

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02820723.8

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 2 月 1 日

[11] 公开号 CN 1729019A

[22] 申请日 2002.8.23 [21] 申请号 02820723.8

[30] 优先权

[32] 2001.8.24 [33] US [31] 60/314,693

[86] 国际申请 PCT/US2002/026830 2002.8.23

[87] 国际公布 WO2003/018755 英 2003.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.19

[71] 申请人 俄亥俄州立大学研究基金会

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 M·尤 Y·王 Z·张

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

权利要求书 2 页 说明书 27 页 附图 9 页

[54] 发明名称

作为癌症治疗剂的野生型 RAS

[57] 摘要

本发明提供抑制细胞、尤其是癌症细胞增殖的方法。所述方法包括提高细胞中一种或多种野生型 ras 蛋白质的胞内水平。一方面，所述方法包括在细胞中引入和表达编码野生型 ras 蛋白的核酸。另一方面，通过在细胞中引入一种或多种野生型 ras 蛋白而提高一种以上 ras 蛋白的胞内水平。本发明还涉及野生型 ras 蛋白或编码一种或多种野生型 ras 蛋白的核酸在治疗肿瘤或癌症中的治疗性应用，或预防肿瘤或癌症形成的预防性应用。提供了特征分析或评价人或动物中癌症的方法。在一实施例中，所述方法包括测试获自受试者肿瘤细胞基因组中一种或多种内源性 ras 等位基因的丢失。在另一实施例中，所述方法包括测试获自受试者的肿瘤细胞中一种或多种内源性 ras 等位基因中的功能性突变的丢失和一种或多种 ras 等位基因中的激活突变。

1. 一种抑制细胞增殖的方法，其特征在于，所述方法包括：
提高细胞内一种或多种野生型 ras 蛋白的胞内水平。
- 5 2. 如权利要求 1 所述的方法，其中，通过：
 - a) 在细胞中引入含有野生型 ras 蛋白编码区的核酸，和
 - b) 在细胞内表达野生型 ras 蛋白提高细胞内野生型 ras 蛋白胞内水平。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述细胞是人或其它动物的肿瘤细胞。
- 10 4. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述核酸是含有能导致野生型 ras 蛋白编码区高水平转录的启动子序列的 DNA。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述核酸是病毒基因组的一部分。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其中，所述野生型 ras 蛋白选自野生型 K-ras 蛋白、野生型 N-ras 蛋白、野生型 H-ras 蛋白或它们的组合。
- 15 7. 如权利要求 1 所述的方法，其中，野生型 ras 蛋白的胞内水平通过将一种或多种野生型 ras 蛋白引入细胞中而提高。
8. 如权利要求 7 所述的方法，其中，所述细胞是人或其它动物的肿瘤细胞。
9. 如权利要求 7 所述的方法，其中，所述野生型 ras 蛋白还包含一蛋白质转导结构域。
- 20 10. 如权利要求 9 所述的方法，其中，所述蛋白质转导结构域包含人免疫缺陷病毒 TAT 蛋白的 11 个氨基酸序列。
11. 一种降低细胞内 ERK MAP 激酶活性的方法，其特征在于，所述方法包括提高细胞内野生型 ras 蛋白的水平。
12. 一种评价哺乳动物中某肿瘤的方法，其特征在于，所述方法包括：
 - 25 提供该肿瘤的细胞；和
 - 测定肿瘤细胞基因组中至少一种内源性 ras 等位基因中功能性突变的丢失。
13. 如权利要求 12 所述的方法，还包括测试所述细胞基因组中内源性 ras 等位基因之一中的激活突变。
- 30 14. 如权利要求 12 所述的方法，其中，所述功能性突变的丢失导致产生具有降低的细胞增殖活性的突变 ras 蛋白。

15. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述功能性突变的丢失导致肿瘤细胞中 ras 蛋白的水平比正常细胞中的 ras 蛋白水平降低。

16. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 所述功能性突变的丢失导致野生型 ras 等位基因全部或部分丢失。

5 17. 如权利要求 13 所述的方法, 其中, 一个 ras 等位基因中存在功能性突变丢失, 另一个 ras 等位基因中存在激活突变, 表明预后不良。

18. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 是功能性突变的丢失发生在 ras 等位基因的第一、第二或第三外显子中。

10 19. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 通过测定细胞内一种或多种野生型 ras 蛋白的胞内水平来检测功能性突变的丢失。

20. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 通过测定编码一种或多种野生型 ras 蛋白的 mRNA 的胞内水平来检测功能性突变的丢失。

21. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 通过测定细胞基因组内一种或多种野生型 ras 等位基因的存在与否来检测功能性突变的丢失。

15 22. 如权利要求 12 所述的方法, 其中, 通过测定细胞中一种或多种野生型 ras 蛋白的细胞增殖活性来检测功能性突变的丢失。

23. 一种预防或治疗哺乳动物肿瘤或癌症的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 给予受试者野生型 ras 蛋白或编码和表达野生型 ras 蛋白的核酸。

20 24. 如权利要求 23 所述的方法, 其中, 将野生型 ras 蛋白注射到受试者的肿瘤中。

25. 如权利要求 23 所述的方法, 其中, 给受试者注射编码野生型 ras 蛋白的核酸。

26. 一种预测人类受试者癌症预后的方法, 其特征在于, 所述方法包括测定获自受试者的肿瘤细胞中一种或多种 ras 等位基因中功能性突变的丢失。

25 27. 一种诱导杂合性 ras 敲除小鼠中肺肿瘤形成的方法, 其特征在于, 所述方法包括给所述小鼠注射化学致癌剂。

作为癌症治疗剂的野生型 RAS

5 本申请要求2001年8月24日提交的美国临时申请系列号60/314693的优先权，
其内容整体纳入本文中。

本发明至少部分得到国家卫生研究院基金 NO. R01CA58554 和 R01CA78797 的支助，联邦政府对本发明拥有一定权利。

背景

Ras 基因是存在于各种动物包括人和鼠类中的 ras 超基因家族的成员, 该超基因家族包括 50 个以上的编码结构相关蛋白质的基因, 这些蛋白质具有三磷酸鸟嘌呤结合位点, 在许多各种细胞内信号传递通路中起着重要作用。此超家族中的 ras 亚家族包括 H-ras、K-ras(也称为 K ras2)、N-ras、RAP 和 REL 基因(Bredel 和 Pollack, 1999. Brain Res Rev. 29. 232-49; Beaupre 和 Kurz rock, 1999. J Clin Oncol. 17:1071-9)。人 ras 基因各自的染色体定位是该领域已知的。

三个 ras 基因 (H-ras、K-ras 和 N-ras) 含有 6 或 7 个外显子, 分布在基因组 DNA 的约 7-35Kb 对之间。取决于具体的 ras 基因, 其中 4 或 5 个外显子含有蛋白质编码区, 这些编码外显子中的前三个是编码 ras 蛋白质的 GDP/GTP 结合和 GTP 酶功能的区域。这 3 个 ras 基因编码位于细胞膜内表面、活性 GTP 结合位点的长约 189 个氨基酸的 p21 蛋白质。具体讲, 当酪氨酸激酶受体因其配体 (如生长因子或激素) 的结合而被激活时, 此 p21-ras 蛋白质活化, 启动胞内信号传递 (Bredel 和 Pollack, 1999. Curr Opin Genet Dev. 4:74-6)。ras/Erk 通路的后续下游信号传递可激活许多转录因子, 它们根据细胞类型调控着对外部刺激时细胞的增殖或分化。

25 ras/Erk 通路受到几种 GTP 酶活化蛋白质的负调节。当 p21-ras 和 GAP 之间形成蛋白复合体时,大大提高了 p21-ras 蛋白的弱的内在 GTP 酶活性(McCormick, 1995, Curr Opin Genet Dev.5:51-5, Ahmadian 等, 1996, J Biol Chem, 271:16409-15)。这提高了 GTP 酶催化 GTP 转变为 GDP 的活性,并使活性 GTP:p21-ras 转变成无活性 GDP: p21-ras, 从而中止下游信号传递。参与内部信号传递通路的

30 非受体蛋白质酪氨酸激酶也可能激活 p21-ras 和 ras/Erk 通路(Rozakis-Adcock 等, 1992. Nature, 360-689-92; McCormick, 1993, Ciba Found Wympt, 176:1-5.

Baltesperger 等, 1993 Science, 260, 1950-2)。以上参考文献中所述的许多蛋白质的相互反应和酶活性调控着 p21-ras 蛋白质和 ras/Erk 通路。

Ras 基因的特别重要方面是它们在癌发生中起着关键作用, ras 基因野生型无致癌作用。然而, ras 的各种突变, 所谓“活化性”突变, 导致 ras 基因变成致癌性, 它们的表达导致动物产生恶性肿瘤和培养细胞的转化。野生型、非致癌状态的 ras 基因称为原致癌基因(proto-oncogenes), 含有激活突变(activating mutation)的 Ras 基因称为致癌基因。

已在较多人类肿瘤类型中检测到 ras 基因中的活化性点突变, 比人肿瘤中其它致癌基因频率高 25-30%(Beaupre 和 Kurzrock, 1999, J Clin Oncol, 17:1071-9, Anderson 等, 1992, Environ Health Perspect, 98:13-24; Bos, 1989, Cancer Res, 49:4682-9; Rodenhuis 和 Slebos, 1992, Cancer Res, 52:2665s-69s)。例如, 在 40-50%的结肠癌(Bos 等, 1987, Nature 327:293-7; Forrester 等, 1987, Nature 327:298-303; Burmer 等, 1991, Environ Health Perspect, 93:27-31)、80%的胰腺癌(Burmer 等, 1991, Environ Health Perspect, 93:77-31; Mariyama 等, 1989, Jpn J Cancer Res, 80:602-6; Shibata 等, 1990, Cancer Res 50:1279-83, Pinte 等, 1997, Acta Cytol, 41:427-34)和 30-50%的肺腺癌(Roden huis 和 Slebos, 1992 Cancer Res 52:2665s-69s; Rodenhuis 等, 1988, Cancer Res, 48:5738-41, Reymlds 等, 1991, Proc Natl Acad Sci U S A, 88:1085-9; Suznki 等, 1990, Oncogene 5:1037-43; Li 等, 1994, Tang Cancer; 11:19-27; Mills 等, 1995, Cancer Res 55:1444-7)中可测到突变。这些类型肿瘤中发现 K-ras 突变占活化性 ras 突变的 90%以上。此外, 在骨髓起源的造血干细胞肿瘤、精原瘤、乳腺癌、胶质母细胞癌和神经母细胞癌中也找到活化性 ras 突变。在胃、尿道膀胱、前列腺、皮肤、甲状腺、头颈、子宫内膜、肝、卵巢、肾、睾丸等癌症中也发现有 Ras 突变。已在许多啮齿动物系统自发产生和化学诱导产生的肿瘤中检测到活化的 ras 致癌基因(Anderson 等, 1992, Environ Health Perspect, 98:13-24; Balmain 和 Brown, 1988, Adv Cancer Res, 51:147-82; Guerrero 和 Pellicer, 1987, Mutat Res, 1985:293-308)。例如, 在小鼠肺肿瘤中测到 K-ras 致癌基因。

Ras 中不是所有的突变都是“活化性”的, 因为不是所有突变都导致 ras 基因成为致癌基因。Ras 前癌基因的激活突变主要发生在但不总是发生在该基因的第 12、13 和 61 位密码子, 激活突变也见于密码子 59、63、116、117、119、195 和 146。这些突变的结果是在无外部刺激时不断地上调细胞中的 ras/Erk 信号传递通

路。因此，在细胞增殖中起着重要作用的此信号传递通路组成性地开通了 (McCormick 1994 Curr Opin Genet Dev, 4:71-6; Lowy 和 Willinmsen, 1993. Annu Rev Biochem 62:851-91)。突变性致癌 p21 和野生型 p21 之间生物活性最先观察到的差异是，内在 GTP 酶的活性野生型比缬氨酸-12 致癌突变体高 10 倍。后来认识到可利用这种内在 GTP 酶活性来区别人肿瘤和野生型 ras 蛋白中所见到的某些 p21 突变类型 (Trahey 和 McCormick, 1987, Science, 238:542-5)。发现 GAP 后，显示致癌性 p21 (密码子 12、13 或 61 有突变) 和野生型 p21 之间的主要生化性能区别是，GAP 能诱导活化性 p21: GTP 复合体中的 GTP 水解。野生型 p21 中 GAP-诱导的水解比这些 ras 突变类型高 1000 倍 (Vagel 等, 1988, Nature, 335:90-3; Gibbs 等, 1988, Proc Natl Acad Sci U S A, 85:5026-30)。活化 GTP 类型中保留的突变比野生型时间长得多。突变所致的不断信号传输至少部分引起了致癌作用。

活化的 ras 致癌基因遗传学上称为“支配性”基因、支配性基因突变是能产生其表型的突变，即使是同源性的。同一细胞还表达野生型等位基因。此突变基因产生的表型支配着同一基因野生型等位基因表达产生的表型，因为活化的 ras 等位基因是致癌性的，即使野生型等位基因也同时表达，故 ras 致癌基因称为支配性突变 (Barbacid, 1987, Annu Rev Biochem, 56:779-827; Marshall 1991, Pa Med, 94:10)。

然而，ras 致癌基因作为支配性基因的特征可能是不满意的。编码真正“支配性”突变的基因，如上所述在其同源性非突变等位基因表达时，产生正常基因表达水平 (而非升高的或过度的表达水平) 的表型。一些研究表明转化性 ras 致癌基因不以正常水平而是比正常高得多的水平表达。例如，小鼠 NIH/3T3 细胞中以及其它用突变 ras 等位基因转化的鼠类细胞中，突变 ras 等位基因表达水平比对照细胞中高得多 (Hua 等, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci U S A, 94:9614-9; You 等, 1989. Proc Natl Acad Sci U S A, 86:3070-4, Guerrero 等; 1984, Proc Natl Acad Sci U S A, 81:202-5; Spandidos 和 Wilkie, 1984, Nature, 310:469-75) 此外，从人肿瘤细胞系分离得到的第一个致癌性 ras 基因，突变性 EJ H-ras 1 等位基因，不仅第 12 个密码子突变，还含有最后内含子中的一个突变，与正常 ras 基因相比，此突变提高其表达至少 10 倍 (Cohen 和 Levinson, 1988, Nature, 334:119-24)。最后，Finney 和 Bishop (1993, Science, 260:1524-7)。采用同源重组以转化性突变 H-ras 等位基因替代一个野生型 H-ras 等位基因，虽然正常和突变的 H-ras 基因表达相等，但杂合细胞没被转化，杂合性细胞培养物中产生了自发转化细胞，该转化细胞扩大了突变等位基因。这些具体研究表明 ras 致癌基因的致癌潜力可能取决于高

表达水平，与支配性突变不一致。

因为活化 ras 致癌基因的致癌活性不能完全视为支配性突变的活性，为此需要更全面了解活化 ras 致癌基因的转化活性或致癌活性，这种了解为癌症特别是活化 ras 致癌基因所引起的癌症可提供更好的治疗手段。这种了解也可为 ras 致癌基因引起的癌症提供更好的诊断和预后方法。

目前抗 ras 治疗方法的优点是，合成的 ras 蛋白作为无活性前体蛋白，必须经转录后修饰成为具有生物活性 (Casey 等, 1989, Proc Natl Acad Sci U S A, 86:8323-7, Hancock 等, 1989, Cell, 57:1167-77)。此类修饰第一步是用法呢基转移酶 (FTase) 将 15 个碳的类异戊二烯 (如法呢醇) 加到 CAAX 基序的 C 末端半胱氨酸上 (Hancock 等, 1989, Cell 57:1167-77)。牻牛儿基化是另一种转录后步骤，导致经牻牛儿基转移酶 (GGTase-1) 将 20 个碳的分子加到 CAAX 基序中。目前的抗-ras 疗法正在探索选择性干扰这些转录后步骤的策略 (Gibbs 等, 1993, J Biol Chem 268:7617-20; Tamanoi, 1993, Trends Biochem Sci, 18:349-53; Lerner 等, 1995, J Biol Chem 270:26770-3)。这些策略的一个问题是抑制这些转录后步骤可能不仅抑制了活化 ras 蛋白的活性，而且抑制了具有肿瘤抑制作用的野生型 ras 蛋白。另一问题是 ras 蛋白以外的蛋白质也如上述被转录后修饰。因此，这些步骤的抑制是非特异性的、可能影响 ras 以外的蛋白质。本申请中所述的方法，表达的野生型 ras 不会导致这些缺陷。

20

发明概述

我们发现野生型 ras 基因可抑制细胞的致癌性或转化表型 (即抑制细胞增殖)。特别是当该致癌性或转化表型是由活化的 ras 基因或由活化的 ras 信号传递通路引起时，因此，本发明提供了抑制细胞特别是癌细胞增殖的一种方法。所述方法包括提高细胞中一种或多种野生型 ras 蛋白质的胞内水平。一个方面，所述方法包括在细胞中引入野生型 ras 蛋白质的核酸分子。引入的核酸可以是 DNA，此时，该核酸还包含操作性连接于编码野生型 ras 蛋白质的序列的转录启动子。引入的该核酸也可以是 RNA，其编码在细胞内能被翻译成多肽的野生型 Ras 蛋白或其片段。这两种情况都提高了一种或多种野生型 ras 蛋白质的胞内水平并抑制了细胞增殖。当是人体或其它动物肿瘤中细胞增殖时，抑制细胞增殖就停止或减慢了肿瘤的扩大、减少了肿瘤的体积或甚至能从人体中消除肿瘤。

另一方面，将一种或多种野生型 ras 蛋白引入细胞内提高其胞内水平，可在野

生型 ras 蛋白中加入一种蛋白质转导功能域以促进其引入细胞。此蛋白转导功能域能促进蛋白质摄取。这种内化的 ras 蛋白可抑制摄取该蛋白的细胞增殖。通过注射或吸入途径可有效地将含有蛋白转导功能域的 ras 蛋白给予人或其它动物。

5 本发明还涉及野生型 ras 蛋白或编码一种或多种野生型 ras 蛋白的核酸在治疗肿瘤或癌症中的治疗用途或预防肿瘤或癌形成的预防性用途。诊断为某癌症的上述人群(即高危人群)是野生型 ras 预防性应用的可能候选对象。这类人群可能处在高危险中, 因为接触特殊的环境(如严重吸烟者), 因为对某些癌症的家族性易感(如遗传基因导致易用感性升高)或其它原因。野生型 ras 的这种治疗性或预防性应用, 包括给予个体治疗有效量的一种或多种野生型 ras 蛋白质或编码此类蛋白质的核
10 酸分子。

本发明还包括通过提高细胞内野生型 ras 蛋白或其生长抑制性片段的浓度来降低细胞中 ERK MAP 激酶活性的方法。通过引入编码野生型 ras 蛋白的 DNA 分子并表达, 或通过引入细胞一种或多种野生型 ras 蛋白可提高细胞内 ras 的浓度。

本发明还提供特征鉴定或评价人体或其它动物中癌症的方法, 在一实施例中,
15 所述方法包括测定肿瘤细胞基因组中获自受试者的一个或多个内源性 ras 等位基因中的功能性突变的丢失。另一实施例中, 所述方法包括测试肿瘤细胞中获自受试者的一个或多个内源性 ras 等位基因中功能性突变的丢失, 和一个或多个 ras 蛋白质产生水平的降低。其它病例中, 功能性突变的丢失导致产生丢失了野生型 ras 蛋白所具有的生长抑制功能的 ras 蛋白。因为活化的 ras 引起的大多数侵袭性癌症
20 含有一个活化的 ras 等位基因, 和缺乏野生型 ras 生长抑制活性的第二个 ras 等位基因, 此方法可提供这类癌症的诊断和患这类癌症的人或动物的预后。

本发明还涉及在杂合性 ras 敲除小鼠中诱导肺肿瘤形成的方法。

附图简述

25 图 1. 采用杂合性 K-ras 缺陷小鼠的肺肿瘤生物学试验。a, 实验设计。b 和 d, 尿烷和 MUC 分别处理小鼠的肺肿瘤的复数性。c 和 e 尿烷和 MUC 分别处理小鼠的肺肿瘤负荷。空心柱代表 K-ras^{+/+} 小鼠, 黑色柱是 K-ras^{+/-} 小鼠。A/J(A/J×129/Sv-K-ras)F1; 129/SvImJ(129/SvImJ×129/Sv-K-ras)F1; C57BL/6J(C57BL/6J×129/Sv-K-ras)F1。星号表示与野生型动物比较 P<0.0001。

30 图 2. 杂合性 K-ras 缺陷小鼠的肺肿瘤。a 和 b 分别为 (A/J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 和 (A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠肺部的显微照片。注意与野生型小鼠比较; K-ras

缺陷小鼠的肿瘤复数明显增加。c 和 d 分别为 (A/J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 和 (A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠肺肿瘤(腺瘤和癌)4 倍放大的光镜照片。e 和 d 分别为 (A/J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 和 (A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠肺肿瘤 40 倍放大照片。肺泡支气管腺瘤中的致癌细胞为单形态性, 而肺泡支气管癌中的致癌细胞为多形态性; 核的大小和形状不同, 含有多个突出的核仁。

图 3. 小鼠肺肿瘤染色体 6 上的 LOH。a. (C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 野生型小鼠肺肿瘤中 LOH 态 K-ras 内含子 2 多态区 PCR-RFLP 分析的代表图。泳道 1:A/J 小鼠对照 DNA。泳道 2:C57BL/6J 小鼠对照 DNA, 泳道 3-7: (C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 野生型腺瘤肺肿瘤。b. 氯丁二烯诱导的 B6C3F1 小鼠肺腺癌 LOH 分析的代表图, 采用 K-ras 密码子 61 突变(CAA→CTA)作为标记。分图 7:B6C3F1 小鼠对照 DNA; 分图 3: 氯丁二烯诱导的 B6C3F1 小鼠肺腺癌无 LOH; 分图 1、2、4-6: 氯丁二烯诱导的 B6C3F1 小鼠肺腺癌含有 LOH。c. 显示标记 D6MC012 的代表图。泳道 1: C3H/HeJ 小鼠对照 DNA; 泳道 2: C57BL/6J 小鼠对照 DNA; 泳道 3: B6C3F1 小鼠对照 DNA; 泳道 4-18: 氯丁二烯诱导的 B6C3F1 小鼠肺腺癌。

图 4. 野生型 K-ras 对转化 N1H/3T3 细胞系(R16)的生长抑制。a. 载体对照和 K-ras4B 转染 R16 细胞的生长曲线。在相同条件下单用 pCR3.1 载体或野生型 K-ras4B 纯化质粒 DNA1.5-2 微克转染同一代 R16 细胞。计数 1-6 天 G418 抗性 R16 细胞, 各数据点为两次实验的平均值。b 和 c. 转染的野生型 K-ras4B 抑制细胞集落形成。将 1000 个 G418 抗性 R16 细胞接种在 4 个平皿(10cm)每一个中, 在加有 10%FBS 和 50μg/ml G418 的 DMEM 中培养 12 天。用 10%福尔马林液固定细胞, 结晶紫染色, 计数可见集落(直径>1.5mm)。星号表示与载体转染细胞相比 p<0.05。

图 5. 野生型 K-ras 对小鼠肺肿瘤细胞系(CM2)的生长抑制。a. 载体对照和 K-ras4B 转染 LM2 细胞的生长曲线。在相同条件下单用 PCR3.1 载体或野生型 K-ras4B 纯化质粒 DNA1.5-2 微克转染同一 LM2 细胞。将 G418 抗性 LM2 细胞亚克隆成为稳定的克隆。一个克隆命名为 LM2-4S-7, 表达较高水平转染的野生型 K-ras, 称为 LM2-K-ras4BH。称为 LM2-4S-4 的另一克隆表达转染水平低 3 倍的野生型 K-ras, 命名为 LM2-K-ras4BL。计数 1-4 天 G418 抗性载体对照、LM2-K-ras4BH 和 LM2-K-ras4BL 细胞。各数据点为两次实验的平均值。星号表示与载体转染细胞相比 p<0.05。b 和 c. 转染的野生型 K-ras4B 抑制细胞集落形成。将 1000 个 G418 抗性载体对照、LM2-K-ras4BH 和 LM2-K-ras4BL 接种在 4 个平皿(10mm)中的每一个。在加有 10%FBS 和 50μg/ml G418 的 CPRL1066 中培养 12 天。用 10%福尔马林液固定细胞,

结晶紫染色,计数可见集落(直径>1.5mm)。星号表示与载体转染细胞相比 $p<0.05$ 。

d. 转染 K-ras4B 克隆携带的独特序列的 RFPCR。泳道 1-14: LM2-4S-1、LM2-4S-2、LM2-4S-3、LM2-K-ras4BL、LM2-K-ras4BH、LM2-4S-8、LM2-4S-9、LM2-4S-10、LM2-4S-11、LM2-4S-L1、LM2-4S-L3、LM2-4S-L4、LM2-4S-M 和载体对照。

- 5 图 6. 表达野生型 K-ras 的 LM2 细胞中 K-ras 和 ERK 的活化状态。a. Ras 活化。将 LM2 细胞系裂解物与偶联于与谷胱甘肽琼脂糖的 GST-RBD, 或与谷胱甘肽琼脂糖单独培养(左图)。用抗 K-rasF234 抗体(Santa Cruz Biotechnology)作 Western 印迹, 检测结合的 K-ras。用 K-rasV12 和 K-rasN17 的表达载体转染 HEK293 细胞, 裂解并进行上述相同的结合试验(右图)b. ERK 活性, 用抗 ERK(上图)和抗磷酸化
- 10 ERK(下图)抗体, 检测全细胞裂解液, 将未经 EGF 刺激的 HEK293 细胞作为阴性对照, 经 EGF 刺激的 HEK293 细胞作为阳性对照。免疫印迹中的双条带对应于 GRK1 (44KD) 和 ERK2 (42KD)。

- 图 7. 野生型 K-ras 转染肿瘤细胞的裸鼠致瘤性试验。a 和 b. 抑制裸鼠的肿瘤产生(左侧为载体对照, 右侧为 K-ras4B 转染细胞)。c. 测定肿瘤大小。d. 测定裸鼠肿瘤最终重量。星号表示与载体转染细胞相比 $p<0.05$ 。
- 15

图 8A. 显示非小细胞肺癌中 LOH 的代表性放射自显影照片, 各为自显影图、微卫星标记、箭头、等位基因缺失; N. 正常 DNA; T. 肿瘤 DNA。各样品的左图为肺肿瘤无 LOH。B. K-ras2 基因密码子 12 突变的代表性例子。左侧, 肺肿瘤无 K-ras2 突变。右侧, 肺肿瘤含 K-ras2 基因 12th 密码子突变(GGT→TGT 转换)。

- 20 图 9 非小细胞肺癌染色体 12 的 LOH 图谱, 有 14 份样品在一个或多个基因座上显示 LOH。左侧, 12 份样品还保留了活化的 K-ras2 等位基因。右侧, 2 份样品不含 K-ras2 突变, 从 NCBI Human Genome Resource 产生染色体 12 的基因图谱。L. 大细胞癌。A. 腺癌。

发明详述

定义

- 本文中“野生型”指某基因的核苷酸序列或其编码的蛋白质的氨基酸序列, 该序列见于含此特定基因的大多数生物或细胞中。如果某基因或蛋白质不是野生型, 它则是突变体。突变体基因具有的核苷酸序列与野生型基因的序列不同。突变体蛋白质具有的氨基酸序列与野生型蛋白质的序列不同。
- 30

本文中, 野生型 ras 蛋白具有的活性, 称为“生长抑制”活性。细胞中表达野

生型 ras 活性,或其它野生型 ras 活性后,衡量生长抑制是与不表达野生型 ras 或不表达其它野生型 ras 活性的细胞相比,细胞的一种或多种生长或增殖参数降低或受到抑制。对这些细胞所作的许多不同测定是显著的生长抑制活性。例如,细胞周期时间减少,细胞分裂时间减少,G1 细胞周期时像时间减少等,是野生型 ras 生长抑制活性的特征。如果表达野生型 ras 活性的细胞是肿瘤、癌或转化细胞,与对照相比软琼脂中集落形成效率的降低或病灶形成减少等特性测定,是野生型 Ras 的生长抑制活性的特征,如果表达野生型 ras 活性的细胞包含在人或动物的肿瘤内或是肿瘤的一部分,肿瘤体积减少、肿瘤生长速度减慢、或转移速度减慢等特性测定,是野生型 ras 生长抑制活性的特征。

10 本发明一重要方面是,细胞中表达野生型 ras 基因可抑制或阻遏细胞增殖。抑制或阻遏细胞增殖是本领域技术人员熟知的术语,指减慢或停止细胞分化,使细胞数量不增加。减慢细胞生长的程度可以不同。这里,任何肿瘤细胞生长的改变都在本申请范围内,在本申请的实施例中将说明表明细胞生长减慢或停止的细胞特征的各种测定方法。野生型 ras 抑制细胞生长另一方面,包括属于本申请范围的肿瘤细胞

15 的凋亡(程序性细胞死亡)和诱导细胞分化。

本文中,“灭活突变”或“功能性突变的丢失”,指 ras 基因中或周围的突变,此种突变消除或降低了该基因编码的 ras 蛋白的生长抑制活性。一个例子是 ras 基因编码区中的一个或多个替代,缺失,插入或重复,这些变化不导致该基因表达的 ras 蛋白数量减少,而是就每个分子而言,含这种突变的 ras 蛋白的生长抑制活性比不含灭活突变的 ras 蛋白要差,这种类型的灭活突变可能发生在 ras 基因前三个编码外显子之一或一个以上中。

灭活突变的另一个例子是 ras 基因中,其附近或影响 ras 基因的突变,此突变使 ras 基因不能表达 ras 蛋白或降低其表达量。例如,此种突变可降低 ras 启动子的转录活性,引起 ras 基因转录物的异常剪接、或减少剪接、或引起细胞内 rasmRNA 或蛋白质半衰期减少。这种情况时,虽然产生的 ras 蛋白每个分子具有与野生型 ras 蛋白相同的生长抑制活性,但含此种突变的细胞含有的野生型 ras 蛋白数量减少,ras 的生长抑制活性程度降低。

其它突变导致整个 ras 等位基因缺乏或 ras 等位基因完全缺失,因而不能从该 DNA 序列产生 ras 蛋白。其它类型的突变包括 ras 基因序列中的内部重复,一种类型是串联重复。

还应认识到细胞中野生型 ras 生长抑制活性量的降低,也可能由于 DNA 中特异

性 ras 基因内或附近半胱氨酸残基甲基化的增加或改变。细胞 DNA 中的这种后成性变化导致超甲基化是本领域熟知的，通常认为会导致基因转录水平降低。

应认识到野生型 ras 的生长抑制活性与细胞中 ERK MAP 激酶活性降低相关。ERK MAP 激酶是 ras 信号传递通路的下游，这是本领域熟知的。细胞内野生型 ras 蛋白
5 浓度升高将导致 ERK MAP 激酶活性降低(见实施例 2)。

本发明还提供通过提高细胞内野生型 ras 蛋白浓度来降低细胞中 ERK MAP 激酶活性的方法。

本文中，“激活突变”或“获得功能性突变”，指通常发生在 ras 基因编码序列中发生的能导致产生具有转化致肿瘤或致癌活性的 ras 蛋白质的突变。生化性质
10 上，含激活突变的 ras 蛋白也称活化的 ras 蛋白，可能降低 GTP 酶的活性，这样 ras 蛋白被固定在活性 GTP 结合状态，活化的 ras 蛋白也可能降低核苷酸结合亲和力，因此以提高的速率，将 ras 结合的 GDP 交换成 GTP，也可能是 GAP 蛋白的活性降低导致 GTP 结合的 ras 转变成 GDP 结合的 ras。这些情况均导致 GTP 结合的 ras 累积，其中的 ras 引起信号转导。已知激活突变发生在 ras 基因的密码子 12、13、
15 54、61、63、116、117、119、145 和 146 中。这些突变发生在 ras 蛋白的鸟嘌呤核苷酸结合位点或其附近。这些密码子中的突变不是都能引起相同程度的活化，同样，这些密码子中的突变不都是活化性的。这些密码子的一个或多个中的某些突变可以是功能性突变的丢失，可通过美国专利 5591582 中所述的一些技术检测此激活突变，该专利中的内容纳入本文参考文献。

20 本文中，将 DNA 分子“引入”细胞，指本领域已知的将 DNA 摄入细胞的各种方法，其中一种将分离的 DNA 引入细胞的方法称为转染。转染通常用各种能促进细胞摄取 DNA 的方法处理细胞或 DNA，例如，可用化学方法处理细胞提高它们的 DNA 渗透性，也可以通过将 DNA 加入到脂质体中来处理 DNA，使细胞可内化 DNA。

也可用病毒将核酸(DNA 或 RNA)引入细胞，例如，可将编码野生型 ras 蛋白的
25 cDNA 克隆入一病毒基因组而引入细胞。用这种病毒感染细胞，结果将该病毒基因组引入了细胞。由于克隆的基因是病毒基因组的一部分，故其与病毒基因组一齐引入了细胞。这类病毒“载体”可能含有 DNA 或 RNA 基因组。许多这类病毒载体是本领域技术人员熟知的。基因组中克隆了野生型 ras 基因的病毒载体可称为“重组”病毒。

30 本文中“致癌性”、“转化的”或“致肿瘤的”，指癌细胞或恶性细胞具有的特性(即表型)，本领域技术人员熟知这类特性的各种情况。致癌细胞注射到动物将形

成肿瘤而动物注射非致癌细胞后不形成肿瘤，本文中所谓“致癌基因”，是引入细胞并在细胞中表达后能引起非癌细胞成为癌细胞的基因。本文中，一个这样的致癌基因是含激活突变的 ras 基因，这种 ras 基因可称为“活化的” ras 基因。“抗致癌基因”或“肿瘤抑制”基因，是引入细胞并在细胞中表达后引起癌细胞变成非癌细胞的基因。本文中一个这样的肿瘤抑制基因是野生型 ras 基因。

“瘤形成”是一种导致异常组织形成或生长的过程，此异常组织通过比正常组织更快的细胞增殖而生长，并能在引起新生长的刺激中止后继续生长。

含不同拷贝数野生型 ras 的小鼠中肿瘤的发生率

设计这些实验来测定野生型 K-ras 在肺肿瘤发生中的作用。缺乏两种 K-ras 等位基因的小鼠由于胎肝缺陷和贫血，在妊娠 12-14 天之间不能存活而死亡 (Johnson 等 1997, Genes Dev, 11:2468-81)，因此不可能对它们测试。然而，杂合性 K-ras 缺陷小鼠是评估野生型 K-ras 在肺肿瘤发生中作用的另一极好选择，因为近交品系小鼠的肺肿瘤 100%显示活化的 K-ras 等位基因 (You 等, 1989, Proc Natl Acad Sci U S A 86:3070-4)。如下所述进行了这些研究。

动物和 F1 杂合子的产生

6 周龄 A/J, 129/Sv1mJ 和 C57BL/6J 雌鼠获自 Jackson Labontories (Bar Harbor, Maine)。按先前报道 (Johnson 等, 1997, Genes Dev. 11:2468-81) 发育成功 129/Sv-K-ras^{+/-} (K-ras “敲除”) 小鼠。此敲除小鼠含有 DNA 结构中一插入突变，此 DNA 结构中 K-ras 基因含有一个 neo 基因 (Johnson 等, 1997, Genes Dev. 11: 2468-81)。动物饲养在 HEPA 过滤空气控制室的带硬木底和防尘罩的塑料笼子中 (24±1℃, 12/12 小时光照/黑暗循环)。动物吃啮齿动物实验室食物 (#5001, Purina)，自由饮水。7 天检疫期后，交配动物发育成 (A/J×129/Sv-K-ras^{+/-}) F1、(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras^{+/-}) F1 和 (C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/-}) F1 小鼠产生的繁殖群。研究期间每月监测所有动物的体重。

小鼠的基因型

收集各种 (A/J×129/Sv-K-ras^{+/-}) F1、(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras^{+/-}) F1 和 (C57BL/ 6J×129/Sv-K-ras^{+/-}) F1 小鼠剪下的尾组织，均浆，并在裂解液 (链霉蛋白酶 0.4mg/ ml, 10%十二烷基磺酸钠 (w/v)、10mM Tris、400mM NaCl 和 2 mM EDTA) 中 31℃温育过夜，然后氯仿抽提，冰冷乙醇沉淀。用聚合酶链反应 (PCR) 给每只小鼠剪下的尾组织分离的 DNA 就是否存在 K-ras 突变，进行基因分型。简言之，采用一对 PCR 引物 (oIMR013: 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3'; oIMR014: 5'-AGGTGAGATGA

CAGGAGATC-3')扩增 neo 插入物的 280bp 产物,用另一对 PCR 引物(oIMR015: 5'-CAAATGTTGCTTGTCTGGTG-3' TCR Cd-1; oIMR16: 5'-GTCAGTCGAGTGCACAGTTT-3')扩增作为内部标准的 150bp 产物。含有两个野生型 K-ras 等位基因[K-ras(+/+)]的 DNA 显示只有一条 150bp 片段,而含有野生型 K-ras 等位基因和目标突变(+/-)等位基因的 DNA 在 PCR 后显示 150bp 和 280bp 两条带。重复此筛检至少一次得以证实。使杂合子 129/Sv-K-ras^{+/-}雌鼠与 A/J 和 C57BL/6J 雄鼠交配,50%的后代小鼠具有 K-ras 目标突变(tml),其余 50%只有野生型 K-ras 基因。

K-ras^{+/-}小鼠中的肺肿瘤形成

图 1a 显示尿烷和 MNU 诱导肺肿瘤生成的实验设计,将 6 周龄(A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1、(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 和 (C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 杂交鼠根据 K-ras 基因型和致癌剂处理类型,随机分成 12 组。尿烷(氨基甲酸乙酯,纯度>99%)和 N-甲基亚硝基脲(MNU,纯度 99%)购自 Sigma Chemical 公司(圣路易斯,密苏里州)。用于生物试验前刻,配制这些化学致癌剂。尿烷和 MNU 均溶于生理盐水。对于尿烷处理,用于生物试验的 100 只雄鼠包括 17 只(A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠,12 只(A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠,15 只(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠,19 只(C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠和 18 只(C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠,所有小鼠一次腹腔内注射(i.p.)含尿烷(1mg/每克体重)的 0.2ml 磷酸缓冲液。

对于 MNU 处理组,生物试验用的 83 只雄鼠包括 14 只(A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠、13 只(A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠、14 只(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠、15 只(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠、13 只(C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠和 14 只(C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠。所有小鼠一次腹腔内注射(1P)含 MNU(50mg/每克价重)的 0.2ml 磷酸缓冲液。

因为小鼠产生肺肿瘤主要取决于遗传背景的不同,采用三种不同 F1 小鼠以避免可能的品系特异性作用。用尿烷处理后 18 周和用 MNU 处理后 12 天,用 CO₂窒息处死所有 12 组小鼠,取出一部分肺肿瘤和正常组织,在液氮中急冻,用 Tellyesniczky 液固定各肿瘤的代表性部分,测定各肿瘤的三维尺寸测定肿瘤体积,用三维尺寸平均值作为直径。确定半径(直径/2)并用公式:体积=(4/3)πr³(r 为半径)计算肿瘤总体积。用单程 ANOVA 确定对照和治疗组之间每只小鼠肺肿瘤数目的差异。用双程 ANOVA 确定对照和治疗组之间肺肿瘤数目和大小的差异。

如图 1a 所示,给 6 周龄(A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1、(129/Sv1mJ×129/Sv-K-

ras^{+/+})F1 或(C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 小鼠,野生型或杂合性 K-ras 敲除鼠一次腹膜内注射 1mg/每克体重剂量的尿烷。用尿烷处理后 18 周,三组杂合性 K-ras 缺陷小鼠都产生了比纯合性野生型小鼠明显更多更大的肺肿瘤。如图 1 所示,用尿烷处理的(A/J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 杂合性 K-ras 缺陷小鼠,每只肺产生的肿瘤比用同一致癌剂处理的野生型(A/J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 小鼠多 4 倍。类似地,尿烷处理(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 和(C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 杂合性 K-ras 缺陷小鼠,导致每只肺产生的肿瘤比它们各自的野生型同窝出生小鼠多 4-5 倍(图 1b)。对肺肿瘤总体的作用甚至更显著,具有 A/J×129/Sv 背景、129/Sv1mJ×129/Sv 背景和 C57BL/6J×129/Sv 小鼠背景的杂合性 K-ras 缺陷小鼠肿瘤体积分别增加 30 倍、19 倍和 8 倍(图 1c)。

杂合性 K-ras 缺陷性小鼠的大多数肺部大肿瘤(60%以上)是腺癌(图 2b、d 和 f)相反,用尿烷或 N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)处理的野生型小鼠的肿瘤都是小细胞肺腺瘤(图 2a、c 和 e),如图 2c 和 e 所示,腺瘤的特征是呈单形态生长模式,通常由分化良好的细胞组成。杂合性 K-ras 缺陷小鼠的肺肿瘤大约 60%为腺癌(图 2d 和 f),小鼠肺腺癌包含的细胞分化程度不同(图 2f),这些癌瘤显示正常肺泡结构完全丧失、核/浆比例提高、核聚集、细胞学非典型性、生长模式异质性和侵入相邻的支气管和血管。这些结果提示丢失野生型 K-ras 显著促进了未分化恶性肺肿瘤的发

育。这些发现出乎意料,表明野生型 K-ras 等位基因在化学诱生的肺癌发生中起着肿瘤抑制剂作用。进行了用 MNU 作为致癌剂的第二次肺肿瘤生物试验。MNU 是一种直接作用的烷化剂,不需要经过代谢的活化,而尿烷是前致癌剂需经代谢而活化。用类似于尿烷所述的方案以 MNU 处理(A/J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1、(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 或(C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/+})F1 小鼠。见图 1d 和 e,经 MNU 处理的 K-ras 缺陷小鼠在所有这三种背景的小鼠中肿瘤复数增加 6 倍,肿瘤体积增加 32-50 倍。

肺肿瘤中的 K-ras 激活突变

分析了上述小鼠中肺肿瘤的 K-ras 激活突变。用 TRIzol 试剂(Gibco BRL)分离肺肿瘤的 DNA,用作 PCR 反应的模板,并测定 PCR 产物的 DNA 序列。前已报道过 K-ras 处显子 1 和 2 的 PCR 引物序列(You 等,1989,Proc Natl Acad Sci U S A,86:3070-4)。还如前文所述(You 等,同上)进行了 PCR 反应和 PCR 产物的直接测序。

如表 1 所示,对 K-ras 第一外显子和第二外显子作序列分析,揭示 K-ras 野生

型小鼠所有分析的尿烷诱导肿瘤都含有密码子 61 第二位的 AT→TA 颠换。在杂合性 K-ras 缺陷小鼠用尿烷处理产生的肺肿瘤中观察到类似频率和类型的 K-ras 突变。与此相似,野生型小鼠或杂合性 K-ras 缺陷小鼠的 MNU 诱导肺肿瘤都在 K-ras 密码子 12 的第二位含有 GC→AT 的转换(表 1)。

5 **表 1 肺肿瘤中检测到的 K-ras 基因中的激活突变**

动物	处理	发病率	密码子 12 GGT→GAT	密码子 61 CAA→CTA
(A/J×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	尿烷	10/10	0	10
(A/J×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	尿烷	10/10	0	10
(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	尿烷	9/9	0	9
(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	尿烷	9/9	0	9
(C57BL/6J×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	尿烷	10/10	0	10
(C57BL/6J×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	尿烷	9/9	0	9
(A/J×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	MNU	5/5	5	0
(A/J×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	MNU	5/5	5	0
(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	MNU	5/5	5	0
(129/Sv1mJ×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	MNU	5/5	5	0
(C57BL/6J×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	MNU	5/5	5	0
(C57BL/6J×129/Sv-K-ras ^{+/-})F1	MNU	3/3	3	0

小鼠肺肿瘤中远端染色体 6 的 LOH

此项研究中, 申请人进一步检测了 K-ras 激活突变和 K-ras 区中标记丢失(杂合性丢失或 LOH)之间的关系, 表明肿瘤中丢失了 K-ras 的其它野生型等位基因。

10 国家毒理学计划(National Toxicology Program) (NTP)提供了 B6C3F1 小鼠的二组小鼠肺肿瘤供 K-ras 突变和 LOH 分析。第一组得自通过吸入而接触 0、1、2 或 4mg/m³V2P05 二年的小鼠, 第二组得自用氯丁二烯处理的小鼠。已报道过氯丁二烯诱生肿瘤的肺肿瘤复数数据和 K-ras 突变分析(Sills 等, 1999, Carcinogenesis, 20:657-62, 1996, NTP Technical Report 467, NIH 出版号 96-3957, NIEHS, NIH
15 Research Triangle Park, NC)。在 V2P05 研究中用 42 个小鼠肺肿瘤进行标记 D6MIT14 的等位型分析(2 个为未处理小鼠, 40 个为接触 V2P05 的小鼠)。D6MIT14 获自 Research Genetics 有限公司(Huntsville, 阿拉巴马州)。进行标准的 PCR 反应, 当观察到可见的差别时给等位基因丢失评分。用福尔马林固定氯丁二烯诱导

的肺肿瘤，石蜡包埋。因此不可能获得 D6MIT14 标记的 PCR 满意结果。为评估 K-ras 附近的 LOH，利用 C57BL/6 和 C3H 小鼠之间为多态性的一种标记 D6MC012 (引物序列: D6MC012-1F 5'GATGTCAAACGTGAGAGTGTCT3', SEQ ID NO. — 和 D6MC012-1R, 5'GCGCTGACTCGCTTCTTCCAT3', SEQ ID NO. —) 和单链构象多态性分析技术。结果用

5 K-ras 密码子 61 突变(CAA→CTA)作为标记进一步证实。

见表 2 小结，检测了五氧化钒(V2P05)诱导的肺腺癌中 K-ras 活化情况，29 个 (73%)有突变。还对这些肿瘤的 K-ras 区标记 D6MIT14 作了 LOH 类型分析，其中 18 个显示等位基因丢失(表 2)。V2P05 诱生肿瘤中最常见的 K-ras 突变是密码子 12 的第二个碱基 GA→AT 转换成 GA→TA 转换(数据来显示)图谱中 D6MIT14 位于 K-ras
10 的 0.5cM 内 (Manenti 等, 1999, Genane Res, 9:639-46)。D6MIT14 的等位丢失与肿瘤中 K-ras 突变密切相关。18 个肿瘤中 16 个 (89%)有等位基因丢失和 K-ras 突变。利用 K-ras 密码子 61 突变(CAA→CTA)和距 K-ras 约 5cM 的 D6MC012，申请人检测了这些样品中的 LOH 水平。如图 3b 和 c 及表 2 所示，19 个等位基因丢失的肿瘤中 16 个 (84%)也有 K-ras 突变，表明这些标记的等位基因丢失和 K-ras 活化之间
15 密切相关。这些结果还表明 K-ras 野生型小鼠发病率较低，肺肿瘤体积较小，是保持野生型 K-ras 等位基因的结果。对 (A/J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1、(129/SvImJ×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 或 (C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠各 6 只的 18 个尿烷处理肺肿瘤进行了 PCR-RFLP 分析，wt/wt 小鼠的 18 个肺肿瘤没有一个含等位基因丢失，图 3a 显示 (C57BL/6J×129/Sv-K-ras^{+/-})F1 小鼠肺肿瘤 LOH 态分析的代表性结果。
20

表 2 小鼠肺肿瘤中与 K-ras 活化相关的远端染色体 6 上的 LOH

品系	处理	肿瘤类型	K-ras 活化频率	染色体 6 上 LOH 频率	含等位基因丢失肿瘤中的 K-ras 突变
B6C3F1	无 ^a	腺瘤	2/14 (14%)	3/14 (21%)	2/3 (67%)
B6C3F1	无 ^a	腺癌	19/58 (35%)	8/58 (14%)	8/8 (100%)
B6C3F1	MeCl ^a	腺癌	10/49 (20%)	7/49 (15%)	7/7 (100%)
B6C3F1	V2P05	腺癌	29/40 (73%)	18/40 (45%)	16/18 (89%)
B6C3F1	氯丁二烯	腺瘤	13/16 (81%) ^b	13/16 (81%)	12/13 (92%)
B6C3F1	氯丁二烯	腺癌	6/9 (67%) ^b	6/9 (67%)	4/6 (67%)

^a LOH 和 K-ras 突变数据引自 Hegi 等人 (Hegi 等, 1994, Cancer, Res, 54:6257-64)

^b K-ras 突变数据引自 Sillis 等 (Sillis 等, 1999, Carcinogenesis, 20:657-62)

诊断和预后试验

本发明提供特征鉴定人或动物中肿瘤或癌的方法。一方面，所述方法包括分析肿瘤或癌样品中一种或多种 ran 基因的一个或多个等位基因，目的是检测 ras 基因中或附近的突变。一实施例中，分析了特异性 H-ras、K-ras 和 N-ras 等位基因。

- 5 另一实施例中分析了多种 H-ras、K-ras、或 N-ras 基因的等位基因。这种分析通常包括分析肿瘤或癌细胞基因组 DNA 的某些基因类型，可用各种方法进行。优选该分析包括分析 ras 基因 DNA 序列决定簇的某些类型。基因分型不包括分析不能检出改变的基因中单个碱基对类型突变的序列。

- 在一种分析中，用 PCR 分析了从肿瘤或癌分离的 DNA。选择 ras 基因区域或周
10 围区域，制备能与此区域基因组 DNA 杂交的 PCR 引物。可制备 ras 基因中或 ras 基因周围区域基因组序列已知的任何序列的这类引物。可用于 ras 基因周围区域的一组标记是多态性微卫星标记，它们在人类和某些动物基因中的序列和位置是本领域已知的。在 PCR 反应中应用这些引物扩增感兴趣 ras 基因的基因组区域。可用单次 PCR 反应扩增含 ras 基因的整个基因组区域，或者进行多次 PCR 反应，每次扩
15 增感兴趣 ras 基因的一个不同区域。优选用 PCR 反应扩增感兴趣 ras 基因的整个编码区。此外，也可扩增感兴趣 ras 基因的内含子和周围的基因组区域。

- 进行 PCR 产物分析。PCR 产物分析可有不同类型，分析类型通常取决于该分析试图检测的突变类型。例如，分析肿瘤或癌细胞基因组特定 PCR 产物的大小，与采用对照细胞 DNA (即已知含野生型 ras 基因) 作 PCR 的产物大小相比较，可检测该基
20 因组区域中的 DNA 插入或缺失。本领域熟知，如果两区域之间基因组区域中存在 DNA 插入，当用两种 PCR 引物扩增该基因组时，产生的 PCR 产物大小与用无插入基因组 DNA 作 PCR 所得产物的大小相比更大。同样，两种 PCR 引物之间基因组 DNA 缺失导致的 PCR 产物要比用不含缺失的基因组 DNA 获得的对照 PCR 产物小。此种分析可检测到与野生型基因组相比 PCR 产物尺寸的较大变化 (如至少 10% 的变化)。通常
25 通过比较二个或多个 PCR 产物的相对大小来确定 PCR 产物的大小。例如，将怀疑有 ras 突变的基因组 PCR 产物的大小与已知无 ras 突变的基因组 PCR 产物大小作比较。利用 PCR 产物在电场，如凝胶电泳中的迁移不难比较相对大小，琼脂糖凝胶电泳常用于此目的。

- 分析 PCR 产物的另一种方法是通过测定 PCR 产物的所有或部分核苷酸序列。此
30 分析方法检测 PCR 产物的相对大小变化不超过 10%。此方法也可检测 DNA 序列中不会导致相对大小变化的改变。例如测定和比较获自二种不同细胞 DNA 扩增的同一

PCR 产物的序列，可检测到 DNA 区域中的单个或多个核苷酸改变、替代等。DNA 序列测定和 PCR 产物序列测定的方法是分子生物学领域熟知的。常采用链末端测序方法。常用自动化测序仪进行 DNA 测序。

另一种分析类型，采用分离自肿瘤或癌细胞的 RNA，优选 mRNA，作为模板在逆转录反应中产生 DNA，然后用逆转录产生的 DNA 作为 PCR 反应的模板，采用的 PCR 引物具有已知为待测 ras 基因的 mRNA 中的序列。可如上所述选择各种 mRNA 引物以扩增该特定 ras 基因的全长 mRNA 序列。这可如上所述用一次或多次 PCR 反应进行。然后如所述进行 PCR 产物分析。在一种分析中，PCR 产物的存在或缺乏，或其大小的变化与对照相比，表明 ras 基因组区域中有大的变化，如大的插入或缺失。还有，这种分析通常采用 PCR 产物作凝胶电泳。在另一种分析中，用本领域熟知的方法测定 PCR 产物的 DNA 序列。

也可用本领域熟知的其它方法测试 ras 基因、转录物的存在，或二者的变化，与野生型比较。一些这种方法包括 Southern 印迹、Northern 印迹、RNA 酶保护试验、S1 核酸酶试验等。

除了分析 rasDNA 和 RNA 突变的方法外，也可检测 ras 蛋白本身是否存在变化。例如，根据编码特定 ras 蛋白质的基因中存在的特异性突变，可采用本领域熟知的各种能特异性结合不同 ras 蛋白质 (H-ras, K-ras 和 N-ras) 的抗体。例如可得到只有编码该蛋白基因的特定密码子中有激活突变才与 ras 蛋白结合的抗体。可采用其它只有该蛋白质上不含突变或至少无已知的特征性激活突变才与 ras 蛋白结合的抗体。这些差异性结合抗体作用的基础是特定 ras 蛋白质的构型。例如，可导致某 ras 蛋白构型改变的突变，或能或不能被某特异性抗体结合。许多这类抗体可购买到 (如 Oncogene Science)。因此通过使用这些抗体，可测定肿瘤或癌细胞中是否存在特异性 ras 突变蛋白，还可确定是否存在特异性突变。

可用这类抗体分析 ras 蛋白质，采用本领域熟知的各种试验。例如，免疫沉淀、Western 印迹和免疫组化是常用的方法。采用抗体的其它试验是本领域所知的，可运用。某些抗体在一种或多种试验中可得到良好结果。

如上所述，ras 基因的超甲基化可导致细胞中野生型 ras 活性表达降低。本领域熟知各种方法可检测某特定基因的超甲基化。在一方法中，采用了一对限制性内切核酸酶，它们能识别 DNA 中相同的核苷酸序列，但能根据甲基化序列中是否有特定核苷酸而区别性切割该序列。然后用 Southern 印迹分析切割的 DNA，所用的探针应跨越一个或多个限制性内切酶位点。通过与对照相比，Southern 印迹上 DNA 条带

模式的差异,可确定肿瘤或癌细胞基因组 DNA 中甲基化位点的变化。检测超甲基化的其它方法包括亚硫酸氢盐处理基因组 DNA 以将其中的甲基化半胱氨酸改变成不同的核苷酸碱基。然后用各种技术检测此改变的碱基,甲基化敏感的 PCR 是这些技术之一。其它方法包括各种 DNA 测序技术。这种技术之一是基因组测序。可采用其它已知方法。

能特征鉴定肿瘤或癌细胞中 ras 基因、RNA 或蛋白质的这些试验的结果可用于诊断和预后。因为野生型 ras 具有生长抑制活性,此活性的存在是采用上述试验的病人所需要的。一般,最差的情况是病人的肿瘤或癌细胞中不存在野生型 ras 的生长抑制活性。更理想的情况和病人更好的预后是通常其肿瘤或癌细胞膜中具有野生型 ras 的生长抑制活性。

作为治疗或预防剂的野生型 ras 基因

本发明还提供通过提高细胞中表达具有生长抑制活性的野生型 ras 蛋白质来抑制或阻止细胞生长的方法。可用各种方法来提高这种活性的表达。这些方法通常包括将编码野生型 ras 蛋白质的多核苷酸序列引入细胞,可将 DNA 或 RNA 引入这些细胞。也可以将 ras 蛋白质引入细胞。某些情况下,可给予能提高已存在于细胞中的 ras 基因表达野生型 ras 活性的药物。

应明白这些方法可用于治疗患有可用野生型 ras 治疗的肿瘤或癌症的受试者。这些方法也可用于预防个体中可能形成的肿瘤或癌症。提高 ras 表达的方法优选用于患有肿瘤或癌症而其肿瘤或癌细胞中无野生型 ras 活性或降低的个体。然而,本方法也可用于虽有野生型 ras 活性但熟知的该 ras 信号传导通路仍被激活,从而导致肿瘤或癌症的形成和生长这类情况。当 ras 以外的基因或 ras 信号传导通路以外的通路引起个体肿瘤或癌症时,也可采用本方法。

在这些方法中,“野生型 ras 蛋白质”总体指前述 ras 超基因家族成员编码的任何野生型蛋白质。更优选所用野生型 ras 蛋白质是该超家族中的 ras 亚家族成员编码的蛋白(如 H-ras, K-ras, N-ras)。最优选的野生型 ras 蛋白是 K-ras 蛋白。本方法中所用的基因和蛋白质宜为人源性的,虽然也可以是鼠源性的。这些蛋白和编码它们的序列是本领域熟知的,这些基因和蛋白质的序列可在因特网上 生物技术信息国家中心(National Center For Biothchnology Information)提供的数据库中或其它类似数据库中找到。

通过一个或多个不同的试验测定 ras 蛋白、或 DNA、RNA 的生长抑制活性。一组这种试验包括将该基因或蛋白引入培养的细胞或动物中,然后测定该基因或蛋白

对细胞生长的作用。生长抑制活性导致生长抑制。另一方法是将该基因或蛋白引入细胞，然后测定 ERK MAP 激酶的活性，可采用本领域熟知的生化试验进行此测定。

本方法还提供对 ras 基因或其编码蛋白质的修饰，导致该蛋白给药后在人体或动物中稳定性或半衰期提高。重要的是应指出，对野生型 ras 基因或蛋白质的任何
5 修饰都属于本发明范围，只要这种修饰的、缩短的、或部分的蛋白质保留了所述抗增殖、生长抑制、抗肿瘤发生、抗致癌性、抗恶变等某些活性。

可用各种方法将野生型 ras 基因引入。许多这些方法是基因治疗领域所熟知的。可用各种方法如用编码野生型 ras 活性或能刺激野生型 ras 活性的病毒载体转染或感染肿瘤或癌细胞来引入基因。

10 本发明提供将野生型 ras 基因引入人或动物细胞，例如人或动物肿瘤细胞的方法。将基因引入人体或动物有各种方法。一种优选的方法采用给予人体或动物含克隆的野生型 ras 基因的重组病毒。使该病毒感染肿瘤细胞将基因引入人体或动物细胞的另一方法包括直接给予人或动物编码野生型 ras 的纯化 DNA。可通过注射该 DNA 给药。这些方法通常用于疫苗领域，特别是用于所谓的“DNA 疫苗”。

15 为了将编码野生型 ras 活性的多核苷酸序列引入细胞，通常将该多核苷酸的此蛋白质编码区连接于能促进其转录成 mRNA，以及将此 mRNA 翻译为野生型 ras 的序列。本领域进行此种连接常用的方法是将编码 ras 蛋白质的多核苷酸序列克隆入一载体中，该载体含有能促进其中克隆的蛋白质编码序列表达的序列。

表达载体通常含有促进基因表达的序列。表达载体含有的转录单元包含组装的
20 蛋白质编码序列、调控转录和翻译的元件。转录调控元件通常包括启动转录的那些元件，这类元件的类型包括启动子和增强子。启动子可以是组成性、可诱导性和组织特异性启动子。转录调控元件还包括终止转录或提供 RNA 3' 端加工信号(聚腺苷酸化信号)的那些元件。翻译调控元件是蛋白质编码序列的正常部分，包括翻起
25 始密码子和翻译终止密码子。该蛋白质编码区部分可有其它序列如引导蛋白质穿过细胞膜的信号序列。

引入细胞的 ras 序列在引入细胞后宜以高水平表达(即引入的多核苷酸序列在细胞中产生大量的 ras 蛋白质)。使引入的多核苷酸序列高水平表达的技术是本领域熟知的。这些技术通常包括但不限于一旦引入细胞后提高多核苷酸的转录。这些技术通常包括采用能使引入的多核苷酸序列高速启动的转录启动子。已有各种启动
30 子为本领域所熟知。通常这类启动子衍生自病毒。这类启动子可导致多核苷酸序列在各种类型细胞中有效转录。这类启动子可以是组成型(如人巨细胞病毒的 CMV 增

强子/启动子)、或可诱导性(如小鼠乳房肿瘤病毒的 MMTV 增强子/启动子)。各种组成型和可诱导性启动子和增强子是本领域知道的。也可采用能导致多核苷酸在特定细胞类型中表达的其它启动子,即所谓的“组织特异性启动子。已有能在特定组织中表达的各种启动子是本领域知道的。例如,已有对神经、肝、上皮和其它细胞特异性的启动子是本领域熟知的。制备这类 DNA 分子的方法(如重组 DNA 方法)是本领域技术人员所熟知的。

专业上,载体指能介导与其连接的另一核酸或多核苷酸序列引入细胞的核酸分子。一种优选的载体是游离体,即一种能在染色体外复制的核酸。其它类型的载体在其引入细胞时成为细胞基因组的一部分。能引导插入的 DNA 序列表达的载体称为“表达载体”,包括质粒、病毒或本领域已知的其它类型分子。

通常,载体含有允许 ras 多核苷酸插入的一个或多个限制性内切核酸酶识别位点。载体还可含有一标记基因,如显性抗菌素抗性基因,其编码的化合物能鉴定和分离已转化的细胞与非转化细胞。

用于本发明的一种载体是病毒载体。病毒载体一般是基于不同病毒家族(包括痘病毒、疱疹病毒、腺病毒、细小病毒和逆转录病毒)的重组病毒。这些重组病毒一般包含外源性多核苷酸序列(此地是 ras 基因),并且此外源性多核苷酸处在能使该外源性多核苷酸序列在病毒感染细胞中表达的启动子控制下。

一种病毒载体是缺陷性腺病毒,其基因组中具有插入的外源性多核苷酸序列。术语“缺陷性腺病毒”指在靶细胞中不能自主复制的腺病毒。通常,缺陷性腺病毒的基因组没有在被感染细胞中复制所必须的序列,部分或优选完全从基因组中除去这种序列。为了能感染靶细胞,在体外制备构建物时该缺陷性病毒应含有最初基因组的足够长的序列以允许病毒颗粒包裹。该病毒所含的其它序列是遗传学上所需的“顺式”序列。

另一种病毒载体是一种缺陷性逆转录病毒,其基因组中具有插入的外源性多核苷酸序列。这类重组逆转录病毒是本领域熟知的。用于本发明的重组逆转录病毒优选没有污染辅助病毒。辅助病毒是无复制缺陷但在重组逆转录病毒包装时有时会出现的病毒。

也可采用无缺陷或复制活性病毒载体。这类载体保留了病毒复制所必须的序列。

其它类型的载体是质粒载体。

一个方面,本方法包括将优选包含在一载体中的 ras 多核苷酸序列引入特定的

细胞, 使该细胞表达升高水平的野生型 ras。此地, 可用本领域所知的各种方法将 DNA 分子, 具体是编码 ras 多核苷酸序列的 DNA 分子引入或转运入细胞。一种将分离的 DNA 引入细胞中的方法称为转染。转染通常用能促进细胞摄取该 DNA 的各种方法处理细胞或 DNA。例如, 用化学方法处理细胞, 使其允许 DNA 透入。也可处理 DNA,

5 例如将 DNA 包含在脂质体中使细胞能内化。优选利用转染将 DNA 引入细胞。

如上所述, 可利用病毒将 ras 多核苷酸序列引入细胞。例如, 引入细胞的多核苷酸是克隆入病毒基因组中的多核苷酸。用这类病毒感染细胞导致病毒基因组引入该细胞。由于克隆的多核苷酸成了病毒基因组的一部分, 其就与病毒基因组一起引入了细胞。这类病毒“载体”可含有 DNA 或 RNA 基因组。许多这类病毒载体是本领域技术人员熟知的。在其基因组中含有克隆的编码 ras 蛋白质的多核苷酸的病毒载体, 称为“重组”病毒。用病毒转运 DNA 分子具体可用于将多核苷酸序列转运入动物的特定细胞或组织。此类技术通常为基因治疗领域所知道。

将多核苷酸序列引入患病的人或动物的另一方法, 包括直接给予人或动物纯化的含编码 ras 蛋白质的多核苷酸的 DNA。可通过注射 DNA 或转染 DNA 进行给药。这些方法通常用于疫苗领域, 特别是所谓“DNA 疫苗”的给药。

无论用何种方法给予人或动物野生型 ras 基因, 这类方法可包括能导致野生型 ras 基因优先进入肿瘤细胞, 而较差进入非肿瘤细胞的变化。例如, 本领域知道能导致重组病毒特异性感染人或动物中某种类型细胞(如肿瘤细胞)的技术。对于病毒, 可通过制备该重组病毒的细胞受体, 和/或制备能识别和结合该病毒细胞受体的病毒配体来实现这种“靶向”。用于引入野生型 ras 基因到动物或人肿瘤细胞中的这类方法在本申请的范围内。

在基因转移和基因治疗领域已知将外源多核苷酸序列引入特定细胞但不引入其它细胞的方法。例如, 本领域知道能导致重组病毒特异性感染人或动物中某种类型细胞(如肿瘤细胞)的技术。对于病毒, 可通过制备该重组病毒的细胞受体, 和/或制备能识别和结合该病毒细胞受体的病毒配体来实现这种“靶向”。用于引入野生型 ras 基因到动物或人肿瘤细胞中的这类方法在本申请的范围内。

将 ras 多核苷酸引入细胞后, 采用技术来特异性检测细胞中是否已引入了该多核苷酸序列, 和/或表达了引入的多核苷酸序列的特异性细胞。已有检测存在的多核苷酸序列和/或多核苷酸序列表达的各种技术, 是本领域熟知的。一些这样的技术包括: Southern 印迹、Northern 印迹、聚合酶链反应(PCR)、Western 印迹、RNA 保护、放射性碘摄取试验等。

野生型 ras 蛋白质作为治疗剂

本发明另一方面提供一种通过向细胞引入 ras 蛋白质来抑制或遏制细胞生长的方法。已有各种将蛋白质引入细胞的方法。本领域知道将蛋白质引入细胞的各种方法。在一方法中，将蛋白质偶联于或融合于能引导其进入细胞的短肽。一组这样的短肽称为蛋白质转导结构域。将蛋白质引入细胞的另一种方法是采用脂质运载体。例如，将蛋白质与脂质体结合，当该脂质体进入细胞或与细胞融合时能进入细胞。已知将蛋白质引入细胞的其它方法。显微注射和电穿孔是这样的二种方法。其它方法是已知的。

这些方法包括但不限于：“蛋白质转导”或“蛋白质治疗”，见 Nagahara 等，1998, Nat Med, 4:1449-52 发表文章和 Dowdy 实验室发表的文章中的描述(Nagahara 等，1998, Nat Med. 4:1449-52; Schwarze 等，1999, Science. 285:1569-72; Vocero-Akbani 等，2000, Methods Enzymol. 322:508-21; Ho 等，2001, Cancer Res, 61:474-7; Vocero-Akbani 等，2001. Methods Enzymol. 332:36-49; Snyder 和 Dowdy, 2001, Curr Opin Mol Ther, 3:147-52; Becker-Hapak 等，2001, Methods, 24:247-56)，这些文章纳入本文参考文献。

在一实施例中，将人免疫缺陷病毒 TAT 蛋白质(Green 和 Loewenstein, 1998, Cell, 55: 1179-88; Frankel 和 Pabo, 1988, Cell, 55: 1189-93)的“蛋白转导结构域”(PTD)的 11 个氨基酸序列融合于野生型 ras 蛋白质。将该纯化的融合蛋白质与细胞表面接触，细胞即摄取野生型 ras 蛋白，发挥其抑制或遏制细胞生长的功能。此例中需要将融合于 PTD 的野生型 ras 蛋白引入人或动物的肿瘤细胞中，有各种方法将该蛋白给予人，优选通过注射(如静脉内)或气溶胶吸入给予此蛋白。

含有融合的 PTD 的野生型 ras 蛋白宜通过将编码野生型 ras 基因的 DNA 序列与编码 PTD 的 DNA 序列融合来制备。宜将产生的 ras-PTD 融合基因掺入一载体，例如质粒或病毒载体以促进该融合基因引入生物和在生物中高水平表达，在细胞中产生大量的该融合蛋白。可表达载体中所含此融合基因的一种生物是细菌，优选大肠杆菌(*Escherichia coli*)。本领域技术人员也知道常用的其它生物。此融合蛋白在这些生物中以高水平表达后，用本领域技术人员熟知的蛋白质纯化技术从生物中纯化此融合蛋白。

宜以药物组合物形式给予人或其它动物野生型 ras 蛋白。适合于输送的制剂见 Renington's Pharmaceutical Sciences, 17th(Mack Publishing 公司，费城，宾西法尼亚州，1985)。这些药物组合物适合用于各种药物输送系统(Langer，

Science. 249:1527-1533, 1990)。

组合物中的野生型 ras 蛋白适合于单次给药或一系列接种。此药物组合物可肠胃外、局部或口服给药。肠胃外给药宜为静脉内、皮下、皮内、腹膜内、肌肉内给药。肠胃外给药优选通过肝动脉导管或胆道插管进入病人的肝脏。肠胃外给药，该组合物可包含 ras 蛋白和适合的无菌运载体，如水、水性缓冲液、0.4%盐水、0.3%甘氨酸、透明质酸或无毒性非离子表面活性剂的乳液，这是本领域知道的。该组合物还可包含接近生理状态的物质如缓冲剂和湿润剂，NaCl、KCl、CaCl₂、乙酸钠和乳酸钠等。应注意，除了以药学上可接受的组合物给予 ras 蛋白外，也可给予作为此组合物一部分的编码 ras 蛋白的 DNA 或 RNA。

包含 ras 蛋白的固体组合物以常规的无毒性固体运载体，如葡萄糖、蔗糖、甘露糖、山梨糖、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、纤维素或纤维素衍生物、碳酸钠和碳酸镁配制。对于口服给予的固体组合物，HCV 样颗粒宜含 10%-95%，更优选 25%-75% 的该组合物。

给予个体治疗或预防有效量的 ras 蛋白组合物。该组合物可单剂给药，但更多为一系列剂量在数天、数周、或甚至数月期间给药。本文中，有效治疗量是能抑制肿瘤生长或甚至导致肿瘤消退的剂量，此剂量也能抑制或防止肿瘤转移。本文中，有效预防量是防止肿瘤形成的剂量。

野生型 ras 表达对 ERK MAP 激酶的作用

本发明另一方面提供一种抑制 ERK MAP 激酶活性的方法。如上所述将编码野生型 ras 蛋白的基因或野生型 ras 蛋白引入细胞后，产生对 ERK MAP 激酶的抑制。

实施例

以下实施例对本发明作进一步详细描述，进一步明确本发明的范围。本文所引用的所有参考物都纳入本文参考文献中。

实施例 1 野生型 K-ras 基因对肿瘤细胞系的生长抑制

进行了转染研究，其中野生型 K-ras 抑制了名为 R16 (You 等, 1989, Proc Natl Acad Sci U S A, 86:3070-4) 的转化 NTH / 3T3 细胞系的生长，和名为 LM2 (McDoniels-Silvers 等, 2001, Exp Lung Res. 27:297-318) 的小鼠肺肿瘤细胞系的生长。这二个细胞系含有 K-ras 突变体等位基因。R16 衍生自含有 K-ras 密码子 12 第二位 GC→AT 转换的小鼠肺肿瘤 DNA 转化的 NIH/3T3 细胞。R16 细胞显示高水平表达突变体 K-ras (比野生型 K-ras 等位基因高约 10 倍)。LM2 是尿烷诱生 A/J

小鼠品系肺肿瘤而建立的转移性肿瘤细胞系。LM2 含有 K-ras 密码子 61 第二位的 AT→GC 转换。

用衍生自小鼠 cDNA 序列的引物从 A/J 小鼠正常肺分离的总 mRNA 作 RT-PCR, 分离野生型 K-ras4B 的全长 cDNA, 制备含野生型 K-ras 的表达载体(George 等, 1985, Embo J. 4:1199-203)。通过将 cDNA 连接 pCR3.1 哺乳动物表达质粒(Invitrogen, Carlsbad, California), 制备野生型 K-ras 表达构建物。用 Maxi-tip500 柱(QIAGEN, Santa Clarita, California)纯化此表达构建物并测序, 用于转染实验前应进行验证。

在相同条件下, 用 Lipofectamine(Life Technologies, Gaithersburg, 马里兰州)以 1.5-2 μ g 以下克隆: pCR3.1 载体单独和野生型 K-ras4B 的纯化质粒 DNA, 转染同一代的 R16 和 LM2 细胞。在 G418 中选择, 挑选出转染的细胞。直接测定 G418 抗性 R16 细胞, 并将 G418 抗性 LM2 细胞亚克隆成稳定的克隆。用这些细胞分析生长速率和集落形成效率。用 12 孔板每孔接种 2000 个细胞测定这些细胞的生长速率。R16 细胞一式二份培养在 Dulbecco 改进的 Eagle 培养液(DMEM)加 10%FBS 和 50 μ g/ml G418 中。LM2 细胞培养在 CMRL1066 加 10%FBS 和 50 μ g/ml G418 中。接种后培养细胞 1、2、4、6 和 8 天(图 4 和 5)。对于集落形成试验, 采用 4 个平板, 直径 10 厘米, 各用于一个亚克隆的转染细胞。各平板接种 1000 个细胞培养于 DMEM 加 10%FBS 和 50 μ g/ml G418 中。用 10%福尔马林缓冲液固定细胞, 结晶紫染色, 计数可见集落(直径大于 1.5mm)。在这些亚克隆中和在集落形成试验选出的克隆中, 用转染克隆携带的独特序列作 RT-PCR, 监测转染的野生型 K-ras 的表达。特别是, 用野生型 K-ras 转染从 G418 抗性细胞分离的 RNA, 产生 cDNA。在这些 cDNA 上用位于转录起始位点后的载体序列的特异性引物(5'TAATACGACTCACTATAGGG3')和 K-ras 基因内编码序列(5'CTCTATCGTAGGGTCGTAC3')进行 PCR。

如图 4a 所示, 野生型 K-ras 转染的 R16 细胞显著抑制了细胞生长(第 6 天 80 %抑制)。而空载体对照细胞中有 65 个以上集落生长, 野生型 K-ras 转染的 NIH/3T3 细胞只观察到很少的集落(不到 10), 见图 4b 和 c。在选出的 G418 抗性细胞(LM2-K-ras4B H)克隆中, 野生型 K-ras 基因转染的 LM2 显著抑制了细胞生长(第 4 天 90 %抑制), 见图 5a。LM2-K-ras4B H 表达了高水平的转染的野生型 K-ras(图 5d), 而空载体对照细胞中有 200 个以上的集落, LM2-K-ras4B H 细胞中只见到很少的集落(图 5b 和 c)。LM2 细胞平均有 30 个集落表达转染的野生型 K-ras, 水平低 3 倍(命名为 LM2-K-ras4B H), 见图 5d, 表明野生型 K-ras 的抑制作用是剂量依赖性的(图

5b-d)。

检验了转染的野生型 K-ras 的抑制作用是否可用致癌性 K-ras 蛋白表达减少来解释。LM2 细胞在 K-ras 的密码子 61 中含有 CAA→CGA 突变。无法得到能识别此突变 K-ras 的抗体，因而采用另一方法。GTP 结合而非 GDP 结合的 Ras 可与 c-Raf 的 Ras 结合结构域(RBD)结合，可用细菌表达的 GST-RBD 作为亲和基质来分离 LM2 细胞系中 GTP 结合的 K-ras 致癌形式。

在温和的裂解缓冲液(10mM Tris-HCl pH-7.5, 100mM NaCl, 1%NP-40, 5mM MgCl₂, 0.2mM PMSF, 2 μg/ml 亮抑肽酶, 5 μg/ml 抑蛋白酶肽, 1mM)中裂解 LM2 细胞，离心澄清。用 Bradford 试验测定蛋白浓度(BioRad)，均分样品，然后与预交联于谷胱甘肽琼脂糖的 40 μg Raf 的 GST-RBD(Hermann 等, 1995, J Biol Chem. 270: 2901-5)培育，或单与琼脂糖培育。混合二小时后洗涤琼脂糖珠并用 SDS 样品处理缓冲液洗脱结合的蛋白质。用抗 K-rasF234 抗体(Santa Cruz Biotechnology)作 Western 印迹，显示结合的 K-ras 蛋白质。

如图 6 所示，在所有测试的细胞系中分离到相等量的致癌性 K-ras，但转染的野生型 K-ras 表达程度不同。LM2-4S-11 和 LM2-K-ras4BH 表达了相当高水平的转染野生型 K-ras，而 LM2-4S-3、LM2-K-ras4B L、和 LM2-4S-M1 只有相对低水平的转染野生型 K-ras。作为阳性对照的 293 细胞用 K-rasV12(pCDNA3-K-rasV12; GTP-结合)或 K-rasN17(pCDNA3-K-rasN17; GDP-结合)转染，只有 K-rasV12 与 GTP-RBD 结合(图 6a)。此数据显示，致癌性 K-ras 的表达不受野生型过度表达的影响。

20

实施例 2 野生型 K-ras 抑制 ERK 活性

这些研究测定到野生型 K-ras 影响 ERK 活性。已知 MAP 激酶活化在细胞转化中起着重要作用。用抗磷酸-ERK 抗体作免疫印迹测定 ERK 活性。抗磷酸-ERK 抗体所识别的活化环磷酸化直接调节 ERK 活性。ERK 激酶活性直接与用抗磷酸-ERK 免疫印迹检测的信号相关。

如实施例 1 所述，这些研究中采用了 LM2-K-ras4B 和 LM2-4S-11 细胞系。为分析 HRK 活性，分别用含 10%FBS 的 DMEM 和 CMLR1066 培养液培养 HEK293 和 LM2 细胞。用 50ng/ml EGF 刺激 ERK 活性 10 分钟，培养不用 EGF 刺激的 HEK 细胞作为阴性对照，用 EGF 刺激的 HEK293 细胞作为阳性对照。如实施例 1 所述，直接用 SDS 样品处理缓冲液裂解细胞，并用抗 ERK 抗体或抗磷酸-ERK 抗体(Sigma Chemical 公司，圣路易斯，密苏里州)作 Western 印迹分析。

如图 6b 所示,观察到野生型 K-ras 表达与 ERK 活性之间反相关。LM2-K-ras4B 和 HLM2-4S-11 细胞系具有较高水平的 K-ras 表达(图 5d)并显示比载体对照细胞明显低的 ERK 活性(图 6d)。相反, LM2-K-ras4B L、LM2-4S-3、和 LM2-4S-M1 细胞具有较低水平 K-ras 表达(图 5d)并显示相对正常的 ERK 活性(图 6b)。

5

实施例 3 转染的野生型 K-ras 抑制转染细胞系体外的肿瘤生长

此研究显示野生型 K-ras 抑制了裸鼠中 R16 和 LM2 细胞系的体外肿瘤生长。如实施例 1 所述,将野生型 K-ras 或空载体转染入 R16 和 LM2 细胞。无胸腺小鼠(4-6 周龄)获自 Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine)。将约 1 百万个对数生长期的细胞皮下注射到裸鼠两腹侧,每种亚克隆用 5 只动物。每天监测动物健康状况和核查肿瘤大小,记录肿瘤潜伏期(出现时间)和大小(mm^3)。细胞注射后 2-4 周麻醉处死小鼠测量肿瘤重量。用 RT-PCR 验证所有裸鼠肿瘤中野生型 K-ras 克隆的表达。

如图 7a-d 所示,注射载体对照细胞的所有 5 只小鼠产生了大肿瘤,而注射携带野生型 K-ras 的 R16 和 LM2 细胞的 5 只小鼠中只观察到小肿瘤。野生型 K-ras 转染组中的肿瘤(约 0.3g 和 0.05g)比载体对照小鼠中的肿瘤(约 1.9g 和 0.6g)明显较小(图 7d) ($p < 0.0001$)。这些结果表明野生型 K-ras 抑制了 R16 和 LM2 细胞的致肿瘤能力。

实施例 4 用病毒载体将野生型 K-ras 基因输送给人

通过将野生型 K-ras 基因重组入腺病毒基因组构建重组腺病毒。培养病毒并用标准方法纯化。为测试重组 K-ras 腺病毒表达 K-ras 基因的能力,感染培养的细胞,制备感染细胞的蛋白质提取物,并用 K-ras 蛋白的特异性抗体作免疫印迹分析该提取物是否存在 K-ras 蛋白。将表达 K-ras 的重组病毒给予患肿瘤的人,然后监测已给予该重组腺病毒的人中肿瘤的生长。

25

实施例 5 用蛋白质转导将野生型 K-ras 蛋白质给予人

构建一细菌质粒表达载体,其含有携带编码人免疫缺陷病毒 TAT 基因(融合于野生型 K-ras 基因的 5' 端)的 11 个氨基酸蛋白质转导结构域核苷酸序列的野生型 K-ras 基因。将此质粒转化入大肠杆菌,产生携带有融合于该蛋白质氨基端的 11 个氨基酸 PTD 的野生型 K-ras 蛋白质(K-ras: PTD 融合蛋白)。用标准蛋白质纯化方法从转化大肠杆菌纯化得到 K-ras:PTD 融合蛋白。将该 K-ras:PTD 融合蛋白给予

30

患肿瘤的人,通过静脉注射或气溶胶吸入给药。给予人的 K-ras:PTD 融合蛋白包含在药物制品中,该制品的具体给药途径是可接受的。

实施例 6 活化 ras 和野生型 ras 丢失所致癌症的诊断

- 5 通过活检获得人肿瘤的组织样品。用标准方法裂解组织样品所含细胞并分离细胞的 DNA。采用能扩增编码 K-ras 蛋白的 K-ras 基因组序列区域的引物对分离的 DNA 进行 PCR,然后测定 PCR 扩增产物的序列。分析获得的 DNA 序列以确定是否存在已知的激活突变,并确定 K-ras 中是否存在能导致野生型 K-ras 蛋白的生长抑制活性消除的其它突变。

10

实施例 7 与野生型 ras 丢失相关的癌症特征分析

- 对总共 22 个腺癌和 8 个大细胞癌作染色体 22 上杂合性丢失的基因型分析。这些肿瘤和它们的配对正常组织获自 Ohio 州立大学(Columbus, OH)病理系和 Cincinnati 大学(Cincinnati, OH)的 Cooperative Human Tissue Network。一病
- 15 理学家给所有肿瘤作了组织病理分类。按照公布的程序(Blin N& Stafford, D.W.1976, Nucleic Acid Res, 3:2303-8),分离每个病例的肿瘤和正常组织的高分子量 DNA。用染色体 12p 上的 8 个多态性微卫星标记:D12S89、D12S358、D12S319、D12S1606、D12S1596、G60541、D12S1617 和 D12S1592(Research Genetics 有限公司)作等位基因的丢失的 PCR 分析。评分 8%变性聚丙烯酰胺凝胶上的所有标记。干
- 20 燥凝胶并暴光 X 线胶片过夜,肉眼观察给予 LOH 评分。只有那些 40%或以上差异的样品评为等位基因丢失。采用 PCR 指导的序列分析,测出所有的肺腺癌和大细胞癌 DNA 中有 K-ras2 基因密码子 12 突变。如 M., Wang, Y., Stoner, G., You, L., Maronpot, R., Reynolds, S.H 和 Anderson, M. 1992, Proc Natl Acad Sci U S A, 89:5804-8 所述进行了肺肿瘤 K-ras2 外显子 1 的 PCR 扩增。K-ras2 外显子 1 的 PCR 引物序列
- 25 为: K-ras2-1F:5'-TTTTTATTATAAGGCTGCT-3' SEQ ID NO.—和 K-ras2-1R:5'-GTCCACAAAATGATTCTGAA-3', SEQ ID NO.—。用 QIA 快速凝胶抽提试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)洗脱 114bpPCR 产物。用 ABI PRISM 3700 DNA 分析仪(Perkin-Elmer/Applied Biosystems)检测密码子 12 的突变。

- 总之,分析的 8 个微卫星标记集中在 K-ras2 区。表 3 小结了各标记的等位基
- 30 因型数据。22 个腺癌中的 11 个(50%)和 8 个大细胞癌中的 4 个(50%)发现有所用标记之一的等位基因丢失。图 8a 显示染色体 12p 的 8 个微卫星标记等位基因型分

析的代表性结果。对于 K-ras2 突变分析,我们的数据显示 22 个腺癌中的 9 个(40.9 %)和 8 个大细胞癌中的 3 个(37.5%)在密码子 12 中含有 K-ras2 突变(GCT→TGT, CGT, GAT, GCT, GTT 转换, 图 8b, 表 3)。当综合 LOH 分析和 K-ras2 突变资料时,发现腺癌和大细胞癌中染色体 12p 上的大多数等位基因丢失与活化 K-ras2 突变相
5 对应。大约 82%(11 个有 9 个)腺癌和 75%(4 个有 3 个)大细胞癌显示染色体 12p 有等位基因丢失,同时保留了活化的 K-ras2 等位基因。图 9 显示带有 12p 上 K-ras2 突变和一个或多个基因座中 LOH 的 12 个肿瘤。其中肿瘤 HCG0688L、5796A、HCG1595A、HCG1610L 和 HCG1618A 显示分析的所有信息标记都丢失,而肿瘤 363A 只丢失 D12S1596 标记同时在最近的信息标记 D12S319 和 D12S1592 处保留了杂合性。
10 性。肿瘤 167A 和 5471A 也显示 K-ras2 所位于的标记 D12S1617/G60541 的末端缺失,在最近信息标记 D12S1592 处保留了杂合性(图 9)。LOH 数据将 LOH 的最小区域定位于标记 D12S1606 和 D12S1617/G60541。生理基因组图谱将 K-ras2 基因定位于 800kb 区域中这二标记侧接的一部位。结果表明人肺腺癌和大细胞癌中丢失了野生型 K-ras2 等位基因。

15

表 3 非小细胞肺癌染色体 12 上的 LOH

标记	染色体 12 上 LOH 的频率	
	腺癌 LOH/I ^a (%)	大细胞癌 LOH/I (%)
1. D12S89	4/11 (36.4%)	2/5 (40.0%)
D12S358	6/11 (54.5%)	3/6 (50.0%)
D12S310	5/11 (45.5%)	3/6 (50.0%)
D12S1606	4/8 (50.0%)	3/4 (75.0%)
D12S1596	6/10 (60.0%)	2/3 (66.7%)
G60541	7/16 (43.8%)	2/3 (66.7%)
D12S1617	5/13 (38.5%)	2/4 (50.0%)
D12S1592	2/12 (16.7%)	0/3 (0.0%)
综 合	10/22 (45.5%)	4/8 (50.0%)

I^a: 具有所选标记信息的肿瘤数目。

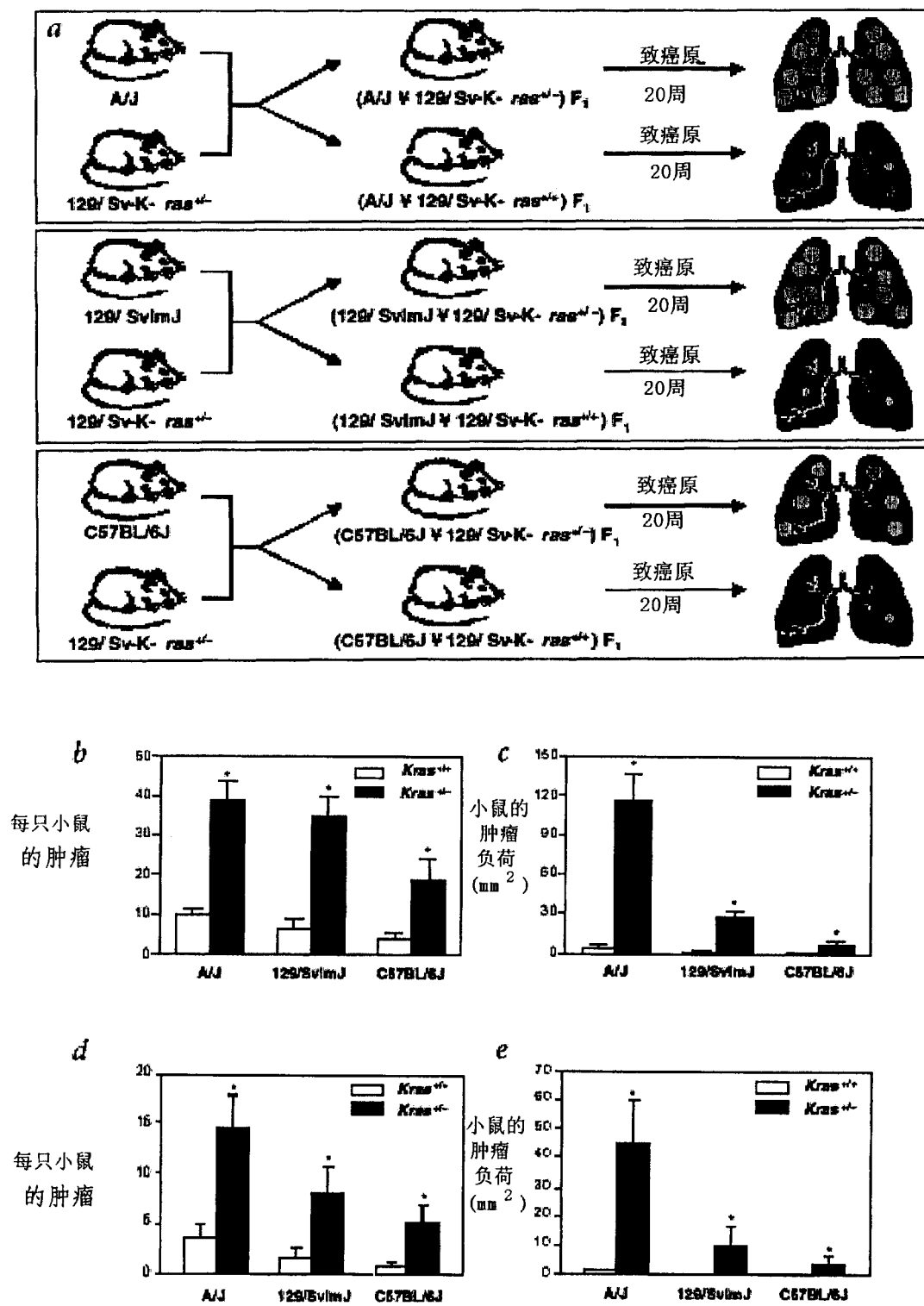


图 1

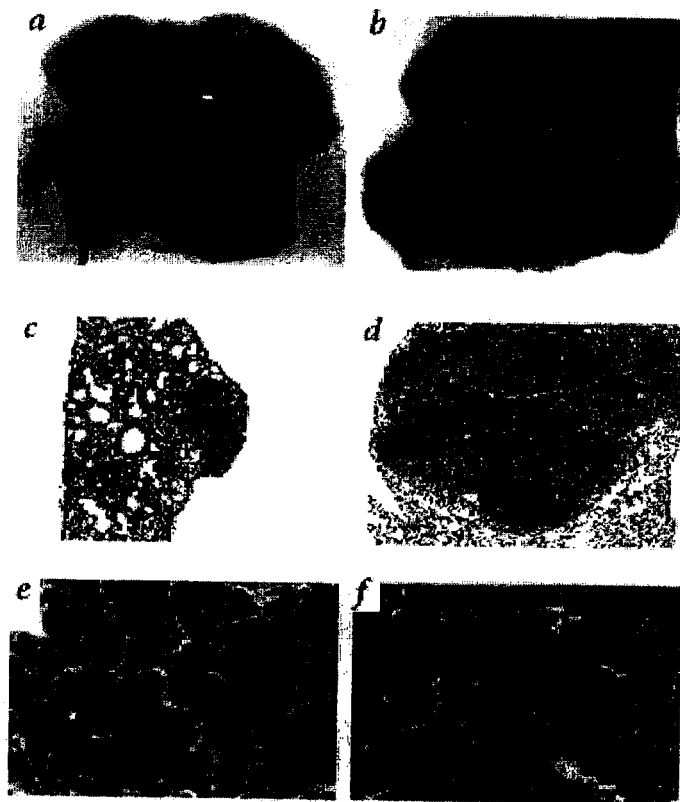


图 2

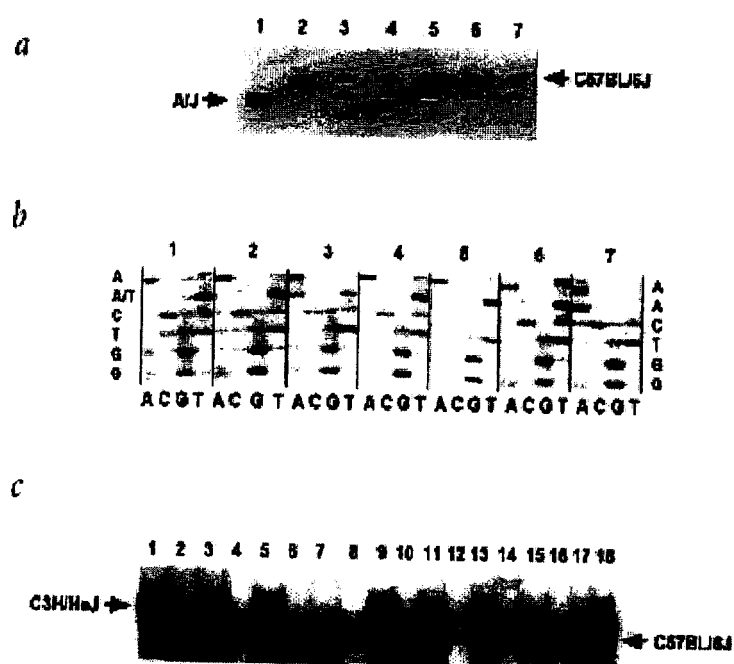
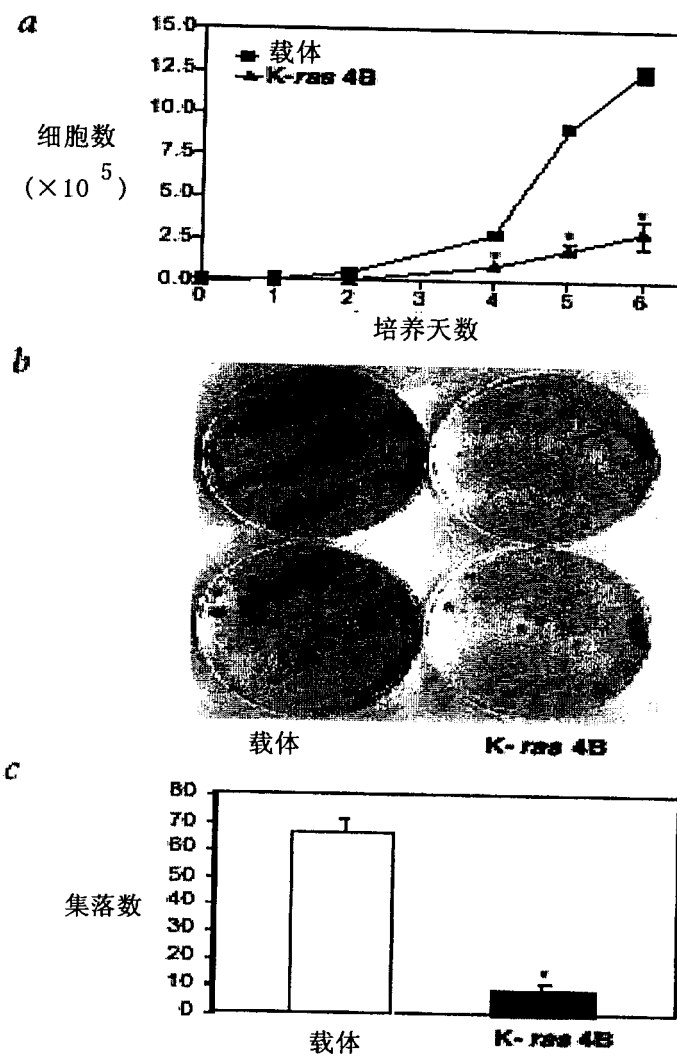


图 3



图

4

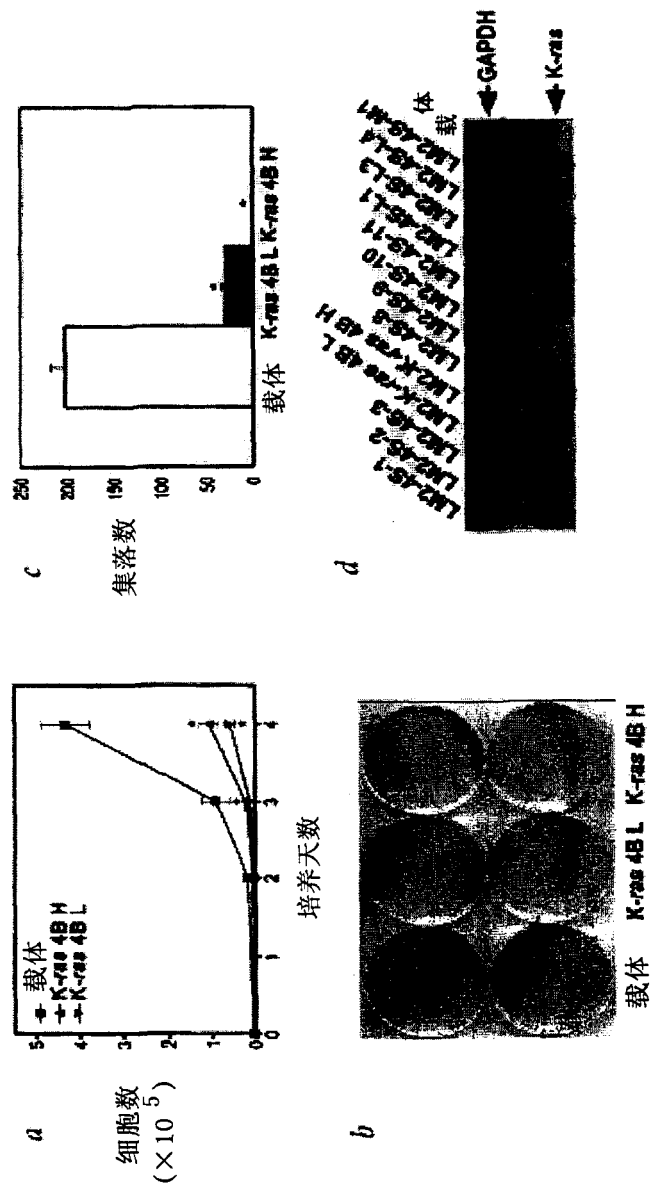


图 5

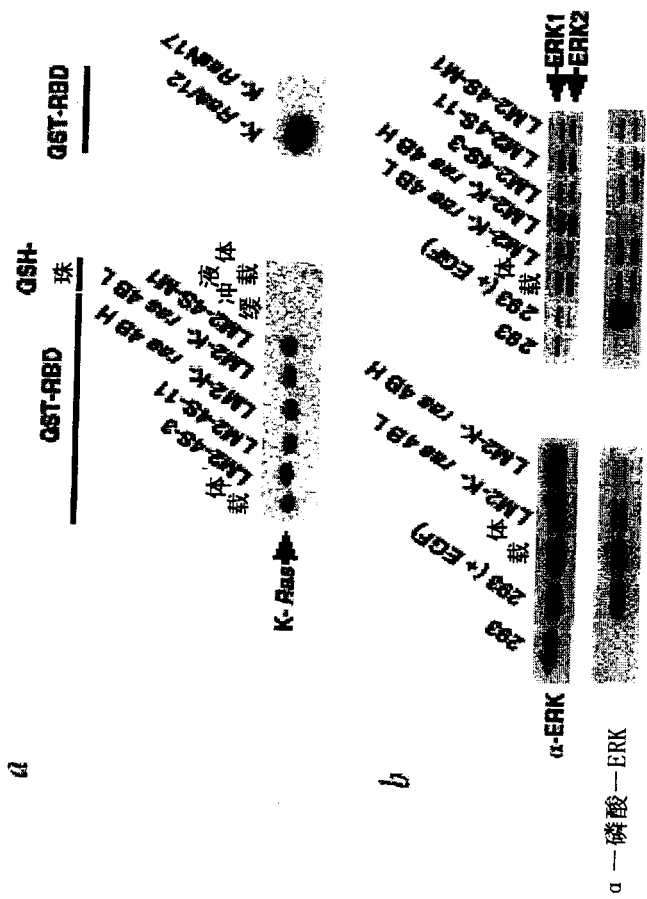
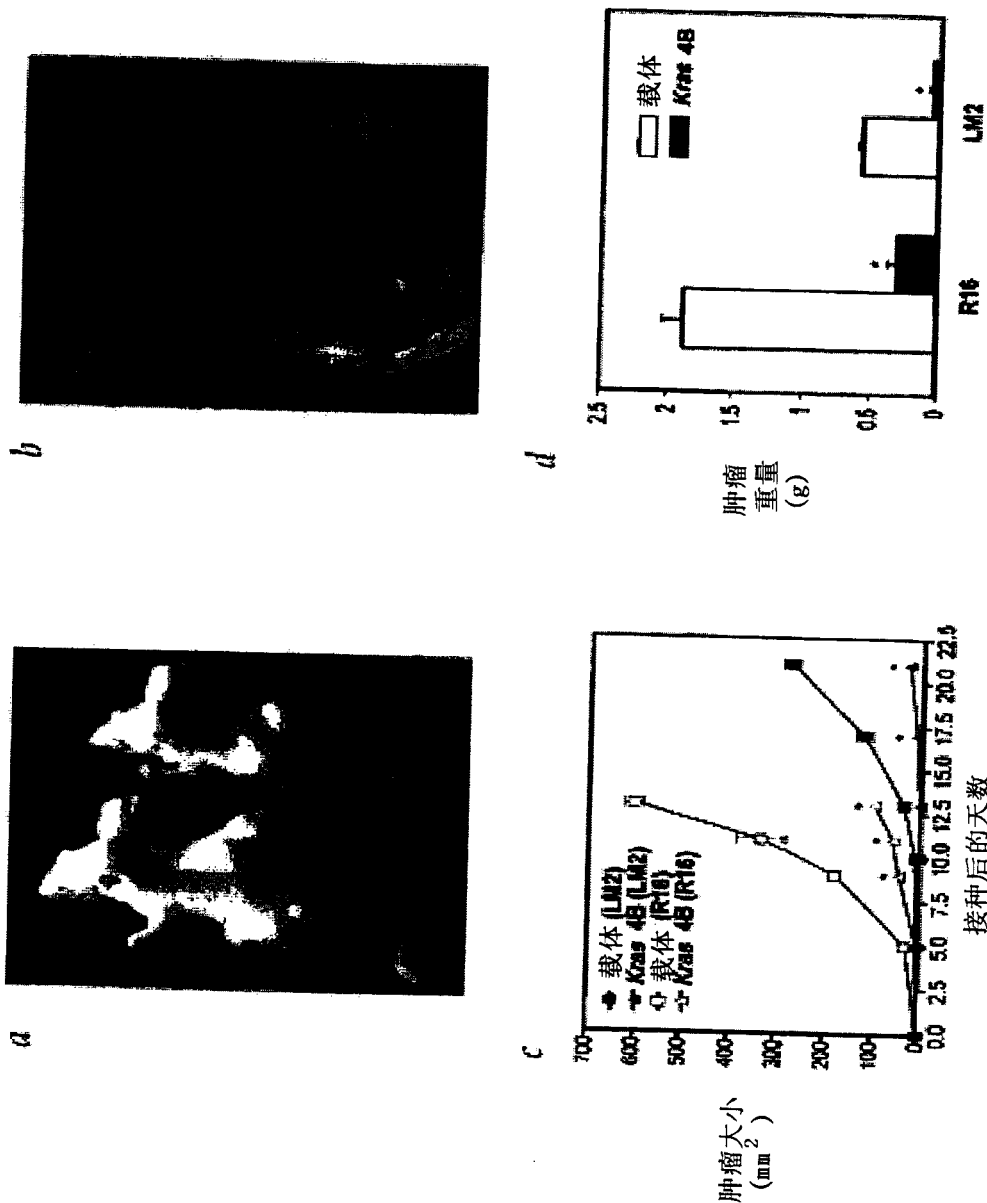
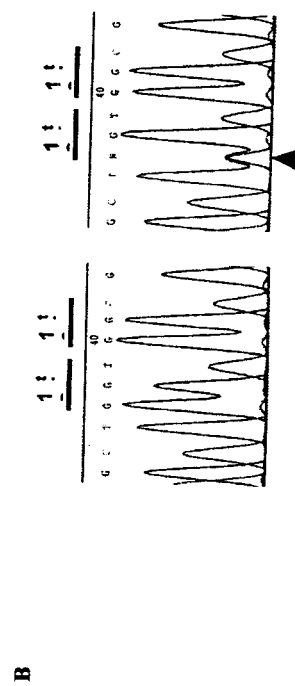
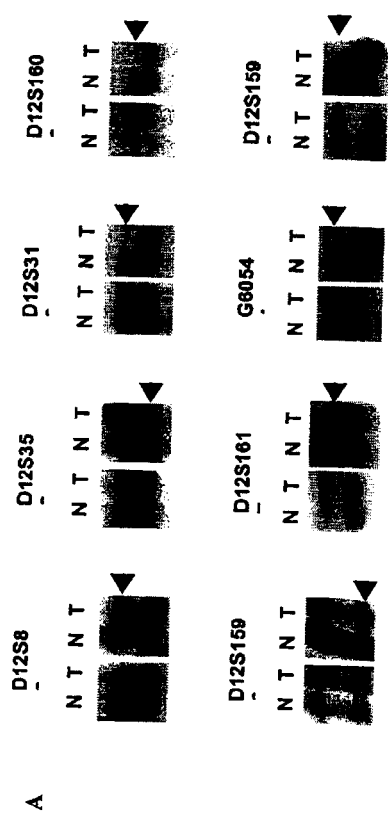


图 6



7

图



8

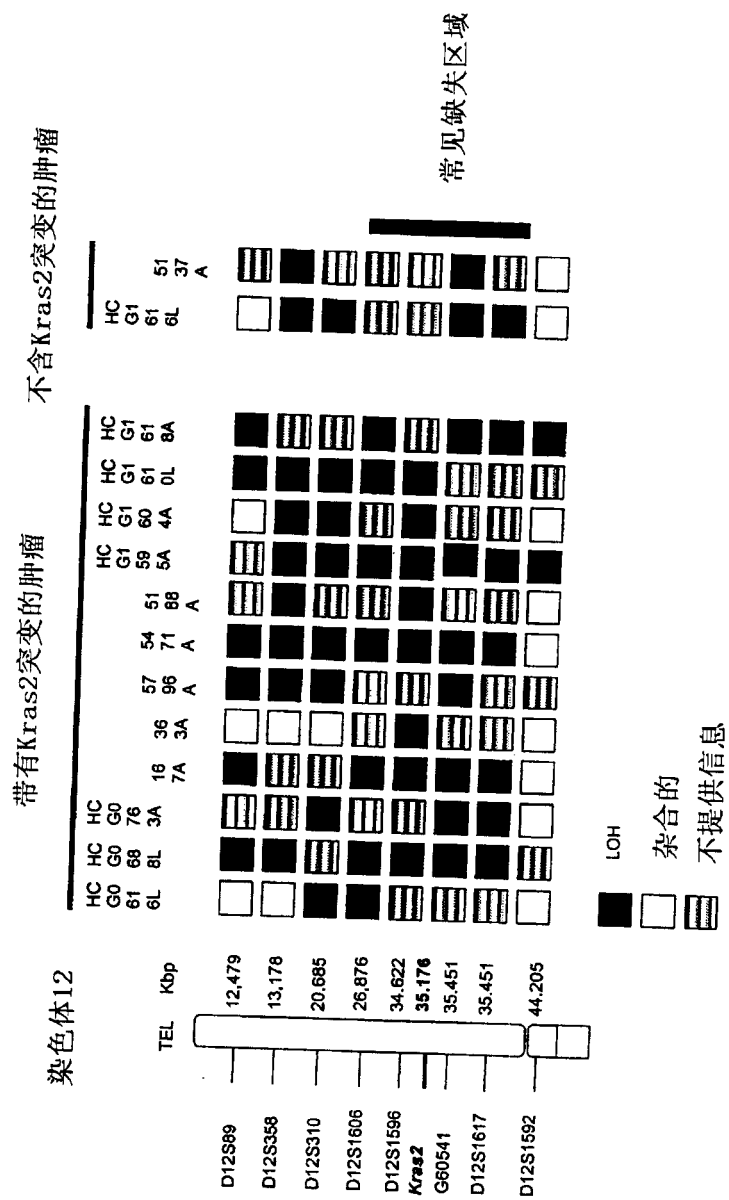


图 9

专利名称(译)	作为癌症治疗剂的野生型RAS		
公开(公告)号	CN1729019A	公开(公告)日	2006-02-01
申请号	CN02820723.8	申请日	2002-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	俄亥俄州立大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	俄亥俄州立大学研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	俄亥俄州立大学研究基金会		
[标]发明人	Y王 Z张		
发明人	M·尤 Y·王 Z·张		
IPC分类号	A61K48/00 A61K35/00 A61K38/00 G01N33/53 C12N15/63 G01N33/68 A61K31/7088 A61K38/17 A61P35/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/6886		
CPC分类号	A61K38/1709 C12Q1/6886 A61K48/00 A61P35/00 C12Q2600/156 C12Q2600/158		
代理人(译)	周承泽		
优先权	60/314693 2001-08-24 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供抑制细胞、尤其是癌症细胞增殖的方法。所述方法包括提高细胞中一种或多种野生型ras蛋白质的胞内水平。一方面，所述方法包括在细胞中引入和表达编码野生型ras蛋白的核酸。另一方面，通过在细胞中引入一种或多种野生型ras蛋白而提高一种以上ras蛋白的胞内水平。本发明还涉及野生型ras蛋白或编码一种或多种野生型ras蛋白的核酸在治疗肿瘤或癌症中的治疗性应用，或预防肿瘤或癌症形成的预防性应用。提供了特征分析或评价人或动物中癌症的方法。在一实施例中，所述方法包括测试获自受试者肿瘤细胞基因组中一种或多种内源性ras等位基因的丢失。在另一实施例中，所述方法包括测试获自受试者的肿瘤细胞中一种或多种内源性ras等位基因中的功能性突变的丢失和一种或多种ras等位基因中的激活突变。

