

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710151644.0

[51] Int. Cl.

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 2 月 27 日

[11] 公开号 CN 101129349 A

[22] 申请日 1998.6.23

[21] 申请号 200710151644.0

分案原申请号 98806550.9

[30] 优先权

[32] 1997.6.26 [33] IL [31] 121165

[71] 申请人 辛德罗姆 X 有限公司

地址 以色列耶路撒冷

[72] 发明人 詹考伯·巴-塔那

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

代理人 章社杲 李丙林

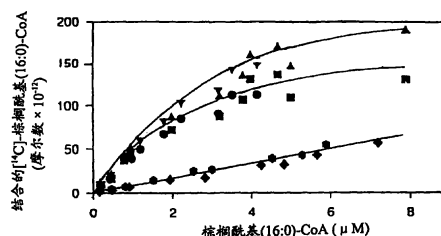
权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 4 页

[54] 发明名称

羧酸和其衍生物以及含有它们的药物组合物

[57] 摘要

根据本发明，提供有疗效的化合物，包括式 R - COOH 的两亲羧酸，或这类化合物的盐或酯或酰胺，其中 R 表示 10 - 24 个碳原子的饱和或不饱和烷基链，其中一个或多个碳原子可以被杂原子代替，其中一个或多个碳或杂原子链成员非强制性地形成环的部分，并且其中所述的链非强制性地被羟基，杂环基，低级烷氧基，羟基取代的低级烷基，羟基，羧基，卤素，苯基或(羟基 -，低级烷基 -，低级烷氧基 -，低级烯基 - 或低级炔基) - 取代的苯基，C3 - C7 环烷基或(羟基 -，低级烷基 -，低级烷氧基 -，低级烯基 - 或低级炔基) - 取代的 C3 - C7 环烷基取代，其中所述的化合物可以内生性地转化为其各自的辅酶 A 硫酯。



1. 分子式为 R-COOH 的化合物、或所述化合物的盐或酯或酰胺在制备用于治疗人类的综合症-X、或包含综合症-X 的疾病的药物中的应用,其中 R 表示 10-24 个碳原子的饱和或不饱和烷基链,其中所述的链可选择地被烃基,杂环基,低级烷氧基,羟基取代的低级烷基,羟基,羧基,苯基或(羟基-,低级烷基-,低级烷氧基-,低级烯基-或低级炔基)-取代的苯基,C3-C7 环烷基或(羟基-,低级烷基-,低级烷氧基-,低级烯基-或低级炔基)-取代的 C3-C7 环烷基取代,其中所述的化合物可以内生性地转化为其各自的辅酶 A 硫酯,RCOSCoA。
2. 根据权利要求 1 所述的化合物,其中 RCOOH 是长链脂肪酸。
3. 根据权利要求 1 所述的应用,其中有效化合物选自下列化合物,其中 R 是 ω -羧基,而 RCOOH 选自如下组成的一组:
 - 1, 16-十六烷二酸,
 - 1, 18-十八烷二酸,
 - 2, 2, 15, 15-四甲基十六烷-1, 16-二酸,
 - 2, 2, 17, 17-四甲基十八烷-1, 18-二酸,
 - 3, 3, 14, 14-四甲基十六烷-1, 16-二酸,
 - 3, 3, 16, 16-四甲基十八烷-1, 18-二酸,
 - 4, 4, 13, 13-四甲基十六烷-1, 16-二酸,
 - 4, 4, 15, 15-四甲基十八烷-1, 18-二酸。
4. 根据权利要求 3 所述的应用,其中 RCOOH 为 2, 2, 15, 15-四甲基十六烷-1, 16-二酸。

5. 根据权利要求3所述的应用, 其中 RCOOH 为 4, 4, 15, 15-四甲基十八烷-1, 18-二酸。
6. 根据权利要求1所述的应用, 其中 R 是 ω -羟基, 而 RCOOH 是选自如下组成的一组:
 - 16-羟基十六烷酸,
 - 18-羟基十八烷酸,
 - 16-羟基-2,2-二甲基十六烷酸,
 - 18-羟基-2,2-二甲基十八烷酸,
 - 16-羟基-3,3-二甲基十六烷酸,
 - 18-羟基-3,3-二甲基十八烷酸,
 - 16-羟基-4,4-二甲基十六烷酸,
 - 18-羟基-4,4-二甲基十八烷酸。
7. 权利要求 1-4 中任意一项所述的应用, 其中所述药物组合物用于治疗血脂蛋白异常。
8. 权利要求 1-4 中任意一项所述的应用, 其中所述药物组合物用于治疗胰岛素抵抗, 葡萄糖耐受力降低和 NIDDM。
9. 权利要求 1-4 中任意一项所述的应用, 其中所述药物组合物用于治疗原发性高血压。
10. 权利要求 1-4 中任意一项所述的应用, 其中所述药物组合物用于降低凝血性和增加血纤维蛋白溶解。
11. 权利要求 1-4 中任意一项所述的应用, 其中所述药物组合物用于治疗代谢综合症。

-
12. 权利要求 1-4 中任意一项所述的应用, 其中所述药物组合物用于治疗冠状或周身动脉粥样化。
 13. 权利要求 1-4 中任意一项所述的应用, 其中所述药物组合物用于治疗乳腺癌, 结肠癌, 或前列腺癌。

羧酸和其衍生物以及含有它们的药物组合物

本申请是 1998 年 6 月 23 日提交的名称为“羧酸和其衍生物以及含有它们的药物组合物”的第 98806550.9 号发明专利申请的分案申请。

本发明所属技术领域

本发明涉及具有治疗作用的化合物和用这类化合物治疗某些疾病/综合症的方法。

参考文献

下列参考文献以在申请的相关部位的括号或上标中的数字引入本申请中。

1、Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E. Darnell, J. E., Jr. Gene Dev. 4, 2353-2365(1990)

2、Sladek, F. M., in Liver Gene Expression (eds. Tronche, F. & Yaniv, M.) pp.207-230, R. G. Landes Co., Austin, TX (1994)

3、The Metabolic and Inherited Bases of Inherited Disease (eds., Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D.) Vol. II Part 8, 1995 (McGraw-Hill, Inc.)

4、Yamagata, K. Et al., Nature 384, 458-460 (1996)

5、DeFronzo, R. A. & Eleaterrio, F. Diabetes Care 14, 173-194 (1991)

6、Leff, T., Reue, K., Melian, A., Culver, H. & Breslow J. L. J. Biol. Chem. 264, 16132-16137 (1989)

7、Cave, W.t. FASEB J. 5, 2160-2166 (1991)

8、Chin, J. P. F. Prost. Leuk. Essent. Fatty Acids 50, 211-222 (1994)

9、Grundy, S. M. & Denke, M. A. J. Lipid Res. 31, 1149-1172 (1990)

10、Storlien, L.H. et al., Science 237, 885-888 (1987)

11、Unger, R. H. Diabetes 44, 863-870(1995)

12、Morris, M.c., Saks, F. & Rosner, B. Circulation 88, 523-533 (1993)

13、Hultin, M. B. Prog. Hemost. Thromb. 10, 215-241 (1991)

14、Bar-Tana, J., Rose-Kahn, G., Frenkel, B., Shafer, Z. & Fainaru, M. J. Lipid Res. 29, 431-441(1998)

15、Tzur, R., Rose-Kahn, G., Adler, J. & Bar-Tana, J. Diabetes 37, 1618-1624 (1988)

16、Tzur, R., Smith, E. & Bar-Tana, J. Int. J. Obesity 13, 313-326 (1989)

17、Russel, J.C., Amy, R. M., Graham, S. E., Dolphin, P. J. & Bar-Tana, J. Arterioscler. Thromb. Biol. 15, 918-923 (1995)

上述出版物，专利和专利申请的内容全文引入本文，好象各个出版物，专利和专利申请的语言明确和各自包括在本文中一样。

发明背景

肝细胞核因子-4 α 1(HNF-4 α)(在文献 2 中综述)是核受体的超家族的孤独成员。HNF-4 α 在成人和胚胎肝，肾，肠和胰腺中表达，并通过同源重组破坏鼠 HNF-4 α 而导致胚胎死亡。与其他超家族的孤独成员一样，HNF-4 α 受体由包含通过铰链区与疏水的 C-端配体结合区域连接的很保守的 N-端 DNA 结合区域组成。两种 HNF-4 α 同种型已经被克隆和表征：HNF-4 α 1 和包含具有插入 C-端区域的 10 个氨基酸的剪接变体的 HNF-4 α 2。

HNF-4 α 是一种基因表达激活剂。由 HNF-4 α 的转录激活通过其作为同源二聚体与靶基因的反应 DR-1 启动子序列结合而介导，导致转录起始复合物的激活。由 HNF-4 α （在文献 2 中综述）激活的基因编码各种酶和与脂蛋白，胆固醇和甘油三酯代谢（载脂蛋白 AI，AII，AIV，B，CIII，微粒体甘油三酯转移蛋白，胆固醇 7 α 羟化酶），脂质代谢（线粒体中链脂肪酰基-CoA 脱氢酶，过氧化物酶体脂肪酰基-CoA 氧化酶，与脂肪酰基 ω -氧化和类固醇羟基化关联的细胞色素 P-450 同工酶，脂肪酸结合蛋白，细胞内视黄醇结合蛋白 II，运甲状腺素蛋白），葡萄糖代谢（烯醇丙酮酸磷酸羧激酶，丙酮酸激酶，醛缩酶，glut2），氨基酸代谢（酪氨酸氨基转移酶，鸟氨酸转氨甲酰酶），血液凝固（因子 VII，IX，X），铁代谢（运铁蛋白，血红蛋白）和巨噬细胞激活（肝细胞生长因子类蛋白/巨噬细胞刺激蛋白，乙肝核心和 X 蛋白，人 HIV-1 的长端重复， α -1 抗胰蛋白酶）相关的蛋白。

一些被 HNF-4 α 激活的基因在动脉粥样硬化形成，癌症，自身免疫和一些其他疾病 3 的开始和进程中扮演重要角色。载脂蛋白 B，

AIV 和 CIII 以及微粒体甘油三酯转移蛋白的超量表达由于极低密度脂蛋白 (VLDL) 和乳糜微粒的超量生产以及其血浆清除率的降低, 将导致血脂蛋白异常 (联合的血甘油三酯高和血胆固醇高)。类似地, 引起 HNF-4 α /HNF-1-诱导的胰胰岛素超量表达/超量分泌的过强的胰糖酵解率将导致引起胰岛素抵抗的高胰岛素血。确实, HNF-4 α 和 HNF-1 的突变最近显示是青年成熟期发作糖尿病 (MODY) 的原因 4。与 HNF-4 α -诱导的肝烯醇丙酮酸磷酸羧激酶的超量表达和过量的肝脏葡萄糖生产联合的胰岛素抵抗将导致最终引起非胰岛素依赖糖尿病 (NIDDM) 的葡萄糖耐受力降低 (IGT)。而且, 高胰岛素血今天已被认识到在特发性高血压的开始和进程中作为重要的病因, 因此 HNF-4 α 控制的基因的超量表达可以进一步引发高血压。而且, 也许与血纤维蛋白溶解抑制剂 (例如, 血纤维蛋白溶酶激活物抑制剂-1) 联合的凝血因子的 HNF-4 α -诱导的超量表达引起血栓的过量形成和血纤维蛋白溶解降低, 伴随着动脉粥样硬化倾向性的加重。

血脂蛋白异常, 肥胖, IGT/NIDDM, 高血压和凝血/血纤维蛋白溶解缺陷最近已经被认识到由一个统一的综合征 (综合征-X, 代谢综合征, 胰岛素抵抗综合征) 5 串在一起。引起 HNF-4 α 控制的基因的超量表达的 HNF-4 α 的高转录活性可以确切地解释综合征-X 类型的病因学联系。综合征-X 类型和综合征今天全部被认识到是西方社会动脉粥样化心血管疾病的主要危险因素, 这暗示 HNF-4 α 引发并促进动脉粥样化形成。而且, 因为乳腺, 结肠和前列腺癌在患综合征-X 的个体中被引发和促进, 所以 HNF-4 α 控制的基因的超量表达可以与这些癌的开始和进程关联。

除了由 HNF-4 α 在综合征-X 相关的基因表达中扮演的角色外, HNF-4 α 还激活对与调节自身免疫反应过程相关蛋白编码的基因表达。因此, 巨噬细胞刺激蛋白的 HNF-4 α -诱导的超量表达可以引起

巨噬细胞对自身抗原或交叉反应抗原的致敏作用，因而引发和加重自身免疫疾病，例如，风湿性关节炎，多发性硬化和牛皮癣的病情。而且，因为乙肝核心和 X 蛋白，以及人 HIV-1 的长端重复的转录由 HNF-4 α 控制，所以 HNF-4 α 可以与由这些病毒剂引发的感染过程的调节关联。

因为 HNF-4 α -诱导的基因的超量表达引起血脂蛋白异常，IGT/NIDDM，高血压，凝血和血纤维蛋白溶解缺陷，动脉粥样化形成，癌症，炎症，免疫缺损和其他疾病，所以 HNF-4 α 转录活性的抑制可以预期产生 HNF-4 α -诱导病理学的改善。但是，尚无配体被确定为用于 HNF-4 α 的，该配体可以作为设计 HNF-4 α 转录活性抑制剂的基础。本发明涉及 HNF-4 α 的低分子量配体，该配体被设计为 HNF-4 α -诱导的转录调节剂，因而在治疗由 HNF-4 α -控制的基因诱导或与其相关的疾病时作为有效的药物。

发明概述

根据本发明，提供有治疗作用的化合物，包括式 R-COOH 的两亲羧酸，或这类化合物的盐或酯或酰胺，其中 R 表示 10-24 个碳原子的饱和或不饱和烷基链，其中一个或多个碳原子可以被杂原子代替，其中一个或多个碳或杂原子链成员非强制性地形成环的部分，并且其中所述的链非强制性地被烃基，杂环基，低级烷氧基，羟基取代的低级烷基，羟基，羧基，卤素，苯基或（羟基-，低级烷基-，低级烷氧基-，低级烯基-或低级炔基）-取代的苯基，C3-C7 环烷基或（羟基-，低级烷基-，低级烷氧基-，低级烯基-或低级炔基）-取代的 C3-C7 环烷基取代，其中所述的两亲羧酸可以内生性地转化为其各自的辅酶 A 硫酯。

在优选的方案中，两亲羧酸是生物异源两亲羧酸。在更优选的方案中，生物异源两亲羧酸可以是长链二羧酸， ω -OH 羧酸，

ω -B(OH)₂ 羧酸，祛脂酸同系物或非甾类消炎药。在最优选的方案中，两亲羧酸选自如下组成的组：硬脂酰基(18:0)-CoA，油酰基(18:1)-CoA，亚油酰基(18:2)-CoA，亚麻酰基(18:3)-CoA，二十碳五烯酰基(20:5)-CoA，二十二碳六烯酰基(22:6)-CoA，1,16-十六烷二酸，1,18-十八烷二酸，2,2,15,15-四甲基十六烷-1,16-二酸，2,2,17,17-四甲基十八烷-1,18-二酸，3,3,14,14-四甲基十六烷-1,16-二酸，3,3,16,16-四甲基十八烷-1,18-二酸，4,4,13,13-四甲基十六烷-1,16-二酸，4,4,15,15-四甲基十八烷-1,18-二酸，16-B(OH)₂-十六烷酸，18-B(OH)₂-十八烷酸，16-B(OH)₂-2,2-二甲基十六烷酸，18-B(OH)₂-2,2-二甲基十八烷酸，16-B(OH)₂-3,3-二甲基十六烷酸，18-B(OH)₂-3,3-二甲基十八烷酸，16-B(OH)₂-4,4-二甲基十六烷酸，18-B(OH)₂-4,4-二甲基十八烷酸，16-羟基十六烷酸，18-羟基十八烷酸，16-羟基-2,2-二甲基十六烷酸，18-羟基-2,2-二甲基十八烷酸，16-羟基-3,3-二甲基十六烷酸，18-羟基-3,3-二甲基十八烷酸，16-羟基-4,4-二甲基十六烷酸，和18-羟基-4,4-二甲基十八烷酸。

本发明另一方面提供治疗综合征X的方法，包括施用治疗有效量的两亲羧酸。在优选的方案中，包括综合征X的各种疾病被单个治疗。

本发明另一方面提供调节 HNF-4 α 活性的方法。

另一方面，提供治疗疾病或综合征的方法，包括施用治疗有效量的两亲羧酸。诸如乳腺癌，结肠癌和前列腺癌的疾病可以用本发明方法治疗。

附图简要说明

附图 1 显示长链酰基-CoA 是 HNF-4 α 的配体。GST-HNF-4 α (LBD)融合蛋白标记物(I)由与谷胱甘肽-S 转移酶融合

的 HNF-4 α (LBD)组成。His-HNF-4 α (n)由被 6 个组氨酸标记的全长 HNF-4 α 组成。

a. 棕榈酰基(16:0)-CoA 的饱和结合曲线。各个重组蛋白被温育,如指出的那样由[3H]棕榈酰基(16:0)-CoA(0.05 μ Ci)和过量的未标记棕榈酰基(16:0)-CoA 平衡。通过 Scatchard 分析测定 2.6 μ M 的离解常数(Kd)和 1mol 棕榈酰基(16:0)-CoA/mol HNF-4 α 的最大结合。

b. 通过肉豆蔻酰基(14:0)-CoA 竞争。各个重组蛋白如指出的那样用 8nM 的[3H]棕榈酰基(16:0)-CoA(60Ci/mmol)和过量的未标记肉豆蔻酰基(14:0)-CoA 温育。结合百分数相对于在结合部分中放射标记的 [3H] 棕榈酰基 (16:0)-CoA。对 0.3pmol [3H] 棕榈酰基 (16:0)-CoA 的结合量为 100%。结合百分数相对于在结合部分中放射标记的 [3H] 棕榈酰基 (16:0)-CoA。对 0.3pmol [3H] 棕榈酰基 (16:0)-CoA 的结合量为 100%。EC50 (50%专一性竞争)量相对于 1.4 μ M (范围为 1.2-1.5 μ M)肉豆蔻酰基(14:0)-CoA。各个脂肪酰基-CoA 和生物异源两亲羧酸酰基-CoA 的 EC50 如下:

十二烷酰基(12:0)-CoA	2.3 μ M(范围为 2.1-2.4 μ M)
棕榈酰基(16:0)-CoA	2.6 μ M(范围为 1.3-3.4 μ M)
硬脂酰基(18:0)-CoA	2.7 μ M(范围为 2.1-3.3 μ M)
油酰基(18:1)-CoA	1.4 μ M(范围为 1.0-1.8 μ M)
亚油酰基(18:2)-CoA	1.9 μ M(范围为 1.5-2.3 μ M)
亚麻酰基(18:3)-CoA	2.9 μ M(范围为 2.9-3.8 μ M)
二十碳五烯酰基(20:5)-CoA	0.6 μ M(范围为 0.5-0.7 μ M)
二十二碳六烯酰基(22:6)-CoA	1.6 μ M(0.6-2.7 μ M)
3, 3, 16, 16-四甲基十八烷-1, 18-二酸	8 μ M(范围为 5-15 μ M)
3, 3, 14, 14-四甲基十六烷-1, 16-二酸	8 μ M(范围为 5-15 μ M)

3, 3, 12, 12-四甲基十四烷二酸	40 μ M
苯扎贝特	90 μ M
萘苯丁酸	90 μ M
布洛芬	40 μ M

附图 2 显示 HNF-4 α 的脂肪酰基-CoA 配体调节与其关联 DNA 增强子的结合。

a. 在没有(1 道)或有各 10 μ M 肉豆蔻酰基(14:0)-CoA(2 道)或棕榈酰基(16:0)-CoA(3 道)存在下, His-HNF-4 α (14ng)与 C3P 结合。

b. 在没有(1 道)或有各 10 μ M 硬脂酰基(18:0)-CoA(2 道)或亚麻酰基(18:3, w-3)-CoA(3 道)存在下, His-HNF-4 α (20ng)与 C3P 结合。

c. 通过增加肉豆蔻酰基(14:0)-CoA 的浓度激活与 C3P 结合的 His-HNF-4 α (14ng)。给出了含有与 His-HNF-4 α 二聚体结合的放射标记 C3P 的凝胶切面。

附图 3 显示体外通过长链脂肪酰基-CoA 调节 HNF-4 α 转录活性。

a. 如所指示的, 代表性的实验显示在增加浓度的 His-HNF-4 α 存在下, 和在没有 (1-3, 7-9 道)或各 10 μ M 加入的棕榈酰基(16:0)-CoA(4-6 道)或硬脂酰基(18:0)-CoA(10, 11 道)存在下试验模板的体外转录。试验和对照模板的校正启动转录分别由(→)和(→)指示。

b. 在没有(空带)或有各 10 μ M 加入的棕榈酰基(16:0)-CoA(填满的带)或硬脂酰基(18:0)-CoA(画影线的带)存在下 HNF-4 α 诱导体外转录。折叠转录指示由试验模板产生的特异性转录与对照模板产

生的转录比例，该对照模板正常为没有 HNF-4 α 时观察到的比例。该附图概括了各个酰基-CoA 的 5 个独立实验。*-指与没有加入配体的各个值相比。

附图 4 显示在瞬时转染试验中，通过长链脂肪酸和生物异源两亲羧酸调节 HNF-4 α 活性。

a. 通过长链脂肪酸调节 HNF-4 α 。通过转染的 HNF-4 α 的 CAT 活性的折叠诱导通过在 pSG5-HNF-4 α 存在下与 pSG5 质粒比较，并作为如指示的那样加入培养基中的各个脂肪酸的函数，评价 CAT 活性而测定。该附图概括了各个脂肪酸的 3-4 个独立实验。平均值 $\pm$ S.E。

b. 通过生物异源两亲羧酸抑制 HNF-4 α 。折叠诱导指在用 3,3,12,12-四甲基十四烷二酸($\cdot$), 3,3,14,14-四甲基十六烷-1,16-二酸(■)和 3,3,16,16-四甲基十八烷-1,18-二酸(▲)前配体温育的细胞中的 CAT 活性，正常为在没有加入前配体温育的细胞中的活性。上述羧酸和其他生物异源两亲羧酸配体的 EC50 如下：

3,3,12,12-四甲基十四烷二酸	>300 μ M
3,3,14,14-四甲基十六烷二酸	155 μ M
3,3,16,16-四甲基十八烷二酸	150 μ M
2,2,13,13-四甲基十四烷二酸	230 μ M
2,2,15,15-四甲基十六烷二酸	150 μ M
2,2,17,17-四甲基十八烷二酸	150 μ M
4,4,13,13-四甲基十六烷二酸	150 μ M
4,4,15,15-四甲基十八烷二酸	150 μ M
苯扎贝特	260 μ M
茶苯丁酸	160 μ M
吲哚美辛	130 μ M

发明详述

长链脂肪酸显示出通过各个脂肪酰基-CoA 硫酯与 HNF-4 α 配体结合区域结合而直接调节 HNF-4 α 的转录活性。由 HNF-4 α 激动或拮抗的酰基-CoA 配体引起的转录调节可以从两个明显独立的配体-诱导作用产生，即移动 HNF-4 α 寡聚-二聚平衡或影响 HNF-4 α 二聚体其关联增强子的内结合亲和力。

本文所用的下列术语具有如下意义：

术语“两亲羧酸”指具有疏水骨架和羧酸官能团的化合物。

术语“生物异源物质”指与哺乳动物的中间代谢无关的化合物。

术语“综合征 X”指包括下列疾病的一些或全部的综合征：1) 血脂蛋白异常(联合的血胆固醇高-血甘油三酯高，低 HDL-胆固醇)，2)肥胖(尤其是超体重肥胖)，3) 引起非胰岛素依赖糖尿病(NIDDM)的葡萄糖耐受力降低(IGT)，4)原发性高血压和 5)凝血/血纤维蛋白溶解缺陷。

术语“调节”指增加或降低 HNF-4 α 的表观活性。HNF-4 α 的调节可以是直接的，例如与 HNF-4 α 结合，或间接的，例如，通过其他途径，例如，激酶活性介导的。与 HNF-4 α 结合的本发明化合物可以激活或抑制其与关联增强子的结合，为链长和/或饱和度的函数。

治疗综合征 X 的方法可以寄希望于本发明。这类方法包括施用天然或生物异源两亲羧酸。也可以预期的抑制 HNF-4 α 转录活性的方法是通过反义抑制，通过抗体抑制或任何其他降低 HNF-4 α 表观活性的方法。

方法

HNF-4 α 重组蛋白

大鼠 HNF-4 α 1 cDNA(pLEN4S)1 被亚克隆到谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)中, 编码 pGEX-2T 质粒(Pharmacia), 产生的质粒用 *smal* 和 *AccI* 裂解并再连接产生 GST-HNF-4 α (LBD)融合质粒。融合质粒通过用 0.2mM IPTG 温育 60 分钟而表达到 E.coli BL21(DE3)菌株中, 产物通过用谷胱甘肽-琼脂珠(Sigma)亲和层析纯化, 产生由融合到 GST 中的野生型 HNF-4 α 的氨基酸 96-455 组成的 GST-HNF-4 α (LBD)融合蛋白。克隆到 6His-pET11d 载体中的全长 HNF-4 α 1 cDNA 被表达到 E.coli BL21(DE3)plysS 中。

配体结合试验

重组 GST-HNF-4 α (LBD)(100pmol)或 His-HNF-4 α (100pmol)在 22℃ 用 [3H]棕榈酰基(16:0)-CoA(American Radiolabeled Chemicals)在 100 μ l 10mM 磷酸缓冲液(pH 7.4)中温育 60 分钟。如指示的那样加入竞争剂配体或溶剂载体。通过 Dowex-涂层的木炭分离游离的和 HNF-4 α 结合的 [3H]棕榈酰基(16:0)-CoA, 结合的配体通过液体闪烁计数定量。[3H]棕榈酰基(16:0)-CoA 的非特异性结合通过其与 GST 部分或与碳酸酐酶结合为非相关蛋白而测定。

迁移率变动分析

His-HNF-4 α 和酰基-CoA(如指示的)在 22℃, 在最终体积为 20 μ l 的含有 50mM KCl, 1mM 二硫赤鲜糖醇, 2.5mM MgCl₂, 10%甘油, 1 μ g 聚(dl-dC)的 11mM Hepes(pH 7.9)中预温育 30 分钟。然后加入由人 C3P apo CIII 启动子序列(-87/-66)6 组成的 32P-标记的寡核苷酸

(0.1ng), 继续再温育 15 分钟。蛋白-DNA 复合物用 5%非变性聚丙烯酰胺凝胶在 $0.6 \times \text{TBE}$ 中溶解, 并通过 PhosphorImager 分析定量。

体外转录分析

反应混合物如所指示的含有 20mM Hepes-KOH(pH 7.9), 5mM MgCl_2 , 60mM KCl, 8%甘油, 2mM DTT, 1mM 3'-O-甲基-GTP, 10 单位 T1 RNA 酶, 20 单位 RNA 酶蛋白质抑制剂, 0.5 μg 超声的鲑精 DNA 和 His-HNF-4 α 和试验配体。将该混合物在 22 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 分钟, 接着加入 10ng 由与 200bp G-less 盒连接的腺病毒主要晚期启动子(-400/+10)组成的 pAdML200 对照模板, 和由 apo CIII 启动子序列(-87/-66)的三个 C3P 复制件组成的 200ng 试验模板, 在合成的卵白蛋白 TATA 盒启动子上游, 在 377 bp-G-less 盒前面。将混合物在 22 $^{\circ}\text{C}$ 再预温育 10 分钟, 接着加入 40 μg HeLa 核萃取液, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 再温育 30 分钟。然后加入 0.5mM ATP, 0.5mM CTP, 25 μM UTP, 和 10 μCi [α -32P]UTP(s.a.800Ci/mol, Amersham), 反应混合物在 30 $^{\circ}\text{C}$ 以 25 μl 的最终体积温育 45 分钟。通过加入 175 μl 停止混合物(0.1M 醋酸钠(pH 5.2), 10mM EDTA, 0.1%SDS, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tRNA)终止反应, 接着苯酚萃取和乙醇沉淀。将 RNA 再悬浮于含有 80%甲酰胺和 10mM Tris-HCl(pH 7.4)的样品缓冲液中, 在含有 7M 尿素的 5%聚丙烯酰胺凝胶上, 在 TBE 中分离。校正启动的转录通过 PhosphorImager 分析定量。试验 DNA 通过往 pC2AT19 质粒中插入一个 PCR-扩增的寡核苷酸而构建, 该寡核苷酸通过用 (C3P)3-TK-CAT 质粒作为模板制备, 并且由分别在 5'和 3'末端具有 ECoRI 和 SSTI 位点的 Apo CIII 启动子序列(-87/-66)的 C3P 元素的三个复制件组成。产生的质粒用 *sphI* 和 *sacl* 裂解, 并连接到含有 HSV 胸苷激酶启动子(-41/-29)序列和鸡卵白蛋白启动子(-33/-21)序列的合成寡核苷酸(5'-CGAGGTCCACTTCGCTATATATTCCCCGAGCT-3')中。

转染分析

用(C3P)3-TK-CAT 报道因子质粒(5 μ g)共转染 6 小时,并用通过磷酸钙沉淀加入的 pSG5-HNF-4 α 表达质粒(0.025 μ g)或 pSG5 质粒(0.025 μ g)共转染的 COS-7 细胞在无培养基的血清中用如所指示的加入的脂肪酸(以 6:1 的摩尔比与白蛋白复合)培养。将半乳糖苷酶表达载体 pRSGAL(1 μ g)加入各个沉淀作为转染内部控制。(C3P)3-TK-CAT 构建通过将包含由 HindIII 限制位点掩护侧翼的(-87/-66)Apo CIII 启动子序列(5'-GCAGGTGACCTTTGCCCAGCGCC-3')插入-105bp 胸苷激酶启动子上游的 pBLCAT247 而制备。选择含有直接取向的三个合成的寡核苷酸复制件的构建,并通过测序确定。

脂肪酰基-CoA

通过溶解于干燥乙腈中的游离酸与 1, 1'-羰基二咪唑反应制备脂肪酰基-CoA。将反应混合物蒸发至干,各个酰基-咪唑啉合物与 1 当量溶于 1:1 THF:水中的还原的 CoA 反应。接着用硅胶 60H 板(Merck)(丁醇:乙酸:水 5:2:3)TLC。酰基-CoA 衍生物用 0.1M HCl 沉淀,该沉淀用 0.1 M HCl 洗涤三次,无过氧化物的乙醚洗涤三次,并用丙酮洗涤三次。酰基-CoA 通过其 260/232nm 分光光度测定。

实施例

为了进一步说明本发明和其优点,给出下列特例,应该理解,这些实施例仅仅是举例说明,而没有任何限制作用。

实施例 1

长链酰基-CoA 是 HNF-4 α 的配体

各种链长和饱和度的酰基-CoA 被发现与 HNF-4 α 特异性结合。结合由融入谷胱甘肽-S-转移酶(GST-HNF-4 α (LBD))的 HNF-4 α 配体结合区域或由 6 组氨酸标记的全长 HNF-4 α 蛋白(His-HNF-4 α)作为例子。与配体结合区域或全长 HNF-4 α 蛋白结合的棕榈酰基(16:0)-CoA 是具有 2.6 μ M Kd 的可饱和的,并接近 1 摩尔脂肪酰基-CoA/摩尔 HNF-4 α 的饱和度(附图 1A)。结合是对酰基-CoA 特异性的,而对游离脂肪酸或游离 CoA 是无活性的。各种链长和饱和度的酰基-CoA 的结合通过与结合于重组 GST-HNF-4 α (LBD)或 His-HNF-4 α 的放射标记的棕榈酰基(16:0)-CoA 竞争而证实(附图 1B)。对于链长短于 C12 的饱和脂肪酰基-CoA 没有观察到结合。但是, HNF-4 α 的长链脂肪酰基-CoA 的结合亲和力基本上不受各个配体链长或饱和度的影响,在 0.5-3.0 μ M 范围内。长链脂肪酰基-CoA 与 HNF-4 α 的结合特异性进一步通过分析棕榈酰基(16:0)-CoA 与重组的组氨酸-标记的过氧化物酶体增殖体激活的受体 α (His-PPAR α)的推定结合而证实。与 HNF-4 α 相反,长链脂肪酰基-CoA 不通过 PPAR α 或视黄酸 X 受体 α (RXR α)结合。这些结构表明,天然长链脂肪酰基-CoA 可以与 HNF-4 α 的配体结合区域结合,并作为该蛋白的特异性配体。

酰基-CoA 与 HNF-4 α 的结合不限于上面举例的天然脂肪酰基-CoA。因此,生物异源的酰基-CoA(RCOSCoA)可以观察到结合,其中 R 是由 10-24 个碳原子的饱和或不饱和烷基链组成的基团,其中一个或多个碳原子可以被杂原子代替,其中一个或多个所述的碳原子或杂原子链成员非强制性地形成环的部分,并且其中所述的链被非强制性地取代(附图 1B)。

实施例 2

通过长链酰基-CoA 调节 HNF-4 α 活性

作为长链酰基-CoA 结合函数的 HNF-4 α 活性通过研究 HNF-4 α 与其 apo CIII 启动子序列(-87/-66)6 的关联 C3P 元素在有或没有加入的各种链长, 饱和度, 和取代程度的酰基-CoA 存在下的结合而评价。通过用凝胶迁移率变动分析确证结合。如附图 2 所示, 随着 His-HNF-4 α 浓度增加, C3P 与 HNF-4 α 的结合也增加, 并由链长为 C12-C16 的天然饱和脂肪酰基-CoA 所激活。激活依赖于浓度, 并且在其与 HNF-4 α 结合所需的浓度范围的肉豆蔻酰基(14:0)-CoA 存在下最大。而且, 一些脂肪酰基-CoA 以及物异源的酰基-CoA 被发现作为真正的 HNF-4 α 拮抗剂, 即抑制其与其关联增强子的内部结合。因此, 在硬脂酰基(18:0)-CoA 或 α -亚麻酰基(18:3)-CoA 存在下温育 HNF-4 α 强力抑制其与 C3P 寡核苷酸的结合(附图 2)。类似地, 在各种生物异源的酰基-CoA 存在下温育 HNF-4 α 导致对其与关联 C3P 寡核苷酸结合的抑制。因此, 与 HNF-4 α 结合的天然或生物异源的酰基-CoA 可以以链长, 饱和度或取代程度的函数作为其转录活性的激动剂, 部分激动剂或拮抗剂。

实施例 3

通过 HNF-4 α 激动剂和拮抗剂调节 HNF-4 α 诱导的转录

激动或拮抗的 HNF-4 α -配体的作用进一步通过分析由加入的 HeLa 核提取物催化, 并由重组 HNF-4 α 诱导的, 由被 HSV 胸苷激酶和鸡卵白蛋白启动子启动, 并由 apo CIII 基因启动子的三个复制件增强的 377 bp G-less 盒组成的试验模板的体外转录率而评价。通过 HNF-4 α 的转录激活在有或没有加入的代表性长链脂肪酰基-CoA 存在下评价。由腺病毒主要晚期(AdML)启动子驱动并缺少 HNF-4 α

增强子的 200 bp G-less 盒组成的模板转录被用作内部对照模板。如附图 3 所示, 试验模板的体外转录以 HNF-4 α 的函数增加, 在 HNF-4 α 浓度为 200ng 时接近饱和。HNF-4 α 诱导的转录在凝胶迁移率变动分析中, 由于 HNF-4 α 激动剂和拮抗剂发挥的作用, 以线性通过加入的棕榈酰基(16:0)-CoA 激活, 并通过加入的硬脂酰基(18:0)-CoA 而抑制。因此, 与 HNF-4 α 结合的酰基-CoA 可以在无细胞体系中直接调节其转录活性。

HNF-4 α 配体对介导转录的 HNF-4 α 的胞内作用在用 HNF-4 α 表达载体和由胸苷激酶启动子驱动并由 1 至 3 个 apo CIII 基因启动子的 C3P 复制件增强的 CAT 报道基因质粒共转染的 COS-7 细胞内评价。转染的细胞在代表激动或拮抗的 HNF-4 α 前配体的游离脂肪酸和生物异源两亲羧酸存在下温育。如附图 4 所示, C3P-增强的报道基因质粒的表达在没有往培养基中加入脂肪酸的情况下由 HNF-4 α 7 倍激活。转染 HNF-4 α 的转录激活可以反映未配位 HNF-4 α 二聚体的内转录活性, 或者可以从与内源激活酰基-CoA 的结合产生。往培养基中加入肉豆蔻酸(14:0)或棕榈酸(16:0)产生 HNF-4 α 依赖性转录的依赖于剂量的活性, 而硬脂酸(18:0), α -亚麻酸(18:3)或二十烷五酸(20:5)却在凝胶迁移率变动分析(附图 2)和无细胞转录分析(附图 3)中由各个脂肪酰基-CoA 的激动或拮抗活性呈线性抑制。在转染分析中 HNF-4 α 转录活性的抑制在加入培养基中的生物异源两亲羧酸存在下可以类似地观察到(附图 4b), 其中 R 是由 10-24 个碳原子的饱和或不饱和烷基链组成的基团, 其中一个或多个碳原子可以被杂原子代替, 其中一个或多个碳或杂原子链成员非强制性地形成环的部分, 并且其中所述的链非强制性地被羟基, 杂环基, 低级烷氧基, 羟基取代的低级烷基, 羟基, 羧基, 卤素, 苯基, 取代的苯基, C3-C7 环烷基或取代的 C3-C7 环烷基取代。因此, 胞内 HNF-4 α -介导的表达可以通过天然长链脂肪酸和能够内部转化为其相应的 CoA 硫酯(RCOSC_oA)的生物异源两亲羧酸调节。高效抑制化合物是其中 R 被

ω -羧基取代的下列化合物:2,2,15,15-四甲基十六烷-1,16-二酸, 2,2,17,17-四甲基十八烷-1,18-二酸, 3,3,14,14-四甲基十六烷-1,16-二酸, 3,3,16,16-四甲基十八烷-1,18-二酸, 4,4,13,13-四甲基十六烷-1,16-二酸, 4,4,15,15-四甲基十八烷-1,18-二酸。另一组有效的化合物是其中 R 被 ω -羟基取代的化合物:16-羟基十六烷酸, 18-羟基十八烷酸, 16-羟基-2,2-二甲基十六烷酸, 18-羟基-2,2-二甲基十八烷酸, 16-羟基-3,3-二甲基十六烷酸, 18-羟基-3,3-二甲基十八烷酸, 16-羟基-4,4-二甲基十六烷酸, 18-羟基-4,4-二甲基十八烷酸。另一组效果较低的化合物由祛脂酸同系物(祛脂酸酯化合物)或非甾族消炎药组成。所发挥的综合效果可以反映核心酰基-CoA 的优势组合物和当与 HNF-4 α 结合时由各自发挥的激动/拮抗作用。

实施例 4

生理关联

HNF-4 α 转录活性通过天然或能够内部转化为其相应的 CoA 硫酯的生物异源两亲羧酸的抑制可以提供一种治疗由 HNF-4 α 控制的基因超量表达引发和/或启动的疾病的治疗方式。作为 HNF-4 α 转录活性抑制剂的相关两亲羧酸的特性第一位取决于其各个 CoA 硫酯作为 HNF-4 α 拮抗剂的内容量。目前还不能预测哪一种能够内部转化为其相应的 CoA 硫酯的两亲羧酸可以被证实为真正的 HNF-4 α 拮抗剂。肉豆蔻酰基(14:0)-CoA 或棕榈酰基(16:0)-CoA 被证实为 HNF-4 α 转录活性的激活物, 而系列中的下一同系物, 即硬脂酰基(18:0)-CoA 被证实为真正的拮抗剂。然而, 应该指出, 如果代替内源性 HNF-4 α 有效激动剂, 或与对 HNF-4 α 结合更多产的激动剂竞争, 部分激动剂将诱导 HNF-4 α 活性的表观抑制。

作为 HNF-4 α 转录活性抑制剂的两亲羧酸的综合体内特性不仅反映其各个 CoA 硫酯作为 HNF-4 α 拮抗剂的内容量, 还进一步依赖

于特定的细胞类型和核心脂肪酰基-CoA 的优势组合物。该组合物可以通过各个酸的膳食/药理学有效性轮廓，各个 CoA-硫酯化的有效性以及各个酰基 CoA 由酰基 - CoA 水解酶水解的有效性影响，酯化为脂质，氧化为产物，延长，去饱和或与其它酰基 - CoA 结合蛋白结合。而且，由两亲羧酸而不是脂肪酸（例如视黄酸，前列腺素，白细胞三烯，等等）CoA - 酯化产生的内源性酰基 - CoA 可以与 HNF-4 α 结合，并调节其作为激动剂或拮抗剂的活性产生的效果将进一步依赖于可以影响 HNF-4 α 的寡聚 - 二聚平衡，HNF-4 α 与其关联增强子的结合亲和力或 HNF-4 α 与转录引发复合物之间的相互作用的附加核因子。特别地，因为 HNF-4 α 和过氧化物酶体激活物激活的受体（PPAR）共享相似的 DR - 1 共有序列，并且 PPAR 可以通过长链游离脂肪酸而不是其相应的 CoA 硫酯激活，所以由某些酰基 - CoA 发挥并由 HNF-4 α 介导的作用可以类似于，或由相应的游离酸激活的 PPAR 拮抗。

不管上述未知的情况，如本文举例的 HNF-4 α 的酰基 - CoA 的激动/拮抗分布图还是有助于认识由膳食脂肪酸体内发挥，并与一些由 HNF-4 α 调节的基因有关的作用的分子基础。膳食脂肪的长链脂肪酰基组成包括西方膳食热量摄取的 30 - 40 %。除了其底物角色外，最经常被氧化产生能量或分别酯化为甘油三酯和磷脂，产生脂肪和细胞膜，一些膳食脂肪酸已经被认识到作为癌症 7，动脉粥样硬化形成 8，血脂蛋白异常 9，胰岛素抵抗 10，11，高血压 12，凝血和溶解纤维蛋白缺陷 13，炎症，免疫缺损和其它疾病开始和进程的中性调节剂。这些未阐明的作用现在可以被认为能由相应的酰基 - CoA 对 HNF-4 α 转录活性所发挥的作用解释，导致调节与上述疾病的开始和进程有关基因的表达。由膳食长链脂肪酸对血脂和血凝发挥的作用根据由 HNF-4 α 对编码与脂蛋白代谢（载脂蛋白 AI，AII，B，CIII，微粒体甘油三酯转移蛋白）和血凝（因子 IV，IX，X）有关蛋白质的基因所发挥的确定作用而值得注意。确实，由一般的 C12

- C16 膳食饱和脂肪酸特别是肉豆蔻酸诱导的血浆中 VLDL-, LDL- 和 HDL-胆固醇确定的增加与由相应的饱和酰基-CoA 诱导的 HNF-4 α 激活一致, 而短于 C12 的脂肪酰基-CoA 不发挥作用。血脂由饱和硬脂酸(18:0)出人意料的降低可以类似地由硬脂酰基(18:0)-CoA 对 HNF-4 α 活性所发挥的拮抗作用解释。类似地, 可归于代替饱和膳食脂肪酸 9 的一和多不饱和脂肪酸的降脂作用与饱和脂肪酰基-CoA 相比, 也与多或一不饱和脂肪酸的活性一致, 进一步由亚麻酰基(18:3)-CoA, 二十烷五酸酰基(20:5)-CoA 或二十二烷六酸酰基(22:6)-CoA 的 HNF-4 α 直接抑制作用补充。而且, 由饱和 C12 - C16 膳食脂肪酸诱导并与因子 VII 的相应增加相关联的血凝性增加, 由多不饱和膳食脂肪酸诱导的血凝性降低以及因子 VII 含量和特别由膳食硬脂酸(18:0)诱导的血凝性出人意料的降低可以类似地归于由相应的脂肪酰-CoA 对 HNF-4 α 活性发挥的作用, 导致调节 HNF-4 α 控制的编码维生素 K - 依赖的凝血因子的基因表达。

而且, HNF-4 α 控制的基因通过可以内源地酯化为其相应的 CoA 硫酯并作为 HNF-4 α 激动剂或拮抗剂的生物异源两亲羧酸的转录调节可以提供由 HNF-4 α 控制的基因超量表达引发或启动的疾病的治疗方式。由生物异源取代的两亲羧酸提供的例子根据与其在动物模型中改变血脂蛋白异常, 肥胖, 胰岛素抵抗和动脉粥样化形成 14 - 17, 即与一些与 HNF-4 α 控制的基因超量表达有关的疾病方面的药理表现有关的积累的信息是值得注意的。这些药物的疗效可以由如本文举例的 HNF-4 α 转录活性的抑制解释。

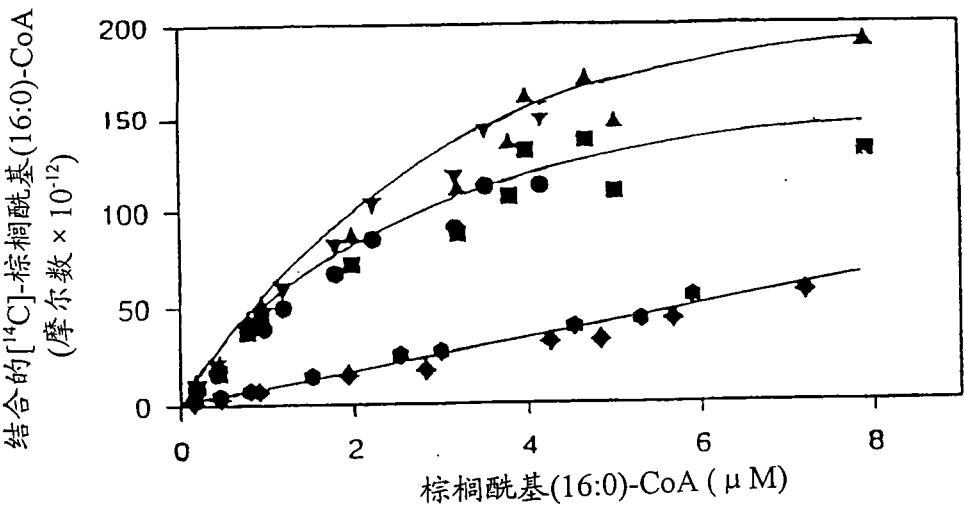


图 1a

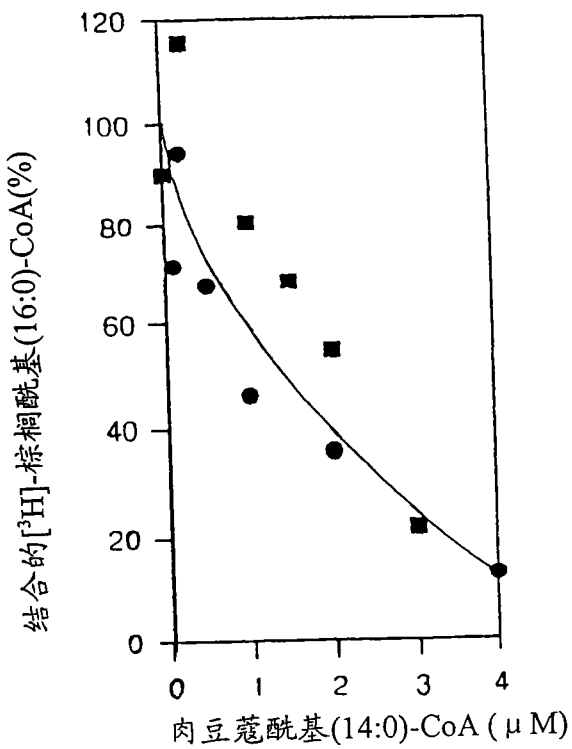


图 1b

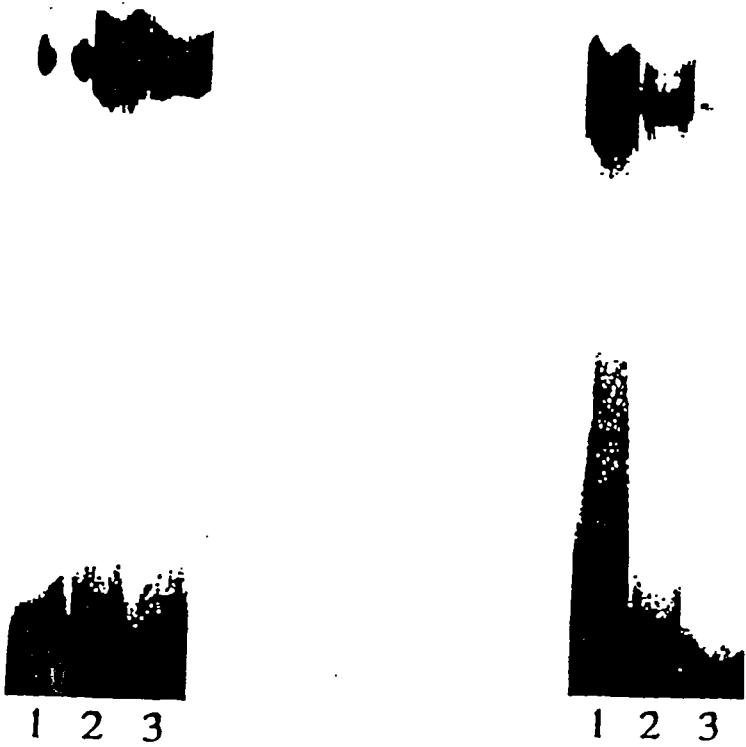


图 2a

图 2b

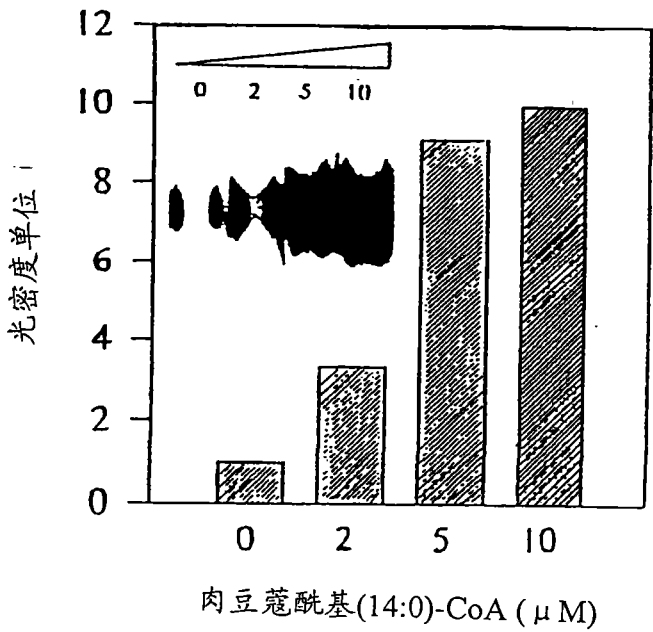


图 2c

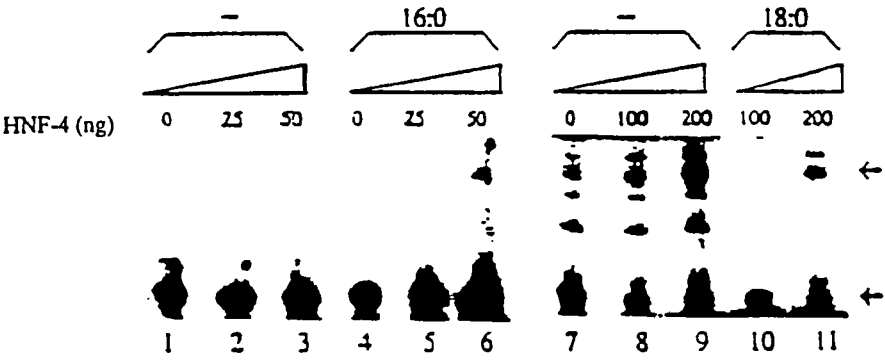


图 3a

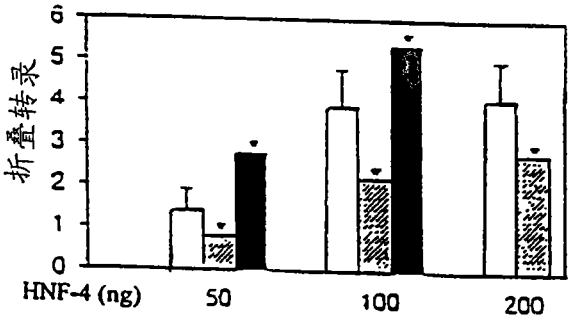


图 3b

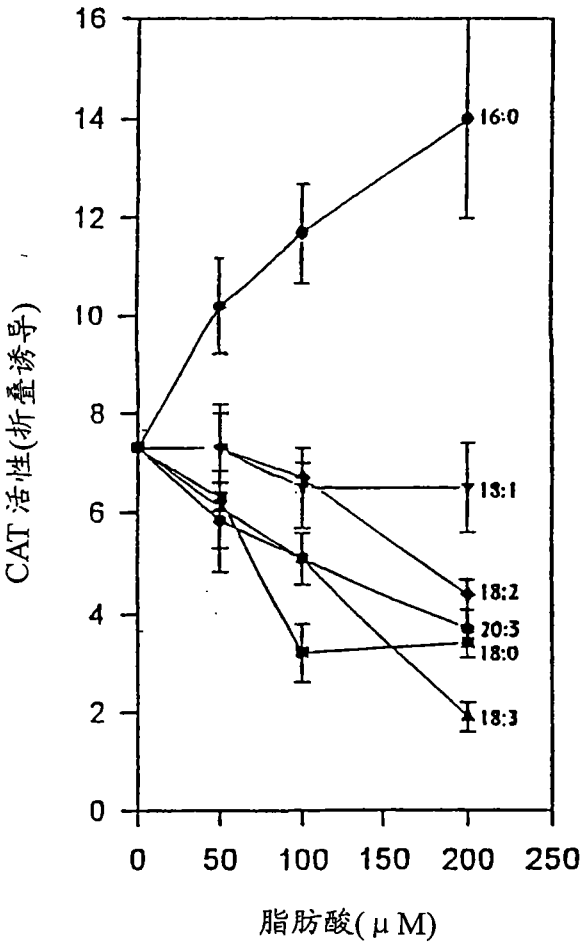


图 4a

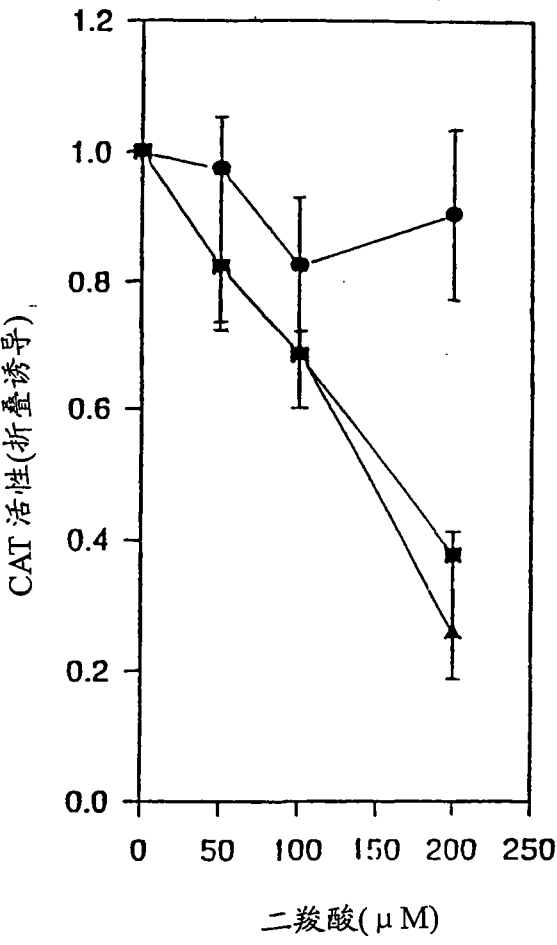


图 4b