



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102575300 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

-
- (21) 申请号 201080047775. 4 *A61P 35/00* (2006. 01)
- (22) 申请日 2010. 08. 18 *C07K 16/30* (2006. 01)
- (30) 优先权数据 *C12N 15/09* (2006. 01)
61/274, 800 2009. 08. 21 US *C12N 15/113* (2006. 01)
G01N 33/50 (2006. 01)
- (85) PCT申请进入国家阶段日 *G01N 33/53* (2006. 01)
2012. 04. 23
- (86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2010/005095 2010. 08. 18
- (87) PCT申请的公布数据
W02011/021386 EN 2011. 02. 24
- (71) 申请人 肿瘤疗法科学股份有限公司
地址 日本神奈川县
- (72) 发明人 醍醐弥太郎 角田卓也 中村佑辅
- (74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
代理人 罗天乐
- (51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006. 01) 权利要求书 3 页 说明书 59 页
序列表 5 页 附图 6 页
-

(54) 发明名称

肺癌治疗和诊断的靶基因 CSTF2

(57) 摘要

本发明涉及 CSTF2 基因在癌症发生中发挥的作用, 而且特征在于一种通过施用针对 CSTF2 基因的双链分子或含有此类双链分子的组合物、载体或细胞来治疗或预防癌症的方法。本发明的特征还在于利用过表达的 CSTF2 基因对具有肺癌的受试者诊断癌症或评估 / 测定预后的方法。为此, CSTF2 可充当癌症, 特别是肺癌的新颖预后生物标志物。还有, 公开了使用它们对 CSTF2 的表达或生物学活性的影响作为指标筛选用于治疗 and 预防癌症的候选物质的方法。

1. 一种用于在受试者中诊断癌症或发生癌症的倾向性的方法,其中该方法包括下述步骤:
 - (a) 通过选自下组的任何一种方法测定源自受试者的生物样品中 CSTF2 基因的表达水平:
 - (i) 检测 CSTF2 基因的 mRNA,
 - (ii) 检测由 CSTF2 基因编码的蛋白质,和
 - (iii) 检测由 CSTF2 基因编码的蛋白质的生物学活性;并
 - (b) 将步骤 (a) 中测定到的表达水平与 CSTF2 基因的正常对照水平相比的升高与该受试者中癌症的存在关联起来。
2. 权利要求 1 的方法,其中步骤 (a) 中测定到的表达水平比该正常对照水平高至少 10%。
3. 权利要求 1 的方法,其中该源自受试者的生物样品包括活检样品、痰、血液、胸腔积液或尿。
4. 一种用于评估或确定患有癌症的受试者的预后的方法,其中该方法包括下述步骤:
 - (a) 检测源自受试者的生物样品中 CSTF2 基因的表达水平;
 - (b) 将检测到的表达水平与对照水平比较;并
 - (c) 基于 (b) 的比较确定该受试者的预后。
5. 权利要求 4 的方法,其中该对照水平为良好预后对照水平,且该表达水平与该对照水平相比的升高指示不良预后。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述升高是比该对照水平高至少 10%。
7. 权利要求 4 的方法,其中该表达水平是通过任何一种选自下组的方法测定的:
 - (a) 检测 CSTF2 基因的 mRNA;
 - (b) 检测由 CSTF2 基因编码的蛋白质;和
 - (c) 检测由 CSTF2 基因编码的蛋白质的生物学活性。
8. 权利要求 4 的方法,其中该源自受试者的生物样品包括活检样品、痰或血液、胸腔积液或尿。
9. 一种用于对患有癌症的受试者诊断癌症或评估或测定预后的试剂盒,其包含选自下组的试剂:
 - (a) 用于检测 CSTF2 基因的 mRNA 的试剂;
 - (b) 用于检测由 CSTF2 基因编码的蛋白质的试剂;和
 - (c) 用于检测由 CSTF2 基因编码的蛋白质的生物学活性的试剂。
10. 权利要求 9 的试剂盒,其中该试剂包含针对 CSTF2 基因的基因转录物的探针或引物或针对 CSTF2 基因的翻译产物的抗体。
11. 一种分离的双链分子,其在导入细胞中时抑制 CSTF2 基因的体内表达以及细胞增殖,其中该分子包括有义链及其互补反义链,其中这些链彼此杂交以形成该双链分子。
12. 权利要求 11 的双链分子,其中该有义链包含与选自 SEQ ID NO:9 和 10 的靶序列对应的序列。
13. 权利要求 11 或 12 的双链分子,其中该有义链与反义链在该靶序列处杂交以形成该双链分子,该双链分子的长度为 19 ~ 25 个碱基对。

14. 权利要求 11 至 13 任一项的双链分子,其由单一多核苷酸组成,该单一多核苷酸包括通过间插单链连接的该有义和反义链二者。

15. 权利要求 14 的双链分子,其具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3',其中 [A] 为有义链,其包含与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列对应的序列,[B] 为间插单链,其由 3 至 23 个核苷酸组成,而 [A'] 为反义链,其包括 [A] 中所选的靶序列的互补序列。

16. 一种载体,其编码权利要求 11 至 15 任一项的双链分子。

17. 一种在受试者中治疗或预防癌症的方法,其中该方法包括对受试者施用药理学有效量的针对 CSTF2 基因的双链分子或编码该双链分子的载体,其中该双链分子在导入表达 CSTF2 基因的细胞中时抑制 CSTF2 基因的表达。

18. 权利要求 17 的方法,其中该双链分子为权利要求 11 至 15 任一项的双链分子。

19. 权利要求 17 的方法,其中该载体为权利要求 16 的载体。

20. 一种用于治疗表达 CSTF2 基因的癌症的组合物,其中该组合物包含至少一种分离的针对 CSTF2 基因的双链分子或编码该双链分子的载体,其中该双链分子在导入表达 CSTF2 基因的细胞中时抑制 CSTF2 基因的表达;以及可药用的担载体。

21. 权利要求 20 的组合物,其中该双链分子为权利要求 11 至 15 任一项的双链分子。

22. 权利要求 20 的组合物,其中该载体为权利要求 16 的载体。

23. 一种筛选用于治疗或预防癌症或抑制癌细胞生长的候选物质的方法,其中该方法包括下述步骤:

- (a) 使测试物质与 CSTF2 多肽或其片段接触;
- (b) 检测该多肽或片段和该测试物质之间的结合活性;并
- (c) 选择结合该多肽或片段的测试物质作为用于治疗或预防癌症的候选物质。

24. 一种筛选用于治疗或预防癌症或抑制癌细胞生长的候选物质的方法,其中该方法包括下述步骤:

- (a) 使测试物质与 CSTF2 多肽或其片段接触;
- (b) 检测该多肽或片段的生物学活性;
- (c) 将该多肽或片段的生物学活性与在该测试物质不存在时检测到的生物学活性相比较;并

(d) 选择阻抑该多肽的生物学活性的测试物质作为用于治疗或预防癌症的候选物质。

25. 权利要求 24 的方法,其中该生物学活性为细胞增殖活性、RNA 结合活性、mRNA 切割活性或 mRNA 聚腺苷酸化活性。

26. 一种筛选用于治疗或预防癌症或抑制癌细胞生长的候选物质的方法,其中该方法包括下述步骤:

- (a) 使测试物质与表达 CSTF2 基因的细胞接触;并
- (b) 选择与在该测试物质不存在时检测到的表达水平相比降低 CSTF2 基因的表达水平的测试物质。

27. 一种筛选用于治疗或预防癌症或抑制癌细胞生长的候选物质的方法,其中该方法包括下述步骤:

- (a) 使测试物质与其中导入有载体的细胞接触,该载体包括 CSTF2 基因的转录调节区

和在该转录调节区控制下表达的报告基因；

(b) 测量该报告基因的表达或活性；并

(c) 选择与在该测试物质不存在时检测到的表达或活性水平相比降低该报告基因的表达或活性水平的测试物质。

28. 一种用于在受试者中治疗或预防癌症的方法,包括对该受试者施用抗 CSTF2 抗体或其免疫学活性片段。

29. 权利要求 1 至 8、17 至 19 和 23 至 28 任一项的方法,权利要求 9 或 10 的试剂盒、或权利要求 20 至 22 任一项的组合物,其中该癌症为肺癌。

30. 载体,它们包含包括有义链核酸和反义链核酸的多核苷酸组合中之任一,其中所述有义链核酸包含与 SEQ ID NO :9 或 10 对应的核苷酸序列且所述反义链核酸由与该有义链互补的序列组成,其中所述有义链和所述反义链的转录物彼此杂交以形成双链分子,且其中所述载体在导入表达 CSTF2 基因的细胞中时抑制细胞增殖。

肺癌治疗和诊断的靶基因 CSTF2

技术领域

[0001] 本发明涉及生物科学领域,更具体地,涉及癌症研究、癌症诊断和癌症治疗领域。特别地,本发明涉及用于检测和诊断肺癌的方法以及用于对具有肺癌的受试者治疗和预防或评估/测定预后的方法。此外,本发明涉及筛选用于治疗 and / 或预防肺癌的候选物质的方法。

[0002] 优先权

[0003] 本申请要求 2009 年 8 月 21 日提交的美国临时申请 No. 61/274,800 的权益,通过述及其完整内容收入本文。

背景技术

[0004] 原发性肺癌是大多数国家中首要的癌症死亡的原因,而且非小肺癌 (NSCLC) 占那些死亡的约 80% (NPL 1)。肺癌发生的详细分子机制仍然不清楚,尽管报告了肺癌中的多种基因改变 (NPL 2)。虽然手术技术和化疗取得了进展,但晚期肺癌患者的病情发展往往是致命的 (NPL 1)。因此,认为了解肺癌的生物学和引入更加有效的治疗来改善患者的存活是极端重要的 (NPL 3)。在最近二十年里,一些新开发的细胞毒剂诸如帕利他赛、多西他赛、吉西他滨、和长春瑞滨已开始为具有晚期 NSCLC 的患者提供多种治疗选择项,然而,与基于顺铂的常规疗法相比,那些方案显示的存活效益不突出 (NPL 4,5)。

[0005] 现在,特异性分子靶向的概念已应用于开发改良癌症治疗策略,而且主要的两种办法用于治疗:治疗性单克隆抗体和小分子剂 (NPL 6)。至今,多种分子靶向疗法已在晚期肺癌的化疗的 II 期和 III 期试验中得到了考察,包括表皮生长因子的酪氨酸激酶抑制剂诸如吉非替尼、厄洛替尼和埃罗替尼 (erlotinib),血管内皮生长因子的酪氨酸激酶抑制剂诸如 vandetanib、sorafenib、sunitinib,和针对表皮生长因子或血管内皮生长因子的单克隆抗体诸如贝伐单抗和西妥昔单抗 (NPL 6-10)。然而,由于毒性问题,仅有限数目的患者能选择这些治疗方案,而且即使应用所有种类的治疗,显示较好响应的患者的比例仍然有限 (NPL 6-10)。

[0006] 引用表

[0007] [非专利文献]

[0008] [NPL 1]Ahmedin J, Rebecca S, Elizabeth W, et al. Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 2007 ;57 :43-66

[0009] [NPL 2]Sozzi G. Molecular biology of lung cancer. Eur J Cancer 2001 ; 37Suppl 7 :S63-73

[0010] [NPL 3]Daigo Y, Nakamura Y. Gen Thorac Cardiovasc Surg 2008 ;56 :43-53

[0011] [NPL 4]Kelly K, Crowley J, Bunn PA et al. J Clin Oncol 2001 ;19 :3210-18

[0012] [NPL 5]Schiller JH, Harrington D, Belani CP et al. N Engl J Med 2002 ;346 : 92-8

[0013] [NPL 6]Thatcher Lung Cancer 2007 ;57 Suppl 2 :S18-23

- [0014] [NPL 7] Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. *N Engl J Med* 2006 ;355 :2542-50
- [0015] [NPL 8] Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. *N Engl J Med* 2005 ;353 :123-32
- [0016] [NPL 9] Thatcher N, Chang A, Parikh P, et al. *Lancet* 2005 ;366 :1527-37
- [0017] [NPL 10] Cesare G, Paolo M, Filomena G, et al. *Oncologist* 2007 ;12 :191-200
- [0018] 发明概述

[0019] 使用 cDNA 微阵列技术对数以千计的基因的表达水平的系统分析,是鉴定与癌发生途径有关的、可成为用于开发新治疗剂和诊断剂的候选者的靶分子的一种有效的办法。为了分离用于诊断和 / 或治疗肺癌的潜在分子靶,本发明人先前使用通过激光显微解剖纯化的肿瘤细胞群借助由 27,648 种基因或表达序列标签 (EST) 组成的 cDNA 微阵列分析了 101 份肺癌组织样品的基因组范围基因表达谱 (Daigo Y, Nakamura Y. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2008 ;56 :43-53, Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, et al. *Oncogene* 2003 ;22 :2192-205, Kakiuchi S, Daigo Y, Tsunoda T, Yano S, Sone S, Nakamura Y. *Mol Cancer Res* 2003 ;1 :485-99, Kakiuchi S, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Hum Mol Genet* 2004 ;13 :3029-43, Kikuchi T, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Int J Oncol* 2006 ;28 :799-805, Taniwaki M, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Int J Oncol* 2006 ;29 :567-75)。为了验证各基因产物的生物学和临床病理学意义,本发明人通过临床肺癌材料的肿瘤组织微阵列分析与 RNA 干扰技术的组合建立了筛选系统 (Suzuki C, Daigo Y, Kikuchi T, Katagiri T, Nakamura Y. *Cancer Res* 2003 ;63 :7038-41, Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, et al. *Clin Cancer Res* 2004 ;10 :8363-70, Kato T, Daigo Y, Hayama S, et al. *Cancer Res* 2005 ;65 :5638-46, Furukawa C, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Cancer Res* 2005 ;65 :7102-10, Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, et al. *Cancer Res* 2005 ;65 :9176-84, Suzuki C, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Cancer Res* 2005 ;65 :11314-25, Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, et al. *Cancer Sci* 2006 ;97 :737-45, Takahashi K, Furukawa C, Takano A, et al. *Cancer Res* 2006 ;66 :9408-19, Hayama S, Daigo Y, Kato T, et al. *Cancer Res* 2006 ;66 :10339-48, Kato T, Hayama S, Yamabuki Y, et al. *Clin Cancer Res* 2007 ;13 :434-42, Suzuki C, Takahashi K, Hayama S, et al. *Mol Cancer Ther* 2007 ;6 :542-51, Yamabuki T, Takano A, Hayama S, et al. *Cancer Res* 2007 ;67 :2517-25, Hayama S, Daigo Y, Yamabuki T, et al. *Cancer Res* 2007 ;67 :4113-22, Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N, et al. *Clin Cancer Res* 2007 ;13 :6624-31, Ishikawa N, Takano A, Yasui W, et al. *Cancer Res* 2007 ;67 :11601-11, Mano Y, Takahashi, K, Ishikawa N, et al. *Cancer Sci* 2007 ;98 :1902-13, Kato T, Sato N, Hayama S, et al. *Cancer Res* 2007 ;67 :8544-53, Kato T, Sato N, Takano A, et al. *Clin Cancer Res* 2008 ;14 :2363-70, Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, et al. *Cell* 2009 ;137 :485-97, Hirata D, Yamabuki T, Ito T, et al. *Clin Cancer Res* 2009, 15 :256-66, Suda T, Tsunoda T, Daigo Y, Nakamura Y, Tahara H. *Cancer Sci* 2007 ;98 :1803-8, Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, et al. *Cancer Sci* 2008 ;99 :1448-54, Harao M, Hirata S, Irie A, et al. *Int J Cancer* 2008 ;123 :2616-25)。

[0020] 这种系统性策略揭示,切割刺激因子 3' 前 -RNA, 亚基 2,64kDa (CSTF2) 在大多数原发性肺癌中频繁过表达。CSTF2 编码一种核蛋白,其在 N 端区中含有核糖核蛋白 (RNP) 型

RNA 结合域。该蛋白是切割刺激因子复合物 (CSTF) 的一个成员, 其与切割刺激因子的其它 2 个成员一起在 mRNA 的聚腺苷酸化中发挥作用 (Takagaki Y, MacDonald CC, Shenk T, Manley JL. Proc. Nat. Acad. Sci 1992 ;89 :1403-1407)。CSTF2 结合 mRNA 的 3'-非翻译区内的富含 GU 的元件 (Colgan DF, Manley JL. Genes Dev 1997 ;11 :2755-2766, MacDonald CC, Wilusz J, Shenk T. Mol Cell Biol 1994 ;14 :6647-6654, Takagaki Y, Manley JL. Mol Cell Biol 1997 ;17 :3907-3914, Deka P, Rajan PK, Perez-Canadillas JM, J Mol Biol 2005 ;347 :719-33)。CSTF2 的量在 3T6 成纤维细胞中在 G0 至 S 期转换期间升高 (Martincic K, Campbell R, Edwalds-Gilbert G, Souan L, Lotze MT, Milcarek C. 1998 ;95 :11095-100)。报告了小鼠和大鼠的雄性生殖细胞和人癌细胞中的强 CSTF2 表达, 或 CSTF2 在小鼠组织中遍在表达 (Dass B, Tardif S, Park JY, Tian B, Weitlauf HM, Hess RA, Carnes K, Griswold MD, Small CL, Macdonald CC. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 ;104 :20374-9, Huber Z, Monarez RR, Dass B, MacDonald CC. Ann N Y Acad Sci. 2005 ;1061 :163-72, Wallace AM, Denison TL, Attaya EN, MacDonald CC. Biol Reprod 2004 ;70 :1080-7, Dass B, Attaya EN, Michelle Wallace A, MacDonald CC. Biol Reprod 2001 ;64 :1722-9, Chennathukuzhi VM, Lefrancois S, Morales CR, Syed V, Hecht NB. Mol Reprod Dev 2001 ;58 :460-9, Dass B, McMahon KW, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, MacDonald CC. J Biol Chem 2001 ;276 :8044-50, Wallace AM, Dass B, Ravnik SE, Tonk V, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, MacDonald CC. Proc Natl Acad Sci U S A 1999 ;96 :6763-8, Shankarling GS, Coates PW, Dass B, Macdonald CC. BMC Mol Biol 2009 Mar ;10 :22)。尽管有 CSTF2 在体外作为 CSTF 成员的功能的证据, CSTF2 的激活在人癌症进展中的意义及其作为治疗靶的临床潜力尚无记载。

[0021] 如上所述, 本发明涉及 CSTF2 及其在肺癌发生中发挥的作用。因此, 本发明涉及用于检测、诊断、治疗和 / 或预防肺癌的新组合物和方法以及用于筛选有用物质的方法。

[0022] 特别地, 本发明缘于下述发现, 即 CSTF2 基因在癌症中过表达, 但在正常组织中不然; 并且, 靶向 CSTF2 基因的由特定序列 (特别是 SEQ ID NO :9 和 10) 构成的双链分子可有效抑制肺癌细胞的细胞生长。具体地, 本发明提供靶向 CSTF2 基因的小干扰 RNA (siRNA)。这些双链分子可在分离状态下利用, 或在载体中编码且自该载体表达来利用。因而, 本发明的一个目的是提供此类双链分子以及表达它们的载体和宿主细胞。

[0023] 在一个方面, 本发明提供通过将本发明的双链分子或载体施用于有所需要的受试者来抑制癌细胞生长或治疗癌症, 包括肺癌的方法。此类方法涵盖对受试者施用含有一种或多种该双链分子或载体的组合物。

[0024] 在另一个方面, 本发明提供用于治疗肺癌的组合物, 其含有至少一种本发明的双链分子或载体。

[0025] 在还有另一个方面, 本发明提供一种通过测定源自受试者的生物样品中 CSTF2 基因的表达水平在受试者中诊断或测定癌症倾向性 (predisposition) 的方法。该基因的表达水平与该基因的正常对照水平相比的升高指示该受试者罹患或有风险发生癌症, 包括肺癌。在一个优选的实施方法中, CSTF2 基因的表达水平可通过用适宜探针或引物检测 CSTF2 基因的 mRNA 或用抗 CSTF2 抗体检测 CSTF2 蛋白来测定。

[0026] 此外, 本发明涉及下述发现, 即较高的 CSTF2 表达水平与较差的存活率相关。因

此,本发明提供一种用于对具有肺癌的患者评估或测定预后的方法,该方法包括下述步骤:检测 CSTF2 基因的表达水平,将它与预定的参照表达水平比较并根据它们之间的差异为该患者确定预后。

[0027] 在又一个方面,本发明提供一种筛选用于治疗和 / 或预防癌症的候选物质的方法。此类物质会结合 CSTF2 蛋白、降低 CSTF2 蛋白的生物学活性、降低 CSTF2 基因的表达或降低代替 CSTF2 基因的报告基因的表达或活性。

[0028] 本领域技术人员会理解,本发明的一个或多个方面能符合某些目的,而一个或多个其它方面能符合某些其它目的。每个目的可以不是在它的所有方面同等适用于本发明的每一个方面。因此,前述目的可视为关于本发明的任何一个的备选。本发明的这些和其它目的和特征在阅读下面的详细描述连同附图和实施例之后会变得更加清楚明白。然而,要理解,上面的发明概述和下面的详细描述都是优选实施方案,而非对本发明或本发明其它备选实施方案的限制。

[0029] 附图简述

[0030] 在考虑下面的附图简要描述和发明详细描述及其优选实施方案之后,熟练技术人员容易想到本发明的各个方面和应用:

[0031] [图 1ab] 图 1 描绘肺肿瘤中 CSTF2 的表达:A,通过半定量 RT-PCR 检查的 15 例临床肺癌 [肺腺癌 (ADC),肺鳞状细胞癌 (SCLC),和小细胞肺癌 (SCC)] 和 15 种肺癌细胞系中 CSTF2 的表达。 β -肌动蛋白 (ACTB) 基因的表达充当数量对照。B,肺癌细胞系中 CSTF2 蛋白的表达的 Western 印迹分析。ACTB 蛋白的表达充当数量对照。IB,免疫印迹。

[0032] [图 1c] 图 1 描绘肺肿瘤中 CSTF2 的表达:C,通过共聚焦显微术检查的 CSTF2 蛋白的亚细胞定位。

[0033] [图 2ab] 图 2 描绘正常组织中 CSTF2 的表达,及 NSCLC 患者的 CSTF2 过表达与不良预后的关联:A,通过 Northern 印迹分析检测的正常人组织中 CSTF2 的表达。B,通过使用该家兔多克隆抗 CSTF2 抗体的免疫组织化学染色检测的 5 种正常人组织以及肺的腺癌细胞中 CSTF2 的表达;用苏木精复染色 (x200)。

[0034] [图 2cd] 图 2 描绘正常组织中 CSTF2 的表达,及 NSCLC 患者的 CSTF2 过表达与不良预后的关联:C,肺 ADC 组织和正常肺组织中强、弱、和无 CSTF2 表达的代表例 (初始放大倍数, x100)。D, NSCLC 患者的存活的 Kaplan-Meier 分析 ($P = 0.0079$, 时序检验)。

[0035] [图 3] 图 3 描绘针对 CSTF2 的 siRNA 对 NSCLC 细胞的生长的抑制:A,通过半定量 RT-PCR 分析的 A549 和 LC319 细胞中响应针对 CSTF2 的 siRNA 处理 (si-CSTF2-#1 或 si-CSTF2-#2) 或对照 siRNA [si-增强型绿色荧光蛋白 (si-EGFP) 或 si-萤光素酶 (si-LUC)] 的 CSTF2 的表达 (顶部)。B, C, 用 si-CSTF2 或对照 siRNA 转染的肿瘤细胞的 MTT 和集落形成测定。

[0036] [图 4] 图 4 描绘 CSTF2 导入哺乳动物细胞对细胞生长的增强:A,通过 Western 印迹分析检测的 COS-7 细胞中 CSTF2 的瞬时表达。对细胞导入 pcDNA3.1-myc-His-CSTF2 或模拟载体。B 和 C, 通过 MTT 和集落形成测定评估细胞存活力和集落数目。测定在三个重复孔中进行三次。

[0037] 发明详述

[0038] 虽然任何与本文中描述的方法和材料相似或等同的方法和材料可用于实施或测

试本发明的实施方案,但是现在描述优选的方法、装置、和材料。然而,在描述本发明的材料和方法之前,要理解,本发明不限于本文中描述的特定大小、形状、尺度、材料、方法、方案、等,因为这些可依照常规实验和优化而变化。还要理解,该描述中使用的术语只是出于描述特定样式或实施方案的目的,而非意图限制本发明的范围,本发明的范围只会由所附权利要求来限制。

[0039] 通过述及明确地将此说明书中提到的每一篇出版物、专利或专利申请的公开内容完整收入本文。然而,本文中无一处可解释为承认本发明没有资格凭借发明在先而早于此类公开。

[0040] 如果有冲突,当以本说明书,包括定义为准。另外,该等材料、方法、和实施例只是例示性的,而非意图限制。

[0041] 定义

[0042] 如本文中使用的,词语“一个 / 种”、“该”、和“所述”意味着“至少一个 / 种”,除非另有明确说明。

[0043] 术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸,以及与天然存在的氨基酸发挥相似功能的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸指由遗传密码编码的氨基酸,以及在细胞中在翻译后经过修饰的氨基酸(例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸、和 O-磷酸丝氨酸)。短语“氨基酸类似物”指与天然存在的氨基酸具有相同的基础化学结构(α 碳与氢、羧基、氨基、和 R 基团结合)但具有经过修饰的 R 基团或经过修饰的主链的化合物(例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷)。短语“氨基酸模拟物”指与具有与一般氨基酸不同的结构但发挥与一般氨基酸相似的功能的化学化合物。

[0044] 氨基酸在本文中可以通过它们公知的由 IUPAC-IUB 生物化学命名委员会推荐的三字母符号或单字母符号来指称。

[0045] 如本文中使用的,术语“生物样品”指完整生物体或其组织、细胞或组成部分(例如体液,包括但不仅限于血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊液、唾液、羊水、脐带血、尿液、阴道液和精液)的子集。“生物样品”进一步指从完整生物体或其细胞、组织或组成部分的子集制备的匀浆物、裂解物、提取物、细胞培养物或组织培养物,或其级分或部分。最后,“生物样品”指含有细胞成分(诸如蛋白质或多核苷酸)的培养基,诸如生物体已在其中繁殖的营养汤或凝胶。

[0046] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核酸”、和“核酸分子”在本文中可互换使用,指核酸残基的聚合物,而且除非另有明确说明,通过它们公认的单字母代码来指称。该等术语适用于其中一个或多个核酸通过酯键合连接的核酸(核苷酸)聚合物。核酸聚合物可以由 DNA、RNA 或其组合构成,而且涵盖天然存在的和非天然存在的核酸聚合物二者。

[0047] 术语“多肽”、“肽”、和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。该等术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是经过修饰的残基或非天然存在的残基(诸如相应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物)的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物。

[0048] 术语“细胞增殖活性”、“细胞增殖增强活性”、和“细胞增殖促进活性”在本文中可互换使用,指当多肽与细胞接触或将编码多肽的基因导入细胞中时,多肽促进或增强细胞增殖的活性。

[0049] 与物质（例如多肽、抗体、多核苷酸、等）联用的术语“分离的”和“纯化的”表示该物质基本上不含至少一种可包括于天然来源中的物质。如此，分离的或纯化的抗体指基本上不含细胞材料例如碳水化合物、脂质、或其它来自衍生该蛋白质（抗体）的细胞或组织来源的污染性蛋白质的抗体，或当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学品的抗体。术语“基本上不含细胞材料”包括其中多肽与用于分离或重组生产它的细胞的细胞成分分开

的多肽制备物。
[0050] 如此，基本上不含细胞材料的多肽包括具有少于约 30%、20%、10%、或 5%（按干重计）的异源蛋白质（在本文中称作“污染性蛋白质”）的多肽制备物。当多肽重组产生时，在一些实施方案中，其还基本上不含培养基，包括具有少于约 20%、10%、或 5% 的蛋白质制备物体积的培养基的多肽制备物。当多肽通过化学合成产生时，在一些实施方案中，其基本上不含化学前体或其它化学品，包括具有少于约 30%、20%、10%、5%（按干重计）的蛋白质制备物体积的与该蛋白质合成有关的化学前体或其它化学品的多肽制备物。可例如通过在蛋白质制备物的十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳及凝胶的考马斯亮蓝染色等等之后单一条带的出现来显示特定蛋白质制备物含有分离的或纯化的多肽。在一个实施方案中，蛋白质（包括本发明的抗体）是分离的或纯化的。

[0051] “分离的”或“纯化的”核酸分子，例如 cDNA 分子，当通过重组技术产生时可基本上不含其它细胞材料或培养基，或当化学合成时可基本上不含化学前体或其它化学品。在一个实施方案中，编码本发明的蛋白的核酸分子是分离的或纯化的。

[0052] 除非另有定义，术语“癌症”指过表达 CSTF2 基因的癌症，诸如肺癌，包括腺癌（ADC）、鳞状细胞癌（SCC）、大细胞癌（LCC）、和小细胞肺癌（SCLC）。

[0053] CSTF2 基因或 CSTF2 蛋白

[0054] 人 CSTF2 基因的核酸和多肽序列分别显示于但不限于 SEQ ID NO :1 和 SEQ ID NO : 2。另外，上述序列数据也可经 GenBank 登录号 NM_001325 得到。

[0055] 依照本发明的一个方面，认为功能性等同物也是上述“多肽”。在本文中，蛋白的“功能性等同物”为具有与该蛋白等同的生物学活性的多肽。也就是，任何保留生物学能力的多肽可用作本发明中的此类功能性等同物。例如，已知 CSTF2 多肽具有细胞增殖增强活性、RNA 结合活性、RNA 切割活性、RNA 聚腺苷酸化活性等等。认为保留这些活性中至少一种的多肽是本发明中 CSTF2 多肽的功能性等同物。此类功能性等同物包括那些对蛋白的天然存在氨基酸序列替代、删除、添加、或插入一个或多个氨基酸的。或者，多肽可包含与相应蛋白的序列具有至少约 80% 同源性（也称作序列同一性），更优选至少约 90% 至 95% 同一性，进一步更优选 96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列。在其它实施方案中，多肽可以由在严格条件下与基因的天然存在核苷酸序列杂交的多核苷酸编码。

[0056] 本发明的多肽可在氨基酸序列、分子量、等电点、糖链的有无、或形式方面有变化，取决于用于产生它的细胞或宿主，或使用的纯化方法。无论如何，只要它具有与人蛋白的功能等同的功能，它就在本发明的范围内。

[0057] 短语“严格（杂交）条件”指下述条件，在该条件下，核酸分子会与其靶序列杂交，通常在核酸复杂混合物中，但没有与其它序列的可检测的杂交。严格条件取决于序列，而且在不同情况中会有所不同。较长的序列在较高的温度特异性杂交。对于核酸杂交详尽指导可见于 Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization

with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays"(1993)。一般地,严格条件选择为在限定的离子强度和 pH,比特定序列的热熔点 (T_m) 低约 5-10°C。 T_m 是如下的温度(在限定的离子强度、pH、和核酸浓度下),其中 50% 的与靶互补的探针在平衡时与靶序列杂交(因为靶序列过量存在,所以在 T_m , 在平衡时 50% 的探针被占据)。严格条件也可以通过添加去稳定剂(诸如甲酰胺)来实现。对于选择性或特异性杂交,阳性信号是背景的至少两倍,优选背景杂交的 10 倍。例示性的严格杂交条件包括如下:50% 甲酰胺、5x SSC、和 1% SDS,在 42°C 温育,或 5x SSC、1% SDS、在 65°C 温育,用 0.2x SSC 和 0.1% SDS 在 50°C 清洗。

[0058] 在本发明的背景中,用于分离编码与上述人蛋白在功能上等同的多肽的 DNA 的杂交条件可由本领域技术人员常规选择。例如,可如下进行杂交:在 68 摄氏度用 "Rapid-hyb buffer"(Amersham LIFE SCIENCE) 进行 30 分钟或更长的预杂交,添加经过标记的探针,并在 68 摄氏度温育 1 小时或更长。下面的清洗步骤可在例如低严格度条件中进行。一种例示性的低严格度条件可包括 42°C、2x SSC、0.1% SDS,优选 50°C、2x SSC、0.1% SDS。常常优选使用高严格条件。一种例示性的高严格条件可包括在室温在 2x SSC、0.1% SDS 中清洗 3 次各 20 分钟,然后在 1x SSC、0.1% SDS 中在 37 摄氏度清洗 3 次各 20 分钟,并在 1x SSC、0.1% SDS 中在 50 摄氏度清洗 2 次各 20 分钟。然而,数种因素,诸如温度和盐浓度,可影响杂交的严格度,而且本领域技术人员可选择合适的因素以达到所需的严格度。

[0059] 一般而言,已知蛋白中一个或多个氨基酸的修饰不影响蛋白的功能。事实上,已知突变的或经过修饰的蛋白(其具有通过对某种氨基酸序列替代、删除、插入和/或添加一个或多个氨基酸残基而修饰的氨基酸序列)保留原始的生物学活性(Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 81:5662-6(1984); Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 10:6487-500(1982); Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 79:6409-13(1982))。因而,本领域技术人员会认识到,对氨基酸序列进行个别添加、删除、插入、或替代,这改变单个氨基酸或少数氨基酸,或者被认为是"保守修饰"的那些修饰——其中蛋白的改变产生具有相似功能的蛋白,这些都是本发明的背景中可接受的。

[0060] 只要保持蛋白活性,氨基酸突变的数目不受特别限制。然而,一般优选改变氨基酸序列的 5% 或更少。因而,在一个优选的实施方案中,在此类突变体中要突变的氨基酸数目一般为 30 个氨基酸或更少,优选 20 个氨基酸或更少,更优选 10 个氨基酸或更少,更优选 6 个氨基酸或更少,甚至更优选 3 个氨基酸或更少。

[0061] 要突变的氨基酸残基优选突变为氨基酸侧链特性保持的另一种氨基酸(称为保守性氨基酸替代的过程)。氨基酸侧链特性的例子有疏水性氨基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、亲水性氨基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、和具有下列共同官能团或特征的侧链:脂肪族侧链(G, A, V, L, I, P);含有羟基基团的侧链(S, T, Y);含有硫原子的侧链(C, M);含有羧酸和酰胺的侧链(D, N, E, Q);含有碱的侧链(R, K, H);和含有芳香族的侧链(H, F, Y, W)。提供功能相似氨基酸的保守性替代代表在本领域是公知的。例如,下列 8 个组各种包含彼此构成保守性替代的氨基酸:

[0062] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0063] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0064] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0065] 4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K) ;

[0066] 5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V) ;

[0067] 6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W) ;

[0068] 7) 丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T) ;和

[0069] 8) 半胱氨酸 (C)、甲硫氨酸 (M) (参见例如 Creighton, Proteins 1984) 。

[0070] 此类保守性修饰多肽包括在本发明的蛋白中。然而,本发明并不仅限于此,而且蛋白质包括非保守性修饰,只要蛋白的至少一种生物学活性得以保留即可。另外,经过修饰的蛋白并不排除多态变体、种间同源物、和那些由这些蛋白的等位基因编码的。

[0071] 此外,CSTF2 基因涵盖编码蛋白的此类功能性等同物的多核苷酸。除了杂交之外,可以利用基因扩增方法,例如聚合酶链式反应 (PCR) 方法,通过使用基于上述信息的序列合成的引物来分离编码与蛋白功能等同的多肽的多核苷酸。分别作为人类基因和蛋白的功能性等同物的多核苷酸和多肽通常与其原始核苷酸或氨基酸序列具有高同源性。“高同源性”通常指 40% 或更高的同源性,优选 60% 或更高,更优选 80% 或更高,甚至更优选 90% 至 95% 或更高,甚至更优选 96%、97%、98%、99% 或更高。特定多核苷酸或多肽的同源性可遵循“Wilbur and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80 :726-30 (1983)” 中的算法来确定。

[0072] 抗体

[0073] 如本文中使用的,术语“抗体”意图包括可以与指定的蛋白或其肽特异性反应的免疫球蛋白及其片段。抗体可以包括人抗体、灵长源化 (primatized) 抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、人源化抗体、与其它蛋白或放射性标记物融合的抗体、和抗体片段。另外,在本文中,抗体以最广义使用,具体涵盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体 (例如双特异性抗体)、和抗体片段,只要它们展现期望的生物学活性。“抗体”指示所有类别 (例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM) 。

[0074] 本发明使用针对 CSTF2 的抗体。这些抗体会通过已知方法来生成。

[0075] 描述了用于生成依照本发明使用的抗体的例示性技术。

[0076] (i) 多克隆抗体 :

[0077] 多克隆抗体优选地通过多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂在动物中产生。可能有用的是,使用双功能或衍生化试剂将相关抗原与在待免疫的物种中具有免疫原性的蛋白相偶联,其中具有免疫原性的蛋白例如钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂,且其中双功能或衍生化试剂例如马来酰亚胺苯甲酸硫代琥珀酰亚胺酯 (maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester) (通过半胱氨酸残基偶联)、N- 羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}' \text{N} = \text{C} = \text{NR}$, 其中 R 和 R' 是不同的烷基。

[0078] 用抗原、免疫原性偶联物、或衍生物免疫动物,方式是例如组合 100 或 $5 \mu\text{g}$ 蛋白或偶联物 (分别用于家兔或小鼠) 与 3 倍体积的弗氏完全佐剂,并在多点皮内注射该溶液。一个月后,用弗氏完全佐剂中 1/5-1/10 原始量的肽或偶联物在多点通过皮下注射来对动物加强免疫。7-14 天后,对动物进行采血,并测定血清的抗体滴度。加强免疫动物,直至滴度达到高平台。优选地是,用于对动物进行加强免疫的是相同抗原的偶联物,但与不同的蛋白偶联和 / 或通过不同的交联物质偶联。

[0079] 偶联物亦可在重组细胞培养中作为蛋白融合物来制备。聚集剂诸如明矾亦适用于

增强免疫应答。

[0080] (ii) 单克隆抗体：

[0081] 单克隆抗体自基本上均质的抗体的群体获得，即构成该群体的单个抗体是相同的，只是可能存在少量的可能的天然发生的突变。如此，修饰语“单克隆”是指抗体的这样的特征，即其不是离散 (discrete) 抗体的混合物。

[0082] 例如，单克隆抗体可以使用杂交瘤方法来制备，该方法首先记载于 Kohler G&Milstein C. Nature. 1975 Aug 7 ;256 (5517) :495-7, 或者可以通过重组 DNA 方法来制备 (美国专利 No. 4, 816, 567)。

[0083] 在杂交瘤方法中，小鼠或其它适宜的宿主动物，诸如仓鼠，用本文上文所述免疫以引发淋巴细胞产生或能够产生会特异性结合用来免疫的蛋白的抗体。或者，可在体外免疫淋巴细胞。然后使用合适的融合剂诸如聚乙二醇使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。

[0084] 将如此制备的杂交瘤细胞接种在合适的培养基中并培养，所述培养基优选包含一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如，如果所述亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT)，那么所述杂交瘤的培养基通常会包含次黄嘌呤、氨基蝶呤、和胸腺嘧啶 (HAT 培养基)，这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞的生长。

[0085] 优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合，支持所选抗体产生细胞稳定高水平产生抗体，且对某种培养基诸如 HAT 培养基敏感的。在这些中，优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系，诸如那些自可以从 Salk 研究所细胞配送中心 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA) 获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤和可以从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) 获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞衍生的。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也有记载用于产生人单克隆抗体 (Kozbor D, et al., J Immunol. 1984 Dec ;133 (6) :3001-5 ;Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0086] 对杂交瘤细胞在其中生长的培养基分析针对抗原的单克隆抗体的生成。优选地，通过免疫沉淀或通过体外结合测定诸如放射性免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸收测定法 (ELISA) 来测定由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0087] 例如，单克隆抗体的结合亲和力可通过 Munson PJ&Rodbard D. Anal Biochem. 1980 Sep 1 ;107 (1) :220-39 的 30Scatchard 分析来测定。

[0088] 在鉴定出产生具有期望的特异性、亲和力、和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后，该克隆可通过有限稀释规程来亚克隆，并通过标准方法来培养 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。适合于此目的的培养基包括，例如 D-MEM 或 RPML-1640 培养基。另外，杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水瘤来体内培养。

[0089] 通过常规免疫球蛋白纯化规程合适地将由亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水、或血清分开，所述规程诸如例如蛋白 A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、或亲和层析。

[0090] 编码单克隆抗体的 DNA 易于使用常规规程,例如通过使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针,来分离和测序。杂交瘤细胞是此类 DNA 的优选来源。一旦分离,就可将 DNA 置入表达载体中,然后将其转染进入本身不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞,诸如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中华仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、或骨髓瘤细胞中,从而在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于在细菌中重组表达编码抗体的 DNA 的综述论文包括 Skerra A. *Curr Opin Immunol*. 1993 Apr ;5(2) :256-62 和 Plückthun A. *Immunol Rev*. 1992 Dec ;130 :151-88。

[0091] 另一种产生可与 CSTF2 起反应的特异性抗体或抗体片段的方法是用 CSTF2 筛选在细菌中表达的、编码免疫球蛋白基因或其部分的表达文库。例如,可以使用噬菌体表达文库,在细菌中表达完整的 Fab 片段、VH 区和 Fv 区。参见例如 Ward ES, et al., *Nature*. 1989 Oct 12 ;341(6242) :544-6 ;Huse WD, et al., *Science*. 1989 Dec 8 ;246(4935) :1275-81 ;及 McCafferty J, et al., *Nature*. 1990 Dec 6 ;348(6301) :552-4。用 CSTF2 肽筛选此类文库能鉴定出可与 CSTF2 起反应的免疫球蛋白片段。或者, SCID-hu- 小鼠 (可从 Genpharm 获得) 可用来产生抗体或其片段。

[0092] 在又一个实施方案中,可以从使用 McCafferty J, et al., *Nature*. 1990 Dec 6 ;348(6301) :552-4 ;Clarkson T, et al., *Nature*. 1991 Aug 15 ;352(6336) :624-8 中记载的技术产生的抗体噬菌体文库分离抗体或抗体片段 ;Marks JD, et al., *J Mol Biol*, 222 :581-597 (1991) ;*J Mol Biol*. 1991 Dec 5 ;222(3) :581-97 分别记载了使用噬菌体文库分离小鼠和人抗体。后续出版物记载了通过链改组产生高亲和性 (nM 范围) 人抗体 (Marks JD, et al., *Biotechnology* (N Y). 1992 Jul ;10(7) :779-83), 以及组合感染 (combinatorial infection) 和体内重组作为构建超大噬菌体文库的策略 (Waterhouse P, et al., *Nucleic Acids Res*. 1993 May 11 ;21(9) :2265-6)。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方法。

[0093] 也可以通过例如用人重链和轻链恒定域编码序列替换同源鼠序列 (美国专利 No. 4, 816, 567 ;Morrison SL, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Nov ;81(21) :6851-5), 或者通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列共价连接来修饰 DNA。

[0094] 通常,用此类非免疫球蛋白多肽替换抗体恒定域,或者用它们替换抗体的一个抗原结合位点的可变域以创建包括一个具有某种抗原特异性的抗原结合位点和另一个具有不同抗原特异性的抗原结合位点的嵌合双价抗体。

[0095] (iii) 人源化抗体 :

[0096] 用于将非人抗体人源化的方法在本领域中已有记载。优选地,人源化抗体中引入了一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人源氨基酸残基经常称作“输入 (import)”残基,通常取自某个“输入”可变域。人源化可以基本上遵循 Winter 及其合作者的方法 (Jones PT, et al., *Nature*. 1986 May 29-Jun 4 ;321(6069) :522-5 ;Riechmann L, et al., *Nature*. 1988 Mar 24 ;332(6162) :323-7 ;Verhoeyen M, et al., *Science*. 1988 Mar 25 ;239(4847) :1534-6) 来实施,用高变区序列替换人抗体的相应序列。因而,此类“人源化”抗体是其中完整人可变域的一小部分 (substantially less than intact) 被来自非人物种的相应序列替换的嵌合抗体 (美国专利 No. 4, 816, 567)。在实践中,人源化抗体通常是人抗

体中一些高变区残基,可能还有一些FR残基被来自啮齿动物抗体中类似位点的残基替代而得到的抗体。

[0097] 在制备人源化抗体中要使用的人可变域,包括轻链和重链可变域,的选择对于降低抗原性是非常重要的。依照所谓的“最佳拟合(best-fit)”方法,针对已知人可变域序列的整个文库来筛选啮齿动物抗体的可变域的序列。然后,接受与啮齿动物序列最接近的人序列作为用于人源化抗体的人框架区(FR)(Sims MJ, et al., *J Immunol.* 1993 Aug 15; 151(4):2296-308; Chothia C&Lesk AM. *J Mol Biol.* 1987 Aug 20; 196(4):901-17)。另一种方法使用自轻链或重链特定亚群的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体(Carter P, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 15; 89(10):4285-9; Presta LG, et al., *J Immunol.* 1993 Sep 1; 151(5):2623-32)。

[0098] 另外,重要的是,抗体的人源化保留对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了实现这一目标,依照一种优选的方法,人源化抗体的制备借助下述过程:使用亲本和人源化序列的三维模型来分析亲本序列和各种概念性人源化产物。三维免疫球蛋白模型是本领域技术人员普遍可得且熟悉的。有可用的计算机程序来图解和显示选定的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构。检查这些显示容许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。这样,可以选择FR残基,并与受体和输入序列组合,从而实现期望的抗体特征,诸如对靶抗原的增加的亲和力。一般地说,高变区残基直接且最实质性地参与影响抗原结合。

[0099] (iv) 人抗体:

[0100] 作为人源化的替代方式,可生成人抗体。例如,现在有可能生成这样的转基因动物(例如小鼠),它们当被免疫接种时能够产生人抗体的完整全集(repertoire),而没有内源免疫球蛋白产生。例如,已有记载,在嵌合和种系突变小鼠中纯合删除抗体重链连接区(JH)基因导致内源抗体产生完全被抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到此类种系突变小鼠中会导致在抗原攻击时产生人抗体。例如参见 Jakobovits A, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 15; 90(6):2551-5; *Nature.* 1993 Mar 18; 362(6417):255-8; Brüggemann M, et al., *Year Immunol.* 1993; 7:33-40; 及美国专利 No. 5,591,669; 5,589,369 和 5,545,807。

[0101] 或者,可使用噬菌体展示技术(McCafferty J, et al., *Nature.* 1990 Dec 6; 348(6301):552-4)在体外从来自未经免疫的供体的免疫球蛋白可变(V)域基因全集(repertoire)产生人抗体和抗体片段。依照这种技术,将抗体V域基因符合读框地(in-frame)克隆入丝状噬菌体(诸如M13或fd)的主要或次要外壳蛋白基因中,并作为功能性抗体片段在噬菌体颗粒的表面上展示。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以基于抗体的功能特性进行的选择也导致编码展现那些特性的抗体的基因被选出。如此,噬菌体模拟B细胞的一些特性。噬菌体展示可以用多种形式实施,关于它们的综述参见例如 Johnson KS&Chiswell DJ. *Curr Opin Struct Biol.* 1993; 3:564-71。有V基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。

[0102] Clackson T, et al., *Nature.* 1991 Aug 15; 352(6336):624-8 从自经免疫小鼠的脾衍生的V基因小型随机组合文库分离了一系列多样的抗噁唑酮抗体。可以构建来自未免疫人供体的V基因全集,并可以基本上遵循下列文献中记载的技术分离针对一系列多

样抗原（包括自身抗原）的抗体：Marks JD, et al., *J Mol Biol.* 1991 Dec 5;222(3) : 581-97, 或 Griffiths AD, et al., *EMBO J.* 1993Feb;12(2) :725-34。还可参见美国专利 No. 5, 565, 332 和 5, 573, 905。

[0103] 人抗体也可以由体外活化的 B 细胞来产生（参见美国专利 No. 205, 567, 610 和 5, 229, 275）。在共有的共同未决申请中记载了使用 SCID 小鼠产生人抗体的一种优选手段。

[0104] (v) 抗体片段：

[0105] 已经开发了多种技术用于产生抗体片段。传统上, 这些片段是通过蛋白水解消化完整抗体而衍生的（参见例如 Morimoto K&Inouye K. *J Biochem Biophys Methods.* 1992 Mar;24(1-2) :107-17; Brennan M, et al., *Science.* 1985Jul 5;229(4708) :81-3)。然而, 现在这些片段也可以由重组宿主细胞直接产生。例如, 可以从上文讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。或者, 可以直接从大肠杆菌回收 Fab' -SH 片段, 并化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter P, et al., *Biotechnology (N Y).* 1992 Feb;10(2) :163-7)。依照另一种办法, F(ab')₂ 片段可以直接从重组宿主细胞培养物分离。其它用于产生抗体片段的技术对熟练从业人员会是显然的。在其它实施方案中, 选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见 WO 93/16185; 美国专利 No. 5, 571, 894 和 5, 587, 458。抗体片段亦可为“线性抗体”, 例如如例如美国专利 No. 5, 641, 870 中记载的。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0106] (vi) 非抗体结合蛋白：

[0107] 术语“非抗体结合蛋白”或“非抗体配体”或“抗原结合蛋白”可互换使用, 指使用非免疫球蛋白骨架的抗体模拟物, 包括 adnectins、avimers、单链多肽结合分子、和抗体样结合肽模拟物, 如下文中更详细讨论的。

[0108] 已经开发出了其它以与抗体相似的方式靶定和结合靶物的物质。某些这些“抗体模拟物”使用非免疫球蛋白骨架作为抗体可变区的替代蛋白框架。

[0109] 例如, Ladner et al. (美国专利 No. 5, 260, 203) 记载了单多肽链结合分子, 其具有与抗体的轻链和重链可变区——它们聚集在一起但在分子水平上是分开的——相似的结合特异性。单链结合分子同时含有抗体重链和轻链可变区的抗原结合位点, 它们通过肽接头连接, 并会折叠成与双肽抗体相似的结构。单链结合分子与传统的抗体相比展示多种优势, 包括尺寸更小、稳定性更高和更容易被修饰。

[0110] Ku 等 (*Proc Natl Acad Sci USA* 92(14) :6552-6556(1995)) 记载了一种基于细胞色素 b562 的抗体替代物。Ku 等 (1995) 制成了一个文库, 其中细胞色素 b562 的两个环被随机化, 并从中选择针对牛血清清蛋白的结合。发现各突变体以与抗 BSA 抗体相似的方式选择性结合 BSA。

[0111] Lipovsek 等 (美国专利 No. 6, 818, 418 和 7, 115, 396) 记载了一种抗体模拟物, 其特征是具有纤连蛋白或纤连蛋白样蛋白骨架和至少一个可变环。这些基于纤连蛋白的抗体模拟物称作 Adnectins, 它们展现出许多与天然或工程化抗体相同的特征, 包括对任何靶配体的高亲和力和特异性。任何用于发展新的或改良的结合蛋白的技术均可用于这些抗体模拟物。

[0112] 这些基于纤连蛋白的抗体模拟物的结构与 IgG 重链可变区的结构相似。因此, 这些模拟物展示在性质和亲和力方面与天然抗体相似的抗原结合特性。另外, 这些基于纤连

蛋白的抗体模拟物还展现出胜过抗体和抗体片段的某些优点。例如,这些抗体模拟物的天然折叠稳定性不依赖于二硫键,因此在通常会破坏抗体的条件下是稳定的。此外,因为这些基于纤连蛋白的抗体模拟物的结构与 IgG 重链的结构相似,所以可以在体外采用类似于抗体的体内亲和力成熟过程的随机化和改组过程。

[0113] Beste 等 (Proc Natl Acad Sci USA 96(5) :1898-1903(1999)) 记载了一种基于脂笼蛋白骨架的抗体模拟物 (Anticalin(注册商标))。脂笼蛋白包括蛋白末端具有 4 个超变环的 β -桶。Beste(1999) 对环进行随机诱变,并选择与例如荧光素的结合。三种变体展现与荧光素的特异性结合,其中一种变体显示与抗荧光素抗体相似的结合。进一步的分析揭示,所有随机化位置均是可变的,表明 Anticalin(注册商标) 会适合于用作抗体的替代物。

[0114] Anticalin(注册商标) 是小型单链肽,通常在 160 和 180 个残基之间,这提供了胜过抗体的若干优势,包括降低生成成本,提高储藏稳定性及降低免疫学反应。

[0115] Hamilton 等 (美国专利 No. 5, 770, 380) 记载了一种合成抗体模拟物,其使用杯芳烃 (calixarene) 刚性非肽有机骨架,骨架上附着有多个可变肽环用作结合位点。肽环相对于彼此均从杯芳烃的几何学上的同一侧突出。由于这种几何学构象,所有的环均可供结合,从而提高与配体的结合亲和力。然而,与其它抗体模拟物相比,基于杯芳烃的抗体模拟物不是纯粹由肽构成的,因此对蛋白酶攻击的敏感性降低。骨架也不是纯粹由肽、DNA 或 RNA 构成,这意味着此抗体模拟物在极端环境条件中相对稳定,而且寿命较长。另外,因为基于杯芳烃的抗体模拟物相对较小,其产生免疫原性应答的可能性降低。

[0116] Murali 等 (Cell Mol Biol. 49(2) :209-216(2003)) 记载了一种用于将抗体减小为更小的模拟肽的方法,它们称为“抗体样结合模拟肽 (antibody like binding peptidomimetics)” (ABiP),也可以用作抗体的替代物。

[0117] Silverman 等 (Nat Biotechnol. 23 :1556-1561(2005)) 记载了一些融合蛋白,它们是包含多个域的单链多肽,称作“avimers”。avimers 是通过体外外显子改组和噬菌体展示从人细胞外受体域发展而来的,是一类在它们对各种靶分子的亲和力和特异性方面与抗体有些相似的结合蛋白。所得的多域蛋白可以包括多个独立的结合域,它们能展现与单表位结合蛋白相比改良的亲合性(在某些情况中是亚纳摩尔级的)和特异性。关于 avimers 构建和使用方法的更多细节披露于例如美国专利申请公开 No. 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 和 20050221384。

[0118] 除了非免疫球蛋白蛋白框架之外,还在包括但不限于 RNA 分子和非天然寡聚物(例如蛋白酶抑制剂、苯并二氮卓、嘌呤衍生物和 β -转角模拟物)的物质中模拟抗体特性,它们都适用于本发明。

[0119] (vii) 药物配制剂:

[0120] 可通过将具有期望纯度的抗体与任意的可药用的担载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) 混合,以冻干剂型或水溶液的形式,制备抗体的治疗用配制剂供贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯

甲酸甲酯或丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（少于约 10 个残基）多肽；蛋白质，诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如 EDTA；糖类，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐反荷离子，诸如钠；金属复合物（例如 Zn-蛋白质复合物）；和 / 或非离子表面活性剂，诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

[0121] W097/04801 中记载了适于皮下施用的冻干配制剂。此类冻干配制剂可用合适的稀释剂重建至高蛋白质浓度且重建的配制剂可皮下施用于本文中待治疗的哺乳动物。

[0122] 根据需治疗的特定病症需要，本文所述配制剂亦可包含多于一种活性物质，优选那些具有互补活性且不会互相有负面影响的。举例而言，可以进一步提供化疗剂、细胞因子或免疫抑制剂。这样的其它药剂的有效量依赖于配制剂中存在的抗体量，病症或疾病或治疗的类型，以及其它上述讨论的因素。这些药剂通常使用与前述所用相同的剂量和给药途径，或前述所用的剂量的大约 1 到 99%。

[0123] 活性成分还可包埋于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊中（例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊）、在胶体药物投递系统中（例如脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或在粗滴乳状液 (macroemulsions) 中。此类技术公开于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)。

[0124] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有药剂的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质是成型产品的形式，例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶（例如聚（2-羟乙基-甲基丙烯酸酯）或聚（乙烯醇））、聚交酯（美国专利第 3,773,919 号）、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯共聚物、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体）及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0125] (x) 用抗体治疗：

[0126] 包含本抗体的组合物可以按照符合良好医疗实践的形式配制、确定剂量和施用。本抗体优选为人类、嵌合或人源化抗体 scFv，或抗体片段。在此语境中考虑的因素包括所治疗的特定肺癌、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床情况、病症或疾病的原因、药剂需投递的部位、施用方法、施用时程以及其它医疗从业者所知的因素。治疗上有效的施用抗体量将由这些考虑因素所决定。

[0127] 作为一般性的建议，非消化道施用的抗体治疗上有效的量应在每剂大约每日 0.1 到 20mg/kg 患者体重的范围内，典型的抗体起始用量范围为大约 2 到 10mg/kg。

[0128] 然而，如上所述，这些建议的抗体量在很大程度上受治疗学上考量的左右。在合适剂量与时程的选择中最重要的因素，如上所述，是所得的结果。

[0129] 例如，对治疗正在进行的以及急性的疾病，可能开始需要相对较高的剂量。为获取最有效的结果，根据疾病或病症，所述抗体可能应尽可能在接近疾病或病症的初兆、诊断、出现或发生时施用，或在疾病或病症复发的过程中施用。

[0130] 所述抗体可用任何合适的方法施用，包括非消化道、皮下、腹膜内、肺内、以及鼻内

施用,还有如果期望局部免疫抑制治疗,在病变内施用。非消化道输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内与皮下施用。

[0131] 另外,通过脉冲输注 (pulse infusion) 施用所述抗体可能为合适的,例如,用递减剂量的抗体。所述给药优选通过注射,最优选通过静脉内或皮下注射,这部分取决于所述施用是短期的还是长期的。

[0132] 另外,还可以与本文所述抗体一起施用其它物质,例如细胞毒剂、化疗剂、免疫抑制剂和 / 或细胞因子。组合施用包括使用不同配制剂或单一药物配制剂同时施用,以及任何顺序的相继施用,其中优选存在这样的一段时间,其中两种 (或所有) 活性药剂同时发挥其生物学活性。

[0133] 除施用所述抗体于患者外,本发明还构思了用基因疗法施用所述抗体。上述施用编码抗体的核酸的方法涵盖于“施用治疗有效量的抗体”这一表述中。例如,关于使用基因疗法产生胞内抗体,参见公布于 1996 年 3 月 14 日的 W096/07321。

[0134] 有两种主要方法使核酸 (任选包含在载体中) 进入患者的细胞,即体内和回体 (ex vivo)。对于体内投递,通常在需要抗体的部位将核酸直接注射到患者体内。对于回体治疗,取出患者的细胞,将核酸导入这些分离的细胞,并将经过修饰的细胞或是直接施用于患者,或是例如包埋入多孔膜内并植入患者体内 (参见例如美国专利第 4,892,538 号和第 5,283,187 号)。有多种技术可用于将核酸导入活细胞。这些技术根据是将核酸转移至体外培养细胞还是目的宿主的体内细胞而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖酐、磷酸钙沉淀法等。常用于回体投递基因的载体是逆转录病毒。

[0135] 目前优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体 (诸如腺病毒、I 型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒) 和基于脂质的系统 (可用于脂质介导的基因转移的脂质有例如 DOTMA、DOPE 和 DC-Chol) 进行的转染。在有些情况中,希望将核酸源与靶向靶细胞的试剂,诸如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异的抗体、靶细胞上受体的配体等一起提供。在采用脂质体时,与胞吞作用相关的细胞表面膜蛋白结合的蛋白质可用于靶向和 / 或促进摄入,例如对特定细胞类型具有向性的衣壳蛋白或其片段、针对在循环中被内在化的蛋白质的抗体、和靶向细胞内定位和增加细胞内半衰期的蛋白质。例如 Wu et al., J. Biol. Chem. 262 : 4429-4432 (1987) 和 Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 3410-3414 (1990) 中记载了受体介导的胞吞技术。关于目前已知的基因标记和基因治疗方案的综述参见 Anderson et al., Science 256 : 808-813 (1992)。还可参见 W0 93/25673 及其引用的参考文献。

[0136] 在另一个实施方案中,本发明还提供本发明针对 CSTF2 的抗体在制造用于治疗表达 CSTF2 基因的癌症的药物组合物中的用途。

[0137] 或者,本发明进一步提供供治疗表达 CSTF2 基因的癌症用的本发明针对 CSTF2 的抗体。

[0138] 或者,本发明进一步提供制造用于治疗表达 CSTF2 基因的癌症的药物组合物的方法或工艺,其中该方法或工艺包括将药学或生理学可接受的载体与作为活性组分的针对 CSTF2 的抗体一起配制的步骤。

[0139] 在另一个实施方案中,本发明还提供制造用于治疗表达 CSTF2 基因的癌症的药物组合物的方法或工艺,其中该方法或工艺包括将活性组分与药学或生理学可接受的载体混

合的步骤,其中所述活性组分是针对 CSTF2 的抗体。

[0140] 双链分子

[0141] 如本文中使用的,术语“分离的双链分子”指抑制靶基因表达的核酸分子,而且包括例如短干扰 RNA (siRNA ;例如双链核糖核酸 (dsRNA) 或小发夹 RNA (shRNA)) 和短干扰 DNA/RNA (siD/R-NA ;例如 DNA 和 RNA 的双链嵌合物 (dsD/R-NA) 或 DNA 和 RNA 的小发夹嵌合物 (shD/R-NA))。在本文中,“双链分子”也称作“双链核酸”、“双链核酸分子”、“双链多核苷酸”、“双链多核苷酸分子”、“双链寡核苷酸”和“双链寡核苷酸分子”。

[0142] 如本文中使用的,术语“靶序列”指靶基因的 mRNA 或 cDNA 序列内的某段核苷酸序列,如果将靶向该序列的双链分子导入表达靶基因的细胞中的话,会导致靶基因的整个 mRNA 的翻译受到阻抑。对于基因的 mRNA 或 cDNA 序列内的某个核苷酸序列,若包含与靶序列对应的序列的双链分子抑制表达该基因的细胞中该基因的表达,可确定其为靶序列。阻抑基因表达的双链多核苷酸可以由靶序列和长度为 2 至 5 个核苷酸的 3' 突出端 (例如 uu) 的组成。

[0143] 当靶序列通过 cDNA 序列来显示时,使用双链 cDNA 的有义链序列 (即 mRNA 序列转变成 DNA 序列的序列) 来限定靶序列。双链分子包含有义链 (其具有与靶序列对应的序列) 和反义链 (其具有与靶序列互补的序列),而且该反义链与该有义链在互补序列处杂交以形成双链分子。

[0144] 在本文中,短语“与... 对应”表示依照构成双链分子有义链的核酸的种类来转变靶序列。例如,当靶序列以 DNA 序列显示且双链分子的有义链具有 RNA 区时,该 RNA 区内的碱基“t”用碱基“u”替换。另一方面,当靶序列以 RNA 序列显示且双链分子的有义链具有 DNA 区时,该 DNA 区内的碱基“u”用“t”替换。

[0145] 例如,当靶序列以 RNA 序列 SEQ ID NO :10 显示且双链分子的有义链具有由 DNA 构成的 3' 侧半区时,“与靶序列对应的序列”为“5' -CACUUUACUUTCTGTA ACT-3'”。

[0146] 还有,对于双链分子的反义链,与靶序列互补的序列可依照构成反义链的核酸的种类来限定。例如,当靶序列显示在 RNA 序列 SEQ ID NO :10 中,且双链分子的反义链具有由 DNA 构成的 5' 侧半区时,“与靶序列互补的序列”为“3' -GUGAAAUGAAAGACATTGA-5'”。

[0147] 另一方面,当双链分子由 RNA 构成时,与 SEQ ID NO :10 中所示靶序列对应的序列为 SEQ ID NO :10 的 RNA 序列,且与 SEQ ID NO :10 中所示靶序列对应的互补序列为 RNA 序列“3' -GUGAAAUGAAAGACAUUGA-5'”。

[0148] 除了与靶序列对应的序列及其互补序列之外,双链分子可具有一个或两个长度为 2 至 5 个核苷酸的 3' 突出端 (例如 uu) 和 / 或连接有义链和反义链的环序列以形成发夹结构。

[0149] 本文中使用的术语“siRNA”指阻止靶 mRNA 翻译的双链 RNA 分子。使用将 siRNA 导入细胞的标准技术,包括其中以 DNA 为模板转录 RNA 的那些。所述 siRNA 包括有义核酸序列 (亦用“有义链”指代)、反义核酸序列 (亦用“反义链”指代) 或两者。所述 siRNA 可如此构建使得单个转录物具有靶基因的有义核酸序列与其互补的反义核酸序列,例如,发夹结构。所述 siRNA 可为 dsRNA 或 shRNA。

[0150] 本文中使用的术语“dsRNA”指包含相互互补序列的两个 RNA 分子的构建体,所述两个 RNA 分子通过所述互补序列退火以形成双链 RNA 分子。所述两条链的核苷酸序列可不

仅包含选自靶基因序列中蛋白质编码序列的“有义”或“反义”RNA,亦可包括具有选自所述靶基因非编码区域的核苷酸序列的RNA分子。

[0151] 在本说明书中使用的术语“shRNA”是指:具有茎-环结构的siRNA,其包含彼此互补的第一区和第二区(即有义链和反义链)。两个区的互补程度和方向足以使两个区之间发生碱基配对,所述第一区和第二区通过环区连接在一起,而所述环是因为环区内的核苷酸(或核苷酸类似物)之间缺乏碱基配对而形成的。shRNA的环区是介于有义链和反义链之间的单链区,也可以称作“间插单链(intervening single-strand)”

[0152] 在本说明书中使用的术语“siD/R-NA”是指包含RNA和DNA二者的双链多核苷酸分子,包括RNA和DNA的杂合体和嵌合体,其阻止靶mRNA的翻译。在本说明书中,杂合体表示这样的分子,其中由DNA组成的多核苷酸和由RNA组成的多核苷酸相互杂交形成双链分子;而嵌合体表示组成所述双链分子的链中的一条或两条可以同时含有RNA和DNA。使用将siD/R-NA导入细胞的常规技术。所述siD/R-NA包括CSTF2有义核酸序列(亦用“有义链”指代)、CSTF2反义核酸序列(亦用“反义链”指代)或两者。siD/R-NA可以这样构建,使单个转录物同时具有来自靶基因的有义核酸序列和互补反义核酸序列,例如发夹。siD/R-NA可以是dsD/R-NA或shD/R-NA。

[0153] 在本文中使用的术语“dsD/R-NA”是指这样两个分子的构建体,所述两个分子包含彼此互补的序列并且已经藉由所述互补序列退火在一起而形成双链多核苷酸分子。两条链的核苷酸序列可以不仅仅包含选自靶基因序列的蛋白编码序列的“有义”或“反义”多核苷酸序列,还可以包含具有选自靶基因非编码区的核苷酸序列的多核苷酸。组成dsD/R-NA的两个分子中的一个或两个由RNA和DNA二者组成(嵌合体分子),或者一个分子由RNA组成而另一个由DNA组成(杂合双链)。

[0154] 在本文中使用的术语“shD/R-NA”是指:具有茎-环结构的siD/R-NA,其包含彼此互补的第一区和第二区,即有义链和反义链。所述区的互补程度和方向足以使它们之间发生碱基配对,第一区和第二区通过环区连接,所述环是因为在环区内的核苷酸(或核苷酸类似物)之间缺乏碱基配对而形成的。shD/R-NA的环区是介于有义链和反义链之间的单链区,也可以称作“间插单链”。

[0155] 本说明书中使用的“分离的核酸”是指:从本来的环境(例如自然出现时的自然环境)中被取出,与其自然状态相比发生了合成性的改变的核酸。在本发明中,分离的核酸的例子包括DNA、RNA和它们的衍生物。

[0156] 与靶mRNA杂交的针对CSTF2基因的双链分子通过与正常情况下为单链的基因mRNA转录物结合,干扰其翻译,抑制蛋白质表达,来降低或抑制由CSTF2基因编码的CSTF2蛋白的产生。

[0157] 肺癌细胞系中CSTF2基因的表达可被针对CSTF2基因的dsRNA所抑制。因此本发明提供了能够在导入表达CSTF2基因的细胞后抑制该基因表达的分离双链分子。所述双链分子的靶序列可通过siRNA设计算法来设计,例如下述的。

[0158] CSTF2靶序列包括例如核苷酸序列SEQ ID NO:9和10。换言之,本发明还提供其靶序列包含SEQ ID NO:9或10或由其组成的双链分子。

[0159] 具体地,本发明提供了下列双链分子[1]至[19]:

[0160] [1] 一种分离的双链分子,它当被导入细胞后,抑制CSTF2基因的体内表达和细胞

增殖,其中所述双链分子包括有义链以及与之互补的反义链,二者彼此杂交形成所述双链分子;

[0161] [2][1] 中所述的双链分子,其中所述双链分子对 mRNA 作用,所述 mRNA 与选自 SEQ ID NO:9 和 10 的靶序列匹配;

[0162] [3][1] 中所述的双链分子,其中所述有义链含有对应于选自 SEQ ID NO:9 和 10 的靶序列的序列;

[0163] [4][1] 至 [3] 任一中所述的双链分子,其中有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子具有少于约 100 个核苷酸的长度;

[0164] [5][4] 中所述的双链分子,其中有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子具有少于约 75 个核苷酸的长度;

[0165] [6][5] 中所述的双链分子,其中有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子具有少于约 50 个核苷酸的长度;

[0166] [7][6] 中所述的双链分子,其中有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子具有少于约 25 个核苷酸的长度;

[0167] [8][7] 中所述的双链分子,其中有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子具有约 19 到约 25 个核苷酸的长度;

[0168] [9][1] 至 [8] 任一中所述的双链分子,其由单一多核苷酸构成,所述多核苷酸包含通过间插单链连接在一起的有义链和反义链;

[0169] [10][9] 中所述的双链分子,其具有通式 5' -[A]-[B]-[A'] -3', 其中, [A] 为包含与选自 SEQ ID NO:9 和 10 的靶序列对应的序列的有义链, [B] 为由 3 个~ 23 个核苷酸构成的间插单链, [A'] 为包含与 [A] 中选择的靶序列互补的序列的反义链;

[0170] [11][1] 至 [10] 任一中所述的双链分子,其由 RNA 构成;

[0171] [12][1] 至 [10] 任一中所述的双链分子,其由 DNA 和 RNA 构成;

[0172] [13][12] 中所述的双链分子,其中所述分子是 DNA 多核苷酸与 RNA 多核苷酸的杂合体;

[0173] [14][13] 中所述的双链分子,其中所述有义链与反义链分别由 DNA 与 RNA 构成;

[0174] [15][12] 中所述的双链分子,其中所述分子为 DNA 与 RNA 的嵌合体;

[0175] [16][15] 中所述的双链分子,其中反义链 3' 端侧翼的区域为 RNA, 或者有义链 5' 端侧翼的区域与反义链 3' 端侧翼的区域均为 RNA;

[0176] [17][16] 中所述的双链分子,其中所述侧翼区域由 9 到 13 个核苷酸组成;和

[0177] [18][1] 至 [17] 任一中所述的双链分子,其中所述分子包含一个或两个 3' 突出端;和

[0178] [19][3] 中所述的双链分子,其中有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子具有 19 到 25 个核苷酸的长度;

[0179] 本发明所述的双链分子将在下面更详细描述。

[0180] 设计具有抑制细胞内靶基因表达能力的双链分子的方法是已知的(见例如,美国专利 No. 6, 506, 559, 本文通过提述并入其全部内容)。例如,可以从 Ambion 网站(在万维网上 ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) 访问用于设计 siRNA 的计算机程序。

[0181] 该计算机程序可以根据如下的规程选择双链分子的靶核苷酸序列。

[0182] 靶点的选择：

[0183] 1. 从转录物的 AUG 起始密码子开始向下游扫描搜寻 AA 双核苷酸序列。记录每个 AA 的出现及其 3' 侧相邻的 19 个核苷酸作为潜在 siRNA 靶点。Tuschl 等建议避免针对 5' 和 3' 非翻译区 (UTR) 以及邻近起始密码子的区域 (75 个碱基之内) 设计 siRNA, 因为这些区域可能更富含调节蛋白质的结合位点, 而 UTR 结合蛋白和 / 或翻译起始复合物可能干扰 siRNA 核酸内切酶复合物的结合。

[0184] 2. 将潜在靶点与合适的基因组数据库 (人、小鼠、大鼠等) 进行比较, 将任何与其他编码序列具有显著同源性的靶序列排除在考虑之外。主要使用 BLAST (Altschul SF 等, *Nucleic Acids Res* 1997 Sep 1, 25(17) :3389-402), 其可见于 NCBI 服务器 :www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/。

[0185] 3. 选择合格的靶序列用于合成。通常沿着待评估的基因的长度选择几个靶序列。

[0186] 使用上述规程, 设计本发明中针对 CSTF2 基因的双链分子的靶序列为 SEQ ID NO : 9 和 10。

[0187] 分别对以上述靶序列为目标的双链分子检查其阻抑表达靶基因细胞生长的能力。因此, 本发明提供以选自 SEQ ID NO : 9 和 10 的序列为靶标的双链分子。

[0188] 靶向上文所述 CSTF2 基因靶序列的双链分子的例子包括含有与靶序列对应的核苷酸序列和 / 或与靶序列互补的序列的分离的多核苷酸。靶向 CSTF2 基因的多核苷酸的优选例包括含有与 SEQ ID NO : 9 或 10 对应的序列和 / 或与这些序列互补的序列的多核苷酸。在一个实施方案中, 双链分子由两条多核苷酸构成, 一条多核苷酸具有与靶序列对应的序列, 即有义链, 而另一条多核苷酸具有与靶序列互补的序列, 即反义链。有义链多核苷酸和反义链多核苷酸彼此杂交以形成双链分子。此类双链分子的例子包括 dsRNA 和 dsD/R-NA。

[0189] 在另一个实施方案中, 双链分子由一条多核苷酸构成, 其具有与靶序列对应的序列 (即有义链) 和与靶序列互补的序列 (即反义链) 二者。一般地, 有义链和反义链通过间插链连接, 且彼此杂交以形成发夹环结构。此类双链分子的例子包括 shRNA 和 shD/R-NA。

[0190] 换言之, 本发明的双链分子包含有义链多核苷酸 (其具有靶序列的核苷酸序列) 和反义链多核苷酸 (其具有与靶序列互补的核苷酸序列), 而且这两种多核苷酸彼此杂交以形成双链分子。在包含上述多核苷酸的双链分子中, 任一条链或两条链的多核苷酸的一部分可以是 RNA, 而且当靶序列用 DNA 序列来限时, 靶序列及其互补序列内的核苷酸 “t” 用 “u” 替换。

[0191] 在本发明的一个实施方案中, 本发明的此类双链分子包含茎-环结构, 所述茎-环结构由有义链和反义链构成。有义链和反义链可通过环连接。因而, 本发明还提供包含单一多核苷酸的双链分子, 该多核苷酸含有有义链和反义链二者, 该有义链和反义链通过间插单链连接或侧翼为间插单链。

[0192] 在本发明中, 靶向 CSTF2 基因的双链分子可具有选自 SEQ ID NO : 9 和 10 的序列作为靶序列。因而, 本发明的双链分子的优选例包括在与 SEQ ID NO : 9 或 10 对应的序列及其互补序列处彼此杂交的多核苷酸和具有与 SEQ ID NO : 9 或 10 对应的序列及其互补序列的多核苷酸。

[0193] 本发明的双链分子可以靶向单个 CSTF2 基因序列, 或可以靶向多个 CSTF2 基因序列。

[0194] 以上述靶序列 CSTF2 基因为靶标的本发明的双链分子包括含有靶序列和 / 或靶序列之互补序列的任何核酸序列的分离多核苷酸。以 CSTF2 基因为靶的多核苷酸例子包括那些含有序列 SEQ ID NO :9 或 10 和 / 或这些核苷酸的互补序列的多核苷酸。然而,本发明并不仅限于这些例子,且上述核酸序列中次要修饰是可以接受的,只要所述经修饰分子保留阻抑 CSTF2 基因表达的能力。本文中,短语“次要修饰”当用于和核酸序列相关时表示对所述序列替换、缺失、添加或插入一个、两个或数个核酸。

[0195] 在本发明的背景中,术语“数个”当用于核酸替换、缺失、添加和 / 或插入时可意指 3-7 个,优选 3-5 个,更优选 3-4 个,进一步更优选是 3 个核苷酸残基。

[0196] 根据本发明,本发明的双链分子可用实施例中使用的方法检测其能力。在本文中下述的实施例中,在体外对包含 CSTF2 基因的 mRNA 不同部分的有义链或其互补的反义链的双链分子测验其在肺癌细胞系中(例如使用 A549 和 SBC-5)降低 CSTF2 基因产物产生的能力。进一步,例如,较之在没有候选分子情况下培养的细胞,在与候选双链分子接触的细胞中 CSTF2 基因产物的减少可由,例如,使用在实施例:“半定量 RT-PCR”项中针对 CSTF2 mRNA 的引物的 RT-PCR 来加以检测。然后,对在体外基于细胞的分析中减少 CSTF2 基因产物的序列,可检测其针对细胞生长的抑制作用。然后可对在体外基于细胞的分析中抑制细胞生长的序列使用患癌症动物(例如裸小鼠异种移植模型)检测其体内的相应能力,以证实 CSTF2 基因产物的产生降低与癌细胞生长降低。

[0197] 当所述分离多核苷酸是 RNA 或其衍生物时,核苷酸序列中的“t”应替换为“u”。本文中使用的术语“互补”指多核苷酸中核苷酸单元之间的 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基配对,且术语“结合”意指两个多核苷酸之间的物理的或化学的相互作用。当所述多核苷酸包含修饰的核苷酸和 / 或非磷酸二酯联接时,这些多核苷酸亦可以同样地发生相互结合。一般而言,互补多核苷酸序列在合适条件下杂交以形成包含很少或没有错配的稳定双链体。进一步,本发明中所述分离多核苷酸的有义链与反义链可通过杂交形成双链分子或发夹环结构。在优选实施方案中,上述双链体在每 10 个匹配中包含不超过一个错配。在特别优选的实施方案中,双链体的链完全互补,这样的双链体不包含错配。

[0198] 对 CSTF2 而言,所述多核苷酸长度优选少于 1009 个核苷酸。举例而言,对所述的基因,多核苷酸长度小于 500、200、100、75、50 或 25 个核苷酸。本发明中所述分离多核苷酸对形成针对 CSTF2 基因的双链分子,或制备编码所述双链分子的模板 DNA 是有用的。当所述多核苷酸用于形成双链分子时,所述多核苷酸可长于 19 个核苷酸,优选长于 21 个核苷酸,且更加优选长度在约 19 与 25 个核苷酸之间。因而,本发明提供了包含有义链和反义链的双链分子,其中有义链包括与靶序列对应的核苷酸序列。在优选的实施方案中,有义链与反义链在靶序列处杂交以形成长度为 19 至 25 个核苷酸对的双链分子。

[0199] 当将双链分子导入细胞中时,双链分子为 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)充当识别 mRNA 中同源序列的向导。被识别的靶 RNA 受到 Dicer 核酸酶活性的切割和降解,由此所述双链分子最终降低或抑制由该 RNA 编码的多肽的生成(表达)。因此,本发明的双链分子可通过其生成在严格条件下与 CSTF2 基因的 mRNA 特异性杂交单链的能力来限定。在本文中,mRNA 中与自双链分子生成的单链杂交的部分称作“靶序列”或“靶核酸”或“靶核苷酸”。在本发明中,“靶序列”的核苷酸序列不仅可使用 mRNA 的 RNA 序列来显示,而且还可以使用自 mRNA 合成的 cDNA 的 DNA 序列来显示。

[0200] 本发明中所述双链分子可包含一个或更多修饰核苷酸和 / 或非磷酸二酯连接。本领域众所周知的化学修饰能够增加所述双链分子的稳定性、可用性和 / 或细胞摄入。一般技术人员明白可引入本发明分子的其它类型的化学修饰 (W003/070744 ;W02005/045037)。在一个实施方案中,可使用修饰以提供改善的抗降解性或改善的摄入。上述修饰的例子包括但不限于,硫代磷酸酯联接、2'-O- 甲基核糖核苷酸 (特别是在双链分子的有义链上)、2'-脱氧-氟代核糖核苷酸、2'-脱氧核糖核苷酸、“通用碱基”核苷酸、5'-C- 甲基核苷酸以及倒转脱氧脱碱基残基的掺入 (US20060122137)。

[0201] 另一个实施方案中,可以使用修饰来增强双链分子的稳定性或增加寻靶效率。这样的修饰包括但不限于双链分子两条互补链之间的化学交联、双链分子一条链的 3' 或 5' 末端的化学修饰、糖修饰、核碱基修饰和 / 或骨架修饰、2- 氟代修饰的核糖核苷酸和 2'-脱氧核糖核苷酸 (W02004/029212)。在另一个实施方案中,可以利用修饰来增加或减少针对靶 mRNA 中和 / 或互补双链分子链中互补核苷酸的亲和力 (W02005/044976)。例如,未修饰的嘧啶核苷酸可以用 2- 硫、5- 炔基 (5-alkynyl)、5- 甲基或 5- 丙炔基 (5-propynyl) 嘧啶替代。另外,未修饰的嘌呤可以用 7- 脱氮 (7-deza)、7- 烷基或 7- 烯基嘌呤取代。在另一个实施方案中,当双链分子是具有 3' 突出端的双链分子时,可以把 3' - 末端核苷酸的突出核苷酸替换成脱氧核糖核苷酸 (Elbashir SM 等, Genes Dev 2001 Jan 15, 15(2) :188-200)。关于进一步的细节,可以利用公开文献如 US20060234970。本发明不限于这些实例,可以将任何已知化学修饰应用于本发明的双链分子,只要所得分子保留抑制靶基因表达的能力。

[0202] 此外,本发明的双链分子可以包含 DNA 和 RNA 二者,例如 dsD/R-NA 或 shD/R-NA。具体而言,由 DNA 链与 RNA 链形成的杂合多核苷酸或 DNA-RNA 嵌合体多核苷酸表现出提高的稳定性。可以形成 DNA 和 RNA 的混合,即由 DNA 链 (多核苷酸) 和 RNA 链 (多核苷酸) 组成的杂合型双链分子、或在任一单链 (多核苷酸) 或两条单链 (多核苷酸) 上同时包含 DNA 和 RNA 的嵌合型双链分子,诸如此类,来增强所述双链分子的稳定性。

[0203] DNA 链和 RNA 链的杂合体可具有这样的结构,其中有义链是 DNA 而反义链是 RNA, 或者相反,只要它在导入表达靶基因的细胞中后能够抑制该基因表达。优选地,有义链多核苷酸是 DNA 而反义链多核苷酸是 RNA。同样,嵌合型双链分子可具有这样的结构,其中有义链和反义链均由 DNA 和 RNA 组成,或者有义链或反义链中的任一条由 DNA 和 RNA 组成,只要在导入表达靶基因的细胞中时,所述双链分子具有抑制该基因表达的活性即可。为了提高双链分子的稳定性,分子中优选包含尽可能多的 DNA ;而为了诱导靶基因的表达抑制,要求分子在一定范围内是 RNA,以充分地诱导表达抑制。

[0204] 作为嵌合型双链分子的一个优选实例,双链分子的上游部分区域 (即位于有义链或反义链内的靶序列或其互补序列之侧翼的区域) 为 RNA。优选地,所述上游部分区表示有义链的 5' 侧 (5' 端) 和反义链的 3' 侧 (3' 端)。或者,将位于有义链 5' 末端侧翼或者反义链 3' 末端侧翼的区域称为上游部分区域。就是说,在优选实施方案中,反义链 3' 末端侧翼的区域由 RNA 组成,或者有义链 5' 末端侧翼的区域和反义链 3' 末端侧翼的区域均由 RNA 组成。例如,本发明的嵌合型或杂合型双链分子包含以下组合。

[0205] 有义链:

[0206] 5' -[---DNA---]-3'

[0207] 3' -(RNA)-[DNA]-5'

[0208] :反义链,

[0209] 有义链:

[0210] 5'-(RNA)-[DNA]-3'

[0211] 3'-(RNA)-[DNA]-5'

[0212] :反义链,和

[0213] 有义链:

[0214] 5'-(RNA)-[DNA]-3'

[0215] 3'-(---RNA---)-5'

[0216] :反义链。

[0217] 上游部分区优选是由 9-13 个核苷酸组成的域,从双链分子的有义链或反义链内的靶序列或其互补序列的末端算起。此外,这种嵌合型双链分子的优选实例包括这样的实例:链长为 19-21 个核苷酸,其中多核苷酸的至少上游的半区(对于有义链为 5' 侧区域而对于反义链为 3' 侧区域)是 RNA,而另一半是 DNA。在这样的嵌合型双链分子中,抑制靶基因表达的效果比反义链整体为 RNA 时强得多(US20050004064)。

[0218] 在本发明中,双链分子可以形成发夹结构,例如短发夹 RNA(shRNA)以及由 DNA 与 RNA 组成的短发夹(shD/R-NA)。shRNA 或 shD/R-NA 是 RNA 序列或 RNA 和 DNA 的混合序列,其形成紧密的发夹转弯,可以用来通过 RNA 干扰来沉默基因表达。shRNA 或 shD/R-NA 在单一链上包含有义靶序列和反义靶序列,其中所述各序列被环序列隔开。通常,发夹结构被细胞机制切割成 dsRNA 或 dsD/R-NA,所述 dsRNA 或 dsD/R-NA 进一步与 RISC 结合。这种复合物结合并切割与所述 dsRNA 或 dsD/R-NA 的靶标序列匹配的 mRNA。

[0219] 为了形成发夹环结构,可以在有义序列与反义序列之间设置由任意核苷酸序列构成的环序列。因此,本发明还提供具有通式 5'-[A]-[B]-[A']-3' 的双链分子。式中,[A] 为有义链,包含与靶序列对应的序列;[B] 为间插单链;[A'] 为反义链,包含与靶序列互补的序列。靶序列例如可以选自例如 SEQ ID NO:9 和 10。

[0220] 本发明不限于这些实例,在双链分子保持抑制作为靶标的 CSTF2 基因的表达能力的前提下,[A] 中的靶序列可以是在这些实例的基础上修饰而得到的序列。区域 [A] 与 [A'] 杂交而形成由区域 [B] 构成的环。间插单链部分 [B]、即环序列,长度优选可以为 3~23 个核苷酸。例如,环序列可以选自由以下的序列组成的组(http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html)。此外,由 23 个核苷酸组成的环序列也提供活性 siRNA(Jacque JM et al., Nature 2002 Jul 25, 418(6896):435-8, Epub 2002 Jun 26):

[0221] CCC、CCACC 或 CCACACC:Jacque JM et al., Nature 2002 Jul 25, 418(6896):435-8, Epub 2002 Jun 26;

[0222] UUCG:Lee NS et al., Nat Biotechnol 2002 May, 20(5):500-5; Fruscoloni P et al., Proc Natl Acad Sci USA 2003 Feb 18, 100(4):1639-44, Epub 2003 Feb 10; 和

[0223] UUCAAGAGA:Dykhhoorn DM et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2003 Jun, 4(6):457-67。

[0224] 优选的具有本发明的发夹环结构的双链分子实例如下所示。在下面的结构中,环序列可以选自由 AUG、CCC、UUCG、CCACC、CTCGAG、AAGCUU、CCACACC 和 UUCAAGAGA 组成的组;但本发明不限于此:

[0225] GGCUUUAGUCCCGGGCAGA-[B]-UCUGCCCGGGACUAAAGCC (对靶序列 SEQ ID NO :9) ;

[0226] CACUUUACUUUCUGUAACU-[B]-AGUUACAGAAAGUAAAGUG (对靶序列 SEQ ID NO :10) ;

[0227] 此外,为了增强双链分子的抑制活性,可以将数个核苷酸添加到靶序列的有义链和 / 或反义链的 3' 末端,作为 3' 突出端。添加的核苷酸的数目为至少 2 个,通常为 2-10 个,优选为 2-5 个。添加的核苷酸在双链分子的反义链的 3' 末端形成单链。用于 3' 突出端的核苷酸优选但不限于“u”或“t”。当双链分子具有发夹环结构时,将 3' 突出端添加至反义链的 3' 末端。

[0228] 对于双链分子的制备方法没有特殊限制,但优选采用本技术领域公知的化学合成方法。根据化学合成方法,分别合成有义和反义单链多核苷酸,然后采用适当的方法使它们退火到一起,来获得双链分子。退火的具体例子包括其中将合成的单链多核苷酸以优选至少约 3 : 7、更优选约 4 : 6、最优选基本上等摩尔量(即约 5 : 5 的摩尔比)的摩尔比混合。然后,将混合物加热到双链分子解离的温度,再逐渐冷却。经退火的双链多核苷酸可以采用本技术领域公知的常用方法来纯化。纯化方法的例子包括:利用琼脂糖凝胶电泳的方法,或者其中任选地除去剩余的单链多核苷酸(例如利用适当的酶进行降解)的方法。

[0229] 所述位于 CSTF2 序列侧翼的调控序列可为相同或不同的,以使得它们的表达能够独立地,或者以时间性或空间性方式被调控。所述双链分子可通过将 CSTF2 基因模板克隆入载体(例如含有来自小核 RNA (snRNA)U6 的 RNA 多聚酶 III 转录单元或人类 H1RNA 启动子的载体)以在胞内进行转录。

[0230] 或者,双链分子可通过将其编码序列克隆入含有与编码区相邻的指导双链分子在适当细胞中表达的调节序列(例如来自小核 RNA (snRNA)U6 的 RNAPoly III 转录单元或人 H1RNA 启动子)的载体中而在胞内转录。双链分子的编码序列侧翼的调节序列可以相同或不同,使得它们的表达可独立调控,或者以时间或空间方式调控。下面会描述能够生成双链分子的载体的详情。

[0231] 编码本发明双链分子的载体:

[0232] 本发明还包括编码一种或多种本文所述的双链分子的载体、以及包含该载体的细胞。

[0233] 具体地,本发明提供了下列载体 [1] 至 [10]。

[0234] [1] 一种载体,它编码当被导入细胞后,抑制 CSTF2 基因的体内表达和细胞增殖的双链分子,其中所述双链分子包含有义链以及与之互补的反义链,二者彼此杂交形成所述双链分子。

[0235] [2] [1] 中所述的载体,它编码双链分子,所述双链分子对 mRNA 作用,所述 mRNA 与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列匹配;

[0236] [3] [1] 中所述的载体,其中有义链包括对应于选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列的序列;

[0237] [4] [1] 至 [3] 任一中所述的载体,它编码双链分子,其中双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成长度小于约 100 个核苷酸对的双链分子;

[0238] [5] [4] 中所述的载体,它编码双链分子,其中双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成长度小于约 75 个核苷酸对的双链分子;

[0239] [6] [5] 中所述的载体,它编码双链分子,其中双链分子的有义链与反义链在靶序

列处杂交以形成长度小于约 50 个核苷酸对的双链分子；

[0240] [7][6] 中所述的载体,它编码双链分子,其中双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成长度小于约 25 个核苷酸对的双链分子；

[0241] [8][7] 中所述的载体,它编码双链分子,其中双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成长度为约 19 个至约 25 个核苷酸对的双链分子；

[0242] [9][1] 至 [8] 任一中所述的载体,其中所述双链分子由单一多核苷酸构成,所述多核苷酸包含通过间插单链连接在一起的有义链和反义链；

[0243] [10][9] 中所述的载体,它编码具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3' 的双链分子,其中, [A] 为包含与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列对应的序列的有义链, [B] 为由 3 个至 23 个核苷酸构成的间插单链, [A'] 为包含与 [A] 中选择的靶序列互补的序列的反义链；

[0244] 本发明的载体优选编码处于可表达的形式本发明的双链分子。在本说明书中,术语“处于可表达的形式”,是指该载体当被导入细胞中时,将表达该分子。在优选的实施方案中,载体包含双链分子表达所必需的调节元件。因而,在一个实施方案中,表达载体编码本发明的核酸序列且适合表达所述核酸序列。本发明的这种载体可以用于产生本发明的双链分子,也可以直接用作癌症治疗的活性成分。

[0245] 本发明的载体可通过下述方法生成:例如,将编码针对 CSTF2 基因的双链分子的有义链和反义链的序列克隆入表达载体中,使调控序列可操作性地连接于编码所述链的序列,以允许两条链的表达(通过 DNA 分子的转录)(Lee NS et al., Nat Biotechnol 2002 May, 20(5):500-5)。例如,与 mRNA 反义的 RNA 分子由第一启动子(例如位于克隆 DNA 的 3' 末端侧翼的启动子序列)转录,对 mRNA 而言为有义链 RNA 分子由第二启动子(例如位于克隆 DNA 的 5' 末端侧翼的启动子序列)转录。有义链和反义链在体内杂交,产生用于沉默该基因的双链分子构建体。或者,使用分别编码双链分子之有义链和反义链的两个载体构建体来分别表达有义链和反义链,随后形成双链分子构建体。而且,克隆的序列可编码具有二级结构(例如发夹)的构建体,即,载体的单一转录物同时包含靶基因的有义序列和互补反义序列二者。

[0246] 也可以配置本发明的载体使得其实现靶细胞的基因组中的稳定插入(关于同源重组盒载体的说明,参见 Thomas KR&Capecchi MR, Cell 1987, 51:503-12)。可以参考例如:Wolff 等, Science 1990, 247:1465-8;美国专利第 5,580,859 号、第 5,589,466 号、第 5,804,566 号、第 5,739,118 号、第 5,736,524 号、第 5,679,647 号和 WO 98/04720。基于 DNA 的输送技术的例子包括:“裸 DNA”、辅助(布比卡因(bupivacaine)、聚合物、肽介导型)输送、阳离子脂质复合体、和粒子介导型投递(“基因枪”)或压力介导型输送(例如参照美国专利第 5,922,687 号)。

[0247] 本发明的载体包括,例如,病毒载体或细菌载体。表达载体的例子包括牛痘或鸡痘等减毒病毒宿主(参照美国专利第 4,722,848 号)。该策略涉及例如使用牛痘病毒作为载体来表达编码双链分子的核苷酸序列。重组牛痘病毒在被导入表达靶基因的细胞时即表达该分子并由此抑制细胞的增殖。可使用的载体的其它例子包括卡介苗(BCG)。BCG 载体在 Stover 等, Nature 1991, 351:456-60 中有记载。其它多种多样的载体可用于双链分子的治疗性施用与生产,例子包括腺病毒载体和腺随伴病毒载体、逆转录病毒载体、伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)载体、脱毒的炭疽毒素载体等。参照例如 Shata 等, Mol Med Today

2000,6 :66-71 ;Shedlock 等, J Leukoc Biol 2000,68 :793-806 ;以及 Hipp 等, In Vivo 2000,14 :571-85。

[0248] 使用本发明双链分子抑制或降低癌细胞生长或治疗癌症的方法 :

[0249] 本发明提供了抑制癌细胞生长,例如肺癌细胞生长的方法,所述方法通过抑制 CSTF2 的表达来诱导 CSTF2 基因的功能障碍。CSTF2 基因表达可通过任何上文所述的特异性靶向 CSTF2 基因的本发明双链分子或可表达至少一种所述双链分子的本发明载体来抑制。

[0250] 上述本发明双链分子及载体抑制癌性细胞的细胞生长的能力提示其可用于治疗癌症的方法。因此,发明提供通过施用针对 CSTF2 基因的双链分子或表达所述分子的载体来治疗罹患肺癌患者而无不良作用的方法,因为正常器官中几乎检测不到该基因。

[0251] 具体而言,本发明提供下列 [1] 至 [36] 的方法 :

[0252] [1] 一种在受试者中治疗或预防癌症的方法,包括对受试者施用药学有效量的针对 CSTF2 基因的双链分子或编码该双链分子的载体,其中该双链分子在导入细胞中时抑制 CSTF2 基因的表达 ;

[0253] [2] [1] 的方法,其中所述双链分子对 mRNA 作用,所述 mRNA 与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列匹配 ;

[0254] [3] [1] 的方法,其中有义链包含与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列对应的序列 ;

[0255] [4] [1] 至 [3] 任一的方法,其中施用多种双链分子 ;

[0256] [5] [1] 至 [4] 任一的方法,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 100 个核苷酸对 ;

[0257] [6] [5] 的方法,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 75 个核苷酸对 ;

[0258] [7] [6] 的方法,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 50 个核苷酸对 ;

[0259] [8] [7] 的方法,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 25 个核苷酸对 ;

[0260] [9] [9] 的方法,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度为大约 19 个至大约 25 个核苷酸对 ;

[0261] [10] [1] 至 [9] 任一的方法,其中所述双链分子由单一多核苷酸构成,所述多核苷酸包含通过间插单链连接在一起的有义链和反义链 ;

[0262] [11] [10] 的方法,其中所述双链分子具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3' ,其中,[A] 为包含与选自 SEQ ID NO :9 和 10 中的靶序列对应的序列的有义链,[B] 为由 3 个~ 23 个核苷酸构成的间插单链,[A'] 为包含与 [A] 中选择的靶序列互补的序列的反义链 ;

[0263] [12] [1] 至 [11] 任一的方法,其中所述双链分子是 RNA ;

[0264] [13] [1] 至 [11] 任一的方法,其中所述双链分子包含 DNA 和 RNA ;

[0265] [14] [13] 的方法,其中所述双链分子是 DNA 多核苷酸与 RNA 多核苷酸的杂合体 ;

[0266] [15] [14] 的方法,其中所述有义与反义链多核苷酸分别由 DNA 与 RNA 构成 ;

[0267] [16] [13] 的方法,其中所述双链分子是 DNA 与 RNA 的嵌合体 ;

[0268] [17] [16] 的方法,其中反义链 3' 端侧翼的区域由 RNA 构成,或者有义链 5' 端侧翼的区域与反义链 3' 端侧翼的区域均由 RNA 构成 ;

- [0269] [18][17] 的方法,其中所述侧翼区域由 9 到 13 个核苷酸组成;
- [0270] [19][1] 至 [18] 任一的方法,其中所述双链分子包含一个或多个 3' 突出端;
- [0271] [20][1] 至 [19] 任一的方法,其中所述双链分子包含于组合物中,所述组合物除所述分子外还包括转染增强剂和药学上可接受的载体。
- [0272] [21][1] 至 [20] 任一的方法,其中所述双链分子由载体编码;
- [0273] [22][21] 的方法,其中由所述载体编码的所述双链分子对 mRNA 作用,所述 mRNA 与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列匹配;
- [0274] [23][22] 的方法,其中由所述载体编码的所述双链分子的有义链包含与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列对应的序列;
- [0275] [24][23] 的方法,其中施用多种双链分子;
- [0276] [25][21] 至 [24] 任一的方法,其中由所述载体编码的所述双链分子的有义链长度小于大约 100 个核苷酸对;
- [0277] [26][25] 的方法,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 75 个核苷酸对;
- [0278] [27][26] 的方法,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 50 个核苷酸对;
- [0279] [28][27] 的方法,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 25 个核苷酸对;
- [0280] [29][28] 的方法,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度在大约 19 个与大约 25 个核苷酸对之间;
- [0281] [30][21] 至 [29] 任一的方法,其中由所述载体编码的所述双链分子由单一多核苷酸构成,所述多核苷酸包含通过间插单链连接在一起的有义链和反义链;
- [0282] [31][30] 的方法,其中由所述载体编码的所述双链分子具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3' ,其中,[A] 为包含与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列对应的序列的有义链,[B] 为由 3 个至 23 个核苷酸构成的间插单链,[A'] 为包含与 [A] 中选择的靶序列互补的序列的反义链;
- [0283] [34][21] 至 [31] 任一的方法,其中由所述载体编码的所述双链分子包含于组合物中,所述组合物除所述分子外还包括转染增强剂和药学上可接受的载体;
- [0284] [35][1] 至 [34] 任一的方法,其中所述癌症为肺癌;和
- [0285] [36][35] 的方法,其中所述肺癌为腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌或小细胞肺癌。
- [0286] 本发明方法将在下面更加详细的加以描述。
- [0287] 可通过将细胞与针对 CSTF2 基因的双链分子、表达该分子的载体或包含同样分子的组合物接触来抑制表达 CSTF2 基因的细胞的生长。可进一步将所述细胞与转染剂接触。合适的转染剂在本领域是已知的。短语“抑制细胞生长”表示所述细胞较之未暴露于所述分子的细胞以较低的速率增殖或具有降低的存活力。细胞生长可通过本领域已知技术测定,例如使用 MTT 细胞增殖测定。
- [0288] 任何种类的细胞的生长均可根据本方法进行阻抑,只要所述细胞表达或过表达本发明所述双链分子的靶基因。可作为例子的细胞包括肺癌细胞,诸如 NSCLC 和 SCLC。
- [0289] 因此,对于正罹患或有风险发生与 CSTF2 有关的疾病,例如癌症的患者,可通过施

用至少一种本发明双链分子、表达至少一种所述分子的至少一种载体或包含至少一种所述分子的至少一种组合物进行治疗。举例而言,肺癌患者可根据本发明的方法进行治疗。癌症类型可通过根据所诊断的特定类型肿瘤的标准方法来进行鉴定。肺癌可通过,例如,癌胚抗原(CEA)、CYFRA、pro-GRP 等等作为肺癌标志,或通过胸部 X 光和 / 或痰细胞学进行诊断。更优选地,用本发明所述方法治疗的患者是用这样的方法选出的:在自患者获得的活检标本中通过本领域已知的方法,例如 RT-PCR 或免疫测定法检测 CSTF2 基因的表达。优选地,在本发明的治疗之前,对于来自受试者的所述活检标本通过本领域所知的方法,例如,免疫组织化学分析或 RT-PCR,证实 CSTF2 基因的过表达。

[0290] 根据本发明的方法,为抑制细胞生长并藉此治疗癌症,当施用多种所述双链分子(或表达同样分子的载体或含有同样分子的组合物)时,每个所述分子可具有不同结构,但作用于与相同靶序列匹配的 mRNA。或者,多种双链分子可作用于与相同基因的不同靶序列匹配的 mRNA,或作用于与不同基因的不同靶序列匹配的 mRNA。举例而言,所述方法可使用针对 CSTF2 基因不同靶序列的双链分子。或者,例如,本方法可利用针对 CSTF2 基因和其它基因的一种、两种或更多种靶序列的双链分子。

[0291] 为抑制细胞生长,本发明的双链分子可直接以可实现该分子与对应 mRNA 转录物结合的形式导入细胞。另外,如上所述,编码双链分子的 DNA 可作为载体导入细胞。为将双链分子和载体导入细胞,可使用转染增强剂,例如 FuGENE (Roche diagnostics)、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)、Oligofectamine (Invitrogen) 与 Nucleofector (Wako pure Chemical)。

[0292] 当治疗导致临床效益,诸如 CSTF2 基因表达的减少、受试者中癌症的尺寸、患病率(prevalence)、或转移潜力的降低时,可以认为该治疗是“有效”的。当预防性地适用治疗时,“有效”是指其延迟或防止癌症形成,或者预防或缓解癌症的临床症状。有效性结合特定肿瘤类型的任何公知的诊断或治疗方法来加以确定。

[0293] 就本发明的方法和组合物用于“预防”和“防范”的语境而言,此类术语在本文中可互换使用,指降低源自疾病的死亡率或发病率负担的任何活动。预防和防范可发生于“一级、二级和三级预防水平”。一级预防和防范避免疾病的发生,而二级和三级预防和防范水平涵盖旨在预防和防范疾病的进展与症状的出现、以及通过恢复功能和减轻疾病相关并发症来降低已建立的疾病的负面影响的活动的。或者,预防和防范可包括旨在减轻特定病症的严重性(例如降低肿瘤的增殖和转移等)的广泛的预防性疗法。

[0294] 治疗和 / 或预防癌症和 / 或预防其手术后复发包括任何下述步骤,诸如手术去除癌细胞、抑制癌性细胞生长、肿瘤衰退或消退、诱导癌症减退和阻抑癌症发生、肿瘤消退、及降低或抑制转移。癌症的有效治疗和 / 或预防可降低患癌个体死亡率及改善其预后,降低其血液中肿瘤标志物的水平,及减轻其伴随癌症的可检测症状。例如,症状的减轻或改善构成有效治疗和 / 或预防,包括 10%、20%、30% 或更多降低,或病情稳定。

[0295] 应理解,本发明的所述双链分子降解亚化学计量的 CSTF2 mRNA。虽不愿拘于任何理论,认为本发明的所述双链分子以催化方式造成靶 mRNA 的降解。因此,与常规的癌症疗法相比,为实施治疗效应而需要输送到癌症的位置或其附近的双链分子要少得多。

[0296] 本领域技术人员在考虑了受试者的体重、年龄、性别、疾病类型、症状及其它条件、施用途径、以及是局部施用还是全身施用等因素的基础上,能够容易地确定本发明的双链

分子的有效量。一般而言,本发明双链分子的有效量是在癌症部位或其附近胞间浓度为大约 1 纳摩尔 (nM) 到约 100nM, 优选大约 2nM 到大约 50nM, 更优选大约 2.5nM 到大约 10nM。考虑可使用更多或更少量的双链分子。本领域一般技术人员可方便地及常规地确定特定情况下所需的确切剂量。

[0297] 本发明的方法可用于抑制表达 CSTF2 基因的癌症, 例如肺癌, 包括 NSCLC 和 SCLC, 的生长或转移。具体而言, 含有靶序列 SEQ ID NO :9 或 10 的双链分子特别优选用来治疗肺癌。

[0298] 为了治疗癌症, 还可以将本发明的双链分子与不同于所述双链分子的药剂组合来施用于受试者。或者, 本发明的双链分子还可以与其它旨在用于癌症治疗的治疗方法组合来施用于受试者。举例而言, 本发明所述双链分子可与现在用于治疗癌症或预防癌症转移的治疗方法 (例如, 放射疗法, 外科手术, 以及使用化疗剂, 如顺铂、卡铂、环磷酰胺、5- 氟尿嘧啶、阿霉素、柔红霉素 (daunorubicin) 或他莫昔芬 (tamoxifen) 等的治疗) 组合施用。

[0299] 在本发明的方法中, 双链分子可以裸双链分子的形式、或与投递物质相组合的形式, 或者以表达双链分子的重组质粒或者病毒载体的形式施用于受试者。

[0300] 用于与本发明的双链分子组合施用的合适的投递物质包括 Mirus Transit TKO 亲脂性物质、Lipofectin、Lipofectamine、Cellfectin、或聚阳离子 (例如聚赖氨酸)、或脂质体。一种优选的投递物质是脂质体。

[0301] 脂质体能够帮助将双链分子投递至特定的组织如肺肿瘤组织中, 还能够增加双链分子的血中半衰期。适合在本发明中使用的脂质体是由常规的囊泡形成性脂质 (vesicle-forming lipids) 形成的, 囊泡形成性脂质通常包括中性或带负电荷的磷脂, 以及甾醇, 诸如胆固醇。对一些因素的考虑通常可以为脂质的选择提供指导, 如期望的脂质体大小以及在血流中的脂质体的半衰期等。有多种制备脂质体的方法是公知的, 例如 Szoka 等, *Ann Rev Biophys Bioeng*1980, 9 :467 ; 美国专利第 4, 235, 871 号 ; 第 4, 501, 728 号 ; 第 4, 837, 028 号 ; 和第 5, 019, 369 号 ; 将上述文献的全部内容援引并入本说明书。

[0302] 优选地, 封装本发明的双链分子的脂质体包含能够将脂质体输送至癌症部位的配体分子。优选的配体是与肿瘤或血管内皮细胞中常见的受体结合的配体, 例如与肿瘤抗原或内皮细胞表面抗原结合的单克隆抗体。

[0303] 特别优选地, 封装本发明的双链分子的脂质体经过了修饰以免被单核巨噬细胞和网状内皮系统清除, 例如, 由于其结构的表面结合有调理作用抑制部分 (opsonization inhibition moities)。在一个实施方案中, 本发明的脂质体可以同时包括调理作用抑制部分和配体。

[0304] 用于制备本发明的脂质体的调理作用抑制部分通常是与脂质体膜结合的大型亲水性聚合物。如在本说明书中所使用的, 例如, 当调理作用抑制部分化学地或物理地搭接在脂质体膜上时, 例如通过脂溶性锚 (anchor) 插入膜本身, 或者通过与膜脂质的活性基团直接结合时, 则称调理作用抑制部分与脂质体膜 “结合”。这些调理作用抑制性亲水性聚合物形成保护性表层, 该表层显著地减少巨噬 - 单核细胞系统 (“MMS”) 和网状内皮系统 (“RES”) 对脂质体的摄入 ; 在例如美国专利第 4, 920, 016 号中对此有记载, 后者的全部公开内容援引并入本说明书。因此, 与未修饰的脂质体相比, 被调理作用抑制部分修饰过的脂质体能够保留在血液循环中的时间显著更长。出于以上理由, 这样的脂质体有时也被称为

“隐形”(stealth)脂质体。

[0305] 已知隐形脂质体蓄积在依靠多孔性或“渗漏性”微血管系统供给的组织中。因此,在以这样的微血管系统缺损为特征的靶组织,例如实体瘤中,这些脂质体会高效率地蓄积。参见 Gabizon 等,Proc Natl Acad Sci USA 1988,18 :6949-53。此外,RES 的摄入的减少阻止隐形脂质体在肝脏和脾脏中的显著蓄积,从而降低隐形脂质体的毒性。因此,用调理作用抑制部分修饰的本发明的脂质体能够将本发明的双链分子输送至肿瘤细胞。

[0306] 适用于修饰脂质体的调理作用抑制部分优选为分子量约 500 ~ 约 40,000 道尔顿、更优选约 2,000 ~ 约 20,000 道尔顿的水溶性聚合物。这样的聚合物中包括聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇 (PPG) 衍生物;例如,甲氧基 PEG 或 PPG、和 PEG 或 PPG 硬脂酸酯;合成聚合物如聚丙烯酰胺或聚 N- 乙烯基吡咯烷酮;直链状、分枝状或者树状聚酰胺胺 (polyamidoamine);聚丙烯酸;聚醇 (polyalcohols), 诸如化学结合有羧基或氨基的聚乙烯醇和聚木糖醇,以及神经节苷脂,诸如神经节苷脂 GM₁。PEG、甲氧基 PEG、或甲氧基 PPG 或其衍生物的共聚体也是适合的。此外,抑制调理作用的聚合物可以是 PEG 与聚氨基酸、多糖、聚酰胺胺、聚亚乙基胺或者多核苷酸中的任何一种的嵌段共聚物。抑制调理作用的聚合物也可以是含有氨基酸或羧酸的天然多糖,例如半乳糖醛酸、葡糖醛酸、甘露糖醛酸、透明质酸、果胶酸、神经氨酸、海藻酸、角叉胶;氨基化多糖类或寡糖(直链状或者分枝状);或者羧基化的多糖或寡糖,例如,通过与碳酸的衍生物反应而生成了羧基结合的羧基化多糖类或寡糖。

[0307] 优选地,调理作用抑制部分为 PEG、PPG 或其衍生物。用 PEG 或 PEG 衍生物修饰的脂质体有时称为“PEG 化脂质体”。

[0308] 调理作用抑制部分可以通过许多公知技术中的任何一种结合到脂质体膜上。例如,PEG 的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯能够与磷脂酰乙醇胺脂溶性锚 (lipid-soluble anchor) 结合,然后再结合到膜上。相似地,可以通过还原性氨基化,用硬脂酰胺脂溶性锚来将右旋糖酐聚合物衍生化,所述还原性氨基化中使用 Na (CN) BH₃ 和混合溶剂,如 60°C 的四氢呋喃与水的 30 : 12 比例混合物。

[0309] 上文讨论了表达本发明的双链分子的载体。这样的表达至少一种本发明的双链分子的载体也可以直接施用或者与合适的投递物质组合施用,所述合适的投递试剂包括 Mirus Transit LT1 亲脂性物质、Lipofectin、Lipofectamine、cellfectin、聚阳离子(例如聚赖氨酸)或脂质体。将表达本发明的双链分子的重组病毒载体输送到患者的癌症区域的方法在本技术领域的技术范围内。

[0310] 本发明的双链分子可以通过适于将双链分子递送到癌症部位的任何手段来施用给受试者。例如,双链分子可以通过基因枪、电穿孔、或者其它合适的非消化道或肠内施用途径来施用。

[0311] 合适的肠内施用途径包括口腔、直肠、或鼻内递送。

[0312] 合适的非消化道施用途径包括血管内施用(例如静脉内推注、静脉内输注、动脉内推注、动脉内输注和针对血管网络的导管滴注),组织周围和组织内注射(例如肿瘤周围和肿瘤内注射),皮下注射或沉积,包括皮下输注(例如利用浸透压泵),直接施加到癌症部位或其附近的区域,例如借助导管或其它放置装置(例如,包含多孔性、非多孔性或明胶状材料的栓剂或植入物),和吸入。优选通过注射或输注将双链分子或载体施用到癌症部位或

其附近。

[0313] 本发明的双链分子可以以单一剂量或分多个剂量来施用。当本发明的双链分子的施用为输注方式时,输注可以是单个持续剂量,或者通过多次输注来施用。优选的是将药剂直接注射到癌症部位或其附近的组织中。特别优选的是将药剂多次注射到癌症部位或其附近的组织中。

[0314] 本领域技术人员可以容易地确定用于对给定受试者施用本发明双链分子的合适剂量方案。例如,双链分子可以一次性施用给受试者,例如以单次注射或者沉积的形式施用到癌症部位或其附近。或者,双链分子可以在约 3 ~ 约 28 日、更优选约 7 ~ 约 10 日的期间内每日一次或二次地施用给受试者。在优选的剂量方案中,双链分子可以在 7 日期间内一日一次地注射到癌症部位或其附近。当剂量方案包括多次施用时,应该理解的是,给受试者施用的双链分子的有效量,可以包含在整个剂量方案中施用的该双链分子的总量。

[0315] 在本发明中,可以用至少一种选自下组的活性成分来治疗过表达 CSTF2 的癌症:

[0316] (a) 本发明的双链分子,

[0317] (b) 编码它们的 DNA,和

[0318] (c) 编码它们的载体。

[0319] 所述癌症包括但不限于肺癌。因而,在施用本发明的双链分子作为活性成分之前,优选确认要治疗的癌细胞或组织中 CSTF2 的表达水平与相同器官的正常细胞相比是否升高。如此,在一个实施方案中,本发明提供了一种治疗(过)表达 CSTF2 的癌症的方法,该方法可包括下列步骤:

[0320] i) 检测自具有要治疗的癌症的受试者获得的癌细胞或组织中 CSTF2 的表达水平;

[0321] ii) 将所述 CSTF2 表达水平与正常对照比较;并

[0322] iii) 对具有与正常对照相比过表达 CSTF2 的癌症的受试者施用至少一种选自下组的成分:

[0323] (a) 本发明的双链分子,

[0324] (b) 编码它们的 DNA,和

[0325] (c) 编码它们的载体。

[0326] 或者,本发明还提供了一种药物组合物,其包含至少一种选自下组的成分,用于施用于具有过表达 CSTF2 的癌症的受试者:

[0327] (a) 本发明的双链分子,

[0328] (b) 编码它们的 DNA,和

[0329] (c) 编码它们的载体。

[0330] 换言之,本发明进一步提供了一种用于鉴定要用下述各项治疗的受试者的方法:

[0331] (a) 本发明的双链分子,

[0332] (b) 编码它们的 DNA,或

[0333] (c) 编码它们的载体,

[0334] 该方法可包括测定源自受试者的癌细胞或组织中 CSTF2 的表达水平的步骤,其中所述水平与该基因正常对照相比的升高指示该受试者具有可用下述各项治疗的癌症:

[0335] (a) 本发明的双链分子,

[0336] (b) 编码它们的 DNA,或

[0337] (c) 编码它们的载体。

[0338] 下面会更加详细地描述本发明治疗癌症的方法。

[0339] 要用本方法治疗的受试者优选为哺乳动物。例示性的哺乳动物包括但不限于例如人类、非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马、和牛。

[0340] 根据本发明,测定在自受试者获得的癌细胞或组织中 CSTF2 的表达水平。使用本领域已知方法,可在转录(核酸)产物水平上确定表达水平。举例而言,可通过杂交方法(例如, Northern 杂交)使用探针定量 CSTF2 的 mRNA。所述检测可在芯片或阵列上实施。对检测 CSTF2 的表达水平而言,优选使用阵列。本领域技术人员可利用 CSTF2 的序列信息制备上述探针。举例而言, CSTF2 的 cDNA 可用作探针。如需要,所述探针可用合适的标记物来标记,例如染料、荧光物质和同位素,且所述基因的表达水平可以作为发生了杂交的标记物的强度检测。

[0341] 进一步,可通过基于扩增的检测方法(例如, RT-PCR)使用引物定量 CSTF2 的转录产物(例如 SEQ ID NO :1)。上述引物可基于所述基因的可得序列信息制备。

[0342] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、中等严格条件或低严格条件下与 CSTF2 的 mRNA 杂交。如本文中所使用的,短语“严格(杂交)条件”是指这样的条件,在该条件下,探针或引物将与其靶序列杂交,但不与其它序列杂交。严格条件是依赖于序列的,而且在不同的环境下会不同。较长序列的特异杂交与较短序列相比在较高温度下观察到。一般地,严格条件的温度选择比特定序列在限定的离子强度和 pH 下的热熔点(T_m)低大约 5°C 。 T_m 是(在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下)平衡状态下有 50% 的与其靶序列互补的探针与靶序列杂交的温度。因为靶序列一般过量存在,因此在 T_m ,平衡时 50% 的探针被占据。典型地,严格条件会是这样的:其中盐浓度小于大约 1.0M 钠离子,典型地大约 0.01-1.0M 钠离子(或其它盐),pH7.0-8.3,温度对于较短的探针或引物(例如 10-50 个核苷酸)是至少大约 30°C ,对于较长的探针或引物是至少大约 60°C 。严格条件也可以通过添加去稳定剂,例如甲酰胺,来实现。

[0343] 或者,可以检测翻译产物以进行本发明的诊断。例如,可以确定 CSTF2 蛋白(SEQ ID NO :2)的量。测定作为翻译产物的蛋白量的方法包括免疫测定法,其使用特异识别所述蛋白的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。而且,抗体的任何片段或修饰(例如嵌合抗体、scFv、Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv 等)均可用于检测,只要该片段或经修饰抗体保留对 CSTF2 蛋白的结合能力即可。制备这些种类的用于检测蛋白的抗体的方法是本领域众所周知的,并且在本发明中可以使用任何方法制备这些抗体和它们的等价物。

[0344] 作为另一种基于 CSTF2 的翻译产物检测 CSTF2 基因表达水平的方法,可利用针对 CSTF2 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析测量染色的强度。意即,在此测量中,强染色表明所述蛋白质的存在/水平增加,且同时表明 CSTF2 基因的高表达水平。

[0345] 对于靶基因(例如 CSTF2 基因)在癌细胞中的表达水平而言,如果该水平较之靶基因的对照水平(例如在正常细胞中的水平)增加了例如 10%、25%或 50%,或增加到超过 1.1 倍、超过 1.5 倍、超过 2.0 倍、超过 5.0 倍、超过 10.0 倍或者更多的话,可以确定该水平是增加的。

[0346] 对照水平可以与癌细胞同时确定,使用先前从疾病状态(癌性或非癌性)已知的受试者收集和保存的样品。另外,自具有要治疗的癌症的器官的非癌性区获得的正常细胞

可用作正常对照。或者,对照水平可以借助统计方法,基于通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的 CSTF2 基因表达水平获得的结果加以确定。进一步,对照水平可以是来自先前测试过的细胞的表达样式数据库。而且,根据本发明的一个方面,可以将生物样品中 CSTF2 基因的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用从来自与源自受试者的生物样品组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且,优选地,使用具有已知的疾病状态的群体中 CSTF2 基因表达水平的标准值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,平均值 $\pm 2S.D.$ 或平均值 $\pm 3S.D.$ 的范围可以用作标准值。

[0347] 在本发明的背景中,从已知非癌性的生物样品确定的对照水平称作“正常对照水平”。另一方面,若对照水平从癌性生物样品确定,则它称作“癌性对照水平”。

[0348] 若 CSTF2 基因的表达水平相比于正常对照水平提高了或与癌性对照水平相似/等同,则可诊断受试者为具有要治疗的癌症。

[0349] 包含本发明双链分子的组合:

[0350] 除上述外,本发明亦提供了包含至少一种本发明的双链分子或编码该分子的载体的药物组合物。具体而言,本发明提供下述 [1] 至 [34] 的组合物:

[0351] [1] 一种用于抑制癌细胞生长和/或治疗或预防癌症的组合物,其中所述组合物包括至少一种分离的针对 CSTF2 基因的双链分子或编码该双链分子的载体,其中该双链分子在导入细胞中时抑制 CSTF2 的表达和细胞增殖,其中该双链分子包括有义链和与其互补的反义链,二者相互杂交以形成双链分子,所述组合物还包括可药用担载体;

[0352] [2] [1] 中的组合物,其中所述双链分子作用于 mRNA,所述 mRNA 与选自 SEQ ID NO: 9 和 10 的靶序列匹配;

[0353] [3] [1] 的组合物,其中所述双链分子,其中有义链包含与选自 SEQ ID NO: 9 和 10 的靶序列相应的序列。

[0354] [4] [1] 的组合物,其中所述组合物包含多种所述双链分子;

[0355] [5] [1] 至 [3] 任一的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 100 个核苷酸对;

[0356] [6] [5] 的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 75 个核苷酸对;

[0357] [7] [6] 的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 50 个核苷酸对;

[0358] [8] [7] 的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 25 个核苷酸对;

[0359] [9] [8] 的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度为大约 19 个到大约 25 个核苷酸对;

[0360] [10] [1] 至 [9] 任一的组合物,其中所述双链分子由单一多核苷酸构成,所述多核苷酸包含通过间插单链连接在一起的有义链和反义链;

[0361] [11] [10] 的组合物,其中所述双链分子具有通式 $5' -[A]-[B]-[A'] -3'$, 其中, [A] 为包含与选自 SEQ ID NO: 9 和 10 的靶序列对应的序列的有义链序列, [B] 为由 3 个~23 个核苷酸构成的间插单链, [A'] 为包含与 [A] 中选择的靶序列互补的序列的反义链;

- [0362] [12][1] 至 [11] 任一的组合物,其中所述双链分子是 RNA ;
- [0363] [13][1] 至 [11] 任一的组合物,其中所述双链分子是 DNA 和 / 或 RNA ;
- [0364] [14][13] 的组合物,其中所述双链分子是 DNA 多核苷酸与 RNA 多核苷酸的杂合体 ;
- [0365] [15][14] 的组合物,其中所述有义链多核苷酸与反义链多核苷酸分别由 DNA 与 RNA 组成 ;
- [0366] [16][13] 的组合物,其中所述双链分子是 DNA 与 RNA 的嵌合体 ;
- [0367] [17][16] 的组合物,其中反义链 3' 端侧翼的区域由 RNA 组成,或者有义链 5' 端侧翼的区域与反义链 3' 端侧翼的区域均由 RNA 组成 ;
- [0368] [18][17] 的组合物,其中所述侧翼区域由 9 到 13 个核苷酸组成 ;
- [0369] [19][1] 至 [18] 任一的组合物,其中所述双链分子包含一个或两个 3' 突出端 ;
- [0370] [20][1] 至 [19] 任一的组合物,其中所述组合物进一步包括转染增强剂。
- [0371] [21][1] 至 [20] 任一的组合物,其中所述双链分子由载体编码并包含于组合物中 ;
- [0372] [22][21] 中的组合物,其中由所述载体编码的所述双链分子作用于 mRNA,所述 mRNA 与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列匹配 ;
- [0373] [23][21] 的组合物,其中由所述载体编码的所述双链分子的有义链包含与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列相应的序列 ;
- [0374] [24][21] 至 [23] 任一的组合物,其中施用多种所述双链分子 ;
- [0375] [25][21] 至 [24] 任一的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 100 个核苷酸对 ;
- [0376] [26][25] 的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 75 个核苷酸对 ;
- [0377] [27][26] 的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 50 个核苷酸对 ;
- [0378] [28][27] 的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度小于大约 25 个核苷酸对 ;
- [0379] [29][28] 的组合物,其中所述双链分子的有义链与反义链在靶序列处杂交以形成双链分子,该双链分子长度为大约 19 个至大约 25 个核苷酸对 ;
- [0380] [30][21] 至 [29] 任一的组合物,其中由所述载体编码的所述双链分子由单一多核苷酸构成,所述多核苷酸包含通过间插单链连接在一起的有义链和反义链二者 ;
- [0381] [31][30] 的组合物,其中所述双链分子具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3' ,其中,[A] 为包含与选自 SEQ ID NO :9 和 10 的靶序列对应的序列的有义链,[B] 为由 3 个~ 23 个核苷酸构成的间插单链,[A'] 为包含与 [A] 中选择的靶序列互补的序列的反义链 ;
- [0382] [32][21] 至 [31] 任一的组合物,其中所述组合物进一步包含转染增强剂 ;
- [0383] [33][1] 至 [32] 任一的组合物,其中所述癌症为肺癌。和
- [0384] [34][33] 的组合物,其中所述肺癌为腺癌、鳞状细胞癌、大细胞癌或小细胞肺癌。
- [0385] 本发明合适的组合物将在下面更加详述地加以描述。
- [0386] 本发明的所述双链分子优选在施用于受试者之前根据本领域众所周知的技术配

制为药物组合物。本发明的药物组合物特征为至少是无菌且不含热原的。本文中所使用的“药物配制剂”包括适用于人类与兽医用的配制剂。制备本发明药物组合物的方法属于本领域一般技术,例如,描述于 Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985), 其全部公开内容通过引用包含于本文中。

[0387] 本发明的药物配制剂包含至少一种本发明的双链分子或编码它们的载体(例如,以重量计为 0.1% 到 90%), 或所述分子的生理学上可接受的盐, 与生理学上可接受的载体介质混合。生理学上可接受的载体介质优选水、缓冲水、生理盐水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸、透明质酸及类似物。

[0388] 根据本发明, 所述组合物可包含多种双链分子, 其中每一个可针对相同基因的不同靶序列或不同基因的不同靶序列。举例而言, 所述组合物可包含针对 CSTF2 基因靶序列的双链分子。或者, 例如, 所述组合物可包含针对 CSTF2 基因和其它基因的一种、两种或更多种靶序列的双链分子。

[0389] 而且, 本组合物可以包含编码 1 个或多个双链分子的载体。例如, 所述载体可以编码 1 种、2 种或数种本双链分子。或者, 本组合物可以包含多种载体, 而各载体编码不同的双链分子。

[0390] 而且, 本双链分子可以作为脂质体的形式包含在本组合物中。脂质体的详细内容可以参照“使用本发明的双链分子抑制或降低癌细胞生长或治疗癌症的方法”项。

[0391] 本发明的组合物可以是药物组合物。本发明的药物组合物中还可以包含传统的药用赋形剂和 / 或添加剂。合适的药用赋形剂包括稳定化剂、抗氧化剂、浸透压调节剂、缓冲剂、和 pH 调节剂。合适的添加剂包括: 生理学生物相容性的缓冲剂(例如氨基丁三醇盐酸盐)、补加螯合剂(例如 DTPA 或 DTPA- 双酰胺等), 或钙螯合剂复合物(例如、钙 DTPA、CaNaDTPA- 双酰胺), 或者, 任选地, 补加钙或钠盐(例如氯化钙、抗坏血酸酸钙、葡糖酸钙或乳酸钙)。本发明的药物组合物可以进行包装以便作为液体使用, 或者也可以加以冷冻干燥。

[0392] 对于固体组合物, 可以使用常规的无毒固态载体; 例如, 药物级的甘露醇、乳酸、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。

[0393] 例如, 用于口服施用的固体药物组合物中可以包含上述列举的任意载体和赋形剂, 以及 10-95%, 优选 25-75% 的本发明的一种或多种双链分子。用于气雾剂(吸入)施用的药物组合物可以包含 0.01-20 重量%、优选 1-10 重量% 的包被于上述脂质体中的一种或多种本发明的双链分子, 以及推进剂。还可以根据需要包含载体, 例如用于鼻内投递的卵磷脂等。

[0394] 除上述之外, 本组合物中还可以包含其它药学活性成分, 只要它们不抑制本双链分子的体内功能。例如, 上述组合物中可以包含常规用于癌症治疗的化疗药物。

[0395] 在另一个实施方案中, 本发明还提供本发明的双链核酸分子在制备用于治疗以表达 CSTF2 为特征的肺癌的药物组合物中的用途。例如, 本发明涉及下述双链核酸分子在制备用于治疗表达 CSTF2 的肺癌的药物组合物中的用途: 该分子在细胞内抑制 CSTF2 基因的表达, 且该分子包含有义链和与之互补的反义链, 二者彼此杂交而形成该双链核酸分子, 且该分子以选自 SEQ ID NO: 9 和 10 的序列为靶标。

[0396] 或者, 本发明进一步提供在治疗表达 CSTF2 基因的肺癌中使用的本发明双链核酸

分子。

[0397] 此外,本发明还提供生产用于治疗部分以表达 CSTF2 为特征的肺癌的药物组合物的方法或工艺。该方法或工艺包括将药学或者生理学可接受的载体与作为活性成分的下述双链核酸分子一起制剂化的步骤,其中所述双链核酸分子抑制细胞内 CSTF2 的表达,且该分子包含有义链和与之互补的反义链,二者彼此杂交而形成该双链核酸分子,且该分子以选自 SEQ ID NO :9 和 10 的序列为靶标。

[0398] 在另一个实施方案中,本发明还提供生产用于治疗以表达 CSTF2 为特征的肺癌的药物组合物的方法或工艺,其中所述方法或工艺包括将活性成分与药学上或生理学上可接受的载体混合的步骤,其中所述活性成分是这样的双链核酸分子,其在过表达 CSTF2 基因的细胞中抑制 CSTF2 的表达,该分子包含有义链与与其互补的反义链,二者相互杂交以形成双链核酸分子,并以选自 SEQ ID NO :9 和 10 的序列为靶标。

[0399] 检测或诊断肺癌的方法

[0400] 发现 CSTF2 基因的表达在肺癌细胞中特异性的提高(图 1A-1C)。因此,本文鉴定出的基因及其转录与翻译产物可以作为肺癌标志用于诊断,且通过测量细胞样品中 CSTF2 基因的表达可诊断肺癌。具体而言,本发明提供了通过确定受试者中 CSTF2 表达水平诊断肺癌的方法。可用本方法诊断的肺癌包括 NSCLC 与 SCLC。进一步地,NSCLC,包括肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)和大细胞癌(LCC),亦可通过本发明诊断或检测出来。

[0401] 根据本发明,可提供用于检查受试者状况的中间结果。所述中间结果可与其它信息结合起来以协助医生、护士或其它从业人员诊断患者罹患所述疾病。就是说,本发明提供用于检查癌症的诊断标志物 CSTF2。或者,本发明提供了一种用于检测或鉴定源自受试者的肺组织样品中癌细胞的方法,所述方法包括测定源自受试者的生物样品中 CSTF2 基因表达水平的步骤,其中所述表达水平与所述基因的正常对照水平相比的升高指示组织中存在或怀疑存在癌细胞。此类结果可以与别的信息组合来帮助医生、护士、或其它保健从业人员诊断受试者患有疾病。换言之,本发明可以给医生提供有用信息来诊断受试者患有疾病。例如,依照本发明,当关于自受试者获得的组织中癌细胞的存在有疑问时,通过考虑 CSTF2 基因的表达水平,加上疾病的其他不同方面,包括组织病理学、血液中的已知肿瘤标志物的水平、和受试者的临床过程等,能做出临床决策。例如,一些公知的血液中的诊断性肺肿瘤标志物为 IAP, ACT, BFP, CA19-9, CA50, CA72-4, CA130, CEA, KMO-1, NSE, SCC, SP1, Span-1, TPA, CSLEX, SLX, STN 和 CYFRA。就是说,在本发明的这个具体实施方案中,基因表达分析的结果作为中间结果,用于进一步诊断受试者的疾病状态。

[0402] 具体而言,本发明提供了下述 [1] 到 [11] 的方法:

[0403] [1] 一种在受试者中诊断肺癌或肺癌发生倾向性的方法,所述方法包括下述步骤:

[0404] (a) 检测源自受试者的生物样品中 CSTF2 基因的表达水平;

[0405] (b) 将检测出的表达水平较之该基因的正常对照水平的提高与该受试者中疾病的存在相关联;

[0406] [2] [1] 的方法,其中所述表达水平比正常对照水平高至少 10%;

[0407] [3] [1] 或 [2] 的方法,其中所述表达水平通过选自下组的方法检测:

[0408] (a) 检测由 CSTF2 基因编码的 mRNA;

- [0409] (b) 检测由 CSTF2 基因编码的蛋白质；
- [0410] (c) 检测由 CSTF2 基因编码的蛋白质的生物学活性；
- [0411] [4][3] 的方法,其中所述表达水平是通过检测探针与由 CSTF2 基因编码的 mRNA 的杂交来确定的；
- [0412] [5][3] 的方法,其中所述表达水平是通过检测针对由 CSTF2 基因编码的蛋白质的抗体与由 CSTF2 基因编码的蛋白质的结合来确定的；
- [0413] [6][1] 至 [5] 任一的方法,其中所述生物样品包括活检样品、痰或血液。
- [0414] [7][1] 至 [6] 任一的方法,其中所述源自患者的生物样品包含上皮细胞。
- [0415] [8][1] 至 [7] 任一的方法,其中所述源自患者的生物样品包含癌性细胞。
- [0416] [9][8] 的方法,其中所述源自受试者的生物样品包含癌性上皮细胞。
- [0417] [10][1] 至 [9] 任一的方法,其中所述源自受试者的生物样品包含肺组织或肺细胞。
- [0418] [11][1] 至 [10] 任一的方法,其中所述肺癌是 NSCLC 或 SCLC。
- [0419] 诊断肺癌的方法将在下面更加详细的加以叙述。
- [0420] 用本方法诊断的受试者优选为哺乳动物。哺乳动物的例子包括但不限于,例如,人类,非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马以及牛。
- [0421] 为实施诊断,优选从要诊断的受试者采集生物样品。任何生物学材料均可作为生物样品用于测定,只要其包括目标的 CSTF2 基因转录或翻译产物。所述生物样品包括,但不限于,想要诊断或怀疑患有癌症的身体组织与体液,例如血液,痰,胸腔积液与尿液。生物样品优选含有这样的细胞群体,该群体包括上皮细胞,更优选癌性上皮细胞或源自怀疑为癌性的组织的上皮细胞。进一步,如果必要,可从所得的身体组织与体液中纯化所述细胞,并将其用为生物样品。在一个优选的实施方案中,生物样品含有肺组织或肺细胞。此类生物样品可通过自受试者的肺中怀疑癌性的区域收集肺组织或肺细胞来获得,例如通过活检。
- [0422] 根据本发明,测定在所述源自患者的生物样品中 CSTF2 基因的表达水平。表达水平可在转录产物 (mRNA) 水平确定,使用本领域熟知的方法。举例而言,CSTF2 基因的 mRNA 可通过杂交方法(例如,Northern 杂交)使用探针定量。可在芯片或阵列上实施所述检测。对检测多个基因(例如,多种癌症特异性基因),包括 CSTF2 基因,的表达水平而言,优选使用阵列。本领域技术人员可利用 CSTF2 基因 (SEQ ID NO :1 ;GenBank 登录号 :NM_001325) 的序列信息制备上述探针。举例而言,CSTF2 基因的 cDNA 可用作探针。如需要,所述探针可用合适的标记物例如染料、荧光或同位素来标记,且所述基因的表达水平可以作为发生杂交的标记物的强度来加以检测。
- [0423] 进一步,CSTF2 基因的转录产物可通过基于扩增的检测技术(例如,RT-PCR)使用引物定量。上述引物亦可基于所述基因已知的序列信息制备。举例而言,用于实施例的引物或探针 (SEQ ID NO :3、4、7 和 8) 可用于通过 RT-PCR 或 Northern 印迹的检测,但本发明并不仅限于此。
- [0424] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、中等严格条件与低严格条件下与 CSTF2 基因的 mRNA 杂交。如上文定义的,短语“严格(杂交)条件”是指这样的条件,在该条件下,探针或引物将与其靶序列杂交,但不与其它序列杂交。严格条件是依赖于序列的,在不同的环境下会不同。较长序列的特异杂交与较短序列相比在较高温度下发生。一

般地,严格条件的温度选择为比特定序列在限定的离子强度和 pH 下的热熔点 (T_m) 低大约 5°C 。 T_m 是 (在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下) 平衡状态下有 50% 的与靶序列互补的探针与靶序列杂交的温度。因为靶序列一般过量存在,因此在 T_m 下,平衡时 50% 的探针被占据。典型地,严格条件是这样的:其中盐浓度小于大约 1.0M 钠离子,典型地大约 0.01-1.0M 钠离子 (或其它盐), pH7.0-8.3,温度对于较短的探针或引物 (例如 10-50 个核苷酸) 是至少大约 30°C ,用于较长的探针或引物是至少大约 60°C 。严格条件也可以通过添加去稳定剂例如甲酰胺来实现。

[0425] 或者,本发明的诊断可以通过检测翻译产物来进行。例如,可以确定 CSTF2 蛋白的量。测定作为翻译产物的蛋白量的方法包括免疫测定法,此类方法使用特异识别所述蛋白的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。而且,抗体的任何片段或修饰 (例如嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等) 均可用于检测,只要该片段保留对 CSTF2 蛋白的结合能力即可。制备这些类型的用于检测蛋白的抗体的方法是本领域众所周知的,并且在本发明中可以使用任何方法制备这些抗体和它们的等价物。

[0426] 作为另一种基于 CSTF2 的翻译产物检测其基因的方法,可利用针对 CSTF2 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析观察其染色的强度。即,观察到强染色表明所述蛋白质的存在增加,且同时表明 CSTF2 的高表达水平。

[0427] 另外,除 CSTF2 基因的表达水平外,亦可确定其它癌症相关基因,例如已知在肺癌中有差异表达的基因的表达水平,以提高所述诊断的准确性。

[0428] 对于包括 CSTF2 基因在内的癌症标志基因而言,如果其较之相应的癌症标志基因的对照水平增加了例如 10%,25% 或 50% 的话,或增加到超过 1.1 倍,超过 1.5 倍,超过 2.0 倍,超过 5.0 倍,超过 10 倍或者更多,则可认为其在生物样品中的表达水平是增加的。

[0429] 对照水平可以与测试生物样品同时确定,使用先前从疾病状态 (癌性或非癌性) 已知的受试者收集和保存的样品。或者,对照水平可以借助统计方法,根据通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的 CSTF2 基因表达水平获得的结果加以确定。进一步,对照水平可以是来自先前测试过的细胞的表达模式数据库。而且,根据本发明的一个方面,可以将生物样品中 CSTF2 基因的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用从来自与源自患者的样品组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且,优选地,使用具有已知的疾病状态的群体中 CSTF2 基因表达水平的标准值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,平均值 $\pm 2\text{S.D.}$ 或平均值 $\pm 3\text{S.D.}$ 的范围可以用作标准值。

[0430] 在本发明的背景中,从已知非癌性的生物样品确定的对照水平称作“正常对照水平”。另一方面,如果对照水平从癌性生物样品确定,则称作“癌性对照水平”。

[0431] 当 CSTF2 基因的表达水平相比正常表达水平有所提高或与癌性对照水平相似,则受试者可诊断为正罹患或有风险发生癌症。进一步,当比较多种癌症相关基因的表达水平时,样品与癌性参照之间基因表达模式的相似性表明受试者正罹患或有风险发生癌症。

[0432] 测试生物样品的表达水平与对照水平间的差异,可以相对已知表达水平不会随着细胞的癌或非癌状态改变的对照核酸 (例如管家基因) 的表达水平加以标准化。示例对照基因包括,但不限于, β -肌动蛋白、甘油醛-3 磷酸脱氢酶和核糖体蛋白 P1。

[0433] 或者,本发明提供试剂制备用于诊断癌症的诊断试剂的用途。在一些实施方案中,

该试剂可选自下组：

[0434] (a) 用于检测 CSTF2 基因的 mRNA 的试剂；

[0435] (b) 用于检测 CSTF2 蛋白的试剂；和

[0436] (c) 用于检测 CSTF2 蛋白的生物学活性的试剂。

[0437] 具体地，此类试剂是与 CSTF2 多核苷酸杂交的寡核苷酸或与 CSTF2 多肽结合的抗体。

[0438] 在本发明中，揭示了 CSTF2 不仅是有用的诊断标志物，而且还是癌症疗法的合适靶物。因此，靶向 CSTF2 的癌症治疗可通过本发明来实现。在本发明中，靶向 CSTF2 的癌症治疗指阻抑或抑制癌细胞中的 CSTF2 活性和 / 或表达。任何抗 CSTF2 剂均可用于靶向 CSTF2 的癌症治疗。在本发明中，抗 CSTF2 剂包括下述物质作为活性组分：

[0439] (a) 本发明的双链分子，

[0440] (b) 编码它的 DNA，和

[0441] (c) 编码它的载体。

[0442] 因而，在一个优选的实施方案中，本发明提供下述方法：(i) 诊断受试者是否具有要用抗 CSTF2 剂治疗的癌症，和 / 或 (ii) 为靶向 CSTF2 的癌症治疗选择受试者，该方法包括下述步骤：

[0443] (a) 测定自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的癌细胞或组织中 CSTF2 基因的表达水平；

[0444] (b) 将 CSTF2 基因的表达水平与正常对照水平比较；

[0445] (c) 如果 CSTF2 的表达水平与正常对照水平相比升高的话，将该受试者诊断为具有要治疗的癌症；并

[0446] (d) 如果在步骤 (c) 中将该受试者诊断为具有要治疗的癌症的话，选择该受试者进行癌症治疗。

[0447] 或者，此类方法包括下述步骤：

[0448] (a) 测定自怀疑具有要治疗的癌症的受试者获得的癌细胞或组织中 CSTF2 基因的表达水平；

[0449] (b) 将 CSTF2 基因的表达水平与癌性对照水平比较；

[0450] (c) 如果 CSTF2 基因的表达水平与癌性对照水平相似或等同的话，将该受试者诊断为具有要治疗的癌症；并

[0451] (d) 如果在步骤 (c) 中将该受试者诊断为具有要治疗的癌症的话，选择该受试者进行癌症治疗。

[0452] 评价癌症预后的方法

[0453] 本发明部分涉及下列新发现，即 CSTF2 表达与患者不良预后显著相关。因此，本发明提供确定或评价罹患癌症，尤其是肺癌患者预后的方法，所述方法检测患者生物样品中的 CSTF2 表达水平；将测得的表达水平与对照水平比较；并确定与对照水平相比升高的表达水平为不良预后（不良的存活）的指示。具体地，本发明提供一种评价或确定具有肺癌的受试者的预后的方法，所述方法包括下述步骤：

[0454] (a) 检测源自受试者的生物样品中 CSTF2 基因的表达水平；

[0455] (b) 将检测到的表达水平与对照水平比较；并

[0456] (c) 基于 (b) 的比较确定该受试者的预后。

[0457] 在此,术语“预后”指由病例的性质与症状表明的关于所述疾病的可能结果以及从疾病中恢复的前景。相应地,不利的、负面的、不良的预后定义为较低的治疗后存活期间与存活率。相反,正面的、有利的、或良好的预后定义为治疗后存活期间或存活率提高。

[0458] 术语“评价预后”指预测、预告与患者癌症的将来结果(例如,恶性,治愈癌症的可能性、存活率等),或将一定的检测或测量与患者癌症的将来结果相联系的能力。举例而言,确定 CSTF2 基因经时的表达水平使预测患者结果(例如,恶性的增加或减少,癌症等级的增加或减少,治愈癌症的可能性、存活率等)成为可能。

[0459] 在本发明的背景中,短语“评价(或确定)预后”意欲涵盖癌症、进展、特别是癌症复发、转移扩散与疾病复发的预测与可能性分析。这里的评价预后的方法意欲用于临床以对关于治疗模式作出决定,所说的治疗模式包括治疗介入、诊断标准例如疾病的分期,以及针对肿瘤疾病的转移与复发的疾病监视和监测。

[0460] 本方法所用的源自患者的生物样品可为任何源自要评价的受试者的样品,只要 CSTF2 基因可在样品中检测出来。所述生物样品优选肺细胞(从肺获得的细胞)。进一步,所述生物样品可包括体液例如痰、血液、血清或血浆。另外,所述样品可为从组织纯化的细胞。生物样品可在不同的时点自患者获取,包括治疗前,治疗中和/或治疗后。例如,自要评估的受试者获得的肺癌细胞是优选的生物样品。

[0461] 根据本发明,显示在源自患者的生物样品中 CSTF2 基因的表达水平越高,治疗后病情缓和、恢复和/或存活的预后就越为不良,且不良临床后果的可能性就越高。因此,根据本方法,用作比较的“对照水平”可为,例如,在治疗后显示良好或积极的癌症预后的个体或个体组成的群体中的任何 CSTF2 基因的表达水平,在此称之为“良好预后对照水平”。此外,所述“对照水平”可为,例如,在治疗后显示不良或消极的癌症预后的个体或个体组成的群体中的任何 CSTF2 基因的表达水平,在此称之为“不良预后对照水平”。所述“对照水平”是源自自单一参照群体的单一表达模式,或者是多种表达模式。因此,所述对照水平可基于在其疾病状态(良好或不良预后)已知的癌症患者或癌症患者的群体中,在进行任何种类治疗之前的 CSTF2 基因的表达水平来确定。在本发明的背景中,癌症为肺癌。优选使用在疾病状态已知的患者集合中的 CSTF2 基因的表达水平的标准值。所述标准值可通过任何本领域已知的方法获得。举例而言,平均值 ± 2 倍标准偏差或平均值 ± 3 倍标准偏差的范围可用作标准值。

[0462] 所述对照水平可以与所测试的生物样品同时确定,这通过使用先前从已知其疾病状态(良好或不良预后)的患者(对照或对照组)在接受任何种类的治疗之前采集并储藏的样品来实现。

[0463] 或者,所述对照水平可通过统计学方法基于通过分析先前从对照组收集或储藏的样品中的 CSTF2 基因表达水平来确定。进一步,所述对照水平可为来自先前测试的细胞的表达模式的数据库。

[0464] 另外,根据本发明的一个方面,可将生物样品中 CSTF2 基因的表达水平与多种对照水平进行比较,所述对照水平是从多种参照样品确定的。优选使用从与源自患者的生物样品类似的组织类型所得的参照样品确定的对照水平。

[0465] 根据本发明, CSTF2 基因的表达水平与良好预后对照水平的相似性显示所述患者

较理想的预后,而相对良好预后对照水平表达水平的增加显示较不理想的、较不良的治疗后病情缓和、恢复、存活和/或临床后果的预后。另一方面,相比于不良预后对照水平 CSTF2 表达水平的减少显示患者较理想的预后,而与不良预后对照水平相似的表达水平显示较不理想的、较不良的治疗后病情缓和、恢复、存活和/或临床后果的预后。例如,自在治疗后显示较好或较差癌症预后的受试者获得的肺癌细胞分别是较好或不良预后对照水平的优选生物样品。

[0466] 当相对对照水平表达水平变化超过 1.0、1.5、2.0、5.0、10.0 或更多倍时,生物样品中的 CSTF2 基因表达水平可认为是改变了。

[0467] 所试生物样品与对照水平间表达水平的差异可相对于对照,例如持家基因,加以标准化。举例而言,已知其表达水平在癌性与非癌性细胞中不变的多核苷酸,包括那些编码 β -肌动蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶与核糖体蛋白 P1 的基因,可用于标准化 CSTF2 基因表达水平。

[0468] 表达水平可通过利用本领域众所周知的技术在源自患者的生物样品中检测基因转录物来确定。所述通过本方法检测的基因转录物既包括转录产物也包括翻译产物,例如 mRNA 与蛋白质。

[0469] 举例而言,CSTF2 基因的转录产物可通过使用针对基因转录物的 CSTF2 基因探针进行杂交,例如 Northern 印迹杂交分析来加以检测。所述检测可在芯片或阵列上进行。对检测 CSTF2 基因的表达水平,优选使用阵列。作为另一个示例,基于扩增的检测方法,例如使用 CSTF2 基因特异性的引物基于逆转录的聚合酶链式反应可用于检测(参见实施例)。CSTF2 基因特异性探针或引物可使用常规技术参照 CSTF2 基因的全序列(SEQ ID NO:1)设计和制备。举例而言,在实施例中使用的引物(SEQ ID NO:3 和 4)可用于通过 RT-PCR 检测,但本方面并不仅限于此。

[0470] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、中等严格条件或低严格条件下与 CSTF2 的 mRNA 杂交。

[0471] 或者,本发明的评价亦可通过检测翻译产物来进行。举例而言,可确定 CSTF2 蛋白的量。确定作为翻译产物的蛋白质的量的方法包括使用特异性识别 CSTF2 蛋白的抗体的免疫测定方法。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。进一步,任何所述抗体的片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等等)均可用于检测,只要所述片段保留与 CSTF2 蛋白的结合能力。制备此类用于检测蛋白的抗体的方法在本领域是众所周知的,本发明中可以使用任何方法制备这样的抗体及其等价物。

[0472] 作为另一种基于 CSTF2 基因翻译产物来检测该基因的表达水平的方法,可通过免疫组织化学分析利用针对 CSTF2 蛋白质的抗体观察其染色的强度。即,观察到强染色表明 CSTF2 的存在量增加,且同时表明 CSTF2 基因的高表达水平。

[0473] 进一步,已知 CSTF2 蛋白具有细胞增殖活性。因此,CSTF2 基因的表达水平可使用上述细胞增殖活性作为指标来确定。举例而言,在生物样品存在下制备并培养表达 CSTF2 的细胞,随后通过检测增殖速度或测定细胞周期或集落形成能力,可确定所述生物样品的细胞增殖活性。

[0474] 另外,除 CSTF2 基因的表达水平外,亦可确定其它肺癌相关基因,例如已知在肺癌中有差异表达的基因,的表达水平,以提高所述评价的准确性。上述其它的肺细胞相关基因

的实例包括那些于 W02004/031413 和 W02005/090603 中描述的基因。将它们的内容以引用方式纳入于本文中。

[0475] 或者,根据本发明,除其它测试结果外,还可提供用于评价受试者预后的中间结果。所述中间结果可协助医生、护士或其它从业人员评价、确定或估计受试者的预后。可与本发明所得中间结果结合考虑的其它信息包括受试者的临床症状和身体状况。

[0476] 换言之, CSTF2 基因的表达水平是用于为罹患肺癌(例如 NSCLC)的受试者评价、预测或确定预后的有用预后标志物。因此,本发明还提供一种用于检测预后标志物,为罹患肺癌(包括 NSCLC)的受试者评价、预测或确定预后的方法,其包括下述步骤:

[0477] a) 检测或测定源自受试者的生物样品中 CSTF2 基因的表达水平,并

[0478] b) 将步骤 a) 中检测或测定到的表达水平与该受试者的预后关联起来。

[0479] 特别地,依照本发明,与对照水平相比升高的表达水平指示不良预后(较差存活)的可能性或怀疑。

[0480] 要根据本方法评价癌症预后的患者优选为哺乳动物,包括人、非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马和牛。

[0481] 或者,本发明提供试剂制备用于评价癌症预后的试剂的用途。在一些实施方案中,该试剂选自下组:

[0482] (a) 用于检测 CSTF2 基因的 mRNA 的试剂;

[0483] (b) 用于检测 CSTF2 的试剂;和

[0484] (c) 用于检测 CSTF2 蛋白的生物学活性的试剂。

[0485] 具体地,此类试剂是与 CSTF2 多核苷酸杂交的寡核苷酸或与 CSTF2 多肽结合的抗体。

[0486] 诊断癌症或评价癌症预后的试剂盒:

[0487] 本发明提供了诊断癌症或评价癌症预后的试剂盒。或者,本发明还提供用于确定罹患可用本发明双链分子或编码它的载体来治疗的癌症的受试者的试剂盒,其也可用于评估和/或监测癌症治疗的效果。在一个优选的实施方案中,所述癌症是肺癌。具体而言,所述试剂盒包含至少一种在源自患者的生物样品中检测 CSTF2 基因表达的物质或试剂,所述物质可选自下组:

[0488] (a) 检测 CSTF2 基因的 mRNA 的物质或试剂;

[0489] (b) 检测 CSTF2 的蛋白质的物质或试剂;

[0490] (c) 检测 CSTF2 的蛋白质的生物学活性的物质或试剂。

[0491] 适于检测 CSTF2 基因的 mRNA 的物质或试剂包括特异性结合或鉴定 CSTF2mRNA 的核酸,诸如具有与 CSTF2mRNA 的一部分互补的序列的寡核苷酸。这类寡核苷酸的例子有对 CSTF2mRNA 为特异性的引物与探针。可基于本领域众所周知的方法制备这类寡核苷酸。如果需要,可将用于检测 CSTF2mRNA 的物质或试剂固定化在固体基质上。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 CSTF2mRNA 的物质或试剂。

[0492] 探针或引物可以是特定大小。该大小选自下组:至少 10 个核苷酸、至少 12 个核苷酸、至少 15 个核苷酸、至少 20 个核苷酸、至少 25 个核苷酸、至少 30 个核苷酸,而且探针和引物的大小范围可以为 5-10 个核苷酸、10-15 个核苷酸、15-20 个核苷酸、20-25 个核苷酸和 25-30 个核苷酸。

[0493] 另一方面,适于检测 CSTF2 蛋白质的物质或试剂包括针对 CSTF2 蛋白质的抗体。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。进一步,任何所述抗体的片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等等)均可用作所述物质或试剂,只要所述片段保留与 CSTF2 蛋白的结合能力。为检测蛋白制备此类抗体的方法在本领域是众所周知的,且在本发明中可使用任何方法制备上述抗体及其等价物。进一步,所述抗体可用能产生信号的分子通过直接连接或间接标记技术进行标记。标记物与标记抗体以及检测抗体与其靶的结合的方法在本领域是众所周知的,且本发明可使用任何标记物与方法。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 CSTF2 蛋白质的物质或试剂。

[0494] 进一步,所述生物学活性可通过,例如,测量所述生物样品中由于 CSTF2 蛋白质表达而导致的细胞增殖活性来确定。举例而言,在源自患者的生物样品的存在下培养所述细胞,然后通过检测增殖的速度,或测量细胞周期或集落形成能力,可确定所述生物样品的细胞增殖活性。如需要,可将用于检测 CSTF2mRNA 的物质或试剂固定化在固体基质上。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 CSTF2 蛋白质的生物学活性的物质。

[0495] 所述试剂盒可包含多于一种前述的物质或试剂。进一步,所述试剂盒可包括固体基质以及用于结合针对 CSTF2 基因的探针或针对 CSTF2 蛋白质的抗体的物质,用于培养细胞的培养基与容器,阳性与阴性对照物质或试剂,以及用于检测针对 CSTF2 蛋白质的抗体的第二抗体。举例而言,从具有良好预后或不良预后的患者获取的组织样品可用作有用的对照物质或试剂。本发明的试剂盒可进一步包括其它从商业和用户角度而言期望的材料,包括缓冲液、稀释液、滤器、针头、注射器和带有使用说明书的装箱单(例如,书面的、磁带、CD-ROM 等等)。这些物质或试剂之类的包含在带有标签的容器中。合适的容器包括瓶、管状瓶(vials)和试管。所述容器可从多种材料制得,例如玻璃或塑料。

[0496] 作为本发明的一个实施方案,当所述物质或试剂是针对 CSTF2mRNA 的探针时,所述物质或试剂可固定化于固体基质诸如多孔条上,以形成至少一个检测位点。所述多孔条的测量或检测区域可包含多个位点,每个都包含核酸(探针)。测试条亦可包含阴性和/或阳性对照的位点。或者,对照位点可位于与测试条不同的条上。任选地,不同的检测位点可包含不同量的固定化核酸,即,在第一个检测位点上量较大而在接下来的位点上量较小。在加入测试样品之后,显示可检测信号的位点的数量提供了在样品中存在的 CSTF2mRNA 量的定量指征。所述检测位点可配置为具有任何合适地可检测的形状,通常是横跨测试条宽度的条状或点状。

[0497] 本发明的试剂盒可进一步包括阳性对照或 CSTF2 标准样品。本发明的阳性对照样品可通过收集 CSTF2 阳性血液样品,随后测定其 CSTF2 水平来制备。或者,可将纯化的 CSTF2 蛋白或多核苷酸添加到不含 CSTF2 的血清中以形成所述阳性样品或 CSTF2 标准品。

[0498] 抗肺癌物质的筛选

[0499] 在本发明的背景中,待通过本筛选方法鉴定的物质可以是任何物质或包含数种物质的组合物。而且,根据本发明筛选方法暴露于细胞或蛋白的测试物质可以是单种物质或多种物质的组合。当在方法中使用物质组合时,各物质可以顺次或同时加以接触。

[0500] 任何测试物质,例如,细胞提取物、细胞培养上清、发酵微生物产物、海洋生物提取物、植物提取物、纯化或粗蛋白质、肽、非肽物质、合成微分子物质(包括核酸构建体,例如反义 RNA、siRNA、核酶以及适体等等)以及天然物质,均可用于本发明的筛选方法中。也可

使用本领域熟知的很多组合文库方法中的任何途径来获得本发明的测试物质,包括(1)生物文库,(2)空间可寻址平行固相或液相文库(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries),(3)需要解卷积(deconvolution)的合成文库法,(4)“一珠一物质”(“one-bead one-substance”)文库法,以及(5)使用亲和色谱选择的合成文库法。使用亲和色谱选择的生物文库法限于肽文库,而其它四种途径适用于肽、非肽寡聚物或物质小分子文库(Lam(1997)Anticancer Drug Des.12:145-67)。合成分子文库方法的例子可在现有技术中找到(DeWitt et al., Proc Natl Acad Sci USA 1993,90:6909-13;Erb et al., Proc Natl Acad Sci USA 1994,91:11422-6;Zuckermann et al., J Med Chem 37:2678-85,1994;Cho et al., Science 1993,261:1303-5;Carell et al., Angew Chem Int Ed Engl 1994,33:2059;Carell et al., Angew Chem Int Ed Engl 1994,33:2061;Gallop et al., J Med Chem 1994,37:1233-51)。物质文库可提供于溶液中(参见Houghten,Bio/Techniques 1992,13:412-21)或珠子上(Lam,Nature 1991,354:82-4)、芯片上(Fodor,Nature 1993,364:555-6)、细菌上(美国专利5,223,409)、孢子上(美国专利5,571,698;5,403,484与5,223,409)、质粒上(Cull et al., Proc Natl Acad Sci USA 1992,89:1865-9)或噬菌体上(Scott and Smith,Science1990,249:386-90;Devlin, Science 1990,249:404-6;Cwirla et al., Proc Natl Acad Sci USA 1990,87:6378-82;Felici,J Mol Biol 1991,222:301-10;美国专利申请2002103360)。

[0501] 通过本发明任何筛选方法筛选到的物质的一部分结构通过添加、删除、和/或置换方式被转换而得到的物质,包括在通过本发明筛选方法鉴定的物质之内。

[0502] 此外,当所筛选的测试物质是蛋白质时,为了获得编码该蛋白的DNA,可以确定蛋白的全部氨基酸序列,以此推定该编码蛋白的核酸序列,或者可以分析所得蛋白的部分氨基酸序列,根据该序列制备寡DNA作为探针,并用该探针筛选cDNA文库,以获得编码该蛋白的DNA。对所得的DNA确认其在制备治疗或预防癌症的候选物测试物质中的有用性。

[0503] 对本文描述筛选为有用的测试样品亦可为特异性结合CSTF2蛋白或其缺乏原蛋白的体内生物学活性的部分肽的抗体。

[0504] 尽管测试剂文库的构建是本领域众所周知的,在下文中还是进一步提供了鉴定测试物质和构建用于本筛选方法的这些测试物质的文库的指导。

[0505] 在本发明中,揭示了阻抑CSTF2的表达水平和/或生物学活性导致癌细胞生长的阻抑。因此,当某种物质阻抑CSTF2的表达和/或活性时,该阻抑指示受试者中的潜在治疗效果。在本发明中,潜在治疗效果指具有合理预期的临床好处。在本发明中,此类临床好处包括:

[0506] (a) CSTF2基因表达的减少,

[0507] (b) 受试者中癌症的尺寸、患病率(prevalence)、或转移潜力的降低,

[0508] (c) 预防癌症发生,或

[0509] (d) 预防或缓解癌症的临床症状。

[0510] (i) 分子建模:

[0511] 对具有目标性质的物质的分子结构和/或对CSTF2的分子结构的知识为人们构建测试剂文库提供了便利。预筛选适于进一步评估的受试药剂的方法之一是对受试药剂与其靶标的相互作用进行计算机建模。

[0512] 计算机建模技术为选定分子的三维原子结构的可视化以及会与该分子相互作用的新物质的合理设计提供了可能。三维构建典型地依赖于来源于选定分子的 x-射线晶体分析或 NMR 成像的数据。分子动力学需要力场数据。计算机图形系统为预测新物质如何连接靶分子,以及实验操作物质和靶分子的结构以完善结合特异性提供了可能。为了预测当分子和物质之一或二者都发生细小改变时分子-物质相互作用是什么样的,需要分子力学软件和计算密集型计算机,它们通常耦联着分子设计程序和用户之间的用户友好的、菜单驱动界面。

[0513] 上文一般性描述的分子建模系统的一个实例包括 CHARMM 和 QUANTA 程序, Polygen Corporation, Waltham, Mass. CHARMM 执行能量最小化和分子动力学功能。QUANTA 执行构建、图形建模和分子结构分析。利用 QUANTA 可进行分子相互行为的互动性构建、修饰、可视化和分析。

[0514] 有多篇文献综述了与特异蛋白相互作用的药物的计算机建模,例如 Rotivinen et al. *Acta Pharmaceutica Fennica* 1988, 97:159-66; Ripka, *New Scientist* 1988, 54-8; McKinlay&Rossmann, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989, 29:111-22; Perry&Davies, *Prog Clin Biol Res* 1989, 291:189-93; Lewis&Dean, *Proc R Soc Lond* 1989, 236:125-40, 141-62; 以及关于核酸组分模型受体的 Askew et al., *J Am Chem Soc* 1989, 111:1082-90。

[0515] 其它可筛选并图形描述化学物质的计算机程序可以从例如 Mississauga, Ontario, Canada 的 BioDesign, Inc., Pasadena, Calif., Allelix, Inc 公司、Cambridge, Ontario 的 Hypercube, Inc. 等公司获取。见例如 DesJarlais et al., *J Med Chem* 1988, 31:722-9; Meng et al., *J Computer Chem* 1992, 13:505-24; Meng et al., *Proteins* 1993, 17:266-78; Shoichet et al., *Science* 1993, 259:1445-50。

[0516] 一旦鉴定出推定的抑制剂,可使用组合化学技术基于鉴定出的推定抑制剂的化学结构构建任何数量的变体,如下所述。所得的推定抑制剂,或“测试物质”文库,可使用本发明的方法筛选,以鉴定治疗或预防肺癌的测试剂。

[0517] (ii) 组合化学合成:

[0518] 测试物质的组合文库可以作为合理药物设计程序的一部分来制备,合理药物设计程序涉及有关已知抑制剂中存在的核心结构的知识。这种策略使得文库可以保持合理的规模,便于进行高通量筛选。或者,可通过简单地合成构成文库的分子家族的所有排列,来构建简单的,特别是短的、聚合物性的分子文库。后一种方法的一个实例是由所有长度为 6 个氨基酸组成的肽文库。这种肽文库包含所有 6 氨基酸序列排列。这种类型的文库称作线性组合化学文库。

[0519] 组合化学文库的制备是本领域技术人员所熟知的,可以通过化学或生物合成来产生。组合化学文库包括,但不仅限于,肽文库(见例如美国专利 5,010,175; Furka, *Int J Pept Prot Res* 1991, 37:487-93; Houghten et al., *Nature* 1991, 354:84-6)。也可以使用其它用于产生化学多样性文库的化学。这些化学包括,但不仅限于,肽(例如 PCT 公布 WO 91/19735),被编码的肽(例如 W093/20242),随机生物寡聚体(例如 W0 92/00091),苯并二氮卓(benzodiazepines)(例如美国专利 5,288,514), diversomer 如乙内酰脲、苯并二氮卓和二肽(DeWitt et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:6909-13),插烯化(vinylogous)多肽(Hagihara et al., *J Amer Chem Soc* 1992, 114:6568),具有葡萄糖

骨架 (scaffolding) 的非肽类肽模拟物 (Hirschmann et al., J Amer Chem Soc 1992, 114 :9217-8), 小化合物文库的模拟物有机合成 (analogous organic synthesis) (Chen et al., J. Amer Chem Soc 1994, 116 :2661), 寡聚氨基甲酸盐 (Cho et al., Science 1993, 261 : 1303), 和 / 或肽酰磷酸酯 (peptidylphosphonates) (Campbell et al., J Org Chem 1994, 59 :658), 核酸文库 (见 Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology 1995 增刊; Sambrook et al., Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA), 肽核酸文库 (见例如美国专利 5, 539, 083), 抗体文库 (见例如 Vaughan et al., Nature Biotechnology 1996, 14(3) :309-14 和 PCT/US96/10287), 碳水化合物文库 (见例如 Liang et al., Science 1996, 274 :1520-22 ;美国专利 5, 593, 853), 和有机小分子文库 (见例如苯并二氮卓, Gordon EM. Curr Opin Biotechnol. 1995 Dec 1 ;6(6) : 624-31 ;类异戊二烯 (isoprenoids), 美国专利 5, 569, 588 ;噻唑烷酮 (thiazolidinones) 和偏硫杂氮杂环己烷 (metathiazanone), 美国专利 5, 549, 974 ;吡咯烷 (pyrrolidines), 美国专利 5, 525, 735 和 5, 519, 134 ;吗啉代化合物, 美国专利 5, 506, 337 ;苯并二氮卓, 5, 288, 514 ;等)。

[0520] 用于制备组合文库的设备是可商购的 (见例如 357MPS, 390MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA)。此外, 有多种组合文库本身也是商业可得的 (见例如 ComGenex, Princeton, N. J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, 等等)。

[0521] (iii) 其它候选物

[0522] 另一种手段是使用重组细菌噬菌体来产生文库。使用“噬菌体方法” (Scott & Smith, Science 1990, 249 :386-90 ;Cwirla et al., Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87 :6378-82 ;Devlin et al., Science 1990, 249 :404-6), 可以构建非常大的文库 (例如 10⁶-10⁸ 个化学实体)。再一种手段主要使用化学方法, 其实例包括 Geysen 方法 (Geysen et al., Molecular Immunology 1986, 23 :709-15 ;Geysen et al., J Immunologic Method 1987, 102 :259-74) 和 Fodor 等的方法 (Science 1991, 251 :767-73)。Furka 等 (14th International Congress of Biochemistry 1988, Volume#5, Abstract FR :013 ; Furka, Int J Peptide Protein Res 1991, 37 :487-93), Houghten (美国专利 4, 631, 211) 和 Rutter 等 (美国专利 5, 010, 175) 记载了产生肽混合物的方法, 可以将这些肽作为激动剂或拮抗剂加以测试。

[0523] 适体是由可紧密结合特定分子靶的核酸构成的大分子。Tuerk 和 Gold (Science. 249 :505-510 (1990)) 披露了 SELEX (通过指数式富集进行的配体系统性进化) 方法来选择适体。在 SELEX 方法中, 核酸分子的大型文库 (例如 10¹⁵ 种不同分子) 可用于筛选。

[0524] CSTF2 结合物质的筛选

[0525] 在本发明中, 在肺癌中检测出 CSTF2 基因的过表达, 而在正常器官中没有表达 (图 1 与 2)。另外, 针对 CSTF2 基因的 siRNA 对 CSTF2 基因表达的阻抑诱导对癌细胞生长的阻抑 (图 3)。这些结果指示 CSTF2 基因在癌细胞中发挥至关重要的作用。因此, 本发明提供了使用 CSTF2 基因、该基因编码的蛋白, 来筛选结合 CSTF2 多肽的物质的方法。由于肺癌中

CSTF2 基因的表达,与 CSTF2 多肽结合的物质可望抑制肺癌细胞的增殖,并因此对治疗或预防肺癌有用。因此,本发明亦提供了使用 CSTF2 多肽筛选抑制肺癌细胞增殖的候选物质的方法,以及筛选治疗或预防肺癌的候选物质的方法。具体而言,在筛选用于治疗或预防癌症或抑制癌细胞生长的候选物质方法的一个实施方案中,该方法包括以下步骤:

[0526] (a) 将测试物质与 CSTF2 多肽或其片段接触;

[0527] (b) 检测所述多肽或其片段与所述测试物质之间的结合活性;和

[0528] (c) 选择结合所述多肽或其片段的测试物质作为用于治疗或预防癌症的候选物质。

[0529] 在另一个实施方案中,本发明亦提供了使用 CSTF2 多肽或其片段来筛选用于治疗或预防癌症或抑制癌细胞生长的候选物质的方法,其包括以下步骤:

[0530] (a) 将测试物质与 CSTF2 多肽或其功能性片段接触;

[0531] (b) 检测步骤 (a) 中所述多肽或其片段与所述测试物质之间的结合活性;并

[0532] (c) 将 (b) 的结合活性与所述测试物质的治疗效果关联起来。

[0533] 或者,依照本发明,也可评估或估计测试物质或化合物对治疗或预防癌症的潜在治疗效果。在一些实施方案中,本发明提供用于评估或评价测试物质对治疗或预防癌症或抑制与 CSTF2 过表达有关的癌症的治疗效果的方法,该方法包括下述步骤:

[0534] (a) 使测试物质与由 CSTF2 多核苷酸编码的多肽接触;

[0535] (b) 检测所述多肽和所述测试物质之间的结合活性;并

[0536] (c) 将潜在治疗效果与测试物质关联起来,其中当该物质结合所述多肽时显示潜在治疗效果。

[0537] 在本发明中,可以将治疗效果与 CSTF2 多肽或其功能性片段的结合活性关联起来。例如,当某种测试物质结合 CSTF2 多肽或其功能性片段时,可将所述测试物质鉴定或选择为具有治疗效果的候选物质。或者,当某种测试物质不结合 CSTF2 多肽或其功能性片段时,可将所述测试试剂或化合物鉴定为没有显著治疗效果的物质。

[0538] 本发明的方法将在下面更加详细的加以描述。

[0539] 需用于筛选的 CSTF2 多肽可为重组多肽,或者是源自自然界的蛋白质,或其部分肽。与测试物质接触的多肽可以是,例如,纯化的多肽、可溶蛋白质、与载体结合的形式、或者与其它多肽融合的融合蛋白。

[0540] 作为使用 CSTF2 多肽来筛选蛋白质,例如与 CSTF2 多肽结合的蛋白质的方法,可使用本领域技术人员公知的多种方法。此类筛选可通过,例如,免疫沉淀方法,具体说是如下述的方式进行。通过将编码 CSTF2 多肽的基因插入外源基因表达载体,例如 pSV2neo、pcDNA1、pcDNA3.1、pCAGGS 与 pCD8,在宿主(例如,动物)细胞等中表达该基因。

[0541] 为此表达所用的启动子可为任何通常可使用的启动子,包括,例如,SV40 早期启动子(Rigby in Williamson(ed.), Genetic Engineering, vol. 3. Academic Press, London, 83-141(1982))、EF- α 启动子(Kim et al., Gene 91:217-23(1990))、CAG 启动子(Niwa et al., Gene 108:193(1991))、RSV LTR 启动子(Cullen, Methods in Enzymology 152:684-704(1987))、SR α 启动子(Takebe et al., Mol Cell Biol 8:466(1988))、CMV 立即早期启动子(Seed and Aruffo, Proc Natl Acad Sci USA 84:3365-9(1987))、SV40 晚期启动子(Gheysen and Fiers, J Mol Appl Genet 1:385-94(1982))、腺病毒晚期启动子

(Kaufman et al., Mol Cell Biol 9 :946(1989))、HSV TK 启动子等等。

[0542] 将所述导入宿主细胞以表达外源基因可根据任何方法实施,例如电穿孔方法((Chu et al., Nucleic Acids Res 15 :1311-26(1987))、磷酸钙方法(Chen and Okayama, Mol Cell Biol 7 :2745-52(1987))、DEAE 葡聚糖方法(Lopata et al., Nucleic Acids Res 12 :5707-17(1984); Sussman and Milman, Mol Cell Biol 4 :1641-3(1984))、Lipofectin 方法(Derijard B., Cell 76 :1025-37(1994); Lamb et al., Nature Genetics 5 :22-30(1993); Rabindran et al., Science 259 :230-4(1993)) 等等。

[0543] 对于由 CSTF2 基因编码的多肽,可以把特异性已知的单克隆抗体的识别位点(表位)导入该多肽的 N 或 C 端,从而将该多肽表达为包含该表位的融合蛋白。可以使用商品化的表位-抗体系统(Experimental Medicine 13 :85-90(1995))。能够利用其多克隆位点表达与例如 β -半乳糖苷酶、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽 S 转移酶和绿色荧光蛋白(GFP)形成的融合蛋白的载体是可商购的。另外,还报道了如下的融合蛋白,其通过导入仅由数个到十二个(a dozen)氨基酸构成的小型表位加以制备,使融合不会改变 CSTF2 多肽的性质。可以使用例如多组氨酸(His- 标签)、流感凝集素 HA、人 c-myc、FLAG、水泡性口炎病毒糖蛋白(VSV-GP)、T7 基因 10 蛋白(T7- 标签)、人单纯疱疹病毒糖蛋白(HSV- 标签)、E- 标签(单克隆噬菌体上的表位)等表位,和识别它们的单克隆抗体作为筛选与 CSTF2 多肽结合的蛋白质的表位-抗体系统(Experimental Medicine 13 :85-90(1995))

[0544] 在免疫沉淀中,将这些抗体添加到用合适去垢剂制备的细胞裂解物中而形成免疫复合体。免疫复合体由 CSTF2 多肽、包含与该多肽结合的能力的多肽、和抗体组成。除了使用针对上述表位的抗体之外,还可以使用针对 CSTF2 多肽的抗体进行免疫沉淀,这样的抗体可以如上文所述制备。免疫复合体可以被沉淀,例如当抗体是小鼠 IgG 抗体时,可以通过蛋白 A sepharose 或蛋白 G sepharose 将其沉淀。如果将由 CSTF2 基因编码的多肽制备成与表位(例如 GST)的融合蛋白,则可以使用特异结合这些表位的物质,例如谷胱甘肽-sepharose 4B,按照与使用针对 CSTF2 多肽的抗体的相同的方式来形成免疫复合体。

[0545] 可遵循或根据,例如,文献中的方法来实施免疫沉淀(Harlow and Lane, Antibodies, 511-52, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York(1988))。

[0546] 普遍使用 SDS-PAGE 分析经免疫沉淀的蛋白,使用合适浓度的凝胶,可以利用结合的蛋白的分子量来分析该蛋白。由于与 CSTF2 多肽结合的蛋白难以通过考马斯兰染色或银染色等普通染色方法检测到,可以通过如下的方法提高蛋白的检测灵敏度:在含有放射性同位素 ^{35}S -甲硫氨酸或 ^{35}S -半胱氨酸的培养基中培养细胞,标记细胞中的蛋白,并检测该蛋白。当蛋白的分子量已知时,可以直接从 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上纯化出靶蛋白并测定其序列。

[0547] 作为利用 CSTF2 多肽来筛选结合该多肽的蛋白的方法,可以使用例如 West-Western 印迹分析法(Skolnik et al., Cell 65 :83-90(1991))。具体地,与 CSTF2 多肽结合的蛋白可以通过如下方法获得,从预期表达结合 CSTF2 多肽的蛋白质的培养细胞(例如 LC176、LC319、A549、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H522、PC3、PC9、PC14、SK-LU-1、EBC-1、RERF-LC-AI、SK-MES-1、SW900 与 SW1573)利用噬菌体载体(例如 ZAP)制备 cDNA 文库,在 LB 琼脂糖上表达蛋白,将表达出的蛋白固定在滤膜上,使纯化并且标记的 CSTF2 多肽与上述滤膜反应,并依照标记物来检测表达与 CSTF2 多肽结合的蛋白的噬菌斑。本发明的多肽

可以利用生物素与抗生物素蛋白间的结合,或者利用特异结合 CSTF2 多肽或与 CSTF2 多肽融合的肽或多肽(例如 GST)的抗体,来进行标记。也可以使用利用放射性同位素或荧光等的方法。

[0548] 或者,在本发明筛选方法的另一个实施方案中,可以使用利用细胞的双杂交系统(“MATCHMAKER Two-Hybrid system”,“Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit”,“MATCHMAKER one-Hybrid system”(Clontech);“HybriZAP Two-Hybrid Vector System”(Stratagene);参考文献见“Dalton and Treisman, Cell 68:597-612(1992)”,“Fields and Sternglanz, Trends Genet 10:286-92(1994)”)。

[0549] 在双杂交系统中,使本发明的多肽与 SRF 结合区或 GAL4 结合区融合,并在酵母细胞中表达。从预期表达与本发明多肽结合的蛋白的细胞制备 cDNA 文库,使该文库在被表达时与 VP16 或 GAL4 转录激活区融合。然后,将 cDNA 文库导入到上述酵母细胞中,并从检测到的阳性克隆(当酵母细胞中表达出可与本发明多肽结合的蛋白时,两者的结合激活报告基因,使阳性克隆可检测)分离源自该文库的 cDNA。通过将上面分离的 cDNA 导入到大肠杆菌中并表达该蛋白,可制备由该 cDNA 编码的蛋白。作为报告基因,除了 HIS3 基因之外,还可以使用例如 Ade2 基因、lacZ 基因、CAT 基因、萤光素酶基因等。

[0550] 也可以用亲和色谱来筛选与 CSTF2 基因编码的多肽结合的物质。例如,可以把本发明多肽固定在亲和柱的载体上,而将含有能够结合本发明多肽的蛋白的测试物质施加到该柱上。这里的测试物质可以是例如细胞提取物、细胞裂解物等。在加载测试物质之后,冲洗柱子,从而可以制备得到结合于本发明多肽的物质。当测试物质是蛋白质时,对所得蛋白质的氨基酸序列进行分析,根据该序列合成寡 DNA,并用该寡 DNA 作为探针筛选 cDNA 文库,从而获得编码该蛋白的 DNA。

[0551] 利用表面等离子体共振现象的生物传感器可以在本发明中用作检测或定量结合物质的装置。当使用这种生物传感器时,可以仅使用微量并且没有标记的多肽(例如 BIAcore, Pharmacia),以表面等离子体共振信号的形式对本发明多肽与测试物质间的相互作用进行实时的观察。因此,使用生物传感器,例如 BIAcore,人们就有可能对本发明多肽与测试物质间的结合进行评估。

[0552] 用于筛选当固定的 CSTF2 多肽暴露于合成化学物质或天然物质文库或随机噬菌体肽展示文库时发生结合的分子的方法,以及使用基于组合化学技术的高通量筛选方法(Wrighton et al., Science 273:458-64(1996);Verdine, Nature 384:11-13(1996);Hogan, Nature 384:17-9(1996)),以不仅分离与 CSTF2 蛋白结合的蛋白质,而且分离与 CSTF2 蛋白结合的物质(包括激动剂和拮抗剂)的方法,是本领域技术人员众所周知的。

[0553] 除了 CSTF2 多肽之外,该多肽的片段也可用于本发明的筛选,只要其保留天然存在 CSTF2 多肽的至少一种生物学活性即可。

[0554] 所述多肽或其片段可进一步连接其他物质,只要该多肽及片段保留其至少一种生物学活性即可。可利用的物质包括:肽、脂质、糖和糖链、乙酰基、天然和合成聚合物等。可进行这些类型的修饰以赋予该多肽及片段别的功能或使其稳定。

[0555] 用于本发明方法的多肽或片段可作为天然存在的蛋白质通过常规纯化方法从自然界获得,或基于所选择的氨基酸序列通过化学合成获得。例如,可用于合成的常规肽合成法包括:

- [0556] 1) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966 ;
- [0557] 2) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976 ;
- [0558] 3) Peptide Synthesis(日语), Maruzen Co. , 1975 ;
- [0559] 4) Basics and Experiment of Peptide Synthesis(日语), Maruzen Co. , 1985 ;
- [0560] 5) Development of Pharmaceuticals(第二卷)(日语), Vol. 14(peptide synthesis), Hirokawa, 1991 ;
- [0561] 6) W099/67288 ; 和
- [0562] 7) Barany G. & Merrifield R. B. , Peptides Vol. 2, “Solid Phase Peptide Synthesis”, Academic Press, New York, 1980, 100-118.

[0563] 或者, 可通过用于产生多肽的任何已知的基因工程方法来获得该蛋白质(例如 Morrison J. , J Bacteriology 1977, 132 : 349-51 ; Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology(编辑 Wu et al.) 1983, 101 : 347-62)。例如, 首先制备以可表达形式(例如位于包含启动子的调节序列的下游) 包含编码目标蛋白质的多核苷酸的适合的载体, 然后转化入合适的宿主细胞, 接着培养宿主细胞以产生蛋白质。更具体的说, 通过将编码 CSTF2 多肽的基因插入用于表达外来基因的载体诸如 pSV2neo、pcDNA1、pcDNA3. 1、pCAGGS 或 pCD8, 在宿主(例如动物) 细胞等中表达该基因。启动子可用于表达。可使用任何常用的启动子, 包括例如 SV40 早期启动子 (Rigby in Williamson(编), Genetic Engineering, vol. 3. Academic Press, London, 1982, 83-141)、EF- α 启动子 (Kim et al. , Gene 1990, 91 : 217-23)、CAG 启动子 (Niwa et al. , Gene 1991, 108 : 193)、RSV LTR 启动子 (Cullen, Methods in Enzymology 1987, 152 : 684-704)、SR α 启动子 (Takebe et al. , Mol Cell Biol 1988, 8 : 466)、CMV 立即早期启动子 (Seed et al. , Proc Natl Acad Sci USA 1987, 84 : 3365-9)、SV40 晚期启动子 (Gheysen et al. , J Mol Appl Genet 1982, 1 : 385-94)、腺病毒晚期启动子 (Kaufman et al. , Mol Cell Biol 1989, 9 : 946)、HSV TK 启动子等。可根据任何方法将载体导入宿主细胞以表达 CSTF2 基因, 例如电穿孔法 (Chu et al. , Nucleic Acids Res 1987, 15 : 1311-26)、磷酸钙法 (Chen et al. , Mol Cell Biol 1987, 7 : 2745-52)、DEAE 右旋糖苷法 (Lopata et al. , Nucleic Acids Res 1984, 12 : 5707-17 ; Sussman et al. , Mol Cell Biol 1985, 4 : 1641-3)、脂转染法 (Derijard B, Cell 1994, 7 : 1025-37 ; Lamb et al. , Nature Genetics 1993, 5 : 22-30 ; Rabindran et al. , Science 1993, 259 : 230-4) 等。

[0564] 还可采用体外翻译系统在体外产生 CSTF2 蛋白。

[0565] 要与测试物质接触的 CSTF2 多肽可以是例如纯化的多肽、可溶性蛋白质或与其他多肽融合的融合蛋白。

[0566] 在本发明中, 揭示了阻抑 CSTF2 基因表达降低细胞生长。因此, 通过筛选结合 CSTF2 多肽的候选物质, 可鉴定出可用于治疗或预防癌症的候选物质。这些候选物质或药剂可通过二次和 / 或更进一步筛选来评估治疗或预防癌症的潜力以鉴定用于癌症的治疗性物质。

[0567] 阻抑 CSTF2 生物学活性的物质的筛选

[0568] 本发明提供了筛选可阻抑癌细胞增殖的物质的方法, 以及筛选用于治疗或预防癌症, 包括肺癌的物质的方法。因此, 本发明提供了使用由 CSTF2 基因编码的多肽来筛选治疗或预防癌症或抑制癌细胞生长的物质的方法, 其包括下列步骤:

[0569] (a) 将测试物质与 CSTF2 多肽接触；
[0570] (b) 检测步骤 (a) 所述多肽的生物学活性；并
[0571] (c) 选择较之测试物质不存在时 CSTF2 多肽的生物学活性，阻抑该多肽的生物学活性的测试物质。

[0572] 在另一个实施方案中，本发明亦提供了使用由 CSTF2 基因编码的多肽筛选用于治疗或预防癌症或者用于抑制癌细胞生长的物质的方法，其包括以下步骤：

[0573] (a) 将测试物质与 CSTF2 多肽接触；并
[0574] (b) 检测步骤 (a) 的所述多肽的生物学活性；并
[0575] (c) 将 (b) 的生物学活性与所述测试物质的治疗效果关联起来。

[0576] 或者，在一些实施方案中，本发明提供一种用于评估或评价测试物质治疗或预防癌症或抑制与 CSTF2 过表达有关的癌症的治疗效果的方法，该方法包括以下步骤：

[0577] (a) 将测试物质与由 CSTF2 基因的多核苷酸编码的多肽接触；
[0578] (b) 检测步骤 (a) 所述多肽的生物学活性；并
[0579] (c) 将潜在治疗效果与测试物质关联起来，其中当较之测试物质不存在下检测到的由 CSTF2 基因的多核苷酸编码的多肽的生物学活性，该物质阻抑所述多肽的生物学活性时显示潜在治疗效果。

[0580] 在本发明中，可以将治疗效果与 CSTF2 多肽的生物学活性关联起来。例如，当与某种物质不存在下检测到的水平相比该测试物质阻抑或抑制 CSTF2 多肽的生物学活性时，可将所述测试物质鉴定或选择为具有治疗效果的候选物质。或者，当与某种测试物质不存在下检测到的水平相比该测试药剂或化合物不阻抑或抑制 CSTF2 多肽的生物学活性时，可将所述测试物质鉴定为没有显著治疗效果的物质。

[0581] 本发明所述方法将在下面更加详细的加以描述。

[0582] 任何 CSTF2 多肽均可用于筛选，只要它们包含 CSTF2 蛋白的生物学活性即可。这样的生物学活性包括 CSTF2 蛋白的细胞增殖活性、RNA 结合活性、mRNA 切割活性和 mRNA 聚腺苷酸化活性。举例而言，可使用 CSTF2 蛋白，亦可使用与 CSTF2 蛋白功能上等价的肽。上述多肽可由细胞内源或外源地表达。

[0583] 通过本筛选分离的物质是 CSTF2 基因编码的多肽的拮抗剂的候选者。术语“拮抗剂”是指通过结合多肽而抑制多肽功能的分子。该术语还指可降低或抑制编码 CSTF2 的基因的表达的分子。而且，通过本筛选分离的物质是如下物质的候选物，所述物质抑制 CSTF2 多肽与分子（包括 DNA、RNA 和蛋白）的体内相互作用。

[0584] 当本方法中要检测的生物学活性是细胞增殖时，可以通过例如如下方法进行测定：制备表达 CSTF2 多肽的细胞，在测试物质的存在下培养细胞，确定细胞增殖速度，测量细胞周期等，以及通过测量存活细胞或集落形成能力，例如图 3 或 4 所示。选择降低表达 CSTF2 的细胞的增殖速度的物质作为治疗或预防癌症，包括肺癌的候选物质。

[0585] 在本发明中，揭示了阻抑 CSTF2 基因表达降低细胞生长。如此，通过筛选降低 CSTF2 多肽生物学活性的候选物质，可鉴定出可用于治疗或预防癌症的候选物质。这些候选物质治疗或预防癌症的潜力可通过二次和 / 或更进一步筛选来评估以鉴定用于癌症的治疗性物质。

[0586] 更具体而言，该方法包括以下步骤：

[0587] (a) 使测试物质与过表达 CSTF2 基因的细胞接触；
[0588] (b) 测量细胞增殖活性；并
[0589] (c) 选择与测试物质不存在下的细胞增殖活性相比降低细胞增殖活性的测试物质。

[0590] 在优选的实施方案中，本发明的方法可进一步包括以下步骤：

[0591] (d) 选择对很少或不表达 CSTF2 的细胞没有影响的测试物质。

[0592] “阻抑生物学活性”在此定义为较之不存在所述物质时，对 CSTF2 生物学活性的优选至少 10% 的阻抑，更优选至少 25%、50% 或 75% 的阻抑，最优选至少 90% 的阻抑。

[0593] 在优选的实施方案中，使用不表达 CSTF2 多肽的对照细胞。因而，本发明还提供了使用 CSTF2 多肽或其片段来筛选用于抑制细胞生长的候选物质或用于治疗或预防 CSTF2 相关疾病的候选物质的方法，包括下列步骤：

[0594] (a) 在测试物质存在下培养表达 CSTF2 多肽或其功能性片段的细胞和不表达 CSTF2 多肽或其功能性片段的对照细胞；

[0595] (b) 检测表达所述蛋白的细胞和对照细胞的生物学活性；并

[0596] (c) 选择与对照细胞中及所述测试物质不存在下检出的增殖相比抑制表达所述蛋白的细胞中的生物学活性的测试物质。

[0597] 在一些实施方案中，可使用 RNA 结合活性、mRNA 切割活性或 mRNA 聚腺苷酸化活性作为要在本发明的筛选方法中检测的 CSTF2 多肽生物学活性。用于检测这些活性的方法是本领域公知的。当在筛选中检测这些活性中的任一种时，可优选使用含有 CSTF2 多肽之 RNA 识别基序的多肽作为 CSTF2 多肽的功能等同物。例如，具有氨基酸序列 SEQ ID NO :2 的 CSTF2 多肽的 RNA 识别基序是由 SEQ ID NO :2 的氨基酸 17 至 90 组成的区域。

[0598] 改变 CSTF2 表达的物质的筛选

[0599] 本发明提供了筛选抑制 CSTF2 基因表达的物质的方法。抑制 CSTF2 基因表达的物质可望能够阻抑肺癌细胞增殖，并因此对治疗或预防肺癌有用。因此，本发明亦提供了筛选阻抑肺癌细胞增殖的候选物质的方法，以及筛选治疗或预防肺癌的候选物质的方法。在本发明的背景中，上述筛选可包括，例如，下列步骤：

[0600] (a) 将测试物质与表达 CSTF2 基因的细胞接触；

[0601] (b) 检测 CSTF2 基因的表达水平；并

[0602] (c) 选择与在测试物质不存在时检测到的表达水平相比降低 CSTF2 基因表达水平的测试物质。

[0603] 在另一个实施方案中，本发明亦提供了筛选阻抑癌细胞增殖的候选物质的方法和筛选用于治疗或预防 CSTF2 相关疾病的候选物质的方法。

[0604] 在本发明的背景中，此类筛选可包括例如以下步骤：

[0605] (a) 使测试物质与表达 CSTF2 基因的细胞接触；

[0606] (b) 检测 CSTF2 基因表达水平；并

[0607] (c) 将 (b) 的表达水平与所述测试物质的治疗效果关联起来。

[0608] 或者，在一些实施方案中，本发明还提供一种用于评估或评价测试物质治疗或预防癌症或抑制与 CSTF2 过表达有关的癌症的治疗效果的方法，该方法包括以下步骤：

[0609] (a) 使测试物质与表达 CSTF2 的细胞接触；

[0610] (b) 将潜在治疗效果与测试物质关联起来,其中当测试物质与对照相比降低 CSTF2 的表达水平时显示潜在治疗效果。

[0611] 在本发明中,治疗效果可以与 CSTF2 基因表达水平关联起来。例如,当与某种测试物质不存在下检测到的水平相比该测试物质降低 CSTF2 基因的表达水平时,可将所述测试物质鉴定或选择为具有治疗效果的候选物质。或者,当与某种测试物质不存在下检测到的水平相比该测试物质不降低 CSTF2 基因表达水平时,可将所述测试物质鉴定为没有显著治疗效果的物质。

[0612] 下面将更加详细地描述本发明的方法。

[0613] 表达 CSTF2 基因的细胞包括,例如,自肺癌建立的细胞系;这样的细胞可用于上述本发明的筛选(例如 A427, A549, LC319, PC14, PC3, PC9, NCI-H1373, NCI-H1781, NCI-H358, NCI-H226, NCI-H520, NCI-H1703, NCI-H2170, EBC-1, RERF-LC-AI, LX1, DMS114, DMS273, SBC-3, SBC-5, NCI-H196, NCI-H446, SK-MES-1, LU61)。可用本领域技术人员众所周知的方法,例如,RT-PCR、Northern 印迹分析、Western 印迹分析、免疫染色与流式细胞分析来估计表达水平。在此定义的“降低表达水平”优选为较之在所述物质不存在时的表达水平,至少使 CSTF2 基因表达水平降低至少 10%,更优选降低至少 25%、50%或 75%,最优选降低 95%的水平。本文中的物质包括化学物质、双链核苷酸等等。在前面描述了双链核苷酸的制备。在筛选方法中,可选择降低 CSTF2 基因表达水平的物质作为用来治疗或预防肺癌的候选物质。

[0614] 在本发明中,揭示了阻抑 CSTF2 基因表达降低细胞生长。因此,通过筛选降低 CSTF2 基因表达水平的物质,可鉴定出可用于治疗或预防癌症的候选物质。这些候选物质可通过二次和/或更进一步筛选来评估治疗或预防癌症的潜力以鉴定用于癌症的治疗性物质。

[0615] 或者,本发明的所述筛选方法可包括下列步骤:

[0616] (a) 将测试物质与导入了包含 CSTF2 基因转录调控区域与在该转录调控区域控制下表达的报告基因的载体的细胞接触;

[0617] (b) 测量报告基因的表达水平或活性;并

[0618] (c) 选择降低报告基因表达水平或活性的测试物质。

[0619] 在另一个实施方案中,本发明亦提供了筛选用于阻抑癌细胞增殖的候选物质的方法和筛选用于治疗或预防 CSTF2 相关疾病的候选物质的方法。

[0620] 依照另一个方面,本发明提供了一种方法,其包括以下步骤:

[0621] (a) 使测试物质与其中导入了载体的细胞接触,该载体包含 CSTF2 基因的转录调节区和在该转录调节区控制下表达的报告基因;

[0622] (b) 检测所述报告基因的表达或活性;并

[0623] (c) 将(b)的表达水平与测试物质的治疗效果关联起来。

[0624] 或者,在一些实施方案中,本发明还提供一种用于评估或评价测试物质治疗或预防癌症或抑制与 CSTF2 过表达有关的癌症的治疗效果的方法,该方法包括以下步骤:

[0625] a) 使测试物质与其中导入了载体的细胞接触,该载体包含 CSTF2 基因的转录调节区和在该转录调节区控制下表达的报告基因

[0626] b) 测量所述报告基因的表达或活性;并

[0627] c) 将潜在治疗效果与测试物质关联起来,其中当测试物质降低所述报道基因的表达或活性时显示潜在治疗效果。

[0628] 在本发明中,治疗效果可以与所述报道基因的表达水平或活性关联起来。例如,当与某种测试物质不存在时检测到的水平相比该物质降低所述报道基因的表达水平或活性时,可将所述测试物质鉴定或选择为具有治疗效果的候选物质。或者,当与某种测试物质不存在时检测到的水平相比该物质不降低所述报道基因的表达水平或活性时,可将所述测试物质鉴定为没有显著治疗效果的物质。

[0629] 合适的报道基因和宿主细胞在本领域是众所周知的。举例而言,报道基因为萤光素酶、绿色荧光蛋白 (GFP)、香菇珊瑚 (*Discosoma* sp.) 红色荧光蛋白 (DsRed)、氯霉素乙酰基转移酶 (CAT)、Laz 与 β -葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS),而宿主细胞为 COS7、HEK293、HeLa 等。所述筛选所需的报道构建体可通过将报道基因序列与 CSTF2 基因转录调控区域连接来制备。本文所述的 CSTF2 转录调控区域是从起始密码子至至少 500bp 上游的区域,优选 1,000bp,更优选 5000 或 10,000bp 上游。含有所述转录调控区域的核苷酸片段可从基因组文库中分离出来,或可通过 PCR 扩增。所述筛选所需的报道构建体可通过将报道基因序列与这些基因中任一的转录调控区域连接来制备。鉴别转录调控区域的方法,以及其测定法规程都是众所周知的 (Molecular Cloning, 第三版,第 17 章,2001, Cold Springs Harbor Laboratory Press)。

[0630] 用含有报道构建体的载体感染宿主细胞,并用本领域众所周知的方法检测报道基因的表达或活性 (例如,使用照度计 (luminometer)、吸收光谱仪、流式细胞仪等等)。在此定义的“降低表达或活性”为较之在所述物质不存在时,报道基因的表达或活性优选地被降低至少 10%,更优选地,降低 25%、50% 或 75%,最优选地,降低至少 95%。

[0631] 在本发明中,揭示了阻抑 CSTF2 基因表达降低细胞生长。因此,通过筛选降低报道基因表达或活性的候选物质,可鉴定出有潜力治疗或预防癌症的候选物质。这些候选物质可通过二次和 / 或更进一步筛选来评估治疗或预防癌症的潜力以鉴定用于癌症的治疗性物质。

[0632] 本发明的各方面在下述实施例中加以描述,它们并无意对权利要求中描述的本发明范围进行限定。

[0633] 除非另行定义,在此使用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域一般技术人员通常理解的意义相同。下面描述了合适的方法和材料,虽然与在此描述的相似或等同的方法和材料亦可用于实践或测试本发明。

[0634] 本发明将于下列实施例中进一步加以描述,其并不对权利要求中描述的本发明范围进行限定。

实施例

[0635] 材料和方法

[0636] 细胞系和组织样品。

[0637] 此项研究中使用的 15 种人肺癌细胞系包括 5 种腺癌 (NCI-H1781、NCI-H1373、LC319、A549、和 PC-14)、5 种鳞状细胞癌 (SK-MES-1、NCI-H520、NCI-H1703、NCI-H2170、和 LU61)、1 种大细胞癌 (LX1)、和 4 种小细胞肺癌 (SBC-3、SBC-5、DMS114、和 DMS273)。

所有细胞在补充有 10% FCS 的适宜培养基中以单层培养并在含 5% CO₂ 的增湿空气中于 37℃ 维持。用作正常对照的人小气道上皮细胞 (SAEC) 在经过优化的培养基 (Cambrex Bioscience, Inc) 中培养。早前在知情同意下, 从在肿瘤切除之前未经过抗癌治疗的患者获得原发性 NSCLC 组织样品及其临近切除边缘的对应正常组织 (Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, et al. *Oncogene* 2003 ;22 :2192-205, Taniwaki M, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Int J Oncol* 2006 ;29 :567-75, Kato T, Daigo Y, Hayama S, et al. *Cancer Res* 2005 ; 65 :5638-46)。对所有肿瘤基于国际癌症联合会的病理性肿瘤 - 淋巴结 - 转移分类 (表 1; Sobin L, Wittekind CH. *TNM classification of malignant tumors*. 6th ed. New York: Wiley-Liss ;2002) 来分期。用于组织微阵列上免疫染色的福尔马林固定的原发性肺肿瘤和临近正常肺组织样品是从在 Saitama 癌症中心接受手术的 327 名患者 (196 例腺癌、98 例鳞状细胞癌、23 例大细胞癌、和 10 例腺鳞状癌 ;99 名女性和 228 名男性患者 ;年龄中值 64.7 岁, 范围 29-85 岁) 获得的。这些接受其原发性癌症切除的患者没有接受任何术前治疗, 而且他们中只有具有阳性淋巴结转移的患者在其手术后接受了基于铂的辅助化疗治疗。此项研究和所有所述临床材料的使用均得到了各个科研伦理委员会批准。

[0638] [表 1]

[0639] NSCLC 组织中的 CSTF2 阳性与患者的特征之间的关联 (n = 327)

[0640]

	总数	CSTF2 强阳性	CSTF2 弱阳性	无 CSTF2	P 值 强对弱/无
	n=327	n=77	n=165	n=85	
性别					
男性	228	56	120	53	0.7775
女性	99	22	45	32	
年龄 (岁)					
	150	33	77	40	0.6016
	177	44	88	45	
组织学					
ADC	196	46	97	54	0.7910
非 ADC	131	32	68	31	
吸烟					
吸烟者	234	51	124	59	0.2487
不吸烟者	93	26	41	26	
pT 因子					
T1	135	26	68	41	0.1458
T2+T3	192	51	97	44	
pN 因子					
N0	208	46	107	56	0.2824
N1+N2	119	32	58	29	

[0641] ADC, 腺癌

[0642] 非 ADC, 鳞状细胞癌加大细胞癌及腺鳞状细胞癌

[0643] *P < 0.05 (Fisher 氏确切检验)

[0644] 半定量逆转录 -PCR。

[0645] 使用随机引物 (Roche Diagnostics) 和 Superscript II (Invitrogen) 将来自每份样品的总共 3 微克 mRNA 等份试样逆转录成单链 cDNA。半定量逆转录 -PCR (RT-PCR) 实验用下述各组对人 CSTF2 (基因登录号 NM_001325) 特异性的合成引物或用作为内部对照的 β -肌动蛋白 (ACTB) 特异性引物进行: CSTF2, 5' -GTCATGCAGGGAACAGGAAT-3' (SEQ ID NO :3) 和 5' -TGAGTCATTCAAGGGTTAGGATG-3' (SEQ ID NO :4); ACTB,

5'-GAGGTGATAGCATTGCTTTCG-3' (SEQ ID NO :5) 和 5'-CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3' (SEQ ID NO :6)。优化 PCR 反应的循环数以确保产物强度在扩增的线性期内。

[0646] Northern 印迹分析。

[0647] 将涵盖 23 种组织的人多组织印迹 (BD Bioscience) 与 CSTF2 的 32P 标记的 521-bp PCR 产物 (其使用引物 5'-CGAGGCTTGTTAGGAGATGC-3' (SEQ ID NO :7) 和 5'-CCCCATGTTAAGGACTG-3' (SEQ ID NO :8) 制备成探针) 杂交。预杂交、杂交、和清洗遵循制造商的推荐进行。将印迹于 -80°C 用增强屏放射自显影 14 天。

[0648] Western 印迹。

[0649] 将肿瘤细胞在裂解缓冲液中裂解; 50mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150mmol/L NaCl, 0.5% NP40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 和蛋白酶抑制剂混合物组 III (Calbiochem)。通过 Bio-Rad 蛋白质测定试剂盒来测定每份裂解物的蛋白质含量, 以牛血清白蛋白作为标准品。每份裂解物取 10 微克在 7.5% 至 12% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (带 3% 聚丙烯酰胺积层凝胶) 上解析并电泳转移到硝酸纤维素膜 (GE Healthcare Biosciences) 上。用 TBST (含 Tween 20 的 Tris 缓冲盐水) 中的 5% 无脂奶粉封闭后, 将膜与家兔多克隆抗体一起于室温温育 1 小时。商品化家兔多克隆抗 CSTF2 抗体购自 ATLAS 公司, 而且通过使用肺癌细胞系的裂解物的 Western 印迹分析, 探查为对人 CSTF2 特异性的。免疫反应性蛋白质与缀合有辣根过氧化物酶的二抗 (GE Healthcare Bio-sciences) 一起于室温温育 1 小时。用 TBST 清洗后, 反应物使用增强型化学发光试剂盒 (GE Healthcare Bio-sciences) 显色。

[0650] 免疫荧光分析。

[0651] 培养的细胞用 PBS(-) 清洗两次, 在 4% 甲醛溶液中于 4°C 固定 60 分钟, 并通过用含有 0.1% Triton X-100 的 PBS(-) 处理 5 分钟使得可透。细胞用 CASBlock (Zymed) 覆盖 10 分钟以封闭非特异性结合, 之后进行一抗反应。然后, 将细胞与针对人 CSTF2 的抗体或带 c-myc 标签的蛋白质一起温育。

[0652] 免疫组织化学和组织微阵列。

[0653] 为了在福尔马林固定的且石蜡块中包埋的临床肺癌样品中调查 CSTF2 蛋白的临床病理学意义, 对切片使用 Envision+ 试剂盒 / 辣根过氧化物酶 (DakoCytomation) 以下述方式染色。为了抗原修复, 将载玻片在靶物修复溶液 pH 9 (DakoCytomation) 中浸泡并在高压灭菌锅中于 108°C 煮沸 15 分钟。封闭内源过氧化物酶和蛋白质之后, 每张载玻片添加家兔多克隆抗人 CSTF2 抗体 (0.06 微克 /ml ; ATLAS), 并将切片与作为二抗的辣根过氧化物酶标记的抗家兔 IgG [Histofine Simple Stain MAX PO(G), Nichirei] 一起温育。添加底物 - 色原体, 并将标本用苏木精复染色。

[0654] 用 327 份福尔马林固定的原发性 NSCLC 构建肿瘤组织微阵列; 这些原发性 NSCLC 由单一机构 (请见上文) 按照相同的切除后收集、固定、和保存组织的规程获取 (Chin S F, Daigo Y, Huang HE, et al. Mol Pathol 2003 ;56 :275-9, Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, et al. Diagn Mol Pathol 2003 ;12 :27-34, Callagy G, Pharoah P, Chin SF, et al. J Pathol 2005 ;205 :388-96)。考虑到各个肿瘤的组织学异质性, 基于与载玻片上对应 H&E 染色切片的目测比选来采样组织区域。用组织微阵列仪 (Beecher Instruments) 将取自一个供体肿瘤块的 3 个、4 个、或 5 个组织核心 (直径, 0.6mm ; 深度, 3-4mm) 放置入受体石蜡块中。自每个病例冲孔取 1 个正常组织核心, 并将所得微阵列块的 5 微米切片用于免疫

组织化学分析。由 3 名独立的调查人员在事先不知道临床病理学数据的条件下半定量地评估 CSTF2 阳性。因为每个肿瘤组织核心内的染色强度大多是均匀的,所以使用下述标准半定量评估 CSTF2 染色强度:强阳性(得分 2+),在 > 50% 的肿瘤细胞中深褐色染色,使得细胞核和细胞质完全模糊;弱阳性(1+),肿瘤细胞核和细胞质中可察觉任何较低程度的褐色染色;无(得分 0),肿瘤细胞中没有可察觉的染色。只有在调查人员独立地将它们定义为强阳性的情况下,才接受病例为强阳性。

[0655] 统计分析。

[0656] 统计分析使用 StatView 统计程序(SaS)进行。使用 Fisher 确切检验评估强 CSTF2 免疫反应性与临床病理学变量诸如年龄、性别、病理性肿瘤-淋巴结-转移阶段、和组织学类型的关联。计算自手术之日起至 NSCLC 相关死亡时或至最后一次随访观察时止的数据肿瘤特异性存活曲线。为每个有关变量和为 CSTF2 表达计算 Kaplan-Meier 曲线;使用时序检验分析患者亚组间存活时间的差异。用 Cox 比例风险回归模型进行单变量和多变量分析以确定临床病理变量和癌症相关死亡之间的关联。首先,分析死亡和可能的预后因素包括年龄、性别、组织学、pT 分类、和 pN 分类之间的关联,一次考虑一个因素。其次,以反向(逐步)程序应用多变量分析,其总是迫使强 CSTF2 表达以及任何满足进入水平 $P < 0.05$ 的变量一起进入模型。随着该模型继续添加因素,独立因素没有超过退出水平 $P < 0.05$ 。

[0657] RNA 干扰测定法。

[0658] 为了评价 CSTF2 在肺和食管癌细胞中的生物学功能,使用针对靶基因的小干扰 RNA(siRNA)双链体(SIGMA)。用于 RNA 干扰的合成寡核苷酸的靶序列如下:si-CSTF2-#1,5'-GGCUUUAGUCCCGGGCAGA-3'(SEQ ID NO:9);si-CSTF2-#2,5'-CACUUUACUUUCUGUAACU-3'(SEQ ID NO:10),对照 1:(EGFP,增强型绿色荧光蛋白[GFP]基因,维多利亚水母(Aequorea victoria)GFP 的一种突变体),5'-GAAGCAGCACGACUUCUUC-3'(SEQ ID NO:11);对照 2(LUC,来自萤火虫(Photinus pyralis)的萤光素酶基因),5'-CGUACGCGAAUACUUCGA-3'(SEQ ID NO:12)。将肺癌细胞系 A549 和 LC319 涂布到 10-cm 盘上(每个盘 8.0×10^5),并使用 30 微升 Lipofectamine2000(Invitrogen)依照制造商的指令用每种 siRNA 寡核苷酸(100nmol/L)转染。温育 7 天后,通过 Giemsa 溶液染色这些细胞以评估集落形成,并通过溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑(MTT)测定法评估细胞存活力。

[0659] 结果

[0660] 肺癌和正常组织中 CSTF2 的表达。

[0661] 为了鉴定用于开发肺癌的治疗剂和/或生物标志物的新颖靶分子,首先,对 101 份肺癌使用由 27,648 种基因或 EST 组成的 cDNA 微阵列进行了基因组范围基因表达谱分析(Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, et al. Oncogene 2003;22:2192-205, Kakiuchi S, Daigo Y, Tsunoda T, Yano S, Sone S, Nakamura Y. Mol Cancer Res 2003;1:485-99, Kakiuchi S, Daigo Y, Ishikawa N, et al. Hum Mol Genet 2004;13:3029-43, Kikuchi T, Daigo Y, Ishikawa N, et al. Int J Oncol 2006;28:799-805, Taniwaki M, Daigo Y, Ishikawa N, et al. Int J Oncol 2006;29:567-75)。鉴定出 CSTF2 转录物在大多数检查的肺癌样品中过表达(3 倍或更高),而 CSTF2 所有 29 种正常组织中很少表达(除睾丸外)。结果,认为 CSTF2 是新分子靶的较好候选基因。通过半定量 RT-PCR 实验确认了 CSTF2 在所检查的 12/15 个

肺癌组织中和 15/15 个肺癌细胞系中过表达 (图 1A)。另外,通过使用抗 CSTF2 抗体进行 Western 印迹分析确认了 9 个肺癌细胞系中 CSTF2 蛋白的表达 (图 1B)。为了确定肺癌细胞中内源 CSTF2 的亚细胞定位,使用抗 CSTF2 抗体进行了免疫荧光分析,发现了它在 SBC5 细胞的细胞核中的染色 (图 1C)。

[0662] 用 CSTF2cDNA 作为探针进行 Northern 印迹分析,在所检查的 16 种正常人组织中仅在睾丸中鉴定出 2.6-kb 转录物 (图 2A)。另外,使用抗 CSTF2 抗体检查了 5 种正常组织 (心、肺、肝、肾、和睾丸) 以及肺癌中的 CSTF2 蛋白表达。发现在睾丸细胞的细胞核中观察到 CSTF2 阳性染色,但是在其它正常组织中没有观察到 (图 2B)。

[0663] CSTF2 过表达与 NSCLC 患者的不良预后的关联。

[0664] 为了验证 CSTF2 在肺癌发生中的生物学和临床病理学意义,在含有来自 327 名接受治愈性手术切除的患者的原发性 NSCLC 组织的组织微阵列上进行了免疫组织化学染色。在肺癌细胞的细胞核中观察到抗 CSTF2 多克隆抗体的 CSTF2 阳性染色,但是在任何其邻近正常肺细胞或围绕肿瘤细胞的基质细胞中染色是阴性的。将组织阵列上的 CSTF2 表达水平分类,范围从无 (得分 0) 至弱 / 强阳性 (得分 1+ 至 2+) (图 2C)。在 327 例 NSCLC 中,CSTF2 在 77 例中强染色 (24%;得分 2+),在 165 例中弱染色 (50%;得分 1+),而在 85 例中无染色 (26%;得分 0;详情显示于表 1)。接着,检查了 CSTF2 表达水平 (强阳性对弱阳性 / 无) 与各种临床病理变量的关联,而且发现了强 CSTF2 表达与原发性肿瘤切除后 NSCLC 患者的不良预后有关 ($P = 0.0079$, 时序检验;图 2D),但是与任何其它临床病理变量无关。另外,检查了单变量分析以评价患者预后和数个临床病理因素 (包括年龄 (≥ 65 对 < 65 岁)、性别 (男性对女性)、组织学 (非腺癌对腺癌)、吸烟史 (吸烟者对不吸烟者)、pT 阶段 (肿瘤大小;T2-T3 对 T1)、pN 阶段 (淋巴结转移;N1-N2 对 N0)、和 CSTF2 表达 (得分 2+ 对 0、1+) 之间的关联。所有这些参数除吸烟史外均与不良预后显著相关 (表 2)。使用 Cox 比例风险模型进行的多变量分析指示 pT 阶段、pN 阶段、年龄、和强 CSTF2 阳性是 NSCLC 的独立预后因素 (表 2)。

[0665] [表 2]

[0666] NSCLC 患者中预后因素的 Cox 氏比例风险模型分析

[0667]

		风险比	95% CI	不利 / 有利	P 值
单变量分析					
	CSTF2	1.617	1.130-2.314	强 (+) / 弱 (+) 或 (-)	0.0085*
	年龄 (岁)	1.672	1.188-2.353	$\geq 65 / 65 >$	0.0032*
	性别	1.512	1.037-2.206	男 / 女	0.0317*
	组织学	1.434	1.033-1.989	非 ADC / ADC	0.0311*
	pT 因子	2.176	1.505-3.146	T2+T3+T4 / T1	$<0.0001^*$
	pN 因子	1.965	1.416-2.728	N1+N2 / N0	$<0.0001^*$
	吸烟	1.252	0.858-1.826	吸烟者 / 不吸烟者	0.2437
多变量分析					
	标志物	1.548	0.951-1.875	强 (+) / 弱 (+) 或 (-)	0.0177*
	年龄 (岁)	1.770	1.385-2.519	$\geq 65 / 65 >$	0.0006
	性别	1.346	0.839-1.939	男 / 女	0.2301
	组织学	0.959	0.775-1.463	非 ADC/ADC	0.9607
	pT 因子	1.877	1.697-3.068	T2+T3+T4 / T1	0.0085*
	pN 因子	2.244	1.697-3.068	N1+N2 / N0	$<0.0001^*$

[0668] ADC, 腺癌

[0669] 非 ADC, 鳞状细胞癌加大细胞癌及腺鳞状细胞癌

[0670] 针对 CSTF2 的 siRNA 对肺癌细胞生长的抑制。

[0671] 为了评估 CSTF2 的上调是否在肺癌细胞的生长或存活中发挥作用, 将针对 CSTF2 的 siRNA (si-CSTF2-#1 和 si-CSTF2-#2) 连同对照 siRNA (si-LUC 和 si-EGFP) 的合成寡核苷酸转染入内源过表达 CSTF2 的 A549 和 LC319 细胞中。用 si-CSTF2-#1 和 si-CSTF2-#2 转染的细胞中 CSTF2 的 mRNA 水平与用任一对照 siRNA 转染的细胞相比显著降低 (图 3A)。通过 MTT 测定法和集落形成测定法调查的细胞存活力和集落数在用 si-CSTF2-#1 和 si-CSTF2-#2 转染的细胞中显著降低 (图 3B 和 3C)。

[0672] CSTF2 对哺乳动物细胞增殖的激活。

[0673] 为了检查 CSTF2 在肿瘤发生中的潜在作用, 构建了设计成表达 CSTF2 的质粒 (pcDNA3.1/myc-His-CSTF2) 并转染入 COS-7 细胞中。通过 Western 印迹分析确认了外源 CSTF2 表达 (图 4A)。进行了 MTT 和集落形成测定法, 发现了用 CSTF2 转染的 COS-7 细胞的生长与用模拟载体转染的 COS-7 细胞相比得到显著增强 (图 4B 和 4C)。

[0674] 讨论

[0675] 为了开发预期对恶性细胞高度特异性的、不良反应风险最低的分子靶向抗癌药物, 建立了一种有力的靶物筛选系统来鉴定在肺癌细胞中特异性激活的蛋白质及其相互作用蛋白。首先, 通过含有 27,648 种基因的基因组范围 cDNA 微阵列系统, 偶联激光显微解剖, 对 101 份肺癌样品分析了基因组范围表达谱。在通过 cDNA 微阵列分析和多组织 Northern 印迹分析验证了此类基因在正常器官中表达很低或无表达之后, 在组织微阵列上对数以百计的临床样品分析候选靶的蛋白质表达, 然后使用 RNA 干扰系统来调查功能丧失表型, 并进一步确定了该蛋白质的生物学功能。通过这些分析, 鉴定了用于开发新的诊断性生物标志物、治疗性药物、和 / 或免疫疗法的候选基因, 它们在癌细胞中上调但在除睾丸、胎盘、和 / 或胎儿组织外的正常器官中不表达 (Daigo Y, Nakamura Y. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2008 ;56 :43-53, Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, et al. *Oncogene* 2003 ;22 :2192-205, Kakiuchi S, Daigo Y, Tsunoda T, Yano S, Sone S, Nakamura Y. *Mol Cancer Res* 2003 ;1 :485-99, Kakiuchi S, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Hum Mol Genet* 2004 ;13 :3029-43, Kikuchi T, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Int J Oncol* 2006 ;28 :799-805, Taniwaki M, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Int J Oncol* 2006 ;29 :567-75, Suzuki C, Daigo Y, Kikuchi T, Katagiri T, Nakamura Y. *Cancer Res* 2003 ;63 :7038-41, Ishikawa N, Daigo Y, Yasui W, et al. *Clin Cancer Res* 2004 ;10 :8363-70, Kato T, Daigo Y, Hayama S, et al. *Cancer Res* 2005 ;65 :5638-46, Furukawa C, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Cancer Res* 2005 ;65 :7102-10, Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, et al. *Cancer Res* 2005 ;65 :9176-84, Suzuki C, Daigo Y, Ishikawa N, et al. *Cancer Res* 2005 ;65 :11314-25, Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, et al. *Cancer Sci* 2006 ;97 :737-45, Takahashi K, Furukawa C, Takano A, et al. *Cancer Res* 2006 ;66 :9408-19, Hayama S, Daigo Y, Kato T, et al. *Cancer Res* 2006 ;66 :10339-48, Kato T, Hayama S, Yamabuki Y, et al. *Clin Cancer Res* 2007 ;13 :434-42, Suzuki C, Takahashi K, Hayama S, et al. *Mol Cancer Ther* 2007 ;6 :542-51, Yamabuki T, Takano A, Hayama S, et al. *Cancer Res* 2007 ;67 :2517-25, Hayama S, Daigo Y, Yamabuki T, et al. *Cancer Res* 2007 ;67 :4113-22, Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N, et al. *Cancer*

Clin Cancer Res 2007 ;13 :6624-31, Ishikawa N, Takano A, Yasui W, et al. Cancer Res 2007 ;67 :11601-11, Mano Y, Takahashi, K, Ishikawa N, et al. Cancer Sci 2007 ;98 :1902-13, Kato T, Sato N, Hayama S, et al. Cancer Res 2007 ;67 :8544-53, Kato T, Sato N, Takano A, et al. Clin Cancer Res 2008 ;14 :2363-70, Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, et al. Cell 2009 ;137 :485-97, Hirata D, Yamabuki T, Ito T, et al. Clin Cancer Res 2009, 15 :256-66, Suda T, Tsunoda T, Daigo Y, Nakamura Y, Tahara H. Cancer Sci 2007 ;98 :1803-8, Mizukami Y, Kono K, Daigo Y, et al. Cancer Sci 2008 ;99 :1448-54)。

[0676] 如上所述, CSTF2(其编码切割刺激因子的一个成员)以较高的频率在肺癌中过表达,而且有可能在肺癌的生长中发挥重要作用。通过 siRNA 敲低 CSTF2 表达阻抑了肺癌细胞的生长。此外,通过我们的组织微阵列实验获得的临床病理学证据显示,具有 CSTF2 强阳性表达的 NSCLC 患者的癌症特异性存活期比具有 CSTF2 弱阳性/阴性表达的 NSCLC 患者短。通过体外和体内测定法获得的结果强烈提示, CSTF2 有可能是重要的生长因子,且与肺癌细胞更加恶性的表型有关。

[0677] 总之, CSTF2 基因可以在肺癌的生长/进展中发挥重要作用。对于可能具有不良预后的肺癌患者而言,切除标本中的 CSTF2 过表达可以是辅助疗法的有用指示。

[0678] 工业应用性

[0679] 本文中描述的使用基因组范围 cDNA 微阵列的癌症的基因表达分析鉴定出特定基因作为癌症预防和治疗的靶。基于差异表达基因——CSTF2 的表达,本发明提供用于鉴定和检测癌症,特别是肺癌的分子诊断标志物。

[0680] 本文中提供的数据增加对癌症的综合理解,便于开发新颖诊断策略,并为鉴定治疗药和预防剂的分子靶提供线索。此类信息有助于更加深刻地理解肿瘤发生,并为开发用于诊断、治疗、和最终预防癌症的新策略提供指示。

[0681] 如本文中证明的,细胞生长受到特异性靶向 CSTF2 基因的双链分子的阻抑。因此,这些新双链分子可用作抗癌药物。

[0682] CSTF2 基因的表达在癌症,特别是肺癌中与正常器官相比显著升高。因而,此基因可方便地用作癌症,特别是肺癌的诊断标志物,而且由其编码的蛋白可用于癌症的诊断测定法。另外,发现了 CSTF2 基因的表达水平较高的癌症患者的预后趋于较差。因此, CSTF2 基因可用于评估癌症患者的预后。

[0683] 此外,本发明提供用于治疗癌症,包括肺癌的新治疗途径。CSTF2 基因是抗癌药物开发的有用靶标。

[0684] 通过提及完整收录本文中引用的所有专利、专利申请、和出版物。

[0685] 另外,虽然已经详细地且参照其具体实施方案描述本发明,要理解,前面的描述在性质上是例示性的和解释性的,而且意图例示本发明及其优选实施方案。通过常规实验,本领域技术人员会容易地认识到可以在其中进行各种改变和修改,不偏离本发明的精神和范围。如此,本发明意图不受上文描述限定,而是由所附权利要求及其等同方案限定。

[0001]

序列表

<110> 肿瘤疗法科学股份有限公司 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.)
 <120> 肺癌治疗和诊断的靶基因 CSTF2
 <130> ONC-A0917P
 <150> US 61/274,800
 <151> 2009-08-21
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 2027
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 1
 ggcttgtgct ccgtacggaa gigtgctttg ggcaccgga agccgactca acagagctat 60
 ggcgggtttg actgtgagag acccagcggg ggatcgttct ctacgttctg tgttcgtggg 120
 gaacattcct tatgaagcta ctgaagagca gttgaaggac atcttttctg aggttggacc 180
 tgttgttagt ttcagattgg tatac gatag agagacagga aagccaaagg gttatggctt 240
 ctgigaatac caagaccaag agacagcact tagtgccatg cggaacctga atgggcgca 300
 attcagtggg agagcacttc gagtggacaa tcttgccagt gaaaagaaca aagaagagct 360
 gaagagcctt ggcactggtg cccctgtcat tgagtacct tatggagaga ccatcagtcc 420
 tgaggatgcc cctgagtcga ttagcaaagc agttgccagc ctteccaccag agcagatggt 480
 tgagclgatg aaacaaatga agclctglgl ccagaalagl ccccaggagg cacggaacal 540
 gttacttcag aacctcaac tggcttatgc ttgtctgcaa gcacaggtag tgatgagaat 600
 tgtggatccg gaaattgccc tgaaaattct gcatcgccag acaataatcc caacgctgat 660
 tgcaggcaac cctcagccag tccatgggtc tgggctggc tcaggatcca atgtgtcaat 720
 gaaccagcag aatcctcagg cccctcagcc ccagtctttg ggtggaatgc atgtcaatgg 780
 cgcaccctct ctgatgcaag ctctctatgca ggggtggagtt ccagcaccag ggcaaatgcc 840
 agctgtctgtc acaggacctg gccctggttc cttagctcct ggaggaggaa tgcaggctca 900
 ggttggaaatg ccaggaaatg gaccagtgtc catggaacgg gggcaagtgc cgatgcaaga 960
 cccagagca gctatgcagc ggggatcctt gcctgcgaat gtcccaacc ctcaggcctt 1020
 gttaggagat gctccgaatg atccacgggg aggcacttta ctttctgtaa ctggagaggt 1080
 agagcctaga ggttacttgg gaccacctca tcagggtcca cccatgcacc atgtccctgg 1140
 ccatgagagc caggaccac cccacatga actgagggga gggccattac ccgagcccag 1200
 acctctaagt gcagaaccaa gaggacccat gctagatcag aggggtccac ccttggatgg 1260
 cagagggtga agggatcccc gaggaataga tgcacgaggg atggaggccc gagccatgga 1320
 ggcaagaggg ttatgatcca gaggattaga ggcccgtgca atggaggccc gtgcgatgga 1380
 agclctglca atggaggccc gagcgaatga ggcccglgca atggaaglcc gagggatgga 1440
 ggccagaggc atggatacca gaggcccagt gcctggcccc agaggacctc tacctagtgg 1500
 aatgcagggt cccagtccaa itaacaatgg ggcggttgtc ccccagggat ccagacaggt 1560
 cccagtcatg cagggaacag gaatgcaagg agcaagtata cagggtggaa gccagcctgg 1620
 cggctttagt cccggcaga accaagtcac tccacaggat catgagaagg ctgctttgat 1680
 tatgcagggt ctacaactga ctgcagacca gattgccatg ttgctctctg agcaaaggca 1740
 gagtatcctg attttaaagg aacaataca gaaatccact ggagcacctt gataggtttt 1800

[0002]

caaaaatacc tggcaagaaa tctggaatt ctataatttt gtgaaatat tgaaaaaaga 1860
 tgacctgcat cctaaccctt gaatgactca aatcagtgcc aggtggagga ctcccatcac 1920
 cttctctcag aacaaaatca cttcatttta ttgtcttagt ttgtatattt tctgigactt 1980
 gaaataaact ttgaacacaa ttttagtaca ctgcaaaaaa aaaaaaa 2027

<210> 2
 <211> 577
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Ala Gly Leu Thr Val Arg Asp Pro Ala Val Asp Arg Ser Leu Arg
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Val Gly Asn Ile Pro Tyr Glu Ala Thr Glu Glu Gln Leu
 20 25 30
 Lys Asp Ile Phe Ser Glu Val Gly Pro Val Val Ser Phe Arg Leu Val
 35 40 45
 Tyr Asp Arg Glu Thr Gly Lys Pro Lys Gly Tyr Gly Phe Cys Glu Tyr
 50 55 60
 Gln Asp Gln Glu Thr Ala Leu Ser Ala Met Arg Asn Leu Asn Gly Arg
 65 70 75 80
 Glu Phe Ser Gly Arg Ala Leu Arg Val Asp Asn Ala Ala Ser Glu Lys
 85 90 95
 Asn Lys Glu Glu Leu Lys Ser Leu Gly Thr Gly Ala Pro Val Ile Glu
 100 105 110
 Ser Pro Tyr Gly Glu Thr Ile Ser Pro Glu Asp Ala Pro Glu Ser Ile
 115 120 125
 Ser Lys Ala Val Ala Ser Leu Pro Pro Glu Gln Met Phe Glu Leu Met
 130 135 140
 Lys Gln Met Lys Leu Cys Val Gln Asn Ser Pro Gln Glu Ala Arg Asn
 145 150 155 160
 Met Leu Leu Gln Asn Pro Gln Leu Ala Tyr Ala Leu Leu Gln Ala Gln
 165 170 175
 Val Val Met Arg Ile Val Asp Pro Glu Ile Ala Leu Lys Ile Leu His
 180 185 190
 Arg Gln Thr Asn Ile Pro Thr Leu Ile Ala Gly Asn Pro Gln Pro Val
 195 200 205
 His Gly Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Asn Val Ser Met Asn Gln Gln
 210 215 220
 Asn Pro Gln Ala Pro Gln Ala Gln Ser Leu Gly Gly Met His Val Asn
 225 230 235 240
 Gly Ala Pro Pro Leu Met Gln Ala Ser Met Gln Gly Gly Val Pro Ala
 245 250 255

[0003]

Pro Gly Gln Met Pro Ala Ala Val Thr Gly Pro Gly Pro Gly Ser Leu
 260 265 270

Ala Pro Gly Gly Gly Met Gln Ala Gln Val Gly Met Pro Gly Ser Gly
 275 280 285

Pro Val Ser Met Glu Arg Gly Gln Val Pro Met Gln Asp Pro Arg Ala
 290 295 300

Ala Met Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ala Asn Val Pro Thr Pro Arg Gly
 305 310 315 320

Leu Leu Gly Asp Ala Pro Asn Asp Pro Arg Gly Gly Thr Leu Leu Ser
 325 330 335

Val Thr Gly Glu Val Glu Pro Arg Gly Tyr Leu Gly Pro Pro His Gln
 340 345 350

Gly Pro Pro Met His His Val Pro Gly His Glu Ser Arg Gly Pro Pro
 355 360 365

Pro His Glu Leu Arg Gly Gly Pro Leu Pro Glu Pro Arg Pro Leu Met
 370 375 380

Ala Glu Pro Arg Gly Pro Met Leu Asp Gln Arg Gly Pro Pro Leu Asp
 385 390 395 400

Gly Arg Gly Gly Arg Asp Pro Arg Gly Ile Asp Ala Arg Gly Met Glu
 405 410 415

Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Gly Leu Asp Ala Arg Gly Leu Glu Ala
 420 425 430

Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Ala Arg
 435 440 445

Ala Met Glu Ala Arg Ala Met Glu Val Arg Gly Met Glu Ala Arg Gly
 450 455 460

Met Asp Thr Arg Gly Pro Val Pro Gly Pro Arg Gly Pro Ile Pro Ser
 465 470 475 480

Gly Met Gln Gly Pro Ser Pro Ile Asn Met Gly Ala Val Val Pro Gln
 485 490 495

Gly Ser Arg Gln Val Pro Val Met Gln Gly Thr Gly Met Gln Gly Ala
 500 505 510

Ser Ile Gln Gly Gly Ser Gln Pro Gly Gly Phe Ser Pro Gly Gln Asn
 515 520 525

Gln Val Thr Pro Gln Asp His Glu Lys Ala Ala Leu Ile Met Gln Val
 530 535 540

Leu Gln Leu Thr Ala Asp Gln Ile Ala Met Leu Pro Pro Glu Gln Arg
 545 550 555 560

Gln Ser Ile Leu Ile Leu Lys Glu Gln Ile Gln Lys Ser Thr Gly Ala
 565 570 575

[0004]

Pro	
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 的人工合成引物	
<400> 3	
gtcatgcagg gaacaggaat	20
<210> 4	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 的人工合成引物	
<400> 4	
tgagtcattc aagggttagg atg	23
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 的人工合成引物	
<400> 5	
gaggatgatag cattgctttc g	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 的人工合成引物	
<400> 6	
caagtcagtg tacaggaag c	21
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> An artificially synthesized probe for northern blot	
<400> 7	
cgaggcttgt taggagatgc	20
<210> 8	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> Northern 印迹的人工合成探针	
<400> 8	
cccccatgtt aaggactg	18
<210> 9	
<211> 19	
<212> RNA	

[0005]

<213> 人工的	
<220>	
<223> siRNA 的人工合成的靶序列	
<400> 9	
ggcuuuaguc ccgggcaga	19
<210> 10	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> siRNA 的人工合成的靶序列	
<400> 10	
cacuuuacuu ucuguaacu	19
<210> 11	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> siRNA 的人工合成的靶序列	
<400> 11	
gaagcagcac gacuucuuc	19
<210> 12	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> siRNA 的人工合成的靶序列	
<400> 12	
cguacgcgga auacuucga	19

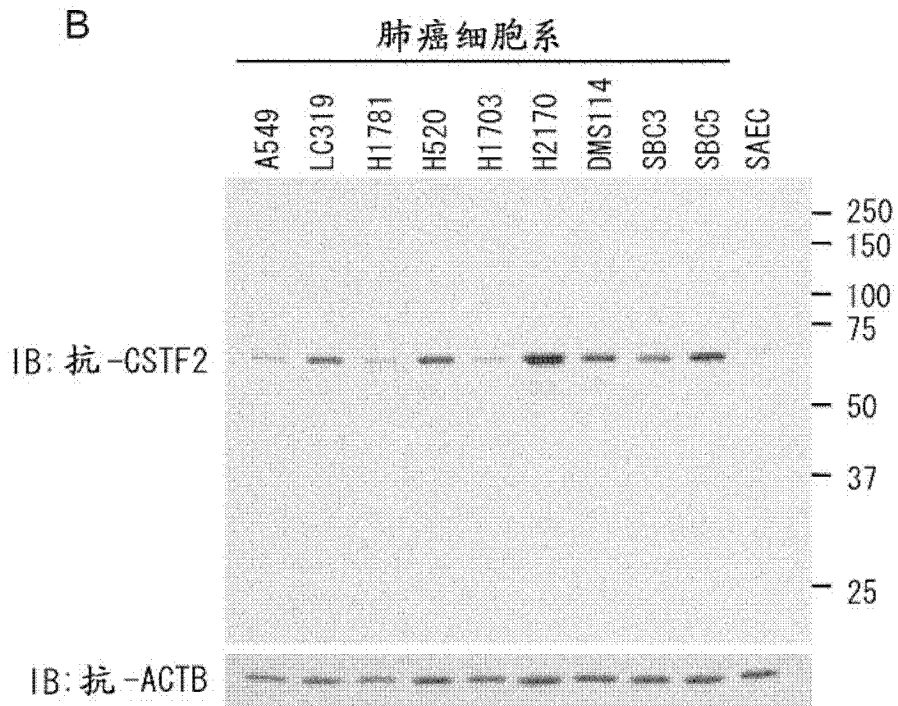
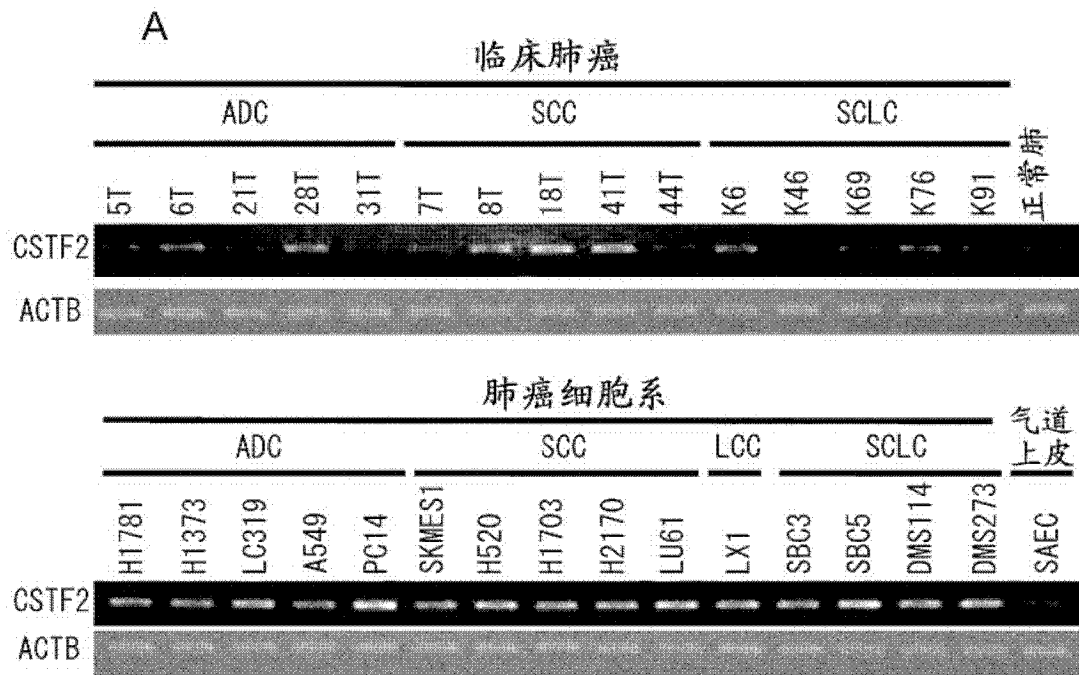


图 1ab

C

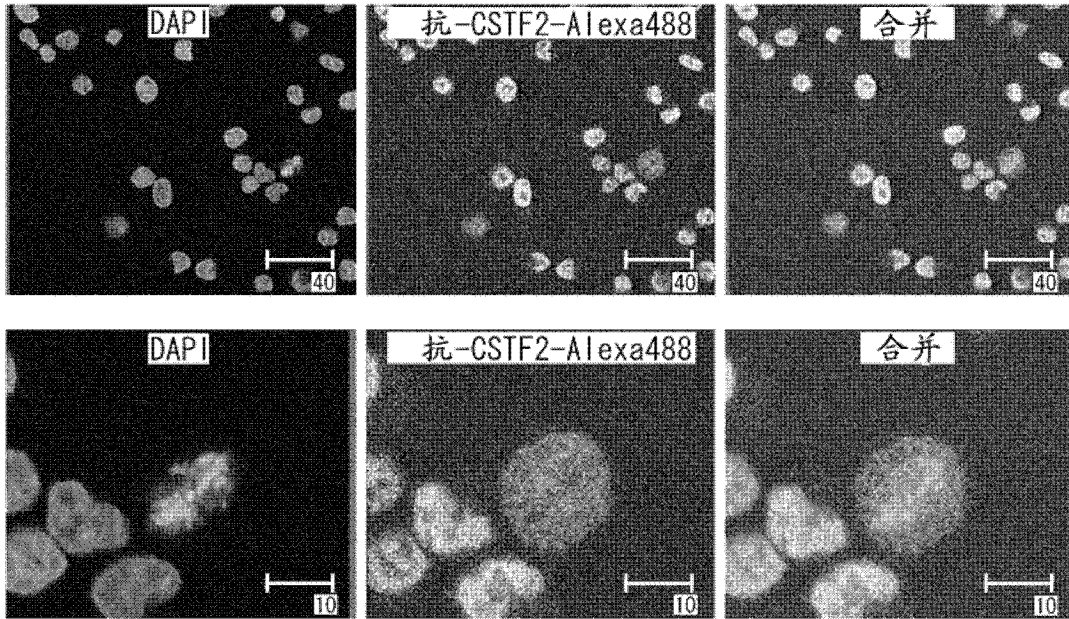


图 1c

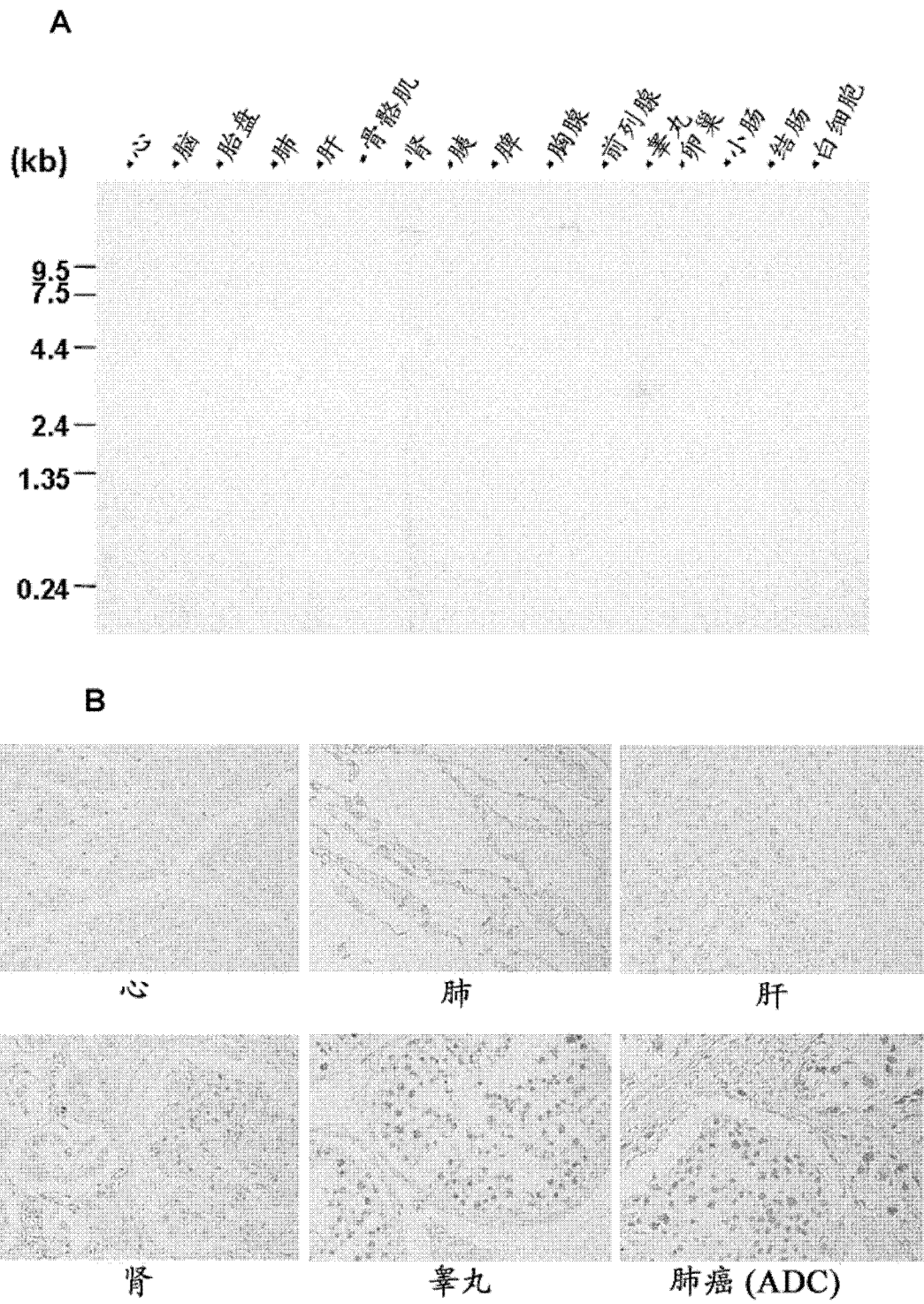
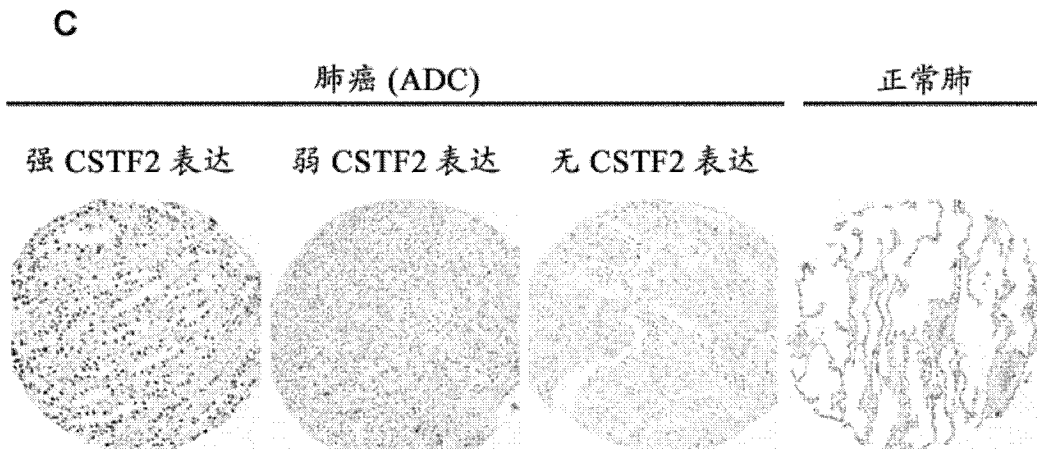
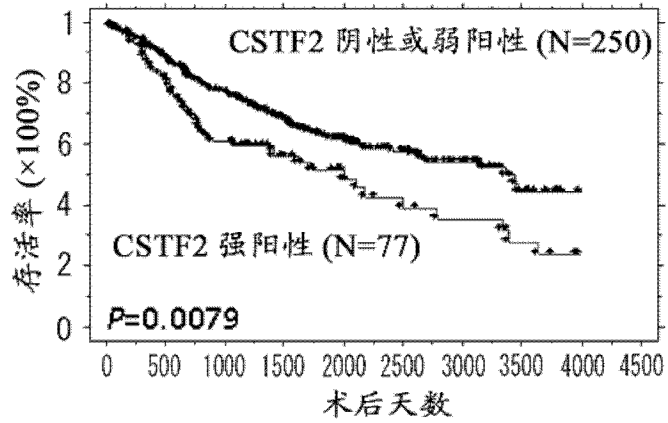


图 2ab



D



有风险的数目

CSTF2 阴性或弱阳性	250	223	193	135	93	57	33	16
CSTF2 强阳性	77	64	47	28	19	12	10	7

图 2cd

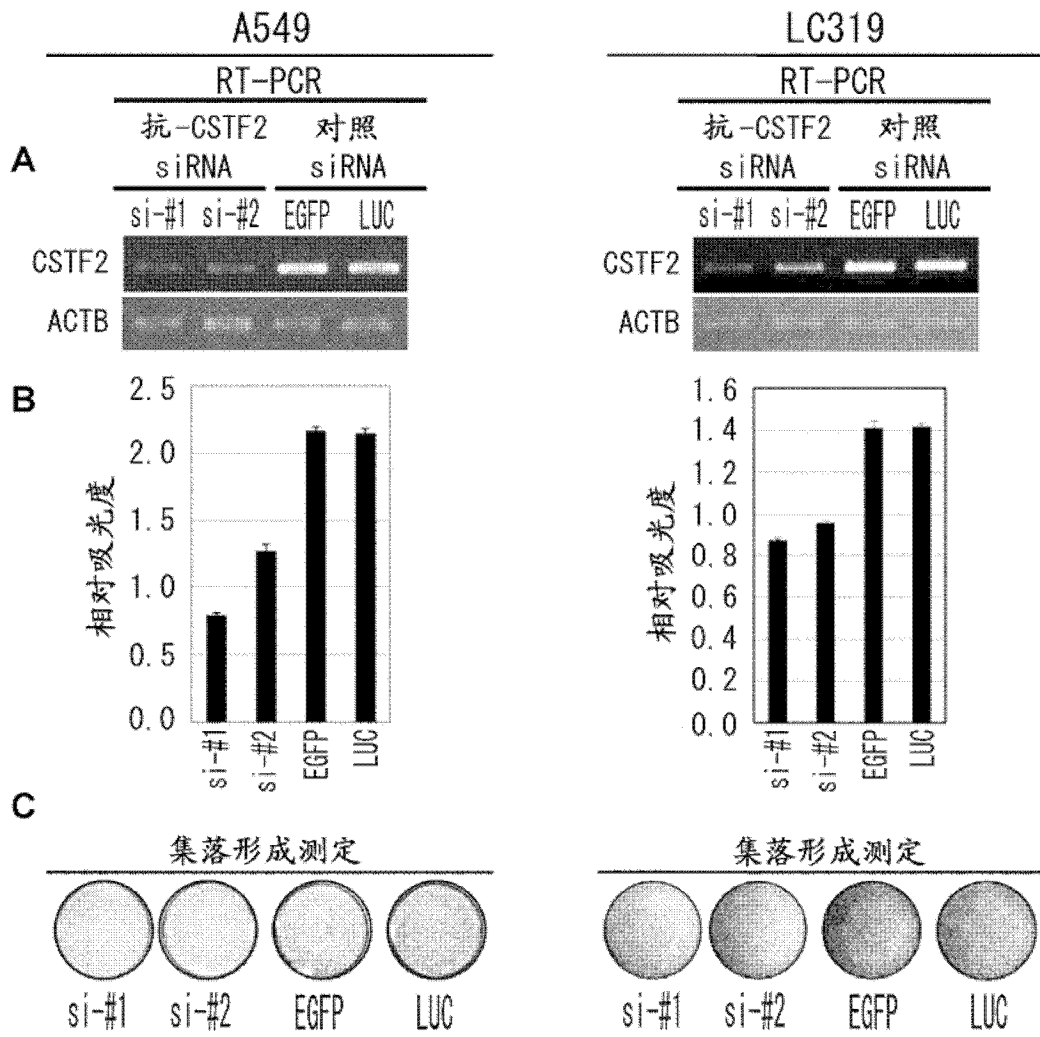


图 3

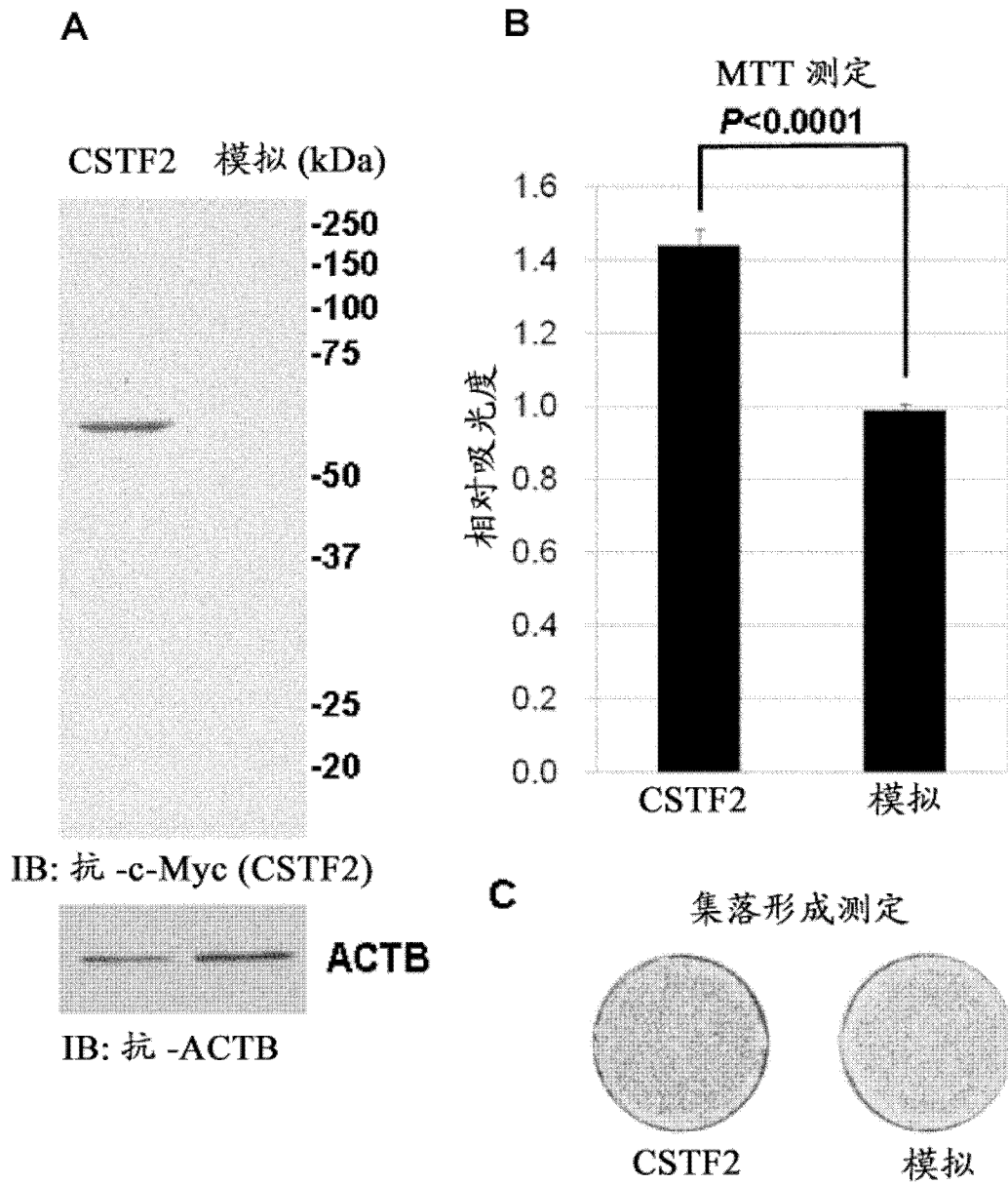


图 4

专利名称(译)	肺癌治疗和诊断的靶基因CSTF2		
公开(公告)号	CN102575300A	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201080047775.4	申请日	2010-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司		
[标]发明人	醍醐弥太郎 角田卓也 中村佑辅		
发明人	醍醐弥太郎 角田卓也 中村佑辅		
IPC分类号	C12Q1/68 A61P35/00 C07K16/30 C12N15/09 C12N15/113 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57423 G01N33/5011 C12N2310/14 C12Q2600/158 C12Q1/6886 C07K16/18 C12N15/113 C12Q2600/118 C12Q2600/136		
代理人(译)	罗天乐		
优先权	61/274800 2009-08-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及CSTF2基因在癌症发生中发挥的作用，而且特征在于一种通过施用针对CSTF2基因的双链分子或含有此类双链分子的组合物、载体或细胞来治疗或预防癌症的方法。本发明的特征还在于利用过表达的CSTF2基因对具有肺癌的受试者诊断癌症或评估/测定预后的方法。为此，CSTF2可充当癌症，特别是肺癌的新颖预后生物标志物。还有，公开了使用它们对CSTF2的表达或生物学活性的影响作为指标筛选用于治疗和预防癌症的候选物质的方法。

	总数	CSTF2 强阳性	CSTF2 弱阳性	无 CSTF2	P 值 强/弱/无
	n=327	n=17	n=165	n=85	
性别					
男性	220	56	120	53	0.3775
女性	99	22	45	32	
年龄(岁)					
<65	150	39	77	46	0.6016
≥65	177	44	88	45	
组织学					
ADC	166	46	97	54	0.7910
非 ADC	131	32	68	31	
吸烟					
吸烟者	234	51	124	59	0.2467
不吸烟者	93	25	41	25	
pT 因子					
T1	135	26	60	41	0.1459
T2+T3	192	51	97	44	
pN 因子					
N0	208	46	107	58	0.2824
N1+N2	119	32	58	27	