

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 39/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480042303.4

[43] 公开日 2007 年 3 月 7 日

[11] 公开号 CN 1925869A

[22] 申请日 2004.11.29

[21] 申请号 200480042303.4

[30] 优先权

[32] 2004.1.29 [33] EP [31] 04001895.4

[32] 2004.1.29 [33] EP [31] 04001894.7

[32] 2004.3.26 [33] EP [31] 04007447.8

[32] 2004.5.7 [33] EP [31] PCT/EP2004/004891

[32] 2004.5.7 [33] EP [31] PCT/EP2004/004889

[86] 国际申请 PCT/EP2004/013539 2004.11.29

[87] 国际公布 WO2005/074980 英 2005.8.18

[85] 进入国家阶段日期 2006.9.5

[71] 申请人 塞尔卓姆股份公司

地址 德国海德堡

[72] 发明人 C·霍普 G·德维斯

H·鲁夫尼尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 陈轶兰

权利要求书 2 页 说明书 46 页 附图 5 页

[54] 发明名称

使用 GPR49 治疗神经变性疾病

[57] 摘要

本发明涉及 GPR49 - 相互作用分子在制备用于治疗神经变性疾病的药物组合物中的应用。在此 GPR49 - 相互作用分子优选地是 GPR49 的抑制剂,尤其是,它具有调控 γ - 分泌酶和/或 β - 分泌酶的活性的能力。而且,本发明涉及鉴别 γ - 分泌酶和/或 β - 分泌酶调控剂的方法,其包括下述步骤: a) 通过检测给定的实验化合物是否是 GPR49 - 相互作用分子,鉴别 GPR49 - 相互作用分子; b) 确定步骤 a) 的 GPR49 - 相互作用分子是否能调控 γ - 分泌酶和/或 β - 分泌酶活性。

1. GPR49-相互作用分子在制备用于治疗神经变性疾病的药物组合物中的应用。

2. 权利要求 1 的应用，其中所述 GPR49-相互作用分子是 GPR49-抑制剂。

3. 权利要求 2 的应用，其中所述抑制剂选自抗体，反义寡核苷酸，siRNA，低分子量分子(LMW)，结合肽，适体，核酶和肽模拟物。

4. 权利要求 1-3 中的任一项的应用，其中 GPR49 是胞内蛋白复合物的一部分。

5. 权利要求 1-4 中的任一项的应用，其中所述相互作用分子或抑制剂调控 γ -分泌酶和/或 β -分泌酶的活性。

6. 权利要求 1-5 中的任一项的应用，其中所述神经变性疾病是阿尔茨海默氏病。

7. 鉴别 γ -分泌酶和/或 β -分泌酶调控剂的方法，其包括下述步骤：

a. 通过检测给定的实验化合物是否是 GPR49-相互作用分子，鉴别 GPR49-相互作用分子，

b. 确定步骤 a) 的 GPR49-相互作用分子是否能调控 γ -分泌酶和/或 β -分泌酶活性。

8. 权利要求 7 的方法，其中在步骤 a) 中，使实验化合物与 GPR49 接触，并检测 GPR49 与实验化合物的相互作用。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述实验化合物与 GPR49 的相互作用导致对 GPR49 活性的抑制。

10. 权利要求 7-9 中的任一项的方法，其中在步骤 b) 中，测量 γ -分泌酶和/或 β -分泌酶剪切 APP 的能力，优选地，其中测量生成 AB 42 的能力。

11. 制备用于治疗神经变性疾病的药物组合物的方法，其包括下述步骤：

a. 根据权利要求 7-10，鉴别 γ -分泌酶和/或 β -分泌酶调控剂，

和

b. 将所述 γ -分泌酶和/或 β -分泌酶调控剂配制成药物组合物。

12. 权利要求 11 的方法, 还包括混合鉴别的分子和药学上可接受的载体的步骤。

13. 药物组合物, 其包含权利要求 1-5 任一项中所定义的 GPR49-抑制剂。

14. 可通过根据权利要求 11 或 12 中的任一项的方法得到的药物组合物。

15. 根据权利要求 13 或 14 中的任一项的药物组合物, 用于治疗神经变性疾病例如阿尔茨海默氏病和有关的神经变性障碍。

16. 治疗或预防神经变性疾病、优选阿尔茨海默氏病的方法, 向需要这样的治疗或预防的对象施用治疗有效量的权利要求 13- 15 中的任一项的药物组合物。

17. GPR49-相互作用分子在体外调控 β -分泌酶和/或 γ -分泌酶活性的应用。

使用 GPR49 治疗神经变性疾病

本发明涉及包含 GPR49 蛋白的 APP-加工途径的蛋白复合物,和这些复合物以及 GPR49 的抑制剂在治疗神经变性疾病中的应用。

阿尔茨海默氏病是一种慢性病,其在全世界影响数百万人。

阿尔茨海默氏病患者的脑表现出显著的神经病理性损害的特征病理学,例如最初细胞内的神经原纤维缠结(NFT),和细胞外的富含淀粉样蛋白的老年斑。这些损害伴有 CNS 神经元群的大量丧失,且它们的进展伴随与 AD 有关的临床痴呆。淀粉样蛋白斑的主要组分是不同长度的淀粉样蛋白 β (A- β , Abeta 或 A β) 肽。其一种变体——A β 1-42-肽(A β -42),是淀粉样蛋白形成的主要成因剂。另一种变体是 A β 1-40-肽(A β -40)。淀粉样蛋白 β 是前体蛋白—— β 淀粉样蛋白前体蛋白(β -APP 或 APP)的蛋白水解产物。APP 是 I 型跨膜蛋白,其被几种不同的膜相关蛋白酶依次剪切。APP 的第一次剪切由 2 种蛋白酶 α -分泌酶或 β -分泌酶之一进行。 α -分泌酶是一种金属蛋白酶,其活性最可能是由蛋白 ADAM-10 和 ADAM-17 中的一种或其组合提供。 α -分泌酶的剪切会妨碍淀粉样蛋白肽的形成,因而称作不产生淀粉样蛋白性的。相反地, β -分泌酶对 APP 的剪切,是随后形成淀粉样蛋白肽的前提。该分泌酶也称作 BACE1 (β -位点 APP-剪切酶),是含有天冬氨酸蛋白酶活性的 I 型跨膜蛋白(下面详细描述)。

β -分泌酶 (BACE) 活性剪切 APP 的外功能区,导致分泌的可溶 APP_b 的脱落,和 99 个残基的 C-末端跨膜片段 (APP-C99)。Vassar 等 (Science 286, 735-741) 克隆了跨膜天冬氨酸蛋白酶,其具有 APP 的假定的 β -分泌酶的特征,他们将其称作 BACE1。来自 BACE1 敲除的小鼠的脑和原代皮层培养物没有表现出可检测的 β -分泌酶活性,而来自 BACE 敲除的小鼠的原代皮层培养物产生少得多的来自 APP 的淀粉样蛋白- β 。这表明, BACE1, 而不是它的平行进化同源物 BACE2, 是 APP 的

主要 β -分泌酶。BACE1 是 501 个氨基酸(aa) 的蛋白, 其含有 21 个 aa 的信号肽, 随后是跨越 aa 22- 45 的原序列域。存在可选择地剪切的形式, BACE-I-457 和 BACE-I-476。成熟蛋白的胞外域后是一个预测的跨膜域和 24 个 aa 的短胞质 C-末端尾。预测 BACE1 是 1 型跨膜蛋白, 其活性位点在膜的胞外侧, β -分泌酶在那里剪切 APP 和可能的其它尚未鉴定的底物。尽管 BACE1 显然是将 APP 加工成 A- β 所需的关键酶, 近期的证据暗示 BACE1 的另外的潜在底物和功能 (J. Biol. Chem. 279, 10542-10550)。迄今为止, 尚未描述具有调节或调控功能的 BACE1 相互作用蛋白。

BACE1 剪切产生的 APP 片段, APP-C99, 是 γ -分泌酶活性的底物, 该酶能将膜平面内的 APP-C99 剪切成 A- β 肽 (例如生成淀粉样蛋白性的 A β 1-42 肽), 和称作 APP 胞内域(AICD)的 C-末端片段 (Annu Rev Cell Dev Biol 19, 25-51)。 γ -分泌酶活性存在于具有至少 4 个不同的亚基的多蛋白复合物中。发现的第一个亚基是早老素 (Proc Natl Acad Sci USA 94, 8208-13)。 γ -分泌酶复合物的其它已知的蛋白组分是 Pen-2, Nicastrin 和 Aph-1a。

尽管在阐述作为阿尔茨海默氏病的病因学基础的分子事件方面的最近进展, 到目前为止还没有开发出病性改善疗法。为此, 业界已经努力鉴别合适的用于抑制 BACE1 的先导化合物。此外, 已经认识到, 存在增多数目的 γ -分泌酶的替代底物, 最显著的是 Notch 蛋白。结果, 对 γ -分泌酶的抑制可能会造成基于机理的副作用。现有的顶级药物 (例如 Aricept®/多奈哌齐) 尝试通过抑制乙酰胆碱酯酶, 这会导致脑中神经递质乙酰胆碱水平的增加, 达到认知功能的暂时改善。这些疗法不适用于疾病的晚期阶段, 它们不能治疗潜在的疾病病理状况, 且它们不能停止疾病进展。

因而, 存在未满足的需要, 即鉴别允许新的治疗阿尔茨海默氏病的分子策略的新靶物。另外, 强烈需要新的治疗化合物, 其能通过靶向所述的新靶物, 修饰改变前述的分子过程。

在第一个方面, 本发明提供了“GPR49 相互作用分子”在制备用于

治疗神经变性疾病的药物组合物中的应用。

在本发明的上下文中，已经意外地发现，GPR49（也称作含有富亮氨酸重复的 G 蛋白-偶联的受体 5 (LGR5)；FEX HG38, GPR67) 形成不同的蛋白复合物的一部分，所述复合物参与阿尔茨海默氏病中 γ -分泌酶对 APP 的异常加工。特别地，已经发现 GPR49 是 Aph1a-复合物、Fe65L2-复合物、APP-C99-复合物和 BACE1-复合物的一部分。这些复合物按照它们各自用作 TAP 技术进入点(见下面)的关键蛋白化合物命名。

将 GPR49 鉴别为这些复合物中的关键分子，使得能使用与 GPR49 相互作用的分子治疗神经变性疾病。这特别地在实施例中显示，其中证实了针对 GPR49 的 siRNA 导致 AB-42 的产生和/或分泌的减弱。

在本发明的上下文中，“GPR49 相互作用分子”是至少暂时与 GPR49 结合的分子，且其优选地调控和特别是抑制 GPR49 活性。

GPR49 是糖蛋白激素受体超家族的推定成员，所述家族是不常见的 G-蛋白-偶联的受体 (GPCR)，其特征在于含有富亮氨酸的重复序列的大 N-末端外功能区，在有些情况下，已经显示所述重复序列对与糖蛋白配体的相互作用是重要的。对超家族成员的种系发生分析提示，它分成 3 个亚家族：第一个是 LH, FSH (促卵泡激素) 和 TSH (促甲状腺激素) 的受体；第二个包含松弛素受体 LGR7 和 LGR8。GPR49/LGR5 和 LGR4 及 LGR6 (图 4) 一起构成孤儿受体亚家族，其显示出与 FSH 受体仅仅 ~ 35% 序列同一性 (Hsu SY, Liang SG, Hsueh AJ (1998) Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region. Mol Endocrinol. 12(12):1830-45; McDonald T, Wang R, Bailey W, Xie G, Chen F, Caskey CT, Liu Q (1998) Identification and cloning of an orphan G protein-coupled receptor of the glycoprotein hormone receptor subfamily. Biochem Biophys Res Commun. 247(2): 266-70)。

GPR49 在骨骼肌、胎盘和脊髓中显著表达, 在结肠、肾上腺和脑各亚区中较低水平地表达(Hsu SY 等(1998), 同上)。在成年小鼠脑中, GPR49 转录物主要限于嗅球, 其中它们出现在神经元细胞层 (Hermeij G, Methner A, Schaller HC, Hermans-Borgmeyer I (1999) Identification of a novel seven-transmembrane receptor with homology to glycoprotein receptors and its expression in the adult and developing mouse. *Biochem Biophys Res Commun.* 254(1): 273-9)。没有很好地表征 GPR49 在成年小鼠中的功能。靶向删除小鼠中的 GPR49 基因, 导致新生致死现象, 且与舌系带过短和胃肠膨胀有关 (Morita H, Mazerbourg S, Bouley DM, Luo CW, Kawamura K, Kuwabara Y, Baribault H, Tian H, Hsueh AJ (2004) Neonatal lethality of LGR5 null mice is associated with ankyloglossia and gastrointestinal distension. *Mol Cell Biol.* 24(22): 9736-43)。

近来, 已经将 GPR49 鉴别为在具有 β -连环蛋白突变的人肝细胞癌中过表达的基因 (Yamamoto Y, Sakamoto M, Fujii G, Tsuiji H, Kenetaka K, Asaka M, Hirohashi S (2003) Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with beta-catenin mutations. *Hepatology.* 37(3): 528-33)。

根据本发明, 表述“GPR49”不仅仅指如图 3 中所示的蛋白, 而且还指其功能活性衍生物, 或其功能活性片段, 或其同源物, 或由在低严格性条件下与编码所述蛋白的核酸杂交的核酸编码的变体。优选地, 这些低严格性条件包括, 在含有 35%甲酰胺, 5X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA, 0.02% PVP, 0.02% BSA, 100 ug/ml 变性鲑精 DNA 和 10% (重量/体积) 硫酸葡聚糖的缓冲液中, 在 40°C 杂交 18-20 小时, 在由 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA 和 0.1% SDS 组成的缓冲液中, 在 55°C 洗涤 1-5 小时, 和在由 2X SSC, 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) 5 mM EDTA 和 0.1% SDS 组成的缓冲液中, 在 60°C

洗涤 1.5 小时。

这也同样适用于本发明中提及的所有其它蛋白。因此，给定蛋白或核酸的名称不仅仅指序列表中所指示的该蛋白或核酸，而且还指它的功能活性衍生物，或其功能活性片段，或其同源物，或由在低严格性条件下，优选地在如上所述的条件下，与编码所述蛋白的核酸杂交的核酸编码的变体。

如本文使用的术语“功能活性的”指多肽，即片段或衍生物，其具有根据该多肽即片段或衍生物所涉及的实施方案的蛋白的结构、调节的、或生化的功能。

根据本发明，如本文使用的术语“活性”指最广义的分子功能。它通常包括但不限于，分子的生物的、生化的、物理的或化学的功能。它包括例如酶活性，与其它分子相互作用的能力和活化、促进、稳定、抑制、阻遏或去稳定其它分子的功能的能力，稳定性，定位到某些亚细胞位置的能力。在适用时，所述术语也涉及最广义的蛋白复合物的功能。

根据本发明，如本文使用的术语“组分蛋白的衍生物”或“类似物”或“变体”优选地包括，但不限于，包含与组分蛋白基本上同源的区域的分子，在不同的实施方案中，相同大小的氨基酸序列，或当与比对序列相对比时（其中通过本领域已知的计算机源性程序进行比对），具有至少 30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，95%或 99%同一性；或其编码核酸能在严格的、中等严格的或非严格的条件下与编码组分蛋白的序列杂交。它指蛋白，其是分别通过氨基酸置换、删除和添加而修饰天然存在的蛋白的结果，该衍生物仍然表现出天然存在的蛋白的生物功能，尽管不一定是相同的程度。通过例如如本发明中提供的合适的可利用的体外测定，可以检查这样的蛋白的生物功能。

如本文使用的术语“片段”指根据实施方案的组分蛋白的至少 10，20，30，40 或 50 个氨基酸的多肽。在具体的实施方案中，这样的片段不超过 35，100 或 200 个氨基酸。

如本文使用的术语“基因”指核酸，其包含编码本发明的（如果

没有另作说明)多肽的开放读码框,包括外显子和任选存在的内含子序列。

如本文使用的术语"同源物"或"同源基因产物"指另一个物种、优选哺乳动物中的蛋白,其能执行与本文进一步描述的复合物的蛋白组分相同的生物功能。这样的同源物也称作"正向同源基因产物"。用于检测来自人和哺乳动物或其它物种的正向同源基因对的算法,使用这些生物整个基因组。首先,使用预测蛋白的完全 Smith-Waterman 比对,寻找最佳配对样。为了进一步提高可靠性,将这些对与包含果蝇和美丽线虫蛋白的最佳配对样串在一起。这样的分析记载在例如 Nature, 2001, 409:860-921。基于编码本文提供的蛋白的基因和其它物种的基因的序列同源性,通过采用常规技术克隆各基因,并从这样的基因表达蛋白,或根据本文提供的方法或本领域普遍知道的其它合适的方法,通过分离类似的复合物分离其它物种的蛋白,可以分离根据本发明的蛋白的同源物。

在本发明的一个优选的实施方案中,"GPR49-相互作用分子"是 GPR49-抑制剂。

根据本发明,术语"抑制剂"指生化的或化学的化合物,其优选地能抑制或减少 GPR49 的活性。这可以通过例如阻遏对应的基因的表达来实现。通过 RT-PCR 或蛋白印迹分析,可以测量基因的表达。此外,这可以通过对活性的抑制来实现,例如通过结合 GPR49。

这样的 GPR49-抑制剂的实例是针对 GPR49 尤其是针对 GPR49 的活性部位的结合蛋白或结合肽,和针对 GPR49 基因的核酸。

术语"针对 GPR49 的核酸"指双链或单链 DNA 或 RNA,或其修饰或衍生物,例如,其能抑制 GPR49 基因的表达或 GPR49 的活性,且包括但不限于反义核酸,适体, siRNA (小干扰 RNA)和核酶。

优选地,抑制剂选自抗体,反义寡核苷酸, siRNA, 低分子量分子 (LMW), 结合肽, 适体, 核酶和肽模拟物。

可以将这些核酸直接施用给细胞,或可以通过外源的导入序列的转录,在细胞内生产。

如本文使用的"反义"核酸指,由于一些序列互补性,能与组分蛋白 RNA (优选地 mRNA) 的序列-特异性部分杂交的核酸。反义核酸可以与组分蛋白 mRNA 的编码和/或非编码区互补。这样的能抑制复合物形成或活性的反义核酸,可以用作治疗剂,且可以用于治疗或预防本文所述的疾病。

反义核酸是至少 6 个核苷酸,且优选地是具有 6-约 200 个核苷酸的寡核苷酸。在特定的方面,寡核苷酸是至少 10 个核苷酸,至少 15 个核苷酸,至少 100 个核苷酸,或至少 200 个核苷酸。

可以化学合成核酸,例如反义核酸或 siRNA,例如根据磷酸三酯法(见,例如, Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543-584)。适体是能高亲和力地结合多肽(这里是 GPR49)的核酸。通过选择方法例如 SELEX (见例如 Jayasena (1999) Clin. Chem., 45, 1628-50; Klug 和 Famulok (1994) M. Mol. Biol. Rep., 20, 97-107; US 5,582,981), 可以从大量不同的单链 RNA 分子中分离出适体。也可以合成适体,并选择它们的镜像形式,例如作为 L-核糖核苷酸 (Nolte 等(1996) Nat. Biotechnol., 14, 1116-9; Klussmann 等(1996) Nat. Biotechnol., 14, 1112-5)。已经按照该方式分离的形式具有下述优点,即它们不会被天然存在的核糖核酸酶降解,且因此具有更大的稳定性。

核酸可以被核酸内切酶或核酸外切酶降解,尤其是被可在细胞中发现的 DNA 酶和 RNA 酶降解。因此,为了稳定它们免受降解,从而确保在细胞中长时间维持高浓度的核酸,修饰核酸是有利的(Beigelman 等 (1995) Nucleic Acids Res. 23:3989-94; WO 95/11910; WO 98/37240; WO 97/29116)。典型地,通过导入一个或多个核苷酸间磷基或通过导入一个或多个非-磷的间核苷酸(internucleotide),可以得到这样的稳定作用。

合适的修饰的间核苷酸记载在 Uhlmann 和 Peyman (1990), 同上(也见 Beigelman 等(1995) Nucleic Acids Res. 23:3989-94; WO 95/11910; WO 98/37240; WO 97/29116)。可以在根据本发明的应用

之一中使用的核酸中的修饰的核苷酸间磷酸基团和/或非-磷桥含有, 例如, 甲基磷酸酯, 磷硫酰, 氨基磷酸酯, 二硫代磷酸酯和/或磷酸酯, 而非-磷间核苷酸类似物含有, 例如, 硅氧烷桥, 碳酸酯桥, 羧甲基酯, acetamidate 桥和/或硫醚桥。还意图该修饰应当能提高可以在根据本发明的应用之一中使用的药物组合物的耐久性。通常, 可以在碱基部分、糖部分或磷酸主链上修饰寡核苷酸。

寡核苷酸可以包含其它的附加基团例如肽, 能促进跨细胞膜 (见, 例如, Letsinger 等, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556; Lemaitre 等, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652; 国际专利公开号 WO 88/09810) 或血-脑屏障 (见, 例如, 国际专利公开号 WO 89/10134) 转运的试剂, 杂交-触发的剪切试剂 (见, 例如, Krol 等, 1988, BioTechniques 6: 958-976), 或嵌入剂 (见, 例如, Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549)。

具体而言, 反义寡核苷酸可以包含至少一个修饰的碱基部分, 其选自包括但不限于以下的组: 5-氟尿嘧啶, 5-溴尿嘧啶, 5-氯尿嘧啶, 5-碘尿嘧啶, 次黄嘌呤, 黄嘌呤, 4-乙酰胞嘧啶, 5-(羧羟基甲基)尿嘧啶, 5-羧甲基氨甲基-2-硫代-尿嘧啶核甙, 5-羧甲基氨甲基尿嘧啶, 二氢尿嘧啶, D-半乳糖基 queosine, 肌苷, N6-异戊烯腺嘌呤, 1-甲基鸟嘌呤, 1-甲基肌苷, 2,2-二甲基鸟嘌呤, 2-甲基腺嘌呤, 2-甲基鸟嘌呤, 3-甲基胞嘧啶, 5-甲基胞嘧啶, N6-腺嘌呤, 7-甲基鸟嘌呤, 5-甲基氨甲基尿嘧啶, 5-甲氧基氨甲基-2-硫代尿嘧啶, D-mannosylqueosine, 5N-甲氧基羧甲基尿嘧啶, 5-甲氧基尿嘧啶, 2-甲基-硫代-N6-异戊烯腺嘌呤, 尿嘧啶-5-氧醋酸(v), wybutoxosine, 假尿嘧啶, queosine, 2-硫胞嘧啶, 5-甲基-2-硫尿嘧啶, 2-硫尿嘧啶, 4-硫尿嘧啶, 5-甲基尿嘧啶, 尿嘧啶-5-氧醋酸甲基酯, 尿嘧啶-5-氧醋酸(v), 5-甲基-2-硫尿嘧啶, 3-(3-氨基-3-N-2-羧丙基)尿嘧啶, (acp3)w, 和 2,6-二氨基嘌呤。

在另一个实施方案中, 寡核苷酸包含至少一个修饰的糖部分, 其选自包括但不限于以下的组: 阿拉伯糖, 2-氟阿拉伯糖, 木酮糖, 和己

糖。

合适的反义核酸的应用，还记载在例如 Zheng 和 Kemeny (1995) Clin. Exp. Immunol., 100, 380-2; Nellen 和 Lichtenstein (1993) Trends Biochem. Sci., 18, 419-23, Stein (1992) Leukemia, 6, 697-74 或 Yacyshyn, B. R. 等 (1998) Gastroenterology, 114, 1142)。

在另一个实施方案中，寡核苷酸是 2- α -异头寡核苷酸。 α -异头寡核苷酸 (2- α -异头的或 α -异头的) 与互补的 RNA 形成特异性双链杂交体，其中与常见的 β -单位不同，链彼此平行地排列 (Gautier 等, 1987, Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641)。

寡核苷酸可以缀合到另一个分子上，例如，肽，杂交-触发的交联剂，转运剂，杂交-触发的剪切剂，等。

在本发明中，通过本领域已知的标准方法，例如，通过使用自动化的 DNA 合成仪 (例如商业上购自 Biosearch, Applied Biosystems, etc.)，可以合成本发明的寡核苷酸。作为实例，通过 Stein 等 (1988, Nucl. Acids Res. 16: 3209) 的方法，可以合成磷硫酰寡核苷酸，通过使用可控多孔玻璃聚合物支持物 (Sarin 等, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7448-7451) 等，可以制备出甲基膦酸酯寡核苷酸。

在一个具体的实施方案中，反义寡核苷酸包含催化性 RNA，或核酶 (见，例如，国际专利公开号 WO 90/11364; Sarver 等, 1990, Science 247: 1222-1225)。在另一个实施方案中，寡核苷酸是 2'-O-甲基核糖核苷酸 (Inoue 等, 1987, Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148)，或嵌合的 RNA-DNA 类似物 (Inoue 等, 1987, FEBS Lett. 215: 327-330)。

在一个替代实施方案中，通过外源序列的转录，细胞内地生产本发明的反义核酸。例如，可以在体内导入载体，以便它被细胞摄入，该载体或其一部分在该细胞中转录，生成本发明的反义核酸 (RNA)。这样的载体将含有编码组分蛋白的序列。这样的载体可以保持为附加体，或变成染色体整合的，只要它可以被转录，生成需要的反义 RNA。通过本领域标准的重组 DNA 技术方法，可以构建这样的载体。载体可以是质粒，病毒载体，或本领域已知能在哺乳动物细胞中复制和表达的

其它载体。编码反义 RNA 的序列的表达, 可以通过本领域已知能在哺乳动物、优选人细胞中起作用的任何启动子。这样的启动子可以是诱导型或组成型的。这样的启动子包括, 但不限于, SV40 早期启动子区 (Bernoist 和 Chambon, 1981, Nature 290: 304-310), 包含在劳斯肉瘤病毒的 3' 长末端重复中的启动子 (Yamamoto 等, 1980, Cell 22: 787-797), 疱疹胸苷激酶启动子 (Wagner 等, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1441-1445), 金属硫蛋白基因的调节序列 (Brinster 等, 1982, Nature 296: 39-42) 等。

本发明的反义核酸包含与组分蛋白基因、优选人基因的 RNA 转录物的至少一部分互补的序列。但是, 不要求绝对的互补性, 尽管这是优选的。如本文提及的, “与 RNA 的至少一部分互补的” 序列指, 具有足够的互补性能与 RNA 杂交、形成稳定的双链体的序列; 在双链反义核酸的情况下, 因而可以测试双链体 DNA 的一条链, 或可以测定三链体形成。杂交能力依赖于互补性的程度和反义核酸的长度。通常, 杂交核酸越长, 可以含有越多的与组分蛋白 RNA 的碱基错配而仍然形成稳定的双链体 (或三链体, 依具体情况而定)。使用确定杂交的复合体的解链温度的标准方法, 本领域的技术人员可以确定可容忍的错配度。

作为在下调或关闭基因表达 (这里指 GPR49 基因表达) 的过程中 RNA 干扰的工具的 siRNA 的生产和应用, 记载在例如 Elbashir, S. M. 等 (2001) Genes Dev., 15, 188 或 Elbashir, S. M. 等 (2001) Nature, 411, 494。优选地, siRNA 具有小于 30 个核苷酸的长度, 其中 siRNA 的有义链的同一性片段优选地是至少 19 个核苷酸。

核酶也是合适的抑制核酸 (这里是 GPR49 基因) 的翻译的工具, 因为它们能特异性地结合和切割 mRNA。它们记载在例如 Amarzguoui 等 (1998) Cell. Mol. Life Sci., 54, 1175-202; Vaish 等 (1998) Nucleic Acids Res., 26, 5237-42; Persidis (1997) Nat. Biotechnol., 15, 921-2 或 Couture 和 Stinchcomb (1996) Trends Genet., 12, 510-5。

可以给患者施用本发明的药物组合物，其包含在药学上可接受的载体中的有效量的核酸，所述患者患有疾病或障碍，所述疾病或障碍属于表达或过表达本发明的蛋白复合物的类型。

将有效地治疗特定障碍或状况的核酸的量，取决于该障碍或状况的性质，且可以通过标准的临床技术来确定。当可能时，需要体外检测核酸细胞毒性，然后在可用的动物模型系统中，再在人中测试和使用。

在一个具体的实施方案中，通过脂质体、微粒、或微胶囊，施用包含核酸的药物组合物。在本发明的不同实施方案中，可以有用地使用这样的组合物实现核酸的持续释放。在一个具体的实施方案中，可能需要使用脂质体，其通过抗体靶向特定可识别的中枢神经系统细胞类型 (Leonetti 等, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 2448-2451; Renneisen 等, 1990, *J. Biol. Chem.* 265: 16337-16342)。

所谓的“低分子量分子” (以后称作“LMW”) 是非蛋白、肽、抗体或核酸的分子，其表现出小于 5000 Da、优选地小于 2000 Da、更优选地小于 1000 Da、最优选地小于 500 Da 的分子量。可以通过高通量方法从文库开始鉴别出这样的 LMW。这样的方法是本领域已知的，且在下面详细讨论。

术语“结合蛋白”或“结合肽”指一类蛋白或肽，其能结合和抑制 GPR49，包括但不限于，针对 GPR49 的多克隆或单克隆抗体、抗体片段和蛋白支架。

根据本发明，术语抗体或抗体片段也应当理解为指抗体或其抗原-结合部分，其已经被重组地制备，当适当时被修饰，例如嵌合抗体，人源化抗体，多功能抗体，双特异性的或寡特异性的抗体，单链抗体和 F(ab) 或 F(ab)₂ 片段 (见，例如，EP-B1-0 368 684, US 4, 816, 567, US 4, 816, 397, WO 88/01649, WO 93/06213 或 WO 98/24884)，优选地在 FAB 表达文库的辅助下生产。

作为经典抗体的替代物，也可能例如使用针对 GPR49 的蛋白支架，例如 anticalin，其基于 lipocalin (Beste 等 (1999) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA, 96, 1898-1903)。可以改变 lipocalin (例如视黄醇-结合蛋白或后胆色素-结合蛋白)的天然配体-结合位点,例如通过“组合蛋白设计”方案,以这样的方式使它们结合选定的半抗原,这里指 GPR49 (Skerra, 2000, Biochim. Biophys. Acta, 1482, 337-50)。其它已知的蛋白支架是已知用于分子识别的抗体替代物 (Skerra (2000) J. Mol. Recognit., 13, 167-187)。

根据熟练的技术人员众所周知的方法,例如通过用 GPR49 免疫哺乳动物例如兔子,当适当时在例如弗氏佐剂和/或氢氧化铝凝胶存在下,可以实现制备抗体或抗体片段的操作(见,例如, Diamond, B. A. 等 (1981) The New England Journal of Medicine: 1344-1349)。随后,可以使用众所周知的方法,从血液中分离多克隆抗体,其作为免疫反应的结果在动物中形成,并例如通过柱色谱纯化。例如根据已知的 Winter & Milstein 的方法 (Winter, G. & Milstein, C. (1991) Nature, 349, 293-299),可以制备单克隆抗体。

更具体地,通过使用作为免疫原的多肽免疫合适的对象,可以如上所述制备多克隆抗体。优选的多克隆抗体组合物是,已经选择针对本发明的一种或多种多肽的抗体的那些。特别优选的多克隆抗体制品是,仅仅含有针对给定的一种或多种多肽的抗体的那些。特别优选的免疫原组合物是,不含有其它人蛋白的那些,例如,使用非-人宿主细胞重组表达本发明的多肽制备的免疫原组合物。以这样的方式,由得到的针对该免疫原的抗体组合物识别的唯一人表位,会作为本发明的一种或多种多肽的一部分存在。

通过标准的技术,例如用使用固定化的多肽的酶联免疫吸附测定 (ELISA),可以随时间监测经免疫的对象中的抗体滴度。如果需要,可以从哺乳动物 (例如,从血液)分离抗体分子,并进一步通过众所周知的方法例如蛋白 A 色谱进行纯化,得到 IgG 级分。或者,通过例如亲和色谱,可以选择(例如,部分地纯化)或纯化对本发明的蛋白或多肽特异性的抗体。例如,如本文所述生产重组地表达和纯化(或部分地纯化)的本发明的蛋白,且共价地或非-共价地偶联到固体支持物例如色

谱柱上。然后，可以用该柱，从含有针对大量不同表位的抗体的样品中，亲和纯化对本发明的蛋白特异性的抗体，从而产生基本上纯化的抗体组合物，即基本上不含有污染抗体的抗体组合物。在该上下文中，基本上纯化的抗体组合物指，抗体样品至多含有仅仅 30% (按干重计) 污染抗体，其针对本发明目的蛋白或多肽上的表位以外的表位，优选地样品中至多 20%，更优选地至多 10%，最优选地至多 5% (按干重计) 是污染抗体。纯化的抗体组合物指，组合物中的至少 99% 抗体针对本发明的目的蛋白或多肽。

在免疫后适当的时间，例如，当特异性抗体滴度最高时，可以从对象得到产生抗体的细胞，并通过标准的技术，例如 Kohler 和 Milstein, 1975, *Nature* 256:495-497 最初描述的杂交瘤技术，人 B 细胞杂交瘤技术 (Kozbor 等, 1983, *Immunol. Today* 4:72), EBV-杂交瘤技术 (Cole 等, 1985, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 页) 或三源杂交瘤技术，用于制备单克隆抗体。生产杂交瘤的技术是众所周知的 (通常见 *Current Protocols in Immunology* 1994, Coligan 等 (编) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY)。通过筛选杂交瘤培养物上清液中能结合目标多肽的抗体，例如，使用标准的 ELISA 测定，可以检测能生产本发明的单克隆抗体的杂交瘤细胞。

作为制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的替代方案，通过用目标多肽筛选重组组合免疫球蛋白文库 (例如，抗体噬菌体展示文库)，可以鉴别和分离针对本发明的多肽的单克隆抗体。用于产生和筛选噬菌体展示文库的试剂盒可以在市场上得到 (例如，Pharmacia 重组噬菌体抗体系统，目录号 27-9400-01；和 Stratagene SurfZAP 噬菌体展示试剂盒，目录号 240612)。另外，特别适用于产生和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例可见于例如美国专利号 5,223,409；PCT 公开号 WO 92/18619；PCT 公开号 WO 91/17271；PCT 公开号 WO 92/20791；PCT 公开号 WO 92/15679；PCT 公开号 WO 93/01288；PCT 公开号 WO 92/01047；PCT 公开号 WO 92/09690；PCT 公开号 WO 90/02809；Fuchs 等, 1991,

Bio/Technology 9:1370-1372; Hay 等, 1992, Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse 等, 1989, Science 246:1275-1281; Griffiths 等, 1993, EMBO J. 12:725-734.

另外, 重组抗体, 例如嵌合的和人源化的单克隆抗体, 其包含人和非-人部分, 可以使用标准的重组 DNA 技术生产, 它们在本发明的范围内。嵌合抗体是一种分子, 其中不同的部分源自不同的动物物种, 例如具有源自鼠 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些 (见, 例如, Cabilly 等, 美国专利号 4,816,567; 和 Boss 等, 美国专利号 4,816,397, 它们都在本文中整体引作参考)。人源化抗体是来自非-人物种的抗体分子, 其具有一个或多个来自非-人物种的互补决定区 (CDR) 和来自人免疫球蛋白分子的框架区 (见, 例如, Queen, 美国专利号 5,585,089, 其在本文中整体引作参考)。通过本领域已知的重组 DNA 技术, 例如使用 PCT 公开号 WO 87/02671; 欧洲专利申请 184,187; 欧洲专利申请 171,496; 欧洲专利申请 173,494; PCT 公开号 WO 86/01533; 美国专利号 4,816,567; 欧洲专利申请 125,023; Better 等, 1988, Science 240:1041-1043; Liu 等, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu 等, 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun 等, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura 等, 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood 等, 1985, Nature 314:446-449; 和 Shaw 等, 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559); Morrison, 1985, Science 229:1202-1207; Oi 等, 1986, Bio/Techniques 4:214; 美国专利 5,225,539; Jones 等, 1986, Nature 321:552-525; Verhoeyan 等, 1988, Science 239:1534; 和 Beidler 等, 1988, J. Immunol. 141:4053-4060 所述的方法, 可以生产这样的嵌合和人源化单克隆抗体。

治疗性处理人患者, 特别需要完全人的抗体。可以生产这样的抗体, 例如, 使用转基因小鼠, 其不能表达内源免疫球蛋白重链和轻链基因, 但是其可以表达人重链和轻链基因。用选择的抗原, 例如, 本发明的多肽的全部或一部分, 以正常的方式免疫该转基因小鼠。使用

常规的杂交瘤技术，可以得到针对抗原的单克隆抗体。在 B 细胞分化过程中，转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因进行重排，并随后经历类转换和体细胞突变。因而，使用这样的技术，可能生产治疗上有用的 IgG, IgA 和 IgE 抗体。关于生产人抗体的该技术的概述，见 Lonberg 和 Huszar, 1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93)。关于生产人抗体和人单克隆抗体的该技术和生产这样的抗体的方案的详细讨论，见，例如，美国专利 5,625,126；美国专利 5,633,425；美国专利 5,569,825；美国专利 5,661,016；和美国专利 5,545,806。另外，Abgenix, Inc. (Freemont, CA) 等公司可从事使用类似于上述的技术提供针对选择的抗原的人抗体。

使用称作“引导选择”的技术，可以产生能识别选择的表位的完全人抗体。在该方案中，使用选择的非-人单克隆抗体，例如鼠抗体，引导选择能识别该表位的完全人抗体 (Jespers 等, 1994, *Bio/technology* 12: 899-903)。

通过本领域已知的技术，可以产生含有复合物的独特型的抗体片段。例如，这样的片段包括，但不限于，F(ab')₂ 片段，其可以通过对抗体分子的胃蛋白酶消化来生产；Fab' 片段，其可以通过还原 F(ab')₂ 片段的二硫键来产生；Fab 片段，其可以通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子来产生；和 Fv 片段。

在抗体的生产中，通过本领域已知的技术，例如，ELISA (酶联免疫吸附测定)，可以筛选需要的抗体。为了选择对复合物的特定结构域或其衍生物特异性的抗体，可以测定产生的杂交瘤中能结合含有这样的结构域的复合物片段或其衍生物的产物。为了选择能特异性地结合本发明的复合物或其衍生物或同源物、但是不特异性地结合复合物的各蛋白或其衍生物或同源物的抗体，可以在与复合物阳性结合和缺乏与各蛋白组分结合的基础上选择。

在与给定的一种或多种蛋白的定位和/或定量有关的领域已知的方法中，例如，用于将这些蛋白成像，测量其在适当的生理学样品中的水平 (通过免疫测定)，在诊断方法中等，可以使用前述抗体。这也

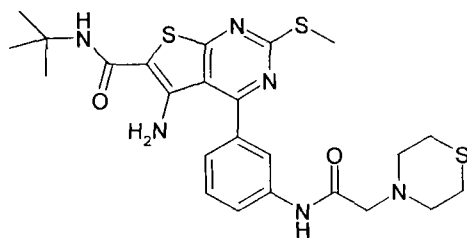
适用于复合物的衍生物或其同源物。

在一个优选的实施方案中，GPR49-抑制剂是具有下述序列的 siRNA:

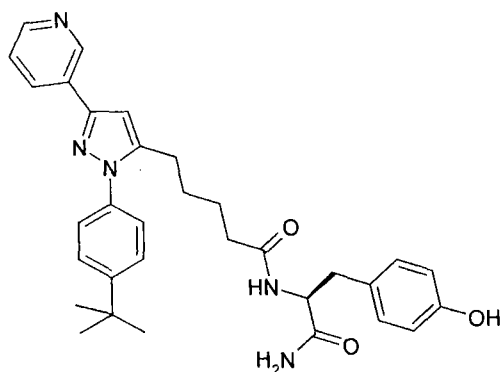
AACAGCAGTATGGACGACCTT

GPR49 表现出与 LH (促黄体生成激素), 松弛素, IGF, FSH (促卵泡激素), 和 TSH 的受体的相似性。因此, LH, 松弛素, IGF, FSH, 和 TSH 可以是 GPR49 的生理配体。此外, 在以下文献中鉴别为 LH 和 FSH 受体激动剂的噻吩并[2,3-d]嘧啶可以是 GPR49 的激动剂,

在 WO-03 020 726 中,



在 WO-00 187 287 中,



如上所述, GPR49 是参与调节 γ 分泌酶活性和/或 β -分泌酶的蛋白复合物的一部分。因此, 在一个优选的实施方案中, GPR49 相互作用分子或抑制剂作用于 GPR49 分子, 后者是蛋白复合物的一部分, 优选地是 Aph1a-复合物、Fe65L2-复合物、APP-C99-复合物或 BACE1-复合物的一部分。

已经将所述蛋白复合物鉴别为与 γ -分泌酶亚基 Aph1a、 γ -分泌酶底物 APP-C99 (加上它的接头 (adapter) Fe65L2) 和与 β -分泌酶蛋白相互作用的蛋白的装配体。

早老素 1 和 2 (Psen1 和 Psen2, 分别也称作 PS1 和 PS2) 是整合膜蛋白, 其位于内质网、高尔基体, 也位于细胞表面 (Kovacs, Nat Med 2. 224)。它们主要作为 NTF 和 CTF 内切蛋白酶解片段的异二聚体存在。不知道能剪切早老素的蛋白酶(“早老素酶”), 该过程可能是自身催化的, 也不清楚 PS (自身) 蛋白水解的功能意义。早老素参与淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) (De Strooper 等, Nature 391, 387) 和 Notch 受体 (De Strooper 等, Nature 398, 518) 的蛋白水解加工。另外, 早老素与细胞粘附蛋白 α 和 β -连环蛋白、N-钙粘蛋白和 E-钙粘蛋白 (Georgakopoulos 等, Mol Cell 4, 893) 和犰狳家族的其它成员 (Yu 等, J Biol Chem 273, 16470) 有关。早老素对 APP 的加工, 是通过它们对剪切 APP 的 γ -分泌酶的作用, 产生 A- β 肽的 C-末端。PS1 与 APP 的 C83 和 C99 加工的 C-末端片段 (Xia 等, Proc Natl Acad Sci USA, 94, 8208), Nicastrin (Yu 等, Nature 407, 48) 和 Pen-2 (Francis 等, Dev Cell 3, 85) 有关。

早老素加工中需要 Aph-1 蛋白如 Aph-1a (Francis 等, Dev Cell 3, 85)。不清楚早老素是否直接调节 γ -分泌酶活性, 或它们自身是否是蛋白酶 (Kopan 和 Gouate, Genes Dev 14, 2799)。 γ 分泌酶活性可以包含这些蛋白的多聚体复合物 (Yu 等, Nature 407, 48), 但是不知道这些蛋白之间的关系如何影响分泌酶活性。

近来, 在筛选美丽线虫中的早老素增强子 (“pen”) 时, 克隆了 Aph-1 和 Pen-2, 且显示其与 Aph-2 (Nicastrin) 在遗传上相互作用。Aph-1 中的缺陷会影响 Notch 信号传递和 Nicastrin 定位。Notch 剪切、 γ -分泌酶活性和加工过的早老素的蓄积都需要 Aph-1 和 Pen-2。Francis 等克隆了这些基因的推定的人正向同源基因 Aph-1a, Aph-1b 和 Pen-2, 最近 Lee 等也克隆了人 Aph-1 cDNA。尚不知道 γ -分泌酶复合物的确切组分, 但是这两种新蛋白可能是复合物的组分或辅助因子,

且可一起直接与早老素或与早老素/Nicastrin 复合物相互作用。因此, Nicastrin 是有活性的 γ -分泌酶复合物的成员, 近来有证据证实, 在该复合物中重要的是该蛋白完全糖基化的形式。

Fe65-样 2 (Fe65L2) 是充分表征的胞内 APP-相互作用接头蛋白 Fe65 的同源物 (Duilio A, Faraonio R, Minopoli G, Zambrano N, Russo T (1998) Fe65L2: a new member of the Fe65 protein family interacting with the intracellular domain of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Biochem J.* 330 (Pt 1): 513-9.)。它在脑中高度表达, 且通过它的 C-末端 PTB 结构域与 APP 相互作用 (Tanahashi H, Tabira T (1999) Molecular cloning of human Fe65L2 and its interaction with the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *Neurosci Lett.* 261(3): 143-6.)。已经显示, Fe65L2 能转移到核和调节转录 (Bruni P, Minopoli G, Brancaccio T, Napolitano M, Faraonio R, Zambrano N, Hansen U, Russo T (2002) Fe65, a ligand of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein, blocks cell cycle progression by down-regulating thymidylate synthase expression. *J. Biol. Chem.* 277(38): 35481-8.), 表明它参与 APP 的下游信号传递功能。Fe65L2 的过表达, 在体外促进 A β 分泌/产生 (Tanahashi H, Tabira T (2002), Characterization of an amyloid precursor protein-binding protein Fe65L2 and its novel isoforms lacking phosphotyrosine-interaction domains. *Biochem J.* 367(Pt 3): 687-95.)。

β -分泌酶 (BACE) 活性剪切 APP 外功能区, 导致分泌的可溶 APP_b 的脱落, 和 99 个残基的 C-末端跨膜片段 (APP-C99)。Vassar 等 (Science 286, 735-741) 克隆了跨膜天冬氨酸蛋白酶, 其具有 APP 的假定的 β -分泌酶的特征, 被他们称作 BACE1。来自 BACE1 敲除的小鼠的脑和原代皮层培养物没有显示出可检测的 β -分泌酶活性, 且来自 BACE 敲除的小鼠的原代皮层培养物从 APP 产生少得多的淀粉样蛋白- β 。这表明, BACE1, 而不是它的平行进化同源物 BACE2, 是 APP 的主

要 β -分泌酶。BACE1 是 501 个氨基酸的蛋白，其含有 21 个 aa 的信号肽，随后是跨 aa 22 到 45 的前蛋白结构域。存在可替代地剪接的形式，BACE-I-457 和 BACE-I-476。成熟蛋白的腔域后是一个预测的跨膜域和 24 个 aa 的短胞质 C-末端尾。预测 BACE1 是 1 型跨膜蛋白，其在膜的腔侧具有活性部位， β -分泌酶在这里剪切 APP 和可能的其它尚未鉴定的底物。尽管 BACE1 显然是将 APP 加工成 A- β 所需的关键酶，近期的证据暗示 BACE1 的其它的潜在底物和功能 (J. Biol. Chem. 279, 10542-10550)。迄今为止，尚未描述具有调节或调控功能的 BACE1 相互作用蛋白。

如上所述，在本发明的上下文中，已经意外地发现，GPR49 是调节 APP 的蛋白水解加工（特别是通过 β -分泌酶和/或 γ 分泌酶活性）的蛋白复合物的一部分。因此，在一个优选的实施方案中，抑制剂或相互作用分子能调控 β -分泌酶和/或 γ 分泌酶的活性。

在本发明中，术语“调控 γ 分泌酶和/或 β 分泌酶的活性”包括，直接或间接地调控该酶的活性。这意味着，GPR49 调控剂也可以直接与这些酶中的任一种结合，或更优选地，可以对 GPR49 施加影响，这又例如通过蛋白-蛋白相互作用或通过信号转导或经由小代谢产物，调控这些酶中的任一种的活性。

在本发明中，优选地， β 分泌酶调控剂完全地或部分地抑制 β 分泌酶的活性。在本发明中，GPR49 调控剂的最优选的功能后果是 AB-42 产生的减少。

在本发明的上下文中，“调控 γ 分泌酶和/或 β -分泌酶的活性”指活性减少，所以形成较少的产物或不形成产物，最优选地形成较少的 AB-42 或不形成（部分或完全抑制），或各酶产生不同的产物（在 γ -分泌酶的情况下，例如 AB-38 或更短氨基酸序列的其它 AB 肽种类-而不是 AB-42），或产物的相对量是不同的（在 γ -分泌酶的情况下，例如改变、优选地增加 AB-40/AB-42 的比例）。此外包括，调控剂能调控 γ 分泌酶或 β -分泌酶或 2 种酶的活性。

关于 γ 分泌酶活性的调控剂，优选地，该调控剂能抑制 γ 分泌酶

活性。但是，也优选地，以不改变 AB 肽种类的总量、但是产生更多的 AB-38 来替代 AB-42 的方式，转变 γ 分泌酶的活性。

例如通过检测 APP 加工，例如通过检测产生的 AB 肽种类的水平，最重要地 AB-42 的水平(见下面的实施例部分)，可以测量 γ 分泌酶活性。

为了测量 BACE1 活性，通过蛋白印迹(Blasko 等, J Neural Transm 111, 523), 可以分析 α -和 β -C-末端 APP 片段之间的比例的变化; BACE1 活性测定的其它实例包括但不限于: 使用含有 BACE1 剪切位点的环化酶供体肽, 以重建和测量 β -半乳糖苷酶报道分子活性 (Naqvi 等, J Biomol Screen. 9, 398); 使用淬灭的荧光肽底物和荧光测量 (Andrau 等, J. Biol Chem 278, 25859); 使用基于细胞的利用重组嵌合蛋白的测定, 其中通过一串含有 BACE1 识别序列的氨基酸将酶(例如碱性磷酸酶) 连接到高尔基体-驻留蛋白 (Oh 等, Anal Biochem, 323, 7); 荧光共振能转移 (FRET)-为基础的测定 (Kennedy 等, Anal Biochem 319, 49); 在酵母中的细胞生长选择系统 (Luthi 等, Biochim Biophys Acta 1620, 167)。

优选地，神经变性疾病是阿尔茨海默氏病。

根据本发明，使用 GPR49 相互作用分子来制备药物组合物。

因此，本发明提供了药物组合物，其可以以有效量施用给对象。在一个优选的方面，治疗剂基本上是纯化的。对象优选地是动物，包括但不限于动物例如牛，猪，马，鸡，猫，狗，等，且优选地是哺乳动物，最优选地是人。在一个具体的实施方案中，非-人哺乳动物是对象。

已知多种输送系统，且可以用于施用本发明的治疗剂，例如包封在脂质体，微粒，和微胶囊中；使用能表达治疗剂的重组细胞，使用受体-介导的胞吞作用 (例如，Wu 和 Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432); 构建作为逆转录病毒或其它载体的一部分的治疗核酸等。导入方法包括但不限于皮内的，肌肉内的，腹膜内的，静脉内的，皮下的，鼻内的，硬膜外的和经口的途径。通过任何方便的途径，

例如通过输注，通过快速推注，通过经上皮或粘膜皮肤内衬(例如，口腔的，直肠的和肠的粘膜等)的吸收，可以施用化合物，且可以与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身的或局部的。另外，可能需要通过任何合适的途径，包括脑室内的和鞘内的注射，将本发明的药物组合物导入中枢神经系统；通过脑室内的导管，例如其连接到储器，例如 Ommaya 储器，可以促进脑室内注射。也可以采用肺施用，例如，通过使用吸入器或或喷雾器，并与雾化剂一起配制。

在一个具体的实施方案中，可能需要将本发明的药物组合物局部地施用到需要治疗的区域。这可以通过下述方式实现：例如但不限于，在手术过程中局部灌输，局部应用（外用），例如手术后与创伤敷料相联合，通过注射，借助导管，借助栓剂，或借助植入物，所述植入物是多孔的，无孔的，或凝胶状的材料，包括膜，例如 sialastic 膜，或纤维。在一个实施方案中，施用可以是通过在恶性肿瘤或肿瘤的或肿瘤发生前的组织的部位（或先前部位）直接注射。

在另一个实施方案中，可以在囊泡、尤其脂质体中输送治疗剂 (Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat 等, 1989, 见: Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein 和 Fidler 编, Liss, New York, 第 353-365 页; Lopez-Berestein, 同上, 第 317-327 页; 总见上文)

在另一个实施方案中，通过控释系统，可以输送治疗剂。在一个实施方案中，可以使用泵 (Langer, 同上; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald 等, 1980, Surgery 88:507-516; Saudek 等, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574-579)。在另一个实施方案中，可以使用聚合材料 (Medical Applications of Controlled Release, Langer 和 Wise 编, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen 和 Ball 编, Wiley, New York, 1984; Ranger 和 Peppas, 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; Levy 等, 1985, Science 228:190-192; During 等, 1989, Ann. Neurol.

25: 351-356; Howard 等, 1989, J. Neurosurg. 71: 858-863)。在另一个实施方案中, 控释系统可以置于治疗靶物(即脑)附近, 从而仅仅需要全身剂量的一小部分(例如, Goodson, 1984, 见: Medical Applications of Controlled Release, 同上, Vol. 2, 第 115-138 页)。在 Langer (1990, Science 249:1527-1533)的综述中, 讨论了其它控释系统。

在一个具体的实施方案中, 其中治疗剂是核酸, 优选地编码蛋白治疗剂, 可以体内施用核酸, 以促进它编码的蛋白的表达, 通过将它构建为合适的核酸表达载体的一部分, 并施用它, 以便使它变成胞内的, 例如, 通过使用逆转录病毒载体(美国专利号 4,980,286), 或通过直接注射, 或通过使用微粒轰击(例如, 基因枪; Biolistic, Dupont), 或通过给它包被脂类、细胞-表面受体或转染剂, 或通过将它与已知能进入核中的同源框-样肽一起连合施用(例如, Joliot 等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868)等。或者, 可以胞内地导入核酸治疗剂, 并通过同源重组掺入宿主细胞 DNA 中以进行表达。

总体而言, 本发明的药物组合物包含治疗有效量的治疗剂和药学上可接受的载体。在一个具体的实施方案中, 术语"药学上可接受的"指被联邦或政府机关的管理部门所批准, 或列在美国药典或其它公认的药典中, 用于动物, 更特别是用于人。术语"载体"指与治疗剂一起施用的稀释剂, 辅剂, 赋形剂, 或介质。这样的药物载体可以是无菌的液体, 例如水和油, 包括石油、动物、植物或合成来源的那些, 包括但不限于花生油, 大豆油, 矿物油, 芝麻油等。当经口施用药物组合物时, 水是优选的载体。当静脉内地施用药物组合物时, 盐水和含水右旋糖是优选的载体。盐水溶液和含水右旋糖和甘油溶液优选地用作可注射溶液的液体载体。合适的药物赋形剂包括淀粉, 葡萄糖, 乳糖, 蔗糖, 明胶, 麦芽, 稻, 面粉, 白垩, 硅胶, 硬脂酸钠, 单硬脂酸甘油酯, 滑石, 氯化钠, 脱脂奶粉, 甘油, 丙烯, 乙二醇, 水, 乙醇等。如果需要, 组合物还可以含有小量的润湿剂或乳化剂, 或 pH

缓冲剂。这些组合物可以采取溶液、混悬剂、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉末、持续释放制剂等的形式。利用传统的粘合剂和载体，例如甘油三酯，可以将组合物配制成栓剂。经口制剂可以包括标准的载体例如药物级甘露醇，乳糖，淀粉，硬脂酸镁，糖精钠，纤维素，碳酸镁等。合适的药物载体的实例记载在 E. W. Martin 的 "Remington's Pharmaceutical Sciences"。这样的组合物含有治疗有效量的治疗剂，优选纯化的形式，以及合适量的载体，以便提供适于施用给患者的形式。制剂应当适合施用模式。

在一个优选的实施方案中，根据常规方法，将组合物配制成适于静脉内地施用给人类的药物组合物。典型地，静脉内施用的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。当需要时，组合物也可以包括增溶剂和局部麻醉剂，例如利多卡因，以缓解注射部位的疼痛。通常，单独分开地或在单位剂型中混合在一起地供应成分，例如，作为在密封容器中的冻干粉末或无水浓缩物，所述容器例如指示活性剂的量的安瓿或药囊 (sachette)。当要通过输注施用组合物时，可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配它。当通过注射施用组合物时，可以提供一安瓿的无菌注射用水或盐水，以便可以在施用前混合各成分。

本发明的治疗剂可以配制成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括与游离羧基形成的那些，例如源自盐酸、磷酸、醋酸、草酸、酒石酸等的羧基；与游离胺基团形成的那些，例如源自异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇，组氨酸，普鲁卡因等的胺基团，和源自钠、钾、铵、钙和铁氢氧化物等的那些。

将有效地治疗特定障碍或状况的本发明的治疗剂的量，将取决于障碍或状况的性质，且可以通过标准的临床技术来确定。另外，可以任选地采用体外测定，以辅助鉴别最佳剂量范围。在制剂中使用的准确剂量，也依赖于施用途径，疾病或障碍的严重性，且应当根据操作人员的判断和每位患者的情况来决定。但是，静脉内施用的合适的剂量范围通常是约 20-500 微克活性化合物/千克体重。鼻内施用的合适的剂量范围通常是约 0.01 pg/kg 体重至 1 mg/kg 体重。从源自体外

或动物模型实验系统的剂量效应曲线，可以外推有效剂量。

栓剂通常含有 0.5%-10%（重量）的活性成分；经口制剂优选地含有 10%-95%活性成分。

本发明也提供了药物包或试剂盒，其包含一个或多个容器，其中装有本发明的药物组合物的一种或多种成分。任选地，这样的容器伴有负责管理药物或生物产品的生产、使用或销售的政府机构规定形式的说明书，该说明书能反映用于人施用的生产、使用或销售的机构的批准。

本发明的试剂盒也可以含有编码复合物结构的基本组分的表达载体，该组分在表达后可以重构，以形成生物活性复合物。这样的试剂盒优选地还含有需要的缓冲液和试剂。任选地，这样的容器伴有试剂盒的使用说明书和/或负责管理药物或生物产品的生产、使用或销售的政府机构规定形式的说明书，该说明书能反映用于人施用的生产、使用或销售的机构的批准。

本发明还涉及治疗方法，其中将有效量的本发明的 GPR49-相互作用分子或抑制剂或药物组合物施用给患有神经变性疾病、优选阿尔茨海默氏病的对象。

关于本发明的该方法，上面给出的所有实施方案都适用于本发明的应用。

本发明还涉及鉴别 γ 分泌酶调控剂和/或 β -分泌酶调控剂的方法，其包括下述步骤：

- a. 通过检测给定的实验化合物是否是 GPR49-相互作用分子，鉴别 GPR49-相互作用分子，
- b. 确定步骤 a) 的 GPR49-相互作用分子是否能调控 γ 分泌酶活性或 β -分泌酶活性。

在本发明的一个优选的实施方案中，在步骤 a) 中，使实验化合物接触 GPR49，并检测 GPR49 与实验化合物的相互作用。优选地，测量候选分子是否与 GPR49 结合。

在本发明的一个优选的实施方案中，在步骤 a) 中鉴别的 GPR49 相

互作用分子首先进行如上所述的 GPR49 活性测试(也见实施例 3), 以发现它是否能调控、优选地抑制 GPR49 活性, 然后进行方法的步骤 b) (测试 AB-降低作用)。

优选地, 在高通量测定的情境中, 进行本发明的方法。这样的测定是本领域的技术人员已知的。

可以将待筛选的实验或候选分子提供为有限数目的特定化合物的混合物, 或作为化合物文库, 肽文库等。待筛选的试剂/分子也可以包括所有形式的抗血清, 反义核酸等, 其可以调控复合物活性或形成。下面阐述了用于筛选的示例性的候选分子和文库。

通过许多普遍知道的方法之一, 可以实现对文库的筛选。见例如下面的文献, 其公开了肽文库的筛选: Parmley 和 Smith, 1989, Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218; Scott 和 Smith, 1990, Science 249: 386-390; Fowlkes 等, 1992, BioTechniques 13: 422-427; Oldenburg 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5393-5397; Yu 等, 1994, Cell 76: 933-945; Staudt 等, 1988, Science 241: 577-580; Bock 等, 1992, Nature 355: 564-566; Tuerk 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6988-6992; Ellington 等, 1992, Nature 355: 850-852; Ladner 等的美国专利号 5, 096, 815, 美国专利号 5, 223, 409, 和美国专利号 5, 198, 346; Rebar 和 Pabo, 1993, Science 263: 671-673; 和国际专利公开号 W0 94/18318。

在一个具体的实施方案中, 通过使文库成员接触固定化在固相上的 GPR49, 并收获与蛋白(或编码核酸或衍生物)结合的那些文库成员, 可以进行筛选。这样的筛选方法的实例称作"淘选(panning)"技术, 例如记载在 Parmley 和 Smith, 1988, Gene 73: 305-318; Fowlkes 等, 1992, BioTechniques 13: 422-427; 国际专利公开号 W0 94/18318; 和上面引用的文献中。

在一个具体的实施方案中, 筛选 GPR49-片段和/或类似物、尤其是肽模拟物作为 GPR49 与其它蛋白例如表 1 中给出的蛋白形成复合物(复合物的量或复合物的组成)或细胞中 GPR49 活性的竞争性或非-竞

竞争性抑制剂的活性，其由此抑制细胞中的复合物活性或形成。

在一个实施方案中，使用结合抑制测定，可以筛选能调控(即拮抗或激动)GPR49-活性或 GPR49-蛋白复合物形成的试剂，其中在水性的或生理的结合条件下，筛选试剂调控复合物形成的能力，其中在没有要测定的试剂的情况下发生复合物形成。将能干扰本发明的复合物形成的试剂鉴别为复合物形成的拮抗剂。将能促进复合物形成的试剂鉴别为复合物形成的激动剂。将能完全阻断复合物形成的试剂鉴别为复合物形成的抑制剂。

筛选方法可以包含，用放射性配体(例如， ^{125}I 或 ^3H)，磁性配体(例如，共价地结合到醋酸光生物素上的顺磁珠)，荧光配体(例如，荧光素或罗丹明)，或酶配体(例如，萤光素酶或 β -半乳糖苷酶)，标记复合物的组分蛋白。然后，通过许多本领域已知的技术之一，包括但不限于，使用针对未标记的结合伴侣(或标记的结合伴侣，其具有与第二个标记的复合物部分上所用的标记可区分的标记)的抗血清对标记的复合物部分的共免疫沉淀，免疫亲和色谱，尺寸排阻色谱，和梯度密度离心，可以分离在溶液中结合的反应物。在一个优选的实施方案中，标记的结合伴侣是小片段或肽模拟物，其不能被市场上买到的过滤器截留。结合后，标记的种类不再能通过过滤器，提供对复合物形成的简单测定。

使用本领域普遍已知的方法来标记复合物的至少一个组分成员。合适的标记方法包括但不限于，通过掺入放射性标记的氨基酸例如 ^3H -亮氨酸或 ^{35}S -甲硫氨酸进行放射标记，通过使用氯胺 T 方法，鲍尔通-亨特试剂等，用 ^{125}I 或 ^{131}I 进行翻译后碘化而实现放射性标记，或使用磷酸化酶和无机放射性标记的磷，用 ^{32}P 进行标记，用光生物素-醋酸酯进行生物素标记，和太阳灯暴露等。在复合物成员之一是固定化的情况下，例如如下所述，可标记游离的种类。当相互作用物质都没有被固定化时，可以用可区分的标记物标记每一种，从而可以追踪两个部分的分离，以便更准确的定量并区分同源和异源复合物的形成。提供了使用辅助蛋白的方法，该蛋白能结合经修饰的相互作用剂之一，

以提高检测的灵敏性，增加复合物的稳定性等。

典型的结合条件是，例如，但不限于，在 10-250 mM NaCl, 5-50 mM Tris-HCl, pH 5-8, 和 0.5% Triton X-100 或能提高相互作用的特异性的其它去污剂的水性盐溶液中。可以加入金属螯合剂和/或二价阳离子，以提高结合和/或减少蛋白水解。反应温度可以包括 4, 10, 15, 22, 25, 35, 或 42℃, 且温育时间典型地是至少 15 秒，但是更长的时间是优选的，以允许发生结合平衡。使用常规的蛋白结合测定来确定可再现的结合的最佳结合条件，可以测定特定的复合物。

使用对所用的标记特异性的测定方法，例如，用于放射性检测的液体闪烁计数，酶-标记的部分的酶活性等，通过定量复合物形成，可以分析复合物形成的物理参数。然后，使用 Scatchard 分析，Hill 分析，和本领域普遍已知的其它方法，分析反应结果(见，例如，Proteins, Structures, and Molecular Principles, 2nd Edition (1993) Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York)。

在结合测定的第二个普通方案中，将结合物质之一共价地或非-共价地固定化到过滤器上，微量滴定板孔中，试管中，色谱基质上等。使用本领域众所周知的任意方法，例如，但不限于 Kadonaga 和 Tjian, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5889-5893 的方法，即连接到溴化氰衍生的基质例如 CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia)，可共价地固定化蛋白。当需要时，可以使用间隔物减少基质的空间位阻。蛋白向基质的非-共价结合包括但不限于，蛋白向带电荷的表面的结合，与特异性的抗体的结合，向第三种无关的相互作用蛋白的结合等。

提供了用于竞争复合物的一个成员(或其衍生物)与通过任意方式(例如，上述的那些方式)标记的复合物的另一个成员结合的试剂(包括细胞提取物或文库集合)的测定，以筛选复合物形成的竞争剂或增强剂。

在具体的实施方案中，在测定混合物中包括封闭剂，其用于抑制试剂与其它蛋白组分的非特异性结合，或试剂向塑料、固定化基质的吸附损失等。封闭剂包括但不限于牛血清白蛋白，酪蛋白，脱脂奶粉，

Denhardt 氏试剂, 菲柯尔, 聚乙烯吡咯烷, 非离子型去污剂 (NP40, Triton X-100, Tween 20, Tween 80, 等), 离子型去污剂 (例如, SDS, LDS, 等), 聚乙二醇等。合适的封闭剂浓度允许复合物形成。

进行结合后, 去除上清液中的未结合的标记的蛋白, 广泛地洗涤保留任意的结合的标记蛋白的固定化蛋白。然后, 使用本领域的标准方法, 检测如上所述的标记, 定量结合的标记的量。

在另一个具体的实施方案中, 通过将本文提供的蛋白复合物/蛋白和/或本文提供的抗体结合到固体载体上, 可以筛选如本文提供的蛋白复合物/蛋白的调控剂。

这样的含有不同类型的蛋白 (包括抗体) 的阵列的制备, 是本领域众所周知的, 且是本领域的技术人员显而易见的 (见例如 Ekins 等, 1989, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7:155-168; Mitchell 等 2002, *Nature Biotechnol.* 20:225-229; Petricoin 等, 2002, *Lancet* 359:572-577; Templin 等, 2001, *Trends Biotechnol.* 20:160-166; Wilson 和 Nock, 2001, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:81-85; Lee 等, 2002 *Science* 295:1702-1705; MacBeath 和 Schreiber, 2000, *Science* 289:1760; Blawas 和 Reichert, 1998, *Biomaterials* 19:595; Kane 等, 1999, *Biomaterials* 20:2363; Chen 等, 1997, *Science* 276:1425; Vaughan 等, 1996, *Nature Biotechnol.* 14:309-314; Mahler 等, 1997, *Immunotechnology* 3:31-43; Roberts 等, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-273; Nord 等, 1997, *Nature Biotechnol.* 15:772-777; Nord 等, 2001, *Eur. J. Biochem.* 268:4269-4277; Brody 和 Gold, 2000, *Rev. Mol. Biotechnol.* 74:5-13; Karlstroem 和 Nygren, 2001, *Anal. Biochem.* 295:22-30; Nelson 等, 2000, *Electrophoresis* 21:1155-1163; Honore 等, 2001, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 3: 265-274; Albala, 2001, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2:145-152, Figeys 和 Pinto, 2001, *Electrophoresis* 2:208-216 和本文列出的出版物中的文献)。

通过本领域的技术人员显而易见的各种不同方法, 可以将蛋白或

蛋白复合物结合到阵列上。例如，纯化步骤后，或通过本领域的技术人员显而易见的另一种合适的纯化方案，经由 TAP-标记（如 WO/0009716 和 Rigaut 等，1999, Nature Biotechnol. 10:1030-1032 所述），可以将复合物添加到阵列。

任选地，可以交联复合物的蛋白，以增强复合物的稳定性。不同的交联蛋白的方法，是本领域众所周知的。交联剂的反应性末端基团包括但不限于-COOH，-SH，-NH₂ 或 N-氧-琥珀酰胺酸酯。

应当根据要交联的复合物的尺寸，选择交联剂的间隔物。对于仅仅包含少数蛋白的小蛋白复合物，相对较短的间隔物是更优选的，以便减少交联反应混合物中分开的复合物的可能性。对于较大的蛋白复合物，另外使用较大的间隔物是优选的，以便促进复合物内的蛋白之间的交联。

优选地，在将复合物连接到载体上之前，检查交联的成功率。

本领域的技术人员显而易见，需要在个案的基础上，确定最佳交联率。这可以通过本领域众所周知的方法来实现，下面示例性地描述了其中的一些。

例如通过分析变性蛋白凝胶上交联的复合物相对未交联的复合物，可以检查足够的交联率。

如果已经成功地进行了交联，预期会在相同的泳道中发现复合物的蛋白，而预期未交联的复合物的蛋白会按照它们各自的特征分开。任选地，使用本领域众所周知的方法，例如质谱法和/或埃德曼降解，通过各条带中的蛋白的肽-测序，可以进一步检查复合物的所有蛋白的存在。

另外，还应当避免太高的交联率。如果已经太广泛地进行了交联，将会有增加量的各蛋白复合物的交联，这会潜在地干扰使用阵列进行的对潜在结合伴侣和/或调控剂等筛选。

通过本领域众所周知的方法，包括例如凝胶过滤实验，其对比含有交联的复合物相对未交联的复合物的凝胶过滤特征溶液，可以确定这样的结构的存在。

任选地, 可以进行本领域的技术人员显而易见的功能测定, 本文示例地提供了其中的一些, 以检查复合物的完整性。

或者, 可以将所述多种或一种蛋白表达为单一融合蛋白, 并偶联到基质上, 如本领域的技术人员显而易见的。

任选地, 通过本领域的技术人员显而易见的各种方法, 可以进一步监测如上所述的复合物或蛋白或抗体的结合。它们包括但不限于表面等离子共振(见例如 McDonnel, 2001, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5:572-577; Lee, 2001, *Trends Biotechnol.* 19:217-222; Weinberger 等, 2000, 1:395-416; Pearson 等, 2000, *Ann. Clin. Biochem.* 37:119-145; Vely 等, 2000, *Methods Mol. Biol.* 121:313-321; Slepak, 2000, *J. Mol. Recognit.* 13:20-26。

用于通过 ELISA 测量 A β -40 和 A β -42 肽的产生的示例测定, 包括但不限于在 Vassar R 等, 1999, *Science*, 286:735-41 中描述的那些。

用于通过蛋白印迹测量细胞系或转基因动物中 C-末端 APP 片段的产生的示例测定, 包括但不限于在 Yan R 等, 1999, *Nature*, 402:533-7 中描述的那些。

用于测量 BACE1-复合物的针对体外细菌表达的 APP 片段的 B-或 γ 分泌酶的蛋白水解活性(例如借助于 RNAi (siRNA) 和/或编码相互作用蛋白的质粒, 通过修饰细胞中一种或几种相互作用蛋白的表达)的示例测定, 包括但不限于在 Tian G 等, 2002, *J Biol Chem*, 277:31499-505 中描述的那些。

用于测量 BACE1-复合物的 Gal4-驱动的报道基因的转活化(例如借助于 RNAi (siRNA) 和/或编码相互作用蛋白的质粒, 通过修饰细胞中一种或几种相互作用蛋白的表达)的示例测定, 包括但不限于在 Cao X 等, 2001, *Science*, 293:115-20 中描述的那些。

可以测定本领域已知的任意分子作为根据本发明的相互作用分子或抑制剂的能力。可以将候选分子直接提供给能表达 GPR49-复合物机制的细胞, 或者, 在候选蛋白的情况下, 可以通过在能重组表达核酸

以生成候选蛋白的条件下，通过提供它们的编码核酸来提供。

本发明的方法非常适用于筛选化学文库中能调控（例如，抑制、拮抗或激动）复合物的量、活性或蛋白组分组成的分子。化学文库可以是肽文库，肽模拟物文库，化学合成的文库，重组体例如噬菌体展示文库，和基于体外翻译的文库，其它非-肽合成有机文库等。

示例文库可以在商业上从几种来源得到（ArQule, Tripos/PanLabs, ChemDesign, Pharmacopoeia）。在有些情况下，使用组合策略生成这些化学文库，其在成员化合物结合的基质上编码每个文库成员的身份，从而允许直接且立即鉴别是有效的调控剂的分子。因而，在许多组合方案中，化合物在平板上的位置指示着化合物的组成。另外，在一个实例中，单个的平板位置可以具有 1-20 种化学物质，通过施用到含有目标相互作用的孔，可以进行筛选。因而，如果检测到调控，可以测定越来越小的相互作用对集合的调控活性。通过这样的方法，可以筛选许多候选分子。

适合使用的许多多样性文库是本领域已知的，且可以用于提供要根据本发明测试的化合物。或者，使用标准方法，可以构建文库。化学(合成)文库，重组表达文库，或基于多核糖体的文库，是可以使用的示例类型的文库。

文库可以是受限制的或半刚性的（具有一定程度的结构刚性），或线性的或非限制的。文库可以是 cDNA 或基因组表达文库，随机肽表达文库或化学合成的随机肽文库，或非-肽文库。将表达文库导入在其中进行测定的细胞，在其中表达文库的核酸以产生它们编码的蛋白。

在一个实施方案中，可以在本发明中使用的肽文库可以是体外化学合成的文库。这样的文库的实例提供在 Houghten 等，1991, *Nature* 354: 84-86，其描述了游离的六肽的混合物，其中各自分别地和具体地定义了每个肽中的第一个和第二个残基；Lam 等，1991, *Nature* 354: 82-84，其描述了"一个珠子，一种肽"方案，其中固相裂分合成方案生成肽文库，其中收集物中的每个珠子具有固定化在其上面的氨基酸残基的单一的随机序列；Medynski, 1994, *Bio/Technology*

12: 709-710, 其描述了裂分合成法和 T-袋合成法; 和 Gallop 等, 1994, J. Med. Chem. 37: 1233-1251. 仅仅作为其它实例, 可以根据 Ohlmeyer 等, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10922-10926; Erb 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-11426; Houghten 等, 1992, BioTechniques 13: 412; Jayawickreme 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1614-1618; 或 Salmon 等, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11708-11712 的方法制备组合文库供使用。PCT 公开号 WO 93/20242 和 Brenner 和 Lerner, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5381-5383 描述了"编码的组合化学文库", 其含有各化学聚合物文库成员的寡核苷酸标识符。

在一个优选的实施方案中, 筛选的文库是生物表达文库, 其是随机肽噬菌体展示文库, 其中随机的肽是受限制的(例如因为具有二硫键)。

另外也可以使用其它更一般的结构上受限制的有机多样性(例如, 非肽)文库。作为实例, 可以使用苯并二氮草类文库(见例如, Bunin 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4708-4712)。

可以使用的构象受限制的文库包括但不限于以下那些: 含有不变的半胱氨酸残基, 所述残基在氧化环境下通过二硫键进行交联形成胱氨酸; 修饰的肽(例如, 掺入氟, 金属, 同位素标记, 被磷酸化, 等), 含有一个或多个非-天然存在的氨基酸的肽, 非-肽结构, 和含有-羧基谷氨酸的重要部分的肽。

也可以使用非-肽的文库, 例如, 肽衍生物(例如, 含有一个或多个非-天然存在的氨基酸的那些)。它们的一个实例是类肽文库(Simon 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367-9371)。类肽是非-天然氨基酸的聚合物, 所述非天然氨基酸具有天然存在的侧链, 后者不是连接到 α -碳而是连到主链氨基氮。由于类肽不能被人消化酶容易地降解, 它们有利地更易适用于药物用途。Ostresh 等, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11138-11142 描述了可以使用的文库的另一个实例, 其中肽中的酰胺官能团已经被全甲基化, 产生化学转化的

组合文库。

可以根据本发明筛选的肽文库的成员不限于含有 20 种天然存在的氨基酸。更具体地，化学合成的文库和基于多核糖体的文库允许使用 20 种天然存在的氨基酸以外的氨基酸（它们包括在用于文库产生的氨基酸的前体集合中）。在具体的实施方案中，文库成员含有一种或多种非-天然的或非-经典的氨基酸或环肽。非-经典的氨基酸包括但不限于普通氨基酸的 D-异构体， γ -氨基异丁酸，4-氨基丁酸，Abu，2-氨基丁酸； γ -Abu， γ -Ahx，6-氨基己酸；Aib，2-氨基异丁酸；3-氨基丙酸；鸟氨酸；正亮氨酸；正缬氨酸， γ -脯氨酸，肌氨酸，瓜氨酸，磺丙氨酸，叔丁基甘氨酸，叔丁基丙氨酸，苯基甘氨酸，环己基丙氨酸， β -丙氨酸，设计的氨基酸例如 β -甲基氨基酸，C-甲基氨基酸，N-甲基氨基酸，氟-氨基酸和一般的氨基酸类似物。而且，氨基酸可以是 D（右旋的）或 L（左旋的）。

在一个具体的实施方案中，筛选本发明的复合物或其蛋白组分的片段和/或类似物（尤其肽模拟物）作为复合物活性或形成的竞争性或非-竞争性抑制剂的活性。

在本发明的另一个实施方案中，可以使用组合化学来鉴别复合物的调控剂。组合化学能建立含有许许多多化合物的文库，其中的许多可以是结构上类似的。尽管高通量筛选程序能筛选这些巨大的文库对已知靶物的亲和力，已经开发了新的方案，其实现更小尺寸的文库，但是其能提供最大的化学多样性（见例如，Matter, 1997, J. Med. Chem. 40:1219-1229）。

一种组合化学方法是亲和指纹法，以前已经用于测试小分子的离散文库对确定的一组蛋白的结合亲和力。使用通过筛选得到的指纹，预测各文库成员对其它目标蛋白或受体（在本发明中，本发明的蛋白复合物和其蛋白组分）的亲和力。将指纹与从已知能与目标蛋白反应的其它化合物得到的指纹相对比，预测该文库化合物是否可能类似地反应。例如，不测试大文库中的每种配体与复合物或蛋白组分的相互作用，而仅仅测试具有与已知具有该活性的其它化合物类似的指纹的那些配

体(见,例如, Kauvar 等, 1995, Chem. Biol. 2:107-118; Kauvar, 1995, Affinity fingerprinting, Pharmaceutical Manufacturing International. 8:25-28;和 Kauvar, Toxic-Chemical Detection by Pattern Recognition in New Frontiers in Agrochemical Immunoassay, Kurtz, Stanker and Skerritt (eds), 1995, AOAC: Washington, D.C., 305-312)。

Kay 等(1993, Gene 128:59-65)公开了构建肽文库的方法,所述文库编码完全随机序列的肽,其比任何以前的常规文库的序列更长。Kay 等公开的文库编码完全合成的随机的肽,其长度大于约 20 个氨基酸。可以有利地筛选这样的文库,以鉴别复合物调控剂(也见美国专利号 5,498,538,1996 年 3 月 12 日;和 PCT 公开号 WO 94/18318,1994 年 8 月 18 日)。

对各种类型的肽文库的综述可见 Gallop 等,1994, J. Med. Chem. 37:1233-1251。

在一个优选的实施方案中,实验化合物与 GPR49 的相互作用,会导致对 GPR49-活性的抑制。

根据一个优选的实施方案,在步骤 b) 中,测量 γ -分泌酶剪切 APP 的能力。这可以如上所述测量。

而且,本发明还涉及制备用于治疗神经变性疾病、优选阿尔茨海默氏病的药物组合物的方法,其包括下述步骤:

- a) 根据本发明的方法,鉴别 γ -分泌酶调控剂和/或 β -分泌酶调控剂,优选抑制剂,和
- b) 将 γ -分泌酶和/或 β -分泌酶调控剂、优选抑制剂配制成药物组合物。

关于药物组合物,如上所述的所有实施方案也适用于此。

在一个优选的实施方案中,本发明的该方法还包括混合鉴别的分子和如上所述的药学上可接受的载体的步骤。

本发明还涉及药物组合物,其包含如上定义的 GPR49-抑制剂。

而且,本发明也涉及可以通过上面的制备药物组合物的方法得到

的药物组合物。

本发明也涉及本发明的药物组合物用于治疗神经变性疾病，例如阿尔茨海默氏病和有关的神经变性障碍。

本发明也涉及治疗或预防神经变性疾病、优选阿尔茨海默氏病的方法，其包括向需要这样的治疗或预防的对象施用治疗有效量的本发明的药物组合物。

关于本发明的该方法，如上所述的关于本发明的应用的所有实施方案也适用。

本发明也涉及 GPR49-相互作用分子在体外调控、优选地抑制 β -分泌酶和/或 γ -分泌酶活性的应用。例如，本发明包括通过 GPR49-相互作用分子调控、优选地抑制细胞培养物中的 β -分泌酶和/或 γ -分泌酶活性。如上所述的关于 GPR49-相互作用分子的所有实施方案也适用于本发明的该应用。

下面的实施例将更详细地描述本发明的主题。

实施例 1

使用 TAP-技术，其更完整地分别记载在 EP 1 105 508 B1 和 Rigaut, 等, 1999, Nature Biotechnol. 17:1030-1032, 并如下所述进一步改进，进行蛋白纯化。使用如下所述的质谱法鉴别蛋白。

将 GPR49 鉴别为与 TAP 技术进入点 Aph1a、APP-C99、BACE1 和 Fe65L2 (图 1) 的蛋白复合物的成员。

第 1 部分: TAP-标记的诱饵的构建

通过 RT-PCR，得到了编码完整 ORF 的 cDNA。使用 RNeasy 小试剂盒 (Qiagen)，从适当的细胞系制备总 RNA。使用基因-特异性的引物，以用于长模板试剂盒 (Life Technologies) 的 SUPERScript One-Step RT-PCR，进行 cDNA 合成和 PCR。扩增 35-40 个循环后，用 MinElute PCR 纯化试剂盒 (Qiagen)，凝胶纯化具有预期大小的 PCR-产物，如果需要，用于进一步扩增。在凝胶纯化前，通过巢床 PCR 扩增低丰度的 RNA。

将 NotI 的限制位点连接到 PCR 引物上, 以允许将扩增的 cDNA 亚克隆进逆转录病毒载体 pIE94-N/C-TAP, 从而产生具有 TAP-标记的 N-或 C-末端融合体 (Rigaut 等, 1999, Nature Biotechnol. 17:1030-1032)。为下面的诱饵/进入点选择 N-末端标记: 早老素 1, 早老素 2, Aph-1a, Aph-1b, Pen-2, APP, Tau, Fe65, Calsenilin。为下面的诱饵/进入点选择 C-末端标记: Nicastrin, Aph-1a, Aph-1b, BACE1 D215N, APP, APP695SW, APP-C99, Fe65, X11B。

通过限制消化, DNA 测序和使用 TNT T7 快速偶联的转录/翻译系统 (Promega inc.) 通过体外翻译, 分析克隆。使用 TAP-标记的蛋白 A 部分进行检测, 通过蛋白印迹, 证实了蛋白的存在。简而言之, 通过标准的 SDS-PAGE 分离蛋白, 然后使用来自 Pharmacia Biotech 的 MultiphorII 印迹装置, 半干转移到硝酸纤维素膜 (PROTRAN, Schleicher&Schuell) 上。转移缓冲液由 48 mM Tris, 39 mM 甘氨酸, 10% 甲醇和 0.0375% 十二烷基硫酸钠组成。在添加了 10% 干奶粉和 0.1% Tween 20 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中封闭后, 用在封闭溶液中稀释的过氧化物酶-抗-过氧化物酶可溶复合物 (Sigma) 探测转移的蛋白。彻底洗涤后, 通过增强化学发光 (ECL; Amersham Pharmacia Biotech), 观察免疫反应蛋白。

第 2 部分: 病毒的制备和感染

使用基于 MoMLV 的重组病毒作为载体。

如下进行制备:

2.1. 病毒的制备

293 gp 细胞生长至 100% 汇合。将它们以 1:5 分到聚-L-赖氨酸平板 (在 PBS 中 1:5 稀释的聚-L-赖氨酸 [0.01% 原液, Sigma P-4832], 放在平板上至少 10 min)。在第 2 天, 将 63 微克逆转录病毒载体 DNA 和 13 微克编码合适的包膜蛋白的质粒的 DNA 一起, 转染进 293 gp 细胞 (Somia, 等, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:12667-12672; Somia 等, 2000, J. Virol. 74:4420-4424)。在第 3 天, 将培养基替

换为 15 ml DMEM + 10% FBS / 15-cm 培养皿。在第 4 天, 收获含有病毒的培养基(上清液)(在转染后培养基更换后 24 h)。当计划第二次收集时, 将 DMEM 10 % FBS 加入平板, 并将平板温育另外 24 h。如下进行所有收集: 经 0.45 微米过滤器(Corning GmbH, 醋酸纤维素, 431155), 过滤上清液。将过滤器置于圆锥形异质同晶聚合物离心管(Beckman, 358126)中, 后者置于 SW 28 转子(Beckman)的桶中。在 21 °C, 以 19400 rpm, 在 SW 28 转子中超速离心经过滤的上清液 2 小时。抛弃上清液。使用气溶胶安全的管尖, 通过上下吸液 100 次, 将含有病毒的沉淀重新悬浮在小体积(例如 300 微升) 汉克平衡盐溶液 [Gibco BRL, 14025-092] 中。将病毒用于如下所述的转染。

2.2. 感染

在前一天, 将感染的细胞平板接种到 6-孔平板的一个孔中。感染前 4 小时, 将细胞上的旧培养基替换为新鲜培养基。仅仅加入最小体积, 以便完全覆盖细胞(例如 700 微升)。在感染期间, 细胞活跃地分裂。

下面(“3. 细胞系”)进一步描述了细胞和它们的生长条件。

向浓缩的病毒中, 加入聚凝胺(溴化己二甲铵; Sigma, H 9268), 达到 8 微克/ml 的终浓度(这相当于 2.4 微升 1 毫克/ml 聚凝胺原液/300 微升浓缩的逆转录病毒)。在室温, 在聚凝胺中温育病毒 1 小时。为了感染, 将病毒/聚凝胺混合物加给细胞, 并在 37 °C, 在合适的 CO₂ 浓度下, 温育数小时(例如经过白天或过夜)。感染后, 将感染的细胞上的培养基替换为新鲜培养基。在它们变成汇合后, 照常将细胞传代。细胞含有整合进它们的染色体中的逆转录病毒, 且稳定地表达目标基因。

2.3. 细胞系

使用 SKN-BE2 细胞进行表达。在 95% OptiMEM + 5% 添加了铁的小牛血清中, 培养 SKN-BE2 细胞(美国典型培养物保藏中心-No. CRL-2271)。

第 3 部分：检查 TAP-标记的蛋白的表达模式

通过免疫印迹分析和/或通过免疫荧光，检查 TAP-标记的蛋白的表达模式。取决于 TAP-标记的蛋白的类型，根据 No. 1 或 No. 2，进行免疫荧光分析。根据 No. 3，进行免疫印迹分析。

3.1 对固定的哺乳动物细胞的质膜和 ER 结合的蛋白进行间接免疫荧光染色的方案

细胞在聚赖氨酸包被的 8 孔室载玻片上的 FCS 培养基中生长至 50% 汇合。然后，在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 溶液 (0.14M 磷酸盐，0.1M NaCl pH 7.4) 中稀释的 4% 多聚甲醛中，进行细胞的固定。以 300 微升/孔，在室温培养细胞 30 分钟。在室温，在 PBS 中的 0.1M 甘氨酸中，淬灭 2x 20 分钟。用在 0.3% 皂苷 + PBS 中的 1% 牛血清白蛋白 (BSA)，在室温封闭至少 1 小时。在 +4°C，在封闭溶液中温育一抗过夜。在个案基础上，确定抗体的适当稀释度。在室温，在含有 0.3% 皂苷的 PBS 中，洗涤细胞 2x 20 分钟。在封闭溶液中，温育二抗。以 1:1000 稀释 Alexa 594 偶联的山羊抗-兔 (Molecular Probes)。以 1:1000 稀释 Alexa 488 偶联的山羊抗-小鼠 (Molecular Probes)。使用 DAPI 来标记 DNA。如果使用鬼笔环肽来标记 F-肌动蛋白，以 1:500 稀释该药物，并与二抗一起温育。然后，在室温，在 PBS 中再洗涤细胞 2x 20 分钟。去除多余的缓冲液，将细胞置于含有抗-漂白剂的培养基 (Vectashield, Vector Laboratories) 中。

3.2 对固定的哺乳动物细胞的非-质膜结合的蛋白进行间接免疫荧光染色的方案

细胞在聚赖氨酸包被的 8 孔室载玻片上的 FCS 培养基中生长至 50% 汇合。然后，在室温 (RT)，以 300 微升/孔，在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 溶液 (0.14M 磷酸盐，0.1M NaCl pH 7.4) 中稀释的 4% 多聚甲醛中，进行细胞的固定 30 分钟。在室温，在 PBS 中的 0.1M 甘氨酸中，淬灭 2x 20 分钟。在室温，用在 PBS 中的 0.5% Triton X-100，透化细胞 10

分钟。在 0.3% 皂苷 + PBS 中的 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 中，在室温封闭至少 1 小时 (封闭溶液)。在 +4°C，在封闭溶液中温育一抗过夜。必须在个案基础上确定抗体的适当稀释度。在室温，在含有 0.3% 皂苷的 PBS 中，洗涤细胞 2x 20 分钟。在封闭溶液中，温育二抗。以 1:1000 稀释 Alexa 594 偶联的山羊抗-兔 (Molecular Probes)。以 1:1000 稀释 Alexa 488 偶联的山羊抗-小鼠 (Molecular Probes)。使用 DAPI 来标记 DNA。如果使用鬼笔环肽来标记 F-肌动蛋白，以 1:500 稀释该药物，并与二抗一起温育。在室温，在 PBS 中洗涤细胞 2x 20 分钟。去除多余的缓冲液，将细胞置于含有抗-漂白剂的培养基 (Vectashield, Vector Laboratories) 中。

3.3 免疫印迹分析

为了分析 TAP-标记的蛋白的表达水平，在 60 μ l DNA 酶 I 缓冲液 (5% 甘油, 100 mM NaCl, 0.8 % NP-40 (IGEPAL), 5 mM 硫酸镁, 100 μ g/ml DNA 酶 I (Roche Diagnostics), 50 mM Tris, pH 7.5, 蛋白酶抑制剂混合物) 中，在冰上裂解细胞沉淀 (来自 6-孔皿) 15 min。将每份样品分成两个等分试样。第一份以 13,000 rpm 离心 5 min，在上清液中产生 NP-40-可提取的物质；仔细地研磨第二份 (全部材料)。在 50°C，在振荡器上，将 NP-40-可提取的物质和全部材料各 50 μ g 与含有 DTT 的样品缓冲液混合 30 min，通过在预凝成块的 4-12% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen) 上进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。然后，使用不连续缓冲系统的半干方法，将蛋白转移到硝酸纤维素。简而言之，将凝胶和硝酸纤维素膜叠放到浸泡在阳极缓冲液 (3 层缓冲液 A1 (0.3 M Tris-HCl) 和 3 层缓冲液 A2 (0.03 M Tris-HCl)) 或阴极缓冲液 (3 层 0.03 M Tris-HCl, pH 9.4, 0.1 % SDS, 40 mM $\square$ -氨基己酸) 中的滤纸之间。立刻在 600 mA 进行 2 种凝胶的电转移 25 min。用丽春红 S 溶液使转移的蛋白显色 1 分钟，以控制转移效率，然后在水中脱去染色。在室温，在 TBST (含有 0.05% Tween-20 的 TBS) 中的 5% 脱脂奶粉中封闭膜 30 min。随后，在室温，与 HRP-偶联的 PAP 抗体 (在 5% 奶

/TBST 中 1:5000 稀释)温育 1 h, 在 TBST 中洗涤 3 次 10 min。最后, 将印迹膜浸泡在化学发光底物 (ECL, Roche Diagnostics) 中 2 min, 并暴露于 X-射线胶片或在成像台上分析。

第 4 部分 纯化蛋白复合物

使蛋白复合物纯化适合于 TAP-标记的蛋白的亚细胞定位, 并如下进行。

4.1 细胞质蛋白的裂解物制备

用细胞刮刀, 收获约 1×10^9 贴壁细胞(平均), 并在冰冷的 PBS 中洗涤 3 次 (3 min, 550g)。将收集的细胞冷冻在液氮中, 或立即进一步加工。为了细胞裂解, 将细胞沉淀重新悬浮于 10 ml CZ 裂解缓冲液 (50 mM Tris-Cl, pH 7.4; 5 % 甘油; 0,2 % IGEPAL; 1.5 mM $MgCl_2$; 100 mM NaCl; 25 mM NaF; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM DTT; 每 25 ml 缓冲液含有 1 片无 EDTA 的蛋白酶抑制剂混合物 (Complete™, Roche)), 并通过用紧密配合的杵在 dounce 匀浆器中冲击 10 次进行匀浆。将裂解物在冰上温育 30 min, 以 20,000g 离心 10 min。以 100,000g, 将上清液进行另外的超速离心步骤 1 h。回收上清液, 并迅速冷冻在液氮中, 或立即进一步加工。

4.2 膜蛋白的裂解物制备

用细胞刮刀, 收获约 1×10^9 贴壁细胞(平均), 并在冰冷的 PBS 中洗涤 3 次 (3 min, 550g)。将收集的细胞冷冻在液氮中, 或立即进一步加工。为了细胞裂解, 将细胞沉淀重新悬浮于 10 ml 膜-裂解缓冲液 (50 mM Tris, pH 7.4; 7.5 % 甘油; 1 mM EDTA; 150 mM NaCl; 25 mM NaF; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM DTT; 每 25 ml 缓冲液含有 1 片无 EDTA 的蛋白酶抑制剂混合物 (Complete™, Roche)), 并通过用紧密配合的杵在 dounce 匀浆器中冲击 10 次, 进行匀浆。以 750g 离心裂解物 10 min, 回收上清液, 并以 100,000g 进行超速离心步骤 1 h。将膜沉淀重新悬浮于 7,5 ml 含有 0.8% 正十二烷基- β -D-麦芽苷的膜-裂解缓冲

液中，在恒定搅拌下，在 4°C 温育 1 h。以 100,000g，将样品进行另一个超速离心步骤 1 h，并将溶解的物质迅速冷冻在液氮中，或立即进一步加工。

4.3 核蛋白的裂解物制备

用细胞刮刀，收获约 1×10^9 贴壁细胞(平均)，并在冰冷的 PBS 中洗涤 3 次 (3 min, 550g)。将收集的细胞冷冻在液氮中，或立即进一步加工。为了细胞裂解，将细胞沉淀重新悬浮于 10 ml 低渗的-裂解缓冲液 (10 mM Tris, pH 7.4; 1.5 mM $MgCl_2$; 10 mM KCl; 25 mM NaF; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM DTT; 每 25 ml 缓冲液含有 1 片无 EDTA 的蛋白酶抑制剂混合物 (Complete™, Roche))，并通过用紧密配合的杵在 dounce 匀浆器中冲击 10 次，进行匀浆。以 2,000g 离心裂解物 10 min，将得到的上清液 (S1) 保藏在冰上。将核沉淀 (P1) 重新悬浮于 5 ml 核-裂解缓冲液 (50 mM Tris, pH 7.4; 1.5 mM $MgCl_2$; 20 % 甘油; 420 mM NaCl; 25 mM NaF; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM DTT; 每 25 ml 缓冲液含有 1 片无 EDTA 的蛋白酶抑制剂混合物 (Complete™, Roche))，并在冰上温育 30 min。将样品与 S1 合并，用 7 ml 稀释缓冲液 (110 mM Tris, pH 7.4; 0.7 % NP40; 1.5 mM $MgCl_2$; 25 mM NaF; 1 mM Na_3VO_4 ; 1 mM DTT) 进一步稀释，并在冰上温育 10 min，以 100,000g 离心 1h。将最后的上清液 (S2) 迅速冷冻在液氮中。

4.4 串连亲和纯化

在 37°C 水浴，迅速解冻冷冻的裂解物，并以 100,000g 离心 20 min。回收上清液，在恒定搅拌下，在 4°C，与 0.2 ml 沉降的兔 IgG-琼脂糖珠子 (Sigma) 一起温育 2 h。用 10 ml CZ 裂解缓冲液 (每 50ml 缓冲液含有 1 片 Complete™ 片剂 (Roche)) 洗涤固定化的蛋白复合物，并用 5 ml TEV 剪切缓冲液 (10 mM Tris, pH 7.4; 100 mM NaCl; 0.1 % IGEPAL; 0.5 mM EDTA; 1 mM DTT) 进一步洗涤。通过与 5 μ l TEV 蛋白酶 (GibcoBRL, Cat.No. 10127-017) 在 16°C、在 150 μ l TEV 剪切缓冲液

中温育 1 小时，洗脱蛋白-复合物。回收洗脱物，与在 0.2 ml CBP 结合缓冲液 (10 mM Tris, pH 7.4; 100 mM NaCl; 0.1 % IGEPAL; 2mM MgAc; 2mM 咪唑; 1mM DTT; 4 mM CaCl₂) 中的 0.2 ml 沉降的钙调蛋白亲和珠子 (Stratagene) 合并，随后在恒定搅拌下，在 4°C 温育 1 小时。用 10 ml CBP 洗涤缓冲液 (10 mM Tris, pH 7.4; 100 mM NaCl; 0.1 % IGEPAL; 1mM MgAc; 1mM 咪唑; 1mM DTT; 2 mM CaCl₂) 洗涤固定化的蛋白复合物，并通过添加 600 μ l CBP 洗脱缓冲液 (10 mM Tris, pH 8.0; 5 mM EGTA)，在 37°C 洗脱 5 min。在硅化的试管中回收洗脱物并冻干。在 50 μ l 4x Laemmli 样品缓冲液中，煮沸剩余的钙调蛋白树脂 5 min。分离样品缓冲液，与冻干的级分合并，并装载到 NuPAGE 梯度凝胶 (Invitrogen, 4-12%, 1.5 mm, 10 孔) 上。

第 5 部分 质谱法鉴别蛋白

5.1 质谱法分析之前的蛋白消化

基本上按照 Shevchenko 等, 1996, Anal. Chem. 68:850-858 所述的方法，将凝胶分离的蛋白还原，烷基化并在凝胶中消化。简而言之，使用干净的解剖刀，从凝胶切下凝胶分离的蛋白，使用 10 mM DTT (在 5mM 碳酸氢铵中, 54°C, 45 min) 还原，随后用 55 mM 碘乙酰胺 (在 5mM 碳酸氢铵中) 在室温、在黑暗中烷基化 (30 min)。在 5mM 碳酸氢铵中以 12.5 ng/ μ l 的蛋白酶浓度，用猪胰蛋白酶 (Promega) 在凝胶中消化经还原且烷基化的蛋白。在 37°C，进行消化 4 小时，随后使用 5 μ l 5% 甲酸终止反应。

5.2 质谱法分析之前的样品制备

用 20 μ l 1% TFA 提取凝胶塞 2 次，并与酸化的消化上清液合并。在真空离心机中干燥样品，并重新悬浮于 13 μ l 1% TFA。

5.3. 质谱数据获取

将肽样品注射进毫微 LC 系统 (CapLC, Waters 或 Ultimate, Dionex)，后者直接连接到四极 TOF (QTOF2, QTOF Ultima, QTOF Micro,

Micromass 或 QSTAR Pulsar, Sciex) 或离子阱 (LCQ Deca XP) 质谱仪。使用水性和有机溶剂的梯度(见下面), 在 LC 系统上分离肽。溶剂 A 是在 0.5% 甲酸中的 5% 乙腈, 溶剂 B 是在 0.5% 甲酸中的 70% 乙腈。

时间 (min)	% 溶剂 A	% 溶剂 B
0	95	5
5.33	92	8
35	50	50
36	20	80
40	20	80
41	95	5
50	95	5

在质谱仪中, 部分地测序从 LC 系统洗脱的肽。

5.4. 蛋白鉴别

使用在 LC-MS/MS 实验中产生的肽质量和断裂 (fragmentation) 数据, 查询 fasta 格式化的蛋白和核苷酸序列数据库, 其由 NCBI (对于 NCBI nr, dbEST 以及人和小鼠基因组) 和欧洲生物信息研究所 (EBI, 对于人, 小鼠, 果蝇和美丽线虫蛋白质组数据库) 维持和定期更新。使用软件工具 Mascot (Matrix Science; Perkins 等, 1999, Electrophoresis 20: 3551-3567), 通过将测量的肽质量和断裂数据与从数据库中的输入条目计算的相同数据相关联, 鉴别蛋白。搜索标准随使用哪个质谱仪进行分析而变化。

实施例 2: siRNA-介导的 GPR49 的 knock-down 对 $\text{A}\beta 1-42$ 水平的影响

结果:

我们注意到, 类似于针对已知的 APP 加工的效应物 BACE1 和 nicastrin 的 siRNA, 靶向 GPR49 的 siRNA 造成 $\text{A}\beta 1-42$ 分泌的显著弱化, 而 Luc3 siRNA 没有作用 (图 2A), 这证实了 GPR49 在调节 APP 的

加工/分泌中起作用。

我们证实, GPR49-siRNA 实际上确实干扰 GPR49 的表达 (图 2B)。

采用 RNAi 基因表达干扰策略, 进行 GPR49 作为 APP 加工的效应物的功能验证: 将针对 GPR49 的 siRNA, 或针对 APP 加工的已知效应物 BACE1 或 nicastrin 的 siRNA, 或针对无关的 Luc3 的 siRNA, 转染进表达人 APP695 的 SK-N-BE2 成神经细胞瘤细胞。由 Dharmacon Research Inc. 合成人 GPR49 的 siRNA。

为 GPR49 使用的 siRNA 的序列是: AACAGCAGTATGGACGACCTT。

按照生产商的说明书, 使用 LipofectAMINE 2000 (Invitrogen), 进行 SK-N-BE2 细胞的转染。简而言之, 转染前 12-16 小时, 以 1.0×10^4 细胞的密度, 将细胞接种到 85 μ l 终体积 /96-孔。将 25 nM siRNA 与 8 μ l Opti-MEM 缓冲液 (Gibco) 和 60 ng 载体 DNA 相混合, 并在室温温育混合物 20 分钟, 然后加入细胞。转染后 16 和 48 小时, 将培养基分别替换为 100 μ l 或 200 μ l 有或没有血清的生长培养基。转染后 72 小时, 收获 100 μ l 上清液用于 A β 1-42 ELISA (Innogenetics)。按照生产商的说明书, 进行该测定。

通过定量 RT-PCR, 评估选择的 siRNA 的 Knockdown 效率。简而言之, 平板接种 5×10^5 SKNBE2 细胞/6-孔, 并在次日用 25 nM siRNA 转染。转染后 36 h, 收获细胞, 制备总 RNA, 并使用标准方法进行反转录。按照生产商的说明书, 使用等量的 cDNA 和 GPR49-特异性的引物, 检测 GPR49 的相对表达水平。所有值都相对于人参照 RNA (Stratagene) 标准化。

实施例 3: GPR49 活性的测定

目前尚不知道由 GPR49 触发的信号转导级联。但是, 已经显示其它家族成员——人糖皮质激素受体以及在线虫中的种系发生上较远的推定的 LGR 正向同源物 (Kudo M, Chen T, Nakabayashi K, Hsu SY, Hsueh AJ. (2000) The nematode leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor (LGR) protein homologous to

vertebrate gonadotropin and thyrotropin receptors is constitutively active in mammalian cells. Mol Endocrinol. 14(2):272-84)通过腺苷酸环化酶-依赖性机理进行信号转导。后者当在哺乳动物细胞中异源表达时会造成细胞环磷酸腺苷(cAMP)水平的组成性增加。

为了证实 GPR49 确实与 cAMP 途径偶联,可以使用公知领域可得到的几种测定。例如, Bresnick 等(Bresnick JN, Skynner HA, Chapman KL, Jack AD, Zamiara E, Negulescu P, Beaumont K, Patel S, McAllister G (2003) Identification of signal transduction pathways used by orphan g protein-coupled receptors. Assay Drug Dev Technol. 1(2):239-49.)已经使用 β -内酰胺酶报道基因构建体来鉴别孤儿 GPCR 使用的信号转导途径。

然后,基于它们触发细胞 cAMP 升高的能力鉴别 GPR49 调控剂,所述升高在表达 GPR49 的细胞中而不在 GPR49 缺乏的细胞中观察到。对 cAMP 的直接测量可以例如以高通量格式,使用 cAMP-反应元件(CRE)-萤光素酶报道细胞系完成 (Gabriel D, Vernier M, Pfeifer MJ, Dasen B, Tenaillon L, Bouhelal R (2003) High throughput screening technologies for direct cyclic AMP measurement. Assay Drug Dev Technol. 1 (2):291-303)。本领域的技术人员显而易见检测 cAMP 升高或 cAMP-依赖性信号传递的其它方法。关于鉴别以前的孤儿 GPCR 的小分子调控剂的先例的综述,见(Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH, Patchett AA (2001) Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. Trends Pharmacol Sci. 22(3):132-40)。

实施例 4: GPR49 调控剂对 A β 1-42 产生/分泌的调控

将稳定地过表达人 APP695 的 SKNBE2 细胞(SK NBE2/APP695) (或另一种合适的细胞系),或具有增强的 β -/ γ -分泌酶剪切动力学的合适的突变体,平板接种在生长培养基中,并在次日早晨血清-剥夺

(serum-starved) 4 小时。然后, 加入在无血清培养基中稀释的 GPR49 调控剂, 优选抑制剂, 并温育合适的时间段。收集细胞上清液, 并通过 ELISA (Innotest β -淀粉样蛋白 (1-42), 购自 INNOGENETICS N. V., Belgium) 测定 A β 1-42 的水平。

下面的附图更详细地描述了本发明:

图 1: 发现 GPR49 与之相互作用的 TAP 进入点(白色)的示意图。

图 2: siRNA-介导的 GPR49 表达的 knock-down 减弱 A β 1-42 的产生/分泌。

图 2A: 将针对 BACE1, nicastrin, GPR49 或 Luc3 的 siRNA, 转染进过表达 APP695 的 SK-N-BE2 成神经细胞瘤细胞。转染后 48h, 去除生长培养基, 并在无血清的培养基中培养细胞过夜。收集上清液, 通过 ELISA (Innotest β -淀粉样蛋白 (1-42), 购自 INNOGENETICS N. V., Belgium) 测定 A β 1-42 的水平。一式两份地进行至少 3 次独立实验。显示了代表性的实施例。

图 2B: 针对 GPR49 的 siRNA, 而不是针对无关的 Luc3 的 siRNA, 特异性地减少 GPR49-mRNA, 如通过定量 RT-PCR 分析所评估的。为每个 siRNA 显示的 2 个条柱代表着 2 次独立实验。

图 3: 以单字母密码描绘的人 GPR (LGR5; 含有富亮氨酸重复序列的 G 蛋白-偶联的受体 5) 的氨基酸序列。

图 4: 人 LGR4, LGR5/GPR49 和 LGR6 的多序列比对。

图1

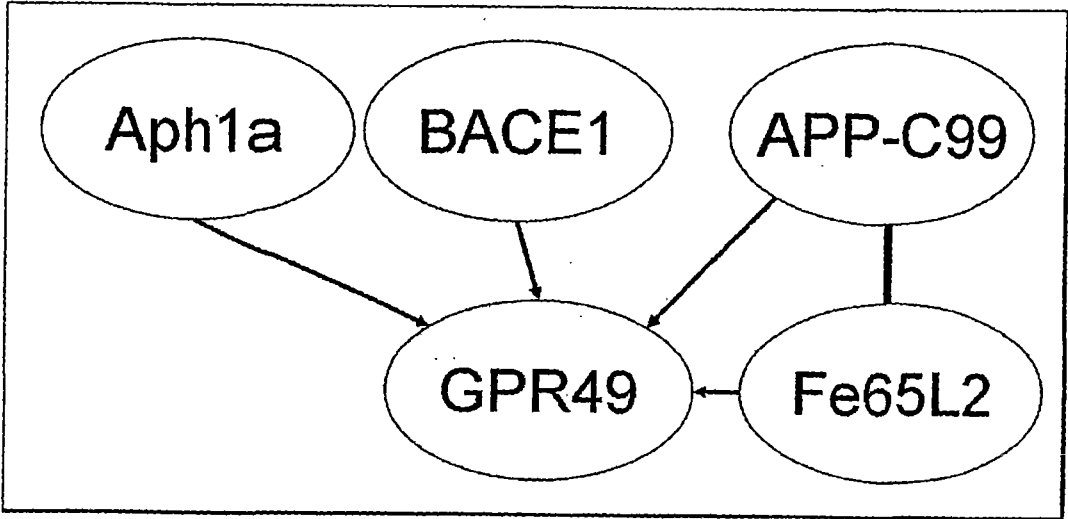


图 2

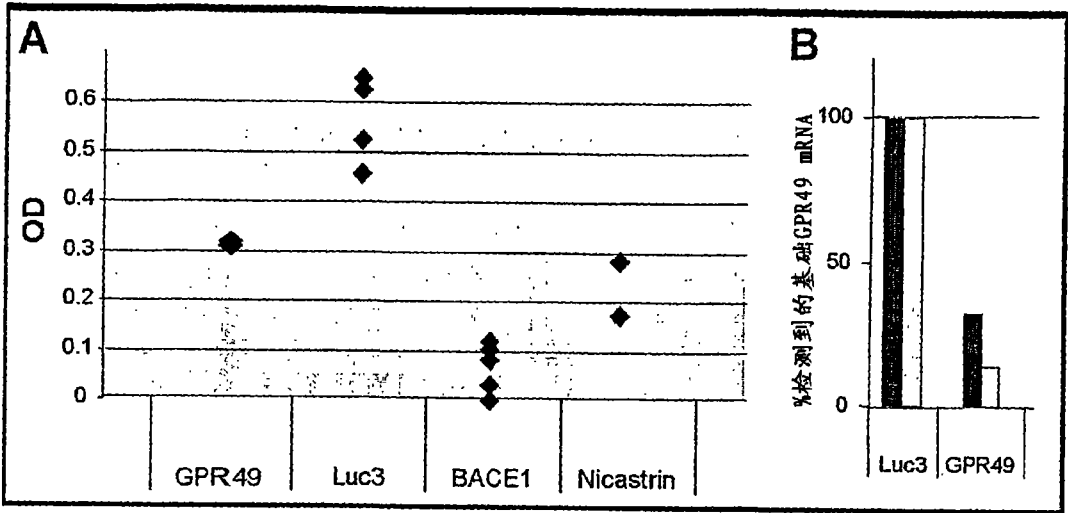


图3

```

MDTSRLGVLL SLPVLLQLAT GGSSPRSGVL LRGCPHCHC EPDGRMLLRV
DCSDLGLSEL PSNLSVFTSY LDLSMNNISQ LLPNPLPSLR FLEELRLAGN
ALTYIPKGAF TGLYSLKVLM LQNNQLRHVP TEALQNLRSI QSLRLDANHI
SYVPPSCFSG LHSRLHLWLD DNALTEIPVQ AFRSLSALQA MTLALNKIHH
IPDYAFGNLS SLVVLHLHNN RIHSLGKKCF DGLHSLETLD LNYNNLDEFP
TAIRTLNLK ELGFHSNNIR SIPEKAFVGN PSLITIHFYD NPIQFVGRSA
FQHLPELRTL TLNGASQITE FPDLTGTANL ESLLTGAQI SSLPQTVCNQ
LPNLQVLDLS YNLLEDLPSE SVCQKLQKID LRHNEIYEIK VDTFQQLLSL
RSLNLAWNKI AIIHPNAFST LPSLIKLDLS SNLLSSFPIT GLHGLTHLKL
TGNHALQSLI SSENFPPELV IEMPYAYQCC AFGVCENAYK ISNQWNKGDN
SSMDDLHKKD AGMFQAQDER DLEDFLDFE EDLKALHSVQ CSPSPGPFKP
CEHLLDGWLI RIGVWTIAVL ALTCNALVTS TVFRSPLYIS PIKLLIGVIA
AVNMLTGVSS AVLAGVDAFT FGSEFARHGAW WENGVGCHVI GFLSIFASES
SVFLLTLAAL ERGFSVKYSA KFETKAPFSS LKVIILLCAL LALTMAAVPL
LGGSKYGASP LCLPLPFGEF STMGYMVALI LLNSLCFLMM TIAYTKLYCN
LDKGDLENIW DCSMVKHIAL LLFTNCILNC PVAFLSFSSL INLTFISPEV
IKFILLVVVP LPACLNPLLY ILFNPHEKED LVSLRKQTYV WTRSKHPSLM
SINSDDVEKQ SCDSTQALVT FTSSSITYDL PPSSVPSPAY PVTESCHLSS
VAFVPCL

```

图4 (1/2)

```

LGR5      MDSRLGVLLSLPVLLQLATGGSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCSDLGSELPSNSVFTSYLDLSMNNISQ
LGR6      -----MRLEGEGRSARAGQNLRSAGSARRGAPR-----DLSMNNITE
LGR4      ----MPGFLGLLCFLALGLLGSAGPSGAAPLCAAPCSCDGD RR----VDCSGKGLTAVPEGLSAFTQALDISMNNITQ
共有/80%  .....b.L.h.Gpts.tG....sss.pps.sc.....DLSMNNI*p

LGR5      LLENPLPSLRFLEELRLAGNALTYIPKGFTGLYSLKVLMLQNNQLRHVPTALQNLRSLSLRLDANHSIVPPSCFSG
LGR6      LQPGLFHHLRFEELRLSGNHLSHIPGQAFSGLYSLKILMLQNNQLGGIPAEALWELPSLQSL-----
LGR4      LPEDAFKNFPFLEELQLAGNDLSFIHPKALSGLKELKVLTLQNNQLKTVPEAIRGLSALSRLDANHSIVPEDSFEG
共有/80%  L..s.b.pb.FLEELpLtGN.L*aI...Ab*GLbpLKlLhLQNNQL.hlpSeAlb.L.tLQSL.....

LGR5      LHSRLHLWLDNALTEIPVQA.FRSLSALQAMTLALNKIHHPDYAFGNLSSLVVLHLHNNRIHSLGKCFDGLHSLETLD
LGR6      -----D
LGR4      LVQLRHLWLDNLSLEVPHPLSNLPTLQALTALNKISSIPDFAFTNLSSLVVLHLHNNKIRLSQRCFDGLDNLETLD
共有/80%  .....D

LGR5      LNYNNLDEFPTAIRTLNLKE.LGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSLITIHFDNPIQFVGRSAFQHLPELRLTLNGASQITE
LGR6      LNYNKLQEFVPAIRTLGRLQE.LGFHNNNIKAIPEKAFMGNPLLQTIHFYDNPIQFVGRSAFYQLPKLHTLSLNGAMDIE
LGR4      LNYNNLGEFPQAIKALPSLKE.LGFHSNSISVIPDGAFDGNPLLRTHLYDNPLSFVGNSAFHNLSDLSLVIRGASMVQQ
共有/80%  LNYNP.L.EFP.AI+sLspLpELGFHsNsIpsIP-.AF.GNP.LbTIHbYDNPlpFVGpSAfp.LscL+*LslpGA..lpp

LGR5      FPDLTGTANLESITLTAQIS.SLPQTVCNQLPNLQVLDLSYNLLEDLPSFSVCQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLLSL
LGR6      FPDLTGTTSLIILTLTRAGIRLLPSGMCCQLPRLRVLELSHNQIEELPSLHRCQKLEIQLQHNRIWEIGADTFSQLSSL
LGR4      FPNLTGTVHLESITLTGKISSIPNNLQEQKMLRLTDLGYNNIRDLPSFNGCHALEEISLQRNQIYQKEGTFOGLISL
共有/80%  FFsLpGTspLE.LTLT.s.Ip..lPpshCpbb..LpsL-LSaN.lc-LPSbp.Cp.LpcIsLp+NpIapI..sTFp.L.SL

LGR5      RSLNLAWNKAIIHPNAFSTLPSLIKLDLSSNLLSSFFITGLHGLTHLKLTLGNHALQSLISSENFPELKIEMPIYAYQCC
LGR6      QALDLSWNAIRSINPEAFSTLHSLVKLDLTDNQLTTLPLAGLGGLMHLKLKGNLALSQAFSKDSFPKLRILEVPIYAYQCC
LGR4      RILDLSRNLIHEIHSRAFATLGPITNLDSFNELTSFPTEGLNGLNQLKLVGNFKLKEALAAKDFVNLRSLSVPIYAYQCC
共有/80%  p.LsLtbN.I..IHspAftTL.sihpLDl*.NbL**bPh.GL.GL.pLKL.GNb.Lpphbt.csFspL+.lphPIYAYQCC

LGR5      AFGVCENAYKISNQWNGDNS.SMDD-LHKKDAGMEQAQDE----RDLEDFLLDFEEDLKALHSVQCSPSFGPFKPCERLL
LGR6      PYGMCASFFKASGQWEAEDLHLDDEESSKRPLGLLARQAENHYDQDLDELQLEMEDS-KPHFSVQCSPTPGPFKPCYELF
LGR4      AFWGCDSYANLN----TEDNSLQDHSVAQEKGKCMSTADA-----ANVTSTLENEEHSQIIHCTPSTGAFKPCYELL
共有/80%  sahhC.shhphs.....D.p..Dc...pc.h.hb...s.....ph..pbEpp.†sb..lpC*P*sGsFKPCEaLb

LGR5      DGHIRIGVWTIAVLALTCNALVTSTVFR-SPLYISPIKLLIGVIAAVNMLTGVSSAVLAGVDAFTFGSFARHGAWWENG
LGR6      ESWGIRLAVWAIVLSVLNCGLVLLTVFAGGVPVLPVPVKFVVGAIAGANTLTGISCGLLASVDALTFGQFSEYGARWETG
LGR4      GSWMIRLTVWFIFLVALFFNLVLILTTFE-SCTSLPSSKLFIGLISVSNLFMGIYTGILTFDVAWSWGRFAEFGIWWETG
共有/80%  .tWhIRIsVWhIhltlhhNhLvh.Tsf..tsh.lss.KbhlGhItssNhhbGl.stlLs.lDah*aGpftcaGhbWESG

```

续为图4 (2/2)

图4 (2/2)

续接图4 (1/2)

LGR5	VGCHVIGFLSIFASESSVFLTLAALERGFVSVKYSAKFETKAPFSSLVIIILLCALLALTMAAVPLGGSKYGASPLCLP
LGR6	LGCRTATGFLAVLGSEASVLLTLAAVQCSVSVSCVRAYGKSPSLGSRVAGVLGCLALAGLAAALPLASVGEYGASPLCLP
LGR4	SGCKVAGFLAVFSESAIFLLMLATVERSLSAKDIMONGKSNHLKQFRVAALLAFLGATVAGCFPLFHRGEYSASPLCLP
共有/80%	.GC+shGFLt1btSEtt1bLLhLAslpthSsp.....pps.b.ph+shhLhshhhAhhhtshPLh..tcYtASPLCLP
LGR5	--LPFGEPSTMGYMVALILLNSLCFLMMTIAYTKLYCNLDKGDLENIWDCSMVKHIALLLFTNCILNCPVAFLSFSSLIN
LGR6	YAPPEGQPAALGFTVALVMNSFCFLVAGAYIKLYCDLPRGDFEAVWDCAMVRHVAVLIADGLLYCPVAFLSFASMLG
LGR4	--FPTGETPSLGFTVTLLVLLNSLAFLMAVIYTKLYCNLEKEDLSENSQSSMIKHVAVLIFTNCIFFCPVAFSFAPLIT
共有/80%	...P.GpsssbGahVsLlbbNSbsFLhshhhYhKLYCsL.+Dbp...pstM1+H1AbL1Fssslb.CPVAFbSftshls
LGR5	LTFISPEVIKFILLVVVPLPACLNPLLYILFNPHEKEDLVSLKQTYVWTRSKHPSLMSINSDDVEKQSCDS-----TQ
LGR6	LFPVTPEAVKSVLLVVLPLPACLNPLLYLLFNPHEKEDLVSLKQTYVWTRSKHPSLMSINSDDVEKQSCDS-----TQ
LGR4	AISISPEIMKSVTLIFFPLPACLNPLVLYVFNPKFKEDWKLLKRRVTKKSGSVSVSISQGGCLEQDFYYDCGMYSHLQG
共有/80%	hh.1*PEhK.1hLlhhPLPACLNPLLYlbFNP+F+-Db..L+.p.....t.pssl...sts..pc..hDs.....p.
LGR5	ALVFTSSSITYDLPPS-----SVSPAYPVTESCHLS-----
LGR6	ALVAFSDVDLILEASEAGRPPGLEYGFPSVTLISQQPGAPRLEGSHCVEPEGNHFGNPQPSMDGELLRAEGSTPAGG
LGR4	NLTVDCCESEFLTKFVSCHELIKSHSCPALAVASCORPEGYWDCGTQSAHSDYADEEDSFVSDSSDQVQACGRACFYQ
共有/80%	sLsshssp.hb.h..s.....Ss.pP.h...-ssp.s.....
LGR5	-----SVAFVPECL
LGR6	GLSGGGGFQPSGLAFASHV
LGR4	SRGFPLVRYAYNLPRVKD-
共有/80%	slsbs.p.