



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111278443 A

(43)申请公布日 2020.06.12

(21)申请号 201880066812.2

(22)申请日 2018.11.05

(30)优先权数据

62/583,166 2017.11.08 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/059188 2018.11.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/094326 EN 2019.05.16

(71)申请人 丹娜法伯癌症研究院

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 A·巴斯 H·张

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 吴瑜 黄遵玲

(51)Int.Cl.

A61K 31/513(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C07K 1/00(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书3页 说明书51页 附图4页

(54)发明名称

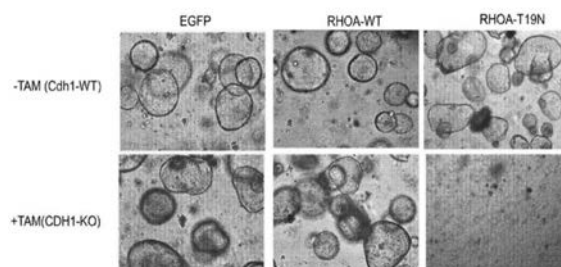
使用RHOA显性负型治疗癌症的组合物和方法

法

(57)摘要

本发明提供使用RHOA显性负多肽或其生物活性片段和/或编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸来治疗CDH1减少或缺失的癌症的组合物和方法。

Mist1CreERT2, Cdh1^{fl}类器官



1. 一种治疗患有CDH1水平降低的癌症的受试者的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的至少一种选自由以下组成的组的试剂:1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症具有CDH1表达的丧失。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述癌症正在或已经经历上皮间质转化(EMT)。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述癌症选自由弥漫性胃癌(DGC)、小叶乳腺癌、转移性乳腺癌、转移性肺癌、转移性非小细胞肺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌和黑素瘤组成的组。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述试剂选自由以下组成的组:(i) RHOA显性负多肽,在其全长上与选自由SEQ ID NO:1、2和3组成的组的多肽或其生物活性片段至少80%相同;和(ii) 编码(i)的RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸序列,其中所述核酸序列在其全长上与选自由SEQ ID NO:4、5、6、7、8、9、10和11组成的组的核酸序列或其编码所述生物活性片段的部分至少80%相同。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述试剂包括SEQ ID NO:1、2或3的RHOA显性负多肽序列。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述试剂是RHOA显性负多肽或其生物活性片段,并且进一步包括与其融合的异源多肽。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述融合的多肽具有比相应的未融合的RHOA显性负多肽或其生物活性片段更长的半衰期和/或细胞渗透性。

9. 根据权利要求7所述的方法,其中所述异源多肽是Fc结构域和/或细胞可渗透肽。

10. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述试剂是包括在表达载体或细胞内的核酸。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,进一步包括向所述受试者施用免疫疗法和/或癌症疗法,任选地其中在所述试剂之前、之后或同时施用所述免疫疗法和/或癌症疗法。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述免疫疗法是基于细胞的。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述免疫疗法包括癌症疫苗和/或病毒。

14. 根据权利要求11所述的方法,其中所述免疫疗法抑制免疫检查点。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述免疫检查点选自由CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRPα(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、嗜乳脂蛋白和A2aR组成的组。

16. 根据权利要求11所述的方法,其中所述癌症疗法选自由放射、放射增敏剂和化学疗法组成的组。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述试剂减少癌细胞中的存活或增殖细胞的数量,和/或减小包括癌细胞的肿瘤的体积或大小。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的方法,进一步包括向所述受试者施用至少一种另外的用于治疗所述癌症的治疗剂或方案。

19. 一种降低CDH1水平降低的癌细胞的存活力或增殖的方法,包括使所述癌细胞与至

少一种选自由以下组成的组的试剂接触：1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸；和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段。

20. 根据权利要求19所述的方法，其中所述癌细胞具有CDH1表达的丧失。

21. 根据权利要求19或20所述的方法，其中所述癌细胞正在或已经经历上皮间质转化(EMT)。

22. 根据权利要求19-21中任一项所述的方法，其中所述癌细胞获自患有癌症的受试者，所述癌症选自弥漫性胃癌(DGC)、小叶乳腺癌、转移性乳腺癌、转移性肺癌、转移性非小细胞肺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌和黑素瘤组成的组。

23. 根据权利要求19-22中任一项所述的方法，其中所述试剂选自由以下组成的组：(i) RHOA显性负多肽，在其全长上与选自SEQ ID NO:1、2和3组成的组的多肽或其生物活性片段至少80%相同；和(ii) 编码(i)的RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸序列，其中所述核酸序列在其全长上与选自SEQ ID NO:4、5、6、7、8、9、10和11组成的组的核酸序列或其编码所述生物活性片段的部分至少80%相同。

24. 根据权利要求19-23中任一项所述的方法，其中所述试剂包括SEQ ID NO:1、2或3的RHOA显性负多肽序列。

25. 根据权利要求19-24中任一项所述的方法，其中所述试剂是RHOA显性负多肽或其生物活性片段，并且进一步包括与其融合的异源多肽。

26. 根据权利要求25所述的方法，其中所述融合的多肽具有比相应的未融合的RHOA显性负多肽或其生物活性片段更长的半衰期和/或细胞渗透性。

27. 根据权利要求26所述的方法，其中所述异源多肽是Fc结构域和/或细胞可渗透肽。

28. 根据权利要求19-23中任一项所述的方法，其中所述试剂是包括在表达载体或细胞内的核酸。

29. 根据权利要求19-28中任一项所述的方法，进一步包括使所述癌细胞与免疫疗法和/或癌症疗法接触，任选地其中在所述试剂之前、之后或同时施用所述免疫疗法和/或癌症疗法。

30. 根据权利要求29所述的方法，其中所述免疫疗法是基于细胞的。

31. 根据权利要求29所述的方法，其中，所述免疫疗法包括癌症疫苗和/或病毒。

32. 根据权利要求29所述的方法，其中所述免疫疗法抑制免疫检查点。

33. 根据权利要求29所述的方法，其中所述免疫检查点选自CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRPα(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、嗜乳脂蛋白和A2aR组成的组。

34. 根据权利要求29所述的方法，其中所述癌症疗法选自放射、放射增敏剂和化学疗法组成的组。

35. 一种评估权利要求1的试剂用于治疗受试者中CDH1水平降低的癌症的功效的方法，所述方法包括：

a) 在第一时间点检测受试者样本中的存活和/或增殖癌细胞的数量；

b) 在施用所述试剂后至少一个随后的时间点期间重复步骤a)；以及

c) 比较在步骤a)和b)中检测到的存活和/或增殖癌细胞的数量，其中与在所述第一时

间点所述样本中的量相比,随后的样本中存活和/或增殖癌细胞不存在或数量显著减少,表明所述试剂可以治疗所述受试者的癌症。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中在所述第一时间点和所述随后的时间点之间,所述受试者已经接受治疗、完成治疗和/或处于癌症缓解中。

37. 根据权利要求35或36所述的方法,其中所述第一和/或至少一个随后的样本选自游离体和体内样本组成的组。

38. 根据权利要求35-37中任一项所述的方法,其中所述第一和/或至少一个随后的样本是从所述癌症的动物模型获得的。

39. 根据权利要求35-38中任一项所述的方法,其中所述第一和/或至少一个随后的样本是从所述受试者获得的单个样本或合并样本的一部分。

40. 根据权利要求35-39中任一项所述的方法,其中所述样本包括获自所述受试者的细胞、血清、肿瘤周围组织和/或肿瘤内组织。

41. 根据权利要求35-40中任一项所述的方法,进一步包括通过测量选自以下组成的组的至少一个标准来确定对所述试剂的响应性:临床受益率、直至死亡存活、病理完全缓解率、病理缓解的半定量测量、临床完全缓解、临床部分缓解、临床疾病稳定、无复发存活、无转移存活、无疾病存活、循环肿瘤细胞减少、循环标志物响应和RECIST标准。

42. 根据权利要求1-41中任一项所述的方法,其中所述试剂以药学上可接受的制剂施用。

43. 根据权利要求1-42中任一项所述的方法,其中所述施用或接触的步骤在体内、离体或体外进行。

44. 根据权利要求1-43中任一项所述的方法,其中所述受试者是癌症的动物模型,任选地其中所述动物模型是小鼠模型。

45. 根据权利要求1-44中任一项所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述哺乳动物是小鼠或人。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

48. 一种基于细胞的测定,用于筛选可降低CDH1水平降低的癌细胞的存活力或增殖的试剂,所述测定包括:

a) 使所述癌细胞与选自以下组成的组的测试剂接触:1) 编码RHOA突变体或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA突变体多肽或其生物活性片段;以及

b) 确定相对于对照,所述癌细胞的存活力或增殖降低,从而鉴定用于降低所述癌细胞的存活力或增殖的测试剂。

49. 根据权利要求48所述的基于细胞的测定,其中所述对照是未与所述测试剂接触的癌细胞。

50. 根据权利要求48所述的基于细胞的测定,其中所述对照是与抗癌剂接触的癌细胞。

51. 根据权利要求48-50中任一项所述的基于细胞的测定,其中所述癌细胞是从癌症的动物模型或患有癌症的人类患者分离的。

52. 根据权利要求48-51中任一项所述的基于细胞的测定,其中所述接触步骤在体内、离体或体外发生。

使用RHOA显性负型治疗癌症的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年11月8日提交的美国临时申请第62/583,166号的权益;所述申请的全部内容通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 胃癌是世界上癌症死亡率的第三大主要原因(Sutter等人(2006)《世界肠胃病学杂志(World J.Gastroenterol.)》12:380-387;Zhou等人(2014)《癌细胞(Cancer Cell)》16:9-11;癌症基因组图谱研究网络(Cancer Genome Atlas Research Network)(2014)《自然(Nature)》513:202-209)。尽管胃癌具有显著的异质性,但两种最突出的亚型是肠胃癌(IGC)和弥漫性胃癌(DGC)。DGC的名称归因于其缺乏细胞内聚、侵入整个基质和差的细胞分化(通常具有印戒细胞形态)的特征。具有遗传形式DGC的家族在CDH1中携带突变,其编码细胞粘附蛋白E-钙粘蛋白(Guilford等人(1998)《自然》392:402-405)。除了遗传性DGC,更加常见的散发形式DGC也与E-钙粘蛋白损失有关,这是通过体细胞突变或启动子超甲基化实现的。DGC引发典型地在肿瘤抑制因子CDH1丧失之后。EMT癌症与E-钙粘蛋白损失弥漫性胃癌具有相似的特征。

[0004] 在DGC中反复鉴定RHOA突变,这暗示RHOA是DGC的新型候选驱动物。RhoA是小GTPase-Ras-样蛋白Rho家族的成员,该蛋白作为细胞表面受体和不同细胞内信号转导蛋白之间的媒介。与其它GTPase相似,RhoA在无活性的GDP结合构型和与下游效应物如ROCK相互作用的活性GTP结合构型之间循环,这影响肌动蛋白细胞骨架的结构和动力学、细胞迁移、胞质分裂和细胞周期。在各种癌症中都观察到RhoA过度表达,并且RhoA活性与肿瘤发生和肿瘤细胞侵入有关(Karlsson等人(2009)《生物化学和生物物理学报(Biochim Biophys Acta.)》,1796:91-98)。然而,仍然需要阐明RHOA突变是否仅减弱RhoA的生理活性,或者可替代地,这些突变是否导致功能的获得。

[0005] 因此,以CDH1表达降低和/或缺乏为特征的胃癌以及其它上皮/间质转化(EMT)癌症易于早期侵袭和转移,并且缺乏有效的分子靶向疗法。因此,本领域非常需要鉴定EMT癌症如DGC的新治疗靶标。

发明内容

[0006] 本发明部分基于发现小GTPase RHOA显性负型(例如RHOA T19N、RHOA G17E或RHOA G17V)可调节具有降低和/或不存在CDH1表达的癌细胞的过度增殖,如,在无CDH1癌细胞中,而CDH1表达完整的癌细胞则可以保留。

[0007] 一方面,提供一种治疗患有CDH1水平降低的癌症的受试者的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的至少一种选自以下组成的组的试剂:1)编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2)RHOA显性负多肽或其生物活性片段。

[0008] 进一步提供多个实施例,其可以应用于本发明的任何方面和/或与本文描述的任何其它实施例组合。例如,在一个实施例中,癌症具有CDH1表达的丧失。在另一个实施例中,

癌症正在经历或已经经历上皮间质转化 (EMT)。在仍另一个实施例中,癌症选自弥漫性胃癌 (DGC)、小叶乳腺癌、转移性乳腺癌、转移性肺癌、转移性非小细胞肺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌和黑素瘤组成的组。在又一个实施例中,所述试剂选自以下组成的组: (i) RHOA显性负多肽, 在其全长上与选自 SEQ ID NO:1、2和3组成的组的多肽或其生物活性片段至少80%相同; 和 (ii) 编码 (i) 的 RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸序列, 其中所述核酸序列在其全长上与选自 SEQ ID NO:4、5、6、7、8、9、10和11组成的组的核酸序列或其编码生物活性片段的部分至少80%相同。在另一个实施例中,所述试剂包括 SEQ ID NO:1、2或3的 RHOA显性负多肽序列。在仍另一个实施例中,所述试剂是 RHOA显性负多肽或其生物活性片段, 并且进一步包括与其融合的异源多肽。在又一个实施例中,融合多肽具有比相应的未融合 RHOA显性负多肽或其生物活性片段更长的半衰期和/或细胞渗透性。在另一个实施例中,异源多肽是 Fc 结构域和/或细胞可渗透性肽。在另一个实施例中,所述试剂是包括在表达载体或细胞内的核酸。在又一个实施例中,所述方法进一步包括向受试者施用免疫疗法和/或癌症疗法, 任选地其中在所述试剂之前、之后或同时施用免疫疗法和/或癌症疗法。在另一个实施例中,免疫疗法是基于细胞的。在仍另一个实施例中,免疫疗法包括癌症疫苗和/或病毒。在又一个实施例中,免疫疗法抑制免疫检查点。在另一个实施例中,免疫检查点选自 CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR 家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、嗜乳脂蛋白和 A2aR 组成的组。在仍另一个实施例中,癌症疗法选自放射、放射增敏剂和化学疗法组成的组。在又一个实施例中,所述试剂减少癌症中存活或增殖细胞的数量, 和/或减小包括癌细胞的肿瘤的体积或大小。在另一个实施例中,所述方法进一步包括向所述受试者施用至少一种另外的用于治疗所述癌症的治疗剂或方案。

[0009] 在另一方面,提供一种降低 CDH1 水平降低的癌细胞的存活力或增殖的方法,所述方法包括使癌细胞与至少一种选自以下组成的组的试剂接触: 1) 编码 RHOA 显性负多肽或其生物活性片段的核酸; 和 2) RHOA 显性负多肽或其生物活性片段。

[0010] 如上所述,进一步提供多个实施例,其可以应用于本发明的任何方面和/或与本文描述的任何其它实施例组合。例如,在一个实施例中,癌细胞具有 CDH1 表达的丧失。在另一个实施例中,癌细胞正在经历或已经经历上皮间质转化 (EMT)。在仍另一个实施例中,癌细胞获自患有癌症的受试者,所述癌症选自弥漫性胃癌 (DGC)、小叶乳腺癌、转移性乳腺癌、转移性肺癌、转移性非小细胞肺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌和黑素瘤组成的组。在又一个实施例中,所述试剂选自以下组成的组: (i) RHOA 显性负多肽, 在其全长上与选自 SEQ ID NO:1、2和3组成的组的多肽或其生物活性片段至少80%相同; 和 (ii) 编码 (i) 的 RHOA 显性负多肽或其生物活性片段的核酸序列, 其中所述核酸序列在其全长上与选自 SEQ ID NO:4、5、6、7、8、9、10和11组成的组的核酸序列或其编码生物活性片段的部分至少80%相同。在另一个实施例中,所述试剂包括 SEQ ID NO:1、2或3的 RHOA 显性负多肽序列。在仍另一个实施例中,所述试剂是 RHOA 显性负多肽或其生物活性片段, 并且进一步包括与其融合的异源多肽。在又一个实施例中,融合多肽具有比相应的未融合 RHOA 显性负多肽或其生物活性片段更长的半衰期和/或细胞渗透性。在另一个实施例中,异源多肽是 Fc 结构域和/或细胞可渗透性肽。在仍另一个实施例中,所述试剂是包括在表达载体或细胞内的核

酸。在又一个实施例中,所述方法进一步包括使癌细胞与免疫疗法和/或癌症疗法接触,任选地其中在所述试剂之前、之后或同时施用免疫疗法和/或癌症疗法。在另一个实施例中,免疫治疗包括癌症疫苗和/或病毒。在仍另一个实施例中,免疫疗法抑制免疫检查点。在又一个实施例中,免疫检查点选自CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、嗜乳脂蛋白和A2aR组成的组。在另一个实施例中,癌症疗法选自放射、放射增敏剂和化学疗法组成的组。

[0011] 在仍另一个方面,提供一种评估权利要求1的试剂用于治疗受试者中CDH1水平降低的癌症的功效的方法,所述方法包括:a)在第一时间点检测受试者样本中的存活和/或增殖癌细胞的数量;b)在施用试剂后至少一个随后的时间点期间重复步骤a);以及c)比较在步骤a)和b)中检测到的存活和/或增殖癌细胞的数量,其中与在第一时间点样本中的量相比,随后的样本中存活和/或增殖癌细胞不存在或数量显著减少,表明所述试剂可以治疗受试者的癌症。

[0012] 如上所述,进一步提供多个实施例,其可以应用于本发明的任何方面和/或与本文描述的任何其它实施例组合。例如,在一个实施例中,在第一时间点和随后的时间点之间,受试者已经接受治疗、完成治疗和/或处于癌症缓解中。在另一个实施例中,第一和/或至少一个随后的样本选自离体和体内样本组成的组。在仍另一个实施例中,第一和/或至少一个随后的样本从癌症的动物模型获得。在又一个实施例中,第一和/或至少一个随后的样本是从受试者获得的单个样本或合并样本的一部分。在另一个实施例中,样本包括获自受试者的细胞、血清、肿瘤周围组织和/或肿瘤内组织。在仍另一个实施例中,所述方法进一步包括通过测量选自以下组成的组的至少一个标准来确定对试剂的响应性:临床受益率、直至死亡存活、病理完全缓解率、病理缓解的半定量测量、临床完全缓解、临床部分缓解、临床疾病稳定、无复发存活、无转移存活、无疾病存活、循环肿瘤细胞减少、循环标志物响应和RECIST标准。在又一个实施例中,所述试剂以药学上可接受的制剂施用。在另一个实施例中,施用或接触的步骤在体内、离体或体外进行。在仍另一个实施例中,受试者是癌症的动物模型,任选地其中动物模型是小鼠模型。在又一个实施例中,受试者是哺乳动物。在另一个实施例中,哺乳动物是小鼠或人。在仍另一个实施例中,哺乳动物是人。

[0013] 在又一方面,提供一种基于细胞的测定,用于筛选可降低CDH1水平降低的癌细胞的存活力或增殖的试剂,所述测定包括:

[0014] a)使癌细胞与选自以下组成的组的测试剂接触:1)编码RHOA突变体或其生物活性片段的核酸;和2)RHOA突变体多肽或其生物活性片段;以及b)确定相对于对照,癌细胞的存活力或增殖降低,从而鉴定用于降低癌细胞的存活力或增殖的测试剂。在一个实施例中,对照是未与测试剂接触的癌细胞。在另一个实施例中,对照是与抗癌剂接触的癌细胞。在仍另一个实施例中,癌细胞是从癌症的动物模型或患有癌症的人类患者分离的。在又一个实施例中,接触步骤在体内、离体或体外发生。

附图说明

[0015] 图1显示RHOA-T19N异位表达特异性杀死无CDH1胃类器官。用p1x307慢病毒EGFP/

RHOA-WT/RHO-T19N病毒感染Mist1CreER、Cdh1^{F/F}类器官,并通过持续1周加入嘌呤霉素(puro)来选择稳定感染的类器官。然后用或不用他莫昔芬处理细胞以激活Cre来诱导E-钙粘蛋白损失。RHOA异位表达和E-钙粘蛋白损失通过蛋白质印迹和番茄/GFP颜色转化测定二者来验证。

[0016] 图2显示RHOA-T19N异位表达特异性杀死无CDH1乳腺上皮MCF10A细胞。用不同的组成型RHOA突变病毒感染等基因MCF10A-CDH1完整细胞,并通过持续1周加入嘌呤霉素来选择稳定感染的细胞。然后将细胞铺板于96孔板中,以用于使用细胞滴度glo测定进行分析。用不同的Dox诱导型RHOA突变病毒感染MCF10A-CDH1-KO细胞,并通过持续1周加入嘌呤霉素来选择稳定感染的细胞。然后将细胞铺板于具有Dox诱导的96孔板中,以用于细胞滴度glo测定分析。

[0017] 图3显示RHOA-T19N可以显著抑制NUGC4肿瘤生长。通过蛋白质印迹分析证实弥漫性胃癌(DGC)NUGC4细胞的总E-钙粘蛋白损失。然后使用嘌呤霉素选择用Dox诱导型慢病毒RHOA病毒稳定感染细胞。将三百万NUGC4细胞注射到裸鼠的胁腹。2周后,将常规食物换成含Dox的食物以诱导突变RHOA表达。每组中N=3只小鼠。 $P<0.0001$:Ctrl-VS-T19N。

[0018] 图4显示RHOA-T19N可以显著抑制MKN45肿瘤生长。通过蛋白质印迹分析证实弥漫性腺癌MKN45细胞的总E-钙粘蛋白损失。然后使用嘌呤霉素选择用Dox诱导型慢病毒RHOA病毒稳定感染细胞。将三百万MKN45细胞注射到裸鼠的胁腹。2周后,将常规食物换成含Dox的食物以诱导突变RHOA表达。每组中N=3只小鼠。 $P<0.0001$:Ctrl-VS-T19N。

[0019] 对于示出条形直方图的任何图,每个指示从左到右的条形与图例的框以从上到下的顺序直接对应,如图所示。

具体实施方式

[0020] 本发明部分基于发现小GTPase RHOA显性负型(例如RHOA T19N、RHOA G17E或RHOA G17V)可调节具有降低和/或不存在CDH1表达的癌细胞的过度增殖,例如在无CDH1癌细胞中,而CDH1表达完整的癌细胞则可以保留。例如,RHOA T19N显性负型特异性杀死无CDH1的MCF10A细胞,但保留CDH1完整的MCF10A细胞。使用等基因胃类器官模型发现了类似的结果。例如,RHOA-T19N的异位表达特异性地杀死无CDH1的胃类器官。此外,RHOA-T19N可显著抑制E-钙粘蛋白损失NUGC4和MKN45弥漫性胃细胞系的肿瘤生长。因此,本发明部分涉及使用显性负RHOA治疗CDH1水平降低的癌症的方法和试剂。

[0021] I. 定义

[0022] 冠词“一”和“一个”在本文中用于指该冠词的语法对象中的一个或多个(即,至少一个)。举例来说,“一个元件”是指一个元件或多个元件。

[0023] 除非本文另有说明,否则术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”广泛涵盖天然存在形式的抗体(例如IgG、IgA、IgM、IgE)和重组抗体如单链抗体、嵌合和人源化抗体和多特异性抗体,以及所有前述抗体的片段和衍生物,所述片段和衍生物至少具有一个抗原结合位点。抗体衍生物可包括与抗体缀合的蛋白质或化学部分。

[0024] 如本文所用,术语“抗体”还包括抗体的“抗原结合部分”(或简单地“抗体部分”)。如本文所用,术语“抗原结合部分”是指抗体的一个或多个片段,其保留特异性结合抗原的能力。已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段来进行。涵盖在术语抗体的

“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括：(i) Fab片段，由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')₂片段，包含两个在铰链区通过二硫键连接的Fab片段的二价片段；(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段；(iv) 由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段，(v) 由VH结构域组成的dAb片段 (Ward等人，(1989)《自然》341:544-546)；和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外，尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码，但它们可以使用重组方法通过能够使它们成为单蛋白链的合成接头连接，其中VL和VH区配对以形成单价多肽(称为单链Fv(scFv)；参见例如Bird等人(1988)《科学(Science)》242:423-426；和Huston等人(1988)《美国科学学院学报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》85:5879-5883；和Osbourn等人1998,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》16:778)。此类单链抗体也旨在涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。可以将特异性scFv的任何VH和VL序列连接至人免疫球蛋白恒定区cDNA或基因组序列，以产生编码完整IgG多肽或其它同种型的表达载体。使用蛋白质化学或重组DNA技术，VH和VL也可用于产生免疫球蛋白的Fab、Fv或其它片段。也包括其它形式的单链抗体如双体抗体。双体抗体是二价双特异性抗体，其中VH和VL结构域在单多肽链上表达，但使用的接头太短而不能在同一条链上的两个结构域之间配对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger,P.等人(1993)《美国科学学院学报》90:6444-6448；Poljak,R.J.等人(1994)《结构(Structure)》2:1121-1123)。

[0025] 更进一步，抗体或其抗原结合部分可以是较大的免疫粘附多肽的一部分，其是通过抗体或抗体部分与一种或多种其它蛋白质或肽的共价或非共价结合形成的。此类免疫粘附多肽的实例包括使用链霉亲和素核心区域来制备四聚体scFv多肽(Kipriyanov, S.M.等人(1995)《人类抗体和杂交瘤(Human Antibodies and Hybridomas)》6:93-101)，以及使用半胱氨酸残基、标记肽和C末端多组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv多肽(Kipriyanov, S.M.等人(1994)《分子免疫学(Mol.Immunol.)》31:1047-1058)。抗体部分如Fab和F(ab')₂片段，可以使用完整抗体的常规技术，如分别通过木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化从完整抗体制备。此外，如本文所述，可以使用标准重组DNA技术获得抗体、抗体部分和免疫粘附多肽。

[0026] 抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体；异种的、同种异体的或同基因的；或其修饰形式(例如，人源化，嵌合等)。抗体也可能是完全人类的。如本文所用，术语“单克隆抗体”和“单克隆抗体组合物”是指仅含有一种能够与抗原的特定表位免疫反应的抗原结合位点的抗体多肽群，而术语“多克隆抗体”和“多克隆抗体组合物”是指含有能够与特定抗原相互作用的多种抗原结合位点的抗体多肽群。单克隆抗体组合物典型地对与其免疫反应的特定抗原表现出单一结合亲和力。

[0027] 术语“反义”核酸多肽包括与编码蛋白质的“正义”核酸互补的核苷酸序列，例如与双链cDNA多肽的编码链互补，与mRNA序列互补或与基因的编码链互补。因此，反义核酸多肽可以与正义核酸多肽氢键键合。

[0028] 术语“体液”是指从体内排泄或分泌的流体，以及通常不从体内分泌的流体(例如，羊水、房水、胆汁、血液和血浆、脑脊髓液、耳垢和耳屎、尿道球腺液或射精前液、乳糜、食糜、大便、女性射精、间质液、细胞内液、淋巴液、月经、母乳、粘液、胸膜液、腹膜液、脓液、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、眼泪、尿液、阴道润滑性分泌物、玻璃体液、呕吐物)。在优选的

实施例中,体液限于与血液有关的流体,包括全血、血清、血浆等。

[0029] 术语“癌症”或“肿瘤”或“过度增殖性病征”是指具有致癌细胞典型特征如不受控制的增殖、永生、转移潜能、快速生长和增殖速率以及某些特征性形态特征的细胞的存在。癌症通常与不受控制的细胞生长,此类细胞向邻近组织的侵袭以及此类细胞通过血管性和淋巴性方式扩散至身体其它器官有关。当癌细胞侵入并越过相邻组织的正常边界时,就会发生癌症侵袭,这可以通过测定癌细胞迁移、癌细胞对基底膜的酶破坏等来测量。在一些实施例中,癌症的特定阶段是相关的,并且此类阶段可以包括血管生成、细胞侵袭和/或转移之前和/或之后的时间段。癌细胞通常是实体瘤的形式,但是此类细胞可以单独存在于动物体内,或者可以是非致瘤性癌细胞如白血病细胞。癌症包括但不限于B细胞癌,例如多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症、重链病(例如 α 重链病、 γ 重链病和 μ 重链病)、良性单克隆丙种球蛋白病和免疫细胞淀粉样变、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、周围神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、血液组织癌等。适用于本发明涵盖的方法的癌症类型的其它非限制性实例包括人肉瘤和癌,例如,纤维肉瘤、粘肉肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结肠直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、肝癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、骨癌、脑肿瘤、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤;白血病,例如急性淋巴细胞性白血病和急性髓细胞性白血病(成髓细胞、早幼粒细胞、粒单核细胞、单核细胞和红白血病);慢性白血病(慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病和慢性淋巴细胞性白血病);和真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金氏病和非霍奇金氏病)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症和重链病。在一些实施例中,通过本发明的方法确定其表型的癌症是上皮癌,例如但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、妇科癌、肾癌、喉癌、肺癌、口腔癌、头颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或皮肤癌。在其它实施例中,癌症是乳腺癌、前列腺癌、肺癌或结肠癌。在仍其它实施例中,上皮癌是非小细胞肺癌、非乳头状肾细胞癌、宫颈癌、卵巢癌(例如浆液性卵巢癌)或乳腺癌。上皮癌可以以多种其它方式表征,包括但不限于浆液性、子宫内膜样、粘液性、透明细胞、布伦纳(brenner)或未分化。在一些实施例中,本发明用于治疗、诊断和/或预后黑色素瘤及其亚型。

[0030] 术语“分类”包括将样本与疾病状态“关联”或“分类”。在某些情况下,“分类”是基于统计证据、经验证据或二者。在某些实施例中,分类使用具有已知疾病状态的所谓训练样本集的方法和系统。一旦建立,训练数据集充当基础、模型或模板,将未知样本的特征与之进行比较,以对样本的未知疾病状态进行分类。在某些情况下,对样本进行分类类似于诊断样本的疾病状态。在某些其它情况下,对样本进行分类类似于将样本的疾病状态与另一疾病状态区分开。

[0031] 术语“编码区”是指核苷酸序列的包括被翻译成氨基酸残基的密码子的区域,而术

语“非编码区”是指核苷酸序列的未被翻译成氨基酸的区域(例如5'和3'非翻译区)。

[0032] 术语“互补的”是指两个核酸链的区域之间或同一核酸链的两个区域之间的序列互补性的广义概念。已知第一核酸区域的腺嘌呤残基能够与第二核酸区域的残基形成特异性氢键(“碱基配对”),如果所述残基是胸腺嘧啶或尿嘧啶,则第二核酸区域与第一区域反平行。类似地,已知第一核酸链的胞嘧啶残基能够与第二核酸链的残基碱基配对,如果所述残基是鸟嘌呤,则第二核酸链与第一链反平行。如果当两个区域以反平行方式布置时,第一区域的至少一个核苷酸残基能够与第二区域的残基配对,则核酸的第一区域与相同或不同核酸的第二区域互补。优选地,第一区域包括第一部分,并且第二区域包括第二部分,由此,当第一和第二部分以反平行方式布置时,至少约50%,并且优选至少约75%,至少约90%或至少约95%的第一部分的核苷酸残基能够与第二部分中的核苷酸残基碱基配对。更优选地,第一部分的所有核苷酸残基都能够与第二部分中的核苷酸残基碱基配对。

[0033] 术语“对照”是指适合提供与测试样本中的表达产物进行比较的任何参考标准。在一个实施例中,对照包括获得“对照样本”,从中检测表达产物水平并将其与测试样本的表达产物水平进行比较。此类对照样本可以包括任何合适的样本,包括但不限于来自具有已知结果的对照癌症患者的样本(可以为存储的样本或先前的样本测量);从受试者如正常患者或癌症患者分离的正常组织或细胞,从受试者如正常受试者或癌症患者分离的培养原代细胞/组织,从癌症患者的同一器官或身体部位获得的相邻正常细胞/组织,从正常受试者分离的组织或细胞样本,或从保藏处获得的原代细胞/组织。在另一个优选的实施例中,对照可以包括来自任何合适来源的参考标准表达产物水平,包括但不限于管家基因,来自正常组织(或其它先前分析的对照样本)的表达产物水平范围,来自具有一定结果(例如,存活期为一、二、三、四年等)或接受某种治疗的患者组或患者集的测试样本中的先前确定的表达产物范围。本领域技术人员将理解,此类对照样本和参考标准表达产物水平可以组合使用以用作本发明方法中的对照。在一个实施例中,对照可包括正常或非癌性细胞/组织样本。在另一个优选的实施例中,对照可以包括对于患者集如癌症患者集,或者对于接受某种治疗的癌症患者集,或者对于具有一个结果相对于另一个结果的患者集的表达水平。在前一种情况下,可以将每个患者的特定表达产物水平指定为百分位数的表达水平,或表示为高于或低于参考标准表达水平的均值或平均值。在另一个优选的实施例中,对照可包括正常细胞,来自联合化学疗法治患者的患者的细胞和来自患有良性癌症的患者的细胞。在另一个实施例中,对照还可以包括测量值,例如,与相同群体中管家基因的表达水平相比,群体中特定基因的平均表达水平。此类群体可以包括正常受试者,未经任何治疗(即未接受过治疗)的癌症患者,正在接受疗法的癌症患者或患有良性癌症的患者。在另一个优选的实施例中,对照包括表达产物水平的比率转化,包括但不限于确定测试样本中两个基因的表达产物水平的比率并将其与参考标准中相同的两个基因的任何合适的比率进行比较;确定测试样本中两个或更多个基因的表达产物水平,并确定任何合适对照中表达产物水平的差异;并确定测试样本中两个或更多个基因的表达产物水平,将它们的表达标准化为测试样本中管家基因的表达,并与任何合适的对照进行比较。在特别优选的实施例中,对照包括与测试样本具有相同谱系和/或类型的对照样本。在另一个实施例中,对照可以包括表达产物水平,所述表达产物水平被分组为患者样本集内或基于患者样本集如所有癌症患者的百分位数。在一个实施例中,建立了对照表达产物水平,其中相对于例如特定百分位数的较高或较

低的表达产物水平被用作预测结果的基础。在另一个优选的实施例中,使用来自具有已知结果的癌症对照患者的表达产物水平来建立对照表达产物水平,并将来自测试样本的表达产物水平与对照表达产物水平进行比较,作为预测结果的基础。如以下数据所证明的,本发明的方法不限于在比较测试样本中的表达产物水平与对照中使用特定的分割点。

[0034] 如本文所用,相对于活化的免疫细胞,术语“共刺激”包括共刺激分子提供诱导增殖或效应子功能的第二非活化受体介导的信号(“共刺激信号”)的能力。例如,共刺激信号可以导致细胞因子分泌,例如,在已经接受T细胞受体介导的信号的T细胞中。已经例如经由激活受体接收到细胞受体介导的信号的免疫细胞在本文中被称为“激活的免疫细胞”。

[0035] 术语“诊断癌症”包括使用本发明的方法、系统和遗传密码来确定个体中癌症或其亚型的存在或不存在。该术语还包括用于评估个体疾病活动水平的方法、系统和遗传密码。诊断可以直接通过提供治疗处理的试剂进行。可替代地,提供治疗剂的人可以请求进行诊断测定。诊断医生和/或治疗干预人员可以解释诊断测定结果以确定治疗策略。类似地,处理替代过程可以应用于其它测定,例如预后测定。

[0036] 如果分子与底物共价或非共价结合,则所述分子“固定”或“粘附”在底物上,使得可以用液体(例如标准柠檬酸盐水,pH 7.4)漂洗底物,而无需使大部分分子从底物上解离。

[0037] 如本文所用,术语“基因表达数据”或“基因表达水平”是指关于细胞或细胞组中基因或基因集表达的相对或绝对水平的信息。可以基于基因编码的RNA如mRNA的水平来确定基因的表达水平。可替代地,可以基于基因编码的多肽或其片段的水平来确定表达水平。可以获取单个细胞或一组细胞如肿瘤或活检样本的基因表达数据。基因表达数据和基因表达水平可以存储在计算机可读介质上,例如,与微阵列或芯片读取设备结合使用的计算机可读介质。可以操纵处理基因表达数据以产生基因表达签名。

[0038] 如本文所用,术语“基因表达签名”或“签名”是指一组协调表达的基因。可以在特定的细胞谱系、分化阶段或特定的生物反应期间表达组成该签名的基因。所述基因可以反映它们在其中表达的肿瘤的生物学方面,例如癌症的起源细胞,活检中非恶性细胞的性质以及引起癌症的致癌机制。

[0039] 如本文所用,术语“同源的”或“同源性”是指相同核酸链的两个区域之间或两个不同核酸链的区域之间的核苷酸序列相似性。当两个区域中的核苷酸残基位置被相同的核苷酸残基占据时,则所述区域在该位置是同源的。如果每个区域的至少一个核苷酸残基位置被相同残基占据,则第一区域与第二区域同源。两个区域之间的同源性根据被相同核苷酸残基占据的两个区域的核苷酸残基位置的比例表示。举例而言,具有核苷酸序列5'-ATTGCC-3'的区域和具有核苷酸序列5'-TATGGC-3'的区域具有50%的同源性。优选地,第一区域包括第一部分,并且第二区域包括第二部分,由此,每个部分的核苷酸残基位置的至少约50%,和优选至少约75%,至少约90%,或至少约95%被相同的核苷酸残基占据。更优选地,每个部分的所有核苷酸残基位置都被相同的核苷酸残基占据。

[0040] 术语“宿主细胞”旨在是指已引入本发明的核酸,如本发明的重组表达载体的细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文可互换使用。应该理解的是,此类术语不仅指特定的受试者细胞,而且还指此类细胞的后代或潜在后代。由于突变或环境影响,某些修饰可能会在后代中发生,因此此类后代实际上可能与亲本细胞不同,但仍包括在本文所用术语的范围内。

[0041] 如本文所用,术语“人源化抗体”旨在包括由具有可变区和恒定区的非人细胞制备的抗体,所述可变区和恒定区已被改变以更紧密类似于由人细胞制备的抗体,例如,通过改变非人抗体氨基酸序列以掺入人种系免疫球蛋白序列中发现的氨基酸制备的抗体。人源化抗体可以包括例如在CDR中不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0042] 如本文所用,术语“人源化抗体”还包括其中衍生自另一哺乳动物物种如小鼠的种系的CDR序列已嫁接到人框架序列上的抗体。

[0043] 如本文所用,术语“免疫细胞”是指在免疫应答中起作用的细胞。免疫细胞是造血起源的,并且包括淋巴细胞如B细胞和T细胞;自然杀伤细胞;髓样细胞如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0044] 如本文所用,术语“免疫应答”包括T细胞介导的和/或B细胞介导的免疫应答。示例性的免疫应答包括T细胞应答,例如细胞因子产生和细胞的细胞毒性。另外,术语免疫应答包括受T细胞活化例如抗体产生(体液应答)和细胞因子应答细胞例如巨噬细胞活化间接影响的免疫应答。

[0045] 术语“免疫治疗剂”可以包括任何分子、肽、抗体或其它可以刺激宿主免疫系统以产生对受试者的肿瘤或癌症的免疫应答的试剂。各种免疫治疗剂可用于本文所述的组合物和方法。免疫治疗剂类别中的多种抗癌剂是本领域公知的,并且包括但不限于阻断或抑制PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4等功能的抗体。

[0046] 如本文所用,术语“抑制”包括例如特定作用、功能或相互作用的减少、限制或阻断。例如,如果减轻、终止、减慢或预防了癌症的至少一种症状,如过度增殖性生长,则“抑制”了癌症。如本文所用,如果降低、减慢、延迟或预防了癌症的复发或转移,则也“抑制”了癌症。

[0047] 如本文所用,术语“抑制性信号”是指经由针对免疫细胞上的多肽的抑制性受体(例如,CTLA-4或PD-1)传递的信号。此类信号通过激活受体(例如,通过TCR、CD3、BCR或Fc多肽)拮抗信号,并且可以导致例如抑制第二信使产生;抑制增殖;抑制免疫细胞中的效应子功能,例如减少吞噬作用、减少抗体产生、减少细胞的细胞毒性、免疫细胞无法产生介质(如细胞因子(例如IL-2)和/或过敏性反应的介质);或无变应性的发展。

[0048] 如本文所用,术语“相互作用”在指两个分子之间的相互作用时,是指分子彼此之间的物理接触(例如,结合)。通常,此类相互作用导致一个或两个所述分子的活性(产生生物学效应)。所述活性可以是一个或两个分子的直接活性。可替代地,可以防止相互作用中的一个或两个分子与它们的配体结合,并且因此就配体结合活性而言是保持无活性的(例如,结合其配体并触发或抑制免疫应答)。抑制处理相互作用导致破坏参与相互作用的一个或多个分子的活性。增强此类相互作用是延长或增加所述物理接触的可能性,以及延长或增加所述活动的可能性。

[0049] 如本文所用,“分离的抗体”旨在是指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体。此外,分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学物质。

[0050] 如本文所用,“分离的蛋白质”是指当从细胞分离或通过重组DNA技术生产时基本上不含其它蛋白质、细胞物质、分离培养基和培养基的蛋白质,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质的蛋白质。“分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物活性部分基本

上不含来自衍生抗体、多肽、肽或融合蛋白的细胞或组织来源的细胞物质或其它污染蛋白，或者当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质。词语“基本上不含细胞物质”包括制剂，其中将本发明的组合物与从其分离或重组产生其的细胞的细胞组分分离。在一个实施例中，词语“基本上不含细胞物质”包括具有小于约30%、20%、10%或5%（按干重计）的细胞物质的制剂。当重组产生抗体、多肽、肽或融合蛋白或其片段，例如其生物活性片段时，优选基本上不含培养基，即培养基少于蛋白质制剂体积的约20%，更优选小于约10%，最优选小于约5%。

[0051] “试剂盒”是包括至少一种试剂（例如探针）的任何制品（例如包装或容器），以用于特异性地检测或调节本发明的标志物的表达。所述试剂盒可以作为用于执行本发明方法的单元被推广、分发或出售。

[0052] 术语“弥漫性胃癌”是指一种特定类型的胃癌，有时也称为“印戒细胞胃癌”或“革囊胃”。它倾向于影响大部分的胃，而不是停留在胃的一个区域。不存在实体瘤。相反，癌细胞（恶性细胞）在胃粘膜下繁殖，使粘膜变得厚且坚硬。这类癌症的侵袭性使这些癌细胞极有可能扩散（转移）到其它组织，例如肝脏或附近的骨头。所有胃癌中约有20%是弥漫性胃癌，并且这些中的少数是由于遗传性弥漫性胃癌（HDGC）引起的。HDGC是继承的遗传病况。最常与HDGC相关的基因称为CDH1。CDH1基因的突变（改变）使人发展胃癌和与HDGC相关的其它癌症的风险增加。包括CTNNA1在内的其它基因可能与HDGC相关。

[0053] 可以使用内窥镜检查 and 钡剂X射线分析扫描来诊断胃癌。可以使用选自CT扫描、PET扫描、内窥镜超声检查和腹腔镜分期中的一项或多项测试来确定胃肿瘤的阶段。弥漫性胃癌难以诊断，因为该癌症在上消化道内镜检查中不可见。因此，大多数弥漫性胃癌病例在晚期（III或IV）被诊断出，且存活率较低。建议对弥漫性胃癌多发病例的家庭以及40岁之前被诊断为弥漫性胃癌的患者进行CDH1基因突变测试。当前的筛查建议是每年进行上消化道内镜检查 and 活检。外科手术（例如胃部分切除术或全胃切除术）是最常见的治疗方法，尤其是在疾病处于早期时。对于更晚期的胃癌，可以使用除外科手术以外的治疗如化学疗法、放射疗法或这些方法的组合。

[0054] 术语“小叶乳腺癌”，也称为浸润性小叶癌（ILC），是指已经穿透小叶壁并开始侵袭乳房组织的癌症。ILC是继浸润性导管癌（始于载乳导管并扩散到载乳导管之外的癌症）之后的第二大最常见的乳腺癌类型。根据美国癌症协会，美国每年有超过18万名妇女发现自己患有浸润性乳腺癌。所有浸润性乳腺癌中约有10%是浸润性小叶癌。

[0055] 与其它形式的乳腺癌相比，ILC更难以诊断，因为它以独特的分支模式扩散。诊断浸润性小叶癌通常涉及程序组合，包括乳房的物理检查、乳房X线摄影、超声、乳房MRI和活检（例如，细针抽吸活检、针芯活检、切开活检或切除活检）。将组织样本发送到病理学家以在显微镜下检查。病理学家寻找浸润性小叶癌典型的细胞外观和生长方式。病理学家还可以订购一项特殊的测试，称为E-钙粘蛋白研究。对浸润性小叶癌细胞进行这种突变测试可以帮助将其与原位小叶癌，小叶中的不是癌症的一组异常细胞区分开来。从I期（最早期）到IV期（最晚期）的规模描述了浸润性小叶癌。分期与肿瘤的大小、淋巴结转移以及是否扩散到身体其它部位有关。较高的数字表示更晚期的阶段。

[0056] 浸润性小叶癌的治疗分为两大类：局部治疗和全身治疗。可以采用局部治疗如外科手术和放射疗法来治疗浸润性小叶癌（ILC）本身以及任何可能受癌症影响的附近区域如

胸部和淋巴结。可能的外科手术方法包括乳房肿瘤切除术、乳房切除术、前哨淋巴结清除术和腋窝淋巴结清除术。进行放射治疗的可能方法包括外照射、内部部分乳房照射和外部部分乳房照射。与侧重于发现浸润性小叶癌 (ILC) 的区域的局部治疗不同, 全身治疗涉及整个身体。治疗如化学疗法、激素疗法和其它靶向疗法用于破坏可能已离开原始肿瘤的任何癌细胞, 并降低浸润性小叶癌复发的风险。可用于治疗浸润性小叶癌的多种化学疗法的仅一些实例包括阿霉素、表柔比星、环磷酰胺、多西他赛、紫杉酚、卡培他滨、伊沙匹隆、甲氨蝶呤和氟尿嘧啶。激素疗法也称为抗雌激素疗法, 通过降低体内雌激素的量或阻止雌激素向乳腺癌细胞生长发出信号来起作用。存在最常用的两类激素疗法: 选择性雌激素受体调节剂 (SERM) 和芳香酶抑制剂。其它类型的激素疗法包括雌激素受体下调剂 (ERD) 和卵巢关闭或切除。如果浸润性小叶癌为HER2阳性, 则可以使用HER2靶向疗法 (例如赫赛汀或拉帕替尼)。与激素疗法和HER2靶向疗法一样, 其它靶向疗法也旨在干扰能够使乳腺癌细胞生长和茁壮成长的特定过程。仅一个实例是阿瓦斯丁 (化学名称: 贝伐单抗), 该药物靶向称为血管内皮生长因子 (VEGF) 的蛋白质, 可防止其刺激新血管的形成和生长。

[0057] 表1

[0058] EMT的标志物

获取的标志物		减弱的标志物	
名称	EMT类型	名称	EMT类型
细胞表面蛋白			
N-钙粘蛋白	1, 2	E-钙粘蛋白	1, 2, 3
OB-钙粘蛋白	3	ZO-1	1, 2, 3
α 5 β 1整合蛋白	1, 3		
α V β 6整合蛋白	1, 3		
蛋白多糖-1	1, 3		
细胞骨架标志物			
FSP1	1, 2, 3	细胞角蛋白	1, 2, 3
α -SMA	2, 3		
波形蛋白	1, 2		
β -连环蛋白	1, 2, 3		
ECM蛋白			
[0059] α 1(I)胶原蛋白	1, 3	α 1(IV)胶原蛋白	1, 2, 3
α 1(III)胶原蛋白	1, 3	层粘连蛋白1	1, 2, 3
纤连蛋白	1, 2		
层粘连蛋白5	1, 2		
转录因子			
Snail1 (Snail)	1, 2, 3		
Snail2 (Slug)	1, 2, 3		
ZEB1	1, 2, 3		
CBF-A/KAP-1复合物	2, 3		
扭转	1, 2, 3		
LEF-1	1, 2, 3		
Ets-1	1, 2, 3		
FOXC2	1, 2		
Goosecoid	1, 2		
微小RNA			
miR10b	2	Mir-200家族	2
miR-21	2, 3		

[0060] ZEB1, 锌指E-盒结合同源异形盒1

[0061] 术语“上皮间质转化 (EMT)”是指一种生物学过程, 其允许正常通过其基底表面与基底膜相互作用的极化上皮细胞经历多种生化变化, 使其能够呈现间充质细胞表型, 包括增强的迁徙能力、侵袭性、增强的抗凋亡性, 以及大大增加的ECM组分生产。EMT的完成通过下面的基底膜的降解和间充质细胞的形成来发出信号, 所述间充质细胞可以从其起源的上皮层迁移走。为了启动EMT并使其完成, 需要进行多个不同的分子过程。这些包括转录因子的激活, 特定细胞表面蛋白的表达, 细胞骨架蛋白的重组和表达, ECM降解酶的产生以及特定微小RNA表达的变化。在多种情况下, 所涉及的因素也被用作生物标志物来证明细胞通过EMT的传代。E-钙粘蛋白的损失被认为是EMT中的基本事件。EMT对于包括中胚层形成和神经

管形成在内的众多发育过程至关重要。EMT还显示在伤口愈合、器官纤维化和癌症进展的转移开始中发生。转移的开始需要入侵,这是由EMT启用的。原发性肿瘤中的癌细胞会失去由E-钙粘蛋白阻抑介导的细胞粘附,并穿透具有增强的侵袭性的基底膜,并通过内渗进入血流。术语“EMT癌症”是指正在或已经经历EMT过程的任何类型的癌症。EMT癌症包括但不限于弥漫性胃癌、小叶乳腺癌、转移性乳腺癌、转移性肺癌、转移性非小细胞肺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌和黑素瘤。

[0062] 存在EMT时,向更间充质状态过渡的上皮细胞会失去极性;增加几种转录因子的核表达(见表1);失去E-钙粘蛋白、蛋白多糖-1和紧密连接蛋白(ZO-1)的表达;增加其细胞骨架蛋白的合成(见下文);重新排列肌动蛋白应力纤维;变成纺锤形;和变得更具迁徙性。这些EMT样细胞也可以抵抗凋亡和癌症化学疗法。

[0063] 已经使用了多种生物标志物来证明EMT,其中一些在转化期间获得,并且一些在转化期间被减弱(见表1)。E-钙粘蛋白表达的改变是EMT的原型上皮细胞标志物,并且E-钙粘蛋白功能的丧失促进了EMT。在间充质细胞、成纤维细胞、癌细胞和神经组织中表达的从E-钙粘蛋白到N-钙粘蛋白的钙粘蛋白转换经常被用来监测EMT的进展。FSP1是与Ca²⁺结合的S100蛋白家族的成员。它是一种原型成纤维细胞标志物,用于检测癌症和纤维发生中的EMT。Snail转录因子是调节EMT的各种信号转导通路共同下游靶标的一个突出实例。

[0064] 术语“调节”包括上调和下调,例如增强或抑制反应。

[0065] 生物标志物如CDH1、RHOA等的“正常”或“对照”表达水平是未患有目标疾病如癌症的受试者例如人类患者的细胞中该生物标志物的表达水平。生物标志物的“过表达”或“显著较高的表达水平”是指测试样本中的表达水平,所述水平高于用于评估表达的测定的标准误差,并且优选至少比对照样本(例如来自未患有目标疾病的健康受试者的样本)中的生物标志物的表达活性或水平(并且优选为若干对照样本的生物标志物的平均表达水平)高1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更高。生物标志物的“显著较低的表达水平”是指测试样本中的表达水平至少比对照样本(例如来自未患有目标疾病的健康受试者的样本)中的生物标志物的表达水平(并且优选为若干对照样本的生物标志物的平均表达水平)低1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更高。

[0066] 如本文所述,术语“癌前病变”是指虽然不是癌性的但具有变成癌性的潜力的病变。它还包括术语“癌前病症”或“潜在恶性病症”。特别地,这是指良性、形态学和/或组织学改变的组织,其恶性转化的风险高于正常,并且疾病或患者的习性不一定改变局部组织的临床外观,但与高于该组织癌前病变或癌症发展的正常风险(粘膜白斑、黏膜红斑、erythroleukoplakia扁平苔藓(苔藓样反应))相关以及任何组织学检查显示细胞异型或发育异常的病变或区域。

[0067] 术语“探针”是指能够选择性结合特定目的靶分子的任何分子,例如,由标志物编码或对应于标志物的核苷酸转录物或蛋白质。探针可以由本领域技术人员合成,或衍生自适当的生物制剂。为了检测靶分子,可以将探针特异性地设计为被标记,如本文所述。可用作探针的分子的实例包括但不限于RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0068] 术语“预后”包括对癌症的可能进程和结果或从疾病中恢复的可能性的预测。在一些实施例中,统计算法的使用在个体中提供了癌症预后。例如,预后可以是外科手术,黑色素瘤临床亚型的发展,一种或多种临床因素的发展,肠癌的发展或疾病的恢复。在一些实施例中,术语“良好预后”表示黑色素瘤治疗后的预期或可能的结果是良好的。术语“不良预后”表示黑色素瘤治疗后的预期或可能的结果不良。

[0069] 术语“耐药性”是指癌症样本或哺乳动物对癌症疗法的获得性或天然耐药性(即,对治疗处理无反应或对治疗处理的反应减少或有限),例如对治疗处理的反应减少25%或更多,例如30%、40%、50%、60%、70%、80%或更多,至减少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或更多。可以通过在获得耐药性之前与相同的癌症样本或哺乳动物进行比较,或与已知对治疗处理无耐药性的不同癌症样本或哺乳动物进行比较,来测量反应的减少。一种典型的对化学疗法的获得性耐药性称为“多药耐药性”。多药耐药性可以由P-糖蛋白介导或可以由其它机制介导,或者当哺乳动物被多药耐药性微生物或微生物组合感染时可发生。对治疗处理的耐药性的确定是本领域常规的,并且在普通技术人员的技能范围内,例如,可以通过本文描述为“敏化”的细胞增殖测定和细胞死亡测定来测量。在一些实施例中,术语“逆转耐药性”意指在单独的原发癌疗法(例如化学疗法或放射疗法)与未经治疗的肿瘤的肿瘤体积相比时无法产生统计学上显著的肿瘤体积降低的情况下,使用第二种试剂与原发癌疗法(例如化学疗法或放射疗法)的组合与未经治疗的肿瘤的肿瘤体积相比时能够在统计学上显著的水平(例如 $p < 0.05$)下显著降低肿瘤体积。这通常适用于在未经治疗的肿瘤有节奏地对数增长时进行的肿瘤体积测量。

[0070] 术语“致敏”意指以允许用癌症疗法(例如化学疗法或放射疗法)更有效地治疗相关癌症的方式来改变癌细胞或肿瘤细胞。在一些实施例中,正常细胞不会受到影响导致正常细胞受到癌症疗法(例如化学疗法或放射疗法)的过度伤害的程度。根据本领域对于下文描述的特定治疗和方法已知的方法测量对治疗处理的敏感性增加或降低,包括但不限于细胞增殖测定(Tanigawa N, Kern D H, Kikasa Y, Morton D L, 《癌症研究(Cancer Res)》1982;42:2159-2164)、细胞死亡测定(Weisenthal L M, Shoemaker R H, Marsden J A, Dill P L, Baker J A, Moran E M, 《癌症研究》1984;94:161-173; Weisenthal L M, Lippman M E, 《癌症治疗报告(Cancer Treat Rep)》1985;69:615-632; Weisenthal L M, In: Kaspers G J L, Pieters R, Twentyman P R, Weisenthal L M, Veerman A J P 编辑《白血病和淋巴瘤的耐药性(Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma)》,朗和湾(Langhorne),宾夕法尼亚州:哈伍德学术出版社(Harwood Academic Publishers),1993:415-432; Weisenthal L M, 《妇产科研究(Contrib Gynecol Obstet)》1994;19:82-90)。还可以通过测量一段时间(例如,对于人类来说是6个月,对于小鼠是4-6周)内的肿瘤大小减小来测量动物的敏感性或耐药性。如果与在不存在此类组合物或方法的情况下的治疗敏感性或耐药性相比,治疗敏感性的增加或耐药性的降低为25%或更多,例如30%、40%、50%、60%、70%、80%或更多,至减少2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或更多,则组合物或方法使对治疗处理的反应敏感。对治疗敏感性或耐药性的确定是本领域常规的,并且在普通技术人员的技能范围内。应当理解,本文描述的用于增强癌症疗法功效的任何方法可以等同地应用于使过度增殖或其它癌细胞(例如,抗性细胞)对癌症疗法敏感的方法。

[0071] 术语“RHOA”是指为小GTPases Rho家族成员的Ras同源基因家族成员A,其在无活

性的GDP结合状态和有活性的GTP结合状态之间循环,并在信号转导级联中充当分子开关。Rho蛋白促进肌动蛋白细胞骨架的重组,并调节细胞形状、附着和运动。该基因的过表达与肿瘤细胞增殖和转移有关。已经鉴定出多个选择性剪接的变体。术语“RHOA”旨在包括其片段、变体(例如,等位基因变体)及衍生物。代表性的人RHOA cDNA和人RHOA蛋白序列是本领域公知的,并且可从国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得。人RHOA同种型包括最长的同种型1(NM_001664.3和NP_001655.1)、较短的同种型2(NM_001313941.1和NP_001300870.1;其与变体1相比区别在于5'UTR但编码相同的蛋白质)、3(NM_001313943.1和NP_001300872.1;其含有替代的3'编码外显子,与同种型1相比,C末端更短且不同)、4(NM_001313944.1和NP_001300873.1;其使用3'编码区中的两个替代的框内剪接位点,导致与同种型1相比更短的同种型)、5(NM_001313945.1和NP_001300874.1;其使用5'区域中的替代剪接位点,并使用下游起始密码子,导致与同种型1相比更短的N末端)、6(NM_001313946.1和NP_001300875.1;其在3'编码区中缺少两个替换的框内外显子,导致与同种型1相比更短的同种型)和7(NM_001313947.1和NP_001300876.1;其在5'编码区缺少替换外显子,导致移码,与同种型1相比更短且C末端不同的同种型)。人类以外的生物体中RHOA直向同源物的核酸和多肽序列是公知的,并且包括例如黑猩猩RHOA(XM_001163851.5和XP_001163851.3)、狗RHOA(NM_001003273.3和NP_001003273.2)、牛RHOA(NM_176645.3和NP_788818.1)、小鼠RHOA(NM_001313961.1和NP_001300890.1;NM_001313962.1和NP_001300891.1;以及NM_016802.5和NP_058082.2),和大鼠RHOA(XM_006243699.1和XP_006243761.1;XM_006243700.1和XP_006243762.1;以及XM_006243701.1和XP_006243763.1)。

[0072] 术语“显性负RHOA”是指具有一个或多个突变并因此不结合GTP,以显性负型方式起作用来抑制RhoA GTP负载,从而导致内源RHOA和其它GTPase减弱的RHOA基因或蛋白质。在一些实施例中,它们可以隔离其它GTPase活化蛋白和鸟嘌呤交换因子。这些突变包括但不限于T19N、G17V和G17E。表2和表3中所示的序列显示了示例性“显性负RhoA”。

[0073] 术语“CDH1”是指钙粘蛋白1,钙粘蛋白超家族的经典钙粘蛋白。该基因与16号染色体上钙粘蛋白家族的其它成员一起存在于一个基因簇中。替代的剪接导致多个转录变体,其中至少一个编码蛋白水解加工以产生成熟糖蛋白的前原蛋白。这种钙依赖性细胞粘附蛋白由五个细胞外钙粘蛋白重复序列、一个跨膜区和一个高度保守的胞质尾区构成。蛋白质的结构-功能关系是公知的。例如,细胞内结构域含有对连环蛋白分子(例如, β -连环蛋白)结合并因此对E-钙粘蛋白功能至关重要的高度磷酸化的区域。该基因的突变与胃癌、乳腺癌、结肠直肠癌、甲状腺癌和卵巢癌有关。在弥漫型胃癌中已证实外显子8或9的框内跳跃和外显子10的缺失。还证实了外显子7(浸润性乳腺癌)、12和13(子宫内膜癌)和16(卵巢癌)的点突变主要影响E-钙粘蛋白的胞外结构域。表现出CDH1突变的最著名的肿瘤可能是浸润性小叶乳腺癌和弥漫性胃癌,其中约50%的这些肿瘤受到了影响。已经在多个家族中检测到CDH1的种系突变,导致具有印戒细胞的弱分化弥漫型腺癌的发展。术语“遗传性弥漫性胃癌(HDGC)综合征”是为了描述受影响的患者而创造的。CDH1基因功能的损失通过增加增殖、侵袭和/或转移来促进癌症进展。该蛋白的胞外域还可以介导细菌与哺乳动物细胞的粘附,并且胞质结构域是内在化所必需的。

[0074] 已经鉴定出多个替换剪接变体。术语“CDH1”旨在包括其片段、变体(例如,等位基因变体)及衍生物。代表性的人CDH1 cDNA和人CDH1蛋白序列是本领域公知的,并且可从国

家生物技术信息中心 (NCBI) 公开获得。人CDH1同种型包括最长的同种型1 (NM_004360.4和NP_004351.1)、较短的同种型2 (NM_001317184.1和NP_001304113.1;其与变体1相比在中央编码区缺少替代外显子)、3 (NM_001317185.1和NP_001304114.1;在其5'UTR外显子中使用替代剪接位点,导致与变体1相比不同的5'UTR和使用下游起始位点)和4 (NM_001317186.1和NP_001304115.1;在其5'UTR中缺少外显子,导致与变体1相比不同的5'UTR和使用下游起始位点)。人类以外的生物体中CDH1直向同源物的核酸和多肽序列是公知的,并且包括例如黑猩猩CDH1 (XM_001168150.4和XP_001168150.1;XM_016930064.1和XP_016785553.1;XM_016930063.1和XP_016785552.1)、猴CDH1 (XM_015126485.1和XP_014981971.1;2.XM_015126486.1和XP_014981972.1)、狗CDH1 (NM_001287125.1和NP_001274054.1)、牛CDH1 (NM_001002763.1和NP_001002763.1)、小鼠CDH1 (NM_009864.3和NP_033994.1)和大鼠CDH1 (NM_031334.1和NP_112624.1)。

[0075] 术语“协同效应”是指两种或更多种抗癌剂或化疗药物的组合效应可以大于单独的抗癌剂或化疗药物的单独效应的总和。

[0076] 术语“受试者”是指任何健康的动物、哺乳动物或人,或任何患有目标病况(例如癌症)的动物、哺乳动物或人。术语“受试者”与“患者”可互换。在一些实施例中,受试者未患除黑素瘤以外的任何癌症。在其它实施例中,受试者患有黑素瘤但不患有一种或多种其它目标癌症。例如,在一些实施例中,受试者未患肾细胞癌、头颈癌和/或肺癌。

[0077] 词语“基本上不含化学前体或其它化学物质”包括抗体、多肽、肽或融合蛋白的制剂,其中蛋白质与参与蛋白质合成的化学前体或其它化学物质分离。在一个实施例中,词语“基本上不含化学前体或其它化学物质”包括抗体、多肽、肽或融合蛋白的制剂,其具有小于约30% (按干重计)的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物质,更优选小于约20%的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物质,仍更优选小于约10%的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物质,并且最优选小于约5%的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物质。

[0078] 术语“基本上纯的细胞群”是指具有特定细胞标志物特征和分化潜能的细胞群,其为构成总细胞群的细胞的至少约50%,优选至少约75-80%,更优选至少约85-90%,并且最优选至少约95%。因此,“基本上纯的细胞群”是指在指定的测定条件下不显示特定标志物特征和分化潜能的细胞群,其含有少于约50%,优选少于约20-25%,更优选少于约10-15%,并且最优选少于约5%的细胞。

[0079] 如本文所用,术语“存活”包括以下所有:直至死亡存活,也称为总体存活(其中所述死亡可能与病因无关或与肿瘤相关);“无复发存活”(其中术语复发应包括局部和远处复发);无转移存活;无疾病存活(其中术语疾病应包括癌症和与其相关的疾病)。所述存活的长度可以通过参考定义的起点(例如,诊断时间或治疗开始)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。此外,治疗功效的标准可以扩展到包括对化学疗法的反应、存活的概率、在给定时间段内转移的概率和肿瘤复发的概率。

[0080] “转录的多核苷酸”或“核苷酸转录物”是与通过本发明标志物的转录和RNA转录物和RNA转录物的逆转录的正常转录后加工(例如,剪接)(如果有的话)制备的成熟mRNA的全部或一部分互补或同源的多核苷酸(例如,mRNA、hnRNA、cDNA、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA*、piwiRNA、抗miRNA或miRNA结合位点,或其变体或此类RNA或cDNA的类似物)。

在一些实施例中,转录的多核苷酸是“长链非编码RNA”或“lcrRNA”,其被定义为不天然编码翻译蛋白的转录的多核苷酸。lcrRNA通常是长于约100个核苷酸的序列,并且可以长达最多数十碱基,尽管长度定义是便于区分传统小核酸如微小RNA、siRNA和piwi相关RNA的问题。lcrRNA可以与蛋白编码基因(长基因间ncRNA或lincRNA)分开定位,或位于蛋白编码基因附近或内部(Guttman等人(2009)《自然》458:223-227;Katayama等人(2005)《科学》309:1564-1566;Kim等人(2010)《自然》465:182-187;De Santa等人(2010)PLoS Biol.8:e1000384)。

[0081] 如本文所用,术语“载体”指能够转运与其连接的另一核酸的核酸。一种类型的载体是“质粒”,其是指其中可以连接另外的DNA区段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们所导入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与它们可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”或简称为“表达载体”。通常,用于重组DNA技术的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明旨在包括此类其它形式的表达载体,如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其提供等同的功能。

[0082] 如本文所用,术语“无应答性”包括免疫细胞对刺激(例如,通过活化受体或细胞因子的刺激)的折射性。例如,由于暴露于免疫抑制剂或暴露于高剂量的抗原,可能发生无应答性。如本文所用,术语“无变应性”或“耐受性”包括对活化受体介导的刺激的折射性。此类折射性通常是抗原特异性的,并且在停止暴露于耐受性抗原后仍持续。例如,T细胞无变应性(与无应答性相反)的特征是缺乏细胞因子如IL-2产生。当T细胞暴露于抗原并在没有第二信号(共刺激信号)的情况下接受第一信号(T细胞受体或CD-3介导的信号)时,发生T细胞无变应性。在这些条件下,细胞再暴露于相同的抗原(即使再暴露在共刺激多肽的存在下发生)导致不能产生细胞因子,并且因此不能增殖。然而,如果与细胞因子(例如IL-2)一起培养,无变应性T细胞可以增殖。例如,通过ELISA或通过使用指示细胞系的增殖测定测量T淋巴细胞缺乏IL-2产生,也可以观察到T细胞无变应性。可替代地,可以使用报道基因构建体。例如,无变应性T细胞不能启动IL-2基因转录,该转录由在5' IL-2基因增强子控制下的异源启动子诱导,或者由可在增强子内发现的AP1序列的多聚体诱导(Kang等人(1992)《科学》257:1134)。

[0083] 术语“分离的多肽”是指在某些实施例中由重组DNA或RNA制备的、或合成来源的、或其一些组合的多肽,其(1)与通常在自然界中发现的蛋白质不相关,(2)从其通常存在的细胞中分离,(3)分离为不含来自相同细胞来源的其它蛋白质,(4)由来自不同物种的细胞表达,或(5)不在自然界中存在。

[0084] 术语“标记”或“标记的”是指将可检测标记物任选地共价或非共价地掺入或附着到分子如多肽中。标记多肽的各种方法是本领域已知的,并且可以使用。多肽标记的实例包括但不限于以下:放射性同位素、荧光标记、重原子、酶标记或报道基因、化学发光基团、生物素基团、由第二报道分子识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。下面更详细地描述此类标记的实例和用途。在一些实施例中,标记通过各种长度的间隔臂连接以降低潜在的位阻。

[0085] 术语“治疗”病况意指采取步骤以获得有益的或期望的结果,包括临床结果,例如减轻、缓解或改善疾病的一种或多种症状;减少疾病的程度;延迟或减缓疾病进展;改善和减轻或稳定疾病的度量(统计);使受试者经历病症和/或其症状的减轻、延迟进展、消退或缓解。在一个实施例中,预防了病症和/或其症状的复发。在优选的实施例中,受试者的病症和/或其症状被治愈。在一些实施例中,“治疗(treatment或treating)”还可以指治疗、防止和预防,并且特别地指对患者施用药物或进行医疗程序,用于预防(防止)或治愈(如果可能)或降低在患者受折磨的情况下发生虚弱或疾病或病况或事件的程度或可能性。更特别地,与本发明相关,“治疗”定义为对患者应用或施用治疗剂,或对来自患者的分离的组织或细胞系应用或施用治疗剂,所述患者具有疾病、疾病症状或发生疾病的倾向。治疗可以减缓、治愈、痊愈、减轻、缓解、改变、减轻、补救、改良、改善或影响疾病、疾病的症状或对疾病的易感性。

[0086] 在特定蛋白质的氨基酸序列和编码该蛋白质的核苷酸序列之间存在已知和明确的对应性,如遗传密码所定义的(如下所示)。同样,在特定核酸的核苷酸序列和由该核酸编码的氨基酸序列之间存在已知和明确的对应性,如遗传密码所定义的。

[0087] 遗传密码

[0088]	丙氨酸(Ala,A)	GCA,GCC,GCG,GCT
[0089]	精氨酸(Arg,R)	AGA,ACG,CGA,CGC,CGG,CGT
[0090]	天冬酰胺(Asn,N)	AAC,AAT
[0091]	天冬氨酸(Asp,D)	GAC,GAT
[0092]	半胱氨酸(Cys,C)	TGC,TGT
[0093]	谷氨酸(Glu,E)	GAA,GAG
[0094]	谷氨酰胺(Gln,Q)	CAA,CAG
[0095]	甘氨酸(Gly,G)	GGA,GGC,GGG,GGT
[0096]	组氨酸(His,H)	CAC,CAT
[0097]	异亮氨酸(Ile,I)	ATA,ATC,ATT
[0098]	亮氨酸(Leu,L)	CTA,CTC,CTG,CTT,TTA,TTG
[0099]	赖氨酸(Lys,K)	AAA,AAG
[0100]	甲硫氨酸(Met,M)	ATG
[0101]	苯丙氨酸(Phe,F)	TTC,TTT
[0102]	脯氨酸(Pro,P)	CCA,CCC,CCG,CCT
[0103]	丝氨酸(Ser,S)	AGC,AGT,TCA,TCC,TCG,TCT
[0104]	苏氨酸(Thr,T)	ACA,ACC,ACG,ACT
[0105]	色氨酸(Trp,W)	TGG
[0106]	酪氨酸(Tyr,Y)	TAC,TAT
[0107]	缬氨酸(Val,V)	GTA,GTC,GTG,GTT
[0108]	末端信号(end)	TAA,TAG,TGA

[0109] 遗传密码的一个重要且公知的特征是其冗余性,由此,对于用于制备蛋白质的大多数氨基酸,可以使用多于一个的编码核苷酸三联体(如上所述)。因此,多个不同的核苷酸序列可以编码给定的氨基酸序列。此类核苷酸序列被认为是功能等价的,因为它们导致在

所有生物中产生相同的氨基酸序列(尽管某些生物可以比它们翻译其它序列更有效地翻译一些序列)。此外,有时,在给定的核苷酸序列中可以发现嘌呤或嘧啶的甲基化变体。此类甲基化不影响三核苷酸密码子和相应氨基酸之间的编码关系。

[0110] 鉴于前述,编码本发明融合蛋白或多肽(或其任何部分)的DNA或RNA的核苷酸序列可用于使用遗传密码将DNA或RNA翻译成氨基酸序列来获得融合蛋白或多肽氨基酸序列。同样地,对于融合蛋白或多肽氨基酸序列,可以从遗传密码推导可编码融合蛋白或多肽的相应核苷酸序列(由于其冗余性,对于任何给定的氨基酸序列,它将产生多个核酸序列)。因此,本文中对编码融合蛋白或多肽的核苷酸序列的描述和/或公开应被认为也包括对核苷酸序列编码的氨基酸序列的描述和/或公开。类似地,本文中融合蛋白或多肽氨基酸序列的描述和/或公开应被认为也包括可以编码氨基酸序列的所有可能的核苷酸序列的描述和/或公开。

[0111] 最后,下面显示了本发明的物质组合物和方法范围内包括的显性负RHOA的示例性核酸和蛋白质序列。

[0112] 表2:RHOA显性负型的氨基酸序列

[0113] SEQ ID NO:1人RHOA T19N氨基酸序列

[0114] MAAIRKKLVIVGDGACGKNCLLIVFSKQDFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRL
RPLSYPTDVLIMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKDLRNDHTRRELAKMKQEPVKPEEGRD
MANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

[0115] SEQ ID NO:2人RHOA G17V氨基酸序列

[0116] MAAIRKKLVIVGDGACVKTCLLIVFSKQDFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRL
RPLSYPTDVLIMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKDLRNDHTRRELAKMKQEPVKPEEGRD
MANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

[0117] SEQ ID NO:3人RHOA G17E氨基酸序列

[0118] MAAIRKKLVIVGDGACEKTCLLIVFSKQDFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRL
RPLSYPTDVLIMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKDLRNDHTRRELAKMKQEPVKPEEGRD
MANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

[0119] 表3:RHOA显性负型的cDNA序列

[0120] SEQ ID NO:4人RHOA T19N cDNA序列,变体1

[0121] atggctgccatccggaagaaactggtgattgttggtgatggagcctgtggaaagAATtgcttgctcat
agtcttcagcaaggaccagttcccagaggtgtatgtgccacagtgtttgagaactatgtggcagatatcgaggtg
gatggaaagcaggtagattggctttgtgggacacagctgggcaggaagattatgatcgctgaggccccctctcct
accagataccgatgttatactgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaaacatcccagaaaagtg
gacccagaagtcagcatttctgtcccaacgtgcccatcatcctggttgggaataagaaggatcttcggaatgat
gagcacacaaggcgaggtagccaagatgaagcaggagccggtgaaacctgaagaaggcagagatatggcaaaca
ggattggcgcttttgggtacatggagtgttcagcaaagaccaaagatggagtgagagaggtttttgaaatggctac
gagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaaatctgggtgccttgtcttgta

[0122] SEQ ID NO:5人RHOA T19N cDNA序列,变体2

[0123] atggctgccatccggaagaaactggtgattgttggtgatggagcctgtggaaagAACTgcttgctcat
agtcttcagcaaggaccagttcccagaggtgtatgtgccacagtgtttgagaactatgtggcagatatcgaggtg

gatggaaagcaggtagagttggctttgtgggacacagctgggcaggaagattatgatcgctgaggccccctctcct
accagataccgatgttatactgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaaacatcccagaaaagtg
gacccagaagtcaagcatttctgtcccaacgtgcccatcatcctggttgggaataagaaggatcttcggaatgat
gagcacacaaggcgggagctagccaagatgaagcaggagccggtgaaacctgaagaaggcagagatatggcaaaca
ggattggcgcttttgggtacatggagtgttcagcaaagaccaaagatggagtgaagagaggtttttgaaatggctac
gagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaaatctgggtgccttgtcttgtga

[0124] SEQ ID NO:6人RHOA G17VcDNA序列,变体1

[0125] atggctgccatccggaagaaactgggtgattgttgggtgatggagcctgtGTTaagacatgcttgctcat
agtcttcagcaaggaccagttcccagaggtgtatgtgccacagtgtttgagaactatgtggcagatatcgaggtg
gatggaaagcaggtagagttggctttgtgggacacagctgggcaggaagattatgatcgctgaggccccctctcct
accagataccgatgttatactgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaaacatcccagaaaagtg
gacccagaagtcaagcatttctgtcccaacgtgcccatcatcctggttgggaataagaaggatcttcggaatgat
gagcacacaaggcgggagctagccaagatgaagcaggagccggtgaaacctgaagaaggcagagatatggcaaaca
ggattggcgcttttgggtacatggagtgttcagcaaagaccaaagatggagtgaagagaggtttttgaaatggctac
gagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaaatctgggtgccttgtcttgtga

[0126] SEQ ID NO:8人RHOA G17VcDNA序列,变体2

[0127] atggctgccatccggaagaaactgggtgattgttgggtgatggagcctgtGTCaagacatgcttgctcat
agtcttcagcaaggaccagttcccagaggtgtatgtgccacagtgtttgagaactatgtggcagatatcgaggtg
gatggaaagcaggtagagttggctttgtgggacacagctgggcaggaagattatgatcgctgaggccccctctcct
accagataccgatgttatactgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaaacatcccagaaaagtg
gacccagaagtcaagcatttctgtcccaacgtgcccatcatcctggttgggaataagaaggatcttcggaatgat
gagcacacaaggcgggagctagccaagatgaagcaggagccggtgaaacctgaagaaggcagagatatggcaaaca
ggattggcgcttttgggtacatggagtgttcagcaaagaccaaagatggagtgaagagaggtttttgaaatggctac
gagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaaatctgggtgccttgtcttgtga

[0128] SEQ ID NO:8人RHOA G17V cDNA序列,变体3

[0129] atggctgccatccggaagaaactgggtgattgttgggtgatggagcctgtGTGaagacatgcttgctcat
agtcttcagcaaggaccagttcccagaggtgtatgtgccacagtgtttgagaactatgtggcagatatcgaggtg
gatggaaagcaggtagagttggctttgtgggacacagctgggcaggaagattatgatcgctgaggccccctctcct
accagataccgatgttatactgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaaacatcccagaaaagtg
gacccagaagtcaagcatttctgtcccaacgtgcccatcatcctggttgggaataagaaggatcttcggaatgat
gagcacacaaggcgggagctagccaagatgaagcaggagccggtgaaacctgaagaaggcagagatatggcaaaca
ggattggcgcttttgggtacatggagtgttcagcaaagaccaaagatggagtgaagagaggtttttgaaatggctac
gagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaaatctgggtgccttgtcttgtga

[0130] SEQ ID NO:9人RHOA G17V cDNA序列,变体4

[0131] atggctgccatccggaagaaactgggtgattgttgggtgatggagcctgtGTAaagacatgcttgctcat
agtcttcagcaaggaccagttcccagaggtgtatgtgccacagtgtttgagaactatgtggcagatatcgaggtg
gatggaaagcaggtagagttggctttgtgggacacagctgggcaggaagattatgatcgctgaggccccctctcct
accagataccgatgttatactgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaaacatcccagaaaagtg
gacccagaagtcaagcatttctgtcccaacgtgcccatcatcctggttgggaataagaaggatcttcggaatgat

gagcacacaaggcgggagctagccaagatgaagcaggagccggtgaaacctgaagaaggcagagatatggcaaaca
ggattggcgcttttgggtacatggagtgttcagcaaagaccaaagatggagtgaagagaggtttttgaaatggctac
gagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaaatctgggtgccttgtcttgtga

[0132] SEQ ID NO:10人RHOA G17E cDNA序列,变体1

[0133] atggctgccatccggaagaaactggtgattgttgggtgatggagcctgtGAAaagacatgcttgctcat
agtcttcagcaaggaccagttcccagaggtgtatgtgccacagtgtttgagaactatgtggcagatatcgaggtg
gatggaaagcaggtagagtggctttgtgggacacagctgggcaggaagattatgatcgctgaggccccctctcct
accagataccgatgttatactgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaaacatcccagaaaagt
gacccagaagtcaagcatttctgtcccaacgtgcccatcatcctggttgggaataagaaggatcttcggaatgat
gagcacacaaggcgggagctagccaagatgaagcaggagccggtgaaacctgaagaaggcagagatatggcaaaca
ggattggcgcttttgggtacatggagtgttcagcaaagaccaaagatggagtgaagagaggtttttgaaatggctac
gagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaaatctgggtgccttgtcttgtga

[0134] SEQ ID NO:11人RHOA G17E cDNA序列,变体2

[0135] atggctgccatccggaagaaactggtgattgttgggtgatggagcctgtGAGaagacatgcttgctcat
agtcttcagcaaggaccagttcccagaggtgtatgtgccacagtgtttgagaactatgtggcagatatcgaggtg
gatggaaagcaggtagagtggctttgtgggacacagctgggcaggaagattatgatcgctgaggccccctctcct
accagataccgatgttatactgatgtgtttttccatcgacagccctgatagtttagaaaacatcccagaaaagt
gacccagaagtcaagcatttctgtcccaacgtgcccatcatcctggttgggaataagaaggatcttcggaatgat
gagcacacaaggcgggagctagccaagatgaagcaggagccggtgaaacctgaagaaggcagagatatggcaaaca
ggattggcgcttttgggtacatggagtgttcagcaaagaccaaagatggagtgaagagaggtttttgaaatggctac
gagagctgctctgcaagctagacgtgggaagaaaaaatctgggtgccttgtcttgtga

[0136] *表2中包括包含氨基酸序列的多肽分子,所述氨基酸序列与表2中列出的任何SEQ ID NO的氨基酸序列或其部分在其全长上具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更高的同一性。此类多肽可以具有如本文进一步描述的全长多肽的功能,例如减少癌症中的存活或增殖细胞的数量,和/或减小包含癌细胞的肿瘤的体积或大小。进一步包括具有或不具有信号肽,和/或包括或仅为前蛋白,和/或包括或仅为成熟蛋白的多肽。

[0137] *表3中包括RNA核酸分子(例如,被尿素替代的胸腺嘧啶),以及包含核酸序列的DNA或RNA核酸序列,所述核酸序列与表3中列出的任何SEQ ID NO的核酸序列或其部分在其全长上具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更高的同一性。此类核酸分子可以具有如本文进一步描述的全长核酸的功能,例如编码减少癌症中存活或增殖细胞的数量和/或减小包含癌细胞的肿瘤的体积或大小的蛋白质。进一步包括编码具有或不具有信号肽,和/或包括或仅为前蛋白,和/或包括或仅为成熟蛋白的多肽的核酸。

[0138] II. 试剂和组合物

[0139] a. 分离的核酸

[0140] 本发明的一方面涉及利用分离的核酸分子的方法,所述分离的核酸分子编码RHOA显性负多肽或其生物活性部分。如本文所用,术语“核酸分子”旨在包括DNA分子(即cDNA或基因组DNA)和RNA分子(即mRNA)以及使用核苷酸类似物产生的DNA或RNA的类似物。核酸分

子可以是单链或双链的,但是优选是双链DNA。“分离的”核酸分子是与存在于核酸天然来源中的其它核酸分子分离的核酸分子。优选地,“分离的”核酸不含天然存在于该核酸来源的生物体的基因组DNA中的该核酸侧翼的序列(即,位于该核酸的5'和3'末端的序列)。例如,在各种实施例中,编码RHOA显性负多肽或其生物活性部分的分离的核酸分子可含有少于约5kb、4kb、3kb、2kb、1kb、0.5kb或0.1kb的核苷酸序列,其天然位于该核酸来源的细胞(例如,具有RHOA显性负型突变的癌细胞)的基因组DNA中的核酸分子侧翼。此外,“分离的”核酸分子如cDNA分子在通过重组技术生产时可以基本上不含其它细胞物质或培养基,或者在化学合成时可以不含化学前体或其它化学物质。

[0141] 编码本发明的RHOA显性负多肽或其生物活性部分的核酸分子,例如具有SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11的核苷酸序列的核酸分子,或与SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11中所示的核苷酸序列或其部分至少约50%,优选至少约60%,更优选至少约70%,再更优选至少约80%,仍更优选至少约90%,和最优选至少约95%或更多(例如,约98%)同源的核苷酸序列(即,100、200、300、400、450、500或更多个核苷酸)可以使用标准分子生物学技术和本文提供的序列信息分离。例如,可以使用SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11的全部或部分或其片段,从人癌细胞系中分离人RHOA结构域负突变cDNA作为杂交探针和标准杂交技术(即,如Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和Maniatis, T.《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual.)》第二版,冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港实验室(Cold Spring Harbor),纽约,1989中所述)。此外,包含SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11的全部或部分的核酸分子,或与SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11中所示的核苷酸序列或其片段至少约50%,优选至少约60%,更优选至少约70%,再更优选至少约80%,仍更优选至少约90%,和最优选至少约95%或更多(例如,约98%)同源的核苷酸序列可以使用基于SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11的序列或其片段或同源核苷酸序列设计的寡核苷酸引物,通过聚合酶链反应分离。例如,可以从癌细胞中分离mRNA(即,通过Chirgwin等人(1979)《生物化学(Biochemistry)》18:5294-5299中的硫氰酸胍提取程序),并且可以使用逆转录酶(即, Moloney MLV逆转录酶,可从Gibco/BRL,贝塞斯达(Bethesda),马里兰州获得;或AMV逆转录酶,可从美国精工有限公司(Seikagaku America, Inc.),圣彼德斯堡,佛罗里达州获得)制备cDNA。可以基于SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11所示的核苷酸序列或其片段或同源核苷酸序列设计用于PCR扩增的合成寡核苷酸引物。可以根据标准PCR扩增技术,使用cDNA或可替代地基因组DNA作为模板和合适的寡核苷酸引物扩增本发明的核酸。另外,本发明的核酸可以通过定点诱变技术,使用野生型RHOA的cDNA或基因组DNA为模板,并使用含有目的突变的特异寡核苷酸引物来产生。可以将如此扩增或产生的核酸克隆到适当的载体中,并通过DNA序列分析进行表征。此外,可以通过标准合成技术,即使用自动DNA合成仪,制备与RHOA显性负突变核苷酸序列相对应的寡核苷酸。

[0142] 基于RHOA显性负突变核苷酸序列的探针可用于检测编码相同或同源蛋白的转录物或基因组序列。在优选的实施例中,探针进一步包括与其连接的标记基团,即标记基团可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。此类探针可以用作诊断测试试剂盒的一部分,用于鉴定表达RHOA显性负多肽的细胞或组织,例如通过测量来自受试者的细胞样本中编码RHOA显性负多肽的核酸的水平,即检测RHOA显性负多肽的mRNA水平来鉴定。

[0143] 考虑了编码其它RHOA显性负突变体并因此具有与SEQ ID NO 4-11的序列或其片段不同的核苷酸序列的核酸分子。此外,编码来自不同物种的RHOA显性负突变体并且因此具有不同于SEQ ID NO 4-11的序列的核苷酸序列的核酸分子也旨在包含在本发明的范围内。例如,可以基于人和/或小鼠RHOA显性负突变体的核苷酸序列鉴定黑猩猩或猴RHOA显性负突变体cDNA。

[0144] 在一个实施例中,本发明的核酸分子编码蛋白质或其部分,所述蛋白质或其部分包括与SEQ ID NO 1、2或3的氨基酸序列或其片段充分同源的氨基酸序列,使得所述蛋白质或其部分减少癌症中存活或增殖细胞的数量,和/或减小包括癌细胞的肿瘤的体积或大小。用于测量每种此类生物活性的方法和测定是本领域公知的,并且代表性的非限制性实施例在以下实例和以上定义中描述。

[0145] 如本文所用,语言“充分同源”是指具有氨基酸序列的蛋白质或其部分,所述氨基酸序列包括最小数目的与SEQ ID NO 1、2或3的氨基酸序列或其片段相同或等同(例如,具有与SEQ ID NO 1、2或3中的氨基酸残基或其片段相似的侧链的氨基酸残基)的氨基酸残基,使得蛋白质或其部分减少癌症中存活或增殖细胞的数量和/或减小包括癌细胞的肿瘤的体积或大小。

[0146] 在另一个实施例中,蛋白质与SEQ ID NO 1、2或3的整个氨基酸序列或其片段至少约50%,优选至少约60%,更优选至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源。

[0147] 由本发明的RHOA显性负突变核酸分子编码的蛋白质部分优选是RHOA显性负多肽的生物活性部分。如本文所用,术语“RHOA显性负多肽的生物活性部分”旨在包括具有全长RHOA显性负多肽的一种或多种生物活性的RHOA显性负多肽的一部分,例如结构域/基序。

[0148] 可以进行本文所述的标准结合测定,例如免疫沉淀和酵母双杂交测定,或功能测定,例如RNAi或过表达实验,以确定RHOA显性负多肽或其生物活性片段维持全长RHOA显性负多肽的生物活性的能力。

[0149] 本发明进一步包括由于遗传密码的简并性而与SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11所示的核苷酸序列或其片段不同,并且因此编码与由SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11所示的核苷酸序列或其片段编码的RHOA显性负多肽相同的RHOA显性负多肽的核酸分子。在另一个实施例中,本发明的分离的核酸分子具有核苷酸序列,所述核苷酸序列编码具有SEQ ID NO 1、2或3所示的氨基酸序列或其片段的蛋白质,或具有与SEQ ID NO 1、2或3的氨基酸序列或其片段至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多同源,或与SEQ ID NO 1、2或3至少相差1、2、3、5或10个氨基酸,但相差不超过30、20、15个氨基酸的氨基酸序列的蛋白质。在另一个实施例中,编码RHOA显性负多肽的核酸由核酸序列组成,所述核酸序列编码目标全长RHOA显性负多肽片段的长度小于195、190、185、180、175、170、165、160、155、150、145、140、135、130、125、120、115、110、105、100、95、90、85、80、75或70个氨基酸的一部分。

[0150] 本领域技术人员将理解,导致RHOA显性负多肽的氨基酸序列改变的DNA序列多态性可存在于群体(例如哺乳动物群体,例如人类群体)内。由于自然等位基因变异,显性负RHOA基因中的此类遗传多态性可能存在于群体内的个体之间。如本文所用,术语“基因”和“重组基因”是指包括编码显性负RHOA蛋白(优选哺乳动物,例如人显性负RHOA蛋白)的开放

阅读框的核酸分子。此类天然等位基因变异典型地可导致显性负RHOA基因的核苷酸序列的1-5%的变异。为天然等位基因变异结果并且不改变显性负RHOA的功能活性的任何和所有此类核苷酸变异和显性负RHOA中的所得氨基酸多态性均旨在包含在本发明的范围内。此外,编码来自其它物种的显性负RHOA蛋白并且因此具有不同于SEQ ID NO 4-11的序列的核苷酸序列的核酸分子旨在包含在本发明的范围内。可使用人或小鼠cDNA或其部分基于与本文公开的人或小鼠显性负RHOA核酸序列的同源性来分离与本发明的人或小鼠显性负RHOA cDNA的天然等位基因变体和同源物相对应的核酸分子作为在严格杂交条件(如本文所述)下的根据标准杂交技术的杂交探针。

[0151] 除了可能存在于群体中的RHOA显性负突变序列的天然存在的等位基因变体之外,技术人员还将理解,可以通过突变将变化引入SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11或其片段的核苷酸序列中,从而导致编码的RHOA显性负多肽的氨基酸序列的变化,而不会改变RHOA显性负多肽的功能能力。例如,可以在SEQ ID NO 1、2或3的序列或其片段中进行导致“非必需”氨基酸残基处的氨基酸取代的核苷酸取代。“非必需”氨基酸残基是可以从RHOA显性负多肽的序列(例如,SEQ ID NO 1、2或3的序列或其片段)改变,而不会显著改变RHOA显性负多肽活性的残基,而RHOA显性负多肽活性需要“必需”氨基酸残基。然而,其它氨基酸残基(例如,在小鼠和人之间不保守或仅半保守的氨基酸残基)对于活性可能不是必需的,并且因此很可能在不改变RHOA显性负多肽活性的情况下进行改变。此外,可对对于与癌细胞存活力和/或增殖有关的RHOA显性负多肽功能必不可少但对于其它RHOA显性负多肽功能不是必不可少的氨基酸残基进行改变。

[0152] 因此,本发明的另一方面涉及编码RHOA显性负多肽的核酸分子,其含有对于RHOA显性负多肽活性不是必需的氨基酸残基的变化。此类RHOA显性负多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO 1、2或3或其片段不同,但保留本文所述的至少一种RHOA显性负多肽活性。在一个实施例中,分离的核酸分子包括编码蛋白质的核苷酸序列,其中所述蛋白质缺少一个或多个RHOA显性负多肽结构域。如定义部分中所述,RHOA显性负多肽的构效关系是已知的,使得普通技术人员容易理解可以突变或以其它方式改变区域,同时保留RHOA显性负多肽的至少一种生物活性。

[0153] 如本文所用,“序列同一性或同源性”是指两个多肽分子之间或两个核酸分子之间的序列相似性。当两个比较序列的位置均被相同的碱基或氨基酸单体亚基占据时,例如,如果两个DNA分子中的每一个的位置被腺嘌呤占据,则该分子在该位置是同源的或序列相同的。两个序列之间的同源性或序列同一性百分比是两个序列共享的匹配或同源相同位置数除以比较的位置数 $\times 100$ 的函数。例如,如果两个序列10个中有6个的位置相同,则两个序列是60%同源的或具有60%序列同一性。举例来说,DNA序列ATTGCC和TATGGC享有50%的同源性或序列同一性。通常,当将两个序列比对以给出最大同源性时进行比较。除非另有说明,否则“环出区域”,例如,由序列之一中的缺失或插入引起的那些被计为错配。

[0154] 序列的比较和两个序列之间同源性百分比的确定可以使用数学算法来完成。优选地,可以使用Clustal方法进行比对。多个比对参数包括空位罚分=10,空位长度罚分=10。对于DNA比对,成对比对参数可以为Htuple=2,空位罚分=5,窗口=4和对角线保存=4。对于蛋白质比对,成对比对参数可以是Ktuple=1,空位罚分=3,窗口=5和对角线保存=5。

[0155] 在优选的实施例中,使用已被并入GCG软件包(在线可获得)的GAP程序中的

Needleman和Wunsch(《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》(48):444-453(1970))算法,使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵,16、14、12、10、8、6或4的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重,确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比。在另一个优选实施例中,使用GCG软件包(在线可获得)中的GAP程序,使用NWSgapdna.CMP矩阵,40、50、60、70或80的空位权重和1、2、3、4、5或6的长度权重,确定两个核苷酸序列之间的同一性百分比。在另一个实施例中,使用已并入ALIGN程序(2.0版)(在线可获得)中的E.Meyers和W.Miller的算法(CABIOS,4:11-17(1989)),使用PAM120重量残留表,12的空位长度罚分和4的空位罚分,确定两个氨基酸或核苷酸序列之间的同一性百分比。

[0156] 可以通过将一个或多个核苷酸取代、添加或缺失引入SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11或其片段的核苷酸序列或同源核苷酸序列中来创建编码与SEQ ID NO 1、2或3或其片段的蛋白质同源的RHOA显性负多肽的分离的核酸分子,使得一个或多个氨基酸取代、添加或缺失被引入编码的蛋白质中。可以通过标准技术如定点诱变和PCR介导的诱变,将突变引入SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11或其片段或同源核苷酸序列中。优选地,在一个或多个预测的非必需氨基酸残基上进行保守氨基酸取代。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、bet217-420支化侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,优选来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替换RHOA显性负多肽中的预测的非必需氨基酸残基。可替代地,在另一个实施例中,可以例如通过饱和诱变沿全部或部分RHOA显性负多肽编码序列随机引入突变,并且可以筛选所得突变体的本文所述的RHOA显性负多肽活性以鉴定保留RHOA显性负多肽活性的突变体。诱变SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11或其片段后,可以重组表达编码的蛋白质(如本文所述),并且可以使用例如本文所述的测定确定蛋白质的活性。

[0157] RHOA显性负多肽水平可以通过多种公知的检测转录分子或蛋白质表达的方法进行评估。此类方法的非限制性实例包括用于检测蛋白质的免疫学方法、蛋白质纯化方法、蛋白质功能或活性测定、核酸杂交方法、核酸逆转录方法和核酸扩增方法。

[0158] 在优选的实施例中,通过测量基因转录物(例如,mRNA),通过测量翻译的蛋白质的量或通过测量基因产物活性来确定RHOA显性负多肽水平。可以通过多种方式,包括通过检测mRNA水平、蛋白质水平或蛋白质活性来监测表达水平,其中任何一种都可以使用标准技术进行测量。检测可以涉及基因表达水平(例如,基因组DNA、cDNA、mRNA、蛋白质或酶活性)的定量,或者可替代地,可以是基因表达水平的定性评估,特别是与对照水平相比。从上下文中将清楚检测的水平类型。

[0159] 在一个特定的实施例中,可以使用本领域已知的方法通过生物学样本中的原位和体外形式二者来确定RHOA显性负多肽mRNA表达水平。术语“生物学样本”旨在包括从受试者分离的组织、细胞、生物流体及其分离物,以及存在于受试者体内的组织、细胞和流体。多种表达检测方法使用分离的RNA。对于体外方法,可以使用任何不针对分离mRNA选择的RNA分离技术来从细胞中纯化RNA(参见,例如,Ausubel等人编辑,《分子生物学最新方案(Current

Protocols in Molecular Biology)》，约翰威立父子出版公司(John Wiley&Sons)，纽约1987-1999)。另外，可以使用本领域技术人员公知的技术容易地处理大量组织样本，诸如例如，Chomczynski的单步RNA分离方法(1989，美国专利第4,843,155号)。

[0160] 分离的mRNA可用于杂交或扩增测定，包括但不限于Southern或Northern分析、聚合酶链反应分析和探针阵列。用于检测mRNA水平的一种优选的诊断方法包括使分离的mRNA与可以与由检测基因编码的mRNA杂交的核酸分子(探针)接触。核酸探针可以是例如全长cDNA或其部分，例如长度为至少7、15、30、50、100、250或500个核苷酸并且足以在严格条件下与编码RHOA显性负多肽的mRNA或基因组DNA特异性杂交的寡核苷酸。本文描述了用于本发明的诊断测定的其它合适的探针。mRNA与探针的杂交表明正在表达RHOA显性负多肽。

[0161] 在一种形式中，将mRNA固定在固体表面上并与探针接触，例如通过使分离的mRNA在琼脂糖凝胶上运行并将mRNA从凝胶转移到膜如硝酸纤维素上。在可替代形式中，将探针固定在固体表面上，并且使mRNA与探针接触，例如，在基因芯片阵列如Affymetrix™基因芯片阵列中。技术人员可以容易地采用已知的mRNA检测方法检测RHOA显性负mRNA表达水平。

[0162] 确定样本中RHOA显性负mRNA表达水平的可替代方法涉及核酸扩增过程，例如通过rtPCR(Mullis,1987,美国专利第4,683,202号中所述的实验实施例)、连接酶链反应(Barany,1991,《美国科学学院学报》,88:189-193)、自我维持的序列复制(Guatelli等人,1990,《美国科学学院学报》87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh等人,1989,《美国科学学院学报》86:1173-1177)、Q-β复制酶(Lizardi等人,1988,《生物技术(Bio/Technology)》6:1197)、滚环复制(Lizardi等人,美国专利第5,854,033号)或任何其它核酸扩增方法，然后使用本领域技术人员公知的技术检测扩增的分子。如果此类分子以非常低的数量存在，则这些检测方案对于核酸分子的检测尤其有用。如本文所用，扩增引物被定义为一对核酸分子，其可以退火至基因的5'或3'区域(分别为正和负链，反之亦然)，并且在其之间含有短区域。通常，扩增引物的长度为约10至30个核苷酸，并且侧接长度为约50至200个核苷酸的区域。在合适的条件下和合适的试剂下，此类引物允许扩增包含侧接有引物的核苷酸序列的核酸分子。

[0163] 对于原位方法，不需要在检测之前从细胞中分离mRNA。在此类方法中，使用已知的组织学方法制备/处理细胞或组织样本。然后将样本固定在典型为载玻片的支持物上，并且然后与可与RHOA显性负mRNA杂交的探针接触。

[0164] 作为基于绝对的RHOA显性负多肽表达水平进行确定的替代方法，可以基于标准化的RHOA显性负多肽表达水平进行确定。通过将其表达与非RHOA显性负多肽基因(例如组成型表达的管家基因)的表达进行比较来校正绝对的RHOA显性负多肽表达水平，从而标准化表达水平。用于标准化的合适基因包括管家基因，例如肌动蛋白基因或上皮细胞特异性基因。该标准化允许比较一个样本例如受试者样本与另一样本例如正常样本或来自不同来源的样本之间的表达水平。

[0165] 还可通过检测或定量表达的多肽来检测和/或定量RHOA显性负突变体的水平或活性。可以通过本领域技术人员公知的多种手段中的任一种来检测和定量RHOA显性负多肽。这些可以包括分析生化方法，例如电泳、毛细管电泳、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、超扩散色谱法等，或各种免疫学方法，例如流体或凝胶沉淀反应、免疫扩散(单次或

双重)、免疫电泳、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定、蛋白质印迹等。技术人员可以容易地采用已知的蛋白质/抗体检测方法来确定细胞是否表达RHOA显性负多肽。

[0166] b. 重组表达载体和宿主细胞

[0167] 本发明的另一方面涉及含有编码RHOA显性负多肽(或其部分)的核酸的载体,优选表达载体的用途。如本文所用,术语“载体”指能够转运与其连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指其中可以连接另外的DNA区段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们所导入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与它们可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。通常,用于重组DNA技术的表达载体通常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明旨在包括此类其它形式的表达载体,如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),其提供等同的功能。在一个实施例中,使用包括显性负RHOA核酸分子的腺病毒载体。

[0168] 本发明的重组表达载体包含适合于在宿主细胞中表达核酸的形式本发明的核酸,这意指重组表达载体包括一个或多个基于用于表达的宿主细胞选择的调控序列,其有待表达的核酸序列可操作地连接。在重组表达载体中,“可操作地连接”旨在意指目标核苷酸序列以允许核苷酸序列(例如,在体外转录/翻译系统中或将载体引入宿主细胞时在宿主细胞中)表达的方式与调控序列连接。术语“调控序列”旨在包括启动子、增强子和其它表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。此类调控序列描述于例如Goeddel,《基因表达技术:酶学方法(Gene Expression Technology:Methods in Enzymology)》185,学术出版社(Academic Press),圣地亚哥,加利福尼亚州(1990)。调控序列包括在多种类型的宿主细胞中指导核苷酸序列组成型表达的那些序列和仅在某些宿主细胞中指导核苷酸序列表达的那些序列(例如组织特异性调控序列)。本领域技术人员将理解,表达载体的设计可以取决于诸如待转化的宿主细胞的选择,期望蛋白质的表达水平等因素。本发明的表达载体可以引入宿主细胞以由此产生由本文所述的核酸编码的蛋白质或肽,包括融合蛋白或肽。

[0169] 可以设计本发明的重组表达载体以在原核或真核细胞中表达显性负RHOA。例如,显性负RHOA可以在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞(使用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。合适的宿主细胞在Goeddel,《基因表达技术:酶学方法》185,学术出版社,圣地亚哥,加利福尼亚州(1990)中进一步讨论。可替代地,重组表达载体可以例如使用T7启动子调控序列和T7聚合酶在体外转录和翻译。

[0170] 蛋白质在原核生物中的表达最常见的是在具有含有指导融合蛋白或非融合蛋白表达的组成型或诱导型启动子的载体的大肠杆菌中进行。融合载体向其中编码的蛋白质、通常向重组蛋白的氨基末端添加多种氨基酸。此类融合载体典型地用于三个目的:1)增加重组蛋白的表达;2)增加重组蛋白的溶解度;和3)通过在亲和纯化中充当配体来帮助重组蛋白的纯化。通常,在融合表达载体中,在融合部分和重组蛋白的连接处引入蛋白水解切割位点,以使得在纯化融合蛋白之后能够从融合部分分离重组蛋白。此类酶及其同源识别序

列包括因子Xa、凝血酶和肠激酶。典型的融合表达载体包括pGEX(法玛西亚生物技术公司(Pharmacia Biotech Inc);Smith,D.B.和Johnson,K.S.(1988)《基因(Gene)》67:31-40)、pMAL(新英格兰实验室(New England Biolabs),Beverly,马萨诸塞州)和pRIT5(法玛西亚,皮斯卡塔韦,新泽西州),其使谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋白A分别与目标重组蛋白融合。在一个实施例中,将显性负RHOA的编码序列克隆到pGEX表达载体中,以产生编码融合蛋白的载体,所述融合蛋白包含从N末端至C末端的GST-凝血酶切割位点显性负RHOA。融合蛋白可以使用谷胱甘肽-琼脂糖树脂通过亲和色谱法纯化。可以通过用凝血酶切割融合蛋白来回收未与GST融合的重组RHOA显性负多肽。

[0171] 合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的实例包括pTrc(Amann等人,(1988)《基因》69:301-315)和pET 11d(Studier等人,《基因表达技术:酶学方法》185,学术出版社,圣地亚哥,加利福尼亚州(1990)60-89)。来自pTrc载体的靶基因表达依赖于来自杂种trp-lac融合启动子的宿主RNA聚合酶转录。来自pET 11d载体的靶基因表达依赖于共表达的病毒RNA聚合酶介导的T7 gn10-lac融合启动子的转录(T7 gn1)。该病毒聚合酶由宿主菌株BL21(DE3)或HMS174(DE3)从在lacUV 5启动子的转录控制下携带T7 gn1基因的常住λ噬菌体供应。

[0172] 最大化大肠杆菌中的重组蛋白表达的一种策略是在宿主细菌中表达蛋白,蛋白水解切割重组蛋白的能力受损(Gottesman,S.,《基因表达技术:酶学方法》185,学术出版社,圣地亚哥,加利福尼亚州(1990)119-128)。另一种策略是改变要插入表达载体中的核酸的核酸序列,使得每种氨基酸的单个密码子是大肠杆菌中优先使用的密码子(Wada等人,(1992)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》20:2111-2118)。本发明的核酸序列的此类改变可以通过标准DNA合成技术来进行。

[0173] 在另一个实施例中,显性负RHOA表达载体是酵母表达载体。用于在酵母酿酒酵母(*S.cerevisiae*)中表达的载体的实例包括pYepSec1(Baldari等人,(1987)《欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.)》6:229-234)、pMFa(Kurjan和Herskowitz,(1982)《细胞(Cell)》30:933-943)、pJRY88(Schultz等人,(1987)《基因》54:113-123)和pYES2(英杰公司(Invitrogen Corporation),圣地亚哥,加利福尼亚州)。

[0174] 可替代地,可以使用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达显性负RHOA。可用于在培养的昆虫细胞(例如Sf 9细胞)中表达蛋白质的杆状病毒载体包括pAc系列(Smith等人(1983)《分子和细胞生物学(Mol.Cell Biol.3:2156-2165)》和pVL系列(Lucklow和Summers(1989)《病毒学(Virology)》170:31-39)。

[0175] 在又一个实施例中,使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达本发明的核酸。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8(Seed,B.(1987)《自然》329:840)和pMT2PC(Kaufman等人(1987)《欧洲分子生物学学会杂志》6:187-195)。当用于哺乳动物细胞时,表达载体的控制功能通常由病毒调控元件提供。例如,常用的启动子衍生自多瘤、腺病毒2、巨细胞病毒和猿猴病毒40。对于用于原核和真核细胞二者的其它合适的表达系统,参见Sambrook,J.,Fritsch,E.F.和Maniatis,T.《分子克隆:实验室手册》第二版,冷泉港实验室,冷泉港实验室出版社,冷泉港实验室,纽约1989中的第16和17章。

[0176] 在另一个实施例中,重组哺乳动物表达载体能够指导核酸优先在特定细胞类型中表达(例如,组织特异性调控元件用于表达核酸)。组织特异性调控元件是本领域已知的。合

适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝特异性;Pinkert等人(1987)《基因与发展(Genes Dev.)》1:268-277)、淋巴样特异性启动子(Calame和Eaton(1988)《免疫学进展(Adv.Immunol.)》43:235-275),特别是T细胞受体的启动子(Winoto和Baltimore(1989)《欧洲分子生物学学会杂志》8:729-73)和免疫球蛋白(Banerji等人(1983)《细胞》33:729-740;Queen和Baltimore(1983)《细胞》33:741-748)、神经元特异性启动子(例如,神经丝启动子;Byrne和Ruddle(1989)《美国科学学院学报》86:5473-5477)、胰腺特异性启动子(Edlund等人(1985)《科学》230:912-916)和乳腺特异性启动子(例如乳清启动子;美国专利第4,873,316号和欧洲申请公开第264,166号)。还包括发育调控的启动子,例如鼠hox启动子(Kessel和Gruss(1990)《科学》249:374-379)和甲胎蛋白启动子(Campes和Tilghman(1989)《基因与发展》3:537-546)。

[0177] 本发明的另一方面涉及其中已引入本发明的重组表达载体或核酸的宿主细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文可互换使用。应当理解,此类术语不仅指特定的受试细胞,而且指此类细胞的后代或潜在后代。由于突变或环境影响,某些修饰可能会在后代中发生,因此此类后代实际上可能与亲本细胞不同,但仍包含在本文所用术语的范围内。

[0178] 宿主细胞可以是任何原核或真核细胞。例如,RHOA显性负多肽可以在细菌细胞如大肠杆菌、昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞(如Fao肝癌细胞、原代肝细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞)中表达。其它合适的宿主细胞是本领域技术人员已知的。

[0179] 可以通过常规转化或转染技术将载体DNA引入原核或真核细胞。如本文所用,术语“转化”和“转染”旨在指用于将外来核酸(例如,DNA)引入宿主细胞中的多种本领域公认的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适方法可以在Sambrook等人(《分子克隆:实验室手册》第二版,冷泉港实验室,冷泉港实验室出版社,冷泉港实验室,纽约1989)和其它实验室手册中找到。

[0180] 细胞培养物包括宿主细胞、培养基和其它副产物。用于细胞培养的合适培养基是本领域公知的。可以从含有多肽的细胞和培养基的混合物中分泌并分离出RHOA显性负多肽或其片段。可替代地,可以将RHOA显性负多肽或其片段保留在细胞质中,收获并裂解细胞,然后分离蛋白质或蛋白质复合物。可以使用本领域已知的用于纯化蛋白质的技术利用对显性负性RHOA或其片段的特定表位具有特异性的抗体从细胞培养基、宿主细胞或两者分离RHOA显性负多肽或其片段,所述技术包括离子交换色谱法、凝胶过滤色谱法、超滤、电泳和免疫亲和纯化。

[0181] 在一些实施例中,RHOA显性负多肽或其生物活性片段可以与异源多肽融合。在某些实施例中,融合的多肽具有比相应的未融合的RHOA显性负多肽或其生物活性片段更长的半衰期和/或细胞渗透性。例如,可以将RHOA显性负多肽融合至细胞可渗透肽,以促进将RHOA显性负多肽递送至完整细胞。细胞可渗透肽,也称为蛋白质转导结构域(PTD),是带有小肽结构域的可以自由穿越细胞膜的载体。已经鉴定了几种PTD,其允许融合蛋白在称为蛋白转导的过程中有效穿过细胞膜。研究表明,源自HIV TAT蛋白的TAT肽具有将肽或蛋白质转导到各种细胞中的能力。PTD已用于抗癌策略中,例如,细胞可渗透的Bcl-2结合肽cpm1285在减慢小鼠中人类骨髓性白血病生长中显示活性。模拟特定的含SH2结构域蛋白的受体结合位点的细胞可渗透磷酸肽如FGFR730pY是进行癌症研究和细胞信号转导机制研究的潜在工具。在其它实施例中,根据本领域已知的标准方法,异源标签可以用于纯化目的

(例如,表位标签和Fc融合标签)。

[0182] 因此,编码RHOA显性负多肽的全部或选定部分的核苷酸序列可用于通过微生物或真核细胞过程产生蛋白质的重组形式。将序列连接至多核苷酸构建体如表达载体,并转化或转染到为真核(酵母、禽类、昆虫或哺乳动物)或原核(细菌细胞)的宿主中是标准程序。根据本发明,可以通过微生物手段或组织培养技术,采用类似的程序或其修饰来制备重组的RHOA显性负多肽或其片段。

[0183] 在另一变体中,可以使用体外翻译系统来实现蛋白质生产。体外翻译系统通常是翻译系统,其是至少含有将RNA分子翻译成蛋白质所需的最少元素的无细胞提取物。体外翻译系统典型地至少包含核糖体、tRNA、引发剂甲硫氨酰-tRNA^{Met}、参与翻译的蛋白质或复合物如eIF2、eIF3、包括帽结合蛋白(CBP)和真核起始因子4F(eIF4F)的帽结合(CB)复合物。多种体外翻译系统是本领域公知的,并且包括可商业获得的试剂盒。体外翻译系统的实例包括真核裂解物,如兔网织红细胞裂解物、兔卵母细胞裂解物、人细胞裂解物、昆虫细胞裂解物和小麦胚芽提取物。裂解物可从制造商如Promega Corp., Madison, Wis.; Stratagene, La Jolla, Calif.; Amersham, Arlington Heights, Ill.; 和GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y. 商业获得。体外翻译系统典型地包含大分子如酶、翻译、起始和延伸因子、化学试剂和核糖体。另外,可以使用体外转录系统。此类系统典型地至少包含RNA聚合酶全酶、核糖核苷酸和任何必要的转录起始、延伸和终止因子。可以在一锅反应中偶联体外转录和翻译,以从一种或多种分离的DNA产生蛋白质。

[0184] 在某些实施例中,RHOA显性负多肽或其片段可以化学合成,在无细胞系统中通过核糖体合成或在细胞内通过核糖体合成。可以使用多种本领域公认的方法来进行化学合成,包括逐步固相合成,通过肽片段的构象辅助的重新连接进行的半合成,克隆的或合成的肽区段的酶促连接以及化学连接。天然化学连接采用两个未保护的肽区段的化学选择性反应,以产生瞬时硫酯连接的中间体。然后,瞬时硫酯连接的中间体自发地经历重排,以提供在连接位点具有天然肽键的全长连接产物。全长连接产物在化学上与无细胞合成产生的蛋白质相同。如果允许,全长连接产物可以被重新折叠和/或氧化,以形成天然的含二硫键的蛋白质分子(参见例如,美国专利第6,184,344号和第6,174,530号;和T.W.Muir等人,《生物技术现状(Curr.Opin.Biotech.)》(1993):vol.4,p 420;M.Miller等人,《科学》(1989):vol.246,p 1149;A.Wlodawer等人,《科学》(1989):vol.245,p 616;L.H.Huang等人,《生物化学(Biochemistry)》(1991):vol.30,p 7402;M.Schmolzer等人,《国际多肽与蛋白质研究杂志(Int.J.Pept.Prot.Res.)》(1992):vol.40,p 180-193;K.Rajaratnam等人,《科学》(1994):vol.264,p 90;R.E.Offord,“蛋白质工程的化学方法(Chemical Approaches to Protein Engineering)”,《蛋白质设计与新疗法和疫苗的开发(Protein Design and the Development of New therapeutics and Vaccines)》,J.B.Hook,G.Poste编辑,(增压器出版社(Plenum Press),纽约,1990)pp.253-282;C.J.A.Wallace等人,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》(1992):vol.267,p 3852;L.Abrahmsen等人,《生物化学》(1991):vol.30,p 4151;T.K.Chang等人,《美国科学学院学报》(1994)91:12544-12548;M.Schnlzer等人,《科学》(1992):vol.,3256,p 221;和K.Akaji等人,《化学药品公告(Chem.Pharm.Bull.)》(东京)(1985)33:184)。

[0185] 为了稳定地转染哺乳动物细胞,已知根据所使用的表达载体和转染技术,只有一

小部分细胞可以将外源DNA整合到其基因组中。为了鉴定和选择这些整合体,通常将编码选择标志物(例如,对抗生素的耐药性)的基因与目标基因一起引入宿主细胞。优选的选择标志物包括赋予对药物如G418、潮霉素和甲氨蝶呤的耐药性的那些。编码选择标志物的核酸可以在与编码显性负RHOA的载体相同的载体上引入宿主细胞,或者可以在单独的载体上引入。可以通过药物选择来鉴定被引入的核酸稳定转染的细胞(例如,已掺入了选择标志物基因的细胞将存活,而其它细胞死亡)。

[0186] 本发明的宿主细胞,如培养物中的原核或真核宿主细胞,可以用于产生(即表达)RHOA显性负多肽。因此,本发明进一步提供使用本发明的宿主细胞产生RHOA显性负多肽的方法。在一个实施例中,所述方法包括在合适的培养基中培养本发明的宿主细胞(已向其中引入了编码显性负RHOA的重组表达载体),直到产生RHOA显性负多肽。在另一个实施例中,所述方法进一步包括从培养基或宿主细胞中分离RHOA显性负多肽。

[0187] 本发明的宿主细胞还可以用于产生人或非人转基因动物和/或细胞,其例如过表达RHOA显性负多肽或过度分泌RHOA显性负多肽。非人转基因动物可用于筛选测定中,所述测定设计为鉴定能够减轻选定病症如弥漫性胃癌(DGC)、小叶乳腺癌或其它类型的EMT癌症的有害症状的试剂或化合物,例如药物、药品等。例如,在一个实施例中,本发明的宿主细胞是受精卵母细胞或胚胎干细胞,其中已引入编码显性负RHOA的序列或其片段。然后,此类宿主细胞可以用于创建其中已将外源显性负RHOA序列引入其基因组的非人转基因动物或其中内源RHOA序列已被改变的同源重组动物。此类动物可用于研究显性负RHOA或其片段的功能和/或活性,以及用于鉴定和/或评价显性负RHOA活性的调节剂。如本文所用,“转基因动物”是非人类动物,优选为哺乳动物,更优选为啮齿动物,如大鼠或小鼠,其中动物的一个或多个细胞包括转基因。转基因动物的其它实例包括非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、山羊、鸡、两栖动物等。转基因是被整合到细胞的基因组中的外源DNA,转基因动物从其中发育并保留在成熟动物的基因组中,从而指导编码的基因产物在转基因动物的一种或多种细胞类型或组织中的表达。如本文所用,“同源重组动物”是非人动物,优选为哺乳动物,更优选为小鼠,其中内源RHOA基因已通过内源基因与在动物发育之前引入动物细胞例如动物的胚胎细胞内的外源DNA分子之间的同源重组而改变。

[0188] 本发明的转基因动物可以通过将编码显性负RHOA或其片段的核酸引入受精卵的雄性前核(例如通过显微注射、逆转录病毒感染)中,并允许卵母细胞在假孕雌性寄养动物中发育来产生。可以将人显性负RHOAcDNA序列作为转基因引入非人动物的基因组中。可替代地,可以将人显性负RHOA基因的非人同源物用作转基因。内含子序列和聚腺苷酸化信号也可以包括在转基因中以增加转基因的表达效率。可以将组织特异性调控序列可操作地连接至显性负RHOA转基因,以指导将RHOA显性负多肽表达至特定细胞。通过胚胎操作和显微注射产生转基因动物(特别是诸如小鼠的动物)的方法已成为本领域的常规方法,并且描述于例如Leder等人的美国专利第4,736,866号和第4,870,009号,Wagner等人的美国专利第4,873,191号以及Hogan,B.,《操作小鼠胚胎(Manipulating the Mouse Embryo)》(冷泉港实验室出版社,冷泉港实验室,纽约,1986)中。类似的方法用于生产其它转基因动物。可以基于显性负RHOA转基因在其基因组中的存在和/或显性负RHOAmRNA在动物的组织或细胞中的表达来鉴定转基因基础动物。然后可以使用转基因基础动物繁殖带有转基因的其它动物。而且,带有编码显性负RHOA的转基因的转基因动物可以进一步与带有其它转基因的其

它转基因动物一起繁殖。

[0189] 为了产生同源重组动物,制备了含有至少一部分显性负RHOA基因的载体。显性负RHOA基因可以是人基因,或人显性负RHOA基因的非人同源物。例如,人显性负RHOA基因可以用于构建适合于改变小鼠基因组中的内源RHOA基因的同源重组载体。在同源重组载体中,显性负RHOA基因的显性负突变在其5'和3'端侧接RHOA基因的额外核酸,以允许同源重组发生在载体携带的外源显性负RHOA基因和胚胎干细胞中的内源性RHOA基因之间。额外的侧翼RHOA核酸具有足够的长度以用于与内源基因的成功同源重组。典型地,载体中包括几千个碱基的侧翼DNA(在5'和3'末端)(参见例如,Thomas,K.R.和Capecchi,M.R.(1987)《细胞》51:503关于同源重组载体的描述)。将所述载体引入胚胎干细胞系(例如,通过电穿孔),并选择其中引入的显性负RHOA基因与内源RHOA基因同源重组的细胞(参见例如,Li,E.等人(1992)《细胞》69:915)。然后将选定的细胞注射到动物(例如小鼠)的胚胎中以形成聚集嵌合体(参见例如Bradley,A.,《畸胎瘤和胚胎干细胞:一种实用的方法(Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells:A Practical Approach)》,E.J.Robertson编辑(IRL,牛津,1987)pp.113-152)。然后将嵌合胚胎植入合适的假孕雌性寄养动物中,并使胚胎发育。在其生殖细胞中带有同源重组DNA的后代可用于繁殖动物,其中动物的所有细胞均通过转基因的种系传递而含有同源重组DNA。构建同源重组载体和同源重组动物的方法进一步描述于Bradley(1991)《生物技术最新观点(Current Opinion in Biotechnology)》2:823-829和PCT国际公开:Le Mouellec等人的第W0 90/11354号;Smithies等人的第W0 91/01140号;Zijlstra等人的第W0 92/0968号;和Berns等人的第W0 93/04169号。

[0190] 在另一个实施例中,可以产生转基因非人动物,其含有允许转基因表达受控的选定系统。此类系统的一个实例是噬菌体P1的cre/loxP重组酶系统。有关cre/loxP重组酶系统的说明,参见例如Lakso等人(1992)《美国科学院学报》89:6232-6236。重组酶系统的另一个实例是酵母酿酒酵母的FLP重组酶系统(O' Gorman等人(1991)《科学》251:1351-1355)。如果使用cre/loxP重组酶系统调节转基因的表达,则需要含有编码Cre重组酶和选定蛋白质二者的转基因的动物。可以通过“双”转基因动物的构建来提供此类动物,例如,通过使两只转基因动物交配,一只含有编码选定蛋白质的转基因,另一只含有编码重组酶的转基因。

[0191] 本文所述的非人转基因动物的克隆也可以根据Wilmut,I.等人(1997)《自然》385:810-813和PCT国际公开第W0 97/07668号和第W0 97/07669号中描述的方法产生。简而言之,可以分离来自转基因动物的细胞,例如体细胞,并诱导其退出生长周期并进入G₀期。然后可以例如通过使用电脉冲将休眠细胞融合至来自分离了所述休眠细胞的相同物种的动物的去核卵母细胞。然后,培养重建的卵母细胞,使得其发育为桑葚胚或胚胎,然后转移至假孕雌性寄养动物。所述雌性寄养动物所生的后代将是所述动物的克隆,从所述克隆中分离出细胞,例如体细胞。

[0192] c. 分离的RHOA显性负多肽

[0193] 本发明还提供根据本文所述方法使用的可溶性、纯化和/或分离形式的RHOA显性负多肽或其片段。

[0194] 一方面,RHOA显性负多肽可包含全长显性负RHOA氨基酸序列或具有1至约20个保守氨基酸取代的全长显性负RHOA氨基酸序列。本文所述的任何RHOA显性负多肽的氨基酸序列也可以与本文所述的本领域公知的目标RHOA显性负多肽序列或其片段至少50、55、60、

65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或99.5%相同。另外,本文所述的任何RHOA显性负多肽或其片段可以调节(例如降低)一种或多种以下生物活性:癌细胞存活、癌细胞增殖和肿瘤大小/体积。

[0195] 在另一方面,本发明考虑一种组合物,其包含分离的RHOA显性负多肽和少于约25%、或可替代的15%、或可替代的5%的污染生物大分子或多肽。

[0196] 本发明进一步提供与产生、检测或表征RHOA显性负多肽或其片段如核酸、载体、宿主细胞等有关的组合物。此类组合物可以用作调节RHOA显性负多肽的表达和/或活性的化合物,例如反义核酸。

[0197] 在某些实施例中,本发明的RHOA显性负多肽可以是融合蛋白,其含有增加其溶解度和生物利用度和/或促进其纯化、鉴定、检测和/或结构表征的结构域。在一些实施例中,表达RHOA显性负融合多肽可能是有用的,其中融合伴侣增强血浆中融合蛋白的稳定性和/或增强全身生物利用度。示例性结构域包括例如谷胱甘肽S-转移酶(GST)、蛋白A、蛋白G、钙调蛋白结合肽、硫氧还蛋白、麦芽糖结合蛋白、HA、myc、聚精氨酸、聚His、聚His-Asp或FLAG融合蛋白和标签。另外的示例性结构域包括改变体内蛋白质定位的结构域,例如信号肽、靶向2I型分泌系统的肽、胞吞结构域、核定位信号等。在各种实施例中,本发明的RHOA显性负多肽可以包含一个或多个异源融合。多肽可以含有相同融合结构域的多个拷贝,或者可以含有与两个或更多个不同结构域的融合。融合可以发生在多肽的N末端,多肽的C末端或多肽的N末端和C末端。在本发明的多肽和融合结构域之间包括连接序列,以促进融合蛋白的构建或优化融合蛋白的蛋白表达或结构限制也在本发明的范围内。在一个实施例中,连接肽是本文所述的连接肽,例如,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或更多个氨基酸的连接肽。连接肽可以是例如非结构化重组聚合物(URP),例如长度为9、10、11、12、13、14、15、20个氨基酸的URP,即连接肽具有有限的或缺乏二级结构,例如Chou-Fasman算法。示例性的连接肽包含(例如,由以下组成)氨基酸序列GGGGAGGGG。在另一个实施例中,可以构建多肽以便在本发明的融合多肽和多肽之间包含蛋白酶切割位点,以便在蛋白质表达之后或此后除去标签。合适的内切蛋白酶的实例包括例如因子Xa和TEV蛋白酶。

[0198] 在一些实施例中,RHOA显性负多肽或其片段与抗体(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)片段(例如Fc多肽)融合。制备这些融合蛋白的技术是已知的,并且描述于例如W099/31241和Cosman等人,(2001)《免疫(Immunity)》14:123-133中。与Fc多肽的融合提供与蛋白A或蛋白G柱相比通过亲和色谱法促进纯化的额外优势。

[0199] 在又一个实施例中,可以用荧光标记来标记RHOA显性负多肽,以促进它们的检测、纯化或结构表征。在一个示例性的实施例中,本发明的RHOA显性负多肽可以与产生可检测的荧光信号的异源多肽序列融合,包括例如绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、海肾绿色荧光蛋白、GFPmut2、GFPuv4、增强型黄色荧光蛋白(EYFP)、增强型蓝绿色荧光蛋白(ECFP)、增强型蓝色荧光蛋白(EBFP)、来自discosoma的柠檬和红色荧光蛋白(dsRED)。

[0200] “分离的”或“纯化的”蛋白或其生物活性部分当通过重组DNA技术生产时基本上不含细胞物质,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质。词语“基本上不含细胞物质”包括RHOA显性负多肽的制剂,其中所述多肽与其中天然或重组产生所述多肽的细胞的细胞组分分开。在一个实施例中,词语“基本上不含细胞物质”包括具有少于约30%(以

干重计)的非RHOA显性负多肽(在本文中也称为“污染蛋白”),更优选小于约20%的非-RHOA显性负多肽,仍更优选小于约10%的非-RHOA显性负多肽,并且最优选小于约5%的非-RHOA显性负多肽的RHOA显性负多肽的制剂。当重组产生RHOA显性负多肽或其生物活性部分时,其也优选基本上不含培养基,即,培养基小于蛋白质制剂体积的约20%,更优选小于约10%,并且最优选小于约5%。语言“基本上不含化学前体或其它化学物质”包括RHOA显性负多肽的制剂,其中所述多肽与参与多肽合成的化学前体或其它化学物质分离。在一个实施例中,词语“基本上不含化学前体或其它化学物质”包括具有少于约30%(以干重计)的非RHOA显性负多肽化学物质的化学前体,更优选小于约20%的非RHOA显性负多肽化学物质的化学前体,仍更优选小于约10%的非RHOA显性负多肽化学物质的化学前体,并且最优选小于约5%的非RHOA显性负多肽化学物质的化学前体的RHOA显性负多肽制剂。在优选的实施例中,分离的多肽或其生物活性部分缺乏来自衍生有RHOA显性负多肽的同一动物的污染多肽。典型地,此类多肽通过在非人细胞中重组表达例如人RHOA显性负多肽而产生。

[0201] 在优选的实施例中,蛋白质或其部分包含与SEQ ID NO 1、2或3的氨基酸序列或其片段足够同源的氨基酸序列,使得蛋白质或其部分保持一种或多种下列生物活性,或以复合物形式调节(例如,降低)一种或多种下列生物活性:癌细胞存活、癌细胞增殖和肿瘤大小/体积。蛋白质的部分优选是如本文所述的生物活性部分。在另一个优选的实施例中,RHOA显性负多肽具有分别如SEQ ID NO 1、2或3所示的氨基酸序列或其片段,或者具有与如SEQ ID NO 1、2或3所示的氨基酸序列或其片段至少约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同源的氨基酸序列。在又一个优选的实施例中,RHOA显性负多肽具有由核苷酸序列编码的氨基酸序列,所述核苷酸序列例如在严格条件下与SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11的核苷酸序列或其片段杂交,或者与SEQ ID NO 4、5、6、7、8、9、10或11所示的核苷酸序列或其片段至少约50%,优选至少约60%,更优选至少约70%,还更优选至少约80%,仍更优选至少约90%,并且最优选至少约95%或更高同源的核苷酸序列杂交。本发明优选的RHOA显性负多肽还优选具有至少一种本文所述的RHOA显性负多肽生物活性。

[0202] RHOA显性负蛋白的生物活性部分包括含有衍生自RHOA显性负蛋白的氨基酸序列的肽,例如SEQ ID NO 1、2或3所示的氨基酸序列或其片段,或者与RHOA显性负蛋白同源的蛋白质的氨基酸序列,其包括比全长RHOA显性负蛋白或与RHOA显性负蛋白同源的全长多肽更少的氨基酸,并且表现出RHOA显性负蛋白的至少一种活性。典型地,生物活性部分(肽,例如长度为例如50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100或更多个氨基酸的肽)包含结构域或基序(例如全长蛋白质减去信号肽)。在一个优选的实施例中,包括一个或多个本文所述结构域/基序的蛋白质的生物活性部分可以调节(例如降低)一种或多种下列生物活性:癌细胞存活、癌细胞增殖和肿瘤大小/体积。此外,其中蛋白质的其它区域缺失的其它生物活性部分可以通过重组技术制备,并由本文所述的一种或多种活性评估。优选地,RHOA显性负蛋白的生物活性部分包括一个或多个具有生物活性的选定结构域/基序或其部分。在一个实施例中,目的显性负RHOA片段由全长显性负RHOA蛋白的一部分组成,其长度小于240、230、220、210、200、195、190、185、180、175、170、165、160、155、150、145、140、135、130、125、120、115、110、105、100、95、90、85、80、75或70个氨基酸。

[0203] RHOA显性负蛋白可通过重组DNA技术产生。例如,将编码蛋白质的核酸分子克隆到

表达载体(如上所述)中,将表达载体导入宿主细胞(如上所述),并且RHOA显性负蛋白质在宿主细胞中表达。RHOA显性负蛋白然后可以使用标准蛋白纯化技术通过适当的纯化方案从细胞中分离。作为重组表达的替代,RHOA显性负蛋白、多肽或肽可以使用标准肽合成技术化学合成。此外,可以例如使用抗RHOA抗体从细胞(例如,携带RHOA显性负突变的癌细胞)中分离天然RHOA显性负蛋白。

[0204] 本发明还提供显性RHOA嵌合或融合蛋白。如本文所用,显性RHOA“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含与非RHOA显性负多肽可操作连接的RHOA显性负多肽。“RHOA显性负多肽”指具有对应于显性负RHOA的氨基酸序列的多肽,而“非RHOA显性负多肽”指具有对应于与显性负RHOA蛋白基本上不同源的蛋白质的氨基酸序列的多肽,例如,不同于RHOA显性负蛋白并且来源于相同或不同生物的蛋白质。在融合蛋白中,术语“可操作地连接”旨在表示RHOA显性负多肽和非RHOA显性负多肽彼此框内融合。非RHOA显性负多肽可与RHOA显性负多肽的N-末端或C-末端融合。例如,在一个实施例中,融合蛋白是显性负RHOA-GST和/或显性负RHOA-Fc融合蛋白,其中显性负RHOA序列分别与GST或Fc序列的N-末端融合。此类融合蛋白可以使用显性负RHOA多肽制备。此类融合蛋白也可以促进重组显性负RHOA的纯化、表达和/或生物利用度。在另一个实施例中,融合蛋白是在其C末端含有异源信号序列的显性负RHOA蛋白。在某些宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞)中,显性负RHOA的表达和/或分泌可通过使用异源信号序列来增加。

[0205] 优选地,本发明显性负RHOA嵌合或融合蛋白通过标准重组DNA技术产生。例如,根据常规技术,例如通过使用平端或交错末端连接,限制性酶消化以提供合适的末端,适当时填充粘性末端,碱性磷酸酶处理以避免不期望的连接,和酶连接将编码不同多肽序列的DNA片段框内连接在一起。在另一个实施例中,融合基因可以通过常规技术包括自动DNA合成仪合成。可替代地,可以使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增,所述锚定引物在两个连续基因片段之间产生互补突出端,所述突出端随后可以退火并再扩增以产生嵌合基因序列(参见,例如,《分子生物学最新方案》,Ausubel等人编辑,约翰威立父子出版公司:1992)。此外,多种已经编码融合部分(例如GST多肽)的表达载体是可商购的。可将编码显性负RHOA的核酸克隆到此类表达载体中,使得融合部分框内连接到RHOA显性负蛋白。

[0206] 本发明还涉及RHOA显性负蛋白的同源物。显性负RHOA蛋白的同源物可以通过诱变产生,例如分别通过显性负RHOA蛋白的离散点突变或截短产生。如本文所用,术语“同源物”是指显性负RHOA蛋白的变体形式。在一个实施例中,用具有天然存在形式蛋白质的生物活性亚组的同源物对受试者进行治疗,与用显性负RHOA蛋白的天然存在形式进行治疗相比,在受试者中具有较少的副作用。

[0207] 在另一个实施例中,显性负RHOA蛋白的同源物可以通过筛选显性负RHOA蛋白的突变体,例如截短突变体的组合文库来鉴定。在一个实施例中,显性负RHOA变体的多样化文库是通过核酸水平的组合诱变产生的,并由多样化基因文库编码。显性负RHOA变体的多样化文库可通过例如将合成寡核苷酸的混合物酶促连接到基因序列中,使得潜在显性负RHOA序列的简并组可作为单独多肽表达,或者可替代地作为其中含有显性负RHOA序列组的更大融合蛋白的组(例如,用于噬菌体展示)表达来产生。有多种方法可用于从简并寡核苷酸序列产生潜在显性负RHOA同源物的文库。简并基因序列的化学合成可以在自动DNA合成仪中进行,然后将合成的基因连接到合适的表达载体中。使用基因简并组允许在一个混合物中提

供编码所需的一组潜在显性负RHOA序列的所有序列。合成简并寡核苷酸的方法是本领域已知的(参见例如,Narang,S.A. (1983)《四面体(Tetrahedron)》39:3;Itakura等人(1984)《生物化学年鉴(Annu.Rev.Biochem.)》53:323;Itakura等人(1984)《科学》198:1056;Ike等人(1983)《核酸研究》11:477)。

[0208] 此外,显性负RHOA蛋白编码片段的文库可用于产生显性负RHOA片段的多样化群体,以筛选和随后选择RHOA显性负蛋白的同源物。在一个实施例中,编码序列片段文库可通过以下方法产生:在每个分子仅发生约一次切口的条件下用核酸酶处理显性负RHOA编码序列的双链PCR片段,使双链DNA变性,使DNA复性以形成可包括来自不同切口产物的有义/反义对的双链DNA,通过用S1核酸酶处理从重新形成的双链体中除去单链部分,并将所得片段文库连接到表达载体中。通过这种方法,可以得到编码显性负RHOA蛋白的N-末端、C-末端和各种大小的内部片段的表达文库。

[0209] 本领域已知若干技术用于筛选通过点突变或截短制备的组合文库的基因产物,和用于筛选cDNA文库中具有所选性质的基因产物。此类技术适用于快速筛选通过显性负RHOA同源物的组合诱变产生的基因文库。最广泛使用的技术,其可经受高通量分析检验,用于筛选大的基因文库,所述文库典型地包括将基因文库克隆到可复制的表达载体中,用得到的载体文库转化合适的细胞,和在其中检测所需活性促进分离编码其产物被检测的基因的载体的条件下表达组合基因。递归整体诱变(REM),一种提高文库中功能突变体频率的新技术,可与筛选测定组合使用,以鉴定显性负RHOA同源物(Arkin和Youvan(1992)《美国科学学院学报》89:7811-7815)。

[0210] III. 选择试剂和组合物的方法

[0211] 本发明的另一方面涉及选择试剂(例如RHOA突变多肽)的方法,所述试剂降低CDH1水平降低的癌细胞的存活力或增殖。此类方法可以使用筛选测定,包括基于细胞的测定和基于非细胞的测定。

[0212] 在一个实施例中,本发明涉及用于筛选候选或测试化合物的测定,所述候选或测试化合物可降低CDH1水平降低的癌细胞的存活力或增殖。此类化合物包括但不限于RHOA突变多肽。

[0213] 在一个实施例中,测定是基于细胞的测定,用于筛选降低CDH1水平降低的癌细胞的存活力或增殖的试剂,包括:a)使癌细胞与选自以下组成的组的测试试剂接触:1)编码RHOA突变体或其生物活性片段的核酸;和2)RHOA突变体多肽或其生物活性片段;以及b)确定相对于对照降低的癌细胞的存活力或增殖,从而鉴定降低癌细胞的存活力或增殖的测试试剂。例如,如本文进一步描述的,可以通过监测细胞数目计数、细胞运动、基质胶测定、诱导与增殖和/或侵袭有关的基因表达等来确定细胞增殖或侵袭。

[0214] 在另一个实施例中,本发明的测定是无细胞测定,其中RHOA突变多肽或其生物活性片段与GTP接触,并确定测试RHOA突变多肽掺入GTP的能力。可以通过不同的方法确定GTP到测试的RHOA突变多肽中的摄入。例如,可以使用RhoGEF交换测定试剂盒(细胞骨架有限公司(cytoskeleton,Inc.)),所述试剂盒通过测量游离的和RHOA结合的mant-GTP之间的光谱差异来分析荧光核苷酸类似物N-甲基氨苄酰-GTP(mant-GTP)到RHOA中的摄入。在RHOA存在下mant-GTP荧光强度的增强表明GTPase摄入了核苷酸。

[0215] 在另一方面,本发明涉及本文所述的两种或更多种测定的组合。例如,可以使用基

于细胞或无细胞的测定来鉴定调节剂,并且可以在体内(例如,在动物如用于细胞转化和/或肿瘤发生的动物模型中)确定所述试剂降低CDH1水平降低的癌细胞的存活力或增殖的能力。

[0216] 本发明进一步涉及通过上述筛选测定鉴定的新型试剂。因此,在适当的动物模型中进一步使用如本文所述鉴定的试剂涵盖在本发明的范围内。例如,如本文所述鉴定的试剂可用于动物模型来确定用所述试剂治疗的功效、毒性或副作用。可替代地,可以在动物模型中使用如本文所述鉴定的试剂来确定此类试剂的作用机理。此外,本发明涉及通过上述筛选测定鉴定的新型试剂在如本文所述的治疗中的用途。

[0217] IV. 受试者

[0218] 在一个实施例中,被施用降低CDH1水平降低的癌细胞的存活力或增殖的试剂(例如,选自由以下组成的组的至少一种试剂:1)编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段),或已确定其治疗具有CDH1水平降低的癌症的试剂功效的预期可能性的受试者是哺乳动物(例如小鼠、大鼠、灵长类动物、非人类哺乳动物、家畜如狗、猫、牛、马等),并且优选是人。在另一个实施例中,受试者是癌症的动物模型。例如,动物模型可以是人源癌症的原位异种移植动物模型。

[0219] 在本发明方法的另一个实施例中,受试者未接受治疗,例如化学疗法、放射疗法、靶向疗法和/或免疫疗法。在又一个实施例中,受试者已经接受治疗,例如化学疗法、放射疗法、靶向疗法和/或免疫疗法。

[0220] 在某些实施例中,受试者进行了外科手术以去除癌性或癌前组织。在其他实施例中,癌组织未被去除,例如,癌组织可以位于身体的不可手术区域中,例如位于对于生命必不可少的组织中,或者位于外科手术程序将对患者引起相当大的危害风险的区域中。

[0221] V. 治疗方法

[0222] 本发明提供用于治疗处于CDH1水平降低的癌症的风险中(或易感所述癌症)的受试者的预防和治疗的方法。在一些实施例中,癌症具有CDH1表达的丧失,例如,无CDH1癌症。在一些实施例中,癌症正在经历或已经经历了上皮间质转化(EMT)。在某些实施例中,癌症是弥漫性胃癌(DGC)或小叶乳腺癌。

[0223] 1. 预防方法

[0224] 在一个方面,本发明提供一种通过向受试者施用治疗有效量的选自由以下组成的组的至少一种试剂来预防患有CDH1水平降低的癌症的受试者的方法:1)编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段。预防剂的施用可以在CDH1水平降低的癌症特征性症状出现之前进行,使得癌症得到预防或替代地延缓其发展。

[0225] 2. 治疗方法

[0226] 本发明的另一方面涉及一种通过向受试者施用治疗有效量的选自由以下组成的组的至少一种试剂来治疗患有CDH1水平降低的癌症的受试者的方法:1)编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段。

[0227] 本发明的调节方法包括使具有CDH1水平降低的癌细胞与选自由以下组成的组的至少一种试剂接触:1)编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段。

[0228] 这些调节方法可以在体外进行(例如,通过使细胞与试剂接触),或者可替代地通过使试剂与细胞在体内接触来进行(例如,通过将试剂施用于受试者)。在一个实施例中,所述方法包括施用一种试剂(例如,本文所述的试剂,或通过本文所述的筛选测定鉴定的试剂),或选自自由以下组成的组的试剂的组合:1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段。

[0229] 另外,这些调节剂还可以与例如化学治疗剂、激素、抗血管生成剂、放射标记的化合物或与外科手术、冷冻疗法和/或放射疗法以组合疗法施用。可以与其它形式的常规疗法(例如,本领域技术人员公知的癌症的护理标准疗法)联合地或连续地,在常规疗法之前或之后施用前述治疗方法。例如,这些调节剂可以与治疗有效剂量的化学治疗剂一起施用。在另一个实施例中,这些调节剂与化学疗法联合施用以增强化学治疗剂的活性和功效。医生桌上参考手册(Physicians' Desk Reference) (PDR) 公开了已用于治疗各种癌症的化学治疗剂的剂量。这些前述化学治疗药物在治疗上有效的剂量方案和剂量将取决于所治疗的特定癌症、疾病的程度和本领域技术人员熟悉的其它因素,并且可以由医生确定。

[0230] 术语“靶向疗法”是指与选择的生物分子选择性相互作用从而治疗癌症的试剂的施用。例如,关于抑制免疫检查点抑制剂的靶向疗法可与本发明的方法组合使用。术语“免疫检查点抑制剂”意指CD4+和/或CD8+T细胞的细胞表面上的一组分子,其通过下调或抑制抗肿瘤免疫应答来微调免疫应答。免疫检查点蛋白是本领域公知的,并且包括但不限于CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR(例如,参见WO 2012/177624)。一种或多种免疫检查点抑制剂的抑制可以阻断或中和抑制性信号转导,从而上调免疫应答,以便更有效地治疗癌症。

[0231] 免疫疗法是靶向疗法的一种形式,其可以包括,例如,使用癌症疫苗和/或致敏的抗原呈递细胞。例如,溶瘤病毒是一种能够感染和裂解癌细胞而又不损害正常细胞的病毒,从而使其有可能用于癌症疗法。溶瘤病毒的复制既促进肿瘤细胞的破坏,又在肿瘤部位产生剂量放大。它们还可以充当抗癌基因的载体,从而允许它们特异性地递送至肿瘤部位。免疫疗法可包括用于宿主的短期保护的被动免疫,这通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预先形成的抗体来实现(例如,向肿瘤抗原施用任选与化学治疗剂或毒素连接的单克隆抗体)。例如,已知抗VEGF和mTOR抑制剂可有效治疗肾细胞癌。免疫疗法也可以专注于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别的表位。可替代地,反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三螺旋多核苷酸等可用于选择性地调节与肿瘤或癌症的发生、发展和/或病理相关的生物分子。

[0232] 术语“非靶向疗法”是指不与选择的生物分子选择性相互作用但仍治疗癌症的试剂的施用。非靶向疗法的代表性实例包括但不限于化学疗法、基因疗法和放射疗法。

[0233] 在一个实施例中,使用化学疗法。化学疗法包括化学治疗剂的施用。此类化学治疗剂可以是但不限于选自以下化合物组的那些:铂化合物、细胞毒性抗生素、抗代谢物、抗有丝分裂剂、烷基化剂、砷化合物、DNA拓扑异构酶抑制剂、紫杉烷、核苷类似物、植物生物碱和毒素;及其合成衍生物。示例性的化合物包括但不限于烷基化剂:顺铂、曲奥舒凡和曲洛磷胺;植物生物碱:长春碱、紫杉醇、多西紫杉醇;DNA拓扑异构酶抑制剂:替尼泊苷、克雷斯托

和丝裂霉素;抗叶酸制剂:甲氨蝶呤、麦考酚酸和羟基脲;嘧啶类似物:5-氟尿嘧啶、去氧氟尿苷和胞嘧啶阿拉伯糖苷;嘌呤类似物:巯基嘌呤和硫鸟嘌呤;DNA抗代谢物:2'-脱氧-5-氟尿苷、蚜肠霉素甘氨酸盐和吡唑并咪唑;和抗有丝分裂剂:软海绵素、秋水仙碱和根霉素。也可以使用包含一种或多种化学治疗剂的组合物(例如,FLAG、CHOP)。FLAG包含氟达拉滨、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Ara-C)和G-CSF。CHOP包含环磷酰胺、长春新碱、阿霉素和泼尼松。在另一个实施例中,使用PARP(例如,PARP-1和/或PARP-2)抑制剂,并且此类抑制剂是本领域公知的(例如,奥拉帕尼、ABT-888、BSI-201、BGP-15(N基因研究实验室有限公司(N-Gene Research Laboratories, Inc.)); INO-1001(Inotek制药公司(Inotek Pharmaceuticals Inc.)); PJ34(Soriano等人(2001)《循环研究(Circ.Res.)》89(8):684-91;Pacher等人(2002)《英国药理学杂志(Br.J.Pharmacol.)》135(6):1347-1350);3-氨基苯甲酰胺(Trevigen);4-氨基-1,8-萘二甲酰亚胺;Trevigen);6(5H)-菲二酮(Trevigen);苯甲酰胺(美国专利参考36,397);和NU1025(Bowman et al.(2001)《英国癌症杂志(Br.J.Cancer)》84(1):106-12)。作用机理通常与PARP抑制剂结合PARP并降低其活性的能力有关。PARP催化 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)转化为烟酰胺和聚ADP-核糖(PAR)。聚(ADP-核糖)和PARP均与转录、细胞增殖、基因组稳定性和致癌作用的调节有关(Bouchard V.J.等人《实验血液学(Experimental Hematology)》第31卷,第6期,2003年6月,第446-454(9)页;Herceg Z.; Wang Z.-Q.《突变研究/诱变的基础和分子机制(Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis)》第477卷,第1期,2001年6月2日,第97-110(14)页)。聚(ADP-核糖)聚合酶1(PARP1)是修复DNA单链断裂(SSB)的关键分子(de Murcia等人(1997)《美国科学院学报》94:7303-7307;Schreiber等人(2006)《自然评论分子细胞生物学(Nat Rev Mol Cell Biol)》7:517-528;Wang等人(1997)《基因与发展》11:2347-2358)。通过抑制PARP1功能来阻碍SSB修复诱导DNA双链断裂(DSB),所述DNA双链断裂可触发具有缺陷同源性指导的DSB修复的癌细胞中的合成致死性(Bryant等人(2005)《自然》434:913-917;Farmer等人(2005)《自然》434:917-921)。前述化学治疗剂的实例是说明性的,而不是限制性的。

[0234] 在另一个实施例中,使用放射疗法。放射疗法中使用的辐射可以是电离辐射。放射疗法也可以是伽马射线、X射线或质子束。放射疗法的实例包括但不限于外束放射疗法、放射性同位素(I-125、钷、铈)的间质植入、放射性同位素如镭89、胸腔放射疗法、腹膜内P-32放射疗法和/或全部腹部和骨盆放射疗法。有关放射治疗的一般概述,参见Hellman,第16章:癌症管理原理:放射疗法(Principles of Cancer Management:Radiation Therapy),第六版,2001,DeVita等人编辑,利本科特公司(J.B.Lippencott Company),费城。放射疗法可以作为外部束放射或远距疗法来施用,其中放射是从远程源引导的。放射治疗还可以作为内部疗法或近距离疗法来施用,其中放射源被放置在体内靠近癌细胞或肿瘤块的位置。还包括使用光动力疗法,其包括施用光敏剂如血卟啉及其衍生物、维替泊芬(BPD-MA)、酞菁、光敏剂Pc4、脱甲氧基-竹红菌甲素A;和2BA-2-DMHA。

[0235] 在另一个实施例中,使用激素疗法。激素治疗处理可以包含例如激素激动剂、激素拮抗剂(例如氟他胺、比卡鲁胺、他莫昔芬、雷洛昔芬、醋酸亮丙瑞林(LUPRON)、LH-RH拮抗剂)、激素生物合成和加工的抑制剂以及类固醇(例如地塞米松、类维生素A、三角肌(deltoid)、倍他米松、皮质醇、可的松、泼尼松、去氢睾酮素、糖皮质激素、盐皮质激素、雌激

素、睾丸激素、孕激素)、维生素A衍生物(例如全反式维甲酸(ATRA));维生素D3类似物;抗孕激素(例如米非司酮、奥那司酮)或抗雄激素(例如醋酸环丙孕酮)。

[0236] 在另一个实施例中,使用热疗,其是将身体组织暴露于高温(高达106°F)的过程。热量可能通过破坏细胞或剥夺其生存所需的物质来帮助缩小肿瘤。使用外部和内部加热设备,热疗可以是局部、区域和全身热疗。热疗几乎总是与其它形式的疗法(例如放射疗法、化学疗法和生物疗法)一起使用,以试图提高其有效性。局部热疗是指施加到很小区域如肿瘤的热量。所述区域可以用来自人体外部设备的针对肿瘤的高频波从外部加热。为了实现内部加热,可以使用几种类型的无菌探头中的一种,包括细的加热丝或装满温水的空心管;植入的微波天线;和射频电极。在局部热疗中,会加热器官或肢体。产生高能量的磁铁和设备放置在待加热的区域上。在另一种称为灌注的方法中,将患者的一些血液取出,加热,然后泵送(灌注)到内部待加热的区域。全身加热用于治疗已扩散到全身的转移性癌症。可以使用温水毯、热蜡、感应线圈(如电热毯中的线圈)或热室(类似于大型孵化器)来实现。热疗不会引起放射副作用或并发症的任何明显增加。但是,直接加热到皮肤上的热量会在大约一半的患者中引起不适或甚至明显的局部疼痛。还会引起水泡,通常会迅速愈合。

[0237] 在又一个实施例中,光动力疗法(也称为PDT、光辐射疗法、光疗法或光化学疗法)可用于治疗某些类型的癌症。基于这一发现,当生物体暴露于特定类型的光下时,某些称为光敏剂的化学物质可以杀死单细胞生物体。PDT通过结合使用固定频率的激光和光敏剂来破坏癌细胞。在PDT中,将光敏剂注入血液中,并被全身细胞吸收。所述试剂在癌细胞中的保留时间比在正常细胞中的保留时间更长。当治疗的癌细胞暴露于激光下时,光敏剂吸收光并产生破坏治疗的癌细胞的活性氧。必须谨慎安排光暴露时间,使得在大多数光敏剂离开健康细胞但仍存在于癌细胞中时发生。PDT中使用的激光可以通过光纤(非常细的玻璃丝)定向。光纤放置在靠近癌症的位置,以递送适当数量的光。可以将光纤通过支气管镜导入肺以治疗肺癌,或通过内窥镜导入食管中以治疗食道癌。PDT的优点是它对健康组织的损害最小。但是,由于当前使用的激光不能通过超过3厘米的组织(略大于一又八分之一英寸),因此PDT主要用于治疗皮肤上或恰好在皮肤下或内部器官衬里层上的肿瘤。光动力疗法可使皮肤和眼睛在治疗后6周或更长时间对光敏感。建议患者避免阳光直射和室内明亮至少6周。如果患者必须去户外,则需要穿着防护服,包括太阳镜。PDT的其它暂时性副作用与特定部位的治疗有关,并且可能包括咳嗽、吞咽困难、腹痛和呼吸痛苦或呼吸短促。1995年12月,美国食品药品监督管理局(FDA)批准了一种称为卟吩姆钠或Photofrin®的光敏剂,用于缓解引起阻塞的食道癌症状,以及不能单独用激光令人满意地治疗的食道癌症状。1998年1月,FDA批准卟吩姆钠用于不适合常规肺癌治疗的患者的早期非小细胞肺癌治疗。国家癌症研究所和其它机构正在支持临床试验(研究),以评价光动力疗法对几种类型的癌症(包括膀胱癌、脑癌、喉癌和口腔癌)的用途。

[0238] 在又一个实施例中,激光疗法用于利用高强度光破坏癌细胞。该技术通常用于缓解癌症症状,例如出血或阻塞,尤其是在无法通过其它治疗治愈癌症时。其也可以通过缩小或破坏肿瘤来用于治疗癌症。术语“激光”代表通过受激辐射发射进行的光放大。普通光如来自灯泡的光具有多种波长,并在所有方向上传播。另一方面,激光具有特定的波长并聚焦在窄光束中。这种类型的高强度光含有很大大能量。激光非常强大,并且可用于穿透钢或塑造钻石。激光还可以用于非常精确的外科手术工作,例如修复眼睛中受损的视网膜或穿透组

织(代替手术刀)。尽管有几种不同的激光,但在医学上仅广泛使用三种:二氧化碳(CO₂)激光-这种类型的激光可以去除皮肤表面的薄层而不会穿透更深的层。该技术在治疗尚未深入皮肤扩散的肿瘤和某些癌前病况时特别有用。作为传统手术刀外科手术的替代,CO₂激光还能够切割皮肤。激光以这种方式用于去除皮肤癌。钕:钇铝石榴石(Nd:YAG)激光-该激光发出的光比其它类型激光发出的光可以更深地渗透到组织中,并且可以使得血液迅速凝结。它可以通过光纤携带到身体较难接近的部位。这种类型的激光有时用于治疗咽喉癌。氩激光-该激光只能穿过组织的浅层,并且因此可用于皮肤病学和眼部外科手术。它也与光敏染料一起在称为光动力疗法(PDT)的程序中用于治疗肿瘤。与标准手术工具相比,激光具有若干优势,包括:激光比手术刀更精确。切口附近的组织受到保护,因为几乎不与周围的皮肤或其它组织接触。激光产生的热量对手术部位进行消毒,从而降低了感染的风险。因为激光的精度允许较小的切口,所以可能需要较少的操作时间。修复时间通常会缩短;由于激光热密封血管,因此出血、肿胀或疤痕更少。激光手术可能不太复杂。例如,使用光纤,可以将激光导向身体部位而不会产生大切口。可以在门诊病人的基础上完成更多程序。激光可以两种方式用于治疗癌症:通过加热使肿瘤缩小或破坏,或者通过激活破坏癌细胞的化学物质(称为光敏剂)。在PDT中,光敏剂保留在癌细胞中,并且可以被光刺激以引起杀死癌细胞的反应。CO₂和Nd:YAG激光用于缩小或破坏肿瘤。它们可以与内窥镜一起使用,内窥镜是允许医生看到身体的某些区域如膀胱的管。来自某些激光器的光可以通过装有光纤的柔性内窥镜传输。这允许医生看到并在除了外科手术外无法触及的身体部位处进行工作,因此允许激光束非常精确地瞄准。激光还可以与低功率显微镜一起使用,从而使医生可以清楚地看到要治疗的部位。与其它仪器一起使用时,激光系统可以产生直径小至200微米(小于非常细的线的宽度)的切割区域。激光用于治疗多种类型的癌症。激光手术是声门(声带)癌、宫颈癌、皮肤癌、肺癌、阴道癌、外阴癌和阴茎癌某些阶段的标准治疗。除了用于破坏癌症之外,激光手术还用于帮助缓解癌症引起的症状(姑息治疗)。例如,可以使用激光来缩小或破坏阻塞患者气管(嗓子)的肿瘤,使其更容易呼吸。其有时也用于结直肠癌和肛门癌的缓解。激光诱导间质热疗(LITT)是激光治疗的最新进展之一。LITT使用与称为热疗的癌症疗法相同的想法;热量可以通过破坏细胞或剥夺其生存所需的物质来帮助缩小肿瘤。在这种治疗中,激光指向体内的间隙区域(器官之间的区域)。然后,激光会升高肿瘤的温度,从而损坏或破坏癌细胞。

[0239] 本文所述调节剂治疗的持续时间和/或剂量可根据具体调节剂或其组合而变化。特定癌症治疗剂的适当治疗时间将被技术人员理解。本发明考虑对每种癌症治疗剂的最佳治疗方案的持续评估,其中通过本发明的方法确定的受试者癌症的表型是确定最佳治疗剂量和方案的因素。

[0240] VI. 临床疗效

[0241] 临床疗效可以通过本领域已知的任何方法来测量。例如,对癌症疗法的反应(例如,选自由以下组成的组的至少一种试剂:1)编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段)涉及癌症例如肿瘤对疗法的任何反应,优选涉及在新辅助或辅助化学疗法开始后肿瘤质量和/或体积的变化。可以在新辅助或辅助情况下评估肿瘤反应,其中可以将全身干预后的肿瘤大小与通过CT、PET、乳房X线照片、超声或触诊测量的初始大小和尺寸进行比较,并且可以在组织学上估计肿瘤的结构,并与开

始治疗前进行的肿瘤活检的细胞结构进行比较。活检或手术切除后,也可通过肿瘤的卡尺测量或病理检查来评估反应。可以以定量方式记录反应,例如肿瘤体积或细胞结构的百分比变化,或使用半定量评分系统如残留的癌症负担 (Symmans等人 (2007)《临床肿瘤学杂志 (J.Clin.Oncol.)》25:4414-4422) 或Miller-Payne评分 (Ogston等人 (2003)《乳房 (Breast)》(爱丁堡,苏格兰) 12:320-327) 以定性方式记录反应,如“病理完全缓解”(pCR)、“临床完全缓解”(cCR)、“临床部分缓解”(cPR)、“临床稳定疾病”(cSD)、“临床进行性疾病”(cPD) 或其它定性标准。肿瘤反应的评估可以在新辅助或辅助疗法开始后的早期进行,例如在数小时、数天、数周之后或优选在数月之后。反应评估的典型终点是新辅助化学疗法终止后或手术切除残余肿瘤细胞和/或肿瘤床后。

[0242] 在一些实施例中,可以通过测量临床受益率(CBR)来确定本文所述的治疗处理的临床疗效。通过在治疗结束后至少6个月的时间点确定完全缓解(CR)的患者百分比、部分缓解(PR)的患者数和患有稳定疾病(SD)的患者数之和来测量临床受益率。该公式的简写为 $CBR = 6\text{个月内}CR + PR + SD$ 。在一些实施例中,表1、2和/或3治疗方案中列出的生物标志物的特定调节剂的CBR为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更高。

[0243] 评价对癌症疗法(例如,选自由以下组成的组的至少一种试剂:1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段)的反应的其它标准涉及“存活”,其包括以下所有:直至死亡存活,也称为总体存活(其中所述死亡可能与病因无关或与肿瘤相关);“无复发存活”(其中术语复发应包括局部和远处复发);无转移存活;无疾病存活(其中术语疾病应包括癌症和与其相关的疾病)。所述存活的长度可以通过参考定义的起点(例如,诊断时间或治疗开始)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。此外,治疗疗效的标准可以扩展到包括对化学疗法的反应、存活的概率、在给定时间段内转移的概率和肿瘤复发的概率。

[0244] 例如,为了确定合适的阈值,可以将本发明涵盖的特定试剂施用于受试者群体,并且结果可以与在施用任何癌症疗法(例如,选自由以下组成的组的至少一种试剂:1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段)之前确定的生物标志物测量相关。结果测量可能是对新辅助治疗中给出的疗法的病理反应。可替代地,可以在一段时间内监测癌症疗法(例如,选自由以下组成的组的至少一种试剂:1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段)后受试者(其生物标志物测量值是已知的)的结果量度,如总体存活和无疾病存活。在某些实施例中,向每个受试者施用相同剂量的试剂。在相关的实施例中,所施用的剂量是该试剂在本领域中已知的标准剂量。监测受试者的时间段可能会有所不同。例如,可以监测受试者至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。与癌症疗法(例如,选自由以下组成的组的至少一种试剂:1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸;和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段)的结果相关的生物标志物测量阈值可以使用方法如实验部分所述的那些确定。

[0245] VII. 药物组合物

[0246] 在另一方面,本发明提供药学上可接受的组合物,其包含与一种或多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂和/或其它活性成分一起配制的治疗有效量的选自由以

下组成的组的至少一种试剂：1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸；和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段。如以下详细描述，本发明的药物组合物可以被具体配制为以固体或液体形式施用，包括适合于以下的那些：(1) 口服施用，例如，灌药（水性或非水性溶液或悬浮液）、片剂、大丸剂、粉剂、颗粒剂、糊剂；(2) 肠胃外施用，例如通过皮下、肌内或静脉内注射作为例如无菌溶液或悬浮液；(3) 局部应用，例如作为应用于皮肤的乳膏、软膏或喷雾剂；(4) 阴道内或直肠内，例如作为子宫托、乳膏或泡沫；(5) 气雾剂，例如作为含有所述化合物的水性气雾剂、脂质体制剂或固体颗粒。

[0247] 如本文所用，短语“治疗有效量”意指选自以下组成的组的试剂量：1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸；和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段，或者包含选自以下组成的组的试剂的组合物的量：1) 编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸；和2) RHOA显性负多肽或其生物活性片段，所述量有效于产生一些期望的治疗效果，例如，以合理的收益/风险比减少癌症中存活或增殖的细胞数量，和/或减小包含癌细胞的肿瘤的体积或大小。

[0248] 本文使用短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内，适合于与人类和动物的组织接触而无过度毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症，与合理的收益/风险比相称的那些试剂、材料、组合物和/或剂型。

[0249] 如本文所用，短语“药学上可接受的载体”意指药学上可接受的材料、组合物或媒介物，例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料，其涉及从身体的一个器官或一部分携带或运输主题化学品到身体的另一个器官或一部分。每个载体在与制剂的其它成分相容且对受试者无害的意义上必须是“可接受的”。可以用作药学上可接受的载体的材料的一些实例包括：(1) 糖，如乳糖、葡萄糖和蔗糖；(2) 淀粉，如玉米淀粉和马铃薯淀粉；(3) 纤维素及其衍生物，如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素；(4) 黄芪粉；(5) 麦芽；(6) 明胶；(7) 滑石；(8) 赋形剂，如可可脂和栓剂蜡；(9) 油，如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油；(10) 二醇，如丙二醇；(11) 多元醇，如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇和聚乙二醇；(12) 酯，如油酸乙酯和月桂酸乙酯；(13) 琼脂；(14) 缓冲剂，如氢氧化镁和氢氧化铝；(15) 海藻酸；(16) 无热原水；(17) 等渗盐水；(18) 林格氏液；(19) 乙醇；(20) 磷酸盐缓冲溶液；和(21) 药物制剂中使用的其它无毒相容性物质。

[0250] 术语“药学上可接受的盐”是指本发明涵盖的试剂的相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可以在治疗剂的最终分离和纯化期间原位制备，或者通过使纯化的游离碱形式的治疗剂与合适的有机酸或无机酸单独反应，并分离由此形成的盐来制备。代表性的盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘甲酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸盐和月桂基磺酸盐等（参见例如Berge等人（1977）《药物科学杂志（J.Pharm.Sci.）》66:1-19）。

[0251] 在其它情况下，可用于本发明方法的试剂可含有一个或多个酸性官能团，并且因此能够与药学上可接受的碱形成药学上可接受的盐。在这些情况下，术语“药学上可接受的盐”是指本发明涵盖的试剂的相对无毒的无机和有机碱加成盐。这些盐同样可以在治疗剂的最终分离和纯化期间原位制备，或通过使纯化的治疗剂以其游离酸形式与合适的碱如药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐，与氨或与药学上可接受的有机

伯、仲或叔胺分别反应来制备。代表性的碱金属或碱土金属盐包括锂盐、钠盐、钾盐、钙盐、镁盐和铝盐等。可用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(参见,例如,Berge等人,同上)。

[0252] 组合物中也可以存在润湿剂、乳化剂和润滑剂,如月桂基硫酸钠和硬脂酸镁,以及着色剂、脱模剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和香料、防腐剂和抗氧化剂。

[0253] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚(BHA)、丁基羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨糖醇、酒石酸、磷酸等。

[0254] 可用于本发明方法的制剂包括适合于口服、鼻、局部(包括颊和舌下)、直肠、阴道、气溶胶和/或肠胃外施用的那些。所述制剂可以方便地以单位剂型存在,并且可以通过药学领域公知的任何方法制备。可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量将根据所治疗的宿主、特定的给药方式而变化。可以与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常将是产生治疗效果的化合物的量。通常,在百分之一百中,该量将为约1%至约99%的活性成分,优选地约5%至约70%,最优选地约10%至约30%。

[0255] 制备这些制剂或组合物的方法包括使本发明所涵盖的试剂与载体和任选的一种或多种辅助成分结合的步骤。通常,通过使治疗剂与液体载体,或细分的固体载体或两者均匀且紧密地结合,然后,如果需要,将产品成型来制备制剂。

[0256] 适于口服施用的制剂可以是胶囊、扁囊、丸剂、片剂、锭剂(使用调味基质,通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄芪胶)、粉剂、颗粒剂形式,或作为在水性或非水性液体中的溶液或悬浮液,或作为水包油或油包水液体乳液,或作为酞剂或糖浆,或作为糖果锭剂(使用惰性基质,例如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口水等,各自含有预定量的治疗剂作为活性成分。化合物也可以作为大丸剂、栓剂或糊剂施用。

[0257] 在用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉剂、颗粒剂等)中,将活性成分与一种或多种药学上可接受的载体如柠檬酸钠或磷酸二钙和/或以下的任何一种混合:(1)填充剂或增量剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和/或硅酸;(2)粘合剂,诸如例如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;(3)保湿剂,例如甘油;(4)崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐和碳酸钠;(5)缓溶剂,例如石蜡;(6)吸收促进剂,例如季铵化合物;(7)润湿剂,诸如例如乙酰醇和单硬脂酸甘油酯;(8)吸附剂,例如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、月桂基硫酸钠及其混合物;和(10)着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情况下,药物组合物还可包含缓冲剂。也可以使用赋形剂如乳糖或奶糖以及高分子量聚乙二醇等将相似类型的固体组合物用作软和硬填充明胶胶囊中的填充剂。

[0258] 片剂可以通过任选地与一种或多种辅助成分一起压制或模制来制备。可以使用粘合剂(例如明胶或羟丙基甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(例如淀粉羟乙酸钠或交联的羧甲基纤维素钠)、表面活性剂或分散剂来制备压制的片剂。模制片剂可以通过在合适的机器中模制用惰性液体稀释剂润湿的粉末状肽或拟肽的混合物来制备。

[0259] 片剂和其它固体剂型如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒剂可以任选地用包衣和衣壳如肠溶衣和药物配制领域公知的其它包衣获得或制备。它们还可以被配制为使得使用例如提

供所需的释放特性的可变比例的羟丙基甲基纤维素,其它聚合物基质,脂质体和/或微球体来提供活性成分在其中的缓慢或受控释放。它们可以通过例如通过细菌截留过滤器过滤或通过以无菌固体组合物的形式掺入灭菌剂进行灭菌,所述灭菌固体组合物可以在使用前立即溶于无菌水或某些其它无菌可注射介质中。这些组合物还可以任选地含有遮光剂,并且可以是仅或优选在胃肠道的某些部分中任选地以延迟方式释放活性成分的组合。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物物质和蜡。如果合适,活性成分也可以与一种或多种上述赋形剂呈微囊形式。

[0260] 口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳剂、微乳剂、溶液剂、悬浮液、糖浆剂和酏剂。除活性成分外,液体剂型还可含有本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂,如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苧醇、苯甲酸苧酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、落花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢糠醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇脂肪酸酯及其混合物。

[0261] 除惰性稀释剂外,口服组合物还可包含佐剂,例如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、香料和防腐剂。

[0262] 悬浮液除活性剂外还可含有悬浮剂,例如乙氧基化的异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄芪胶及其混合物。

[0263] 直肠或阴道施用的制剂可以栓剂形式存在,其可以通过将一种或多种治疗剂与一种或多种合适的无刺激性赋形剂或载体混合来制备,所述赋形剂或载体包含例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸盐,并且在室温下为固体,但在体温下为液体,并且因此会在直肠或阴道腔内融化并释放出活性剂。

[0264] 适用于阴道施用的制剂还包括阴道栓、棉塞、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂,其含有本领域已知合适的载体。

[0265] 用于本发明涵盖的试剂的局部或透皮施用的剂型包括粉剂、喷雾剂、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶剂、溶液剂、贴剂和吸入剂。可以在无菌条件下将活性成分与药学上可接受的载体以及可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0266] 除治疗剂外,软膏、糊剂、乳膏和凝胶剂还可含有赋形剂,例如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄芪胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石和氧化锌或其混合物。

[0267] 除本发明所涵盖的试剂外,粉剂和喷雾剂还可含有赋形剂,例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末,或这些物质的混合物。喷雾剂可另外含有常规推进剂,例如氯氟烃和挥发性未取代的烃,例如丁烷和丙烷。

[0268] 本发明所涵盖的试剂可以替代地通过气雾剂施用。这可以通过制备含有化合物的水性气雾剂、脂质体制剂或固体颗粒来实现。可以使用非水(例如碳氟化合物推进剂)悬浮液。声波喷雾器是优选的,因为它们使试剂暴露于剪切状态最小化,这可能导致化合物的降解。

[0269] 通常,通过将试剂的水溶液或悬浮液与常规的药学上可接受的载体和稳定剂一起配制来制备水性气雾剂。载体和稳定剂随特定化合物的要求而变化,但典型地包括非离子表面活性剂(吐温、普朗尼克或聚乙二醇)、无毒蛋白如血清白蛋白、脱水山梨糖醇酯、油酸、卵磷脂和氨基酸如甘氨酸、缓冲剂、盐、糖或糖醇。气雾剂通常由等渗溶液制备。

[0270] 透皮贴剂具有提供治疗剂向身体的受控递送的附加优点。此类剂型可以通过将试剂溶解或分散在适当的介质中来制备。吸收促进剂也可用于增加拟肽在皮肤上的通量。可以通过提供速率控制膜或将拟肽在聚合物基质或凝胶中分散来控制此类通量的速率。

[0271] 眼科制剂、眼用软膏、粉剂、溶液等也被认为涵盖在本发明的范围内。

[0272] 适用于肠胃外施用的本发明药物组合物包含一种或多种治疗剂以及一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散体、悬浮液或乳剂，或在使用前可以重构为无菌注射液或分散液的无菌粉剂，其可能含有使制剂与预期接受者的血液或悬浮剂或增稠剂等渗的抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、溶质。

[0273] 可以在本发明的药物组合物中使用的合适的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇（如甘油、丙二醇、聚乙二醇等）及其合适的混合物、植物油如橄榄油和可注射的有机酯如油酸乙酯。例如，通过使用包衣材料如卵磷脂，在分散体的情况下，通过保持所需的粒径，以及通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。

[0274] 这些组合物还可含有佐剂，例如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可以通过包含各种抗细菌和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸等来确保防止微生物的作用。还可能需要在组合物中包括等渗剂，例如糖、氯化钠等。另外，可通过包含延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。

[0275] 在某些情况下，为了延长药物的作用，期望减慢皮下或肌肉注射药物的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。然后，药物的吸收速率取决于其溶解速率，而溶解速率又可取决于晶体大小和结晶形式。可替代地，通过将药物溶解或悬浮在油媒介物中来实现肠胃外施用药物形式的延迟吸收。

[0276] 通过在可生物降解的聚合物如聚丙交酯-聚乙交酯中形成本发明涵盖的试剂的微胶囊基质来制备可注射的储库形式。根据药物与聚合物的比例以及所用特定聚合物的性质，可以控制药物的释放速率。其它可生物降解的聚合物的实例包括聚（原酸酯）和聚（酸酐）。还可以通过将药物截留在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备储库型可注射制剂。

[0277] 当将本发明的治疗剂作为药物施用于人和动物时，它们可以本身或作为包含例如0.1至99.5%（更优选0.5至90%）活性成分与药学上可接受的载体的组合的药物组合物给予。

[0278] 可以通过本发明的方法确定本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平，以便获得一定量的活性成分，所述量对于特定的受试者、组合物和施用方式有效地实现期望的治疗反应，而不会对受试者产生毒性。

[0279] 可将本发明的核酸分子插入载体中并用作基因疗法载体。基因疗法载体可以通过例如静脉内注射、局部施用（参见美国专利第5,328,470号）或通过立体定位注射（参见例如Chen等人（1994）《美国科学学院学报》91:3054-3057）来递送至受试者。基因疗法载体的药物制剂可以将基因疗法载体包括在可接受的稀释剂中，或者可以包含缓释基质，其中嵌入有基因递送载体。可替代地，当完整的基因递送载体可从重组细胞完整产生时，例如逆转录病毒载体，药物制剂可包括一个或多个产生基因递送系统的细胞。

[0280] VIII. 试剂施用

[0281] 术语“施用”旨在包括允许试剂执行其预期功能的施用途径。可以使用的施用途径

的实例包括注射(皮下、静脉内、肠胃外、腹膜内、鞘内)、口服、吸入和透皮。注射可以是大量注射或可以是连续输注。取决于施用途径,可以用选定的材料将试剂包衣或将试剂布置在选定的材料中以保护其免受可能不利地影响其执行其预期功能的能力的自然条件的影响。所述试剂可以单独施用,或与药学上可接受的载体联合施用。所述试剂还可以作为前药施用,其在体内转化为其活性形式。所述试剂还可以与一种或多种另外的治疗剂组合(例如,在其之前、之后或与其同时)施用。

[0282] 应当理解,可以根据主治医生的判断中受试者的需求,所治疗病况的严重程度以及所采用的特定化合物来改变个体剂量。在确定治疗有效量或剂量时,主治医生可以考虑多种其它因素,包括但不限于特定治疗剂的药效学特性及其施用方式和途径;所需的治疗时间进程;哺乳动物的物种;其大小、年龄和总体健康;涉及的特定疾病;疾病的程度或参与程度或严重程度;个别受试者的反应;施用的特定化合物;施用方式;所施用制剂的生物利用度特征;选择的剂量方案;并发治疗的种类;和其它相关情况。

[0283] 可以以小于化合物有效剂量的较小剂量开始治疗。此后,在一个实施例中,应以小的增量增加剂量,直到在这种情况下达到最佳效果。为了方便起见,如果期望,可以将每日总剂量分开并在一天中分批施用。

[0284] 通常,优选在开始治疗之前从受试者获得第一样本,并在治疗期间获得一个或多个样本。在此类用途中,确定在治疗之前来自患有所述病症的受试者的细胞表达的基线,然后在治疗过程中监测来自患有所述病症的受试者的细胞表达的基线状态的变化。可替代地,可以使用在治疗期间获得的两个或更多个连续的样本而无需治疗前的基线样本。在此类用途中,将从受试者获得的第一样本用作确定来自患有所述病症的受试者的细胞表达是增加还是减少的基线。

[0285] 用于将多核苷酸引入哺乳动物、人或非人或其细胞的任何方式都可以适合于本发明将本发明的各种构建体递送至预期的受体中的实施。在本发明的一个实施例中,通过转染,即通过递送“裸”DNA或在与胶体分散系统的复合物中,将DNA构建体递送至细胞。胶体系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。本发明优选的胶体系统是脂质复合的或脂质体制配的DNA。在前一种方法中,在配制DNA之前,例如在用脂质配制DNA之前,可以首先通过实验优化含有带有所需DNA构建体的转基因的质粒的表达(例如,将内含子包含在5'非翻译区中,并消除不必要的序列)(Felgner等人(1995)《纽约科学院年鉴(Ann NY Acad Sci)126-139》)。DNA的配制,例如用各种脂质或脂质体材料进行的DNA配制,可以用已知的方法和材料进行,并递送到受体哺乳动物中。参见例如,Canonica等人(1994)《美国呼吸系统细胞和分子生物学杂志(Am J Respir Cell Mol Biol)》10:24-29;Tsan等人(1995)《美国生理学杂志(Am J Physiol)》268:L1052-1056;Alton等人(1993)《自然-遗传学(Nat Genet.)》5:135-142和美国专利第5,679,647号。

[0286] 脂质体的靶向可以基于解剖学和机制因素进行分类。解剖学分类基于选择性的水平,例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性。可以基于机械靶向是被动还是主动来进行区分。被动靶向利用脂质体的自然趋势将其分布到器官中的网状内皮系统(RES)的细胞中,所述细胞含有窦状毛细血管。另一方面,主动靶向涉及通过将脂质体偶联至特定的配体如单克隆抗体、糖、糖脂或蛋白质或通过改变脂质体的组成或大小来改变脂质体,从而实现

靶向器官和细胞类型而非自然定位部位。

[0287] 靶向递送系统的表面可以以多种方式进行修饰。在脂质体靶向递送系统的情况下,可以将脂质基团掺入脂质体的脂质双层中,以维持靶向配体与脂质体双层稳定缔合。各种连接基团可用于将脂质链连接至靶向配体。可以将裸DNA或与递送媒介物如脂质体相关的DNA施用于受试者的多个位点(见下文)。

[0288] 核酸可以任何期望的载体递送。这些包括病毒或非病毒载体,包括腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体和质粒载体。病毒的示例性类型包括HSV(单纯疱疹病毒)、AAV(腺相关病毒)、HIV(人类免疫缺陷病毒)、BIV(牛免疫缺陷病毒)和MLV(鼠白血病病毒)。核酸能够以提供足够有效的递送水平的任何所需形式施用,包括在病毒颗粒中、在脂质体中、在纳米颗粒中以及与聚合物复合施用。

[0289] 编码目的蛋白质或核酸的核酸可以在质粒或病毒载体或本领域已知的其它载体中。此类载体是公知的,并且可以针对特定应用选择任何载体。在本发明的一个实施例中,基因递送媒介物包含启动子和脱甲基酶编码序列。优选的启动子是组织特异性启动子和被细胞增殖激活的启动子,例如胸苷激酶和胸苷酸合酶启动子。其它优选的启动子包括可被病毒感染激活的启动子,例如 α -和 β -干扰素启动子,以及可被激素激活的启动子,例如雌激素。可以使用的其它启动子包括Moloney病毒LTR、CMV启动子和小鼠白蛋白启动子。启动子可以是组成型的或诱导型的。

[0290] 在另一个实施例中,如WO 90/11092和美国专利5,580,859中所述,使用裸露的多核苷酸分子作为基因递送媒介物。此类基因递送媒介物可以是生长因子DNA或RNA,并且在某些实施例中,与杀死的腺病毒(Curiel等人(1992)《人类基因疗法(Hum. Gene. Ther.)》3:147-154)连接。可以任选使用的其它媒介物包括DNA-配体(Wu等人(1989)《生物化学杂志》264:16985-16987)、脂质-DNA组合(Felgner等人(1989)《美国科学学院学报》84:7413-7417)、脂质体(Wang等人(1987)《美国科学学院学报》84:7851-7855)和微粒(Williams等人(1991)《美国科学学院学报》88:2726-2730)。

[0291] 基因递送媒介物可任选地包含病毒序列,例如病毒复制起点或包装信号。这些病毒序列可以选自病毒,例如星状病毒、冠状病毒、正粘病毒、乳多空病毒、副粘病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、痘病毒、逆转录病毒、披膜病毒或腺病毒。在一个优选的实施例中,生长因子基因递送媒介物是重组逆转录病毒载体。重组逆转录病毒及其各种用途已在多个参考文献中进行了描述,包括例如,Mann等人(1983)《细胞》33:153, Cane和Mulligan(1984)《美国科学学院学报》81:6349, Miller等人(1990)《人类基因疗法(Human Gene Therapy)》1:5-14, 美国专利第4,405,712号、第4,861,719号和第4,980,289号以及PCT申请第WO 89/02,468号、第WO 89/05,349号和第WO 90/02,806号。多种逆转录病毒基因递送媒介物可用于本发明,包括例如EP 0,415,731;WO 90/07936;WO 94/03622;WO 93/25698;WO 93/25234;美国专利第5,219,740号;WO 9311230;WO 9310218;Vile和Hart(1993)《癌症研究(Cancer Res.)》53:3860-3864;Vile和Hart(1993)《癌症研究》53:962-967;Ram等人(1993)《癌症研究》53:83-88;Takamiya等人(1992)《神经科学研究杂志(J. Neurosci. Res.)》33:493-503;Baba等人(1993)《神经外科杂志(J. Neurosurg.)》79:729-735(美国专利第4,777,127号、GB 2,200,651、EP 0,345,242和WO91/02805)中描述的那些。

[0292] 可以用于递送本发明的多核苷酸的其它病毒载体系统已经衍生自疱疹病毒,例

如,单纯疱疹病毒(Woo等人的1997年5月20日发布的美国专利第5,631,236号,以及Neurovex的W0 00/08191)、牛痘病毒(Ridgeway(1988)“哺乳动物表达载体”,载于:Rodriguez RL,Denhardt DT编辑,《载体:分子克隆载体及其用途的调查(Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses)》;Stoneham:Butterworth;Baichwal和Sugden(1986)“源自动物DNA病毒的基因转移载体:转移基因的瞬时和稳定表达”,载于:Kucherlapati R编辑,《基因转移(Gene transfer)》,纽约:增压器出版社;Coupar等人(1988)《基因》68:1-10),和几种RNA病毒。优选的病毒包括α病毒、痘病毒、沙粒病毒、牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒等。它们为各种哺乳动物细胞提供多种有吸引力的功能(Friedmann(1989)《科学》244:1275-1281;Ridgeway,1988,同上;Baichwal和Sugden,1986,同上;Coupar等人,1988,同上;Horwich等人(1990)《病毒学杂志(J.Virol.)》64:642-650)。

[0293] 在其它实施例中,基因组中的靶DNA可以使用本领域公知的方法进行操作。例如,基因组中的靶DNA可以通过缺失、插入和/或突变来操作,例如逆转录病毒插入、人工染色体技术、基因插入、具有组织特异性启动子的随机插入、基因靶向、可转座元件和/或任何其它用于引入外源DNA或产生修饰的DNA/修饰的核DNA的方法。其它修饰技术包括从基因组中删除DNA序列和/或改变核DNA序列。例如,可以通过定点诱变来改变核DNA序列。

[0294] 在其它实施例中,可以将重组RHOA显性负多肽及其片段施用于受试者。在一些实施例中,可以构建和施用具有增强的生物特性的融合蛋白(例如,上文讨论的Fc融合蛋白)。另外,可以根据本领域公知的药理方法(例如,聚乙二醇化、糖基化、寡聚等)来修饰RHOA显性负多肽及其片段,以进一步增强所需的生物活性,例如增加生物利用度和减少蛋白水解降解。

[0295] 实例

[0296] 通过以下实例进一步说明本发明,所述实例不应解释为限制性的。

[0297] 实例1:实例2的材料和方法

[0298] a. 小鼠集落

[0299] 携带有条件等位基因(其中loxP位点位于Cdh1的外显子2-3旁)的Mist1-CreERT2、Cdh1flox/flox、Tomation/GFP小鼠由哥伦比亚大学的Timothy C.Wang慷慨提供。Cre重组酶通过口服施用他莫昔芬(西格玛(Sigma),T5648) TAM(1-5mg/0.2ml玉米油,如所示)激活。Dana-Farber癌症研究所的伦理委员会批准了所有动物研究和程序。

[0300] b. 小鼠胃类器官的分离与培养

[0301] 先前如Miyoshi等人(2013)《自然方案(Nat.Prot.)》8:2471-2482所述的方案执行如下:使用化学试剂对小鼠实施安乐死,纵向张开胃,并大致除去纸巾上的内容物。在90mm培养皿中用冰冷的PBS洗涤组织,然后在50ml离心管中用约20ml的冰冷PBS剧烈振摇洗涤组织。洗涤后,将组织放入35mm培养皿中,将培养皿置于生物罩中,并用细剪刀将组织切碎。用1,000μl移液器加入1ml胶原酶溶液(英杰公司,17100-0017,2mg/ml),并将组织碎片悬浮在溶液中,在细胞培养箱中孵育培养皿,并且每5-10分钟使用1,000μl移液器剧烈移取组织混合物。移液后,使用相显微镜或解剖显微镜检查单个上皮单位(隐窝/凹坑)是否已与较大的组织碎片分离。在50ml离心管中放置70μm细胞过滤器,并使用1000μl移液管将组织混合物通过细胞过滤器过滤。用9ml洗涤介质洗涤过滤器,并将过滤后的细胞悬液转移至15ml离心管中,然后以20x g使管离心5分钟。加入500μl-1ml洗涤介质,并将细胞重悬在管中。将适量

的悬浮液转移至1.5ml管(每支管1,000-3,000个完整的上皮单位)中,并以200x g使管离心5分钟。将管置于冰上并将上皮单位重悬于Matrigel (BD,356234,每管15μl)中。将管和24孔板放在冰上,并使用20μl移液管将15μl细胞-Matrigel悬浮液加入到每个孔的中心,并用移液管尖端小心地铺开。在细胞培养箱中孵育板以聚合Matrigel。将板倒置,以避免上皮单元附着在板表面。向每个孔中加入500μl的50%条件培养基。对于小肠和盲肠,将500μl的50%条件培养基(加入重组Wnt3a (R&D系统,5036-WN-010) (100ng/ml)和R-脊椎蛋白1 (R&D系统,3474-RS-050)) (500ng/ml)加入到含有10μM Y27632 (R&D系统,1254)和10μM SB431542 (R&D系统,1614)的高级DMEM/F-12 (英杰公司,12634-010)中。至少每2天更换一次培养基。

[0302] c.类器官的慢病毒感染

[0303] 使用以下方案:在24孔中生长类器官2-3天,然后用p1000移液管刮擦并将Matrigel悬浮在培养基中。将类器官悬浮液转移到15ml管中,并根据测定规模将多个孔的悬浮液合并。将管以200x g离心5分钟,然后吸去上清液,剩下约100μl。在200μl胰蛋白酶-EDTA中重悬类器官,并将管在37℃下孵育5分钟。加入1ml洗涤介质,并通过剧烈移液使类器官分解。将管以200g离心5分钟,然后将细胞重悬于250μl慢病毒溶液(由LentiX™浓缩器(Clontech,类别#631231)浓缩,含8μg/ml聚凝胺(西格玛,TR-1003),10μM Y27632)。将悬浮液转移到48孔板上的孔中。用石蜡膜密封板,并通过将板在600x g 32℃下离心1小时进行旋转渗滤。在37℃下孵育板6小时以允许转导。向孔中加入1ml条件培养基,重悬并将悬浮液转移至1.5ml管中。将管以200x g离心5分钟,并将细胞重悬于15μl基质胶中,遵循培养类器官的程序,并选择适当的抗生素。

[0304] d.细胞存活力测定

[0305] 通过遵循CellTiter-Glo® (普洛麦格(Promega),类别#G7570)的方案进行细胞存活力测定。

[0306] e.异种移植瘤生长

[0307] 在4周龄的雄性裸鼠(BALB/cA-nu(nu/nu))的每个侧面皮下注射感染了dox诱导性对照或RHOA突变病毒的细胞。根据达纳法贝尔癌症研究所(Dana-Farber Cancer Institute)的机构动物护理和使用委员会的指导,对所有动物进行饲养和使用。

[0308] 实例2:RHOA显性负突变体杀死无CDH1癌细胞

[0309] 弥漫性胃癌(DGC)是胃癌的高致死性变异体,易于早期侵袭和转移,并且缺乏有效的分子靶向疗法。DGC的启动通常在编码细胞粘附蛋白E-钙粘蛋白的肿瘤抑制物CDH1丢失之后进行。E-钙粘蛋白(CDH1)的减少和/或丧失是浸润性小叶乳腺癌的关键标志,并且靶向CDH1的功能丧失突变存在于50%-60%的浸润性小叶乳腺癌中,并且被认为是一种在匹配的原位小叶癌中通常观察到的早期事件(McCart Reed等人(2015)《乳腺癌研究(Breast Cancer Res.)》17:12)。本文证明,小GTPase RHOA显性负型(如T19N、G17V、G17E等)的异位表达导致显著抑制无CDH1细胞(而非具有完整CDH1的细胞)的增殖和诱导细胞死亡。这些结果通过使用等基因胃类器官模型(有或没有E-钙粘蛋白)和等基因乳房上皮细胞模型(有或没有E-钙粘蛋白)和具有E-钙粘蛋白损失的NUGC4和MKN45弥散性胃细胞的异种移植瘤生长模型得到证实。具有上皮间质转化(EMT)、弥漫性胃癌和小叶乳腺癌的癌症相似之处在于E-钙粘蛋白丢失和/或下调。这些发现表明,RHOA显性负型可以用作DGC和小叶乳腺癌以及其它具有EMT表型的癌症的有效疗法。

[0310] 通过引用合并

[0311] 贯穿本申请引用的所有参考文献、专利申请、专利和公开的专利申请以及附图和序列表的内容均通过引用并入本文。

[0312] 等价物

[0313] 仅使用常规实验,本领域技术人员将认识到或能够确定本文所述的本发明的特定实施例的多种等同方案。此类等价物旨在由所附权利要求书涵盖。

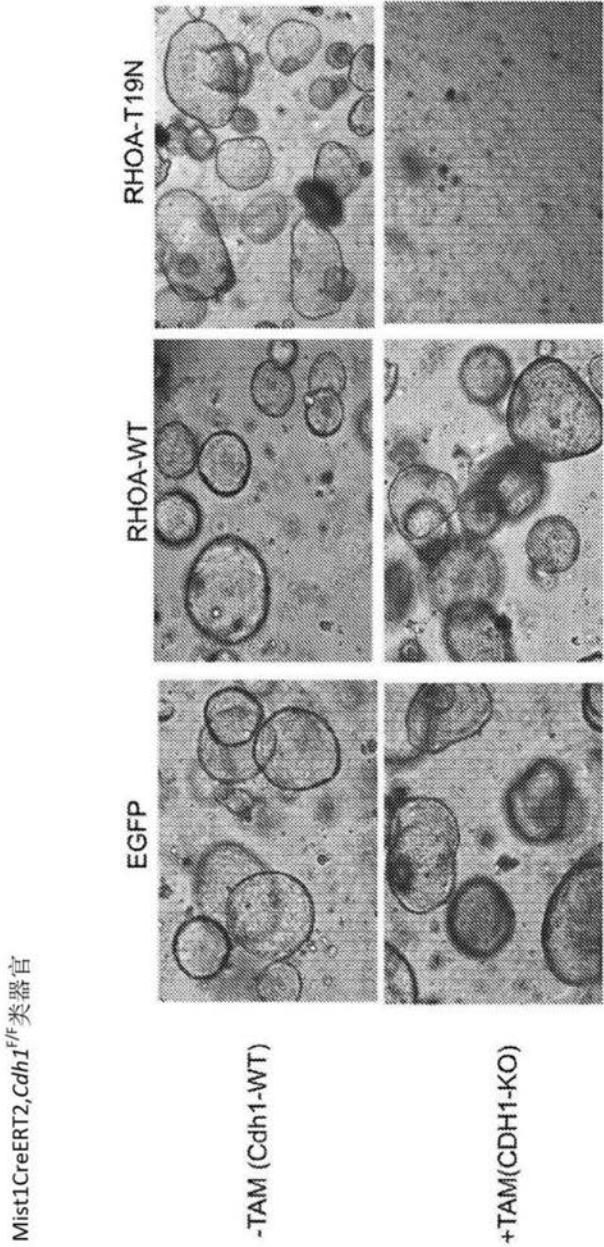


图1

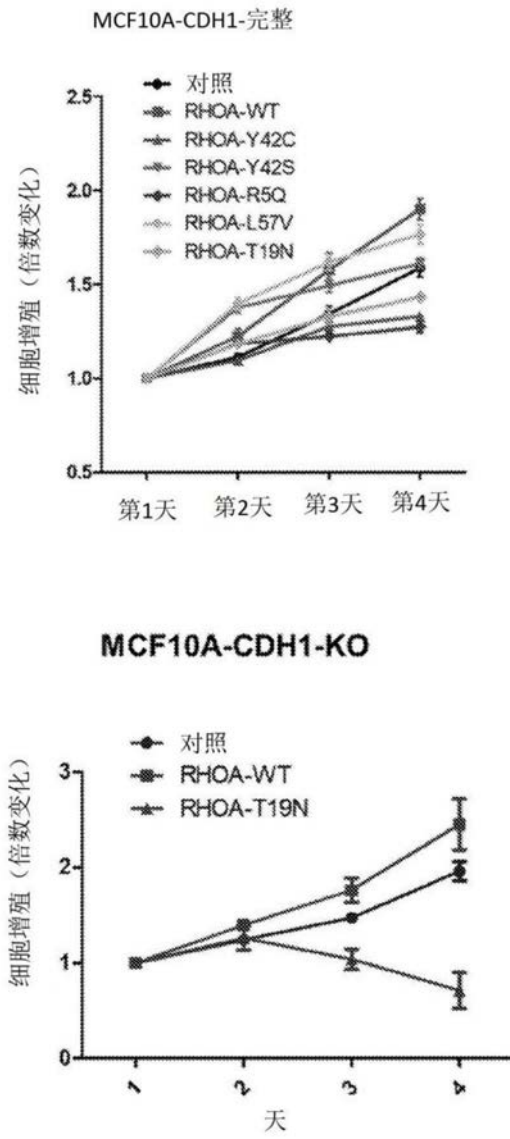


图2

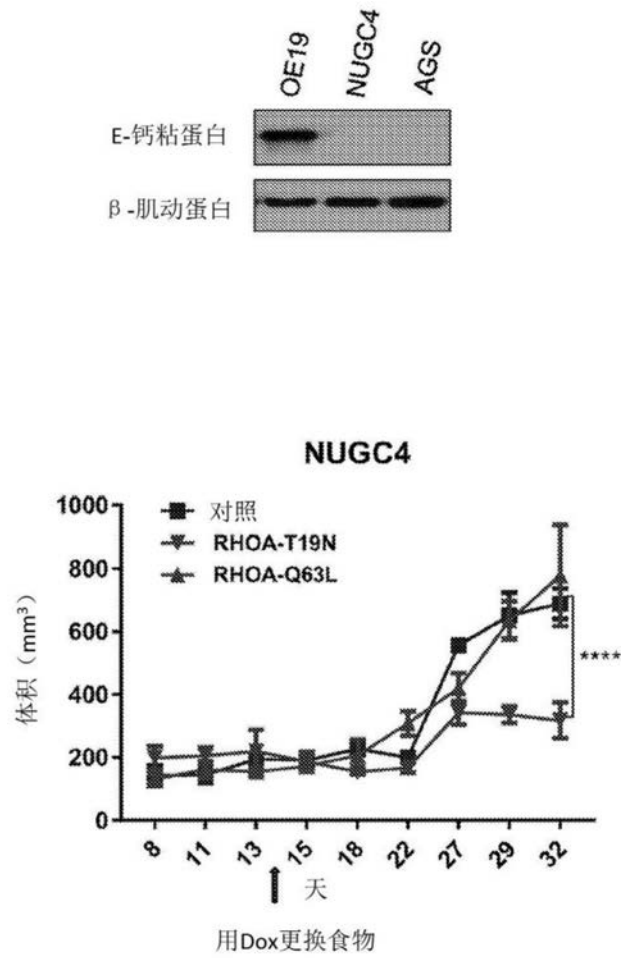


图3

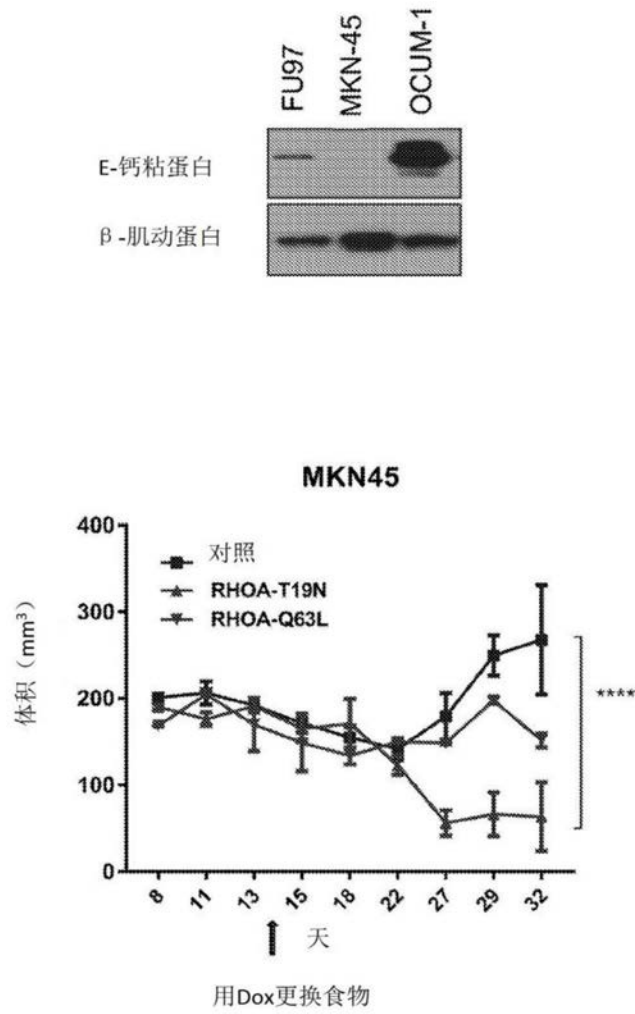


图4

专利名称(译)	使用RHOA显性负型治疗癌症的组合物和方法		
公开(公告)号	CN111278443A	公开(公告)日	2020-06-12
申请号	CN201880066812.2	申请日	2018-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	丹娜法伯癌症研究院		
当前申请(专利权)人(译)	丹娜法伯癌症研究院		
[标]发明人	A巴斯 H张		
发明人	A·巴斯 H·张		
IPC分类号	A61K31/513 A61K45/06 A61P35/00 C07K1/00 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/46 A61K45/06 A61P35/00 C07K2319/31 C12N9/14 C12Y306/05002 C07K1/00 G01N33/574 G01N2333/914 G01N33/53		
代理人(译)	吴瑜		
优先权	62/583166 2017-11-08 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

Mist1CreERT2, Cdh1^{flp}类器官

本发明提供使用RHOA显性负多肽或其生物活性片段和/或编码RHOA显性负多肽或其生物活性片段的核酸来治疗CDH1减少或缺失的癌症的组合物和方法。

