



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109475644 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201680035402.2

(22)申请日 2016.04.18

(30)优先权数据

62/148,403 2015.04.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.12.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2016/004023 2016.04.18

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/167633 KO 2016.10.20

(71)申请人 银汉斯德生物技术公司

地址 韩国首尔特别市九老区数码路242韩
华商务都市903室

(72)发明人 慎英基 金永德 郑宪淳 金得爱
拉杰斯凯伦·尼马尔

(74)专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司 31236

代理人 庄文莉

(51)Int.Cl.

A61K 48/00(2006.01)

A61K 31/282(2006.01)

C12Q 1/6886(2018.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

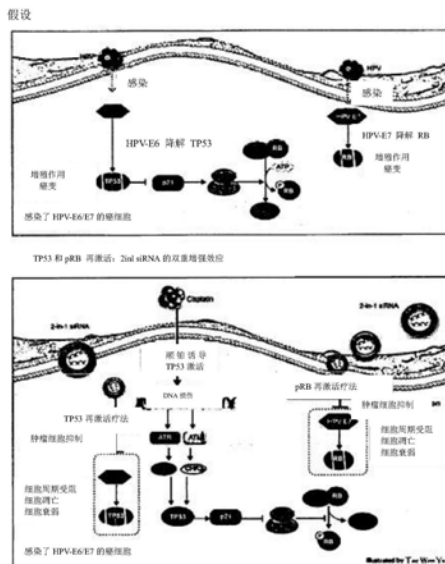
权利要求书1页 说明书17页
序列表9页 附图19页

(54)发明名称

利用铂金类抗癌剂诱导的细胞内增加的p53水平的维持方法及其运用

(57)摘要

本发明有关一种利用铂金类抗癌剂诱导细胞内增加的p53水平的维持方法及其运用,具体来说是一种把铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA联合或先后用于对其有需求的个体,以此维持细胞内p53的增加水平的方法以及利用这一方法的一种用于促进癌细胞杀灭的组合物。根据本发明的方法,即使用低浓度的铂金类抗癌剂进行处理,也能长时间地维持细胞内p53的增加的表达水平,可有效诱导癌细胞的杀灭,不仅如此,使用铂金类抗癌剂还能使药物副作用最小化,可用于癌症的预防和治疗药物的开发。



1. 一种维持细胞内增加的p53水平的方法,其特征是,所述方法包括把铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶的siRNA联合或先后用药于有需求的个体。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征是,所述铂金类抗癌剂选自顺式铂氨、卡波铂、奥沙利铂、奈达铂、铂、triplatin tetranitrate、沙铂及它们的混合物形成的群。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征是,所述泛素连接酶选自由人乳头肿瘤病毒的E6/E6-AP复合体、E6、E6-AP、人类HDM2、Pirh2及COP1组成的群。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征是,所述细胞是所述个体的癌细胞。

5. 根据权利要求1所述是方法,其特征是,所述方法能诱导所述细胞杀灭。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征是,所述细胞的杀灭通过使其凋亡的途径完成。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征是,所述siRNA选自由SEQ ID NOs:1至10组成的群。

8. 一种组合物,含有铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶的siRNA这些有效成分的,在细胞中将p53的水平维持在增加的水平,以此促进细胞的杀灭。

9. 根据权利要求8的组合物,其特征是,所述细胞是癌细胞。

10. 一种药学组合物,含有铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶的siRNA这些有效成分的,在癌细胞中将p53的水平维持在增加的水平,以此预防或治疗癌症。

11. 一种预防宫颈癌或治疗药剂的筛选法,包括

阶段(a):将对人乳头状瘤病毒的E6及E7的siRNA形质诱导至宫颈癌细胞株;

阶段(b):对所述(a)阶段中经形质诱导的细胞株用宫颈癌治疗药剂候选物质处理;

阶段(c):用所述治疗药剂候选物质处理后的48小时内,以一定的时间间隔对细胞内肿瘤蛋白p53的表达水平进行测定;

阶段(d):与未经治疗药剂候选物质处理的细胞进行比较,选出细胞内肿瘤蛋白p53的表达增加持续时间延长的物质。

12. 根据权利要求11所述的筛选方法,其特征是,包括在所述(d)阶段后还包括(e)阶段,即在细胞或动物中识别所筛选物质效果的阶段。

13. 根据权利要求11所述的筛选方法,其特征是,所述阶段(c)中,p53表达可用选自RT-PCR、竞争性RT-PCR、实时RT-PCR、RNase保护分析法、RNA印迹法,DNA微阵列芯片分析法、蛋白质印迹法,酶连接免疫吸附测定,放射免疫性鉴定、放射免疫扩散法、免疫扩散法、火箭免疫电泳、免疫组织化学分析法、免疫沉淀法、补体固定分析法、流式细胞分析法及蛋白质芯片分析法组成的群组中选择的方法进行测定。

14. 根据权利要求11所述的筛选法,其特征是,所述siRNA选自序列号1至10组成的群。

15. 根据权利要求11所述的筛选法,其特征是,所述(c)阶段的一定的时间间隔为30分钟至1小时。

利用铂金类抗癌剂诱导的细胞内增加的p53水平的维持方法 及其运用

技术领域

[0001] 本发明申请书主张2015年4月16日获取专利的美国专利申请第62/148,403号的优先权,所述说明书的所有内容作为本专利申请的参考文献。

[0002] 本发明有关利用铂金类抗癌剂诱导在细胞内增加的p53基因水平的维持方法及其运用,具体来说涉及的这种组合物,是将铂金类抗癌剂和p53泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA联合或先后用药于有需求的个体上,以维持细胞内水平增加的p53的方法及利用其的促进癌细胞杀灭。

背景技术

[0003] 肿瘤抑制蛋白质p53能调节负责DNA修复、阻止细胞周期和生长及凋亡的基因的多种方阵的表达,发挥着在细胞中维持基因组完整性的中枢作用[文献[May et al., Oncogene 18 (53) (1999) p.7621-7636]; [Oren, Cell Death Differ. 10 (4) (2003) p.431-442]; [Hall and Peters, Adv. Cancer Res., 68: (1996) p.67-108]; [Hainaut et al., Nucleic Acid Res., 25: (1997) p.151-157]; [Sherr, Cancer Res., 60: (2000) p.3689-95]].对肿瘤引起的压力信号做出反应,细胞启动p53转录因子,激活与调节细胞周期有关的基因活性,启动由此引起的凋亡或细胞周期的阻滞。凋亡使有机体中受损细胞的去除变得容易,而细胞周期的阻滞却能使受损细胞的遗传性的损伤得到修复[文献[Ko et al., Genes&Devel. 10: (1996) p.1054-1072]; [Levine, Cell 88: (1997) p.323-331]中进行了探讨]。p53的安全保护功能丧失,使受损细胞易转变为癌变状态。使实验鼠的p53失去活性,罕见地连续诱发了高比例的肿瘤[文献[Donehower et al., Nature, 356: (1992) p.215-221]]。

[0004] p53转录因子促进了许多细胞周期调节基因(包括固有的隐性调节剂人类双微染色体2、Human double EV 2 (HDM2)蛋白质的编码基因)的表达[文献[Chene, Nature Reviews Cancer 3: (2003) p.102-109]; [Momand, Gene 242 (1-2): (2000) p.15-29]; [Zheleva et al. Mini. Rev. Med. Chem. 3 (3): (2003) p.257-270]]。HDM2蛋白质用自动调节方式发生作用,以降低-调节p53的活性[文献[Wu et al., Genes Dev., 7: (1993) p.1126-1132]; [Bairak et al., EMBO J, 12: (1993) p.461-468]]。在没有肿瘤引起的压力信号时,即在正常细胞条件下,HDM2蛋白质有助于将p53活性维持在低水平。[文献[Wu et al., Genes Dev., 7: (1993) p.1126-1132]; [Bairak et al., EMBO J, 12: (1993) p.461-468]]。但是,在对细胞DNA受损做出反应或细胞压力下,p53活性增强,有助于借助细胞周期和生长的阻滞或诱导凋亡来防止永远受损的细胞克隆的增殖。

[0005] P53功能的调节依赖于所述p53-HDM2自动-调节系统的2种成分之间合理的平衡。事实上,这种平衡可以看作是细胞生存所必需的。HDM2对降低调节p53活性的作用方式至少有3种。第一,HDM2与p53的N-末端转录活性结构域结合,可切断p53-反应性基因的表达[文献[Kussie et al., Science, 274: (1996) p.948-953]; [Oliner et al., Nature, 362:

(1993) p.857-860]; [Momand et al., Cell, 69: (1992) p.1237-1245]。第二, HDM2将p53在核到细胞质之间往返输送, 更易于p53的蛋白质降解性水解[文献[Roth et al., EMBO J, 17: (1998) p.554-564]; [Freedman et al., Mol Cell Biol, 18: (1998) p.7288-7293]; [Tao and Levine, Proc. Natl. Acad. Sci. 96: (1999) p.3077-3080]。最后, 为了泛素-依赖性26S蛋白酶体途径的降解, HDM2有着使p53与泛素接合的内源性E3连接酶的活性[文献[Honda et al., FEBS Lett, 420: (1997) p.25-27]; [Yasuda, Oncogene 19: (2000) p.1473-1476]。因此, HDM2在核内与p53结合, 削弱了促进靶标基因表达的p53转录因子的能力。使P53-HDM2自动-调节系统恶化可严重影响细胞的稳定状态。不断地有报告提及HDM2的过表达和肿瘤形成之间的相互关系[文献[Chene, Nature 3: (2003) p.102-109]。野生型p53的功能性失活在各类型人类肿瘤中被表达。利用抗-HDM2疗法修复细胞中P53的功能带来了延缓肿瘤增殖的疗效, 而同时也刺激了凋亡。当然, 紧接着为了证实阻碍和p53进行相互作用的HDM2能力的新型抗癌剂, 正在切实的努力中[文献[Chene, Nature 3: (2003) p.102-109]。抗体、肽和反义寡核苷酸已被证实能破坏p53-HDM2的相互作用, 将P53从HDM2的隐性控制中释放, 发出生长阻滞和/或凋亡的正常信号, 激活p53途径的活性, 这为以癌以及非正常细胞增殖为特征的其他疾病的治疗提供了潜在的治疗方法[例如, 参照文献[Blaydes et al., Oncogene 14: (1997) p.1859-1868]; [Bottger et al., Oncogene 13(10): (1996) p.2141-2147]]。

[0006] 另一方面, 已知铂金类抗癌药物中顺式铂氨对头颈部癌、肺癌、乳房癌、膀胱癌、胃癌、宫颈癌、骨髓肿瘤等同类肿瘤癌症的治疗是十分有效的。顺式铂氨是含有铂金(platinum)的重金属化合物, 以铂金原子为中心, 2个氯原子和2个氨分子结合为cis型, 与临近DNA分股的2个鸟嘌呤(guanine)结合后形成链接交联(interstrand crosslink), 抑制DNA的合成。即, 附着在存在于癌细胞核内的DNA双重螺旋结构中, 阻止DNA复制, 抑制癌细胞生长和增殖, 去除癌细胞, 显示出其抗癌效果。已知这类顺式铂氨为了对癌细胞发挥细胞毒性, p53的表达与否是十分重要的(Apoptosis. 2007Sep; 12(9): 1733-42), 根据不同的细胞种类, 针对顺式铂氨处理的p53的表达动态是相异的, 因此存在不能突显顺式铂氨的抗癌效果或一贯影响的局限性。

[0007] 于是, 由于随着p53的表达增加而诱发凋亡(apoptosis)是抗癌治疗方法中最为重要的治疗策略之一, 所以如果能够用铂金类抗癌剂维持细胞内p53表达长时间的增加, 是可以更有效治疗癌症的。

发明内容

[0008] 对此, 本发明的发明者们借助铂金类抗癌剂的处理, 致力于研究为诱导癌细胞中的凋亡(apoptosis), p53的表达必须增加至临界值(threshold)以上才能超过一定时间地维持p53的表达增加的方法, 即研发借助铂金类抗癌剂而增加的细胞内p53的表达的长时间维持能有效杀灭癌细胞的治疗策略, 结果证实将已知抑制p53泛素连接酶的物质与顺式铂氨作为对p53的内在抑制剂合并用药, 借助顺式铂氨的细胞内p53的表达增加能持续更长的时间, 癌细胞的疗效更为优秀, 从而实现了本发明。

[0009] 因此, 本发明的目的是提供一种方法, 具有将铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA在有需要的个体上联合或先后用药的特征, 在细胞中维持升

高水平(elevated level)的p53。

[0010] 因此,本发明的另一目的是提供一种组合物,其含有铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA这一有效成分,使细胞中p53的水平维持在升高水平(elevated level),用于促进细胞消灭。

[0011] 本发明的另一目的是提供一种药学组合物,其含有铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA这一有效成分,维持癌细胞中p53的水平在升高了的水平(elevated level),用于预防或治疗癌症。

[0012] 本发明的另一目的是提供一种预防宫颈癌或治疗药剂的筛选法,包括阶段(a):将对人乳头状瘤病毒(Human Papillomavirus,HPV)的E6及E7的siRNA形质诱导至宫颈癌细胞株;阶段(b):在所述(a)阶段中经形质诱导的细胞株中处理宫颈癌治疗药剂候选物质;阶段(c):在处理所述治疗药剂候选物质后的48小时内,以一定的时间间隔对细胞内肿瘤蛋白p53(tumor protein 53)的表达水平进行测定;阶段(d):与未经治疗药剂候选物质处理的细胞进行比较,选出细胞内肿瘤蛋白p53(tumor protein 53)的表达增加持续时间延长的物质。

[0013] 为了达成本发明的上述目的,本发明提供一种方法,具有将铂金类抗癌剂和对针对p53的泛素连接酶的siRNA在有需求的个体上联合或先后用药的特征,在细胞中维持升高水平(elevated level)的p53。

[0014] 为了达成本发明的另一目的而提供一种组合物,其含有铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA这一有效成分,使细胞中p53的水平维持在升高水平(elevated level),用于促进细胞的杀灭。

[0015] 为了达成本发明的另一目的而提供一种药学组合物,其含有铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA这一有效成分,以维持癌细胞中p53的水平在升高水平(elevated level),用于预防或治疗癌症。

[0016] 为了达成本发明的另一目的而提供一种预防宫颈癌或治疗药剂的筛选法,包括阶段(a):将对人乳头状瘤病毒(Human Papillomavirus,HPV)的E6及E7的siRNA形质诱导至宫颈癌细胞株;阶段(b):在所述(a)阶段中经形质诱导的细胞株中处理宫颈癌治疗药剂候选物质;阶段(c):在处理所述治疗药剂候选物质后的48小时内,以一定的时间间隔对细胞内肿瘤蛋白p53(tumor protein 53)的表达水平进行测定;阶段(d):与未经治疗药剂候选物质处理的细胞进行比较,选出细胞内肿瘤蛋白p53(tumor protein 53)的表达增加的持续时间延长的物质。

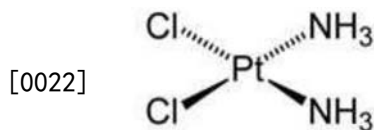
[0017] 以下将对本发明进行详细说明。

[0018] 本发明提供一种方法,其特征是在将铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶的siRNA在有需求的个体上联合或先后用药,在细胞中维持升高水平(elevated level)的p53。

[0019] 本发明中,所述铂金类抗癌剂是广泛用于癌症治疗抗癌剂中的一种,是用于约50%的癌症患者的药物。铂金类抗癌剂是和铂金配位结合的复合体,本发明中所述铂金类抗癌剂可选自顺式铂氨(cis-diamminedichloroplatinum[II])、卡波铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、奈达铂(nedaplatin)、铂(picoplatin)、triplatin tetranitrate)、沙铂(satraplatin)及它们的混合物形成的群,顺式铂氨或卡波铂比较理想,但最为理想的可能是顺式铂氨。

[0020] 其中,顺式铂氨是铂金原子上与2个氯和2个氨配位的具有如下化学式1所表示结构的化合物:

[0021] [化学式1]



[0023] 以下在没有额外说明的情况下,本发明涉及的铂金类抗癌剂的使用是基于包含所有化合物本身、药学上可接受的碱、水合物、溶剂化物、同分异构体及前药的概念。

[0024] “药学可接受的盐”是指化合物对用药后的有机体不诱发严重刺激的,不损伤化合物的生物学活性和物性的一种化合物的剂型。用语“水合物”、“溶剂化物”、“同分异构体”也具有上述含义。所述药剂学的盐可通过使本发明的化合物与盐酸、溴酸、磺酸、硝酸、磷酸等无机酸以及甲烷磺酸、乙烷磺酸、对甲苯磺酸等磺酸,果酸、甲酸、柠檬酸、醋酸、三氯乙酸、三荧光醋酸、羊蜡酸、异丁烷酸、丙二酸、琥珀酸、苯甲酸、葡萄糖酸、安息香酸、乳酸、延胡索酸、马来酸、水杨酸等有机碳酸发生反应后获取。此外,也可使本发明的化合物与碱基发生反应,形成氨盐、钠盐、钾盐等的碱金属盐,钙盐或镁盐等碱土金属盐等的盐,己基胺、冬氨酸、三羟甲基甲胺等的各有机碱基的盐,以及精氨酸、赖氨酸等的氨基酸盐后获取。

[0025] “水合物”是指本发明的化合物或其盐,含有由非共价分子间力(non-covalent intermolecular force)结合的化学计量学(stoichiometric)或非化学计量学(non-stoichiometric)的量的水。

[0026] “溶剂化物(solvate)”是指本发明的化合物或其盐,含有由非共价分子力结合的化学计量学或非化学计量学的量的溶剂。与其有关的理想的溶剂是具有挥发性、非毒性、和/或适用于人类用药的各种溶剂。

[0027] “同分异构体(isomer)”是指虽具有同一化学式或分子式,但在光学上或立体上不同的本发明涉及的化合物或其盐。例如,本发明涉及的化学式1所表示的化合物随着取代基的种类不同,可具备立体生成中心(asymmetric center,不对称碳素原子),这种情况下,化学式1表示的化合物可作为和镜面同分异构体及部分立体同分异构体相同的光学同分异构体而存在。

[0028] “前药(prodrug)”是指在活体内转变为母体药物(parent drug)的物质。前药在某些时候,因为用药比母体药物更容易,故常常被使用。举例来说,对于前药在口服用药时具有生活性而让人满意,但母体药物却可能做不到。另外,前药与母体药物相比还可具有在制药组合中提高的溶解度。例如,前药被以酯(“前药”)作为用药化合物,虽然水溶解度对移动性不利,但水溶解度在有利的细胞中,依靠物质对象水解为活性体羟酸,使穿透细胞膜更加容易。另外举一个前药的例子,肽为了表露活性部位,可以是利用物质对象与已变酸基结合了的短肽(聚氨基酸)。

[0029] 本发明中,所述泛素连接酶(ubiquitin ligase)是因E3泛素连接酶而为人所知的一种蛋白质,识别特定蛋白质后诱导泛素化的一种泛素连接酶。泛素连接酶显现出利用泛素连接酶对p53产生作用,使p53泛素化,通过26S蛋白酶体途径进行分解的功能。因此,可以理解为,本发明中,所述泛素连接酶不仅是利用泛素连接酶对p53产生作用,使p53泛素化,阻止在细胞内表达p53的蛋白质,其片段、其功能性同等物及功能性诱导体全部包括在内。

[0030] 本发明的泛素连接酶2个以上蛋白质形成复合体,包括起到泛素连接酶作用的,但是并不限于此,例如,也可以是人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 的E6/E6-AP复合体等泛素连接酶复合体。

[0031] 所述“片段”作为一种天然蛋白质,其氨基酸部分缺失,蛋白质的生理活性和天然蛋白质相同或包括形成蛋白质复合体的结构蛋白质中的一部分。所述“功能性同等物”中,天然蛋白质氨基酸中一部分或全部被取代,是指氨基酸的一部分缺失或补充的氨基酸序列变异体,与天然泛素连接酶蛋白质有着实质上同等的生理活性。另外,所述“功能诱导体”是指一种为增加或减少所述泛素连接酶蛋白质的物理/化学性质而变形的蛋白质,与天然蛋白质有着实质相同的生理活性。

[0032] 本发明中,所述泛素连接酶最好是HDM2、人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 的E6/E6-AP复合体、B6或E6-AP6蛋白质,最理想的是人乳头瘤病毒的E6/E6-AP复合体、B6或E6-AP6蛋白质,但是对此没有限制。

[0033] 根据本发明的一实施例,确认了顺式铂氨处理宫颈癌细胞株的结果,细胞内p53的表达量体现脉搏 (pulse) 的状态,反复地增加和减少。证实了为了用顺式铂氨诱发肿瘤细胞的凋亡 (apoptosis),细胞内p53的表达量需增加至一定水平 (threshold, 临界值) 以上,当肿瘤细胞单独用顺式铂氨处理时,在充分的程度下显示细胞毒性,不持续增加p53的表达。

[0034] 根据本发明的另一实施例,宫颈癌细胞株中p53泛素连接酶起作用的人乳头瘤病毒 (Human Papillomavirus, HPV) 的E6和E7的siRNA,宫颈癌细胞株处理的结果证实,细胞内p53的表达量虽表现出增加的倾向,这种p53的表达增加或细胞毒性充分体现的程度得不到长时间维持。

[0035] 对此,本发明的发明者们联合使用了人乳头瘤病毒E6和E7的siRNA和顺式铂氨处理宫颈癌细胞株的结果证实,维持水平 (threshold) 以上p53的表达增加可诱导细胞的凋亡 (apoptosis)。

[0036] 本发明中的用语,“siRNA”是指可通过特定mRNA的分裂 (cleavage) 诱发RNAi (核糖核酸干扰) 现象的短双链RNA。由具有与靶标基因的mRNA相同序列的意义RNA链以及有着与其互补序列的反义RNA链组成。siRNA由于能够抑制靶标基因的表达,提供了有效的基因敲减方法或基因治疗 (gene therapy) 方法。

[0037] siRNA RNA之间成双成对的双链RNA部分并不限于完全成双,包括由于匹配 (对应的碱基不互补)、凸起 (没有对应普通链的碱基) 等造成的不能成双的部分。全长为10至100碱基,比较理想的是15至80碱基,更理想的是20至70碱基。siRNA末端结构因RNAi效果而抑制靶标基因的表达,可以是平滑 (blunt) 末端或者黏性 (cohesive) 末端。黏性末端可能是结构3末端突出的结构,也可能是5末端方向突出的结构。突出的碱基数并无限定。例如,碱基数为1至8碱基,理想的可以是2至6碱基。本申请书中siRNA的全长是中央的双链部分的长与构成两个末端的单链突出的长的和。另外,siRNA在可以维持靶标基因表达抑制效果的范围内,如,一个末端的突出部分可包括低分子RNA (如tRNA、rRNA、病毒RNA等天然的RNA分子或人工RNA分子)。siRNA末端结构的两侧不必都是切断结构,双链RNA的一个方向的末端部位也可以是连接器RNA连接的茎环式结构。连接器的长度是对茎部分成双不产生影响的长度,并无特别限定。

[0038] 本发明的siRNA可特定地使p53泛素连接酶 (ubiquitin ligase) mRNA减少,对序列

和长度并不做特别的限定,本发明的具体实施例中制备了HPV E6或E7中具有特异性的5种siRNA,证实了增加所述siRNA细胞内p53的表达,与顺式铂氨联合使用进行处理时,可产生细胞内p53的表达长时间维持在一定水平(threshold)以上的效果。

[0039] 因此,本发明中所述siRNA最好是选自序列号1至10组成的群,但对此不做特别的限定。

[0040] 本发明的发明者们制备了如下表所示的针对HPV16型和18型的E6/E7肿瘤性蛋白质的siRNA。下表中用‘m’表示的siRNA序列显示的是置换为使碱基残基结合了甲基的2’-0-Me变形核苷酸的碱基。即,2’-0-Me变形为‘U’时表示为‘mU’或2’-0-Me变形为‘G’时表示为‘mG’。

[0041] 表1对应HPV16型和18型的siRNA

[0042]

名称	序列号	序列
HPV18型 siRNA426	序列号1 (正向)	5’ -CAACmGAmGCACmGACAmGmGAA-3’
	序列号2 (逆向)	5’ -UUCCUGUCGUGCUCGGUUG-3’
HPV18型 siRNA450	序列号3 (正向)	5’ -CCAACmGACmGCmGAmGAAACA-3’
	序列号4 (逆向)	5’ -UGUmUUCUCmUGCGmUCGmUUGG-3’
HPV16型 siRNA366	序列号5 (正向)	5’ -GCAAAGACAUCmUmGmGACAAA-3’
	序列号6 (逆向)	5’ -UUUGUCCAGAUGUCUUUGC-3’
HPV16型 siRNA488	序列号7 (正向)	5’ -UCAAmGAACACmGUAmGAmGAAA-3’
	序列号8 (逆向)	5’ -UUUCUCUACGUGUUCUUGA-3’
HPV16型 siRNA497	序列号9 (正向)	5’ -GACCGGUCGAUGUAUGUCUUG-3’
	序列号10 (逆向)	5’ -AGACAmUACAmUCGACCGmUCCA-3’

[0043] 本发明的特征是,为了用铂金类抗癌剂维持细胞内p53表达的增加,联合使用铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶的siRNA。

[0044] 所述联合用药是指铂金类抗癌剂和siRNA同时(simultaneously)、分别(separately)或先后(sequentially)用药。具体来说就是,铂金类抗癌剂和siRNA均以单一组合物的形态制备后同时用药,或是铂金类抗癌剂和siRNA中的任意一个比另外一个先用药。本发明中铂金类抗癌剂和siRNA的用药顺序,即哪一药物在哪个时间需同时、分别或先后用药可依据专家的判断,这样更容易进行选择。

[0045] 根据所述本发明的方法,铂金类抗癌剂和对p53泛素连接酶的siRNA联合投药于个体时,个体的细胞、尤其是癌细胞内p53的表达增加可长时间维持,结果显示可诱导癌细胞的杀灭。理想的是,所述癌细胞的杀灭可通过用增加的p53所诱导的凋亡(apoptosis)途径实现。

[0046] 本发明提供一种组合物,含有铂金类抗癌剂和p53泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA这些有效成分,使细胞中p53水平维持升高了的水平(elevated level),以用来促进细胞的杀灭。

[0047] 本发明提供一种药学组合物,包括铂金类抗癌剂和p53泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA等有效成分的,使细胞中p53水平维持升高了的水平(elevated level),用于癌的预防和治疗。

[0048] 本发明涉及的药学组合物可用铂金类抗癌剂和siRNA以单一组合物(single composition)的形态制剂或独立组合物(separate composition)的形态制剂。它们的制剂方法可采用该行业内广泛使用的技术。

[0049] 本发明涉及的药学组合物,所述各成分可同时地(simultaneous)、分别地(separate)或先后地(sequential)用药。例如,本发明的药学组合物中包括的各成分为单一组合物(single composition)时可同时用药,非单一组合物时,一个成分在其他成分用药之前、之后和、或其他成分一起使用。所述本发明涉及的药学组合物的用药顺序,即哪种药物在什么时间点,同时、分别还是依次用药可由医生或专家决定。这种用药顺序可随众多的因子而不同。

[0050] 根据本发明的一实施例,识别人类宫颈癌细胞的动物标本中联合使用顺式铂氨和HPV E6和E7的siRNA的结果证实了,即使是在顺式铂氨单独用药时不能体现抑制肿瘤生长效果的低浓度中也能体现出优秀的肿瘤生长抑制效果。

[0051] 即,利用本发明的药学组合物联合使用铂金类抗癌剂和siRNA的情况下,所使用药物的浓度低于通常为达到抗癌效果而使用的铂金类抗癌剂的浓度,体现出优秀的抗癌效果,因此具有减少过量或长期使用铂金类抗癌剂所带来的严重的副作用的优势。

[0052] 因此,本发明的药学组合物不仅体现出使癌细胞内p53的表达增加长期持续的优秀的抗癌效果,而且还能减少抗癌治疗带来的副作用,非常适用于临床使用。

[0053] 本发明涉及的药学组合物可以是仅含有所述铂金类抗癌剂和siRNA的或者与药物学上可接受的载体一起的合适的形态制剂,还可以含有成型添加剂或稀释剂。所述载体包括所有种类的溶媒、分散介质、水中乳或乳中水乳液、水性组合物、脂质体、微珠和微量铬。

[0054] 药学上可接受的载体还可包括口服用药载体或非口服用药载体。口服用药载体有乳糖、淀粉、纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸等。同时,还可包括口服用药使用的各种药物

传送物质。另外,非口服用药载体可包括水、合适的油、生理盐水、水溶性葡萄糖和乙二醇等,还可包括稳定剂、防腐剂。合适的稳定剂亚硫酸氢钠、亚硫酸钠或抗坏血酸维生素C等抗氧化剂。合适的防腐剂有苯扎氯铵、甲基-或对羟基苯甲酸丙酯。本发明的药学组合物除所述成分外,润滑剂、湿润剂、甜味剂、芳香剂、乳化剂、悬浮剂等。此外,药学上可接受的载体和制剂可参考以下文献中的记录(Remington's Pharmaceutical Sciences,19th ed., Mack Publishing Company,Easton,PA,1995)。

[0055] 本发明的组合物可以任何方式用于人类等哺乳动物。例如,可制成口服或非口服用药。非口服用药的用药方式并没有限制,可在静脉内、肌肉内、动脉内、骨髓内、心脏内、经皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、肠道、局部、舌下或直肠内使用。

[0056] 本发明的药学组合物可按照如上所述的用药途径制备成口服用或非口服用制剂。

[0057] 当为口服药剂时,本发明的组合物可用该行业内的常规方法制成粉剂、颗粒制剂、锭剂、丸剂、糖衣锭剂、胶囊制剂、液体剂、凝胶、糖浆、浆、悬浮剂等剂型。例如,将口服制剂活性成分与固体成型添加剂调配后进行粉碎,再添加合适的防腐剂加工成颗粒混合物,获取锭剂或糖衣锭剂。合适的成型添加剂可包括如乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、木糖醇、甘露醇、赤藻糖醇和麦芽糖醇等糖类,玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、土豆淀粉等淀粉类,纤维素、甲基纤维素、羟甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素等纤维素类,白明胶、聚乙烯吡咯烷酮等填充剂。另外,视情况还可添加架桥结合聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、褐藻酸或海藻酸钠等分裂剂。还有,本发明的药学组合物也可包括抗凝集制剂、润滑剂、湿润剂、香料、乳化剂、防腐剂等。

[0058] 非口腔用药制剂的状态可以是注射剂、霜剂、润肤剂、外用膏药、油剂、保湿剂、凝胶剂及鼻腔吸入剂等,可用该行业内已知的方法制备。这些剂型全都记录在制药化学领域一般公开的处方文献(Remington's Pharmaceutical Science,19th ed.,Mack Publishing Company,Easton,PA,1995)中。

[0059] 本发明涉及组合物的总有效量可以单一用药量(single dose)给患者用药,也可以倍剂量(multiple dose)长期采用药分级治疗方案(fractionated treatment protocol)进行用药。用药量不仅考虑制剂化方法、用药途径及治疗次数,还要考虑患者的年龄、体重、健康状态、性别、疾病严重程度、进食及排泄率等多种要素才能决定对患者的有效的用药量,考虑这点时,拥有该领域一般知识的人可以决定本发明所涉及组合物的合适的用药量。按照韩国食品药品安全厅(KFDA)的资料,一般铂金类抗癌剂按照每次 $0.1\sim 250\mu\text{M}$ 的用量用药。

[0060] 铂金类抗癌剂的有效量在 $0.1\sim 250\mu\text{M}$ 比较好, $0.5\sim 200\mu\text{M}$ 更好一些,最好的是 $0.625\sim 160\mu\text{M}$,但对此并不做限定,由医生根据患者的年龄、身高、重症度、部位、排泄量等来调整所述有效量。

[0061] 一方面,含有铂金类抗癌剂和siRNA的药学组合物以单一制剂的形式用药时,一次用药量为上述铂金类抗癌剂的量或以下的量以合适的配制比率进行制剂的配制,所配制的制剂可1天1次或数次分开用药。可预防或治疗癌症的铂金类抗癌剂的理想的1次投药量为 $0.5\sim 200\mu\text{M}$,p53泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA的用量为1天 $0.5\text{mg}\sim 5\text{mg}$,可分几次联合使用。

[0062] p53泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA的有效量为 $0.1\sim 20\text{mg}/\text{kg}$,较为理想

的量是0.2~15mg/kg,最理想的量是0.4~10mg/kg,但对此并不做限制,由医生根据患者的年龄、身高、重症度、部位、排泄量等调整所述有效量。

[0063] 本发明涉及的药学组合物在体现本发明的效果时,对其剂型、用药途径及用药方法等不做特别限制。

[0064] 本发明另外还提供一种预防宫颈癌或治疗药物的筛选法,包括:

[0065] (a):将对人乳头肿瘤病毒(Human Papillomavirus,HPV)的E6及E7的siRNA转导至宫颈癌细胞株的阶段;

[0066] (b):在所述(a)阶段中经转导的细胞株中用宫颈癌治疗药剂候选物质进行处理的阶段;

[0067] (c):用所述治疗药剂候选物质处理之后的48小时内,隔一定的时间就对细胞内p53(tumor protein 53)的表达水平进行测定的阶段;

[0068] (d):与未经治疗药剂候选物质处理的细胞进行比较,选出细胞内p53表达增加的持续时间延长的物质的阶段。

[0069] 本发明的所述(a)阶段中,宫颈癌细胞株中对HPV E6和E7转导siRNA的方法利用磷酸钙的转染(Graham,F.L.et al.,Virology,52:456(1973))、利用考来糖酐(DEAE-Dextran.)的转染、微注射转染(Capecchi,M.R.,Cell,22:479(1980))、正负离子脂质转染(Wong,T.K.et al.,Gene,10:87(1980))、电穿孔技术(Neumann E.et al.,EMBO J.,1:841(1982))、如转导或转染等文献(Basic methods in molecular biology,Davis等,1986和Molecular cloning:A laboratory manual,Davis等,1986)中所记载,拥有本发明所述技术领域常规知识的人可根据已知的各种方法制备。

[0070] 本发明的所述(b)阶段中,治疗药剂候选物质是指能够影响细胞内p53的表达量的未知物,包括抗体、核酸适体、天然提取物或化学物质,但对此并没有限定。在细胞内进行治疗药剂候选物质处理是指将实验物质加入细胞培养基后进行一定时间的细胞培养。

[0071] 所述阶段(c)中,p53表达是指p53mRNA或蛋白质的表达,可用RT-PCR、竞争性RT-PCR(competitive RT-PCR)、实时RT-PCR(Real-time RT-PCR)、RNase保护分析法(RPA:RNase protection assay)、RNA印迹法(northern blotting)、DNA微阵列芯片分析法、蛋白质印迹法(Western Blotting)、酶连接免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay)、放射免疫性鉴定(RIA)、放射免疫扩散法、奥克特洛尼免疫扩散法、火箭免疫电泳、免疫组织化学分析法、免疫沉淀法(immunoprecipitation)、补体固定分析法、流式细胞分析法(FACS)及蛋白质芯片分析法组成的群组中进行选择后测定。

[0072] 所述(c)阶段中,一定的时间间隔是指在过程中观察细胞内p53的表达量变化的合适的时间间隔,并不做特别的限定,但最好是30分钟到1个小时。

[0073] 本发明的筛选方法的特征还有,可在所述(d)阶段后追加(e)阶段,即在细胞或动物中识别所筛选物质的效果。在细胞中确认效果的阶段是指确认宫颈癌细胞株是否体现出细胞毒性,在动物中确认效果的阶段则是指确认宫颈癌细胞株识别的肿瘤在动物标本中是否体现出抑制肿瘤生长的效果。

[0074] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果:

[0075] 本发明的方法的特征是将铂金属抗癌剂及p53泛素连接酶的siRNA联合使用或先后投药于有需求的个体,根据本发明的方法,即使用低浓度的铂金属抗癌剂处理也能长时

间维持细胞内p53增加的表达水平,有效诱导癌细胞的杀灭,不仅如此,使用铂金界抗癌剂的药物副作用最小,对癌症的预防和治疗药物的开发十分有用。

附图说明

[0076] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0077] 图1是对宫颈癌细胞联合使用HPV E6/E7 siRNA和顺式铂氨进行处理时,细胞内TP53的动态观察图(426、450、366、448、497:siRNA编码名,SP:siRNA池,CDDP:顺式铂氨,NC:未处理的对照群);

[0078] 图1A是用20nM的HPV E6/E7 siRNA使HeLa细胞(左面板)和CaSki细胞(右面板)形质转换后,使其暴露在10 μ M的顺式铂氨;24小时后,收集所有细胞溶解物以分析TP53的诱发和E6、E7效率的免疫印迹。使用的对照群是 β -actin;

[0079] 图1B是通过WST分析证实细胞的生存能力;误差条是指独立实验的mean \pm SD;

[0080] 图1C是处理了HPV E6/E7 siRNA的肿瘤细胞中,利用TP53和转录因子E2F荧光素酶报告活性对TP3和过磷酸化的RB的诱发程度进行评价;

[0081] 图1D是HeLa细胞(上面板)和CaSki细胞(下面板),将E6/E7特异siRNA单独和/或顺式铂氨(CDDP)一起进行处理;内源性TP53、RB和18E7、16E7、16E6以及18E6的沉默修复在指定的时间和其他下级靶标基因一同进行了分析。使用的对照群是 β -actin;

[0082] 图1E是显示TP53、E6、E2F以及E7的相对强度比率用对应的蛋白质印迹法获得后的结果;

[0083] 图1F是HeLa细胞(上面板)和CaSki细胞(下面板),将E6/E7特异siRNA单独和/或顺式铂氨(CDDP)一起处理后,对各细胞中沉默基因CDKN1A的转录体的水平用实时荧光定量定量法(qPCR:Real-time quantitative PCR)进行了分析;误差条是指独立实验的mean \pm SD;

[0084] 图2是HPV E6/E7 siRNA单独或和CDDP一起处理,对tp53中广为人知的靶标基因的表达的影响实时通过qPCR分析后确认的结果(A:HeLa细胞,B:Caski细胞);

[0085] 图3是分析E6/E7缺失对TP53动态和细胞生存影响的结果;

[0086] 图3A是GFP-TP53报告结构的图示用于形成稳定的细胞株;特性化的TP53-RE包括TP53共识的结合位点(consensus binding site,绿框),箭头显示的是带有GFP-报告基因的最小化的TATA box;每30分钟一次将IncuCyte用作所有孔的9个图像;存活的HeLa细胞的延时显微镜图像实施了20nMSP、10 μ CDDP的单一治疗法以及SP和CDDP的混合疗法;形质转换后典型图像的选择呈现的是作为对照组的对照siRNA处理的细胞在荧光与阶段对比的图像的合并(merge)(存活细胞典型的图像记录IncuCyte图像用5天时间制备;比例尺=40 μ m.GFP-TP53报告稳定HeLa细胞);

[0087] 图3B显示的是增殖速度(左上)、GFP个数(右上)、GFP强度(右下)及GFP个数标准化(左下)是以HPV E6/E7 siRNA反应,进行CDDP单独处理和/或它们的组合处理(比例尺:20 μ m;箭头表示的是TP53-反应要素(response element,RE)驱动GFP报告基因表达的诱导和HPV E6/E7 siRNA处理时间);

[0088] 图3C显示的是对HPV E6/E7 siRNA单独和/或混合处理产生反应,GFP-TP53报告稳定性CaSki细胞的增殖速度(左上)、GFP个数(右上)、GFP强度(左下)及GFP个数标准化(右

下) (箭头表示的是TP53-反应要素 (response element, RE) 驱动GFP报告基因表达的诱导和HPV E6/E7 siRNA处理时间);

[0089] 图3D是HPV E6/E7 siRNA单独、CDDP单独或两者结合反应后TP53活性的模拟显示图;

[0090] 图4显示的是对应HPV E6/E7 siRNA单独用药和/或与CDDP联合用药的GFP-TP53和RFP-E2F的表达的观察结果;

[0091] 图4A显示的是稳定培养的RFP-E2F和GFP-TP53形质转换的HeLa细胞,用共焦显微镜(confocal microscopy)拍摄了揭示HeLa细胞中HPV E6/E7致癌基因(oncogene)的沉默效果的GFP-TP53的RFP-E2F的时间依赖性变化(红色显示的是Ex/Em=565nm/650nm,绿色显示的是Ex/Em=495nm/545nm。细胞的荧光图像与相位差图像重叠);

[0092] 图4B是用Dual报告稳定的细胞的延时共焦图像获取平均强度数据;细胞是从12小时开始到24小时为止每隔20分钟进行拍摄;尤其是,转移模式在HPV E6/E7 siRNA池(pool)形质转换细胞中观察了19至21小时;

[0093] 图5是三组分联合(顺式铂氨、紫杉醇和siRNA)用药对HPV阳性宫颈癌细胞的效果在生物体外或在活的有机体内确认的结果(CDDP:顺式铂氨,PTX抗肿瘤药:紫杉醇);

[0094] 图5A是HeLa细胞中处理了E6/E7特异性的siRNA、顺铂CDDP+抗肿瘤药(paclitaxel)或它们的混合物;内源性TP3、去磷酸化RB(hypophosphorylated RB)及沉默性18E7、16E7、16E6及18E6的诱导出现的时间点与其他下级靶标基因一起进行了分析; β -actin作为对照组使用;

[0095] 图5B是用Real-time quantitative (q) PCR分析CDKN1A转录水平;误差条显示的是独立实验的mean \pm SD;

[0096] 图5C是对GFP-TP53的活性的三组分混合物效果的分析;显示了细胞增殖比例(左上)、GFP个数(右上)及GFP强度(右下);

[0097] 图5D对HeLa细胞处理PV E6/E7 siRNA池(pool)、CDDP和CDDP+特素(paclitaxel)或它们的混合物;进行了细胞周期分析并测定在各阶段(G0-G1, S和G2/M)细胞的比率(% cells);

[0098] 图6是被HPV感染的宫颈癌细胞中HPV E6/E7致癌基因和HPV E6/E7 siRNA混合治疗作用的简单图示;

[0099] 图7是HeLa细胞中单独使用顺式铂氨、单独使用siRNA池和或联合使用顺式铂氨处理时GFP-TP53的表达量在各时间点的确认结果。

具体实施方式

[0100] 以下将对本发明进行详细说明。

[0101] 但,下述实施例只是对本发明的举例说明,本发明的内容并不仅限于下述实施例。

[0102] <实施例1>宫颈癌细胞中顺式铂氨和HPV E6/E7 siRNA影响TP3的效果

[0103] <实施例1-1>宫颈癌细胞中联合顺式铂氨处理的HPV E6/E7 siRNA的效果

[0104] 宫颈癌细胞和被HPV18型病毒感染的HeLa宫颈癌细胞株(HeLa; ATCC CCL-2)、被HPV16型病毒感染的SiHa (SiHa; ATCC HTB-35) 宫颈癌细胞株按 5×10^4 或 1×10^5 的细胞数放入6孔实验盘,在37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳的条件下放在RPMI1640或DMEM培养基中各培养24小时。

siRNA细胞内导入(transfection)用转染试剂DharmaFect (Dharmacon,Lafayette,CO,USA)操作,按照生产公司的说明操作。

[0105] 被HPV18型病毒感染的HeLa宫颈癌细胞株的情况是426、450序列的siRNA各自和共同进行形质转换,被HPV16型病毒感染的SiHa宫颈癌细胞株的情况是366、44、497序列的siRNA各自和共同进行形质转换。

[0106] 使用蛋白质印迹法时,全细胞裂解液使用RIPA Buffer裂解液(10mM Tris(pH.4), 0.15M NaCl,5mM EDTA,1%Triton X-100,0.5%deoxycholic acid sodium salt和0.1% SDS)提取。离心分离后,上层液的蛋白质浓度用BCA蛋白浓度测定盒(Thermo Fisher Scientific Inc)进行了测定。为了使蛋白质样本完全变性,加入样本缓冲液并煮5分钟。然后,各样本分别使用了6%、10%或15%的聚丙烯酰胺凝胶,在0.4 μ m的PVDF膜(Milipore, Bilerica)转移。转移之后,用5%的脱脂乳将膜挡住,放入适合浓度的一次抗体和辣根过氧化物酶结合的免疫球蛋白进行了繁殖。最后使用ECL溶液测出蛋白质的表达程度。当蛋白质印迹法实验中使用的抗体是TP53[D07]、HPV 18-E6[G7]、HPV16-E6[C1P5]、HPV 18-E7[F7]、HPV16-E7[ED17]、 β -Actin[C4]时,使用的抗体产自Santa Cruz Biotechnology(St.Louis, CA)公司。

[0107] 为确认宫颈癌细胞中与顺式铂氨(CDDP)结合的HPV E6/E7 siRNA对TP53产生的影响,做了如下实验。

[0108] 宫颈癌细胞HeLa细胞和CaSki细胞用HPV E6/E7 siRNA进行形质转换后,用10 μ M顺式铂氨(cisplatin)处理后培养24小时。收集细胞溶解物后实施了该行业人人皆知的方法—蛋白质印迹法。

[0109] 其结果如图1A所示,可以确认经顺式铂氨处理的群中,HPV E6/E7的蛋白质表达量没有显示,TP3的表达量增加了。

[0110] <实施例1-2>顺式铂氨和HPV E6/E7 siRNA的细胞杀灭效果

[0111] 为了确认在宫颈癌细胞中,顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA对细胞生存能力产生的影响,做了如下实验。

[0112] 宫颈癌细胞HeLa细胞和CaSki细胞用HPV E6/E7 siRNA进行形质转换后,10 μ M顺式铂氨(cisplatin)处理后培养24小时,之后为确认细胞的生存能力实施了WST分析法。

[0113] 细胞数的测定使用了水溶性四氮唑盐(WST)方法(EZ-Cytox kit;韩国首尔Daeil分析研究所)。将EZ-Cytox solution(50 μ l)放入12孔实验盘的每一个孔中,培养2~3小时后,96孔实验盘中使用GENios亲酶标仪(Tecan Trading AG,瑞士文尼多夫)测定(485nm)存活细胞。

[0114] 其结果如图1B所示,和未经顺式铂氨处理的群比较,经处理的群的细胞生存能力降低。

[0115] <实施例1-3>利用顺式铂氨和HPV E6/E7 siRNA测定TP53的酶活性

[0116] 为了确认宫颈癌细胞中顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA对酶活性产生的影响,进行了如下实验。

[0117] 对经顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA处理的HeLa细胞和CaSki细胞使用pTA-TP53-Luc(TP53报告)和pTA-E2F-Luc(E2F报告)矢量进行双重形质转换。所述荧光素酶报告矢量系统购自Clontech通路分析系统(Mountain View,美国加利福尼亚)公司。其中形质转

换24小时后,利用双萤光素酶报告基因系统(Promega公司)进行荧光素酶报告基因实验(luciferase assay),使用GENios亲酶标仪(Tecan Trading AG,瑞士文尼多夫)装备测定冷发光活性度。

[0118] 其结果如图1C所示,HeLa细胞和CaSki细胞中处理顺式铂氨的情况下,TP53的活性显得增加更多,而E2F的活性则显得下降更多。

[0119] <实施例1-3>顺式铂氨和HPV E6/E7 siRNA对TP53的表达产生的影响

[0120] 为了确认宫颈癌细胞中顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA对酶活性产生的影响,进行了如下实验。

[0121] 用和所述实施例1-1中记载的相同的方法培养HeLa细胞和CaSki细胞,进行形质转换后处理顺式铂氨。在获取细胞溶解物后实施蛋白质印迹法。蛋白质印迹法中TP53[D07]、HPV 18-E6[G7]、HPV16-E6[C1P5]、HPV 18-E7[F7]、HPV16-E7[ED17]、E2F-1[KH195]、Cyclin-E[M20]、 β -Actin[C4]的情况是使用了Santa Cruz Biotechnology(St.Louis,CA)公司的抗体,RB[554164]的情况是使用了BD Pharmingen公司的抗体,Phospho-TP53(ser-15)[9284]的情况是使用了Cell signaling公司的抗体。

[0122] 其结果如图1D和1E所示,处理顺式铂氨时显示出TP53的表达量增加,pRB的表达量增加。此外还显示出18-E6和16-E6、18-E7和16-E7的表达量减少(图1D,图1E)。

[0123] <实施例1-4>顺式铂氨和HPV E6/E7 siRNA对CDKN1A的表达产生的影响

[0124] 为了确认宫颈癌细胞中顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA对酶活性产生的影响,进行了如下实验。

[0125] 用和所述实施例中所记载的相同的方法培养HeLa细胞和CaSki细胞,进行形质转换后处理顺式铂氨。然后在细胞中提取RNA并实施了实时定量荧光PCR。

[0126] 对PCR使用的引物和取样序列如下,均由TIB MOLBIOL(德国柏林)公司制作。

[0127] CDKN1A forward 5'-CGA AGT CAG TTC CTT GTG GAG-3'

[0128] CDKN1A reverse 5'-CAT GGG TTC TGA CGG ACA T-3'

[0129] TaqMan probe 5'-FAM-CAG AGG AG-Dark quencher-3'

[0130] 使用LightCycler实时荧光定量PCR检测系统(Roche Diagnostics,瑞士巴塞尔)装备,分别在530和705nm的波长中确认了mRNA水平。

[0131] 其结果如图1F所示,证实了HeLa细胞(左侧)和CaSki细胞(右侧)联合处理顺式铂氨和E6/E7 siRNA时,CDKN1A的mRNA表达量增加。

[0132] <实施例2>宫颈癌细胞中顺式铂氨和HPV E6/E7 siRNA对有关TP3基因表达产生的影响

[0133] 为了确认宫颈癌细胞中顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA对TP53靶标基因的表达产生的效果,进行了下述实验。

[0134] 广为人知的TP53靶标基因根据细胞周期阻滞和DNA修复、调节TP3表达、细胞杀灭及老化的调节等机能分类。用所述实施例中记载的相同的方法培养HeLa细胞和CaSki细胞,进行形质转换后处理了顺式铂氨。然后从细胞中提取了RNA并实施了实时定量荧光PCR。

[0135] 对PCR使用的引物和取样序列如下表2,均由TIB MOLBIOL(德国柏林)公司制作。使用LightCycler实时荧光定量PCR检测系统(Roche Diagnostics,瑞士巴塞尔)装备,分别在530和705nm波长中确认了mRNA水平。

[0136] 表2 qRT-PCR引物和取样序列

[0137]

名称	序列
CDKN1A forward (序列号11)	5' -CGA AGT CAG TTC CTT GTG GAG-3'
CDKN1A reverse (序列号12)	5' -CAT GGG TTC TGA CGG ACA T-3'
TaqMan probe (序列号13)	5' -FAM-CAG AGG AG-Dark quencher-3'
APAF1 forward (序列号14)	5' -CCT GTT GTC TCT TCT TCC AGT GT-3'
APAF1 REVERSE (序列号15)	5' -AAA ACA ACT GGC CTC TGT GG-3'
TaqMan probe (序列号16)	5' -FAM-AGG TGG AG-Dark quencher-3'
Bax forward (序列号17)	5' -GAA CCA TCA TGG GCT GGA-3'
Bax reverse (序列号18)	5' -CGT CCC AAA GTA GGA GAG GA-3'
TaqMan probe (序列号19)	5' -FAM-CTT CCT CC-Dark quencher-3'
PML forward (序列号20)	5' -GAG CCC CGT CAT AGG AAG T-3'
PML reverse (序列号21)	5' -CAC AAC GCG TTC CTC TCC-3'
TaqMan probe (序列号22)	5' -FAM-GCAGGAAG-Dark quencher-3'
YPEL3 forward (序列号23)	5' -AAC CAC GAC GAC CTC ATC TC-3'
YPEL3 reverse (序列号24)	5' -AGC CCA CGT TCA CCA CTG-3'
TaqMan probe (序列号25)	5' -FAM-CCAGGGCA-Dark quencher-3'
GADD45A forward (序列号26)	5' -CCC CGA TAA CGT GGT GTT-3'
GADD45A reverse (序列号27)	5' -GCC ACA TCT CTG TCG TCG T-3'
TaqMan probe (序列号28)	5' -FAM-GCC TGC TG-Dark quencher-3'
XPC forward (序列号29)	5' -AGA CCA TAC CAG AGC CCA TTT -3'
XPC reverse (序列号30)	5' -AGG CTG GTC CAT GTG TTT TG -3'
TaqMan probe (序列号31)	5' -FAM-GGG AGA AG-Dark quencher-3'
PPM1D(WIP1) forward	5' -CCC ATG TTC TAC ACC ACC AGT -3'

[0138]

(序列号32) PPM1D(WIP1) reverse	5' -TGG TCC TTA GAA TTC ACC CTT G -3'
(序列号33) TaqMan probe (序列号34)	5' -FAM—TGG AGG AG-Dark quencher-3'
MDM2 forward (序列号35)	5' -CCA TGA TCT ACA GGA ACT TGG TAG TA-3'
MDM2 reverse (序列号36)	5' -TCA CTC ACA GAT GTA CCT GAG TCC-3'
TaqMan probe (序列号37)	5' -FAM-TCC TGC TG-Dark quencher-3'
HPRT1 forward (序列号38)	5' - TGA CCT TGA TTT ATT TTG CAT ACC-3'
HPRT1 reverse (序列号39)	5' - CGA GCA AGA CGT TCA GTC CT-3'
TaqMan probe (序列号40)	5' -FAM-GCTGAGGA-Dark quencher-3'

[0139] 其结果如图2所示,用顺式铂氨和HPV E6/E7 siRNA同时处理时,GADD45A、XPC、MDM2、PPM1D、BAX、APAF1、PML、YPEL3的表达量增加。

[0140] <实施例3>宫颈癌细胞中顺式铂氨和HPV E6/E7 siRNA对细胞杀灭产生的影响

[0141] 为了确认宫颈癌细胞中顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA对TP53的活性和细胞杀灭产生的效果,进行了下述实验。

[0142] 在6孔实验盘中培养HeLa和CaSki细胞,利用荧光物质标记的GFP-TP53矢量进行形质转换,构建稳定的细胞株。GFP-TP53矢量使用了带有puromycin(Sigma-Aldrich, St.Louis,MO)耐性标记的慢病毒(lentivirus)系统。

[0143] 稳定构建的细胞株中用顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA处理。然后利用延时技法通过IncuCyte高清系统(Essen Instruments,Ann Arbor,Michigan)装备拍摄各孔中存活的癌细胞,一共5天。此外,对各HPV E6/E7 siRNA的细胞的增殖速度和代表TP3的GFP的个数和强度使用Incucyte变焦软件(Essen Bioscience)进行了分析。

[0144] 其结果如图3所示,HeLa细胞中用siRNA和顺式铂氨共同处理时,时间越长细胞增殖速度越慢,GFP结合的TP53的个数增加越多(图3A,3B)。此外,CaSki细胞中用siRNA和顺式铂氨共同处理时,时间越久细胞增殖速度越慢,GFP结合的TP53的个数增加越多(图3C)。

[0145] <实施例4>对宫颈癌细胞中顺式铂氨和HPV E6/E7 siRNA的结合产生反应的TP3和E2F

[0146] 为了确认宫颈癌细胞中顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA的结合下TP53和E2F的变化,进行了如下实验。

[0147] 96孔实验盘中培养HeLa细胞,形质转换为GFP存在缺陷的TP53和RFP结合的E2F,用HPV E6/E7 siRNA或顺式铂氨处理。然后,用共焦显微镜(confocal microscopy)拍摄了显示HPV E6/E7 siRNA沉默效果的HeLa细胞中各时间点GFP-TP53和RFP-E2F的变化。红色是在Ex/Em=565nm/650nm,绿色是在Ex/Em=495nm/545nm下拍摄的。另外,各信号的平均强度使用第12小时开始到24小时为止每20分钟拍摄的稳定细胞的延时共焦图像进行观察。

[0148] 其结果如图4所示,可以确认与HPV E6/E7 siRNA处理之前相比,处理之后GFP结合的TP53的表达量增加,时间越久绿色的信号越强。GFP结合的TP53的表达量在第19-21小时的时间段里增加,而RFP结合的E2F的表达量却减少了(图4A)。

[0149] 一方面,可以确认顺式铂氨(CDDP)和HPV E6/E7 siRNA联合用药时,在第12-14小时内,GFP结合的TP53的表达量增加,而RFP结合的E2F的表达量却减少了(图4B)。

[0150] <实施例5>HPV良性宫颈癌细胞中三组分混合物的治疗效果

[0151] <实施例5-1>生物体外实验中对HPV良性宫颈癌细胞产生影响的三组分混合物的治疗效果

[0152] 为确认宫颈癌细胞中用顺式铂氨(CDDP)、HPV E6/E7 siRNA和抗癌剂处理时,HPV良性癌细胞中显现的治疗效果,进行了如下实验。

[0153] HeLa细胞中用HPV E6/E7 siRNA、顺式铂氨、抗癌剂紫杉醇(paclitaxel,PTX)处理。然后获取细胞溶解物实施蛋白质印迹法,提取RNA后实施RT-qPCR。引物和取样序列如下,均由TIB MOLBIOL(德国柏林)生产。

[0154] CDKN1A forward 5'-CGA AGT CAG TTC CTT GTG GAG-3',

[0155] CDKN1A reverse 5'-CAT GGG TTC TGA CGG ACA T-3',

[0156] TaqMan probe 5'-FAM-CAG AGG AG-Dark quencher-3'

[0157] 使用LightCycler实时荧光定量PCR检测系统(Roche Diagnostics,瑞士巴塞尔)装备,分别在530和705nm的波长中确认了mRNA水平。

[0158] 另外,利用GFP结合的TP53通过Incucyte高清系统(Essen Instruments,Ann Arbor,Michigan)测定了细胞增殖比率、GFP个数和强度。另外,将HeLa细胞进行HPV E6/E7 siRNA、顺式铂氨和顺式铂氨+紫杉醇(paclitaxel)或它们的混合物的处理,通过FACS assay分析细胞周期并测定各阶段(G0-G1,S和G2/M)细胞的比率(%cells)。

[0159] 结果如图5A至5D所示。

[0160] 对HeLa细胞进行HPV E6/E7 siRNA、顺式铂氨、紫杉醇处理时,时间越久TP53的蛋白质表达量增加越多,18-E6和18-E7的蛋白质表达量减少(图5A)。此外还确认了对HeLa细胞进行HPV E6/E7 siRNA池(光谱纯试剂SP,20nM)、顺式铂氨(5 μ M)、紫杉醇(10nM)的共同处理时,CDKN1A的mRNA表达量增加(图5B)。另外,形质转换为GFP-TP53的HeLa细胞中进行三组分混合物处理时抑制了细胞增殖,GFP的个数增加,GFP的强度变大(图5C)。一方面,与对照组对比,HeLa细胞进行HPV E6/E7 siRNA池(光谱纯试剂SP,20nM)、顺式铂氨(5 μ M)、紫杉醇(10nM)处理时,Sub-G1细胞的比率显得高,G0/G1基细胞的比率显得低。鉴此,可以确认HPV E6/E7 siRNA、顺式铂氨、紫杉醇的混合物抑制了G1基和G2/M基细胞周期。

[0161] 本发明的方法具有把铂金类抗癌剂和p53泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA联合或先后用药于有需求的个体的特征,根据这一方法,即使使用低浓度的铂金类抗癌剂进行处理,也能长时间地维持细胞内p53的增加的表达水平,可有效诱导癌细胞的杀灭,不仅如此,使用铂金界抗癌剂还能使药物副作用最小化,可用于癌症的预防和治疗药物的开发,在产业上的利用价值十分之高。

[0162] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变化或修改,这并不影响本发明的实质内容。在不冲突的情况下,本申请的实施例和实施例中的特征可以任意相

互组合。

- <110> 瑗备恩有限公司;首尔大学校产学协力团
- <120> 利用铂金类抗癌剂诱导的细胞内增加的p53水平的维持方法及其运用
- <130> OP17-0143/PCT/CN
- <160> 40
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 24
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> HPV type 18 siRNA 426 Forward
- <400> 1
- caaccmgamg cacmgacamg mgaa 24
- <210> 2
- <211> 19
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> HPV type 18 siRNA 426 Reverse
- <400> 2
- uuccugucgu gcucgguug 19
- <210> 3
- <211> 23
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> HPV type 18 siRNA 450 Forward
- <400> 3
- ccaacmgacm gcamgamgaa aca 23
- <210> 4
- <211> 23
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> HPV type 18 siRNA 450 Reverse
- <400> 4
- ugumuucucm ugcgmucgmu ugg 23
- <210> 5

<211> 22
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> HPV type 16 siRNA 366 Forward
<400> 5
gcaaagacau cmummgaca aa 22
<210> 6
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> HPV type 16 siRNA 366 Reverse
<400> 6
uuuguccaga ugucuuugc 19
<210> 7
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> HPV type 16 siRNA 488 Forward
<400> 7
ucaamgaaca cmguamgamg aaa 23
<210> 8
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> HPV type 16 siRNA 488 Reverse
<400> 8
uuucucuacg uguucuuga 19
<210> 9
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> HPV type 16 siRNA 497 Forward
<400> 9
gaccggucga uguaugucuu g 21

<210> 10
<211> 24
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> HPV type 16 siRNA 497 Reverse
<400> 10
agacamuaca mucgaccggm ucca 24
<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CDKN1A forward
<400> 11
cgaagtcagt tccttgtaga g 21
<210> 12
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CDKN1A reverse
<400> 12
catgggttct gacggacat 19
<210> 13
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> TaqMan probe
<400> 13
cagaggag 8
<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> APAF1 forward
<400> 14

cctgttgtct cttcttccag tgt 23

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> APAF1 reverse

<400> 15

aaaacaactg gcctctgtgg 20

<210> 16

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TaqMan probe

<400> 16

aggtggag 8

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BAX forward

<400> 17

gaaccatcat gggctgga 18

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BAX reverse

<400> 18

cgtcccaaag taggagagga 20

<210> 19

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TaqMan probe

<400> 19
cttcctcc 8
<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PML forward
<400> 20
gagccccgtc ataggaagt 19
<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PML reverse
<400> 21
cacaacgcgt tcctctcc 18
<210> 22
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> TaqMan probe
<400> 22
gcaggaag 8
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> YPEL3 forward
<400> 23
aaccacgacg acctcatctc 20
<210> 24
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> YPEL3 reverse
<400> 24
agcccacggt caccactg 18
<210> 25
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> TaqMan probe
<400> 25
ccagggca 8
<210> 26
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GADD45A forward
<400> 26
ccccgataac gtggtggt 18
<210> 27
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GADD45A reverse
<400> 27
gccacatctc tgtcgtcgt 19
<210> 28
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> TaqMan probe
<400> 28
gcctgctg 8
<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> XPC forward
<400> 29
agaccatacc agagcccatt t 21
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> XPC reverse
<400> 30
aggctggtcc atgtgttttg 20
<210> 31
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> TaqMan probe
<400> 31
gggagaag 8
<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PPM1D (Wip1) forward
<400> 32
cccatgttct acaccaccag t 21
<210> 33
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PPM1D (Wip1) reverse
<400> 33
tggtccttag aattcacct tg 22
<210> 34
<211> 8
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> TaqMan probe
<400> 34
tggaggag 8
<210> 35
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> MDM2 forward
<400> 35
ccatgatcta caggaacttg gtagta 26
<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> MDM2 reverse
<400> 36
tcactcacag atgtacctga gtcc 24
<210> 37
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> TaqMan probe
<400> 37
tcctgctg 8
<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> HPRT1 forward
<400> 38
tgacctgat ttattttgca tacc 24
<210> 39
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> HPRT1 reverse
<400> 39
cgagcaagac gttcagtcct 20
<210> 40
<211> 8
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> TaqMan probe
<400> 40
gctgagga 8

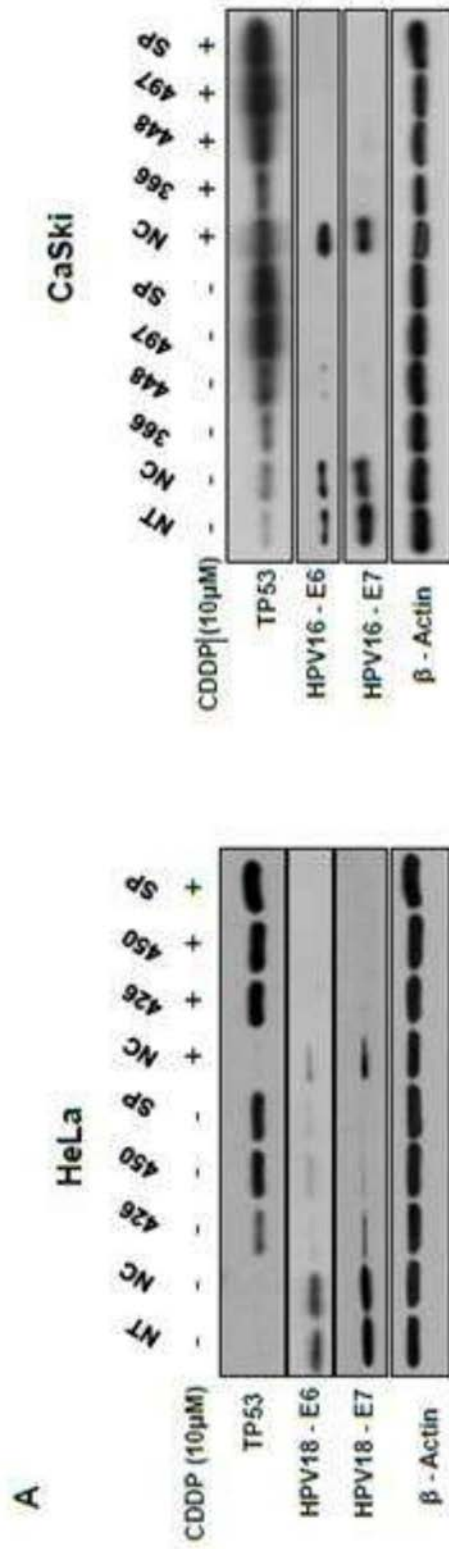


图1A

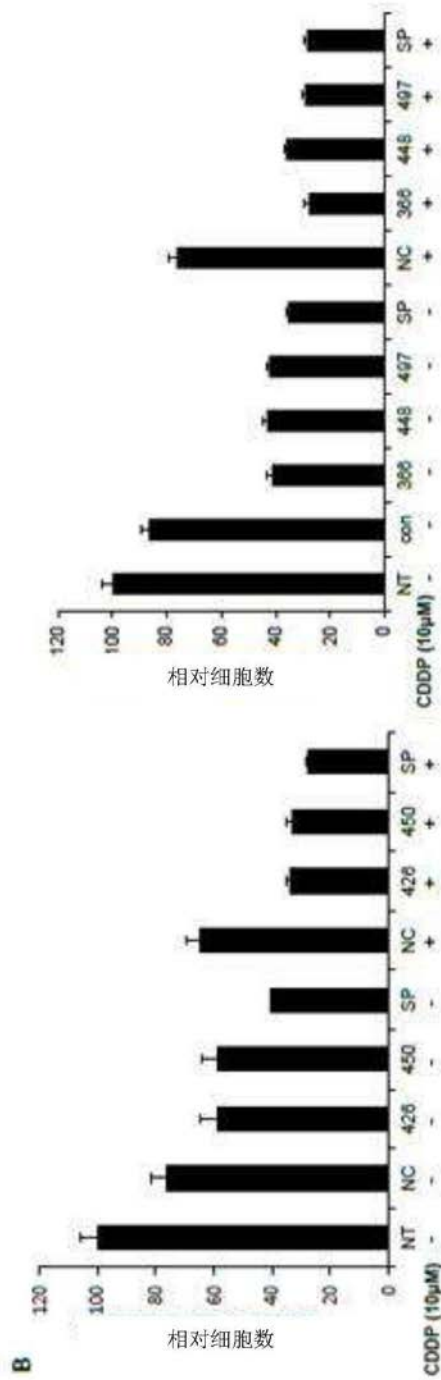


图1B

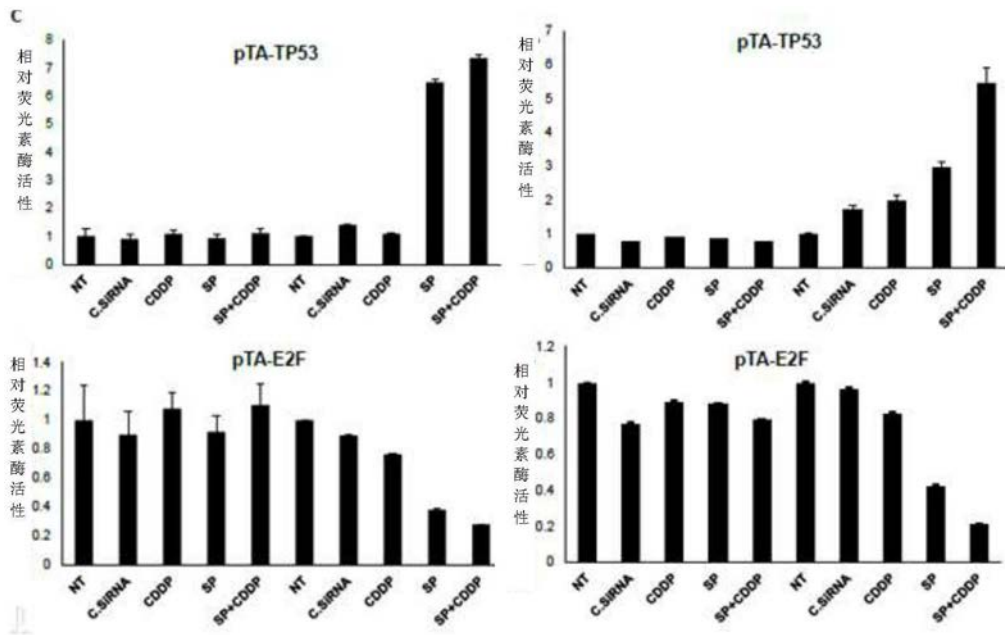


图1C

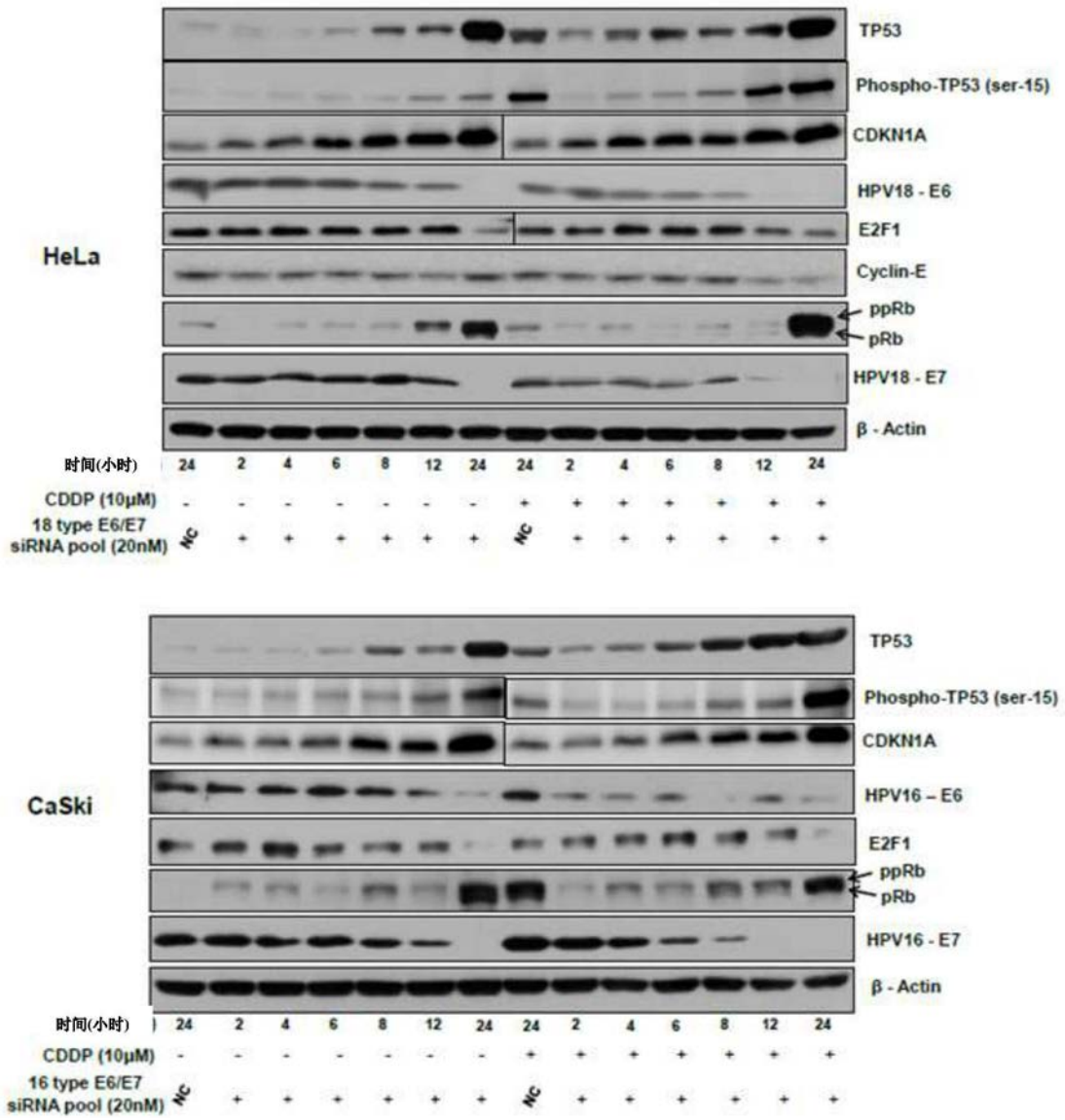


图1D

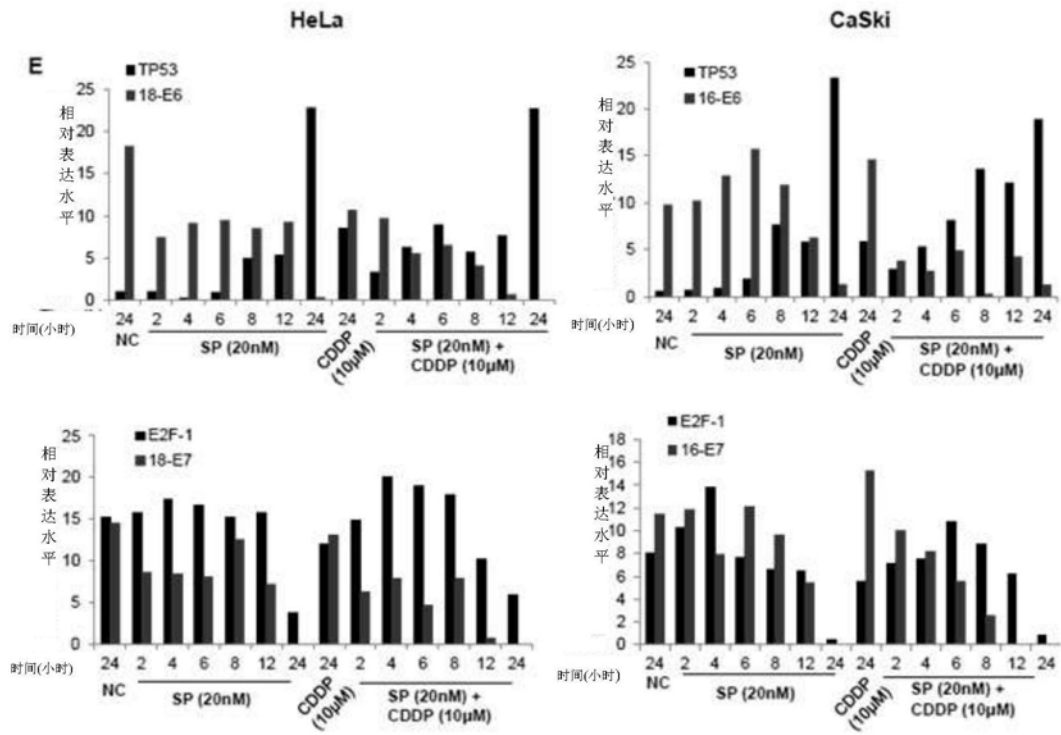


图1E

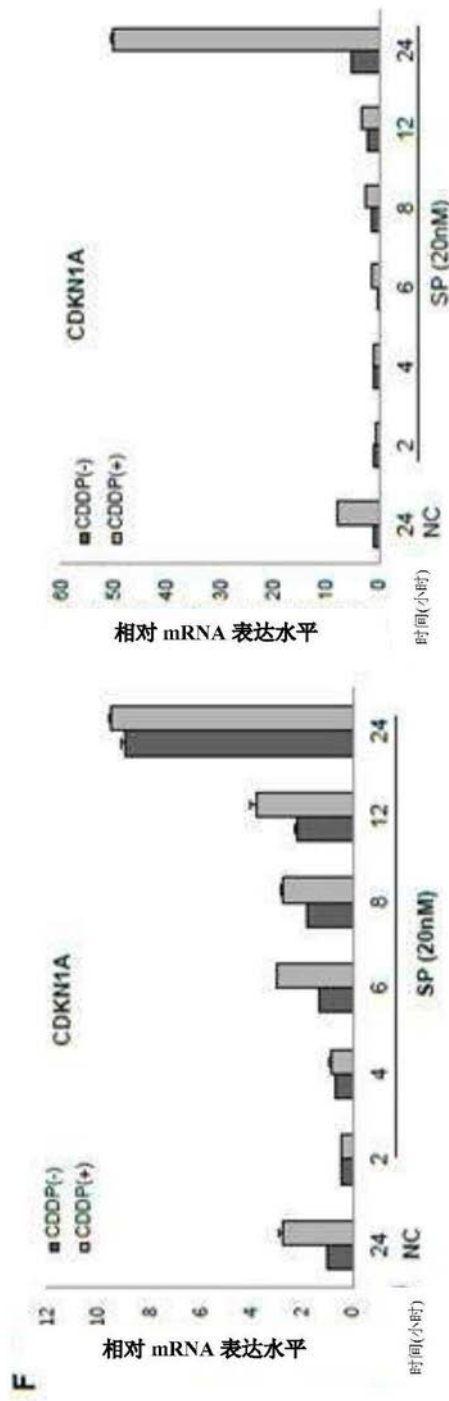


图1F

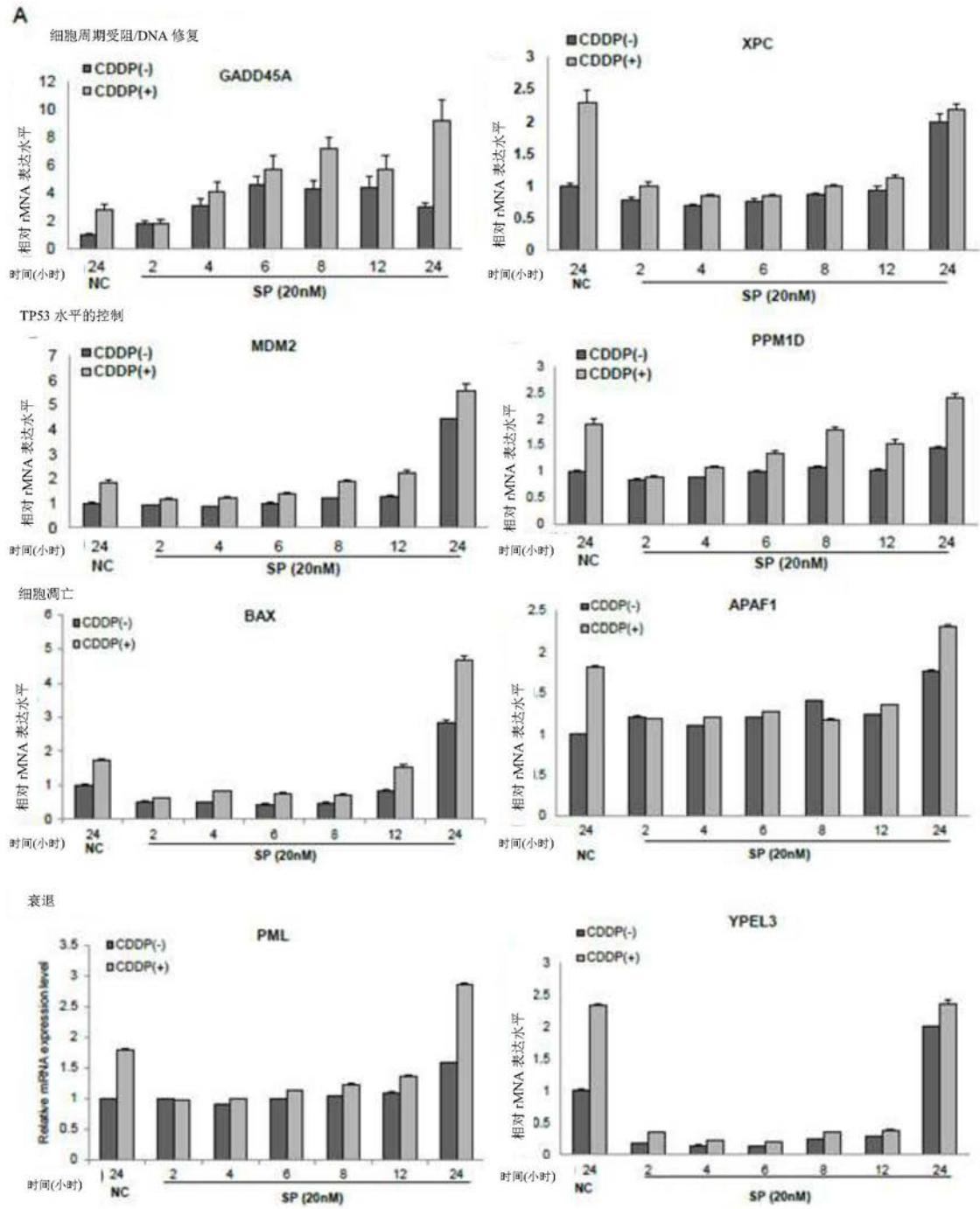


图2A

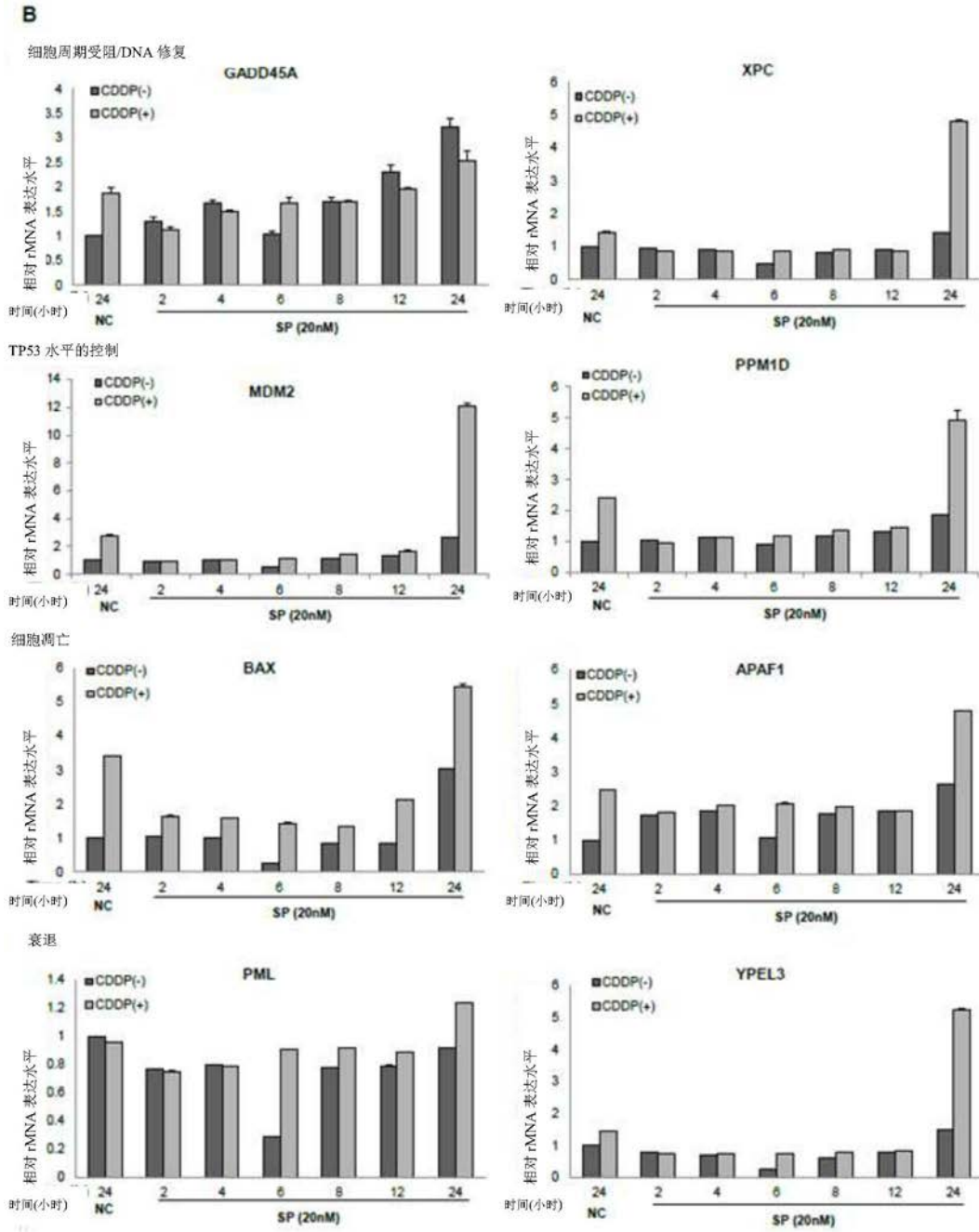


图2B

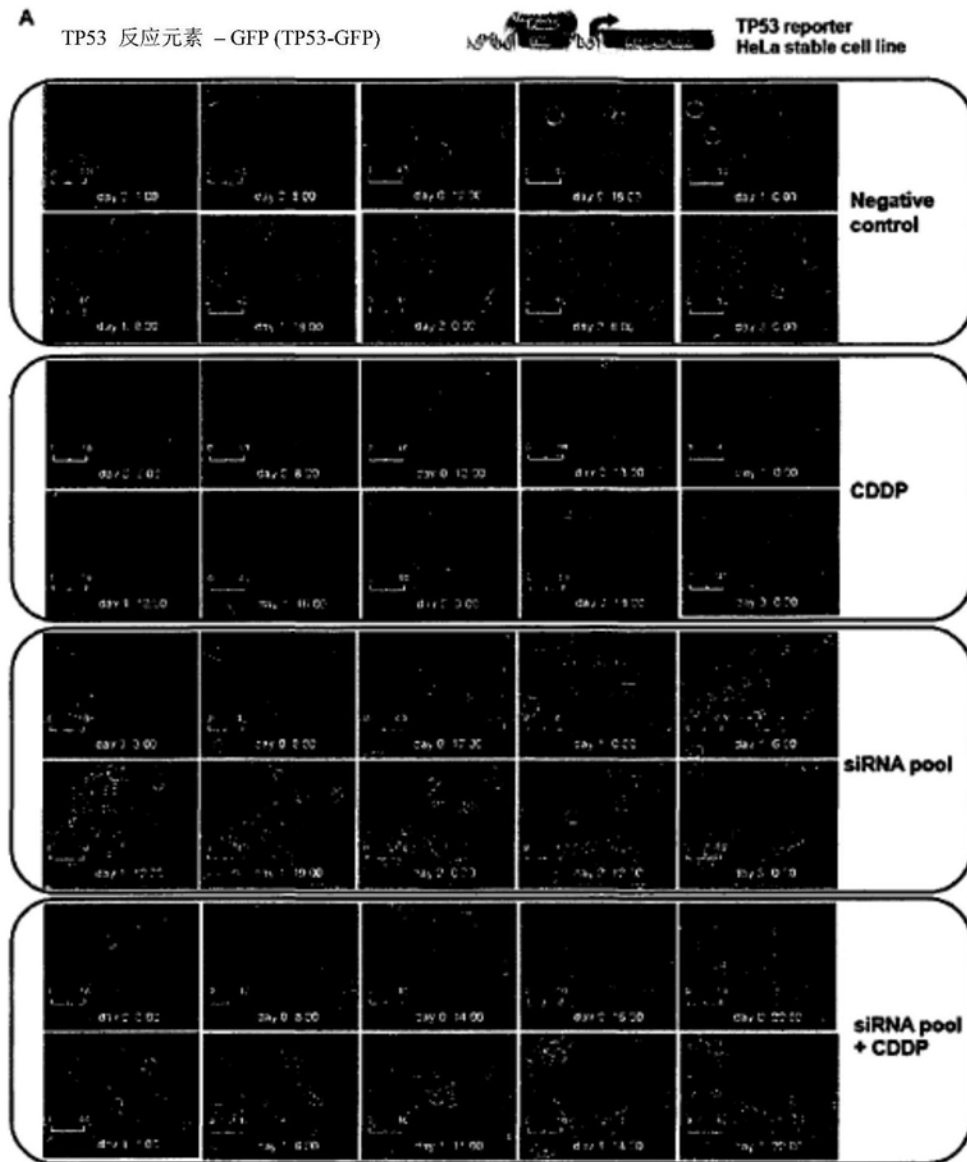


图3A

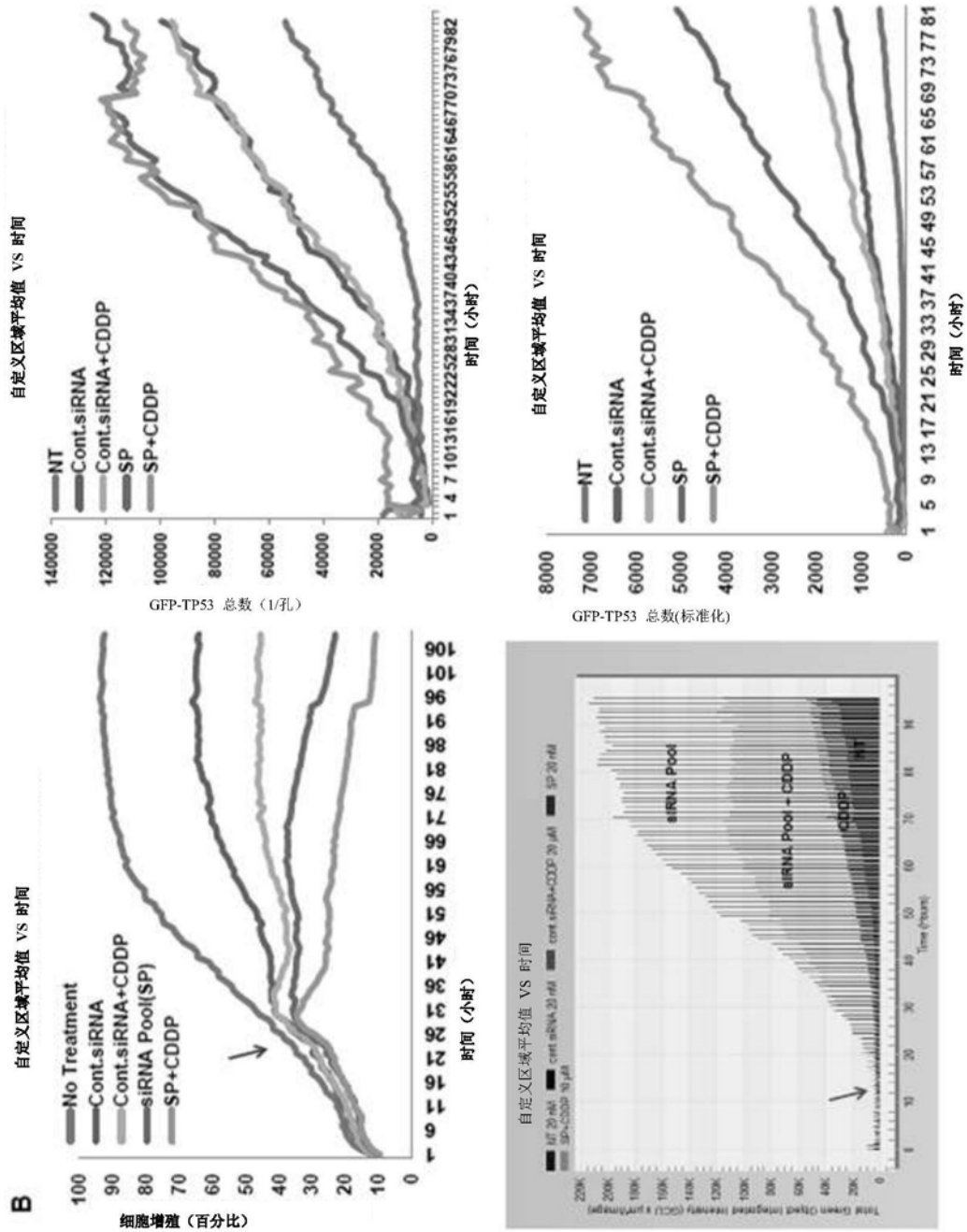


图3B

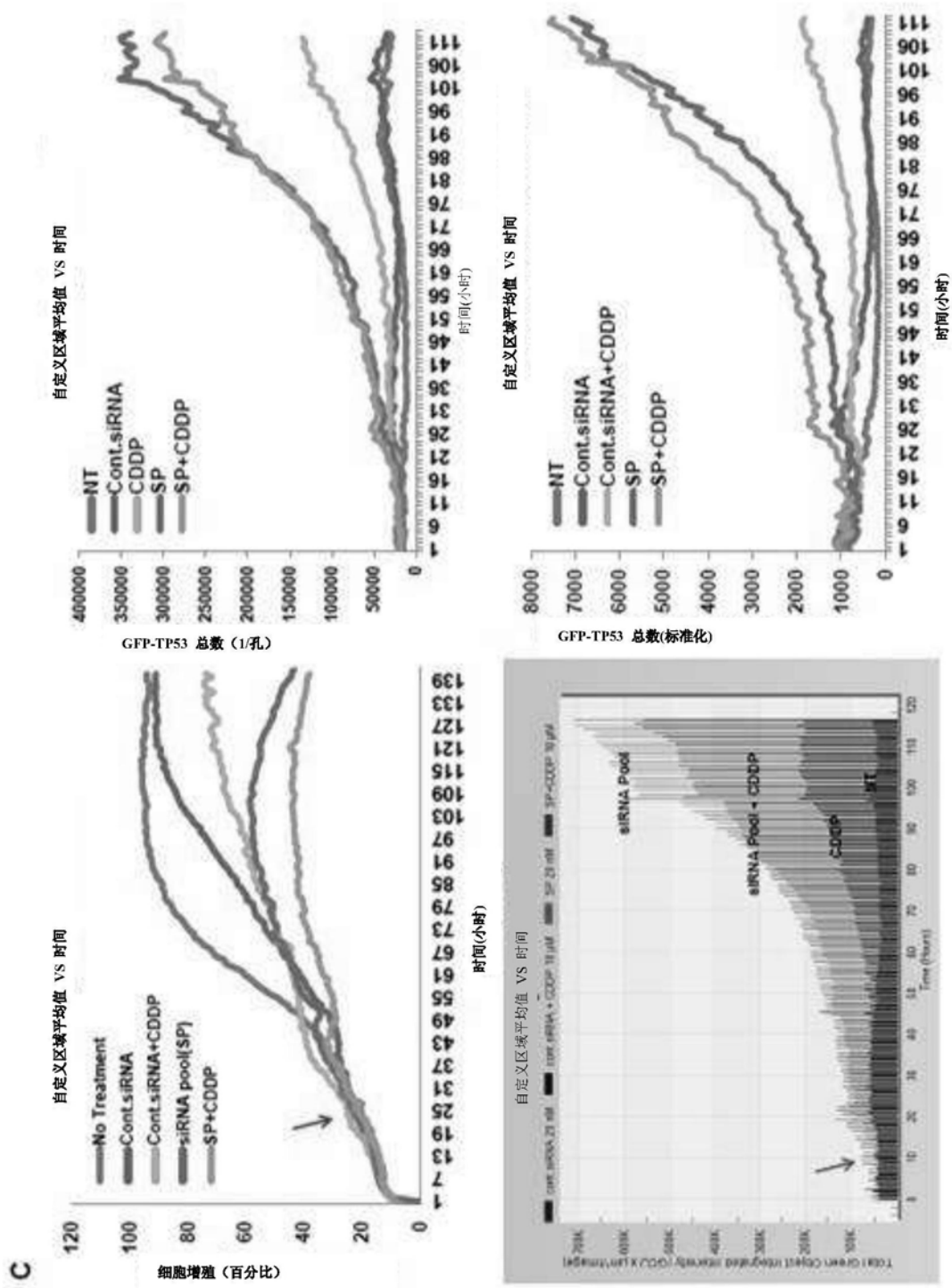


图3C

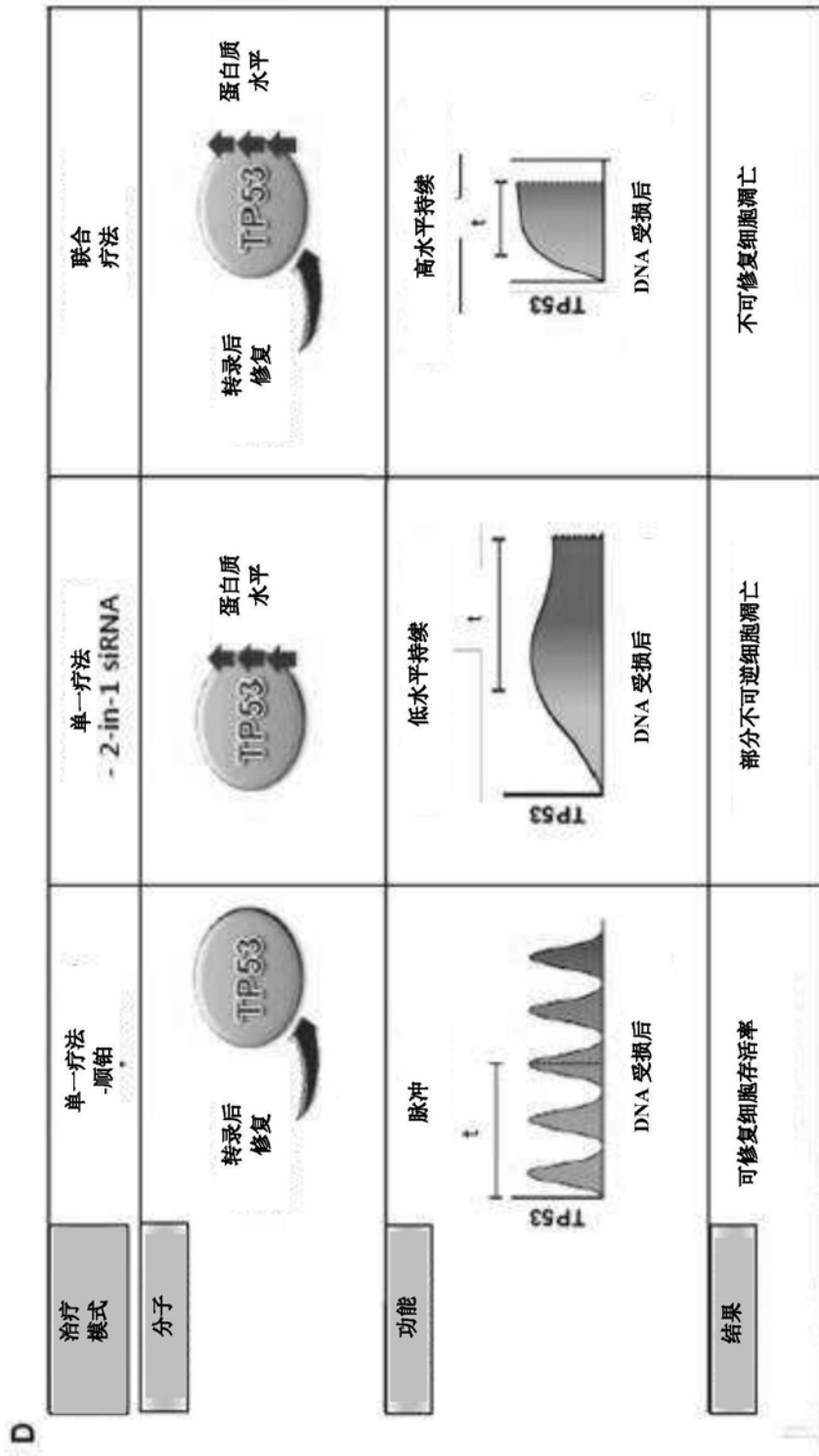


图3D

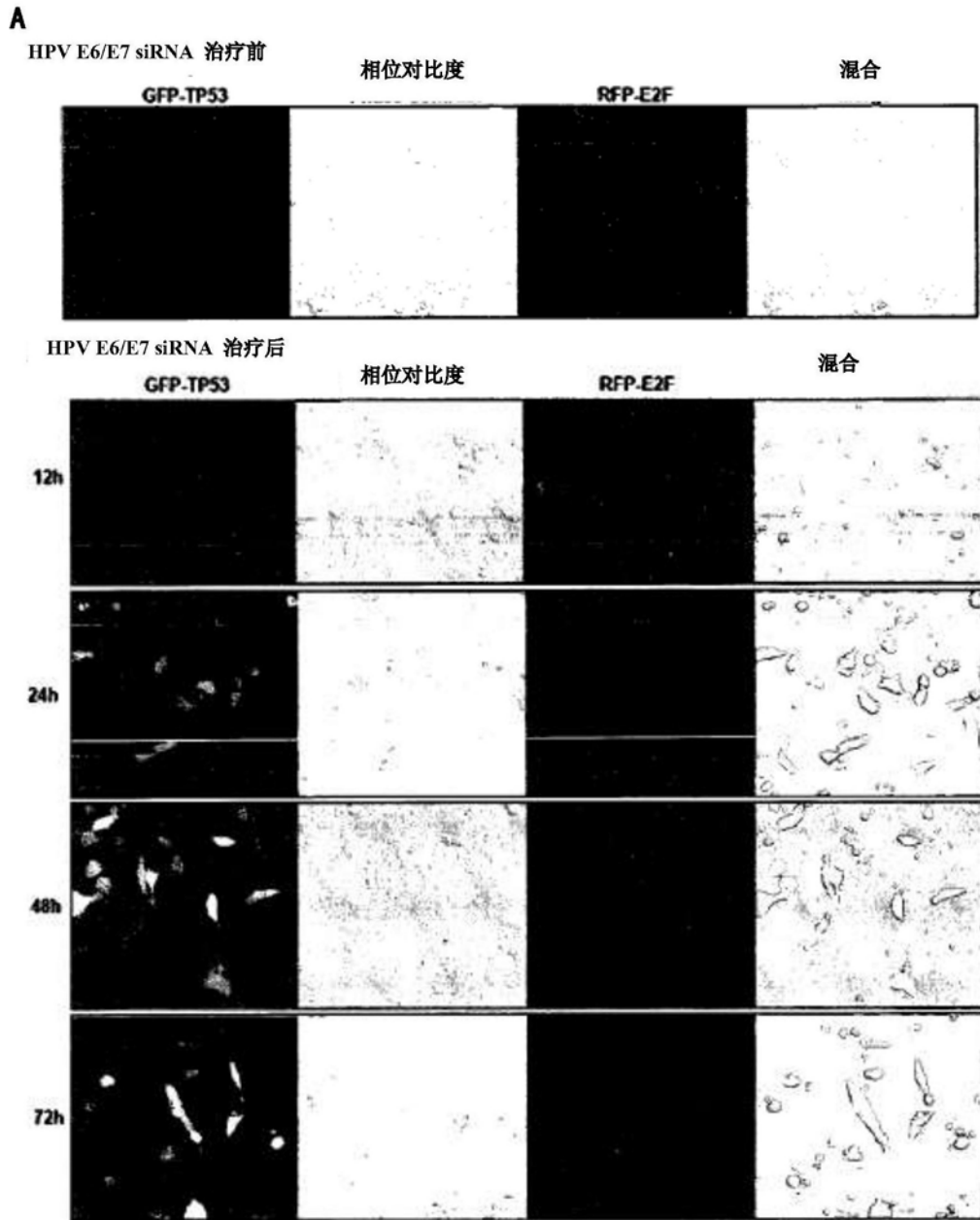


图4A

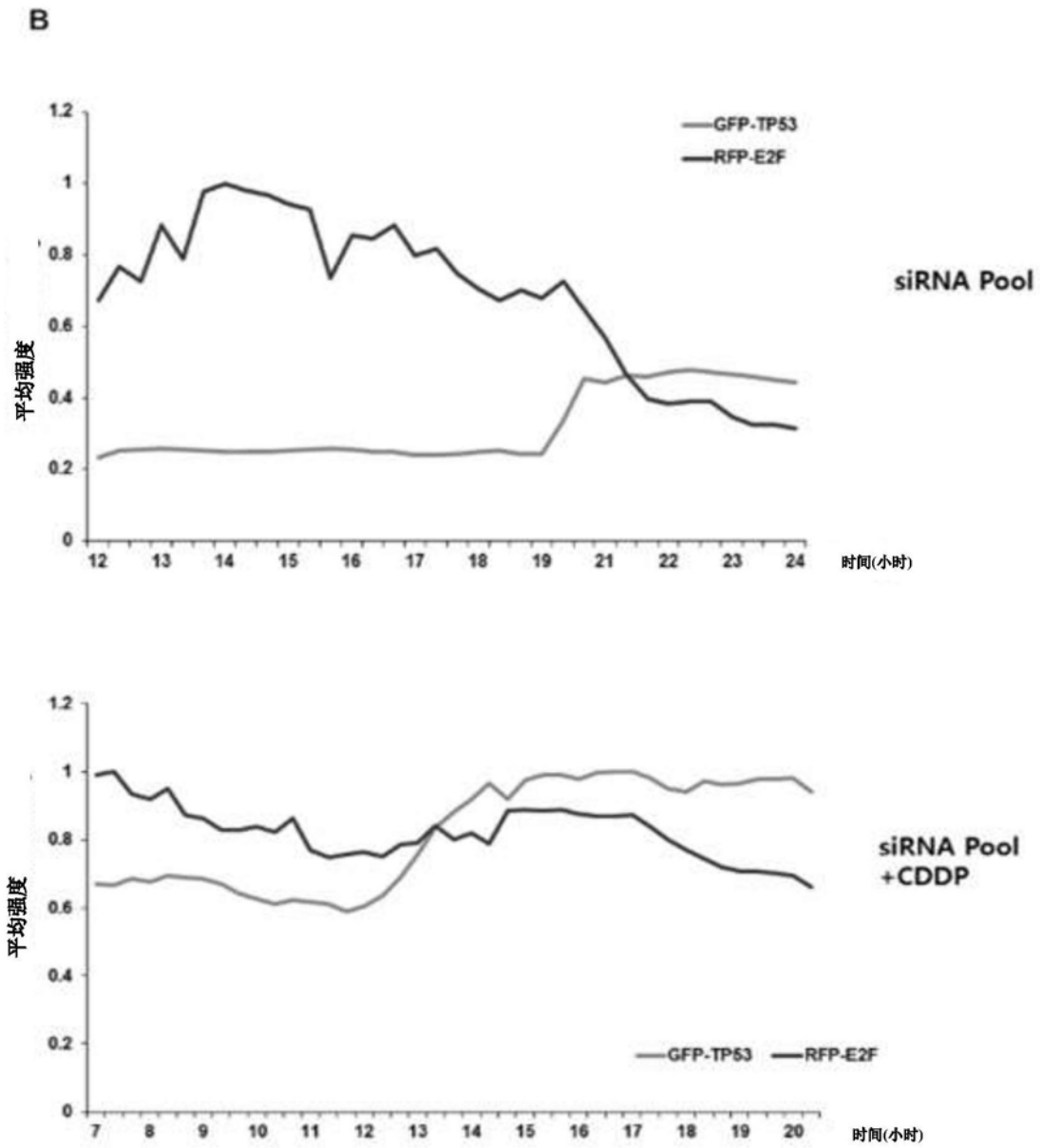


图4B

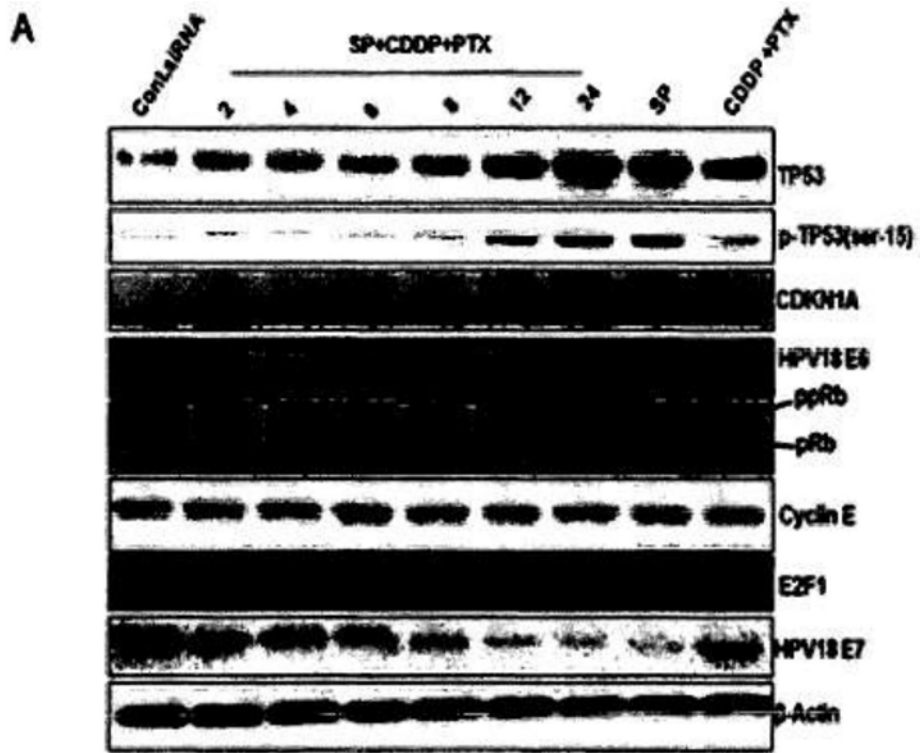


图5A

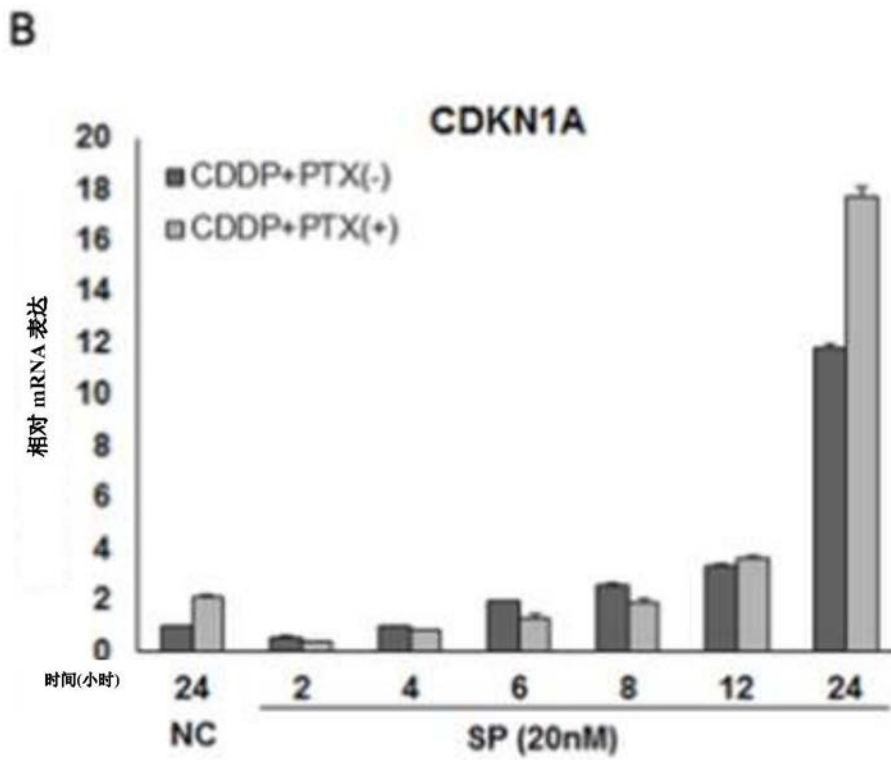


图5B

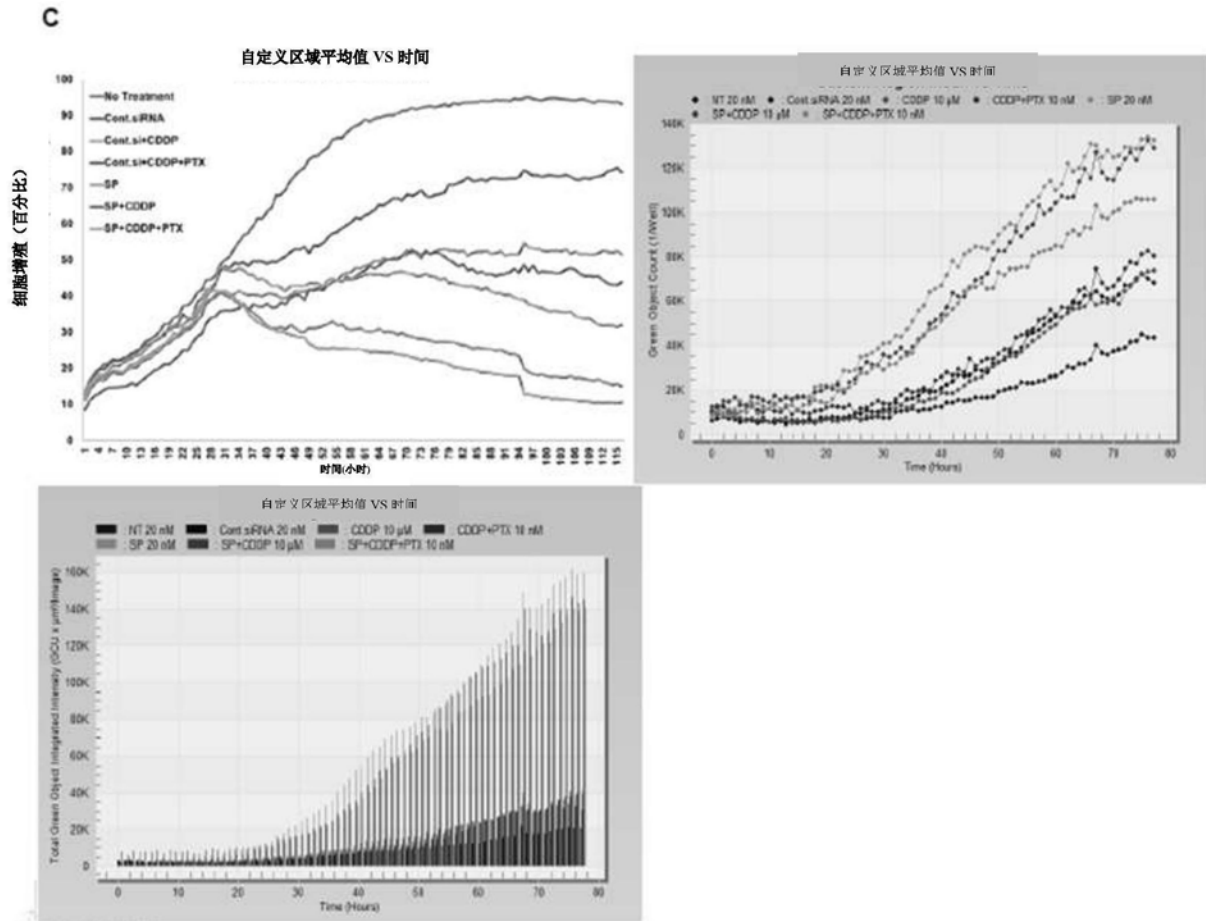


图5C

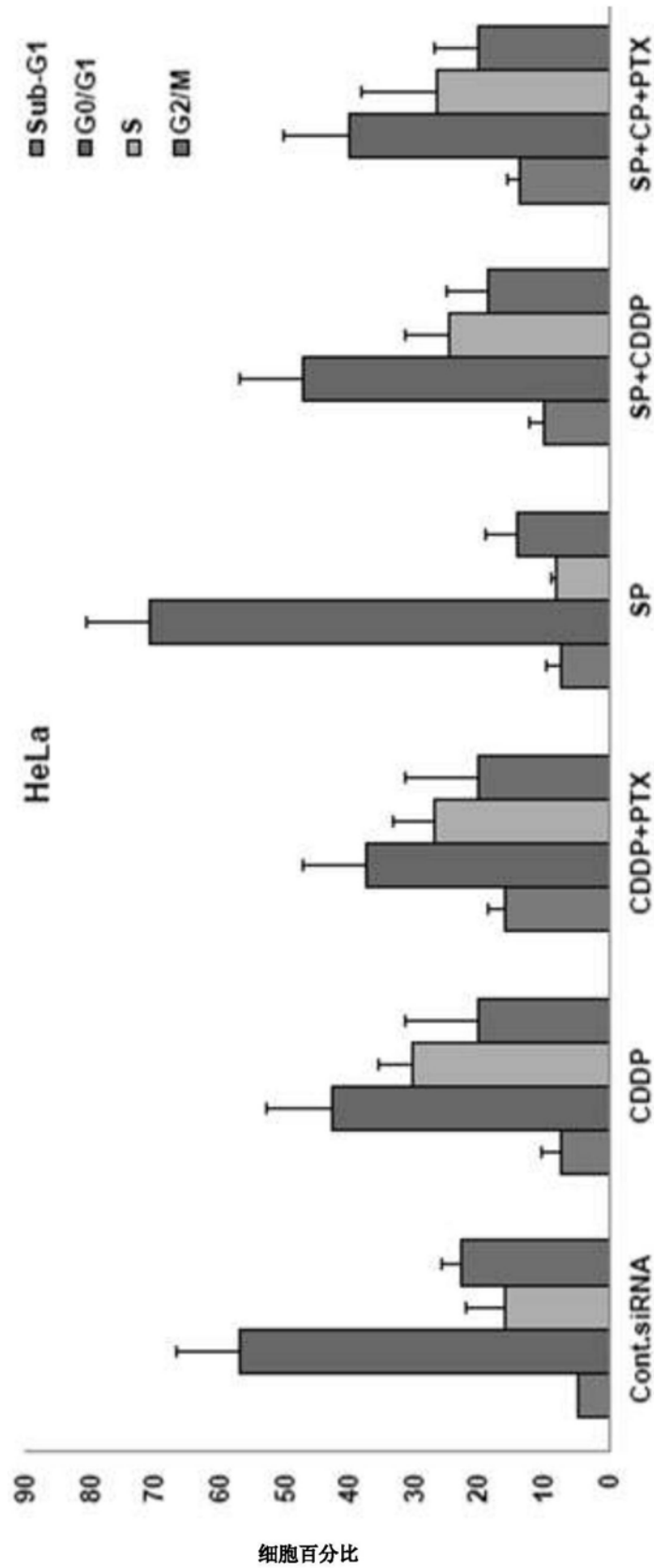
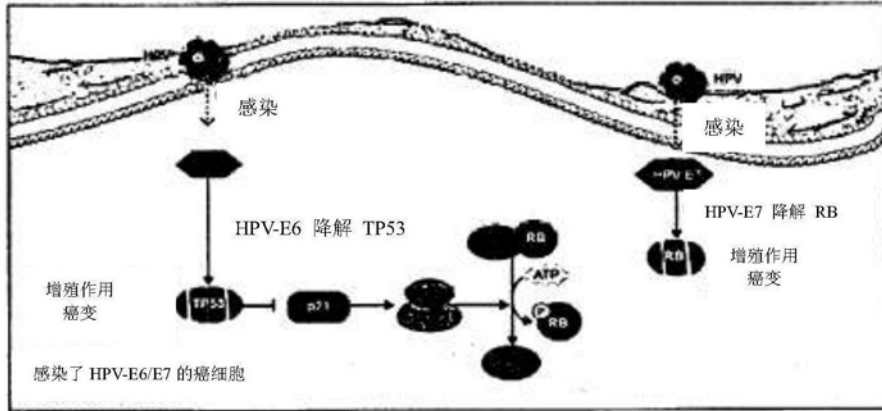


图5D

假设



TP53 和 pRB 再激活: 2in1 siRNA 的双重增强效应

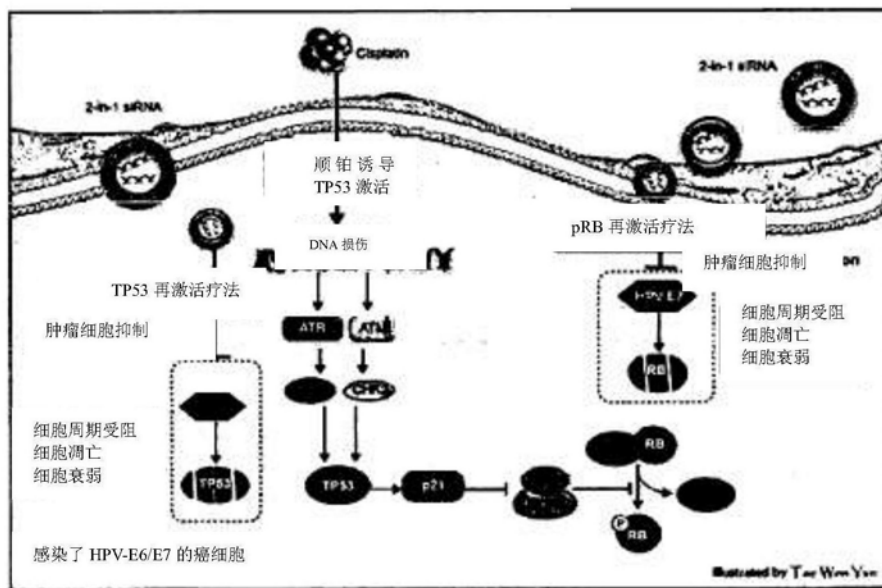


图6

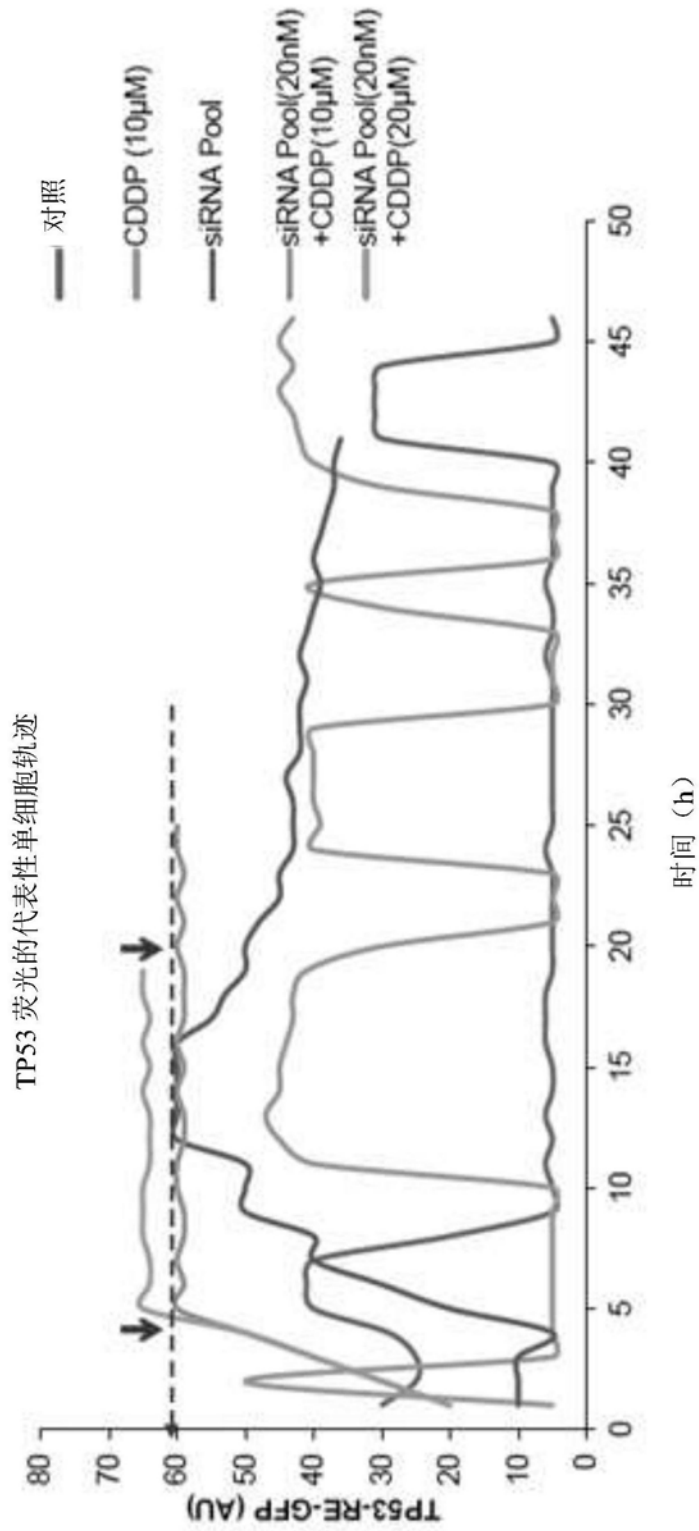


图7

专利名称(译)	利用铂金类抗癌剂诱导的细胞内增加的p53水平的维持方法及其运用		
公开(公告)号	CN109475644A	公开(公告)日	2019-03-15
申请号	CN201680035402.2	申请日	2016-04-18
[标]发明人	慎英基 金永德 郑宪淳 金得爱		
发明人	慎英基 金永德 郑宪淳 金得爱 拉杰斯凯伦·尼马尔		
IPC分类号	A61K48/00 A61K31/282 C12Q1/6886 G01N33/53 G01N33/569 A61P35/00		
CPC分类号	A61K31/282 A61K31/555 A61K31/7088 A61K33/24 A61K33/243 A61P35/00 C12N15/1131 C12N15/1137 C12N2310/14 C12N2320/31 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/118 C12Q2600/158 C12Q1/68 G01N33/5011 G01N2333/4748 A61K48/00 G01N33/53 G01N33/569 C12Q2600/136		
优先权	62/148403 2015-04-16 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明有关一种利用铂金类抗癌剂诱导细胞内增加的p53水平的维持方法及其运用，具体来说是一种把铂金类抗癌剂和对p53的泛素连接酶(ubiquitin ligase)的siRNA联合或先后用药于对其有需求的个体，以此维持细胞内p53的增加水平的方法以及利用这一方法的一种用于促进癌细胞杀灭的组合物。根据本发明的方法，即使用低浓度的铂金类抗癌剂进行处理，也能长时间地维持细胞内p53的增加的表达水平，可有效诱导癌细胞的杀灭，不仅如此，使用铂金类抗癌剂还能使药物副作用最小化，可用于癌症的预防和治疗药物的开发。

