细胞体外创伤模型的结果。用所述模型模拟体内组织活化, 以进一步表征 SPT 在增殖性细胞中的表达。将休眠成纤维细胞培养物与经过机械刮伤并让其恢复 5 天(创伤状态)的汇合培养物进行比较。图 9 显示在第 9 天或第 14 天用阴性对照 (图 9A 和图 9B)和 PCNA (图 9D 和图 9E)抗体免疫标记的休眠培养物中  
10 通过 ICC 没有 SPT 标记。用 SPT1 抗体(图 9G 和图 9H)和 SPT2 抗体(图 9J 和图 9K)观察到浅弥散性标记。受伤 14 天的成纤维细胞(图 9C、9F、9I 和 9L)对 PCNA (图 9F)、SPT1 (图 9I)和 SPT2 (图 9L)显示强免疫标记。在 SPT1 和 SPT2 免疫标记细胞中最突出的观察结果是受伤 14 天的成纤维细胞(图 9I 和图 9L)中致密核相关标记, 这在第 9 天休眠细胞(图 9G 和图 9J)和第 14 天休眠细胞(图 9H 和图 9K)中却不  
15 存在。

图 10 显示用来显示 PCNA (图 10B 和图 10D)与增加的 SPT1 (图 10A)和 SPT2 (图 10C)表达相符的核双重染色(IF:IF)。箭头指示检测到 PCNA 的细胞。表达 SPT 的标记细胞与细胞核相关并且显示强 SPT  
20 表达。箭头指示缺乏 PCNA 标记、具有弥散性 SPT 标记、显示与细胞核没有特异性关系的细胞。根据在核双重染色和体外创伤模型中观察到的表达模式, SPT 表达似乎在增殖性细胞中增加, 并且 SPT1 和 SPT2 的表达与细胞核相关。SPT1 和 SPT2 在气囊损伤性大鼠颈动脉的去分化成纤维细胞和增殖性血管平滑肌细胞中的表达增加最近  
25 也有报道(Uhlinger DJ、Carton JM、Argentieri DC 和 Damiano BP, R. DAM Increased Expression of Serine Palmitoyltransferase(SPT) in Balloon-injured Rat Carotid Artery(气囊损伤性大鼠颈动脉中丝氨酸棕榈酰转移酶(SPT)的表达增加), *Thrombosis and Haemostasis*, 2001, 86:

1220-6)。

图 11 显示 3 个很好建立的癌细胞系 Jurkat (图 11A、图 11B 和图 11C)、HT-29 (图 11D、图 11E 和图 11F)和 SH-SY 5Y (图 11 G、图 11H 和图 11I)中的致密 SPT 免疫标记。在体外和体内创伤修复模型中观察到的 SPT1 和 SPT2 表达增加证明，创伤修复反应和肿瘤形成之间的平行关系。对于用 ICC 根据 SPT1 和 SPT2 的过量表达筛选的几种癌细胞系，表 4 所示的 5 种癌(结肠癌、卵巢癌、胰腺癌、甲状腺癌和未分化癌)和 2 种肉瘤的结果都证明这两种 SPT 亚基的强过量表达；其它肿瘤几乎不表达 SPT1 或 SPT2 或者 SPT1 或 SPT2 的水平不可检测。

图 12 显示用 IHC 和抗免疫前血清(图 12A)、SPT1 (图 12B)和 SPT2 (图 12C)的抗体处理的人恶性结肠癌组织。在所述恶性肿瘤细胞中观察到 SPT1 (小箭头)和 SPT2 (小箭头)的强胞内标记。另外，在靠近所述肿瘤的基质成纤维细胞(大箭头)中观察到免疫染色。人恶性未分化癌组织(图 12D、图 13E 和图 12F)用 IHC 和抗免疫前血清(图 12D)、SPT1 (图 12E)和 SPT2 (图 12F)的抗体进行处理。在与更弱的 SPT2 信号(图 12F)相比，在未分化的人癌组织中似乎是一种强 SPT1 信号(箭头，图 12E)。组织样品中信号强度的比较可能是相关的。由于通过两种 SPT 亚基(或者是催化亚基或者是调节亚基)发挥的酶活性作用仍不清楚，因此没有证据证明无论是增强的 SPT1 表达还是 SPT1 表达与 SPT2 表达之比对于细胞反应是关键性的。图 12G、图 12H 和图 12I 显示用抗免疫前血清(图 12G)、SPT1 (图 12H)和 SPT2 (图 12I)的抗体处理的人恶性甲状腺癌组织。SPT 特异性染色在大多数肿瘤细胞中出现。SPT1 和 SPT2 信号(箭头)的强度在细胞间有所变化。某些恶性肿瘤细胞表达非常高水平的 SPT 亚基，表明在肿瘤细胞中可能需要所述亚基的各种表达水平。图 12J、图 12K 和图 12L 显示人恶性肉瘤组织。SPT1 和 SPT2 (箭头)在该恶性肿瘤中高丰度地表达。

这些结果表明，SPT 在癌细胞中的过量表达并不限于来源于上

皮细胞的那些癌细胞例如癌。来源于间充质细胞、诸如肉瘤的癌症也似乎增加 SPT 亚基的表达。

## 结果

5 本发明研制的抗人 SPT1 和 SPT2 的抗体涉及一种用来观察这些酶亚基在正常人体组织中表达以及在气囊损伤性大鼠颈动脉血管平滑肌细胞和活化成纤维细胞和证明 SPT1 和 SPT2 在体外创伤模型中的表达增加的受伤的人皮肤成纤维细胞的增殖性细胞中升高的表达水平的方法，表明这两种 SPT 亚基的不同细胞正调节和强免疫染色  
10 标记。休眠非增殖性成纤维细胞仅显示全部细胞为浅的弥散性 SPT1 和 SPT2 染色。另外，显然显著量的增加的 SPT1 和 SPT2 免疫标记与细胞核相关。SPT 的核定位涉及鞘脂核信号转导(例如对于有丝分裂发生而言)也是可能的。观察到鞘氨醇激酶转运到用 PDGF 处理的成纤维细胞的细胞核，支持鞘脂参与增殖细胞和转化细胞核信号转导的假说。  
15

本发明的方法涉及一种用于比较正常人体组织和过度增殖性人体组织中的 SPT 表达的方法并且支持越来越多的报道，即参与细胞创伤修复反应的某些关键分子也参与肿瘤的生长和转移。

20 SPT 亚基在几个已很好建立的人肿瘤细胞系(包括淋巴瘤、腺癌和成神经细胞瘤)中高丰度地表达。本发明的方法提供了 SPT1 和 SPT2 在恶性癌细胞以及形成肿瘤微环境的细胞类型例如反应性基质成纤维细胞和局限性巨噬细胞中表达增加的形态学证据。在相似的正常组织的基质成纤维细胞没有检测到 SPT1 和 SPT2。SPT 亚基在这些细胞类型中升高的水平提示 SPT 在细胞转移活性和增殖中的作用。

25 也观察到 SPT 在参与炎症反应的活化白细胞中表达增加(2)。已经证明 SPT 在人巨噬细胞中的正调节增加通过鞘脂生物合成途径的流入。SPT 在人恶性肿瘤中的表达增加可以为通过在经历肿瘤转化的细胞和周围微环境的细胞中发生的鞘脂生物合成途径调节流入的

特征。鞘脂涉及增殖和转移过程。细胞表面各种鞘糖脂表达的变化与获得并保持癌症表型、肿瘤进程和转移相关。

5 本发明的方法也首次提供 SPT1 和 SPT2 蛋白在人恶性肿瘤细胞、局限性巨噬细胞和肿瘤细胞周围的“反应性”基质成纤维细胞中表达的原位组织学比较。升高的 SPT 水平提示，肿瘤以及形成肿瘤微环境(TME)的细胞类型内某些异常细胞活性的可能机制。SPT 亚基在增殖性成纤维细胞的亚细胞定位从弥散性胞质至核相关性所观察到的变化提示该酶的功能作用。另外，SPT 水平和细胞定位可能与特殊的肿瘤类型相关，并且 SPT1 和 SPT2 在肿瘤细胞和基质成纤维细胞中的相对量可能是临床相关的。TME 细胞中的 SPT1 和 SPT2 10 可以是转移活动的一种有效预测指征，从而具有诊断和预后价值。更为重要的是，这些数据表明，本发明的方法可以进一步作为筛选方法使用，以鉴定针对某些肿瘤具有治疗用途的新型 SPT 抑制剂化合物。

15

#### 实施例 4

##### 检测内皮组织中的 SPT1 和 SPT2

##### 气囊血管成形术大鼠模型

20 采用前述方法，通过大鼠颈总动脉的气囊导管吹胀法诱导血管损伤。重 350-450 gm 的雄性 Sprague Dawley 大鼠用氯胺酮/赛拉嗪(75/5 mg/kg, i.m.)麻醉。采用无菌技术，将 2F 栓子切除术导管(Baxter Healthcare, Irvine, CA)通过外颈动脉插入左颈总动脉中。气囊尖后接主动脉，充气至 30 p.s.i，然后用扭曲运动缓慢抽出。该步骤总共重复 3 次。取出导管，牢固地结扎外颈动脉。损伤后 1 天、3 天、7 天和 14 天，大鼠用氯胺酮/赛拉嗪(75/5 mg/kg, i.m.)麻醉。静脉内给予 1 ml 25 含有 1000 U 肝素的 5% Evan 氏蓝溶液。10 分钟后，通过主动脉给大鼠输注 100 mmHg 盐水达 10 分钟，然后输注含 4%低聚甲醛的磷酸缓冲盐溶液(PBS)。取出左右颈总动脉，并且进行制备，供石蜡包埋

法用。完全血栓性闭塞的颈动脉以及在受伤区段未被染成蓝色的颈动脉不进行分析。

### 组织制备

- 5 将组织切片(5  $\mu$ M)固定在玻片上,得自颈动脉中部的代表性切片用苏木精和伊红染色。靠近或几乎靠近的切片用改良的 elastin-van Gieson 染色(Sigma, St. Louis, MO)对弹性蛋白和胶原蛋白进行组织化学染色。其它靠近或几乎靠近的切片用来进行免疫组织化学分析。

### 10 双重免疫组织化学标记

- 受伤的和正常的颈动脉的切片用针对人 SPT1 产生的肽特异性多克隆抗体进行免疫组织化学标记,在独立的实验中,如实施例 2 中所述的方法,用针对人 SPT2 的抗肽抗体进行免疫组织化学标记。各切片也用抗因子 VIII 相关抗原、平滑肌肌动蛋白和 PCNA 的抗体标记。进行一系列的对照,以确保对标记的适当解释。初次抗体用适当种的同种型取代,以控制检测系统。在另一组对照中,省去第一初次抗体而对第二初次抗体进行加工,反之亦然。

- 对于同时双重免疫组织化学标记(IHC:IHC),每种免疫组织化学标记方法在同一切片上顺序进行,然后复染。第二抗原通过碱性磷酸酶-FAST RED (Dako)系统来检测。在初次免疫组织化学标记后,将针对第二标记的初次抗体在室温下在所述玻片上保留 30 分钟。简单地洗涤之后,在室温下加入第二生物素化抗体达 30 分钟。然后将玻片在 PBS 中洗涤,在室温下将链霉抗生物素蛋白-碱性磷酸酶试剂(Vector Labs)在所述玻片上保留 30 分钟。洗涤后,将玻片暴露于 FAST RED CHROMOGEN (Dako)。然后所述玻片用苏木精复染,洗涤,然后在基于水的封固剂(Dako)中覆盖,以便在光学显微镜下观测。

在正常血管中, SPT 标记在内侧平滑肌和内皮中是弥散不规则的。损伤后 1 天和 3 天,在出现新内膜之前, SPT1 和 SPT2 标记在靠近损害或坏死的平滑肌细胞的细胞中增加。另外,增殖性外膜肌

成纤维细胞强标记 SPT1 和 SPT2。损伤后 7 天和 14 天, 受伤血管的基质和新内膜增加了所述新内膜腔边最致密的 SPT 标记。这种腔边已有描述并且显示包括活动性增殖平滑肌细胞。双重免疫组织化学标记证实, SPT 在密度最高的 PCNA 阳性细胞的区内表达最高。

5 图 13 显示在气囊血管成形术后 14 天在大鼠模型中观察到的典型病斑。与未受伤的动脉(右图)相比, 观察到明显的基质增厚以及在气囊损伤的动脉中存在突出的新内膜(左图)。在受伤动脉的基质和新内膜以及未受伤的动脉的基质中都存在平滑肌肌动蛋白标记(图 13C)。在腔边标记最大的受伤血管的基质和新内膜中观察到 PCNA  
10 阳性细胞(图 13E, 箭头)。未受伤血管不表达多种 PCNA 阳性细胞(图 13F)。未受伤颈动脉中的 SPT 标记仅沿完整内皮层显而易见(箭头, 图 13H 和图 13J)。动脉损伤后 14 天, SPT1 和 SPT2 标记从腔细胞向下延伸通过所述新内膜。SPT2 标记似乎更加致密, 尤其是在腔边。这些数据证明, 在对血管损伤应答时存在 SPT1 和 SPT2 的特异性正调节。  
15 在与下述细胞相关的细胞中观察到 SPT1 和 SPT2 的正调节: 基质平滑肌损害、增殖性外膜肌成纤维细胞和新内膜的平滑肌细胞、特别在所述新内膜的增殖性腔边的那些平滑肌细胞。

图 14 通过检查血管成形术后第 1 天、第 3 天、第 7 天和 3 个月 PCNA、SPT1 和 SPT2 表达显示血管损伤的时程。在第 3 天, PCNA  
20 标记在受伤基质的平滑肌细胞(参见箭头)中显而易见(图 14D)。在基质(大箭头)以及沿腔边沉积的血小板(小箭头)中观察到 SPT1 阳性免疫反应性(图 14E)和 SPT2 阳性免疫反应性(图 14F)。在第 7 天, PCNA 标记变得明显得多。标记在早期新内膜中最致密, 但也存在于受伤血管的基质中(图 14G)。与第 7 天在所述基质的浅 SPT1 和 SPT2 免疫标记相比, 致密 SPT1 (图 14H)和 SPT2 (图 14I)免疫标记位于所述  
25 受伤血管的新内膜中。因此, SPT 的表达与似乎活动性增殖平滑肌细胞相一致。损伤后 3 个月, 对 PCNA、SPT1 和 SPT2 的标记限于所述新内膜腔边的倒数第二层。

图 15 显示肌成纤维细胞在对血管成形术应答时外膜和基质重建模中的去分化和增殖。在未受伤颈动脉(图 15A)和受伤第 3 天的血管(图 15B)的苏木精和伊红染色后, 受伤血管的外膜比对照血管外膜更厚且细胞更多。免疫组织化学特征用来显示受伤血管和抗体对 SMA (图 15C)、PCNA (图 15D)、SPT1 (图 15E)和 SPT2 (图 15F)的应答。SMA 阳性免疫标记指示在所述外膜中存在去分化反应性肌成纤维细胞, 而在对照血管中没有观察到这一现象。在所述外膜中也观察到明显的 PCNA 阳性免疫标记(箭头)(图 15D), 证明存在反应性成纤维细胞。在所述外膜(箭头)内的肌成纤维细胞中也观察到明显的 SPT1 免疫标记(图 15E)和 SPT2 免疫标记(图 15F)。这些特征性创伤应答变化与在各种各样的癌中观察到的结果相似, 并且表明 SPT 可能参与成纤维细胞的增生和瘤形成所共有的信号途径。

### 实施例 5

#### 15 体内再狭窄模型

重 350-450 gm 的雄性 Sprague Dawley 大鼠用氯胺酮/赛拉嗪(75/5 mg/kg, i.m.)麻醉。采用前述方法(Damiano 等, 1999), 通过大鼠颈总动脉的气囊导管吹胀法诱导血管损伤。一组大鼠用在第 0 天、第 2 天、第 5 天和第 10 天腹膜内注射的 0.5 mg/kg 丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂多球壳菌素治疗。在第 1 天、第 3 天、第 7 天和第 14 天处死动物, 以评价颈动脉再狭窄损伤的组织病理学并且用免疫组织化学法检查所述丝氨酸棕榈酰转移酶亚基在受伤切片和对照切片中的表达。在经治疗的动物中再狭窄损伤(即血管变窄)程度的降低是 SPT 抑制剂功效的指标。

25

### 实施例 6

#### B16 肺转移模型

让 B16-F10 小鼠黑素瘤细胞(ICLC 目录编号 ATL99010)在标准条件下生长, 作为单层组织培养物。将大约  $2 \times 10^6$  细胞静脉内注射

到 4-8 周龄 C57BL/6 小鼠的尾静脉中。在一组小鼠中，在第 0 天、第 2 天和第 5 天，同时腹膜内给予约 0.5 mg/kg 浓度的丝氨酸棕榈酰转移酶抑制剂例如多球壳菌素。对照组注射溶剂溶媒。肿瘤注射后让小鼠生存 9 天，以让所述肿瘤建立，然后使小鼠安乐死。取出肺，在 Bouin 氏溶液中固定，使用解剖显微镜对肺转移肿瘤数计数。肺转移肿瘤数减少表示 SPT 抑制剂阻止 B16-F10 肿瘤在小鼠中的建立。

### 实施例 7

#### 检测炎性结肠-大鼠结肠炎模型中的 SPT2

10 所述动物用氟烷麻醉，其结肠用乙醇(30%, 1 ml, 约 30 秒)洗涤，以破坏粘膜屏障，然且用盐水冲洗(1 ml)。然后或者将酵母聚糖(1 ml, 25 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO)或者将等体积的溶媒(盐水)通过肛门内插入深约 7-8 cm 的管饲法针滴注到结肠中。结肠内滴注后 20 小时处死所述酵母聚糖动物。给所述动物经贲门灌注固定剂。取出结肠  
15 并在同一溶液中进行后固定。

#### 组织制备

从该模型的结肠远端即已知有结肠炎反应的部位，切取大约 3 个连续的 1 cm 切片，在每种动物一种石蜡封闭剂中包埋，同时进行观察。从每种石蜡封闭剂中切取组织切片(5  $\mu$ M)。将各切片固定在玻片上并用 SPT1 和 SPT2 特异性抗体处理，供免疫组织化学分析用。用髓过氧化物酶和巨噬细胞特异性抗体，用巨噬细胞特异性抗体 MAC-1，用另外的免疫组织化学标记证实多形核白细胞(PMN)的存在。

25 图 16 说明炎性结肠中的白细胞浸润。上图(图 16A)的箭头指示具有增强水平的 SPT2 的活化巨噬细胞。下图(图 16B)显示炎性结肠腔面上的嗜中性粒细胞浸润。箭头指示表现出增强的 SPT2 表达的视野多种活化嗜中性粒细胞中的三种嗜中性粒细胞。根据 SPT1 免疫标记获得相似的结果(数据未显示)。除明显存在 SPT1 和 SPT2 免疫阳

性 PMN 和巨噬细胞外，还观察到迁移性上皮舌上的阳性免疫标记，似乎从正常上皮迁移而来(数据未显示)，提示 SPT1 和 SPT2 不仅存在于炎性细胞中，而且也存在于增殖性上皮细胞(也许作用在于使伤口愈合)中。

5

虽然先前的说明书叙述了本发明的原理、提供用于说明的实施例，但是人们将会理解，就本说明书而论，对本发明各个方面的进一步修改是本领域技术人员显而易见的，并且本发明的实施包括以下权利要求书范围内进行的所有通常的变化、替代实施方案、改进和/或修改及其解释为包括所有这样的变化的等同实施方案。

10

图 1

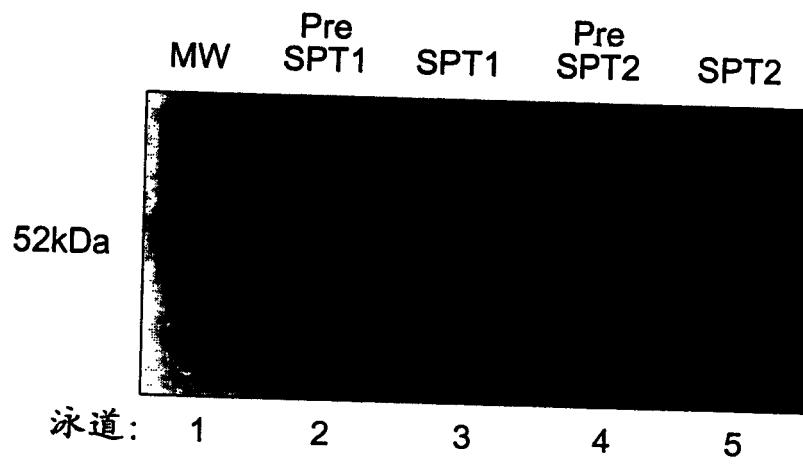


图 2A 图 2B 图 2C

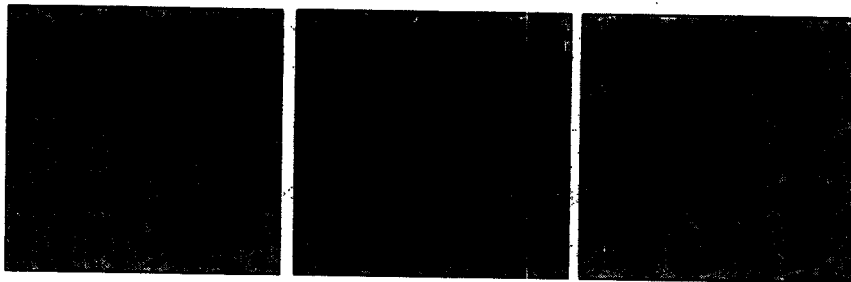


图 3A      图 3B      图 3C

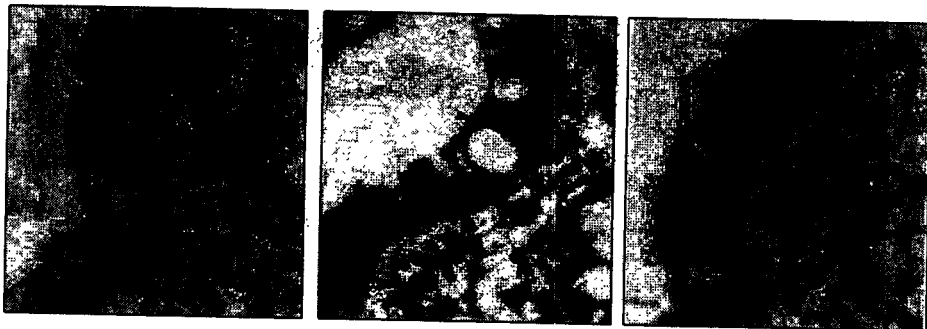


图 4A 图 4B 图 4C



图 5A 图 5B 图 5C



图 6A 图 6B 图 6C



图 7A 图 7B

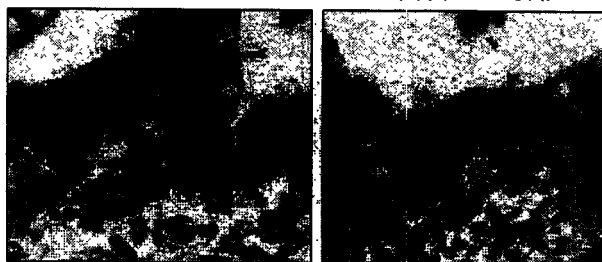


图 8A

图 8B

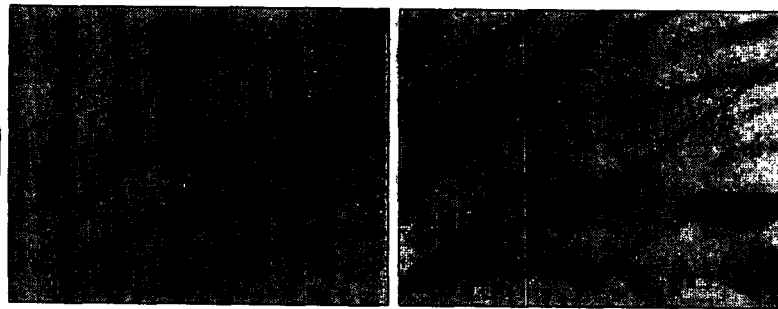


图 8C

图 8D

图 9A 图 9B 图 9C

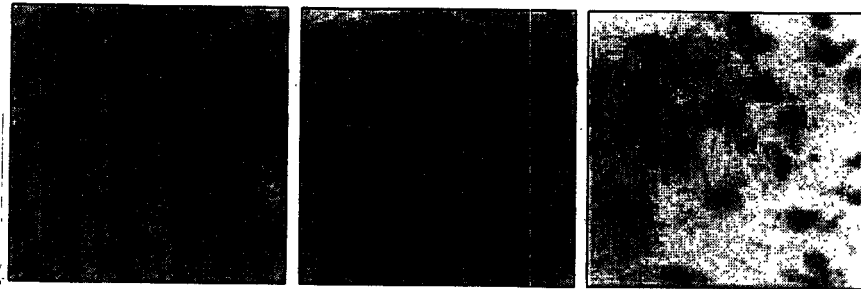


图 9D 图 9E 图 9F

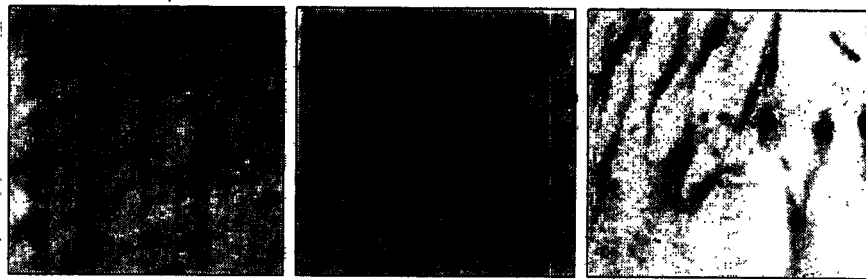


图 9G 图 9H 图 9I

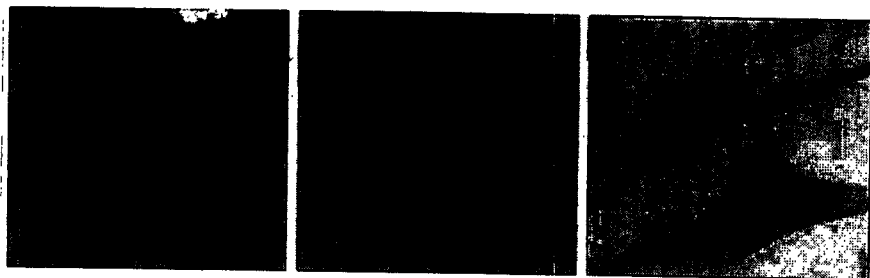


图 9J 图 9K 图 9L

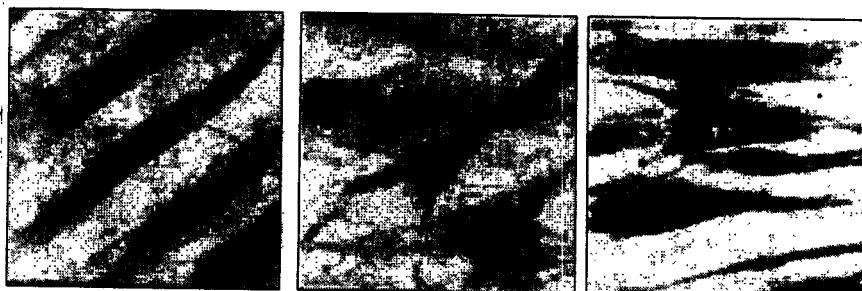


图 10A

图 10B

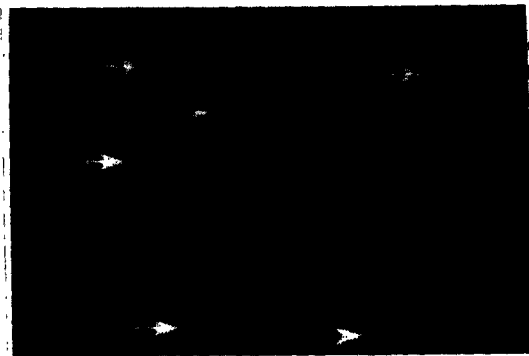
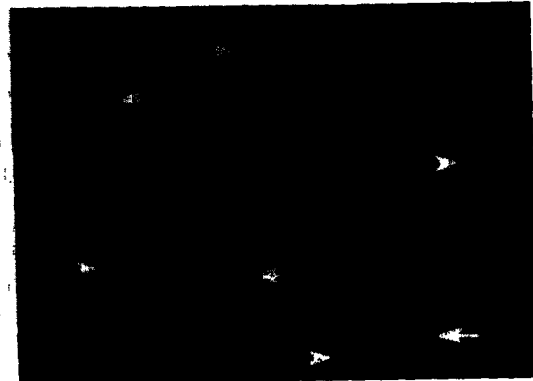
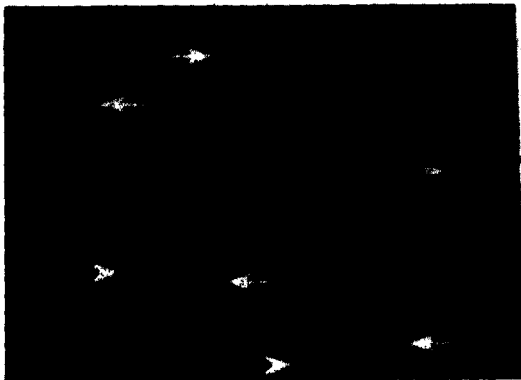


图 10C

图 10D

图 11A

图 11B

图 11C

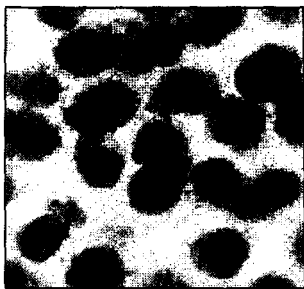


图 11D

图 11E

图 11F



图 11G

图 11H

图 11I

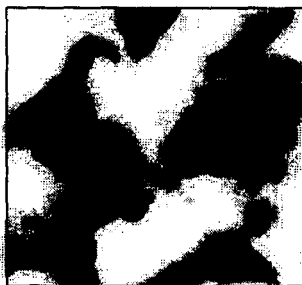
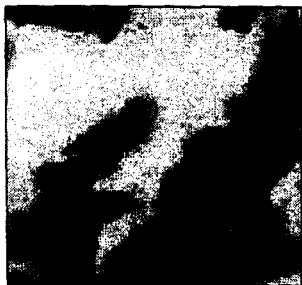


图 12A      图 12B      图 12C

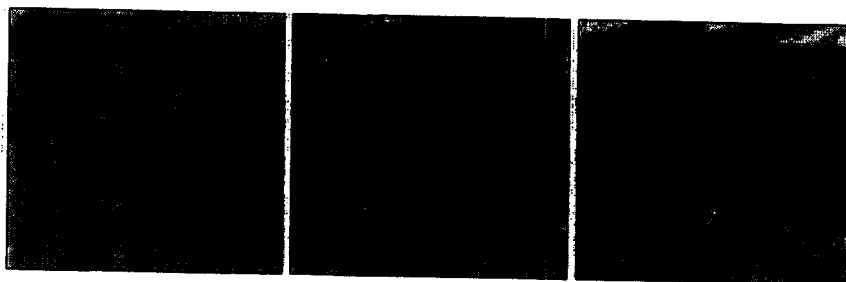


图 12D      图 12E      图 12F

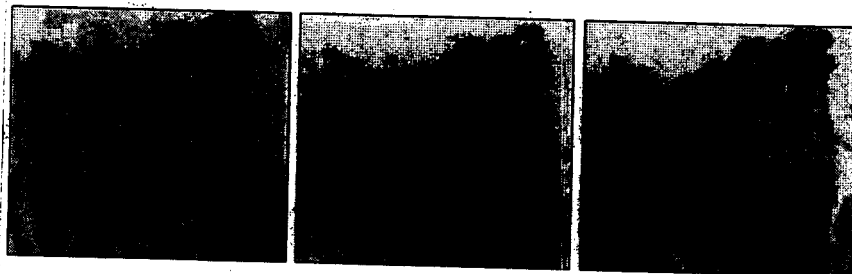


图 12G      图 12H      图 12I

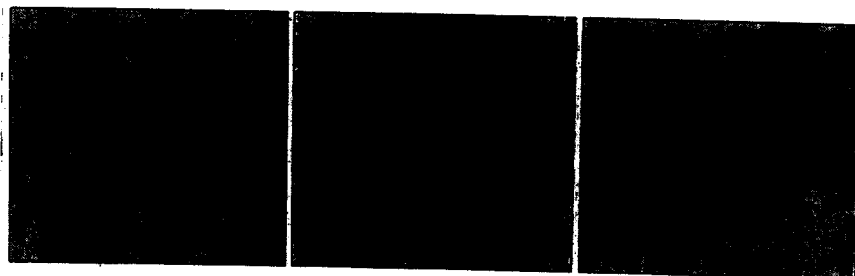


图 12J      图 12K      图 12L

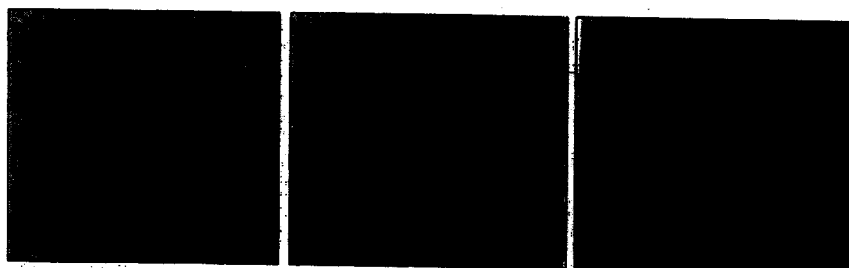


图 13A

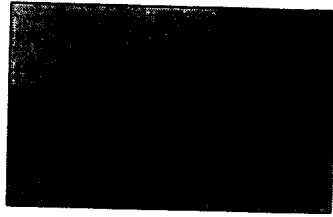


图 13B

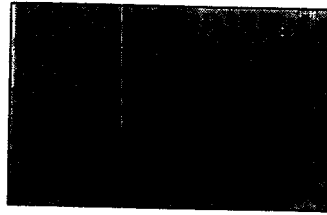


图 13B

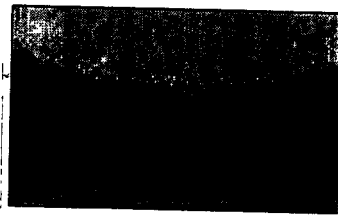


图 13C

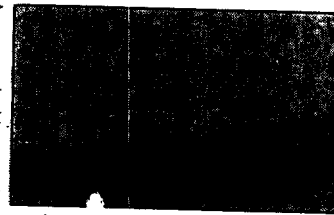


图 13D



图 13E

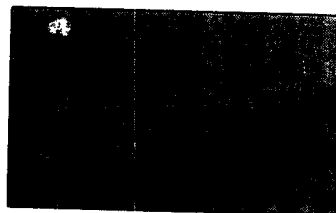


图 13F

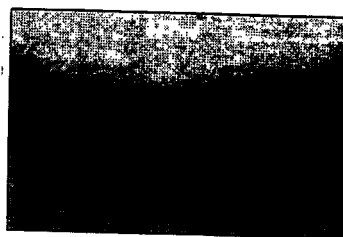


图 13G

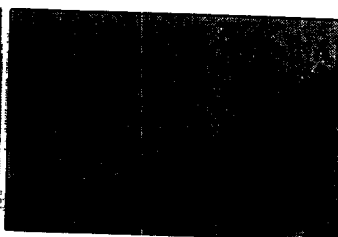


图 13H

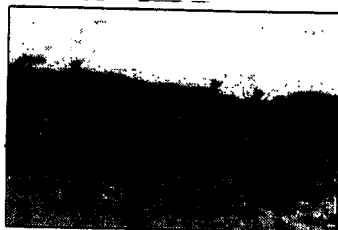


图 13I



图 14A 图 14B 图 14C

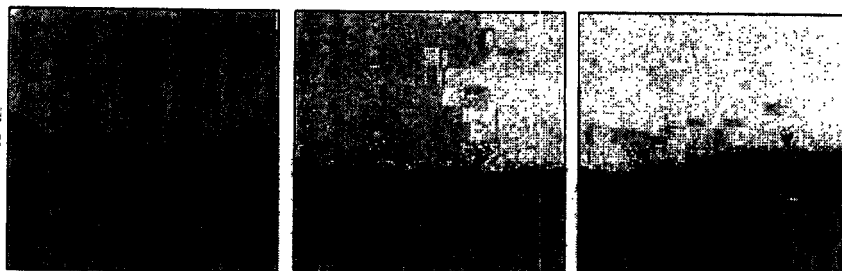


图 14D 图 14E 图 14F

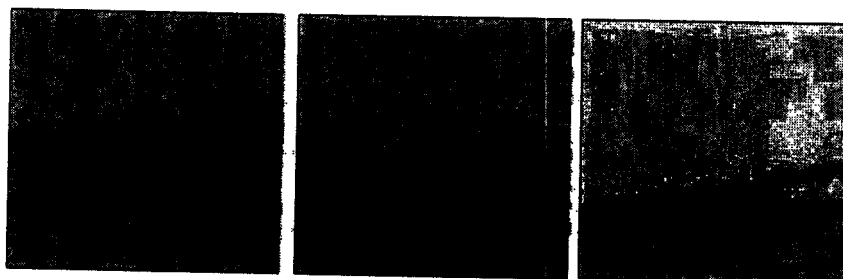


图 14G 图 14H 图 14I

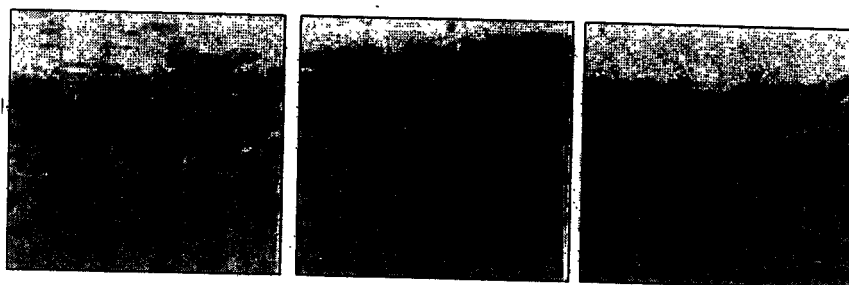


图 14J 图 14K 图 14L

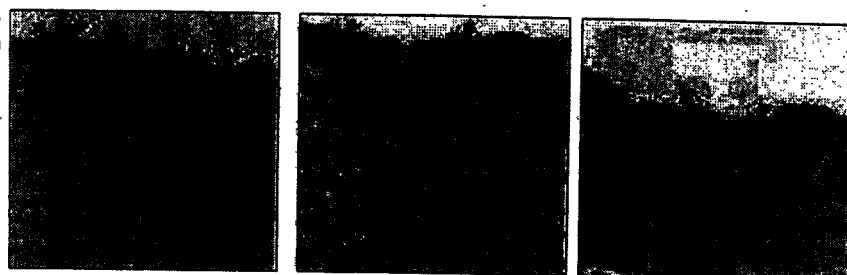


图 15A

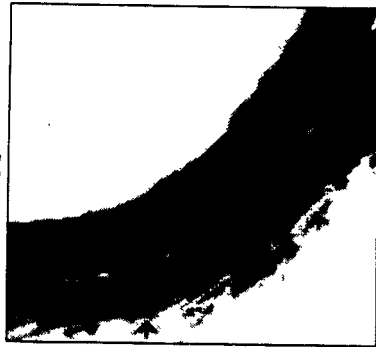


图 15B



图 15C



图 15D

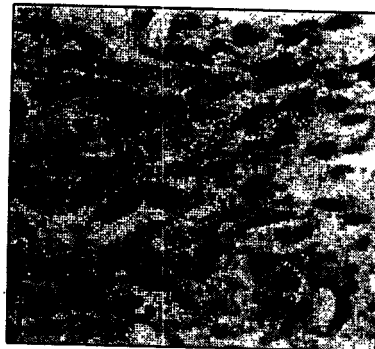


图 15E

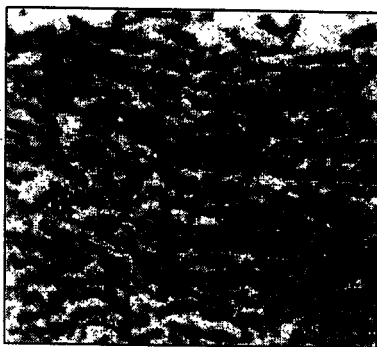


图 15F



图 16A

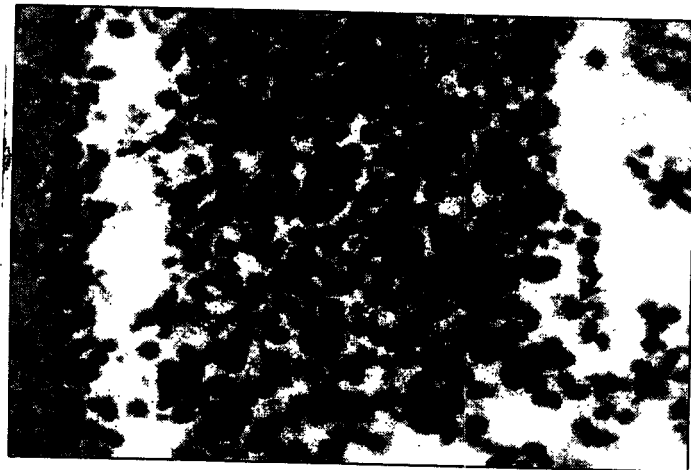
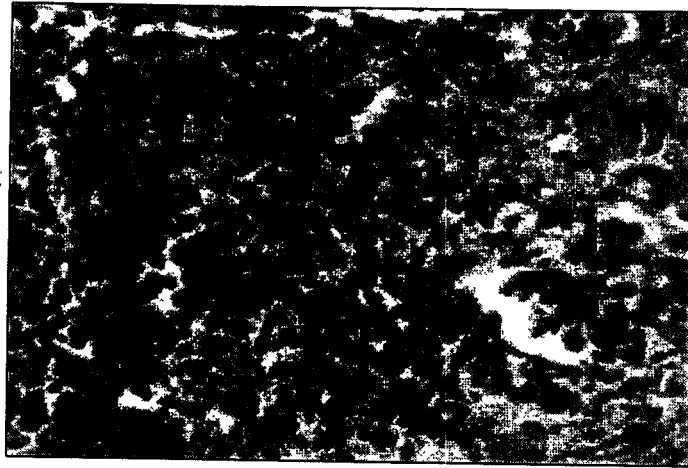
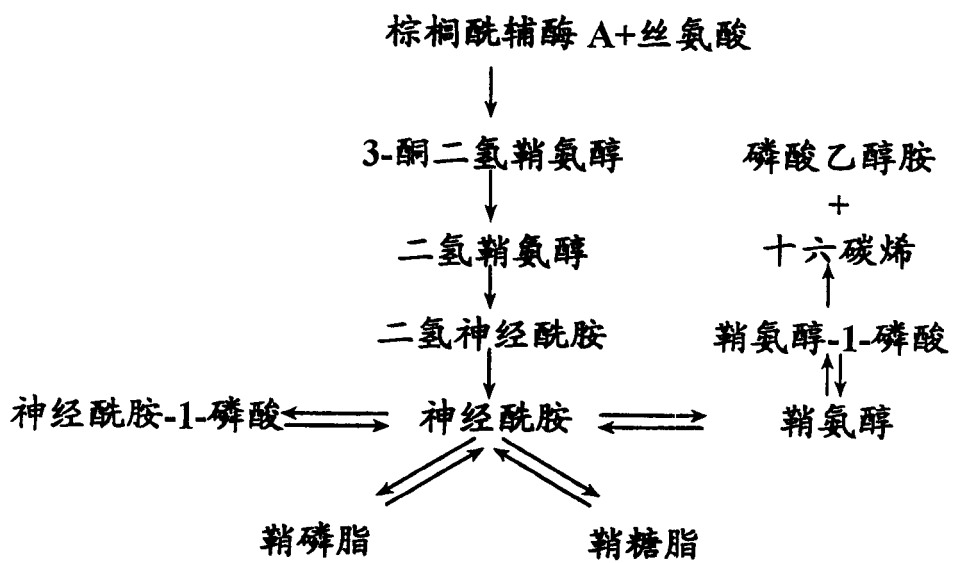


图 16B

# 图 17

## 鞘脂代谢



专利名称(译)	用于测量哺乳动物组织丝氨酸棕榈酰转移酶的方法及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1610751A</a>	公开(公告)日	2005-04-27
申请号	CN02810014.X	申请日	2002-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	奥索 - 麦克尼尔药品公司		
申请(专利权)人(译)	奥索·麦克尼尔药品公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥索·麦克尼尔药品公司		
[标]发明人	JM卡顿 MR德安德雷 DJ厄林格		
发明人	J·M·卡顿 M·R·德安德雷 D·J·厄林格		
IPC分类号	G01N33/573 A61K45/00 A61P1/04 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/40 C12N9/10 C12Q1/02 C12Q1/48 C12R1/91 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 C12Q1/00 G01N33/574 A61K49/00 A61K39/00 A01N61/00		
CPC分类号	G01N2500/10 C12N9/1029 C12Q1/48 G01N33/5011 C07K16/40 G01N33/5091 G01N2800/52 A61P1/04 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/14 A61P11/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00		
优先权	60/277252 2001-03-20 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)  
本发明涉及一种用于比较性测量哺乳动物组织中正常与过度增殖性丝氨酸棕榈酰转移酶表达水平的方法及其应用。

