

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/67 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

专利号 ZL 99109067.5

[45] 授权公告日 2007 年 1 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1296480C

[22] 申请日 1999.6.17 [21] 申请号 99109067.5

[30] 优先权

[32] 1998.6.17 [33] US [31] 60/089546

[32] 1999.5.20 [33] US [31] 09/315451

[73] 专利权人 罗姆和哈斯公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 格伦·理查德·卡尔森
塔罗尚·辛格·达迪尔拉
戴特·帕特·列
迪安·欧文·克雷斯
罗伯特·欧仁·赫尔曼

[56] 参考文献

WO9627673A1 1996.9.12 C12N15/82

WO9637609A1 1996.11.28 C12N15/12

US5530028A 1996.6.25 A01N33/26

WO9738117A1 1997.10.16 C12N15/82

审查员 安玉苹

[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 樊卫民 杨青

权利要求书 9 页 说明书 25 页

[54] 发明名称

通过蜕皮激素受体复合物调整外源基因表达的配位体

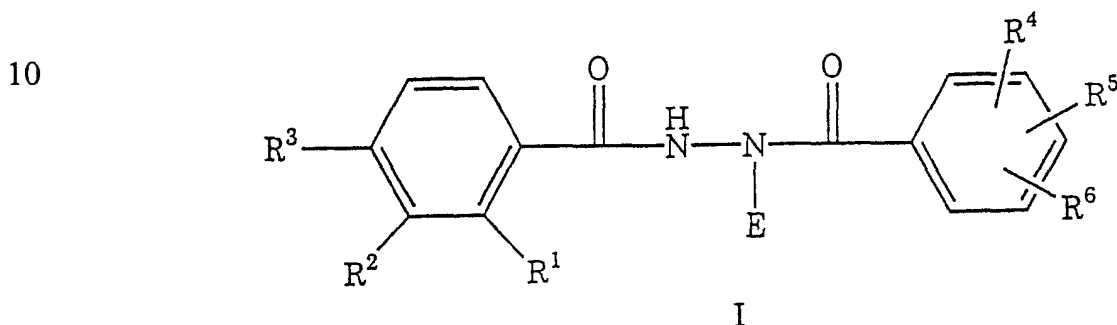
[57] 摘要

本发明涉及一种调整外源基因表达的改进方法，其中蜕皮激素受体复合物包含：一个 DNA 结合域、一个配位体结合域、一个反式激活域；在该方法中使配位体与含有：外源基因和应答元件的 DNA 构建体接触；其中外源基因受应答元件控制和在配位体存在下 DNA 结合域与应答元件结合，因此激活或抑制基因。所做的改进在于一组经选择的非甾体配位体，其显示出比已知配位体改善的活性。

1. 一种调整外源基因表达的方法，包括使含有：

- 5 a) DNA 结合域；
 b) 配位体结合域；
 c) 反式激活域；和
 d) 下式 I 所示的配位体；

的蜕皮激素受体复合物



15 其中：

E 为含有叔碳原子的(C₄-C₆)烷基；

R¹ 为 H、Me、Et、异丙基或 F；

R² 为 H、Me、Et、正丙基、异丙基、OH、OMe、OEt、SOMe，
 或与 R³ 相连并和与 R² 和 R³ 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基、带有
 20 与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有与苯基碳原子相邻的
 氧原子的二氢吡喃基；

R³ 为 H、Et，或与 R² 相连并和与 R² 和 R³ 连接的苯基碳原子形
 成亚乙二氧基、带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有
 与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢吡喃基；

25 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为 H、Me、Et、F、Cl、CH₂OH、OMe
 或 OEt；

条件是

a) 当 R¹ 为 Me 和 R² 为 OMe 时；

则 R³ 为氢，而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基、3,5-二甲氧
 30 基-4-甲基或 3,5-二氯；

b) 当 R^1 为 Me 和 R^2 为 OEt 时;

则 R^3 为氢, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

c) 当 R^1 为 Et, R^2 为 OMe 或 OEt 时;

则 R^3 为氢, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是:

5 i) 3,5-二-甲氧基-4-甲基、3,5-二氯、3,5-二氟、3-甲氧基或 2-氯;

或

ii) R^6 为 H, R^4 为甲基, 而 R^5 为乙基;

d) 当 R^1 是异丙基时;

则 R^2 是 OMe, R^3 是 H, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

10 e) 当 R^3 为 Et 时;

则 R^2 为 H, R^1 为 F, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

f) 当 R^2 、 R^3 和它们各自相连的苯基上的碳原子一起形成亚乙基
二氧基环时;

则 R^1 是 Me, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

15 g) 当 R^2 、 R^3 和它们各自相连的苯基上的碳原子一起形成二氢呋喃基或二氢吡喃基环时;

则 R^1 是 Et, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

与含有:

a) 外源基因; 和

20 b) 应答元件;

的 DNA 构建体接触;

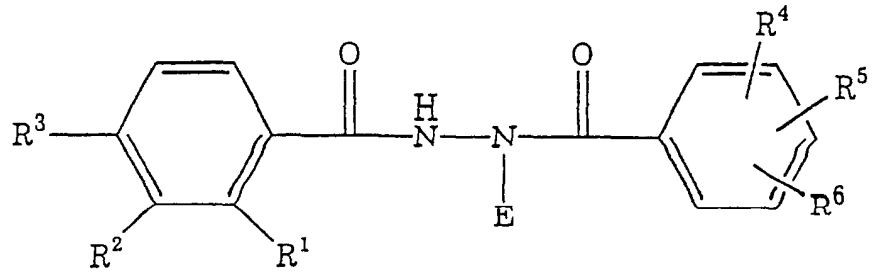
其中

a) 外源基因受应答元件的控制; 和

25 b) 在配位体存在下 DNA 结合域与应答元件的结合使所述外源基因得到激活或抑制。

2. 下式 I 的配位体在制备调整一种或多种外源基因在主体中表达的药物组合物中的应用:

30



I

5 其中：

E 为含有叔碳原子的(C₄-C₆)烷基；

R¹ 为 H、Me、Et、异丙基或 F；

R² 为 H、Me、Et、正丙基、异丙基、OH、OMe、OEt、SOMe，
 10 或与 R³ 相连并和与 R² 和 R³ 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基、带有
 与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有与苯基碳原子相邻的
 氧原子的二氢吡喃基；

R³ 为 H、Et，或与 R² 相连并和与 R² 和 R³ 连接的苯基碳原子形
 成亚乙二氧基、带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有
 与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢吡喃基；

15 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为 H、Me、Et、F、Cl、CH₂OH、OMe
 或 OEt；

条件是

a) 当 R¹ 为 Me 和 R² 为 OMe 时；

20 则 R³ 为氢，而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基、3,5-二甲氧
 基-4-甲基或 3,5-二氯；

b) 当 R¹ 为 Me 和 R² 为 OEt 时；

则 R³ 为氢，而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基；

c) 当 R¹ 为 Et 和 R² 为 OMe 或 OEt 时；

则 R³ 为氢，而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是：

25 i) 3,5-二-甲氧基-4-甲基、3,5-二氯、3,5-二氟、3-甲氧基或 2-氯；

或

ii) R⁶ 为 H，R⁴ 为甲基，而 R⁵ 为乙基；

d) 当 R¹ 是异丙基时；

则 R² 是 OMe，R³ 是 H，而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基；

30 e) 当 R³ 为 Et 时；

则 R^2 为 H, R^1 为 F, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

f) 当 R^2 、 R^3 和它们各自相连的苯基上的碳原子一起形成亚乙基二氧基环时;

则 R^1 是 Me, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

5 g) 当 R^2 、 R^3 和它们各自相连的苯基上的碳原子一起形成二氢咪喃基或二氢吡喃基环时;

则 R^1 是 Et, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

其中所述主体的细胞含有:

a) 一种蜕皮激素受体复合物, 其中该受体复合物包含:

10 1) DNA 结合域;

2) 配位体结合域; 和

3) 反式激活域; 和

b) DNA 构建体, 其包含:

1) 外源基因; 和

15 2) 应答元件;

其中

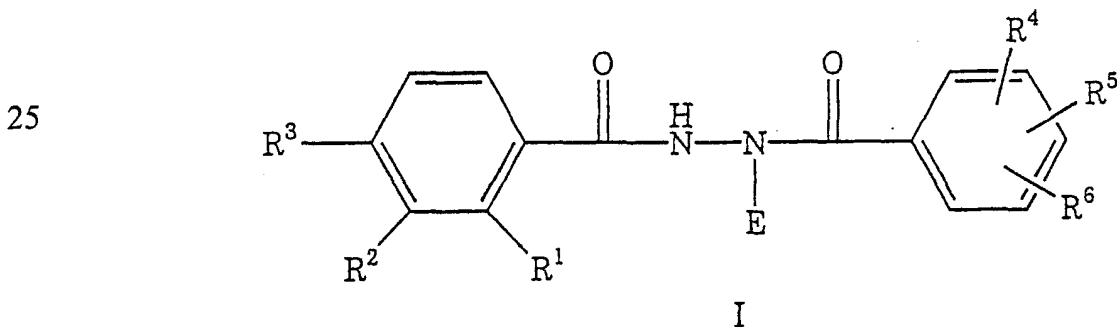
a) 外源基因受应答元件的控制; 和

b) 在配位体存在下 DNA 结合域与应答元件的结合使所述外源基因得到激活或抑制。

20

3. 一种生产多肽的方法, 其中包含下述步骤:

a) 选择一种细胞, 其暴露在下式 I 所示的配位体下是不敏感的:



30

其中:

E 为含有叔碳原子的(C₄-C₆)烷基;

R¹ 为 H、Me、Et、异丙基或 F;

5 R² 为 H、Me、Et、正丙基、异丙基、OH、OMe、OEt、SOMe,
或与 R³ 相连并和与 R² 和 R³ 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基、带有
与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有与苯基碳原子相邻的
氧原子的二氢吡喃基;

R³ 为 H、Et, 或与 R² 相连并和与 R² 和 R³ 连接的苯基碳原子形
成亚乙二氧基、带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有
与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢吡喃基;

10 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为 H、Me、Et、F、Cl、CH₂OH、OMe
或 OEt;

条件是

a) 当 R¹ 为 Me 和 R² 为 OMe 时;

15 则 R³ 为氢, 而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基、3,5-二甲氧
基-4-甲基或 3,5-二氯;

b) 当 R¹ 为 Me 和 R² 为 OEt 时;

则 R³ 为氢, 而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基;

c) 当 R¹ 为 Et 和 R² 为 OMe 或 OEt 时;

则 R³ 为氢, 而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是:

20 i) 3,5-二-甲氧基-4-甲基、3,5-二氯、3,5-二氟、3-甲氧基或 2-氯;
或

ii) R⁶ 为 H, R⁴ 为甲基, 而 R⁵ 为乙基;

d) 当 R¹ 是异丙基时;

则 R² 是 OMe, R³ 是 H, 而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基;

25 e) 当 R³ 为 Et 时;

则 R² 为 H, R¹ 为 F, 而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基;

f) 当 R²、R³ 和它们各自相连的苯基上的碳原子一起形成亚乙基
二氧基环时;

则 R¹ 是 Me, 而 R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基;

30 g) 当 R²、R³ 和它们各自相连的苯基上的碳原子一起形成二氢呋

喃基或二氢吡喃基环时；

则 R^1 是 Et, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基；

b) 向细胞中引入：

1) 一种 DNA 构建体，其中包含：

- 5 a) 编码多肽的外源基因；和
b) 应答元件；

其中所述外源基因受应答元件的控制；和

2) 蜕皮激素受体复合物，该复合物包含：

- a) DNA 结合域；
10 b) 配位体结合域；和
c) 反式激活域；和

c) 将细胞暴露于配位体。

4. 根据权利要求 1 或 3 的方法，其中配位体如权利要求 1 的结构
15 式 I 所示，并且 E 为叔丁基； R^1 为 H、Me、Et、i-Pr 或 F； R^2 为 H、
Me、Et、正丙基、异丙基、OH、OMe、OEt，或与 R^3 相连并和与 R^2
和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧
原子的二氢呋喃基环； R^3 为 H、Et，或与 R^2 相连并和与 R^2 和 R^3 连接
20 的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二
氢呋喃基环； R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地为 H、Me、F、Cl 或 OMe；

条件是

a) 当 R^1 为 Me, R^2 为 OMe 时；

则 R^3 为 H； R^4 、 R^5 和 R^6 的组合为 3,5-二甲基、3,5-二甲氧基-4-
25 甲基或 3,5-二氯；

b) 当 R^1 为 Me, R^2 为 OEt 时；

则 R^3 为 H； R^4 、 R^5 和 R^6 的组合为 3,5-二甲基；

c) 当 R^1 为 Et, R^2 为 OMe 或 OEt 时；

则 R^3 为氢， R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是：

i) 3,5-二氯、3,5-二氟、3-甲氧基或 2-氯；

30 d) 当 R^1 为 i-Pr 时；

则 R² 为 OMe; R³ 为 H; R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基;

e) 当 R³ 为 Et 时;

则 R² 为 H; R¹ 为 F; R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基;

5 f) 当 R² 和 R³ 和与它们相连的苯基碳原子一起形成亚乙二氧基
时;

则 R¹ 为 Me 或 Et; R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基;

g) 当 R² 和 R³ 和与它们相连的苯基碳原子一起形成二氢呋喃基环
时;

则 R¹ 为 Et; R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基。

10

5. 根据权利要求 2 的应用, 其中配位体如权利要求 1 的结构式 I
所示, 并且 E 为叔丁基; R¹ 为 H、Me、Et、i-Pr 或 F; R² 为 H、Me、
Et、正丙基、异丙基、OH、OMe、OEt, 或与 R³ 相连并和与 R² 和 R³
15 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的
二氢呋喃基环; R³ 为 H、Et, 或与 R² 相连并和与 R² 和 R³ 连接的苯
基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋
喃基环; R⁴、R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为 H、Me、F、Cl 或 OMe;

条件是

a) 当 R¹ 为 Me, R² 为 OMe 时;

20 则 R³ 为 H; R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合为 3,5-二甲基、3,5-二甲氧基-4-
甲基或 3,5-二氯;

b) 当 R¹ 为 Me, R² 为 OEt 时;

则 R³ 为 H; R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合为 3,5-二甲基;

c) 当 R¹ 为 Et, R² 为 OMe 或 OEt 时;

25 则 R³ 为氢, R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是:

i) 3,5-二氯、3,5-二氟、3-甲氧基或 2-氯; ;

d) 当 R¹ 为 i-Pr 时;

则 R² 为 OMe; R³ 为 H; R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基;

e) 当 R³ 为 Et 时;

30 则 R² 为 H; R¹ 为 F; R⁴、R⁵ 和 R⁶ 的组合是 3,5-二甲基;

f) 当 R^2 和 R^3 和与它们相连的苯基碳原子一起形成亚乙二氧基时;

则 R^1 为 Me 或 Et; R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

5 g) 当 R^2 和 R^3 和与它们相连的苯基碳原子一起形成二氢呋喃基环时;

则 R^1 为 Et; R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基。

6. 根据权利要求 2 的应用, 其中配位体如权利要求 1 的结构式 I 所示, 并且 E 为叔丁基; R^1 为 Me、Et 或 F; R^2 为 OH、OMe、OEt,
10 或与 R^3 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基环; R^3 为 H、Et, 或与 R^2 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基环; R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地为 H、Me、Cl 或 OMe。

15

7. 根据权利要求 1 或 3 的方法, 其中配位体如权利要求 1 的结构式 I 所示, 并且 E 为叔丁基; R^1 为 Me、Et 或 F; R^2 为 OH、OMe、OEt, 或与 R^3 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基环; R^3 为 H、Et, 或与 R^2 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基环; R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地为 H、Me、Cl 或 OMe。

20

8. 根据权利要求 2 的应用, 其中配位体如权利要求 1 的结构式 I 所示, 并且 E 为叔丁基, R^1 为 Et, R^2 为 OEt, R^3 为 H, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合为 3,5-二甲基。

25

9. 根据权利要求 1 或 3 的方法, 其中配位体如权利要求 1 的的结构式 I 所示, 并且 E 为叔丁基, R^1 为 Et, R^2 为 OEt, R^3 为 H, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合为 3,5-二甲基。

30

-
10. 根据权利要求 2 的应用，其中蜕皮激素受体复合物是嵌合蜕皮激素受体复合物，而且 DNA 构建体还含有启动子。
- 5 11. 根据权利要求 1 或 3 的方法，其中蜕皮激素受体复合物是嵌合蜕皮激素受体复合物，而且 DNA 构建体还含有启动子。
12. 根据权利要求 2 的应用，其中所述主体是植物。
- 10 13. 根据权利要求 2 的应用，其中所述主体是哺乳动物。

通过蜕皮激素受体复合物调整外源基因表达的配位体

5 本申请是 U.S. 申请号 09/210,010, 申请日 1998 年 12 月 11 日的申请的后续申请。

 本发明涉及用于诱导或抑制外源基因在动物和植物细胞中表达的非甾族配位体。

10

 在基因工程领域里, 对基因表达的精确暂时控制, 即, 激活或抑制基因的能力, 在研究、操作和控制发育以及其它生理过程方面是有价值的工具(例如参见, Evans 和 PCT 国际申请 PCT/US97/05330, 并在本文中引证参考)。在哺乳动物中, 其应用包括诱导基因寻靶, 有毒和致畸基因的过表达、反义 RNA 表达和基因治疗。在植物中, 其应用包括控制植物性状、雄性或雌性繁殖; 植物保护剂过表达; 包括固有和非固有物质的所需植物产品的生产和改性。对动物和植物, 对外源蛋白质例如治疗蛋白质、工业酶、聚合物等的诱导作用是有价值的。

15 用于控制基因表达的试剂是重要的, 通常它被称作“基因开关”, 它是一种在控制所述基因的生物体中通常不存在的物质。这是为了避免基因的不期望表达和抑制。例如发明了一种可诱导的受四环素调节的系统, 并应用到转基因小鼠中, 使得在抗体不存在时诱导基因活性, 而在抗体存在时抑制基因活性。在这种情况下, 不幸的是, 它作为一种有效的“开-关”型基因开关会干扰四环素的药用机理。

20 国际专利申请 PCT/GB96/01195 中, 公开了一种从美洲菸夜蛾 (*Heliothis virescens*)(“HEcR”)中分离的昆虫甾族受体, 它对甾族(例如, 20-羟基蜕皮激素和 Muristerone A)和一些非甾族诱导剂能作为基因开关而产生应答反应。在这一和许多其它对甾族和非甾族诱导剂都有反应

30

5 的系统中，非甾族诱导剂比甾族诱导剂具有明显的优点，这是由于以下几种原因，例如包括：生产低成本、代谢稳定性、不存在于昆虫、植物或哺乳动物体内和环境的可接受性。该 PCT 申请公开了应用两种二苯甲酰基肼，1,2-二苯甲酰基-1-叔丁基肼和 tebufenozide(N-(4-乙基苯甲酰基)-N-(3,5-二甲基苯甲酰基)-N-叔丁基肼)作为 HEcR 系统的基因开关，并提示其它的如在美国专利 U.S. 5,117,057 中公开的二苯甲酰基肼也可在此系统中作为基因开关而使用。尽管上述是真实的，上述二苯甲酰基肼的活性是不清楚的。特别是，在 5,117,057 中说明了一大类二苯甲酰基肼，其中的许多种作为基因开关是无效的。GB96/01195 中表明，当试验 10 20 种上述二苯甲酰基肼时，只有 7 种有活性。

国际申请 PCT/EP96/00686 公开了使用 tebufenozide 作为黑猩猩果蝇蜕皮激素受体的化学配位体。这一受体在转基因植物中用来控制基因的表达，由此控制重要农作物的多种性状。

15

不幸的是，尽管上述具体说明的配位体在分离的细胞中显示出报告基因诱导活性，在整个植物体如整体植物和动物中使用却没有相应的作用。

20

因此，仍需要开发与已知配位体相比其活性提高或一致，并对整体植物和动物具有活性的非甾族配位体。我们先已发现一小类二苯甲酰基肼衍生物不仅在分离的细胞中显示出报告基因诱导活性，而且优于已知的二酰基肼，1,2-二苯甲酰基-1-叔丁基-肼和 tebufenozide，当应用在整体植物和动物上时，由于其具有改善的输送和分布性质，它们具有代谢稳定性，持效性，对受体的亲和力，和没有副作用的优点。

25

本发明涉及调整外源基因表达的改进方法，包括使含有：

- a) DNA 结合域；
- b) 配位体结合域；
- c) 反式激活域；和

30

d) 配位体;

的蜕皮激素受体复合物与含有:

a) 外源基因; 和

b) 应答元件;

5 的 DNA 构建体接触,

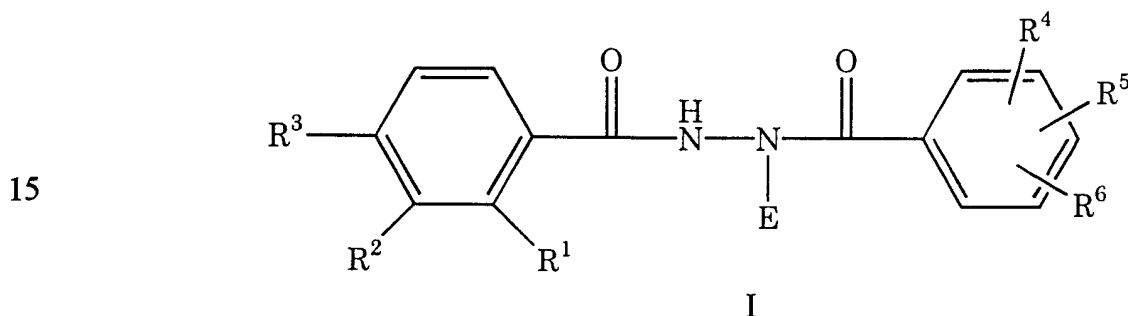
其中

a) 外源基因受应答元件的控制; 和

b) 在配位体存在下 DNA 结合域与应答元件结合, 由此激活或抑制所述的外源基因;

10 该方法的改进包括:

从式 I 化合物中选择配位体:



其中:

20 E 为含有叔碳原子的(C₄-C₆)烷基或含有叔碳原子的氰基(C₃-C₅)烷基;

R¹ 为 H, Me, Et, 异丙基, F, 甲酰基, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, C≡CH, 1-丙炔基, 2-丙炔基, 乙烯基, OH, OMe, OEt, 环丙基, CF₂CF₃, CH=CHCN, 烯丙基, 叠氮基, SCN, 或 SCHF₂;

25 R² 为 H, Me, Et, 正丙基, 异丙基, 甲酰基, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, C≡CH, 1-丙炔基, 2-丙炔基, 乙烯基, Ac, F, Cl, OH, OMe, OEt, O-正丙基, OAc, NMe₂, NEt₂, SMe, SEt, SOCF₃, OCF₂CF₂H, COEt, 环丙基, CF₂CF₃, CH=CHCN, 烯丙基, 叠氮基, OCF₃, OCHF₂, O-异丙基, SCN, SCHF₂,
30 SOME, NH-CN, 或与 R³ 相连并和与 R² 和 R³ 连接的苯基碳原子形成亚

乙二氧基、带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢吡喃基；

R^3 为 H, Et, 或与 R^2 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基、带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢吡喃基；

5

R^4 , R^5 , 和 R^6 各自独立地为 H, 甲基, 乙基, F, Cl, Br, 甲酰基, CF_3 , CHF_2 , $CHCl_2$, CH_2F , CH_2Cl , CH_2OH , CN, $C\equiv CH$, 1-丙炔基, 2-丙炔基, 乙烯基, OMe, OEt, SMe 或 SEt;

条件是

10

a) 当 R^1 为 Me 和 R^2 为 OMe 时；

则 R^3 为氢, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基, 3,5-二甲氧基-4-甲基, 3,5-二氯, 或 3,5-二氟；

b) 当 R^1 为 Me 和 R^2 为 OEt 时；

则 R^3 为氢, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基, 3,5-二甲氧基-4-甲基, 3,5-二氯, 3,5-二氟, 2,4-或 2,5-二氟, 2,4-或 2,5-二氯；

15

c) 当 R^1 为 Et 和 R^2 为 OMe 或 OEt 时；

则 R^3 为氢, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是：

i) 3,5-二甲氧基-4-甲基, 3,5-二氯, 3,5-二氟, 2,4-或 2,5-二氟, 2,4-或 2,5-二氯, 3-甲氧基, 2-氯-5-甲基, 2-溴-5-甲基, 2-氯, 2-溴, 或 3-甲基；或

20

ii) R^6 为 H, R^4 为甲基, 而 R^5 为乙基, F, Cl, Br, 甲酰基, CF_3 , CHF_2 , $CHCl_2$, CH_2F , CH_2Cl , CH_2OH , CN, $C\equiv CH$, 1-丙炔基, 2-丙炔基, 乙烯基, OMe, OEt, SMe, 或 SEt;

d) 当 R^1 是异丙基；

25

则 R^2 是 OMe 或 OEt, R^3 是 H, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基；

e) 当 R^3 为 Et；

则 R^2 为 H, R^1 为 F 或 Cl, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基；

f) 当 R^2 、 R^3 和它们各自相连的苯基上的碳原子一起形成亚乙基二氧基环时；

30

则 R^1 是 Me 或 Et, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

g) 当 R^2 、 R^3 和它们各自相连的苯基上的碳原子一起形成二氢咪喃基或二氢吡喃基环时;

则 R^1 是 Et, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基;

5 h) 当 R^1 为甲酰基, CF_3 , CHF_2 , $CHCl_2$, CH_2F , CH_2Cl , CH_2OH , CH_2OMe , CH_2CN , CN , $C\equiv CH$, 1-丙炔基, 2-丙炔基, 乙烯基, OH , 环丙基, CF_2CF_3 , $CH=CHCN$, 烯丙基, 叠氮基, SCN 或 $SCHF_2$ 时;

则 R^2 为 OMe 或 OEt , R^3 为 H , 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基; 和

10 i) 当 R^2 为甲基, 乙基, 正丙基, 异丙基, 甲酰基, CF_3 , CHF_2 , $CHCl_2$, CH_2F , CH_2Cl , CH_2OH , CH_2OMe , CH_2CN , CN , $C\equiv CH$, 1-丙炔基, 2-丙炔基, 乙烯基, Ac , F , Cl , OH , O -正丙基, OAc , NMe_2 , NEt_2 , SMe , SEt , $SOCF_3$, OCF_2CF_2H , $COEt$, 环丙基, CF_2CF_3 , $CH=CHCN$, 烯丙基, 叠氮基, OCF_3 , $OCHF_2$, O -异丙基, SCN , $SCHF_2$, $SOMe$ 或
15 $NH-CN$ 时;

则 R^1 为 Et, R^3 是 H , 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基。

本发明还涉及调整外源基因表达的方法, 其中包括使含有:

a) DNA 结合域;

20 b) 配位体结合域;

c) 反式激活域; 和

d) 由式 I 化合物组成的配位体

的蜕皮激素受体复合物与含有:

a) 外源基因; 和

25 b) 应答元件;

的 DNA 构建体接触,

其中

a) 外源基因受应答元件的控制; 和

b) 在配位体存在下 DNA 结合域与应答元件结合, 由此激活或抑制

30 所述的基因。

为了获得在 a) 配位体结合和所得基因开关活性, 和 b) 在整体植物和动物中输送、系统性、毒性和代谢稳定性之间的最佳平衡, 式 I 化合物取代基的位置和大小是重要的。当 E 为叔丁基, R^1 为乙基, R^2 为乙氧基, R^3 是氢, 而 R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基时, 出现最佳的平衡性质。上述“R”基各自的组成可以有相当大的变化。可是, 这种变化将导致式 I 化合物的大小、形状和整体极性的明显改变, 这将降低最佳平衡, 结果改变化合物的性质。由于这种原因, 当任一特定 R 基的组成从最佳态发生改变时, 组合中其它 R 基的变化将受到限制。

10

优选, E 为(C₄-C₅)烷基。更优选, E 为叔丁基。

优选, R^1 为甲基, 乙基, 异丙基, F, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, C≡CH, 或 CF₂CF₃。更优选 R^1 为甲基, 乙基, 异丙基, F, CF₃, CHF₂, CH₂F, CH₂OMe, CH₂CN, C≡CH, 或 CF₂CF₃。更加优选 R^1 为甲基, 乙基, 异丙基, 或 F。最优选 R^1 为甲基或乙基。

15

优选的 R^2 为乙基, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, OH, OMe, OEt, O-正丙基, CF₂CF₃, 叠氮基, OCF₃, 或与 R^3 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基、带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢吡喃基。更优选的 R^2 为乙基, CF₃, CHF₂, CHCl₂, CH₂F, CH₂Cl, CH₂OH, CH₂OMe, CH₂CN, CN, OH, OMe, OEt, CF₂CF₃, 或与 R^3 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基。更加优选的 R^2 为 OH, OMe, OEt, 或与 R^3 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基。最优选 R^2 为 OMe 或 OEt。

20

25

30

5 优选地， R^3 为 H，Et，或与 R^2 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基、带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢吡喃基。更优选的 R^3 为 H，Et，或与 R^2 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基。更加优选的 R^3 与 R^2 相连并和与 R^2 和 R^3 连接的苯基碳原子形成亚乙二氧基或带有与苯基碳原子相邻的氧原子的二氢呋喃基。

10 优选地， R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地为甲基，F，Cl， CH_2OH ，或 OMe。更优选地， R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地为甲基，F，Cl， CH_2OH ，或 OMe。更加优选地， R^4 、 R^5 和 R^6 各自独立地为甲基，F，Cl。更特别优选地， R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基，3,5-二氯，或 3,5-二氟。最优选地， R^4 、 R^5 和 R^6 的组合是 3,5-二甲基。

15 术语“Me”，“Et”，“n-Pr”，“i-Pr”，和“Ac”分别意为甲基，乙基，正丙基，异丙基，和乙酰基。在提及 R^4 、 R^5 和 R^6 时所用的术语“2,4”，“2,5”，“3,5”等表示基团在苯环上连接的相对位置。

术语“卤素”意为氟、氯、溴或碘。

20

术语“调整”意为给定的配位体/受体复合物诱导或抑制外源基因的转活。

25 术语“外源基因”意为相对于主体的一种外来基因，即，通过转化方法将其引入主体的一种基因或内源突变基因的未突变形式。在本发明中，转化方法不是关键的，且是现有技术中已知的对主体而言适合的任何方法。例如，从转化细胞再生获得转基因植物。许多种转化方法可从文献中获知如使用根瘤土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)或其 T_1 质粒的农杆菌侵染，电穿孔，植物细胞和原生质体的微注射和微粒转化。
30 动物细胞的转化和这种转化细胞在转基因动物中再生的其它技术是已

知的。外源基因可以是天然或合成的基因和治疗基因，且所述治疗基因以 DNA 或 RNA 形式被引入主体并通过 DNA 中间体如通过反转录酶发挥作用。上述基因可被引入靶细胞，直接引入主体物，或通过转化细胞转移至主体物而非直接地引入。术语“治疗基因”意为在其表达的宿主细胞中发挥有益作用的基因。治疗基因不是在宿主细胞中自然存在的。

术语“蜕皮激素受体复合物”通常指由甾族受体家族的两个成员，蜕皮激素受体(“EcR”)和超气门(“USP”)蛋白质组成的杂二聚物蛋白质复合物(参见 Yao,T.-P.,等人(1993)自然(Nature)366,476-479; Yao,T.-P.等人,(1992)细胞(Cell) 71,63-72)。具有蜕皮甾族受体复合物功能的物质还包括其它蛋白质，如亲免素。其它已知作为转录因子的甾体受体类的蛋白质(如 DHR38, β -FTZ-1 或其它昆虫同系物)，也可以是对 EcR 和/或 USP 配位体独立或不独立的配偶体。蜕皮激素受体复合物还可以是蜕皮激素受体蛋白质和超气门蛋白质的脊椎动物同系物，视黄酸-X 受体蛋白质(“RXR”)的杂二聚体。蜕皮激素受体蛋白质或 USP 的同型二聚体复合物在一些情况下也具有作用。

活性蜕皮甾体或非甾体配位体与复合物中的蛋白质之一(其中包括 EcR, 但并不排除复合物中的其它蛋白质)接触可以活化蜕皮甾体受体复合物。

蜕皮激素受体复合物包括蛋白质，它们是甾体受体超家族的成员，其中所有成员的特征在于存在由绞链区隔开的氨基末端反式激活域、DNA 结合域(“DBD”)和配位体结合域。在该家族中的一些成员在 LBD 的羧基末端那侧还具有另一反式激活域。DBD 特征在于在两个氨基酸基元 P-box 和 D-box 间存在两个半胱氨酸锌指，它们赋予对蜕皮激素应答元件的特异性。上述域可以是天然的，改性的，或异源受体蛋白质不同区的嵌合体。

术语“应答元件”(“RE”)意为一或多种顺式-作用 DNA 元件，它

在与外源激素受体复合物的 DNA 结合域相互作用的介导下对启动子产生应答反应。这种 DNA 元件可以在其序列中有回文结构(完全或不完整)或由被不同的核苷酸分隔开的序列基元或半位点组成。半位点可以相似或相同，并且可以正向或反向重复排列。存在或不存在配位体时，蜕皮激素受体复合物与 RE 的 DNA 序列结合，在这种应答元件的调节下引发或抑制下游基因的转录。天然蜕皮激素受体的 RE 的 DNA 序列的实例包括：RRGG/TTCANTGAC/ACYY(参见：Cherbas L., 等人，(1991).Genes Dev.5,120-131); AGGTCAN_(n)AGGTCA，其中 N_(n)可以是一个或多个间隔核苷酸(参见：D Avino PP 等人，(1995)，Mol.Cell.Endocrinol，113，1-9); 和 GGGTTGAATGAATTT(参见：Antoniewski C.等人，(1994) Mol.Cell Biol.14.4465-4474)。

可将组成外源基因的 DNA 序列、应答元件和蜕皮激素受体复合物输入原核细胞，如大肠杆菌(*Escherichia coli*)，枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)，或其它肠杆菌。可是，由于许多蛋白质的基因表达在细菌中不能准确进行，所以优选真核细胞。外源基因的核苷酸序列、应答元件和受体复合物也以 RNA 分子的形式，优选以在有功能的烟草花叶病毒的病毒 RNAs 中的形式输入。对于真核细胞，脊椎动物的细胞是优选的，这是由于它们本身缺少对蜕皮激素受体的配位体有应答能力的分子。因此，它们对本发明的配位体不敏感。因此，本发明配位体对转化细胞或整个生物体的生理或其它作用可以忽略。因此，细胞可以生长和表达所需的产品，基本上不受配位体存在的影响。

术语“主体”意为整体植物或动物，或植物或动物的细胞。还应期望的是当主体是真菌或酵母时，配位体的作用同样的好。当主体是整体动物时，优选动物是脊椎动物，最优选是哺乳动物。

当本发明的配位体与蜕皮激素受体复合物(所述复合物结合到连接外源基因的应答元件上)一起使用时，提供外源基因表达的外部临时调节机制。各种成分彼此结合的顺序，即，配位体与受体复合物结合和受

体复合物与应答元件之间的结合顺序不是关键的。典型地，外源基因表达的调整是蜕皮激素受体复合物与具体的 DNA 控制或调节元件结合的反应。蜕皮激素受体蛋白质，象其它类的甾族受体一样，至少具有三个域，一个反式激活域，一个 DNA 结合域和一个配位体结合域。这种受体，象甾体受体家族的亚类一样，还具有导致杂二聚体性质的未充分定义的区。配位体与蜕皮激素受体蛋白质的配位体结合域结合，在与 USP 或 RXR 蛋白质形成二聚体后，能使该杂二聚体蛋白质的 DNA 结合域与活化型的应答元件结合，由此得到外源基因的表达和抑制。这种机理不排除配位体与 EcR 或 USP 结合的可能性，结果形成活性同二聚体复合物(例如：EcR+EcR 或 USP+USP)。优选的，受体的一或多个域可以不同，生成嵌合的基因开关。典型的，三个域中的一个或多个选自不同于其它域的来源时，在选择转活性的宿主细胞或生物体、配位体的互结合和识别具体应答元件方面，嵌合受体是最佳的。另外，应答元件本身可被改变或用其它 DNA 结合蛋白域的应答元件取代以得到嵌合蜕皮激素受体复合物，所述其它 DNA 结合蛋白域例如为源自酵母的 GAL-4 蛋白质(参见 Sadowski, 等人, (1988) Nature, 335, 563-564)或源自大肠杆菌的 LexA 蛋白质(参见 Brent 和 Ptashne(1985), Cell, 43, 729-736)。嵌合系统的其它优点是它们允许选择一个启动子，用于根据所需最终结果来驱动外源基因。上述双重控制在基因治疗区特别重要，特别是当生产细胞毒素蛋白质时更是如此，这是因为表达的时间以及其中出现表达的细胞都可被控制。术语“启动子”意为被 RNA 聚合酶识别的一种具体的核苷酸序列。该序列是在适当条件下转录可被特定引发的位点。当可操作地与适合启动子连接的外源基因，被引入主体细胞时，通过本发明配位体的存在控制外源基因的表达。启动子可被组成性或可诱导性地调节或可以是组织特异性(即，仅在特定细胞类型中表达)或对生物体一定的发育阶段是特异的。

本发明其它方面是调整一或多种外源基因在生物体中表达，其中包含向生物体给药有效量，即，引起目的基因表达或抑制的所需量的含有式 I 化合物的配位体，且其中生物体细胞含有：

- 5 a) 蜕皮激素受体复合物，其中包含：
- 1) DNA 结合域；
 - 2) 配位体结合域；和
 - 3) 反式激活域；和
- 5 b) DNA 构建体，其中包含：
- 1) 外源基因；和
 - 2) 应答元件；和
- 其中
- a) 外源基因受应答元件控制；和
 - 10 b) 在配位体存在下 DNA 结合域与应答元件结合，由此激活或抑制基因。

15 本发明的相关方面是在转基因生物体中调节内源或异源基因的表达的方法，其中包括使含有式 I 化合物的配位体与生物体细胞中的蜕皮激素受体接触，其中所述细胞含有与蜕皮激素受体结合的 DNA 结合序列，而且其中蜕皮激素-配位体-DNA 结合序列复合物的形成诱导基因的表达。

本发明第四方面是生产多肽的方法，其中包括下述步骤：

- 20 a) 选择对暴露在含有式 I 化合物的配位体下基本上不敏感的一种细胞；
- b) 向细胞中引入：
- 1) 一种 DNA 构建体，其包含：
 - a) 编码多肽的外源基因；和
 - 25 b) 应答元件；其中所述基因在应答元件的控制下；和
 - 2) 一种蜕皮激素受体复合物，其中包含：
 - a) DNA 结合域；
 - b) 配位体结合域；和
 - 30 c) 反式激活域；和

c) 将细胞暴露于所述配位体。

5 关于通过细胞临时控制多肽生产的优点,本发明在此方面提过了进一步的优点,由于多肽积聚会上损害细胞,因此多肽的表达被限制在短期内。当外源基因是治疗基因时,上述控制特别重要。可用治疗基因生产控制所需功能的多肽,如生产糖尿病人需要胰岛素。它们还用来生产有害或甚至致死的蛋白质,如对癌细胞致死的蛋白质。当生产出的蛋白质水平对生长或繁殖构成代谢负担时,上述控制也是重要的,例如在转基因植物中的情形。

10

编码多种多肽的许多基因组和 cDNA 核苷酸序列是现有技术中已知的。与本发明配位体一起使用的外源基因包括编码有价值的生物活性蛋白质的基因,例如:可从细胞中释放出的分泌蛋白质;可将一种底物从毒性物质代谢为无毒物质或从无活性物质代谢为有活性物质的酶;调节蛋白质;细胞表面受体等。有用的基因还包括编码凝血因子、激素如胰岛素、甲状旁腺激素、促黄体激素释放因子、 α 和 β 精子抑制素和人体生长激素的基因;编码蛋白质如酶的基因,缺少酶会导致出现不正常状态;编码细胞分裂素或淋巴激活素,如干扰素、粒性白细胞状的巨噬细胞种群刺激因子、种群刺激因子-1、肿瘤坏死因子和促红细胞生成素的基因;编码抑制剂物质如 α 1-抗胰蛋白酶的基因,编码具有药物功能的物质的基因,如编码白喉和霍乱毒素的基因;等。使用的基因还包括用于癌症治疗和治疗遗传紊乱的基因。本领域技术人员从事实上所有已知的基因中可以获得核酸序列资料,且可直接从公共保藏单位,公开所述序列的研究机构来获得核酸分子或使用常规方法制备分子。

25

对于基因治疗的用途,本文中所述的配位体可被适于药用的载体吸收,例如被溶液,悬浮液,片剂,胶囊,软膏,甘香酒剂和注射组合物等吸收。药用制剂可含有 0.01%至 99%重量的配位体。制剂可以是单独或多种剂量形式。在任何特定药用制剂中配位体的量将取决于有效剂量,即,得到目的基因表达或抑制的所需剂量。

30

5 药物制剂适合的给药途径包括口服，经肠，局部(包括经皮，经口和经舌)，阴道，肠胃外(包括皮下，肌肉内，静脉，表皮，胸膜和硬膜)和鼻-胃管。本领域技术人员应理解的是，优选的给药途径将依赖于处理条件，且根据不同因素如赋形剂条件而变化。

本文中所述的配位体还可与其它药用活性化合物结合给药。本领域技术人员应理解的是本文中配位体组合使用的药用活性化合物将选择避免对赋形剂存在有害作用或在化合物之间发生反应的物质。与配位体组合使用的其它药用活性化合物的实例包括，例如：艾滋病化疗剂，氨基酸衍生物，止痛剂，麻醉剂，厌食剂，抗酸剂和抗肠胃气胀剂，抗生素，抗凝结剂，解毒剂，抗纤维蛋白溶解剂，抗组氨剂，抗炎剂，抗肿瘤剂，抗寄生虫剂，抗原生动物剂，退烧药，抗败血病药，镇痉药，和抗胆碱能药，抗病毒剂，厌食剂，关节炎药物，生物反应调节物，骨代谢调节剂，肠排泄剂，心血管病药剂，中枢神经系统刺激剂，脑代谢增强剂，防耳垢剂，胆碱脂酶抑制剂，感冒和咳嗽制剂，种群刺激因子，避孕药，植物保护剂，牙制剂，去味剂，皮肤病药，解毒剂，糖尿病药剂，诊断试剂，腹泻药，多巴胺受体拮抗剂，电解质，酶和消化剂，麦角制剂，致育因子，纤维补充剂，抗真菌剂，半乳糖抑制剂，胃酸分泌抑制剂，胃肠道激酶剂，促性腺激素，头发生长刺激剂，补血药，出血剂，止血剂，组胺， H_2 受体拮抗剂，激素，高甘氨酸血症药剂，高血脂药剂，免疫抑制剂，缓泄剂，麻风病药剂，leukapheresis adjuncts，肺表面活性剂，周期性偏头疼药剂，粘液溶解剂，肌肉放松拮抗剂，肌肉放松剂，麻醉拮抗剂，鼻喷雾剂，恶心药剂，核苷类似物，营养补剂，骨质疏松制剂，催产素，类副交感神经功能药剂，震颤性麻痹药物，青霉素助剂，磷脂，血小板抑制剂，卟啉症药剂，前列腺炎类似物，前列腺炎药剂，质子泵抑制剂，瘙痒精神治疗药物，喹诺酮，呼吸刺激剂，唾液刺激剂，盐取代剂，硬化剂，皮肤创伤制剂，戒烟助剂，磺酰胺，交感剂，凝血剂，Tourette's 综合症药剂，震颤制剂，结核病制剂，尿毒症药剂，尿道药剂，子宫收缩剂，子宫放松剂，阴道药剂，眩晕剂，维生

10
15
20
25
30

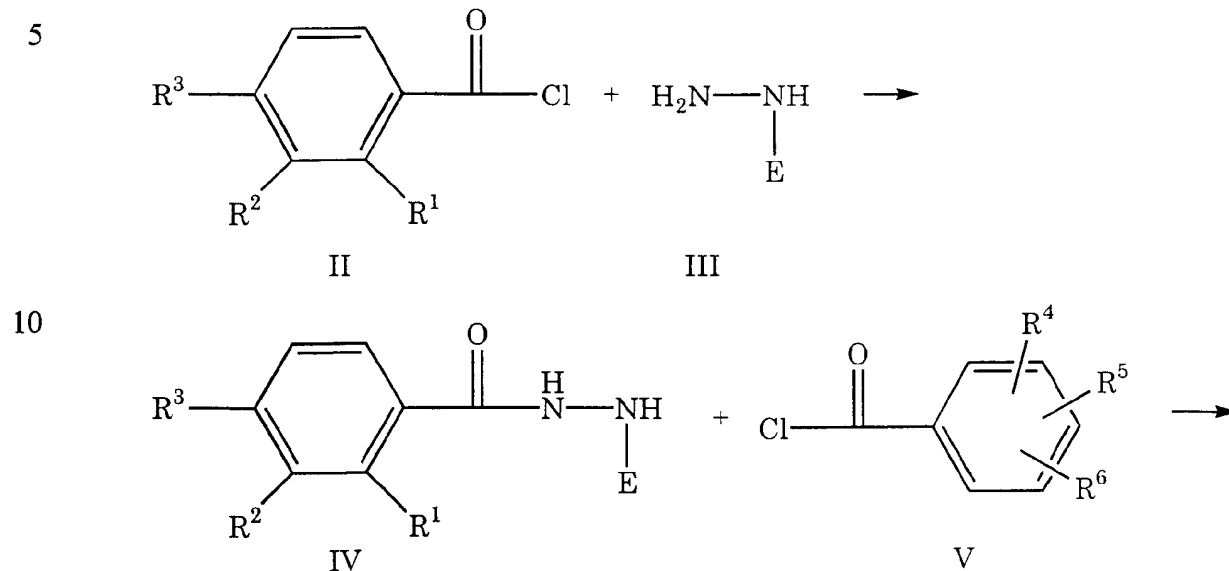
素 D 类似物，维生素，和医疗成像用造影剂。在一些情况下，配位体可以用作药物治疗的辅剂，例如，用于“关闭”产生代谢特定药物的酶的基因。

5 对于农业应用，除了上述应用外，本发明配位体还可用来控制杀虫剂蛋白质如苏云芽胞杆菌毒素(Bt)的表达。上述表达可以是组织或植物特异性的。另外，特别是当还需要控制植物害虫时，一或多种杀虫剂可与本文中的配位体组合，由此提供了其它的优点和效果，包括比单独施用杀虫剂减少使用总量。当使用与杀虫剂的混合物时，在组合物中各种成分的相对比例将根据对被处理作物、害虫和/或杂草的相对效力和每种杀虫剂所需使用剂量而确定。本领域技术人员将认识到杀虫剂混合物可提供如比使用一种农药宽的活性谱的优点。在组合物中与本文所述配位体混合使用的农药的实例包括杀真菌剂，除草剂，杀虫剂，杀螨剂和杀生剂。

15 使用常规方法可将本文中所述的配位体水喷雾液施用到植物叶面上，上述常规方法包括高容量喷雾，低容量喷雾，吹雾和飞机喷雾。稀释和使用剂量将根据使用设备的类型，所需使用的方法和频率和配位体的施用剂量而确定。在喷雾桶中还可加入其它所需助剂，例如所述助剂包括表面活性剂，分散剂，扩展剂，粘合剂，防泡剂，乳化剂，和在 McCutcheon's Emulsifiers and Detergents, McCutcheon's Emulsifiers and Detergents/Functional Materials, 和 McCutcheon's functional Materials(Mc 出版公司(新泽西)的 McCutcheon 分社按年度出版)中所述的其它类似物质。在使用前，配位体还可与肥料或肥料物质混合。配位体和固体肥料物质还可在混合设备中混合，或它们可与肥料在颗粒制剂中混合。所使用肥料的相对比例只要适于作物和被处理的杂草即可。本文所述的配位体通常含有 5%至 50%的肥料组合物。上述组合物提供的肥料物质促进所需植物的快速生长，同时控制基因的表达。

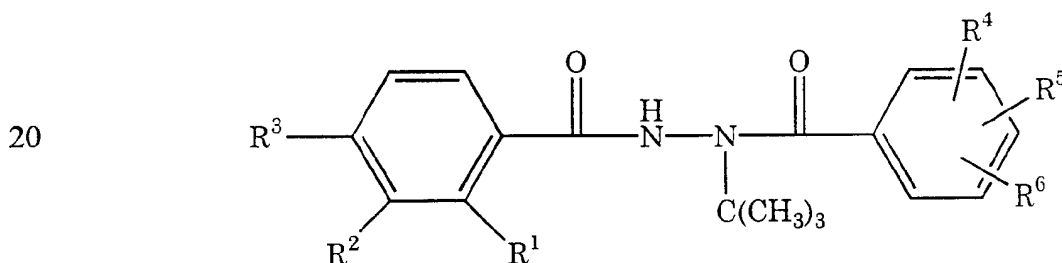
30 本发明配位体是已知化合物或本领域技术人员采用美国专利 US

5,117,057, US 5,530,028, 和 US 5,378,726 中所述方法简单制备的化合物。典型的使用两步方法。第一步, 式 II 的取代苯甲酰氯与式 III 的取代胍反应得到式 IV 的单酰基胍。在第二步中, 式 IV 的单酰基胍与式 V 所示另一苯甲酰氯反应, 得到式 I 化合物。



下述实施例证明了本发明配位体活性。

评价了下述配位体和对比配位体:



配位体	R1	R ²	R ³	3- R4	5- R5	4- R6
CE-1	H	H	Et	Me	Me	
CE-2	H	H	H	H	H	
CE-3						
1	Et	OMe	H	OMe	H	
2	Me	-OCH ₂ CH ₂ O-		Me	Me	
3	Me	OMe	H	Me	Me	

4	Et	OMe	H	F	F	
5	Et	OMe	H	Me	Me	
6	Me	OEt	H	Me	Me	
7	Et	-OCH ₂ CH ₂ O-		Me	Me	
8	Et	-CH ₂ CH ₂ O-		Me	Me	
9	Me	OMe	H	Cl	Cl	
10	Et	OMe	H	Cl	Me	
11	i-Pr	OMe	H	Me	Me	
12	Et	OEt	H	Me	Me	
13	Et	OMe	H	Cl	Cl	
14	Me	OH	H	Me	Me	
15	Me	OH	H	Me	CH ₂ OH	
17	F	H	Et	Me	Me	
18	Me	OMe	H	OMe	OMe	Me

CE-1 = tebufenozide

CE-2 = 1,2-二苯甲酰基-1-叔丁基肼

CE-3 = muristerone A

5 基因构建体

pVgRXR(Invitrogen Corp., Carlsbad, California)是一种 8728kb 质粒, 它表达 VgEcR 和 RXR 形成改性杂二聚体报告基因(参见 No, D., 等(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 3346-3351)。蜕皮激素受体(VgEcR)是从天然果蝇蜕皮激素受体衍生来的, 并变成了含有 VP16 反式激活域(参见: Cress, W.D., 和 Triezenberg, S.J.(1991), Science 251,87-90; Sadowski, I., 等人(1988) Nature 335, 563-564; Triezenberg, S.J., 等人.(1988), Genes Dev 2,718-729; Triezenberg, S.J.等人(1988), Genes Dev 2,730-742)。RXR 是 USP(超气门)的哺乳动物的同源物, USP 是果蝇蜕皮激素受体的天然配偶体(参见 Yao,T.-P., 等人, (1993), Nature 366,476-479; Yao,T.-P., 等人, (1992), Cell 71,63-72)。VgEcR DNA 结合域的 P-box 区被改性了, 以识别杂合蜕皮激素应答元件, 后者由一个葡萄糖类皮质激素应答元件(参见: Umesono, K.和 Evans, R.M.(1989), Cell 57, 1139-1146)半位点和一个天然蜕皮激素应答元件半位点组成。

这种杂合应答元件降低与 farsenoid X 受体任何相互作用的可能性,后者可结合到天然蜕皮激素应答元件(EcRE)上。细胞肥大病毒增强子-启动子驱动 VgEcR 的表达,且劳氏肉瘤病毒启动子驱动 RXR 表达。载体 pIND(Invitrogen Crop.)是一种以 pcDNA 3.1 为基础的 5024bp 载体。它含有五个杂合 E/GRE,后者由从 pVgRXR 表达的被改性蜕皮激素受体和一个最小热休克启动子识别(参见 Yao,T.P.,等人,(1993), Nature, 366,476-479)。pIND/lacZ(Invitrogen Crop.)是一种 8170bp 的质粒,它含有 β -半乳糖苷酶基因作为报告基因。pIND/lacZ 和 pVgRXR 的共转染导致在加入蜕皮激素兴奋剂如 muristerone A 时诱导 β -半乳糖苷酶的表达。报告质粒 pIND/luc 是通过将作为 Nhe I-BamHI 片段的来自 pGL3(Promega/E1741)的萤火虫荧光素酶基因亚克隆入 pIND,接着用 Nhe I 和 BamHI 消化构建成的。

保持哺乳动物细胞系和转染

15 将 CHO 细胞(ATCC#CCL-61)保存在 F-12 营养混合物中(Ham 的介质)(Gibco/BRL, 11765-054),其中补加有 10%胎牛血清(FBS,完全培养基;Gibco/BRL, 16000-036)。这些细胞保持在 37°C,5%二氧化碳和 95%空气中。

20 将 CHO 细胞接种于 12-孔组织培养板中,浓度为每孔每毫升 0.5×10^5 个细胞。脂质体 Pfx-8(Invitrogen, T930-18)用来瞬时性地转染可诱导的蜕皮激素表达系统(Invitrogen 目录 K1000-01 号)。可诱导的蜕皮激素表达系统由编码受体亚单元的 pVgRXR,和 pIND/lacZ 或 pIND/luc 组成,其含有应答元件和分别编码 β -半乳糖苷酶或荧光素酶的报告基因。接种细胞 24 小时后,在灭菌水中用 0.5mg/ml 的 VgRXR 和 0.5mg/ml
25 pIND/lacZ 或 pIND/luc DNA 来制备脂质体/DNA 溶液。在消毒的 17X100mm 聚苯乙烯试管中用 1.5ml 的 Opti-MEM 培养基(Gibco/BRL, 31986)稀释 $36 \mu\text{l}$ 的 Pfx-8。将 $6 \mu\text{l}$ DNA 质粒母液与 1.5ml 的 Opti-MEM 培养基在另一个聚苯乙烯试管中混合。将 DNA 和脂质体溶液合并,得到
30 3ml 的转染溶液(足够一个处理的三次重复)。用磷酸缓冲液冲洗细胞

三次(PBS; Gibco/BRL, 14190-144), 通过将培养基从细胞中吸出。向每孔加入 1ml 转染溶液。将细胞温育四小时, 并将转染培养基用同样体积的完全培养基置换。继续温育 20 小时。

5 稳定转化的哺乳动物细胞系

用 pVgRXR 和 pIND/LacZ(SPI)(Invitrogen Corp.)稳定转化的 CHO 细胞保存在含有 10%FBS、2mM 谷氨酰胺、300 μ g/ml Zeocin(Invitrogen Corp.)和 300 μ g/ml 潮霉素 B.的 Hams F-12 培养基中。由于 3 个顺式作用 SPI 元件的存在, pIND 载体的替代物 pIND(SPI)可被诱导至完全表达水平, 其水平高于 pIND 水平的 5。基础表达水平也相应较高。

10 用配位体处理

分别在乙醇和丙酮中制备 muristerone A 和本发明非甾体配位体的母液(10^{-2} M), 并在 -20°C 储藏。转染 24 小时后, 向每个 1ml 细胞培养物孔加入最终浓度 10 μ M(10^{-5} M)的供试化合物。将 10 μ M 浓度的 Muristerone A(Sigma M7888)用作阳性对照。单独的丙酮用作阴性对照。

报告基因检测

在用供试配位体处理瞬时转染细胞 24-48 小时后或处理稳定转化的细胞系 24 小时后评价报告基因表达。 β -半乳糖苷酶或是通过将固定细胞染色测定或在细胞溶解产物中测定酶活性。 β -半乳糖苷酶催化 β -乳糖苷, X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -半乳糖吡喃苷)的水解, 在固定的细胞中生成蓝色(Invitrogen, K1465-01), 在显微镜下可看到。另外, 可用报告细胞溶解缓冲液(RLB; Promega/E397A)溶解细胞, 应用化学发光底物, Galacto-Star(Tropix/BM100S)测定 β -半乳糖苷酶活性。每个 12-孔板中的细胞用 250 μ l 的 RLB 溶解。20 μ l 的各提取物用 100 μ l 的底物测定。

为了测定荧光素酶活性, 用 PBS 冲洗细胞两次, 每孔用 250 μ l RLB 溶解细胞。10 分钟后, 在 -80°C 下冷冻培养板 10 分钟, 并使之恢复到

室温。20 μ l 细胞溶解物样品与 100 μ l 荧光素酶检测试剂(Promega, E1500)混合。对 β -半乳糖苷酶和荧光素酶进行检测。在室温下,用装有释放底物的自动注入器的 DYNEX MLX 微滴定板荧光计测定荧光。

5 从 Kc 果蝇细胞制备胞质蜕皮激素受体提取物

来源于果蝇胚的双翅目细胞系 Kc167(参见: Echalier, G. 和 Ohanessian, A.(1969) C. R. Acad. Sci., 268, 1771)从 Peter Cherbas 博士处得到(印第安纳大学)并根据说明保存(Cherbas, L., 等人, (1994), Method in Cell Biology, 44, 161-179)。在室温下,于 700 x g 离心 400ml 的 Kc 细胞培养物(3×10^7 细胞/ml)10 分钟,得到细胞团。吸走上清液,将细胞团再次悬浮于 70ml 的冷 TM 缓冲液中(10mM Tris, 5mM $MgCl_2$, 1mM DTT, pH 7.2)。在冰中培育 10 分钟后,在 2,300x g 下离心。去掉上清液。在 -20 $^{\circ}C$ 冷冻细胞团 1 小时。将冷冻的细胞团在冰上缓慢解冻,并在冷的 Potter-Elvehjem 匀浆器中匀浆,在 Caframo 匀浆器马达上使用聚四氟乙烯杵,设置为 500 与 10 次上、下冲程, 4 $^{\circ}C$ 。将浆液在最大速转子中,以 100,000 x g 离心 60 分钟。含有胞质蛋白质提取物的上清液用 T 缓冲液(10mM Tris, 1mM DTT, pH 7.2)稀释,得到蛋白质的浓度为 5mg/ml。将此提取物立即用来作配位体结合检测。

20 从印度谷螟(Plodia interpunctella)细胞制备核内蜕皮激素受体

从鳞翅目印度谷螟成虫翅膀中域获得的 IAL-PID2 细胞系,是从 H.Oberlander 处得到的并根据说明保存(Lynn, E.E. 和 Oberlander, H.(1983), J. Insect Physiology, 29, 591-96)。将 300ml 印度谷螟细胞静止相培养物在 700 x g 下离心 10 分钟得到细胞团。吸走上清液,将细胞团再次悬浮于 35ml TMT 缓冲液中(TM 缓冲液和 0.1% Triton X-100)。用 20 次上下冲程的 Dounce 匀浆器在冰上匀浆悬浮液。在冰中培育匀浆液 10 分钟,然后在 900xg 下离心 15 分钟。将细胞团再悬浮于 15ml TM 缓冲液中,并在 2,300xg 离心。在 TMK 缓冲液(TM 缓冲液和 800mM KCl)中提取这种细胞团,用玻璃棒压榨细胞团,直到形成明胶样浆液,在冰中培育 15 分钟。将浆液在最大速转子中,以 100,000 x g 离心 60 分钟。

将由核提取物组成的上清液，在 10DG 脱盐柱上脱盐(Bio-Rad, 732-2010)，用 T 缓冲液平衡。溶液用含有 1mM DTT 的 T-缓冲液，将在核提取物中的总蛋白浓度调节到 5mg/ml。

5 制备细菌谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白质

云杉卷叶蛾(*Choristoneura fumiferana*)的仅含有 CDEF 区的细菌谷胱甘肽-S-转移酶(GST)融合蛋白质 EcR(CfEcR)和超气门蛋白质(CfUSP)也用来进行放射性配位体置换检测。使用含有 BamHI 和 EcoRI 位点的引物进行 PCR 扩增后，编码 CfEcR 的 CDEF 区的 cDNA 被构建(Perera SC, M Sundaram, Krell PJ, Retnakaran A, Dhadialla TS, SR Palli, 1999 Arch.Insect Biochem. Physiol.41,正在付印中)。用 BamHI 和 EcoRI 消化 PCR 产物，并克隆入从 Pharmacia Biotech 获得的载体 pGEX-3X 中。使用含有 BamHI 和 EcoRI 位点的引物扩增 CfUSP 编码区，并克隆入从 Pharmacia Biotech 获得的 pGEX-2T 载体中。使使用两种载体中的一种转化的大肠杆菌生长，并如 Pharmacia Biotech GST-技术简报中的详述方法生产融和的蛋白质。

蜕皮激素受体竞争结合检测

^3H 松甾酮 A，一种有效的植物蜕皮甾体，(66,000 dpm，比活性 170ci/mmol; NEN Life Science Products, Boston, Massachusetts)与 100 μl Kc 胞质或谷螟核内蜕皮激素受体提取物在 0.8X50mm 玻璃试管中混合，在存在或不存在 10 μM 未标记 20-羟基蜕皮激素(20E)下分别评价总的和非特异的与氚标记的松甾酮 A 的结合。对 Kc 胞质提取物的试管进行涡旋并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 培育过夜，或使谷螟核内提取物进行 1.5 小时的结合反应以到达平衡。在结合平衡结束时，分别向 Kc 或谷螟提取物反应中加入冰冷的 600 μl 或 300 μl 炭包被的葡聚糖溶液(500mg 的 Sigma HCl-冲洗活性炭，50mg 药用葡聚糖 T70，50ml T-缓冲液)，以此将与氚结合的松甾酮与未结合的那些分离。将试管短时间涡旋，并在 7,000 $\times g$ 下离心得到碳团。用于 Kc 或谷螟提取物的反应上清液中含有 600 μl 或 300 μl 与氚标记松甾酮 A 结合的蛋白质。将上清液吸入装有 5ml 闪烁化合

物液体(ReadySafe[®], Beckmann)的闪烁试管中。涡旋混合物,用 60%氚计数效率的 Beckman LS500 液体闪烁计数器测定总的或非特异性的结合放射活性。

- 5 测定 ³H-松甾酮 A 的竞争抑制剂 Kd 值,其在 Kc 或谷螟细胞提取物和细菌融合蛋白质中结合于蜕皮激素受体复合物
- 抑制 50%的氚标记松甾酮 A 结合的竞争剂的浓度(IC50)的测定是通过在一定浓度的供试化合物(0.1nM 至 10 μ M)存在下,培养 Kc 或谷螟核提取物或生产 CfEcR(CDEF)-GST 和 CfUSP-GST 融合蛋白质的细菌提取物与 ³H-松甾酮 A(66,000dpm 每反应)。在使用细菌融合蛋白质的结合反应中,每个结合反应中分别包括 20 或 1 μ l 生产 CfEcR(CDEF)-GST 或 CfUSP-GST 融合蛋白质的细菌提取物。检测条件和对总的和非特异性结合的测定如上所述。在溶剂中竞争化合物的体积,象 20E 或溶剂本身一样,通过使用 100 倍浓缩母液(即,稀释母液 100 倍),保持为 1% 总反应体积。如上述进行其余的检测。每个反应对每个浓度每个供试化合物进行一次重复。³H-松甾酮 A 的特异性结合的确是从总量(无竞争者)中减去非特异性结合(在 10 μ M 20E 存在下获得)或竞争的放射活性得到的。每个试验化合物的数据用 IGRO Pro 软件分析(WaveMetrics, Lake Oswego, OR)计算 IC50 值。对试验化合物的结合常数(以 μ M 表示的 Kd)通过结合 Cheng-Prusoff 公式(参见: Munson P.J.和 Rodbard D.(1980) Anal.Biochem.107, 220-239)在 IGOR Pro 软件中计算。

表 1-3 归纳了获得的数据:

表 1

配位体	Kc Log(1/EC50)	谷螟 log(1/IC50)	细菌 CfECR Log(1/IC50)
CE-1	6.55	8.7	
CE-2	5.52	6.48	
CE-3	7.96		
1	7.36	8.52	

2	7.16	9.14	
3	6.73	9.04	8.76
4	7.41	8.51	
5	7.70	9.49	
6		8.82	
7		8.78	
8		8.85	
9		9.00	
10		8.80	
11		8.93	
12	8.10	9.63	
13	7.44	9.06	
14			8.61
15			8.49
17		9.24	
18		8.82	

表 2

在瞬时转染的 CHO 细胞中荧光素酶活性

配位体 10 μ M	荧光素酶活性 ¹	诱导比 ²	Kc 细胞的 Kd (nM)
无	42		
CE-1	89	2	110
CE-2	36	1	2000
CE-3	316	8	2.3
CE-4	418	10	0.7
1	275	7	39.5
2	204	5	60
3	324	8	124
4	251	6	47
5	313	8	13.3
12	305	7	5.3
13	226	5	65

CE-4=松笛酮 A

¹ 以相对光单位(RLU)表示-两个重复样品的平均

² 存在或不存在配位体时的 RLU 比例

表 3

5 在稳定转化的 CHO 细胞中 β -半乳糖苷酸基因活性

配位体 10mM	β -半乳糖苷酶 活性 ¹	诱导比 ²	Kc 细胞 Kd (nM)
无	200		
CE-1	323	2	192
CE-2	145	1	2000
CE-3	9830	49	2
CE-4	10386	52	0.7
1	1123	6	40
2	536	3	47
3	681	3	124
4	1963	10	26
5	11599	58	13
12	9830	49	5
13	6667	33	24

¹ 以相对光单位(RLU)表示-两个重复样品的平均

² 存在或不存在配位体时的 RLU 比例

10 上述数据表明，在相当或少于上述已知化合物 CE-1 和 CE-2 浓度下，本发明配位体能够诱导基因表达。

15 除了改进基因表达调整能力外，由于其具有优越的传输和代谢性质，预期对于整体植物和动物本发明配位体具有较大的活性。下述实施例证明在植物中与已知配位体(CE-1)相比，植物促进本发明配位体(配位体 3)的传输。

转层运动

进行研究以评价两种化合物在棉叶上的转层运动，使用新生甜菜夜

蛾(*Spodoptera exigua*)作为模型系统。

5 评价两个处理：CE-1 的乳油和配位体 3(分别 5%和 19%)浓度，以 100 μ g/ml 模拟喷雾桶浓度。然后将上述处理与已知具有极好转层运动的化学标准(齐墩螨素苯甲酸酯，0.16%EC[20 μ g/ml]，Merck & Co.)和与未处理植物比较。

10 处理四周大小的棉花(*Gossypium hirsutum* L.品种 Stoneville)植株，每个处理是用相应的处理通过涂刷单独重复叶/植物顶部表面进行。将植物放置在控制环境的温室中，保持在 27°C，直到使用。残留作用是通过用新生甜菜夜蛾攻击处理和未处理叶片而评价，在 3 天，即处理后的第 1、7、14 天(DAT)进行评价。在抽样的各天，从每五个重复植物中切下单独处理叶/植物。叶片然后固定在塑料培替氏培养皿(10X20mm)的顶盖上，然后用 10 个一龄幼虫侵染。一龄甜菜夜蛾幼虫通常从叶的下表面
15 取食，且通常不贯穿到达上表面而全部取食。因此，由于化合物仅施用到叶顶表面，物质的转层运动将影响幼虫。侵染 4 天后记录幼虫死亡率。另外，观察活虫的对蜕皮加速化合物特征的表现(形成新的几丁质和/或脱落头顶膜)。每个处理重复 5 次。

20 将死亡百分率数据转换为平方根，然后使用 JMP(Ver.3.2.1)通过 ANOVA 分析。通过 Tukey-Kramer 试验(P=0.05)分离平均数。

25 在杀死甜菜夜蛾幼虫方面，结果显示由于转层运动，配位体 3 明显地比 CE-1 有效，因此，预期在植物上有较高的系统性作用。

表 4

处理	浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	死亡百分率		
		施药后天数		
		1	7	14
CE-1, 5%乳油	100	2.5	0.0	22.7
3, 19%乳油	100	100.0	93.8	100.0
齐墩螨素苯甲酸酯 0.16EC+AG-98	20	100.0	100.0	100.0
未处理对照		11.6	6.5	8.1

AG-98=0.12%的非离子表面活性剂 Latron AG-98 表面活性剂(罗姆和哈斯公司)