



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101855346 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 06

(21) 申请号 200880109851. 2

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

(22) 申请日 2008. 08. 20

11105

代理人 罗天乐 封新琴

(30) 优先权数据

60/957, 853 2007. 08. 24 US

61/036, 030 2008. 03. 12 US

(51) Int. Cl.

C12N 15/00 (2006. 01)

A61K 31/70 (2006. 01)

A61K 48/00 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 04. 01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2008/065234 2008. 08. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02009/028521 EN 2009. 03. 05

(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 中村佑辅 中川英刀 中鹤修一

权利要求书 3 页 说明书 54 页 序列表 22 页
附图 9 页

(54) 发明名称

PKIB 和 NAALADL2 用作前列腺癌治疗和诊断的靶基因

(57) 摘要

本发明的特色是用于检测前列腺癌,特别是激素难治性前列腺癌(HRPC)或去势抵抗性前列腺癌(CRPC)的方法,所述方法系通过检测与正常器官相比 PKIB 或 NAALADL2 的过表达来检测前列腺癌。还公开了鉴定用于治疗 and 预防前列腺癌(包括 HRPC)的化合物的方法,所述方法系基于 PKIB 或 NAALADL2 在前列腺癌中的过表达、PKIB 或 NAALADL2 的细胞增殖功能、PKIB 或 NAALADL2 的细胞内定位或 PKIB 与 PKA-C 之间的相互作用来鉴定化合物。另外,提供了通过施用针对 PKIB 或 NAALADL2 基因的双链分子来治疗前列腺癌的方法。本发明还提供了产品,包括双链分子和编码它们的载体,以及包含可用于本发明所提供方法的分子或载体的组合物。

1. 一种分离的双链分子,它在被导入细胞中时,在体内抑制PKIB或NAALADL2的表达和细胞增殖,该双链分子包含有义链和与之互补的反义链,它们彼此杂交形成该双链分子。

2. 权利要求1的双链分子,其中该有义链包含与选自SEQ ID NO:16、17和19的靶序列对应的序列。

3. 权利要求2的双链分子,其长度为大约19-大约25个核苷酸。

4. 权利要求2的双链分子,其由单一多核苷酸组成,该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。

5. 权利要求4的双链分子,其具有通式 $5' - [A] - [B] - [A'] - 3'$,其中[A]是包含选自SEQ ID NO:16、17和19的序列的有义链,[B]是由3-23个核苷酸组成的间插单链,[A']是包含与[A]互补的序列的反义链。

6. 一种载体,其表达权利要求1的双链分子。

7. 权利要求6的载体,其中该双链分子具有通式 $5' - [A] - [B] - [A'] - 3'$,其中[A]是包含选自SEQ ID NO:16、17和19的序列的有义链,[B]是由3-23个核苷酸组成的间插单链,[A']是包含与[A]互补的序列的反义链。

8. 一种用于治疗癌症的方法,包括施用至少一种分离的双链分子的步骤,该双链分子抑制PKIB基因或NAALADL2基因在过表达该基因的细胞中的表达,该双链分子包含有义链和与之互补的反义链,它们彼此杂交形成该双链分子。

9. 权利要求8的方法,其中该有义链包含与选自SEQ ID NO:16、17和19的靶序列对应的序列。

10. 权利要求9的方法,其中该双链分子的长度为大约19-大约25个核苷酸。

11. 权利要求8的方法,其中该双链分子由单一多核苷酸组成,该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。

12. 权利要求11的方法,其中该双链分子具有通式 $5' - [A] - [B] - [A'] - 3'$,其中[A]是包含选自SEQ ID NO:16、17和19的序列的有义链,[B]是由3-23个核苷酸组成的间插单链,[A']是包含与[A]互补的序列的反义链。

13. 权利要求8的方法,其中该双链分子由载体编码。

14. 权利要求13的方法,其中由载体编码的双链分子具有通式 $5' - [A] - [B] - [A'] - 3'$,其中[A]是包含选自SEQ ID NO:16、17和19的序列的有义链,[B]是由3-23个核苷酸组成的间插单链,[A']是包含与[A]互补的序列的反义链。

15. 权利要求8的方法,其中待治疗的癌症是前列腺癌或激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌。

16. 一种用于治疗癌症的组合物,其包含至少一种抑制PKIB或NAALADL2的表达的分离的双链分子,该双链分子包含有义链和与之互补的反义链,它们彼此杂交形成该双链分子。

17. 权利要求16的组合物,其中该有义链包括与选自SEQ ID NO:16、17和19的靶序列对应的序列。

18. 权利要求17的组合物,其中该双链分子的长度为大约19-大约25个核苷酸。

19. 权利要求16的组合物,其中该双链分子由单一多核苷酸组成,该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。

20. 权利要求19的组合物,其中该双链分子具有通式 $5' - [A] - [B] - [A'] - 3'$,其中[A]

是包含选自 SEQ ID NO :16、17 和 19 的序列的有义链序列, [B] 是由 3-23 个核苷酸组成的间插单链, [A'] 是包含与 [A] 互补的序列的反义链。

21. 权利要求 16 的组合物, 其中该双链分子由载体编码并包含在该组合物中。

22. 权利要求 21 的组合物, 其中该双链分子具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3', 其中 [A] 是包含选自 SEQ ID NO :16、17 和 19 的序列的有义链, [B] 是由 3-23 个核苷酸组成的间插单链, [A'] 是包含与 [A] 互补的序列的反义链。

23. 权利要求 16 的组合物, 其中待治疗的癌症是前列腺癌或激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌。

24. 一种用于诊断前列腺癌的方法, 所述方法包括如下步骤:

(a) 通过选自下组的任何一种方法测定来自受试者的生物样品中基因的表达水平:

(i) 检测包含对应于 SEQ ID NO :1、3 或 5 的序列的 mRNA,

(ii) 检测包含 SEQ ID NO :2 或 4 的氨基酸序列的蛋白质, 和

(iii) 检测包含 SEQ ID NO :2 或 4 的氨基酸序列的蛋白质的生物活性; 和

(b) 将基因与正常对照水平相比的表达水平增加与前列腺癌相关联。

25. 权利要求 24 的方法, 其中前列腺癌是激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌。

26. 权利要求 24 的方法, 其中表达水平比正常对照水平高至少 10%。

27. 权利要求 24 的方法, 其中通过检测探针与所述来自受试者的生物样品的基因转录本的杂交来测定表达水平。

28. 权利要求 27 的方法, 其中该杂交步骤在 DNA 阵列上进行。

29. 权利要求 24 的方法, 其中通过检测抗体与包含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 或 4 的蛋白质的结合来测定表达水平。

30. 权利要求 29 的方法, 其中该抗体与由 SEQ ID NO :32、33 或 34 组成的多肽结合。

31. 权利要求 24 的方法, 其中该来自受试者的生物样品包括活检物、痰、血液或尿。

32. 一种抗体, 其结合包含 SEQ ID NO :33 或 34 的氨基酸序列的蛋白质。

33. 一种用于检测前列腺癌的组合物, 其含有结合包含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 或 4 的蛋白质的抗体。

34. 权利要求 33 的组合物, 其中该抗体结合 SEQ ID NO :32、33 或 34。

35. 筛选可用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法, 该方法包括如下步骤:

(a) 使测试化合物与由 PKIB 或 NAALADL2 多核苷酸编码的多肽接触;

(b) 检测所述多肽与测试化合物之间的结合活性; 和

(c) 选择与所述多肽结合的测试化合物。

36. 一种筛选用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法, 该方法包括如下步骤:

(a) 使测试化合物与由 PKIB 或 NAALADL2 多核苷酸编码的多肽接触;

(b) 检测步骤 (a) 的多肽的生物活性; 和

(c) 选择这样的测试化合物: 与不存在该测试化合物时检测到的由 PKIB 或 NAALADL2 多核苷酸编码的多肽的生物活性相比, 该化合物可抑制所述多肽的生物活性。

37. 权利要求 36 的方法, 其中该生物活性是易化细胞增殖或 PKA-C 核积累活性。

38. 一种筛选可用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法, 该方法包括如下步骤:

(a) 使候选化合物与表达 PKIB 或 NAALADL2 的细胞接触；

(b) 选择如下的候选化合物,与不存在该测试化合物时检测到的 PKIB 或 NAALADL2 表达水平相比,该化合物可抑制所述表达水平。

39. 一种筛选用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法,该方法包括如下步骤：

(a) 使候选化合物与导入了载体的细胞接触,该载体包括 PKIB 或 NAALADL2 的转录调节区和在该转录调节区的控制下表达的报告基因；

(b) 测量所述报告基因的表达或活性；和

(c) 选择与对照相比可降低所述报告基因的表达或活性水平的候选化合物。

40. 一种筛选用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法,该方法包括如下步骤：

(a) 在测试化合物的存在下,使 PKIB 多肽或其功能等价物与 PKA-C 多肽或其功能等价物接触；

(b) 检测所述多肽之间的结合；和

(c) 选择可抑制所述多肽之间结合的测试化合物。

41. 权利要求 40 的方法,其中 PKIB 多肽的功能等价物包括由 SEQ ID NO:31 组成的多肽。

42. 权利要求 40 的方法,其中 PKA-C 多肽的功能等价物包含 PKIB 结合域的氨基酸序列。

43. 一种筛选用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法,该方法包括如下步骤：

(a) 在适合 Akt 被 PKIB 多肽磷酸化并有测试化合物存在的条件下温育 PKIB 多肽或其功能等价物、PKA-C 多肽或其功能等价物、以及 Akt；

(b) 检测 Akt 的磷酸化水平；和

(c) 将步骤 (b) 中测得的 Akt 的磷酸化水平与对照水平进行比较；

(d) 选择与对照水平相比降低 Akt 磷酸化水平的化合物。

44. 权利要求 43 的方法,其中在 SEQ ID NO:35 氨基酸序列的第 473 位丝氨酸残基处检测 Akt 的磷酸化水平。

45. 权利要求 43 的方法,其中在细胞中表达 PKIB 多肽或其功能等价物、PKA-C 多肽或其功能等价物、以及 Akt,并且通过使细胞或其裂解物与测试化合物接触而将它们在测试化合物存在下进行温育。

46. 权利要求 35、36、38、39、40 和 43 的方法,其中前列腺癌是激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌。

PKIB 和 NAALADL2 用作前列腺癌治疗和诊断的靶基因

[0001] 相关申请的交叉援引

[0002] 本申请要求获得分别于 2007 年 8 月 24 日和 2008 年 3 月 12 日递交的美国临时专利申请 No. 60/957,853 和 No. 61/036,030 的权益。本文援引并入它们的全部内容用于各种目的。

技术领域

[0003] 本发明涉及生物科学领域,更具体地,涉及癌症诊断和治疗领域。特别地,本发明涉及用于检测和诊断前列腺癌的方法,以及用于治疗 and 预防前列腺癌的方法。而且,本发明涉及用于筛选可用于预防前列腺癌的药剂的方法。

背景技术

[0004] 前列腺癌 (PC) 是美国和欧洲最常见的男性恶性肿瘤,并且是第二大癌症相关死亡的原因 (Gronberg H, Lancet 2003 361 :859-64.)。由于西式饮食的流行和老龄人口的爆发性增长,PC 的发病率在大多数发达国家显著增加 (Gronberg H, Lancet 2003 361 :859-64. and Hsing AW et al., Epidemiol Rev 2001 23 :3-13.)。使用血清前列腺特异抗原 (PSA) 进行筛选导致 PC 的早期检出大大改善,增加了可通过外科手术和放射治疗治愈的局部化疾病的患者的比例 (Gronberg H, Lancet 2003 361 :859-64. and Hsing AW et al., Epidemiol Rev 2001 23 :3-13.)。然而,有 20-30% 的这类 PC 患者仍然受到疾病复发的困扰 (Feldman BJ et al., Nat Rev Cancer 2001 1 :34-45. and Han M et al., J Urol 2001 166 :416-9.)。

[0005] 雄激素 / 雄激素受体 (AR) 信号途径在 PC 发生和发展中发挥核心作用,在相对早期阶段,PC 的生长通常是雄激素依赖的 (Feldman BJ et al., Nat Rev Cancer 2001 1 :34-45. and Han M et al., J Urol 2001 166 :416-9.)。因此,大多数具有复发或晚期疾病的患者对雄激素消减疗法 (androgen-ablation therapy) 响应良好,该疗法通过手术或医药去势抑制睾丸雄激素的产生。虽然如此,但是这些患者最终会获得不依赖雄激素的和侵袭性更高的表型,称作激素难治性前列腺癌 (HRPC)。可选择地,他们最终会获得对雄激素消减疗法 (去势) 的耐受性,以及侵袭性更高的表型,称作去势抵抗性前列腺癌 (CRPC),这基本上是致死的疾病 (Scher HI, Sawyers CL. J Clin Oncol 2006 23 :8253-61.)。最近,多烯紫杉醇 (docetaxel) 和强的松 (prednisone) 的组合被确立为 HRPC 患者的新护理标准 (Tannock IF et al., N Engl J Med 2004 351 :1502-12.),但是它们不能实现治愈,对 HRPC 患者的生存益处非常有限。因此,现在许多研究团队正在尝试各种方法,鉴定对 HRPC 生长起贡献的新型分子靶标或信号途径 (Scher HI et al., J Clin Oncol 2005 23 :8253-61.)。

[0006] 这种去势抵抗性进程的机制被假定为可分成两个途径,即:涉及 AR 的途径;和旁路 AR 或不依赖 AR 的途径。它们并不相互排斥,而往往在 CRPC 细胞中共存 (Feldman BJ, Feldman D. Nat Rev Cancer 2001 1 :34-45, Scher HI, Sawyers CL. J Clin Oncol 2006 23 :

8253-61.)。有报道,许多旁路 AR 或不依赖 AR 的途径在 CRPC 细胞中被激活,有助于获得恶性或侵袭性更高的表型。AR 途径与 AR 非依赖途径 -- 例如 Her-2/neu 和 IL-6/STAT3 -- 之间还会发生对话 (Cross-talk) (Feldman BJ, Feldman D. Nat Rev Cancer 20011:34-45, Scher HI, Sawyers CL. J Clin Oncol 200623:8253-61, Grossmann ME, et al. JNCI 200193:1687-97, Yang L, et al. BBRC 2003305:462-469.)。

[0007] 在独立途径中, PTEN-PI3K-Akt 途径可能是可以解释 CRPC 表型的最关键的途径之一。Akt 是一种丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 其被磷脂肌醇 (3,4,5)- 磷酸 (PIP3) 激活, 而激活的或磷酸化的 Akt 可通过调节 GSK3 β 、BAD、FOXO 和 mTOR 来促进细胞生长和细胞存活 (Sharma M, et al. J Biol Chem 2002277:30935-41, Pap M, Cooper GM. J Biol Chem 1998273:19929-32, Downward J. 1998Curr Opin Cell Biol 10:262-67, Datta SR, et al. Cell 199791:231-41, Downward J. Cell Develop Biol 2004 15:177-82, Vivanco I and Sawyers C. NatRev Cancer 20022:289-501, Hay N. Cancer Cell 20058:179-83)。

[0008] 在正常细胞中, 肿瘤阻遏物 PTEN -- 一种可从 PIP3 除去磷酸的脂质磷酸酶 (lipid phosphatase) -- 可抑制 Akt 激活, 使细胞发生凋亡, 而一些肿瘤细胞具有 PTEN 突变或 PTEN 表达缺失, 导致 Akt 激活。除了其抗细胞凋亡功能之外, 在前列腺癌细胞中, 激活的 Akt 直接与 AR 结合, 并且在没有雄激素的条件下使 AR 磷酸化, 这也有助于 CRPC 表型 (Wen Y, et al. CancerRes 200060:6841-45)。

[0009] 实际上, 在高格里森等级的 PC 中磷酸化 Akt 的水平上升, 并且与 PC 进展或 CRPC 进展相关 (Malik SN, et al. Clin Cancer Res 20028:1168-71, Kreisberg JI, et al. Cancer Res 200464:5232-36)。

[0010] Akt 的激活需要 Thr308 和 Ser473 残基的磷酸化。磷酸肌醇依赖的激酶 1 (PDK1) 能够催化 Thr308 的磷酸化, 并且有人提出若干激酶可发挥所谓 PDK2 的功能, 可催化 Ser473 的磷酸化, 但是它们中是否有一些或全部在癌细胞中发挥生理性 PDK2 的作用仍然有待确认 (Grossmann ME, et al. JNCI200193:1687-97, Tasken K, Aandahl EM. Physiol Review 200484:137-67.)。

[0011] 另一方面, cAMP 依赖的蛋白激酶 A (PKA) 经常被认为对于介导由 cAMP 引发的多种生理或病理效应以及 G 蛋白的偶联是至关重要的。多种配体 - 受体系统可激活 PKA 信号传导途径, 并且其激活与细胞生长和分化的控制有关 (Tasken K, Aandahl EM. Physiol Review 200484:137-67, Stork PJ, Schmitt JM. Trends Cell Biol 200212:258-66)。

[0012] 在前列腺癌中, 有多项报告称, PKA 参与了雄激素非依赖性生长和神经内分泌分化 (Cox ME, et al. J Biol Chem 2000275:13812-8, Deebie PD, Cox ME, et al. Cancer Res 200767:663-72)。还有人提出 PKA 途径与 AR 途径的对话参与了 PC 细胞的雄激素非依赖性或去势抵抗性生长 (Stork PJ, Schmitt JM. Trends Cell Biol 200212:258-66, Sadar MD. J Biol Chem 1999274:7777-83)。

[0013] 该 PKA 途径受到多种因子的调节, 例如 PKA 调节亚基 (PKA-R) 或 PKA 抑制物 (Taylor SS, Kim C, Vigil D, et al. BBA 20051754:25-37, Dalton GD, Dewey WL. Neuropeptides 200640:23-34), 在癌细胞中, 这些调节因子被异常表达从而改变 PKA 途径, 并且其中一些是癌症治疗的靶标 (Miller WR. Ann NY Acad Sci 2002968:37-48, 2002)。

[0014] 先前,为了表征临床 HRPC 或 CRPC 的分子特征和鉴定用于 HRPC 或 CRPC 治疗的分子靶标,对通过 LMM(激光微束显微解剖)方法从 HRPC 或 CRPC 组织纯化的癌细胞进行了全基因组范围的 cDNA 微阵列分析,并且在 HRPC 或 CRPC 细胞中鉴定了若干不受调节的基因,其中一些可能涉及雄激素非依赖性和侵袭性表型(Tamura K et al.,Cancer Res 2007 67:5117-25.)。

发明概要

[0015] 根据 HRPC 或 CRPC 细胞的全基因组范围表达谱,有两个分子靶标:PKIB(GenBank 登录号:NM 181795)和 NAALADL2(GenBank 登录号:NM 207015andAK021754),被鉴定为可用于 PC 治疗和诊断。此外,该蛋白可用作分子靶标,用于开发新的 HRPC 治疗方法。

[0016] PKIB 是 PKA 途径中的调节因子之一,是 CRPC 中的一种过表达基因。本发明人证明,它藉由 PKA 途径与 Akt 途径之间的功能联系对 PC 细胞的生存力及其恶性表型起贡献。

[0017] PKIB 属于 PKI(蛋白激酶 A 抑制物)家族。PKIA 被认为通过直接与 PKA-C 结合来抑制蛋白激酶 A 催化亚基(PKA-C)(GenBank 登录号:NM 002730)的激酶活性,并将 PKA-C 从细胞核外排到细胞质(Glass DB et al.,J Biol Chem 1986261:12166-71.and Wen W et al.,J Biol Chem 1994269:32214-20.)。蛋白激酶 A(PKA),cAMP 依赖的蛋白激酶 A,经常被认为对于介导由 cAMP 引发的多种生理或病理效应以及与 G 蛋白的偶联是至关重要的,多种配体和受体系统可激活 PKA 信号途径,并且 PKA 激活与细胞生长和分化的控制有关(Tasken K, Aandahl EM.Physiol Review 200484:137-67, Stork PJ, Schmitt JM.Trends Cell Biol 200212:258-66)。在前列腺癌中,有多项报告提示,它参与了雄激素非依赖性生长和神经内分泌分化(Cox ME,et al.J Biol Chem 2000275:13812-8,Deeble PD,Cox ME,et al.Cancer Res 200767:663-72),PKA 途径与 AR 途径的对话也被提示参与了 PC 细胞的雄激素非依赖性或去势抵抗性生长(Stork PJ,Schmitt JM.Trends Cell Biol 200212:258-66,Sadar MD.J Biol Chem 1999274:7777-83)。

[0018] NAALADL2 是一种新的 II 型膜蛋白,属于谷氨酸羧肽酶 II(GCPII)家族。GCPII 的前列腺形式称作前列腺特异膜抗原(PSMA),在前列腺癌中表达,并且 PSMA 水平增加与 PC 进展和 HRPC 有关(Rajasekaran AK et al.,AmJ Physiol Cell Physiol 2005 288:C975-81.and Murphy GP et al.,Prostate 200042:145-9.)。考虑到它与 PSMA 的同源性和相似的表达模式,NAALADL2 应当被称作“PSMA2”。PSMA 是 FDA 批准的前列腺癌显像剂 --¹¹¹In 标记 7E11 单克隆抗体(Prostascint,Cytogen,Princeton,NJ)的靶标。PSMA 是单克隆抗体如 J591 的靶标,J591 正在临床试验中用于将显像剂或治疗剂特异性投递到 PSMA 表达细胞(Murphy GP et al.,Prostate 200042:145-9.andHolmes EH,Expert Opin Investig Drugs 200110:511-9.)。除了其作为肿瘤标志的特征之外,PSMA 具有 GPC 活性,其底物包括多聚- γ -谷氨酸化叶酸盐(poly- γ -glutamated folates)(Zhou J et al.,Nature Review Drug Disc 20054:1015-26.)。PSMA 的酶活性可被利用来设计前体药物,其中仅在表达 PSMA 的细胞中药物的无活性谷氨酸化形式被选择性切裂并从而被激活(DennyWA et al.,Eur J Med Chem 200136:577-95.)。然而,人们对于 PSMA 如何与前列腺癌进程相关联一无所知,靶定 PSMA 功能或其活性自身的可能性仍然不知晓。

[0019] 本发明突出提供一种通过确定来源于受试者的生物样品中 PIKB 和 NAALADL 的表

达水平来诊断或确定受试者的前列腺癌或前列腺癌倾向的方法。任何上述基因的表达水平与该基因的正常对照水平相比的增加表明受试者罹患前列腺癌或者具有前列腺癌发病的危险。

[0020] 本发明至少部分地基于如下的发现,即包含特定序列(尤其是 SEQ IDNO:16、17 和 19)的双链分子可有效抑制前列腺癌细胞的细胞生长。具体地,本发明提供了以 PIKB 和 NAALADL2 基因为靶标的小干扰 RNA(siRNA)。

[0021] 根据本发明的一个方面,双链分子可以被编码在载体中,并从所述载体表达。

[0022] 因此,本发明提供了通过施用本发明的双链分子或载体来抑制细胞生长和治疗前列腺癌的方法。这种方法包括向受试者施用包含一种或多种所述双链分子或载体的组合物。

[0023] 本发明的另一个方面涉及用于治疗癌症的组合物,其含有至少一种本发明的双链分子或载体。或者,本发明进一步提供了一种筛选用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法,其包括如下步骤:使测试化合物与表达 PIKB 或 NAALADL2 蛋白的细胞接触,然后选择可降低 PIKB 或 NAALADL2 蛋白的表达水平的测试化合物。进一步,本发明提供了一种筛选用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法,其中检测 PIKB 和蛋白激酶 A 催化亚基(PKA-C)之间的结合。我们预期,可抑制 PIKB 与 PKA-C 之间结合的化合物可以减轻前列腺癌的症状。而且,本发明提供了筛选用于检测癌症的抗体的方法,其中检测细胞表面中的 NAALADL2。将识别 NAALADL2 的抗体用于检测前列腺癌。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1A 半定量 RT-PCR 确认,与同样经显微解剖的正常前列腺上皮细胞(NPmix)、完整的正常前列腺组织和生命器官(心、肺、肝和肾)相比,PIKB 在 HRPC 细胞(5/5)中过表达,但在 HSPC 细胞中则不然。cDNA 含量的定量都使用 ACTB。B 针对 PIKB 表达的多组织 Northern(MTN)印迹分析显示,在成人器官中,胎盘显示大约 1.5kb 条带,而在生命器官(心、肺、肝和肾)则没有。PIKB 表达的 Northern 印迹分析显示,数个 PC 细胞系(22Rv1 和 PC-3)强烈表达 PIKB,而其它正常成人器官没有表达 PIKB。C-F 显示了 PC 组织的免疫组化分析。C 前列腺上皮内瘤(PIN)显示微弱的 PIKB 染色(+)。D Gleason 3 级的 PC 显示微弱的染色(+),而正常前列腺上皮(N)显示阴性染色。E Gleason 5 级的 PC 显示强烈的 PIKB 阳性染色(+++)。F HRPC 也显示强烈的 PIKB 阳性染色(+++)。

[0026] 图 2A 半定量 RT-PCR 确认,与同样显微解剖的正常前列腺上皮细胞(NPmix)、完整的正常前列腺组织和生命器官(心、肺、肝和肾)相比,NAALADL2 在 HRPC 细胞(7/11)中过表达。cDNA 含量的定量都使用 ACTB。B NAALADL2 表达的 MTN 印迹分析显示,在成人器官中,仅在 PC 细胞系中存在大约 10kb、6kb 和 5kb 的三个条带,而在生命器官(心、肺、肝和肾)则没有。

[0027] 图 3PIKB-siRNA 对 PC 细胞生长的影响。A RT-PCR 确认在 22Rv1 细胞(左)和 LNCaP(HP)细胞(右)中,si1 和 si2 对 PIKB 表达具有敲低作用(knockdown effect),但 si3 和阴性对照 siEGFP 都没有。B 用表达针对 PIKB 的指定 siRNA(si1、si2 和 si3)的载体和阴性对照载体(siEGFP)转染的 22Rv1 细胞(左)和 LNCaP(HP)细胞(右)的各自的 MTT 测定。与遗传霉素(Geneticin)温育 20 天后,对每次的平均值作图,误差线指示 SD(标准偏差)。Y 轴上的 ABS 表示 490nm 吸光度,以 630nm 为参比,用微滴定板读数器测量。这些实

验重复三次。用 si1 和 si2 转染 22Rv1 (左) 和 LNCaP (HP) 细胞 (右) 导致存活细胞数目大大减少, 而与此相比的是用 si3 和 siEGFP 转染没有观察到敲低作用 ($P < 0.01$, Student t 检验)。C 用针对 PKIB 的指定 siRNA 表达载体 (si1, si2 和 si3) 和阴性对照载体 (siEGFP) 转染的 22Rv1 细胞 (左) 和 LNCaP (HP) 细胞 (右) 的集落形成测定。用遗传霉素温育 20 天后, 用 1% 结晶紫染色 (crystal violet staining) 使细胞可视化。

[0028] 图 4 NAALADL2-siRNA 对 PC 细胞生长的影响。A RT-PCR 确认, 在 22Rv1 细胞中, si#690 对 NAALADL2 表达有敲低作用, 但 si#913, si#1328 和阴性对照 siEGFP 没有。利用 ACTB 定量 RNA。B 用针对 NAALADL2 的指定 siRNA 表达载体 (si#690, si#913 和 si#1328) 和阴性对照载体 (siEGFP) 转染的 22Rv1 细胞的 MTT 测定。与遗传霉素温育 20 天后, 对每次的平均值作图, 误差线指示 SD (标准偏差)。Y 轴上的 ABS 表示 490nm 吸光度, 以 630nm 为参考, 用微滴定板读数器测量。这些实验重复三次。用 si#690 转染 22Rv1 细胞导致存活细胞数目大大减少, 而相比之下其它 siRNA 处理没有观察到敲低作用 ($P < 0.01$, Student t 检验)。C 用针对 NAALADL2 的指定 siRNA 表达载体 (si#690, si#913 和 si#1328) 和阴性对照载体 (siEGFP) 转染的 22Rv1 细胞的集落形成测定。与遗传霉素温育 20 天后, 用 1% 结晶紫染色 (crystal violet staining) 细胞使之可视化。D RT-PCR 确认在另一种 NAALADL2 表达型的 C4-2B 细胞中, 对应于 si#690 的合成 RNA 双链体 (duplex) 对 NAALADL2 表达有敲低作用, 但 si#913, si#1328 和阴性对照 siEGFP 则没有。利用 ACTB 定量 RNA。E 与对照 RNA 双链体 siEGFP 相比, 对应于 si#690 的合成 RNA 双链体抑制了 C4-2B 细胞的细胞生存力 ($P < 0.01$, Student t 检验)。

[0029] 图 5 PKIB 蛋白 (A) 和 NAALADL2 蛋白 (B) 的亚细胞定位。使用抗标签抗体进行免疫细胞组化分析显示, 外源 PKIB 定位于细胞质, 外源 NAALADL2 蛋白主要定位于细胞质膜。C PKIB-Myc 和 HA-PKA-C 表达载体共转染 22Rv1 细胞, 用每种标签抗体免疫沉淀它们的细胞裂解物。PKIB-Myc 与 PKA-C 免疫共沉淀, 反之亦然, 表明 PKIB 与 PKA-C 间的直接相互作用。D 免疫细胞组化分析观察到, 当对照 siRNA 转染 PC-3 细胞时, 大多数 PKA-C 定位于细胞质, 一些 PKA-C 信号位于细胞核 (左)。另一方面, 当 siRNA 敲低 PC-3 细胞中的内源 PKIB 时, 免疫细胞组化分析显示在细胞核中没有或者有非常少的 PKA-C 信号 (右)。E 在 PC 细胞中用 siRNA 双链体处理后, 将细胞分级为细胞核和细胞质级分, 以便更加定量地分析细胞核 PKA-C。使用 30 微克经分级的细胞裂解物, 用抗 PKA-C 抗体和作为上样和细胞核级分对照的抗核纤层蛋白 B 抗体进行 western 印迹。与对照 siRNA 相比, 由 siRNA 导致的 PKIB 敲低可明显降低细胞核中的 PKA-C 量, 而细胞质中的 PKA-C 量在 PKIB 敲低中仅略微增加。

[0030] 图 6A RT-PCR 确认了 PKIB 在 DU145 来源 (deribed) 的克隆 (PKIB#1、#2、#3) 中的组成性表达。B Western 印迹确认了 PKIB 在 DU145 来源 (deribed) 的克隆 (PKIB#1、#2、#3) 中的组成性表达。C 表达高水平的外源 PKIB 的 DU145 克隆 (克隆 1-3) 和用模拟 (Mock) 载体转染的克隆 (#1、#2、#3 混合物) 的体内生长速度。X 和 Y 轴分别表示接种后的日数点和用直径吸光度 (absorbance of the diameter) 计算的、与作为对照的第 1 天的吸光度值比较的相对生长速度。PKIB 过表达细胞比模拟细胞生长更快速, 提示 PKIB 在前列腺癌中的促生长作用。D 将 2×10^6 个稳定表达 PKIB 的 DU145 来源的克隆 (右) 或者模拟细胞 (左) 接种在雄性裸鼠的胁部 (frank)。接种 15 周后, 仅在右胁部建立了肿瘤 (PKIB++ ; 箭头), 而在左胁部 (模拟) 没有。E 基质胶侵袭测定 (Matrigel invasion assay) 显示了 NIH3T3

细胞在被 PKIB 表达载体转染后的侵袭性质。Y 轴表示迁移通过基质胶包被膜的细胞数目。试验重复三次,对每次的平均值作图,误差线表示 SD(标准偏差)。PKIB 的过表达显著促进了 NIH3T3 细胞的侵袭性 ($P = 0.0052$)。

[0031] 图 7A 在 LNCaP 和 PC-3 细胞中用 siRNA 双链体 (siPKIB) 敲低 PKIB 导致 Akt 的 Ser 473 磷酸化减弱。用 siEGFP 双链体转染作为阴性对照。用 RT-PCR 确认 PKIB 的敲低,使用 ACTB 作为上样对照。B PKIB 在 PC-3 和 22Rv1 细胞中的过表达提高了 Akt 的 Ser 473 磷酸化。PKIB 过表达通过使用 HA 标签抗体进行 western 印迹加以确认。C PKA-C 在 PC-3 细胞中的过表达也提高了 Akt 的 Ser 473 磷酸化。PKA-C 的过表达通过使用 HA 标签抗体进行 western 印迹加以确认,以 Akt 总量作为上样对照。D 使用重组 PKIB 和 PKA-C 蛋白进行 Akt 的体外激酶测定。Akt-Ser473 的磷酸化通过抗磷酸-Akt (Ser473) 抗体 (Cell Signaling) 进行检测, Akt 总量作为上样对照。用抗 Akt 抗体检测 Akt 总量。在 PKA-C 的基础上添加 PKIB 在体外显著增加了 Akt-Ser473 的磷酸化。

[0032] 图 8 在临床 PC 组织中, PKIB 表达与 Akt 磷酸化关联。图片代表了在 PC 组织的面对面切片 (face-to-face slides) 上进行的 A PKIB 和 B 磷酸化 Akt 的免疫组织化学。

[0033] 发明的公开

[0034] 定义

[0035] 除非具体指出, 否则词语“一”、“一个 (一种)”和“该”在本文中的意思是“至少一个”。

[0036] 如本文使用的, 术语“生物样品”是指整个生物体或由其组织、细胞或组成部分 (例如体液, 包括但不限于, 血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊液、唾液、羊水、羊膜脐带血、阴道分泌物和精液) 构成的子集。“生物样品”还指从整个生物体, 或从由其细胞、组织或组成部分、或级分或部分构成的子集, 所制备的匀浆、裂解物、提取物、细胞培养物或组织培养物。最后, “生物样品”指这样的介质, 例如其中已有生物体繁殖的营养液或凝胶: 其含有细胞成分, 例如蛋白质或多核苷酸。

[0037] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”在本文中若无具体指出可交换使用, 并且用它们公认的单字母编码指示。这两个术语适用于这样的核酸 (核苷酸) 聚合物, 其中有一个或多个核酸通过酯键连接。多核苷酸或寡核苷酸可以由 DNA、RNA 或其组合构成。

[0038] 双链分子

[0039] 术语“分离的双链分子”是指可抑制靶基因的表达的核酸分子, 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 的双链嵌合体 (dsD/R-NA) 或 DNA 和 RNA 的小发夹嵌合体 (shD/R-NA))。

[0040] 如本文所使用的, 术语“siRNA”是指可阻止靶 mRNA 翻译的双链 RNA 分子。使用将 siRNA 引入到细胞中的常规技术, 包括以 DNA 为 RNA 转录模板的技术。siRNA 包括 PKIB 或 NAALADL2 有义核酸序列 (也称作“有义链”)、PKIB 或 NAALADL2 反义核酸序列 (也称作“反义链”)、或两者。siRNA 可以被构建为使单个转录本同时具有靶基因的有义核酸序列和互补的反义核酸序列, 例如发夹。siRNA 可以是 dsRNA 或 shRNA。

[0041] 如本文所使用的, 术语“dsRNA”是指两个 RNA 分子的构建体, 两个 RNA 分子包含彼此互补的序列, 并通过互补序列退火在一起形成双链 RNA 分子。两条链的核苷酸序列可能

不仅包括从靶基因序列蛋白编码序列选出的“有义”或“反义”RNA,还包括具有从靶基因非编码区选出的核苷酸序列的RNA分子。

[0042] 如本文所使用的,术语“shRNA”是指具有茎环结构的siRNA,包括彼此互补的第一和第二区,即有义和反义链。所述区域的互补程度和方向足以使得两个区域间形成碱基配对,其中第一和第二区通过环区连接,该环是由于环区内核苷酸(或核苷酸模拟物)之间缺乏碱基配对产生的。shRNA的环区是介于有义和反义链之间的单链区,也可以称作“间插单链”。

[0043] 如本文所使用的,术语“siD/R-NA”是指同时包含RNA和DNA的双链多核苷酸分子,包括RNA和DNA的杂交体和嵌合体,其可阻止靶mRNA的翻译。这里,杂交体指示这样的分子,其中一个由DNA构成的多核苷酸与一个由RNA构成的多核苷酸彼此杂交形成双链分子;而嵌合体是指构成双链分子的一条链含有或两条链都含有RNA和DNA。使用将siD/R-NA引入细胞内的常规技术。siD/R-NA包括PKIB或NAALADL2有义核酸序列(也称作“有义链”)、PKIB或NAALADL2反义核酸序列(也称作“反义链”)或两者。siD/R-NA可以被构建成使单个转录本同时具有靶基因的有义和互补核酸序列,例如发夹。siD/R-NA可以是dsD/R-NA或shD/R-NA。

[0044] 如本文所使用的,术语“dsD/R-NA”是指由两个包含彼此互补的序列的分子所成的构建体,两个分子通过互补序列退火在一起从而形成双链多核苷酸分子。两条链的核苷酸序列不仅包括从靶基因序列蛋白编码序列选出的“有义”或“反义”多核苷酸,还包括具有从靶基因非编码区选出的核苷酸序列的多核苷酸。构成dsD/R-NA的两个分子中的一个或两个都由RNA和DNA二者构成(嵌合分子),或者,其中一个分子由RNA构成,另一个由DNA构成(杂交双链)。

[0045] 如本文所使用的,术语“dsD/R-NA”是指具有茎环结构的siD/R-NA,包括彼此互补的第一和第二区,即有义和反义链。所述区域的互补程度和方向足以使得两个区域间形成碱基配对,第一和第二区通过环区连接,环是由于环区内核苷酸(或核苷酸模拟物)之间缺乏碱基配对而形成的。siD/R-NA的环区是介于有义和反义链之间的单链区,可以称作“间插单链”。

[0046] 如本文所使用的,“分离核酸”是指从其原始环境(例如其自然存在的天然环境)被取出,因此从其自然状态发生了人工改变(synthetically altered)的核酸。在本发明中,分离核酸包括DNA、RNA和其衍生物。

[0047] 针对PKIB或NAALADL2的双链分子,是与靶mRNA杂交的分子,可通过与基因的在正常情况下为单链的mRNA转录本结合(associate),干扰蛋白翻译进而抑制蛋白的表达,从而降低或抑制由PKIB或NAALADL2基因编码的PKIB或NAALADL2蛋白的产生。PKIB在前列腺癌细胞系中的表达被1或2不同的dsRNA抑制(图3);NAALADL2在前列腺癌细胞系中的表达被dsRNA抑制(图4)。

[0048] 因此,本发明提供了具有下述性质的分离的双链分子:它们在被引入到表达PKIB或NAALADL2基因的细胞内时可抑制该基因的表达。双链分子的靶序列通过下文提到的siRNA设计算法加以设计。

[0049] PKIB靶序列包括,例如,核苷酸:

[0050] SEQ ID NO:16,

[0051] SEQ ID NO:17

[0052] NAALADL2 靶序列包括,例如,核苷酸:

[0053] SEQ ID NO:19

[0054] 具体地,本发明提供了如下的双链分子 [1]-[16]:

[0055] [1] 一种分离的双链分子,其在被引入到细胞内时,可抑制 PKIB 或 NAALADL2 基因的表达和细胞生长,该分子包括有义链和与之互补的反义链,它们彼此杂交形成该双链分子,并且其中有义链包括从 SEQ ID NO:16、17 和 19 的组中选出的靶序列;

[0056] [2] [1] 所述的双链分子,其长度小于大约 100 个核苷酸;

[0057] [3] [2] 所述的双链分子,其长度小于大约 75 个核苷酸;

[0058] [4] [3] 所述的双链分子,其长度小于大约 50 个核苷酸;

[0059] [5] [4] 所述的双链分子,其长度小于大约 25 个核苷酸;

[0060] [6] [5] 所述的双链分子,其长度为大约 19- 大约 25 个核苷酸;

[0061] [7] [1] 所述的双链分子,其由单个多核苷酸构成,所述多核苷酸包含通过间插单链连接起来的有义链和反义链;

[0062] [8] [7] 所述的双链分子,其具有通式 5'-[A]-[B]-[A']-3',其中 [A] 是包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 19 的序列的有义链,[B] 是由 3-23 个核苷酸组成的间插单链,[A'] 是包含与 [A] 互补的序列的反义链;

[0063] [9] [1] 所述的双链分子,其包含 RNA;

[0064] [10] [1] 所述的双链分子,其包含 DNA 和 RNA;

[0065] [11] [10] 所述的双链分子,其是 DNA 多核苷酸与 RNA 多核苷酸的杂交体;

[0066] [12] [11] 所述的双链分子,其中有义链和反义链分别由 DNA 和 RNA 构成;

[0067] [13] [10] 所述的双链分子,其是 DNA 和 RNA 的嵌合体;

[0068] [14] [13] 所述的双链分子,其中反义链 3' 端侧翼的区域由 RNA 构成,或者有义链 5' 端侧翼的区域和反义链 3' 端侧翼的区域均由 RNA 构成;

[0069] [15] [14] 所述的双链分子,其中侧翼区域由 9-13 个核苷酸组成;和

[0070] [16] [1] 所述的双链分子,其包含 3' 突出端。

[0071] 下面将更详细地介绍本发明的双链分子。

[0072] 具有抑制细胞内靶基因表达的能力的双链分子的设计方法是已知的。(见例如,美国专利 No. 6, 506, 559, 本文援引并入其全部内容)。例如,可以从 Ambion 网站访问一种用于设计 siRNA 的计算机程序 (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)。

[0073] 该计算机程序根据如下方案选择双链分子的靶核苷酸序列。

[0074] 靶位点的选择

[0075] 1. 从转录本的 AUG 起始密码子开始,向下游搜寻 AA 二核苷酸序列。记录每个 AA 的出现以及 3' 毗邻的 19 个核苷酸,作为潜在的 siRNA 靶位点。Tuschl 等推荐避免在 5' 和 3' 非翻译区 (UTR) 以及临近起始密码子的区域 (75 个碱基内) 设计 siRNA,因为这些区域可能更富含调节蛋白结合位点,并且 UTR 结合蛋白和 / 或翻译起始复合体可能干扰 siRNA 内切酶复合体的结合。

[0076] 2. 比较潜在靶位点与合适的基因组数据库 (人、小鼠、大鼠等),将任何与其它编码序列具有显著同源性的靶序列排除在考虑之外。基本上使用 BLAST,其可通过 NCBI

服务器访问：www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ (Altschul SF et al., Nucleic Acids Res 1997 Sep 1; 25(17):3389-402)

[0077] 3. 选择合格的靶序列用于合成。典型地,沿着基因的长度选择数个靶序列进行评估。

[0078] 通过这个方案,本发明分离双链分子的靶序列设计如下:

[0079] SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17 用于 PKIB 基因;核苷酸

[0080] SEQ ID NO:19 用于 NAALADL2 基因;核苷酸

[0081] 对于靶定上述靶序列的双链分子,分别检查它们抑制表达所述靶基因的细胞的生长的能力。因此,本发明提供了以选自下组的任何序列为靶标的双链分子:

[0082] SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17 用于 PKIB 基因;核苷酸

[0083] SEQ ID NO:19 用于 NAALADL2 基因;核苷酸

[0084] 本发明的双链分子针对单个靶标 PKIB 或 NAALADL2 基因序列,或者可以针对多个 PKIB 或 NAALADL2 基因序列。

[0085] 所谓 PKIB 或 NAALADL2 靶序列,意思是与 PKIB 基因或 NAALADL2 基因的一部分(即 PKIB 或 NAALADL2 基因内的多核苷酸,其与 siRNA 长度相等并且与之互补)相同的核苷酸序列。靶序列可包括人 PKIB 或 NAALADL2 基因的 5' 非翻译(UT)区、开放阅读框(ORF)或 3' 非翻译(UT)区。或者,siRNA 是与 PKIB 或 NAALADL2 基因表达的上游或下游调节子(modulator)互补的核酸序列。上游和下游调节子的实例包括:与 PKIB 或 NAALADL2 基因启动子结合的转录因子,与 PKIB 或 NAALADL2 多肽相互作用的激酶或磷酸酶,PKIB 或 NAALADL2 启动子或增强子。

[0086] 以上述的 PKIB 或 NAALADL2 基因靶序列为靶标的本发明双链分子包括这样的分离的核苷酸,它们包括靶序列的任何核酸序列和/或与靶序列互补的序列。靶定 PKIB 基因的多核苷酸的实例包括:含有 SEQ ID NO:16 或 17 的序列和/或这些核苷酸的互补序列的多核苷酸;靶定 NAALADL2 基因的多核苷酸包括:含有 SEQ ID NO:19 的序列和/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实例,前述核酸序列的微小修饰也是可以接受的,只要经过修饰的分子仍保持抑制 PKIB 或 NAALADL2 基因表达的能力即可。这里,核酸序列中的“微小修饰”是指对序列进行 1、2 或数个核酸的替换、删除、添加或插入。典型地,微小修饰是对序列进行 4 个或者更少,有时是 3 个或者更少,经常是 2 个或者更少核酸的替换、删除、添加或插入。

[0087] 根据本发明,可以用实施例中采用的方法对本发明双链分子的能力进行测试。在实施例中,对于包含 PKIB 或 NAALADL2 基因不同部分的有义链和与之互补的反义链的双链分子,根据常规方法体外测试了它们降低前列腺癌细胞系(例如使用 22Rv1、LNCaP(HP) 和 C4-2B)中 PKIB 或 NAALADL2 基因产物的产生的能力。而且,例如,与不存在候选分子时培养的细胞相比,与候选双链分子接触的细胞中 PKIB 或 NAALADL2 基因产物的减少,可以通过例如 RT-PCR 方法,使用实施例 1,题目“半定量 RT-PCR”中提到的 PKIB 或 NAALADL2 mRNA 引物进行检测。然后,对于可在体外细胞测定中降低 PKIB 或 NAALADL2 基因产物的产生的序列,测试它们对细胞生长的抑制作用。然后,对于在体外细胞测定中抑制细胞生长的序列,用患有癌症的动物,例如裸鼠异种移植模型,测试它们在体内的能力,以确认 PKIB 或 NAALADL2 产物生成的减少和癌细胞生长的降低。

[0088] 当分离的多核苷酸是 RNA 或其衍生物时,核苷酸序列中的碱基“t”应当用“u”代替。如本文所使用的,术语“互补”是指多核苷酸的核苷酸单位之间的 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基配对,术语“结合”的意思是两个多核苷酸之间的物理或化学相互作用。当多核苷酸包含经过修饰的核苷酸和 / 或非磷酸二酯联结时,这些多核苷酸也可以用相同的方式彼此结合。一般地,互补多核苷酸序列在合适的条件下杂交,形成稳定的、含有极少错配或没有错配的双链体。而且,本发明的分离多核苷酸的有义链和反义链可以通过杂交形成双链分子或者发夹环结构。在优选实施方案中,这种双链体每 10 个配对含有不超过 1 个错配。在特别优选的实施方案中,双链体的链完全互补,这种双链体不含有错配。

[0089] 多核苷酸的长度,对于 PKIB 小于 1909 个核苷酸,对于 NAALADL2 小于 4912 个核苷酸。例如,对于所有这些基因,多核苷酸的长度小于 500、200、100、75、50 或 25 个核苷酸。本发明的分离多核苷酸可用于形成针对 PKIB 或 NAALADL2 基因的双链分子,或用于制备编码这样的双链分子的模板 DNA。当使用所述多核苷酸形成双链分子时,多核苷酸的长度可以超过 19 个核苷酸,优选地超过 21 个核苷酸,更优选地,长度为大约 19- 大约 25 个核苷酸。

[0090] 本发明的双链分子可以含有一个或多个经过修饰的核苷酸和 / 或非磷酸二酯联结。本领域中众所周知的化学修饰能够提高双链分子的稳定性、利用度和 / 或细胞摄取。技术人员知道可用于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,可利用修饰来提高对降解的抵抗性或者改善摄取。这些修饰的实例包括硫代磷酸酯联结 (phosphorothioate linkage), 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 (“universal base” nucleotide), 5'-C- 甲基核苷酸, 和倒置脱氧碱基残基掺入 (inverted deoxybasic residue incorporation) (US20060122137)。在另一个实施方案中,修饰可用于提高双链分子的稳定性或提高靶定效率。修饰包括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' 末端化学修饰, 糖基化修饰, 核苷碱基修饰和 / 或骨架修饰, 2- 氟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,修饰可用于增加或降低互补核苷酸在靶 mRNA 和 / 或在互补双链分子链内的亲和性 (W02005/044976)。例如,非修饰的嘧啶核苷酸可以被 2- 硫, 5- 炔基, 5- 甲基, 或 5- 丙炔基嘧啶代替。此外,非修饰的嘌呤可以被 7- 脱氮, 7- 烷基, 或 7- 烯基嘌呤代替。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' 末端核苷酸的悬置核苷酸替换为脱氧核糖核苷酸 (Elbashir SM et al., Genes Dev 2001 Jan 15, 15(2) :188-200)。更详细的内容可以参见已公开的文献,例如 US20060234970。本发明并不仅限于这些实施例,任何已知的化学修饰均可用于本发明的双链分子,只要所得的分子仍保持抑制靶基因表达的能力即可。

[0091] 而且,本发明的双链分子可以同时包括 DNA 和 RNA,例如 dsD/R-NA 或 shD/R-NA。具体地, DNA 链和 RNA 链的杂交多核苷酸或 DNA-RNA 嵌合多核苷酸显示更高的稳定性。可形成 DNA 和 RNA 的混合,即由一条 DNA 链 (多核苷酸) 和一条 RNA 链 (多核苷酸) 的杂交型双链分子,在一条或两条单链 (多核苷酸) 上同时包含 DNA 和 RNA 的嵌合型双链分子,或诸如此类,以提高双链分子的稳定性。DNA 链和 RNA 链的杂交体可以是有义链为 DNA,反义链为 RNA,或者相反,只要其在引入到表达靶基因的细胞内时具有抑制靶基因表达的能力即可。优选地,有义链多核苷酸是 DNA,反义链多核苷酸是 RNA。另外,嵌合型双链分子可以是

两条有义和反义链都由 DNA 和 RNA 构成,或者是有义链和反义链中的任何一个由 DNA 和 RNA 构成,只要其在引入表达该基因的细胞内时具有抑制靶基因表达的活性即可。为了提高双链分子的稳定性,分子优选地含有尽可能多的 DNA,而为了诱导靶基因表达的降低,分子需要有一定范围的 RNA,以诱导充分的表达抑制。作为嵌合型双链分子的优选实例,双链分子的上游部分区域(即有义或反义链内位于靶序列或其互补序列之侧翼的区域)是 RNA。优选地,上游部分区域是指有义链的 5' 侧(5' 端)和反义链的 3' 侧(3' 端)。或者,将位于有义链 5' 端侧翼和/或反义链 3' 端侧翼的区域称作上游部分区域。也就是说,在优选实施方案中,位于反义链 3' 端侧翼的区域包含 RNA,或者位于有义链 5' 端侧翼的区域和反义链 3' 端侧翼的区域均包含 RNA。例如,本发明的嵌合或杂交型双链分子包括如下组合:

[0092] 有义链: 5' -[DNA]-3'

[0093] 3' -(RNA)-[DNA]-5':反义链

[0094] 有义链: 5' -(RNA)-[DNA]-3'

[0095] 3' -(RNA)-[DNA]-5':反义链,和

[0096] 有义链: 5' -(RNA)-[DNA]-3'

[0097] 3' -(RNA)-5':反义链。

[0098] 上游部分区域优选地是由双链分子有义或反义链内从靶序列或其互补序列的末端数起的 9-13 个核苷酸组成的区域。而且,这种嵌合型双链分子的优选实例包括链长为 19-21 个核苷酸,其中多核苷酸的至少上游一半(对于有义链而言为 5' 侧区域,对于反义链而言是 3' 侧区域)是 RNA,另一个半区是 DNA。在这种嵌合型双链分子中,抑制靶基因表达的效果比整个反义链都是 RNA 时的效果高得多(US20050004064)。

[0099] 在本发明中,双链分子可以形成发夹,例如短发夹 RNA(shRNA) 和由 DNA 和 RNA 组成的短发夹(shD/R-NA)。shRNA 或 shD/R-NA 是一段 RNA 序列或 RNA 和 DNA 的混合序列,其形成紧密的发夹转角(turn),可用于通过 RNA 干扰来沉默基因表达。shRNA 或 shD/R-NA 包含位于一条链上的有义靶序列和反义靶序列,其中所述序列被一个环序列分开。一般地,发夹结构被细胞机制切割成 dsRNA 或 dsD/R-NA,它进而结合 RNA 诱导的沉默复合体(RISC)。该复合体结合并切割与所述 dsRNA 或 dsD/R-NA 的靶序列匹配的 mRNA。

[0100] 有义和反义序列之间可以有由任意核苷酸序列构成的环序列,以形成发夹环结构。因此,本发明还提供了一种双链分子,其具有通式 5'-[A]-[B]-[A']-3',其中 [A] 是包含靶序列的有义链,[B] 是间插单链,[A'] 是包含与 [A] 互补的序列的反义链。靶序列可从例如如下核苷酸的组中选出:

[0101] SEQ ID NO:16,或

[0102] SEQ ID NO:17 用于 PKIB;核苷酸

[0103] SEQ ID NO:19 用于 NAALADL2;核苷酸

[0104] 本发明不仅限于这些实例,[A] 中的靶序列可以是这些实例的修饰序列,只要该双链分子保留抑制靶定 PKIB 或 NAALADL2 基因的表达能力即可。区域 [A] 与 [A'] 杂交,形成由区域 [B] 构成的环。间插单链部分 [B],即环序列,的长度优选地为 3-23 个核苷酸。环序列可以从例如包含如下序列的组中选出(<http://www.ambion.com/techlib/tb/tb506.html>)。进一步,由 23 个核苷酸构成的环序列也可提供活性 siRNA(Jacque JM et al., Nature 2002Jul25,418(6896):435-8,电子形式公布于 2002 年 6 月 26 日):

[0105] CCC、CCACC、或 CCACACC :Jacque JM et al., Nature 2002 Jul 25, 418(6896) : 435-8, 电子形式公布于 2002 年 6 月 26 日 ;

[0106] UUCG :Lee NS et al., Nat Biotechnol 2002May, 20(5) :500-5 ;Fruscoloni P et al., Proc Natl Acad Sci USA 2003Feb 18, 100(4) :1639-44, 电子形式公布于 2003 年 2 月 10 日 ;和

[0107] UUCAAGAGA :Dykxhoorn DM et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2003Jun, 4(6) : 457-67。

[0108] 作为举例, 下面显示了优选的本发明具有发夹环结构的双链分子。在下面的结构中, 环序列可以选自 AUG、CCC、UUCG、CCACC、CTCGAG、AAGCUU、CCACACC 和 UUCAAGAGA ;然而, 本发明并不仅限于此 :

[0109] gauaugccaucacagauuu-[B]-aaaucugggauggcauauac (用于靶序列 SEQ ID NO :16) ;

[0110] gucaaaauucacacaaauaa-[B]-uuauuuuggggaauuugac (用于靶序列 SEQ ID NO :17) ;
和

[0111] guguccagaggccaauauuu-[B]-aaauuuggccucuggacac (用于靶序列 SEQ ID NO :19) ;

[0112] 进一步, 为了提高双链分子的抑制活性, 可以向靶序列反义链的 3' 端添加核苷酸 “u”, 作为 3' 突出端。添加的 “u” 的数目至少为 2 个, 一般为 2-10 个, 优选地为 2-5 个。添加的 “u” 在双链分子反义链的 3' 端形成单链。

[0113] 制备双链分子的方法没有特殊限制, 但优选地使用本领域已知的化学合成方法。根据化学合成方法, 分别合成有义和反义单链多核苷酸, 然后通过合适的方法将它们退火在一起, 以获得双链分子。退火的具体实例包括, 其中合成的单链多核苷酸以优选地至少大约 3 : 7 ;更优选地大约 4 : 6, 最优选地基本上等摩尔量 (即大约 5 : 5 的摩尔比) 的比例混合。接着, 将混合物加热到双链分子会解离的温度, 然后缓慢冷却下来。经退火的双链分子可以通过本领域已知的通常使用的方法加以纯化。纯化方法的实例包括使用琼脂糖凝胶电泳的方法, 或者视情况除去剩余的单链多核苷酸 (例如通过用合适的酶降解) 的方法。

[0114] PKIB 或 NAALADL2 序列的侧翼调节序列可以是相同或不同的, 从而它们的表达可以独立地接受调节, 或者按照时间 (temporal) 或空间 (spatial) 的方式接受调节。可以通过将 PKIB 或 NAALADL2 基因模板克隆到载体内, 例如含有来自小核 RNA (snRNA) U6 或人 H1RNA 启动子的 RNA pol III 转录单元的载体内, 来在细胞内转录出双链分子。

[0115] 含有双链分子的载体

[0116] 本发明还包括含有一个或多个本文所述双链分子的载体, 和含有该载体的细胞。本发明的载体优选地以可表达的形式编码本发明的双链分子。这里, 术语 “以可表达的形式” 是指载体在被引入到细胞内时会表达所述分子。在优选的实施方案中, 载体包括双链分子表达必需的调节元件。本发明的这些载体可用于产生本发明的双链分子, 或者直接作为用于癌症治疗的活性成分。

[0117] 本发明载体的产生可以通过例如将 PKIB 或 NAALADL2 序列克隆到表达载体内, 使调节序列与 PKIB 或 NAALADL2 序列以允许两条链表达 (通过 DNA 分子的转录) 的方式操作连接 (Lee NS et al., Nat Biotechnol 2002May, 20(5) :500-5)。例如, 相对于 mRNA 为反义的 RNA 分子被第一个启动子 (例如所克隆 DNA 的 3' 端侧翼的启动子序列) 转录, 相对于 mRNA 为有义的 RNA 分子则被第二个启动子 (例如所克隆 DNA 5' 端侧翼的启动子序列) 转

录。有义链和反义链在体内杂交,产生用于沉默基因的双链分子构建体。或者,使用两个载体构建体,它们分别编码双链分子有义和反义链,来分别表达有义链和反义链,然后形成双链分子构建体。而且,所克隆的序列可以编码具有二级结构(例如发夹)的构建体;即载体的单个转录本同时含有靶基因的有义序列和互补反义序列。

[0118] 还可以为本发明的载体提供必要的装备,以实现在靶细胞的基因组中的稳定插入(同源重组盒载体的描述见例如 Thomas KR&Capecchi MR, Cell 1987, 51:503-12)。见例如 Wolff et al., Science 1990, 247:1465-8; US Patent Nos. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; 和 W098/04720。基于 DNA 的递送技术的实例包括“裸 DNA”,协助(布比卡因(bupivacaine)、聚合物、肽介导的)递送、阳离子脂质复合体和颗粒介导的(“基因枪”)或压力介导的递送(见例如美国专利 No. 5,922,687)。

[0119] 本发明的载体可以是,例如,病毒或细菌载体。表达载体的实例包括减毒病毒宿主,例如牛痘或禽痘(见例如美国专利 No. 4,722,848)。这种方法涉及使用痘苗病毒,例如作为载体来表达编码该双链分子的核苷酸序列。在被引入到表达靶基因的细胞内时,重组牛痘病毒表达该分子,借此抑制细胞的增殖。可使用的载体的另一个实例包括卡介苗(BCG)。BCG 载体在 Stover et al., Nature 1991, 351:456-60 中有记载。多种其它载体也可用于双链分子的治疗性施用和产生;实例包括腺病毒载体和腺伴随病毒载体、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。见例如 Shata et al., Mol Med Today 2000, 6:66-71; Shedlock et al., J Leukoc Biol 2000, 68:793-806; 和 Hipp et al., In Vivo 2000, 14:571-85。

[0120] 用双链分子治疗癌症的方法

[0121] 在本发明中,为 PKIB 构建了 3 种不同的 dsRNA,为 NAALADL2 构建了 3 种不同的 dsRNA,测试它们抑制细胞生长的能力。PKIB 的两种 dsRNA 有效敲低了基因在两种前列腺癌细胞系中的表达,同时细胞增殖被抑制(图 3A、B 和 C)。NAALADL2 的一个 dsRNA 显著降低了前列腺细胞系中的表达水平和细胞生长能力(图 4A-E)。

[0122] 因此,本发明提供了通过抑制 PKIB 或 NAALADL2 基因的表达,诱导 PKIB 或 NAALADL2 基因的功能障碍,从而抑制细胞生长,即前列腺癌细胞生长的方法。PKIB 或 NAALADL2 基因的表达可以被任何前述的特异性靶定 PKIB 或 NAALADL2 基因的本发明双链分子所抑制,或者被能够表达任何该双链分子的本发明载体所抑制。

[0123] 本发明双链分子和载体的这种抑制癌性细胞的细胞生长的能力提示它们能够用于癌症治疗方法。因此,本发明提供了治疗前列腺癌患者的方法,所述方法施用针对 PKIB 或 NAALADL2 基因的双链分子或表达该分子的载体,而没有不良作用,因为这些基因在正常器官中几乎未检出(图 1 和 2)。

[0124] 术语“特异性抑制”,在抑制性多核苷酸和多肽的语境中,是指试剂或配体抑制 PKIB 或 NAALADL2 的表达或生物学功能的能力。特异性抑制通常导致 PKIB 或 NAALADL2 的表达(例如转录或翻译)或测得的生物学功能(例如细胞生长或增殖,细胞凋亡的抑制)与背景相比至少有大约 2 倍的抑制,优选地大于大约 10 倍,最优选地大于 100 倍的抑制。表达水平和/或生物学功能可以通过比较经过处理的和未经处理的细胞或者处理之前和之后的细胞群体加以测量。在一些实施方案中,PKIB 或 NAALADL2 的表达或生物学功能被完全抑制。典型地,特异性的抑制,是利用合适的统计检验,显示 PKIB 或 NAALADL2 的表达或

生物学功能的统计学上有意义的降低（例如 $p \leq 0.05$ ）。

[0125] 具体地，本发明提供了如下的方法 [1]–[23]：

[0126] [1] 一种用于治疗前列腺癌的方法，包括施用至少一种分离的双链分子的步骤，所述双链分子抑制 PKIB 或 NAALADL2 在过表达该基因的细胞内的表达和细胞的增殖，该分子包括有义链和与之互补的反义链，它们彼此杂交形成该双链分子。

[0127] [2] [1] 所述的方法，其中该有义链包含与从 SEQ ID NO:16, 17 和 19 的组中选出的靶序列对应的序列。

[0128] [3] [1] 所述的方法，其中待治疗的前列腺癌是激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌；

[0129] [4] [1] 所述的方法，其中施用多种双链分子；

[0130] [5] [4] 所述的方法，其中所述多种双链分子靶定相同的基因；

[0131] [6] [1] 所述的方法，其中双链分子的长度小于约 100 个核苷酸；

[0132] [7] [6] 所述的方法，其中双链分子的长度小于约 75 个核苷酸；

[0133] [8] [7] 所述的方法，其中双链分子的长度小于约 50 个核苷酸；

[0134] [9] [8] 所述的方法，其中双链分子的长度小于约 25 个核苷酸；

[0135] [10] [9] 所述的方法，其中双链分子的长度为大约 19– 大约 25 个核苷酸；

[0136] [11] [1] 所述的方法，其中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起来的有义链和反义链；

[0137] [12] [11] 所述的方法，其中双链分子具有通式 $5' - [A] - [B] - [A'] - 3'$ ，其中 [A] 是包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 19 的序列的有义链，[B] 是由 3–23 个核苷酸组成的间插单链，[A'] 是包含与 [A] 互补的序列的反义链；

[0138] [13] [1] 所述的方法，其中双链分子包含 RNA；

[0139] [14] [1] 所述的方法，其中双链分子包含 DNA 和 RNA；

[0140] [15] [14] 所述的方法，其中双链分子是 DNA 多核苷酸与 RNA 多核苷酸的杂交体；

[0141] [16] [15] 所述的方法，其中所述有义链多核苷酸和反义链多核苷酸分别由 DNA 和 RNA 构成；

[0142] [17] [14] 所述的方法，其中所述双链分子是 DNA 和 RNA 的嵌合体；

[0143] [18] [17] 所述的方法，其中位于反义链 3' 端侧翼的区域由 RNA 构成，或者位于有义链 5' 端侧翼的区域和反义链 3' 端侧翼的区域均由 RNA 构成；

[0144] [19] [18] 所述的方法，其中所述侧翼区域由 9–13 个核苷酸组成；

[0145] [20] [1] 所述的方法，其中所述双链分子含有 3' 突出端；

[0146] [21] [1] 所述的方法，其中所述双链分子由载体编码；

[0147] [22] [21] 所述的方法，其中所述由载体编码的双链分子具有通式 $5' - [A] - [B] - [A'] - 3'$ ，其中 [A] 是包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 19 的序列的有义链，[B] 是由 3–23 个核苷酸组成的间插单链，[A'] 是包含与 [A] 互补的序列的反义链；和

[0148] [23] [1] 所述的方法，其中双链分子包含在组合物中，该组合物除了该分子之外还包括转染增强剂和药学上可接受的载体。

[0149] 下文中将更详细地描述本发明的方法。

[0150] 通过使表达 PKIB 或 NAALADL2 基因的细胞与针对 PKIB 或 NAALADL2 基因的双链分

子、表达该分子的载体、或包含它（们）的组合物接触，可抑制该细胞的生长。进一步使细胞与转染剂接触。合适的转染剂是本领域已知的。术语“抑制细胞生长”表示与没有暴露于该分子的细胞相比，细胞增殖速度更低或者生存力降低。细胞生长可以用本领域已知的方法测量，例如使用 MTT 细胞增殖测定。

[0151] 任何类型细胞的生长均可根据本发明加以抑制，只要该细胞表达或过表达本发明双链分子的靶基因即可。示例细胞包括前列腺癌细胞。

[0152] 因此，对于患有或有风险患上与 PKIB 或 NAALADL2 相关的疾病的患者，可以通过施用至少一种本发明的双链分子、至少一种表达至少一种该分子的载体、或至少一种含有至少一种该分子的组合物加以治疗。例如，前列腺癌患者可以根据本发明的方法加以治疗。癌症的类型可以利用与待诊断肿瘤的具体类型相应的常规方法加以鉴定。前列腺癌可以用例如前列腺特异抗原 (PSA) 或直肠指检 (digital rectal exam) 进行诊断。更优选地，通过 RT-PCR 或免疫测定检测来自患者的活检物中的 PKIB 或 NAALADL2 的表达，据此选择可通过本发明方法治疗的患者。优选地，在用本发明治疗之前，通过本领域已知的方法，例如免疫组织化学分析或 RT-PCR，确认来自受试者的活检样本中 PKIB 或 NAALADL2 基因的过表达。

[0153] 根据该抑制细胞生长以治疗癌症的方法，在施用多种双链分子（或表达这些分子的载体或含有这些分子的组合物）时，每种分子可以针对 PKIB 和 / 或 NAALADL2 的相同靶序列或者不同靶序列。例如，所述方法可以采用针对 PKIB 或 NAALADL2 的双链分子。或者，例如，所述方法可以采用针对从 PKIB 和 NAALADL2 选出的 1 种、2 种或多种靶序列的双链分子。

[0154] 为了抑制细胞生长，可以将本发明的双链分子以该分子与相应的 mRNA 转录本相结合的形式直接导入到细胞内。或者，如上文所述，可将编码该双链分子的 DNA 作为载体导入到细胞内。为了将双链分子和载体导入到细胞内，可以采用转染增强剂，例如 FuGENE (Roche diagnostics), Lipofectamine 2000 (Invitrogen)、Oligofectamine (Invitrogen)、和 Nucleofector (Wako pure Chemical)。

[0155] 如果治疗可导致临床利益，例如患者体内 PKIB 或 NAALADL2 基因的表达降低，或癌症的大小、普遍性 (prevalence) 或转移潜力下降，则治疗可被确定有效。当治疗是预防性施用时，“有效”的意思是它可阻止或预防癌症形成，或者预防或减轻癌症的临床症状。有效性的确定可以和任何已知的用于诊断或治疗特定肿瘤类型的方法结合进行。

[0156] 预防 (prevention 和 prophylaxis) 包括任何可以减轻疾病所致的死亡率或发病率负担的活动。预防可以在“一级、二级和三级预防水平”上进行。一级预防是避免疾病的发生，而二级和三级水平的预防包括旨在预防疾病进展和症状出现、以及通过恢复功能和减少疾病相关并发症来减轻已成形的疾病的负面影响的的活动。或者，预防包括广泛的旨在减轻特定疾病严重性的预防性治疗，例如降低肿瘤的增殖和转移，减少血管新生。

[0157] 癌症的治疗和 / 或防治，和 / 或术后复发的预防包括任何如下步骤，例如手术除去癌细胞、抑制癌性细胞的生长、肿瘤的消退或衰退，诱导癌症的减轻和抑制癌症的发生、肿瘤衰退、和减少或抑制转移。癌症的有效治疗和 / 或防治可降低患癌个体的死亡率，改善患癌个体的预后，降低血液中肿瘤标志物的水平，和减轻可检测的癌症伴随症状。

[0158] 应当理解，本发明的双链分子以亚化学计量的方式降解靶 mRNA (PKIB 或 NAALADL2)。不希望受限于任何理论，我们相信，本发明的双链分子是以催化的方式降解靶

mRNA 的。因此,与常规的癌症治疗相比,为发挥治疗效果而需要在癌症部位或其附近递送的双链分子显著较少。

[0159] 本领域的技术人员通过考虑如下因素,例如受试者的体重、年龄、性别、疾病类型、症状和其它条件;施用途径;施用是局部性还是全身性的等,能够容易地确定施予给定受试者的本发明双链分子的有效量。一般地,本发明双链分子的有效量包括癌症部位或附近的细胞内浓度,为大约 1 纳摩尔 (nM)– 大约 100nM,优选地大约 2nM– 大约 50nM,更优选地大约 2.5nM– 大约 10nM。我们意图可以施用更大或更小量的双链分子。

[0160] 本方法可用于抑制癌症的生长或转移;例如前列腺癌,特别是激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌。特别地,包含 PKIB 靶序列(即 SEQ ID NO:16 和 17)的双链分子是治疗前列腺癌特别优选的;包含 NAALADL2 靶序列(即 SEQ ID NO:19)的双链分子是治疗前列腺癌特别优选的。

[0161] 为了治疗癌症,还可以将本发明的双链分子和与该双链分子不同的药剂组合施用给受试者。或者,可以将本发明的双链分子和另一种设计用于治疗癌症的治疗方法组合施用给受试者。例如,本发明的双链分子可以和目前用于治疗癌症或防止癌症转移的治疗方法(例如放射治疗,手术和使用化疗剂例如顺铂、卡铂、环磷酰胺、5-氟尿嘧啶、亚德里亚霉素、柔红霉素(daunorubicin)或他莫昔芬(tamoxifen)的治疗)组合施用。

[0162] 在本方法中,双链分子可以作为裸双链分子施用、与递送剂联合施用、或者作为表达双链分子的重组质粒或病毒载体施用给受试者。

[0163] 用于和本发明双链分子联合施用的合适递送剂包括Mirus TransitTKO[®]亲脂试剂;lipofectin;lipofectamine;cellfectin;或多聚阳离子(例如多聚赖氨酸);或脂质体。优选地递送剂是脂质体。

[0164] 脂质体能够辅助将双链分子递送到特定组织,例如前列腺肿瘤组织,并且还能够增加双链分子的血液半衰期。适于用在本发明的脂质体由常规的囊泡形成性脂质(vesicle-forming lipids)形成,它们一般包括中性或带负电荷的磷脂和甾醇,例如胆固醇。一般通过考虑期望的脂质体大小和脂质体在血流中的半衰期等因素来指导脂质的选择。已知有多种方法用于制备脂质体,例如在下列文献中记载的:Szoka et al., Ann Rev Biophys Bioeng 1980,9:467;和 US Pat. Nos. 4,235,871;4,501,728;4,837,028;和 5,019,369,本文援引并入它们的全部公开内容。

[0165] 优选地,封装本发明双链分子的脂质体包括能够将脂质体递送到癌症部位的配体分子。与普遍存在于肿瘤或血管内皮细胞中的受体结合的配体,例如与肿瘤抗原或内皮细胞表面抗原结合的单克隆抗体,是优选的。

[0166] 特别优选的是对封装本发明双链分子的脂质体加以修饰,以避免被单核巨噬细胞和网状内皮系统(reticuloendothelial system)所清除,例如通过使结构的表面结合有调理作用抑制部分(moieties)。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。

[0167] 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,则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,显著地减少单核巨噬细胞系统(“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,上述脂质体有时也被称为“隐形”(stealth)脂质体。

[0168] 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,由于 RES 的摄入的减少,防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核酸分子输送至肿瘤细胞。

[0169] 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;多元醇,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还可以是含有氨基酸或羧酸的天然多糖,例如半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、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,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。

[0170] 优选地,调理作用抑制部分是 PEG、PPG 或其衍生物。用 PEG 或 PEG 衍生物修饰的脂质体有时称作“PEG 化脂质体”。

[0171] 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。

[0172] 上文讨论了表达本发明的双链核酸分子的载体。这样的表达至少一种本发明的双链核酸分子的载体也可以直接施用或者与合适的投递试剂,包括 Mirus Transit **LT1**®脂溶性试剂、lipofectin、lipofectamine、cellfectin、聚阳离子(例如聚赖氨酸)或脂质体等组合施用。将表达本发明的双链核酸分子的重组病毒载体投递到患者的癌症区域的方法在本技术领域内。

[0173] 本发明的双链核酸分子可以通过适于将双链核酸分子投递到癌症区域的任何手段来施用给受试者。例如,双链核酸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途径来施用。

[0174] 合适的肠内施途径包括口服、直肠或鼻内投递。

[0175] 合适的非消化道施途径包括静脉内施用(例如静脉内推注、静脉内输注、动脉内推注、动脉内输注和向血管网络中的导管滴注),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),直接施加到癌症区

域或其附近,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视网膜片剂(retinal pellet)或栓剂或植入物),和吸入。优选通过注射或输注将双链核酸分子或载体施用到癌症部位或其附近。

[0176] 本发明的双链核酸分子可以以单一剂量或分多个剂量来施用。当本发明的双链核酸分子通过输注方式施用时,输注可以是单个持续剂量,或者通过多次输注来输送。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。

[0177] 本领域技术人员可以容易地确定合适的剂量方案来给受试者施用本发明的双链核酸分子。例如,可以将双链核酸分子一次施用给受试者,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,双链核酸分子可以在约3~约28日、更优选约7~约10日的期间内施用给受试者,每日一次或二次。在优选的剂量方案中,在7日期间内每日一次地将双链核酸分子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核酸分子的有效量,可以包含在整个剂量方案中施用的该双链核酸分子的总量。

[0178] 包含双链分子的组合物

[0179] 进一步,本发明提供了包含至少一种本发明双链分子或编码这些分子的载体的药物组合物。具体地,本发明提供了如下的组合物[1]-[23]:

[0180] [1] 一种用于治疗前列腺癌的组合物,包括至少一种分离的双链分子,该双链分子抑制PKIB或NAALADL2的表达和细胞增殖,该分子包含有义链和与之互补的反义链,它们彼此杂交形成该双链分子。

[0181] [2][1] 所述的组合物,其中该有义链包含与从SEQ ID NO:16,17和19中选出的靶序列对应的序列。

[0182] [3][1] 所述的组合物,其中待治疗的前列腺癌是激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌;

[0183] [4][1] 所述的组合物,其中该组合物含有多种所述的双链分子;

[0184] [5][4] 所述的组合物,其中所述多种双链分子靶定相同的基因;

[0185] [6][1] 所述的组合物,其中双链分子的长度少于约100个核苷酸;

[0186] [7][6] 所述的组合物,其中双链分子的长度少于约75个核苷酸;

[0187] [8][7] 所述的组合物,其中双链分子的长度少于约50个核苷酸;

[0188] [9][8] 所述的组合物,其中双链分子的长度少于约25个核苷酸;

[0189] [10][9] 所述的组合物,其中双链分子的长度为约19-大约25个核苷酸;

[0190] [11][1] 所述的组合物,其中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起来的有义链和反义链;

[0191] [12][11] 所述的组合物,其中双链分子具有通式5'-[A]-[B]-[A']-3',其中[A]是包含选自SEQ ID NO:16、17和19的序列的有义链,[B]是由3-23个核苷酸组成的间插单链,[A']是包含与[A]互补的序列的反义链;

[0192] [13][1] 所述的组合物,其中所述双链分子包含RNA;

[0193] [14][1] 所述的组合物,其中所述双链分子包含DNA和RNA;

[0194] [15][14] 所述的组合物,其中所述双链分子是DNA多核苷酸与RNA多核苷酸的杂

交体；

[0195] [16][15] 所述的组合物,其中所述有义链多核苷酸和反义链多核苷酸分别由 DNA 和 RNA 构成；

[0196] [17][14] 所述的组合物,其中双链分子是 DNA 和 RNA 的嵌合体；

[0197] [18][17] 所述的组合物,其中位于反义链 3' 端侧翼的区域由 RNA 构成,或者位于有义链 5' 端侧翼的区域和反义链 3' 端侧翼的区域均由 RNA 构成；

[0198] [19][18] 所述的组合物,其中所述侧翼区域由 9-13 个核苷酸构成；

[0199] [20][1] 所述的组合物,其中所述双链分子含有 3' 突出端；

[0200] [21][1] 所述的组合物,其中所述双链分子由载体所编码,并且包含在组合物内；

[0201] [22][21] 所述的组合物,其中所述双链分子具有通式 5'-[A]-[B]-[A']-3', 其中 [A] 是包含选自 SEQ ID NO:16、17 和 19 的序列的有义链, [B] 是由 3-23 个核苷酸组成的间隔单链, [A'] 是包含与 [A] 互补的序列的反义链；和

[0202] [23][1] 所述的组合物,其中该组合物包含转染增强剂和药学上可接受的载体。

[0203] 本发明的方法在下文将有更加详细的记载。

[0204] 对于本发明的双链核酸分子,在施用给受试者之前,优选采用本技术领域公知的技术将其配制成药物组合物。本发明的药物组合物的特征在于至少是无菌和无热源的。如在本说明书中使用的,“药物制剂”包括人用和兽医用的制剂。本发明的药物组合物的制备方法在本技术领域的技术范围内,例如如 Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985) 所记载的,将其全部内容援引并入本说明书。

[0205] 本药物制剂包含至少一种本发明的双链分子或编码它们的载体(例如重量比 0.1-90%),或者所述分子的生理可接受的盐,与生理可接受的载体介质相混合。优选的生理可接受的载体介质是水、缓冲水(buffered water)、生理盐水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸、透明质酸等。

[0206] 根据本发明,该组合物可以含有多种类型的双链分子,每一种分子可以被导向到 PKIB 和 / 或 NAALADL2 的相同靶序列或不同靶序列。例如,所述组合物可以含有针对 PKIB 或 NAALADL2 的双链分子。或者,例如,所述组合物可以包含针对从 PKIB 或 NAALADL2 选出的一个、两个或更多个靶序列的双链分子。

[0207] 进一步,本组合物可以含有编码一个或多个双链分子的载体。例如,载体可以编码一种、两种或多种本发明双链分子。或者,本组合物可以包含多种类型的载体,每一种载体编码一种不同的双链分子。

[0208] 而且,本双链分子可以作为脂质体包含在本发明组合物中。关于脂质体的细节,见条目“使用双链分子治疗癌症的方法”。

[0209] 此外,本发明的药物组合物中还可以包含常规的药用赋形剂和 / 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:生理学上生物相容性的缓冲液(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、葡萄糖酸钙或乳酸钙)。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。

[0210] 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。

[0211] 例如,用于口服的固体药物组合物可以包括任何上面列举的载体和赋形剂,和 10-95%,优选地 25-75%的一种或多种本发明双链分子。用于喷雾(吸入)施用的药物组合物可以包括重量比 0.01-20%,优选地重量比 1-10%的一种或多种如上所述地包被在脂质体中的本发明双链分子,和推进剂。还可以视需要包含载体;例如卵磷脂,用于鼻内递送。

[0212] 除了上述之外,本组合物可以含有其它的药物活性成分,只要它们不抑制本双链分子的体内功能即可。例如,组合物可以含有常规用于治疗癌症的化疗剂。

[0213] 在其它实施方案中,本发明还提供本发明的双链核酸分子在制备用于治疗表达 PKIB 和 / 或 NAALADL2 基因的癌症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 PKIB 和 / 或 NAALADL2 基因的癌症的药物组合物中的用途:该双链核酸分子在细胞中抑制 PKIB 和 / 或 NAALADL2 基因的表达,该分子包含有义链和与之互补的反义链,所述有义链和与之互补的反义链彼此杂交而形成所述双链核酸分子,且该分子以选自 SEQ ID NO:16、17 和 19 中的序列为靶标。

[0214] 或者,本发明进一步提供了用于制造用于治疗表达 PKIB 和 / 或 NAALADL2 基因的癌症的药物组合物的方法或过程,其中该方法或过程包括将药学上或生理学上可接受的载体与作为活性成分的、可抑制 PKIB 和 / 或 NAALADL2 基因在细胞内的表达的双链核酸分子一起配制的步骤,该分子包括有义链和与之互补的反义链,所述有义链和反义链彼此杂交形成所述双链核酸分子,并且该分子以选自 SEQ ID NO:16、17 和 19 的序列为靶标。

[0215] 在另一个实施方案中,本发明还提供了用于制造用于治疗表达 PKIB 和 / 或 NAALADL2 基因的癌症的药物组合物的方法或过程,其中该方法或过程包括混合活性成分与药学上或生理学上可接受的载体的步骤,其中该活性成分是抑制 PKIB 和 / 或 NAALADL2 基因在细胞内表达的双链核酸分子,该分子包括有义链和与之互补的反义链,所述有义链和反义链彼此杂交形成所述双链核酸分子,并且该分子以选自 SEQ ID NO:16、17 和 19 的序列为靶标。

[0216] 或者,根据本发明,提供了本发明双链分子在制造用于治疗前列腺癌的药物组合物方面的应用。进一步,本发明还提供了用于治疗前列腺癌的本发明双链分子。

[0217] 诊断前列腺癌的方法

[0218] PKIB 或 NAALADL2 的表达被发现特异性地在前列腺癌细胞中变得更高(图 1A、B、C、D、E、F 和图 2A、B)。因此,本文鉴定的基因以及其转录和翻译产物可作为标志用于诊断前列腺癌,并且,通过测量 PKIB 或 NAALADL2 在细胞样品中的表达,可以诊断前列腺癌。具体地说,本发明提供了通过确定 PKIB 或 NAALADL2 在受试者中的表达水平来诊断前列腺癌的方法。可以通过本方法诊断的前列腺癌包括激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌。

[0219] 本发明的方法可以为确定受试者状况提供初始结果。这些初始结果可以和其他信息结合,来帮助医生、护士或其它从业人员诊断疾病。或者,本发明可用于检测受试者来源组织中的癌性细胞,并为医生提供诊断疾病的有用信息。

[0220] 具体地,本发明提供了如下方法 [1]-[10]:

[0221] [1] 一种用于诊断或检测前列腺癌存在的方法,所述方法包括如下步骤:

[0222] (a) 检测生物样品中编码 PKIB 或 NAALADL2 氨基酸序列的基因的表达水平;和

- [0223] (b) 将该基因与正常对照水平相比的表达水平增加与疾病相关联。
- [0224] [2][1] 所述的方法,其中表达水平比正常对照水平至少高 10%。
- [0225] [3][1] 所述的方法,其中通过选自下组的任何一种方法检测表达水平:
- [0226] (a) 检测包含 PKIB 或 NAALADL2 的序列的 mRNA,
- [0227] (b) 检测包含 PKIB 或 NAALADL2 的氨基酸序列的蛋白质,和
- [0228] (c) 检测包含 PKIB 或 NAALADL2 的氨基酸序列的蛋白质的生物活性。
- [0229] [4][1] 所述的方法,其中前列腺癌是激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌。
- [0230] [5][3] 所述的方法,其中通过检测探针与基因转录本的杂交确定表达水平。
- [0231] [6][3] 所述的方法,其中表达水平的确定是通过检测抗体与由基因编码的蛋白质的结合作为基因的表达水平。
- [0232] [7][1] 所述的方法,其中生物样品包括活检物、痰、血液或尿。
- [0233] [8][1] 所述的方法,其中受试者来源的生物样品包括上皮细胞。
- [0234] [9][1] 所述的方法,其中受试者来源的生物样品包括癌细胞。
- [0235] [10][1] 所述的方法,其中受试者来源的生物样品包括癌性上皮细胞。
- [0236] 下文将更详细地记载诊断或检测前列腺癌存在的方法。
- [0237] 本方法要诊断的受试者优选地是哺乳动物。哺乳动物的实例包括,但不限于,例如人、非人灵长动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马和牛。
- [0238] 优选地从待诊断的受试者收集生物样品来进行诊断。任何生物材料均可用作供测定的生物样品,只要其包含 PKIB 或 NAALADL2 的目标转录产物或翻译产物即可。生物样品包括,但不仅限于,身体组织或体液,例如血液、痰和尿。优选地,生物样品含有细胞群体,包括上皮细胞,更优选地是癌上皮细胞或来自怀疑为癌性的前列腺组织的上皮细胞。进一步,如果需要,可以从所得身体组织和体液纯化出细胞,然后用作生物样品。
- [0239] 根据本发明,测定 PKIB 或 NAALADL2 在受试者来源的生物样品中的表达水平。表达水平可以在转录本(核酸)产物水平上加以确定,使用本领域已知的方法。例如,PKIB 或 NAALADL2 的 mRNA 可以通过杂交方法(例如 Northern 杂交)用探针进行定量。检测可以在芯片或阵列上进行。对于包括 PKIB 或 NAALADL2 在内的多数个基因(例如各种癌特异基因)的表达水平的检测,阵列的使用是优选的。本领域的技术人员可以利用 PKIB(SEQ ID NO 1;GenBank 登录号:NM 181795)或 NAALADL2(SEQ ID NO 3;GenBank 登录号:NM 207015 或 SEQ ID NO 5;GenBank 登录号:AK021754)的序列信息制备这些探针。例如,可以使用 PKIB 或 NAALADL2 的 cDNA 作为探针。如果需要,可以用合适的标签,例如染料、荧光和同位素等,来标记探针,由此基因的表达水平可以作为杂交标签的强度加以检测。进一步,PKIB 或 NAALADL2 的转录产物可以通过基于扩增的检测方法(例如 RT-PCR)用引物进行定量。这些引物还可以根据基因的可用序列信息加以制备。例如,实施例中使用的引物(SEQ ID NO 8-15)可以用来实施 RT-PCR 或 Northern 印迹检测,但是本发明并不仅限于此。
- [0240] 具体地,用于本方法的探针或引物在严格、中等严格或低严格条件下与 PKIB 或 NAALADL2 的 mRNA 杂交。如本文所使用的,术语“严格(杂交)条件”是指这样的条件,在该条件下,探针或引物与其靶序列杂交,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,

严格条件的温度应选择比特定序列在限定的离子强度和 pH 下的熔点 (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), pH 7.0–8.3, 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。

[0241] 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 PKIB 或 NAALADL2 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 PKIB 或 NAALADL2 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 PKIB 或 NAALADL2 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。优选地, 结合 PKIB 的抗体被制备为具有表位肽, 所述表位肽包含 SARAGRRNALPDIQSSAATD (SEQ ID NO: 33) 或 KEKDEKTTQDQLEKPQNEEK (SEQ ID NO: 34) 的氨基酸序列。而与 NAALADL2 结合的抗体则被制备为具有含有胞外域 (SEQ ID NO: 32) 的表位肽。

[0242] 作为根据翻译产物检测 PKIB 或 NAALADL2 基因的表达水平的另一种方法, 可以用针对 PKIB 或 NAALADL2 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析观察染色的强度。也就是说, 强染色观察结果表明蛋白存在量增加, 同时表明 PKIB 或 NAALADL2 基因的表达水平升高。

[0243] 而且, 除了 PKIB 或 NAALADL2 基因的表达水平之外, 还可以确定其它癌症相关基因的表达水平, 例如已知在前列腺癌中差异表达的基因, 以提高诊断的准确度。

[0244] 如果 PKIB 或 NAALADL2 在生物样品中的表达水平比 PKIB 或 NAALADL2 基因的对照水平增加例如 10%、25% 或 50%; 或者增加到超过 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, 则可看作该表达水平升高。

[0245] 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 (患癌或未患癌) 已知的患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 PKIB 或 NAALADL2 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 PKIB 或 NAALADL2 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。优选地使用来自与患者来源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 PKIB 或 NAALADL2 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。在本发明的语境下, 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“癌对照水平”。

[0246] 当 PKIB 或 NAALADL2 基因的表达水平比正常对照水平增加或者与癌对照水平相似时, 可以诊断患者罹患或者具有发生癌症的危险。而且, 当比较多种癌症相关基因的表达水平时, 样品与癌参考样品之间基因表达模式相似表明受试者罹患或具有发生癌症的危险。

[0247] 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,但不仅限于, β -肌动蛋白、甘油醛-3 磷酸脱氢酶和核糖体蛋白 P1。

[0248] 抗前列腺癌化合物的筛选

[0249] 在本发明的内容中,待通过本筛选方法鉴定的治疗剂可以是任何化合物或包含数种化合物的组合物。而且,根据本发明筛选方法暴露于细胞或蛋白的测试剂可以是单个化合物或多个化合物的组合。当在方法中使用化合物组合时,化合物可以顺次或同时加以接触。

[0250] 任何测试剂,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、非肽化合物、合成小分子化合物以及天然化合物,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测试化合物,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) “一珠一化合物” (“one-bead one-compound”) 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、非肽寡聚物或化合物小分子文库 (Lam(1997) *Anticancer Drug Des.* 12 :145-67)。合成分子文库方法的例子可在本领域技术中找到 (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)。化合物文库可提供于溶液中 (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 和 5,223,409),质粒上 (Cullet et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1992,89 :1865-9) 或噬菌体上 (Scott and Smith, *Science* 1990,249 :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)。

[0251] 通过本发明任何筛选方法筛选到的化合物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化合物,包括在通过本发明筛选方法鉴定的治疗剂之内。

[0252] 此外,当所筛选的测试剂是蛋白质时,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 进行确认,以在制备治疗或预防癌症的候选物测试剂中的有用性为准。

[0253] 可用于本文所述筛选的测试剂还可以是这样的抗体,它们特异结合 PKIB 或 NAALADL2 蛋白或它们的在体内缺乏原始蛋白生物活性的部分肽。

[0254] 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剂和构建用于本筛选方法的这些治疗剂文库的指导。

[0255] (i) 分子建模

[0256] 对具有目标性质的化合物的分子结构和 / 或对待抑制靶分子即 PKIB 和 NAALADL2 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作用剂的方法之一,是对受试作用剂与其靶标的相互作用进行计算机建模。

[0257] 计算机建模技术为针对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化合物的合理设计提供了可能。三维构建典型地依赖于从选定分子的 x-射线晶体分析或 NMR 成像而来的数据。分子动力学需要力场数据。计算机图形系统为预测新化合物如何连接靶分子,以及实验操作化合物和靶分子的结构以优化结合特异性提供了可能。为了预测当分子和化合物之一或二者发生细小改变时分子-化合物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、菜单驱动的用户界面。

[0258] 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、和可视化分析。

[0259] 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, *NewScientist* 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; 以及综述关于核酸组分模型受体的 Askew et al., *J Am Chem Soc* 1989, 111:1082-90。

[0260] 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。

[0261] (ii) 组合化学合成

[0262] 测试剂的组合文库可以作为合理药物设计程序——其涉及有关已知化合物中存在的核心结构的知识——的一部分生成。该方法允许文库保持合理的规模,便于高通量筛选。或者,简单的、特别是短的聚合物分子文库,可以通过直接合成构成该文库的分子家族的所有排列来加以构建。后一种方法的一个实例是全部由长度为 6 个氨基酸组成的肽文库。这种肽文库包含每一种 6 氨基酸序列组合。这种类型的文库称作线性组合化学文库。

[0263] 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 申请号 WO 91/19735),被编码的肽(例如 WO 93/20242),随机生物寡聚体(例如 WO 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 organicsynthesis) (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 supplement; 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)。

[0264] (iii) 噬菌体展示

[0265] 另一种手段是使用重组噬菌体来产生文库。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。

[0266] 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 (见例如 ComGenex, Princeton, N. J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, 等等)。

[0267] PKIB 或 NAALADL2 结合化合物的筛选

[0268] 在本发明中, 尽管在正常器官中没有表达, 但在前列腺癌中检测到了 PKIB 或 NAALADL2 的过表达 (图 1 和 2)。因此, 使用 PKIB 或 NAALADL2 基因、由该基因编码的蛋白质、或该基因的转录调节区, 能够筛选出可改变该基因的表达或改变由该基因编码的多肽的生物学活性的化合物。这些化合物可用作治疗或预防前列腺癌的药物。

[0269] 本发明提供了筛选可结合 PKIB 或 NAALADL2 的作用剂的方法。因为 PKIB 和 NAALADL2 在前列腺癌中表达, 所以与 PKIB 或 NAALADL2 结合的作用剂可用于抑制前列腺癌细胞的增殖, 从而可用于治疗或预防前列腺癌。因此, 本发明还提供了用于筛选可抑制前列腺癌细胞增殖的作用剂的方法, 以及使用 PKIB 或 NAALADL2 多肽筛选可用于治疗或预防前列腺癌的作用剂的方法。具体地, 该筛选方法的一个实施方案包括如下步骤:

[0270] a) 使测试化合物与由 PKIB 或 NAALADL2 多核苷酸编码的多肽接触；

[0271] b) 检测所述多肽与测试化合物之间的结合活性；和

[0272] c) 选择可结合所述多肽的测试化合物。

[0273] 本发明的方法在下文将有更详细的记载。

[0274] 用于筛选的 PKIB 或 NAALADL2 多肽可以是重组多肽，或者是来自自然界的蛋白质，或其部分肽。与测试化合物接触的多肽可以是，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。

[0275] 作为使用 PKIB 或 NAALADL2 多肽来筛选蛋白质，例如与 PKIB 或 NAALADL2 多肽结合的蛋白质的方法，可以使用本领域技术人员周知的许多方法。这样的筛选可以根据例如免疫沉淀方法（例如，按照下文 [实施例 1] 中“PKIB 与 PKA-C 间的相互作用”）来进行，具体地说以如下所述的方式。将基因插入到用于外源基因的表达载体（例如 pSV2neo、pcDNA1，pcDNA3.1，pCAGGS 和 pCD8）内，在宿主（例如动物）细胞中表达编码 PKIB 或 NAALADL2 多肽的基因。用于表达的启动子可以是任何能够通用的启动子，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., Gene91:217-23(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。将基因导入到表达外源基因的宿主细胞内可以根据本领域技术人员众所周知的任何方法来进行，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 右旋糖酐法（Lopata et al., Nucleic Acids Res 12:5707-17(1984); Sussman and Milman, Mol Cell Biol 4:1641-3(1984)), Lipofectin 转染法（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。对于由 PKIB 基因或 NAALADL2 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)）。可商购的载体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。另外，也可以使用如下的融合蛋白，其通过导入仅由数个到十余个 (a dozen) 氨基酸构成的小型表位加以制备，使融合不会改变 PKIB 或 NAALADL2 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（多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 PKIB 或 NAALADL2 多肽结合的蛋白质的表位-抗体系统（Experimental Medicine 13:85-90(1995)）。

[0276] 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内形成免疫复合物。免疫复合物由 PKIB 或 NAALADL2 多肽、具有与该多肽结合能力的多肽、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 PKIB 或 NAALADL2 多肽的抗体进行免

疫沉淀,这样的抗体的制备如下文所述。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 PKIB 或 NAALADL2 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底物,例如谷胱甘肽-sepharose 4B,按照与使用针对 PKIB 或 NAALADL2 多肽的抗体的相同的方式来形成免疫复合体。

[0277] 免疫沉淀可以根据下文所述实施,或者例如按照文献中的方法(Harlow and Lane, Antibodies, 511-52, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)) 实施。

[0278] 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,可以利用结合蛋白的分子量来分析该蛋白。由于与 PKIB 或 NAALADL2 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。

[0279] 作为利用 PKIB 或 NAALADL2 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,PKIB 或 NAALADL2 多肽结合蛋白可以通过如下方法获得,从预期表达 PKIB 或 NAALADL2 多肽的培养细胞(例如 LNCaP, 22Rv1, PC-3DU-145 和 C4-2B)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膜上,使纯化并且标记的 PKIB 或 NAALADL2 多肽与上述膜反应,并依照标记来检测表达与 PKIB 或 NAALADL2 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 PKIB 或 NAALADL2 多肽或与 PKIB 或 NAALADL2 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。

[0280] 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)”)。

[0281] 在双杂交系统中,例如,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,从而使该文库,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(当酵母细胞表达可与本发明多肽结合的蛋白时,两者的结合可激活报告基因,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、荧光酶基因等。

[0282] 也可以用亲和色谱来筛选与 PKIB 或 NAALADL2 基因编码的多肽结合的化合物。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化合物施加到该柱上。这里的测试化合物可以是例如细胞提取物、细胞裂解物等。在加载测试化合物之后,冲洗柱子,从而可以制备得到结合于本发明多肽的化合物。当测试化

合物是蛋白质时,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。

[0283] 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化合物的装置。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化合物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化合物间的结合进行评估。

[0284] 用于筛选当固定的 PKIB 或 NAALADL2 多肽暴露于合成化合物或天然底物文库或随机噬菌体多肽展示文库时发生结合的分子的方法,以及使用基于高通量的组合化学技术(Wrighton et al., Science 273:458-64(1996);Verdine, Nature 384:11-13(1996);Hogan, Nature 384:17-9(1996)),不仅分离与 PKIB 或 NAALADL2 蛋白结合的蛋白质,而且分离与 PKIB 或 NAALADL2 蛋白结合化合物(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。

[0285] 在优选实施方案中,通过本发明方法选出的测试化合物可以作为候选物,用于进一步筛选评估其治疗作用。

[0286] 筛选可抑制 PKIB 或 NAALADL2 生物活性的化合物

[0287] 在本发明中,PKIB 或 NAALADL2 蛋白已显示具有促进前列腺癌细胞增殖的活性(图 3C, 4C 和 6)。而且,PKIB 显示具有 PKA-C 细胞核积累活性(图 5D 和 E)。在本发明中,所谓 PKA-C 细胞核积累,意思是抑制 PKA-C 从细胞核外排或者加速 PKA-C 转运进入细胞核。利用这些生物活性,可以筛选能够抑制这些蛋白的活性的化合物,该化合物对于治疗或预防前列腺癌有用。因此,本发明还提供了筛选可抑制前列腺癌细胞增殖的化合物的方法,和筛选治疗或预防前列腺癌的化合物的方法。因此,本发明提供了使用 PKIB 或 NAALADL2 基因表达的多肽来筛选用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法,该方法包括如下步骤:

[0288] a) 使测试化合物与由 PKIB 或 NAALADL2 的多核苷酸编码的多肽接触;

[0289] b) 检测步骤(a)的多肽的生物活性;和

[0290] c) 选择与不存在测试化合物时所述多肽的生物活性相比,可抑制由 PKIB 或 NAALADL2 多核苷酸编码的多肽的生物活性的测试化合物。

[0291] 下文将更详细地记载本发明的方法。

[0292] 任何多肽均可用于筛选,只要它们具有 PKIB 或 NAALADL2 蛋白的生物活性即可。例如,可以使用 PKIB 或 NAALADL2 蛋白,也可以使用与这些蛋白功能上等同的多肽。这些多肽可以由细胞内源或外源表达。而且,这些生物活性包括 PKIB 或 NAALADL2 蛋白的细胞增殖活性或 PKIB 蛋白的 PKA-C 细胞核积累活性。

[0293] 通过本筛选分离的化合物是 PKIB 或 NAALADL2 基因编码多肽的拮抗剂的候选物。术语“拮抗剂”是指可以通过结合多肽而抑制多肽功能的分子。所述术语还指可降低或抑制编码 PKIB 或 NAALADL2 的基因的表达的分子。而且,通过本筛选分离的化合物是如下化合物的候选物,所述化合物抑制 PKIB 或 NAALADL2 多肽与分子(包括 DNA 和蛋白)的体内相互作用。

[0294] 当本方法中要检测的生物活性是细胞增殖时,可以通过例如如下方法进行检测:制备表达 PKIB 或 NAALADL2 多肽的细胞,在测试化合物的存在下培养细胞,确定细胞增殖速

度,测量细胞周期等,以及通过测量集落形成活性,例如图 3C 和 4C 所示。“抑制生物活性”在本文中定义为,与不存在该化合物时相比,PKIB 或 NAALADL2 的生物活性优选地至少被抑制 10%,更优选地,至少抑制 25%、50%或 75%,最优选地,抑制 90%。

[0295] 当待在本方法中检测的生物活性是 PKA-C 细胞核积累时,可以通过例如如下方法进行检测,即通过制备表达 PKIB 多肽的细胞,在测试化合物的存在下培养细胞,并使用免疫细胞化学或 western 印迹确定细胞核中 PKA-C 蛋白的量,例如图 5D 和 E 所示。“抑制生物活性”在此处定义为,与不存在该化合物时相比,PKIB 的生物活性优选地至少被抑制 10%,更优选地,至少抑制 25%、50%或 75%,最优选的,被抑制 90%。

[0296] 在优选实施方案中,通过本发明方法筛选的测试化合物可以作为候选物,进行进一步筛选评估其治疗作用。

[0297] 筛选可改变 PKIB 或 NAALADL2 表达的化合物

[0298] 在本发明中,已显示利用 siRNA 降低 PKIB 或 NAALADL2 的表达可以抑制癌细胞增殖(图 3、4)。因此,本发明提供了用于筛选可抑制 PKIB 或 NAALADL2 表达的作用剂的方法。抑制 PKIB 或 NAALADL2 表达的作用剂可用于抑制前列腺癌细胞的增殖,因此可用于治疗或预防前列腺癌。因此,本发明还提供了用于筛选可抑制前列腺癌细胞增殖的作用剂的方法,以及筛选可用于治疗或预防前列腺癌的作用剂的方法。在本发明的内容中,该筛选可以包括例如如下步骤:

[0299] a) 使候选化合物与表达 PKIB 或 NAALADL2 的细胞接触;和

[0300] b) 选择与对照相比降低 PKIB 或 NAALADL2 的表达水平的候选化合物。

[0301] 本发明的方法在下文将有更详细的记载。

[0302] 表达 PKIB 或 NAALADL2 的细胞包括,例如,从前列腺癌建立的细胞系;这些细胞可用于上文所述的本发明的筛选(例如 LNCaP、22Rv1、PC-3、DU-145 和 C4-2B)。表达水平可以通过本领域技术人员众所周知的方法进行评估,例如 RT-PCR、Northern 印迹测定、Western 印迹测定、免疫染色和流式细胞术分析。“表达水平降低”在本文中定义为,与不存在该化合物时相比,PKIB 或 NAALADL2 的表达水平优选地被降低至少 10%,更优选地,至少水平降低 25%、50%或 75%,最优选地,水平降低 95%。本文的化合物包括化学化合物(chemical compound)、双链核苷酸等。双链核苷酸的制备如前述的记载。在筛选方法中,降低 PKIB 或 NAALADL2 表达水平的化合物可以被选择来作为用于治疗或预防前列腺癌的候选作用剂。

[0303] 或者,本发明的筛选方法可包括如下步骤:

[0304] a) 使候选化合物与导入了如下载体的细胞接触,该载体包括 PKIB 或 NAALADL2 的转录调节区和在该转录调节区控制下表达的报告基因;

[0305] b) 测量所述报告基因的表达或活性;和

[0306] c) 选择可降低所述报告基因表达或活性的候选化合物。

[0307] 合适的报告基因和宿主细胞是本领域众所周知的。例如,报告基因是荧光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)、香菇珊瑚(Discosoma sp.)红色荧光蛋白(DsRed)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、lacZ 和 β -葡萄糖苷酸酶(GUS),而宿主细胞是 COS7、HEK293、HeLa 等。筛选所需的报告构建体可以通过使报告基因序列与 PKIB 或 NAALADL2 的转录调节区相连接来加以制备。这里,PKIB 或 NAALADL2 的转录调节区是从起始密码子到上游至少 500bp 的区域,优选地是到上游 1000bp,更优选地是到上游 5000 或 10000bp 的区域。含有转录调节区的核苷酸区

段可以从基因组文库分离,或者可以通过 PCR 扩增。用于鉴定转录调节区的方法以及测定规程是众所周知的 (Molecular Cloning third edition chapter 17, 2001, Cold Springs Harbor Laboratory Press)。将含有所述报告构建体的载体转染到宿主细胞,并通过本领域众所周知的方法 (例如使用照度计 (luminometer)、吸收光谱仪、流式细胞仪等) 检测报告基因的表达或活性。“表达或活性降低”在本文中定义为,与不存在该化合物时相比,报告基因的表达或活性优选地被降低至少 10%,更优选地,至少降低 25%、50% 或 75%,最优选地,降低 95%。

[0308] 在优选实施方案中,通过本发明方法选出的测试化合物可以作为候选物,用于进一步筛选以评估其治疗作用。

[0309] 筛选降低 PKIB 和 PKA-C 间结合的化合物

[0310] 在本发明中,PKIB 与 PKA-C 间的相互作用通过免疫沉淀显示 (图 5C)。而且,PKA-C 在没有 PKIB 时从细胞核外排到细胞质中 (图 5D)。本发明提供了用于筛选可抑制 PKIB 和 PKA-C 间结合的化合物的方法。可抑制 PKIB 和 PKA-C 间结合的化合物可用于抑制前列腺癌细胞的增殖,从而可用于治疗或预防前列腺癌。因此,本发明还提供了用于筛选可抑制前列腺癌细胞增殖的化合物的方法,和用于筛选可用于治疗或预防前列腺癌的化合物的方法。

[0311] 更具体地,该方法包括如下步骤:

[0312] a) 在测试化合物的存在下,使 PKIB 多肽或其功能等价物与 PKA-C 多肽或其功能等价物接触;

[0313] b) 检测多肽间的结合;和

[0314] c) 选择可抑制多肽间结合的测试化合物。

[0315] 这里,“PKIB 多肽的功能等价物”是指包含 PKA-C 结合域氨基酸序列;假底物基序 (RRNA:SEQ ID NO:31) 的多肽。类似地,“PKA-C 多肽的功能等价物”是指包含 PKIB 结合域氨基酸序列的多肽。

[0316] 本发明的方法将在下文有更详细的记载。

[0317] 作为筛选可抑制 PKIB 和 PKA-C 间结合的化合物的方法,可以使用本领域技术人员众所周知的许多方法。这些筛选可以作为体外测定系统来实施。更具体地说,首先,使 PKIB 或 PKA-C 多肽与支持物结合,将另一多肽与测试化合物一起施加。接着,温育混合物,清洗,并检测和 / 或测量与支持物结合的另一多肽。潜在的候选化合物能够降低另一多肽的检测量 (reduce the amount of detecting the other polypeptide)。这里,PKIB 或 PKA-C 多肽不仅可以制备成天然蛋白质,还可以作为通过基因重组技术制备的重组蛋白加以制备。天然蛋白可以通过例如亲和色谱制备。另一方面,重组蛋白的制备可以通过培养用编码 PKA-C 的 DNA 转化的从而在其中表达该蛋白的细胞,然后回收该重组蛋白。

[0318] 可用于结合蛋白的支持物的实例包括不溶性多糖,例如琼脂糖、纤维素和右旋糖酐;和合成树脂,例如聚丙烯酰胺、聚苯乙烯和硅橡胶 (silicon);优选地,使用由上述材料制备的可商购的珠子和板 (例如多孔板、生物传感器芯片等)。当使用珠子时,可以将它们填充到柱中。或者,磁珠的使用也是本领域已知的,借助磁珠能够容易地通过磁性分离珠子上结合的蛋白。

[0319] 蛋白与支持物的结合可以根据常规方法进行,例如化学键合和物理吸附。或者,蛋白可以通过特异识别该蛋白的抗体与支持物结合。而且,蛋白与支持物的结合也可以通过

抗生物素蛋白和生物素进行。蛋白间的结合在缓冲液中进行,缓冲液例如但不仅限于,磷酸盐缓冲液和 Tris 缓冲液,只要该缓冲液不抑制蛋白间的结合即可。

[0320] 在本发明中,利用表面等离子体共振现象的生物传感器可用作检测或定量结合蛋白的装置。当使用这种生物传感器时,蛋白间的相互作用可以作为表面等离子体共振信号得以实时地观察,仅使用微量的多肽,并且无需标记(例如 BIAcore, Pharmacia)。因此,使用生物传感器例如 BIAcore 来评估 PKA-C 和 PKIB 间的结合是有可能的。

[0321] 或者,可以标记 PKA-C 或 PKIB,利用多肽的标记来检测或测量结合活性。具体地,预标记其中一个多肽,然后使标记的多肽在测试化合物的存在下与另一多肽接触,经过清洗后,根据标记检测或测量结合的多肽。可用于在本发明中标记蛋白的标记物质有例如放射性同位素(例如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶)、荧光底物(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、若丹明)和生物素/抗生物素蛋白。当用放射性同位素标记蛋白时,可以借助液体闪烁进行检测或测量。或者,对于用酶标记的蛋白,可以添加酶的底物,使用吸收测定仪检测底物的变化,例如颜色的产生,来检测或测量。此外,当使用荧光底物作为标记时,用荧光光度计检测或测量结合蛋白。

[0322] 而且,PKA-C 和 PKIB 间的结合还可以用针对 PKA-C 或 PKIB 的抗体进行检测或测量。例如,使固定在支持物上的 PKA-C 多肽与测试化合物和 PKIB 接触,然后温育并清洗混合物,然后可以用针对 PKIB 的抗体进行检测或测量。或者,可以将 PKIB 固定在支持物上,而使用针对 PKA-C 的抗体作为抗体。当在本筛选中使用抗体时,抗体优选地用上述标记物质的其中一种加以标记,并根据标记物质进行检测和测量。或者,可以用针对 PKA-C 或 PKIB 的抗体作为第一抗体,用标记底物标记的第二抗体进行检测。而且,在本发明筛选中与蛋白结合的抗体可以用蛋白 G 或蛋白 A 柱进行检测或测量。

[0323] 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)”)。

[0324] 在双杂交系统中,例如,使 PKA-C 多肽与 SRF 结合区或 GAL4 结合区融合,并在酵母细胞中表达。使能结合 PKA-C 多肽的 PKIB 多肽与 VP16 或 GAL4 转录激活区融合,在测试化合物的存在下,也在酵母细胞中表达。或者,可以使 PKIB 多肽和 SRF 结合区或 GAL4 结合区融合,而使 PKA-C 多肽与 VP16 或 GAL4 转录激活区融合。两者的结合可激活报告基因,使阳性克隆可检测。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、荧光素酶基因等。

[0325] 而且,本发明的筛选方法是检测 PKA-C 的细胞核定位,因为 PKA-C 在 PKIB 的存在下定位于细胞核,而在没有 PKIB 时定位于细胞质。例如,使表达 PKA-C 和 PKIB 的细胞均与测试化合物接触并清洗。细胞用例如 70%乙醇或 4%多聚甲醛固定,并用抗 PKA-C 抗体检测。当 PKA-C 基本上在细胞质内被检测到时,使用测试化合物预防前列腺癌。这里,可通过本领域众所周知的方法在细胞中强制表达(force-expressed)PKA-C 和 PKIB。因此,使表达 PKA-C 和 PKIB 细胞均与测试化合物接触,并通过众所周知的方法制备细胞的细胞核提

取物（例如使用 Merck Bioscience 生产的 SubcellularProteoExtract Kit(S-PEK)）。用 western 印迹测定检测细胞核提取物中 PKA-C 的量。

[0326] 在优选实施方案中,通过本发明方法选出的测试化合物可以作为候选物,用于进一步评价其治疗作用。也就是说,上述筛选方法还包括如下步骤:

[0327] d) 使步骤 c) 选出的候选化合物与表达 PKIB 和 PKA-C 的细胞接触;和

[0328] e) 选择与不存在该候选化合物时检测到的表达水平相比,可降低 Akt 磷酸化水平的候选化合物。

[0329] 可以使用本领域技术人员众所周知的 Akt 磷酸化检测方法。例如,可以使用在下文实施例部分记载的 western 印迹分析。更具体地,在 473 位丝氨酸残基处检测 Akt (SEQ ID NO :35) 的磷酸化水平。

[0330] 筛选可通过抑制 PKIB 功能降低 Akt 磷酸化的化合物

[0331] 在本发明中,Akt 磷酸化被 PKIB siRNA 降低(图 7A)。而且,Akt 磷酸化被 PKIB 和 / 或 PKA-C 的过表达所提高(图 7B 和 C)。本发明提供了筛选可抑制 PKIB 和 PKA-C 间结合的化合物的方法。Akt 磷酸化很可能在 HRPC 进展和其恶性表型中发挥关键作用 (Sellers, W. R. & Sawyers, C. L. (2002) in Somatic Genetics of Prostate Cancer : Oncogenes and Tumor Suppressors ed. Kantoff, P. (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), Wang Y, Kreisberg JI, Ghosh PM. , Curr Cancer Drug Targets. 2007 Sep ; 7 (6) : 591-604, Lin HK, Yeh S, Kang HY, Chang C, Proc Natl Acad Sci U S A 2001 ; 98 (13) : 7200-5, Feldman BJ, Feldman D, Nat Rev Cancer 2001 ; 1 (1) : 34-45, Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Bedolla R, Kreisberg JI. , Clin Cancer Res. 2002 ; 8 (4) : 1168-71), 因此我们预期,可通过抑制 PKIB 功能而降低 Akt 磷酸化的化合物可以抑制前列腺癌细胞的增殖,从而可用于治疗或预防前列腺癌。因此,本发明还提供了用于筛选可抑制前列腺癌细胞增殖的化合物的方法,和用于筛选可用于治疗或预防前列腺癌,优选地 HRPC, 的化合物的方法。

[0332] 更具体地说,本发明包括如下步骤:

[0333] a) 使候选化合物与表达 PKIB 和 PKA-C 的细胞接触;和

[0334] b) 选择与不存在该候选化合物时检测到的表达水平相比,可降低 Akt 磷酸化水平的候选化合物。

[0335] 或者,通过本发明可以鉴定适于治疗和 / 或预防前列腺癌的候选化合物。这样的方法包括如下步骤:

[0336] a) 在测试化合物的存在下,在适于 PKIB 磷酸化 Akt 的条件下,将 PKIB 或其功能等价物与 Akt 与 PKA-C 或其功能等价物一起温育,其中 Akt 是从下组中选出的多肽:

[0337] i. 包含氨基酸序列 SEQ ID NO :35 (Akt) 的多肽;

[0338] ii. 包含氨基酸序列 SEQ ID NO :35 且其中替换、删除或插入了一个或多个氨基酸的多肽,其中所述多肽具有与由氨基酸序列 SEQ ID NO :35 组成的多肽等价的生物活性;

[0339] iii. 由在严格条件下与由核苷酸序列 SEQ ID NO :36 组成的多核苷酸杂交的多核苷酸所编码的多肽,其中该多肽具有与由氨基酸序列 SEQ ID NO :35 组成的多肽等价的生物活性;

[0340] b) 检测 Akt 的磷酸化水平;

[0341] c) 比较在步骤 b) 中测得的 Akt 磷酸化水平与对照水平 ;和

[0342] d) 选择与对照水平相比,可降低 Akt 磷酸化水平的化合物。

[0343] 在优选实施方案中,通过本发明方法选出的测试化合物可以作为候选物,用于进一步筛选评价其治疗作用。

[0344] 优选地,Akt 的磷酸化水平可以在氨基酸序列 SEQ ID NO :35 的 473 位丝氨酸残基或该多肽的同源位置进行检测。可以使用本领域技术人员周知的 Akt 磷酸化检测方法。例如,可以使用在下文实施例部分记载的 western 印迹分析。

[0345] 在本发明的语境中,适于 PKIB 磷酸化 Akt 的条件可以通过在磷酸供体例如 ATP 的存在下温育 Akt 和 PKIB 及 PKA-C 来提供。适于 PKIB 磷酸化 Akt 的条件还包括培养表达 PKIB、PKA-C 和多肽的细胞。例如,所述细胞可以是携带有包含编码该多肽的多核苷酸的表达载体的转化细胞。在温育之后,可以用识别磷酸化 Akt 的抗体检测 Akt 的磷酸化水平。

[0346] 在检测磷酸化 Akt 之前,可以将 Akt 与其它成分或 Akt 表达细胞的细胞裂解物分离。例如,可利用凝胶电泳将 Akt 与其余组分分离。或者,可以通过使 Akt 与具有抗 Akt 抗体的载体接触来捕获 Akt。当使用标记的磷酸供体时,可以通过追踪该标记来检测 Akt 的磷酸化水平。例如,当放射性标记的 ATP (例如 ^{32}P -ATP) 用作磷酸供体时,分离的 Akt 的放射活性与 Akt 的磷酸化水平相关。或者,可以使用特异识别磷酸化 Akt 而不识别非磷酸化 Akt 的抗体来检测磷酸化 Akt。优选地,所述抗体识别在 Ser-473 残基处磷酸化的 Akt。

[0347] 用于制备与给定蛋白功能上等价的多肽的方法是本领域技术人员众所周知的,包括在蛋白中导入突变的已知方法。一般地说,已知蛋白质中一个或多个氨基酸的修饰不会影响蛋白的功能 (Mark DF et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984,81 :5662-6 ;Zoller MJ&Smith M, Nucleic Acids Res 1982,10 :6487-500 ;Wang A et al., Science 1984,224 :1431-3 ;Dalbadie-McFarland G et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982,79 :6409-13)。实际上,突变的或经过修饰的蛋白,具有通过在特定氨基酸序列中替换、删除、插入和 / 或添加一个或多个氨基酸残基进行修饰的氨基酸序列的蛋白,已知可以保留原始的生物活性 (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))。由此,本领域的技术人员将会理解,对氨基酸序列进行个别添加、删除、插入或替换以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 -- 其中蛋白质的改变的结果是产生具有相似功能的蛋白,这些都是本发明所预期的。

[0348] 例如,本领域的技术人员能够通过 Akt、PKA-C 或 PKIB 中的任一个内导入合适的突变来制备与这些蛋白功能上等价的多肽,例如使用定点诱变 (Hashimoto-Gotoh et al., Gene 152 :271-5(1995) ;Zoller and Smith, Methods Enzymol 100 :468-500(1983) ;Kramer et al., Nucleic Acids Res. 12 :9441-56(1984) ;Kramer and Fritz, Methods Enzymol 154 :350-67(1987) ;Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82 :488-92(1985) ;Kunkel TA, et al., Methods Enzymol. 1991 ;204 :125-39.)。本发明的多肽包括这样的多肽,其具有 Akt、PKA-C 或 PKIB 的氨基酸序列,且其中一个或多个氨基酸被突变,其中所得的突变多肽分别与 Akt、PKA-C 或 PKIB 的功能等价。只要保留蛋白的活性,氨基酸突变的数目没有具体限制。然而,一般优选地改变氨基酸序列的 5% 或者更少。因此,在优选实施方案中,在这样的变体中要突变的氨基酸的数目一般为 30 个氨基酸或者更少,典型地 20 个氨基酸或者更少,

更典型地 10 个氨基酸或者更少,优选地 5-6 个氨基酸或者更少,更优选地 1-3 个氨基酸。

[0349] 要突变的氨基酸残基优选地被突变成氨基酸侧链性质保守的不同氨基酸(这个过程称作保守氨基酸替换)。氨基酸侧链的性质的实例包括疏水氨基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V),亲水氨基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T),和具有如下共同官能团或特征的侧链:脂肪族侧链(G, A, V, L, I, P);含羟基侧链(S, T, Y);含硫原子侧链(C, M);含羧酸和酰胺侧链(D, N, E, Q);含碱侧链(R, K, H);和含芳香基侧链(H, F, Y, W)。注意,圆括号内的字母指示氨基酸的单字母编码。而且,提供功能相似氨基酸的保守替换表是本领域众所周知的。例如,下面 8 组中每一组含有的氨基酸彼此之间是保守替换:

[0350] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0351] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0352] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0353] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0354] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0355] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0356] 7) 丝氨酸(S),苏氨酸(T);和

[0357] 8) 半胱氨酸(C),甲硫氨酸(M)(见例如 Creighton, Proteins 1984)。

[0358] 这样的保守修饰的多肽包含在本 Akt、PKA-C 或 PKIB 蛋白内。然而,本发明不仅限于此,Akt、PKA-C 和 PKIB 蛋白包含非保守修饰,只要保留原始蛋白的结合活性即可。而且,修饰蛋白不排除多态变异体、种间同源物和由这些蛋白的等位基因编码的蛋白。

[0359] 向 Akt、PKA-C 或 PKIB 氨基酸序列添加了一个或多个氨基酸残基的多肽的实例是分别含有 Akt、PKA-C 或 PKIB 的融合蛋白。因此,本发明包括 Akt、PKA-C 或 PKIB 与其它肽或蛋白的融合蛋白,也就是融合物。融合蛋白可以通过本领域技术人员众所周知的技术加以制备,例如使编码 Akt、PKA-C 或 PKIB 的 DNA 与编码其它肽或蛋白的 DNA 相连,并使阅读框匹配,将融合 DNA 插入到表达载体内,并在宿主中表达它。与本发明蛋白融合的肽或蛋白没有限制。

[0360] 可用作与 Akt、PKA-C 或 PKIB 蛋白融合的肽的已知肽包括,例如,FLAG(Hopp TP et al., Biotechnology 19886:1204-10),含 6 个 His(组氨酸)残基的 6xHis,10xHis,流感凝集素(HA),人 c-myc 片段,VSP-GP 片段,p18HIV 片段,T7- 标签,HSV- 标签,E- 标签,SV40T 抗原片段,lck 标签, α -微管蛋白片段,B- 标签,蛋白 C 片段等。可以和本发明蛋白融合的蛋白的实例包括 GST(谷胱甘肽-S 转移酶)、流感凝集素(HA)、免疫球蛋白恒定区、 β -半乳糖苷酶、MBP(麦芽糖结合蛋白)等。

[0361] 融合蛋白的制备可以通过使编码上面讨论的融合肽或蛋白的商业可得 DNA 与编码 Akt、PKA-C 或 PKIB 蛋白的 DNA 融合,并表达所制备的融合 DNA。

[0362] 另一种本领域已知可分离功能等价多肽的方法涉及,例如,杂交技术(Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. Press(1989))。本领域的技术人员能够容易地从分离的 DNA 分离与 Akt(即 SEQ ID NO:36)、PKA-C 或 PKIB 具有高同源性的 DNA,并从所述分离的 DNA 分离出与 Akt、PKA-C 或 PKIB 功能上等价的肽。本发明的蛋白包括由与编码 Akt、PKA-C 或 PKIB 的 DNA 序列的全部或一部分杂交的 DNA 编码,并且与 Akt、PKA-C 或 PKIB 功能上等价的蛋白。这些多肽包括对应于人源蛋白的哺乳动

物同源体（例如由猴、大鼠、家兔和牛基因编码的多肽）。在从动物分离与编码 Akt、PKA-C 或 PKIB 的 DNA 高度同源的 DNA 时，特别优选地使用前列腺癌组织。

[0363] 用于分离编码与人 Akt、PKA-C 或 PKIB 蛋白功能上等价的蛋白的 DNA 的杂交条件可以由本领域技术人员常规地加以选择。术语“严格（杂交）条件”是指这样的条件，在该条件下核酸分子与其靶序列杂交，典型地在核酸复合体混合物中，但检测不到与其它序列杂交。严格条件是序列依赖的，并且在不同环境下会不同。序列越长，特异杂交的温度越高。Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993) 提供了关于核酸杂交的详细指导。在本发明的语境中，合适的杂交条件可以由本领域的技术人员常规地加以选择。

[0364] 一般地说，严格条件被选择为在限定的离子强度 pH 下，比特定序列的熔点 (T_m) 低大约 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% 的与靶分子互补的探针在平衡状态下与靶序列杂交（因为靶序列过量存在，所以在 T_m 下，在平衡时 50% 的探针被占据）。严格条件还可以通过添加去稳定剂（例如甲酰胺）来实现。为了选择性或特异性的杂交，阳性信号优选地至少是背景的两倍，更优选地是背景杂交的 10 倍。

[0365] 示例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 下清洗。合适的杂交条件还可以包括使用“快速杂交缓冲液 (Rapid-hyb buffer)” (Amersham LIFE SCIENCE) 在 68°C 预杂交 30 分钟或者更长时间，添加标记的探针，在 68°C 温育 1h 或更长时间。

[0366] 清洗步骤可以在例如低严格条件下进行。因此，示例性的低严格条件可以包括例如 42°C、2x SSC、0.1% SDS、或优选地 50°C、2x SSC、0.1% SDS。或者，示例性的高严格条件包括例如在室温下用 2x SSC、0.01% SDS 清洗三次各 20 分钟，然后在 37°C 用 1x SSC、0.1% SDS 清洗三次各 20 分钟，和在 50°C 下用 1x SSC、0.1% SDS 清洗两次各 20 分钟。然而，多种因素，例如温度和盐浓度，会影响杂交的严格度，本领域的技术人员能够合适地选择可实现所需严格度的因素。

[0367] 优选地，功能上等价多肽的氨基酸序列与本文公开的天然 Akt、PKA-C 或 PKIB 序列具有至少大约 80% 的同源性（也称作序列同一性），更优选地，至少大约 85%、90%、95%、96%、97%、98%、或 99% 同源性。多肽的同源性可以通过如下文献中的算法加以确定：“Wilbur and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80:726–30 (1983)”。在其它实施方案中，功能上等价多肽可以由在严格条件下（如下文定义）与编码这种功能上等价多肽的多核苷酸杂交的多核苷酸编码。

[0368] 除了杂交，可以使用基因扩增方法，例如聚合酶链式反应 (PCR) 方法，使用根据 Akt 或 PKIB 的序列信息合成的引物分离编码与 Akt、PKA-C 或 PKIB 功能上等价的的多肽的 DNA。

[0369] 可用于本发明语境下的 Akt、PKA-C 或 PKIB 功能上等价物在氨基酸序列、分子量、等电点、是否存在糖链或形式方面可以有不同，这取决于用于产生它的细胞或宿主或者所使用的纯化方法。然而，只要它是 Akt、PKA-C 或 PKIB 多肽的功能上等价物，就包含在本发明的范围内。

[0370] 筛选与 NAALADL2 结合的抗体

[0371] NAALADL2 是一种新的 II 型膜蛋白,属于谷氨酸羧肽酶 II (GCPII) 家族。著名的前列腺癌标记——前列腺特异膜抗原 (PSMA),也属于 GCPII 家族 (Rajasekaran AK et al., Am J Physiol Cell Physiol 2005288 :C975-81. 和 Murphy GP et al., Prostate 200042 :145-9.)。NAALADL2 显示与 PSMA 同源,具有一个跨膜区,并定位在细胞质膜上 (图 5B)。PSMA 是一种 FDA 批准的前列腺癌显像剂——¹¹¹In 标记的 7E11 单克隆抗体 (Prostascint, Cytogen, Princeton, NJ) 的靶标,而且 PSMA 被单克隆抗体如 J591 靶定, J591 在接受临床试验,用于将显像剂或治疗剂特异递送到 PSMA 表达细胞 (Murphy GP et al., Prostate 200042 :145-9. 和 Holmes EH, Expert Opin Investig Drugs 200110 :511-9.)。因此,利用 NAALADL2 在细胞表面的结合能力作为指征进行筛选,可以鉴定用于诊断或预防前列腺癌的抗 NAALADL2 抗体。该筛选方法的一个实施方案包括如下步骤:

[0372] a) 使候选抗体与表达 NAALADL2 的细胞接触;

[0373] b) 选择可结合细胞表面上的 NAALADL2 的测试抗体。

[0374] 本发明的方法在下文将有更详细的记载。

[0375] 或者,NAALADL2 的推定胞外域是 SEQ ID NO :32。因此,筛选在细胞外与 NAALADL2 结合的抗体的方法包括如下步骤:

[0376] a) 使候选抗体与包含 SEQ ID NO :32 的多肽接触;

[0377] b) 选择与该多肽结合的测试抗体。

[0378] 通过检测 NAALADL2 表达细胞 (例如前列腺癌细胞) 的亲合性来选择抗体或抗体片段或非抗体结合蛋白 (在下文中描述)。通过用含有 3% BSA 的 PBS 在室温下处理 30 分钟,封闭与这些细胞的非特异结合。将细胞在室温下与候选抗体或抗体片段温育 60 分钟。用 PBS 清洗后,细胞在室温下用 FITC 偶联的第二抗体染色 60 分钟,并用荧光计进行检测。或者,可以使用利用表面等离子体共振现象的生物传感器作为检测或定量本发明中抗体或抗体片段的装置。在本发明中,选择能够检测细胞表面上的 NAALADL2 肽的抗体或抗体片段。

[0379] 在优选实施方案中,通过本发明方法选出的测试化合物可以作为候选物,用于进一步筛选评估其治疗作用。

[0380] 抗体

[0381] 如本文所使用的,术语“抗体”意图包括可以和指定蛋白或其片段特异反应的免疫球蛋白或其片段。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融合的抗体和抗体片段。而且,本文中,抗体使用其最广泛的意义,具体地涵盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两个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,只要它们显示期望的生物学活性即可。“抗体”指示所有类型 (例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM)。

[0382] 本发明使用针对 PKIB 或 NAALADL2 的抗体。更优选地说,可以使用针对包含氨基酸序列 SEQ ID NO :33 或 34 的蛋白的抗体作为针对 PKIB 的抗体,并且可以使用针对包含氨基酸序列 SEQ ID NO :32 的蛋白的抗体作为针对 NAALADL2 的抗体。这些抗体将通过已知的方法提供。本文描述了用于产生根据本发明使用的抗体的示例技术。

[0383] (i) 多克隆抗体

[0384] 单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

体内产生。可以使用双功能或衍生化试剂将相关抗原与在待免疫物种体内具有免疫原性的蛋白相偶联,所述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,双功能或衍生试剂例如马来酰亚胺苯甲酸硫代丁二酰亚胺酯 (maleimido benzoylsulfosuccinimide 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、SOCl₂ 或 $R' - N = C = NR$, 其中 R 和 R' 是不同的烷基。

[0385] 用该抗原、免疫原性偶联物或衍生物免疫动物是通过,例如,组合 100 μg 或 5 μg 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,并在皮内多点注射该溶液。一个月后,用 1/5-1/10 原始量的肽或偶联物与弗氏完全佐剂多点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 / 或通过不同的交联剂偶联。

[0386] 偶联物还可以在重组细胞培养物中作为蛋白融合物制备。另外,可以适当地使用凝集剂,例如明矾,来提高免疫响应。

[0387] (ii) 单克隆抗体

[0388] 单克隆抗体从基本上均质的抗体构成的群体获得,即构成该群体的单个抗体是相同的,只是可能存在少量的天然发生的突变。因此,修饰语“单克隆”是指抗体不是离散 (discrete) 抗体的混合物这一特征。

[0389] 例如,单克隆抗体可以用杂交瘤方法制备,该方法首先在 Kohler et al., Nature, 256 :495 (1975) 中被记载,或者可以通过重组 DNA 方法制备 (U. S. Patent No. 4, 816, 567)。

[0390] 在杂交瘤方法中,小鼠或其它合适的宿主动物,例如仓鼠,被如上文所述地免疫,从而引发出淋巴细胞,这些淋巴细胞产生或者能够产生特异结合用来进行免疫的蛋白的抗体。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。然后,用合适的融合剂,例如聚乙二醇,使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,形成杂交瘤细胞 (Goding, Monoclonal Antibodies :Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。

[0391] 将这样制备的杂交瘤细胞接种并生长于合适的培养基中,其优选地含有一种或多种可抑制未融合的母骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如,如果母骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HRPT), 则用于杂交瘤的培养基典型地可包含次黄嘌呤、氨甲喋呤和胸苷 (HAT 培养基), 这些物质可阻止 HGPRT 缺陷细胞的生长。

[0392] 优选的骨髓瘤细胞具有如下特征:融合效率高,支持所选抗体产生细胞稳定高水平产生抗体,并且对某种培养基例如 HAT 培养基敏感。其中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,例如从可以从 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 细胞衍生的细胞系。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也有报道用于产生人单克隆抗体 (Kozbor, J. Immunol., 133 :3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0393] 对培养着杂交瘤细胞的培养基,测定其中针对抗原的单克隆抗体的产生。优选地,由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合试验加以确

定,例如放射免疫试验(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA)。

[0394] 单克隆抗体的结合亲和性可以通过例如 Munson et al., Anal. Biochem., 107 : 220 (1980) 的 30Scatchard 分析加以确定。

[0395] 在鉴定出可产生具有期望特异性、亲和性和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,可以通过有限稀释程序对克隆进行亚克隆,并通过常规方法来培育它们 (Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。用于此目的合适培养基包括例如 D-MEM 或 RPML-1640 培养基。此外,杂交瘤细胞可以在体内作为动物体内的腹水瘤培育。

[0396] 通过常规的免疫球蛋白纯化程序,例如蛋白 A-sepharose 凝胶、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱,合适地将由亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水液或血清分离。

[0397] 编码单克隆抗体的 DNA 可以用传统方法(例如通过使用能够特异结合编码鼠源抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地加以分离和测序。杂交瘤细胞是这类 DNA 的优选来源。一旦分离了 DNA,即可将 DNA 置于表达载体内,然后将其转染进入宿主细胞,例如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中华仓鼠卵巢(CHO)细胞,或骨髓瘤细胞,这些细胞本身不会产生免疫球蛋白,从而在重组宿主细胞内合成单克隆抗体。关于在细菌体内重组表达编码抗体的 DNA 的综述文献见 Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5 : 256-262 (1993) 和 Pluckthun, Immunol. Revs., 130 : 151-188 (1992)。

[0398] 另一种产生与 PKIB 或 NAALADL2 特异反应的抗体或抗体片段的方法,是用 PKIB 或 NAALADL2 蛋白或肽对在细菌体内表达的、编码免疫球蛋白基因或其部分的表达文库进行筛选。更优选地,可以使用包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 33 或 34 的 PKIB 片段作为 PKIB 的替代物,可以使用包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 32 的 NAALADL2 片段作为 NAALADL2 的替代物。例如,可以用噬菌体表达文库,在细菌内表达完整的 Fab 片段、VH 区和 Fv 区。见例如 Ward et al., Nature 341 : 544-546 (1989) ; Huse et al., Science 246 : 1275-1281 (1989) ; 和 McCafferty et al., Nature 348 : 552-554 (1990)。用例如 PKIB 肽、包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 33 或 34 的 PKIB 片段、NAALADL2 肽或包含氨基酸序列 SEQ ID NO : 32 的 NAALADL2 片段筛选这些文库,能够鉴定出与 PKIB、PKIB 片段、NAALADL2 或 NAALADL2 片段反应的免疫球蛋白片段。或者,可以使用 SCID-hu 小鼠(可以从 Genpharm 获得)产生抗体或其片段。

[0399] 在进一步的实施方案中,抗体或抗体片段可以从抗体噬菌体文库分离,抗体噬菌体文库用 McCafferty et al., Nature, 348 : 552-554 (1990) 中记载的技术来产生。Clackson et al., Nature, 352 : 624-628 (1991) 和 Marks et al., J Mol Biol, 222 : 581-597 (1991) 分别记载了使用噬菌体文库分离鼠源和人源抗体。随后出版物记载了通过链重排产生高亲和性(nM 范围)的人抗体(Marks et al., Biol Technology, 10 : 779-783 (1992)), 以及使用组合感染(combinatorial infection)和体内重组作为构建超大噬菌体文库的策略(Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21 : 2265-2266 (1993))。因此,这些技术都是传统的单克隆抗体杂交瘤法分离单克隆抗体的切实可行的替代方式。

[0400] DNA 还可以例如以下述方式进行修饰:针对编码序列,用人重链和轻链恒定域替换同源的鼠源序列(美国专利 4,816,567 ; Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci USA, 81 : 6851 (1984)), 或者将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分与免疫球蛋白的编码

序列共价连接。

[0401] 典型地,用这些非免疫球蛋白多肽替换抗体的恒定域,或者用它们替换抗体的一个抗原结合位点的可变域而生成嵌合二价抗体,其包含一个对抗原特异的抗原结合位点,和另一个对不同抗原特异的抗原结合位点。

[0402] (iii) 人源化抗体

[0403] 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,人源化抗体中导入了一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人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。人源化可以基本上按照 Winter 及其合作者的方法 (Jones et al., *Nature*, 321:522-525(1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536(1988)) 来进行,用高变区序列替换人抗体的相应序列。因此,这些“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 No. 4,816,567),其中完整人可变区的一小部分 (substantially less than intact) 被来自非人物种的相应序列替代。在实践中,人源化抗体典型的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置上的残基替代而得到的抗体。

[0404] 用于制造人源化抗体的人可变区,包括轻链和重链,的选择对于减少抗原性是非常重要的。根据所谓的“最佳匹配 (best-fit)”方法,用啮齿动物抗体的可变域的序列来筛选整个已知人可变区序列文库。然后,选择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) (Suns et al., *J. Immunol.*, 151:2296(1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。另一种方法使用来源于轻链或重链特定亚群中的所有抗体之共有序列的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体 (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

[0405] 此外,人源化的抗体保留对抗原的高亲和性和其它有利的生物学性质是重要的。为了实现这一目标,根据优选的方法,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理论上的人源化产物。三维免疫球蛋白模型是常用的,而且本领域技术人员很熟悉它们。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型结构。通过检查这些显示结果,人们可以分析残基在候选免疫球蛋白序列功能中的可能作用,即分析残基是否影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力。这样,可以选择 FR 残基,并与受体序列和输入序列组合,从而获得期望的抗体特性,例如增加对靶抗原的亲合性。一般地说,高变区残基直接而且最实质性地参与影响抗原的结合。

[0406] (iv) 人抗体

[0407] 除人源化之外,还可以生成人抗体。例如,现在有可能生产这样的转基因动物(例如小鼠),它能够在被免疫时产生完全的人抗体谱 (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内纯合删除抗体重链连接区 (JH),可导致内源抗体的产生完全被抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到这种种系的突变小鼠体内,可导致在抗原刺激时产生人抗体。见例如 Jakobovits et al., *Proc. Mad. Acad. Sci. USA*, 90:2551(1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258(1993); Bruggermann et al., *Year in immuno.*, 7:33(1993); 和美国专利 5,591,669, 5,589,369 和 5,545,807。

[0408] 或者,噬菌体展示技术 (McCafferty et al., Nature 348 :552-553(1990)) 可用于在体外从来自未被免疫的供体的免疫球蛋白可变 (V) 区基因谱 (repertoire) 产生人抗体和抗体片段。根据这种技术,将抗体 V 区基因阅读框架一致地 (in-frame) 克隆到丝状噬菌体 (例如 M13 或 fd) 的大或小衣壳蛋白基因内,作为有功能的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,所以根据抗体的功能性质进行选择也可以选出编码显示这些性质的抗体的基因。因此,噬菌体模拟 B 细胞的一些性质。噬菌体展示可以用多种形式进行,关于它们的综述,见例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3 :564-571(1993)。有多种来源的 V 基因片段可用于噬菌体展示。

[0409] Clackson et al., Nature, 352 :624-628(1991) 从经免疫小鼠的脾脏来源的小型随机组合 V 基因文库分离了多种系列的抗噁唑酮抗体。可以从未被免疫的人供体构建 V 基因谱,并基本上按照下列文献中记载的技术分离针对多种系列抗原 (包括自身抗原) 的抗体 :Marks et al., J. Mol. Biol, 222 :581-597(1991), 或 Griffith et al., EMBO J. 12 :725-734(1993)。另见美国专利 5,565,332 和 5,573,905。

[0410] 人抗体也可以由体外活化的 B 细胞来产生 (见美国专利 205,567,610 和 5,229,275)。在共有的共同未决申请中记载了用 SCID 小鼠产生人抗体的一个优选手段。

[0411] (v) 抗体片段

[0412] 已经开发了各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的抗体产生的 (见例如 Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 :107-117(1992) 和 Brennan et al., Science, 229 :81(1985))。然而,现在这些片段也可以由重组宿主细胞直接产生。例如,可以从上面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,并加以化学偶联形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., Bio/Technology 10 :163-167(1992))。根据另一种方法, F(ab')₂ 片段可以直接从重组宿主细胞分离。其它用于产生抗体片段的技术是技术人员容易想到的。在其它实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。见 W093/16185; 美国专利 No. 5,571,894; 和美国专利 No. 5,587,458。抗体片段还可以是“线性抗体”,例如在美国专利 5,641,870 中记载的。这些线性抗体片段可以是单特异性或双特异性的。

[0413] (vi) 非抗体结合蛋白

[0414] 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类抗体结合肽模拟物,在下文中将更详细地进行讨论。

[0415] 已经开发出了其它按照与抗体相似的方式靶定和结合靶标的化合物。这些“抗体模拟物”的一些使用非免疫球蛋白骨架作为抗体可变区的可替代蛋白框架。

[0416] 例如, Ladner et al. (美国专利 No. 5,260,203) 记载了单多肽链结合分子,其具有与抗体的聚集的、但分子水平上分离的轻链和重链可变区相似的结合特异性。单链结合分子同时含有抗体重链和轻链可变区的抗体结合位点,它们通过一段肽接头连接,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显示有多种优势,包括尺寸更小、稳定性更高和更容易被修饰。

[0417] Ku 等 Proc Natl Acad Sci USA 92(14) :6552-6556(1995) 公开了一种基于细胞

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白蛋白的结合性。发现突变体们以与抗 BSA 抗体相似的方式选择性结合 BSA。

[0418] Lipovsek 等 (美国专利 6,818,418 和 7,115,396) 公开了一种抗体模拟物,其特征是具有一个纤连蛋白或纤连蛋白样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,它们显示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性和特异性。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。

[0419] 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,这些模拟物的抗原结合性质在性质上与亲和性上与天然抗体相似。而且,这些基于纤连蛋白的抗体模拟物与抗体和抗体片段相比还表现出某些优点。例如,这些抗体模拟物的天然折叠稳定性不依赖于二硫键,因此这些抗体模拟物在通常会破坏抗体的条件下仍然保持稳定。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,所以可以在体外进行环随机化和重排处理,类似于抗体的体内亲和力成熟过程。

[0420] Beste 等 (Proc Natl Acad Sci USA 96(5):1898-1903(1999)) 公开了一种基于脂笼蛋白骨架的抗体模拟物(**Anticalin®**)。脂笼蛋白包括蛋白末端由 4 个超变环构成的 β -桶。Beste(1999) 将这些环进行随机突变,并以例如对荧光素的结合为条件进行选择。这些变异体显示对荧光素的特异性结合,其中一个变异体显示与抗-荧光素抗体相似的结合。进一步的分析显示,所有随机化位置均是可变的,表明**Anticalin®**可能适合于用作抗体的替代物。

[0421] **Anticalin®**是小的单链肽,典型地为 160-180 个残基,与抗体相比具有多种优势,包括生产成本低、保存稳定性高和免疫反应小。

[0422] Hamilton 等 (美国专利 No. 5,770,380) 公开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,骨架上搭接有多个可变肽环,作为结合位点。肽环相对于彼此均从杯芳烃的几何学上的同一侧突出。由于这种几何学构型,所有的环均可供结合,从而增加了与配体的结合亲和性。然而,与其它的抗体模拟物相比,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。骨架也不是仅由肽、DNA 或 RNA 构成,这意味着该抗体在极端环境条件下相对稳定,寿命较长。而且,因为基于杯芳烃的抗体模拟物相对较小,其产生免疫响应的可能性降低。

[0423] Murali 等 (Cell Mol Biol. 49(2):209-216(2003)) 讨论一种用于将抗体减小为更小的模拟肽的方法,他们称之为“类抗体结合模拟肽 (antibody likebinding peptidomimetics)” (ABiP),也可以作用抗体的替代物。

[0424] Silverman 等 (Nat Biotechnol. (2005), 23:1556-1561) 公开了融合蛋白,它们是包含多个域的单链多肽,称作“avimers”。avimers 是通过体外外显子重排和噬菌体展示从人细胞外受体域发展而来的,是一类在亲和性和对各种靶分子的特异性方面与抗体相似的结合蛋白。所得的多结构域蛋白可以包括多个独立的结合域,它们与单表位结合蛋白相比显示更高的亲和性(在某些情况下是亚纳摩尔级)和特异性。关于 avimers 构建和使用的更多细节参见例如美国专利申请公开 Nos. 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 和 20050221384。

[0425] 除了非免疫球蛋白蛋白框架之外,包含 RNA 分子和非天然寡聚体(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)的化合物也可以模拟抗体的性质,所有这些均适用于本发明。

[0426] 尽管测试剂文库的构建是本领域众所周知的,但在下文中,还是提供了关于鉴定测试剂和构建这些试剂文库用于本筛选方法的额外指导。

[0427] (vii) 抗体偶联和其它修饰

[0428] 本方法中使用的或者本文制造商文献中包含的抗体可以任意地与细胞毒性或治疗剂偶联。

[0429] 本文也预期了抗体与一个或多个小分子毒素,如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素(maytansine)(美国专利 No. 5, 208, 020)、trichothene、和 CC1065, 的偶联物。在本发明的一个优选实施方案中,抗体与一个或多个美登木素分子偶联(例如每个抗体分子与大约 1- 大约 10 个美登木素分子)。美登木素可以例如转变为 May SS-Me, 其可被还原成 May-SH3, 进而与经过修饰的抗体反应(Chari et al. Cancer Research 52 : 127-131(1992)), 从而产生类美登木素生物碱(maytansinoid)- 抗体偶联物。

[0430] 或者,可以将抗体与一个或多个加利车霉素分子偶联。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链 DNA 断裂。可使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基- γ_1^I 、PSAG 和 θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53 : 3336-3342(1993) 和 Lode et al., Cancer Research 58 : 2925-2928(1998))。

[0431] 可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素(modeccin) A 链、 α -帚曲毒素(sarcin)、油桐(Aleurites fordii) 毒蛋白、香石竹(dianthin) 毒蛋白、美洲商陆(Phytolacca Americana) 毒蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(momordicacharantia) 抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(saponaire officinalis) 抑制物、白树毒素(gelonin)、丝林霉素(mitogellin)、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、依诺霉素(neomycin) 和单端孢菌毒素(tricothecenes)。还可参见例如 1993 年 10 月 28 日公开的 W093/21232。

[0432] 本发明进一步预期了与多种放射性同位素偶联的抗体。实例包括 ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P 和放射性同位素 Lu。

[0433] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和胞毒剂的偶联物,诸如 3-(2-吡啶基二硫代)丙酸 N-琥珀酰亚氨基酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己胺-1-羧酸琥珀酰亚氨基酯、亚氨基硫烷(iminothiolane) (IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸二甲基己二酰亚胺酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对重氮苯甲酰基)己二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如 Vitetta et al., Science 238 : 1098(1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与拮抗剂或抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO 94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、二甲基接头或含二硫化物接头(Chari et al., Cancer Research 52 : 127-131(1992))。

[0434] 或者,可以通过例如重组技术或肽合成制备包含抗体和细胞毒剂的融合蛋白。

[0435] 在另外一个实施方案中,抗体可以和用于肿瘤预定位 (pretargeting) 的“受体”(例如链霉抗生物素蛋白) 偶联,其中将抗体-受体偶联物施用给患者,随后用清除剂从循环中除去未结合的偶联物,然后施用与细胞毒剂(例如放射性核苷酸) 偶联的“配体”(例如抗生物素蛋白)。

[0436] 本发明的抗体还可以和前体药激活酶偶联,其将前体药物(例如肽酰化疗剂,见 W081/01145) 转变成活性抗癌药物。见例如 WO 88/07378 和美国专利 No. 4, 975, 278。

[0437] 这些偶联物的酶组分包括任何能够作用于前体药的酶,这些酶将前体药转变成更有活性的细胞毒形式。

[0438] 可用于本发明方法的酶包括但不限于:可用于将含磷酸盐/酯的前体药物转变为游离药物的碱性磷酸酶;可用于将含硫酸盐/酯的前体药物转变为游离药物的芳基硫酸酯酶;可用于将无毒 5- 氟胞嘧啶转变为抗癌药物 5- 氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶;可用于将含肽的前体药物转变为游离药物的蛋白酶,诸如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(诸如组织蛋白酶 B 和 L);可用于转化含 D- 氨基酸替代的前体药物的 D- 丙氨酰羧肽酶;可用于将糖基化前体药物转变为游离药物的碳水化合物切割酶类,诸如 β - 半乳糖苷酶和神经氨酸酶;可用于将 β - 内酰胺衍生的药物转变为游离药物的 β - 内酰胺酶;及可用于将在其氨基氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转变成游离药物的青霉素酰胺酶,诸如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者,可使用具有酶活性的抗体,本领域也称作“抗体酶”(abzymes),来将本发明的前体药物转变为游离活性药物(参见例如 Massey, Nature 328 :457-458(1987))。可如本文所述制备抗体-抗体酶偶联物,用于将抗体酶投递至肿瘤细胞群。

[0439] 可通过本领域众所周知的技术将本发明的酶与抗体共价结合,诸如使用上文讨论的异双功能交联剂。或者,可使用本领域众所周知的重组 DNA 技术构建包含与本发明酶的至少功能活性部分连接的抗体的至少抗原结合区的融合蛋白(参见例如 Neuberger et al., Nature 312 :604-608(1984))。

[0440] 本文还设想了抗体的其它修饰。例如,可将抗体与多种非蛋白质性质聚合物中的一种连接,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。

[0441] 本文公开的抗体还可以被配制为脂质体。含有抗体的脂质体可通过本领域众所周知的方法加以制备,例如下列文献中所述:Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :3688(1985);Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4030(1980);美国专利 Nos. 4, 485, 045 和 4, 544, 545;和 1997 年 10 月 23 日公开的 W097/38731。美国专利 No. 5, 013, 556 公开了具有更长循环时间的脂质体。

[0442] 特别有用的脂质体可以通过反相蒸发法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE) 的脂质组合物来产生。将脂质体通过具有限定孔尺寸的滤膜挤出,产生具有期望直径的脂质体。本发明抗体的 Fab' 片段可以按照下列文献所述通过二硫键交换反应与脂质体偶联:Martin et al. J Biol. Chem. 257 :286-288(1982)。脂质体中可以视需要包含化疗剂。见 Gabizon et al. A National Cancer Inst. 81(19) 1484(1989)。

[0443] 还预期了本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如,我们期望提高抗体的结合亲和性和/或其它生物学性质。通过在编码抗体的核酸中导入合适的核苷酸变化或通过肽合成

制备抗体的氨基酸序列变异体。这些修饰包括,例如,从抗体氨基酸序列删除、和 / 或插入、和 / 或替换残基。删除、插入和替换的任意组合均可用于实现所得构建体,使所得的构建体具有期望的性质。氨基酸变化也可以改变抗体的翻译后处理,例如改变糖基化位点的数目或位置。

[0444] 一种用于鉴定抗体中作为优选突变位置的某些残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描突变”,如 Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989) 所述。这里,鉴定了一个或一组靶残基(例如带电荷的残基,诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸),并用中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)替代,以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体,推敲那些对替代显示功能敏感性的氨基酸位置。因此,虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但是突变本身的性质不需要预先决定。例如,为了分析在指定位点处的突变的后果,在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描诱变或随机突变,并对所表达的抗体变体筛选所需活性。

[0445] 氨基酸序列插入包括氨基-和 / 或羧基-末端的融合,长度范围从一个残基至包含上百或更多残基的多肽,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N-末端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括在抗体的 N-或 C-末端融合酶或提高抗体血清半衰期的多肽。

[0446] 另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替换。最感兴趣进行替代诱变的位点包括高变区或 CDR,但也考虑了 FR 或 Fc 区改变。

[0447] 对抗体生物学特性的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来完成:(a) 替代区域的多肽主链的结构,例如作为折叠片或螺旋构象,(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性,或(c) 侧链的体积。

[0448] 天然发生的残基可以根据共有的侧链性质分成如下几组:

[0449] (1) 疏水:正亮氨酸, met, ala, val, leu, ile;

[0450] (2) 中性亲水: cys, ser, thr;

[0451] (3) 酸性: asp, glu;

[0452] (4) 碱性: asn, gln, his, lys, arg;

[0453] (5) 影响链方向的残基: gly, pro; 和

[0454] (6) 芳香性: trp, tyr, phe.

[0455] 非保守替换需要用这些组中其中一个的成员交换另一个组的成员。

[0456] 任何不参与保持抗体的合适构象的半胱氨酸残基均可加以替换,一般是替换成丝氨酸,以提高分子的氧化稳定性,和防止异常交联。相反,可以向抗体添加半胱氨酸键,以提高其稳定性(特别是抗体是片段例如 Fv 片段的情况)。

[0457] 特别优选的一类替代变体涉及替代亲本抗体(如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。产生此类替代变体的一种便利方法涉及使用噬菌体展示的亲合力成熟。简而言之,将数个高变区位点(例如 6-7 个位点)突变,在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上,作为与各个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活

性（例如结合亲和力）。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者 / 另外，分析抗原 - 抗体复合物的晶体结构，以鉴定抗体和抗原之间的接触点可能是有益的。所述接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生这样的变体，如本文所述对该组变体进行筛选，可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

[0458] 抗体的另一类氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化样式。改变意味着删除在抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块，和 / 或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0459] 抗体的糖基化通常或是 N- 连接的或是 O- 连接的。N- 连接指碳水化合物模块搭接于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸（其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸）是将碳水化合物模块酶促搭接于天冬酰胺侧链的识别序列。因此，多肽中这些三肽序列其中任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O- 连接的糖基化指将糖类 N- 乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一搭接于羟基氨基酸，最常见的是丝氨酸或苏氨酸，但也可使用 5- 羟脯氨酸或 5- 羟赖氨酸。

[0460] 向抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利地完成（对于 N- 连接的糖基化位点）。所述改变还可通过向原始抗体的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行（对于 O- 连接的糖基化位点）。

[0461] 编码抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离（在天然存在氨基酸序列变体的情况中），或者通过对早期制备的变体或非变体型的抗体进行寡核苷酸介导的（或定点）诱变、PCR 诱变和盒式诱变来加以制备。

[0462] 理想的是修饰本发明中使用的抗体来改善效应物功能，例如增强抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒性（ADCC）和 / 或补体依赖性细胞毒性（CDC）。这可通过在抗体 Fc 区中引入一个或多个氨基酸替代来实现。或者 / 另外，可在 Fc 区中引入半胱氨酸残基，从而容许在该区中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有改善的内在化能力和 / 或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞细胞毒性（ADCC）。参见 Caron et al., J. Exp. Med. 176 :1191-1195 (1992) 和 Shopes, B., J. Immunol. 148 :2918-2922 (1992)。

[0463] 具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如 Wolff et al., Cancer Research 53 :2560-2565 (1993) 中描述的异双功能交联剂来制备。或者，抗体可改造成具有双重 Fc 区，由此可具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3 :219-230 (1989)。

[0464] 为了提高抗体的血清半衰期，可如例如美国专利 5,739,277 中所述在抗体（尤其是抗体片段）中加入补救受体结合表位。在用于本文时，术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子（如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄）Fc 区中负责提高 IgG 分子体内血清半衰期的表位。

[0465] 本发明的多个方面将在下面的实施例中进行描述，这些实施例并不意图限制由权利要求描述的本发明的范围。

[0466] 除非另外定义，否则本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员所普遍理解的相同的意思。尽管在实践或检验本发明时可以使用与本文所述方法和材料相似或等价的方法和材料，但是下文记载了合适的方法和材料。

[0467] 本发明在下文的实施例中将进行进一步的描述,它们并不限制由权利要求描述的本发明的范围。

实施例

[0468] 本发明在下文的实施例中将进行进一步的记载,它们并不限制由权利要求描述的本发明的范围。

[实施例 1] 通用方法

[0470] 细胞系

[0471] COS7 细胞和 PC 细胞系 LNCaP、22Rv1、PC-3、DU-145 和 C4-2B 从美国典型培养物保藏中心 (ATCC、Rockville、MD) 购买, LNCaP 来源的 HRPC 细胞系 C4-2B 从 ViroMed Laboratories (Minnetonka, MN) 购买。传代超过 30 次的 LNCaP 被定义为 LNCaP (HP), 其与传代次数低的 LNCaP 细胞在形态学上和基因表达模式方面有所不同。它们生长于 Delbecco 改良的 Eagle 培养基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中, 该培养基添加了 10 % 胎牛血清 (GeminiBio-Products, West Sacramento, CA) 和 1 % 抗生素 / 抗真菌剂溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。将细胞保持在 37℃ 5% CO₂ 的湿润气氛中。

[0472] 半定量 RT-PCR

[0473] 如前人所述地 (Tamura K et al., Cancer Res 200767 :5117-25.) 从冷冻 PC 组织中纯化 PC 细胞和正常前列腺上皮细胞。在获得了患者知情同意的前提下, 从正在进行前列腺针吸活检、骨活检、TUR-P (经尿道前列腺切除) 和“温热”尸检的 HRPC 患者采取组织样品。同时, 还从正在进行根治性前列腺切除术的、未经治疗的可手术病例 (untreated operable cases) 获得未经激素处理的 (hormone-**naïve**) 前列腺癌 (HNPC) 样品, 从已确认组织病理学上无明显前列腺癌或 PIN 的良性前列腺增生 (BPH) 患者和膀胱癌患者获得了正常的前列腺上皮细胞 (NPEC)。如前所述 (Tamura K et al., Cancer Res 200767 :5117-25.) 进行 HRPC 细胞、未经激素处理的前列腺癌细胞和正常前列腺上皮细胞的显微解剖。对来自这些样品的 RNA 进行两轮基于 T7 的 RNA 扩增 (Epicentre Technologies, Madison, WI), 并随后合成单链 cDNA。用 Rneasy 试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA) 根据制造商的推荐提取人 HRPC 细胞系的总 RNA。提取的 RNA 用无 RNA 酶的 DNA 酶套装 (QIAGEN) 处理, 然后利用 d(T)12-18 引物和 Superscript II 逆转录酶 (Invitrogen) 逆转录成单链 cDNA。使用如下的引物序列:

[0474] β -肌动蛋白 (ACTB) 正向: TTGGCTTGACTCAGGATTTA (SEQ ID NO. 6)

[0475] β -肌动蛋白 (ACTB) 反向: ATGCTATCACCTCCCCTGTG (SEQ ID NO. 7)

[0476] PKIB 正向: GGCACATACTAGAAGCAAAATACG (SEQ ID NO. 8)

[0477] PKIB 反向: GATGGGCAAATCATTCTTGGTA (SEQ ID NO. 9)

[0478] NAALADL2 正向: GAAAGCATCTCACATTGGTTTTTC (SEQ ID NO. 10)

[0479] NAALADL2 反向: GGGTTTCAAAGAGAACTCTGCT (SEQ ID NO. 11)

[0480] NAALADL2-2 正向: GAAGCAAAATGCCAGATGGT (SEQ ID NO. 12)

[0481] NAALADL2-2 反向: TCCTGCACAGTGTTCTAGAAAGG (SEQ ID NO. 13)

[0482] 该 EST 与 NAALADL2 基因的联系通过 RT-PCR 加以确认。确定 RT-PCR 的指数期, 以容许对从相同反应产生的 cDNA 进行半定量比较。每个 PCR 体系包括 98℃, 30 秒初始变性

步骤,随后 98℃ 10 秒,55℃ 5 秒,和 72℃ 30 秒进行 22 个循环(对于 ACTB),23 个循环(对于 PKIB, NAALADL2),在 GeneAmp PCR system 9600(PE Applied Biosystems, Foster, CA)上进行。

[0483] Northern 印迹分析

[0484] 使用 Rneasy 试剂盒(QIAGEN)从 7 种 PC 细胞系提取总 RNA,并进行 Northern 印迹分析。用 mRNA 纯化试剂盒(GE Healthcare)根据制造商的方案纯化出 mRNA。将 1 μg 等份的来自 PC 细胞系以及从正常人心脏、肺、肝、肾、脑和前列腺(BD Biosciences, Palo Alto, CA)分离的每种 mRNA 在 1%变性琼脂糖凝胶上进行分离,并转移到尼龙膜上。261bp 的 PKIB 特异性探针通过用上述的引物组进行 PCR 加以制备,706bp 的 NAALADL2 特异性探针通过用如下的引物组进行 PCR 加以制备:正向 5'-ccagtgtcccagaaaccaata-3'(SEQ ID NO. 14)和反向 5'-tcaattcttcccatccaagaca-3'(SEQ ID NO. 15)。根据 Megaprime DNA 标记系统(GE bioscience, UK)的使用说明,与随机引发的 α³²P-dCTP- 标记探针进行杂交。预杂交、杂交和清洗根据供应商的推荐进行。印迹用光增感屏在 -80℃ 放射自显影 7 天。

[0485] 小干扰 RNA(siRNA) 表达构建体和转染

[0486] 为了敲低 PKIB 和 NAALADL2 在 PC 细胞中的表达,如前人所述地(Tamura K et al., Cancer Res 200767:5117-25.) 使用 psiU6BX3.0 载体表达针对靶基因的短发夹 RNA。用于 PKIB siRNA 的合成寡核苷酸的靶序列如下:

[0487] si1;GCCCTAAGCAGCATGTGTA (SEQ ID NO. 16),

[0488] si2;GCAGTAGGCACTTAAGCAT (SEQ ID NO. 17)

[0489] si3;GATGCAAAAGAGAAAGATG (SEQ ID NO. 18)

[0490] 用于 NAALADL2 siRNA 的合成寡核苷酸的靶序列如下:

[0491] si#690;GACTCAGTGGACCTCTTTG (SEQ ID NO. 19)

[0492] si#913;GTCATCGATGTGAGTTATG (SEQ ID NO. 20)

[0493] si#1328;GAGTCGTCAGCATGCAAGT (SEQ ID NO. 21)

[0494] 和 siEGFP;GAAGCAGCAGCACTTCTTC (SEQ ID NO. 22) (作为阴性对照)。将 PC 细胞系 22Rv1 和 LNCaP (HP) 或 C4-2B 细胞铺布在 10-cm 盘或 6 孔板上,并使用 FuGENE6 (Roche) 根据制造商的说明,用设计表达针对 PKIB 或 NAALADL2 的 siRNA 的质粒 (8 μg/ 盘, 3 μg/ 孔) 进行转染。细胞用 0.8mg/ml 遗传霉素 (Sigma-Aldrich) 选择 7 天,然后收集细胞并分析对 PKIB 或 NAALADL2 表达的敲低作用。用上述引物对 PKIB 或 NAALADL2 进行 RT-PCR。对于集落形成试验,将表达 siRNA 的转化体在含有遗传霉素的培养基内生长 20 天。用 100% 甲醇固定后,转化细胞用 0.1% 结晶紫 -H₂O 染色以评估集落形成。细胞生存力的定量使用细胞计数试剂盒 -8 (DOJINDO, Kumamoto, Japan)。在含有遗传霉素的培养基中培养 20 天后,添加终浓度为 10% 的溶液。在 37℃ 温育 2 小时后,用酶标仪 550 (Bio-Rad, Hercules, CA) 测量 490nm 吸光度,以 630nm 为参比。本发明人还合成了对应于 si#690 的 RNA 双链体: 5'-GACUCAGUGGACCUCUUUGGG-3' (SEQ ID NO. 23) 和 5'-CAAAGAGGUCCACUGAGUCUU-3' (SEQ ID NO. 24),或者阴性对照 siRNA 双链体 (GCAGCACGACUUCTUUCAAGTT (SEQ ID NO. 25) 和 CUUGAAGAAGUCGUGCUGCTT (SEQ ID NO. 26)), 将它们的分别转染进入另一种表达 NAALADL2 的 PC 细胞系: C4-2B 细胞。

[0495] 免疫细胞化学

[0496] 通过 PCR 扩增编码 PKIB 或 NAALADL2 开放阅读框的 cDNA, 将 PCR 扩增产物克隆到 pcDNA3.1(+)/myc-HisA 载体 (Invitrogen) 或 pIRES/HA (Clontech/BD Bioscience) 中。用 FuGENE6 按照制造商推荐的程序 (Roche) 将质粒转染进入涂布在玻璃盖玻片 (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) 上的 COS7 中。温育 48 小时后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 并在室温下用溶于 PBS 中的 0.1% Triton X-100 处理 1min 使之通透化。用含有 3% BSA 的 PBS 在室温下处理 30min, 封闭非特异结合。用稀释于含 1% BSA 的 PBS 中的抗 -Myc 抗体 (Santa Cruz) 或抗 -HA 抗体 (Sigma) 在室温下温育细胞 60min。用 PBS 清洗后, 用 FITC 偶联第二抗体 (Santa Cruz) 在室温下对细胞染色 60min。用 PBS 清洗后, 用含有 4',6'-二脒基-2-苯基吡啶二盐酸盐 (DAPI) 的 VECTASHIELD (VECTOR Laboratories, Inc, Burlingame, CA) 封固样品, 并用光谱共聚焦扫描系统 (Leica, Bensheim, Germany) 可视化。

[0497] PKIB 与 PKA-C 间的相互作用

[0498] 将 PKIB-Myc 和 HA-PKA-C 表达载体共转染进入 22Rv1 细胞, 转染 48 小时后, 用裂解缓冲液 [50mM Tris-HCl (pH7.0)、250mM 蔗糖、1mM DTT、10mM EDTA、1mM EGTA、5mM MgCl₂] 裂解这些细胞。细胞裂解物用抗 -Myc 抗体 (Santa Cruz) 或抗 -HA 抗体 (Sigma) 免疫沉淀, 用抗 -Myc 抗体或抗 -HA 抗体对这些免疫沉淀物进行 western 印迹分析。

[0499] PKA-C 定位

[0500] 本发明人合成了对应于序列 si1 的 RNA 双链体 (5'-GCCCUAAGCAGCAUGUGUAUA-3' (SEQ ID NO. 27) 和 5'-UACACAUGCUGCUUAGGGCUU-3' (SEQ ID NO. 28)), 以更有效地敲低内源 PKIB。用 Lipofectamin 2000 (Invitrogen) 根据制造商的推荐方法将这些 RNA 双链体转染进入 PC-3 细胞。温育 48 小时后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 并在室温下用溶于 PBS 中的 0.1% Triton X-100 通透化 1min。用含有 3% BSA 的 PBS 在室温下处理 30min, 封闭非特异结合。用以 1:200 的比例稀释于含 1% BSA 的 PBS 中的抗 -PKA-C 抗体 (C-20, Santa Cruz) 在室温下温育细胞 60min。用 PBS 清洗后, 用 FITC 偶联第二抗体 (Santa Cruz) 在室温下对细胞染色 60min, 并用光谱共聚焦扫描系统可视化。为了分级细胞裂解物, 用 Lipofectamin 2000 (Invitrogen) 根据制造商的推荐方法将 RNA 双链体转染进入 LNCaP (HP) 细胞。温育 48 小时后, 收集细胞, 并用 NE-PER 细胞核和细胞质提取试剂 (PIERCE) 将这些细胞裂解物分级。用抗 -PKA-C 抗体和作为上样和细胞核分级对照的抗 -核纤层蛋白 B 抗体 (Calbiochem), 对 30 μg 蛋白的分级的细胞裂解物进行 western 印迹。

[0501] PKIB 过表达细胞的生成和体外 / 体内生长测定

[0502] 通过 PCR 扩增了编码 PKIB 开放阅读框的 cDNA, 并将 PCR 扩增产物克隆到 pIRES/HA (Clontech/BD Bioscience) 中。用 FuGENE6 (Roche) 根据制造商推荐的程序将质粒转染进入无 PKIB 的 PC 细胞系 DU145。细胞群体用 0.6mg/ml 遗传霉素 (Invitrogen) 选择, 然后通过有限稀释对形成克隆的 DU145 细胞进行亚克隆。通过 RT-PCR 如上所述地确认 PKIB 表达, 建立了三个组成型表达 PKIB 的克隆。还建立了用空 pIRES/HA 载体转染的对照 DU145 细胞作为模拟细胞。使用细胞计数试剂盒 -8 (DOJINDO) 测量这些已建立的克隆的生长曲线。

[0503] 对于体内生长测定, 将两个稳定克隆和两个模拟克隆的 2×10^6 个细胞分别接种在雄性裸鼠的右肋和左肋。

[0504] 抗体生成和免疫组织化学

[0505] 将两种来自人 PKIB 的肽 (SARAGRRLPDIQSSAATD (SEQ ID NO :33) 和 KEKDEKTTQDQLEKPQNEEK (SEQ ID NO :34)) 免疫接种到家兔体内,在亲和柱上对免疫血清进行纯化,其中亲和柱装填有通过基本方法与每种肽抗原偶联的 Affi-Gel10 活化亲和介质 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 的。PC 组织的常规切片 (Conventional section) 从手术样品获得, HRPC 组织通过尸检和 TUR-P 获得 (Tamura et al. Cancer Res 67, 5117-25, 2007)。将切片在 108℃ 的 Dako Cytomation Target Retrieval Solution High pH (Dako, Carpinteria, CA) 中处理 15min, 进行脱蜡和高压灭菌。在封闭内源过氧化物酶和蛋白质之后, 将切片与抗 -PKIB 抗体 (按 1 : 100 稀释) 在室温下温育 60min。用 PBS 清洗后, 用过氧化物酶标记的抗家兔免疫球蛋白 (Envision kit, Dako) 进行免疫检测。最后, 用 3,3'-二氨基联苯胺 (Dako) 对反应物进行显影。用苏木精进行复染。

[0506] Akt 磷酸化

[0507] 22Rv1, LNCaP 或 PC-3 细胞如上面讨论地用对应于序列 si1 的 PKIB 寡 siRNA 或 PKIB 表达载体 (pcDNA3.1/HA-PKIB) 转染, 在 48 小时或 24 小时后收集。用含有蛋白酶抑制剂 (蛋白酶抑制剂合剂第 III 组; CALBIOCHEM) 的 RIPA 缓冲液 (50mM Tris-HCl [pH 8.0]、150mM NaCl、1% NP-40、0.5% 脱氧胆酸钠、0.1% 十二烷基磺酸钠 [SDS]) 裂解细胞。蛋白样品用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离, 并电印迹到 PVDF 转移膜 (GE Healthcare Bio-sciences) 上。将印迹与家兔单克隆抗 -磷酸 Akt1 (Ser473) 抗体 (Cell signaling)、家兔单克隆抗 -Akt1 抗体 (Cell signaling) 或小鼠单克隆 β -肌动蛋白 (ACTB) 抗体 (Sigma) 温育。蛋白条带通过增强化学发光 (ECL) western 印迹检测试剂 (GE Healthcare Bio-sciences) 可视化。

[0508] 基质胶 (Matrigel) 侵袭测定

[0509] 用表达 PKIB 的质粒 (pcDNA3.1/HA-PKIB) 或用模拟质粒转染的 NIH3T3 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 中生长至接近汇合。通过胰蛋白酶消化收集细胞, 用未添加血清或蛋白酶抑制剂的 DMEM 清洗, 并以 5×10^5 /ml 的浓度悬浮在 DMEM 中。在制备细胞悬液之前, 将基质胶基质 (Becton Dickinson Labware) 的干燥层用 DMEM 在室温下复水 2 小时。向每个下部小室 (lower chamber) 中添加含有 10% FBS 的 DMEM (0.75ml); 侵袭通过人工基膜 (Matrigel) 的细胞如上所述地固定, 并用吉姆萨染色。

[0510] [实施例 2] 在 PC 细胞中 PKIB 和 NAALADL2 的过表达

[0511] 在通过 HRPC 细胞的全基因组范围 cDNA 微阵列分析筛选出的数十种反式激活基因中 (Tamura K et al., Cancer Res 200767 :5117-25.), 本发明关注 PKIB 和 NAALDL2。在 9 个显微解剖的 HRPC 细胞群体中的 5 个内通过 RT-PCR 确认有 PKIB 过表达 (图 1A), 在 9 个显微解剖的 HRPC 细胞群体中的 5 个内确认有 NAALADL2 过表达 (图 2A)。

[0512] 这两个基因在正常器官, 包括心脏、肺、肝和肾中的表达微弱, 与激素敏感型或未处理型 PC 细胞相比, HRPC 细胞显示这两个基因有更高表达。使用 PKIB 的 cDNA 片段作为探针进行 Northern 印迹分析, 在胎盘和 PC 细胞系中特异地鉴定出了一个大约 1.3kb 的转录本, 但是在任何其它器官中, 包括肺、心、肝、肾和脑, 没有观察到表达 (图 1B)。使用 NAALADL2 的 cDNA 片段作为探针进行 Northern 印迹分析, 在三个 PC 细胞系中特异性地鉴定出了大约 10kb、6kb 和 5kb 的条带, 但是在任何其它器官中, 包括肺、心、肝、肾和脑, 没有观察到表达 (图 2B)。

[0513] 数据库分析和跨 NAALADL2 编码区的 RT-PCR 提示,这三个条带反映了 3' UTR 的变异。制成了特异针对人 PKIB 的多克隆抗体,并且为了确认 PKIB 蛋白在 PC 细胞中的表达,用 41 个临床 PC 组织,包括 32 个激素敏感型或未经激素处理型的 PC 和 9 个 HRPC,进行了免疫组织化学分析。如 Northern 印迹分析和 RT-PCR 分析所示,PIN(图 1C)和正常前列腺上皮细胞(图 1D,用 N 表示)显示微弱的 PKIB 染色(+),10/32(31%)的未经激素处理型 PC 也显示微弱或无 PKIB 染色(+)(图 1D)。另一方面,22/32(69%)的未经激素处理型 PC(图 1E)和全部 6 个 HRPC(图 1F)显示 PKIB 强阳性(++ 或 +++),这与 RT-PCR 分析的结果是一致的。而且,全部 (9/9) Gleason 等级 5 级的未经激素处理型 PC(图 1E)以及 HRPC 都显示 PKIB 强阳性,并且 PKIB 表达与 Gleason 等级强烈相关(表 1,卡方检验, $P = 1.35 \times 10^{-6}$),提示 PKIB 表达可以指示 PC 的恶性表型和不良预后。

[0514] 表 1 在临床 PC 组织中 PKIB 表达与 Gleason 分数 (GS) 相关

	PKIB表达			
	+++	++	+	-
HRPC	9/9	-	-	-
HNPC	10/32	12/32	8/32	2/32
Gleason 5	7/9	2/9	-	-
Gleason 4	2/11	7/11	2/11	-
Gleason 3	1/12	3/12	6/12	2/12

[0516] (+++ 相对其它 : $P = 1.35 \times 10^{-6}$)

[0517] [实施例 3] PC 细胞系中 siRNA 敲低 PKIB

[0518] 为了研究 PKIB 异常表达的潜在促生长作用构建了数个 siRNA 表达载体,以检查它们对表达 PKIB 的 PC 细胞系 22Rv1 和 LNCaP (HP) 细胞的敲低作用。当 si1 和 si2 构建体被转染到 22Rv1 细胞(左)和 LNCaP (HP) 细胞(右)时,通过半定量 RT-PCR 观察到了显著的敲低效果,但是 #3si 和阴性 siRNA 构建体 siEGFP 没有(图 3A)。在含有遗传毒素的培养基中选择之后,MTT 测定(图 3B)和克隆形成测定(图 3C)证明,在 22Rv1 细胞(左)和 LNCaP (HP) 细胞(右)中导入 si1 和 si2 可显著降低其细胞生长和生存力,而其它不影响 PKIB 表达的 siRNA 则不会影响细胞生长,表明 PKIB 很可能在 PC 细胞生存力中发挥重要作用。

[0519] [实施例 4] PC 细胞系中通过 siRNA 敲低 NAALADL2

[0520] 为了研究 NAALADL2 异常表达的潜在促生长作用,构建了数个 siRNA 表达载体,以检查它们对表达 NAALADL2 的 PC 细胞系 --22Rv1 细胞的敲低作用。当 si#690 构建体被转染到 22Rv1 细胞时,通过半定量 RT-PCR 观察到了显著的敲低效果,但是其它构建体没有(图 4A)。在含有遗传毒素的培养基中选择 14 天之后,MTT 测定(图 4B)和克隆形成测定(图 4C)证明,在 22Rv1 细胞中导入 si#690 可急剧降低其细胞生长和生存力,而其它没有显示对 NAALADL2 表达的敲低效果的 siRNA 则没有影响细胞生长,这表明 NAALADL2 很可能在癌细胞生存力中发挥重要作用。将对应于 si#690 的合成 RNA 双链体或阴性对照 siRNA 双链体转染进入另一个 NAALADL2 表达 PC 细胞系 C4-2B 细胞。RT-PCR 显示, si#690RNA 双链体明显

地敲低了内源 NAALADL2 在 C4-2B 细胞中的表达 (图 4D), 并且 MTT 测定证明 si#690RNA 双链体还能抑制 C4-2B 细胞的生长 (图 4E)。

[0521] [实施例 5]PKIB 和 NAALADL2 蛋白的亚细胞定位

[0522] 使用构建的哺乳动物表达载体表达带标签的全长 PKIB 和 NAALADL2 蛋白, 用抗-标签抗体通过免疫细胞化学研究它们的亚细胞定位。如图 5 所示, 外源 PKIB 定位于细胞质 (图 5A), 而外源 NAALADL2 蛋白定位于细胞膜 (图 5B)。NAALADL2 具有一个跨膜, 被预测作为 II 型膜蛋白定位于质膜。我们的数据支持这一点, 因此 NAALADL2 蛋白很可能是 II 型膜蛋白。

[0523] [实施例 5]PKIB 与 PKA-C 的相互作用, 和敲低 PKIB 所致的 PKA-C 转位

[0524] PKIB 属于 PKI (蛋白激酶 A 抑制剂) 家族, 并且 PKIA 能够敲低蛋白激酶 A 催化亚基 (PKA-C) 的激酶活性, 并通过其假底物基序 (RRNA; SEQ IDNO :31) 与 PKA-C 直接结合从而将 PKA-C 从细胞核外排到细胞质 (Glass DBet al., J Biol Chem 1986261:12166-71. 和 Wen W et al., J Biol Chem 1994269:32214-20.)。PKIB 也具有假底物基序 (RRNA), 但其抑制活性比 PKIA 小得多 (Gamm DM et al., J Biol Chem 1995270:7227-32.), 并且其在细胞中转位 PKA-C 的活性未知。为了研究 PKIB 是否参与 PKA-C 定位, 首先验证 PKIB 与 PKA-C 间的直接相互作用。将 PKIB-Myc 和 HA-PKA-C 表达载体共转染 22Rv1 细胞, 通过每种标签抗体对它们的细胞裂解物进行免疫沉淀。图 5C 显示, PKIB-Myc 与 PKA-C 免疫共沉淀, 反之亦然, 表明 PKIB 与 PKA-C 间有直接相互作用。

[0525] 接着, 通过免疫细胞化学分析和细胞分级检查在敲低了 PKIB 的 PC-3 细胞或 LNCaP (HP) 细胞中内源 PKA-C 的亚细胞定位。免疫细胞化学分析观察到, 当用对照 siRNA 转染 PC-3 细胞时, 大多数 PKA-C 定位于细胞质, 一些 PKA-C 蛋白细胞位于细胞核 (图 5D, 左)。另一方面, 当在 PC-3 细胞中用 siRNA 敲低内源 PKIB 时, 免疫细胞化学分析显示在细胞核中没有或者仅有非常小的 PKA-C 信号 (图 5D, 右)。在另一种 PKIB 表达 PC 细胞系 LNCaP (HP) 细胞中观察到了相同的现象。为了更加定量地分析细胞核 PKA-C, 对用 PKIB siRNA 处理过的 LNCaP (HP) 细胞的裂解物进行分级。

[0526] 如图 5E 所示, 与对照 siRNA 相比, PKA-C 在细胞核中的量在 PKIB 敲低中被明显降低, 而 PKA-C 在细胞质中的量在 PKIB 敲低中则有微小增加。这些发现暗示, PKIB 能够帮助 PKA-C 进入细胞核, 或者抑制 PKA-C 从细胞核外排, 这与 PKIA 的细胞核外排功能不同。

[0527] [实施例 7]PKIB 过表达促进 PC 细胞生长

[0528] 为了研究 PKIB 的致癌功能, 从 DU145 细胞 (其不表达或仅表达很少量内源 PKIB) 建立了三个组成性表达外源 PKIB 的克隆, 将这些克隆的生长与模拟 DU145 细胞进行比较。如图所示, 所有三个克隆均组成性表达外源 PKIB (图 6A, 图 6B), 并且它们在体外 (图 6C) 和体内 (图 6D) 比模拟细胞生长得更快, 提示 PKIB 在前列腺癌中的促生长作用。如本免疫组织化学分析所示, PKIB 过表达与高 Gleason 分数强相关, 这表明 PKIB 可能对前列腺癌细胞的恶性和侵袭潜能有贡献。然后, 通过基质胶侵袭测定考察了 PKIB 在细胞侵袭中的可能作用。如图 6E 所示, 用 PKIB 表达载体转染的 NIH3T3 细胞与用模拟载体转染的细胞相比, 显著增强了其透过基质胶的迁移。

[0529] [实施例 8]PKIB 参与 PC 内的 Akt 磷酸化

[0530] 许多报道提示, PTEN 的功能丧失和 Akt 的激活与前列腺癌的进展显著相关,

并且 PTEN-PI3K-Akt 途径很可能在 HRPC 进展和其恶性表型中发挥关键作用 (Sellers, W. R. & Sawyers, C. L. (2002), 《Somatic Genetics of Prostate Cancer: Oncogenes and Tumor Suppressors》Kantoff, P. 编辑 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), Wang Y, Kreisberg JI, Ghosh PM., Curr Cancer Drug Targets. 2007 Sep; 7(6) :591-604, Lin HK, Yeh S, Kang HY, Chang C, Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98(13) :7200-5, Feldman BJ, Feldman D, Nat Rev Cancer 2001; 1(1) :34-45, Malik SN, Brattain M, Ghosh PM, Troyer DA, Prihoda T, Bedolla R, Kreisberg JI., Clin Cancer Res. 2002; 8(4) :1168-71)。于是, 我们研究了 PKIB 是否能够影响 Akt 磷酸化。首先, 用对应于 si1 的 RNA 双链体敲低 PKIB 在 PC 细胞系 (LNCaP 和 PC-3) 中的表达, 通过 western 印迹分析检查 Akt 在 Ser 473 位的 Akt 磷酸化。RNA 双链体对 PKIB 的敲低得到了 RT-PCR 的验证 (数据未显示)。结果, PKIB 敲低显著影响了 PC 细胞中的 Akt 磷酸化 (图 7A)。而且, 如图 7B 所示, 还观察到, PKIB 在 PC 细胞中的过表达显著提高 Akt 在 Ser473 位的磷酸化。结果证明, PKIB 直接相互作用于 PKA-C 激酶, 并可能修饰其功能, 并且已经确认, PKA-C 激酶过表达也会提高 Akt 在 Ser473 的磷酸化 (图 7A)。这些发现提示, PKIB 可能参与 PC 细胞中的 Akt 磷酸化 (Ser473), 可能是通过修饰 PKA-C 激酶的功能。

[0531] 接着, 如图 7B 所示, 我们观察到, PKIB 在 PC 细胞中的过表达可提高 Akt 磷酸化。结果证明 PKIB 与 PKA-C 激酶直接相互作用, 并可能修饰后者的功能, 并且已经确认, PKA-C 激酶过表达也会提高 Akt 磷酸化 (图 7C)。这些发现提示, PKIB 可能参与 Akt 磷酸化, 可能是通过修饰 PKA-C 激酶。

[0532] 此外, 为了确认 Akt Ser473 是否直接被 PKA-C 和 / 或 PKIB 磷酸化, 使用重组 PKIB、PKA-C 激酶和 Akt 蛋白进行体外激酶测定。如图 7D 所示, 当 PKA-C 激酶与重组 Akt 反应时磷酸化 Ser473 特异抗体可检测到磷酸化的 Akt, 而且 PKIB 的添加显著提高了 Akt (Ser473) 的磷酸化水平。这提示, PKA-C 激酶和 PKIB 可以直接并且有效地磷酸化 Akt Ser473, 这有助于 PC 细胞的生长促进和进展。

[0533] [实施例 9] PC 组织中的 Akt 磷酸化和 PKIB 过表达

[0534] 最后, 在临床 PC 组织中检查 PKIB 表达与 Akt Ser473 磷酸化的关联。图 8 显示了代表性的 PC 组织图片, 比较 PC 组织面对面切片 (face-on-faceslide) 中 PKIB 的染色模式和 pAkt (Ser473) 的染色模式, 表明在该 PC 组织中 PKIB 表达和 Akt 磷酸化具有相关性。表 2 总结了临床 PC 组织中 PKIB 表达与 Akt 磷酸化间的相关性 ($P = 0.0156$, 卡方检验)。

[0535] 表 2 临床组织中 PKIB 表达与 Akt Ser473 磷酸化间的关联

PKIB 表达	pAkt (Ser473)		
	++	+	-
++ (n=22)	8 (36%)	10 (45%)	4 (18%)
+ (n=20)	2 (10%)	11 (55%)	7 (35%)
- (n=8)	0	2 (25%)	6 (75%)

[0537] ($P = 0.0156$, 卡方检验)

[0538] 讨论

[0539] 在本发明中,用临床 HRPC 细胞的全基因组范围基因表达谱分析鉴定了两种前列腺癌——特别是激素难治性前列腺癌——的分子靶标。前列腺癌显示相对良好的预后,激素耗竭疗法 (hormone depletion therapy) 在大多数复发或晚期 PC 中有效。但是一旦出现 HRPC 细胞,PC 患者护理的选项就非常少了。结果,现有技术已经认识到,需要为 HRPC 患者鉴定新的分子靶标,并通过靶定这些新分子开发 HRPC 的新疗法。

[0540] PKIB 属于 PKI (蛋白激酶 A 抑制剂) 家族,PKIA 能够抑制蛋白激酶 A 催化亚基 (PKA-C) 的激酶活性,并通过与 PKA-C 直接结合将 PKA-C 从细胞核外排到细胞质 (Glass DB et al., J Biol Chem 1986261:12166-71. 和 Wen Wet al., J Biol Chem 1994269:32214-20.)。蛋白激酶 A (PKA)、cAMP- 依赖的蛋白激酶 A, 多被认为对于介导由 cAMP 引发的广泛的生理和病理作用和与 G 蛋白的偶联至关重要,有多种配体和受体系统可激活 PKA 信号途径,并且其激活与细胞生长和分化的控制有关 (Tasken K et al., Physiol Review200484:137-67. and Stork PJ et al., Trends Cell Biol 200212:258-66.)。

[0541] 在前列腺癌中,有多个报道提示,它涉及不依赖雄激素的生长和神经内分泌性分化 (Cox ME et al., J Biol Chem 2000275:13812-8.), 还有人提出 HRPC 细胞的雄激素非依赖性生长中涉及了 PKA 途径和 AR 途径之间的对话 (cross-talk) (Stork PJ et al., Trends Cell Biol 200212:258-66. 和 Sadar MD, J Biol Chem 1999274:7777-83.)。

[0542] 在本发明中,已经证明 PKIB 能够帮助 PKA-C 的细胞核定位并促进 PC 细胞生长,而不是像 PKI 家族成员那样抑制 PKA-C 活性或 PKA 途径。先前的报道提示,PKIB 在体外具有一些 PKA-C 抑制活性,但是其 K_m 比 PKIA 高得多,并且辅助 PKA-C 的细胞核转入或抑制其细胞核导出是 PKIB 在 PC 细胞中的主要功能。而且,PKIB 与在 CRPC 的侵袭和恶性表型中发挥关键作用的 Akt Ser473 磷酸化强烈相关。

[0543] NAALADL2 是一种新的 II 型膜蛋白,属于谷氨酸羧肽酶 II (GCPII) 家族。GCPII 的前列腺形式,称作前列腺特异膜抗原 (PSMA),在前列腺癌中表达,并且 PSMA 的表达水平增加与 PC 进展和 HRPC 相关 (Rajasekaran AK et al., Am J Physiol Cell Physiol 2005 288:C975-81. 和 Murphy GP et al., Prostate200042:145-9.)。考虑到其与 PSMA 的同源性和其相似的表达模式,这种新型分子 NAALADL2 应当称作“PSMA2”。PSMA 是一种 FDA 批准的前列腺癌显像剂—— ^{111}In - 标记的 7E 11 单克隆抗体 (Prostascint, Cytogen, Princeton, NJ)——的靶标,并且 PSMA 被单克隆抗体例如 J591 靶定,该抗体在临床试验中用于将成像剂或治疗剂特异递送到 PSMA 表达细胞 (Murphy GP et al., Prostate 200042:145-9. 和 Holmes EH, Expert Opin Investig Drugs 2001 10:511-9.)。

[0544] 除了充当肿瘤标志物之外,PSMA 具有 GPC 活性,其底物包括聚- γ -谷氨酸叶酸 (Zhou J et al., Nature Review Drug Disc 20054:1015-26.)。PSMA 的酶活性可用于设计前体药物,其中药物的无活性谷氨酸化形式仅在表达 PSMA 的细胞中被选择性切割并由此激活 (Denny WA et al., Eur J Med Chem200136:577-95.)。然而,PSMA 如何与前列腺癌进程相关则完全未知,并且靶定 PSMA 功能或其自身活性的可能性也尚未知晓。NAALADL2 在 HRPC 细胞中高表达,而其在正常成人器官中的表达则非常有限,如图 2B 所示。除了其作为肿瘤标记的限制性表达之外,它很可能与 PC 生存力或生长有关,这得到了 siRNA 实验的支持。因此,和肿瘤标志一样,针对 PSMA2 的特异单克隆抗体亦可用于通过阻断 PSMA2 活性进行 PC 治疗。

[0545] 工业应用性

[0546] 人基因 PKIB 和 NAALADL2 的表达在前列腺癌中,特别是激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌,比正常器官显著提高。因此,这些基因可以方便地用作前列腺癌诊断标记,借此所编码的蛋白可以用于前列腺癌的诊断试验。

[0547] 本发明人证明,细胞生长被特异靶定 PKIB 和 NAALADL2 基因的双链分子抑制。因此,这些新的双链分子可用于开发抗癌药物。例如,阻断 PKIB 或 NAALADL2 蛋白表达或阻止其活性的试剂可应用为抗癌剂,特别是用于治疗前列腺癌,尤其是激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌,的抗癌剂的治疗用途。

[0548] 而且,无论是 PKIB 还是 NAALADL2 多肽均是开发抗癌药物的有用靶标。例如,与 PKIB 或 NAALADL2 结合、或阻断 PKIB 或 NAALADL2 的表达或阻止其活性、或者抑制 PKIB 与 PKA-C 结合的试剂,或者抗 -NAALADL2 抗体,可用作抗癌剂,特别是用于治疗前列腺癌,尤其是激素难治性前列腺癌或去势抵抗性前列腺癌,的抗癌剂。

[0549] 尽管本文对于本发明参考其具体的实施方案进行了详细的记载,但是本领域的技术人员显然可以想到,在不背离本发明精神和范围的前提下可以在其中进行各种改变和修饰。

序列表

<110> 肿瘤疗法科学股份有限公司 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.)

<120> PKIB 和 NAALADL2 用作前列腺癌治疗和诊断的靶基因

<130> ONC-A0718P

<150> US 60/957,853

<151> 2007-08-24

<150> US 61/036,030

<151> 2008-03-12

<160> 36

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1909

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

ggaaaaaagc taccgtggca cgtgccccgg ggagtgatgc ggtggccccg tttgcacgga 60
gagcgggaca ccgcctgggg agccgcgctc gtagcctggg ggcgggacgc ggcggccgct 120
ccctccgccc ccgagtagct gccaccgcct ggctgcgccc cagcccagta gtcagacgc 180
ggccgcaccc cggtggactg tagaggcggc agcgagctag agcccgagtc gcagctccgg 240
ggcgagagc gctgggcgag cgcgagcgcc agggcacccg cagggcaggc agctgcgcgc 300
ggctggagtc atgtatact gaaaagacac ttcatcaaga taactctggg agaagcagaa 360
aaccctgtgc caggacagc aaagatagga gaaagaaagt ttatcagaat tttttaaac 420
tgtctcagaa ataacaacat attttaatca gagatttatg ttgctatgag gacagattca 480
tcaaaaatga ctgacgtgga gtctgggggt gccaattttg catcttcagc aagggcaggc 540
cgccggaatg ccttaccaga catccagagt tcagctgcca cagacggaac ctcagatttg 600
cccccaaac tggaggctct ctccgtgaag gaagatgcaa aagagaaaga tgaaaaaaca 660
acacaagacc aattggaaaa gcctcaaaat gaagaaaaat gaaggctcat aatctatcaa 720
gagtgtgtaa tttctgcatg ttgaaagact tagtggttct gttttcttga gacatttaat 780
ctgggtgtaa ctgtggtaac attgcagccc taagcagcat gtgtatatta gataattgtg 840
ttgtgatgct actcactttg attgcaatga tgatgtccaa ggtaagctat taaaaggcag 900
gttacttcca aatgcactg aaggaaaagg ttaagaataa tacatgatca cagaaatgca 960

```

taccactgtc tgtaaaccce acaaaattca ctgttctctt ttggatttat ttagcctgat 1020
gtatTTTTTaa ttcaattttt atgggtgatgg gcaaatcatt cttggtaaata gtaaatacaaa 1080
catgattgat ttaaaacttc atggaatttg tagaaaatta tggacatttt tggtagagaaa 1140
gaacaatagt caaaactcac atggatagag tgtgtttgtt ttttgccaaa aatgccccag 1200
actttttccc aaacctcaaa aacgtcttgg aaaaattgta aaagtttgat aacagaaaca 1260
tcttttaggat atttttgtct gacatatttt gcttctagta tgtgcctact gtgatttttt 1320
tcatgtggaa aatgcaaaat ttgtaacaaa atgggttatat ggaacatgcc tattaatatga 1380
attttactat ctccctaac tttgggtctgt gtatgtgtgt gtgttttact ttaatatgaa 1440
ttatacaaaa tactagtgtt tttacactct cttttcttat tcttagggct tttgtgtatg 1500
tctgacttgt ttttaaataa ctccctcagc aatgcagacc ttaattttta tatTTTTTTa 1560
aagtagctaa catagcagta ggcacttaag catttagtca atgatattgg tagaaatagt 1620
aaaatacatc ctttaaatat atatctaagc atatatttta aaaggagcaa aaataaaacc 1680
aaagtgttag taaattttga tttattagat attttagaaa aataatagaa ttctgaagtt 1740
ttaaaaatgt cagtaattaa tttattttca ttttcagaaa tatatgcatg cagttatgtt 1800
ttatttgatt gttgacttag gctatgtctg tatacagtaa ccaaataaac tctttcacta 1860
ttaaagagat ttcttactga aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1909

<210>2

<211>78

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>2

Met Arg Thr Asp Ser Ser Lys Met Thr Asp Val Glu Ser Gly Val Ala
1 5 10 15
Asn Phe Ala Ser Ser Ala Arg Ala Gly Arg Arg Asn Ala Leu Pro Asp
 20 25 30
Ile Gln Ser Ser Ala Ala Thr Asp Gly Thr Ser Asp Leu Pro Leu Lys
 35 40 45
Leu Glu Ala Leu Ser Val Lys Glu Asp Ala Lys Glu Lys Asp Glu Lys
 50 55 60
Thr Thr Gln Asp Gln Leu Glu Lys Pro Gln Asn Glu Glu Lys
65 70 75

<210>3

<211>4912

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>3

acagtagaaa	gtcagaaggt	cacaaagctt	gcagggttaag	tgacacaact	tgaaactgct	60
tggccctctt	taaaaagaaa	taataaaatg	ggagagaatg	aagcaagttt	acctaacacg	120
tctttgcaag	gtaaaaagat	ggcctatcag	aagggtccatg	cagatcaaag	agctccagga	180
cactcacagt	acttagacaa	tgatgacctt	caagccactg	cccttgactt	agagtgggac	240
atggagaagg	aactagagga	gtctggtttt	gaccaattcc	agctagacgg	tgctgagaat	300
cagaacctag	ggcattcaga	gactatagac	ctcaatcttg	attccattca	accagcaact	360
tcacccaaag	gaaggttcca	gagacttcaa	gaagaatctg	actacattac	ccattataca	420
cgatctgcac	caaagagcaa	tcgctgcaac	ttttgccacg	tcttaaaaat	actttgcaca	480
gccaccatth	tattttatth	tgggattttg	ataggttatt	atgtacatac	aaattgccct	540
tcagatgctc	catcttcagg	aacagttgat	cctcagttat	atcaagagat	tctcaagaca	600
atccaggcag	aagatattha	gaagtctttc	agaaatttgg	tacaactata	taaaaatgaa	660
gatgacatgg	aaatttcaaa	gaagattaag	actcagtggg	cctctttggg	cctagaagat	720
gtacagtttg	taaattactc	tgtgctgctt	gatctgccag	gcccttctcc	cagcactgtg	780
actctgagca	gcagtgggtc	atgctttcat	cctaattggc	agccttgtag	tgaagaagcc	840
agaaaagata	gcagccaaga	cctgctctat	tcatatgcag	cctattctgc	caaaggaact	900
ctcaaggctg	aagtcatega	tgtgagttat	ggaatggcag	atgatttaaa	aaggattagg	960
aaaataaaaa	acgtaacaaa	tcagatcgca	ctcctgaaat	taggaaaatt	gccactgctt	1020
tataagctth	cctcatttga	aaaggcttga	tttgagggtg	ttcttctgta	tatcgatcct	1080
tgtgatttgc	caaagactgt	gaatcctagc	catgatacct	tcatgggtgc	actgaatcca	1140
ggaggagacc	cttctacgcc	tggttaccca	agtgtcgatg	aaagttttag	acaaagccga	1200
tcaaacctca	cctctctatt	agtgcagccc	atctctgcac	ccctcgttgc	aaaactgac	1260
tcttcgccaa	aagctagaac	caaaaatgaa	gcgtgtagct	ctctagagct	tccaaataat	1320
gaaataagag	tcgtcagcat	gcaagttcag	acagtcacaa	aattgaaaac	agttactaat	1380
gttgtttgat	ttgtaattgg	cttgacatct	ccagaccggt	atatcatagt	tggcagccat	1440
catcacactg	cacacagtta	taatggacaa	gaatgggcca	gtagtactgc	aataatcaca	1500
gcgtttatcc	gtgccttgat	gtcaaaagtt	aagagagggt	ggagaccaga	ccgaactatt	1560
gttttctgtt	cttggggagg	aacagctttt	ggcaatattg	gctcatatga	atggggagag	1620
gatttcaaga	aggttcttca	gaaaaatgtt	gtggcttata	ttagcctcca	cagtcccata	1680
agggggaact	ctagtctgta	tcctgtagca	tcaccatctc	ttcagcaact	gtagtagag	1740
aaaaataatt	tcaactgtac	cagaagagcc	cagtgccccag	aaaccaatat	cagttctata	1800
cagatacaag	gtgatgctga	ttatttcate	aaccatcttg	gagttcccat	cgtgcagttt	1860
gcttacgagg	acatcaaaac	attagagggt	ccaagttttc	tctccgaggc	ccgtttttct	1920
acacgagcaa	caaaaattga	agaaatggat	ccctctttca	accttcatga	aaccattact	1980
aagctctcag	gagaagtgat	tttgcaaatt	gccaacgaac	ctgttctgcc	ctttaatgca	2040
cttgatatag	ctttagaagt	tcaaaacaac	cttaaagggtg	atcaacccaa	cactcatcaa	2100
ctgttagcca	tggcgttacg	cctgcgggag	agtgtctgaac	tttttcagtc	tgatgagatg	2160
cgacctgcta	atgateccaa	ggagagagca	cccatccgca	tccggatgct	gaatgacatt	2220
ctccaagaca	tggagaaaag	ctttctggta	aagcaggcac	caccaggttt	ttatagaaac	2280
atcctctacc	accttgatga	aaagacaagc	cggttttcaa	tacttataga	ggcttgggaa	2340

cactgcaaac cccttgcate aaatgagacc cttcaagaag ccctgtcaga ggtgttgaac	2400
agcattaatt cagctcaggt ttacttcaaa gcaggacttg atgtgttcaa gagtgtcttg	2460
gatgggaaga attgagaaaa ctctgagcat ttttaaaagt ttgtttacaa ttccacaagc	2520
aaaagctcta atttaaccag attttctgac attgaaggct tattttcccc aatggctttt	2580
tgacaagtat aaagctatta ttacattgta ttttttaa atgtaaatatag aaagaacatt	2640
ttgcacat tt aatattttt ttatatctac atttctgaat atgtaaagca agttattgaa	2700
ataggactta agaattacct attaaaaaga aatctgatat ataaaaatat gtactat ttt	2760
aaggaaaaat ttccaagaag ttctggacta tctttgttcc tatggggagg gcata tagga	2820
acacagttta ttctctctga tagagctatt aatgacttag tttctgtaaa agaaatggag	2880
agttgatatg gttcagatta acttcactat taagtgttca atatgaagaa ttcaagtatt	2940
ctgactgagt gattgggtga cctaaaccac ttggaatgtt tctattttat gaaatgaagt	3000
ttctcttctt aacacaacta gatgtagtaa tacactgggt atgaaattgt atttttttaa	3060
gtattaatga aaaaagagcc ataagcattc caggagaaaa tctcaaggga gctacataga	3120
gcaattttaa tgcaaat ttttcttaaca acttacaagg tgactagctt tgaaaccct	3180
aatttgcctc agttgat ttt ctaagaattt caggagtgat gtatgtctta agaggagaa	3240
aaaaatat ttt cttattactt tttctcttgt ttctgttga aacactgaag cagggactct	3300
aaaatgaaag catctcacat tggttttctt tcttgtatct tttctgaaac tccttgctgt	3360
aaggcagctt tctcagagta ctatatatt tcaacagtaa agtagcagag tttctctt	3420
aaacccaaaa tgtcttctaa agaatcaaat ttctatttct gcctctgaca aaaagaactt	3480
actatgaaag aaatagttgt tttatcaata aaagccctt aatattatga agaaactttt	3540
catatttttt cttctttatc ctttaattgtg actaagatgg aaatctagaa aatattcatg	3600
cttctaagtt tctgcagtgt tactgtgaaga gagtgtctcg tctacacttc agttcttctc	3660
tcatgtggaa aactaagctt tttatat tga cattgccatt gaatagctct agcaactatt	3720
attattcccc caaacctaa aattctacct attaggtgtc aggttaaagt tctaatttat	3780
ctttagaaat ttatgtgaaa aatggttttc ctatactgga taaagcaatt ccccttagga	3840
aacatagcct cagagtattt catataaatt ttctctatct aattcaaaca tatctcccca	3900
tgatacaccg ccagagtgac attgcagaca gtctgtgtat gtttaaat ttcactttta	3960
tggatgagca taaacctagt cttagtttaa aggcaaacta aagttgaggg gaaataatta	4020
atcaatactg attaattgat ttataagggt caacactgtc taccctaaat aatttttata	4080
tgctcaaggc aaagcaggga atagaggcaa ttagctagat aattcaagca gaaatccatt	4140
ttcatcgaaa ttgcctgtgt gcacatat tttagatgaaa aatgaaacta cttacaata	4200
ttattttttt aaccaatgta ttgttttgca aacatttgcc atgttgaaga gtgtgtatag	4260
gaaaggtcta gaaataaata ggcttgtgca tacctaggca ttcatgctct ttttctctct	4320
tcagagatca tcagaaaaga ggtgggaata cacaagcagg tgcatgtaag cccaaaagct	4380
agaaagcctt atatttaacc aaaggttgat gtgttcattc cagttattca cttacagatg	4440
aaactaaaac aaataaaggc aagctattat cagtttggta gttcattatt ttagaacaaa	4500
tttctaaatt aatttattcc cataacctac aatagcactg agaacagaaa acatgtttct	4560
tcttcatttt gtttaagat tgcgtacct ggtaagtcac actgtataga taaaaacctt	4620
cttctgtatt cctcacctct aaattatatg ttatttgcta ttgaaaact gtagttaact	4680

```

atggtttttt attagtctat taaaagatac gtggagatat taaattatac ctaaagcaga 4740
cgtccaacaa attctgtaca tgctgcttta catcttttgca acaaacctct taactagcag 4800
cattattttct atagtgtgat tacctgagggg tgcctccaaa tgtatatcat ttactctccc 4860
tcccctcccc accccaata gattcaaata aataaaatcc tgagcaaatt aa 4912

```

<210>4

<211>795

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>4

```

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

```

Gly	Pro	Ser	Pro	Ser	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Gly	Gln	Cys	Phe
225						230				235					240
His	Pro	Asn	Gly	Gln	Pro	Cys	Ser	Glu	Glu	Ala	Arg	Lys	Asp	Ser	Ser
			245						250					255	
Gln	Asp	Leu	Leu	Tyr	Ser	Tyr	Ala	Ala	Tyr	Ser	Ala	Lys	Gly	Thr	Leu
		260						265					270		
Lys	Ala	Glu	Val	Ile	Asp	Val	Ser	Tyr	Gly	Met	Ala	Asp	Asp	Leu	Lys
	275						280					285			
Arg	Ile	Arg	Lys	Ile	Lys	Asn	Val	Thr	Asn	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Lys
	290					295				300					
Leu	Gly	Lys	Leu	Pro	Leu	Leu	Tyr	Lys	Leu	Ser	Ser	Leu	Glu	Lys	Ala
305				310					315					320	
Gly	Phe	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	Tyr	Ile	Asp	Pro	Cys	Asp	Leu	Pro	Lys
			325						330					335	
Thr	Val	Asn	Pro	Ser	His	Asp	Thr	Phe	Met	Val	Ser	Leu	Asn	Pro	Gly
		340						345					350		
Gly	Asp	Pro	Ser	Thr	Pro	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Asp	Glu	Ser	Phe	Arg
	355						360				365				
Gln	Ser	Arg	Ser	Asn	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Gln	Pro	Ile	Ser	Ala
	370					375					380				
Pro	Leu	Val	Ala	Lys	Leu	Ile	Ser	Ser	Pro	Lys	Ala	Arg	Thr	Lys	Asn
385				390						395				400	
Glu	Ala	Cys	Ser	Ser	Leu	Glu	Leu	Pro	Asn	Asn	Glu	Ile	Arg	Val	Val
			405						410					415	
Ser	Met	Gln	Val	Gln	Thr	Val	Thr	Lys	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Asn	Val
		420						425					430		
Val	Gly	Phe	Val	Met	Gly	Leu	Thr	Ser	Pro	Asp	Arg	Tyr	Ile	Ile	Val
	435						440					445			
Gly	Ser	His	His	His	Thr	Ala	His	Ser	Tyr	Asn	Gly	Gln	Glu	Trp	Ala
	450					455					460				
Ser	Ser	Thr	Ala	Ile	Ile	Thr	Ala	Phe	Ile	Arg	Ala	Leu	Met	Ser	Lys
465				470						475				480	
Val	Lys	Arg	Gly	Trp	Arg	Pro	Asp	Arg	Thr	Ile	Val	Phe	Cys	Ser	Trp
			485						490					495	
Gly	Gly	Thr	Ala	Phe	Gly	Asn	Ile	Gly	Ser	Tyr	Glu	Trp	Gly	Glu	Asp
		500						505					510		
Phe	Lys	Lys	Val	Leu	Gln	Lys	Asn	Val	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Leu	His
	515						520						525		
Ser	Pro	Ile	Arg	Gly	Asn	Ser	Ser	Leu	Tyr	Pro	Val	Ala	Ser	Pro	Ser

530	535	540
Leu Gln Gln Leu Val Val Glu Lys Asn Asn Phe Asn Cys Thr Arg Arg		
545	550	555
Ala Gln Cys Pro Glu Thr Asn Ile Ser Ser Ile Gln Ile Gln Gly Asp		560
565	570	575
Ala Asp Tyr Phe Ile Asn His Leu Gly Val Pro Ile Val Gln Phe Ala		
580	585	590
Tyr Glu Asp Ile Lys Thr Leu Glu Gly Pro Ser Phe Leu Ser Glu Ala		
595	600	605
Arg Phe Ser Thr Arg Ala Thr Lys Ile Glu Glu Met Asp Pro Ser Phe		
610	615	620
Asn Leu His Glu Thr Ile Thr Lys Leu Ser Gly Glu Val Ile Leu Gln		
625	630	635
Ile Ala Asn Glu Pro Val Leu Pro Phe Asn Ala Leu Asp Ile Ala Leu		640
645	650	655
Glu Val Gln Asn Asn Leu Lys Gly Asp Gln Pro Asn Thr His Gln Leu		
660	665	670
Leu Ala Met Ala Leu Arg Leu Arg Glu Ser Ala Glu Leu Phe Gln Ser		
675	680	685
Asp Glu Met Arg Pro Ala Asn Asp Pro Lys Glu Arg Ala Pro Ile Arg		
690	695	700
Ile Arg Met Leu Asn Asp Ile Leu Gln Asp Met Glu Lys Ser Phe Leu		
705	710	715
Val Lys Gln Ala Pro Pro Gly Phe Tyr Arg Asn Ile Leu Tyr His Leu		720
725	730	735
Asp Glu Lys Thr Ser Arg Phe Ser Ile Leu Ile Glu Ala Trp Glu His		
740	745	750
Cys Lys Pro Leu Ala Ser Asn Glu Thr Leu Gln Glu Ala Leu Ser Glu		
755	760	765
Val Leu Asn Ser Ile Asn Ser Ala Gln Val Tyr Phe Lys Ala Gly Leu		
770	775	780
Asp Val Phe Lys Ser Val Leu Asp Gly Lys Asn		
785	790	795

<210>5

<211>1724

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>5

```

ttaaaaaagc ctcgttagaa ttgctattc gaaaagacct taaaaaccct cacagagttc      60
taaacatccc attcattgaa aatacttttc agttaagtag atttgttttg tgcacttcac      120
aacttttagg tgacatgaat ttgaagcgta gcaaaagaaa tgtataaaga tagccttttc      180
tggtcattac catgtctact caagtttctg ttttctaggt acactctagc attgtaactt      240
tttccccctg agaagtaatt ttaagatcta tcagtctcaa tttaaagat ctgttaatca      300
gccagagttt tagtttcata atategttcc attgcctgac aaagatatac acactgaagt      360
gccttttagca gacctgggac cgtcaagaat cttgttacct tgattattgc aagatgacat      420
atttcttaag ccatttataa tctcatattc gggttgaatc tgtattttaca aataaaaggg      480
ttaaattgag gcagtttcaa gcagcattta ggaaaatgaa gtggcttcaa atttttagtgt      540
ttctggttac attattttgt ttgaattata caattacata attttctgta accaaaatgg      600
taattttgat ggatttttta aatgccaaaa tccaatcacc aaggccaaag aaatgcatga      660
ttactctgat ttcttatgca ccattcagtc aagacttaac tcagaggcag ttgattcagt      720
gcttacatct agacaaagct ttaatgagtg cagaccacgc ctaacagtat ttcactaat      780
ttctttgatg gcttaagcca ataagcactg aggtagcttt tctcagaagg aacagattt      840
tattttccag gggctaatta atatgcacca cctaagtcac caaaggatca cacaggtgcc      900
tgtatcatgc catatgtcat gtgctatatt cctgcaagct caagagatta atatacaatc      960
attattatga attattatgt tgcattgaag ttaatgtcgg tcttttggtc taattaaagt     1020
acaaacgtgg catctgaata gaagcttagc tagagaagtg gagttagagt ccctatttta     1080
atgaactaca tatatttttc aatcaaaatg tgtaattatt taattatcta gcctgctcag     1140
taatcataac tctccaactt ctccaaggg cctttattca atatgttacc actcatatgg     1200
tcattacttg gtaagtgttt tatattttga atttcttaga tgctttcagt gtatgtgcta     1260
gtgtttttatt aatattaaaa atttttgttt acttatatat caagctgctg caaatggact     1320
accttatttt aaaagttaga ataaaatgct attactctct aaacagaact ttagcatatc     1380
tgtttgataa gaaatacaca aacaaaatat ttttctatgc tattgcaaat tgtccgcagg     1440
aagcaaaatg ccagatgggt aagtgtagct cacataatta tattccaaag gtgttataaa     1500
caattctatt tagcatctga gataggtcta tattaggcaa tttcatgttt acatttctaa     1560
cagaaagggt taatggcaaa tattccttat attctaactt gctacttgga gaatatggat     1620
attctgaaaa gaaaaaccct ttctagaaca ctgtgcagga ctaatttttt ttaatagac     1680
atccagaaaa tagcctgggc aacaaagtga gaccctgtct ctct                        1724

```

<210>6

<211>20

<212>DNA

<213> 用于 PCR 的人工合成的引物

<400>6

ttggcttgac tcaggattta

20

<210>7

<211>20

<212>DNA

<213> 用于 PCR 的人工合成的引物

<400>7

atgctatcac ctccccctgtg

20

<210>8

<211>24

<212>DNA

<213> 用于 PCR 的人工合成的引物

<400>8

ggcacatact agaagcaaaa tacg 24

<210>9

<211>22

<212>DNA

<213> 用于 PCR 的人工合成的引物

<400>9

gatgggcaaa tcattcttgg ta 22

<210>10

<211>23

<212>DNA

<213> 用于 PCR 的人工合成的引物

<400>10

gaaagcatct cacattgggtt ttc 23

<210>11

<211>23

<212>DNA

<213> 用于 PCR 的人工合成的引物

<400>11

gggtttcaaa gagaaactct gct 23

<210>12

<211>20

<212>DNA

<213> 用于 PCR 的人工合成的引物

<400>12

gaagcaaaat gccagatggt 20

<210>13

<211>23

<212>DNA

<213> 用于 PCR 的人工合成的引物

<400>13

tcctgcacag tgttctagaa agg 23

<210>14

<211>20

<212>DNA

<213> 用于 RNA 印迹探针的人工合成的引物

<400>14

ccagtgccca gaaaccaata 20

<210>15

<211>22

<212>DNA

<213> 用于 RNA 印迹探针的人工合成的引物

<400>15

tcaattcttc ccatccaaga ca 22

<210>16

<211>19

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>16

gccctaagca gcatgtgta 19

<210>17

<211>19

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>17

gcagtaggca cttagcat 19

<210>18

<211>19

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>18

gatgcaaaag agaaagatg 19

<210>19

<211>19

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>19

gactcagtgg acctctttg 19

<210>20

<211>19

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>20

gtcatcgatg tgagttatg 19

<210>21

<211>19

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>21

gagtcgtcag catgcaagt 19

<210>22

<211>19

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>22

gaagcagcac gactttcttc 19

<210>23

<211>19

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>23

gacucagugg accucuuug 19

<210>24

<211>21

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>24

caaagagguc cacugagucu u 21

<210>25

<211>22

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>25

gcagcacgac uuctuucaag tt 22

<210>26

<211>21

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>26

cuugaagaag ucgugcugct t 21

<210>27

<211>21

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>27

gccuaagca gcauguguau a 21

<210>28

<211>21

<212>DNA

<213> 用于 siRNA 的人工合成的靶序列

<400>28

uacacaugcu gcuuagggu u 21

<210>29

<211>2689

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>29

gatcttgggc tgaggttccc gggcgggcgg gcgcggagag acgcgggaag caggggctgg	60
gcgggggtcg cggcgcgcga gctagcgcag ccagcccagag ggccgcccgc gccgcccgcc	120
agcgcgctcc ggggcgcgcg gccgcagcca gcacccgcgc cgccgcagct ccgggaccgg	180
ccccggccgc cgccgcgcgc atgggcaacg ccgcgcgcgc caagaagggc agcgagcagg	240
agagcgtgaa agaattctta gccaaagcca aagaagattt tcttaaaaaa tgggaaagtc	300
ccgctcagaa cacagcccac ttggatcagt ttgaacgaat caagaccctc ggcacgggct	360
ccttcgggcg ggtgatgctg gtgaaacaca aggagaccgg gaaccactat gccatgaaga	420
tcctcgacaa acagaagggtg gtgaaactga aacagatcga acacaccctg aatgaaaagc	480
gcatectgca agctgtcaac ttccggttcc tcgtcaaaact cgagtttctc ttcaaggaca	540
actcaaaactt atacatggtc atggagtacg tgcccggcgg ggagatgttc tcacacctac	600
ggcggatcgg aaggttcagt gagecccatg ccggtttcta cgcgggcccag atcgtcctga	660
cctttgagta tctgcactcg ctggatctca tctacaggga cctgaagccg gagaatctgc	720
tcattgacca gcagggttac attcaggtga cagacttcgg ttctgccaag cgcgtgaagg	780
gccgcacttg gaccttgtgc ggcacccctg agtacctggc ccctgagatt atcctgagca	840
aaggctacaa caaggccgtg gactgggtgg ccctgggggt tcttatctat gaaatggccg	900
ctggctaccc gcccttcttc gcagaccagc ccatccagat ctatgagaag atcgtctctg	960
ggaaggtgcg ctcccttctc cacttcagct ctgacttgaa ggacctgctg cggaacctcc	1020
tgcaggtaga tctaccaag cgctttggga acctcaagaa tggggtcaac gatataaga	1080
accacaagtg gtttgccaca actgactgga ttgccatcta ccagaggaag gtggaagtc	1140
ccttcatacc aaagttttaa ggccctgggg atacagtaa ctttgacgac tatgaggaag	1200

```

aagaaatccg ggtctccatc aatgagaagt gtggcaagga gttttctgag ttttaggggc 1260
atgcctgtgc ccccatgggt tttctttttt cttttttctt ttttttggtc gggggggtgg 1320
gagggttgga ttgaacagcc agagggcccc agagtccctt gcatctaatt tcacccccac 1380
cccaccctcc aggggttaggg ggagcaggaa gccagataa tcagagggac agaaacacca 1440
gctgctcccc ctcatccctt tcaccctcct gccccctctc ccacttttcc ctctctcttt 1500
ccccacagcc cccagcccc tcagccctcc cagcccactt ctgcctgttt taaacgagtt 1560
tctcaactcc agtcagacca ggtcttgctg gtgtatccag ggacagggtg tggaaagagg 1620
ggctcacgct taactccagc cccacccac acccccatcc cacccaacca caggccccac 1680
ttgctaaggg caaatgaacg aagegccaac ctctctttcg gagtaatcct gcctgggaag 1740
gagagatttt tagtgacatg ttcagtgggt tgcttgctag aattttttta aaaaaacaac 1800
aattttaaatt cttatttaag ttccaccagt gcctccctcc ctctctctc tactcccacc 1860
cctcccatgt cccccattc ctcaaateca ttttaaagag aagcagactg actttggaag 1920
gggaggcgct ggggtttgaa cctccccgct gctaattctc cctgggcccc tccccgggga 1980
atcctctctg ccaatcctgc gagggcttag gcccctttag gaagcctccg ctctcttttt 2040
ccccaacaga cctgtcttca cccttgggct ttgaaagcca gacaaagcag ctgcccctct 2100
ccctgccaaa gaggagtcac cccccaaaaa gacagagggg gagccccaag cccaagtctt 2160
tcctcccagc agcgtttccc cccaactcct taattttatt ctccgctaga ttttaacgct 2220
cagccttccc tcagctgagt ggggagggca tccctgcaaa aggggaacaga agaggccaag 2280
tcccccaag ccacggcccg gggttcaagg ctagagctgc tggggagggg ctgcctgttt 2340
tactaccca ccagcttccg cctcccccat cctgggcgcc cctcctccag cttagctgtc 2400
agctgtccat cacctctccc ccactttctc atttgtgctt ttttctctcg taatagaaaa 2460
gtggggagcc gctggggagc cacccttctc atccccgtat ttccccctct cataacttct 2520
ccccatcca ggaggagttc tcaggcctgg ggtggggccc cgggtgggtg cgggggcgat 2580
tcaacctgtg tgctgcgaag gacgagactt cctcttgaac agtgtgctgt tgtaaacata 2640
tttgaaaact attaccaata aagttttgtt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2689

```

<210>30

<211>351

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>30

```

Met Gly Asn Ala Ala Ala Ala Lys Lys Gly Ser Glu Gln Glu Ser Val
1           5           10           15
Lys Glu Phe Leu Ala Lys Ala Lys Glu Asp Phe Leu Lys Lys Trp Glu
           20           25           30
Ser Pro Ala Gln Asn Thr Ala His Leu Asp Gln Phe Glu Arg Ile Lys
           35           40           45
Thr Leu Gly Thr Gly Ser Phe Gly Arg Val Met Leu Val Lys His Lys

```


50	55	60
Glu Thr Gly Asn His Tyr Ala Met Lys Ile Leu Asp Lys Gln Lys Val		
65	70	75
Val Lys Leu Lys Gln Ile Glu His Thr Leu Asn Glu Lys Arg Ile Leu		
85	90	95
Gln Ala Val Asn Phe Pro Phe Leu Val Lys Leu Glu Phe Ser Phe Lys		
100	105	110
Asp Asn Ser Asn Leu Tyr Met Val Met Glu Tyr Val Pro Gly Gly Glu		
115	120	125
Met Phe Ser His Leu Arg Arg Ile Gly Arg Phe Ser Glu Pro His Ala		
130	135	140
Arg Phe Tyr Ala Ala Gln Ile Val Leu Thr Phe Glu Tyr Leu His Ser		
145	150	155
Leu Asp Leu Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Pro Glu Asn Leu Leu Ile Asp		
165	170	175
Gln Gln Gly Tyr Ile Gln Val Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys Arg Val		
180	185	190
Lys Gly Arg Thr Trp Thr Leu Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro		
195	200	205
Glu Ile Ile Leu Ser Lys Gly Tyr Asn Lys Ala Val Asp Trp Trp Ala		
210	215	220
Leu Gly Val Leu Ile Tyr Glu Met Ala Ala Gly Tyr Pro Pro Phe Phe		
225	230	235
Ala Asp Gln Pro Ile Gln Ile Tyr Glu Lys Ile Val Ser Gly Lys Val		
245	250	255
Arg Phe Pro Ser His Phe Ser Ser Asp Leu Lys Asp Leu Leu Arg Asn		
260	265	270
Leu Leu Gln Val Asp Leu Thr Lys Arg Phe Gly Asn Leu Lys Asn Gly		
275	280	285
Val Asn Asp Ile Lys Asn His Lys Trp Phe Ala Thr Thr Asp Trp Ile		
290	295	300
Ala Ile Tyr Gln Arg Lys Val Glu Ala Pro Phe Ile Pro Lys Phe Lys		
305	310	315
Gly Pro Gly Asp Thr Ser Asn Phe Asp Asp Tyr Glu Glu Glu Glu Ile		
325	330	335
Arg Val Ser Ile Asn Glu Lys Cys Gly Lys Glu Phe Ser Glu Phe		
340	345	350

<210>31

<211>4

<212>PRT

<213>PKIB 中的 PKA-C- 结合序列

<400>31

Arg Arg Asn Ala

1

<210>32

<211>649

<212>PRT

<213>胞外域

<400>32

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

195	200	205
Pro Ser Thr Pro Gly Tyr	Pro Ser Val Asp Glu Ser Phe Arg Gln Ser	
210	215	220
Arg Ser Asn Leu Thr Ser Leu Leu Val Gln Pro Ile Ser Ala Ser Leu		
225	230	235
Val Ala Lys Leu Ile Ser Ser Pro Lys Ala Arg Thr Lys Asn Glu Ala		240
245	250	255
Cys Ser Ser Leu Glu Leu Pro Asn Asn Glu Ile Arg Val Val Ser Met		
260	265	270
Gln Val Gln Thr Val Thr Lys Leu Lys Thr Val Thr Asn Val Val Gly		
275	280	285
Phe Val Met Gly Leu Thr Ser Pro Asp Arg Tyr Ile Ile Val Gly Ser		
290	295	300
His His His Thr Ala His Ser Tyr Asn Gly Gln Glu Trp Ala Ser Ser		
305	310	315
Thr Ala Ile Ile Thr Ala Phe Ile Arg Ala Leu Met Ser Lys Val Lys		
325	330	335
Arg Gly Trp Arg Pro Asp Arg Thr Ile Val Phe Cys Ser Trp Gly Gly		
340	345	350
Thr Ala Phe Gly Asn Ile Gly Ser Tyr Glu Trp Gly Glu Asp Phe Lys		
355	360	365
Lys Val Leu Gln Lys Asn Val Val Ala Tyr Ile Ser Leu His Ser Pro		
370	375	380
Ile Arg Gly Asn Ser Ser Leu Tyr Pro Val Ala Ser Pro Ser Leu Gln		
385	390	395
Gln Leu Val Val Glu Lys Asn Asn Phe Asn Cys Thr Arg Arg Ala Gln		
405	410	415
Cys Pro Glu Thr Asn Ile Ser Ser Ile Gln Ile Gln Gly Asp Ala Asp		
420	425	430
Tyr Phe Ile Asn His Leu Gly Val Pro Ile Val Gln Phe Ala Tyr Glu		
435	440	445
Asp Ile Lys Thr Leu Glu Gly Pro Ser Phe Leu Ser Glu Ala Arg Phe		
450	455	460
Ser Thr Arg Ala Thr Lys Ile Glu Glu Met Asp Arg Ser Phe Asn Leu		
465	470	475
His Glu Thr Ile Thr Lys Leu Ser Gly Glu Val Ile Leu Gln Ile Ala		
485	490	495
Asn Glu Pro Val Leu Pro Phe Asn Ala Leu Asp Ile Ala Leu Glu Val		
500	505	510

Gln Asn Asn Leu Lys Gly Asp Gln Pro Asn Thr His Gln Leu Leu Ala
 515 520 525
 Met Ala Ser Arg Leu Arg Glu Ser Ala Glu Leu Phe Gln Ser Asp Glu
 530 535 540
 Met Arg Pro Ala Asn Asp Pro Lys Glu Arg Ala Pro Ile Arg Ile Arg
 545 550 555 560
 Met Leu Asn Asp Ile Leu Gln Asp Met Glu Lys Ser Phe Leu Val Lys
 565 570 575
 Gln Ala Pro Pro Gly Phe Tyr Arg Asn Ile Leu Tyr His Leu Asp Glu
 580 585 590
 Lys Thr Ser Arg Phe Ser Ile Leu Ile Glu Ala Trp Glu His Cys Lys
 595 600 605
 Pro Leu Ala Ser Asn Glu Thr Leu Gln Glu Ala Leu Ser Glu Val Leu
 610 615 620
 Asn Ser Ile Asn Ser Ala Gln Val Tyr Phe Lys Ala Gly Leu Asp Val
 625 630 635 640
 Phe Lys Ser Val Leu Asp Gly Lys Asn
 645

<210>33

<211>20

<212>PRT

<213> 用于制备抗体的人工合成的表位肽

<400>33

Ser Ala Arg Ala Gly Arg Arg Asn Ala Leu Pro Asp Ile Gln Ser Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Thr Asp
 20

<210>34

<211>20

<212>PRT

<213> 用于制备抗体的人工合成的表位肽

<400>34

Lys Glu Lys Asp Glu Lys Thr Thr Gln Asp Gln Leu Glu Lys Pro Gln
 1 5 10 15
 Asn Glu Glu Lys

20

<210>35

<211>480

<212>PRT

<213>人 (Homo sapiens)

<400>35

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

	245	250	255
Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr			
	260	265	270
Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile			
	275	280	285
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala			
	290	295	300
Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val			
305	310	315	320
Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly			
	325	330	335
Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln			
	340	345	350
Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe			
	355	360	365
Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu			
	370	375	380
Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys			
385	390	395	400
Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val			
	405	410	415
Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu			
	420	425	430
Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr			
	435	440	445
Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu			
	450	455	460
Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala			
465	470	475	480

<210>36

<211>3008

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>36

taattatggg tctgtaacca cctggactg ggtgctcctc actgacggac ttgtctgaac	60
ctctcttttgt ctccagegcc cagcactggg cctggcaaaa cctgagacgc ccggtacatg	120
ttggccaaat gaatgaacca gattcagacc ggcaggggcg ctgtgggttta ggaggggacct	180
ggggttttctc ccaggagggtt tttgggcttg cgctggaggg ctctggactc ccgtttgcgc	240

cagtggcctg	catectggtc	ctgtcttccct	catgtttgaa	tttcttttgc	ttcctagtct	300
ggggagcagg	gaggagccct	gtgccctgtc	ccaggatcca	tgggtaggaa	caccatggac	360
agggagagca	aacggggcca	tctgtcacca	ggggcttagg	gaaggccgag	ccagcctggg	420
tcaaagaagt	caaaggggct	gcctggagga	ggcagcctgt	cagctgggtc	atcagaggct	480
gtggccaggc	cagctgggct	cggggagcgc	cagcctgaga	ggagcgcgtg	agcgtcgcgg	540
gagcctcggg	caccatgagc	gacgtggcta	ttgtgaagga	gggttggctg	cacaaacgag	600
gggagtacat	caagacctgg	cggccacgct	acttctctct	caagaatgat	ggcaccttca	660
ttggctacaa	ggagcggccg	caggatgtgg	accaacgtga	ggctccccct	aacaacttct	720
ctgtggcgca	gtgccagctg	atgaagacgg	agcggccccg	gccaacacc	ttcatcatcc	780
gctgcctgca	gtggaccact	gtcatcgaac	gcaccttcca	tgtggagact	cctgaggagc	840
gggaggagtg	gacaaccgcc	atccagactg	tggctgacgg	cctcaagaag	caggaggagg	900
aggagatgga	cttccggctg	ggctcaccca	gtgacaactc	aggggctgaa	gagatggagg	960
tgtccctggc	caagcccaag	caccgcgtga	ccatgaacga	gtttgagtac	ctgaagctgc	1020
tgggcaaggg	cactttcggc	aaggtgatcc	tgggtgaagga	gaaggccaca	ggccgctact	1080
acgccatgaa	gacctcaag	aaggaagtca	tctgtggcaa	ggacgagggtg	gcccacacac	1140
tcaccgagaa	ccgcgtcctg	cagaactcca	ggcacccctt	cctcacagcc	ctgaagtact	1200
ctttccagac	ccacgaccgc	ctctgctttg	tcatggagta	cgccaacggg	ggcgagctgt	1260
tcttccacct	gtcccgagg	cgtgtgttct	ccgaggaccg	ggcccgcctt	tatggcgctg	1320
agattgtgtc	agccctggac	tacctgcact	cggagaagaa	cgtgggtgtac	cgggacctca	1380
agctggagaa	cctcatgctg	gacaaggacg	ggcacattaa	gatcacagac	ttcgggctgt	1440
gcaaggaggg	gatcaaggac	ggtgccacca	tgaagacctt	ttgcggcaca	cctgagtacc	1500
tggcccccga	ggtgctggag	gacaatgact	acggccgtgc	agtggactgg	tgggggctgg	1560
gcgtggctcat	gtacgagatg	atgtgcggtc	gcctgccctt	ctacaaccag	gacctgaga	1620
agctttttga	gtcctcctc	atggaggaga	tccgcttccc	gcgcacgctt	ggtcccagg	1680
ccaagtcctt	gctttcagg	ctgctcaaga	aggaccccaa	gcagaggctt	ggcgggggct	1740
ccgaggacgc	caaggagatc	atgcagcatc	gcttctttgc	cggtatcgtg	tggcagcacg	1800
tgtacgagaa	gaagctcagc	ccaccttcca	agccccaggt	cacgtcggag	actgacacca	1860
ggtattttga	tgaggagttc	acggcccaga	tgatcaccat	cacaccacct	gaccaagatg	1920
acagcatgga	gtgtgtggac	agcgagcgca	ggccccactt	ccccagttc	tcctactcgg	1980
ccagcggcac	ggcctgaggc	ggcggtggac	tgcgctggac	gatagcttgg	agggatggag	2040
aggcggcctc	gtgcatgat	ctgtatttaa	tggtttttat	ttctcgggtg	catttgagag	2100
aagccacgct	gtcctctcga	gccagatgg	aaagacgttt	ttgtgctgtg	ggcagcacc	2160
tccccgcag	cggggtaggg	aagaaaacta	tcctgcgggt	tttaatttat	ttcatccagt	2220
ttgttctccg	ggtgtggcct	cagccctcag	aacaatccga	ttcacgtagg	gaaatgttaa	2280
ggacttctgc	agctatgcgc	aatgtggcat	tggggggccg	ggcaggctcct	gcccattgtg	2340
ccccctacte	tgtcagccag	ccgccctggg	ctgtctgtca	ccagctatct	gtcatctctc	2400
tggggccctg	ggcctcagtt	caacctgggtg	gcaccagatg	caacctcact	atgggtatgt	2460
ggccagcacc	ctctcctggg	ggtggcaggc	acacagcagc	ccccagcac	taaggccgtg	2520
tctctgagga	cgtcatcgga	ggctgggccc	ctgggatggg	accagggatg	ggggatgggc	2580

cagggtttac ccagtgggac agaggagcaa ggtttaaatt tgttattgtg tattatgttg	2640
ttcaaatagca ttttggggggt ttttaattctt tgtgacagga aagccctccc cttccctctt	2700
ctgtgtcaca gttcttggtg actgtccac cgggagcctc cccctcagat gatctctcca	2760
cggtagcact tgaccttttc gacgcttaac ctttcgctg tcgccccagg ccctccctga	2820
ctccctgtgg ggggtggccat ccctgggccc ctccacgcct cctggccaga cgctgccgct	2880
gccgctgcac cacggcgttt ttttacaaca ttcaacttta gtatttttac tattataata	2940
taatatggaa cttccctcc aaattcttca ataaaagttg cttttcaaaa aaaaaaaaaa	3000
aaaaaaaa	3008

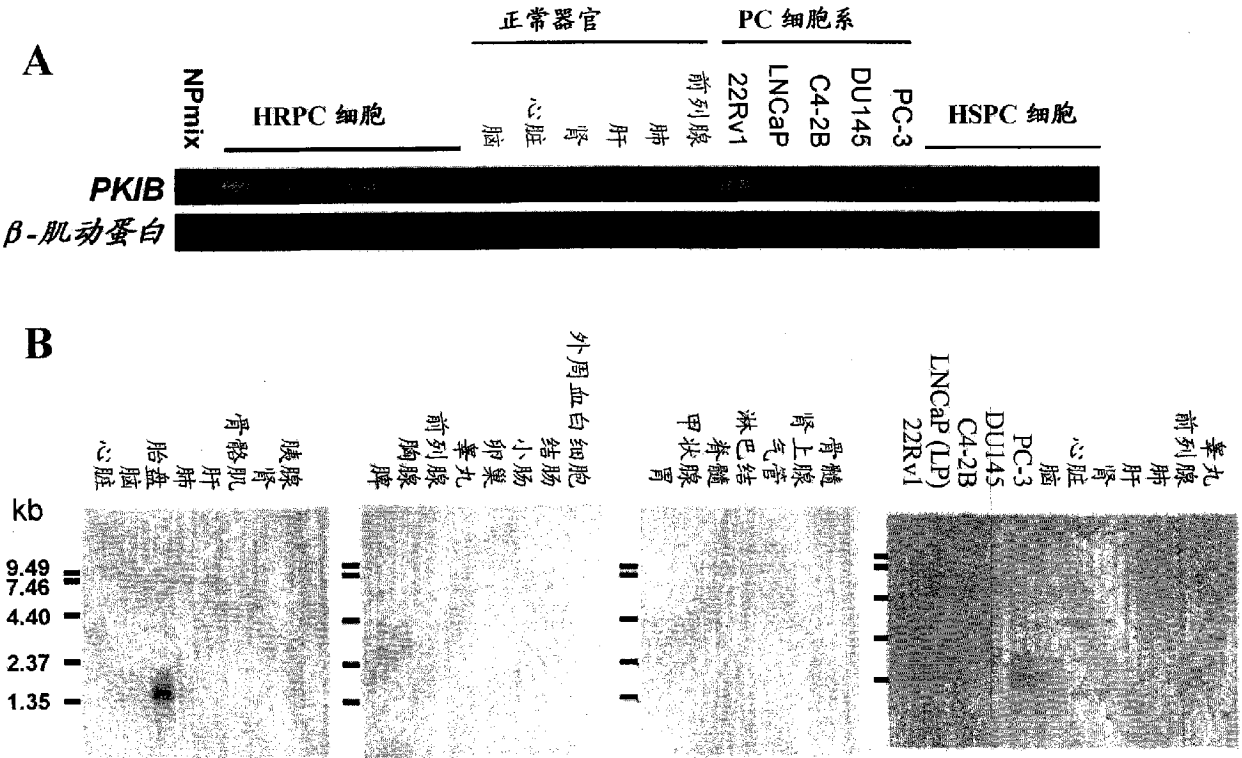


图 1

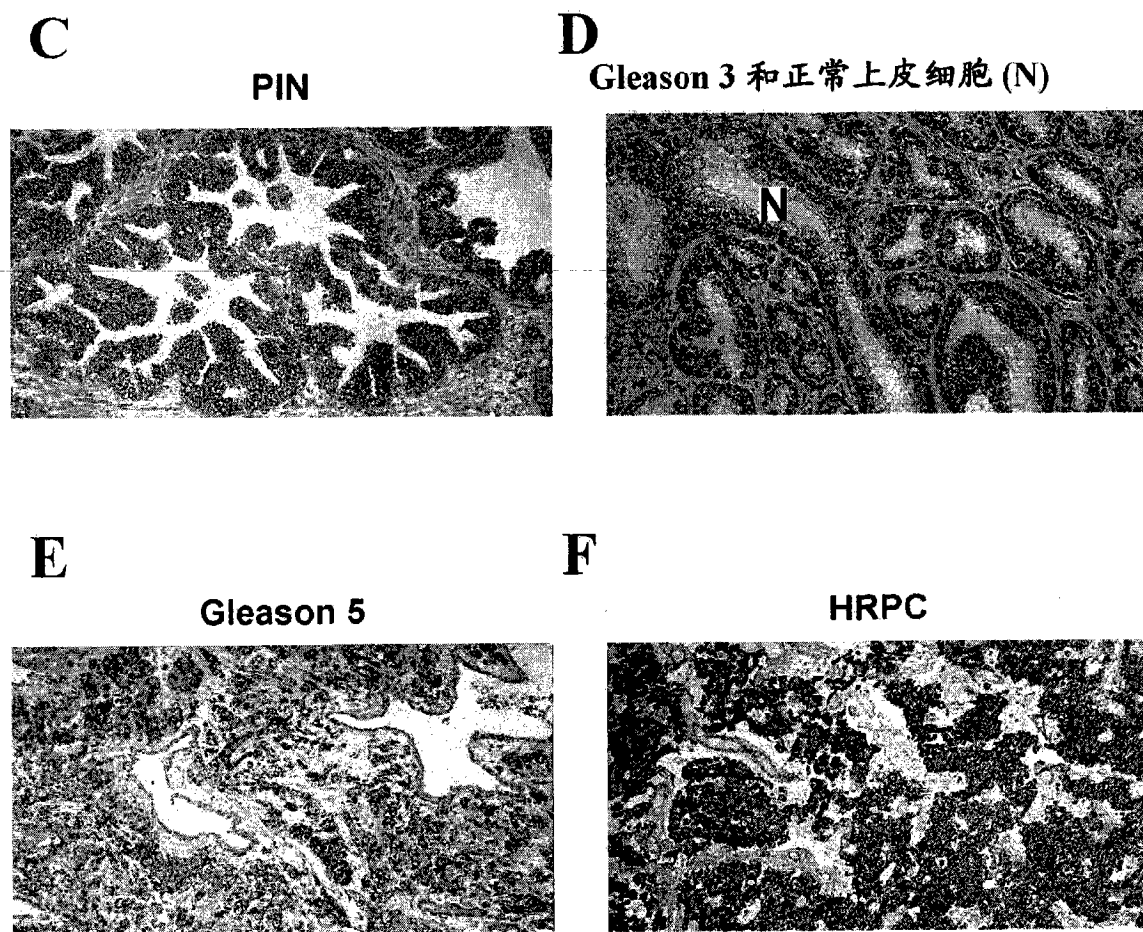


图 1(续)

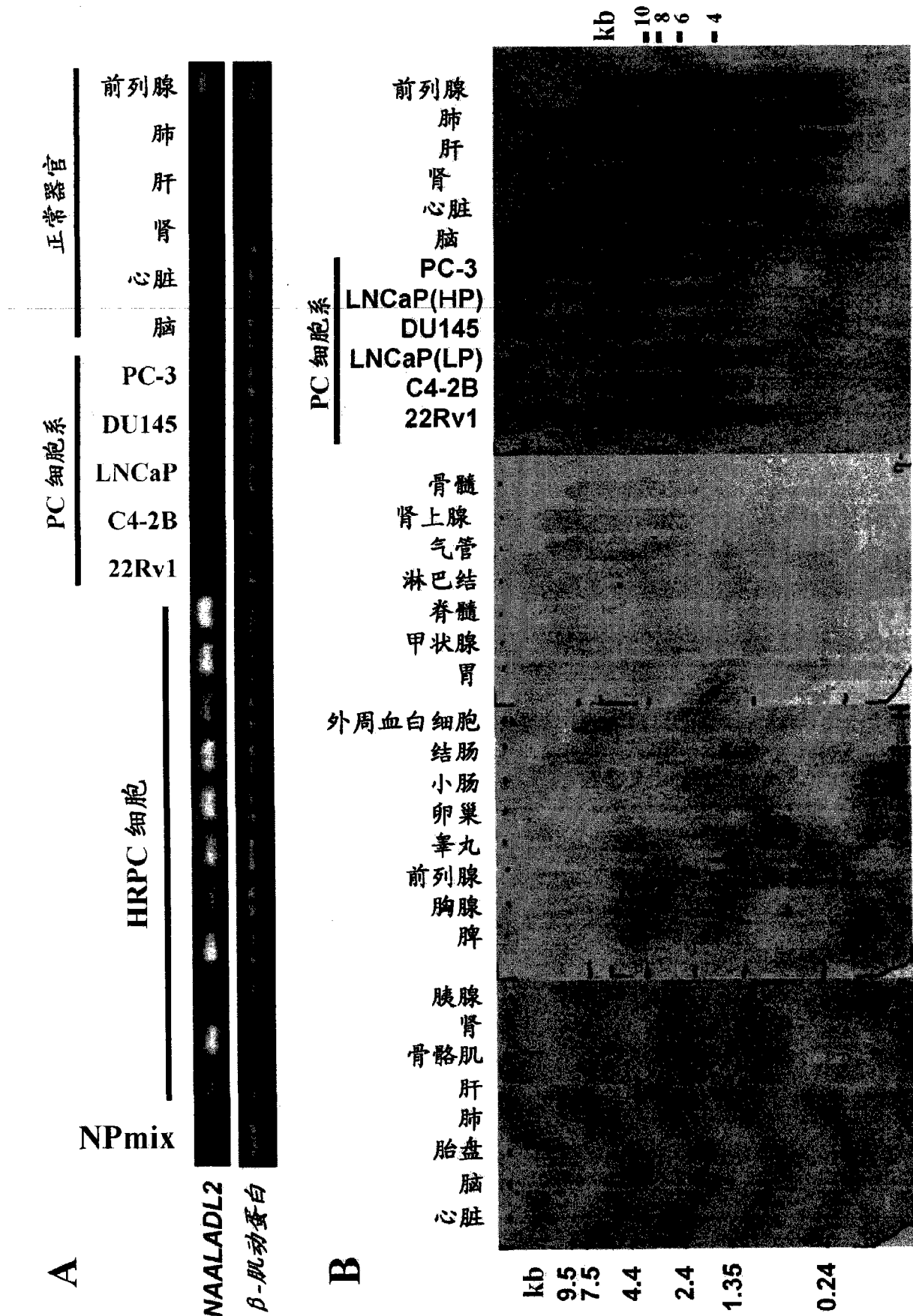


图 2

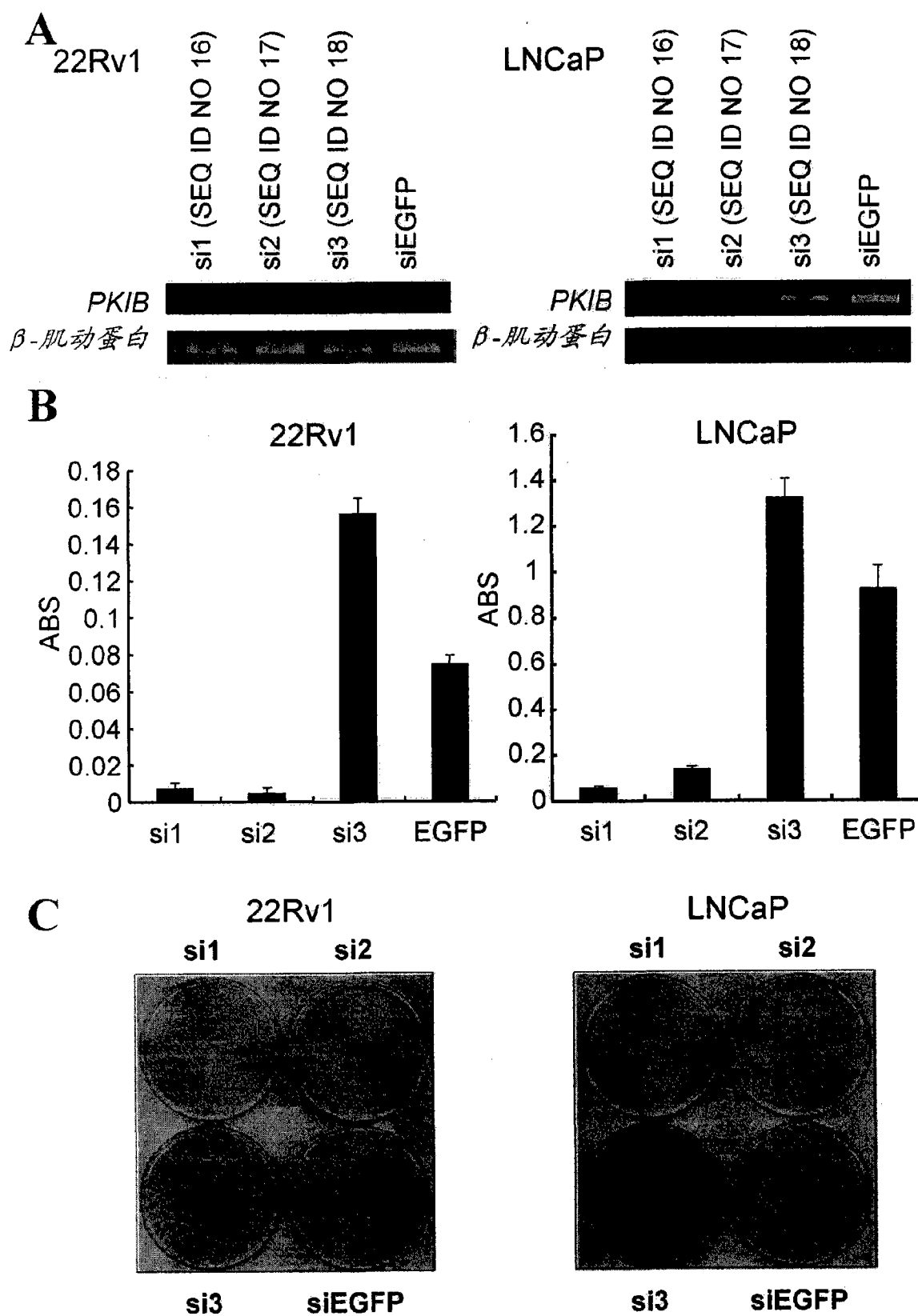


图 3

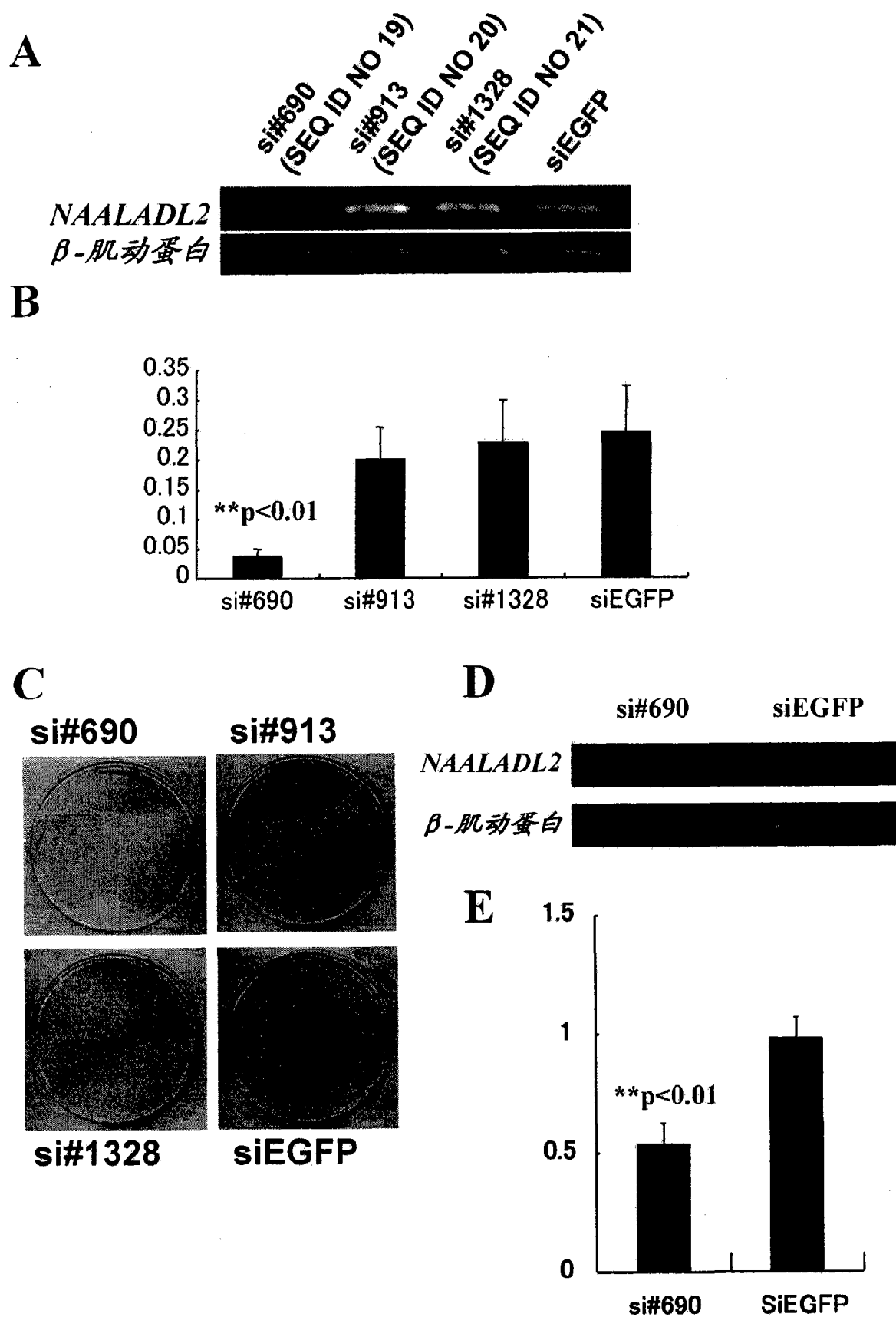


图 4

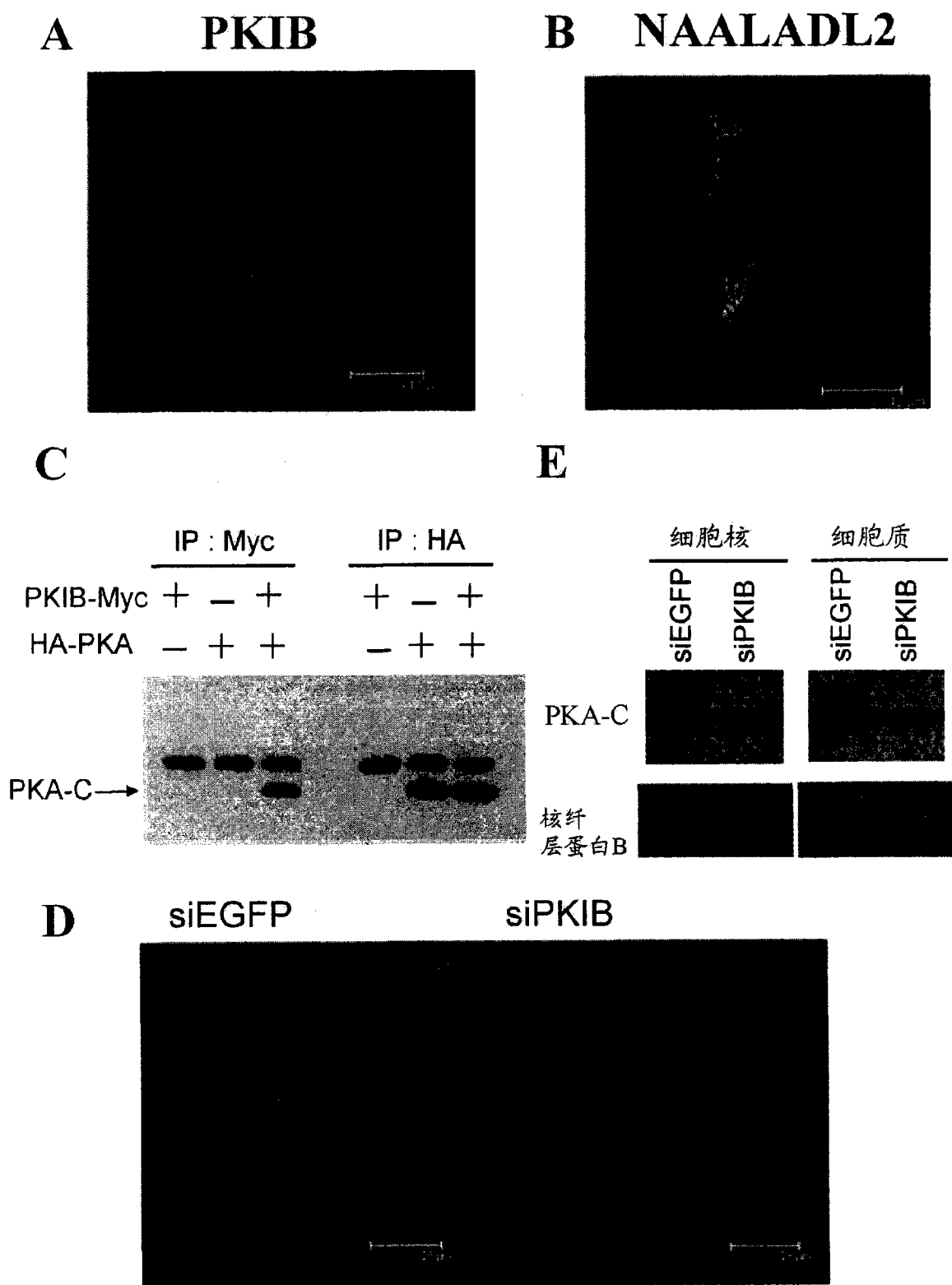


图 5

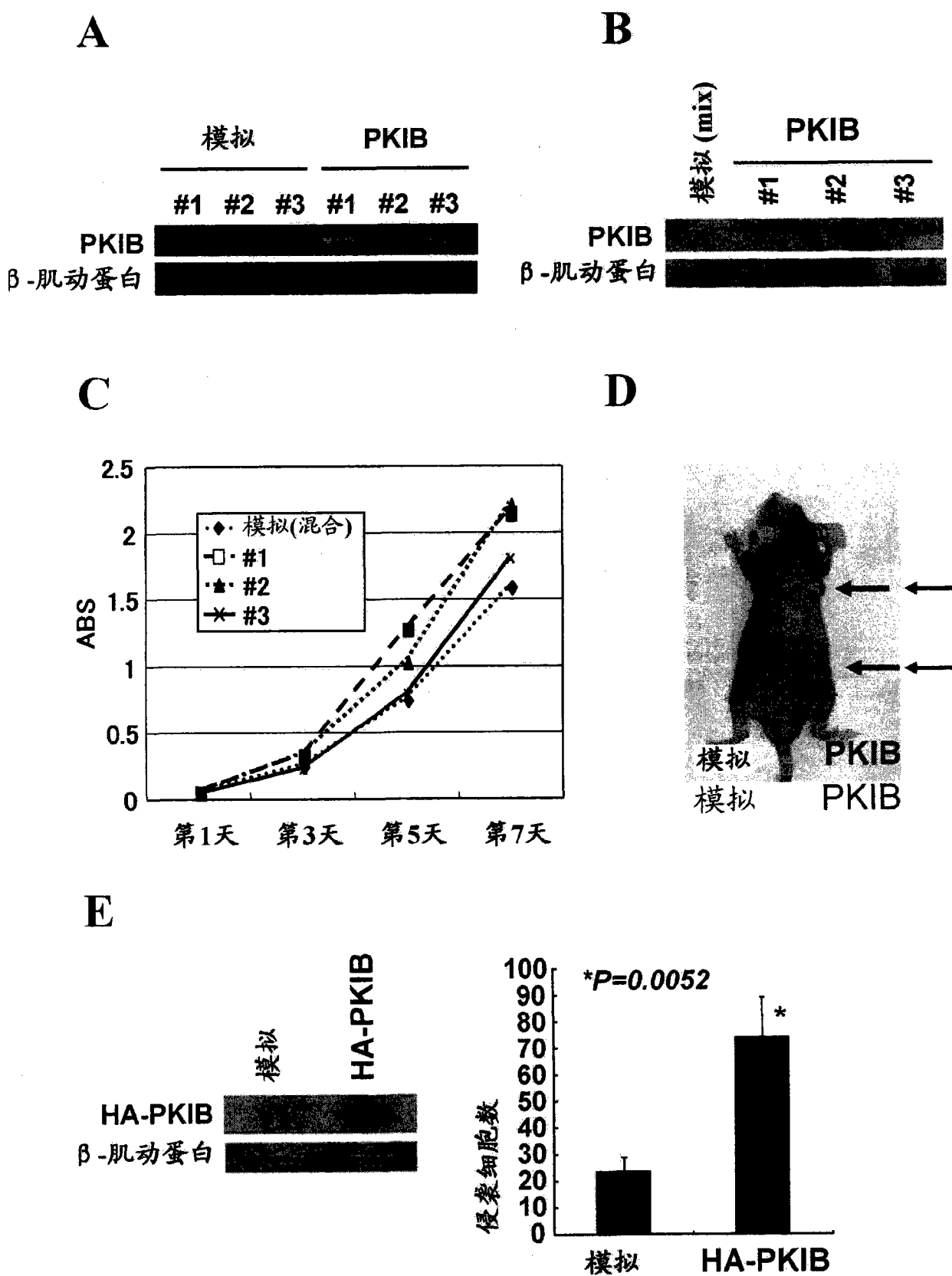


图 6

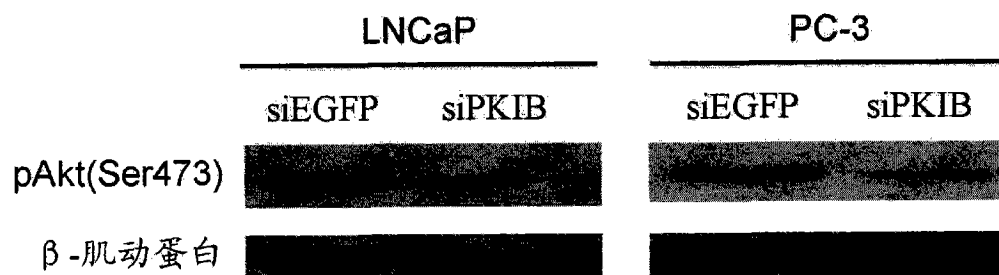
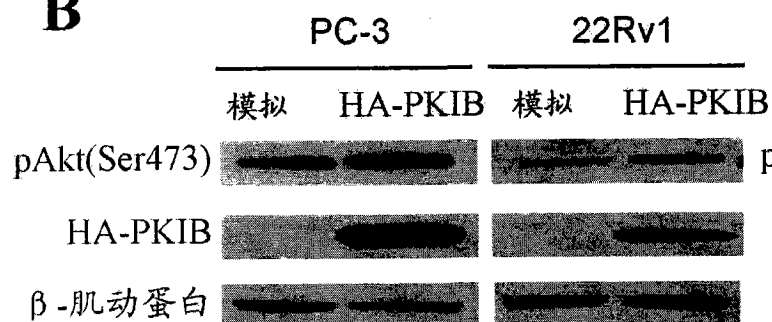
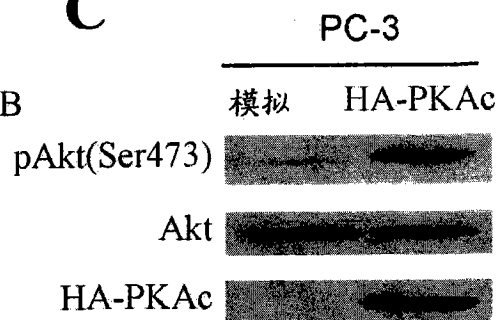
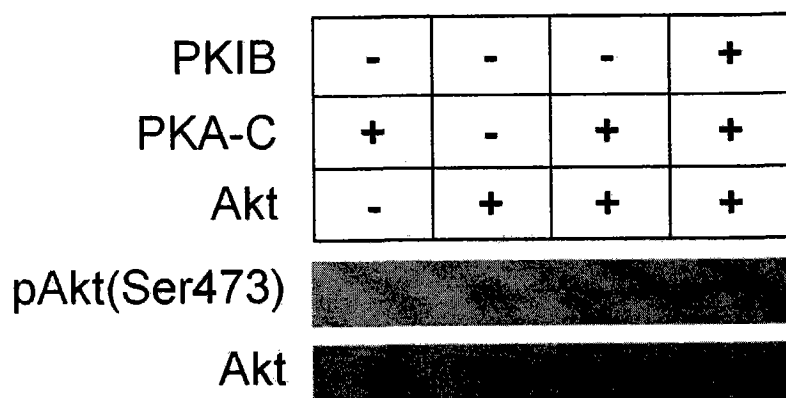
A**B****C****D**

图 7

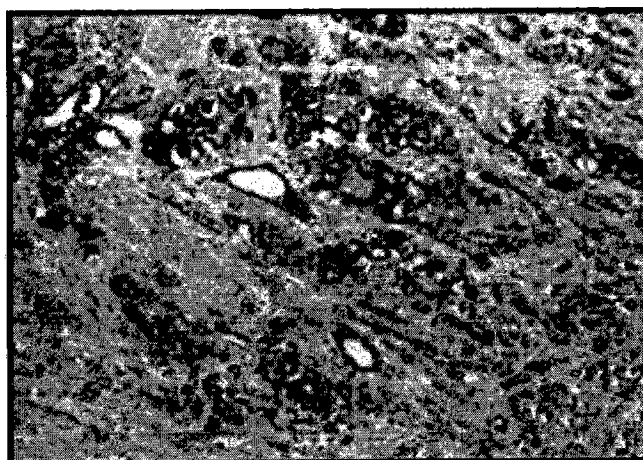
A PKIB**B pAkt (Ser473)**

图 8