

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380101645.4

C12N 15/12

C07K 14/47

C12N 15/11

C07K 16/18

G01N 33/50

A61P 35/00

[43] 公开日 2005 年 12 月 7 日

[11] 公开号 CN 1705746A

[22] 申请日 2003.10.20

[21] 申请号 200380101645.4

[30] 优先权

[32] 2002.10.18 [33] EP [31] 02023384.7

[86] 国际申请 PCT/EP2003/011604 2003.10.20

[87] 国际公布 WO2004/035615 英 2004.4.29

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.18

[71] 申请人 阿图根股份公司

地址 德国柏林

[72] 发明人 A·克利佩尔 - 吉泽 J·考夫曼

R·施瓦策尔

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 程金山

权利要求书 5 页 说明书 41 页 序列表 9 页
附图 11 页

[54] 发明名称 新转移因子及其应用

[57] 摘要

本发明涉及编码与一种生物过程有关的因子的核酸，其中该过程是 PI 3 - 激酶途径调节的过程，优选选自包括葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、胁迫应答、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程，该因子是含有根据 SEQ ID. NO. 1 的氨基酸序列的多肽或者具有根据数据库登记号 gi 9506687 或 NP_061931、优选 NP_061931.1 的序列的多肽。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 编码与一种生物过程有关的因子的核酸,其中所述过程是PI 3-激酶途径调节的过程,优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、胁迫应答、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程,该因子是含有根据SEQ ID. NO. 1 的氨基酸序列的多肽或者具有根据数据库登记号 gi 9506687 或 NP_061931, 优选 NP_061931.1 的序列的多肽。
2. 编码与一种生物过程有关的因子的核酸,其中所述过程是PI 3-激酶途径调节的过程,优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、胁迫应答、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程,其中该核酸含有根据SEQ ID NO. 2、SEQ ID NO. 3 的核酸序列或者根据数据库登记号 gi 9506686 或 NM_019058, 优选 NM_019058.1 的核酸序列。
3. 编码与一种生物过程有关的因子的核酸,其中所述过程是PI 3-激酶途径调节的过程,优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、胁迫应答、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程,其中如果不是遗传密码的简并性,该核酸将和与按照权利要求 2 的核酸或其一部分基本上互补的核酸杂交。
4. 编码与一种生物过程有关的因子的核酸,其中所述过程是PI 3-激酶途径调节的过程,优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、胁迫应答、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程,其中该核酸在严谨条件下和与按照权利要求 2 的核酸或其一部分基本上互补的核酸杂交。
5. 含有根据权利要求 1 至 4 任一项的核酸的载体, 优选表达载体。
6. 含有根据权利要求 5 的载体的细胞, 优选哺乳动物细胞。
7. 与一种生物过程有关的因子,其中所述过程是PI 3-激酶途径调节的过程, 优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤

口愈合、胁迫应答、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程，其中该因子是含有根据 SEQ ID. NO. 1 的氨基酸序列的多肽或者具有根据数据库登记号 gi 9506687 或 NP_061931，优选 NP_061931.1 的序列的多肽。

5 8. 与一种生物过程有关的因子，其中所述过程是 PI 3-激酶途径调节的过程，优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、胁迫应答、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程，其中该因子被根据权利要求 1 到 4 中任何一项的核酸编码。

10 9. 根据权利要求 7 或 8 的因子，其中所述因子是所述过程的标记物。

10 10. 根据权利要求 7 至 9 任一项的因子，其中所述因子是转化细胞、尤其是侵入性细胞的标记物。

15 11. 根据前面权利要求任一项的因子或者其片段或衍生物作为 PI 3-激酶途径的下游靶标或者下游标记物、优选作为 PI 3-激酶途径的下游药物靶标的应用。

12. 根据前面权利要求任一项的因子或者其片段或衍生物的应用，用于生产治疗和/或预防疾病的药物和/或生产用于疾病诊断的诊断剂，其中所述疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、与 PI 3-激酶途径有关的任何病理学病症的组。

20 13. 根据前面权利要求任一项的核酸或者其片段或衍生物的应用，用于治疗 and/或预防疾病和/或生产用于疾病诊断的诊断剂，其中所述疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、与 PI 3-激酶途径有关的任何病理学病症的组。

25 14. 根据权利要求 11 至 13 之一的应用，其中所述疾病其特征在于与所述疾病有关的细胞缺乏 PTEN 活性，或表现出 PI 3-激酶途径的超活化，或表现出增加的侵入性行为，或是肿瘤细胞，优选晚期肿瘤细胞。

15. 根据权利要求 11 至 14 任一项的应用，其中所述疾病是晚期肿瘤。

30 16. 根据权利要求 11 至 15 任一项的应用，其中所述疾病是与 PI 3-激酶途径的分支有关的疾病，该分支与葡萄糖代谢有关，优选所述疾病是糖尿病。

17. 一种筛选用于治疗 and/或预防疾病的药物和/或生产用于诊断疾病的诊断剂的方法，其中该疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、和与 PI 3-激酶途径有关的任何病理学病症的组，该方法包括以下步骤：

- a) 提供候选化合物，
- 5 b) 提供根据前面权利要求任一项的因子的表达系统和/或一种系统，
优选检测根据前面权利要求任一项的因子的活性的活性系统；
- c) 将候选化合物与根据前面权利要求任一项的因子的表达系统和/
或该系统，优选检测根据前面权利要求任一项的因子的活性的活
性系统接触；
- 10 d) 确定在候选化合物的影响下根据前面权利要求任一项的因子的表
达和/或活性是否变化。

18. 根据权利要求 17 的方法，其特征在于候选化合物包含在化合物文库中。

15 19. 根据权利要求 17 或 18 的方法，其特征在于所述候选化合物选自
包含肽，蛋白质，抗体，抗促成素，功能核酸，天然化合物和小分子的各种化合物的组。

20. 根据权利要求 19 的方法，其特征在于所述功能核酸选自包含适体，
适配酶，核酶，spiegelmer，反义寡核苷酸和 siRNA 的组。

20 21. 根据前面权利要求任一项的因子或者该因子的部分或衍生物和/或
根据前面权利要求任一项的核酸或者该核酸的部分或衍生物的应用，其用
作靶标分子以开发和/或生产用于治疗 and/或预防疾病的药物和/或生产用于
诊断疾病的诊断剂，其中所述疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈
合、和与 PI 3-激酶途径有关的任何病理学病症的组。

25 22. 根据权利要求 21 的应用，其特征在于所述药物和/或诊断剂含有一
种试剂，其选自包含抗体、肽、抗促成素、小分子、反义分子、适体、
spiegelmer 和 RNAi 分子的组。

23. 根据权利要求 22 的应用，其特征在于所述试剂与根据前面权利要
求任一项的因子或其部分或衍生物相互作用。

24. 根据权利要求 22 的应用，其特征在于所述试剂与根据前面权利要

求任一项的核酸或其部分或衍生物，尤其与根据前面权利要求任一项的因子的 mRNA、基因组核酸或 cDNA 相互作用。

25. 与根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物相互作用的多肽的应用，用于开发或生产用于治疗 and/或预防疾病的药物和/或生产用于诊断疾病的诊断剂，其中所述疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、和与 PI 3-激酶途径有关的任何病理学病症的组。

26. 根据权利要求 25 的应用，其特征在于所述多肽选自包含针对前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物的抗体、和结合根据前面权利要求任一项的因子或者其部分或衍生物的多肽的组。

27. 与根据前面权利要求任一项的因子或者该因子的部分或衍生物相互作用的核酸的应用，用于开发或生产用于治疗 and/或预防疾病的药物和/或生产用于诊断疾病的诊断剂，其中所述疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、和与 PI 3-激酶途径有关的任何病理学病症的组。

28. 根据权利要求 27 的应用，其特征在于所述核酸选自包含适体和 spiegelmer 的组。

29. 与编码根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的核酸的应用，用于开发或生产用于治疗 and/或预防疾病的药物和/或生产用于诊断疾病的诊断剂，其中所述疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、和与 PI 3-激酶途径有关的任何病理学病症的组。

30. 根据权利要求 29 的应用，其特征在于所述相互作用的核酸是反义寡核苷酸、核酶和/或 siRNA。

31. 根据权利要求 29 或 30 的应用，其特征在于编码根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物的核酸是 cDNA、mRNA 或 hnRNA。

32. 药物组合物，含有至少一种试剂和至少一种药用载体，所述试剂选自根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物、与根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物或者与编码根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的小分子、对根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物特异的抗体、与根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物相互作用的多肽、根据权利要求 1 到 4 任一项的核酸、编码根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物的核酸、

与根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物相互作用的核酸和与编码根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的核酸，所述组合物优选用于预防和/或治疗疾病，其中所述疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、和与 PI 3-激酶途径有关的任何病理学病症的组。

5 33. 用于表征选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、和与 PI 3-激酶途径有关的任何病理学病症的组的疾病或病症的试剂盒，该试剂盒含有至少一种试剂和任选至少一种其他化合物，所述试剂选自根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物、对根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物特异的抗体、与根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物相互作用的多肽、与根据权利要求 1 至 4 任一项的核酸和/或与编码根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的多肽、与根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物相互作用的核酸、与根据权利要求 1 至 4 任一项的核酸和/或与编码根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的核酸。

10

15

新转移因子及其应用

5

本发明涉及尤其与转移和/或迁移、葡萄糖代谢和氨基酸代谢有关的新因子，还涉及生产药物和诊断剂的方法及其应用。

现代药物开发不再依赖于或多或少试探的方法，而典型地包含阐明构成疾病或症状基础的分子机制，鉴定候选靶分子和评估所述靶分子。显然
10 候选靶分子的鉴定对于该方法是基本的。随着人类基因组的测序和各种序列数据的公布，原则上，可以得到人的所有编码核酸。然而，对该数据的一个严重限制是通常没有给出对所述序列的功能的注解。此外，仅了解编码核酸序列不足以预测多肽的体内功能。因此，本领域技术人员从研究没有任何适当被证实的注解的数据库登记不能得到关于怎样使用该核酸数
15 据的任何技术教导。计算机 (*In silico*) 方法容许第一次可能的注解，然而，该注解容易出错并且不一定反映各自核苷酸序列所编码的多肽的真实功能。将所述多肽放在适当的体内和原位背景中并且阐明其在那里的功能，仍然是一种要求高的任务，其得到了令人惊奇的发现。

一旦可以得到被证实的靶分子（其在此后也称为靶标或靶分子），就可
20 以筛选或开发和随后检验针对该靶分子的候选药物。在许多情况中，这些候选药物是化合物文库的成员，该化合物文库可以由合成的或天然化合物组成。此外使用组合文库也是常见的。这些化合物文库在此处也被称为候选化合物文库。尽管在过去该方法已被证明是成功的，但是其仍然是费时和费钱的。

25 仍然有许多肿瘤和癌是人类健康的大威胁。为了产生更安全和更有效的具有更小副作用的药物，必须了解经适当化合物处理后可特异性地或选择性地影响它们的活性或存在的靶分子。因为可以是潜在或候选药物的化合物与靶之间的优选地选择性和特异性相互作用，靶在疾病或疾病症状如例如癌、肿瘤发生和转移中的功能可能被影响，因此疾病被治疗或预防和
30 疾病症状被改善。除了基于新鉴定的和已证实的靶标分子的治疗方法，诊

断方法也是重要的。这种诊断方法适于在治疗之前或之中或治疗后监视所要治疗的病症或疾病，以允许决策者如医生决定是否继续治疗或者根据个别患者的要求作出调整。

因此构成本发明基础的问题是提供分别对癌和肿瘤特异的靶标。构成
5 本发明基础的另一问题是提供更具体地涉及肿瘤发生和转移的靶。最后，
本发明的一个问题是提供与肿瘤发生和转移有关的诊断标记。

在第一方面，通过编码与一种生物过程有关的因子的核酸解决了构成
本发明基础的问题，该过程是 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径调节的过程，
优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失（deprivation）过程、糖
10 尿病、伤口愈合、胁迫应答、缺氧、凋亡(apoptosis)、转移、肿瘤发生、
细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程，该因
子是含有根据 SEQ ID. NO. 1 的氨基酸序列的多肽或者具有根据数据库登
记号 gi 9506687 或 NP_061931，优选 NP_061931.1 的序列的多肽。

在第二方面，通过编码与一种生物过程有关的因子的核酸解决了构成
15 本发明基础的问题，该过程是 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径调节的过程，
优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、
胁迫应答、缺氧、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运
运动和胞外基质中细胞生长的组的过程，其中该核酸含有根据 SEQ ID NO. 2
或 SEQ ID NO. 3 的核酸序列或者根据数据库登记号 gi 9506686 或
20 NM_019058，优选 NM_019058.1 的核酸序列。

在第三方面，通过编码与一种生物过程有关的因子的核酸解决了构成
本发明基础的问题，该过程是 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径调节的过程，
优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、
胁迫应答、缺氧、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运
25 运动和胞外基质中细胞生长的组的过程，其中如果不是遗传密码的简并性，
该核酸将与本发明的核酸杂交，更具体地与根据本发明的第二方面的核酸
杂交。

第四方面，通过编码与一种生物过程有关的因子的核酸解决了构成本
本发明基础的问题，其中该过程是 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径调节的过
30 程，优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口

愈合、胁迫应答、缺氧、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程，其中该核酸在严谨条件下与本发明的核酸杂交，更具体地与根据本发明的第二方面的核酸杂交。

在涉及核酸的本发明的任何方面，该核酸可以以 DNA 或 RNA 存在。
5 还在本发明内的是该核酸可以作为单链的、部分双链的或双链核酸存在。在优选的实施方案中，根据本发明的核酸以单链 RNA 存在。这种单链 RNA 被优选用作表达系统中的 mRNA，其中表达系统优选为如此处描述的表达系统。在根据本发明的核酸的一个实施方案中，该核酸是单链的并且如果不是遗传密码的简并性，将和与编码根据本发明的因子的核酸基本互补的
10 核酸杂交。在另一实施方案中，根据本发明的单链核酸在严谨条件下和与根据本发明的第二方面的核酸基本互补的核酸杂交。

在第五方面，通过含有根据本发明的核酸的载体，优选表达载体解决了构成本发明基础的问题。用于这种目的的载体是本领域技术人员熟知的。

15 在第六方面，通过含有根据本发明的载体的细胞，优选哺乳动物细胞解决了构成本发明基础的问题。

在第七方面，通过与一种生物过程有关的因子解决了构成本发明基础的问题，其中该过程是 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径调节的过程，优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、胁迫
20 胁迫应答、缺氧、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程，其中该因子是含有根据 SEQ ID. NO. 1 的氨基酸序列的多肽或者具有根据数据库登记号 gi 9506687 或 NP_061931，优选 NP_061931.1 的序列的多肽。

在第八方面，通过与一种生物过程有关的因子解决了构成本发明基础
25 的问题，其中该过程是 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径调节的过程，优选选自包含葡萄糖代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、糖尿病、伤口愈合、胁迫应答、缺氧、凋亡、转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长的组的过程，其中该因子被根据本发明的核酸编
码。

30 在根据本发明的因子的一个实施方案中，该因子是所述过程的一种标

记物。

在根据本发明的因子的另一个实施方案中，该因子是转化细胞，优选侵入性细胞的一种标记物。

5 在第九方面，通过使用根据本发明的因子或其片段或衍生物作为 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的下游靶标或者下游标记物，优选作为 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的下游药靶解决了构成本发明基础的问题。

10 在第十方面，通过使用根据本发明的因子或其片段或衍生物生产用于治疗 and/或预防疾病的药物和/或生产用于疾病诊断的诊断剂，其中该疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、任何缺氧相关的疾病和与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径有关的任何病理学病症的组，解决了构成本发明基础的问题。

15 在第十一方面，通过使用根据本发明的核酸或者其片段或衍生物治疗和/或预防疾病和/或生产用于疾病诊断的诊断剂，其中该疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、任何缺氧相关的疾病和与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径有关的任何病理学病症的组，解决了构成本发明基础的问题。

20 在根据本发明的各方面的应用的实施方案中，疾病的特征是与所述疾病有关的细胞缺乏 PTEN 活性，和/或表现出增加的侵入性行为，和/或表现出 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的超活化，和/或是肿瘤细胞，优选晚期肿瘤细胞。

在优选的实施方案中，细胞是哺乳动物细胞，优选人细胞。

在根据本发明的各方面的应用的尤其优选的实施方案中，疾病是晚期肿瘤。

25 在根据本发明的各方面的应用的另一尤其优选的实施方案中，疾病是与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的分支有关的疾病，该分支与葡萄糖代谢有关，优选该疾病是糖尿病。

在根据本发明的各方面的应用的另一优选的实施方案中，疾病是与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的分支有关的疾病，该分支与肿瘤生长和/或转移有关。

30 在第十二方面，通过筛选用于治疗 and/或预防疾病的药物和/或生产用

于诊断疾病的诊断剂的方法，其中该疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、任何缺氧相关的疾病和与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径有关的任何病理学病症的组，解决了构成本发明基础的问题，该方法包括：

- e) 提供候选化合物，
- 5 f) 提供根据本发明的因子的表达系统和/或一种系统，优选检测根据本发明的因子的活性的活性系统；
- g) 将候选化合物与根据本发明的因子的表达系统和/或该系统，优选检测根据本发明的因子的活性的活性系统接触；
- 10 h) 确定在候选化合物的影响下根据本发明的因子的表达和/或活性是否变化。

在根据本发明的方法的优选实施方案中，候选化合物包含在化合物文库中。

- 15 在根据本发明的方法的另一优选实施方案中，候选化合物选自包含肽，蛋白质，抗体，抗促成素（anticaline），功能核酸，天然化合物和小分子的各种化合物的组。

在根据本发明的方法的尤其优选的实施方案中，功能核酸选自包含适体（aptamer），适配酶（aptazyme），核酶，spiegelmer，反义寡核苷酸和 siRNA 的组。

- 20 在第十三方面，通过使用根据本发明的因子或者该因子的部分或衍生物和/或根据本发明的核酸或者该核酸的部分或衍生物作为靶标分子以开发和/或设计和/或生产用于治疗 and/或预防疾病的药物和/或生产用于诊断疾病的诊断剂，其中该疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、任何缺氧相关的疾病和与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径有关的任何病理学病症，解决了构成本发明基础的问题。

25 在根据本发明的第十三方面的应用的一个实施方案中，药物和/或诊断剂含有一种试剂，其选自包含抗体、肽、抗促成素、小分子、反义分子、适体、spiegelmer 和 RNAi 分子的组。

在根据本发明的第十三方面的应用的另一个实施方案中，该试剂与根

据本发明的因子或其部分或衍生物相互作用。

在根据本发明的第十三方面的应用的一个备选实施方案中，试剂与根据本发明的核酸或者其部分或衍生物，尤其与根据本发明的因子的 mRNA、基因组核酸或 cDNA 相互作用。

5 在第十四方面，通过使用与根据本发明的因子或其部分或衍生物相互作用的多肽，开发或生产用于治疗 and/or 预防疾病的药物和/或生产诊断疾病的诊断剂，其中该疾病选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、任何缺氧相关的疾病和与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径有关的任何病理学病症，解决了构成本发明基础的问题。

10 在根据本发明的第十四方面的应用的一个实施方案中，多肽选自包含针对根据本发明的因子或其部分或衍生物的抗体、和结合根据前面权利要求任一项的因子或者其部分或衍生物的多肽的组。

在第十五方面，通过与根据本发明的因子或其部分或衍生物相互作用的核酸，开发或生产用于治疗 and/or 预防疾病的药物和/或生产诊断疾病的诊断剂，其中该疾病选自癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、任何缺氧相关的疾病和与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径有关的任何病理学病症，解决了构成本发明基础的问题。

在根据本发明的第十五方面的应用的一个实施方案中，核酸选自包含适体和 spiegelmer 的组。

20 在第十六方面，通过使用与编码根据本发明的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的核酸，开发或生产用于治疗 and/or 预防疾病的药物和/或生产诊断疾病的诊断剂，其中该疾病选自癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、任何缺氧相关的疾病和与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径有关的任何病理学病症，解决了构成本发明基础的问题。

25 在根据本发明的第十六方面的应用的一个实施方案中，相互作用的核酸是反义寡核苷酸、核酶和/或 siRNA。

在根据本发明的第十六方面的应用的另一个实施方案中，编码根据前面权利要求任一项的因子或其部分或衍生物的核酸是 cDNA、mRNA 或 hnRNA。

30 在第十七方面，通过含有选自包含根据本发明的因子或其部分或衍生

物、与根据本发明的因子或其部分或衍生物或者与编码根据本发明的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的小分子、对根据本发明的因子或其部分或衍生物特异的抗体、与根据本发明的因子或其部分或衍生物相互作用的多肽、根据本发明的核酸、编码根据本发明的因子或其部分或衍生物的核酸、与根据本发明的因子或其部分或衍生物相互作用的核酸和与编码根据本发明的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的核酸的组的至少一种试剂和至少一种药用载体，优选用于预防和/或治疗疾病的药物组合物，其中该疾病优选选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、任何缺氧相关的疾病和与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径有关的任何病理学病症的组，解决了构成本发明基础的问题。

在第十八方面中，通过表征选自包含癌、转移癌、糖尿病、伤口愈合、任何缺氧相关的疾病和与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径有关的任何病理学病症的组的疾病或病症的试剂盒，该试剂盒含有选自包含根据本发明的因子或其部分或衍生物、对根据本发明的因子或其部分或衍生物特异的抗体、与根据本发明的因子或其部分或衍生物相互作用的多肽、与根据本发明的核酸和/或与编码根据本发明的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的多肽、与根据本发明的因子或其部分或衍生物相互作用的核酸、与根据本发明的核酸或者与编码根据本发明的因子或其部分或衍生物的核酸相互作用的核酸的组的至少一种试剂和任选至少一种其他化合物，解决了构成本发明基础的问题。

在本发明的任何方面，肿瘤优选为晚期肿瘤。

本发明人还令人惊奇地发现与许多生物学过程如癌细胞的代谢偏移 (shift) (Warburg 效应)、葡萄糖代谢、氨基酸代谢、氨基酸和葡萄糖缺失过程、伤口愈合、转移、肿瘤发生、缺氧、细胞迁移、胞外基质中细胞运动和胞外基质中细胞生长有关的一种新的多肽因子。这些过程处于 PI 3-激酶途径的控制下。该新因子在此处被称为 PI 3-激酶途径调节因子 1 或 PRF1。

PRF1 的基因组序列位于 10 号染色体上，更具体地该基因座是 10 pter-q 26.12。该基因含有如当前定义的共 1,760 个核苷酸。代表该 cDNA 的各自数据库登记号被称为 NM_019058，更优选地 NM_019058.1，和 gi 9506686。

编码 PRF1 的 cDNA 在此处被称为 SEQ ID NO. 2 并且其编码序列被称为 SEQ ID NO. 3。在本发明内的是编码 PRF1 的核酸可以具有一些变异，如在 321 位 C 被 G 代替，在 991 位 A 被 T 代替，在 1247 位 C 被 T 代替，在 1297 互补位 C 被 T 代替，在 1958 位 C 被 T 代替，在 1666 互补位 A 被 G 代替，在 1743 位 A 被 C 代替。所有上面提到的位置指 cDNA，该 cDNA 在此处也被称为 SEQ ID NO.2。可读框在 198 位开始，在 896 位结束。

PRF1 的氨基酸序列在此处也被称为 SEQ ID NO. 1。代表该氨基酸序列的各自数据库登记号是 NP_061931、更具体地 NP_061931.1，和 gi 9506687。

根据本发明的多肽也可以含有变异如例如，在氨基酸 39 位 R 被 G 代替。

根据本发明的多肽最近在文献中被称为 REDD1，并且如此被 Ellisen, L. W., *Molecular Cell*, 卷 10, 995-1005, 11 月, 2002 描述。

还应该理解在任何所述序列中可以有一些测序错误，然而，本领域技术人员应该承认基本序列是上面指定的序列，其可以被进一步改进，并且可以从上面的记录号分别得到修改序列，该修改序列也应该包含在本发明的范围内。本发明的范围还包括实施方案，其中包含或实现了一个或多个上面的变异。

在本发明内的是，根据本发明也可使用 PRF1 的衍生物或截断形式或者编码该衍生物或截断形式的核酸，只要可以实现所希望的效果。所希望的效果尤其可以是仍然可以筛选或设计特定化合物，如功能核酸、抗体、多肽和小分子的效果。在这个范围内，术语 PRF1 也包括这种衍生物或截断的形式。其中，PRF1 的优选衍生物是磷酸化形式或者其糖基化形式。从而，本领域技术人员通过常规分析可以确定衍生化和截断的程度。当提到核酸序列时，那些核酸序列也被术语编码 PRF1 的核酸序列所包括，该编码 PRF1 的核酸序列与由上述记录号指定的核酸或者可以从上述核酸序列衍生的任何核酸序列杂交。这种杂交及其实验细节是本领域技术人员公知的。这种杂交的细节可以，例如，也可以来自 Ausubel 等人, (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. J. Wiley and Sons, 纽约。如此处所用的严谨杂交指，例如，0.1xSSC; 0.1%SDS, 65°C, 15 分钟。此外，术语编码 PRF1

的核酸还包括与上述提到的核酸序列之一同源的核酸序列，其中同源性程度优选 75、80、85、90 或 95%，包括 70%到 99%之间的任何百分数。

在文献中描述的编码 PRF1 的基因，但是没有对其功能的注释。据声称该基因是缺氧-可诱导的并且应答缺氧可诱导的因子 1(Shoshani T.,等人, 5 Molecular and cellular biology, 2002 年 4 月, 2283 – 2293 页)。

在所述论文中据说 PRF1 被缺氧调节。然而，其中没有公开 PRF1 是涉及并参与缺氧应答的一种存活因子。本发明人已经令人惊奇地发现 PRF1 以 PI 3-激酶和/或 HIF1 α 依赖的方式被调节。PRF1 的敲除适于抑制如此处实施例中描述的 matrigel 测定法中细胞的生长。与之相联系，值得 10 注意的是 PRF1 的敲除也可以在蛋白质水平上表现并且功能的丧失表现出类似于 LY294002 的效果的抑制表型，证实了本发明人的发现：PRF1 是特定靶标，更具体地癌靶标，其在 HIF1 α 和 Akt 的下游。这更加相关，因为可得到许多数据证明 HIF 在肿瘤治疗中高度相关。而且，PRF1 的敲除导致肿瘤的抑制，如使用 PC-3 细胞作为肿瘤模型所阐明的。从这一点可以 15 得到 PRF1 和更具体地抑制 PRF1 的化合物的各种应用。因此，PRF1 如此可以在细胞系统中被过表达以容许细胞在缺氧条件下幸存。这些条件在例如，中风、心力衰竭中实现，从而 PRF1 的过表达或激活可能是这类疾病的治疗或预防的适宜方法。本领域技术人员将公认与 PRF1 的增加的表达或活性有关的任何化合物或机理从而也可以是这类疾病的治疗和/或预防 20 的适宜方法。

此外，在本发明内的是 PRF1 的表达或者如此处以同义方式使用的，活性的降低适于将各自细胞系统置于相应于低氧条件的条件中。在这些条件下可以开始其他细胞过程如，例如，凋亡。通过抑制 PRF1 可以实现低氧条件，其反过来适于治疗其中不希望细胞被提供足够氧的那些疾病。通 25 过将细胞置于其中所述细胞经历或暴露于或者将经历缺氧的条件中可以治疗一些公知的疾病。这种疾病之一是如此处描述的肿瘤和癌症。目前，适于在转录水平和翻译水平降低 PRF1 表达和/或活性的任何化合物，尤其此处描述的那些化合物可以适于这类疾病的预防和/或治疗。这些疾病在此处也称为缺氧相关的疾病。这些化合物或方法可以有效治疗尤其是肿瘤， 30 其基于肿瘤血管发生的抑制。

5 本发明人已经令人惊奇地发现 PRF1 是与癌和肿瘤和其他生物学过程如转移、肿瘤发生、细胞迁移、胞外基质中的细胞运动和胞外基质中的细胞生长和基于上面的或者与这些过程之一有关的任何疾病或病症有关的一种有价值的靶标。更具体地,本发明人已经发现 PRF1 是 PI-3 激酶/PTEN 途径和/或 HIF1 α 途径的下游靶标。甚至更令人惊奇地,本发明人已经发现 PRF1 与本文图 1 中描述的 PI 3-激酶途径的几个分支有关。此外,本发明人已经令人惊奇地发现 PRF1 通过 HIF1 α 途径被高度调节, HIF1 α 途径与也在图 7 中描述的 Akt 途径平行。关于 PRF1, 涉及葡萄糖运输、生长转化和转移和迁移的分支最相关。这些过程中 PRF1 的重要性在抑制剂功能, 10 更具体地 PTEN 肿瘤抑制剂功能的丧失中表现出来。如将在实施例中表明的, 在 PTEN——PI -3 激酶途径的一种抑制剂——无活性的条件下, PRF1 将被上调。

PRF1 是一种有价值的诊断标记, 其表达在 PTEN 负 (minus) 细胞中增加, PTEN 负细胞是许多晚期肿瘤和病症所特有的(Cantley, L. C. 和 Neel, 15 B. G. (1999). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4240 – 4245; Ali, I. U. (2000). I. Natl. Cancer Inst. 92, 861 – 863)。此外, PTEN 的丧失与各种肿瘤细胞的增加的侵入性和侵入行为相关。因此, PRF1 是与其有关的一种有价值的诊断剂。另一方面, 这些结果还表明 PRF1 是 PI 3-激酶/PTEN 途径和/或 HIF1 α 途径的有价值的下游药物靶标, 因此通过如也将在本文中公开的不同治疗 20 方法和各种试剂可以处理这些途径。这意味着 PRF1 的抑制剂是控制细胞的转移性和迁移行为的适宜方法并且这是治疗肿瘤和癌症, 更具体地转移性并且其细胞表现出转移和/或迁移行为的肿瘤和癌症的适宜方法, 这些肿瘤和癌症通常在此处被称为“如此处描述的疾病”或“如此处描述的病症”。如此处描述的疾病以及如此处描述的病症也包括肿瘤发生和转移, 但是不 25 限于这些。其他疾病和病症分别通常是涉及与 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径, 更具体地图 1 和图 12 中描述的那些不同过程有关的任何疾病或病理学症状。涉及 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的这些疾病之一特别是糖尿病。这尤其适用于如此处描述的那些疾病和如此处描述的那些病症, 其中与这些疾病或病症有关的细胞是 PTEN 阴性的, 这意味着肿瘤抑制剂 30 PTEN 无活性或者具有降低的活性水平, 或者其中涉及 PI 3-激酶途径和/

或 HIF1 α 途径的疾病或病症。此外转移性肿瘤，糖尿病分别属于这种类型的疾病和病症。因此，细胞，尤其是与此处描述的疾病或病症有关并且是 PTEN 阴性的那些细胞易于被作用模式为例如降低或消除有关各自细胞中 PRF1 活性的药物治疗。因此，可以使用所述药物有利地治疗其肿瘤为

5 PTEN 阴性或者有 PTEN 阴性细胞，尤其如果这些细胞与如此处描述的疾病或者如此处描述的病症有关的患者。对于各种诊断剂或药物同样适用。

用所述药物可以有利地治疗的另一组患者是患有具有 PTEN 功能丧失发生率高的癌症，特别是晚期肿瘤的那些患者(Cantley, L. C.和 Neel, B. G (1999). 肿瘤抑制的新的理解: PTEN 通过抑制磷酸肌醇 3-激酶/AKT 途径

10 和/或 HIF1 α 途径抑制肿瘤形成. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 4240-4245; Ali, I. U. (2000). 子宫内膜的看门人:PTEN 肿瘤抑制基因. J Natl Cancer Inst 92, 861-863)。PTEN 的丧失与各种肿瘤细胞的增强的侵略性和侵入性行为相关。因为该原因，在优选实施方案中，如果上述前提条件——即 PTEN 与增加的侵略性和侵入性行为相关——被满足，那么针对 PRF1 的那些诊断

15 剂和治疗剂可用于任何肿瘤。

根据此处所给的公开，即 PRF1 是 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的下游靶标，而且涉及增殖控制、转移和迁移，本领域技术人员可以开发分别针对此处描述的疾病和此处描述的病症的治疗剂和诊断剂。关于一旦靶标被证实可以怎样筛选药物的代表性描述由例如 Prendergast, Nature

20 Biotechnology, 2001 年 10 月, 卷 19, 919-921 页或 Torrance C. J. 等人, Nature Biotechnology, 2001 年 11 月, 卷 19, 940 - 945 页描述。

由于 PRF1 与上面概述的机理有关，其或者编码其的核酸也可用作标记物以诊断细胞或者在其体内有这种细胞的患者，是否将经历转移、肿瘤发生或者此处描述的任何其他过程或者其是否遭受氧、葡萄糖和/或葡萄糖

25 耗尽，这又预示肿瘤细胞，尤其快速生长的癌细胞。这种方法可行并且可应用于该目的的一个实例是例如，ICAM-1。ICAM-1 用于经历转移的胃癌的预后(Maruo Y, Gochi A, Kaihara A, Shimamura H, Yamada T, Tanaka N, Orita K. *Int J Cancer*. 2002 年 8 月 1 日;100(4):486-490)，其中发现在肝脏转移患者中 s-ICAM-1 升高了。在另一实例中，骨桥蛋白被用作乳腺癌

30 的预后标记物(Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, De Silva Rudland

S, Barraclough R, Winstanley JH, Howitt R, West CR. *Cancer Res.* 2002年6月15日;62(12):3417-3427)。在这个范围内, PRF1 的存在或者存在水平(蛋白质或 mRNA)或者活性水平可用作标记物并且或多或少与 PRF1 特异相互作用的任何化合物将因此是适宜的诊断剂和/或适宜的分析工具或方法。

5 下面将公开在任何情况下与 PRF1 特异和/或选择性相互作用的药物和诊断剂的方法和设计原理。

根据这些发现证明 PRF1 是适宜的下游药物靶标, 其容许仅一些方面的选择性调节, 这些方面通常涉及 PI-3 激酶途径, 如转移和迁移以及缺氧应答、细胞生长、伤口愈合、翻译控制和葡萄糖运输和选择性和特异性诊断方法, 即和通常与 PI 3-激酶途径相关的过程, 更具体地转移和迁移以及生长翻译和葡萄糖运输的检测。

PI 3-激酶途径其特征在于经生长因子诱导后的 PI 3-激酶活性和平行的信号途径。细胞的生长因子刺激导致细胞膜上它们相关受体的激活, 其又与胞内信号分子如 PI 3-激酶相关并将 PI 3-激酶激活。PI 3-激酶(由调节 p85 和催化 p110 亚基组成)的激活通过磷酸化导致 Akt 的激活和/或 HIF1 α 的激活, 由此支持细胞应答如增殖, 存活或向下游迁移。PTEN 因此是涉及磷脂酰肌醇 (PI) 3-激酶途径的肿瘤抑制剂, 过去已经广泛研究其在调节细胞生长和转化中的作用(关于综述参见 Stein, R. C.和 Waterfield, M. D. (2000). PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today* 6, 347-357; Vazquez, F. 和 Sellers, W. R. (2000). The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3- kinase signaling. *Biochim Biophys Acta* 1470, M21-35; Roymans, D.和 Slegers, H. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem* 268, 487-498)。肿瘤抑制剂 PTEN 通过逆转 PI 3-激酶-催化反应起 PI 3-激酶负调节物的作用和由此确保途径的激活以瞬时和可控方式发生。PTEN 的功能失活导致 PI 3-激酶和/或 HIF1 α 途径信号转导的慢性超活化。通过加入小分子抑制剂 LY294002 可以阻断 PI 3-激酶活性和/或 HIF1 α 活性。以平行途径作用的信号激酶 MEK 的活性和下游响应可以例如被小分子抑制剂 PD98059 抑制。

30 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 活性通过 PTEN 功能丧失的慢性激活是肿瘤

发生和转移的主要贡献者，显示该肿瘤抑制剂代表控制细胞增殖的重要关卡。PTEN 剔除 (knock out) 细胞显示与其中 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径已经通过 PI 3-激酶的激活形式被慢性诱导的细胞类似的特性(Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. 和 Pandolfi, P. P. (1998). PTEN is essential for embryonic development and tumour suppression. Nat Genet 19, 348-355. Klippel, A., Escobedo, M. A., Wachowicz, M. S., Apell, G., Brown, T. W., Giedlin, M. A., Kavanaugh, W. M.和 Williams, L. T. (1998). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. Mol Cell Biol 18, 5699-5711. Kobayashi, M., Nagata, S., Iwasaki, T., Yanagihara, K., Saitoh, I., Karouji, Y., Ihara, S. 和 Fukui, Y. (1999). Dedifferentiation of adenocarcinomas by activation of phosphatidylinositol 3-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 4874-4879)。

通过 PI 3-激酶途径和/或活化, 优选 HIF1 α 途径的超活化也可以表征如此处描述的各种疾病。该活化或超活化类似于缺少 PTEN 活性的细胞的情形。如此处所用的 PI 3-激酶途径的超活化和/或 HIF1 α 途径的活化具体指与正常观察到的所述途径的活性——即特定种类的细胞的 PI 3-激酶途径, 其中该细胞不是该疾病或病症的部分或者与其相关——相比 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的增加的活性。

PTEN 涉及也称为 PTEN 相关途径的几个途径如 PI3K/PTEN 途径, Akt 途径, EGF-相关自分泌回路 (loop) 和 mTOR 途径和, 如被本发明人记载的, HIF1 α 途径。PI 3-激酶途径实际上是直接或间接涉及 PI 3-激酶的任何途径。PI 3-激酶在该途径中可以用作抑制剂或激活剂, 或者它可以被途径的其它元件调节。

存在丰富的现有技术描述涉及 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的疾病和症状。这些症状和疾病中的任何一种可以因此通过本文教导设计、筛选或制备的本发明方法和药物和诊断剂处理。为了不限制性地举例说明的原因, 它是指下列各项: 子宫内膜癌, 结肠直肠癌, 神经胶质瘤, 子宫内膜癌, 腺癌, 子宫内膜增生, 考登综合征, 遗传性非息肉病结肠直肠癌, Li-Fraumene's 综合征, 乳腺-卵巢癌, 前列腺癌(Ali, I. U., Journal of the

National Cancer Institute, Vol. 92, no. 11, June 07, 2000, 第 861 – 863 页), 班-佐综合征, LDD (Lhermitte-Duklos'综合征) (Macleod, K., 上文)错构瘤-巨头病, 包括 Cow 病 (CD) 和 Bannayan-Ruvalcaba-Riley 综合征 (BRR), 粘膜皮肤损伤 (例如毛膜瘤 (trichilemmomas)), 巨头, 智力低下, 胃肠
5 harmatomas, 脂瘤, 甲状腺腺瘤, 乳腺纤维囊性病, 小脑发育不良性神经节细胞瘤和乳腺和甲状腺恶性肿瘤 (Vazquez, F., Sellers, W. R., 上文)。

鉴于此, PRF1 是 PI 3-激酶途径和/或 HIF1 α 途径的有价值的下游药物靶标, 其可以被药物靶定, 该药物将比针对 PRF1 的上游靶标的其他药物具有更小的副作用。在本发明范围内提供了适于比本领域中公知的药理学活
10 性化合物, 如, 例如, LY 294002 更具选择性的药理学活性化合物的设计、筛选、开发和生产的药物靶标。通过控制效应分子, 即 PRF1 和参与该途径的其他下游分子的该特定部分, 仅极有限量的其平行分支或信号级联放大中另外的上游靶可能导致不期望的作用。因此, 涉及细胞周期、DNA 修复、凋亡、葡萄糖转运、翻译的 PI-3 激酶/PTEN 途径和/或 HIF1 α 途径
15 的其他活性将不受影响。

如此处描述的 PRF1 除了是与上述指定的疾病和调节网络有关的有价值的靶标分子以外, 在核酸水平和蛋白质水平上, 还是与组合治疗的开发或应用和用于这种组合治疗的药物有关的尤其有价值的靶标。换句话说, PRF1, 即编码其的核酸以及蛋白质, 可用于筛选、产生、生产或设计可用
20 于细胞、组织、器官或患者的敏化的化合物, 该敏化使得该细胞、组织、器官或患者对治疗, 优选使用在核酸水平上或蛋白质水平上与针对 PRF1 的化合物和药物分别不同的化合物或药物的治疗敏感。在本发明范围中, 所述化合物还用于生产分别治疗任何如此处描述的病症和疾病之一的药物, 该药物被单独使用或者分别与针对 PRF1 的化合物或药物一起使用。

不希望被任何理论束缚, 似乎通过 PI 3-激酶途径的 HIF1 α 分支以及 AKT 分支调节 PRF1。由于在缺氧条件下 HIF1 α 被上调和在胁迫条件下 Akt 被上调以引发阻碍细胞的凋亡反应的生存应答, 所以针对如此处描述的 PRF1 并且可用作药物或者 PRF1 的相互作用配偶体的化合物, 在核酸水平和/或蛋白质水平上, 可以将细胞转移到一种情形, 在该情形中其他化合物
30 尤其有效。因此在本发明范围内使用所述针对 PRF1 的化合物筛选可用于

治疗任何此处描述的疾病（包括但不限于肿瘤疾病），和用于治疗所述疾病的化合物。因此，可以，例如，在缺氧条件下和/或将胁迫应用于细胞，如应用细胞抑制剂，例如，顺铂、放射，优选与肿瘤的治疗和高热联合使用实施筛选。优选地，在用于此处公开的疾病之一的治疗和/或治疗该疾病的药物的开发的化合物和药物的筛选、产生、生产和/或设计过程方法中包括两个靶标，其中所述靶标之一优选不同于 PRF1。

针对转录因子如 HIF1 α 的筛选可以成功地进行，可以从 Welsh, S. J. 等人, *Molecular Cancer Therapeutics* 卷 2, 235-243, 2003 年 3 月得到。

此外，不诱导胰岛素信号，这意味着实际上避免了与 LY294002 的使用相关的观察到的糖尿病响应或其它副作用。LY294002（2-(4-吗啉基)8-苯基色酮）是 Lilly 研究实验室(Indianapolis)开发的作为 PI-3K 抑制剂的几种色酮衍生物小分子抑制剂之一（Vlahos 等, 1994, *JBC*, 269, 5241-5248）。它靶向 PI-3K 分子它们的催化亚基，p110 并且通过与 ADP 竞争结合催化中心来发挥作用。然而，LY294002 不能辨别不同的 p110 同工型（ α , β , γ , δ ），这些同工型提示具有不同细胞功能。

PRF1 也是雷帕霉素处理的 mTOR 的另一下游。mTOR（雷帕霉素的哺乳动物靶），也称为 Raft 或 FRAP，作用于 PI 3-激酶的下游来调节诸如 pp70 S6 激酶依赖性进入细胞周期的过程。mTOR 用作生长因子和营养可用性的传感物以通过激活 pp70 S6 激酶和起始因子 4E 来控制翻译。mTOR 的功能受细菌大环内酯雷帕霉素抑制，雷帕霉素抑制 T-细胞和某些肿瘤细胞的生长(Kuruville 和 Schreiber 1999, *Chemistry & Biology* 6, R129-R136)。

雷帕霉素及其衍生物是当前用于临床的适当药物的事实证明药靶更有益和具有更小副作用，更具体地它是关于例如 Yu 等(Yu, K.等(2001) *Endocrine-RelatCanc* 8, 249)证明的特定分子机制。因为雷帕霉素用于人类中免疫抑制，干扰 PRF1 的药物可能对于该适应症更特异。

由于上面概述的 PRF1 的特异性以及其作为潜在的药物靶标的应用，其还可以作为诊断标记物并且优选允许 PRF1 的选择性和特异检测的分别设计的试剂将用作诊断剂。再次，标记物对特定生物学现象或者信号途径越接近和越特异，其对于最后观察的结果越接近，关于最终过程（在本情况中分别是转移和肿瘤发生）是否可能发生所作出的声明就越可靠。因此，

分别基于 PRF1 和检测 PRF1 的诊断剂是允许分别对肿瘤发生和转移，或者此处描述的其他疾病和此处描述的病症之一的可能性的更可靠评估的诊断剂。这些预测尤其涉及此处描述的那些疾病和此处描述的病症。在基于如此处公开的 PRF1 的治疗剂的设计、筛选和/或生产中，PRF1 可用作
5 可用作药物或候选药物或者作为诊断剂的化合物所针对的化合物。这些化合物属于不同的化合物类别如抗体、肽、抗促成素、适体、spiegelmer、核酶、反义寡核苷酸和 siRNA 以及小分子。使用 PRF1 自身作为物理或化学实体或者与 PRF1 相关的信息设计、选择、筛选、产生和/或生产该化合物。在所述类别的化合物的设计、选择、筛选、产生和/或生产中，PRF1
10 也将称为用于该过程而不是各种化合物对需要该化合物的患者的最终应用中的靶标。在提供各种类别的化合物的过程中，可以使用 PRF1 或者编码 PRF1 的核酸，包括具有或者含有上述变异之一的一种实施方案。如此处所用的术语 PRF1 包括 PRF1 的任何片段或衍生物，其允许设计、选择、筛选、产生和/或生产各类化合物的所述类别的化合物，该化合物被应用时
15 反过来可作为药物或具有同样活性的诊断剂。如此处所用的术语编码 PRF1 的核酸将包括含有编码如上面定义的 PRF1 的核酸的核酸，或者其一部分。编码 PRF1 的核酸的一部分被同样考虑，只要其仍然适于所述类别的化合物的设计、选择、筛选、产生和/或生产，该化合物被应用时反过来可作为药物或具有同样活性的诊断剂。编码 PRF1 的核酸可以是基因组核
20 酸、hnRNA、mRNA、cDNA 或者它们每一种的一部分。

在本发明内，如上述的化合物，即，但不限于，抗体、肽、抗促成素、适体、spiegelmer、核酶、反义寡核苷酸和 siRNA 可以为了如关于 PRF1 所描述的同样的目的使用。

如上面概述的，在本发明内，除了 PRF1 或者其一部分或者衍生物或者
25 者相应的核酸序列，如此处描述，还可以使用其他方法或化合物以产生或者抑制 PRF1 或者编码 PRF1 的核酸引起的效果。可以在筛选方法中确定或者选择这些方法。在该筛选方法中，第一步是提供一种或几种所谓的候选化合物。如此处所用的候选化合物是如下化合物，将在试验系统中试验
30 候选化合物治疗或减轻如此处描述的各种疾病和如此处描述的病症的适宜性，或者候选化合物将用作这种疾病和病症的诊断方法或试剂。如果候

选化合物在试验系统中表现出相应效果,那么所述候选化合物是所述疾病和病症的适宜方法或适宜试剂和,原则上,也是所述疾病和病症的适宜的
诊断剂。在第二步中,将候选化合物与 PRF1 表达系统或者 PRF1 活性系
统接触。PRF1 活性系统在此处也被称为检测 PRF1 活性的系统。

5 PRF1 表达系统基本上是表现或显示出 PRF1 的表达的表达式,从而
表达程度或水平基本上可被改变。PRF1 活性系统基本上是一种表达式,
其中测量 PRF1 的活性或者活性情况而不是 PRF1 的表达。更具体地,试
10 验了在候选化合物的影响下,PRF1 或者编码 PRF1 的核酸的活性是否不同
于没有候选化合物的情形。不管具体系统是表达式还是活性系统,在本
发明范围内,可以发生并测量活性和表达各自的增加或减少。通常,该表
达系统和/或活性系统是一种体外反应系统,如细胞提取物或者该细胞提取
物的级分如细胞核提取物。如此处所用的 PRF1 表达式或活性系统也可
以是细胞、组织或器官,优选与如此处描述的疾病或如此处描述的病症有
15 关的细胞或组织或器官的细胞。

15 在本发明范围内,还可以实施根据本发明的试剂的筛选方法,从而步
骤 d) 后,该方法的内在顺序步骤 1 的第一轮中得到或者鉴定的候选化合
物被置于步骤 c),从而表达式或活性系统不同于在表征候选化合物的
第一轮中所用的各自表达式或活性系统。因此,在第一轮中,表达式
和活性系统分别可以是与此处描述的疾病有关的系统,其中在第二轮中细
20 胞可以是与所述疾病无关的细胞。在备选实施方案中,使用两种细胞类型
的顺序被颠倒。

可以在每个表达水平确定活性系统或表达式中是否有增加或者降
低,这可以例如通过测量在候选化合物的影响下编码 PRF1 的核酸,更具
体地 mRNA 的量的增加或减少,或者所表达的 PRF1 的增加或减少来确定。
25 这种改变,如对于 mRNA 或者蛋白质的测量,更具体地定量测量所需要
的技术是本领域技术人员公知的。本领域技术人员还公知的是例如用适宜
的抗体确定 PRF1 的量或含量的方法。可以如本领域技术人员公知的和例
如 Harlow, E., 和 Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring
Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY,(1988)所描述的产生抗体。

30 对于 PRF1 表达式,可以优选在功能测定法中确定 PRF1 的活性的

增加或减小。

通常通过将候选化合物的水性溶液加到各自反应系统（其在此处通常也被称为试验系统）实施候选化合物分别与表达系统和活性系统的接触。除了水性溶液还可以使用有机溶剂中的候选化合物的悬浮液或溶液。水溶液优选为缓冲液。

优选地，在每轮分别使用表达系统和活性系统中，仅使用单一候选化合物。然而，还属于本发明范围内的是几个该类测试在高通量系统中平行进行。

按照本发明的方法的另一步骤在于测定在候选化合物的影响下，表达系统和活性系统的表达或活性是否分别相对于 PRF1 或编码其的核酸变化。典型地，这通过将加入候选化合物后的系统反应与未加入候选化合物的系统反应比较完成。优选地，候选化合物是化合物文库的成员。基本上任何化合物文库适合于本发明目的，而与化合物类别无关。适当的化合物文库尤其有由小分子组成的文库，由肽、蛋白质、抗体、抗促成素和功能核酸组成的文库。如本领域技术人员公知可以产生后者化合物并在本文中概述。

PRF1 的特异性抗体或编码 PRF1 的核酸的制备为本领域技术人员已知，并且例如在 Harlow, E., 和 Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988)中描述。优选地，单克隆抗体可以与本发明结合使用，其可以按照 Cesar 和 Milstein 的方案和基于其的进一步发展来制备。本文所用抗体包括但不限于，完全抗体，抗体片段或衍生物如 Fab 片段，Fc 片段和单链抗体，只要它们适合于和能够与蛋白激酶 N β 结合。除了单克隆抗体以外，还可以使用和/或产生多克隆抗体。多克隆抗体的产生也为本领域技术人员已知，例如在 Harlow, E., 和 Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988)中描述。优选地，用于治疗目的的抗体是以上定义的人源化的或人的抗体。

按照本发明可以使用的抗体可以具有一个或几个标记或标签。这些标记或标签可以在其诊断应用或其治疗应用中用于检测抗体。优选地，标记和标签选自包含抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、生物素、金和荧光素

的组，并例如在 ELISA 方法中使用。这些和另外的标记在例如 Harlow, E., 和 Lane, D., "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988)中描述。

5 还属于本发明范围内的是，标签或标记显示除了检测以外的额外功能，如与其它分子相互作用。该相互作用可以例如是与其它化合物的特异相互作用。这些其它化合物可以是其中使用抗体的系统如人或动物体固有的那些或通过使用各自抗体分析的样品。适当的标记可以例如是生物素或荧光素，其特异相互作用的配偶体如抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白等存在于各种化合物或结构上以与如此标记或带标签的抗体相互作用。

10 使用 PRF1 蛋白质或编码 PRF1 的核酸可以产生的另一类药物以及诊断剂是与其结合的肽。这些肽可以通过使用按照现有技术的方法如噬菌体展示产生。基本上，产生诸如噬菌体形式的肽文库，这种文库与靶分子接触，在本情形中靶分子是例如 PRF1。随后从各自反应中优选作为与靶分子的复合体去除与靶分子结合的那些肽。本领域技术人员已知结合特性至少在一定程度上依赖于具体实现的实验设定如盐浓度等。在从未结合的文库成员中分离以较高亲和力或较大力与靶分子结合的那些肽以后，和任选地还在从靶分子和肽的复合体中去除靶分子以后，可以随后表征各个肽。在表征前，任选地如例如通过增殖编码肽的噬菌体来实现扩增步骤。表征优选包含将靶结合肽测序。基本上，肽不受它们的长度限制，然而在各种方法中优选获得优选长度约为 8-20 个氨基酸的肽。文库的大小可以为约 15 20 10^2 至 10^{18} ，优选 10^8 至 10^{15} 种不同的肽，然而不限于此。

一种具体形式的靶结合多肽是所谓的“抗促成素”，其尤其在德国专利申请 DE 197 42 706 中描述。

25 按照本发明，PRF1 以及编码 PRF1 的核酸可以在筛选方法中用作制备或开发治疗本文所述疾病和本文所述疾病症状的药物的靶，以及制备和/或开发用于诊断所述疾病和所述症状的工具，其中在筛选方法中使用小分子或小分子文库。该筛选包含同时或顺序将靶分子与优选来自上面指定文库的那些的单个小分子或多种小分子接触的步骤，和鉴定与靶分子结合的那些小分子或文库成员，其如果连同其它小分子筛选，可以从未结合或未 30 相互作用的小分子中分离。应当认识到结合和未结合可强烈受具体的实验

设定影响。在改变反应参数的严谨度方面可以改变结合和未结合的程度，这允许微调该筛选方法。优选地，在鉴定一种或几种与靶分子特异相互作用的小分子以后，可以进一步表征该小分子。这种进一步表征可以例如在于鉴定小分子和确定其分子结构和另外的物理、化学、生物和/或医学特性。

5 优选地，天然化合物具有约 100-1000 Da 的分子量。还优选地，小分子是遵守本领域技术人员已知的 Lepinsky 五项法则的那些。备选地，与优选非合成的天然产物相反，还可以限定小分子以使它们是优选产生于组合化学的合成小分子。然而，应当注意这些定义是仅帮助对本领域各个术语的一般理解。

10 还属于本发明范围内的是将 PRF1 和/或编码 PRF1 的核酸用作制备或选择适体和 spiegelmer 的靶分子，其然后可以直接或间接用作药物或诊断剂。

适体是单链或双链的并且与靶分子特异性相互作用的 D-核酸。适体的制备或选择例如在欧洲专利 EP 0 533 838 中描述。基本上实现下列步骤。

15 首先，提供核酸即潜在适体的混合物，其中每个核酸典型地包含几个、优选至少 8 个顺序随机化的核苷酸的片段。该混合物随后与靶分子接触，其中如基于与候选混合物相比，对靶增加的亲和力或与其的更大力，核酸与靶分子结合。结合核酸随后从混合物的剩余部分中分离。任选地，使用例如聚合酶链式反应扩增如此获得的核酸。这些步骤可以重复数次最终提供

20 与靶特异性结合的核酸比率提高的混合物，然后从中任选地选择最终结合核酸。这些特异性结合的核酸称为适体。明显的是在产生或鉴定适体的方法的任何阶段，可以取单个核酸混合物样品来使用标准技术测定其序列。在本发明范围内的是可以例如通过引入产生适体的本领域技术人员已知的限定化学基团来稳定适体。该修饰可以例如在于在核苷酸糖部分的 2'-

25 位引入氨基。适体当前用作治疗剂。然而，还属于本发明范围内的是如此选择或产生的适体可以用于靶验证和/或作为先导物质用于开发药物，优选基于小分子的药物。这实际上通过竞争测定完成，其中靶分子和适体之间的特异相互作用受候选药物的抑制，候选药物从靶和适体的复合体中替代适体，可以假定各个候选药物允许特异性抑制靶和适体之间的相互作用，

30 和如果相互作用是特异性的，所述候选药物至少在原则上将适合于阻断靶

和因此在各种包含该靶的系统中降低其生物有效性或活性。如此获得的小分子可以然后进行进一步的衍生化和修饰以优化其物理、化学、生物和/或医学特性如毒性、特异性、生物可降解性和生物利用度。

基于类似原理产生或制备 *spiegelmer*，其可以按照使用 PRF1 或编码 PRF1 的核酸的本发明使用或产生。*Spiegelmer* 的制备在国际专利申请 WO 98/08856 中描述。*Spiegelmer* 是 L-核酸，这意味着它们由 L-核苷酸组成，不同于如适体由 D-核苷酸组成的适体。*Spiegelmer* 其特征不在于它们在生物系统中具有极高稳定性和与适体相比与它们针对的靶分子特异性相互作用的事实。为了产生 *spiegelmer*，产生 D-核酸异质群体并将该群体与靶分子的旋光对映体接触，在本情形中例如与天然存在的 PRF1 的 L-对映异构体的 D-对映异构体接触。随后，分离不与靶分子的旋光对映体相互作用的那些 D-核酸。然而，分离与靶分子的旋光对映体相互作用的那些 D-核酸，任选地测定和/或测序和随后基于获自 D-核酸的核酸序列信息合成相应的 L-核酸。序列和与靶分子的旋光对映体相互作用的上述 D-核酸相同的这些 L-核酸，将特异性地与天然存在的靶分子而不是与其旋光对映体相互作用。类似于产生适体的方法，还可以重复各个步骤数次和由此富集与靶分子的旋光对映体特异性相互作用的那些核酸。

基于本文公开的作为靶分子的 PRF1 或编码 PRF1 的核酸可以制备或产生的另一类化合物是核酶，反义寡核苷酸和 siRNA。由于 PRF1 的功能和作用模式，优选基于本发明的公开，更优选基于此处公开和描述的核酸序列产生和/或生成这些种类的分子，这些分子也被称为和用作基于核酸的药物。

所有上述核酸的共同特征是它们不与靶分子在翻译产物水平上（在本情形中 PRF1）相互作用，而是与转录产物（即编码 PRF1 的核酸如基因组核酸或其衍生的任何核酸如分别地相应的 hnRNA，cDNA 和 mRNA）相互作用。因此，上述类别的化合物的靶分子优选为 PRF1 的 mRNA。

核酶是有催化活性的核酸，优选由基本上包含两部分的 RNA 组成。第一部分显示催化活性而第二部分负责与靶核酸（在本情形中编码 PRF1 的核酸）的特异相互作用。当靶核酸和核酶的第二部分之间典型地通过两条杂交链上基本上互补的碱基序列杂交和沃森-克里克碱基配对相互作用

时，催化活性部分可变得有活性，这意味着它在分子内或分子间催化靶核酸，假定核酶的催化活性是磷酸二酯酶活性。随后，可以进一步降解靶核酸，由于缺乏新合成的 PRF1 和在先存在的 PRF1 的更新，最终导致靶核酸以及衍生于所述靶核酸的蛋白质（在本情形中为 PRF1）的降解。核酶，
5 它们的应用和设计原理为本领域技术人员已知，例如在 Doherty 和 Doudna (Ribozym structures and mechanism. Annu ref. Biophys. Biomolstruct. 2001 ; 30 :457-75) 和 Lewin & Hauswirth (Ribozyme Gene Therapy: Applications for molecular medicine. 2001 7: 221-8)中描述。

反义寡核苷酸分别在制备药物和作为诊断剂中的应用是基于类似的作用方式。基本上，基于碱基互补性反义寡核苷酸与靶 RNA、优选与 mRNA 杂交，由此激活 RNase H。RNase H 被磷酸二酯和硫代磷酸酯偶联的 DNA 激活。然而，除了硫代磷酸酯偶联的 DNA 以外，磷酸二酯偶联的 DNA 被细胞核酸酶迅速降解。这些抗性的非天然存在的 DNA 衍生物与 RNA 杂交后不抑制 RNase H。换句话说，反义多核苷酸仅作为 DNA RNA 杂交复合
15 体有效。这类反义寡核苷酸的实例尤其在美国专利 US 5,849,902 和 US 5,989,912 中描述。换句话说，基于靶分子（在本情形中为编码 PRF1 的核酸）的核酸序列，其来自从中原则上可以推断各自核酸序列的靶蛋白质，或通过知道如特别是 mRNA 的核酸序列，基于碱基互补的原理可以设计适当的反义寡核苷酸。

特别优选的是含有短序列的硫代磷酸酯 DNA（3-9 个碱基）的反义寡核苷酸。激活细菌 RNase H 需要最少 3 个 DNA 碱基，哺乳动物 RNase H 激活需要至少 5 个碱基。在这些嵌合寡核苷酸中，存在形成 RNase H 的底物的中央区域，侧邻由不形成 RNase H 的底物的修饰核苷酸组成的杂交
20 “臂”。例如通过 2'-O-甲基或 2'-氟可以修饰嵌合寡核苷酸的杂交臂。备选方法在所述臂中使用磷酸甲酯或氨基磷酸酯键。用于实施本发明的反义寡核苷酸的另外实施方案是对甲氧基寡核苷酸，部分对甲氧基寡脱氧核糖核苷酸或对甲氧基寡核苷酸。

对于本发明特别相关和有用的是在上述两个 US 专利中更具体描述的那些反义寡核苷酸。这些寡核苷酸不含有天然存在的 5'→3'-连接的核苷
25 酸。然而寡核苷酸具有两类核苷酸：激活 RNase H 的 2'-脱氧硫代磷酸酯

和不激活 RNase H 的 2'-修饰核苷酸。2'-修饰核苷酸之间的键可以是磷酸二酯，硫代磷酸酯或对乙氧基磷酸二酯。通过连续的 RNase H-激活区域完成 RNase H 的激活，该区域在 3 和 5 之间含有激活细菌 RNase H 的 2'-脱氧硫代磷酸酯核苷酸和在 5 和 10 之间含有激活真核的、特别是哺乳动物 RNase H 的 2'-脱氧硫代磷酸酯核苷酸。防止降解的保护是通过使 5'和 3'末端碱基高度抗核酸酶和任选地通过放置 3'末端保护基团来完成。

更具体地，反义寡核苷酸包含 5'末端和 3'末端；11-59 5'→3'-连接的核苷酸独立地选自 2'-修饰磷酸二酯核苷酸和 2'-修饰的对烷氧基磷酸三酯核苷酸组成的组；和其中 5'-末端核苷酸与 3 个和 10 个连续硫代磷酸酯连接的脱氧核糖核苷酸之间的 RNase H 激活区域连接，和其中所述寡核苷酸的 3'-末端选自自由反向脱氧核糖核苷酸、1-3 个硫代磷酸酯 2'-修饰核糖核苷酸的连续序列、生物素基团和对烷氧基磷酸三酯核苷酸组成的组。

还可以使用反义寡核苷酸，其中不是 5'末端核苷酸而是上述 3'末端核苷酸与 RNase H-激活区域连接。而且，5'末端选自特定组而不是所述寡核苷酸的 3'末端。

适当的和有用的反义寡核苷酸还有以下那些：包含 5'末端 RNase H 激活区域和在 5 个和 10 个连续脱氧硫代磷酸酯核苷酸之间；在 11-59 个连续 5'→3'-连接的 2'-甲氧基核糖核苷酸之间含有 RNase H 激活区域；和核酸外切酶封闭基存在于寡核苷酸的 3'末端，其来源于由非-5'-3'-磷酸二酯-连接的核苷酸，1-3 个连续的 5'-3'-连接的修饰核苷酸和非核苷酸化学封闭基组成的组。

如下可以表征两类特别优选的反义寡核苷酸：

第一类反义寡核苷酸，在本文中也称为第二代反义寡核苷酸，包含总共 23 个核苷酸，其包含 5' → 3'方向的 7 个 2'-O-甲基核糖核苷酸的一段序列，9 个 2'-脱氧核糖核苷酸的一段序列，6 个 2'-O-甲基核糖核苷酸的一段序列和 3'-末端 2'-脱氧核糖核苷酸。从 7 个 2'-O-甲基核糖核苷酸的第 1 个基团开始，首先 4 个是硫代磷酸酯连接，而随后 4 个 2'-O-甲基核糖核苷酸是磷酸二酯连接。此外，在最后一个即 2'-O-甲基核糖核苷酸的最 3'-末端和由 9 个 2'-脱氧核糖核苷酸组成的序列的第一个核苷酸之间存在磷酸二酯键。所有 2'-脱氧核糖核苷酸是硫代磷酸酯连接。硫代磷酸酯还存

在最后一个即最 3'-末端的 2'-脱氧核苷酸和随后由 6 个 2'-O-甲基核糖核苷酸组成的序列的第一个 2'-O-甲基核糖核苷酸之间。从 6 个 2'-O-甲基核糖核苷酸的该基团开始，它们中的首先 4 个，再次以 5' → 3' 方向，是磷酸二酯键连接的，而它们中的最后 3 个，对应于位置 20-22，是硫代磷酸酯连接的。最后一个，即末端 3'-末端 2'-脱氧核苷酸通过硫代磷酸酯键与最后一个即最 3'-末端 2'-O-甲基核糖核苷酸连接。

该第一类也可以通过参考下列示意性结构描述：
RRRnnnnNNNNNNNNNnnnRRRN。因此，R 表示硫代磷酸酯连接的 2'-O-甲基核糖核苷酸(A, G, U, C)；n 表示 2'-O-甲基核糖核苷酸(A, G, U, C)；N 表示硫代磷酸酯连接的脱氧核糖核苷酸(A, G, T, C)。

第二类特别优选的反义寡核苷酸，在本文中也称为第三代反义寡核苷酸或 GeneBlocs，也包含具有下列碱基结构（5' → 3' 方向）的总共 17-23 个核苷酸。

在 5'-末端存在反向无碱基核苷酸，其是适合于赋予对外切核酸酶活性的抗性的结构和例如在 WO 99/54459 中描述。该反向无碱基与磷酸二酯连接的 5-7 个 2'-O-甲基核糖核苷酸的序列连接。在该 5-7 个 2'-O-甲基核糖核苷酸的序列之后有 7-9 个 2'-脱氧核糖核苷酸的序列，其全部都是硫代磷酸酯连接的。最后一个即最 3'-末端的 2'-O-甲基核糖核苷酸和包含 2'-脱氧核糖核苷酸的序列的第一个 2'-脱氧核糖核苷酸之间的连接是通过磷酸二酯键发生。与 7-9 个 2'-脱氧核糖核苷酸的序列邻近，连接由 5-7 个 2'-O-甲基核糖核苷酸组成的序列。最后一个 2'-脱氧核糖核苷酸与稍后提及的由 5-7 个 2'-O-甲基核糖核苷酸组成的序列的第一个 2'-O-甲基核糖核苷酸的连接是通过硫代磷酸酯键发生。5-7 个 2'-O-甲基核糖核苷酸的序列是磷酸二酯连接的。在第二个 5-7 个 2'-O-甲基核糖核苷酸序列的 3'-末端连接另一个反向无碱基。

该第二类还可以通过参考下列示意性结构描述：（GeneBlocs 代表第三代反义寡核苷酸，也具有下列示意性结构：）帽-(n_p)_x(N_s)_y(n_p)_z-帽或帽-nnnnnnnnnNNNNNNNNNnnnnnnnn-帽。因此，帽代表两个末端处的反向脱氧无碱基或类似修饰；n 代表 2'-O-甲基核糖核苷酸(A, G, U, C)；N 表示硫代磷酸酯连接的脱氧核糖核苷酸(A, G, T, C)；x 表示 5-7 的整数；y 表示 7-9 的整数；和 z 表示 5-7 的整数。

应当注意整数 x , y 和 z 可以彼此独立地选择, 尽管优选 x 和 z 在给定反义寡核苷酸中相同。因此, 下列第三代反义寡核苷酸的碱基设计或结构可以如下: 帽 $-(n_p)_5(N_s)_7(n_p)_5$ -帽, 帽 $-(n_p)_6(N_s)_7(n_p)_5$ -帽, 帽 $-(n_p)_7(N_s)_7(n_p)_5$ -帽, 帽 $-(n_p)_5(N_s)_8(n_p)_5$ -帽, 帽 $-(n_p)_6(N_s)_8(n_p)_5$ -帽, 帽 $-(n_p)_7(N_s)_8(n_p)_5$ -帽, 帽 $-(n_p)_5(N_s)_9(n_p)_5$ -帽, 帽 $-(n_p)_6(N_s)_9(n_p)_5$ -帽, 帽 $-(n_p)_7(N_s)_9(n_p)_5$ -帽, 帽 $-(n_p)_5(N_s)_7(n_p)_6$ -帽, 帽 $-(n_p)_6(N_s)_7(n_p)_6$ -帽, 帽 $-(n_p)_7(N_s)_7(n_p)_6$ -帽, 帽 $-(n_p)_5(N_s)_8(n_p)_6$ -帽, 帽 $-(n_p)_6(N_s)_8(n_p)_6$ -帽, 帽 $-(n_p)_7(N_s)_8(n_p)_6$ -帽, 帽 $-(n_p)_5(N_s)_9(n_p)_6$ -帽, 帽 $-(n_p)_6(N_s)_9(n_p)_6$ -帽, 帽 $-(n_p)_7(N_s)_9(n_p)_6$ -帽, 帽 $-(n_p)_5(N_s)_7(n_p)_7$ -帽, 帽 $-(n_p)_6(N_s)_7(n_p)_7$ -帽, 帽 $-(n_p)_7(N_s)_7(n_p)_7$ -帽, 帽 $-(n_p)_5(N_s)_8(n_p)_7$ -帽, 帽 $-(n_p)_6(N_s)_8(n_p)_7$ -帽, 帽 $-(n_p)_7(N_s)_8(n_p)_7$ -帽, 帽 $-(n_p)_5(N_s)_9(n_p)_7$ -帽, 帽 $-(n_p)_6(N_s)_9(n_p)_7$ -帽和帽 $-(n_p)_7(N_s)_9(n_p)_7$ -帽。

基于本文提供的技术教导可以产生的和可以用作药物和/或诊断剂的另一类化合物是针对编码 PRF1 的核酸、优选 mRNA 的小干扰 RNA (siRNA)。siRNA 是典型长度为约 21 至约 23 个核苷酸的双链 RNA。两条 RNA 链之一的序列对应于待降解的靶核酸如编码 PRF1 的核酸的序列。换句话说, 知道靶分子 (在本情形中 PRF1) 的核酸序列, 优选 mRNA 序列, 可以设计双链 RNA, 两条链之一与所述例如 PRF1 的 mRNA 互补, 当将所述 siRNA 应用于含有编码 PRF1 的基因、基因组 DNA、hnRNA 或 mRNA 的系统时, 各自的靶核酸将被降解和因此降低各个蛋白质的水平。设计、构建和使用所述 siRNA 分别作为药物和诊断剂的基本原理尤其在国

际专利申请 WO 00/44895 和 WO 01/75164 中描述。

基于上述类别的化合物如抗体、肽、抗促成素、适体、spiegelmer、核酶、反义寡核苷酸以及 siRNA 的作用方式, 因此还属于本发明范围内的是使用分别靶向 PRF1 和编码其的核酸的这些化合物中任何一种, 以制备针对本文所述任何疾病和本文所述任何疾病症状的药物或诊断剂。另外, 这些试剂可以用于分别监视所述疾病和疾病症状的进展和施用的任何治疗的成功。

按照本发明设计的各类化合物如抗体、肽、抗促成素、小分子、适体、spiegelmer、核酶、反义寡核苷酸和 siRNA 也可以包含在药物组合物中。优选该药物组合物用于治疗本文所述疾病或本文所述疾病症状。在一个实

实施方案中药物组合物还可以包含一种或几种上述类别的化合物和/或单一类别的一个或多个成员，和任选地另外的药物活性化合物，和药用载体。该载体可以是液体或固体，例如溶液，缓冲液，醇溶液等。适当的固体载体尤其是淀粉等。本领域技术人员已知的是提供按照上述类别的化合物的不同化合物的各种制剂，以便实现特定给药途径如口服、肠胃外、皮下、静脉内、肌内等。

上述不同类别的化合物的各种化合物也可以单独或组合附属于或包含在试剂盒中。除了各种化合物以外该试剂盒另外包含一种或多种附加成分（element）或化合物，其中该成分选自包含缓冲液、阴性对照、阳性对照和各种化合物的使用说明的组。优选地，各种化合物以干燥或液体形式存在，优选作为每次单一给药的单位剂量存在。试剂盒可以特别用于治疗、诊断或监视疾病或对本文所述疾病和疾病症状施加的治疗的进展。

在另一方面，PRF1 和编码其的核酸和优选地氨基酸序列和 PRF1 多肽或蛋白质可用于开发和/或产生和/或设计用于此处描述的疾病和病症中任何一种的治疗和/或预防和/或诊断的化合物。为此，在第一步中，确定并筛选 PRF1，优选 PRF1 蛋白的相互作用配偶体。更优选地，这种相互作用配偶体是天然存在的相互作用配偶体，更优选这种相互作用配偶体是天然相互作用配偶体。确定或筛选这种相互作用配偶体的方法是本领域技术人员公知的。一种熟知的技术是所谓的双-杂交系统，其在例如，Ausubel (如前), unit 13.14 "Interaction Trap/Two-Hybrid System to Identify Interacting Proteins" 或 Fields S., Song, O., Nature. 1989 Jul 20; 340 (6230):245-6 中描述。其备选方案是从细胞提取物或细胞裂解物沉淀 PRF1 蛋白或其片段并确定哪一种其他因子附着 PRF1 或者与 PRF1 共沉淀。可使用本领域技术人员公知的标准技术如质谱进行这种分析。在具体实施方案中，该沉淀是免疫沉淀。在另一实施方案中，用放射-标记的细胞，优选 ³⁵S 标记的细胞进行沉淀。除了该相互作用配偶体，还可以使用层析方法和表征所得级分（例如洗脱的级分）来确定天然存在的相互作用配偶体。在优选的实施方案中这种层析方法也可以是亲和层析，从而 PRF1 蛋白被固定在分离介质上。由于 PRF1 蛋白和可能的相互作用配偶体之间的特异相互作用，该相互作用配偶体将作为层析方法中的配体并从而可被纯化和进一步鉴定。

在第二步所鉴定的相互作用配偶体可用于关于 PRF1 的如此处描述的筛选方法。附加或备选地，编码相互作用配偶体的核酸，如果其是基于多肽或核酸的相互作用配偶体，那么可以用于设计和/或生成和/或产生此处定义的化合物种类如，但不限于，抗体、肽、抗促成素、小分子、适体、
5 spiegelmer、核酶、反义分子（在此处也称为反义寡核苷酸），和 siRNA。关于术语 siRNA，可以包括其任何形式，包括但不限于如 WO 03/070918 中描述的 siRNA。

应该理解上述第一步本身可以是一种方法，第二步仅仅被任选实施。

通过下面的附图和实施例进一步阐明本发明，这些附图和实施例不打算限制保护范围而是仅用于例证的原因。从所述附图、实施例可以得到本
10 发明另外的特征、实施方案和优点，其中

图 1 显示生长因子诱导的 PI 3-激酶途径激活的图示；

图 2 显示同位 PC-3 小鼠模型中在用雷帕霉素(Rapamune)处理后淋巴结转移的测量；

15 图 3 显示鉴定 PRF1 为 PI 3-激酶途径下游药靶的实验方法；

图 4 显示对 PC-3 细胞的初级 GeneBloc 筛选；

图 5 显示了 matrigel 上用 PRF1 特异的 GeneBlocs 转染的 PC-3 细胞的生长，图 5A 显示了在这些条件下 mRNA 的剔除，图 5B 显示了从生长在 matrigel 上的各自细胞得到的照片。

20 图 6 显示了 PRF1 特异 RNA 干涉对前列腺肿瘤生长抑制的程度（图 6C）和使用相同 PRF1 特异 RNA 干涉时总淋巴结转移的程度（图 6D），图 6A 显示了用于 siRNA 的表达的基本载体设计，图 6B 是所用的 siRNA 序列。

图 7 显示了差异表达实验的结果，其中监视生长在各种生长表面上的
25 不同细胞系的 PRF1 的表达，细胞被不同化合物处理，从而针对 PI 3-激酶途径的不同成分。

图 8A 显示了用于表征针对 PRF1 的多克隆抗体的特异性的蛋白质印迹分析的结果；

图 8B 显示了用图 8A 中表征的多克隆抗体并使用预免疫血清染色的前
30 列腺癌组织的两张照片。

图 9A 显示了在 24h、48h、72h 和 96h 用 LY294002 (LY) 或 DMSO 处理的细胞的蛋白质印迹分析的结果。

图 9B 显示了用对 p110 β 特异的反义分子 (GB) 处理的 PC-3 细胞的蛋白质印迹分析的结果。

5 图 10A 显示了一个实验的蛋白质印迹分析的结果, 该实验中, 用 Akt 特异的反义分子(GB)处理 PC-3 细胞。

图 10B 显示了在缺氧条件下生长并用对 HIF1 α 特异的反义分子处理的 PC-3 细胞的蛋白质印迹分析结果;

10 图 11A 显示了在胞外基质上用各种反义分子(GB)处理的 PC-3 细胞的照片;

图 11B 显示了在根据图 5A 的照片中显示了 PC-3 细胞的蛋白质印迹分析; 和

15 图 12 显示了 PI 3-激酶途径的生长因子诱导的激活的示意性表示, 该途径现在还含有作为该途径的下游成分的 HIF1 α , 其与其中称为 REDD1 的会聚于 RPF1 的 Akt 平行。

20 图 1 显示生长因子诱导的 PI 3-激酶途径激活的图示。生长因子刺激细胞导致细胞膜上它们相关受体的激活, 其又与胞内信号分子如 PI 3-激酶相关并将其激活。肿瘤抑制剂 PTEN 干扰 PI 3-激酶介导的下游应答和确保途径的激活以瞬时方式发生。LY294002 是 PI 3-激酶的小分子抑制剂。PI 3-K 的一个已知下游基因是 mTOR (雷帕霉素的哺乳动物靶), 其可以通过临床批准的药物雷帕霉素 (Rapamune) 抑制。PI 3-K 涉及细胞周期和 DNA 修复、凋亡的调节、葡萄糖转运、生长翻译、转化和迁移。X 指潜在的下游药物靶标, 认为该靶标参与促进癌细胞的转移行为并且可被认为由于更小的副作用而是比更“上游”的靶标如 mTOR 更好的药物靶标。

25 图 12 显示了类似于图 1 的表示的 PI 3-激酶途径的生长因子诱导的激活的示意性表示。然而, 由于本发明的发现, PI 3-K 途径已经被进一步阐明从而 HIF1 α 已经被鉴定为对于 PRF1 的 PI 3-K 途径的分支, 该分支与 Akt 介导的途径平行。

将在下面的实施例中给出其他图的更详细描述。

实施例 1: 材料和方法

细胞培养

人前列腺癌 PC-3 细胞获自美国典型培养物中心(ATCC)。细胞在 F12K 营养混合物 (Kaighn's 改进) 中培养, 该营养混合物含有 10%胎小牛血清 (CS), 庆大霉素(50 $\mu\text{g/ml}$), 和两性霉素(50 ng/ml)。按照制造商的使用说明, 通过使用各种阳离子型脂质如 Oligofectamine、Lipofectamine (Life Technologies)、NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, CO)或 FuGene 6 (Roche), 在 96 孔或 10-cm 板中进行转染 (30%-50%汇合)。通过将预形成的无血清培养基中的 5x 浓缩的 GeneBloc 和脂质复合物加入完全培养基中的细胞来转染 GeneBlocs。对于平铺在 96 孔中的细胞总转染体积为 100 μl , 对于 10 cm 平板中的细胞为 10 ml。取决于细胞密度, 最终脂质浓度为 0.8-1.2 $\mu\text{g/ml}$; GeneBloc 浓度在每个实验中显示。

将培养的细胞胰蛋白酶消化, 在通过培养基终止胰蛋白酶作用后收获。加入洗涤步骤 (PBS; 离心 5 分钟/1000 rpm), 最后, 考虑接种的细胞数和体积重悬浮沉淀。

通过 Taqman 分析测定 RNA 水平的相对量

使用 Invisorb RNA HTS 96 试剂盒(InVitek GmbH, Berlin)分离和纯化在 96-孔中转染的细胞的 RNA。使用 300 nM PRF1 5'引物, 300 nM PRF1 3'引物和 100 nM 标记的 PRF1 Taqman 探针 Fam-Tamra, 通过实时 RT-PCR(Taqman)分析检测 PRF1 mRNA 表达的抑制。按照制造商的使用说明在下列条件下在 50 μl 中进行反应并在 ABI PRISM 7700 测序仪(Applied Biosystems)上分析: 48°C 30 分钟, 95°C 10 分钟, 接着 95°C 15 秒和 60°C 1 分钟 40 个循环。

25

在 matrigel 基质上的体外生长

当接种在 Matrigel 上时用 10 μM LY294002 或 DMSO 处理 PC3 细胞。如果在接种前转染细胞, 用 GeneBloc 转染细胞和在转染后 48 小时胰蛋白酶消化。在培养基中洗涤细胞, 接种到用 250 μl matrigel 基底膜基质(Becton Dickinson) 预包被的双份 24-孔 (每孔 100,000 个细胞) 中。在温育 24-72

30

小时后用与 Axiovert S100 显微镜(Zeiss)连接的 AxioCam 照相机以 5x 放大率照相。

Affymetrix

- 5 根据制造商的方案，使用总 RNA 试剂盒(AMBION)制备来自 Matrigel 上生长的细胞的总 RNA。在最后步骤中将沉淀的总 RNA 重悬浮在 Invisorb 裂解缓冲液中并使用 Invisorb spin 细胞-RNA 试剂盒(INVITEK)纯化。根据 Affymetrix 的方案制备生物素标记的 cRNA，将 15 μ g cRNA 杂交到 Affymetrix GeneChip 组 HG-U95 上。

10

数据分析

- 使用 Affymetrix GeneChip 软件 Microarray Suite v4.0 分析原始数据。作为一组对应于一个转录物的 16-20 个探针对的平均的与错配寡核苷酸相比完全匹配寡核苷酸的杂交信号的差异，计算每个探针组的强度。探针组的平均差异与转录物的丰度成比例。在比较前将不同测定的总信号强度换算成相同值。通过成对比较来自实验和基线测定的相应探针对的强度，使用 Affymetrix 软件计算倍数变化。使用 Affymetrix 描述的抉择矩阵，软件还产生绝对调用 (call) (在实验中转录物缺乏，临界或存在) 和差异调用 (与另一个实验相比一个实验中转录物的丰度：增加，临界增加，无变化，15 临界降低，降低)。结果输出到 Microsoft Excel (绝对调用，差异调用，倍数变化) 中并过滤。丢弃具有缺少调用或无变化调用的所有探针组并通过倍数变化将表分类。

20

动物研究

- 25 按照食品与药物管理局的非临床实验室研究的良好实验室规范 (GLP 条例) 和根据作为立法基础的德国动物保护法进行体内实验。

- 雄性 Shoe: NMRI-nu/nu 小鼠 (Tierzucht Schönwalde GmbH)，在 SPF 条件下保养 (层流气流设备, Scantainer, Scanbur)，用作人前列腺癌细胞的受体。将 $2 \times 10^6/0.03$ ml 肿瘤细胞接种到年龄为 6-8 周和重 28-30 g 的动物的前列腺的左背侧叶 (iprost; 同位的) 或肝脏的左侧叶的顶部 (ihep; 异 30

位的)。为此，小鼠接受全身麻醉，使用 Ketanest (Parke-Davis GmbH)和 Rompun (Bayer Vital GmbH) 80:1 的混合物，剂量分别为 100 mg/kg 和 5 mg/kg。在腹部身体表面彻底消毒后，通过腹部皮肤和腹膜壁进行切割，从包皮腺边缘附近开始和测量约 1 cm。借助一对镊子和棉拭，显现前列腺。

5 同位细胞攻击，接着借助放大镜和通过使用携带 30G 0,30x13 的微型手术针(Becton Dickinson)的 1 ml 注射器(Henke Sass Wolf GmbH)。施用是成功的，在接种位点观察到显著疱疹。关于腹膜壁和腹部皮肤的 Michel 钳 11x2mm (Heiland)，通过缝合材料(PGA Resorba, Franz Hiltner GmbH)闭合伤口。伤口喷雾(Hansaplast Sprühpflaster, Beiersdorf AG)覆盖损伤。在手术后阶段期间将动物保养在温暖环境中直至完全醒来。按照每组由 5-10 只动物组成的治疗组的数量随机化动物。依次检查它们，包括记录发现。施用 Ssniff NM-Z, 10mm, 可高压灭菌(ssniff Spezialdiäten GmbH)，作为强化食物和通过 HCl 酸化饮用水，两者都任意。

10

15 评估

为了收到实际剂量水平，在治疗日登记体重。同时，从体重发展可以获得以认识治疗方式对整个生物体的影响。

在第 0 (基线); 14; 28; 和 35 天 (处死) 进行血穿刺。从短期麻醉的动物(二乙醚, Otto Fischar GmbH)的眼眶静脉中吸血。为治疗的相容性和副作用提供数据的评估参数如下：白细胞数；血小板数；酶。另外的血载参数是胆红素；肌酸酐；蛋白质；脉；尿酸。

20

将所有处死的动物完全解剖并照相记录。通过一对测径器二维测量肿瘤 (前列腺) 和转移瘤 (尾部, 腰部, 肾淋巴结转移瘤)。按照 $V(\text{mm}^3) = ab^2/2$ 计算体积, $b < a$ 。通常, 实施治疗方法的细胞数导致关于前列腺 100% 的肿瘤吸收。登记一些器官 (肝脏; 脾; 肾) 的重量以便发现另外的关于了解次级副作用的数据。

25

对于组织学分析，将肿瘤组织，即前列腺肿瘤和淋巴结转移瘤的样品固定在 5% 甲醛中并包埋石蜡。常规地，将切片 HE 染色，如果需要制备特异染色(Azan, PAS)。

30 为了检测肿瘤和转移细胞的人源，将充分的组织样品冷冻在液氮中。

当使用 PCR 和用 huHPRT 特异扩增子的 Taqman 分析时,我们可以在 5 mg 组织中检测到 50 个人细胞。

通过 Mann 和 Whitney u-检验统计学证实治疗结果。

5 实施例 2: 对下游药靶适合性概念的实验证据

如在结合于此作为参考的本说明书介绍部分中概述,与信号途径下游连接的靶对于设计或开发药物和诊断剂都有价值。明显的是,如果特定靶与其它不同途径连接或者由于它在信号途径中的位置与许多生物学现象连接如转移和迁移、生长翻译、调亡、细胞周期、DNA 修复等,如在 PI-3 激酶的情形中,处理该靶的任何化合物可能具有多种副作用,其可能对系统有害和从医学观点来看是不希望有的。因此,进一步作用下游的靶应当是治疗干预的第一选择。

本发明人已经发现在 PI 3-激酶途径的控制下涉及除了 mTOR 以外的另外可能的药靶,其特异性用于控制转移和迁移的现象和因此肿瘤发生。在制药工业中已经发现以 Rapamune 的商品名出售的雷帕霉素适合于抑制转移和迁移以及免疫抑制(例如用于器官移植)。这证实了处理下游药靶的策略的适合性。

如从图 2 中可以知道,雷帕霉素适于减小淋巴结转移瘤的体积和因此其效果比得上公知的 PI 3-激酶抑制剂 LY294002,然而,LY294002 和许多副作用相关,从而得到下面的结果并不令人奇怪:PI 3-激酶和 mTOR 与许多生物学现象有关。如在图 2A 中描述,使用肿瘤获得模型,在第 1 天开始使用雷帕霉素的处理。使用的两个浓度,即 0.4 mg/kg/剂量-2mg/kg/剂量导致淋巴结转移程度的巨大降低,表示为与磷酸盐缓冲盐水阴性对照相比测量的转移瘤体积(mm^3)。

在从第 28 天开始处理的 Rapamune 处理确立 (established) 肿瘤模型的情形中也基本上获得相同结果 (图 2B)。

测量在用雷帕霉素(Rapamune)处理以后在同位 PC-3 小鼠模型中的淋巴结转移。在图 2 (A) 中显示 (A) 肿瘤获得模型的结果。用 0.03ml 前列腺内 2×10^6 PC3 细胞注射裸 shoe: NMRI -nu/nu 小鼠 (每组 8 只),每日腹膜内使用 Rapamune 进行处理,共 28 天,剂量为 2mg/kg 和 0.4mg/kg。

PBS 用作对照。

为了处理确立的肿瘤(B), 允许细胞 ipros 生长 28 天, 在移植后第 29 天至第 50 天口服使用 Rapamune 进行处理。如 A 中概述选择剂量。分别

5

实施例 3: 鉴定 PRF1 作为 PI 3-激酶途径中的下游药靶

基本实验方法在图 3 中显示。用 DMSO 或 PI 3-K 抑制剂 LY294002 处理在 Matrigel 上培养的 PC3 细胞, 从每个样品中分离总 RNA。进行差异 Affymetrix 基因表达作图, 使用实时 RT-PCR Taqman 测定证实表达。将

10

p110 α 用作无差异的标准。

PC3 细胞是 PTEN -/- 的, 这意味着肿瘤抑制剂 PTEN 确实在这些细胞中缺乏, 以致 PI 3-激酶途径被永久激活, 导致细胞增加的转移活性或行为, 其表现为它们在 matrigel 测定中的生长模式。具有侵入生长潜力的细胞在基底膜如 matrigel 基质上显示增强生长。(Petersen, O.W., Ronnov-Jessen, L.,

15

Howlett, A.R. 和 Bissell, M.J. (1992) Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9064-9068. (Auch: Sternberger et al., 2002 *Antisense & Nucleic acid drug development* 12:131-143)。

20

与其相关应当注意 PC3 细胞在 matrigel 上生长并将这当作接近体内环境的模型系统, 从中分离的 RNA 假定比获自生长在非-matrigel 环境如常规细胞培养板中的细胞的任何制剂更接近原位情形或结果。

25

除了 PC-3 细胞, 培养和试验其他细胞如 PNT-1A、MCF-10A 和 HELA。使用各种生长表面并且用认为或者知道将影响 PI 3-激酶途径的化合物处理细胞。结果在图 7 中的表中显示。如从最上面两个右栏中表达为“改变”的读出可以得到的, 在 Affymetrix 基因表达图谱中得到的信号增加了但是除了施用于细胞的下面的化合物组合之外, 即对于 PC-3 细胞, 针对 PI 3-激酶 p110a 和 p110b 的催化亚单位的错配 GB 和关于 LY (为 LY294002) 的相同错配, 对于 PNT-1A 细胞, 被称为 PTEN 17 和各自错配的反义分子,

30

和对于 HELA 细胞, 分别 47h 和 72 加 96h 后 Tam 和 DMSO 的组合。已经

描述了表达组成性活性 PI 3-激酶——Mp110*ER——的可诱导形式的稳定细胞系(Klippel 等人, 1998; Sternberger 等人, 2002)。用如前面描述的 DMSO 中的 200 nM 诱导剂 4-OH 他莫西芬 (Tam)刺激生长培养基中的稳定转染的细胞库。

5

实施例 4: 筛选针对 PRF1 的最优反义寡核苷酸

为了筛选针对 PRF1 的最优反义寡核苷酸, 在 PRF1 的总 mRNA 序列内选择 8 种 GeneBlocs。

如所述用不同的 GeneBloc 浓度转染 PC3 细胞, 使用 Taqman 测定在转染后 24 小时测定 mRNA 水平, 利用 300 nM NM_019058 特异正向和反向引物和 100 nM 探针和 40 nM 正向和反向引物和 100 nM 人 β -肌动蛋白探针确定 mRNA 水平。

在图 4 中描绘了该方法的结果, 该方法在此处也称为初级 GeneBlock 筛选。从所得结果选择 GeneBlocs 70034 和 70044 用于进一步的研究。

关于在各种实施例中本文使用的 GeneBloc, 应当注意它们都是本文指定的第三代反义寡核苷酸, 这意味着, 从表 1 中也是明显的, 大写字母代表脱氧核苷酸, 其通过硫代磷酸酯而不是磷酸二酯键连接。

表 1: 所用各种 GeneBlocs、它们的别名、相对于靶核酸的错配和它们的序列和结构特性的综述

20

GeneBloc No	别名	MM	序列	SEQ ID NO.
70040	FLJ:1558L21	0	gctcaaCTCTGCAGTaccagga	4
70041	FLJ:1356L21	0	cttggtCCCTTCAGAccagta	5
70042	FLJ:1006L21	0	cagtttTCCAACCACtggaaat	6
70043	FLJ:954L21	0	cccaaaAGTTCAGTCgtctct	7
70044	FLJ:975L21	0	gctcctGCCTCTAGTtctccac	8
70045	FLJ:470L21	0	gtgttcATCCTCAGGgtcatc	9
70046	FLJ:1412L21	0	ggtcagTAGTGATGctccgat	10
70047	FLJ:571L21	0	cttaccAACTGGCTAaggcatc	11
70168	FLJ:954L21	4	ccgaaaAGAACAGTGctctct	12
70169	FLJ:975L21	4	gctcgtCCCTGTAGTgtccac	13

另外应当注意，考虑到以上反义寡核苷酸是 GeneBlocs 即第三代反义寡核苷酸的事实，以上的任何“t”实际上是“u”。

用于本发明的各种实例和实施方案中的其他反义分子可以从指出其名字，即反义分子的内部参考、它们的序列和该序列的特征的表 2 得到。这些反义分子是 GeneBlocs，即第三代反义寡核苷酸。下划线表示相对于靶序列的错配。

表 2：所用的其他 GeneBlocs 概述

	PTEN 48	guccuuuCCCAGCTTTacaguga
10	PTEN 52	cuggaucAGAGTCAGTgguguca
	PTEN 53	ucuccuuTTGTTTCTGcuaacga
	PTEN 57	ugccacuGGTCTGTAAuccaggt
	mm PTEN 52	cuggaugAGACTGAGTgcuguca
	mm PTEN 53	ucuc <u>au</u> TTCTTTGTGcu <u>ac</u> ga
15	p110 α 79	acuccaaAGCCTCTTGcucaguu
	p110 α 82	uaccacaCTGCTGAACcagucaa
	p110 β 88	caaa <u>uuc</u> CAGTGGTTCauuccaa
	p110 β 93	ggcu <u>aac</u> TTCATCTTCcu <u>ucca</u>
	mm p110 α 79	acugcaaACCCTGTTGcu <u>ac</u> uu
20	mm p110 β 93	ggcu <u>aag</u> TTCTTCATCcu <u>ugcca</u>
	PTEN 17	ccuuuCCAGCTTTAcaguga
	mm PTEN 17	ccguuuGCACCTTTAgaguga
	HIF1 α 66	gguaguGGTGGCATTagcagu
	mm HIF1 α 66	gguagaGGTGCCAATugcagu
25	HIF1 α 67	ugacucCTTTTCCTGcucugu
	mm HIF1 α 67	ugacucCTTTTCCTGcucugu
	AKT1-GB	gucuugATGTACTCC <u>ccucgu</u>
	mm-AKT1	guguugATCTAGTCC <u>ccuccu</u>
	AKT2-GB	uccuugTACCCAATGaaggag
30	mm-AKT2	ucguugTAGCCAATCaacgag

实施例 5: 选择性剔除 PRF1

为了证明 PRF1 是 PI 3-激酶途径适合的下流药靶, 将获自实施例 4 的两个特别有利的 GeneBlocs 即 70044 和 70043, 用于基于 matrigel 的生长实验。将 Matrigel 生长实验当作显示各个细胞转移和迁移行为的替代模型。将更汇合的细胞生长当作它们的转移和迁移行为增加的指示, 这允许细胞扩展到 matrigel 提供的三维结构上。该实施例的结果在图 5 中描绘。

如所述转染 PC3 细胞并接种在 matrigel 上, 监视生长。从接种在 matrigel 上的等份细胞中分离 mRNA, 并使用 Taqman 测定分析 (左图)。将 PRF1(NM_019058)特异的 mRNA 对内源 p110 α mRNA 水平标准化。将 PTEN 特异的 GeneBloc 用作 PTEN^{-/-} PC-3 细胞中的阴性对照, 将 p110 β 特异的 GeneBloc 用作胞外基质中生长的阳性对照。通过分别比较 PRF1 特异的 GeneBlocs 70043 和 70044 和它们对应的错配寡核苷酸 70168 和 70169 处理的细胞的生长, 显示特异的生长抑制。

从图 5A 和图 5B 可以看出两种优选的 GeneBlocs, 即 70043 和 70044 导致 PRF1 的 mRNA 的显著剔除, 其中该结果对应于从 matrigel 生长测定法中得到的结果。y 轴代表按照 Applied Biosystems 的使用说明通过 DCt 方法确定的 mRNA 的量。

20 实施例 6: 针对 PRF1 的多克隆抗体的产生和特异性

使用标准技术产生了针对 PRF1 的多克隆抗体。试验了这样得到的多克隆抗体对 PRF1 的特异性。为此, 生产了用 PRF1 特异反义分子, 更具体地基因封闭物, 或者其错配处理的 PC-3 细胞的细胞裂解物和用重组 HA-标记的 PRF1 的表达质粒转染的细胞。通过蛋白质印迹使用多克隆抗体分析裂解物, 结果在图 8A 中描绘。

从图 8A 可以得到用对此处公开的核酸序列特异的基因封闭物号 70043 (GB43, 见表 1) 处理的 PC-3 细胞表现出所表达的 PRF1-蛋白质的明显减少, 其中 PI 3-激酶仍然被广泛表达, 如通过 p110 α 和 p85 特异抗体所证明的。另一种反义分子即 GB44, 其也是针对 PRF1 设计的, 该反义分子也导致 PRF1 蛋白的表达的显著下降。再次, 对于如 GB43、MM43

的错配的错配分子，在细胞中 PRF1 蛋白被显著表达。用重组 HA-标记的 PRF1 的表达质粒转染的细胞的裂解物显示出两条带，一条是 HA-标记的 PRF1，另一条是内源性 PRF1。

5 这些结果证实该多克隆抗体表现出对 PRF1 的特异性，从而分别是监控 PRF1 的存在和不存在的有价值的工具。

实施例 7：对前列腺肿瘤组织中的 PRF1 的免疫染色

将在实施例 6 中描述了其产生和表征的抗体用于人前列腺肿瘤组织的染色。使用多克隆血清 1:1000 稀释液，可以清楚地显色蛋白质水平上 PRF1 10 的表达，如图 8B 所描绘，其中左边的照片描绘了使用实施例 6 中描述的多克隆抗体的染色，而右边的照片描绘了使用预免疫血清的前列腺肿瘤染色的切片。

实施例 8：PRF1 蛋白质表达依赖于 PI 3-激酶途径的各种成员

15 为了阐明 PRF1 是 PI 3-激酶途径和 HIF1 α 途径的下游靶标，实施了各种实验，其中已知所用的化合物对各自途径的各种成分特异并研究了 PRF1 蛋白质水平对这些化合物的影响。

a) PI 3-激酶活性对 PRF1 蛋白质表达的影响

20 为了研究 PI 3-激酶活性对 PRF1 蛋白质表达是否有影响，将 PC-3 细胞用 LY294002 或者作为对照的 DMSO 处理。通过蛋白质印迹分析用多克隆抗体作为 PRF1 蛋白的检测方法进行分析。除了 PRF1 蛋白质，还使用各自特异抗体监视 Akt 和磷酸化 Akt(P* Akt) 的表达。此外，监视 p110 α 和 p85 的表达。

结果在图 9A 中描绘。

25 分别 72 和 96 小时后，在 DMSO 处理的细胞中仅可以检测到 PRF1-蛋白。在 LY294002 的影响下，分别由 Akt 和磷酸化 Akt 组成的级联，和 PRF1 蛋白被下调。

使用相同的标记物，用反义分子，即特异抑制 PI 3-激酶且被称为 p110 β -GB 88 的 GeneBloc (GB)处理细胞。

30 结果在图 9B 中显示。

从第三和第五个泳道可以得到，针对催化活性亚单位 p110 β 的 GeneBloc 具有类似于公知的 PI 3-K 抑制剂 LY294002 的效果，这证明 PRF1 是下游靶标，其蛋白质表达受 PI 3-激酶的影响。针对 p110 α 的反义分子或者错配反义分子或者 DMSO 对于蛋白质水平上 PRF1 的表达没有任何影响。

b) Akt 和 HIF1 α 对 PRF1 蛋白质表达的影响

为了研究 PRF1 在蛋白质水平上的表达是否也依赖于 Akt (PKB)活性和 HIF1 α 活性，将 PC-3 细胞用 Akt 特异反义分子处理。更具体地，使用两种反义分子——称为 Akt1-GB 和 Akt2-分子——得到的读出和关于图 9 中所讨论的相同，其中，附加地，使用通过商业途径可得到的蛋白质 G-纯化的多克隆抗体(R&D Systems, 批号: IUGO13071)监视 HIF1 α 蛋白质表达。结果在图 10A 中显示。从图 10A 可看出，用该反义分子处理 72 小时后，用 Akt2 GeneBloc 处理的细胞和用 Akt1 GeneBloc 与 Akt2 GeneBloc 一起处理的那些细胞表现出在 PRF1 蛋白质水平上的降低，这表明 Akt1 和 Akt2 分别表现出对 PRF1 蛋白质表达水平上的一定抑制作用。

使用用于监视的相同标记物实施相同的实验，除了使用生长在缺氧条件的细胞（通过用 CoCl₂ 处理细胞实现）进行 Akt 和 P*-Akt 以外。使用反义分子的两种不同形式，即 HIF1 α -GB66 和 HIF1 α -GB67，它们各自的错配用作对照。该 GeneBlocs 显著降低 HIF1 α 在蛋白质水平上的表达，其反过来降低了 PRF1 蛋白质的表达。用 GeneBlocs 处理 72 小时和用 CoCl₂ 处理 24 小时后得到该结果。

从该结果可以得到 PRF1 的蛋白质水平依赖于 Akt 和 HIF1 α 的活性，尽管 HIF1 α 对 PRF1 在蛋白质水平上的表达的影响似乎比 Akt 的更显著。

这些结果证明 PRF1 是 PI 3-激酶和 HIF1 α 信号转导的下游效应物。关于途径缺失所给出的数据表明 PRF1 依赖于缺氧生长条件下的 HIF1 α 活性。此外，似乎 PRF1 表达还依赖于 Akt 但是不依赖于 HIF1 α 。该调节关系在图 12 中阐述。

30 实施例 9: HIF1 α 蛋白和 PRF1 蛋白被抑制的细胞的表型分析

本实施例中实验的目的是研究分别表现出 HIF1 α 和 PRF1 在蛋白质水平上的表达抑制的细胞的表型变化。

细胞生长于 matrigel 表面并用反义分子 (geneblocs)和各种对照, 在上面实验中描述的条件处理。

5 结果在图 11A 和图 11B 中描绘, 其中每一行由图 11A 和图 11B 的一部分组成, 图 11A 和图 11B 将一起被讨论。

图 11A 显示了生长在 matrigel 表面并用各自反义分子处理的细胞的一系列照片, 而图 11B 显示了对从 matrigel 表面得到的细胞实施的蛋白质印迹分析的结果。Blot 的一个泳道代表相应照片中所示细胞的细胞裂解物。
10 作为读出, p110 α 和 p85 作为上样对照显示, 所研究的 PI-3K 途径的组分, 即 AKT, 作为 P*AKT, HIF1 α 和 PRF1 被监视。

未处理的细胞在 matrigel 测定法中表现出正常肿瘤细胞的生长模式。当使用针对 p110 β 的反义分子的错配时, 观察到类似表型。使用针对 PTEN (其反过来抑制 PI-3K)的反义分子, 表现出不被该肿瘤抑制剂影响的细胞
15 系的表型 (图 11A, 第一行)。如所预期的, 在这些条件下 P*-AKT 被显著减少并且表示功能 p110 β 剔除的读出 (图 11B, 第一行)。当使用针对 HIF1 α 的反义分子时, 观察到与使用 p110 β 的剔除类似的由于功能丧失导致的表型, 错配不导致表型变化 (图 11A, 第二行)。蛋白质印迹分析证实了该结果并且表明两种 HIF1 α 特异反义分子都导致 HIF1 α 蛋白质水平
20 降低 (图 11B, 第二行)。最后, 使用 PRF1 特异的反义分子再次观察到功能表型的同样丧失 (图 11A 的第三行的图 1 和 3), 同时在蛋白质印迹分析中 PRF1 蛋白质表达也减少 (图 11B, 第三行)。

总之, 这些结果证明 PRF1 也是 PI 3-激酶信号转导的蛋白质水平上的一种下游效应物。而且, PRF1 依赖于缺氧生长条件下 HIF1 α 活性。此外,
25 似乎 PRF1 表达还依赖于 AKT 而不依赖于 HIF1 α 。

实施例 10: 通过特异 RNA 干涉抑制前列腺肿瘤生长

该实验是小干涉 RNA(siRNA)的成功设计的一个实例, 这些小干涉 RNA 使得下游药物靶标 PRF1 被特异处理。通过启动子 (u6+2)驱动的靶
30 标特异序列的表达产生 siRNA 分子。

siRNA 表达质粒的构建

通过 PCR，使用合成的寡核苷酸，产生 pol III 启动子盒 U6+2 并将其克隆到 pUC-衍生的载体的 *EcoRI/XhoI* 限制位点。使用非回文限制酶（具有 5'突出端 TTTT 和 3'突出端 GGCA 的 *BsmBI*）克隆特异 siRNA 插入片段。通过将两种合成的寡核苷酸与 5'CCGT 和 3'AAAA 突出端退火产生插入片段。对于 PRF1 特异的 siRNA，含有启动子、将要表达的 siRNA 和终止子序列的表达盒如下：

5'**gaattcctatttcccatgattccttcatatttgcataattttaaataaggactatcatatgcttaccgtaacttga**
 10 aagtatttcgatttcttgctttatata tcttgggaaaggacgaaacacc **gggagactagaggcaggagc**
aaaaaaaaaaaa ctctgcctctagctccac tttttctcgag 3' (SEQ ID NO. 17)。

U6+2 合成启动子和 PRF1 特异 siRNA 为粗体(*EcoRI*; *XhoI*)。

该表达盒可以，在理论上，被克隆到任何表达载体。

SiRNA 表达构建体的基本设计也在图 6A 中描绘，从图 6A 可以得到，如此设计 siRNAs 是为了形成细胞内环，其通过多聚-A-片段产生。图 6B 显示了用于本实施例中的各种 siRNA 构建体，即用于 p110 β (SEQ ID NO. 14)、p110 α (SEQ ID NO. 15) 和 PRF1 的 mRNA 的构建体。

各种 siRNA 构建体如针对 p 110 α 、p110 β 和 PTEN 的 siRNA 构建体和 PRF1 特异 siRNA 被克隆到同一载体构建体中。使用 *Effectene*TM (*Qiagen*, *Hilden*, 德国)，根据生产商的使用说明，用 6 μ g 各自 siRNA 表达载体或 EGFP 表达质粒转染 PC-3 细胞 (1×10^6 个细胞)。p110 α 、p110 β 、或 PRF1 的表达 siRNA 或者作为稳定转染的 PC-3 细胞的肿瘤生长对照的表达全长 EGFP 被转染。转染后 48 小时，将细胞用胰蛋白酶消化并稀释和再次接种于含有 500 μ g/ml Geneticin 的 150 mm 皿中。每天用 500 μ g/ml Geneticin 替换培养基并且转染后 7 天用含有 600 μ g/ml Geneticin 的培养基替换。将合并的抗性细胞扩大并收获，确定细胞数并准备用于如所描述的动物实验。

结果在图 6 中显示，其中更具体地在图 6C 中显示了接种后 56 天原代前列腺肿瘤的体积 (mm^3)，在图 6D 中显示了接种后 56 天总淋巴结转移的体积 (mm^3)。

从所述图中可以得出，通过使用 PRF1 特异的 siRNA 可以显著抑制前列腺肿瘤的生长。抑制程度类似于针对 p110 β 的 siRNA 构建体。然而，将 p110 β 和 PRF1 的位置分别置于 PI 3-激酶途径，应该理解对 PRF1 特异的 siRNA 允许更特异的处理，从而与处理 p110 β 相比，PI 3-激酶途径和与其
5 相关的过程的一部分或分支的调节。考虑到总淋巴结转移也得到相同结果，从而那里的效果较不明显。

在本说明书、序列表和权利要求书和/或附图中公开的本发明的特征可以单独和以任何组合作为实现本发明的各种形式的材料。

<110> atugen AG
 <120> 新转移因子及其应用
 <130> A 19011 PCT
 <160> 17
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 人类
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> NMF的氨基酸序列
 <400> 1
 Met Pro Ser Leu Trp Asp Arg Phe Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser
 1 5 10 15
 Pro Ser Ser Leu Pro Arg Thr Pro Thr Pro Asp Arg Pro Pro Arg Ser
 20 25 30
 Ala Trp Gly Ser Ala Thr Arg Glu Glu Gly Phe Asp Arg Ser Thr Ser
 35 40 45
 Leu Glu Ser Ser Asp Cys Glu Ser Leu Asp Ser Ser Asn Ser Gly Phe
 50 55 60
 Gly Pro Glu Glu Asp Thr Ala Tyr Leu Asp Gly Val Ser Leu Pro Asp
 65 70 75 80
 Phe Glu Leu Leu Ser Asp Pro Glu Asp Glu His Leu Cys Ala Asn Leu
 85 90 95
 Met Gln Leu Leu Gln Glu Ser Leu Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ser Arg
 100 105 110
 Arg Pro Ala Arg Leu Leu Met Pro Ser Gln Leu Val Ser Gln Val Gly
 115 120 125
 Lys Glu Leu Leu Arg Leu Ala Tyr Ser Glu Pro Cys Gly Leu Arg Gly
 130 135 140
 Ala Leu Leu Asp Val Cys Val Glu Gln Gly Lys Ser Cys His Ser Val
 145 150 155 160

Gly Gln Leu Ala Leu Asp Pro Ser Leu Val Pro Thr Phe Gln Leu Thr
 165 170 175

Leu Val Leu Arg Leu Asp Ser Arg Leu Trp Pro Lys Ile Gln Gly Leu
 180 185 190

Phe Ser Ser Ala Asn Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe Ser Gln Ser Leu
 195 200 205

Thr Leu Ser Thr Gly Phe Arg Val Ile Lys Lys Lys Leu Tyr Ser Ser
 210 215 220

Glu Gln Leu Leu Ile Glu Glu Cys
 225 230

<210> 2
 <211> 1760
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 2
 gcagcaggcc aagggggagg tgcgagcgtg gacctgggac gggctctgggc ggctctcggg 60
 gggtggcagc gggttcgaca ccattcaag cggcaggacg cacttgtctt agcagttctc 120
 gctgaccgcg ctagctgagg cttctacgct ccggcactct gagttcatca gcaaacgccc 180
 tggcgtctgt cctcaccatg cctagccttt gggaccgctt ctcgctcgtcg tccacctcct 240
 cttcgccctc gtccttgccc cgaactccca ccccagatcg gccgcccgcgc tcagcctggg 300
 ggtcggcagc ccgggaggag gggtttgacc gctccacgag cctggagagc tcggactgcg 360
 agtccctgga cagcagcaac agtggcttcg ggccggagga agacacggct tacctggatg 420
 ggggtgctgt gcccgaactc gagctgctca gtgaccctga ggatgaacac ttgtgtgcca 480
 acctgatgca gctgctgcag gagagcctgg ccagggcgcg gctgggctct cgacgccttg 540
 cgcgcctgct gatgcctagc cagttggtaa gccagggtggg caaagaacta ctgcgcctgg 600
 cctacagcga gccgtgcggc ctgcgggggg cgctgctgga cgtctgcgtg gagcagggca 660
 agagctgcca cagcgtgggc cagctggcac tcgaccccag cctggtgccc acctccagc 720
 tgaccctcgt gctgcgctg gactcacgac tetggcccaa gatccagggg ctgttttagct 780
 ccgccaactc tcccttctc cctggcttca gccagtcctt gacgctgagc actggcttcc 840
 gagtcatcaa gaagaagctg tacagctcgg aacagctgct cattgaggag tgttgaactt 900
 caacctgagg gggccgacag tgcctccaa gacagagacg actgaacttt tggggtgagg 960
 actagaggca ggagctgagg gactgattcc agtgggttga aaactgaggc agccacctaa 1020

ggtggaggtg ggggaatagt gtttcccagg aagctcattg agttgtgtgc ggggtggctgt 1080
 gcattgggga cacatacccc tcagtactgt agcatggaac aaaggcttag gggccaacaa 1140
 ggcttccagc tggatgtgtg tgtagcatgt accttattat ttttgttact gacagttaac 1200
 agtgggtgtga catccagaga gcagctgggc tgctcccgcc ccagcctggc ccaggggtgaa 1260
 ggaagaggca cgtgctcctc agagcagccg gagggagggg ggaggtcgga ggtcgtggag 1320
 gtggtttgtg tatcttactg gtctgaaggg accaagtgtg tttgttgtt gttttgtatc 1380
 ttgtttttct gatcggagca tcaactactga cctgtttag gcagctatct tacagacgca 1440
 tgaatgtaag agtaggaagg ggtgggtgtc agggatcact tgggatcttt gacacttgaa 1500
 aaattacacc tggcagctgc gtttaagcct tccccatcg tgtactgcag agttgagctg 1560
 gcaggggagg ggctgagagg gtgggggctg gaaccctcc ccgggaggag tgccatctgg 1620
 gtcttccatc tagaactgtt tacatgaaga taagatactc actgttcatg aatacacttg 1680
 atgttcaagt attaagacct atgcaatatt ttttactttt ctaataaaca tgtttgttaa 1740
 aacaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1760

<210> 3
 <211> 699
 <212> DNA
 <213> 人类

<400> 3
 atgcctagcc tttgggaccg cttctcgtcg tcgtccacct cctcttcgcc ctcgtecttg 60
 ccccgaactc ccaccccaga tcggccgccg cgctcagcct gggggtcggc gaccgggag 120
 gaggggtttg accgctccac gagcctggag agctcggact gcgagtccct ggacagcagc 180
 aacagtggct tcgggcccga ggaagacacg gcttacctgg atggggtgtc gttgcccagc 240
 ttcgagctgc tcagtgacct tgaggatgaa cacttgtgtg ccaacctgat gcagctgctg 300
 caggagagcc tggcccaggc gcggctgggc tctcgacgcc ctgcccgcct gctgatgcct 360
 agccagttgg taagccaggt gggcaaagaa ctactgcgcc tggcctacag cgagccgtgc 420
 ggctgcggg gggcgctgct ggacgtctgc gtggagcagg gcaagagctg ccacagcgtg 480
 ggccagctgg cactcgacct cagcctggtg cccacctcc agctgacct cgtgctgccc 540
 ctggactcac gactctggcc caagatccag gggctgttta gctccgcaa ctctcccttc 600
 ctccctggct tcagccagtc cctgacgctg agcactggct tccgagtcac caagaagaag 660
 ctgtacagct cggaacagct gctcattgag gagtgttga 699

<210> 4
 <211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> RNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(15)
<223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(21)
<223> RNA

<400> 4
gcucaactct gcagtacacg a

21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(6)
<223> RNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(15)
<223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(21)
<223> RNA

<400> 5
cuugguccct tcagaccagu a

21

<210> 6
<211> 21

<212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 反义寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> RNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(15)
 <223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(21)
 <223> RNA

 <400> 6
 caguutcca accacuggaa u 21

 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 反义寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> RNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(15)
 <223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(21)
 <223> RNA

 <400> 7
 cccaaaagtt cagtcgucuc u 21

 <210> 8
 <211> 21

<212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 反义寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> RNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(15)
 <223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(21)
 <223> RNA

<400> 8
 gcuccugcct ctagtucca c

21

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反义寡核苷酸

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> RNA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(15)
 <223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(21)
 <223> RNA

<400> 9
 guguucatcc tcagggucau c

21

<210> 10
 <211> 21

<212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 反义寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> F反义寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(15)
 <223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(21)
 <223> RNA

 <400> 10
 ggucagtagt gatgcuccga u 21

 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 反义寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> RNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(15)
 <223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(21)
 <223> RNA

 <400> 11
 cuuaccaact ggctaggcau c 21

 <210> 12
 <211> 21

<212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 反义寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> RNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(15)
 <223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(21)
 <223> RNA

 <400> 12
 ccgaaaagaa cagtgcucuc u 21

 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 反义寡核苷酸

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(6)
 <223> RNA

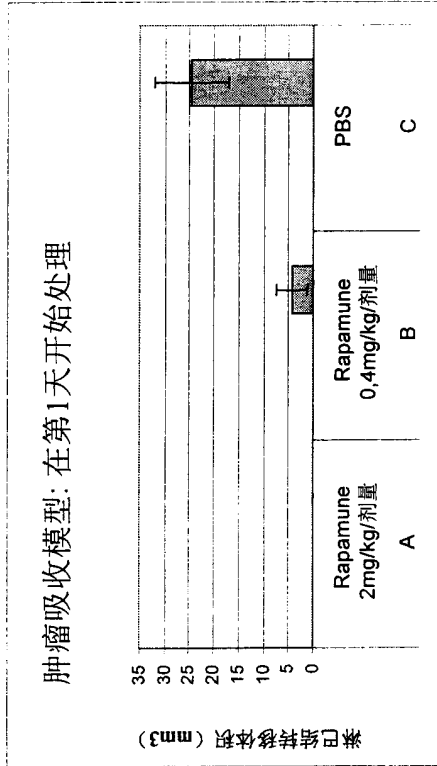
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(15)
 <223> 通过硫代磷酸酯键连接的 DNA

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (16)..(21)
 <223> RNA

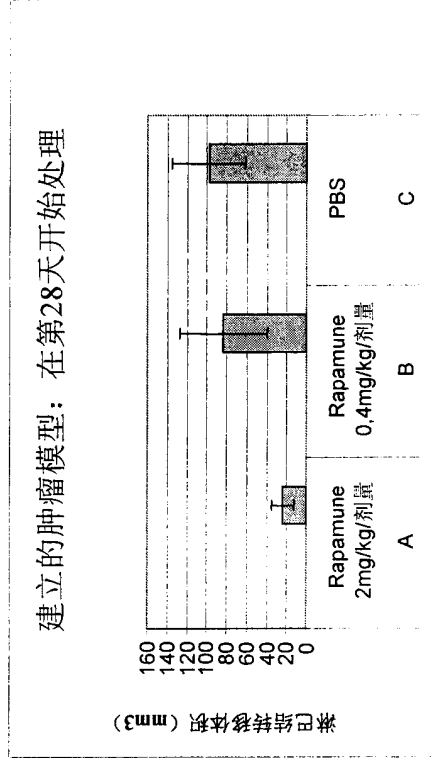
 <400> 13
 gcucguccct gtagtgucca c 21

 <210> 14
 <211> 54

<212> RNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> siRNA		
<400> 14		
gggaaugaac cacuggaaua gcaaaaaaaaa aaaagcuucc agugguuc <u>au</u> uccc		54
<210> 15		
<211> 54		
<212> RNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> siRNA		
<400> 15		
acugagcaag aggc <u>uu</u> ugga gaaaaaaaa aaacuccaaa gcc <u>cu</u> ugcu cagu		54
<210> 16		
<211> 54		
<212> RNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> siRNA		
<400> 16		
guggagacua gaggcaggag caaaaaaaaa aaagcuccug cc <u>cu</u> agucu ccac		54
<210> 17		
<211> 187		
<212> DNA		
<213> 人工		
<400> 17		
gaattcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatat <u>ttt</u> ttaaaatgga ctatcatatg		60
cttaccgtaa cttgaaagta tttegat <u>ttc</u> ttggctttat atatcttggg aaaggacgaa		120
acaccgggag actagaggca ggagcaaaaa aaaaaactcc tgccttagt ctccactttt		180
tctcgag		187



A



B

图2

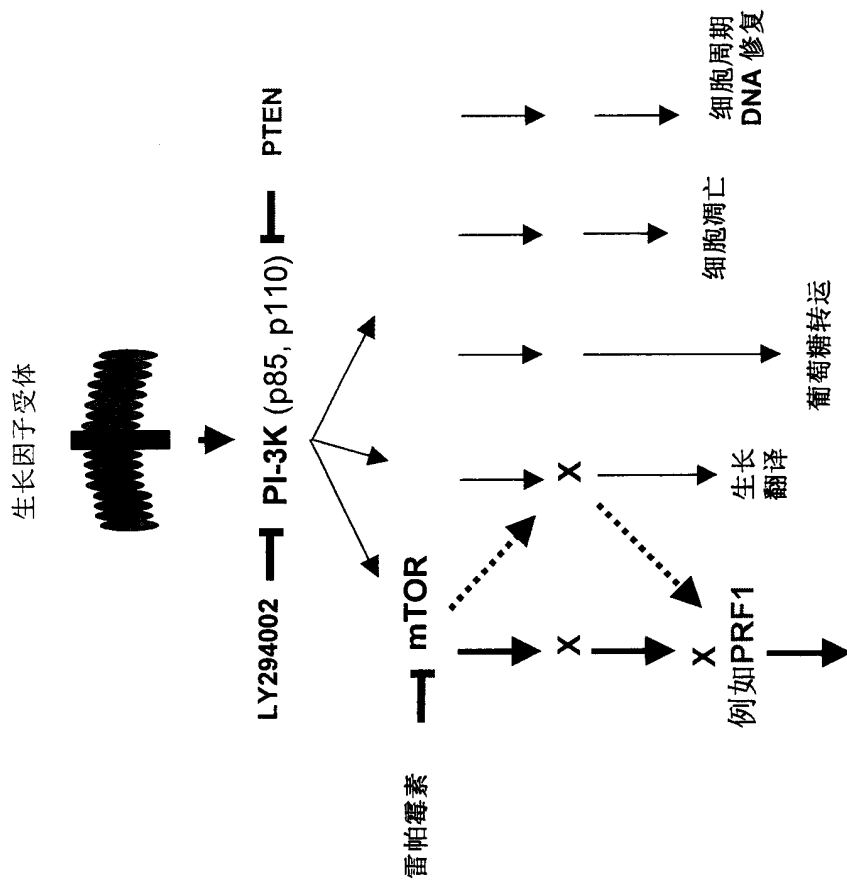


图1

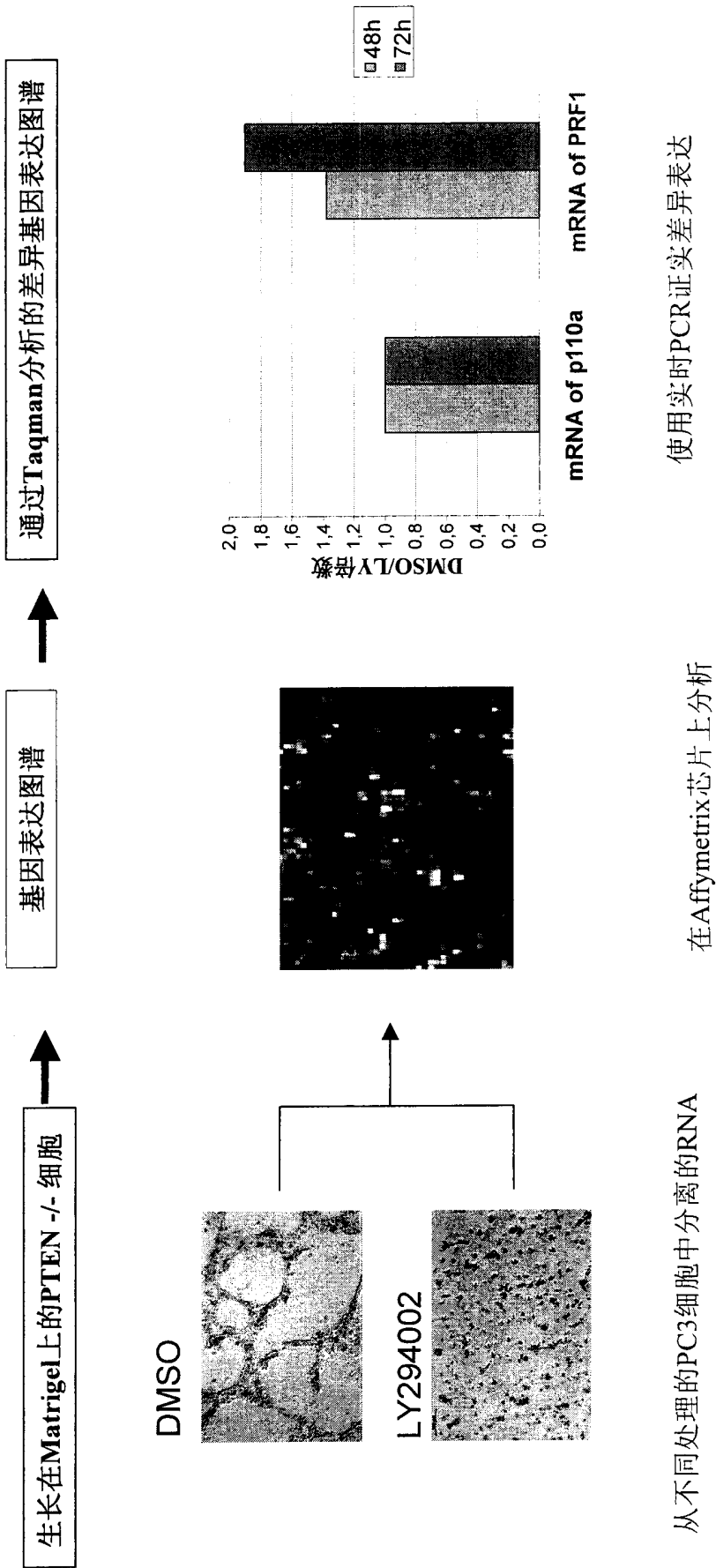


图3

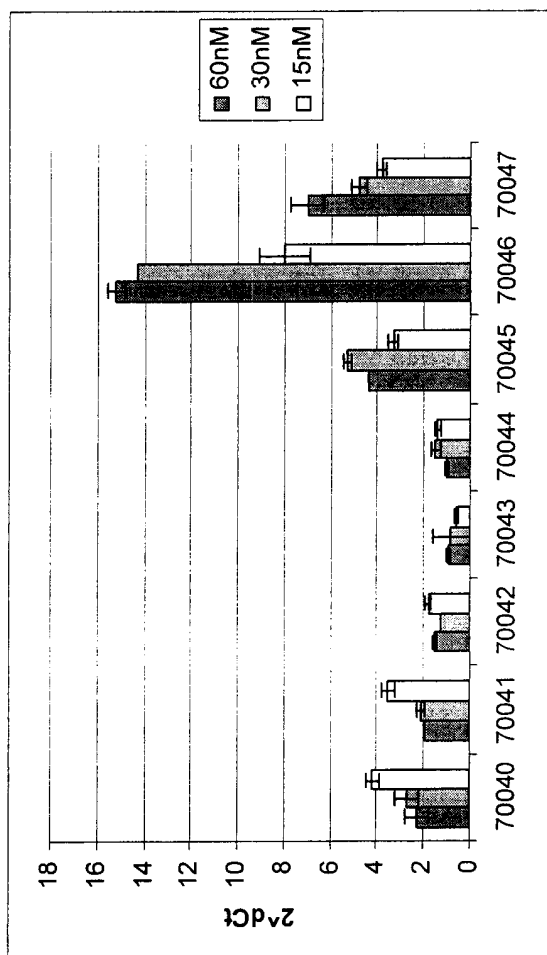


图4

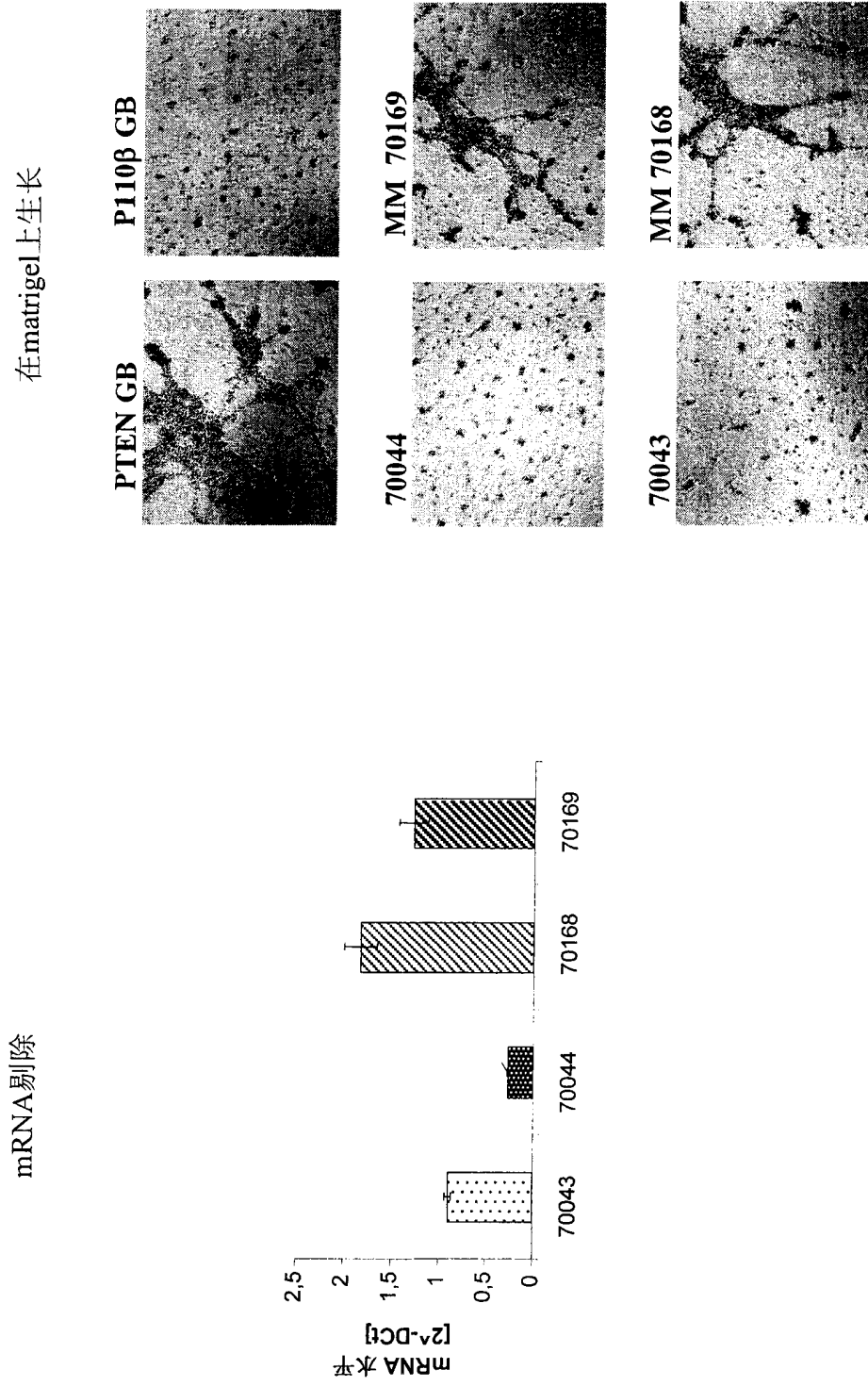


图5

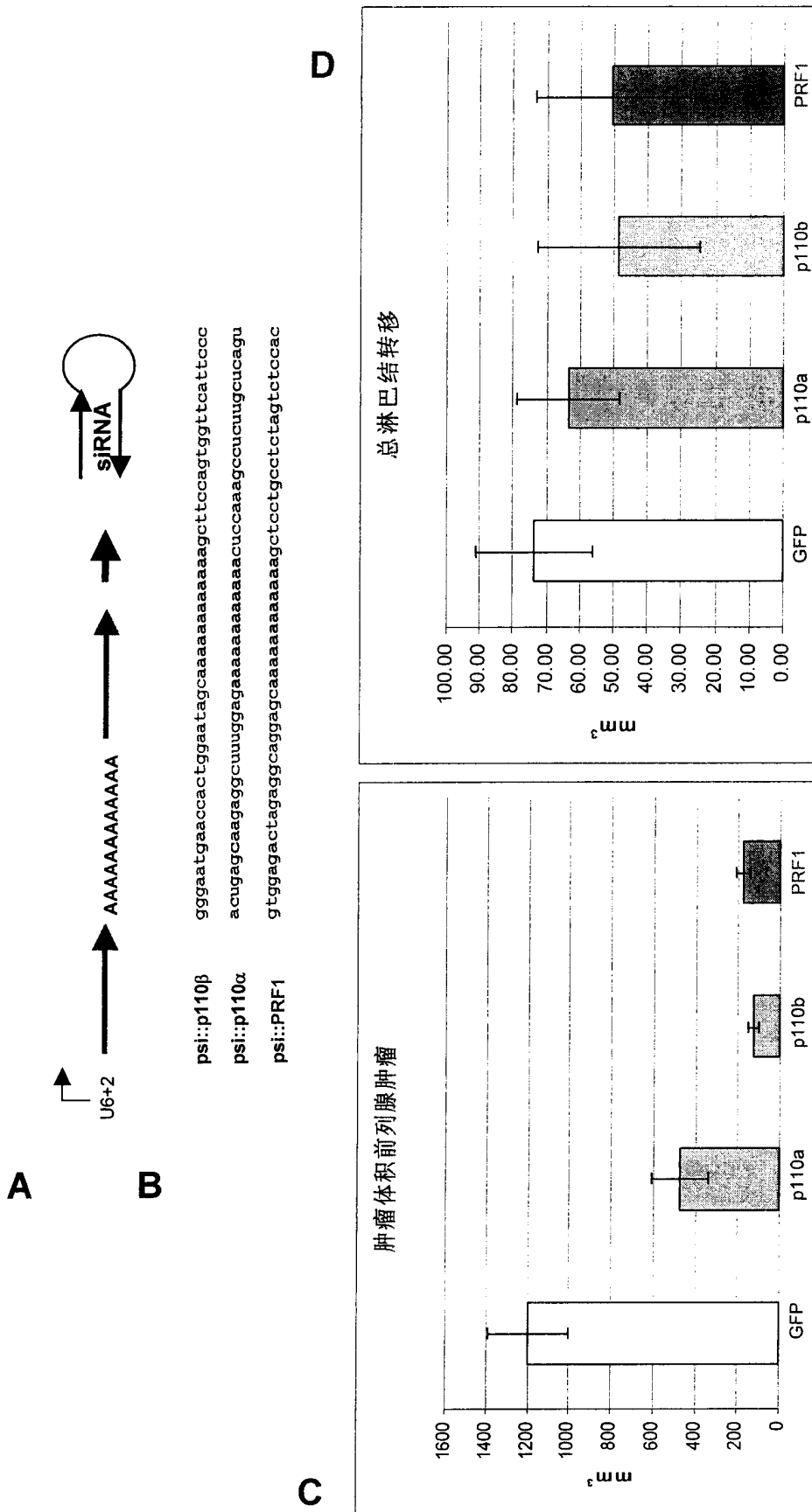


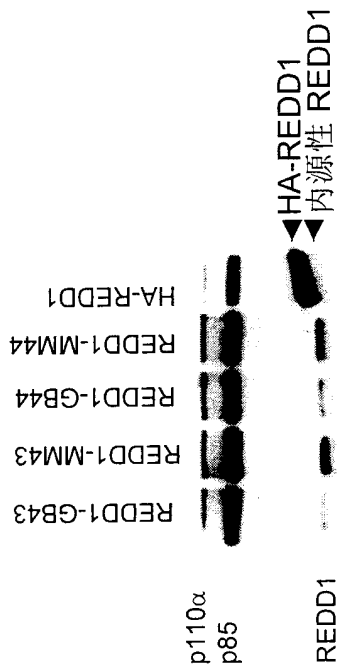
图6

细胞系	生长表面	时间	处理	CHANGE 39827_at AA522530	CHANGE 43853_at AA618602
PC3	Matrigel	24h	DMSO/LY		
PC3	Matrigel	48h	DMSO/LY		
PC3	塑料	27h	DMSO/LY		
PC3	塑料	58h	DMSO/LY		
PC3	塑料	96h	DMSO/LY		
PC3	塑料	27h	DMSO/雷帕霉素		
PC3	塑料	58h	DMSO/雷帕霉素		
PC3	塑料	48h	MM(a+b)/MM(a+b)+LY	NC	NC
PC3	塑料	72h	MM(a+b)/MM(a+b)+LY		
PC3	塑料	96h	MM(a+b)/MM(a+b)+LY		
PC3	塑料	72h	PTEN/p110(a+b)		
PC3	塑料	90h	PTEN/p110(a+b)		
PC3	塑料	101h	PTEN/p110(a+b)		
PNT1A	塑料	72hrs.	DMSO/LY		
PNT1A	塑料	72hrs.	HB-EGF/LY		
PNT1A	塑料	72hrs.	PTEN17/mm17	NC	NC
PNT1A	塑料	72hrs.	PTEN17/LY		
MCF-10A	塑料	8d	Tam/DMSO		
MCF-10A	塑料	4d	Tam/DMSO		
HELA	塑料	48hrs.	GB53+DMSO/MM+LY		
HELA	塑料	48hrs.	Tam/DMSO	NC	
HELA	塑料	72+96hrs.	Tam/DMSO	NC	NC
HELA	塑料	48hrs.	mm79a+Tam/mm79a+Tam+LY		

I=增加; NC= 未变化

图7

7/11

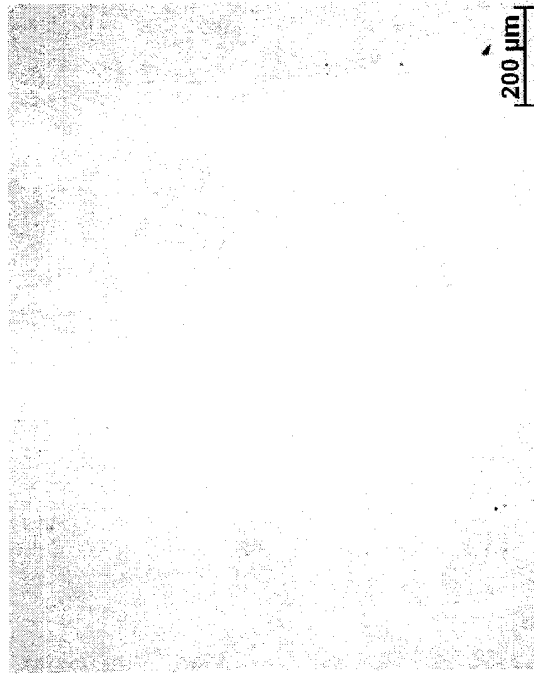


A

前列腺肿瘤中的REDD1-免疫染色



B



免疫前血清

REDD1特异性多克隆AB

图8

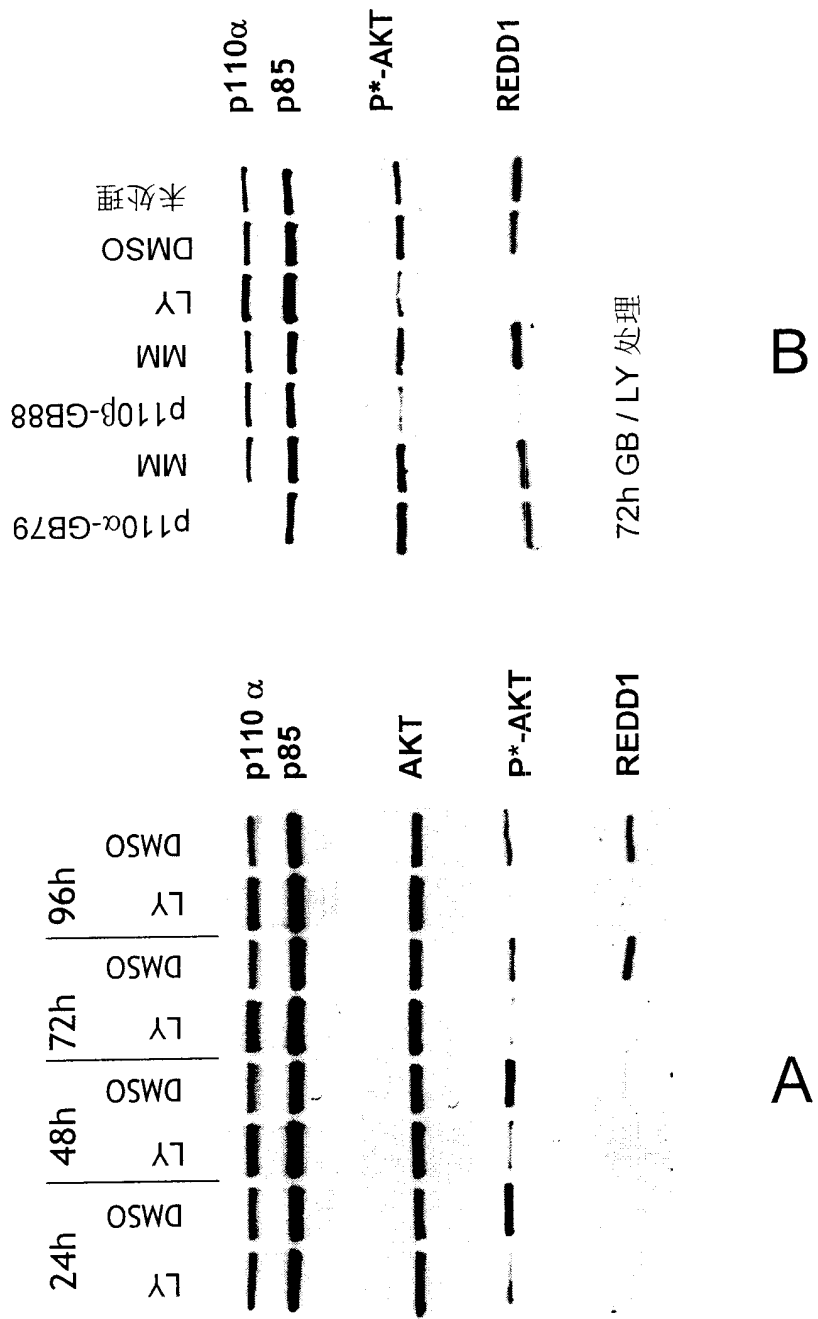


图9

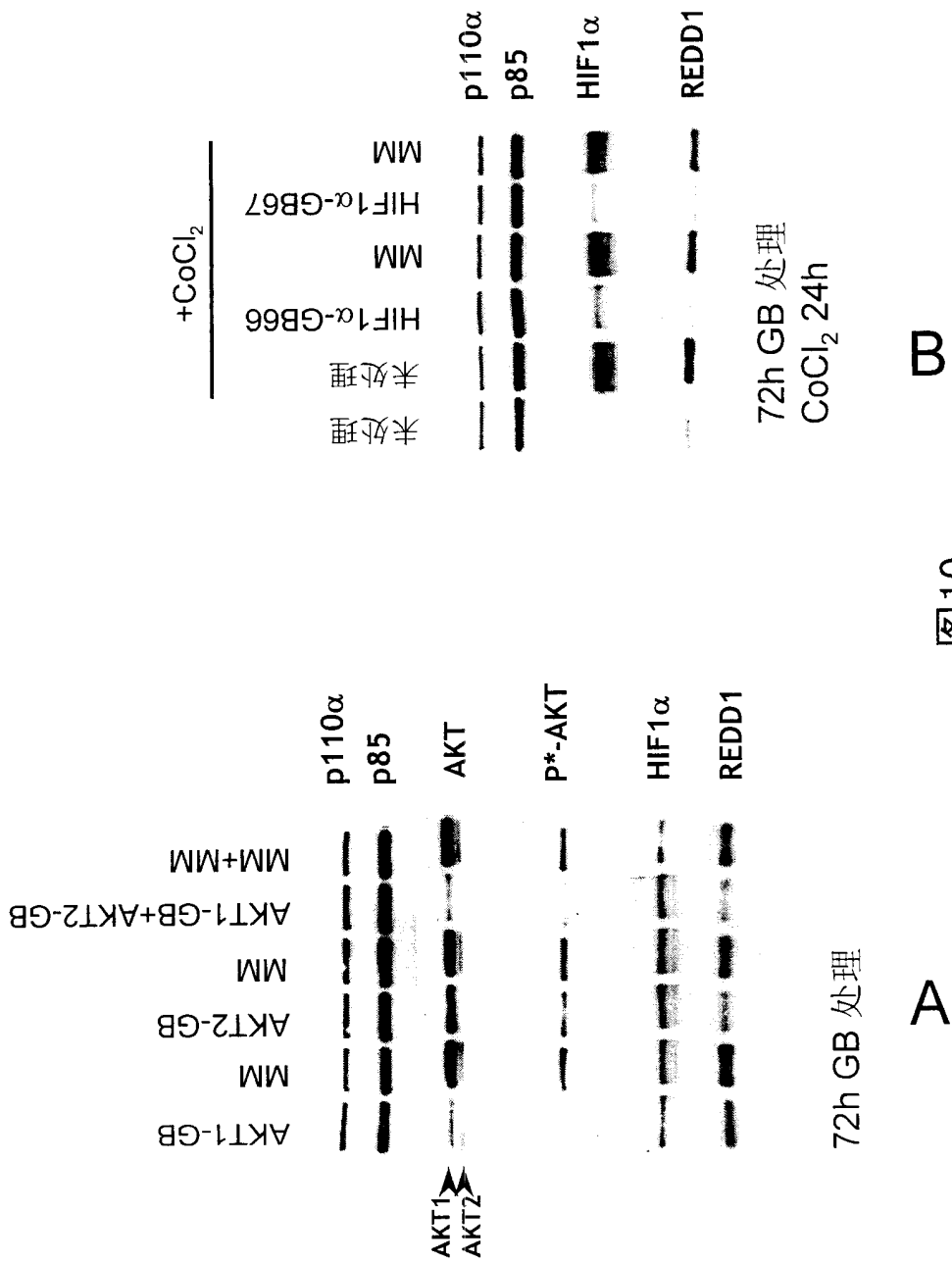
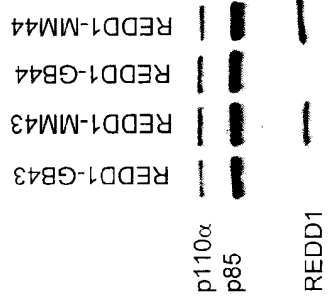
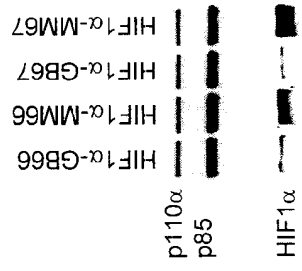
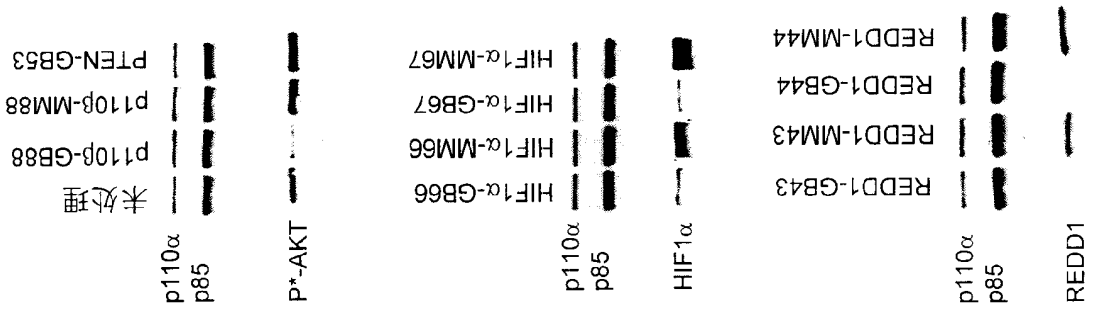
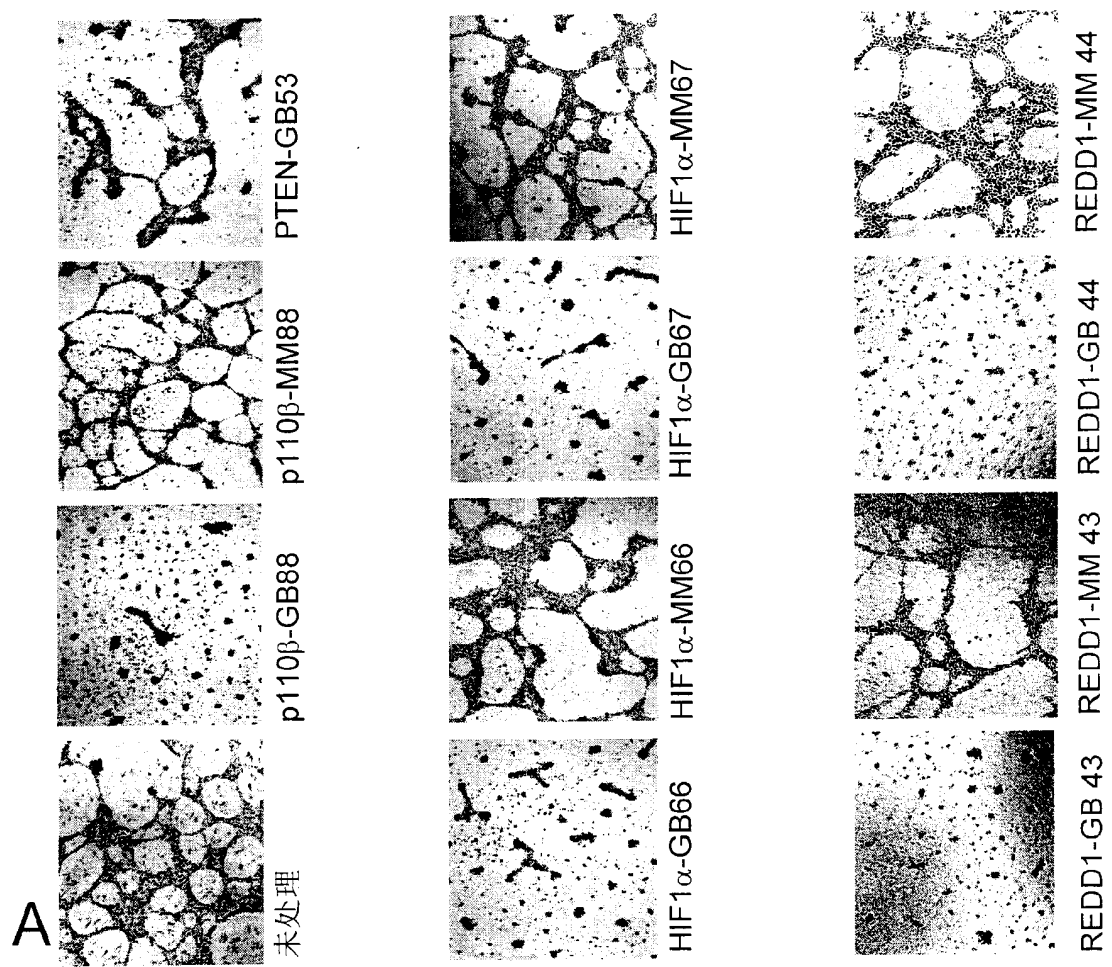


图10



B



A

图11

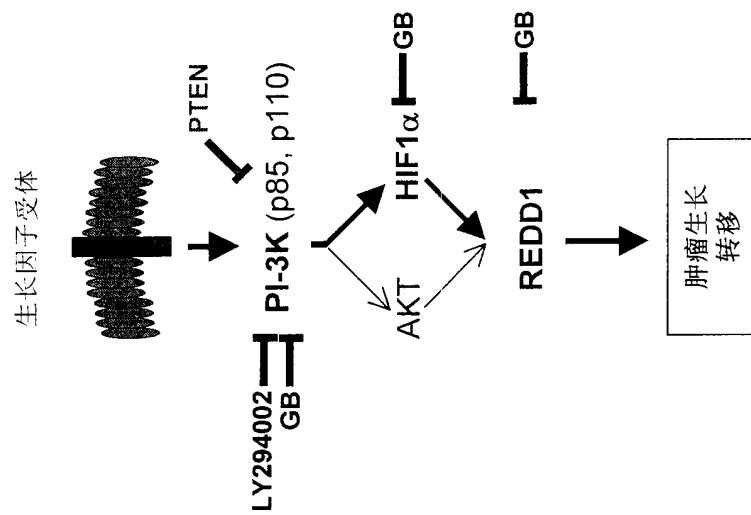


图12