



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111727254 B

(45) 授权公告日 2024.12.17

(21) 申请号 201980013819.2

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

(22) 申请日 2019.02.21

有限公司 11262

(65) 同一申请的已公布的文献号

专利代理人 王玮玮 郑霞

申请公布号 CN 111727254 A

(51) Int.CI.

(43) 申请公布日 2020.09.29

C12N 15/113 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7052 (2006.01)

10201801432S 2018.02.21 SG

A61K 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2020.08.17

US 2005215497 A1, 2005.09.29

(86) PCT国际申请的申请数据

Edmund I-Tsuen Chen. Selective

PCT/SG2019/050099 2019.02.21

Inhibition of p53 Dominant Negative
Mutation by shRNA Resulting in Partial
Restoration of p53 Activity. J Med
Sci. 2009, 第29卷(第4期), 图1.

(87) PCT国际申请的公布数据

Swathi V. Iyer. Allele-specific
silencing of mutant p53 attenuates
dominant-negative and gain-of-function
activities. Oncotarget. 2015, 7(5), 图1-5.

W02019/164451 EN 2019.08.29

专利权人 新加坡保健服务集团有限公司
地址 新加坡新加坡城

审查员 张智贤

(72) 发明人 卡纳加·萨芭帕蒂

权利要求书2页 说明书22页

序列表27页 附图27页

(54) 发明名称

使用突变型p53特异性siRNA进行癌症治疗性靶向

(57) 摘要

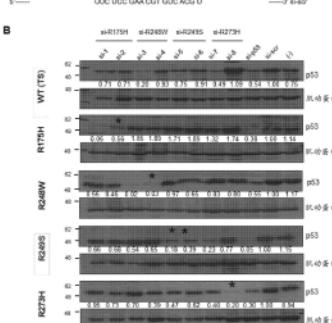
本文披露了用于靶向p53基因内的一个或多个点突变的核酸序列。特别地, p53中的点突变位点选自由以下组成的组: R249、R248、R273和R175。本文还披露了用于治疗受试者的癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用本文披露的一种或多种核酸序列。

R175H
5'—AUG AGG GAG GGU GUG AGG CgC UGCG CCC CAC CAU GAG
5'—AUG AGG GAG GGU GUG AGG CgC UGCG CCC CAC CAU GAG
5'—UGG GAG GGU GUG AGG CgC UGCG CCC CAC CAU GAG
5'—AGG GAG UGG UGC CCC CAC CAU GA
——3' P53 WT
——3' P53 MUT-R175H
——3' Si-R175H
——3' Si-Si-R175H

R248W
5'—UGC AUG GGC GGC AUG AAC UGG AGG CCG AUU CUC
5'—UGC AUG GGC GGC AUG AAC UGG AGG CCG AUU CUC
5'—UGC AUG AAC UGG AGG CCG AUU CUC
5'—GCG GGC AUG AAC UGG AGG CCG AUU CUC
——3' P53 WT
——3' P53 MUT-R248W
——3' Si-R248W
——3' Si-Si-R248W

R249S
5'—UGC UGU GGC GGC AUG AAC UGG AGG CCG AUU CUC ACC
5'—UGC UGU GGC GGC AUG AAC UGG AGG CCG AUU CUC ACC
5'—UGC UGU GGC GGC AUG AAC UGG AGG CCG AUU CUC ACC
5'—GAC UGG AUG AAC UGG AGG CCG AUU CUC ACC
5'—AAC UGG AUG AAC UGG AGG CCG AUU CUC A
——3' P53 WT
——3' P53 MUT-R249S
——3' Si-R249S
——3' Si-Si-R249S

R273H
5'—AGC UGU GAG GGG Cgg UGU UGU GCG UGU CGU
5'—AGC UGU GAG GGG Cgg UGU UGU GCG UGU CGU
5'—AGC UGU GAG Cgg UGU UGU GCG UGU CGU
5'—AGC UGU GAG UGU UGU GCG UGU CGU
5'—GAC UGG Cgg CAC CAC CAU GAG CG
5'—UUC UGU GAA Cgg CAC CAC CAU GAG CG
——3' P53 WT
——3' P53 MUT-R273H
——3' Si-R273H
——3' Si-Si-R273H
——3' P53 siRNA
——3' Si-R273H
——3' Si-Si-R273H



1. 一种双链siRNA分子,其中正义链由SEQ ID NO:17、13、16或21中的序列组成。
2. 一种双链shRNA分子,其中siRNA正义序列由SEQ ID NO:17、13、16或21中的序列组成。
3. 如权利要求2所述的双链shRNA分子,其中所述shRNA分子包含长度在15至30个碱基对之间的茎。
4. 一种或多种如权利要求1所述的双链siRNA分子和/或一种或多种如权利要求2或3所述的双链shRNA分子用于制造用于治疗受试者的癌症的药物的用途,其中所述受试者在p53肿瘤抑制基因的一个或多个位点处具有一个或多个点突变,所述一个或多个位点选自由以下组成的组:R249 (p53)、R248 (p53) 和R273 (p53)、及其组合,所述癌症选自由以下组成的组:子宫内膜腺癌、横纹肌肉瘤、肾腺癌、结肠腺癌、肝细胞癌、支气管鳞状细胞癌、乳腺癌、胰腺癌和肺癌。
5. 如权利要求4所述的用途,其中所述一个或多个点突变选自由以下组成的组:R249S (p53)、R249G (p53)、R249M (p53)、R248W (p53)、R248Q (p53)、R273H (p53)、R273L (p53)、及其组合。
6. 如权利要求4或5所述的用途,其中:
 - (a) 所述受试者在所述p53肿瘤抑制基因的R249 (p53) 处具有点突变并且所述一种或多种双链siRNA或shRNA分子选自其中正义链由SEQ ID NO:17或16中的序列组成的双链siRNA分子以及其中siRNA正义序列由SEQ ID NO:17或16组成的双链shRNA分子;和/或
 - (b) 所述受试者在所述p53肿瘤抑制基因的R248 (p53) 处具有点突变并且所述一种或多种双链siRNA或shRNA分子选自其中正义链由SEQ ID NO:13中的序列组成的双链siRNA分子以及其中siRNA正义序列由SEQ ID NO:13组成的双链shRNA分子;和/或
 - (c) 所述受试者在所述p53肿瘤抑制基因的R273 (p53) 处具有点突变并且所述一种或多种双链siRNA或shRNA分子选自其中正义链由SEQ ID NO:21中的序列组成的双链siRNA分子以及其中siRNA正义序列由SEQ ID NO:21组成的双链shRNA分子。
7. 如权利要求4或5所述的用途,其中所述药物将与治疗剂一起施用。
8. 如权利要求6所述的用途,其中所述药物将与治疗剂一起施用。
9. 如权利要求7所述的用途,其中所述治疗剂是抗癌剂。
10. 如权利要求8所述的用途,其中所述治疗剂是抗癌剂。
11. 一种或多种如权利要求1所述的双链siRNA分子和/或一种或多种如权利要求2或3所述的双链shRNA分子用于制造用于治疗对治疗敏感的受试者的药物的用途,其中所述对治疗敏感的受试者患有选自由以下组成的组的癌症:子宫内膜腺癌、横纹肌肉瘤、肾腺癌、结肠腺癌、肝细胞癌、支气管鳞状细胞癌、乳腺癌、胰腺癌和肺癌,并且所述对治疗敏感的受试者是被鉴定为在p53肿瘤抑制基因的一个或多个位点处具有一个或多个点突变的受试者,所述一个或多个位点选自由以下组成的组:R249 (p53)、R248 (p53) 和R273 (p53),并且其中所述双链siRNA或shRNA分子靶向所述一个或多个点突变位点。
12. 如权利要求11所述的用途,其中所述一个或多个点突变选自由以下组成的组:R249S (p53)、R249G (p53)、R249M (p53)、R248W (p53)、R248Q (p53)、R273H (p53) 和R273L (p53)。
13. 如权利要求11或12所述的用途,其中:

(a) 所述受试者在所述p53肿瘤抑制基因的R249 (p53) 处具有点突变并且所述一种或多种双链siRNA或shRNA分子选自其中正义链由SEQ ID N0:17或16中的序列组成的双链siRNA分子以及其中siRNA正义序列由SEQ ID N0:17或16组成的双链shRNA分子；和/或

(b) 所述受试者在所述p53肿瘤抑制基因的R248 (p53) 处具有点突变并且所述一种或多种双链siRNA或shRNA分子选自其中正义链由SEQ ID N0:13中的序列组成的双链siRNA分子以及其中siRNA正义序列由SEQ ID N0:13组成的双链shRNA分子；和/或

(c) 所述受试者在所述p53肿瘤抑制基因的R273 (p53) 处具有点突变并且所述一种或多种双链siRNA或shRNA分子选自其中正义链由SEQ ID N0:21中的序列组成的双链siRNA分子以及其中siRNA正义序列由SEQ ID N0:21组成的双链shRNA分子。

使用突变型p53特异性siRNA进行癌症治疗性靶向

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年2月21日提交的新加坡临时申请号10201801432S的优先权权益,出于所有目的将其内容通过引用以其全文特此并入。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及分子生物学领域。特别地,本发明涉及使用生物标记进行检测和诊断,以及使用siRNA来治疗癌症。

[0004] 发明背景

[0005] 通过泛癌基因组测序工作,已经在几乎所有癌症类型中鉴定了大量基因组改变。这导致将这些突变中的许多突变鉴定并关联为偶然参与癌症发展的潜在驱动因素。通过开发抑制性分子或封闭性抗体,已对癌基因中的一些已鉴定的改变进行了治疗性靶向,这在治疗带有这些突变的癌症方面已取得了巨大的初步成功,形成了肿瘤学精准医疗的基础。然而,使用抑制剂或封闭性抗体进行治疗性靶向的这种方法的一个挑战是它们对蛋白质的突变型形式不是完全特异的,而是相对于其野生型(WT)对应物在表达突变型蛋白的细胞中是更为有效的(这是由于突变型蛋白的活性或表达升高)。结果,这可能导致对表达WT蛋白的多种细胞类型产生不良副作用。

[0006] 因此,针对突变蛋白的理想药物应该是仅影响突变型形式的功能而不对WT型产生任何影响的药物。然而,到目前为止,还没有产生具有如此高特异性的药物或分子。尽管如此,但到目前为止,尚无可用于产生“仅突变体”特异性试剂的常规技术。

[0007] 精准医疗时代促进了许多药物的发展,这些药物对蛋白质的高活性突变型形式具有特异性。尽管最初已经取得了令人瞩目的成果,但仍存在关于特异性的两大问题。首先,针对特定蛋白质(通常是激酶)产生的药物几乎总是对其他细胞靶标有影响。而且,尽管这些药物中的许多药物对蛋白质的突变型形式和活性形式非常有效,但对野生型对应物也有重大影响,如针对c-Kit所显示的。因此,尽管这些抑制剂是有效的,但其对野生型形式或其他紧密相关的靶标的影响将持续导致不良副作用,从而降低这些试剂的前景。

[0008] 因此,需要对蛋白质的突变形式具有高特异性并且与野生型形式几乎没有或没有交叉反应性的试剂,用于治疗过度增生性疾病。

[0009] 发明概述

[0010] 在一方面,本发明涉及用于靶向靶基因内的单点突变的核酸序列,其中该靶基因是一个或多个肿瘤抑制基因;其中该肿瘤抑制基因是p53,并且其中该点突变的位点选自由以下组成的组:R249(p53)、R248(p53)、R273(p53)和R175(p53)。

[0011] 在另一方面,本发明涉及治疗受者的癌症的方法,该方法包括向该受试者施用如本文披露的一种或多种核酸序列,其中这些核酸序列靶向靶基因内的一个或多个点突变位点,其中该靶基因是肿瘤抑制基因。

[0012] 在又另一方面,本发明涉及鉴定对治疗敏感的受者的方法,其中该方法包括:i)鉴定靶基因内的一个或多个单点突变,其中该靶基因是一个或多个肿瘤抑制基因;其中该

肿瘤抑制基因是p53，并且其中该一个或多个点突变的位点选自由以下组成的组：R249 (p53)、R248 (p53)、R273 (p53) 和R175 (p53)；ii) 向该受试者施用如本文披露的一种或多种核酸序列，其中这些核酸序列靶向靶基因内的一个或多个点突变位点，其中该靶基因内的一个或多个点突变的存在表明该受试者对治疗敏感。

附图说明

[0013] 当结合非限制性实例和附图考虑时，参考详细说明将更好地理解本发明，其中：

[0014] 图1提供了示出了通过siRNA步移选择的siRNA序列可特异性靶向各种p53热点突变体的数据。(A) 示出了野生型(WT)的核苷酸序列，并且在每种情况下指示了各自的p53突变体(即R175H;R248W;R249S和R273H)，随后指示了筛选后以靶向每个突变体的p53等位基因特异性siRNA序列。WT核苷酸残基和突变核苷酸残基均以粗体突出显示。在底部指示了泛p53 siRNA (si-p53) 和乱序 (scr) siRNA (si-scr) 序列。(B) 示出了针对(A)中所示的每个siRNA进行的免疫印迹的图像。将每个siRNA转染到稳定表达指示的p53突变体的同基因H1299细胞系中。然后，在转染后72小时，使用抗p53抗体(D0-1)通过免疫印迹分析细胞裂解物的p53表达。将表达温度敏感的(TS) WT p53的细胞用作WT对照。用星号(“*”)指示显示出特异的和改善的敲低活性的突变体特异性siRNA。示出了至少三个独立实验中的一种代表性印迹。肌动蛋白显示为上样对照，并且(-)仅代表未进行任何siRNA转染的细胞。对于每个样品，计算p53与肌动蛋白条带强度的比率，并将其标准化为si-scr对照的比率。数值代表标准化倍数变化。

[0015] 图2描绘了免疫印迹数据，其示出了突变体特异性siRNA对内源性突变型p53的沉默效力。小图(A)至(D)示出了分别针对R175H、R248W、R249S和R273H的siRNA的免疫印迹结果。突变型siRNA在具有WT p53表达的三个细胞系和表达指示的p53突变体的三个细胞系中转染。如上所述通过免疫印迹评估沉默效力。示出了至少三个独立实验中的一种代表性印迹。细胞系的突变型p53状态在印迹下方突出显示，并在表1中进行描述。

[0016] 图3呈现了流式细胞术图，其示出了突变型p53表达的等位基因特异性沉默导致细胞死亡。在指示的细胞系中转染指示的siRNA 72小时后，对细胞中亚G1 DNA含量(指示细胞凋亡)的流式细胞术分析进行定量。从至少三个独立重复中的一个实验中示出了代表性直方图。直方图(M1)中指示了亚G1细胞的%。

[0017] 图4提供了说明了突变型p53特异性沉默导致在表达突变型p53的细胞中p53经典靶基因的激活的直方图。(A) 示出了用靶向四个热点p53突变体的siRNA或对照乱序siRNA或p53特异性siRNA瞬时转染表达WT p53的HCT116细胞。72小时后收集细胞，用于通过定量实时PCR对指示的靶基因进行mRNA分析。(B) 示出了以相似的方式转染并分析表达指示的p53突变体的AU565、786-0、BT549和ASPC1细胞系。示出了靶基因的相对表达。所有实验均标准化为GAPDH，并一式三份进行。条形图示出了三个独立实验的平均值±标准偏差。*表示p值<0.05，**表示<0.005；并且***表示<0.001，其中n=3个样品/组。

[0018] 图5示出了描绘突变型p53特异性shRNA的生长抑制作用的数据。(A) 示出了指示的细胞系的免疫印迹，将这些细胞系用表达泛p53 (sh-p53) shRNA的shRNA、乱序对照、各自的突变特异性shRNA或空载体(-)转染。48小时后收获细胞，并通过免疫印迹分析这些细胞的沉默效率。(B) 示出了shRNA转染5天后用结晶紫溶液染色并观察的细胞集落的平行培养物

的图像。从至少三个独立实验 (b) 中的一个实验中示出了代表性图像并进行量化。

[0019] 图6描绘了显示通过突变型p53特异性沉默而使突变型p53的显性负效应缓解的数据。(A) 示出了用对照、泛p53 (sh-p53) 或R248W特异性shRNA (sh-4) 转染的RKO^{+/−}和RKO^{+/248W}细胞的免疫印迹, 并如上所述分析了这些细胞的沉默效力。关于集落生长的数据在小图(B) 中示出, 并且p53靶基因表达分析的结果在小图(C) 中示出。在不使用顺铂(CDDP) 处理(小图D) 或使用顺铂处理(小图E) 的情况下分析细胞死亡。直方图中指示了亚G1细胞的百分比(%) (如通过M1表示)。从三个独立实验中示出了代表性数据。条形图示出了三个独立实验的平均值±标准偏差。**表示p值<0.005; 并且***表示<0.001, 其中n=3个样品/组。

[0020] 图7呈现了显示突变型p53特异性沉默阻滞体内肿瘤生长的数据。突变型p53特异性沉默阻滞体内肿瘤生长。(A) & (B) 将RD、PLC-PRF5和H1975细胞系用乱序shRNA或指示的突变型p53特异性shRNA转导并在3天后收集, 并且将细胞[RD (4×10^6)、PLC-PRF5 (3×10^6) 和H1975 (5×10^6)]作为PBS中75μl细胞和75μl基质胶的混合物注入SCID小鼠的侧腹, 并定期监测肿瘤生长。图(A) 中指示了肿瘤的大小。将在每种情况下的终点收获的肿瘤用于RD肿瘤的H&E或抗p53染色(B)。数值表示平均值±SD。N=4 (对于RD和H1975细胞/组) 并且n=5 (对于PLC细胞)。***表示p值<0.001。

[0021] 图8示出了关于突变体特异性siRNA对内源性突变型p53表达的沉默效力的免疫印迹数据。将针对R175H(si-1&2)、R248W(si-3&4)、R249S(si-5&6)和R273H(si-7&8)的siRNA在表达指示的p53突变体的指示的细胞系中转染, 并且如所描述的通过免疫印迹评估沉默效力。示出了至少两个独立实验中的一种代表性印迹。细胞系的突变p53状态在印迹下突出显示, 并在表1中进行描述。对于每个样品, 计算p53与肌动蛋白条带强度的比率, 并将其标准化为si-scr对照的比率。数值代表标准化倍数变化。

[0022] 图9示出了进一步的流式细胞术结果, 这些结果评估了突变体特异性siRNA对在表达各种突变型p53的细胞系中的细胞死亡的影响。在指示的细胞系中转染指示的siRNA(如本文所述)72小时后, 对细胞中亚G1 DNA含量(指示细胞凋亡)的流式细胞术分析进行定量。示出了代表性直方图。直方图中指示了亚G1细胞的% (对于HCC1395细胞表示为M1, 并且对于所有其他细胞系表示为M2)。

[0023] 图10示出了进一步的流式细胞术数据, 这些数据与顺铂处理可在突变型p53沉默后增强细胞死亡有关。在HCT116、AU565、786-0、BT549和H1975细胞中进行亚G1 DNA含量(指示细胞凋亡)的流式细胞术分析。将这些细胞用指示的siRNA转染, 并在转染后48小时再用顺铂处理24小时。从至少三个独立重复中的一个实验中示出了代表性直方图。直方图(M1)中指示了亚G1细胞的百分比(%)。

[0024] 图11示出了显示关于突变型等位基因表达的耗尽导致p53转录靶标激活的实时PCR数据的直方图。在指示的细胞系上进行针对p53靶基因(如p21、Mdm2和Noxa)的qRT-PCR, 将这些细胞系用各种siRNA转染, 并且随后不使用顺铂(CDDP)或使用顺铂进行处理(如本文所述)。所有实验均标准化为GAPDH, 并一式三份进行, 并且示出了靶基因的相对表达。条形图示出了三个独立实验的平均值±标准偏差。*表示p值<0.05; **表示<0.005; 并且***表示<0.001, 其中n=3个样品/组。

[0025] 图12示出了表明等位基因特异性突变型p53特异性shRNA诱导细胞死亡、并且对相同残基处的各种突变型核苷酸有效的数据。(A) 示出了指示的细胞系中亚G1 DNA含量(指示

细胞凋亡)的流式细胞术分析结果的直方图,将这些细胞系用指示的shRNA转染,并在转染后72小时进行。代表性直方图示出了三个独立实验的平均值±标准偏差。(B)至(D)示出了来自表达R248Q突变型p53的HEC1A细胞的数据,将这些细胞用指示的shRNA转染,并分析其突变型p53表达(B)、集落生长(C)和在不存在或存在CDDP处理的情况下细胞凋亡(D)。示出了来自三个独立实验中的一个的代表性结果。条形图示出了三个独立实验的平均值±标准偏差.sh-4是R248特异性siRNA。

[0026] 图13示出了说明通过突变型p53特异性沉默而使突变型p53的显性负效应缓解的数据。将HCT116+/-和HCT116+/R248W细胞用对照、泛p53(sh-p53)或R248W特异性shRNA(sh-4)转染,并如所描述的分析这些细胞的沉默效力(A)、集落生长(B)和p53靶基因表达(C)。在不使用顺铂(CDDP)处理(小图D)或使用顺铂处理(小图E)的情况下分析细胞死亡。直方图中指示了亚G1细胞的百分比(%) (如通过M1表示)。从三个独立实验中示出了代表性数据。条形图示出了三个独立实验的平均值±标准偏差.*表示p值<0.05;**表示<0.005;并且***表示<0.001,其中n=3个样品/组。

[0027] 图14示出了描述siRNA-6对各种R249突变体的效力的数据。(A)示出了如下表,该表示出了在人癌症中p53的位置R249处发现的各种可能的突变,以及针对每种氨基酸可能性的核苷酸序列。因此,R249可以突变为R249S、R249G和R249M。(B)示出了各种直方图,这些直方图示出了以突变计数表示的人癌症中各种R249突变的频率。(C)示出了免疫印迹分析的结果。将si-6和对照sip53以及si-scr siRNA转染到H1299细胞系中,24小时后将这些细胞系与各种R249突变型cDNA构建体或WT p53构建体共转染。然后,在siRNA转染后72小时,使用抗p53抗体(D0-1)通过免疫印迹分析细胞裂解物的p53表达。示出了至少两个独立实验中的一种代表性印迹。肌动蛋白显示为上样对照,并且(-)仅代表未进行任何siRNA转染的细胞。

[0028] 图15示出了描述siRNA-8对各种R273突变体的效力的数据。(A)是如下表,该表示出了在人癌症中p53的位置R273处发现的各种可能的突变,以及针对每种氨基酸可能性的核苷酸序列。因此,R273可以突变为R273H和R273L。(B)示出了各种直方图,这些直方图示出了以突变计数表示的人癌症中各种R273突变的频率。(C)示出了免疫印迹分析的结果。将si-8和对照sip53以及si-scr siRNA转染到H1299细胞系中,24小时后将这些细胞系与各种R273突变型cDNA构建体或WT p53构建体共转染。然后,在siRNA转染后72小时,使用抗p53抗体(D0-1)通过免疫印迹分析细胞裂解物的p53表达。示出了至少两个独立实验中的一种代表性印迹。肌动蛋白显示为上样对照,并且(-)仅代表未进行任何siRNA转染的细胞。

[0029] 图16提供了说明了突变型p53特异性沉默导致在表达突变型p53的细胞中p53经典靶基因的激活的直方图。(A)示出了在转染si-8和对照乱序siRNA或p53特异性siRNA对照siRNA 24小时后,用R273L和R273H p53突变型cDNA转染的H1299细胞的直方图。在siRNA转染后72小时收集细胞,用于通过定量实时PCR对指示的靶基因进行mRNA分析。(B)以相似的方式示出了用R249G、R249M或R249S p53突变型cDNA连同si-6和对照乱序siRNA或p53特异性siRNA对照siRNA转染的H1299细胞的直方图。在siRNA转染后72小时收集细胞,用于通过定量实时PCR对指示的靶基因进行mRNA分析。(C)示出了用WT p53 cDNA连同si-2、si-4、si-6、si-8和对照乱序siRNA或p53特异性siRNA转染的H1299细胞的直方图。在siRNA转染后72小时收集细胞,用于通过定量实时PCR对指示的靶基因进行mRNA分析。示出了靶基因的相对

表达。所有实验均标准化为GAPDH，并一式三份进行。

[0030] 图17示出了如下表，该表总结了突变型p53特异性siRNA对相同氨基酸内的突变的效力。Y:表示是(换言之, siRNA可有效靶向所列的突变体)。

[0031] 本发明的详细说明

[0032] 由于相对于功能性野生型等位基因的显性负效应；或由于突变型p53赋予了癌细胞变得上瘾的生存优势，Tp53突变损害了治疗应答。因此，靶向突变型p53代表对所有癌症的超过一半的有效治疗性靶向。已经产生了一系列能够靶向p53热点突变体的小干扰RNA。这些突变型p53特异性siRNA (MupSi) 在沉默预期突变体的表达方面具有高特异性，并且不影响野生型p53。不受理论的束缚，认为在功能上，这些MupSi通过消除对突变型p53的成瘾和显性负效应而诱导细胞死亡；并且当在治疗环境中施用时阻滞异种移植植物中的肿瘤生长。

[0033] 因此，在一个实例中，披露了用于靶向靶基因内的单点突变的核酸序列。在另一个实例中，靶基因是一个或多个肿瘤抑制基因。在又一个实例中，肿瘤抑制基因是p53。

[0034] 在功能上并且不受理论的束缚，这些突变型p53特异性siRNA通过消除对突变型p53的成瘾和显性负效应而诱导细胞死亡；并且当在治疗环境中施用时阻滞异种移植植物中的肿瘤生长，这表明可以产生突变特异性siRNA并将其有效地用于改善治疗应答，这是一种可广泛应用的策略。

[0035] 在一个实例中，核酸序列导致以下作用中的任何一种或多种，这些作用包括但不限于：细胞死亡、成瘾的消除、靶基因中的任何一个或多个的激活、显性负效应的缓解、对一种或多种抗癌剂的敏感性增加、以及肿瘤生长的阻滞或停止。在另一个实例中，核酸序列能够基本上沉默突变型肿瘤抑制基因等位基因。在另一个实例中，如本文披露的核酸序列沉默突变型抑制基因等位基因。在又一个实例中，如本文披露的核酸序列沉默突变型抑制基因等位基因，并且不影响相应的野生型等位基因。

[0036] 如本文所用，术语“突变”或“突变的”或“遗传改变”是指任何生物有机体、病毒或染色体外遗传元件的基因组或核酸序列的一部分的天然或人工修饰或遗传改变。该突变可以使用(但不限于)化学品和辐射来人工诱导，但是也可以在细胞分裂中的核酸复制过程中自发发生。突变可能会或可能不会在生物体的可观察特征(表型)中产生可辨别的变化。已知存在多种类型的突变，它们可以是小规模突变或大规模突变。小规模突变的实例是但不限于取代突变、沉默突变、错义突变、无义突变、插入和缺失。大规模突变的实例是但不限于扩增、缺失、染色体易位、中间缺失、染色体倒位、以及导致杂合性丧失的突变。也可以通过突变对所得产物的功能的影响而对它们分组。这些包括但不限于功能丧失(失活)突变、功能获得(激活)突变、显性负(反效等位基因)突变、致死突变、以及回复突变(back mutation或reverse mutation)。点突变(例如，也称为单碱基修饰)是引起遗传物质(DNA或RNA)的单核苷酸碱基取代、插入或缺失的一种突变。术语“移码突变”表示碱基对的添加或缺失。

[0037] 如本文所用，术语“热点突变”是指DNA序列内显示具有统计学上高突变倾向的区域或位点。可以例如在所有癌症类型的p53基因中找到此类高频突变。例如，在p53基因中找到了六个位点。这些热点突变位点包括R175、R248、R249和R273。在一个实例中，点突变的位点是但不限于R249 (p53)、R248 (p53)、R273 (p53) 和R175 (p53)。

[0038] 因此，在一个实例中，突变是点突变。在另一个实例中，点突变是取代突变。在又另

一个实例中,突变是热点突变。

[0039] 在另一个实例中,点突变是但不限于R175H(p53)、R248W(p53)、R273H(p53)、R249S(p53)、及其组合。在另一个实例中,点突变是但不限于R249S(p53)、R249G(p53)、R249M(p53)、R248W(p53)、R248Q(p53)、R273H(p53)、R273L(p53)和R175H(p53)。

[0040] 在癌症的突变基因中,肿瘤抑制基因Tp53(以下称为p53)的突变发生频率最高,这巩固了其作为关键门卫基因(必须放弃其功能癌症才能发展)的地位。p53的突变可发生在其393个残基的几乎所有中,并且这些突变以多种方式影响肿瘤形成。首先,种系中p53的突变可导致癌症易感性,如李-佛美尼综合征(Li-Fraumeni syndrome)和许多模式生物体中所例示的。此外,p53的突变与对疗法的应答不良有关,这通常是由于突变型蛋白相对于其余野生型蛋白的显性负(DN)效应,可通过减少突变型形式的表达来改善这种显性负效应。最后,癌细胞通常对突变型p53的存在成瘾以维持生存和转移,而消除许多功能获得(GOF)的突变型p53可减少成瘾和转移,从而诱导肿瘤细胞死亡和体内肿瘤负荷。然而,GOF本身似乎并不是所有p53突变体中的普遍现象。

[0041] 从治疗的角度看,突变型p53将因此有望成为治疗癌症的主要靶标。然而,缺乏开发靶向突变型p53的试剂的兴趣源于以下事实:p53被认为是“无成药性”转录因子。这种信念阻碍了p53靶向剂的开发进展。而且,最近表明,并非所有突变体在形式和功能上都是相同的,并且与能够选择性靶向各种p53突变体的单一药剂相反,靶向突变型p53将需要大量分子。另外,为了有效,所有这些分子均不应影响野生型形式的功能。因此,用于药物开发中的当前技术尚未应用,也没有成功地靶向突变型p53。

[0042] 已开发小干扰RNA(siRNA)用于许多靶标,从而成功地沉默其表达,并且如本文所示,可以将这些小干扰RNA视为靶向各种突变型p53的途径。然而,尚未常规产生能够识别单核苷酸变化的siRNA,这主要是由于无法实现靶向单核苷酸变化的特异性且不影响预期靶标的野生型对应物。尚未常规使用这些技术以产生针对相同基因上的多种遗传改变的试剂。因此,已探索了产生对六个热点突变(例如,p53的六个热点突变)特异的siRNA的可能性。本文提供的数据证明了此类突变型p53特异性siRNA(称为MupSi)的产生,并证明了其在选择性沉默预期突变型p53形式的表达中的效用,并且针对其他突变体或针对野生型蛋白无交叉反应性。另外,已使用这些siRNA来证明突变型p53相对于野生型形式的显性负(DN)活性的改善,从而使肿瘤细胞对治疗性治疗敏感。而且,它们还消除了癌细胞用于维持生存对突变型p53的成瘾,从而导致表达突变型p53的肿瘤细胞的细胞死亡。最后,已表明siRNA可用作治疗剂,并且能够阻滞体内肿瘤生长且没有任何副作用或器官毒性(数据未示出)。本文示出了这种突变型p53特异性siRNA(称为MupSi)的产生。另外,证明了它们在选择性沉默预期突变型p53形式的表达中的能力,并且针对其他突变体或针对野生型蛋白无交叉反应性。另外,已显示这些RNA相对于野生型形式改善了突变型p53的显性负(DN)活性,从而导致突变型肿瘤细胞对治疗性治疗的敏化。而且,还显示这些RNA消除了癌细胞用于维持生存对突变型p53的成瘾,从而导致表达突变型p53的肿瘤细胞的细胞死亡。最后,已表明这些RNA可用作治疗剂,并且能够阻滞体内肿瘤生长且不导致任何副作用或器官毒性。总之,该数据证明可以常规产生突变特异性RNA(例如siRNA),并且这些突变特异性siRNA可有效治疗癌症。

[0043] 术语“RNAi”是指RNA干扰,这是一种RNA分子抑制基因功能的过程。这种干扰是基

于双链RNA干扰或抑制具有相应碱基序列的基因的表达的能力。例如,两种类型的小核糖核酸(RNA)分子-微小RNA(miRNA)和小干扰RNA(siRNA)-对RNA干扰很重要。RNA分子(或RNA)是基因的直接产物,并且这些小RNA可以例如通过防止信使RNA(mRNA)产生蛋白质而结合至例如其他特异性mRNA分子,从而增加或降低其活性。

[0044] 如本文所用,术语“RNA”,即“核糖核酸”是指由沿核苷酸链组成的有机分子,其中糖是核糖(或其变体)并且碱基是腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤和尿嘧啶。在本披露中,术语“siRNA”和“shRNA”是指使用RNA干扰(RNAi)的概念进行操作的一类双链RNA分子。siRNA和shRNA之间的区别在于它们的二级结构,因为shRNA的命名是由于其二级结构中存在紧密的发夹回转(hairpin turn)。

[0045] 因此,在一个实例中,本文披露的核酸序列是短干扰RNA(siRNA)序列或短发夹RNA(shRNA)序列。在另一个实例中,核酸序列是siRNA。在又另一个实例中,核酸序列是shRNA。

[0046] 在一个实例中,siRNA序列的长度在15至150个碱基对之间、在60至100个碱基对之间、在70至120个碱基对之间、约60个碱基对、约65个碱基对、约70个碱基对、约75个碱基对、约80个碱基对、约85个碱基对、约90个碱基对、约95个碱基对、约100个碱基对、约105个碱基对、或约110个碱基对。在另一个实例中,siRNA序列的长度是至少15个碱基对、至少20个碱基对、至少25个碱基对、至少30个碱基对、至少35个碱基对、至少40个碱基对、至少45个碱基对、或至少50个碱基对。

[0047] 在另一个实例中,shRNA序列包含具有以下长度的茎:在15至30个碱基对之间、在19至29个碱基对之间、在15至20个碱基对之间、在20至30个碱基对之间、约18个碱基对、约19个碱基对、约20个碱基对、约21个碱基对、约22个碱基对、约23个碱基对、约24个碱基对、约25个碱基对、约26个碱基对、约27个碱基对、约28个碱基对、约29个碱基对、或约30个碱基对。

[0048] 在又另一个实例中,所披露的核酸序列包含以下的序列中的一种:SEQ ID NO.7、SEQ ID NO.8、SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.11、SEQ ID NO.44、SEQ ID NO.12、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.15、SEQ ID NO.45、SEQ ID NO.46、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、SEQ ID NO.19、SEQ ID NO.47、SEQ ID NO.20、SEQ ID NO.21、SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.32、或SEQ ID NO.33。

[0049] 总体而言,本文示出的数据(例如,如本文披露的图2A-D中的数据)表明,通过广泛筛选可能可重复地产生对单核苷酸变化具有高特异性和选择性的siRNA。因此,在一个实例中,本文披露的核酸序列包含以下的序列中的一种:SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、或SEQ ID NO.21。

[0050] 在一个实例中,本文披露的核酸序列包含以下的序列中的一种:SEQ ID NO.8 (R175H Si-1-R175H)、SEQ ID NO.9 (R175H Si-2-R175H)、SEQ ID NO.12 (R248W/Q Si-3-R248W/R248Q)、SEQ ID NO.13 (R248W/Q Si-4-R248W/R248Q)、SEQ ID NO.16 (R249S/M/G Si-5-R249S/R249M/R249G)、SEQ ID NO.17 (R249S/M/G Si-6-R249S/R249M/R249G)、SEQ ID NO.20 (R273H/L Si-7-R273H/R273L) 或SEQ ID NO.21 (R273H/L Si-8-R273H/R273L)。

[0051] 在又另一个实例中,本文披露的核酸序列包含以下的序列中的一种:SEQ ID NO.26、SEQ ID NO.27、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.29、SEQ ID NO.30、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.32、或SEQ ID NO.33。

[0052] 在另一个实例中,本文披露的核酸序列包含以下的序列对中的一种:SEQ ID NO.26和SEQ ID NO.27;SEQ ID NO.28和SEQ ID NO.29;SEQ ID NO.30和SEQ ID NO.31;或SEQ ID NO.32和SEQ ID NO.33。

[0053] 在再一个实例中,在一个实例中,本文披露的核酸序列包含以下的序列中的一种:SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、或SEQ ID NO.21。

[0054] 在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.7。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.8。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.9。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.11。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.44。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.12。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.13。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.15。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.45。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.46。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.16。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.17。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.19。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.47。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.20。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.21。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.26。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.27。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.28。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.29。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.30。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.31。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.32。在一个实例中,核酸序列是SEQ ID NO.33。

[0055] 在一个实例中,核酸序列包含SEQ ID NO.24 (AAGCTTT)、SEQ ID NO.40 (TTCAAGAGA) 和SEQ ID NO.41 (TTTTTA),由此该核酸序列具有以下结构:5' - AAGCTTTN₍₁₉₋₂₉₎ (正义序列) TTCAAGAGAN₍₁₉₋₂₉₎ (反义序列) TTTTTA-3'。这是示例性shRNA上端寡核苷酸,由此(除了被称为N₍₁₉₋₂₉₎的siRNA序列之外)在每个寡核苷酸的前端和末端处指示的核苷酸针对限制酶酶切位点。中间序列(在该实例中为TTCAAGAGA)用于茎环的形成。

[0056] 在另一个实例中,核酸序列包含SEQ ID NO.25 (AGCTTAAAAA)、SEQ ID NO.42 (TCTCTTGAA) 和SEQ ID NO.43 (GGG),由此该核酸序列具有以下结构:5' - AGCTTAAAAAN₍₁₉₋₂₉₎ (正义序列) TCTCTTGAAAN₍₁₉₋₂₉₎ (反义序列) GGG-3'。这是示例性shRNA下端寡核苷酸,由此(除了被称为N₍₁₉₋₂₉₎的siRNA序列之外)在每个寡核苷酸的前端和末端处指示的核苷酸是针对限制酶酶切位点。中间序列(在该实例中为TCTCTTGAA)用于茎环的形成。

[0057] 本文呈现的结果表明,确实可以定期产生具有高特异性并且能够区分一个核苷酸变化的siRNA,并突出显示了它们在靶向四个p53热点突变体中的效用。这四个p53突变体占癌症中发现的所有p53突变的约20%,并因此代表了靶向所有癌症的约10%的可能性。靶向突变型p53导致化学敏感性提高,因为它对杂合细胞中的野生型p53蛋白没有影响,从而允许其能够诱导细胞死亡。另外,在仅表达突变型p53的癌细胞中消除突变型p53的表达(如通常在癌症晚期观察到的,其中由于杂合性丧失,导致野生型p53等位基因丧失)即使用作单一疗法也可导致体内肿瘤生长的阻滞。该数据突出显示了这些p53突变体特异性siRNA的治疗用途,与其他化学治疗剂或放射疗法组合可以进一步增强其作用。因此,这些数据直接为靶向突变型p53提供了动力以获得临床益处,并将其很快转化到临床环境中。

[0058] 选择突变型p53来证明核苷酸特异性siRNA,因为它是所有癌症中最具突变性的基因,并且重要的是,并非所有突变体均以相似的方式表现,因此需要选择性药剂以靶向它们中的每一个。而且,靶向突变型p53代表了巨大的未开发途径,该途径可阻滞肿瘤细胞生长

和转移并提高对一般细胞毒剂的敏感性,因此发现其适用于大多数癌症类型。相似地,认为靶向与突变型p53结合的、具有特异性siRNA的其他驱动癌基因可增强治疗效果,并因此,也可能在临床环境中使用针对各种癌症类型中主要遗传改变的siRNA的混合物。

[0059] 因此,在一个实例中,披露了治疗受试者的癌症的方法。在另一个实例中,该方法包括向受试者施用如本申请所述的一种或多种核酸序列。在又另一个实例中,核酸序列靶向靶基因内的一个或多个点突变。在另一个实例中,靶基因是一个或多个肿瘤抑制基因。在又另一个实例中,该方法包括向受试者施用如本文披露的一种或多种核酸序列,其中这些核酸序列靶向靶基因内的一个或多个点突变,其中该靶基因是肿瘤抑制基因。本文还披露了如本文披露的一种或多种核酸序列在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途。本文进一步披露了本文披露的一种或多种核酸序列在疗法中的用途。在另一个实例中,本文披露的核酸序列用于在疗法中使用。

[0060] 如本文所用,术语“治疗(treat或treating)”旨在是指提供药学有效量或治疗有效量的例如其核酸、蛋白质或其各自的药物组合物或药物,该量足以预防性地防止虚弱状态和/或不健康状态的发展;和/或向受试者提供足够量的其药物组合物或药物,以减轻或消除疾病状态和/或疾病状态的症状、以及虚弱状态和/或不健康状态。如本领域中已知的,给定组合物的药学有效量也将取决于施用途径。通常,如果通过例如胃肠道(例如通过栓剂、直肠或通过胃内探针)施用,则所需的量较高,而如果施用途径是胃肠道外的(例如静脉内),则所需的量较低。

[0061] 已经显示了对在人癌症中具有高度代表性的各种p53突变体具有高特异性的siRNA的产生和表征。该数据直接转换用于具有适当递送机制的临床评估。

[0062] 在一个实例中,施用核酸序列中的一种或多种导致以下作用中的一种或多种,这些作用包括但不限于:细胞死亡、对靶基因中的任何一个或多个成瘾的消除、显性负效应、对一种或多种抗癌剂的敏感性增加、以及肿瘤生长的阻滞或停止。在另一个实例中,所披露的核酸序列与治疗剂一起施用。

[0063] 如本文所用,术语“治疗剂”是指当适当施用至受试者时能够诱导期望的治疗效果的化学化合物或组合物。例如,从施用抗糖尿病剂以治疗例如受试者的糖尿病的意义上而言,其被认为是治疗剂。因此,在一个实例中,本文披露的方法包括施用治疗剂。在另一个实例中,治疗剂是抗癌剂。在另一个实例中,抗癌剂选自由以下组成的组:10-羟基喜树碱、白蛋白结合型紫杉醇(abraxane)、醋地砜(acediasulfone)、阿柔比星(aclarubicine)、盐酸阿克拉菌素(aklavine hydrochloride)、安巴腙、安吖啶、氨鲁米特、阿那曲唑、盐酸安西他滨、L-天冬酰胺酶、硫唑嘌呤、博来霉素、硼替佐米、白消安、亚叶酸钙、卡铂、卡培他滨(carpecitabine)、卡莫司汀、塞来昔布、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、秋水仙碱、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素、氨苯砜、柔红霉素、双溴丙脒、己烯雌酚(diethylstilbestrole)、多西他赛、阿霉素、吐根碱、烯二炔、表柔比星、埃博霉素B、埃博霉素D、磷酸雌莫司汀(estramucin phosphate)、雌激素、炔雌醇、依托泊苷、盐酸表柔比星、氟维司群(faslodex)、夫拉平度(flavopiridol)、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、磷雌酚(fosfestrol)、呋喃唑酮、藤黄酸酰胺、藤黄酸、吉西他滨、促性腺激素释放激素类似物、赫赛汀、六甲嘧胺、羟基脲、羟甲基硝基呋喃妥因、己酸羟孕酮、羟基脲、伊达比星、碘昔、异环磷酰胺、干扰素 γ (INF- γ)、伊立替康、伊马替尼、伊立替康、来曲

唑、亮丙瑞林、洛莫司汀、勒托替康、硫酸磺胺米隆油酰胺(mafenide sulfate olamide)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、乙酸甲羟孕酮、乙酸甲地孕酮、美法仑、米帕林、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、甲硝唑、丝裂霉素C、盐酸米托蒽醌、米托肼、米托坦、米托蒽醌、光辉霉素、萘啶酮酸、硝呋太尔、硝呋齐特、硝呋三嗪(nifuralazine)、硝呋莫司、尼莫司汀、尼诺唑(ninorazole)、呋喃妥因、氮芥(nitrogen mustard)、oleomucin、恶喹酸、奥沙利铂、乌本昔、喷他脒、喷司他丁、非那吡啶、酞磺胺噻唑、乙酸苯汞、苦鬼臼毒素、哌泊溴烷、泼尼莫司汀、泼尼松、preussin、扁蒴藤素(pristimerin)、甲基苄肼、乙胺嘧啶、盐酸阿的平、雷替曲塞、雷帕霉素、鱼藤酮、罗非昔布、罗格列酮、雷洛昔芬、柳氮磺胺吡啶、吖啶黄(scriflavinium chloride)、司莫司汀、链脲霉素、磺胺脲、磺乙酰胺、磺酰氯哒嗪(sulfachloropyridazine)、磺胺嘧啶、磺胺戊烯、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺乙二唑、磺胺二甲异噁唑、磺胺胍、磺胺胍诺、磺胺甲二唑(sulfamethizole)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole)、复方新诺明(co-trimoxazole)、磺胺甲氧基二嗪(sulfamethoxydiazine)、磺胺甲氧基哒嗪(sulfamethoxypyridazine)、磺胺噁唑、磺胺、磺胺培林、磺胺苯吡唑、磺胺噻唑、磺胺索嘧啶、星形孢菌素、他莫昔芬、紫杉醇、替莫唑胺(temozolimide)、替尼泊昔、tertiposide、睾酮、丙酸睾酮(testosteronpropionate)、硫柳汞(thimerosal)、硫鸟嘌呤、噻替派、咪唑、拓扑替康、曲妥珠单抗、三亚胺醌、曲奥舒凡(treosulfan)、甲氧苄啶、曲洛磷胺、UCN-01、长春碱(vinblastine)、硫酸长春碱、长春新碱(vincristine)、硫酸长春新碱、长春地辛(vindesine)、长春瑞滨和佐柔比星,或它们各自的衍生物或其类似物。在一个实例中,化学治疗剂是但不限于顺铂、依托泊昔、白蛋白结合型紫杉醇、曲妥珠单抗、吉西他滨、伊马替尼、伊立替康、奥沙利铂、硼替佐米、甲氨蝶呤、苯丁酸氮芥、阿霉素、达卡巴嗪、环磷酰胺、紫杉醇、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、长春新碱、多西他赛、长春瑞滨、埃博霉素B、吉非替尼及其组合。在另一个实例中,抗癌剂是但不限于顺铂、依托泊昔、白蛋白结合型紫杉醇、曲妥珠单抗、吉西他滨、伊马替尼、伊立替康、奥沙利铂、硼替佐米、甲氨蝶呤、苯丁酸氮芥、阿霉素、达卡巴嗪、环磷酰胺、紫杉醇、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、长春新碱、多西他赛、长春瑞滨、吉非替尼、埃博霉素B及其组合。

[0064] 因此,本文披露的方法可用于治疗过度增生性疾病,例如癌症。在一个实例中,发现癌症位于或起源于哺乳动物身体的器官和区域,该癌症包括但不限于:食道癌、上呼吸道癌、皮肤癌、上皮癌、中枢神经系统癌症、卵巢癌、乳腺癌、胃-肠癌、大肠癌、小肠癌、结肠直肠癌、肝癌、腺癌、肾上腺腺癌、甲状腺癌、肺癌、胰腺癌、肾癌、子宫内膜癌、造血系统癌症、肌肉癌、结缔组织(如腱或软骨)癌、骨骼癌、软组织癌、淋巴组织癌、淋巴癌和免疫系统癌症。在另一个实例中,癌症的类型是但不限于黑色素瘤、骨髓瘤、恶性上皮肿瘤、肉瘤、淋巴瘤、母细胞瘤和生殖细胞肿瘤。在另一个实例中,癌症是但不限于:肺癌、恶性黑色素瘤、结肠癌、乳腺癌、子宫内膜腺癌、横纹肌肉瘤、肾腺癌、结肠腺癌、肝细胞癌、支气管鳞状细胞癌、卵巢癌和胰腺癌。

[0065] 在另一个实例中,癌症是包括但不限于以下的癌细胞系:A549、A375、HCT116、RKO、AU565、SKBR3、HCC1395、HEC 1A、RD、786-0、COLO-320DM、PLC-PRF/5、KNS-62、BT549、ASPC1、WiDR1和H1975。在另一个实例中,癌症取决于肿瘤抑制基因中的一个或多个。在又另一个实例中,肿瘤抑制基因是p53。在再一个实例中,癌症取决于肿瘤抑制基因,其中该肿瘤抑制基因是p53。

[0066] 本文呈现的结果表明,确实可以定期产生具有特异性并且能够区分一个核苷酸变化的siRNA,并突出显示了它们在靶向四个p53热点突变体中的效用。本文披露的四个p53突变体占癌症中发现的所有p53突变的约20%,并且靶向它们代表了靶向所有癌症的约10%的可能性。靶向突变型p53导致化学敏感性提高,因为它对杂合细胞中的野生型p53蛋白的影响微乎其微或没有影响,从而允许后者能够诱导细胞死亡。另外,在仅表达突变型p53的癌细胞中消除突变型p53的表达(如通常在癌症晚期观察到的,其中由于杂合性丧失,导致野生型p53等位基因丧失)即使用作单一疗法也可导致体内肿瘤生长的阻滞。该数据突出显示了由如本文披露的RNA构建体提供的治疗潜力,与其他化学治疗剂或放射疗法组合可以进一步增强其作用。因此,本文示出的数据还证明了靶向突变型p53直接具有临床益处,并将转化到临床环境中。

[0067] 已经成功产生了RNA(例如siRNA)以沉默基因表达,并且已经将这些RNA广泛用于研究中并且还将其转化到临床环境中。这些siRNA中的大多数靶向全基因(蛋白质),而与其他相关基因无交叉反应性。然而,对于产生能够辨别疾病状态中发现的单核苷酸变化的siRNA,仅存在很少的实例。已针对单核苷酸产生的、具有一些特异性的siRNA包括针对R248W突变型p53的那些。尽管经常注意到这些siRNA与野生型蛋白具有一定程度的交叉反应性,但已显示其在报告物测定和过表达系统中具有相对特异性。而且,许多siRNA尚未在大量细胞系中进行测试以明确地确定其特异性。这些因素突出显示了在获得siRNA方面的巨大挑战,这些siRNA在核苷酸水平处显示了特异性并且可用于影响正常生理的多个过程的关键基因(像p53)。本文示出的数据表明,在获得高特异性siRNA之前必须对大型siRNA文库进行测试,尤其是在siRNA序列中添加或减去几个核苷酸可产生巨大差异。siRNA序列中非常细微的变化可显著影响特异性,并导致在选择性方面的明显差异,并且突出显示了对各种序列的作用无法进行直观预测。尽管有相对可能获得看起来具有核苷酸特异性的siRNA,尤其是当针对一个或两个细胞系或使用转染系统进行测定时,但针对大批细胞系统进行的分析对于确保其具有特异性是至关重要的。当这些siRNA旨在用于临床环境中时,这点至关重要。本文呈现的siRNA/shRNA序列组代表一组独特的RNA,这些RNA能够特异性靶向具有在p53处的突变的所有癌症的几乎20%,这支持了以下观点:通过充分筛选,可以产生核苷酸特异性siRNA/shRNA并在临床试验中对其进行评估。

[0068] 选择突变型p53来证明具有产生核苷酸特异性siRNA的能力,因为它是所有癌症中最具突变性的基因。重要的是,并非所有p53突变体均以相似的方式表现,因此,靶向突变型p53需要选择性药剂以单独靶向它们中的每一个。而且,靶向突变型p53代表了未开发途径,该途径可阻滞肿瘤细胞生长和转移并提高对一般细胞毒剂的敏感性,因此发现其适用于大多数癌症类型。如前所突出显示的,突变型p53可以在肿瘤发生的早期与野生型等位基因一起存在,或在晚期由于LOH而在野生型等位基因丧失后单独存在。在早期,突变型p53通过显性负(DN)效应抑制WT蛋白,并且在晚期,该突变型提供了独立于野生型等位基因的生存优势。本文示出的数据证明,突变型p53特异性siRNA能够缓解显性负(DN)效应以及癌细胞对突变型p53的成瘾两者,并因此,只要突变存在于肿瘤中就可以广泛使用该突变型p53特异性siRNA。相似地,认为靶向与突变型p53结合的具有特异性siRNA的其他驱动癌基因可增强治疗效果,并且认为,针对各种癌症类型中主要遗传改变的siRNA(或能够沉默靶基因表达的其他RNA)的混合物将具有临床益处,其目的是使交叉反应性最小化并因此减少与当今许

多癌症药物相关的副作用。

[0069] 本文说明性描述的本发明可以适当地在本文中未具体披露的任何一种或多种要素、一种或多种限制不存在的情况下实施。因此,例如,术语“包含”、“包括”、“含有”等应被宽泛地解读且无限制。另外,本文所使用的术语和表达被用作描述的术语而非限制的术语,并且无意图在使用这些术语和表达时,排除掉显示和描述的特征的任何等同物或其部分,而是认可各种修饰可以在本发明请求保护的范围内。因此,应当理解的是,虽然本发明通过优选的实施例以及任选的特征进行特定的披露,但本领域技术人员可以使用本文所披露于其中的本发明的修饰及变化,且认为这样的修饰及变化在本发明的范围内。

[0070] 如本申请中所用,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数指代物,除非上下文另外明确规定。例如,术语“遗传标记”包括多个遗传标记,包括其混合物和组合。

[0071] 如本文所用,在配制品成分的浓度的上下文中,术语“约”典型地意指所述值的+/-5%,更典型地所述值的+/-4%,更典型地所述值的+/-3%,更典型地所述值的+/-2%,甚至典型地所述值的+/-1%,并且甚至更典型地所述值的+/-0.5%。

[0072] 贯穿本披露,某些实施例可以以范围形式披露。应当理解,以范围形式描述仅为了方便和简洁,并且不应当被视为对所披露范围的范围的硬性限制。因此,应当将范围的描述视为已明确披露所有可能的子范围以及该范围内的单独数值。例如,对诸如1至6的范围的描述应当被视为已经明确披露诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等子范围,以及该范围内的单独数字,例如1、2、3、4、5和6。无论范围的宽度如何,这都适用。

[0073] 也可以在本文中宽泛且概括地对某些实施例进行描述。落在一般披露内容内的每一个更窄的种类和子类分组也形成了本披露的一部分。这包括实施例的一般描述,且具有从该种类中去除任何主题的条件或负面限制,而不管该去除的材料是否在本文中具体陈述。

[0074] 已经在本文中宽泛且概括地对本发明进行了描述。落在一般披露内容内的每一个更窄的种类和子类分组也形成了本发明的一部分。这包括本发明的一般描述,且具有从该种类中去除任何主题的条件或负面限制,而不管该去除的材料是否在本文中具体陈述。

[0075] 其他实施例在以下权利要求和非限制性实例内。此外,当本发明的特征或方面以马库什组(Markush group)描述时,本领域技术人员应意识到本发明还由此描述马库什组的任何单个个体或亚组个体。

[0076] 实验部分

[0077] 材料与方法

[0078] 细胞培养

[0079] 细胞系获得自ATCC和JCRB,并在标准条件下(37°C,5%CO₂)用以下培养基培养:针对H1299、RKO、HCT116、A549、A375、SKBR3、RD、PLC-PRF-5、KNS-62和HEC1A细胞系的含4.5g/L葡萄糖和10% FBS(海克隆公司(Hyclone))的DMEM;针对AU565、HCC1395、COLO-320DM、786-0、ASPC-1、WiDR和H1975的RPMI-1640和10% FBS(海克隆公司);针对BT-549、RKO p53+/-和+R248W以及HCT p53+/-和+R248W的含0.023IU/ml胰岛素和10% FBS(海克隆公司)的RPMI-1640。

[0080] siRNA设计

[0081] 设计了大型siRNA文库以靶向p53热点突变(R175H、R248W、R249S和R273H),并从中筛选了8个用于这四个突变体的进一步表征(si-1-8)。将针对我们的筛选中产生的所有p53等位基因的siRNA用作泛p53靶向的阳性对照。对照乱序siRNA在人类基因组中没有生物信息学预测的序列靶标,并将其用作阴性对照。

[0082] p53 siRNA/shRNA和RNA的转染以及蛋白质分析

[0083] 转染前24小时,将 2.5×10^5 个细胞/孔接种到6孔板中。按照制造商的说明,使用LipofectamineTM 2000试剂(英杰公司(Invitrogen))将细胞用80nM siRNA或1 μ g的pRetroSuper-shRNA转染。一式三份进行每个转染,并且在转染后72小时,用1mL的TRIzol试剂(英杰公司)收获细胞。为了与p53 cDNA共转染,在siRNA转染后24小时转染后者,并在cDNA转染后48小时(即在siRNA转染后72小时)分析细胞。

[0084] 使用英杰公司的标准方案进行总RNA分离,并使用Superscript II逆转录(英杰公司)制备cDNA。对以下p53靶基因进行定量和半定量逆转录酶(RT)-PCR分析:p21、pig3、mdm2、noxa和gapdh,如所描述的。

[0085] 在裂解缓冲液(0.7% NP40;Tris.C1,pH 7.4;70mM EDTA;200nM NaCl,在冰上持续10分钟)中制备细胞提取物。蛋白质定量后,将30-50 μ g裂解物加载到SDS-聚丙烯酰胺凝胶(12%)电泳(SDS-PAGE)上,并且将分解的蛋白质电泳式转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(英杰公司,布雷达市,荷兰)。用ECL(GE医疗集团(GE Healthcare),沃基肖,威斯康星州,美国)进行蛋白质的检测。用小鼠抗p53单克隆抗体(来自圣克鲁斯生物技术公司(Santa Cruz Biotechnology)的D0-1,#SC126)检测p53,并且用兔抗肌动蛋白抗体(西格玛公司(Sigma),#82061)检测肌动蛋白。在来自第一抗体的背景很高的情况下,使用等量的裂解物运行平行凝胶,并分别用各种抗体对其进行探测。使用ImageJ软件通过泳道标绘和peal标记(peal labelling)(信号强度定量)进行蛋白质印迹的定量。对于每个样品,计算p53与肌动蛋白条带强度的比率,并将其标准化为si-scr/sh-scr对照的比率。数值代表标准化倍数变化。

[0086] 细胞死亡测定

[0087] 将细胞用80nM siRNA转染并在转染后72小时收获,包括培养基中的漂浮细胞。将细胞在PBS中洗涤2X,并固定在70%乙醇中过夜,并且用RNA酶处理20分钟,然后添加5 μ g/ml碘化丙啶(PI),并通过流式细胞术(BD生物科学公司(BD Biosciences)FACScalibur)进行流式细胞术分析以测量细胞凋亡(亚G1 DNA含量)。

[0088] shRNA模板寡核苷酸的设计以及质粒的构建

[0089] 将shRNA靶序列设计为与前述siRNA序列同源。pRetro-Super载体含有用于shRNA表达的人H1聚合酶III(pol-III)启动子。将每个shRNA插入物设计为合成双链体,其中突出端与通过限制酶(RE)酶切产生的那些相同(在5'处的BamHI以及在3'处的HindIII)。每个发夹的编码区嵌套在单个寡核苷酸(上部寡核苷酸:5' - AAGCTT₍₁₉₋₂₉₎ (正义序列) TTCAAGAGAN₍₁₉₋₂₉₎ (反义序列) TTTTTA-3')及其互补等同物(下部寡核苷酸:5' - AGCTTAAAAN₍₁₉₋₂₉₎ (正义序列) TCTCTTGAAN₍₁₉₋₂₉₎ (反义序列) GGG-3')内。它们的大小范围为从60-100个碱基(对于具有19-29bp的茎的发夹)。每个双链体含有转录起始碱基、shRNA编码区(正义茎、环序列和反义茎)、终止间隔子、以及由至少4个“T”的运行组成的pol-III终止信号。转录起始碱基是“A”或“G”(有效的pol-III转录起始所需的),并且仅在发夹茎的第

一个碱基不是嘌呤的情况下才包括在内。终止间隔子是除“T”以外的任何碱基，并且仅在反义茎的最后一个碱基为“T”时才包括在内，以防止通过“T”的早期运行而提前终止。以最小的合成和纯化规模(0.05μM并且脱盐，西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich))订购寡核苷酸。将每个寡核苷酸以100μM的浓度重悬于水中，并且将来自每个寡核苷酸的10μl添加到20μl的2X退火缓冲液(200mM乙酸钾、60mM HEPES KOH pH 7.4、4mM乙酸镁)中，加热至95°C持续10分钟，缓慢平衡至室温，并稀释1:1000倍用于连接。将插入物和载体连接，并转化到TOP10或DH5α感受态细胞中。在转染前，选择并纯化具有shRNA插入物的克隆。

[0090] 集落形成测定

[0091] 将指示的细胞系用指示的shRNA质粒转染(这些shRNA质粒含有用于沉默各种突变型p53的寡核苷酸序列)，并在15μg/ml的杀稻瘟菌素(blasticidin) (西格玛公司，美国)上进行选择持续2周。如所描述的，用结晶紫溶液(默克公司(Merck))对集落染色。

[0092] 产生表达shRNA的细胞系用于体内肿瘤生长分析

[0093] 使用HEK293T细胞中的pCL-Ampho双嗜型病毒包装质粒产生针对p53突变体特异性shRNA的病毒。简而言之，通过使用lipofectamine2000™用1.5μg合适的shRNA和1.0μg包装质粒转染HEK293T细胞来制备逆转录病毒。在转染后24h收获逆转录病毒上清液，将其通过0.45μM注射器式过滤器过滤，等分并快速冷冻。在6cm培养皿中一式三份存在8μg/ml聚凝胺(西格玛公司)的情况下，使用3.5ml逆转录病毒上清液在10cm培养皿中转导5x 10⁵个细胞。第二天进行第二次转导。在第二次转导后，使用10μg/ml的杀稻瘟菌素选择细胞持续48h，并收获这些细胞用于体内异种移植研究。将平行培养物用于免疫印迹分析以评估p53敲低的效率。

[0094] 收获表达各自shRNA的细胞系，并将其与在冰上的50%基质胶(Corning®Matrigel®基底膜基质)(西格玛公司)混合，并且皮下注射到雌性C.B-17SCID小鼠(6-8周龄)的右侧腹中，并且将用乱序shRNA转导的细胞注射到每只小鼠的左侧腹中。每周两次用卡尺评估肿瘤体积，并且一旦肿瘤变得明显就记录下数值。根据 $V=1/2*(长*宽^2)$ 进行肿瘤体积的计算。将数值绘制为平均值及标准偏差。使用非配对(双尾)t检验，用PRISM软件(图形软件公司(GraphPad Prism Software Inc.)，圣地亚哥，加利福尼亚州)来计算生长曲线之间的统计学显著性。每组中使用四-五只小鼠进行每个处理。

[0095] 当处死小鼠时，将肿瘤组织切除并固定在10%福尔马林中过夜，脱水并包埋在石蜡中，并且制备5μm切片。使用p53 1C12小鼠单克隆抗体(细胞信号传导技术公司(Cell Signaling Technology), #2524)以1:1500的浓度进行抗p53染色。使用Dako REAL™EnVision™检测系统、过氧化物酶/DAB+、兔/小鼠(#5007)开发染色信号。所有动物实验均按照机构动物护理和伦理委员会所批准的进行。

[0096] 结果

[0097] 设计和选择针对热点p53突变体的等位基因特异性siRNA

[0098] 产生siRNA的起点是这些siRNA仅能够沉默突变型p53等位基因，而不会影响WT p53表达。为此，通过进行序列步移产生了具有大量siRNA的文库，使得突变型核苷酸的位置相对于整个siRNA链变化。所有siRNA在一系列稳定表达各种p53突变体或温度敏感的(TS) WT p53的基于H1299的同基因细胞系中转染，并且示出了来自代表性siRNA的数据，这些数据显示了针对四个热点突变体R175H、R248W、R249S和R273H的特定活性(图1A)。这些是对各

自的p53突变体具有特定活性的少数经筛选的siRNA。所有指示的siRNA在所有同基因细胞系中瞬时转染,24小时后将其收获通过免疫印迹分析p53蛋白表达。如图1B中所示,与乱序siRNA或未转染的细胞(凝胶图像右边的最后3个泳道)相比,无差别地靶向所有p53的si-p53能够降低p53在所有细胞系中的表达。大多数突变特异性siRNA均显示出特异性,并且能够区分预期突变体,而对其他突变体或WT p53的影响最小至没有:例如,对R175H突变型p53具有特异性的si-1和si-2能够降低R175H的表达,但对其他p53突变体和WT p53的影响最小。相似地,对R248W突变型p53具有特异性的si-3和si-4能够明显降低R248W突变体的表达,而不影响其他突变体。然而,另一方面,尽管同样靶向R248W突变体的si-3能够降低其预期突变的表达,但其也导致WT p53表达的降低。相似地,尽管靶向R273H的si-8非常特异,但si-7也对WT p53和R249S突变体两者有一定影响。该数据表明,评估针对在多个细胞系统上的相同突变产生的多个siRNA对于获得高突变体特异性试剂至关重要。

[0099] 突变特异性siRNA介导的内源性突变型p53表达的沉默

[0100] 在表达WT或各种突变型p53的17个不同的癌细胞系组上评估所选siRNA的功效和特异性(表1)。与H1299同基因细胞系相似,将这些细胞用特异性siRNA或阳性对照si-p53转染,阳性对照si-p53无差别地抑制WT和突变型p53两者的表达(图2A-D)。如前关于H1299同基因细胞环境所述,si-2能够在表达R175H突变体的细胞(即HCC1395、SKBR3和AU565)中特异性下调该突变体的表达,而不会影响三个细胞系(即HCT116、A549和A375)中的WT p53的表达(图2A)。相似地,对R248W突变型p53具有特异性的si-4有效抑制在表达R248W突变体的COLO-320DM、786-0和RD细胞中的p53表达(图2B),而对其他细胞系中的WT p53表达没有明显影响。使用对R249S突变体具有选择性的si-6(在BT549、KNS-62和PLC-PRF5细胞中)和对R273H具有特异性的si-8(在表达R273H的ASPC1、H1975和WIDR细胞中)获得了相似结果(图2C和D)。针对特定突变体的其他siRNA(si-1、si-3、si-5和si-7)也对预期突变体具有特异性,偶尔会对WT p53产生轻微影响。因此,还在各种其他表达突变型p53的细胞上评估了每种突变型p53特异性siRNA的特异性。如图8中所示,si-2、si-4、si-6和si-8具有高特异性和且不影响其他突变型p53在所有测试的细胞系中的表达。然而,如前关于H1299同基因细胞系统所述,si-1、si-3、si-5和si-7偶尔会对一些细胞系中的其他突变体产生影响。值得注意的是,针对R248W的si-3与靶向该特定突变的公开的siRNA相似(Martinez, L.A., Naguibneva, I., Lehrmann, H., Vervisch, A., Tchénio, T., Lozano, G., 和Harel-Bellan, A. (2002). Synthetic small inhibiting RNAs: efficient tools to inactivate oncogenic mutations and restore p53 pathways[合成的小抑制RNA:灭活致癌突变并恢复p53途径的有效工具]. PNAS;99;14849-14854)。然而,广泛的分析表明,尽管如Martinez等人公开的siRNA确实靶向R248W,但它还具有针对一些细胞系中的WT和R175H突变体的某些非特定活性。这证明了siRNA序列中非常细微的变化显著影响特异性,并在不同序列之间的特异性方面产生了明显差异,并且突出显示了对各种序列的作用无法进行直观预测。总体而言,这些结果表明,通过广泛筛选可能可重复地产生对单核苷酸变化具有高特异性和选择性的siRNA。基于这些分析,筛选了si-2(针对R175H突变体);si-4(针对R248W突变体);si-5和si-6(针对R249S突变体);以及si-8(针对R273H突变体)进行进一步的深入表征。因此,在一个实例中,本文披露的核酸序列包含以下的序列中的一种:SEQ ID NO.9、SEQ ID NO.13、SEQ ID NO.16、SEQ ID NO.17、或SEQ ID NO.21。

[0101] 突变型p53表达的等位基因特异性敲低促进细胞凋亡并诱导p53靶基因表达

[0102] 由于表达突变型p53的肿瘤细胞已显示出用于维持生存对其存在的成瘾,首先评估了突变特异性siRNA是否能够减轻这种现象并诱导表达各自的突变体的癌细胞系中的细胞死亡。特异性siRNA在表达各自的突变型p53的细胞系中的转染普遍导致细胞凋亡增加,如通过亚G1群体的百分比所确定的(图3)。尽管未转染的细胞和经乱序siRNA转染的细胞可导致基础死亡,但泛p53 siRNA或特异性突变型p53 siRNA的转染导致在表达各自的突变型p53的细胞系中的细胞死亡增加(si-scr对比si-p53对比si-突变型p53中的亚G1群体的%→AU565:26.7对比39.6;786-0:18.0对比37.2对比31.7;BT549:10.4对比39.6对比32.9;H1975:11.5对比25.8对比28.5)(图3)。重要的是,si-p53减少了在表达WT p53的HCT116细胞中的细胞死亡(si-scr对比si-p53:7.6对比2.1),这证实了通过一般p53 siRNA或突变特异性siRNA使突变型p53表达沉默仅在表达突变型p53的癌细胞系中导致细胞死亡增加。在表达其他p53突变体的癌细胞上对siRNA进行交叉评估也证实了它们在仅沉默预期突变体而不沉默其他突变体方面的特异性(图9)。使用化学治疗剂顺铂(CDDP)同时处理这些细胞可增加细胞死亡,该细胞死亡仅在表达突变型p53的癌细胞系中由突变特异性siRNA诱导,而在表达WT p53的HCT116细胞中不被诱导(图10)。总之,这些数据表明由沉默突变型p53诱导的细胞死亡进一步与细胞毒性药物治疗协同作用。

[0103] 先前已经显示,在表达突变型p53的细胞系中突变型p53的沉默可诱导经典p53靶基因的表达,伴随着用于维持生存对突变型p53的成瘾的减轻。因此,评估了这种现象是否也发生在突变型p53特异性siRNA处理的上下文中。为此,对几个p53靶基因(如p21、Mdm2、Noxa和Pig3)进行定量RT-PCR(qPCR)(图4)。如所预期的,在表达WT p53的HCT116细胞中下调p53后,显著下调所有测试的p53靶基因的mRNA表达,但这些细胞中的突变体特异性siRNA最低程度地改变了该mRNA的表达(图4A)。相比之下,突变体特异性siRNA(即si-2、si-4、si-6和si-8)或一般p53 siRNA在表达突变型p53的细胞系中的转染导致几乎所有测试的靶基因均显著上调(图4B)。使用表达相应突变体的另一组细胞系上的突变体特异性siRNA获得相似结果(图11)。而且,如关于细胞活力实验所述,用突变型p53特异性siRNA及CDDP同时处理细胞导致对p53靶基因的诱导增强,从而突出协同作用。另外,用CDDP处理的、表达WT p53的细胞中p53表达的抑制导致靶基因表达的预期降低,这表明突变型p53 siRNA对表达突变型p53的细胞系的作用的特异性。

[0104] 使用突变型p53特异性shRNA表达载体抑制突变型p53表达

[0105] 为了评估突变型p53特异性沉默的长期作用,使用pSuper载体产生短发夹RNA,这些短发夹RNA表达来自si-2、si-4、si-6和si-8 siRNA以及一般p53特异性siRNA的突变型p53特异性序列。在瞬时转染质粒后,在表达各自的突变型p53的细胞系中进行评估其沉默特异性突变体p53的表达的功效的初步测试。免疫印迹分析表明,与对照乱序shRNA不同,突变型p53特异性shRNA在抑制各自细胞系中预期突变型p53的表达方面同样有效(图5A)。基于此,评估了抑制突变型p53表达对长期集落生长的影响,这再次证实了通过沉默各自的突变型p53可显著抑制细胞生长(图5B)。在短期细胞凋亡测定中获得了相似结果(图12A),这表明基于shRNA的突变型p53沉默在促进表达突变型p53的癌细胞的细胞死亡方面同样有效。

[0106] 还评估了突变特异性shRNA是否能够沉默在p53上的相同核苷酸位置处出现的各种突变体。为了检验该假设,使用表达R248Q突变的HEC-1A癌细胞系,并将其用最初针对

R248W突变产生的sh-4转染。如图12B-D中所示,sh-4能够沉默R248Q p53突变体的表达,其伴随在短期和长期测定中的细胞死亡增加。该数据表明,针对特定的突变核苷酸残基的突变特异性si/shRNA对该位置处的残基具有特异性,但不一定能区分经取代的残基,并因此,在一个实例中,可以将其广泛用于在特定核苷酸位置处发现的许多突变,尤其是在突变型p53的情况下。

[0107] 突变型p53的显性负效应的缓解以及突变型p53沉默后细胞死亡的增加

[0108] 尽管仅表达突变型p53导致癌细胞用于维持生存对突变蛋白的成瘾,但WT和突变型p53两者在杂合状态下的共表达导致突变蛋白相对于WT蛋白的显性负(DN)效应,这导致后者在靶基因激活和细胞凋亡诱导中的功能得到改善。先前已经显示,在这种杂合的情况下降低突变型p53的水平可导致WT p53功能的恢复,并使细胞对化学治疗剂和辐射敏感。因此,评估了突变型p53特异性shRNA在降低突变型杂合细胞中突变型p53的水平中的用途,以改善治疗应答。为此,使用两组同基因结肠直肠细胞系(RKO和HCT116),它们对p53(p53+/-)是杂合的或对于突变型p53(p53+/R248W)是杂合的。对R248W突变体具有特异性的sh-4的转染导致p53+/R248W细胞中总p53的显著降低,而在p53+/-HCT和RKO细胞中则没有降低,这表明了特异性(图6A和图13A)。长期存活的伴随分析表明,与p53+/-细胞相比,经sh-4转染的p53+/R248W细胞更容易受到生长抑制(图6B和图13B)。而且,当转染sh-4时,与p53+/-细胞相比,仅在p53+/R248W细胞中显著诱导了p53靶基因诱导(图6C和图13C),这共同表明抑制突变型p53缓解DN效应,并导致在表达突变型p53的细胞中的细胞死亡增加。

[0109] 还分析了顺铂(CDDP)处理后这些siRNA对细胞死亡的影响,这表明突变型p53的存在减少了细胞死亡(在RKO p53+/-对比p53+/R248W细胞中亚G1细胞的%,在未转染的细胞和经乱序shRNA转染的细胞中:50.9和50.3对比14.9和11.3;在HCT细胞中:61.1和51.2对比32.1和28.6),从而突出了DN效应(图6D-E和图13D-E)。相比之下,与p53+/-细胞相比,突变体特异性sh-4的转染导致特别是在p53+/R248W细胞中的细胞死亡显著增加(在RKO p53+/-细胞中亚G1细胞的%,未转染的对比sh-4shRNA:50.9对比49.7;在RKO p53+/R248W细胞中:14.9对比86.1;在HCT p53+/-细胞中:61.1对比68.8;在HCT p53+/R248W细胞中:32.1对比66.9;图13E)。总之,该数据表明,在不影响WT p53表达的情况下特异性沉默突变型p53导致DN效应的缓解,并使表达突变型p53的细胞对死亡敏感,这可通过化学治疗药治疗得到增强。

[0110] 突变型p53的治疗性靶向阻滞体内肿瘤生长

[0111] 最后,通过使用基于细胞的异种移植模型来监测表达乱序shRNA或各自的突变体特异性shRNA的癌细胞系(RD、PLC-PR5和H1975)的生长,评估了突变型p53特异性si/shRNA是否可有效阻滞体内肿瘤生长。表达各种p53突变体并被表达乱序shRNA的病毒粒子瞬时感染的癌细胞随时间推移而生长至较大体积,而表达各自的突变型p53特异性shRNA的细胞在体内的生长明显受阻(图7A)。处死后的肿瘤的组织学分析表明,表达突变体特异性shRNA的肿瘤具有显著降低的p53染色,这说明特异性shRNA可有效沉默肿瘤生长期各自的突变型p53的体内表达(图7B)。该数据确定了突变型p53特异性siRNA可有效阻滞体内肿瘤细胞生长。

[0112] 此外,检查了表达R249S突变体的、患者来源的三阴性乳腺癌异种移植肿瘤(PDX)的生长是否受到在治疗性治疗方案中使用的siRNA的影响。本质上,PDX肿瘤是原位生长的,

并且当它们达到170mm³时,每周两次用乱序siRNA或突变型p53特异性siRNA(其以纳米脂质体静脉内递送)处理小鼠,已证明可有效递送至肿瘤。当与经乱序siRNA处理的小鼠相比时,每周两次用si-6(针对R249S)进行处理可导致肿瘤生长阻滞,在处理后29天肿瘤发展为完全成熟的(full blown)肿瘤(数据未示出)。p53的免疫组织化学染色表明,突变型p53在经si-6处理的肿瘤中的表达显著降低(数据未示出)。对来自经siRNA处理的小鼠处死后的多个器官进行进一步分析,其未显示出任何异常,且排除了由于该治疗方案引起的任何副作用(数据未示出)。总之,该数据确定了可在治疗上使用突变型p53特异性siRNA来阻滞体内肿瘤生长。

[0113] 表

[0114] 表1:所使用的人肿瘤细胞系

[0115]

研究中使用的细胞系	P53状态	细胞系的起源
A549	野生型	肺癌
A375	野生型	恶性黑色素瘤
HCT116	野生型	结肠癌
RKO	野生型	结肠癌
AU565	R175H	乳腺癌
SKBR3	R175H	乳腺癌
HCC1395	R175H	乳腺癌
HEC-1A	R248Q	子宫内膜腺癌
RD	R248W	横纹肌肉瘤
786-0	R248W	肾腺癌
COLO-320DM	R248W	结肠腺癌
PLC-PRF/5	R249S	肝细胞癌
KNS-62	R249S	支气管鳞状细胞癌
BT549	R249S	乳腺癌
ASPC1	R273H	胰腺癌
WIDR1	R273H	结肠腺癌
H1975	R273H	肺癌

[0116] 序列

[0117] 野生型p53多肽可包含UniProtKB-P04637(P53_人)的氨基酸序列或由其组成:

MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEA
PRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTY
SPALNKMFCQLAKTCPVQLWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDG

[0118]

LAPPQHLIRVEGNLRVEYLDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCTTIHYNYMCNSSCMGGMNR
RPILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGDRRTEENLRKKGEPHHELPPGSTKRALPNNT
SSSPQPKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKG
QSTSRHKKLMFKTEGPDS (SEQ ID NO: 1)

SEQ ID NO:	突变	序列 (相对于野生型 p53 的突变残基显示为粗体、带下划线)
[0119]	2	MEEPQSDPSVEPLSQETFSDLWKLLENNVLSPLPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVR <u>H</u> CPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTIHYNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQTSRHKKLMFK TEGPDS
	3	MEEPQSDPSVEPLSQETFSDLWKLLENNVLSPLPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVR <u>R</u> CPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTIHYNYMCNS SCMGGMN <u>W</u> RPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQTSRHKKLMFK TEGPDS
	4	MEEPQSDPSVEPLSQETFSDLWKLLENNVLSPLPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVR <u>R</u> CPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTIHYNYMCNS SCMGGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEV <u>H</u> VCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQTSRHKKLMFK TEGPDS
	5	MEEPQSDPSVEPLSQETFSDLWKLLENNVLSPLPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVR <u>R</u> CPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTIHYNYMCNS SCMGGMN <u>R</u> SPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQTSRHKKLMFK TEGPDS
	36	MEEPQSDPSVEPLSQETFSDLWKLLENNVLSPLPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVR <u>R</u> CPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTIHYNYMCNS SCMGGMN <u>R</u> MPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQTSRHKKLMFK

SEQ ID NO:	突变	序列 (相对于野生型 p53 的突变残基显示为粗体、带下划线)	
		TEGPDS	
37	R249G	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPEENNVLSPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTIHYNYMCNS SCMGGMNR <u>G</u> PILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQTSRHKKLMFK TEGPDS	
[0120]	38	R273L	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPEENNVLSPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTIHYNYMCNS SCMGGMNR <u>R</u> PILTITLEDSSGNLLGRNSFEV <u>L</u> VCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQTSRHKKLMFK TEGPDS
	39	R248Q	MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLPEENNVLSPSQAMDDMLSPD DIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAAPPVAPAPAAPTAAAPAPAPSWPLSSS VPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKTCPVQ LWVDSTPPPGTRVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPP QHLIRVEGNLRVEYLDDRNTFRHSVVVPYEPPEVGSDCCTIHYNYMCNS SCMGGMNR <u>Q</u> PILTITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCACPGRDRRTEEENL RKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERF EMFRELNEALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQTSRHKKLMFK TEGPDS

SEQ ID NO:	序列	名称/评论
6	5' AUG ACG GAG GUU GUG AGG CgC UGC CCC CAC CAU GAG 3'	R175H P53 WT
7	5' AUG ACG GAG GUU GUG AGG CaC UGC CCC CAC CAU GAG 3'	R175H P53 MUT-R175H
8	5' UG ACG GAG GUU GUG AGG CaC U 3'	R175H Si-1-R175H
9	5' AGG CaC UGC CCC CAC CAU GA 3'	R175H Si-2-R175H
10	5' UGC AUG GGC GGC AUG AAC cGG AGG CCC AUC CUC 3'	R248W P53 WT
11	5' UGC AUG GGC GGC AUG AAC uGG AGG CCC AUC CUC 3'	R248W P53 MUT-R248W
44	5' UGC AUG GGC GGC AUG AAC CaG AGG CCC AUC CUC 3'	R248Q P53 MUT-R248Q

[0122]

SEQ ID NO:	序列	名称/评论
12	5' GC AUG AAC uGG AGG CCC AU 3'	R248W/Q Si-3-R248W/R248Q
13	5' GC GGC AUG AAC uGG AGG CCC 3'	R248W/Q Si-4-R248W/R248Q
14	5' UGC AUG GGC GGC AUG AAC CGG AGG CCC AUC CUC ACC 3'	R249S P53 WT
15	5' UGC AUG GGC GGC AUG AAC CGG AGu CCC AUC CUC ACC 3'	R249S P53 MUT-R249S
45	5' UGC AUG GGC GGC AUG AAC CGG Aug CCC AUC CUC ACC 3'	R249M P53 MUT-R249M
46	5' UGC AUG GGC GGC AUG AAC CGG gGG CCC AUC CUC ACC 3'	R249G P53 MUT-R249G
16	5' G AAC CGG AGu CCC AUC CUC 3'	R249S/M/G Si-5-R249S/R249M/R249G
17	5' AAC CGG AGu CCC AUC CUC A 3'	R249S/M/G Si-6-R249S/R249M/R249G
18	5' AGC UUU GAG GUG CgU GUU UGU GCC UGU CCU 3'	R273H P53 WT
19	5' AGC UUU GAG GUG CaU GUU GUU UGU GCC UGU CCU 3'	R273H P53 MUT-R273H
47	5' AGC UUU GAG GUG CuU GUU UGU GCC UGU CCU 3'	R273L P53 MUT-R273L
20	5' AG GUG CaU GUU UGU GCC UGU 3'	R273H/L Si-7-R273H/R273L
21	5' GAG GUG CaU GUU UGU GCC UGU 3'	R273H/L Si-8-R273H/R273L
22	5' CAC UGC CCC CAC CAU GAG CG 3'	一般 p53; si-p53
23	5' UUC UCC GAA CGT GUC ACG U 3'	一般乱序对照
24; 40;41	5'-AAGCTTTN ₍₁₉₋₂₉₎ (正义序列) TTCAAGAGAN ₍₁₉₋₂₉₎ (反义序列) TTTTTA-3'	示例性 shRNA 上端寡核苷酸, 由此(除了被称为 N ₍₁₉₋₂₉₎ 的 siRNA 序列之外)在每个寡核苷酸的前端和末端处指示的核苷酸针对限制酶酶切位点。在每种情况下中间序列用于茎环的形成。
25; 42;43	5'-AGCTTAAAAAN ₍₁₉₋₂₉₎ (正义序列) TCTCTTGAAN ₍₁₉₋₂₉₎ (反义序列) GGG-3'	示例性 shRNA 下端寡核苷酸, 由此(除了被称为 N ₍₁₉₋₂₉₎ 的 siRNA 序列之外)在每个寡核苷酸的前端和末端处指示的核苷酸针对限制酶酶切位点。在每种情况下中间序列用于茎环的形成。
26	正向 5'- AAGCTT <u>AGGCaCTGCCCCCACCATGAT</u> TCAAGAGAT <u>CATGGTGGGGCAGtGCC</u> TTTTTA-3'	shRNA 对比 R175H (sh-2) 正向
27	反向 3'- GAAT <u>CCGTGACGGGGTGGTACTAAG</u> TTCT <u>CTAGTACCA</u> CCCCGTACGGAA AAATT _{CGA} -5'	shRNA 对比 R175H (sh-2) 反向

[0123]

SEQ ID NO:	序列	名称/评论
28	正向 5'- AAGCTT <u>GCGGCATGAACtGGAGGCC</u> T TCAAGAG <u>AGGGC</u> CTCCAGTT <u>CATGCCG</u> <u>CTTTTA</u> -3'	shRNA 对比 R248W/R248Q (sh-4) 正向
29	反向 3'- GAACGCCGTACTT <u>GACCTCCGG</u> GAAGT TCT <u>CTCCGGAGGT</u> CAAGTAC <u>CGGC</u> GAA AAATT <u>CGA</u> -5'	shRNA 对比 R248W/R248Q (sh-4) 反向
30	正向 5'- AAGCTT <u>AACCGGAGtCCC</u> ATCCTCATT <u>C</u> AAGAGAT <u>GAGGATGG</u> ACT <u>CCGG</u> TTT TTA-3'	shRNA 对比 R249S/R249M/R249G (sh-6) 正向
31	反向 3'- GAATT <u>GGCCTCAGGGTAGGAG</u> TAAGTT CT <u>CTACTCCTACCC</u> T <u>GAGGCC</u> AAAAAA TTCGA-5'	shRNA 对比 R249S/R249M/R249G (sh-6) 反向
32	正向 5'- AAGCTT <u>GAGGTG</u> CaT <u>GTTTG</u> TGCCTGTT CAAGAGA <u>ACAGG</u> CAAA <u>ACAT</u> GCAC <u>CT</u> TTTTA-3'	shRNA 对比 R273H/R273L (sh-8) 正向
33	反向 3'- GAA <u>CTCCACGT</u> ACAA <u>ACACGG</u> ACAAA GTT <u>CTCTTG</u> CCGT <u>TTTG</u> TACGTGGAG AAAATT <u>CGA</u> -5'	shRNA 对比 R273H/R273L (sh-8) 反向
34	正向 5'- AAG <u>CTTCTCCG</u> AA <u>CGTGT</u> CACGTT CAAGAGA <u>ACGT</u> GACAC <u>CGT</u> GGAGAA TTTTA-3'	shRNA 对比乱序 (sh-scr) 正向
35	反向 3'- GAA <u>AAAGAGG</u> CT <u>GCACAGT</u> GCAA <u>AGT</u> T <u>CTCTTG</u> CA <u>CTGT</u> GA <u>AGC</u> CT <u>TT</u> AAA AATT <u>CGA</u> -5'	shRNA 对比乱序 (sh-scr) 反向

序列表

<110> 新加坡保健服务集团有限公司 (Singapore Health Services Pte Ltd)

<120> 使用突变型p53特异性siRNA进行癌症治疗性靶向

<130> 32644SG68

<160> 47

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 393

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> UniProtKB-P04637 (P53_人) 的氨基酸序列

<400> 1

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
[0001] 20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

[0002]

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390

<210> 2
<211> 393
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R175H突变

<400> 2

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

[0003] Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg His Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

[0004]

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390

<210> 3
<211> 393
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R248W突变

<400> 3

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
[0005] 35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Trp Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

[0006]

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390

<210> 4
<211> 393
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R273H突变

<400> 4

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

[0007] Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

[0008]

His Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390

<210> 5
<211> 393
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R249S突变

<400> 5

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
[0009] 50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Ser Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

[0010]

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390

<210>	6	
<211>	36	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R175H P53 WT	
<400>	6	
	augacggagg uugugaggcg cugcccccac caugag	36
<210>	7	
<211>	36	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R175H P53 MUT-R175H	
<400>	7	
	augacggagg uugugaggca cugcccccac caugag	36
<210>	8	
<211>	21	
[0011]	<212>	RNA
	<213>	人工序列
<220>		
<223>	R175H Si-1-R175H	
<400>	8	
	ugacggaggu ugugaggcac u	21
<210>	9	
<211>	20	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R175H Si-2-R175H	
<400>	9	
	aggcacugcc cccaccauga	20
<210>	10	
<211>	33	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> R248W P53 WT		
<400> 10 ugcaugggcg gcaugaaccg gaggcccauc cuc		33
<210> 11 <211> 33 <212> RNA <213> 人工序列		
<220>		
<223> R248W P53 MUT-R248W		
<400> 11 ugcaugggcg gcaugaacug gaggcccauc cuc		33
<210> 12 <211> 19 <212> RNA <213> 人工序列		
<220>		
<223> R248W/Q Si-3-R248W/R248Q		
<400> 12 gcaugaacug gaggcccau		19
<210> 13 <211> 20 <212> RNA <213> 人工序列		
<220>		
<223> R248W/Q Si-4-R248W/R248Q		
<400> 13 gcccccaugaa cuggagggcc		20
<210> 14 <211> 36 <212> RNA <213> 人工序列		
<220>		
<223> R249S P53 WT		
<400> 14 ugcaugggcg gcaugaaccg gaggcccauc cucacc		36
<210> 15 <211> 36		

〈212〉	RNA		
〈213〉	人工序列		
〈220〉			
〈223〉	R249S P53 MUT-R249S		
〈400〉	15		
	ugcaugggcg gcaugaaccg gagucccauc cucacc		36
〈210〉	16		
〈211〉	19		
〈212〉	RNA		
〈213〉	人工序列		
〈220〉			
〈223〉	R249S/M/G Si-5-R249S/ R249M/R249G		
〈400〉	16		
	gaaccggagu cccauccuc		19
〈210〉	17		
〈211〉	19		
〈212〉	RNA		
〈213〉	人工序列		
〔0013〕	〈220〉		
	〈223〉 R249S/M/G Si-6-R249S/ R249M/R249G		
〈400〉	17		
	aaccggaguc ccauccuca		19
〈210〉	18		
〈211〉	30		
〈212〉	RNA		
〈213〉	人工序列		
〈220〉			
〈223〉	R273H P53 WT		
〈400〉	18		
	agcuuugagg ugcguguuug ugccuguccu		30
〈210〉	19		
〈211〉	30		
〈212〉	RNA		
〈213〉	人工序列		
〈220〉			
〈223〉	R273H P53 MUT-R273H		
〈400〉	19		
	agcuuugagg ugcauguuug ugccuguccu		30

	<210>	20	
	<211>	20	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	R273H/L Si-7-R273H/R273L	
	<400>	20	
		aggugcaugu uugugccugu	20
	<210>	21	
	<211>	21	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	R273H/L Si-8-R273H/R273L	
	<400>	21	
		gaggugcaug uuugugccug u	21
[0014]	<210>	22	
	<211>	20	
	<212>	RNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	一般p53; si-p53	
	<400>	22	
		cacugccccc accaugagcg	20
	<210>	23	
	<211>	19	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	一般乱序对照	
	<400>	23	
		uucuccgaac gtgucacgu	19
	<210>	24	
	<211>	7	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		

〈223〉	示例性shRNA上部寡核苷酸的第1/3部分	
〈400〉	24	
	aagcttt	7
〈210〉	25	
〈211〉	10	
〈212〉	DNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	示例性shRNA下部寡核苷酸的第1/3部分	
〈400〉	25	
	agcttaaaaa	10
〈210〉	26	
〈211〉	60	
〈212〉	DNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	shRNA对R175H (sh-2) 正向	
〈400〉	26	
[0015]	aagctttaggc actgccccca ccatgattca agagatcatg gtggggcag tgcctttta	60
〈210〉	27	
〈211〉	61	
〈212〉	DNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	shRNA对R175H (sh-2) 反向；以3'至5'方向	
〈400〉	27	
	gaatccgtga cgggggtgg actaagttct ctagtaccac ccccgtaacg gaaaaattcg	60
a		61
〈210〉	28	
〈211〉	61	
〈212〉	DNA	
〈213〉	人工序列	
〈220〉		
〈223〉	shRNA对R248W/R248Q (sh-4) 正向	
〈400〉	28	
	aagcttgcgg catgaactgg aggccttca agagagggcc tccagttcat gccgctttt	60
a		61

<210>	29		
<211>	62		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	shRNA对R248W/R248Q (sh-4) 反向; 以3' 至5' 方向		
<400>	29		
	gaacgccgta cttgacctcc gggaaaggttct ctcccgagg tcaagtacgg cggaaaaattc	60	
	ga	62	
<210>	30		
<211>	58		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	shRNA对R249S/R249M/R249G (sh-6) 正向		
<400>	30		
	aagcttaacc ggagtcccat cctcattcaa gagatgagga tgggactccg gtttttta	58	
[0016]	<210>	31	
	<211>	59	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
<220>			
<223>	shRNA对R249S/R249M/R249G (sh-6) 反向; 以3' 至5' 方向		
<400>	31		
	gaattggcct caggtagga gtaagttctc tactcctacc ctgaggccaa aaaattcga	59	
<210>	32		
<211>	61		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	shRNA对比R273H/ R273L (sh-8) 正向		
<400>	32		
	aagcttgagg tgcattttg tgcctgttca agagaacagg cacaacatg caccctttt	60	
	a	61	
<210>	33		
<211>	63		

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

[0018]

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Met Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
370 375 380

[0019] Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390

<210> 37
<211> 393
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R249G突变

<400> 37

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

[0020]

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Gly Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
370 375 380

[0021] Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
385 390

<210> 38
<211> 393
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> R273L突变

<400> 38

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

[0022]

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

Leu Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
 370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 385 390

[0023]

<210> 39
 <211> 393
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> R248Q突变

<400> 39

Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln
 1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu
 20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp
 35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro
 50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro
65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser
85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly
100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro
115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln
130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met
145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys
165 170 175

[0024]

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln
180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp
195 200 205

Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu
210 215 220

Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser
225 230 235 240

Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Gln Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr
245 250 255

Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val
260 265 270

Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn
275 280 285

Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr
 290 295 300

Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys
 305 310 315 320

Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu
 325 330 335

Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp
 340 345 350

Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His
 355 360 365

Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met
 370 375 380

Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp
 385 390

[0025]

<210> 40

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性shRNA上部寡核苷酸的第2/3部分

<400> 40

ttcaagaga

9

<210> 41

<211> 7

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 示例性shRNA上部寡核苷酸的第3/3部分

<400> 41

ttttta

7

<210> 42

<211> 9

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>		
<223>	示例性shRNA下部寡核苷酸的第2/3部分	
<400>	42	
	tctcttgaa	9
<210>	43	
<211>	3	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	示例性shRNA下部寡核苷酸的第3/3部分	
<400>	43	
	ggg	3
<210>	44	
<211>	33	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R248Q P53 MUT-R248Q	
[0026]	<400>	44
	ugcaugggcg gcaugaacca gagggcccauc cuc	33
<210>	45	
<211>	36	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R249M P53 MUT-R249M	
<400>	45	
	ugcaugggcg gcaugaacccg gaugggcccauc cucacc	36
<210>	46	
<211>	36	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	R249G P53 MUT-R249G	
<400>	46	
	ugcaugggcg gcaugaacccg gggggcccauc cucacc	36

<210>	47
<211>	30
<212>	RNA
<213>	人工序列
[0027]	
<220>	
<223>	R273L P53 MUT-R273L
<400>	47
agcuuugagg ugcuuguuug ugccuguccu	30

A

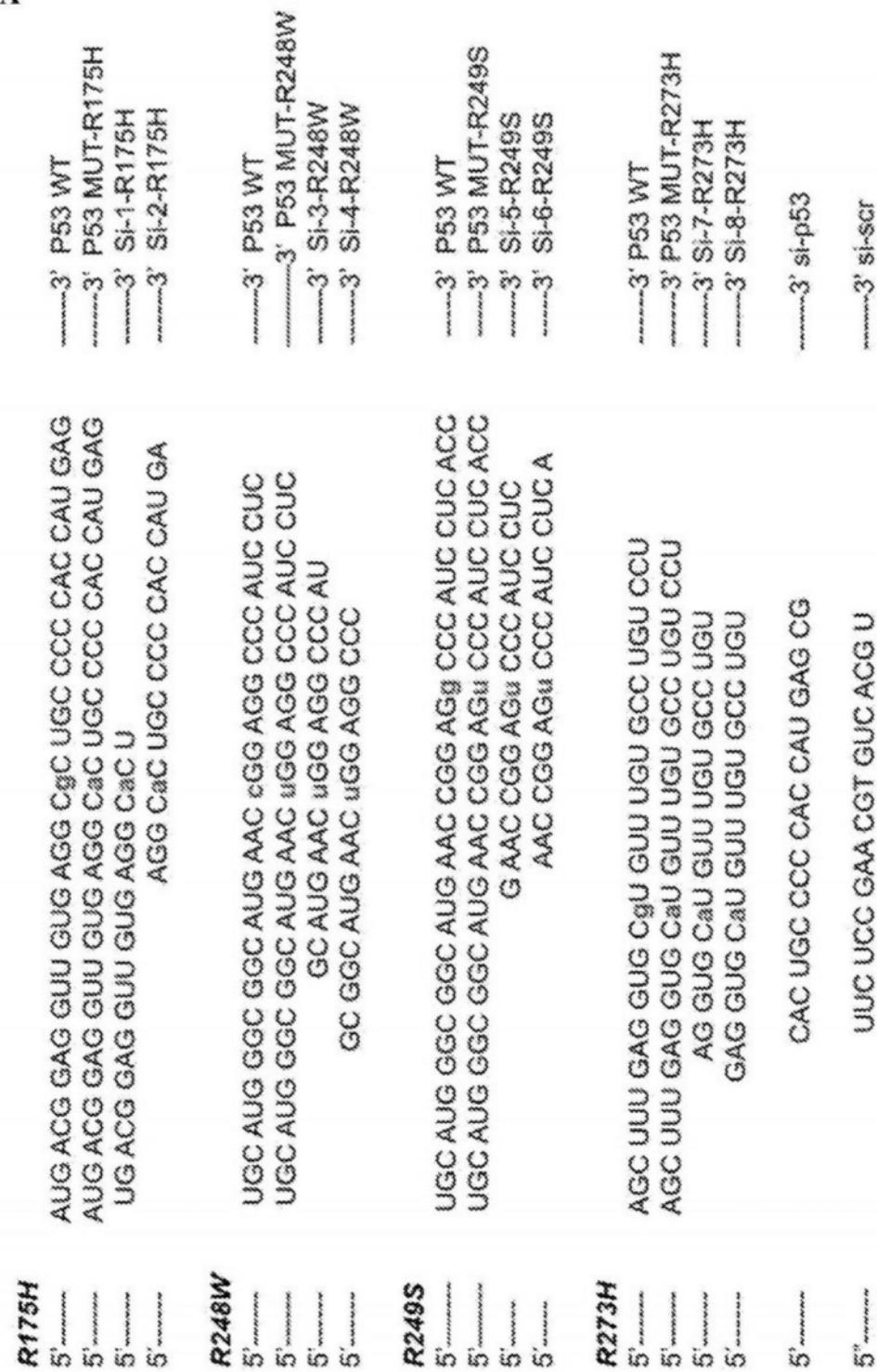


图1

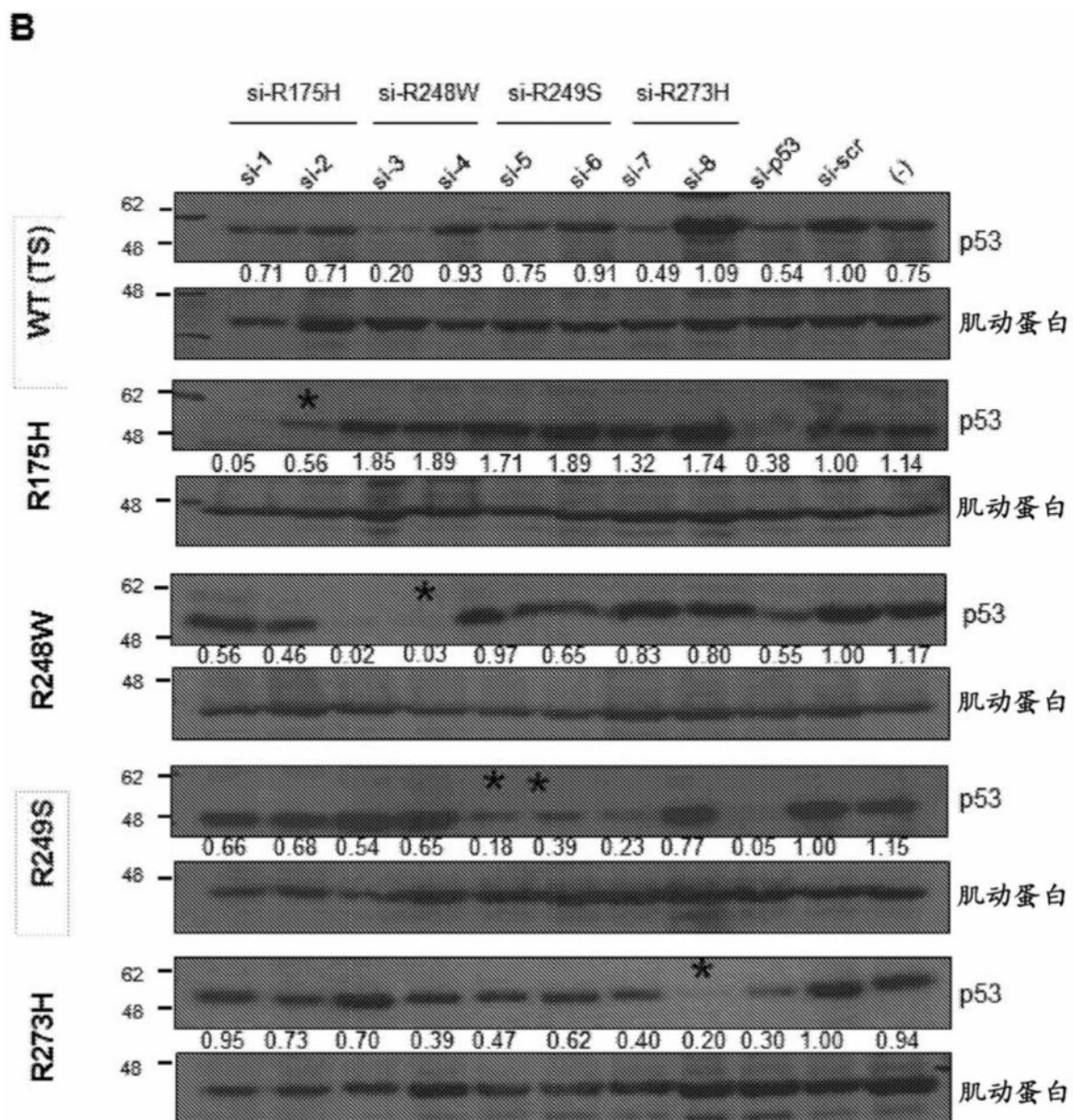


图1续

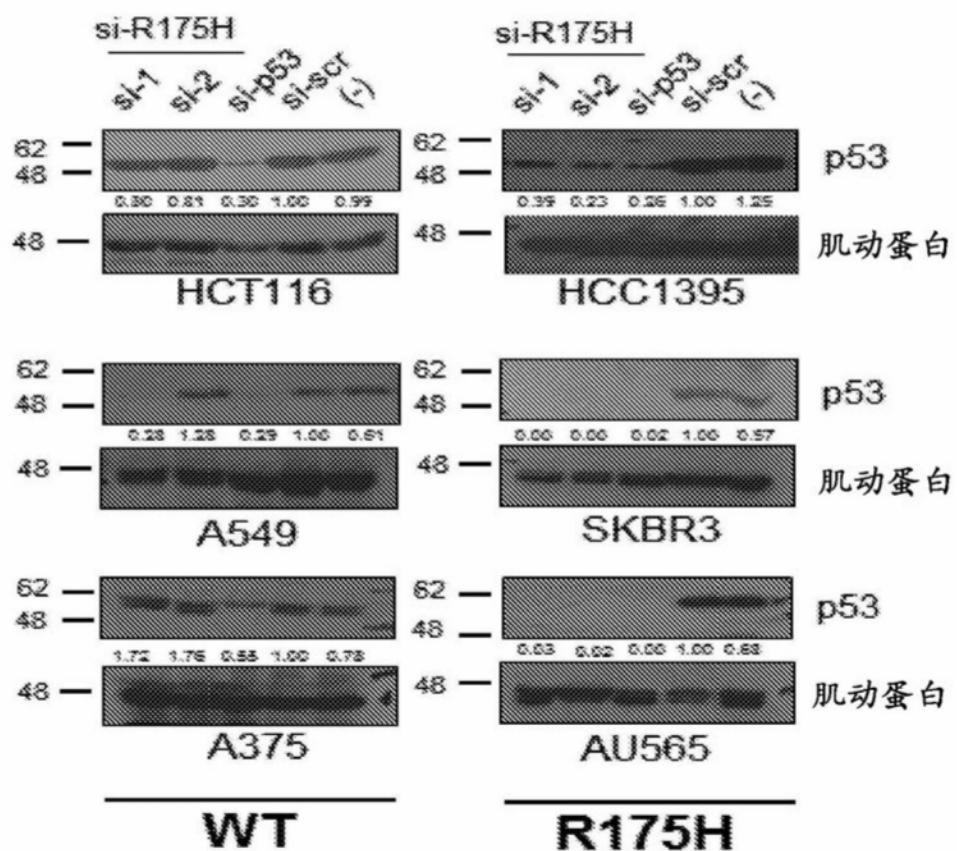
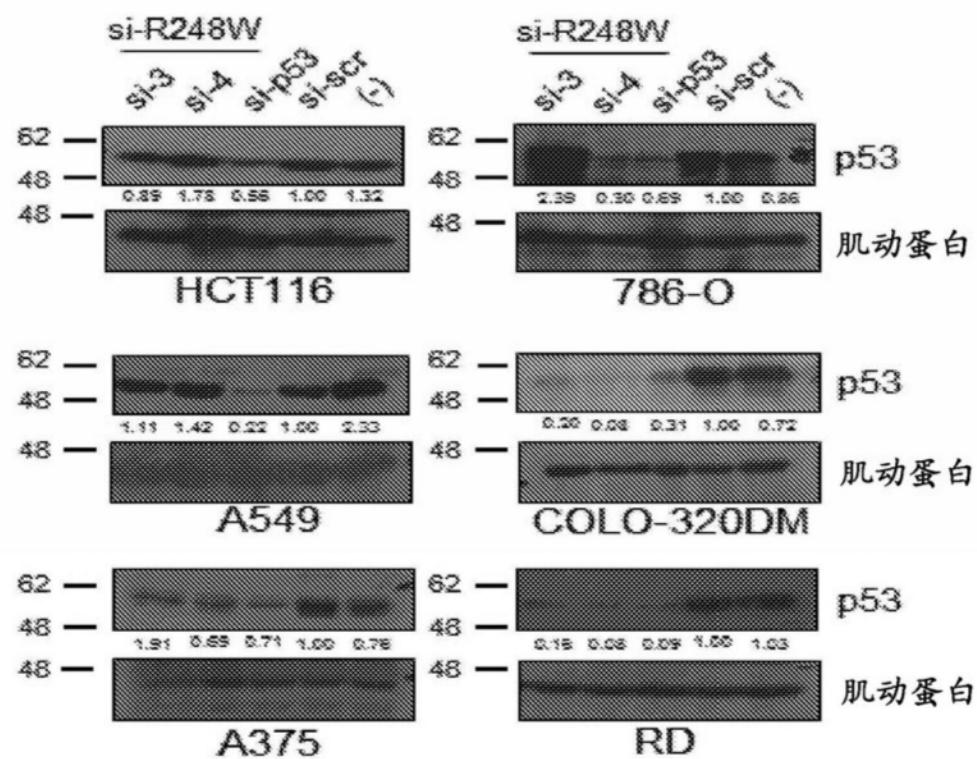
A**WT****R175H****B**

图2

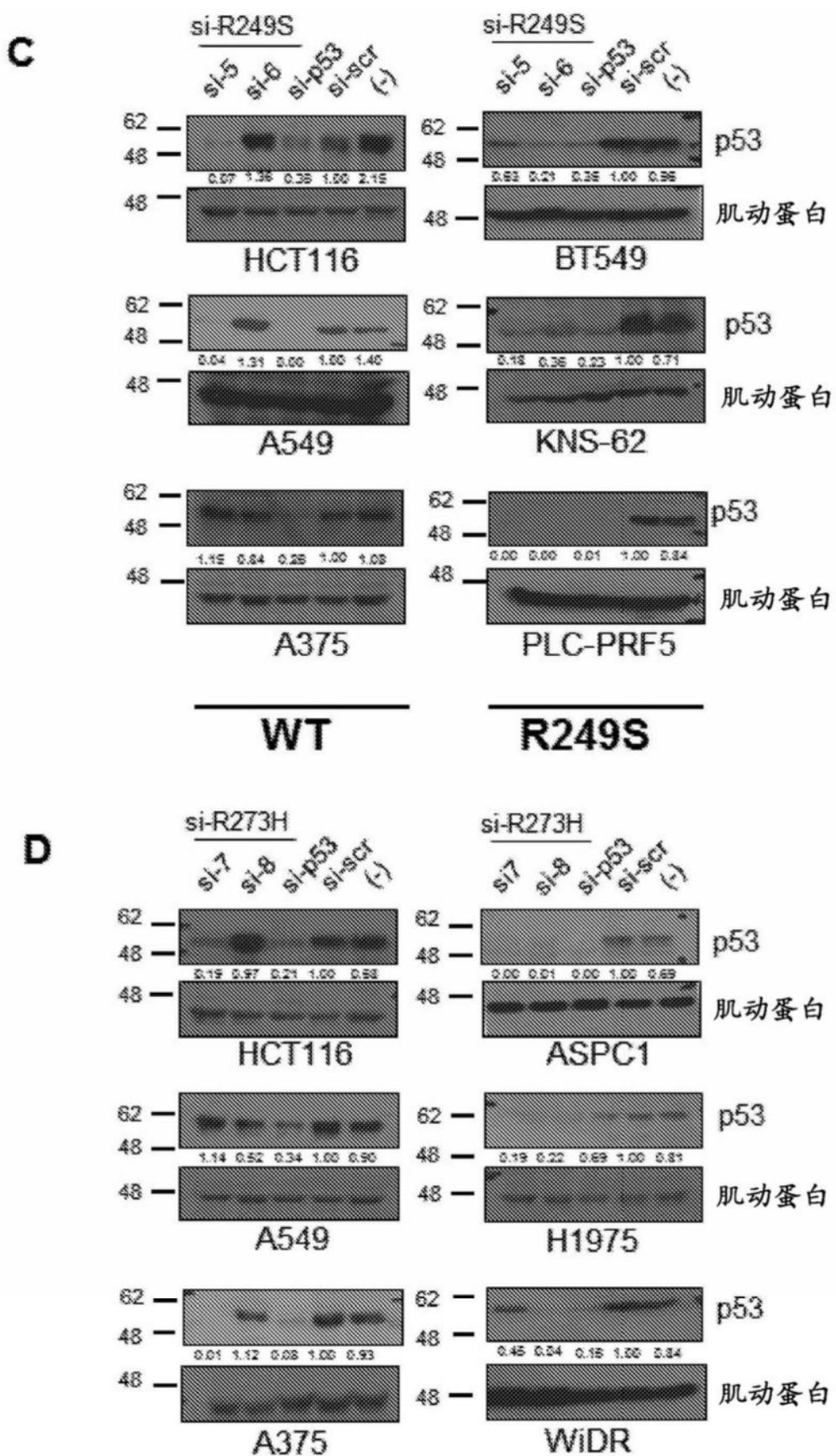


图2续

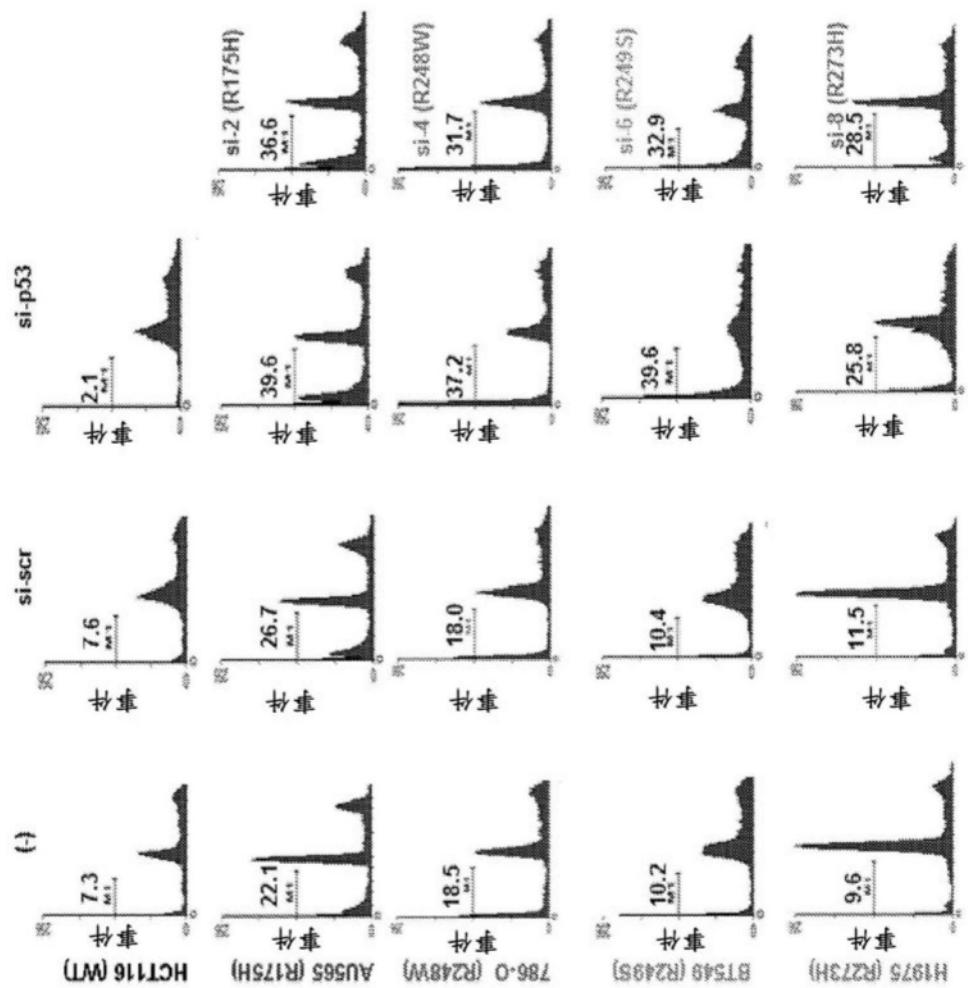


图3

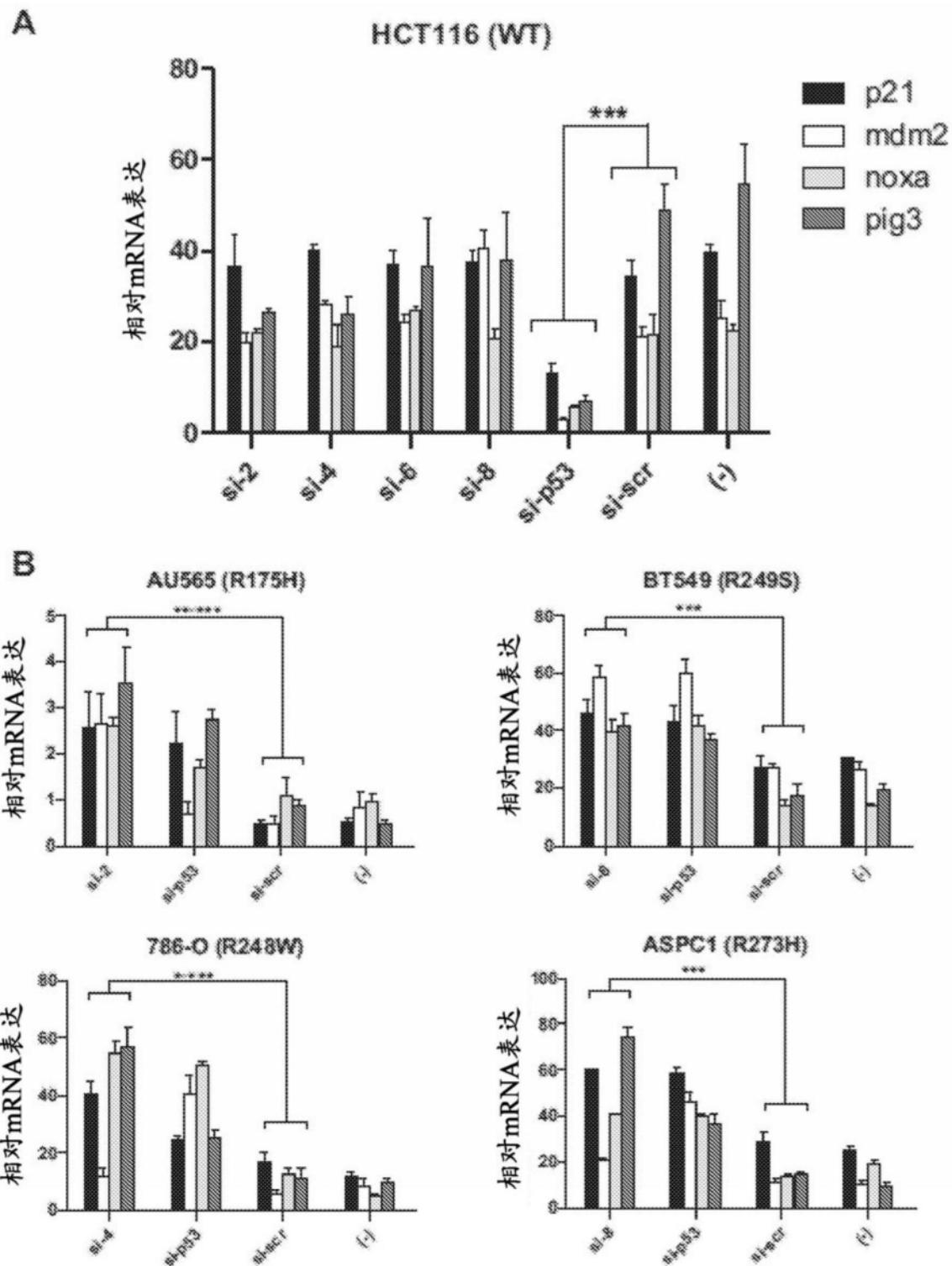


图4

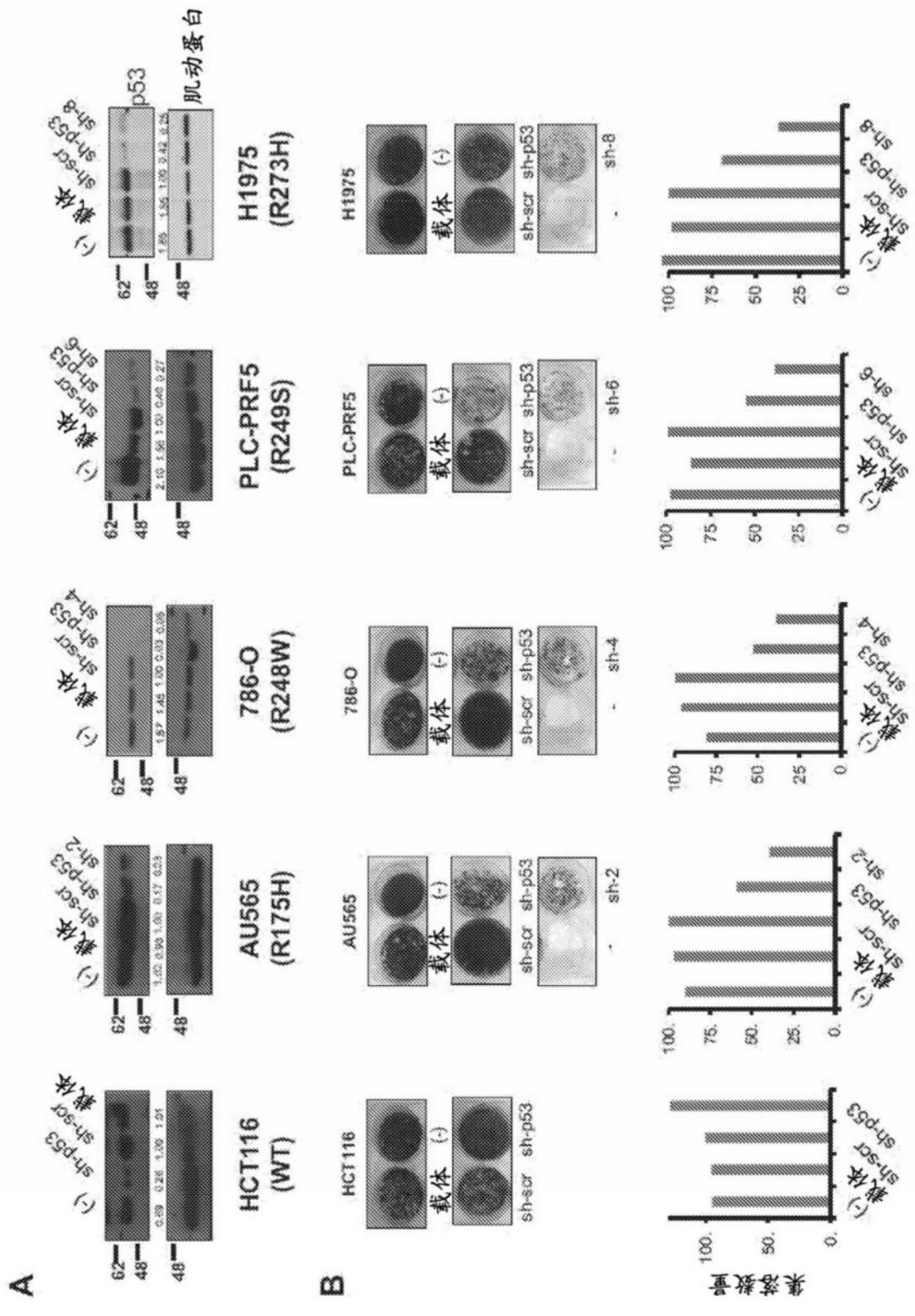


图5

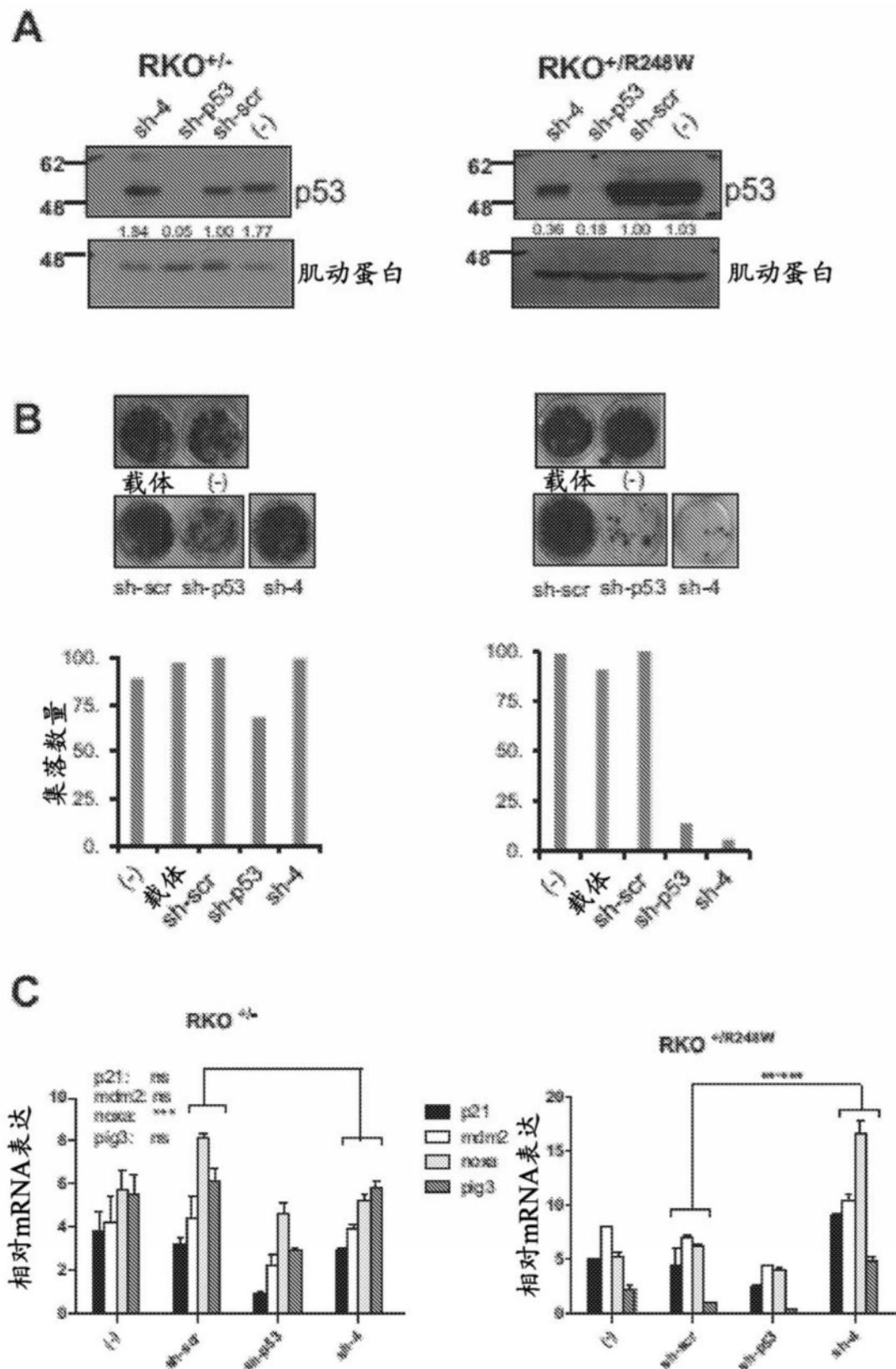
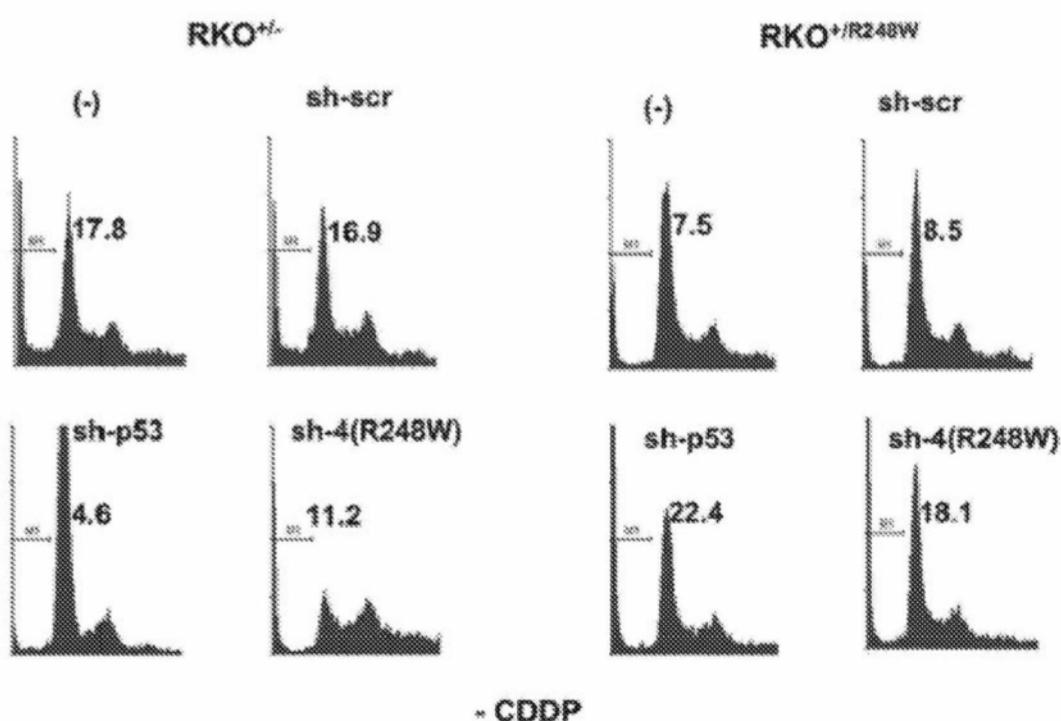


图6

D



E

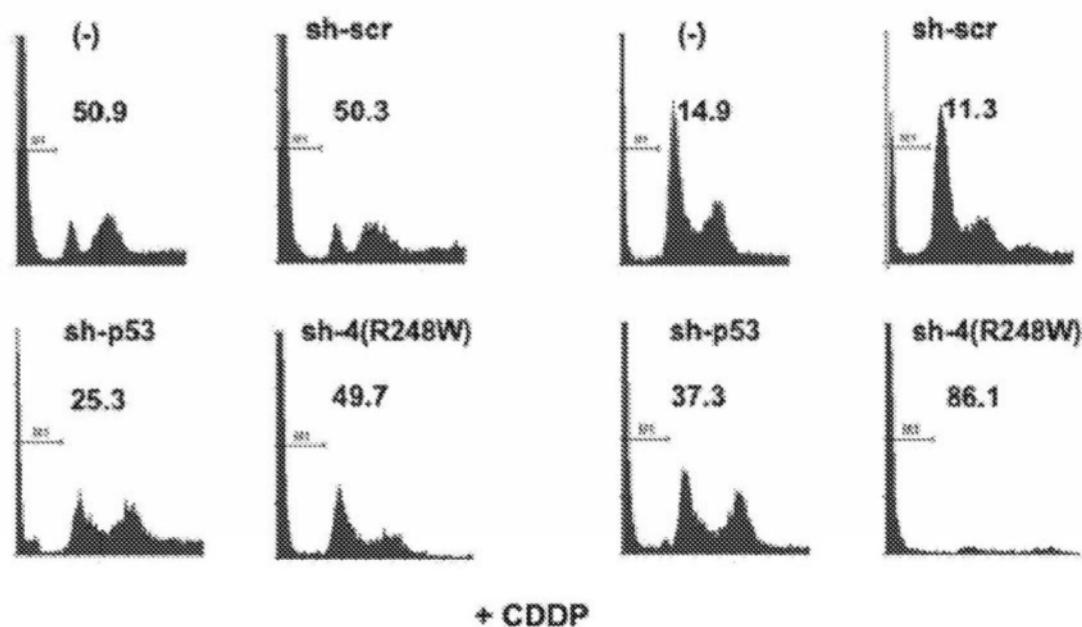


图6续

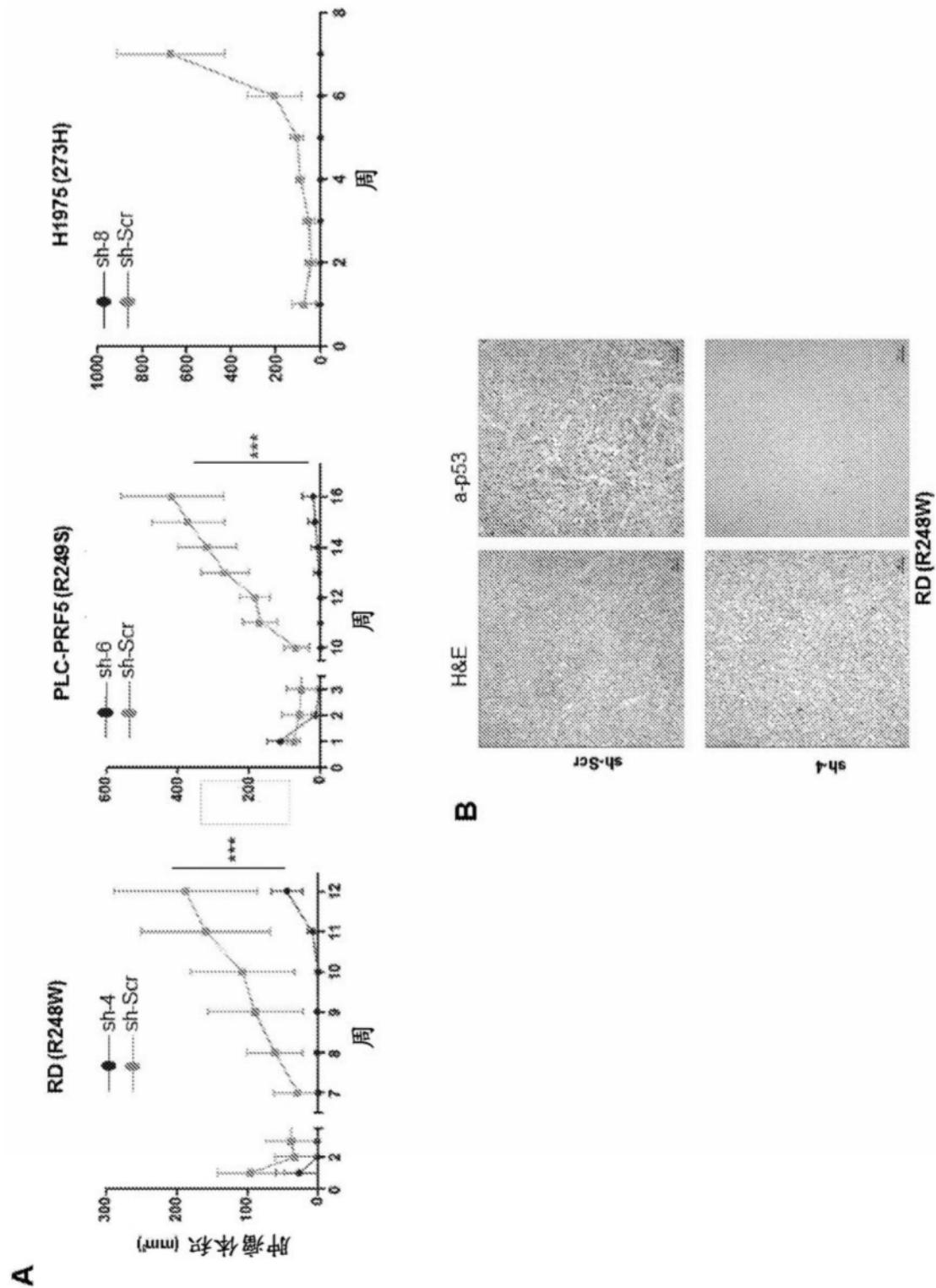


图7

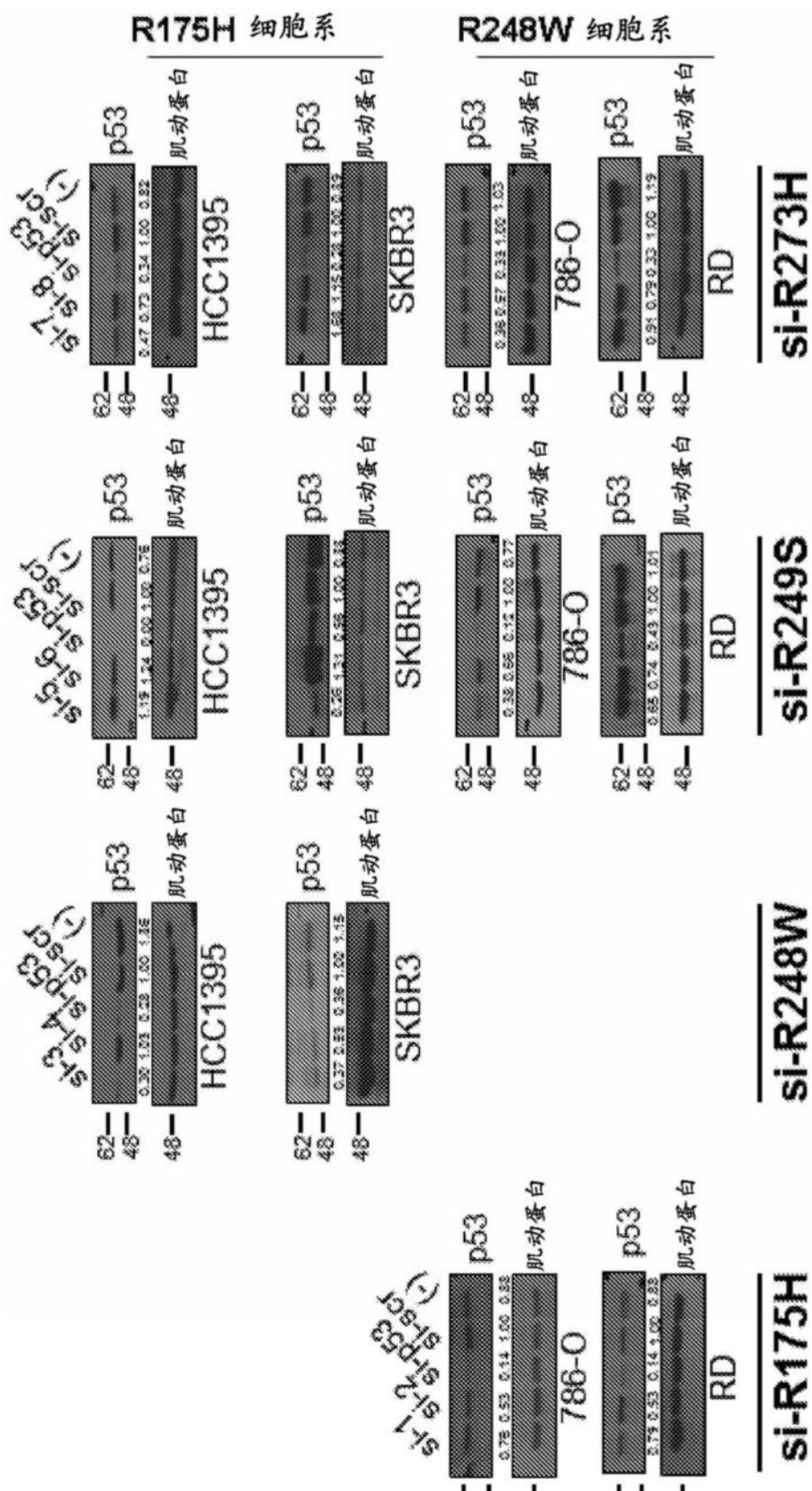


图8

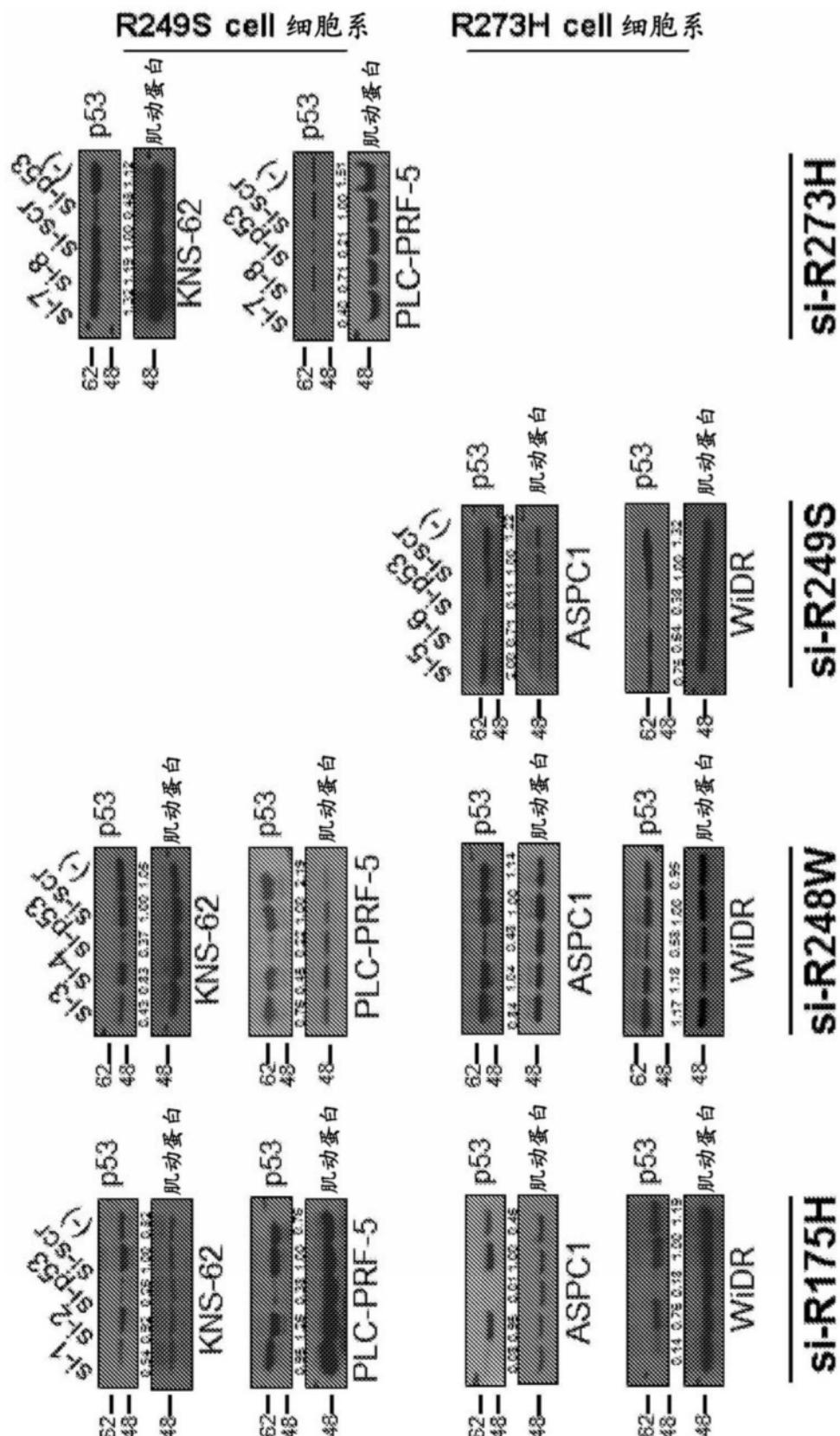


图8续

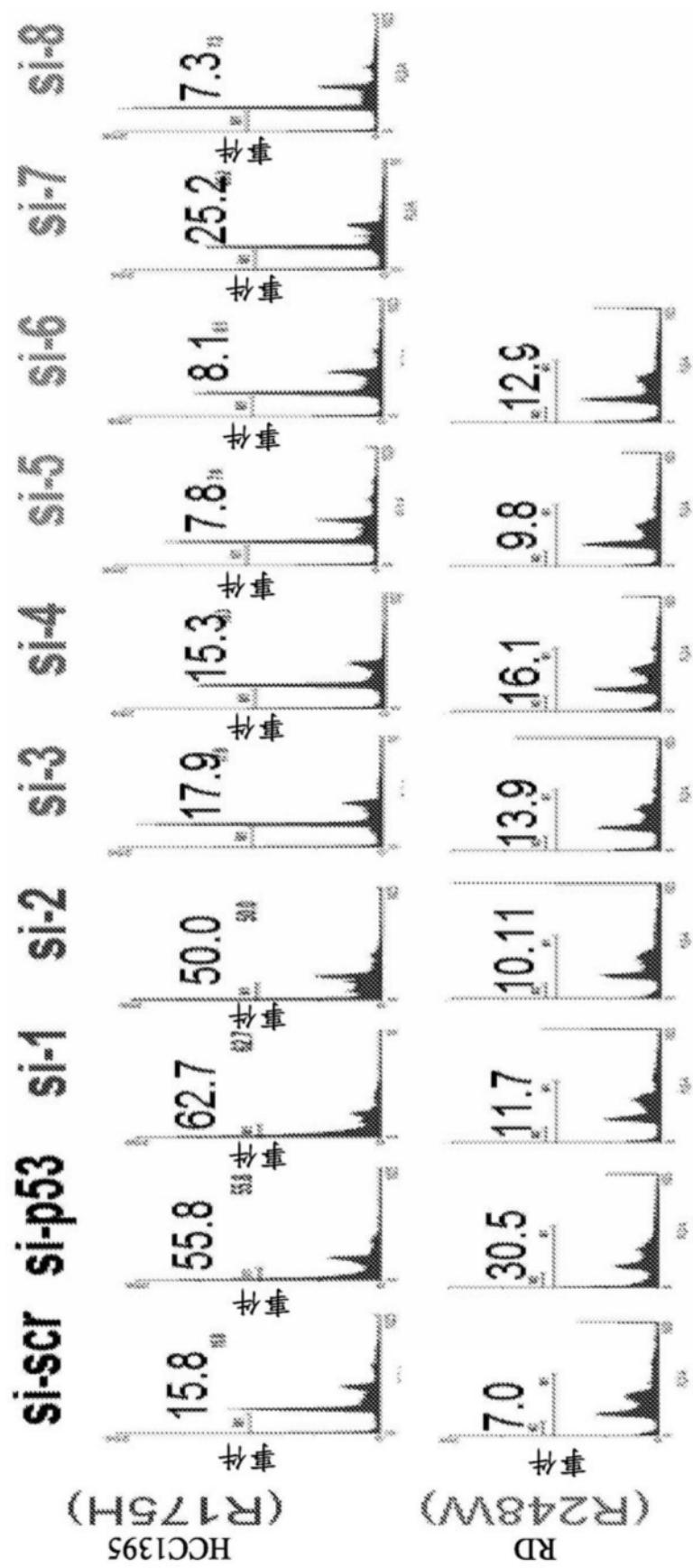


图9

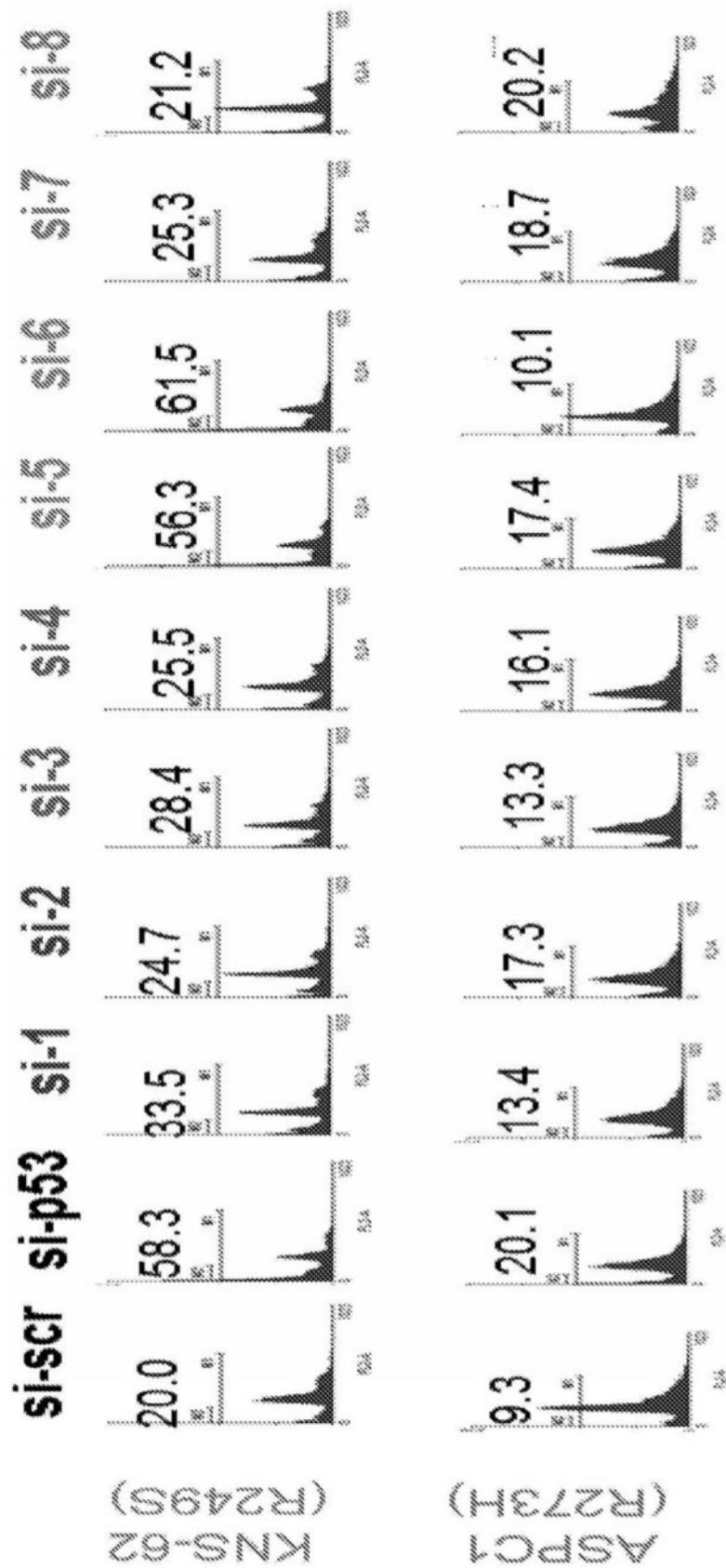


图9续

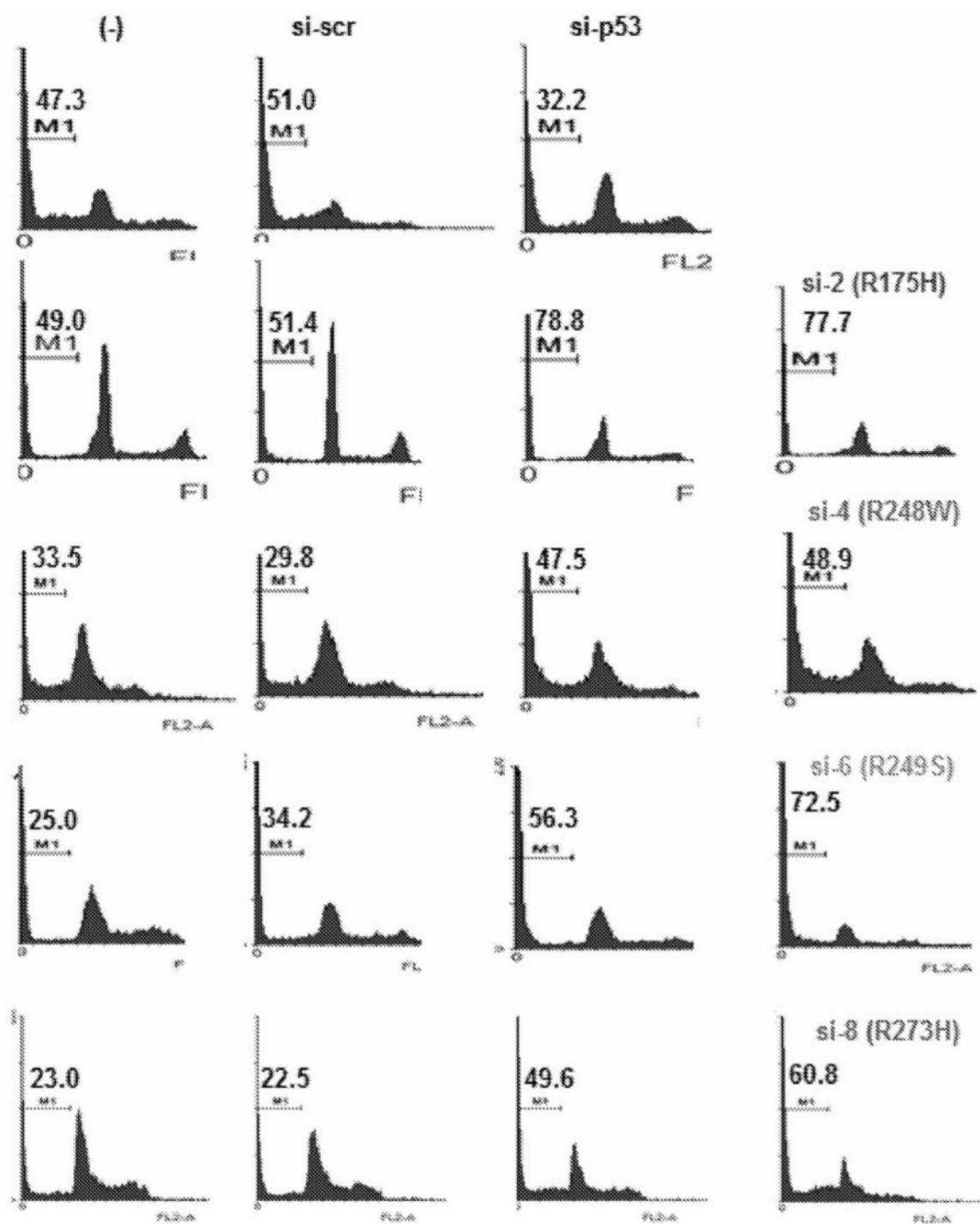


图10

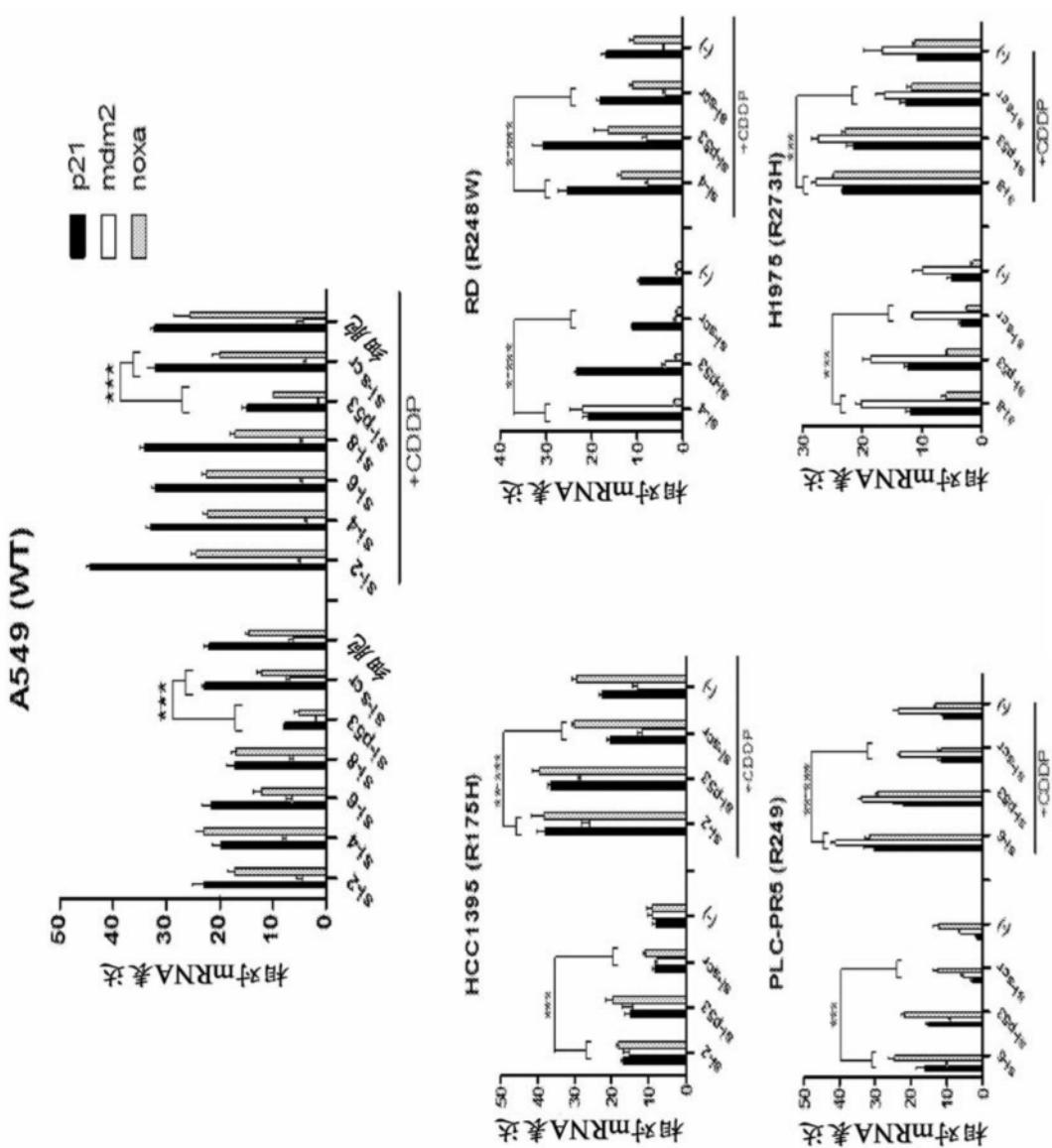


图11

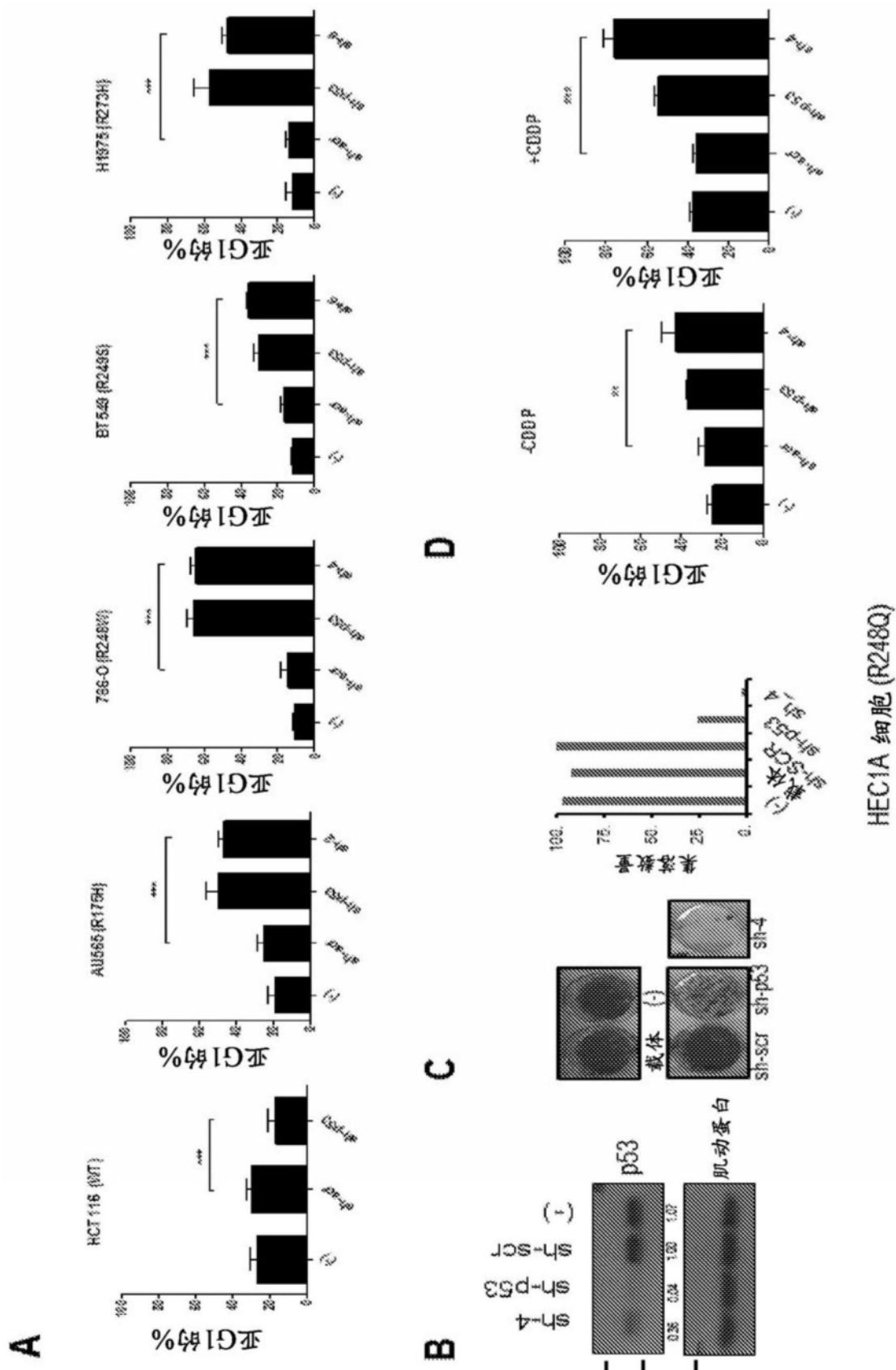
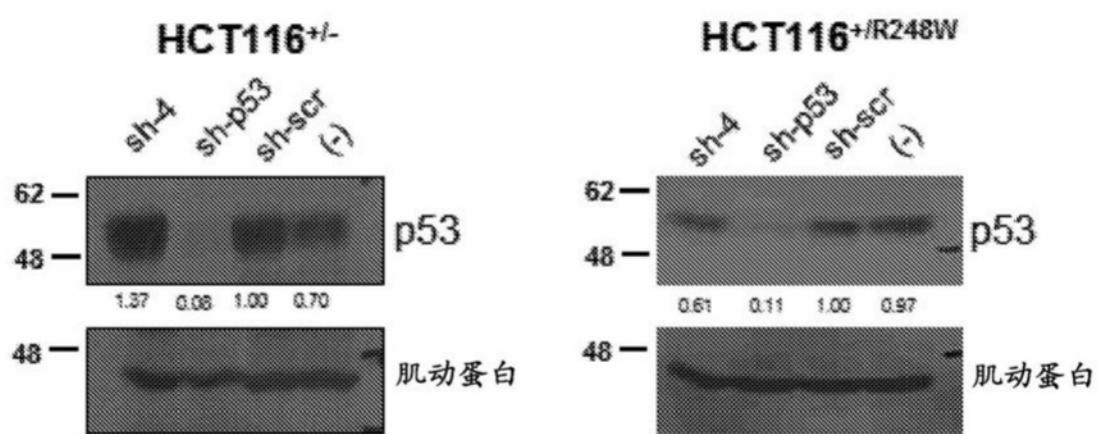


图12

A



B

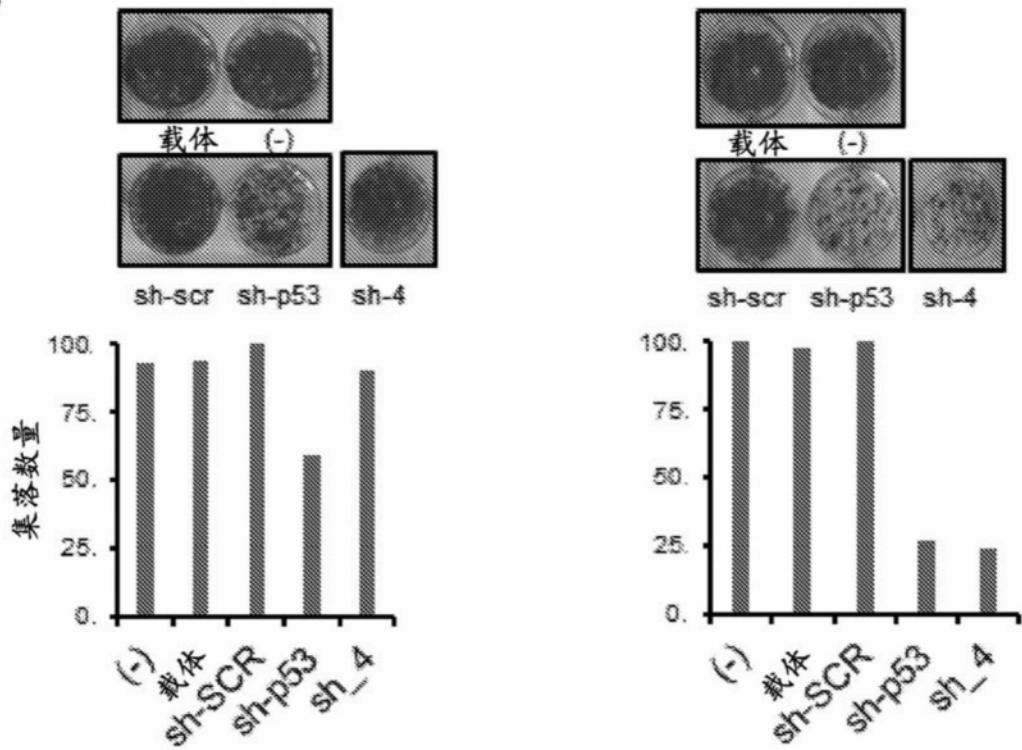
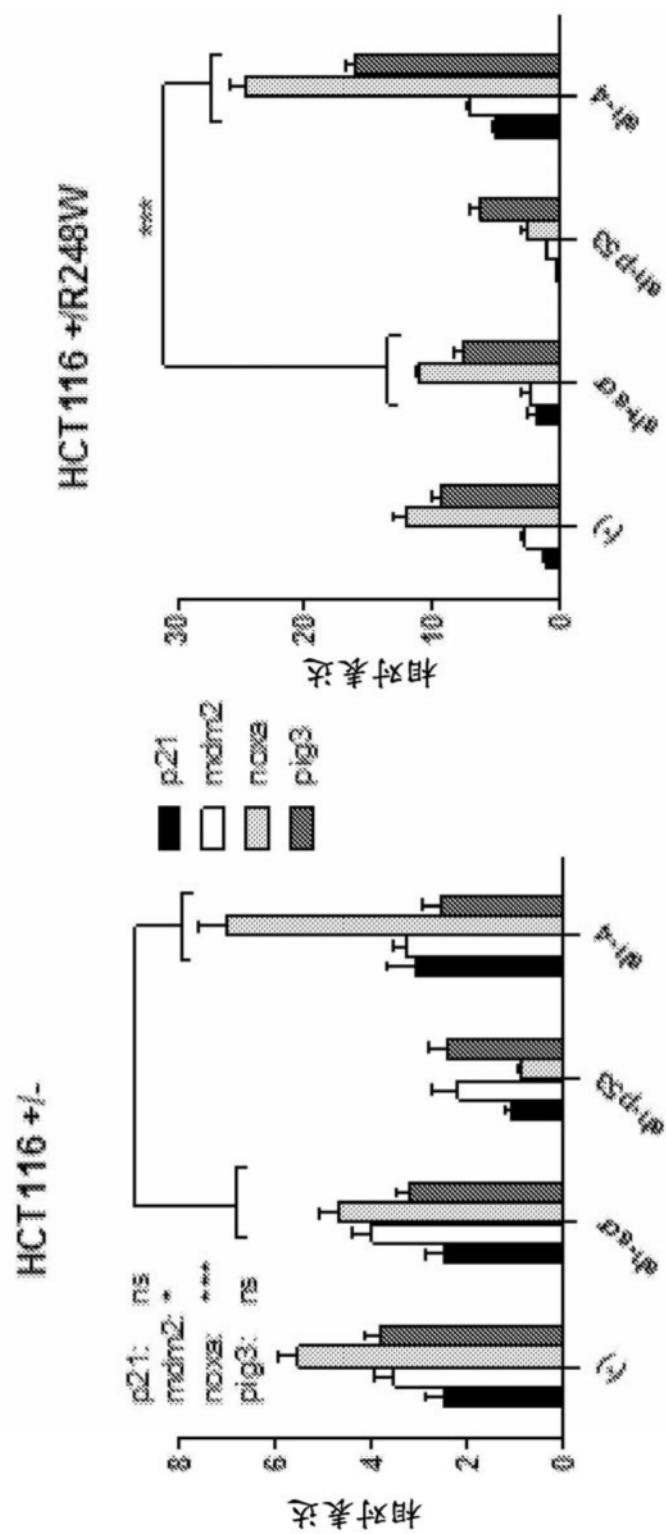


图13



C

图13续

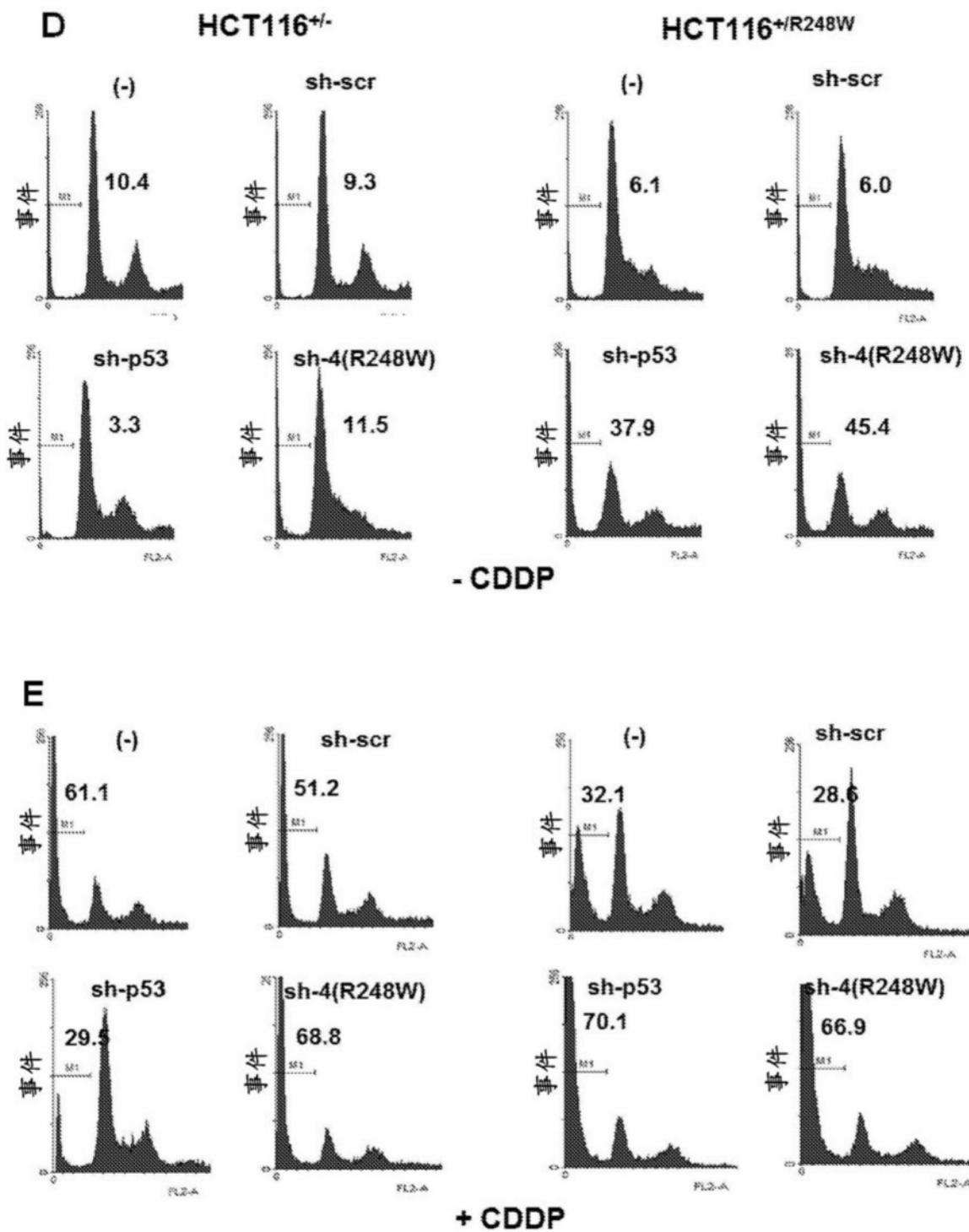


图13续

A

P53 R249 (si-6)

R249	密码子
wt	AGG
R249 - S	AGT
R249 - G	GGG
R249 - M	ATG

图14

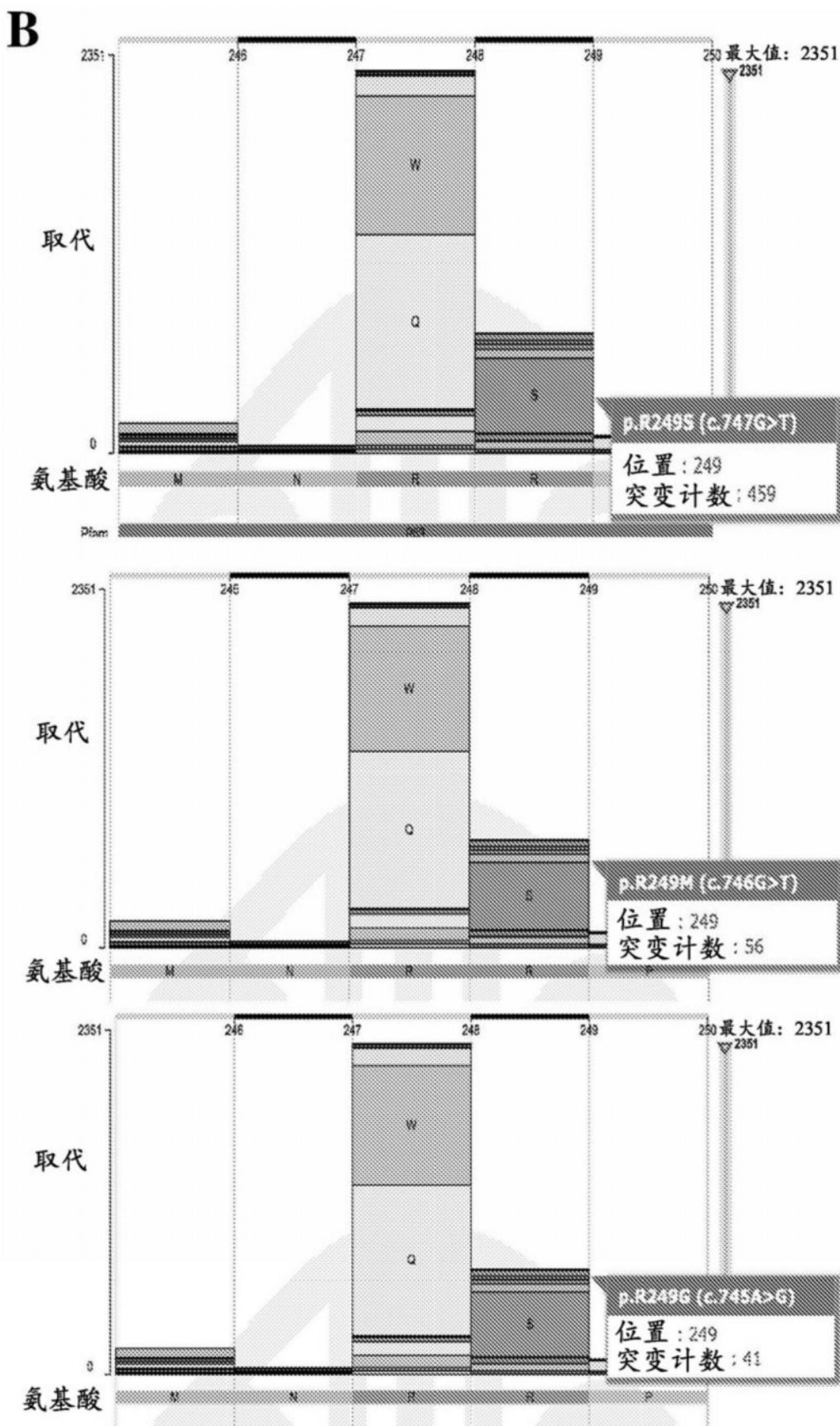
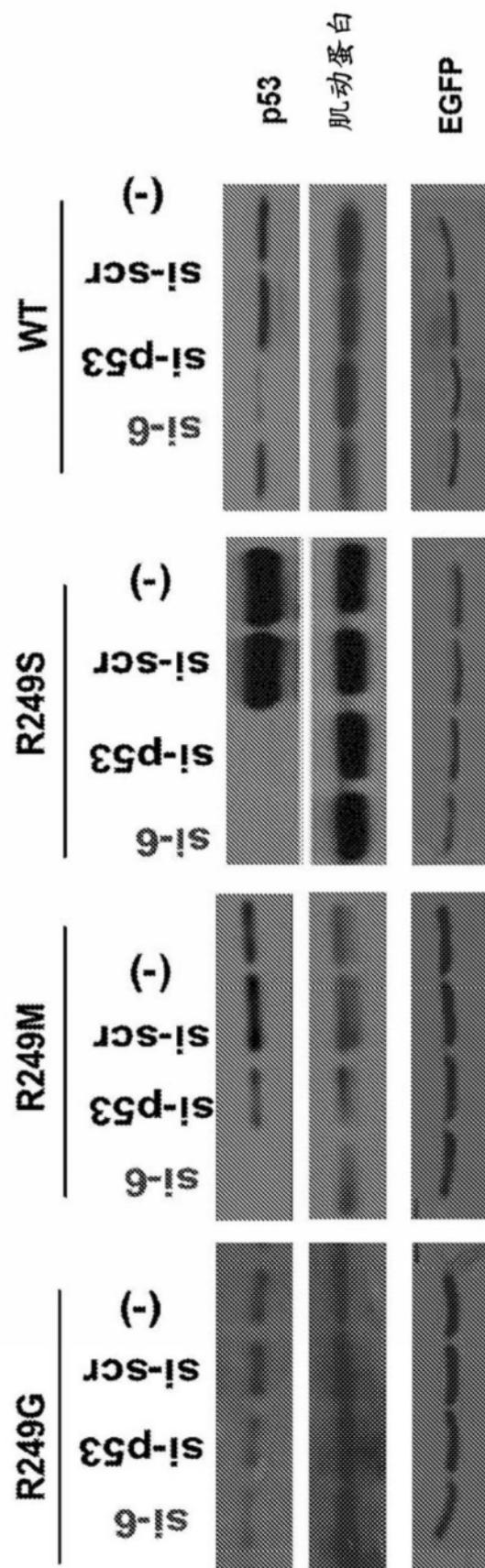


图14续

C



H1299细胞转染突变型cDNA后48小时

图14续

A P53 R273 (si-8)

R273	密码子
wt	CGU
R273 - H	CAU
R273 - L	CUU

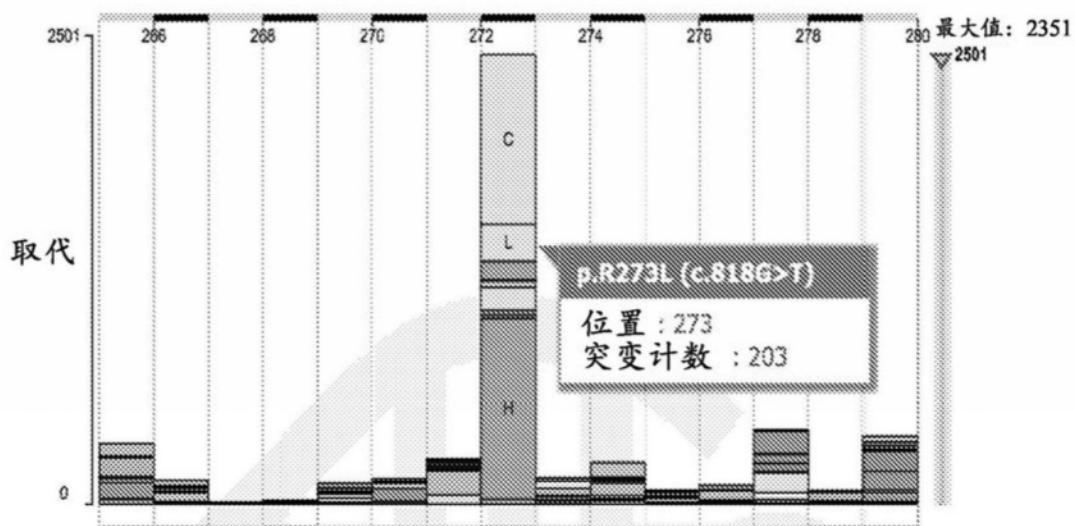
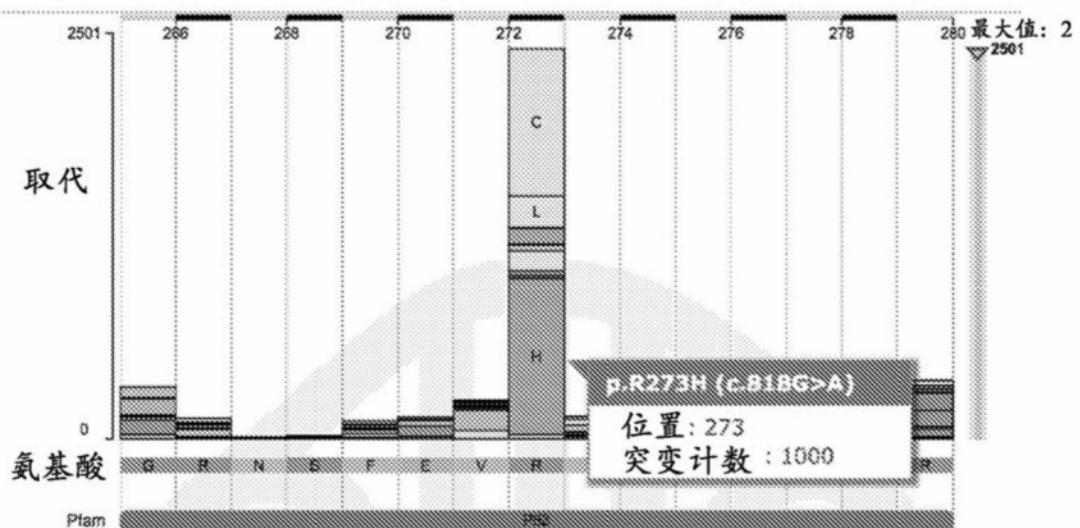
B

图15

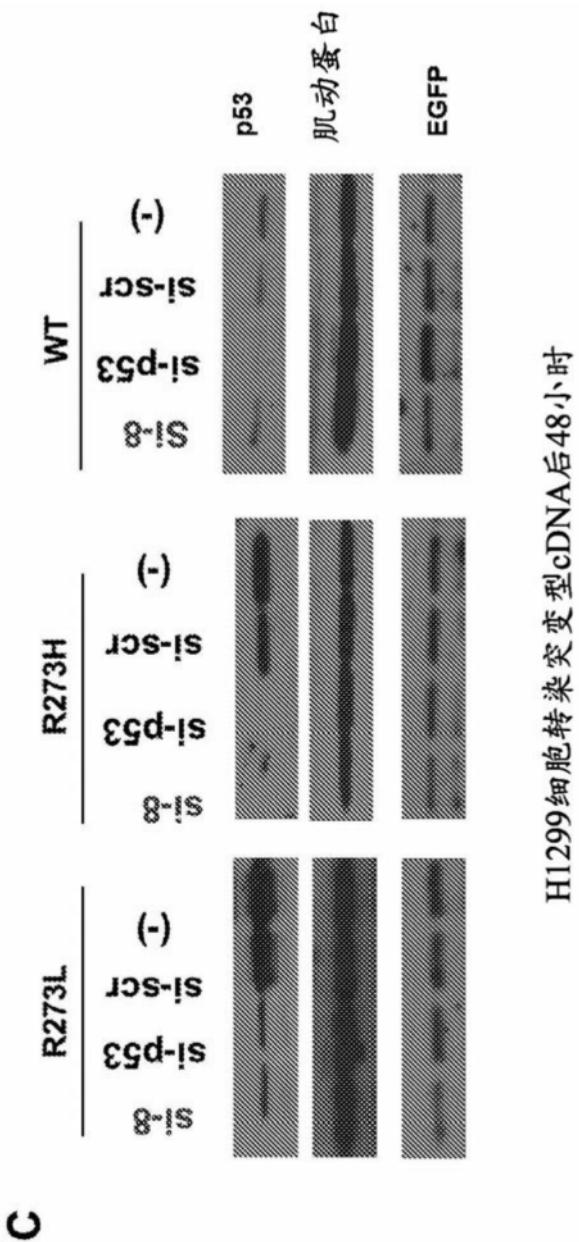


图15续

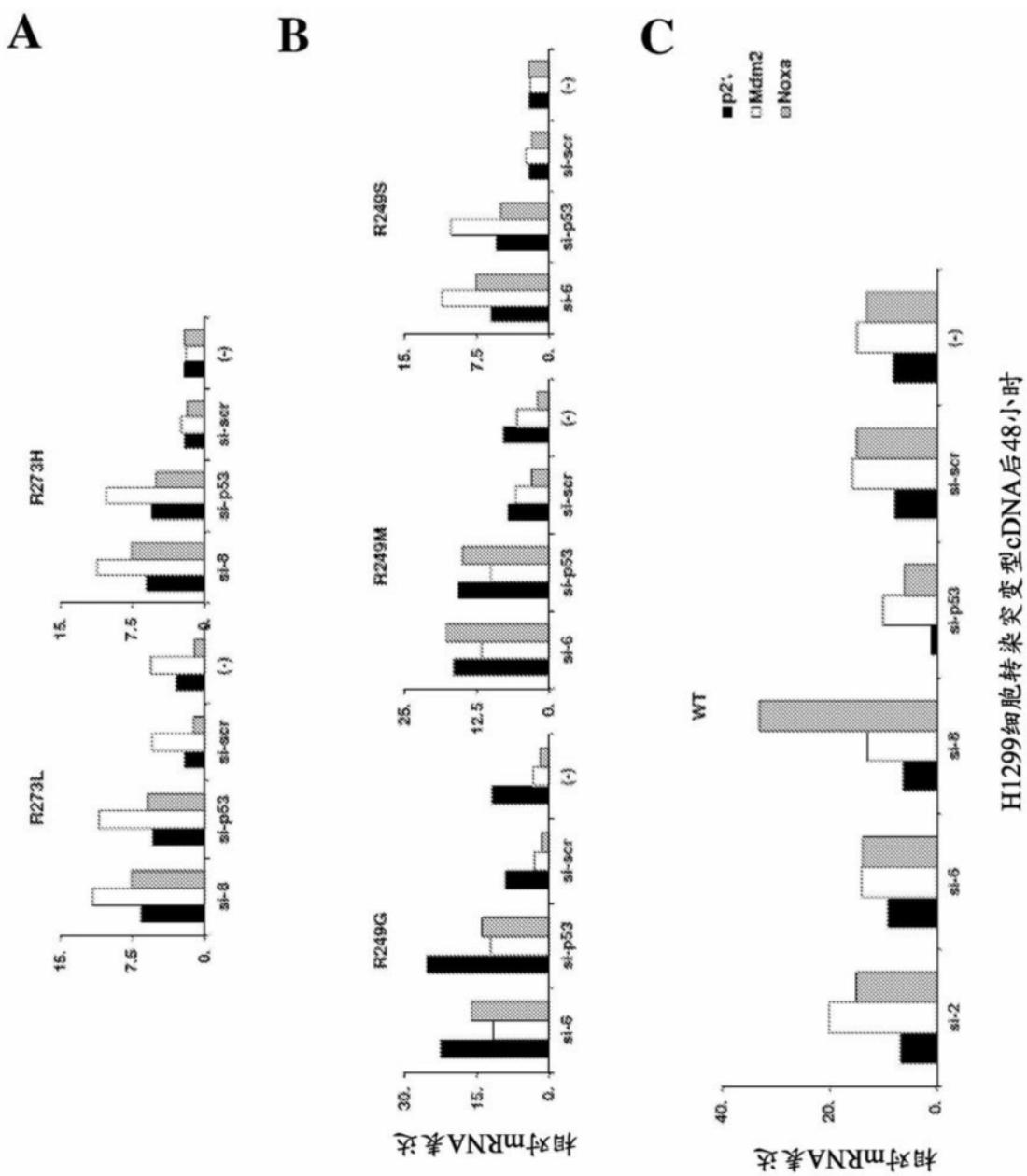


图16

R248	密码子	si-4
wt	CGG	-
R248 - W	UGG	Y
R248 - Q	CAG	Y
R249	密码子	si-6
wt	AGG	-
R249 - S	AGU	Y
R249 - G	GGG	Y
R249 - M	AUG	Y
R273	密码子	si-8
wt	CGU	-
R273 - H	CAU	Y
R273 - L	CUU	Y

图17