

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
A01N 61/00 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580006450.0

[43] 公开日 2007 年 3 月 7 日

[11] 公开号 CN 1925750A

[22] 申请日 2005.1.18

[21] 申请号 200580006450.0

[30] 优先权

[32] 2004.1.15 [33] US [31] 10/758,329

[86] 国际申请 PCT/US2005/001319 2005.1.18

[87] 国际公布 WO2005/069880 英 2005.8.4

[85] 进入国家阶段日期 2006.8.30

[71] 申请人 ALT 解决方案公司

地址 美国特拉华州

[72] 发明人 艾戈尔·E·邦达里夫

约翰·S·伯特拉姆

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 孟凡宏

权利要求书 6 页 说明书 35 页 附图 6 页

[54] 发明名称

LINE-1 逆转录酶的调节

[57] 摘要

由 L-1 (LINE-1) 编码的逆转录酶已被确定为治疗或预防由该分子诱导或介导的癌症的靶分子。治疗或预防患者的这种癌症的方法涉及施用具有患者细胞中逆转录酶的抑制剂或拮抗剂的治疗有效量的组合物。该抑制剂或拮抗剂阻断端粒酶阴性细胞中端粒的延长。也公开了用来检测表达 L1RT 的病理性增殖细胞的方法和试剂盒。

1. 一种治疗患有癌症的个体的方法，包括向该个体施用包括由个体细胞中的 L-1 (LINE-1) 逆转录转座子编码的逆转录酶的抑制剂或拮抗剂的治疗有效量的组合物，其中所述的抑制剂或拮抗剂阻断端粒酶阴性细胞中端粒的延长。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述逆转录酶的抑制剂或拮抗剂包括反义序列、无机化合物、有机化合物、肽或小分子。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述的反义序列能够与编码该逆转录酶的核酸杂交。

4. 权利要求 1 的方法，其中编码所述逆转录酶的核酸包括转录自 DNA 的 RNA。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述的反义序列包括嵌合的 RNA-DNA 寡核苷酸。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述的有机化合物是核苷类似物。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述的有机化合物是核苷类似物，其是 3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷 (AZT)、2',3'-双脱氧肌苷 (ddI)、2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸苷 (d4T)、更昔洛韦或缬更昔洛韦，或其组合。

8. 权利要求 1 的方法，其中所述癌症是骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌或黑素瘤。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述组合物通过口服、非肠道、皮下、肌肉、血管内或局部施用。

10. 一种治疗人类癌症的方法，其中所述的癌症是由于显示由所述人类细胞中 L-1 (LINE-1) 逆转录转座子编码的逆转录酶诱导或介导的替代端粒延长的细胞造成的，该方法包括对患有癌症的人施用包括一种或多种核苷类似物、或其药物学上可接受的盐的治疗有效量的组合物。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述的核苷类似物是选自 3'-叠氮

-2',3'-双脱氧胸苷 (AZT)、2',3'-双脱氧肌苷 (ddI)、2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸苷 (d4T)、更昔洛韦和缬更昔洛韦中的至少一种。

12. 权利要求 10 的方法, 其中所述癌症是骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌或黑素瘤。

13. 权利要求 10 的方法, 其中所述组合物通过口服、非肠道、皮下、肌肉或血管内施用。

14. 权利要求 10 的方法, 其中施用包括两种或多种所述核苷类似物的组合物。

15. 权利要求 10 的方法, 其中施用的所述核苷类似物之一是每天大约 10mg/kg 体重到大约 100mg/kg 体重。

16. 一种干扰端粒酶阴性肿瘤细胞中端粒延长的方法, 该方法包括对细胞施用有效量的由该细胞中 L-1 (LINE-1) 逆转录转座子编码的逆转录酶的抑制剂或拮抗剂。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述逆转录酶的抑制剂或拮抗剂包括反义序列、无机化合物、有机化合物、肽或小分子。

18. 权利要求 16 的方法, 其中所述反义序列能够与编码逆转录酶的核酸杂交。

19. 权利要求 16 的方法, 其中编码逆转录酶的核酸包括 DNA、从 DNA 转录的 RNA 或从 RNA 逆转录的 cDNA。

20. 权利要求 16 的方法, 其中所述反义序列包括嵌合的 RNA-DNA 寡核苷酸。

21. 权利要求 16 的方法, 其中所述有机化合物是核苷类似物。

22. 权利要求 16 的方法, 其中所述有机化合物是核苷类似物, 其是 3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷 (AZT)、2',3'-双脱氧肌苷 (ddI)、2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸苷 (d4T)、更昔洛韦或缬更昔洛韦或其组合。

23. 权利要求 16 的方法, 其中所述癌症是骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌或黑素瘤。

24. 一种防止或抑制端粒酶阴性细胞生长的方法, 该方法包括: 使细胞接触核苷类似物; 或

用能够表达人 L1RT 反义序列的构建体转染细胞, 该人 L1RT 反义序列与编码 L1RT 酶所必需的核酸的亚序列基本或完全互补。

25. 权利要求 24 的方法, 其中使细胞接触浓度为 0.2  $\mu\text{M}$  的核苷类似物。

26. 权利要求 24 的方法, 其中所述核酸为 mRNA。

27. 权利要求 24 的方法, 其中所述核酸是人 L1RT 开放阅读框。

28. 权利要求 27 的方法, 其中所述核酸编码包括 SEQ ID NO: 的蛋白质。

29. 权利要求 24 的方法, 其中所述核苷类似物是 3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷 (AZT)。

30. 权利要求 24 的方法, 其中所述反义序列是 DNA 寡核苷酸、2'-O 甲基寡核苷酸、肽核酸寡核苷酸或硫代磷酸寡核苷酸。

31. 权利要求 30 的方法, 其中所述反义 L1RT 核酸具有包括 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列。

32. 权利要求 24 的方法, 其中所述反义序列长度为大约 8 个到大约 50 个核苷酸。

33. 权利要求 32 的方法, 其中所述反义序列长度为大约 15 个到大约 25 个核苷酸。

34. 权利要求 24 的方法, 其中使细胞接触两个或多个与所述核酸的不同亚序列完全互补的反义序列。

35. 权利要求 24 的方法, 其中所述反义序列是核酶的一部分。

36. 权利要求 24 的方法, 其中所述端粒酶阴性细胞是癌细胞, 其中该癌细胞选自骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌或黑素瘤。

37. 一种在能够进行 L1RT 转录的系统中干扰 L1RT 活性的方法, 包括向该系统提供有效干扰该系统中 L1RT 活性的一定量的核苷类似物或反义化合物, 其中该系统是体内或体外生长的细胞。

38. 权利要求 37 的方法, 其中所述核苷类似物是 3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷 (AZT)、2',3'-双脱氧肌苷 (ddI)、2',3'-双脱氢-3'-脱

氧胸苷 (d4T)、更昔洛韦或缬更昔洛韦或其组合。

39. 一种在需要这种预防的患者中预防癌症的方法, 其中所述的癌症是由于显示由所述人类细胞中 L-1(LINE-1)逆转录转座子编码的逆转录酶诱导或介导的替代端粒延长的细胞造成的, 该方法包括对该人施用包括一种或多种核苷类似物、或其药物学上可接受的盐的治疗有效量的组合物。

40. 根据权利要求 39 的方法, 其中所述的癌症选自: 骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌或黑素瘤。

41. 一种组合物, 其包括能够编码在细胞中能够干扰 L-1 (LINE-1) 逆转录转座子活性的核酸节段的多聚核苷酸。

42. 权利要求 41 的组合物, 其中所述核酸节段包括 SEQ ID NO :1。

43. 包括权利要求 41 的组合物分离的宿主细胞。

44. 权利要求 41 的分离的细胞, 其中所述细胞是人细胞。

45. 权利要求 41 的分离的细胞, 其中所述细胞是癌细胞。

46. 一种选择能够在端粒酶阴性癌细胞中缩短端粒的化合物的方法, 该方法包括:

对所述细胞施用测试化合物;

评估该测试化合物的抗-L-1 (LINE-1)逆转录转座子的活性, 或评估该化合物是否下调所述细胞中由 L-1 逆转录转座子编码的逆转录酶的表达; 以及

选择显示下调逆转录酶表达的抗-L-1 逆转录转座子活性的化合物。

47. 权利要求 46 的方法, 其中所述评估步 包括, 检测所述细胞中的端粒缩短或 G2 停滞, 或所述细胞的凋亡。

48. 权利要求 46 的方法, 其中所述的细胞是体外培养的细胞, 或是非人类的动物模型中的细胞。

49. 权利要求 46 的方法, 其中所述动物模型选自小鼠、大鼠、兔子、猪、牛、猴子和豚鼠。

50. 一种检测端粒酶阴性细胞样品中癌细胞的存在的方法，该方法包括：

使所述样品接触由 L-1 (LINE-1) 逆转录转座子编码的逆转录酶的抑制剂或拮抗剂；以及

检测显示端粒缩短或所述细胞中 G2 停滞，或所述细胞的凋亡的细胞。

51. 一种检测能够在哺乳动物组织内病理性增殖的细胞的方法，包括：

从所述组织获得细胞样品，

使该细胞样品接触与 L1RT mRNA 的亚序列基本互补或完全互补的核酸探针，或 L1RT 逆转录酶的特异性抗体；以及

检测所述细胞中 L1RT 的表达。

52. 权利要求 51 的方法，其中所述核酸探针包括可检测部分。

53. 权利要求 52 的方法，其中所述可检测部分是放射性同位素、荧光分子、生物素或洋地黄毒苷。

54. 权利要求 51 的方法，其中所述的核酸探针包括选自 5'-CCA GAG ATT CTG GTA TGT GGT GTC TTT GTT-3' (SEQ ID NO : 2)、5'-CTT TCT CTT GTA GGC ATT TAG TGC TAT AAA-3' (SEQ ID NO : 3)、5'-CTC TTG CTT TTC TAG TTC TTT TAA TTG TGA- 3' (SEQ ID NO : 4)、5'-CTT CAG TTC TGC TCT GAT TTT AGT TAT TTC-3' (SEQ ID NO : 5) 和 5'-TCC TGC TTT CTC TTG TAG GCA-3' (SEQ ID NO : 6) 的序列。

55. 一种抑制 L-1 (LINE-1) 逆转录转座子的聚合酶活性、或诱导表达所述逆转录转座子的分离细胞或组织凋亡的方法，包括使所述的细胞或组织接触包含至少一种核苷类似物或反义序列或包含此二者的组合物，以抑制聚合酶活性。

56. 权利要求 55 的方法，其中所述的核苷类似物是 3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷 (AZT)、2',3'-双脱氧肌苷 (ddI)、2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸苷 (d4T)、更昔洛韦或缬更昔洛韦或其组合。

57. 权利要求 55 的方法, 其中所述反义序列选自 5'-CCA GAG ATT CTG GTA TGT GGT GTC TTT GTT- 3' (SEQ ID NO : 2)、5'-CTT TCT CTT GTA GGC ATT TAG TGC TAT AAA-3' (SEQ ID NO : 3)、5'-CTC TTG CTT TTC TAG TTC TTT TAA TTG TGA-3' (SEQ ID NO : 4)、5'- CTT CAG TTC TGC TCT GAT TTT AGT TAT TTC-3' (SEQ ID NO :5) 和 5'-TCC TGC TTT CTC TTG TAG GCA-3' (SEQ ID NO : 6)。

58. 一种用于检测病理性增殖细胞的试剂盒, 包括与 L1RT mRNA 的亚序列基本或完全互补的核酸探针。

59. 权利要求 58 的试剂盒, 其中该核酸探针包括可检测部分。

60. 权利要求 59 的试剂盒, 其中所述可检测部分是放射性同位素、荧光分子、生物素或洋地黄毒苷。

61. 权利要求 58 的试剂盒, 其中该核酸探针包括选自 5'-CCA GAG ATT CTG GTA TGT GGT GTC TTT GTT-3' (SEQ ID NO : 2)、5'-CTT TCT CTT GTA GGC ATT TAG TGC TAT AAA- 3' (SEQ ID NO : 3)、5'-CTC TTG CTT TTC TAG TTC TTT TAA TTG TGA-3' (SEQ ID NO : 4)、5'-CTT CAG TTC TGC TCT GAT TTT AGT TAT TTC-3' (SEQ ID NO : 5) 和 5'-TCC TGC TTT CTC TTG TAG GCA-3' (SEQ ID NO : 6)的序列。

## LINE-1 逆转录酶的调节

本申请是于 2004 年 1 月 15 日提交的在先申请号 10/758,329 申请的部分继续，其要求对 2003 年 1 月 15 日提交的美国临时申请号 60/440,988 的权益，并且申请 10/758,329 和 60/440,988 的文本因而全部引入作为参考。

### 发明领域

本发明涉及癌症治疗领域。特别是，靶分子已经被确认为在端粒酶阴性癌细胞中调节端粒的延长。更特别的是，涉及干扰人 L1 (Line-1) 逆转录转座子编码的逆转录酶 (L1RT) 用于治疗或预防 L1RT 诱导的癌症的多种抑制剂化合物的用途。本发明也涉及用于鉴定对治疗 L1RT 介导的增殖疾病有用的药物活性化合物的筛选方法。

### 发明背景

DNA 的前导链和后随链合成的不对称造成了线性基因组复制的“终结问题”<sup>8</sup>。为了克服这个问题，真核染色体具有特化的末端结构，即由 TTAGGG 重复组成的端粒<sup>9</sup>。端粒酶是延长端粒并因此在细胞倍增期间的大多数癌细胞中保持染色体稳定性的核糖核蛋白酶。在细胞倍增期间 DNA 从端粒末端的逐渐损失与体细胞中细胞增殖潜能的控制有关<sup>10</sup>。

正常培养的人类细胞在培养物中具有有限的复制潜能。培养中的正常细胞进行复制直到它们达到群体生长停止的离散点。这被称为 M1 期，并且由于少数端粒缩短到导致称为细胞老化的生长停滞的大小而引起。这个阶段在体外能够通过消除 p53 和 pRB 人肿瘤抑制基因的功能而被绕过。之后该细胞能增殖直到端粒已经变得相当短，而导致 M2 或转折期。生长停滞在 M2 阶段是由细胞增殖和细胞死亡

速率之间的平衡引起的。在这个阶段，当多数端粒是非常短的时候，末端到末端的融合和染色体断裂-融合引起显著的染色体异常和凋亡。在很少情况下，细胞能够脱离 M2 并通过稳定其端粒的长度而变为无限增殖。这通过端粒酶活化或替代端粒延长机制（ALT）而发生。

人类生殖系细胞<sup>2</sup>和多数癌症细胞<sup>3</sup>表达端粒酶。端粒酶是延长端粒并因此在细胞倍增期间保持多数癌细胞的染色体稳定性的核糖核蛋白酶。实际上，端粒酶对已缩短的端粒的延长是人癌细胞中端粒维持的主要机制。端粒酶的抑制通过降低端粒的长度而限制人端粒酶阳性癌细胞<sup>11</sup>的生长，这些化合物降低了这些癌细胞增殖的能力。逆转录酶抑制剂先前已经被用于治疗癌症。在体外试验中，用逆转录酶抑制剂处理的肿瘤细胞在 14 天后经历凋亡。

通过端粒酶延长已缩短的端粒是在人癌细胞中维持端粒的众所周知的机制。但是多达 30% 的不同类型的人肿瘤不表达端粒酶。在多达 30% 的不同类型的人肿瘤、肿瘤来源的细胞系和在体外无限增殖的人细胞系中，都报道有 ALT 的存在<sup>4,5, 12, 13</sup>，且在肿瘤和无限增殖细胞系的某些亚型中多达 50% 也报道有 ALT 存在。

当前，目标为选择性治疗来自端粒酶阳性细胞的癌症的策略涉及通过反义策略、显性失活突变体或药理药物来调节 TERT 的功能或端粒的长度(见，Bisoffi 等, Eur J Cancer, 1998, 34 : 1242-1249; Roth 等, Leukemia, 2003, 17 : 2410-2417; Damm 等, EMBO J., 2001, 20 : 6958-6968; 美国专利 6,294, 332、6, 194,206、6,156, 763 和 6,046, 307)。如果在这些细胞中负责端粒延长的靶分子是已知的，则端粒酶阴性癌细胞的选择性调节（即选择性抑制或促进）也可能是可行的。因此，需要在端粒酶阴性细胞中确定负责延长端粒的靶分子，以及鉴定选择性干扰已确定靶分子的试剂，以使得不表达端粒酶的人肿瘤类型也能够被预防或治疗。

## 发明概述

现已发现 L1 (LINE-1) 逆转录转座子逆转录酶核酸的产物与某些癌细胞中端粒的延长有关，并因此与其维持有关。特别是，已经发现干扰由 L1 逆转录转座子编码的逆转录酶的表达抑制癌细胞中端粒的延长。更特别的，已经发现在端粒酶阴性细胞中干扰 L1 逆转录酶的表达导致例如端粒缩短、细胞周期停滞和凋亡或细胞死亡的表现型表现。相信逆转录酶可能通过端粒 DNA 合成的“滑移”机制和/或端粒末端靶向的 L1 转座子的逆转录转座而涉及端粒维持。

更特别的，已经发现用逆转录酶抑制剂 3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷 (AZT) 对端粒酶阴性细胞 (ALT 细胞) 的处理，或用反义策略对 L1 逆转录酶 (L1RT) 的抑制，诱导进行性的端粒丢失、G2 期停滞、染色体异常和最终的细胞死亡。

因此，在本发明的一个实施方案中，提供一种治疗特征在于 L1RT 表达和/或端粒酶表达缺失的肿瘤的方法。干扰 L1RT 的表达或活性会直接导致细胞死亡，或增强化疗药物最终通过凋亡杀死细胞的效果。特别是，本发明提供一种通过施用 L1RT 的抑制剂和拮抗剂来抑制具有持续增加细胞数量能力的 L1RT 表达细胞增殖的方法。例如，通过获得具有可操作地连接于启动子的 cDNA 序列的 DNA 分子，使其以反义方向表达，其中该 cDNA 具有 L1RT 的全部或部分序列，并且用该 DNA 分子转染具有不可控制的增殖潜力的 L1RT 细胞，能够抑制或下调 L1RT 的表达。该抑制剂或拮抗剂任选地与药物学上可接受的载体一起给药。

在本发明的另一个实施方案中，提供一种在需要这种预防的个体（例如人）中预防癌症的方法。该癌症是由于人体中存在显示由该人细胞中 L-1(LINE-1) 逆转录转座子编码的逆转录酶诱导或介导的替代端粒延长的细胞而引起的。细胞中端粒的延长诱导人体中这种细胞的持续增殖潜能。该预防方法包括对人施用治疗有效量的组合物。该组合物具有所述逆转录酶的抑制剂或拮抗剂。该抑制剂或拮抗剂阻断端粒酶阴性细胞中端粒的延长，因此抑制 L1RT 表达细胞的增殖。优选该抑制剂是一个或多个核苷类似物，或这种类似物的药物

学上可接受的盐。用抑制剂或拮抗剂强化液体或固体的食材。食品可以是例如黄油、人造黄油、饼干、面包、蛋糕、蜜饯、糖果、酸奶酪或其他发酵牛奶产品、或适于人类消费的谷类食品形式的功能性食物。或者可以是营养补充物、营养物、药品、食品、营养品、健康食品和/或特制食品。周期性地测试人体中 ALT 细胞的存在。一旦不再检测到 ALT 细胞,即可以停止使用抑制剂或拮抗剂。

在本发明的另一个实施方案中,提供一种筛选候选药物或化合物用来选择能够降低肿瘤细胞积聚速率的药物的方法,其中通过与候选药物一起培养或处理表达 L1RT 的细胞,并监测该候选药物可能对细胞具有的一个或多个所需要的生物学效果。如果候选药物引起了所需要的生物学效果,则选择该药物。在这种筛选中特别优选的生物学效果包括渐进性的端粒损失、G2 期停滞、染色体异常或癌细胞死亡。生物学效果也可包括用不同癌基因例如 *ras* 转化的端粒酶阴性细胞的增殖的抑制。

本发明进一步提供用于检测病理性增殖的表达 L1RT 的细胞的方法和试剂盒。这些和其他本发明的实施方案将会在下文更为详细地描述。

### 附图简述

图 1 是端粒特异性探针对来自 ALT 和端粒酶阳性细胞系的胞内总 RNA 的斑点印迹。1,U-2 OS. 2, Saos-2. 3, 没有 RNA. 4,HEC-1. 5, HeLa。

图 2 说明用 AZT 处理 ALT 细胞系 14 天后显示端粒长度缩短、大规模凋亡和细胞周期变化的流式细胞术数据。(a) Saos-2; (b) U-2 OS 细胞中,处于细胞周期的 G2 期的端粒特异性荧光。(c) Saos-2; (d) U-2 OS 细胞中细胞周期的分布<sup>22</sup>。未处理的细胞 - 灰色,处理过的细胞 - 黑色。

图 3 说明显示用 AZT 处理不同时间的 U-2 OS 细胞中, DNA 合成速率、细胞周期分布和端粒长度改变的流式细胞分析数据。a、b、

c、d: 未处理和分别处理 10、17 和 40 天。细胞周期分布<sup>24</sup> - 左边。BdU 掺入(FITC)和 PI<sup>24</sup> 染色 - 中间。PNA-FITC 和 PI 染色 - 右边。数字分别指出 G1 和 G2 期以任意单位<sup>22</sup>测得的端粒特异性荧光。

图 4 说明显示更昔洛韦处理 14 天后端粒长度缩短、大规模凋亡、和细胞周期改变的 PNA-FITC 和 PI 染色的流式细胞术数据。(a) 未处理的 U-2 OS 细胞; (b) 更昔洛韦处理的 U-2 OS 细胞。

图 5 显示 L1 逆转录酶反义靶向策略的图示说明。

图 6 说明显示用 L1 靶向的反义构建体转染 40 天的 U-2 OS 细胞中细胞周期分布和端粒长度变化的流式细胞分析数据, (a) 未处理; (b) 有义构建体; (c)反义构建体。

## 发明详述

本发明公开了 LINE-1 (L1) 逆转录转座子编码的逆转录酶(L1RT)与某些人癌细胞中端粒的延长有关。具体地, 本发明公开了 L1RT 与包括端粒酶阴性肿瘤的某些肿瘤组织和该肿瘤来源的细胞系中端粒的延长有关, 并且确定 L1RT 酶或其编码序列为用于控制该肿瘤细胞增殖特性或诱导这些细胞凋亡的靶标。

端粒酶阴性的肿瘤和该肿瘤来源的细胞系不表达端粒酶, 或具有内源端粒酶, 但仍然显示端粒延长, 在此也称为替代端粒延长 (ALT)。细胞中 L1RT 介导的端粒延长的特征在于相对于端粒酶介导的端粒延长出现长且异质性的端粒。本领域的技术人员已知如何通过例如 TRF 检测 (见 Bryan 等, 1997, *Nature Medicine*, 3: 1271-1274) 来确定细胞中存在 ALT 特有的长且异质性的端粒。

由 L1 逆转录转座子的 ORF2 编码的 L1 逆转录酶已经表征, 且其核酸和蛋白序列是本领域已知的(GeneBank GI: 5070620; Ostertag 等, 2000, Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells, *Nucleic Acids Res.* 28,1418-1423 ; Kimberland 等, 1999, Full-length human L1 insertions retain the capacity for high frequency retrotransposition in cultured cells, *Hum. Mol. Genet.* 8 (8),

1557-1560)。在本发明中,已经发现在端粒酶阴性细胞中 L1RT 向染色体添加端粒 DNA 重复片段。

因此,在本发明的一个方面,提供预防或治疗由于动物中存在不恰当或病理性增殖的细胞或无限增殖的细胞所引起的病症的方法。这些不恰当或病理性增殖的细胞存在,并且独立于细胞正常的调控机制而复制。这些细胞是病理性的,因为它们由于细胞元件,即 L1RT 的活性而不同于正常细胞。当然,这里所使用的不恰当增殖的细胞有可能是良性的高度增殖细胞,但是除非另作说明,否则这些细胞是指恶性的高度增殖细胞,如例如成骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌或黑素瘤特有的癌细胞。

特别是提供了预防或治疗以表达 L1RT 为特征的人肿瘤的方法。根据本发明,病症的预防和治疗是通过使用 L1RT 的抑制剂或拮抗剂而获得的。用于本发明的抑制剂或拮抗剂直接或间接与 L1RT 相互作用从而抑制其表达(或活性),和/或被整合到端粒中并因此阻止端粒进一步延长,尽管 L1RT 是功能性的,因此抑制了表达 L1RT 细胞的生长。因此,L1RT 的抑制剂或拮抗剂用于抑制细胞的生长。例如,当向患者施用 L1RT 的抑制剂或拮抗剂时,这引起进行性的端粒缩短、细胞中细胞周期停滞、和/或表达 L1RT 细胞的大规模凋亡。在本发明中,术语“抑制生长”或“生长的抑制”也可以指减少或阻止细胞分裂。在本发明中表达 L1RT 的细胞的生长抑制可以是大约 100% 或小于 100%,但不是 0%。例如,与对照细胞相比较,抑制可以是大约 10% 至大约 100%,优选至少约 25%,更优选至少约 50%,再更优选至少大约 90%、95% 或正好 100% (对照细胞表达 L1RT 但是不用抑制剂或拮抗剂处理)。生长的抑制能够用本领域已知的任何方法来测量。例如,可以将被处理样品中的活细胞数与对照样品中的活细胞数相比较,与活性染料一起孵育后进行测定。而且,生长抑制可通过能够检测体外或体内细胞增殖的减少的测定方法来测量,例如含氘氢掺入测定、BdU 掺入测定、MTT 分析、形成病灶的能力的改变、贴壁依赖或丧失无限增殖能力、丧失肿瘤特异性标记、和/

或当被注射进动物宿主体内时没有形成或抑制肿瘤的能力(Dorafshar 等, 2003, J Surg Res., 114 : 179- 186; Yang 等, 2004, Acta Pharmacol Sin., 25: 68-75)。

人体中从单个或几个这种无限增殖的细胞发展为癌性肿瘤可能要几个月至几年。但是通过实施本发明, 癌症能够被预防, 因为用 L1RT 处理的致瘤的 ALT 细胞在有机会生长为肿瘤之前, 就丧失了其增殖能力。而且, 在有癌症的临床表现之前, 对危险人群定期预防性施用 L1RT 的抑制剂或拮抗剂以停止肿瘤的发展可明显降低新发癌症病例的速度。

本发明使用的 L1RT 抑制剂或拮抗剂可以是无机化合物、有机化合物、反义序列、与 L1RT mRNA 中确定的目标区域相应的双链 RNA (dsRNA)、L1RT 蛋白的显性失活突变体、抗体或小分子。

在本发明的一个实施方案中, 有机化合物, 例如, 核苷类似物, 用作 L1RT 的抑制剂和拮抗剂。因此, 用于靶向 L1RT 的一种方法是将核苷类似物施用于癌症患者。该核苷类似物能够模拟 L1RT 所使用的构件来延伸端粒酶阴性细胞中染色体的末端。这些通过 L1RT 掺入染色体末端的伪构件(例如核苷类似物), 可以干扰端粒的功能并因此促进端粒缩短、细胞周期停滞和细胞死亡。

很多核苷类似物是本领域技术人员已知的。实际上, 核苷类似物是已知的抗逆转录病毒的种类, 并且很多核苷类似物药物已经被批准用于治疗 HIV 感染者。这些药物通过干扰 HIV 遗传物质(RNA)复制为 DNA 形式而阻止 HIV 增殖。可用于本发明的核苷类似物的实例是 3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷(AZT)、2',3'-双脱氧肌苷(ddI)、2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸苷(d4T)、阿昔洛韦、更昔洛韦。也可使用这些核苷类似物的前体(或药物前体)(例如, 缬更昔洛韦)。

由于 L1RT 是端粒酶阴性细胞的癌症中的关键因素, 这个关键酶活性的非竞争性抑制剂的本发现代表癌症研究和治疗中潜在的突破性进展。在广泛接受的模型系统中(下文有描述)核苷类似物(例如, AZT 和更昔洛韦)明确阻断 ALT 癌症的证明证实了本发明真正代表

了引人注目的突破性进展。尽管没有提示本发明可能的有益应用，但是先前对 AIDS 病人的 AZT 给药意味着可容易地对癌症病人施用 AZT。

实际上，核苷类似物已经用于改变癌细胞中端粒酶的活性至接近正常细胞中所发现的水平来作为癌症的治疗方法。但是，抑制 L1RT 所需的核苷类似物的浓度可比抑制端粒酶所需的浓度低几倍。例如，抑制 L1RT 活性所需的 AZT 浓度可比抑制端粒酶活性所需的浓度低几个数量级（例如低 10 至 1000 倍）。L1RT 对于这样低水平的核苷类似物的敏感性是出乎意料的，并且这个出乎意料的发现现在为 L1RT 特异性癌症的治疗提供了有益的治疗途径。重要的是，本发明提供选择明显低于其他可用于癌症患者的水平的有效剂量。本发明的研究表明，AZT 在达到纳摩尔药物水平而不是 200 $\mu$ M 至 800 $\mu$ M 的水平时即可用于癌症。

进一步的，目前核苷类似物对 AIDS 患者的用途，与使用显著比 HIV 疗法的 AZT 剂量低的能力相结合，将会加速 AZT 用于治疗 L1RT 诱导和/或介导的癌症的管理批准。而且，本发明并不限于只将 AZT 用于治疗 L1RT 诱导和/或介导的癌症。实际上，L1RT 抑制剂的用途广泛适合于一系列以 L1RT 为要素的其他病症。这些包括，例如诱导血友病 A 的血液因子 VIII 基因、X-连锁的视网膜色素变性 2、肌营养不良蛋白基因、引起 X-连锁的扩张型心肌病的 DMD 基因、以及引起慢性肉芽肿病的 X 连锁的基因 CYBB 中 L1 诱导的突变

（Woods-Samuels 等, 1989, Genomics, 4: 290-296; Schwahn 等, 1998, Nat. Genet., 19: 327-332; Holmes 等, 1994, Nat Genet., 7: 143-148; Yoshida 等, 1998, Hum Mol Genet., 7: 1129-1132; Brouha 等, 2002, Am J Hum Genet., 71: 327-336）。

核苷化合物也可单独或与不同类似物组合且可通过任何给药途径，包括口服施用来给药。AZT 和更昔洛韦或其药物前体，缙更昔洛韦，是优选的核苷类似物。AZT 是可以商业获得的，并且 AZT 制剂在很多美国专利中有描述，例如，见美国专利 5,683, 990。具有

AZT 的细胞将被选择性地靶向, 因为这些细胞依赖于 L1RT 来延长或保持端粒, 并且端粒的延长或保持需要核苷和/或其类似物的掺入。需要任何特异性的靶向试剂递送类似物来实现抗癌效果, 这里预期使用靶向 AZT 和/或其他类似物。因此在一些实施方案中, 药物组合物可能具有已经连接到靶向试剂(例如肽)上的活性化合物, 在这种情况下为 AZT 或另一种核苷类似物, 用于专门递送给特定的靶细胞或细胞内的核部分。

在本发明的另一个方面, 也被称为反义寡核苷酸或反义多核苷酸的反义序列用作 L1RT 的抑制剂或拮抗剂。本发明的反义序列与编码 L1RT 的核酸是基本互补或完全互补的。反义序列的互补性(无论是完全互补还是基本互补)使得其与靶核酸序列特异杂交, 并且干扰 L1RT 的功能、表达等, 该干扰足以抑制细胞的生长。

编码 L1RT 的核酸可以是 DNA, 从这种 DNA 转录的 RNA, 或该 RNA 的 cDNA。不同哺乳动物, 例如小鼠、猴子和人类的 L1 核酸和氨基酸序列已经被测序(见 GenBank 登录号 AY053456、AF036235、AF148856 和 GI5070620)(对于 L1RT ORF2 序列见 GenBank 蛋白登录 AAD39215)。本发明的上下文中, L1RT mRNA 是用于设计反义核酸序列的优选核酸。例如, 设计靶向编码 L1RT 的核酸、长度为 20 个或 20 个以上核苷酸的一系列反义硫代磷酸寡核苷酸。通常本发明的反义序列可被设计成结合启动子或其他调控区, 以及 L1RT 的编码和/或非编码区。反义序列优选靶向包括起始密码子的 L1RT 核酸序列部分。也预期最有效的反义序列或构建体包括与 L1RT 的编码和非编码区相互补的区域。仅仅通过体外检测构建体来确定正常细胞的功能是否受到影响, 技术人员就可容易地检测给定反义构建体的效果。优选所选择的反义序列抑制 L1RT 活性或表达, 至不足以诱导或介导 ALT 细胞中端粒延长的水平。

L1RT 表达的干扰能够由于任何机制而发生。例如, 认为这种反义序列结合有义 L1RT mRNA, 并干扰其翻译。另外, 反义序列可使 L1RT mRNA 易受核酸酶或核酶消化, 干扰转录, 或干扰 L1RT

mRNA 的加工，抑制从 L1RT 基因转录 mRNA，或通过一些其他的机制，例如通过核酶起作用。核酶，为本领域技术人员所熟知，是具有催化活性的 RNA 分子。本发明的核酶是结合并且酶促切割 L1RT RNA 以及使其失活的反义序列。有用的核酶可包括与 L1RT RNA 互补的 5'-和 3'-末端序列，并且可由技术人员以 L1RT RNA 序列为基础加以工程化。但是，只要达到最终结果，反义序列干扰 L1RT 表达的特定机制并不是关键。

通常为了确保特异性杂交，反义序列与目标 L1RT mRNA 序列基本互补。在某些实施方案中，可使用与目标核酸序列完全或精确互补的反义序列，或与给定的 L1RT 目标核酸序列的不同亚序列完全互补的两个或多个反义序列。亚序列是作为更长核酸残基序列的一部分的核酸残基或核苷酸序列，例如，相应于人 L1 逆转录转座子 (GenBank GI: 5070620) 的第 1987 - 2800 位核苷酸的反义序列。

表. 用于干扰 L1RT mRNA 的序列实例。

|                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>SEQ ID NO: 1<br/>(当此处所述的序列 SEQ ID NO: 1 以反向在表达载体中表达时, 产生 L1RT mRNA 的反义序列)</p> | <p>5'-atga caggatcaac ttcacacata acaatattaa<br/>ctttaaatat aaatggacta<br/>aattctgcaa ttaaaagaca cagactggca agttggataa<br/>agagtcaaga cccatcagtg<br/>tgctgtattc aggaaaccca tctcacgtgc agagacacac<br/>ataggctcaa aataaaagga<br/>tggaggaaga tctaccaagc caatggaaaa caaaaaaagg<br/>caggggttgc aatcctagtc<br/>tctgataaaa cagactttta accaacaag atcaaaagag<br/>acaaagaagg ccattacata<br/>atggtaaagg gatcaattca acaagaggag ctaactatcc<br/>taaataattta tgcaccaat<br/>acaggagcac ccagattcat aaagcaagtc ctcagtgacc<br/>tacaaagaga cttagactcc<br/>cacacattaa taatggggaga ctttaacacc ccactgtcaa<br/>cattagacag atcaacgaga<br/>cagaaagtca acaaggatac ccaggaattg aactcagctc<br/>tgcaccaagc agacctata<br/>gacatctaca gaactctcca ccccaaatac acagaatata<br/>catttttttc agcaccacac<br/>cacacctatt ccaaaattga ccacatagtt ggaagtaaag<br/>ctctcctcag caaatgtaaa<br/>agaacagaaa ttataacaaa ctatctctca gaccacagtg<br/>caatcaaact agaactcagg<br/>attaagaatc tcaactcaaag ccgctcaact acatggaaac<br/>tgaacaacct gctcctgaat<br/>gactactggg tacataacga aatgaaggca gaaataaaga<br/>tggtctttga aaccaacgag<br/>aaciaagaca ccacatacca gaatctctgg gacgcattca<br/>aagcagtggt tagagggaaa<br/>tttatagcac taaatgccta caagagaaag cagga-3'</p> |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                               |                                               |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| SEQ ID NO: 2<br>( L1RT mRNA<br>一部分的反义<br>序列 ) | 5'-CCA GAG ATT CTG GTA TGT GGT GTC TTT GTT-3' |
| SEQ ID NO: 3<br>( L1RT mRNA<br>一部分的反义<br>序列 ) | 5'-CTT TCT CTT GTA GGC ATT TAG TGC TAT AAA-3' |
| SEQ ID NO: 4<br>( L1RT mRNA<br>一部分的反义<br>序列 ) | 5'-CTC TTG CTT TTC TAG TTC TTT TAA TTG TGA-3' |
| SEQ ID NO: 5<br>( L1RT mRNA<br>一部分的反义<br>序列 ) | 5'-CTT CAG TTC TGC TCT GAT TTT AGT TAT TTC-3' |
| SEQ ID NO: 6<br>( L1RT mRNA<br>一部分的反义<br>序列 ) | 5'- TCC TGC TTT CTC TTG TAG GCA -3'           |

反义序列，例如，DNA、RNA、修饰物、类似物等，可通过使用任何适合生产核酸的方法制备，例如化学合成和在此公开的重组方法（见实施例部分）或本领域技术人员已知的这些方法。例如，在一个实施方案中，本发明的反义 RNA 分子可通过从头化学合成或克隆来制备。例如，与 L1RT mRNA 杂交的反义 RNA 可通过如下步骤来制备：将如 SEQ ID NO :1 所示的序列以相反方向插入（连接），将其可操作地连接于启动子，并在表达载体（例如质粒）中表达。倘若启动子以及优选终止子或多聚腺苷酸化信号定位正确的话，相

应于非编码链的插入序列的链将被转录，并且作为本发明的反义序列起作用。

在一些实施方案中，反义序列也可包括具有核苷酸添加、替代、缺失或修饰的修饰反义核酸序列，或其他核酸序列或非核酸部分，只要保留与相关的目标序列，即 L1RT RNA 或其基因/cDNA 的特异性结合作为该序列的功能特性。

例如，由与 SEQ ID NO: 2、3、4、5 或 6 所示相同的核苷酸组成的修饰的反义核酸序列，除了在整个长度上相应于 SEQ ID NO: 2、3、4、5 或 6 的核苷酸序列的以外，修饰的反义核酸序列具有一个或多个核苷酸取代、缺失或插入。如本领域已知的，同一性或相似性是通过比较序列确定的两个或多个多核苷酸序列之间的关系。同一性也意味着如通过从多核苷酸 5'到 3'末端对序列串之间进行匹配所确定的多核苷酸序列之间的序列相关程度。“同一性”能够通过本领域已知的方法容易地计算。例如见 Altschul 等, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)。例如，序列同一性也可通过本领域中已知的排列算法进行优化，并且计算核苷酸序列之间的百分比差异。有效的反义序列能够通过使用例如 GCG (Genetics Computer Group, Madison Wis.)或寡核苷酸组合阵列或 DNA 微阵列来确定，这些技术是本领域技术人员已知的。

本发明中，L1RT 反义多核苷酸、RNA、DNA、或能够通过直接化学合成而生产的修饰核酸也都可以使用。通常化学合成优选用于生产寡核苷酸，或含有非标准核苷酸的寡核苷酸和多核苷酸（例如，探针、引物和反义寡核苷酸）来用于本发明。核酸的直接化学合成可按本领域已知的程序进行。本领域的普通技术人员将认识到，DNA 的化学合成通常可能被限制在大约 100 或 150 个碱基的序列，更长的序列可通过较短序列的连接或更为复杂的合成方法来获得。应了解的是，本发明的 L1RT 反义寡核苷酸能够用非标准的碱基或非标准的主链结构制备，来提供所需的特性，例如，增强的核酸酶抗性、更紧密的结合、稳定性或所需要的  $T_m$ 。

可生产多种有用的修饰的寡核苷酸, 包括肽核酸 (PNA)。肽核酸是 DNA 类似物, 其中主链是假肽 (酰胺, 特别是 N-乙氨基甘氨酸主链) 而不是糖 (见, Peter E. Nielsen (Ed), *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Applications*, First Edition, 1999, Horizon Scientific Press)。已经报道这种主链比通常获得的主链产生更强的结合和更高的特异性。而且, 已经利用 PNA 独特的化学、物理学和生物学特性来生产有效的生物分子工具、反义和反基因剂、分子探针和生物传感器。PNA 化合物的深入教导可以在美国专利号 5,539,082; 5,714,331 和 5,719,262 中找到。

在一些实施方案中, 可以合成和使用嵌合的寡核苷酸、形成三链的反义序列、RNA-DNA 寡核苷酸 (RDO)、具有主链类似物的寡核苷酸, 例如磷酸双酯、硫代磷酸、二硫代磷酸酯, 和本领域中已知的其他物质。例如, 可使用长度为 30 个核苷酸、靶向 L1RT 编码核酸的一系列反义硫代磷酸寡核苷酸。

标记本发明的反义多核苷酸通常是有益的, 例如, 当使用 L1RT 多核苷酸来检测 L1RT 的表达, 或用于诊断和预测与不适当的高度增生有关的状况时。该标记可以用本领域技术人员已知的许多方法中的任何方法引入。合适的标记是可通过光化学、生物化学、免疫化学、化学、或光谱学方法检测到的任何化合物。例如, 有用的标记包括  $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、荧光染料、酶 (例如在 ELISA 中所普遍使用的)、生物素-链亲合素、洋地黄毒苷、半抗原、和可获得抗血清或单克隆抗体的蛋白质, 或具有与靶标互补的序列的核酸分子。标记通常产生可测量的信号, 例如放射性, 能够用于对结合的可检测部分的量进行定量。

在本发明的另一方面, 将相应于 L1RT mRNA 中已确定的目标区的双链 RNA (dsRNA) 用作 L1RT 的抑制剂和拮抗剂。dsRNA 诱导 L1RT 的 RNA-靶向的基因沉默, 这导致靶向的细胞中 L1RT 表达的降低或丧失。RNA-靶向的基因沉默是本领域技术人员所熟知的 (Ahlquist, 2002, *Science*, 296: 1270-1273)。dsRNA 可内源性合成或外

部施加，但只需要催化量的 dsRNA 来诱导沉默。选择来自 L1RT 基因一部分的核苷酸序列来生产抑制性的 RNA，其可以是部分或全部的双链型。该抑制是特异性的，因为选择了来自靶基因一部分的核苷酸序列来生产抑制性的 RNA。

本领域中已知有不同的方法来诱导 RNA-靶向的基因沉默，例如小干扰 RNA、短发夹 RNA、表达的长干扰 RNA、表达的小干扰 RNA 和表达的短发夹 RNA。优选某些 dsRNA(小干扰 RNA 和短发夹 RNA)包括对磷酸-糖骨架或核苷的修饰。RNA 双链体的形成可在细胞的内部或外部开始。可按照容许每个细胞递送至少一个拷贝，而更高的双链物质剂量可产生更有效抑制的量导入 RNA。抑制是序列特异的，因为相应于 RNA 双链区的 L1RT mRNA 核苷酸序列是遗传性抑制的目标。相对于目标序列具有插入、缺失和单个点突变的 RNA 序列也被发现对抑制是有效的。

RNA 可被递送到细胞，或直接导入组织的细胞间隙内，或导入生物体的血管系统。其也可通过口服递送给患者。口服导入的方法包括将 dsRNA 与患者的食物直接混合，以及工程化方法，其中用作食物的物种通过工程化而表达 RNA，之后饲喂给待作用的生物体。导入核酸的物理方法包括将 RNA 溶液直接注射进入细胞，或胞外注射进入患者。

另一方面，施用 L1RT 蛋白的显性失活突变体或具有编码显性失活突变体 L1RT 蛋白的序列的核酸、或其非功能性片段、或其衍生物，通过干扰细胞中 L1RT 与其他分子的相互作用来抑制 L1RT 的功能。据认为 L1RT 必须直接与端粒的部分相互作用来延长端粒。

因此，功能缺陷但有效结合端粒该部分的 L1RT 突变体能够被用作显性失活突变体来与野生型 L1RT 竞争。能够工程化显性的非功能性 L1RT 用于在不恰当地过度表达 L1RT 的癌细胞中表达。考虑到野生型 L1RT 的蛋白质和核酸序列是已知的，本领域的技术人员能够产生适用于本发明的 L1RT 的显性失活突变体。按照本领域已知的标准递送方法，这种显性失活突变体可在体外或体内施用于细胞。在本

发明优选的方面，治疗性的核酸具有 L1RT 核酸，该 L1RT 核酸是在癌细胞中表达显性非功能性 L1RT 蛋白或其片段或其嵌入蛋白的表达载体的部分。

在本发明的另一个方面，特异于 L1RT 的抗体或其结合部分用作 L1RT 的抑制剂或拮抗剂。特别的，本发明预计通过使用 L1RT 的抗体来预防和治疗人以及其他动物中 L1RT 诱导的癌症。多克隆和单克隆抗体以及这些抗体的结合部分（Fab 片段和 Fv 片段）在本发明的内容中是可预期的。这种抗体可在各种各样的动物中制备，包括小鼠、兔子、猴子、黑猩猩、奶牛（例如在牛奶中）和鸟。本发明也涉及人和人源化抗体。抗体可以预防性使用或在细胞病理性增殖的急性阶段期间使用。

在一个实施方案中，本发明涉及其中施用结合 L1RT 蛋白的抗体以使得该抗体与 L1RT 反应的方法。在另一个实施方案中，抗体与包括但不限于其他抗体的其他试剂组合。抗体的给药可通过口服、非肠道地、或其他合适的途径来进行。

抗体的生产可通过本领域已知的技术来完成。例如，通过用人 L1RT 蛋白或多肽体内免疫动物（例如小鼠）而免疫哺乳动物淋巴细胞。这种免疫必要时以可达几周的间隔重复，以获得足够的抗体效价。可以生产及培养杂交瘤，并且筛选所得到的克隆来生产所需要的单克隆抗体。将产生这种抗体的克隆进行克隆，并在体外或体内生长来产生大量的抗体。

如下面所进一步论述的，不同的抑制剂或拮抗剂的效率在施用于受试个体或患者之前可在标准实验动物模型中显示。将接受本发明方法治疗的受试个体或患者优选是人，且可以是胎儿、儿童或成人。可被治疗的其他哺乳动物可以是小鼠、大鼠、兔子、猴子和猪。

抑制剂或拮抗剂可单独施用，或与其他化学疗法或其他方法结合使用。例如，L1RT 诱导的癌症的治疗可与化学和/或放射性疗法相结合来治疗由端粒酶或一些其他因素诱导的癌症。本领域技术人员已知的化疗剂的实例包括但不限于抗癌药物，例如博莱霉素、丝裂

霉素、氮芥、苯丁酸氮芥、5-氟尿嘧啶（5-FU）、氟尿嘧啶脱氧核苷（5-FUdR）、甲氨喋呤（MTX）、秋水仙碱和己烯雌酚（DES）。为了进行组合治疗，以在动物或患者体内有效导致其组合抗癌作用的方式，简单地对动物施用与另一种抗癌剂组合的本发明的抑制剂成分。因此应以有效导致其在目标细胞区域中组合存在的剂量和时间周期提供该药剂。为了达到这个目的，该药剂可以在单一组合物中或作为使用不同给药途径的两个单独组合物同时给药。或者，两个治疗可以先后进行，例如间隔几分钟到几小时或几天。例如但不限于，全身使用的 AZT 平均每天剂量可以是，对成年人为每天 10mg/kg，对小鼠是每天 20mg/kg。

一些剂量上的变化可依照被治疗对象的状况而进行。负责给药的内科医生将能确定用于患者个体的合适剂量，并且可依赖于多个因素，例如，所述患者的年龄、状况、病史等。

因此，本发明的方法能够用于与 L1RT 诱导的病理性细胞增殖有关的状况和疾病的治疗应用。可从本发明的治疗应用中受益的疾病包括，以细胞高度增殖为特征的所有疾病，包括例如实体瘤和白血病，以及非癌症状况。进一步预期本发明的方法不仅在体内背景下，而且在离体（*ex vivo*）条件下，能够用于抑制癌症细胞的生长。本发明的方法对于抑制病理性增殖的人细胞的离体生长尤其有用，包括但不限于人癌细胞—骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌、或黑素瘤。

本发明提供用于鉴定由细胞中 L1RT 表达引起的不适宜的、病理性或非正常增殖的细胞的方法和试剂盒。该方法能够用作通过确定来自病人的组织中 L1RT 表达的存在（和/或水平）帮助诊断患者中存在癌细胞或肿瘤的筛选方法，其中 L1RT 表达的存在表明患者体中有癌细胞或病理性的细胞增殖。

例如，癌肿瘤样品能够如下诊断，通过检测以多种方法测定的 L1 特异性 mRNA 表达，这些方法包括但不限于，利用核酸的杂交、Northern 印迹法、原位杂交或 RNA 微阵列，或通过多种方法测定 L1

逆转录转座子 ORF1 和/或 ORF2 编码的蛋白的存在,这些方法包括但不限于, Western 印迹法、免疫沉淀或免疫组化、或逆转录酶的酶活性。

显示 ALT 的癌细胞也能够通过测定催化亚基 mRNA 表达的缺失而确定(通过多种方法测定,包括但不限于, Northern 印迹法、RNA 保护分析、原位杂交、RT-PCR、实时 RT-PCR 或 RNA 微阵列),或通过测定端粒酶催化亚基翻译的缺失来确定(通过多种方法测定,包括但不限于, Western 印迹法、免疫沉淀或免疫组化)。显示 ALT 的细胞的另一个特征是存在长且异质性的端粒(Bryan 等, 1997, *Nature Medicine*, 3: 1271-1274)。因此, 诊断方法可包括检测长且异质性端粒的存在作为具有 ALT 细胞的指标。方法包括但不限于, 末端限制性消化及其修饰、使用端粒特异性探针的原位杂交、或使用端粒特异性 DNA 或 PNA 探针的流式细胞术。

在优选的实施方案中, 直接针对 L1RT 的核酸探针能够被用来检测经历快速增殖的组织中 L1RT mRNA 水平的存在和/或增加, 例如原代癌细胞, 包括人骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌或黑素瘤。因此, 本发明提供使用与 L1RT 亚序列互补的核酸探针来检测和确定病理性增殖的细胞包括癌细胞的方法。例如, 确定病理性增殖的细胞的方法可包括用直接针对 L1RT mRNA 的核酸探针来将检测细胞中 L1RT mRNA 的表达水平与对照细胞中 L1RT mRNA 的表达水平进行比较。当观察到 L1RT 的表达水平与对照细胞相同时, 检测细胞就被确定为病理性增殖细胞。

优选用于本发明方法的核酸探针与人 L1RT 核酸序列, 优选 mRNA 完全互补, 并且检测细胞是人细胞。与人 L1RT RNA 序列完全互补的核酸探针的一个实例是 5'-TCC TGC TTT CTC TTG TAG GCA-3' (SEQ ID NO: 6)。但用于本发明方法的核酸探针也可以与人、小鼠或其他哺乳动物的 L1RT mRNA 或 L1RT 逆转录转座子 RT 序列基本互补。对于本领域的技术人员显而易见的是, 核酸探针中可以进行不会影响该探针有效检测病理性增殖细胞(例如癌细胞)中

L1RT RNA 的能力的取代，且因此这种取代是在本发明的范围之内。用于本发明方法中的核酸探针可以是 DNA 探针、或修饰的探针，例如肽核酸探针、硫代磷酸探针、或 2'-O 甲基探针。核酸探针的长度可以是大约 8 或 10 个到 50 个核苷酸，优选大约 15 到 25 个核苷酸长度。本发明的方法可以在来自人、哺乳动物、或其他脊椎动物的细胞提取物、培养的细胞、或组织样品中很容易地进行。

本发明的方法可用于检测由于 L1RT 在体外细胞、细胞培养液、以及人细胞和组织，例如实体瘤和癌（人骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌、或黑素瘤）中表达而引起的不恰当、病理性或非正常增殖的细胞。

本发明也提供检测和/或抑制高度增殖细胞或癌细胞的试剂盒。该试剂盒可具有与 L1RT mRNA 的序列完全互补或基本互补的核酸探针。用于抑制病理性增殖细胞的增殖的试剂盒，包括使细胞接触试剂的步骤的试剂盒，可具有当接触细胞时能够影响病理性增殖的试剂，例如，与 L1RT 核酸的亚序列基本互补的，优选完全互补的反义寡核苷酸。该试剂盒可以是含有一种或多种上述核酸探针、反义寡核苷酸、或含有或不含这里所讨论的检测标记的其他合适试剂的容器形式。该试剂盒可包含用于样品 RNA、DNA 或蛋白分离和杂交的适合的膜，优选为适合所要求保护的方法使用的分析装置的形式。该试剂盒也可包括用来进行本发明方法的说明书手册。试剂盒也可包括用于检测出现可检测标记的试剂，和/或在进行多种检测中有用的材料，包括阳性、阴性对照、内部和/或外部对照。试剂和材料的例子是 RNA 抽提缓冲液、杂交缓冲液、试管、移液管等。

能够用于本发明方法的 L1RT 抑制剂或拮抗剂应该不以任何方式限于本申请中提及的特异性化合物。考虑到本发明公开了负责细胞高度增殖的靶标，一些其他有用的 L1RT 抑制剂或拮抗剂可通过简单的筛选方法加以确认。活性化合物可包括天然存在或现有技术中的化合物的片段或部分。但是，在人体中测试这种化合物之前，必须在筛选测试中检测各种候选试剂来确定哪些具有作为抗肿瘤药物

的潜力。用于检测药物对癌症影响的许多检测是本领域已知的。因此，在特别的实施方案中，本发明涉及确定或选择可调节 L1RT 表达或活性的化合物的方法。干扰 L1RT 生物活性的药物是抗肿瘤药物的优良候选者，因为它们影响导致不受控制的增殖或细胞数量持续增长的步骤之一。

化合物或药物的筛选可用纯化的 L1RT 酶、体外模型、细胞培养物、遗传改变的细胞或动物、或异种移植模型抗肿瘤分析进行。特别有意义的是筛选对人细胞有低毒性的试剂的检测。候选试剂包括很多化学品种类，尽管其一般是有机分子、反义多核酸、或具有大于 50 小于大约 2,500 道尔顿分子量的小有机分子、嘌呤和嘧啶的类似物、或其组合。已知的药物抗肿瘤剂可进行进一步的化学修饰，例如酰胺化，来生产结构类似物。如果筛选分析是结合分析法，可使一个或多个分子与标记结合到一起，其中该标记能够直接或间接地提供可检测到的信号。也可使用不同的标记，例如放射性同位素、荧光染料、化学发光试剂、酶和特异性结合分子、颗粒，例如磁性微粒。其他多种试剂，诸如盐、中性蛋白，例如白蛋白，去污剂等，也可用于促进优化的蛋白-蛋白结合和/或减少非特异性或背景相互作用。也可使用提高分析效率的试剂，例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗微生物剂。

例如，最简单形式的用于确定化合物或试剂的筛选检测或方法可包括使候选化合物或待测化合物在一定条件下与表达 L1RT 的细胞一起温育，其中对于该化合物或待测化合物的存在，L1RT 和其他细胞成分的相互作用诱导可检测或可测量的生物学效应或化学效应

（例如向端粒添加核苷或类似物，或保持端粒长度），之后在存在该化合物或待测化合物时，确定 L1RT 与细胞成分相互作用诱导可检测或可测量的生物学效应或化学效应的能力。如果候选化合物和待测化合物调节 L1RT 与其他细胞成分的相互作用，则选择这个化合物。

感兴趣的其他检测可以是，例如，可将表达 L1RT 的细胞系或具

有 L1RT 基因的表达构建体在允许 L1RT 表达的条件下导入细胞系。向这个细胞系加入候选试剂，检测抑制或下调 L1RT 活性的能力。L1RT 的活性水平可通过功能性读取或检测来确定，包括 L1RT 表达水平的变化、与端粒或一些其他底物的结合或结合的抑制、凋亡、生长的存在或缺乏、转移的存在或缺乏、细胞分裂的存在或缺乏、细胞迁移的存在或缺乏、软琼脂集落形成的存在或缺乏、接触抑制的存在或缺乏、侵入性的存在或缺乏、和/或肿瘤进展或其他恶性表型的存在或缺乏。

例如，确定候选化合物降低细胞中野生型 L1RT 表达能力，以及在这些细胞中伴随诱导凋亡的能力的方法，可如下进行：获得表达 L1RT 的细胞，混合候选物质与细胞；以及确定该候选物质降低 L1RT 含量和/或细胞染色体上端粒长度的能力。

用来确定候选物质能够干扰 L1RT 表达的另一个简单的实施例可如下进行：可以测量或确定细胞的 L1RT 状态。如果细胞具有表达 L1RT 的能力，则在没有添加候选化合物时测定其基础的 L1RT 含量。之后向细胞添加候选化合物，并且在存在候选化合物时再次测定野生型 L1RT 的表达。相对于在缺少待测或候选化合物时细胞的 L1RT 表达，减少 L1RT 表达的候选化合物表明该候选化合物具有野生型 L1RT 表达抑制能力。因此，它能够具有预防和/或治疗性的癌症缓和与凋亡的能力。

本发明也包括不同动物模型的使用。通过研发或分离表达 L1RT 的细胞系，能够在不同的实验动物中产生疾病模型。这些模型可以采用皮下、正位(orthotopic)或全身细胞给药，以模拟各疾病状态。例如，H1CF/c 成纤维细胞系 (ALT) 可用 pSV2neo- EJras 质粒 DNA (含有来自 EJ 膀胱癌细胞系的活化 c-Ha-ras 癌基因)转染，用 G418 选择，并皮下注射进裸鼠体内以获得 ALT 肿瘤。产生的肿瘤在端粒重复扩增法 (TRAP) 分析中并不显示任何可检测到的端粒酶活性，并且 Southern 分析显示它们保持诊断 ALT 的 TRF 长度模式(Yeager 等, Cancer Res. 1999,59 (17): 4175-9)。最终，端粒酶敲除的动物(例如，

端粒酶 KO 小鼠<sup>-/-</sup> ; Rudolph 等, 1999, Cell, 96: 701-712)或在动物中作为转基因表达野生型 L1RT 的转基因动物可用作治疗模型。当然, 动物模型也提供检测试剂组合的有用工具。在体内确定化合物的效果可涉及多种不同的标准, 包括但不限于, 存活率、肿瘤消退、肿瘤进展停滞或减缓、肿瘤的消除和转移的抑制或防止。

用待测化合物治疗动物涉及将化合物以合适的形式施用于动物。给药将通过任何能够用于临床或非临床目的的途径来进行, 包括但不限于, 口、鼻、颊、直肠、阴道或局部给药。或者, 给药也可通过气管内滴注、支气管滴注、皮内、皮下、肌肉内、腹膜内或静脉内注射。特别预期的是全身性静脉内注射, 通过血液或淋巴供应的局部给药和肿瘤内注射。

当然, 筛选可包括合适的对照值(例如, 在缺少候选化合物时在显示 ALT 的分离细胞或动物中 L1RT 的表达或生产水平)。被认为是阳性的待测化合物或候选化合物, 即可能有益于癌症治疗的化合物, 是具有实质的生长抑制效果的化合物(例如能够使细胞生长减少优选至少 20%, 更优选至少 50%, 最优选至少 80%, 最优选大约 90-100% 的待测试剂)。

这样的化合物在许多方面是重要的。它们在 L1RE-相关癌症的治疗方案中至关重要, 无论在癌症治疗中是单独给药, 还是与本领域技术人员已知的化学和放疗方案相组合。另外, 仅仅通过减少 L1RT, 这些化合物将有助于选择性诱导癌症细胞的大规模凋亡。

选择具有所需药物活性的化合物, 并且可以将其在生理学或药物可接受的载体中施用于宿主来治疗增生性疾病等。药物可接受的载体部分取决于待给药的特定组合物(例如核酸、蛋白质、有机化合物、载体或转导的细胞), 以及用于施用该组合物的特定方法。因此本发明的药物组合物存在广泛种类的适当制剂。

本发明的药物组合物可包含重组产物。例如可将靶向 L1RT 的反义寡核苷酸或 dsRNA 插入用于转染靶细胞和生物体的许多已知载体中的任何载体内。例如, 核酸以 DNA 质粒、裸核酸和与递送载体如

脂质体复合的核酸的形式进行递送。病毒载体递送系统包括 DNA 和 RNA 病毒(Porter, 2004, Retroviral vectors for suicide gene therapy, Methods Mol Med.,90: 91-106; Wang 等, 2004, Prolonged and inducible transgene expression in the liver using gutless adenovirus: A potential therapy for liver cancer, Gastroenterology, 126: 278-289)。在具体的实施方案中, 使用含有反义 L1RT 核酸的病毒载体。例如, 可以使用本领域已知的用于癌症基因治疗的逆转录病毒载体或腺病毒载体。将用于基因治疗的反义 L1RT 核酸克隆进合适的载体中, 其有利于该基因递送进入患者。

核酸的非病毒递送方法可包括裸多核苷酸、试剂增强的多核苷酸摄取、显微注射, 粒子轰击、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸共轭物。递送可以是到细胞(离体给药)或到靶组织(体内给药)(Narayanan, Antisense therapy of cancer, In Vivo. 1994,8(5): 787-793; Zhang 等, Anti-oncogene and tumor suppressor gene therapy--examples from a lung cancer animal model, In Vivo. 1994,8 (5): 755-769)。在特别的实施方案中, 使用一种核酸分子, 其中反义 L1RT 序列和任何其他需要的序列的侧翼为促进在基因组中所需要的位点发生同源重组的区域, 由此提供反义 L1RT 核酸的染色体内表达。位于 L1RT ORF (ORF2)的 5'末端一侧的序列的一个实例是 5'-agaccat caagactagg aagaaactgc atcaactaat gagcaaaatc accagctaac atcata-3' (SEQ ID NO : 7)。

本发明的药物组合物、抑制剂或拮抗剂能够以多种方式给药, 包括口服、局部、非肠道给药, 例如皮下、腹膜内、通过病毒感染、血管内给药等。根据导入的方式, 化合物可以多种方式配制。适用于口服给药的制剂可以是液体溶液。适用于非肠道给药的制剂(例如通过关节内、心室内、鼻内、静脉内、肌肉内、皮内、腹膜内和皮下途径)包括含水和非含水的、等渗无菌注射溶液。在本发明的实践中, 组合物能够通过例如静脉输液、口服、局部、非肠胃或腹膜内给药。口服和非肠道给药是优选的给药方法。配制和给药的技

术是本领域常规的，进一步的细节可在例如"Remington's Pharmaceutical Sciences (2000), Gennaro AR (ed), 20th edition, Maack Publishing Company, Easton, PA 中发现。

含有用于调节 L1RT 的化合物（例如核酸、蛋白质、有机化合物、载体和转导的细胞）的药物组合物以能获得预期目的的有效量施用于需要该组合物的患者。治疗有效量或药理学有效量是本领域公知的措辞，是指药物产生预期药理学效果的有效剂量。例如，治疗有效量是足以随时间在患者中产生有益治疗反应（即，治疗疾病或状况或缓和被治疗患者中疾病的症状）的量。实际的给药量将根据被施加治疗的个体情况而定，优选是获得所需效果且没有明显副作用的优化剂量。如下文进一步详细描述，剂量也可根据所施用的特定抑制剂或拮抗剂的效果和患者的状况，以及被治疗患者的体重或表面积来确定。剂量的大小也根据对特定患者施用例如特定试剂、载体或转导细胞类型所伴随的任何不良副作用的存在、特性和程度来确定。

能够防止、抑制或减少 ALT 介导的癌症发病率的药物的治疗有效量，利用来自在此公开的细胞培养分析，和/或来自利用动物模型的体内分析所获得的数据，是很容易确定的。有鉴于此，可使用本领域已知的任何 L1RT 诱导的癌症动物模型(Hahn 等, 1999, Nature Medicine, 5 (10): 1164-1170; Yeager 等, 1999, Cancer Research, 59 (17): 4175-4179)。动物模型也能够用来评估对人体的合适剂量范围和给药途径。在转变为临床环境之前，荷有人来源实体瘤的实验动物（或本领域公认的动物模型）经常被用来优化合适的治疗剂量。这种模型已知在预测有效的抗癌策略中是非常可靠的。例如，荷有实体瘤的小鼠或本领域公认的小鼠模型被广泛用于前期临床测试，以确定获得有益抗肿瘤效果而毒性最小的治疗剂的工作范围。由于在本领域公认的模型中已经证实了安全性，至少对于 AIDS 和端粒酶介导的癌症中使用的核苷类似物来说，本发明的临床前检测主要是常规实验。体内效果可利用测量肿瘤形成（进展）的抑制、肿瘤消退或转

移等的试验来预测。

以下描述了利用从 U-2 OS 人骨肉瘤细胞系生长的裸鼠皮下(s. c.)肿瘤作为模型(即,携带异种移植物的老鼠)测定 AZT 抗肿瘤效力的体内测定的实例。

体内测定需要的人癌细胞例如可如下制备:从例如 ATCC 的公共来源获得端粒酶阴性,但 ALT 阳性的 U-2 OS 人骨肉瘤细胞系。细胞于 37°C,5% CO<sub>2</sub> 的潮湿空气中保持在补充有 10%胎牛血清的 McCoy 5 培养基中。初步检测显示,对于明显的抗肿瘤活性,U-2 OS 肿瘤模型需要癌基因表达。因此,按照厂商说明书通过 Lipofectamine 2000™ 转染,将活化的 *ras*-癌基因表达载体导入接近汇合的 U-2 OS 细胞。转染前一天,将 U-2 OS 细胞以  $1 \times 10^5$  个细胞的密度接种于 6 孔板中。用 Sca I 酶限制性消化使质粒 pBABE-puro-*ras*-V12(可公开获得)线性化。用线性化的构建体转染细胞并在培养中生长。转染一天后可稀释细胞。之后用嘌呤霉素( $0.5 \text{ mg/ml}^{-1}$ )选择细胞 8 天。另一个会在小鼠模型中产生肿瘤的人 ALT 细胞系的实例是用 pSV2neo-EJras 质粒(含有来自 EJ 膀胱癌细胞系的活化 c-Ha-ras 癌基因)DNA 转染并用 G418 选择的 IICF/c 成纤维细胞系。

对于体内检测,获得免疫缺陷的小鼠,例如大约 5-7 周龄的瑞士纯合裸鼠(*nu/nu*)(或免疫缺陷小鼠,Balb/c-ByJ-Hfh1 lnu),在施用癌细胞之前保持于不含病原体的环境中。将包含在 200  $\mu\text{l}$  无血清培养液中的大约  $5 \times 10^5$  个 U-2 OS/*ras*-V12 细胞通过体侧皮下注射(s.c.)输送给用 Metofane 暂时麻醉的全部动物以产生肿瘤。或者,肿瘤发生可在皮下注射大约  $30 \times 10^6$  个未转化的 U-2 OS 细胞后实现(Manara 等,2000, Reversal of malignant phenotype in human osteosarcoma cells transduced with the alkaline phosphatase gene, *Bone* 26 (3): 215-220)。之后小鼠被分为试验组和对照组。

在一个实施方案中,评估皮下肿瘤生长或进展时间的影响,而不是已建立肿瘤的大小缩减。在这个实施方案中,从第 0 天开始,试验组中的小鼠例如在饮水中获得 AZT (Retrovirm IV,

GlaxoSmithKline)。水中 AZT 的浓度可以是 2mg/ml。每 3 天提供 AZT 的新鲜溶液。对照组中的小鼠只接受饮用水。每 2-3 天测量肿瘤。当肿瘤超过  $1\text{ cm}^3$  时，处死小鼠。肿瘤体积用公式  $4/3\pi r^3$  计算，其中  $r$  是肿瘤的半径。对照组中的所有小鼠应长出肿瘤，而试验组中的全部小鼠保持没有肿瘤。

在另一个实施方案中，本发明的试剂和方法可用于促进携带预先已建立肿瘤的动物体内肿瘤的衰退；即本发明的试剂可用来治疗具有预先存在的肿瘤的动物。在这种情况下，将癌细胞皮下注射入裸鼠(*nu/nu*)侧腹来建立肿瘤。肿瘤细胞植入后一旦肿瘤建立，即向试验组中的小鼠施用含有有效针对 L1RT 活性的核苷类似物的组合物，而对照组中的小鼠接受不含有该核苷类似物的相同组合物（例如水或盐），每天 2-3 次。每 2-3 天监测肿瘤生长。当在肿瘤细胞植入 10-14 天后向这些荷瘤动物施用核苷类似物时，观察到肿瘤生长迟缓。这种肿瘤细胞生长的抑制在对照组中未发现。肿瘤植入几周后，只有用核苷类似物处理的动物显示 100% 的存活率。

例如，异种移植的肿瘤能够通过注射转化的 IICF/c 成纤维细胞而在免疫缺陷的小鼠皮下产生。可将大约  $2 \times 10^6$  个细胞皮下注射进用 Metofane 短暂麻醉的小鼠中。优选细胞沿着其背侧注射。每 2-3 天测量生长中的肿瘤。能够用卡钳测量肿瘤的最长轴以及与该轴垂直的轴来监测肿瘤的生长。肿瘤体积可用公式  $4/3\pi r^3$  计算，其中  $r$  是肿瘤的半径。可切下肿瘤并在处理前称重。用于分子生物学分析的组织可在液氮中速冻并储存于  $-80^\circ\text{C}$ 。异种移植的肿瘤在端粒重复扩增方案(TRAP)检测中没有可检测到的端粒酶活性。诊断显示 ALT 的细胞的 TRF 长度模式可通过 Southern 分析来验证。

诱发肿瘤后，试验组中的小鼠可以用 AZT 治疗。小鼠可一天 2 次腹膜内注射溶于 PBS 中的 AZT 溶液，每天总剂量为 10mg/kg。对照组小鼠可注射 PBS。或者，相同每日剂量的 AZT 可在饮用水中给予。对照组中的小鼠将具有活跃生长的肿瘤，而试验组中的小鼠均没有肿瘤。作为单独的一组对照，可通过用 WM1175 (恶性黑素瘤) 或

HUT292DM (肺癌)细胞代替转化的 IICF/c 成纤维细胞注射细胞免疫缺陷小鼠而在裸鼠中诱导端粒酶阳性肿瘤。应注意的是免疫缺陷小鼠中的端粒酶阳性细胞不能被用于抑制 ALT 癌细胞生长的剂量的 AZT 所抑制。

在另一个实施方案中,也可使用测定凋亡促进的体内分析。在这个实施方案中,可检测用治疗性组合物处理的异种移植小鼠中凋亡病灶的出现并与未处理的对照异种移植小鼠相比较。在处理小鼠的肿瘤中发现的凋亡病灶的程度提供了该组合物治疗效果的指标。

在设计用于治疗人 ALT-介导的癌症(早期肿瘤和血管化的肿瘤)的药剂的适当剂量时,可从在此描述的动物研究很容易地外推以获得临床给药的合适剂量。为了获得这个转换,将考虑每单位质量的实验动物所施用的药剂质量,优选考虑实验动物和人患者之间体表面积的差异。所有这些计算对本领域普通技术人员来说是已知和常规的。因此,治疗有效量的确定是本领域技术人员力所能及的。

例如,在采用在细胞培养测定和小鼠研究中成功的 AZT 剂量时,以及在基于质量和表面积进行标准计算时,用于人患者的有效剂量是每个患者每天大约 100 mg 到大约 1000mg 的 AZT,优选每个患者每天大约 500 mg 到大约 600 mg 的 AZT。因此,利用这些信息,在此预期用于人给药的治疗剂(例如,核苷类似物 3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷(AZT)、2',3'-双脱氧肌苷(ddI)、2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸苷(d4T)、或更昔洛韦)的低剂量可以是每个患者每天大约 1、5、10、20、25 或大约 30mg;用于人给药的治疗剂的有用高剂量可以是每人每天大约 250、300、400、450、500、1000、3000 或大约 6000 mg。有用的中等剂量可以是每个患者大约 500 到大约 3000mg。尽管有这些注明的范围,应当理解考虑到这里所述的参数和详细指导,活性或最佳范围的进一步变化也包括在本发明的范围内。本发明的治疗方案的目的一般是产生明显的抗肿瘤效果,同时仍然将剂量保持在与不可接受的毒性相关的水平以下。除了改变剂量本身外,也可改变给药方案以优化治疗策略。目前优选的治疗策略是在大约 40 天周

期内，每天施用大约 1 - 500mg，优选大约 10-100mg 的 L1RT 抑制剂或拮抗剂或包含其的治疗性混合物。给药能通过口服的单个或分开剂量，或例如直接向实体瘤部位给药，或以缓释制剂形式来完成。负责给药的医师根据本发明所公开的内容，将能够为受试个体确定合适的剂量、给药的形式和途径。这种优化和调整是本领域常规进行的，并且决不会反映过多的实验。在施用特定剂量本身时，根据无菌性、致热原性、纯度和对人患者全身性的一般安全性的管理标准，优选提供药物学上可接受的组合物。当然，身体检查、肿瘤测量和实验室检测应在治疗前进行，并且在治疗后以最多为 1 到几个月的间隔进行，本领域的技术人员应知道如何进行这种常规程序。临床反应可通过任何可接受的测量来确定。例如，完全的反应可通过治疗后指定期间内全部可测量的肿瘤消失来确定。

### 实施例

下列实施例进一步阐明了本发明。下面的实施例用本领域技术人员已知且是常规的标准技术进行，除非另有详细说明。这些实施例用例证说明而非限制的方式提供。

实施例 1 AZT 或更昔洛韦处理后端粒酶阴性 ALT 细胞中端粒缩短、G2 停滞和凋亡的诱导

为了检测据报道通过 ALT 机制<sup>4</sup>保持端粒的两个细胞系(U-2 OS 和 Saos-2 骨肉瘤)中 L1 特异的 RNA，通过使用 L1 逆转录转座子特异性探针的斑点印迹法分析总 mRNA。报告的端粒酶阳性细胞系(HEC-1 和 HeLa)用来进行比较<sup>4,21</sup>(图 1)。两个 ALT 细胞系(U-2 OS 和 Saos-2 骨肉瘤)在这个检测中都是阳性。如以前所报道的<sup>20</sup>，HEC-1 细胞是完全阴性的，HeLa 细胞中只有痕量的 L1 转录物。

用治疗性浓度的 AZT 处理 ALT 细胞系，来测定滑动端粒 DNA 合成是否能被 AZT-TP 所抑制，并因此诱导端粒变短。AZT 处理的和未处理的细胞系中的端粒长度通过使用端粒特异的肽核酸(PNA)

探针的流式细胞术进行测定<sup>22,23</sup>。为了确定细胞周期分布,用碘化丙啶(PI)染色细胞<sup>22</sup>。AZT处理14天后,两个ALT细胞系均证实发生端粒缩短、大量凋亡和G2停滞(图2)。为了确定AZT诱导的端粒缩短对ALT细胞的特异性,用AZT在相同条件下处理已知端粒酶阳性的HeLa细胞系。在HeLa细胞中,选定浓度的AZT对端粒的长度或细胞周期分布没有影响(未显示)。

为了证明端粒缩短和DNA合成速率的动态变化,用AZT处理U-2 OS细胞不同的时间,并同时用流式细胞术分析。DNA合成速率通过5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BdU)掺入法<sup>24</sup>来确定。结果(图3)显示渐进性的端粒缩短和DNA合成减少。重要的是注意到细胞周期分布、DNA合成和端粒长度的变化迅速,并且在AZT处理仅仅10天后就能检测到。

同时,PI染色证实在处理后期,与未处理的细胞相比较,AZT处理的细胞中有更高的DNA含量。这一事实的合理解释是短的端粒诱导染色体末端到末端的连接<sup>12,26</sup>。由于U-2 OS和Saos-2代表p53+/+和p53-/-癌细胞系<sup>27</sup>,AZT处理的ALT细胞中凋亡的诱导看来不依赖于p53。

另外,U-2 OS细胞也用治疗浓度的鸟嘌呤类似物更昔洛韦(GCV)处理,来证实滑动端粒DNA合成能够被GCV-TP抑制,并且端粒的缩短能够被诱导。未处理的(图4a)和GCV处理的细胞(图4b)中,端粒长度可如上所述,用端粒特异性PNA探针通过流式细胞术测量。

为了确定细胞周期分布,用碘化丙啶(PI)染色细胞。用浓度为0.3 $\mu$ g/ml的GCV处理14天后,U-2 OS细胞证明发生端粒缩短、大规模凋亡(程序性细胞死亡)和G2停滞。

应该注意的是,例如AZT和GCV的核苷类似物一旦进入宿主细胞,就被转化为它们的三磷酸酯形式。例如,如本领域技术人员熟知的,GCV首先被磷酸化为GCV-单磷酸(GCV-MP)。之后GCV-MP被内源性激酶进一步磷酸化为GCV-双磷酸(GCV-BP)和GCV

- 三磷酸 (GCV-TP)。GCV-TP 缺乏脱氧核糖上的 3'OH, 以及 DNA 链延长所必需的 2'和 3'碳之间的键。因此, GCV-TP 向 U-2 OS 细胞或其他宿主细胞基因组内的整合抑制 DNA 聚合酶, 并且导致 DNA 链终止, 这引起了细胞的凋亡。

已经报道端粒延长受到抑制的肿瘤失去了产生肿瘤的能力<sup>12,26</sup>, 并且 AZT 已经被临床用于治疗 AIDS。本公开的内容证明 AZT 能够用来治疗多达 30% 的癌症病例。也可使用其他一些已经在临床上应用的核苷逆转录酶抑制剂 (例如 2', 3'-双脱氧肌苷 (ddI) 或 2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸苷 (d4T) )。

实施例 2: L1 逆转录酶反义抑制后端粒酶阴性 ALT 细胞中端粒缩短、G2 停滞和凋亡的诱导

为了确证 ALT 只通过 L1 逆转录酶进行, 用含有有义和反义方向的人 L1 ORF2 部分的表达构建体转染 U-2 OS 细胞。如下产生 L1 特异性逆转录酶靶向的反义构建体: 用 RT-F (5'- ATG ACA GGA TCA ACT TCA CAC-3') (SEQ ID NO : 8)、RT-R (5'-TCC TGC TTT CTC TTG TAG GCA-3') (SEQ ID NO : 6)引物, 以 pBS-L1<sub>RP</sub>-EGFP 质粒作为模板进行 PCR。将 929bp 的 PCR 产物克隆到 pTargetT 载体 (Promega)中。

包含有义和反义方向插入的重组构建体, 用 Plasmid Midi 试剂盒 (Qiagen)纯化, 用 Xmn I (Promega)消化, 并根据制造商的指导用 "Lipofectamine" (Gibco)将其转染进 U-2 OS 细胞中。在含有 0.5mg/ml G418 (Gibco)的培养基中选择 40 天后, 收获细胞, 用 PNA 和 PI 染色, 并且用流式细胞术<sup>22</sup>分析。L1 逆转录酶反义靶向的示意图在图 5 中显示。

图 6 所示的数据显示携带反义构建体的细胞证实有如预期的大量凋亡、G2 停滞和端粒缩短。相反, 表达有义构建体的细胞没有显示端粒长度或细胞周期的差异。

下列材料和方法用于上文的工作实施例:

细胞系: 本研究中使用的全部细胞系获得自美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD)。细胞的来源包括骨肉瘤(Saos-2 和 U-2 OS)、肝(HEC-1)和宫颈(HeLa)。细胞按照 ATCC 推荐来培养。为了用 AZT 处理细胞, 培养液中补充有  $0.2\ \mu\text{M}$  的 3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷 (Sigma)<sup>28</sup>。

斑点印迹分析: 用"RNA-STA 60"溶液 (Tel-Test, Inc.) 分离总细胞 RNA。利用  $30\ \mu\text{g}$  总 RNA 和"HRP North2South" (Pierce) 标记的 pBS-L1<sub>RP</sub>-EGFP 质粒<sup>29</sup> 作为特异性探针, 按照制造商的方案进行反应。

溴脱氧尿嘧啶核苷掺入法: 对于 BrdU 掺入, 利用与  $10\ \text{mM}$  BrdU (Sigma) 温育 2.5 小时的细胞进行细胞染色, 用 BU-33 抗-BrdU 单克隆抗体(Sigma)和 FITC 标记的 Alexa 488 山羊抗小鼠 IgG (H+L) (Fab') 片段 (Molecular Probes) 染色, 用  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$  PI (Sigma) 复染, 并通过所描述的流式细胞术分析<sup>24</sup>。

通过流式细胞术的端粒长度测量: 细胞用端粒特异性 FITC 共轭的  $(\text{C}_3\text{TA}_2)_3\text{PNA}$  (Applied Biosystems) 探针染色, 并如所描述的用  $0.06\ \mu\text{g}/\text{ml}$  PI 复染<sup>21</sup>。

利用反义策略的 L1 逆转录酶的抑制: 为了产生 L1 特异性逆转录酶靶向的反义构建体, 使用 RT-F(5'-ATG ACA GGA TCA ACT TCA CAC-3') (SEQ ID NO : 8)、RT-R (5'-TCC TGC TTT CTC TTG TAG GCA-3') (SEQ ID NO : 6) 为引物, 并以 pBS-L1<sub>RP</sub>-EGFP 质粒为模板进行 PCR。将 929 bp 的 PCR 产物克隆到 pTargetT 载体(Promega) 中。含有有义和反义方向插入的重组构建体用 Plasmid Midi 试剂盒 (Qiagen) 纯化, 用 Xmn I (Promega) 消化, 并根据制造商的指导用 "Lipofectamine" (Gibco) 将其转染进 U-2 OS 细胞。在含有  $0.5\ \text{mg}/\text{ml}$  G418 (Gibco) 的培养基中选择 40 天后, 收获细胞, 用 PNA 和 PI 染色, 并通过流式细胞术分析<sup>22</sup>。

下列编号 1-29 的参考文献在上述说明书中被引用(带有相应的上标号), 如此本领域的技术人员会将该参考文献与上文中适当的

上标号相匹配。

1. Greider, C. W., Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43,405-413 (1985).
2. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., Shay, J. W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18,173-179 (1996).
3. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015 (1994).
4. Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., Reddel, R. R. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.* 3,1271-1274 (1997).
5. Reddel, R. R., Bryan, T. M., Colgin, L. M., Perrem, K. T., Yeager, T. R. Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat. Res.* 155, 194-200 (2001).
6. Kazazian, H.H. Jr, Moran, J.V. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nat. Genet.* 19,19-24 (1998).
7. Nozawa, K., Suzuki, M., Takemura, M., Yoshida, S. In vitro expansion of mammalian telomere repeats by DNA polymerase alpha-primase. *Nucleic Acids Res.* 28,3117-3124 (2000).
8. Olovnikov, A. M. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 201,1496-1499(1971).
9. Allshire, R. C., Dempster, M., Hastie, N. D. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* 17,4611-4627 (1989).
10. Harley, C. B., Futcher, A. B., Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 34,458-460 (1990).

11. Hahn, W. C.等 Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat. Med.* 5,1164-1170 (1999).
12. Bryan, T. M. and Reddel, R. R. Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur. J. Cancer* 33,767-773 (1997).
13. Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., Reddel, R. R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* 14,4240-4248 (1995).
14. Gupta, J., Han, L. P., Wang, P., Gallie, B. L., Bacchetti, S. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1152- 1157 (1996).
15. Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L., Reddel, R. R. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* 26,447-450 (2000).
16. Mathias, S. L., Scott, A. F., Kazazian, H. H. Jr, Boeke, J. D., Gabriel, A. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* 254, 1808-1810 (1991).
17. Clements, A. P., Singer, M. F. The human LINE-1 reverse transcriptase : effect of deletions outside the common reverse transcriptase domain. *Nucleic Acids Res.* 26, 3528-3535 (1998).
18. Skowronski, J., Singer, M. F. Expression of a cytoplasmic LINE-1 transcript is regulated in a human teratocarcinoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82,6050- 6054 (1985).
19. Bratthauer, G.L., Fanning, T.G. Active LINE-1 retrotransposons in human testicular cancer. *Oncogene* 7,507-510 (1992).
20. Moran, J. V 等 High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* 87, 917-927 (1996).
21. Murakami, J., Nagai. N., Shigemasa. K., Ohama. K. Inhibition of telomerase activity and cell proliferation by a reverse transcriptase

inhibitor in gynaecological cancer cell lines. *Eur. J. Cancer* 35,1027-1034 (1999).

22. Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury G., Roosnek, E., Lansdorp P. M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol.* 16,743-747 (1998).

23. Hultdin, M.等 Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* 26,3651-3656 (1998).

24. Sasaki, K., Murakami, T., Ogino, T., Takahashi, M., Kawasaki, S. Flow cytometric estimation of cell cycle parameters using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. *Cytometry* 7,391-395 (1986).

25. Perrem, K.等 Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids. *Oncogene* 18,3383-3390 (1999).

26. Guiducci, C., Cerone, M. A., Bacchetti, S. Expression of mutant telomerase in immortal telomerase-negative human cells results in cell cycle deregulation, nuclear and chromosomal abnormalities and rapid loss of viability. *Oncogene* 20,714-725 (2001).

27. Craig, C.等 Effects of adenovirus-mediated p16INK4A expression on cell cycle arrest are determined by endogenous p16 and Rb status in human cancer cells. *Oncogene* 16,265-272 (1998).

28. Schmidtmayerova, H., Mayer, V. Inhibition of human immunodeficiency virus replication by azidothymidine (Aztidin Lachema) in cultured cells. *Bratisl. Lek. Listy* 94,76-80 (1993).

29. Ostertag, E. M., Prak, E. T., DeBerardinis, R. J., Moran, J. V., Kazazian, H. H. Jr. Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* 28, 1418-1423 (2000).

说明书中提到的全部出版物、专利和专利申请体现本发明所属领域的技术人员的水平。全部出版物、专利和专利申请在此引入作为参考，其程度同于每个单独的出版物或专利申请具体且分别地引入作为参考。尽管前述发明已经为了清楚理解的目的通过例证说明和实施例加以详细描述，显而易见的是可在所附权利要求的范围内实现某些变化和修改。



1            2            3            4            5

图 1

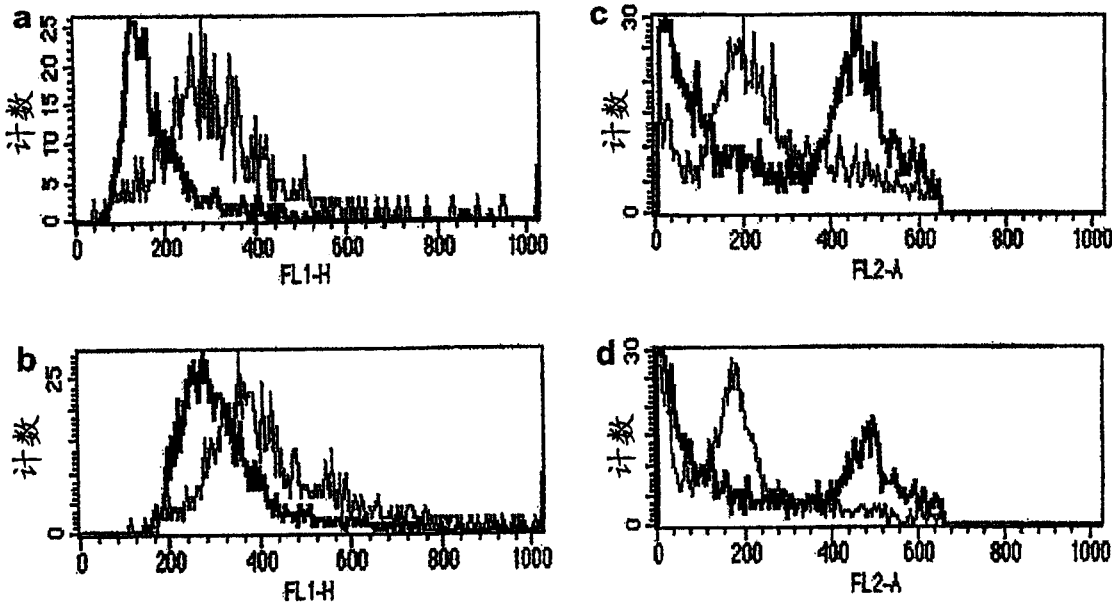


图 2

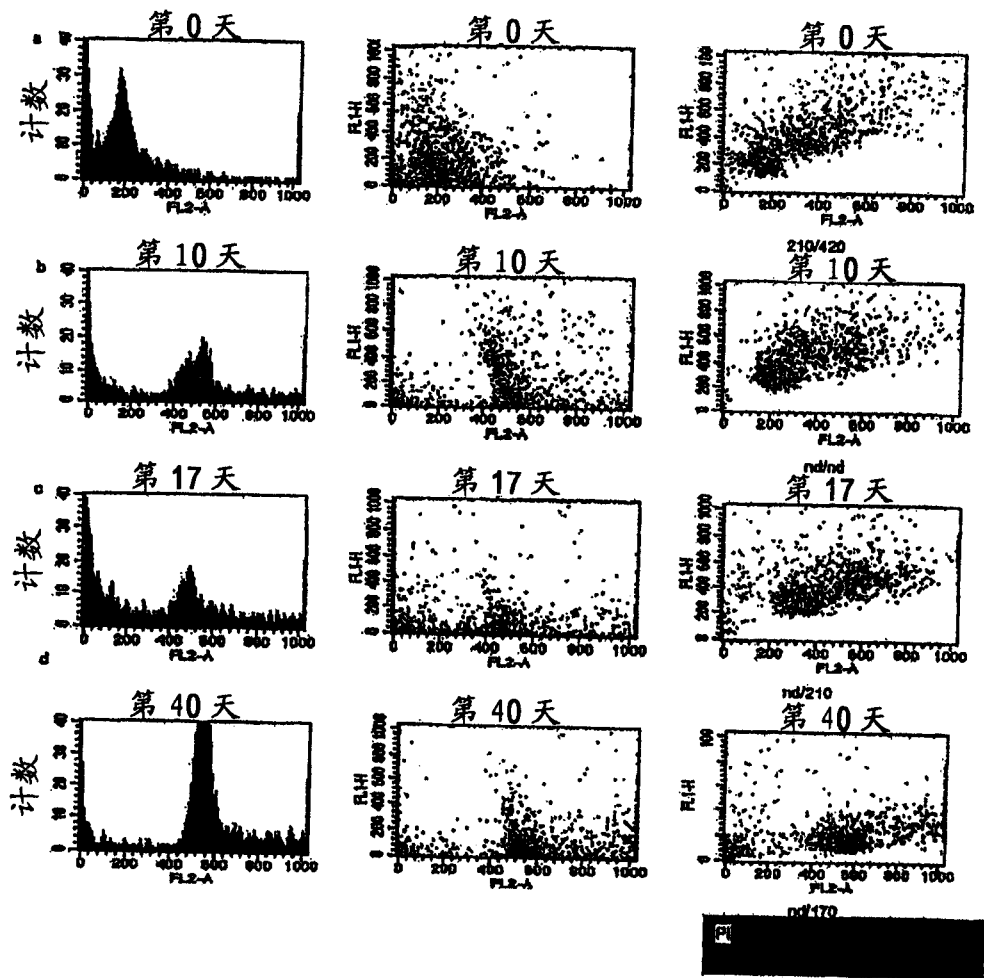


图 3

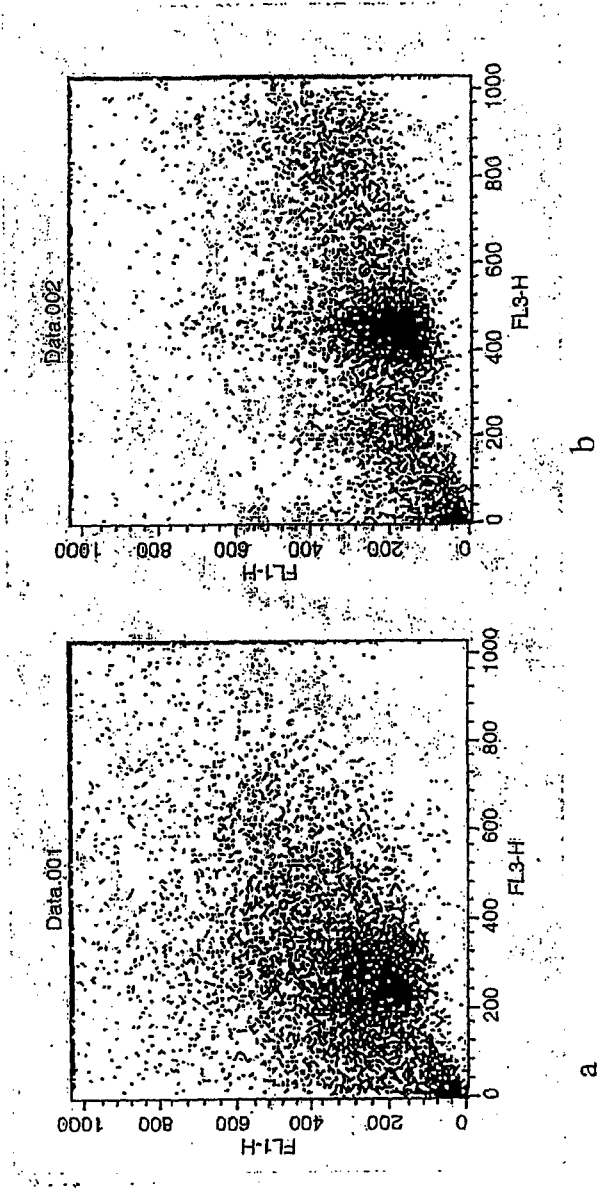


图 4

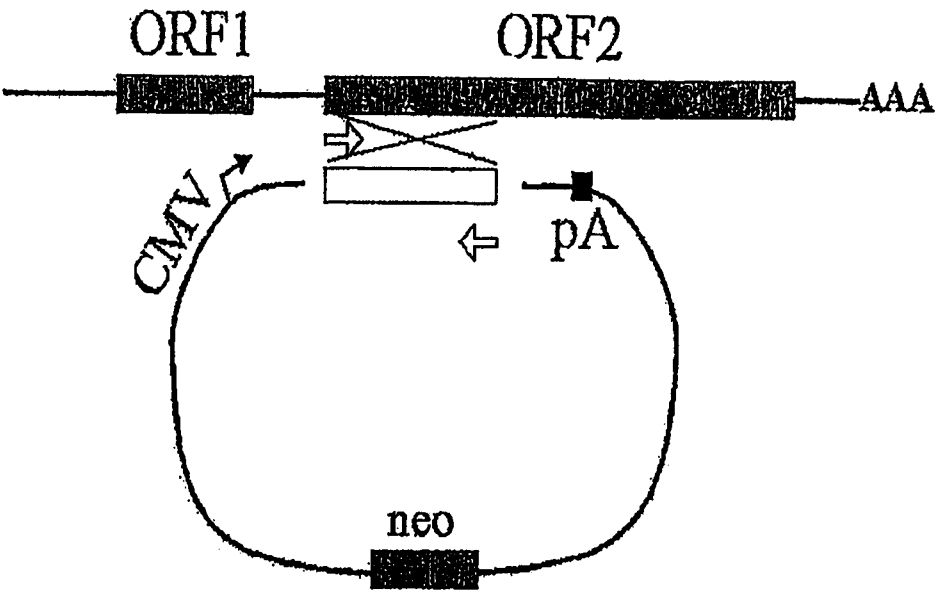


图 5

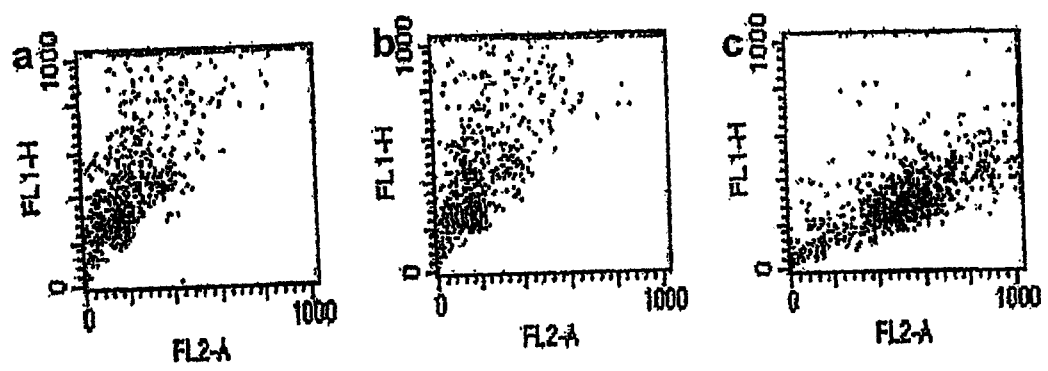


图 6