



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103917228 B

(45)授权公告日 2018.04.20

(21)申请号 201280054472.4  
 (22)申请日 2012.09.06  
 (65)同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 103917228 A  
 (43)申请公布日 2014.07.09  
 (30)优先权数据  
 20115876 2011.09.06 FI  
 61/531337 2011.09.06 US  
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日  
 2014.05.06  
 (86)PCT国际申请的申请数据  
 PCT/FI2012/050862 2012.09.06  
 (87)PCT国际申请的公布数据  
 W02013/034806 EN 2013.03.14  
 (73)专利权人 图尔库大学  
 地址 芬兰图尔库  
 (72)发明人 J.维斯特马克 A.斯杰韦  
 (74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
 72001  
 代理人 杜艳玲 权陆军  
 (51)Int.Cl.  
 A61K 31/00(2006.01)  
 A61K 31/09(2006.01)

A61K 31/165(2006.01)  
 A61K 31/166(2006.01)  
 A61K 31/245(2006.01)  
 A61K 31/282(2006.01)  
 A61K 31/337(2006.01)  
 A61K 31/404(2006.01)  
 A61K 31/407(2006.01)  
 A61K 31/4184(2006.01)  
 A61K 31/4188(2006.01)  
 A61K 31/436(2006.01)  
 A61K 31/4406(2006.01)  
 A61K 31/444(2006.01)  
 A61K 31/4725(2006.01)

(56)对比文件

Chadrick E.等.“Proteasome Inhibition Sensitizes Non-Small-Cell Lung Cancer to Gemcitabine-Induced Apoptosis”.《Ann Thorac Surg》.2004,第78卷第1207-1214页.

(续)

审查员 焦士勇

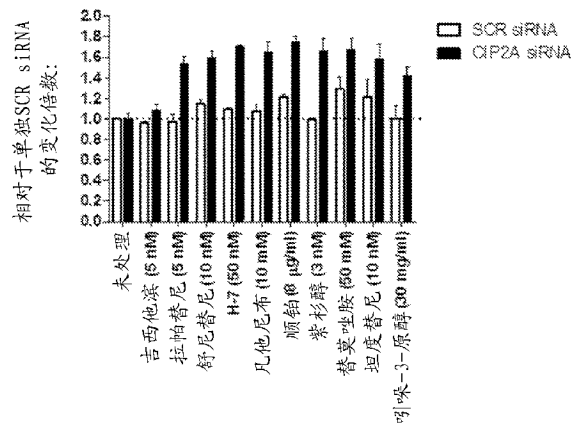
权利要求书1页 说明书14页  
 序列表6页 附图3页

(54)发明名称

用于治疗过度增生性障碍、优选具有受损的p53功能的过度增生性障碍的包含CIP2A沉默剂的药物组合

(57)摘要

本发明是基于以下发现：沉默CIP2A (KIAA1524)基因会使癌细胞对某些小分子化学治疗剂的细胞凋亡诱导活性敏化。因而，本发明涉及各种联合治疗、致敏方法和药物组合物。本发明另外涉及基于得自所述对象的样品中的CIP2A和p53表达和/或蛋白活性为对象选择癌症治疗的方法。



CN 103917228 B

[接上页]

**(56)对比文件**

Yeon A. Choi 等.“Increase in CIP2A expression is associated with doxorubicin resistance”.《FEBS Letters》.2011,第585卷第755-760页.

Zhenhua Lin等.“Combination of proteasome and HDAC inhibitors for therapy of uterine cervical cancer”.《Clin Cancer Res》.2009,第15卷(第2期),第570-577页.

Kuen-Feng Chen等.Bortezomib Sensitizes HCC Cells to CS-1008, an AntihumanDeath Receptor 5 Antibody, through the Inhibition of CIP2A.《Mol Cancer Ther》.2011,第10卷(第5期),第892-901页.

Liang Ma 等.Overexpression and Small Molecule-Triggered Downregulation of CIP2A in Lung Cancer.《plos one》.2011,第6卷(第3期),第1-10页.

1. 用作药物的至少一类CIP2A沉默剂和化合物的组合产品,所述药物用于治疗包含具有受损的p53功能的细胞的过度增殖障碍,所述化合物选自PKC-412、PARP抑制剂III、吡啶-3-甲醇、顺铂、雷帕霉素、TGX-221、NU-7441、S31- 201和吉西他滨,其中所述CIP2A沉默剂是SEQ ID NO: 2,且其中所述过度增殖障碍选自乳腺癌和神经胶质瘤。

2. 用作药物的至少一类CIP2A沉默剂和化合物的组合产品,所述药物用于治疗包含具有受损的p53功能的细胞的过度增殖障碍,所述化合物选自PKC-412、PARP抑制剂III、吡啶-3-甲醇、顺铂、雷帕霉素、TGX-221、NU-7441、S31- 201和吉西他滨,其中所述CIP2A沉默剂是SEQ ID NO: 6,且其中所述过度增殖障碍选自胃癌和宫颈癌。

3. 药物组合物,其包含在权利要求1或2中定义的组合产品和至少一种药学上可接受的载体。

4. 至少一类CIP2A沉默剂和化合物在制备用于通过在需要这种致敏的人或动物对象中沉默CIP2A基因使具有受损的p53功能的过度增生性细胞对化学治疗剂敏化的药物中的用途,所述CIP2A沉默剂选自SEQ ID NO: 2和SEQ ID NO: 6,所述化合物选自PKC-412、PARP抑制剂III、吡啶-3-甲醇、顺铂、雷帕霉素、TGX-221、NU-7441、S31- 201和吉西他滨。

5. 至少一类CIP2A沉默剂和化合物在制备在需要这种治疗的人或动物对象中治疗包含具有受损的p53功能的细胞的过度增生性疾病的方法中使用的药物中的用途,所述化合物选自PKC-412、PARP抑制剂III、吡啶-3-甲醇、顺铂、雷帕霉素、TGX-221、NU-7441、S31- 201和吉西他滨,其中所述CIP2A沉默剂是SEQ ID NO: 2,其中所述方法包括,给所述对象伴随地、同时地或相继地施用所述至少一类CIP2A沉默剂和化合物,所述化合物选自PKC-412、PARP抑制剂III、吡啶-3-甲醇、顺铂、雷帕霉素、TGX-221、NU-7441、S31- 201和吉西他滨,且其中所述过度增生性疾病选自乳腺癌和神经胶质瘤。

6. 至少一类CIP2A沉默剂和化合物在制备在需要这种治疗的人或动物对象中治疗包含具有受损的p53功能的细胞的过度增生性疾病的方法中使用的药物中的用途,所述化合物选自PKC-412、PARP抑制剂III、吡啶-3-甲醇、顺铂、雷帕霉素、TGX-221、NU-7441、S31- 201和吉西他滨,其中所述CIP2A沉默剂是SEQ ID NO: 6,其中所述方法包括,给所述对象伴随地、同时地或相继地施用所述至少一类CIP2A沉默剂和化合物,所述化合物选自PKC-412、PARP抑制剂III、吡啶-3-甲醇、顺铂、雷帕霉素、TGX-221、NU-7441、S31- 201和吉西他滨,且其中所述过度增生性疾病选自胃癌和宫颈癌。

7. 评价样品中的CIP2A和p53表达和/或蛋白活性的试剂在制备用于为需要这种治疗的对象选择癌症治疗的方法中的试剂盒中的用途,其中所述对象患有选自胃癌、乳腺癌、宫颈癌和神经胶质瘤的疾病,其中所述方法包括:评价得自所述对象的样品中的CIP2A和p53表达和/或蛋白活性,和对于其样品为CIP2A表达和/或活性阴性的和p53活性受损的对象,选择至少一种化学治疗剂的单一疗法,且对于其样品为CIP2A表达阳性的和p53活性受损的对象,选择根据权利要求1或2所述的组合产品作为疗法。

8. 试剂盒,其包含评价得自对象的样品中的CIP2A和p53表达和/或蛋白活性的试剂。

## 用于治疗过度增生性障碍、优选具有受损的p53功能的过度增生性障碍的包含CIP2A沉默剂的药物组合

### 技术领域

[0001] 本发明涉及联合癌症治疗剂的领域。

### 背景技术

[0002] 癌症是影响全世界所有社会群体的破坏性疾病。据估计2个男性中的1个和3个女性中的1个将在其一生中发展某种形式的癌症。

[0003] 令人感兴趣的是,最近已经确定,不论不同癌症类型之间的表型变异性如何,有限数目的遗传元件的微扰足以在许多不同的人细胞类型中诱发细胞转化(综述见(Zhao等人, 2004))。通过实验证实,Ras和端粒末端转移酶(TERT)的活化,与肿瘤抑制蛋白p53和视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)的失活一起,可以永生化多种人细胞类型,所述人细胞类型可以随后响应于蛋白磷酸酶2A(PP2A)的抑制而转化为致瘤状态。因此,这些普通的遗传元件可以被视作癌症发展的主要调节剂(Zhao等人, 2004)。

[0004] PP2A是在很大程度上保守的蛋白丝氨酸/苏氨酸磷酸酶(PSP),其作为由一个催化亚基(PP2Ac或C)、一个支架亚基(PR65或A)和替代性的调节B亚基之一组成的三聚体蛋白复合物而起作用。如上所述,最近的实验证据已经肯定地确认,PP2A活性的抑制是人细胞转化的先决条件(综述见(Westermarck和Hahn, 2008))。尽管如此,关于在体内调节PP2A复合物组成和/或活性的机制知之甚少。PP2A抑制机制的鉴别可提供开发新类型的再活化PP2A肿瘤抑制物活性的癌症治疗剂的机会。该想法类似于以用小分子(诸如Nutlin-3)再活化p53的肿瘤抑制物活性为目的的癌症治疗方案(Vassilev等人, 2004)。

[0005] 在2007年,鉴别出了一种新颖的PP2A抑制剂蛋白,其被命名为PP2A的癌性抑制剂(CIP2A)(Junttila等人, 2007)。CIP2A会与PP2A和与最重要的致癌转录因子之一MYC相互作用。此外,siRNA介导的CIP2A的消除显著增加MYC-PP2A复合物中的PP2A活性,并导致MYC丝氨酸62去磷酸化和MYC蛋白降解。还已经证实,CIP2A是恶性细胞生长和体内肿瘤形成所需的(Junttila等人, 2007; Khanna等人, 2009; Westermarck和Hahn, 2008)。此外,最近的工作已经证实了CIP2A在几种常见的人恶性肿瘤中的过表达,并且验证了它作为临床上有关的人癌蛋白的作用(Khanna等人, 2009; Westermarck和Hahn, 2008)。因而,这些结果证实,CIP2A是一种新颖的在人恶性肿瘤中抑制PP2A的人癌蛋白。

[0006] 细胞杀死和/或细胞凋亡是癌症治疗方案的优选终点。另一方面,固有的或获得性的抗性是与当前使用的化学疗法有关的主要问题。因而,尽管已经揭示了恶性肿瘤的至少一些基础机制,本领域需要开发用于过度增生性疾病和尤其是癌症的药物。肿瘤抑制蛋白p53的活化会响应于多种临床使用的化疗剂而介导细胞的细胞凋亡诱导(Chari等人, 2009)。但是,由于p53功能在大约50-70%的人癌症中是受损的,这是化学疗法抗性的一个重要原因(Chari等人, 2009)。在大多数情况下,癌症中的p53通过基因突变或通过p53的负调节剂(诸如MDM2)或病毒蛋白(诸如人乳头瘤病毒(HPV) 16 E6蛋白)的过表达而失活。因而,为了克服抗药性,显然需要这样的方案:其使携带在功能上受损的p53的那些癌细胞对化学

疗法敏化 (Chari等人, 2009)。

## 发明内容

[0007] 在一个方面,本发明提供了用作药物的至少一类CIP2A沉默剂和化学治疗剂的组合,所述药物用于治疗包含具有受损的p53功能的细胞的过度增殖障碍,所述化学治疗剂选自小分子酪氨酸激酶抑制剂、PARP抑制剂、CHK1抑制剂、硫代葡萄糖苷、烷化剂、植物生物碱、PI3K/mTOR抑制剂、组蛋白脱乙酰基酶、DNA-PK抑制剂、STAT抑制剂、抗代谢药和存活抑制剂。在权利要求1中阐述了每类药剂的合适药剂。

[0008] 在另一个方面,本发明提供了药物组合物,其包含根据本发明的CIP2A沉默剂和化学治疗剂的组合以及至少一种药学上可接受的载体。

[0009] 在另一个方面,本发明提供了一种使过度增生性细胞对化学治疗剂敏化的方法,所述方法包括:在需要这种致敏的人或动物对象中使CIP2A基因沉默。

[0010] 在另一个方面,本发明提供了一种在需要这种治疗的人或动物对象中治疗过度增生性疾病的方法,所述方法包括:给所述对象伴随地、同时地或相继地施用至少一类CIP2A沉默剂和选自小分子酪氨酸激酶抑制剂、PARP抑制剂、CHK1抑制剂、硫代葡萄糖苷、烷化剂、植物生物碱、PI3K/mTOR抑制剂、组蛋白脱乙酰基酶、DNA-PK抑制剂、STAT抑制剂、抗代谢药和存活抑制剂的化合物。在权利要求8中阐述了每个类别的合适化合物。

[0011] 此外,本发明的一个方面提供了一种为需要这种治疗的对象选择癌症治疗的方法,其中所述方法包括:评价得自所述对象的样品中的CIP2A和p53表达和/或蛋白活性,和对于其样品为CIP2A表达和/或活性阴性的和p53活性受损的对象,选择至少一种化学治疗剂的单一疗法,且对于其样品为CIP2A表达阳性的和p53活性受损的对象,选择根据本发明实施方案的联合治疗。

[0012] 在上述方面的某些实施方案中,所述CIP2A沉默剂选自:siRNA分子、DsiRNA分子、人工miRNA前体、shRNA分子、反义寡核苷酸、核酶和阻止CIP2A向PP2Ac起作用的药剂。在其它实施方案中,所述CIP2A沉默剂包含选自以下的核酸序列:SEQ ID NO:1-25,和与所述SEQ ID NO:1-25具有至少80%序列同一性且保留它们的CIP2A沉默活性的序列。

[0013] 在上述方面的某些实施方案中,要治疗的过度增生性障碍选自:银屑病、心肌肥大、良性肿瘤、实体癌症和血液学癌症。所述实体癌症的非限制性例子包括:头和颈的鳞状细胞癌、结肠癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、食管癌、肺癌、肝癌、脑癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤和胶质母细胞瘤,而血液学癌症的非限制性例子包括急性和慢性T-细胞和B-细胞白血病以及淋巴瘤。

[0014] 在从属权利要求、下面的附图、详细描述和实施例中阐述了本发明的其它具体实施方案、目的、细节和优点。

## 附图说明

[0015] 在下面,将借助于优选的实施方案参考附图更详细地描述本发明,其中

[0016] 图1显示了当与单独SCR siRNA转染的细胞相比时,在用与标准化学治疗剂组合的siRNA抑制CIP2A以后,在人衍生的神经胶质瘤细胞系T98G中诱导的细胞凋亡水平(即天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7活性)。

[0017] 图2显示了当与单独的SCR siRNA相比时,使用CTG测定在人衍生的宫颈癌细胞系HeLa中确定的、与不同化疗药物组合的CIP2A siRNA的降低细胞生存力的效力。

[0018] 图3证实了使用天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7测定所确定的各种化疗药物在原代小鼠淋巴瘤细胞中诱导细胞凋亡的效力,所述原代小鼠淋巴瘤细胞源自CIP2A缺陷型(CIP2A<sup>-/-</sup>)小鼠或表达CIP2A的小鼠(CIP2A<sup>+/+</sup>)小鼠。

[0019] 图4证实,在用各种的化疗药物处理细胞以后,当与表达CIP2A的细胞相比时,使用CTG测定确定的细胞生存力在源自CIP2A缺陷型(CIP2A<sup>-/-</sup>)小鼠的原代淋巴瘤细胞中显著降低。

[0020] 图5是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7测定,其测量当与单独的SCR siRNA转染的细胞相比时,在用与标准化学治疗剂组合的siRNA抑制CIP2A以后,在人衍生的胃癌细胞系MKN28中诱导的细胞凋亡水平(即天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7活性)。

[0021] 图6证实,当与单独的SCR siRNA转染的细胞相比时,在用与标准化学治疗剂组合的siRNA抑制CIP2A以后,在人衍生的乳腺癌细胞系MCF-7中没有诱导细胞凋亡(即天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7活性)。

### 具体实施方式

[0022] 本发明是基于以下惊人发现:沉默CIP2A基因会使p53肿瘤抑制蛋白功能受损的癌细胞对某些小分子化学治疗剂的细胞凋亡诱导活性敏化。伴随地沉默CIP2A基因和施用所述化学治疗剂会导致其中已经抑制p53功能的细胞中的细胞凋亡和/或其它类型的细胞死亡的水平的累加性或协同性增加。另一方面,本发明表明,表达突变的p53的CIP2A阴性的淋巴瘤细胞对使用所述化学治疗剂的单一疗法更敏感。因而,在一个方面,本发明提供了CIP2A缺失和所述化学治疗剂的联合治疗,而在另一个方面,本发明提供了通过检测患者样品的CIP2A和p53状态而将癌症患者分级进行化疗的方法。

[0023] 本发明的患者分级方法包括,确定得自所述患者的癌症组织样品的CIP2A和p53状态。应当选择具有CIP2A阴性的和p53灭活的癌细胞的患者进行使用化学治疗剂的单一疗法治疗,而具有CIP2A阳性的和p53灭活的癌细胞的患者应当用本发明的联合治疗(即CIP2A抑制与某些化学治疗剂的施用一起)来治疗。

[0024] 通过多种方式可以确定癌症组织样品或体液中的CIP2A水平。例如,可以如下定量组织或体液中的CIP2A蛋白水平:i) 通过RT-PCR或通过杂交技术,确定得自所述组织或体液的CIP2A mRNA表达,或ii) 对预期含有蛋白CIP2A的组织或体液实施识别所述CIP2A的抗体,并检测和/或定量所述抗体,或通过蛋白组学技术对所述组织或体液实施分析。合适的杂交技术包括例如DNA杂交和RNA印迹。根据标准免疫测定方案,例如标记连接的免疫吸附测定、蛋白质印迹和免疫组织化学方法,可以进行抗体的检测或定量。

[0025] 通过本领域技术人员已知的标准方法,可以确定癌症组织或体液样品中受损的p53功能。选择的方法至少部分地取决于受损的p53功能的基础机制。例如,如本领域技术人员众所周知的,通过杂交技术、或通过DNA或RNA测序、或通过RNA或DNA的RT-PCR分析,可以进行p53失活突变的检测。通过与CIP2A水平相同的方式,可以确定p53的负调节剂(诸如MDM2或病毒蛋白诸如人乳头瘤病毒(HPV) 16 E6蛋白)的过表达。

[0026] 通过确定单独的CIP2A和p53或者它们与其它蛋白或基因的组合的状态,可以进行

所述患者分级方法。

[0027] 通过本领域已知的任意合适的方法,包括、但不限于RNA干扰(RNAi),可以得到CIP2A基因沉默。最常见的基于RNAi的基因沉默方案是使用小干扰RNA(siRNA)。

[0028] siRNA的原理在文献中得到广泛呈现。作为例子可以提及美国专利公开2003/0143732、2003/0148507、2003/0175950、2003/0190635、2004/0019001、2005/0008617和2005/0043266。siRNA双链体分子包含反义区和有义链,其中所述反义链包含与编码某一蛋白质的mRNA序列中的靶区互补的序列,且所述有义链包含与所述反义链互补的序列。因此,siRNA双链体分子由2个核酸片段装配成,其中1个片段包含反义链,且第2个片段包含所述siRNA分子的有义链。换言之,siRNA是小双链RNA(dsRNA)。所述有义链和反义链可以经由接头分子共价连接,所述接头分子可以是多核苷酸接头或非核苷酸接头。所述反义链和有义链的长度可以变化,且通常是各自约19-21个核苷酸。在某些情况下,siRNA可以包含22、23或24个核苷酸。

[0029] 另一个基于RNAi的CIP2A沉默方案是,使用更长的、通常25-35个核苷酸的Dicer底物siRNA(DsiRNA),已经报道其在某些情况下比对应的常规21-聚体siRNA更有效(Kim等人,2005)。Dicer在体内将DsiRNA加工成有活性的siRNA。

[0030] 有活性的siRNA反义链在细胞中形成,并且它识别靶mRNA的靶区。这又会导致RISC内切核酸酶复合物(RISC = RNA诱导的沉默复合物)对靶RNA的切割以及RNA依赖性的RNA聚合酶(RdRP)对额外RNA的合成,这可以激活Dicer并产生额外的siRNA双链体分子,从而放大应答。

[0031] 本文中使用的术语“dsRNA”表示siRNA和DsiRNA两者。

[0032] 通常,但不一定,dsRNA的反义链和有义链二者包含几个、通常1-3个核苷酸的3'-端突出端。所述3'突出端可以包括一个或多个修饰的核苷酸,诸如2'-O-甲基核糖核苷酸。所述反义链的5'-端通常是磷酸酯基团(P)。具有末端磷酸酯基团(P)的dsRNA双链体比单链反义链更容易施用进细胞中。在某些情况下,有义链的5'-端或反义链和有义链二者的5'-端可以包含P基团。

[0033] 由于其被存在于活细胞中的核糖核酸酶的降解,正常的、未修饰的RNA在生理条件下具有低稳定性。如果要外源地施用寡核苷酸,那么非常希望根据已知方法修饰该分子,以便增强其对抗化学和酶促降解的稳定性。

[0034] 在本领域中(例如在US 2005/0255487中,通过引用并入本文)广泛描述了要在体内外源地施用的核苷酸的修饰。基本上可以修饰核苷酸的任何部分,即核糖、碱基和/或核苷酸间磷酸二酯链。例如,从核糖单位除去2'-OH基团以产生2'-脱氧核糖核苷酸,会导致提高的稳定性。先前也公开了在该基团处的其它修饰:用烷基、烯基、烯丙基、烷氧基烷基、卤代、氨基、叠氨基或巯基替代核糖2'-OH基团。还可以进行在核糖单位处的其它修饰:含有在核糖的2'-位和4'-位之间的亚甲基连接的锁核酸(LNA)可以用于产生更高的固有稳定性。

[0035] 此外,核苷酸间磷酸二酯键可以例如这样进行修饰:使得一个或多个氧被硫、氨基、烷基或烷氧基替代。也可以修饰核苷酸中的碱基。

[0036] 优选地,寡核苷酸包含在核糖处的一个或多个2'-羟基的修饰,和/或一个或多个核苷酸间磷酸二酯键中的修饰,和/或在核糖的2'-位和4'-位之间的一个或多个锁核酸

(LNA) 修饰。

[0037] 特别优选的修饰是例如用2'-脱氧、2'-O-甲基、2'-卤代(例如氟代)或2'-甲氧基乙基替代一个或多个2'-OH基团。特别优选的是这样的寡核苷酸:其中某些核苷酸间磷酸二酯键也被修饰,例如被硫代磷酸酯键替代。

[0038] 在某些实施方案中,dsRNA可以含有一种或多种合成的或天然的核苷酸类似物,包括、但不限于,硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性-甲基磷酸酯和肽-核酸(PNA),只要dsRNA保留它们的CIP2A沉默能力。

[0039] 应当指出,上面提及的修饰仅是非限制性例子。

[0040] 与RNAi相关的挑战之一是,鉴别对相应mRNA的有效dsRNA。应当指出,具有不完全互补性的基因会被dsRNA非故意地减量调节,从而导致数据解释和潜在毒性方面的问题。但是,这可以通过用设计算法小心地设计适当的dsRNA来部分地解决。这些计算机程序用一组规则筛选给定的靶序列,以发现具有低GC含量的序列段、内部重复序列的缺乏、富含A/U的5'末端和高局部自由结合能,这些是增强dsRNA的沉默效应的特征。

[0041] 为了鉴别在本发明中有用的试剂,使用商业和非商业算法设计了几种不同的CIP2A siRNA。为此目的,将CIP2A的全长cDNA序列(KIAA1524)装载到siRNA算法程序(Eurofins MWG Operon's Online Design Tool)和由Cui等人(Cui等人,2004)开发的独立程序。此外,随后通过基因组范围的DNA序列比对(BLAST)筛选算法产生的siRNA序列,以消除没有免于脱靶的siRNA。换言之,具有与除靶基因(CIP2A)以外的其它基因匹配的更短序列区域的所有那些siRNA被认为对于进一步应用而言是无价值的。

[0042] 然后将得到的siRNA转染至不同的细胞系,并通过测量用CIP2A特异性抗体进行siRNA处理以后CIP2A蛋白的量而在蛋白水平研究它们的降解mRNA和进一步缺失CIP2A翻译的能力(表1)。

[0043] 表1. CIP2A特异性的siRNA

| SEQ ID NO | siRNA有义序列<br>(5'至3')          | CIP2A抑制百分比<br>(蛋白水平) |
|-----------|-------------------------------|----------------------|
| 1         | 5'-AACATAAGTGCTTCACTGATCTT-3' | 中等                   |
| 2         | 5'-AACTGTGGTTGTGTTTGCACCTT-3' | 高                    |
| 3         | 5'-GGUUGCAGAUUCUGAAUUATT-3'   | 中等                   |
| 4         | 5-AAUGCCUUGUCUAGGAUUATT-3'    | 低                    |
| 5         | 5'-ACCAUUGAUAUCCUUGAATT-3'    | 高                    |

[0044] 合适的dsRNA包括与SEQ ID NO:1-5具有大于80%序列同一性(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%序列同一性)的那些,只要它们具有与参照dsRNA类似的或增强的结合性能和CIP2A沉默活性。

[0045] 根据本领域已知的方法,可以设计和合成适合用在本发明的不同实施方案中的其它CIP2A特异性的dsRNA。为了沉默CIP2A基因,任何这样的分离的dsRNA必须与CIP2A cDNA序列充分互补。

[0046] 人工微RNA(miRNA)前体是另一类适合用于介导RNAi的小RNA。通常,人工miRNA前体的长度是约21-25个核苷酸,且它们可以具有1-3个、通常2个突出的3'核苷酸。通过本领域已知的方法,可以设计和合成沉默CIP2A的人工miRNA前体。

[0048] 短发夹RNA (shRNA) 是另一种沉默CIP2A的方式。ShRNA由以下序列组成:i) 从靶基因衍生出的短核苷酸序列,通常在19-29个核苷酸范围内;ii) 环,通常在4-23个核苷酸范围内;和iii) 与最初靶序列反向互补的短核苷酸序列,通常在19-29个核苷酸范围内。ShRNA表达盒还可以含有增加RNA干扰活性的序列。这样的序列的非限制性例子是如Silva等人(Silva等人, 2005)所证实的mir-30的微RNA序列。

[0049] 通过技术人员已知的方式和方法,可以设计和合成沉默CIP2A的shRNA。在表2中列出了用在CIP2A shRNA中的合适有义序列(即上面的核苷酸序列i))的非限制性例子。在SEQ ID NO:6至SEQ ID NO:9中描绘的shRNA可得自例如Origene,而在SEQ ID NO:10至SEQ ID NO:25中描绘的shRNA可得自例如Open Biosystems。

[0050] 表2. CIP2A特异性的shRNA的有义序列

| SEQ ID NO | siRNA有义序列 (5'至3')                   |
|-----------|-------------------------------------|
| 6         | 5'-GATAGCAATGATCCACAGTTTAAGTGGTG-3' |
| 7         | 5'-CTTTGTCGGCACAATCTTTCTGTTCAAAC-3' |
| 8         | 5'-GTAAGTGGAGAAAGTATAGCAGCAAACAA-3' |
| 9         | 5-CAGTTGACCTACTGATGGATCTCCTTAAG-3'  |
| 10        | 5'-CGCAGATTCTGAATTATGCAAA-3'        |
| 11        | 5'-AGCACATAAAGACATTGAGTAA-3'        |
| 12        | 5'-ATTCTGATAGATCACATTCAA-3'         |
| 13        | 5'-CACGTCAGATAATAGAGAACAA-3'        |
| 14        | 5'-CATGGATGTATATGAAATGAAA-3'        |
| 15        | 5'-CCGGCACAATCTTTCTGTTCAA-3'        |
| 16        | 5'-AGCACATAAAGACATTGAGTAA-3'        |
| 17        | 5'-CGCAAACCTTGCTGCTGATGTAA-3'       |
| 18        | 5'-CCGGCACAATCTTTCTGTTCAA-3'        |
| 19        | 5'-CGCAGCAAGTTGAATCAGAAA-3'         |
| 20        | 5'-CCACAGTTTAAGTGGTGGAAA-3'         |
| 21        | 5'-GCTAGTATGTTGAGAGAAGTT-3'         |
| 22        | 5'-GCTAGTAGACAGAGAACATAA-3'         |
| 23        | 5'-GACAGAACTCACACGACTAT-3'          |
| 24        | 5'-CCACAGTTTAAGTGGTGGAAA-3'         |
| 25        | 5'-CGGCACAATCTTTCTGTTCAA-3'         |

[0051] 合适的shRNA包括与SEQ ID NO:6-25具有大于80%序列同一性(例如,80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或甚至100%序列同一性)的那些,只要它们具有与参照shRNA类似的或增强的结合性能和CIP2A沉默活性。

[0052] CIP2A沉默也可以通过反义疗法得到,其中相对较短的(通常13-25个核苷酸)合成单链DNA或RNA寡核苷酸通过结合对应的mRNA而失活CIP2A基因。反义寡核苷酸可以是未修饰的或经化学修饰。在某些实施方案中,在核糖的2'-位处的氢被0-烷基(诸如甲基)替代。在其它实施方案中,反义寡核苷酸可以含有一个或多个合成的或天然的核苷酸类似物,包括、但不限于PNA。

[0053] 此外,通过切割CIP2A mRNA的核酶,可以得到CIP2A沉默。例如Li等人(Li等人, 2007)描述了所述核酶技术。

[0055] 本文中使用的术语“CIP2A沉默”表示CIP2A基因表达的完全或部分减少。在某些实施方案中,当将CIP2A特异性的dsRNA、人工miRNA前体、shRNA、反义寡核苷酸、核酶或它们的任意组合引入人或动物对象中时,CIP2A基因表达减少了至少50%或至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0056] 在某些实施方案中,通过阻断或抑制CIP2A和PP2A(特别是PP2A的c-亚基)之间的相互作用,从而将CIP2A对PP2Ac的功能阻止至少50%或至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,可以得到CIP2A沉默。这样的阻断剂或抑制剂包括、但不限于:重组地或化学地生产的修饰的或未修饰的肽和部分肽、以及非肽分子,诸如小分子化学化合物。鉴别这样的试剂的方法已经公开在例如WO 2009/100173和US 2009/239244中。

[0057] 适合用在本发明的不同实施方案中的化学化合物包括在表3中列出的那些和它们的任意立体异构体、盐、溶剂合物或前药。

[0058] 表3. 化学化合物

[0059]

| 药物类别                       | 化疗药物                | 同义词   | 分子式  |
|----------------------------|---------------------|---|--|
| 小分子酪氨酸<br>激酶抑制剂            | 拉帕替尼                | INN, Tycebo <sup>®</sup>                                  | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> CFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S                              |
|                            | 甲度替尼                |   | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                  |
|                            | 凡他尼布                | INN, ZD6474, Zalcitna                                     | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> 5FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                |
|                            | 达沙替尼                | BMS 354825, Sprycel                                       | C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> ClFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S                             |
|                            | PKC-412             | 米啉罗林,<br>苯甲酰基星形孢菌素  | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                  |
|                            | H-7                 |   | C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ·S·2HCl                          |
|                            | 舒尼替尼                | SU11248   | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                 |
| PARP抑制剂                    | ABT-888             | Velparib  | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ·2HCl                            |
|                            | AG-014689           |   | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|                            | INO-7877            | BSI-201, Inparib, NSC -<br>746045                         | C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                  |
|                            | 奥拉帕利                |   | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                 |
|                            | PARP抑制剂III<br>(OPC) | 3,4-二氢-5[4-(1-吡啶基)<br>丁氧基]-1(2H)-异唑啉                      | C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                  |
| CHK1抑制剂                    | UCN-01              | 7-羟基星形孢菌素   | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                  |
|                            | AZD7762             | 5-(3-氯苯基)-3-噻基噻吩<br>-N-[(S)-吡啶-3-基]-2-<br>甲酰胺             | C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> CFN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S                              |
|                            | PF-477730           | PF-0044738  | C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                  |
|                            | SB 216078           |   | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                  |
|                            | G66 876             | PD 406676 , Go 6 976                                      | C <sub>25</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O   |
| 硫代葡萄糖苷                     | 吡嗪-3-甲醇             | BC  | C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO   |
| 烷化剂                        | 顺铂                  | DDP, Platin <sup>®</sup>                                  | Cl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> Pl   |
|                            | 替莫唑胺                | TMZ, Temozol,<br>Temodar <sup>®</sup>                     | C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>                                    |
| 植物生物碱                      | 紫杉醇                 | Taxol <sup>®</sup> , Onxol <sup>™</sup>                   | C <sub>47</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>11</sub>   |
|                            | 长春瑞滨                | 酒石酸长春瑞滨,<br>Navelbine                                     | C <sub>45</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>                                  |
| PI3K (p110_/_)/mTOR<br>抑制剂 | 雷帕霉素                | RAPA, 雷帕吗,<br>RAPA, Rapamune,<br>西罗莫司, RPM, AY -<br>ZZ589 | C <sub>50</sub> H <sub>78</sub> NO <sub>12</sub>   |
|                            | TGX-221             |   | C <sub>27</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                  |

[0060]

| 药物类别                  | 化疗药物      | 同义词       | 分子式                    |
|-----------------------|-----------|-----------|------------------------|
| 组蛋白脱乙酰酶和<br>DNA-PK抑制剂 | NU-7441   | KU5788    | $C_{25}H_{29}NO_5S$    |
|                       | 曲古抑菌素A    | TSA       | $C_{27}H_{29}N_3O_5$   |
| STAT抑制剂               | S31-201   | NSC 74859 | $C_{26}H_{26}NO_5S$    |
|                       | 吉西他滨      | Gemzar®   | $C_8H_{11}F_2N_2O_4Cl$ |
| 存活抑制剂                 |           |           |                        |
|                       | LY2181308 |           |                        |
|                       | 特拉罗考      |           |                        |
|                       | YM155     |           |                        |

[0061] 任意公开的化合物可以转化成药学上可接受的盐。所述药学上可接受的盐没有特别限制,只要它是无毒的即可。与无机或有机碱形成的盐的非限制性例子包括:碱金属盐(例如钠盐、钾盐等)、碱土金属盐(例如钙盐、镁盐等)、铵盐、胺盐(例如三乙胺盐)等。酸加成盐的非限制性例子包括:从无机酸(例如盐酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸、硝酸、硫酸等)衍生出的盐,和从有机酸(例如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、马来酸、苯甲酸、羟乙酸(glycol acid)、葡糖酸、琥珀酸等)衍生出的盐。

[0062] 任意公开的化合物可以用作下述药物组合物的前药。本文中使用的术语“前药”表示在施用后可以在体内转化成活性药物的任意化合物,例如通过被代谢。

[0063] CIP2A dsRNA和式(I)的化合物的施用可以是伴随的、同时的或相继的。

[0064] CIP2A特异性的dsRNA的递送可以以2种基本上不同的方式实现:1) 编码所述寡核苷酸的核酸序列的内源性转录,其中所述核酸序列位于表达构建体中,或2) 所述寡核苷酸的外源性递送。

[0065] 就内源性转录而言,使用本领域已知的方法,可以将CIP2A特异性的dsRNA插入合适的表达系统中。这样的表达系统的非限制性例子包括:逆转录病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体、其它病毒载体、表达盒和质粒,诸如被包裹在聚乙二醇化的免疫脂质体(PIL)中的那些,其含有或没有本领域已知的一个或多个诱导型启动子。两种dsRNA链可以从相同或单独启动子在单个表达构建体中表达,或者所述链可以在单独表达构建体中表达。

[0066] 上述表达系统也可以用于递送沉默CIP2A的人工miRNA前体和shRNA。

[0067] 通常,在施用给人或动物对象(例如犬科动物对象)之前,将表达构建体制配在药物组合物中。通过本领域已知的任意合适的方法,包括全身和局部递送,可以进行施用。如本领域技术人员已知的,所述制剂取决于预期的施用途径。作为例子,所述表达构建体可以在药学上可接受的载体或稀释剂中递送,或者它可以嵌入合适的缓释组合物中。在某些情况下,所述药物组合物可以含有一个或多个生产所述表达构建体的细胞。细菌也可以用于RNAi递送。例如,重组工程改造的大肠杆菌(*Escherichia coli*)在体内递送以后可以进入哺乳动物细胞中和转移shRNA。一个有关的方案是,使用源自例如肠沙门氏菌(*Salmonella*

*enterica*)的小细胞(minicell)。

[0068] 就外源性递送而言,通常将dsRNA分子与基于脂质体或脂质的载体、胆固醇缀合物或聚乙烯亚胺(PEI)复合。一种有前途的新方案是使dsRNA与稳定的核酸脂质颗粒(SNALP)复合。就外源性递送(经过或不经过所述复合)而言,合适的施用途径包括、但不限于本领域技术人员已知的胃肠外递送(例如静脉内注射)、肠内递送(例如口服)、局部施用、表面施用(例如真皮或透皮)。由于肿瘤的外科手术切除经常是主要临床干预,可以将dsRNA直接施用至切除的肿瘤腔。

[0069] 通过本领域已知的任意合适的途径,包括、但不限于,关于CIP2A特异性的dsRNA的施用所列出的那些,可以将式(I)的化学治疗剂施用给人或动物对象。

[0070] 在本发明的联合治疗中,可以将dsRNA分子和式(I)的化合物配制在相同或单独的药物组合物中。当使用单独的药物组合物时,施用可以是伴随的、同时的或相继的。可以彼此独立地选择dsRNA分子和式(I)的化合物的制剂和/或施用途径。在某些实施方案中,所述药物组合物可以包含一种或多种不同的沉默CIP2A的dsRNA和/或一种或多种式(I)的化学治疗剂。

[0071] 所述药物组合物可以在适合于施用的任意适当的药理学载体中施用。可以在人或动物患者中实现预防、姑息、阻止或治愈过度增生性疾病(诸如癌症)的任意形式施用它们。

[0072] 就胃肠外或表面施用的目的而言,可以将dsRNA和/或式(I)的化合物配制为例如溶液、混悬液或乳剂。所述制剂可以根据需要包含水性或非水性溶剂、共溶剂、增溶剂、分散剂或润湿剂、助悬剂和/或粘度剂。非水性溶剂的非限制性例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油、鱼油和可注射的有机酯。水性载体包括,例如,水、水-醇溶液,包括盐水和缓冲的中性胃肠外媒介物,包括氯化钠溶液、林格氏右旋糖溶液、右旋糖+氯化钠溶液、含有乳糖的林格氏溶液或不挥发性油。静脉内媒介物的非限制性例子包括流体和营养物补充剂、电解质补充剂,诸如基于林格氏右旋糖的那些等。水性组合物可以包含合适的缓冲剂,诸如磷酸钠和磷酸钾、柠檬酸盐、乙酸盐、碳酸盐或甘氨酸缓冲剂,取决于目标pH范围。氯化钠作为张度调节剂的应用也是有用的。所述组合物还可以包括其它赋形剂,诸如稳定剂或防腐剂。有用的稳定赋形剂包括表面活性剂(聚山梨酯20和80、泊洛沙姆407)、聚合物(聚乙二醇、聚维酮)、碳水化合物(蔗糖、甘露醇、葡萄糖、乳糖)、醇(山梨醇、甘油丙二醇、乙二醇)、合适的蛋白(白蛋白)、合适的氨基酸(甘氨酸、谷氨酸)、脂肪酸(乙醇胺)、抗氧化剂(抗坏血酸、半胱氨酸等)、螯合剂(EDTA盐、组氨酸、天冬氨酸)或金属离子(Ca、Ni、Mg、Mn)。有用的防腐剂中包括苯甲醇、氯丁醇、苯扎氯铵和可能的对羟基苯甲酸酯。

[0073] 用于口服施用的固体剂型包括、但不限于:胶囊剂、片剂、丸剂、糖锭、锭剂、粉剂和颗粒。在这样的固体剂型中,dsRNA和/或式(I)的化合物可以与至少一种惰性稀释剂(诸如蔗糖、乳糖或淀粉)混合。如常规实践的,这样的剂型也可以包含药用佐剂物质,例如硬脂酸盐润滑剂或矫味剂。还可以用调控活性成分释放的肠溶包衣或其它包衣制备固体口服制剂。

[0074] 用于口服施用的液体剂型的非限制性例子包括药学上可接受的乳剂、溶液、混悬液、糖浆剂和酞剂,其含有本领域中常用的惰性无毒稀释剂,诸如水和醇。这样的组合物也可以包含佐剂,诸如润湿剂、缓冲剂、乳化剂、助悬剂、甜味剂和矫味剂。

[0075] 可以以浓缩形式或者以要根据需要重构的粉末形式提供所述药物组合物。在低压冻干的情况下,某些冷冻保护剂是优选的,包括聚合物(聚维酮、聚乙二醇、葡聚糖)、糖(蔗糖、葡萄糖、乳糖)、氨基酸(甘氨酸、精氨酸、谷氨酸)和白蛋白。如果将用于重构的溶液添加到包装中,它可以由例如无菌注射用水或氯化钠溶液或右旋糖或葡萄糖溶液组成。

[0076] 用于配制本发明的药物制剂的方式和方法是本领域技术人员已知的,且可以以其本身已知的方式来制备,例如,借助于常规混合、造粒、溶解、冻干或类似的方法。

[0077] 本发明的联合治疗可以用于治疗人或动物过度增生性疾病,包括、但不限于:银屑病,心肌肥大,良性肿瘤诸如腺瘤、错构瘤和软骨瘤,以及癌症诸如头和颈的鳞状细胞癌、结肠癌、胃癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、宫颈癌、食管癌、肺癌、肝癌、脑癌(例如神经胶质瘤、星形细胞瘤和胶质母细胞瘤)和血液学癌症(例如慢性和急性T-细胞和B-细胞白血病和淋巴瘤)。

[0078] 本文中使用的术语“治疗”或“处理”不仅指疾病的完全治愈,而且指疾病或与其有关的症状的预防、减轻和改善。

[0079] 通过dsRNA和式(I)的化合物的组合的“有效量”是指至少改善肿瘤的有害效应的量。治疗癌症相关障碍的临床领域中的普通技术人员可以容易地确定施用本发明的联合治疗的量和方案。通常,本发明的联合治疗的剂量取决于诸如以下考虑因素:要治疗的患者的年龄、性别和一般健康;如果有的话,并行治疗的种类;治疗的频率和期望的效果的性质;组织损伤的程度;症状的持续时间;和要由个别医师调整的其它变量。可以在一次或多次应用中施用期望的剂量,以得到期望的结果。可以在单位剂型中提供根据本发明实施方案的药物组合物。

[0080] 在一个实施方案中,可以在约0.01 $\mu$ g/kg至约10 mg/kg、或约1.0 $\mu$ g/kg至约10 $\mu$ g/kg的剂量范围内的有效量施用dsRNA。可以在单个每日剂量中施用dsRNA,或者可以在分份剂量(例如每天2、3或4次)中施用总每日剂量。在一个实施方案中,可以在约0.1 $\mu$ g/kg至约300 mg/kg、或约1.0 $\mu$ g/kg至约10 mg/kg的剂量范围内的有效量施用式(I)的化合物。可以在单个每日剂量中施用式(I)的化合物,或者可以在分份剂量(例如每天2、3或4次)中施用总每日剂量。所述给药计划可以独立于dsRNA的给药计划来选择。

[0081] 本领域技术人员显而易见,随着技术的进步,本发明的概念可以以不同的方式实现。本发明和它的实施方案不限于下面描述的实施例,而是可以在权利要求的范围内变化。

[0082] 实施例1. CIP2A抑制使T98G细胞对不同的化疗药物敏化

[0083] 用SCR siRNA (25 nM)或CIP2A siRNA (Seq ID # 2; 25 nM)转染人衍生的神经胶质瘤癌细胞T98G(其表达突变体p53)。48 h后,用含有图1所示浓度的化疗药物的培养基替代含有siRNA的培养基。为了确定将CIP2A抑制与标准化疗药物组合是否会与用单独SCR siRNA或化疗药物处理的细胞相比更有效地诱导细胞凋亡,在48 h后根据生产商的说明书测量天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7活性(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7 g1o测定, Promega),该活性用于确定细胞中的细胞凋亡诱导。图1所示的结果证实,单独的CIP2A siRNA不会诱导细胞凋亡。但是,与用单独CIP2A siRNA处理的细胞相比,将CIP2A siRNA与拉帕替尼,舒尼替尼;H-7;凡他尼布;顺铂;紫杉醇;替莫唑胺;坦度替尼或吡啶-3-甲醇组合,会明显增强T98G细胞中的细胞凋亡的诱导。

[0084] 实施例2. CIP2A抑制会使HeLa细胞对不同的化疗药物敏化

[0085] 用SCR siRNA (25 nM)或CIP2A siRNA (Seq ID # 6; 25 nM) 转染人衍生的宫颈癌细胞HeLa(其中野生型p53功能被HPV18 E6钝化)。72 h后,用含有图2所示浓度的化疗药物的培养基替代含有siRNA的培养基。为了确定将CIP2A抑制与标准化疗药物组合是否会与用单独SCR siRNA或化疗药物处理的细胞相比更有效地降低细胞生存力,在48 h后根据生产商的说明书使用CTG测定(Promega)。图2所示的结果证实,单独的CIP2A siRNA对降低细胞生存力没有影响。但是,与用单独CIP2A siRNA处理的细胞相比,将CIP2A siRNA与拉帕替尼,PARPi (DPQ); 吡啶-3-甲醇; NU-7441; 雷帕霉素; S31-201; TGX-221; 曲古抑菌素A; 吉西他滨或PKC-412组合,会更有效地降低细胞生存力,从而指示CIP2A的抑制会使HeLa细胞对这些化疗药物敏化。

[0086] 实施例3. 从CIP2A缺陷型(CIP2A<sup>-/-</sup>)小鼠衍生出的原代淋巴瘤肿瘤细胞对化疗药物敏化

[0087] 从与Emu-myc小鼠品系杂交的CIP2A野生型(CIP2A<sup>+/+</sup>)或CIP2A缺陷型(CIP2A<sup>-/-</sup>)小鼠的脾衍生出原代小鼠淋巴瘤肿瘤细胞系(其表达突变体p53)。将细胞接种进96-孔平板中,并允许沉降24小时,然后用含有图3所示浓度的化疗药物的培养基替代“正常生长”培养基。为了确定CIP2A缺陷型癌细胞与表达CIP2A的癌细胞相比是否对化疗药物敏化,在48 h后根据生产商的说明书测量天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7活性(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7 glo测定, Promega),该活性用于确定细胞中的细胞凋亡诱导。图3所示的结果证实,与表达CIP2A的细胞相比,当用不同的化疗药物(包括拉帕替尼、PARPi (DPQ)、PKC-412、坦度替尼、替莫唑胺、紫杉醇、NU-7441、TGX-221或S31-201)处理时,在表达极低的CIP2A水平(CIP2A<sup>-/-</sup>)的淋巴瘤细胞中更有效地诱导细胞凋亡。

[0088] 实施例4. 从CIP2A缺陷型(CIP2A<sup>-/-</sup>)小鼠衍生出的原代淋巴瘤肿瘤细胞对化疗药物敏化,从而导致降低的细胞生存力

[0089] 从与Emu-myc小鼠品系杂交的CIP2A野生型(CIP2A<sup>+/+</sup>)或CIP2A缺陷型(CIP2A<sup>-/-</sup>)小鼠的脾衍生出原代小鼠淋巴瘤肿瘤细胞系(其表达突变体p53)。将细胞接种进96-孔平板中,并允许沉降24小时,然后用含有图4所示浓度的化疗药物的培养基替代“正常生长”培养基。为了确定用化疗药物处理CIP2A缺陷型细胞是否会降低细胞生存力(与表达CIP2A的细胞相比),在48 h以后根据生产商的说明书进行CTG测定(Promega)。图4所示的结果证实,与表达CIP2A的细胞相比,在用不同的化疗药物(包括拉帕替尼、PARPi (DPQ)、H-7、坦度替尼、PKC-312、雷帕霉素、曲古抑菌素A、S31-201或TGX-221)处理的、表达极低的CIP2A水平(CIP2A<sup>-/-</sup>)的淋巴瘤细胞中更有效地降低了细胞生存力。

[0090] 实施例5. CIP2A抑制会使MKN28细胞对不同化疗药物敏化

[0091] 用SCR siRNA (25 nM)或CIP2A siRNA (Seq ID # 6; 25 nM)转染人衍生的胃癌细胞MKN28(其表达突变体p53)。48 h后,用含有图5所示浓度的化疗药物的培养基替代含有siRNA的培养基。为了确定将CIP2A抑制与标准化疗药物组合是否会与用单独SCR siRNA或化疗药物处理的细胞相比更有效地诱导细胞凋亡,在48 h后根据生产商的说明书测量天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7活性(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7 glo测定, Promega),该活性用于确定细胞中的细胞凋亡诱导。图5所示的结果证实,与用单独SCR siRNA处理的MKN28细胞相比,单独的CIP2A siRNA会诱导细胞凋亡。但是,当将CIP2A siRNA与不同的化疗药物(包括H-7、凡他尼布、顺铂、紫杉醇、替莫唑胺、吉西他滨、PKC-412、吡啶-

3-甲醇和坦度替尼)组合时,明显增强细胞凋亡的水平。

[0092] 实施例6. CIP2A抑制不会使表达野生型p53的MCF-7细胞对化疗药物敏化

[0093] 用SCR siRNA (25 nM)或CIP2A siRNA (Seq ID # 2; 25 nM) 转染人衍生的乳腺癌细胞MCF-7(其表达野生型p53)。48 h后,用含有图6所示浓度的化疗药物的培养基替代含有siRNA的培养基。为了确定将CIP2A抑制与标准化疗药物组合是否会与用单独SCR siRNA或化疗药物处理的细胞相比显著诱导细胞凋亡,在48 h后根据生产商的说明书测量天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7活性(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3/7 glo测定, Promega),该活性用于确定细胞中的细胞凋亡诱导。图6所示的结果证实,与用单独SCR siRNA处理的MCF-7细胞相比,单独的CIP2A siRNA不会诱导细胞凋亡。类似地,将CIP2A siRNA与各种化疗药物组合不会在这些表达野生型p53的细胞中诱导细胞凋亡。

[0094]

## 参考文献:

- Chari, N.S., N.L. Pinaire, L. Thorpe, L.J. Medeiros, M.J. Routbort, and T.J. McDonnell. 2009. The p53 tumor suppressor network in cancer and the therapeutic modulation of cell death. *Apoptosis*. 14:336-47.
- Cui, W., J. Ning, U.P. Naik, and M.K. Duncan. 2004. OptiRNAi, an RNAi design tool. *Comput Methods Programs Biomed*. 75:67-73.
- Junttila, M.R., P. Puustinen, M. Niemela, R. Ahola, H. Arnold, T. Bottzauw, R. Ala-Aho, C. Nielsen, J. Ivaska, Y. Taya, S.L. Lu, S. Lin, E.K. Chan, X.J. Wang, R. Grenman, J. Kast, T. Kallunki, R. Sears, V.M. Kähäri, and J. Westermarck. 2007. CIP2A Inhibits PP2A in Human Malignancies. *Cell*. 130:51-62.
- Khanna, A., C. Bockelman, A. Hemmes, M.R. Junttila, J.P. Wiksten, M. Lundin, S. Junnila, D.J. Murphy, G.I. Evan, C. Haglund, J. Westermarck, and A. Ristimäki. 2009. MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer. *J Natl Cancer Inst*. 101:793-805.
- Kim, D.H., M.A. Behlke, S.D. Rose, M.S. Chang, S. Choi, and J.J. Rossi. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol*. 23:222-6.
- Li, Q.X., P. Tan, N. Ke, and F. Wong-Staal. 2007. Ribozyme technology for cancer gene target identification and validation. *Adv Cancer Res*. 96:103-43.
- Silva, J.M., M.Z. Li, K. Chang, W. Ge, M.C. Golding, R.J. Rickles, D. Siolas, G. Hu, P.J. Paddison, M.R. Schlabach, N. Sheth, J. Bradshaw, J. Burchard, A. Kulkarni, G. Cavet, R. Sachidanandam, W.R. McCombie, M.A. Cleary, S.J. Elledge, and G.J. Hannon. 2005. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet*. 37:1281-8.
- Vassilev, L.T., B.T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, and E.A. Liu. 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*. 303:844-8.
- Westermarck, J., and W.C. Hahn. 2008. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 14:152-60.
- Zhao, J.J., T.M. Roberts, and W.C. Hahn. 2004. Functional genetics and experimental models of human cancer. *Trends Mol Med*. 10:344-50.

|        |   |    |
|--------|---|----|
| [0001] | 序列表   |    |
| [0002] | <110> Turun yliopisto                                   |    |
| [0003] | <120> 用于治疗过度增生性障碍、优选具有受损的p53功能的过度增生性障碍的包含CIP2A 沉默剂的药物组合 |    |
| [0004] | <130> 2110986PC   |    |
| [0005] | <160> 25  |    |
| [0006] | <170> PatentIn 3.5版                                     |    |
| [0007] | <210> 1   |    |
| [0008] | <211> 23  |    |
| [0009] | <212> DNA   |    |
| [0010] | <213> 人工序列  |    |
| [0011] | <220>   |    |
| [0012] | <223> siRNA 分子  |    |
| [0013] | <400> 1   |    |
| [0014] | aacataagtg cttcactgat ctt                               | 23 |
| [0015] | <210> 2   |    |
| [0016] | <211> 23  |    |
| [0017] | <212> DNA   |    |
| [0018] | <213> 人工序列  |    |
| [0019] | <220>   |    |
| [0020] | <223> siRNA 分子  |    |
| [0021] | <400> 2   |    |
| [0022] | aactgtggtt gtgtttgcac ttt                               | 23 |
| [0023] | <210> 3   |    |
| [0024] | <211> 21  |    |
| [0025] | <212> DNA   |    |
| [0026] | <213> 人工序列  |    |
| [0027] | <220>   |    |
| [0028] | <223> siRNA 分子  |    |
| [0029] | <400> 3   |    |
| [0030] | gguugcagau ucugaauuat t                                 | 21 |
| [0031] | <210> 4   |    |
| [0032] | <211> 21  |    |
| [0033] | <212> DNA   |    |
| [0034] | <213> 人工序列  |    |
| [0035] | <220>   |    |
| [0036] | <223> siRNA 分子  |    |
| [0037] | <400> 4   |    |

|        |                                  |    |
|--------|----------------------------------|----|
| [0038] | aaugccuugu cuaggauuat t          | 21 |
| [0039] | <210> 5                          |    |
| [0040] | <211> 21                         |    |
| [0041] | <212> DNA                        |    |
| [0042] | <213> 人工序列                       |    |
| [0043] | <220>                            |    |
| [0044] | <223> siRNA 分子                   |    |
| [0045] | <400> 5                          |    |
| [0046] | accauugaua uccuuagaat t          | 21 |
| [0047] | <210> 6                          |    |
| [0048] | <211> 29                         |    |
| [0049] | <212> DNA                        |    |
| [0050] | <213> 人工序列                       |    |
| [0051] | <220>                            |    |
| [0052] | <223> shRNA有义序列                  |    |
| [0053] | <400> 6                          |    |
| [0054] | gatagcaatg atccacagtt taagtgggtg | 29 |
| [0055] | <210> 7                          |    |
| [0056] | <211> 29                         |    |
| [0057] | <212> DNA                        |    |
| [0058] | <213> 人工序列                       |    |
| [0059] | <220>                            |    |
| [0060] | <223> shRNA有义序列                  |    |
| [0061] | <400> 7                          |    |
| [0062] | ctttgtcggc acaatctttc tgttcaaac  | 29 |
| [0063] | <210> 8                          |    |
| [0064] | <211> 29                         |    |
| [0065] | <212> DNA                        |    |
| [0066] | <213> 人工序列                       |    |
| [0067] | <220>                            |    |
| [0068] | <223> shRNA有义序列                  |    |
| [0069] | <400> 8                          |    |
| [0070] | gtacttggag aaagtatagc agcaaacaa  | 29 |
| [0071] | <210> 9                          |    |
| [0072] | <211> 29                         |    |
| [0073] | <212> DNA                        |    |
| [0074] | <213> 人工序列                       |    |
| [0075] | <220>                            |    |
| [0076] | <223> shRNA有义序列                  |    |

|        |                                 |    |
|--------|---------------------------------|----|
| [0077] | <400> 9                         |    |
| [0078] | cagttgacct actgatggat ctccttaag | 29 |
| [0079] | <210> 10                        |    |
| [0080] | <211> 22                        |    |
| [0081] | <212> DNA                       |    |
| [0082] | <213> 人工序列                      |    |
| [0083] | <220>                           |    |
| [0084] | <223> shRNA有义序列                 |    |
| [0085] | <400> 10                        |    |
| [0086] | cgcagattct gaattatgca aa        | 22 |
| [0087] | <210> 11                        |    |
| [0088] | <211> 22                        |    |
| [0089] | <212> DNA                       |    |
| [0090] | <213> 人工序列                      |    |
| [0091] | <220>                           |    |
| [0092] | <223> shRNA有义序列                 |    |
| [0093] | <400> 11                        |    |
| [0094] | agcacataaa gacattgagt aa        | 22 |
| [0095] | <210> 12                        |    |
| [0096] | <211> 22                        |    |
| [0097] | <212> DNA                       |    |
| [0098] | <213> 人工序列                      |    |
| [0099] | <220>                           |    |
| [0100] | <223> shRNA有义序列                 |    |
| [0101] | <400> 12                        |    |
| [0102] | attcctgata gatcacattc aa        | 22 |
| [0103] | <210> 13                        |    |
| [0104] | <211> 22                        |    |
| [0105] | <212> DNA                       |    |
| [0106] | <213> 人工序列                      |    |
| [0107] | <220>                           |    |
| [0108] | <223> shRNA有义序列                 |    |
| [0109] | <400> 13                        |    |
| [0110] | cacgtcagat aatagagaac aa        | 22 |
| [0111] | <210> 14                        |    |
| [0112] | <211> 22                        |    |
| [0113] | <212> DNA                       |    |
| [0114] | <213> 人工序列                      |    |
| [0115] | <220>                           |    |

|        |       |                          |    |
|--------|-------|--------------------------|----|
| [0116] | <223> | shRNA有义序列                |    |
| [0117] | <400> | 14                       |    |
| [0118] |       | catggatgta tatgaaatga aa | 22 |
| [0119] | <210> | 15                       |    |
| [0120] | <211> | 22                       |    |
| [0121] | <212> | DNA                      |    |
| [0122] | <213> | 人工序列                     |    |
| [0123] | <220> |                          |    |
| [0124] | <223> | shRNA有义序列                |    |
| [0125] | <400> | 15                       |    |
| [0126] |       | ccggcacaat ctttctgttc aa | 22 |
| [0127] | <210> | 16                       |    |
| [0128] | <211> | 22                       |    |
| [0129] | <212> | DNA                      |    |
| [0130] | <213> | 人工序列                     |    |
| [0131] | <220> |                          |    |
| [0132] | <223> | shRNA有义序列                |    |
| [0133] | <400> | 16                       |    |
| [0134] |       | agcacataaa gacattgagt aa | 22 |
| [0135] | <210> | 17                       |    |
| [0136] | <211> | 22                       |    |
| [0137] | <212> | DNA                      |    |
| [0138] | <213> | 人工序列                     |    |
| [0139] | <220> |                          |    |
| [0140] | <223> | shRNA有义序列                |    |
| [0141] | <400> | 17                       |    |
| [0142] |       | cgcaaacttg ctgctgatgt aa | 22 |
| [0143] | <210> | 18                       |    |
| [0144] | <211> | 22                       |    |
| [0145] | <212> | DNA                      |    |
| [0146] | <213> | 人工序列                     |    |
| [0147] | <220> |                          |    |
| [0148] | <223> | shRNA有义序列                |    |
| [0149] | <400> | 18                       |    |
| [0150] |       | ccggcacaat ctttctgttc aa | 22 |
| [0151] | <210> | 19                       |    |
| [0152] | <211> | 21                       |    |
| [0153] | <212> | DNA                      |    |
| [0154] | <213> | 人工序列                     |    |

|        |       |                         |    |
|--------|-------|-------------------------|----|
| [0155] | <220> |                         |    |
| [0156] | <223> | shRNA有义序列               |    |
| [0157] | <400> | 19                      |    |
| [0158] |       | cgcagcaagt tgaatcagaa a | 21 |
| [0159] | <210> | 20                      |    |
| [0160] | <211> | 21                      |    |
| [0161] | <212> | DNA                     |    |
| [0162] | <213> | 人工序列                    |    |
| [0163] | <220> |                         |    |
| [0164] | <223> | shRNA有义序列               |    |
| [0165] | <400> | 20                      |    |
| [0166] |       | ccacagttta agtggtggaa a | 21 |
| [0167] | <210> | 21                      |    |
| [0168] | <211> | 21                      |    |
| [0169] | <212> | DNA                     |    |
| [0170] | <213> | 人工序列                    |    |
| [0171] | <220> |                         |    |
| [0172] | <223> | shRNA有义序列               |    |
| [0173] | <400> | 21                      |    |
| [0174] |       | gctagtatgt tgagagaagt t | 21 |
| [0175] | <210> | 22                      |    |
| [0176] | <211> | 21                      |    |
| [0177] | <212> | DNA                     |    |
| [0178] | <213> | 人工序列                    |    |
| [0179] | <220> |                         |    |
| [0180] | <223> | shRNA有义序列               |    |
| [0181] | <400> | 22                      |    |
| [0182] |       | gctagtagac agagaacata a | 21 |
| [0183] | <210> | 23                      |    |
| [0184] | <211> | 21                      |    |
| [0185] | <212> | DNA                     |    |
| [0186] | <213> | 人工序列                    |    |
| [0187] | <220> |                         |    |
| [0188] | <223> | shRNA有义序列               |    |
| [0189] | <400> | 23                      |    |
| [0190] |       | gacagaaact cacacgacta t | 21 |
| [0191] | <210> | 24                      |    |
| [0192] | <211> | 21                      |    |
| [0193] | <212> | DNA                     |    |

---

|        |       |                         |    |
|--------|-------|-------------------------|----|
| [0194] | <213> | 人工序列                    |    |
| [0195] | <220> |                         |    |
| [0196] | <223> | shRNA有义序列               |    |
| [0197] | <400> | 24                      |    |
| [0198] |       | ccacagttta agtggtggaa a | 21 |
| [0199] | <210> | 25                      |    |
| [0200] | <211> | 21                      |    |
| [0201] | <212> | DNA                     |    |
| [0202] | <213> | 人工序列                    |    |
| [0203] | <220> |                         |    |
| [0204] | <223> | shRNA有义序列               |    |
| [0205] | <400> | 25                      |    |
| [0206] |       | cggcacaatc tttctgttca a | 21 |

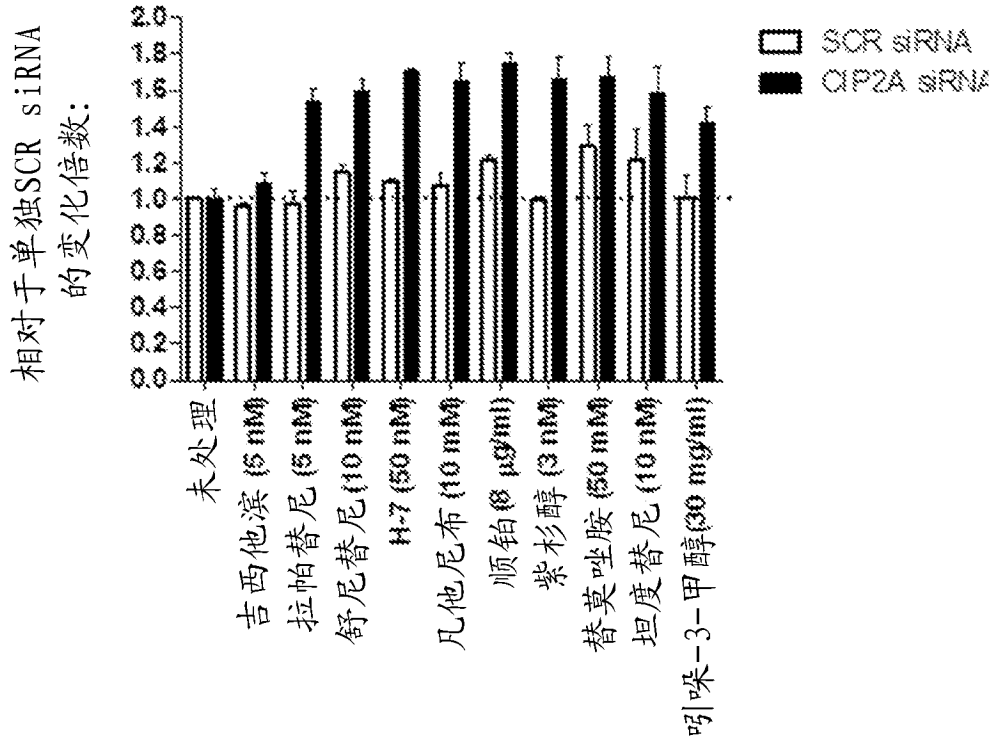


图 1

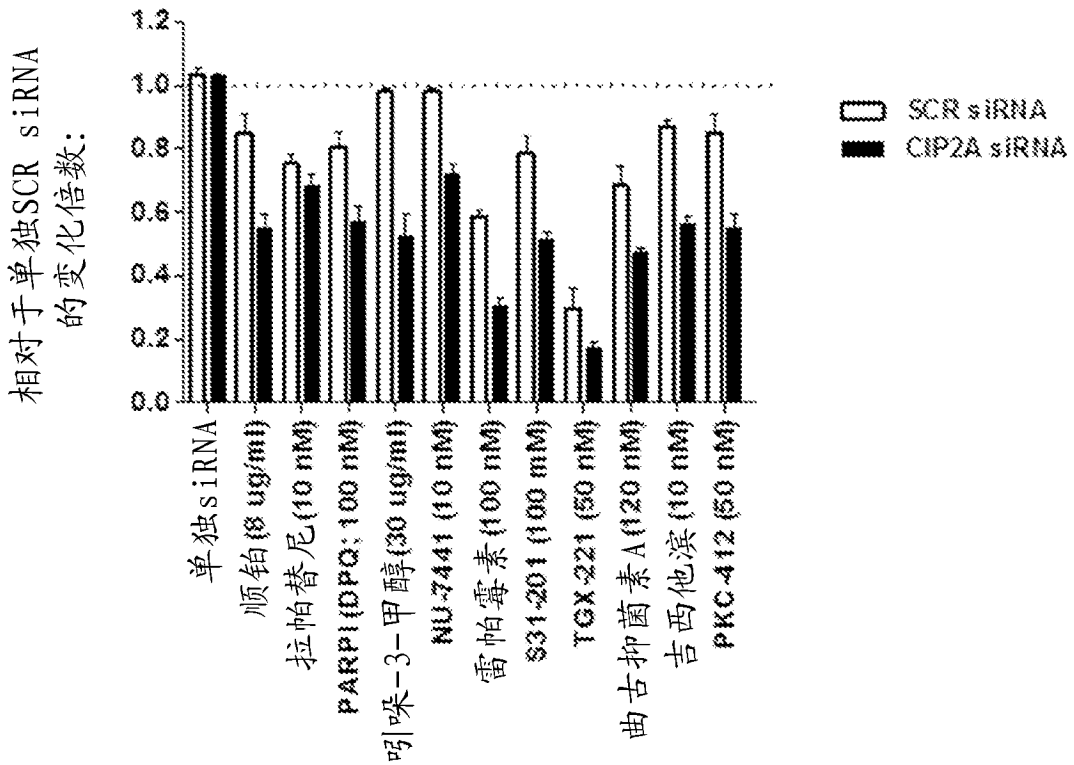


图 2

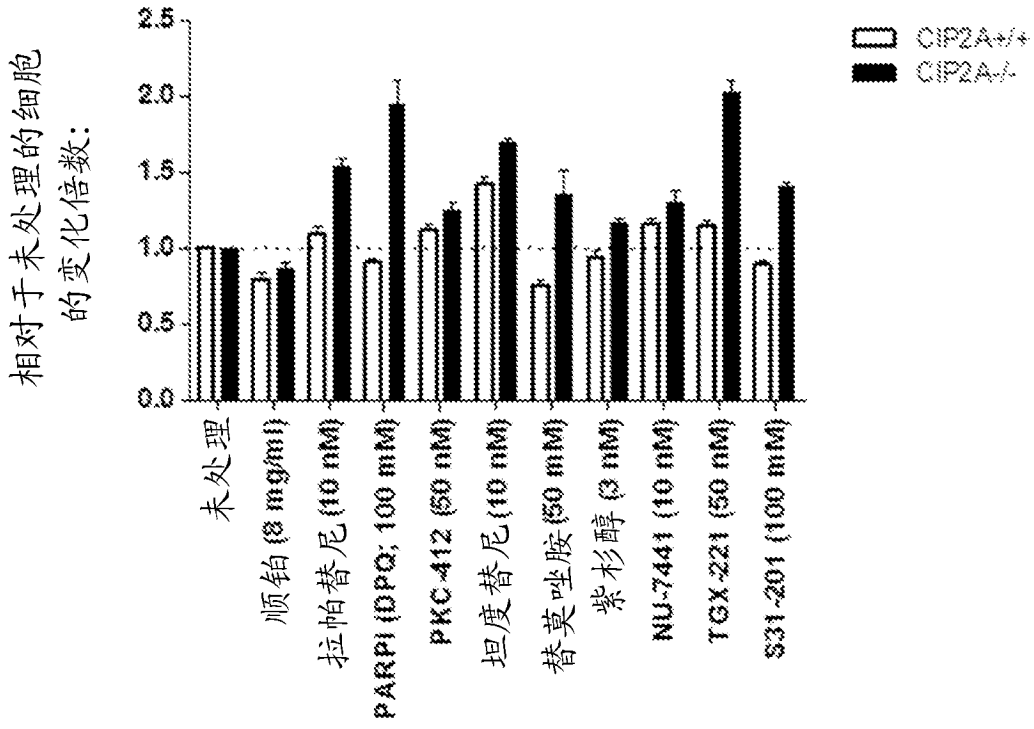


图 3

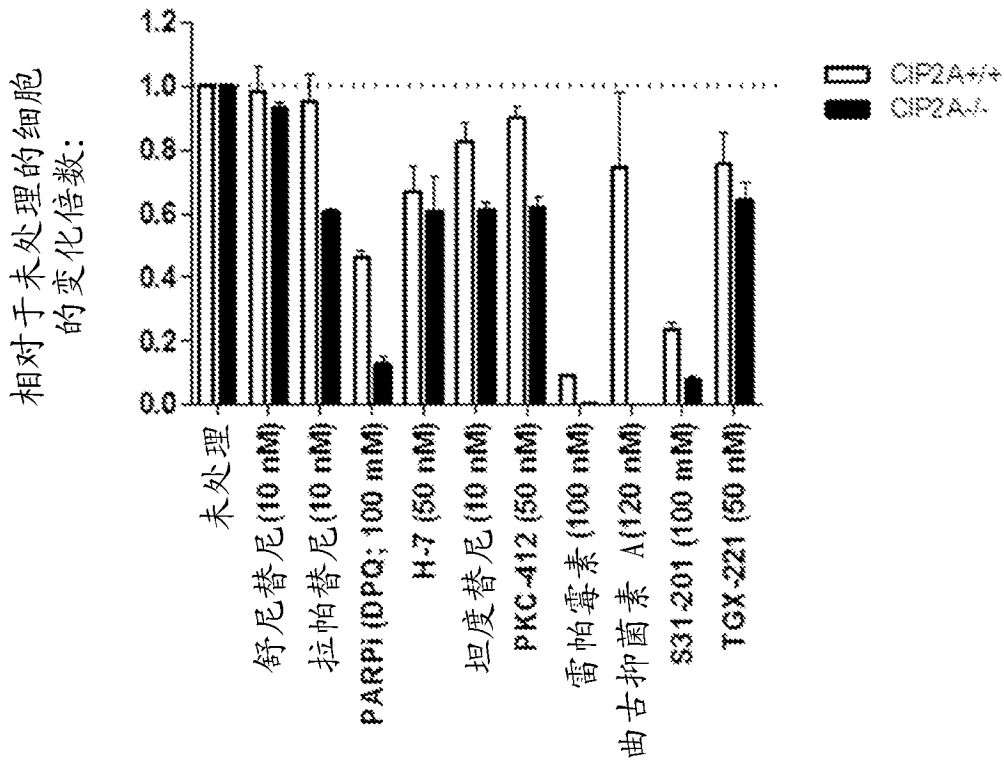


图 4

