

1. 一种 RNAi 制剂,其包含第一链,该第一链包含与编码 Hom-1 蛋白的基因区域具有同源性的第一核苷酸序列,其中所述 RNAi 制剂靶向编码 Hom-1 蛋白的基因转录得到的 mRNA。
2. 如权利要求 1 的 RNAi 制剂,其中 RNAi 制剂进一步包含第二链,该第二链具有与第一序列互补的第二核苷酸序列。
3. 如权利要求 1 的 RNAi 制剂,其中所述第一序列包括 4,6,7,或 8。
4. 一种含有如权利要求 1 的 RNAi 的药物组合物。
5. 如权利要求 3 的药物组合物,其中该药物组合物是一种鼻腔气雾剂或吸入气雾剂组合物。
6. 一个分离的核酸,其包含序列 SEQ ID NO :3,4,6,7,或 8,或其互补序列。
7. 一种降低个体中前炎性细胞因子水平或炎性细胞水平或活性的方法,包括向所需要的个体施用有效量的含有序列 SEQ ID NO :1 的多肽的抑制剂。
8. 如权利要求 7 的方法,其中所述的细胞因子是 TNF- α , IL-1 β ,或 IL6。
9. 如权利要求 7 的方法,其中所述抑制剂是一种抗体,一条反义核酸或一个 RNAi 制剂。
10. 如权利要求 9 的方法,其中 RNAi 制剂包含序列 SEQ ID NO :4,6,7,或 8。
11. 如权利要求 7 的方法,其中抑制剂是泼尼松,依木兰,甲氨喋呤或骁悉。
12. 一种治疗患有免疫系统疾病或处于免疫系统疾病风险中的人类个体的方法,包括向所需要的个体施用有效量的含有序列 SEQ ID NO :1 的多肽的抑制剂。
13. 如权利要求 12 的方法,其中抑制剂是一种抗体,一条反义核酸或一个 RNAi 制剂。
14. 如权利要求 13 的方法,其中 RNAi 制剂包含序列 SEQ ID NO :4,6,7,或 8。
15. 如权利要求 12 的方法,其中免疫系统疾病是一种炎症疾病。
16. 如权利要求 12 的方法,其中免疫系统疾病是急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。
17. 如权利要求 12 的方法,其中个体患有或疑似患有流行性感。
18. 一种提高个体中炎性细胞的水平或活性的方法,包括向所需要的个体施用有效量的含有序列 SEQ ID NO :1 或 5 的多肽,或其功能等同物,或编码该多肽的核酸。
19. 如权利要求 18 的方法,其中细胞是巨噬细胞。
20. 一种控制患者治疗的方法,包括
确认处于或者需要治疗一种症状的患者,
从患者中获取生物样本,
确定样本中基因的表达水平,该基因编码包含 SEQ ID NO :1 的多肽,
其中如果该水平处于或高于预定值,则该患者被确定为适合进行治疗。
21. 如权利要求 20 的方法,其中该方法进一步包括将表达水平与患者或医生或患者的看护者进行交流。
22. 如权利要求 20 的方法,其中的症状是细胞增殖性疾病。
23. 如权利要求 20 的方法,其中的症状是炎性或自身免疫性疾病。
24. 一种用于诊断免疫系统疾病或控制患者治疗的试剂盒,包括一种或多种选自于包含以下的组:
具有 SEQ ID NO :1 序列的蛋白的特异性抗体,
具有 SEQ ID NO :1 序列的多肽,
扩增 SEQ ID NO :2,3,或 5 的片段的 PCR 引物对,以及

在严格条件下与参考核酸的互补链杂交的核酸,其中的参考核酸由SEQ ID NO :2,3,或5组成。

25. 如权利要求 24 的试剂盒,其中的疾病是 ALL, CLL, AML, MDS, SLE, IBD, RA 或移植排斥。

26. 一种诊断个体中免疫系统疾病的方法,该方法包括从该个体中获得生物样本;确定样本中基因的表达水平,该基因编码含有 SEQ ID NO :1 的多肽。

27. 如权利要求 20 的方法,其中的疾病是细胞增殖性疾病,如果该表达水平低于第一预定水平或没有表达,则个体被确定为患有或倾向于发生细胞增殖性疾病。

28. 如权利要求 20 的方法,其中的疾病是炎性或自身免疫性疾病,如果该表达水平高于第二预定水平,则该个体被确定为患有或倾向于发生该疾病。

免疫系统疾病的治疗和诊断

[0001] 相关申请案

[0002] 本申请要求于 2009 年 7 月 15 日提交的美国临时申请号 61/225, 852 的优先权。在先申请作为参考文献全文引入。

背景技术

[0003] 免疫系统保护人体不受病原体感染, 细胞转化, 以及物理 / 化学损伤。它的功能异常, 无论是过度活化还是活化不足, 都会导致不同的疾病。免疫系统功能异常可能由年龄老化、发育缺陷, 疾病和医学治疗 (例如化疗或免疫抑制) 所导致。这需要治疗和诊断免疫系统疾病的药物和试剂。

发明内容

[0004] 本发明涉及利用 Hom-1 或其抑制剂或其激活剂治疗和诊断免疫系统疾病的材料和方法。下面所示的是 Hom-1 的多肽和核酸序列:

[0005] Hom-1 多肽 (SEQ ID NO :1) :

[0006]

```
mrlsssprrg    pqqlssfgsv    dwlsqsscsg    pthtprpadf    slgslpgpgg    tsgareppqa
vsikeaagss    nlpapertma    glskepntlr    aprvrtaftm    eqvrtlegvf    qhhgylsple
rkrlaremgl    sevqiktwfq    nrrmkhkrqm    qdpqlhspfs    gslhappafy    stssglangl
qllcpwapls    gpqalmppg    sfwglcqvaq    ealasagasc    cgqplashpp    tpgrpslgpa
lstgprglca    mpqtgdaf (下划线: aa.91-151/同源异型域)
```

[0007] Hom-1 核酸序列 (SEQ ID NO :9) :

[0008]

```
acctggcgcg    catggcgctc    tctctctccc    cacctcgtgg    cccgcagcag    ctctccagct
ttggctccgt    ggactggtc    tcccagagca    gctgctcagg    gccgaccac    acccccaggc
ctgccgactt    ctccctgggg    agcctcctg    gcccaggcca    gacatccggc    gcccgggagc
cccctcaggc    cgtcagcatc    aaggaggccg    ccgggtcctc    aaatctgcct    gcgcccggaga
ggaccatggc    cgggttgagt    aaggagccaa    ataccttgcg    ggcccccgct    gtccgcacag
ccttcaccat    ggagcaggtc    cgcaccttgg    agggcgtctt    ccagcaccac    cagtacctga
gccctctgga    gcggaagagg    ctggccaggg    agatgcagct    ctcagaggct    cagataaaaa
ctgggtttca    gaatcgccgc    atgaaacaca    aacggcaaat    gcaggacccc    cagctgcaca
gccccttctc    ggggtctctc    catgcgcccc    cagctttcta    ctcaacgtct    tctggccttg
ccaatggcct    gcagctgctg    tgcccttggg    caccctgtc    cgggccccag    gctctgatgc
tgccccctgg    ctcttctg    ggtctctgcc    aagtggcaca    agaggccctg    gcatctgcgg
gagcttctg    ctgcgggcag    cctctggcgt    cccaccccc    taccacaggc    cggccttcgc
tgggaccagc    cctgtccacg    gggccccggg    gcctgtgtgc    tatgccacag    acgggggatg
```

[0009]

<u>cattttgagg</u>	aggcacctct	gactcccaca	ctcgcggtct	tgctgatcgc	acctggctcc
tacctggagg	actcagttgt	tctgtttaca	tectgggtggc	acctctcacc	ctgaccacaca
caaaggttct	ggagattact	ggagaatata	tataaatata	tatatgtacg	tatatatgta
aatacacata	tacgtatata	taaatatata	tatacatatg	tgtgtgtata	tatatatata
tttttttttt	tttttttttt	tttgagacgg	agtgttgctc	tgtcaccag	gctggagtgc
aatgacgcaa	tctcggctca	ctgcaacctc	cgectcctgg	gttcaagcga	ttctccagcc
tcagcctccc	gagtagctgg	gattacagac	acccgccacc	acgccggct	aattttttct
attttttagta	gaaatggggt	ttcaccatgt	tagccaggct	ggtctcaaac	tcctgacctt
gtgatccgcc	cgctcggcc	tcccaaagtg	ctgggattac	aggcatgagc	cactgcacc
ggcctgaga	atatatttat	taaagccacc	tcttcaactga	aagtaccga	aagatcgggt
ttaggaagga	aacgaagggt	cagtgaacag	agtcaaatgc	agaagtggc	ttgtcatggg
tagggctttc	ggcgtacgat	aaaaggatca	tttgtttttt	aaaaggggtt	ggaaaaactg
gttttccagt	tggaaacagt	aaaggttgta	agcttttgtt	gtacaaaaga	aaacagggaa
tgcaggtgtg	tttatagcgt	tgtggttcaa	gtccctctta	acaagaactc	caaagctgga
aagcaggagg	gaacaaaggt	gaacatgaag	gcgaggatgc	tggggccctg	cagtgcgctc
taggctgtgc	gtgagccggg	actgtaccca	cagcttgctg	agggctgctc	ttcttggggc
agggaaagca	gggcagccgg	gacctgcggc	tgtgcctgga	ctgaagctgt	cccgcaggtc
cccaccctcc	aacacgtgct	cacctgtccc	cctcctcgca	gcagcctcgg	gacaaaacaa
tgactcaagg	acagcacttc	tcgcagaagg	tctggaagtg	cccagaatgg	gaggcacgga
agccctccc	gggaaggact	cccgcgttga	tggaccgttc	ttggtgcaga	ctcctgactg
cgtgcatgaa	acctgagaca	agtgcaattc	cttccatgtc	gccccagagt	gcccaggagg
caggcagtgc	gggtgcca	ggcagacggg	ttcagcctgc	agaactggag	gcgacctgtg
aaaccacccc	gggcacccca	acaggaacag	aagcgtggtc	ctgcgctgc	gtccccagcg
agtttcactt	tccccttgct	cgtttctccc	ttggtgtaag	tgtttacaac	tggcatgtgc
ttttaaacgt	cagtaagag	gggaacagct	gctgtacatc	gtcctggcga	gtgacaatgt
gacagaagcc	tgggcgaggc	cctcggaggg	cagcagctgg	acaggggcta	ctgggtttgg
cctggacagc	actgatttgt	ggatgtggat	gggggcacgt	tgtccgtgat	aaaagtacaa
gtgcccctca	caaaaaaaaa	aaaaaaaa	(下划线: 编码区 (nt12 to 788, SEQ ID NO: 2))		

[0010] 相应地,在一个方面,本发明的特征在于一种 RNAi 制剂,所述 RNAi 制剂含有第一链,所述第一链具有与编码 Hom-1 蛋白的基因一个区域同源的第一核酸序列。RNAi 制剂靶向所述基因或其 5' - 非翻译区转录得到的 mRNA。在一个实施方案中,第一序列包括 UUCAG AAUCGCCGAUGAAACACAAACGG (SEQ ID NO :6), UCUACUCAACGUCUUCUGGCCUUGCCAAU (SEQ ID NO : 7), 以及相应的 DNA 形式 :TTCAGAATCGCCGCATGAAAC ACAAACGG (SEQ ID NO :4), TCTACTCAACG TCTTCTGGCCTTGCCAAT (SEQ ID NO :8), RNAi 制剂还可以包括第二链,所述第二链具有与第一序列互补的第二核酸序列。

[0011] 本发明的特征还在于一种药物组合物,所述组合物包括刚刚提及的 RNAi 制剂。该组合物可以是一种鼻腔喷雾剂或吸入组合物。

[0012] 上述制剂和组合物能够用于治疗患有免疫系统疾病或者处于免疫系统疾病风险中的患者的用途,例如炎症疾病,包括由病毒感染或化学试剂引起的急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。特别地,可以向所需要的个体施用有效量的 RNAi 制剂或组合物。在一个实施方案中, RNAi 制剂具有 SEQ ID NO :6 或 7 的核酸序列。所述个体可以是患有或疑似患有流行性感冒的个体,例如, SARS。

[0013] 在第二个方面,本发明的特征在于具有上述 SEQ ID NO :4,6,7, 或 8 的分离的核酸序列或其互补序列。本发明的特征还在于具有下面列出的分离的核酸序列 (SEQ ID NO :3) 或其互补序列。

[0014] 5' cgaatgcagaggctcctgcgatggccccggagtgagtccccagaggagccggatttagggctgga ggcggccgagtcccccgagaggccccctcccgacattcccggccccgcgcgcgctccccgggtcctccgcgtctctt tccccgggaaagcctccctcggttctctgcgcggccgcacagcctggacgcagcgcacgcgggcaccggcctgactctc ccaccccgaagcctgctcccaacctaaagtccgccctgactctcccagcctgaagcctgctcgccctcgggtgtccgg gctgggcacagcgcgcagcgtccccctggagaggagaggtcggccggcacctcccaggacaggcccaagtgggagtg

ggaccctcctaccttctgcagcctcggccccgcggggtggggggttgggagagatgaaaggaggtgaccgatcccga
accatgcctctccattaaccagggccccgcagccccgccccccccagacatcgaggagccggggaggtgtgaacg
gcctcctttgtgcctctgaatcgaaggcaattaggcgctgcttatctgggcattagccgtgtatgcaaaccgggctc
ccgccccctcctcctgggcttataaacgccgcccgcctggcgaggccccgaggtggatcctgcgcctggccagccccgc
ctggccttccctccggccccacctggccgcc3'

[0015] 在第三个方面,本发明的特征在于一种降低个体炎症细胞(如巨噬细胞)水平或活性的方法。所述方法包括向需要的个体施用有效量的多肽的抑制剂,所述多肽包含序列 SEQ ID NO :1。

[0016] 在第四个方面,本发明的特征在于一种通过向需要的个体施用有效量的多肽的抑制剂来降低个体体内前炎性细胞因子水平的方法,所述多肽包含序列 SEQ ID NO :1。细胞因子的例子包括 TNF- α , IL-1 β , 和 IL6。

[0017] 在第五个方面,本发明的特征在于一种治疗患有免疫系统疾病或者处于免疫系统疾病风险中的患者的方法。所述方法包括向需要的个体施用有效量的多肽的抑制剂,所述多肽包含序列 SEQ ID NO :1。免疫系统疾病可以是炎症或自身免疫性疾病,例如 ARDS。在一个实施方案中,个体患有或者疑似患有流行性感冒。

[0018] 在上述的方法中,抑制剂的例子包括抗体(如导致细胞生长的抗体,包括 anti-CD3),反义核酸,RNAi 制剂,以及其他的大分子或小分子化合物和自然发生的化合物,它们都靶向于 Hom-1。RNAi 制剂可以具有核酸序列 SEQ ID NO :4,6,7,或 8。小分子化合物的例子包括泼尼松,依木兰,甲氨喋呤,骁悉,和离子霉素。大分子的例子包括 PHA。在一个实施方式中,每种方法进一步包括在施用之前或之后,确定从该个体获得的样品中 Hom-1 的表达水平或活性,以确认 Hom-1 被抑制。

[0019] 在第六个方面,本发明的特征在于一种提高个体体内炎症细胞(例如巨噬细胞)水平或活性的方法。该方法包括向需要的个体施用有效量的包含序列 SEQ ID NO :1 或 5 的多肽,或其功能等同物,或编码多肽的核酸,或 Hom-1 的激活剂。激活剂的例子包括 5-FU, DOX,放射,视黄酸,GM-CSF-IL4,白藜芦醇,鞣花酸,阿司匹林,水杨酸,大黄素和黄酮类化合物以及能够诱导 Hom-1 表达的这些物质的衍生物。在一个实施方案中,该方法进一步包括在施用之前或之后,确定从该个体获得的样品中 Hom-1 的表达水平或活性,以确认 Hom-1 被催生。

[0020] 功能等同物是指与一个常见多肽相似或者就是常见多肽衍生物的多肽,例如,具有一个或多个点突变,插入,缺失,切断,融合蛋白或其组合的蛋白,大体上保留了常见多肽的能力,例如与 LEF1/TCF 的结合。在一个实施方式中,该多肽缺失一个 LEF1/TCF 反式激活结构域。细胞增生症可以是一个以 LEF1/TCF 介导的转录的异常激活为特征的病症。LEF1/TCF 介导的转录的异常激活是指这样一种细胞状态,即以下面的实施例描述的方法或其它类似的方法检测时,LEF1/TCF 介导的转录异常地高。SEQ ID NO :5 的功能等同物的例子包括非洲爪蟾(如 Xom)、黑猩猩和猕猴的同源异型域。这些同源异型域序列列举在图 1 中。一般地,它们与 SEQ ID NO :5 至少有 30% (例如 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, or 95%) 的同一性。例如, Hom-1 的同源异型域与 Xom 的氨基酸序列有 68% 的同一性和 85% 阳性(类似)。

[0021] 在第七个方面,上述的核酸可以用于诊断免疫系统疾病的方法中,包括 (1) 细胞

增殖性病症 / 癌症和 (2) 炎症或自身免疫疾病。细胞增殖性病症的例子包括急性淋巴细胞白血病 (ALL), 慢性淋巴细胞白血病 (CLL), 和急性粒细胞白血病 (AML)。炎症或自身免疫疾病的例子包括骨髓增生异常综合征 (MDS), 系统性红斑狼疮 (SLE), 炎症性肠病 (IBD), 类风湿性关节炎 (RA), 和移植排斥反应。该方法包括从个体中获得生物样本; 确定样本中编码含有 SEQ ID NO :1 的多肽的基因表达水平。如果表达水平低于第一个预定的水平, 或没有表达, 则可确定个体患有或者易于患上细胞增殖性病症 / 癌症 (ALL, CLL, 和 AML)。如果表达水平高于第二个预定的水平, 则可确定个体患有或者易于患上炎症或自身免疫疾病。这样的预定水平能够从正常对照个体中获得。

[0022] 在第八个方面, 本发明的特征在于控制患者治疗的方法。该方法包括确认患者处于或者需要一个病症治疗, 从该患者获取生物样本, 确定样本中编码含有 SEQ ID NO :1 的多肽的基因表达水平。如果表达水平达到或超过预定值, 则可确定患者适合于治疗。相反, 如果表达水平低于预定值, 该患者则不应接受治疗。该方法可以进一步包括将表达水平与患者或医生或患者的照看者进行沟通。在一个实施方式中, 该病症是细胞增殖性病症, 或免疫系统疾病, 例如上面提到的 ALL, CLL, AML, 和 MDS。

[0023] 对于 ALL, CLL, AML, MDS, 它们中 Hom-1 的表达水平是低于预定值的, Hom-1 可以作为指导选择有效治疗策略的标志; 对于移植患者, Hom-1 可以用于确保免疫抑制剂的足量使用; 对于自身免疫疾病, 例如 SLE, Hom-1 可以用于监测免疫抑制剂的使用。举个例子, 如果使用免疫抑制剂使 Hom-1 的表达水平降低到了所述的值, 则表明需要停止使用免疫抑制剂以避免淋巴组织增生性疾病, 如淋巴瘤。

[0024] 在第九个方面, 本发明的特征在于用于诊断上面所述的病症或控制患者的治疗的试剂盒。该试剂盒包括一个或多个选自于以下组的试剂, 所述组包括: 具有序列 SEQ ID NO :1 的多肽的特异性抗体, 具有序列 SEQ ID NO :1 的多肽, 扩增 SEQ ID NO :2 或 3 片段的 PCR 引物对, 以及在严格的条件能与参考核酸的互补链杂交的核酸, 所述参考核酸包含 SEQ ID NO :2, 3, 或 5。

[0025] 严格杂交条件可由本领域技术人员适当地选择, 例如, 低严格条件可以被给定。低严格条件是, 例如, 42°C, 2x SSC, 和 0.1% SDS, 优选地, 50°C, 2x SSC, 和 0.1% SDS。高严格条件更优选和包括, 例如, 65°C, 2x SSC, 和 0.1% SDS。然而, 除了温度外, 其它的多个因素, 例如盐浓度也会影响杂交的严格性, 本领域技术人员能够合适地选择这些因素来达到类似的严格性。

[0026] 本发明的一个或多个具体实施方式的详情列在附图和下面的描述中。根据描述、图片和权利要求, 本发明的其它的特征, 目的和优点将是显而易见的。

附图说明

[0027] 图 1A 和图 1B 是 Xom 与 Hom-1 同源异型区域的氨基酸序列比对 (图 1A) 和 Hom-1, 预测的黑猩猩和猴的 Hom-1 的同源物的氨基酸序列比对, 这表明 Hom-1 序列在灵长目动物中是保守的 (图 1B)。

[0028] 图 2A 和 2B 是 Hom-1 和它的缺失突变以及它们在体内与 TCF4 的相互作用的示意图, 该相互作用通过免疫共沉淀 western 印记分析 (图 2A) 利显示 Hom-1 与 TCF4 在 HCT116 细胞中共定位的照片 (图 2B) 确定。

[0029] 图 3A-3D 是显示下述结果的示意图:(A) 由台盼蓝染色(图 3A,左栏),MTS 分析(图 3A,中间栏),和 ^3H -胸腺嘧啶掺入法(图 3A,右栏)确定的细胞活力;(B) 用 Hom-1 shRNA 使 Hom-1 的表达下调(图 3B);(C) Hom-1 的下调对于 Na1m16 增殖的影响,通过 MTT 分析(图 3C,上栏)和细胞活力计数(图 3C,下栏)进行测定;(D) Hom-1 的下调导致 cyclin D1 表达的升高,用 tubulin 的表达水平作为内参(图 3D)。

[0030] 图 4A-4D 是照片或图表(图 4C,右栏),显示了下述结果:(A) 成体组织中的 Hom-1 组织表达图谱,使用 RT-PCR, GAPDH 作为内参;(B) 线性分析显示 Hom-1 主要在骨髓和淋巴系来源的细胞中表达,包括单核细胞, T 细胞, B 细胞和中性粒细胞;(C) B 细胞发育中 Hom-1 的表达增高;(D) Hom-1 表达研究显示,除了 Na1m16, Hom-1 在大多数来源于 B 细胞恶性肿瘤的肿瘤细胞中并不表达。

[0031] 图 5A 和 5B 是 (A) 照片显示了在新诊断的十个 CLL 患者中获得的外周血样本中, Hom-1 的表达显著降低(图 5A) 和 (B) 图表显示在淋巴细胞白血病中, Hom-1 的下调与相应的 cyclin D1 的表达上升相关,使用 GAPDH 作为内参(图 5A)。

[0032] 图 6A-6B 的图表(图 6A 和 6C) 以及照片(图 6B 和 6D) 显示:(A) 用编码 GFP 或 GFP-Hom-1 的构建体转染野生型和 p53 敲除型 HCT116 细胞的转染率(图 6A);(B) Hom-1 对于荷瘤裸鼠(图 6B) 和肿瘤体积(图 6C) 的影响,其中在 Hom-1 转染的 p53 野生型和 KO 型细胞系中,肿瘤的生长被显著抑制。(数值是均值 \pm SD, 每组中 $n = 5$, * $P < 0.01$, v. s 载体转染细胞);(C) 使用 TUNEL 染色来测定异种移植物肿瘤组织中的细胞凋亡(图 6D)。

具体实施方式

[0033] 本发明基于,至少部分基于,一个预料之外的发现,即 Hom-1 或它的抑制剂能够用于治疗或诊断各种各样的免疫系统疾病。

[0034] 如这里所描述的, Hom-1 是一个 LET/TCF 相关的因子,其通过破坏 beta- 连环蛋白 /LEF/TCF 复合物的形成来抑制典型 Wnt/beta- 连环蛋白信号。功能获得和功能丧失的方法将 Hom-1 定义为一种细胞生长负调节因子。Hom-1 在正常造血细胞中是高表达的(并且在造血细胞成熟的过程中 Hom-1 的表达是被上调的),但是在人类淋巴细胞白血病和在被 EBV 感染的外周 B 淋巴细胞的永生中,它的表达量显著降低。Hom-1 表达的改变与相应的 Wnt/beta- 连环蛋白 /LEF/TCF 靶向癌基因的改变有关,例如 cyclin D1, 这表明 Hom-1 在各种免疫疾病和血液系统恶性肿瘤的发病机制中起作用。相应地,本发明的特征在于治疗或诊断这些疾病的材料和方法。

[0035] 举个例子,包含编码 Hom-1 抑制剂的核酸序列的多聚核酸能够用于治疗炎症相关的疾病,例如 ARDS。该抑制剂可以用作免疫抑制剂。核酸序列可以编码一个靶向 Hom-1 并抑制其表达或活性的小干扰 RNA(例如 RNAi 制剂)。

[0036] 核酸是指 DNA 分子(例如 cDNA 或基因组 DNA), RNA 分子(例如 mRNA), 或 DNA 或 RNA 类似物。DNA 或 RNA 类似物可以由核苷酸类似物合成得到。核酸分子可以是单链或双链,但优选双链 DNA。“分离的核酸”是指结构与天然发生的核酸或天然发生的基因组核酸片段不同的这样一种核酸。因此,该术语涵盖了,例如, (a) 具有天然发生的基因组 DNA 分子的部分序列,但是其两侧并不是编码序列,而该编码序列在天然发生的有机体的基因组中是位于所述分子部分的两侧的;(b) 整合进载体或原核或真核细胞基因组中的核酸,以

至于得到的分子与天然发生的载体或基因组 DNA 不同；(c) 一个单独的分子，如 cDNA，基因组片段，由聚合酶链式反应 (PCR) 产生的片段，或限制性片段；以及 (d) 一个重组核苷酸序列，该序列是混合基因的一部分，例如，编码融合蛋白的基因。

[0037] 术语“RNAi 制剂”是指一个具有与靶标 RNA 有足够互补序列或能够引导 RNA 干扰的 RNA (或其类似物)。例子包括能够用于制备 RNA 的 DNA。RNA 干扰 (RNAi) 是指下调靶标分子 (例如目的基因，蛋白或 RNA) 的序列特异性或选择性过程。通常，干扰 RNA (“iRNA”) 是一个双链短干扰 RNA (siRNA)，短发夹 RNA (shRNA)，或单链小 RNA (miRNA)，它们能够导致特异 mRNA 催化降解，也能用于降低或抑制基因表达。

[0038] 因此，使用 RNAi 降解 RNA 分子 (例如在细胞内) 同样也落入本发明的范围之内。降解过程由具有酶活的 RNA- 诱导的沉默复合物 (RISC) 进行催化。具有“与靶标 RNA 有足够互补序列，例如 Hom-1，来诱导 RNAi”的 RNA 制剂的意思是 RNA 制剂具有能够足够诱发靶 RNA 损坏的序列，该破坏是通过 RNAi 机制 (例如 RISC 复合物) 或过程实现。具有“与靶标 RNA 有足够互补序列来诱导 RNAi”的 RNA 制剂的意思还有 RNA 制剂具有能够足够诱发靶 RNA 翻译抑制的序列，该抑制是通过 RNAi 机制或过程实现。RNA 制剂还具有与靶 DNA 序列编码的 RNA 充分互补的序列，以致靶 DNA 序列在染色体上被沉默。换言之，RNA 制剂具有能够足够诱导转录基因沉默的序列，例如，下调靶 DNA 序列或其附近的基因表达，例如，通过诱导靶 DNA 序列或其附近的染色质结构发生改变。术语“RNA”或“RNA 分子”或“核糖核酸分子”是指核糖核苷酸的聚合物。术语“DNA”或“DNA 分子”或“脱氧核糖核酸分子”是指脱氧核糖核苷酸聚合物。DNA 和 RNA 可以通过天然合成 (例如，分别通过 DNA 复制或 DNA 转录)。RNA 可以进行转录后修饰。DNA 和 RNA 也可以通过化学合成。DNA 和 RNA 可以是单链 (例如，分别是 ssRNA 和 ssDNA) 或多链 (例如，双链，比如说分别是 dsRNA 和 dsDNA)。

[0039] 上面所提及的多聚核苷酸可以通过本领域已知的聚合物，生物可降解的微粒或微囊递送系统进行递送。另外的可以实施吸收多聚核苷酸的方法是使用脂质体，该脂质体可由常规方法制备。多聚核苷酸可以单独整合进这些递送载体中或者与组织特异性抗体一起整合。此外，可以制备由质粒或其它载体组成的分子偶联物，所述质粒或载体通过静电或共价力与多聚 L- 赖氨酸相连。多聚 L- 赖氨酸与能够结合靶细胞受体的配体相结合 (Cristiano, et al., 1995, J. Mol. Med. 73 :479)。另外，组织特异性靶向可以通过使用本领域已知的组织特异性转录调节元件来实现。向肌肉，皮内，或皮下部位递送裸 DNA (就是，没有递送载体) 是实现体内表达所使用的其它方法。

[0040] 在上面所提及的多聚核苷酸中，例如，表达载体，编码 Hom-1 抑制剂的核酸序列可操作地和一个启动子或增强子 - 启动子组合相连接。合适的表达载体包括质粒和病毒载体例如疱疹病毒，逆转录病毒，牛痘病毒，减毒痘苗病毒，金丝雀痘病毒，腺病毒和腺相关病毒。

[0041] siRNA, miRNA 和 asRNA (反义 RNA) 分子可以通过本领域已知的方法进行设计。具有足够同源性，以便于为特异性降解任何 RNA 提供序列特异性的 siRNA, miRNA 和 asRNA 分子可以通过本领域中已知的程序进行设计，包括保留在 Ambion, Inc. 和 Dharmacon, Inc 网站上的那些程序。为优化 siRNA, miRNA 和 asRNA 序列的一些设计物种的系统测试可由本领域技术人员通过常规手段进行。当设计短干扰核酸分子时，所需要考虑的因素包括生物物理，热力学，和结构因素，正义链中特定位置的碱基偏好以及同源性。这些考虑因素是本领

域中众所周知的,能为设计本申请所描述的,例如用于鼻腔内递送至肺部的上述 RNA 分子提供指导。

[0042] 在一个方面,上述的制剂或包含该制剂的组合物能够用于治疗个体的炎症-相关的疾病。炎性或炎症相关疾病以局部或全身性,急性或慢性炎症为特征。例子包括炎症性皮肤病(例如,皮炎,湿疹,过敏性皮炎,过敏性接触性皮炎,荨麻疹,皮肤坏死性血管炎,血管炎,过敏性血管炎,嗜酸性肌炎,皮炎,多发性肌炎,和嗜酸性筋膜炎),炎症性肠病(例如,克罗恩病和溃疡性结肠炎),急性呼吸窘迫综合征,重型肝炎,胰腺炎,过敏肺疾病(例如,过敏性肺炎,嗜酸性粒细胞性肺炎,迟发型超敏反应,间质性肺疾病或 ILD,特发性肺纤维化,和 ILD 相关的类风湿关节炎),哮喘,过敏性鼻炎。例子还包括自身免疫性疾病(例如,银屑病性关节炎,牛皮癣关节炎,系统性红斑狼疮,重症肌无力,幼年型糖尿病,肾小球肾炎,自身免疫甲状腺炎,强直性脊柱炎,系统性硬化症,多发性硬化症),急性和慢性炎症性疾病(例如,全身过敏或超敏反应,药物过敏,昆虫叮咬过敏,移植排斥反应,移植抗宿主疾病),干燥综合征,人类免疫缺陷和病毒感染。

[0043] 在另一个方面,Hom-1 的超表达和它的激活剂能够用于增强免疫力,以治疗细胞增殖类疾病,例如癌症(如脑,乳腺,前列腺,结肠,肾,卵巢,甲状腺,肺,和造血细胞癌症),和肿瘤转移。

[0044] “个体”指的是人类或非人类的动物。非人类动物的例子包括所有的脊椎动物,例如,哺乳动物,如非人灵长类(特别是高等灵长类),狗,老鼠(例如,小鼠或大鼠),豚鼠,猫,和非哺乳动物,如鸟类,两栖动物,爬行动物等。在一个优选具体实施例中,个体是人类。在另外一个具体实施方式中,个体是实验动物或适合作疾病模型动物。“治疗”或“治愈”是指向一个患有疾病的个体(例如 ARDS 或类似的呼吸道和肺部疾病)施用化合物或制剂,旨在治愈,缓解,缓和,治疗,推迟,或减轻疾病,疾病症状,疾病继发病症,或对疾病的易感性。“治疗有效量”是指能够在治疗的个体中,例如前面所描述的,可以产生想要的医疗效果的化合物的量。该治疗方法可以在体内或体外实施,单独或者与其它的药物或治疗方法联合使用。

[0045] 本发明的组合物可以通过肠胃外,口腔,鼻腔,直肠给药,局部,或向颊进行施用。这里所使用的术语“肠胃外”指的是皮下,皮内,静脉,肌肉,关节,动脉,滑膜,胸骨内,鞘内,损伤区,或颅内注射,以及任何合适的输液技术。

[0046] 在一个具体实施方式中,上述的组合物可以用于治疗 ARDS,以及类似或相关的呼吸道/肺部疾病。例子包括呼吸道或肺部感染,所述感染指的是任何细菌,病毒,真菌或寄生虫感染呼吸系统的任何部位。

[0047] 核酸分子可以以任何的水性载体、颗粒或溶液进行制备,以便于提供药学上适合于体内施用的组合物。制备液体溶液的方法对于本领域常规技术人员来说是已知的。优选地,液体溶液是水,生理学可接受液体溶液包含盐和/或缓冲液,例如磷酸盐缓冲液(PBS),或其它任何可接受的施用于动物或人类的液体溶液/表面活性剂。此类溶液对于本领域技术人员来说是已知的,包括,但不限于蒸馏水,去离子水,纯水或超纯水,盐水, PBS,以及包含常用缓冲液的溶液,该缓冲液与核酸是相容的。该组合物还可以包含氯化钠和葡萄糖或甘露醇,以使溶液等渗化。该组合物可以包含合适的辅助组分例如 pH,渗透压和张力调节剂。

[0048] 对于通过上呼吸道的施用来说,该组合物被制备成一种溶液,例如,水或等渗盐水,缓冲或无缓冲,或作为悬浮液,在鼻腔施用时的浓度作为滴液或作为喷雾。优选地,该溶液或悬浮液相对于鼻腔分泌物是等渗的,具有差不多相同的 pH,其范围,例如从 pH4.0 至 7.4,或者从 pH6.0 至 7.0。缓冲液应该是生理学上相容的,包括,简单举例,磷酸缓冲液。例如,一个代表性的鼻解充血剂被描述为缓冲到 pH 值约为 6.2 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Ed. Arthur Osol, page 1445 (1980))。本领域技术人员能够很容易为用于鼻腔和 / 或上呼吸施用的无害水溶液确定一个合适的盐含量和 pH 值。其它合适的水性载体包括,但不限于 Ringer's 溶液和等渗氯化钠。水性悬浮液可以包括悬浮剂例如纤维素衍生物,海藻酸钠,聚乙烯吡咯烷酮和黄蓍胶,和润湿剂,如卵磷脂。合适的防腐剂包括乙基和 N-羟基苯水悬浮液。

[0049] 该组合物可以包括微量的本领域已知的聚合物,表面活性剂,或其它辅料。在该内容中,“微量”指的是没有可能影响或调节肺部细胞吸收核酸的辅助制剂或物质存在。

[0050] 可以为一个特定的治疗应用选择气雾剂剂量,配方和运载系统,如例如在 Gonda, 治疗药物运载系统中的关键评论, 6:273-313, 1990 中的描述。这里所使用的术语气雾剂是指任何一种细水雾粒子的制备,可以以溶液或悬浮液形式,无论它是否使用推进剂来产生。气雾剂可以用常规技术来生产,例如超声或高压处理。

[0051] 该剂型可以以水性溶液进行施用,所述水性溶液用于呼吸系统施用在药学上是可接受的。体积大于 $5\mu\text{m}$ 的颗粒在鼻腔内沉积。 2 至 $10\mu\text{m}$ 的颗粒保留在肺里面,而小于 $1\mu\text{m}$ 的颗粒则被呼出。在优选实施方式中,化合物是通过吸入诸如液体颗粒和 / 或固体颗粒的形式来施用。合适的例子包括,但不限于,气雾剂,喷雾剂,雾,雾化样本和液滴。能够用于向人体施用的典型设备包括计量剂量吸入器 (MDI),雾化器,和滴注技术。该剂型根据一个或多个肺部疾病的症状或表现,以治疗,预防或诊断有效量施用。据信,核酸分子也可以作为干粉,通过使用干粉吸入器进行施用,其中颗粒会溶解在肺的分泌物中。能够向患者的呼吸道施用颗粒的各种合适的装置和吸入方法在本领域中是已知的。雾化器能够从溶液或悬浮液中产生可被病人吸入的细雾。例如,见美国专利号 5709202。

[0052] 组合物优选以一种能够递送有效剂量核酸的剂型动力学类型进行递送。正如常规使用,本发明的核酸的“有效量”是这样的量,与对应的没有接受化合物或治疗制剂的个体相比,在施用过化合物或治疗剂的个体中,它能够治疗肺部疾病一个或多个症状,扭转肺部疾病一个或多个症状的发展,终止肺部疾病的一个或多个症状的发展,预防肺部疾病一个或多个症状发生,降低疾病的表现或诊断肺部疾病的一个或多个症状。根据使用的具体药物或其组合,特定组合物剂型,施用的方式,年龄,体重,患者的情况,以及所治疗的症状的严重程度,药物实际有效量可以不同。一个特定患者的剂量可以由本领域普通技术人员根据常规方法来确定,(例如,通过合适的、常规的药理操作指南)。在一个具体实施例中,组合物以每 20g 体重 3 至 $400\mu\text{g}$ 的剂量进行递送,上限剂量是每 20g 体重 1g。在一个优选实施例中,组合物以每 20g 体重 50 至 $100\mu\text{g}$ 的剂量进行递送。在另一个优选实施方式中,组合物以每公斤体重 150nM 的剂量进行递送。

[0053] 上述制剂中的一种或多种可以向动物(例如,人类)进行施用来调节 Hom-1 或其同源物的表达或活性。例如,医生可能在刚开始会规定一个相对低的剂量,随后增加剂量直至获得一个合适的响应。此外,据了解,对于任何一个特定个体,其特别剂量水平取决于许

多因素,包括所使用的特定化合物的活性,年龄,体重,总的健康状况,性别,个体的饮食,施用的时间,施用的方式,排泄率,任何药物的组合,以及将要调节的表达或活性的程度。

[0054] 治疗的效果可以通过测量靶基因 mRNA 的量(例如,用实时 PCR)或由靶基因 mRNA 编码的多肽的量(Western 印记分析)来进行监测。正如本领域所公知的,患者的剂量取决于如上所述的许多因素。虽然剂量是不同的,但施用多聚核苷酸的优选剂量是约 10^6 至 10^{12} 个拷贝属的多聚核苷酸分子。如果需要,该剂量可被重复施用。施用的方式可以是上面所列举的任何一种。

[0055] 本发明的特征还是一种诊断方法。基于来自于个体的检测样本中的 Hom 多肽(例如,抗体)或编码该多肽的核酸(例如,基因组 DNA 或 mRNA)的缺失,可以检测该个体中的肿瘤细胞或倾向于肿瘤化的细胞。换言之,该多肽和核酸可以作为指示肿瘤细胞存在与否的标记。本发明的诊断和预后分析包括评估 Hom 多肽或核酸的表达水平的方法,以及确定 Hom 多肽或核酸序列中的变异和突变的方法。

[0056] Hom 多肽或核酸在检测样本中的存在与否,其水平,可以通过从待测个体中获得检测样本,并将该检测样本与能够检测 Hom 多肽或核酸(例如 mRNA 或基因组 DNA 探针)的化合物或制剂相接触来进行评估。“检测样本”包括从个体中分离出来的组织,细胞和生物学液体,以及存在于个体体内的组织,细胞和液体。Hom 基因的表达水平可以通过许多方法进行测定,包括测量由 Hom 基因编码的 mRNA;测量由 Hom 基因编码的多肽的量;或者测量由 Hom 基因编码的多肽的活性。

[0057] 细胞中相对于 Hom 基因的 mRNA 的水平可以通过原位或体外形式进行确定。从检测样本中分离的信使 RNA 能够用于杂交或扩增分析,包括 Southern 或 Northern 分析,PCR 分析和探针阵列。一个优选的检测 mRNA 水平的诊断方法涉及将分离的 mRNA 与核酸探针接触,该探针能够与 Hom 基因编码的 mRNA 杂交。探针可以是全长的 Hom 核酸,例如 SEQ ID NO:2 或 3 或部分的核酸,例如至少 10 个核苷酸长,并且足够在严格条件下与 Hom mRNA 或基因组 DNA 特异性杂交的寡聚核苷酸。

[0058] 在一个形式中,mRNA(或由其制备的 cDNA)被固定在一个表面上,与探针进行接触,例如,通过使分离的 mRNA 在琼脂糖凝胶上跑胶,并将 mRNA 从凝胶中转移到膜上,例如硝化纤维膜。在另外一个形式中,探针被固定在表面上,mRNA(或 cDNA)与探针进行接触,例如,在基因芯片阵列中。本领域技术人员能够适用已知的 mRNA 检测方法去检测 Hom mRNA 的水平。

[0059] 由 Hom 基因编码的 mRNA(或由其制备的 cDNA)在样本中的水平可以利用核酸扩增来进行评估,例如通过标准 PCR(美国专利号 4,683,202),RT-PCR(Bustin S. J Mol Endocrinol. 25 :169-93,2000),定量 PCR(Ong Y. et al., Hematology. 7 :59-67,2002),实时 PCR(Ginzinger D. Exp Hematol. 30 :503-12,2002),以及原位 PCR(Thaker V. Methods Mol Biol. 115 :379-402,1999),或其它任何的核酸扩增方法,之后利用本领域中已知的技术检测扩增后的分子。正如在这里使用的,扩增引物被定义为能够与基因的 5' 或 3' 区域(分别是正链和负链,或反过来)退火,并且它们之间包含一小段区域的核酸分子对。在合适的条件下,和合适的制剂一起,该引物允许扩增具有核酸序列的核酸分子,该核酸序列的两端是引物序列。

[0060] 对于原位技术,细胞或组织样本将被制备和固定在一个支持物上,例如玻璃片,然

后与能够与染色体上的基因组 DNA 或编码 Hom 多肽的 mRNA 杂交的探针进行接触。

[0061] 在另一个实施例中,本发明的方法进一步包括将一个对照样本与能够检测 HommRNA,或基因组 DNA 的化合物或制剂进行接触,然后将检测样本中的 HommRNA 或基因组 DNA 的存在与对照样本中的进行对比。

[0062] 上述的基于核酸的诊断方法可以提供定性和定量的信息来确定一个个体患有或倾向患有与 Hom 基因异常表达相关的疾病,例如,癌症。

[0063] 有许多方法可以用于确定 Hom 多肽的水平。一般说来,这些方法包括接触一种选择性结合该多肽的制剂,例如抗体,来评估样本中的多肽的水平。抗体可以是多克隆抗体,或者更优选的,单克隆抗体。一个完整的抗体,或者其片段(例如, Fab or F(ab')₂)也可以使用。在一个优选实施方式中,该抗体具有一个可检测的标记。术语“标记的”,对于探针或抗体来说,是希望包括通过将可检测的物质与探针或抗体物理连接来完成的探针或抗体的直接标记,以及通过与可检测物质反应的探针或抗体的间接标记。例如,具有兔 Fc 区域的抗体可以使用针对兔 Fc 区域结合的二抗来进行间接标记,其中的二抗与可检测物质相偶联。这里提供一些可检测物质的例子。合适的可检测物质或标记包括放射性同位素(例如,¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³H, or ³²P),酶(例如,碱性磷酸酶,辣根过氧化物酶,荧光素酶,或 β-半乳糖苷酶),荧光基团或蛋白质(例如,荧光素,罗丹明,藻红蛋白, GFP 或 BFP),或发光基团(例如, Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA 提供的 Qdot™ 纳米粒子)。

[0064] 检测方法可以用来检测体外和体内生物样本中的 Hom 多肽。体外检测 Hom 多肽的技术包括 ELISAs,免疫沉淀,免疫荧光, EIA, RIA, 以及 Western 印记分析。体内检测 Hom 多肽的技术包括向个体引入一个标记的抗-Hom 抗体。例如,抗体能够用如上所述的可检测物质进行标记。个体中可检测物质的存在和位置可使用标准成像技术来进行检测。

[0065] 这里描述的诊断方法能够鉴定患有或者有风险发生与异常 Hom 表达或活性相关的疾病或病症的个体。正如这里所描述的,此类疾病或病症的例子包括 ALL, CLL, AML, 和 MDS。

[0066] 这里描述的预后方法可以用于确定某个个体是否适合于施用某个制剂(例如激动剂,拮抗剂,多肽模拟物,蛋白质,肽,核酸,小分子,或其它候选药物)来治疗疾病,例如癌症(如 ALL, CLL, 和 AML)。举个例子,该分析可以用于确定某个个体能否施用细胞毒性药物来治疗细胞增殖性病症,或能否施用免疫抑制剂来治疗免疫系统病症,包括那些涉及器官/组织移植的病症。

[0067] 因此,本发明的特征还在于一种控制个体癌症或免疫系统疾病治疗的方法。为了这个目的,在治疗之前,治疗中和治疗后,可以确定一个个体的检测样本中的 Hom 基因表达水平。治疗后 Hom 表达水平的升高指示该个体可以用同样的方法进行进一步治疗。举个例子,接受了器官或组织移植的患者通常要面对器官或组织排斥的问题。也就是说,身体对于器官或组织的免疫响应,会导致移植的失败。为了解决这个问题,器官或组织移植通常伴随着非特异性免疫抑制治疗以防止 T 细胞介导的排斥反应。尽管如此,这些免疫抑制剂会导致感染,高血压,癌症,和其他不良副作用。因此,需要对抑制进行监测。在这方面, Hom-1 的表达水平可以作为合适的免疫抑制水平或程度的标记。本领域技术人员可以基于治疗过程中 Hom-1 表达的水平来调整免疫抑制剂的量 and 治疗的长短。

[0068] 从上述分析的实践中获得的信息对于预测,确定疾病和其它影响个人健康状况有

害条件的进展和临床管理是有用的。在优选实施方式中,上述诊断分析为预测,确定恶性肿瘤(癌症)的进展和管理提供了有用的信息,所述恶性肿瘤以的缺失或异常低水平的 Hom 表达为特征。该信息可以更具体地协助临床医生设计化疗或其它治疗方案来从受折磨的哺乳动物体内,例如人类,根除恶性肿瘤。

[0069] 下面的具体例子只是被视作说明,而不以任何方式作为其余的披露的限制。尽管没有进一步阐述,相信本领域技术人员根据这里的描述可以将本发明最大限度地利用。这里所引用的所有公开物的全部内容被作为参考文献引入。此外,以下提出的任何机制不以任何方式限制发明的范围。

[0070] 实施例 1 Hom-1, 一种 LET/TCF 相关的转录抑制子, 是一种肿瘤抑制物

[0071] LEF/TCFs 转录因子是经典 Wnt/beta- 连环蛋白信号通路的核转录调节子, 该信号通路对于早期胚胎发育中的细胞命运决定是很关键的, 并且其被暗示在各种癌症中是一个主要的致癌途径。LEF/TCFs 不具备内源转录活性, 但是却被相关因子密切控制。在 Wnt 信号的存在下, LEF/TCFs 与 beta- 连环蛋白组成复合物, 驱动 LEF/TCF 下游的基因表达, 包括得到确认的癌基因, 如 cyclin D1 和 C-myc。Xom(同样被称为 Vent-2, Xbr-1, 和 Vox) 是果蝇 homeobox 基因 Om1D 的脊椎动物同源基因。Xom 被确认为是 BMP4 的主要下游调节子, 也是腹信号中心的必要组分。与 beta- 连环蛋白相似, Xom 也是一个不稳定蛋白。我们检测了 Xom 对 LEF/TCF 介导的转录的影响, 确定 Xom 是一个新的 LEF/TCF 相关的转录因子。

[0072] 在此实施例中, 通过序列同源搜索, 分布数据和功能分析, 我们确定了一个新的转录子 Hom-1 作为人类 Xom 同源物的候选者。据发现, Hom-1 与之前已知的 VentX2 共享一个相同的 ORF, 但是在 VentX2 的已知序列之外它还包含一个 711bp 的 5' UTR。下面描述了对 Hom-1 实施进一步的分析。

[0073] 材料和方法

[0074] 启动子 - 荧光素酶分析

[0075] 为进行一个典型的启动子 - 荧光素酶分析实验, 在转染前 24 小时, 将 2×10^5 293T 细胞接种于 12 孔培养板中。将 1 微克编码目的基因的质粒与 0.3 μ g 荧光素酶 - 报告构建体用 3 μ l 脂质体转染试剂 (TRANSIT, Mirus) 进行混合, 根据产商操作指示转染进培养的细胞中。转染 48 小时后, 用 PBS 洗涤细胞, 用 $1 \times$ 细胞裂解缓冲液 (PROMEGA) 裂解细胞, 刮下细胞, 冰上收集。在桌上离心机上进行简短的旋转, 将 20 μ l 上清液与 100 μ l 荧光素酶分析试剂 (PROMEGA) 进行混合, 用 TR717 微板光度计 (APPLIED BIOSYSTEM) 测量荧光素酶的活性。

[0076] RNA 分离, RT-PCR 和实时 PCR

[0077] 用 TRIzol 方法提取总 RNA。在 1ml Trizol 中匀浆细胞 (1×10^6), 然后加入 200ml 氯仿。漩涡混匀之后, 12000rpm 下离心样本, 将上清液收集到新的管子中。向每个样本中加入异丙醇 (500ml), 混匀, 室温放置 30 分钟。在 4°C 下, 12000rpm 离心样本 30 分钟。收集沉淀, 用 70% ETOH 洗涤, 风干, 重悬于 20 μ l DEPC- 处理的 H₂O 中。通过测量 OD₂₆₀ 来确定 RNA 的终浓度。根据产商操作指南, 用 SuperSript 第一链合成系统 (INVITROGEN) 来合成第一链 cDNA。简言之, 每个样本中的 3 μ g 总 RNA 被用于 RT 反应, 1 μ g RT 产物用于 PCR 反应。GAPDH 用作内参。通过测序确定 PCR 产物的身份。使用 LightCycler 系统 (ROCHE) 和 LightCycler 快速启动 DNA Master SYBR Green I, 根据产商操作指南的指示来进行实时

PCR。基因表达的相对水平用该公式进行计算：相对基因表达 = $2^{-\Delta C_d}$ (ΔC_d = 特异基因的循环数 - 参考 GAPDH 基因的循环数)。

[0078] Hom-1 的剪接克隆和 5' cDNA 步行

[0079] 从包含 Hom-1 基因组序列的 BAC RP13 克隆中，用引物 F1：5' AATTGAATTCAATGCGCCTCTCCTCCTCC 3'，

[0080] R1：5' TTAATCTAGATCATCAAAATGCATCCCCCGTCTG 3' 通过 PCR 反应扩增 2.4kb 的 Hom-1 基因组 DNA。

[0081] 用 EcoRI 和 XbaI 消化 PCR 产物，并克隆进 CS2 载体中。用该质粒转染 293T 细胞。用 TriZol 方法提取转染后的细胞的总 RNA，使用 SuperScript 第一链合成系统 (INVITROGEN) 进行 RT 反应。使用引物 F1 和 R1 扩增 RT 产物，用 EcoRI 和 XbaI 进行消化，然后克隆进 CS2 载体中。

[0082] 为进行 5' cDNA 步行，使用从健康志愿者的外周白细胞中提取出来的总 RNA 来扩增第一链 cDNA。用正向引物扩增 5' 非翻译区，这些引物的起始位点位于 -100, -161, -291, -357, -471, -711, -843 (起始密码子 ATG 中的核苷酸“A”被定义为位点 0)。

[0083] 免疫荧光和免疫共沉淀

[0084] 为进行免疫荧光实验，用 TransIT (MIRUS) 将 GFP-Hom-1 和 Myc-TCF4 共转染进 HCT116 细胞。用抗 myc 抗体对 TCF4 进行染色，之后加入 Alexa 568 标记的羊抗鼠二抗 (INVITROGEN)。通过 DAPI 看见细胞核，影像用波士顿儿童医院的核心设施的共聚焦显微镜拍照。为进行免疫共沉淀，将 20 μ l 蛋白 A/G 琼脂糖珠子 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) 与 1 μ g 目的抗体混合以制备亲和蛋白 A/G 珠子。为了制备细胞裂解液，用包含 1 \times 蛋白酶抑制剂 (ROCHE) 的 1 \times 细胞裂解缓冲液 (PROMEGA) 裂解 2×10^6 细胞。细胞裂解液在冰上孵育 30 分钟，简短超声波冲击后，在 4 $^{\circ}$ C 下 12000xg 离心 5 分钟。加入 20 μ l 蛋白 A/G 珠子和 1 μ g 免疫前血清，4 $^{\circ}$ C 下 2 小时，对上清液进行进一步清理。简短的旋转之后，将上清液与 20 μ l 抗体标记的蛋白 A/G 珠子混合，4 $^{\circ}$ C 下过夜。用 PBS 0.2% NP40 洗涤珠子 4 次。加入 2x 样本缓冲液，95 $^{\circ}$ C 煮沸 5 分钟以释放结合蛋白，简短离心，使用如文中的特异性抗体进行 western 印记分析。小鼠抗 myc 抗体和羊抗 TCF4 抗体购自 Santa Cruz。

[0085] 细胞培养，细胞分离和 cDNA 阵列

[0086] 本实施例中使用的细胞包括 Nalm6 细胞，Nalm6 细胞，Reh 细胞，RS11 细胞，H 苏丹细胞，ALL 样本细胞，CLL 样本细胞，293T 细胞，Jurkat 细胞，Tal1 细胞，EBV 转换 B 细胞和来自于健康个体的配对 B 细胞，PC3 细胞，LnCap 细胞，MCF7 细胞，MDA 细胞，SK-N-AS 细胞，H1299 细胞，H460 细胞和 116 细胞。所有这些细胞系被保存在额外加有 10% FBS 和 1% 青霉素和链霉素的 RPMI1640 或 DMEM 中。健康个体来源的白细胞是从波士顿儿童医院的健康的匿名捐血者所丢弃的白细胞中分离得到的。人体材料的实验是根据布里格姆妇女医院的机构审查委员会所批准的准则进行实施的。

[0087] T 细胞，B 细胞，粒细胞和单核细胞都利用 CD3，CD19，CD15 和 CD14 抗体特异性标记 (MILTENYI BIOTEC) 的 MCAS 微珠，根据产商操作指南来进行分离。PrimeExpress II 人类正常组织 cDNA 板 (#10020) 购自 PRIMGEN。

[0088] 暂时转染和 Hom-1 shRNA 稳定细胞系的建立

[0089] 对于 HCT116 和 293T 细胞，所有的暂时转染都用脂质体 TransIT 试剂 (Mirus) 根据

产商操作指南来实施。对于 Reh 和 Na1m16 细胞,使用细胞系 Nucleofector 试剂盒 V(细胞),根据产商操作指南,用电穿孔实施暂时转染。Hom-1shRNA 质粒获自 Origene Technologies; 构建体 1:5' CAAATCTGCCT GCGCCG GAGAGGACCATG 3'; 构建体 3:5' TTCAGAATCGCCGCATGAA ACACAAACGG 3' (SEQ ID NO:4)。为了建立 Hom-1 降低表达的细胞系,用 Hom-1shRNA 转染细胞。转染后 48 小时,利用 500ng/ml 嘌呤霉素处理 4 周以选择 Hom-1 降低表达的细胞系。

[0090] 细胞活力分析,MTS 增殖分析,以及 ³H 胸腺嘧啶脱氧核苷掺入分析

[0091] 为进行 Hom-1 超表达实验,用编码 GFP-Hom1 或 GFP 的质粒转染细胞。转染后 24 小时,利用 FAC G4 分选细胞计数器 (BD BIOSCIENCE) 将 GFP 阳性细胞分选出来,接种于培养板中。

[0092] 为进行细胞活力分析实验,将 5x10⁵ 细胞以三个重复接种于 12 孔板中。在每个指示的时间点通过锥虫蓝染色来对活细胞进行计数 4 次。细胞活力用百分比来表示。为进行 MTS 增殖分析,将 1x10⁵ 细胞以三个重复接种于 96 孔板中。接种后 48 小时,使用细胞滴度 96 水性非放射性细胞增殖分析试剂盒 (PROMEGA),根据厂商操作指南来测量细胞增殖速度。为进行 ³H 胸腺嘧啶脱氧核苷掺入分析,1x10⁵ 分选的细胞以三个重复接种于 96 孔板中。接种后 48 小时,每个孔中加入 ³H 胸腺嘧啶脱氧核苷 (1.0U^{ci}/孔),再培养 18 小时。在 -70℃ 冷冻过夜以裂解细胞,转移到膜上,用 PBS 洗涤三次,使用 TopCount NXT 进行闪烁计数 (PACKARD BIOSCIENCE)。

[0093] CHIP 分析

[0094] HeLa 细胞于 6cm 培养皿中培养 24 小时,然后用编码 myc-Hom-1 或 myc-tag 的构建体进行转染。转染后 24 小时,使用分析试剂盒 (Upstate Cell Signaling),按照厂商操作指南实施染色质免疫沉淀 (ChIp)。Cyclin D1 启动子序列用特异性引物进行扩增:F5' -CGGACTACAGGGGAGTTTTGTTG-3' 和 R5' -TCCAGCATCCAGGTGGCGACGAT-3', 免疫球蛋白重链启动子启动子用特异性引物进行扩增:F5' -AACCCTTTTCCCCCTCGTCT-3' 和 R5' -AGCACTGTGAGGTGGCTGC-3'。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳来分析 PCR 产物。

[0095] 统计分析

[0096] 用 t 检验分析数据。p 值 < 0.05 的差异被认为是从统计意义上显著的。

[0097] 结果

[0098] Hom-1 是 Xom 的同源物

[0099] 为了确定 Xom 的人类同源物,我们利用 Xom 同源结构域 (HD) 的序列作为模板在 NCBI 蛋白质数据库中进行搜索。搜索所揭示的候选基因被认定为是 Hom-1 (之前被称为 Ventx2)。Hom-1 的开放阅读框编码 258 个氨基酸,而 Xom 则有 327 个氨基酸。如图 1A 中所示, Hom-1 的同源结构域与 Xom 具有 68% 的氨基酸序列同一性和 85% 阳性 (相似性)。Hom-1 包含一个 N 端丝氨酸 / 苏氨酸丰富区域 (aa 4-89), 一个同源结构域 (aa 91-151), 以及一个 C 端富含脯氨酸区域 (aa 151-258)。这与 Xom 类似,其也包括一个 N 端丝氨酸 / 苏氨酸丰富区域 (aa 31-154), 一个同源结构域 (aa 172-233), 以及一个 C 端富含脯氨酸区域 (aa 233-326)。

[0100] 利用 Vector NTI 蛋白质对比程序,我们发现,除了同源结构域, Hom-1 与 Xom 在碳末端区域和在氨基末端的起始部位约 10 个氨基酸区域具有很高的相似性。两个分子也具有一个与功能相关的不相对的 N 末端区域。比较基因组分析表明, Hom-1 在灵长类中是保

守的(图 1B),但是在其他物种中序列同源性已丢失。除了结构的相似性,CGAP(癌症基因组解析计划)的 EST 数据显示,Hom-1 的表达谱与 Xom 的分布类似,它们在成体组织中都表现非常有限的表达但却在胚胎组织中表达。

[0101] 为了进一步评估 Hom-1 的功能,使用 BAC RP13 作为模板,通过剪切克隆获得它的 cDNA。除了已知的序列,位于 Hom-1 第一个外显子上 711bp 的一个新的 5' 非翻译区通过 5' -cDNA 步行被确定出来。

[0102] Xom 是背部特异性基因 Gooseoid 的转录抑制子。为了确定 Hom-1 与 Xom 之间任何潜在的功能类似性,将编码 Hom-1 或 Xom 的 mRNA 与编码激活素和 Gsc- 荧光素酶报告构建体的 mRNA 一起,注射进两细胞阶段的非洲爪蟾的两个分裂球的一个之中。在阶段 10 的时候收集 5 个胚胎,用 PROMEGA 荧光素酶分析系统测量荧光素酶活性。

[0103] 发现 Hom-1 的表达抑制了激活素诱导的 Gsc- 启动子的表达,这与 Xom 对 Gsc- 启动子的抑制类似。这些结果与之前的发现是一致的,即 Hom-1/Ventx2 的表达抑制斑马鱼中的背部化。然而,如下图所示,Xom 通过其 N 末端区域使 LEF/TCF 介导的转录转活,这是 Xom 不同于 Hom-1 的地方。因此,可以下结论 Hom-1 是 Xom 的同源物但不是 Xom 的直系同源物。

[0104] Hom-1 与 Lef/Tcf 转录因子组或复合物

[0105] 检测了 Hom-1 与 LEF1/TCFs 是否有相互作用。Myc- 标记的 Hom-1 在 HCT116 细胞中短期表达, Hom-1 和 TCF4 之间潜在的相互作用通过免疫共沉淀而被确定。当抗 TCF4- 包裹的珠子应用于 HCT116 细胞提取物时, myc-Hom-1 很容易地与 TCF4 免疫共沉淀。还发现 Hom-1 与 TCF-4 以一种点状的方式共定位于转染细胞的细胞核中(图 2B)。为了确定 Hom-1 中的参与与 Lef/Tcf 因子相互作用的关键结构域,制备了 Hom-1 的一系列缺失突变体,检测它们与 TCF4 的亲合性(图 2A)。发现如果同源结构域和它周围的 50 个氨基酸区域从 Hom-1 中缺失,由此产生的突变体并不能与抗 -TCF4- 包裹珠子免疫共沉淀,这表明 Hom-1 的同源结构域和它周围的区域在 Hom-1 与 LEF1/TCF 因子的相互作用中起着关键的作用。

[0106] 考虑到 homeobox 区域是 Hom-1 的 DNA 结合域,用 20 μ g/ml 溴化乙锭(EtB)来排除在 Hom-1 与 TCF4 之间的相互作用中可能的核酸干扰。发现 EtB 并不会破坏 TCF4 和 Hom-1 的相互作用,这暗示着 Hom-1 与 TCF4 之前的相互作用并不依赖于它们与 DNA 的结合。

[0107] Hom-1 抑制 beta- 连环蛋白转活 Lef/Tcf 介导的转录

[0108] 使用 LET/TCF 报告 TOPflash 分析来确定 Hom-1 对于 LEF/TCF4 的 beta- 连环蛋白转活的影响。发现 Hom-1 单独并不能在 293T 细胞中激活 LEF1/TCF4 介导的转录。相反, Hom-1 以一种浓度依赖性的方式阻碍了 beta- 连环蛋白转活 Lef/Tcf 介导的转录。

[0109] 为了进一步确认 Hom-1 对于 beta- 连环蛋白信号通路的抑制效果,实施分析来检测 Hom-1 在 HCT116 细胞中对于 LEF/TCF 介导的转录的影响,该细胞组成型地表达高水平内源性 beta- 连环蛋白活性。这些结果显示, Hom-1 在 HCT116 细胞中是以一种浓度依赖性的方式抑制 LEF1/TCF 介导的转录,但是对于 beta- 连环蛋白的 mRNA 或蛋白的表达却没有施加显著的影响。

[0110] 为了探讨隐藏在 Hom-1 活性之下的不同的机制,检测了 Hom-1 是否破坏了 beta- 连环蛋白和 TCF4 复合体的形成,该复合体是 beta- 连环蛋白转活 LEF/TCF 靶基因所必需的。用 Myc-Hom-1 短期转染 HCT116 细胞以增加浓度。转染后 48 小时,收集 HCT116 细胞的裂解液,用特异性抗体免疫沉淀 TCF4。特异性的抗体被用于检测免疫复合物中的任何

Hom-1 和 beta-连环蛋白。据发现,随着免疫复合物中 Myc-Hom-1 水平的增高,免疫复合物中的 beta-连环蛋白表现出相应的下降,这表明, Hom-1 的表达破坏了 beta-连环蛋白 /TCF4 复合物的形成。

[0111] 因此,与那些 beta-连环蛋白 /LEF/TCF 信号中的诸如 Chibby 的 beta-连环蛋白相关抑制子的功能类似,阻止 beta-连环蛋白和 LEF/TCF 因子复合物的形成可以解释 Hom-1 对于 beta-连环蛋白转活 LEF/TCF 的抑制作用。

[0112] Hom-1 调节 beta-连环蛋白 /LEF1/TCF 下游基因的表达

[0113] 在该部分,实施分析来检测 Hom-1 对于内源性 LEF/TCF 靶基因表达的影响,例如 cyclin D1。

[0114] 首先,使用 CHIP 分析来检测 Hom-1 与 cyclin D1 启动子之间的相互作用。用编码 myc-Hom-1 和对照 myc- 标签的质粒暂时转染 HeLa 细胞,随后该细胞被用于 myc- 标签抗体的免疫共沉淀。用特异性引物扩增 Cyclin D1 启动子或作为阴性对照的 IgG 重链启动子 Cm μ 。发现 Hom-1 与 Cyclin D1 启动子特异性结合,但是不与对照 Cm μ 启动子结合。

[0115] 利用 cyclin D1 启动子-荧光素酶分析进一步检测 Hom-1 对于 Cyclin D1 的表达的影响。与 Hom-1 对 LEF/TCF 介导的转录一致,发现 Hom-1 在 HCT116 细胞中阻碍了 Cyclin D1 启动子-荧光素酶构建体的转活,这与其对于 TOPflash 报告构建体的效果类似。与 Hom-1 对于 cyclin D1 表达的抑制效果一致,western 印记分析显示 Hom-1 导致细胞内 cyclin D1 的水平发生浓度依赖型的降低。

[0116] Hom-1 是细胞增殖的负调控因子

[0117] 经典 Wnt/beta-连环蛋白 /LEF/TCF 通路被显示与恶性转化和细胞增殖有关系。在该部分,实施分析来评价 Hom-1 在细胞增殖中的作用。

[0118] 用 RT-PCR 检查 Hom-1 在衍生自单个的和造血系统恶性肿瘤的癌症细胞中的表达。确定了 Hom-1 只在 Na1m16 淋巴细胞性白血病细胞中,而不在其它癌症细胞中表达(见下文和图 4D)。

[0119] 为了确定 Hom-1 对于细胞增殖的影响,GFP-Hom-1 被暂时转染进 Reh 淋巴细胞白血病细胞中,该细胞并不表达内源性 Hom-1。阳性转染的细胞用 FACS 进行分选,通过细胞计数,MTT 代谢分析和 DNA 合成 ³H 胸腺嘧啶核苷掺入分析(图 3A)来确定 Hom-1 对于细胞增殖的影响。这些结果显示 Hom-1 表达强烈地抑制 Reh 细胞的增殖。Hom-1 对于其它癌症细胞的增殖也获得了类似的结果。

[0120] 为了进一步评估 Hom-1 对于细胞增殖的影响,用 shRNA 技术下调 Na1m16 细胞中的 Hom-1 表达。将四个 Hom-1shRNA 构建体转染进 Na1m16 细胞中。这些构建体对于下调 Hom-1 表达的有效性由 RT-PCR 确定,并使用实验室制备的特异性 Hom-1 抗体,由 western 印记分析进一步证实。发现构建体 3 对于 Hom-1 表达具有高特异性的活性,而构建体 1 却几乎不引起效果(图 3B)。随后,这些构建体被用来转染 Na1m16 细胞,通过嘌呤霉素抗性来选择阳性转染的细胞。这些 Hom-1shRNA 对内源性 Hom-1 表达的影响利用 RT-PCR 进行确认(图 3B,上栏)。Hom-1 在对照和 Hom-1shRNA 转染的细胞中的表达通过使用 Hom-1 特异性抗体进行免疫印记(图 3B,中栏),并通过密度测定法来定量测定(图 3B,下栏)。这些结果表明构建体 -3,而非构建体 -1,有效地降低了 Hom-1 在 Na1m16 细胞中的表达。

[0121] 利用细胞增殖分析和 MTT 分析进一步确定 Hom-1 对细胞增殖的影响。如图 3C 中

所示,构建体 3 对于 Hom-1 的下调与 Na1m16 的超增殖有关,但对照构建体或构建体 1 对于 Na1m16 的增殖不产生任何影响。上述结果显示, Hom-1 是细胞增殖的一个负调节因子。

[0122] 为了确定 Hom-1 对于细胞增殖的影响是否与 LEF/TCF 靶基因的表达有关,检测了 Hom-1 的下调对于 cyclin D1 表达的影响。与超表达的效果相反, Hom-1 的下调与 cyclin D1 在细胞中的水平增高有关(图 3D)。上述结果显示, Hom-1 至少部分通过抑制 beta- 连环蛋白 /LEF/TCF 信号和如 cyclin D1 的下游细胞周期调控子的表达来下调细胞增殖。

[0123] Hom-1 的表达在造血细胞中是被高度调控的,并且显示其与淋巴细胞白血病的癌变发生有关

[0124] 为了探讨 Hom-1 的生理作用,利用组织 cDNA 阵列和 RT-PCR 来显示其在成体组织的表达。发现全长 Hom-1 的表达被高度限制在外周血白细胞中(图 4A)。外周血白细胞谱系分析显示 Hom-1 在髓系和淋巴系中表达,包括单核细胞, B 细胞, T 细胞和中性白细胞(图 4B)。随着 B 细胞的成熟,它的表达随之增加(图 4C)。与 Hom-1 在外周 B 淋巴细胞中的生理表达相反,除了 Na1m16 细胞之外, Hom-1 在衍生自 B 细胞恶性肿瘤的癌症细胞中基本不表达(图 4D)。此外,对衍生于单个癌症的癌症细胞系的筛查揭示, Hom-1 并不在癌症细胞系中表达,包括 HCT116, SW480, HT29, HepG2, PC3, LnCap, He1a, H460, H1299, MCF7, MDA 和 SK-N-AS。LEF/TCF 因子已经被表明在 B 淋巴细胞发育和白血病发生中起着重要的作用。与 Hom-1 对 B 细胞恶性肿瘤发生的作用相一致,在 EBV 感染外周 B 细胞的永生中,全长 Hom-1 的表达水平被显著降低。

[0125] 为了进一步探讨 Hom-1 在 B 细胞恶性肿瘤发生中的作用,检测外周血样本中的全长 Hom-1 的表达,这些样本来自于新的诊断和未治疗过的急性淋巴细胞白血病(ALL)和慢性淋巴细胞白血病(CLL)的患者。所有 ALL 样本包含最少 95% 的 CD19⁺ 白细胞。这些血样中的总 RNA 水平的 RT-PCR 显示,在所有 7 个 ALL 和 10 个 CLL 样本中, Hom-1 的表达显著降低(图 5A)。还发现,在急性和慢性淋巴细胞白血病患者中的外周血中, Hom-1 表达下调与 cyclin D1 的表达升高有关(图 5B)。

[0126] 一些机制能够解释 Hom-1 的表达被高度调控。除了转录调控, Hom-1 的转录本包含一条长的具有 711 个碱基对的富含 GC 的 5' 非翻译区(5' UTR)。一个非典型的长 5' UTR 出现在大约 10% 的 mRNA 中,通常在能调控细胞生长和增殖的基因之前,例如 C-myc, HIF, 和 LEF/TCF。这条长的 5' UTR 能够形成一个二级结构,调控 Hom-1 的翻译启动。因此, Hom-1 的 5' UTR 很可能在 Hom-1 表达的翻译水平调控中起着关键的作用。

[0127] 上述结果显示, Hom-1 是一个肿瘤抑制子,作为,至少部分作为 LEF/TCF- 下游癌基因,如 cyclin D1, 表达的抑制子而起功能。这些结果还显示了 Hom-1 能够用于预测淋巴细胞白血病的临床行为,并且可作为鉴定能治疗各种病症,如癌症,的药物的靶标。

[0128] 实施例 2 Hom-1 在 p53 充分型和缺陷型癌症细胞中诱导细胞凋亡

[0129] 材料和方法

[0130] 细胞培养,转染,化疗

[0131] 人类大肠癌细胞系 HCT116, SW480, 人类肺癌细胞系 H460 和 H1299 获自于美国典型培养中心(Manassas, VA)。HCT116(p53^{-/-}) 细胞系是赠品。所有细胞系在 37°C 和 5% CO₂ 下培养。HCT116, HCT116(p53^{-/-}) 和 SW480 的细胞培养基包含 McCoy's 5A(INVITROGEN, Carlsbad, CA), 而 H460 和 H1299 的则包含 RPMI-1640(INVITROGEN)。细胞培养基中均加

入 10% 的胎牛血清 (HYCLONE, Logan, UT), 100 单位 /ml 青霉素, 100 μ 克 /ml 链霉素, 和 250ng/ml 的两性霉素 B (MEDIATECH, Hemdon, VA)。根据厂商操作说明, 用 Lipofectamine 2000 (INVITROGEN) 转染。本研究中使用的抗癌药物, 包括 5- 氟尿嘧啶 (5-FU, 50ug/ml) 和盐酸阿霉素 (DOX, 0.4ug/ml) 从 SIGMA (ST. Louis, MO) 购得。所有药物都溶解于 DMSO 中, 并用细胞培养基稀释至合适的浓度。

[0132] 质粒及其构建

[0133] 用基于 PCR 的技术将编码 Hom 的核酸亚克隆进 pCS2+ 载体, GFP- 标签。通过体外翻译和测序来证实构建体。

[0134] 共聚焦显微镜

[0135] HCT116 细胞接种于玻璃载玻片上, 用 Hom-GFP 表达构建体转染。24 小时后, 在 PBS 中用仲甲醛固定细胞, 碘化丙啶 (PI, SIGMA) 复染色。在 PBS 中洗涤 4 次, 每次 5 分钟后, 装上玻片, 用共聚焦显微镜进行分析。

[0136] 细胞凋亡和生长分析

[0137] 收集包括附着的和漂浮在培养基中的细胞, 在含有终浓度为 3.7% 甲醛, 0.5% Nonidet P40, 和 10 μ g/ml 的 4', 6- 二脒基 -2- 苯基吲哚的 PBS 溶液中进行固定。通过在显微镜下观察到凝聚染色质和微核化来评估细胞凋亡。每个条件至少实施 3 个独立实验, 每次至少测量 400 个细胞。

[0138] 用 3-(4,5- 二甲基噻唑 -2)-5-(3- 羧基甲基苯基)-2-(4- 磺苯基)-2H- 四唑分析 (MTT) 在 96 孔板 (8,000 细胞 / 每孔) 中测定细胞生长, 根据厂商操作说明, 使用 CellTiter 96 AQueous One Solution (PROMEGA, Madison, WI) 来进行测量。使用 VERSAmax 可调酶标仪 (Sunnyvale, CA) 测量 A_{490nm} 值。载体处理的细胞被设定为 1 (100%)。每次实验设定 3 个重复, 并至少重复两次。

[0139] 群落形成分析

[0140] 根据厂商操作说明, 用 Lipofectamine 2000 (INVITROGEN) 在 100mm 细胞培养皿中转染细胞 24 小时。然后收集细胞, 用 FAC G4 分选流式细胞仪 (BD Biosciences) 分选 GFP- 载体或 GFP-Hom1 阳性细胞。这些 GFP 阳性细胞以每孔 1×10^5 细胞置于 6 孔板中。让细胞生长 5-10 天, 之后用结晶紫 (SIGMA) 进行染色。所有实验重复至少两次, 在每次测试中均获得了相似的结果。

[0141] 异种移植肿瘤和组织染色

[0142] 所有的动物实验是经过哈佛医学院学校动物保护和利用委员会的批准的。在 100mm 细胞培养皿中, 用 Lipofectamine 2000 (INVITROGEN) 转染细胞 24 小时。然后收集细胞, 用 FAC G4 分选流式细胞仪 (BD Biosciences) 分选载体 -GFP 或 Hom1-GFP 阳性细胞。通过将 1×10^5 载体 -GFP 或 Hom-GFP 阳性 HCT116 (p53^{+/+}) 或 HCT116 (p53^{-/-}) 细胞 s.c 注射进 5 至 6 周龄的雌性无胸腺裸鼠 (SIMONSEN LABORATORIES, Gilroy, CA) 的侧腹中来建立移植肿瘤。同时, 将 1×10^6 包括 GFP- 阳性和阴性的未分选的细胞 s.c 注射到其他裸鼠中, 建立未分选移植肿瘤模型。每周用卡尺测量 3 次, 根据公式 (长度 x 宽度²) / 2 计算肿瘤体积, 以监测肿瘤的生长。立即用 10% 中性缓冲福尔马林固定移植肿瘤组织。然后将该组织进行石蜡包埋和切片。用苏木精和伊红 (H&E) 对切片进行染色, 然后用于组织学分析。用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法 (TUNEL), 根据厂商操作说明利用重

组末端转移酶 (ROCHE, Indianapolis, IN) 和 dUTP-Alexa 594 (MOLECULAR PROBES) 进行染色,再用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚进行复染色。所有的图像都使用 SPOT 照相图形软件,通过 Nikon TS800 荧光显微镜获得。

[0143] 细胞分级

[0144] 从 2 个 60-cm² 皿中离心收集漂浮的和附着的细胞,重悬于均质缓冲液中 (0.25mol/L 蔗糖,10mmol/L HEPES (pH 7.4),和 1mmol/L EGTA),在冰上用 2-ml 的 Dounce 匀浆器匀浆 40 次。匀浆物在 1000xg,4°C 下离心 10 分钟以沉淀细胞核。上清液继续在 14,000xg,4°C 下离心 30 分钟,获得胞浆 (上清) 组分。

[0145] Western 印记

[0146] 对总细胞裂解液,线粒体和胞浆组分进行纯化,并用 4-20% Tris-甘氨酸凝胶 (INVITROGEN, Carlsbad, CA) 电泳进行分离。对于活性的 caspase-3, PARP 和 Hom 的分析,提取总细胞,并用 4-20% Tris-甘氨酸凝胶 (INVITROGEN) 电泳进行分离。所使用的抗体包括 GFP (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), Histone-1 (Ab-1, NEOMARKERS, Fremont, CA), 和 β -肌动蛋白 (SIGMA), 活性 caspase-3 (BD BIOSCIENCES), 以及 PARP (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, Boston, MA)。合适的辣根过氧化物酶结合的二抗被用于检测一抗和抗原复合物的结合,之后用 Western Lightning® Western 印记化学发光试剂 Plus (PERKINELMER, Boston, MA) 检测。

[0147] 逆转录-PCR

[0148] 根据厂商操作说明,用 TRIzol® 试剂 (INVITROGEN) 分离总 RNA。用 Superscript II 逆转录酶 (INVITROGEN) 合成第一链 cDNA。接着,将每个 RT 反应的混合物用 PCR 扩增,扩增循环数从 20 (GAPDH) 至 35 (Hom) 不等。每个循环包括一个热变性阶段 (94°C, 60 秒), 一个退火阶段 (57°C, 30 秒), 一个延伸阶段 (72°C, 30 秒)。PCR 产物根据大小在 2% 的琼脂糖凝胶中被分级,并能在紫外灯下看到。用于扩增 Hom 的引物包括: 5'-AAGGCAATTAGGCGCTGCTT-3' 和 5'-ACAGAACAACCTGAGTCCTCCA-3'。

[0149] 统计分析

[0150] 结果以均值 \pm SD 来表示。用 ANOVA 分析来评估统计分析,在该分析中,使用最小显著差异法来实施多重比较。如果差异偶然发生的概率 $< 5/100$, 则认为差异是显著的 ($P < 0.05$)。

[0151] 结果

[0152] Hom-1 编码一个核蛋白

[0153] Hom-1 是非洲爪蟾 Xom 蛋白的人类同源物,它们具有相似的结构同源性。为了确定 Hom-1 的细胞内定位,构建了编码具有氨基末端 GFP 标签的全长 Hom-1 的表达载体。将构建体转染进 HCT116 结肠癌细胞中,用共聚焦显微镜观察嵌合蛋白的细胞内分布。HCT116 细胞的细胞核用 PI 染色以进行标记。发现 Hom-1 靶向转染细胞的细胞核中,与 PI 同位。为了进一步确定 Hom-1 的核定位,用蔗糖梯度来对亚细胞组分进行分级,随后用 western 印记分析确定 Hom-1 在各个组分中的分布。发现 Hom-1 富集于转染细胞的核组分中,而 GFP 富集于转染细胞的细胞质组分中。

[0154] Hom 通过诱导细胞凋亡来抑制人类肿瘤细胞的生长

[0155] 如上面所讨论的, Hom-1 是致癌 Wnt 信号的拮抗剂。为了确定 Hom-1 对实体肿瘤

生长的影响,实施分析来检测 Hom-1 对于人类癌症细胞生长的影响。

[0156] 发现用编码 GFP-Hom-1 或 GFP 的表达载体转染 HCT116 结肠癌细胞, H460 肺癌细胞和人胚肾细胞 293T (用腺病毒 E1a 转化, 带有一个与新霉素共选择的温度敏感性 T 抗原)。对于所有的这三个细胞系, 通过 GFP 信号的指示, 大约有 35-50% 的细胞被转染。转染后 48 小时, 根据厂商操作说明用 MTS 分析细胞生长。

[0157] 发现 GFP 对于待测细胞的生长不产生任何影响。然而, GFP-Hom-1 对待测癌症细胞的生长表现出很强的抑制。有趣的是, GFP-Hom-1 在非癌症 293T 细胞中具有很低的生长抑制效果。这些发现与之前的观察即肿瘤依赖 (对致癌通路) 相一致。

[0158] 此外, 实施群落形成分析来探讨 Hom-1 对于细胞长期生存的影响。用编码 GFP-Hom-1 或 GFP 的质粒暂时转染 HCT116 细胞。转染后 48 小时, 收集细胞, 通过 GFP 信号分选细胞, 然后以每孔 1×10^5 个细胞的稀释度置于 6 孔板中。定植于板中之后 24 小时, 用荧光显微镜和相差显微镜可见 HCT116 结肠细胞 (90% 附着在板上)。定植后 96 小时, 再一次用相差显微镜和荧光显微镜对转染细胞进行检测。

[0159] 发现在定植后 96 小时的时候, 在转染 GFP-Hom-1 的孔中很少有 GFP 阳性的细胞, 这表明 GFP-Hom-1 抑制了转染细胞的生长。在其它的人类癌症细胞系中也观察到了类似的结果, 包括 Sw480, H460 和 H1299。与暂时转染研究的结果一致, 293T 细胞的生长只会被 GFP-Hom-1 轻微抑制。分选的转染细胞的长期生长显示 GFP 转染细胞中形成多个群落, 但是在用 GFP-Hom-1 转染的细胞中很少有群落产生。在 GFP-Hom-1 转染的 293T 细胞中, 群落数量只是降低了 20%。

[0160] 为了确定 GFP-Hom-1 转染的细胞中这种生长抑制是否是细胞凋亡的结果, 通过显微观察转染细胞以确定凋亡特征的存在, 来对细胞凋亡进行评定, 这些特征诸如凝集的染色质和如之前所描述的用 Hoechst 33258 染色后的微核化 (Waldman T, et al. Nature 1996, 381 :713)。发现 GFP 并不会诱导细胞凋亡, 但是 GFP-Hom-1 在人类癌症细胞系中诱导了大量的细胞凋亡。此外, GFP-Hom-1 并不能诱导 293T 细胞的凋亡, 这是一个非癌症细胞系。

[0161] 这些结果表明 Hom-1 是人类癌症细胞有力的生长抑制诱导剂, 其是部分通过诱导凋亡起作用。Hom-1 的生长抑制效果在非癌症人类 293T 细胞中显著减少, 这可能反映出之前注意到的现象即癌症依赖于致癌通路。

[0162] Hom-1 在 p53 缺陷型细胞中诱导程序性细胞死亡

[0163] P53 是一个重要的肿瘤抑制基因。超过百分之五十的癌症由于 p53 基因的直接突变而具有失活的 p53。为了确定 Hom-1 的肿瘤抑制效果是否依赖于功能性的 p53, 实施分析来研究 Hom-1 对于 3 个癌症细胞系的效果, 这三个细胞系是 HCT116p53K0, p53 缺陷性 H1299 以及 p53 突变型 SW480, 其中由于突变或人工敲除而使 p53 丧失其功能。分析 Hom-1 对这些癌症细胞生长的效果的方法从本质上来说和上述的方法是一样的。

[0164] 实施 MTS 分析, 体外细胞生长分析, 以及群落形成分析。这些结果显示 Hom-1 强烈地抑制了这些缺乏功能性 p53 的待测癌症细胞的生长 (分别地, $P < 0.01$)。在 p53 缺陷型细胞中, 凋亡图像显示 Hom-1 同样诱导了细胞凋亡。

[0165] Hom-1 诱导 Caspase-3 的激活

[0166] Caspase-3 是细胞凋亡的关键执行者。它部分或者全部负责许多重要蛋白质的

蛋白裂解,例如核酶聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)。Caspase-3 被确定为是哺乳动物细胞中一个关键性的细胞凋亡调控因子。凋亡的诱导导致前 caspase-3 被切割以及产生活性的 17kDa caspase-3 和 12kDa caspase-3 片段。激活的 caspase-3 靶向包括 PARP 和其它 caspases 在内的凋亡通路关键调节子。

[0167] 为了研究 caspase-3 的激活是否参与 Hom-1 介导的细胞凋亡,提取总蛋白,利用活性 caspase-3 抗体通过 western 印记来分析 caspase-3 的活性。发现在 p53 充分型和缺陷癌症细胞中,是 GFP-Hom-1 而不是 GFP 的表达激活了 caspase-3。这些结果表明 Hom-1 以 p53 非依赖性的方式诱导 caspase-3 的激活。

[0168] Hom-1 在体内通过诱导程序性细胞死亡来抑制肿瘤生长

[0169] 为了确定 Hom-1 在体内是否具有抗肿瘤活性,用编码 GFP 或 GFP-Hom-1 的表达载体转染 HCT116p53 野生型(WT)细胞系和 HCT116 p53 敲除型(KO)细胞系。转染效率大约为 35-40% (图 6A)。这些转染细胞的生长率通过向裸鼠的背部皮下注射细胞来确定。表达 GFP 的细胞被注射进背部的左边,而表达 GFP-Hom-1 的细胞则被注射进背部的右边。肿瘤的生长通过原位检测和剪除来测定(图 6B)。

[0170] 发现在 p53 充分型和 p53 缺陷性 HCT116 细胞中,是 GFP-Hom-1 而不是 GFP 在体内抑制了肿瘤的生长。H&E 染色以及 TUNEL 染色的原位凋亡分析显示表达 Hom-1 的肿瘤表现出大量的片段化 DNA,这表明 Hom-1 在体内通过诱导程序性细胞死亡来抑制肿瘤生长。

[0171] 实施例 3: Hom-1 抑制子诱导细胞因子的表达

[0172] 实施分析来确定 Hom-1 是否可以调节淋巴细胞中的前炎性细胞因子的表达,例如白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-6(IL-6),白细胞介素-8(IL-8),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)。特别地,确定从细胞中抑制 Hom-1,通过 RNAi 制剂,是否会降低细胞因子的表达。

[0173] 未分化的单核 U937 细胞在包含 M-CSF 的培养基中培养四天,该培养基可诱导单核细胞分化。将这些细胞用直接作用于 Hom-1 (构建体 3) 或 GFP 的 RNAi 制剂进行电穿孔,然后再继续培养 3 天。据评估,只有一半的电穿孔细胞成功吸收了 RNAi 制剂。脂多糖(LPS, 1 μ g/ml) 随后加入到培养基中以诱发细胞因子的表达;24 小时后收集细胞。用如实施例 1 中描述的方法,提取细胞的总 RNA,对提取的 RNA 进行 RT-PCR,用实时 PCR 来定量细胞中 IL-1, IL-6, IL-8, 或 TNF- α mRNA。

[0174] 据发现在用靶向 Hom-1 的 RNAi 制剂电穿孔的细胞中,细胞因子的 mRNA 水平被极大地降低。相对于对照细胞(也就是,用靶向 GFP 的 RNAi 制剂电穿孔的细胞),每种细胞因子的 mRNA 水平都降低了 40%至 60%。因为只有一半的细胞吸收了 RNAi 制剂,真实的抑制程度比 40-60%更高,可能会达到 100%或接近于 100%。

[0175] 该结果表明, Hom-1 抑制剂,例如 RNAi 制剂,可以用于降低前炎性细胞因子的表达,因此能够治疗 ARDS 和其它的由这些细胞因子介导的类似的呼吸道/肺部病症。

[0176] 实施例 4 Hom-1 促进淋巴细胞发育

[0177] Hom-1 在正常髓系和淋巴系细胞中是高度表达的。在造血干细胞的成熟过程中,其表达被上调。

[0178] 未分化的包含 GFP^{Tet} 或 GFPHom-1^{Tet} 的单核细胞 U937 细胞被用于该实验中。GFP^{Tet} 或 GFPHom-1^{Tet} 是转基因,当暴露在四环素(Tet)下就能够被激活,从而能分别过量表达 GFP

和 GFP 与 Hom-1 融合蛋白。细胞在含有 Tet 的培养基中培养 48 小时。随后如上述加入 LPS, 24 小时后收获细胞。用如上述同样的方式确定 IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , 或 M-CSF 的 mRNA 水平。

[0179] 据发现细胞因子的 mRNA 水平在超表达 Hom-1 的细胞中显著增高。比只表达 GFP 的对照细胞中的水平高约 10 至超过 300 倍。该结果表明 Hom-1 促进淋巴细胞的成熟和分化。

[0180] 进一步实施分析来检测 Hom-1 在单核细胞和巨噬细胞中的作用, 上述两种细胞是天然和获得性免疫系统的关键性因子。结果发现 Hom-1 对单核细胞发育为巨噬细胞起着关键的作用。

[0181] 更为具体地, 在初级单核细胞中抑制 Hom-1 的表达对终端巨噬细胞的分化带来了极度的损害。使用上述的 siRNA 将单核细胞中的 Hom-1 表达降低, 这使得成纤维细胞样形状的形态发生终止, 大大减少了细胞表面 CD71 标志, Fc γ RI CD64, CD40, CD86, 整联蛋白 CD11b 和 CD11c, TLR4 (Toll 样受体 4), MR (甘露糖受体) 和 CD14 的表达。有趣的是, 通过台盼蓝排除法确定该蛋白的低表达并没有降低初级单核细胞的活力。其它一些细胞表面分子的表达, 例如 HLA-DR, 并没有受到 Hom-1 低表达的影响, 这排除了单核细胞向巨噬细胞分化的降低由 Hom-1 抑制的细胞毒性导致的可能性。另外, 与对照细胞相比, 用 siRNA 转染的单核细胞表现出降低的吞噬活性, 这表明 Hom-1 是单核细胞分化为巨噬细胞的功能性发育所必需的。

[0182] 相反, Hom-1 在单核细胞中的超表达加速了单核细胞向巨噬细胞的分化, 如转染细胞表面 CD71 表达升高所显示。类似的, Hom-1 在髓系 U937 细胞中的异常表达也诱发了它们的分化, 表现出突出的巨噬细胞特征, 包括上面提及的标志物的表达, 明显的形态学变化 (细胞变得有附着性, 产生大量的伪足), 增强的吞噬活性, 以及前炎性细胞因子分泌的增高。这些结果进一步显示了 M-CSF 受体是 Hom-1 的直接转录靶标。

[0183] 在临床患者中, Hom-1 的表达与一些前炎性细胞因子表达正相关的事实表明, Hom-1 在炎症性疾病的发病机理和治疗中起着重要的作用。

[0184] 其它具体实施方式

[0185] 本说明书中所公开的所有特征可以进行任意的组合。本发明所公开的每个特征都可以被另外一个具有相同, 等同或类似目的的特征所代替。因此, 除非有特别陈述, 每一个公开的特征只是一类等同或类似特征的例子。

[0186] 本发明已经描述了许多实施例。然而, 这将被理解为可以有多种改进而不背离本发明的精神和范围。相应地, 其它实施例落入下述权利要求的范围之内。

A

Xom 176 RLRTAFTSDQISTLEKTFQKHRYLGA SERQKLA AKLQLSEVQIKTUFQNRMMKYKREIQD 235
 R+RTAFT +Q+ TLE FQ H+YL ER++LA ++QLSEVQIKTUFQNRMMK+KR++QD
 Hom-1 93 RVRTAFTMEQVRTLEGVFQHHQYLSPLERKRLAREMQLSEVQIKTUFQNRMMKHKRQMQD 152

B

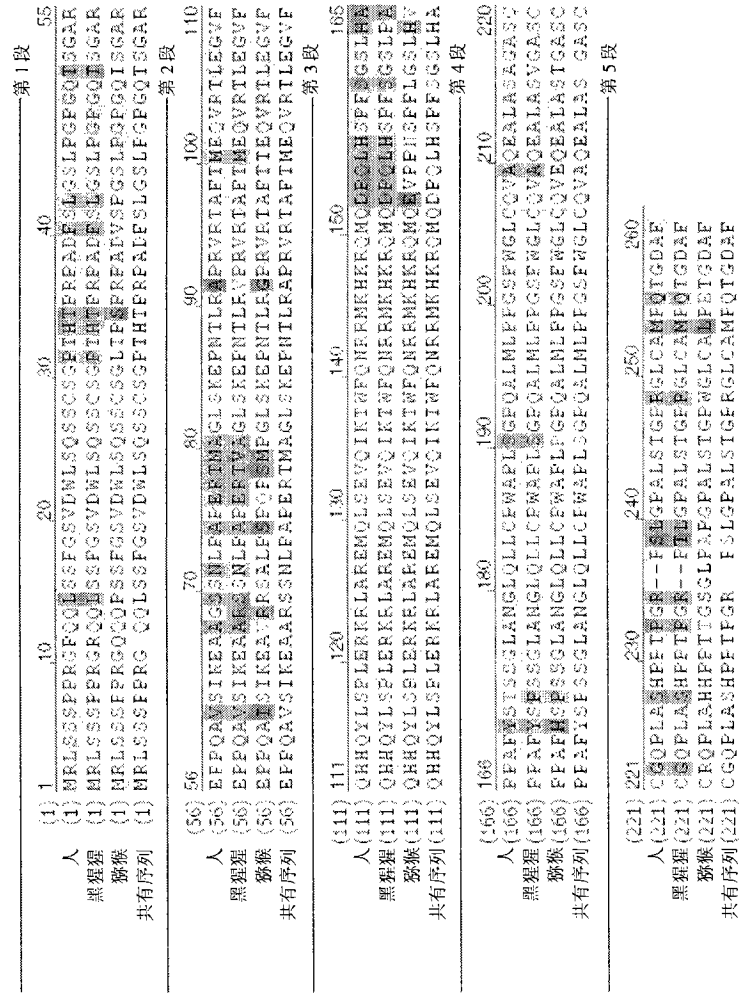


图 1

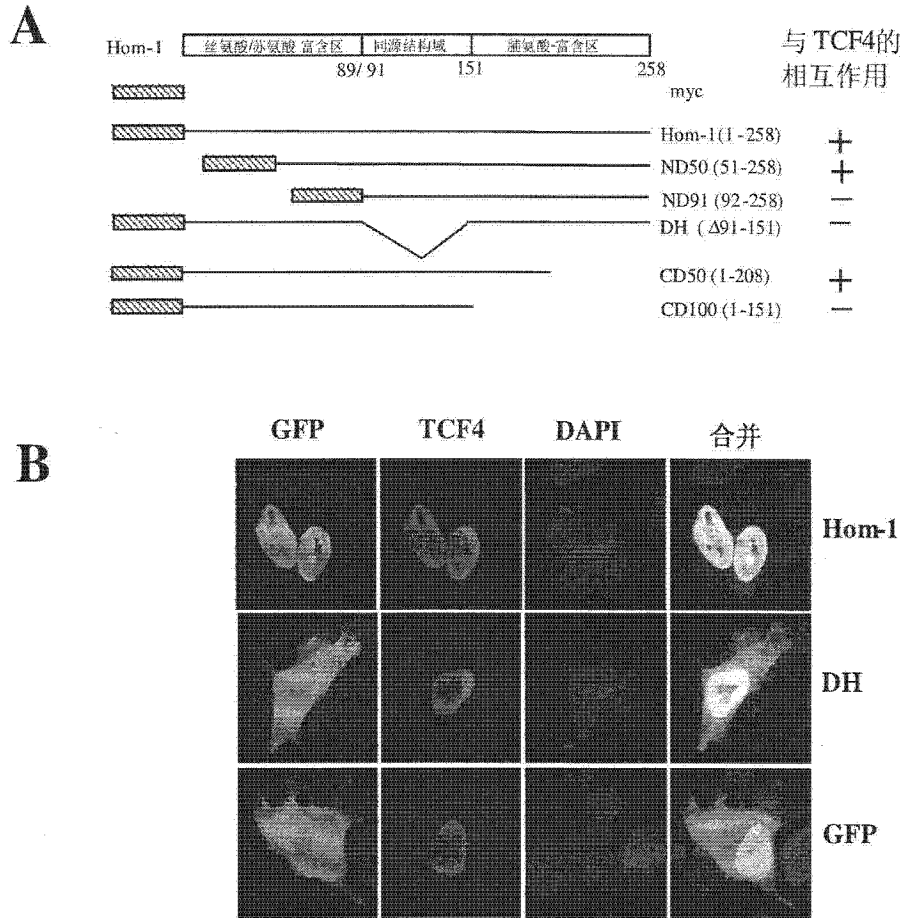


图 2

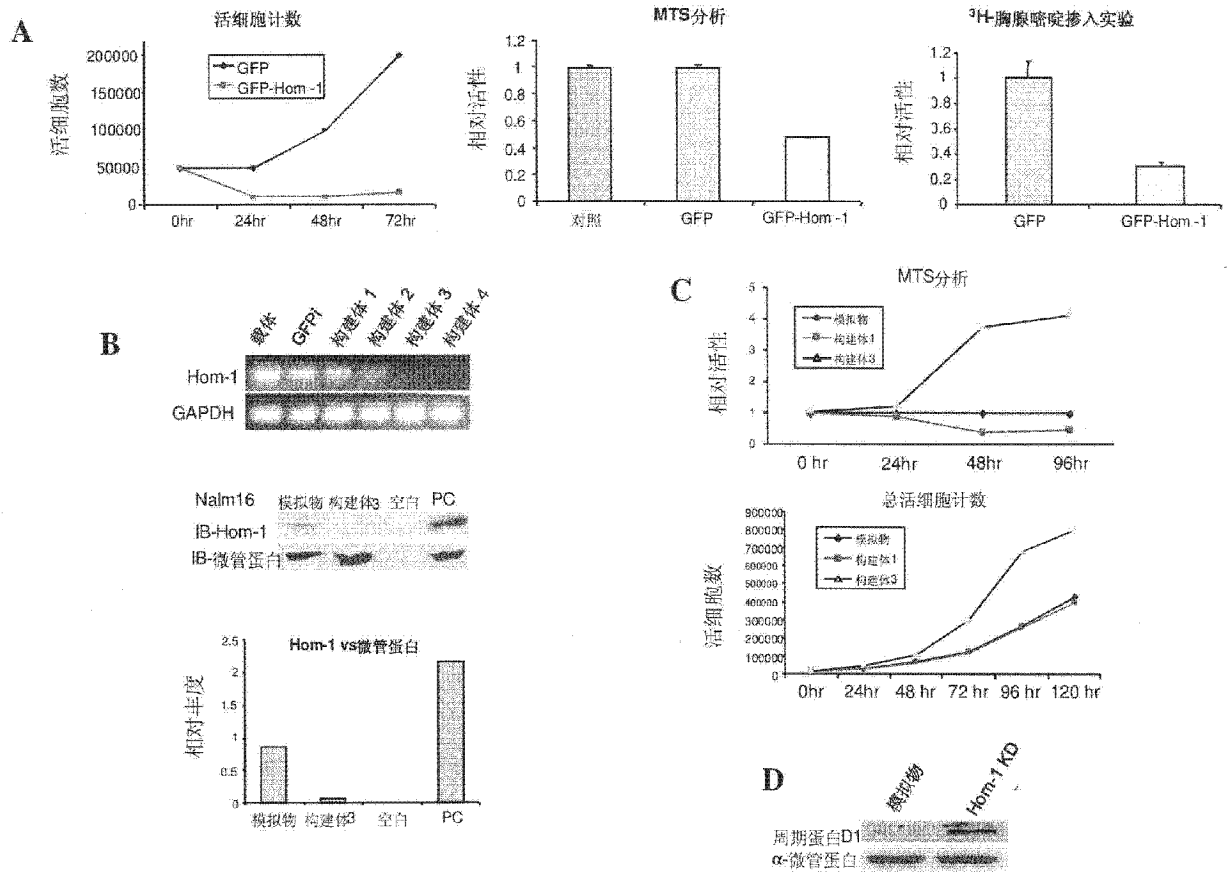


图 3

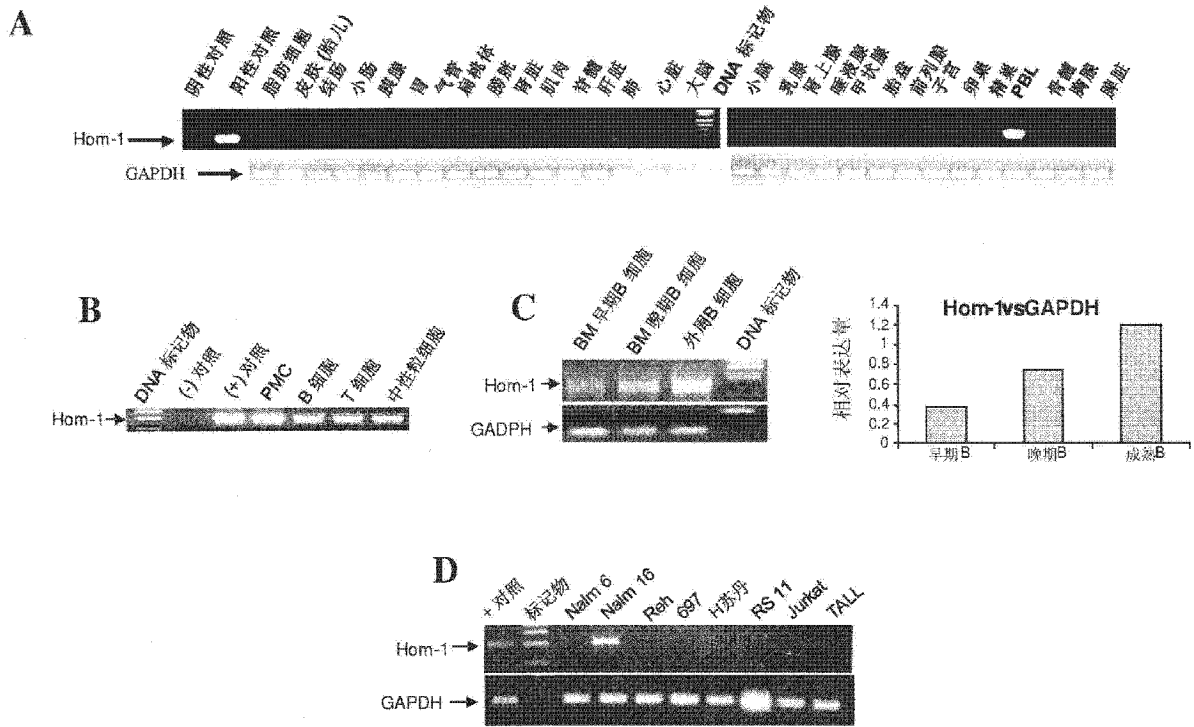


图 4

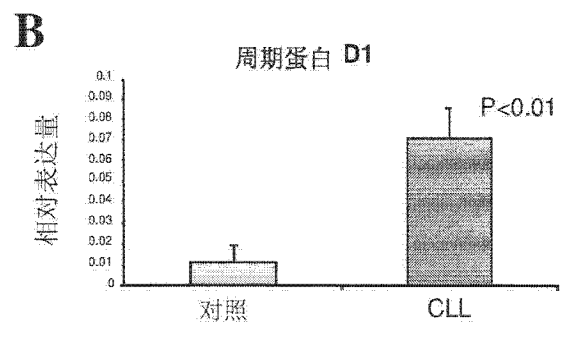
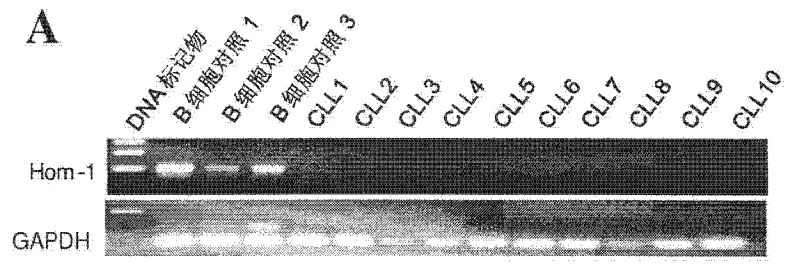


图 5

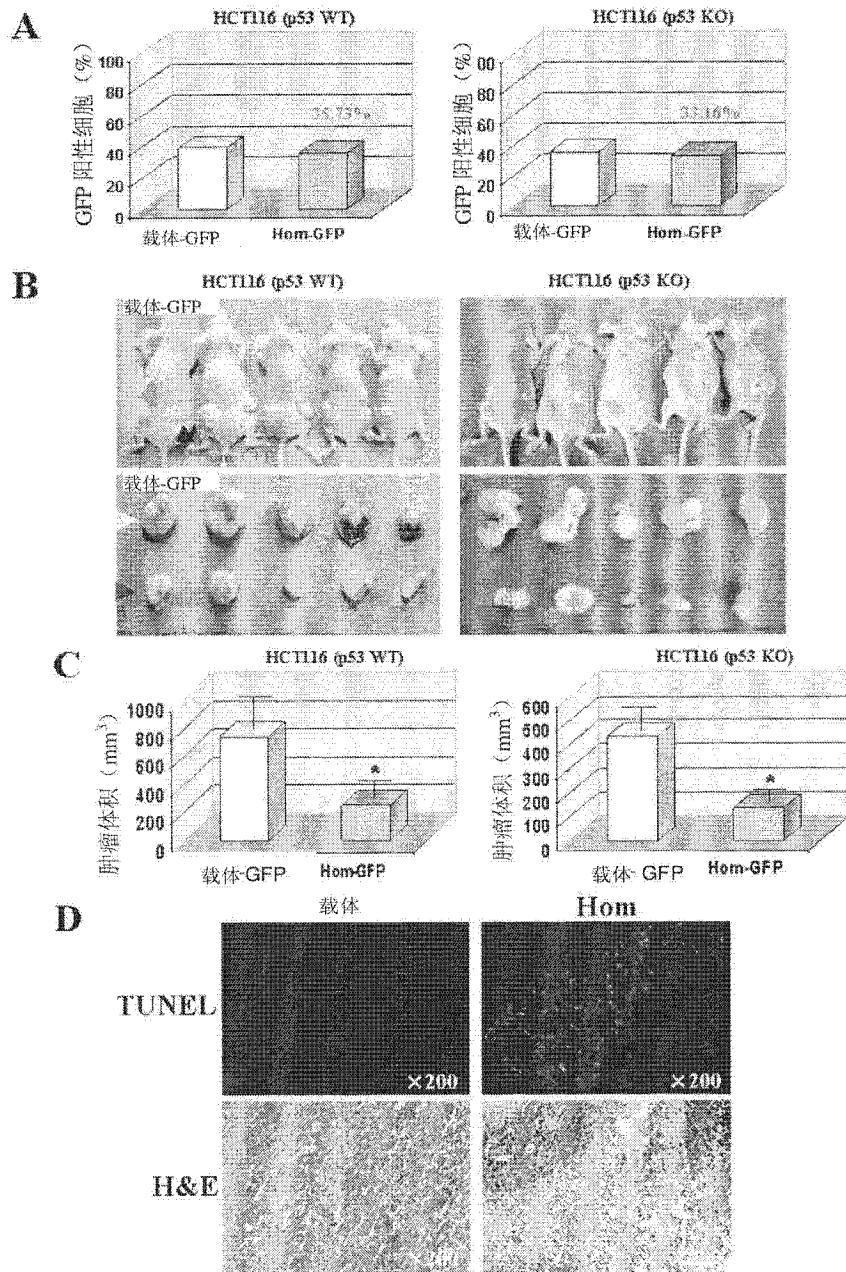


图 6

专利名称(译)	免疫系统疾病的治疗和诊断		
公开(公告)号	CN102575250A	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201080032111.0	申请日	2010-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	高红		
申请(专利权)人(译)	高红		
当前申请(专利权)人(译)	高红		
[标]发明人	朱正仑 高红		
发明人	朱正仑 高红		
IPC分类号	C12N15/113 A61K31/7105 A61K48/00 C12Q1/68 G01N33/53 A61P31/00 A61P37/00		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/178 A61K31/7105 C12Q2600/106 C12N2310/14 C12Q2600/158 C12N15/113 A61P11/00 A61P29/00 A61P31/00 C12Q1/68		
优先权	61/225852 2009-07-15 US		
其他公开文献	CN102575250B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明揭露治疗免疫系统疾病的组合物和方法。还揭露了诊断方法和预后方法。

A

Xom 176 RLRTAFTSDQISTLEKTFQKHRYLGASERQKLAALKLSEVQIKTUFQNRMRKYKREIQD 235
R+RTAFT +Q+ TLE FQ H+YL ER++LA ++QLSEVQIKTUFQNRMRK+KR++QD
Hom 1 93 RVRTAFTNEQVRLTEGVFQHQYLSPLERKRLAREMQLSEVQIKTUFQNRMRKRRHQD 152

B

```

-----第 1 段-----
(1) 1 10 20 30 40 50
人 (1) NPLSSFFPRQQLSDFQVDNLQSSCSGPTHTFRFAEPLGSLSPQDGGAR
黑框 (1) NPLSSFFPRQQLSDFQVDNLQSSCSGPTHTFRFAEPLGSLSPQDGGAR
影 (1) NPLSSFFPRQQLSDFQVDNLQSSCSGPTHTFRFAEPLGSLSPQDGGAR
共有序列 (1) NPLSSFFPRQQLSDFQVDNLQSSCSGPTHTFRFAEPLGSLSPQDGGAR
-----第 2 段-----
(56) 56 70 80 90 100 110
人 (56) EFPQAVSIEAARSNLEFAERTMAGLSEKPNLRAFRVTAFTMEQVRLTEGVF
黑框 (56) EFPQAVSIEAARSNLEFAERTMAGLSEKPNLRAFRVTAFTMEQVRLTEGVF
影 (56) EFPQAVSIEAARSNLEFAERTMAGLSEKPNLRAFRVTAFTMEQVRLTEGVF
共有序列 (56) EFPQAVSIEAARSNLEFAERTMAGLSEKPNLRAFRVTAFTMEQVRLTEGVF
-----第 3 段-----
(111) 111 120 130 140 150 165
人 (111) QHQVLSPLERKRLAREMQLSEVQITWFOHREMRKRCQVFFSFLGLHA
黑框 (111) QHQVLSPLERKRLAREMQLSEVQITWFOHREMRKRCQVFFSFLGLHA
影 (111) QHQVLSPLERKRLAREMQLSEVQITWFOHREMRKRCQVFFSFLGLHA
共有序列 (111) QHQVLSPLERKRLAREMQLSEVQITWFOHREMRKRCQVFFSFLGLHA
-----第 4 段-----
(166) 166 180 190 200 210 220
人 (166) FFATPFSGLANGQLLCEWAPLQEQALMLPFSFNGLCVQALASGASC
黑框 (166) FFATPFSGLANGQLLCEWAPLQEQALMLPFSFNGLCVQALASGASC
影 (166) FFATPFSGLANGQLLCEWAPLQEQALMLPFSFNGLCVQALASGASC
共有序列 (166) FFATPFSGLANGQLLCEWAPLQEQALMLPFSFNGLCVQALASGASC
-----第 5 段-----
(221) 221 230 240 250 260
人 (221) CQPLARHPTTGGLEFQALSTGFWGLCAHPTGDAP
黑框 (221) CQPLARHPTTGGLEFQALSTGFWGLCAHPTGDAP
影 (221) CQPLARHPTTGGLEFQALSTGFWGLCAHPTGDAP
共有序列 (221) CQPLARHPTTGGLEFQALSTGFWGLCAHPTGDAP

```