



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106470699 A

(43)申请公布日 2017.03.01

(21)申请号 201580018179.6

(22)申请日 2015.02.03

(30)优先权数据

61/934,954 2014.02.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.09.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2015/050118 2015.02.03

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/114638 EN 2015.08.06

(71)申请人 耶路撒冷希伯来大学的益生研究开

发有限公司

地址 以色列耶路撒冷市

(72)发明人 伊农·本-内里艾

瓦利德·门策尔 盖·布雷加

(74)专利代理机构 上海翼胜专利商标事务所

(普通合伙) 31218

代理人 翟羽

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 31/506(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

权利要求书3页 说明书30页

序列表7页 附图9页

(54)发明名称

使用酪蛋白激酶I抑制剂以消耗干细胞的用途

(57)摘要

本发明公开一种治疗受试者的癌症的方法。所述方法包含对所述受试者施用一治疗有效量的一酪蛋白激酶I α (CKI α 1pha)抑制剂,其中所述癌症与一腺瘤性结肠息肉病(APC)突变非相关联。同时也公开了CKI抑制剂的其他用途。



1. 一种治疗有需求的受试者的癌症的方法,其特征在于:所述方法包含对一受试者施用一治疗有效量的一酪蛋白激酶I α (CKI α) 抑制剂,其中所述癌症与一腺瘤性结肠息肉病 (APC) 突变非相关联,从而治疗所述癌症。

2. 一种使用酪蛋白激酶I α (CKI α) 抑制剂以治疗癌症的用途,其特征在于:所述癌症与一腺瘤性结肠息肉病 (APC) 突变非相关联。

3. 一种治疗有需求的受试者的癌症的方法,其特征在于:所述方法包含对所述受试者施用一治疗有效量的PF670462,其中所述癌症不是慢性淋巴细胞性白血病 (CLL),从而治疗所述癌症。

4. 一种使用PF670462以治疗癌症的用途,其特征在于:所述癌症不是CLL。

5. 一种治疗有需求的受试者的慢性骨髓性白血病 (CML) 的方法,其特征在于:所述方法包含对所述受试者施用一治疗有效量的酪蛋白激酶I抑制剂,其中所述CML选自于由伊马替尼抗性的CML、伊马替尼相关的TKI抗性的CML、伊马替尼不耐的CML、增生的CML以及淋巴急变期CML所组成的一族群,从而治疗所述CML。

6. 一种使用酪蛋白激酶I抑制剂以治疗CML的用途,其特征在于:所述CML选自于由伊马替尼抗性的CML、伊马替尼不耐的CML、增生的CML以及淋巴急变期CML所组成的一族群。

7. 一种将细胞移植至有需求的受试者体内的方法,其特征在于:所述方法包含步骤:

(a) 通过使取自一受试者的一血液或骨髓的多个不成熟血细胞与一数量的CKI抑制剂接触,以消耗取自所述受试者的血液或骨髓的所述不成熟血细胞,其中所述CKI抑制剂用以正调节p35的一数量及/或活性,且杀死所述血液或骨髓中的所述不成熟血细胞;以及随后:

(b) 移植多个细胞至所述受试者体内。

8. 一种消耗取自一受试者的一血液或骨髓的不成熟血细胞的方法,其特征在于:所述方法包含:在体外使多个干细胞与一数量的CKI抑制剂接触,其中所述CKI抑制剂用以正调节P35的一数量及/或活性,且杀死所述血液或骨髓中的所述不成熟血细胞,从而消耗取自所述血液或骨髓的所述不成熟血细胞。

9. 一种物质的组合物,其特征在于:所述物质的组合物包含:一小分子,所述小分子对于CKI α 的抑制活性大于对于CKI δ 及/或CKI ϵ 的抑制活性至少两倍。

10. 如权利要求7或8所述的方法,其特征在于:在所述消耗之前,另包含:诱导所述不成熟血细胞从所述骨髓移动到所述血液。

11. 如权利要求1或2所述的方法或用途,其特征在于:所述CKI α 抑制剂在正调节p53上至少和CKI δ 及CKI ϵ 的抑制剂一样有效。

12. 如权利要求1、2、7或8任一项所述的方法或用途,其特征在于:所述抑制剂键结到CKI α 或一编码相同的多核苷酸。

13. 如权利要求5或6所述的方法或用途,其特征在于:所述抑制剂键结到CKI或一编码相同的多核苷酸。

14. 如权利要求1、2以及5至8任一项所述的方法或用途,其特征在于:所述抑制剂激活一DNA损坏反应 (DDR)。

15. 如权利要求5至8任一项所述的方法或用途,其特征在于:所述CKI抑制剂包含一CKI α 抑制活性。

16. 如权利要求15所述的方法或用途,其特征在于:所述CKI抑制剂另包含一CKI δ 及/或

CKI- ϵ 抑制活性。

17. 如权利要求5至8任一项所述的方法或用途,其特征在于:所述CKI抑制剂包含一CKI δ 及CKI- ϵ 抑制活性。

18. 如权利要求1、2以及5至8任一项的方法或用途,其特征在于:所述抑制剂是一小分子抑制剂。

19. 如权利要求5至8任一项所述的方法或用途,其特征在于:所述抑制剂是PF670462。

20. 如权利要求1、2以及5至8任一项所述的方法或用途,其特征在于:所述抑制剂是一RNA静默剂。

21. 如权利要求20所述的方法或用途,其特征在于:所述静默剂是靶向至CKI α 。

22. 如权利要求7所述的方法,其特征在于:所述不成熟血细胞包含多个干细胞。

23. 如权利要求7所述的方法,其特征在于:所述不成熟血细胞包含多个癌症干细胞。

24. 如权利要求7所述的方法,其特征在于:所述接触是在体内实现。

25. 如权利要求7所述的方法,其特征在于:所述接触是在体外实现。

26. 如权利要求8或25所述的方法,其特征在于:所述接触是在分离性输血期间实现。

27. 如权利要求7所述的方法,其特征在于:所述消耗是在无放射线或化疗下实现。

28. 如权利要求7所述的方法,其特征在于:所述消耗是结合放射线及/或化疗实现。

29. 如权利要求1至4任一项所述的方法或用途,其特征在于:所述癌症是一恶性血液病。

30. 如权利要求29所述的方法或用途,其特征在于:所述恶性血液病选自于由慢性骨髓性白血病(CML)、CML增生期或母细胞危象期、多发性骨髓瘤、增多综合征(HES)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、急性前髓细胞白血病(APL)、慢性中性粒细胞白血病(CNL)、急性未分化型白血病(AUL)、间变大细胞淋巴瘤(ALCL)、前淋巴细胞白血病(PML)、少年粒单细胞白血病(JMML)、成人T细胞ALL、AML伴随三系骨髓增生异常(AML/TMDS)、混合系白血病(MLL)、骨髓增殖性紊乱(MPD)、多发性骨髓瘤(MM)以及髓细胞肉瘤所组成的一族群。

31. 如权利要求29或30所述的方法或用途,其特征在于:所述恶性血液病是慢性骨髓性白血病(CML)。

32. 如权利要求31所述的方法或用途,其特征在于:所述CML是选自于由伊马替尼抗性的CML、伊马替尼不耐的CML、伊马替尼相关的TKI抗性的CML、增生的CML以及髓细胞或淋巴急变期CML所组成的一族群。

33. 如权利要求31所述的方法或用途,其特征在于:另包含:对所述受试者施用伊马替尼。

34. 如权利要求31所述的方法或用途,其特征在于:所述受试者不施予一种试剂,其选自于由伊马替尼、达沙替尼以及尼罗替尼所组成的一族群。

35. 如权利要求1至4任一项所述的方法或用途,其特征在于:所述癌症是乳癌或黑色素瘤。

36. 如权利要求1或2所述的方法或用途,其特征在于:所述CKI α 抑制剂对于CKI α 的抑制活性至少两倍于CKI δ 或CKI ϵ 。

37. 一种鉴定及可选择性制造有利于消耗干细胞的试剂的方法,其特征在于:所述方法

包含：

(a) 决定在一候选试剂存在下的CKI的一活性及/或表达；以及

(b) 选择用以负调节所述CKI的一活性及/或表达以及正调节p53的一活性及/或表达的所述试剂，从而鉴定有利于消减干细胞的一试剂。

38. 如权利要求37所述的方法，其特征在于：所述干细胞包含造血的干细胞(HSCs)。

39. 如权利要求37所述的方法，其特征在于：所述干细胞包含癌症干细胞。

40. 如权利要求37所述的方法，其特征在于：所述方法另包含：测试所述候选试剂作为癌症的一治疗的效果，或者作为细胞移植前的一预治疗的效果。

41. 如权利要求37至40任一项所述的方法，其特征在于：所述方法另包含：合成所述候选试剂。

使用酪蛋白激酶I抑制剂以消耗干细胞的用途

[0001] 技术领域及背景技术

[0002] 本发明,在其一些实施例中,涉及一种减少干细胞的方法,所述干细胞包含造血的干细胞以及癌症干细胞。

[0003] Wnt途径在整个进化过程中是高度被保持的,从蠕虫到人类,在胚胎发育和疾病中均扮演了关键角色。Wnt信号是由一组激酶及磷酸酶进行严格调节,作用于级联的不同组件且在一有机体生命期中引领各种细胞的命运。

[0004] 正规的Wnt途径的主要目标是细胞质 β -连环蛋白,其作为基因增殖、分化、迁移以及生存的一转录共活化剂。所述信号转导取决于所述Wnt配体的存在或缺乏。在静息组织中,在Wnt配体的缺乏中, β -连环蛋白经常通过一多蛋白络合物被磷酸化以及降级,且因此在细胞中被维持在低阶。在分裂细胞中,在成人自我更新组织及胚胎各处中,隐藏的Wnt蛋白质结合于卷曲受体家族的成员以及细胞膜上的协同受体LRP5/6。Wnt键结激活了蓬乱蛋白(Disevelled, Dvl),导致 β -连环蛋白降解络合物的分解以及在所述细胞质中的 β -连环蛋白的稳定。这可使 β -连环蛋白易位进入细胞核,且通过Tcf/Lef依赖的转录激活它的目标基因(如c-Myc、cyclin D1)。所述正规的Wnt信号的失调导致各种癌症,其中包括大肠癌(CRC)、肝细胞癌(HCC)以及黑色素瘤。在这些癌症中,一或多个Wnt组成构件时常突变,造成核的 β -连环蛋白的异常积累。此解释了在细胞中严格调节 β -连环蛋白水平的需求。

[0005] β -连环蛋白被磷酸化及降级的机制就在最近已经被展示出来,其强调了在所述Wnt信号途径中明显的角色扮演者。所述 β -连环蛋白降解络合物包含腺瘤性结肠息肉病(APC)肿瘤抑制因子、Axin1或Axin2(被认为扮演一支架功能)以及包含两个丝氨酸/苏氨酸(Serine/Threonine)激酶:酪蛋白激酶I (CKI) 以及糖原合成酶激酶-3 (Glycogen synthase kinase-3, GSK3), 其在四个N端的Ser/Thr残片上将 β -连环蛋白磷酸化。此结果标识了 β -连环蛋白通过SCF ^{β -TrCP} E3泛素连接酶的泛素化,以及随后的蛋白酶体降解。最近已经展示了第一个磷酸化事件是由CKI介导,其磷酸化 β -连环蛋白的Ser45。此创造了一个给GSK3的引发位址,随后磷酸化Thr41、Ser37以及Ser33。最后的两个残片,当进行磷酸化时,作为给E3连接酶 β -TrCP的一个停靠位址,其标识 β -连环蛋白以进行降解。

[0006] CKI的参与被证实驱动级联造成 β -连环蛋白负调节所必须且为充足的。此与果蝇Wnt信号组件的同源物的研究一致,且因此指派CKI作为一Wnt信号拮抗剂。换言之,在涉及CKI作为一Wnt信号效应因子的非洲爪蟾和线虫发育研究中显示了,CKI提升了二级体轴和胚胎极性(Wnt效应)。支持它的是观察CKI磷酸化及激活Dvl,另一个Wnt效应因子,从而增加 β -连环蛋白的水平。

[0007] 美国专利申请案第20050171005号教导调变 β -连环蛋白磷酸化的方法。

[0008] 美国专利申请案第20090005335号教导了通过提供正调节 β -连环蛋白的组合物治疗具有APC基因突变的癌症细胞。

[0009] 美国专利申请案第20110076683号教导了Wnt抑制剂用于治疗白血病。

[0010] 其余先前技术包括美国专利申请案第20080146555号、国际专利申请案W02014023271以及美国专利申请案第20100179154号。

发明内容

[0011] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种治疗有需求的受试者的癌症的方法,其包含对所述受试者施用一治疗有效量的一酪蛋白激酶I α (CKI α) 抑制剂,其中所述癌症与一腺瘤性结肠息肉病 (APC) 突变非相关联,从而治疗所述癌症。

[0012] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种使用酪蛋白激酶I α (CKI α) 抑制剂以治疗癌症的用途,其中所述癌症与一腺瘤性结肠息肉病 (APC) 突变非相关联。

[0013] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种治疗有需求的受试者的癌症的方法,其包含对所述受试者施用一治疗有效量的PF670462,其中所述癌症不是慢性淋巴细胞性白血病 (CLL),从而治疗所述癌症。

[0014] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种使用PF670462以治疗癌症的用途,其中所述癌症不是CLL。

[0015] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种治疗有需求的受试者的慢性骨髓性白血病 (CML) 的方法,其包含对所述受试者施用一治疗有效量的一酪蛋白激酶I抑制剂,其中所述CML选自于由伊马替尼抗性的CML、伊马替尼相关的TKI抗性的CML、伊马替尼不耐的CML、增生的CML以及淋巴急变期CML所组成的一族群,从而治疗所述CML。

[0016] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种使用酪蛋白激酶I抑制剂以治疗CML的用途,其中所述CML选自于由伊马替尼抗性的CML、伊马替尼相关的TKI抗性的CML、伊马替尼不耐的CML、增生的CML以及淋巴急变期CML所组成的一族群。

[0017] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种将细胞移植至有需求的受试者体内的方法,所述方法包含步骤:

[0018] (a) 通过使取自一受试者的一血液或骨髓的多个不成熟血细胞与一数量的CKI抑制剂接触,以消耗取自所述受试者的血液或骨髓的所述不成熟血细胞,其中所述CKI抑制剂用以正调节p35的一数量及/或活性,且杀死所述血液或骨髓中的所述不成熟血细胞;以及随后:

[0019] (b) 移植多个细胞至所述受试者体内。

[0020] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种消耗取自一受试者的一血液或骨髓的不成熟血细胞的方法,包含:在体外使多个干细胞与一数量的CKI抑制剂接触,其中所述CKI抑制剂用以正调节P35的一数量及/或活性,且杀死所述血液或骨髓中的所述不成熟血细胞,从而消耗取自所述血液或骨髓的所述不成熟血细胞。

[0021] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种鉴定及可选择性制造有利于消耗干细胞的试剂的方法,所述方法包含:

[0022] (a) 决定在一候选试剂存在下的CKI的一活性及/或表达;以及

[0023] (b) 选择用以负调节所述CKI的一活性及/或表达以及正调节p53的一活性及/或表达的所述试剂,从而鉴定有利于消减干细胞的一试剂。

[0024] 根据本发明的一些实施例的一观点,其提供一种物质的组合物,所述物质的组合物包含:一小分子,所述小分子对于CKI α 的抑制活性大于对于CKI δ (CKI δ) 及/或CKI ϵ (CKI ϵ) 的抑制活性至少两倍。

[0025] 根据本发明的一些实施例,所述方法另包含诱导所述不成熟血细胞从所述骨髓移

動到所述血液。

[0026] 根据本发明的一些实施例,所述CKI α 抑制剂在正调节p53上至少和CKI δ 及CKI ϵ 的抑制剂一样有效。

[0027] 根据本发明的一些实施例,所述抑制剂键结到CKI α 或一编码相同的多核苷酸。

[0028] 根据本发明的一些实施例,所述抑制剂键结到CKI或一编码相同的多核苷酸。

[0029] 根据本发明的一些实施例,所述抑制剂激活一DNA损坏反应(DNA damage response,DDR)。

[0030] 根据本发明的一些实施例,所述CKI抑制剂包含一CKI α 抑制活性。

[0031] 根据本发明的一些实施例,所述CKI抑制剂另包含一CKI δ 及/或CKI- ϵ (CKI-epsilon)抑制活性。

[0032] 根据本发明的一些实施例,所述CKI抑制剂包含一CKI δ 及CKI- ϵ 抑制活性。

[0033] 根据本发明的一些实施例,所述抑制剂是一小分子抑制剂。

[0034] 根据本发明的一些实施例,所述抑制剂是PF670462。

[0035] 根据本发明的一些实施例,所述抑制剂是一RNA静默剂。

[0036] 根据本发明的一些实施例,所述静默剂是靶向至CKI α 。

[0037] 根据本发明的一些实施例,所述不成熟血细胞包含多个干细胞。

[0038] 根据本发明的一些实施例,所述不成熟血细胞包含多个癌症干细胞。

[0039] 根据本发明的一些实施例,所述接触是在体内实现。

[0040] 根据本发明的一些实施例,所述接触是在体外实现。

[0041] 根据本发明的一些实施例,所述接触是在分离性输血期间实现。

[0042] 根据本发明的一些实施例,所述消耗是在无放射线或化疗下实现。

[0043] 根据本发明的一些实施例,所述消耗是结合放射线及/或化疗实现。

[0044] 根据本发明的一些实施例,所述癌症是一恶性血液病。

[0045] 根据本发明的一些实施例,所述恶性血液病选自于由慢性骨髓性白血病(CML)、CML增生期或母细胞危象期、多发性骨髓瘤、增多综合征(HES)、骨髓增生异常综合征(MDS)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓细胞白血病(AML)、急性前髓细胞白血病(APL)、慢性中性粒细胞白血病(CNL)、急性未分化型白血病(AUL)、间变大细胞淋巴瘤(ALCL)、前淋巴细胞白血病(PML)、少年粒单细胞白血病(JMML)、成人T细胞ALL、AML伴随三系骨髓增生异常(AML/TMDS)、混合系白血病(MLL)、骨髓增殖性紊乱(MPD)、多发性骨髓瘤(MM)以及髓细胞肉瘤所组成的一族群。

[0046] 根据本发明的一些实施例,所述恶性血液病是慢性骨髓性白血病(CML)。

[0047] 根据本发明的一些实施例,所述CML是选自于由伊马替尼抗性的CML、伊马替尼不耐的CML、伊马替尼相关的TKI抗性的CML、增生的CML以及髓细胞或淋巴急变期CML所组成的一族群。

[0048] 根据本发明的一些实施例,对所述受试者施用伊马替尼。

[0049] 根据本发明的一些实施例,所述受试者不施予一种试剂,其选自于由伊马替尼、达沙替尼以及尼罗替尼所组成的一族群。

[0050] 根据本发明的一些实施例,所述癌症是乳癌或黑色素瘤。

[0051] 根据本发明的一些实施例,所述CKI α 抑制剂对于CKI α 的抑制活性至少两倍于CKI δ

或CKIε。

[0052] 根据本发明的一些实施例,所述干细胞包含造血的干细胞(HSCs)。

[0053] 根据本发明的一些实施例,所述干细胞包含癌症干细胞。

[0054] 根据本发明的一些实施例,所述方法另包含:测试所述候选试剂作为癌症的一治疗的效果,或者作为细胞移植前的一预治疗的效果。

[0055] 根据本发明的一些实施例,所述方法另包含:合成所述候选试剂。

[0056] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和/或科学术语具有与普通技术人员对本发明有关的技术领域中所通常理解的相同含义。虽然类似或等同于本文描述的那些方法与材料可以用在本发明实施例的实践或测试中,示例性方法和/或材料仍进行说明如下。在冲突的情况下,专利说明书,包括定义,将控制。此外,材料、方法和举例仅是说明性的,非意指其必要限制。

附图说明

[0057] 在此描述本发明的一些实施例,仅通过举例的方式,参照随附的图式以及图像。现以具体参照附图详细说明,强调所示细节是通过举例的方式以及为了发明实施例的说明性讨论的目的。在这点上,结合附图所做的描述会使得本领域的技术人员明显可知本发明的实施例可以如何实施。

[0058] 在附图中:

[0059] 图1A至1F说明CKIα消融消耗了小鼠的造血干细胞(HSC)且允许骨髓植入。

[0060] A)产生一嵌合体小鼠的方案。B)诱导后第7天取自两个股骨和两个胫骨的LT-HSC (Lineage⁻c-kit⁺Sca1⁺CD34⁻FLT3⁻)、ST-HSC (Lineage⁻c-kit⁺Sca1⁺CD34⁺FLT3⁻)、MPP (Lineage⁻c-kit⁺Sca1⁺CD34⁺FLT3⁺)的绝对计数值。C)植入CKIαKO骨髓的致死IR小鼠或控制小鼠的存活曲线。D)CKIα重建实验的方案。E)CKIαKO诱导小鼠重建或不治疗的小鼠的存活曲线。F)取自重建三个月后的WT或CKIαKO诱导小鼠的GFP+外周血白细胞的百分比。

[0061] 图2是产生老鼠模式的CML母细胞危象期的一方案。

[0062] 图3A至3D说明CKIα消融如何预防CML发育。A)实验方案。B)监控白血病起始细胞(LICs)移植后两个月中的GFP+外周血白细胞的百分比;不带CKIα缺失的小鼠(PBS-已治疗或不带MXCre的LICs在三周间垂死及牺牲)C)取自白血病小鼠的血涂片的照片,其中CKIα缺失已被诱发(pIpC-已治疗)或未诱发(PBS已治疗)。D)CKIα缺失被以pIpC诱发或不被诱发(PBS已治疗)的白血病小鼠的存活,或者不具有MXCre于缺失。

[0063] 图4A至4C说明CKIα消融如何消耗正常与白血病干细胞此两者,且允许正常骨髓重建。A)实验方案。B)受白血病折磨的BM移植12天之后CD45.1(捐赠细胞)以及GFP+白血病细胞在外周血白细胞中的百分比,显示了CKIα缺失之后仅有正常捐赠的BM重建(红色长条)以及无CKIα缺失的高百分比的白血病GFP-阳性细胞(PBS治疗,黑色长条)。C)CKIα缺失之后(pIpC治疗)白血病小鼠的全体存活,是因为成功的捐赠者骨髓重建。

[0064] 图5A至5D说明所述CKI抑制剂PF670462优选靶向所述体外白血病细胞。A)实验方案。B)RT-PCR结果说明抑制剂治疗中,剂量依赖性的增加于p53以及Wnt目标的表达。C)PF670462治疗之后,白血病细胞数量选择性地减少-剂量反应曲线具有LD50<2μM。D)PF670462治疗之后,白血病细胞中的凋亡基因表达增加。

[0065] 图6A至6F说明PF670462激活了BM中的Wnt以及p53,消除移植的白血病起始细胞,并预防体内CML发育。A)实验治疗方案。B)Western印迹分析(Western blot analysis)说明基于PF670462治疗, β -连环蛋白和p53稳定化,以及c-Myc(一Wnt目标基因的一个例子)的提高。C)PF670462治疗后GFP+外周血白细胞的百分比显示赋形剂处理的(vehicle-treated)小鼠在外周血中的GFP+白血病细胞的迅速扩散,以及抑制剂处理的小鼠的无扩散。D)骨髓脊椎动物部份的H&E染色显示赋形剂处理的小鼠的胚细胞侵袭以及脊椎动物的完全毁灭,以及抑制剂处理的小鼠显示一正常的脊椎动物。垂死的赋形剂处理的小鼠均在白血病移植12天后牺牲。健康的抑制剂处理的小鼠在三周后牺牲且他们的骨髓被移植到放射小鼠以监控正常的长期造血和无白血病复发。E)殒灭两天前于赋形剂处理的小鼠中的不成熟髓细胞和胚细胞,以及同时间于抑制剂处理的小鼠中的正常外周血象。F)PF670462治疗后白血病小鼠存活。

[0066] 图7A至7B是说明一黑色素瘤老鼠模式中CKI α 缺失的影响的照片。图7A是描绘他莫昔芬(tamoxifen)施用于局部耳朵之前及给药56天之后,一BrafV600E;Pten双重基因敲除的floxed老鼠脸部的耳朵及组织的照片。图7B是描绘他莫昔芬(tamoxifen)诱导局部耳朵之前(左侧)及给药56天之后(右侧),一BrafV600E;Pten;CKI α 三重基因敲除的floxed老鼠脸部的耳朵及组织的照片。他莫昔芬诱导之后无肿瘤可见于B,仅有耳朵色素沉着,证明了CKI α 缺失的一个强烈的肿瘤抑制效果,而没有肿瘤突变逃逸

具体实施方式

[0067] 本发明,在其一些实施例中,关于消减干细胞的方法,所述干细胞包括造血的干细胞及癌症干细胞。

[0068] 根据本发明的消减干细胞的方法的原理及操作可以参照附图及说明更好地被了解。

[0069] 详细解释本发明至少一实施例之前,必须了解到在此申请中的发明不必须受限制于下面的详细说明或例示。本发明可以用于其它实施例或可以不同方式实施或执行。

[0070] 所述 β -连环蛋白降解络合物由腺瘤性结肠息肉病(APC)肿瘤抑制因子;Axin1或Axin2(被认为扮演一支架功能);以及由两个丝氨酸/苏氨酸(Serine/Threonine)激酶:酪蛋白激酶I(CKI)以及糖原合成酶激酶-3(Glycogen synthase kinase-3,GSK3)所组成,其在四个N端的Ser/Thr残片上将 β -连环蛋白磷酸化。CKI α 和APC均被注意到于Wnt信号传导及有丝分裂纺锤体的调控中扮演了重要角色。

[0071] 为了分析骨髓干细胞,如造血干细胞(HSCs),CKI所扮演的角色,发明人制得有条件的骨髓CKI α 敲出突变小鼠。如图1A至1F所示,骨髓CKI α 消融消耗小鼠的造血干细胞(HSC)且允许骨髓植入(图1A至1F)不使用其它共同使用于移植的预处理(如放射线或化疗)。

[0072] 利用CML母细胞危象期的老鼠模式,发明人继续展示CKI α 消融预防慢性骨髓性白血病(CML)的发育(图3A至3D)。由于CML一般而言,加上特别是母细胞危象阶段,已知与癌症干细胞有关联,发明人推测CKI α 抑制剂可不仅是被用于消耗造血干细胞(HSC),也会消耗其它干细胞如癌症干细胞。

[0073] 为评估CKI α 缺失是否可取代化疗或放射线诱导的髓细胞消融以及白血病细胞净空,白血病细胞被注入CKI α 基因敲除的floxed Mx-Cre小鼠。当敲除不被诱导,一个非常高

百分比的白血病细胞会出现,而在CKI α KO,则检测不到所述白血病细胞(图4B),反映如存活率数据所示(图4C)。

[0074] 发明人寻求使用抑制CKI的一小分子试剂以确认他们的结果。由于CKI α 的负调节已知是增加p53的表达,本发明人寻找CKI抑制剂,其对于p53具有相似效果。在图5B和6B中可见,所述CKI抑制剂PF670462大幅增加了p53的表达且它的目标于骨髓细胞中。在一体外研究中,本发明人展示了PF670462优先耗尽白血病细胞。此抑制剂的深远影响反映于一体内研究中。这样,显示了PF670462消减移植的白血病起始细胞,且预防体内的CML发育(图6C至6F)。于抑制剂处理的小鼠的所述骨髓移植到致死放射处理的小鼠(移植一个月后)明显无白血病细胞,表明了所述抑制剂处理根除了所述白血病干细胞,但保留了正常的造血干细胞。

[0075] 同时进一步减少了本发明实施,本发明人分析CKI α 消耗于其他癌症的影响,且发现了CKI α 敲出在黑色素瘤的老鼠模式中具有一治疗效果。

[0076] 由于黑色素瘤是从神经外胚层胚层细胞衍生,以及白血病细胞是从中胚层胚层细胞衍生,本发明人推断CKI的负调节对于无数的癌症可以是有效的,不分衍生肿瘤细胞的胚层。再者,由于CKI抑制已经显示选择性地靶向癌症干细胞,本发明人作出可抑制CKI的试剂一般而言应该会对癌症干细胞有效的结论,不分包含癌症干细胞的特殊癌症。

[0077] 如此,根据本发明的一第一观点是提供一种治疗有需求的受试者的癌症的方法,包含对一受试者施用一治疗有效量的一酪蛋白激酶I α (CKI α) 抑制剂,其中所述癌症与一腺瘤性结肠息肉病(APC)突变非相关联,从而治疗所述癌症。

[0078] 此处使用的术语“癌症”参照到增生疾病,包括但不限于是癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤以及白血病。所述癌症可例如是一实体肿瘤良性脑膜瘤(solid tumors Benign Meningioma)、唾液腺混合瘤(Mixed tumors of salivary gland)、结肠腺瘤(Colonic adenomas);腺癌(Adenocarcinomas),如小细胞肺癌、肾、子宫、前列腺、膀胱、卵巢、结肠、肉瘤、脂肪肉瘤、粘液样、关节滑膜肉瘤、横纹肌肉瘤(肺泡)、骨骼外粘液样软骨肉瘤、尤文瘤(Ewing's tumor);其它包括睾丸及卵巢无性细胞瘤、视网膜母细胞瘤、肾母细胞瘤(Wilms' tumor)、神经母细胞瘤、恶性黑色素瘤、间皮瘤、乳腺、皮肤、前列腺及卵巢。

[0079] 根据一特别的实施例,所述癌症是一黑色素瘤、一乳癌或一恶性血液病。

[0080] 此处的术语“恶性血液病”包括一淋巴瘤、白血病、骨髓瘤或一恶性淋巴瘤,以及一脾脏及淋巴结的癌症。适合以本发明所揭露的抗CXCR4抗体治疗而作为范例的淋巴瘤包括B细胞淋巴瘤及T细胞淋巴瘤。B细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)以及大多数非霍奇金淋巴瘤。B细胞淋巴瘤的非限制性的例子包括弥漫型大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma,DLBCL)、滤泡性淋巴瘤(follicular lymphoma,FL)、粘膜相关淋巴组织淋巴瘤(MALT)、小细胞淋巴细胞淋巴瘤(与慢性淋巴细胞性白血病重叠)、外套膜细胞淋巴瘤(mantle cell lymphoma,MCL)、伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、纵隔大B细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)、结边缘区B细胞淋巴瘤(NMZL)、脾边缘区淋巴瘤(SMZL)、血管内大B细胞淋巴瘤、原发渗出性淋巴瘤、淋巴瘤样肉芽肿。T细胞淋巴瘤的非限制性的例子包括结外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变大细胞淋巴瘤以及血管免疫母细胞T细胞淋巴瘤。恶性血液病也包括白血病,例如但不限于是,二级白血病、急性骨髓性白血病(AML;也称为急性淋巴白血病)、慢性骨髓性白血病(CML)、

B细胞前淋巴细胞白血病(B-PLL)、急性淋巴母细胞白血病(ALL)以及骨髓增生异常(MDS)。恶性血液病另包含骨髓瘤,例如但不限于是,多发性骨髓瘤(MM)、郁积多发性骨髓瘤(SMM)以及B细胞慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[0081] 根据一特殊实施例,所述恶性血液病是慢性骨髓性白血病(CML)术语CML包括伊马替尼抗性的CML、第二/第三代Bcr-Abl TKI(例如达沙替尼(dasatinib)和尼罗替尼(nilotinib))可耐的CML、伊马替尼不耐的CML、增生的CML以及淋巴急变期CML。

[0082] 其它血液学及/或B细胞或T细胞关联的癌症以术语恶性血液病来涵盖。例如,恶性血液病也包括其他造血细胞的癌症,包含树突状细胞、血小板、红细胞、自然杀手细胞以及多形核白细胞,如嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞以及单核细胞。本领域的技术人员应该清楚这些前期恶性肿瘤以及恶性肿瘤经常由于分类系统的变化而具有不同的名称,而且具有被分类在不同名称的淋巴瘤的病患也可以从本发明的治疗方案获益。

[0083] 如上所述,对于本发明的此观点来说,所述癌症不包括与一腺瘤性结肠息肉病(APC)突变关联的癌症。

[0084] APC突变的例子可例如是造成所述APC产物截断的那些。典型突变发生于编码序列的上半部,以及在结直肠肿瘤的体细胞突变是进一步集群于一特殊区域,称为MCR (mutation cluster region)。参与人类疾病的APC突变的一份清单提供于OMIM, worldwidewebdotnchidotnlmdotnihdotgov/omim。与APC突变关联的癌症的例子包括结肠癌症、神经管细胞瘤以及肝细胞癌。

[0085] 根据本发明的另一观点提供一种治疗有需求的受试者的CML的方法,包含对所述受试者施用一治疗有效量的酪蛋白激酶I抑制剂,其中所述CML选自于由伊马替尼抗性的CML、伊马替尼(或伊马替尼相关的TKI)不耐的CML、增生的CML以及淋巴急变期CML所组成的一族群。

[0086] 根据本发明的再另一观点提供一种治疗有需求的受试者的癌症的方法,包含对所述受试者施用一治疗有效量的PF670462,其中所述癌症不是CLL。

[0087] 所有癌症都在本发明的此观点中被考量(CLL除外)。根据本发明此观点的一实施例,所述癌症也包括那些与APC突变关联的癌症。根据另一实施例,所述癌症不包括与APC突变关联的癌症。

[0088] 本发明的所述治疗的方法通过接触/施予可抑制CKI的一试剂来实现。

[0089] CKI是在每个受测有机体中发现的Ser/Thr激酶的一高度保持的家族,从酵母到人类。在哺乳动物中CKI家族由七个基因(α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 , δ , ϵ)编码11个选择性剪接异构体所组成。Members of the所述CKI家族的成员共享一保存催化区域以及ATP结合位点,其仅仅从其他激酶家族被区分出来。CKI是在所有细胞中可发现的一种普及的酵素,占据不同的亚细胞的本地化且除了Wnt信号传递之外,涉及各种细胞进程。

[0090] 优选的,所述CKI抑制剂增加p53的表达及/或活性(至少2倍)及/或激活一DNA损坏反应(DDR)。

[0091] 本发明的CKI抑制剂,相比于其它激酶如周期蛋白依赖性激酶(CDK)用于调节细胞周期,(例如Cdk2、Cdk4、Cdk6),优选具有至少两倍、至少5倍、至少10倍对CKI的抑制活性。此外,相比于蛋白激酶C(PKC)、PKA、her2、raf 1、MEK1、MAP激酶、EGF受体、PDGF受体、IGF受体、PI3激酶、wee1激酶、Src及/或Abl,CKI抑制剂具有至少两倍、至少5倍、至少10倍对CKI的抑

制活性。

[0092] 在一些实施例中,所述试剂为CKI- α 抑制剂,即它们是选择性的对于CKI- α (CSNK1A;在基因组,mRNA或蛋白质水平,GenBank登记号NP_001020276、NM_001025105及NM_001020276)。因此,举例来说,此CKI抑制剂相比于CKI- δ (CKI-delta) 及CKI- ϵ 具有至少两倍、至少5倍、至少10倍对于CKI- α 的抑制活性。

[0093] 优选地,对CKI- α 有选择性的所述试剂在正调节p53上至少和CKI δ 及CKI ϵ 的抑制剂一样有效(如PF670462)。优选地,对CKI- α 有选择性的所述试剂在正调节p53上至少两倍有效于CKI δ 及CKI ϵ 的抑制剂(如PF670462)。

[0094] 在一些实施例中,所述试剂抑制CKI- δ (CSNK1A;在基因组,mRNA或蛋白质水平,GenBank登记号NP_001884.2、NP_620693.1、NM_001893.3及NM_139062.1) 以及CKI- ϵ (CSNK1E;NP_001885.1、NP_689407.1、NM_001894.4及NM_152221.2)。

[0095] 在本发明观点的一些实施例中,所述试剂较大程度的抑制CKI- δ 以及CKI- ϵ 相较于抑制CKI- α (例如与CKI- α 比较,对CKI- δ 及CKI- ϵ 的抑制活性至少两倍、至少5倍、至少10倍)。

[0096] 在本发明观点的一些实施例中,所述CKI抑制剂较大程度的抑制CKI α 、 δ 以及 ϵ 异构体相较于抑制CKI- β 、 γ_1 、 γ_2 或 γ_3 (例如,与CKI- β 、 γ_1 、 γ_2 或 γ_3 中的任一个比较,对CKI- δ 及CKI- ϵ 的抑制活性至少两倍、至少5倍、至少10倍)。

[0097] 根据一实施例,本发明所述CKI抑制剂直接结合于所述CKI (例如CKI- α 、CKI- δ 及/或CKI- ϵ) 或一编码相同的基因。

[0098] CKI- α 、CKI- δ 及/或CKI- ϵ 的负调节可于所述基因组及/或所述转录水平上使用干扰转录及/或转译的各种分子(例如,反义、siRNA、核酶、微小RNA或脱氧核酶(DNAzyme)) 而被实现,或于蛋白质水平上使用如拮抗剂、切割多肽的酶等类似物。

[0099] 本发明的一实施例中,可以负调节所述CKI的一种试剂是一抗体或可特定键结所述特定CKI的抗体片段。优选地,所述抗体特定键结CKI- α 、CKI- δ 或CKI- ϵ 的至少一表位(epitope)。

[0100] 此处所使用的术语“表位”参照至一抗原上的任何抗原定子其键结至一抗体的互补位。

[0101] 表位定子通常由分子的化学活性表面基团所组成,如氨基酸或碳水化合物侧链,且通常具有特定三维结构特性,以及特定电荷特性。

[0102] 人源化非人类抗体的方法是本领域公知的技术。一般而言,一人源化的抗体具有自一非人类来源导入的一或多个氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基经常被认为是输入残基,其通常取自一输入可变结构域。人源化可以Winter等人的方法实质上被执行(见Jones等人(1986);Riechmann等人(1988);以及Verhoeyen,M.等人(1988),Reshaping human antibodies:grafting an antilysozyme activity.Science 239,1534-1536),通过以啮齿动物CDRs或CDR取代一人类抗体的对应序列。据此,此人源化抗体为嵌合抗体(美国专利第4,816,567号),其中基本上小于一完整人类可变结构域已经被一取自非人类物种的对应序列所取代。实际上,人源化抗体是一般人类抗体,其中一些CDR残基及可能一些FR残基由取自啮齿动物抗体中的类比位点的残基所取代。

[0103] 人类抗体也可以使用本技术领域已知的多种技术制得,包括噬菌体展示文库(phage display libraries)中(Hoogenboom,H.R.及Winter,G.(1991).By-passing

immunization. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol* 227,381-388)。Cole等人及Boerner等人的技术也可使用于人类单克隆抗体的制备 (Cole et al. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp.77-96; and Boerner, P. et al. (1991) .Production of antigen-specific human monoclonal antibodies from in vitro-primed human splenocytes. *J Immunol* 147,86-95)。相似的,人类抗体可通过引导人类免疫球蛋白基因位点进入转基因动物,如小鼠,制得,其中内源性免疫球蛋白基因已经部份或完全被去活化。在此挑战中,人类抗体的制造被观察到是相当类似于在人类在各方面中所见的,包括基因重排、组装以及抗体谱。此途径被描述于,例如,美国专利第5,545,807号、第5,545,806号、第5,569,825号、第5,625,126号、第5,633,425号以及第5,661,016号;以及在下列科学公开刊物: Marks, J.D. et al. (1992) .By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology (N.Y.)* 10 (7) ,779-783; Lonberg et al., 1994. *Nature* 368:856-859; Morrison, S.L. (1994) .News and View: Success in Specification. *Nature* 368,812-813; Fishwild, D.M. et al. (1996) .High-avidity human IgG kappa monoclonal antibodies from a novel strain of minilocus transgenic mice. *Nat Biotechnol* 14,845-851; Neuberger, M. (1996) .Generating high-avidity human Mabs in mice. *Nat Biotechnol* 14,826; 以及 Lonberg, N. 与 Huszar, D. (1995) .Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol* 13,65-93。

[0104] 本发明可负调节所述CKI类的一试剂的另一例子是一RNA静默剂。

[0105] 此处所使用的术语“RNA静默”参照调节机制的一族群(例如RNA干扰(RNAi)、转录基因静默(TGS)、转录后基因静默(PTGS)、平息、共抑制以及转译阻抑)由RNA分子介导而导致一对应蛋白质编码基因的表达的抑制或“静默”。RNA静默已在许多类型的生物体中被观察到,包括植物、动物以及菌类。

[0106] 此处所使用的术语“RNA静默剂”参照到可抑制或使一标的基因表达静默的一RNA。在某些实施例中,所述RNA静默剂可以预防一mRNA分子的完全处理(例如完全转译及/或表达)通过一转录后静默机制。RNA静默剂包括非编码的RNA分子,例如RNA双链包含成对股,以及可产生此一小的非编码的RNA的前驱RNA。RNA静默剂的例子包括dsRNAs如siRNAs、miRNAs及shRNAs。在一实施例中,所述RNA静默剂可导入RNA干扰。在另一实施例中,所述RNA静默剂可介导转译的阻抑。

[0107] RNA干扰参照由短干扰RNA(siRNA)介导的动物的序列特定转录后基因静默的进程。植物的相应进程共同参照为转录后基因静默或RNA静默,且亦参照为菌类的平息。转录后基因静默的进程被认为是一进化保守的细胞防御机制,其用于预防外来基因的表达,且被多样的植物群和动物门所共同分享。此保护外来基因表达可能已经进化以响应双股RNA(dsRNAs)的制造,所述双股RNA衍生自病毒感染,或衍生自转座子元件通过一细胞响应随机整合到一主基因组,所述细胞响应特定摧毁同源单股RNA或病毒基因组RNA。

[0108] 长dsRNA在细胞中的存在刺激了被称为切丁酶(dicer)的一核糖核酸酶III酵素(ribonuclease III enzyme)的活性。切片酶涉及所述dsRNA加工成已知为短干扰RNA(siRNAs)的短片。衍生自切片酶活性的短干扰RNA一般约21至23个核苷酸长度,且包含约19

个碱基配对双链。所述RNAi响应也显示一核酸内切酶络合物,常被称为一RNA-诱导静默络合物(RISC),其介导单股RNA切割,所述单股RNA具有具有序列互补于所述siRNA链的反义股。所述标的RNA的切割发生在与siRNA链的反义股互补的区域中间。

[0109] 据此,本发明考虑以dsRNA负调节来自mRNA的蛋白质表达的用途。

[0110] 根据一实施例,所述dsRNA大于30碱基对(bp)。长dsRNAs的用途(即dsRNA大于30bp)已经非常有限,由于双股RNA的这些较长区段被认为将导致干扰素及PKR反应的诱导。然而,长dsRNAs的使用可提供众多优点,其中细胞可选择最佳静默序列以缓和测试大量siRNAs的需要;长dsRNAs将允许静默资料库(silencing libraries)具有较少复杂性,相较于siRNA所必需的复杂性;也许最重要的是,当作为疗法使用时,长双链RNA可以避免病毒逃逸突变(viral escape mutations)。

[0111] 各种研究表明,使用长dsRNA可以静默基因表达而不诱导压力反应或不引起显著的非目标效应(off-target effects),见如[Strat et al.,Nucleic Acids Research,2006,Vol.34,No.13 3803-3810;Bhargava A et al.Brain Res.Protoc.2004;13:115-125;Diallo M.,et al.,Oligonucleotides.2003;13:381-392;Paddison P.J.,et al.,Proc.Natl Acad.Sci.USA.2002;99:1443-1448;Tran N.,et al.,FEBS Lett.2004;573:127-134]。

[0112] 具体而言,本发明也设想将长dsRNA(超过30个碱基的转录片段(transcripts))引入于细胞中以用于使基因静默,所述细胞中干扰素途径未被激活(例如在胚胎细胞和卵母细胞),例如参见Billy等人所公开的美国国家科学院院刊(PNAS 98:14428-14433(2001));和Diallo等人所公开的寡核苷酸(Oligonucleotides 13:381-392(2003).doi:10.1089/154545703322617069)。

[0113] 本发明亦设想引入长dsRNA,其设计为不会诱导干扰素和PKR路径,以负调控基因表达。例如,Shinagwa及Ishii (Genes&Dev.17(11):1340-1345,2003)已经开发出一种载体(vector),命名为pDECAP,以RNA聚合酶II(RNA polymerase II,Pol II)启动子表达长的双股RNA。因为源自于pDECAP的转录片段(transcripts)缺少5'-帽(5'-cap)结构及3'-聚(A)尾部(3'-poly(A)tail),以便dsRNA输出到细胞质中,而源自于pDECAP的长双链RNA并不会不诱导干扰素反应。

[0114] 在哺乳动物系统中回避干扰素和PKR通路的另一种方法是通过引入小抑制RNA(small inhibitory RNAs,siRNA)或者通过转染(transfection)或内源表达(endogenous expression)。

[0115] 术语“siRNA”是指小抑制性RNA双链体(small inhibitory RNA duplexes,通常为18-30个碱基对),诱导RNA干扰(RNAi)途径。通常情况下,siRNA是化学合成为21聚体(21mers)以及中央19碱基对的双链区域和在末端(termini)对称的2碱基的3'突出端(overhang),然而最近已描述25-30碱基长度的化学合成RNA双链体可具有高达增加100倍的效力,当与21单位(21mers)在相同位置相比。使用更长的RNA触发RNAi,以获得观察到的增加效力,理论上是因为提供切丁酶(dicer)基质(substrate)(27聚体)而非产物(21聚体),这样提高siRNA双链进入RISC的速度或效率。

[0116] 已经发现3'突出端(overhang)的位置影响siRNA的效力,并且具有3'突出端(overhang)于反义股的不对称的双链通常比突出端(overhang)于有义股的更有效力(Rose

等人,2005年)。这可以归因于装载到RISC的不对称股,当以反义转录片段(transcript)作为目标时,观察到相反的效力形式。

[0117] 可以理解的是,siRNA可通过选择两者蛋白质所共有的序列被设计成抑制一个以上的CKI(例如可同时抑制CKI- δ 和CKI- ϵ)。一个例示性的可负调节CKI- α 的siRNA如SEQ ID NO:1及2。一个例示性的可负调节CKI- δ 的siRNA如SEQ ID NO:6(5'-GAAACAUGGUGUCCGGUUUTT-3)。一个例示性的可负调节CKI- ϵ 的siRNA如SEQ ID NO:5。一个例示性的可同时负调节CKI- δ 和CKI- ϵ 的siRNA如SEQ ID NO:3和4。

[0118] 用于本发明所述CKI的RNA静默剂也可由商业上取得,例如从Applied Biosystems公司。

[0119] 双股干扰RNA(例如,siRNA)的双股可以被连接以形成发夹(hairpin)或茎环结构(stem-loop structure,例如shRNA)。因此,如上所述,本发明的所述RNA静默剂也可以是一短发夹RNA(short hairpin RNA,shRNA)。

[0120] 此处所使用的术语“shRNA的”,是指具有茎-环结构(stem-loop structure)的一RNA,包括互补序列的第一和第二区域,这些区域的互补性(complementarity)和取向(orientation)的程度的足以使得在发生区域之间产生碱基配对,第一和第二区域通过环状区域连接,所述环体(loop)是由于所述环状区域中核苷酸(或核苷酸类似物)之间缺乏碱基配对所导致。在环体的核苷酸数目是包括3到23,或5至15或7至13,或4至9,或9至11之间的一数字。在环体中一些核苷酸可与环体中的其他核苷酸的碱基对相互作用有关。可用于形成环体的寡核苷酸序列的实例包括5'-UUCAAGAGA-3' [Brummelkamp,T.R.et al. (2002) Science 296:550]和5'-UUUGUGUAG-3' [Castanotto,D.et al. (2002) RNA 8:1454]。所得到的单链寡核苷酸形成茎环或发夹结构,其包含能够与RNAi机制相互作用的双链区域,这可被本领域中的技术人员识别。

[0121] 根据另一实施例,所述RNA静默剂可以是一微小RNA(miRNAs)。

[0122] miRNAs是小的RNA,其由不同尺寸的基因编码初级转录片段(primary transcripts)所形成。他们在动物及植物两者之中已经被定义出来。所述初级转录片段(称为“pri-miRNA”)是经过不同核酸切割步骤处理成一较短的miRNA前驱物或“pre-miRNA”。所述pre-miRNA以一折叠形式存在,因此最终(成熟)miRNA是以双链形式存在,其两股被称为所述miRNA(所述股,将最终会与标的物形成碱基对)。所述pre-miRNA是切丁酶形态的一种底材,其自所述前驱物移除了所述miRNA的双链形式,然后,相似于siRNAs,所述双链可被放进所述RISC络合物。已经证实的是,miRNAs可以被转基因表达,且通过一前驱物的表达是有效的,而非通过整个初级形式(Parizotto et al. (2004) Genes&Development 18:2237-2242and Guo et al. (2005) Plant Cell17:1376-1386)。

[0123] 不同的是,siRNAs、miRNAs键结到转录片段序列仅具有部份互补性(Zeng et al., 2002,Molec.Cell 9:1327-1333),且抑制了不影响稳态RNA水平的转译(Lee et al.,1993, Cell 75:843-854;Wightman et al.,1993,Cell75:855-862)。miRNAs和siRNAs两者都由切丁酶处理,且与所述RNA诱导静默络合物的组成相关(Hutvagner et al.,2001,Science 293:834-838;Grishok et al.,2001,Cell 106:23-34;Ketjing et al.,2001,Genes Dev.15:2654-2659;Williams et al.,2002,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99:6889-6894;Hammond et al.,2001,Science 293:1146-1150;Mourlatos et al.,2002,Genes Dev.16:

720-728)。一个最近的报导 (Hutvagner et al., 2002, Scienceexpress 297:2056-2060) 推测, 经所述miRNA途径与所述siRNA途径的基因调节是各自与标的转录片段的互补性的程度所决定。猜测siRNAs仅部份标识所述mRNA标的将作用于转译表达, 类似于miRNA, 而不是触发RNA降解。

[0124] 适用于本发明的RNA静默剂的合成可如下实施。首先, 在AUG起始密码子下游扫描CKI mRNA序列的AA二核苷酸序列。每个AA的发生点以及与3' 相邻的19个核苷酸被记录为潜在的siRNA目标位点。优选地, siRNA目标位点选自于开放阅读框 (open reading frame), 因为非转译区 (untranslated regions, UTRs) 具有较丰富的调节蛋白结合位点 (regulatory protein binding sites)。UTR结合蛋白及/或转译起始络合物可能干扰siRNA内切酶络合物 (siRNA endonuclease complex) 的结合 [Tuschl所著, ChemBiochem. 2: 239-245 (2001)]。但可以理解的是, 引导至非翻译区的siRNA也可能是有效的, 这已由GAPDH所证明, 其中引导至5' 端非编码区的siRNA调节降低约90%的细胞GAPDH mRNA, 并完全消除蛋白质水平 (www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html)。

[0125] 第二, 将有潜力的目标位点与适当的基因组资料库 (例如, 人, 小鼠, 大鼠等) 比较, 使用任何序列比对软件, 例如可用从NCBI服务器的BLAST软件 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)。过滤掉与其他编码序列表现出显着同源性的假定目标位点。

[0126] 合格的目标序列被选择作为siRNA合成模板。优选的是那些包括低G/C含量的序列, 因为相对于G/C含量高于55%的序列, 这些序列已经被证明更有效地调节基因静默。优选地沿着目标基因的长度选择几个目标位点进行评估。为了达到所选择的siRNA的更佳评估, 优选地一起使用阴性控制组。阴性控制组siRNA优选地包括与所述siRNA相同的核苷酸组成, 但在基因组中缺乏显着同源性。因此, 优选使用一打散的 (scrambled) siRNA核苷酸序列, 其对其他任何基因不显示任何显着同源性。

[0127] 应该理解的是, 本发明的RNA静默剂不必限于那些只包含RNA的分子, 还包括化学修饰的核苷酸和非核苷酸。

[0128] 在一些实施例中, 此处提供的所述RNA静默剂可以是功能上与细胞穿透肽 (cell-penetrating peptide) 相关联。此处所使用的“细胞穿透肽”是一种肽, 其包括一短 (约12-30个残基 (residue)) 氨基酸序列或功能性基序 (functional motif), 其赋予与能量无关 (即非胞吞 (non-endocytotic)) 的转运 (translocation) 特性, 此特性与穿过细胞膜和/或核膜的膜可透络合物 (membrane-permeable complex) 的运输 (transport) 相关联。本发明使用于所述膜可透络合物 (membrane-permeable complex) 的所述细胞穿透肽 (cell-penetrating peptide) 优选地包含至少一非功能性的半胱氨酸残基 (cysteine residue), 其可以是游离的或衍生化的 (derivatized), 与双股核糖核酸形成双硫链接 (disulfide link), 所述双股核糖核酸被修饰以用于这种链接。赋予这类特性的代表性氨基酸基序都列在美国专利第6,348,185号, 其内容明确地通过引用并入本文。本发明的所述细胞穿透肽优选包括, 但不限于, 穿膜蛋白 (penetratin)、运输蛋白 (transportan)、pIsl、TAT (48-60)、pVEC、MTS以及MAP。

[0129] 本发明可负调节CKI的另一试剂是一脱氧核酶 (DNAzyme) 分子, 其可以特定切割一mRNA转录片段或所述CKI- α 、 δ 或 ϵ 的一DNA序列。脱氧核酶是单股多核苷酸 (single-stranded polynucleotides), 其可切割单股及双股标的序列 (Breaker, R.R. and Joyce,

G.F. (1995). A DNA enzyme with Mg^{2+} -dependent RNA phosphoesterase activity. *Curr Biol* 2, 655-660; Santoro, S.W. and Joyce, G.F. (1997). A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4262-4266)。所述脱氧核酶的一个普通模型 ("10-23" 模型) 已经被提出。"10-23" 脱氧核酶具有 15 个脱氧核糖核苷酸组成的一催化结构域, 两侧由两个基底识别域 (substrate-recognition domains) 所取代, 每个所述基底识别域各自具有 7 至 9 个脱氧核糖核苷酸。此类型的脱氧核酶可于嘌呤:嘧啶接点 (purine:pyrimidine junctions) 处有效切割其基底 RNA (Santoro and Joyce (1997)); 为回顾脱氧核酶, 见 Khachigian, L.M. (2002) (DNAzymes: cutting a path to a new class of therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 4, 119-121)。

[0130] 建构与放大合成、制造脱氧核酶识别单股及双股标的切割位点的例子被公开在 Joyce 等人的美国专利第 6,326,174 号。针对人类尿激酶受体 (Urokinase receptor) 相似设计的脱氧核酶近来已经被观察到可抑制尿激酶受体的表达, 且成功抑制结肠癌症细胞在体内的癌转移 (metastasis) (Itoh, T. et al., Abstract 409, American Society of Gene Therapy 5th Annual Meeting (www.asgt.org), June 5-9, 2002, Boston, Mass. USA.)。在另一应用中, 与 bcr-abl 致癌基因 (oncogene) 互补的脱氧核酶在抑制白血病细胞中所述致癌基因的表达是成功的, 且在自体骨髓移植中成功降低慢性骨髓性白血病 (CML) 及急性淋巴细胞白血病 (ALL) 的复发率。

[0131] 本发明 CKI 的负调节也可以通过使用特定与一 mRNA 转录片段杂交的反义多核苷酸被实现, 所述 mRNA 转录片段编码所述 CKI。

[0132] 设计反义分子, 其可用以有效率地负调节 CKI, 必须被实现, 同时考虑对反义进程重要的两方面。第一方面是, 运送寡核苷酸到适当细胞的细胞质里面, 同时第二方面是, 设计一寡核苷酸, 其以抑制转译的方式在细胞中特定键结指定的所述 mRNA。

[0133] 先前技术教导了多种运输策略, 可被用于有效率地运输寡核苷酸进入广泛且多样的细胞类型 (见, 例如: Luft, F.C. (1998). Making sense out of antisense oligodeoxynucleotide delivery: getting there is half the fun. *J Mol Med* 76 (2), 75-76 (1998); Kronenwett et al. (1998). Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset. *Blood* 91, 852-862; Rajur, S.B. et al. (1997). Covalent protein-oligonucleotide conjugates for efficient delivery of antisense molecules. *Bioconjug Chem* 8, 935-940; Lavigne et al. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 566-71 (1997); and Aoki, M. et al. (1997). In vivo transfer efficiency of antisense oligonucleotides into the myocardium using HVJ-liposome method. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 540-545)。

[0134] 此外, 也可以使用是基于热力循环来辨识那些对它们的目标 mRNA 具有最高预测键结亲和力的序列的算法, 所述热力学循环与所述标的 mRNA 及所述寡核苷酸的结构改变的能量学有关 (见如, Walton, S.P. et al. (1999). Prediction of antisense oligonucleotide binding affinity to a structured RNA target. *Biotechnol Bioeng* 65, 1-9)。

[0135] 此算法已经成功用于细胞中实施一反义途径。例如, 由 Walton 等人发展的所述算

法使科学家可以成功设计兔 β 球蛋白 (rabbit beta-globin, RBG) 的反义寡核苷酸, 以及老鼠肿瘤坏死因子 α (mouse tumor necrosis factor- α , TNF- α) 转录片段。相同的研究团队在更近期报导了合理选择的寡核苷酸的所述反义活性对抗三个模型的标的 mRNA (人类乳酸脱氢酶 A 及 B, 以及大鼠 gp130) 在细胞群中通过一动力 PCR 技术 (kinetic PCR technique) 评估来证明在几乎所有案例中都是有效的, 包括使用磷酸二酯 (phosphodiester) 和硫代磷酸酯 (phosphorothioate) 寡核苷酸化学对三个不同目标物在两个细胞类型中的测试。

[0136] 此外, 使用一体外系统来设计及预测特定寡核苷酸的效率的多个方法也已经被公开 (Matveeva, O. et al. (1998). Prediction of antisense oligonucleotide efficacy by in vitro methods. *Nature Biotechnology* 16, 1374-1375)。

[0137] 多个临床试验已经证明反义寡核苷酸的安全、可行性以及活性。例如, 适合于癌症的治疗的反义寡核苷酸已经成功被利用 (Holmund, B. P. et al. (1999). Toward antisense oligonucleotide therapy for cancer: ISIS compounds in clinical development. *Curr Opin Mol Ther* 1, 372-385), while treatment of hematological malignancies via antisense oligonucleotides targeting c-myc gene, p53, and Bcl-2 entered clinical trials and was shown to be tolerated by patients (Gewirtz, A. M. (1999). Oligonucleotide therapeutics: clothing the emperor. *Curr Opin Mol Ther* 1, 297-306)。

[0138] 更近期的, 人类肝素酶基因的表达的介导的抑制已经被报导在一小鼠模型中抑制人类癌症细胞的胸膜传播 (pleural dissemination) (Uno, F. et al. (2001). Antisense-mediated suppression of human heparanase gene expression inhibits pleural dissemination of human cancer cells. *癌症 Res* 61, 7855-7860)。

[0139] 因此, 目前的共识是, 最近在反义技术领域的发展, 如上所述, 已经引领高精度的反义设计算法的产生, 以及一广泛多样的寡核苷酸运输系统, 使得本领域的技术人员可以设计及实施反义方法, 适合于负调节已知序列的表达, 而不必诉诸过度的尝试及错误实验。

[0140] 可以负调节一 CKI 的另一试剂是一核酶 (ribozyme) 分子, 其可以特定切割所述特定 CKI 编码的 mRNA 转录片段。核酶日益增加的被使用于基因表达的序列特异性抑制上, 通过切割有兴趣的 mRNA 编码蛋白质 (Welch, P. J. et al. (1998). Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA levels. *Curr Opin Biotechnol* 9, 486-496)。设计核酶来切割任何特定目标 RNA 的可能性已经使他们同时在基础研究与疗法应用方面成为有价值的工具。在疗法领域中, 核酶已经被用于靶向在感染性疾病中的病毒 RNA, 在癌症中的优势致癌基因, 以及遗传性疾病中的特定体细胞突变 (Welch, P. J. et al. (1998). Ribozyme gene therapy for hepatitis C virus infection. *Clin Diagn Virol* 10, 163-171)。最显著的是, HIV 患者的多个核酶基因治疗方案已经在第一阶段试验中。最近, 核酶已经被使用于转基因动物研究、基因目标验证, 以及途径分析。多个核酶还在不同临床测试的阶段。ANGIOZYME™ 是第一个化学合成的核酶, 在人类临床试验中被研究。ANGIOZYME 特定抑制血管内皮生长因子受体 (Vascular Endothelial Growth Factor receptor, VEGFR) 的形成, 它是血管生成途径的一个关键组份。核酶制药公司 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.), 及其他公司, 已经在动物模型中证明了抗血管生成治疗剂的重要性。HEPTAZYME™, 设计用来选择性破坏丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) RNA 的一个

核酶,被发现在细胞培养试验中降低HCV RNA是有效的(Ribozyme Pharmaceuticals,Inc., Boulder,Colorado,USA(www.rpi.com))。

[0141] 调节细胞中CKI基因的一个额外方法是通过三股形成能力的寡核苷酸链(triplex-forming oligonucleotides,TFOs)。最近研究显示,TFOs可被设计成辨识且一序列特定方法键结到双股螺旋的DNA中聚嘌呤或多聚嘧啶区间以一序列特定方法。这些辨识规则概述于:Maher III,L.J.等人(1989).Inhibition of DNA binding proteins by oligonucleotide-directed triple helix formation.Science 245,725-730;Moser,H.E.等人(1987).Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation.Science 238,645-650;Beal,P.A.与Dervan,P.B.(1991).Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation.Science 251,1360-1363;Cooney,M.等人(1988).Science 241,456-459;以及Hogan,M.E.等人的欧洲公开号EP375408。寡核苷酸的修饰,如嵌入剂以及骨干取代的导入,以及键结条件的优化(例如,pH及阳离子浓度)已经帮助克服TFO活性所固有的障碍,例如电荷排斥作用以及不稳定性,且近来显示,合成的寡核苷酸可被靶向特定序列(一最近的回顾,见Seidman,M.M.and Glazer,P.M.(2003).The potential for gene repair via triple helix formation J Clin Invest 112,487-494)。

[0142] 一般来说,所述三股形成能力的寡核苷酸链具有序列对应:

[0143] 寡 3'—A G G T

[0144] 双股 5'—A G C T

[0145] 双股 3'—T C G A

[0146] 然而,其已经显示的是,所述A-AT和G-GC三联体具有最大的三螺旋稳定性(Reither,S.and Jeltsch,A.(2002).Specificity of DNA triple helix formation analyzed by a FRET assay.BMC Biochem 3(1),27,Epub)。相同的作者已经证明了,根据A-AT和G-GC规则所设计的TFOs并不形成非特定性的三联体,代表了三联体形态确实是序列特定性的。

[0147] 因此,一三股形成能力的序列可以依据任何在所述CKI调节区间中所给定的序列而被设计出来。三股形成能力的寡核苷酸链优选是至少15个,更优选为25个,仍然更优选为30个,或更多的核苷酸长度,至多50或100碱基对(bp)。

[0148] 以TFOs(例如阳离子脂质体)的细胞转染以及与目标DNA的三螺旋结构的形诱导立体与功能电荷、阻断转录起始及生长,允许内源性DNA中所欲序列改变的导入,以及造成基因表达的特定负调节。以TFOs处理的细胞基因表达的抑制实例包括:在哺乳动物细胞中敲出游离supFG1(episomal supFG1)及内源性HPRT基因(Vasquez,K.M.et al.(1999).Chromosomal mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mammalian cells.Nucl Acids Res 27,1176-1181;以及Puri,N.et al.(2001).Targeted Gene Knockout by 2'-O-Aminoethyl Modified Triplex Forming Oligonucleotides.J Biol Chem276,28991-28998);所述序列及目标特定的负调节Ets2转录因子的表达,在前列腺癌发病原因中是重要的(Carbone,G.M.et al.,Selective inhibition of transcription of the Ets2gene in prostate cancer cells by a triplex-forming oligonucleotide.Nucl Acids Res 31,833-843);以及调节促炎(pro-inflammatory)

ICAM-1基因 (Besch, R. et al. (2003). Specific inhibition of ICAM-1 expression mediated by gene targeting with Triplex-forming oligonucleotides. J Biol Chem 277, 32473-32479)。此外, Vuyisich和Beal最近已经展示序列特定的TFOs可键结到dsRNA, 抑制dsRNA-依赖的酶活性, 如RNA-依赖的激酶 (Vuyisich, M. and Beal, P.A. (2000). Regulation of the RNA-dependent protein kinase by triple helix formation. Nucl Acids Res 28, 2369-2374)。

[0149] 此外, 根据上述原理设计的TFOs可诱导影响DNA修复的定向诱变 (directed mutagenesis), 因此提供同时负调节与正调节内源性基因的表达 (Seidman and Glazer (2003))。有效TFOs的设计、合成及施用的详细描述可见于Froehler等人的美国专利申请号第03/017068及03/0096980号, 以及Emanuele等人的美国专利申请号第02/0128218和02/0123476号, 以及Lawn的美国专利第5,721,138号。

[0150] 微小RNAs (MicroRNAs) 利用本领域的方针可被设计出来。这些分子的设计的算法也是有用的。见如www.wmddotweigeltorg/cgi-bin/mirnatoolsdotpl网页所示, 此处一并列入参考。

[0151] 本发明可负调节所述CKI的另一试剂是键结及/或切割所述CKI的任何分子。这些分子可以例如是CKI拮抗剂或一CKI抑制肽。

[0152] 可理解的是, CKI的至少一个催化或连接部位的一个非功能性的类似物也可以作为负调节CKI的一个试剂。

[0153] 小的化学CKI抑制剂也被本发明所考虑。这些化学试剂对于一特别CKI可具有选择性的抑制活性, 或可包含对于二或多个CKI的抑制活性。与对于CKI- α 的抑制活性相比, 此抑制剂对于CKI- δ 及 ϵ 可具有大于至少2倍、至少5倍或甚至10倍的抑制活性。例如, IC261 (可自Santa Cruz technology公司取得) 是所述CKI- δ 及CKI- ϵ 的一特定抑制剂。

[0154] 根据一特殊实施例, 所述小的化学CKI抑制剂对CKI- δ 有选择性。与对于CKI- α 及/或CKI- ϵ 的抑制活性相比, 此抑制剂对CKI- δ 可具有大于至少2倍、至少5倍或甚至10倍的抑制活性。

[0155] 根据另一实施例, 所述小的化学CKI抑制剂对CKI- ϵ 有选择性。与对于CKI- α 及/或CKI- δ 的抑制活性相比, 此抑制剂对CKI- ϵ 可具有大于至少2倍、至少5倍或甚至10倍的抑制活性。

[0156] 根据另一实施例, 与对于CKI- δ 及/或CKI- ϵ 的抑制活性相比, 所述小分子化学试剂 (即, 不是一多核苷酸试剂) 对CKI- α 可具有大于至少2倍、至少5倍或甚至10倍的抑制活性。根据一实施例, 所述小分子试剂在正调节p53上至少和CKI δ 及CKI ϵ 的抑制剂一样有效。优选地, 所述小分子试剂在正调节p53上的有效性至少两倍于CKI δ 及CKI ϵ 的抑制剂。

[0157] 根据一特殊实施例, 所述试剂不是CKI7、D4476或IC261, 由于这些试剂没有一个能稳定 β 连环蛋白及p53, 也不会诱导一DNA损坏反应。

[0158] 设想的小分子试剂包括PF670462 (CAS编号: 950912-80-8) 或PF4800567 (CAS编号: 1188296-52-7)。

[0159] 根据本发明可使用以负调节CKI的另一试剂是预防CKI激活或基材键结的分子。

[0160] 其他可被使用以调节CKI- α 、 δ 或 ϵ 的试剂可使用本领域已知的筛选方法被发现或精制 (以改善选择性、特定性)。这些试验的例子包括生化试验 (例如, 体外激酶活性)、细胞

生物学分析(例如蛋白质定位)以及分子检测(例如,Northern、Western及Southern印迹)。

[0161] 下面是不同检测的描述,可被使用于筛选小分子化学试剂,具有负调节本发明CKI的其中之一的能力。

[0162] 酶抑制测定:

[0163] 1.以一小分子抑制剂(SMI)培养重组的CKI ϵ 酶10分钟;加入一基材,人类Per2,并通过SDS-PAGE上的蛋白质上移(protein upshift)观察Ser662的磷酸化(Toh et al, Science 291:1040,2001)。

[0164] 2.以一小分子抑制剂(SMI)培养重组的CKI δ 酶10分钟;加入一基材,小鼠p53,并通过Western印迹,利用诺瓦斯兔抗P53(Novus Rabbit Anti-p53),磷酸(Thr18)多克隆抗体(NB100-92607),观察Thr182的磷酸化。

[0165] 3.以一SMI培养人类肿瘤细胞1-24小时;获取细胞并分析他们的 β -连环蛋白在Ser45上的磷酸化,使用英杰公司兔抗 β 连环蛋白(Invitrogen Rabbit Anti- β -Catenin),磷酸(Ser45)多克隆抗体(44-208G)(CKI α 的一独特属性)。生物学分析:

[0166] 1.以一SMI培养人类肿瘤细胞1-24小时;获取细胞并分析他们的DDR及p53激活,利用抗体对 γ H2A.X及p53,通过免疫组织化学法或Western印迹。

[0167] 2.以一SMI培养人类原发肿瘤细胞和与肿瘤相关的成纤维细胞(tumor-associated fibroblasts)24小时;移去所述SMI并更换培养基;分析细胞的细胞老化现象,通过衰老相关 β 半乳糖苷酶测定法(Senescence-Associated β -galactosidase assay,SA- β -Gal)。

[0168] 候选试剂可包含,小分子化学抑制剂、抗体或多种多核苷酸试剂,如在本文上面所描述的那些。接着使用上列筛选方法识别,所述试剂可作为癌症细胞的一候选抗癌试剂被测试,或作为一消耗造血干细胞的候选。确认试剂活性可在合成并制备大量试剂于一药物组合物之后,所述药物组合物包含包含本文下面详述相同的试剂。

[0169] 如所述,本发明的所述抑制剂也可以作为血液消融试剂(hemato-ablation agent)用于消耗骨髓细胞于一细胞移植步骤之前。所述血液消融可以和化疗及/或辐照共同实施,或不使用化疗及/或辐照单独实施。

[0170] 因此,根据本发明的另一观点,提供一种将细胞移植至有需求的受试者体内的方法,包含:

[0171] (a)通过使取自一受试者的一血液或骨髓的多個不成熟血细胞与一数量的CKI抑制剂接触,以消耗取自所述受试者的血液或骨髓的所述不成熟血细胞,其中所述CKI抑制剂用以正调节p35的一数量及/或活性,且杀死所述血液或骨髓中的所述不成熟血细胞;以及随后:

[0172] (b)移植多個细胞至所述受试者體內。

[0173] 根据本发明一实施例的此观点,所述受试者患有一疾病,细胞移植对他来说是治疗方法。

[0174] 此疾病包括但不限于一血液学疾病、一心脏疾病、糖尿病、神经退化性疾病、一恶性疾病、一免疫疾病以及一自体免疫疾病。所述疾病可为先天或后天。

[0175] 根据本发明一实施例的此观点,所述疾病是一恶性疾病。根据一特定实施例,所述恶性疾病是造血或淋巴组织的一恶性肿瘤。

[0176] 所述受试者可能患有的疾病包括,但不限于,白血病[例如,急性淋巴的、急性淋巴瘤细胞的、急性淋巴瘤细胞前B细胞(pre-B cell)、急性淋巴瘤细胞T细胞白血病,急性巨核细胞的(megakaryoblastic)、单核细胞的、急性骨髓性、急性髓细胞、具有嗜酸性粒细胞的急性髓细胞、B细胞、嗜碱性粒细胞、慢性髓细胞、慢性B细胞、嗜酸性粒细胞、伴细胞(Friend)、粒细胞(granulocytic)或髓细胞性(myelocytic)、毛发细胞、淋巴细胞、巨核细胞、单核细胞、单核巨噬细胞、粒细胞、髓细胞、粒单核、血浆细胞、前B细胞、前髓细胞、亚急性T细胞、淋巴瘤、倾向髓细胞的恶性肿瘤、急性非淋巴细胞白血病,T细胞急性淋巴细胞性白血病(T-ALL),以及B细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)];淋巴瘤[例如,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,B细胞、弥漫型大B细胞淋巴瘤(DLBCL),B细胞慢性淋巴细胞性白血病/淋巴瘤,伯基特氏淋巴瘤,T细胞、皮肤T细胞、前驱T细胞白血病/淋巴瘤,滤泡性淋巴瘤,外套膜细胞淋巴瘤,MALT淋巴瘤,组织细胞性(histiocytic)、淋巴瘤细胞、胸腺(thymic)及蕈样肉芽肿(Mycosis fungoides)],与一接枝的移植关联的病症(例如移植排斥反应,慢性移植排斥反应,亚急性移植排斥反应,超急性移植排斥反应,急性移植排斥反应,以及移植抗宿主症(graft versus host disease));自体免疫疾病如1型糖尿病(Type 1 diabetes);重症联合免疫缺陷综合征(severe combined immunodeficiency syndromes, SCID),包括腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)、骨硬化病(osteopetrosis)、再生障碍性贫血(aplastic anemia)、戈谢氏病(Gaucher's disease)、地中海贫血(thalassemia)以及其他先天性或遗传决定的造血异常。

[0177] 被消耗的所述不成熟血细胞,根据本发明的此观点,包括造血干细胞(HSCs)、造血祖细胞(progenitor cell)以及癌症干细胞。所述不成熟血细胞可以存在于骨髓及/或循环系统血中。

[0178] 术语“造血干细胞”指多能干细胞,引起一生物体的全部血细胞类型,包括髓细胞(例如单核细胞及巨噬细胞、中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞、巨核细胞/血小板、树突状细胞),以及淋巴系(例如,T细胞、B细胞、NK细胞)。当被移植到致死剂量辐照的动物或人体,造血干细胞可以重新填入红细胞、中性粒细胞-巨噬细胞、巨核细胞及淋巴造血细胞池中。

[0179] 此处所使用的术语“造血干及祖细胞”或“HSPC”是指一细胞由抗原标记物CD34的出现,及缺乏谱系(lin)标记物来识别。HSPCs因此特征如CD34⁺/Lin(-)细胞,及这些细胞群。已认识到,所述细胞群包括CD34⁺及Lin(-)细胞也包括造血祖细胞,因此对于此应用的目的来说,术语“HSPC”包括造血祖细胞。

[0180] 此处所使用的术语“消耗”指消减至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%的骨髓干细胞。

[0181] 因此,所述CKI抑制剂可以一清髓性(myeloablative)或一降髓性(myeloreductive)剂量被提供。

[0182] 此处所使用的“清髓性”是指一治疗中,如若不给予造血干细胞移植,将发生一显著数量的接受者由于骨髓衰竭而死亡。

[0183] 此处所使用的“非清髓性”是指一治疗,其杀害骨髓细胞,但将不会使一显著数量的接受者因骨髓衰竭而导致死亡。

[0184] 此处所使用的“降髓性”是指一治疗造成血细胞减少或贫血。

[0185] 可以理解的是,当所述CKI抑制剂以一降髓性剂量提供,其他试剂可用以带来一个完整的骨髓消融。此试剂包括例如肿瘤细胞减灭剂,其选自于一或多个的:烷化剂,例如氮芥类(nitrogen mustards) [如mechlorethamine]、环磷酰胺(cyclophosphamide)、美法仑(melphalan)以及苯丁酸氮芥(chlorambucil);烷基磺酸盐,例如白消安(busulphan);亚硝基脲类(nitrosoureas),例如卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、司莫司汀(semustine)以及链脲霉素(streptozocine);三嗪类(triazenes),例如达卡巴嗪(dacarbazine);抗代谢药物,例如叶酸类似物如氨甲喋呤(methotrexate);嘧啶类似物,例如氟尿嘧啶(flourouracil)以及阿糖胞苷(cytarabine);嘌呤类似物,例如氟达拉滨(fludarabine)、伊达比星(idarubicin)、阿拉伯糖胞苷(cytosine arabinoside)、巯基嘌呤(mercaptopurine)以及硫鸟嘌呤(thioguanine);长春花生物碱类(vinca alkaloids),例如长春花碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)以及范地辛(vendesine);表鬼臼毒素(epipodophyllotoxins),例如依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide);抗生素,例如放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、博莱霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicamycin)以及丝裂霉素(mitomycin);二溴甘露醇(dibromomannitol);脱氧精胍菌素(deoxyspergualine);二甲基马利兰(dimethyl myleran)以及噻替哌(thiotepa)。

[0186] 其他降髓性非清髓性试剂为烷化剂,例如环磷酰胺,或氟达拉滨或相似物质,然而,造血空间创造抗体或药物,例如细胞增殖抑制剂,例如DSG,或一抗代谢产物,例如布喹那(brequinar),或一抗T细胞抗体,例如一抗CD4或抗CD8抗体中的一或二者可被使用作为一降髓性非清髓性试剂。X辐射,以及X辐射和药物施用的结合也是被考虑的。在一些实施例中,骨髓消融是通过已知是杀害转移性骨细胞的放射性同位素的给予而制造,例如,放射性元素镱、钐¹³⁵(¹³⁵Samarium)或钬¹⁶⁶(¹⁶⁶Holmium) (Applebaum et al.,1992,Blood 80:1608-1613)。

[0187] 所述CKI抑制剂一般以可增加p53的数量及/或活性的一数量来提供。

[0188] 所述CKI抑制剂与所述骨髓细胞的接触是在体内或体外实现,例如分离性输血期间。

[0189] 如此,根据本发明的另一观点,提供一种消耗取自一受试者的一血液或骨髓的不成熟血细胞的方法,其包含:在体外使多个干细胞与一数量的CKI抑制剂接触,其中所述CKI抑制剂用以正调节P35的一数量及/或活性,且杀死所述血液或骨髓中的所述不成熟血细胞,从而消耗取自所述血液或骨髓的所述不成熟血细胞。

[0190] 根据本发明的这些观点可被使用的CKI抑制剂描述于本文上面。

[0191] 被移植的所述细胞可以是被分离的细胞(也参照为一细胞植入物(cell graft))或可以被包含在一组织内(也参照为一组织植入物(tissue graft))。

[0192] 此处所使用的字串“细胞或组织植入物”是指一身体细胞(例如一单一细胞或一群细胞)或组织(例如固态组织或软组织,可被完整或部份移植)。根据本发明教导可被移植的组织,包含但不限于,例如淋巴/造血组织(例如淋巴结、淋巴集结胸腺(Peyer's patches thymus)或骨髓)。根据本发明教导可被移植的细胞,包含但不限于,例如造血干细胞(例如不成熟造血细胞)。根据一特定实施例,本发明的所述造血干细胞是CD34+。

[0193] 可以理解的是,被移植到骨髓干细胞消耗的受试者体内的细胞类型依赖于治疗的

疾病。

[0194] 因此,举例来说,当所述受试者有肾脏或心脏衰竭,所述移植细胞可包含肾或心脏细胞。当所述受试者患有肝或肺衰竭或皮肤损害(例如烧伤),所述植入物可包含肝,肺或皮肤组织。当所述受试者有糖尿病,所述细胞包括 β 细胞胰腺细胞(pancreatic cells)。当所述受试者有血液疾病,所述细胞可包含不成熟造血细胞。

[0195] 取决于应用,所述方法可以利用一细胞或组织植入物来实施,所述植入物与所述受试者同基因系或不同基因系。

[0196] 此处所使用的术语“同基因系”指一细胞或组织,其衍生自一个体,实质上与所述受试者的基因一致。一般来说,实质上完全自交的哺乳动物、哺乳动物的克隆或同卵双胞胎哺乳动物都属于同基因系。

[0197] 同基因系细胞或组织的例子包括,自所述受试者衍生的细胞或组织(本领域也指“自体”),所述受试者的一克隆,或所述受试者的一同卵双胞胎。

[0198] 此处所使用的“不同基因系”指自一个体衍生的细胞或组织,所述个体与所述受试者的淋巴细胞同种异体(allogeneic)或异种(xenogeneic)(本领域也指“非自体”)。

[0199] 此处所使用的术语“同种异体”指自一捐赠者衍生的一细胞或组织,所述捐赠者与所述受试者相同物种,但基本上与所述受试者是非克隆(non-clonal)。一般而言,相同物种的远系杂交,非同卵(non-zygotic)双胞胎哺乳动物是彼此同种异体的。可以理解的是,一同种异体的捐赠者可以与所述受试者HLA一致或非一致。

[0200] 此处所使用的术语“异种”是指一细胞或组织,基本上表达一不同物种抗原关于所述受试者的大量比例的淋巴细胞的物种。一般而言,不同物种的远系杂交的哺乳动物是彼此为异种。

[0201] 本发明设想,异种细胞或组织是从各种各样的物种衍生,例如但不限于,牛科动物(例如,牛)、马科动物(例如,马)、猪类(例如猪)、羊科(ovids,例如,山羊、绵羊)、猫科动物(例如,家猫)、犬类(例如,家犬)、啮齿动物(例如,老鼠,大鼠、兔子、豚鼠、沙鼠、仓鼠)或灵长类动物(例如,黑猩猩、恒河猴、猕猴、狨猴)。

[0202] 异种来源的细胞或组织(例如猪源)优选取自一来源,已知无人畜共患病,例如猪内源性逆转录病毒(porcine endogenous retroviruses)。相似地,人类衍生细胞或组织优选取自基本上无病原体的来源。

[0203] 根据本发明的一实施例,所述受试者与所述捐赠者都是人类。

[0204] 取决于应用及可用的来源,本发明的所述细胞或组织植入物可取自一产前生物体、产后生物体、成人或死体捐赠者。再者,取决于所需应用,所述细胞或组织可以是天然或基因修饰的。这些判断是在本领域的普通技术人员中的一个的能力范围之内。

[0205] 任何本领域已知的方法可被采用,以获得一细胞或组织(例如,为了移植)。

[0206] 根据一特别实施例,被移植的所述细胞包含造血细胞,例如不成熟造血细胞(imature hematopoietic cells)。

[0207] 此处所使用的术语“不成熟造血细胞”指任何类型不完全分化的细胞,其可分化为一或多种的完全分化的造血细胞。不成熟造血细胞包括本技术领域所指不限类型的细胞,如“祖细胞(progenitor cells)”、“前驱细胞(precursor cells)”、“干细胞”、“多能细胞(pluripotent cells)”、“复能细胞(multipotent cells)”等等。

[0208] 优选的所述不成熟造血细胞为造血干细胞。

[0209] 优选地,其中所述不成熟造血细胞是从人类衍生,所述不成熟造血细胞为CD34+细胞,如CD34+CD133+细胞。

[0210] 本发明的植入物类型包含不成熟造血细胞,其包括所有骨髓细胞植入物(耗尽的T细胞或耗尽的非T细胞)、取自骨髓抽取物的不成熟造血细胞植入物、外周血衍生的不成熟造血细胞植入物,以及脐带衍生的不成熟造血细胞植入物。获得这些植入物的方法在下面描述。

[0211] 一植入物,包含人类外周血衍生的造血干细胞可以根据标准方法被取得,如由细胞因子治疗的捐赠者移动CD34+细胞至所述外周血,且获取所述移动的CD34+细胞通过白细胞分离。大量方针在本领域的文献中被提供用于实施从骨髓或血液分离骨髓衍生的干细胞(参照例如:Arai S,Klingemann H G.,2003.Arch Med Res.34:545-53;以及Repka T.and Weisdorf D.,1998.Curr Opin Oncol.10:112-7;Janssen W E.et al.,1994.Cancer Control 1:225-230;Atkinson K.,1999.Curr Top Pathol.92:107-36)。

[0212] 人类脐带血衍生的造血干细胞的一植入物可根据标准方法取得(参照如:Quillen K,Berkman E M.,1996.J.Hematother.5:153-5)。

[0213] 本发明的造血干细胞的一植入物可以衍生自肝组织或卵黄囊。

[0214] 造血干细胞的一必要数量可通过初级造血干细胞的前体(ex-vivo)扩展来提供(回顾Emerson,1996,Blood 87:3082,以及更详细描述于Petzer et al.,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.3:1470;Zundstra et al.,1994,BioTechnology12:909;以及国际专利申请案WO 95 11692)。

[0215] 移植所述细胞或组织植入物到所述受试者体内可利用众多方式实现,取决于多种参数,如,所述细胞或组织类型;所述接受者的疾病类型、阶段或严重性(例如器官衰竭);特定对所述受试者的所述物理或生理参数;及/或所想要的治疗结果。

[0216] 本发明移植细胞或组织植入物可通过移植细胞或组织植入物到任何一个解剖位置,取决于应用。所述细胞或组织植入物可以被移植到一同伦解剖位置(homotopic anatomical location,对于移植正常的解剖位置),或一异位解剖位置(对于移植不正常的解剖位置)。取决于应用,所述细胞或组织植入物可以是有利植入肾包膜下,或植入肾、睾丸脂肪、皮下组织、网膜、门静脉、肝、脾脏、骨骼、心脏腔室、心脏、胸腔、肺、皮肤、胰腺及/或在腹腔内的空间。

[0217] 可以理解的是,本发明所述同基因系或不同基因系造血细胞(例如不成熟造血细胞)可被移植到一受体体内,使用任何本技术领域已知的细胞移植方法,例如但不限于,细胞输注(例如I.V.)或通过一腹膜内途径(intraperitoneal route)。

[0218] 可选择的,当移植本发明的一细胞或组织植入物到有缺陷的器官/细胞的一受试者体内,首先从所述受试者至少部份移除失效的器官/细胞是有利的,因此使植入物有最佳发展,且其结构/功能上与受试者的解剖学/生理学整合。

[0219] 在消耗步骤之前,从所述骨髓移出所述不成熟血细胞到所述血液中也在本发明中被考虑。移动试剂的例子包括影响移动的生长因子或细胞因子,例如细胞集落刺激因子(例如粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony stimulating factor,G-CSF)以及粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophages colony stimulating factor,GM-

CSF))以及干细胞因子SCF。肽群集试剂也在本发明中被设想,包括那些公开于美国专利申请案第2004/0209921号、美国专利第6,946,445号、美国专利第6,875,738号、美国专利申请案第2005/0002939号、国际专利申请案WO 2002/020561、WO 2004/020462以及WO 2004/087068、WO 00/09152、美国专利申请案第2002/0156034号,以及国际专利申请案WO 2004/024178及WO 01/85196。

[0220] 接着根据本发明,移植所述细胞或组织植入物到所述受试者体内,根据标准医疗实践,依照任一种标准技术,监测所述器官/细胞的生长功能性及免疫相容性是适当的。举例来说,所述细胞或组织的结构发展可以使用计算机断层扫描或超声影像被监控当植入不同基因系细胞或骨髓植入物可例如以嵌合体测试被监控[例如基于PCR的步骤,使用短串联重复序列(STR)分析]。

[0221] 本文上面所述CKI抑制剂(或表达载体编码的多核苷酸CKI抑制剂)可被施用于个体本身或作为药物组合物的一部份,其也包括一生理学上可接受的载体。一药物组合物的目的是促进活性成分施用到生物体。

[0222] 此处所使用的一“药物组合物”是指一制剂含有本文所述的一或多个活性成分(例如一CKI- α 抑制剂、CKI- δ 抑制剂及/或一CKI- ϵ 抑制剂)以及其他化学成分,例如生理上适合的载体和赋形剂(excipient)。

[0223] 此处术语“活性成分”是指负责生物效应的试剂(例如,静默分子)。

[0224] 在下文中,所述字串“生理学上可接受的载体”以及“药学可接受的载体”可彼此交换使用参照为一种载体或一种稀释剂,不会造成一生物体的显著刺激,且不会废除所施用的化合物的生物活性及特性。这些字串也涵盖一助剂(adjuvant)。

[0225] 此处术语“赋形剂(excipient)”是指一种加入药物组合物的惰性物质,以更促进活性成分的施用。例如,但不限于,赋形剂包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶(gelatin)、植物油和聚乙二醇。

[0226] 制定及给药技术可见于“Remington's Pharmaceutical Sciences,”(Mack Publishing Co.,Easton,PA,latest edition),一并列入本文参考。

[0227] 适合的给药途径,可例如是,包含口腔(oral)、直肠(rectal)、粘膜(transmucosal),特别是especially鼻(transnasal)、肠(intestinal)或肠外(parenteral)输送,包括肌肉注射(intramuscular)、皮下注射(subcutaneous)以及髓内注射(intramedullary injections)以及鞘内注射(intrathecal)、直接心室内(direct intraventricular)、心内(intracardiac),例如到右或左心室、到公共冠状动脉、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0228] 二者择一,可以一局部而非系统的方式来施用所述药物组合物,例如,通过直接注射所述药物组合物至一病患的一组织区间。

[0229] 术语“组织”是指一生物体的部份,由具有相似构造及/或共同功能的细胞群集所组成。例子包括,但不限于,脑组织,视网膜,皮肤组织,肝组织,胰腺组织,骨,软骨,结缔组织,血组织,肌肉组织,心脏组织脑组织,血管组织,肾组织,肺组织,性腺组织,造血组织。在一例示的实施例,所述组织是一结肠癌症组织。

[0230] 本发明的药物组合物可利用本技术领域已知的工序来制造,例如,以常规混合、溶解、造粒、制锭、研碎、乳化、封装、包埋或冻干工艺。

[0231] 依照本发明所使用的药物组合物因此可以常规方式使用一或多个生理学可接受的载体来配制,所述生理学可接受的载体包含赋形剂与辅剂,促进所述活性成分加工到制剂中,可在药学上使用。恰当的配制是基于所选择的给药途径。

[0232] 用于注射,所述药物组合物的所述活性成分可被配制为一水溶液,优选是在在生理相容的缓冲液中,如汉克溶液(Hank's solution)、林格氏液(Ringer's solution),或生理盐水缓冲液。用于粘膜给药,适合于被渗透的屏障的渗透剂也使用于所述配方中。这些渗透剂一般是本领域已知的。

[0233] 用于口腔给药,所述药物组合物可通过组合所述活性化合物与本领域已知的药学可接受的载体而被容易地配制。这些载体使所述药物组合物可以被配制成片剂(tablets)、丸剂(pills)、糖衣丸(dragees)、胶囊(capsules)、液体、凝胶、糖浆、浆料(slurries)、悬浮液及其他类似物,用于患者口服摄取。口腔使用的药物制剂可以使用一固态赋形剂,任选地研磨所得混合物,且加工颗粒状的所述混合物,如果需要,加入适合的助剂(auxiliaries)后,可获得片剂或糖衣丸心。适当的赋形剂为,特别是,填充剂如糖类,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇(mannitol)、山梨糖醇;纤维素制剂如,举例来说,玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;及/或生理上可接受的聚合物如聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)。如果需要,崩解剂(disintegrating agents)也可以加入,如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂(agar)或海藻酸(alginic acid),或其盐类如海藻酸钠(sodium alginate)。

[0234] 糖衣丸心(Dragee cores)具有合适的涂层。为了此目的,浓缩的糖液可被使用,选择性地包含阿拉伯树胶(gum arabic)、滑石(talc)、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇(polyethylene glycol)、二氧化钛、漆溶液(lacquer solutions)和合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料和颜料可被加入涂层中,以识别或表示不同组合的活性化合物计量。

[0235] 口部可使用的药物组合物,包括由明胶(gelatin)与明胶和增塑剂制成的软、密封的胶囊所组合成的推入配合胶囊(push-fit capsules),所述增塑剂如甘油或山梨糖醇(sorbitol)。所述推入配合胶囊可包含所述活性成分,与填料混合,如乳糖,粘着剂(binders)如淀粉,润滑剂如滑石(talc)或硬脂酸镁(magnesium stearate),以及,可选择的,稳定剂。在软胶囊中,所述活性成分可被溶解或悬浮于合适的液体中,如脂肪油(fatty oils),液体石蜡(liquid paraffin),或液体聚乙二醇(polyethylene glycols)。此外,稳定剂可以被加入。用于口服给药的所有制剂应该是适合于选择的给药途径的剂量。

[0236] 对于口腔(buccal)给药,组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂(lozenges)的形式。

[0237] 用于鼻腔吸入给药,根据本发明使用的所述活性成分从加压包装或喷雾器使用一合适的推进剂以气溶胶喷雾(aerosol spray)的形式呈现且方便携带,所述推进剂例如二氯二氟甲烷(dichlorodifluoromethane)、三氯氟甲烷(trichlorofluoromethane)、二氯四氟乙烷(dichloro-tetrafluoroethane)或二氧化碳。在一加压气溶胶的例子中,所述剂量单位可由提供一阀门以递送一定量来决定。用于一分散剂的,例如明胶(gelatin),胶囊与匣可被制成容置一粉末,混合有所述化合物及一合适的粉末基底,例如乳糖或淀粉。

[0238] 此处所述药物组合物可被定制为肠胃外给药,例如,丸剂推注(bolus injection)

或连续输液。注射配方可以单位剂量形式呈现,例如,在安瓿(ampoules)中或在多剂量容器中具有选择性地,一添加的防腐剂。所述组合物可以是悬浮液、水溶液或乳化液,于油性或水溶液介质中,且可以包含调配剂(formulatory agent),如悬浮剂,稳定剂及/或分散剂。

[0239] 肠胃外给药的药物组合物包括水可溶解型态的所述活性制剂的水溶液。此外,所述活性成分的悬浮液可以被制备成适当油或水为基础的注射悬浮液。适合的亲脂溶剂或介质包括脂肪油如芝麻油,或合成脂肪酸酯如油酸乙酯,甘油三酯或脂质体。水溶液注射悬浮液可以包含物质,其提高所述悬浮液的粘性,如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或右旋糖酐。可选择的,所述悬浮液可包含适合的稳定剂或试剂,其提高所述活性成分的稳定性,可制备高浓缩水溶液。

[0240] 可选择的,所述活性成分可以是粉末状,使用前可与一适当的赋形剂一起组合,所述赋形剂例如,无菌的、无热原水溶液。

[0241] 本发明的所述药物组合物也可以定制为直肠(rectal)组合物,如栓剂或保留灌肠剂(suppositories or retention enemas)使用例如传统栓剂基质,如可可脂(cocoa butter)或其它甘油酯。

[0242] 适合用于本发明上下文的药物组合物包括组合物,其中所述活性成分以一有效数量被包含于其中,以达成所想要的目的。更特别的,一治疗有效量意指一数量的活性成分有效于的预防、缓解或改善一紊乱症状或延长被处理的所述受试者的存活。

[0243] 治疗有效量的确定是本领域技术人员中的能力,特别是根据本文提供的详细公开内容。

[0244] 使用于本发明方法的制剂,所述治疗有效量或计量可从体外及细胞培养分析被初步估算出来。例如,一剂可以被定制于动物模型(例如此处例示的APC模型),以达成一所欲浓度或滴定量(titer)。此资讯可被使用在更精确决定可用于人类的剂量。

[0245] 此处所述活性成分的毒性及疗效可以通过在细胞群或实验动物中的体外标准药理学方法来确定。从这些体外及细胞群测试,以及动物研究中所获得的数据,可以被用于制定使用于人类的一剂量范围。所述剂量取决于采用的剂型以及利用的给药途径而有不同。确切的配方、给药途径以及数量可通过个体医生鉴于患者的病情而做选择。(见如,Fingl, et al., 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1p. 1)。

[0246] 剂量及间隔可以各自调整,以提供活性成分的组织水平是足以诱导或抑制生物学效果(最低有效浓度(minimal effective concentration), MEC)。所述MEC将在每一制剂都不同,但可以从体外数据估量。达成MEC所必需的剂量取决于个体特性和给药途径。检测方法可用于确定血浆浓度。

[0247] 取决于被处理的状况的严重程度和响应,给药剂量可以是单一或多个施药,随着治疗过程持续数天至数周,或直到治愈,或疾病状态的缩减实现。

[0248] 一组合物的给药量,当然,将是依赖于被处理的所述受试者、痛苦的严重性、给药方式、处方医师的判断等。

[0249] 本发明的组合物可以,如果想要的话,以包装或分配装置呈现,例如一FDA批准的套件,其可以容纳含有活性成分的一或多单位剂量形式。所述套件可包含所述抑制剂的组合,如一CKI- α 抑制剂、CKI- δ 抑制剂以及CKI- ϵ 抑制剂。所述包装可以,例如,包含金属或塑胶薄片,如一吸塑包装(blister pack)。所述包装或分配装置可伴随施用说明书。所述包装

或分配装置也可以被关联所述容器的一通知来提供,所述容器以政府机构规定的形式调节制造、使用或販售药物,所述通知反映所述机构核准的所述组合物或人类或兽医给药的形式。此通知,例如,可以是标示通知,由美国食品和药物管理局(U.S.Food and Drug Administration)所批准用于处方药(prescription drugs)或一批准的产品说明书。组合物包含本发明在相容的药物载体中所制定的一制剂,也可被制造、放置于一适当容器,且标示用于处理一适应症,如上面更详细的说明。

[0250] 术语“处理”指抑制、预防或阻止一病理(疾病、紊乱或条件)的发展及/或造成一病理的降低、缓解或消退。那些本领域的技术人员将理解,各种方法及测试可被使用,以评估病理发展,且相同的,各种方法及测试也可被使用来评估病理的降低、缓解或消退。

[0251] 此处所使用的术语“预防”是指保持一疾病、紊乱或条件不会发生在处于所述疾病的风险的受试者,但未被诊断为患有所述及并。

[0252] 此处所使用的术语“受试者”包括哺乳动物,优选任何年龄患病的人类。优选地,此术语包含处于发展患病风险的个体。

[0253] 根据一特殊实施例,所述受试者不伴随使用伊马替尼、达沙替尼或尼罗替尼治疗。

[0254] 可以理解的是,发明的某些特征,为了明确清晰,描述于分开的实施例的上下文中,也可以在一单一实施例中结合提供。反之,本发明的各个特征,为了简短,描述于一单一实施例的上下文中,也可以被分开或以任何适当的子组合,或作为适合用于本发明的任何其他描述的实施例。各个实施例上下文中所述的某些特征不考虑为那些实施例的必要特征,除非实施例没有那些元件是无法操作的。

[0255] 如上文划定的本发明的各种实施例和各方面,以及如下面权利要求所宣告,可以在以下实施例找到实验支持。

[0256] 实施例

[0257] 现在参考以下实施例,其与上面的描述一起示出了一个非限制性的方式来说明本发明的一些实施例。

[0258] 一般来说,本发明此处所用的术语和实验室方法包括分子、生化、微生物以及重组DNA技术。这些技术在文献中充分说明。请参照,例如:“Molecular Cloning:A laboratory Manual”Sambrook et al.,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”Volumes I-III Ausubel,R.M.,ed.(1994);Ausubel et al.,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical Guide to Molecular Cloning”,John Wiley&Sons,New York(1988);Watson et al.,“Recombinant DNA”,Scientific American Books,New York;Birren et al.(eds)“Genome Analysis:A Laboratory Manual Series”,Vols.1-4,Cold Spring Harbor Laboratory Press,New York(1998);阐述于美国专利第4,666,828号、第4,683,202号、第4,801,531号、第5,192,659号以及第5,272,057号的方法;“Cell Biology:ALaboratory Handbook”,Volumes I-III Cellis,J.E.,ed.(1994);“Culture of Animal Cells-A Manual of Basic Technique”by Freshney,Wiley-Liss,N.Y.(1994),Third Edition;“Current Protocols in Immunology”Volumes I-III Coligan J.E.,ed.(1994);Stites et al.(eds),“Basic and Clinical Immunology”(8th Edition),Appleton&Lange,Norwalk,CT(1994);Mishell and Shiigi(eds),“Selected Methods in Cellular Immunology”,

W.H.Freeman and Co., New York (1980); 可用的免疫检测方法广泛描述于专利及科学期刊论文中, 请参照例如美国专利第3,791,932号、第3,839,153号、第3,850,752号、第3,850,578号、第3,853,987号、第3,867,517号、第3,879,262号、第3,901,654号、第3,935,074号、第3,984,533号、第3,996,345号、第4,034,074号、第4,098,876号、第4,879,219号、第5,011,771号以及第5,281,521号; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M.J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1985); "转录and Translation" Hames, B.D., and Higgins S.J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) 以及 "Methods in Enzymology" Vol.1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); 它们全部所阐述的完整内容都并入本文作为参考。其他一般参考文件已在此文件各处提供。其中步骤被认为在本领域中是公知的, 且为了读者的方便性而提供, 其所有涵盖的资讯在此一并列入参考。

[0259] 材料与方法

[0260] 条件的CK1αKO小鼠: C57b1/6小鼠是具有loxP两侧CSNK1A1的小鼠 (Elyada et al., 2011) 与mx1-Cre小鼠 (Kuhn et al., 1995) 进行杂交。七代与C57b1/6小鼠回交以产出一纯基因背景。Mx1-Cre诱导以隔日2mg/mL聚肌胞苷酸钠盐 (Polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt, pIpC (sigma P1530)) 的三个I.P. 注射的10uL/g小鼠实施。植入通过I.V. 注射新鲜分离的 5×10^6 骨髓细胞来实施。

[0261] BCR-ABL-诱导CML模型: 为了产生BCR-ABL-诱导CML模型, 从MxCre⁻Ck1α1^{f1/f1}或MxCre⁺Ck1α1^{f1/f1}取得的BM细胞为了cKit表达细胞 (EasySep#18757) 被提取且丰富, 且于RPMI补充15%FCS L-谷氨酰胺 (L-Glutamine)、Pen/Strep (Beit Haemek公司)、干细胞因子 (SCF)、IL-3、IL-6以及TPO (Peprotech公司) 中培养整夜。培养基接着以含上清液的p210BCR-ABL-IRES-GFP逆转录病毒构建感染4小时及返回培养基再经额外24小时。所述培养接着被注入I.V. 至亚致死剂量辐照 (500rad) 小鼠。基于小鼠外周血中可侦测的稳定增加GFP表达细胞 (通过FACS) 以及白细胞与不成熟细胞数量的上升 (通过Wright-Giemsa染色血膜 (Wright-Giemsa stained blood films)), 所述小鼠被牺牲且他们的骨髓被转移到亚致死剂量辐照的WT宿主。

[0262] 每一此转移都称为疾病世代 (disease generation)。通过第四次转移, 宿主不再于及并转移前被亚致死剂量辐照, 且世代之间的时间更短 (经常是10天)。母细胞危象的发展是易于检测的, 通过高不正常数量的胚细胞 (在PB中大于30%的WBC), 及转移之间所缩短的时间。实验步骤如图3所示。实验在最后世代疾病实施, 其中胚细胞易于侦测到, 宿主必须无辐照, 且世代时间是短的 (至多14天)。每日监测小鼠的恶病质 (cachexia)、昏睡 (lethargy) 及环状毛皮 (ruff coats), 麻痹及垂死小鼠被牺牲。

[0263] 为了评估Ck1α1KO在CMP上的效果, pIpC自骨髓移植 (BMT) 后24小时起通过I.P. (20微克/克小鼠) 隔日施用。

[0264] 当MxCre⁺Ck1α1^{f1/f1} CD45.2疾病宿主被使用时, 实施相同的步骤, 在第一pIpC施用

的第7天自一WT同类CD45.1捐赠者添加I.V. 5×10^6 的BM细胞。嵌合体通过分析小鼠PB中植入后一个月的CD45.1表达的白细胞而被评估。LT-HSC植入通过PC中髓细胞与淋巴成熟CD45.1表达白细胞两者的出现来评价。

[0265] 所述PF670462溶解于20%的2-羟丙基 β -环糊精(2-hydroxypropyl β -cyclodextrin)(赋形剂),且在疾病转移之后每日I.P.给药剂量60mg/Kg开始7小时。所述控制组小鼠仅以所述赋形剂处理。

[0266] 体外抑制剂测试:从带有CML的小鼠中分离的新鲜骨髓与正常小鼠骨髓以1:1的比例混合,且在RPMI补充15%的FCS L-谷氨酰胺(L-Glutamine)、Pen/Strep、Hepes、丙酮酸钠(Sodium Pyruvate)、非必要的氨基酸(Beit Haemek公司)中生长。PF670462抑制剂溶解于DMSO并加入所示浓度的组织培养基以及0.1%的DMSO。为了控制对照,所述细胞仅以赋形剂处理。36至48小时之后,收获细胞并使用相机及标准倒置光显微镜进行手动计数。死去的细胞使用Trypan Blue(sigma公司)被剔除。正常及BCR-ABL表达细胞的数量根据FACS分析的%GFP⁺/7AAD⁻表达细胞在之后推算。膜联蛋白V-PE(AnnexinV-PE, MBL)、7AAD(Tonbo公司)染色由FACS根据制造者的建议来评估。

[0267] 定量RT-PCR:细胞中全部RNA使用DirectZol RNA miniprep(Zymed公司)提取。使用一聚(dT)寡核苷酸(IDT)及MMLV-逆转录酶(Invitrogen公司)生成cDNA,且在7900HT实时PCR系统(7900HT Real Time PCR System, Applied Biosystems公司)中放大,根据制造者的说明使用Platinum[®] SYBR[®] Green(Invitrogen公司)。每个基因实施至少相同的三次反应。熔解曲线分析在每次反应之后实施,以控制非特定PCR产物及引物二聚体(primer dimers)。正常化使用PP1A, UBC和HPRT作为一内部控制来实施。

[0268] Western印迹分析:所有细胞裂解物从带有CML,且以赋形剂或PF670462处理后的小鼠的骨髓萃取到蛋白酶及磷酸酶抑制剂中。

[0269] 蛋白质以SDS-PAGE提取、分离且转移到硝化纤维素薄膜(nitrocellulose membranes)上,以 β -连环蛋白、c-Myc、p53及HSP90的抗体探测。感兴趣的蛋白质以HRP-复合驴/兔抗小鼠IgG抗体(Donkey/Rabbit anti-mouse IgG antibody)侦测(1:5000, GE Healthcare, Uppsala, Sweden),且根据所提供的规则,以Pierce ECL Western印迹基材进行可视化(Thermo Scientific, Rockford, IL)。

[0270] FACS分析:所有试验都在BD's:FACS口径,FACS ARIA分类器或LSR II机器实施。染色细胞以5uM的EDTA悬浮于1%的BSA/PBS缓冲液中。细胞接着与适当抗体冰上培养30分钟,清洗并与制造者的建议适合的二级抗体一起培养。特定对CD16及CD32的单克隆抗体(Miltenyi Biotec公司)被用于染色前封锁Fc受体。用于细胞表面标识的所述抗体列在下面表1。

[0271] 表1

[0272]

名称	公司	分类
Lineage cocktail- Biotin (CD5, CD45R (B220), CD11b, Gr-1 (Ly-6G/C), 7-4, and Ter-119)	Miltenyibiotec	130-092-613
c-Kit APC-eFluor780	eBioscience	47-1171
Sca-1 PE-Cy7	eBioscience	25-5981
Streptavidin-percp/cy5.5	eBioscience	45-4317-82

[0273] 实施例1

[0274] CKI α 缺失引导正常HSC消耗而令骨髓重建

[0275] 生产Ck1 α ^{f1/f1} Mx-Cre转基因小鼠以分析骨髓中CKI α 缺失的效果。Mx-Cre不仅被引入BM也引入肝脏及脾脏。为了确保观察到的表现型是特定对在BM中的CKI α 缺失而不是在其他组织，GFP老鼠Ck1 α ^{f1/f1} Mx-Cre转基因的所述骨髓被注入一致致死IR WT老鼠内。藉着这样做，可确保在pIpC注射到受体小鼠，CKI α 缺失仅作用在BM而不是在其他组织。长期(LT)植入由移植后2个月决定稳定捐赠GFP阳性细胞于外周血被验证。仅在确认成功植入后注射pIpC。

[0276] CKI α KO诱发(以pIpC)情况中，所述小鼠发展一致致死的全血细胞减少，由于HSC数量的降低，造成20天的平均存活(图1C)。然而，如果pIpC处理，BM CKI α 删除的小鼠在pIpC治疗后第7天以WT骨髓移植，牠们被救回且显出高水平的嵌合现象(chimerism)(图1D至1F)。此维持超过3个月且包括髓细胞及淋巴世系(未显示)，代表一长期骨髓重建。所述控制组小鼠不受pIpC诱导注射的影响，且对植入不显出超过1%的嵌合现象(未示数据)。

[0277] 实施例2

[0278] 删除CKI α 的骨髓预防Bcr-Abl驱使白血病发生

[0279] 取自带有Mx-Cre或不带Mx-Cre的CKI α 的floxed等位基因(floxed alleles)的小鼠的骨髓被带有逆转录病毒的Bcr-Abl感染，并注入到亚致死量辐射WT受体小鼠(图2)。接着，从生病的小鼠取出BM，并接枝到一WT小鼠。此一流程重复数次直到慢性白血病转为一激进的急性母细胞危象疾病，具有多重胚细胞(blast cell)在BM及外周血中，且在2-3周间死亡。

[0280] 当在第一代中，所述小鼠约5周后死亡，在下一代中，所述小鼠移植后仅存活2周，因为他们患了更加激进的疾病。再者，几次重复移植之后，不再需要辐照所述白血病受体小鼠，证明了所述白血病的激进本质。

[0281] 为了测试CKI α 消融于CML发展中的的效果，白血病BM植入受体小鼠之后24小时，pIpC被注入。在此实验中，使用两个不同的控制组：在第一控制组，所述小鼠以带有Mx-Cre的白血病细胞注入，且所述小鼠以PBS注射；以及在第二控制组中，所述小鼠以缺少所述Mx-

Cre的白血病细胞注射,但接受pIpC注射(图3A至3D)。疾病进展在计数所述受体小鼠的外周血中的GFP+之后(图3B)。

[0282] 在所述控制小鼠中,代表一激进疾病的所述GFP+细胞呈指数增加,而在CKI α KO组,所述白血病细胞几乎检测不到(图3B)。控制与CKI α 删除的组别之间的差异在血涂片中也是明显的。在所述控制组,多重胚细胞是明显的,就如在CML母细胞危象期中,而在CKI α KO组,所述外周血the外周血涂片看起来正常无胚细胞存在(图3C)。所述小鼠也接着存活。两组控制组小鼠在骨髓移植后约3周死亡,而CKI α KO组的绝大多数的小鼠都存活(图3D)。

[0283] BMT候选的CML病患以高剂量的化疗或IR治疗,为了优先在BMT之前消减白血病干细胞(LSC)。在这些方法中,正常造血干细胞(HSCs)也会被消减。

[0284] 为了评估CKI缺失能否取代化疗或辐照诱导髓细胞消融以及白血病细胞清除,白血病细胞被注入以Mx-Cre基因敲除的CKI α floxed小鼠。

[0285] 在此模型中,pIpC注射在白血病及正常HSCs的受体小鼠两者都诱发CKI α KO。KO诱发后七天,WT小鼠的BM被植入所述白血病小鼠无辐照(图4A)。为了区别捐赠及受体小鼠,使用具有两个不同亚型的CD45的小鼠。

[0286] 如图4B所示,在控制组的CKI α KO并没有被诱发,没有捐赠者衍生细胞在外周血(PB)的证据,而在KO组则有大于25%的细胞为12天后捐赠者衍生。

[0287] 疾病进展的分析显示,有非常高百分比的白血病细胞存在控制组小鼠中,而在CKI α KO组,侦测不到所述白血病细胞(图4B),正如存活率数据所反映出来的(图4C)。

[0288] 实施例3

[0289] CKI抑制剂PF670462在白血病细胞的效果

[0290] 接着,发明人评估PF670462、CKI抑制剂在体外正常BM及白血病细胞的效果。PF670462被考虑为CKI- δ/ϵ 特定的抑制剂(Long A,Zhao H,Huang X.J Med Chem.2012,Jan 26;55(2):956-60.doi:10.1021/jm201387s),且因此不被认为可激活Wnt或p53途径(Price MA,Genes Dev.Feb 15;20(4):399-410)。当所述细胞在体外以所述抑制剂处理,一Wnt及p53的正调节以剂量依赖性的方式在骨髓细胞分析中被观察到(图5B),其指出了CKI α 抑制活性(Elyada et al,Nature.2011Feb 17;470(7334):409-13.doi:10.1038/nature09673)。特别注意的是,一个显著的差异存在以所述抑制剂处理之后的细胞类型已被观察到,而以浓度增加的抑制剂处理后,所述正常BM细胞数量仅略微降低,白血病细胞数量的下降是更为突出的(图5C)。

[0291] 可能可以推测的是,所述抑制剂诱导所述白血病细胞中的细胞凋亡(apoptosis)。这通过7AAD-/Annexin+测试被确认,其验证了在所述抑制剂处理下以一剂量依赖的方式凋亡细胞率的增加,同时所述WT BM细胞不显著地被影响(图5D)。

[0292] 如图6A的方案所述的一体内研究被实施。疾病转移七个小时后,每日以PF670462(i.p.)处理小鼠。取自抑制剂处理的小鼠的骨髓细胞的Western印迹分析显示 β -连环蛋白和p53的稳定性,以及Wnt目标基因c-Myc的诱导,再次证明PF670462对CKI α 的抑制活性(图6B)。

[0293] 抑制剂处理的小鼠的疾病进展在计数在所述白血病起始细胞(LIC)(即癌症干细胞)受体小鼠的外周血中的GFP+之后。在以赋形剂处理的小鼠组别中,所述GFP+细胞呈指数上涨,代表一恶化的疾病,而在以CKI抑制剂处理的小鼠组别中,所述白血病细胞几乎检测

不到(图6C)。在赋形剂处理的小鼠中,所述骨髓被摧毁脊椎动物的白血病细胞入侵,抑制剂处理的小鼠则具有脊椎动物外观完好的正常骨髓(图6D)。不像赋形剂处理的小鼠,抑制剂处理的小鼠在外周血没有胚细胞被检测到(图6E)。

[0294] 当随后小鼠存活,可见到当赋形剂处理的组别在12天内死亡,所述CKI抑制剂处理的组别仍然存活(图6F)。健康显现的抑制剂处理小鼠在20天后被牺牲,他们的组织被检验是否有任何白血病迹象(例如,图6D),且他们的骨髓被移植到致死辐射剂量的小鼠以确定任何残留的LICs是否在辐射宿主中存活与扩张,以及正常、长期再植入的造血干细胞(LT0HSCs)是否会被所述抑制剂影响。到目前为止,移植后一个月,所述受体小鼠的骨髓完整重建而没有白血病GFP+细胞在外周血中的证据,代表完整的LT-HSCs具有LICs的完全消减。

[0295] 实施例4

[0296] 黑色素瘤小鼠中CKI α 缺失的效果

[0297] BRAF的突变激活是人类黑色素瘤中最早且最普遍的基因改变。BRAFv600E结合Pten肿瘤抑制基因静默的表达诱发100%外显率的黑色素瘤的发育,短潜伏期且在淋巴结、腹腔和肺中观察到转移。这些小鼠提供一个系统,用来研究具有长生命期的黑色素瘤起始细胞(MIC)存在,转移的黑色素瘤的根本特点。所述小鼠黑色素瘤模型基于致癌基因BRAF及PTEN缺失(B6.Cg-Braf^{tm1Mcm} Pten^{tm1Hwu} Tg(Tyr-cre/ERT2)13Bos/Bos.J),基于他莫昔芬-诱导激活的酪氨酸酶-Cre(Tyrosinase-Cre)(对黑色素细胞具有特异性),此处所指,所述BRAF模型培育出CKI α -floxed小鼠,称为BRAF-CKI KO小鼠模型。所述BRAF和所述BRAF-CKI KO模型两者都以他莫昔芬的局部耳部应用来处理。他莫昔芬处理后56天,所述BRAF模型的小鼠发展转移的黑色素瘤(图7A),局部及系统传播,但所述BRAF-CKI KO模型显示没有黑色素瘤的迹象,仅有色素斑在耳朵上(图7B)。在此实验系统中,CKI α 消融因此消减了MIC。

[0298] BRAF黑色素瘤小鼠每日以60mg/Kg的PF-670462皮下注射处理,或以赋形剂(20%的2-羟丙基 β -环糊精;Sigma公司)处理,黑色素瘤的他莫昔芬诱导后开始24小时或3周。小鼠于他莫昔芬诱导之后56天被牺牲以观察所述抑制剂的效果。

[0299] 尽管本发明已经结合具体实施方案进行了描述,但显然的,许多替换、修改和变化对于本领域的技术人员将是清楚明白的。因此,本发明意在涵盖落入所附权利要求的精神和范围内的所有替换、修改和变化。

[0300] 所有在此说明书中所述的公开刊物、专利以及专利申请案在此并入它们的全文于本说明书中,以供参照至每一个单一公开文件、专利或专利申请案所特定且单一指示于此并入参照的相同范围。此外,任何参照资料的援引文献或定义在此申请中不应被解释为承认这个参照资料可作为本发明的已知技术。关于其章节标题被使用的情况下,不应被解释为必要的限制。

序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 耶路撒冷希伯来大学的益生研究开发有限公司

伊农·本-内里艾

瓦利德·门策尔

盖·布雷加

[0001]

<120> 减少干细胞的方法

<130> 61214

<150> US 61/934,954

<151> 2014-02-03

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 64

<212> DNA

[0002]

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于复制 CKI- α 专一 shRNA 基因表达单元的人工合成寡核苷酸

<400> 1

gateccccaag aagatgtcca cgcctgttca agagacaggc gtggacatct tctttttttg 60

gaaa 64

<210> 2

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0003]

<223> 用于复制 CKI- α 专一 shRNA 基因表达单元的人工合成寡核苷酸

<400> 2

agctttttcca aaaaaagaag atgtccacgc ctgtctcttg aacaggcgtg gacatcttct 60

tggg 64

<210> 3

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

[0004]

<223> 用于复制 CKI- δ/ε 专一 shRNA 基因表达单元的人工合成寡核苷酸

<400> 3

gatcccgggc ttctcctatg actacttcaa gagagtagtc ataggagaag cccttttttg 60

aaa 63

<210> 4

<211> 64

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于复制 CKI- δ/ϵ 专一 shRNA 基因表达单元的人工合成寡核苷酸

[0005]

<400> 4

agctttttcca aaaagggett ctcttatgac tactctcttg aagtagtcac aggagaagcc 60

cgggg 64

<210> 5

<211> 57

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于复制 CKI- δ 专一 shRNA 基因表达单元的人工合成寡核苷酸

[0006] <400> 5

ceggcccatc gaagtgttgt gtaaactcga gttacacaa cacttcgatg ggttttt 57

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 可用于负调节 CKI- δ 的例示性 siRNA

[0007]

<400> 6

gaaacauggu guccgguut t

21

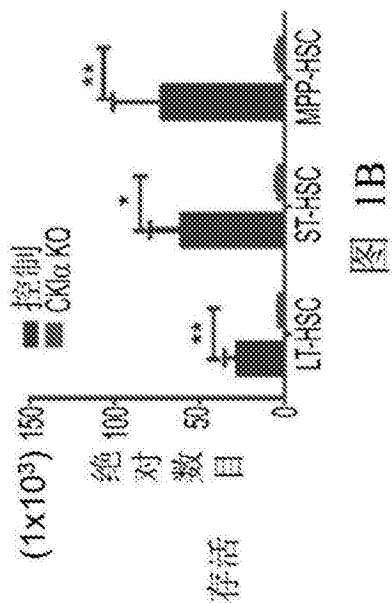


图 1A

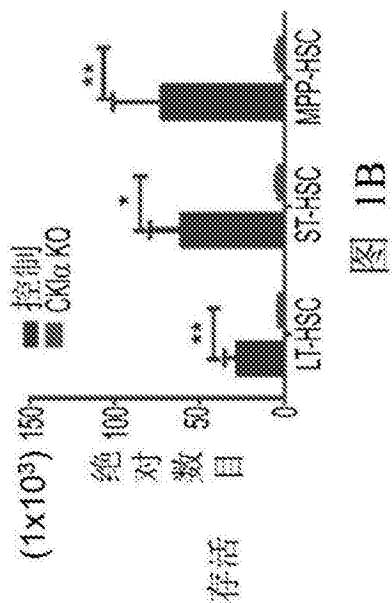


图 1B

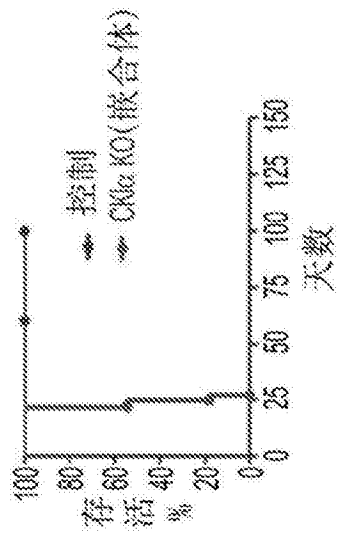


图1C

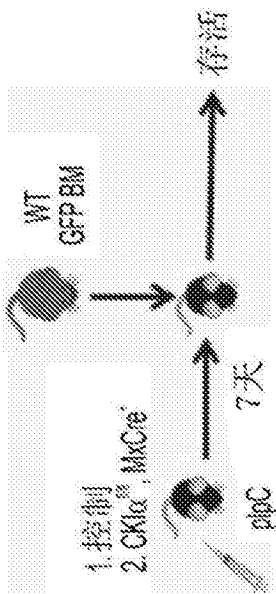


图1D

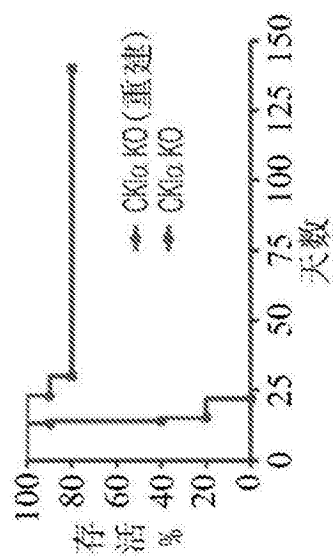


图1E

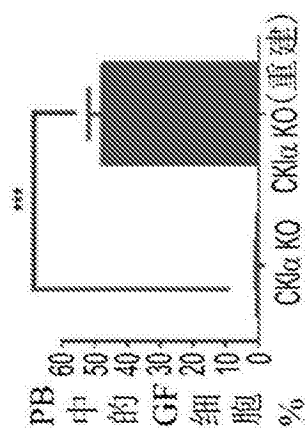


图1F

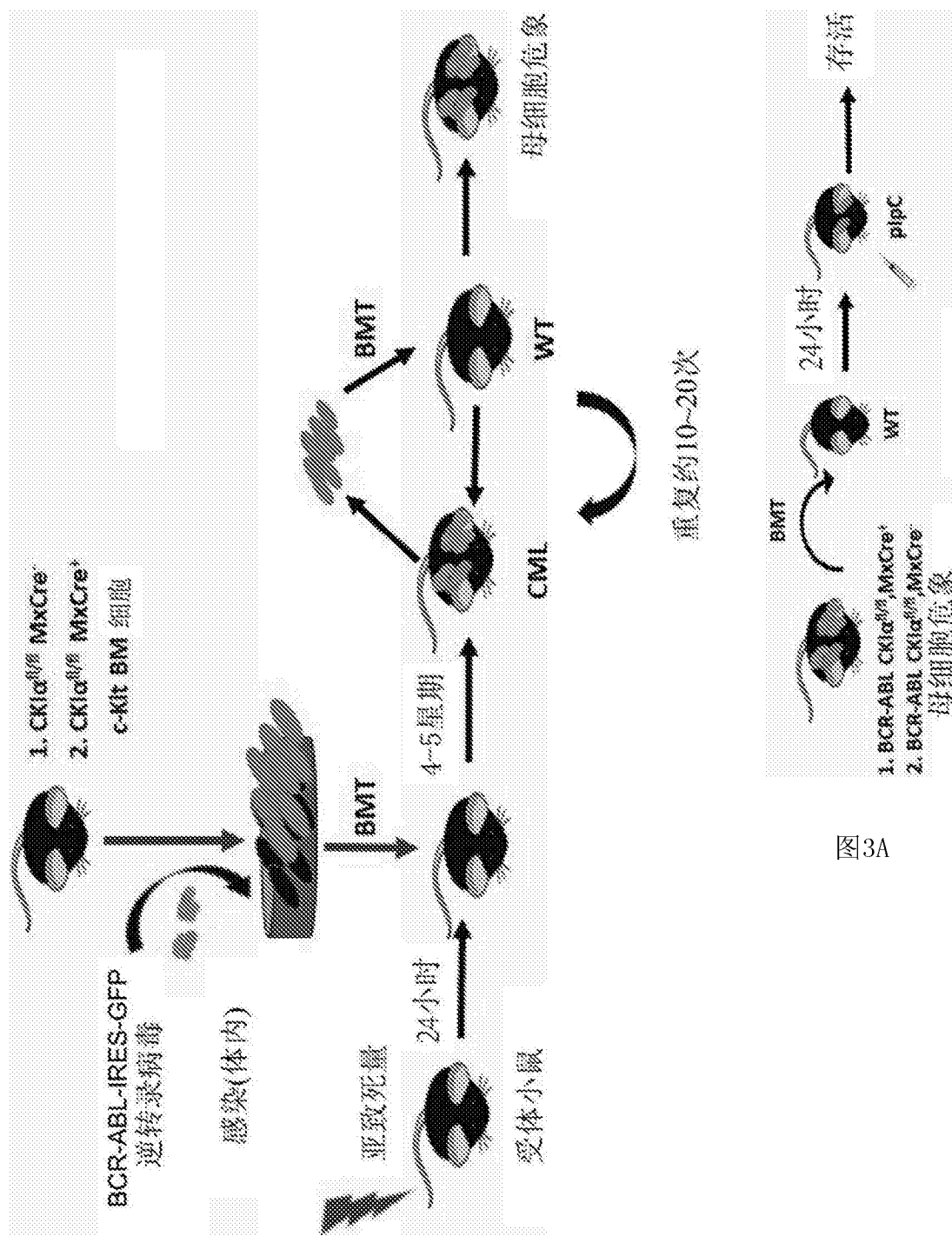


图3A

图2

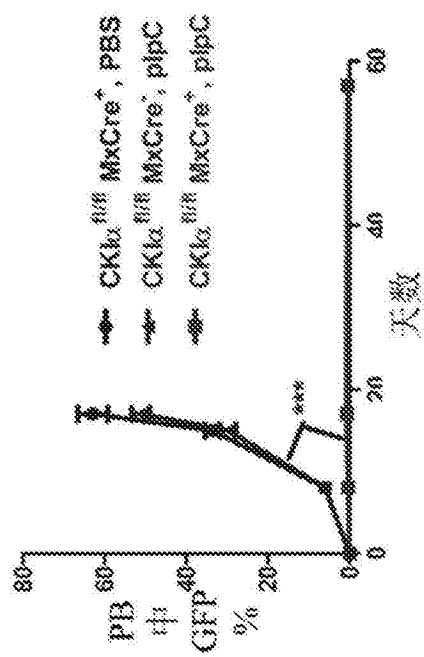


图3B

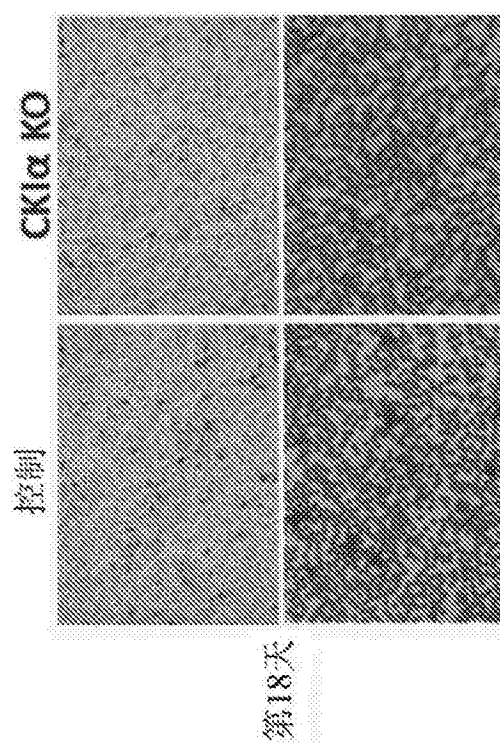


图3C

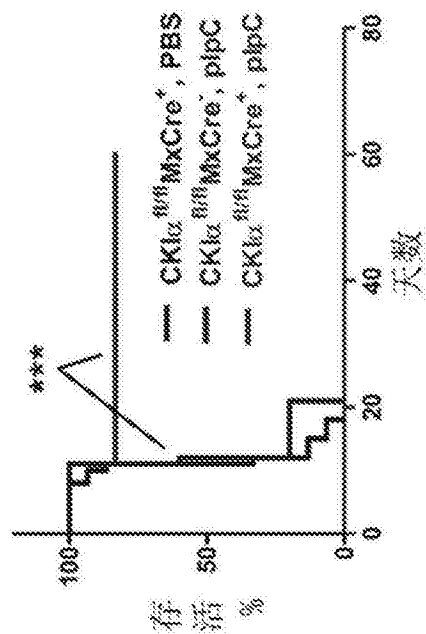


图3D

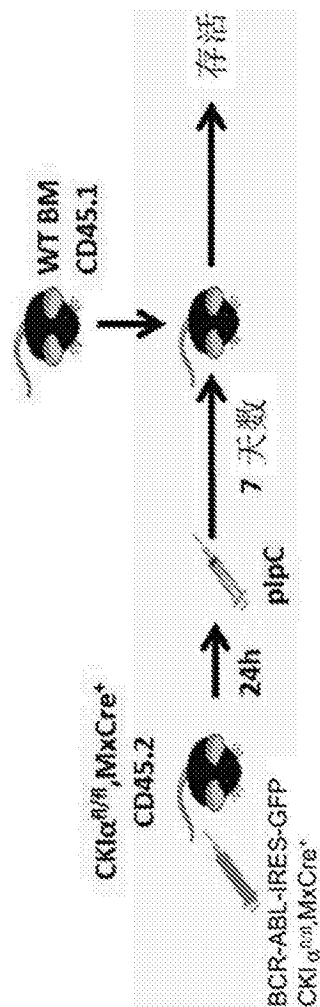


图4A

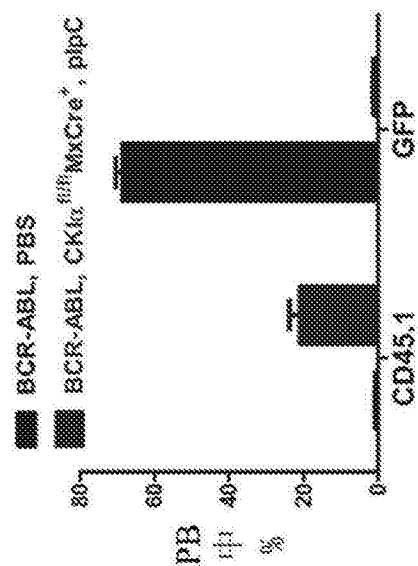


图4B

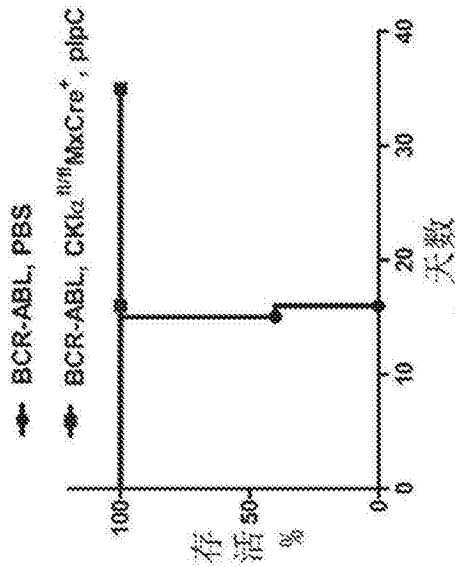


图4C

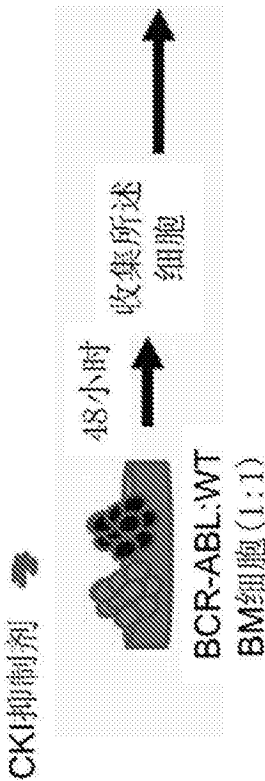


图5A

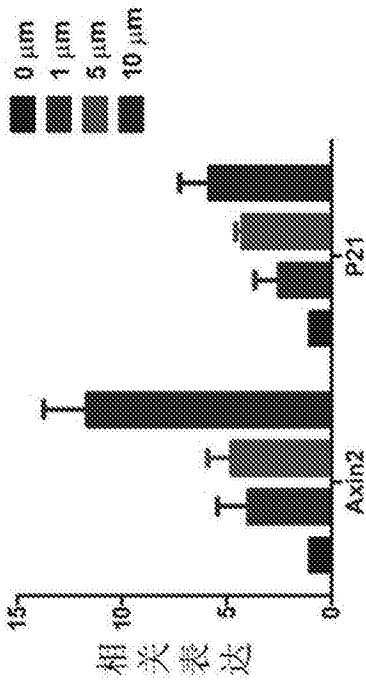


图5B

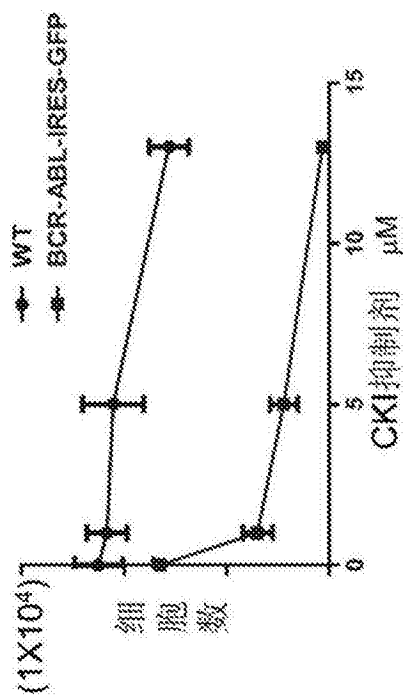


图5C

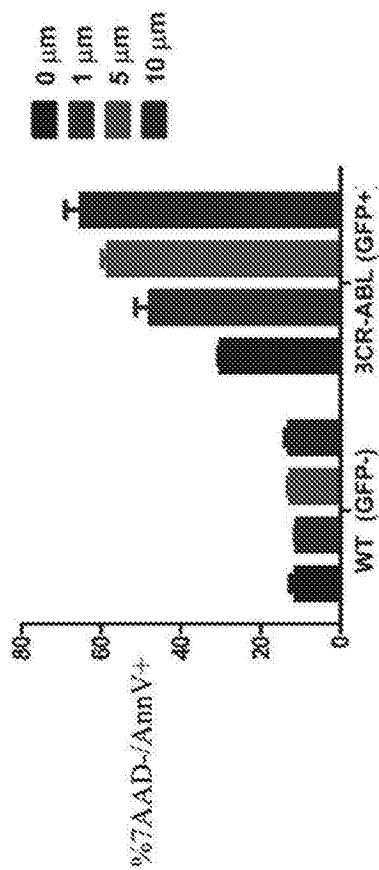


图5D

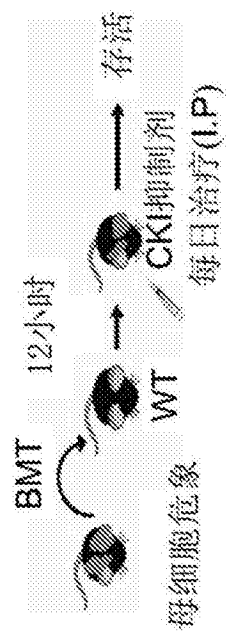


图6A

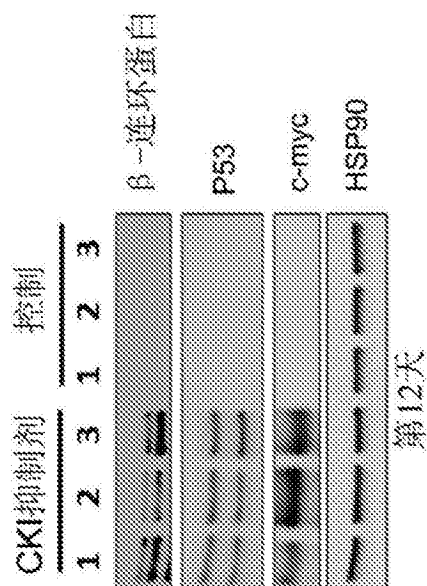


图6B

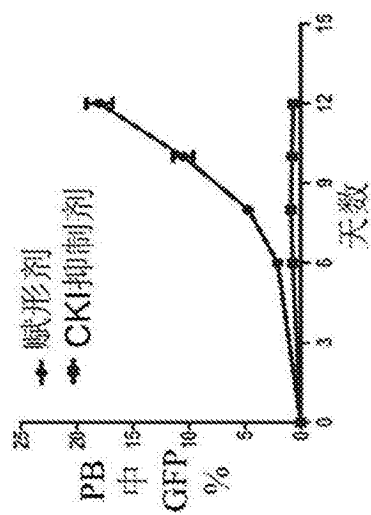


图6C

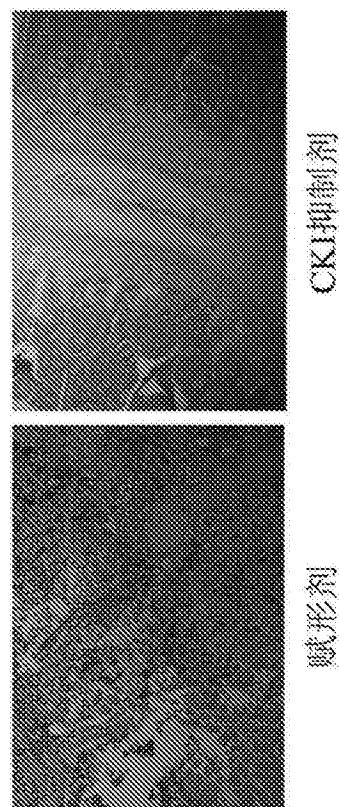


图6D

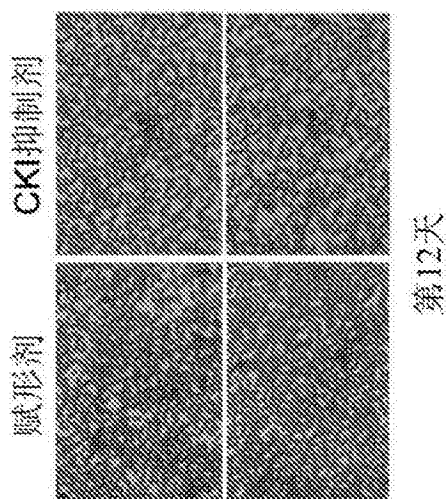


图6E

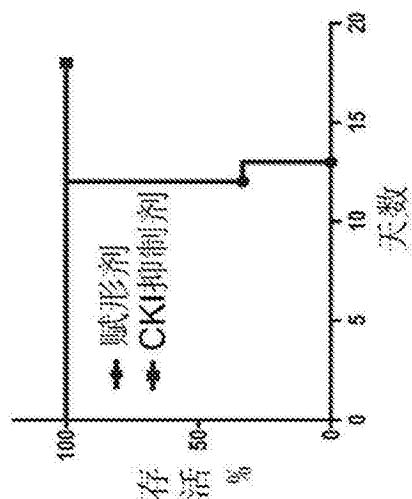


图6F

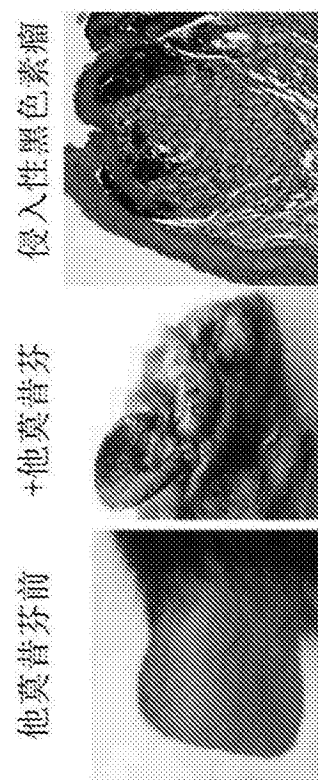


图7A

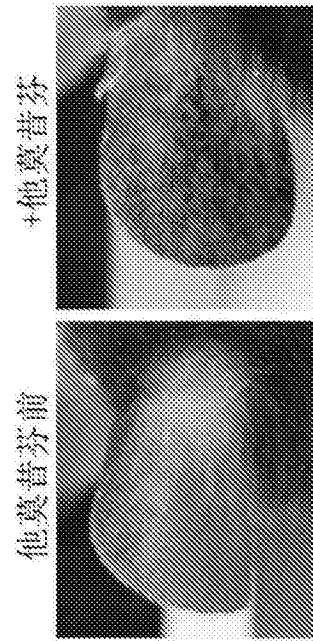


图7B