



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2134374 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C12N 15/113 (2010.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.04.14
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.11.20
(86)	Europeisk søknadsnr	08717840.6
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.03.14
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2009.12.23
(30)	Prioritet	2007.04.13, EP, 07106119 2007.03.14, IT, PD20070088
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA MK RS
(73)	Innehaver	BIONSIL S.R.L. IN LIQUIDAZIONE, Via Giuseppe Mazzini 2, 20123 Milano, IT-Italia
(72)	Oppfinner	LAVITRANO, Marialuisa, viale Luigi Majno 10, I-20129 Milano, IT-Italia GRASSILLI, Emanuela, viale Libertà 159, I-20052 Monza, IT-Italia HELIN, Kristian, Fredens Plads 2, DK-2920 Charlottenlund, DK-Danmark
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	BTK-INHIBITORER TIL ANVENDELSE I BEHANDLINGEN AV MEDIKAMENTRESISTENTE KJEMOTERAPEUTISKE EPITELTUMORER
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 662 259 US-B1- 6 303 652 WO-A-2005/056766 WO-A-2006/041902 WO-A-2006/063164 WO-A-2006/081418 WO-A-2006/113679 "Colorectal Cancer" THE MERCK MANUAL, [Online] December 2007 (2007-12), pages 1-5, XP002502052 Retrieved from the Internet: URL: http://www.merck.com/mmpe/print/sec02/ch021/ch021h.html [retrieved on 2008-10-30] "Modalities of Cancer Therapy" THE MERCK MANUAL, [Online] November 2005 (2005-11), pages 1-6, XP002502053 Retrieved from the Internet: URL: http://www.merck.com/mmpe/print/sec11/ch149/ch149b.html [retrieved on 2008-10-30] BARTZ STEVEN R ET AL: "SMALL INTERFERING RNA SCREENS REVEAL ENHANCED CISPLATIN CYTOTOXICITY IN TUMOR CELLS HAVING BOTH BRCA NETWORK AND TP53 DISRUPTIONS" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 26, no. 24, 1 December 2006 (2006-12-01), pages

9377-9386, XP009077057 ISSN: 0270-7306

DE TONI F ET AL: "A crosstalk between the Wnt and the adhesion-dependent signaling pathways governs the chemosensitivity of acute myeloid leukemia" ONCOGENE, vol. 25, no. 22, May 2006 (2006-05), pages 3113-3122, XP002502049 ISSN: 0950-9232

HAFNER C ET AL: "Expression profile of Eph receptors and ephrin ligands in human skin and downregulation of EphA1 in nonmelanoma skin cancer" MODERN PATHOLOGY 20061021 GB, vol. 19, no. 10, 21 October 2006 (2006-10-21), pages 1369-1377, XP002487739 ISSN: 0893-3952 1530-0285

LANDEN CHARLES N JR ET AL: "Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery" CANCER RESEARCH, vol. 65, no. 15, August 2005 (2005-08), pages 6910-6918, XP002502048 ISSN: 0008-5472

LEVIN P A ET AL: "Liposomal delivery of EphA2 siRNA in combination with gemcitabine reduces pancreatic tumor growth and invasion" PANCREAS, vol. 33, no. 4, November 2006 (2006-11), page 477, XP002502047 & 37TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-PANCREATIC-ASSOCIATION/13TH MEETING OF THE INTERNATIONAL-ASSOCIA; CHICAGO, IL, USA; NOVEMBER 01 04, 2006 ISSN: 0885-3177

MAO WEIGUANG ET AL: "EphB2 as a therapeutic antibody drug target for the treatment of colorectal cancer" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, USA, DE, vol. 64, no. 3, 1 February 2004 (2004-02-01), pages 781-788, XP002343724

MASUDA JUNKO ET AL: "Fibronectin type I repeat is a nonactivating ligand for EphA1 and inhibits ATF3-dependent angiogenesis." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 9 MAY 2008, vol. 283, no. 19, 9 May 2008 (2008-05-09), pages 13148-13155, XP002487740 ISSN: 0021-9258

MAYES PATRICK A ET AL: "Overcoming drug resistance of hypoxic cancer cells and tumors via stabilization of c-Myc protein through inhibition of GSK3 beta" PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, vol. 49th, 1 April 2008 (2008-04-01), page 641, XP001538924 ISSN: 0197-016X

SHAKOORI ET AL: "Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 334, no. 4, 9 September 2005 (2005-09-09), pages 1365-1373, XP005001539 ISSN: 0006-291X

SURAWSKA H ET AL: "The role of ephrins and Eph receptors in cancer" CYTOKINE AND GROWTH FACTOR REVIEWS, OXFORD, GB, vol. 15, no. 6, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 419-433, XP004652022 ISSN: 1359-6101

TAN JING ET AL: "Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3 beta promotes p53-dependent apoptosis through a direct bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells" CANCER RESEARCH, vol. 65, no. 19, October 2005 (2005-10), pages 9012-9020, 8993, XP002502050 ISSN: 0008-5472

UCKUN ET AL: "Anti-breast cancer activity of LFM-A13, a potent inhibitor of Polo-like kinase (PLK)" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 15, no. 2, 12 December 2006 (2006-12-12), pages 800-814, XP005882800 ISSN: 0968-0896

UCKUN FATIH M ET AL: "In vivo pharmacokinetic features, toxicity profile, and chemosensitizing activity of alpha-cyano-beta-hydroxy-beta- methyl-N-(2,5-dibromophenyl)propenamide (LFM-A13), a novel antileukemic agent targeting Bruton's tyrosine kinase." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH MAY 2002, vol. 8, no. 5, May 2002 (2002-05), pages 1224-1233, XP002502051 ISSN: 1078-0432

BTK-INHIBITORER TIL ANVENDELSE I BEHANDLINGEN AV MEDIKAMENTRESISTENTE KJEMOTERAPEUTISKE EPITELTUMORER

Teknisk område

5

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører et isolert protein ifølge karakteristikkene omtalt i ingressen i hovedkravet. Den vedrører også en in vitro fremgangsmåte for å redusere medikamentresistensen i epiteltumorceller så vel som i tumorstamceller.

10

Teknologisk bakgrunn

15

En av de vanligst fulgte strategiene i terapien av neoplastiske patologier forutser anvendelsen av medikamenter (kjemoterapi) som er i stand til å ødelegge DNA-et i tumorcellene for å indusere den naturlige apoptoseprosessen i cellene.

20

Ikke desto mindre er det kjent at tumorceller kan respondere på en uventet måte på medikamentterapien, og viser tvert imot en sterk resistens mot den. Det er også kjent at én av hovedgrunnene til medikamentresistens som tumorcellene viser, er at cellene har en manglende evne til å starte apoptoseprosessen, selv i nærvær av betydelig DNA-skade.

25

Dette fenomenet ble sporet tilbake til en funksjonell forandring (mutasjon eller delesjon) i p53-genet som ikke lenger er i stand til å initiere den cellulære apoptoseprosessen, og dette fører dermed til at cellene blir resistente mot virkningen av medikamentet. Medikamentresistensnivåene i tumorcellene kan være veldig høye. I tilfellet med tumorceller i kolon-rektum i fremskreden fase viser for eksempel en medikamentterapi basert på 5-fluoruracil (5FU), en effektiv respons på kun 10-15 % av cellene og en kombinasjon av 5FU med nye medikamenter slik som irinotekan og oksaliplatin fører til en økning av celledødeligheten på opp til 40-50 %, en verdi som fremdeles er fullstendig utilfredsstillende for en effektiv terapeutisk virkning mot neoplastiske patologier.

30

I Clinical Cancer Research vol. 8 (2002) s. 1224-1233, demonstrerte Uckun F.M. et al. den kjemosensibiliserende aktiviteten til LFM A13 som målretter BTK i leukemiceller.

5 Resultatene vist i Biorganic & Medicinal Chemistry vol. 15 (2007) s. 800-814 ved Uckun F.M. et al., indikerer at LFM A13 er en proteinkinaseinhibitor som har anti-proliferativ effekt på humane brystkreftceller og glioblastomceller.

10 WO 02/38797 rapporterer nukleinsyresekvensen (Genbank tilgangsnr. X58957) og aminosyresekvensen (Genbank tilgangsnr. CAA41728) av human BTK.

15 I de siste årene er det blitt oppdaget et cellefenomen som kalles for "RNA interferens" (RNAi), og ved hjelp av RNAi kan genuttrykk slås av på en spesifikk måte. Ved å benytte seg av en slik prosess er det mulig å oppnå og selektivt slå av gener med ukjent funksjon og dermed tillate definisjonen av dets spesifikke funksjon gjennom studien av den oppnådde fenotypen. Ved å benytte RNAi-teknikker og å studere de resulterende fenotypene er det videre mulig å tildele nye funksjoner til allerede kjente gener.

20 Genene som er involvert i fenomenet medikamentresistens hos tumorceller er i dag hovedsakelig ukjente.

25 Det er derfor et stort behov for å identifisere nye gener som er involvert i medikamentresistens og å utforme fremgangsmåter og forbindelser som er i stand til å redusere vesentlig tumorcellenes resistens mot medikamenter.

Beskrivelse av oppfinnelsen

30 Problemet som ligger til grunn for den foreliggende oppfinnelsen er det å fremstille tilgjengelige forbindelser som er i stand til å redusere de epiteltumorcellenes medikamentresistens for å tillate produksjonen av medikamenter ment for behandlingen av relaterte neoplastiske patologier.

35 Oppfinnelsen vedrører et isolert protein med aminosyresekvensen SEQ ID NO:2, som koder for en BTK-protein isoform og den isolerte polynukleotidsekvensen

som koder for det samme, slik som en isolert polynukleotidsekvens som har sekvensen for det første exonet som korresponderer til SEQ ID NO:1.

I et annet aspekts tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en in vitro fremgangsmåte ifølge krav 4 og det farmasøytiske kittet ifølge krav 7.

Kort beskrivelse av figurene

Karakteristikkene og fordelene med oppfinnelsen vil bli klarere fra den detaljerte beskrivelsen som følger av testene og resultatene som har ført til dens definisjon, rapportert med henvisning til tegningene hvor:

- Figur 1 er en graf som illustrerer resultatene fra inhibering av kapasiteten til å danne medikamentresistente tumorcellekolonier fra kolon som er behandlet med forbindelsene ifølge oppfinnelsen og et kjemoterapeutisk medikament,
- Figur 2a og 2b er grafer som viser resultatene fra en analyse av resistensreverseringen til en tumorcellelinje for to forskjellige kjemoterapeutiske medikamenter ved hjelp av å slå av alfa- og beta-isoformene av GSK3-genet,
- Figur 3a-3c er grafer som illustrerer resultatene av testene på reversering av resistensen mot et kjemoterapeutisk medikament til tre forskjellige kolontumorcellelinjer ved hjelp av å slå av GSK3beta-genet,
- Figur 4a er en graf som illustrerer resultatene fra testene av resistensreversering til to forskjellige kolontumorcellelinjer ved hjelp av å slå av GSK3beta-genet,
- Figur 4b er en graf som illustrerer resultatene fra en analyse av resistensreverseringen til en tumorcellelinje på kombinasjonen av to forskjellige kjemoterapeutiske medikamenter ved hjelp av å slå av beta-isoformen av GSK3-genet,
- Figur 5 er en samling bilder som illustrerer lokaliseringen av cytokrom C i 5FU-indusert celledød i fravær av GSK3.
- Figur 6 er en graf som illustrerer resultatene av caspase 3- og caspase 7-aktiveringsanalyser som respons på 5FU behandling av HCT116 og GSK3alfa, GSK3beta genavslåtte HCT116p53KO kolonkarsinomceller,
- Figur 7 er en samling bilder som illustrerer translokasjonen av AIF til kjernen under 5FU-indusert celledød i fravær av GSK3,

- Figur 8 er en graf som illustrerer resistensreverseringen av et kjemoterapeutisk medikament i en tumorcellelinje utført ved hjelp av funksjonell blokkering av BTK-genet oppnådd ved forskjellige fremgangsmåter,
- 5 • Figur 9 er en graf som illustrerer prosent celledød induisert av 5FU ved overuttrykk av BTK i HCT116 kolonkarsinomceller,
- Figur 10a og 10b er grafer som illustrerer resistensreverseringen av kjemoterapeutiske medikamenter ved hjelp av den funksjonelle blokkeringen av BTK-genet i forskjellige kolontumorcellelinjer,
- 10 • Figur 11 er en Western blott-analyse som viser BTK-uttrykk i flere tumorcellelinjer avledet fra forskjellige epitelkrefttyper,
- Figur 12a og 12b er grafer som illustrerer resistensreverseringen av kjemoterapeutiske medikamenter ved hjelp av den funksjonelle blokkeringen av BTK-genet i andre epiteltumorcellelinjer enn fra kolon,
- 15 • Figur 13 er en samling bilder som illustrerer den cytoplasmatiske akkumuleringen av cytokrom C i 5FU-behandlede celler ved BTK-inhibering,
- Figur 14 er en graf som illustrerer resultatene av fluorimetriske caspase-aktiveringsanalyser etter 72 t og 96 t i HCT116 og HCT116p53KO kolonkarsinomceller behandlet med 5FU, BTK-inhibering eller kombinasjonen av de to,
- 20 • Figur 15a er Western blott-bilde som viser at antistoff sc-1696 spesifikt gjenkjenner BTK-protein, og at BTK i epitelkarsinomceller (HCT116p53KO) har en tilsynelatende molekylvekt på ~67 kDa og at den samme formen av proteinet også er til stede, sammen med den "klassiske" 77 kDa-formen, i leukemiceller (Nalm6),
- 25 • Figur 15b er et immunpresipiterings-Western blott-bilde som bekrefter at også et annet antistoff (BL7) identifiserer BTK-protein til å være ~67 kDa i HCT116p53KO-celler og at denne isoformen er tilstede i leukemiceller (Nalm6) sammen med den "klassiske" 77 kDa-formen,
- 30 • Figur 16 er et bilde som illustrerer resultatene av et PCR-eksperiment som viser at den 5'-enden oppstrøms for nukleotid 202 i det BTK-kodende mRNA fra HCT116p53KO-celler er fraværende eller forskjellig fra den 5'-enden til BTK mRNA fra perifere blod mononukleære celler (PBMC) (eng.: peripheral blood mononuclear cells, PBMC),
- 35 • Figur 17 er et bilde som illustrerer resultatene av ClustalW oppstilling av BTK-transkriptet identifisert ved GenBank tilgang #NM_000061, og det nye transkriptet identifisert i HCT116p53KO-celler ved 5'RACE-PCR etterfulgt av

kloning og sekvensering (indikert som *alternativ*), boksen betegner delen av BTK-sekvensen (start fra nukleotid 131 i det kjente transkriptet) som er felles mellom BTK mRNA avledet fra #NM_000061 og det nye transkriptet funnet i HCT116p53K0,

- 5 • Figur 18 er et bilde som illustrerer resultatene fra en Blast-opstilling mot en genomisk database av exonene 1-5 i BTK-transkriptet identifisert ved GenBank tilgang # NM_000061 og de samme exonene i det nye BTK-transkriptet, prikkene indikerer posisjonen på kromosom X av de forskjellige BTK-exonene,
- 10 • Figur 19 er et bilde som illustrerer resultatene fra et nestet PCR (eng.: nested PCR)- eksperiment som viser at det nye BTK-transkriptet uttrykkes i formalinfikserte parafin-innstøpte (FFPE) (eng.: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) tumorvev fra kolonkarsinompasienter.

15 **Fremgangsmåter for å identifisere genene som modulerer medikamentresistensen i epiteltumorceller og relaterte valideringstester**

Det tekniske problemet omtalt ovenfor, ble håndtert ved å utsette flere epiteltumorcellelinjer for en rekke tester og analyser rettet mot å identifisere og karakterisere genene som er i stand til å gi opphav til det fenotypiske uttrykket

20 av interesse, dvs. resistensreverseringen mot apoptosen induisert av kjemoterapeutiske medikamenter.

Slik identifikasjon ble utført ved hjelp av fenotypisk screening av en representativ cellelinje for epiteltumorcellelinjene etterfulgt av selektivt å slå av

25 en utvidet gengruppe ved hjelp av RNAi.

Dette komplekse screeningsarbeidet ble gjort mulig på grunn av et retroviralt pRetroSuper (pRS)-vektorbibliotek som nylig ble fremstilt hos Bernards laboratoriene. Det er kjent at slike vektorer er i stand til å stabilt uttrykke et

30 spesifikt oligonukleotidmolekyl, kjent som små interfererende RNA, kort siRNA, som er i stand til å blokkere translasjonsprosessen av ett spesifikt budbringer-RNA (mRNA) (eng.: messenger RNA, mRNA) til det korresponderende proteinet. I korthet forutser en slik mekanisme at siRNA-molekylet (eller et filament av det) er assosiert med RISC- enzymkomplekset, aktiverer det slik at det

35 sistnevnte kan gjenkjenne og binde seg til mRNA-et som er komplementært til siRNA-et som er assosiert til det og deretter degradere det. Det følger at mRNA-

et som er identifisert på en spesifikk måte av siRNA-et ikke kan translateres i den korresponderende aminosyrekjeden og dermed oppnås at genet som mRNA-et var transkribert fra, slås av. Interferensprosessen er spesifikk slik at et siRNA-molekyl normalt er i stand til kun å degradere ett mRNA og derfor slå av ett enkelt gen. På den andre siden er det istedenfor mulig at det samme mRNA-et kan degraderes via RISC, av forskjellige siRNA.

Denne mekanismen er en av de forskjellige mulige måtene for funksjonelt å blokkere et gen (funksjonell utslåing (eng.: knockout)). Imidlertid produserer den påfølgende degraderingen av siRNA via RISC kun en forbigående effekt på proteinnivå og tillater dermed kun kortvarige eksperimenter hvis resultater ikke trenger å være relevante over lengre tid. For å overkomme dette problemet ble korte hårnåls-RNA (shRNA-er) (eng.: short hairpin RNAs, shRNAs), en RNA-sekvens som er foldet i en hårnålsfasong, anvendt som en mekanisme for funksjonell utslåing. I korthet ble det anvendt en vektor for å introdusere og inkorporere shRNA inn i cellekromosomet. Transkripsjon av DNA-et produserer shRNA som deretter kløyves av det cellulære maskineriet, DICER, til siRNA. siRNA-et fungerer så som tidligere nevnt. Inkorporeringen av shRNA-vektoren inn i cellekromosomet tillater avslåing av genet som arves av dattercellene. Anvendelsen av shRNA-er tillater å funksjonelt slå ut celler som kan anvendes i langtidseksperimenter.

Det er også kjent i litteraturen at transfeksjonseffektiviteten til siRNA-er aldri er 100 %. Derfor sikrer ikke anvendelsen av transfekterte siRNA-er at alle de behandlede cellene med hell er uten målproteinet. Fraværet av en selekterbar markør skaper ytterligere et problem når det arbeides med homogene cellepopulasjoner. Anvendelsen av en selekterbar markør, slik som et puromycinresistens-gen, sammen med et retroviral-bibliotek, tillater gjenvinningen av celler som kun har shRNA-er. Dessuten, etter seleksjon av shRNA-uttrykk blir kun gener hvis avslåing er kompatibel med normal celleoverlevelse og proliferasjon, selektert for. Fraværet av disse genene influerer ikke normal cellefysiologi, men kun responsen på anti-kreft medikamenter, en veldig viktig betraktning ved utvikling av antikreft-terapi.

Det er ikke desto mindre viktig å spesifisere at den samme effekten generelt kan oppnås ved å påvirke et hvilket som helst annet trinn i et gens proteinkodende prosess, slik som for eksempel transkripsjonstrinnet av genet til mRNA, eller

mRNA-transduksjonstrinnet eller ved hjelp av inhibering av proteinet som er et resultat av den kodende prosessen.

5 Det er opplagt at det essensielle og kritiske trinnet i løsningen av problemet er representert ved identifikasjonen av genet eller genene som er ansvarlig for den ønskede fenotypen.

10 Retroviralbiblioteket i regi av Bernards-laboratoriene består av omlag 25000 forskjellige elementer som er i stand til å slå av omlag 8300 gener i det humane genomet med et forhold på omlag 3 forskjellige vektorer for hvert gen.

15 Testene ble opprinnelig utført *in vitro* og deretter validert *ex vivo* på forskjellige epiteltumorcellelinjer, karakterisert ved mangelen på eller ved mutasjon i p53-genet og dermed utstyrt med en markert resistens mot kjemoterapeutiske medikamenter.

20 I detalj ble et humant RNAi-bibliotek (Nki-bibliotek) etablert som består av 8300 målgener for avslåing. Målgenene inkluderer kinaser, fosfataser, onkogener, tumorsuppressorer, transkripsjonsfaktorer, gener involvert i transformasjon, metastase, cellesyklus, differensiering, apoptose, metabolske og anabolske prosesser. En protokoll lignende den som er nevnt i en tidligere publikasjon, ble fulgt (Berns et al., NATURE vol. 428, 25. mars 2004).

25 mRNA-sekvensen for hvert målgene ble valgt fra UniGene. Sekvensene ble maskert ved å anvende RepeatMasker for å fjerne repeterte sekvenser og det ble søkt med NCBI BLAST mot UniVec for å maskere for vektorkontaminering. Tre forskjellige 19-nukleotid (19-mer)-sekvenser til å slå av hvert målgene ble utformet, totalt ca. 25000 59-mer-oligonukleotider som spesifiserer korte hårnåls-RNA-er (shRNA-er). 19-mer-sekvensene ble valgt ved å anvende ett
30 seleksjonskriterie som er omtalt i Berns-publikasjonen hvori, a) det ikke var noen strekk på fire eller flere etterfølgende T- eller A-residuer (for å unngå for tidlige polymerase III transkripsjonstermineringssignaler); b) det var 30-70 % totalt GC-innhold; c) de ligger innenfor den kodende sekvensen for målgenet; d) de starter med et G eller C residu (i overensstemmelse med nylig etablerte
35 regler for tråd-bias); e) de starter etter en AA-dimer i den 5'-flankerende sekvensen; f) de slutter rett før en TT-, TG- eller GT-dublett i den 3'-flankerende sekvensen; g) de inneholder ikke seter for restriksjonsenzymene *XhoI* eller

EcoRI for å fasilitere påfølgende pendling av nedslåingskassetten inn i vektorskjelettene; h) de deler minimal sekvensidentitet med andre gener; i) de målretter alle transkriptvariantene representert ved RefSeq mRNA-er; og j) de overlapper ikke med andre 19-merer valgt fra den samme målsekvensen. 59-mer-oligonukleotidene ble utformet til å inneholde en 19-mer-sekvens, dens komplementære 19-mer-sekvens, polIII transkripsjonsstartsted, polIII termineringssete, og *HindIII/BglII* kloningsseter. Ved å benytte *HindIII/BglII* kloningssettene ble oligonukleotidene ligert inn i pRetroSuper (pRS) retroviralvektorer som inkluderer en seleksjonskassett for puromycinresistens. DNA fra de tre forskjellige vektorene som målretter det samme genet ble slått sammen og virus ble fremstilt for å infisere målceller.

EKSEMPEL 1

Tumorcellelinjen som opprinnelig ble anvendt var HCT116p53KO (som skiller seg fra villtype vt HCT116 på grunn av mangelen på p53-genet), relatert til kolontumoren, mens ytterligere detaljerte studier av spesifikke gener ble utført på andre medikamentresistente kolontumorcellelinjer, slik som DLD-1 og SW480, så vel som andre lunge- og ovarietumorcellelinjer. Særlig var alle cellelinjene som var gjenstand for analysen, relater til epiteltumortyper.

Cellelinjene HCT116p53KO, DLD-1 og SW480 ble preliminært behandlet med vanlige kjemoterapeutiske medikamenter for å bekrefte deres resistens mot medikamentindusert apoptose.

De kjemoterapeutiske medikamentene som er anvendbare ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan være av hvilken som helst type som er egnet til å indusere apoptoseprosessen i de aktuelle tumorcellene slik som for eksempel en antimetabolitt eller et hvilket som helst DNA-ødeleggende middel som omfatter topoisomerase I-inhibitorer, topoisomerase II-inhibitorer, platina-koordinerende forbindelser og alkyleringsmiddel.

De tidligere nevnte preliminære testene har vist hvordan celledødeligheten var lavere enn 10 % mot en vt HCT116 celledødelighet på mer enn 95 % etter behandling i 72 timer med 200 μ M 5FU.

Supplerende tester med kolonidannende analyser (CFA) (eng.: colony forming assays, CFA) har ytterligere vist hvordan slik medikamentresistens var av den ikke-varige typen.

5 Når apoptoseresistensen induisert av kjemoterapeutiske middel var bekreftet, ble 200x10⁶ HCT116p53KO-celler infisert med det ovenfor identifiserte pRetroSuper-biblioteket tilveiebrakt av Bernards-laboratoriene. Hver vektor i dette biblioteket var utstyrt med en fordelaktig seleksjonskasset for et puromycinresistensgen slik at det var mulig å selektene HCT116p53KO-cellene som faktisk var infisert
10 med vektorene i biblioteket gjennom behandling med puromycin (2mg/l i dyrkningsmedium i to dager).

På slutten av antibiotikabehandlingen ble cellene som fremdeles var i live samlet, og de omfattet derfor alle cellene som var infisert av retrovirus i
15 biblioteket hvis avslåtte gener ikke var kompatible med celleoverlevelse.

Cellene som dermed var samlet ble så behandlet med 200 µM 5FU i 72 timer mens vt HCT116-celler og uinfiserte HCT116p53KO-celler ble samtidig også utsatt for den samme behandlingen som kontroller.

20 På slutten av hver behandling ble det funnet at omlag halvparten av cellene fløt i dyrkingsmediet og var derfor døde. Slike celler representerte den etterspurte fenotypen slik at de ble samlet og utsatt for den nødvendige behandlingen for identifikasjonen av genene som var slått av ved hjelp av det retrovirale
25 biblioteket.

I korthet omfattet slike behandlinger ekstraksjonen av DNA og oppformeringen ved hjelp av PCR (eng.: Polymerase Chain Reaction) av en region på 643 basepar som inneholdt regionen H1 fra en bestemt promoter og den tilstøtende
30 regionen som koder for nukleotidsekvensen av interesse. PCR-oppformering ble utført ved å anvende en pRS-fw primer: 5'-CCCTTGAACTCCTC GTTCGACC-3' og pRS-rev primer: 5'-GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC-3'. Produktene som ble fremskaffet ved oppformeringen ble så bundet i pRS-retroviralvektorer og infeksjonsprosessen av HCT115p53KO-celler ble fullstendig repetert med de nye
35 vektorene for å avgrense screeningen. Produktene ble kløvyd med *EcoRI/XhoI* og reklonet inn i pRS.

Produktene som ble fremskaffet fra den andre oppformeringsbehandlingen med PCR på DNA-et utvunnet fra de døde cellene etter ny behandling med 5FU, ble isolert på ny og bundet i de retrovirale vektorene pRS og deretter anvendt til å transformere DH5alfa-bakterier hvis respektive plasmider ble sekvensert for identifisering av genene som ga opphav til det fenotypiske uttrykket av interesse.

Når enkeltgenene ble fremskaffet og det ble, ved hjelp av interferens med RNA, identifisert hvilke avslåtte gener som ga opphav til resistensreverseringen i tumorcellene som var testet mot 5FU, fant den separate og uavhengige valideringen av enkeltgenene sted.

Først ble valideringen utført *in vitro* på HCT116p53KO-tumorcelleprøver som hver var separat infisert med ett av de tidligere fremstilte plasmidene for å slå av på en spesifikk og bestemt måte ett av genene indikert i den foregående screeningen og å verifisere dets kapasitet til å modulere resistensen mot medikamenter. Prøvene ble så selektert med puromycin, plassert i petriskåler ved 50 % konfluens og behandlet med 200 µM 5FU i 12 timer.

Evalueringen av medikamentresistensreversjonen ble utført ved hjelp av observasjon av dannelsen av kolonier ifølge protokollen definert av CFA og deres sammenligning med en vt HCT116-prøve og en uinfisert HCT116p53KO-prøve.

I figur 1 er resultatene vist i graf-form som ble fremskaffet fra denne første *in vitro* valideringen. Som det klart fremkommer i grafen er en høy prosent identifiserte gener i stand til, når de er funksjonelt blokkerte, å gjennomgående reversere den kolonidannende evnen til 5FU-behandlede HCT116p53KO-celler. HCT116 og KO representerer positive og negative kontroller.

Denne første valideringen har særlig tillatt identifisering av en gengruppe hvis spesifikke avslåing har gitt opphav til en 5FU-indusert inhibering av veksten av tumorkoloniene som er høyere enn 50 % med hensyn til HCT116p53KO-prøven.

Disse genene, som selv er kjente og karakteriserte, er angitt nedenfor med deres offisielle symbol sammen med deres identifikasjonsnummer (i parentes) rapportert i NCBI Entrez Gene databanken:

5 EphA1 (2041), EphA2 (1969), EphA8 (2046), EphB2 (2048), CSF1R (1436),
VEGFR2 (3791), RAMP2 (10266), RAMP3 (10268), CLRN1 (7401), MAPK4
(5596), PIK3C2A (5286), PIK3CG (5294), GSK3beta (2932), IRAK3 (11213),
DAPK1 (1612), JAK1 (3716), CHEK1 (1111), PIM1 (5292), TRB3 (57761), BTG1
(694), LATS1 (9113), LIMK2 (3985), MYLK (4638), PAK1 (5058), PAK2 (5062),
10 CDC2 (983), BTK (695), PNRC2 (55629), NCOA4 (8031), NR2C1 (7181), TPR
(7185), RBBP8 (5932), TRPC7 (57113), FXYD1 (5348), ERN1 (2081), PRSS16
(10279), RPS3 (6188), CCL23 (6368) og SERPINE1 (5054).

Blant de genene angitt ovenfor kan en første gen-subgruppe identifiseres hvis avslåing fordelaktig fører til mer enn 75 % inhibering av tumorcelleveksten.

15

En slik første subgruppe er dannet av de følgende genene:

EphA1 (2041), EphA2 (1969), EphA8 (2046), EphB2 (2048), CSF1R (1436),
VEGFR2 (3791), RAMP2 (10266), RAMP3 (10268), MAPK4 (5596), PIK3C2A
(5286), PIK3CG (5294), GSK3beta (2932), IRAK3 (11213), DAPK1 (1612), JAK1
20 (3716), CHEK1 (1111), PIM1 (5292), TRB3 (57761), BTG1 (694), LATS1 (9113),
LIMK2 (3985), BTK (695), PNRC2 (55629), NCOA4 (8031), NR2C1 (7181), TPR
(7185), TRPC7 (57113), FXYD1 (5348), ERN1 (2081), RPS3 (6188) og SERPINE1
(5054).

25 På en mer fordelaktig måte ble ytterligere en andre gen-subgruppe identifisert
hvis avslåing fordelaktig førte til en mer enn 95 % inhibering av
tumorcelleveksten.

En slik subgruppe er dannet av de følgende genene:

30 EphA1 (2041), EphA2 (1969), EphA8 (2046), RAMP3 (10268), PIK3C2A (5286),
GSK3beta (2932), IRAK3 (11213), DAPK1 (1612), CHEK1 (1111), PIM1 (5292),
BTK (695), NCOA4 (8031), TPR (7185).

35 Genet GSKalfa (2931), isoform av genet GSK3beta, må legges til de ovenfor
nevnte genene; i separate tester hvis resultater er vist ved grafene i figur 2a og

2b er det vist en optimal effektivitet i resistensreverseringen både mot 5FU og mot oksaliplatinet i HCT116p53KO-cellene som er fullstendig sammenlignbart med dets beta-isoform. I detalj sammenligner figur 2a prosent celledød i fravær (symbol "-") og nærvær (symbol "+") av 200 μ M 5FU (72 t behandling) for villtype (vt) HCT116-celler, medikamentresistente HCT116p53KO-celler, celler med GSK3alfa- og GSK3beta-genet avslått. Sammenlignet med de medikamentresistente HCT116p53KO-cellene resulterte HCT116p53KO-celler med GSK3alfa- og GSK3beta-gener avslått i en høy prosent tumorcelledød i nærværet av 5FU. Figur 2b sammenligner prosent celledød i fravær (symbol "-") og nærvær (symbol "+") av 50 μ M oksaliplatin (72 t behandling) for vt HCT116-celler, medikamentresistente HCT116p53KO-celler, celler med GSK3alfa- og GSK3beta-genet avslått. Sammenlignet med de medikamentresistente HCT116p53KO-cellene resulterte HCT116p53KO-celler med GSK3alfa- og GSK3beta-genet avslått også i en høy prosent tumorcelledød i nærværet av oksaliplatin.

Den formelle bekreftelsen av å slå av de spesifikke genene ved hjelp av interferens ble utført med Western blott-analyse av proteinnivåene de koder for hvis antistoffet var kommersielt tilgjengelig (EphA1, EphA2, CSF1R, VEGFR, GSK3, JAK1, CHEK1, LIMK2, CDC2, BTK). Western blott-analyse ble utført ved å lysere de puromycinselekterte cellene i E1A-buffer (50 mM Hepes pH 8; 500 mM NaCl; 0,1 % NP 40; DTT 1M; EDTA 1Mm). 8-12 % SDS-polyakrylamidgelelektroforese ble anvendt for å separere 30 μ g protein som senere ble overført til polyvinylidindifluorid-membraner. Antistoffer ble deretter anvendt for å probe Western-blottene.

Effektiviteten til plasmidene som var i stand til å slå av genene som tilhører gruppen identifisert ovenfor, ble ytterligere testet på DLD-1 og SW480, andre kolontumorcellelinjer kjent for å ha mutert p53 og for deres resistens mot medikamenter.

Kapasiteten til å redusere resistensen mot kjemoterapeutiske medikamenter ble generelt bekreftet, selv med forskjellige utførelser. Særlig var inhiberingsprosenten av koloniveksten etter medikamentbehandling i alle tre cellelinjene optimal når de følgende genene ble slått av:

EphA1 (2041), EphA2 (1969), EphA8 (2046), EphB2 (2048), CSF1R (1436), VEGFR2 (3791), PIK3C2A (5286), PIK3CG (5294), GSK3alfa (2931), GSK3beta

(2932), IRAK3 (11213), CDC2 (983), CHEK1 (1111), LATS1 (9113), TRB3 (57761), JAK1 (3716), BTK (695), PIM1 (5292), LIMK2 (3985), PAK2 (5062).

EKSEMPEL 2 (KOMPARATIVT EKSEMPEL)

5

Som et eksempel vises i figur 3a-3c grafer etter avslåingstester av genet GSK3beta i de tre testede tumorcellelinjene hvor fraksjon døde celler etter behandling med 5FU i prøvene infisert med vektorer som er i stand til å slå av det tidligere omtalte genet, blir rapportert og sammenlignet med prøvene infisert med tomme vektorer. I detalj sammenligner figur 3a prosent celledød i fravær (symbol "-") og nærvær (symbol "+") av 200 µM 5FU (72 t behandling) i vt HCT116-celler, medikamentresistente HCT116p53KO-celler og celler med GSK3beta-genet avslått. Sammenlignet med de medikamentresistente HCT116p53KO-celler resulterte HCT116p53KO-celler med GSK3beta-genet avslått i en høy prosent tumorcelledød i nærvær av 5FU. Figur 3b sammenligner prosent celledød i fravær (symbol "-") og nærvær (symbol "+") av 200 µM 5FU (72 t behandling) i vt DLD-1-celler og DLD-1-celler med GSK3beta-genet avslått. Sammenlignet med vt DLD-1-celler resulterte DLD-1-cellene med GSK3beta-genet avslått i en høy prosent tumorcelledød i nærvær av 5FU. Figur 3c sammenligner prosent celledød i fravær (symbol "-") og nærvær (symbol "+") av 200 µM 5FU (72 t behandling) i vt SW480-celler og SW480-celler med GSK3beta-genet avslått i nærvær av 5FU.

I tillegg til 5FU som er et representativt eksempel på familien med kjemoterapeutiske medikamenter av den antimetabolske typen, ble også resistensreversjonen mot medikamentene testet for kjemoterapeutiske medikamenter av forskjellige typer, slik som oksaliplatin.

I figur 4a blir fraksjonene av celledød indusert med en oksaplatinbehandling (50 µM) vist i prøver fra tumorcellelinjene DLD-1 og SW480 som henholdsvis er infisert med tomme vektorer og vektorer som slår av GSK3beta-genet.

Den betydelige reduksjonen av resistensen mot apoptose indusert av oksaliplatin i prøven hvor GSK3beta var slått av er åpenbar. I figur 4b vises en graf hvor resultatene av en analog test indikeres i cellelinjen SW480 hvor medikamentet som ble anvendt var en kombinasjon av 5FU og oksaliplatin.

Som omtalt tidligere og vist i figur 2a og 2b, har GSK3alfa avslåing den samme effekten som GSK3beta i moduleringen av apoptoseresponsen på 5FU og oksaliplatin.

5

En ytterligere studie ble utført for å bestemme om 5FU-indusert celledød i fravær av GSK3 var cytokrom C-avhengig eller uavhengig. Ved å benytte anti-cytokrom C- og DAPI-farging, som vist i figur 5, ble det funnet at 5FU-indusert celledød i fravær av GSK3 er cytokrom C-uavhengig. Mer spesifikt, ved å benytte anti-AIF- og DAPI-farging, som vist i figur 7, ble det oppdaget at i fravær av GSK3 translokeres AIF til kjernen, noe som resulterer i celledød. Dette ble ytterligere støttet ved at det ikke ble funnet aktivering av caspasene 3 og 7 under 5FU-indusert celledød i celler hvor GSK3 var avslått, som vist i figur 6.

10

15

EKSEMPEL 3

Et annet særlig representativt eksempel på gengruppen identifisert ovenfor, utgjøres av BTK-genet som flere undersøkelser er utført på.

20

BTK-kinase er en cytoplasmatisk proteintyrosinkinase som er avgjørende for B-celle utvikling og differensiering. BTK-mutasjon er faktisk ansvarlig for X-koblet gammaglobulinemi (XLA), en primær immunsvikt som hovedsakelig er karakterisert ved mangel på modne B-celler så vel som lave immunoglobulin-nivåer. Det er rapportert at BTK i B-celler enten har pro-apoptotiske eller anti-apoptotiske funksjoner. Det har videre vært antatt så langt at BTK kun er uttrykt i noen benmargsavledete linjer, slik som B- og mast-celler, erytroide stamceller, blodplater. Vårt funn at BTK er et gen hvis avslåing reverserer resistens mot den cytotoksiske virkningen av 5FU viser for første gang at BTK også uttrykkes i andre celletyper enn i den hematopoietiske linjen. Først ble effektiviteten av resistensreverseringen mot medikamentene testet i HCT116p53KO-tumorceller med en inhibitorforbindelse av BTK-proteinet for å vise hvordan den funksjonelle blokkeringen av genet av interesse kan utføres på alternative måter for avslåing ved hjelp av RNAi.

25

30

35

Forbindelsen som ble anvendt i disse testene var (2Z)-2-cyan-N-(2,5-dibromfenyl)-3-hydroksy-2-butenamid, kjent som LFM-A13, hvis strukturelle formel er vist under i formel 1.



Formel 1

5

I figur 8 vises i en graf resultatene fra sammenligningstesten for den funksjonelle blokkeringen av BTK-genet ved hjelp av plasmider, siRNA eller LFM-A13 i prøver av HCT116p53KO-celler behandlet med 5FU. Det kan lett sees hvordan det oppnådde reverseringsnivået mot medikamentresistens, uttrykt ved hjelp av prosent fraksjon celledød, er helt sammenlignbare. I detalj sammenligner figur 8 prosent celledød i nærvær av 200 μ M 5FU (72 t behandling) i vt HCT116-celler og i medikamentresistente HCT116p53KO-celler med eller uten (symbol "tom" og "-") spesifikk reduksjon av BTK etter transient siRNA-transfeksjon (symbol "BTKi"), stabil retroviral-mediert RNA-interferens (symbol "shBTK") og ved å anvende LFMA13, en inhibitorforbindelse av BTK.

15

Ifølge den beskyttende effekten av BTK som ble avdekket av inhiberingseksperimentene beskrevet ovenfor, beskytter BTK-overuttrykk sensitive HCT116 vt fra 5FU-indusert celledød. I detalj sammenligner fig. 9 prosent celledød i nærvær av 200 μ M 5FU (72 t behandling) i vt HCT116-celler infisert med tom pBabe-vektor, vt HCT116-celler infisert med pBabe BTK-vektor og medikamentresistente HCT116p53KO-celler.

20

Det ble også bestemt at BTK inhibering reverserer resistens også mot oksaliplatin (figur 10a) og i DLD-1 (figur 10b).

25

Resistensreduksjonen mot kjemoterapeutiske medikamenter etter den funksjonelle blokkeringen av BTK-genet ved hjelp av LFM-A13 ble ytterligere bekreftet av tester utført *in vitro* på andre epiteltumorcellelinjer enn koloncellelinjene. I figur 11 er BTK-nivåer undersøkt ved hjelp av Western blott, i flere forskjellige epitelkarsinomcellelinjer og viser at kinasen uttrykkes i de

30

fleste. Særlig i figur 12a og 12b viser grafene reversjonstestene som ble oppnådd med SKOV-cellelinjer (relatert til en ovarietumor) og A549-cellelinjer (relatert til en lungetumor).

5 I detalj sammenligner figur 12a prosent celledød i fravær (symbol "NT" og "-") og nærvær av 200 μ M 5FU, 50 μ M OxPt, og kombinasjonen av de to i resistente ovarie (SKOV)-celler med eller uten BTK inhibering gjennom anvendelsen av LMFA13. Sammenlignet med SKOV-cellene uten LMFA13, resulterte SKOV-cellene med LMFA13 i en høy prosent tumorcelledød. Figur 12b sammenligner
10 prosent celledød i fravær (symbol "NT" og "-") og nærvær av 200 μ M 5FU, 50 μ M OxPt, og kombinasjonen av de to resistente lungecellene (A549) med eller uten BTK-inhibering gjennom anvendelsen av LMFA13. Sammenlignet med A549-cellene uten LMFA13, resulterte A549-cellene i en høy prosent tumorcelledød.
15 I begge tilfellene skal det bemerkes hvordan behandlingen av cellelinjene med LFM-A13, funksjonell inhibitor av BTK-genet, fører til en betydelig økning av den cellulære dødeligheten etter eksponering for 5FU eller oksaliplatin eller begge medikamentene i kombinasjon.

20 Videre bekrefter den høye effektiviteten virkningen av medikamentresistensreduksjonen en også i disse cellelinjene, at validiteten av resultatene oppnådd i de foregående testene kan i det minste utvides til alle epiteltumortyper, slik som lungetumor, ovarietumor og brysttumor. De optimale resultatene som det er pekt på ovenfor har foreslått å validere BTK-genet også gjennom *ex-vivo* analyse på humane epiteltumorprøver. Først ble det gjennom
25 Western blott, verifisert at BTK-proteinnivåene var høye i 30 % av prøvene fra ovarietumorceller tatt fra pasienter i fremskredet stadium av sykdom og/eller som var resistente mot kjemoterapeutiske medikamenter. Derne ble det utført undersøkelser på kolontumorstamceller isolert fra pasienter for å verifisere om de undersøkte genene ble uttrykt (og i hvilken målestokk) også i denne
30 celletypen. Ifølge nyere studier (Dean et al., 2005) ville faktisk disse stamcellene være hovedansvarlige for medikamentresistensen.

I alle tumorstamcellelinjene som ble analysert, isolert fra forskjellige pasienter, er BTK-proteinuttrykket veldig høyt, minst 4-5 ganger høyere enn uttrykket som
35 ble detektert i kolonkarsinomcellelinjene anvendt i de funksjonelle eksperimentene, noe som tyder på at bestemmelsen av BTK-nivåene fordelaktig kan anvendes som en fremgangsmåte for å definere de undersøkte

tumorcellenes stamcelle-egenskaper og dermed også deres resistens mot kjemoterapeutiske medikamenter.

Resultatene har vist at BTK-nivåer bestemmer tumorcellenes sensitivitet for 5FU og at BTK-inhibering reverserer medikamentresistens. Immunfarging med anti-cytokrom C i 5FU-behandlede celler (figur 13) viste cytoplasmatisk akkumulering etter 5FU-behandling i resistente celler kun når BTK var inhibert, noe som støtter funnet om at medikamentresistensreversering ved BTK-inhibering skyldes aktivering av apoptose. Det samme funnet støttes også av grafen som er vist i figur 14 som evaluerer caspase 3/7 aktiveringsnivået ved 5FU-behandling i resistente HCT116p53KO-celler i nærvær eller fravær av BTK-inhibitor LFM-A13. Høye caspase 3/7 aktiveringsnivåer, målt ved hjelp av en luminometrisk analyse som RLU/antall celler, er observert i 5FU-behandlede HCT116p53KO-celler kun når BTK er inhibert.

Den forutsagte og rapporterte molekylvekten av BTK-protein er 77 kDa. Proteinets identifisering i Western blott som BTK av et spesifikt antistoff (sc-1696, fra Santa Cruz Biotechnology) har, i HCT116p53KO og i alle andre epitelkarsinomceller som er testet (6 brystcellelinjer, 3 ovariecellelinjer, 7 lungecellelinjer, 5 koloncellelinjer), i motsetning til dette en tilsynelatende molekylvekt på omlag 65-68 kDa (figur 11, figur 15a), noe som tyder på at en kortere BTK-isoform uttrykkes i epitelcellelinjer.

For å bekrefte disse resultatene ble en immunpresipiteringsanalyse utført ved å anvende to forskjellige og spesifikke BTK-antistoffer (sc-1696 sitert ovenfor og BL7, en gave fra Dr. Mike Tomlinson, Universitetet i Birmingham, Storbritannia). Resultatene i figur 15b viser at kun denne nye isoformen uttrykkes i epitelcellelinjer mens i en leukemicellelinje (Nalm6), som allerede fra litteraturen er kjent for å uttrykke den klassiske 77 kDa form, er begge isoformene tilstede.

Derfor er det utført en bioinformatikkanalyse av BTK kodende sekvens (cdc) (eng.: coding sequence, cds) og følgelig er en andre nukleotidtripltett ATG (nt 428-430), i leseramme med det som er kjent for å anvendes til å translatere BTK (nt 164-166) og mottagelig for å starte translasjonen av et protein, blitt identifisert. Den forventede molekylvekten til det putative proteinet som translateres med start i denne andre ATG er 67 kDa, i overensstemmelse med forskjellige BTK-antistoffer i epitelkarsinomceller. For å identifisere hvilken del

som mangler i mRNA-et som koder for den kortere og nye BTK-protein isoformen er det blitt utført PCR-eksperimenter ved å anvende forskjellige primerpar (som annealer til forskjellige deler av cdc som indikert i det øvre diagrammet i figur 16). Som vist i figur 16 indikerer disse eksperimentene at den 5'-enden, oppstrøms for nukleotid 202, er fraværende eller forskjellig i HCT116p53KO-cellene.

5'-RACE/sekvenseringseksperimenter er utført på mRNA fra HCT116p53KO-celler for å bestemme identiteten av den ukjente 5'-enden. Oppstillingsanalyser mellom cDNA-et avledet fra mRNA fra HCT116p53KO-celler og cDNA-et avledet fra standard BTK-mRNA, identifisert med GenBank tilgang #NM_00061, ved å anvende ClustalW dataprogram (resulter vist i figur 17), viste deretter at sekvensen oppstrøms for det andre exonet (som starter ved nt 134 i cds) er forskjellig fra den som er rapportert i litteraturen, dvs. kolon-epitelkarsinomceller uttrykker et annet første exon.

BLAST-analyse ved å anvende en genomisk database (figur 18) lokaliserer det første exonet til NM_000061 BTK-transkriptet ved 101160K på kromosom X contiget i overensstemmelse med begynnelsen av BTK-lokuset. Som en forskjell oppstilles det første exonet i det nye BTK-transkriptet 15192 bp 5' for det først kjente BTK-exonet, rett nedstrøms for RPL36A-lokuset, noe som tyder på at det korresponderer til et hittil ukjent BTK-exon. Videre er dette nye exonet til stede i HCT116p53KO istedenfor det første "klassiske" exonet og tyder på at dette er et "alternativt" første exon hvis anvendelse gir opphav til et forskjellig BTK-mRNA, transkribert i celler som uttrykker denne kortere BTK isoformen. PCR/sekvenseringseksperimenter viste uttrykket av dette "alternative" BTK-mRNA-et, ikke bare i alle kolonkarsinomcellelinjene som ble testet (HCT116p53KO, DLD-1 og SW480), men også i 9/9 FFPE-prøver fra kolonkarsinompasienter (figur 19).

Det bør legges merke til at det første exonet i BTK, identifisert ved GenBank tilgang # NM_000061, korresponderer til 5'UTR av mRNA, hvor ATG-tripletten som koder for den første Met-aminosyren i BTK-proteinet som er lokalisert i det andre exonet. 5'UTR-er utfører vanligvis regulatoriske funksjoner, slik som å styre cap-avhengig eller IRES-mediert cap-uavhengig translasjon. Et første exon, som identifisert i det nye transkriptet, kan derfor diktere om en forskjellig ATG (i dette tilfellet en ATG lokalisert i det fjerde exonet) må anvendes for å starte

translasjonen av BTK-protein og derfor regulere uttrykket av forskjellige isoformer.

5 Nukleotidsekvensen i det første exonet korresponderer til 5'UTR i det nye mRNA uttrykt av BTK-genet er vist i SEQ ID NO:1, vedlagt den foreliggende oppfinnelsen.

10 Aminosyresekvensen til den nye BTK-protein isoformen som kodes for av det nye transkriptet er vist i SEQ ID NO:2, vedlagt den foreliggende oppfinnelsen.

15 Resultatene ovenfor antyder en fremgangsmåte for å bestemme resistensen av tumorceller for kjemoterapeutiske medikamenter så vel som en fremgangsmåte for identifikasjonen av nærvær av tumorstamcellene hvori uttrykket av BTK-genet omfatter trinnene med å verifisere nærværet av den nye isoformen av BTK-proteinet.

20 Nærværet av den nye BTK-protein isoformen kan kontrolleres ved å verifisere nærværet av proteinet, for eksempel ved å anvende Western blott- eller immunpresipiterings- eller immunkjemi- eller immunfluorescensanalyse eller foretrukket å verifisere nærværet av mRNA-et som har det alternative første exonet hvis cDNA viser nukleotidsekvensen definert i SEQ ID NO:1. Sistnevnte kan med fordel utføres ved hjelp av PCR-analyse, fortrinnsvis ved å anvende primere som har en sekvens inkludert i SEQ ID NO:1.

25 Denne nye fremgangsmåten forventes å vise relevante fordeler med hensyn til kjent teknikk, særlig når den anvendes til å analysere tumorvev fra mennesker.

30 Faktisk er det velkjent at tumorvev fra mennesker kan inneholde en effektiv mengde lymfocytter som også kan uttrykke BTK-protein, og dermed forstyrres søket etter BTK-protein uttrykt av tumorcellene.

35 Imidlertid er BTK-protein som uttrykkes i lymfocytter av den "klassiske" BTK-protein isoformen som har en molekylvekt på 77 KDa slik at søket etter den nye BTK-protein isoformen kan utføres uten forstyrrelse, med en enkel PCR-analyse som ser etter nærværet av BTK-mRNA som har det alternative første exonet.

Patentkrav

1. Isolert protein med aminosyresekvensen SEQ ID NO:2, som koder for en BTK-protein isoform.
- 5 2. Isolert polynukleotid som koder for det isolerte proteinet ifølge krav 1.
3. Polynuklotidet ifølge krav 2 som har sekvensen av det første exonet som korresponderer til SEQ ID NO:1
- 10 4. In vitro fremgangsmåte for å redusere medikamentresistens i epiteltumorceller som omfatter trinnet med funksjonelt og selektivt å blokkere et BTK-gen ved:
 - a. et lite interfererende RNA (siRNA) oligonukleotidmolekyl; eller
 - b. LFM-A13, hvor BTK-genet koder for en protein isoform som har en
- 15 molekylvekt mellom 65 og 68 kDa av aminosyresekvensen SEQ ID NO:2
5. Fremgangsmåte ifølge krav 4 hvor tumorcellene er stamceller.
6. Forbindelse som er i stand til å funksjonelt blokkere BTK-genet for anvendelse
- 20 til å redusere resistensen mot kjemoterapeutiske medikamenter i den terapeutiske behandlingen av epiteltumorpatologier hvor forbindelsen er et oligonukleotidmolekyl av lite internerende RNA (siRNA), eller LEM-A13.
7. Farmasøytisk kit som omfatter et lite interfererende RNA (siRNA)
- 25 oligonukleotidmolekyl eller LFM-A13 som er i stand til funksjonelt og selektivt å blokkere et BTK-gen, og et kjemoterapeutisk medikament valgt fra gruppen som består av 5-fluoruracil, oksaliplatin eller oksaliplatin i blanding med 5-fluoruracil, hvor kittet er for anvendelse i behandlingen av epiteltumorpatologier.
- 30 8. Farmasøytisk kit for anvendelse ifølge krav 7 hvor epiteltumorpatologiene er valgt fra gruppen som består av kolon-, bryst-, lunge- og ovarietumorer.

SEKVENSLISTE

<110> Università degli Studi di Milano - Bicocca Lavitrano, Marialuisa Grassilli,
Emanuela Helin, Kristian

<120> Modulator compounds of the drug resistance in epithelial tumour cells

<130> BE004398-PCT356

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 300

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ttttggtgga ctctgctacg tagtggcggt cagtgaaggg agcagtgttt ttcccagatc	60
ctctggcctc cccgtccccg aggggaagcca ggactagggt cgaatgaagg ggtcctccac	120
ctccacgttc cattcctgtt ccacctcaag gtcactggga acacctttcg cagcaaactg	180
ctaattcaat gaagacctgg agggagccaa ttgttccagt tcattctatca catggccagt	240
tggtccattc aacaaatggt tattggatgc ccattatgtg gcaggcactg ttccggggga	300

<210> 2

<211> 571

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

2

Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val
 1 5 10 15

Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu
 20 25 30

Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser
 35 40 45

Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro Cys Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr
 50 55 60

Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala Lys Asn Ala Met Gly Cys Gln Ile Leu
 65 70 75 80

Glu Asn Arg Asn Gly Ser Leu Lys Pro Gly Ser Ser His Arg Lys Thr

[illegible]

4

Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met Ile Lys Glu Gly Ser Met Ser Glu Asp
 340 345 350

Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val Met Met Asn Leu Ser His Glu Lys
 355 360 365

Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile
 370 375 380

Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu
 385 390 395 400

Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp
 405 410 415

Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg
 420 425 430

Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Asn Asp Gln Gly Val Val Lys
 435 440 445

Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr
 450 455 460

Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Pro Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val
 465 470 475 480

Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser Ser Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly
 485 490 495

Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr Ser Leu Gly Lys Met Pro Tyr Glu Arg
 500 505 510

Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala Glu His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu
 515 520 525

Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser Glu Lys Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser
 530 535 540

Cys Trp His Glu Lys Ala Asp Glu Arg Pro Thr Phe Lys Ile Leu Leu
 545 550 555 560

Ser Asn Ile Leu Asp Val Met Asp Glu Glu Ser
 565 570

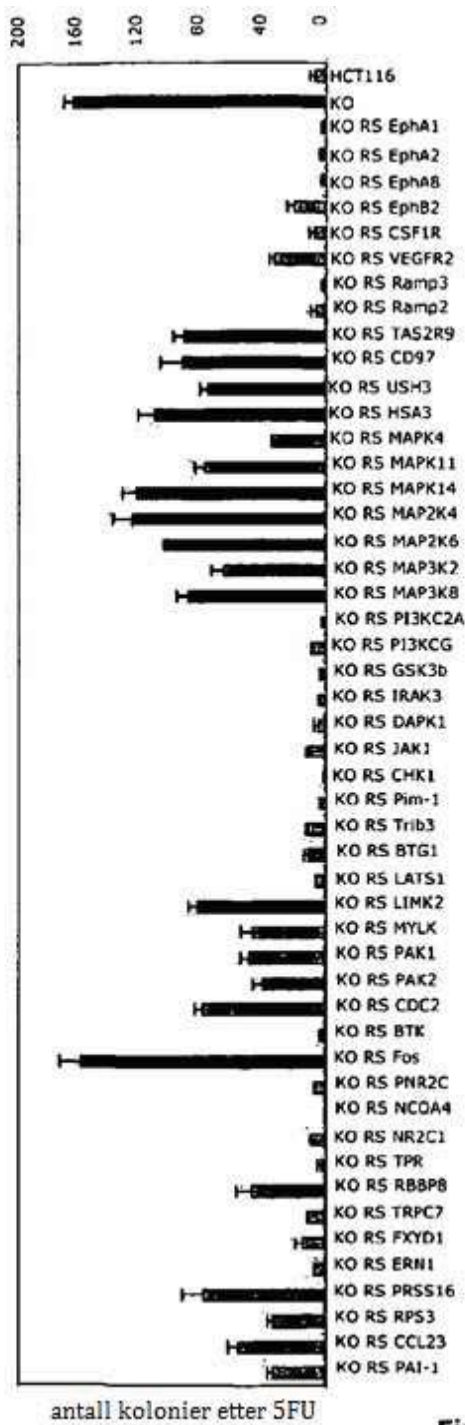


Fig. 1

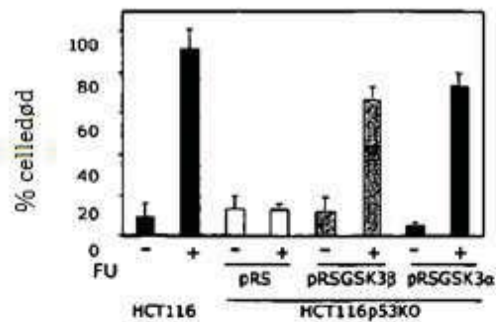


Fig. 2a

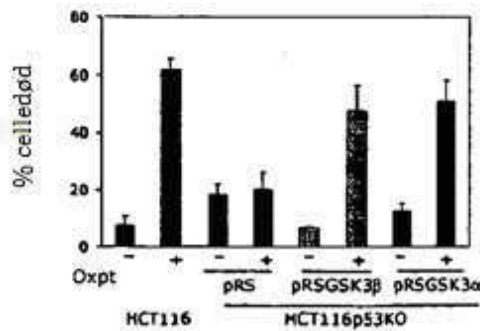


Fig. 2b

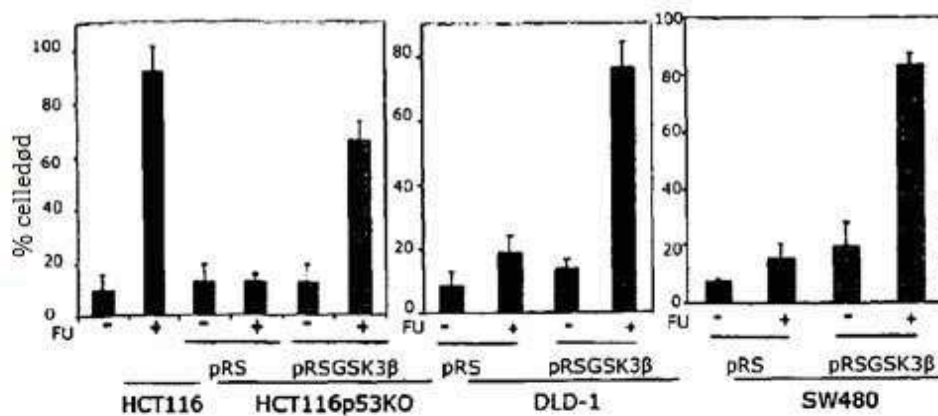


Fig. 3a

Fig. 3b

Fig. 3c

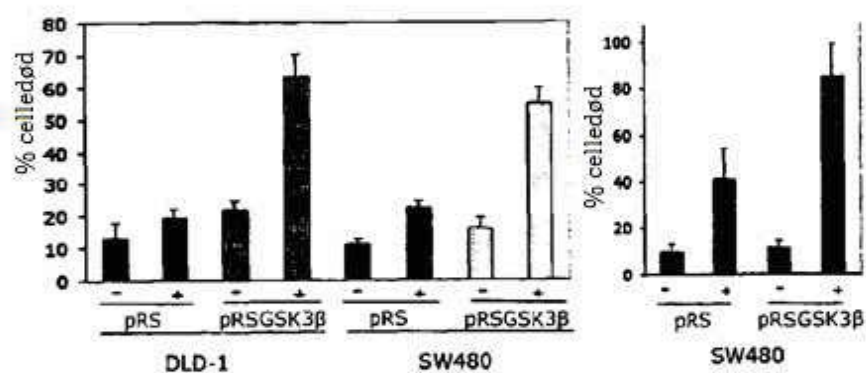


Fig. 4a

Fig. 4b

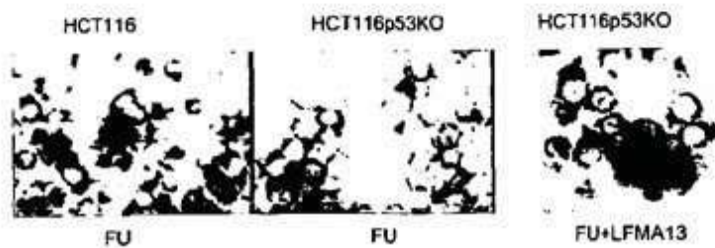
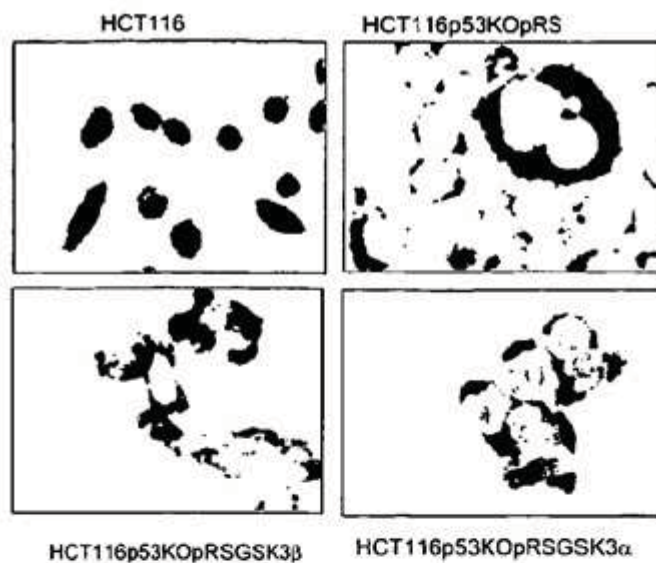
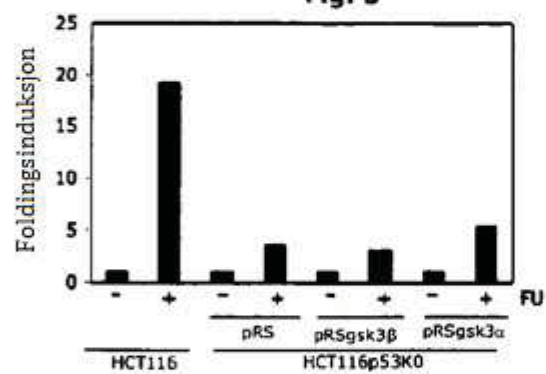
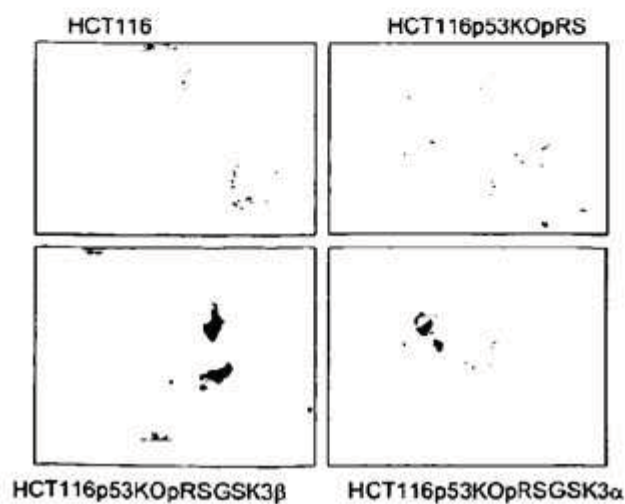


Fig. 13

**Fig. 5****Fig. 6****Fig. 7**

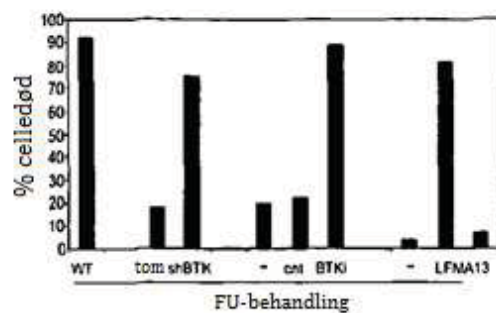


Fig. 8

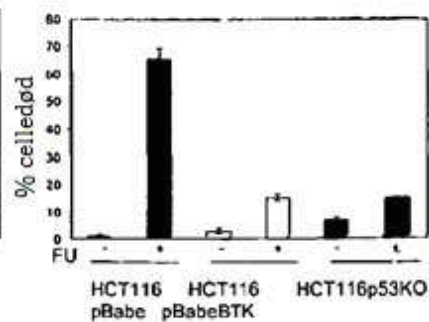


Fig. 9

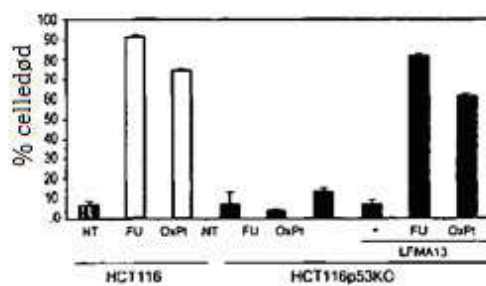


Fig. 10a

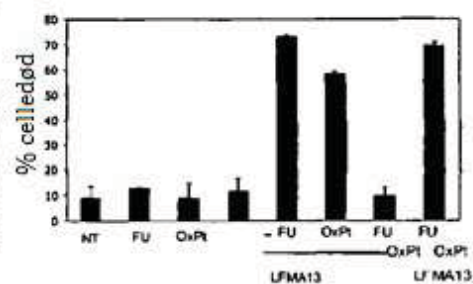
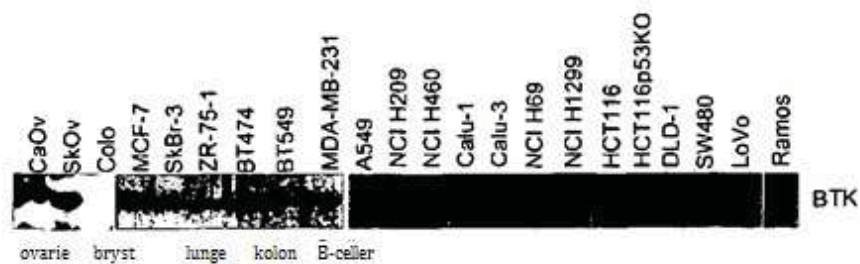


Fig. 10b

Fig. 11



5

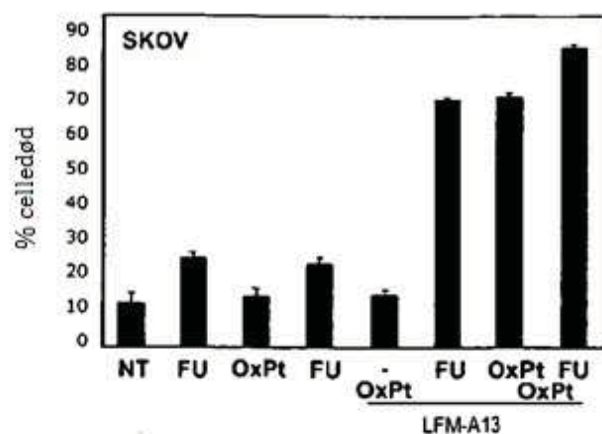


Fig. 12a

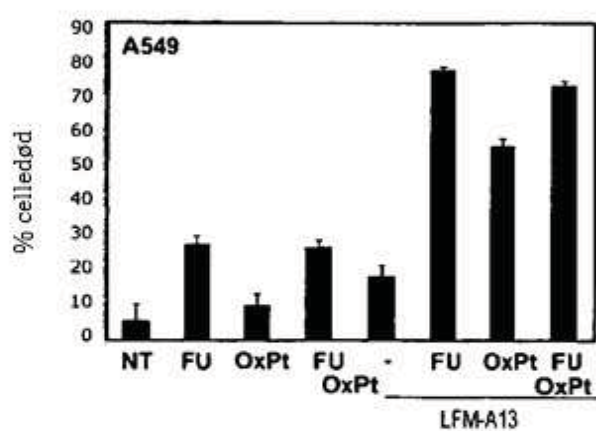


Fig. 12b

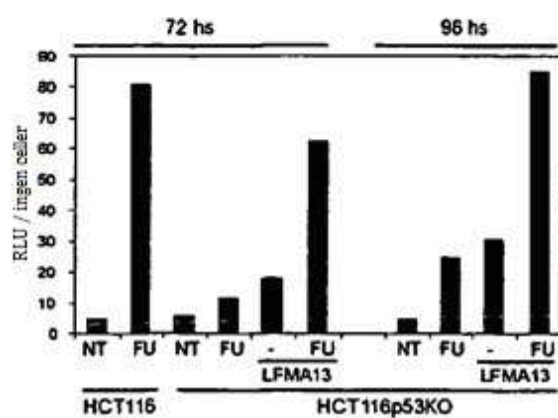


Fig. 14

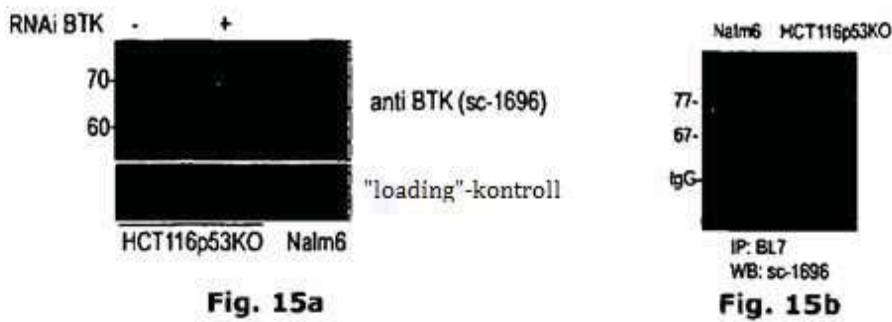


Fig. 15a

Fig. 15b

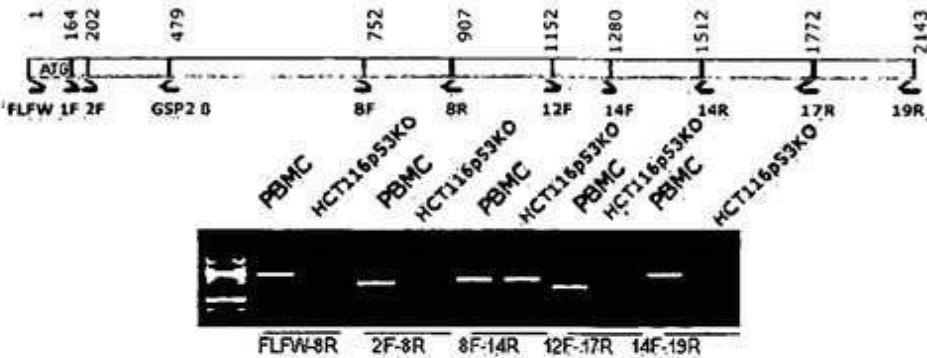


Fig. 16

CLUSTAL 2.0.3 multiple sequence alignment

```
NM_000061
alternative
-----
TTTTGGTGGACTCTGCTACGTAGTGGCGTTCAGTGAAGGGAGCAGTGTTTTTCCAGATC 60

NM_000061
alternative
-----
CTCTGGCCTCCCCGTCCCGAGGGAAGCCAGGACTAGGGTCGAATGAAGGGTCTCTCCAC 120

NM_000061
alternative
-----
CTCCACGTTCCATTCTGTTCCACCTCAAGGTCACCTGGGAACACCTTTCGACGCAAACTG 180
** ****

NM_000061
alternative
TCCTTCCTCTCTGGACTGTAAGAATATGTCTCCAGGGCCAGT--GTCTGCTGCG-ATCGA 66
--CTAATTCAATGAAGACCTGGAGGGAGCCAATTGTCCAGTTCATCTATCACATGGCCA 238
** ** * * * * *

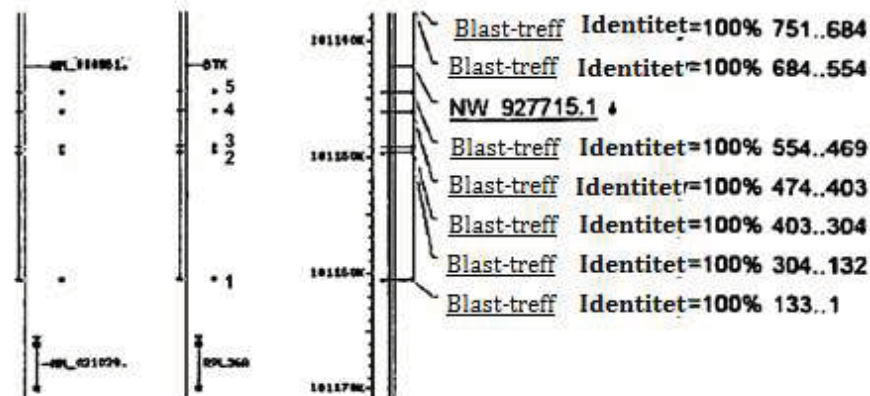
NM_000061
alternative
GTCCACCTTCCAAGTCTCTGGCATCTCAATGCATCTGGGAAGCTACCTGCATTAAGTCAG 126
GTTGTTCATTCAACAAATGGTTATTGGATGC--CCATTATGTGGCAGGCACCTGTTCCGG 296
** * * * * *

NM_000061
alternative
GACTGAGCACACAGGTGAACCTCCAGAAAGAAGAAGCTATGGCCGAGTGATTCTGGAGAG 186
GGGAGAGCACACAGGTGAACCTCCAGAAAGAAGAAGCTATGGCCGAGTGATTCTGGAGAG 356
* .....
```

Fig. 17

not in

Blast-exoner 1-5 NM_000061 vs. genomisk



Blast-exoner 1-5 alternative BTK transkript vs. genomisk

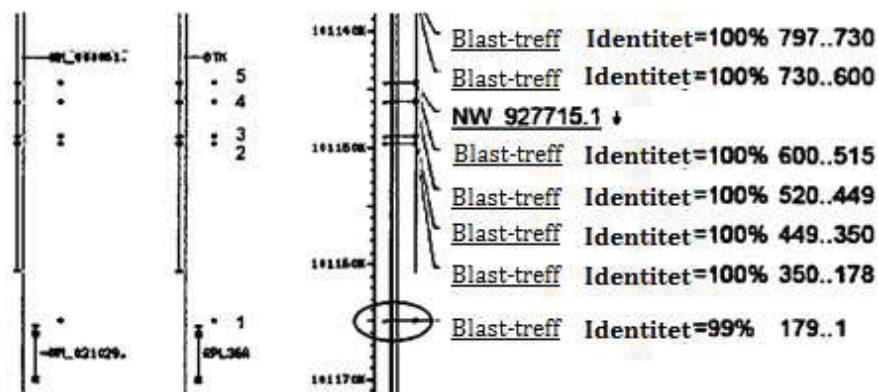


Fig.18



Fig. 19