[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680043729.0

[43] 公开日 2008 年 12 月 3 日

[11] 公开号 CN 101316605A

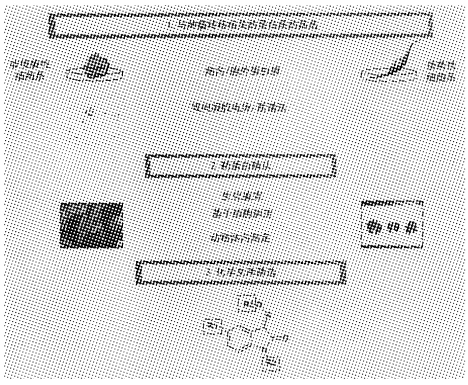
[22] 申请日 2006.11.24
[21] 申请号 200680043729.0
[30] 优先权
[32] 2005.11.24 [33] KR [31] 10-2005-0113101
[86] 国际申请 PCT/KR2006/004989 2006.11.24
[87] 国际公布 WO2007/061256 英 2007.5.31
[85] 进入国家阶段日期 2008.5.22
[71] 申请人 梨花女子大学校产学协力团
地址 韩国首尔
共同申请人 SK 株式会社
[72] 发明人 李公珠 金贤晶 赵政宇 孟哲永 南俞琼 林相美 金荣美
[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红
权利要求书 2 页 说明书 23 页 序列表 4 页
附图 20 页

[54] 发明名称

泛素 C 末端水解酶 L1 的新用途

[57] 摘要

本发明涉及包含泛素 C 末端水解酶 L1(UCH-L1)的用于诊断癌症转移的组合物，UCH-L1 用于诊断癌症转移的用途以及利用 UCH-L1 诊断癌症转移的方法；包含 UCH-L1 抑制剂的用于抑制癌症转移的组合物，UCH-L1 抑制剂用于抑制癌症转移的用途以及利用 UCH-L1 抑制剂抑制癌症转移的方法；包含 UCH-L1 蛋白的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物，UCH-L1 蛋白用于筛选癌症转移抑制剂的用途以及利用 UCH-L1 蛋白筛选癌症转移抑制剂的方法；包含 UCH-L1 基因的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物，UCH-L1 基因用于筛选癌症转移抑制剂的用途以及利用 UCH-L1 基因筛选癌症转移抑制剂的方法。 UCH-L1 是根据其表达水平调节细胞迁移包括癌症侵袭的关键分子。 因此，UCH-L1 的单克隆和多克隆抗体及底物可用于癌症转移的诊断。 此外，可通过抑制 UCH-L1 的表达或所述酶的活性抑制癌症转移，由此本申请发明人可以筛选和开发 UCH-L1 的抑制剂并将其用作用于抗癌治疗的佐药。



1. 用于抑制癌症转移的组合物，其包含 UCH-L1 的抑制剂。

2. 权利要求 1 的组合物，其中所述 UCH-L1 的抑制剂是 UCH-L1 的 shRNAi。

3. 权利要求 2 的组合物，其中所述 UCH-L1 的 shRNAi 是选自 SEQ ID No.：8、9 和 10 的寡核苷酸的一或多个寡核苷酸。

4. 权利要求 1 的组合物，其中所述 UCH-L1 的抑制剂是 UCH-L1 的单克隆抗体。

5. 权利要求 1 的组合物，其中所述 UCH-L1 的抑制剂是针对位于 UCH-L1 的 N-末端区域的 11 个氨基酸的多克隆抗体。

6. 用于筛选癌症转移抑制剂的组合物，其包含具有 SEQ ID No.: 1 的氨基酸序列的 UCH-L1 蛋白。

7. 用于筛选癌症转移抑制剂的组合物，其包含具有 SEQ ID No.: 2 的碱基序列的 UCH-L1 基因。

8. UCH-L1 的抑制剂用于抑制癌症转移的用途。

9. 权利要求 8 的用途，其中所述 UCH-L1 的抑制剂是 UCH-L1 的 shRNAi。

10. 权利要求 9 的用途，其中所述 UCH-L1 的 shRNAi 是选自 SEQ ID No.：8、9 和 10 的寡核苷酸的一或多个寡核苷酸。

11. 权利要求 8 的用途，其中所述 UCH-L1 的抑制剂是 UCH-L1 的单克隆抗体。

12. 权利要求 8 的用途，其中所述 UCH-L1 的抑制剂是针对位于 UCH-L1 的 N-末端区域的 11 个氨基酸的多克隆抗体。

13. 具有 SEQ ID No.: 1 的氨基酸序列的 UCH-L1 蛋白用于筛选癌症转移抑制剂的用途。

14. 具有 SEQ ID No.: 2 的碱基序列的 UCH-L1 基因用于筛选癌症转移抑制剂的用途。

15. 抑制癌症转移的方法，该方法包括给对象施用治疗有效量的 UCH-L1 的抑制剂和药学上可接受的载体。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述 UCH-L1 的抑制剂是 UCH-L1 的

shRNAi。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述 UCH-L1 的 shRNAi 是选自 SEQ ID No.: 8、9 和 10 的寡核苷酸的一或多个寡核苷酸。

18. 权利要求 15 的方法，其中所述 UCH-L1 的抑制剂是 UCH-L1 的单克隆抗体。

19. 权利要求 15 的方法，其中所述 UCH-L1 的抑制剂是针对位于 UCH-L1 的 N-末端区域的 11 个氨基酸的多克隆抗体。

20. 癌症转移抑制剂的筛选方法，该方法由以下步骤组成：将试验材料与用于筛选癌症转移抑制剂的组合物接触，所述组合物包含作为靶材料的具有 SEQ ID No.: 1 的氨基酸序列的 UCH-L1 蛋白；然后检查它们之间的反应，从而确定所述试验材料激活或抑制所述蛋白质的功能。

21. 癌症转移抑制剂的筛选方法，该方法由以下步骤组成：将试验材料与用于筛选癌症转移抑制剂的组合物接触，所述组合物包含作为靶材料的具有 SEQ ID No.: 2 的碱基序列的 UCH-L1 基因；然后检查它们之间的反应，从而确定所述试验材料激活或抑制所述基因的表达。

泛素 C 末端水解酶 L1 的新用途

技术领域

本发明涉及包含泛素 C 末端水解酶 L1 (UCH-L1) 的用于诊断癌症转移的组合物，UCH-L1 用于诊断癌症转移的用途以及利用 UCH-L1 诊断癌症转移的方法；包含 UCH-L1 抑制剂的用于抑制癌症转移的组合物，UCH-L1 抑制剂用于抑制癌症转移的用途以及利用 UCH-L1 抑制剂抑制癌症转移的方法；包含 UCH-L1 蛋白的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物，UCH-L1 蛋白用于筛选癌症转移抑制剂的用途以及利用 UCH-L1 蛋白筛选癌症转移抑制剂的方法；包含 UCH-L1 基因的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物，UCH-L1 基因用于筛选癌症转移抑制剂的用途以及利用 UCH-L1 基因筛选癌症转移抑制剂的方法。

背景技术

泛素 C 末端水解酶-L1 (UCH-L1) 是去泛素化酶 (DUB)和神经元特异性泛素再循环酶 (ubiquitin recycling enzyme) 中的一种。

据报道，UCH-L1 在体外水解泛素与小加合物或未折叠多肽之间的肽键。然而，对于 UCH-L1 酶的底物特异性和 DUB 家族的同工型的特异性特征了解甚少 (Christopher N. *et al.*, "substrate specificity of deubiquitinating enzymes; Ubiquitin C-terminal hydrolase," *Biochemistry*, 37, 3358-3368, 1998)。

UCH-L1 是在神经元分化的各个阶段广泛表达于神经元组织中的泛素水解酶，并特异性地表达于神经元和弥散神经内分泌系统的细胞及其肿瘤中。UCH-L1 在大脑的大多数部分表达，在中脑的黑质表达尤其高。根据序列相同性，将 DUB 细分为泛素 C 末端水解酶 (UCH) 和泛素加工蛋白酶 (UBP) 或泛素特异性蛋白酶 (USP)。虽然具有高的序列相同性，这两种酶的体外水解活性没有显著差异。

UCH 酶含有 4 个通常跨越一约 200 个氨基酸的结构域的保守序列基序，且 UCH 在大小上比 UBP 小。其中一个保守基序在活性位点含有一个关键

的半胱氨酸以及一个氧阴离子洞谷氨酰胺残基。另一个编码存在于活性位点的组氨酸和天冬氨酸残基。所述残基以类似于在其他半胱氨酸蛋白酶 (如木瓜蛋白酶/组织蛋白酶 B) 中发现的催化机理共同作用 (Simon S. Wing. Deubiquitinating enzymes-the importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, 590-605, 2003)。

据报道，UCH-L1 在 AD 和 PD 脑中是氧化性损伤的主要靶的，并通过羰基生成、甲硫氨酸氧化及半胱氨酸氧化被广泛修饰 (J Biol Chem. 2004, Mar 26; 279(13):13256-64, Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic Parkinson's and Alzheimer's diseases)。此外，据报道 UCH-L1 是一种在各种癌症 (例如肺癌、结直肠癌和胰腺癌、骨髓瘤) 中高度表达的生物标记 (Otsuki T, *et al.*, "Expression of protein gene product 9.5(PGP9.5)/ubiquitin-C-terminal hydrolase 1(UCH-L1) in human myeloma cells", *Br J Heamatol.*, Nov; 127(3):292-8, 2004; Guoan Chen *et al.*, "Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: Identification of highly expressed set of proteins in tumor", *Clinical Cancer Research*, Vol. 8, 2298-2305, 2002; Taiji Yamazaki *et al.*, "PGP9.5 as a Marker for invasive colorectal cancer", *Clinical Cancer Research*, vol.8, 192-195, 2002; Hidefumi Sasaki, *et al.*, "Expression of the protein gene product 9.5, PGP9.5, is correlated with T-status in non-small cell lung cancer", *Jpn J Clin Oncol.*, 31(11), 532-535, 2001)。

无论 *hASH1* 状态如何，UCH-L1 的表达与肺癌的发展特异性相关联并大量存在于小细胞肺癌 (SCLC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞系中 (Kenji Hibi, *et al.*, "PGP9.5 As a Candidate Tumor Marker for Non-Small-Cell Lung Cancer" *American Journal of Pathology*, Vol. 155, No. 3, pp711-715, 1999)。与 T1/T2 NSCLC 相比，UCH-L1 在 T3/T4 NSCLC 中优先表达 (Hidefumi Sasaki, *et al.*, "Expression of the protein gene product 9.5, PGP9.5, is correlated with T-status in non-small cell lung cancer", *Jpn J Clin Oncol.*, 31(11) 532-535, 2001)。在肺癌患者的血清中可以检测到循环 UCH-L1 抗原和/或抗体(Franck Brichory, *et al.*, "Proteomics-based Identification of Protein Gene Product 9.5 as a Tumor Antigen That Induces a Humoral Immune Response in

Lung Cancer", *CANCER RESEARCH*, Vol. 61, pp7908-7912, 2001)。

美国专利公开号 2005-79560 (公开日：2005.4.14) 公开了一种组合物和一种利用 UCH-L3 治疗和诊断结肠癌的方法，UCH-L3 是 UCH-L1 的同工型和一种癌症标记物。此公开详述了 UCH-L3 是一种在结肠肿瘤中的表达高于在其他肿瘤形式中的表达 3-5 倍的癌症抗原的事实，以及一种用于检查 UCH-L3 的表达的诊断和分析方法，提供了一种 UCH-L3 的抗体，并记载了利用 UCH-L3 用于癌症免疫治疗的方法。

如上述，已报道 UCH-L1 及其同工型是癌症标记物。然而，本申请第一次报道 UCH-L1 与癌症转移所必需的侵袭有关。

本申请发明人利用双相凝胶电泳和蛋白质组学分析发现 UCH-L1 与癌症转移和侵袭特异性地相关，并证明 UCH-L1 是癌症侵袭中的一个关键靶分子。

发明内容

技术问题

本发明的一个目的是提供包含泛素 C 末端水解酶-L1 (UCH-L1) 的用于诊断癌症转移的组合物、UCH-L1 的抗体或底物、或 UCH-L1 基因的引物或探针、UCH-L1 用于诊断癌症转移的用途以及利用 UCH-L1 诊断癌症转移的方法。

此外，本发明的另一个目的是提供包含 UCH-L1 抑制剂的用于抑制癌症转移的组合物、UCH-L1 抑制剂用于抑制癌症转移的用途以及利用 UCH-L1 抑制剂抑制癌症转移的方法。

本发明的另一个目的是提供包含 UCH-L1 蛋白的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物、UCH-L1 蛋白用于筛选癌症转移抑制剂的用途以及利用 UCH-L1 蛋白筛选癌症转移抑制剂的方法；包含 UCH-L1 基因的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物、UCH-L1 基因用于筛选癌症转移抑制剂的用途以及利用 UCH-L1 基因筛选癌症转移抑制剂的方法。

技术方案

本发明提供包含泛素 C 末端水解酶-L1 (UCH-L1) 的用于诊断癌症转移的组合物、UCH-L1 用于诊断癌症转移的用途以及利用 UCH-L1 诊断癌症转

移的方法。

泛素 C 末端水解酶-L1 (UCH-L1) 包含 SEQ ID No.: 1 的氨基酸序列 (NCBI 登录号：P09936)，其由包含 SEQ ID No.: 2 的序列的碱基序列编码。

UCH-L1 在癌细胞中的表达水平随转移的特性而特异性地增加，并且因为 UCH-L1 的表达增加，细胞迁移也增加。

因此，癌症转移的诊断可以通过定量分析 UCH-L1 在癌细胞或组织中的表达进行。

本发明还提供用于诊断癌症转移的方法，该方法包括以下步骤：(a) 获得从哺乳动物组织或细胞表达的蛋白质样本；和 (b) 检查 UCH-L1 在所获得的样本中的存在并进行定量分析。

本发明还提供了包含 UCH-L1 蛋白的单克隆抗体的用于诊断癌症转移的组合物，所述 UCH-L1 蛋白具有 SEQ ID No.: 1 的氨基酸序列。

此外，本发明还提供用于诊断癌症转移的方法，该方法包括以下步骤：(a) 获得从哺乳动物组织或细胞表达的蛋白质样本；和 (b) 将所获得的样本与 UCH-L1 的单克隆抗体反应，从而检查 UCH-L1 在所获得的样本中的存在并进行定量分析。

可以通过利用包含 UCH-L1 的单克隆抗体的用于诊断癌症转移的组合物与从活体获得的样本材料 (癌细胞或者组织或血清的蛋白质提取物等) 之间的呈色反应、ELISA (酶联免疫吸附测定) 和定量分析进行所述诊断。此外，可以通过对自活体获得的癌组织或细胞进行 UCH-L1 特异性的组织免疫染色，或通过蛋白印迹分析对自活体获得的癌组织或细胞与正常组中的 UCH-L1 表达水平进行比较和分析诊断癌症转移。

举例来说，癌症转移的诊断也可以通过以下步骤进行：(1) 通过将 UCH-L1 的单克隆抗体附着于凝胶支持物上制备免疫亲和柱；(2) 利用步骤 1 的免疫亲和柱通过 HPLC 检测从活体获得的材料 (癌细胞或者组织或血清的蛋白质提取物等) 中的 UCH-L1 的量；(3) 比较和分析该定量分析数据。

UCH-L1 的单克隆抗体可以根据常用单克隆抗体制备方法制备或从商业途径获得。

一般而言，UCH-L1 的单克隆抗体可以通过利用与酶 (例如碱性磷酸酶 (AP) 或辣根过氧化物酶 (HRP) 等) 及其底物结合的第二抗体的呈色反应进行定量分析。或者，直接与 AP 或 HRP 等结合的 UCH-L1 单克隆抗体可

用于定量分析。

也可以使用识别UCH-L1蛋白的多克隆抗体代替UCH-L1单克隆抗体。所述多克隆抗体可以通过常规抗血清制备方法制备。

本发明还提供包含多克隆抗体的用于诊断癌症转移的组合物，所述多克隆抗体针对位于UCH-L1的N末端区域的11个氨基酸。也可以使用识别位于UCH-L1蛋白的N末端区域的11个氨基酸 (SEQ ID. No.: 7) 的多克隆抗体代替 UCH-L1 单克隆抗体。所述多克隆抗体可以通过已在文献中公开的方法制备。

此外，本发明提供用于诊断癌症转移的组合物，其包含具有SEQ ID No.: 1的氨基酸序列的UCH-L1的底物。

UCH-L1的底物可以是泛素化的物质。优选地，可以使用UB-AMC (泛素化氨基-4-甲基香豆素)。

可以通过在UCH-L1水解UB-AMC时检测荧光对UCH-L1酶进行定量分析。

诊断可以通过向从活体获得的样本材料 (癌细胞或组织的蛋白质提取物) 添加用于诊断癌症转移的组合物从而检测发光反应并分析数据来进行。

此外，本发明提供用于诊断癌症转移的方法，该方法包含以下步骤：(a) 获得从哺乳动物组织或细胞表达的蛋白质样本；(b) 将获得的样本与UCH-L1的底物反应，检测荧光，从而检查UCH-L1的表达并进行定量分析。

本发明还提供了用于诊断癌症转移的组合物，其包含具有SEQ ID No.: 2的碱基序列的UCH-L1基因的PCR引物或探针。

癌症转移的诊断可以通过利用 UCH-L1 基因的引物进行的 RT-PCR 或定量 RT-PCR 比较检测组与正常组之间的 UCH-L1 表达水平进行。此外，癌症转移的诊断可以通过利用UCH-L1基因的探针进行的RNA印迹杂交分析等比较检测组与正常组之间的UCH-L1表达水平进行。

癌症转移的诊断可通过反应从活体获得的材料 (从癌细胞或组织提取的RNA) 和 (通过RT-PCR、定量RT-PCR、或RNA印迹) 比较检测组与正常组之间的UCH-L1表达水平进行。

此外，本发明提供通过以下步骤诊断癌症转移方法：(a) 获得从哺乳动物组织或细胞表达的RNA样本；和 (b) 将所获得的样本与UCH-L1的引物或探针反应，从而检查UCH-L1在所获得的样本中的表达并进行定量分析。

本发明提供包含 UCH-L1 抑制剂的用于抑制癌症转移的组合物、UCH-L1 抑制剂用于抑制癌症转移的用途和利用 UCH-L1 抑制剂抑制癌症转移的方法。

通过本发明抑制癌症转移包括减轻和预防癌症转移。

由于 UCH-L1 在癌细胞中高度表达，本发明的组合物通过给患者施用 UCH-L1 表达抑制剂可用于抑制癌症转移。

本发明还提供用于抑制癌症转移的方法，包括给癌症患者施用抑制癌症转移的治疗有效量的 UCH-L1 抑制剂。

所述 UCH-L1 抑制剂可以是抑制 UCH-L1 的表达或抑制酶活性的物质，尤其是 shRNAi (短发夹状 RNA 干扰)；在现有技术中称作 UCH-L1 抑制剂的靛红肟类化合物 (Chem. Biol., 10(9):837-846, 2003)；或 UCH-L1 蛋白的单克隆抗体或针对位于 UCH-L1 的 N 末端区域的 11 个氨基酸的多克隆抗体。

图 13 是用于制备 UCH-L1 的 shRNAi 的慢病毒的示意图。

在本发明中，UCH-L1 的 shRNAi 优选是选自 SEQ ID No.: 8、9 和 10 的一或多个 shRNAi。

SEQ ID No.: 3-6 的碱基序列被制备用于慢病毒载体用作表达载体的情形。

SEQ ID No.: 3 是包含零乱序列 (scramble sequence) 的慢病毒对照 shRNAi 的碱基序列。

SEQ ID No.: 4 是被制备用于靶向人和小鼠的 shRNAi 的共有碱基序列区域的 shRNAi，并被用于利用慢病毒作为表达载体诱导 UCH-L 的敲除 (chemistry and biology. vol 10. 837-846, 2003)。

SEQ ID No.: 5 和 6 是被制备用于通过将慢病毒用作表达载体靶向小鼠的碱基序列区域的 shRNAi。

SEQ ID No.: 8 是能用于所有各种 siRNA (小干扰 RNA) 的重要靶序列，用于降低人和小鼠中的 UCH-L1 表达。

SEQ ID No.: 9 和 10 是能用于所有各种 siRNA (小干扰 RNA) 的重要靶序列，用于降低小鼠中的 UCH-L1 的表达。

通过初步实验，发现在使用人碱基序列上的 SEQ ID No.: 8 的区域的 siRNA 以及使用鼠碱基序列上的 SEQ ID No.: 8 或 10 的区域的 siRNA 中，UCH-L1 的表达水平有效降低。人和小鼠的碱基序列通过 clustalW 多重序列

比对程序显示出 95%的氨基酸序列相同性。当将慢病毒用做表达载体时，与 GFP 或 zeosin 抗性基因的共表达可以证实细胞是否被慢病毒感染 (Nature genetics, vol.33, March 2003)。

在本发明的一个实施方式中，抑制 UCH-L1 表达的 shRNAi 在小鼠黑色素瘤细胞中被抑制引起 RNA 干扰 (RNAi)，导致对 UCH-L1 表达的抑制。将所述黑色素瘤细胞微量注射入小鼠的静脉显示出主要的肺转移减少。

本发明的用于抑制癌症转移的组合物还可以包含一或多种抗癌药。UCH-L1 蛋白的抑制剂或抗体可与本领域技术人员熟知的化疗剂联合使用，所述化疗剂例如是烷化剂 (如环磷酰胺、氮丙啶、alkylalconsulphonate、亚硝基脲、达卡巴嗪、卡铂、顺铂等)、抗生素 (如丝裂霉素 C、蒽环类抗生素、多柔比星 (阿霉素) 等)、抗代谢剂 (如甲氨喋呤、5-氟脲嘧啶、阿糖胞苷等)、衍生自植物的试剂 (如 Vinka 生物碱) 和激素等。

包含UCH-L1抑制剂作为活性成份的本发明的组合物，除活性成份外，可通过使用药学和生理学上可接受的添加剂制备。这样的添加剂可以是赋形剂、崩解剂、甜味剂、粘合剂、涂层剂、发泡剂、润滑剂、助流剂、调味剂、增溶剂等。

包含 UCH-L1 抑制剂作为活性成份的本发明的组合物，除活性成份外，还可包含一或多种药学上可接受的载体，以适当地配制成药物组合物。

为了配制液体制剂，所述组合物包含具有生物相容性并已灭菌的药学上可接受的载体，例如盐水、灭菌水、林格溶液、缓冲盐水、白蛋白注射液、葡萄糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油、乙醇及其混合物。如果需要，可将其他常见添加剂如抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂等添加到所述组合物中。此外，通过进一步添加稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂或润滑剂，所述组合物可被配制成可注射的形式 (如溶液、悬浮液、乳剂等)、丸剂、胶囊、胶囊或片剂。此外，通过利用常规方法或 Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA) 的文字记载，本发明的组合物可以根据疾病或成分配制成任何所需形式。

本发明的药物组合物可制成任何形式如颗粒、粉末、糖衣片、片剂、胶囊、栓剂、糖浆、汁、悬浮液、乳剂、滴剂或可注射液体制剂及活性成分的持续释放制剂等。

包含 UCH-L1 抑制剂作为活性成份的本发明的组合物可根据常规的施

用方法经各种途径进行施用，包括静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、胸内、经皮、鼻内、吸入、局部、直肠、口服、眼和真皮内导入。

包含 UCH-L1 抑制剂作为活性成份的本发明的组合物的剂量表示诱导对癌症转移的抑制效应所需的活性成份或药物组合物的量。

因此，所述剂量可以通过各种因素确定，例如疾病的性质、患者症状的严重程度，活性成分的含量，其他成分的性质和含量，制剂的类型，患者的年龄、体重、健康状况、性别和食物，给药时间，给药途径，组合物的分泌比例，治疗时间和其他共同施用的药物。在成人中，当每天施用一或多次 UCH-L1 抑制剂时，shRNAi 的剂量优选为 0.01 ng/kg~10 mg/kg，化合物的剂量优选为 0.1 ng/kg ~ 10 mg/kg，UCH-L1 单克隆抗体的剂量优选为 0.1 ng/kg ~ 10 mg/kg。

本发明提供包含 UCH-L1 基因的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物、UCH-L1 基因用于筛选癌症转移抑制剂的用途和利用 UCH-L1 基因筛选癌症转移抑制剂的方法。

本发明的组合物的 UCH-L1 基因序列可以是选自 SEQ ID No.: 2 的部分或全部碱基序列和其他包含 SEQ ID No.: 2 的多态性的碱基序列的一或多个序列。此外，用于筛选癌症转移抑制剂的组合物可包含以包括在原核生物或真核生物的表达载体系统中的形式存在的 UCH-L1 基因序列。

本发明还提供利用包含 UCH-L1 基因的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物筛选癌症转移抑制剂的方法。

根据本发明的用于筛选癌症转移抑制剂的方法可包括以下步骤：将包含 UCH-L1 基因的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物与试验材料接触，然后检查它们之间的反应，并确定所述试验材料是否抑制基因表达。

为确认在本发明的筛选方法中包含 UCH-L1 基因的组合物与试验材料之间的反应，可以使用用于确认 DNA-DNA、DNA-RNA、DNA-蛋白质或 DNA-化合物之间的反应的常规方法，例如通过对基因与试验材料之间的结合的体外杂交检测测量所述基因的表达率的方法；哺乳动物细胞与试验材料反应后进行的 RNA 印迹分析、定量 PCR、定量实时定量 PCR 等；或通过将报道基因与待导入细胞的所述 UCH-L1 基因连接后与所述试验材料反应测量报道蛋白质的表达率的方法。

除 UCH-L1 基因外，本发明的组合物可以包含蒸馏水或缓冲液以保持

核酸结构的稳定。

本发明提供包含 UCH-L1 蛋白的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物、UCH-L1 蛋白用于筛选癌症转移抑制剂的用途、及利用 UCH-L1 蛋白筛选癌症转移抑制剂的方法。

根据本发明的组合物的 UCH-L1 蛋白序列可以是选自以下的一或多个序列：SEQ ID No.: 1 的部分或全部碱基序列、由包含 SEQ ID No.: 2 的多态性的碱基序列表达的蛋白质的氨基酸序列、和具有同等生理活性的 UCH-L1 的多肽片段。

由于根据本发明的用于筛选的组合物对癌症转移的促进有影响，可以筛选并选择抑制 UCH-L1 基因序列转录成 mRNA 或翻译成蛋白质的物质、或作为癌症转移抑制剂抑制 UCH-L1 蛋白的活性的物质。

本发明还提供利用包含作为靶材料的 UCH-L1 基因的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物筛选癌症转移抑制剂的方法。

根据本发明的用于筛选癌症转移抑制剂的方法包括以下步骤：将包含 UCH-L1 蛋白的用于筛选癌症转移抑制剂的组合物与试验材料接触，检测它们之间的反应并确定所述试验材料是否增强或抑制所述组合物中所包含的蛋白质的功能。

在根据本发明的用于筛选的方法中，为确认包含 UCH-L1 蛋白的组合物与试验材料之间的反应，可以使用用于确认 DNA-DNA、DNA-RNA、DNA-蛋白质或 DNA-化合物之间的反应的常规方法，例如在 UCH-L1 基因或 UCH-L1 蛋白与试验材料反应后测量活性的方法、酵母双杂交方法、与 UCH-L1 蛋白结合的噬菌体展示肽克隆的搜索、利用天然物质和化学文库等的高效筛选 (HTS)、药物打靶 HTS (drug hit HTS)、基于细胞的筛选和 DNA 阵列。

除 UCH-L1 表达的蛋白质外，本发明的组合物可以包含缓冲液或反应溶液以保持所述蛋白质的结构或生理活性的稳定。

此外，本发明的组合物可以包含表达 UCH-L1 蛋白的细胞、或含有在能控制转录率的启动子的控制下表达的质粒的细胞等。

在本发明的用于筛选的方法中，所述试验材料可以选自假定具有癌症转移抑制剂的可能性的单独的核酸、蛋白质、任意提取物、天然物质或化合物，或从它们中间随机选取。

在本发明的图 18 中，描述了利用 UCH-L1 筛选抑制剂的方法的具体实例。将 5~10 nM 的 UCH-L1 酶与 0~1,000 nM 的 UB-AMC(底物) 和反应缓冲液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.6)、0.5 mM EDTA、0.1 mg/mL 白蛋白、W/O 或 W/5 mM DTT) 反应，同时向其中加入 UCH-L1 抑制剂的候选材料，并进行生化特性 (如酶活性、酶促反应速率) 的分析和 HTS 分析以筛选 UCH-L1 抑制剂。

在通过根据本发明的用于筛选的方法获得的用于增强或抑制基因的表达或蛋白质的功能的试验材料中，增强基因的表达或蛋白质的功能的材料可作为候选的癌症转移抑制剂。抑制基因的表达或蛋白质的功能的材料，可以通过开发抑制基因的表达或蛋白质的功能的材料的抑制剂来发现癌症转移抑制剂的候选材料。

此后，此类癌症转移抑制剂的候选材料将在癌症转移抑制剂的开发中用作先导化合物，且所述先导化合物可用于修饰或优化 UCH-L1 基因或 UCH-L1 蛋白的结构以抑制它们的功能，从而开发新的癌症转移抑制剂。

由于通过这一方法获得的物质部分地或者完全地影响 UCH-L1 基因或 UCH-L1 蛋白，因此有可能使由抑制 UCH-L1 基因表达或降低 UCH-L1 蛋白的功能引起的癌症转移或其他疾病得到抑制。

涉及基因工程技术的问题在 Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001) 和 Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994) 中有更为清楚的记载。

本发明的优势和特点及揭示它们的方法将从以下详述的实施例清楚可见。然而，应当清楚地理解本发明并不限于此而可以以其他不同的方式体现和实施。很明显以下实施例是用于完成本发明的公开以及向本领域技术人员指明本发明的范围，本发明将仅通过权利要求书的范围加以限定。

有益效果

UCH-L1 是根据其表达水平来调节细胞迁移 (包括癌症侵袭) 的关键分子。因此，UCH-L1 的单克隆和多克隆抗体及底物可用于癌症转移的诊断。

此外，可通过抑制 UCH-L1 的表达或酶的活性抑制癌症转移，由此本申请发明人可以筛选和开发 UCH-L1 的抑制剂并将其用作佐药用于抗癌治

疗。

附图说明

图 1 是显示鉴定在具有不同侵袭能力的两个细胞系中与侵袭相关的靶蛋白的全过程的示意图。

图 2 显示采用以 Matrigel™包被的 transwell 对具有不同侵袭能力的 WI38、H358 和 H157 细胞系进行侵袭检测的结果。

图 3 显示对具有不同侵袭能力的 WI38、H358 和 H157 细胞进行明胶酶活性检测的结果。

图 4 显示利用双向凝胶电泳对具有不同侵袭能力的 H358 和 H157 癌细胞系的胞内或胞外蛋白质的蛋白质组学分析。

图 5 显示 WI38、H358 和 H157 细胞系的胞内或胞外蛋白质的相对表达水平。

图 6 显示以 pFlag-CMV-2-UCH-L1 瞬时转染的 WI38 正常肺细胞系的侵袭检测的结果。

图 7 显示以 pFlag-CMV-2-UCH-L1 瞬时转染的 HeLa 宫颈癌细胞系的侵袭检测的结果，UCH-L1 在 HeLa 宫颈癌细胞系中不表达。

图 8 显示利用免疫沉淀法对以 pFlag-CMV-2-UCH-L1 瞬时转染的 HEK 293T 细胞系进行蛋白组学分析以鉴定与 UCH-L1 结合的蛋白质。

图 9 显示用抗 β-肌动蛋白、抗-HSP70 和抗-ERK 抗体进行蛋白质印迹分析以鉴定如图 8 和表 3 中所示的 UCH-L1 结合蛋白。

图 10 显示利用共焦显微镜检查对 H358 癌细胞系细胞膜中 flag 标记的 UCH-L1 和 β-肌动蛋白的细胞共区域化的免疫荧光分析。

图 11 是显示肺转移检测 (动物实验) 的示意图。

图 12 显示利用蛋白质印迹分析检测在 B16F10 小鼠黑色素瘤细胞系和 H157 人肺癌细胞系中 UCH-L1 的蛋白质表达水平。

图 13 是显示以基于慢病毒的系统制备 UCH-L1 的 shRNAi 的示意图。

图 14 显示用抗 UCH-L1 抗体进行蛋白质印迹分析以确认在表达 UCH-L1 特异性 RNAi 的 H157 稳定细胞中 UCH-L1 表达减少。

图 15 显示利用 FACS 流式细胞仪进行 FACS 分析以测量在表达 UCH-L1 特异性 RNAi 的 H157 稳定细胞中的 GFP 表达水平的结果。

图 16 显示具有或不具有从注射 B16F10 稳定细胞的 BALB/C 裸鼠摘除的黑色球形群体的肺的影象，所述细胞表达无关的 RNAi 或 UCH-L1 特异性 RNAi 并 (在注射后第 14 天) 通过 Zeocin 抗生素筛选。

图 17 显示利用解剖镜计数图 16 中显示的相同的肺表面上的黑色球形群体的数目。

图 18 和 19 显示 UCH-L1 酶促活性的抑制剂的高效筛选 (HTS)的示意图。

具体实施方式

实施例 I 利用 UCH-L1 诊断癌症转移、抑制癌症转移和筛选癌症转移的抑制剂

I-1. 筛选与癌症转移相关的蛋白质以鉴定靶分子

为鉴定与癌症转移相关的蛋白质，本申请发明人分析了在具有侵袭能力的 H157 (鳞状细胞癌)、不具有侵袭能力的 H358 (支气管肺泡癌) 癌细胞系、和正常肺细胞系 WI38 (VA-13 亚克隆 2RA (成纤维细胞)) 的胞内或胞外组分中差异化表达的蛋白质。

将 H157、H358 和 WI38 细胞保持在补充 10% (v/v) 胎牛血清(FBS)、100 单位/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素、3.75μg/mL 碳酸氢钠和 10 mM HEPES 的 RPMI-1640 (pH 7.3，含有 2 mM L-谷氨酰胺)中。

I-1-1) 利用以 Matrigel™包被的 transwell 进行侵袭检测

为检测细胞迁移能力，利用以 Matrigel™ (Matrigel, Becton Dickinson(BD) company, Cat No.354234) 包被的 transwell 进行体外侵袭检测，Matrigel™是一种自 EHS (Englebreth-Holm-Swarm) 小鼠肿瘤提取的重建基膜基质。

于 4℃，用无血清冷培养基将 Matrigel™稀释至 1 mg/mL (终浓度)。用上述经稀释的 Matrigel™ (80μg/μL) 包被 Transwell 侵袭小室的上层小室，然后于 37℃温育 1 小时。用 600 μL 补充了 10% FBS 的 RPMI-1640 温育 Transwell 侵袭小室的下层小室进行平衡。1 小时后，用无血清培养基从所述 transwell 除去未包被的 Matrigel™。

用胰蛋白酶收获 H157、WI38 和 H358 细胞，然后悬浮于无血清培养基中，将相同数量的细胞(1.0 x 10^4 个细胞/孔，150μL) 分别接种于以 Matrigel™包被的 transwell 的上层小室并于 37℃温育 24 小时。在进行温育并用棉球除去 transwell 的上层小室中的残留细胞后，用结晶紫 (结晶紫 2.5g、甲醇 125 mL、d-H_2O 375mL) 对细胞染色 5 分钟并用蒸馏水洗涤 3 遍共 1 分钟，然后利用血细胞计数器计数向 transwell 的下层小室迁移的细胞的数目。数据以 3 次独立实验的迁移细胞的平均数 ± S.D.表示。

如图 2 中所示，发现在上述 3 种细胞系中，H157 细胞侵袭能力最强，WI38 细胞次之，而 H358 细胞尽管属于肺癌细胞但不具有侵袭能力。

I-1-2) 利用酶谱法对 MMP2 和 MMP9 进行活性检测

为研究各种癌细胞系中细胞迁移与 MMP 的表达之间的关系，利用酶谱法测量了 MMP 的活性。

酶谱法是一种测定明胶酶活性的方法。在包含明胶的 SDS-PAGE 上进行蛋白质分离后，将凝胶于 37℃温育 15 至 20 小时。由于明胶被激活的 MMP (明胶酶) 水解，因此温育的凝胶上具有激活的 MMP (明胶酶) 的条带不被考马斯蓝染料染色。这些条带被称为阴性带。

为研究 MMP 在 WI38、H358 和 H157 细胞系中的活性，提取所述细胞系的蛋白质，并根据上述程序进行酶谱法检测。

如图 3 所示，WI-38 具有 MMP 2 的活性，H358 具有 MMP 9 的活性。而 H157 同时具有 MMP 2 和 MMP 9 的活性。

如图 2 和图 3 所示，侵袭能力与 MMP 的活性之间存在相关性。也就是说，同时具有 MMP2 和 MMP9 的活性的 H157 细胞具有高侵袭能力。另一方面，仅具有一种 MMP 活性的 H358 和 WI38 细胞侵袭能力低。具有 MMP9 的活性的 H358 细胞没有侵袭性，具有 MMP2 的活性的 WI38 细胞的侵袭性较 H157 细胞的侵袭性低。

转移是指肿瘤从其发生的原发器官扩散到机体的其他部位的过程。在这个过程中，肿瘤细胞必须能够侵入穿过一个被称为基膜的屏障，且明胶酶 (如 MMP) 必须激活以侵入所述屏障。基于这些过程和上述侵袭检测结果，表明 MMP2 活性是癌细胞的迁移和侵袭所必需的，MMP9 对 MMP2 导致的癌细胞的迁移和侵袭有累加效应。发现癌症中的细胞迁移和侵袭不仅

通过 MMP9 调节。

I-1-3) 双向凝胶电泳和 MALDI-TOF 质谱分析

为鉴定在各细胞系中差异化表达的蛋白质，进行双向凝胶电泳。

使用获自 Amersham Pharmacia Biotech (USA) 的胶条进行双向 PAGE。根据其 pI 值使蛋白质在胶条上等电聚焦，然后根据其分子量在 SDS-PAGE 上进行分离。

于室温下，将 H358 和 H157 细胞 (1×10^6 个细胞: 150-200 μg) 在第一维样本缓冲液 (30 μL) 中裂解 1 小时，所述缓冲液含有 8.4 M 尿素、2.4 M 硫脲、5% CHAPS、50 mMDTT、1.6% 5-7 两性电解物、0.4% 3-10 两性电解物、1 mM PMSF、5 μg/mL 抑肽酶、10 μg/mL 胃酶抑素 A、10 μg/mL 亮抑蛋白酶肽和 1 mM EDTA。为根据 pI 分离细胞裂解物，将再水合缓冲液 (125 μL; 8M 尿素、2% (w/v) CHAPS、0.5% IPG 缓冲液、1% 溴酚蓝) 添加至胶条托槽 (strip holder)中。向其中加入裂解的细胞样本，然后将胶条置于其上。为了防止水分蒸发，添加 180μL 矿物油，胶条在 20℃条件下再水合 12 小时以上，然后进行电聚焦。使用以下聚焦方案：1) 500 V，1 小时；2) 1000V，1 小时；和 3) 8000 V，3 小时。电聚焦后，将胶条快速贮存于-70°C 防止分离的蛋白质扩散。

为通过分子量进行蛋白质的分离 (第二次分离)，将胶条用平衡缓冲液 (50 mM Tris-HCl [pH 8.8]、6 M 尿素、30% (v/v) 甘油和 2% (w/v) SDS、1% 溴酚蓝、100 mM DTT) 振荡 20 分钟，然后加载于 11% SDS-PAGE 上进行分离。

待通过双向 PAGE (上述方法)鉴定的、在三个细胞系 (H157、H358 和 WI38) 中差异化表达的蛋白质 (斑点) 示于图 4。

为利用 MALDI-TOF 质谱法进行分析，将蛋白质在双向 PAGE 上进行分离，然后用考马斯染料染色。经鉴定后，切下凝胶上的蛋白质 (斑点)并贮存于 eppendorf 管中。将切下的凝胶在 30%甲醇 (1 mL) 中均质化，然后于 37°C 温育 5 分钟。将这些凝胶用 100μL 的 25mM 碳酸氢氨 (NH_4HCO_3)/50%乙腈溶液脱色三遍共 10 分钟，用 100% 乙醇脱水，并用 Speed Vac 真空离心机进行完全干燥。将含有 25mM NH_4HCO_3 的胰蛋白酶 (10μL, 10ng/mL) 溶液加入干燥的凝胶，并于所述凝胶在室温下反应 5-10

分钟，接着于 4°C 反应 30 分钟。接下来，向其中添加 20μL 的 25mM NH_4HCO_3。将这些经胰蛋白酶和 25mM NH_4HCO_3 (20μL) 处理的凝胶于 37°C 再温育 12-16 小时。此时，再添加 30μL 的 60%乙腈/0.1% TFA (1:1 v/v) 溶液。于 37°C 温育这些凝胶 10 分钟。将上清液合并在一起三次，然后用 20μL 的 100%乙腈处理，最后在 SpeedVac 真空离心机干燥并贮存于-70°C。

将该浓缩并干燥的样本溶解于 10μL 的 60%乙腈/ 0.1%TFA(1:1 v/v) 溶液并超声处理 2 分钟。接下来，将它们按 1:1 的比率与基质溶液 (于乙腈/0.1%TFA (1:1 v/v)中的 α-氰基-4-羟基肉桂酸)混合，加载于板上，并于室温下干燥。用装配有氮激光器(337nm)的 HP G2025A MALDI-TOF MS (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) 进行质谱分析。来自离子源的加速电压为 28 kV，光谱通过外部底物 P (MH^+ = 1348.6 Da) 和胰岛素 (MH^+ = 5778.6 Da) 进行定量。收集数据，并用因特网蛋白质资源(UCSF) "MS-Fit" (http://prospector.ucsf.edu/) 程序鉴定数据以分析质谱。用 Image Master 双向凝胶分析软件(Amersham Pharmacia Biotech., USA) 对量进行分析。

使用上述方法检测在各细胞系中差异化表达的蛋白质的结果示于表 1 和图 5 中。

与 H358 肺癌细胞系相比，UCH-L1 是在 H157 细胞系中差异化表达最强的蛋白质中的一种。通过蛋白质组学分析，UCH-L1 在 H157 细胞的胞内和胞外蛋白质中都检测到。

表 1

	胞内蛋白质	NCBI#	胞外蛋白质
1		4755085	α1(1)前胶原
2		1418930	α2(1)前胶原
3	转运内质网 ATP 酶	5410290	转运内质网 ATP 酶
4	71Kd 热休克同源蛋白	32467	71Kd 热休克同源蛋白
5	线粒体应激 70 蛋白前体	P38646	线粒体应激 70 蛋白前体
6	重金属结合蛋白	34707/306890	伴侣蛋白 (HSP60)
7	T-复合蛋白 (TCP)	1351211/603955	KIAA0098 蛋白
8	转化敏感蛋白 IEF SSP	P31948	
9	波形蛋白	2119204	
10	蛋白质二硫键异构酶 (PDI)	1085373	蛋白质二硫键异构酶 (PDI)
11	T-复合蛋白 1	P78371	
12	丙酮酸激酶	266427	丙酮酸激酶
13	α 烯醇化酶	4503571/1167848	α 烯醇化酶
14	肌动蛋白	1070613/28252	β 肌动蛋白
15	磷酸甘油酸酯激酶	387020	磷酸甘油酸酯激酶
16	磷酸甘油酸酯激酶	387020	磷酸甘油酸酯激酶
17	醛缩酶 A	28614	醛缩酶 A
18	醛缩酶 A	28614	醛缩酶 A
19	B23 核仁磷蛋白(280AA)	825671	B23 核仁磷蛋白(280AA)
20	trophmyosin 4 类似物	12653955	
21		4505751	脂壳素 V (Lipcortin V)
22		7106894	HSPC252
23		6434861	磷脂酰胆碱转移蛋白 (Phosphatidylcholone transfer protein)
24		2217923	α(1,2)岩藻糖基转移酶
25		4757756	脂壳素 II

26	泛素 C 末端水解酶 L1 类似物	12653131	泛素 C 末端水解酶 L1 类似物
27	磷酸甘油酸酯变位酶 2	450571	磷酸甘油酸酯变位酶 2
28	磷酸丙糖异构酶 (trisphosphate isomerase)	37247	磷酸丙糖异构酶
29	谷胱甘肽 S-转移酶(GST-Pi)	31946	谷胱甘肽 S-转移酶 (GST-Pi)
30	原肌球蛋白	P07226/37424	细胞支架原肌球蛋白
31		339958	支架原肌球蛋白
32	Nm23H1g	468542	Nm23H1g
33	亲环蛋白	181250	亲环蛋白
34	起始因子 4D	181997/4691541	腺苷酸激酶 5
35	钙调蛋白	179810	钙调蛋白
36	视黄酸结合蛋白 II	181026	
37	肽基异构酶	30168	肽基异构酶
38	肽基异构酶	30168	肽基异构酶
39	Nm23H2 产物	189240	Nm23H2 产物

以上结果表明一种可能性，既 UCH-L1 可用做与癌症转移密切相关的蛋白质。

I-2. UCH-L1 作为调节癌症转移的靶分子的鉴定

I-2-1) 特异性地表达 flag 标记的 UCH-L1 的 WI38 细胞系的侵袭检测

为研究 UCH-L1 是否是调节与癌细胞侵袭的靶分子，本申请发明人使用以 Matrigel™包被的 transwell 检测了正常肺细胞系 WI38 的侵袭能力(侵袭分析)，WI38 以剂量依赖性的方式 (1、2、4、6μg) 表达 flag 标记的 UCH-L1 (pFlag-CMV-2-UCH-L1，包括 SEQ ID No.: 2 的 UCH-L1 全长 cDNA 的序列的 pFlag-CMV-2 表达载体 (sigma, saint louis, USA))。

在该侵袭检测中，将具有优良的细胞迁移能力的 H157 细胞用做阳性对照。如图 6 中所示，pFlag-CMV-2-UCH-L1 的转染使细胞迁移能力增强。特

别地，过表达 flag 标记的 UCH-L1 的 WI38 细胞以剂量依赖性的方式显著增强细胞迁移。

I-2-2) 特异性地表达 flag 标记的 UCH-L1 的 HeLa 细胞的侵袭检测

尽管 HeLa 细胞具有侵袭性，但 UCH-L1 在 HeLa 细胞中不表达。当用 pFlag-CMV-2-UCH-L1 以剂量依赖性的方式 (0.5、1、2 和 4μg) 瞬时转染 HeLa 细胞后，研究 HeLa 细胞的迁移能力增强与否。

如图示 7 中所示，过表达 UCH-L1 的 HeLa 细胞的迁移与对照组细胞相比以剂量依赖性的方式显著增强。

这一结果表明 UCH-L1 特异性地调节细胞迁移并在癌细胞侵袭中起作用。

I-2-3) 与 UCH-L1 相互作用的蛋白质的鉴定

A. 利用免疫沉淀法鉴定与 UCH-L1 相互作用的蛋白质

以上结果表明 UCH-L1 是调节细胞迁移的关键分子。为鉴定细胞内与 UCH-L1 相互作用的蛋白质，进行免疫沉淀法。

用 pFlag-CMV-2-UCH-L1 瞬时转染 HEK293T 细胞后，利用免疫沉淀法筛选与 UCH-L1 相互作用的蛋白质。结果如图示 8 中所示。通过检测 HEK293 细胞中根据其 pI 值而具有不同运动性的 5 个斑点 (斑点 1-5) 已知在细胞中存在 UCH-L1 的各种同工型 (图 8A)。

为根据氧化性应激分别检查各 UCH-L1 同工型的相互作用的蛋白质的分布，用 H_2O_2 对 HEK293 细胞进行处理。对该经 H_2O_2 处理的细胞裂解物进行免疫沉淀并通过双向 PAGE (图 8B) 和 MALDI-TOF MS 与对照细胞进行比较分析。

表 2 显示了利用免疫沉淀法和 MALDI-TOF MS 鉴定为与 UCH-L1 相互作用的蛋白质。

如表 2 所示，β-肌动蛋白、HSP70、ERK 等被鉴定为细胞中与 UCH-L1 相互作用的蛋白质。表明 UCH-L1 通过与蛋白质 (如 β-肌动蛋白和 ERK 这些已知与细胞形态学相关的蛋白质)相互作用参与细胞迁移的调节。

表 2 与 UCH-L1 相互作用的蛋白质的鉴定 (MALDI-TOF-MS)

斑点	鉴定的蛋白质	登录号#	质量 (Da)	pI	%Cov	功能
1	热休克 70kDa 蛋白 9B 前体；热休克 70kD 蛋白 9	24234688M	73681	5.9	34	伴侣蛋白
2	热休克 70kDa 蛋白 9B 前体；热休克 70kDa 蛋白 9	24234688M	73681	5.9	20	伴侣蛋白
3	热休克 70kDa 蛋白 8 同工型 1；热休克同源蛋白，71kDa；热休克 70kD 蛋白 10；热休克同源蛋白 54；组成型热休克蛋白 70；脂多糖相关蛋白 1；LPS-相关蛋白 1 (人)	5729877M	70899	5.4	28	伴侣蛋白
4	角蛋白 1，II 型，细胞支架	7428712	65494	6.0	33	细胞支架蛋白
5	异种核糖核蛋白 H2；异种核糖核蛋白 H^1 (人)	9624998M	49264	5.9	50	核糖核蛋白
6	异种核糖核蛋白 H1 (人)	5031753M	49230	5.9	25	核糖核蛋白
	异种核糖核蛋白 H1 (人)	5031753M	49230	5.9	20	核糖核蛋白
7	44kDa 蛋白激酶，丝裂原活化蛋白激酶	1335009M	41001	6.3	23	信号调节激酶
8	鼠乳腺瘤整合位点 6 (癌基因同系物)；真核翻译起始因子 3，亚单位 6 (48kD) (人)	4503521M	52221	5.7	19	翻译因子
9	β 肌动蛋白；β 细胞支架肌动蛋白	4501885M	41737	5.3	28	细胞支架蛋白
10	β 肌动蛋白	14250401	41005	5.6	27	细胞支架蛋白
11	BPNT1 蛋白	17389533	35772	5.5	18	酯酶
12	ACTB 蛋白	15277503	40221	5.6	27	结构蛋白

为确认表 2 中所示的相互作用的蛋白质，利用蛋白质免疫印迹分析将其中的 β-肌动蛋白、HSP70 和 ERK 分别以其抗体鉴定为相互作用的蛋白质(图 9)。

B. UCH-L1 与 β-肌动蛋白在细胞中的相互作用

细胞形态学变化与细胞迁移有很深的联系。β-肌动蛋白涉及细胞形态学。当用 pFlag-CMV-2-UCH-L1 瞬时转染具有小 UCH-L1 的 H358 细胞以过表达 UCH-L1 时，其形态变化显著，这种形态学变化与细胞迁移能力密切相关。为确认 UCH-L1 与细胞迁移能力之间的关系，在具有小 UCH-L1 的 H358 细胞中检测 UCH-L1 和 β-肌动蛋白的亚细胞分布

用 pFlag-CMV-2-UCH-L1 瞬时转染 H358 细胞，然后用鬼笔环肽异硫氰酸荧光素进行温育用于肌动蛋白染色，然后用抗 Flag 抗体和与结合德克萨斯红的第二抗体进行 UCH-L1 染色。

如图 10 所示，利用共焦显微镜检查证明了 UCH-L1 与 β-肌动蛋白在细胞内相互作用。具体来说，UCH-L1 与 β-肌动蛋白主要共定位于细胞膜中，而非整个细胞质中。结果表明 UCH-L1 参与影响细胞迁移能力的细胞形态的调节。

上述结果证明 UCH-L1 是与癌症转移所需的细胞迁移相关的靶蛋白。

实施例 II 表达 UCH-L1 特异性 RNAi 的 B16F10 小鼠黑素瘤稳定细胞中细胞迁移的减少

通过使用动物模型所做的转移实验，本申请发明人试图阐明 UCH-L1 是否是与癌症转移相关的关键靶分子。正常的 B16F10 小鼠黑素瘤细胞具有高侵袭性，其在转移过程中的第一靶器官是肺。利用基于慢病毒的系统，本申请发明人制备了 B16F10 稳定细胞，其中 UCH-L1 被敲除。

制备 B16F10 稳定细胞后，将 B16F10 稳定细胞经静脉注射入尾静脉检查肺转移是否减少。

图 11 是显示使用动物模型的转移实验的示意图。

II-1. 表达 UCH-L1 特异性 RNAi 的 B16F10 小鼠黑素瘤稳定细胞的制备

使用抗 UCH-L1 抗体通过蛋白质印迹法分析 UCH-L1 在 B16F10 小鼠黑

素瘤细胞系中的表达水平，结果与过表达 UCH-L1 的 H157 肺癌细胞系相比较。这一结果示于图 12 中。可确定 UCH-L1 也在 B16F10 细胞系中表达。

将 B16F10 细胞 (2.5×10^5 个细胞, 70~80% 汇合) 接种于细胞培养皿中。24 小时后，用 1mL 表达无关的 RNAi 或 UCH-L1 特异性 RNAi 的慢病毒 (VCA™, Vectorcorea, Inc., 首尔, 韩国) 感染这些细胞。用 500μL (단위수정) (病毒滴度 1×10^7 IFU/mL) 表达序列特异性 shRNAi (SEQ ID No.: 3、8、9 和 10) 的慢病毒感染 2.5×10^5 个 B16F10 细胞。

向其中添加 Polyburene (4~8 mg/mL)，然后将细胞培养皿上下慢慢震动。在 5% CO_2、37℃的条件下温育 6 小时后，病毒液换成补充了 10% FBS 的 RPMI-1640。在第一次感染后的第 24 小时，用慢病毒再次感染 B16F10 细胞。然而，第二次感染的温育时间为 12 小时而不是 6 小时。自第二次感染 24 小时后，用胰蛋白酶收获 B16F10 细胞，并以 RPMI-1640 培养液 (1/16 稀释) 稀释所述细胞在另一培养皿中进行传代培养。

24 小时后，将细胞维持在含有 5μg/mL 的 Zeocin 的细胞培养基中。大约 14 天后，每三天用含有相同量的 Zeocin 的新鲜培养基更换细胞培养基一次。在开始用 Zeocin 进行选择后的第 14 天，只有对 Zeocin 具有抵抗的细胞能存活，且这些细胞均被稳定表达 UCH-L1 特异性 RNAi (shRNAi, 短发夹状RNA) 的慢病毒感染。在开始用Zeocin进行选择后的第14天，对Zeocin具有抵抗的细胞形成集落。选择集落化 (colonized) 细胞并使用新鲜培养基再次传代培养。使用这种方法，本申请发明人可以制备 UCH-L1 表达减少的稳定的细胞系。

如图 14 所示，在表达 UCH-L 特异性 RNAi 的稳定细胞系中的 UCH-L1 表达水平通过蛋白质印迹分析法得以证实。

与正常 B16F10 细胞和表达无关 RNAi (对照, SEQ ID No. 3)的 B16F10 稳定细胞相比较，UCH-L1 的水平在表达 UCH-L1 特异性 RNAi (ha，SEQ ID No. 8；mb，SEQ ID No. 10) 的 B16F10 稳定细胞 (ha 和 mb) 中减低。然而，在表达 UCH-L1 特异性 RNAi (ma：SEQ ID No. 9) 的 B16F10 稳定细胞 ma 中，UCH-L1 表达没有降低。慢病毒感染和 RNAi 表达通过用于检测共表达的 GFP 的共焦显微镜分析得以证实。

图 15 显示在表达 UCH-L1 特异性 RNAi 的稳定细胞中通过慢病毒感染表达的 GFP 利用 FACS 流式细胞仪得以证实。通过 GFP 的表达水平证明表

达特异性序列 RNAi (ha, ma 和 mb) 的稳定细胞被相同量的慢病毒感染。因此，选择两个稳定的细胞系 (ha 和 mb) 进行动物实验性转移。该动物实验性转移是用 ha 和 mb 稳定细胞系与使用表达无关 RNAi (对照组) 的稳定细胞系做比较进行的。

II-2. 使用表达 UCH-L1 特异性 RNAi 的 B16F10 稳定细胞进行的癌症转移动物实验

如上述，通过 Zeocin 选择敲除 UCH-L1 表达的 B16F10 稳定细胞后，将这些细胞 (1×10^6 个细胞) 单次注入 BALB/C 裸鼠的尾静脉。注射后第 14 天，检查到肺转移 (对于对照组，用相同量的表达无关 RNAi (对照慢病毒载体) 的 B16F10 稳定细胞注射 BALB/C 小鼠)。

图 16 是显示注射后第 14 天的肺部图象。

如图 16 所示，从注射敲除 UCH-L1 表达的细胞的 BALB/C 裸鼠 (b 和 c) 切除的肺部的集落数与从对照 BALB/C 小鼠(a)切除的肺部的集落数相比显著下降。

图 17 显示使用解剖显微镜对如图 16 所示的相同的肺表面的黑色球形群体的定量结果。结果表明与具有转移潜力的对照 B16F10 细胞相比较，在表达 UCH-L1 特异性 RNAi 的 B16F10 稳定细胞中通过慢病毒感染使肺转移显著减少 (ha 减少 92%，mb 减少 62%)。

这些结果表明 UCH-L1 是癌症转移所需的细胞迁移的关键调节因子，这表明通过抑制 UCH-L1 来抑制癌症侵袭和转移是一种可能的方式。

实施例 III 利用 UCH-L1 筛选肿瘤转移的抑制剂

为了筛选抑制 UCH-L1 的表达或水解酶活性的化学药剂(用于癌症转移的抑制剂)，可以使用高效筛选 (HTS) (图 18 和 19)。

如图 18 所示，可以将泛素-AMC (Ub-AMC，泛素的 C-末端 7-氨基-4-甲基香豆素衍生物) 用做 UCH-L1 的人工荧光底物。UCH-L1 抑制剂的"命中率"可通过监测 UCH-L1 从 Ub-AMC 释放的自由 AMC (相对荧光强度) 的比率来检测。

详细地，当 UCH-L1 (5~10 nM)和 Ub-AMC (0~1000 nM)的混合物与作为抑制剂的不同的候选化学制剂 (不同浓度) 在 UCH 分析缓冲液 (50mM

Tris-HCl [pH 7.6]、0.5 MmEDTA、0.1 mg/mL 白蛋白、含或不含 5mM 二硫苏糖醇) 中反应时，可以通过 HTS 监测相对荧光强度以验证 UCH-L1 的水解酶活性及 UCH-L1 酶反应的速率 (图 19)。

如上所述，使用 HTS 获得的 UCH-L1 抑制剂可用作用于抑制和预防癌症转移的组合物。

<110> 梨花女子大学校 产学协力团
SK株式会社

<120> 泛素C末端水解酶L1的新用途

<130> P06014-LKJ

<150> KR10-2005-0113101
<151> 2005-11-24

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 223
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CHAIN
<222> (1)..(223)
<223> Human Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1

<400> 1

```
Met Gln Leu Lys Pro Met Glu Ile Asn Pro Glu Met Leu Asn Lys Val
 1               5                  10                  15

Leu Ser Arg Leu Gly Val Ala Gly Gln Trp Arg Phe Val Asp Val Leu
            20                  25                  30

Gly Leu Glu Glu Glu Ser Leu Gly Ser Val Pro Ala Pro Ala Cys Ala
        35                  40                  45

Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Thr Ala Gln His Glu Asn Phe Arg Lys
    50                  55                  60

Lys Gln Ile Glu Glu Leu Lys Gly Gln Glu Val Ser Pro Lys Val Tyr
65                  70                  75                  80

Phe Met Lys Gln Thr Ile Gly Asn Ser Cys Gly Thr Ile Gly Leu Ile
                85                  90                  95

His Ala Val Ala Asn Asn Gln Asp Lys Leu Gly Phe Glu Asp Gly Ser
            100                 105                 110

Val Leu Lys Gln Phe Leu Ser Glu Thr Glu Lys Met Ser Pro Glu Asp
        115                 120                 125

Arg Ala Lys Cys Phe Glu Lys Asn Glu Ala Ile Gln Ala Ala His Asp
    130                 135                 140

Ala Val Ala Gln Glu Gly Gln Cys Arg Val Asp Asp Lys Val Asn Phe
145                 150                 155                 160
```

```
His Phe Ile Leu Phe Asn Asn Val Asp Gly His Leu Tyr Glu Leu Asp
                165                 170                 175

Gly Arg Met Pro Phe Pro Val Asn His Gly Ala Ser Ser Glu Asp Thr
            180                 185                 190

Leu Leu Lys Asp Ala Ala Lys Val Cys Arg Glu Phe Thr Glu Arg Glu
        195                 200                 205

Gln Gly Glu Val Arg Phe Ser Ala Val Ala Leu Cys Lys Ala Ala
    210                 215                 220
```

<210> 2
<211> 1110
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> gene
<222> (1)..(1110)
<223> Human ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1

<400> 2

```
cctgggcggc tccgctagct gtttttcgtc ttccctaggc tatttctgcc gggcgctccg   60

cgaagatgca gctcaagccg atggagatca accccgagat gctgaacaaa gtgctgtccc  120

ggctgggggt cgccggccag tggcgcttcg tggacgtgct ggggctggaa gaggagtctc  180

tgggctcggt gccagcgcct gcctgcgcgc tgctgctgct gtttcccctc acggcccagc  240

atgagaactt caggaaaaag cagattgaag agctgaaggg acaagaagtt agtcctaaag  300

tgtacttcat gaagcagacc attgggaatt cctgtggcac aatcggactt attcacgcag  360

tggccaataa tcaagacaaa ctgggatttg aggatggatc agttctgaaa cagtttcttt  420

ctgaaacaga gaaaatgtcc cctgaagaca gagcaaaatg ctttgaaaag aatgaggcca  480

tacaggcagc ccatgatgcc gtggcacagg aaggccaatg tcgggtagat gacaaggtga  540

atttccattt tattctgttt aacaacgtgg atggccacct ctatgaactt gatggacgaa  600

tgccttttcc ggtgaaccat ggcgccagtt cagaggacac cctgctgaag gacgctgcca  660

aggtctgcag agaattcacc gagcgtgagc aaggagaagt ccgcttctct gccgtggctc  720

tctgcaaggc agcctaatgc tctgtgggag ggactttgct gatttcccct cttcccttca  780

acatgaaaat atataccccc ccatgcagtc taaaatgctt cagtacttgt gaaacacagc  840

tgttcttctg ttctgcagac acgccttccc ctcagccaca cccaggcact taagcacaag  900
```

cagagtgcac agctgtccac tgggccattg tggtgtgagc ttcagatggt gaagcattct 960

ccccagtgta tgtcttgtat ccgatatcta acgctttaaa tggctacttt ggtttctgtc 1020

tgtaagttaa gaccttggat gtggtttaat tgtttgtcct caaaaggaat aaaacttttc 1080

tgctgataag ataaaaaaaa aaaaaaaaaa 1110

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shLenti 1.1/scrambl: control virus shRNAi sequence

<400> 3
aatcgcatag cgtatgccgt t 21

<210> 4
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shLenti 1.1/UCHL_a

<400> 4
cggaattccc cgagatgctg aacaaagttc aagagacttt gttcagcatc tcgggttttt 60

gatatctaga ca 72

<210> 5
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> shLenti 1.1/mUCHL_a

<400> 5
cggaattcag ctgaagccga tggagattat tcgtaatctc catcggcttc agctttttg 60

atatctagac a 71

<210> 6
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> shLenti 1.1/mUCHL_b

<400> 6
cggaattccc taaagtttac ttcatgaagt tcgcttcatg aagtaaactt taggtttttg 60

atatctagac a 71

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CHAIN
<222> (1)..(11)
<223> UCH-L1 N-terminal amino acids

<400> 7
Met Gln Leu Lys Pro Met Glu Ile Asn Pro Glu
1 5 10

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
cccgagatgc tgaacaaag 19

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 9
agctgaagcc gatggagatt a 21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 10
cctaaagttt acttcatgaa g 21

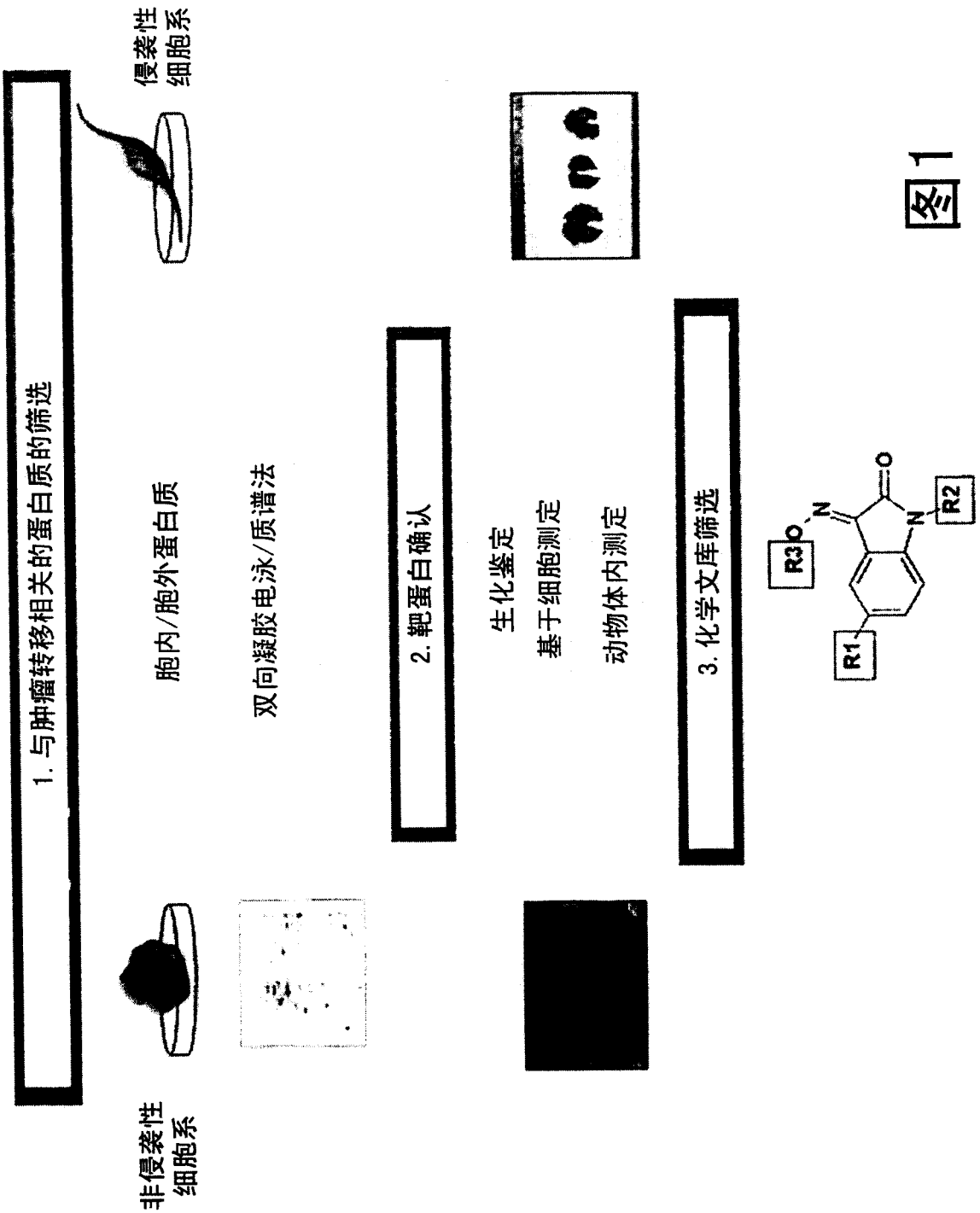

1. 与肿瘤转移相关的蛋白质的筛选
侵袭性细胞系
非侵袭性细胞系
胞内/胞外蛋白质
双向凝胶电泳/质谱法
2. 靶蛋白确认
生化鉴定
基于细胞测定
动物体内测定
3. 化学文库筛选
R3
R1
R2
O
N

图1

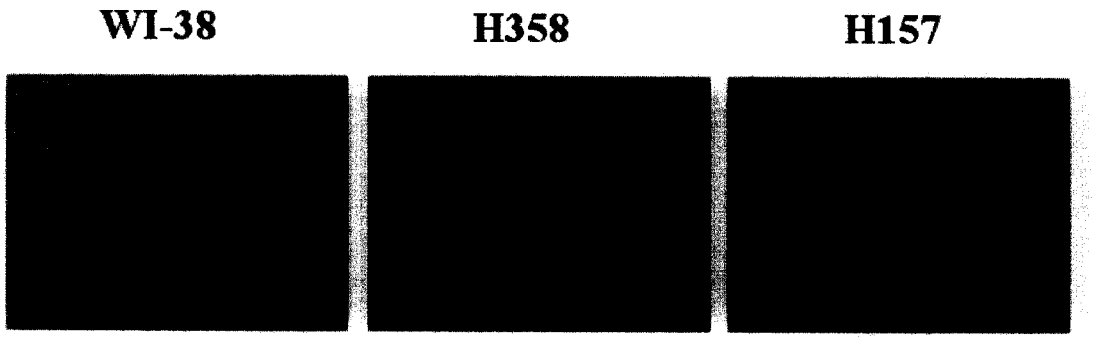

WI-38
H358
H157

图2

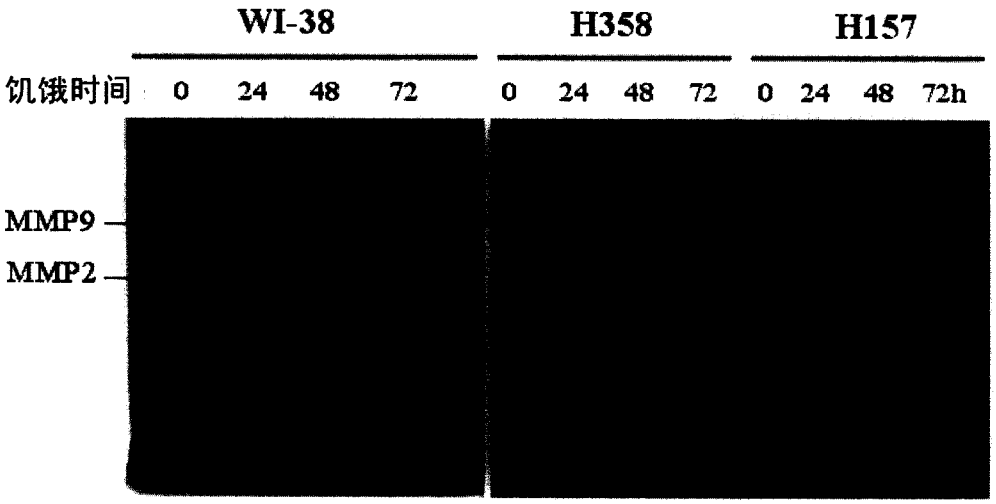

WI-38
H358
H157
饥饿时间
0 24 48 72 0 24 48 72 0 24 48 72h
MMP9
MMP2

图3

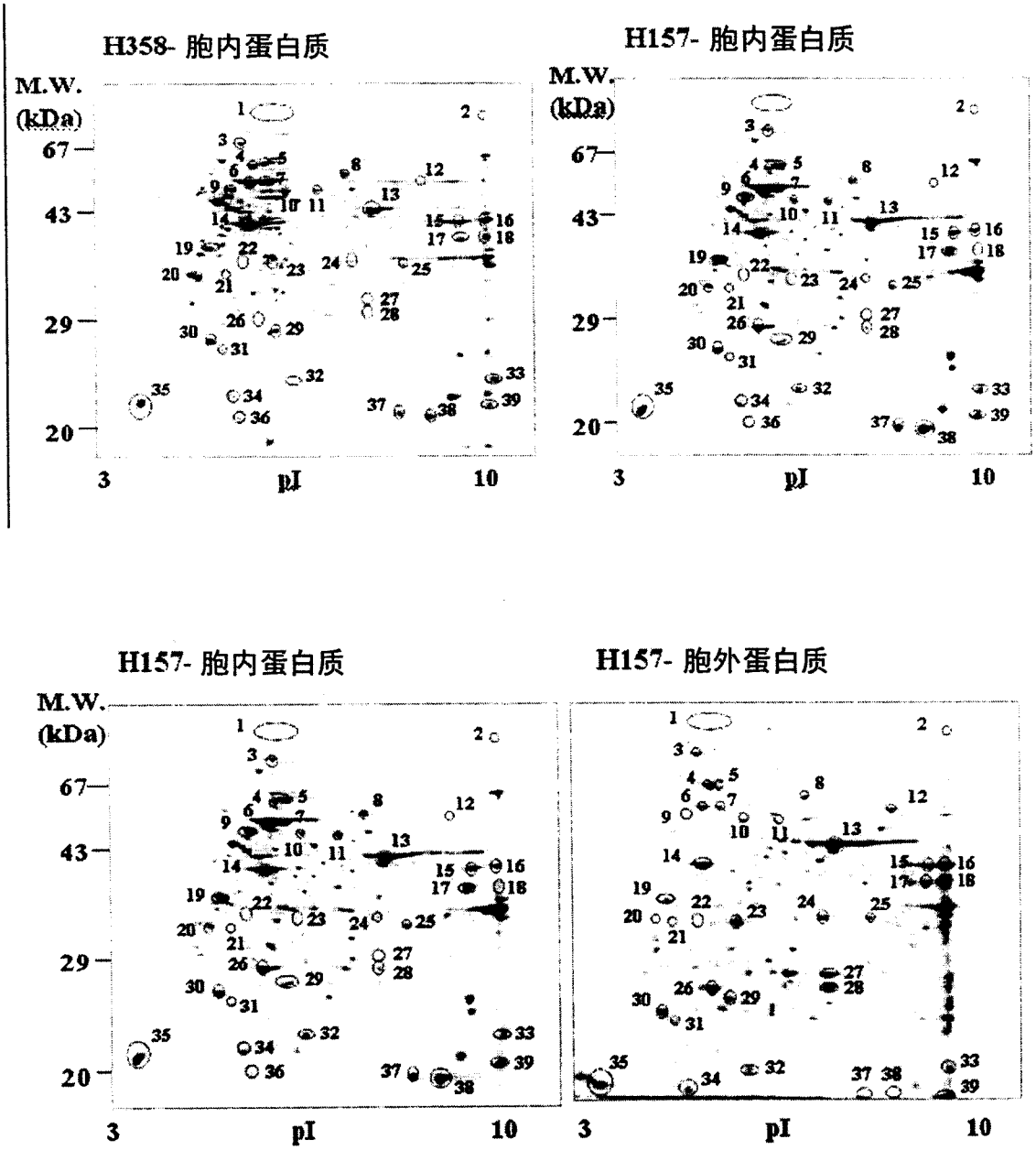

H358- 胞内蛋白质
H157- 胞内蛋白质
H157- 胞内蛋白质
H157- 胞外蛋白质
M.W.
(kDa)
67
43
29
20
3
pI
10

图4

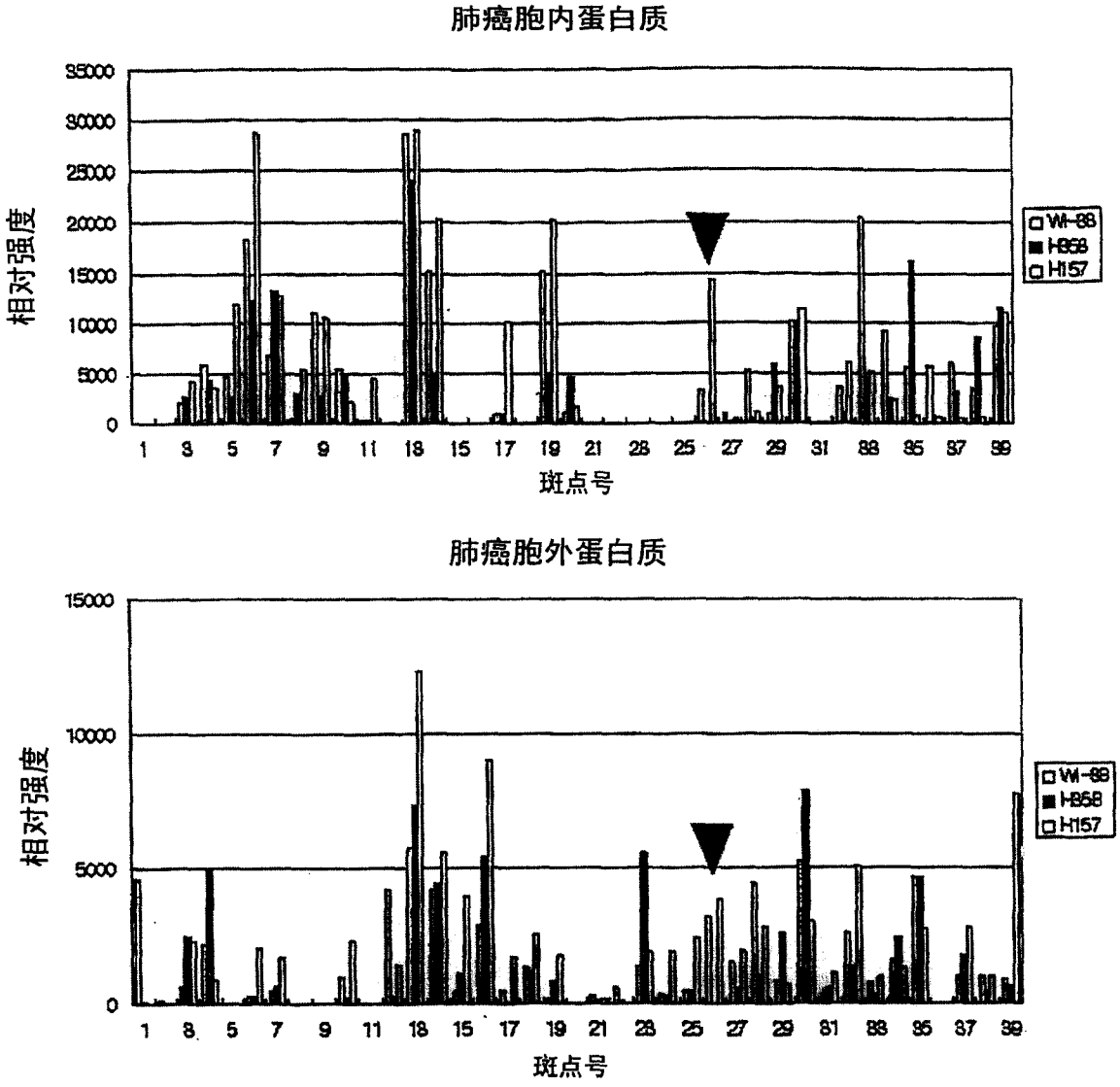

肺癌胞内蛋白质
相对强度
斑点号
WI-38
H358
H157
肺癌胞外蛋白质
相对强度
斑点号
WI-38
H358
H157

图5

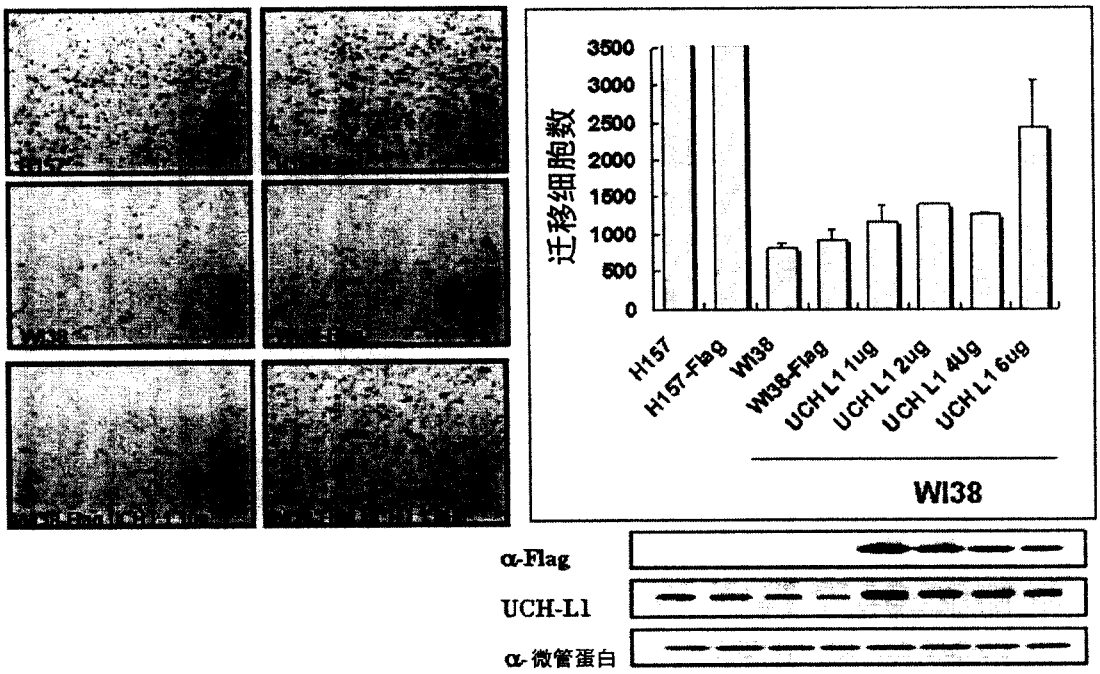

迁移细胞数
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
H157
H157-Flag
WI38
WI38-Flag
UCH L1 1ug
UCH L1 2ug
UCH L1 4Ug
UCH L1 6ug
WI38
α-Flag
UCH-L1
α-微管蛋白

图6

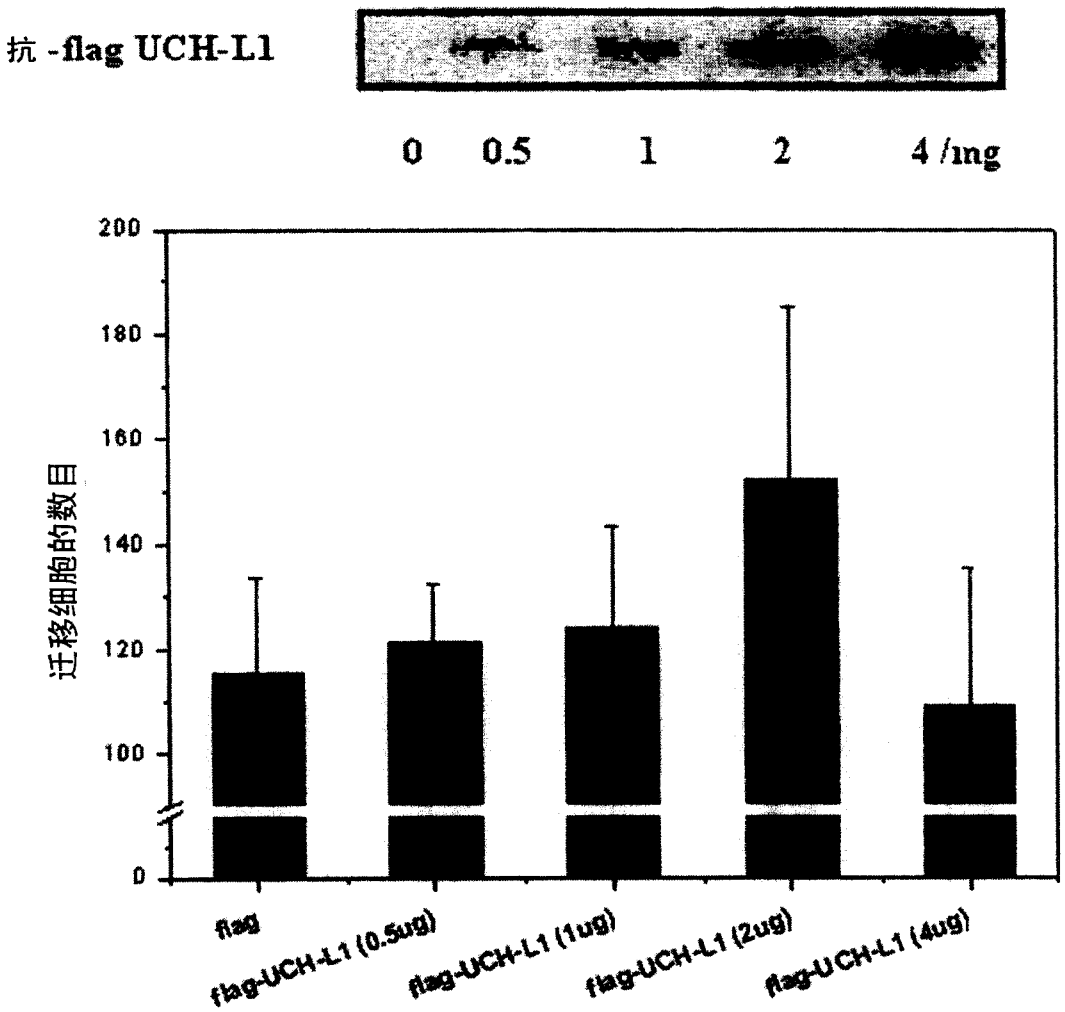

抗 -flag UCH-L1
0 0.5 1 2 4 /ıng
迁移细胞的数目
200
180
160
140
120
100
0
flag
flag-UCH-L1 (0.5ug)
flag-UCH-L1 (1ug)
flag-UCH-L1 (2ug)
flag-UCH-L1 (4ug)

图7

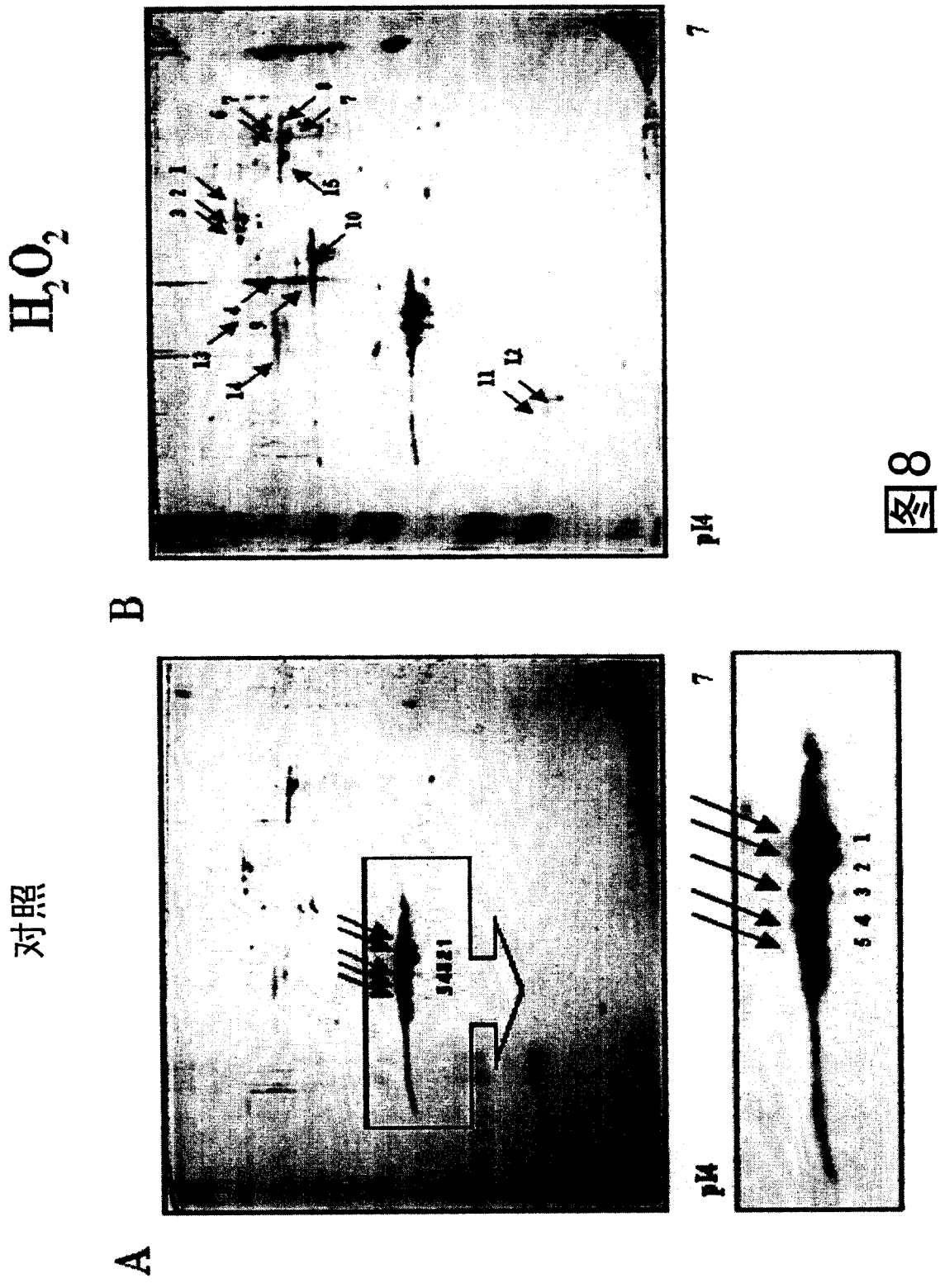


图8

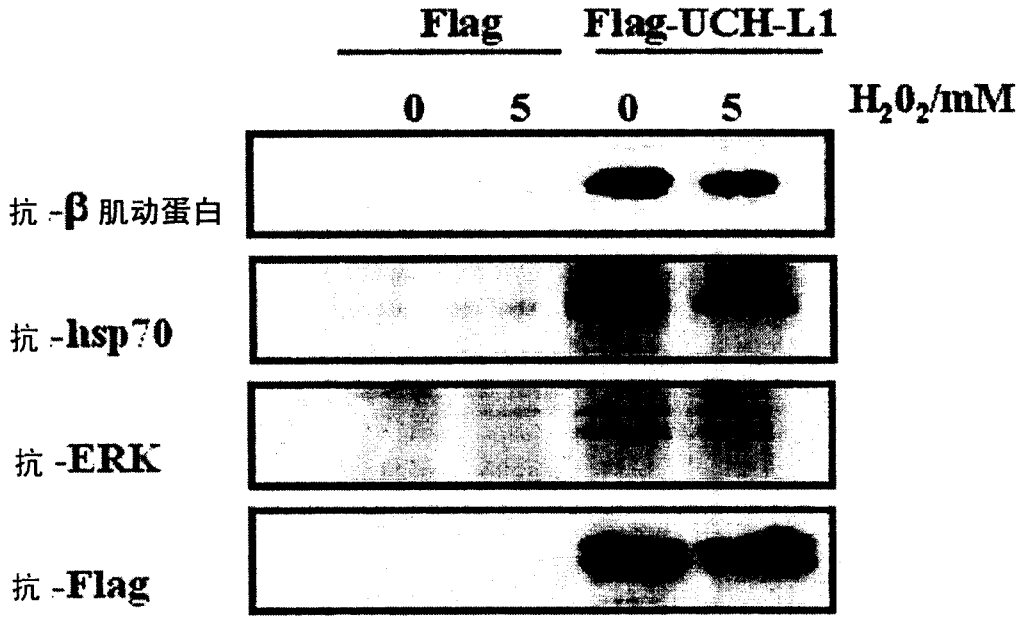

Flag
Flag-UCH-L1
0
5
0
5
H_2O_2/mM
抗 -β 肌动蛋白
抗 -hsp70
抗 -ERK
抗 -Flag
IP: Flag

图9

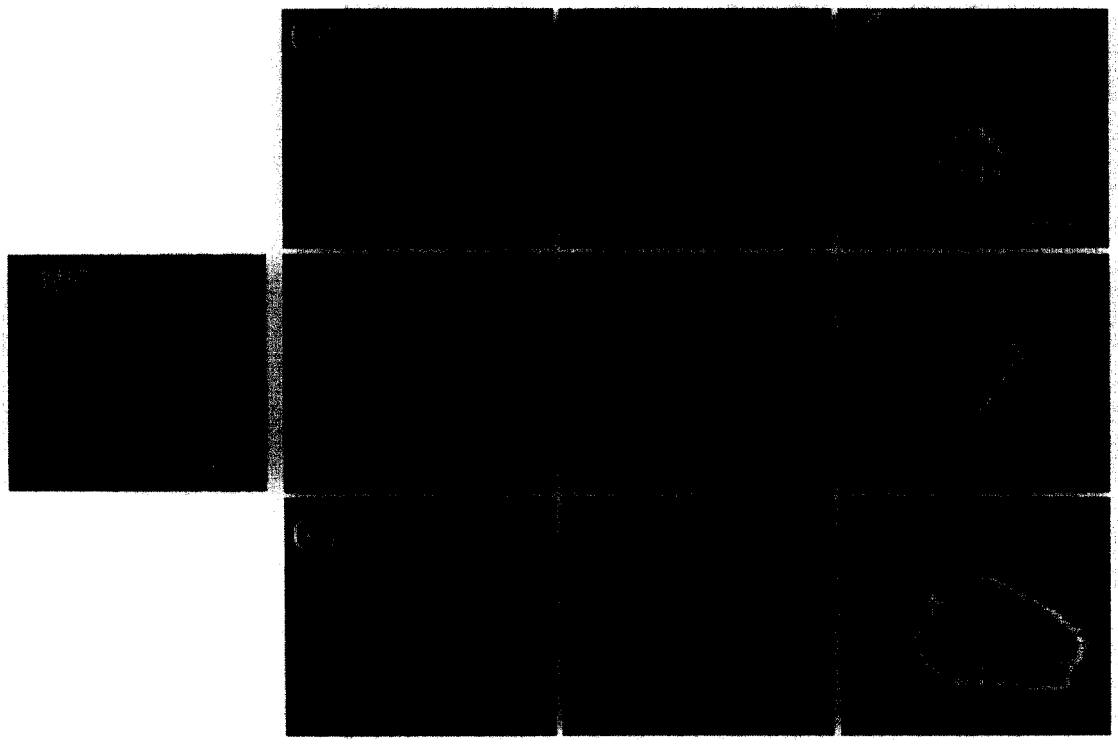


图10

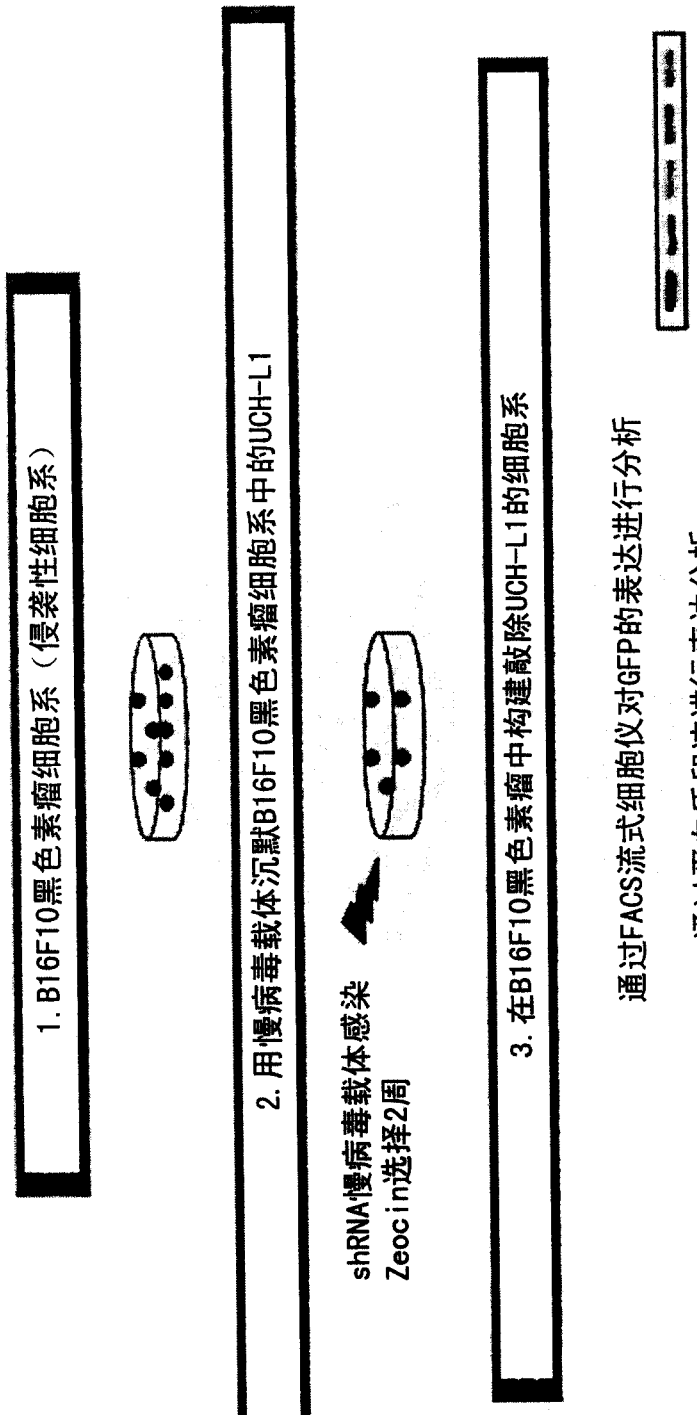
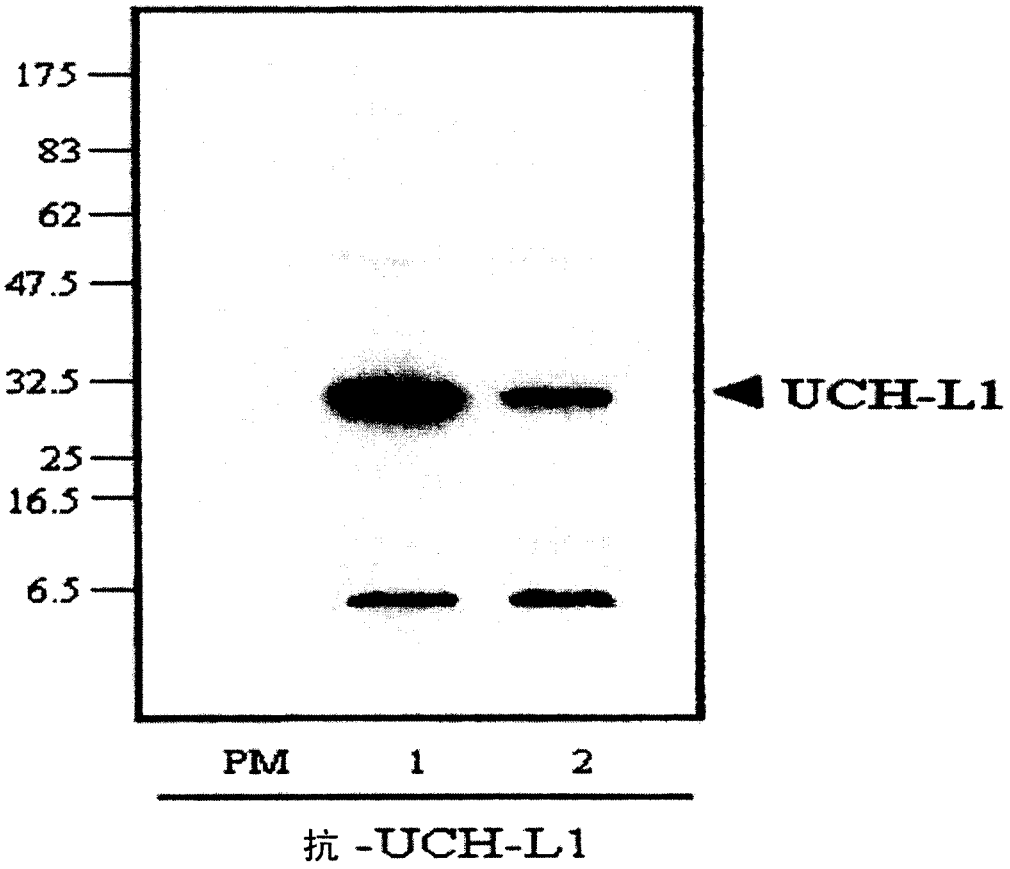

1. B16F10黑色素瘤细胞系（侵袭性细胞系）
2. 用慢病毒载体沉默B16F10黑色素瘤细胞系中的UCH-L1
shRNA慢病毒载体感染
Zeocin选择2周
3. 在B16F10黑色素瘤中构建敲除UCH-L1的细胞系
通过FACS流式细胞仪对GFP的表达进行分析
通过蛋白质印迹进行表达分析
4. 动物研究
BALB C/裸小鼠
静脉内注射

图11



PM; 预染标准参照物
1; H157
2; B16F10

图12

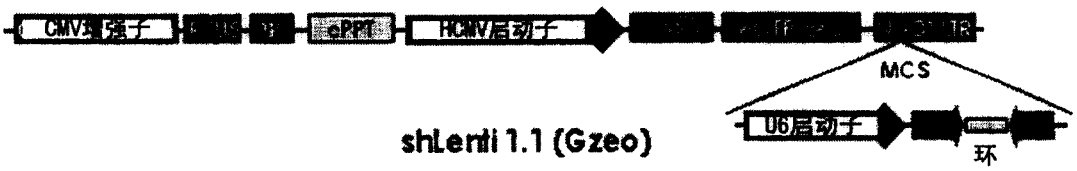


图13

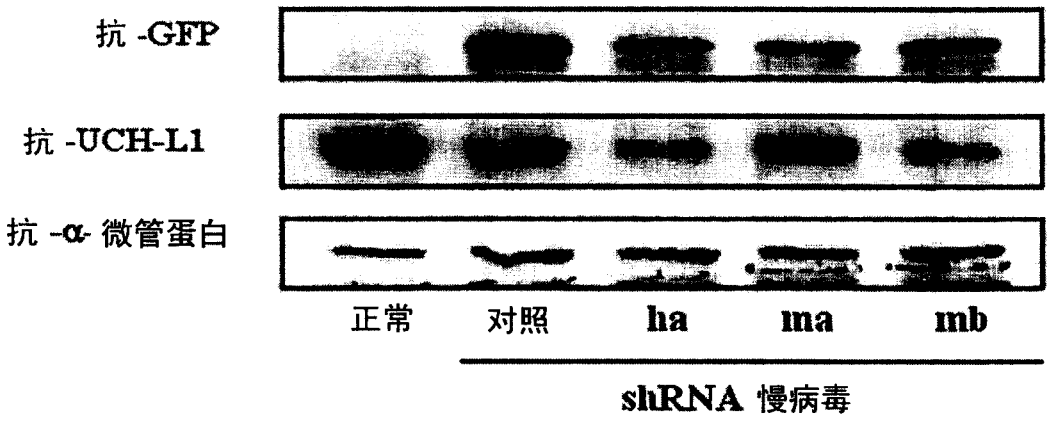
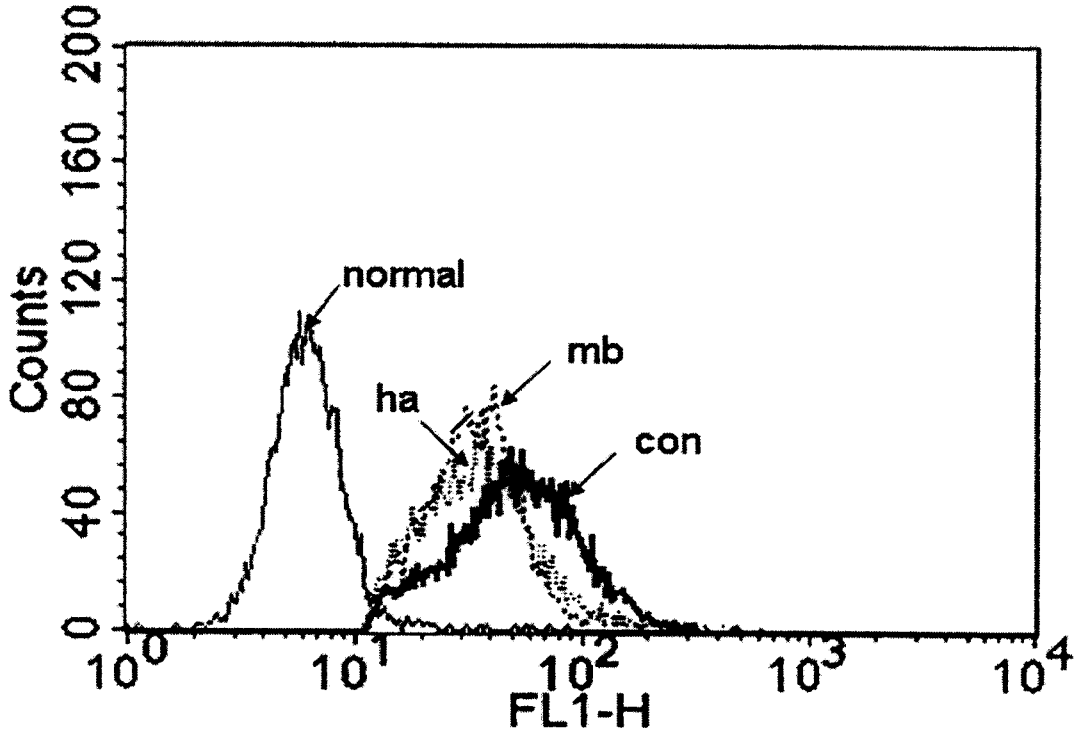
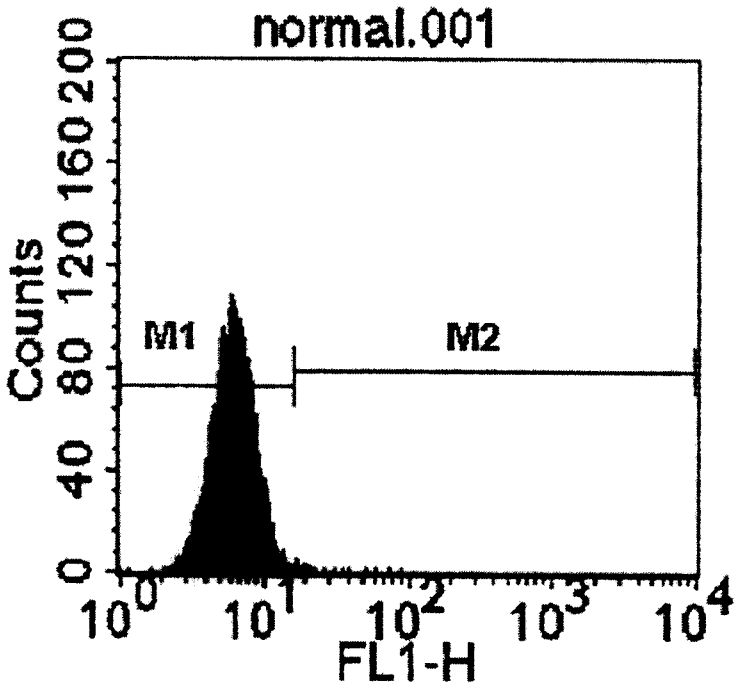


图14



Key	Name	Parameter	Gate
———	normal.001	FL1-H	G1
———	con.002	FL1-H	G3
▪▪▪▪	ha.003	FL1-H	G3
— · —	mb.004	FL1-H	G3

图15A

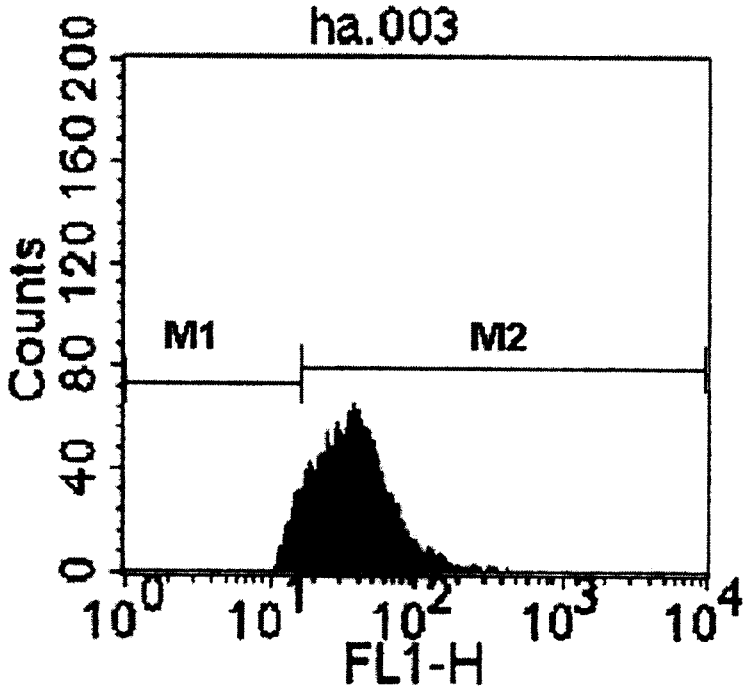


File: normal.001
Gate: G1
Total Events: 10000

Acquisition Date: 01-Jul-05
Gated Events: 7935

Marker	Events	% Gated	% Total
All	7935	100.00	79.35
M1	7898	99.53	78.98
M2	38	0.48	0.38

图15B

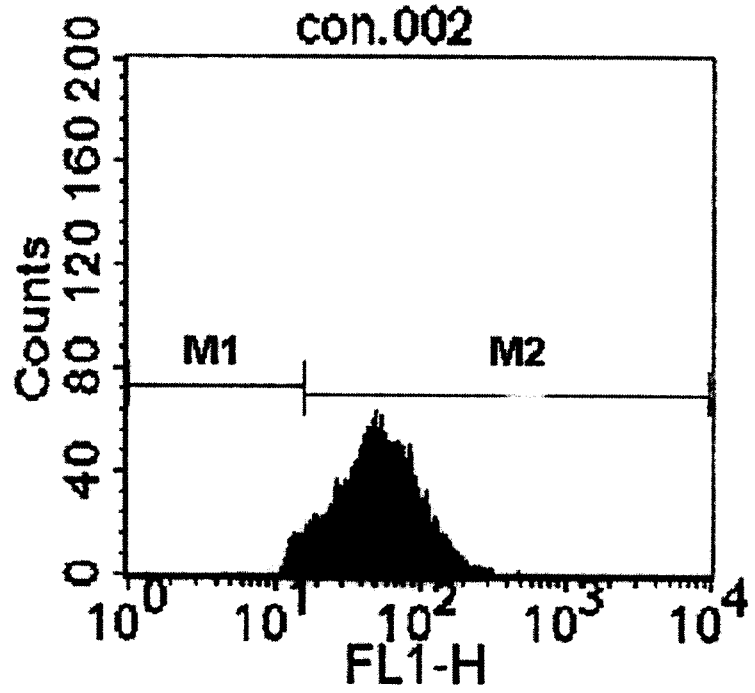


File: ha.003
Gate: G3
Total Events: 10000

Acquisition Date: 01-Jul-05
Gated Events: 7524

Marker	Events	% Gated	% Total
All	7524	100.00	75.24
M1	629	8.36	6.29
M2	6916	91.92	69.16

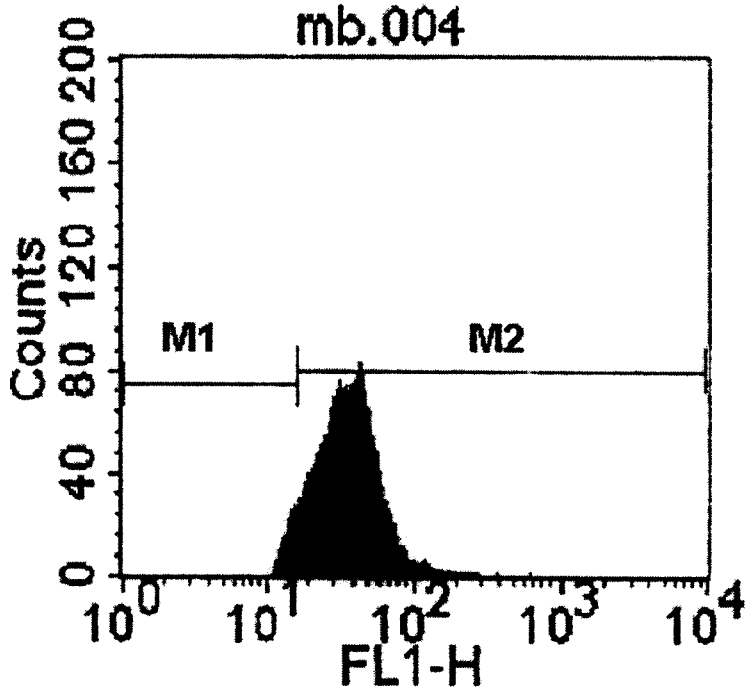
图15C



File: con.002
Acquisition Date: 01-Jul-05
Gate: G3
Gated Events: 7505
Total Events: 10000

Marker	Events	% Gated	% Total
All	7505	100.00	75.05
M1	344	4.58	3.44
M2	7174	95.59	71.74

图15D

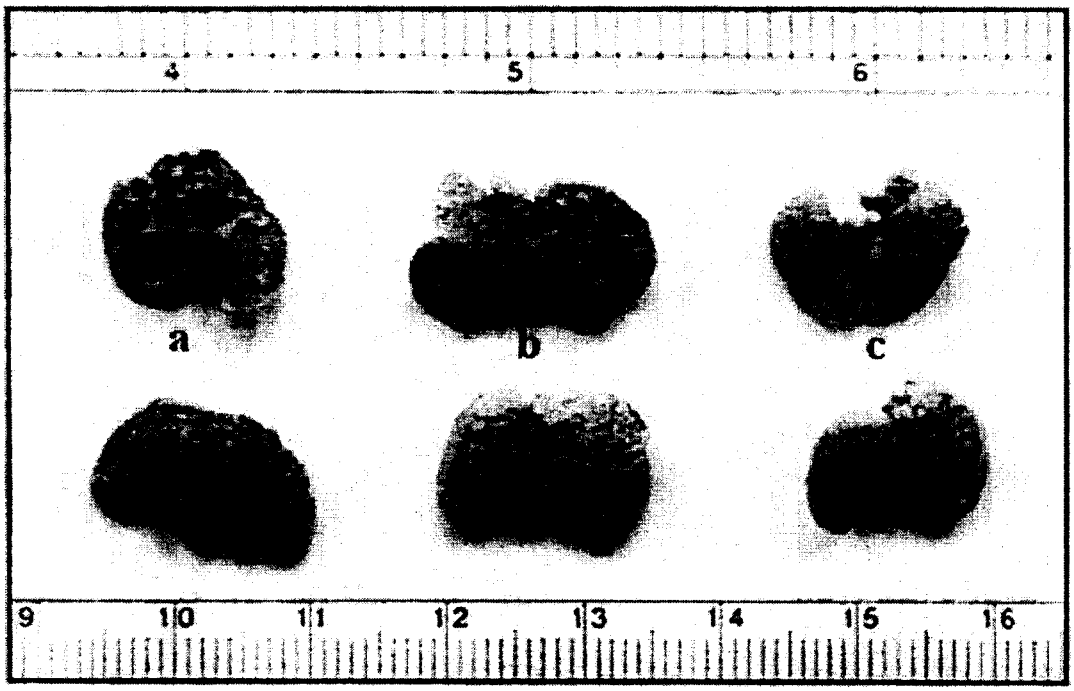


File: mb.004
Gate: G3
Total Events: 10000

Acquisition Date: 01-Jul-05
Gated Events: 8136

Marker	Events	% Gated	% Total
All	8136	100.00	81.36
M1	552	6.78	5.52
M2	7602	93.44	76.02

图15E



a; shLenti Cont
b; shLenti ha
c; shLenti mb

图16

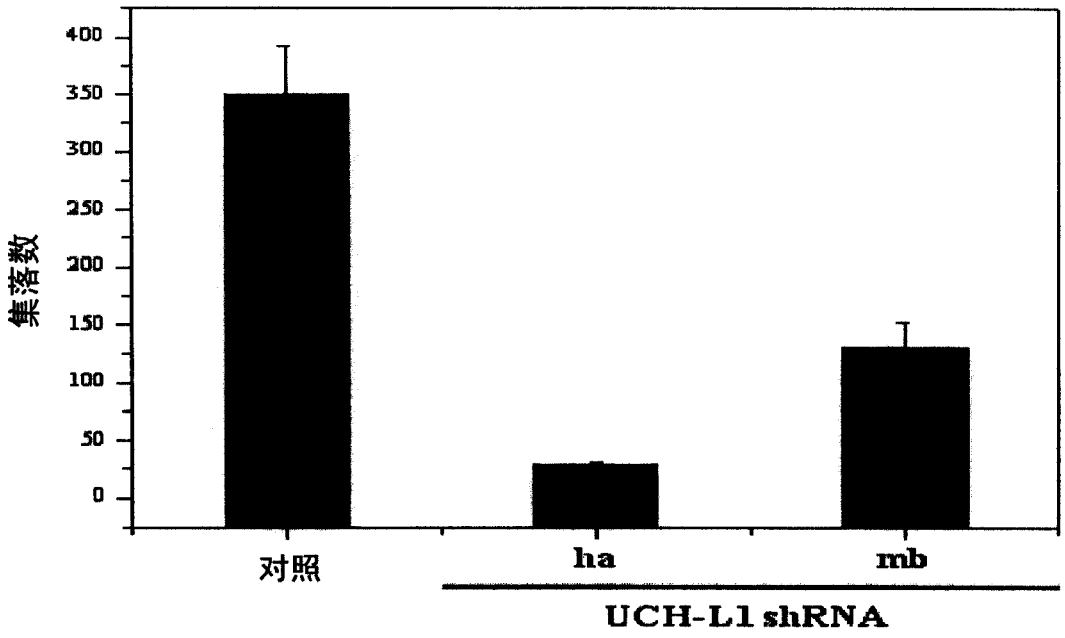
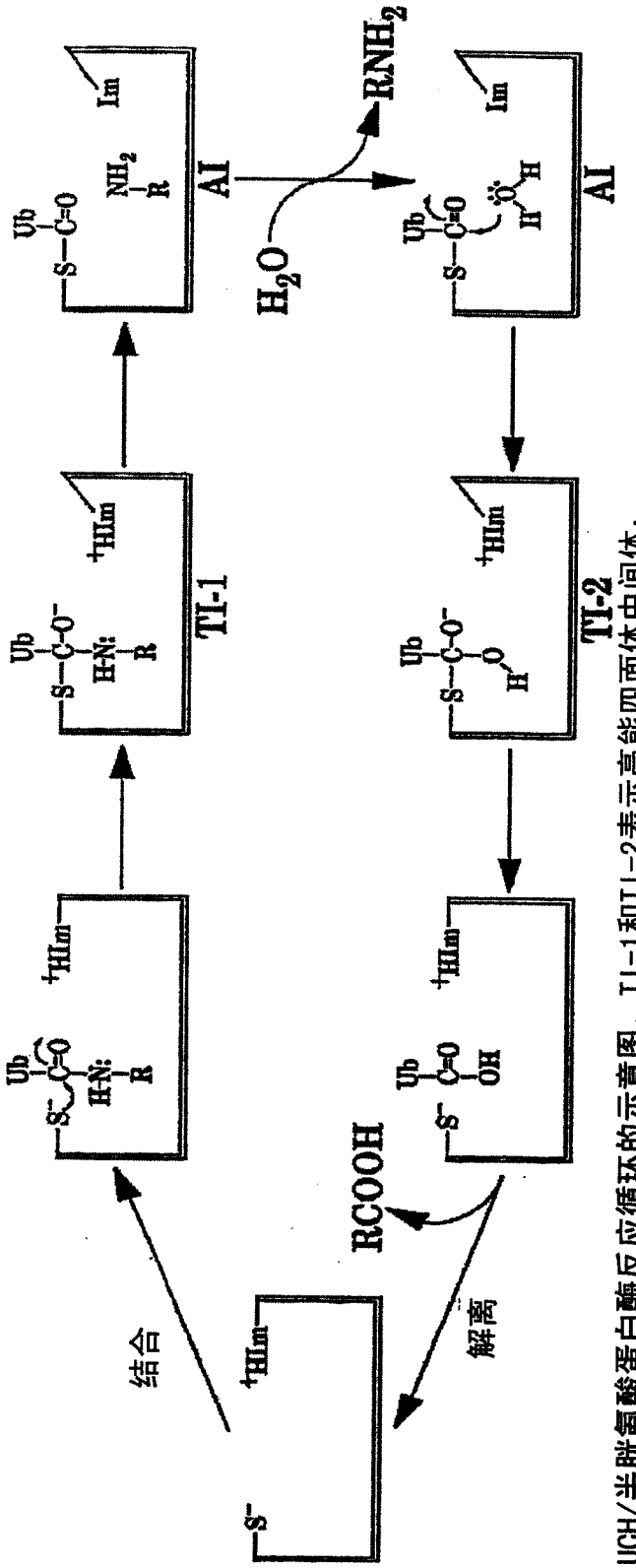


图17



UCH/半胱氨酸蛋白酶反应循环的示意图。TI-1和TI-2表示高能四面体中间体；AI，酰基中间体；S，半胱氨酸；Im，组氨酸。*The EMBO Journal Vol. 18, No. 14 pp3877-3887, 1999*

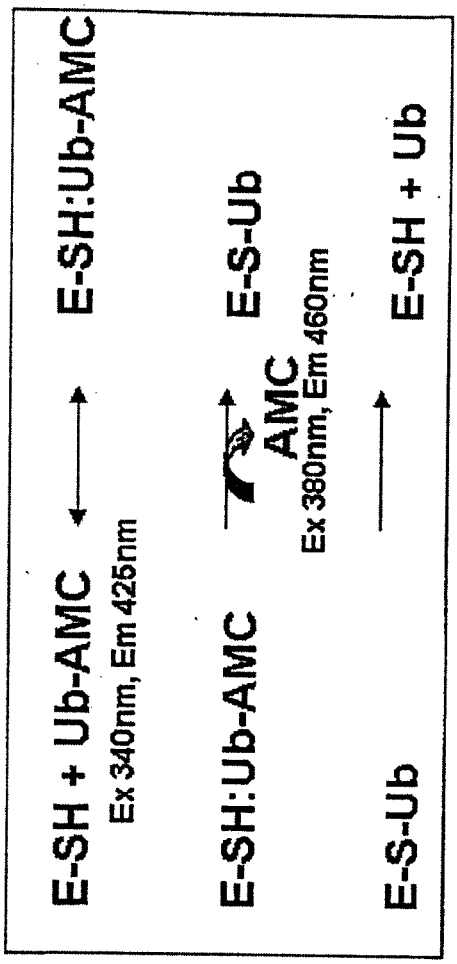
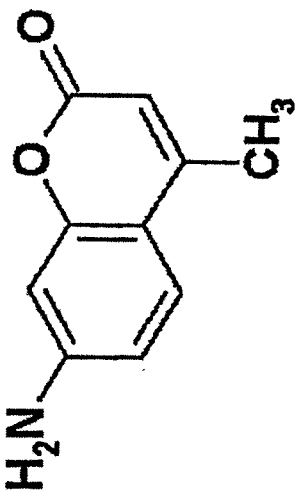


图18

Biochemistry Vol. 37, No. 7, 1868-1879, 1998



7-氨基-4-甲基香豆素（AMC）

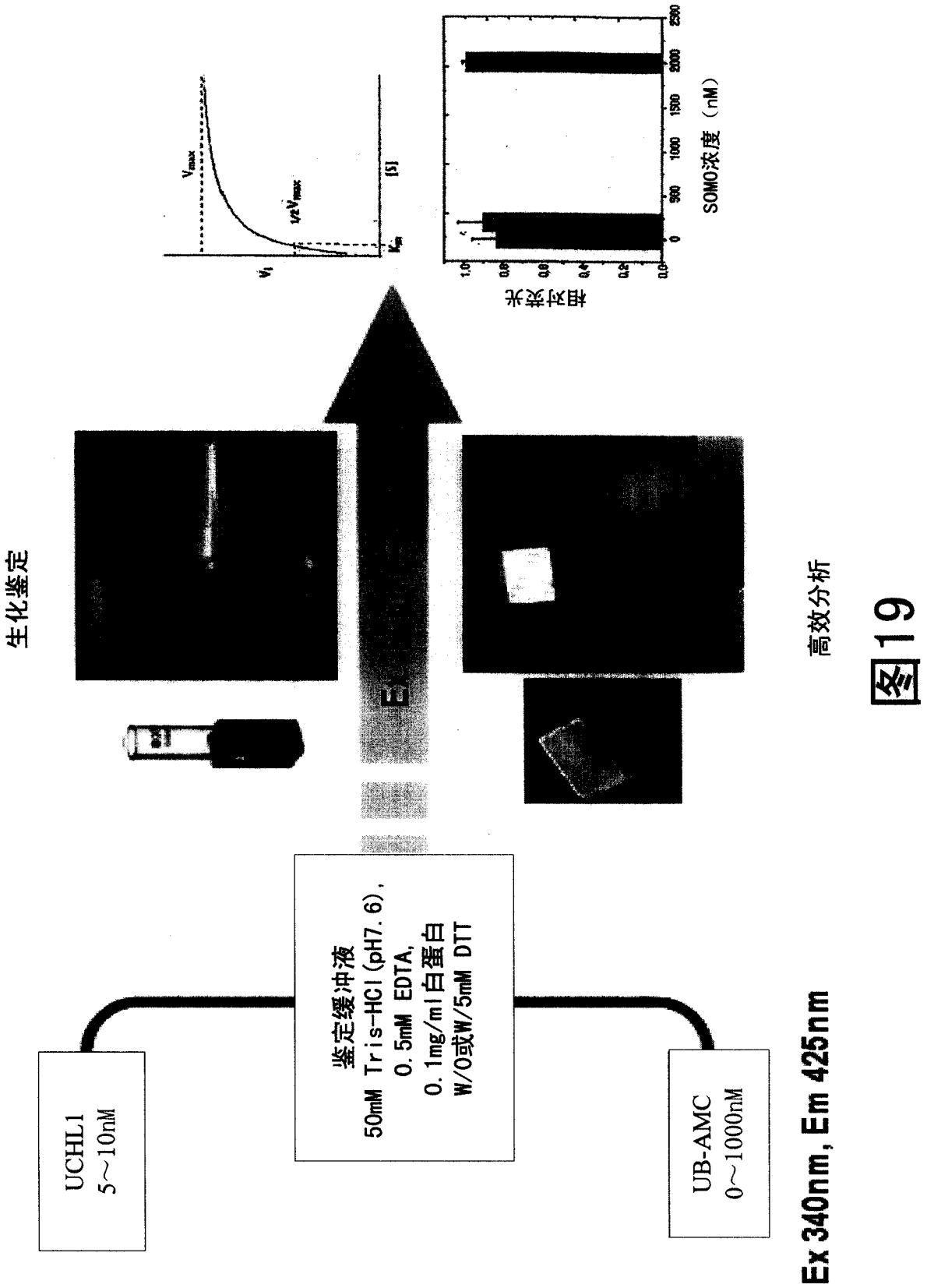

生化鉴定
UCHL1
5～10nM
鉴定缓冲液
50mM Tris-HCl(pH7.6),
0.5mM EDTA,
0.1mg/ml白蛋白
W/O或W/5mM DTT
UB-AMC
0～1000nM
Ex 340nm, Em 425nm
高效分析
相对荧光
SOMO浓度（nM）

图19