[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12Q 1/68
A61P 3/06

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02803509.7

[43] 公开日 2005 年 1 月 19 日

[11] 公开号 CN 1568374A

[22] 申请日 2002.2.4 [21] 申请号 02803509.7
[30] 优先权
[32] 2001. 2. 5 [33] FR [31] 01/01486
[86] 国际申请 PCT/FR2002/000410 2002.2.4
[87] 国际公布 WO2002/063038 法 2002.8.15
[85] 进入国家阶段日期 2003.7.8
[71] 申请人 基恩菲特公司
地址 法国洛斯
[72] 发明人 巴特·施泰尔斯
[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 6 页 说明书 24 页 序列表 2 页
附图 8 页

[54] 发明名称 调节胆固醇反向运输的化合物的鉴定方法

[57] 摘要

本发明涉及能够调节哺乳动物中的胆固醇反向运输的方法和化合物以及选择、鉴定和/或表征能够调节胆固醇反向运输的化合物的筛选方法。 本发明还涉及实施所述方法所用的细胞、载体和基因构建体，以及涉及治疗动脉粥样硬化的药物组合物。 本发明方法是基于源自 apo A－I 基因启动子的 FXR 效应元件的用途。

ISSN1008-4274

1. 一种选择、鉴定或表征能够调节胆固醇反向运输的化合物的方法，其包括：

- 将测试化合物与核酸构建体接触，所述核酸构建体含有至少一个拷贝的人载脂蛋白 A-I 基因启动子的 FXR 效应元件或其功能性变体，以及

- 确定所述测试化合物与效应元件的可能结合。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中接触在 FXR 受体或 FXR 受体的功能性等同物存在下进行，以及其中确定测试化合物的存在对 FXR 与效应元件结合的影响。

3. 一种选择、鉴定或表征能够调节胆固醇反向运输的化合物的方法，其包括：

- 将测试化合物与含有报道基因的表达盒的宿主细胞接触，所述表达盒含有置于启动子控制之下的报道基因，所述启动子含有至少一个拷贝的人载脂蛋白 A-I 基因启动子的 FXR 效应元件或其功能性变体，以及

- 测定报道基因的表达。

4. 据权利要求 3 所述的方法，其中宿主细胞含有 FXR 受体或功能性等同物。

5. 根据权利要求 3 或 4 中任一项所述的方法，其中宿主细胞含有 FXR 的配体。

6. 根据权利要求 3-5 中任一项所述的方法，其包含在测试化合物存在或缺乏下确定报道基因表达的水平，报道基因表达水平的增加或减少显示测试化合物调节胆固醇反向运输的能力。

7. 根据权利要求 3-6 中任一项所述的方法，其中宿主细胞为哺乳动物细胞。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中哺乳动物细胞为人细胞。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法，其中 FXR 效应元件包含下列能够结合 FXR 受体的序列（SEQ ID NO:1）：5'-CAGAGCTGATCCTTGAACTCTTAAGTTCC-3'或其功能性变体。

10. 根据权利要求 1-9 中任一项所述的方法，其中 FXR 效应元件包含下列能够结合 FXR 受体的序列（SEQ ID NO:2）：5'-CCCCACTGAACCCTTGACCCCTGCCCTGCAGCC-3'或其功能性变体。

11. 根据权利要求 3-10 中任一项所述的方法，其中报道基因是编码产物的基因，所述产物在生物提取物中的活性或存在可被测定，所述报道基因尤其是编码荧光素酶、分泌的碱性磷酸酶、半乳糖苷酶或内酰胺酶的基因中的一种。

12. 根据权利要求 3-11 中任一项所述的方法，其中启动子选自 HSV-TK 启动子、CMV 立即启动子、PGK 启动子以及编码人载脂蛋白 A-I 的基因启动子、SV40 启动子。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的方法，其中一种或几种化合物作为混合物或单独被测试。

14. 根据权利要求 1-13 中任一项所述的方法，其中测试化合物是组合文库。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中测试化合物是表达一种或几种 DNA－结合的多肽的克隆或核酸克隆的文库。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中接触在多孔板中进行。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其还包括将由所述方法确定的可能效果与在相同条件下，但采用含有至少一个突变拷贝的人载脂蛋白 A-I 基因启动子的 FXR 效应元件的核酸构建体，由此实施方法所确定的可能效果进行比较，所述突变拷贝基本上不能结合 FXR 受体。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其用于选择、鉴定或表征能够增加胆固醇反向运输的化合物。

19. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法，其用于选择、鉴定或表征能够调节 HDL 活性的化合物。

20. 根据权利要求 1-17 中任一项所述的方法，其用于选择、鉴定或表征能够调节载脂蛋白 A-I 的化合物。

21. 能够调节 FXR 与人载脂蛋白 A-I 基因启动子的效应元件或其功能性变体结合的化合物在制备调节胆固醇反向运输的组合物中的用途。

22. 降低 FXR 与 SEQ ID NO:1 序列或其功能性变体结合的化合物在制备增加胆固醇反向运输的组合物中的用途。

23. 降低 FXR 对人载脂蛋白 A-I 基因转录的影响的化合物在制备增加胆固醇反向运输的组合物中的用途。

24. 调节 FXR 和/或其辅因子与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:2 序列或其功能性变体结合的化合物在制备调节 HDL 活性的组合物中的用途。

25. 降低 FXR 与 SEQ ID NO:1 序列或其功能性变体结合的化合物在制备增加 HDL 活性的组合物中的用途。

26. 增加 FXR 与 SEQ ID NO:2 序列或其功能性变体结合的化合物在制备增加 HDL 活性的组合物中的用途。

27. 根据权利要求 21-26 中任一项所述的用途，其中所述化合物是生物化合物或化学化合物。

28. 根据权利要求 27 所述的用途，其中化合物是核因子或辅因子。

29. 根据权利要求 21-26 中任一项所述的用途，其中化合物是表达一种或多种 DNA－结合的多肽的克隆。

30. 根据权利要求 21-26 中任一项所述的用途，其中化合物是根据权利要求 1-20 中任一项所述的选择、鉴定或表征的化合物。

31. 由下列序列（SEQ ID NO:1）：5'-CAGAGCTGATCCTTGAACTCTTAAGTTCC-3'或其变体表征的核酸片段，其中它能够结合 FXR 受体。

32. 由下列序列（SEQ ID NO:2）：5'-CCCCACTGAACCCTTGACCCCTGCCCTGCAGCC-3'或其变体表征的核酸片段，其中它能够结合 FXR 受体。

33. 一种核酸构建体，其含有至少一个拷贝的根据权利要求 31 所述的核酸片段和/或根据权利要求 32 所述的核酸片段。

34. 一种核酸构建体，其含有至少一个突变拷贝的根据权利要求 31 所述的核酸片段和/或根据权利要求 32 所述的核酸片段，所述突变拷贝基本上不能够结合 FXR 受体。

35. 一种表达盒，其含有至少一个拷贝的根据权利要求 31 和/或权利要求 32 所述的核酸片段，所述一个或多个拷贝含在与置于所述启动子控制之下的报道基因相关的启动子中。

36. 一种表达盒，其含有至少一个突变拷贝的根据权利要求 31 和/或权利要求 32 所述的核酸片段，所述拷贝含在与置于所述启动子控制之下的报道基因相关的启动子中。

37. 根据权利要求 35 或 36 中任一项所述的表达盒，其中所述启动子选自 HSV-TK 启动子、CMV 立即启动子、PGK 启动子、SV40 启动子以及人载脂蛋白 A-I 基因启动子。

38. 根据权利要求 35-37 中任一项所述的表达盒，其中报道基因是其在生物提取物中的活性或存在可被测定的基因。

39. 根据权利要求 38 所述的表达盒，其中报道基因是编码荧光素酶、分泌的碱性磷酸酶、半乳糖苷酶或内酰胺酶的基因。

40. 一种宿主细胞，其含有根据权利要求 33-39 中任一项所述的构建体或表达盒。

41. 根据权利要求 33-39 中任一项所述的构建体或表达盒或根据

权利要求 40 所述的细胞在体外筛选能够调节 HDL 活性的化合物中的应用。

42. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 1-20 中任一项所述方法之一所选择、鉴定或表征的化合物。

调节胆固醇反向运输的化合物的鉴定方法

本发明涉及能在哺乳动物中调节胆固醇反向运输的方法和化合物以及用于选择、鉴定和/或表征能调节胆固醇反向运输的化合物的筛选方法。本发明还涉及用于实施所述方法的细胞、载体和基因构建体，以及治疗动脉粥样硬化症的药物组合物。

动脉粥样硬化症是导致发病、死亡、心肌梗塞、脑局部缺血症、心血管病以及外周动脉疾病的主要原因。参与血管炎症的高胆固醇血症和巨噬细胞中胆固醇过载是对动脉粥样硬化症的主要作用因素。当前，高胆固醇血症的治疗存在于饮食和药物的组合，例如抑制素或胆汁酸多价螯合剂。然而，需要开发新的治疗路线来克服现有治疗的缺陷。

胆固醇反向运输由 HDL（高密度脂蛋白）介导，去除已在外周组织中积累的胆固醇，并确保其在肝脏中的代谢清除。以此方式，它帮助保护身体免于动脉粥样硬化。载脂蛋白 A-I（apo A-I）是 HDL 的基本成分，并支撑其功效。在此方面，apo A-I 表达增加具有抗动脉粥样硬化的保护作用。Apo A-I 表达受到激素或治疗剂如 fibrates 的调节。诸如 HNF4、PPARα 或 RORα 的核受体已经显示在控制 apo A-I 基因转录中发挥关键作用。特别地，PPARα 是造成人 apo A-I 表达由 fibrates 诱导增加的原因，所述 fibrates 发现在治疗异常脂血症（dyslipidemias）中的临床应用。所以，涉及控制 apo A-I 表达的新胞内信号途径的鉴定使得详细说明新治疗路线成为可能，所述新治疗路线能够增加胆固醇反向运输的功效并由此防止动脉粥样硬化。

核激素受体形成大的转录因子家族，其活性可由天然和/或合成配体调节。通常通过与特异性顺式作用效应元件结合以及通过招募对

激活转录机理所必需的辅助蛋白，这类转录因素控制它们靶基因的表达。

FXR 受体也称为 RIP14 或 NR1H4，最初鉴定成 farnesoid 受体。其作用是与同为该蛋白家族成员的 RXR 受体形成杂二聚体。最新研究表明 FXR 的真正配体是数个诸如鹅脱氧胆酸（CDCA）或脱氧胆酸（DCA）之类的胆汁酸以及较低程度的石胆酸（LCA），并且显示这些化合物激活 FXR 受体。

FXR 优选与效应元件结合，所述效应元件包含被一个核苷酸分开的两个 AGGTCA 基元的反向重复序列。其还与被 2、4 或 5 个核苷酸分开的重复的 AGGTCA 基元结合（DR-2、DR-4、DR-5）（Laffitte B A 等，J.Biol.Chem.,2000,275:10638-10647）。若干个 FXR 的靶基因已被鉴定，如 Cyp7α-羟化酶（参见 WO 00/40965）、I-BABP、PLTP 和 CPT-II。

本发明是基于 FXR 在人 apo A-I 基因的表达中所观测到的作用，以及基于在 FXR 和该基因启动子的两个不同片段之间发生的直接相互作用。本发明也基于原始的观察结果，即 FXR 在胆汁酸存在下过表达导致人 apo A-I 启动子活性的阻遏。本发明进一步基于人 apo A-I 基因启动子中的位点 C 和 A 鉴定为功能性 FXR 效应元件以及它们各自序列的表征。本发明还基于下列原始的观察结果：FXR 与位点 C 结合后抑制 apo A-I 表达，FXR 作为单体以意想不到和不可预见的方式与该位点结合，以及 FXR 通过位点 C 对人 apo A-I 基因启动子的活性的抑制控制着其通过位点 A 的激活作用。

由此，本发明首次证明 FXR 核受体调节 apo A-I 的产生。本发明公开新的靶和新的方法，用来搜寻能够调节该蛋白的表达或 HDL 的活性或胆固醇反向运输的化合物。

本发明还描述提高胆固醇反向运输的方法，所述方法基于利用调节 FXR 与 apo A-I 启动子结合的化合物和/或其对人 apo A-I 基因转录的影响。

本发明进一步提供鉴定治疗性物质的筛选方法，所述治疗性物质能够调节人 apo A-I 基因的表达和/或 HDL 的活性和/或胆固醇反向运输。

根据特别的实施方案，本发明的筛选方法更具体地包括下列步骤：

- 将一种或多种化合物与含有至少一个人 apo A-I 基因启动子的 FXR 效应元件或其功能性变体的核酸构建体在适于让所述化合物与所述效应元件结合的条件下接触，
- 确定所述化合物与一种或多种效应元件可能的结合，以及
- 任选将上述测定与在相同条件下但使用含有至少一种突变拷贝的人 apo A-I 基因启动子的 FXR 效应元件的核酸构建体进行的测定比较。

根据本发明方法的特别实施方案，适于让所述化合物与所述一种或多种 FXR 效应元件结合的条件包括存在 FXR 受体（例如以单体形式）或功能性等同物，以及确定测试化合物对与效应元件结合的 FXR 的影响。

根据另一特定的实施方案（转录活性的测试），测定了一种或多种测试化合物对启动子的转录活性的影响，所述启动子含有至少一个本发明的 FXR 效应元件。通过测定置于这种启动子控制下的报道基因的表达，这种测试优选在细胞系统，特别在包含（例如，自然或通过重组表达）FXR 受体或其功能性等同物的细胞中进行。

本发明优选的实施方案在于利用将一种或多种本发明的 FXR 效

应元件与报道基因结合的表达盒。以有利的方式，将所述报道基因置于启动子的控制下，所述启动子含有至少一个拷贝的所述一种或多种效应元件，例如 apo A-I 启动子或其变体或片段。本领域那些技术人员已知的生物提取物中的活性或存在容易测定的任何基因可用作实施筛选方法的报道基因。

可通过本发明方法鉴定的化合物可以是能够修饰 FXR 活性的不同性质、结构和起源的化合物，特别是生物化合物、核因子、辅助因子等，化学产品、合成化合物等。它们还可以是文库，尤其是化学化合物的文库或蛋白、肽或核酸的文库，例如编码 DNA－结合的蛋白或肽的克隆。

本发明的方法可用来选择、鉴定或表征化合物，所述化合物能够修饰 FXR 与其效应元件的一种和/或其他种结合和/或调节（即增加或降低）人 apo A-I 基因的表达和/或调节 HDL 的活性和/或调节胆固醇反向运输。

本发明进一步说明由此选择的化合物在制备调节胆固醇反向运输或 HDL 活性的组合物中的应用，以及对应的治疗方法。

为了更易理解本申请，给出下列定义，其阐明或添加到其平常的意思中。

“载脂蛋白 A-I”或 apo A-I：载脂蛋白 A-I 是 243 个氨基酸的蛋白质，其氨基端具有球状结构域，其羧基端能够与脂质结合（Segrest 等，Curr. Opin. Lipidol., 2000, 11:105-115）。此蛋白是高密度脂蛋白的主要组分，并在胆固醇反向运输中发挥重要作用（Fruchart 和 Duriez，Biochimie, 1998, 80:167-172，Leroy 等，Curr. Opin. Lipidol., 1995, 6:281-285）。apo A-I 基因、cDNA 和 mRNA 已被克隆和测序（Breslow 等，PNAS, 1982, 79:6861-6865，Shoulders 和 Baralle，Nuc. Ac. Res., 1982,

10:4873-4882，Karathanasis 等，Nature, 1983, 304:371-373），并可在 Genebank*数据库中获得（例如以登记号：NM_000039、M20656（启动子）和 J00098 从下列网址：http://www.ncbi.nlm.nih.gov）进入）。

“高密度脂蛋白（HDL）”：HDL 颗粒为高密度脂蛋白（1.063-1.21g/ml），已知其起到保护作用防止动脉粥样硬化，主要因为它们能够从外周细胞中抽提胆固醇以及促进其运输到肝脏而被消除（Fruchart 和 Duriez，Biochimie, 1998, 80:167-172）。Apo A-I 是 HDL 的主要蛋白成分，占到多达 70%的蛋白。HDL 还包括少量的 apo A-II、apo C-I、apo C-II、apo C-III 和 apo E。

“FXR”：人和小鼠的 FXR 受体已被分离、表征和测序（Forman 等，Cell, 1995, 81:687-693，Seol 等，Mol. Endo., 1995, 9:72-85）。mRNA 序列也可从 Genbank®数据库中获得（登记号 NM_005123、NM_021745 和 U18374）。FXR DNA 结合结构域主要包含在人蛋白的第 124 位的半胱氨酸（Cys）－第 189 位的甲硫氨酸（Met）之间（对应于 NM_005123 中的第 726-953）或鼠蛋白的第 423－621 位的残基之间（U18374）。

涉及 FXR 受体的表述“功能性等同物”表示任何源自 FXR 受体结构并保留与效应元件结合的能力的多肽，所述效应元件尤其是具有 SEQ ID NO:1 或 2 序列或其功能性变体的任何效应元件。功能性等同物可以是天然变体（多态性、剪接等）、片段、突变体、缺失等。它们优选是含有至少一个区域的氨基酸的多肽，所述区域的氨基酸与 FXR 受体的那些氨基酸共享至少 60%的同一性，优选至少 75%以及甚至更优选至少 90-95%。该表述还包括 FXR 受体的片段，尤其是含有 FXR 受体的 DNA 结合位点的片段。

术语“反向运输”用来描述生理机制，有时是缺陷的，由此通过高密度脂蛋白（HDL）收集外周组织中的过量的胆固醇，然后运输至肝脏中消除。

A．FXR 效应元件的鉴定

本发明显示 FXR 通过胆汁酸参与调节 apo A-I 表达及其作用机制，在本申请的情况下为参与调节胆固醇反向运输。在胆汁酸存在下，过表达 FXR 导致后者活性降低。本发明进一步公开两个位于人 apo A-I 基因的启动子中的 FXR 效应元件的确切序列。

本发明还涉及特定的构建体，尤其是含有 FXR 效应元件的核酸，以及表达盒、载体和含有它们的重组细胞。

因此，本发明公开两个 FXR 效应元件的序列（SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2），这两个 FXR 效应元件最初鉴定在人 apo A-I 基因启动子中，是造成 FXR 与 apo A-I 启动子之间相互作用以及调节 apo A-I 表达的原因。

例如，3 个拷贝的位点 C（SEQ ID NO:1）导致 FXR 的抑制以及报道基因表达胆汁酸（参见实施例 5）。相反，3 个拷贝的位点 A（SEQ ID NO:2）导致刺激所述表达（参见实施例 5）。

本发明的特殊目的是含有 SEQ ID NO:1 或 2 的序列或其功能性变体（“FXR 效应元件”）的核酸。

本发明的另一目的是含有如上所述的 FXR 效应元件的核酸构建体。具体而言，这种核酸构建体可以是含有至少一个拷贝的如上所述的效应元件的表达盒。

本发明进一步涉及任何人工或嵌合的含有如上所述的 FXR 效应元件的启动子。

根据本发明，效应元件的功能性变体可以是任何保留与 FXR 受

体结合的能力的天然序列的衍生物或片段。变体一般保留至少 50%的本申请所述的天然序列的残基。变体一般含有影响所考虑序列中的少于 5 个核苷酸的修饰。它们优选显示至少 60%序列同一性，优选至少 75%和甚至更优选至少 90%序列同一性于本发明所述的天然序列。

变体可含有不同类型的修饰，如一个或多个点突变或没有点突变、添加、缺失和/或替换。

这些修饰可以通过常规的物理、化学或分子生物学方法导入，特别如定点诱变或更实用地是通过合成仪进行序列的人工合成。

变体可以不同途径对它们结合 FXR 的能力进行测试，尤其是通过下列途径：

（i）将测试序列与 FXR 受体接触（例如放置在非细胞的试验中），以及检测复合体的形成（例如通过凝胶移位试验）；

（ii）在含有最小启动子和报道基因的表达盒中插入测试序列，把该盒导入细胞，以及检测（测定，如本发明可用）报道基因在有和没有 FXR 存在下的表达；

（iii）采用本领域那些技术人员已知的任何其他方法，例如允许证明核酸和蛋白之间的相互作用。

本发明的其他目的由上文限定的效应元件的无活性变体，尤其是基本上不能结合 FXR 受体的变体组成。这些变体具体由 SEQ ID NO:3 和 4 的序列举例。

这些无活性变体可以在上文对功能性变体所述的条件下进行制备和测试。

本发明的变体有利地是能够与 SEQ ID NO:1 或 2 的序列或其部分杂交。

B．选择、鉴定和表征调节胆固醇反向运输的化合物的方法

本发明描述了鉴定调节（即提高或降低）胆固醇反向运输的化合物的方法。这些化合物可起到改变 FXR 与其一种或多种配体结合的作用（胆汁酸、辅阻遏物和辅激活物等）。它们可进一步修饰甚至抑制 FXR 单独与其效应元件或 FXR 及其辅助因子与效应元件的结合，由此修饰人 apo A-I 基因的表达。例如，FXR 与效应元件 C（SEQ ID NO:1）的结合降低人 apo A-I 基因的转录并且减少胆固醇反向运输。所以，使用能抑制 FXR 与此效应元件结合的化合物，其中 FXR 起到抑制剂的作用，相反使得增加人 apo A-I 基因转录以及刺激胆固醇反向运输。

本发明还以令人惊奇的方式证明，FXR 与效应元件 A（SEQ ID NO:2）的结合提高人 apo A-I 基因的转录以及增加胆固醇反向运输。所以，使用能刺激 FXR 与此效应元件结合的化合物，在此情况下 FXR 充当转录激活剂（或通过直接结合再现这个激活作用的激活剂），也使得增加人 apo A-I 基因转录以及刺激胆固醇反向运输。

因此，本发明描述选择、鉴定或表征能够增加胆固醇反向运输的化合物的新方法。

1． 基于表达筛选的方法

本发明涉及选择、鉴定或表征能够调节胆固醇反向运输的化合物的方法，所述方法包括：

- 将测试化合物与含有报道基因表达盒的宿主细胞接触，所述表达盒包含置于启动子控制之下的报道基因，该启动子含有至少一个拷贝的人 apo A-I 基因启动子的 FXR 效应元件或其功能性变体，以及
- 测定报道基因的表达。

本发明方法更具体提供将测试化合物与核酸构建体或含有至少一个拷贝的 FXR 效应元件（SEQ ID NO:1 或 2）的表达盒接触。根据本

发明的另一实施方案，FXR 效应元件（位点 C 和/或 A）的拷贝可以是突变的拷贝，所述突变的拷贝基本上不能够结合 FXR 受体，即使有胆汁酸存在。

根据本发明方法的特别的实施方案，其进一步提供把通过这些方法其中之一所确定的可能作用与在相同条件下进行但采用核酸构建体的方法所确定的可能作用比较，所述核酸构建体含有至少一种人 apo A-I 基因启动子（SEQ ID NO:1 或 2）的 FXR 效应元件的无活性变体（如突变的拷贝）或人 apo A-I 基因启动子的功能性变体。

本发明方法可以采用不同类型的细胞、启动子、报道基因在不同条件下进行，如下文所述。

a) 将化合物接触宿主细胞

本发明所述的一些筛选方法由此提供在特定条件下将测试化合物与宿主细胞接触的步骤，所述特定条件允许测定报道基因在所述细胞的表达，从而获得涉及测试化合物的作用的信息。通常，把测试化合物的效应比作在没有所述化合物存在下（和/或具有突变的效应元件）所测定的报道基因的表达水平。

在本发明优选的实施方案中，这些细胞可以是哺乳动物细胞（肝细胞、成纤维细胞、内皮细胞、肌细胞等）。甚至更优选地，这些细胞可以为人细胞。它们还可以是原始培养物或确定的细胞系。在另一实施方案中，也可能使用原核细胞（细菌）、酵母细胞（糖酵母、克鲁维氏酵母等）、植物细胞等。

根据化合物的效应、浓度、细胞种类和技术考虑，可将化合物与细胞接触不同的时间。所述接触可在任何合适的支持物上，特别是在平板上、试管或摇瓶中进行。一般而言，接触放置在多孔板中进行，这使得同时处理多种不同测试成为可能。典型的支持物包括便于操作

的微量滴定板，更特别是含有 96 或 384（或更多）孔的板，并在其上通过标准刺激能实现肉眼观察。

取决于支持物和测试化合物的性质，可使用不同量的细胞来实施本发明所述的方法。通常，在合适的培养基中将 10^3-10^4 细胞，优选 10^4-10^5 细胞与一种测试化合物接触。以实施例方式，在 96 孔板中，可将 10^5 细胞在各个孔中与所需数量的测试化合物进行温育。在 384 孔板中，将少于 10^5 细胞并优选介于 1×10^4 和 4×10^4 间的细胞通常在各个孔中与测试化合物进行温育。

测试化合物的数量（或浓度）可由使用者根据化合物的种类（其毒性、穿透细胞的能力等）、细胞数、温育时间等进行调整。一般而言，细胞与浓度范围为 1nM-1mM 的测试化合物接触。当然，其他浓度也可用于测试而没有偏离本发明。此外，各个化合物可同时以不同浓度测试。如果需要，可另使用不同的佐剂和/或载体和/或促进化合物穿透细胞的产物，如脂质体、阳离子脂质、多聚体、穿透素（penetatin）、Tat PDT、来自腺病毒（五邻体或尾丝）或其他病毒的肽等。

接触维持 5-72 小时，通常 12-48 小时。实际上，细胞和各种试剂应优选保持接触足够长的时间以使得报道基因的表达产物重新合成。以优选的方式，温育时间大约为 36 小时。

b) 确定化合物的活性

本发明提供选择、鉴定或表征能调节胆固醇反向运输的化合物的方法要求宿主细胞转化有报道基因表达盒。所述报道基因尤其可以是任何在生物提取物中的转录或表达产物可被检测的基因。例如，它可以为编码人 apo A-I 本身的基因或编码荧光素酶的基因以及更特别编码萤火虫或 Renilla 荧光素酶、分泌的碱性磷酸酶、半乳糖苷酶、内酰胺酶、氯霉素乙酰转移酶（CAT）、人生长激素（hGH）、β-葡糖醛

酸糖苷酶（Gluc）和绿色荧光蛋白（GFP）等。理解的是术语“基因”广义上表示任何核酸，特别是 cDNA、gDNA、合成 DNA、RNA 等。

可将不管是什么的报道基因置于启动子控制之下，所述启动子含有至少一个拷贝的如上所述的 FXR 效应元件。

所以，可将报道基因置于任何启动子控制之下，所述启动子的序列包含 SEQ ID NO:1 和/或 2 序列或其功能性变体的一种。这种特定序列可以相同方向或相反方向、一种或多种拷贝存在于启动子（优选 1-10 以及甚至更优选 1-6）的上游、下游或内部。在本发明优选的实施方案中，报道基因置于启动子的控制之下，所述启动子含有一个或多个拷贝的位点 A（SEQ ID NO:2）以及不含位点 C。在本发明另一实施方案中，报道基因置于启动子的控制之下，所述启动子含有一个或多个拷贝的位点 C（SEQ ID NO:1）以及不含位点 A。在本发明的其他实施方案中，报道基因置于启动子的控制之下，所述启动子含有一个或多个拷贝的位点 C 和 A。优选地，所述启动子是一种在 FXR 或功能性等同物缺乏或存在下可检测到差异活性的启动子。

为构建本发明的启动子，FXR 效应元件可与转录极微的启动子结合。极微启动子是指具有低的或不存在基础活性并能在转录激活剂存在下增加（FXR 在胆汁酸存在下与位点 A 相互作用）的转录启动子。因此，极微启动子可以是哺乳动物细胞的天然弱的启动子，即产生非毒性的和/或不足的表达以获得显著的生物效应。有利地，极微启动子是从天然启动子通过缺失对转录活性不必需的一个或多个区域而制备的构建体。因此，优选的是启动子基本上含有 TATA 盒，一般长度小于 160 个核苷酸，以转录起始密码子为中心。极微启动子可从强或弱的病毒或细胞启动子制备，其例子包括疱疹病毒胸苷激酶（TK）基因的启动子、CMV 立即启动子、PGK 启动子、SV40 启动子等。极微启动子具有足够高的活性，从而允许鉴定化合物，所述化合物例如，通过位点 C 增加 FXR-介导的抑制或通过位点 A 增加 FXR-介导的激活。

启动子（P）、FXR 效应元件（RE）和报道基因（RG）以功能性方式排列在表达盒中，即以此方式极微启动子控制所述基因的表达以及其活性由 FXR 调节。一般而言，这些区域以下列顺序、5'→3'的方向排列：RE-P-RG。然而，任何其他功能性排列可由那些本领域的技术人员使用而没有偏离本发明。

此外，上文不同功能性结构域可直接相互位于两侧或者由核苷酸分开，所述核苷酸对表达盒的功能性特征没有显著的影响或者允许赋予系统改进的特征或性能（增强子（amplifier）、沉默子、内含子、剪接位点等）。

选择、鉴定和表征能够调节胆固醇反向运输的化合物的方法提供测定报道基因表达的步骤。这可以是转录活性的测定。为此目的，一方面从实验条件下培养物的细胞中抽提总 RNA，而另一方面从对照条件下培养的细胞中抽提总 RNA。这种 RNA 用作探针，例如分析报道基因的表达变化。

这也可包括通过合适底物肉眼观察报道基因的表达。这种肉眼观察可通过其性质依赖于所用报道基因的种类的不同方法来实现。例如，测定在利用半乳糖苷酶或荧光素酶基因作为报道基因的情况下可对应于光密度或荧光发射。

在特定的实施方案中，报道基因的表达通过水解报道基因的表达产物的底物而测定。例如，许多底物可用来评价β-内酰胺酶的表达。特别地，这些底物可以是任何含有β-内酰胺核并且其水解可得到控制的产物。优选的底物是那些特异于β-内酰胺酶的物质（即一般它们在缺乏β-内酰胺酶时不被哺乳动物细胞水解），那些对哺乳动物细胞没有毒性的物质和/或其水解产物例如通过基于荧光、放射性、酶活性或任何其他检测方法容易进行测定的物质。甚至更优选的底物是放射计

量的底物。这些底物的水解可直接通过细胞数与报道基因的表达产物的活性相关。本发明中可用的特异和非毒性的放射计量的底物为CCF2-AM。

例如，底物的浓度可由本领域的那些专业人员根据细胞数来进行调节。细胞一般与底物接触大约 60 分钟。

报道基因产物（和底物的水解产物）可通过本领域那些专业人员公知的常规方法（荧光、放射活性、光密度、发光、FRET（参见 WO 0037077）、SPA、生物芯片、免疫学方法等）而测定。

一般而言，在细胞中测定测试化合物的活性，并且把该效应与没有测试化合物时的活性水平比较或者与没有任何测试化合物时所测定的平均值比较。

测定水解基本上表示测定各个反应样品中所含的水解产物（或确定其相对量）。这种测定可通过本领域那些技术人员所公知的不同方法，包括检测荧光、放射活性、颜色、酶活性、抗原－抗体免疫复合体等来进行。以优选的方式，水解产物通过荧光检测方法来检测或量化。由此对细胞样品可使用和控制不同荧光染料。

第二种测试允许在动物中验证选择的化合物，其操作方法也可确定表达的 HDL 的量或确定用所述化合物处理的细胞中胆固醇反向运输与未处理的细胞比较有显著变化。测定血浆胆固醇和/或确定肝中表达 apo A-I 也是可能的。

以优选的方式，本发明方法利用含有 FXR 受体或其功能性等同物的宿主细胞。

FXR 受体的存在允许再现生理情形以及通过上文所述方法鉴定化

合物，所述化合物能够调节 FXR 与其效应元件之一和/或其他之间相互作用，如本发明所公开，或者 FXR 与一种或多种 FXR 配体之间相互作用。

FXR 受体可以天然存在或可以通过人工方法已经导入或添加。它可以是 FXR 等同物，表示其与 FXR 受体共享至少 60%的氨基酸同一性，优选至少 75%以及甚至更优选至少 90-95%。

根据优选的实施方案，本发明也描述选择、鉴定或表征能够调节胆固醇反向运输的化合物的方法，所述方法包含：

■ 将测试化合物与宿主细胞接触，所述宿主细胞含有：

- 报道基因的表达盒，所述表达盒包含置于启动子控制之下的报道基因，所述启动子含有至少一个拷贝的人 apo A-I 基因启动子的 FXR 效应元件或其功能性变体，和

- FXR 受体或其功能性等同物，以及

■ 测定报道基因的表达

该方法使得根据本领域那些技术人员公知的上述方法之一测定报道基因的表达水平成为可能，在有测试化合物或没有所述化合物存在下，报道基因表达水平的提高或降低是测试化合物调节胆固醇反向运输的能力的反映。根据本发明甚至更优选的实施方案，宿主细胞还含有 FXR 配体。

术语“FXR 配体”不仅应用于胆汁酸及其衍生物而且应用于转录因子、辅激活物和辅阻遏物，以及应用于其他参与基因表达的调节性机制的多肽。例如，这些配体可以是其他受体，例如 RXR 或核激素受体。

如上文所述，这类方法能够在一种或多种细胞群（哺乳动物细胞、人细胞如肝细胞、原核细胞等）上对许多测试化合物进行快速和同时

筛选。这些方法是预测性的，并能自动化，因而适合于选择、鉴定和表征所述化合物。

该筛选方法的一个特别的实施方案利用常规方法来鉴定表达DNA－结合的蛋白的克隆。此方案可包括例如筛选 γ gt11 cDNA 表达文库或利用所谓的“一步杂交（One Hybrid）”或“噬菌体展示”方法，或通过亲和层析进行纯化。然后使分离的一种或多种蛋白测序。

2．基于结合测试的方法

本发明还涉及根据测定测试化合物与一种或另一种甚至或两种效应元件的结合来选择、鉴定或表征能调节胆固醇反向运输的化合物的方法。所述方法更特别包含：

- 将测试化合物与含有至少一个拷贝的人 apo A-I 基因启动子的 FXR 效应元件或其功能性变体的核酸构建体接触，以及
- 确定所述测试化合物与所述效应元件的可能结合。

测试化合物与至少一个 FXR 效应元件的结合可以通过实施上述方法结果所形成的杂二聚体的电泳凝胶迁移而证实。实际上，一些测试化合物可含有大多与 FXR 的 DNA 结合位点相同的 DNA 结合位点，并因此担当 FXR 的竞争者。

电泳使得直接区分 FXR/FXR 效应元件的杂二聚体、测试化合物/FXR 效应元件的杂二聚体和 FXR 效应元件成为可能。

基于发光的其他方法或本领域那些技术人员众所周知的采用 FRET（荧光共振能量转移）方法或 SPA（闪烁亲近测定）方法可用于本发明的范围内以确定测试化合物与一种和/或其他 FXR 效应元件的潜在结合。

在本发明特别的实施方案中，直接选择、鉴定和表征能够调节胆

固醇反向运输的化合物的方法可在 FXR 受体或其功能性等同物存在下进行。此中方法的最终步骤在于确定测试化合物对 FXR 与其效应元件结合的影响。例如，通过测定有测试化合物时 FXR 结合的量相对于没有测试化合物时的量，建立所述测试化合物对调节 FXR 与效应元件结合的能力。利用本领域那些技术人员公知的荧光极性（FP）方法可有效用于这种测定目的。

能够调节 FXR 与效应元件结合的测试化合物是根据上述方法之一对其调节报道基因表达和/或胆固醇反向运输的能力随后进行测试的对象。

在特定的实施方案中，核酸构建体含有至少一个拷贝，优选 2-5 个拷贝的 SEQ ID NO:1 序列或其功能性变体。能够抑制（即至少部分减少）FXR 与该构建体结合的测试化合物使得报道基因表达激活并且组成刺激胆固醇反向运输的候选物。

C. HDL 和载脂蛋白 A-I 的活性

在本发明的另一实施方案中，选择、鉴定和表征能够调节报道基因表达和/或胆固醇反向运输的化合物的上述方法可用于选择、鉴定和表征能够调节 HDL 活性和/或表达 apo A-I 的化合物。

D. 测试化合物

本发明可使用任何种类的测试化合物。例如，测试化合物可以是单独或与其他产物混合使用的任何产物。化合物可依据其结构和/或组成限定或者不限定。例如，化合物可以是分离的并且结构清晰的产物、结构不定的分离产物、已知混合物、表征的产物、或包含一种或多种产物的不定组合物。这种不定的组合物的举例是组织样品、生物流体、细胞上清液、植物制品等。测试化合物可以无机或有机产物，并且特别是多肽（或蛋白或肽）、核酸、脂质、多糖、化学或生物化合物如核因子、辅因子或后者的任何混合物或衍生物。化合物可以是天然的

或合成的，并包括组合文库、克隆或表达一种或多种 DNA－结合肽的核酸克隆的文库等。

本发明尤其适用于选择、鉴定或表征大量的化合物。这种简单和有效率的筛选可在很短的时间内完成。特别地，本文所述的方法可以部分自动化，由此使得有效并同时以混合物或单独方式筛选许多不同的化合物成为可能。

E．鉴定的化合物的用途

根据本发明鉴定的化合物显示为治疗用途尤其在动脉粥样硬化领域是有利的特性。本发明一种可能的应用是能鉴定治疗性物质，所述物质能够减少胆汁酸对 apo A-I 表达的抑制作用并因此增加胆固醇反向运输。本发明提供能调节（即增加或减少）FXR 与人 apo A-I 基因启动子的效应元件或其功能性变体结合的化合物在制备调节（即增加或减少）胆固醇反向运输的组合物中的应用。根据本发明另一实施方案，这种应用可以是调节（即增加或减少）HDL 的活性或调节 apo A-I 的表达。

本发明的其他实施方案提供能够控制 FXR 对人 apo A-I 基因或其功能性变体转录的影响的化合物在制备增加胆固醇反向运输的组合物中的应用。

根据本发明优选的实施方案，所述化合物是化学化合物或生物化合物。在另一优选的实施方案中，所述化合物是核因子或辅因子。在甚至更优选的实施方案中，其是表达一种或多种 DNA－结合多肽的克隆。通常，它可以是任何根据上述方法之一所选择、鉴定或表征的化合物。

本发明包括在本发明范围内使用任何根据上述方法之一所选择、鉴定或表征的化合物（或所述化合物的衍生物），作为实验研究的目

标或用于制备药物组合物来增加胆固醇反向运输或治疗高胆固醇血症、动脉粥样硬化、脂质失调和/或心血管疾病。

本发明的其他优点和应用在下列实施例中会变得一目了然，这些实施例为说明目的而非以限制方式给出。

附图说明

图 1：TCA 减少血浆胆固醇和 apo A-I 的浓度以及 apo A-I 在转有人 apo A-I 基因的小鼠的肝脏中的表达。

图 2：CDCA 和 TCA 减少 apo A-I 在 HepG2 细胞中的表达。

图 3：胆汁酸的转录效应。

图 4：CDCA 和 TCA 激活 FXR。

图 5：FXR 在 CDCA 存在下的过表达减少人 apo A-I 在 HepG2 细胞中的启动子活性。

图 6：FXR 在 CDCA 存在下过表达减少人 aop A-I 在 HepG2 细胞中的启动子活性：效应元件的功能性鉴定。

图 7：FXR 与 apo A-I 启动子的位点 C（SEQ ID NO:1）和 A（SEQ ID NO:2）的结合作为与 RXR 的二聚体，其中 FXR 作为单体也与位点 C（SEQ ID NO:1）结合。

图 8：特定的 FXR 激活剂 GW4064 减少人 apo A-I 在 HepG2 细胞中的表达及其启动子活性。

序列

SEQ ID NO:1（位点 C 野生型）

5’-CAGAGCTGATCCTTGAACTCTTAAGTTCC-3’

SEQ ID NO:2（位点 A 野生型）

5’-CCCCACTGAACCCTTGACCCCTGCCCTGCAGCC-3’

SEQ ID NO:3（位点 C 突变型）

5’-CAGAGCTATATATTATATATATAAGTTCC-3’

SEQ ID NO:4（位点 A 突变型）

5'-CCCCACTGAACCCTTGATTCCTGCTTTGCAGCC-3'

SEQ ID NO:5（apo A-I 启动子－j04066（apo A-I 基因）1819-2167）

5'-
gggagacctgcaagcctgcagcactcccctcccgcccccactgaacccttgacccctgccctgcagcccccgca
gcttgctgtttgcccactctatttgcccagccccagggacagagctgatccttgaactcttaagttccacattgccagg
accagtgagcagcaacagggccggggctgggcttatcagcctcccagcccagaccctggctgcagacataaata
ggccctgcaagagctggctgcttagagactgcgagaaggaggtgcgtcctgctgcctgccccggtcactctggct
ccccagctcaaggttcaggccttgccccaggccgggcctctgggtac-3'

SEQ ID NO:6（TK 启动子－M80483（pBLCAT5）38-204；J02224（单纯疱疹病毒）302-462）

5'-
tgccccgcccagcgtcttgtcattggcgaattcgaacacgcagatgcagtcggggcggcgcggtccaggtccact
tcgcatattaaggtgacgcgtgtggcctcgaacaccgagcgaccctgcagcgacccgcttaacagcgtcaacacg
tgccgcagatcacgag-3'

实施例

实施例 1：TCA 对血浆胆固醇和 apo A-I 浓度以及 apo A-I 在转有人 apo A-I 基因的小鼠的肝中表达的影响（图 1）

实施例 1 说明富含牛磺胆酸的饮食对血清胆固醇和人 apo A-I 水平的影响以及对在表达 apo A-I 基因、具有 C57BL 遗传背景的转基因小鼠中的脂质图和其肝中表达人 apo A-I 的影响。

十只表达 apo A-I 基因、具有 C57BL 遗传背景的转基因小鼠（IFFA-CREDO, L'Arbresle, France）通过 PCR 确定基因型，并分成两组，每组 5 只。第一组接受正常饮食一周，而第二组施用富含 TCA（牛磺酸，0.5％m/m）的饮食。12 小时禁食后经巴比妥麻醉通过眼眶后的穿刺采集血液。收集血清样品，并储存在-20℃待分析。饮食处理一周后，将动物处死，收集肝脏样本并冷冻用于分析。如前所述（Peters, J. Biol. Chem., 1997, 272(43):27307-12）在饮食前后测定血清中人 apo A-I 的含量。如前所述（Raspé 等，J. Lipid Res., 1999, 40(11):2099-2110）测量 FPLC 后的血清胆固醇和脂质图。如前所述（Chomczynski 等，Anal.

Biochem., 1987, 162(1):156-9）从肝脏样本中抽提总 RNA 并利用人 apo A-I 和 28S 作为探针（Peters，J. Biol. Chem., 1997, 272(43):27307-12）通过 Northern 印迹杂交（Peters, 1997）进行定量。

实施例 2：CDCA 和 TCA 对 apo A-I 在 HepG2 细胞中表达的影响（图 2）

实施例 2 表示 CDCA 和 TCA 浓度增加的效果，其减少 apo A-I 在 HepG2 细胞中的表达。将 HepG2 细胞生长在补充有 10％胎牛血清、青霉素/链霉素、丙酮酸钠和非必需氨基酸的 DMEM 培养基中，37℃下温育在加湿的 5％CO_2/95％空气气氛中。然后将它们用所示浓度的 CDCA 处理。如前所述（Chomczynski 等，Anal. Biochem., 1987, 162(1):156-9）抽提总 RNA 并利用人 apo A-I 和 28S 作为探针（Peters，J. Biol. Chem., 1997, 272(43):27307-12）通过 Northern 印迹杂交（Peters，J. Biol. Chem., 1997, 272(43):27307-12）进行定量。

实施例 3：胆汁酸的转录效果证明

实施例 3 显示 CDCA 在 50μM 浓度时相当大地减少 apo A-I 在 HepG2 细胞中的表达。其作用被与放线菌素 D（5g/ml）预先温育 12 小时所抵消，这提示该作用发生在转录水平。将 HepG2 细胞生长在补充有 10％胎牛血清、青霉素/链霉素、丙酮酸钠和非必需氨基酸的 DMEM 培养基中，37℃下温育在加湿的 5％CO_2/95％空气气氛中。如前所述（Chomczynski 等，Anal. Biochem., 1987, 162(1):156-9）抽提总 RNA 并利用人 apo A-I 和 28S 作为探针（Peters，J. Biol. Chem., 1997, 272(43):27307-12）通过 Northern 印迹杂交（Peters，J. Biol. Chem., 1997, 272(43):27307-12）进行定量。

实施例 4：有 CDCA 存在时过表达 FXR 对 HepG2 细胞中的人 apo A-I 启动子活性的影响

实施例 4 显示 hFXR 和 mRXRα在 CDCA 存在下过表达阻遏位于荧光素酶报道基因上游克隆的 apo A-I 基因启动子的片段-254/+91（其

含有位点 AB 和 C）[参见 SEQ ID NO:5]、片段-192/+91（其含有位点 B 和 C）的活性，但不阻遏片段-40/+91（其仅含有极微启动子）的活性。

将 HepG2 细胞通过脂转染法与 300 ng 用于 FXR 表达的 pCDNA3-hFXR 载体、300 ng 的 pSG5-mRXRα 载体和 1μg 的所示报道载体共转染，所述报道载体使荧光素酶报道基因能在 apo A-I 启动子的片段-254/+91、-192/+91 和-40/+91 的控制下表达荧光素酶报道基因。这些构建体的获得方法是采用如前所述（Raspe 等，J. Lipid Res., 1999, 40(11):2099-2110）从 Promega 的质粒 pGL3（Madison, WI, USA）提取的荧光素酶报道基因交换前述构建体中的 CAT 报道基因（Ngoc Vu-Dac 等，J. Biol. Chem., 1994, 269(49):31012-8）。利用质粒 pBKS+ 将总 DNA 调整至 2μg。转染 3 小时后，将细胞以所示浓度温育在含有胆汁酸的培养基中 36 小时。然后，如前所述（Raspe 等，J. Lipid Res., 1999, 40(11):2099-2110）测定荧光素酶活性。

实施例 5：人 apo A-I 基因启动子中存在的 FXR 效应元件的功能性鉴定（图 6）

实施例 5 显示 hFXR 在 CDCA 存在下过表达阻遏荧光素酶报道基因上游克隆的 apo A-I 启动子的野生型片段-254/+91（“wt”构建体）的活性（组 A）。它进一步显示位点 C 的突变导致在 hFXR 过表达反应中构建体的转录活化，所述位点 C 存在于荧光素酶报道基因上游克隆的 apo A-I 启动子的片段-254/+91（“C mut”构建体）中（组 A）。hFXR 在 CDCA 存在下过表达也阻遏荧光素酶报道基因上游克隆的 apo A-I 启动子的片段-254/+91 的活性，其中位点 A 是突变的（“A mut”构建体）（组 A）。最终，荧光素酶报道基因上游克隆的 apo A-I 启动子的片段-254/+91 的位点 A 和 C（“AC mut”构建体）的双突变导致 hFXR 反应的丧失。

实施例 5 显示 hFXR 在 CDCA 存在下过表达阻遏构建体的活性，

所述构建体含有 3 个拷贝的位于单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子上游克隆的人 apo A-I 启动子以及荧光素酶报道基因的位点 C（表示为“C3TK”），然而含有 3 个拷贝的位于单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子上游克隆的人 apo A-I 启动子的位点 A 的构建体（表示为“A3TK”）受到 hFXR 在 CDCA 存在下过表达的激活，以及仅含有单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子的构建体（表示为“TkpGL3”）的活性不受到 hFXR 在 CDCA 存在下过表达的影响（组 B）。

将 HepG2 细胞通过脂转染法与 300 ng 用于表达 hFXR 表达的 pCDNA3-hFXR 载体和 1μg 的所示报道载体共转染，所述报道载体使荧光素酶报道基因在人 apo A-I 基因启动子的野生型或突变片段-254/+91 的控制下、在单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子的控制下或在 3 个拷贝的位于单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子上游克隆的人 apo A-I 基因的位点 A 或位点 C 的控制下表达荧光素酶报道基因。该构建体含有 apo A-I 启动子的野生型片段-254/+91，其获得方法是采用如前所述（Raspé 等，J. Lipid Res., 1999, 40(11):2099-2110）从 Promega 的质粒 pGL3（Madison, WI, USA）提取的荧光素酶报道基因交换前述相应构建体中的 CAT 报道基因（Ngoc Vu-Dac 等，J. Biol. Chem., 1994, 269(49):31012-8）。构建体含有其中位点 A 是突变的 apo A-I 启动子的片段-254/+91，其获得方法是利用 Quick Change 定点诱变试剂盒（Stratagene, La Jolla, CA, USA）、寡核苷酸 5’-CCCCACTGAACCCTTGATTCCTGCTTTGCAGCC-3’（SEQ ID NO:4）和互补寡核苷酸对野生型构建体进行位点 A 的定点诱变。构建体含有其中位点 C 是突变的 apo A-I 启动子的片段-254/+91，其获得方法是利用 Quick Change 定点诱变试剂盒（Stratagene, La Jolla, CA, USA）、寡核苷酸 5’-CAGAGCTATATATTATATATATAAGTTCC-3’（SEQ ID NO:3）和互补寡核苷酸对野生型构建体进行位点 C 的定点诱变。构建体含有其中位点 A 和 C 是突变的 apo A-I 启动子的片段-254/+91，其获得方法是利用 Quick Change 定点诱变试剂盒（Stratagene, La Jolla, CA, USA）、寡核苷酸 5’-

CCCCACTGAACCCTTGATTCCTGCTTTGCAGCC-3'（SEQ ID NO:4）和互补寡核苷酸对野生型构建体进行位点 A 的定点诱变。表示为 TkpGL3 的构建体含有位于荧光素酶报道基因上游克隆的单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子，其已在前文所述（Raspe 等，J. Biol. Chem., 2001, 276(4):2865-2871）。C3TK 构建体含有 3 个拷贝的位于单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子的上游克隆的人 apo A-I 启动子的位点 C 以及荧光素酶报道基因，其获得方法是定向将 3 个拷贝对应于野生型位点 C 序列（SEQ ID NO:1）的双链寡核苷酸克隆到载体 TkpGL3 的 SmaI 位点中。A3TK 构建体含有 3 个拷贝的位于单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子上游克隆的人 apo A-I 启动子的位点 A 以及荧光素酶报道基因，其获得方法是定向将 3 个拷贝对应于野生型位点 A 序列（SEQ ID NO:2）的双链寡核苷酸克隆到载体 TkpGL3 的 SmaI 位点中。利用质粒 pBKS+将总 DNA 调整至 2μg。转染 3 小时后，将细胞温育在含有以所示浓度的胆汁酸的培养基中 36 小时。然后，如前所述（Raspe 等，J. Lipid Res., 1999, 40(11):2099-2110）测定荧光素酶活性。

实施例 6：将 FXR/RXR 复合体结合到 apo A-I 启动子的位点 A（SEQ ID NO:2）以及将 FXR 和 FXR/RXR 复合体结合到位点 C（SEQ ID NO:1）上（图 7）

实施例 6 显示 RXRα/hFXR 复合体特异性结合到人 apo A-I 启动子的位点 A 和 C 上。其还显示 FXR 能够作为单体单独结合到人 apo A-I 启动子的位点 C 上。

利用 Promega 的 TNT-T7 试剂盒（Madison, WI, USA）以及载体 pCDNA3-hFXR 和 pSG5-mRXRα 体外生产 hFXR 和 mRXRα。利用多核苷酸激酶把对应于人 apo A-I 基因启动子的位点 A 和 C（SEQ ID NO:2，SEQ ID NO:1）以及如前述所制备（Ngoc Vu-Dac 等，J.Biol.Chem.,1994,269(49):31012-8）的双链寡核苷酸用[γ-^{32}P]-ATP 标记。在加入标记探针（0.5ng）前，将 2μl 的 hFXR-和 mRXRα-编程的网状细胞裂解液在终体积 20μl 的缓冲液中室温下温育 15 分钟，所

述缓冲液含有 10mM HEPES、2.5mM $MgCl_2$、10%甘油、2.5mg/ml BSA、50mM NaCl 和 0.5mM DTT 以及 2.5μg 的 polydI-dC 和 1μg 鲱鱼精子 DNA。此混合物室温下温育 15 分钟，并利用 0.25×TBE 缓冲液通过非变性凝胶电泳分开复合体。在 4℃下加入 DNA 前 3 小时，通过添加抗－FXR 抗体（Santa Cruz,CA,USA）进行超移位实验。

实施例 7：FXR 的合成的激动剂 GW4064 减少 apo A-I 在 HepG2 细胞中的表达（图 8）

如实施例 5 所述共转染 HepG2。如上文实施例 2 所述获得细胞 mRNA。

	相对 apo AI mRNA（%）
对照	100.0±9.4
GW4064 1μM	54.3±7.3
GW4064 5μM	23.0±5.5

		相对荧光素酶活性（%）
构建体 ABC	对照	100.0±11.9
	GW4064 1μM	56.8±6.9
构建体 A3 TK	对照	100.0±1.1
	GW4064 1μM	1119.1±28.1
构建体 C3 TK	对照	100.0±12.6
	GW4064 1μM	61.8±2.8

实施例 7 显示 FXR 的强的特定激活剂 GW4064（Goodwin 等，Mol Cell., 2000, Sept., 6(3):517-26）显著降低 apo A-I 在 HepG2 细胞中的表达。

实施例 7 显示 hFXR 在 1μM GW4064 存在下过表达阻遏人 apo A-I 启动子（构建体 ABC）的片段-254/+91 的活性以及含有 3 个拷贝的人 apo A-I 启动子的位点 C（SEQ ID NO:1）构建体（构建体 C3TK）的活性。相反，含有 3 个拷贝的人 apo A-I 启动子的位点 A（SEQ ID NO:2）的构建体（构建体 A3TK）受到 hFXR 在 GW4064 存在下过表达的激活。

<110> 基恩菲特公司（GENFIT SA）

<120> 调节胆固醇反向运输的化合物的鉴定方法
（METHODS FOR IDENTIFYING COMPOUNDS MODULATING REVERSE CHOLESTEROL TRANSPORT）

<130> SCT031429-47

<140>
<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 29
<212> DNA
<213> 合成序列

<220>
<223> 合成序列描述：位点 C 野生型（Site C wt）

<400> 1
cagagctgat ccttgaactc ttaagttcc 29

<210> 2
<211> 33
<212> DNA
<213> 合成序列

<220>
<223> 合成序列描述：位点 A 野生型（Site A wt）

<400> 2
ccccactgaa cccttgaccc ctgccctgca gcc 33

<210> 3
<211> 29
<212> DNA
<213> 合成序列

<220>
<223> 合成序列描述：位点 C 突变型（Site C mt）

<400> 3
cagagctata tattatatat ataagttcc 29

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> 合成序列

<220>
<223> 合成序列描述：位点 A 突变型（Site A mt）

<400> 4
ccccactgaa cccttgattc ctgctttgca gcc 33

<210> 5
<211> 349
<212> DNA
<213> 合成序列

<220>
<223> 合成序列描述：apo A-I 启动子

<400> 5
gggagacctg caagcctgca gcactcccct cccgccccca ctgaaccctt gacccctgcc 60
ctgcagcccc cgcagcttgc tgtttgccca ctctatttgc ccagccccag ggacagagct 120
gatccttgaa ctcttaagtt ccacattgcc aggaccagtg agcagcaaca gggccggggc 180
tgggcttatc agcctcccag cccagaccct ggctgcagac ataaataggc cctgcaagag 240
ctggctgctt agagactgcg agaaggaggt gcgtcctgct gcctgccccg gtcactctgg 300
ctccccagct caaggttcag gccttgcccc aggccgggcc tctgggtac 349

<210> 6
<211> 166
<212> DNA
<213> 合成序列

<220>
<223> 合成序列描述：tk 启动子

<400> 6
tgccccgccc agcgtcttgt cattggcgaa ttcgaacacg cagatgcagt cggggcggcg 60
cggtccaggt ccacttcgca tattaaggtg acgcgtgtgg cctcgaacac cgagcgaccc 120
tgcagcgacc cgcttaacag cgtcaacacg tgccgcagat cacgag 166

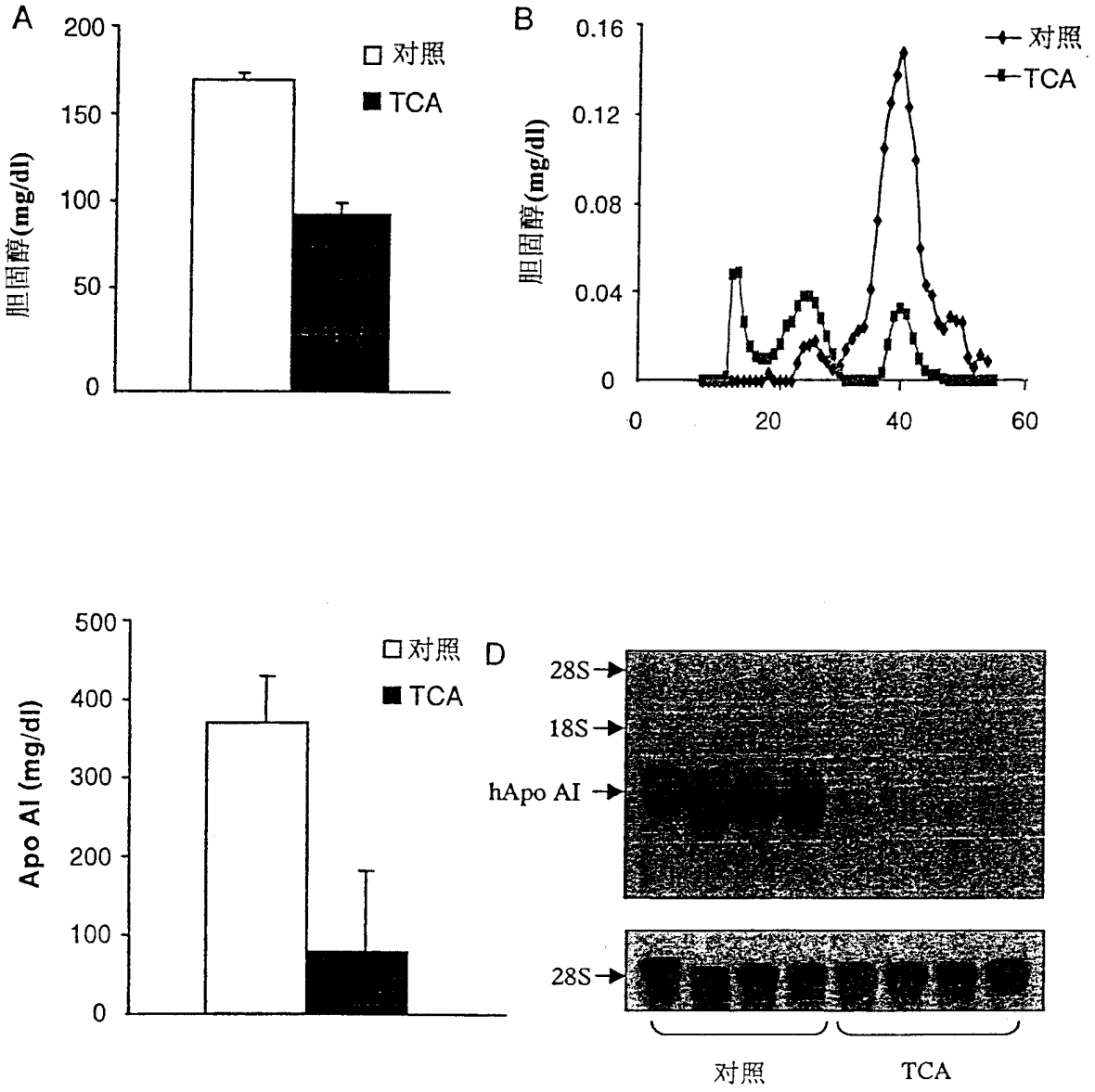

A
200
150
100
50
0
胆固醇(mg/dl)
□ 对照
■ TCA
B
0.16
0.12
0.08
0.04
0
胆固醇(mg/dl)
对照
TCA
0
20
40
60
500
400
300
200
100
0
Apo AI (mg/dl)
□对照
■ TCA
D
28S
18S
hApo AI
28S
对照
TCA

图1

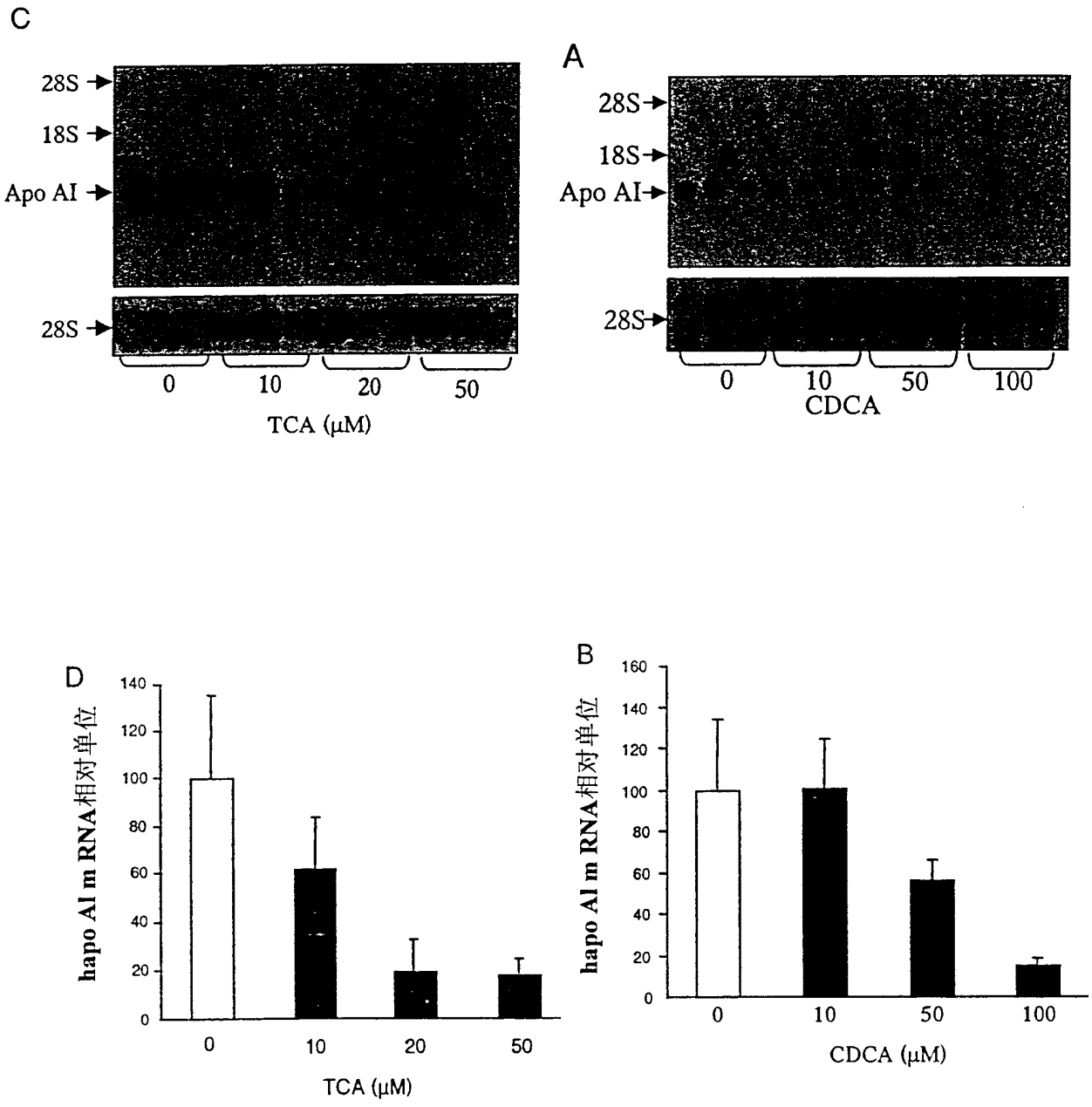

C
28S
18S
Apo AI
28S
0
10
20
50
TCA (μM)
A
28S
18S
Apo AI
28S
0
10
50
100
CDCA
D
hapo AI m RNA相对单位
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
50
TCA (μM)
B
hapo AI m RNA相对单位
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
10
50
100
CDCA (μM)

图2

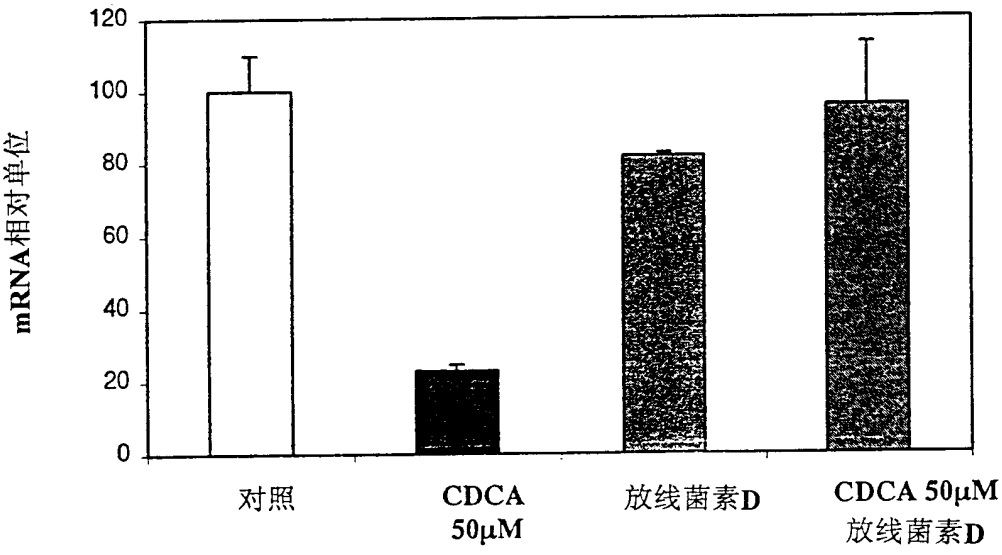
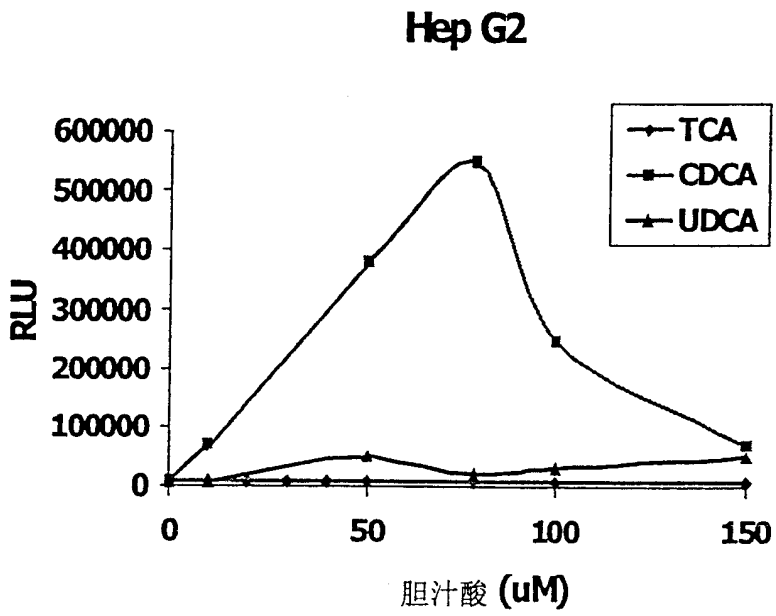

120
100
80
60
40
20
0
mRNA相对单位
对照
CDCA
50μM
放线菌素D
CDCA 50μM
放线菌素D

图3


Hep G2
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
RLU
0
50
100
150
胆汁酸 (uM)
TCA
CDCA
UDCA

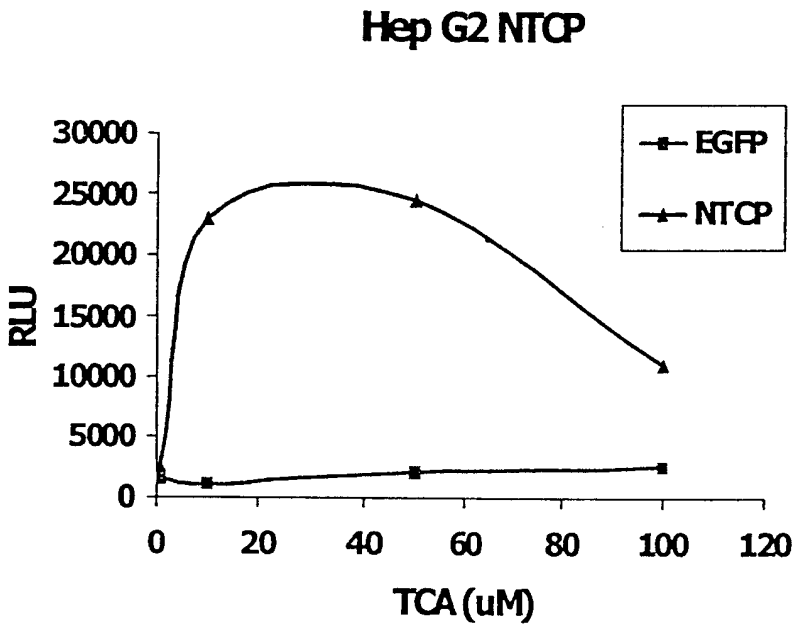

Hep G2 NTCP
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
RLU
0
20
40
60
80
100
120
TCA (uM)
EGFP
NTCP

图4

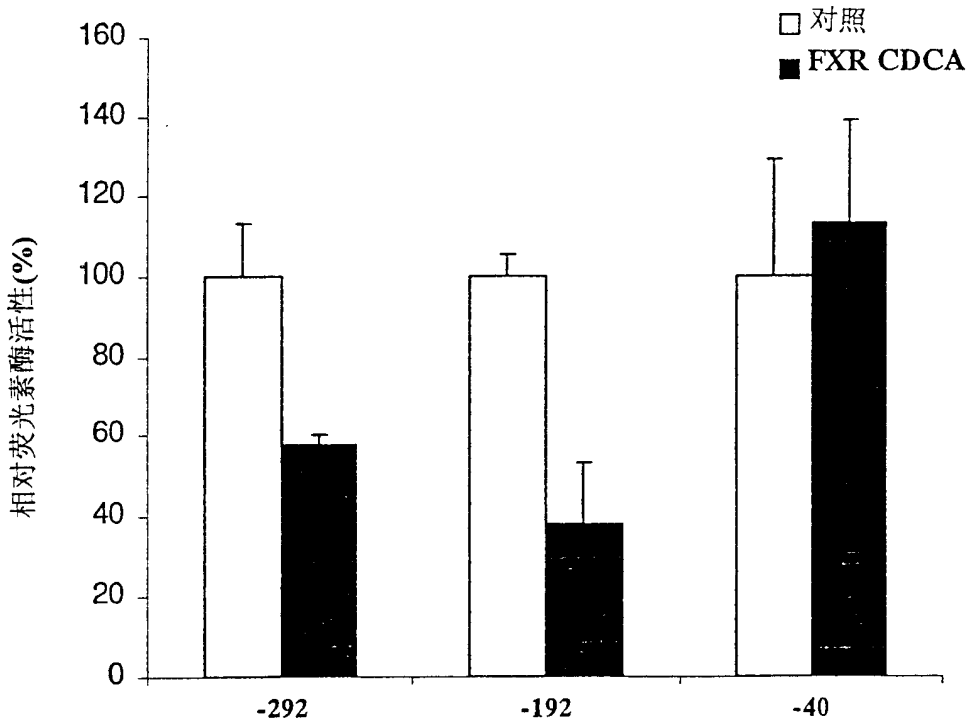


图5

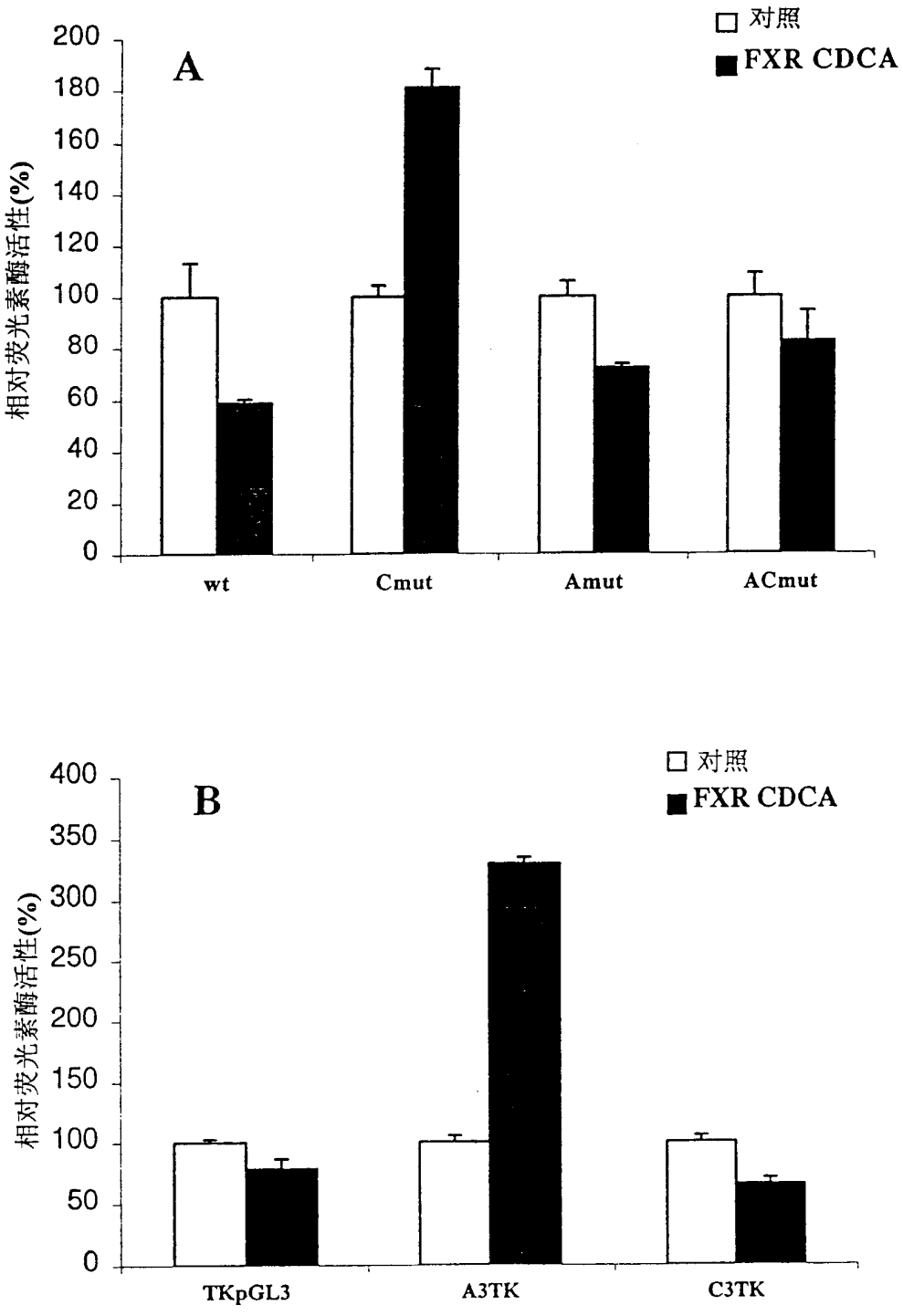

A
对照
FXR CDCA
相对荧光素酶活性(%)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
wt
Cmut
Amut
ACmut
B
对照
FXR CDCA
相对荧光素酶活性(%)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
TKpGL3
A3TK
C3TK

图6

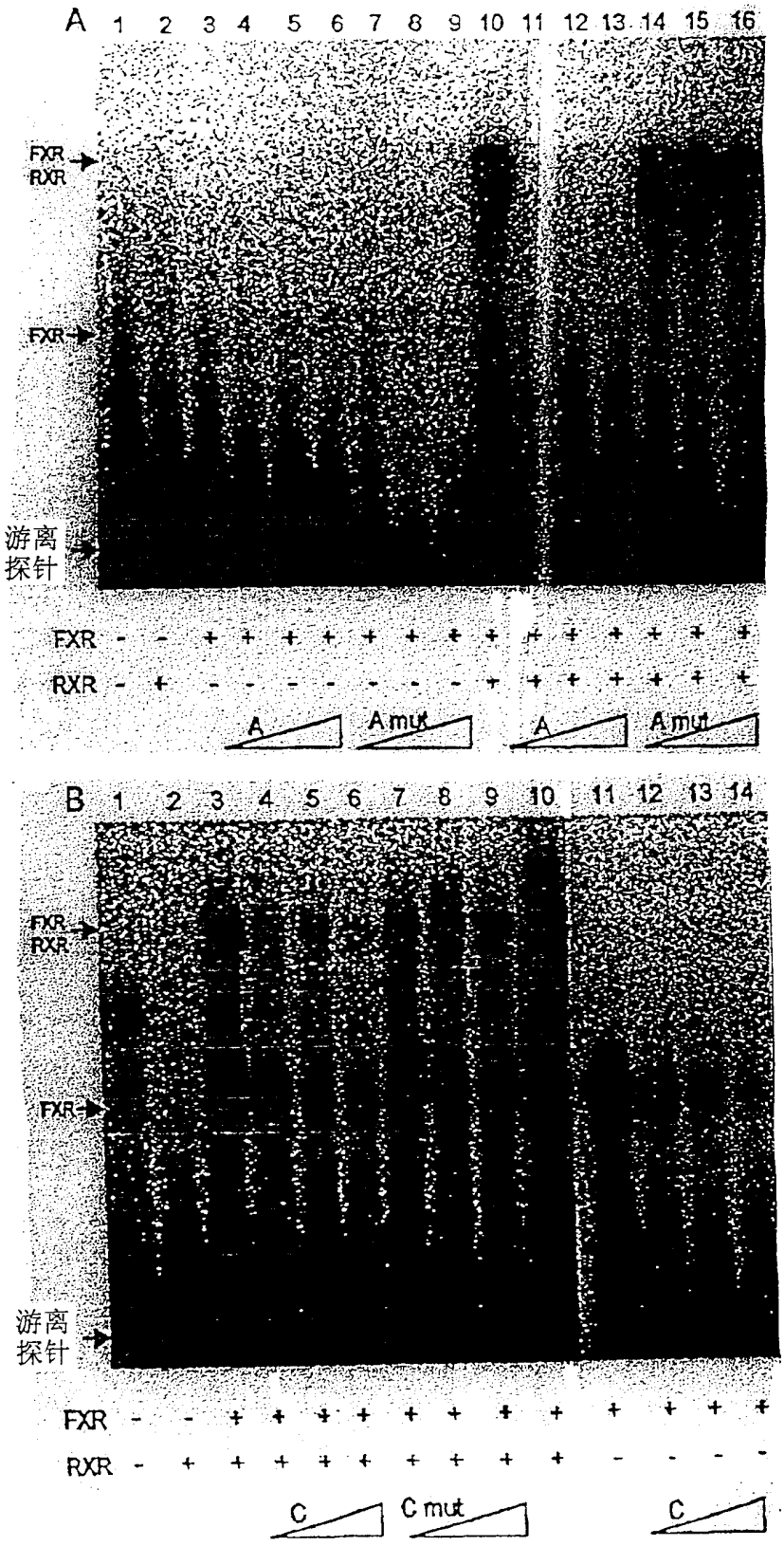

A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
FXR
RXR
FXR
游离
探针
FXR - - + + + + + + + + + + + + + +
RXR - + - - - - - - - + + + + + + +
A
A mut
A
A mut
B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
FXR
RXR
FXR
游离
探针
FXR - - + + + + + + + + + + + +
RXR - + + + + + + + + + - - - -
C
C mut
C

图7

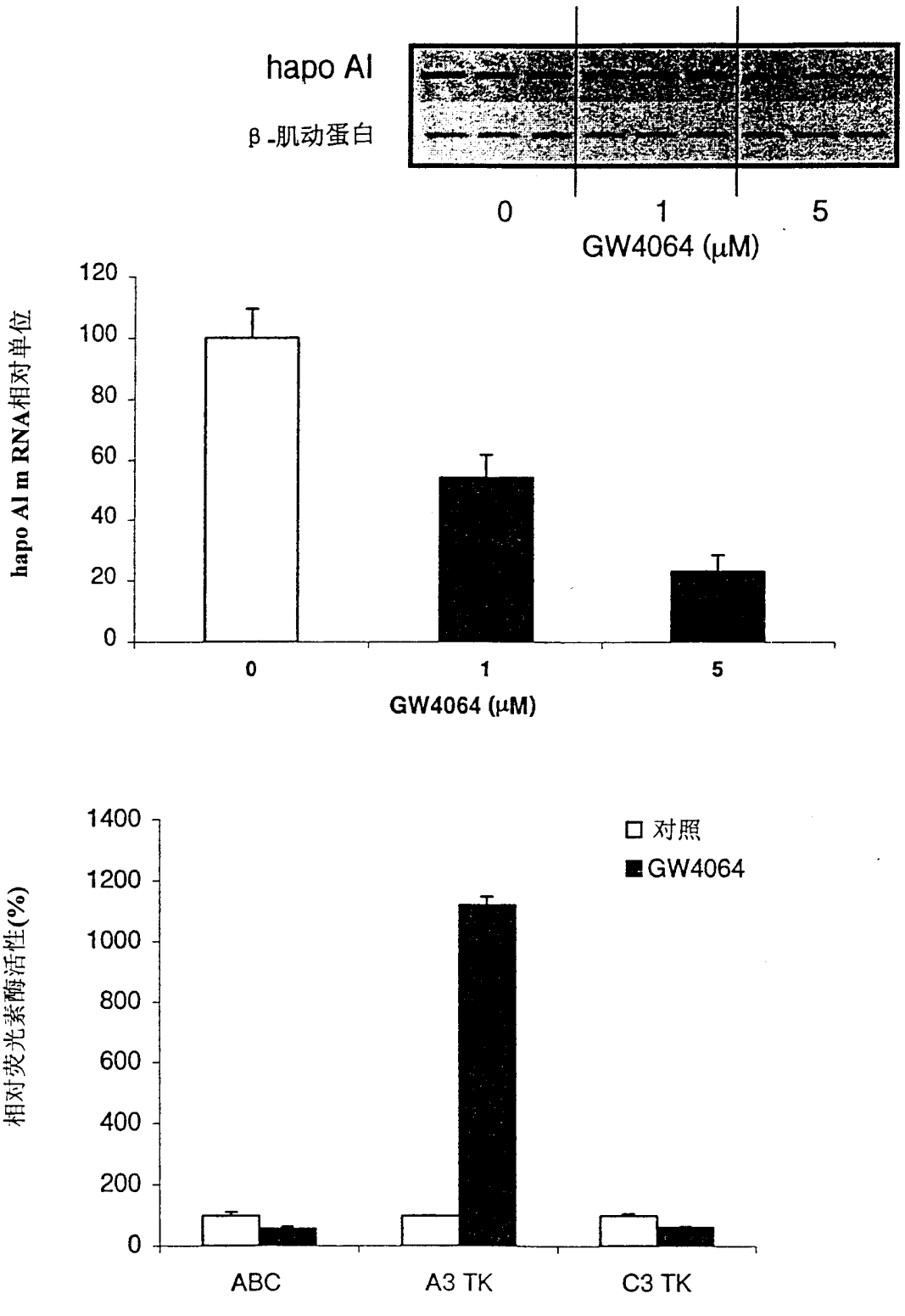

hapo AI
β-肌动蛋白
0
1
5
GW4064 (μM)
hapo AI m RNA相对单位
120
100
80
60
40
20
0
0
1
5
GW4064 (μM)
相对荧光素酶活性(%)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
□ 对照
■ GW4064
ABC
A3 TK
C3 TK

图8