



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01821527.0

[43] 公开日 2005 年 7 月 13 日

[11] 公开号 CN 1639355A

[22] 申请日 2001. 10. 25 [21] 申请号 01821527. 0

[30] 优先权

[32] 2000. 10. 27 [33] US [31] 60/243,689

[86] 国际申请 PCT/US2001/051234 2001. 10. 25

[87] 国际公布 WO2002/044427 英 2002. 6. 6

[85] 进入国家阶段日期 2003. 6. 27

[71] 申请人 哈佛学院校长同事会

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 金泰国

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任
公司

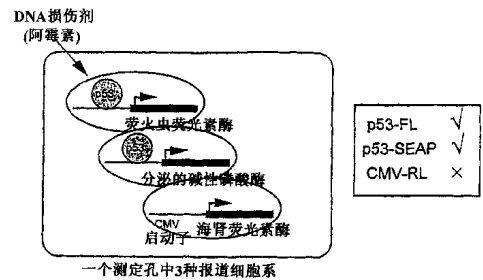
代理人 丁业平 王维玉

权利要求书 5 页 说明书 18 页 附图 5 页

[54] 发明名称 双倍和三倍读出测定系统

[57] 摘要

本发明提供测定方法用于鉴定影响目的蛋白转录活性或影响目的蛋白稳定性的化合物。三倍读出测定系统可用来鉴定影响目的蛋白转录活性的化合物，使用三株细胞系以对非特异效果如插入基因两侧的序列和细胞毒性进行控制。双倍读出测定系统评估蛋白稳定性并利用报道蛋白和目的蛋白的融合蛋白。这些测定系统在鉴定影响转录因子和肿瘤抑制物的化合物方面是特别有用的。在特别的实施方案中，肿瘤抑制物 p53 是在研的靶蛋白。



1. 一种鉴定影响受 p53 调节的基因转录的化合物的方法，所述方法包含下列步骤：
- 5 提供第一株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第一报道基因可操作连接的 p53 结合元件；
- 提供第二株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第二报道基因可操作连接的 p53 结合元件；
- 提供第三株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第三报道基因
- 10 可操作连接的启动子；
- 将测试化合物与三株细胞系中的各株的细胞接触；以及
- 确定测试化合物对三种报道基因表达的影响。
2. 一种鉴定影响受 p53 调节的基因转录的化合物的方法，所述方法包含下列步骤：
- 15 提供第一株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第一报道基因可操作连接的 p53 结合元件；
- 提供第二株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第二报道基因可操作连接的 p53 结合元件；
- 20 将测试化合物与两株细胞系中的各株的细胞接触；以及
- 确定测试化合物对报道基因表达的影响。
3. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中细胞系源自在用 DNA 损伤剂处理后高水平诱导 p53 的细胞系。
- 25
4. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中细胞系源自表达野生型 p53 的细胞系。
5. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中细胞系源自在对 DNA 损伤
- 30 反应中具有完整的 p53-介导的生长停滞途径的细胞系。

6. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中细胞系源自动物细胞系。
7. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中细胞系源自哺乳动物细胞系。
8. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中细胞系源自人细胞系。
9. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中细胞系源自 RKO 细胞系。
10. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中 p53 结合元件源自 p21 基因。
11. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中 p53 结合元件源自 bax 基因。
12. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中 p53 结合元件源自 14-3-3 基因。
13. 权利要求 1 或 2 所述的方法，其中 p53 结合元件包含多个 p53 结合位点。
14. 权利要求 1 所述的方法，其中启动子是组成型启动子。
15. 权利要求 1 所述的方法，其中启动子是 CMV 启动子。
16. 权利要求 1 所述的方法，其中报道基因选自萤火虫荧光素酶、分泌的碱性磷酸酶、增强的绿色荧光蛋白、辣根过氧化物酶和海肾荧光素酶。

17. 权利要求 1 所述的方法，其中报道基因选自萤火虫荧光素酶、分泌的碱性磷酸酶、海肾荧光素酶和 β -半乳糖苷酶。

5 18. 权利要求 1 所述的方法，其中报道基因编码可由抗体检测的蛋白。

19. 权利要求 1 所述的方法，其中报道基因编码通过吸光度的变化、荧光的变化或放射免疫测定可检测的基因产物。

10 20. 一种鉴定影响 p53 稳定性的化合物的方法，所述方法包含下列步骤：

提供转染有构建体的细胞系，其表达与 p53-融合的报道蛋白和对照报道蛋白；

将测试化合物与细胞系的细胞接触；

15 将细胞与 DNA 损伤剂接触；以及

比较 p53 融合蛋白与对照报道蛋白的水平。

21. 一种鉴定影响 p53 稳定性的化合物的方法，所述方法包含下列步骤：

20 提供转染有构建体的细胞系，其表达与 p53-融合的报道蛋白和对照报道蛋白，以及受转染后表达 E6；

将测试化合物与细胞系的细胞接触；

将细胞与 DNA 损伤剂接触；以及

比较 p53 融合蛋白与对照报道蛋白的水平。

25

22. 权利要求 20 或 21 所述的方法，其中细胞系源自已知含有活性 p53 翻转途径的细胞系。

30 23. 权利要求 20 或 21 所述的方法，其中细胞系源自具有相对低的 p53 蛋白稳态水平并且显示在用 DNA 损伤剂处理后显著积累 p53

蛋白的细胞系。

24. 权利要求 20 或 21 所述的方法，其中 DNA 损伤剂是化疗剂。

5 25. 权利要求 20 或 21 所述的方法，其中 DNA 损伤剂是阿霉素。

26. 由权利要求 1 或 20 所述的方法鉴定的 p53 的抑制剂。

27. 由权利要求 1 或 20 所述的方法鉴定的 p53 的激活剂。

10

28. 一种试剂盒，其用于鉴定影响受 p53 调节的基因转录的化合物，所述试剂盒包括：

含有构建体的第一株细胞系，该构建体包含与第一报道基因可操作连接的 p53 结合元件；

15 含有构建体的第二株细胞系，该构建体包含与第二报道基因可操作连接的 p53 结合元件；以及

含有构建体的第三株细胞系，该构建体包含与第三报道基因可操作连接的启动子。

20 29. 一种试剂盒，其用于鉴定影响 p53 稳定性的化合物，所述试剂盒包括：

含有构建体的细胞系，其表达与 p52-融合的报道蛋白和对照报道蛋白。

25 30. 一种鉴定影响受目的蛋白调节的基因转录的化合物的方法，所述方法包含下列步骤：

提供第一株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第一报道基因可操作连接、已知结合目的蛋白的元件；

30 提供第二株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第二报道基因可操作连接、已知结合目的蛋白的元件；

提供第三株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第三报道基因可操作连接的启动子；

将测试化合物与三株细胞系中的各株的细胞接触；以及
确定测试化合物对报道基因表达的影响。

5

31. 一种鉴定影响受目的蛋白调节的基因转录的化合物的方法，所述方法包含下列步骤：

提供第一株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第一报道基因可操作连接、已知结合目的蛋白的元件；

10 提供第二株含有构建体的细胞系，该构建体包含与第二报道基因可操作连接、已知结合目的蛋白的元件；

将测试化合物与两株细胞系中的各株的细胞接触；以及
确定测试化合物对报道基因表达的影响。

15

32. 一种鉴定影响目的蛋白稳定性的化合物的方法，所述方法包含下列步骤：

提供转染有构建体的细胞系，其表达与目的蛋白融合的第一报道蛋白和第二对照报道蛋白；

将测试化合物与细胞系的细胞接触；

20 将细胞与 DNA 损伤剂接触；以及

比较第一报道蛋白与第二报道蛋白的水平。

33. 一种鉴定影响目的蛋白稳定性的化合物的方法，所述方法包含下列步骤：

25 提供转染有构建体的细胞系，其表达与目的蛋白融合的第一报道蛋白和第二对照报道蛋白；

将测试化合物与细胞系的细胞接触；

将细胞与 DNA 损伤剂接触；以及

比较第一报道蛋白与第二报道蛋白的水平。

30

双倍和三倍读出测定系统

5 相关申请

本申请要求 2000 年 10 月 27 日提交在审的临时申请 USSN 60/243,689 的优先权，将其在此引作参考。

发明背景

10 数十年来，药物筛选和生物测定一直用于药物和生物技术产业中，以甄别研究中的先导化合物成为新的药剂。在过去十年，通过诸如组合化学的技术，化学家在短的时间内合成大量化学化合物的能力已大大提高（对于组合化学领域的最新综述，请参见 Geysen 等 *Molec. Immunol.* 23:709-715, 1986; Houghton 等 *Nature* 354:84-86, 1991; Frank
15 *Tetrahedron* 48:9217-9232, 1992; Bunin 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4708-4712, 1994; Thompson 等 *Chem. Rev.* 96:555-600, 1996; Keating 等 *Chem. Rev.* 97:449-472, 1997; Gennari 等 *Liebigs Ann./Recueil* 637-647, 1997; Reddington 等 *Science* 280:1735-1737, 1998; 分别在此引作参考），并且这已扩充超出了传统筛选方法的容量。通常，需要筛选
20 成千上万的化合物以鉴定那些具有所需的药物特性的化合物（如抗癌活性、免疫抑制活性等）。许多目前通用的筛选为生化测定系统，其中将化合物加入到纯化或部分纯化的细胞抽提物中，以确定其是否具有所需的活性。与生化测定系统形成对照，目前通用的基于细胞的测定系统鉴定可透过细胞并在生理环境中起作用的生物活性分子。然
25 而，基于细胞的测定筛选的主要缺陷之一是高的假阳性率，这是由细胞内的化合物的非特异效果产生的（例如，请参见 Sarver 等 *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8:659-666, 1992; Witvrouw 等 *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2628-2633, 1992; 分别在此引作参考）。假设基因调节在许多病态中具有根本的重要性，一种典型的基于细胞的测定在特异
30 报道基因的控制下测量报道基因的活性。然而，抑制报道基因表达并

不必然地显现特异性干扰启动子活性，而能反映细胞功能的非特异性抑制，例如由于细胞毒性。

5 在癌症研究中一种特别重要的蛋白是核磷蛋白 p53。据认为 p53 在超过 50% 的人类癌症中是突变的。p53 基因中的突变已在结肠、肺、乳房、卵巢、膀胱及其他若干器官的肿瘤中找到。如果将 p53 基因的突变型导入到初级成纤维细胞中，这些细胞就变为无限增殖化细胞。野生型 p53 基因已显示抑制转化人细胞的生长，但是 p53 的致癌形式失去这种抑制功能。因此，p53 基因已被称为“肿瘤抑制”基因。假设 p53 在肿瘤发生中起作用，它在新抗瘤剂研究中已变为重要的潜在靶子。

15 野生型 p53 的功能可被干扰。例如，转化病毒性感染细胞能干扰 p53 蛋白产物。例如，转化某些株的人乳头瘤病毒（HPV），并且已知干扰感染细胞中的 p53 蛋白的水平，这是因为所述病毒生产蛋白 E6，其促进 p53 蛋白的降解。

20 对 p53 还有兴趣，因为 p53 蛋白能够诱导某些细胞凋亡。在凋亡或“编程性细胞死亡”中，一系列细胞的致死事件显示直接作为细胞 DNA 转录的结果发生。例如，与糖皮质激素接触的淋巴细胞通过编程性细胞死亡而死亡。当促激素去除时，激素敏感组织如乳房和前列腺就通过编程性细胞死亡而发生退化。

25 特别地，最新的研究已显示，野生型（非突变）p53 导入携带 p53 突变型的转化的细胞系，诱导细胞进行编程性细胞死亡，同时伴随着核 DNA 的分解。相信通过诱导编程性细胞死亡，p53 可以抑制肿瘤发展，由此调节细胞生长。

30 假设 p53 在各种各样的生理状态和病态中的重要性，有需要具有低背景的基于细胞的测定，所述测定可用于筛选化合物以鉴定 p53 的

抑制剂和激活剂。此外，通过基因组研究快速增加新药物靶子以及化学化合物巨大文库的可利用度对提高筛选方法的新技术创造极大需求。

5 发明概述

本发明提供筛选化学化合物以甄别目的蛋白的激活剂和抑制剂（如转录因子、酶和肿瘤抑制物）的测定系统。

一方面，本发明提供基于细胞的三倍读出测定系统用于鉴定影响
10 转录活性的化合物。使用三种单独的细胞系，各细胞系含有不同改造的构建体。其中两种已转化有包含报道基因和已知与选择的转录因子结合的可调节的转录调节序列的构建体。两个细胞系各有不同的报道基因，以及将构建体整合进基因组的
15 不同位置以控制侧翼序列对报道基因转录的影响。第三细胞系已转染有包含与组成型启动子可操作连接的第三报道基因的构建体。第三细胞系用来评估测试化合物的总的细胞毒性。将源自三种细胞系中的各系的至少一个细胞与测试化合物接触，测定报道基因的水平，并用来测试化合物对转录因子或转录因子途径的特异性。在特别优选的实施方案中，目的转录因子为 p53。

20 另一方面，本发明提供基于细胞双倍读数测定系统用于鉴定影响细胞中的蛋白稳定性/水平的化合物。在目的蛋白和第一报道蛋白之间创建融合蛋白。融合蛋白和第二报道蛋白在测试化合物加入的细胞系中表达。第二报道蛋白用来控制非特异效应如细胞毒性。测量所述两种蛋白（即融合蛋白和第二报道蛋白）的水平以评估测试化合物对目的蛋白的特异性。在特别优选的实施方案中，这两种蛋白翻译自被改
25 造 DNA 构建体的相同 mRNA 转录物。

在本发明这方面的特别优选的实施方案中，目的蛋白为 p53。调节 p53 的一个关键点发生在蛋白水平。部分通过抑制由遍在蛋白-蛋白酶体途径的降解，影响其构型的肿瘤突变通常增加它的半衰期。与
30

其肿瘤抑制中的关键作用相一致，包括人乳头瘤病毒 E6 癌蛋白的许多癌蛋白靶击 p53 蛋白并且改变其稳定性。

5 另一方面，本发明提供 p53 的化学抑制剂和激活剂。利用本发明的三倍和双倍读出测定系统中的一种或两种系统，这种抑制剂和激活剂优选被鉴定和/或表征。在某些临床情形中，理想的是抑制 p53 的细胞效果。例如，p53 依赖的编程性细胞死亡据信有助于用化疗抗癌治疗的毒性副作用。在本发明的某些优选的实施方案中，将 p53 抑制剂或激活剂提供在药物组合物的情形中。在优选的实施方案中，抑制剂
10 和激活剂是小分子。

另一方面，本发明提供试剂盒用于进行双倍和三倍读出测定。优选地，本发明试剂盒含有所有测定测试化合物对转录和/或蛋白稳定性/水平的影响所需的试剂。在特别优选的实施方案中，三倍读出测定中
15 所用的试剂盒含有上述三种细胞系。双倍读出测定的试剂盒优选含有稳定转染有融合蛋白和第二报道蛋白的细胞系。在另一优选的实施方案中，本发明的试剂盒包含用于转染细胞系的 DNA 构建体。本发明优选的试剂盒也可含有其他试剂，如生长细胞的介质、酶底物（如荧光酶的底物）、DNA 损伤化合物（如阿霉素）、人乳头瘤病毒 E6 癌蛋白、生长因子等。
20

定义

除非另外指明，下文所定义的术语具有下列含义：

25 “化合物”：如本文所用的术语“化合物”或“化学化合物”可包括有机金属化合物、多核苷酸、寡核苷酸、肽、蛋白质、有机化合物、金属、过渡金属复合物以及小分子。在一特别优选的实施方案中，术语化合物是指小分子（例如，优选非肽和非寡聚的分子）并且排除肽、多核苷酸、过渡金属复合物、金属以及有机金属化合物。

30 “组成型启动子”：术语“组成型启动子”是指总处于“开启”

状态下的启动子。换句话说，与组成型启动子可操作连接的基因总能被转录成 mRNA。

5 “构建体”：术语构建体是指任何已经人工操作的多核苷酸。具体而言，构建体分离自其他在天然状态发现的序列。构建体可以由本领域公知的重组技术如聚合酶链式反应来产生。所述多核苷酸优选含有各种各样的可操作连接的元件，并将构建体导入细胞。例如，构建体可含有与编码序列可操作连接的启动子，以及所述构建体可导入细胞以诱导细胞生产编码蛋白。在一优选的实施方案中，构建体已经人工创建或改造，不是自然发生的。

15 “融合蛋白”：术语“融合蛋白”是指含有两个或更多个多肽的蛋白，所述多肽尽管在其天然态通常是非连接的，但是通过它们各自的氨基和羧基末端以肽键合连接成单个连续多肽。两个或更多个多肽组分可通过肽接头/间隔臂直接连接或间接连接。融合蛋白可由核糖体从 mRNA 翻译成单个多肽，或者利用合成或酶化学可将多肽连接。

20 “可调节的转录调节序列”：术语“可调节的转录调节序列”是指通过蛋白与序列结合能够调节报道基因的启动子进行转录起始的 DNA 序列。蛋白优选结合构建体的调节序列，在所述构建体中启动子、可调节的转录调节序列以及报道基因是可操作连接的，由此所述蛋白上调或下调启动子的转录。

25 “可操作连接”：术语可操作连接是指可相互影响的多核苷酸序列的两个区段。在一特别优选的实施方案中，两个区段中的一个结合蛋白（如聚合酶、增强子和转录因子）的序列，以及蛋白与序列的结合导致位于第二区段的基因序列的转录。在另一特别优选的实施方案中，分子（如核酸、小分子、蛋白和肽）与一个区段的结合可抑制或增强另一分子（如核酸、小分子、蛋白和肽）与第二区段的结合。

30 两个可操作连接的区段优选是共价连接的，但是在本发明的情况下，

足以取得所需结果的任何类型的结合都被视为可操作连接。

“p53”：如本发明所用的术语“p53”是指 p53 的基因和蛋白形式或 p53 的任何同系物或 p53 基因家族的成员。所述同系物应该至少 50% 同源于小鼠 p53 DNA 或蛋白序列；优选至少 60% 的同源性，以及最优选大于 75% 的同源性。p53 同系物的鉴定也可通过其活性如抑制转化细胞生长的能力进行。在另一优选的实施方案中，p53 同系物由其在基因组中的位置（如染色体上的位置）来鉴定。在另一优选的实施方案中，p53 同系物能在标准杂交条件下与 p53 基因杂交。p53 还可以指 p53 基因的片段。在某些优选的实施方案中，p63、p73 及其同系物被视为 p53 家族成员。在其他优选的实施方案中，同系物在中央序列特异的 DNA 结合域、N-端反式激活域和/或 C-端寡聚结构域内有至少 50% 的同源性，更优选大于 60% 的同源性。

“p53 结合元件”：术语“p53 结合元件”是指结合 p53 蛋白的多核苷酸的序列。在一优选的实施方案中，p53 结合元件是 p21、bax 或 14-3-3 基因中发现的 p53 结合元件。p53 结合元件可包含多结合元件（即多聚化）。

“多核苷酸”或“寡核苷酸”：多核苷酸或寡核苷酸是指核苷酸的聚合物。多核苷酸优选包含至少三个核苷酸，更优选包含至少 10 个核苷酸，以及最优选包含至少 100 个核苷酸。所述聚合物可包括天然核苷（即腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷、脱氧胞苷）、核苷同系物（如 2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5 丙炔基-胞苷、C-5 丙炔基-尿苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧腺苷、8-氧鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤以及 2-硫代胞苷）、化学修饰的碱基、生物修饰的碱基（如甲基化碱基）、插入碱基、修饰糖（如 2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖以及己糖）或修饰磷酸基团（如硫代磷

酸和 5'-N-亚磷酰胺键合)。

“蛋白”：根据本发明，“蛋白”包含通过肽键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。如本文所用的术语是指任何大小、结构或功能的蛋白、多肽和肽。通常，蛋白的长度至少为 3 个氨基酸。肽可以涉及单独的肽或肽的集合。尽管本领域公知的非天然氨基酸（即不会自然发生但可掺入多肽链的化合物；参见，例如 <http://www.cco.caltech.edu/~dadgrp/Unnatstruct.gif>，其展示已成功掺入功能离子通道的非天然氨基酸的结构）和/或氨基酸同系物可以选择使用，但是本发明肽优选只含有天然氨基酸。同样，例如通过加入化学基团如碳水化合物基团，磷酸基团，羟基，法尼基，异法尼基，脂肪酸基团，共轭、官能作用或其他修饰的接头等，本发明肽中的一个或多个氨基酸可被修饰。蛋白也可以是单个分子或多分子复合体。蛋白可以是天然存在的蛋白或肽的片段。蛋白可以是天然存在、重组或合成的或其组合。

“报道基因”：如本文所用的术语“报道基因”是指其转录物或任何其他基因产物（如蛋白质）为可检测的基因。基因产物优选也是可定量测定的。基因产物更优选是利用标准分析可检测的。基因产物最优选是利用标准分析可检测的，在此分析中所用的试剂可以试剂盒的形式获得。在某些优选的实施方案中，报道基因编码荧光蛋白或其活性是可检测的及优选是可定量测定的酶。

“小分子”：如本文所用的术语“小分子”是指实验室中合成的或自然界中发现的非肽、非寡聚的有机化合物。如本文所用的小分子可涉及“类似天然产物”的化合物，然而，术语“小分子”不限于“类似天然产物”的化合物。反之，小分子的特征通常在于其含有几个碳-碳键，并且其分子量小于 1500，尽管此特征不旨在限制本发明的目的。自然界中出现的“小分子”的实例包括，但不限于紫杉醇、dynemicin 和雷帕霉素。实验室中合成的“小分子”的实例包括，但不限于下列

文献所述的化合物：Tan 等（“超过两百万个具有下列结构特征的化合物的立体选择性合成：既起源于天然产物又与小型化的基于细胞的测定法相容” J. Am. Chem. Soc. 120:8565, 1998）以及在审的专利申请号为 08/951,930 的“起源于天然产物的组合文库化合物的合成”，其全部内容在此引作参考。

附图描述

图 1 示出 p53 结合位点的转录活化。将 (A) 6 拷贝的 p21、bax 和 14-3-3 基因的 p53 结合位点和 (B) 多拷贝 (3、6 和 12) 的 14-3-3 基因的 p53 位点克隆到 FL (萤火虫荧光素酶) 报道基因的上游。RKO 细胞用这些质粒转化，并用阿霉素处理后对报道活性进行分析。与未用阿霉素处理的细胞的荧光素酶活性比较，结果以倍比诱导表示。

图 2 示出用于 p53 转录活性的报道质粒。将 12 拷贝的 14-3-3 基因的 p53 位点克隆到 FL (萤火虫荧光素酶) 或 SEAP (分泌的碱性磷酸酶) 报道基因的上游。该报道质粒用来监控细胞中 p53 的转录活性。

图 3 示出由 DNA 损伤剂导致 p53 在选择的稳定细胞系中的转录活化。在用各种各样的 DNA 损伤剂 (阿霉素、UV 辐射、丝裂霉素 C 和鬼臼亚乙苷) 处理前后，确定稳定转染 RKO 细胞的选择的克隆中的 (A) FL (萤火虫荧光素酶) 和 (B) SEAP (分泌的碱性磷酸酶) 报道活性。与未处理细胞的报道活性比较，结果以倍比诱导表示。

图 4 示出 p53 转录活性的三倍读出。将等数量的三种不同 RKO 报道细胞系 (含有在 p53 控制下的 FL 和 SEAP 以及在 CMV 启动子控制下的 RL) 中的各种培养在 384-孔板的各个孔中。利用针形阵列 (pin array) 把化学物质转移到孔中，并在加入阿霉素 (0.5-1.0 μ M) 之前与细胞预先温育。~24 小时后，利用 SEAP 测定系统 (Promega) 确定培养基中的 SEAP 活性。利用双重荧光素酶测定系统 (Promega) 确定细胞裂解液中的 FL 和 RL 活性。通过筛选，我们鉴定了特异性影响 p53-依赖的 FL 和 SEAP 表达而不影响 CMV 启动子一驱动的 RL 表达的化合物。

图 5 示出由 DNA 损伤剂导致 p53 蛋白的稳定以及由 E6 癌蛋白

导致 p53 蛋白的去稳定。(A) 在用阿霉素处理前后, 确定选择的 MCF7 克隆中的 p53-FL (萤火虫荧光素酶) 和 RL (renilla 荧光素酶) 报道活性。与未处理细胞的荧光素酶活性比较, 结果以倍比诱导表示 (p53-FL/RL)。(B) 在没有或有 E6 癌蛋白表达下, 确定选择的 MCF7 克隆中的 p53-FL 和 RL 报道活性。与未处理细胞的荧光素酶活性比较, 结果以倍比诱导表示 (p53-FL/RL)。

图 6 示出用于 p53 蛋白稳定性和水平的报道质粒。将 p53 基因与 FL (萤火虫荧光素酶) 报道基因融合。在 CMV 启动子的控制下通过 IRES (内部核糖体进入位点) 使 p53-FL 融合蛋白与 RL (renilla 荧光素酶) 报道蛋白一起表达。该报道质粒用来监控 p53 蛋白在细胞中的稳定性。

图 7 示出 p53 蛋白稳定性的双倍读出测定。384-孔板用来培养均在 CMV 启动子的控制下表达 p53-FL 和 RL 蛋白的 MCF7 细胞。利用针形阵列把化学物质转移到 384-孔板中, 并在加入阿霉素 (1 μ M) 之前与细胞预先温育。~24 小时后, 利用双重荧光素酶测定系统 (Promega) 确定细胞裂解液中的 p53-FL 和 RL 活性。通过筛选, 鉴定出特异性影响 p53-FL 蛋白的稳定性/水平而不影响 RL 蛋白稳定性/水平的化学物质。

图 8 示出由多倍读出鉴定的特异性化学物质。(A) 三倍和双倍读出系统有效用来在分别影响 p53 的转录活性和蛋白活性的不同集合的 16,320 种合成化合物 (Chembridge Corporation) 中筛选特异化学物质。(B) 示出影响 p53-依赖的 FL 和 SEAP 表达而不影响 CMV 启动子驱动的 RL 表达的挑选化合物的例子。

图 9 示出用于信号途径的双倍和三倍读出作为药物发现平台。利用多倍读出, 这些测定可用来有效筛选对 p53 特异的小分子。通过上调或下调 p53 蛋白水平一些化学物质可影响 p53 的转录活性。其活性由三倍读出而非由双倍读出检测的那些其他化学物质可能调节 p53 转录活性而不影响 p53 蛋白稳定性。因此, 这些读出使我们能够选择和归类对 p53 蛋白稳定性和/或转录活性的有效和特异影响的化学物质。这些测定系统展示在许多其他信号途径中系统筛选特异化学配体的基

础。

一些优选实施方案的描述

5 本发明提供利用具有内置对照以使非特异击中（即背景）的数量最小化的基于细胞的测定以鉴定基因和基因产物的抑制剂和激活剂的系统。本发明测定系统消除昂贵和耗时的多筛选的需要。本发明测定确定测试化合物对目的蛋白的转录和水平/稳定性的影响。

三倍读出测定系统

10 本发明提供基于细胞的三倍读出测定系统，所述系统包括对报道基因产物在特异启动子控制下的活性或水平进行测定。过去测定报道基因活性的努力错综复杂，其问题包括非特异性抑制报道基因表达，原因可能是细胞毒性导致细胞功能非特异性抑制。在本发明之前，为了区分“真的”抑制和其他非特异作用，需要进行众多耗时和昂贵的
15 试验。同样，另一与许多可用的报道基因测定有关的问题是在报道基因整合到基因组中后，报道基因的转录可受到周围稳定插入了报道基因的 DNA 序列的影响。

20 本发明三倍读出测定克服这些限制，所以减少或消除多筛选的需要。本发明基于细胞的三倍读出测定包括三株单独的细胞系。其中两株细胞系在同样可调节的转录调节序列控制下表达报道基因。第三细胞系在组成型启动子控制下表达报道基因。与报道基因稳定插入位置相邻的 DNA 序列的影响被头两株细胞系控制。利用含有组成型启动子的第三细胞系可消除基因表达的细胞毒性或抑制的总效应。

25

在一特别优选的实施方案中，研究中的转录因子是 p53。在非应激细胞中，p53 的含量较低，并以潜伏非活化的形式存在。p53 的水平
30 和/或活性增加对各种各样刺激物包括基因毒性应激的反应。活性 p53 蛋白积累在细胞核中，与其 DNA 效应元件结合并且诱导其靶基因的转录。在不适宜的生长条件下，p53 可整合多种信号至特异基因调节，

用于保护细胞免于瘤的转移。与其在肿瘤抑制中的关键作用一致，除了许多癌蛋白以外，与人肿瘤相关的绝大多数 p53 突变降低 p53 序列特异的 DNA 结合和转录活性。因此，调节 p53 转录活性的小分子对于治疗目的是重要的。

5

任何细胞系可用于开发本发明三倍读出测定中所用的细胞系。所述细胞可以是动物、植物、细菌或真菌细胞。在一优选的实施方案中，所述细胞系是哺乳动物细胞系。在一特别优选的实施方案中，所述细胞系是人细胞系。所选的细胞系可满足针对目的蛋白和本领域技术人员已知的其他要求；例如，如果人们对调节 p53-依赖的转录感兴趣，细胞系应该优选（1）表达野生型 p53；（2）显示在用 DNA 损伤剂处理后高水平诱导 p53；和/或（3）具有功能完整的 p53-介导的生长停滞途径。一种在研究 p53 中所用的特别优选的细胞系是一种结肠癌细胞系 RKO 细胞系。本领域中那些普通技术人员会轻易意识到众多的细胞系，它们能用于测定系统中并能根据影响本发明测定中在研的基因或蛋白的多种因素来选择细胞系。

10
15

可调节的转录调节序列由目的蛋白或被目的蛋白次级或间接调节的蛋白来调节。在一些实施方案中，目的蛋白通过与调节序列直接或间接结合直接调节转录。在其他实施方案中，目的蛋白间接起到调节转录的作用。通过一步或多步生物途径，目的蛋白可间接起作用。调节序列的反应性取决于有或没有目的蛋白或其活性水平。

20

仅为了给出一个实例，其中 p53 是目的蛋白，可调节的转录调节序列包含至少一个 p53 结合元件。任何 p53 结合元件可与报道基因可操作连接。在一优选的实施方案中，所述 p53 结合元件对 DNA 损伤的反应显示出高水平地诱导可操作连接的报道基因。p53 结合元件的实例可在下列 3 个靶基因中发现：p21、bax 和 14-3-3。在一特别优选的实施方案中，所述 p53 结合元件是多聚化的。例如，6 或 12 拷贝的元件可导致近乎饱和的 p53 诱导水平。在其他实施方案中，所述 p53

25

30

可充当阻遏物，并且测定报道基因的下调节。

报道基因可编码由任何已知方法（如 Northern 分析、Western 分析、放射免疫测定、酶法测定、荧光变化、吸光度变化等）可检测的任何基因产物（即转录物和蛋白），以及基因产物水平优选是由任何公知方法可定量测定的（请参见分子克隆：实验室手册（Molecular Cloning: A Laboratory Manual），第二版，Sambrook、Fritsch 和 Maniatis 编（Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989）；Nucleic Acid Hybridization（B. D. Hames & S. J. Higgins 编 1984）；论文，Methods in Enzymology（Academic Press, Inc., N.Y.）；Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology（Mayer 和 Walker 编，Academic Press, London, 1987）；Ausubel 等 Current Protocols in Molecular Biology（John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999）；Transcription and Translation（B. D. Hames & S. J. Higgins 编 1984）；Handbook of Experimental Immunology, 第 I-IV 卷（D. M. Weir 和 C. C. Blackwell 编，1986）；各篇文献在此引作参考）。在一优选的实施方案中，所述报道基因是酶（如激酶、磷酸酶、荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、还原酶、合酶、辣根过氧化物酶、合成酶等）。酶本身可以是可检测的或者酶活性可以用来间接测量酶的水平。

在本发明一特别优选的实施方案中，测定系统的至少一种报道基因编码荧光素酶蛋白。荧光素酶可来自任何生物，包括北美萤火虫 *Photinus pyralis*、海洋海肾（*pansy Renilla reniformis*）和海荧光菌（*Vibrio fischeri*）。荧光素酶和其作为转录报道分子的更完全描述可在 De Wet 等（“萤火虫荧光素酶 cDNA 的克隆以及活性荧光素酶在大肠杆菌中的表达” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7870, 1985；在此引作参考）和 Engebrecht 等（“用光测量基因表达” Science 227:1345, 1985；在此引作参考）中找到。

在本发明另一特别优选的实施方案中，测定系统的至少一种报道

基因编码碱性磷酸酶。磷酸酶基因可来自任何物种。一特别优选的碱性磷酸酶为分泌的碱性磷酸酶（SEAP）。

5 在另一特别优选的实施方案中，报道基因编码增强的绿色荧光蛋白（EGFP）。对于使用增强的绿色荧光蛋白作为报道分子的更多细节，请参见 Cinelli 等（*Photochem. Photobiol.* 71(6):771-776, 2000；在此引作参考）； Kiss-Toth 等（*J. Immunol. Methods* 239(1-2):125-135, 2000；在此引作参考）以及 Millet 等（*Toxicol. Sci.* 55(1):69-77, 2000；在此引作参考）。

10

双倍读出测定系统

15 细胞中某些蛋白的水平调节许多细胞过程。所以，蛋白的降解、稳定和积累在细胞中受到高度控制。例如，调节蛋白降解的一种途径是遍在蛋白-蛋白酶体途径。调节特异蛋白间接途径或影响特异蛋白的稳定性的能力将考虑用于治疗诸如癌症、自身免疫疾病和神经病等的新方法。

20 用于鉴定实现蛋白稳定性的化合物的传统测定已被大量的非特异效果所阻碍。例如，蛋白稳定性增加可以反映通过化合物的细胞毒性效应对细胞功能的非特异性抑制，而非对蛋白稳定性的特异性作用。

25 仅为了给出蛋白的一个实例，其水平在细胞过程中是关键，p53 是肿瘤阻遏物蛋白，已发现其水平在肿瘤发生中是重要的。部分通过抑制由遍在蛋白-蛋白酶体途径的降解，影响其构型的肿瘤突变通常增加它的半衰期。在非应激细胞中，p53 的含量较低，并以潜伏非活化的形式存在。如果细胞是应激的（如基因毒性应激），p53 的水平

30 和/或活性增加。然后活性 p53 蛋白积累在细胞核中，与其 DNA 效应元件结合并且诱导其靶基因的表达。在不适宜的生长条件下，p53 可整合多种信号用于保护细胞免于瘤的转移。与 p53 在肿瘤抑制中的关键作用一致，许多癌蛋白靶击 p53 及其蛋白稳定性，包括人乳头瘤病

毒 E6 癌蛋白。因此，可调节 p53 蛋白稳定性的化合物对于治疗目的是重要的。

5 在本发明双倍读出测定系统中，例如使用标准重组 DNA 技术（Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999)；Sambrook、Fritsch 和 Maniatis 编, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)；各篇文献在此引作参考)，将目的蛋白与第一报道蛋白融合（如 p53）。融合蛋白和对照报道蛋白在细胞中表达。将所述
10 一种或多种细胞与各种测试化合物接触，并测量融合蛋白和对照报道蛋白的水平。融合蛋白的水平当与对照报道蛋白的水平比较时，将考虑到化合物的鉴定，由于所述化合物对融合蛋白与对照的比例的作用，其特异性影响目的蛋白的稳定性。在一优选的实施方案中，当与对照报道蛋白比较时，融合蛋白的水平变化至少 50% 才视为击中，更
15 优选有至少 150% 的变化，以及最优选有至少 500% 的变化。

报道蛋白可以是任何如上三倍读出测定系统中所述的蛋白或肽。蛋白或肽的测定优选可采用标准技术（如方式免疫测定、放射标记、免疫测定、酶活性测定、吸光度、荧光、发光以及 Western 印迹）。
20 更优选地，各报道蛋白的水平即使在低水平利用标准技术也是易于定量测定的。在一优选的实施方案中，报道蛋白是相关的，因此它们的水平是易于比较的。

在特别优选的实施方案中，报道蛋白是如上三倍读出测定系统中
25 所述的荧光素酶。如果两种荧光素酶用作报道蛋白，则荧光素酶优选是相互可区分的。在特别优选的实施方案中，一种报道蛋白是 *Photinus pyralis* 的萤火虫荧光素酶（FL），而另一种为海洋海肾（*Renilla reniformis*）的海肾（*Renilla*）荧光素酶（RL）。蛋白水平的测定可使用 Dual-Luciferase® 测定系统（Promega）（Dual-Luciferase® Reporter
30 1000 Assay System, Technical Manual No.046, Promega Corp., Madison,

WI, 1999; 在此引作参考)。

5 编码融合蛋白和对照报道蛋白的基因优选以基本相同的水平转录。在特别优选的实施方案中，两个蛋白基因被一起转录成一个转录物。内部核糖体进入位点 (IRES) 可插入两个基因之间以确保两种编码蛋白翻译。在另一特别优选的实施方案中，所述两个基因是在相同启动子序列和调节元件的控制之下。

10 正如本发明三倍读出测定系统，其中蛋白被表达的任何细胞系可用于本发明双倍读出系统中。优选地，在 p53 的实例中，细胞系含有活性 p53 翻转途径，p53 蛋白的稳态水平是相对低的，但在应激刺激 (如用化疗 DNA 损伤剂处理) 之后，p53 蛋白的水平显著提高。在一特别优选的实施方案中，细胞系是 MCF7。

15 在另一特别优选的实施方案中，细胞系用融合蛋白基因和对照报道基因转染，并将所得细胞用阿霉素处理之后对 p53 蛋白的稳定性进行测试。克隆优选显示融合蛋白的水平增加 5 倍。克隆更优选显示增加 10 倍；以及克隆最优选显示增加 20 倍。

20 细胞系可用其他影响 p53 降解的基因转染。在特别优选的实施方案中，细胞系用人乳头瘤病毒癌蛋白 E6 转染。许多其他癌蛋白可用于本发明的该实施方案中。正如本领域中的一名技术人员会懂得，任何可影响在研蛋白的稳定性/水平的基因能被转染到细胞系中。

25 测试化合物

30 本发明双倍和三倍读出测定中待筛选的化合物可由本领域任何公知的方法来提供。测试化合物可以是多核苷酸、肽、蛋白、小分子、有机分子、无机分子、肽类似物 (peptidomimetics)、抗体或其他化学化合物。化合物的制备可通过从来源 (如植物、真菌、动物、细菌、土样等) 中纯化或分离，或通过合成。合成化合物的产生可采用更多

常规的一个接一个的合成方法或采用组合化学方法通过快速平行和/或自动合成来进行。化合物可以粗或纯的形式来提供。化合物可以是天然产物或其衍生物。在另一优选的实施方案中，化合物的提供来自大的制药和化学公司的化合物历史档案。化合物优选提供为化学化合物的文库。

5

通过上述方法筛选化合物以鉴定目的蛋白/基因的激活剂和抑制剂。仅为了给出一个实例，所述方法可用来鉴定 p53 的激活剂和抑制剂。p53 的化学抑制剂在防止或最小化源自 p53-依赖的编程性细胞死亡的毒副作用（如那些经受化疗和放疗的个体中所见的副作用）方面是有用的。p53 的化合物激活剂在开发新的抗癌剂方面将是有益的。在一特别优选的实施方案中，所述化合物可激活或抑制目的蛋白/基因 2 倍，更优选 5 倍以及最优选 10 倍。

10

15 试剂盒

本发明还提供用于进行双倍和三倍读出测定的试剂盒。这些试剂盒优选包括所有对分析测试化合物或测试化合物的文库所必须的试剂。所述试剂盒可包括细胞系、如上所述稳定转染的细胞系、培养基、生长因子、DNA 损伤剂（如博来霉素、阿霉素）、人乳头瘤病毒 E6 癌蛋白、DNA 构建体、酶底物（如在测荧光素酶的底物）等。

20

本发明的这些和其他方面在考虑下列实施例之后会进一步懂得，它们旨在阐述本发明某些特别的实施方案，而非限制如权利要求所限定的范围。

25

实施例

实施例 1—p53 转录活性的三倍读出

在用报道质粒转染 RKO 细胞之后，通过潮霉素（400 μ g/ml）选择，建立了 3 株不同的报道细胞系（第一株含有 p53 控制下的 FL，第二株含有 p53 控制下的 SEAP 以及第三株含有 CMV 启动子控制下的

30

RL) (参见图 2)。在此筛选中, 将源自 3 株细胞系的细胞混合, 并与如下所述的化学物质温育后在单个孔中测定 3 种不同报道蛋白的活性。

5 使细胞系维持在补充有抗生素和 10% 热灭活牛血清 (FBS) 的 McCoy 培养基中以排除血清中的 SEAP 活性。在报道细胞与胰蛋白酶单聚之后, 将 3 株细胞系中各株的等数量细胞混合在瓶中, 并利用全自动分液器 (Multidrop 384, Labsystems) 将 30 μ l 所得的细胞混合物分配到 384-孔板各个孔中 (5×10^3 细胞/孔)。12-16 小时后, 利用针形阵列把测试化学化合物导入孔中, 导致测试化合物的终浓度为 ~
10 5 μ g/ml, 并与细胞预温育 2 小时, 接着加入阿霉素 (0.5-1.0 μ M)。24 小时后, 利用相应的测定系统根据厂商说明对报道蛋白的活性进行测定。

15 对于 SEAP 测定, 将 5 μ l 的各培养基转移至另一 384-孔板中, 并在室温下与 55 μ l 的 SEAP 测定混合物 (EscAPe SEAP 化学发光测定系统, Clontech Laboratories) 温育 20 分钟。利用发光读数仪 (Wallac VICTOR², PerkinElmer Life Sciences) 测定 SEAP 活性。

20 双重荧光素酶报道测定系统 (Promega) 用于 FL 和 RL 测定。在最初的 384-孔培养板中, 移出剩余的培养基, 并用 40 μ l 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤细胞一次。将洗涤细胞用 Passive 裂解缓冲液 (PLB, 5 μ l/孔) 室温下轻轻振荡温育 20 分钟。接着, 把荧光素酶测定试剂 II (LAR II, 25 μ l/孔) 直接加入到细胞裂解液中, 并利用发光读数仪 (Wallac VICTOR², PerkinElmer Life Sciences) 测定 FL 活性。在测量 FL 活性后, 加入 Stop & Glo 试剂 (25 μ l/孔), 并测定 RL 活性。在此筛选中, 特异性影响 p53-依赖的 FL 和 SEAP 表达而不影响 CMV 启动子一驱动的 RL 表达的化合物得到了鉴定。
25

30 实施例 2—p53 蛋白稳定性的双倍读出测定

创建在单个 CMV 启动子控制下表达 p53/FL 融合基因和 EL 基因、带有内部核糖体进入位点 (IRES) 的质粒 (参见图 6)。通过利用内部核糖体进入位点共表达 p53/FL 和 RL 蛋白使得在各种各样的测定条件下规格化 p53/FL 与 RL 的水平成为可能。利用含有遗传霉素 (G418) (700 μ g/ml) 的培养基通过选择转染有 IRES 表达质粒的 MCF7 细胞建立报道细胞系。在此筛选中, 对两种不同报道蛋白 p53/FL 和 RL 的活性进行测量以确定测试化学化合物的效果。

将源自报道细胞系的细胞维持在补充有抗生素和 10% FBS 的 DMEM 培养基中。在报道细胞与胰蛋白酶单聚之后, 利用全自动分液器 (Multidrop 384, Labsystems) 将体积为 30 μ l 的等数量细胞分配到 384-孔板的各个孔中 (5 \times 10³ 细胞/孔)。12-16 小时后, 利用针形阵列把测试化学化合物导入孔中, 测试化合物的终浓度为 \sim 5 μ g/ml, 并与细胞预温育 2 小时, 接着加入阿霉素 (1.0 μ M)。

24 小时后, 利用双重荧光素酶报道测定系统 (Promega) 在相同的孔中确定 p53/FL 和 RL 的活性。在 384-孔培养板中, 移出剩余的培养基, 并用 40 μ l 的 PBS 洗涤细胞一次。然后将洗涤过的细胞与 Passive 裂解缓冲液 (PLB, 5 μ l/孔) 在室温下轻轻振荡温育 20 分钟。把荧光素酶测定试剂 II (LAR II, 25 μ l/孔) 直接加入到细胞裂解液中, 利用发光读数仪 (Wallac VICTOR², PerkinElmer Life Sciences) 测定 FL 活性。接着加入 Stop & Glo 试剂 (25 μ l/孔), 测定 RL 活性。在此筛选中, 特异性影响 p53-FL 稳定性而不影响 RL 稳定性的测试化学化合物得到了鉴定。这些化学化合物所观察到的作用被内源性 p53 蛋白和其他内源性对照蛋白如肌动蛋白的免疫印迹分析证实。

其他实施方案

本领域的那些普通技术人员会容易懂得, 上述仅代表本发明某些优选的实施方案。在不背离如下列权利要求所阐述的本发明实质或范围的情况下, 可对上述程序和组成进行各种变化和修正。

图1

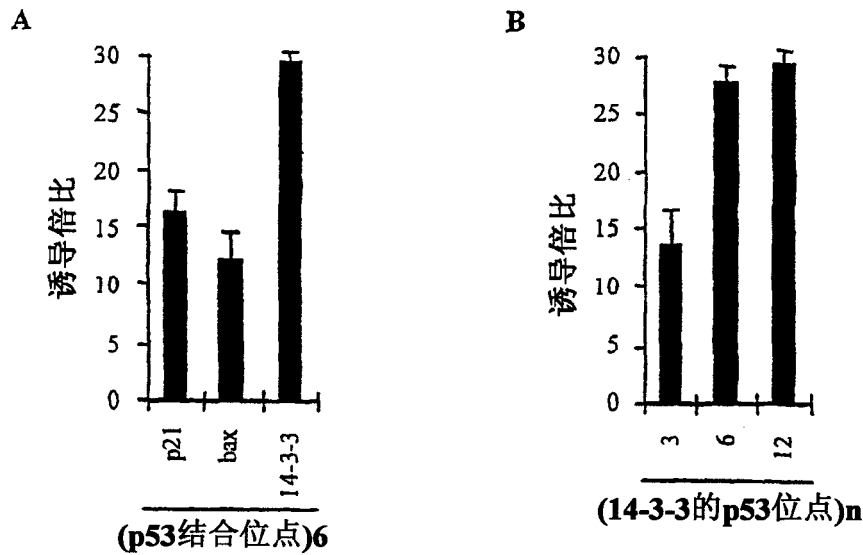


图2

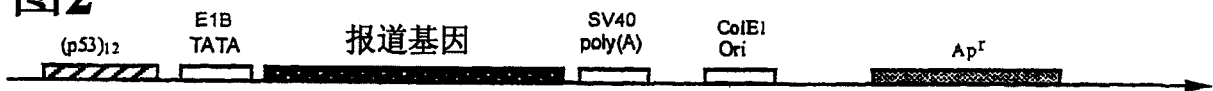


图3

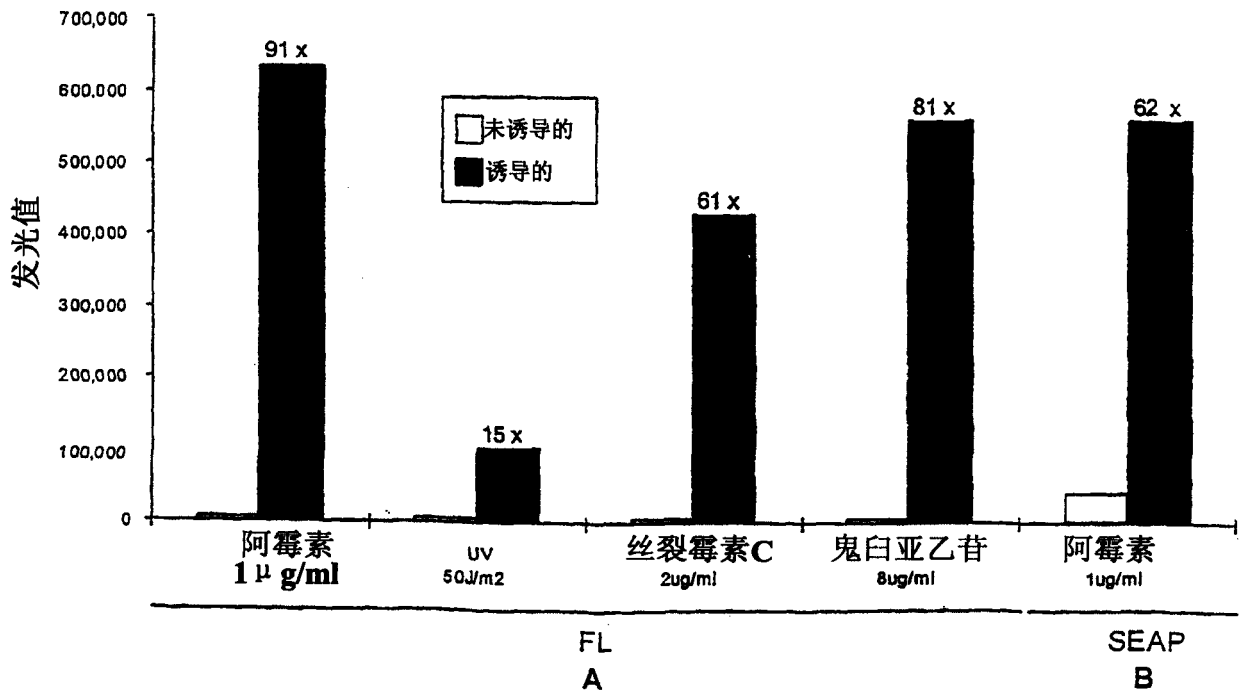


图7

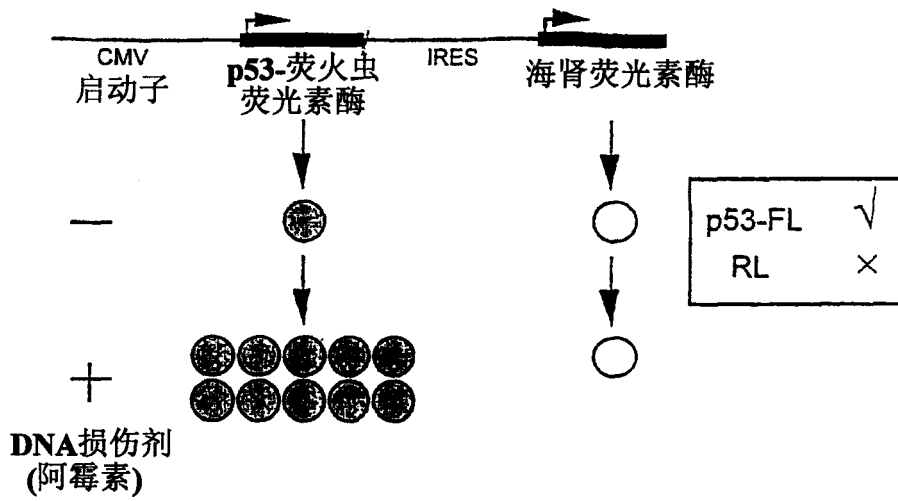


图8A

一个测定孔中多倍(三倍和两倍)读出

促进鉴定特异性影响p53功能而不影响对照基因功能的化学物质

通过消除多倍筛选提高筛选效率

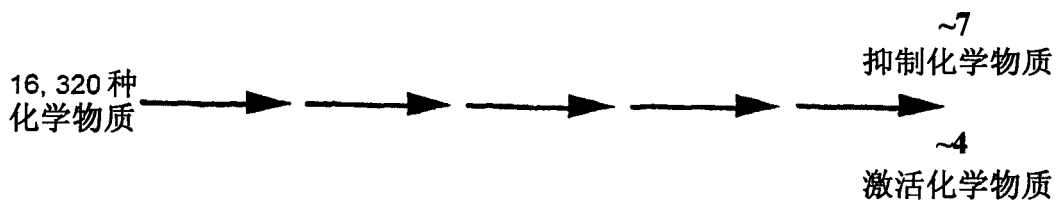


图8B

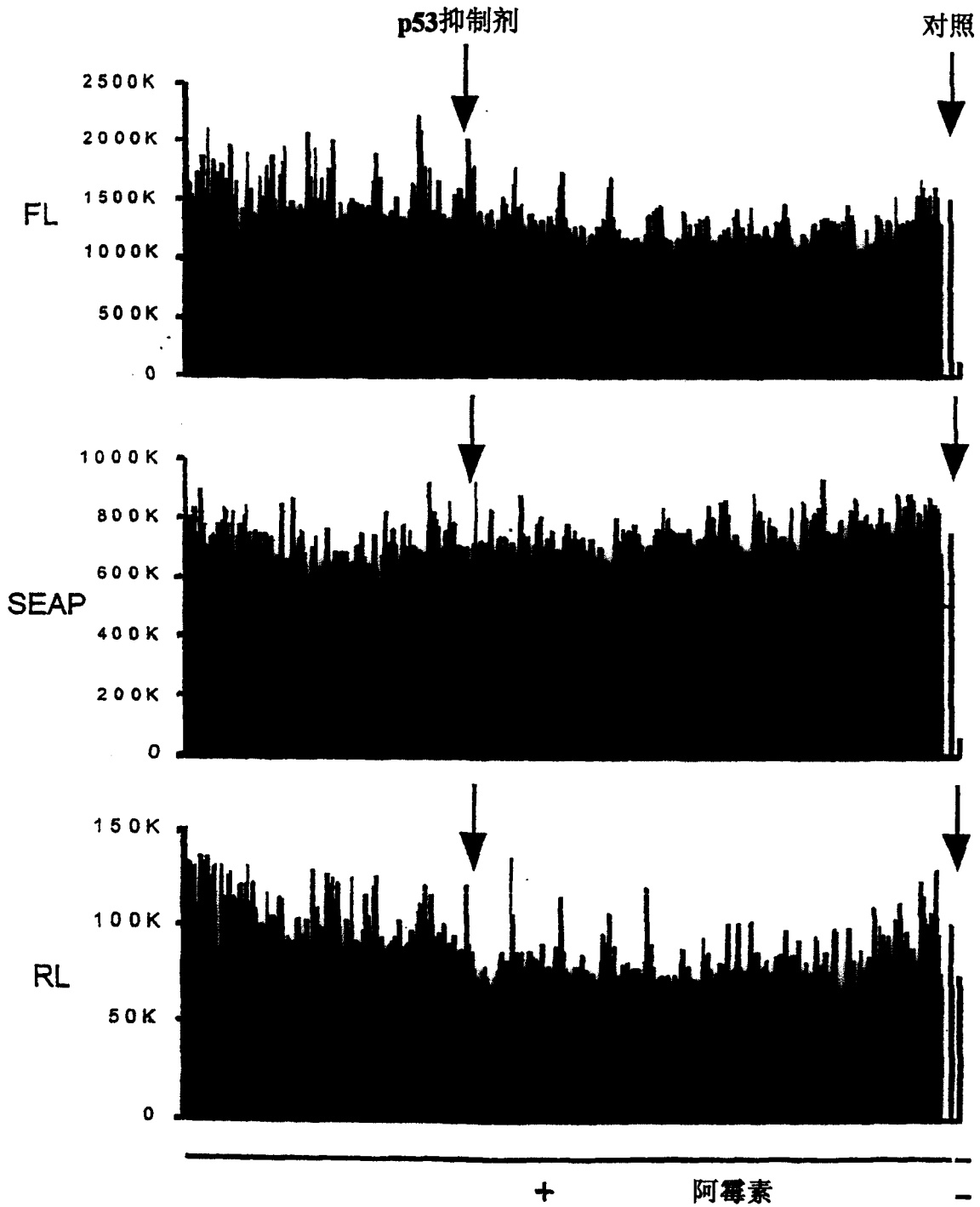
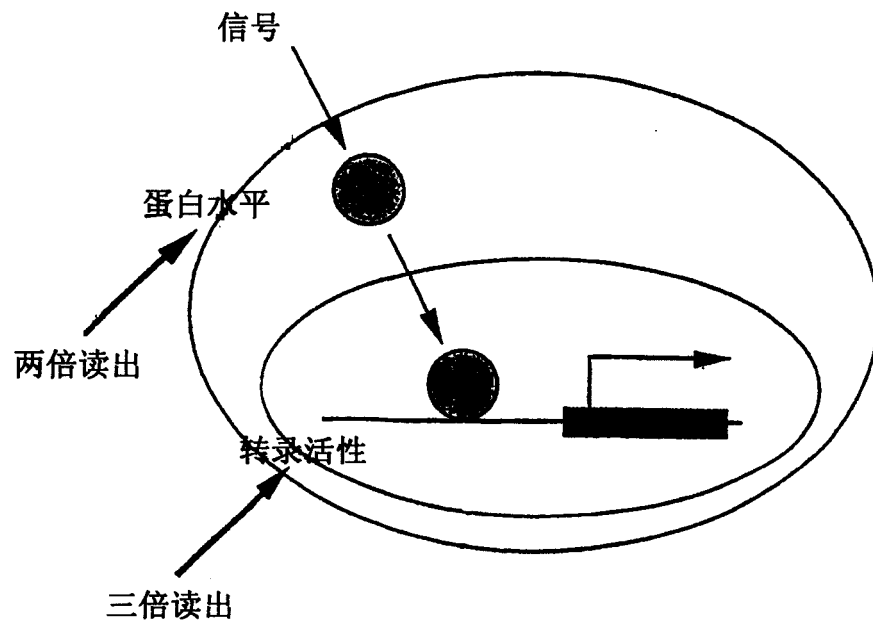


图9

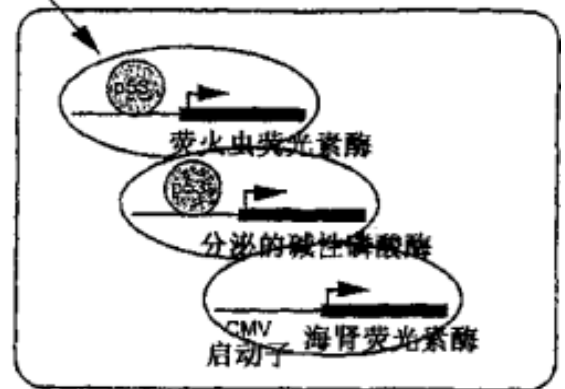


专利名称(译)	双倍和三倍读出测定系统		
公开(公告)号	CN1639355A	公开(公告)日	2005-07-13
申请号	CN01821527.0	申请日	2001-10-25
[标]申请(专利权)人(译)	哈佛学院校长同事会		
申请(专利权)人(译)	哈佛学院校长同事会		
当前申请(专利权)人(译)	哈佛学院校长同事会		
[标]发明人	金泰国		
发明人	金泰国		
IPC分类号	C07H21/04 C12N15/00 C12N15/85 C12Q1/00 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6897 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	G01N33/5011 C12Q1/6897		
代理人(译)	丁业平 王维玉		
优先权	60/243689 2000-10-27 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供测定方法用于鉴定影响目的蛋白转录活性或影响目的蛋白稳定性的化合物。三倍读出测定系统可用于鉴定影响目的蛋白转录活性的化合物，使用三株细胞系以对非特异效果如插入基因两侧的序列和细胞毒性进行控制。双倍读出测定系统评估蛋白稳定性并利用报道蛋白和目的蛋白的融合蛋白。这些测定系统在鉴定影响转录因子和肿瘤抑制物的化合物方面是特别有用的。在特别的实施方案中，肿瘤抑制物p53是在研究的靶蛋白。

DNA损伤剂
(阿霉素)



一个测定孔中3种报道细胞系