

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/685 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680015221.X

[43] 公开日 2008 年 6 月 4 日

[11] 公开号 CN 101193643A

[22] 申请日 2006.3.27

[21] 申请号 200680015221.X

[30] 优先权

[32] 2005.3.25 [33] US [31] 60/665,105

[86] 国际申请 PCT/US2006/011027 2006.3.27

[87] 国际公布 WO2006/104975 英 2006.10.5

[85] 进入国家阶段日期 2007.11.2

[71] 申请人 ALT 解决方案公司

地址 美国特拉华州

[72] 发明人 I·E·博恩达尔耶夫

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
代理人 孟凡宏

权利要求书 3 页 说明书 22 页 附图 3 页

[54] 发明名称

端粒酶阳性细胞中端粒长度的调节和癌症治疗

[57] 摘要

本发明公开了使用无环核苷类似物诱导端粒酶阳性癌细胞的端粒缩短、G2 停滞和细胞凋亡。另外，还公开了削弱或防止致肿瘤端粒酶阳性细胞有机会生长为肿瘤的方法，以及使用无环核苷类似物促进肿瘤消退(形成的肿瘤的尺寸缩小)的方法。

1. 一种在哺乳动物或人体中预防或治疗由于存在不恰当或病理性增殖的细胞或无限增殖细胞而引起的疾病或治疗癌症的方法，该方法包括向患有癌症的人施用治疗有效量的包含一种或多种无环核苷类似物或其药学可接受的盐的组合物，其中所述核苷类似物诱导所述细胞中的端粒缩短。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述核苷类似物选自：阿昔洛韦、更昔洛韦和喷昔洛韦或其前药。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述癌症选自：骨癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、脑癌、卵巢癌、子宫癌、睾丸癌、皮肤癌、白血病、黑素瘤、食管癌、胃癌、结肠癌、视网膜癌、或膀胱癌。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述组合物通过口服、非肠道、皮下、肌肉内或静脉内施用。

5. 权利要求 2 的方法，其中施用包含两种或多种所述核苷类似物的组合物。

6. 权利要求 1 的方法，其中所述核苷类似物之一的施用量为每天大约 10mg/kg 体重到大约 150mg/kg 体重。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述核苷类似物与不同类型的类似物联合施用，该不同类型的类似物选自：3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷 (AZT)、2',3'-双脱氧肌苷 (ddI)、2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸苷 (d4T)，其中该不同类型的类似物以低剂量存在，其单独时不足以治疗癌症。

8. 一种减少端粒酶阳性癌细胞中端粒延长的方法，该方法包括给细胞施用有效量的无环核苷类似物，其中所述核苷类似物诱导所述细胞中的端粒缩短。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述核苷类似物选自：阿昔洛韦、更昔洛韦和喷昔洛韦或其前药。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述核苷类似物与不同类型的类似

物联合施用，该不同类型的类似物选自：3'-叠氮-2',3'-双脱氧胸苷（AZT）、2',3'-双脱氧肌苷（ddI）、2',3'-双脱氢-3'-脱氧胸苷（d4T），其中该不同类型的类似物以低剂量存在，其单独时不足以终止端粒的延长。

11. 权利要求 8 的方法，其中所述癌细胞是乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、肝癌细胞、骨癌细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞、脑癌细胞、卵巢癌细胞、子宫癌细胞、睾丸癌细胞、皮肤癌细胞、白血病细胞、食管癌细胞、胃癌细胞、结肠癌细胞、视网膜癌细胞、或膀胱癌细胞或这些细胞的组合。

12. 一种防止或抑制端粒酶阳性细胞生长的方法，该方法包括使细胞接触足量的无环核苷类似物，从而实现所述细胞中端粒缩短、G2 停滞和细胞凋亡的诱导。

13. 权利要求 12 的方法，其中细胞与浓度为大约 1.5 μ M 至 3.0 μ M 的核苷类似物接触。

14. 权利要求 12 的方法，其中所述核苷类似物是阿昔洛韦、更昔洛韦或喷昔洛韦或其前药。

15. 权利要求 12 的方法，其中所述端粒酶阳性细胞是癌细胞，其中该癌细胞选自：骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质瘤和黑素瘤。

16. 一种对需要的人预防癌症的方法，其中所述癌症是由于该人细胞中的端粒酶活性引起的，该方法包括给所述人施用治疗有效量的含有一种或多种无环核苷类似物或其药学可接受的盐的组合物，其中所述核苷类似物削弱或阻止致肿瘤端粒酶阳性细胞有机会生长为癌。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述癌症选自：骨癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、肺癌、脑癌、卵巢癌、子宫癌、睾丸癌、皮肤癌、白血病、黑素瘤、食管癌、胃癌、结肠癌、视网膜癌、或膀胱癌。

18. 一种促进端粒酶阳性癌细胞中的细胞凋亡的方法，包括给所

述细胞施用治疗有效量的含有一种或多种无环核苷类似物或其药学可接受的盐的组合物，其中所述核苷类似物诱导所述细胞中的端粒缩短。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述核苷类似物诱导 G2 停滞。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述癌细胞是乳腺癌细胞、前列腺癌细胞、肝癌细胞、骨癌细胞、胰腺癌细胞、肺癌细胞、脑癌细胞、卵巢癌细胞、子宫癌细胞、睾丸癌细胞、皮肤癌细胞、白血病细胞、食管癌细胞、胃癌细胞、结肠癌细胞、视网膜癌细胞、或膀胱癌细胞或这些细胞的组合。

端粒酶阳性细胞中端粒长度的调节和癌症治疗

本申请要求 2005 年 3 月 25 日提交的美国临时申请 No. 60/665, 105 的优先权, 申请 60/665, 105 的公开内容全文引入本文作为参考。

技术领域

本发明涉及癌症治疗领域。特别是, 本发明涉及端粒酶阳性细胞中端粒延长的调节。更特别地, 本发明涉及包括更昔洛韦 (GCV)、阿昔洛韦 (ACV) 及其酯前药在内的无环 (acyclic) 核苷类似物在干扰端粒延长、诱导细胞凋亡以及治疗或预防端粒酶阳性癌症中的用途。

背景技术

DNA 的前导链和后随链合成中的不对称造成了线性基因组复制的“终结问题”¹。为了克服这个问题, 真核染色体具有特化的末端结构, 即由 TTAGGG 重复组成的端粒²。端粒酶^{3,4}是延长端粒并因此在细胞倍增期间保持大多数癌细胞的染色体稳定性的核糖核蛋白酶⁵。在细胞倍增期间 DNA 从端粒末端的逐渐损失与体细胞中细胞增殖潜力的控制有关⁶。

正常培养的人类细胞在培养中具有有限的复制潜力。培养中的正常细胞进行复制直到它们达到群体生长停止的离散点。这被称为死亡期 1 (M1 期), 是由于少数端粒缩短到导致被称为细胞老化的生长停滞的大小而引起的。这个阶段能够通过消除 p53 和 pRB 人肿瘤抑制基因的功能而被绕过。之后该细胞可继续增殖而端粒长度进一步变短, 直到另一个被称为死亡期 2 (M2 期) 或转折期的限制点。在 M2 期的生长停滞是由细胞增殖和细胞死亡速率之间的平衡引起的。在这个阶段, 当大多数端粒非常短的时候, 末端到末端的融合

和染色体断裂 - 融合引起显著的染色体异常和细胞凋亡。在很少情况下, 细胞能够脱离 M2 并通过稳定其端粒的长度而变为无限增殖的。这通过端粒酶活化或替代的端粒延长机制 (ALT) 而发生^{7,8}。

人类生殖系细胞⁹和多数癌细胞³表达端粒酶。端粒酶是延长端粒并因此在细胞倍增期间保持大多数癌细胞的染色体稳定性的核糖核蛋白酶¹⁰。实际上, 端粒酶对已缩短的端粒的延长是人类癌细胞中端粒维持的主要机制。端粒酶的抑制通过缩短端粒的长度而限制人类端粒酶阳性癌细胞的生长¹¹。

通过端粒酶延长已缩短的端粒是在人类癌细胞中维持端粒的众所周知的机制。从生物学的观点来看, 端粒酶在细胞分裂过程中通过在端粒的末端添加 TTAGGG 型的重复 DNA 序列 (端粒序列) 来延长端粒。通过这种作用, 端粒酶提供了染色体稳定性, 并且使细胞成为无限增殖的。为了获得作为研究该酶的有效工具的选择性抑制剂, 已经在无细胞系统中研究了核苷类似物的抑制作用 (Yamaguchi 等, (2001, Nucleic Acids Research Supplement No. 1 211-212)。由于增殖的细胞 (包括癌细胞) 表达端粒酶活性, 而正常人体细胞不象在癌细胞中所见到的那样以足以在多次细胞分裂中维持端粒长度的水平表达端粒酶活性, 因此端粒酶是治疗增生性疾病 (包括癌症) 的良好靶标。

当前, 以选择性治疗由端粒酶阳性细胞引起的癌症为目标的策略涉及通过反义策略、显性失活突变体或药理药物来调节 TERT 的功能或端粒的长度 (见, Bisoffi 等, Eur J Cancer, 1998, 34 : 1242-1249; Roth 等, Leukemia, 2003, 17 : 2410-2417; Damm 等, EMBO J., 2001, 20: 6958-6968; 美国专利 6,294, 332、6,194,206、6,156,763 和 6,046,307)。已经尝试用核苷类似物 (例如 AZT) 干扰人端粒酶活性以达到治疗癌症的目的。然而现有技术中公开的为了改变端粒酶活性而施用核苷类似物的方法不能令人满意, 或者不适合临床情况, 因为它们的临床应用受到低治疗比 (即毒性剂量与有效剂量之比) 的限制。

在药物浓度为 100 μ M (Murakami, J., Nagai. N., Shigemasa. K.,

Ohama. K. Inhibition of telomerase activity and cell proliferation by a reverse transcriptase inhibitor in gynaecological cancer cell lines. *Eur. J. Cancer* 35, 1027-1034 (1999))或甚至 800 μM (Gomez DE, Tejera AM, Olivero OA. Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) treatment. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 246(1): 107-10; Tejera AM, Alonso DF, Gomez DE, Olivero OA. Chronic in vitro exposure to 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine induces senescence and apoptosis and reduces tumorigenicity of metastatic mouse mammary tumor cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;65(2):93-9) 时, 端粒酶阳性细胞系长时间暴露于 AZT 不能诱导任何明显的端粒缩短。

服用 300 mg 单口服剂量的 AZT 后的血清浓度峰值小于 10 μM , 而在 0.5 小时内快速吸收(Morse GD, Olson J, Portmore A, Taylor C, Plank C, Reichman RC. Pharmacokinetics of orally administered zidovudine among patients with hemophilia and asymptomatic human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Antiviral Res.* 1989 Mar; 11(2):57-65)。按照 Retrovir® (AZT)生产商的推荐, 标准 AZT 治疗为, 对于成人, 每天以两次或三次分开的剂量给予 500 或 600 mg。已经报道在体外和体内甚至短时间暴露于浓度为 5 μM 的 AZT 也诱导不希望的对哺乳动物细胞的毒性作用(Roskrow M, Wickramasinghe SN. Acute effects of 3'-azido-3'-deoxythymidine on the cell cycle of HL60 cells. *Clin Lab Haematol.* 1990; 12(2): 177-84)。基于这些报道, 可以预测核苷类似物如 AZT 在足以提供抗端粒酶和抗肿瘤效力的高剂量时可能具有高毒性, 并且导致对人体中重要组织的损害。因此, 需要确定对人端粒酶具有调节或抑制活性的治疗性核苷类似物, 并且发展针对端粒酶引起无限增殖及不希望的增殖的癌症的治疗方法。

发明内容

本发明提供含有抗病毒核苷类似物的组合物和它们用于调节、抑制或阻止真核细胞端粒酶活性以及治疗增生性疾病(包括癌症)的

方法。更具体地，本发明公开了无环核苷类似物或那些具有抗疱疹病毒剂和抗巨细胞病毒剂活性的核苷类似物可以改变增殖细胞（包括癌细胞）中的端粒酶活性，因此起抗肿瘤剂的作用。在本发明的一个方面，已经发现用更昔洛韦或阿昔洛韦处理端粒酶阳性细胞诱导进行性的端粒丢失、G2 期停滞、染色体异常和最终的细胞死亡

进一步，这些抗肿瘤核苷类似物对端粒酶具有惊人的效果，其临床可接受的水平在增殖的细胞中足以控制端粒酶活性并且诱导细胞死亡。这些发现现在为以端粒酶活性为特征的癌症（端粒酶阳性癌症）的治疗或预防提供了新的治疗途径。

当前，在应用中还没有基于无环、抗端粒酶和抗肿瘤核苷类似物的治疗性组合物。申请人第一次披露了使用无环核苷类似物（在此也被称为端粒酶的抑制剂或拮抗剂）在体内抑制端粒酶在治疗上具有益处。而且，在该公开之前，本领域技术人员没有认识到可以预测这种处理具有治疗上的用途。

由于端粒酶参与控制细胞周期、细胞复制和老化，本发明的含有核苷类似物的组合物可以阻止或控制不受控制的细胞生长和肿瘤细胞的无限增殖。本发明的组合物特别可用于治疗细胞增殖性疾病，特别是以端粒酶保持端粒为特征的人类肿瘤。

因此，一方面，本发明提供了一种治疗与端粒酶有关的、特别是细胞中端粒酶活性水平升高的疾病的方法。该方法包括给细胞或需要治疗的哺乳动物施用一种组合物，该组合物含有治疗有效量的至少一种为无环、抗端粒酶和抗肿瘤剂的核苷类似物。端粒酶活性水平可以如下所述测定，或者通过任意其他现有的方法或等同的方法测定。端粒酶活性的“升高的水平”是指特定细胞中端粒酶活性的绝对水平与受试者或个体的正常细胞相比升高，或者与未患该疾病的其他受试者或个体的正常细胞相比升高。这些疾病的例子包括癌症，或与通常不存在于个体中的细胞的存在有关的疾病。在一个实施方案中，组合物含有除 AZT、ddI、ddA、d4T 以外的核苷类似物(Strahl C, Blackburn EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on

telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Mol Cell Biol.* 1996;16(1):53-65)。优选地，该组合物含有 GCV 或 ACV 或它们的前药。在另一实施方案中，这些组合物还可含有临床上可接受的水平的 AZT。这些端粒酶抑制剂（直接抑制端粒酶活性或间接整合到端粒中从而阻止端粒进一步延长）的应用将导致在端粒酶具有活性的肿瘤中端粒进行性缩短。一旦端粒长度缩短到临界长度，肿瘤就进入转折期并最终死亡。这些端粒酶抑制剂对正常体细胞没有影响或者只有极小的影响，因为正常细胞中的端粒酶活性通常较低或者检测不到。

干扰端粒酶活性可能直接导致细胞死亡或者可能加强化疗剂最终通过凋亡杀死细胞的效应。具体地，本发明提供一种通过施用端粒酶抑制剂和拮抗剂来抑制具有细胞数持续增长潜力的端粒酶表达细胞增殖的方法。核苷类似物的施用可以通过本领域技术人员公知的任何期望的方法来实现。

在本发明的一个实施方案中，提供一种在需要预防的哺乳动物或个体（例如人）中预防以端粒酶表达为特征的癌症的方法。该预防方法包括给该哺乳动物施用治疗有效量的组合物。该组合物含有本发明的端粒酶抑制剂或拮抗剂。该抑制剂或拮抗剂阻断端粒酶阳性细胞中端粒的延长，由此抑制端粒酶表达细胞的增殖。该抑制剂是无环核苷类似物或这种类似物的药学上可接受的盐或富含该抑制剂或拮抗剂的液体或固体食材。食品可以是，例如，黄油、人造黄油、饼干、面包、蛋糕、蜜饯、糖果、酸奶酪或其他发酵乳制品、或适于人类消费的谷类食品形式的功能性食物。或者可以是营养补充物、营养物、药品、食品、营养品、健康食品和/或特制食品。周期性地测试人体中端粒酶阳性细胞的存在。一旦在哺乳动物中不再检测到端粒酶阳性细胞，即可以停止使用抑制剂或拮抗剂。

除了治疗方面以外，本发明还提供用于检测病理性增殖的表达端粒酶的细胞的诊断方法和试剂盒。本发明的这些和其他实施方案将会在下文更为详细地描述。

附图说明

图 1 说明用 1.5 μM GCV 处理端粒酶阳性 HeLa 细胞系 10 天后显示端粒长度缩短、大规模凋亡和细胞周期改变的流式细胞术数据。未处理的细胞 - 上图，处理过的细胞 - 下图。

图 2 说明用 3 μM ACV 处理端粒酶阳性 NuTu-19 细胞系 14 天后显示端粒长度缩短、大规模凋亡和细胞周期改变的流式细胞术数据。未处理的细胞 - 上图，处理过的细胞 - 下图。

图 3 说明显示用 1.5 μM GCV 处理 10 天的 HeLa (上图) 和 NuTu-19 (下图) 细胞中细胞周期分布改变的流式细胞术数据。未处理的细胞 - 灰色，处理过的细胞 - 黑色。

发明详述

本发明提供涉及使用能够干扰哺乳动物端粒酶活性的核苷类似物的组合物和方法。特别是，已经发现某些核苷类似物在临床上可接受的水平时可以影响细胞中的端粒/端粒酶功能。特别地，在本发明的上下文中，“核苷类似物”是与天然存在的核苷具有结构相似性的化合物，但是仅限于无环类似物。本发明中涉及无环核苷类似物具有嘌呤（或嘧啶）骨架，该骨架具有一个尾部分（例如鸟嘌呤中存在的 9-(1,3-二羟基-2-丙氧甲基)），但是缺乏羟环（戊糖）。本发明的类似物的例子包括但不限于如下化合物：阿昔洛韦、更昔洛韦、喷昔洛韦及相应的前药，即，分别为伐昔洛韦、缬更昔洛韦、泛昔洛韦。阿昔洛韦¹²通过模拟细胞 DNA 组分鸟嘌呤起作用。鸟嘌呤即 DNA 的 AT-GC 中的“G”。阿昔洛韦（9-[2(羟甲氧基)-甲基]鸟嘌呤）尽管在结构上类似于“G”，但是它的尾部一羟“环”（戊糖）缺失，因此为“无环的”。更昔洛韦^{13,14,15}和喷昔洛韦^{16,17}也是“无环的”，因为它们缺乏羟环。在本发明的一个实施方案中，本发明的无环核苷类似物的尾部具有至少一个羟基，该羟基模拟核苷的 2'-脱氧核糖部分的 3'-和 5'-羟基。已经发现本发明的无环核苷类似物表现出抗端粒酶和抗肿瘤性质，具有临床上可接受程度的毒性。

无环核苷类似物阿昔洛韦、更昔洛韦、喷昔洛韦及相应的前药，即伐昔洛韦、缬更昔洛韦、泛昔洛韦，均被批准为临床应用的抗病毒药。它们的化学结构和对抗病毒感染的剂量方案是本领域技术人员公知的。

尽管阿昔洛韦、更昔洛韦、喷昔洛韦及相应的前药作为治疗疱疹病毒或/和 CMV 感染的抗病毒药是众所周知的，但是它们在肿瘤疾病中的应用还是未知的。本领域中还知道这些抗疱疹病毒药的目标酶是 DNA 聚合酶。

本发明表明无环抗病毒剂也可以针对增殖的细胞和肿瘤中的真核细胞端粒酶。相信这些药物一旦进入增殖的细胞内即成为磷酸化（例如二磷酸盐和三磷酸盐）形式，并且与端粒酶反应的天然底物（例如 dGTP）竞争。磷酸化类似物可以抑制天然底物向正在延长的端粒 DNA 链中的整合，或者其本身可以整合到 DNA 中，由此干扰端粒酶介导的聚合活性，最终导致链延长终止。实质上，这些核苷类似物通过链延长终止损害端粒 DNA、缩短端粒并且导致细胞凋亡。

对端粒的损害对于快速生长的（例如肿瘤）细胞比对于正常细胞具有更大的伤害。

已经报道抗 HIV 和抗疱疹核苷类似物只有在从核苷磷酸化为核苷酸的阶段后才具有活性。因此，磷酸化可能是核苷类似物针对其靶标的活性的关键因素。在这方面，已经报道 AZT 需要三次连续的磷酸化才能具有针对端粒酶的活性。

本发明的无环核苷类似物是比现有技术已知的抗端粒酶核苷类似物如 AZT 更强并且选择性更高的抗端粒酶药物；与核苷类似物如 AZT 相比，其临床上可接受的剂量^{18,19,20,21,22}足以实现抗端粒酶活性和细胞凋亡或细胞死亡。

在更昔洛韦（GCV）和阿昔洛韦（ACV）治疗后诱导端粒酶阳性癌细胞的端粒缩短、G₂/M 停滞（在此也称为 G₂ 停滞）和细胞凋亡如下所述进行。

为了检测两种细胞系（HeLa 和 NuTu-19）中的端粒酶特异性活

性，进行实时 TRAP 测定。报道的端粒酶阳性细胞系（HeLa）用于进行比较⁴。在该试验中两种细胞系都为阳性（数据未显示）。

用治疗浓度的 GCV（1.5 μM ）或 ACV（3.0 μM ）处理端粒酶阳性细胞系，以证明细胞内的端粒 DNA 合成能够被抑制，由此诱导端粒缩短。GCV 或 ACV 处理的和未处理的细胞中的端粒长度通过流式细胞术使用端粒特异性肽核酸（PNA）探针进行测量^{23,24}。为了检测细胞周期分布，将细胞用二碘化丙锭（PI）染色²³。在两种处理 14 天后，两种细胞系都证明有端粒缩短、大规模凋亡和 G2 停滞（图 1 和图 2）。

为了证明细胞周期分布的改变，用 GCV 或 ACV 处理 HeLa 和 NuTu-19 细胞 14 天，用 PI 染色，同时通过流式细胞术分析。结果显示细胞周期的 G2 停滞（图 3）。重要的是注意到其改变是快速的并且只在 ACV 处理 14 天后检测到。相反，核苷类似物 AZT 对端粒酶阳性细胞 HeLa 和 NuTu-19 中的端粒长度或细胞周期分布没有影响，甚至在升高的浓度例如 100 μM 时也是如此（数据未显示）。

同时，PI 染色证明 GCV 或 ACV 处理的细胞在处理后期比未处理的细胞有更高的 DNA 含量。这一事实的合理解释是短端粒诱导了染色体的末端-末端连接²⁵。

细胞系的来源是子宫颈（HeLa）和上皮卵巢（NuTu-19）。细胞在 37°C、5% CO₂ 的潮湿环境中在添加有 10% 胎牛血清的 D-MEM 培养基中培养。为了用 GCV 处理细胞，培养基中添加 1.5 μM 的 GCV（Cymevene, Hoffman-La Roche）。为了用 ACV 处理细胞，培养基中添加 3 μM 的阿昔洛韦（Aciclovir, TEVA Pharm. Ind. Ltd, Israel）。

实时 TRAP 测定如述进行（Wege 等, SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(2):E3-3）。

为了通过流式细胞术进行端粒长度测量，如 Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury G., Roosnek, E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations were measured by flow cytometry. *Nat.*

Biotechnol. 16, 743-747 (1998))所述,将细胞用端粒特异性 FITC 偶联的 $(C_3TA_2)_3$ PNA (Applied Biosystems)探针染色,并且用 $0.06 \mu\text{g/ml}$ PI 复染。人淋巴细胞亚群中的端粒长度动力学通过流式细胞术检测。*Nat. Biotechnol.* 16, 743-747 (1998))。

因此,在此已经在广泛接受的模型系统中证明了核苷类似物 GCV 和 ACV 显然可阻断端粒酶阳性癌。决不能认为有用的端粒酶抑制性化合物仅限于以上具体举例说明的特定化合物或核苷类似物和衍生物。实际上,可以证明根据本公开内容设计和合成的大多数有用的药理化合物将是第二代衍生物或进一步化学修饰的无环核苷类似物。

尽管没有提到通过本发明可能实现的有利应用,但是以前为了治疗 CMV(巨细胞病毒)感染而给 AIDS 或其他免疫缺陷患者施用 GCV 意味着 GCV 可以容易地给癌症患者施用。

进一步地,当前大量无环核苷类似物对于 HSV 和 CMV 患者的应用,结合这些类似物以明显较低剂量使用的能力,应当加快管理部门对阿昔洛韦、更昔洛韦、喷昔洛韦及相应的前药(即伐昔洛韦、缬更昔洛韦和泛昔洛韦)用于治疗端粒酶诱导的和/或介导的癌症的批准。

本发明还包括各种动物模型的使用。通过开发或分离表达端粒酶的细胞系,能够在各种实验动物中产生疾病模型。这些模型可以采用皮下、正位(orthotopic)或全身细胞施用,以模拟各种疾病状态。例如,可以将 HeLa 细胞系皮下注射进裸鼠体内以获得端粒酶阳性肿瘤。产生的肿瘤在端粒重复扩增法(TRAP)分析中应当显示端粒酶活性。这样的动物模型也提供了分别以及组合检测核苷类似物的有用工具。

确定一种化合物的体内有效性包括不同的标准,包括但不限于存活率、肿瘤消退、肿瘤进展的停滞或延缓、肿瘤消失以及转移的抑制或阻止。

用试验化合物治疗动物包括给动物施用适当形式的化合物或组

合物。本发明的药物组合物、抑制剂或拮抗剂可以通过多种途径施用，包括但不限于口服、非肠道、经鼻、口腔、直肠、阴道或局部。此外，也可通过气管内滴注、支气管滴注、皮内、皮下、肌肉内、腹膜内或静脉内注射来施用。特别预期的是全身性静脉内注射、通过血液或淋巴供应的局部给药和肿瘤内注射。

本发明的组合物在许多方面是重要的。它们在端粒酶相关癌症的治疗方案中至关重要，无论在癌症治疗中是单独给药，还是与本领域技术人员已知的化疗和/或放疗方案相组合。另外，这些组合物仅仅通过降低端粒酶活性，就将有助于选择性诱导癌细胞的大规模凋亡。

核苷类似物可以在生理学或药学可接受的载体中施用于宿主来治疗增生性疾病等。药学可接受的载体部分取决于待给药的特定组合物，以及用于施用该组合物的特定方法。

在本发明的一个方面，提供了预防或治疗哺乳动物由于存在不恰当或病理性增殖的细胞或无限增殖的细胞而引起的疾病的方法。这些不恰当或病理性增殖的细胞或无限增殖细胞独立于细胞的正常调控机制而存在并复制。这些细胞是病理性的，因为它们由于细胞元件即端粒酶的活性而不同于正常细胞。当然，这里所使用的术语“不恰当增殖的细胞”有可能是良性的高度增殖细胞，但是除非另作说明，否则这些细胞是指多种肿瘤和癌症特有的恶性高度增殖细胞。

特别地，提供了预防或治疗以表达端粒酶为特征的人类肿瘤的方法。人类肿瘤包括胃癌、骨肉瘤、肺癌、胰腺癌、肾上腺皮质癌或黑素瘤、脂肪癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、皮肤癌、结缔组织癌、子宫癌、生殖器癌、中枢神经系统癌、视网膜癌、血液和淋巴瘤、肾癌、膀胱癌、结肠癌和前列腺癌。根据本发明，疾病的预防和治疗是通过使用本发明的无环核苷类似物（端粒酶的抑制剂或拮抗剂）而获得的。用于本发明的抑制剂或拮抗剂直接或间接地与端粒酶相互作用从而抑制其活性，和/或被整合到端粒中并因此阻止端粒进一步延长，尽管功能性端粒酶因此抑制了表达端粒酶的细胞的

生长。这样，端粒酶的抑制剂或拮抗剂用于抑制细胞的生长。例如，当给患者施用端粒酶的抑制剂或拮抗剂时，这引起表达端粒酶的细胞的进行性端粒缩短、细胞周期停滞、和/或大规模凋亡。在本发明中，术语“抑制生长”或“生长的抑制”也可以指减少或阻止细胞分裂。在本发明中，表达端粒酶的细胞生长的抑制可以是大约 100 % 或小于 100 %，但不是 0 %。例如，与对照细胞（对照细胞表达端粒酶但是不用抑制剂或拮抗剂处理）相比较，可以抑制大约 10 % 至大约 100 %，优选至少约 25 %，更优选至少约 50 %，再更优选至少大约 90 %、95 % 或正好 100 %。生长的抑制能够用本领域已知的任何方法来检测。例如，可以将被处理样品中的活细胞数与对照样品中的活细胞数进行比较，与活性染料一起孵育后进行测定。另外，生长抑制可通过能够检测体外或体内细胞增殖减少的测定方法来检测，例如氘化氢掺入测定、BdU 掺入测定、MTT 分析、形成病灶的能力的改变、贴壁依赖性或缺失无限增殖能力、丧失肿瘤特异性标记、和/或当被注射进动物宿主体内时不能形成或抑制肿瘤(Dorafshar 等, 2003, J Surg Res., 114 : 179-186; Yang 等, 2004, Acta Pharmacol Sin., 25: 68-75)。

人体中从单个或几个这种无限增殖化细胞发展为癌性肿瘤可能要几个月至几年。但是通过实施本发明，癌症能够被预防，因为用端粒酶抑制剂处理的致肿瘤端粒酶阳性细胞在有可能会生长为肿瘤之前就丧失了其增殖能力。而且，在有癌症的临床表现之前，给危险人群定期预防性施用端粒酶抑制剂或拮抗剂以停止肿瘤的进展可以有效地显著降低新发癌症病例的速度。

核苷化合物可以通过任何给药途径（包括口服）单独给药或者与不同类似物联合给药。核苷类似物 ACV、GCV 或其 L-valil 酯缬更昔洛韦（V-GCV）和伐昔洛韦（V-ACV）是优选的核苷类似物。它们都是可以购买到的，其制剂在大量专利和出版物中已有描述。

具有端粒酶活性的细胞应当被选择性地靶向，因为这些细胞依赖于端粒酶来延长或保持端粒，并且端粒的延长或保持需要核苷和/或

其类似物与端粒酶相互作用。需要任何特定的靶向试剂来递送类似物，以实现抗癌效果，这里预期使用靶向 ACV 或 GCV 和/或其他类似物。因此，在一些实施方案中，药物组合物可能具有已经连接到靶向试剂（例如肽）上的活性化合物，在该情况下为 ACV 和 GCV 或另一种核苷类似物，用于专门递送给特定的靶细胞或细胞内的核部分。

特定端粒酶抑制剂或拮抗剂的剂量可以由本领域技术人员在进行常规实验后确定。在给患者给药之前，其效力可以在标准实验动物模型中显示。在这方面，可以使用本领域公知的任何端粒酶诱导的癌症的动物模型(Hahn 等, 1999, Nature Medicine, 5(10): 1164 - 1170; Yeager 等, 1999, Cancer Research, 59(17): 4175-4179)。将接受本发明方法治疗的受试者或患者优选地是人，且可以是胎儿、儿童或成人。可被治疗的其他哺乳动物可以是小鼠、大鼠、兔子、猴子和猪。

抑制剂或拮抗剂可单独施用，或与其他化学疗法（即，基于非核苷类似物的抗癌剂）包括放射疗法联合使用。例如，端粒酶诱导的癌症的治疗可与化学和/或放射性疗法相结合来治疗由端粒酶或一些其他因素诱导的癌症。本领域技术人员已知的化疗剂的实例包括但不限于抗癌药物，例如博来霉素、丝裂霉素、氮芥、苯丁酸氮芥、5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿嘧啶脱氧核苷(5-FUdR)、甲氨喋呤(MTX)、秋水仙碱和己烯雌酚(DES)。为了进行联合治疗，以在动物或患者体内有效导致其组合抗癌作用的方式给动物施用与另一种抗癌剂（化学或放射）组合的本发明的抑制剂成分。因此应以有效导致其在靶细胞区域中组合存在的有效量和时间段来提供该药剂。为了达到这个目的，该药剂可以同时给药，在化疗剂的情况下，在单一组合物中或使用不同给药途径作为两个不同的组合物同时给药。或者，两个治疗可以先后进行，例如间隔几分钟到几小时或几天。例如但不限于，全身使用的 GCV 的平均每天剂量可以是，对成年人为每天 100mg/kg，对于小鼠和婴儿是每天 50mg/kg。

一定的剂量上的变化可依照被治疗对象的状况而进行。负责给药

的内科医生将能确定用于患者个体的合适剂量，并且可依赖于多个因素，例如，所述患者的年龄、状况、病史等。

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

本发明提供用于鉴定由细胞中端粒酶表达引起的不适当的、病理性或非正常增殖的细胞的方法和试剂盒。该方法能够用作筛选方法，通过确定患者组织中端粒酶表达的存在（和/或水平）帮助诊断患者中癌细胞或肿瘤的存在，其中端粒酶表达的存在指示患者体中有癌细胞或病理性的细胞增殖。

例如，癌性肿瘤样品能够根据它们不能在本发明的无环核苷类似物存在下增殖而得到诊断。该诊断可进一步包括通过多种方法测定端粒酶特异性的 mRNA 表达，这些方法包括但不限于：利用核酸的杂交、Northern 印迹法、原位杂交、RNA 微阵列、RNA 保护分析、RT-PCR、实时 RT-PCR，或通过多种方法测定端粒酶催化亚单位编码的蛋白质的存在，该方法包括但不限于：Western 印迹法、免疫沉淀或免疫组化、或端粒酶的酶活性（TRAP 测定及其变型^{4,26,27}）。

在优选的实施方案中，针对端粒酶催化亚单位 RNA 的核酸探针能够被用来检测经历快速增殖的组织中端粒酶催化亚单位 RNA mRNA 水平的存在和/或增加，所述组织例如是原发癌细胞，包括人骨肉瘤、乳腺癌、卵巢癌、肺癌、肾上腺皮质癌或黑素瘤。因此，本发明提供使用与端粒酶亚序列互补的核酸探针来检测和确定病理性增殖的细胞（包括癌细胞）的方法。例如，确定病理性增殖的细

胞的方法可包括用针对 hTERT mRNA 的核酸探针来将检测细胞中 hTERT mRNA 的表达水平与对照细胞中 hTERT mRNA 的表达水平进行比较。当观察到 hTERT 的表达水平与对照细胞相同时,检测细胞就被确定为病理性增殖细胞。然而,本发明的方法中使用的核酸探针也可以基本上互补于人、小鼠或其他哺乳动物的 hTERT mRNA 序列。

对于本领域的技术人员来说显而易见的是,可以在核酸探针中进行不会影响该探针有效检测病理性增殖细胞(例如癌细胞)中 hTERT mRNA 的能力的取代,且因此这种取代是在本发明的范围之内。用于本发明方法中的核酸探针可以是 DNA 探针、或修饰的探针,例如肽核酸探针、硫代磷酸探针、或 2'-O 甲基探针。核酸探针的长度可以是大约 8 或 10 个到 50 个核苷酸,优选大约 15 到 25 个核苷酸长度。本发明的方法可以在来自人、哺乳动物、或其他脊椎动物的细胞提取物、培养的细胞、或组织样品中很容易地进行。

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

本发明也提供检测和/或抑制高度增殖细胞或癌细胞的试剂盒。该试剂盒可具有 ACV、GCV、缬更昔洛韦、伐昔洛韦、或其他无环核苷类似物,和/或具有与 hTERT mRNA 的亚序列完全互补或基本互补的核酸探针。

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

膜内给药。口服和非肠胃给药是优选的给药方法。配制和给药的技术是本领域常规的，进一步的细节可见于例如 "Remington's Pharmaceutical Sciences (2000), Gennaro AR (ed), 20th edition, Maack Publishing Company, Easton, PA。

治疗有效量（或有效量）或药理学有效量是本领域公知的措辞，是指药物产生预期药理学效果的有效剂量。例如，治疗有效量是足以随时间在患者中产生有益治疗反应（即，治疗疾病或状况或缓和被治疗患者中疾病的症状）的量。无环核苷类似物（或其组合物）的治疗有效量是在测定中与未处理细胞的水平相比有效重复地诱导癌细胞中端粒缩短、G₂ 停滞和/或大规模凋亡的量。无环核苷类似物（或其组合物）的治疗有效量也指会降低、减少、抑制或以其他方式消除癌细胞生长的无环核苷类似物的量。该量优选地是获得所需效果且没有明显副作用的优化剂量。如下文进一步详细描述，也可根据所施用的特定抑制剂或拮抗剂的效果和患者的状况，以及被治疗患者的体重或表面积来确定剂量。剂量的大小也可根据对特定患者施用（例如）特定试剂、载体或转导细胞类型所伴随的任何不良副作用的存在、特性和程度来确定。

能够防止、抑制或减少端粒酶介导的癌症发病率的药物的治疗有效量，利用来自在此公开的细胞培养分析和/或来自利用动物模型的体内分析所获得的数据，是很容易确定的。也能够利用动物模型来评估对人体的合适剂量范围和给药途径。在转变为临床环境之前，荷有人源实体瘤的实验动物（或本领域公认的动物模型）经常被用来优化合适的治疗剂量。已知这些模型在预测有效的抗癌策略方面是非常可靠的。例如，荷有实体瘤的小鼠是本领域公认的小鼠模型，被广泛用于临床前试验，以确定获得有益抗肿瘤效果而毒性最小的治疗剂的工作范围。由于在本领域公认的模型中已经证实了安全性，至少对于在端粒酶介导的癌症中使用的核苷类似物来说，本发明的临床前检测主要是常规实验。体内效果可利用测量肿瘤形成（进展）、肿瘤消退或转移等的抑制的试验来预测。

以下描述了利用从人 HeLa 癌细胞系生长的裸鼠皮下(s.c.)肿瘤（即，携带异种移植物的老鼠）作为模型测定 ACV 和/或 GCV 抗肿瘤效力的示例性体内测定。

体内测定需要的人癌细胞例如可如下制备：从公共来源获得端粒酶阳性 HeLa 人细胞系。细胞于 37°C，5% CO₂ 的潮湿空气中保持在补充有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中。

对于体内检测，获得合适的宿主，例如大约 5-7 周龄的裸鼠（*nu/nu*），保持于不含病原体的环境中。将包含在 200μl 无血清培养液中的大约 1×10^6 个 HeLa 细胞通过体侧皮下注射（s.c.）输送给用甲氧氟烷（Metofane）暂时麻醉的全部动物。之后小鼠被分为试验组和对照组。

在一个实施方案中，评估皮下肿瘤生长或进展时间的影响，而不是已建立肿瘤的大小的缩减。在这个实施方案中，从第 0 天开始，试验组中的小鼠在饮水中任意获得 GCV。水中 GCV 的浓度可以是 2mg/ml。每 3 天提供 GCV 的新鲜溶液。对照组中的小鼠只接受饮用水。每 2-3 天测量肿瘤。当肿瘤超过 1 cm³ 时，处死小鼠。肿瘤体积用公式 $4/3\pi r^3$ 计算，其中 r 是肿瘤的半径。对照组中的所有小鼠均长出肿瘤，而试验组中的全部小鼠保持没有肿瘤。

体内测定如下进行：给裸鼠皮下注射 HeLa 细胞（ 3×10^5 ），以证明体内端粒酶阳性肿瘤发展的预防和治疗。人癌 HeLa 细胞培养物购自 ATCC。总共 12 只 CD1/-*nu* 和 12 只 NMRiI/-*nu* 裸鼠购自 Charles River Laboratories, Charles River Deutschland GmbH。给这些裸鼠皮下注射 3×10^5 个 HeLa 细胞。实验组从第 0 天开始在饮水中接受缬更昔洛韦。具体地，实验组小鼠（每株 6 只小鼠）从第 0 天开始接受饮水中的 Valcyte（缬更昔洛韦）（1 mg/ml）。对照组和治疗组中的所有小鼠都发生肿瘤。在大约 14 天时，所有小鼠都有肿瘤。经 Valcyte 单一治疗，治疗组中有一只小鼠的肿瘤开始消退，到大约第 30 天，其肿瘤消失。治疗组中的其他小鼠证明肿瘤生长缓慢（稳定）。

在另一个实施方案中，本发明的试剂和方法可用于促进携带预先

已建立的肿瘤的免疫活性动物体内肿瘤的消退；即，本发明的试剂可用来治疗具有预先存在的肿瘤的动物。在这种情况下，将癌性 10^6 NuTu-19 细胞皮下注射入 Fisher 大鼠的侧腹来建立肿瘤。肿瘤细胞植入后一旦肿瘤建立，即随意给试验组大鼠施用含有 GCV(或 ACV) 的组合物，例如在饮用水中的溶液，而对照组大鼠接受不含该药物的相同组合物（例如蒸馏水）。每 2-3 天监测肿瘤生长。当给这些荷瘤动物施用 GCV(或 ACV) 21-28 天时，观察到肿瘤生长迟缓。这种肿瘤细胞生长的抑制在对照组中未发现。治疗开始几周后，只有用 GCV 处理的动物显示 100% 的存活率。

在另一个实施方案中，也可使用测定凋亡增强的体内分析。在这个实施方案中，可检测用治疗性组合物治疗的带有异种移植物的动物中凋亡灶的存在，并与未治疗的带有异种移植物的对照动物相比较。在治疗组动物的肿瘤中发现凋亡灶的程度提供了关于该组合物治疗效果的指示。

从上述示例性体内测定显然可以看出，使用基于非核苷类似物的抗癌剂（例如博来霉素、丝裂霉素、氮芥、苯丁酸氮芥、5-氟尿嘧啶（5-FU）等，如上列出）或放射治疗的联合治疗不是本发明需要的。无环核苷类似物的单独使用或与不是无环的核苷类似物联合使用足以诱导癌细胞的端粒缩短、 G_2 停滞和/或大规模凋亡，因此足以实现仅仅一周以上的肿瘤生长延迟（或者足以明显减少肿瘤生长延迟）。因此，在一些方面，本发明不涉及基于非核苷类似物的抗癌剂或放射治疗的应用。另外，在本发明的一些方面（治疗或预防肿瘤生长的方法），不包括或者不使用以下核苷类似物：HPMPC [(S)-1-[3-羟基-2-(磷酸甲氧基)丙基]胞嘧啶]；为腺嘌呤衍生物的 HPMPA 或 9-(2-[磷甲氧基乙基])(PMEA, 阿德福韦)，它们是腺嘌呤或鸟嘌呤的衍生物（PMEG），2-6 二氨基嘌呤（PMEDAP）、环丙基 PMEDAP（cPr-PMEDAP）。

本发明包括基于端粒酶抑制剂的癌症治疗在本领域公知的影响皮肤、结缔组织、脂肪、乳腺、肺小细胞肺癌和非小细胞肺癌

(NSCLC)、胃(胃癌)、胰腺、卵巢、子宫颈、子宫、肾、膀胱、结肠、前列腺、肛门生殖器、中枢神经系统(CNS)、视网膜和血液和淋巴(在前体T细胞、前体B细胞、生殖中心细胞、活化T细胞或里-施细胞中CDK9/CYCLIN T1表达引起的淋巴瘤)、病毒相关癌症(HBV相关癌症、EBV-相关癌症、HCV-相关癌症、HPV-相关癌症)的多种肿瘤和癌症以及在本文其他部分提到的其他癌症中的应用。然而,一方面,本发明不包括本领域公知的病毒相关癌症的治疗或预防。

在设计用于治疗人端粒酶介导的癌症(早期肿瘤和血管化的肿瘤)的药物的适当剂量时,可从本文描述的动物研究外推而容易地获得临床给药的合适剂量。为了获得这种转换,需考虑每单位质量的实验动物所施用的药物质量,优选考虑实验动物和人类患者之间体表面积差异。所有这些计算对本领域普通技术人员来说是已知和常规的。因此,治疗有效量的确定是本领域技术人员力所能及的。

例如,采用在细胞培养测定和小鼠研究中成功的GCV或ACV(V-GCV或V-ACV)剂量,以及基于质量和表面积进行标准计算,用于成人患者的有效剂量是每个患者每天大约1000mg到大约6000mg的GCV或ACV,优选每个患者每天大约500mg到大约1000mg的V-GCV或V-ACV。因此,利用这些信息,在此预期用于人类给药的治疗剂(例如阿昔洛韦、更昔洛韦、喷昔洛韦及相应的前药,即,伐昔洛韦、缬更昔洛韦、泛昔洛韦)的低剂量可以是每个患者每天大约1、5、10、20、25或大约30mg等;用于人类给药的治疗剂的有用高剂量可以是每人每天大约250、300、400、450、500或大约600mg等。有用的中等剂量可以是每个患者大约40mg到大约200mg。

尽管有这些提到的范围,但是应当理解,考虑到这里所述的参数和详细指导,活性或最佳范围的进一步变化也包括在本发明的范围内。本发明的治疗方案的总体上是产生明显的抗肿瘤效果,同时仍然将剂量保持在与不可接受的毒性相关的水平以下。除了改变

剂量本身外，也可改变给药方案以优化治疗策略。目前优选的一种治疗策略是在大约 60 天的期限内施用大约 1 - 500mg、优选大约 10-100mg 的端粒酶抑制剂或拮抗剂或包含它们的治疗性混合物，大约 4 次。例如，可以在大约第 1、3、4 天和第 6 天或第 7 天给予剂量。可通过口服单个或分开的剂量给药，或例如直接向实体瘤部位给药，或以缓释制剂形式给药。负责给药的医师根据本发明所公开的内容，将能够为受试个体确定合适的剂量、给药的形式和途径。这种优化和调整是本领域常规进行的，不需要过多的实验。在施用特定剂量本身时，根据关于无菌性、致热原性、纯度和对人类患者全身性的一般安全性的管理标准，优选提供药物学上可接受的组合物。当然，身体检查、肿瘤测量和实验室检测应在治疗前进行，并且在治疗后以最多 1 到几个月的间隔进行，本领域的技术人员应当知道如何进行这种常规程序。临床反应可通过任何可接受的测量来确定。例如，在治疗后特定期间内全部可测量的肿瘤均消失可以确定为完全有效。

下列编号为 1 - 27 的参考文献在上述说明书中被引用(带有相应的上标号)，如此本领域的技术人员会将该参考文献与上文中适当的上标号相对应。

1. Olovnikov, A.M. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 201,1496-1499 (1971).

2. Allshire, R. C., Dempster, M., Hastie, N. D. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* 17, 4611-4627 (1989).

3. Greider, C. W., Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413 (1985).

4. Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell.* 1989 Nov 3;59(3):521-9.

5. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015 (1994).

6. Harley, C. B., Futcher, A. B., Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 34,458-460 (1990).

7. Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., Reddel, R. R. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat. Med.* 3,1271-1274 (1997).

8. Reddel, R. R., Bryan, T. M., Colgin, L. M., Perrem, K. T., Yeager, T. R. Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat. Res.* 155, 194-200 (2001).

9. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., Shay, J. W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18,173-179 (1996).

10. Greider CW Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation shortening and stabilization. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4(2):203-11.

11. Hahn, W. C.等. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat. Med.* 5,1164-1170 (1999).

12. Elion, G. B.; Furman, P. A.; Fyfe, J. A.; de Miranda, P.; Beauchamp, L.; Schaeffer, H. J. Selectivity of Action of an Antiherpetic Agent, 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977, 74, 5716-5720.

13. Martin, J. C; Dvorak, C. A.; Smee, D. F.; Matthews, T. R.; Julien, P. H.; Verheyden, J. P. H. 9-[(1,3-Dihydroxy-2-propyloxy)methyl]guanine: A New Potent and Selective Antiherpes Agent. *J. Med. Chem.* 1983, 26, 759-761.

14. Smee, D. F.; Martin, J. C; Verheyden, J. P. H.; Matthews, T. R.

Antiherpesvirus Activity of the Acyclic Nucleosides 9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983, 23, 676-682.

15. Field, E. K.; Davies, M. E.; DeWitt, C; Perry, H. C; Liou, R.; Germershausen, J.; Karkas, J. D.; Ashton, W. T.; Johnston, D. B.; Tolman, R. L. 9-([2-Hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy]methyl)guanine: A Selective Inhibitor of Herpes Group Virus Replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983, 80, 4139-4143.

16. Harnden, M. R.; Jarvest, R. L.; Bacon, T. H.; Boyd, M. R. Synthesis and Antiviral Activity of 9-[4-Hydroxy-3-(hydroxymethyl)but-1-yl]purines. *J. Med. Chem.* 1987, 30, 1636-1643.

17. Vere Hodge, R. A.; Perkins, R. M. Mode of Action of 9-(4-Hydroxy-3-hydroxymethylbut-1-yl)guanine (BRL 39123) against Herpes Simplex Virus in MRC-5 Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, 33, 223-229.

18. de Miranda P, Whitley RJ, Blum MR, Keeney RE, Barton N, Cocchetto DM, Good S, Hemstreet GP 3rd, Kirk LE, Page DA, Elion GB. Acyclovir kinetics after intravenous infusion. *Clin Pharmacol Ther.* 1979;26(6):718-28.

19. Van Dyke RB, Connor JD, Wyborny C, Hintz M, Keeney RE. Pharmacokinetics of orally administered acyclovir in patients with herpes progerdalis. *Am J Med.* 1982;73(1A):172-5.

20. Lycke J, Malmstrom C, Stahle L. Acyclovir levels in serum and cerebrospinal fluid after oral administration of valacyclovir. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(8):2438-41.

21. Piketty C, Bardin C, Gilquin J, Gairard A, Kazatchkine MD, Chast R. Monitoring plasma levels of ganciclovir in AIDS patients receiving oral ganciclovir as maintenance therapy for CMV retinitis. *Clin Microbiol Infect* 2000;6(3):1 17-20.

22. Brown F, Banken L, Saywell K, Arum I. Pharmacokinetics of valganciclovir and ganciclovir following multiple oral dosages of valganciclovir in HTV- and CMV- seropositive volunteers. *Clin Pharmacokinet.* 1999;37(2): 167-76.
23. Rufer, N., Dragowska, W., Thornbury G., Roosnek, E., Lansdorp P.M. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat. Biotechnol.* 16, 743-747 (1998).
24. Hultdin, M. 等. Telomere analysis by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* 26, 3651-3656 (1998).
25. Guiducci, C, Cerone, M.A., Bacchetti, S. Expression of mutant telomerase in immortal telomerase-negative human cells results in cell cycle deregulation, nuclear and chromosomal abnormalities and rapid loss of viability. *Oncogene* 20, 714-725 (2001).
26. TRAP-ELISA A.K. Velin, A. Herder, K.J. Johansson 等, Telomerase is not activated in human hyperplastic and adenomatous parathyroid tissue. *Eur J Endocrinol* 145 (2001), pp. 161-164.
27. 实时 TRAP (Wege 等, SYBR Green real-time telomeric repeat amplification protocol for the rapid quantification of telomerase activity. *Nucleic Acids Res.*2003;31(2):E3-3).

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

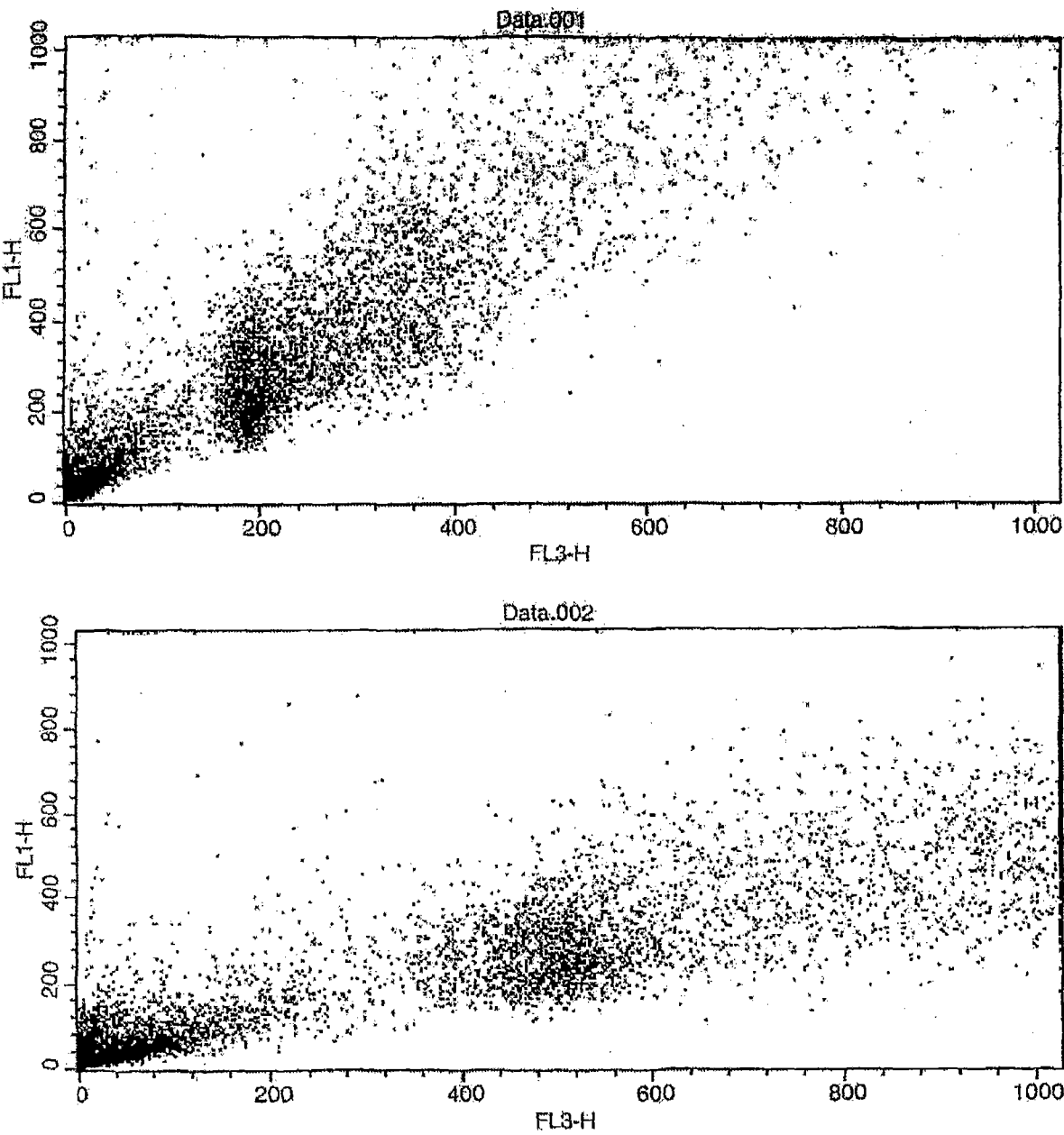


图1

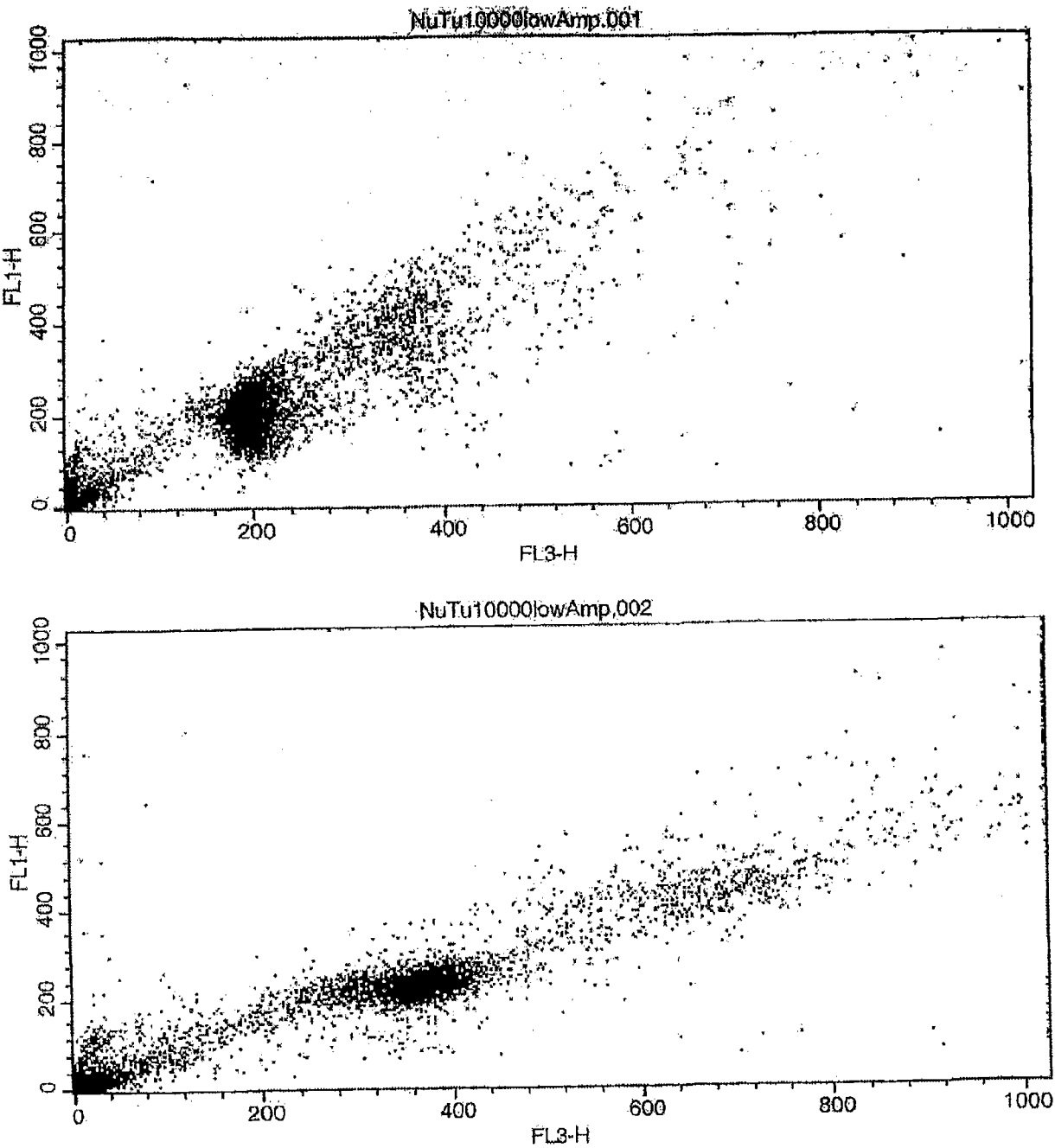


图2

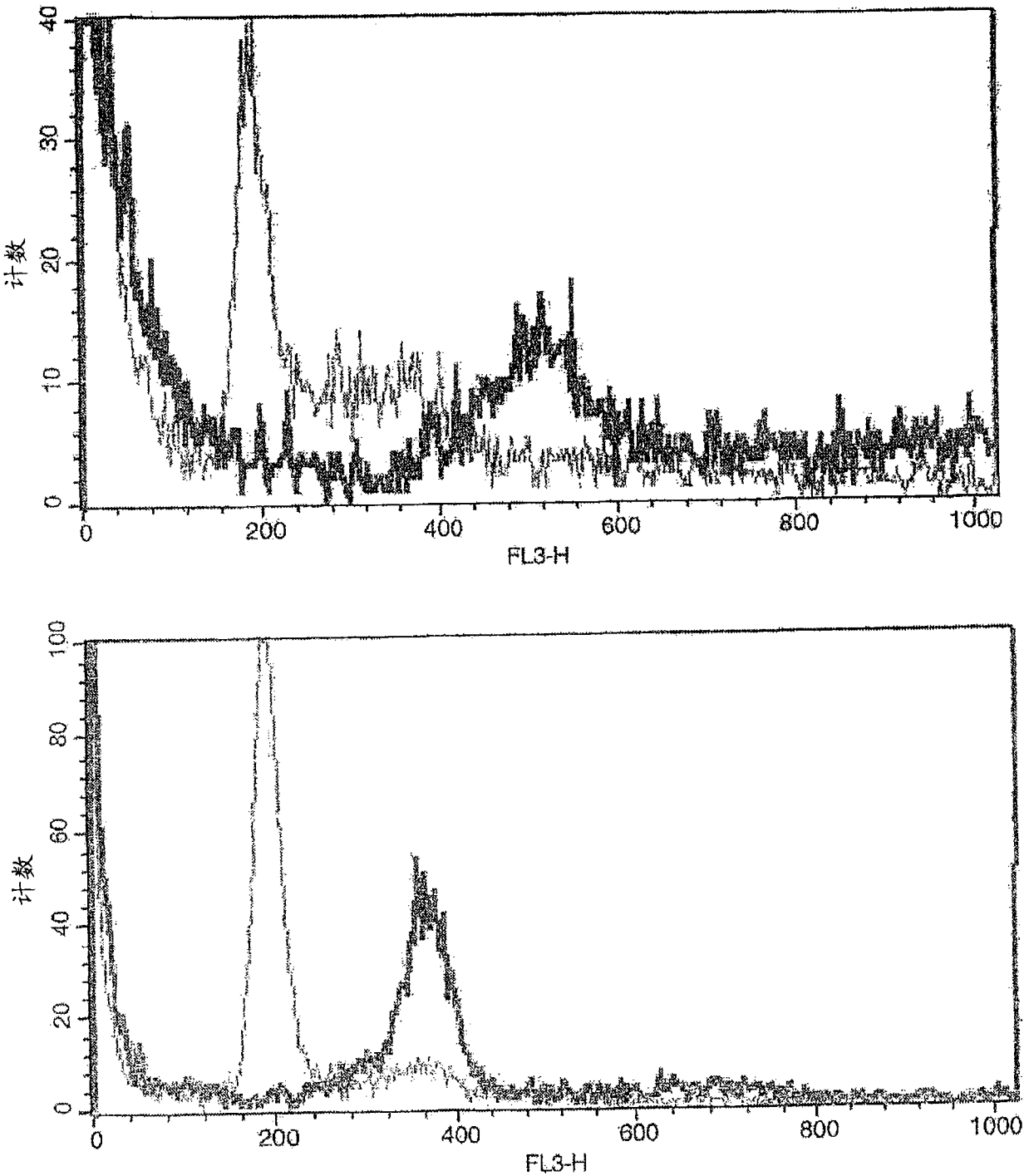


图 3