



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102821778 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 30

(21) 申请号 201180015006. 0

A61K 31/7105(2006. 01)

(22) 申请日 2011. 04. 01

A61P 35/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

10-2010-0030004 2010. 04. 01 KR

(56) 对比文件

CN 1744919 A, 2006. 03. 08, 全文.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 09. 20

Uwe Zangemeister-Wittke. Antisense to Apoptosis Inhibitors Facilitates Chemotherapy and TRAIL-Induced Death Signaling. 《Ann. N. Y. Acad. Sci》. 2003, (第 1002 期), 90-94.

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2011/002300 2011. 04. 01

Jing Xu et al.. Sp1-Mediated TRAIL Induction in Chemosensitization. 《Cancer Research》. 2008, 第 68 卷 (第 16 期), 6718-6726.

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/122916 KO 2011. 10. 06

In Sung Song et al.. Inhibition of MKK&-JUK by the TOR signaling pathway regulator-like protein contributes to resistance of HCC cells to trail-induced apoptosis. 《Gastroenterology》. 2012, 第 143 卷 (第 5 期), 1341-1351.

(73) 专利权人 韩国生命工学研究院

地址 韩国大田市

审查员 吕小蒙

(72) 发明人 金南顺 宋寅成 金哲熙 河佳喜

金晁宅 郑昭泳 金楨珉 金柱宪

金镇万 全修英

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

公司 11002

代理人 谢顺星 张晶

(51) Int. Cl.

A61K 38/16(2006. 01)

权利要求书1页 说明书29页

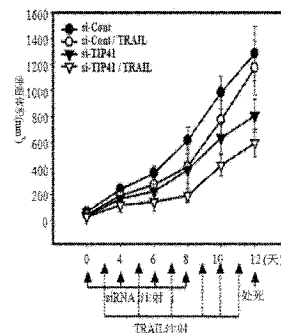
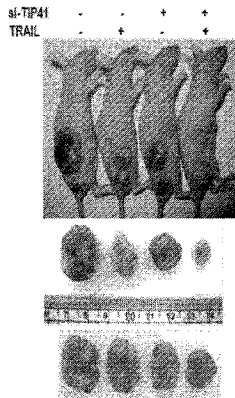
序列表15页 附图18页

(54) 发明名称

含有 TIP41 表达或活性抑制剂作为靶基因或 TRAIL 敏化剂的用于增强 TRAIL 敏感性的组合物

(57) 摘要

本发明涉及一种增强 TRAIL 敏感性的组合物,其含有用于抑制 TIP41 蛋白表达或活性的抑制剂。更具体地,已发现当用 TIP41siRNA 和 TRAIL 处理具有 TRAIL 抗性的肝癌细胞系后,诱导了癌细胞特异性的细胞凋亡,且不仅在肝癌中而且在具有 TRAIL 抗性的肺癌和结肠癌中均诱导了细胞凋亡,并且通过动物实验发现肿瘤的大小减小且癌细胞的细胞凋亡被诱导,由此诱导的细胞凋亡是由于抑制 TIP41 表达而激活 MKK7/JNK 传递途径导致的。因此,本发明含有用于抑制 TIP41 蛋白表达或活性的抑制剂的组合物可有效地用于预防和治疗癌症或作为抗癌助剂。



1. TIP41 表达或活性抑制剂在制备用于治疗肝癌、结肠癌或肺癌的 TRAIL (TNF 相关的细胞凋亡诱导配体) 敏化剂中的应用, 其中, TIP41 表达或活性抑制剂是能够抑制 TIP41 表达或活性的反义核苷酸、siRNA 或抗体。

2. TIP41 表达或活性抑制剂在制备用于治疗肝癌、结肠癌或肺癌的抗癌助剂中的应用, 其中, TIP41 表达或活性抑制剂是能够抑制 TIP41 表达或活性的反义核苷酸、siRNA 或抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的应用, 其中所述 TIP41 由 SEQ. ID. NO:1 所示的氨基酸序列表示。

4. 一种筛选抗癌剂或 TRAIL 敏化剂的方法, 其包括:

i) 用样品物质处理癌细胞系作为实验组;

ii) 测量步骤 i) 中 TIP41 和 PP2Ac 或 TIP41 和 MKK7 蛋白之间的结合水平; 以及

iii) 与未经步骤 i) 中样品物质处理的对照比较, 筛选出降低步骤 ii) 中 TIP41 和 PP2Ac 或 TIP41 和 MKK7 蛋白之间结合水平的物质。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中所述癌细胞系为 TRAIL- 抗性癌细胞系。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的方法, 其中步骤 ii) 中蛋白的结合水平通过选自下组的方法之一测量: 免疫沉淀反应、ELISA、蛋白质印迹法、谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 钓饵 (Pull-down) 分析、蛋白质芯片、荧光共振能量转移 (FRET)、双分子荧光互补 (BiFC) 和酵母双杂交 (Y2H)。

7. 一种筛选抗癌剂或 TRAIL 敏化剂的方法, 其包括:

i) 用样品物质处理癌细胞系作为实验组;

ii) 测量步骤 i) 中 MKK7 蛋白的活性; 以及

iii) 与未经步骤 i) 中样品物质处理的对照比较, 筛选出增强步骤 ii) 中 MKK7 蛋白活性水平的物质。

8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述癌细胞系为 TRAIL- 抗性癌细胞系。

9. 根据权利要求 7 或 8 所述的方法, 其中步骤 ii) 中 MKK7 的活性通过选自下组的方法之一测量: 免疫荧光、ELISA、质谱分析和蛋白质芯片。

## 含有 TIP41 表达或活性抑制剂作为靶基因或 TRAIL 敏化剂的用于增强 TRAIL 敏感性的组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请基于 2011 年 4 月 1 日递交的 PCT/KR2011/002300 依照 35U. S. C 371 进入美国国家阶段,并要求 2010 年 4 月 1 日递交的韩国专利申请 No. 10-2010-0030004 的优先权,其内容以引用的方式全部并入本文中。

[0003] 发明背景

[0004] 1. 技术领域

[0005] 本发明涉及含有 TIP41 表达或活性抑制剂、用于增强 TRAIL 敏感性的组合物。

[0006] 2. 背景技术

[0007] 癌症是对人类社会威胁最大的疾病;其由细胞系突变产生,细胞系突变导致这些细胞失控、无限分裂和永生。癌症的原因包括外部或环境因素如化学品、病毒、细菌和电离辐射,以及内部因素如先天性基因突变 (Klaunig & Kamendulis, 药理学与毒理学年评 (Annu Rev Pharmacol Toxicol.), 44:239-267, 2004)。

[0008] 早期发现癌症有可能通过手术、放射疗法和化学疗法治愈;但是它们的副作用也大大显现出来,晚期癌症和转移性癌症患者最后身患任何特别治疗都无法治愈的终期病患而结束生命。随之也发展出各种与癌症及其治疗有关的生化机理,至今还没有彻底治愈癌症的办法。

[0009] TRAIL(TNF 相关的细胞凋亡诱导配体 (TNF Related apoptosis Inducing Ligand)) 是与 TNF(肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor)) 家族有关的细胞因子,其通过激活死亡受体途径作为诱导细胞凋亡的配体起作用。TRAIL 有 4 种受体。其中已知 DR 4/5(死亡受体 4/5) 在癌细胞系中过表达,据报道 DcR 1/2(诱捕受体 1/2) 存在于正常细胞系中。与其他受体不同,诱捕受体的 c- 末端没有死亡域,因此,死亡信号未传导到细胞内。因此,使用 TRAIL 进行癌症治疗被认为是对正常细胞无副作用的下一代抗癌剂。

[0010] 迄今为止研发的许多抗癌剂和抑癌剂已报道有副作用,如由于其非特异性而对正常细胞的临界细胞毒性,以及由于高突变率癌细胞系产生的获得性抵抗力。然而,由于 1997 年已报道 TRAIL 可诱导癌细胞而非正常细胞的细胞凋亡,TRAIL 被认为是新抗癌药,其对癌细胞系具有特异性,也对其他对于癌症药物有抗性的癌细胞有特异性。但是,一些癌症,包括乳腺癌、前列腺癌、子宫癌、肺癌、肝癌和脑瘤表现出 TRAIL 抗性,也有报道连续使用 TRAIL 处理癌细胞系导致癌细胞对 TRAIL 产生获得性抵抗力,甚至对于那些对 TRAIL 敏感的细胞来说,也是如此。

[0011] TRAIL 抗性机制可能是由于细胞内细胞凋亡信号转导的抑制而产生的,而由于诱捕受体的过表达,DR 4/5、DcR 1 和 DcR 2,尤其是由于细胞内信号系统变化导致的抵抗力获得被认为是更加合理的解释。已知信号转导变化的主要原因是抗凋亡蛋白的过表达,这抑制了促凋亡蛋白的作用。因此,当前亟需的研究领域是开发通过克服 TRAIL 抗性来增加癌细胞系特异性细胞凋亡的 TRAIL 敏化剂。

[0012] 已报道 TRAIL- 介导的细胞死亡途径在如下疾病中起着重要的作用,包括风湿

性关节炎、糖尿病性肾病和退行性脑病以及癌症（韩国风湿病学会杂志 (Journal of Korean Colledge of Rheumatology) 2005 年 6 月第 2 期, 第 12 卷; J AM Sco Nephrol 19:904-914(2008); 细胞死亡和分化 (Cell Death Differ.) 2003 年 1 月, 10(1):134-41)。因而很多方法采用 TRAIL 通过诱导过表达的免疫细胞的死亡来缓解和治疗自身免疫性疾病症状包括关节炎。因此, TRAIL 不仅可有效地 用于治疗上述各种癌症, 也可有效用于治疗 T 细胞介导的自身免疫性疾病包括实验性自身免疫性脑脊髓炎 (EAE)、风湿性关节炎和 I 型糖尿病。

[0013] TIP41 基因, 也称为 TIPRL (TOR 信号转导途径调控因子样 (TOR Signaling Pathway Regulator-Like)), 其首先分离自酵母。已知 TIP41 蛋白是 TOR 信号转导系统的负调控因子, 其通过与 TAP42 蛋白相互作用而与雷帕霉素 (rapamycin) 反应 (Jacinto E 等人, 分子细胞 (Mol cell) 8(5):1017-26, 2001)。人 TIP41 基因与酵母 TIP41 具有 37% 同源性, 已知其激活 MAPK 和 NF- $\kappa$  B 的信号转导系统 (MatsudaA 等人, 致癌基因 (Oncogene), 22(21):3307-3318, 2003)。与酵母 Tip41 不同, 预期人 TIP41 激活细胞的增殖, 至今未见报道人 TIP41 基因在关于肝癌、胃癌或癌症发生方面的作用。

[0014] 因此, 本发明人通过证明使用 siRNA (小干扰 RNA) 对抗 TIP41, 通过 TRAIL 处理和 TIP41 消耗使得在 TRAIL 抗性癌细胞中的细胞凋亡显著增加, 从而完成了该研究。另外, 不仅在表现出 TRAIL 抗性的肝癌细胞中, 也在表现出 TRAIL 抗性的肺癌细胞和结直肠癌细胞中观察到细胞凋亡的诱导。此外, 其效果也通过注射了抗 TIP41 siRNA 以及 TRAIL 的小鼠中肿瘤变小而证实。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明提供含有 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂的用于增强 TRAIL 敏感性的组合物。

[0017] 为实现该目的, 本发明提供含有 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂的用于增强 TRAIL 敏感性的组合物。

[0018] 本发明还提供含有 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂的抗癌助剂。

[0019] 本发明还提供含有本发明抗癌助剂、用于预防和治疗癌症的组合物。

[0020] 本发明还提供预防或治疗癌症的组合物的筛选方法。本发明还 提供增强癌症对 TRAIL 的敏感性的方法, 其包括将药学上有效量的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂施用于患有 TRAIL 介导的细胞凋亡相关疾病的对象的步骤。

[0021] 本发明还提供预防癌症的方法, 其包括将药学上有效量的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂施用于对象的步骤。

[0022] 本发明还提供治疗癌症的方法, 其包括将药学上有效量的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂施用于罹患癌症的对象的步骤。

[0023] 本发明还提供 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂, 其用于在治疗 TRAIL 介导的细胞凋亡相关疾病期间增强 TRAIL 敏感性。

[0024] 此外, 本发明提供用作抗癌助剂的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂。

[0025] 当用 TIP41 siRNA 处理表现出 TRAIL 抗性的肝癌细胞系以抑制 TIP41 的表达后, 用 TRAIL 处理, 则诱导出癌细胞系的特异性细胞凋亡。同样的效果不仅在肝癌中、也在具有 TRAIL 抗性的肺癌和结肠癌中发现。另外, TIP41 表达的消耗和 TRAIL 处理减小了注射有肿

瘤细胞的裸鼠肿瘤大小。总之,本发明的含有 TIP41 表达或活性抑制剂的组合物可用于增强 TRAIL 敏感性或用作抗癌助剂。

#### 附图说明

[0026] 参照所附的附图可最佳地理解本发明优选实施方案的应用,其中:

[0027] 图 1 显示 TIP41 在肝癌组织中表达增强,并证明了将 TIP41siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中然后用 TRAIL 处理,对 TIP41 的抑制:

[0028] 图 1A 显示 TIP41 在肝癌组织中表达增强;

[0029] 图 1B 显示通过蛋白质印迹法 (Western Blot) 分析,不考虑 HBV 感染,与周围正常细胞中的 TIP41 相比,TIP41 在肝癌组织中表达增强的水平;

[0030] 图 1C 显示通过将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中然后用 TRAIL 处理,对 TIP41 表达的抑制;

[0031] si-cont:对照组 siRNA;和

[0032] si-TIP41:TIP41siRNA。

[0033] 图 2 所示确认了将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中,然后用 TRAIL 处理,所诱导的癌细胞的细胞凋亡:

[0034] 图 2A 所示为将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中,然后以与时间相关的方式用 TRAIL 处理,通过核染色质染色法显示的癌细胞的细胞凋亡;

[0035] si-cont:对照组 siRNA;

[0036] si-1017:TIP41 siRNA;

[0037] 图 2B 所示为将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中,然后以与时间相关的方式用 TRAIL 处理,采用膜联蛋白 V-FITc/PI 染色法进行 FACS(荧光活化细胞分选器)分析;

[0038] si-cont:对照组 siRNA;

[0039] si-TIP41:TIP41 siRNA;

[0040] 图 2C 所示为将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中,然后以与浓度相关的方式用 TRAIL 处理,采用膜联蛋白 V-FITc/PI 染色法进行 FACS(荧光活化细胞分选器)分析;

[0041] si-cont:对照组 siRNA;和

[0042] si-TIP41:TIP41 siRNA。

[0043] 图 3 所示确认了将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中,然后以与时间相关的方式用 TRAIL 处理,促凋亡蛋白对癌细胞的细胞凋亡的激活作用:

[0044] 图 3A 所示确认了将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中,然后以与时间相关的方式用 TRAIL 处理,半胱天冬酶 (caspase)-3、-8、-9 和 PARP(聚腺苷二磷酸核糖聚合酶)的激活作用:

[0045] si-cont:对照组 siRNA;

[0046] si-TIP41:TIP41 siRNA;

[0047] 图 3B 所示确认了将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中,然后以与时间相关的方式用 TRAIL 处理,细胞色素 C 释放至细胞液中:

[0048] si-cont:对照组 siRNA;和

[0049] si-TIP41:TIP41 siRNA。

[0050] 图 4 显示 JNK (Jun 氨基末端激酶) 途径与接受 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理的 Huh7 肝癌细胞的细胞凋亡相关联；

[0051] 图 4A 显示将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中, 然后以与时间相关的方式用 TRAIL 处理, JNK 途径的激活作用；

[0052] si-cont : 对照组 siRNA ；

[0053] si-TIP41 : TIP41 siRNA ；

[0054] 图 4B 显示 JNK 抑制剂处理减少了接受 TIP41 消耗和 TRAIL 处理的 Huh7 肝癌细胞的细胞凋亡；

[0055] si-cont : 对照组 siRNA ；

[0056] si-TIP41 : TIP41 siRNA ；

[0057] 对照溶剂 (Vehicle) : 0.3% 的二甲亚砷 (DMSO) ；和

[0058] SP600125 : JNK 抑制剂。

[0059] 图 5 所示表明 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理所诱导的 Huh7 肝癌细胞的细胞凋亡与 p53 信号转导途径无关；

[0060] 图 5A 显示接受 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理的 Huh7 肝癌细胞细胞凋亡的诱导与 p53 信号转导途径无关；

[0061] si-cont : 对照组 siRNA ；

[0062] si-TIP41 : TIP41 siRNA ；和

[0063] 图 5B 所示表明 TIP41 消耗和 TRAIL 处理所诱导的细胞凋亡与 p53 的存在无关。

[0064] 图 6 显示 TIP41 消耗和 TRAIL 受体之间并无关联；

[0065] 图 6A 显示 TRAIL 受体在各种细胞系中的表达水平；

[0066] 图 6B 显示接受 TIP41 消耗和 TRAIL 的 Huh7 肝癌细胞系中 TRAIL 受体的表达水平；

[0067] si-cont : 对照组 siRNA ；

[0068] si-TIP41 : TIP41 siRNA ；和

[0069] 图 6C 显示 TRAIL 受体的表达水平取决于肝癌组织的时期。

[0070] 图 7 显示 TIP41 消耗和 TRAIL 处理无法诱导正常 HAEC (人主动脉内皮细胞) 细胞中的大量细胞死亡；

[0071] 图 7A 显示在接受与时间相关方式的 TIP41 消耗和 TRAIL 处理的 HAEC 细胞中, 未观察到显著的细胞凋亡的诱导；

[0072] si-cont : 对照组 siRNA ；

[0073] si-TIP41 : TIP41 siRNA ；

[0074] 图 7B 显示在接受与时间相关方式的 TIP41 消耗和 TRAIL 处理的 HAEC 中, 细胞凋亡与促凋亡蛋白裂解没有关联；

[0075] si-cont : 对照组 siRNA ；和

[0076] si-TIP41 : TIP41 siRNA。

[0077] 图 8 显示在接受 TIP41 消耗和 TRAIL 处理的肺癌、结直肠癌和肝癌细胞系中细胞凋亡增加；

[0078] 图 8A 显示与对照组 siRNA 相比, 将 TIP41 siRNA 转染至 A549 肺癌细胞, 然后以与

时间相关的方式用 TRAIL 处理,所诱导的细胞凋亡增加;

[0079] si-cont:对照组 siRNA;

[0080] si-TIP41:TIP41 siRNA;

[0081] 图 8B 显示与对照组 siRNA 相比,将 TIP41 siRNA 转染至 A549 肺癌细胞,然后以与浓度或时间相关的方式用 TRAIL 处理,所诱导的细胞凋亡增加;

[0082] si-cont:对照组 siRNA;和

[0083] si-TIP41:TIP41 siRNA。

[0084] 图 8C 显示与对照组 siRNA 相比,将 TIP41 siRNA 转染至 HepG2、SK-Hep1 肝癌细胞,然后以与时间相关的方式用 TRAIL 处理,所诱导的细胞凋亡增加;

[0085] si-cont:对照组 siRNA;

[0086] si-TIP41:TIP41 siRNA;

[0087] 图 9 所示为通过动物实验确认 TIP41 的抗细胞凋亡作用;

[0088] 图 9A 显示裸鼠移植了癌细胞,然后注射 TIP41 siRNA 和 TRAIL,其肿瘤减小了;

[0089] si-cont:对照组 siRNA;

[0090] si-TIP41:TIP41 siRNA;

[0091] 图 9B 所示为通过对裸鼠肿瘤染色显示的细胞的细胞凋亡;

[0092] si-cont:对照组 siRNA;

[0093] si-TIP41:TIP41 siRNA;和

[0094] 图 9C 所示为对溶解的裸鼠肿瘤细胞采用蛋白质印迹法显示半胱天冬酶 -8 蛋白的活性与细胞凋亡有关。

[0095] 图 10 显示 TIP41 和 PP2Ac 之间的相互作用;

[0096] 图 10A 显示在 PP2Ac 过表达后,用蛋白质印迹法对 TIP41 和 PP2Ac 之间相互作用进行分析的结果;以及

[0097] 图 10B 所示确认了 TIP41 和 PP2Ac 复合体 (complex) 之间,以及 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用。

[0098] 图 11 所示确认了 TIP41 和 PP2Ac 复合体之间,以及 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用;

[0099] 图 11A 所示确认了 MKK7 过表达后,TIP41 和 PP2Ac 复合体之间,以及 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用;

[0100] 图 11B 所示为采用免疫沉淀反应法 (immunoprecipitation procedure) 确认了 TIP41 和 PP2Ac 复合体之间,以及 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用;以及

[0101] 图 11C 所示确认了采用体外 GST 免疫沉淀反应法确认了 TIP41、PP2Ac 复合体和 MKK7 之间的相互作用。

[0102] 图 12 所示确认了 TIP41 与 MKK7 相互作用的结合位点;

[0103] 图 12A 显示制备的用于确认 TIP41 与 MKK7 相互作用结合位点的 TIP41 片段;以及

[0104] 图 12B 采用蛋白质印迹法显示的 TIP41 与 MKK7 相互作用的结合位点。

[0105] 图 13 所示确认了 MKK7 与 TIP41 相互作用的结合位点;

[0106] 图 13A 显示制备的用于确认 MKK7 与 TIP41 相互作用结合位点的 MKK7 片段;以及

[0107] 图 13B 为采用蛋白质印迹法显示的 MKK7 与 TIP41 相互作用的结合位点。

- [0108] 图 14 所示为通过 MKK7 与 TIP41 相互作用确认的细胞凋亡途径；
- [0109] 图 14A 所示确认对 MKK7 表达的抑制减少了细胞凋亡；
- [0110] 图 14B 所示表明一旦 TIP41 表达被抑制则 MKK7/JNK 途径被激活；
- [0111] si-cont:对照组 siRNA ;和
- [0112] si-MKK7:MKK7 siRNA。

### 具体实施方式

[0113] 参照附图和下列优选实施方案的详细描述,将更加清楚地理解本发明的特点和优势。首先应注意的是,基于发明人可以恰当地定义术语的概念以便最好地描述其发明这一原则,本发明所用的术语和词语应视为与本发明的技术精神相对应的含义或概念。同样,应当理解,对本发明涉及的熟知功能和结构的详细描述将被省略,以免不必要地模糊本发明的重点。

[0114] 以下详细描述本发明。

[0115] 本发明提供一种含有 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂、用于增强 TRAIL 敏感性的组合物。

[0116] 优选所述 TIP41 蛋白具有如 SEQ. ID. NO:1 所示的氨基酸序列,但不限于此。

[0117] 优选所述 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂为 TRAIL 敏化剂,但不限于此。

[0118] 优选所述 TIP41 表达抑制剂选自下组之一:互补结合 TIP41 基因 mRNA 的反义核苷酸、抗 TIP41 的小干扰 RNA(siRNA)、短发夹 RNA,但不限于此。

[0119] 优选所述 TIP41 活性抑制剂选自下组之一:特异性结合 TIP41 的化合物、肽、肽模拟物、配体、抗体和天然物质,但不限于此。

[0120] 优选所述组合物用于使用 TRAIL 治疗癌症、炎症性疾病或自身免疫性疾病。

[0121] 优选所述癌症选自下组之一:肝癌、结肠癌、宫颈癌、肾癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、脑瘤、肺癌、子宫癌、膀胱癌、血癌、胰腺癌和任何对 TRAIL 有抗性的癌症,但不限于此。

[0122] 进一步地,优选所述炎症性疾病选自下组之一:皮肤炎、过敏症、特异反应性、结肠炎、牙周炎、鼻炎、中耳炎、咽喉炎、扁桃体炎、肺炎、胃溃疡、胃炎、克罗恩病(Crohn's disease)、结肠炎、痔疮、痛风、僵直性脊椎炎、风湿热、全身性红斑狼疮、纤维肌痛、银屑病关节炎、退行性关节炎、风湿性关节炎、肩关节炎、腱炎、肌腱炎、腱鞘炎、腱周围炎、肌炎、肝炎、膀胱炎、肾炎、干燥综合征、多发性硬化症以及急性和慢性炎症,但不限于此。

[0123] 进一步地,优选所述自身免疫性疾病选自下组之一:风湿性关节炎、多发性硬化症、重症肌无力、葛瑞夫兹病(Graves disease)、桥本甲状腺炎、阿狄森病(Addison's disease)、白癜风、全身性硬化症、肺出血肾炎综合征、白塞病(Becet's disease)、克罗恩病、僵直性脊椎炎、葡萄膜炎、血小板减少性紫癜、寻常性天疱疮、糖尿病、自身免疫性贫血、冷球蛋白血症、肾上腺脑白质营养不良(ALD)和全身性红斑狼疮(SLE),但不限于此。

#### [0124] 反义核苷酸

[0125] 如沃森-克里克(Watson-Crick)碱基配对所定义,反义核苷酸与 DNA 的互补碱基对、未成熟-mRNA 或成熟-mRNA 结合(杂交),并限制遗传信息从 DNA 向蛋白的流动。反义核苷酸特异性结合靶序列的特点尤其使得其具有多种功能。由于反义核苷酸是单体单元的长链,其能够很容易地针对靶 RNA 序列进行合成。最近的研究证明,反义核苷酸可作为研究靶



蛋白的生化工具 (Rothenberg 等人, J. Natl. Cancer Inst., 81:1539-1544, 1999)。在有些领域已经取得了重大进展, 包括表现出核酸酶抗性的寡核苷酸化学和核苷酸合成, 改善的细胞系粘附和靶标结合亲和力, 因此, 反义核苷酸的用途可以看作是一种新型抑制剂。

#### [0126] 肽模拟物

[0127] 所述肽模拟物是抑制导致 TIP41 活化的 TIP41 结合域的肽或非肽。非水解型肽类似物的主要残基包括  $\beta$ -转角二肽核 (Nagai 等人, 四面体通讯 (Tetrahedron Lett) 26:647, 1985), 酮-亚甲基假肽基 (Ewenson 等人, J Med chem 29:295, 1986; 以及 Ewenson 等人, 肽:结构和功能 (Peptides:Structure and Function) (第 9 次美国肽学术会议文集 (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium)) Pierce 化学公司, 伊利诺伊州罗克兰 (Rockland), 1985), 吡啶因 (Huffman 等人, 肽:化学和生物学 (Peptides:Chemistry and Biology), G. R. Marshall 编著, EScOM 出版社, 荷兰莱顿市 (Leiden), 1988), 苯二氮 (Freidinger 等人, 肽:化学和生物学 (Peptides:Chemistry and Biology), G. R. Marshall 编著, EScOM 出版社, 荷兰莱顿市 (Leiden), 1988),  $\beta$ -氨基醇 (Gordon 等人, 生物化学与生物物理研究通讯 (Biochem Biophys Res Commun) 126:419, 1985), 以及取代的  $\gamma$ -内酰胺环 (Garvey 等人, 肽:化学和生物学 (Peptides:Chemistry and Biology), G. R. Marshall 编著, EScOM 出版社, 荷兰莱顿市 (Leiden), 1988)。

#### [0128] siRNA 分子

[0129] 正义 -RNA 和反义 -RNA 形成双链 RNA 分子, 优选正义 -RNA 为 siRNA, 其部分包含与部分 TIP41 mRNA 中的连续核苷酸靶序列相同的核酸序列。优选抗 TIP41 的 siRNA 被设计为包括 10-30 碱基对的正义序列和互补结合所述正义序列的反义序列, 但其并不限于此, 也可以使用任何具有互补结合靶向 TIP41 基因碱基对的正义序列的双链 RNA 分子。最优选与正义序列具有互补序列的反义序列。

#### [0130] 抗体

[0131] 对于 TIP41 抗体, 可使用通过注射 TIP41 制备的抗体, 也可以使用市售的抗体。同样, 所述抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体和可结合抗原表位的片段。

[0132] 多克隆抗体可通过将 TIP41 注射到动物体内, 并通过抽血从动物中采集含有抗体的血清的常规方法制备。所述多克隆抗体可使用本领域熟知的任何方法纯化, 也可以从任意的动物宿主如山羊、兔子、绵羊、猴子、马、猪、牛或狗中制备。

[0133] 单克隆抗体可使用只要通过连续细胞系培养可提供抗体分子生产的任何技术来制备。尽管其不限于此, 所述技术可包括杂交瘤、人 B- 细胞杂交瘤和 EBV 杂交瘤 (Kohler G 等人, 自然 (Nature) 256:495-497, 1975; Kozbor D 等人, 免疫方法杂志 (J Immunol Methods) 81:31-42, 1985; Cote RJ 等人, 美国科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci) 80:2026-2030, 1983; 以及 Cole SP 等人, 分子细胞生物学 (Mol Cell Biol) 62:109-120, 1984)。

[0134] 可制备含有特异性结合 TIP41 的位点的抗体片段。例如, 尽管不限于此, F(ab')<sub>2</sub> 片段可用胃蛋白酶降解抗体分子制备, Fab 片段可通过还原 F(ab')<sub>2</sub> 片段的二硫键桥来制备。作为另一方法, 具有所需特异性的单克隆 Fab 片段可通过减小 Fab 表达文库的大小来快速且简易地分离 (Huse WD 等人, 科学 (Science) 254:1275-1281, 1989)。

[0135] 为简化下列步骤如洗涤或分离复合体,所述抗体可结合至固体基质。固体基质的实例包括合成树脂、硝化纤维、玻璃基质、金属基质、玻璃纤维、微球和微珠。另外,合成树脂包括聚酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯、PVDF 和尼龙。

#### [0136] 适体

[0137] 适体是一种单链核酸 (DNA、RNA 或修饰的核酸),其本身具有稳定的三维结构,可以高亲和力和特异性结合靶分子。由于第一种适体发现技术的发展,即 SELEX (指数富集配体系统进化技术 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)) (Ellington, AD 和 Szostak, JW., 自然 (Nature) 346:818-822, 1990), 发现了许多可结合各种靶分子如低分子量有机物质、肽和膜蛋白的适体。由于适体具有独特的高亲和力 (通常为 pM 水平) 和对靶分子的特异性,这一点与单克隆抗体相当,尤其是其用作替代性抗体的可能性很高,因而适体通常被称为“化学抗体”。

[0138] 在本发明的一个实验例中,通过免疫组织化学和蛋白质印迹法确定了肝癌组织中 TIP41 蛋白的过表达。同样,在以 TIP41 siRNA 感染的肝癌细胞系中确定了 TIP41 蛋白消耗 (参见图 1)。

[0139] 在本发明的一个实验例中,当用 TIP41 siRNA 处理 Huh7 肝癌细胞后,以 TRAIL 处理各种不同的时间,确定的结果表明通过核染色质染色和 FACS 分析法证实了细胞凋亡。另外,将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系后,通过 TRAIL 以浓度 - 依赖的方式诱导细胞凋亡, FACS 分析结果证实与仅用 TRAIL 处理相比,在用 TIP41 siRNA 和 TRAIL 共处理的情况下,细胞凋亡进一步增加 (参见图 2)。

[0140] 在本发明的一个实验例中,用 TIP41 siRNA 转染后,以时间 - 依赖的方式用 TRAIL 处理 Huh7 肝癌细胞系,观察到蛋白激活与细胞凋亡有关,尤其确定了半胱天冬酶 -3、-8、-9 和聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP)。另外也确定了细胞色素 C 在细胞液中的表达,其表明的事实为通过外在途径和内在途径的结合,在 Huh7 肝癌细胞系中发生了由 TRAIL 和 TIP41 蛋白消耗导致的细胞凋亡 (参见图 3)。

[0141] 在本发明的一个实验例中,将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系中后,用 TRAIL 以时间 - 依赖的方式处理,然后确定了 c-JunN- 末端激酶 (JNK) 转导途径的激活 (activation),由于在 JNK 抑制剂处理的情况下确定了通过 TRAIL 和 TIP41 蛋白消耗的细胞凋亡减少,通过这些发现证明 JNK 转导途径在 TRAIL 介导的通过 TIP41 消耗的细胞凋亡中起着重要的作用 (参见图 4)。

[0142] 在本发明的一个实验例中,为证明通过 TIP41 蛋白消耗, TRAIL- 诱导的细胞凋亡不会在正常细胞系中诱导细胞凋亡,而是特异性地在癌细胞系中发生的事实,研究了在 TIP41 siRNA 和 TRAIL- 诱导的细胞凋亡途径中 p53 蛋白的作用,并观察到在丝氨酸 (ser) 15 和 392 位的磷酸化。然而,在 p53- 缺陷的 HCT116 同基因的 HCC 细胞系中 TIP41 消耗后,用 TRAIL 处理以诱导细胞凋亡,凋亡的细胞死亡得以证实。这表明用 TRAIL 处理的 TIP41 消耗所诱导的细胞凋亡与 p53 的存在无关 (参见图 5)。

[0143] 在本发明的一个实验例中,确定在肝癌和肺癌细胞系中 TRAIL 受体的转录水平的结果为,与正常细胞系相比 TRAIL-R2 (DR5) 过表达。另外, TIP41 消耗后,同样地确定了肝癌细胞系中 TRAIL 受体表达。这表明通过 TIP41 消耗的细胞凋亡增加并非由于 TRAIL 受体表达的变化 (参见图 6)。

[0144] 在本发明的一个实验例中,在正常细胞系中用 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理后检验细胞凋亡,与 TIP41 siRNA 转染和 TRAIL 处理有关的细胞凋亡没有变化,证明影响细胞凋亡的蛋白激活没有变化。因此,siRNA TIP41 转染后确定 TRAIL 介导的细胞凋亡特异性发生于癌细胞(参见图 7)。

[0145] 在本发明的一个实验例中,用 siRNA 和 TRAIL 处理 TRAIL-抗性肺癌和结直肠癌细胞系,通过 TIP41 敲除确定细胞凋亡的诱导(参见图 8)。

[0146] 在本发明的一个实验例中为了通过动物实验证明 TIP41 的功能,将肝癌细胞系移植至裸鼠后,注射 TIP41 siRNA 和 TRAIL,确定了肿瘤大小的减小和细胞凋亡的诱导,与仅注射 TRAIL 相比,当 TIP41 siRNA 和 TRAIL 一起注射时,与细胞凋亡有关的蛋白激活甚至增强(参见图 9)。

[0147] 另外,为了确定 TIP41 作为 TRAIL 敏化剂诱导的细胞凋亡途径,确定了 MKK7 与作为 TIP41 结合蛋白的 PP2Ac 成分,以及与 PP2Ac 复合体之间的相互作用(参见图 10 和 11)。

[0148] 更具体地,为了确定结合 TIP41 的 MKK7 的结合位点,构建包括各种 MKK7 区的片段,并确定结合位点(参见图 12 和 13)。

[0149] 而且,为了确定由 TIP41 消耗和 TRAIL 处理诱导的细胞凋亡途径是否由于 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用而减少,在 Huh7 肝癌细胞系中实施 MKK7 敲除以及 TIP41 和 TRAIL 处理后,进行细胞凋亡分析。在这种情况下观察到细胞凋亡的减少。

[0150] MKK7 敲除明显减少了由 TIP41 消耗和 TRAIL 处理诱导的细胞凋亡。此外,我们还检验了是否 JNK 激活与 TIP41 消耗和 TRAIL-诱导的细胞凋亡有关(参见图 14)。

[0151] 因此,当用 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理 TRAIL-抗性肝癌细胞系后,在 TRAIL 抗性癌细胞如肝癌、肺癌和结直肠癌中诱导了细胞凋亡。另外,将 TIP41 siRNA 和 TRAIL 注射到人癌细胞系产生的异种移植小鼠后,观察到癌症组织中肿瘤大小的减小和细胞凋亡的诱导。因此,TIP41 蛋白表达或 TIP41 活性抑制剂可有效地用作增强 TRAIL 敏感性的组合物中的活性成分。

[0152] 除了 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂以外,所述组合物可含有一种或多种具有相同或相似功能的活性成分。

[0153] 所述组合物可口服或非肠道途径施用,在非肠道途径施用时,其可进行腹腔内注射、直肠内注射、皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射、子宫内注射(intrauterine dural injection)、脑血管内注射或胸廓内注射,并可作为常规药物形式使用。

[0154] 所述组合物可单独使用或与包括手术、放射治疗、激素治疗、化学治疗和生物反应调节剂的方法联用。

[0155] 所述组合物的日剂量为约 0.0001g~100mg/kg,优选 0.001g~10mg/kg,且优选每天施用一次或分几次施用,其可变化范围取决于患者的体重、年龄、性别、健康状况、饮食、施用时间和方法、排泄速率和疾病严重程度。

[0156] 在实际的临床施用中,本发明所述组合物可作为各种非口服制剂施用;配制时其可通过使用稀释剂或赋形剂制备,如填充剂、增量剂(extender)、粘合剂、湿润剂、崩解剂和表面活性剂。对于非肠道制剂,其包括无菌溶液、疏水溶剂、悬浮剂、乳剂、冻干药物和栓剂。对于疏水溶剂和悬浮剂,可使用植物油如丙二醇、聚乙二醇和橄榄油及注射用酯如油酸乙酯。对于栓剂的基质可使用 witepsol(饱和脂肪酸混合物甘油酯)、聚乙二醇、吐温 61、

可可脂、月桂酸甘油酯 (laurin) 和甘油胶冻。

[0157] 本发明还提供含有 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂的抗癌助剂。

[0158] 优选所述 TIP41 蛋白具有如 SEQ. ID. NO:1 所示的氨基酸序列, 尽管其不限于此。

[0159] 优选所述 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂为 TRAIL 敏化剂, 尽管其不限于此。

[0160] 优选所述 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂例如选自下组之一 (但不限于此): 互补结合 TIP41 基因 mRNA 的反义核苷酸、抗 TIP41 的小干扰 RNA (siRNA)、短发夹 RNA, 尽管其不限于此。

[0161] 优选所述 TIP41 活性抑制剂选自下组之一: 特异性结合 TIP41 的化合物、肽、肽模拟物、适体、抗体和天然物质, 但不限于此。

[0162] 优选所述癌症选自下组之一: 肝癌、结肠癌、宫颈癌、肾癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、脑瘤、肺癌、子宫癌、膀胱癌、血癌和胰腺癌, 以及任何具有 TRAIL 抗性的癌症, 但不限于此。

[0163] 进一步地, 在所述抗癌助剂中, 优选所述 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂增强 TRAIL 敏感性, 但不限于此。

[0164] 在本发明的一个实验例中, TIP41 蛋白在肝癌组织中过表达 (参见图 1), 与仅用 TRAIL 处理相比, 当将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系且用 TRAIL 以不同的时间段处理后, 细胞凋亡增加更多 (参见图 2)。另外, 为了发现通过 TIP41 siRNA 和 TRAIL 诱导的细胞凋亡途径, 检测了半胱天冬酶 -3、-8、-9 和聚 ADP 核糖聚合酶以及 JNK 转导途径相关蛋白和 p53 蛋白的活性, 与仅用 TRAIL 处理相比, 当用 TIP41 siRNA 和 TRAIL 二者处理时细胞凋亡增加更多, 其表现的细胞凋亡被确定为癌细胞系特异性细胞凋亡 (参见图 3、4、5 和 7)。另外当 TIP41 蛋白受到抑制, 确定了 TRAIL 受体未发生变化 (参见图 6)。此外, 用 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理肝癌以外的也具有 TRAIL 抗性的细胞系, 确定了凋亡的细胞死亡 (参见图 8)。而且, 与分别注射 TRAIL 和 TIP41 siRNA 相比, 共同注射 TIP41 siRNA 和 TRAIL 时异种移植裸鼠的肿瘤大小减小了。另外, 也观察到共同注射 TIP41siRNA 和 TRAIL 时, 细胞凋亡相关蛋白的激活和肿瘤组织中的细胞凋亡最有效。

[0165] 因此, 当用 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理具有 TRAIL- 抗性的肝癌细胞系时, 在 TRAIL 抗性癌细胞如肝癌、肺癌和结直肠癌中诱导了癌细胞系特异性细胞凋亡, 且当将 TIP41 siRNA 和 TRAIL 注射到异种移植小鼠模型中, 其可有效诱导癌细胞的细胞凋亡并减小肿瘤的大小, 因此其可有效用作含有 TIP41 表达或活性抑制剂的抗癌助剂。

[0166] 除了 TIP41 表达或活性抑制剂以外, 所述抗癌助剂可含有一种或多种具有相同或相似功能的活性成分。

[0167] 所述抗癌助剂可口服或非肠道途径施用, 在非肠道途径施用时, 其可进行腹腔内注射、直肠内注射、皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射、子宫内注射、脑血管内注射或胸廓内注射, 并可作为常规药物形式使用。

[0168] 所述抗癌助剂可单独使用或与包括手术、放射治疗、激素治疗、化学治疗和生物反应调节剂的方法联用。

[0169] 所述抗癌助剂的日剂量为约 0.0001g~100mg/kg, 优选 0.001g~10mg/kg, 且优选每天施用一次或分几次施用, 其可变化范围取决于患者的体重、年龄、性别、健康状况、饮食、施用时间和方法、排泄速率和疾病严重程度。

[0170] 在实际的临床施用中,本发明所述抗癌助剂可作为各种非口服制剂施用;配制时其可通过使用稀释剂或赋形剂制备,如填充剂、增量剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂和表面活性剂。对于非肠道制剂,其包括无菌溶液、疏水溶剂、悬浮剂、乳剂、冻干药物和栓剂。对于疏水溶剂和悬浮溶剂,可使用植物油如丙二醇、聚乙二醇和橄榄油及注射用酯如油酸乙酯。对于栓剂的基质可使用 witepsol(饱和脂肪酸混合物甘油酯)、聚乙二醇、吐温 61、可可脂、月桂酸甘油酯和甘油胶冻。

[0171] 本发明还提供一种预防和治疗癌症的组合物,其包含本发明的抗癌助剂。

[0172] 在一个实施方案中,当本发明的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂与 TRAIL 联用时,在各种具有 TRAIL 抗性的癌细胞系如肝癌、肺癌和结直肠癌细胞系中,癌症特异性细胞凋亡比率增加。进一步地,在植入癌细胞系的裸鼠模型中检测了本发明 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂的癌症特异性细胞凋亡体内效果。

[0173] 因此,所述含有 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂的抗癌助剂可用作所述预防和治疗癌症的组合物活性成分。

[0174] 除了 TIP41 表达或活性抑制剂以外,所述组合物可含有一种或多种具有相同或相似功能的活性成分。

[0175] 所述组合物可口服或非肠道途径施用,在非肠道途径施用,可将所述组合物进行腹腔内注射、直肠内注射、皮下注射、静脉内注射、肌肉内注射、子宫内注射、脑血管内注射或胸廓内注射,并可作为常规药物形式使用。

[0176] 所述组合物可单独使用或与包括手术、放射治疗、激素治疗、化学治疗和生物反应调节剂的方法联用。

[0177] 所述组合物的日剂量为约 0.0001g~100mg/kg,优选 0.001g~10mg/kg,且优选每天施用一次或分几次施用,其可变化范围取决于患者的体重、年龄、性别、健康状况、饮食、施用时间和方法、排泄速率和疾病严重程度。

[0178] 在实际的临床施用中,本发明所述组合物可作为各种非口服制剂施用;配制时其可通过使用稀释剂或赋形剂制备,如填充剂、增量剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂和表面活性剂。对于非肠道制剂,其包括无菌溶液、疏水溶剂、悬浮剂、乳剂、冻干药物和栓剂。对于疏水溶剂和悬浮溶剂,可使用植物油如丙二醇、聚乙二醇和橄榄油及注射用酯如油酸乙酯。对于栓剂的基质可使用 witepsol(饱和脂肪酸混合物甘油酯)、聚乙二醇、吐温 61、可可脂、月桂酸甘油酯和甘油胶冻。

[0179] 本发明还提供一种筛选预防或治疗癌症的组合物方法。

[0180] 所述筛选预防或治疗癌症的组合物方法,可优选包括:

[0181] 1) 用样品物质处理癌细胞系作为实验组;

[0182] 2) 测量步骤 1) 中 TIP41 与 PP2Ac 或 TIP41 与 MKK7 蛋白之间的结合水平;以及

[0183] 3) 与未经步骤 1) 中样品物质处理的对照相比,筛选出降低步骤 2) 中 TIP41 和 PP2Ac 或 TIP41 和 MKK7 蛋白之间结合水平的物质,尽管其不限于此。

[0184] 优选所述癌症选自下组之一:肝癌、结直肠癌、宫颈癌、肾癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、脑瘤、肺癌、子宫癌、结肠癌、血癌和胰腺癌,更优选所述癌症为肝癌、肺癌或结直肠癌,但其并不限于此;且优选包括具有 TRAIL 抗性的所有癌症,但其并不限于此。

[0185] 在本发明的筛选预防或治疗癌症的组合物方法中,优选步骤 2) 中所述蛋白的结

合水平以选自下组之一的方法测量：免疫沉淀反应、ELISA、蛋白质印迹法、谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 钓饵 (Pull-down) 分析、蛋白质芯片、荧光共振能量转移 (FRET)、双分子荧光互补 (BiFC) 和酵母双杂交 (Y2H)，但其并不限于此。

[0186] 本发明还提供一种筛选预防或治疗癌症的组合物的方法。

[0187] 所述筛选预防或治疗癌症的组合物的方法，可优选包括：

[0188] 1) 用样品物质处理癌细胞系作为实验组；

[0189] 2) 测量步骤 1) 中 MKK7 的活性；以及

[0190] 3) 与未经步骤 1) 中样品物质处理的对照相比，筛选出增加步骤 2) 中 MKK7 活性的物质，但不限于此。

[0191] 在本发明的筛选预防或治疗癌症的组合物的方法中，优选步骤 2) 中所述 MKK7 蛋白的表达水平以选自下组之一的方法测量：RT-PCR、ELISA、免疫组织化学染色、蛋白质印迹法和 FACS，但其并不限于此。

[0192] 优选所述癌症选自下组之一：肝癌、结直肠癌、宫颈癌、肾癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、脑瘤、肺癌、子宫癌、结肠癌、血癌和胰腺癌，更优选所述癌症为肝癌、肺癌或结直肠癌，但其并不限于此；且优选包括具有 TRAIL 抗性的所有癌症，但其并不限于此。

[0193] 本发明还提供一种筛选预防或治疗癌症的组合物的方法。

[0194] 所述筛选预防或治疗癌症的组合物的方法，可优选包括：

[0195] 1) 用样品物质处理癌细胞系作为实验组；

[0196] 2) 测量步骤 1) 中 PP2Ac 的表达水平；以及

[0197] 3) 与未经步骤 1) 中样品物质处理的对照相比，筛选出降低步骤 2) 中 PP2Ac 蛋白表达水平的物质，尽管其不限于此。

[0198] 在本发明的筛选预防或治疗癌症的组合物的方法中，优选步骤 2) 中所述 PP2Ac 蛋白的表达水平以选自下组之一的方法测量：免疫荧光、ELISA、质谱分析和蛋白质芯片，但其并不限于此。

[0199] 优选所述癌症选自下组之一：肝癌、结直肠癌、宫颈癌、肾癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、脑瘤、肺癌、子宫癌、结肠癌、血癌和胰腺癌，更优选所述癌症为肝癌、肺癌或结直肠癌，但其并不限于此；且优选包括具有 TRAIL 抗性的所有癌症，但其并不限于此。

[0200] 本发明还提供一种增强癌症对 TRAIL 敏感性的方法，其包括将药学上有效量的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂施用于患有 TRAIL 介导的细胞凋亡相关疾病对象的步骤。

[0201] 优选所述 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂为 TRAIL 敏化剂，但其并不限于此。

[0202] 优选所述 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂选自下组之一：互补结合 TIP41 基因 mRNA 的反义核苷酸、短干扰 RNA (siRNA) 和短发夹 RNA，但其并不限于此。

[0203] 优选所述 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂选自下组之一：特异性结合 TIP41 的化合物、肽、肽模拟物、适体、抗体和天然物质，但其并不限于此。

[0204] 所述 TRAIL 介导的细胞凋亡相关疾病为癌症、炎症性疾病或自身免疫性疾病，但其并不限于此。

[0205] 优选所述癌症选自下组之一：肝癌、结肠癌、宫颈癌、肾癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、脑瘤、肺癌、子宫癌、膀胱癌、血癌和胰腺癌，但不限于此。

[0206] 进一步地，优选所述炎症性疾病选自下组之一：皮肤炎、过敏症、特异反应性、结膜

炎、牙周炎、鼻炎、中耳炎、咽喉炎、扁桃体炎、肺炎、胃溃疡、胃炎、克罗恩病、结肠炎、痔疮、痛风、僵直性脊椎炎、风湿热、全身性红斑狼疮、纤维肌痛、银屑病关节炎、退行性关节炎、风湿性关节炎、肩关节炎、腱炎、肌腱炎、腱鞘炎、腱周围炎、肌炎、肝炎、膀胱炎、肾炎、干燥综合征、多发性硬化症以及急性和慢性炎症,但不限于此。

[0207] 进一步地,优选所述自身免疫性疾病选自下组之一:风湿性关节炎、多发性硬化症、重症肌无力、葛瑞夫兹病、桥本甲状腺炎、阿狄森病、白癜风、全身性硬化症、肺出血肾炎综合征、白塞病、克罗恩病、僵直性脊椎炎、葡萄膜炎、血小板减少性紫癜、寻常性天疱疮、糖尿病、自身免疫性贫血、冷球蛋白血症、肾上腺脑白质营养不良(ALD)和全身性红斑狼疮(SLE),但不限于此。

[0208] 在一个实施方案中,当本发明的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂与 TRAIL 联用时,在各种具有 TRAIL 抗性的癌细胞系如肝癌、肺癌和结直肠癌细胞系中,癌症特异性细胞凋亡比率增加。进一步地,在植入肿瘤的裸鼠模型中检测了本发明 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂的癌症特异性细胞凋亡体内效果。

[0209] 因此,本发明的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂可有效地用于增强 TRAIL 敏感性。

[0210] 本发明还提供一种预防癌症的方法,其包括将药学上有效量的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂施用到对象的步骤。

[0211] 本发明还提供一种治疗癌症的方法,其包括将药学上有效量的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂施用到患有癌症的对象的步骤。

[0212] 优选所述对象为脊椎动物,优选为哺乳动物,更优选为包括小鼠、兔、豚鼠、仓鼠、狗、猫的实验动物,最优选为包括黑猩猩或大猩猩的类人猿动物。

[0213] 所述药学上有效量的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂可根据各种因素如给药方法、靶向部位或患者状况而变化。因此,所述施用量在用于人体时应该考虑到稳定性和效率而恰当地确定。所述药学上有效量的给药量也可在动物实验中估测然后调整用于人类。关于确定药学上有效量的给药量要考虑的因素的信息,可参见 Hardman 和 Limbird 编著,古德曼和吉尔曼的治疗学药物基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics),第 10 版(2001),珀盖蒙出版社(Pergamon Press);以及 E. W. Martin 编著,雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第 18 版(1990),麦克出版公司(Mack Publishing Co.)。

[0214] 根据一个实施方案,TIP41 蛋白表达或活性抑制剂可包括通常用于生物药物制剂中的载体、赋形剂、稀释剂,或上述两者或更多的组合。所述药用载体没有严格的限制,条件是所述载体适合将 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂蛋白递送到体内。作为实例,所述载体可包括在默克索引(Merck Index),第 13 版,默克公司(Merck & Co. Inc)公开的化合物的混合物、盐溶液、无菌水、林格氏(Ringer's)溶液、缓冲盐水、葡萄糖溶液、麦芽糊精溶液、甘油、乙醇或上述一种或以上的混合物。根据需要,所述载体可以和其他常用添加剂包括抗氧化剂、缓冲液或抑真菌剂一起加入。进一步地,可另外加入稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂和润滑剂以制备包括水溶液、悬浮液或乳液、丸剂、胶囊剂、颗粒剂或片剂的剂型。此外,可使用已知方法或雷明顿药物科学(麦克出版公司,宾夕法尼亚州伊斯顿,第 18 版,1990)公开的方法根据疾病或成分而制备合适的剂型。

[0215] 本发明 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂可另外包括一种或多种具有相同或相似功

能的有效成分。相对于药物组合物的总重量,本发明药物组合物包括 0.0001~10wt% 的所述蛋白,优选包括 0.001~1wt% 的所述蛋白。

[0216] 根据不同目的,本发明 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂可为非经口给药(如静脉内注射、皮下注射、腹膜内注射或局部应用)或经口给药。进一步地,所述给药量可根据患者的体重、年龄、性别、健康状况、饮食、给药时间和方法、排泄速率和疾病严重程度而变化。本发明药物组合物每日给药量的范围为 0.001  $\mu\text{g}$ ~10mg/kg,优选为 0.01  $\mu\text{g}$ ~10mg/kg,且优选将每日一次给药分为每日多次给药。

[0217] 本发明还提供在治疗 TRAIL 介导的细胞凋亡相关疾病期间,用于增强 TRAIL 敏感性的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂。

[0218] 此外本发明提供用作抗癌助剂的 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂。

[0219] 优选所述 TIP41 蛋白具有如 SEQ. ID. NO:1 所示的氨基酸序列,但不限于此。

[0220] 优选所述 TIP41 蛋白表达或活性抑制剂为 TRAIL 敏化剂,但不限于此。

[0221] 优选所述 TIP41 表达抑制剂选自下组之一:互补结合 TIP41 基因 mRNA 的反义核苷酸、抗 TIP41 的小干扰 RNA(siRNA)、短发夹 RNA,但不限于此。

[0222] 优选所述 TIP41 活性抑制剂选自下组之一:特异性结合 TIP41 的化合物、肽、肽模拟物、适体、抗体和天然物质,但不限于此。

[0223] 所述 TRAIL 介导的细胞凋亡相关疾病为癌症、炎症性疾病或自身免疫性疾病,但不限于此。

[0224] 优选所述癌症选自下组之一:肝癌、结肠癌、宫颈癌、肾癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、脑瘤、肺癌、子宫癌、膀胱癌、血癌、胰腺癌和具有 TRAIL 抗性的任何癌症,但不限于此。

[0225] 进一步地,优选所述炎症性疾病选自下组之一:皮肤炎、过敏症、特异反应性、结膜炎、牙周炎、鼻炎、中耳炎、咽喉炎、扁桃体炎、肺炎、胃溃疡、胃炎、克罗恩病、结肠炎、痔疮、痛风、僵直性脊椎炎、风湿热、全身性红斑狼疮、纤维肌痛、银屑病关节炎、退行性关节炎、风湿性关节炎、肩关节炎、腱炎、肌腱炎、腱鞘炎、腱周围炎、肌炎、肝炎、膀胱炎、肾炎、干燥综合征、多发性硬化症以及急性和慢性炎症,但不限于此。

[0226] 进一步地,优选所述自身免疫性疾病选自下组之一:风湿性关节炎、多发性硬化症、重症肌无力、葛瑞夫兹病、桥本甲状腺炎、阿狄森病、白癜风、全身性硬化症、肺出血肾炎综合征、白塞病、克罗恩病、僵直性脊椎炎、葡萄膜炎、血小板减少性紫癜、寻常性天疱疮、糖尿病、自身免疫性贫血、冷球蛋白血症、肾上腺脑白质营养不良(ALD)和全身性红斑狼疮(SLE),但不限于此。

[0227] 以下将结合实验例和制备例详细描述本发明。然而,下列实验例和制备例仅用于说明本发明的目的,本发明并不限于下列实验例和制备例。

[0228] <实验例 1> 确认肝癌和肺癌组织中 TIP41 蛋白的表达

[0229] <1-1> 用免疫染色确认 TIP41 表达

[0230] 将肝癌患者的组织(忠南大学医学院, Kim, Jin-Man 教授)用约 10% 中性福尔马林溶液固定,加入石蜡并切成约 5  $\mu\text{m}$  厚的切片。将所述切片用约 10mM 的抗坏血酸缓冲液(pH6.0)处理约 4 分钟,置于含有约 3% 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )的约 0.1M Tris-缓冲盐溶液(TBS, pH7.4)中约 30 分钟。将所述切片用蛋白封闭液(DAKO)于室温下处理约 20 分钟,并与抗-TIP41 抗体反应 30 分钟。用 0.1M TBST(含有 0.01% 吐温 20 的 0.1M TBS)洗涤后,



使所述切片与 nVision 抗兔聚合物 (DAKO) 反应 30 分钟。通过与 3, 3'-二氨基联苯胺 (DAB) 色原体基质溶液 (DAKO) 反应可以观察到该过氧化物酶-结合抗体。在显微镜下观察,适当染色后用 0.1M TBS 洗涤以结束反应,用奥林巴斯 (Olympus) BX51 显微镜 (奥林巴斯, 日本) 观察,用奥林巴斯 DP 70 照相机 (奥林巴斯, 日本) 成像。

[0231] 结果,与正常区域相比,观察到肝癌组织肿瘤区域的 TIP41 过表达 (图 1A)。另外与肝癌和肺癌患者的周围正常组织 (忠南大学 Kim, Jin-Man 教授的研究组提供) 相比,这些患者癌症组织中的 TIP41 蛋白过表达 (表 1 和 2)。TIP41 表达和癌症阶段之间的相关分析表明,TIP41 阳性表达与 NSCLC 的较高阶段显著相关,肺癌 ( $P=0.045$ ),表明了 TIP41 表达与 NSCLC 级数的相关性 (表 2)。这些数据显示在 HCC 和 NSCLC 细胞中 TIP41 表达是高度过表达。

[0232] 【表 1】肝癌 (HCC) 临床组织中的 TIP41 表达水平 (IHC 法)

[0233]

| HCC 阶段 | 总数, n | TIP41    |           | P     |
|--------|-------|----------|-----------|-------|
|        |       | 阴性, n(%) | 阳性, n(%)  |       |
| I      | 4     | 1(25.0%) | 3(75.0%)  | 0.490 |
| II     | 19    | 2(10.5%) | 17(89.5%) |       |
| III A  | 6     | 4(66.7%) | 2(33.3%)  |       |
| III C  | 32    | 7(21.9%) | 25(78.1%) |       |
| IV     | 6     | 1(16.7%) | 6(83.3%)  |       |

[0234] P 值由线性相关的卡方值 (linear by linear associations) 计算。

[0235] 【表 2】肺癌 (非小细胞肺癌, NSCLC) 临床组织中的 TIP41 表达水平 (IHC 法)

[0236]

| NSCLC 阶段 | 总数, n | TIP41     |           | P     |
|----------|-------|-----------|-----------|-------|
|          |       | 阴性, n(%)  | 阳性, n(%)  |       |
| I        | 25    | 10(60.0%) | 15(40.0%) | 0.045 |

[0237]

|     |    |           |           |
|-----|----|-----------|-----------|
| I   | 47 | 16(34.0%) | 31(66.0%) |
| II  | 19 | 3(15.8%)  | 16(84.2%) |
| II  | 31 | 6(19.4%)  | 25(80.6%) |
| III | 47 | 4(8.5%)   | 43(91.5%) |
| III | 5  | 1(16.7%)  | 5(83.3%)  |
| IV  | 4  | 0(0%)     | 4(100%)   |

[0238] P 值由线性相关的卡方值计算。

[0239] <1-2> 用蛋白质印迹法确认 TIP41 表达

[0240] 通过使用提取自 7 位带有乙型肝炎病毒 (HBV) 的肝癌患者和 7 位无 HBV 的肝癌患者 (忠南大学医学院) 的肝癌组织和其临近正常组织的蛋白, 用蛋白质印迹法检测 TIP41 蛋白表达水平。

[0241] 将组织用裂解缓冲液 [20mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基乙磺酸) (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA (乙二胺四乙酸), 2mMEGMA (乙二醇四乙酸), 1% Triton X-100, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂混合物, 磷酸酶抑制剂混合物 I/II] 裂解, 在约 15,000rpm 下离心约 10 分钟去除细胞碎片并收集蛋白。通过 SDS-PAGE 根据分子量分离蛋白后, 将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜, 用约 5% 脱脂奶封闭 1 小时以停止任何非特异性反应。约 1 小时后, 将硝酸纤维素膜与 1:2,000TIP41 (Bethyl 实验室, 美国) 和 1:5,000GAPDH (Abforntier, 韩国) 在约 4°C 反应 12 小时以上, 用 0.1%TBST (含吐温-20 的 Tris-缓冲盐溶液) 洗涤 3 次, 每次洗涤约 10 分钟, 将抗-小鼠 (Pierce, 美国) 抗-兔 (Pierce, 美国) 的二抗于室温下反应约 1 小时。然后用 0.1%TBST 洗涤 3 次, 每次洗涤约 10 分钟, 用化学发光试剂确定所述表达。作为每种组织的定量对照组, 使用管家基因 GAPDH (甘油醛-3 磷酸脱氢酶)。

[0242] 结果, 确定了 7 位带有乙型肝炎病毒 (HBV) 的肝癌患者和 7 位无 HBV 的肝癌患者中 TIP41 过表达 (图 1B)。

[0243] <1-3> 肝癌细胞系的培养

[0244] 将源自韩国细胞系库 (Korean Cell Line Bank) 的人 Huh7 肝癌细胞系于 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下在含 10% 胎牛血清的达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM) 中培养。将 1×10<sup>6</sup> 个细胞/100mm 的 Huh7 肝癌细胞系在培养皿中培养 24 小时, 然后用 siRNA 转染。

[0245] <1-4> siRNA 转染

[0246] 为检测 TIP41 作为 TRAIL 敏化剂的功能, 挑选出能有效抑制 TIP41 的 siRNA 序列, 并合成 TIP41 siRNA (Dharmacon RNAi Technologies, 美国)。

[0247] 将 <1-3> 中培养的 2×10<sup>5</sup> 肝癌细胞系接种至 60mm 培养皿中, 使用 RNAimax 脂质体转染试剂 (invitrogen) 按照生产商的说明书指导用 siRNA 进行转染。约 72 小时后, 用 TRAIL (100ng/ml) 分别处理转染后的细胞约 0、0.5、1、2、3、4、6 小时; 在每个时间段使用裂解缓冲液从所述细胞中收集蛋白, 并实施蛋白质印迹法。用裂解缓冲液 [20mM HEPES (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂混合物, 磷酸酶抑制剂混合物 I/II] 裂解所述细胞后, 在约 15,000rpm 下离心约 10 分钟去

除细胞碎片并收集蛋白。通过 SDS-PAGE 根据分子量分离蛋白后,将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜,用约 5% 脱脂奶封闭 1 小时以停止任何非特异性反应。约 1 小时后,使硝酸纤维素膜与 1:2,000TIP41 (Bethyl 实验室,美国) 和 1:5,000GAPDH(Abforntier,韩国) 在约 4℃ 反应 12 小时以上,用 0.1%TBST(含吐温-20 的 Tris-缓冲盐溶液) 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,将抗-小鼠 (Pierce,美国) 抗-兔 (Pierce,美国) 的二抗于室温下反应约 1 小时。然后用 0.1%TBST 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,用化学发光试剂确定所述表达。作为每种组织的定量对照组,使用管家基因 GAPDH(甘油醛-3 磷酸脱氢酶)。

[0248] 使用的 TIP41 siRNA 序列为:5'-CCT AAT GAA ATA TCC CAG TAT-3'(SEQ. ID. NO:2)。

[0249] 结果, TIP41 siRNA 处理后,无论是否进行 TRAIL 处理, TIP41 蛋白都被完全抑制(图 1C)。

[0250] <实验例 2> 通过 TIP41 消耗和 TRAIL 处理诱导细胞凋亡

[0251] <2-1> 用核染色质染色进行 TIP41 消耗诱导的细胞凋亡分析

[0252] 将 TIP41-抑制的细胞系按  $2 \times 10^5$  个细胞/孔接种到 6-孔培养板,按实验例<1-1>的方法培养。约 24 小时后,用 100ng/ml 的 TRAIL 分别处理所述细胞 0、2、4、6、8 小时,用 5  $\mu$ g/ml 的 Hoechst 33342 于室温染色约 30 分钟。用 Hoechst 33342 进行核染色质染色后,通过荧光显微镜对死亡的细胞系计数,测量细胞凋亡。

[0253] 结果,与仅用 TRAIL 处理相比,用 TIP41 siRNA 和 TRAIL 二者处理的 Huh7 癌细胞系中细胞凋亡增加。细胞凋亡随着 TRAIL 处理时间的增加而增加,与对照组 siRNA 处理相比,观察到在 TIP41siRNA 处理组中细胞凋亡增加约 30%。这表明在 Huh7 癌细胞中 TIP41 siRNA 处理降低了 TRAIL 抗性(图 2A)。

[0254] <2-2> 用 FACS 进行 TIP41 消耗诱导的细胞凋亡分析

[0255] 将 TIP41siRNA 转染到按实验例<1-1>方法培养的 Huh7 肝癌细胞系并降低细胞内 TIP41 表达量后,用约 100ng/ml 的 TRAIL 处理,用膜联蛋白 V-FITc/PI 染色法在 0、2、4、6、8 小时染色细胞凋亡分开死亡细胞系和正常细胞系,并用 FACS(荧光活化细胞分选器)测量细胞凋亡。

[0256] 为测量细胞凋亡,用胰蛋白酶-EDTA 收集细胞系,然后用 FITc-融合膜联蛋白 v(50  $\mu$ g/ml) 和 PI(碘化丙啶)(50ng/ml) 染色约 20 分钟,用 FACS Caliber(BD) 流式细胞仪分离细胞系,然后分析膜联蛋白 V-FITc/PI 染色的细胞系比率。

[0257] 结果,通过 FACS 分析确认的事实是,用 TRAIL 处理不同时间段后发生了细胞凋亡(图 2B),且当用约 0、25、50、100、200ng/ml 浓度的 TRAIL 采用同样的实验方法处理约 4 小时,确认细胞凋亡随着处理浓度的增加而增加(图 2C)。

[0258] <实验例 3> 检测 TIP41 消耗和 TRAIL 处理诱导的细胞凋亡途径

[0259] <3-1> 半胱天冬酶激活

[0260] 将 TIP41 siRNA 转染至实验例<1-1>培养的细胞系约 72 小时后,用约 100ng/ml 的 TRAIL 处理不同的时间段。用裂解缓冲液 [20mMHEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基乙磺酸)(pH7.5), 150mM NaCl, 1mMEDTA(乙二胺四乙酸), 2mM EGMA(乙二醇四乙酸), 1%TritonX-100, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂混合物, 磷酸酶抑制剂混合物 I/II] 裂解所述细胞,在约 15,000rpm 下离心约 10 分钟去除细胞碎片并收集蛋白。通过 SDS-PAGE 根据分子

量分离蛋白后,将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜,用约 5% 脱脂奶封闭 1 小时以停止任何非特异性反应。约 1 小时后,使硝酸纤维素膜与 1:1,000 半胱天冬酶 -3、半胱天冬酶 -8、半胱天冬酶 -9 和 1:2,000 PARP (细胞信号转导技术 (cell signaling technology), 美国) 在约 4°C 反应 12 小时以上,用 0.1% TBST (含吐温 -20 的 Tris- 缓冲盐溶液) 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,将抗 - 小鼠 (Pierce, 美国) 抗 - 兔 (Pierce, 美国) 的二抗于室温下反应约 1 小时。然后用 0.1% TBST 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,用化学发光试剂确定所述表达。

[0261] 结果,图 3A 显示 TIP41 消耗后用 TRAIL 处理不同的时间段,激活了半胱天冬酶 -9、-8、-3 和 PARP。该结果表明经 TIP41 消耗后是细胞凋亡随 TRAIL 处理时间和浓度的增加而增加。

[0262] <3-2> 细胞色素 C 从线粒体释放至细胞液中

[0263] 为了弄清楚线粒体中的细胞色素 C 是否释放至细胞液中以确定细胞凋亡途径,进行亚细胞结构分级分离和蛋白质印迹法。通过将 TIP41 siRNA 转染至按实验例 <1-1> 方法培养的 Huh7 肝癌细胞系中以降低细胞内 TIP41 表达量后,将 TIP41-抑制的细胞系按  $2 \times 10^6$  个细胞 / 培养皿接种到 60mm 的培养皿中。约 24 小时后,用约 100ng/ml 的 TRAIL 分别处理 0、1、2、4 小时,并进行亚细胞结构分级分离。使用亚细胞蛋白质组抽提试剂盒 (Calbiochem Co.) 进行亚细胞结构分级分离;试剂盒由 4 种缓冲液组成,分别使用每种缓冲液将亚细胞结构分级分离为细胞液、线粒体、细胞核和细胞骨架部分。

[0264] 将约 500  $\mu$ l 提取缓冲液 1 加入至每种细胞系,在约 4°C 搅拌约 10 分钟并离心以获得细胞基质部分,在约 500  $\mu$ l 提取缓冲液 2 中于 4°C 搅拌约 30 分钟并离心以获得线粒体部分。对分离的细胞液和线粒体部分实施蛋白质印迹法。

[0265] 将 TIP41 siRNA 转染至实验例 <1-1> 培养的细胞系中约 72 小时后,用 TRAIL 分别处理 0、2、4 和 6 小时。用裂解缓冲液 [20mM HEPES (4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基乙磺酸) (pH7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA (乙二胺四乙酸), 2mM EGMA (乙二醇四乙酸), 1% Triton X-100, 10% 甘油, 蛋白酶抑制剂混合物, 磷酸酶抑制剂混合物 I/II] 裂解所述细胞,在约 15,000rpm 下离心约 10 分钟去除细胞碎片并收集蛋白。通过 SDS-PAGE 根据分子量分离蛋白后,将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜,用约 5% 脱脂奶封闭 1 小时以停止任何非特异性反应。微管蛋白 (Tubulin) 被用作细胞液部分的标记,过氧化物还原酶 III 被用作线粒体部分的标记。约 1 小时后,使硝酸纤维素膜与 1:1,000 的细胞色素 C (BD, 美国)、1:5,000 的微管蛋白 (Tubulin) (Sigma Aldrich, 美国) 和 1:2,000 的过氧化物还原酶 III (Abfrontier, 韩国) 在约 4°C 反应 12 小时以上,然后用 0.1% TBST (含吐温 -20 的 Tris- 缓冲盐溶液) 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,抗 - 小鼠 (Pierce, 美国) 抗 - 兔 (Pierce, 美国) 的二抗以 1:2,000 的比例于室温下反应约 1 小时。然后用 0.1% TBST 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,用化学发光试剂确定所述表达。

[0266] 结果发现,经 TIP41 siRNA 处理后细胞色素 C 释放至细胞液中 (图 3B)。因此,半胱天冬酶 -8 和 -9 被激活,且细胞色素 C 从线粒体中释放至细胞液中。这些结果证实,通过线粒体发生了细胞凋亡。这些发现表明 TIP41 消耗和 TRAIL 处理在 Huh7 肝癌细胞系中诱导的细胞凋亡与半胱天冬酶 / 线粒体相关的凋亡的细胞死亡途径紧密相关。

[0267] <实验例 4> 通过 TIP41 消耗和 TRAIL 处理激活 JNK 途径

[0268] <4-1> 通过 TIP41 消耗和 TRAIL 处理激活 JNK

[0269] 据报道 JNK 途径通过 TRAIL 调节细胞死亡。已有报道激活 JNK 和 p38 以诱导细胞凋亡。为了发现〈实验例〉中确定的 TRAIL 处理和 TIP41 消耗诱导的细胞凋亡,以及丝裂原活化蛋白激酶 (MAP) 途径,尤其是 JNK 和 p38 之间的关系,将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系,然后用 TRAIL(100ng/ml) 分别处理 0、1、2、4 小时。用蛋白质印迹法检测 TIP41 蛋白消耗和 TRAIL 处理诱导的细胞凋亡与 JNK 以及 p38 之间的关系。将 TIP41siRNA 转染至实验例〈1-1〉培养的细胞系中约 72 小时后,用 TRAIL 分别处理约 0、2、4 和 6 小时。用裂解缓冲液 [20mM HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基乙磺酸)(pH7.5),150mM NaCl,1mM EDTA(乙二胺四乙酸),2mM EGMA(乙二醇四乙酸),1%Triton X-100,10%甘油,蛋白酶抑制剂混合物,磷酸酶抑制剂混合物 I/II] 裂解所述细胞,在约 15,000rpm 下离心约 10 分钟去除细胞碎片并收集蛋白。通过 SDS-PAGE 根据分子量分离蛋白后,将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜,用约 5% 脱脂奶封闭 1 小时以停止任何非特异性反应。约 1 小时后,使硝酸纤维素膜与 1:1,000 比例的 p-MKK7(cST Inc.,美国)、p-p38(cST Inc.,美国)、1:1,000 比例的 p-JNK(cST Inc.,美国)和 1:5,000 比例的微管蛋白(Sigma Aldrich,美国)在约 4°C 反应 12 小时以上,然后用 0.1%TBST 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,将抗-小鼠(Pierce,美国)抗-兔(Pierce,美国)的二抗于室温下以 1:2,000 的比例反应约 1 小时。然后用 0.1% TBST 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,用化学发光试剂确定所述表达。

[0270] 如图 4A 所示,由 RNAi 导致的 TIP41 下调足以延长 TRAIL- 诱导的 MKK7/JNK 激活作用(图 4A)。

[0271] 〈4-2〉通过 JNK 抑制剂处理减少凋亡的细胞死亡

[0272] 为了发现 JNK 转导途径与 TRAIL 处理和 TIP41 消耗诱导的细胞凋亡之间的关系,以如实验例〈4-1〉的方法将细胞系接种后,用 TIP41siRNA 处理所述细胞系,然后用 JNK 抑制剂 SP600125(10 μ g/ml) 处理 1 小时以抑制 JNK 转导途径。通过采用 Annexin-FITc/PI 染色法的 FACS 分析测量由 TRAIL 刺激而诱导的细胞凋亡。

[0273] 结果,在用 JNK 抑制剂处理抑制 JNK 转导途径后,用 TRAIL 处理的实验中,细胞凋亡减少了。通过这一点确认一个事实,即 JNK 转导途径在 TRAIL 处理和 TIP41 蛋白消耗诱导的细胞凋亡中起着重要的作用(图 4B)。

[0274] 〈实验例 5〉确认 TIP41 蛋白消耗后 p53- 非依赖性细胞凋亡途径

[0275] 〈5-1〉确认肝癌细胞系中 p53- 非依赖性细胞凋亡途径

[0276] 目前使用的抗癌剂最大的问题是其杀死正常细胞系的副作用,其无法区分正常细胞系和癌细胞系,而已知正常细胞系细胞凋亡的机理是其通过 p53 途径的激活而产生。由于诱导 p53- 非依赖性细胞凋亡的抗癌剂即影响癌症也影响正常细胞系,已确认 TIP41siRNA 处理后 TRAIL- 诱导的细胞凋亡是否通过 p53 而发生。将 TIP41siRNA 转染至 HCT 1116p53 野生型和 p53 缺陷型结肠癌细胞系约 72 小时后,用约 100ng/ml 的 TRAIL 分别处理 0、2、4 和 6 小时。为了用磷酸-p53 抗体实施蛋白质印迹法确认是否通过 p53 转导途径发生了细胞凋亡,使用了确认 p53 磷酸化的抗体。使用 p-p53(Ser 6)、p-p53(Ser 9)、p-p53(Ser15)、p-p53(Ser 20)、p-p53(Ser 37)、p-p53(Ser 46)和 p-p53(Ser 392),检测 p53 丝氨酸 6、9、15、20、37、46、392 的磷酸化。

[0277] 用裂解缓冲液 [20mM HEPES(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基乙磺酸)(pH7.5),150mM NaCl,1mM EDTA(乙二胺四乙酸),2mM EGMA(乙二醇四乙酸),1%Triton X-100,10%甘油,蛋

白酶抑制剂混合物,磷酸酶抑制剂混合物 I/II] 裂解所述细胞,在约 15,000rpm 下离心约 10 分钟去除细胞碎片并收集蛋白。通过 SDS-PAGE 根据分子量分离蛋白后,将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜,用约 5% 脱脂奶封闭 1 小时以停止任何非特异性反应。约 1 小时后,使硝酸纤维素膜与 1:1,000 比例的 p-p53(Ser 6)、p-p53(Ser 9)、p-p53(Ser15)、p-p53(Ser20)、p-p53(Ser 37)、p-p53(Ser 46) 和 p-p53(Ser 392) (cST Inc, 美国) 在约 4°C 反应 12 小时以上,然后用 0.1%TBST 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,抗-小鼠 (Pierce, 美国) 抗-兔 (Pierce, 美国) 的二抗于室温下以 1:2,000 的比例反应约 1 小时。然后用 0.1%TBST 洗涤 3 次,每次洗涤约 10 分钟,用化学发光试剂确定所述表达。

[0278] 结果,当用 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理细胞,确认在 p53 蛋白的 Ser 15 和 392 位的磷酸化 (图 5A)。Ser 15 磷酸化的发生是通过激活 ATM (毛细血管扩张性共济失调突变蛋白)/ATR(ATM 和 RAD3- 相关蛋白) 途径,其由于 DNA 损伤而影响到细胞凋亡,而 DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA-PK) 及其与细胞凋亡的关系是已知的,已知 Ser 392 的磷酸化影响 p53 蛋白与细胞核中的 DNA 序列结合。因此,有可能通过 TIP41 消耗的 TRAIL 介导的细胞凋亡是 p53- 依赖性的。但是,考虑到 JNK 转导途径激活的丝氨酸不表达这一结果,其 p53- 非依赖性可能性也不可忽视。

[0279] <5-2>p53- 缺陷细胞系培养

[0280] HCT116 细胞系是正常产生 p53 蛋白的结直肠癌细胞系,已知其为通过 TRAIL 处理而不经常进入细胞凋亡的 TRAIL- 抗性细胞系。HCT116p53- 缺陷细胞系是由 B. Vogelstein 博士于 1998 年建立的 p53 基因缺陷型 (Vogelstein, B., 科学 (Science), 1998)。将该细胞系分散开用于实验,所述细胞系在含有约 10% 胎牛血清、约 100mg/ml 链霉素和约 100IU/ml 氨苄青霉素的 DMEM (Hyclone, 美国) 培养基中継代培养 3 天时间,加入约 100 μg/ml G418 稳定标记抗生素。

[0281] <5-3> 确认 p53 缺陷细胞系中 p53- 非依赖性细胞凋亡途径

[0282] 为了确认 p53- 非依赖性的可能性,将 TIP41 siRNA 转染至实验例 <5-2> 中制备的 HCT116p53 缺陷细胞系中,以同样的条件用 TRAIL 处理以诱导细胞凋亡,然后用 Annexin-FITc/PI 染色法进行 FACS 分析。

[0283] 结果,在 TIP41 siRNA 转染后用 TRAIL 处理,在 HCT116p53- 缺陷细胞系以及 Huh7 肝癌细胞系中很好地诱导了细胞凋亡,这表明 TIP41 消耗和 TRAIL 处理在 p53- 非依赖性途径中诱导了癌细胞系的细胞凋亡。因此,图 5A 所示的 p53Ser 15 激活对通过 TIP41 消耗的 TRAIL 介导的细胞凋亡影响很小,预期 p53 进入到细胞核中以增强转录活性 (图 5B)。

[0284] <实验例 6> 测量 TRAIL 受体表达水平

[0285] <6-1> 确认 TRAIL 受体在各种细胞系中的表达

[0286] 一项研究报道,为了通过克服 TRAIL 抗性来增强癌细胞系特异性治疗效果,已将增强 TRAIL 受体表达作为增加癌细胞系细胞凋亡的方法。与该项研究相关,为确定 TIP41 消耗和 TRAIL 受体之间的关系,确定了在正常细胞系、肝癌和肺癌细胞系中 TRAIL 的表达水平。有四种 TRAIL 受体,分别为 TRAIL-R1 (DR4)、TRAIL-R2 (DR5)、TRAIL-R3 (DcR1) 和 TRAIL-R4 (DcR2); R1 和 R2 的功能为细胞凋亡受体,当结合 TRAIL 后其诱导细胞系启动细胞凋亡,但 R3 和 R4 已知为诱捕受体,其通过抑制 TRAIL 结合 R1 和 R2 而减少 TRAIL- 诱导的细胞凋亡。

[0287] 使用 Trizol 试剂从 Huh7 肝癌细胞系、HAEC(人主动脉内皮细胞, Clonetics) 正常细胞系和 A549 肺癌细胞系(韩国细胞系库)中提取 RNA 进行实时定量 PCR, 使用约 1 μg 提取的 RNA 和反转录酶 SuperScript II (Invitrogen) 进行 cDNA 合成, 基于该模板使用 TIP41 引物、TRAIL-R1(死亡受体 (DR) 4)、TRAIL-R2 (DR5)、TRAIL-R3 (DcR1) 和 TRAIL-R4 (DcR2) 基因。用 2-DDct 比较法通过 PCT 结果确定每种基因的相对表达水平。使用 TIP41 正向引物 (SEQ. ID. NO:3:5'-att gaa agc cag aga aca ga-3') 和 TIP41 反向引物 (SEQ. ID. NO:4:5'-tct cgt gtc att cat tct ga-3')、DR4 正向引物 (SEQ. ID. NO:5:5'-ctc agc gga atc aat cag ctg tg-3')、DR4 反向引物 (SEQ. ID. NO:6:5'-aga gga aca cga caa tca gcc tta g-3')、DR5 正向引物 (SEQ. ID. NO:7:5'-atc aag cgg ccc cct ttt ttt cac-3')、DR5 反向引物 (SEQ. ID. NO:8:5'-ctc att gtc aca ctc ctc gac agc-3')、DcR1 正向引物 (SEQ. ID. NO:9:5'-tcc cca aga ccc taa agt tc-3')、DcR1 反向引物 (SEQ. ID. NO:10:5'-ggc acc aaa ttc ttc aac ac-3')、DcR2 正向引物 (SEQ. ID. NO:11:5'-gca cag agggtg tgg att ac-3') 和 DcR2 反向引物 (SEQ. ID. NO:12:5'-gag cag atg cct ttg agg ta-3') 进行实时定量 PCR。此时, 将写作 β-2-微球蛋白 (B2M) 的正向引物 (SEQ. ID. NO:13:5'-ctc gct ccg tgg cct tag-3') 和反向引物 (SEQ. ID. NO:14:5'-caa atg cgg cat ctt caa-3') 的引物对作为定量对照组, 也进行实时定量 PCR。PCR 条件包括: 约 95°C 变性约 10 分钟, 在约 95°C 约 30 秒、约 60°C 约 30 秒和约 72°C 约 1 分钟的条件下进行约 40 个循环; 此后约 72°C 延伸约 8 分钟, 并冷却至室温。用 2-DDct 比较法分析实时定量 PCR 的结果, 其将每个样品的 TRAIL 受体表达水平调整 (compensate) 为 β-2-微球蛋白 (B2M) 表达水平, 然后将肝癌组织中表达水平与正常肝组织中 TRAIL 受体表达水平的倍数示于图 6 中。

[0288] 结果, 与正常细胞系相比, TRAIL-R3 (DcR1) 在肝癌和肺癌细胞系、TRAIL 抗性癌细胞系中的表达更少, 而 TRAIL-R4 (DcR2) 的表达水平与正常细胞系相似。与正常细胞系相比, TRAIL-R1 (DR4) 在肝癌和肺癌细胞系的表达水平略高, 但其总表达水平较低, 且确定了与正常细胞系相比, TRAIL-R2 (DR5) 在肝癌和肺癌细胞系中过表达。因此, 正如通常所知, 细胞凋亡受体在肝癌和肺癌细胞系的表达较多, 这表明 TRAIL 抗性和该受体的表达之间并无相关性 (图 6A)。

[0289] <6-2> 通过 TRAIL 处理和 TIP41 消耗确认 TRAIL 受体表达

[0290] 为了发现通过敲除 TIP41 蛋白诱导的细胞凋亡和 TRAIL 受体之间的关系, 检测用 TRAIL 和 TIP41 siRNA 处理的 Huh7 肝癌细胞系中 TRAIL 受体的表达水平。将 TIP41 siRNA 转染至 Huh7 肝癌细胞系约 72 小时后, 用约 100ng/ml 的 TRAIL 分别处理 4 和 6 小时。用 TRAIL 处理后, 通过用 Trizol 试剂从 Huh7 肝癌细胞系中提取 RNA 进行实时定量 PCR, 使用约 1 μg 提取的 RNA 和反转录酶 SuperScript II (Invitrogen) 进行 cDNA 合成, 基于该模板使用 TIP41 引物、TRAIL-R1(死亡受体 (DR) 4)、TRAIL-R2 (DR5)、TRAIL-R3 (DcR1) 和 TRAIL-R4 (DcR2) 基因。用 2-DDct 比较法通过 PCT 结果计算每种基因的相对表达水平。

[0291] 如图 6B 所示, 比较 TIP41 siRNA 转染组和对照组后发现, TIP41 蛋白消耗后的 TRAIL 受体表达 (TRAIL-R1、-R2、-R3 和 -R4) 没有显著差异 (图 6B)。

[0292] <6-3> 确认肝癌组织中的 TRAIL 受体表达

[0293] 用反转录酶-PCR 测量肝癌组织和临近组织中的 TRAIL 受体表达水平。该实验所

用的组织术前征得患者同意而收集自韩国首尔的天主教大学 (Catholic University of Medicine); 收集了患者各个肝癌阶段的 19 种组织, 包括肝癌组织和临近的正常组织, 包括 Edmonson 和 Steiner 四级分级法中的 I (n=5)、II (n=5)、III (n=5) 和 IV (n=4)。

[0294] 通过用 Trizol 试剂从 Huh7 肝癌细胞系中提取 RNA 进行实时定量 PCR, 使用约 1  $\mu$ g 提取的 RNA 和反转录酶 SuperScript II (Invitrogen) 进行 cDNA 合成, 基于该模板使用 TIP41 引物、TRAIL-R1 (死亡受体 (DR) 4)、TRAIL-R2 (DR5)、TRAIL-R3 (DcR1) 和 TRAIL-R4 (DcR2) 基因。用 2-DDct 比较法通过 PCT 结果确定每种基因的相对表达水平。

[0295] 结果, 在肝癌阶段 I 观察到 TRAIL-R1 (DR4) 的表达水平显著增加, 随后分别是阶段 III、II、IV; 表达水平差异显著。对于 TRAIL-R2 (DR5), 观察到与正常组织相比, 其在肝癌组织阶段 I 和阶段 V 的表达显著增加, 但 TRAIL-R3 (DcR1) 的表达水平在几乎每个阶段都很低, 且在正常组织和肝癌组织之间没有观察到存在差异。而且, 观察到 TRAIL-R4 (DcR2) 的表达仅在肝癌组织的阶段 II 显著增加; 而在其他阶段其表达水平与正常组织类似, 或甚至在正常组织中表现出更高的表达水平 (图 6C)。

[0296] <实验例 7> 检测正常细胞系中的细胞凋亡

[0297] <7-1> 用 FACS 分析法对通过 TIP41 消耗和 TRAIL 处理的正常细胞系中的细胞凋亡进行分析

[0298] TIP41 特异性地在癌细胞系中过表达, 但其也在正常细胞系中表达; 由于 TIP41 消耗可诱导正常细胞系的细胞凋亡, 这与其在癌细胞系中所发生的一样, 为了确认通过 TIP41 消耗和 TRAIL 处理诱导的细胞凋亡是否为特异性针对癌细胞系的反应, 用 TIP41 蛋白消耗和 TRAIL 处理在正常细胞系 HAEC (人主动脉内皮细胞) 中诱导细胞凋亡。

[0299] 将 TIP41 siRNA 转染至 HAEC 正常细胞系约 72 小时后, 用约 100ng/ml 的 TRAIL 分别处理 0、2、4 和 6 小时以诱导细胞凋亡。采用如上所述的膜联蛋白 V-FITc/PI 染色法分析细胞死亡, 并用 FACS (荧光活化细胞分选器) 测量细胞凋亡。

[0300] 结果发现, TRAIL 处理后无论是否用 TIP41 siRNA 处理, 细胞凋亡均无差异。因此, 用特异性在癌细胞系中过表达的 TIP41 siRNA 转染后, 通过 TRAIL 处理诱导的细胞凋亡特异性地发生于癌细胞系中 (图 7A)。

[0301] <7-2> 分析通过 TIP41 消耗和 TRAIL 处理的正常细胞系中的促凋亡蛋白

[0302] 用同样的实验方法将 TIP41 siRNA 转染至正常细胞系, 检测半胱天冬酶 -8、半胱天冬酶 -3、JNK、PARP 蛋白的活性。用 100ng/ml 的 TRAIL 分别处理正常细胞系 0、2、4 小时, 用如上所述的蛋白质印迹法检测促凋亡蛋白的表达和活性。

[0303] 结果, 确认了 TIP41 siRNA 转染后的 TIP41 蛋白消耗, 对于影响细胞凋亡转导途径的半胱天冬酶 -8、半胱天冬酶 -3、JNK 和 pJNK (磷酸化 JNK) 而言没有发生变化。另外, 通过确定这些蛋白没有被活化, 证实 TIP41 siRNA 转染和 TRAIL 诱导的细胞凋亡特异性地发生于癌细胞系中 (图 7B)。

[0304] <实验例 8> 癌细胞系中通过 TIP41 消耗的 TRAIL 介导的细胞凋亡

[0305] <8-1> 肺癌细胞系中通过 TIP41 消耗的 TRAIL 介导的细胞凋亡

[0306] <8-1-1> 用蛋白质印迹法确认肺癌细胞系中 TIP41 蛋白消耗诱导的细胞凋亡

[0307] 在不同于上述 <实验例> 所用肝癌细胞系的 TRAIL-抗性癌细胞系中, 为了证明其作为敏化剂功能克服由于 TIP41 蛋白消耗导致的 TRAIL 抗性, 用与肝癌细胞系的同样的方



法将 TIP41 siRNA 转染至 A549 细胞系、肺癌细胞系约 72 小时后,用约 100ng/ml 的 TRAIL 分别处理 0、1、2、3 和 4 小时,并用蛋白质印迹法检测与细胞凋亡相关的蛋白的活性。

[0308] 结果,如在肝细胞系中所示,通过 JNK、半胱天冬酶 -8 和 PARP 的活化确认了细胞凋亡,但其弱于肺癌细胞系中的细胞凋亡(图 8a)。

[0309] <8-1-2> 用核染色质染色确认肺癌细胞系中 TIP41 蛋白消耗诱导的细胞凋亡

[0310] 将 TIP41siRNA 转染至 A549 细胞系、肺癌细胞系以消耗细胞中 TIP41 的表达水平,用 100ng/ml 的 TRAIL 处理,并用核染色质染色法分别测量 0、1、2、4 和 6 小时的细胞凋亡率。

[0311] 用 Hoechst 33342 将细胞染色,用荧光显微镜进行细胞凋亡计数。将 TIP41 消耗的细胞系接种到  $2 \times 10^5$  个细胞/孔的 6 孔板。24 小时后,用 100ng/ml 的 TRAIL 分别处理所述细胞 0、1、2、4、6 小时,然后用  $5 \mu\text{g/ml}$  的 Hoechst 33342 于室温染色 30 分钟。在荧光显微镜下观察核染色的细胞,并对死亡细胞计数以测量细胞凋亡率。

[0312] 结果示于图 8b-A 中,其表明与仅用 TRAIL 处理 A549 肺癌细胞系相比,当用 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理 A549 肺癌细胞系时细胞凋亡增加。该观察结果表明用 TRAIL 处理的时间越长,细胞凋亡增加越多。进一步地,与用 siRNA 处理的对照组相比,在用 TIP41siRNA 处理的组中细胞凋亡增加约 30%。因此,确认了 A549 肺癌细胞系的 TIP41 siRNA 减小了 TRAIL- 抗性(图 8b-A)。

[0313] <8-1-3> 用 FACS 分析确认肺癌细胞中通过 TIP41 消耗的 TRAIL- 介导的凋亡的细胞死亡

[0314] 用 TIP41 siRNA 转染 549 细胞以消耗细胞中的 TIP41 表达水平,用 100ng/ml 的 TRAIL 处理死亡细胞系和正常细胞系,在 0、1、2、4、6 小时分别用膜联蛋白 V-FITC/PI 染色,用 FACS(荧光活化细胞分选器)测量细胞凋亡。

[0315] 为了测量细胞凋亡,用胰蛋白酶-EDTA 使细胞胰蛋白酶化,用 FITC 结合的膜联蛋白 v( $50 \mu\text{g/ml}$ ) 和 PI(碘化丙啶)( $50\text{ng/ml}$ ) 染色 20 分钟,然后用 FACS Calibur(BD) 分析计算膜联蛋白 V-FITC/PI 染色的细胞比率。

[0316] 与用对照 siRNA 处理的 A549 细胞(即,肺癌细胞系)相比,本发明用 TIP41 siRNA 处理的 A549 细胞表现出显著增加的 A549 细胞的细胞凋亡(图 8b-B)。进一步地,如图 8b-C 所示,为了检测细胞凋亡,分别用浓度为 0、25、50、100 和 200ng/ml 的 TRAIL 处理细胞 4 小时。结果,观察到在用 TRAIL 和 TIP41 siRNA 二者处理的实例中较高浓度的 TRAIL 增加了细胞凋亡(图 8b-C)。

[0317] 基于上述结果,确认本发明的 TIP41 siRNA 减小了肺癌细胞系的 TRAIL- 抗性,并诱导了癌症特异性细胞凋亡。

[0318] <8-2> 结直肠癌细胞系中通过 TIP41 消耗的 TRAIL- 介导的细胞凋亡

[0319] 用同样的方法将 TIP41 siRNA 转染至 HCT116 结直肠癌细胞系中约 72 小时后,用约 0、50 和 100ng/ml 的 TRAIL 处理,用 0.3%DMSO 作为对照溶剂处理,进行细胞凋亡诱导实验。按上述方法用膜联蛋白 V-FITC/PI 染色法染色死亡细胞,用 FACS 测量细胞死亡。

[0320] 结果确认,细胞凋亡增加与 TRAIL 处理的浓度成正比;与对照组相比, TIP41 siRNA 转染组细胞凋亡增加。因此,通过确定结直肠癌细胞系和肺癌细胞系中的细胞凋亡,确认了 TIP41 蛋白抑制剂可作为 TRAIL 敏化剂用于 TRAIL- 抗性的癌症(图 8a-B)。

[0321] <8-3> 肝癌细胞系中通过 TIP41 消耗的 TRAIL- 介导的细胞凋亡

[0322] 在不同于上述 <实验例> 所用肝癌细胞系的 TRAIL- 抗性癌细胞系中, 为了证明其作为敏化剂功能克服由于 TIP41 蛋白表达抑制导致的 TRAIL 抗性, 将 TIP41 siRNA 转染至 HepG2 (肝细胞) 和 SK-Hep1 细胞中约 72 小时后, 用约 100ng/ml 的 TRAIL 分别处理 0、1、2、4 和 6 小时, 并用蛋白质印迹法检测与细胞凋亡相关的蛋白的活性。

[0323] 如图 8c-A 和 8c-B 中所示, 确认了在 HepG2 和 SK-Hep1 细胞系中具有导致细胞凋亡的半胱天冬酶 -8 和 PARP 的活化作用 (图 8c-A 和 8c-B)。

[0324] <实验例 9> 通过动物实验确认 TIP41 的功能

[0325] <9-1> 将 Huh7 肝癌细胞系移植到裸鼠体内

[0326] 将约  $2 \times 10^6$  个 Huh7 肝癌细胞异种移植至裸鼠的右背部以后, 肿瘤长到一定的大小 ( $50 \sim 100 \text{mm}^3$ )。该实验中每组 7 只小鼠 ( $n=7$ ); 总计 28 只裸鼠购自日本 SLC Inc。

[0327] <9-2> 测量通过 TIP41 消耗和 TRAIL 处理的肿瘤大小变化

[0328] 按照实验例 <9-1> 所述的方法将 Huh7 肝癌细胞系移植至裸鼠并形成肿瘤后, 在 12 天的时间段内, 分别在第 0、4、6 和 8 天将对照 siRNA 和 TIP41 siRNA 注射到所述肿瘤中, 并分别在第 2、5、7、9、10 和 11 天注射 TRAIL, 于第 12 天处死小鼠。用 50nM 浓度的 Lipofectamine (脂质体) RNAiMax 试剂制备药物组合物并注射到肿瘤中; 将约  $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  的 TRAIL 于第 2、5、7、9、10 和 11 天注射以后, 将小鼠分为 4 个不同组 (对照 siRNA+ 对照溶剂, 对照 siRNA+TRAIL, TIP41 siRNA+ 对照溶剂, TIP41 siRNA+TRAIL), 观察 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理后的肿瘤大小。

[0329] 结果观察到, 与对照 siRNA 组相比, 观察到注射 TIP41 siRNA 组的肿瘤减小了, 当注射了 TRAIL 后与对照 siRNA 组相比, TIP41siRNA 处理的肿瘤大小减小的甚至更多 (图 9a)。

[0330] <9-3> 观察癌症组织中的细胞凋亡

[0331] 将小鼠分为无 siRNA 处理组、对照 siRNA 处理组、siRNA 和 TRAIL 处理组, 以及无处理组; 从上述组中分别切离肿瘤后用福尔马林固定, 并用石蜡包埋。制作约  $5 \mu\text{m}$  厚的切片后, 用二甲苯除去石蜡, 并用乙醇浓溶液再水化。用 4% 多聚甲醛溶液处理以固定组织切片, 用蛋白酶 K 溶液处理使组织透明, 将其再次于 4% 聚甲醛溶液中固定后, 用 TUNEL 染色试剂盒 (Promega, 美国) 实施该实验。当用平衡缓冲液平衡所述组织切片时, 制备 rTdT 反应溶液并处理平衡区。最后, 用链霉亲和素 HRP 溶液处理, 用 DAP 混合物进行颜色反应, 然后用光学显微镜观察。

[0332] 结果, 在 TIP41 siRNA 和 TRAIL 处理组观察到大量增加的细胞凋亡 (图 6B)。

[0333] <9-4> 测量肿瘤的细胞凋亡

[0334] 通过溶解来自 4 个组 (对照 siRNA+ 对照溶剂, 对照 siRNA+TRAIL, TIP41 siRNA+ 对照溶剂, TIP41 siRNA+TRAIL) 的肿瘤细胞并提取蛋白后, 通过蛋白质印迹法使用作为细胞凋亡标记的半胱天冬酶 -8 抗体检测细胞凋亡。

[0335] 结果, 通过 TIP41 蛋白表达水平的降低确定了 TIP41 siRNA 的效果, 观察到 TIP41 siRNA 转染后半胱天冬酶 -8 的表达增加, 而通过 TRAIL 处理其并未增加。通过这一点确认 TIP41 siRNA 可应用于活体内, 并可用作抗癌剂, 其具有通过有效地诱导 TRAIL- 抗性癌症的细胞凋亡而克服 TRAIL 抗性的效果 (图 9c)。

[0336] <实验例 10> 测量 TIP41 和 PP2Ac 之间的结合

[0337] <10-1> 构建表达载体

[0338] 为了制备表达 TIP41、PP2Ac、MKK7、 $\alpha$  4 和 PR65 基因的载体,从肝癌细胞中提取 RNA 并克隆到表达载体中。以反向 RNA 为模板,使用对应于每个基因的引物进行 PCR。实施 PCR 使用的引物为:TIP41 正向引物 (SEQ. ID. NO:15:5'-cg ggt acc aa atg atg atc cac ggc ttc'-3') 和 TIP41 反向引物 (SEQ. ID. NO:16:5'-ccc gga tcc tta ttc Cac ttg tgt act-3'), PP2Ac 正向引物 (SEQ. ID. NO:17:5'-cg gga tcc atg gac gag aag gtg ttc-3') 和 PP2Ac 反向引物 (SEQ. ID. NO:18:5'-a tag ttt agc ggc cgc tta cag gaa gta gtc tgg-3'), MKK7 正向引物 (SEQ. ID. NO:19:5'-ccg ctc gag atg gcg gcg tcc tcc ctg-3') 和 MKK7 反向引物 (SEQ. ID. NO:20:5'-gg ggt acc cct gaa gaa ggg cag gtg-3'),  $\alpha$  4 正向引物 (SEQ. ID. NO:21:5'-cg gga tcc atg gct gct gag gac gag-3') 和  $\alpha$  4 反向引物 (SEQ. ID. NO:22:5'-a tag ttt agc ggc cgc tca gcc cat gtt ctg tcg-3'), PR65 正向引物 (SEQ. ID. NO:23:5'-cg gga tcc atg gcg gcg gcc gac ggc-3') 和 PR65 反向引物 (SEQ. ID. NO:24:5'-a tag ttt agc ggc cgc tca gcc gag aga cag aac-3')。PCR 的条件为:95°C 变性 3 分钟,并在 95°C 1 分钟、58°C 1 分钟和 72°C 1 分钟 30 秒的条件下进行 30 个循环;在循环的最后,72°C 延伸约 10 分钟,冷却至 4°C。

[0339] 对于 TIP41 的载体,将提取的 PCR 产物用 KpnI 和 BamHI 限制酶进行酶切,然后插入至 pHA 载体 (pcDNA3.1;由 Invitrogen 公司通过插入 HA 标签制备的载体)。所用引物包括 KpnI 和 BamHI 限制位点。对于 PP2Ac、PR65、MKK7 和  $\alpha$  4,使用包括 Not I 和 BamHI 限制位点的引物进行扩增;纯化 PCR 产物,然后用 Not I 和 BamHI 限制酶进行酶切,并插入至 pGST 载体 (pEBG 载体) 中 (Mayer 等人,1995,现代生物学 (Current Biology) 5(3):296-305)。另外,为了制备重组蛋白,使用上述同样的引物进行 PCR。将 MKK7 和 PP2Ac 的 PCR 产物分别插入至 pET21a (Novagen Inc.) 载体中,其为大肠杆菌 (E. coli) 表达载体,并将 TIP41 的 PCR 产物插入至 pGEX4T-1 (GEhealthcare) 载体。通过该方法构建 pET21-MKK7、pET21-PP2Ac 和 pGEX4T-TIP41。

[0340] <10-2> 培养 HEK293T 细胞系

[0341] 将源自韩国细胞系库的 HEK293T 细胞系在约 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下于含有 10% 胎牛血清的达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM) 中培养。为了转染 siRNA,将 HEK293T 细胞系接种于 1×10<sup>6</sup> 个细胞/100mm 的培养皿并培养约 24 小时;然后完成转染。

[0342] <10-3> 确认 TIP41 和 PP2Ac 之间的结合

[0343] 通过该实验本发明人揭示了由 TIP41 消耗和 TRAIL 处理导致的细胞凋亡是由于连续激活 JNK 的结果,其意味着 TIP41 消耗诱导了 JNK 激活机制。为了确定 JNK 的激活是否由已知结合 TIP41 的蛋白控制,在实验例 <10-1> 中制备表达蛋白磷酸酶 2Ac (PP2Ac) 的表达载体,最近的报道中 PP2Ac 为结合 TIP41 的蛋白。

[0344] PP2Ac 蛋白是一种丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,其功能是去除许多蛋白中磷酸化 Ser/Thr 氨基酸的磷酸。已知 Foxo1、NF- $\kappa$ B (p65)、AMPK 和 MKK4 为 PP2Ac 蛋白的底物。

[0345] 为了确认 TIP41 结合 PP2Ac,将 2×10<sup>5</sup> HEK293T 细胞系接种到 100mm 培养皿中,使用 Lipofectamine LTX 试剂将实验例 <10-1> 制备的 PP2Ac 表达载体转染至细胞中,PP2Ac 过表达。从转染细胞中提取细胞溶解产物并进行 GST- 钓饵 (pull down) 分析。按如下方

式进行 GST- 钓饵分析 :将 40  $\mu$  l GSH- 珠加入至 1mg/ml 细胞溶解产物中,约 4 $^{\circ}$ C 小心搅拌约 12 小时后,加入约 1ml PBST[ 包括 0.1% 吐温 20 的 PBS] 缓冲液进行洗涤,该过程重复 6 次。最后,将 100  $\mu$  l 1 $\times$  样品缓冲液(用于蛋白质印迹法)加入至洗涤后的珠中,在加热器中约 95 $^{\circ}$ C 煮约 5 分钟,于冰上冷却约 2 分钟。然后,使用每一种抗体按上述条件实施蛋白质印迹法。

[0346] 结果,如图 10A 所示,确认了 TIP41 结合 PP2Ac,  $\alpha$  4 是作为阳性对照组而提供的。另外,在进行 GST 钓饵之前通过全细胞溶解产物(WcL)确定每种表达载体的表达水平(图 10A)。

[0347] <10-4> 确认 TIP41 和 PP2Ac 复合体之间的相互作用

[0348] 为了确定 TIP41 和已知为 JNK 激酶的 PP2Ac 之间的结合,将实验例 <10-1> 制备的表达载体按照前述方法转染至 HEK293T 细胞系,并在进行 GST- 钓饵后实施蛋白质印迹法。

[0349] 结果,如图 10B 所示,确认了 TIP41 和 PP2Ac 的结合,以及 PP2Ac、PR65 和  $\alpha$  4 的结合(图 10B)。

[0350] <实验例 11> 确认 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用

[0351] <11-1> 确认 MKK7 过表达后 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用

[0352] 为了确定 TIP41 和已知为 JNK 激酶的 MKK7 之间的结合,将实验例 <10> 制备的表达载体按照同样的方法转染至 HEK293T 细胞系并过表达,然后进行 GST- 钓饵。

[0353] 结果,如图 11A 所示,确认了 TIP41 和 MKK7 的结合(图 11A)。

[0354] <11-2> 用免疫沉淀反应确认 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用

[0355] 为了确定 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用,用每种抗体进行免疫沉淀反应,用蛋白质印迹法确认了 TIP41 和 MKK7 之间的结合。按如下方式实施免疫沉淀反应:将约 2  $\mu$  g 待沉淀的蛋白抗体加入至 1mg 细胞溶解产物中于约 4 $^{\circ}$ C 反应约 2 小时,添加约 30  $\mu$  l Protein G 琼脂糖珠于约 4 $^{\circ}$ C 反应约 12 小时。然后,加入约 1ml PBST[ 包括 0.1% 吐温 20 的 PBS] 缓冲液进行洗涤,该过程重复 4 次。然后,将 100  $\mu$  l 1 $\times$  样品缓冲液(用于蛋白质印迹法)加入至洗涤后的珠中,在加热器中约 95 $^{\circ}$ C 煮约 5 分钟,于冰上冷却约 2 分钟。然后,使用 MKK7 和 TIP41 抗体实施蛋白质印迹法。

[0356] 结果,如图 11B 所示,确认了 TIP41 与 MKK7 的结合(图 11B)。<实验例 12> 确认 TIP41 和 PP2Ac 或 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用

[0357] 为了更准确地确认 TIP41 和 PP2Ac、MKK7 的相互作用,用大肠杆菌中合成的(E. coli) 重组蛋白以 1:1 的反应比例进行 GST- 钓饵分析,不用于 TIP41 和 MKK7 之间的细胞内相互作用。通过将实验例 <10-1> 合成的大肠杆菌表达载体转染至 BL21 大肠杆菌菌株来制备重组蛋白。按如下方式实施诱导:将转染的大肠杆菌接种到 LB 肉汤中培养至 0.4~0.6 OD 水平,然后按最终浓度为 1mM 加入异丙基  $\beta$ -D-1- 硫代半乳糖苷(IPTG),并于 30 $^{\circ}$ C 培养 2 小时。然后,用声波降解法制备溶解产物,以用于 GST- 钓饵。

[0358] 结果,如图 11C 所示,确认了 TIP41 和 MKK7 之间的直接相互作用,也确认了 TIP41 和 PP2Ac 之间的直接相互作用(图 11C)。

[0359] 另外,在实验例 <10-4> 的结果中同样确认了 TIP41 和 PP2Ac、MKK7 之间的相互作用(图 10B)。

[0360] <实验例 13> 确认 TIP41 结合 MKK7 的位点

[0361] 为了确认 TIP41 结合 MKK7 的位点,按照前述<实验例 10>中所述的方法克隆 TIP41 片段表达载体。

[0362] 如图 12A 所示,将全长 TIP41 分为 6 个片段 D1~D6,使用下述引物扩增每个片段并插入到 pHA 表达载体中。PCR 所用引物如下:TIP41-D1 正向引物 (SEQ. ID. NO:15) 和 TIP41-D1 反向引物 (SEQ. ID. NO:25:5'-cg gga tcc cag gct tga aac tcc atg-3'), TIP41-D2 正向引物 (SEQ. ID. NO:15) 和 TIP41-D2 反向引物 (SEQ. ID. NO:26:5'-cg gga tcc g gaa ggt gga aca tgc atc-3'),TIP41-D3 正向引物 (SEQ. ID. NO:27:5'-gg ggt acc atg ctt aaa gtg gcc tgt g-3') 和 TIP41-D3 反向引物 (SEQ. ID. NO:16), TIP41-D4 正向引物 (SEQ. ID. NO:28:5'-cg gga tcc atg ctt aaa gtg gcc tgt-3') 和 TIP41-D4 反向引物 (SEQ. ID. NO:29:5'-ccg ctc gag cag gct tga aac tcc atg-3'), TIP41-D5 正向引物 (SEQ. ID. NO:15) 和 TIP41-D5 反向引物 (SEQ. ID. NO:30:5'-cg gga tcc gtg ttc acc ctc cgt cct-3'),TIP41-D6 正向引物 (SEQ. ID. NO:31:5'-cg gga tcc aaa ttg aaa gcc aga gaa c-3') 和 TIP41-D6 反向引物 (SEQ. ID. NO:16)。

[0363] 为了使表达 D1~D6 的 TIP41 片段的载体过表达,将  $3 \times 10^6$  HEK293T 细胞系接种至 100mm 培养皿中,然后用 Lipofectamine LTX 试剂将克隆的 TIP41D1~D6 片段表达载体转染至细胞中。从转染的细胞中提取细胞溶解产物,并进行 GST- 钓饵分析。按照前述方法进行 GST- 钓饵分析。

[0364] 图 12B 表明与 MKK7 结合的片段分别为全长 TIP41 蛋白、片段 D3 和 D6。因此,确认了 MKK7 与所述 TIP41 蛋白 (SEQ. ID. NO:1) 的 N 末端区位点 230~272 结合 (图 12)。

[0365] <实验例 14> 确认 MKK7 结合 TIP41 的位点

[0366] 为了确定 MKK7 与 TIP41 结合的位点,用前述<实验例 10>中的方法克隆 MKK7 片段表达载体。使用下述引物进行 PCR :MKK7-D1 正向引物 (SEQ. ID. NO:32:5'-cg gga tcc cgc agc atg gag agcatt-3') 和 MKK7-D1 反向引物 (SEQ. ID. NO:20), MKK7-D5 正向引物 (SEQ. ID. NO:33:5'-cg gga tcc gcc ggc tgt gcc gcc tac-3') 和 MKK7-D5 反向引物 (SEQ. ID. NO:20),MKK7-D6 正向引物 (SEQ. ID. NO:19) 和 MKK7-D6 反向引物 (SEQ. ID. NO:34:5'-at agt tta gcg gc cg cta aat gcg ctc ggg gat ggg-3')。如图 13A 所示,全长 MKK7 分为 3 个片段即 D1、D5 和 D6,通过使用上述引物将它们进行扩增并插入至 pGST 表达载体中。

[0367] 为了使表达 D1、D5 和 D6 的 MKK7 片段的载体过表达,将  $3 \times 10^6$  HEK293T 细胞系接种至 100mm 培养皿中,然后用 LipofectamineLTX 试剂将克隆的 MKK7D1、D5 和 D6 的片段表达载体转染至细胞中。从转染的细胞中提取细胞溶解产物,并进行 GST- 钓饵分析。按照前述方法进行 GST- 钓饵分析。

[0368] 结果,如图 13B 所示, MKK7 结合 TIP41 的片段为全长 MKK 蛋白和 D6 片段。因此,确认 TIP41 结合至 MKK7 (SEQ. ID. NO:35) 的 N 末端区 1~85 氨基酸序列 (图 13B)。

[0369] <实验例 15>MKK7/JNK 途径介导的细胞凋亡

[0370] <15-1> 通过 MKK7 消耗减少细胞凋亡

[0371] 为了确认细胞凋亡耐受性是 MKK7 和 TIP41 之间相互作用介导的,检测由抗 MKK7 的 siRNA 导致的细胞凋亡耐受性的减小。

[0372] 将抗 MKK7、TIP41 及二者混合物的 siRNA 引入至 Huh7 肝癌细胞,用 100ng/ml 的 TRAIL 刺激细胞约 0、3 和 6 小时后,通过膜联蛋白 V-FITc/PI 染色法用 FACS 分析测量细胞

凋亡。

[0373] 结果, MKK7 敲除减少了通过 TIP41 消耗和 TRAIL 处理导致的 细胞凋亡。因此, 确认了 MKK7 在 TIP41 蛋白抑制和 TRAIL 处理诱导的细胞凋亡中的重要作用 (图 14A)。

[0374] <15-2> 通过 TIP41 消耗激活 MKK7/JNK 途径

[0375] 为了确认 TIP41 消耗是否直接影响 MKK7 的活性, 及其对 MKK7 信号转导的影响, 进行体外免疫复合激酶分析 (Immune-co-kinase analysis)。免疫复合激酶分析是一种免疫沉淀反应; 其为一种通过在体外沉淀 MKK7 然后定量加入 MKK7 的底物和影响 MKK 信号转导的底物来确定磷酸化水平的实验方法。使用上述的 MKK7 抗体进行免疫沉淀反应后, 获得了结合有 MKK7 蛋白的蛋白 G 微珠, 然后将作为 MKK7 底物的重组 GST-JNK1、作为 JNK1 底物的 GST-c-Jun 和同位素标记物 ( $-^{32}P$ ) 加入至激酶缓冲液并在约 37°C 反应约 30 分钟。然后, 加入 1× 蛋白上样染料并在约 95°C 煮约 5 分钟。在 10%SDS-PAGE 凝胶电泳后, 在凝胶干燥器中干燥凝胶, 然后用 BAS 阅读仪 (辐射测量仪, 日本富士通公司) 进行感光。

[0376] 图 14B 表明 TIP41 消耗、磷酸化的 GST-JNK1 (MKK7 的底物) 和激活的 JNK1 磷酸化 GST-c-jun 蛋白 (JNK 途径的底物) 激活了 MKK7。因此, 证明了 TIP41 蛋白消耗和 TRAIL 处理激活了 MKK7, 而 JNK 转导途径通过其被激活 (图 14B)。

[0377] 下面提供本发明组合物的制备例:

[0378] <制剂例 1> 制备药物制剂

[0379] <1-1> 制备粉剂

[0380] TIP41 蛋白表达或活性抑制剂 2g

[0381] 乳糖 1g

[0382] 将上述成分混合后装入密封袋以制备成粉剂。

[0383] <1-2> 制备片剂

[0384] TIP41 蛋白表达或活性抑制剂 100mg

[0385] 玉米淀粉 100mg

[0386] 乳糖 100mg

[0387] 硬脂酸镁 2mg

[0388] 将上述成分混合后按照常规制备方法压片以制备成片剂。

[0389] <1-3> 制备胶囊剂

[0390] TIP41 蛋白表达或活性抑制剂 100mg

[0391] 玉米淀粉 100mg

[0392] 乳糖 100mg

[0393] 硬脂酸镁 2mg

[0394] 将上述成分混合后按照常规片剂制备方法封装入明胶胶囊中以制备成胶囊剂。

[0395] <1-4> 制备丸剂

[0396] TIP41 蛋白表达或活性抑制剂 1g

[0397] 乳糖 1.5g

[0398] 甘油 1g

[0399] 木糖醇 0.5g

[0400] 将上述成分混合后按照常规方法制备成丸剂, 其中每丸重 4g。

[0401] <1-5> 制备颗粒剂

[0402] TIP41 蛋白表达或活性抑制剂 150mg

[0403] 大豆提取物 50mg

[0404] 葡萄糖 200mg

[0405] 淀粉 600mg

[0406] 将上述成分混合后加入 100mg 的 30% 乙醇,然后在 60℃干燥。制粒后将颗粒装入包装袋中。

[0407] 工业实用性

[0408] 如上所述,当用 TIP41 siRNA 处理 TRAIL- 抗性的肝癌细胞系以抑制表达、然后用 TRAIL 处理时,诱导了癌细胞系的特异性细胞凋亡。同样的效果不仅在 TRAIL- 抗性的肝癌细胞系也在 TRAIL- 抗性的 肺癌和结肠癌细胞系中发现。另外,当小鼠接受癌细胞移植并施予 TIP41 siRNA 和 TRAIL 后,癌细胞大小减小并诱导了癌细胞的细胞凋亡。基于上述所示的效果,本发明的包括 TIP41 表达或活性抑制剂的组合物可用于增强 TRAIL 敏感性或用作预防和治疗的抗癌助剂。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 韩国生命工学研究院

&lt;120&gt; 含有 TIP41 表达或活性抑制剂作为靶基因或 TRAIL 敏化剂的用于增强 TRAIL 敏感性的组合物

&lt;130&gt; KHP12212424.8

&lt;150&gt; KR10-2010-0030004

&lt;151&gt; 2010-01-01

&lt;160&gt; 36

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 272

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人类

&lt;400&gt; 1

Met Met Ile His Gly Phe Gln Ser Ser His Arg Asp Phe Cys Phe Gly  
1                  5                  10                  15

Pro Trp Lys Leu Thr Ala Ser Lys Thr His Ile Met Lys Ser Ala Asp  
                  20                  25                  30

Val Glu Lys Leu Ala Asp Glu Leu His Met Pro Ser Leu Pro Glu Met  
                  35                  40                  45

Met Phe Gly Asp Asn Val Leu Arg Ile Gln His Gly Ser Gly Phe Gly  
                  50                  55                  60

[0002]



Ile Glu Phe Asn Ala Thr Asp Ala Leu Arg Cys Val Asn Asn Tyr Gln  
65 70 75 80

Gly Met Leu Lys Val Ala Cys Ala Glu Glu Trp Gln Glu Ser Arg Thr  
85 90 95

Glu Gly Glu His Ser Lys Glu Val Ile Lys Pro Tyr Asp Trp Thr Tyr  
100 105 110

Thr Thr Asp Tyr Lys Gly Thr Leu Leu Gly Glu Ser Leu Lys Leu Lys  
115 120 125

Val Val Pro Thr Thr Asp His Ile Asp Thr Glu Lys Leu Lys Ala Arg  
130 135 140

Glu Gln Ile Lys Phe Phe Glu Glu Val Leu Leu Phe Glu Asp Glu Leu  
145 150 155 160

His Asp His Gly Val Ser Ser Leu Ser Val Lys Ile Arg Val Met Pro  
165 170 175

Ser Ser Phe Phe Leu Leu Leu Arg Phe Phe Leu Arg Ile Asp Gly Val  
180 185 190

Leu Ile Arg Met Asn Asp Thr Arg Leu Tyr His Glu Ala Asp Lys Thr  
195 200 205

Tyr Met Leu Arg Glu Tyr Thr Ser Arg Glu Ser Lys Ile Ser Ser Leu  
210 215 220

Met His Val Pro Pro Ser Leu Phe Thr Glu Pro Asn Glu Ile Ser Gln  
225 230 235 240

[0003]

Tyr Leu Pro Ile Lys Glu Ala Val Cys Glu Lys Leu Ile Phe Pro Glu  
 245 250 255

Arg Ile Asp Pro Asn Pro Ala Asp Ser Gln Lys Ser Thr Gln Val Glu  
 260 265 270

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TIP4I siRNA

<400> 2

cctaataaaa tatcccagta t

21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TIP4I 正向引物

<400> 3

attgaaagcc agagaacaga

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TIP4I 反向引物

<400> 4

tctcgtgtca ttcattctga

20

[0004]

|       |                             |    |
|-------|-----------------------------|----|
| <210> | 5                           |    |
| <211> | 23                          |    |
| <212> | DNA                         |    |
| <213> | 人工序列                        |    |
| <220> |                             |    |
| <223> | DR4 正向引物                    |    |
| <400> | 5                           |    |
|       | ctcagcggaa tcaatcagct gtg   | 23 |
| <210> | 6                           |    |
| <211> | 25                          |    |
| <212> | DNA                         |    |
| <213> | 人工序列                        |    |
| <220> |                             |    |
| <223> | DR4 反向引物                    |    |
| <400> | 6                           |    |
|       | agaggaacac gacaatcagc cttag | 25 |
| <210> | 7                           |    |
| <211> | 24                          |    |
| <212> | DNA                         |    |
| <213> | 人工序列                        |    |
| <220> |                             |    |
| <223> | DR5 正向引物                    |    |
| <400> | 7                           |    |
|       | atcaageggc cccctttttt teac  | 24 |
| <210> | 8                           |    |
| <211> | 24                          |    |
| <212> | DNA                         |    |
| <213> | 人工序列                        |    |
| <220> |                             |    |

[0005]

|                            |    |
|----------------------------|----|
| <223> DR5 反向引物             |    |
| <400> 8                    |    |
| ctcattgtea cactcctcga cagc | 24 |
| <210> 9                    |    |
| <211> 20                   |    |
| <212> DNA                  |    |
| <213> 人工序列                 |    |
| <220>                      |    |
| <223> DcR1 正向引物            |    |
| <400> 9                    |    |
| tccccaagac cctaaagttc      | 20 |
| <210> 10                   |    |
| <211> 20                   |    |
| <212> DNA                  |    |
| <213> 人工序列                 |    |
| <220>                      |    |
| <223> DcR1 反向引物            |    |
| <400> 10                   |    |
| ggcaccaaat tcttaacac       | 20 |
| <210> 11                   |    |
| <211> 20                   |    |
| <212> DNA                  |    |
| <213> 人工序列                 |    |
| <220>                      |    |
| <223> DcR2 正向引物            |    |
| <400> 11                   |    |
| gcacagaggg tgtggattac      | 20 |
| <210> 12                   |    |
| <211> 20                   |    |

[0006]

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| <212> DNA                      |    |
| <213> 人工序列                     |    |
| <220>                          |    |
| <223> DcR2 反向引物                |    |
| <400> 12                       |    |
| gagcagatgc ctttgaggta          | 20 |
| <210> 13                       |    |
| <211> 18                       |    |
| <212> DNA                      |    |
| <213> 人工序列                     |    |
| <220>                          |    |
| <223> $\beta$ -2 微球蛋白正向引物      |    |
| <400> 13                       |    |
| ctcgcctcgt ggccttag            | 18 |
| <210> 14                       |    |
| <211> 18                       |    |
| <212> DNA                      |    |
| <213> 人工序列                     |    |
| <220>                          |    |
| <223> $\beta$ -2 微球蛋白反向引物      |    |
| <400> 14                       |    |
| caaatggeg c atcttcaa           | 18 |
| <210> 15                       |    |
| <211> 28                       |    |
| <212> DNA                      |    |
| <213> 人工序列                     |    |
| <220>                          |    |
| <223> 用于克隆的 TIP41 正向引物         |    |
| <400> 15                       |    |
| cgggtaccaa atgatgatcc acggettc | 28 |

[0007]

|       |                                       |    |
|-------|---------------------------------------|----|
| <210> | 16                                    |    |
| <211> | 27                                    |    |
| <212> | DNA                                   |    |
| <213> | 人工序列                                  |    |
| <220> |                                       |    |
| <223> | 用于克隆的 TIP41 反向引物                      |    |
| <400> | 16                                    |    |
|       | cccggatcct tattccactt gtgtact         | 27 |
| <210> | 17                                    |    |
| <211> | 26                                    |    |
| <212> | DNA                                   |    |
| <213> | 人工序列                                  |    |
| <220> |                                       |    |
| <223> | 用于克隆的 PP2Ac 正向引物                      |    |
| <400> | 17                                    |    |
|       | cgggateccat ggacgagaag gtgttc         | 26 |
| <210> | 18                                    |    |
| <211> | 34                                    |    |
| <212> | DNA                                   |    |
| <213> | 人工序列                                  |    |
| <220> |                                       |    |
| <223> | 用于克隆的 PP2Ac 反向引物                      |    |
| <400> | 18                                    |    |
|       | atagtttagc ggccgcttac aggaagtagt ctgg | 34 |
| <210> | 19                                    |    |
| <211> | 27                                    |    |
| <212> | DNA                                   |    |
| <213> | 人工序列                                  |    |
| <220> |                                       |    |

[0008]

|  |   |
|--|---|
| <p>&lt;223&gt; 用于克隆的 MKK7 正向引物</p> <p>&lt;400&gt; 19<br/>ccgctcgaga tggcggcgte cteectg</p> <p>&lt;210&gt; 20<br/>&lt;211&gt; 26<br/>&lt;212&gt; DNA<br/>&lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt;<br/>&lt;223&gt; 用于克隆的 MKK7 反向引物</p> <p>&lt;400&gt; 20<br/>gggtacccc tgaagaaggg caggtg</p> <p>&lt;210&gt; 21<br/>&lt;211&gt; 26<br/>&lt;212&gt; DNA<br/>&lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt;<br/>&lt;223&gt; 用于克隆的 alpha4 正向引物</p> <p>&lt;400&gt; 21<br/>cgggatccat ggctgctgag gaagag</p> <p>&lt;210&gt; 22<br/>&lt;211&gt; 34<br/>&lt;212&gt; DNA<br/>&lt;213&gt; 人工序列</p> <p>&lt;220&gt;<br/>&lt;223&gt; 用于克隆的 alpha4 反向引物</p> <p>&lt;400&gt; 22<br/>atagtttagc ggcgcgctcag cccatgttct gtcg</p> <p>&lt;210&gt; 23<br/>&lt;211&gt; 26</p> | <p>27</p> <p>26</p> <p>26</p> <p>26</p> <p>34</p> |
|--|---|

[0009]

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| <212> DNA                             |    |
| <213> 人工序列                            |    |
| <220>                                 |    |
| <223> PR65 正向引物                       |    |
| <400> 23                              |    |
| egggateccat ggcgggcgcc gaeggc         | 26 |
| <210> 24                              |    |
| <211> 34                              |    |
| <212> DNA                             |    |
| <213> 人工序列                            |    |
| <220>                                 |    |
| <223> PR65 反向引物                       |    |
| <400> 24                              |    |
| atagtttagc ggccgctcag gcgagagaca gaac | 34 |
| <210> 25                              |    |
| <211> 26                              |    |
| <212> DNA                             |    |
| <213> 人工序列                            |    |
| <220>                                 |    |
| <223> 用于克隆的 TIP41-D1 反向引物             |    |
| <400> 25                              |    |
| egggatccca ggettgaaac tccatg          | 26 |
| <210> 26                              |    |
| <211> 27                              |    |
| <212> DNA                             |    |
| <213> 人工序列                            |    |
| <220>                                 |    |
| <223> 用于克隆的 TIP41-D2 反向引物             |    |
| <400> 26                              |    |
| cgggatccgg aaggtggaac atgcac          | 27 |

[0010]



|       |                               |    |
|-------|-------------------------------|----|
| <210> | 27                            |    |
| <211> | 27                            |    |
| <212> | DNA                           |    |
| <213> | 人工序列                          |    |
| <220> |                               |    |
| <223> | 用于克隆的 TIP41-D3 正向引物           |    |
| <400> | 27                            |    |
|       | ggggtaccat gcttaaagtg gcctgtg | 27 |
| <210> | 28                            |    |
| <211> | 26                            |    |
| <212> | DNA                           |    |
| <213> | 人工序列                          |    |
| <220> |                               |    |
| <223> | 用于克隆的 TIP41-D4 正向引物           |    |
| <400> | 28                            |    |
|       | cgggateccat gcttaaagtg gcctgt | 26 |
| <210> | 29                            |    |
| <211> | 27                            |    |
| <212> | DNA                           |    |
| <213> | 人工序列                          |    |
| <220> |                               |    |
| <223> | 用于克隆的 TIP41-D4 反向引物           |    |
| <400> | 29                            |    |
|       | ccgctcgagc aggcttgaaa ctccatg | 27 |
| <210> | 30                            |    |
| <211> | 26                            |    |
| <212> | DNA                           |    |
| <213> | 人工序列                          |    |
| <220> |                               |    |

[0011]

- <223> 用于克隆的 TIP41-D5 反向引物
- <400> 30  
 cgggatccgt gttcacccctc cgtect 26
- <210> 31  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 用于克隆的 TIP41-D6 正向引物
- <400> 31  
 cgggatccaa attgaaagec agagaac 27
- <210> 32  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 用于克隆的 MKK7-D1 正向引物
- <400> 32  
 cgggatcccc cagcatggag agcatt 26
- <210> 33  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列
- <220>  
 <223> 用于克隆的 MKK7-D5 正向引物
- <400> 33  
 cgggatccgc cggetgtgcc gectac 26
- <210> 34  
 <211> 36

[0012]

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用于克隆的 MKK7-D6 反向引物

<400> 34

atagtttagc ggccgctaaa tgcgctcggg gatggg

36

<210> 35

<211> 419

<212> PRT

<213> 人类

<400> 35

Met Ala Ala Ser Ser Leu Glu Gln Lys Leu Ser Arg Leu Glu Ala Lys  
1                    5                    10                    15

Leu Lys Gln Glu Asn Arg Glu Ala Arg Arg Arg Ile Asp Leu Asn Leu  
                  20                    25                    30

Asp Ile Ser Pro Gln Arg Pro Arg Pro Thr Leu Gln Leu Pro Leu Ala  
                  35                    40                    45

Asn Asp Gly Gly Ser Arg Ser Pro Ser Ser Glu Ser Ser Pro Gln His  
                  50                    55                    60

Pro Thr Pro Pro Ala Arg Pro Arg His Met Leu Gly Leu Pro Ser Thr  
65                    70                    75                    80

Leu Phe Thr Pro Arg Ser Met Glu Ser Ile Glu Ile Asp Gln Lys Leu  
                  85                    90                    95

Gln Glu Ile Met Lys Gln Thr Gly Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Gln Arg  
                  100                    105                    110

[0013]

Tyr Gln Ala Glu Ile Asn Asp Leu Glu Asn Leu Gly Glu Met Gly Ser  
 115 120 125

Gly Thr Cys Gly Gln Val Trp Lys Met Arg Phe Arg Lys Thr Gly His  
 130 135 140

Val Ile Ala Val Lys Gln Met Arg Arg Ser Gly Asn Lys Glu Glu Asn  
 145 150 155 160

Lys Arg Ile Leu Met Asp Leu Asp Val Val Leu Lys Ser His Asp Cys  
 165 170 175

Pro Tyr Ile Val Gln Cys Phe Gly Thr Phe Ile Thr Asn Thr Asp Val  
 180 185 190

Phe Ile Ala Met Glu Leu Met Gly Thr Cys Ala Glu Lys Leu Lys Lys  
 195 200 205

Arg Met Gln Gly Pro Ile Pro Glu Arg Ile Leu Gly Lys Met Thr Val  
 210 215 220

Ala Ile Val Lys Ala Leu Tyr Tyr Leu Lys Glu Lys His Gly Val Ile  
 225 230 235 240

His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu Leu Asp Glu Arg Gly Gln  
 245 250 255

Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ile Ser Gly Arg Leu Val Asp Ser Lys  
 260 265 270

Ala Lys Thr Arg Ser Ala Gly Cys Ala Ala Tyr Met Ala Pro Glu Arg  
 275 280 285

[0014]

Ile Asp Pro Pro Asp Pro Thr Lys Pro Asp Tyr Asp Ile Arg Ala Asp  
 290 295 300

Val Trp Ser Leu Gly Ile Ser Leu Val Glu Leu Ala Thr Gly Gln Phe  
 305 310 315 320

Pro Tyr Lys Asn Cys Lys Thr Asp Phe Glu Val Leu Thr Lys Val Leu  
 325 330 335

Gln Glu Glu Pro Pro Leu Leu Pro Gly His Met Gly Phe Ser Gly Asp  
 340 345 350

Phe Gln Ser Phe Val Lys Asp Cys Leu Thr Lys Asp His Arg Lys Arg  
 355 360 365

Pro Lys Tyr Asn Lys Leu Leu Glu His Ser Phe Ile Lys Arg Tyr Glu  
 370 375 380

Thr Leu Glu Val Asp Val Ala Ser Trp Phe Lys Asp Val Met Ala Lys  
 385 390 395 400

Thr Glu Ser Pro Arg Thr Ser Gly Val Leu Ser Gln Pro His Leu Pro  
 405 410 415

Phe Phe Arg

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

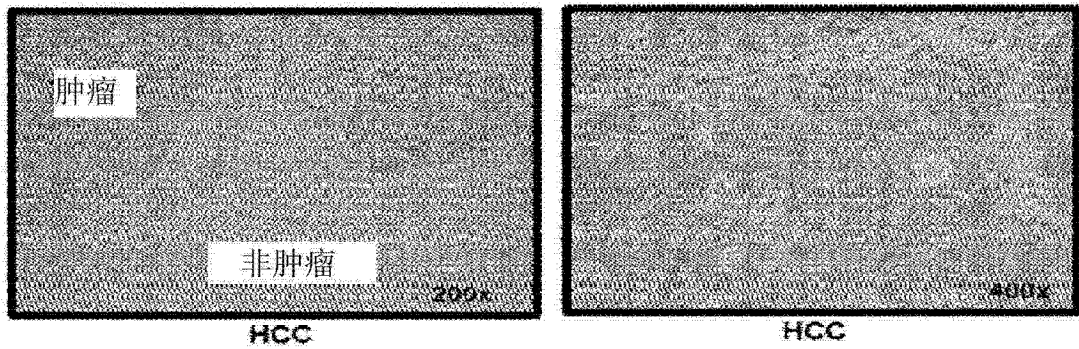
<223> MKK7 siRNA

[0015]

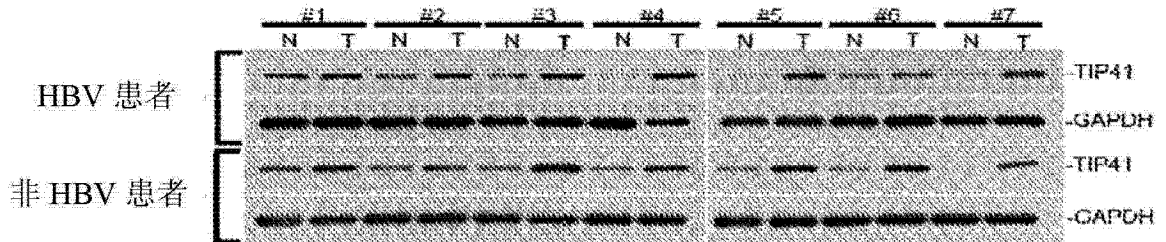
<400> 36

taagctactt gaacacagc

19

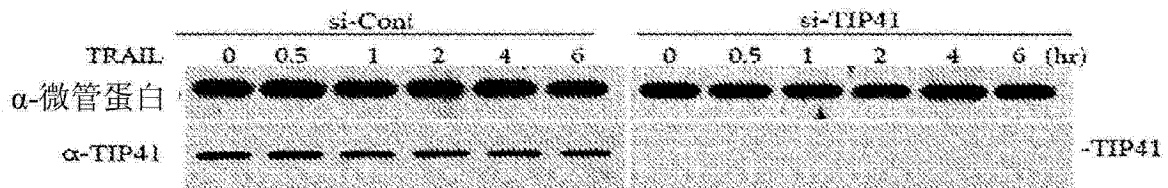


A. 确认在肝癌临床组织中蛋白表达增加



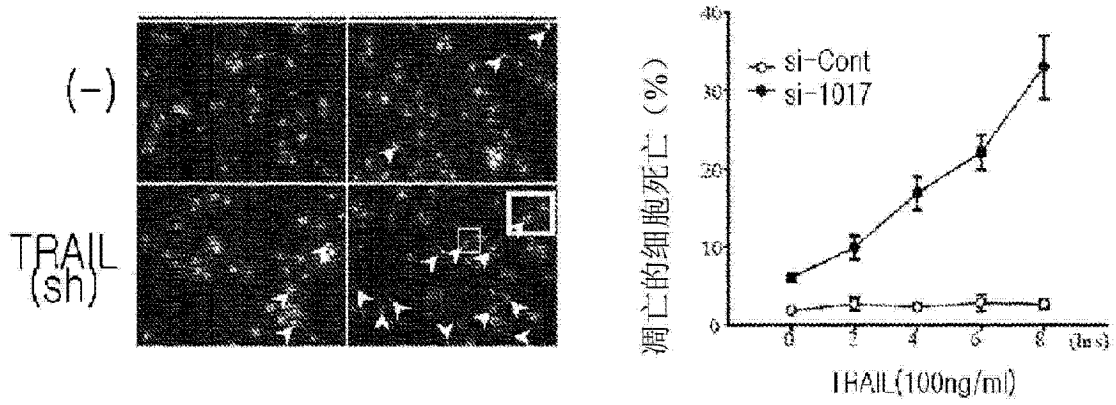
HBV: 乙型肝炎病毒 N: 人肝脏正常组织 T: 人肝脏肿瘤组织 #: 患者数

B. 确认在肝癌临床组织中蛋白表达增加(蛋白质印迹法)

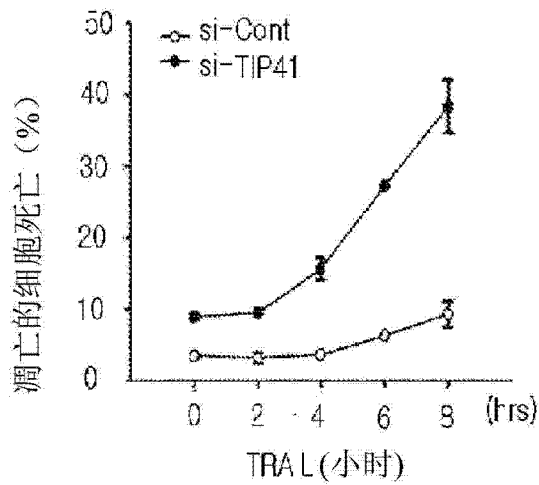


C. 确认通过 siRNA 的 TIP41 蛋白表达抑制(蛋白质印迹法)

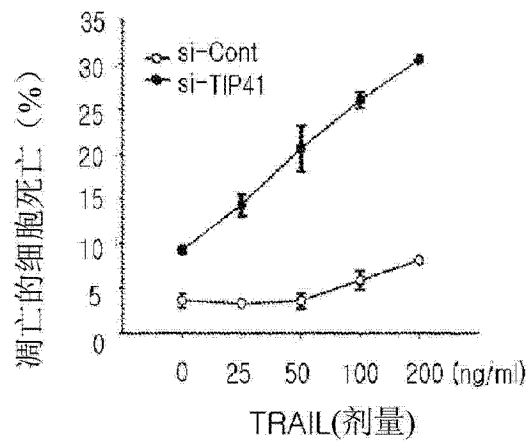
图 1



A. TRAIL 处理的 TIP41 抑制和肝癌细胞系细胞凋亡-TRAIL 处理不同时间段 (使用 heochst 33342 染料进行核染色的荧光显微镜分析)



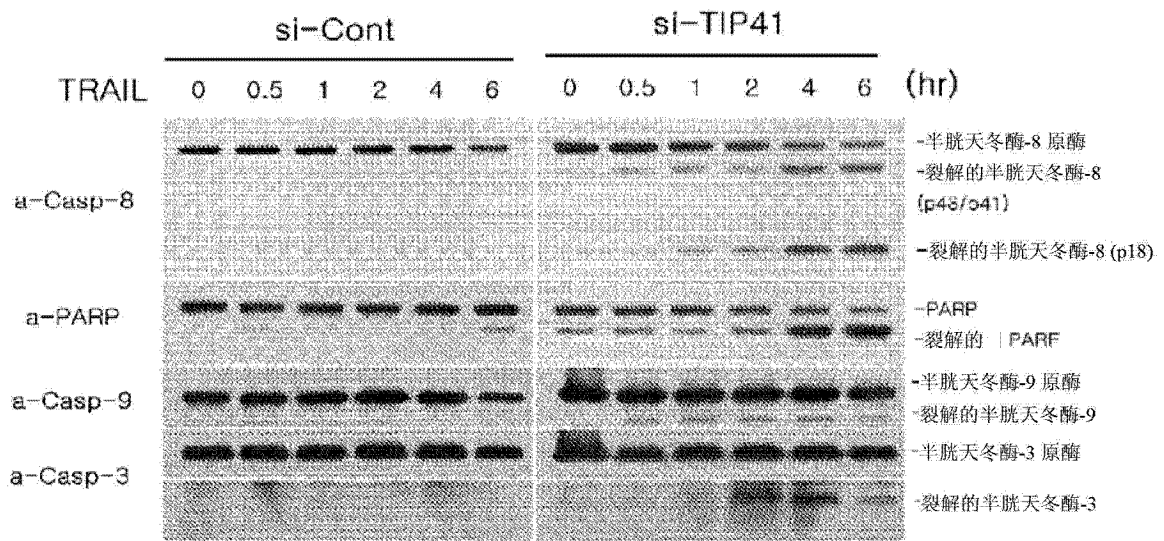
B. TRAIL 处理的 TIP41 抑制和肝癌细胞系细胞凋亡-TRAIL 处理不同时间段 (使用膜联蛋白 V-FITC/PI 染色法的 FACS 分析法)



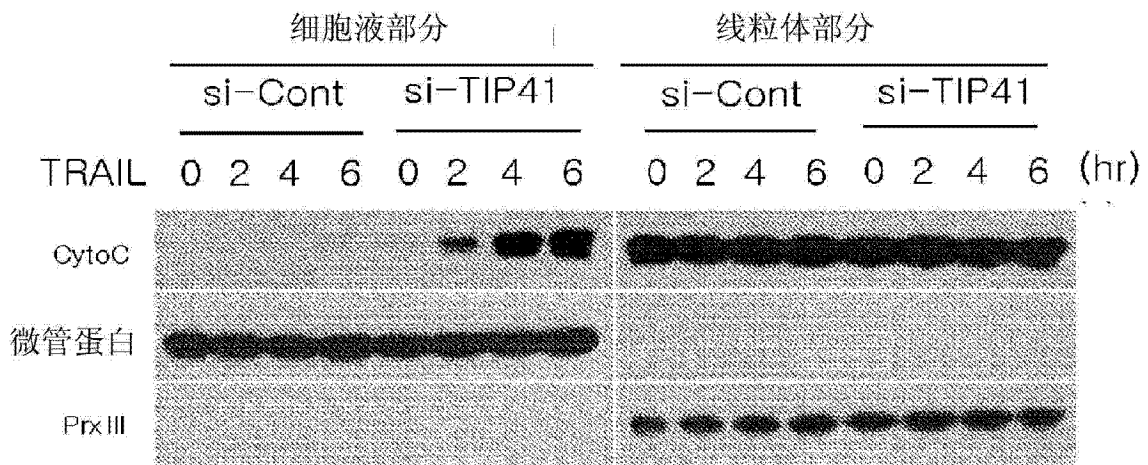
C. TRAIL 处理的 TIP41 抑制和肝癌细胞系细胞凋亡-不同浓度 TRAIL 的 TRAIL 处理 (使用膜联蛋白 V-FITC/PI 染色法的 FACS 分析法)

图 2



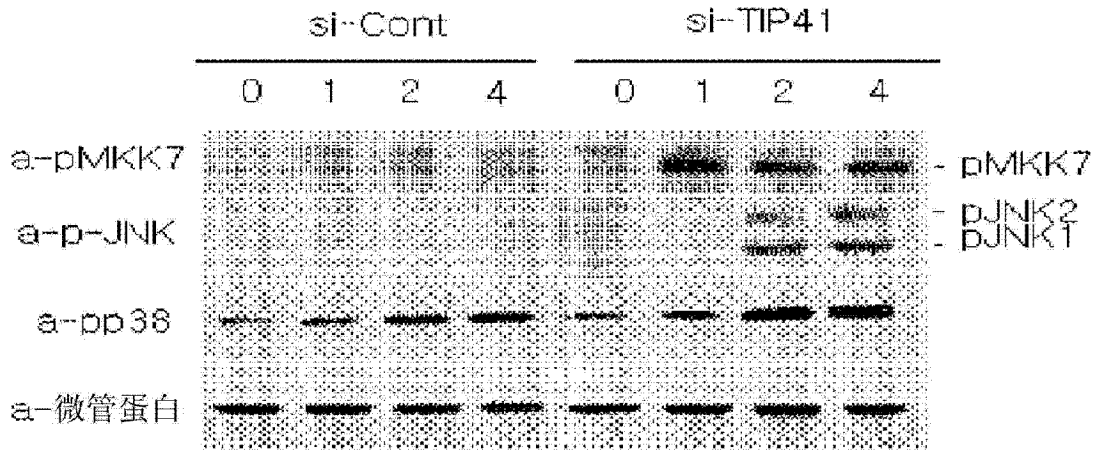


A. 半胱天冬酶级联激活

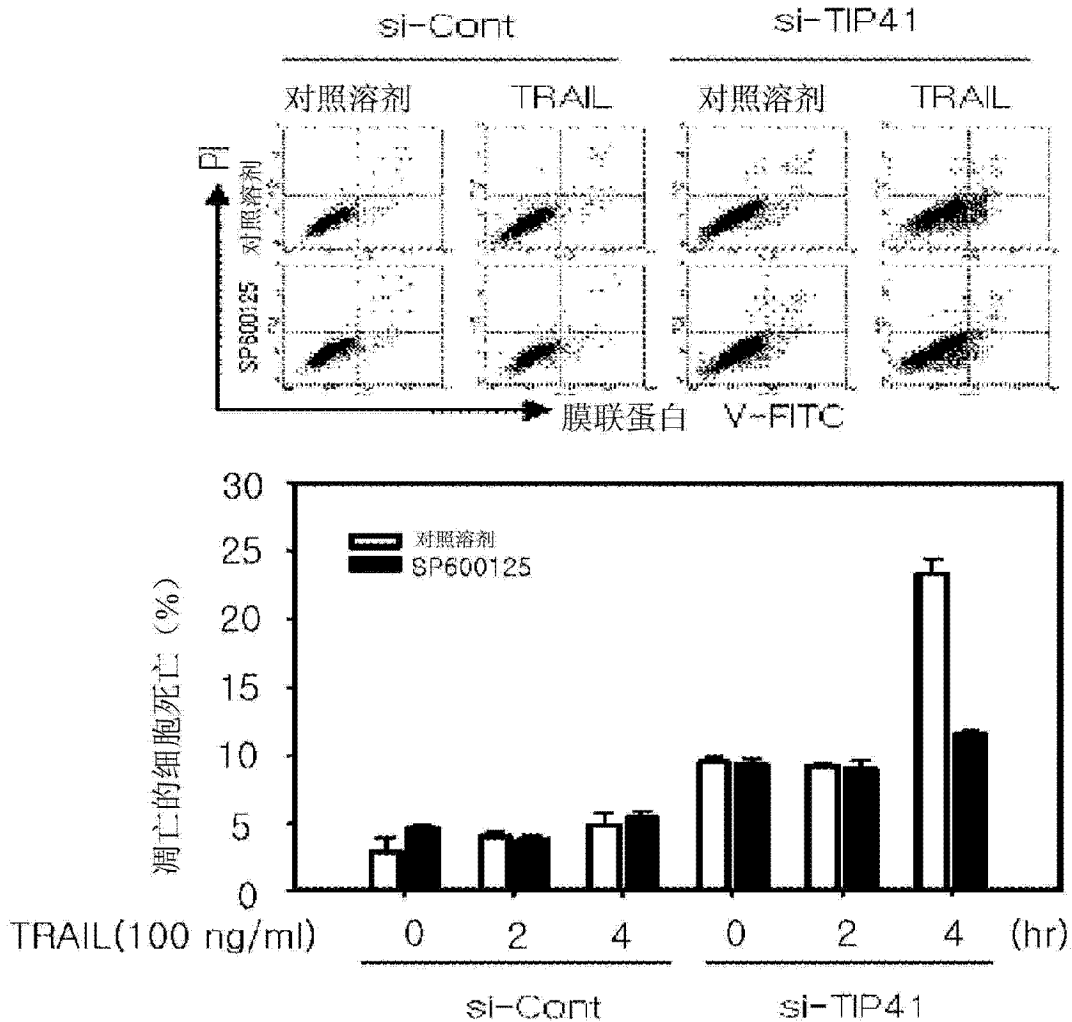


B. 线粒体-细胞色素 C 释放

图 3

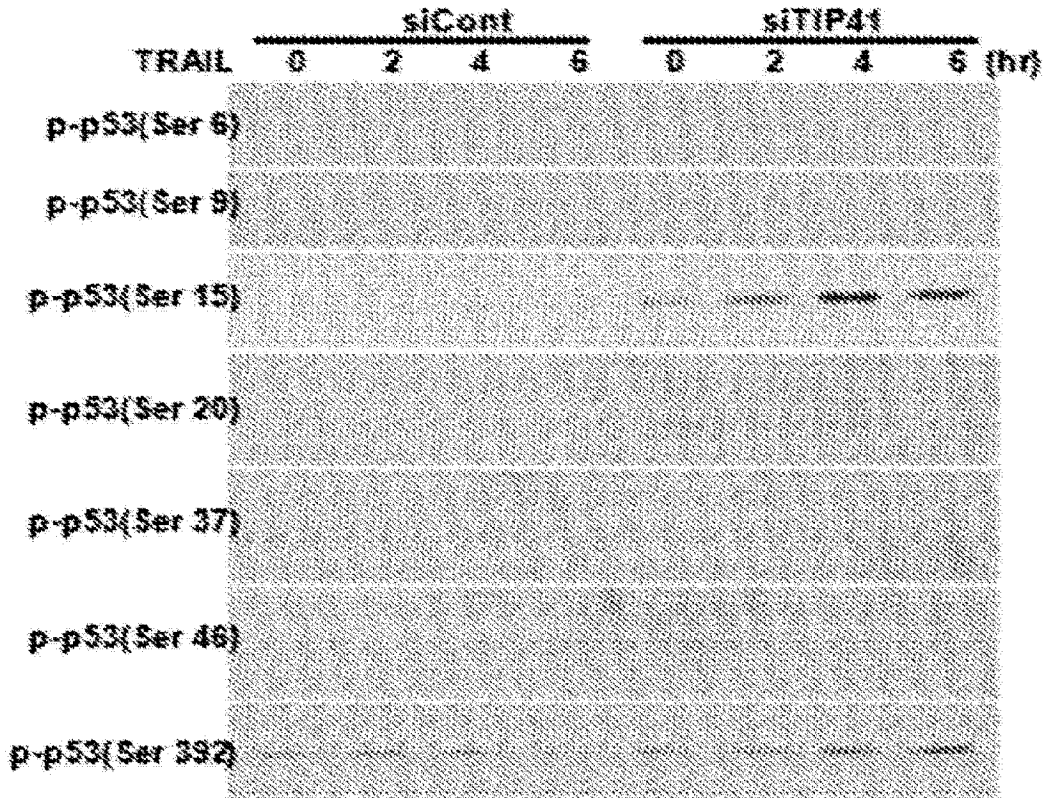


A. 由 TIP41 抑制导致的 JNK 激活

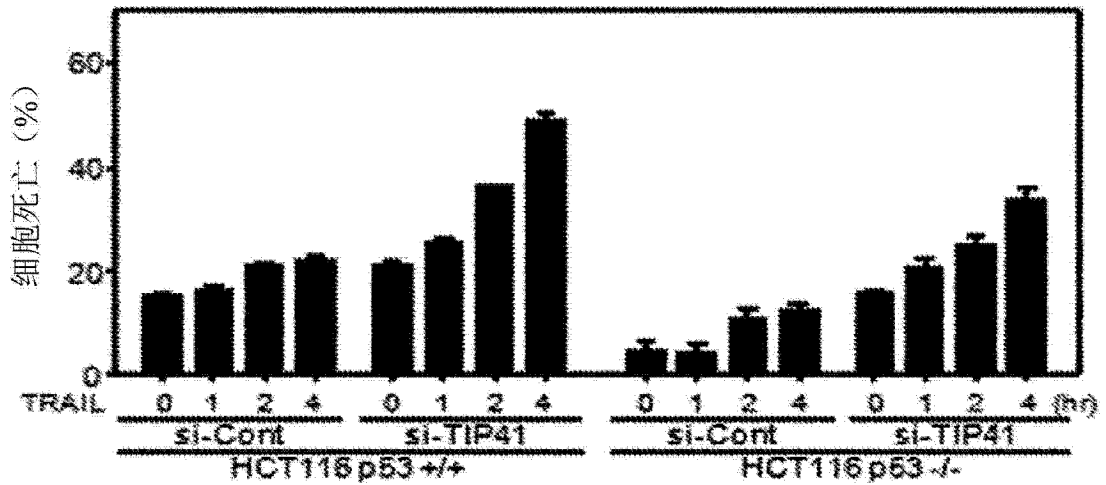


B. 由 JNK 抑制剂导致的细胞凋亡减少

图 4

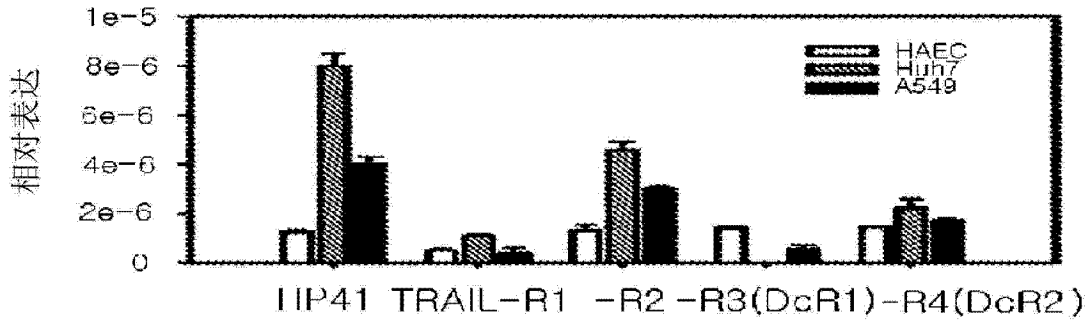


A. 由 TIP41 消耗导致的 p53-非依赖性细胞凋亡

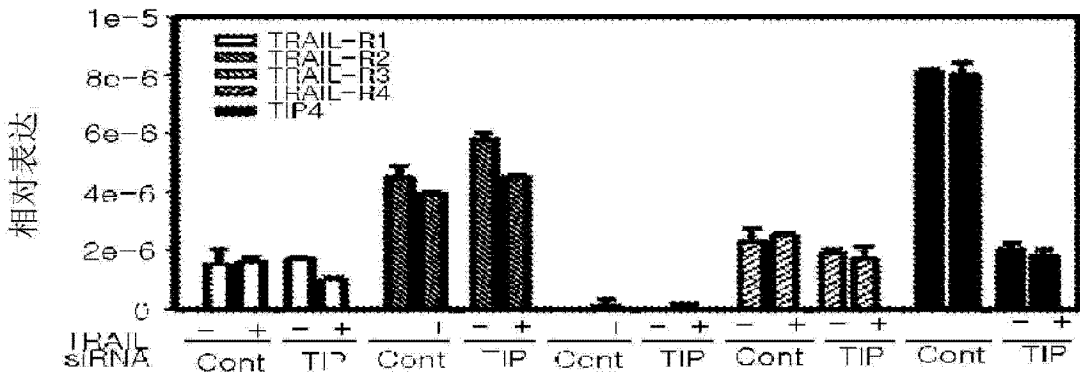


B. 使用 p53-缺陷细胞的细胞凋亡

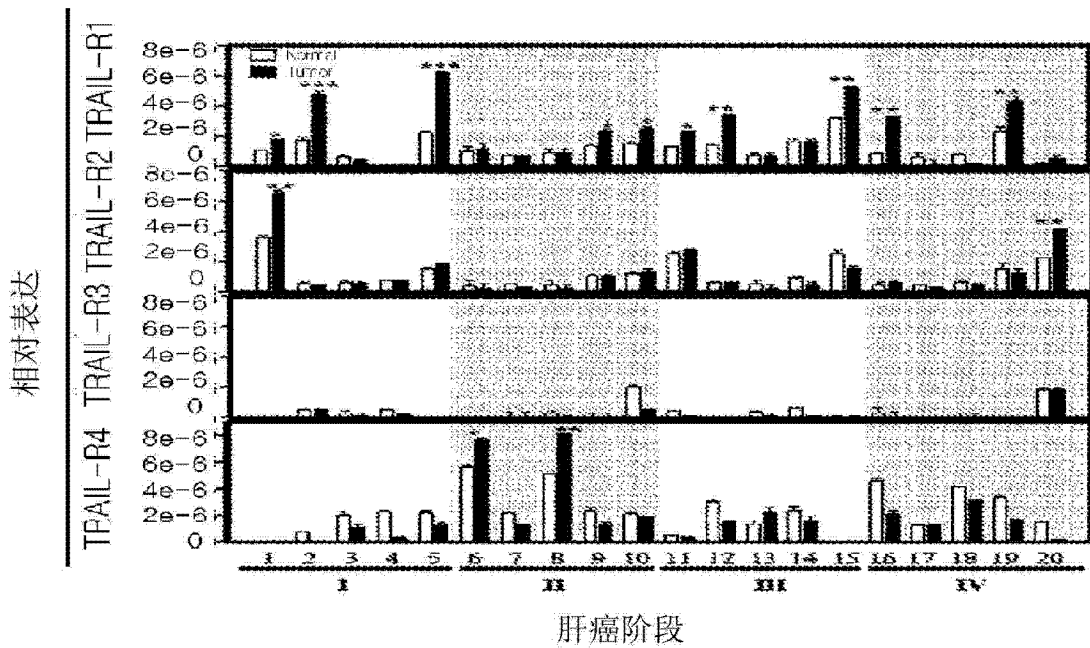
图 5



A. 确认对于每种细胞系的 TRAIL 受体的表达

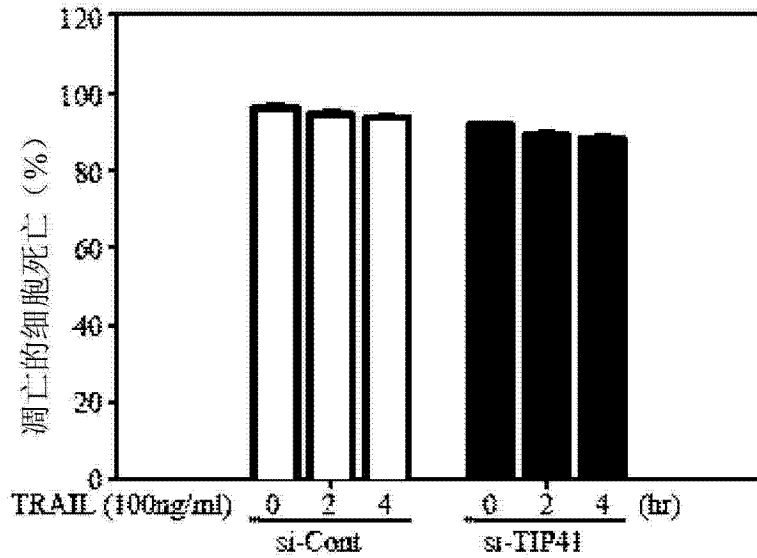


B. 确认由 TIP 抑制和 TRAIL 处理导致的 TRAIL 受体的表达

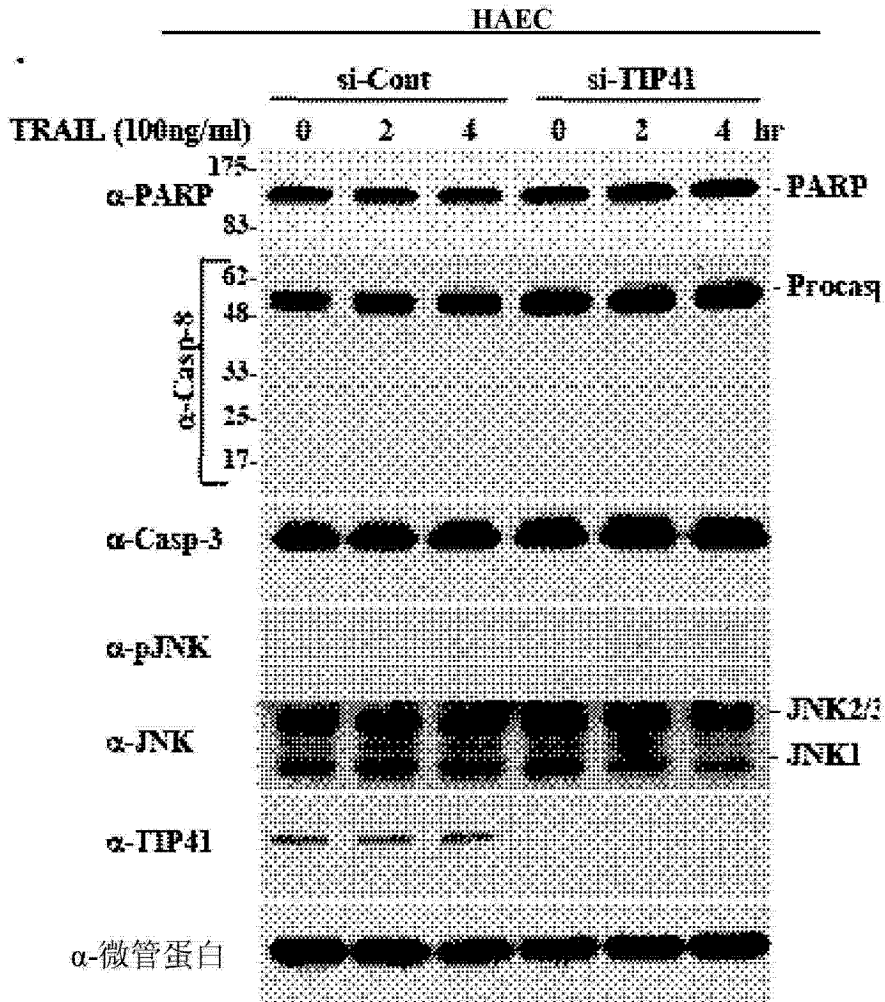


C. 确认对于每种肝癌临床组织的 TRAIL 受体的表达

图 6

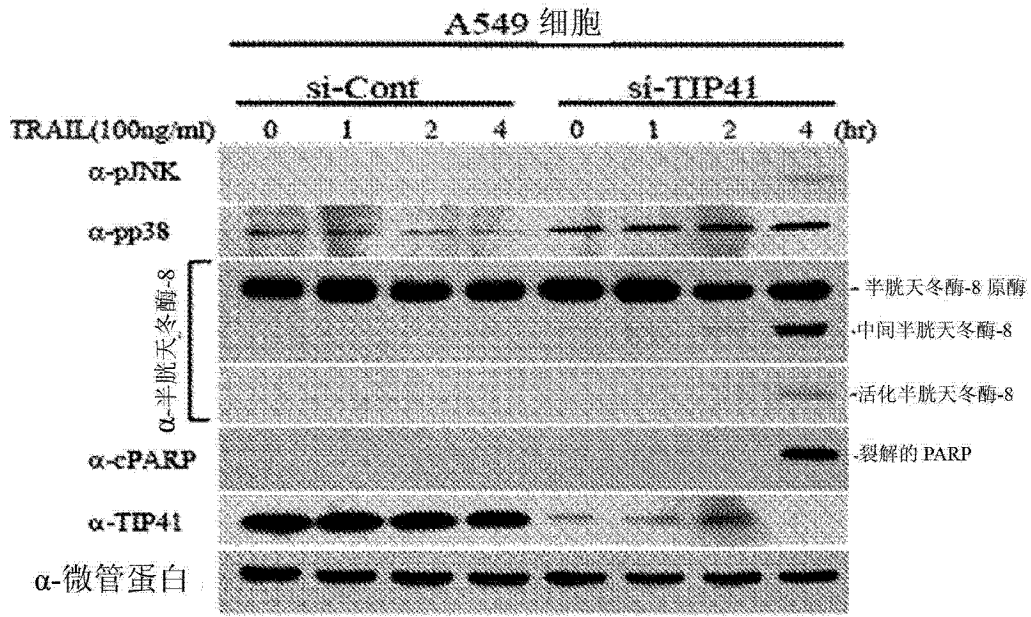


A. 人主动脉内皮细胞(HAEC)

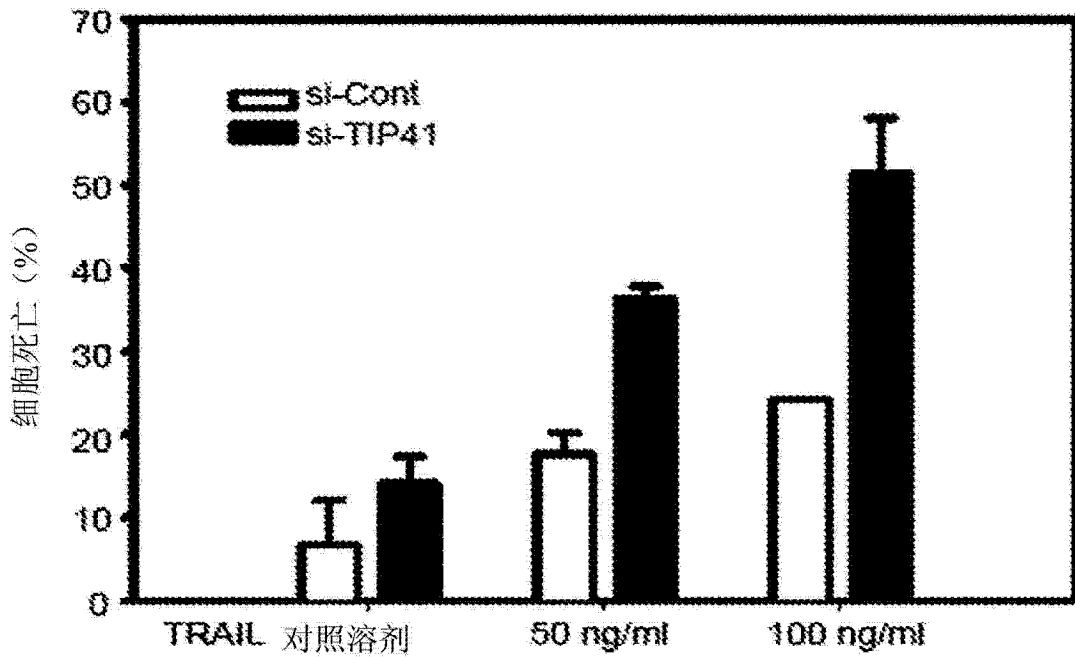


B. 人主动脉内皮细胞(HAEC)

图 7



A. 肺癌-A549



B. 结肠癌-HCT116

图 8a

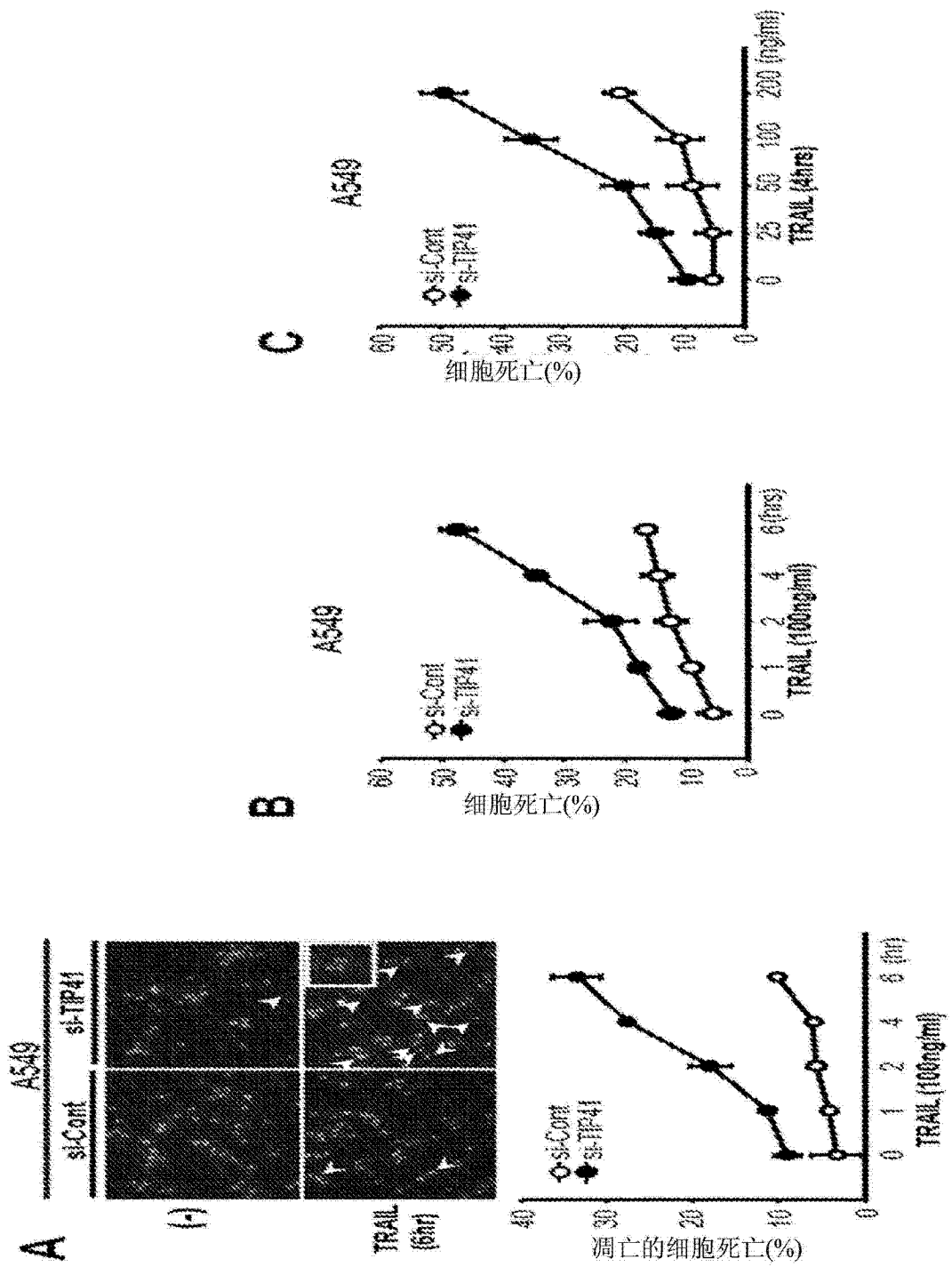
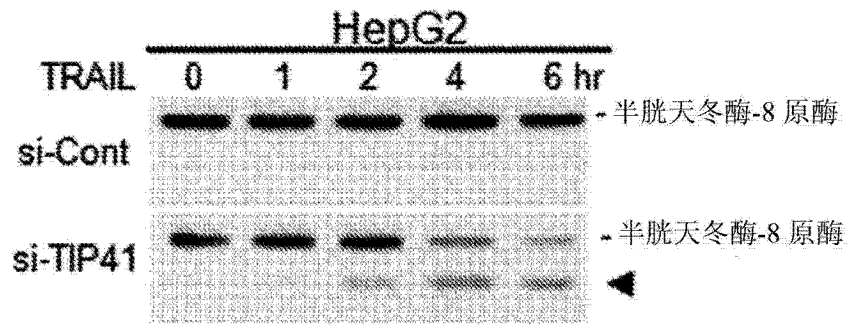


图 8b

**A**



**B**

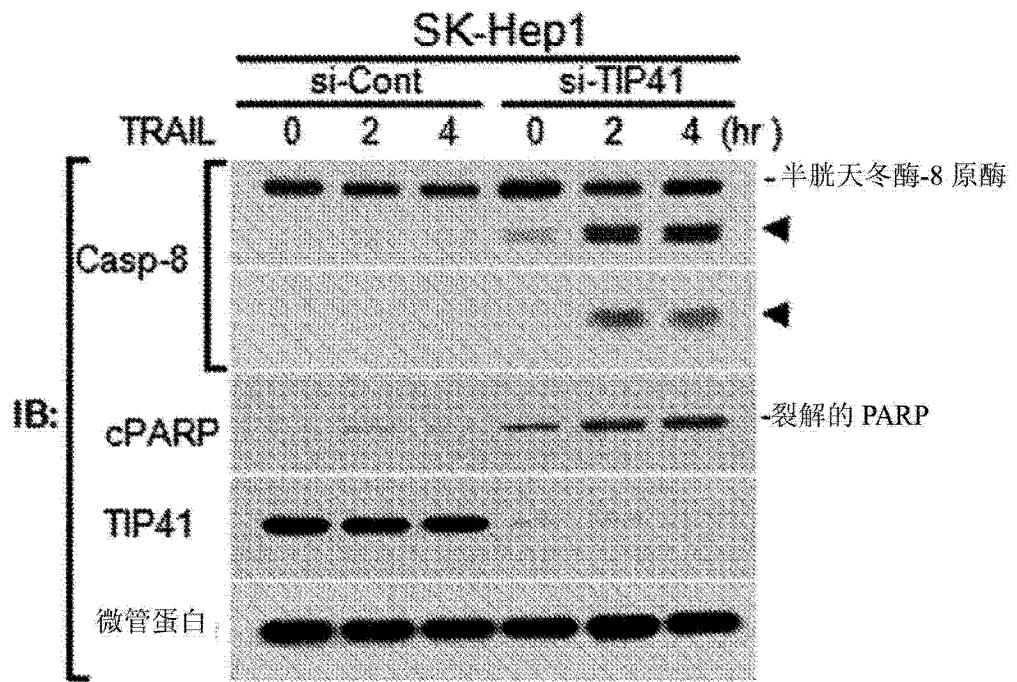


图 8c



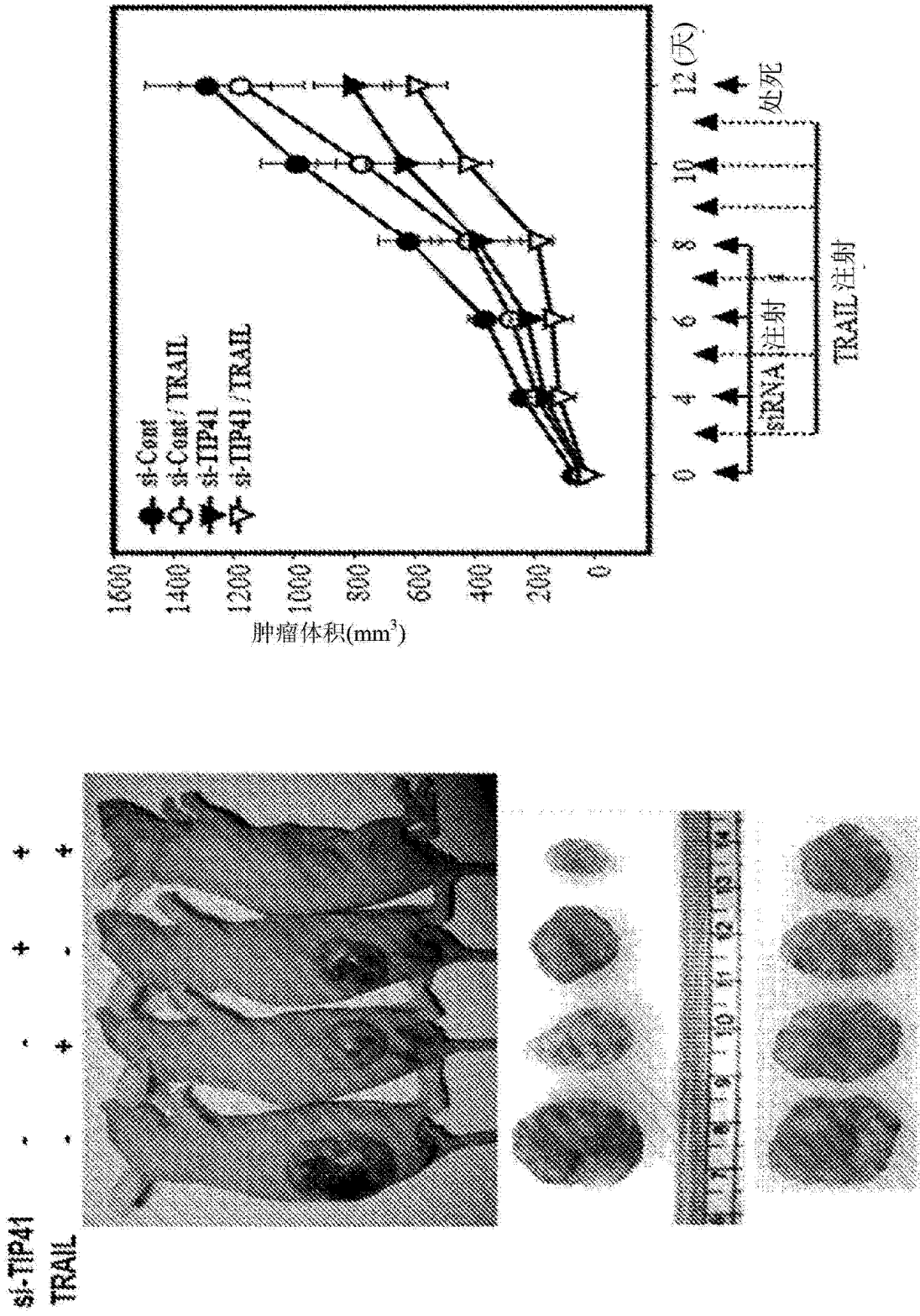


图 9a

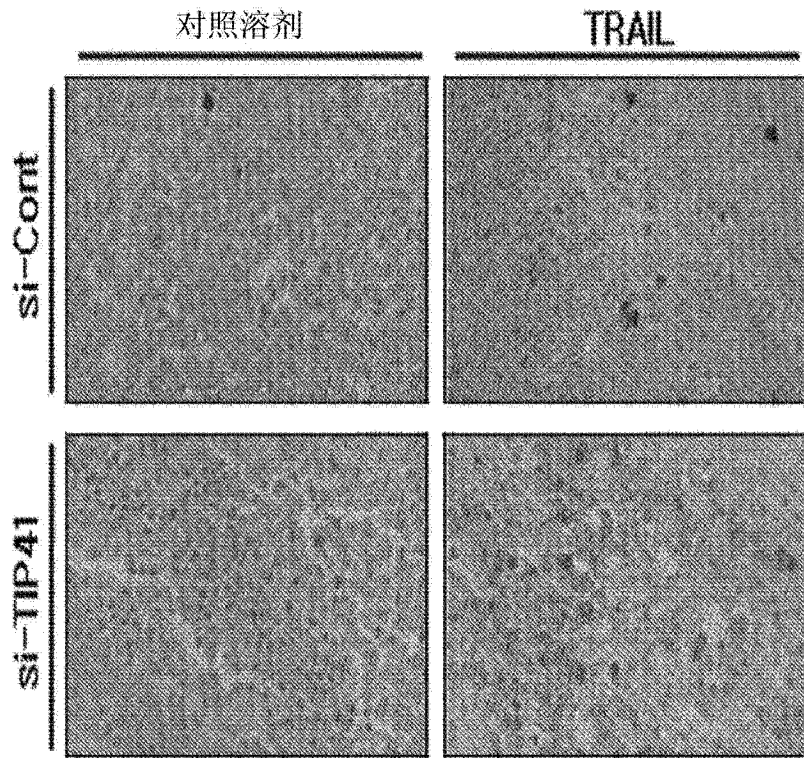


图 9b

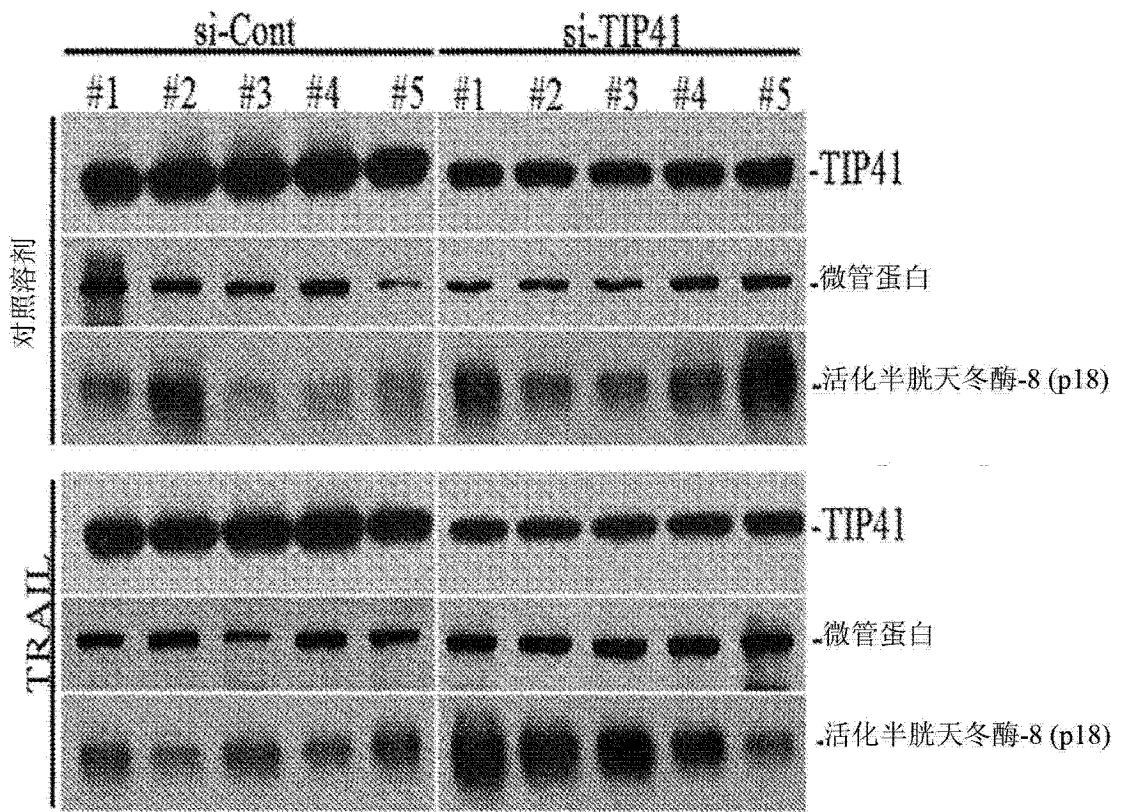
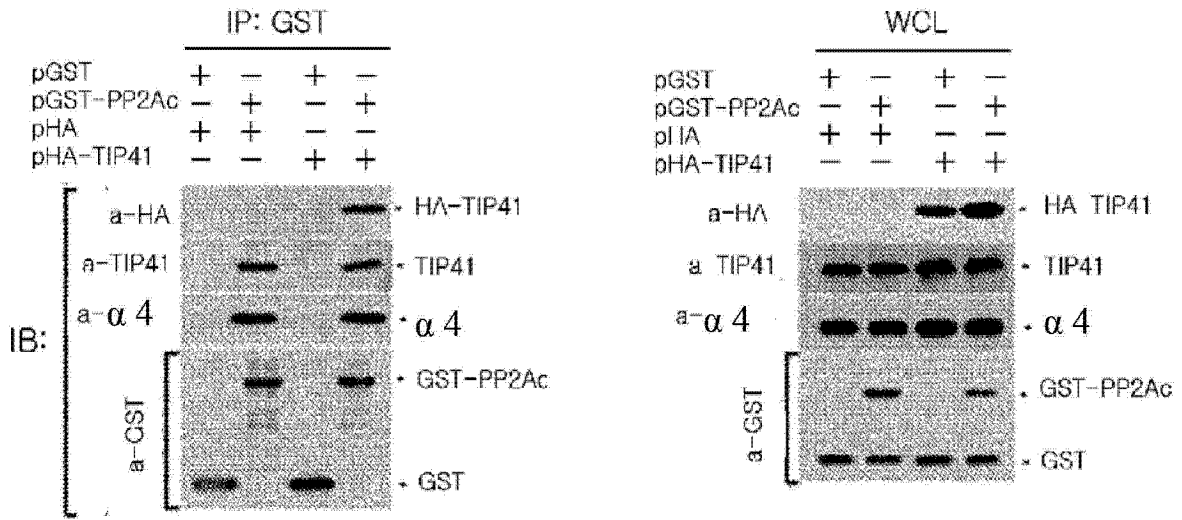
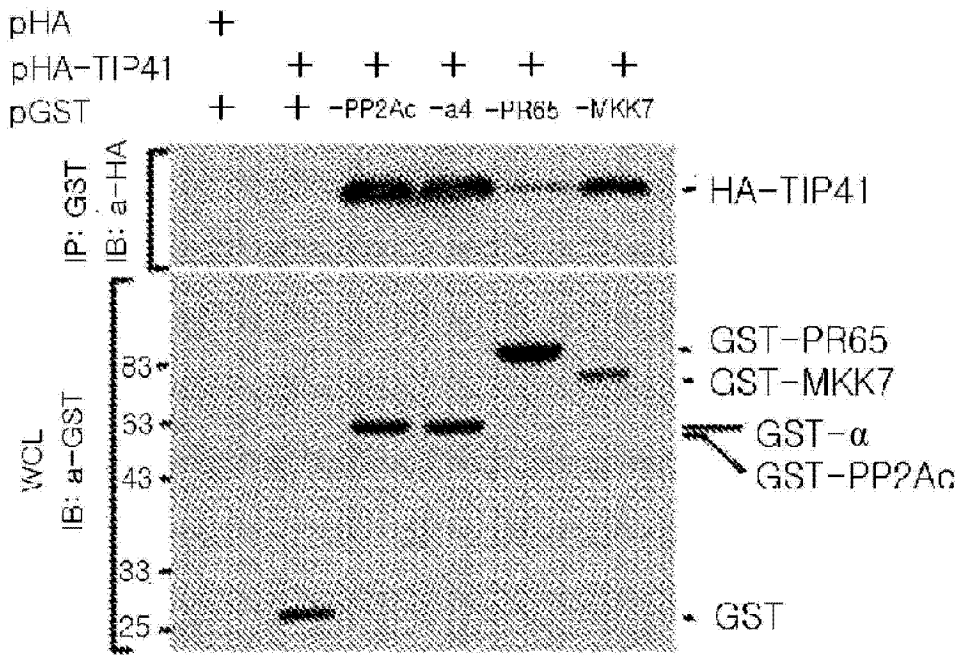


图 9c



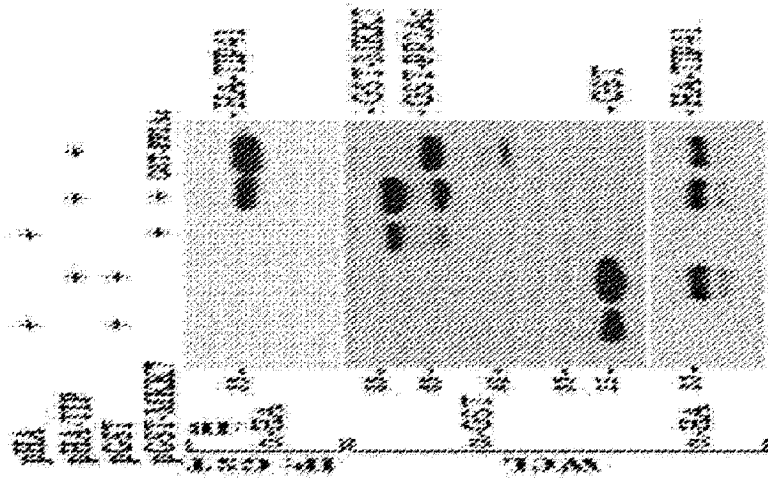
A. TIP41 和 PP2Ac 之间的相互作用



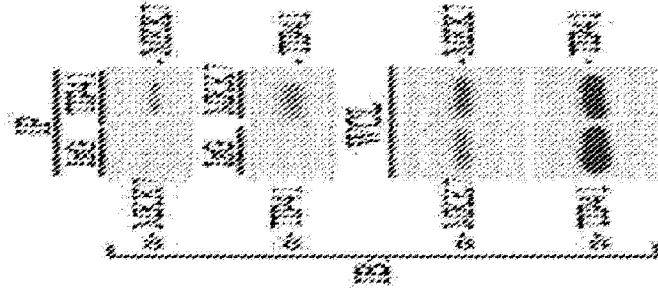
B. TIP41 和 PP2Ac 复合体之间或 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用

图 10

A. 确认 MKK7 过表达后 TIP41 和 MKK7 之间的相互作用



B. 使用 TIP41 和 MKK7 抗体确认相互作用



C. 通过体外 GST-钓饵确认 PP2Ac、TIP41 和 MKK7 之间的相互作用

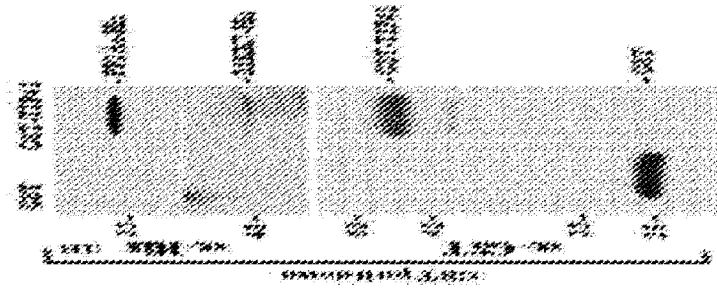
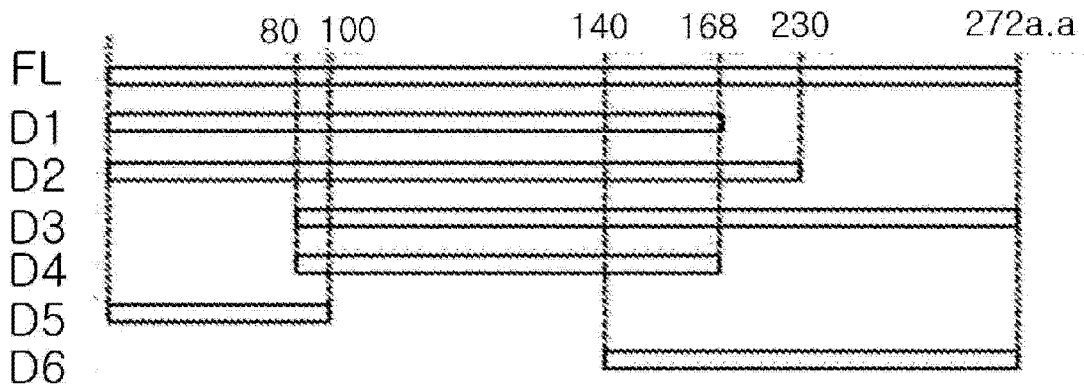
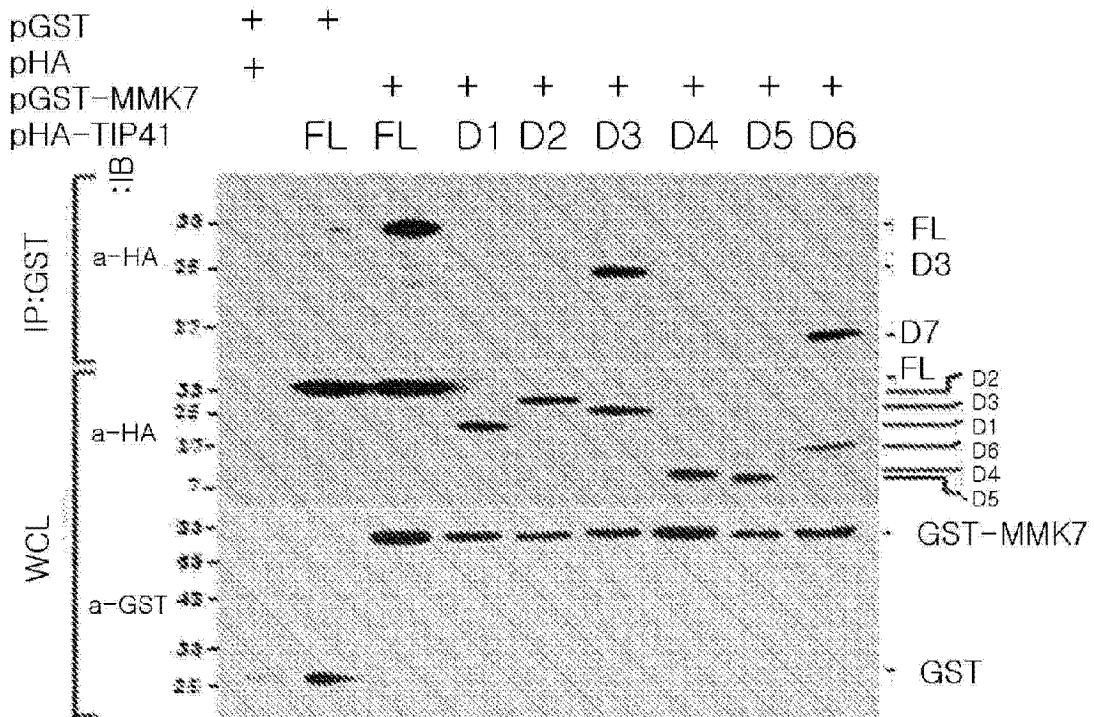


图 11

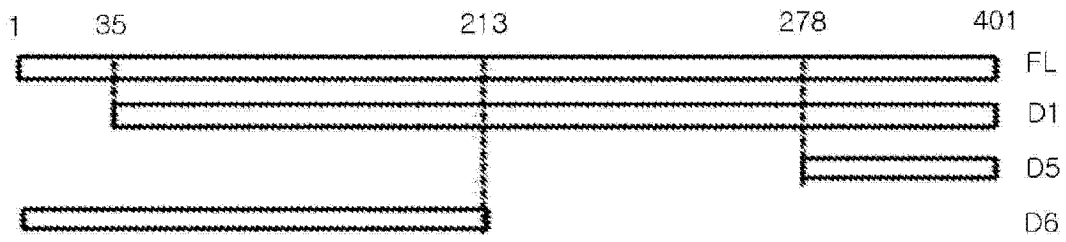


A. TIP41 片段产物

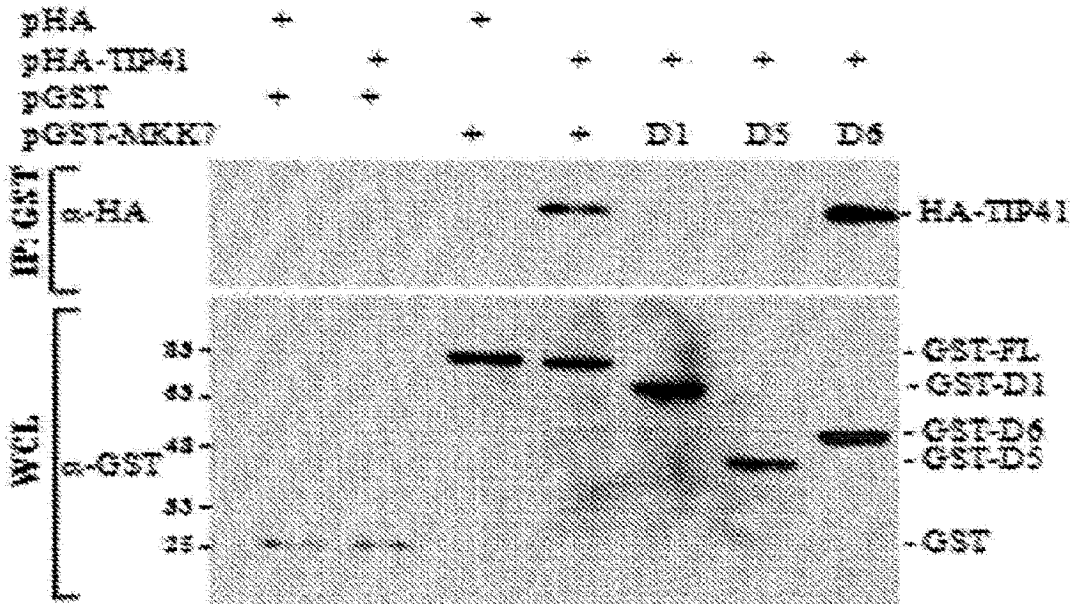


B. 确认与 MKK7 相互作用的 TIP41 结合位点

图 12

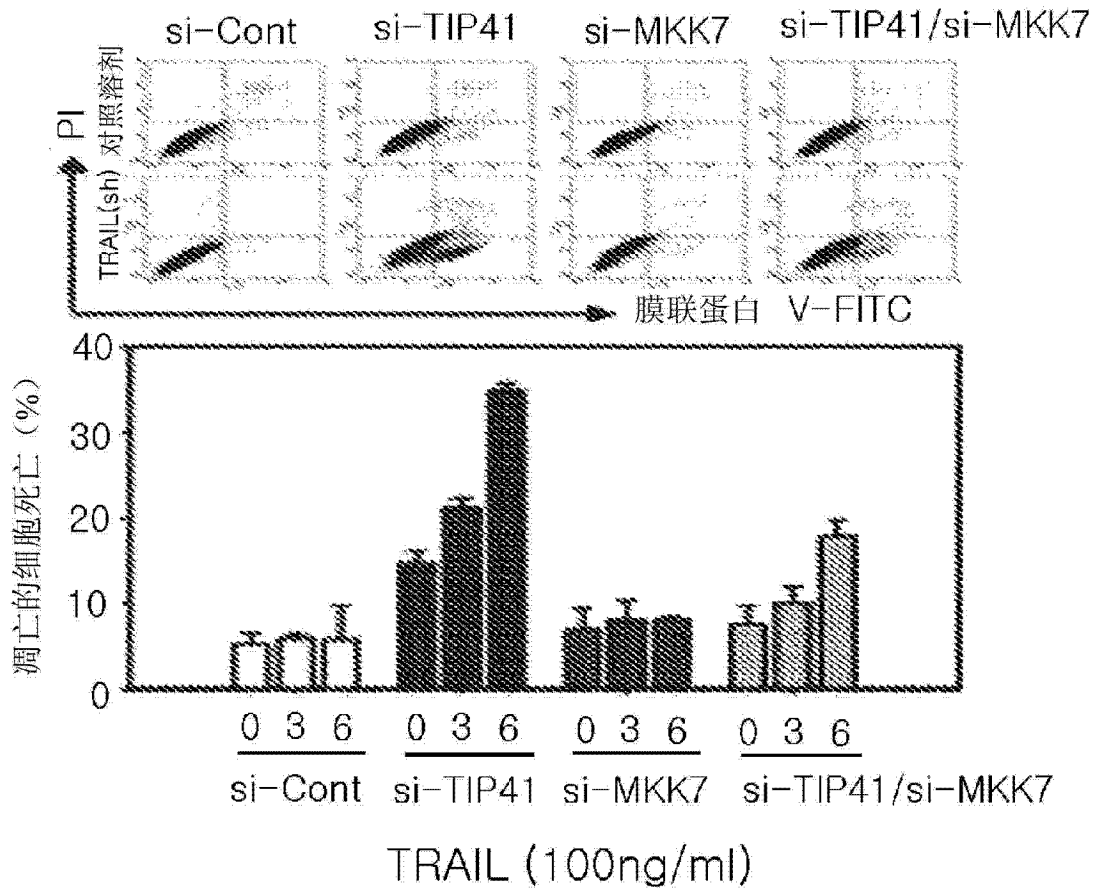


A. MKK7 片段产物

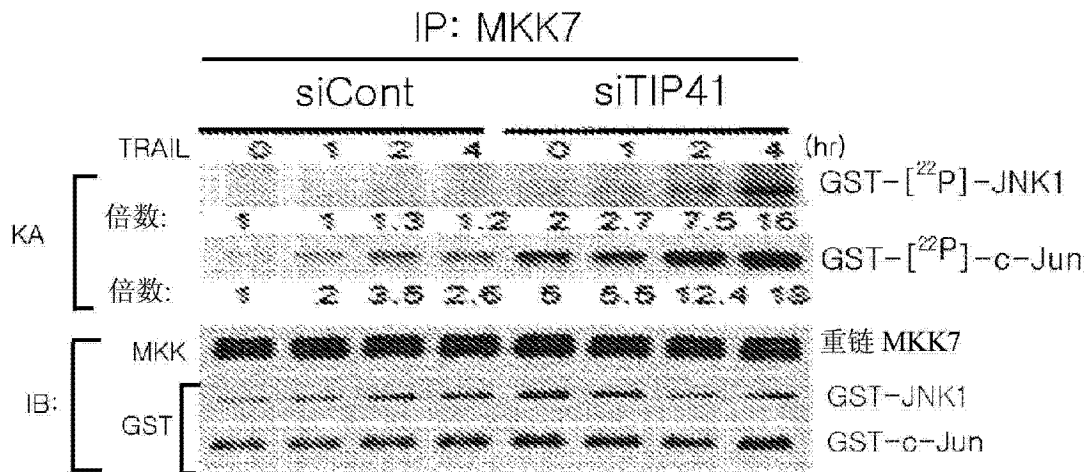


B. 确认与 TIP41 相互作用的 MKK7 结合位点

图 13



A. 通过抑制与 TIP41 相互作用的 MKK7 而减少细胞凋亡



B. 通过 TIP41 抑制激活 MKK7/JNK 途径-体外免疫聚合激酶分析

图 14