

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780010741.6

[51] Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 14/32 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

[43] 公开日 2009年8月12日

[11] 公开号 CN 101505780A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/567 (2006.01)

[22] 申请日 2007.2.22

[21] 申请号 200780010741.6

[30] 优先权

[32] 2006.2.22 [33] US [31] 60/775,645

[86] 国际申请 PCT/US2007/062587 2007.2.22

[87] 国际公布 WO2007/101063 英 2007.9.7

[85] 进入国家阶段日期 2008.9.25

[71] 申请人 朱正崙

地址 美国马萨诸塞州

共同申请人 高红

[72] 发明人 朱正崙 高红

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 刘晓东 彭鲲鹏

权利要求书 3 页 说明书 41 页

[54] 发明名称

发育相关疾病的治疗

[57] 摘要

本发明公开了用于治疗发育相关疾病的组合物和方法。还公开了诊断方法、预后方法和药物筛选方法。

1. 一种用于治疗对象中细胞增殖性疾病的方法，该方法包括向有此需要的对象施用有效量的包含 SEQ ID NO: 1 或 3 的多肽或其功能等效物。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞增殖性疾病是以 LEF1/TCF 所介导转录的异常活化为特征的病症。

3. 权利要求 2 的方法，其中所述多肽缺少 LEF1/TCF 反式激活域。

4. 一种用于治疗对象中炎症相关疾病的方法，该方法包括向有此需要的对象施用有效量的包含 SEQ ID NO: 1 或 3 之多肽或其功能等效物的抑制剂。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述炎症相关疾病是自身免疫病或炎症性疾病。

6. 一种用于治疗骨髓发育不良综合征的方法，该方法包括向有此需要的对象施用有效量的包含 SEQ ID NO: 1 或 3 之多肽或其功能等效物的抑制剂。

7. 一种鉴定用于治疗细胞增殖性疾病或炎症相关疾病的化合物的筛选方法，该方法包括：

将测试化合物与含有 SEQ ID NO: 3 中包含 Ser140 或 Ser144 之片段的多肽接触，或者与包含所述多肽的细胞接触；以及

确定 Ser140 或 Ser144 的磷酸化，

其中，如果所述化合物存在时的磷酸化水平低于该化合物不存在时的磷酸化水平，则表明该化合物是治疗所述疾病的候选药物。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述片段的长度至少为 11 个氨基酸残基。

9. 组合物，其包含具有 SEQ ID NO: 1 序列或其功能等效物的多肽或者该多肽的激活剂。

10. 权利要求 9 的组合物，其中所述组合物包含白藜芦醇、鞣花酸和乙酰水杨酸。

11. 权利要求 10 的组合物，其中所述组合物还包含水杨酸、大黄素或黄酮类化合物。

12. 权利要求 9 的组合物，其中所述组合物是局部应用的组合物。

13. 权利要求 9 的组合物，其中所述组合物是食用组合物。

14. 权利要求 13 的组合物，其中所述组合物是茶、软饮料、果汁、奶、咖啡、果冻、冰淇淋、酸奶、饼干、谷类食品、巧克力、士力架、糖果、口香糖、糖浆或食物胶囊。

15. 一种用于护肤的方法，其包括向有此需要的对象施用安全且有效量的权利要求 12 所述的组合物。

16. 一种评估对象中癌症预后的方法，该方法包括：

从该对象获得生物样品；以及

确定该样品中是否存在编码含有 SEQ ID NO: 1 的多肽的基因，

由此，如果所述基因存在于两条染色体上，则表明该对象具有良好的预后；反之，如果所述基因从染色体之一丢失，则表明该对象具有差的预后。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述生物样品是肿瘤活检样品、血样、尿样或粪便样品。

18. 一种评估对象中癌症预后的方法，该方法包括：

从该对象获得生物样品；以及

确定该样品中编码含有 SEQ ID NO: 1 的多肽之基因的表达水平，

其中，如果所述表达水平高于对照水平，则表明该对象具有良好的预后；反之，如果所述表达水平低于对照水平，则表明该对象具有差的预后。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述方法还包括：在确定该样品中编码含有 SEQ ID NO: 1 的多肽之基因的表达水平之前，将所述样品与化疗试剂接触。

20. 权利要求 18 的方法，其中所述生物样品是肿瘤活检样品、血样、尿样或粪便样品。

21. 一种用于维持多潜能细胞的方法，该方法包括将所述细胞与含有 SEQ ID NO: 1 的多肽的激活剂接触。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述多潜能细胞是干细胞。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述干细胞选自造血干细胞、胃肠干细胞、神经干细胞和皮肤干细胞。
24. 包含 SEQ ID NO: 1、3 或 17 所述序列的分离的多肽。
25. 权利要求 24 的分离的多肽，其中所述多肽包含 SEQ ID NO: 11、12、13、14、15 或 16。
26. 分离的核酸，其包含编码权利要求 24 的多肽的序列。
27. 包含权利要求 26 的核酸序列的表达载体。
28. 包含权利要求 26 的核酸序列的宿主细胞。
29. 一种产生多肽的方法，其包括在允许表达核酸所编码的多肽的条件下，在培养基中培养权利要求 28 的宿主细胞，以及从所述培养细胞或该细胞的培养基纯化所述多肽。
30. 一种诊断对象中骨髓发育不良综合征的方法，该方法包括：
从该对象获得生物样品；以及
确定该样品中编码包含 SEQ ID NO: 1 的多肽之基因的表达水平，
其中，如果所述表达水平高于对照水平，则表明该对象患有或者易于发生骨髓发育不良综合征。
31. 一种诊断对象中系统性红斑狼疮的方法，该方法包括：
从该对象获得生物样品；以及
确定该样品中编码包含 SEQ ID NO: 1 的多肽之基因的表达水平，
其中，如果所述表达水平高于对照水平，则表明该对象患有或者易于发生系统性红斑狼疮。

发育相关疾病的治疗

相关申请

本申请要求 2006 年 2 月 22 日提交的美国临时申请 No. 60/775,645 的优先权。所述在先申请的全部内容通过参考并入本文中。

背景技术

发育生物学家面对的一个基本问题是：多细胞生物是如何从受精卵（一种全能干细胞，其具有简单的对称结构）发育为成体（其具有三维的机体结构）的。该过程的调节异常会导致早期发育期间胚胎发生的中止，并常导致成年时形成肿瘤。因此，有必要开发用于调节发育过程以及治疗多种与发育调节异常有关的疾病（如癌症、退行性疾病和免疫疾病）的药剂和方法。

Wnt 信号途径参与多种干细胞的增殖或分化。例如，它在胚胎组织或骨髓来源的造血干细胞分化中起关键作用。骨形态发生蛋白（bone morphogenic protein, BMP）属于 TGF- β 超家族，并且其在从蝇类到哺乳动物的物种中均有发现。BMP 信号途径对于胚胎发生期间的细胞命运决定和模式形成以及维持成体中的组织稳态是非常重要的。BMP 途径还参与形态发生的调节以及胃肠（GI）发育的出生后再生。参见，例如美国专利 6824971、6159462、6465249 和 6165748。

发明内容

本发明涉及治疗癌症、退行性疾病和免疫疾病，并涉及使用 Wnt/ β -联蛋白（Wnt/ β -catenin）或 BMP4/Xom 信号途径来鉴定用于治疗这些疾病的化合物。以下所示为 Xom 及其人同源物 Hom 的多肽序列和核苷酸序列。

Xom 多肽 (SEQ ID NO: 7)

mtkafssvew laqssrrshr eqpskvdqry spypspslps wnsdvspssw
 nsqslspdpds aqvspcpasa qvspysdse islysheeea sfygmnlnts
 sspgdngllh semvsvpdni prassdedaa ksayststds gyesetscss
 stapegdais lspndtsdee gkmgrrlrta ftsdqistle ktfqkhrylg
aserqklaak lqlsevgikt wfqnrarmkyk reiqdgrpds yhpaqffgvv
 gyaqqptpvf qhavqhpypg ynplmetlpg tmpytmhppa mdsmtpfnsq
 pfqmllylpqq hlgqpltyqe erpfvry

(下划线部分: Ser140 和 Ser144 残基, 以及氨基酸 176-233/同源域/SEQ ID NO.: 3)

Xom cDNA 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 10) :

agaacacaag gactaataca gacaagatga ctaaagcttt ctcctctgtt
gaatggcttg ctcaaagcag ccgcagatct cacagagagc agccaagcaa
agtggatcag agatattcac cgtaccccag gccatccctg ccttcctgga
acagtgatgt gtccccttct tcatggaaca gccaactatc tccagatcca
gacagtgcc aagtctcacc atgccctgtg agtgcaccaag tatctccata
ttcctcagac agtgaaatat cactgtattc acatgaagaa gaagcctctt
tctatggaat ggactttaat acatcatcat ccctggaga caatggattg
ctacacaggg acacaacctc atactccaga ggaatggagg ccatgtcggc
cagcactcca gcaacatcac ctgtgaaagg ggcacaacct gttgattccg
cctacagcac tagcactgac tcaggctatg aaagtgaaac gagtcgatcc
aactctacag ccctgaagg agatgcctcc gtatctctga gtcccaatga
tacctcagat gaagagggca agatgggccg aaggttgagg acggctttca
ccagtgatca gatctccact ctggagaaga cttttcagaa acacagatac
cttggggcgt ctgaaagacg gaaactcgca gccaaactcc agctttctga
agtccagatt aaaacttgg tccagaaccg caggatgaaa tacaaacggg
aatccaaga tggcagacca gactcatacc accagccca gttctttggt
gtgtacggct atgcacagca gccactcct gtattccagc atgcagtcca
acatccctac ccagggtata accactaat ggaaacctg cctgggtacca
tgccctatac catgcatcca cctgccatgg actctctgac tcccttcaac
tctcaacctt ttcagatgct ctacctgcc caacagcacc ttgggcaacc
tctggcctat taggaagaaa ggccatttgt tagatattaa tctagaactt
ataaaaggac tatactaaag gctggacttt tccatggact tctgtcctcc
cgcaggaaa acaaaattgc actgaatatt gttattgaca agatgtttac
tgaatggatg gctaatttg ggccatgtgt tgacatgatt ttattcacat
tgaatagtgg cgtgtatatt ctatgaaaa taccatttat atgactaata
aatgtaagtt atatttaaaa aaaaaaaaa a

(下划线部分: 编码序列 (核苷酸 27 至 1013) /SEQ ID NO: 8)

Hom 多肽 (SEQ ID NO: 5) :

mrlssspprg pqqfssfgsv dwlsqsscsg pthtprpadf slgslpgpgg
tsgareppqa vsikeaagss nlpapertma glskepntlr aprvrtaftm
eqvrtlegvf qhhqylsple rkrlaremql sevgiktwfq nrrmkhkrqm
qdpqlhspfs gslhappafy stssglangl qlfcpwapls gpqalmppg

sfwglcvaq ealasagasc cgqplashpp tpgrpslga lstgprglca
mpqtgdaf

(下划线部分: 氨基酸 93-151/同源域/SEQ ID NO: 1)

Hom 核苷酸序列 (SEQ ID NO: 9)

acctggccgc catgegcctc tctcctccc cacctcgtgg cccgcagcag
 ctctccagct ttggctcctg ggactggctc tcccagagca gctgctcagg
gccgaccac accccaggc ctgccgactt ctccctgggg agcctccctg
gccagggcca gacatccggc gcccgggagc cccctcaggc cgtcagcatc
aaggaggccg ccgggtcctc aaatctgcct gcgccggaga ggaccatggc
cgggttgagt aaggagccaa ataccttgcg ggccccccgt gtccgcacag
ccttcacat ggagcaggtc cgcaccttgg agggcgtctt ccagcaccac
cagtacctga gccctctgga gcggaagagg ctggccaggg agatgcagct
ctcagaggtc cagataaaaa cctggtttca gaatcgccgc atgaaacaca
aacggcaaat gcaggacccc cagctgcaca gcccttctc gggtctctc
catgcgccc cagctttcta ctcaacgtct tctggccttg ccaatggcct
gcagctgctg tgcccttggg caccctgtc cgggcccag gctctgatgc
tgcccctgg ctccttctgg ggtctctgcc aagtggcaca agaggccctg
gcatctgcgg gagcttctg ctgcgggcag cctctggcgt cccaccccc
taccccaggc cggccttgc tgggaccagc cctgtccacg gggccccggg
gctgtgtgc tatgccacag acgggggatg cattttgagg aggcacctct
gactcccaca ctcgcggctc tgctgatcgc acctggctcc tacctggagg
actcagttgt tctgtttaca tcttgggtggc acctctcacc ctgaccaca
caaaggttct ggagattact ggagaatata tataaatata tatatgtacg
tatatatgta aatacacata tacgtatata taaataata tatacatatg
tgtgtgtata tatatatata ttttttttt ttttttttt tttgagacgg
agtgttgctc tgaccaccag gctggagtgc aatgacgcaa tctcggctca
ctgcaacctc cgcctcctgg gttcaagcga ttctccagcc tcagcctccc
gagtagctgg gattacagac accgcccacc acgcccggct aattttttct
attttttagta gaaatgggg ttcaccatgt tagccaggct ggtctcaaac
tctgaccct gtgatccgcc cgcctcggcc tcccaaagt ctgggattac
aggcatgagc cactgcaccc ggccctgaga atataattat taaagccacc
tcttcaactga aagttaccga aagagtccgt ttaggaagga aacgaagggt
cagtgaacag agtcaaatgc agaagtgggc ttgtcatggg tagggcttct
ggcgtacgat aaaaggatca tttgttttt aaaaggggt ggaaaaactg
gttttccagt tggaaacagt aaaggttgta agctttgtgt gtacaaaaga
aaacagggaa tgcaggtgtg tttatagcgt tgtggttcaa gtccctctta
acaagaactc caaagctgga aagcaggagg gaacaaagg gaacatgaag
gcgaggatgc tggggccctg cagtgcgctc taggctgtgc gtgagccggg
actgtacca cagcttgcctg agggctgctc ttcttgggcc agggaaagca
gggcagccgg gacctgcggc tgtgcctgga ctgaagctgt cccgcaggtc
cccaccctcc aacacgtgct cacctgtccc cctcctcgca gcagcctcgg
gacaaaacaa tgactcaagg acagcacttc tcgcagaagg tctggaagtg
cccagaatgg gaggcacgga agcccctccc ggggaggact cccgcgttga
tggaccgttc ttggtgcaga ctcctgactg cgtgcatgaa acctgagaca
agtgcgaattc cttccatgct gcccagagt gcccaggagg caggcagtg

```

ggggtgcccc ggcagacggg ttcagcctgc agaactggag gcgacctgtg
aaaccacc cc gggcaccccc acaggaacag aagcgtggtc ctgcggctgc
gtccccagcg agtttcaact tccccttgot cgtttctccc ttgttgtaag
tgtttacaac tggcatgtgc ttttaaactg caggtaagag gggaacagct
gctgtacatc gtccctggcga gtgacaatgt gacagaagcc tgggocgaggc
cctcggaggg cagcagctgg acaggggcta ctggggttgg cctggacagc
actgatttgt ggatgtggat gggggcacgt tgtccgtgat aaaagtacaa
gtgcccctca caaaaaaaaa aaaaaaaaa

```

(下划线部分: 编码序列 (核苷酸 12 至 788) /SEQ ID NO: 6)

一方面, 本发明涉及用于治疗对象中细胞增殖性疾病的方法。细胞增殖性疾病是指以不受控制的自主性细胞生长 (包括恶性生长和非恶性生长) 为特征的疾病。所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的含有 SEQ ID NO: 1 或 3 的多肽或其功能等效物。“功能等效物”是指一种共同多肽的多肽衍生物 (例如, 包含一个或多个点突变、插入、缺失、截短的蛋白质, 融合蛋白质, 或其组合), 并且其基本上保留了该共同蛋白质的能力 (例如与 LEF1/TCF 结合)。在一个实例中, 所述多肽缺少 LEF1/TCF 反式激活域。细胞增殖性疾病可以是以 LEF1/TCF 所介导转录的异常活化为特征的病症。LEF1/TCF 所介导转录的异常活化是指 LEF1/TCF 所介导的转录处于异常高水平, 如通过以下实施例 1 中所述的 TOPflash 测定或其它类似的测定所确定的细胞状态。

本发明还涉及用于治疗对象中炎症相关疾病的方法。炎症相关疾病的特征在于局部或全身的、急性或慢性的炎症。所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的含有 SEQ ID NO: 1 或 3 的多肽 (例如 Xom 或 Hom) 或其功能等效物的抑制剂。炎症相关疾病是自身免疫病或炎性疾病。含有 SEQ ID NO: 1 或 3 的多肽的抑制剂是指以统计学显著的方式降低细胞中该蛋白质水平的化合物。所述抑制剂的实例包括针对 Hom/Xom 的抗体、反义核酸和 RNAi 试剂以及小分子化合物和天然存在的化合物。

本发明还涉及用于治疗对象中退行性疾病的方法。退行性疾病的特征在于局部或全身的、急性或慢性的退化、细胞体积减小或细胞功能丧失。所述方法包括向有此需要的对象施用有效量的含有 SEQ ID NO: 1 或 3 的

多肽（例如 Xom 或 Hom）或其功能等效物的抑制剂。

本发明还涉及用于治疗骨髓发育不良综合征的方法。该方法包括向有此需要的对象施用有效量的含有 SEQ ID NO: 1 或 3 的多肽或其功能等效物的抑制剂。

另一方面，本发明涉及鉴定用于治疗细胞增殖性疾病的化合物的筛选方法。该方法包括将测试化合物与含有 SEQ ID NO: 3 中包含 Ser140 或 Ser144 之片段的多肽接触；并确定 Ser140 或 Ser144 的磷酸化情况（例如，利用 Ser140 和 Ser144 的磷酸化特异性抗体）。如果所述化合物存在时的磷酸化水平低于该化合物不存在时的磷酸化水平，则表明该化合物是治疗所述疾病的候选药物。所述筛选方法还可通过如下步骤进行：将测试化合物与具有含 SEQ ID NO: 3 中包含 Ser140 或 Ser144 之片段的多肽的细胞接触；并确定 Ser140 或 Ser144 的磷酸化情况。如果所述化合物存在时的磷酸化水平低于该化合物不存在时的磷酸化水平，则表明该化合物是治疗所述疾病的候选药物。所述片段的长度至少为 14（例如，15、18、20、30、50、100、150、200、250 和 300）个氨基酸残基。

上述方法还可用于鉴定增强 Ser140 或 Ser144 磷酸化的化合物。这样鉴定出的化合物代表用于治疗细胞退行性疾病或炎症相关疾病的候选药物。特别地，如果该磷酸化水平高于对照，则表明该化合物是用于治疗细胞退行性疾病的候选药物。

在另一方面，本发明涉及包含具有 SEQ ID NO: 1 或 3 序列之多肽或其功能等效物或者所述多肽之激活剂的组合物。所述多肽的激活剂是提高该多肽的蛋白质水平的化合物，其通过诱导多肽表达或抑制其蛋白酶解来实现。所述激活剂的实例包括视黄酸、白藜芦醇、鞣花酸、乙酰水杨酸及其衍生物。所述组合物还可包含水杨酸、大黄素、黄酮类化合物或其衍生物。在一个实施方案中，所述组合物是局部应用的组合物，其可用于护肤。特别地，可以向有此需要的对象施用安全且有效量的所述组合物。在另一实施方案中，所述组合物是食用组合物，例如茶、软饮料、果汁、奶、咖啡、果冻、冰淇淋、酸奶、饼干、谷类食物、巧克力、士力架（snack bar）、糖果、口香糖、糖浆或食物胶囊。该食用组合物可用于治疗或延缓细胞增殖性疾病的发作。

在另一方面，本发明涉及评估对象中癌症预后的方法。所述方法包括：从该对象获得生物样品；确定该样品中是否存在编码含有 SEQ ID NO: 1

的多肽的基因。如果所述基因存在于两条染色体上，则表明该对象具有良好的预后；反之，如果所述基因从一条或两条染色体丢失，则表明该对象具有差的预后。

也可以通过以下步骤评估对象中癌症预后情况：从该对象获得生物样品；确定该样品中编码含有 SEQ ID NO: 1 的多肽之基因的表达水平。如果所述表达水平高于对照水平，则表明该对象具有良好的预后；反之，如果所述表达水平低于对照水平，则表明该对象具有差的预后。所述对照水平可以从正常对象获得。该方法还可以包括：在确定该样品中编码含有 SEQ ID NO: 1 的多肽之基因的表达水平之前，将所述样品与化疗试剂接触。所述生物样品可以是肿瘤活检样品或血样。

还涉及诊断骨髓发育不良综合征的方法。该方法包括：从该对象获得生物样品；确定该样品中编码含有 SEQ ID NO: 1 的多肽（例如 Hom）之基因的表达水平。异常升高的表达水平表明该对象患有或者易于发生骨髓发育不良综合征。

本发明还包括用于确定对象是否患有或者易于发生系统性红斑狼疮（SLE）的方法。该方法包括：从该对象获得生物样品；确定该样品中编码含有 SEQ ID NO: 1 的多肽之基因的表达水平。如果所述表达水平高于对照水平，则表明该对象患有或者易于发生系统性红斑狼疮。

本发明还包括用于维持多潜能细胞的方法，该方法包括将所述细胞与含有 SEQ ID NO: 1 的多肽的激活剂接触。所述多潜能细胞可以是干细胞，例如造血干细胞、胃肠干细胞、神经干细胞（neuronal stem cell）和皮肤干细胞。

本发明还包括 Xom 或 Hom 的分离的突变多肽，所述 Xom 或 Hom 包含 SEQ ID NO: 1 或 3 序列。这样的突变多肽的实例包括：Xom ND55、Xom ND175、Xom CD145 和 Xom CD85，其分别对应于 SEQ ID NO: 7 的 56-326 位氨基酸、176-326 位氨基酸、1-181 位氨基酸和 1-241 位氨基酸（分别为 SEQ ID NO: 11-14）。另外的实例包括：SEQ ID NO: 7 的 1-130 位氨基酸和 241-326 位氨基酸的融合蛋白（SEQ ID NO: 15）以及 Xom 的 1-175 位氨基酸和 Hom 的 93-258 位氨基酸的融合蛋白（SEQ ID NO: 16）。另外的实例包括含有 SEQ ID NO: 7 片段（其包含 Ser140 或 Ser144）的多肽，如 TDSGYESETSC（SEQ ID NO: 17），以及其中 Ser140 或 Ser144 替换为其它氨基酸残基（如丙氨酸）的突变体。这些多肽的长度至少为 11（例

如, 11、13、15、20、50、100、150、200、250 和 300) 个氨基酸残基。它们可以用于筛选 Ser140 或 Ser144 磷酸化的抑制剂或者作为抑制内源 Xom 的 Ser140 或 Ser144 磷酸化的治疗试剂。本发明包括包含一个或多个上述突变序列和异源序列的融合蛋白。异源的多肽、核酸或基因是源于外源物种的多肽、核酸或基因; 或者, 如果源自同一物种, 则从其最初形式经显著改变而来。如果两个融合的结构域或序列在天然存在的蛋白质或核酸中彼此不相邻, 则它们彼此是异源的。

分离的多肽是指不含与其天然相关之分子的多肽, 即, 其纯度至少为 75% (干重) (即, 包括 75% 与 100% 之间的任何数值)。可以使用任何适当的标准方法来测量纯度, 如柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳或 HPLC 分析。本发明的分离的多肽可以从天然来源进行纯化, 或者通过重组 DNA 技术进行制备。

本发明还涉及分离的核酸, 其包含编码上述突变多肽或融合多肽的序列或者该序列的互补序列。核酸是指 DNA 分子 (例如 cDNA 或基因组 DNA)、RNA 分子 (例如 mRNA) 或者 DNA 或 RNA 类似物。DNA 或 RNA 类似物可以由核苷酸类似物合成而来。所述核酸分子可以是单链或双链的, 但优选双链 DNA。“分离的核酸”是结构上不同于任何天然存在的核酸或者不同于天然存在的基因组核酸之任何片段的核酸。因此, 该术语涵盖了例如: (a) DNA, 其具有天然存在的基因组 DNA 分子的一部分序列, 但是其两侧均不是天然存在该分子的生物基因组中位于该分子部分两侧的编码序列; (b) 核酸, 其被掺入到载体或者原核生物或真核生物的基因组 DNA 中, 从而所得的分子不同于任何天然存在的载体或基因组 DNA; (c) 单独分子, 如 cDNA、基因组片段、聚合酶链式反应 (PCR) 产生的片段或者限制性酶切片段; 以及 (d) 重组核苷酸序列, 其为杂合基因 (hybrid gene) (即编码融合蛋白的基因) 的一部分。上述核酸可用于表达本发明的多肽。为此目的, 可以将所述核酸与合适的调节序列有效连接以得到表达载体。

载体是指能够将其连接的另一核酸进行转运的核酸分子。载体能够自主复制或者整合到宿主 DNA 当中。载体的实例包括质粒、粘粒或病毒载体。本发明的载体包括采用适于在宿主细胞中表达核酸的形式的核酸。优选地, 所述载体包括与待表达的核酸序列有效连接的一个或多个调节序列。“调节序列”包括启动子、增强子和其它表达控制元件 (例如, 多聚

腺苷酸化信号)。调节序列包括指导核苷酸序列的组成型表达的序列,以及组织特异性的调节和/或可诱导序列。表达载体的设计可取决于多种因素,如待转化宿主细胞的选择、期望蛋白质的表达水平等。可以将表达载体引入宿主细胞以产生本发明的多肽。本发明还包括含有上述核酸的宿主细胞。实例包括大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞、昆虫细胞(例如,使用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞。参见,例如 Goeddel, (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA.

为了得到本发明的突变多肽或融合多肽,可以在允许本发明核酸所编码多肽表达的条件下在培养基中培养宿主细胞,并从培养的细胞或细胞培养基中纯化所述多肽。或者,本发明的核酸可以在体外进行转录和翻译,其例如使用 T7 启动子调节序列和 T7 聚合酶来实现。

以下是对本发明的一个或多个实施方案的详述。本发明的其它特征、目的和优点在说明书和权利要求书中显而易见。

发明详述

本发明至少部分地基于信号转导组分的意外发现,该信号转导组分作为介导 Wnt/ β -联蛋白和 BMP4/Xom 途径的共同信号传导的汇合点而起作用。

Xom(也称为 Vent2、Vox 和 Xbr-1)是属于同源异型框基因中 Vent 家族的细胞命运决定因子。它既是转录阻遏蛋白也是转录激活蛋白(Ladher 等, 1996, *Development* 122, 2385-2394; Onichtchouk 等, 1996, *Development* 122, 3045-3053; Schmidt 等, 1996, *Development* 122, 1711-1721; 以及 Papalopulu 等, 1996, *Dev Biol* 174, 104-114)。在胚胎发生早期, Xom 参与腹侧中胚层(ventral mesoderm)的形成以及背腹发育图式形成的决定(Onichtchouk 等, 1998, *Development* 125, 1447-1456 以及 Koide 等, 2005, *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4943-4948)。合子的 Xom 转录在中囊胚期转换(midblastula transition, MBT)后开始,并且随着原肠胚形成的发展,其分布从原肠胚期早期较广泛的表达模式变为腹-侧区域(ventral-lateral region)(Ladher 等, 1996, *Development* 122, 2385-2394 以及 Schmidt 等, 1996, *Development* 122, 1711-1721)。Xom 的表达似乎受来自腹侧信号中心(ventral signal center)的信号(如 BMP4)的正调控,

而受背侧特异性基因（如 *Goosoid* (*Gsc*) 和头蛋白 (*noggin*)）的负调控（Ladher 等, 1996, *Development* 122, 2385-2394; Onichtchouk 等, 1996, *Development* 122, 3045-3053）。*Xom* 的表达进一步通过促进腹侧基因（如 *BMP4* 和 *Vent* 基因）的表达以及抑制背侧组织者基因（dorsal-organizer gene）（如 *Gsc* 和脊索发生素 (*chordin*)）的表达而有助于背腹发育图式的形成（Onichtchouk 等, 1996, *Development* 122, 3045-3053; 以及 Schmidt 等, 1996, *Development* 122, 1711-1721）。为了发挥其转录阻遏蛋白的功能, *Xom* 直接结合背侧特异性基因（如 *Gsc*）启动子的远端元件, 并抑制它们的转录（Trindade 等, 1999, *Dev Biol* 216, 442-456）。

如本文所述, *Xom* 与 *LEF1/TCF* 转录因子在功能上相互作用。*LEF1/TCF* 是一个高速泳动族 (high mobility group, HMG) 转录因子家族, 其本身不具有转录活性。而是, *LEF1/TCF* 介导的转录活性受到它们的相关联因子的严格控制（Hurlstone 等, 2002, *Embo J* 21, 2303-2311）。在非诱导状态下, *LEF1/TCF* 与转录阻遏蛋白（如 *Grouch* 和 *CtBP*）结合, 这将 *LEF1/TCF* 介导的转录维持在受阻遏的状态（Roose 等, 1998, *Nature* 395, 608-612; Brantjes 等, 2001, *Nucleic Acids Res* 29, 1410-1419; Cavallo 等, 1998, *Nature* 395, 604-608; Waltzer 等, 1998, *Nature* 395, 521-525; 以及 Brannon 等, 1999, *Development* 126, 3159-3170）。在胚胎发生早期, β -联蛋白在胚胎将要发育成背侧的区域局部富集, 这使其与 *LEF1/TCF* 相互作用并诱导背侧特异性基因（如 *Siamois*、*Twin* 和 *Xnr*）的表达（Harland 等, 1997, *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 611-667; Brannon 等, 1997, *Genes Dev* 11, 2359-2370; Laurent 等, 1997, *Development* 124, 4905-4916; 以及 McKendry 等, 1997, *Dev Biol* 192, 420-431）。除了在胚胎发生早期决定细胞命运外, 由 β -联蛋白所致的 *LEF1/TCF* 介导转录的过度活化也被认为是多种癌症恶性转化的第一步（Barker 等, 2000, *Adv Cancer Res* 77, 1-24）。由于 *LEF1/TCF* 因子是 *Wnt*/ β -联蛋白的转录介导体（transcriptional mediator），因此 *LEF1/TCF* 启动子-萤光素酶报告基因的活性通常被认为是 *Wnt*/ β -联蛋白活性的指示物。

尽管一些报道称 *LEF1/TCF* 可能参与腹侧细胞命运决定, 但其在腹侧细胞命运决定中的作用并不清楚。例如, 表达谱分析表明 *LEF1/TCF* 家族成员广泛分布在腹-后区域 (ventral-posterior region)（Molenaar 等, 1998, *Mech Dev* 75, 151-154 以及 Oosterwegel 等, 1993, *Development* 118, 439-448）。诱变研究表明, *LEF1*^{-/-}*TCF1*^{-/-}小鼠由于神经扩增 (neural

expansion)而引起尾部缺陷 (Galceran 等, 1999, *Genes Dev* 13, 709-717), 并且 LEF1 功能丧失导致爪蟾 (*Xenopus*) 腹侧而非背侧的缺陷 (Roel 等, 2002, *Curr Biol* 12, 1941-1945)。与 LEF1/TCF 可能参与腹侧细胞命运决定相一致的是, 启动子分析表明许多腹侧基因 (如 Xom 和 Bambi) 包含 LEF1/TCF 结合位点。突变这些腹侧基因的 LEF1/TCF 结合位点导致它们对 BMP4 信号传导应答的显著抑制 (Karaulanov 等, 2004, *Embo J* 23, 844-856)。

如上所述, 已发现 Xom 与 LEF1/TCF 因子在功能上彼此相互作用。这种相互作用对于胚胎发生早期的干细胞池 (stem cell pool) 维持和细胞命运决定起着关键的作用, 并作为胚胎发生早期的介导 BMP/Xom 和 Wnt/ β -联蛋白途径的共同信号传导作用的汇合点。已克隆了 Xom 的人同源物 Hom。发现 Hom 以与爪蟾中的 Xom 相似的方式行使功能。特别地, 发现在癌细胞或终末分化细胞中过表达 Xom/Hom 会导致细胞生长停滞或细胞死亡。

另外, 同时表达 LEF1/TCF 因子和 Xom 或者强制性表达 Hom 可诱导结肠癌细胞死亡 (效力接近 100%)。在宫颈癌细胞和前列腺癌细胞中也发现类似的效果。另外, 已发现多种癌症化疗药物或治疗 (例如 5-FU、DOX (阿霉素) 和辐射) 可诱导 Xom 或 Hom 的表达。这些结果提示, Xom/Hom 充当肿瘤抑制因子, 并可用于癌症的诊断、预后和治疗。编码 Hom 的基因定位于在肿瘤发生和癌转移期间易于丢失的 10q26 的事实也支持了 Hom/Xom 在癌症的诊断、预后和治疗中的作用。

Hom/Xom 的稳定性对干细胞池维持和细胞命运决定起着关键的作用。Xom 的蛋白水平受蛋白酶解控制, 而蛋白酶解又受 Ser140/144 磷酸化的控制。在发育期间, 内源的 Xom 在原肠胚形成开始时迅速降解。在原肠形成前期 (pre-gastrulation) 期间, Xom 的 Ser140/144 未被磷酸化, 但是在原肠胚形成开始时迅速被磷酸化, 该模式与 Xom 的稳定性呈互补的关系。还发现, 磷酸化部分在介导 Xom 和 β -TRCP (介导 Xom 蛋白降解的 E3 连接酶) 结合中起关键作用, 而不能发生磷酸化的 Xom 突变体则不被蛋白酶解。此外, 单独表达野生型 Xom 导致 30% 的结肠癌细胞发生生长抑制, 而表达稳定的 Xom 突变体却导致 60% 的结肠癌细胞发生生长抑制。这种磷酸化与蛋白酶解过程代表了用于鉴定治疗癌症及其它疾病的新药物的新治疗靶点。

除了稳定性以外，Hom/Xom 的表达还在多种发育过程起关键作用。例如，已发现在 CD14+ 血液祖细胞中 GM-CSF 和 IL4 可以诱导 Hom 的产生。该诱导使得 CD14+ 细胞（其为单核细胞祖细胞）终末分化为树突细胞以呈递抗原，并随后发生凋亡。

树突细胞是免疫细胞，并构成哺乳动物免疫系统的一部分。它们的主要功能是加工抗原物质并将抗原物质在它们的表面呈递给免疫系统的其它细胞。树突细胞以少量存在于与外界环境接触的组织中，主要有皮肤（此处的树突细胞常被称为朗格汉斯细胞）以及鼻、肺、胃和肠的内层（inner lining）。也可以在血液中发现未成熟状态的树突细胞。一旦被活化，它们就迁移至淋巴组织，在那里它们与 T 细胞和 B 细胞相互作用从而启动并确定（shape）免疫应答。树突细胞功能的改变在变态反应和自身免疫病（如红斑狼疮）中起主要或关键的作用。变态反应是针对外界变应原的病理性过度反应；自身免疫病是针对生物体自身抗原的不当免疫反应。参见，例如 Santiago-Schwarz 等，J Immunol. 2001 Aug 1; 167 (3):1758-68。鉴于树突细胞的作用，调控树突细胞中 Xom/Hom 的表达提示了一种治疗自身免疫病和炎症的方法。例如，Xom/Hom 至少在以下两个阶段调控树突细胞的分化：（i）早期阶段，即 CD14+ 血液祖细胞在对 GM-CSF 和 IL4 产生应答而终末分化为树突细胞时；以及（ii）末期阶段，即终末分化的树突细胞已形成例如皮肤中的朗格汉斯细胞时。在早期阶段中，Xom/Hom 的表达或活性是 CD14+ 血液祖细胞分化为树突细胞祖细胞所需的。因此，阻断 Xom/Hom 的表达或活性可以导致树突细胞减少，从而减少了不需要的免疫反应。另一方面，在末期阶段中，高水平的 Xom/Hom 表达或活性促使终末分化的树突细胞发生凋亡。随后，在这个阶段，通过诱导凋亡，Xom/Hom 的高水平表达或活性耗尽了终末分化的树突细胞，从而也减少了不希望的免疫反应（尤其是皮肤的免疫反应）。

诊断和预后测定

可以基于来自对象的测试样品中不存在 Hom 多肽（例如抗体）或编码该多肽的核酸（例如基因组 DNA 或 mRNA）来检测对象中的癌细胞或易于形成肿瘤细胞。换句话说，所述多肽和核酸可以用作指示癌细胞存在与否的标志物。本发明的诊断和预后测定包括用于评估 Hom 多肽或核酸的表达水平的方法，以及用于鉴定 Hom 多肽或核酸序列中变异和突变的方法。

测试样品中 Hom 多肽或核酸的存在、水平或不存在可通过如下进行评估：从对象获得测试样品，并将该测试样品与能够检测 Hom 多肽或核酸的化合物或试剂（例如，mRNA 或基因组 DNA 探针）接触。所述“测试样品”包括从对象分离的组织、细胞和生物体液（biological fluid）以及存在于对象中的组织、细胞和体液（fluid）。可以通过以下方法来测量 Hom 基因的表达水平，包括：测量 Hom 基因编码的 mRNA；测量 Hom 基因编码的多肽的量；或者测量 Hom 基因编码的多肽的活性。

通过原位方式和体外方式均可以检测细胞中对应于 Hom 基因的 mRNA 水平。从测试样品分离的信使 RNA 可用于杂交或扩增测定，其包括 Southern 或 Northern 分析、PCR 分析和探针阵列。一种用于检测 mRNA 水平的优选诊断方法包括：将分离的 mRNA 与能够与 Hom 基因编码的 mRNA 杂交的核酸探针接触。所述探针可以是全长的 Hom 核酸，如 SEQ ID NO: 6 的核酸或其一部分（如长度为至少 10 个核苷酸的寡核苷酸片段，其在严格条件下足以与 Hom 的 mRNA 或基因组 DNA 进行特异性杂交）。

在一种形式中，将 mRNA（或由其制备的 cDNA）固定于表面上并与探针接触，例如，将分离的 mRNA 进行琼脂糖凝胶电泳并将 mRNA 从凝胶转移至膜（如硝酸纤维素膜）。在另一形式中，将探针固定在表面上并将 mRNA（或 cDNA）与探针接触，例如，在基因芯片测定中。本领域技术人员可以将已知的 mRNA 检测方法用于检测 Hom 基因编码的 mRNA 水平。

样品中由 Hom 基因编码的 mRNA（或由其制备的 cDNA）水平可以通过核酸扩增来评估，例如通过标准 PCR（美国专利 No. 4,683,202）、RT-PCR（Bustin S. J Mol Endocrinol. 25:169-93, 2000）、定量 PCR（Ong Y.等, Hematology, 7:59-67, 2002）、实时 PCR（Ginzinger D. Exp Hematol. 30:503-12, 2002）和原位 PCR（Thaker V. Methods Mol Biol. 115:379-402, 1999），或者任何其它的核酸扩增方法，然后使用本领域已知的技术来检测经扩增的分子。如本文所使用的，扩增引物定义为可以与基因的 5' 或 3' 区域（分别为正链和负链，或者反之亦然）退火并且其间包含短区域的一对核酸分子。在适当的条件下以及合适的试剂中，所述引物允许扩增出包含两侧为所述引物之核苷酸序列的核酸分子。

对于原位方法来说，可以将细胞或组织样品制备并固定在支持物（如玻璃载玻片）上，然后与可以与染色体上的基因组 DNA 或编码 Hom 多肽

的 mRNA 进行杂交的探针接触。

在另一实施方案中，本发明的方法还包括将对照样品与能够检测 Hom 的 mRNA 或基因组 DNA 的化合物或试剂接触，并将对照样品中 Hom 的 mRNA 或基因组 DNA 的存在与测试样品中 Hom 的 mRNA 或基因组 DNA 的存在进行比较。

上述基于核酸的诊断方法可以提供定性的和定量的信息以确定对象是否患有或易于患与 Hom 基因表达异常有关的疾病（例如癌症）。

可以使用多种方法来确定 Hom 多肽的水平。一般地，这些方法包括接触选择性结合该多肽的试剂（如抗体）从而评估样品中多肽的水平。抗体可以是多克隆抗体，或者更优选地是单克隆抗体。也可以使用完整的抗体或其片段（例如，Fab 或 F(ab')₂）。在一个优选的实施方案中，所述抗体包含可检测的标签。与探针或抗体有关的术语“标签”意在包括通过将可检测物质物理连接至探针或抗体从而直接标记探针或抗体，以及通过与可检测物质反应而间接标记探针或抗体。例如，可以使用直接针对兔 Fc 区域的第二抗体对包含兔 Fc 区域的抗体进行间接标记，其中所述第二抗体偶联有可检测物质。本文提供了可检测物质的实例。合适的可检测物质或标签包括放射性同位素（例如，¹²⁵I、¹³¹I、³⁵S、³H 或 ³²P）、酶（例如，碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、萤光素酶或β-半乳糖苷酶）、发荧光的基因或蛋白质（例如，荧光素、罗丹明、藻红蛋白、绿色荧光蛋白（GFP）或蓝色荧光蛋白（BFP））或者发光基因（例如，Qdot™ 纳米颗粒，其由 Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA 提供）。

所述检测方法可以用于体外以及体内检测生物样品中的 Hom 多肽。体外检测 Hom 多肽的技术包括酶联免疫吸附测定（ELISA）、免疫沉淀、免疫荧光、酶免疫测定（EIA）、放射免疫测定（RIA）和 Western 印迹分析。体内检测 Hom 多肽的技术包括将经标记的抗 Hom 抗体引入对象。例如，所述抗体可以用如上所述的可检测物质进行标记。可以通过标准成像技术来检测对象中可检测物质的存在和定位。

Xom 的 Ser140/144 磷酸化水平也可以用作肿瘤发生的指示物。更具体地，比对照的 Ser140/144 磷酸化水平（或激酶活性）高则表明发生肿瘤/癌症的可能性较高。可以使用 Xom 相关序列以及 Ser140/144 磷酸化特异性抗体或质谱来测量 Ser140/144 的磷酸化情况（Liu 等，Cell 108, 837-47 页，以及 Gerber 等，PNAS 100, 6940-5 页）。

本文所述的诊断方法可以鉴定患有与 Hom 表达或活性异常相关疾病的对象，或者具有发生上述疾病风险的对象。

本文所述的预后测定可用于确定对象是否适合施用药剂（例如，激动剂、拮抗剂、拟肽类（peptidomimetic）、蛋白质、肽、核酸、小分子或其它药物候选物）来治疗癌症。例如，所述测定可用于确定对象是否可以施用细胞毒性药物来治疗细胞增殖性疾病。

本发明还涉及监测对象中癌症治疗的方法。为此目的，可以在治疗前、治疗期间或治疗后测定来自对象的测试样品中 Hom 的基因表达水平。治疗后 Hom 表达水平的提高表明该对象可以继续接受同样的治疗。内源 Xom 肽的 Ser140/144 磷酸化也可以用于监测癌症、退行性疾病和炎症疾病/自身免疫病的活动。例如，可以使用 Xom 蛋白或其包含 Ser140/144 磷酸化位点的片段作为底物，从对象取出细胞，并制备细胞提取物。然后，将 Xom 多肽与所述提取物一起孵育，并使用 Ser140/144 磷酸化特异性抗体来监测 Ser140/144 的磷酸化。或者，可以在取自对象的细胞中表达 Xom 多肽或其包含 Ser140/144 的片段，并确定 Ser140/144 的磷酸化水平。基于本文所提供的教导以及本领域已知的教导，该水平反映了疾病的阶段。

从实施上述诊断测定所获得的信息可用于对疾病及其它影响个体健康状况的有害病症进行预测、确定其进程以及临床管理。在优选的实施方案中，上述诊断测定所提供的信息可用于恶性肿瘤（癌）的预测、确定其进程和管理，其中所述恶性肿瘤的特征在于缺少 Hom 表达或者 Hom 表达水平异常偏低。更特别地，这些信息辅助临床医生制定从患病哺乳动物（通常为人）的机体根除所述恶性肿瘤的化疗或其它治疗方案。

药物筛选

本发明涉及用于鉴定增强 Hom/Xom 活性的化合物的方法，其通过例如抑制 Ser140/144 的磷酸化而诱导其表达或促进其稳定性来实现。如此鉴定出的化合物可以用于治疗癌症、退行性疾病或免疫疾病。

根据下述方法，可以鉴定以统计学显著性方式降低 Xom/Hom 蛋白磷酸化水平的化合物（即 Xom/Hom 激酶抑制剂）。

可以使用本领域已知的多种组合文库方法中的任意方法来获得待筛选的候选化合物（例如，蛋白质、肽、拟肽类、类肽（peptoid）、抗体、小分子或其它药物）。所述文库包括：肽文库、类肽文库（具有肽的功能、

但包含新型非肽骨架的分子的文库,其中非肽骨架对酶促降解具有抗性);空间可寻址的并行固相或液相文库 (spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries); 通过重叠合法 (deconvolution) 或亲和层析筛选获得的合成文库; 以及“一珠一化合物 (one-bead one compound)”文库。参见,例如, Zuckermann 等 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678-2685; 以及 Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145。合成分子文库的方法的实例可见于,例如 DeWitt 等, 1993, *PNAS USA* 90:6909; Erb 等, 1994, *PNAS USA* 91:11422; Zuckermann 等, 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho 等, 1993, *Science* 261:1303; Carrell 等, 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell 等, 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; 以及 Gallop 等, 1994 *J. Med. Chem.* 37:1233。化合物文库可以提供于溶液中 (例如, Houghten, 1992, *Biotechniques* 13:412-421), 或珠子上 (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84)、芯片上 (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556)、细菌中 (美国专利 No. 5,223,409)、孢子中 (美国专利 No. 5,223,409)、质粒中 (Cull 等, 1992, *PNAS USA* 89:1865-1869) 或噬菌体中 (Scott 和 Smith 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla 等, 1990, *PNAS USA* 87:6378-6382; Felici 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310; 以及美国专利 No. 5,223,409)。

为了鉴定 Xom/Hom 激活剂或 Xom/Hom 激酶抑制剂, 可以将候选化合物与包含 Xom/Hom 基因或多肽的系统接触。所述系统可以是无细胞系统或包含细胞的系统, 例如, 体外细胞系模型或体内动物模型。在包含细胞的系统中, 细胞可以天然地表达 Xom/Hom 基因, 或者可以经改造表达重组核酸。所述重组核酸可以包含与异源启动子融合的 Xom/Hom 基因编码区, 或者与报告基因融合的 Xom/Hom 基因启动子序列。然后测量 Xom/Hom 多肽的表达水平或磷酸化水平 (例如, 在 Ser140 或 Ser144 位)。上述 Xom/Hom 多肽可以是全长的 Xom/Hom 多肽或者其包含所述磷酸化位点的片段。

可以在 mRNA 水平或者在蛋白质水平检测表达水平。测量细胞、组织样品或体液中 mRNA 水平的方法是本领域熟知的。为了测量 mRNA 水平, 可以将细胞裂解, 并可以通过例如杂交测定 (使用经可检测标记的基因特异性 DNA 或 RNA 探针) 以及定量或半定量 RT-PCR (使用适当的基因特异性引物) 来检测裂解物中或者经纯化或半纯化自裂解物的 RNA 中的 mRNA 水平。或者, 可以使用组织切片或未经裂解的细胞悬浮物以及经可

检测（例如，荧光或酶）标记的 DNA 或 RNA 探针来进行定量或半定量的原位杂交测定。另外的 mRNA 定量方法包括 RNA 酶保护实验（RNA protection assay, RPA）和 SAGE（基因表达系列分析）。测量细胞或组织样品中蛋白质水平的方法也是本领域已知的。

测量多肽磷酸化水平的方法也是本领域已知的。所述方法的实例包括使用特异性磷酸化抗体或质谱法（Liu 等, Cell 108, 837-47 页, 以及 Gerber 等, PNAS 100, 6940-5 页）。

为了确定候选化合物提高 Xom/Hom 表达水平或降低其磷酸化水平的能力, 将以上述方式获得的水平与候选化合物不存在时获得的对照水平或活性进行比较。如果磷酸化水平低于对照, 或者如果表达水平高于对照, 则鉴定该化合物对于治疗上述疾病是有效的。可以使用爪蟾卵母细胞模型或动物模型来进一步验证如上鉴定的化合物的效力。可以根据下述实施例部分中的方法或其它标准技术向爪蟾卵母细胞模型或动物模型施用化合物以及进行实验。细胞死亡的任何统计学显著性提高指示了该化合物是治疗上述疾病的候选药物。

也可以使用上述方法来鉴定 Xom/Hom 的抑制剂, 不同的是: 如果候选化合物抑制 Xom/Hom 的表达或者增加其磷酸化水平, 则鉴定该化合物为候选药物。

治疗方法

本发明还涉及用于治疗对象的细胞增殖性疾病（例如癌症）、细胞退化性疾病、炎症相关疾病（如湿疹和炎症肠病）或血液疾病（例如骨髓发育不良综合征）的方法。

细胞增殖性疾病是指以不受控制的自主性细胞生长（包括恶性生长和非恶性生长）为特征性疾病。该疾病的实例包括结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、肝细胞癌、黑素瘤、肺癌、成胶质细胞瘤、脑肿瘤、恶性血液病（hematopoietic malignancy）、成视网膜细胞瘤、肾细胞癌、头颈癌、宫颈癌、胰腺癌、食道癌和鳞状细胞癌（squama cell carcinoma）。

炎症相关疾病的特征在于局部或全身的、急性或慢性的炎症。实例包括炎症性皮肤病（inflammatory dermatosis）（例如，皮炎、湿疹、特应性皮炎、变应性接触性皮炎、荨麻疹、坏死性血管炎、皮肤血管炎、过敏性血管炎、嗜伊红细胞性肌炎、多肌炎、皮肌炎和嗜伊红细胞性筋膜炎

(eosinophilic fasciitis))、炎性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎)、急性呼吸窘迫综合征、暴发性肝炎、过敏性肺病(hypersensitivity lung disease)(例如,过敏性肺炎、嗜伊红细胞性肺炎、迟发型超敏反应、间质性肺病(或ILD)、特发性肺纤维化和类风湿性关节炎相关的ILD)、哮喘以及变应性鼻炎。实例还包括自身免疫病(例如,类风湿性关节炎、银屑病关节炎、系统性红斑狼疮、重症肌无力、幼年型糖尿病、肾小球肾炎、自身免疫性甲状腺炎(autoimmune thyroiditis)、强直性脊柱炎、系统性硬化和多发性硬化)、急性和慢性炎性疾病(例如,全身性过敏反应或超敏反应、药物变态反应、昆虫螫伤变态反应(insect sting allergy)、异体移植物排斥反应和移植物抗宿主病)、舍格伦综合征、人免疫缺陷病毒感染、癌症(例如,脑癌、乳癌、前列腺癌、结肠癌、肾癌、卵巢癌、甲状腺癌、肺癌和血癌(hematopoietic cancer))以及肿瘤转移。

“对象”是指人和非人动物。非人动物的实例包括所有脊椎动物,例如哺乳动物(如非人灵长类(特别是高等灵长类)、犬、啮齿动物(例如,小鼠或大鼠)、豚鼠、猫)和非哺乳动物(如鸟类、两栖类、爬行类等)。在一个优选的实施方案中,对象是人。在另一实施方案中,对象是实验动物或者适于用作疾病模型动物。

可以利用针对细胞增殖性疾病的标准诊断技术来鉴定待治疗该疾病的对象。任选地,可以通过上述方法来检测对象的Xom/Hom基因或多肽的基因表达水平或活性水平。如果来自对象的样品中的基因表达或活性水平低于来自正常人的样品中的水平,则该对象是接受有效量的Xom/Hom肽或激活剂进行治疗的候选者。可以通过标准诊断技术来鉴定待治疗炎症相关疾病的对象。

“治疗”是指向患有细胞增殖性疾病(例如癌症)、炎症相关疾病或血液疾病的对象施用化合物,其目的是治愈、减轻、缓解、治疗、预防或改善所述疾病、该疾病的症状、该疾病继发的疾病状态或者该疾病的诱因。

“有效量”是指能够产生医学上期望效果(例如,如上所述在接受治疗的对象中)的化合物的量。所述治疗方法可以在体内或离体进行,可以单独或与其它药物或治疗一起进行。

在一种体内方法中,向对象施用化合物。一般地,将所述化合物悬浮于可药用载体(例如生理盐水)中,并通过口服或者通过静脉输注或以皮下、肌内、鞘内、腹膜内、直肠内、阴道内、鼻内,胃内、气管内或肺内

方式注射或植入来施用。

所需剂量取决于所选择的施用途径、剂型、患者的病情、对象的大小、重量、表面积、年龄和性别、同时施用的其它药物以及主治医生的判断。合适的剂量范围为 0.01-100 mg/kg。所需剂量的变化要视所施用化合物的不同以及各种施用途径的不同效率而定。例如，口服施用往往比静脉内 (i.v.) 注射需要更高的剂量。可以使用本领域熟知的用于优化的标准经验惯例来调整这些剂量水平的变化。将所述化合物包裹入合适的递送载体 (例如，聚合微粒 (polymeric microparticle) 或可植入装置) 可以提高递送效率，尤其适于口服递送。

可用于治疗细胞增殖性疾病或炎症相关疾病的化合物包括含有 SEQ ID NO: 1 或 3 且不含 LEF1/TCF 反式激活域的多肽。实例还包括 SEQ ID NO: 1 或 3 的功能等效物。如上所述，SEQ ID NO: 1 或 3 的功能等效物是指源自 SEQ ID NO: 1 或 3 的多肽，例如融合多肽或者包含一个或多个点突变、插入、缺失、截短的多肽，或其组合。所述多肽与 SEQ ID NO: 1 或 3 具有至少 60% 的一致性 (即包括 60% 到 100% 之间的任何数值)，并基本保留了 Xom 或 Hom 的同源域活性，即通过与内源 LEF1/TCF 激活剂 (如 β -联蛋白) 竞争从而结合 LEF1/TCF 并以显性失活方式抑制 LEF1/TCF 依赖性转录的能力。LEF1/TCF 因子是含有高泳动族 (HMG) 的重要转录因子。LEF1/TCF 本身几乎没有转录活性，然而 LEF1/TCF 被与其结合的因子 (如 Wnt 途径中的 β -联蛋白和 BMP4 途径中的 Xom) 所活化。已发现， β -联蛋白或 Xom 对 LEF1/TCF 的反式激活对于干细胞功能和细胞命运决定以及恶性转化是关键的。

可以使用本领域已知的方法来合成上述多肽，或者使用重组技术来制备上述多肽。例如，可以将编码所述多肽的核酸克隆到表达载体中，其中核酸与适于在宿主细胞中表达多肽的调节序列有效连接。然后，可以将载体引入合适的宿主细胞以表达所述多肽。所表达的重组多肽可以通过例如硫酸铵沉淀和柱层析分离的方法从宿主细胞中纯化。参见，Goeddel, (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA。可以根据以下实施例中的所述的方法来测试如此制备的多肽的活性。

可用于治疗细胞增殖性疾病的化合物的实例包括提高 Hom 蛋白水平的化合物，如 5-FU、DOX、辐射、视黄酸、GM-CSF-IL4、白藜芦醇、鞣

花酸、乙酰水杨酸、水杨酸、大黄素和黄酮类化合物及其诱导 Hom 表达的衍生物。还可以使用抑制 Xom/Hom 磷酸化的化合物（即 Xom/Hom 激酶抑制剂），如白藜芦醇、鞣花酸、乙酰水杨酸、水杨酸、大黄素、黄酮类化合物及其衍生物。

抑制 Hom/Xom 表达或活性的化合物也可用于治疗其它疾病，如骨髓发育不良综合征（MDS）。MDS 也称为“白血病前期”，它是不能有效产生血细胞以及向急性髓细胞源性白血病转化的各种风险等血液疾病的统称。尽管 MDS 不是真正的恶性肿瘤（malignant neoplasm），然而它还是被划归为血液肿瘤。已发现，Hom 基因在 MDS 患者中过表达，这提示 Hom 阻碍了分化进程。因此，Hom/Xom 的抑制剂可用于治疗 MDS。所述抑制剂的实例包括特异性靶向 Hom/Xom 的抗体、反义核酸、RNAi 试剂。另外的实例包括抑制 Hom 表达的化合物。

“抗体”包括完整的分子以及其片段（如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv（单链抗体）和 dAb（结构域抗体（domain antibody）；Ward 等（1989）*Nature*, 341, 544）。抗体的衍生物是指包含本发明多肽变体的蛋白质或蛋白质复合物。可以利用本领域已知的方法通过在适当的宿主细胞中共表达含有相应轻链和重链互补决定区（CDR）的多肽来制备本发明的抗体或衍生物。参见，例如 Harlow 和 Lane,（1988）*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

为了制备本文所述的抗体，可以将 Xom 或 Hom 多肽或其抗原性片段与载体蛋白（如 KLH）偶联，与佐剂混合，并注射入宿主动物。然后，可通过肽亲和层析对所述动物产生的抗体进行纯化。常用的宿主动物包括兔、小鼠、豚鼠和大鼠。可用于增强免疫应答的不同佐剂取决于宿主物种，其包括弗氏佐剂（完全佐剂和不完全佐剂）、矿物凝胶（如氢氧化铝）、表面活性物质（如溶血卵磷脂）、多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂（oil emulsion）、匙孔蛾血蓝蛋白以及二硝基酚。对人有用的佐剂包括 BCG（卡介苗）和小棒杆菌（*Corynebacterium parvum*）。

免疫对象的血清中存在多克隆抗体（抗体分子的异质性群体）。可以使用标准的杂交瘤技术来制备针对特定抗原的单克隆抗体（同质性抗体群体）。参见，例如，Kohler 等（1975）*Nature* 256, 495; Kohler 等（1976）*Eur. J. Immunol.* 6, 511; Kohler 等（1976）*Eur. J. Immunol.* 6, 292; 以及 Hammerling 等（1981）*Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas*,

Elsevier, N.Y.。特别地，可以通过以下用于产生抗体分子的任何技术来获得单克隆抗体：如美国专利 No. 4,376,110 所述的培养传代细胞系、人 B 细胞杂交瘤技术 (Kosbor 等 (1983) *Immunol Today* 4, 72; Cole 等 (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2026) 和 EBV 杂交瘤技术 (Cole 等 (1983) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R, Liss, Inc., 77-96 页)。所述抗体可以是包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 的任何免疫球蛋白类型及其任何亚类。产生本发明单克隆抗体的杂交瘤可以在体外或在体内培养。由于在体内能够产生高滴度的单克隆抗体，因此体内培养成为特别有用的生产方法。

包含编码 Xom 或 Hom 抑制剂的核酸序列的多核苷酸可用于治疗炎症相关疾病。所述核酸序列可以编码靶向 Xom 或 Hom 并抑制其表达活性的上述多肽、抗 Xom 或抗 Hom 的抗体、反义 RNA 或小干扰 RNA (例如, RNAi 试剂)。

术语“RNAi”或“RNA 干扰”是指下调靶分子 (例如, 靶基因、蛋白或 RNA) 的序列特异性或选择性的方法。本发明包括应用 RNAi 介导的 RNA 分子降解 (例如在细胞中)。降解由 RNA 诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 进行酶促催化。细胞中天然 RNAi 用于清除外源 RNA (例如病毒 RNA)。天然 RNAi 作用于从游离的双链 RNA 切割而来的片段, 继而进行降解。或者, 可以人工制备 RNAi 用以例如使靶基因表达沉默。

术语“RNAi 试剂”是指与靶 RNA (即被降解的 RNA) 具有足够的序列互补性以指导 RNAi 的 RNA (或其类似物)。包含“与靶 RNA 具有足够的序列互补性以指导 RNAi 的序列”的 RNA 试剂是指具有通过 RNAi 机制 (例如, RISC 复合体) 或方法足以引发靶 RNA 降解的 RNA 试剂。包含“与靶 RNA 具有足够的序列互补性以指导 RNAi 的序列”的 RNA 试剂还指具有通过 RNAi 机制或方法足以引发靶 RNA 发生翻译抑制的序列的 RNA 试剂。RNA 试剂还可以包含与靶 DNA 序列编码的靶 RNA 具有足够序列互补性的序列, 从而使靶 DNA 在染色体水平沉默。换句话说, 所述 RNA 试剂具有足以诱导转录水平基因沉默的序列用以例如下调靶 DNA 序列处或其附近的基因表达 (例如, 通过引起靶 DNA 序列处或其附近的染色质结构改变来实现)。术语“RNA”或“RNA 分子”或“核糖核酸分子”是指核糖核苷酸多聚物。术语“DNA”或“DNA 分子”或“脱氧

核糖核酸分子”是指脱氧核糖核苷酸多聚物。DNA 和 RNA 可以天然合成（例如，分别通过 DNA 复制或 DNA 转录来实现）。RNA 可以进行转录后修饰。DNA 和 RNA 还可以进行化学合成。DNA 和 RNA 可以是单链的（即分别为 ssDNA 和 ssRNA）或多链的（例如双链的，即分别为 dsRNA 和 dsDNA）。

可以通过使用本领域已知的生物可降解的聚合物微粒或微胶囊递送装置来递送多核苷酸。另一实现核酸摄入的方法是使用经标准方法制备的脂质体。所述多核苷酸可以单独掺入这些递送载体或者与组织特异性抗体一起掺入。或者，可以制备分子缀合物，其由通过静电力或共价力与聚 L-赖氨酸连接的质粒或其它载体组成。聚 L-赖氨酸与能够结合靶细胞上受体的配体结合（Cristiano 等, 1995, J. Mol. Med. 73:479）。或者，可以通过使用本领域已知的组织特异性转录调节元件来实现组织特异性靶向。将“裸 DNA”（即没有递送载体）递送至肌内、皮内或皮下部位是实现体内表达的另一方式。

在上述多核苷酸（例如表达载体）中，将编码 Xom 或 Hom 抑制剂的核酸序列与启动子或增强子-启动子组合进行有效连接。合适的表达载体包括质粒和病毒载体（如疱疹病毒、逆转录病毒、痘苗病毒、减毒痘苗病毒、金丝雀痘病毒、腺病毒和腺伴随病毒）。

如本领域熟知的，患者用药剂量取决于上述多种因素。剂量可以变化，但施用多核苷酸的优选剂量约为 10^6 至 10^{12} 个拷贝的多核苷酸分子。根据需要，可以重复施用所述剂量。施用途径可以是以上列出的任何施用途径。

本发明还包括经包装的产品，其包含容器、有效量的上述化合物之一以及附在容器上的说明，并且其标明施用该化合物用于治疗患有上述疾病或具有发生上述疾病的风险的对象。所述化合物可与可药用载体混合，所述载体包括溶剂、分散剂、包衣剂（coating）、抗菌剂和抗真菌剂以及等渗剂（isotonic agent）和吸收延缓剂（absorption-delaying agent）。

可使用常规方法将所述化合物配制成用于不同施用途径的剂型。例如，可以将其配制成用于口服的胶囊、凝胶密封物（gel seal）或片剂。胶囊可以包含任何标准的可药用物质，如明胶或纤维素。可根据常规方法通过压缩所述化合物与固体载体和润滑剂的混合物来配制片剂。固体载体的实例包括淀粉和糖、皂土。所述化合物还可以以包含粘合剂（例如，乳糖或甘露醇）、常规填充剂和成片剂（tableting agent）的硬壳片剂或胶囊的形式

来施用。所述化合物可以经由肠胃外途径来施用。肠胃外剂型的实例包括活性试剂的水溶液、等渗盐水或 5% 葡萄糖溶液或者其它熟知的可药用赋形剂。环糊精或本领域技术人员熟知的其它增溶剂可用作递送治疗试剂的药物赋形剂。

所述化合物的效力可以在体外或体内进行评估。例如，可以测试所述化合物在体外阻滞细胞生长或诱导凋亡的能力。对于体内研究而言，可以将所述化合物注射入动物（例如动物模型）中，继而评估其对细胞生长或凋亡的影响。根据该结果，可以确定合适的剂量范围和施用途径。

干细胞

干细胞是能够分化成多种终末分化细胞类型的细胞。干细胞可以是全能的、多潜能的（pluripotent）、多能的（multipotent）以及单能的。全能干细胞来源于卵细胞和精细胞的融合。受精卵最初几次分裂形成的细胞也是全能的。这些细胞可以分化成胚胎细胞类型和胚外细胞类型。全能干细胞通常能够发育成任何细胞类型。全能干细胞通常是胚胎来源的。多潜能干细胞是全能干细胞的后代并可以分化成源自三胚层的细胞。这些细胞通常是能够分化成几种不同的终末分化细胞类型的干细胞系中的细胞。多能干细胞仅能产生关系密切的细胞家族的细胞（例如，造血干细胞分化成红细胞、白细胞、血小板等）。单能细胞仅能产生一种细胞类型，然而它们具有自我更新的性质从而使其区别于非干细胞。多潜能的、多能的和单能的干细胞可来自多种组织或器官系统，其包括但不限于血液、神经、肌肉、皮肤、肠、骨、肾、肝、胰、胸腺等。

如上所述，Wnt 和 BMP 信号途径参与多种干细胞的增殖或分化。参见，例如 Reya 等，*Nature*, 2005 Apr 14;434(7035):843-50。作为关键的组分，Xom/Hom 在干细胞的维持、扩充和分化中起重要作用。因此，Xom/Hom 可用于调节干细胞的发育和分化，以及用于治疗相关的增殖性或退行性疾病。例如，Xom/Hom 可用于减缓或阻止干细胞的分化，从而维持干细胞池。进而，Xom/Hom 的拮抗剂（即抑制剂）可用于促进分化。

该分化过程的调节异常将导致多种疾病（如 MDS）发生。认为 MDS 是由多能骨髓干细胞中的突变引起的。阻碍血液前体细胞的分化，则骨髓细胞中的细胞凋亡水平显著提高。异常细胞的克隆扩充会产生已丧失分化能力的细胞。由 MDS 发展为白血病是癌症发生多步理论的很好的例子，其中最初的正常细胞发生一系列突变并转化成癌细胞。如上所述，MDS

患者中 Hom/Xom 过表达可导致 MDS 中发生分化过程和凋亡的阻滞。因此，Hom/Xom 的抑制剂可用于治疗 MDS。所述抑制剂的实例包括特异性靶向 Hom/Xom 的抗体、反义核酸、RNAi 试剂和小分子化合物。

本发明的治疗方法可用于通过促进细胞分化来治疗骨髓发育不良综合征。

本发明的方法还可以用于治疗或延缓另一些增殖性或退行性疾病的进程。所述疾病的实例包括黄斑变性、神经元退变、亨廷顿病、帕金森病、阿尔茨海默病和精神分裂症。

术语“增殖”和“扩充”在本文中涉及细胞时可互换使用，它们是指通过分裂使相同类型的细胞数量增加。术语“分化”是指细胞向特定功能发生特化的发育过程，例如细胞获得一种或多种与最初细胞类型不同的形态学特征和/或功能。术语“分化”包括谱系决定 (lineage commitment) 和终末分化过程。可以通过例如使用免疫组织化学或本领域技术人员已知的其它方法来监测谱系标志物是否存在从而对分化进行评估。源自祖细胞的已分化后代细胞可以但不必然地与干细胞来源组织相同的胚层或组织相关。例如，神经祖细胞和肌肉祖细胞可以分化成造血细胞谱系。

术语“谱系决定”和“特化”在本文中可互换使用，它们是指干细胞经历的过程，其中干细胞生成定向形成特定有限范围的分化细胞类型的祖细胞。已定向祖细胞常常能够自我更新或细胞分裂。

本文使用的术语“终末分化”是指细胞最终分化为成熟的、完全分化细胞。例如，神经祖细胞和肌肉祖细胞可以分化为造血细胞谱系，其终末分化形成特定细胞类型的成熟血细胞。通常，终末分化与退出细胞周期和停止增殖有关。本文使用的术语“祖细胞”是指定向为特定细胞谱系并通过一系列细胞分裂而生成该谱系细胞的细胞。祖细胞的实例包括成肌细胞，它仅能够分化为一种类型的细胞，然而其自身并未完全成熟或完全分化。

组合物

本发明包括包含合适载体以及一种或多种上述化合物的组合物。所述组合物可以是包含可药用载体的药物组合物、包含合适的可食用载体的食用组合物或者包含可化妆用载体的化妆品组合物。

本发明的食用组合物的实例包括上述活性化合物。该化合物的实例包

括 Hom/Xom 多肽或其功能性片段、视黄酸、白藜芦醇、鞣花酸、乙酰水杨酸、水杨酸、大黄素、黄酮类化合物以及这些化合物的衍生物。所述组合物还包括但不限于：食品、食品添加剂、营养补充剂和药物制剂。可以采用以下形式：片剂、混悬液、植入物、溶液、乳剂、胶囊、粉剂、糖浆、液体组合物、软膏、洗剂、霜剂、膏剂、凝胶等。

作为膳食补充剂，可以包含另外的营养物（如矿物质或氨基酸）。食用组合物还可以是饮料制品或食物制品。如本文使用的，术语“饮料”和“食物”分别泛指任何种类的液体和固体/半固体物质，其用于饲喂动物以及维持动物（包括人）的正常或加速生长。饮料制品的实例包括但不限于：基于茶的饮料、果汁、咖啡和奶。食物制品的实例包括果冻、饼干、谷类食品、巧克力、士力架、草本提取物（herbal extract）、乳制品（例如冰淇淋和酸奶）、大豆制品（例如豆腐）以及水稻制品等。

本发明的组合物可包括载体。取决于组合物的种类，载体可以是适当的食用载体或可药用载体。可药用载体的实例包括但不限于生物相容性载体、佐剂、添加剂和稀释剂，从而使组合物成为适用的剂型。

将“可药用载体”施用于对象后不会引起不良生理反应。所述药物组合物中的载体须是“可药用的”还表示其与活性成分是相容的，并且优选能够使其稳定。可以使用一种或多种增溶剂作为药物载体用于递送活性化合物。另一些载体的实例包括胶体二氧化硅、硬脂酸镁、纤维素、十二烷基硫酸钠和 D&C Yellow #10。

采用上述任何形式的上述组合物可用于治疗细胞增殖性疾病和炎症相关疾病。

“有效量”是指对被治疗对象起到治疗效果所需的活性化合物的量。本领域技术人员已知，有效剂量将根据所治疗疾病的类型、使用途径、赋形剂的使用以及可能与其它治疗性处理共同使用而发生变化。

本发明的药物组合物可以通过肠胃外、口服、鼻、直肠、局部或含服等方式来施用。本文使用的术语“肠胃外”是指皮下、皮内、静脉内、肌内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内或颅内以及任何合适的输注技术。

无菌可注射组合物可以是可肠胃外施用的无毒稀释剂或溶剂中的溶液或混悬液，如 1,3-丁二醇中的溶液。可以施用的可接受载体和溶剂包括甘

露醇、水、林格液和氯化钠等渗溶液。另外，固化油（fixed oil）也常规用作溶剂或悬浮介质（例如，合成的甘油单酯或甘油二酯）。脂肪酸如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备注射剂（injectable），这是由于它们是天然的可药用油（如橄榄油或蓖麻油，尤其以其聚氧乙烯化形式）。这些油溶液或混悬液还可以包含长链醇稀释剂或分散剂、羧甲基纤维素或类似的分散试剂。为了配制的目的还可以使用其它常用的表面活性剂，如常用于制备可药用固体、液体或其它剂型的吐温或司盘（Span）或其它类似的乳化剂或生物利用度促进剂（bioavailability enhancer）。

口服施用的组合物可以采用可口服施用的任何剂型，其包括胶囊、片剂、乳剂和水性混悬液、分散剂和溶液。在片剂的情形中，常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常还加入润滑剂，如硬脂酸镁。对于采用胶囊形式的口服施用来说，有用的稀释剂包括乳糖和干玉米淀粉。当口服施用水性混悬液或乳剂时，可以将活性成分与乳化剂或混悬剂一起悬浮或溶解在油相中。如果需要的话，可加入某些甜味剂、调味剂或着色剂。

鼻用气雾剂或吸入组合物可以根据制药领域众所周知的技术进行制备。例如，这样的组合物可以制备成盐溶液，其中使用苯甲醇或另一些合适的防腐剂、吸收促进剂（用以提高生物利用度）、氟碳化合物和/或本领域已知的其它增溶剂或分散剂。

包含活性化合物的组合物还可以采用栓剂形式用于直肠施用。

局部应用的组合物包含适于应用至皮肤的安全且有效量的皮肤可用载体。通常，局部应用的组合物可以是固体、半固体、霜剂或液体。它可以是采用软膏、洗剂、泡沫、霜剂、凝胶或溶液的化妆品或皮肤病药品。皮肤可用载体将在下文详细描述。

本发明的组合物可以单独使用或与其它生物活性成分联合使用。当单独使用或与其它生物活性成分联合使用时，可以在一段时间内向对象一次性给药或者多次给药。本领域技术人员了解多种施用方式。施用组合物的剂量范围要足够大以产生期望的效果。然而，上述剂量不应太大以至于造成任何不良副作用（如有害的交叉反应等）。通常，所述剂量随着对象的年龄、重量、性别、病症和病症程度以及预期目的而变化。本领域技术人员无需过多的实验即可确定该剂量。如果具有任何禁忌、耐受或类似的情况，可以对剂量进行调整。基于该信息，本领域技术人员可以容易地评估这样的因素，并确定待用于预期目的的本发明组合物的特别有效的浓

度。

本发明还包括含有上述活性化合物的化妆品组合物。该化合物的实例包括 Hom/Xom 多肽或其功能性片段。实例还包括视黄酸、白藜芦醇、鞣花酸、乙酰水杨酸、水杨酸、大黄素和黄酮类化合物，以及这些化合物的衍生物。该组合物包含适于局部应用至皮肤的安全且有效量的皮肤可用载体。它使得活性化合物和任选组分以合适的浓度递送至皮肤。因此，所述载体作为稀释剂、分散剂、溶剂等以确保活性物质以合适的浓度被应用并均匀分布在所选靶标上。所述载体可以是固体、半固体或液体。优选地，它采用洗剂、霜剂或凝胶的形式，特别是具有足够粘稠度或屈服点 (yield point) 以防止活性物质沉淀的形式。所述载体本身可以是惰性的或对皮肤病具有益处。它还应当在物理和化学性质上与本文所述的活性化合物相容，而不应不适当地损害与所述组合物有关的稳定性、效力或其它用途优点。

化妆品组合物中使用的载体类型取决于该组合物产品形式的类型。可以将化妆品组合物制成如本领域已知的多种产品形式。这些包括但不限于洗剂、霜剂、凝胶、棒状产品 (stick)、喷雾剂、软膏、糊剂和摩丝。这些产品形式可以包含几种类型的载体，其包括但不限于溶液、气雾剂、乳剂、凝胶剂、固体和脂质体。

优选的载体可包含皮肤可用的、亲水性稀释剂。合适的亲水性稀释剂包括水、有机亲水性稀释剂，如 C₁-C₄ 单羟基醇及低分子量二元醇和多元醇 (包括丙二醇，分子量例如为 200-600 的聚乙二醇)、分子量例如为 425-2025 的聚丙二醇、甘油、丁二醇、1,2,4-丁三醇、山梨醇酯、1,2,6-己三醇、乙醇、异丙醇、山梨醇酯、乙氧基醚、丙氧基醚及其组合。所述组合物优选地包含至少约 60% 的亲水性稀释剂。

优选的载体还包含具有亲水相 (尤其是水相) 和疏水相 (例如，脂质、油或油性物质) 的乳剂。如本领域技术人员熟知的，亲水相将分散于疏水相中 (或者反过来) 从而取决于组合物成分分别形成亲水或疏水的分散相 (dispersed phase) 或连续相。术语“分散相”是本领域技术人员熟知的术语，它是指以微粒或液滴在连续相中悬浮存在或被连续相包围存在的相。所述分散相也称为内相或不连续相。所述乳剂可以是或包含 (例如，在三相乳剂或其它多相乳剂中) 水包油乳剂或油包水乳剂 (如硅酮包水乳剂)。水包油乳剂通常包含 1% 至 50% (优选 1% 至 30%) 的疏水分散相

和 1% 至 99% (优选 40% 至 90%) 的亲水连续相; 油包水乳剂通常包含 1% 至 98% (优选 40% 至 90%) 的亲水分散相和 1% 至 50% (优选 1% 至 30%) 的疏水连续相。所述乳剂还可以包含凝胶网络, 如 G. M. Eccleston, *Application of Emulsion Stability Theories to Mobile and Semisolid O/W Emulsions, Cosmetics & Toiletries*, 第 101 卷, 1996 年 11 月, 73-92 页 (其通过参考并入本文中) 所述。本文优选的组合物是水包油乳剂。

本发明的化妆品组合物的优选实例具有约 5,000 至约 200,000 mPa.s (厘泊) 的表观粘度。例如, 优选的洗剂具有约 10,000 至约 40,000 mPa.s 的表观粘度; 优选的霜剂具有约 30,000 至约 160,000 mPa.s 的表观粘度。表观粘度可以使用 Brookfield DVII RV 粘度计 (TD 转子) 以 5 rpm 或其等效条件来测定。在制备组合物并使其稳定之后 (通常在制备组合物后在 $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 和常压的条件下至少 24 小时), 对组合物进行粘度测定。在 $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, 转子转动 30 秒后测量组合物的表观粘度。

本发明的化妆品组合物通常配制为 pH 9.5 或更低, 一般为 pH 4.5 ~ 9, 更优选 pH 5 ~ 8.5。某些实例, 特别是包含额外活性剂 (如水杨酸) 的实例需要更低的 pH 值, 从而保证该额外活性成分的全部效力。这些组合物通常配制为 pH 2.5 ~ 5, 更优选 pH 2.7 ~ 4。

所述化妆品组合物可以包含多种任选成分, 只要这些任选成分在物理和化学性质上与本文所述的必需成分相容并且不会不适当地损害与组合物有关的稳定性、效力或其它应用优点即可。任选成分可以在本发明组合物的载体中分散、溶解等。

示例性的任选成分包括润肤剂、吸油剂 (oil absorbent)、抗微生物剂、粘合剂、缓冲剂、变性剂、化妆用收敛剂、外用止痛剂、成膜剂、保湿剂、遮光剂、香料、颜料、皮肤舒缓和愈合剂 (skin soothing and healing agent)、防腐剂、抛射剂、透皮促进剂、溶剂、助悬剂、乳化剂、清洁剂、增稠剂、增溶剂、蜡、防晒剂、仿晒剂 (sunless tanning agent)、抗氧化剂和/或自由基清除剂、螯合剂、抗痤疮剂、抗炎剂、脱皮剂、有机羧基酸、维生素和天然提取物。这些物质的实例描述于: *Harry's Cosmeticology*, 第 7 版, Harry & Wilkinson (Hill Publishers, London 1982); *Pharmaceutical Dosage Forms-Disperse Systems*; Lieberman, Rieger & Banker, 第 1 卷 (1988) & 第 2 卷 (1989); Marcel Decker, Inc.; *The Chemistry and Manufacture of Cosmetics*, 第 2 版, deNavarre (Van Nostrand 1962-1965);

以及 *The Handbook of Cosmetic Science and Technology*, 第 1 版, Knowlton & Pearce (Elsevier 1993), 它们也可用于本发明。

通常使用本领域已知的制备局部应用组合物的常规方法来制备本发明的化妆品组合物。所述方法通常包括在一步或多步中将所述成分混合成相对均匀的状态, 其中可以使用或不使用加热、冷却、抽真空等。

所述化妆品组合物可用于调节或改善皮肤状况, 其包括调节可见的或可触知的皮肤皱纹或不连续 (discontinuity), 例如皮肤纹理或色泽的可见或可触知的皱纹或不连续, 特别是与皮肤炎症、老化或其它内部因素 (例如, 皮肤内部的生化改变) 或外部因素 (例如, 紫外线辐射、环境污染、风、热、湿度低、粗糙的表面活性剂和磨料) 有关的皱纹或不连续。

可以预防性或治疗性地调节皮肤状况。预防性调节包括延缓、最小化或防止可见或可触知的皮肤肿胀、皱纹或不连续。另一方面, 治疗性调节包括改善、减少、最小化或消除这些肿胀、皱纹或不连续。调节皮肤状况包括改善皮肤的外观感觉, 例如使其外观或感觉更加光滑、平整以及减少衰老的迹象。

化妆品组合物以安全且有效的量局部应用至皮肤。其使用量、使用频率和使用周期随着给定组合物的活性水平以及期望的调节水平而变化。通常, 可以每日使用一次所述组合物。然而, 使用频率可以在大约每周一次至大约每天 3 次或更多次之间变化。

本发明的化妆品组合物应用至皮肤后使皮肤状况迅速得到显著改善。所述迅速改善包括遮盖或掩盖皮肤的缺陷 (如纹理不连续 (包括与皮肤炎症或老化相关的纹理不连续, 例如毛孔扩大)), 或者提供更均一的肤色。长期局部使用所述化妆品组合物也可以明显改善皮肤状况, 例如, 使用一周、一年或对象的整个生活期间。

优选通过使用皮肤洗剂、霜剂、化妆品等形式的组合物 (其可以较长时间地留在皮肤上从而起到某些美容、预防、治疗或其它作用, 即“留存 (leave-on)”组合物) 来调节皮肤状况。在向皮肤施用所述组合物后, 该“留存”组合物优选留在皮肤上至少 15 分钟并且可达 12 小时。

根据以上的描述, 本领域技术人员可以容易地确定本发明的必需特征, 并且在不背离本发明的精神和范围的前提下, 可以对本发明进行多种改变和修饰以使之适于多种用途和情况。因此, 以下权利要求的范围内也

包含另外的实施方案。

以下的具体实施例仅作为示例进行解释，而不以任何方式对说明书的其余内容进行限制。无需进一步阐述，认为本领域技术人员可以基于本文的描述来最大限度地应用本发明。本文引用的全部出版物全部通过参考并入本文中。另外，下文中提及的任何机制均不得以任何方式限制本申请的范围。

实施例 1

实验步骤

制备爪蟾胚胎，显微注射和萤光素酶测定——处理爪蟾胚胎和萤光素酶测定的实验操作方法大致描述于 Zhu 等, 2002, *Dev Cell* 3, 557-568。典型的细胞萤光素酶测定包括：将 2×10^5 个细胞分至 12 孔细胞培养板中并孵育 24 小时，然后用 3 μ l 脂质体转染试剂 (*TransIT1*, *Mirus*)、1 μ g 所选基因的 DNA 质粒和 0.3 μ g 报告质粒进行转染 (Hela 细胞需要所述 DNA 和脂质体用量的 1/3，而 293T 细胞需要 1/6)。转染 48 小时后，所述细胞用 PBS 洗涤，用 1 \times 细胞裂解缓冲液 (*Promega* 细胞裂解缓冲液) 进行裂解，刮下并收集。冰上孵育 30 分钟后，通过 12,000 g 离心 15 秒收集细胞并将其移至新管；然后将 20 μ l 细胞裂解物与 100 μ l 萤光素酶检测试剂 (*Promega*) 混合，并通过闪烁计数来测量萤光素酶的活性。

质粒和重组蛋白——利用基于聚合酶链式反应的技术，将爪蟾的 LEF1、LEF1 Δ HMG、LEF1 Δ 60、LEF1 Δ 160、Xom 及其缺失突变体亚克隆至 pCS2+和 PGEX4T3 载体中，并通过体外翻译和测序进行验证。pGL3-OT 和 pGL3-OF 由 Dr. B Volgestein 馈赠；p2.4BMP4-Luc 获赠于 Dr. J Feng；pGL3-MSX2 启动子 (WT) 和 pGL3-MSX2-SDM-600/-766 启动子获赠于 Dr. C Sirard。

制备细胞核和细胞质提取物——用胰蛋白酶消化细胞 (4×10^6) 并用 PBS 洗涤两次，离心收集沉淀。通过用含有 1 \times 蛋白酶抑制剂 (*Roche*, 蛋白酶抑制剂混合物) 的 150 μ l RIPA 缓冲液 (150 mM NaCl、1% NP40、0.5% DOC、0.1% SDS、50 mM Tris pH8.0) 裂解细胞而获得总蛋白。通过用含有 1 \times 蛋白酶抑制剂的 150 μ l 低渗缓冲液 (0.05% NP40、10mM HEPES pH7.9、1.5 mM MgCl₂、10mM KCl、1 mM DTT) 在冰上孵育细

胞 (2×10^6) 10 分钟, 然后离心 (4000 rpm) 2 分钟, 从而获得细胞质蛋白。收集上清液并作为细胞质蛋白使用。细胞核沉淀用 PBS 洗涤两次。通过用 150 μ l RIPA 缓冲液在冰上孵育所述沉淀 60 分钟而得到细胞核蛋白。使用特异性抗体 (Takara Bio) 利用 Western 印迹来测定分级分离的细胞提取物中的 β -联蛋白水平。

GST 沉降实验 (GST pull-down assay) —— 将 5 μ g GST 融合蛋白和 5 μ l 35 S 标记的 IVT 蛋白与 20 μ l 50% 谷胱甘肽 Sepharose 4B 珠子混合于 500 μ l 结合缓冲液 (50 mM Tris pH8.0、100 mM NaCl、50 mM KCl、5 mM $MgCl_2$ 、1 mM DTT、10% 甘油和 0.2% NP40) 中。将混合物在 4 $^{\circ}$ C 孵育 3 小时, 用含有 0.2% NP40 的 1 \times PBS 洗涤 4 次。用 2 \times 样品缓冲液释放所结合的物质, 在 95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 分钟, 快速离心, 并通过 SDS-PAGE 和放射自显影显示结果。

免疫共沉淀 —— 通过将 20 μ l G 蛋白琼脂糖珠 (protein G plus-Agarose bead, Santa Cruz Biotechnology) 与 1 μ g 相应抗体混合来制备亲和 G 蛋白珠。用含有 1 \times 蛋白酶抑制剂 (Roche) 的 1 \times 细胞裂解缓冲液 (Promega) 将总共 2×10^6 个细胞裂解, 冰上孵育 30 分钟, 快速超声处理, 并在 4 $^{\circ}$ C 以 12,000 g 离心 5 分钟。在 4 $^{\circ}$ C, 用 20 μ l 未经处理的 G 蛋白琼脂糖珠和 2 μ g 免疫前血清对所得上清液进一步纯化 2 小时。然后, 将上清液与 20 μ l 预先标记的 G 蛋白琼脂糖珠于 4 $^{\circ}$ C 过夜混合。用含有 0.2% NP40 的 PBS 洗涤珠子 4 次。用 2 \times 样品缓冲液释放所结合的蛋白质, 在 95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 分钟, 快速离心, 并使用特异性抗体通过 Western 印迹分析显示结果。

组织学染色 —— 在指定阶段, 用 3.7% 甲醛、0.1 M MOPS (pH 7.4)、2 mM EGTA 和 1 mM $MgSO_2$ 固定胚胎。然后将胚胎包埋到石蜡中并切成 10 μ m 厚的切片。用苏木精和伊红 (H&E) 对切片染色, 并进行组织学分析。继而用 2 μ g/ml 的 4', 6-二联脒-2-吡啶苯 (DAPI, Invitrogen) 对切片染色, 从而显示胚胎细胞的细胞核。

利用实时 PCR 分析基因表达 —— 利用 Trizol 法提取总 RNA。将来自每个处理组的 8 个胚胎合并, 并用 1 ml Trizol (Invitrogen) 进行匀浆。然后向样品中加入氯仿 (200 μ l)。振荡混合后, 将样品以 12,000 rpm 离心 1 分钟, 并将上清液收集至新管中。向每个样品加入异丙醇 (500 μ l), 混合, 并在室温放置 10 分钟。然后将样品离心 30 分钟。用 70% 乙醇洗涤所

得沉淀两次,在空气中干燥,并用 100 μl 双蒸水进行悬浮。通过在 OD_{260} 进行测量来确定 RNA 的终浓度。根据制造商的说明,使用 SuperScript 第一链合成系统 (Invitrogen) 来合成第一链 cDNA。简言之,使用来自每个样品的 2.5 μg 总 RNA。RT (逆转录) 产物的终体积为 20 μl , 并稀释到 200 μl (10 倍稀释); 使用 8 μl 的经稀释 RT 产物用于实时 PCR (根据制造商的说明,使用 LightCycler 系统 (Roche) 和 LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I)。基因表达的相对水平通过如下公式进行计算: 相对基因表达 = $2^{-\Delta\text{Cd}}$ (ΔCd = 特定基因的循环数 - 作为参考的组蛋白 H4 基因的循环数)。每个样品进行 3 次实验。如有要求可以获得引物序列。

结果

Xom 反式激活 LEF1/TCF 介导的转录——Xom 是 BMP4 信号途径的重要的腹侧细胞命运决定因子。使用 TOPflash 测定,先前的研究表明 LEF1/TCF 介导的转录活性定位于胚胎的腹-后侧 (Kiecker 等, 2001, Development 128, 4189-4201)。通过将 TOPflash 质粒注射进 4 细胞期的卵裂球并检测原肠胚形成期的萤光素酶活性,证实了 LEF1/TCF 介导的转录活性在胚胎发生早期定位于胚胎的腹侧 (pGL3-OT 获赠于 Dr. B Vogelstein, 其包含 3 拷贝经优化的 TCF 结合基序)。为了研究 Xom 表达和 LEF/TCF 介导转录之间的潜在联系,使用 TOPflash 萤光素酶测定检测了 Xom 的表达对 LEF1/TCF 介导转录的影响。与单独注射 TOPflash 报告基因的胚胎中的表达相比,当把编码 Xom 的 mRNA 与 TOPflash 报告基因构建体一起注射进两细胞期的爪蟾胚胎时, Xom 的表达使 TOPflash 报告基因的转录增强了 7 倍。Xom 对 TOPflash 报告基因的反式激活作用是特异性的,因为 Xom 的表达不激活对照 FOPflash 报告基因 (pGL3-OF 也来自 Dr. Vogelstein, 其在 LEF/TCF 结合位点包含突变)。为了确定 Xom 对 LEF1/TCF 介导转录的反式作用在胚胎中是否是环境依赖性的,还在非胚胎细胞中对 Xom 的表达对 LEF1/TCF 介导转录的作用进行了研究。当把编码 Xom 的质粒和 TOPflash 共转染进 HeLa 和 HCT116 细胞 (之后使用 293T 细胞) 时, Xom 的表达在这些非胚胎哺乳动物细胞中诱导了 TOPflash 构建体的转录,这表明 Xom 对 LEF1/TCF 介导转录的诱导作用是普遍性的。另外,由于发现 Xom 不能在这些组织培养实验中激活 FOPflash 报告基因构建体,因而表明 Xom 反式激活 LEF1/TCF 介导的转录具有特异性。

Xom在体内和体外结合LEF1/TCF因子——LEF1/TCF与TOPflash的启动子结合是该报告基因构建体活化所需的；因此，Xom的表达激活TOPflash而非FOPflash的结果提示了Xom通过与LEF/TCF相互作用来激活TOPflash报告基因的可能性。通过检测Xom是否与LEF1/TCF物理相互作用来验证该假设。在瞬时转染myc-Xom的HCT116细胞中进行免疫共沉淀实验。发现内源TCF4和抗TCF4抗体的免疫沉淀与Xom蛋白共沉淀。Xom与TCF4在体内的结合似乎比较强，使用300 mM NaCl和0.1% NP40也不能将其解离。为了确定介导Xom与LEF1/TCF相互作用的Xom结构域，制备Xom的系列缺失突变体并测试它们与TCF4在体内的相互作用。所使用的蛋白包括：野生型Xom(氨基酸1-326)、Xom ND55(氨基酸56-326)、Xom ND175(氨基酸176-326)、Xom CD145(氨基酸146-326)、Xom CD85(氨基酸86-326)和Xom ID110(氨基酸1-130与氨基酸241-326的融合蛋白)。所有含有同源框区域的Xom突变体均与抗TCF4珠子发生免疫共沉淀，而缺少该同源域的突变体则不能。

这些数据表明，Xom的同源域在介导Xom和LEF1/TCF因子之间形成复合物中起关键作用。在证实了Xom和TCF4在体内形成复合物之后，又鉴定了LEF1/TCF参与与Xom相互作用的关键结构域。在脊椎动物中，已经鉴定了LEF1/TCF家族的至少四个成员(LEF1、TCF1、TCT3和TCF4)，其中LEF1的表达模式与Xom类似。LEF1的合子转录始于MBT起始后，并在动物体的腹-尾侧富集(Molenaar等, 1998, Mech Dev 75, 151-154)。遗传学数据表明LEF1对腹-后侧的图式形成起关键作用(Roel等, 2002, Curr Biol 12, 1941-1945)，这使得LEF1成为与Xom相互作用蛋白的可能候选物。因此，检测Xom是否与LEF1相互作用，并通过缺失突变分析来研究LEF1参与该相互作用的关键结构域。

发现很少有细胞共表达Xom和全长LEF1。因此，Xom和LEF1间可能的相互作用通过体外结合实验来检测。当³⁵S标记的LEF1或其缺失突变体的体外翻译(IVT)产物与GST-Xom或单独的GST混合时，GST-Xom将LEF1沉降下来，而对照GST却不能。LEF1的C端缺失突变体LEF1 Δ HMG与Xom的亲合力显著减弱，而N端缺失突变体LEF1 Δ 60和LEF1 Δ 160结合GST-Xom与野生型LEF1同样有效。因此，Xom和LEF1之间的相互作用似乎依赖于LEF1的C端基序，该假设进一步得到了LEF1/TCF反式激活测定的支持。

为了确定 LEF1/TCF 介导转录的 Xom 反式激活的可能的生理学相关性, 利用启动子-萤光素酶分析检测了 Xom 对 BMP4 下游基因表达的影响。Msx2 基因是 BMP4 的下游基因, 前者的启动子包含 LEF1/TCF 结合位点和 BMP4 应答元件 (SBE) (Hussein 等, 2003, *J Biol Chem* 278, 48805-48814)。与 LEF1/TCF 可能直接参与 BMP/Xom 信号传导一致的是, 发现 Xom 既激活野生型 Msx2 启动子也激活 SBE 突变的 Msx2 启动子(其仅保留了有功能的 LEF1/TCF 结合位点)。

Xom 反式激活 LEF1/TCF 介导的转录, 其不需要通过 β -联蛋白积累来介导——先前的研究已显示, LEF1/TCF 介导的转录由 β -联蛋白激活 (Behrens 等, 1996, *Nature* 382, 638-642; Huber 等, 1996, *Mech Dev* 59, 3-10; Molenaar 等, 1996, *Cell* 86, 391-399)。为了研究 Xom 激活 LEF1/TCF 介导转录的机制, 并排除 Xom 反式激活 LEF1/TCF 介导的转录是通过 β -联蛋白的蛋白水平升高或核易位增加来实现的可能性, 在 HCT116 细胞中检测 Xom 表达对 β -联蛋白的蛋白水平和细胞内分布的影响。

已发现, 尽管 Xom 的表达以浓度依赖性的方式激活 LEF1/TCF 介导的转录, 但是细胞内 β -联蛋白的总蛋白水平并未相应地增加(反而稍有降低)。另外, 当将细胞内总蛋白分成细胞质部分和细胞核部分时, 未观察到 Xom 表达时 β -联蛋白明显的核易位(同样地, 而是稍有降低)。还发现, 与 Xom 相互作用的 LEF1 结构域位于其 C 端区域, 该区域与参与 β -联蛋白相互作用的 N 端结构域相分隔。在 TOPFlash 测定中, 发现 LEF1 Δ 60 (LEF1 的显性失活突变体, 其阻断 β -联蛋白对 LEF1/TCF 介导转录的反式激活) 促进 Xom 对 LEF1/TCF 介导转录的反式激活。这与 Xom 可能通过直接相互作用来反式激活 LEF1/TCF 介导的转录相一致。

Xom 通过其 N 端的 TAD (反式激活域) 来反式激活 LEF1/TCF——Xom 与 LEF1 之间的相互作用允许我们进一步研究 Xom 反式激活 LEF1/TCF 介导转录的分子机制。先前的研究已显示, β -联蛋白通过其中部的 Armadillo 重复与 TCF 结合, 而通过其 C 端基序激活 TCF (van de Wetering 等, 1997, *Cell* 88, 789-799 以及 Orsulic 等, 1996, *J Cell Biol* 134, 1283-1300)。因此, 在鉴定了参与 LEF1/TCF 相互作用的 Xom 关键结构域之后, 进一步分析了参与 LEF1/TCF 反式激活的 Xom 功能结构域。与仅转染 TOPflash 的对照细胞相比, 当将编码 Xom 或其缺失突变体的 cDNA 与 TOPflash 报告基因构建体共转染进 293T 细胞时, Xom 及其 C 端缺失

突变体 Xom CD85 激活了 TOPflash 几乎 10 倍。相比而言, Xom 的 N 端缺失突变体 (Xom ND55 和 Xom ND175) 激活 LEF1/TCF 介导转录的能力显著减弱。特别地, Xom ND175 几乎不具有反式激活 LEF1/TCF 介导转录的能力。与 Xom 通过直接相互作用反式激活 LEF1/TCF 介导转录的模型一致的是, 发现缺少 LEF1/TCF 相互作用基序的 Xom 突变体不能在胚胎发生早期激活 LEF1/TCF 介导的转录。已知 Xom 是背侧基因表达的转录阻遏蛋白。为了确定 Xom 的双重转录功能是否彼此独立, 进一步研究了这些 Xom 缺失突变体对背侧基因表达的作用。当把编码 Xom 及其缺失突变体的 mRNA 连同编码激活素 (Activin) 的 mRNA 和 Gsc 启动子-萤光素酶构建体共同注射进两细胞期的胚胎时, Xom 的 N 端缺失突变体和 C 端缺失突变体均强烈抑制激活素诱导的 Gsc 启动子活化。这些数据表明, Xom 反式激活域的功能与 Xom 阻遏蛋白功能是独立的, 并且 Xom 反式激活域 (TAD) 位于其 N 端区域, 这得到了胚胎发生早期 TOPflash 测定的进一步支持。

Xom 的 N 端 TAD 是腹侧信号传导所需的——Xom 在中胚层分化期间表现为促进腹侧特异性基因表达的关键性细胞命运决定因子 (Koide 等, 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102, 4943-4948)。已提出, Xom 与 BMP4 形成正加强环路 (positive re-enforcement loop) 以促进腹侧细胞命运 (Schmidt 等, 1996, Development 122, 1711-1721)。为了确定 Xom 的 N 端 TAD 是否在 Xom 反式激活腹侧特异性基因中起作用, 检测了 Xom ND175 在胚胎形成早期对反式激活 BMP4 启动子的作用 (BMP4-萤光素酶构建体获赠于 Dr. J. Feng) (Zhang 等, 2002, Biochem Biophys Res Commun 293, 1412-1419 以及 Ogawa 等, 2006, J Biol Chem 281, 18363-18369)。结果发现, 与 Xom 不同的是, Xom ND175 不能反式激活 BMP4 启动子。而且, 与对照胚胎的萤光素酶活性相比, 注射有 Xom ND175 的胚胎表现出较低的萤光素酶活性, 这提示 Xom ND175 的表达发挥了显性失活的作用从而阻断了内源 Xom 的活性。为了进一步确定 Xom 的 TAD 对下游基因的影响, 将编码 Xom 或 Xom ND175 的 mRNA 分别注射进两细胞期胚胎的两个卵裂球之一。使该胚胎发育至原肠胚阶段 (10.5 期), 从经注射的胚胎和未经注射的胚胎提取总 mRNA。使用组蛋白 H4 作为内部对照, 利用 Q-PCR 来检测 BMP4 和 Xom 的表达水平。与其反式激活腹侧基因表达的作用一致的是, 野生型 Xom 的表达增强了 BMP4 的表达。相反地, Xom ND175 的表达不能增强 BMP4 的表达, 这提示 Xom 的 TAD 是其反式激活 BMP4

表达所需的。而且,与破坏 BMP4 和 Xom 的自主正反馈环路(positive auto feedback loop)一致的是, Xom ND175 的表达强烈抑制 Xom 本身的表达。联系到腹侧特异性基因启动子上的 LEF1/TCF 结合位点是其应答 BMP4 信号传导所需的,并且 LEF1 功能丧失导致腹侧缺陷(Roel 等, 2002, *Curr Biol* 12, 1941-1945 以及 Karaulanov 等, 2004, *Embo J* 23, 844-856), 我们的结果提示 Xom 对 LEF1/TCF 介导转录的反式激活可能在腹侧信号转导和腹侧细胞命运决定中起关键作用。

Xom 反式激活 LEF1/TCF 是原肠胚形成所必需的——我们的生化和诱变研究显示, Xom 在其 N 端区域包含 LEF1/TCF 反式激活域。经鉴定, Xom 突变体(Xom ND175)几乎没有 LEF1/TCF 反式激活能力,但仍保留了转录阻遏蛋白的功能。为了确定 Xom 反式激活 LEF1/TCF 介导的转录在胚胎发生早期的潜在生理学功能,使用失功能(loss of function)方法来研究 Xom ND175 表达对胚胎发生的作用。将编码 Xom、Xom ND175 和另一些 Xom 缺失突变体的 mRNA 注射进四细胞期的两个腹侧卵裂球之一。观察到,用 Xom ND175 的 mRNA 而非其它 Xom 突变体的 mRNA 注射的胚胎表现出原肠胚形成期间的破坏性影响。除了 Xom ND175 的突变特异性表型以外, Xom ND175 的作用似乎还是阶段特异性的。与 Xom ND175-mRNA 不同的是, Xom ND175-cDNA 在原肠胚形成期间几乎不导致异常。进一步研究显示,用 Xom ND175-mRNA 注射的胚胎可以正常通过卵裂期和原肠形成前期;然而,当原肠胚形成开始时,许多较大的灰白色细胞出现在注射一侧。随着原肠胚形成的继续进行,这些细胞逐渐丧失既定的细胞外观,使胚胎变成“破烂状(rotten appearance)”。为了确定与 Xom ND175 表达有关的细胞和组织改变,将经 Xom ND175-mRNA 注射的胚胎和对照胚胎固定,切成 10 μm 厚的切片,用 H&E 和 DAPI 进行染色。在卵裂期和原肠胚形成前期,几乎没有与 ND175 表达有关的组织改变,但是在原肠胚形成期观察到许多大的圆缩(rounded-up)结构,其看上去是死细胞。经 ND175 注射的胚胎中这些大的圆缩结构均不能用 DAPI 染色,这提示它们已失去正常的细胞结构(如细胞核)。胚胎似乎对 Xom ND175 的作用非常敏感。少于 50 pg 的 Xom ND175-mRNA 就能实现 50% 有效渗透率(结果未显示)。发现缺少 TAD 的 Xom 显性失活突变体的表达导致胚胎发育阻滞于原肠胚形成期,这提示 Xom 反式激活 LEF1/TCF 介导的转录对原肠胚形成是关键性的。与 BMP4 有关的另一些转录因子(如 Bix3)也有类似的发现(Trindade 等, 2003, *Development* 130, 4611-4622)。

实施例 2

为了研究 Xom 与 LEF1 的细胞内相互作用及其可能的细胞作用,利用标准方法研究了 Hela 细胞中 LEF1 存在或不存在时 Xom 的细胞内分布和作用。结果发现,在经转染的 Hela 细胞中,野生型 Xom 聚集在细胞核中。然而,当将 Xom 和 LEF1 共转染进 Hela 细胞时,很少有细胞表达这两种蛋白。共表达 Xom 和 LEF1 的少数细胞常常包含巨大的多叶细胞核,这表明共表达 Xom 和 LEF1 导致生长停滞。

为了证实 Xom 通过与 LEF1 在功能上相互作用来介导生长抑制作用,将 Xom 与显性失活的 LEF1 (LEF1 Δ HMG) 共转染进 Hela 细胞。结果发现,许多经转染的细胞共表达 Xom 和 LEF1 Δ HMG,这表明 Xom 通过与 LEF1 在功能上相互作用来介导生长抑制作用。

使用 GFP 和 MTA 细胞活力测定来进一步验证该假设。简言之,将 5×10^4 个细胞铺在 96 孔细胞培养板上。铺板 24 小时后,用 0.3 μ l TransIT-1 和 0.1 μ g 质粒 DNA 转染细胞。转染 36 小时后,使用 CellTiter 96 Aqueous 非放射性细胞增殖检测试剂盒 (Promega) 来测量细胞的活力。每种转染重复 4 次以减少实验误差。结果表明,共表达 Xom 和 LEF1 显著降低了经转染 Hela 细胞的活力。Xom 和 LEF1 在功能上的相互作用对 Xom 影响细胞命运是重要的,与之相一致地,在共表达 Xom 和 LEF1 (Δ HMG) 的细胞中生长停滞表型削弱了。

在用 Xom 和 LEF1 或 LEF1 Δ HMG 转染的细胞中,对胱天蛋白酶 3 (caspase3) 的活化水平进行了检测,从而研究 Xom 与 LEF1 相互作用对细胞生长停滞的影响是否与胱天蛋白酶的活化有关。结果发现,Xom 和 Xom/LEF 的表达增强了胱天蛋白酶 3 的活化水平,该作用可以被凋亡抑制剂 ZVAD 阻断。Xom 对胱天蛋白酶 3 的活化作用被 LEF Δ HMG 的共表达所阻断,这提示 Xom 与 LEF1 之间在功能上的相互作用是激活细胞凋亡所需的。Xom 介导的 LEF1 促凋亡活性似乎与 β -联蛋白介导的 LEF1/TCF 抗凋亡作用是相反的。

BMP4/Xom 是背腹图式形成的关键调节物。尽管先前的研究确定了 LEF1/TCF 在背侧发育中的作用,然而 LEF1/TCF 与 Xom 之间的相互作用提示了 LEF1/TCF 在腹侧发育中在介导 BMP4/Xom 途径的信号传导中起作用。为了验证该假设,对 LEF1 是否增强 Xom 的腹侧发育作用进行了研究。当在背侧卵裂球中表达低水平的 Xom 或 LEF1 时,几乎未检测到可

辨识的腹侧发育作用。然而，共表达相同浓度的 Xom 和 LEF1 则导致显著的背侧发育抑制。与这些结果一致的是，发现单独表达 LEF1 以剂量依赖的方式轻微地抑制背侧发育。为了确定 LEF1 在介导 Xom 信号传导中的功能特异性，研究了显性失活的 LEF1 (Δ HMG) 对 Xom 的腹侧发育作用的影响。结果发现， Δ HMG 的表达拯救了过表达高水平 Xom 所导致的腹侧发育表型，而在背侧卵裂球单独表达 Δ HMG 则几乎不引起可辨识的变化。

上述结果表明，先前已知作为 Wnt/ β -联蛋白途径的介导物的 LEF1/TCF 家族转录因子还参与 BMP4/Xom 途径。因此，Xom 和 β -联蛋白可以竞争 LEF1/TCF，从而实现它们在细胞命运决定中的不同功能。先前的研究已确定 LEF1/TCF 在抗凋亡和背侧发育中与 Wnt 途径的 β -联蛋白有关的作用。我们目前的研究表明，LEF1/TCF 与 Xom 的结合导致细胞生长停滞与腹侧发育。因此，LEF1/TCF 作为 Xom/BMP4 和 β -联蛋白/Wnt 信号传导的汇合点来介导它们对细胞命运的共同信号传导作用。除了与同家族的转录因子（针对不同的表型）竞争并且与 Smad 相区别以外，发现 Xom 的表达降低了 β -联蛋白的蛋白水平并阻断了 β -联蛋白对 LEF1/TCF 介导转录的反式激活。鉴于在图式形成和多种癌症的恶性转化中 β -联蛋白反式激活 LEF1/TCF 的提示，对 LEF1/TCF 介导的细胞命运决定中 BMP/Xom 之分子机制的进一步研究对于了解胚胎发生的基本机制非常重要，并且对治疗肿瘤和退行性疾病具有重要的提示性意义。

我们在研究中发现，BMP4 途径的新组分对细胞命运决定是至关重要的。基于我们的上述结果，还发现 BMP4 途径利用 TCF/LEF1 转录因子来转导其信号。还发现，共表达 LEF1/TCF 因子和 Xom (BMP4 途径的组分) 诱导结肠癌细胞死亡，其效力接近 100%。在宫颈癌和前列腺癌细胞的基因治疗方法中也有效。

利用标准方法克隆 Xom 的人同源物 Hom (先前称为 VentX2)，并进行上述测定。结果发现，Hom 的功能与爪蟾 Xom 的功能相似。

Xom 的稳定性对细胞命运决定是关键。单独表达野生型 Xom 造成 30% 结肠癌细胞生长阻滞，而表达稳定型 Xom 则导致 60% 结肠癌细胞生长阻滞。

Xom 的蛋白水平受蛋白酶解控制，并受 Ser140/144 磷酸化的控制。开发了用于监测 Xom 激酶活性的方法和材料(例如，特异性磷酸化抗体)，

可以使用所述方法和材料来筛选有效预防和治疗癌症的药物。

实施例 3

如上所述, Hom 是脊椎动物中 Xom 的人同源物。生化研究表明, Hom 结合转录因子 LEF1/TCF 并阻断 Wnt/ β -联蛋白途径中致癌信号传导对 LEF1/TCF 的反式激活。Hom 定位于染色体 10q26, 该区域常在转移癌(如转移性结肠癌)中缺失, 这提示 Hom 在癌症形成和转移中的作用。为了研究 Hom 对癌细胞生长的潜在作用, 将 Hom 在结肠癌细胞和肺癌细胞(分别为 HCT116 和 H460)中瞬时表达, 并研究与 Hom 表达有关的形态学改变。

将编码 GFP-Hom 或单独 GFP 的质粒(0.5 ~ 2 μ g)转染进 HCT116 或 H460 细胞。在转染 36 小时后, 用多聚甲醛固定细胞。利用相差显微镜或荧光显微镜来研究与 GFP-Hom 或 GFP 表达有关的形态学改变。结果发现, 在瞬时表达 GFP-Xom 的结肠癌细胞和肺癌细胞中, GFP-Hom 的表达使超过 80% 的细胞变为圆缩表型。相反地, 在该测定中, 在表达 GFP 的结肠癌细胞和肺癌细胞中, 少于 10% 的细胞变为圆缩表型。

为了进一步确定与 GFP-Hom 的表达有关的形态学改变并确定所述圆缩表型是否与细胞生长阻滞/死亡有关, 对瞬时表达 GFP-Hom 的癌细胞进行 TUNEL 测定。用编码 GFP(载体)或 GFP-Hom 的质粒瞬时转染 HCT116 或 H460 细胞。在转染 24 小时后, 收集细胞并用 Hoechst 33258 染色以显示细胞核。包含典型的凝缩染色质和片段化细胞核的细胞被记作凋亡细胞。通过对凋亡细胞和正常形态细胞计数来确定表现为凋亡形态的细胞的百分比。通过随机选取视野, 针对每个样品对至少 400 个细胞进行计数。结果发现, 在瞬时表达 GFP-Hom 的 HCT116 和 H460 细胞中大约 30% 表现为凋亡表型, 而在对照 GFP 组中大约 5% 的细胞表现凋亡表型。该结果提示, Hom 的表达诱导癌细胞死亡。

Hom 对癌细胞的生长抑制作用在体外集落形成实验中也得到了验证。结果发现, 与表达 GFP 的对照细胞相比, GFP-Hom 的表达使结肠癌细胞和肺癌细胞的集落形成减少了 100%。

p53 是参与肿瘤抑制的关键细胞因子。已显示, p53 与另一些肿瘤抑制基因(如 ARF)一起作用从而抑制肿瘤细胞生长。p53 的失功能突变被认为是恶性肿瘤转化的主要步骤。为了确定 p53 是否在 Hom 抑制癌细胞

生长中起作用,根据上述实验步骤分别使用 HCT116 p53^{-/-}和 H1299 细胞,对 Hom 在 p53 缺失或突变的结肠中的作用进行研究。

结果发现,GFP-Hom 的表达导致约 30% 的 p53^{-/-}结肠癌细胞和肺癌细胞出现凋亡表型,该表型与含有野生型 p53 的结肠癌细胞和肺癌细胞类似。该结果提示, Hom 引起的细胞死亡是 p53 非依赖的。因此, Hom 可以在 p53 发生突变的多种癌细胞中发挥着主要的肿瘤抑制功能。

为了确定 Hom 是否可以在体内抑制肿瘤形成,在无胸腺裸鼠中对 Hom 对于结肠癌细胞生长的作用进行了研究。所用裸鼠购自 Charles' River Laboratory。用编码 GFP-Hom 的质粒瞬时转染 HCT116 细胞(GFP 用作成功转染的指示)。对照 HCT116 通过转染 GFP 空载体来制备。对于皮下注射来说,每个注射部位准备 5×10^6 个细胞。用胰蛋白酶将细胞从培养皿分离,之后用完全血清将胰蛋白酶灭活。然后收集细胞,以 400g 离心 5 分钟,并用 PBS 重悬至终浓度为 5×10^7 个细胞/ml。

进行两组测试。在第一组中,在转染后,使用 GFP 作为分选标记,从未转染的细胞中分选出经 GFP-Hom 或 GFP 转染的 HCT116 细胞。在第二组中,不进行 GFP 表达的分选,将转染细胞直接用于注射(转染效率约为 60%)。在使用酒精局部消毒后,使用 1-cc 注射器将所述细胞皮下注射进裸鼠的背侧肩部。每个部位注射 100 μ l 细胞,其中包含 5×10^6 个细胞。将经注射的小鼠做耳部标记,每天进行观察,直至 21 天(裸鼠中形成肿瘤通常需要 7 到 10 天)。在形态学观察之后,将该动物处死并将肿瘤取出。使用 HE 染色和显微镜观察来确定肿瘤的结构异常。

结果发现,用表达 GFP-Hom 的经分选 HCT116 细胞注射的裸鼠中无肿瘤形成。相反地,用仅转染 GFP 载体的 HCT116 细胞注射的裸鼠中发现肿瘤。类似地,用表达 GFP-Hom 的未经分选 HCT116 细胞注射裸鼠中具有肿瘤,但是与用仅转染 GFP 的 HCT116 细胞注射的对照裸鼠相比,其肿瘤尺寸减小约 60%。这些结果支持了 Hom 抑制肿瘤发生。

为了确定 Hom 表达是否在体内影响细胞增殖和生存,将肿瘤样品切片并进行 TUNEL 测定,其中可以通过末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)将 BrdU(5-溴脱氧尿苷)三磷酸掺入 DNA 片段(凋亡标志)的 3'羟基端。可以使用荧光标记的抗 BrdU 抗体来检测 BrdU 掺入情况。TUNEL 测定显示,表达 GFP-Hom 的肿瘤细胞凋亡显著,而仅表达 GFP 的肿瘤细胞中几乎检测不到凋亡发生。

其它实施方案

本说明书所公开的所有特征可以以任何组合方式进行组合。本说明书中公开的每个特征可以替换为具有相同、等效或类似目的的可选特征。因此，除非另有说明，所公开的每个特征只是一系列等效或类似特征的示例。

已对本发明的若干实施方案进行描述。然而，可以理解的是，在不背离本发明的精神和范围的前提下，可以进行多种修改。因此，以下权利要求的范围内还包括其它实施方案。

专利名称(译)	发育相关疾病的治疗		
公开(公告)号	CN101505780A	公开(公告)日	2009-08-12
申请号	CN200780010741.6	申请日	2007-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	高红		
申请(专利权)人(译)	高红		
当前申请(专利权)人(译)	高红		
[标]发明人	朱正嵩 高红		
发明人	朱正嵩 高红		
IPC分类号	A61K38/00 A61P35/00 A61P37/02 C07H21/04 C07K14/32 C07K14/435 C12N15/85 C12N5/00 C12N5/06 C12P21/06 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	C07K14/463 C07K14/4702 C12Q1/6886 A61K38/00 G01N33/53 G01N33/68 A61P3/00 A61P29/00		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	60/775645 2006-02-22 US		
其他公开文献	CN101505780B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了用于治疗发育相关疾病的组合物和方法。还公开了诊断方法、预后方法和药物筛选方法。