

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 15/11 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780051107.7

[43] 公开日 2010 年 3 月 17 日

[11] 公开号 CN 101675165A

[22] 申请日 2007.12.10

[21] 申请号 200780051107.7

[30] 优先权

[32] 2006.12.8 [33] US [31] 60/869,295

[32] 2006.12.29 [33] US [31] 60/882,728

[86] 国际申请 PCT/US2007/087037 2007.12.10

[87] 国际公布 WO2008/073922 英 2008.6.19

[85] 进入国家阶段日期 2009.8.7

[71] 申请人 奥斯瑞根公司

地址 美国得克萨斯州

共同申请人 耶鲁大学

[72] 发明人 查尔斯·D·约翰逊 麦克·拜罗姆

安德里斯·G·巴德

弗兰克·J·斯莱克 大卫·布朗

德米特里·奥弗切兰柯

凯文·克尔纳尔

[74] 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司

代理人 阎斌斌 韩 龙

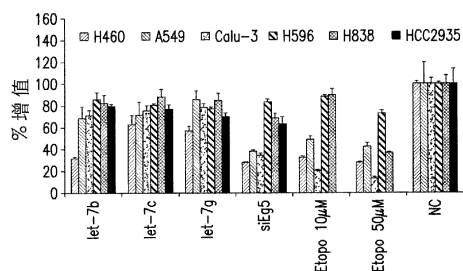
权利要求书 5 页 说明书 165 页 序列表 5 页
附图 3 页

[54] 发明名称

LET-7 微小 RNA 的功能和靶标

[57] 摘要

本发明涉及治疗与可受 let-7 调节的基因或遗传途径的异常表达有关的疾病的方法和组合物，或者评估所述治疗的方法和组合物。所述方法可包括对患者评估受 let-7 调节的基因或遗传途径，和/或使用表达谱来评估患者的状况，或者用适当的 miRNA 治疗该患者。



1. 一种调节细胞中的基因表达的方法，所述方法包括给予该细胞一定量的包含 let-7 核酸序列的分离核酸，所述 let-7 核酸序列的量足以调节受 let-7 miRNA 家族成员调节的基因的表达。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述受调节的基因包含表 2、3、4、5、6、7、8 和 9 中所示的一个或多个基因。
3. 权利要求 2 的方法，其中基因的表达被下调。
4. 权利要求 2 的方法，其中基因的表达被上调。
5. 权利要求 2 的方法，其中受调节的基因包含 ATRX、AURKA/STK6、AURKB/STK12、BRCA1、BRCA2、BUB1、BUB1B、BZRP、CCNA2、CCNB1、CCNE2、CCNG2、CDC2、CDC20、CDC23、CDC25A、CDC6、CDCA7、CDK2、CDK6、CDKN2B、CDT1、CEBPD、CKS1B、CSF1、EIF4E、EPHB2、ERBB3、FASN、FGFBP1、FGFR4、FH、GMNN、IGFBP1、IL8、ITGA6、JUN、JUNB、LHFP、MCAM、MET、MVP、MXI1、MYBL1、MYBL2、NRAS、P8、PDCD4、PLK1、PRKCA、RASSF2、SIVA、SKP2、SMAD4、TACC3、TFDP1、TGFB3、TNFSF10 或 VIM 中的一个或多个。
6. 权利要求 5 的方法，其中受调节的基因是 ATRX、AURKA/STK6、AURKB/STK12、BRCA1、BRCA2、BUB1、BUB1B、BZRP、CCNA2、CCNB1、CCNE2、CCNG2、CDC2、CDC20、CDC23、CDC25A、CDC6、CDCA7、CDK2、CDK6、CDKN2B、CDT1、CEBPD、CKS1B、CSF1、EIF4E、EPHB2、ERBB3、FASN、FGFBP1、FGFR4、FH、GMNN、IGFBP1、IL8、ITGA6、JUN、JUNB、LHFP、MCAM、MET、MVP、MXI1、MYBL1、MYBL2、NRAS、P8、PDCD4、PLK1、PRKCA、RASSF2、SIVA、SKP2、SMAD4、TACC3、TFDP1、TGFB3、TNFSF10 和 VIM。
7. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞是在患有、怀疑患有以下疾病或者有发展以下疾病的危险的受治疗者中：代谢性疾病、免疫性疾病、感染性疾病、心血管疾病、消化疾病、内分泌疾病、眼睛疾病、泌尿生殖器疾病、血液疾病、肌肉骨骼疾病、神经系统疾病、先天性疾病、呼吸疾病、皮肤疾病或癌症疾病或病症。
8. 权利要求 7 的方法，其中所述感染性疾病或病症是寄生虫感染、细菌感染、

病毒感染或真菌感染。

9. 权利要求 7 的方法，其中所述细胞是在患有、怀疑患有以下疾病或者有发展以下疾病的危险的受治疗者中：急性淋巴细胞性白血病；急性髓性白血病；甲型地中海型贫血；血管肉瘤；星细胞瘤；乳腺癌；膀胱癌；伯基特淋巴瘤；子宫颈癌；头颈癌；慢性淋巴细胞性白血病；慢性髓母细胞性白血病；结肠直肠癌；子宫内膜癌；纤维肉瘤、神经胶质瘤；成胶质细胞瘤；多形性成胶质细胞瘤；胃癌；胃泌素瘤；肝母细胞瘤；肝细胞癌；霍奇金淋巴瘤；卡波济氏肉瘤；喉癌；白血病；肺癌；平滑肌瘤；平滑肌肉瘤；脂肪瘤；黑素瘤；髓母细胞瘤；髓性白血病；间皮瘤；黏液纤维肉瘤；多发性骨髓瘤；成神经细胞瘤；非霍奇金淋巴瘤；非小细胞肺癌；卵巢癌；食道癌；口咽癌；骨肉瘤；胰腺癌；乳头状癌；前列腺癌；前髓细胞性白血病；肾细胞癌；成视网膜细胞瘤；横纹肌肉瘤；散发性乳头状肾癌；头颈鳞状细胞癌；唾液腺肿瘤；小肠癌；T 细胞白血病；甲状腺癌或尿路上皮癌，其中对一个或多个基因的调节足以引起治疗反应。
10. 权利要求 9 的方法，其中治疗反应是癌细胞活力降低、增殖减少或转移减少。
11. 权利要求 1 的方法，其中所述 let-7 核酸包含以下至少一个：hsa-let-7a-1、hsa-let-7a-2、hsa-let-7a-3、hsa-let-7b、hsa-let-7c、hsa-let-7d、hsa-let-7e、hsa-let-7f-1、hsa-let-7f-2、hsa-let-7g、hsa-let-7i 或者它们的片段。
12. 权利要求 1 的方法，其中所述 let-7 核酸是 let-7 功能的抑制剂。
13. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞是上皮细胞、基质细胞或黏膜细胞。
14. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞是脑细胞、神经元细胞、血液细胞、子宫颈细胞、食道细胞、肺细胞、心血管细胞、肝细胞、乳腺细胞、骨细胞、甲状腺细胞、腺细胞、肾上腺细胞、胰腺细胞、胃细胞、肠细胞、肾细胞、膀胱细胞、前列腺细胞、子宫细胞、卵巢细胞、睾丸细胞、脾细胞、皮肤细胞、平滑肌细胞、心肌细胞或横纹肌细胞。
15. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞是癌细胞。
16. 权利要求 15 的方法，其中所述癌细胞是神经元细胞、神经胶质细胞、肺细胞、肝细胞、脑细胞、乳腺细胞、膀胱细胞、血液细胞、白血病细胞、结肠细胞、子宫内膜细胞、胃细胞、皮肤细胞、卵巢细胞、脂肪细胞、骨细胞、子宫颈细胞、食道细胞、胰腺细胞、前列腺细胞、肾细胞、子宫细胞、睾丸细胞、上皮细胞、肌肉细胞、口咽细胞、肾上腺细胞、胃肠细胞、间皮细胞、

唾液腺细胞、小肠细胞或甲状腺细胞。

17. 权利要求 1 的方法, 其中所述分离的 let-7 核酸是重组核酸。
18. 权利要求 17 的方法, 其中所述重组核酸是 RNA。
19. 权利要求 17 的方法, 其中所述重组核酸是 DNA。
20. 权利要求 19 的方法, 其中所述重组核酸包含 let-7 表达盒。
21. 权利要求 20 的方法, 其中所述表达盒包含在病毒载体或质粒 DNA 载体中。
22. 权利要求 21 的方法, 其中所述病毒载体以 1×10^5 - 1×10^{14} 个病毒颗粒/剂量的剂量给予, 或者所述质粒 DNA 载体以 100 mg/患者-4000 mg/患者的剂量给予。
23. 权利要求 1 的方法, 其中所述 let-7 核酸是合成核酸。
24. 权利要求 23 的方法, 其中所述核酸以 0.01 mg/kg 体重-10 mg/kg 体重的剂量给予。
25. 权利要求 1 的方法, 其中所述 let-7 是 hsa-let-7。
26. 权利要求 1 的方法, 其中所述核酸经肠给予或胃肠外给予。
27. 权利要求 26 的方法, 其中经肠给予是口服给予。
28. 权利要求 26 的方法, 其中胃肠外给予是血管内、颅内、胸膜内、肿瘤内、腹膜内、肌肉内、淋巴内、腺内、皮下、局部、支气管内、气管内、鼻内、吸入或滴注给予。
29. 权利要求 1 的方法, 其中所述核酸包含在药物制剂中。
30. 权利要求 29 的方法, 其中所述药物制剂是脂质组合物。
31. 权利要求 29 的方法, 其中所述药物制剂是纳米颗粒组合物。
32. 权利要求 29 的方法, 其中所述药物制剂由生物相容性和/或生物可降解分子组成。
33. 一种调节细胞途径或生理途径的方法, 所述方法包括给予细胞一定量的包含 let-7 核酸序列的分离核酸, 所述 let-7 核酸序列的量足以调节这样的细胞途径或生理途径, 该细胞途径或生理途径包括表 2、3、4、5、6、7、8 和 9 中所示的一个或多个基因或者与一个或多个基因相关的基因产物。
34. 权利要求 33 的方法, 其中所述受调节的基因包含 ATRX、AURKA/STK6、AURKB/STK12、BRCA1、BRCA2、BUB1、BUB1B、BZRP、CCNA2、CCNB1、CCNE2、CCNG2、CDC2、CDC20、CDC23、CDC25A、CDC6、CDCA7、CDK2、CDK6、CDKN2B、CDT1、CEBPD、CKS1B、CSF1、EIF4E、EPHB2、

ERBB3、FASN、FGFBP1、FGFR4、FH、GMNN、IGFBP、IL8、ITGA6、JUN、JUNB、LHFP、MCAM、MET、MVP、MXI1、MYBL1、MYBL2、NRAS、P8、PDCD4、PLK1、PRKCA、RASSF2、SIVA、SKP2、SMAD4、TACC3、TFDP1、TGFB3、TNFSF10 或 VIM 中的一个或多个。

35. 权利要求 33 的方法，其中所述 let-7 核酸包含以下至少一个：hsa-let-7a-1、hsa-let-7a-2、hsa-let-7a-3、hsa-let-7b、hsa-let-7c、hsa-let-7d、hsa-let-7e、hsa-let-7f-1、hsa-let-7f-2、hsa-let-7g、hsa-let-7i 或者它们的片段。
36. 权利要求 33 的方法，所述方法还包括给予 2、3、4、5、6 个或更多个 miRNA。
37. 权利要求 36 的方法，其中所述 miRNA 包含在单一组合物中。
38. 权利要求 33 的方法，其中至少有两个细胞途径或生理途径受调节。
39. 权利要求 36 的方法，其中至少有一个基因受到多个 miRNA 的调节。
40. 权利要求 33 的方法，其中基因或基因产物的表达被下调。
41. 权利要求 33 的方法，其中基因或基因产物的表达被上调。
42. 权利要求 33 的方法，其中所述细胞是癌细胞。
43. 权利要求 42 的方法，其中所述癌细胞是肺癌细胞或肝癌细胞或急性髓性白血病细胞。
44. 权利要求 42 的方法，其中所述细胞的活力降低，所述细胞的增殖减少，所述细胞的转移减少或者所述细胞对疗法的敏感性提高。
45. 权利要求 42 的方法，其中所述癌细胞是神经元细胞、神经胶质细胞、肺细胞、肝细胞、脑细胞、乳腺细胞、膀胱细胞、血液细胞、白血病细胞、结肠细胞、子宫内膜细胞、胃细胞、皮肤细胞、卵巢细胞、脂肪细胞、骨细胞、子宫颈细胞、食道细胞、胰腺细胞、前列腺细胞、肾细胞、子宫细胞、睾丸细胞、上皮细胞、肌肉细胞、口咽细胞、肾上腺细胞、胃肠细胞、间皮细胞或甲状腺细胞。
46. 权利要求 33 的方法，其中所述分离的 let-7 核酸是重组核酸。
47. 权利要求 46 的方法，其中所述重组核酸是 DNA。
48. 权利要求 47 的方法，其中所述重组核酸是病毒载体或质粒 DNA。
49. 权利要求 33 的方法，其中所述核酸是 RNA。
50. 权利要求 46 的方法，其中所述重组核酸是合成核酸。
51. 一种治疗经诊断患有或者怀疑患有或者怀疑会发展与受到 miRNA 调节的基因有关的病理状况或疾病的患者方法，所述方法包括以下步骤：

- (a)给予该患者一定量的包含 let-7 核酸序列的分离核酸,所述 let-7 核酸序列的量足以调节细胞途径或生理途径; 和
 - (b)给予第二疗法, 其中对细胞途径或生理途径的调节使得该患者对该第二疗法敏感。
52. 权利要求 51 的方法, 其中一个或多个细胞途径或生理途径包括表 2、3、4、5、6、7、8 和 9 中所示的一个或多个基因。
53. 一种选择给予患有、怀疑患有病理状况或疾病或者具有发展病理状况或疾病的倾向的受治疗者的 miRNA 的方法, 所述方法包括:
- (a)测定选自表 2、3、4、5、6、7、8 和 9 的一个或多个基因的表达谱;
 - (b)基于所述表达谱, 评估所述受治疗者对 miRNA 疗法的敏感性; 和
 - (c)基于评估的敏感性选择一个或多个 miRNA。
54. 权利要求 53 的方法, 所述方法进一步包括用 1、2、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个 miRNA 治疗所述受治疗者。
55. 权利要求 54 的方法, 其中每个 miRNA 是单独给予或者以一个或多个组合给予。
56. 权利要求 55 的方法, 其中所述 miRNA 在单一组合物中。
57. 一种评估细胞、组织或受治疗者的方法, 所述方法包括在至少一个样品中评估 let-7 的表达与评估来自表 2、3、4、5、6、7 或 8 的一个或多个基因的表达相组合。
58. 一种评估样品中的 let-7 状态的方法, 所述方法包括以下步骤:
- (a)评估样品中来自表 2、3、4、5、6、7、8 或 9 的一个或多个基因的表达; 和
 - (b)基于所述样品中的 let-7 表达水平确定 let-7 状态。

LET-7 微小 RNA 的功能和靶标

本申请涉及 2005 年 5 月 31 日提交的美国专利申请系列号 11/141,707 和 2005 年 11 月 14 日提交的系列号 11/273,640, 每个专利申请都通过引用其全文并入本文。

技术领域

本发明主要涉及分子生物学领域。更具体的说, 本发明涉及关系到与这样的生物途径有关的疾病的诊断和治疗的方法和组合物, 所述生物途径直接或间接接受 let-7 微小 RNA (miRNA) 家族调节。

背景技术

在 2001 年, 有几个研究小组使用克隆方法, 从线虫(*C. elegans*)、果蝇(*Drosophila*)和人类分离和鉴定了一大批“微小 RNA” (miRNA) (Lagos-Quintana 等人, 2001; Lau 等人, 2001; Lee 和 Ambros, 2001)。已在似乎没有内源 siRNA 的植物和包括人类在内的动物中鉴定了几百个 miRNA。因此, miRNA 虽然与 siRNA 相似, 但却是不同的。

迄今观察到的 miRNA 其长度为大约 21-22 个核苷酸, 它们是从较长的前体产生, 而这些前体是从非蛋白编码基因转录而来。参见 Carrington 等人 (2003) 的综述。这些前体形成能在自身互补区域中自身折回的结构; 它们然后被动物中的核酸酶切酶(Dicer)或植物中的 DCL1 加工。miRNA 分子通过与其靶标的精确或不精确碱基配对来中断翻译。

许多 miRNA 在众多生物中是保守的, 这引出了这样的提议, 即 miRNA 参与生物体整个生命中的必要生物过程(Esquela-Kerscher 和 Slack, 2006)。具体的说, 已指出 miRNA 参与调节细胞生长及细胞和组织分化; 与癌症的发展有关的细胞过程。例如, lin-4 和 let-7 都调节线虫发育过程中从一个幼虫阶段向另一个幼虫阶段的传代(Ambros, 2001)。mir-14 和 bantam 是果蝇 miRNA, 它们显然是通过调节参与细胞凋亡的基因的表达来调节细胞死亡(Brennecke 等人, 2003, Xu 等人, 2003)。

随着科学家们开始理解到 miRNA 分子在调节真核生物基因表达中所起到的广泛作用, 对这些分子的研究在不断增加。具体的说, 最近几个研究已证实, 有许多 miRNA 的表达水平与各种癌症有关联(Esquela-Kerscher 和 Slack 2006 综述)。有两个 miRNA 其表达的减低与人类慢性淋巴细胞性白血病强烈相关, 这提供了 miRNA 与癌症之间的一个可能关联(Calin 等人, 2002)。其他人评估了众多的 miRNA 在多种人类癌症中的表达模式, 观察到几乎所有的 miRNA 在许多癌症类型之间有差异表达(Lu 等人, 2005)。大多数研究只是根据间接证据将 miRNA 与癌症关联。但是, He 等人 (2005)提供了更多的直接证据, 证明 miRNA 可通过迫使六种 miRNA 在小鼠中过量表达, 导致 B 细胞淋巴瘤显著增加, 而直接有助于引起癌症。

在人类中, let-7 据认为在肺癌发展中起到作用。在许多肺癌细胞系中 (Takamizawa 等人, 2004), 和在肺癌患者的肿瘤样品中相对于其正常样品而言 (Takamizawa 等人, 2004; Johnson 等人, 2005), Let-7 表达都减低。let-7 的过量表达抑制了肺癌细胞系 A549 的生长 (Takamizawa 等人, 2004)。已证实 Let-7 能减少 HepG2 细胞中 RAS 癌基因的表达 (Johnson 等人, 2005)。这些资料合在一起提示, let-7 miRNA 可在肺组织中充当肿瘤抑制物。

let-7 对靶标基因的调节据认为主要是通过翻译抑制来发生, 但 mRNA 不稳定性也可能是一个机制 (Bagga 等人, 2005, Reinhart 等人, 2000)。除 RAS 外, 在癌细胞中受 let-7 调节的基因、基因途径和基因网络在很大程度上仍未知。目前, 这代表着其中 let-7 可能起作用的癌症的治疗的一个显著限制。

在动物中, 大多数 miRNA 据认为是通过在其基因靶标的 3' 非翻译区当中的不精确碱基配对, 来调节基因的。生物信息学分析提示, 任何给定的 miRNA 可结合多达几百种不同基因并改变它们的表达。此外, 单个基因可被几个 miRNA 调节。因此, 每个 miRNA 都可调节基因、基因途径和基因网络之间的复杂相互作用。这些与 miRNA 相关的调节途径和网络的误调节或改变, 很可能会导致紊乱、病理状况和/或疾病如癌症的发展。虽然生物信息学工具有助于预测 miRNA 结合靶标, 但所有的工具都有局限性。由于与其靶标结合位点的不完全的互补性, 单单用生物信息学工具难以精确预测 miRNA 靶标。

通过操纵 miRNA 表达或通过修复 miRNA 误调节来纠正基因表达错误, 这两种做法代表着修复遗传失调和治愈疾病如癌症的有希望的方法。目前这个方法的缺陷是, 有关受任何给定 miRNA 影响的调节途径和网络的细节在很大程度

上仍未知。如上所述,生物信息学只能提供对 miRNA 靶标的数目和身份(identity)的不精确估计。因此存在着鉴定受 let-7 表达调节或可调节 let-7 表达的基因、遗传途径和遗传网络的需求。

发明内容

在具体的各方面,可根据一个或多个 miRNA 或 mRNA 的表达和/或异常表达,来选择受治疗者或患者进行治疗。在又一个方面,可根据一个或多个生物或生理途径的异常,包括一个或多个与某途径有关的基因的异常表达,或者包括一个或多个由一个或多个与某途径有关的基因编码的蛋白质的异常表达,来选择受治疗者或患者进行治疗。在某些方面,将本发明的组合物给予患有、怀疑患有或有危险发展以下疾病的受治疗者:代谢性疾病、免疫疾病、感染性疾病、心血管疾病、消化疾病、内分泌疾病、眼睛疾病、泌尿生殖器疾病、血液疾病、肌肉骨骼疾病、神经系统疾病、先天性疾病、呼吸疾病、皮肤疾病或癌性疾病或病症。

在进一步的方面,可根据 miRNA 表达或者生物和/或生理途径的异常,来选择受治疗者或患者。可根据对 miRNA 或 mRNA 表达或该表达的缺乏的评估和/或分析,对受治疗者进行疗法或治疗方案的敏感性、抗性和/或功效方面的评估。可在将一个或多个疗法给予受治疗者或患者之前、给予过程中或给予之后,对受治疗者进行其对某些疗法的顺应性(amenability)的评估。通常,可通过分析 miRNA 和/或 mRNA 以及结合包括但不限于组织学、免疫组织化学、血液研究等在内的其他评价方法,来进行评估或评价。

在一些实施方案中,感染性疾病或病症包括细菌感染、病毒感染、寄生虫感染或真菌性感染。这些基因和途径中有许多与各种癌症和其他疾病有关。癌性病症包括但不限于间变性大细胞淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、慢性淋巴母细胞性白血病、多发性骨髓瘤、睾丸肿瘤、星细胞瘤、急性骨髓性白血病、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道鳞状细胞癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、白血病、脂肪瘤、黑素瘤、套细胞淋巴瘤、黏液纤维肉瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、头部和颈部的鳞状细胞癌、甲状腺癌、尿路上皮癌,在这些癌性病症中对一个或多个基因的调节足以引起治疗应答。通常,癌性病症是一种异常高增殖性病症,

它与生长不受控制或者不能进行包括细胞凋亡在内的细胞死亡有关。

本发明提供用以鉴定这样的基因的方法和组合物，所述基因是 *let-7* 调节的直接靶标，或者是 *hsa-let-7* 介导的上游基因表达修饰后的下游调节靶标。此外，本发明描述了生物样品中受 *hsa-let-7* 表达影响的基因途径和网络。这些基因和途径中有许多与各种癌症和其他疾病有关。*let-7* 在细胞中的表达或功能的改变，会导致这些关键基因的表情的变化和导致疾病或其他病症的发展。将 *let-7* (对于其中 *miRNA* 被下调的疾病)或 *let-7* 抑制剂(对于其中 *miRNA* 被上调的疾病)导入到疾病细胞或组织或受治疗者中，会导致产生治疗应答。本发明提供了受 *let-7* 直接或间接调节的关键基因的身份及其相关疾病。在某些方面，细胞可以是上皮细胞、基质细胞或黏膜细胞。细胞可以是但不限于是脑细胞、神经元细胞、血液细胞、食道细胞、肺细胞、心血管细胞、肝细胞、乳腺细胞、骨细胞、甲状腺细胞、腺细胞、肾上腺细胞、胰腺细胞、胃细胞、肠细胞、肾细胞、膀胱细胞、前列腺细胞、子宫细胞、卵巢细胞、睾丸细胞、脾细胞、皮肤细胞、平滑肌细胞、心肌细胞或横纹肌细胞。在某些方面，细胞、组织或靶标在 *miRNA* 表达方面可能没有缺陷，但可能仍在对 *miRNA* 的表达或过量表达发生治疗性应答。*let-7* 可用作任何这些疾病的治疗靶标。在某些实施方案中，*let-7* 可用来调节受治疗者、器官、组织或细胞中的 *let-7* 活性。

细胞、组织或受治疗者可以是癌细胞，可以是癌组织，隐匿癌组织，或者可以是经诊断发展某种疾病或病症或者有发展某种疾病或病症的危险的受治疗者或患者。在某些方面，癌细胞是神经元细胞、神经胶质细胞、肺细胞、肝细胞、脑细胞、乳腺细胞、膀胱细胞、血液细胞、白血病细胞、结肠细胞、子宫内膜细胞、胃细胞、皮肤细胞、卵巢细胞、脂肪细胞、骨细胞、子宫颈细胞、食道细胞、胰腺细胞、前列腺细胞、肾细胞、睾丸细胞或甲状腺细胞。在进一步的方面，癌症包括但不限于间变性大细胞淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、多发性骨髓瘤、睾丸肿瘤、星细胞瘤、急性骨髓性白血病、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食道鳞状细胞癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、白血病、脂肪瘤、黑素瘤、套细胞淋巴瘤、黏液纤维肉瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、头部和颈部的鳞状细胞癌、甲状腺癌、尿路上皮癌。

本发明的实施方案包括调节细胞、组织或受治疗者中的基因表达或者生物

或生理途径的方法,所述方法包括给予该细胞、组织或受治疗者一定量的包含 let-7 核酸序列、模拟物序列或抑制剂序列的分离核酸或其模拟物,所述 let-7 核酸序列、模拟物序列或抑制剂序列的量足以调节受 let-7 miRNA 家族成员正调节或负调节的基因的表达。“let-7 核酸序列”包括 let-7 的全长前体或其互补序列或者 let-7 的加工的(即成熟)的序列和本文给出的相关序列,以及前体 miRNA 或其加工的序列的 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 个或更多个核苷酸,包括其间的所有范围和整数的核苷酸,或者它们的互补序列。在某些实施方案中,let-7 核酸序列或 let-7 抑制剂含有全长加工的 miRNA 序列或其互补序列,称为“let-7 全长加工的核酸序列”或“let-7 全长加工的抑制剂序列”。在仍然进一步的方面,let-7 核酸包含 let-7 的至少一个 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50 核苷酸(包括这些数字之间的所有范围和整数)片段或互补片段,所述片段或互补片段与 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:11 有至少 75、80、85、90、95、98、99 或 100%同一性。let-7 这个通用术语包括共享成熟 let-7 序列的至少一部分的 let-7 家族所有成员。

在某些方面,let-7 核酸或其片段或模拟物将包含前体 miRNA 或其加工序列的 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 个或更多个核苷酸,包括这些数字之间的所有范围和整数的核苷酸。在某些实施方案中,let-7 核酸序列含有全长加工的 miRNA 序列,称为“let-7 全长加工的核酸序列”。在仍然进一步的方面,let-7 包含 let-7 的至少一个 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50 核苷酸(包括这些数字之间的所有范围和整数)片段,所述片段与本文给出的各个 SEQ ID NO 有至少 75、80、85、90、95、98、99 或 100%同一性。

在具体的实施方案中,含 let-7 或 let-7 抑制剂的核酸是 hsa-let-7 或 hsa-let-7 抑制剂或者它们的变体。在又一方面,let-7 核酸或 let-7 抑制剂可与 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个 miRNA 或 miRNA 抑制剂一起给予。各 miRNA 或它们的互补序列可同时地、依次地或按规定的进程(in an ordered progression)给予。在某些方面,let-7 或 let-7 抑制剂可与 miR-15、miR-16、miR-20、miR-21、miR-26a、miR-34a、miR-124、miR-126、miR-143、miR-147、miR-188、miR-200、miR-215、miR-216、miR-292-3p 和/或 miR-331 中的一个或多个联合给予。所有

的 miRNA 或其抑制剂或者它们的组合都可以以单一制剂给予。给予可以是在进行第二次疗法之前、过程中或之后给予。

let-7 核酸或其互补序列还可包括各种异源核苷酸序列，即那些通常发现在自然界中不与 let-7 可操作地连接的序列，如启动子、增强子等。let-7 核酸是重组核酸，且可以是核糖核酸或脱氧核糖核酸。重组核酸可包含 let-7 或 let-7 抑制剂表达盒，即当导入到含有核酸合成用的各成分的环境中时能表达核酸的核酸片段。在又一个方面，表达盒包含在病毒载体或质粒 DNA 载体或其他治疗性核酸载体或包括脂质体等的递送运载体中。在一个具体的方面，let-7 核酸是合成核酸。此外，本发明的核酸可以是完全合成的或部分合成的。在某些方面，病毒载体可以以 1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} pfu 或病毒颗粒(vp)给予。

在一个具体的方面，let-7 核酸或 let-7 抑制剂是合成核酸。此外，本发明的核酸可以是完全合成的或部分合成的。在仍然进一步的方面，本发明的核酸或编码本发明这种核酸的 DNA 可以以 0.001、0.01、0.1、1、10、20、30、40、50、100、200、400、600、800、1000、2000 或 4000 μg 或 mg ，包括这些数字之间的所有数值和范围给予。在又一个另外的方面，本发明的核酸，包括合成核酸，可以以 0.001、0.01、0.1、1、10、20、30、40、50、100 至 200 μg 或 $\text{mg}/\text{千克}(\text{kg})$ 体重给予。本文描述的每一个数量都可在一段时间里给予，这一段时间包括 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 分钟、小时、天、星期、月或年，包括这些数字之间的所有数值和范围。

在某些实施方案中，组合物的给予可以是肠道给予或胃肠外给予。在某些方面，肠道给予是口服给予。在另外的方面，胃肠外给予是病灶内、血管内、颅内、胸膜内、肿瘤内、腹膜内、肌肉内、淋巴内、腺内、皮下、局部、支气管内、气管内、鼻内、吸入或滴注给予。本发明的组合物可进行区域或局部给予，不必直接给予到病灶(lesion)。

在某些方面，受调节的一个或多个基因包含表 2、3、4、5、6、7 和 8 中所示的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、100、150、200 个或更多个基因或者基因的组合。在某些方面，基因的表达被下调或上调。在一个具体的方面，受调节的基因包含或选自(甚至可排除) ATRX、AURKA/STK6、AURKB/STK12、BRCA1、BRCA2、BUB1、BUB1B、BZRP、CCNA2、CCNB1、CCNE2、CCNG2、CDC2、CDC20、CDC23、CDC25A、

CDC6、CDCA7、CDK2、CDK6、CDKN2B、CDT1、CEBPD、CKS1B、CSF1、EIF4E、EPHB2、ERBB3、FASN、FGFBP1、FGFR4、FH、GMNN、IGFBP、IL8、ITGA6、JUN、JUNB、LHFP、MCAM、MET、MVP、MXI1、MYBL1、MYBL2、NRAS、P8、PDCD4、PLK1、PRKCA、RASSF2、SIVA、SKP2、SMAD4、TACC3、TFDP1、TGFB3、TNFSF10 和/或 VIM 中的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28 个或全部，它们进行各种组合和排列。在某些实施方案中，受调节或选定进行调节的基因来自表 2。在另外的实施方案中，受调节或选定进行调节的基因来自表 3。在仍然进一步的实施方案中，受调节或选定进行调节的基因来自表 4。在某些实施方案中，受调节或选定进行调节的基因来自表 5。在另外的实施方案中，受调节或选定进行调节的基因来自表 6。在仍然进一步的实施方案中，受调节或选定进行调节的基因来自表 7。在某些实施方案中，受调节或选定进行调节的基因来自表 8。本发明的实施方案还可包括在选定治疗模式例如给予 let-7 核酸、let-7 的抑制剂或它们的模拟物之前，获得或评估靶标细胞的基因表达谱(profile)或 miRNA 谱。与登录号(accession number)或数据库提交(database submission)所标示的所有核酸和基因有关的数据库内容，自本申请的提交日起通过引用并入本文。在本发明的某些方面，一个或多个 miRNA 或 miRNA 抑制剂可调节单个基因。在又一个方面，一个或多个遗传途径、细胞途径或生理途径中的一个或多个基因可被一个或多个 miRNA 或其互补序列，包括 let-7 核酸和 let-7 抑制剂与其他 miRNA 组合在一起进行调节。

在仍然进一步的方面，let-7 核酸包含 hsa-let-7a-1、hsa-let-7a-2、hsa-let-7a-3、hsa-let-7b、hsa-let-7c、hsa-let-7d、hsa-let-7e、hsa-let-7f-1、hsa-let-7f-2、hsa-let-7g、hsa-let-7i 中的至少一个或者它们的片段。细胞、组织或受治疗者可以是癌细胞，癌组织或者隐匿癌组织，或者可以是癌症患者。在一个具体的方面，癌症是血癌、白血病、结肠癌、子宫内膜癌、胃癌、皮肤癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、唾液腺癌、小肠癌、甲状腺癌、肺癌或肝癌。

let-7 核酸还可包括各种异源核苷酸序列，即那些通常发现在自然界中不与 let-7 可操作地连接的序列，如启动子、增强子等。let-7 核酸是重组核酸，且可以是核糖核酸或脱氧核糖核酸。重组核酸可包含 let-7 表达盒。在一个另外的方面，表达盒包含在病毒载体或质粒 DNA 载体或其他治疗性核酸载体或递送运载体中，所述递送运载体包括脂质体等。在一个具体的方面，let-7 核酸是合成核

酸。

本发明的另外一个实施方案涉及调节细胞途径的方法，所述方法包括给予该细胞一定量的包含 let-7 核酸序列的分离核酸，所述 let-7 核酸序列的量足以调节如下途径的表达、功能、状况(status)或状态(state)：表 13 所述的细胞途径，或者已知包括一个或多个在本文中确定为受 let-7 调节的基因的途径。对细胞途径的调节包括但不限于调节表 2、3、4、5、6、7 和 8 中所示的一个或多个基因的表达。对基因的调节可包括抑制内源 miRNA 的功能或者给细胞、组织或受治疗者提供功能性 miRNA。调节是指基因或其相关基因产物或蛋白质的表达水平或活性，例如 mRNA 水平，可被调节，或者 mRNA 的翻译可被调节等等。调节可增加或上调基因或基因产物，或者它可减少或下调基因或基因产物。

另外进一步的实施方案包括治疗有病理状况的患者的方法，所述方法包括以下的一个或多个步骤：(a)给予该患者足以调节细胞途径表达的量的包含 let-7 核酸序列的分离核酸；和(b)给予第二疗法，其中对细胞途径的调节使得该患者对第二疗法敏感。细胞途径可包括但不限于本文各表中描述的一个或多个途径，或者已知包括各表中列举的一个或多个基因的途径。第二疗法可包括给予第二 miRNA 或治疗性核酸，或者可包括各种标准的疗法，如化学疗法、放射疗法、药物治疗、免疫疗法等。本发明的实施方案还可包括测定或评估基因表达谱以选择适当的疗法。

本发明的实施方案包括治疗有病理状况的受治疗者的方法，所述方法包括以下的一个或多个步骤：(a)测定选自表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个基因的表达谱；(b)根据表达谱评估该受治疗者对疗法的敏感性；(c)根据评估的敏感性选择疗法；和(d)用选定的疗法治疗该受治疗者。通常，病理状况会具有表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个基因的误调节作为成分、指标或结果。

进一步的实施方案包括对指示细胞或组织中的 let-7 状况的表达谱进行鉴定和评估，包括对表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个基因或者它们的任何组合的表达评估。

术语“miRNA”按其通常和平常的含义使用，指在真核生物中发现的参与基于 RNA 的基因调节的微小 RNA 分子。参见例如 Carrington 等人, 2003, 该文献通过引用并入本文。该术语可用来指从前体加工而成的单链 RNA 分子，或者在某些情况中指前体本身。

在一些实施方案中，知道细胞是否内源表达特定的 miRNA，或者这种表达

在特定的条件下是否受影响或何时它处在特定的疾病状态是有用的。因此，在本发明的一些实施方案中，各方法包括测定细胞或含细胞的样品中是否存在一个或多个标记基因，或者 mRNA，或者其他指示目的基因表达水平的分析物。因此，在一些实施方案中，各方法包括产生样品的 RNA 谱的步骤。术语“RNA 谱”或“基因表达谱”指关于样品中一个或多个基因或遗传标记的表达模式的一组数据(例如鉴定表 2 的一个或多个标记的多个核酸探针)；考虑到核酸谱可用例如本领域普通技术人员熟知的核酸扩增或杂交技术，用一组 RNA 来获得。患者样品的表达谱与参考表达谱如正常样品或非病理样品的表达谱之间的差异，指示着病理状况、疾病状况或癌状况。包含或鉴定相应 mRNA 的某片段的核酸或探针组，可包括表 2、3、4、5、6、7 和 8 中列举的或者通过本文所述方法确定的基因或遗传标记或者代表它们的核酸、mRNA 或探针的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、100、200、500 个或更多个核苷酸的全部或部分，包括这些数字之间可得出的任何整数或范围。

本发明的某些实施方案涉及用以评估、预后或治疗患者的病理状况的组合物和方法，所述方法包括测量或测定患者样品中的一个或多个标记的表达谱，其中患者样品的表达谱与正常样品的表达谱或参考表达谱之间的差异指示着病理状况特别是例如癌症。在本发明的某些方面，细胞途径、基因或遗传标记是或者代表着表 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 和/或 13 中描述的一个或多个途径或标记，包括它们的任何组合。

本发明的各方面包括诊断、评估或治疗病理状况，或者防止病理状况显现。例如，各方法可用来筛选病理状况；评估病理状况的预后；对病理状况分级；评估病理状况对疗法的反应；或者作为第一疗法用来调节某基因、某些基因或相关途径的表达，或用来使受治疗者对第二疗法敏感或更具反应性。在具体的各方面，评估患者的病理状况可以是评估患者的预后。预后可包括但不限于估计存活时间或预期存活时间，评估对某疗法的反应，等等。在某些方面，一个或多个基因或标记的表达的改变预兆着患者有病理状况，其中所述标记是表 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 和/或 13 的一个或多个标记，包括它们的任何组合。

本发明的又一个实施方案涉及调节细胞途径的方法，所述方法包括给予该细胞一定量的包含 let-7 核酸序列或 let-7 抑制剂的分离核酸。细胞、组织或受治疗者可以是癌细胞，可以是癌组织或隐匿癌组织，或者可以是癌症患者。与通过登录号或数据库提交所标示的所有核酸和基因有关的数据库内容，自本申请的提交日起通过引用并入本文。

本发明的又一个实施方案涉及调节细胞途径的方法，所述方法包括给予该细胞一定量的包含 let-7 核酸序列的分离核酸，所述 let-7 核酸序列的量足以调节细胞途径特别是表 2、3、4、5、6、7 和 8 中描述的那些途径，或者已知包括表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个基因的途径的表达、功能、状况或状态。对细胞途径的调节包括但不限于调节一个或多个基因的表达。对基因的调节可包括抑制内源 miRNA 的功能，或者给细胞、组织或受治疗者提供功能性 miRNA。调节是指基因或其相关基因产物(例如 mRNA)或蛋白质的表达水平或活性，例如 mRNA 水平，可进行调节，或者 mRNA 的翻译可进行调节。调节可增加或上调基因或基因产物，或者它可减少或下调基因或基因产物(例如蛋白质水平或活性)。

仍然进一步实施方案包括给予 miRNA 或其模拟物，和/或治疗患有、怀疑患有病理状况或有发展病理状况的危险的受治疗者或患者的方法，所述方法包括以下一个或多个步骤：(a)给予患者或受治疗者一定量的足以调节细胞途径表达的包含 let-7 核酸序列或 let-7 抑制剂的分离核酸；和(b)给予第二疗法，其中对细胞途径的调节使得该患者或受治疗者敏感或者提高第二疗法的功效。功效的提高可包括毒性的降低，第二疗法的剂量或持续时间的降低，或者加和作用(additive effect)或协同作用(synergistic effect)。细胞途径可包括但不限于下表 2、3、4、5、6、7 和 8 中描述的一个或多个途径，或者已知包括表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个基因的途径。第二疗法可在给予分离核酸或 miRNA 或抑制剂之前、过程中和/或之后给予。

第二疗法可包括给予第二 miRNA 或治疗性核酸，如 siRNA 或反义寡核苷酸，或者可包括各种标准的疗法，如药物、化学疗法、放射疗法、药物治疗(drug therapy)、免疫疗法等。本发明的实施方案还可包括测定或评估基因表达或基因表达谱以选择适当的疗法。在一个具体的方面，第二疗法是化学疗法。化学疗法可包括但不限于紫杉醇(paclitaxel)、顺铂、卡铂、阿霉素、奥沙利铂、larotaxel、紫杉酚(taxol)、拉帕替尼(lapatinib)、多西他赛、甲氨喋呤、卡培他滨、长春瑞滨、

环磷酰胺、吉西他滨、氨柔比星、阿糖胞苷、依托泊苷、喜树碱、地塞米松、达沙替尼(dasatinib)、替吡法尼(tipifarnib)、贝伐单抗、西罗莫司、西罗莫司脂化物(temsirolimus)、依维莫司、洛那法尼(lonafarnib)、西妥昔单抗、埃洛替尼(erlotinib)、吉非替尼、甲磺酸伊马替尼、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、诺考达唑、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、硼替佐米、阿仑单抗、吉妥单抗、托西莫单抗或替伊莫单抗(ibritumomab)。

本发明的实施方案包括治疗有疾病或病况的受治疗者的方法，所述方法包括以下的一个或多个步骤：(a)测定一个或多个选自表 2、3、4、5、6、7 和 8 的基因的表达谱；(b)根据表达谱评估该受治疗者对疗法的敏感性；(c)根据评估的敏感性选择疗法；和(d)用选定的疗法治疗该受治疗者。通常，疾病或病况会具有表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个基因的误调节作为成分、指标或结果。

在某些方面，2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个 miRNA 可依次使用或组合使用。例如，let-7 或 let-7 抑制剂与另一 miRNA 的任何组合。进一步的多个实施方案包括鉴定和评估指示细胞或组织中的 let-7 状况的表达谱，包括对表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个基因或者它们的任何组合的表达评估。

术语“miRNA”按其通常和平常的含义使用，指在真核生物中发现的参与基于 RNA 的基因调节的微小 RNA 分子。参见例如 Carrington 等人, 2003, 该文献通过引用并入本文。该术语可用来指从前体加工而成的单链 RNA 分子，或者在某些情况中指前体本身。

在一些实施方案中，知道细胞是否内源表达特定的 miRNA，或者这种表达在特定的条件下是否受影响或何时它处在特定的疾病状态是有用的。因此，在本发明的一些实施方案中，各方法包括测定细胞或含细胞的样品中是否存在一个或多个标记基因或 mRNA，或其他指示日的基因表达水平的分析物。因此，在一些实施方案中，各方法包括产生样品的 RNA 谱的步骤。术语“RNA 谱”或“基因表达谱”指关于样品中一个或多个基因或遗传标记或 miRNA 的表达模式的一组数据(例如鉴定表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个标记的多个核酸探针)；考虑到核酸谱可用例如本领域普通技术人员熟知的核酸扩增或杂交技术，用一组 RNA 来获得。患者样品的表达谱与参考表达谱如一个或多个基因或 miRNA 的表达谱之间的差异，指示着要给予哪些 miRNA。

在某些方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-10 或 miR-10 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、急性淋巴母细胞性白血病、急性髓性白血病、乳腺

癌、膀胱癌、子宫颈癌、慢性淋巴母细胞性白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、纤维肉瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、白血病、肺癌、平滑肌瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、间皮瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、成视网膜细胞瘤、肾细胞癌、头部和颈部的鳞状细胞癌、甲状腺癌、T 细胞白血病。

在又另一个方面, 可将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-15 或 miR-15 抑制剂给予患有以下疾病的患者: 星细胞瘤、急性髓性白血病、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、头颈癌、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、肺癌、喉癌、黑素瘤、髓母细胞瘤、黏液纤维肉瘤、髓性白血病、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌。

进一步的方面包括将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-16 或 miR-16 抑制剂给予患有以下疾病的患者: 星细胞瘤、乳腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、成胶质细胞瘤、胃癌、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、黑素瘤、髓母细胞瘤、黏液纤维肉瘤、髓性白血病、多发性骨髓瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌。

在仍然进一步的方面, 将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-20 或 miR-20 抑制剂给予患有以下疾病的患者: 星细胞瘤、急性髓性白血病、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、白血病、脂肪瘤、黑素瘤、黏液纤维肉瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌、尿路上皮癌。

在某些方面, 将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-21 或 miR-21 抑制剂给予患有以下疾病的患者: 星细胞瘤、急性淋巴母细胞白血病、急性髓性白血病、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、膀胱癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、黑素瘤、髓性白血病、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌。

本发明的各方面包括其中将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-26 或 miR-26 抑制剂给予患有以下疾病的患者的方法：急性淋巴母细胞白血病、急性髓性白血病、血管肉瘤、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、膀胱癌、子宫颈癌、头颈癌、慢性淋巴母细胞白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、卡波济氏肉瘤、白血病、肺癌、平滑肌肉瘤、喉癌、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤。

在仍然进一步的方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-34 或 miR-34 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、急性淋巴母细胞白血病、急性髓性白血病、血管肉瘤、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、头颈癌、慢性淋巴母细胞白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、胃泌素瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、卡波济氏肉瘤、白血病、肺癌、平滑肌肉瘤、黑色素瘤、髓母细胞瘤、髓性白血病、多发性骨髓瘤、间皮瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、口咽癌、骨肉瘤、胰腺癌、乳头状癌、前列腺癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、唾液腺肿瘤、散发性乳头状肾癌、甲状腺癌、尿路上皮癌。

在另外进一步的方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-124 或 miR-124 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、急性淋巴母细胞白血病、急性髓性白血病、血管肉瘤、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、膀胱癌、子宫颈癌、头颈癌、慢性淋巴母细胞白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、卡波济氏肉瘤、白血病、肺癌、脂肪瘤、平滑肌肉瘤、黑色素瘤、髓母细胞瘤、黏液纤维肉瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、口咽癌、骨肉瘤、胰腺癌、乳头状癌、前列腺癌、成视网膜细胞瘤、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、唾液腺肿瘤、甲状腺癌、尿路上皮癌。

在又另外的方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-126 或 miR-126 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、急性髓性白血病、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、膀胱癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、胃泌素瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、白血病、肺癌、黑色素瘤、髓性白血病、间皮瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道

癌、口咽癌、骨肉瘤、胰腺癌、乳头状癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、散发性乳头状肾癌、甲状腺癌。

在又另外的方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-143 或 miR-143 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、急性淋巴母细胞白血病、急性髓性白血病、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、慢性淋巴母细胞白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、白血病、肺癌、黑素瘤、髓母细胞瘤、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌。

在一个另外的方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-147 或 miR-147 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、白血病、脂肪瘤、黑素瘤、黏液纤维肉瘤、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌。

在另外进一步的另外的方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-188 或 miR-188 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、急性髓性白血病、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、膀胱癌、子宫颈癌、慢性淋巴母细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、白血病、肺癌、黑素瘤、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌。

在又一个方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-200 或 miR-200 抑制剂给予患有以下疾病的患者：乳腺癌、子宫颈癌、慢性淋巴母细胞白血病、结肠直肠癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、白血病、肺癌、脂肪瘤、多发性骨髓瘤、间皮瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌。

在还另一个方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-215 或 miR-215 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、急性淋巴母细胞白血病、急性髓性白血病、血管肉瘤、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、慢性淋巴母细胞白血病、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、胃泌素瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、卡波济氏肉瘤、白血病、肺癌、

脂肪瘤、平滑肌肉瘤、黑素瘤、黏液纤维肉瘤、髓性白血病、多发性骨髓瘤、间皮瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、成视网膜细胞瘤、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、唾液腺肿瘤、甲状腺癌、尿路上皮癌。

在仍然进一步方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-216 或 miR-216 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、乳腺癌、子宫颈癌、头颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝细胞癌、霍奇金淋巴瘤、白血病、肺癌、髓性白血病、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、前列腺癌、头颈鳞状细胞癌。

在其他的方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-292-3p 或 miR-292-3p 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、急性淋巴母细胞白血病、急性髓性白血病、血管肉瘤、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、慢性髓性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、纤维肉瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、肝母细胞瘤、肝细胞癌、卡波济氏肉瘤、白血病、肺癌、脂肪瘤、平滑肌肉瘤、黑素瘤、黏液纤维肉瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、甲状腺癌、尿路上皮癌。

在某些方面，将 let-7 或 let-7 抑制剂和 miR-331 或 miR-331 抑制剂给予患有以下疾病的患者：星细胞瘤、急性淋巴母细胞白血病、急性髓性白血病、血管肉瘤、乳腺癌、膀胱癌、子宫颈癌、头颈癌、慢性淋巴母细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、胃癌、胃泌素瘤、肝细胞癌、卡波济氏肉瘤、白血病、肺癌、平滑肌肉瘤、喉癌、黑素瘤、黏液纤维肉瘤、髓性白血病、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、头颈鳞状细胞癌、散发性乳头状肾癌、甲状腺癌。

考虑到，当 let-7 或 a let-7 抑制剂与一个或多个其他的 miRNA 分子组合给予时，两个不同的 miRNA 或抑制剂可以同时给予或依次给予。在一些实施方案中，用一个 miRNA 或抑制剂进行治疗，接着在该治疗后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55 分钟，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 小时，1、2、3、4、5、6、7 天，1、2、3、4、5 星期或者 1、2、3、4、5、6、7、8、

9、10、11 或 12 个月或任何这些时间组合,用另一个 miRNA 或抑制剂进行治疗。

进一步的多个实施方案包括对指示细胞或组织中的 let-7 状况的表达谱进行鉴定和评估,包括对表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个基因或者它们的任何组合的表达评估。

术语“miRNA”按其通常和平常的含义使用,指在真核生物中发现的参与基于 RNA 的基因调节的微小 RNA 分子。参见例如 Carrington 等人,2003,该文献通过引用并入本文。该术语可用于指从前体加工而成的单链 RNA 分子,或者在某些情况中指前体本身。

在一些实施方案中,知道细胞是否内源表达特定的 miRNA,或者这种表达在特定的条件下是否受影响或何时它处在特定的疾病状态是有用的。因此,在本发明的一些实施方案中,各方法包括测定细胞或含细胞的样品中是否存在一个或多个 miRNA 标记基因或 mRNA,或其他指示目的基因表达水平的分析物。因此,在一些实施方案中,各方法包括产生样品的 RNA 谱的步骤。术语“RNA 谱”或“基因表达谱”指关于样品中一个或多个基因或遗传标记的表达模式的一组数据(例如鉴定表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个标记或基因的多个核酸探针);考虑到核酸谱可用例如本领域普通技术人员熟知的核酸扩增或杂交技术,用一组 RNA 来获得。患者样品的表达谱与参考表达谱如正常样品或非病理样品的表达谱或者数字化参照(digitized reference)之间的差异,指示着病理状况、疾病状况或癌状况。在某些方面,表达谱是发展这种状况的倾向或可能性(即疾病或病症的危险因素)的指标。这种危险或倾向可表示需要治疗、加强监测、预防措施等。核酸或探针组可包含或鉴定相应 mRNA 的某片段,且可包括表 2、3、4、5、6、7 和 8 中列举的或者通过本文所述方法确定的基因或遗传标记或者代表它们的核酸、mRNA 或探针的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、100、200、500 个或更多个片段的全部或部分,包括这些数字之间可得出的任何整数或范围。

本发明的某些实施方案涉及用以评估、预后或治疗患者的病理状况的组合物和方法,所述方法包括测量或测定患者样品中的一个或多个 miRNA 或标记的表达谱,其中患者样品的表达谱与正常样品的表达谱或参考表达谱之间的差异

指示着病理状况特别是癌症。在本发明的某些方面，miRNA、细胞途径、基因或遗传标记是或者代表着表 2、3、4、5、6、7 和 8 中描述的一个或多个途径或标记，包括它们的任何组合。

本发明的各方面包括诊断、评估或治疗病理状况，或者防止病理状况显现。例如，各方法可用来筛选病理状况；评估病理状况的预后；对病理状况分级；评估病理状况对疗法的反应；或者作为第一疗法用来调节某基因、各基因或相关途径的表达，或者用来使受治疗者对第二疗法敏感或更具应答性。在具体的各方面，评估患者的病理状况可以是评估患者的预后。预后可包括但不限于估计存活时间或预期存活时间，评估对某疗法的反应，等等。在某些方面，一个或多个基因或标记的表达的改变预兆着患者有病理状况，其中所述标记是表 2、3、4、5、6、7 和 8 的一个或多个标记，包括它们的任何组合。

本发明的某些实施方案包括用扩增测定法、杂交测定法、蛋白质测定法来测定一个或多个标记、基因或者代表它们的核酸的表达，这些中的多种所述测定法是本领域普通技术人员熟知的。在某些方面，扩增测定法可以是定量扩增测定法，如定量 RT-PCR 或诸如此类方法。在仍然进一步的方面，杂交测定法可包括阵列杂交测定法或溶液杂交测定法。样品的核酸可从该样品进行标记和/或将经标记的核酸与一个或多个核酸探针杂交。核酸、mRNA 和/或核酸探针可偶联到载体。这种载体是本领域普通技术人员熟知的，包括但不限于玻璃、塑料、金属或乳胶。在本发明的具体的方面，载体可以是平面的，或者是珠粒(bead)或本领域公知的其他几何形状或构造。蛋白质通常通过免疫印迹法、色谱法或质谱法或者本领域普通技术人员公知的其他方法来测定。

本发明还涉及含有本发明的组合物或用以执行本发明方法的组合物的试剂盒(kit)。在一些实施方案中，试剂盒可用来评估一个或多个标记分子和/或表达一个或多个 miRNA。在某些实施方案中，试剂盒含有至少或含有至多 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、100、150、200 个或更多个与所要评估的标记或者所要表达或调节的 miRNA 有关的探针、重组核酸或合成核酸分子，且可包括这些数字当中可得出的任何范围或组合。试剂盒可包含各成分，这些成分可各自单独包装或放置在容器中，如管子、瓶子、小瓶(vial)、注射器或其他合适的容器器具。

各个成分还可在试剂盒中以浓缩的量提供；在一些实施方案中，成分以与含有其他成分的溶液中的相同浓度单独提供。各成分的浓度可以作为 1x、2x、5x、10x 或 20x 或更高浓度提供。供将本发明的探针、合成核酸、重组核酸或非合成核酸用于治疗应用、预后应用或诊断应用的试剂盒，作为本发明的一部分包括在本发明中。具体考虑到的是任何这样的分子，它们对应于任何据报道会影响一个或多个本文所述标记基因或基因途径的生物活性或表达的 miRNA。在某些方面，将阴性对照和/或阳性对照包括在一些试剂盒实施方案中。对照分子可用于验证转染效率和/或监控细胞中由转染引起的变化。

某些实施方案涉及用以通过样品的核酸谱分析(nucleic acid profiling)来评估患者中的病理状况或发展病理状况的危险的试剂盒，所述试剂盒包含在合适的容器器具中的两个或多个核酸杂交或扩增试剂。试剂盒可包含用于标记样品中的核酸的试剂和/或核酸杂交试剂。杂交试剂通常包含杂交探针。扩增试剂包括但不限于扩增引物、试剂和酶。

在本发明的一些实施方案中，表达谱通过包括以下的步骤产生：(a)标记样品中的核酸；(b)使核酸与多个探针杂交，或者扩增多个核酸；和(c)测定和/或定量核酸与探针的杂交，或者检测和定量扩增产物，由此产生表达谱。参见美国临时专利申请 60/575,743 和美国临时专利申请 60/649,584 及美国专利申请系列号 11/141,707 和美国专利申请系列号 11/273,640，所有这些专利申请都通过引用并入本文。

本发明的方法涉及根据 miRNA 和/或标记核酸表达谱来诊断和/或评估患者的预后。在某些实施方案中，细胞中某特定基因或遗传途径或一组核酸的表达水平，相比于它们在正常的或非病理的细胞或组织样品中的表达水平，的升高或降低与疾病状态或病理状况相关。当测量所要评估的生物样品中的一个或多个核酸的表达水平，然后与正常的或非病理的细胞或组织样品进行比较时，这个相关性使得诊断方法和/或预后方法得以执行。具体考虑到，患者的表达谱，特别是那些怀疑患有或者倾向于患上特定疾病或病症如癌症的患者的表达谱，可通过评估本申请所述 RNA 的任何一个或几组 miRNA 和/或核酸来产生。从患者产生的表达谱将能提供有关特定疾病或病症的信息。在许多实施方案中，表达谱是用核酸杂交或扩增(例如阵列杂交或 RT-PCR)来产生。在某些方面，表达谱可与其他诊断和/或预后检测如组织学、血清中的蛋白质谱和/或细胞遗传分析 联用。

本发明的方法还可包括以下一个或多个步骤：(a)从患者获得样品；(b)从样品分离核酸，(c)对从样品分离的核酸进行标记，和(d)将经标记的核酸与一个或多个探针杂交。本发明的核酸包括一个或多个包含至少一个这样的片段，所述片段具有代表表 2、3、4、5、6、7、8 和/或 12 中的一个或多个基因或标记的核酸的序列或互补序列。

考虑到，本文描述的任何方法或组合物都可与本文描述的任何其他方法或组合物一起来进行，且不同的实施方案可进行组合。具体考虑到，本文讨论的关于 miRNA 分子、miRNA、基因和代表基因的核酸的任何方法和组合物，都可通过合成核酸来执行。在一些实施方案中，将合成核酸暴露于适当的条件，以让它变成加工的或成熟的核酸，如生理环境下的 miRNA。考虑到，最初提交的权利要求包含任何提交的权利要求的多项从属权利要求或提交的权利要求的组合。

还考虑到，本发明任何通过名字涉及的具体基因(包括其代表性片段)、mRNA 或 miRNA 的实施方案，也会覆盖涉及其序列与指定 miRNA 的成熟序列有至少 80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%同一性的 miRNA 的实施方案。

还要理解到，采用速记符号，使得基因或其标记或者 miRNA 一般描述指代它的基因家族成员的任何一个(用数字区分)或其代表性片段，除非另有指明。本领域技术人员应该理解的是，“基因家族”指一组具有相同的编码序列或 miRNA 编码序列的基因。通常，基因家族的各 miRNA 成员用初始命名后面的数字来识别。例如 miR-16-1 和 miR-16-2 是 miR-16 基因家族的成员，而“mir-7”指 miR-7-1、miR-7-2 和 miR-7-3。此外，除另有指明外，速记符号指的是相关的 miRNA (由字母区分)。因此例如 “let-7”指的是 let-7a、let-7b、let-7c、let-7d、let-7e、i 等等。这个速记符号的例外情况将另外指明。

表 1. 诊断和治疗用 miRNA 一览表

miRNA	探针片段	miR 基础信息	前体序列
hsa-let-7a-1	SEQ ID NO:1	>hsa-let-7a MIMAT0000062	SEQ ID NO:12
hsa-let-7a-2	SEQ ID NO:2		SEQ ID NO:13
hsa-let-7a-3	SEQ ID NO:3		SEQ ID NO:14
hsa-let-7b	SEQ ID NO:4	>hsa-let-7b MIMAT0000063	SEQ ID NO:15

hsa-let-7c	SEQ ID NO:5	>hsa-let-7c MIMAT0000064	SEQ ID NO:16
hsa-let-7d	SEQ ID NO:6	>hsa-let-7d MIMAT0000065	SEQ ID NO:17
hsa-let-7e	SEQ ID NO:7	>hsa-let-7e MIMAT0000066	SEQ ID NO:18
hsa-let-7f-1	SEQ ID NO:8	>hsa-let-7f MIMAT0000067	SEQ ID NO:19
hsa-let-7f-2	SEQ ID NO:9		SEQ ID NO:20
hsa-let-7g	SEQ ID NO:10	>hsa-let-7g MIMAT0000414	SEQ ID NO:21
hsa-let-7i	SEQ ID NO:11	>hsa-let-7i MIMAT0000415	SEQ ID NO:22

本发明的其他实施方案在本申请中讨论到。任何针对本发明的一个方面讨论的实施方案，也适用于本发明的其他方面，反之亦然。实施例部分和具体实施方式部分中的实施方案，应理解为适用于本发明所有各方面的本发明的实施方案。

术语“抑制”、“降低”或“防止”或者这些术语的任何近义词，当在权利要求书和/或说明书中使用时，包括旨在达到期望结果的任何可测量的降低或完全的抑制。

在权利要求书和/或说明书中单词单数“一个”与“包含”一起使用时，可指代“一个”，但也可指“一个或多个”、“至少一个”和“一个或超过一个”。

在本申请全文中，术语“约”用来表示某数值包括用来测定该数值的装置或方法的误差的标准偏差。

术语“或”在权利要求书中的使用是用来意指“和/或”，除非明确指出仅仅是指代两选项之一或者说两选项是互相排斥的，不过本公开内容对于指代仅仅两选项之一和“和/或”的定义是支持的。

本说明书和权利要求书中用到的词语“包含”、“具有”、“包括”或“含有”是包涵式或开放式含义，并不排除另外的未述及的要素或方法步骤。

本发明的其他目标、特征和优点由以下具体实施方式将变得显而易见。但是应理解到，具体实施方式和具体的实施例虽然指出了本发明的具体实施方案，但仅仅是以举例说明的方式给出，因为通过该具体实施方式，各种落入本发明精神和范围内的变化和修改将对本领域技术人员显而易见。

附图说明

以下附图构成本说明书的一部分，包括这些附图是为了进一步说明本发明的某些方面。通过参考一个或多个这些附图结合本文给出的对各具体实施方案的详细描述，可更好地理解本发明。

图 1. hsa-let-7 处理的细胞相对于阴性对照 miRNA 处理的细胞(100%)的增殖百分数(%)。缩写：let-7b, hsa-let-7b; let-7c, hsa-let-7c; let-7g, hsa-let-7g; siEg5, 干扰动力蛋白驱动蛋白 11 (Eg5)的 siRNA; Etopo, 依托泊苷; NC, 阴性对照 miRNA。图中标出了标准偏差。

图 2. 用 Alamar Blue 增殖测定法得到的 hsa-let-7 对各种细胞系的剂量依赖性抑制。细胞增殖以相对于模拟品转染的(mock-transfected)细胞的增殖百分数(0 pM = 100%增殖)的增殖百分数报道。图中标出了标准偏差。缩写：NC, 阴性对照 miRNA。

图 3. 将 1×10^6 个 H226 细胞用 1.6 μ M hsa-let-7b 或阴性对照 miRNA (NC) 进行电穿孔，在标准的生长培养基中生长(第 0 天)。在第 6、10 和 17 天，对细胞进行计数并用 1.6 μ M miRNA 反复进行电穿孔(箭头表示)。为提供指数细胞生长，在第 10 和 17 天进行 miRNA 递送后，将总细胞群体的一部分进行再接种。将细胞计数进行外推，描绘到线性刻度(linear scale)上。该图显示一个代表性的实验。

图 4. H460 肺癌细胞在给予不同组合的微小 RNA 后的增殖百分数(%)。图中每个柱条下方的正号表示微小 RNA 存在于所给予的组合中。两个微小 RNA 的协同活性由柱条下方的字母“S”表示；两个微小 RNA 的加和活性由柱条下方的字母“A”表示。图中显示标准偏差。缩写：Etopo, 依托泊苷; NC, 阴性对照 miRNA。

图 5. 用 hsa-let-7b 或用阴性对照(NC) miRNA 治疗的、带有 A549 肺癌细胞异种移植物的鼠中的平均肿瘤体积。图中显示标准偏差。P 值<0.05 的数据点由星号表示。

具体实施方式

本发明涉及与基因和生物途径的鉴定和表征有关的组合物和方法，所述生物途径与由所指定基因的表达显示与这些基因相关，以及与这些基因和生物途径有关的 miRNA 用于治疗性、预后性和诊断性应用的用途，本发明特别涉及与

评估和/或鉴定与 let-7 表达或其异常表达直接或间接相关的病理状况有关的那些方法和组合物。

在某些方面,本发明涉及评估、分析和/或治疗这样的细胞或受治疗者的方法,所述细胞或受治疗者中某些基因,因为 let-7 家族成员(7a-1、7a-2、7a-3、7b、7c、7d、7e、7f-1、7f-2、7g 和/或 7i)的任何一个或组合的表达提高或降低,其表达减低(相对于正常值),和/或因为 let-7 家族成员(7a-1、7a-2、7a-3、7b、7c、7d、7e、7f-1、7f-2、7g 和/或 7i)的一个或组合的表达提高或降低,其表达提高(相对于正常值)。表达谱和/或对 let-7 表达的反应或缺乏表达,指示出具有病理状况如癌症的个体。

可用表征所列举的 miRNA 或所列举的标记(包括代表它们的核酸)的任何一个或组合的预后测定来评估患者,以确定什么治疗方案(如果有的话)是证明合理的。就上述诊断测定来说,定义低表达的绝对值,要取决于用来测量 miRNA(一个或多个)的平台。描述的用于诊断测定的方法同样可用于预后测定。

I. 治疗方法

本发明的实施方案涉及当被导入到细胞中时,能发挥内源 miRNA 的活性或者抑制内源 miRNA 的核酸。在某些方面,核酸是合成的或非合成的 miRNA。各种序列特异性的 miRNA 抑制剂,可用来依次地或组合地抑制细胞中一个或多个内源 miRNA 的活性,以及受内源 miRNA 调节的那些基因和相关途径。

在一些实施方案中,本发明涉及在细胞中作为 miRNA 或作为 miRNA 的抑制剂起作用的短核酸分子。术语“短”指 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、50、100 或 150 个核苷酸或更少个核苷酸的单一多核苷酸的长度,包括这些数字之间可得出的所有整数或范围。核酸分子通常是合成的。术语“合成”指经分离的而不是细胞中自然产生的核酸分子。在某些方面,序列(整个序列)和/或化学结构偏离天然核酸分子,如内源前体 miRNA 或 miRNA 分子或它们的互补序列。虽然在一些实施方案中,本发明的核酸分子不具有与天然核酸的序列相同或互补的整个序列,但这种分子可涵盖天然序列或其互补序列的全部或部分。然而考虑到,给予细胞的合成核酸分子可随后在细胞中被修饰或改变,使得其结构或序列与非合成的或天然的核酸如成熟 miRNA 序列相同。例如,合成核酸可具有与前体 miRNA 的序列不同的序列,但该序列一旦在细胞中可被改变,而与内源的加工的 miRNA 或其抑制剂相同。术语“(经)分离(的)”指本发明的核酸分子最初从不同类的(就序列或结构而言)和不需要的核酸分子分离,

使得分离核酸的群体相对于其他多核苷酸分子而言，具有少约 90% 同源性，且可以是至少约 95、96、97、98、99 或 100% 同源性。在本发明的许多实施方案中，核酸之所以是分离的，是由于它是在体外合成而来，而与细胞中的内源核酸分开。然而应理解到，各分离核酸随后可混合(mix)或集合(pool)在一起。在某些方面，本发明的合成 miRNA 是 RNA 或 RNA 类似物。miRNA 抑制剂可以是 DNA 或 RNA 或它们的类似物。本发明的 miRNA 和 miRNA 抑制剂统称“合成核酸”。

在一些实施方案中，miRNA 或合成 miRNA 其长度在 17-130 个残基之间。本发明涉及其长度为、至少或至多为 15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、140、145、150、160、170、180、190、200 个或更多个残基的 miRNA 或合成 miRNA 分子，包括这些数字之间的任何整数或任何范围。

在某些实施方案中，合成 miRNA 具有(a)“miRNA 区域”，其从 5'到 3'的序列或结合区域与成熟 miRNA 序列的全部或某个片段相同或互补，和(b)“互补区域”，其从 5'到 3'的序列与(a)的 miRNA 序列具有 60%-100%的互补性。在某些实施方案中，这些合成 miRNA 也如上所述是分离的。术语“miRNA 区域”指合成 miRNA 上的与成熟、天然 miRNA 序列的整个序列或其互补序列有至少 75、80、85、90、95 或 100%同一性的区域，包括这些数字之间的所有整数。在某些实施方案中，miRNA 区域与天然 miRNA 的序列或其互补序列有或者至少有 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9 或 100%同一性。

术语“互补区域”或“互补序列”指核酸、模拟物或合成 miRNA 的与成熟、天然 miRNA 序列有或者至少有 60%互补性的区域。互补区域有或者至少有 60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、

95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9 或 100%的互补性，或者这些数字当中可得出的任何范围。对于单一多核苷酸序列，可能会因为 miRNA 区域和互补区域之间的化学键合而存在发夹环结构。在其他的实施方案中，互补区域在不同于 miRNA 区域的核酸分子上，在这种情况下，互补区域在互补链上，miRNA 区域在活性链上。

在本发明的其他实施方案中，有的 miRNA 抑制剂是合成核酸。miRNA 抑制剂其长度在约 17-25 个核苷酸之间，包含与成熟 miRNA 的 5'-3'序列有至少 90%互补性的 5'-3'序列。在某些实施方案中，miRNA 抑制剂分子其长度为 17、18、19、20、21、22、23、24 或 25 个核苷酸，或者这些数字当中可得出的任何范围。此外，miRNA 抑制剂可具有与成熟 miRNA 特别是成熟、天然 miRNA 的 5'-3'序列有或者至少有 70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9 或 100%互补性的序列(从 5'到 3')，或者这些数字当中可得出的任何范围。本领域技术人员可使用与成熟 miRNA 的序列互补的 miRNA 序列的部分，作为 miRNA 抑制剂的序列。此外，核酸或探针序列的该部分可加以改变，但使得它仍包含与成熟 miRNA 的序列的适当百分比的互补性。

在本发明的一些实施方案中，合成 miRNA 或抑制剂含有一个或多个设计元件(design element)。这些设计元件包括但不限于(i)互补区域 5'末端处的核苷酸的磷酸根或羟基的取代基团；(ii)互补区域的开头或最后 1-6 个残基中的一个或多个糖修饰；或者(iii)互补区域 3'末端处最后 1-5 个残基中的一个或多个核苷酸与 miRNA 区域的相应核苷酸之间的非互补性。有多种设计修饰是本领域公知的，见下文。

在某些实施方案中，合成 miRNA 在其互补区域 5'末端处具有这样的核苷酸，该核苷酸中的磷酸根和/或羟基已用另一化学基团取代(称为“取代设计”)。在一些情况中，磷酸根被取代，而在其他情况中，羟基被取代。在具体的实施方案中，取代基团是生物素、胺基、低碳烷基胺、乙酰基、2'O-Me (2'氧甲基)、DMTO (带氧 4,4'-二甲氧三苯甲基(4,4'-dimethoxytrityl with oxygen))、荧光素、硫醇或吡啶，不过其他的取代基团也是本领域技术人员熟知的，也可使用。这些设计元件还可用在 miRNA 抑制剂上。

另外的实施方案涉及在互补区域的开头或最后 1-6 个残基中具有一个或多个糖修饰的合成 miRNA(称为“糖取代设计”)。在某些情况中，在互补区域的

开头 1、2、3、4、5、6 个或更多个残基中，或者这些数字当中可得出的任何范围有一个或多个糖修饰。在另外的情况中，在互补区域的最后 1、2、3、4、5、6 个或更多个残基中，或者这些数字当中可得出的任何范围有一个或多个糖修饰。应理解到，术语“开头”和“最后”是相对于该区域的从 5'末端到 3'末端的残基的顺序而言。在具体的实施方案中，糖修饰是与 6'位的碳连接的羧基上的 2'O-Me 修饰、2'F 修饰、2'H 修饰、2'氨基修饰、4' 硫代核糖修饰或硫代磷酸酯修饰。在另外的实施方案中，在互补区域的开头或最后 2-4 个残基中，或者在互补区域的开头或最后 4-6 个残基中，有一个或多个糖修饰，这些设计元件还可用在 miRNA 抑制剂上。因此，miRNA 抑制剂可如上所述在 5'末端处的核苷酸上具有这个设计元件和/或取代基团。

在本发明的其他实施方案中有这样的合成 miRNA 或抑制剂，其中互补区域 3'末端处最后 1-5 个残基中的一个或多个核苷酸不与 miRNA 区域的相应核苷酸互补(“非互补性”)(称为“非互补性设计”)。非互补性可在互补 miRNA 的最后 1、2、3、4 和/或 5 个残基中。在某些实施方案中，在互补区域中存在至少 2 个核苷酸的非互补性。

考虑到，本发明的合成 miRNA 具有一个或多个取代设计、糖修饰设计或非互补性设计。在某些情况中，合成 RNA 分子具有这三种设计中的两种，而在其他情况中，这些分子适当地具有所有这三种设计。

miRNA 区域和互补区域可以在同一多核苷酸上，或者在分别的多核苷酸上。在它们被包含在同一多核苷酸之上或之中的情况中，miRNA 分子将被认为是单一多核苷酸。在不同的区域处在分别的多核苷酸上的实施方案中，合成 miRNA 将被认为是由两个多核苷酸组成。

当 RNA 分子是单一多核苷酸时，在 miRNA 区域和互补区域之间可以有接头区域。在一些实施方案中，单一多核苷酸因为 miRNA 区域和互补区域之间的键合，能够形成发夹环结构。接头构成发夹环。考虑到在一些实施方案中，接头区域其长度是、是至少或者是至多 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 个残基，或者这些数字当中可得出的任何范围。在某些实施方案中，接头的长度在 3-30 个残基之间(包括 3 个和 30 个)。

除了具有 miRNA 或抑制剂区域和互补区域外，在区域的 5'末端或 3'末端处

还可具有侧翼序列。在一些实施方案中，在这些区域的一侧或两侧侧接有或者至少侧接有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个核苷酸，或者这些数字当中可得出的任何范围。

本发明的方法包括减少或消除细胞中的一个或多个 miRNA 的活性，所述方法包括向细胞中导入 miRNA 抑制剂(在本文中可统称为 miRNA，因此有关 miRNA 的描述在适当的情况中也将指 miRNA 抑制剂)；或者补充或增强细胞中的一个或多个 miRNA 的活性。本发明还涉及通过给细胞提供特定的核酸，如特定的合成 miRNA 分子或合成 miRNA 抑制剂分子，来诱导某些细胞特性。但是，在本发明的方法中，miRNA 分子或 miRNA 抑制剂不必是合成的。它们可具有与天然 miRNA 相同的序列，或者它们可不具有任何设计修饰。在某些实施方案中，miRNA 分子和/或 miRNA 抑制剂如上所述是合成的。

给细胞提供的特定核酸分子应理解为对应于细胞中的特定 miRNA，因此细胞中的 miRNA 称为“相应 miRNA”。在指定的 miRNA 分子被导入到细胞中的情况中，相应 miRNA 应理解为被诱导或被抑制的 miRNA 或者被诱导或被抑制的 miRNA 功能。然而考虑到，被导入到细胞中的 miRNA 分子不是成熟 miRNA，但能够在适当的生理条件下变成成熟 miRNA，或者起到成熟 miRNA 的作用。在特定的相应 miRNA 被 miRNA 抑制剂抑制的情况中，特定的 miRNA 将被称为“被靶向的 miRNA”。考虑到可能有多个相应 miRNA 被涉及到。在具体的实施方案中，超过一个 miRNA 分子被导入到细胞中。此外，在其他实施方案中，超过一个 miRNA 抑制剂被导入到细胞中。此外，可将 miRNA 分子(一种或多种)和 miRNA 抑制剂(一种或多种)的组合导入到细胞中。本发明人考虑到，miRNA 的组合可在表型异常的细胞的各种途径中的一个或多个位置处起作用，且这种组合可对靶细胞增加功效，而又不会不利地影响正常细胞。因此，miRNA 的组合可对受治疗者或患者具有最小的不利影响，同时又能提供足够的治疗作用，如病症的改善、细胞的生长抑制、被靶向的细胞的死亡、细胞表型或生理的改变、细胞生长的减慢、对第二疗法的敏感化、对特定疗法的敏感化等等。

本发明方法包括鉴定有需要诱导这些细胞特性的细胞或患者。同样要理解到，提供给细胞或生物的合成核酸的量是“有效量”，这个有效量是指为达到期望的目标如诱导特定的细胞特性所需要的量(或者足够的量)。

本发明方法的某些实施方案包括将对应于细胞中的成熟 miRNA 的核酸分子，以能有效达到期望的生理结果的量提供给或导入到细胞。

此外,本发明方法可涉及提供合成的或非合成的 miRNA 分子。考虑到在这些实施方案中,本发明方法可限于或不限于提供仅仅一个或多个合成 miRNA 分子或者仅仅一个或多个非合成 miRNA 分子。因此在某些实施方案中,本发明方法可涉及同时提供合成的和非合成的 miRNA 分子。在这个情况中,一个或多个细胞很可能被提供对应于特定 miRNA 的合成 miRNA 分子和对应于另一不同 miRNA 的非合成 miRNA 分子。此外,任何采用马库什群语言(Markush group language)用一系列 miRNA 来描述的方法,也可不用马库什群语言而是用离散性的词(disjunctive article)(即“或”)来描述,反之亦然。

在一些实施方案中,有减少或抑制细胞增殖的方法,所述方法包括向细胞导入或提供有效量的(i) miRNA 抑制剂分子或(ii)对应于 miRNA 序列的合成或非合成 miRNA 分子。在某些实施方案中,所述方法涉及向细胞中导入有效量的(i)具有与一个或多个成熟 miRNA 的 5'-3'序列有至少 90%互补性的 5'-3'序列的 miRNA 抑制剂分子。

本发明的某些实施方案包括治疗病理状况特别是癌症例如肺癌或肝癌的方法。在一个方面,所述方法包括使靶标细胞与一个或多个包含至少一个具有 miRNA 序列的全部或一部分的核酸片段的核酸、合成 miRNA 或者 miRNA 相接触。该片段可以是 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30 个或更多个核苷酸或核苷酸类似物,包括这些数字之间的所有整数。本发明的一个方面包括调节靶标细胞如癌细胞当中的基因表达、miRNA 表达或功能或者 mRNA 表达或功能。

通常,在细胞中调节内源基因、miRNA 或 mRNA。在具体的实施方案中,核酸序列包含至少一个在核酸序列上与一个或多个 miRNA 或基因序列有至少 70、75、80、85、90、95 或 100%同一性的片段。对内源基因、miRNA 或 mRNA 的表达或加工的调节,可通过对 mRNA 的加工的调节来进行,所述加工包括在细胞中的转录、运输和/或翻译。调节还可通过抑制或增强细胞、组织或器官中的 miRNA 活性来实现。所述加工可影响被编码产物的表达或 mRNA 的稳定性。在其他的实施方案中,核酸序列可包含经修饰的核酸序列。在某些方面,一个或多个 miRNA 序列可包括或包含经修饰的核碱基或核酸序列。

应理解到,在本发明的方法中,可通过将一旦在细胞内就能起到相应 miRNA 的作用的核酸分子,给予细胞或生物体,来给该细胞或其他生物物质(biological matter)如生物体(包括患者)提供对应于特定 miRNA 的 miRNA 或 miRNA 分子。

提供给细胞的分子的形式可以不是一旦在细胞内就能充当 miRNA 的形式。因此考虑到在一些实施方案中,提供的合成 miRNA 或非合成 miRNA 是,如一旦进入到细胞的 miRNA 加工机器(*processing machinery*)就会被加工成成熟有活性 miRNA 的合成 miRNA 或非合成 miRNA。在某些实施方案中特别考虑到,提供给生物物质的 miRNA 分子不是成熟的 miRNA 分子,而是一旦进入到 miRNA 加工机器就会被加工成成熟 miRNA 的核酸分子。术语“非合成(的)”在 miRNA 的情形中是指 miRNA 不是如本文所定义的“合成(的)”。此外还考虑到,在本发明的涉及使用合成 miRNA 的实施方案中,相应的非合成 miRNA 的使用也被认为是本发明的一个方面,反之亦然。应理解到,“提供”某药剂这个术语是用来包括将该药剂“给予”患者。

在某些实施方案中,本发明方法还包括在细胞或生物体中靶向要调节的 miRNA。术语“靶向要调节的 miRNA”意思是要用本发明的核酸来调节选定的 miRNA。在一些实施方案中,调节是用对应于被靶向的 miRNA 的合成或非合成 miRNA 来实现,该合成或非合成 miRNA 能有效地将被靶向的 miRNA 提供到细胞或生物体(正调节)。在其他实施方案中,调节是用 miRNA 抑制剂来实现,该抑制剂能有效抑制细胞或生物体中的被靶向 miRNA (负调节)。

在一些实施方案中,被靶向以进行调节的 miRNA 是能影响疾病、病症或途径的 miRNA。在某些实施方案中,对 miRNA 进行靶向是因为可通过对被靶向 miRNA 的负调节来提供治疗。在其他实施方案中,对 miRNA 进行靶向是因为可通过对被靶向 miRNA 或其靶标的正调节来提供治疗。

在本发明的某些方法中,还有将选定的 miRNA 调节物给予这样的细胞、组织、器官或生物体(统称“生物物质”)的步骤,所述生物物质需要涉及对被靶向 miRNA 进行调节的治疗,或者需要本文所讨论的生理或生物结果(例如就特定细胞途径或结果而言,如细胞活力的下降)。因此,在本发明的一些实施方案中,有对需要可通过 miRNA 调节物提供的治疗的患者进行鉴定的一个步骤。考虑到在一些实施方案中可给予有效量的 miRNA 调节物。在具体的实施方案中,生物物质获得治疗益处,其中“治疗益处”是指一个或多个与疾病或病症有关的情况或症状的改善,或者与该疾病有关的预后、持续时间或状态的改善。考虑到,治疗益处包括但不限于疼痛的减少、发病率的降低和症状的减轻。例如就癌症而言考虑到,治疗益处可以是肿瘤生长的抑制、阻止转移、转移数量的减少、癌细胞增殖的抑制、癌细胞中细胞死亡的诱导、癌细胞附近的血管发生的抑制、

癌细胞凋亡的诱导、疼痛的减轻、复发的危险的降低、癌细胞中化学敏感性或辐射敏感性的诱导、生命的延长和/或与癌症直接或间接有关的死亡的延迟。

而且还考虑到,可将 miRNA 组合物作为疗法的一部分,与传统疗法或预防药剂一起给予患者。此外还考虑到,在疗法的情形中讨论到的任何方法可作为预防方法应用,特别是在经鉴定潜在需要该疗法或者有发展需要治疗的病症或疾病的危险的患者中。

另外,本发明的方法涉及采用一个或多个对应于 miRNA 的核酸和治疗药物。该核酸可增强该药物的作用或功效,减少任何副作用或毒性、改变它的生物利用度和/或降低所需的剂量或用药频率。在某些实施方案中,该治疗药物是癌症治疗药。因此,在一些实施方案中有治疗患者中的癌症的方法,所述方法包括给予该患者癌症治疗药和有效量的至少一个能改进癌症治疗药的功效或者保护非癌细胞的 miRNA 分子。癌症疗法还包括多个与基于化学的治疗和基于放射的治疗组合的疗法。组合化学疗法包括但不限于例如 5-氟尿嘧啶、阿仑单抗、氨柔比星、贝伐单抗、博来霉素、硼替佐米、白消安、喜树碱、卡培他滨、顺铂(CDDP)、卡铂、西妥昔单抗、苯丁酸氮芥、顺铂(CDDP)、EGFR 抑制剂(吉非替尼和西妥昔单抗)、丙卡巴肼、氮芥(mechlorethamine)、环磷酰胺、喜树碱、COX-2 抑制剂(例如塞来考昔)、环磷酰胺、阿糖胞苷)、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲(nitrosurea)、放线菌素、达沙替尼(dasatinib)、柔红霉素、地塞米松、多西他赛、阿霉素、EGFR 抑制剂(吉非替尼和西妥昔单抗)、埃洛替尼、雌激素受体结合剂、博来霉素、plicomycin、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、依维莫司、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫衫酚(taxol)、多烯紫杉醇、吉西他滨、诺维本、法尼基蛋白转移酶抑制剂、吉非替尼、吉西他滨、吉妥单抗、替伊莫单抗、异环磷酰胺、甲磺酸伊马替尼、larotaxel、拉帕替尼(lapatinib)、洛那法尼、氮芥、美法仑、反铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春碱和甲氨喋呤、丝裂霉素、诺维本、亚硝基脲(nitrosurea)、诺考达唑、奥沙利铂、紫杉醇(paclitaxel)、plicomycin、丙卡巴肼、雷洛昔芬、利妥昔单抗、西罗莫司、索拉非尼(sorafenib)、舒尼替尼(sunitinib)、他莫昔芬、紫衫酚(taxol)、多烯紫杉醇、西罗莫司脂化物、替吡法尼、托西莫单抗、反铂、曲妥珠单抗、长春碱、长春新碱或长春瑞滨,或者前述药剂的任何类似物或衍生变体。

通常,可给予 miRNA 的抑制剂以降低内源 miRNA 的活性。例如,可将能增加细胞增殖的 miRNA 分子的抑制剂提供给细胞以增加增殖,或者可将这种分

子的抑制剂提供给细胞以降低细胞增殖。本发明涵盖在用本文所公开的不同 miRNA 分子和 miRNA 抑制剂所观察到的不同生理作用情形下的这些实施方案。这些包括但不限于以下生理作用：增加或减少细胞增殖、增加或减少细胞凋亡、增加转化、增加或减少细胞活力、激活或抑制激酶(例如 Erk)ERK、激活/诱导或抑制 hTert, 抑制对促生长途径(例如 Stat 3 信号转导)的刺激, 减少或增加活细胞数日和增加或减少细胞周期特定阶段的细胞数日。本发明的方法一般考虑到包括提供或导入一个或多个对应于一个或多个不同的 miRNA 分子的不同核酸分子。考虑到可提供或导入以下、至少以下或者至多以下数目的不同核酸或 miRNA 分子：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100, 或者这些数字当中可得出的任何范围。这也适用于可提供或导入到细胞中的不同 miRNA 分子的数目。

II. 药物制剂和递送

本发明的方法包括递送有效量的 miRNA 或编码它的表达构建物。药物组合物的“有效量”通常定义为足以可检测地和重复性地实现规定的期望结果的量, 例如足以改善、减少、最小化或限制疾病或其症状的程度的量。其他更为严格的定义也适用, 包括疾病的消除、根除或治愈。

A. 给药

在某些实施方案中, 期望能杀死细胞, 抑制细胞生长, 抑制转移, 减少肿瘤或组织大小, 和/或逆转或减少细胞的恶性或疾病表型。给药途径当然要随所要靶向的病灶或部位的位置和性质而变, 包括例如真皮内、皮下、区域(regional)、胃肠外、静脉内、肌肉内、鼻内、全身(systemic)和口服给予和制剂。对于分散的、实体易接近的肿瘤或者其他易接近的靶区域, 特地考虑到直接注射、肿瘤内注射或者向肿瘤脉管系统中的注射。局部的、区域的或全身的给药也可以是适当的。对于>4 cm 的肿瘤, 所要给予的体积将为约 4-10 ml (优选 10 ml), 而对于<4 cm 的肿瘤, 将使用约 1-3 ml (优选 3 ml)的体积。

作为单剂量递送的多次注射包含约 0.1 至约 0.5 ml 体积。本发明的组合物可

以以多次注射给予肿瘤或被靶向的位点。在某些方面，各次注射可间隔大约 1 cm 的距离。

在外科手术介入的情况中，本发明可在手术前使用，以使不宜动手术的肿瘤被切除。或者，本发明可在手术时和/或手术之后使用，以治疗残余疾病或转移性疾病。例如，可给切除后的瘤床注射或输注包含 miRNA 或其组合的制剂。可例如通过将导管植入在手术部位，在切除术后继续进行给药。也预想到定期进行的手术后治疗。还考虑到连续输注表达构建物或病毒构建物。

在适当的情况中，例如在肿瘤或其他不期望的受影响区域被切除和瘤床或被靶向的部位被治疗以消除残余的微小疾病(residual, microscopic disease)的情况中，连续给药也可适用。考虑到通过注射器或导管插入术进行的递送。这种连续输注可在治疗开始后进行约 1-2 小时、到约 2-6 小时、到约 6-12 小时、到约 12-24 小时、到约 1-2 天、到约 1-2 个星期的时间或更长的时间。通常，通过连续输注给予的治疗组合物的剂量，要相当于单次或多次注射所给予的剂量，其在进行输注期间会随时间调整。

治疗方案也可变化，往往取决于肿瘤类型、肿瘤位置、免疫状况、靶标部位、疾病进展及患者的健康和年龄。某些肿瘤类型会要求更为积极的治疗。临床医师最适合根据治疗制剂的已知功效和毒性(如果有的话)，来做出这种决定。

在某些实施方案中，被治疗的肿瘤或患病区域可能不是最初可能不是可切除的。用本发明组合物进行的治疗，因为肿瘤边缘处的收缩或者通过消除特别具有侵入性的部分，可增加肿瘤的可切除性。治疗后，切除变得可能。在切除术后进行的额外治疗可有助于消除肿瘤或被靶向部位处的微小残余疾病。

治疗可包括多个“单位剂量”。单位剂量定义为含有预定量的治疗组合物。所要给予的数量及具体的途径和剂型，是临床领域技术人员技能范围内的事情。单位剂量不需要作为单次注射来给予，而是可包括在规定时间内进行的连续输注。就本发明的病毒成分而言，单位剂量可适宜用 μg 或 mg miRNA 或 miRNA 模拟物来描述。或者，所指定的量可以是作为平均日剂量、平均周剂量或平均月剂量来给予的量。

miRNA 可以以约或者至少约 0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、

480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000 μg 或 mg 的剂量，或者更高的剂量，或者这些数字当中可得出的任何范围的剂量，来给予患者。或者，所指定的量可以是作为平均日剂量、平均周剂量或平均月剂量来给予的量，或者它可以用 mg/kg 来表示，其中 kg 指患者的体重， mg 如上所指定。在其他的实施方案中，所指定的量是以上所述的任何数字，但以 mg/m^2 (关于肿瘤大小或患者表面积)表示。

B. 可注射组合物和制剂

在一些实施方案中，据以递送 miRNA 或编码其的表达构建物或它们的组合的方法，是通过全身给药来进行。但是，本文公开的药物组合物还可如 5,543,158 号、5,641,515 号和 5,399,363 号美国专利(每个专利都通过引用其全文并入本文)中所述，进行胃肠外给予、皮下给予、直接给予(directly)、气管内给予、静脉内给予、真皮内给予、肌肉内给予乃至腹膜内给予。

核酸的注射可通过注射器或者任何其他用于注射溶液的方法来递送，只要核酸和任何相关的成分能通过注射所需的特定径号的针头。供用于基因疗法、能够在任何深度精确地多次注射预定量的溶液的注射器系统，也已有描述(5,846,225 号美国专利)。

游离碱或药理学上可接受盐的形式的活性化合物的溶液剂，可在水中与表面活性剂如羟丙基纤维素进行适当混合来制备。还可在甘油、液体聚乙二醇、它们的混合物中，和在油类中，制备分散剂。在通常的储存和使用条件下，这些制品含有防腐剂以防止微生物的生长。适合可注射用的药物形式，包括无菌水溶液剂或分散剂，和供临时制备无菌可注射溶液剂或分散剂的无菌粉末(5,466,468 号美国专利，通过引用其全文并入本文)。在所有的情况中，该剂型必须是无菌的，且流动性必须达到可容易注射的程度。它必须在制造和储存的条件下稳定，必须免受微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、它们的混合物和/或植物油的溶剂或分散介质。可例如通过使用包衣剂(coating)如卵磷脂，通过在分散剂的情况中维持所需的颗粒大小，和通过使用表面活性剂，来维持适当的流动性。可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂，例如对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、山

梨酸、硫柳汞等，来实现微生物作用的防止。在许多情况下，优选的是包括等渗剂，例如糖类或氯化钠。可通过在该组合物中使用能延迟吸收的物质，如单硬脂酸铝和明胶，来达到可注射组合物的长久吸收。

在某些制剂中应用的是水基制剂，而其他制剂可以是脂基制剂。在本发明的具体实施方案中，包含肿瘤抑制蛋白或编码其的核酸的组合物是水基制剂。在其他的实施方案中，制剂是基于脂质的。

例如对于以水溶液剂进行的胃肠外给予，溶液如有需要应当进行适当缓冲，且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂变得等渗。这些具体的水溶液剂特别适合于静脉内、肌肉内、皮下、肿瘤内、病灶内和腹膜内给予。就此而论，本领域技术人员根据本公开内容，将会知道可以采用的无菌含水介质。例如，可将一个剂量溶解于 1 ml 的等渗 NaCl 溶液中，然后加入到 1000 ml 的皮下输液用流体中，或者在所计划的输注部位处进行注射(参见例如 "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, 1035-1038 页和 1570-1580 页)。取决于所治疗的受治疗者的情况，在剂量上必定会出现一些变动。负责给药的人员在任何情况下，都要确定对该受治疗者个体适当的剂量。此外，对于人类给药，制品应当符合 FDA 生物制剂标准办公室(FDA Office of Biologics standards)关于无菌性、致热性、一般安全性和纯度的标准。

本文所用的“载体”包括任何和所有的溶剂、分散介质(dispersion media)、运载体(vehicle)、包衣剂、稀释剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶体等。这些介质(media)和物剂(agent)用于药物活性物质是本领域公知的。考虑到任何常规介质或物剂都可在治疗组合物中使用，除非它与活性成分不相容。还可向组合物中掺入辅助性活性成分。

词语“药学上可接受的”指当给予人时不会产生过敏性反应或类似的不适当反应的分子实体和组合物。

核酸以与剂型相容的方式给予，和以会在治疗上有效的量给予。所要给予的数量取决于所要治疗的受治疗者，包括例如疾病或癌症的侵袭程度、任何肿瘤或病灶的大小、之前的或其他的治疗进程。要求给予的活性成分的精确量依赖于给药医师的判断。初次给药和随后给药的合适方案也是可变的，但代表性做法是初次给药后进行其他的给药。这种给药可以是全身给药，作为单剂量给药，横跨 10、20、30、40、50、60 分钟和/或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 小时或更多小时

和/或 1、2、3、4、5、6、7 天或更多天的时间连续给药。此外，给药可以通过按制剂和/或给药方式执行的定时释放或缓释机制进行。

C. 组合治疗

在某些实施方案中，本发明的组合物和方法涉及 miRNA 或编码它的表达构建物。这些 miRNA 组合物可与第二疗法组合使用，以增强 miRNA 疗法的效果或者提高所采用的另一疗法的治疗作用。这些组合物将以能有效达到期望的效果的组合量(combined amount)来提供，所述期望的效果例如杀死癌细胞和/或抑制细胞过度增殖。这个方法可涉及使细胞与 miRNA 或第二疗法同时或在不同时间进行接触。这可通过如下两种方式来实现：使细胞与一个或多个包括一个或多个所述药剂的组合物或药理学制剂进行接触，或者使细胞与两个或更多个不同的组合物或制剂进行接触，其中一个组合物提供(1) miRNA；和/或(2)第二疗法。可给予第二组合物或方法，其包括化学疗法、放射疗法、手术疗法、免疫疗法或基因疗法。

考虑到，可给患者提供 miRNA 疗法和第二疗法，这两种疗法之间相隔在约 12-24 小时内，更优选两种疗法之间相隔在约 6-12 小时内。但是，在一些情况中，将治疗时间显著延长可能是合乎需要的，在各次给药之间相隔几天(2、3、4、5、6 或 7 天)到几个星期(1、2、3、4、5、6、7 或 8 个星期)。

在某些实施方案，治疗进程将持续 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90 天或更多天。考虑到，可在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89 和/或 90 天、它们的任何组合给予一个药剂，在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、

44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89 和/或 90 天、或它们的任何组合给予另一药剂。在单独一天(24 小时时间)当中,可对患者单次给予或多次给予药剂。此外, 考虑到在某个疗程后有不给予治疗的一段时间。这个时间段可持续 1、2、3、4、5、6、7 天和/或 1、2、3、4、5 个星期和/或 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 个月或更长时间,取决于患者的情况,如他们的预后、力量、健康等。

可采用各种组合,例如 miRNA 疗法为“A”,第二疗法为“B”:

A/B/A	B/A/B	B/B/A	A/A/B	A/B/B	B/A/A	A/B/B/B	B/A/B/B
B/B/B/A		B/B/A/B	A/A/B/B		A/B/A/B	A/B/B/A	B/B/A/A
B/A/B/A		B/A/A/B	A/A/A/B		B/A/A/A	A/B/A/A	A/A/B/A

本发明的任何化合物或疗法向患者的给予,要依照有关这些化合物的给予的一般方案进行,要考虑到载体或任何蛋白质或其他药剂的毒性,如果有毒性的话。因此,在一些实施方案中,有监测可归因于组合疗法的毒性的步骤。预期到,会按需重复进行治疗周期。还考虑到,各种标准的疗法以及手术介入可与所描述的疗法组合应用。

在具体的方面,考虑到将第二疗法如化学疗法、放射疗法、免疫疗法、手术疗法或其他基因疗法与本文所述的 miRNA 疗法组合应用。

1. 化学疗法

有多种化学治疗剂可按照本发明进行使用。术语“化学疗法”指使用药物来治疗癌症。“化学治疗剂”用来表示在癌症的治疗中给予的化合物或组合物。这些药剂或药物按它们在细胞当中的活性方式归类,例如它们是否会影响细胞周期,和它们在什么阶段影响细胞周期。或者,药剂可根据其直接交联 DNA、插入到 DNA 中或者通过影响核酸合成来诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来表征。大多数化学治疗剂落入以下类别:烷基化剂、抗代谢物、抗肿瘤抗生素、有丝分裂抑制剂和亚硝基脲。

a. 烷基化剂

烷基化剂是与基因组 DNA 直接发生相互作用从而防止癌细胞增殖的药物。这个类别的化学治疗药物代表着影响细胞周期的所有阶段的药剂,也就是说它们不是阶段特异性的(phase-specific)。烷基化剂可应用来治疗慢性白血病、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、多发性骨髓瘤以及乳腺、肺和卵巢的特定癌症。它们

包括：白消安、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺(环磷氮芥)、达卡巴嗪、异环磷酰胺、氮芥(mustargen)和美法仑。曲格列酮(troglitazone)可用于与这些烷基化剂中的任何一个或多个联合治疗癌症。

b. 抗代谢物

抗代谢物能破坏 DNA 和 RNA 合成。与烷基化剂不同的是，它们专门影响细胞周期的 S 期。它们除了已被用来对付乳腺、卵巢和胃肠道的肿瘤外，还已被用来对付慢性白血病。抗代谢物包括 5-氟尿嘧啶(5-FU)、阿糖胞苷(Ara-C)、氟达拉滨、吉西他滨和甲氨喋呤。

5-氟尿嘧啶(5-FU)的化学名为 5-氟-2,4(1H,3H)-嘧啶二酮。它的作用机制据认为是通过阻断脱氧尿苷酸向胸苷酸的甲基化反应起作用。因此，5-FU 会干扰脱氧核糖核酸(DNA)的合成，和在较小程度上抑制核糖核酸(RNA)的形成。由于 DNA 和 RNA 对于细胞分裂和增殖是必需的，因此认为 5-FU 的作用是造成胸苷缺乏从而导致细胞死亡。因此，5-FU 的作用存在于快速分裂的细胞中，快速分裂是转移性癌的特征。

c. 抗肿瘤抗生素

抗肿瘤抗生素同时具有抗微生物活性和细胞毒性活性。这些药物还通过在化学上抑制酶类和有丝分裂或者改变细胞膜来干扰 DNA。这些药剂不是阶段特异性的，因此它们在细胞周期的所有阶段都起作用。因此，它们被广泛用于多种癌症。抗肿瘤抗生素的实例包括博来霉素、放线菌素、柔红霉素、阿霉素和伊达比星，其中一些在下文有更详细讨论。在临床环境中广泛用来治疗肿瘤的这些化合物，是通过静脉内弹丸注射给予，剂量从阿霉素的 21 天时间间隔的 25-75 mg/m² 到依托泊苷的静脉内或口服给予 35-100 mg/m²。

d. 有丝分裂抑制剂

有丝分裂抑制剂包括植物生物碱，和其他能抑制细胞分裂或有丝分裂所需的蛋白质合成的天然物质。它们在细胞周期的特定时期起作用。有丝分裂抑制剂包括多西他赛、依托泊苷(VP16)、紫杉醇(paclitaxel)、紫杉酚(taxol)、多烯紫杉醇(taxotere)、长春碱、长春新碱和长春瑞滨。

e. 亚硝基脲

亚硝基脲和烷基化剂一样能抑制 DNA 修复蛋白。它们除了用来治疗脑肿瘤外，还用来治疗非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤和恶性黑素瘤。实例包括卡莫司汀和洛莫司汀。

2. 放射疗法

放射疗法也称放射治疗，是用电离辐射来治疗癌症和其他疾病。电离辐射会沉积能量，该能量通过损害被治疗区域的细胞的遗传材料而损伤或破坏这些细胞，使得这些细胞不可能继续生长。虽然辐射会同时损害癌细胞和正常细胞，但后者能够自我修复而正确发挥作用。放射疗法可用来治疗局部性实体瘤，如皮肤、舌、喉、脑、乳腺或子宫颈的癌症。它可还用来治疗白血病和淋巴瘤(分别为造血细胞和淋巴系统的癌症)。

按照本发明使用的放射疗法，可包括但不限于 γ 射线、X射线的使用和/或放射性同位素向肿瘤细胞的定向递送。也考虑到了其他形式的DNA损害因素，如微波、质子束辐射(5,760,395号和4,870,287号美国专利)和紫外辐射。很可能的是，所有这些因素对DNA、对DNA前体、对DNA的复制和修复和对染色体的装配和维持，都产生大范围的损害。X射线的剂量范围从持续长时间(3-4星期)的50-200伦琴的每日剂量，到2000-6000伦琴的单剂量。取决于同位素的半寿期、所发射的辐射的强度和类型及肿瘤细胞的吸收情况，放射疗法的剂量范围相差甚大。放射疗法可包括使用放射标记的抗体来将辐射剂量直接递送到癌症部位(放射免疫疗法)。抗体一旦注射到身体中，就积极地搜寻癌细胞，从而癌细胞受到辐射的杀细胞作用(细胞毒性)的破坏。这个方法能使对健康细胞的辐射损害的危险减至最低。

用于大脑和其他肿瘤的立体定向放射外科手术(伽玛刀)不是使用手术刀，而是使用来自几百个不同角度的非常精确靶向的伽玛放射疗法射线束。只需要一期(one session)放射疗法，花费约四五个小时。为进行这个治疗，将特别制作的金属框架贴附到头上。然后，执行几次扫描和X射线，找到需要治疗的精确区域。在脑肿瘤的放射疗法过程中，患者躺卧，头放在大头盔中，头盔中有几百个孔让放射疗法射线束通过。相关的方法允许进行定位(positioning)以治疗身体其他区域的肿瘤。

3. 免疫疗法

在癌症治疗的情形中，免疫治疗剂通常依靠使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。曲妥珠单抗(赫赛汀™)是这样一个实例。免疫效应物可以例如是对肿瘤细胞表面上的某一标记有特异性的抗体。抗体可单独充当治疗的效应物，或者它可募集其他细胞来实际影响细胞杀灭。抗体还可与药物或毒素(化疗治疗剂、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合而仅充

当靶向剂。或者，效应物可以是携带表面分子的淋巴细胞，该表面分子能与肿瘤细胞靶标直接或间接发生相互作用。各种效应细胞包括细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞。各治疗方式(therapeutic modalities) 组合也即直接细胞毒性活性与 ErbB2 的抑制或减少的组合，会在过量表达 ErbB2 的癌症的治疗中提供治疗益处。

在免疫疗法的一个方面，肿瘤或疾病细胞必须荷有某一易受靶向的标记，即在大多数其他细胞上不存在的标记。存在着许多肿瘤标记，这些标记中的任何一个在本发明的情形中都可适合靶向。通常的肿瘤标记包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿系统肿瘤相关抗原、胚胎抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸化路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层粘连蛋白受体、erb B 和 p155。免疫疗法的另外一个方面是将抗癌作用与免疫刺激作用相结合。也存在着免疫刺激分子，它们包括：细胞因子如 IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN，趋化因子如 MIP-1、MCP-1、IL-8，和生长因子如 FLT3 配体。将免疫刺激分子——作为蛋白质或者使用基因递送——与肿瘤抑制物如 MDA-7 相结合，已证实能增强抗肿瘤作用(Ju 等人, 2000)。此外，抗任何这些化合物的抗体可用来靶向本文讨论的抗癌药剂。

目前在研究或在使用的免疫疗法的实例有：免疫佐剂，如牛分支杆菌(*Mycobacterium bovis*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯和芳族化合物(5,801,005 号和 5,739,169 号美国专利；Hui 和 Hashimoto, 1998；Christodoulides 等人, 1998)；细胞因子疗法，如干扰素 α 、 β 和 γ ，IL-1、GM-CSF 和 TNF (Bukowski 等人, 1998；Davidson 等人, 1998；Hellstrand 等人, 1998)基因疗法，如 TNF、IL-1、IL-2、p53 (Qin 等人, 1998；Austin-Ward 和 Villaseca, 1998；5,830,880 号和 5,846,945 号美国专利)和单克隆抗体如抗神经节苷脂 GM2、抗 HER-2、抗 p185；Pietras 等人, 1998；Hanibuchi 等人, 1998；5,824,311 号美国专利)。赫赛汀 (曲妥珠单抗)是嵌合(小鼠-人)单克隆抗体，它能阻断 HER2-neu 受体。它具有抗肿瘤活性，已被批准用于治疗恶性肿瘤(Dillman, 1999)。几种已知的抗癌免疫治疗剂及其靶标的非限制性名单包括(通用名(靶标))：西妥昔单抗(EGFR)、帕尼单抗(EGFR)、曲妥珠单抗(erbB2 受体)、贝伐单抗(VEGF)、阿仑单抗(CD52)、吉妥珠单抗奥唑米星(CD33)、利妥昔单抗(CD20)、托西莫单抗(CD20)、马妥珠单抗(EGFR)、替伊莫单抗(CD20)、托西莫单抗(CD20)、HuPAM4 (MUC1)、MORAb-009 (间皮素)、G250 (碳酸酐酶 IX)、mAb 8H9 (8H9 抗原)、M195 (CD33)、Ipilimumab (CTLA4)、HuLuc63 (CS1)、阿仑单抗(CD53)、依帕珠

单抗(CD22)、BC8 (CD45)、HuJ591 (前列腺特异性膜抗原)、hA20 (CD20)、来沙木单抗(TRAIL 受体-2)、帕妥珠单抗(HER-2 受体)、Mik- β -1 (IL-2R)、RAV12 (RAAG12)、SGN-30 (CD30)、AME-133v (CD20)、HeFi-1 (CD30)、BMS-663513 (CD137)、Volociximab (抗 $\alpha 5\beta 1$ 整联蛋白)、GC1008 (TGF β)、HCD122 (CD40)、希普利珠单抗(CD2)、MORAb-003 (叶酸受体 α)、CNTO 328 (IL-6)、MDX-060 (CD30)、Ofatumumab (CD20)或 SGN-33 (CD33)。考虑到, 这些疗法中的一个或多个可与本文描述的 miRNA 疗法一起应用。

癌症的被动免疫疗法存在着多种不同的途径。它们可主要分成以下几类: 单独注射抗体; 注射与毒素或化学治疗剂偶联的抗体; 注射与放射性同位素偶联的抗体; 注射抗独特型抗体; 最后是清除骨髓中的肿瘤细胞。

4. 基因疗法

在还另一个实施方案中, 组合治疗涉及基因疗法, 其中在给予一个或多个治疗性 miRNA 之前、之后或同时给予治疗性多核苷酸。治疗性多肽或编码核酸与 miRNA 的联合递送, 可对靶标组织具有组合的治疗作用。有多种蛋白质被涵盖在本发明范围内, 其中一些在下文描述。与本发明组合的各种可被靶向以进行某种形式的基因疗法的基因, 包括但不限于细胞增殖的诱导物、细胞增殖的抑制物、程序性细胞死亡的调节物、细胞因子和其他治疗性核酸或编码治疗性蛋白质的核酸。

肿瘤抑制癌基因起到抑制过度的细胞增殖的作用。这些基因的失活会破坏它们的抑制活性, 从而导致不受调节的增殖。可采用肿瘤抑制物(例如治疗性多肽) p53、FHIT、p16 和 C-CAM。

除 p53 外, 细胞增殖的另一抑制物是 p16。真核生物细胞周期的主要转变是由细胞周期蛋白依赖性激酶或者说 CDK 引发的。有一种 CDK, 即细胞周期蛋白依赖性激酶 4 (CDK4), 能调节通过 G1 的进程。这个酶的活性可能是在 G1 晚期使 Rb 磷酸化。CDK4 的活性受激活亚单位 D 型细胞周期蛋白和抑制性亚单位的控制。p16INK4 已在生物化学上被表征为能特异性结合和抑制 CDK4 的蛋白质, 因此可调节 Rb 磷酸化(Serrano 等人, 1993; Serrano 等人, 1995)。由于 p16INK4 蛋白是 CDK4 抑制剂(Serrano, 1993), 这个基因的缺失会提高 CDK4 的活性, 从而导致 Rb 蛋白的超磷酸化。p16 已知还能调节 CDK6 的功能。

p16INK4 属于新近描述的一类 CDK 抑制蛋白, 这类抑制蛋白还包括 p16B、p19、p21WAF1 和 p27KIP1。p16INK4 基因定位于(map to) 9p21, 后者是在许多

肿瘤类型中常常被缺失的染色体区域。p16INK4 基因的纯合缺失和突变, 在人肿瘤细胞系中是时常发生的。这个证据提示 p16INK4 基因是肿瘤抑制基因。但是, 这个解释已受到如下观察结果的挑战, 即 p16INK4 基因改变的频率, 在原发性未培养的肿瘤中比在经培养的细胞系中低得多(Caldas 等人, 1994; Cheng 等人, 1994; Hussussian 等人, 1994; Kamb 等人, 1994; Mori 等人, 1994; Okamoto 等人, 1994; Nobori 等人, 1995; Orlow 等人, 1994; Arap 等人, 1995)。通过用质粒表达载体进行转染恢复野生型 p16INK4 功能, 结果减少了一些人癌细胞系的集落形成(Okamoto, 1994; Arap, 1995)。

其他可按照本发明应用的基因, 包括 Rb、APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、zac1、p73、VHL、MMAC1 / PTEN、DBCCR-1、FCC、rsk-3、p27、p27/p16 融合体、p21/p27 融合体、抗血栓基因(例如 COX-1、TFPI)、PGS、Dp、E2F、ras、myc、neu、raf、erb、fms、trk、ret、gsp、hst、abl、E1A、p300、参与血管发生的基因(例如 VEGF、FGF、血小板反应蛋白、BAI-1、GDAIF 或者它们的受体)和 MCC。

5. 手术

大约有 60%的癌症患者将进行某种类型的手术, 包括预防性手术、诊断性手术或分期手术(staging surgery)、治疗性手术和姑息性手术。治疗性手术是一种可与其他疗法联用的癌症治疗法, 所述其他疗法例如本发明的治疗法、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或交替疗法(alternative therapy)。

治疗性手术包括切除术, 其中全部或部分癌组织被物理去除、切离和/或破坏。肿瘤切除术指肿瘤的至少一部分的物理去除。除了肿瘤切除术外, 手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电手术和显微控制手术(Mohs 手术)。还考虑到, 本发明可与浅表癌、初癌或附带数量的(incidental amounts of)正常组织的去除联合使用。

在切除部分或全部的癌性细胞、组织或肿瘤后, 身体中可能形成一个空穴。可通过用另外的抗癌疗法输注、直接注射或局部涂敷该区域, 来完成治疗。这种治疗可例如每 1、2、3、4、5、6 或 7 天, 或者每 1、2、3、4 和 5 个星期, 或者每 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 或 12 个月重复进行。这些治疗所用的剂量也可不同。

6. 其他药剂

应该考虑到, 其他药剂可与本发明组合使用, 以提高治疗的疗效。这些另

外的药剂包括免疫调节物、影响细胞表面受体和间隙连接(GAP junction)的上调的药剂、细胞抑制剂(cytostatic agent)和分化剂、细胞黏着的抑制剂、增加高增殖性细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂或其他生物药剂。免疫调节物包括肿瘤坏死因子；干扰素 α 、 β 和 γ ；IL-2 和其他细胞因子；F42K 和其他细胞因子类似物；或者 MIP-1、MIP-1 β 、MCP-1、RANTES 和其他趋化因子。还应该考虑到，细胞表面受体或其配体如 Fas/Fas 配体、DR4 或 DR5/TRAIL (Apo-2 配体)的上调，会通过建立对高增殖性细胞的自分泌或旁分泌作用，加强本发明的凋亡诱导能力。通过提高间隙连接的数目来增加细胞间信号转导，会增加对邻近的高增殖性细胞群体的抗高增殖作用。在其他的实施方案中，细胞抑制剂或分化剂可与本发明组合使用，以提高治疗的抗高增殖作用。考虑用细胞黏着的抑制剂来改进本发明的功效。细胞黏着抑制剂的实例有黏着斑激酶(FAKs)抑制剂和洛伐他汀。还考虑到，增加高增殖性细胞对凋亡的敏感性的其他药剂如抗体 c225，可与本发明组合使用来提高治疗功效。

Apo2 配体(Apo2L, 也称 TRAIL)是肿瘤坏死因子(TNF)细胞因子家族的成员。TRAIL 能在多种类型的癌细胞中激活快速凋亡，但对正常细胞无毒。TRAIL mRNA 出现在多种组织中。大多数正常细胞似乎对 TRAIL 的细胞毒性作用具有抗性，这提示存在着能抗 TRAIL 的凋亡诱导的机制。描述的 TRAIL 的第一个受体称为死亡受体 4 (DR4)，它含有细胞质“死亡结构域”；DR4 能传送 TRAIL 所携带的凋亡信号。已鉴定出另外的能结合 TRAIL 的受体。有一种受体称为 DR5，它与 DR4 非常相似，含有细胞质死亡结构域并能转导凋亡信号。DR4 和 DR5 mRNA 在许多正常组织和肿瘤细胞系中表达。最近，已鉴定出诱杀型受体如 DcR1 和 DcR2，它们能防止 TRAIL 通过 DR4 和 DR5 诱导凋亡。这些诱杀型受体因此代表着直接在细胞表面处调节对促凋亡细胞因子的敏感性的新机制。这些抑制性受体在正常组织中的优先表达提示，TRAIL 可用作诱导癌细胞的凋亡的抗癌剂，同时不伤害正常细胞。(Marsters 等人, 1999)。

在引进了细胞毒性化疗药物后，在癌症的治疗上已有许多进展。但是，化学疗法的后果之一，是抗药表型的发展/获得和多重药物抗性的发展。药物抗性的发展仍是这种肿瘤的治疗中的主要障碍，因此对另类途径如基因疗法显然有需求。

与化学疗法、放射疗法或生物疗法联用的另一形式的疗法包括高热，这是一种使患者组织暴露于高温的方法(最高达 106°F)。外部或内部加热装置可涉及

到施加局部的、区域性的或全身的高热。局部高热涉及到将热量施加到小区域如肿瘤。热量可由来自身体外装置的高频波靶向肿瘤外部产生。内部热量可涉及无菌探头，包括细加热丝或充入温水的中空管、植入的微波天线或者射频电极。

加热患者的器官或肢体以进行区域性治疗，这是用能产生高能量的装置如磁体来实现。或者，可移出患者的一些血液进行加热，然后输注到要进行内部加热的区域。在癌症已扩散到整个身体的情况中，也可执行全身加热。为此目的，可使用温水毯子、热蜡、感应线圈和热箱(thermal chamber)。

激素疗法也可与本发明联用或者与之前描述的任何其他癌症疗法组合使用。激素可用于治疗某些癌症，如乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌或宫颈癌，以降低某些激素如睾酮或雌激素的水平或阻断它们的作用。这个治疗往往与至少一种其他癌症疗法组合使用，作为治疗选项或者减少转移危险。

本申请将 2006 年 2 月 8 日提交的美国申请系列号 11/349,727 通过引用其全文并入本文，该申请要求了 2005 年 2 月 8 日提交的美国申请系列号 60/650,807 的优先权。

III. miRNA 分子

微小 RNA 分子(“miRNA”)通常长度在 21-22 个核苷酸，不过 19 个和最多 23 个核苷酸的长度也有报道。这些 miRNA 各自是从更长的前体 RNA 分子(“前体 miRNA”)加工而来。前体 miRNA 从非编码蛋白质的基因转录而来。前体 miRNA 具有两个互补性区域，使得它们能够形成茎-环结构或者折回样(fold-back-like)结构，该结构在动物中由称为切酶(Dicer)的核糖核酸酶 III 样核酸酶切割。被加工的 miRNA 通常是茎的一部分。

加工的 miRNA (也称“成熟 miRNA”)变成大复合体的一部分，以下调特定的靶标基因或其基因产物。动物 miRNA 的实例包括与靶标不完全碱基配对而使翻译停止的那些 miRNA (Olsen 等人, 1999; Seggerson 等人, 2002)。siRNA 也由切酶加工从长的双链 RNA 分子加工。siRNA 不在动物细胞中天然存在，但它们能指导通过 RNA 诱导沉默复合体(RISC)的序列特异性切割 mRNA 靶标(Denli 等人, 2003)。

A. 阵列制备

本发明的某些实施方案涉及到使用和制备 mRNA 或核酸阵列、miRNA 或核

酸阵列和/或 miRNA 或核酸探针阵列, 这些阵列是核酸分子(探针)的大阵列或微阵列, 所述核酸分子(探针)完全或几乎与来自受 let-7 miRNA 调节的各种基因和基因途径的多种核酸、mRNA 或 miRNA 分子、前体 miRNA 分子、或者核酸互补(在探针的整个长度上)或者相同(在探针的整个长度上), 且以空间上分隔的布局布置在载体或载体材料上。大阵列通常是其上点缀着探针的硝酸纤维素或尼龙片。微阵列将核酸探针布置得更加紧密, 使得最多 10,000 个核酸分子能容纳在通常 1-4 平方厘米的区域中。微阵列可通过将核酸分子如基因、寡核苷酸等点缀到基材上来制作, 或者通过在基材上原位制作寡核苷酸序列来制作。点缀或制作的核酸分子, 可以以多达约 30 个非相同核酸分子每平方厘米或更多, 例如多达约 100 个乃至 1000 个每平方厘米的高密度矩阵模式来施加。与滤器阵列(filter array)的基于硝酸纤维素的材料不同, 微阵列通常使用包被的玻璃作为固相载体。通过获得标记 RNA 和/或 miRNA 互补的核酸样品的有序阵列, 每个样品的位置可进行跟踪并与原始样品相关联。

有多种不同的阵列装置是本领域技术人员熟知的, 在这些阵列装置中众多的核酸探针与固相载体的表面稳定结合。有用的阵列基材包括尼龙、玻璃、金属、塑料、乳胶和硅。这些阵列可在许多不同方面有差异, 包括平均探针长度、探针的序列或类型、探针和阵列表面之间的键合性质, 例如共价键合或非共价键合, 等等。除了探针检测 miRNA 或基因或代表基因的核酸外, 本发明的标记和筛选方法及阵列就其任何参数而言在应用上不受限制; 因此, 各方法和组合物可在多种不同类型的核酸阵列上使用。

制备微阵列的代表性方法和装置已有描述, 例如在以下美国专利中: 5,143,854; 5,202,231; 5,242,974; 5,288,644; 5,324,633; 5,384,261; 5,405,783; 5,412,087; 5,424,186; 5,429,807; 5,432,049; 5,436,327; 5,445,934; 5,468,613; 5,470,710; 5,472,672; 5,492,806; 5,525,464; 5,503,980; 5,510,270; 5,525,464; 5,527,681; 5,529,756; 5,532,128; 5,545,531; 5,547,839; 5,554,501; 5,556,752; 5,561,071; 5,571,639; 5,580,726; 5,580,732; 5,593,839; 5,599,695; 5,599,672; 5,610,287; 5,624,711; 5,631,134; 5,639,603; 5,654,413; 5,658,734; 5,661,028; 5,665,547; 5,667,972; 5,695,940; 5,700,637; 5,744,305; 5,800,992; 5,807,522; 5,830,645; 5,837,196; 5,871,928; 5,847,219; 5,876,932; 5,919,626; 6,004,755; 6,087,102; 6,368,799; 6,383,749; 6,617,112; 6,638,717; 6,720,138, 以及 WO 93/17126; WO 95/11995; WO 95/21265; WO 95/21944; WO 95/35505; WO

96/31622; WO 97/10365; WO 97/27317; WO 99/35505; WO 09923256; WO 09936760; WO0138580; WO 0168255; WO 03020898; WO 03040410; WO 03053586; WO 03087297; WO 03091426; WO03100012; WO 04020085; WO 04027093; EP 373 203; EP 785 280; EP 799 897 和 UK 8 803 000, 这些专利的公开内容全都通过引用并入本文。

考虑到, 阵列可以是高密度阵列, 使得它们含有 2、20、25、50、80、100 个或更多个不同的探针。考虑到, 它们可含有 1000、16,000、65,000、250,000 或 1,000,000 个或更多个不同的探针。各探针可靶向一个或多个不同生物或细胞类型中的 mRNA 和/或 miRNA 靶标。寡核苷酸探针在一些实施方案中其长度在 5-50 个、5-45 个、10-40 个、9-34 个或 15-40 个核苷酸之间。在某些实施方案中, 寡核苷酸探针的长度为从 5、10、15、20 到 20、25、30、35、40 个核苷酸, 包括这些数字之间的所有整数和范围。

每个不同的探针序列在阵列中的位置和序列通常是已知的。此外, 大量的不同探针可占据相对较小的区域, 从而提供探针密度通常大于约 60、100、600、1000、5,000、10,000、40,000、100,000 或 400,000 个不同寡核苷酸探针/cm² 的高密度阵列。阵列的表面积可以是约或小于约 1、1.6、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 cm²。

此外, 本领域普通技术人员能容易地分析阵列产生的数据。这种方案在上文公开, 且包括见于 WO 9743450; WO 03023058; WO 03022421; WO 03029485; WO 03067217; WO 03066906; WO 03076928; WO 03093810; WO 03100448A1 中的信息, 所有这些专利通过引用明确并入本文。

B. 样品制备

考虑到, 众多样品的 RNA 和/或 miRNA 可用本发明的阵列、探针索引(index of probes)或阵列技术进行分析。虽然考虑的是将内源 miRNA 用在本发明的组合物和方法上, 但重组 miRNA——包括与内源 miRNA 或前体 miRNA 有互补性或同一性的核酸——也可按本文所述进行处理和分析。样品可以是生物样品, 在这种情况下, 它们可以来自活组织检查、细针吸取物、剥落物、血液、组织、器官、精液、唾液、泪液、其他体液、毛囊、皮肤或者任何含有或构成生物细胞特别是癌细胞或高增殖性细胞的样品。在某些实施方案中, 样品可以是但不限于活检物或者从活检物或者其他体液或组织纯化或富集到一定程度的细胞。或者, 样品可以不是生物样品, 而是化学混合物, 如无细胞的反应混合物(其可

含有一种或多种生物酶)。

C. 杂交

在制备了阵列或一组探针后,和/或在样品中核酸或探针进行了标记后,将靶标核酸群体与该阵列或探针在杂交条件下进行接触,其中所述条件可按需调整,以提供对所进行的特定测定而言最佳的特异性水平。合适的杂交条件是本领域技术人员熟知的,在 Sambrook 等人 (2001)和 WO 95/21944 中有综述。在许多实施方案中特别注意的是在杂交过程中使用严格条件。严格条件是本领域技术人员熟知的。

特地考虑到,可将单个阵列或探针组与多个样品进行接触。样品可用不同的标记进行标记以区分各样品。例如,可将单一阵列与用 Cy3 标记的肿瘤组织样品和用 Cy5 标记的正常组织样品进行接触。对于与阵列上的探针对应的特定 miRNA,可以很容易地确定和定量样品之间的差异。

阵列的小表面积能使杂交条件如温度调节和盐含量一致。此外,由于高密度阵列占据的面积小,杂交可在极小的流体体积中进行(例如约 250 μ l 或更小,包括约或小于约 5、10、25、50、60、70、80、90、100 μ l 或者这些数字当中可得出的任何范围)。在小体积中,杂交可进行得非常快。

D. 差异表达分析

本发明的阵列可用来检测两个样品之间的差异。具体考虑的应用包括鉴定和/或定量正常组织与不正常组织之间 miRNA 或基因表达的差异、疾病或病症与不显示这种疾病或病症的细胞之间的差异,或者两个经不同处理的样品之间的差异。还有,可在据认为易感特定疾病或病症的样品和据认为不易感或能抵抗该疾病或病症的样品之间,比较 miRNA 或基因表达。不正常的样品是显示疾病或病症的表型特性或基因型特性的样品,或者据认为就该疾病或病症而言不正常的样品。它可与就该疾病或病症而言正常的细胞进行比较。表型特性包括疾病或病症的症状或者对疾病或病症的易感性,其中所述疾病或病症的某构成因素是或者可以是或者可以不是遗传的,或者由高增殖性或肿瘤性细胞引起。

阵列包含具有核酸探针的固相载体,所述核酸探针结合于载体。阵列通常包含众多不同的核酸探针,它们连接到基材表面不同的、确知的位置。这些阵列也称“微阵列”或者俗称“芯片”,在本领域中普遍有描述,例如 5,143,854 号、5,445,934 号、5,744,305 号、5,677,195 号、6,040,193 号、5,424,186 号美国专利和 Fodor 等人, (1991), 每个专利和文献都为了所有目的通过引用其全文并

入本文。用机械合成方法合成这些阵列的技术描述于例如 5,384,261 号美国专利, 该专利为了所有目的通过引用其全文并入本文。虽然在某些方面, 使用的是平面阵列表面, 但是阵列可制作在几乎任何形状的表面乃至多个表面上。阵列可以是在珠粒、凝胶、聚合物表面、纤维如光纤、玻璃或任何其他适当的基材上的核酸, 参见 5,770,358 号、5,789,162 号、5,708,153 号、6,040,193 号和 5,800,992 号美国专利, 这些专利为了所有目的整体并入本文。阵列可以以便于全包括式装置(all inclusive device)的诊断或其他操作的方式进行包装, 参见例如 5,856,174 号和 5,922,591 号美国专利, 这两个专利为了所有目的通过引用其全文并入本文。有关阵列及它们的制造和特性的更多信息, 另参见 2000 年 4 月 7 日提交的美国专利申请系列号 09/545,207, 这个专利申请为了所有目的通过引用其全文并入本文。

具体的说, 阵列可用来就病理状况如癌症和相关病症对样品评估。具体考虑到, 本发明可用来评估疾病的各阶段或亚类(sub-classification)之间的差异, 如良性的、癌性的和转移的组织或肿瘤之间的差异。

要评估的表型特性包括诸如以下的特征: 寿命、发病率、预期存活期、对特定药物或医疗性治疗的易感性或感受性(药物功效), 和药物毒性的危险。在这些表型特性方面有差异的样品, 还可用于所描述的组合物和方法进行评估。

在某些实施方案中, 可产生 miRNA 和/或表达谱, 以评价这些表达谱并将它们与药代动力学或疗法相关联。例如, 可在患者进行治疗之前或者在治疗过程中, 产生患者肿瘤和血液样品的这些表达谱并进行评估, 以确定是否有其表达与患者的治疗结果相关的 miRNA 或基因。对差异的 miRNA 或基因的鉴定, 可得出用以评估肿瘤和/或血液样品的诊断性测定法, 以确定应给患者提供什么药物方案。另外, 它可用来鉴定或选择适合特定临床试验的患者。如果表达谱经确定与药物功效或药物毒性相关, 则该表达谱关系到该患者是否是接受药物、接受药物组合或者接受该药物特定剂量的适合患者。

除了上述预后性测定外, 还可对患有各种疾病的患者的样品进行评估, 以确定是否可基于 miRNA 和/或相关基因表达水平鉴定不同的疾病。可基于表达谱建立诊断性测定法, 医生们可用来鉴定患有疾病的个体或者鉴定谁有发展疾病的危险。或者, 可基于 miRNA 谱图(profiling)设计治疗方案。这种方法和组合物的实例, 描述于 David Brown, Lance Ford, Angie Cheng 和 Rich Jarvis 名下的、2005 年 5 月 23 日提交的、题为“Methods and Compositions Involving miRNA and

miRNA Inhibitor Molecules”(涉及 miRNA 和 miRNA 抑制剂分子的方法和组合物)的美国临时专利申请, 该临时申请通过引用其全文并入本文。

E. 其他测定法

除了使用阵列和微阵列外, 还考虑到可采用多种不同的测定法来分析 miRNA 或相关基因、它们的活性和它们的作用。这些测定法包括但不限于核酸扩增、聚合酶链反应、定量 PCR、RT-PCR、原位杂交、Northern 杂交、杂交保护测定(HPA) (GenProbe)、分支 DNA (bDNA)测定(Chiron)、滚环式扩增(RCA)、单分子杂交检测(US Genomics)、侵染测定(ThirdWave Technologies)和/或桥连测定(Bridge Litigation Assay)(Genaco)。

IV. 核酸

本发明涉及核酸、经修饰的核酸或模拟核酸、miRNA、mRNA、基因及其代表性片段, 它们可进行标记, 用于阵列分析, 或者在诊断性、治疗性或预后性应用中采用, 特别是与病理状况如癌症相关的应用中。这些分子可以是已由细胞内源产生, 或者已通过化学法或重组法合成或产生。它们可进行分离和/或纯化。每个 miRNA 在本文中都有描述, 包括它们相应的 SEQ ID NO 和登录号。miRNA 的名称往往缩写, 提到时不加“hsa-”前缀, 但取决于上下文而定要理解为加有“hsa-”前缀。除非另有指明, 本说明书中提到的 miRNA 是标示为 miR-X 或 let-X 的人序列, 其中 X 为数字和/或字母。

在某些方面, 可使用由后缀“5P”或“3P”标示的 miRNA 探针。如 sanger.ac.uk 网站上所述, “5P”表示成熟 miRNA 源自前体的 5'末端, 相应的“3P”表示它源自前体的 3'末端。此外, 在一些实施方案中, 使用不对应于已知的人 miRNA 的 miRNA 探针。考虑到这些非人 miRNA 探针可在本发明的实施方案中使用, 或者考虑到可存在着与非人 miRNA 同源的人 miRNA。在其他的实施方案中, 可采用任何哺乳动物细胞、生物样品或其制品。

在本发明的一些实施方案中, 涉及到 miRNA 的方法和组合物可涉及 miRNA、标记(例如 mRNA)和/或其他核酸。核酸的长度可以是、至少是或者至多是 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、

89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990 或 1000 个核苷酸，或者这些数字当中可得出的任何范围。这些长度覆盖加工的 miRNA、miRNA 探针、前体 miRNA、含 miRNA 的载体、mRNA、mRNA 探针、对照核酸及其他探针和引物的长度。

在许多实施方案中，miRNA 的长度为 19-24 个核苷酸，而 miRNA 探针的长度为 19-35 个核苷酸，取决于加工的 miRNA 和任何加入的侧翼区的长度。人类中的 miRNA 前体通常在 62-110 个核苷酸之间。

本发明的核酸可具有与另一核酸有同一性或互补性的区域。考虑到互补性或同一性的区域可以是至少 5 个毗连残基，不过具体考虑到该区域是、至少是或者至多是 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990 或 1000 个毗连核苷酸。还要理解的是，前体 miRNA 或其他核酸当中的互补性长度，或者 miRNA 探针与 miRNA 或 miRNA 基因之间的互补性长度，是这些长度。此外，互补性可以百分数表示，意思是探针与其靶标之间的互补性在

探针的整个长度上为90%或更高。在一些实施方案中,互补性是或者至少为90%、95%或100%。具体的说,这些长度可适用于任何包含任何本文所述 SEQ ID No、登录号所标示的核酸序列,或者本文所公开的任何其他序列。通常,给出 miRNA 的常用名称(前缀表示其鉴定来源,例如“hsa”指人序列)和加工的 miRNA 序列。除非另有指明,不带前缀的 miRNA 应理解为指人 miRNA。此外,miRNA 名称中的小写字母可以是或可以不是小写字母;例如 hsa-mir-130b 也可称为 miR-130B。术语“miRNA 探针”指可鉴定特定的 miRNA 或结构上相关 miRNA 的核酸探针。

应理解到,一些核酸源自基因组序列或基因。在这点上,术语“基因”是为了简便起见,用来指编码给定 miRNA 或基因的前体核酸或 miRNA 的基因组序列。但是,本发明的实施方案可涉及 miRNA 的、参与其表达的基因组序列,如启动子或其他调节序列。

可使用术语“重组”,这通常指已在体外进行过操作的分子,或者是这种分子的复制或表达产物。

术语“核酸”是本领域公知的。本文所用的“核酸”通常是指包含核碱基的 DNA、RNA 或者它们的衍生物或类似物的分子(一条或多条链)。核碱基包括例如存在于 DNA (例如腺嘌呤“A”、鸟嘌呤“G”、胸腺嘧啶“T”或胞嘧啶“C”)或者 RNA (例如 A、G、尿嘧啶“U”或 C)中的天然嘌呤或嘧啶碱基。术语“核酸”涵盖术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”,它们各自都是术语“核酸”的亚属。

术语“miRNA”一般指单链分子,但在具体的实施方案中,在本发明中实施的分子还会涵盖这样的区域或者另外链,它部分上(在整个链长度上有 10-50% 互补性)、基本上(在整个链长度上有大于 50%但小于 100%互补性)或者完全地与同一单链分子的另一区域或者与另一核酸互补。因此,miRNA 核酸可涵盖这样的分子,它包含特定序列的一个或多个互补的或自身互补的链或“互补序列(complement)”。例如,前体 miRNA 可具有自身互补区域,互补性最大达 100%。本发明的 miRNA 探针或核酸可包括、可以是或者可以至少是与其靶标有 60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99 或 100%的互补性。

应理解到,本发明的“合成核酸”意思是该核酸不具有天然核酸的全部或部分化学结构或序列。因此,应理解到,术语“合成 miRNA”指在细胞中或在生理条件下起到天然 miRNA 的作用的“合成核酸”。

虽然本发明的实施方案可涉及合成 miRNA 或合成核酸，但在本发明的一些实施方案中，核酸分子不必是“合成的”。在一些实施方案中，在本发明方法和组合物中采用的非合成核酸或 miRNA，可具有天然 mRNA 或 miRNA 前体或者成熟 mRNA 或 miRNA 的整个序列和结构。例如，在本发明方法和组合物中使用的非合成 miRNA，可不具有一个或多个经修饰的核苷酸或核苷酸类似物。在这些实施方案中，非合成 miRNA 可以是或者不是重组产生的。在特定的实施方案中，本发明方法和/或组合物中的核酸专门是合成 miRNA 而不是非合成 miRNA (非合成 miRNA 也即不是所谓的“合成”miRNA)；然而在其他实施方案中，本发明专门涉及非合成 miRNA 而不是合成 miRNA。任何针对合成 miRNA 的使用所讨论的实施方案，都可适用于非合成 miRNA，反之亦然。

应理解到，术语“天然”指没有任何人类干预下的生物中存在的东西；它可指天然的野生型分子或突变分子。在一些实施方案中，合成 miRNA 分子不具有天然 miRNA 分子的序列。在其他实施方案中，合成 miRNA 分子可具有天然 miRNA 分子的序列，但该分子的化学结构，特别是与精确序列具体不相关的部分中的化学结构(非序列化学结构)，与具有该序列的天然 miRNA 分子的化学结构不同。在一些情况中，合成 miRNA 具有在天然 miRNA 中不存在的序列化学结构和非序列化学结构。此外，合成分子的序列将确定哪个 miRNA 得到有效提供或抑制；内源 miRNA 将被称为“相应 miRNA”。可在本发明情形中使用的相应 miRNA 序列，包括但不限于本文提供的各 SEQ ID 中的那些序列的全部或一部分，以及任何其他 miRNA 序列、miRNA 前体序列或者它们的任何互补序列。在一些实施方案中，序列是或来源于或含有本文所鉴别的序列的全部或一部分，以靶向可与所述序列一起使用的特定 miRNA (或 miRNA 组)。可选定任何 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130 140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260 个或者这些数字当中的任何数字或范围的序列以排除所有非选定序列。

本文所用的“杂交”、“与...杂交”或者“能够杂交”，应理解为意指双链或三链分子或者具有部分双链或三链性质的分子的形成。本文所用的术语“退火”与“杂交”同义。术语“杂交”、“与...杂交”或者“能够杂交”涵盖术语“严格条件”或“高严格性”和术语“低严格性”或“低严格条件”。

本文所用的“严格条件”或“高严格性”是这样的条件，它们能让一个或

多个含有互补序列的核酸链之间或内发生杂交，但排除随机序列的杂交。严格条件能容忍核酸和靶标链之间极少的错配，如果有错配的话。这种条件是本领域普通技术人员公知的，优选用于要求高选择性的应用中。非限制性的应用包括分离核酸如基因或其核酸片段，或者检测至少一个特异性 mRNA 转录物或其核酸片段，等等。

严格条件可包括低盐和/或高温条件，如由约 42°C 至约 70°C 的温度下的约 0.02 M 至约 0.5 M NaCl 提供的条件。应理解到，期望严格性的温度和离子强度部分上由以下因素决定：特定核酸的长度、靶标序列的长度和核碱基含量、核酸的电荷组成，杂交混合物中甲酰胺、四甲基氯化铵或其他溶剂的存在或浓度。

还应理解到，对杂交而言的这些范围、组成和条件，仅是以非限制性实例的方式提及，特定杂交反应的期望严格性，往往是通过与一个或多个阳性对照或阴性对照进行比较来经验确定。视预期的应用而定，优选的是采用不同的杂交条件，来达到核酸对靶标序列的不同程度的选择性。在非限制性实例中，可通过在低温和/或高离子强度下杂交，实现对在严格条件下不与核酸杂交的相关靶标核酸的鉴定或分离。这种条件称为“低严格性”或“低严格性条件”，低严格性的非限制性实例包括在约 20°C 至约 50°C 温度范围的约 0.15 M 至约 0.9 M NaCl 下进行的杂交。当然，本领域技术人员有能力进一步修正低严格性或高严格性条件，以适合特定的应用。

A. 核碱基、核苷、核苷酸和经修饰的核苷酸

本文所用的“核碱基”指杂环碱基，例如在至少一种天然核酸(即 DNA 和 RNA)中存在的天然核碱基(即 A、T、G、C 或 U)，和这种核碱基的天然或非天然衍生物和类似物。核碱基通常可与至少一个天然核碱基，以可替代天然核碱基配对(例如 A 和 T、G 和 C 及 A 和 U 之间的氢键键合)的方式，形成一个或多个氢键(“退火”或“杂交”)。

“嘌呤”和/或“嘧啶”核碱基涵盖天然嘌呤和/或嘧啶核碱基，还有它们的衍生物和类似物，包括但不限于被烷基、羧基烷基、氨基、羟基、卤素(即氟、氯、溴或碘)、硫醇或烷硫基部分(moiety)中的一个或多个取代的那些嘌呤或嘧啶。优选的烷基(例如烷基、羧基烷基等)部分包含约 1、约 2、约 3、约 4、约 5 至约 6 个碳原子。嘌呤或嘧啶的其他非限制性实例包括脱氮嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、5-氟尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、8-溴鸟嘌呤、8-氯鸟嘌呤、溴胸腺嘧啶、8-氨基鸟嘌呤、8-羟基鸟嘌呤、8-甲基鸟嘌呤、8-硫代鸟嘌呤、氮杂鸟嘌呤、2-

氨基嘌呤、5-乙基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-乙基尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-丙基尿嘧啶、硫代尿嘧啶、2-甲基腺嘌呤、甲基硫代腺嘌呤、N,N-二甲基腺嘌呤、氮杂腺嘌呤、8-溴腺嘌呤、8-羟基腺嘌呤、6-羟基氨基嘌呤、6-硫代嘌呤、4-(6-氨基己基/胞嘧啶)等。其他实例是本领域技术人员公知的。

本文所用的“核苷”指包含与核碱基连接部分(linker moiety)共价连接的核碱基的单独化学单位。“核碱基连接部分”的非限制性实例是包含 5 个碳原子的糖(即“5 碳糖”),包括但不限于脱氧核糖、核糖、阿拉伯糖或者 5 碳糖的衍生物或类似物。5 碳糖的衍生物或类似物的非限制性实例,包括 2'-氟-2'-脱氧核糖或者其中糖环中的一个氧原子被碳取代的碳环糖。核碱基与核碱基连接部分的不同类型的共价连接,是本领域公知的(Kornberg 和 Baker, 1992)。

本文所用的“核苷酸”指进一步包含“骨架部分”的核苷。骨架部分通常将核苷酸与另一包含核苷酸的分子共价连接,或者与另一核苷酸连接以形成核酸。天然核苷酸中的“骨架部分”通常包括与 5 碳糖共价连接的磷部分。骨架部分的连接通常出现在 5 碳糖的 3'-或 5'-位置。但是,其他类型的连接也是本领域公知的,特别是当核苷酸包含天然 5 碳糖或磷部分的衍生物或类似物时。

核酸可包含可在天然核酸中存在的核碱基、核碱基连接部分和/或骨架部分的衍生物或类似物,或者完全由这种衍生物或类似物组成。具有核酸类似物的 RNA 也可按本发明方法进行标记。本文所用的“衍生物”指天然分子的经化学修饰或改变的形式,而术语“模拟物”或“类似物”指这样的分子,它在结构上可能与或不与天然分子或部分类似,但具有相似的功能。本文所用的“部分(moiety)”一般指较大化学或分子结构中的较小化学或分子成分。核碱基、核苷和核苷酸类似物或衍生物为本领域公知,已有描述(参见例如 Scheit, 1980, 通过引用并入本文)。

核苷、核苷酸或核酸的另外的非限制性实例,包括以下各号美国专利中的那些实例: 5,681,947、5,652,099、5,763,167、5,614,617、5,670,663、5,872,232、5,859,221、5,446,137、5,886,165、5,714,606、5,672,697、5,466,786、5,792,847、5,223,618、5,470,967、5,378,825、5,777,092、5,623,070、5,610,289、5,602,240、5,858,988、5,214,136、5,700,922、5,708,154、5,728,525、5,637,683、6,251,666、5,480,980 和 5,728,525, 每个专利都通过引用其全文并入本文。

本发明的标记方法和试剂盒特地考虑到使用这样的核苷酸, 它们一方面经

修饰以连接标记,另一方面能掺入到 miRNA 分子中。这种核苷酸包括可用包括荧光染料的染料或者用诸如生物素的分子进行标记的那些核苷酸。经标记的核苷酸是容易获得的;它们可从商业途径获得,或者可通过本领域技术人员公知的反应合成得到。

供用于本发明的经修饰的核苷酸不是天然核苷酸,而是指在其上具有反应性部分的经制备的核苷酸。具体的值得关注的反应性官能团包括:氨基、巯基、亚砷氧基、氨基巯基、叠氨基、环氧化物、异硫氰酸根、异氰酸根、酸酐、一氯三嗪、二氯三嗪、一卤素或二卤素取代的吡啶、一或二取代的二嗪、马来酰亚胺、环氧化物、氮丙啶、磺酰卤、酰基卤、烷基卤、芳基卤、烷基磺酸酯、N-羟基琥珀酰亚胺酯、亚胺酯、肼、叠氨基硝基苯基、叠氮化物、3-(2-吡啶基二硫代)-丙酰胺、乙二醛、醛、碘代乙酰基、氰基甲酯、对硝基苯酯、邻硝基苯酯、羟基吡啶酯、羰基咪唑和其他这类化学基团。在一些实施方案中,反应性官能团可直接与核苷酸键合,或者它可通过连接基团与核苷酸键合。官能部分和任何接头基本上不能削弱核苷酸被加到 miRNA 或被标记的能力。代表性的连接基团包括通常约 2-18 个碳原子、往往约 2-8 个碳原子的含碳连接基团,其中含碳连接基团可以包括或不包括一个或多个杂原子,例如 S、O、N 等,和可以包括或不包括一个或多个不饱和位点。在许多实施方案中特别值得关注的是烷基连接基团,通常是 1-16 个碳原子、往往 1-4 个碳原子的低碳烷基连接基团,其中该连接基团可包括一个或多个不饱和位点。用于上述官能化靶标产生方法的官能化核苷酸(或引物),可用已知的方案制备,或者可从商家购买,例如 Sigma、Roche、Ambion、Biosearch Technologies 和 NEN。官能团可按本领域技术人员公知的方法制备,这些方法包括 4,404,289 号、4,405,711 号、4,337,063 号和 5,268,486 号美国专利和 1,529,202 号英国专利中的代表性信息,这些专利通过引用并入本文。

经胺修饰的单核苷酸在本发明的几个实施方案中使用。经胺修饰的核苷酸是具有连接标记的活性胺基团的核苷酸。考虑到任何核糖核苷酸(G、A、U 或 C)或脱氧核糖核苷酸(G、A、T 或 C)都可进行修饰以便标记。实例包括但不限于以下经修饰的核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸: 5-(3-氨基烯丙基)-UTP; 8-[(4-氨基)丁基]-氨基-ATP 和 8-[(6-氨基)丁基]-氨基-ATP; N6-(4-氨基)丁基-ATP; N6-(6-氨基)丁基-ATP, N4-[2,2-氧基-双(乙胺)]-CTP; N6-(6-氨基)己基-ATP; 8-[(6-氨基)己基]-氨基-ATP; 5-炔丙基氨基-CTP; 5-炔丙基氨基-UTP; 5-(3-氨基烯丙

基)-dUTP; 8-[(4-氨基)丁基]-氨基-dATP 和 8-[(6-氨基)丁基]-氨基-dATP; N6-(4-氨基)丁基-dATP; N6-(6-氨基)丁基-dATP, N4-[2,2-氧基-双(乙胺)]-dCTP; N6-(6-氨基)己基-dATP; 8-[(6-氨基)己基]-氨基-dATP; 5-炔丙基氨基-dCTP 和 5-炔丙基氨基-dUTP。这种核苷酸可按照本领域技术人员公知的方法制备。此外, 本领域技术人员可用相同的胺修饰如 5-(3-氨基烯丙基)-CTP、GTP、ATP、dCTP、dGTP、dTTP 或 dUTP 取代 5-(3-氨基烯丙基)-UTP, 来制备其他的核苷酸实体。

B. 核酸的制备

核酸可通过本领域普通技术人员公知的任何技术制备, 例如化学合成、酶促生产或生物生产。特地考虑到, 本发明的 miRNA 探针是化学合成的。

在本发明的一些实施方案中, 从生物样品回收或分离 miRNA。miRNA 可以是重组的, 或者它可以是细胞的天然或内源 miRNA (从细胞基因组产生)。考虑到, 可对生物样品进行处理, 以增强小 RNA 分子如 miRNA 的回收。美国专利申请系列号 10/667,126 描述了这种方法, 该专利申请通过引用特地结合到本文中。一般来说, 这些方法涉及到用具有胍盐和去污剂的溶液裂解细胞。

或者, 可按标准的方法进行核酸合成。参见例如 Itakura 和 Riggs (1980) 及 4,704,362 号、5,221,619 号和 5,583,013 号美国专利, 每个文献和专利都通过引用并入本文。合成核酸(例如合成寡核苷酸)的非限制性实例, 包括通过如下方式进行体外化学合成制备的核酸: 使用磷酸三酯、亚磷酸盐或亚磷酰胺化学法, 和例如描述于 EP 266,032 的固相技术(通过引用并入本文), 或者通过如 Froehler 等人, 1986 和 5,705,629 号美国专利(各自通过引用并入本文)所描述的脱氧核苷 H-磷酸酯中间体。寡核苷酸合成的各种不同机制已在例如以下各号美国专利中公开: 4,659,774、4,816,571、5,141,813、5,264,566、4,959,463、5,428,148、5,554,744、5,574,146、5,602,244, 每个专利都通过引用并入本文。

酶促产生的核酸的非限制性实例, 包括通过酶在扩增反应如 PCRTM (参见例如 4,683,202 号和 4,682,195 号美国专利, 每个专利通过引用并入本文)中, 或者 5,645,897 号美国专利(通过引用并入本文)描述的寡核苷酸的合成中产生的核酸。另参见 Sambrook 等人, 2001 (通过引用并入本文)。

寡核苷酸合成是本领域技术人员公知的。寡核苷酸合成的各种不同机制已在例如以下各号美国专利中公开: 4,659,774、4,816,571、5,141,813、5,264,566、4,959,463、5,428,148、5,554,744、5,574,146、5,602,244, 每个专利都通过引用并入本文。

在细胞中产生核酸的重组方法是本领域技术人员公知的。这些方法包括使用载体(病毒载体和非病毒载体)、质粒、黏粒和其他介质来将核酸递送到细胞,细胞可以是靶标细胞(例如癌细胞),或者仅仅是宿主细胞(以产生大量的期望 RNA 分子)。或者,这种介质可在无细胞的系统的情形中使用,只要存在用以产生 RNA 分子的试剂。这种方法包括 Sambrook, 2003、Sambrook, 2001 和 Sambrook, 1989 中描述的方法,这三个文献通过引用并入本文。

C. 核酸的分离

核酸可用本领域技术人员公知的技术分离,不过在特定的实施方案中,可采用分离小核酸分子和/或分离 RNA 分子的方法。色谱法是一种常用来将核酸与蛋白质或者与其他核酸分开或分离的方法。这种方法可涉及用凝胶基质进行的电泳、过滤柱、醇沉淀和/或其他色谱法。如果细胞的 miRNA 要进行使用或者要进行评估,方法通常涉及用离液剂(例如异硫氰酸胍)和/或去污剂(例如 N-月桂酰基肌氨酸)裂解细胞,然后执行分离特定 RNA 群体的过程。

在特定的将 miRNA 与其他核酸分离的方法中,用聚丙烯酰胺制备凝胶基质,不过也可使用琼脂糖。凝胶可以有浓度梯度的,或者它们可以是均匀的。可以使用板材或管材保持凝胶基质以进行电泳。核酸的分离通常采用一维电泳。板材用来制备板式凝胶,而管材(通常为玻璃或橡胶)可用来制备管式凝胶。词语“管式电泳”指使用管子或管材而不是板材来形成凝胶。进行管式电泳的材料可容易地由本领域技术人员制备,或者可从例如 C.B.S. Scientific Co., Inc. 或 Scie-Plas 购得。

方法涉及使用有机溶剂和/或醇来分离核酸,特别是用于本发明方法和组合物的 miRNA。一些实施方案在美国专利申请系列号 10/667,126 中描述,该专利申请通过引用并入本文。大体上说,这个公开内容提供了从细胞有效分离小 RNA 分子的方法,所述方法包括:向细胞裂解物加入醇溶液,将醇/裂解物混合物施加到固相载体,然后将 RNA 分子从固相载体上洗脱下来。在一些实施方案中,加到细胞裂解物的醇的量实现约 55%-60%的醇浓度。乙醇非常适用,不过也可采用别的醇。固相载体可以为任何结构,它包括珠粒、滤器和柱子,其可包含带有电负性基团的矿物质或聚合物载体。玻璃纤维滤器或柱子对于这种分离方法特别适用。

在具体的实施方案中,miRNA 分离过程包括:a)用包含胍盐的裂解溶液裂解样品中的细胞,其中产生出胍盐浓度为至少约 1 M 的裂解物;b)用包含苯酚

的提取溶液从裂解物提取 miRNA 分子；c)向裂解物加入醇溶液以形成裂解物/醇混合物，其中混合物中醇的浓度在约 35%至约 70%之间；d)将裂解物/醇混合物施加到固相载体；e)用离子溶液将 miRNA 分子从固相载体上洗脱下来；和 f)捕获 miRNA 分子。通常，将样品干燥，并重悬在适合后续操作的液体和体积中。

V. 标记和标记技术

在一些实施方案中，本发明涉及经标记的 miRNA。考虑到 miRNA 可在进行标记之前先进行分离和/或纯化。与其中 miRNA 在进行标记之前没有进行分离或纯化的样品中的其他 RNA 相比，这可实现能更有效地标记 miRNA 的反应。在本发明的许多实施方案中，标记是非放射性标记。通常，可通过加入经标记的核苷酸(一步法)，或者加入核苷酸并标记所加入的核苷酸(两步法)，来对核酸进行标记。

A. 标记技术

在一些实施方案中，通过以催化方式向核酸加入已经标记的(一个或多个)核苷酸，来对核酸进行标记。可将一个或多个经标记的核苷酸加到 miRNA 分子。参见 6,723,509 号美国专利，其通过引用并入本文。

在其他的实施方案中，将未经标记的(一个或多个)核苷酸以催化方式加到 miRNA，未经标记的核苷酸是用可使它随后能够被标记的化学部分进行修饰。在本发明的实施方案中，化学部分是活性胺，使得核苷酸是经胺修饰的核苷酸。经胺修饰的核苷酸的实例是本领域技术人员公知的，有许多可例如从 Ambion、Sigma、Jena Bioscience 和 TriLink 市售获得。

与 cDNA 合成过程中对其进行标记相反的是，对 miRNA 进行标记的问题在于如何标记已经存在的分子。本发明涉及使用能够利用三磷酸核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸作为底物，将其加到 miRNA 的酶。此外，在具体的实施方案中，本发明涉及使用经修饰的二磷酸或三磷酸核糖核苷酸，它被加到 miRNA 的 3' 末端。能够加入这种核苷酸的酶包括但不限于 poly(A)聚合酶、末端转移酶和多核苷酸磷酸化酶。在本发明的具体实施方案中，考虑到用来加入标记的酶不是连接酶，相反，采用的是非连接酶。末端转移酶能催化核苷酸加入到核酸的 3' 末端。多核苷酸磷酸化酶能不需要引物就使二磷酸核苷酸发生聚合。

B. 标记

miRNA 或 miRNA 探针上的标记可以是比色(包括可见光谱和紫外光谱，包

括荧光) 标记、发光标记、酶促标记或正电子发射标记(包括放射性标记)。标记可直接或间接进行检测。放射性标记包括 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{33}P 和 ^{35}S 。酶促标记的实例包括碱性磷酸酶、萤光素酶、辣根过氧化物酶和 β -半乳糖苷酶。标记也可以是具有发光性质的蛋白质, 例如绿色荧光蛋白和藻红蛋白。

考虑用作缀合物的比色标记和荧光标记包括但不限于 Alexa Fluor 染料; BODIPY 染料, 如 BODIPY FL; Cascade Blue; Cascade Yellow; 香豆素及其衍生物, 如 7-氨基-4-甲基香豆素、氨基香豆素和羟基香豆素; 花青染料, 如 Cy3 和 Cy5; 曙红和赤藓红; 荧光素及其衍生物, 如异硫氰酸荧光素; 镧系离子的大环螯合物, 如 Quantum Dye™; Marina Blue; Oregon Green; 罗丹明染料, 如罗丹明红, 四甲基罗丹明和罗丹明 6G; Texas Red; 荧光能量转移染料, 如噻唑橙乙锭异型二聚体; 和 TOTAB。

染料的具体实例包括但不限于以上所述的染料和以下染料: Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700 和 Alexa Fluor 750; 胺反应性 BODIPY 染料, 如 BODIPY 493/503、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/655、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR 和 BODIPY-TR; Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、罗丹明绿、罗丹明红、肾造影剂、ROX、SYPRO、TAMRA、2',4',5',7'-四溴砒荧光素和 TET。

荧光标记的核糖核苷酸的具体实例可从 Molecular Probes 获得, 它们包括 Alexa Fluor 488-5-UTP、荧光素-12-UTP、BODIPY FL-14-UTP、BODIPY TMR-14-UTP、四甲基罗丹明-6-UTP、Alexa Fluor 546-14-UTP、Texas Red-5-UTP 和 BODIPY TR-14-UTP。其他的荧光核糖核苷酸可从 Amersham Biosciences 获得, 例如 Cy3-UTP 和 Cy5-UTP。

荧光标记的脱氧核糖核苷酸的实例包括二硝基苯基(DNP)-11-dUTP、Cascade Blue-7-dUTP、Alexa Fluor 488-5-dUTP、荧光素-12-dUTP、Oregon Green 488-5-dUTP、BODIPY FL-14-dUTP、罗丹明绿-5-dUTP、Alexa Fluor 532-5-dUTP、

BODIPY TMR-14-dUTP、四甲基罗丹明-6-dUTP、Alexa Fluor 546-14-dUTP、Alexa Fluor 568-5-dUTP、Texas Red-12-dUTP、Texas Red-5-dUTP、BODIPY TR-14-dUTP、Alexa Fluor 594-5-dUTP、BODIPY 630/650-14-dUTP、BODIPY 650/665-14-dUTP、Alexa Fluor 488-7-OBEA-dCTP、Alexa Fluor 546-16-OBEA-dCTP、Alexa Fluor 594-7-OBEA-dCTP、Alexa Fluor 647-12-OBEA-dCTP。

考虑到核酸可用两种不同的标记进行标记。此外，在本发明的方法中可采用荧光共振能量转移技术(FRET) (例如 Klostermeier 等人, 2002; Emptage, 2001; Didenko, 2001, 每个文献通过引用并入本文)。

或者，标记可以本身不是可检测的，但可以是间接可检测的，或者能使靶标核酸得以分离或分开。例如，标记可以是生物素、地高辛、多价阳离子、螯合基团和其他配体，包括抗体的配体。

C. 显示技术

有多种用以显示或检测经标记的核酸的技术是现成可用的。这些技术包括显微镜检术、阵列、荧光测定术、光循环仪(Light cycler)或其他实时 PCR 仪；FACS 分析、闪烁计数器、磷光影像分析仪、盖格计数器、MRI、CAT、基于抗体的检测方法(蛋白质印迹、免疫荧光、免疫组织化学)、组织化学技术、HPLC (Griffey 等人, 1997)、光谱法、毛细管凝胶电泳(Cummins 等人, 1996)、光谱法、质谱、放射技术和质量平衡技术(mass balance technique)。

当采用两个或多个差异着色的标记时，可采用荧光共振能量转移技术(FRET)来表征一个或多个核苷酸的缔合。此外，本领域普通技术人员熟知显示、鉴定和表征经标记的核酸的方法，因此这些方案可作为本发明的一部分使用。可使用的工具的实例还包括荧光显微镜术、BioAnalyzer、读板器、Storm (Molecular Dynamics)、阵列扫描仪、FACS (荧光激活细胞分选仪)或者任何具有激发和检测荧光分子的能力的仪器。

VI. 试剂盒

本文描述的任何组合可包含在试剂盒中。在非限制性的实例中，试剂盒可包括用以采用阵列、核酸扩增和/或杂交来分离 miRNA、标记 miRNA 和/或评估 miRNA 群体的试剂，以及用以从血液样品制备样品的试剂。试剂盒还可包括用以产生或合成 miRNA 探针的试剂。试剂盒因此将在合适的容器器具中，包含用以通过掺入经标记的核苷酸或者随后被标记的未经标记的核苷酸来标记 miRNA

的酶。在某些方面，试剂盒可包括扩增试剂。在其他方面，试剂盒可包括各种载体，如玻璃、尼龙、聚合珠粒等，和/或用以偶联任何探针和/或靶标核酸的试剂。它还可包括一种或多种缓冲液，如反应缓冲液、标记缓冲液、洗涤缓冲液或杂交缓冲液、用以制备 miRNA 探针的化合物和用以分离 miRNA 的成分。本发明的其他试剂盒可包括用以制备包含 miRNA 的核酸阵列的成分，因此可包括例如固相载体。

特地考虑到用以执行本文所述的本发明方法的试剂盒。在一些实施方案中，有用以制备用于多重标记的 miRNA 的试剂盒，和用以制备 miRNA 探针和/或 miRNA 阵列的试剂盒。在这些实施方案中，试剂盒在合适的容器器具中包含以下成分中的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 个或更多个：(1) poly(A) 聚合酶；(2) 未经修饰的核苷酸(G、A、T、C 和/或 U)；(3) 经修饰的核苷酸(经标记的或未经标记的)；(4) poly(A) 聚合酶缓冲液；(5) 至少一个微过滤器；(6) 可与核苷酸连接的标记；(7) 至少一个 miRNA 探针；(8) 反应缓冲液；(9) miRNA 阵列或用以制作这种阵列的成分；(10) 乙酸；(11) 醇；(12) 用以制备、分离、富集和纯化 miRNA 或 miRNA 探针或阵列的溶液。其他的试剂包括通常用于操纵 RNA 的试剂，如甲酰胺、荷载染料、核糖核酸酶抑制剂和 DNA 酶。

在具体的实施方案中，本发明的试剂盒包括含有本申请中所述的 miRNA 探针的阵列。阵列可具有对应于生物的或者特定条件下特定组织或器官的所有已知 miRNA 的探针，或者这些探针的子集(subset)。本发明阵列上的探针子集，可以是或者包括经鉴定为与特定诊断性、治疗性或预后性应用相关的那些探针。例如，阵列可含有一个或多个指示或暗示以下方面的探针：(1) 疾病或病症(急性髓性白血病)；(2) 对特定药物或治疗的易感性或抗性；(3) 对来自药物或物质的毒性的易感性；(4) 疾病或病症的发展阶段或严重性(预后)；和(5) 对疾病或病症的遗传易感性。

对于任何试剂盒实施方案，包括阵列，可以有含有或者可用来扩增这样的序列的核酸分子，该序列是本文描述的任何 SEQ ID 的全部或部分的变体，或者与本文描述的任何 SEQ ID 的全部或部分有同一性或互补性。在某些实施方案中，本发明的试剂盒或阵列可含有一个或多个由本文所述 SEQ ID 所表示的 miRNA 的探针。任何上文讨论的核酸都可作为试剂盒的一部分执行。

试剂盒的各成分可包装在含水介质中，或者可以以冻干形式包装。试剂盒的容器器具通常会包括至少一个其中装入某个成分、该成分优选经适当等分的

小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其他容器器具。在试剂盒中有超过一个成分(标记试剂和标记可包装在一起)的情况中,试剂盒通常还会含有其中可单独装入另外的成分的第二、第三个或其他另外容器。但是,各成分的各种组合可包含在小瓶中。本发明的试剂盒通常还会包括用来装核酸的器具,和任何其他严密密封以供商业销售的试剂容器。这种容器可包括注塑或吹塑的塑料容器,期望的小瓶保持在所述容器中。

当试剂盒的各成分是在一个和/或多个液体溶液中提供时,液体溶液是水溶液,特别优选的是无菌水溶液。

但是,试剂盒的各成分可作为干燥粉末提供。当各试剂和/或成分作为干燥粉末提供时,粉末可通过加入合适的溶剂进行重构。预想到,还可在另一容器器具中提供溶剂。在一些实施方案中,标记染料作为干燥粉末提供。考虑到,在本发明的试剂盒中提供 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900、1000 μg 或至少或至多这些数量的干燥染料。接着染料可重悬在任何合适的溶剂如 DMSO 中。

这种试剂盒还可包括有助于分离经标记的 miRNA 的成分。它还可包括能保藏或维持 miRNA 或者能使 miRNA 免遭降解的成分。这种成分可以是无 RNA 酶的,或者是受保护免遭 RNA 酶的影响。这种试剂盒通常会以合适的方式包含每个试剂或溶液的不同容器。

试剂盒还会包括有关应用试剂盒各成分以及使用试剂盒中没有包括的任何其他试剂的说明书。说明书可包括可执行的各种变化方案。

本发明的试剂盒还可包括以下的一个或多个:对照 RNA;无核酸酶的水;无 RNA 酶的容器,如 1.5 ml 管子;无 RNA 酶的洗脱管;PEG 或葡聚糖;乙醇;乙酸;乙酸钠;乙酸铵;胍盐;去污剂;核酸大小标记;无 RNA 酶的管尖;和 RNA 酶或 DNA 酶抑制剂。

考虑到这些试剂是本领域试剂盒的各实施方案。但是,这种试剂盒并不局限于以上所述的具体项目,而是可包括任何用来操纵或表征 miRNA 的试剂。

实施例

给出以下实施例目的是说明本发明的各个实施方案,并不意在以任何方式限制本发明。本领域技术人员会容易理解到,本发明很适合于执行本文提到的

目标和获得本文提到的目的和优点，以及实现本文暗含的那些目标、目的和优点。本发明的实施例连同本文描述的方法，目前代表着优选的实施方案，是示例性的，并不意在作为对本发明范围的限制。涵盖在由权利要求书的范围所限定的本发明精神内的变化方案和其他用途，本领域技术人员是会想到的。除另有指明外，目录号指代的是可按该号码从 Ambion, Inc.®, The RNA Company 获得的产品。

实施例 1

miRNA 转染后分析基因表达的方法

将合成的前体 miR miRNA (Ambion)反转到 A549、HepG2 或 HL-60 细胞的一式四份的样品中。A549 和 HepG2 细胞用 siPORT NeoFX (Ambion)，按照生产商的推荐使用以下参数进行转染：6 孔板中每孔 200,000 个细胞、5.0 μ l 的 NeoFX、2.5 ml 的 30 nM 终浓度的 miRNA。转染 72 小时后收获细胞。HL-60 细胞用 Gene Pulser Xcell System (Bio-Rad Laboratories, Inc.; Hercules, CA, USA)按照厂商说明书和以下参数进行转染：每反应 150 μ l 体积的 500,000 个细胞，在 2-mm 电穿孔杯(electroporation cuvette)中，使用 25 msec 的单方波脉冲。

总 RNA 用 RNAqueous-4PCR (Ambion)按照生产商推荐的方案进行提取。mRNA 阵列分析由 Asuragen Services (Austin, TX)按照该公司的标准操作程序进行。使用 MessageAmp™ II-96 aRNA Amplification Kit (Ambion, 目录号 1819)，将 2 μ g 的总 RNA 用于进行靶标制备和生物素标记。cRNA 产量用 Agilent Bioanalyzer 2100 毛细管电泳方案进行定量。采用生产商的推荐和以下参数，使经标记的靶标与 Affymetrix mRNA 阵列(Human HG-U133A 2.0 阵列)阵列杂交。杂交是在 Affymetrix Model 640 杂交炉中 45°C 进行 16 小时。将阵列洗涤，在 Affymetrix FS450 流控台上染色，运行洗涤脚本 Midi_euk2v3_450。将阵列在 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 上扫描。用 Affymetrix 统计算法 MAS 5.0 (GCOS v1.4)，产生有关图象信号数据、组平均值、带显著性标签的 p 值、对数比和阵列上每个基因的基因注释的概要。对于观察到的效应，用两个阴性对照微小 RNA 序列的平均值进行归一化，然后一起取平均值来表示。确定为被治疗改变的基因，是通过根据相对于两个对照转染的变化倍数对所有基因进行过滤来确定的。统计学显著性是在综合性 F 检验(omnibus F-test)证实显著后通过 t 检验来评估。

实施例 2

A549、HEPG2 和 HL-60 细胞用 HSA-LET-7B 转染后的基因表达分析

miRNA 据认为主要在翻译水平上影响基因表达。但是,最近已报道,在一些情况中 hsa-let-7 (Bagga 等人, 2005)和其他 miRNA (Lim 等人, 2005)可降低直接靶标的 mRNA 水平,且这种变化可在微阵列基因表达分析时观察到。

本文描述的实验能鉴定人肺癌(A549)细胞系、人肝癌细胞系(HepG2)和人急性髓性白血病细胞系(HL-60)中,其 mRNA 水平受 hsa-let-7 表达的影响的基因。A549、HepG2 或 HL-60 细胞按实施例 1 的描述用前体 miR hsa-let-7b (作为 hsa-let-7 miRNA 家族的代表性成员)进行转染。微阵列基因表达分析的结果在表 2、3 和 4 中显示。

表 2. 用前体 miR hsa-let-7b 转染后 A549 细胞中 mRNA 表达水平发生改变的基因

基因符号	参考序列 (通过引用其全部并入本文)	变化倍数
2'-PDE	NM_177966	-2.031
AADACL1	NM_020792	4.169
AASDHPPT	NM_015423	-2.596
ACF	NM_014576 /// NM_138932 /// NM_138933	-2.342
ACPL2	NM_152282	2.568
ACVR1B	NM_004302 /// NM_020327 /// NM_020328	-2.020
ADA	NM_000022	-2.614
ADAM12	NM_003474 /// NM_021641	2.004
ADCY1	NM_021116	2.255
ADFP	NM_001122	2.038
AK5	NM_012093 /// NM_174858	2.096
AKAP2 PALM2-AKAP2	/// NM_001004065 /// NM_007203 /// NM_147150	3.107
ALCAM	NM_001627	2.591
ALDH1A3	NM_000693	2.164
ALDH3A1	NM_000691	2.814
ANGEL2	NM_144567	-2.238
ANKRD22	NM_144590	2.134
ANKRD44	NM_153697	5.186
ANP32A	NM_006305	-2.037
ANPEP	NM_001150	3.502
ANXA8	NM_001630	2.076
AOX1	NM_001159	2.132
AP1S1	NM_001283 /// NM_057089	-2.326
AQP3	NM_004925	2.111
ARF7	NM_025047	4.907
ARID1A	NM_006015 /// NM_018450 /// NM_139135	-2.031
ARL6IP6	NM_152522	-2.914
ARL7	NM_005737	2.141
ASAM	NM_024769	3.795
ASK	NM_006716	-2.251

ASNS	NM_001673 /// NM_133436 /// NM_183356	-2.206
ATF2	NM_001880	2.120
ATG10	NM_031482	-2.333
ATP11C	NM_001010986 /// NM_173694	2.676
ATP2B4	NM_001001396 /// NM_001684	2.022
ATP6V1C1	NM_001007254 /// NM_001695	-2.311
ATP6V1F	NM_004231	-2.102
ATP9A	NM_006045	2.552
AURKB	NM_004217	-2.989
AVEN	NM_020371	-2.156
BAI2	NM_001703	2.098
BCAT1	NM_005504	-2.520
BCCIP	NM_016567 /// NM_078468 /// NM_078469	-2.304
BEX2	NM_032621	2.154
BEXL1	XM_043653	2.181
BTF3L4	NM_152265	-2.174
BTNL9	NM_152547	3.114
C10orf9	NM_145012 /// NM_181698	-2.502
C13orf1	NM_020456	-2.607
C14orf111	NM_015962	-2.044
C14orf2	NM_004894	-2.455
C14orf46	NM_001024674	-2.290
C16orf45	NM_033201	2.342
C17orf63	NM_018182	-2.058
C18orf17	NM_153211	-2.153
C18orf21	NM_031446	-2.171
C1orf121	NM_016076	-2.042
C1orf139	NM_001002292 /// NM_024911	2.025
C1orf24	NM_022083 /// NM_052966	2.225
C1orf25	NM_030934	-2.193
C1QDC1	NM_001002259 /// NM_023925 /// NM_032156	2.649
C1R	NM_001733	2.135
C20orf100	NM_032883	3.548
C20orf177	NM_022106	-2.455
C2orf32	NM_015463	2.558
C3orf17	NM_001025072 /// NM_001025073 /// NM_015412	-2.577
C6orf120	NM_001029863	-2.347
C6orf141	NM_153344	2.511
C6orf176	XM_499048	-3.962
C6orf211	NM_024573	-2.278
C8orf1	NM_004337	2.660
C9orf125	NM_032342	-3.962
C9orf3	NM_032823	-2.289
CAMTA1	NM_015215	2.232
CANT1	NM_138793	-2.128
CAPG	NM_001747	2.353
CBX5	NM_012117	-3.718
CCL26	NM_006072	2.353
CCNA2	NM_001237	-2.474
CCNG2	NM_004354	2.005
CD164	NM_006016	-2.243
CD44	NM_000610 /// NM_001001389 /// NM_001001390 /// NM_001001391 /// NM_001001392	2.071

CD47	NM_001025079 /// NM_001025080 /// NM_001777 /// NM_198793	2.465
CD59	NM_000611 /// NM_203329 /// NM_203330 /// NM_203331	2.185
CD9	NM_001769	2.197
CDA	NM_001785	2.456
CDC25A	NM_001789 /// NM_201567	-2.588
CDC34	NM_004359	-2.990
CDC42EP3	NM_006449	2.057
CDCP1	NM_022842 /// NM_178181	2.642
CDH19	NM_021153	2.019
CDK5R1	NM_003885	2.003
CDK8	NM_001260	-3.292
CEBPD	NM_005195	-3.131
CFLAR	NM_003879	2.273
CHD7	NM_017780	-2.006
CHEK1	NM_001274	-2.070
ChGn	NM_018371	2.090
CHIC1	XR_000216	-2.169
CITED2	NM_006079	2.212
CLDN3	NM_001306	3.246
CLIC4	NM_013943	2.128
CNFN	NM_032488	2.206
COL12A1	NM_004370 /// NM_080645	2.146
COL13A1	NM_005203 /// NM_080798 /// NM_080799 /// NM_080800 /// NM_080801 /// NM_080802	3.227
COL4A5	NM_000495 /// NM_033380 /// NM_033381	2.073
COL5A1	NM_000093	2.365
COL6A1	NM_001848	2.767
COL6A2	NM_001849 /// NM_058174 /// NM_058175	3.792
CORO2B	NM_006091	3.570
CPOX	NM_000097	-2.163
CREB5	NM_001011666 /// NM_004904 /// NM_182898 /// NM_182899	2.031
CSDE1	NM_001007553 /// NM_007158	-2.306
CSF2RA	NM_006140 /// NM_172245 /// NM_172246 /// NM_172247 /// NM_172248 /// NM_172249	2.365
CTPS	NM_001905	-2.212
CTPS2	NM_019857 /// NM_175859	-2.346
CTSS	NM_004079	2.570
CXCL1	NM_001511	4.396
CXCL2	NM_002089	4.868
CXCL3	NM_002090	4.152
CXCL5	NM_002994	3.654
CXorf45	NM_024810	3.034
CYP3A5	NM_000777	2.050
CYR61	NM_001554	-2.818
DAF	NM_000574	2.590
DCAMKL1	NM_004734	2.780
DDC	NM_000790	-4.408
DDX3Y	NM_004660	2.138
DGKA	NM_001345 /// NM_201444 /// NM_201445 /// NM_201554	2.187
DHX40	NM_024612	2.033

DIAPH2	NM_006729 /// NM_007309	-2.003
DICER1	NM_030621 /// NM_177438	-4.505
DKFZp434J1015	XM_496849 /// XM_499257	2.216
DKFZp667M2411	NM_207323	2.475
DKK3	NM_001018057 /// NM_013253 /// NM_015881	3.449
DNER	NM_139072	2.811
DOCK11	NM_144658	2.066
DOCK2	NM_004946	2.488
DOCK9	NM_015296	3.245
DPAGT1	NM_001382 /// NM_203316	-2.632
DPYSL4	NM_006426	2.671
DUSP16	NM_030640	-2.565
DUSP6	NM_001946 /// NM_022652	2.124
E2F5	NM_001951	-2.923
EDIL3	NM_005711	3.471
EGFL3	XM_031401	3.200
EGFL4	NM_001410	2.310
EHD1	NM_006795	2.112
EHF	NM_012153	2.530
EIF2C2	NM_012154	2.750
EIF4E3	NM_173359	2.081
ELF4	NM_001421	-2.175
ELOVL7	NM_024930	3.863
EMP1	NM_001423	2.211
EMP2	NM_001424	2.628
ENTPD7	NM_020354	2.157
EPHB2	NM_004442 /// NM_017449	2.018
EPLIN	NM_016357	2.303
ERO1L	NM_014584	-3.927
EYA2	NM_005244 /// NM_172110 /// NM_172111 /// NM_172112 /// NM_172113	2.022
F2R	NM_001992	3.514
F2RL2	NM_004101	-2.807
F5	NM_000130	-2.066
FAM54A	NM_138419	-2.026
FAM61A	NM_015578	2.251
FAM96A	NM_001014812 /// NM_032231	-2.015
FBN1	NM_000138	2.407
FCGBP	NM_003890	4.974
FDXR	NM_004110 /// NM_024417	2.103
FGA	NM_000508 /// NM_021871	-3.480
FGB	NM_005141	-5.014
FGFBP1	NM_005130	2.232
FGFR4	NM_002011 /// NM_022963 /// NM_213647	-2.029
FGG	NM_000509 /// NM_021870	-2.461
FHL1	NM_001449	2.089
FHL2	NM_001450 /// NM_201555 /// NM_201556 /// NM_201557	2.036
FIGN	NM_018086	-2.842
FLJ10700	NM_018182	-2.822
FLJ11259	NM_018370	3.624
FLJ20160	NM_017694	2.143
FLJ22313	NM_022373	2.391

FLJ22833	NM_001031716 /// NM_022837	2.060
FLJ30655	NM_144643	-2.028
FLJ36031	NM_175884	2.051
FLJ36748	NM_152406	2.337
FLJ39370	NM_152400	3.186
FLJ43339	NM_207380	2.435
FLJ90709	NM_173514	-2.574
FLRT3	NM_013281 /// NM_198391	-2.146
FMNL2	NM_001004417 /// NM_001004421 /// NM_001004422 /// NM_052905	2.219
FOXO3A	NM_001455 /// NM_201559	2.187
FOXQ1	NM_033260	3.010
FRMD6	NM_152330	2.959
FSTL1	NM_007085	3.378
FVT1	NM_002035	2.179
FYN	NM_002037 /// NM_153047 /// NM_153048	2.199
GALC	NM_000153	-2.359
GALE	NM_000403 /// NM_001008216	-2.420
GALNACT-2	NM_018590	2.008
GALNT12	NM_024642	2.588
GALNT2	NM_004481	-3.061
GARS	NM_002047	-2.134
GBP3	NM_018284	3.721
GCH1	NM_000161 /// NM_001024024 /// NM_001024070 /// NM_001024071	2.242
GDA	NM_004293	2.477
GEMIN7	NM_001007269 /// NM_001007270 /// NM_024707	-2.505
GFPT2	NM_005110	2.175
GLB1	NM_000404	-3.416
GLIPR1	NM_006851	2.448
GLUL	NM_001033044 /// NM_001033056 /// NM_002065	2.125
GMNN	NM_015895	-2.286
GNB1	NM_002074	2.371
GNG2	NM_053064	2.067
GNG5	NM_005274	-2.613
GOLT1B	NM_016072	-2.532
GTF2I	NM_001518 /// NM_032999 /// NM_033000 /// NM_033001	-2.190
H1FX	NM_006026	-2.033
H2BFS	NM_017445	-2.382
HAS3	NM_005329 /// NM_138612	2.710
HDHD1A	NM_012080	-7.596
HERC4	NM_001017972 /// NM_015601 /// NM_022079	3.356
HH114	NM_032499	-2.084
HHIP	NM_022475	2.009
HIPK3	NM_005734	2.241
HIST1H2BK	NM_080593	-2.344
HK1	NM_000188 /// NM_033496 /// NM_033497 /// NM_033498 /// NM_033500	2.622
HLF	NM_002126	2.501
HMGA2	NM_001015886 /// NM_003483 /// NM_003484	-4.655
HMMR	NM_012484 /// NM_012485	-3.297
HNRPC	NM_004500 /// NM_031314	-3.742

HOXA1	NM_005522 /// NM_153620	-2.535
HTRA1	NM_002775	2.315
ICF45	NM_017872	2.015
IFI16	NM_005531	2.148
IFNE1	NM_176891	3.464
IGFBP1	NM_000596 /// NM_001013029	2.598
IGFBP6	NM_002178	2.555
IL10RB	NM_000628	2.039
IL11	NM_000641	-2.922
IL17RD	NM_017563	2.014
IL32	NM_001012631 /// NM_001012632 /// NM_001012633 /// NM_001012634 /// NM_001012635	2.085
IL8	NM_000584	7.197
ILF3	NM_004516 /// NM_012218 /// NM_153464	2.143
IMP-1	NM_006546	-2.676
IMP-2	NM_001007225 /// NM_006548	-2.534
INSIG1	NM_005542 /// NM_198336 /// NM_198337	2.011
INSL4	NM_002195	-2.131
ITGA2	NM_002203	2.284
ITGA6	NM_000210	2.013
ITGB4	NM_000213 /// NM_001005619 /// NM_001005731	3.702
ITGB8	NM_002214	2.362
ITPR2	NM_002223	2.831
IVNS1ABP	NM_006469 /// NM_016389	2.978
JUB	NM_032876 /// NM_198086	-2.858
JUN	NM_002228	2.092
KCNJ16	NM_018658 /// NM_170741 /// NM_170742	-3.743
KCNK1	NM_002245	2.064
KCNMA1	NM_001014797 /// NM_002247	2.962
KCNN4	NM_002250	2.109
KDELC1	NM_024089	2.341
KDELC2	NM_153705	2.794
KIAA0100	NM_014680	2.041
KIAA0179	NM_015056	-2.032
KIAA0507	---	-2.326
KIAA1287	NM_020748	-2.130
KIAA1462	XM_166132	2.220
KIAA1571	XM_371590	2.125
KIAA1641	NM_020970	2.107
KIAA1702	---	-2.308
KIAA1815	NM_024896	2.031
KIAA1946	NM_177454	3.307
KIAA1971	XM_058720	2.057
KLF11	NM_003597	3.448
KRT15	NM_002275	2.859
KRT19	NM_002276	2.910
KYNU	NM_001032998 /// NM_003937	-2.413
L1CAM	NM_000425 /// NM_024003	2.090
LAMB3	NM_000228 /// NM_001017402	2.156
LAMP2	NM_002294 /// NM_013995	2.548
LARP6	NM_018357 /// NM_197958	2.025
LCAT	NM_000229	2.127

LEPR	NM_001003679 /// NM_001003680 /// NM_002303	-2.759
LEPROTL1	NM_015344	-2.689
LGALS3 /// GALIG	NM_002306 /// NM_194327	2.380
LGR4	NM_018490	-2.472
LGR6	NM_001017403 /// NM_001017404 /// NM_021636	2.447
LHFP	NM_005780	2.520
LIN28B	NM_001004317	-6.529
LOC116238	NM_138463	-2.322
LOC150759	XM_498456 /// XM_499585	2.713
LOC201651	XM_114355	-2.280
LOC283464	XM_290597	-3.353
LOC284611	NM_001010883	2.128
LOC285513	NM_198281	-2.702
LOC285943	---	-2.652
LOC399959	XM_378316	2.719
LOC440737	XM_496446	2.720
LOC441027	XM_496707	2.910
LOC492304	NM_001007139	2.604
LOC51315	NM_016618	2.208
LOC554202	---	2.368
LOXL2	NM_002318	2.583
LPGAT1	NM_014873	-2.141
LRP12	NM_013437	2.092
LSM6	NM_007080	-2.442
LTBP3	NM_021070	2.405
LTBP4	NM_003573	2.407
LYST	NM_000081 /// NM_001005736	2.480
MAFF	NM_012323 /// NM_152878	3.282
MAFK	NM_002360	-2.183
MAP3K9	NM_033141	-2.349
MARCH4	NM_020814	2.430
MARS	NM_004990	-2.018
MCAM	NM_006500	2.079
MDH2	NM_005918	-2.057
MED6	NM_005466	-2.300
MED8	NM_001001651 /// NM_001001653 /// NM_001001654 /// NM_052877 /// NM_201542	-2.082
MGC11102	NM_032325	-2.106
MGC11308	NM_032889	-2.003
MGC13204	NM_031465	-2.951
MGC14289	NM_080660	-2.993
MGC18216	---	-2.441
MGC23909	NM_174909	-2.925
MGC2408	NM_032331	-2.471
MGC2560	NM_031452	-3.112
MICAL2	NM_014632	2.124
MICB	NM_005931	-3.386
MMP7	NM_002423	2.127
MN1	NM_002430	-2.037
M-RIP	NM_015134 /// NM_201274	2.082
MRS2L	NM_020662	-2.336
MSRB3	NM_001031679 /// NM_198080	2.261

MT1E	NM_175617	2.263
MT1F	NM_005949	2.583
MT1G	NM_005950	2.162
MT1H	NM_005951	2.635
MT1M	NM_176870	2.021
MT1X	NM_005952	2.407
MT2A	NM_005953	2.913
MTPN	NM_145808	2.033
MTUS1	NM_001001924 /// NM_001001925 /// NM_001001927 /// NM_001001931 /// NM_020749	-2.159
MUC5B	XM_039877	3.213
MYO1D	NM_015194	2.120
NANOS1	NM_001009553 /// NM_199461	3.060
NAPIL1	NM_004537 /// NM_139207	-2.253
NAPIL3	NM_004538	2.028
NARG1	NM_057175	-2.372
NAV3	NM_014903	2.160
NDRG1	NM_006096	2.039
NDUFA5	NM_005000	2.270
NEIL3	NM_018248	-2.344
NEK3	NM_002498 /// NM_152720	-2.099
NEXN	NM_144573	2.374
NFIB	NM_005596	2.161
NGEF	NM_019850	2.259
NHSL1	XM_496826	2.602
NID1	NM_002508	13.062
NLN	NM_020726	-2.344
NME4	NM_005009	-2.386
NME6	NM_005793	-2.601
NOV	NM_002514	2.008
NPC2	NM_006432	2.065
NR2F6	NM_005234	-2.073
NRAS	NM_002524	-3.277
NT5E	NM_002526	2.176
NUDT15	NM_018283	3.077
NUDT4	NM_019094 /// NM_199040	-2.548
NUP98	NM_005387 /// NM_016320 /// NM_139131 /// NM_139132	-3.260
OBSL1	XM_051017	2.368
OLFM1	NM_006334 /// NM_014279 /// NM_058199	2.392
OSTbeta	NM_178859	-3.403
P18SRP	NM_173829	-2.162
PABPC4	NM_003819	-2.222
PALM2-AKAP2	NM_007203 /// NM_147150	3.034
PANK3	NM_024594	2.076
PAPOLA	NM_032632	-2.205
PBEF1	NM_005746 /// NM_182790	2.004
PCTP	NM_021213	-2.334
PDCD4	NM_014456 /// NM_145341	-2.068
PDE3A	NM_000921	-2.340
PDLIM5	NM_001011513 /// NM_001011514 /// NM_001011515 /// NM_001011516 /// NM_006457	2.028
PELI1	NM_020651	2.011

PGM2L1	NM_173582	-2.235
PGRMC1	NM_006667	-2.561
PHF19	NM_001009936 /// NM_015651	-2.126
PHLDA1	NM_007350	2.276
PIGA	NM_002641 /// NM_020472 /// NM_020473	-2.240
PJA2	NM_014819	2.280
PLAGL1	NM_002656 /// NM_006718	-2.228
PLAGL2	NM_002657	-2.732
PLAT	NM_000930 /// NM_000931 /// NM_033011	2.110
PLAU	NM_002658	3.175
PLCL2	NM_015184	2.480
PLEKHH2	NM_172069	2.299
PLSCR4	NM_020353	2.853
PODXL	NM_001018111 /// NM_005397	3.975
POLR2D	NM_004805	-2.153
PPARG	NM_005037 /// NM_015869 /// NM_138711 /// NM_138712	-2.074
PPFIA1	NM_003626 /// NM_177423	2.111
PPP1R15A	NM_014330	2.075
PPP4C	NM_002720	-2.099
PRICKLE1	NM_153026	2.766
PRKAR2A	NM_004157	-3.057
PRKCDBP	NM_145040	3.685
PRP2	NM_173490	2.459
PRRG4	NM_024081	2.910
PRSS1 /// PRSS2 /// PRSS3 /// TRY6	NM_002769 /// NM_002770 /// NM_002771 /// NR_001296	2.040
PRSS3	NM_002771	4.893
PSME4	NM_014614	-3.059
PTRF	NM_012232	2.131
PTX1	NM_016570	-2.305
PURB	NM_033224	2.076
PYCARD	NM_013258 /// NM_145182 /// NM_145183	2.136
QKI	NM_006775 /// NM_206853 /// NM_206854 /// NM_206855	3.366
RAB3B	NM_002867	3.180
RABEP2	NM_024816	2.453
RAGE	NM_014226	2.470
RAP2B	NM_002886	2.237
RASGEF1A	NM_145313	3.000
RASSF2	NM_014737 /// NM_170773 /// NM_170774	2.639
RBP4	NM_006744	2.172
RBPM5	NM_001008710 /// NM_001008711 /// NM_001008712 /// NM_006867	-2.326
RBPM52	NM_194272	2.002
RECK	NM_021111	2.557
RGS2	NM_002923	2.250
RHOB	NM_004040	-2.028
RHOBTB1	NM_001032380 /// NM_014836 /// NM_198225	-2.150
RIG	---	3.819
RIOK2	NM_018343	-2.405
RIS1	NM_015444	5.424
RIT1	NM_006912	2.140

RNF13	NM_007282 /// NM_183381 /// NM_183382 /// NM_183383 /// NM_183384	-2.104
RNF144	NM_014746	2.327
RNF157	NM_052916	2.030
RNF182	NM_152737	3.611
RPS6KA5	NM_004755 /// NM_182398	2.203
RPUSD3	NM_173659	-3.416
RRM2B	NM_015713	2.230
RTCD1	NM_003729	-2.683
RTN4IP1	NM_032730	-2.594
RTN4RL2	NM_178570	-2.193
RUNX2	NM_001015051 /// NM_001024630 /// NM_004348	2.185
RY1	NM_006857	2.393
S100PBPR	NM_001017406 /// NM_022753	-2.194
SAR1B	NM_001033503 /// NM_016103	3.112
SAT	NM_002970	2.446
SCAMP1	NM_004866 /// NM_052822	2.468
SCARA3	NM_016240 /// NM_182826	2.572
SCD5	NM_024906	2.401
SCEL	NM_003843 /// NM_144777	-2.043
SCN1B	NM_001037 /// NM_199037	2.728
SEC24A	XM_094581	2.064
SEMA4B	NM_020210 /// NM_198925	2.978
SEPT6 /// N-PAC	NM_015129 /// NM_032569 /// NM_145799 /// NM_145800 /// NM_145802	2.002
SERP1	NM_014445	-2.398
SERPINB9	NM_004155	-3.543
SERPINE2	NM_006216	3.237
SEZ6L2	NM_012410 /// NM_201575	2.092
SFRP1	NM_003012	2.192
SGK2	NM_016276 /// NM_170693	-2.167
SLC11A2	NM_000617	2.236
SLC16A2	NM_006517	2.756
SLC17A5	NM_012434	-2.453
SLC1A1	NM_004170	3.319
SLC22A4	NM_003059	2.499
SLC25A13	NM_014251	-2.391
SLC25A24	NM_013386 /// NM_213651	-2.411
SLC25A32	NM_030780	-2.231
SLC25A37	NM_016612 /// NM_018579	2.030
SLC35D2	NM_007001	-2.779
SLC44A1	NM_022109 /// NM_080546	2.091
SLC4A11	NM_032034	2.448
SLC4A5	NM_021196 /// NM_033323 /// NM_133478 /// NM_133479	-2.439
SLC5A6	NM_021095	-2.965
SLC6A15	NM_018057 /// NM_182767	2.160
SLC6A6	NM_003043	2.012
SLC7A5	NM_003486	-2.555
SLC7A6	NM_003983	-2.172
SLC7A7	NM_003982	-2.071
SMAD2	NM_001003652 /// NM_005901	2.035
SMARCC1	NM_003074	-2.107
SMURF2	NM_022739	3.642

SNAP23	NM_003825 /// NM_130798	-2.270
SNX5	NM_014426 /// NM_152227	-2.012
SOCS3	NM_003955	2.401
SOD2	NM_000636 /// NM_001024465 /// NM_001024466	2.039
SPCS3	NM_021928	-2.631
SPOCK	NM_004598	2.958
SQRDL	NM_021199	2.004
SRP46	NM_032102	-2.244
SRPK2	NM_182691 /// NM_182692	2.012
SS18L1	NM_015558 /// NM_198935	2.202
ST6GALNAC2	NM_006456	-2.414
STARD3NL	NM_032016	-2.311
STAT1	NM_007315 /// NM_139266	-2.063
STC1	NM_003155	2.166
STEAP3	NM_001008410 /// NM_018234 /// NM_182915	2.414
STK6	NM_003600 /// NM_198433 /// NM_198434 /// NM_198435 /// NM_198436 /// NM_198437	-2.773
STRA6	NM_022369	2.165
STS-1	NM_032873	-2.023
SUSD2	NM_019601	2.326
SUV39H2	NM_024670	-2.173
SYNGR3	NM_004209	2.531
SYT13	NM_020826	2.280
TAGLN	NM_001001522 /// NM_003186	2.210
TBC1D2	NM_018421	2.085
TBC1D7	NM_016495	2.136
TCEAL3	NM_001006933 /// NM_032926	2.373
TDO2	NM_005651	2.248
TFAP2C	NM_003222	2.730
TFPI2	NM_006528	3.936
TFRC	NM_003234	-2.539
TGFA	NM_003236	2.602
TGFBR1	NM_004612	-2.453
THBS1	NM_003246	-2.022
THEM4	NM_053055 /// NM_176853	-2.147
THUMPD1	NM_017736	2.138
TIGA1	NM_053000	-2.341
TK2	NM_004614	2.448
TKT	NM_001064	-2.520
TLN1	NM_006289	2.138
TM4SF20	NM_024795	-5.746
TMED5	NM_016040	-2.165
TMEM16A	NM_018043	2.204
TMEM2	NM_013390	-2.525
TMEM50B	NM_006134	2.193
TMEM87B	NM_032824	2.282
TNFAIP3	NM_006290	2.275
TNFAIP6	NM_007115	5.084
TNFRSF11A	NM_003839	2.148
TNFRSF25	NM_003790 /// NM_148965 /// NM_148966 /// NM_148967 /// NM_148968 /// NM_148969	2.002
TNNT1	NM_003283	2.014
TNRC6A	NM_014494 /// NM_020847	2.135

TOP1MT	NM_052963	2.799
TRIM8	NM_030912	2.355
TSPAN5	NM_005723	2.208
TSPYL5	NM_033512	-2.025
TTC7B	NM_001010854	2.287
TTC9C	NM_173810	-2.004
TWIST1	NM_000474	2.353
UHMK1	NM_175866	2.058
ULBP2	NM_025217	3.094
VGCNL1	NM_052867	2.307
VGL-3	NM_016206	-3.767
VPS33A	NM_022916	-2.356
VPS54	NM_001005739 /// NM_016516	-2.769
XDH	NM_000379	3.375
XK	NM_021083	-2.366
YES1	NM_005433	2.261
YWHAH	NM_003405	3.251
ZC3H12C	XM_370654	2.474
ZCCHC9	NM_032280	-2.537
ZCSL2	NM_206831	-3.789
ZDHHC20	NM_153251	2.934
ZDHHC3	NM_016598	-2.172
ZFHX1B	NM_014795	3.267
ZNF294	NM_015565	-2.085
ZNF680	NM_178558	2.224

表 3. 用前体 miR hsa-let-7b 转染后 HepG2 细胞中 mRNA 表达水平发生改变的基因

基因符号	参考序列 (通过引用其全部并入本文)	变化倍数
2'-PDE	NM_177966	-3.346
AADAC	NM_001086	2.432
AADACL1	NM_020792	2.175
AASDHPPT	NM_015423	-2.081
ABCB10	NM_012089	-2.443
ABCC3	NM_003786 /// NM_020037 /// NM_020038	2.245
ABT1	NM_013375	-2.413
ACF	NM_014576 /// NM_138932 /// NM_138933	-2.141
ACVR1B	NM_004302 /// NM_020327 /// NM_020328	-2.699
ACYP2	NM_138448	2.082
ADCY7	NM_001114	2.676
ADH6	NM_000672	-2.172
AER61	NM_173654	-2.171
AFAP	NM_021638 /// NM_198595	2.049
AGA	NM_000027	2.001
AGPS	NM_003659	-2.047
AGTR1	NM_000685 /// NM_004835 /// NM_009585 /// NM_031850 /// NM_032049	2.127
AGXT2L1	NM_031279	-2.445
AIG1	NM_016108	2.629
AK2	NM_001625 /// NM_013411	-2.247

AKRID1	NM_005989	-13.748
ALCAM	NM_001627	2.286
ALDH3A1	NM_000691	16.662
ALDH9A1	NM_000696	2.105
AMPD3	NM_000480 /// NM_001025389 /// NM_001025390	2.389
ANGPTL1	NM_004673	2.022
ANKRD17	NM_032217 /// NM_198889	-2.602
ANKRD32	NM_032290	-2.668
ANP32A	NM_006305	-2.046
ANP32E	NM_030920	-2.028
ANXA3	NM_005139	2.222
AOX1	NM_001159	2.232
APIN	NM_017855	-4.347
APOB	NM_000384	-3.680
APOC3 LOC440838	/// NM_000040 /// XM_496537	-2.843
APP	NM_000484 /// NM_201413 /// NM_201414	2.774
AQP11	NM_173039	2.381
AQP3	NM_004925	2.202
AQP8	NM_001169	2.442
ARG2	NM_001172	2.069
ARID3A	NM_005224	-2.839
ARID5B	NM_032199	2.199
ARL5A	NM_012097 /// NM_177985	-2.022
ARL6IP6	NM_152522	-3.416
ARL7	NM_005737	3.082
ARL8	NM_178815	-2.383
ARMCX3	NM_016607 /// NM_177947 /// NM_177948	2.371
ARRDC3	NM_020801	2.928
ASCIZ	NM_015251	2.427
ASH1L	NM_018489	2.226
ASK	NM_006716	-4.157
ASPH	NM_004318 /// NM_020164 /// NM_032466 /// NM_032467 /// NM_032468	2.311
ATAD2	NM_014109	-3.130
ATP6V0A2	NM_012463	-2.109
ATP7B	NM_000053 /// NM_001005918	-2.013
ATP8B3	NM_138813	2.446
ATP9A	NM_006045	2.408
ATPAF1	NM_022745	-2.127
ATRX	NM_000489 /// NM_138270 /// NM_138271	2.115
AURKB	NM_004217	-5.040
AXL	NM_001699 /// NM_021913	2.796
AZGP1	NM_001185	2.369
BAZ1A	NM_013448 /// NM_182648	-2.140
BAZ2B	NM_013450	2.304
BCCIP	NM_016567 /// NM_078468 /// NM_078469	-3.087
BIRC3	NM_001165 /// NM_182962	-2.491
BLVRA	NM_000712	2.084
BLVRB	NM_000713	2.394
BM039	NM_018455	-2.987
BMPR2	NM_001204	2.066
BNIP3L	NM_004331	2.241

BRCA1	NM_007294 /// NM_007295 /// NM_007296 /// NM_007297 /// NM_007298 /// NM_007299	-3.100
BRCA2	NM_000059	-3.286
BRIP1	NM_032043	-2.013
BRRN1	NM_015341	-2.266
BST2	NM_004335	2.029
BTF3L4	NM_152265	-2.149
BTG1	NM_001731	2.292
BUB1	NM_004336	-2.280
BUB1B	NM_001211	-2.314
BXDC2	NM_018321	-2.367
BZRP	NM_000714 /// NM_007311	2.936
C10orf10	NM_007021	3.682
C10orf11	NM_032024	2.105
C10orf3	NM_018131	-2.537
C10orf38	NM_001010924	2.289
C10orf6	NM_018121	-2.088
C10orf9	NM_145012 /// NM_181698	-2.422
C13orf23	NM_025138 /// NM_170719	-2.698
C14orf2	NM_004894	-2.044
C14orf46	NM_001024674	-3.545
C14orf78	XM_290629	3.185
C14orf94	NM_017815	-2.021
C15orf23	NM_033286	-2.128
C16orf45	NM_033201	2.182
C16orf52	NM_173501	2.334
C17orf27	NM_020914	2.512
C18orf19	NM_152352	-2.151
C18orf21	NM_031446	-2.129
C18orf24	NM_145060	-2.872
C19orf33	NM_033520	3.232
C1orf112	NM_018186	-2.649
C1orf131	NM_152379	-2.087
C1orf135	NM_024037	-2.115
C1orf25	NM_030934	-2.046
C1orf33	NM_016183	-2.093
C1orf55	NM_152608	-2.042
C1orf85	NM_144580	2.077
C1S	NM_001734 /// NM_201442	2.131
C2	NM_000063	2.093
C20orf112	NM_080616	-2.117
C20orf19	NM_018474	2.131
C21orf45	NM_018944	-2.111
C2orf17	NM_024293	2.063
C2orf3	NM_003203	-2.170
C3orf23	NM_001029839 /// NM_001029840 /// NM_173826	2.103
C4orf13	NM_001029998 /// NM_001030316 /// NM_032128	-2.038
C4orf9	NM_003703	-2.260
C5	NM_001735	3.563
C6orf139	NM_018132	-2.640
C6orf211	NM_024573	-2.048
C7orf23	NM_024315	-3.610

C8orf1	NM_004337	2.629
C9orf150	NM_203403	2.195
C9orf152	NM_001012993	2.906
C9orf40	NM_017998	-2.071
C9orf41	NM_152420	-3.137
C9orf52	NM_152574	-2.479
C9orf76	NM_024945	-2.028
C9orf95	NM_017881	2.838
CACNA2D4	NM_001005737 /// NM_001005766 /// NM_172364	2.297
CAMTA1	NM_015215	2.015
CAPN2	NM_001748	2.097
CAV2	NM_001233 /// NM_198212	2.115
CCDC5	NM_138443	-2.022
CCNA2	NM_001237	-4.693
CCNB1	NM_031966	-2.221
CCNE2	NM_057735 /// NM_057749	-3.087
CCNF	NM_001761	-2.070
CCNG2	NM_004354	3.578
CCNJ	NM_019084	-3.368
CCPG1	NM_004748 /// NM_020739	2.128
CD109	NM_133493	2.253
CD36	NM_000072 /// NM_001001547 /// NM_001001548	2.002
CD58	NM_001779	2.081
CD59	NM_000611 /// NM_203329 /// NM_203330 /// NM_203331	2.188
CD7	NM_006137	2.042
CD9	NM_001769	4.674
CD99L2	NM_031462 /// NM_134445 /// NM_134446	2.191
CDA	NM_001785	3.653
CDC2	NM_001786 /// NM_033379	-2.199
CDC20	NM_001255	-2.172
CDC23	NM_004661	-2.419
CDC25A	NM_001789 /// NM_201567	-8.007
CDC34	NM_004359	-2.829
CDC45L	NM_003504	-2.495
CDC6	NM_001254	-4.395
CDCA1	NM_031423 /// NM_145697	-2.322
CDCA2	NM_152562	-2.917
CDCA3	NM_031299	-2.220
CDCA5	NM_080668	-2.247
CDCA7	NM_031942 /// NM_145810	-3.452
CDCA8	NM_018101	-2.359
CDK2	NM_001798 /// NM_052827	-2.069
CDK8	NM_001260	-2.537
CDKAL1	NM_017774	-2.134
CDKN2B	NM_004936 /// NM_078487	2.569
CDT1	NM_030928	-2.913
CG018	NM_052818	2.905
CGI-116	NM_016053	2.130
CHD6	NM_032221	2.017
CHD7	NM_017780	-2.384
CHEK1	NM_001274	-3.280
ChGn	NM_018371	5.004
CHPF	NM_024536	2.615

CHST9	NM_031422	-2.248
CKS1B	NM_001826	-2.437
CLIC3	NM_004669	4.155
CLTB	NM_001834 /// NM_007097	2.099
COIL	NM_004645	-2.160
COL4A5	NM_000495 /// NM_033380 /// NM_033381	3.563
COL4A6	NM_001847 /// NM_033641	2.124
COL6A1	NM_001848	2.159
COL7A1	NM_000094	2.391
COTL1	NM_021149	2.018
CPB2	NM_001872 /// NM_016413	-2.402
CPEB2	NM_182485 /// NM_182646	-2.193
CPOX	NM_000097	-3.630
CPT1A	NM_001031847 /// NM_001876	2.306
CREB3L2	NM_194071	-2.106
CREB5	NM_001011666 /// NM_004904 /// NM_182898 /// NM_182899	2.205
CRIP1	NM_001311	2.474
CSPG6	NM_005445	-2.099
CTDSPL2	NM_016396	-2.289
CTPS	NM_001905	-2.733
CTSB	NM_001908 /// NM_147780 /// NM_147781 /// NM_147782 /// NM_147783	2.067
CTSC	NM_001814 /// NM_148170	-2.180
CTSD	NM_001909	2.244
CTTN	NM_005231 /// NM_138565	2.692
CXorf12	NM_003492	2.048
CXorf15	NM_018360	-2.089
CXorf45	NM_024810	2.755
CXX1	NM_003928	2.227
CXXC6	NM_030625	-2.424
CYGB	NM_134268	3.437
CYLN2	NM_003388 /// NM_032421	2.479
CYP3A5	NM_000777	2.238
CYP3A7	NM_000765	2.963
CYP4F11	NM_021187	2.318
CYP4F3	NM_000896	2.420
DAF	NM_000574	2.418
DBN1	NM_004395 /// NM_080881	2.361
DCC1	NM_024094	-3.401
DCDC2	NM_016356	-2.019
DDC	NM_000790	-4.057
DDX18	NM_006773	-2.225
DDX19A	NM_018332	-2.032
DDX58	NM_014314	2.159
DENND1A	NM_020946 /// NM_024820	-2.026
DEPDC1	NM_017779	-3.205
DEPDC1B	NM_018369	-2.577
DFNA5	NM_004403	2.045
DGAT1	NM_012079	-2.129
DHFR	NM_000791	-2.868
DICER1	NM_030621 /// NM_177438	-6.058
DIO1	NM_000792 /// NM_213593	-4.696
DISC1	NM_001012957 /// NM_001012958 /// NM_001012959 /// NM_018662	2.337

DKC1	NM_001363	-2.271
DKFZp434B1231	NM_178275	2.069
DKFZp434J1015	XM_496849 /// XM_499257	2.004
DKFZp434N035	NM_032262	2.077
DKK3	NM_001018057 /// NM_013253 /// NM_015881	2.244
DLC1	NM_006094 /// NM_024767 /// NM_182643	-2.088
DLEU2 BCMSUNL	/// NM_006021	-2.452
DLG7	NM_014750	-2.223
DMD	NM_000109 /// NM_004006 /// NM_004007 /// NM_004009 /// NM_004010 /// NM_004011	-2.648
DNA2L	XM_166103	-2.547
DNAJB9	NM_012328	-2.347
DNAJC12	NM_021800 /// NM_201262	2.478
DNASE2	NM_001375	2.224
DOC1	NM_014890 /// NM_182909	4.474
DOK6	NM_152721	2.547
DONSON	NM_017613 /// NM_145794 /// NM_145795	-3.186
DOT1L	NM_032482	-2.692
DPAGT1	NM_001382 /// NM_203316	-2.224
DPH5	NM_015958	-2.050
DST	NM_001723 /// NM_015548 /// NM_020388 /// NM_183380	2.099
DTL	NM_016448	-4.310
DTNA	NM_001390 /// NM_001391 /// NM_001392 /// NM_032975 /// NM_032978 /// NM_032979	2.365
DUSP7	NM_001947	-2.552
DUSP9	NM_001395	-5.552
DZIP1	NM_014934 /// NM_198968	-2.582
E2F5	NM_001951	-4.074
E2F6	NM_001952 /// NM_198256 /// NM_198257 /// NM_198258 /// NM_198325 /// NM_212540	-2.349
E2F8	NM_024680	-3.332
EAF2	NM_018456	-2.674
EGFL5	XM_376905	2.405
EGR1	NM_001964	-2.716
EIF2C2	NM_012154	-2.272
EIF2C4	NM_017629	4.100
EIF4E	NM_001968	-2.069
Ells1	NM_152793	2.372
ELOVL7	NM_024930	3.606
EMP2	NM_001424	2.553
ENOSF1	NM_017512	2.638
EPB41L5	NM_020909	-2.170
EPPK1	NM_031308	2.097
ERBB3	NM_001005915 /// NM_001982	2.078
ERCC1	NM_001983 /// NM_202001	2.049
ERO1L	NM_014584	-2.297
ESCO2	NM_001017420	-2.220
EXOSC8	NM_181503	-2.327
EZH2	NM_004456 /// NM_152998	-2.605
F2R	NM_001992	4.586

FABP1	NM_001443	-4.106
FABP5	NM_001444	-2.278
FAM19A5	NM_015381	-2.176
FAM29A	NM_017645	-2.176
FAM3B	NM_058186 /// NM_206964	-2.097
FAM54A	NM_138419	-3.764
FAM55C	NM_145037	2.106
FAM57A	NM_024792	-2.319
FAM61A	NM_015578	2.138
FAM72A	NM_207418	-2.954
FANCD2	NM_001018115 /// NM_033084	-2.722
FANCM	NM_020937	-2.201
FBL	NM_001436	-2.413
FBLIM1	NM_001024215 /// NM_001024216 /// NM_017556	2.093
FBXO25	NM_012173 /// NM_183420 /// NM_183421	-2.279
FBXO5	NM_012177	-2.306
FEN1	NM_004111	-2.334
FIBCD1	NM_032843	2.122
FIGN	NM_018086	-3.415
FIGNL1	NM_022116	-2.272
FIPIL1	NM_030917	-2.116
FKSG14	NM_022145	-3.151
FLAD1	NM_025207 /// NM_201398	-2.062
FLJ10038	---	2.139
FLJ10292	NM_018048	-2.071
FLJ10534	NM_018128	-2.397
FLJ10700	NM_018182	-2.646
FLJ10719	NM_018193	-2.610
FLJ11000	NM_018295	2.120
FLJ11155	NM_018342	-2.201
FLJ11259	NM_018370	2.103
FLJ11273	NM_018374	2.079
FLJ13391	NM_032181	2.258
FLJ13912	NM_022770	-2.405
FLJ20160	NM_017694	2.580
FLJ20364	NM_017785	-2.375
FLJ20516	NM_017858	-3.084
FLJ20641	NM_017915	-2.229
FLJ20674	NM_019086	2.301
FLJ20719	XM_373827 /// XM_498427	2.043
FLJ21986	NM_024913	-6.726
FLJ22313	NM_022373	2.053
FLJ22624	NM_024808	-2.332
FLJ22833	NM_001031716 /// NM_022837	2.527
FLJ25371	NM_152543	-2.078
FLJ25416	NM_145018	-2.525
FLJ31306	XM_495990	2.300
FLJ31401	---	2.150
FLJ32745	NM_144978	-2.927
FLJ34306	NM_199340	4.762
FLJ38725	NM_153218	2.003
FLJ39370	NM_152400	5.565
FLJ43339	NM_207380	2.195

FLJ90586	NM_153345	2.266
FMO5	NM_001461	2.184
FOSL2	NM_005253	2.797
FOXK2	NM_004514 /// NM_181430 /// NM_181431	-2.171
FOXO3A	NM_001455 /// NM_201559	2.109
FTH1	NM_002032	2.011
FVT1	NM_002035	2.914
FZD3	NM_017412	-2.012
FZD6	NM_003506	2.277
GIP2	NM_005101	2.505
GIP3	NM_002038 /// NM_022872 /// NM_022873	2.180
G3BP	NM_005754 /// NM_198395	-2.145
GABARAPL1 /// GABARAPL3	NM_031412	2.162
GAJ	NM_032117	-4.247
GALE	NM_000403 /// NM_001008216	-2.459
GALNACT-2	NM_018590	2.063
GALNS	NM_000512	2.430
GART	NM_000819 /// NM_175085	-2.600
GBP2	NM_004120	2.543
GBP3	NM_018284	2.251
GDA	NM_004293	2.723
GEMIN5	NM_015465	-2.127
GEMIN7	NM_001007269 /// NM_001007270 /// NM_024707	-2.614
GIPC2	NM_017655	-2.887
GK	NM_000167 /// NM_203391	2.175
GLB1	NM_000404	-4.245
GLCCI1	NM_138426	2.065
GLCE	NM_015554	2.101
GLIPR1	NM_006851	2.047
GLS	NM_014905	2.045
GMNN	NM_015895	-3.074
GMPR2	NM_001002000 /// NM_001002001 /// NM_001002002 /// NM_016576	-2.041
GNAI1	NM_002069	5.503
GNB1	NM_002074	2.579
GNB5	NM_006578 /// NM_016194	2.356
GNG5	NM_005274	-2.407
GNS	NM_002076	2.378
GPC1	NM_002081	2.196
GPD1	NM_005276	-2.324
GPR157	NM_024980	-2.905
GPR56	NM_005682 /// NM_201524 /// NM_201525	3.004
GRCC10	NM_138425	2.526
GRN	NM_001012479 /// NM_002087	2.237
GRPEL1	NM_025196	-2.752
GRPEL2	NM_152407	-2.219
GTPBP4	NM_012341	-2.005
GYG2	NM_003918	-2.029
H2AFY	NM_004893 /// NM_138609 /// NM_138610	2.024
HBP1	NM_012257	2.281
HCAP-G	NM_022346	-2.785
HDHD1A	NM_012080	-5.292
HEAB	NM_006831	-2.065

HELLS	NM_018063	-2.791
HERC4	NM_001017972 /// NM_015601 /// NM_022079	2.566
HIC2	NM_015094	-4.228
HIPK3	NM_005734	3.158
HIST1H1C	NM_005319	2.202
HIST1H2AC	NM_003512	2.999
HIST1H2BC	NM_003526	2.256
HIST1H3H	NM_003536	2.327
HIST2H2AA	NM_003516	2.070
HIST2H2BE	NM_003528	2.620
HIVEP2	NM_006734	2.040
HK1	NM_000188 /// NM_033496 /// NM_033497 /// NM_033498 /// NM_033500	2.452
HMGA2	NM_001015886 /// NM_003483 /// NM_003484	-8.387
HMGH4	NM_006353	2.049
HMMR	NM_012484 /// NM_012485	-5.557
HNRPC	NM_004500 /// NM_031314	-3.426
HOMER3	NM_004838	2.278
HPCAL1	NM_002149 /// NM_134421	2.080
HPR	NM_020995	-2.163
HRMT1L3	NM_005788	-2.125
HS2ST1	NM_012262	2.233
HSA9761	NM_014473	-2.034
HSD17B2	NM_002153	2.103
HSPA14	NM_016299	-2.228
HSPB1	NM_001540	2.727
HSPB8	NM_014365	2.042
HSPC111	NM_016391	-2.381
HSPC159	NM_014181	2.698
HSUP1	XM_497769	-2.085
ICAM2	NM_000873	3.025
IDS	NM_000202 /// NM_006123	2.347
IFI27	NM_005532	3.436
IFITM1	NM_003641	2.014
IFITM2	NM_006435	2.160
IGF2BP1	NM_006546	-2.943
IGFBP1	NM_000596 /// NM_001013029	2.432
IGFBP4	NM_001552	3.118
IGFBP7	NM_001553	2.208
IGSF1	NM_001555 /// NM_205833	-2.245
IHPK2	NM_001005909 /// NM_001005910 /// NM_001005911 /// NM_001005912 /// NM_001005913	2.163
IL10RB	NM_000628	2.826
IL1RN	NM_000577 /// NM_173841 /// NM_173842 /// NM_173843	2.004
IMP-1	NM_006546	-3.538
IMP-2	NM_001007225 /// NM_006548	-2.550
IMP4	NM_033416	-2.024
IPO4	NM_024658	-2.000
IPO7	NM_006391	-2.053
IQCB1	NM_001023570 /// NM_001023571	-2.032
IRAK2	NM_001570	-2.132
ISGF3G	NM_006084	2.804
ITGA2	NM_002203	2.172

ITGA3	NM_002204 /// NM_005501	2.160
ITGB3BP	NM_014288	-2.119
ITGB5	NM_002213	2.026
ITIH3	NM_002217	2.929
JDP2	NM_130469	2.459
KBTBD8	NM_032505	-3.346
KIAA0101	NM_001029989 /// NM_014736	-2.203
KIAA0179	NM_015056	-2.486
KIAA0746	NM_015187	4.687
KIAA0802	NM_015210	2.240
KIAA0934	NM_014974	2.638
KIAA1199	NM_018689	2.008
KIAA1212	NM_018084	-2.021
KIAA1223	NM_020337	2.120
KIAA1287	NM_020748	-2.252
KIAA1458	XM_044434	-2.018
KIAA1462	XM_166132	-2.386
KIAA1609	NM_020947	-2.129
KIAA1618	NM_020954	2.870
KIAA1702	---	-2.728
KIAA1815	NM_024896	2.258
KIF15	NM_020242	-2.249
KIF18A	NM_031217	-2.257
KIF23	NM_004856 /// NM_138555	-2.157
KIF3C	NM_002254	2.017
KIFC2	NM_145754	2.417
KLF11	NM_003597	3.040
KLHL14	NM_020805	-2.955
KLHL24	NM_017644	2.327
KLHL9	NM_018847	2.043
KNS2	NM_005552 /// NM_182923	2.020
KNTC1	NM_014708	-2.090
KRT15	NM_002275	2.214
KRT20	NM_019010	13.981
KRT23	NM_015515 /// NM_173213	5.377
KRTAP1-5	NM_031957	2.295
KRTAP3-1	NM_031958	8.731
L3MBTL	NM_015478 /// NM_032107	2.320
LAIR2	NM_002288 /// NM_021270	3.794
LAMB2	NM_002292	2.080
LARP6	NM_018357 /// NM_197958	2.924
LBR	NM_002296 /// NM_194442	-2.387
LEAP-2	NM_052971	-2.118
LEPR	NM_001003679 /// NM_001003680 /// NM_002303	2.234
LEPROTL1	NM_015344	-2.321
LGALS1	NM_002305	2.299
LGALS2	NM_006498	-4.968
LGALS3 GALIG	/// NM_002306 /// NM_194327	2.547
LGALS7	NM_002307	3.311
LIN28B	NM_001004317	-12.185
LKAP	NM_014647	2.657
LMBR1	NM_022458	2.066

LMNB1	NM_005573	-2.717
LOC123876	NM_001010845	-2.100
LOC123876 /// ACSM2	NM_001010845 /// NM_182617	-2.039
LOC131076	NM_001017928	-2.534
LOC144501	NM_182507	2.511
LOC145786	---	-6.142
LOC146909	XM_085634	-2.071
LOC153222	NM_153607	2.772
LOC158563	---	-2.207
LOC159090	NM_145284	2.305
LOC162993	XM_091914	2.428
LOC201175	NM_174919	2.612
LOC201725	NM_001008393	-2.950
LOC201895	NM_174921	2.177
LOC253842	---	-4.200
LOC283377	NM_207344	-2.105
LOC283464	XM_290597	-2.824
LOC283666	---	2.566
LOC283852	---	2.149
LOC284356	---	2.469
LOC285628	---	2.027
LOC340061	NM_198282	2.116
LOC340109	XM_379322	2.256
LOC387921	NM_001012754 /// NM_001017370	-2.589
LOC389432	NM_001030060	3.174
LOC391020	XM_497663	2.015
LOC440461	XM_498680	2.303
LOC440702	XM_496425	2.036
LOC440737	XM_496446	2.038
LOC440886	XM_496572	2.150
LOC440995	XM_498955	2.794
LOC441027	XM_496707	4.039
LOC441164	XM_499041	-2.106
LOC494143	NM_001008708	-2.792
LOC51315	NM_016618	2.694
LOC55908	NM_018687	-2.404
LOC56902	NM_020143	-2.008
LOC91461	NM_138370	-2.974
LOC92345	NM_138386	-2.410
LONPL	NM_031490	2.205
LOX	NM_002317	-3.558
LOXL2	NM_002318	5.544
LRIG3	NM_153377	-2.202
LRP10	NM_014045	2.921
LSM11	NM_173491	-2.254
LSM6	NM_007080	-3.351
LTB4DH	NM_012212	2.193
LTBP3	NM_021070	2.269
LY96	NM_015364	12.628
LYAR	NM_017816	-2.678
MAC30	NM_014573	-2.204
MAD2L1	NM_002358	-2.509

MAK3	NM_025146	-2.015
MAL2	NM_052886	-2.739
MALAT1	---	-2.689
MAP1B	NM_005909 /// NM_032010	2.450
MAP2K1IP1	NM_021970	2.878
MAP3K8	NM_005204	2.425
MAPK6	NM_002748	-2.362
MAPKAPK5	NM_003668 /// NM_139078	-2.431
MARCH2	NM_001005415 /// NM_001005416 /// NM_016496	2.223
MARCH8	NM_001002265 /// NM_001002266 /// NM_145021	2.143
MARCKS	NM_002356	2.351
MARS2	NM_138395	-2.181
MASTL	NM_032844	-3.802
MATR3	NM_018834 /// NM_199189	-2.259
MBL2	NM_000242	-6.115
MBNL2	NM_144778 /// NM_207304	2.096
MBNL3	NM_018388 /// NM_133486	-2.263
MBTPS1	NM_003791 /// NM_201268	2.229
MCAM	NM_006500	-2.701
MCM10	NM_018518 /// NM_182751	-3.796
MCM2	NM_004526	-2.365
MCM3	NM_002388	-2.442
MCM4	NM_005914 /// NM_182746	-3.179
MCM5	NM_006739	-2.670
MCM6	NM_005915	-2.530
MCM7	NM_005916 /// NM_182776	-2.518
MCM8	NM_032485 /// NM_182802	-2.431
MED6	NM_005466	-2.903
MED8	NM_001001651 /// NM_001001653 /// NM_001001654 /// NM_052877 /// NM_201542	-2.346
MEIS4	NR_002211	2.188
MELK	NM_014791	-2.508
MESDC1	NM_022566	-2.667
MET	NM_000245	2.017
METRNL	NM_001004431	3.008
MGAT4A	NM_012214	-2.283
MGC11102	NM_032325	-2.793
MGC12916	---	-2.258
MGC13170	NM_199249 /// NM_199250	-2.022
MGC13204	NM_031465	-3.680
MGC14289	NM_080660	-4.655
MGC23909	NM_174909	-3.516
MGC2408	NM_032331	-2.609
MGC24665	NM_152308	-2.169
MGC2560	NM_031452	-3.099
MGC26963	NM_152621	2.060
MGC34646	NM_173519	2.241
MGC4308	NM_032359	-2.688
MGC4399	NM_032315	-2.331
MICAL2	NM_014632	2.546
MICB	NM_005931	-3.377
MIXL1	NM_031944	-2.332
MKI67	NM_002417	-2.093

MLF1IP	NM_024629	-2.888
MLLT11	NM_006818	2.581
MMP3	NM_002422	6.834
MMP7	NM_002423	2.068
MNAB	NM_018835	2.021
MNS1	NM_018365	-2.248
MOAP1	NM_022151	3.702
MR-1	NM_015488 /// NM_022572	-2.858
MRS2L	NM_020662	-2.929
MSH6	NM_000179	-2.485
MSLN	NM_005823 /// NM_013404	2.215
MSRB3	NM_001031679 /// NM_198080	2.183
MT1E	NM_175617	2.113
MT1F	NM_005949	2.261
MT1H	NM_005951	2.084
MT1M	NM_176870	2.212
MT1X	NM_005952	2.354
MT2A	NM_005953	2.117
MTF2	NM_007358	-2.805
MTFR1	NM_014637	-2.113
MTMR11	NM_006697 /// NM_181873	2.000
MUC13	NM_033049	2.314
MUC15	NM_145650	3.095
MUTED	NM_201280	-2.263
MVP	NM_005115 /// NM_017458	3.138
MXI1	NM_001008541 /// NM_005962 /// NM_130439	2.208
MXRA7	NM_001008528 /// NM_001008529 /// NM_198530	2.162
MXRA8	NM_032348	2.884
MYBL1	XM_034274	-2.095
MYCBP	NM_012333	-2.250
MYO15B	XM_496245 /// XR_000222	3.170
MYO1D	NM_015194	2.547
MYO5A	NM_000259	2.215
MYO6	NM_004999	2.052
NAB1	NM_005966	-2.059
NAP1L1	NM_004537 /// NM_139207	-2.445
NARG1	NM_057175	-2.798
NASP	NM_002482 /// NM_152298 /// NM_172164	-2.574
NBR2 /// LOC51326	NM_005821 /// NM_016632	-2.022
NCF2	NM_000433	2.827
NDRG1	NM_006096	3.097
NDRG4	NM_020465 /// NM_022910	2.192
NEGR1	NM_173808	2.987
NEIL3	NM_018248	-2.808
NEK2	NM_002497	-2.061
NEK3	NM_002498 /// NM_152720	-3.046
NEXN	NM_144573	3.622
NFIB	NM_005596	2.456
NID1	NM_002508	3.011
NID67	NM_032947	-3.881
NIPSNAP3A	NM_015469	2.121
NKIRAS1	NM_020345	-3.233

NME6	NM_005793	-2.748
NMI	NM_004688	2.343
NOL11	NM_015462	-2.162
NOL3	NM_003946	2.087
NOL5A	NM_006392	-2.058
NOLC1	NM_004741	-2.586
NPC1L1	NM_013389	2.007
NR1D2	NM_005126	3.752
NR1H4	NM_005123	-3.071
NR2F1	NM_005654	2.131
NRAS	NM_002524	-2.563
NRBP2	NM_178564	2.311
NSF LOC641522	/// NM_006178	-2.505
NTN4	NM_021229	3.147
NUFIP1	NM_012345	-2.064
NUP160	NM_015231	-2.055
NUP205	NM_015135	-2.050
NUP35	NM_001008544 /// NM_138285	-3.113
NUP37	NM_024057	-2.080
NUP50	NM_007172 /// NM_153645 /// NM_153684	-2.083
NUP98	NM_005387 /// NM_016320 /// NM_139131 /// NM_139132	-3.648
NUPL1	NM_001008564 /// NM_001008565 /// NM_014089	-2.031
NY-REN-41	NM_030771 /// NM_080654	-2.489
NY-SAR-48	NM_001011699 /// NM_033417	-2.002
OAS1	NM_001032409 /// NM_002534 /// NM_016816	2.024
OPTN	NM_001008211 /// NM_001008212 /// NM_001008213 /// NM_021980	2.192
ORC1L	NM_004153	-2.644
ORC6L	NM_014321	-2.268
ORM1	NM_000607	-3.646
ORM1 /// ORM2	NM_000607 /// NM_000608	-3.184
ORM2	NM_000608	-3.528
OSTbeta	NM_178859	-2.181
OSTM1	NM_014028	2.162
P8	NM_012385	3.789
PA2G4	NM_006191	-2.761
PABPC4	NM_003819	-2.669
PACS2	NM_015197	2.049
PAICS	NM_006452	-2.288
PAK1IP1	NM_017906	-2.110
PANX1	NM_015368	2.031
PAPSS2	NM_001015880 /// NM_004670	2.144
PAQR5	NM_017705	2.302
PARD6B	NM_032521	-2.381
PARP11	NM_020367	2.069
PAX6	NM_000280 /// NM_001604	2.439
PBK	NM_018492	-2.683
PCAF	NM_003884	3.169
PCLKC	NM_017675	2.991
PCTP	NM_021213	-3.039
PCYT1B	NM_004845	-2.007
PDGFA	NM_002607 /// NM_033023	2.105
PDGFC	NM_016205	2.068

PEG3	NM_006210	-3.673
Pfs2	NM_016095	-3.969
PGCP	NM_016134	2.061
PGRMC1	NM_006667	-2.576
PHF19	NM_001009936 /// NM_015651	-2.739
PHF20L1	NM_016018 /// NM_024878 /// NM_032205 /// NM_198513	2.616
PHLDA1	NM_007350	5.217
PHLDB3	NM_198850	2.219
PIGA	NM_002641 /// NM_020472 /// NM_020473	-3.778
PIGC	NM_002642 /// NM_153747	-2.005
PIGL	NM_004278	-2.091
PINK1	NM_032409	2.015
PIP5K1B	NM_001031687 /// NM_003558	-3.370
PITPNC1	NM_012417 /// NM_181671	2.003
PJA2	NM_014819	2.727
PKNOX1	NM_004571 /// NM_197976	2.032
PLAGL1	NM_002656 /// NM_006718	-2.210
PLAGL2	NM_002657	-5.050
PLAU	NM_002658	2.556
PLEKHA2	XM_496973	2.152
PLEKHH2	NM_172069	2.260
PLEKHM1	NM_014798	2.350
PLK1	NM_005030	-2.144
PLK4	NM_014264	-2.560
PLXNB2	XM_371474	2.041
PNN	NM_002687	-2.282
PNRC1	NM_006813	2.333
POLA	NM_016937	-2.150
POLE2	NM_002692	-3.902
POLR1B	NM_019014	-2.388
POLR2D	NM_004805	-2.627
POLR3G	NM_006467	-3.493
POLR3K	NM_016310	-2.120
POPDC3	NM_022361	2.240
PPAT	NM_002703	-2.504
PPIH	NM_006347	-2.170
PPIL5	NM_152329 /// NM_203466 /// NM_203467	-2.440
PPP1R13B	NM_015316	-2.742
PPP4C	NM_002720	-2.176
PQLC3	NM_152391	3.083
PRAF1	NM_022490	-2.021
PRAP1	NM_145202	2.151
PRIM1	NM_000946	-2.588
PRIM2A	NM_000947	-2.124
PRKAR2A	NM_004157	-2.618
PRKCA	NM_002737	2.135
PROCR	NM_006404	2.102
PRTG	XM_370866	-6.751
PSF1	NM_021067	-3.393
PSME4	NM_014614	-3.866
PTP4A1	NM_003463	2.246
PTPRM	NM_002845	2.376
PTPRN2	NM_002847 /// NM_130842 /// NM_130843	2.309

PTX1	NM_016570	-2.405
PUNC	NM_004884	-2.713
PURB	NM_033224	2.249
PYCARD	NM_013258 /// NM_145182 /// NM_145183	2.306
QKI	NM_006775 /// NM_206853 /// NM_206854 /// NM_206855	2.695
RAB11FIP4	NM_032932	-2.066
RAB31	NM_006868	2.585
RABEP2	NM_024816	2.771
RABGGTB	NM_004582	-2.177
RAD18	NM_020165	-4.207
RAD51	NM_002875 /// NM_133487	-2.850
RAD51API	NM_006479	-2.986
RALGDS	NM_006266	2.134
RANBP1	NM_002882	-2.161
RAP2B	NM_002886	2.205
RASD1	NM_016084	5.105
RASSF2	NM_014737 /// NM_170773 /// NM_170774	2.947
RBBP7	NM_002893	-2.295
RBM14	NM_006328	-2.481
RBM19	NM_016196	-2.041
RBM24	NM_153020	3.762
RBP1	NM_002899	2.370
RBPMS	NM_001008710 /// NM_001008711 /// NM_001008712 /// NM_006867	-2.087
RECK	NM_021111	2.950
RFC2	NM_002914 /// NM_181471	-2.300
RFC3	NM_002915 /// NM_181558	-3.259
RFC4	NM_002916 /// NM_181573	-2.337
RFC5	NM_007370 /// NM_181578	-3.462
RFFL	NM_001017368 /// NM_057178	-2.044
RFWD3	NM_018124	-3.699
RGS3	NM_017790 /// NM_021106 /// NM_130795 /// NM_134427 /// NM_144488 /// NM_144489	-2.786
RHOB	NM_004040	-2.149
RHOQ	NM_012249	2.563
RHOQ /// LOC284988	NM_012249 /// XM_209429	3.585
RIF1	NM_018151	-2.269
RIMS3	NM_014747	2.204
RIPK5	NM_015375 /// NM_199462	2.354
RIT1	NM_006912	2.081
RNF144	NM_014746	2.113
RNU22	NR_000008	-2.920
RNU47	XR_000223	-2.614
RPS6	NM_001010	-2.315
RPS6KA3	NM_004586	-2.009
RPUSD3	NM_173659	-3.293
RRAGD	NM_021244	2.188
RRM1	NM_001033	-2.328
RRM2	NM_001034	-4.193
RRM2B	NM_015713	2.704
RRN3	NM_018427	-2.007
RSC1A1	NM_006511	-3.230
RTCD1	NM_003729	-2.223

RTF1	NM_015138	2.048
RTN2	NM_005619 /// NM_206900 /// NM_206901 /// NM_206902	2.095
RTN4IP1	NM_032730	-2.407
RY1	NM_006857	2.180
S100A2	NM_005978	5.992
S100A4	NM_002961 /// NM_019554	2.395
S100A6	NM_014624	3.585
S100PBPR	NM_001017406 /// NM_022753	-2.885
SACS	NM_014363	-2.165
SAR1B	NM_001033503 /// NM_016103	2.287
SASS6	NM_194292	-2.493
SAT	NM_002970	2.290
SCAMP1	NM_004866 /// NM_052822	2.098
SCARB2	NM_005506	2.032
SCD	NM_005063	-2.328
SCGN	NM_006998	-2.461
SCN9A	NM_002977	3.362
SCPEP1	NM_021626	2.260
SELM	NM_080430	2.480
SEMA3B	NM_001005914 /// NM_004636	2.142
SEMA3G	NM_020163	2.055
SEPT6 /// N-PAC	NM_015129 /// NM_032569 /// NM_145799 /// NM_145800 /// NM_145802	2.143
SERP1	NM_014445	-2.007
SERPINA3	NM_001085	2.456
SERPINA6	NM_001756	-2.066
SERPINE1	NM_000602	2.400
SEZ6L2	NM_012410 /// NM_201575	2.116
SFRS1	NM_006924	-2.031
SGCB	NM_000232	2.304
SGK3	NM_001033578 /// NM_013257 /// NM_170709	-2.097
SGOL2	NM_152524	-2.263
SH3BGRL	NM_003022	2.010
SH3BGRL3	NM_031286	2.340
SH3BP5	NM_001018009 /// NM_004844	2.097
SH3GLB1	NM_016009	2.256
SHCBP1	NM_024745	-2.480
SIL	NM_003035	-2.173
SIP1	NM_001009182 /// NM_001009183 /// NM_003616	-2.194
SKP2	NM_005983 /// NM_032637	-4.277
SLC16A10	NM_018593	-2.944
SLC16A6	NM_004694	2.408
SLC17A2	NM_005835	-2.411
SLC20A1	NM_005415	-2.298
SLC22A18	NM_002555 /// NM_183233	2.717
SLC22A7	NM_006672 /// NM_153320	-2.377
SLC23A2	NM_005116 /// NM_203327	2.410
SLC25A13	NM_014251	-2.585
SLC25A24	NM_013386 /// NM_213651	-2.124
SLC25A32	NM_030780	-2.835
SLC26A11	NM_173626	2.537
SLC2A3	NM_006931	-6.221
SLC2A3	NM_006931 /// NM_153449	-5.017

/// SLC2A14		
SLC2A8	NM_014580	-2.078
SLC30A10	NM_001004433 /// NM_018713	-2.129
SLC35D2	NM_007001	-2.343
SLC35F5	NM_025181	-3.794
SLC38A5	NM_033518	-2.093
SLC39A14	NM_015359	-3.916
SLC40A1	NM_014585	5.218
SLC43A1	NM_003627	-2.391
SLC44A1	NM_022109 /// NM_080546	2.114
SLC44A5	NM_152697	2.821
SLC4A11	NM_032034	4.907
SLC4A5	NM_021196 /// NM_033323 /// NM_133478 /// NM_133479	-2.069
SLC5A6	NM_021095	-2.583
SLC6A14	NM_007231	-2.725
SLC6A6	NM_003043	2.081
SLC7A11	NM_014331	2.056
SLC7A2	NM_001008539 /// NM_003046	2.115
SLC7A6	NM_003983	-2.170
SLC04C1	NM_180991	-6.128
SMAD2	NM_001003652 /// NM_005901	2.496
SMARCA2	NM_003070 /// NM_139045	2.328
SMARCC1	NM_003074	-2.014
SMC1L1	NM_006306	-2.248
SMC2L1	NM_006444	-2.288
SMPD1	NM_000543 /// NM_001007593	2.164
SMURF2	NM_022739	2.381
SNAP23	NM_003825 /// NM_130798	-2.346
SNAPC5	NM_006049	-2.093
SNX5	NM_014426 /// NM_152227	-2.669
SOAT2	NM_003578	-2.669
SOCS1	NM_003745	-2.760
SOLH	NM_005632	-2.134
SOX4	NM_003107	2.011
SPBC25	NM_020675	-2.506
SPCS3	NM_021928	-3.408
SPIN2 /// SPIN-2	NM_001006681 /// NM_001006682 /// NM_001006683 /// NM_019003	2.031
SPON2	NM_012445	4.946
SPTAN1	NM_003127	2.050
SPTBN1	NM_003128 /// NM_178313	2.029
SPTLC2L	---	-2.194
SQSTM1	NM_003900	2.525
SR140	XM_031553	-2.333
SSX2IP	NM_014021	-2.558
ST6GALNAC2	NM_006456	-3.504
STEAP3	NM_001008410 /// NM_018234 /// NM_182915	2.363
STK17A	NM_004760	2.089
STK40	NM_032017	-2.417
STK6	NM_003600 /// NM_198433 /// NM_198434 /// NM_198435 /// NM_198436 /// NM_198437	-4.188
STS-1	NM_032873	-3.120
STX3A	NM_004177	-2.978

SULT1C1	NM_001056 /// NM_176825	2.091
SUPT16H	NM_007192	-2.214
SUSD2	NM_019601	3.786
SUV39H2	NM_024670	-3.885
SYNGR3	NM_004209	2.892
SYTL1	NM_032872	2.936
SYTL2	NM_032379 /// NM_032943 /// NM_206927 /// NM_206928 /// NM_206929 /// NM_206930	4.644
TACC2	NM_006997 /// NM_206860 /// NM_206861 /// NM_206862	2.436
TACC3	NM_006342	-2.037
TAF5	NM_006951	-3.117
TAF5L	NM_001025247 /// NM_014409	-2.378
TAGLN	NM_001001522 /// NM_003186	2.095
TBC1D3 /// TBC1D3C	NM_001001418 /// NM_032258	3.067
TBRG4	NM_004749 /// NM_030900 /// NM_199122	-2.044
TBX3	NM_005996 /// NM_016569	2.237
TCERG1	NM_006706	-2.015
TCOF1	NM_000356 /// NM_001008656 /// NM_001008657	-2.455
TCTE1L	NM_006520	2.633
TDE2L	NM_178865	3.110
TDP1	NM_001008744 /// NM_018319	-2.141
TEAD4	NM_003213 /// NM_201441 /// NM_201443	-2.730
TEP1	NM_007110	2.202
TFAM	NM_003201	-2.004
TFDP1	NM_007111	-2.046
TFRC	NM_003234	-2.504
TGFA	NM_003236	2.034
TGFB1	NM_000660	2.104
TGFB1I1	NM_015927	2.701
TGFBR3	NM_003243	-3.258
THEM4	NM_053055 /// NM_176853	-2.356
TIMM8A	NM_004085	-2.159
TIMP2	NM_003255	2.818
TK1	NM_003258	-2.182
TK2	NM_004614	3.123
TM4SF5	NM_003963	2.404
TMCO3	NM_017905	2.169
TMEFF1	NM_003692	2.028
TMEM16K	NM_018075	2.391
TMEM48	NM_018087	-2.540
TMEM55A	NM_018710	2.227
TMEM57 /// LOC159090	NM_018202 /// NM_145284	2.295
TMEM8	NM_021259	-2.039
TMEM87B	NM_032824	2.540
TMPO	NM_001032283 /// NM_001032284 /// NM_003276	-2.608
TMSB4X TMSL3	/// NM_021109 /// NM_183049	2.137
TncRNA	---	2.342
TNFRSF11A	NM_003839	2.156
TNFRSF14	NM_003820	2.220
TNFSF10	NM_003810	-2.099

TNRC6A	NM_014494 /// NM_020847	2.038
TNRC8	---	2.767
TOP1MT	NM_052963	2.350
TOP2A	NM_001067	-2.202
TOPBP1	NM_007027	-2.021
TP53I3	NM_004881 /// NM_147184	2.473
TP53INP1	NM_033285	2.382
TPBG	NM_006670	3.351
TPM2	NM_003289 /// NM_213674	3.855
TPR	NM_003292	-2.385
TPX2	NM_012112	-2.044
TRAF5	NM_001033910 /// NM_004619 /// NM_145759	2.173
TRIB2	NM_021643	2.122
TRIM2	NM_015271	3.066
TRIM22	NM_006074	3.115
TRIM24	NM_003852 /// NM_015905	2.249
TRIM56	NM_030961	2.327
TRIP13	NM_004237	-2.384
TRPV2	NM_016113	2.038
TSC22D1	NM_006022 /// NM_183422	2.076
TTC3	NM_001001894 /// NM_003316	2.040
TTC7B	NM_001010854	2.297
TTK	NM_003318	-2.295
TTLL4	NM_014640	-4.693
TTYH2	NM_032646 /// NM_052869	2.176
TUBA3	NM_006009	6.172
TUBB2	NM_001069	2.343
TUBB-PARALOG	NM_178012	3.758
TUBE1	NM_016262	-2.325
TUBG1	NM_001070	-2.279
TUSC2	NM_007275	-2.216
TUSC3	NM_006765 /// NM_178234	2.119
UBE2H	NM_003344 /// NM_182697	2.381
UBE2Q2	NM_173469	2.207
UBE2T	NM_014176	-2.756
UCHL5	NM_015984	-2.974
UGCG	NM_003358	-2.081
UHMK1	NM_175866	2.111
UHRF1	NM_013282	-4.543
UIP1	NM_017518 /// NM_207106 /// NM_207107	-2.016
ULK1	NM_003565	2.003
UNC93A	NM_018974	-2.304
USP10	NM_005153	-2.312
UTP15	NM_032175	-2.352
VAMP1	NM_014231 /// NM_016830 /// NM_199245	2.079
VAMP3	NM_004781	-2.043
VLDLR	NM_001018056 /// NM_003383	2.084
VNN1	NM_004666	2.180
VPS33A	NM_022916	-2.148
VPS54	NM_001005739 /// NM_016516	-2.421
VRK1	NM_003384	-3.224
WBP11	NM_016312	-2.777
WDHD1	NM_001008396 /// NM_007086	-3.432

WDR45	NM_001029896 /// NM_007075	2.493
WIG1	NM_022470 /// NM_152240	2.413
WNK4	NM_032387	2.064
XPO4	NM_022459	-3.104
XPO5	NM_020750	-2.248
YIPF4	NM_032312	2.158
YOD1	NM_018566	-3.320
YPEL3	NM_031477	3.060
YPEL5	NM_016061	3.006
YWHAH	NM_003405	2.764
ZA20D3	NM_019006	2.086
ZBTB20	NM_015642	2.163
ZBTB4	NM_020899	2.731
ZCCHC10	NM_017665	-2.061
ZCCHC9	NM_032280	-3.491
ZCSL2	NM_206831	-4.066
ZDHHC2	NM_016353	2.520
ZFP90	NM_133458	2.099
ZHX3	NM_015035	2.008
ZNF117	NM_024498	2.157
ZNF161	NM_007146	2.163
ZNF200	NM_003454 /// NM_198087 /// NM_198088	-2.419
ZNF226	NM_001032372 /// NM_001032373 /// NM_001032374 /// NM_001032375 /// NM_015919	3.068
ZNF267	NM_003414	-2.131
ZNF329	NM_024620	2.017
ZNF432	NM_014650	2.618
ZNF514	NM_032788	2.073
ZNF678	NM_178549	-2.169
ZNF680	NM_178558	2.339
ZNF689	NM_138447	-2.188
ZNF706	NM_016096	2.074
ZNF708	NM_021269	2.382
ZNF83	NM_018300	2.269
ZRF1	XM_168590 /// XM_379909	-2.004
ZWILCH	NM_017975	-3.135
ZWINT	NM_001005413 /// NM_001005414 /// NM_007057 /// NM_032997	-2.272
ZYX	NM_001010972 /// NM_003461	2.039

表 4. 用前体 miR hsa-let-7b 转染后 HL-60 细胞中 mRNA 表达水平发生改变的基因

基因符号	参考序列 转录物 ID (Pruitt 等人, 2005)	倍数变化
AATF	NM_012138	-2.27
AB020674, AF245481	AB020674, AF245481	-2.89
AB032979	AB032979	-2.41
AB033091, SLC39A10	AB033091, NM_020342	-3.26
AB058774	AB058774	2.43

AB062477	AB062477	3.08
AB083483	AB083483	3.71
ABCA3	BC062779, NM_001089	2.05
ABCF2	NM_005692	-2.88
ACADVL	BC020218, NM_000018	-2.65
ACPI	NM_004300, NM_007099, NM_177554	-2.71
ADIPOR2	NM_024551	-2.64
AF011390	AF011390	2.32
AF090928	AF090928	-3.71
AF116680	AF116680	2.75
AF240698	AF240698	-2.14
AF277180	AF277180	-2.27
AF289562	AF289562	2.29
AF289565	AF289565	2.55
AF346307	AF346307	2.55
AF439711	AF439711	2.73
AF445026	AF445026	2.17
AF502589	AF502589	-2.11
AHCY	M61831, NM_000687	-3.55
AJ515384	AJ515384	-3.09
AK001073, BC080641	AK001073, BC080641	2.72
AK001987	AK001987	2.28
AK001998	AK001998	2.31
AK022118	AK022118	2.54
AK024110	AK024110	2.08
AK024190	AK024190	-2.94
AK026367	AK026367	2.11
AK026780	AK026780	2.36
AK027395, AL136861, AY358413, BC063012, CR593410	AK027395, AL136861, AY358413, BC063012, CR593410	2.65
AK027583	AK027583	2.06
AK054654	AK054654	2.7
AK054935, MGC33962	AK054935, NM_152479	2.27
AK056176	AK056176	2.7
AK057017	AK057017	2.65
AK057222, MGC16372	AK057222, NM_145038	3.2
AK057372	AK057372	2.23
AK058196	AK058196	2.19
AK090733, BC003505	AK090733, BC003505	2.92
AK091523	AK091523	2.63
AK093431	AK093431	2.17

AK094354	AK094354	3.32
AK095939, BC003083	AK095939, BC003083	-2.39
AK096571	AK096571	2.1
AK097091, AK097411, LOC153561	AK097091, AK097411, NM_207331	4.51
AK097411, BC050737, LOC153561	AK097411, BC050737, NM_207331	4.51
AK123855, BC006300	AK123855, BC006300	2.89
AK124968	AK124968	-2.22
AK125351	AK125351	2.67
AK125522, ATP6V0D1	AK125522, NM_004691	-2.35
AK125850	AK125850	-2.91
AK125850, AL833349	AK125850, AL833349	-2.91
AK126051	AK126051	2.47
AK126465	AK126465	-2.88
AK127284	AK127284	-2.03
AK127639	AK127639	2.17
AK127692, NDUFA11	AK127692, NM_175614	-4.14
AK128554	AK128554	-2.12
AK131383	AK131383	-2.3
AK131517, BC063666	AK131517, BC063666	2.62
AK2	NM_013411	-3.48
AKAP5	NM_004857	4.41
AKAP8L	NM_014371	-2.23
AKR1CL2	AB040821, AB040822, AF263242, NM_031436	2.93
ALDH3A2	NM_000382	3.22
ALG1	NM_019109	-2.31
ALOX15B	AF468053	3.81
ALOX5AP	NM_001629	-2.86
ALS2CR19	AB073472, AF428250, AF428251, AF466152, NM_152526, NM_205863	-3.48
ALS2CR7	NM_139158	3.02
AMD1	BC000171	-2.78
ANP32C	NM_012403	2.65
ANTXR1	AK001463, NM_053034	3.75
ANXA6	AK130077, NM_001155, NM_004033	-2.37
APBA3	NM_004886	2.01
APG3L	NM_022488	-3.43
APLP2	BC000373	-2.81
ARHGAP18	AL834511, NM_033515	3.11
ARHGAP26	BC068555, NM_015071	2.01
ARID1A	AF231056, AF268913, AF521670, NM_006015, NM_018450, NM_139135	-3.37

ARPC5, BC057237, BC071857	BC057237, BC071857, NM_005717	-2.51
ASF1B	NM_018154	-2.61
ASNA1	NM_004317	-2.03
ATF3	AB078026, AY313926, AY313927	-3.8
ATF4	NM_001675	-2.09
ATP2A2	NM_001681, NM_170665	-4.57
ATP5G3	NM_001002256	-2.27
ATP6V1F	NM_004231	-2.76
ATRX	NM_000489, NM_138270, NM_138271, U72937	2.1
ATXN7L2	BC036849	3.95
AY081145	AY081145	-2.05
AY099328, BC002509	AY099328, BC002509	2.53
AY345239, FLJ13798	AY345239, NM_024773	-2.5
AY358738	AY358738	4.71
AY692447, BC040622, LOC340069	AY692447, BC040622, NM_182761	-2.93
AYP1	NM_032193	3.72
BAG1	AF116273	-2.94
BAG2	NM_004282	-2.84
BAG5	NM_001015049, NM_004873	-2.24
BANF1	NM_003860	-2.92
BAT2	NM_004638, NM_080686	-2.53
BC004492	BC004492	2.02
BC006177	BC006177	-4.17
BC007516	BC007516	4.53
BC009792	BC009792	3.08
BC011671	BC011671	2.63
BC013796	BC013796	-2.96
BC014654	BC014654	-2.39
BC016050	BC016050	-2.4
BC016654	BC016654	-2.16
BC020256	BC020256	-2.36
BC020670	BC020670	2.37
BC021187	BC021187	-2.62
BC025700	BC025700	-3.61
BC029496	BC029496	2.3
BC029580	BC029580	3.49
BC030200	BC030200	2.64
BC032334	BC032334	-2.39
BC032396, BC041379	BC032396, BC041379	2.14
BC032420	BC032420	2.74
BC035554	BC035554	-3.11

BC035875	BC035875	-2.74
BC035935, BC056271, LOC51321	BC035935, BC056271, NM_016627	-3.34
BC036832	BC036832	-4.43
BC040013	BC040013	4.24
BC040441, BC068599	BC040441, BC068599	2.12
BC041860, BC047720, BX647229	BC041860, BC047720, BX647229	2.25
BC045618, BC057784	BC045618, BC057784	-3.92
BC062325	BC062325	-4.02
BC064430	BC064430	-3.1
BC064479	BC064479	2.05
BC065557	BC065557	2.03
BC066124, BC066775	BC066124, BC066775	-2.43
BC066644	BC066644	-2.35
BC073829	BC073829	-2.5
BC093044	BC093044	-3.07
BEXL1	BC015794	-2.54
BFAR	NM_016561	-2.77
BIN1	AF068916, NM_139346, NM_139348	2.42
BIN2	BC047686, NM_016293	4.57
BMP2	NM_001200	-5.22
BPI	BC032230, NM_001725	2.96
BRAP	NM_006768	-2.09
BST2	AK223124, NM_004335	-2.06
BZRP	NM_000714, NM_007311	-3.32
C10orf45	BC064407, NM_031453	-2.48
C10orf67	BC035732, NM_153714	2.26
C10orf94	BC034821	-2.45
C12orf12	NM_152638	3.91
C14orf103	NM_018036	2.12
C14orf153	NM_032374	-2.55
C14orf48	AK097741, NM_152777	-3.86
C15orf12	NM_018285	-3.2
C17orf27	BC032220, BX647946, NM_020914	-2.41
C19orf25	BC018441, NM_152482	3.8
C1orf26	BC030781, NM_017673	2.98
C1orf64	NM_178840	2.08
C1QBP	NM_001212	-2.72
C1QTNF2	NM_031908	2.36
C1QTNF3	NM_030945, NM_181435	2.13
C20orf27	BC024036, CR615129, NM_017874	4.34
C2orf29	NM_017546	-2.92

C3orf10	NM_018462	-3
C4orf16	BC009485, BX647702, NM_018569	-2.7
C5orf19	AK223611, NM_016606	3.03
C6orf108	NM_006443	-2.49
C6orf128	BC026012, BC029657, NM_145316	3.24
C6orf136	BC073975, NM_145029	-2.41
C6orf155	NM_024882	-2.56
C6orf62	NM_030939	-2.58
C6orf69	AY305862, BC023525, NM_173562	-4.01
C6orf96	AK000634, NM_017909	-2.69
C8orf6	AJ307469	-2.59
C9orf156	BC002863, NM_016481	2.66
C9orf16	NM_024112	-2.69
C9orf46	NM_018465	3.54
CABP7	NM_182527	-2.56
CACNA1A	AB035727	2.21
CACNA2D3	AF516696, AJ272213, NM_018398	2.23
CAD	NM_004341	-3.71
CAMK1D	NM_020397, NM_153498	2.07
CAMK2N1	NM_018584	2.1
CAPNS1	BC011903, NM_001749	-2.89
CASC3	BC044656	3.03
CASP6	NM_001226	-2.27
CAST	NM_015576	2.29
CBX1	NM_006807	-2.72
CCNDBP1	AK075146, AK128849, BC009689, NM_012142, NM_037370	-2.62
CCT4	NM_006430	-2.77
CCT7	NM_006429	-2.92
CD81	NM_004356	-2.48
CDC2L1	AB209095, AF067519, AF067520, AF067521, AF067522, AF067523, AF067525, NM_001787, NM_024011, NM_033486, NM_033488, NM_033489, NM_033490, NM_033492, NM_033493, NM_033528, NM_033529, NM_033531, NM_033534, NM_033537, U04816, U04817, U04818, U04824, U07705	-2.18
CDC2L2	AB209095, AF067512, AF067514, AF067516, AF067520, AF067521, AF067522, AF067523, AF067525, NM_033534, NM_033536, NM_033537	-2.18
CDC45L	AJ223728, CR604288, NM_003504	-3.47
CDKL1	NM_004196	2.35
CEACAM6	BC005008, M18728, NM_002483	3.85
CEBPE	NM_001805	-3.42
CGI-128	NM_016062	-3.04
CGI-63	BC001419, NM_016011	-3.3
CHAD	NM_001267	-4.68
CHCHD1	NM_203298	-2.64
CHMP2A	NM_198426	-2.93

CHRNBI	NM_000747	2.12
CHST3	NM_004273	2.23
CINP	NM_032630	-2.09
CIP29	NM_033082	-2.9
CLC	NM_001828	2.59
CLIC1	NM_001288, X87689	-3.8
CLTA	NM_001833	-3.71
CMAS	BC016609, NM_018686	-2.37
CNTN4	NM_175607, NM_175612	2.23
CNTNAP3	AK054645, NM_033655	2.31
COL1A2	NM_000089	2.35
COPA	BC038447, NM_004371	-3.21
COQ3	CR607786, NM_017421	-2.3
CORO1A	AB209221, NM_007074	-4.94
COTL1	AK127352, NM_021149	-4.4
COX8A	NM_004074	-2.48
CPNE1	NM_152930	-2.68
CR602867	CR602867	-4.41
CR605850	CR605850	-4.54
CR607440	CR607440	2.35
CR933646	CR933646	-2.56
CRHBP	NM_001882	2.31
CRR9	AK126225, BC025305, NM_030782	-2.85
CSF1	NM_000757, NM_172211	2.57
CSMD2	AK122603, AK127722	-3.29
CSNK2B	CR592250, NM_001320	-2.73
CTNS	BC032850, NM_004937	2.58
CUL1	BC034318, NM_003592, U58087	-2.34
CUL7	NM_014780	4.34
CXorf9	NM_018990	-2.24
CXXC1	BC015733, NM_014593	-2.94
CYC1	NM_001916	-3.41
CYP2B6	NM_000767	-2.22
DDOST	D29643	-2.41
DDX39	BC032128, NM_005804, NM_138998	-4.77
DDX50	NM_024045	2.67
DGCR6	BC047039, NM_005675	-2.45
DHX30	BC038417, NM_014966, NM_138614, NM_138615	-2.61
DHX35	AK025541, BC033453, NM_021931	-2.09
DISP1	AK056569, NM_032890	2.42
dJ39G22.2	NM_001008740	2.91
DKFZp451J0118	BC046565, NM_175852	-2.88
DKFZP564J0863	NM_015459	-2.77
DNAJC10	AF314529, AK027647, AL832632, AY089971, AY358577, BC034713, NM_018981	-2.32

DNAJC12	NM_201262	-2.07
DNAJC6	NM_014787	2
DNCLI1	NM_016141	-2.56
DNCLI2	NM_006141	4.94
DNM2	AK097875, AK124881, NM_001005360, NM_001005361, NM_001005362, NM_004945	2.98
DONSON	NM_017613, NM_145794, NM_145795	-2.13
DRD3	L20469	-2.47
DRG1	NM_004147	-2.5
DVL1	AK093189, NM_004421, NM_181870, NM_182779, U46461	4.92
EBF2	AY700779, NM_022659	2.13
EBPL	BC021021, BC073152, NM_032565	-3.09
EDIL3	BC053656, NM_005711	2.06
EEF1A1	AF267861, BC019669, BC071619, BC094687, CR598396, CR623309, NM_001402	-2.82
EEF1D	NM_001960, NM_032378	-3.63
EEF1G	AF119850, NM_001404	-2.67
EEF2	NM_001961	-3.58
EIF2S3	BC019906	-3.08
EIF3S4	NM_003755	-2.83
EIF3S8	BC001571, NM_003752	-3.92
EIF4A1	NM_001416	-4.52
EIF4EBP1	NM_004095	-2.42
ELF1	BC030507, NM_172373	-3.56
EMP3	NM_001425	-3.12
ENO1	BC073991, NM_001428	-6.06
ENO3	NM_001976	2.02
EPB41	BC039079	4.22
EPM2A	AF454493, NM_005670	2.91
FAM50A	CR612868, D83260, NM_004699	-2.26
FAM54B	AF173891, AK056721, BC017175, NM_019557	-3.41
FASN	BC063242, NM_004104	-3.02
FBL	NM_001436	-4.61
FBP2	NM_003837	2.01
FBXO17	AK021860, NM_024907, NM_148169	2.09
FBXO40	AB033021, NM_016298	2.78
FBXO42	NM_018994	2.73
FH	NM_000143	-2.05
FIBP	NM_004214, NM_198897	-3.44
FLJ10006	AK056881, BC017012, NM_017969	3.46
FLJ10490	NM_018111	2.01
FLJ10774	NM_024662	-3.89
FLJ11305	NM_018386	-2.45
FLJ12760	NM_001005372	-2.8
FLJ14816	NM_032845	-2.2
FLJ20641	BC050696, NM_017915	3.04

FLJ23322	BC027716, NM_024955	-2.05
FLJ25143	NM_182500	-2.54
FLJ25471	AK058200, NM_144651	-2.19
FLJ31139	BC064898, NM_173657	2.1
FLJ35740	NM_147195	-2.07
FLJ36070	AK131427, NM_182574	-2.37
FLJ36180	BC015684, NM_178556	2.54
FLJ37794	NM_173588	-3.02
FLJ42461	NM_198501	-5.18
FLJ90650	BC094716, NM_173800	2.32
FOXP3	NM_014009	-4.42
FPGS	BC009901, BC064393, M98045, NM_004957	-2.9
FSCN1	NM_003088	3.86
FTL	BC067772	-5.74
FTSJ1	NM_012280, NM_177439	-2.97
FUT8	NM_004480, NM_178155, NM_178157	2.07
FXYD5	AF177940, NM_144779	-2.56
G1P3	NM_002038, NM_022872, NM_022873	4.05
GAA	NM_000152	2.09
GABARAP	NM_007278	-2.82
GABRB2	NM_000813, NM_021911	2.42
GANAB	BC065266, NM_198334, NM_198335	-2.08
GAPDH	NM_002046, X53778	-3.7
GBA2	AB046825, AK057610, NM_020944	-2.44
GBL	AK021536, AK022227, BC052292, NM_022372	-2.59
GBP3	BC063819, CR936755, NM_018284	2.75
GCHFR	NM_005258	-2.56
GDI2	NM_001494	-3.77
GH1	AF185611	-2.17
GIP	NM_004123	2.16
GLT25D1	AK075541, BC020492, NM_024656	-2.99
GLUD2	BC050732, NM_012084	-2.12
GMDS	AF040260, BC000117, NM_001500	-2.83
GNB2	NM_005273	-3.1
GNB2L1	AY336089, CR609042, NM_006098	-2.34
GOR	NM_172239	2.04
GOR	NM_172239	2.04
GOR	NM_172239	2.04
GPR	BC067106, NM_007223	2.9
GPR18	NM_005292	2.11
GPR3	NM_005281	-2.04
GPSN2	CR593648, NM_004868, NM_138501	-2.48
GPX1	BC070258, NM_000581	-4.59
GPX4	BC039849, NM_002085	-3.77
GRN	AK023348, NM_002087	-2.7

GSTP1	NM_000852	-2.4
GTPBP4	NM_012341	-2.25
GUCY1A2	NM_000855, Z50053	2.45
GUK1	AK125698, NM_000858	-3.31
GZMB	AY232654, AY232656, AY372494, NM_004131	2.56
H1F0	CR456502	-3.21
HAND2	NM_021973	2.07
HAX1	NM_006118	-2.45
HDAC7A	AK024469, AK026767, AY302468, BC064840, NM_015401, NM_016596	5.6
HHAT	BC051191, CR936628, NM_018194	2.19
HIST1H2BN	BC009783, BC011372, NM_003520	2.1
HIST1H3G	NM_003534	-2.62
HIST1H4C	NM_003542	-2.19
HLA-E	NM_005516	-2.12
HLCS	NM_000411	2.08
HMG2L1	NM_001003681, NM_005487	-2.97
HMGA1	BC071863, NM_002131, NM_145899	-2.37
HMGB1	NM_002128	-3.34
HNRPC	BC003394, BC089438, BX247961, CR617382	-2.41
HNRPF	BC016736, NM_004966	-2.88
HNRPL	BC069184, NM_001533	-4.23
HRMT1L2	AY775289, NM_001536, NM_198318, NM_198319	-4.74
HS3ST1	NM_005114	-2.09
HSDL2	BC004331, NM_032303	-2.02
HSPA5	NM_005347	-4.78
HSPA8	BC016179, NM_006597, NM_153201	-3.45
HSPB2	NM_001541	-2.4
HSPC023	NM_014047	-3.13
HSPCB	AF275719, BC012807, NM_007355	-3.64
HSPD1	BC002676, CR619688, NM_002156	-3.13
HYPIC	AK123353, BC067364, NM_012272	2.15
ICT1	NM_001545	-3.28
IER2	NM_004907	-2.68
IFIT5	BC025786	2.13
IFRD2	NM_006764, Y12395	-2.45
IGLV6-57	BC023973	4.93
IL22	NM_020525	2.23
IL6ST	AB102799, NM_002184, NM_175767	2.3
ILDR1	AY134857, AY672837, NM_175924	5.04
ILF2	NM_004515	-3.78
ILF3	AJ271747, NM_012218	-2.69
INO80	NM_017553	3.37
ITGA8	NM_003638	2.13
ITGB4BP	NM_181466, NM_181468	-2.33
ITIHI	NM_002215	-2.69

JUNB	NM_002229	4.8
KIAA0082	NM_015050	-2.01
KIAA0284	BC047913, NM_015005	3.61
KIAA0339	NM_014712	3.32
KIAA1393	BC063551, NM_020810	-3.34
KIAA1533	AK074914, BC014077, NM_020895	-2.27
KIF20A	NM_005733	3.95
KIF9	NM_022342, NM_182902, NM_182903	2.77
KIR2DL1	BC069344, NM_014218	2.82
KRTAP19-1	NM_181607	2.15
KRTAP4-2	NM_033062	2.78
LCP1	AK223305, NM_002298	-2.75
LENEP	NM_018655	3.51
LETMD1	AK127540, AY259835, AY259836, BC064943, NM_015416	-2.46
LFNG	NM_002304	2.39
LGALS1	NM_002305	-3.19
LGI4	BC087848	2.17
LMNB1	NM_005573	-2.69
LOC124402	AF447881, NM_145253	2.57
LOC129607	NM_207315	2.63
LOC152831	NM_175737	2.15
LOC153561	NM_207331	4.51
LOC157697	NM_207332	2.69
LOC220686, LOC375133	NM_199283, NM_199345	-3.45
LOC284001	NM_198082	2.7
LOC388389	NM_213607	2.52
LOC388882	NM_001006606	-2.64
LOC440503	NM_001013706	2.42
LOC51149	BC069051, NM_001017987, NM_016175	2.2
LOC51233	AL080197, NM_016449	2.94
LOC51234	BC016348, NM_016454	-3.3
LRAT	NM_004744	2.28
LRFN4	NM_024036	-2.09
LRP12	NM_013437	2.13
LRP6	NM_002336	-2.39
LSM2	NM_021177	-2.41
LSM4	NM_012321	-2.63
LSP1	AK129684, NM_001013254, NM_002339	2.51
LY6G6D	AF195764, NM_021246	4.62
LY9	AF244129, AK128573, AY007142, BC027920, BC062589, BC064485, L42621, NM_002348	2.88
M6PRBP1	AK223054, BC019278, NM_005817	-2.58
MAGEA2	NM_175743	-3.34
MAGEB6	NM_173523	2
MAN1C1	AF318353, NM_020379	2.69

MAP2K3	BC032478, NM_145109	-2.23
MAPKAPK5	NM_003668, NM_139078	-2.28
MARS	NM_004990	-2.41
MAZ	AF489858, BC041629, L01420, M94046	-2.3
MCM2	D83987, NM_004526	-3.33
MCM3	NM_002388	-2.31
MCM5	NM_006739	-2.85
MCM7	AF279900, BC009398, BC013375, NM_005916, NM_182776	-2.95
MDH2	NM_005918	-2.99
MED6	NM_005466	-2.19
MED8	NM_001001651, NM_001001654, NM_052877, NM_201542	-2.36
MFAP4	NM_002404	4.43
MGAM	NM_004668	2.32
MGAT4A	NM_012214	2.27
MGC14817	NM_032338	-4.52
MGC15416	NM_032371	-2.71
MGC2198	NM_138820	-2.79
MGC3121	NM_024031	-2.65
MGC34032	BC028743, NM_152697	4.33
MGC40157	NM_152350	-4.69
MGC52010	NM_194326	-3.16
MGC7036	NM_145058	2.49
MIB1	AY147849, BC022403, NM_020774	-3.08
MIF	NM_002415	-2.57
MIR16	BC012153, NM_016641	-2.51
MLC1	BC028425, NM_139202	4.78
MLF2	NM_005439	-2.62
MLX	NM_170607, NM_198204	-2.05
MMP21	NM_147191	2.15
MRPL12	AF105278, NM_002949	-3.4
MRPL21	NM_181514	-3.19
MRPL23	NM_021134	-3.25
MRPL27	NM_016504	-3.71
MRPL35	NM_145644	2.94
MRPL37	AY421759, NM_016491	-2.92
MRPL51	NM_016497	2.85
MRPS2	NM_016034	-2.72
MRPS27	BC064902, NM_015084	4.25
MSH2	NM_000251	-2.16
MTCP1	CR600926, NM_014221	2.38
MTSS1	AK027015, BC023998	2.42
MTVR1	BC023991, CR610230, NM_152832	4.71
MUC17	AJ606307, NM_001004430	2.19
MUSTN1	NM_205853	3.94
MYBL2	NM_002466	-3.25

MYO10	AB018342, AL832428, NM_012334	2.68
NALP12	AK095460, AY116204, AY116205, AY116207, NM_144687	2.49
NAPA	AK126519, NM_003827	-2.11
NCOR2	AF113003, AK127788	-2.64
NDUFA10	NM_004544	-2.97
NDUFB10	BC007509, NM_004548	-2.93
NDUFS8	NM_002496	-3.04
NDUFV1	BC008146, CR624895, NM_007103	-3.4
NES	NM_006617	4.6
NFATC3	NM_173164	-2.28
NFIX	NM_002501	2.22
NID	BC045606, NM_002508	2.9
NLGN4X	AX773938, AY358562, NM_020742	2.05
NME1	NM_000269, NM_198175	-3.78
NOB1P	BC064630, NM_014062	-2.68
NOLA2	NM_017838	-2.43
NP	AK098544, AK126154, CR608316	-2.69
NPEPPS	NM_006310, Y07701	-3.3
NRXN3	AJ316284, AJ493127, AK056530, NM_138970	-2.93
NSEP1	NM_004559	-4.05
NUP205	NM_015135	-2.49
NUP210	AB020713, NM_024923	-2.52
NUTF2	NM_005796	-3.57
OCIAD1	AF324350, NM_017830	-2.73
OCLN	NM_002538	2.23
OR2L2	NM_001004686	2.56
P4HB	BC029617, NM_000918	-3.75
PA2G4	BC069786, NM_006191	-4.4
PABPC4	BC065540, BC071591, NM_003819	-2.77
PAF53	AK091294, NM_022490	-2.77
PARK7	NM_007262	-2.19
PCBP1	NM_006196	-3.81
PCBP2	AB188306, AB208825, NM_005016, NM_031989, X78136	-3.42
PCSK1N	NM_013271	-2.23
PDXK	BC000123, BC005825	-2.41
PECI	AB209917, AF244138, BC002668, BC034702, NM_006117, NM_206836	-2.25
PFKFB2	BC069583	2.47
PFN1	NM_005022	-4.27
PGK1	NM_000291	-3.11
PGK2	NM_138733	2.18
PHEMX	AB029488, AK128812, BC016693, NM_139022	4.56
PHF5A	NM_032758	3.44
PKM2	NM_002654, NM_182470	-4.02
PLDN	AK057545, AK091740	-3.06
PLTP	NM_006227, NM_182676	4.65

PNCK	BC064422, CR611192, NM_198452	-3.12
POLD2	NM_006230	-2.73
POLE3	NM_017443	-5.14
POU3F2	NM_005604	2.27
PPHLN1	AK124921, BC025306, NM_016488	3.83
PPM1G	BC000057, NM_177983	-2.7
PPP1CA	CR595463, NM_001008709, NM_002708	-4.32
PPP1R10	NM_002714	2.05
PPP1R3D	NM_006242	3.55
PPP2R2C	BC032954, NM_020416, NM_181876	2.23
PQBP1	AB041833, NM_005710	-2.05
PRCC	NM_005973	-2
PRDX1	NM_002574	-2.87
PRDX5	AF124993, NM_012094	-3.08
PRKCSH	NM_002743	-2.3
PRSS15	AK096626, AK127867, NM_004793, X74215, X76040	-2.42
PRSS16	AK126160, NM_005865	2.88
PRTN3	M29142, NM_002777	-2.55
PSENN	NM_172341	-2.28
PSIP1	BC064135, NM_021144	2.64
PSMA3	NM_002788, NM_152132	-3.79
PSMB1	BC020807	-2.49
PSMB3	NM_002795	-3.5
PSMB4	NM_002796	-4.54
PSMB8	NM_004159, NM_148919	-3.33
PSMC3	NM_002804	-2.35
PSMC5	NM_002805	2.94
PSMF1	BC029836, CR592856, NM_006814	-2.69
PTCH2	AF119569, NM_003738	4.17
PTD008	NM_016145	-2.93
PTOV1	AY358168, BC042921, NM_017432	-2.33
PUS1	AF318369, NM_025215	3.01
PVRL4	AF218028, NM_030916	2.04
QARS	AF130067, BC000394, NM_005051	-2.36
QTRTD1	NM_024638	2.79
RAB40C	AY823398, NM_021168	2.9
RABAC1	NM_006423	-2.26
RABGGTB	NM_004582	-2.37
RAD51L1	BX248061, NM_133509	2.03
RALB	AK127675, NM_002881	-2.16
RANBP17	AJ288953, AJ288954, AK027880, NM_022897	-2.08
RASGRP2	AK092882, NM_005825, NM_153819	-2.8
RASGRP3	AB020653, NM_170672	2.06
RBBP4	NM_005610	-3.65
RBM3	AK026664, AY203954, NM_006743	-2.87

RBM6	AK124030, BC046643, NM_005777	-2.22
RBP3	J03912, NM_002900	-2.23
RFC2	NM_002914, NM_181471	-3.01
RFXANK	CR622780, NM_003721, NM_134440	-2.97
RHBDL1	AJ272344, NM_003961	4.81
RHOA	NM_001664	-4.04
RHOG	NM_001665	-2.7
RHOT2	AK090426, NM_138769	3.68
RKHD1	AB107353, NM_203304	-2.08
RNF144	NM_014746	3.24
RNF186	NM_019062	2.42
RNH	NM_002939	6.22
RNPEP	NM_020216	-3.57
RPIL1	AK127545, NM_178857	2.12
RPL11	BC018970, NM_000975	-2.2
RPL14	BC029036, NM_003973	-2.13
RPL18	NM_000979	-4.27
RPL18A	NM_000980	-6.02
RPL22	NM_000983	-2.27
RPL29	NM_000992	-2.19
RPL3	AY320405, NM_000967	-2.97
RPL5	AB208980, BC001882, NM_000969	-3.82
RPL6	BC022444, NM_000970	-2.69
RPL8	NM_033301	-5.39
RPN2	AK096243, NM_002951	-3.92
RPS14	NM_005617	-3.06
RPS19	NM_001022	-2.96
RPS3	BC034149, BC071669, NM_001005	-4.08
RPS5	NM_001009	-3.23
RPS9	NM_001013	-4.54
RSL1D1	NM_015659	-3.37
RUVBL1	NM_003707	-2.63
S82297	S82297	-2.64
SAFB2	NM_014649	5.33
SCGB1C1	NM_145651	2.06
SCN8A	NM_014191	-2.15
SCN9A	NM_002977	2.76
SEC10L1	NM_006544	-3.38
SELO	AY324823, NM_031454	-2.66
SEPT10	BC020502, NM_144710, NM_178584	2.61
SEPT6	AF403061	-3.51
SERF2	BC008214, NM_005770	-4.61
SETDB1	BC009362, D31891, NM_012432	-2.08
SFRP2	NM_003013	2.85
SH3BGR	NM_007341	3.69

SH3YL1	BC008374, BC008375, NM_015677	2.28
SHMT2	BC011911, BC032584, NM_005412	-4.13
SIDT1	NM_017699	-2.84
SIM1	NM_005068	2.28
SIVA	AK128704, NM_006427, NM_021709	-2.66
SLC16A3	NM_004207	-2.43
SLC22A4	NM_003059	2.16
SLC25A3	NM_005888, NM_213611, NM_213612	-2.77
SLC25A6	NM_001636	-4.89
SLC35E1	AK027850, BC062562, NM_024881	-2.3
SLC39A3	NM_144564	-2.69
SLC40A1	NM_014585	2.41
SLC6A13	NM_016615	2.16
SLC7A1	NM_003045	2.28
SLC8A3	AF510501, AF510502, NM_033262, NM_058240, NM_182932, NM_182933, NM_182936, NM_183002	3.82
SMARCB1	AK024025, NM_001007468, NM_003073	-2.27
SND1	BC017180, NM_014390	-3.44
SNRP70	BC001315, CR592978, NM_001009820, NM_003089	2.83
SNRPA	NM_004596	-4.38
SNRPB	NM_198216	-4.7
SNX17	NM_014748	-2.81
SPHK1	BC030553, NM_021972, NM_182965	2.15
SRM	NM_003132	-4.07
SSR2	BC000341, BX649192, CR600571, NM_003145	-3.46
SSR4	NM_006280	-3.35
STAR	NM_000349	4.48
STIM1	NM_003156	-2.14
STX16	AF038897, AF305817, AF428146, BC073876, NM_001001433, NM_001001434, NM_003763	-3.49
SULF2	AY358461, BC020962, NM_018837, NM_198596	2.06
SUPT16H	NM_007192	-3.16
SUV420H1	BC012933, NM_017635	3.27
SYNCRIP	AF155568, BC032643, BC040844	-4
SYT9	BC046367, NM_175733	2.76
TBC1D2	AF318370, AK124772, BC028918, BC071978, NM_018421	2.11
TCEA3	AY540752, NM_003196	2.21
TCF2	NM_000458	2.05
TCP1	NM_030752	-2.98
TEGT	NM_003217	-2.29
TFDP1	NM_007111	-2.66
TGM6	AF540970, NM_198994	2.24
TH1L	AJ238379, AK023310, NM_198976	-3.38
THEM2	NM_018473	2.81
THOC4	NM_005782	-3.1
TIGD5	BC032632, NM_032862	4.05

TIMM17B	BC091473, NM_005834	-2.65
TIMM50	CR617826, NM_001001563	-4.13
TIMP1	BC000866, NM_003254	-2.69
TKT	BC002433, NM_001064	-3.34
TM4SF5	NM_003963	2.91
TMEM49	NM_030938	-2.88
TMPRSS11E	AF064819, NM_014058	2.27
TNFAIP2	NM_006291	2.37
TOMM22	NM_020243	-4.55
TOMM70A	NM_014820	-2.27
TOP1	NM_003286	2.36
TPM3	AK056889, AK056921, AK092712, BC072428, BX648485, NM_153649	-3.5
TPST2	NM_001008566	-2.27
TRIM28	BC052986, NM_005762	-3.66
TRIM6	CR749260, NM_001003818, NM_058166	2.37
TRIP3	NM_004773	-2.48
TRPM4	AJ575813, AY297046, NM_017636	2.78
TSC	BC015221, NM_017899	-2.77
TSK	NM_015516	3
TTC11	NM_016068	-3.32
TTC19	AK025958, AK056878, NM_017775	-2.46
TUBA6	NM_032704	-2.67
TUBB	BC007605, NM_178014	-3.23
TUFM	BC001633, NM_003321, S75463	-3.29
U16258	U16258	2.05
U5-116KD	BC002360, NM_004247	-2.96
U78723	U78723	-2.57
UBADC1	NM_016172	-2.64
UBE1	AK097343, NM_003334, X52897	-3.72
UBE2L3	NM_003347	-3.22
UBE2M	NM_003969	-3.39
UBE2NL	NM_001012989	-2.88
UBE2S	NM_014501	-3.25
UBE4B	AF043117, BC093696, NM_006048	3.16
UGP2	NM_001001521, NM_006759	-2.35
UNC5B	AY126437, NM_170744	2.19
UNQ473	NM_198477	2.52
UNQ9391	NM_198464	2.19
UQCRC1	CR618343, NM_003365	-2.35
UQCRC2	NM_003366	-3.57
URP2	NM_031471, NM_178443	3.55
UVRAG	NM_003369	2.65
UXT	NM_004182, NM_153477	-2.31
VAMP8	NM_003761	-2.61
VAPB	AF086629, AK127252, AK128422, NM_004738	2.4

VDAC1	NM_003374	-4.67
VDAC2	BC000165, L08666, NM_003375	-3.64
VGLL4	NM_014667	-3.21
VIM	AK093924, NM_003380	-2.71
VIP	NM_003381, NM_194435	2.29
WDR58	AK075330, BC050674, NM_024339	-2.02
WDR60	BC014491, NM_018051	2.42
WDR61	NM_025234	-2.93
WIG1	AK122768, NM_022470	-2.21
XAB2	BC007208, NM_020196	5.29
XRCC6	AK055786, CR456492, NM_001469	-3.91
Y00638	Y00638	-3
YWHAE	NM_006761	-2.37
YWHAH	BC003047, NM_003405	-3.07
ZBTB1	BC050719, NM_014950	2.05
ZDHHC8	AK131238, BC053544, NM_013373	2.37
ZKSCAN1	NM_003439	-2.32
ZNF167	NM_025169	2.2
ZNF207	BC002372, BC008023, CR616570, NM_003457	-3.31
ZNF323	BC008490, NM_030899, NM_145909	2.53
ZNF407	NM_017757	2.31
ZNF436	NM_030634	2.88
ZSWIM4	AK024452	2
ZYX	NM_003461	-2.87

表 4 中的负变化倍数表示与阴性对照所观察到的 mRNA 水平相比，给定基因的 mRNA 水平降低。

表 2、3 和 4 中的负变化倍数表示与阴性对照所观察到的 mRNA 水平相比，给定基因的 mRNA 水平降低。

结果证明，let-7 表达改变了 A549 细胞中的 558 个基因(217 个下调，341 个上调)、HepG2 细胞中的 1035 个基因(531 个下调，504 个上调)和 HL-60 细胞中的 721 个基因(441 个下调，280 个上调)的表达水平达至少两倍。

实施例 3

LET-7 的预测基因靶标

hsa-let-7a、hsa-let-7b 和 hsa-let-7g 的结合的基因靶标用专有算法 miRNA TargetTM (Asuragen)进行预测，在表 5 中显示，所有数据库提交(database submission)的内容通过引用其全文并入本文，如同在本申请的提交日提出。

表 5. hsa-let-7a、hsa-let-7b 和 hsa-let-7g 的靶标基因

基因符号	参考序列	基因名称
2'-PDE	NM_177966	2'-磷酸二酯酶
ABCB9	NM_019624	ATP-结合盒, 亚家族 B (MDR/TAP),
ABCC10	NM_033450	ATP-结合盒, 亚家族 C, 成员 10
ABCC5	NM_005688	ATP-结合盒, 亚家族 C, 成员 5
ACSL6	NM_001009185	酰基-CoA 合成酶长链家族成员 6
ACTR2	NM_001005386	肌动蛋白相关蛋白 2 同种型 a
ACVR1B	NM_004302	激活蛋白 A IB 型受体同种型 a 前体
ACVR2A	NM_001616	激活蛋白 A 受体, IIA 型前体
ADAM15	NM_207191	去整合蛋白和金属蛋白酶结构域 15
ADAMTS5	NM_007038	ADAM 金属肽酶含血小板反应蛋白 1 型
ADAMTS8	NM_007037	ADAM 金属肽酶含血小板反应蛋白 1 型
ADCY9	NM_001116	腺苷酸环化酶 9
ADIPOR2	NM_024551	脂连蛋白受体 2
ADRB2	NM_000024	肾上腺素能, β_2 -, 受体, 表面
ADRB3	NM_000025	肾上腺素能, β_3 -, 受体
AHCTF1	NM_015446	转录因子 ELYS
AKAP6	NM_004274	A-激酶锚定蛋白 6
ANGPTL2	NM_012098	促血管生成素样 2 前体
ANKFY1	NM_016376	含锚蛋白重复和 FYVE 结构域 1
ANKRD43	NM_175873	锚蛋白重复结构域 43
ANKRD49	NM_017704	胎儿球蛋白诱导因子
AP1S1	NM_057089	衔接子相关蛋白复合物 1, $\sigma 1$
APBB3	NM_006051	淀粉样蛋白 β 前体蛋白结合, 家族
APPBP2	NM_006380	淀粉样蛋白 β 前体蛋白结合蛋白
ARHGAP20	NM_020809	Rho GTP 酶激活蛋白 20
ARHGAP28	NM_001010000	Rho GTP 酶激活蛋白 28 同种型 a
ARHGEF15	NM_173728	Rho 鸟嘌呤交换因子 15
ARID3A	NM_005224	富 AT 相互作用结构域 3A (BRIGHT 样)
ARID3B	NM_006465	富 AT 相互作用结构域 3B (BRIGHT 样)
ARL5A	NM_012097	ADP-核糖基化因子样 5A 同种型 1
ARPP-19	NM_006628	环 AMP 磷蛋白, 19 kD
ASAH3L	NM_001010887	N-酰基鞘氨醇酰胺水解酶 3 样
ATG16L1	NM_017974	APG16 白噬 16 样同种型 2
ATP2A2	NM_170665	ATP 酶, Ca^{++} 运输, 心肌, 慢
ATP2B1	NM_001001323	质膜钙 ATP 酶 1 同种型 1 ^a
ATP2B3	NM_021949	质膜钙 ATP 酶 3 同种型 3 ^a
ATP2B4	NM_001001396	质膜钙 ATP 酶 4 同种型 4 ^a
ATXN1	NM_000332	共济失调蛋白 1
BACH1	NM_001186	BTB 和 CNC 同源性 1 同种型 a
BCAP29	NM_001008405	B 细胞受体相关蛋白 BAP29 同种型
BCL2L1	NM_001191	BCL2 样 1 同种型 2
BCL7A	NM_001024808	B 细胞 CLL/淋巴瘤 7A 同种型 b

BIN3	NM_018688	桥连整合因子 3
BNC2	NM_017637	碱核蛋白 2
BRD3	NM_007371	含染色质结构域蛋白 3
BTBD3	NM_014962	含 BTB/POZ 结构域蛋白 3 同种型 a
BTG2	NM_006763	B 细胞易位基因 2
BZW1	NM_014670	碱性亮氨酸拉链和 W2 结构域 1
BZW2	NM_014038	碱性亮氨酸拉链和 W2 结构域 2
C10orf6	NM_018121	假定蛋白 LOC55719
C11orf11	NM_006133	神经干细胞衍生的树突调节物
C11orf51	NM_014042	假定蛋白 LOC25906
C11orf57	NM_018195	假定蛋白 LOC55216
C15orf29	NM_024713	假定蛋白 LOC79768
C15orf41	NM_032499	假定蛋白 LOC84529
C1orf22	NM_025191	假定蛋白 LOC80267
C21orf29	NM_144991	染色体 21 开放阅读框 29
C22orf8	NM_017911	假定蛋白 LOC55007
C3orf64	NM_173654	AER61 糖基转移酶
C3orf9	NM_152305	假定蛋白 LOC56983
C6orf120	NM_001029863	假定蛋白 LOC387263
C6orf211	NM_024573	假定蛋白 LOC79624
C8orf36	NM_173685	假定蛋白 LOC286053
C9orf28	NM_033446	假定蛋白 LOC89853 同种型 1
C9orf7	NM_017586	假定蛋白 LOC11094
CALD1	NM_004342	钙调蛋白结合蛋白 1 同种型 2
CAP1	NM_006367	腺苷酰环化酶相关蛋白
CASP3	NM_004346	胱天蛋白酶 3 前蛋白原
CBL	NM_005188	Cas-Br-M (鼠)亲嗜型反转录病毒
CBX2	NM_005189	色素框同源物 2 同种型 1
CCND1	NM_053056	细胞周期蛋白 D1
CCND2	NM_001759	细胞周期蛋白 D2
CCNJ	NM_019084	细胞周期蛋白 J
CCR7	NM_001838	趋化因子(C-C 基序)受体 7 前体
CD164	NM_006016	CD164 抗原, 唾液黏蛋白
CDC25A	NM_001789	细胞分裂周期 25A 同种型 a
CDC34	NM_004359	细胞分裂周期 34
CDV3	NM_017548	CDV3 同源物
CDYL	NM_004824	染色质结构域蛋白, Y 染色体样同种型
CEECAM1	NM_016174	大脑内皮细胞黏着分子 1
CEP164	NM_014956	假定蛋白 LOC22897
CGNL1	NM_032866	带蛋白样 1
CHD7	NM_017780	染色质结构域解旋酶 DNA 结合蛋白 7
CHD9	NM_025134	染色质结构域解旋酶 DNA 结合蛋白 9
CHES1	NM_005197	检验点抑制物 1

CLASP2	NM_015097	CLIP-相关蛋白 2
CLDN12	NM_012129	密蛋白 12
COIL	NM_004645	环形体蛋白
COL14A1	NM_021110	胶原, XIV 型, α 1
COL15A1	NM_001855	α 1 XV 型胶原前体
COL19A1	NM_001858	α 1 XIX 型胶原前体
COL1A1	NM_000088	α 1 I 型胶原前蛋白原
COL1A2	NM_000089	α 2 I 型胶原
COL24A1	NM_152890	胶原, XXIV 型, α 1
COL3A1	NM_000090	前胶原, III 型, α 1
COL4A1	NM_001845	α 1 IV 型胶原前蛋白原
COL4A5	NM_000495	α 5 IV 型胶原同种型 1, 前体
COL5A2	NM_000393	α 2 V 型胶原前蛋白原
CPA4	NM_016352	羧肽酶 A4 前蛋白原
CPD	NM_001304	羧肽酶 D 前体
CPEB2	NM_182485	胞质多聚腺苷化成分结合
CPEB3	NM_014912	胞质多聚腺苷化成分结合
CPEB4	NM_030627	胞质多聚腺苷化成分结合
CPM	NM_001005502	羧肽酶 M 前体
CPSF4	NM_006693	切割和聚腺苷化特异性因子 4,
CROP	NM_016424	顺铂抗性相关过量表达
CRTAP	NM_006371	软骨相关蛋白前体
CTDSPL2	NM_016396	CTD (羧基末端结构域, RNA 聚合酶 II,
CTNS	NM_004937	胱氨酸病, 肾病同种型 2
CTSC	NM_148170	组织蛋白酶 C 同种型 b 前体
CYP19A1	NM_000103	细胞色素 P450, 家族 19
DCUN1D2	NM_001014283	假定蛋白 LOC55208 同种型 b
DCUN1D3	NM_173475	假定蛋白 LOC123879
DCX	NM_000555	双皮层蛋白同种型 a
DDI2	NM_032341	DNA 损害可诱导蛋白 2
DDX19A	NM_018332	DDX19 样蛋白
DDX19B	NM_001014449	DEAD (Asp-Glu-Ala-As)盒多肽 19 同种型
DDX19-DDX19L	NM_001015047	DDX19-DDX19L 蛋白
DHX57	NM_198963	DEAH (Asp-Glu-Ala-Asp/His)盒多肽 57
DKFZp686K16132	NM_001012987	假定蛋白 LOC388957
DLC1	NM_006094	在肝癌 1 同种型 2 中缺失
DLST	NM_001933	二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰转移酶(E2
DMD	NM_000109	肌营养不良蛋白 Dp427c 同种型
DMP1	NM_004407	牙质基质酸性磷蛋白
DNAJC1	NM_022365	DnaJ (Hsp40)同源物, 亚家族 C, 成员 1
DOCK3	NM_004947	胞质分裂提呈 3
DPP3	NM_005700	二肽基肽酶 III
DSCAM	NM_206887	唐氏综合征细胞黏着分子同种型

DST	NM_015548	肌动蛋白结合蛋白(dystonin)同种型 1eA 前体
DTX2	NM_020892	deltex 2
DUSP1	NM_004417	双特异性磷酸酶 1
DUSP16	NM_030640	双特异性磷酸酶 16
DUSP9	NM_001395	双特异性磷酸酶 9
DYRK1A	NM_001396	双特异性酪氨酸-(Y)-磷酸化
DZIP1	NM_014934	DAZ 相互作用蛋白 1 同种型 1
E2F5	NM_001951	E2F 转录因子 5
EFHD2	NM_024329	EF 手结构域家族, 成员 D2
EIF2C4	NM_017629	真核生物翻译起始因子 2C, 4
EIF4G2	NM_001418	真核生物翻译起始因子 4
ELOVL4	NM_022726	极长链脂肪酸的延长
EPHA3	NM_005233	肝配蛋白受体 EphA3 同种型 a 前体
EPHA4	NM_004438	肝配蛋白受体 EphA4
ERCC6	NM_000124	切除修复交叉互补啮齿动物
ERGIC1	NM_001031711	内质网-高尔基体中间体
FAM104A	NM_032837	假定蛋白 LOC84923
FAM84B	NM_174911	乳腺癌膜蛋白 101
FAM96A	NM_001014812	假定蛋白 FLJ22875 同种型 b
FARP1	NM_005766	FERM, RhoGEF 和血小板白细胞 C 激酶底物蛋白结构域蛋白 1
FASLG	NM_000639	Fas 配体
FBXL19	NM_019085	F 盒和富亮氨酸重复蛋白 19
FGF11	NM_004112	成纤维细胞生长因子 11
FIGN	NM_018086	Fidgetin
FLJ20232	NM_019008	假定蛋白 LOC54471
FLJ20309	NM_017759	假定蛋白 LOC54891
FLJ21986	NM_024913	假定蛋白 LOC79974
FLJ25476	NM_152493	假定蛋白 LOC149076
FLJ31818	NM_152556	假定蛋白 LOC154743
FLJ36031	NM_175884	假定蛋白 LOC168455
FLJ36090	NM_153223	假定蛋白 LOC153241
FLJ39779	NM_207442	假定蛋白 LOC400223
FLJ90709	NM_173514	假定蛋白 LOC153129
FNDC3A	NM_014923	含纤连蛋白 III 型结构域 3A
FNDC3B	NM_022763	含纤连蛋白 III 型结构域 3B
FRAS1	NM_025074	Fraser 综合征 1 同种型 1
GAB2	NM_012296	GRB2 相关结合蛋白 2 同种型 b
GABPA	NM_002040	GA 结合蛋白转录因子, α
GALE	NM_000403	UDP-半乳糖-4-差向异构酶
GALNT1	NM_020474	多肽 N-乙酰半乳糖胺基转移酶 1
GALNTL2	NM_054110	UDP-N-乙酰- α -D-半乳糖胺:多肽
GAN	NM_022041	巨轴突蛋白
GAS7	NM_003644	生长停滞特异性 7 同种型 a

GCNT4	NM_016591	核心 2 β 1,6-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶
GDPD1	NM_182569	甘油磷酸二酯磷酸二酯酶结构域
GGA3	NM_014001	ADP-核糖基化因子结合蛋白 3
GHR	NM_000163	生长激素受体前体
GIPC1	NM_005716	G 蛋白信号转导 19 相互作用的调节物
GM632	NM_020713	假定蛋白 LOC57473
GNAL	NM_002071	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白),
GNG5	NM_005274	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白),
GNS	NM_002076	葡萄糖胺(N-乙酰)-6-硫酸酯酶前体
GOLT1B	NM_016072	高尔基体转运 1 同源物 B
GPATC3	NM_022078	含 G 碎片结构域 3
GPR137	NM_020155	假定蛋白 LOC56834
GTF2I	NM_001518	通用转录因子 II, 同种型 4
HAND1	NM_004821	碱性螺旋-环-螺旋转录因子
HDHD1A	NM_012080	卤酸脱卤酶样水解酶结构域
HDLBP	NM_005336	高密度脂蛋白结合蛋白
HEAB	NM_006831	ATP/GTP 结合蛋白
HECTD2	NM_182765	含 HECT 结构域 2 同种型 a
HIC2	NM_015094	癌症中高甲基化 2
HK2	NM_000189	己糖激酶 2
HMGA2	NM_001015886	高迁移率族 AT 钩 2 同种型 c
HOMER2	NM_199331	homer 2 同种型 3
HOXA1	NM_153620	同源框 A1 同种型 b
HOXA9	NM_152739	同源框 A9
HOXC11	NM_014212	同源框 C11
HOXD1	NM_024501	同源框 D1
HTR4	NM_000870	5-羟色胺(血清素)受体 4
IDH2	NM_002168	异柠檬酸脱氢酶 2 (NADP+),
IGF2BP1	NM_006546	胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合
IGF2BP2	NM_001007225	胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合
IGF2BP3	NM_006547	胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合
IKBKAP	NM_003640	κ 轻链多肽基因的抑制物
IKBKE	NM_014002	IKK 相关激酶 ϵ
IL10	NM_000572	白细胞介素 10 前体
IL6	NM_000600	白细胞介素 6 (干扰素, β 2)
INPP5A	NM_005539	肌醇多聚磷酸-5-磷酸酶 A
IRS2	NM_003749	胰岛素受体底物 2
ITGB3	NM_000212	整联蛋白 β 链, β 3 前体
ITSN1	NM_001001132	交叉蛋白 1 同种型 ITSN-s
JMJD1A	NM_018433	含 jumonji 结构域 1A
KIAA0179	NM_015056	假定蛋白 LOC23076
KIAA0664	NM_015229	假定蛋白 LOC23277
KIAA1539	NM_025182	假定蛋白 LOC80256

KIAA1961	NM_001008738	假定蛋白 LOC96459 同种型 2
KIF2	NM_004520	驱动蛋白重链成员 2
KLF9	NM_001206	Kruppel 样因子 9
KLHL6	NM_130446	kelch 样 6
KPNA4	NM_002268	核周蛋白 α 4
LBH	NM_030915	假定蛋白 DKFZp566J091
LEPROTL1	NM_015344	瘦蛋白受体重叠转录物样 1
LGR4	NM_018490	含富亮氨酸重复的 G 蛋白-偶联
LIMD1	NM_014240	含 LIM 结构域 1
LIMD2	NM_030576	假定蛋白 LOC80774
LIN28B	NM_001004317	lin-28 同源物 B
LNK	NM_005475	淋巴细胞衔接蛋白
LOC144097	NM_138471	假定蛋白 LOC144097
LOC220594	NM_145809	TL132 蛋白
LOC51136	NM_016125	PTD016 蛋白
LOXL4	NM_032211	赖氨酰氧化酶样 4 前体
LPGAT1	NM_014873	溶血磷脂酰甘油酰基转移酶 1
LRIG2	NM_014813	富亮氨酸重复和免疫球蛋白样
LRIG3	NM_153377	富亮氨酸重复和免疫球蛋白样
LRRC1	NM_018214	含富亮氨酸重复 1
LRRC17	NM_005824	含富亮氨酸重复 17 同种型 2
LRRFIP1	NM_004735	富亮氨酸重复(FILII 中)相互作用
LSM11	NM_173491	LSM11, U7 小核 RNA 相关
LYPLA3	NM_012320	溶血磷脂酶 3 (溶酶体磷脂酶
MAP3K3	NM_002401	促分裂原激活蛋白激酶激酶激酶 3
MAP3K7IP2	NM_015093	促分裂原激活蛋白激酶激酶激酶 7
MAP4K3	NM_003618	促分裂原激活蛋白激酶激酶激酶
MAPK6	NM_002748	促分裂原激活蛋白激酶 6
MARCH9	NM_138396	膜相关 RING-CH 蛋白 IX
MDF1	NM_005586	MyoD 家族抑制剂
MECP2	NM_004992	甲基 CpG 结合蛋白 2
MED6	NM_005466	RNA 聚合酶 II 转录的介体,
MEF2D	NM_005920	MADS 盒转录增强子因子 2,
MEIS2	NM_002399	同源盒蛋白 Meis2 同种型 f
MEIS3	NM_001009813	Meis1, 骨髓亲嗜性病毒整合位点
MGAT4A	NM_012214	甘露糖基(α -1,3-)-糖蛋白
MGC17330	NM_052880	HGFL 蛋白
MGC61598	NM_001004354	假定蛋白 LOC441478
MGLL	NM_001003794	单甘油酯脂肪酶同种型 2
MIB1	NM_020774	Mindbomb 同源物 1
MLL5	NM_182931	髓性/淋巴样或混合谱系白血病 5
MLLT10	NM_001009569	髓性/淋巴样或混合谱系白血病
MLR1	NM_153686	转录因子 MLR1

MLR2	NM_032440	配体依赖性辅阻遏物
MMP11	NM_005940	基质金属蛋白酶 11 前蛋白原
MNT	NM_020310	MAX 结合蛋白
MTPN	NM_145808	肌侵蛋白
MYCL1	NM_001033081	l-myc-1 原癌基因同种型 1
MYCN	NM_005378	v-myc 骨髓细胞瘤病毒相关癌基因,
MYRIP	NM_015460	肌球蛋白 VIIA 和 Rab 相互作用蛋白
NAB1	NM_005966	NGFI-A 结合蛋白 1
NAP1L1	NM_004537	核小体装配蛋白 1 样 1
NAT12	NM_001011713	假定蛋白 LOC122830
NAT5	NM_181528	N-乙酰转移酶 5 同种型 c
NCOA1	NM_003743	核受体辅激活物 1 同种型 1
NCOA3	NM_006534	核受体辅激活物 3 同种型 b
NDST2	NM_003635	N-脱乙酰酶/N-磺基转移酶(乙酰肝素
NID2	NM_007361	巢蛋白 2
NKIRAS2	NM_001001349	NFKB 抑制剂相互作用 Ras 样 2
NME4	NM_005009	二磷酸核苷激酶 4
NME6	NM_005793	二磷酸核苷激酶 6 型
NOPE	NM_020962	DDM36
NOVA1	NM_002515	神经肿瘤腹抗原 1 同种型 1
NRAS	NM_002524	成神经细胞瘤 RAS 病毒(v-ras)癌基因
NRK	NM_198465	Nik 相关激酶
NUMBL	NM_004756	numb 同源物(果蝇)样
NUP98	NM_005387	核孔蛋白 98kD 同种型 3
NXT2	NM_018698	核运输因子 2 样输出因子 2
OLR1	NM_002543	氧化型低密度脂蛋白(凝集素样)
OSBPL3	NM_015550	氧固醇结合蛋白样蛋白 3 同种型
OSMR	NM_003999	制癌蛋白 M 受体
P18SRP	NM_173829	P18SRP 蛋白
P4HA2	NM_001017973	脯氨酰 4-羟化酶, α II 亚单位同种型 2
PAK1	NM_002576	p21 激活激酶 1
PANX2	NM_052839	泛连蛋白 2
PAPPA	NM_002581	怀孕相关血浆蛋白 A
PAX3	NM_181457	配对框基因 3 同种型 PAX3
PBX2	NM_002586	前体 B 细胞白血病转录因子 2
PBX3	NM_006195	前体 B 细胞白血病转录因子 3
PCDH19	NM_020766	原钙粘蛋白 19
PCGF3	NM_006315	环指蛋白 3
PCYT1B	NM_004845	磷酸胞苷酸转移酶 1, 胆碱, β
PGM2L1	NM_173582	磷酸葡萄糖变位酶 2 样 1
PGRMC1	NM_006667	孕酮受体膜成分 1
PHF8	NM_015107	PHD 指蛋白 8
PIGA	NM_002641	磷脂酰肌醇
PLCXD3	NM_001005473	磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 C, X

PLDN	NM_012388	梅毒螺旋体素
PLEKHG6	NM_018173	含血小板白细胞 C 激酶底物同源性结构域, 家族 G
PLEKHO1	NM_016274	OC120
PLXND1	NM_015103	从蛋白 D1
POM121	NM_172020	核孔膜蛋白 121
PPAPDC2	NM_203453	磷脂酸磷酸酶 2 型结构域
PPARGC1A	NM_013261	过氧化物酶体增生激活受体
PPP1R12B	NM_002481	蛋白磷酸酶 1, 调节性(抑制剂)
PPP1R15B	NM_032833	蛋白磷酸酶 1, 调节性亚单位 15B
PPP1R16B	NM_015568	蛋白磷酸酶 1 调节性抑制剂
PPP3CA	NM_000944	蛋白磷酸酶 3 (以前为 2B), 催化性
PRDM2	NM_001007257	成视网膜细胞瘤蛋白结合锌指
PREI3	NM_015387	植入前蛋白 3 同种型 1
PRPF38B	NM_018061	PRP38 前体 mRNA 加工因子 38 (酵母)
PSCD3	NM_004227	血小板白细胞 C 激酶底物同源性, Sec7 和卷曲/螺旋
PSD3	NM_015310	ADP-核糖基化因子鸟嘌呤核苷酸
PYGO2	NM_138300	尾部(pygopus)同源物 2
PYY2	NM_021093	肽 YY, 2 (精液蛋白)
RAB11FIP4	NM_032932	RAB11 家族相互作用蛋白 4 (II 类)
RAB15	NM_198686	Ras 相关蛋白 Rab-15
RAB40C	NM_021168	RAR (RAS 样 GTPASE)样
RAI16	NM_022749	视黄酸诱导的 16
RALB	NM_002881	v-ral 猿白血病病毒癌基因同源物 B
RALGPS1	NM_014636	Ral GEF 含 PH 结构域和 SH3 结合基序 1
RANBP2	NM_006267	RAN 结合蛋白 2
RASL10B	NM_033315	RAS 样, 家族 10, 成员 B
RAVER2	NM_018211	核糖核蛋白, PTB 结合 2
RB1	NM_000321	成视网膜细胞瘤 1
RBM9	NM_001031695	RNA 结合基序蛋白 9 同种型 1
RDH10	NM_172037	视黄醇脱氢酶 10
REEP1	NM_022912	受体表达增强蛋白 1
RFXDC1	NM_173560	含调节因子 X 结构域 1
RGAG1	NM_020769	含反转录转座子 gag 结构域 1
RGS16	NM_002928	G 蛋白信号转导 16 的调节物
RICTOR	NM_152756	mTOR 的雷帕霉素不敏感伴侣
RIOK3	NM_003831	bimD6 同源物同种型 1 的 sudD 抑制物
RNF38	NM_022781	指环蛋白 38 同种型 1
RNF44	NM_014901	指环蛋白 44
RNF5	NM_006913	指环蛋白 5
RNF7	NM_014245	指环蛋白 7 同种型 1
RNPC1	NM_017495	含 RNA 结合区蛋白 1 同种型
RORC	NM_001001523	RAR 相关孤儿受体 C 同种型 b

RPS6KA3	NM_004586	核糖体蛋白 S6 激酶, 90kDa, 多肽
RRM2	NM_001034	核糖核苷酸还原酶 M2 多肽
RRP22	NM_001007279	RAS 相关, 染色体 22 上, 同种型 b
RSPO2	NM_178565	R-脊椎蛋白家族, 成员 2
RUFY3	NM_014961	rap2 相互作用蛋白 x 同种型 2
SBK1	NM_001024401	SH3 结合结构域激酶 1
SCN5A	NM_000335	电压门控钠通道 V 型 α
SCUBE3	NM_152753	信号肽, CUB 结构域, EGF 样 3
SEC14L1	NM_003003	SEC14 (酿酒酵母)样 1 同种型 a
SEC24C	NM_004922	SEC24 相关蛋白 C
SEMA3F	NM_004186	脑信号蛋白 3F
SEN2	NM_021627	SUMO1/泛素相关蛋白/SMT3 特异性蛋白酶 2
SEN5	NM_152699	SUMO1/泛素相关蛋白特异性蛋白酶 5
SFRS12	NM_139168	剪接因子, 富精氨酸/丝氨酸 12
SFRS8	NM_152235	剪接因子, 富精氨酸/丝氨酸 8 同种型
SGCD	NM_000337	δ -肌聚糖同种型 1
SLC20A1	NM_005415	溶质载体家族 20 (磷酸盐)
SLC25A18	NM_031481	溶质载体
SLC25A24	NM_013386	溶质载体家族 25 成员 24 同种型 1
SLC25A27	NM_004277	溶质载体家族 25, 成员 27
SLC25A4	NM_001151	溶质载体家族 25 (线粒体载体;
SLC26A9	NM_052934	溶质载体家族 26, 成员 9 同种型 a
SLC30A4	NM_013309	溶质载体家族 30 (锌转运蛋白),
SLC5A6	NM_021095	溶质载体家族 5 (钠依赖性
SLC6A1	NM_003042	溶质载体家族 6 (神经递质
SLC9A9	NM_173653	溶质载体家族 9 (钠/氢
SLCO5A1	NM_030958	有机阴离子转运蛋白多肽相关
SMARCD1	NM_020159	SWI/SNF 相关, 基质相关
SNAP23	NM_003825	突触小体相关蛋白 23 同种型
SNN	NM_003498	Stannin
SNX16	NM_022133	分选微管连接蛋白 16 同种型 a
SOCS1	NM_003745	细胞因子信号转导 1 的抑制物
SOCS4	NM_080867	细胞因子信号转导 4 的抑制物
SOX13	NM_005686	SRY 盒 13
SPATA2	NM_006038	精子发生相关 2
SPRYD4	NM_207344	假定蛋白 LOC283377
STARD3NL	NM_032016	MLN64 N-末端同源物
STAT3	NM_213662	转录的信号转导物和激活物
STK40	NM_032017	SINK-同源丝氨酸/苏氨酸激酶
STRBP	NM_018387	精细胞核周 RNA 结合蛋白
STX17	NM_017919	突触融合蛋白 17
STX3A	NM_004177	突触融合蛋白 3A
STXBP5	NM_139244	Tomosyn
SURF4	NM_033161	饮食过量 4

SYT1	NM_005639	突触结合蛋白 I
SYT11	NM_152280	突触结合蛋白 12
TARBP2	NM_134324	TAR RNA 结合蛋白 2 同种型 b
TBKBP1	NM_014726	ProSAPiP2 蛋白
TBX5	NM_000192	T 盒 5 同种型 1
TMED5	NM_016040	跨膜 emp24 蛋白转运结构域
TMEM65	NM_194291	假定蛋白 LOC157378
TMPRSS2	NM_005656	跨膜蛋白酶, 丝氨酸 2
TNFRSF1B	NM_001066	肿瘤坏死因子受体 2 前体
TOB2	NM_016272	ERBB2 的转导蛋白, 2
TPP1	NM_000391	三肽基肽酶 1 前体
TRHDE	NM_013381	促甲状腺素释放激素降解酶
TRIB1	NM_025195	G 蛋白偶联受体诱导蛋白
TRIB2	NM_021643	tribbles 同源物 2
TRIM33	NM_015906	含三联基序 33 蛋白同种型
TRIM41	NM_033549	含三联基序 41 同种型 1
TRPM6	NM_017662	瞬时受体电位阳离子通道,
TSC22D2	NM_014779	TSC22 结构域 家族 2
TTL	NM_153712	微管蛋白酪氨酸连接酶
TTLL4	NM_014640	微管蛋白酪氨酸连接酶样家族, 成员 4
TUSC2	NM_007275	肿瘤抑制物候选物 2
UBXD2	NM_014607	含 UBX 结构域 2
UGCGL1	NM_001025777	UDP-葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶样 1
UHRF2	NM_152896	Np95 样指环蛋白同种型 b
ULK2	NM_014683	unc-51 样激酶 2
UNC5A	NM_133369	导蛋白受体 Unc5h1
USP21	NM_001014443	泛素特异性蛋白酶 21
USP32	NM_032582	泛素特异性蛋白酶 32
USP47	NM_017944	泛素特异性蛋白酶 47
VANGL2	NM_020335	vang 样 2 (van gogh, 果蝇)
VCPIP1	NM_025054	含缬酪蛋白(p97)/p47 复合物
VSNL1	NM_003385	视锥蛋白样 1
WAPAL	NM_015045	KIAA0261
WDFY3	NM_014991	含 WD 重复和 FYVE 结构域 3 同种型
WNT1	NM_005430	无翅型 MMTV 整合位点家族,
XKR8	NM_018053	X Kell 血型前体相关家族,
YOD1	NM_018566	假定蛋白 LOC55432
ZBTB10	NM_023929	含锌指和 BTB 结构域 10
ZBTB39	NM_014830	含锌指和 BTB 结构域 39
ZBTB5	NM_014872	含锌指和 BTB 结构域 5
ZCCHC5	NM_152694	含锌指, CCHC 结构域 5
ZFYVE26	NM_015346	含锌指, FYVE 结构域 26
ZMAT1	NM_001011656	锌指, 基质蛋白 1 型同种型 2
ZNF294	NM_015565	锌指蛋白 294

ZNF644	NM_016620	锌指蛋白 644 同种型 2
ZNF710	NM_198526	锌指蛋白 710
ZNF740	NM_001004304	锌指蛋白 740
ZSWIM4	NM_023072	锌指, 含 SWIM 结构域 4

下表 6 显示用前体 miR hsa-let-7b 转染后, 在 HepG2 和 A549 细胞中显示出 mRNA 表达水平发生改变的预测基因靶标。

表 6. 用前体 miR hsa-let-7b 转染 72 小时后, 在 HepG2 和 A549 细胞中显示出 mRNA 表达水平发生改变的预测 hsa-let-7 靶标

基因符号	参考序列	基因名称
在 HepG2 和 A549 中发生改变的表达		
2'-PDE	NM_177966	2'-磷酸二酯酶
ACVR1B	NM_004302	激活蛋白 A 型 IB 受体同种型 a 前体
C6orf211	NM_024573	假定蛋白 LOC79624
CDC25A	NM_001789	细胞分裂周期 25A 同种型 a
CDC34	NM_004359	细胞分裂周期 34
CHD7	NM_017780	染色质结构域解旋酶 DNA 结合蛋白 7
COL4A5	NM_000495	α 5 型 IV 胶原同种型 1, 前体
E2F5	NM_001951	E2F 转录因子 5
FIGN	NM_018086	Fidgetin
GALE	NM_000403	UDP-半乳糖-4-差向异构酶
GNG5	NM_005274	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白),
HDHD1A	NM_012080	卤酸脱卤酶样水解酶结构域
HMGA2	NM_001015886	高迁移率族 AT 钩 2 同种型 c
KIAA0179	NM_015056	假定蛋白 LOC23076
LEPROTL1	NM_015344	瘦蛋白受体重叠转录物样 1
LIN28B	NM_001004317	Lin-28 同源物 B
MED6	NM_005466	RNA 聚合酶 II 转录的介体
NAP1L1	NM_004537	核小体装配蛋白 1 样 1
NME6	NM_005793	核苷二磷酸激酶 6 型
NRAS	NM_002524	成神经细胞瘤 RAS 病毒(v-ras)癌基因
NUP98	NM_005387	核孔蛋白 98kD 同种型 3
PGRMC1	NM_006667	孕酮受体膜成分 1
PIGA	NM_002641	磷脂酰肌醇
SLC25A24	NM_013386	溶质载体家族 25 成员 24 同种型 1

SLC5A6	NM_021095	溶质载体家族 5 (钠依赖性
SNAP23	NM_003825	突触小体相关蛋白 23 同种型
仅在 HepG2 中发生改变的表达		
ARID3A	NM_005224	富 AT 相互作用结构域 3A (BRIGHT 样)
ARL5A	NM_012097	ADP-核糖基化因子样 5A 同种型 1
C10orf6	NM_018121	假定蛋白 LOC55719
CCNJ	NM_019084	细胞周期蛋白 J
COIL	NM_004645	环形体蛋白
CPEB2	NM_182485	胞质聚腺苷酸化成分结合
CTDSPL2	NM_016396	CTD (羧基末端结构域, RNA 聚合酶 II,
CTSC	NM_148170	组织蛋白酶 C 同种型 b 前体
DDX19A	NM_018332	DDX19 样蛋白
DLC1	NM_006094	在肝癌 1 同种型 2 中缺失
DMD	NM_000109	肌营养不良蛋白 Dp427c 同种型
DST	NM_015548	肌动蛋白结合蛋白(dystonin)同种型 1eA 前体
DUSP9	NM_001395	双特异性磷酸酶 9
DZIP1	NM_014934	DAZ 相互作用蛋白 1 同种型 1
EIF2C4	NM_017629	真核生物翻译起始因子 2C, 4
FLJ21986	NM_024913	假定蛋白 LOC79974
GNS	NM_002076	葡糖胺(N-乙酰)-6-硫酸酯酶前体
HEAB	NM_006831	ATP/GTP 结合蛋白
HIC2	NM_015094	在癌症中高甲基化 2
IGF2BP1	NM_006546	胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合
LRIG3	NM_153377	富亮氨酸重复和免疫球蛋白样
LSM11	NM_173491	LSM11, U7 小核 RNA 相关
MAPK6	NM_002748	促分裂原活化激酶 6
MGAT4A	NM_012214	甘露糖基(α -1,3-)-糖蛋白
NAB1	NM_005966	NGFI-A 结合蛋白 1
PCYT1B	NM_004845	胆碱磷酸胞苷酰基转移酶 1, 胆碱, β
RAB11FIP4	NM_032932	RAB11 家族相互作用蛋白 4 (II 类)
RPS6KA3	NM_004586	核糖体蛋白 S6 激酶, 90kDa, 多肽
RRM2	NM_001034	核糖核苷酸还原酶 M2 多肽
SLC20A1	NM_005415	溶质载体家族 20 (磷酸盐
SOCS1	NM_003745	细胞因子信号转导 1 的抑制物
STK40	NM_032017	SINK-同源丝氨酸/苏氨酸激酶

STX3A	NM_004177	突触融合蛋白 3A
TRIB2	NM_021643	tribbles 同源物 2
TTLL4	NM_014640	微管蛋白酪氨酸连接酶样家族, 成员 4
TUSC2	NM_007275	肿瘤抑制物候选者 2
YOD1	NM_018566	假定蛋白 LOC55432
仅在 A549 中发生改变的表达		
AP1S1	NM_057089	衔接子相关蛋白复合物 1, σ 1
ATP2B4	NM_001001396	质膜钙 ATP 酶 4 同种型 4a
C6orf120	NM_001029863	假定蛋白 LOC387263
CD164	NM_006016	CD164 抗原, 唾液黏蛋白
DUSP16	NM_030640	双特异性磷酸酶 16
FAM96A	NM_001014812	假定蛋白 FLJ22875 同种型 b
FLJ36031	NM_175884	假定蛋白 LOC168455
FLJ90709	NM_173514	假定蛋白 LOC153129
GOLT1B	NM_016072	高尔基体运输 1 同源物 B
GTF2I	NM_001518	通用转录因子 II, i 同种型 4
HOXA1	NM_153620	同源框 A1 同种型 b
LGR4	NM_018490	富含亮氨酸重复的 G 蛋白-偶联
LPGAT1	NM_014873	溶血磷脂酰甘油酰基转移酶 1
MTPN	NM_145808	肌侵蛋白
NME4	NM_005009	核苷二磷酸激酶 4
P18SRP	NM_173829	P18SRP 蛋白
PGM2L1	NM_173582	磷酸葡萄糖变位酶 2 样 1
STARD3NL	NM_032016	MLN64 N-末端同源物
TMED5	NM_016040	跨膜 emp24 蛋白转运结构域
ZNF294	NM_015565	锌指蛋白 294

数据表明, hsa-let-7 的这些预测靶标在 hsa-let-7b 转染到 A549 或 HepG2 细胞中 72 小时内, 显示出 mRNA 表达水平发生改变。在这些实验条件下, 有 26 个预测基因靶标在两种细胞类型中发生 mRNA 水平改变, 另外 37 个预测基因靶标仅在 HepG2 细胞中发生 mRNA 水平改变, 还有另外 20 个基因靶标仅在 A549 细胞中发生 mRNA 水平改变。

实施例 4

A549 和 HEPG2 细胞中受 let-7 误调节的基因的功能鉴定

hsa-let-7 在 A549 和 HepG2 细胞中的过量表达,会导致众多与细胞分裂、细胞增殖和细胞周期相关的基因的误调节。这些基因、它们的基因产物和相关蛋白质功能的一览表在表 7 中显示。

表 7. 应答过量 hsa-let-7 的细胞周期基因、细胞分裂基因、细胞增殖基因和 DNA 合成/复制基因、基因产物和基因功能。

基因	产物	功能
在 HepG2 和 A549 中减少的基因表达		
CCNA2	细胞周期蛋白 A2	结合 CDK2 和 CDC2 以促进细胞周期 G1/S 和 G2/M 期转变;在急性髓性和前髓细胞白血病中异常表达
CDC25A	细胞分裂周期 25A, 一种酪氨酸-苏氨酸磷酸酶蛋白质	结合细胞周期蛋白和调节 G1-S 期转变, 在许多癌症中过量表达
CDC34	细胞分裂缺陷型 34	修饰 CDKN1B, 提高 CDKN1B 的泛素化和降解
ASK/DBF4	S 期激酶的激活物	结合和激活 CDC7 的激酶活性, 为 G1 向 S 转变时 DNA 复制的起始所必需
AURKA/STK6 AURKB/STK12	Aurora A 和 Aurora B 激酶	在 G2/M 期最大表达, 可在胞质分裂中起作用, 在多种肿瘤中上调
E2F5	E2F 转录因子 5	在原代啮齿动物细胞中有致癌性, 在人乳腺肿瘤中扩增
CDK8	细胞周期蛋白依赖性激酶 8	与使细胞周期蛋白 H 磷酸化的细胞周期蛋白 C 形成复合物(CCNH), 在转录的调节中和作为 RNA 聚合酶 II 全酶起作用
PLAGL1 和 PLAGL2	多形性腺瘤基因样转录因子	转录激活物, 调节细胞增殖
LIN28	异时 LIN-28 的同源物	推定的 RNA 结合蛋白
DICER1	RNA 酶 III	RNA 酶加工前体 miRNA 和 dsRNA
GMNN	李蛋白	李蛋白, 能调节 DNA 复制和增殖, 结合许可因子 CDT1 和负调节其泛素化, 在乳腺、结肠、直肠和胆道肿瘤中被上调
CHEK1	检验点同源物 1 激酶	为有丝分裂 G2 检验点应答辐射诱导的

		DNA 损伤所必需, 与肺癌有关
NRAS	Ras GTP 酶	信号转导分子, 在多种肿瘤中发生突变
仅在 HepG2 中减少的基因表达		
CDC2	细胞分裂周期 2, 一种细胞周期蛋白依赖性激酶	结合 B 型细胞周期蛋白, 调节 G2 向 M 期转变, 促进细胞增殖
CCNB1	细胞周期蛋白 B1	介导 G2-M 期转变的 CCNB1 - CDC2 促成成熟因子复合物的调节型亚单位, 在各种癌症中上调
CCNE2	细胞周期蛋白 E2	与 CDK2 和 CDK3 发生相互作用的 G1 特异性细胞周期依赖性激酶调节性亚单位, 在转化的细胞中过量表达, 在乳腺癌和肺癌中上调
CCNF	细胞周期蛋白 F	CDK 激酶调节性亚单位的细胞周期蛋白家族的一个成员, 与细胞周期蛋白 B1 (CCNB1) 和 CDC2 形成复合物
CCNJ	细胞周期蛋白 J	含有细胞周期蛋白 C-末端和 N-末端结构域的蛋白质, 具有与细胞周期蛋白 A2 (人 CCNA2) 的某区域相似性低的区域
SKP2	S 期激酶相关蛋白 2	泛素 E3 连接酶复合物的成分, 介导细胞周期调节性蛋白降解, 促进细胞增殖和入侵, 抑制细胞黏附和凋亡; 在许多癌症中过量表达
CKS1B	CDC28 蛋白激酶调节性亚单位 1B	结合 SKP2 并将其靶向其底物, 为 p21 Cip1 (CDKN1A) 和 p27 Kip1 (CDKN1B) 的泛素化所必需, 在非小细胞肺癌、胃癌和结肠癌中高度表达
CDC20	细胞分裂周期 20	激活后期促进复合物的有丝分裂磷酸化形式以及有丝分裂纺锤体检验点, 在胃癌中过量表达
CDCA1	细胞分裂周期相关 1	介导有丝分裂过程中微管与动粒的稳定连接, 在纺锤体检验点中起作用
CDAC2	细胞分裂周期相关 2	新型蛋白质
CDAC3/TOME1	细胞分裂周期相关 3/有丝分裂入口 1 的触发物	一种胞质蛋白, 在 G1 期中被降解, 其基因启动子活性在 G2/M 期时被刺激
CDCA5	细胞分裂周期相关 5	新型蛋白质

CDAC7	细胞分裂周期相关 7	一种在胸腺和小肠中高度表达的核蛋白，在贴壁依赖性生长中起作用，在伯基特淋巴瘤细胞系中上调；相应的基因可能是 MYC 靶标
CDCA8	细胞分裂周期相关 8 (borealin)	染色体过客复合体成分，可将存活蛋白 (BIRC5)和 INCENP 靶向着丝粒，为有丝分裂过程中动粒功能、有丝分裂纺锤体稳定性和中期染色体排列所必需
RRM1 和 RRM2	核糖核苷酸还原酶 M1 和 M2 多肽	DNA 合成
CDC6	编码细胞分裂周期 6 同源物	DNA 复制，在子宫颈上皮内瘤形成和子宫颈癌中上调
CDC45L	细胞分裂周期 45 样	与 ORC2L、MCM7 和 POLA2 缔合，据预测参与 DNA 复制的起始
CDT1	染色质许可因子	确保每个细胞周期出现复制一次，在非小细胞肺癌中上调
ORC1L 和 ORC6L	原点识别复合物蛋白	DNA 复制
MCM2/3/4/5 MCM6/7/8/10	微染色体维持缺陷型复合物	DNA 复制，在多种癌症中上调
RFC2/3/4/5	复制因子 C 复合物	DNA 复制
E2F6 和 E2F8	E2F 转录因子	细胞周期的调节物
BUB1 和 BUB1B	不受苯并咪唑抑制的出芽 1 同源物	在纺锤体装配检验点和染色体会聚中起作用，可调节囊泡运输；突变与肺癌、T 细胞白血病和结肠直肠癌细胞染色体不稳定性相关；有丝分裂纺锤体检验点的蛋白激酶，抑制后期促进复合物激活，结肠直肠癌的标记；突变会引起具有肿瘤的嵌合花斑非整倍性
MAD2L1	MAD2 有丝分裂阻滞缺陷样 1	BUB1B 的成分
CDC23	细胞分裂周期 23	后期促进复合物(APC)的推定成分，能促进中期向后期的转变，认为是卵巢癌中的肿瘤抗原；相应基因中的突变与结肠癌有关
FANCD2	范可尼贫血互补组 D2	参与 DNA 损伤应答

BRCA1 和 BRCA2	乳腺癌易感性基因座	肿瘤抑制物；突变与乳腺癌和卵巢癌相关
在 HepG2 和 A549 中提高的基因表达		
CCNG2	细胞周期蛋白 G2	在甲状腺乳头状癌中下调
RRM2B	核糖核苷酸还原酶 M2B	DNA 合成，被 p53 上调
仅在 HepG2 中提高的基因表达		
CDKN2B	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2B	与 D 性细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK4 和 CDK6 发生相互作用，抑制细胞增殖；基因缺失和启动子高甲基化与许多不同的肿瘤有关
MXI1	MAX 相互作用蛋白 1	转录调节物，拮抗 MYC，前列腺肿瘤中的肿瘤抑制物

这些数据表明 hsa-let-7 是细胞周期进展的关键调节物。许多 hsa-let-7 应答基因是已知的癌基因，或者在肿瘤中过量表达。很可能的是，在 hsa-let-7 缺失或者 hsa-let-7 表达减低的癌细胞中，许多这些基因会被上调，这很可能会刺激细胞周期和 DNA 合成，从而刺激细胞分裂。

虽然大多数的经改变的细胞周期基因在应用 hsa-let-7 后显示出表达减低，但在相同条件下有少数的细胞周期基因被上调，这表明了 hsa-let-7 应用的第二种或第三种作用。这些基因(表 7)包括编码 CDK 抑制剂 2B (CDKN2B)、MAX 相互作用蛋白 1 (MXI1，一种能拮抗 MYC 的转录调节物)和细胞周期蛋白 G2 (CCNG2，在甲状腺乳头状癌中被下调(Ito 等人, 2003)，这表明在肿瘤细胞中它具有充当肿瘤拮抗剂的倾向)的那些基因。在 let-7 缺陷型肿瘤细胞中，这三种基因很可能被下调，而这极有可能会使它们的肿瘤抑制功能丧失。

Hsa-let-7 的添加阻遏了多种已知的和推定的肿瘤抑制基因(表 7)的表达，这些基因例如 BRCA1、BRCA2、FANCD2、PLAGL1、E2F6、E2F8 及细胞周期检验点基因 CHEK1、BUB1、BUB1B、MAD2L1 和 CDC23。

实施例 5

HSA-LET-7 直接靶向的基因的鉴定

hsa-let-7 直接靶向的基因，在 hsa-let-7 给予细胞后 72 小时前可显示出表达发生改变。因此，本发明人分析了在如实施例 1 所述进行 hsa-let-7 转染后第 4、

8、16、24、36、48、72 和 128 小时收获的 HepG2 细胞中的基因表达。将 Affymetrix U133 加 2 GeneChips 用于时间进程研究，并用 Affymetrix MAS 5.0 算法作为标度(scaling) (数值设定至 500)和汇总方法(summarization method) (Affymetrix Statistical Algorithms Description Document Part Number 701137 Rev 3)进行处理。由于时间进程研究是非重复的(unreplicated)，因此采用在 Affymetrix GCOS 1.4 软件中执行的威氏符号秩检验(Wilcoxon Signed Rank test) (Wilcoxon, 1945)，来确定那些相对于时间 0 来说差异表达的基因。弃去那些经计算在 100%的时间点中都不存在的基因。

hsa-let-7 转染 36 小时内，167 个基因被下调，将它们称为早期受阻遏基因(表 8)。早期受阻遏基因包括上表 13 中所列的那些细胞周期基因中的多个(例如 CCNA2、CDC25A、CDK8、SKP2、AURKA/STK6)，以及另外的其表达水平早期受阻遏但到 72 小时为止就恢复到正常水平的基因(例如 CDC16、CDK6)。在 167 个早期受阻遏的基因中，有 125 个基因在 16 小时或 16 小时前开始显示被下调，32 个基因在 16-24 小时之间开始显示被下调，还有 10 个基因在 24-36 小时之间开始显示被下调。除了 E2F6 之外，还有几个转录因子，包括 ID2、CBFB、ZNF336、SMAD4、SOX9、NR1H4、ARID3A、PLAGL2、YAP1 和 GTF2I，也属早期受阻遏基因。很可能这些基因将 let-7 作用传播到它们的下游靶标。例如，MCM 和 RFC DNA 合成复合物的多个成员仅在较后的时间点受阻遏，可能是这些转录因子的靶标。

表 8. 用 hsa-let-7b 转染 HepG2 细胞后的早期受阻遏基因

基因符号	参考序列转录物 ID
转染后 16 小时内阻遏的基因	
SEPTIN	NM_018243
ACTB	NM_001101
AGPS	NM_003659
AHCYL1	NM_006621 /// NM_014121
AK3	NM_001005353 /// NM_013410 /// NM_203464
ALDH5A1	NM_001080 /// NM_170740
ANLN	NM_018685
ANP32E	NM_030920
ARHGAP18	NM_033515
ARS2	NM_015908 /// NM_182800
BRP44L	NM_016098

C20orf36	NM_018257
C20orf59	NM_022082
C3	NM_000064
C6orf96	NM_017909
C9orf64	NM_032307
CANX	NM_001746
CAT	NM_001752
CBFB	NM_001755 /// NM_022845
CDC16	NM_003903
CDK6	NM_001259
CDW92	NM_022109 /// NM_080546
CGI-48	NM_016001
CHP	NM_007236
CKAP4	NM_006825
CTSC	NM_001814 /// NM_148170
CTSH	NM_004390 /// NM_148979
CYP51A1	NM_000786
DENR	NM_003677
DKFZP586L0724	NM_015462
DLC1	NM_006094 /// NM_024767 /// NM_182643
DNCLI2	NM_006141
DSCR1	NM_004414 /// NM_203417 /// NM_203418
EIF5	NM_001969 /// NM_183004
ELOVL1	NM_016031 /// NM_022821
FARP1	NM_001001715 /// NM_005766
FBXO2	NM_012168
FLJ10826	NM_018233
FLJ21924	NM_024774
G3BP	NM_005754 /// NM_198395
GIPC2	NM_017655
GLUD1	NM_005271
GORASP2	NM_015530
GRLF1	NM_004491 /// NM_024342
GRSF1	NM_002092
GTF2I	/// NM_001518 /// NM_032999 /// NM_033000 /// NM_033001 ///
GTF2IP1	NM_033003 /// XR_000285
HERPUD1	NM_014685
HMGCS1	NM_002130
HP	NM_005143

HRB	NM_004504
ID2	NM_002166
IF	NM_000204
IFNGR1	NM_000416
ITGA6	NM_000210
ITGB1	NM_002211 /// NM_033666 /// NM_033667 /// NM_033668 /// NM_033669 /// NM_133376
KBTBD6	NM_152903
KIAA0650	---
LAMP2	NM_002294 /// NM_013995
LIPA	NM_000235
LOC145786	---
LOC163590	NM_145034
LYAR	NM_017816
LYRIC	NM_178812
MAP3K7IP2	NM_015093 /// NM_145342
MAPRE1	NM_012325
MAT2A	NM_005911
MCCC2	NM_022132
ME2	NM_002396
MGC15396	NM_052855
MGC15397	NM_080652
MGC17943	NM_152261
MGC33302	NM_152778
MINA	NM_032778 /// NM_153182
MLLT4	NM_005936
NDFIP1	NM_030571
NFIL3	NM_005384
NR1H4	NM_005123
NUDT4	NM_019094 /// NM_199040
NXT2	NM_018698
OBRGRP	NM_017526
OK/SW-cl.56 (TUBB)	NM_178014
PAPOLA	NM_032632
PCYOX1	NM_016297
PGM2	NM_018290
PIGW	NM_178517
PLOD2	NM_000935 /// NM_182943

PNN	NM_002687
PPAP2B	NM_003713 /// NM_177414
PPIF	NM_005729
PPP2R5E	NM_006246
PPP4R1	NM_005134
PRPF4	NM_004697
PS1TP4	---
QKI	NM_006775 /// NM_206853 /// NM_206854 /// NM_206855
RAB10	NM_016131
RAB14	NM_016322
RNP24	NM_006815
RRBP1	NM_004587
RRM2	NM_001034
SARA1	NM_020150
SARA2	NM_016103
SC4MOL	NM_006745
SDC2	NM_002998
SERP1	NM_014445
SLC35F5	NM_025181
SMAD4	NM_005359
SNRPB2	NM_003092 /// NM_198220
SNX5	NM_014426 /// NM_152227
SNX6	NM_021249 /// NM_152233
SOX9	NM_000346
SPR	NM_003124
SRP68	NM_014230
SRP72	NM_006947
SRPRB	NM_021203
SSR1	NM_003144
STK6	NM_003158 /// NM_003600 /// NM_198433 /// NM_198434 /// NM_198435 /// NM_198436
SYNCRIP	NM_006372
TIA1	NM_022037 /// NM_022173
TLOC1	NM_003262
TOMM70A	NM_014820
USP14	NM_005151
VAMP3	NM_004781
XPOT	NM_007235
YAP1	NM_006106

ZNF336	NM_022482
到 24 小时为止受阻遏的基因	
2'-PDE	NM_177966
ARID3A	NM_005224
C13orf23	NM_025138 /// NM_170719
C14orf46	---
C9orf41	NM_152420
CDC25A	NM_001789 /// NM_201567
CDCA7	NM_031942 /// NM_145810
CEBPA	NM_004364
CPN2	---
CSNK2A1	NM_001895 /// NM_177559 /// NM_177560
DGAT1	NM_012079
DMD	NM_000109 /// NM_004006 /// NM_004007 /// NM_004009 /// NM_004010 /// NM_004011
DZIP1	NM_014934 /// NM_198968
ERO1L	NM_014584
FLJ21986	NM_024913
IL6R	NM_000565 /// NM_181359
KLHL14	---
LOC163782	NM_181712
LOC201194	---
MAL2	NM_052886
MGC12916	---
MGC14289	NM_080660
MOV10	NM_020963
MSH6	NM_000179
PAH	NM_000277
PLAGL2	NM_002657
RAMP	NM_016448
SGKL	NM_013257 /// NM_170709
SKP2	NM_005983 /// NM_032637
SLC13A5	NM_177550
SLC5A9	---
SLCO4C1	NM_018515 /// NM_180991
转染后 36 小时内阻遏的基因	
AGXT2L1	NM_031279
CCNA2	NM_001237
E2F6	NM_001952 /// NM_198256 /// NM_198257 /// NM_198258 ///

	NM_198325 /// NM_212540
GPX7	NM_015696
GSTA1	NM_145740
MCAM	NM_006500
NAP1L1	NM_004537 /// NM_022348 /// NM_139207
OPRS1	NM_005866 /// NM_147157 /// NM_147158 /// NM_147159 /// NM_147160
Pfs2	NM_016095
SLC30A10	NM_001004433 /// NM_018713

实施例 6

具有 LET-7 互补位点的 HSA-LET-7 早期阻遏基因的鉴定

对 let-7 早期受阻遏基因和 36 小时后受阻遏的基因的 3'非翻译区(3'UTRs)进行了检测,确定在经确认的 let-7 靶标基因中是否存在显示 let-7 互补位点(LCS)的特征的序列(Johnson 等人, 2005; Reinhart 等人, 2000; Grosshans 等人, 2005; Lin 等人, 2003; Slack 等人, 2000; Vella 等人, 2004a; Vella 等人, 2004b)。结果在下表 9 中显示。

表 9. 具有 let-7 互补位点(LCS)的 Hsa-let-7 阻遏的基因

16 小时内所阻遏的基因	let-7 LCS 数目
CDK6	10
SSR1	3
RRM2	3
DLC1	3
YAP1	3
SOX9	3
STK6	3
NXT2	3
ZNF336	3
CBFB	2
DSCR1	2
FARP1	2
MAP3K7IP2	1
GTF2I /// GTF2IP1	1
24 小时内所阻遏的基因	let-7 LCS 数目

PLAGL2	9
2'-PDE	5
CDC25A	4
DZIP1	4
CDCA7	2
FLJ21986	2
ARID3A	1
DMD	1
36 小时内所阻遏的基因	let-7 LCS 数目
OPRS1	4
GPX7	3
E2F6	3
36 小时后阻遏的基因	let-7 LCS 数目
CCNF	4
CCNJ	3
CDC34	2
E2F5	2
LIN28	2

至少有 25 个早期受阻遏基因在它们的 3'UTR 中含有 LCS, 很可能代表着直接 let-7 靶标。这一组包括细胞周期调节因子 CDK6、CDC25A、AURKA/STK6、CDCA7, DNA 合成调节因子 RRM2 和转录因子 CBFB、PLAGL2、E2F6、SOX9、ZNF336、YAP1、GTF2I 和 ARID3A。另外, 其他的在它们的 3'UTR 中具有 LCS 的细胞周期基因, 在 36 小时后受到阻遏(E2F5、CDC34、CCNF、CCNJ), 这提示后期受阻遏基因也是直接 let-7 靶标。不含 LCS 的、在 let-7 添加时其表达发生改变的基因, 很可能是受 let-7 表达间接影响的下游基因, 或许作为受 let-7 直接影响的转录因子的下游靶标。

实施例 7

A549 和 HEPG2 细胞中被 HSA-LET-7 表达改变的基因途径

miRNA 可直接影响它们的靶标基因的 mRNA 水平, 在结合靶标 mRNA 而发生翻译调节后也会直接影响蛋白质水平。翻译调节导致蛋白质表达的向上或向下变化可导致下游基因产物和基因的活性和表达的变化, 进而这些基因产物

和基因的活性和表达受这些蛋白质的调节。这些调节作用表现为总 mRNA 表达谱的变化。确定了受 hsa-let-7 表达所诱导的调节级联影响的细胞途径的类型 (identity)和特性。细胞途径分析是用 Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity® Systems, Redwood City, CA)进行。表 10 中显示了在 A549 和 HepG2 细胞中 hsa-let7b 过量表达后最显著受影响的途径。

表 10. A549 和 HepG2 细胞中 hsa-let7b 过量表达后显著受影响的功能细胞途径

hsa-let-7 过量表达所改变的功能细胞途径	
A549	HepG2
氨基酸代谢	氨基酸代谢
行为	
癌症	癌症
碳水化合物代谢	碳水化合物代谢
心血管疾病	心血管疾病
心血管系统发育和功能	心血管系统发育和功能
细胞周期	细胞周期
细胞死亡	细胞死亡
细胞形态	细胞形态
细胞信号转导	细胞信号转导
细胞间信号转导和相互作用	细胞间信号转导和相互作用
细胞装配和组织	细胞装配和组织
细胞损害(Cellular Compromise)	细胞损害(Cellular Compromise)
细胞发育	细胞发育
细胞功能和维持	细胞功能和维持
细胞生长和增殖	细胞生长和增殖
细胞运动	细胞运动
细胞对治疗的反应	
结缔组织发育和功能	结缔组织发育和功能
结缔组织疾病	结缔组织疾病
皮肤疾病和病症	皮肤疾病和病症
	发育疾病
消耗系统发育和功能	消耗系统发育和功能
DNA 复制、重组和修复	DNA 复制、重组和修复
药物代谢	药物代谢
胚胎发育	胚胎发育

内分泌系统发育和功能	内分泌系统发育和功能
内分泌系统疾病	内分泌系统疾病
自由基清除	
胃肠疾病	胃肠疾病
基因表达	基因表达
遗传疾病	遗传疾病
毛发和皮肤发育和功能	毛发和皮肤发育和功能
血液疾病	血液疾病
血液系统发育和功能	血液系统发育和功能
肝系统发育和功能	肝系统发育和功能
肝系统疾病	肝系统疾病
免疫和淋巴系统发育和功能	免疫和淋巴系统发育和功能
免疫应答	免疫应答
免疫疾病	免疫疾病
	传染病
炎性疾病	炎性疾病
脂质代谢	脂质代谢
代谢疾病	代谢疾病
分子运输	分子运输
神经系统发育和功能	神经系统发育和功能
神经疾病	神经疾病
核酸代谢	核酸代谢
	眼病
器官发育	器官发育
器官形态	器官形态
生物体发育	生物体发育
生物体功能	生物体功能
生物体损伤和异常	生物体损伤和异常
生物体存活	
	翻译后修饰
	蛋白质合成
蛋白质运输	蛋白质运输
肾脏和泌尿系统疾病	肾脏和泌尿系统疾病
肾脏和泌尿系统发育和功能	肾脏和泌尿系统发育和功能
生殖系统发育和功能	生殖系统发育和功能

生殖系统疾病	生殖系统疾病
呼吸系统疾病	呼吸系统疾病
呼吸系统发育和功能	呼吸系统发育和功能
	RNA 损害和修复
	RNA 转录后修饰
骨骼和肌肉疾病	骨骼和肌肉疾病
骨骼和肌肉系统发育和功能	骨骼和肌肉系统发育和功能
小分子生物化学	小分子生物化学
组织发育	组织发育
组织形态	组织形态
肿瘤形态	肿瘤形态
病毒功能	病毒功能
	病毒感染
	视觉系统发育和功能
维生素和矿物质代谢	维生素和矿物质代谢

用来自 HepG2 细胞的基因表达数据，通过将差异表达的基因按它们的生物功能进行归类，和使用基因本体(Gene Ontology) (GO)数据库(Ashburner 等人, 2000)，进行了另外的细胞途径分析。HepG2 细胞中最显著受影响的基因本体类别，显示在表 11 (如实施例 1 所述在 hsa-let-7 过量表达 72 小时后)和在表 12 (如实施例 5 所述在 hsa-let-7 过量表达 4-108 小时后)中。鉴定了其表达水平受影响大于 2 倍、p 值低于 0.05 的 mRNA，并用基因本体类别进行了归类。P 值用超几何检验(hypergeometric test)进行计算，以确定当与阵列上呈现的所有基因相比时，基因本体类别中受影响的基因是否有显著富集。

表 11. HepG2 细胞中 hsa-let-7 过量表达 72 小时后最显著受影响的基因本体类别

GO ID	GO 说明	P 值
GO:0006260	DNA 复制	5.8E-16
GO:0000087	有丝分裂细胞周期的 M 期	6.2E-13
GO:0000278	有丝分裂细胞周期	6.4E-13
GO:0000075	细胞周期检验点	1.2E-10
GO:0051301	细胞分裂	8.1E-10
GO:0006270	DNA 复制起始	1.2E-09
GO:0007093	有丝分裂检验点	2.3E-06
GO:0007051	纺锤体组织和生物发生	3.4E-06

表 12. HepG2 细胞中 let-7 过量表达 4 小时至 108 小时后最显著受影响的基因本体类别

GO ID	GO 类别说明	被改变的基因数	类别中的基因数	GO 类别中被改变的基因百分数	P 值
GO:0000278	有丝分裂细胞周期	19	192	10	5.5E-08
GO:0051301	细胞分裂	15	135	11	3.1E-07
GO:0000279	M 期	15	165	9	3.8E-06
GO:0007088	有丝分裂的调节	6	34	18	8.9E-05
GO:0016126	甾醇生物合成	5	24	21	1.5E-04
GO:0005525	GTP 结合	16	262	6	2.0E-04
GO:0006260	DNA 复制	11	138	8	2.2E-04
GO:0051325	间期	8	76	11	2.5E-04

这些数据证明，hsa-let-7 会直接或间接影响许多细胞周期相关基因的表达，因此主要影响与细胞后期、细胞分裂和 DNA 复制有关的细胞功能途径。这些细胞过程在各种癌症的发生和进展中都具有必不可少的作用(integral role)。

实施例 8

被 HSA-LET-7 改变的基因代表着癌症治疗的治疗靶标

增殖和存活途径在肿瘤中常被改变(Hanahan 和 Weinberg, 2000)。本发明人已证实，hsa-let-7 表达直接或间接调节多个细胞增殖基因。hsa-let-7 直接调节少数关键的细胞周期原癌基因，从而控制细胞增殖途径。这些数据有力地支持 let-7 是肿瘤抑制 miRNA 的这一断言。

对 let-7 调节的基因和相关途径的综述表明，将 hsa-let-7 或抗 hsa-let-7 (抗 miR)导入到多种癌细胞类型中，可能会产生治疗反应。表 13 中显示对于各种恶性肿瘤的治疗具有预后和/或治疗价值的 Hsa-let-7 靶标。

表 13. 对于各种恶性肿瘤的治疗具有预后或治疗价值的 Hsa-let-7 靶标

基因符号	基因名称	细胞过程	癌症类型	参考文献
ATRX	ATR-X	转录	AML, 甲型地中海型贫血	(Lacayo 等人, 2004; Steensma 等人, 2005; Serrano 等人, 2006)
AURKA/	Aurora	染色体	BC, CRC, PaC,	Reiter 等人, 2006; Ulisse 等人,

STK6	激酶 A	稳定性	OC, GC, SCCHN, TC	2006; Keen and Taylor, 2004
AURKB/ STK12	Aurora 激酶 B	染色体 稳定性	PC, NSCLC, BC, CRC	Keen and Taylor, 2004; Chieffi 等人, 2006; Smith 等人, 2005
BRCA1	BRCA-1	染色体 稳定性	BC, OC	Wooster and Weber, 2003
BRCA2	BRCA-2	染色体 稳定性	BC, OC	Wooster and Weber, 2003
BUB1	BUB1	染色体 稳定性	AML, SGT, ALL, HL, L, CRC, GC	Shigcishi 等人, 2006; Grabsch 等人, 2003; Qian 等人, 2002; Ru 等人, 2002; Cahill 等人, 1998
BUB1B	BUBR1	染色体 稳定性	LC, GC	Grabsch 等人, 2003; Seike 等人, 2002
BZRP	苯并二氮 草受体, 外周型	细胞凋亡	L, BC, G, CRC, AC, PC, FS, OepC	(Hardwick 等人, 1999; Sutter 等人, 2002; Han 等人, 2003; Kletsas 等人, 2004; Furre 等人, 2005; Maaser 等人, 2005; Pretner 等人, 2006; Vlodavsky and Soustiel, 2007)
CCNA2	细胞周期 蛋白 A2	细胞周期	AML	Qian 等人, 2002
CCNB1	细胞周期 蛋白 B1	细胞周期	HCC, BC, CHN, PC, CRC, LC	Egloff 等人, 2006
CCNE2	细胞周期 蛋白 E2	细胞周期	BC, LC, OC, EC	Payton & Coats, 2002; Payton 等人, 2002
CCNG2	细胞周期 蛋白 G2	细胞周期	TC, SCCHN	Alevizos 等人, 2001; Ito 等人, 2003
CDC2	CDK1	细胞周期	NHL, CRC, SCCHN, OepC	(Wolowiec 等人, 1999; Egilmez 等人, 2001; Chang 等人, 2005a; Hansel 等人, 2005)
CDC20	细胞分裂 周期 20	细胞周期	GC	Kim 等人, 2005
CDC23	细胞分裂 周期 23	细胞周期	CRC	Wang 等人, 2003
CDC25A	细胞分裂 周期 25A	细胞周期	HCC, OepC, BC, CRC, CHN, NSCLC, OC, TC, NHL	Kristjansdottir & Rudolph, 2004
CDC6	细胞分裂 周期 6	细胞周期	PC, CeC	Murphy 等人, 2005; Robles 等人, 2002
CDCA7	JPO1/CD CA7	细胞周期	CRC, OC, LC, GC, EC, AML, CML	Osthus 等人, 2005
CDK2	CDK-2	细胞周期	OC, CRC, PC	Cipriano & Chen, 1998; Marone 等人, 1998; Yamamoto 等人, 1998

CDK6	CDK-6	细胞周期	G, GB, GBM, MB, B-cell CLL	Costello 等人, 1997; Lam 等人, 2000; Hayette 等人, 2003; Mendrzyk 等人, 2005
CDKN2B	CDK 抑制剂 2B/p15INK4B	细胞周期	PML, BldC, NHL, MM, AML	Christiansen 等人, 2003; Teofili 等人, 2003; le Frere-Belda 等人, 2001; Martinez-Delgado 等人, 2000; Ng 等人, 1997
CDT1	Cdt1	染色体稳定性	NSCLC	Karakaidos 等人, 2004
CEBPD	C/EBP δ	转录	PC	(Yang 等人, 2001)
CKS1B	Cks1	细胞周期	NSCLC, BC, CRC	Inui 等人, 2003; Slotky 等人, 2005; Shapira 等人, 2005
CSF1	CSF-1	信号转导	HCC, LC	(Budhu 等人, 2006; Uemura 等人, 2006)
EIF4E	eIF-4e	翻译	BC, CRC, NHL, NB, CHN, LXC, BldC, PC, GC	(Graff and Zimmer, 2003; Huusko 等人, 2004; Nakada 等人, 2004; Wu 等人, 2004; Jubb 等人, 2005; Guo 等人, 2006; Kokko 等人, 2006; Wu 等人, 2006; Davalos 等人, 2007)
EPHB2	EPH 受体 B2	信号转导	PC, GC, CRC, OC, G BC	(Huusko 等人, 2004; Nakada 等人, 2004; Wu 等人, 2004; Jubb 等人, 2005; Guo 等人, 2006; Kokko 等人, 2006; Wu 等人, 2006; Davalos 等人, 2007)
ERBB3	HER-3	信号转导	PC, BC, pilocytic AC, GC, CRC, OC, BldC	(Lemoine 等人, 1992; Rajkumar 等人, 1996; Leng 等人, 1997; Maurer 等人, 1998; Kobayashi 等人, 2003; Koumakpayi 等人, 2006; Xue 等人, 2006)
FASN	脂肪酸合酶	脂肪代谢	OC, BC, BldC, CeC, PC, RB, CRC	(Ye 等人, 2000; Camassei 等人, 2003; Menendez 等人, 2004; Kuhajda, 2006)
FGFBP1	FGF-BP	信号转导	SCCHN, BC, CRC, PC, PaC	(Abuharbcid 等人, 2006; Tassi 等人, 2006)
FGFR4	FGF 受体 -4	信号转导	TC, BC, OC, PaC	(Jaakkola 等人, 1993; Shah 等人, 2002; Ezzat 等人, 2005)
FH	富马酸酶	糖代谢	RCC, LM	(Eng 等人, 2003)
GMNN	孪蛋白	DNA 复制	CRC, BC, CeC	Shetty 等人, 2005; Bravou 等人, 2005; Wohlschlegel 等人, 2002
IGFBP1	IGFBP-1	信号转导	BC, CRC	(Firth and Baxter, 2002)
IL8	IL-8	信号转导	BC, CRC, PaC, NSCLC, PC,	(Akiba 等人, 2001; Sparmann and Bar-Sagi, 2004)

			HCC	
ITGA6	整联蛋白 α -6	细胞黏附	BC, CeC, HCC, LC	Wewer 等人, 1997; Aplin 等人, 1996; Begum 等人, 1995; Rabinovitz 等人, 1995; Mariani Costantini 等人, 1990
JUN	c-Jun	转录	HL, HCC	(Eferl 等人, 2003; Weiss and Bohmann, 2004)
JUNB	Jun B	转录	L, CML, HCC, TCL, HL, FS	(Bossy-Wetzel 等人, 1992; Mathas 等人, 2002; Mao 等人, 2003; Yang 等人, 2003; Passegue 等人, 2004; Chang 等人, 2005b; Liu 等人, 2006; Ott 等人, 2007)
LHFP	脂肪瘤 HMGIC 融合伴侣	转录	Li	(Petit 等人, 1999)
MCAM	MCAM	细胞黏附	M, AS, KS, LMS	McGary 等人, 2002
MET	c-Met	信号转导	SPRC, HCC, GC, SCCHN, OS, RMS, GB, BC, M, CRC, GI, PaC, PC, OC	(Boccaccio and Comoglio, 2006)
MVP	穹隆体主 蛋白	多药抗性	AML, CML, ALL, OC, BC, M, OS, NB, NSCLC	(Mossink 等人, 2003)
MXI1	Max-相互 作用蛋白 1	转录	M, PC, GB	Ariyanayagam-Baksh 等人, 2003; Prochownik 等人, 1998; Wechsler 等人, 1997
MYBL1	A-Myb	转录	BL	(Golay 等人, 1996)
MYBL2	Myb L2	转录	BC, NSCLC, PC, OC	(Tanner 等人, 2000; Bar-Shira 等人, 2002; Borczuk 等人, 2003; Ginestier 等人, 2006)
NRAS	N-Ras	信号转导	M, TC, MM, CRC, AML, BC, GC, GB	Demunter 等人, 2001; Oyama 等人, 1995; Shi 等人, 1991; Paquette, 等人, 1990; Neri et al, 1989; Gerosa 等人, 1989; Bos, 1988
P8	P8	转录	BC, TC, PaC	(Ree 等人, 1999; Su 等人, 2001; Ito 等人, 2005)
PDCD4	Pdcd-4	细胞凋亡	G, HCC, L, RCC	(Chen 等人, 2003; Jansen 等人, 2004; Zhang 等人, 2006; Gao 等人, 2007)
PLK1	Polo 样激 酶 1	染色体稳定 性	NSCLC, OrpC, OepC, GC, M, BC, OC, EC, CRC, GB, PapC, PaC, PC, HB,	(Strebhardt and Ullrich, 2006)

			NHL	
PRKCA	PKC α	信号转导	BldC, PC, EC, BC, CRC, HCC, M, GC, OC	(Weichert 等人, 2003; Jiang 等人, 2004; Lahn and Sundell, 2004; Koivunen 等人, 2006)
RASSF2	RASSF2	信号转导	GC, CRC, OC	(Akino 等人, 2005; Endoh 等人, 2005; Lambros 等人, 2005)
SIVA	CD27 结合	细胞凋亡	BC	(Chu 等人, 2005)
SKP2	SKP-2	蛋白酶体降解	PaC, OC, BC, MFS, GB, EC, NSCLC, PC	Einama 等人, 2006; Traub 等人, 2006; Sui 等人, 2006; Huang 等人, 2006; Saigusa 等人, 2005; Shibahara 等人, 2005; Kamata 等人, 2005; Takanami, 2005
SMAD4	SMAD-4	信号转导	PaC, CRC, BC, SCCHN, AML, GC, HCC, OC, SIC	Miyaki and Kuroki, 2003
TACC3	TACC3	细胞周期	OC, NSCLC	(Lauffart 等人, 2005; Jung 等人, 2006)
TFDP1	E2F 二聚化伴侣	细胞周期	M, HCC, NHL	(Halaban 等人, 2000; Wang 等人, 2001; Chan 等人, 2002; Yasui 等人, 2002)
TGFR3	TGF β 受体 III	信号转导	CeC, 高级 NHL, CRC, BC	Soufla 等人, 2005; Woszczyk 等人, 2004; Bandyopadhyay 等人, 2002; Venkatasubbarao 等人, 2000
TNFSF10	TRAIL	细胞凋亡	CRC, G LC, PC, 多发性 ML	(Fesik, 2005)
VIM	波形蛋白	黏附和迁移	HCC, M, L, BC, PC, CeC, CRC, RCC, SCCHN, AC, CLL, MT, LC	(Caselitz 等人, 1983; Stark 等人, 1984; Ben-Ze'ev and Raz, 1985; Churg, 1985; Upton 等人, 1986; Ferrari 等人, 1990; Sommers 等人, 1992; Gilles 等人, 1996; Rutka 等人, 1999; Islam 等人, 2000; Khoury 等人, 2002; Singh 等人, 2003; Hu 等人, 2004; Fesik, 2005; McInroy and Maatta, 2007; Ngan 等人, 2007)

缩写: AC, 星细胞瘤; ALL, 急性淋巴细胞性白血病; 甲型地中海贫血, 甲型地中海贫血; AML, 急性髓性白血病; AS, 血管肉瘤; BC, 乳腺癌; BL, 伯基特淋巴瘤; BldC, 膀胱癌; CeC, 子宫颈癌; CHN, 头颈癌; CLL, 慢性淋巴细胞性白血病; CML, 慢性髓母细胞性白血病; CRC, 结肠直肠癌; EC, 子宫内膜癌; FS, 纤维肉瘤; G, 神经胶质瘤; GB, 成胶质细胞瘤; GBM, 多形性成胶质细胞瘤; GC, 胃癌; GI, 胃泌素瘤; HB, 肝母细胞瘤; HCC, 肝细胞癌; HL, 霍奇金淋巴瘤; KS, 卡波济氏肉瘤; L, 白血病; LC, 肺癌; Li, 脂肪瘤; LM, 平滑肌瘤; LMS, 平滑肌肉瘤; LXC, 喉癌; M, 黑素瘤; MB, 髓母细胞瘤; MFS, 黏液纤维肉瘤; ML, 髓性白血病; MM, 多发性骨髓瘤; MT, 间皮瘤; NB, 成神经细胞瘤; NHL, 非霍奇金淋巴瘤; NSCLC, 非小细胞肺癌; OC, 卵巢癌; OecP, 食道癌; OrpC, 口咽癌; OS, 骨肉瘤; PaC, 胰腺癌; PapC,

乳头状癌; PC, 前列腺癌; PML, 前髓细胞性白血病; RB, 成视网膜细胞瘤; RCC, 肾细胞癌; RMS, 横纹肌肉瘤; SCCHN, 头颈鳞状细胞癌; SGT, 唾液腺肿瘤; SIC, 小肠癌; SPRC, 散发性乳头状肾癌; TC, 甲状腺癌; TCL, T 细胞白血病; UC, 尿路上皮癌

这些靶标是血管发生、染色体稳定性、细胞黏附、侵入、细胞周期进展、转录、DNA 复制和胞内信号转导的关键调节物。Hsa-let-7 会在不同的层面(layer)影响胞内信号转导, 和控制分泌蛋白、跨膜生长因子受体以及细胞质信号转导分子的表达。分泌蛋白有成纤维细胞生长因子结合蛋白(FGFBP1)、胰岛素生长因子结合蛋白(IGFBP1)和炎症趋化因子白细胞介素 8 (IL8)。FGFBP1 是一种以无活性形式储藏在胞外基质中的硫酸肝素蛋白聚糖上的分泌蛋白(Tassi 等人, 2001; Abuharbeid 等人, 2006)。它对 FGF-1 和 FGF-2 具有高亲和力, 作为伴侣蛋白(chaperone)起作用来调动局部储藏的 FGF。因此, FGFBP1 是 FGF 的正向调节物, 可增强 FGF 信号转导和血管发生(Tassi 等人 2001)。FGFBP1 表达是高度组织特异性的, 在大多数正常的成人组织中不存在。然而, FGFBP1 在包括乳腺、结肠和前列腺的癌症的各种类型的癌症中过量表达(Abuharbeid 等人 2006)。高的 FGFBP1 表达与肿瘤发育的早期阶段有关, 有助于肿瘤血管发生。类似地, IL-8 在各种癌症中往往被上调, 与肿瘤血管形成、转移和不良预后相关(Sparmann 等人, 2004; Rosenkilde 等人, 2004)。

hsa-let-7 调节的膜相关蛋白质有 Met (MET)、转化生长因子- β 受体 3 (TGFB3)、ERBB3 和 Ras 相关结构域家族蛋白 2 (RASSF2)。RASSF2 是一种候选肿瘤抑制物, 它在肺肿瘤细胞系中常常被下调(Vos 等人, 2003)。RASSF2 能与 K-Ras 发生相互作用, 促进细胞周期阻滞和凋亡。Met 作为肝细胞生长因子(HGF)的受体起作用, 已作为癌基因从化学转化的人细胞系分离出来(Cooper 等人, 1984; Dean 等人, 1985)。Met 激活的突变存在于散发性乳头状肾癌、儿童肝细胞癌和胃癌(Danilkovitch-Miagkova 等人, 2002)。这些体细胞突变与各种癌的侵袭性提高和广泛转移有关。在几种其他的癌症类型中, 自分泌和旁分泌机制会导致 Met 信号转导的激活。但是, 最常见的 Met 激活机制, 是出现在结肠直肠癌、肝细胞癌、胃泌素瘤以及胃、胰腺、前列腺、卵巢和乳腺的癌中的过量表达(Boccaccio 等人, 2006)。Met 过量表达与转移性肿瘤表型和不良预后相关(Birchmeier 等人, 2003)。ERBB3 (也称 HER-3)属于 EGFR 的蛋白质家族, 是禽类 v-Erb 癌蛋白的同源物(Hynes 等人, 2005)。与 EGFR 相反, ERBB3 仅当与其他 EGFR 成员如 ERBB2 复合成异型二聚体时才传输有丝分裂信号。各种癌症

类型都显示出 ERBB3 水平提高,从而显示 EGFR 途径的激活(表 13)。TGFBR-3 是推定的肿瘤抑制物,响应 TGF- β 而传输信号。TGF- β 的一般作用,是抑制多种细胞类型如上皮细胞、内皮细胞、造血细胞、神经细胞和间充质细胞的细胞生长。TGFBR-3 也称 β -聚糖,能以高亲和力结合所有三种 TGF- β 同种型。TGFBR-3 能与 TGFBR-2 发生缔合,以向下游效应分子进行信号转导(Blobe 等人, 2001)。TGFBR-3 在多种癌症类型中常被下调(Hishikawa 等人, 1999; Lin 等人, 2005)。PRKCA 是一种胞质(cytosolic)信号转导分子,属于应答受体酪氨酸激酶所诱导的信号转导而被激活的丝氨酸-苏氨酸激酶的家族。功能研究提示,PKC 在癌发生和恶性表型的维持中起到作用(Karakaidos 等人, 2004; Koivunen 等人, 2006)。PRKCA 在子宫内膜、前列腺和恶性(high grade)泌尿膀胱癌(Koivunen 等人 2006)中过量表达。PRKCA 活性与癌细胞迁移率和侵袭性的增加有关联,这种表型可通过 PRKCA 抑制来逆转(Koivunen 等人, 2004)。

hsa-let-7 调节的另一类基因和它们的相应蛋白质,在细胞周期的进展中起作用。这些蛋白质中有一些在通过 G1 期和 S 期的转变中是关键,如细胞周期蛋白 A2 和 E2 (CCNA2、CCNE2)、细胞周期蛋白依赖性激酶 2 和 6 (CDK2、CDK6)、CDK 抑制剂 CDKN2B、CDC25A 和细胞分裂周期 6 (CDC6)。其他的蛋白质是通过 G2/M 纺锤体的检验点进展和在有丝分裂过程中姊妹染色单体正确分离以维持染色体稳定性所必需的。这些蛋白质包括 Aurora 激酶 A 和 B (AURKA, 亦称 STK6; AURKB, 亦称 STK12)、乳腺癌 1 和 2 (BRCA1; BRCA2)、不受苯并咪唑抑制的出芽 1 (budding uninhibited by benzimidazoles 1) (BUB1)、不受苯并咪唑抑制的出芽 1 β (BUB1B)、polo 样激酶 1 (PLK1)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1, 亦称 CDC2)、细胞周期蛋白 B1 和细胞分裂周期 20 和 23 (CDC20、CDC23, 亦称后期促进复合物亚单位 8)。大多数这些转录物受调节的方式提示,hsa-let-7 会阻断细胞周期进程。所有这些靶标也在癌发生中具有明显的作用。例如,肿瘤抑制蛋白 BRCA1 和 BRCA2 以及促进生长的 Aurora 激酶 A 和 B,在各种实体瘤中显示其表达被去调节,所述实体瘤例如乳腺、卵巢、甲状腺、肺、前列腺和结肠直肠的癌(Chieffi 等人, 2006; Keen 等人, 2004; Smith 等人, 2005; Ulisse 等人, 2006; Wooster 等人, 2003; Turner 等人, 2004)。Aurora 激酶在药物工业中是优选的药物靶标。PLK1 (也称丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 13; STPK13),是一种调节有丝分裂纺锤体功能以保持染色体稳定性的蛋白激酶(Strebhardt 等人, 2006)。PLK1 表达在细胞周期过程中受到严格调节,在 M 期达到高峰。PLK1

本质上是致癌的, 会直接抑制 p53 的肿瘤抑制功能(Ando 等人, 2004)。PLK1 的过量表达会诱导多核表型(polynucleated phenotype)和 NIH3T3 细胞的细胞转化(Mundt 等人, 1997; Smith 等人, 1997)。同样, PLK1 在包括乳腺、结肠、肺、胃和前列腺的癌的大多数实体瘤中, 显示出表达水平提高(表 13)。PLK1 过量表达与疾病进展有关, 当它耗竭时可诱导癌细胞的凋亡(Strebhardt 等人 2006; Liu 等人, 2003)。目前, PLK1 正作为未来治疗干预用的各种小分子抑制剂的靶标试验(Strebhardt 等人 2006)。CDC6 是响应促有丝分裂信号, 通过涉及 E2F 蛋白的转录控制机制而受调节的, 是哺乳动物细胞中 DNA 复制的起始所必需的。CDC6 在各种人类癌症中过量表达, 具有内在的致癌潜力(Karakaidos 等人 2004; Gonzalez 等人, 2006; Murphy 等人, 2005; Semple 等人, 2004)。细胞周期蛋白是细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)的辅因子(Malumbres 等人, 2001)。细胞周期蛋白的表达在细胞周期过程中受到严格控制, 以调控各个 CDK 的活性。细胞周期蛋白 A2 和细胞周期蛋白 E2 在 S 期与 CDK2 发生缔合; 细胞周期蛋白 D1 是 G1 期中 CDK4/6 的主要辅因子。由于大多数的细胞周期蛋白是细胞生长的促进物, 细胞周期蛋白如细胞周期蛋白 A2、B1 或 E2 常常在各种肿瘤类型中高水平表达(Egloff 等人, 2006; Payton 等人, 2002; Payton 等人, 2002; Qian 等人, 2002)。CDK6 能与包括 D1、D2 和 D3 的 D 型细胞周期蛋白形成活性复合物。CDK2 和 CDK6 的主要功能是使成视网膜细胞瘤蛋白家族的各成员失活。CDK2 和 CDK6 在多种癌症中过量表达, 目前被作为潜在的癌症药物靶标进行研究(Malumbres 等人 2001; Cipriano 等人, 1998; Costello 等人, 1997; Hayette 等人, 2003; Lam 等人, 2000; Marone 等人, 1998; Mendrzyk 等人, 2005; Yamamoto 等人, 1998)。CDK1 (CDC2)是被称为 M 期促进因子的蛋白激酶复合物的催化型亚单位, 该因子能诱导向进入有丝分裂, 在真核生物当中是普遍存在的。CDK1 的激活需要与 B 细胞周期蛋白的结合和 CDC25 进行的去磷酸化。与其他 CDK 相似, CDK1 在各种癌症中其表达水平提高(表 13)。CDC25 蛋白磷酸酶家族, 在通过保守苏氨酸 15 和酪氨酸 15 抑制性磷酸化位点的去磷酸化来激活细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)中, 起到关键的作用。虽然 CDC25C 主要负责激活 CDK1 以克服 G2/M 检验点和使得可以进入有丝分裂, 但 CDC25A 的主要底物是 CDK2 和 CDK6, 该底物当有活性时能使得可以前进通过 G1/S 和 S 检验点内(Kristjansdottir 等人, 2004)。CDC25A 在包括乳腺、肺、直肠和大脑的癌症的人类癌症中, 常常被扩增和过量表达(Kristjansdottir 等人 2004)。其他间接控制细

胞周期进展的受 hsa-let-7 调节的分子是 SKP2 和 PDCD4 (程序性细胞死亡 4)。Skp2 是多亚单位 E3 泛素连接酶复合物的一个成分,该复合物对蛋白质打上标志以进行蛋白酶体降解。一个得到很好表征的靶标是 CDK 抑制剂 p27,它解释了 Skp2 的促细胞周期活性(Carrano 等人,1999)。Skp2 本质上是致癌的,在各种癌症类型中显示出升高的水平(Gstaiger 等人,2001;Einama 等人,2006;Kamata 等人,2005; Saigusa 等人,2005)。PDCD4 是响应正常细胞中的凋亡而被诱导的肿瘤抑制物。PDCD4 的生长抑制特性,是由 PDCD4 介导的 c-Jun 原癌蛋白的抑制、帽依赖性 mRNA 翻译的抑制和 p21Waf1/Cip1 CDK 抑制剂的激活所致(Bitomsky 等人,2004; Goke 等人,2004; Yang 等人,2003)。PDCD4 在例如神经胶质瘤、肝细胞癌、肺细胞癌和肾细胞癌的各种人类恶性肿瘤中,常常显示出表达减低或丧失(Gao 等人,2007; Jansen 等人,2004; Zhang 等人,2006)。PDCD4 的表达干扰小鼠模型中的皮肤癌发生,和抑制人结肠癌细胞的生长(Jansen 等人,2005; Yang 等人,2006)。PDCD4 的损失还与肺肿瘤进展相关(Chen 等人,2003)。

Hsa-let-7 还调节波形蛋白(VIM)和脂肪酸合酶(FASN)。波形蛋白是间充质细胞的主要中间丝蛋白,调控着在附着、迁移和细胞信号转导方面重要的蛋白质。波形蛋白通过调节整联蛋白功能而在粘附方面具有关键作用。波形蛋白在人类恶性肿瘤中往往以高水平表达,这与侵袭和低存活率相关(Caseltz 等人,1983; Churg 1985; Upton 等人,1986; Gilles 等人,1996; Islam 等人,2000; Ngan 等人,2007; Sommers 等人,1992; Singh 等人,2003)。RNA 干扰下调波形蛋白表达抑制癌细胞迁移和黏附(McInroy 等人,2007)。FASN 常称为 FAS,是人类基因组中能够从乙酰-CoA、丙二酰基-CoA 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)进行长链脂肪酸的还原性从头合成的唯一蛋白质(Kuhajda 2006)。FAS 在各种癌细胞中水平升高和有活性。由于脂肪酸合成消耗能量,FAS 表达可能赋予人类癌细胞一定的存活或生长益处。FAS 表达与患有肺癌、乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌和软组织肉瘤的患者的不良预后相关,能预示前列腺癌的复发(Kuhajda 2006)。

总之,let-7 可控制多种在疾病的发生或进展中起到关键作用的癌基因。这些靶标在人类癌症中常常被去调节。基于这一对受 hsa-let-7 调节的基因和相关途径的评述,将 hsa-let-7 或抑制性的抗 hsa-let-7 (抗 miR)导入到多种癌细胞类型中,很可能会产生治疗反应。

实施例 10

递送合成的 HSA-LET-7 能抑制肺癌细胞的增殖

本发明人之前证明, hsa-let-7 参与到多种细胞活性的调节, 这些细胞活性代表着癌症疗法和其他疾病和病患的疗法的干预点(2005 年 5 月 31 日提交的美国专利申请系列号 11/141,707 和 2005 年 11 月 14 日提交的系列号 11/273,640)。例如, 视细胞类型而定, hsa-let-7 的过量表达可增加或降低某些正常细胞系或癌性细胞系的增殖和/或活力, 且 let-7 在细胞中的过量表达还可诱导细胞周期特定阶段的显著的转变或背离。

有效治疗方案的开发, 需要能证明治疗剂在各种癌症模型和代表同一疾病的多个癌细胞系中的功效和效用的证据。本发明人通过用六个非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系测量细胞增殖, 评估了 hsa-let-7 对肺癌的治疗作用, 这六个细胞系包括源自肺腺癌的细胞(A549、H838、Calu-3、HCC2935)、源自肺鳞状细胞癌的细胞(H226)和源自肺腺鳞状细胞癌的细胞(H596)。本发明人还测量了源自肺大细胞癌的细胞(H460)的增殖。各癌细胞系是获自美国模式培养物保藏所(ATCC, Manassas, VA, USA)。合成的 hsa-let-7b、hsa-let-7c 或 hsa-let-7g (前体 miR™-hsa-let-7, Ambion 目录号 AM17100)或者阴性对照(NC) miRNA (前体 miR™微小 RNA 前体分子-阴性对照#2; Ambion 目录号 AM17111), 通过基于脂质的转染递送到 A549、H838、Calu-3、HCC293 和 H460 细胞中, 和通过电穿孔递送到 H226 细胞中。基于脂质的反转染是按照公布的方案(Ovcharenko 等人, 2005)和以下参数一式三份进行: 5000-12000 个细胞/96 孔; 在 20 μ l OptiMEM (Invitrogen)中的 0.1-0.2 μ l 脂质转染胺™ 2000 (目录号 11668-019, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA); 100 μ l 的 30 nM 终浓度的 miRNA。转染后 72 小时收获 A549、H838、H460、H596 和 HCC2935 细胞, 以评估细胞增殖; Calu-3 细胞在转染后 10 天分析。增殖测定是用 Alamar Blue (Invitrogen)按照生产商说明书进行。使用抗驱动蛋白 11 (也称 Eg5)这个动力蛋白的 siRNA, 作为细胞增殖抑制的对照。Eg5 对于大多数真核细胞的细胞存活是必需的, 缺乏它的话会导致细胞增殖降低和细胞死亡(Weil 等人, 2002)。siEg5 按应用于 miRNA 的相同实验参数用于基于脂质的转染中。本发明人还使用了终浓度为 10 μ M 和 50 μ M 的拓扑异构酶 II 抑制剂依托泊苷, 作为 miRNA 的效价的内标。依托泊苷是经 FDA 批准的用于治疗肺癌的拓扑异构酶 II 抑制剂。已报道了各种肺癌细胞的 IC50 值, 对于 SCLC 和 NSCLC 细胞, 其范围在<1-25 μ M 之间(Ohsaki 等人, 1992; Tsai 等

人, 1993)。将得自 Alamar Blue 测定的增殖百分数值(%)用从阴性对照 miRNA (NC)处理的细胞得到的数值归一化。hsa-let-7 处理的细胞相对于阴性对照 miRNA 处理的细胞(100%)的增殖百分数显示在下表 14 和图 1 中。

hsa-let-7b、hsa-let-7c 或 hsa-let7-g 的递送能抑制肺癌细胞 A549、H838、Calu-3、HCC2935、H596 和 H460 的细胞增殖(表 14 和图 1)。三个 let-7 成员即 hsa-let-7b、hsa-let-7c 和 hsa-let-7g 的抑制活性在所有受试的细胞系中相似, 这提示这些 miRNA 的作用是冗余的。平均来说, hsa-let-7 能抑制细胞增殖达 26%(表 14 和图 1)。Hsa-let-7b、hsa-let-7c 和 hsa-let-7g 在 H460 细胞中具有最大抑制活性, 分别降低增殖达 68%、37%和 43%。hsa-let-7 的生长抑制活性与浓度 $>10\text{ }\mu\text{M}$ 的依托泊苷的生长抑制活性相当。由于 hsa-let-7 在所有受试的肺癌细胞中能诱导治疗反应, hsa-let-7 可对患有肺癌和其他恶性肿瘤的患者提供治疗益处。

本发明人通过将 hsa-let-7b 或阴性对照 miRNA, 以 0 pM-3000 pM 的递增浓度给予 H460 细胞, 测定了 hsa-let-7 的灵敏性和特异性(表 15 和图 2)。miRNA 的递送和细胞增殖的评估是如上所述进行。将得自 Alamar Blue 测定的增殖数值用从模拟品转染的细胞获得的数值(0 pM = 100%增殖)归一化。阴性对照 miRNA (NC)数量的增加对 H460 细胞的细胞增殖没有影响(表 15 和图 2)。相反, hsa-let-7b 的生长抑制表型是剂量依赖性的, 与 hsa-let-7b 数量的增加相关(表 15 和图 2)。Hsa-let-7b 在低至 300 pM 的浓度下也能诱导特异性的治疗反应。

表 14. hsa-let-7、Eg5 特异性 siRNA (siEg5)、依托泊苷或阴性对照 miRNA (NC)处理的肺癌细胞系的增殖百分数(%)。各数值对从阴性对照 miRNA 转染的细胞获得的数值(100%增殖)归一化。NC, 阴性对照 miRNA; siEg5, Eg5 特异性的 siRNA; %SD, 标准偏差; n.d., 未检测。

细胞	hsa-let-7b		hsa-let-7c		hsa-let-7-g		siEg5		依托泊苷 (10 μM)		依托泊苷 (50 μM)		NC (30 nM)	
	%增殖	%SD	%增殖	%SD	%增殖	%SD	%增殖	%SD	%增殖	%SD	%增殖	%SD	%增殖	%SD
A549	69.05	10.53	72.31	11.31	86.00	7.93	37.84	1.06	49.13	2.55	42.18	3.57	100.00	19.53
H460	31.74	1.44	62.75	8.68	57.27	3.92	27.97	0.33	32.13	1.14	27.82	0.58	100.00	2.52
H838	82.75	7.49	88.00	7.21	84.87	6.57	69.14	4.15	89.71	6.17	36.97	0.62	100.00	7.74
H596	86.16	5.56	81.09	0.85	77.41	0.91	83.48	2.82	88.75	1.11	73.39	2.67	100.00	1.89
Calu-3	71.34	4.42	76.03	4.17	78.47	3.78	34.59	1.33	20.81	0.19	13.53	0.64	100.00	5.54
HCC2935	79.79	1.58	77.22	3.91	70.37	3.41	63.61	6.12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	100.00	13.92

表 15. hsa-let-7b 对 H460 肺癌细胞系的细胞增殖的剂量依赖性抑制。各数值对从模拟品转染的细胞获得的数值(0 pM miRNA)归一化。NC, 阴性对照 miRNA; %SD, 标准偏差。

浓度 [pM]	miRNA			
	hsa-let7-b		NC	
	%增殖	%SD	%增殖	%SD
0	100.00	8.84	100.00	8.84
3	108.28	0.92	107.60	0.79
30	101.96	1.14	108.04	1.46
300	74.14	1.32	106.99	4.74
3000	27.76	1.54	91.41	2.14

为评估在长时间里的 hsa-let-7 的抑制表型, 本发明人用 H226 细胞进行了在 hsa-let-7 存在下长达 21 天的生长曲线实验。由于裸干扰 RNA 如合成的 miRNA 的体外转染在本质上是短暂的, 且因不断进行的细胞分裂过程中寡核苷酸的稀释而受到削弱, 因此在多个时间点通过电穿孔给予 hsa-let-7b (Bartlett 等人, 2006, Bartlett 等人, 2007)。用 1.6 μ M 合成的 hsa-let-7b (前体 miR™-hsa-let-7b, Ambion 目录号 AM17100)或阴性对照 miRNA (前体 miR™微小 RNA 前体分子阴性对照#2; Ambion 目录号 AM17111), 使用 Gene Pulser Xcell™ 电穿孔系统 (BioRad Laboratories, Inc.; Hercules, CA, USA) (第 0 天)和以下设置对相等数量的 H226 细胞进行电穿孔: 200 μ l OptiMEM (Invitrogen) (1.6 μ M miRNA)中, 5 μ g hsa-let-7b, $>0-20 \times 10^6$ 个细胞, 250 V 单方波脉冲 5 ms。将经电穿孔的细胞(10^6) 在常规生长培养基中接种和繁殖。在第 6、10 和 17 天, 重复收集、计数和用 1.6 μ M hsa-let-7b 或阴性对照 miRNA 电穿孔细胞。在第 6 天电穿孔后, 所有细胞都再接种到培养皿上。在第 10 天和第 17 天, 将实际细胞计数的 50% (用 hsa-let-7b 处理的细胞)或 25% (阴性对照 miRNA 处理的细胞)进行电穿孔并繁殖, 以提供指数细胞生长。将这些电穿孔事件的细胞计数外推并绘制在线性刻度上。

如图 3 所示, 在 21 天时间里, 以 4-7 天时间间隔给予细胞四个等剂量的合成 hsa-let-7b miRNA, 相对于接受阴性对照 miRNA 的细胞, 导致了 H226 细胞生长的大约 85%抑制。数据提示, 多次给予 hsa-let-7b 能增强 let-7 miRNA 的治

疗作用，并支持之前的数据，这表明了 hsa-let-7 miRNA 的治疗潜力。

实施例 11

HSA-LET-7 与特异性人微小 RNA 组合能协同抑制肺癌细胞系的增殖

miRNA 在多个控制多种细胞过程的途径中起作用。癌细胞常常在几个不同的途径中显示异常，这决定着它们的致癌特性。因此，将多个 miRNA 给予癌症患者，可产生出优于给予单个 miRNA 的治疗益处。本发明人将 hsa-let-7b、hsa-let-7c 或 hsa-let-7g 与 hsa-miR-34a、hsa-miR-124a、hsa-miR-126 或 hsa-miR-147 (前体 miR™ miRNA, Ambion 目录号 AM17100)同时给予，评估了这些成对 miRNA 组合的功效。H460 肺癌细胞一式三份用终浓度为 300 pM 的每个 miRNA 进行短暂反转染，导致产生了 600 pM 的总寡核苷酸。对于阴性对照，使用了 600 pM 的前体 miR™微小 RNA 前体分子阴性对照#2 (Ambion 目录号 AM17111)。为将各个组合的作用与单独的 miRNA 的作用关联起来，还将 300 pM 的每个 miRNA 与 300 pM 阴性对照 miRNA 进行组合。反转染使用以下参数：7,000 个细胞/96 孔，20 μ l OptiMEM (Invitrogen)中 0.15 μ l 脂质转染胺™ 2000 (Invitrogen)，100 μ l 总转染体积。作为 miRNA 的效价的内对照，在转染后 24 小时，将依托泊苷以 10 μ M 和 50 μ M 加到模拟品转染的细胞保持 48 小时。在转染后 72 小时收获细胞，进行 Alamar Blue 测定(Invitrogen)。将得自 Alamar Blue 测定的增殖百分数值，对从用 600 pM 阴性对照 miRNA 处理的细胞获得的增殖百分数值归一化。数据以相对于阴性对照 miRNA 处理的细胞的增殖百分数(%增殖)表示(表 16)。

300 pM hsa-let-7 的转染能减少 H460 的增殖达 30.57% (表 16 和图 4)。成对组合(例如 hsa-let-7 加 hsa-let-7g)的加和活性，定义为大于每个 miRNA 的单独活性的活性(例如，hsa-let-7b 加 hsa-miR-126 的活性大于 hsa-let-7b 加 NC 所观察到的活性，且 hsa-let-7b 加 hsa-miR-126 的活性大于 hsa-miR-126 加 NC 所观察到的活性)。成对组合的协同活性，定义为大于每个 miRNA 的单独活性之和的活性(例如，hsa-let-7b 加 hsa-miR-34a 的活性大于所观察到的 hsa-let-7b 加 NC 的活性与 hsa-miR-34a 加 NC 的活性的之和)。数据表明，hsa-let-7c 或 hsa-let-7g 与 hsa-miR-34a、hsa-miR-124a、hsa-miR-126、hsa-miR-147 或 hsa-let-7b 进行组合，能导致协同活性(表 16 和图 4)。因此，将 hsa-let-7 与其他 miRNA 的组合给予癌症患者，可在肺癌的治疗中引起较佳的治疗反应。miRNA 的组合使用代表着癌

症和其他疾病的潜在有用的疗法。

表 16. H460 肺癌细胞在成对的 hsa-let-7 miRNA 组合存在下的细胞增殖。各数值对从用 600 pM 阴性对照(NC) miRNA 转染的细胞获得的数值归一化。SD, 标准偏差; S, 协同作用; A, 加和作用。

miRNA [300 pM] + miRNA [300 pM]	%增殖	% SD	作用
NC + NC	100.00	1.45	
NC + miR-34a	99.58	1.66	
NC + miR-124a	69.43	1.38	
NC + miR-126	89.46	2.27	
NC + miR-147	76.97	1.46	
NC + let-7b	74.92	3.38	
NC + let-7c	86.74	2.28	
NC + let-7g	91.41	3.26	
miR-34a + let-7b	64.85	3.50	S
miR-34a + let-7c	76.41	3.81	S
miR-34a + let-7g	73.83	2.85	S
miR-124a + let-7b	39.77	7.61	S
miR-124a + let-7c	37.35	3.08	S
miR-124a + let-7g	35.15	0.84	S
miR-126 + let-7b	68.76	5.89	A
miR-126 + let-7c	57.03	5.15	S
miR-126 + let-7g	61.89	3.27	S
miR-147 + let-7b	56.55	3.85	A
miR-147 + let-7c	60.74	0.60	S
miR-147 + let-7g	56.19	2.95	S
let-7b + let-7c	48.07	3.75	S
let-7b + let-7g	43.19	1.71	S
let-7c + let-7g	59.85	6.70	S
依托泊苷(10 μ M)	20.19	1.89	
依托泊苷(50 μ M)	14.94	0.31	

实施例 12

递送合成的 HSA-LET-7 能抑制小鼠中肺癌细胞的肿瘤生长

本发明人评估了 hsa-let-7b 在生长于免疫缺陷小鼠的人肺癌异种移植物中的生长抑制活性。Hsa-let-7b 通过电穿孔递送到 A549 肺癌细胞中,使用的是 Gene Pulser Xcell™ (BioRad), 设置如下: 200 μ l OptiMEM 中, 5 μ g miRNA, 15×10^6 个细胞, 150 V 单方波脉冲 10 ms。作为阴性对照, A549 细胞如上所述用阴性对照(NC) miRNA (前体 miR™微小 RNA 前体分子阴性对照#2; Ambion 目录号 AM17111)进行电穿孔。为评估 hsa-let-7b 的抗癌活性,给一组 4 只动物注射 A459。将经电穿孔的细胞(5×10^6)与 BD Matrigel™, (BD Biosciences; San Jose, CA, USA; 目录号 356237)以 1:1 比例混合,皮下注射到 NOD/SCID 小鼠(Charles River Laboratories, Inc.; Wilmington, MA, USA)的胁腹(第 0 天)。将 NC miRNA 处理的细胞注射到同一动物对面胁腹,以监控动物间变异性。一旦肿瘤达到可测量的大小(第 12 天),每天或每隔一天测定肿瘤的长度和宽度达 18 天。肿瘤体积用公式: 体积 = 长度 x 宽度 x 宽度 / 2 计算, 其中长度大于宽度。将得自 NC 处理细胞和 hsa-let-7b 处理细胞的肿瘤体积取平均值并对时间作图(图 5)。p 值<0.05 (表示统计学显著性)的数据点用星号表示(第 12-19 天)。

将 hsa-let-7b 给予到 A549 肺癌异种移植物中,抑制了体内肿瘤生长(图 5)。接受阴性对照 miRNA 的癌细胞,比 hsa-let-7b 处理的细胞更快地发展肿瘤。将 hsa-let-7b 给予到 A549 细胞中抑制和延迟了肿瘤生长的起始。

这些数据提示, hsa-let-7 代表着肺癌和潜在的其他疾病的治疗中特别有用的候选者。

参考文献

以下参考文献,对本文所述的内容提供了示例性的程序细节或其他细节性地补充,它们通过引用并入本文。

美国专利 4,337,063
美国专利 4,404,289
美国专利 4,405,711
美国专利 4,659,774
美国专利 4,659,774
美国专利 4,682,195
美国专利 4,683,202
美国专利 4,704,362
美国专利 4,816,571
美国专利 4,816,571
美国专利 4,959,463
美国专利 4,959,463
美国专利 5,141,813
美国专利 5,143,854
美国专利 5,202,231
美国专利 5,214,136
美国专利 5,221,619
美国专利 5,223,618
美国专利 5,242,974
美国专利 5,264,566
美国专利 5,268,486
美国专利 5,288,644
美国专利 5,324,633
美国专利 5,378,825
美国专利 5,384,261
美国专利 5,405,783
美国专利 5,412,087
美国专利 5,424,186
美国专利 5,428,148
美国专利 5,429,807
美国专利 5,432,049
美国专利 5,436,327
美国专利 5,445,934
美国专利 5,446,137
美国专利 5,466,786

美国专利 5,468,613
美国专利 5,470,710
美国专利 5,470,967
美国专利 5,472,672
美国专利 5,480,980
美国专利 5,492,806
美国专利 5,503,980
美国专利 5,510,270
美国专利 5,525,464
美国专利 5,527,681
美国专利 5,529,756
美国专利 5,532,128
美国专利 5,545,531
美国专利 5,547,839
美国专利 5,554,501
美国专利 5,554,744
美国专利 5,556,752
美国专利 5,561,071
美国专利 5,571,639
美国专利 5,574,146
美国专利 5,580,726
美国专利 5,580,732
美国专利 5,583,013
美国专利 5,593,839
美国专利 5,599,672
美国专利 5,599,695
美国专利 5,602,240
美国专利 5,602,244
美国专利 5,610,289
美国专利 5,610,287
美国专利 5,614,617
美国专利 5,623,070
美国专利 5,624,711
美国专利 5,631,134
美国专利 5,637,683
美国专利 5,639,603

美国专利 5,645,897
美国专利 5,652,099
美国专利 5,654,413
美国专利 5,658,734
美国专利 5,661,028
美国专利 5,665,547
美国专利 5,667,972
美国专利 5,670,663
美国专利 5,672,697
美国专利 5,677,195
美国专利 5,681,947
美国专利 5,695,940
美国专利 5,700,637
美国专利 5,700,922
美国专利 5,705,629
美国专利 5,708,153
美国专利 5,708,154
美国专利 5,714,606
美国专利 5,728,525
美国专利 5,728,525
美国专利 5,744,305
美国专利 5,763,167
美国专利 5,770,358
美国专利 5,777,092
美国专利 5,789,162
美国专利 5,792,847
美国专利 5,800,992
美国专利 5,807,522
美国专利 5,830,645
美国专利 5,837,196
美国专利 5,847,219
美国专利 5,856,174
美国专利 5,858,988
美国专利 5,859,221
美国专利 5,871,928
美国专利 5,872,232

美国专利 5,876,932
美国专利 5,886,165
美国专利 5,919,626
美国专利 5,922,591
美国专利 6,004,755
美国专利 6,040,193
美国专利 6,087,102
美国专利 6,251,666
美国专利 6,368,799
美国专利 6,383,749
美国专利 6,617,112
美国专利 6,638,717
美国专利 6,720,138
美国专利 6,723,509
美国专利系列号 09/545,207
美国专利系列号 10/667,126
美国专利系列号 11/141,707
美国临时申请 60/575,743
美国临时申请 60/649,584
美国临时申请 *Methods and Compositions Involving miRNA and miRNA Inhibitor Molecules*, 2005

EP 266,032
EP 373 203
EP 785 280
EP 799 897
PCT 申请 WO 0168255
PCT 申请 WO 03020898
PCT 申请 WO 03022421
PCT 申请 WO 03023058
PCT 申请 WO 03029485
PCT 申请 WO 03040410
PCT 申请 WO 03053586
PCT 申请 WO 03066906
PCT 申请 WO 03067217
PCT 申请 WO 03076928
PCT 申请 WO 03087297

PCT 申请 WO 03091426
PCT 申请 WO 03093810
PCT 申请 WO 03100448A1
PCT 申请 WO 04020085
PCT 申请 WO 04027093
PCT 申请 WO 09923256
PCT 申请 WO 09936760
PCT 申请 WO 93/17126
PCT 申请 WO 95/11995
PCT 申请 WO 95/21265
PCT 申请 WO 95/21944
PCT 申请 WO 95/35505
PCT 申请 WO 96/31622
PCT 申请 WO 97/10365
PCT 申请 WO 97/27317
PCT 申请 WO 9743450
PCT 申请 WO 99/35505
PCT 申请 WO0138580
PCT 申请 WO03100012
英国专利 1,529,202
英国专利 8 803 000

Abuharbeid 等人, *Int J Biochem Cell Biol*, 38(9):1463-1468, 2006.
Akiba 等人, *Int J Oncol*, 18(2):257-264, 2001.
Akino 等人, *Gastroenterology*, 129(1):156-169, 2005.
Alevizos 等人, *Oncogene*, 20(43):6196-6204, 2001.
Ambros, *Cell*, 107(7):823-826, 2001.
Anastasi 等人, *Oncogene*, 24(28):4540-4548, 2005.
Aplin 等人, *Br J Cancer*, 74(2):240-245, 1996.
Ariyanayagam-Baksh 等人, *Mod Pathol*, 16(10):992-995, 2003.
Ashburner 等人, *Nat Genet*, 25(1):25-29, 2000.
Bagga 等人, *Cell*, 122(4):553-563, 2005.
Bandyopadhyay 等人, *Oncogene*, 21(22):3541-3551, 2002.
Bar-Shira 等人, *Cancer Res*, 62(23):6803-6807, 2002.
Barton 等人, *Clin Cancer Res*, 3(9):1579-1586, 1997.

- Baumforth 等人, *Blood*, 106(6):2138-2146, 2005.
- Begum 等人, *Hepatology*, 22(5):1447-1455, 1995.
- Ben-Ze'ev and Raz, *Cancer Res*, 45(6):2632-2641, 1985.
- Boccaccio and Comoglio, *Nat Rev Cancer*, 6(8):637-645, 2006.
- Bodner-Adler 等人, *Anticancer Res*, 21(1B):809-812, 2001.
- Borczuk 等人, *Am J Pathol*, 163(5):1949-1960, 2003.
- Bos, *Mutat Res*, 195(3):255-271, 1988.
- Bossy-Wetzel 等人, *Genes Dev*, 6(12A):2340-2351, 1992.
- Bravou 等人, *Int J Oncol*, 27(6):1511-1518, 2005.
- Brennecke 等人, *Cell*, 113(1):25-36, 2003.
- Budhu 等人, *Cancer Cell*, 10(2):99-111, 2006.
- Byrd 等人, *Blood*, 100:4325-4336, 2002.
- Cahill 等人, *Nature*, 392(6673):300-303, 1998.
- Calin 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(24):15524-15529, 2002.
- Camassei 等人, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(6):2399-2403, 2003.
- Carrington and Ambros, *Science*, 301(5631):336-338, 2003.
- Caselitz 等人, *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 400(1):43-51, 1983.
- Chan 等人, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 10(4):322-326, 2002.
- Chang 等人, *Int J Cancer*, 114(6):942-949, 2005a.
- Chang 等人, *Oncol Rep*, 13(3):433-438, 2005b.
- Chen 等人, *J Pathol*, 200(5):640-646, 2003.
- Chieffi 等人, *Prostate*, 66(3):326-333, 2006.
- Christiansen 等人, *Leukemia*, 17(9):1813-1819, 2003.
- Chu 等人, *Cancer Res*, 65(12):5301-5309, 2005.
- Churg, *Am J Surg Pathol*, 9(5):360-365, 1985.
- Cipriano and Chen, *Oncogene*, 17(12):1549-1556, 1998.
- Costello 等人, *Cancer Res*, 57(7):1250-1254, 1997.
- Cummins 等人, In: *IRT: Nucleosides and nucleosides*, La Jolla CA, 72, 1996.
- Davalos 等人, *Oncogene*, 26(2):308-311, 2007.
- Demunter 等人, *Cancer Res*, 61(12):4916-4922, 2001.
- Denli 等人, *Trends Biochem. Sci.*, 28:196, 2003.
- Didenko, *Biotechniques*, 31(5):1106-1116, 1118, 1120-1121, 2001.
- Eferl 等人, *Cell*, 112(2):181-192, 2003.
- Egilmez 等人, *J Exp Clin Cancer Res*, 20(4):549-552, 2001.
- Egloff 等人, *Cancer Res*, 66(1):6-9, 2006.
- Einama 等人, *Pancreas*, 32(4):376-381, 2006.

- Emptage 等人, *Neuron*, 29(1):197-208, 2001.
- Endoh 等人, *Br J Cancer*, 93(12):1395-1399, 2005.
- Eng 等人, *Nat Rev Cancer*, 3(3):193-202, 2003.
- Esquela-Kerscher and Slack, *Nat Rev Cancer*, 6(4):259-269, 2006.
- Ezzat 等人, *Clin Cancer Res*, 11(3):1336-1341, 2005.
- Ferby 等人, *Nat Med*, 12(5):568-573, 2006.
- Ferrari 等人, *Cancer Res*, 50(7):1988-1991, 1990.
- Fesik, *Nat Rev Cancer*, 5(11):876-885, 2005.
- Firth and Baxter, *Endocr Rev*, 23(6):824-854, 2002.
- Fodor 等人, *Science*, 251:767-777, 1991.
- Froehler 等人, *Nucleic Acids Res.*, 14(13):5399-5407, 1986.
- Furre 等人, *Cancer Res*, 65(23):11051-11060, 2005.
- Gao 等人, *Oncol Rep*, 17(1):123-128, 2007.
- Gerosa 等人, *J Natl Cancer Inst*, 81(1):63-67, 1989.
- Gilles 等人, *J Pathol*, 180(2):175-180, 1996.
- Ginestier 等人, *Clin Cancer Res*, 12(15):4533-4544, 2006.
- Golay 等人, *Blood*, 87(5):1900-1911, 1996.
- Goldstone 等人, *Blood*, 98(5):1302-11, 2001.
- Gonzalez Guerrico 等人, *Oncogene*, 24(14):2307-2316, 2005.
- Grabsch 等人, *J Pathol*, 200(1):16-22, 2003.
- Graff and Zimmer, *Clin Exp Metastasis*, 20(3):265-273, 2003.
- Griffey 等人, *J. Mass Spectrom*, 32(3):305-13, 1997.
- Grimwade, *Best.Pract.Res.Clin.Haematol.*, 14:497-529, 2001.
- Grosshans 等人, *Dev Cell*, 8(3):321-330, 2005.
- Guo 等人, *Carcinogenesis*, 27(3):454-464, 2006.
- Halaban 等人, *J Exp Med*, 191(6):1005-1016, 2000.
- Han 等人, *J Recept Signal Transduct Res*, 23(2-3):225-238, 2003.
- Hanahan and Weinberg, *Cell* 100(1):57-70, 2000.
- Hansel 等人, *Am J Surg Pathol*, 29(3):390-399, 2005.
- Hardwick 等人, *Cancer Res*, 59(4):831-842, 1999.
- Hartmann 等人, *Cancer Res*, 59(7):1578-1583, 1999.
- Hayette 等人, *Blood*, 102(4):1549-1550, 2003.
- He 等人, *Nature*, 435(7043):828-833, 2005.
- He 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(52):19075-19080, 2005.
- Hiddemann 等人, *J. Clin. Oncol.* 17(11): 3569-76, 1999.
- Hu 等人, *Oncogene*, 23(1):298-302, 2004.

- Huang 等人, *Clin Cancer Res*, 12(2):487-498, 2006.
- Huusko 等人, *Nat Genet*, 36(9):979-983, 2004.
- Inui 等人, *Biochem Biophys Res Commun*, 303(3):978-984, 2003.
- Islam 等人, *J Cell Biochem*, 78(1):141-150, 2000.
- Itakura and Riggs, *Science*, 209:1401-1405, 1980.
- Ito 等人, *Anticancer Res*, 23(3B):2335-2338, 2003.
- Ito 等人, *Anticancer Res*, 25(5):3419-3423, 2005.
- Jaakkola 等人, *Int J Cancer*, 54(3):378-382, 1993.
- Jansen 等人, *Mol Cancer Ther*, 3(2):103-110, 2004.
- Jiang 等人, *Cancer Res*, 64(16):5787-5794, 2004.
- Johnson 等人, *Cell*, 120:635-647, 2005.
- Jubb 等人, *Clin Cancer Res*, 11(14):5181-5187, 2005.
- Jung 等人, *Pathol Int*, 56(9):503-509, 2006.
- Kamata 等人, *J Cancer Res Clin Oncol*, 131(9):591-596, 2005.
- Karakaidos 等人, *Am J Pathol*, 165(4):1351-1365, 2004.
- Kawagoe 等人, *Cancer Res*, 57(12):2516-2521, 1997.
- Keen and Taylor, *Nat Rev Cancer*, 4(12):927-936, 2004.
- Khoury 等人, *Ann Diagn Pathol*, 6(3):154-158, 2002.
- Killion 等人, *BMC. Bioinformatics*, 4:32, 2003.
- Kim 等人, *Clin Cancer Res*, 11(2 Pt 1):473-482, 2005.
- Kishi 等人, *J Biol Chem*, 281(25):17492-17500, 2006.
- Kletsas 等人, *Biochem Pharmacol*, 67(10):1927-1932, 2004.
- Klostermeier and Millar, *Biopolymers*, 61(3):159-79, 2001-2002.
- Kobayashi 等人, *Oncogene*, 22(9):1294-1301, 2003.
- Koivunen 等人, *Cancer Lett*, 235(1):1-10, 2006.
- Kokko 等人, *BMC Cancer*, 6:145, 2006.
- Kornberg and Baker, In: *DNA Replication*, 2d Ed., Freeman, San Francisco, 1992.
- Koumakpayi 等人, *Clin Cancer Res*, 12(9):2730-2737, 2006.
- Kristjansdottir and Rudolph, *Chem Biol*, 11(8):1043-1051, 2004.
- Kuhajda, *Cancer Res*, 66(12):5977-5980, 2006.
- Lacayo 等人, *Blood*, 104(9):2646-2654, 2004.
- Lagos-Quintana 等人, *Science*, 294(5543):853-858, 2001.
- Lahn and Sundell, *Melanoma Res*, 14(2):85-89, 2004.
- Lam 等人, *Br J Neurosurg*, 14(1):28-32, 2000.
- Lambros 等人, *J Pathol*, 205(1):29-40, 2005.
- Lau 等人, *Science*, 294(5543):858-862, 2001.

- Lauffart 等人, *BMC Womens Health*, 5:8, 2005.
- Le Frere-Belda 等人, *Br J Cancer*, 85(10):1515-1521, 2001.
- Lee and Ambros, *Science*, 294(5543):862-864, 2001.
- Lemoine 等人, *Br J Cancer*, 66(6):1116-1121, 1992.
- Leng 等人, *Chin Med Sci J*, 12(2):67-70, 1997.
- Lim 等人, *Nature*, 433(7027):769-773, 2005.
- Lin 等人, *Dev Cell*, 4(5):639-650, 2003.
- Liu 等人, *Int J Hematol*, 84(5):425-431, 2006.
- Livak and Schmittgen, *Methods*, 25:402-408, 2001.
- Lu 等人, *Nature*, 435(7043):834-838, 2005.
- Maaser 等人, *Clin Cancer Res*, 11(5):1751-1756, 2005.
- Malumbres and Barbacid, *Nat Rev Cancer*, 1(3):222-231, 2001.
- Mao 等人, *Blood*, 101(4):1513-1519, 2003.
- Marcucci 等人, *J.Clin.Oncol.*, 23:5705-5717, 2005.
- Mariani Costantini 等人, *Cancer Res*, 50(18):6107-6112, 1990.
- Marone 等人, *Int J Cancer*, 75(1):34-39, 1998.
- Martinez-Delgado 等人, *Br J Haematol*, 109(1):97-103, 2000.
- Mathas 等人, *Embo J*, 21(15):4104-4113, 2002.
- Maurer 等人, *Hum Pathol*, 29(8):771-777, 1998.
- McGary 等人, *Cancer Biol Ther*, 1(5):459-465, 2002.
- McInroy and Maatta, *Biochem Biophys Res Commun*, 360(1):109-114, 2007.
- Mendrzyk 等人, *J Clin Oncol*, 23(34):8853-8862, 2005.
- Menendez 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29):10715-10720, 2004.
- Miyake 等人, *Cancer*, 86(2):316-324, 1999.
- Miyaki and Kuroki, *Biochem Biophys Res Commun*, 306(4):799-804, 2003.
- Montero 等人, *Clin Cancer Res*, 4(9):2161-2168, 1998.
- Monti 等人, *Virchows Arch.*, 445(3):236-247, 2004.
- Mossink 等人, *Oncogene*, 22(47):7458-7467, 2003.
- Mrozek 等人, *Blood*, 06-001149v1, 2006.
- Murphy 等人, *J Clin Pathol*, 58(5):525-534, 2005.
- Nakada 等人, *Cancer Res*, 64(9):3179-3185, 2004.
- Neri 等人, *J Exp Med*, 170(5):1715-1725, 1989.
- Ng 等人, *Blood*, 89(7):2500-2506, 1997.
- Ngan 等人, *Br J Cancer*, 96(6):986-992, 2007.
- Ohsaki 等人, *Cancer Res*. Jul 1;52(13):3534-8, 1992.
- Olsen 等人, *Dev. Biol.*, 216:671, 1999.

- Osthus 等人, *Cancer Res*, 65(13):5620-5627, 2005.
- Ott 等人, *Oncogene*, 26(33):4863-4871, 2007.
- Ovcharenko 等人, *RNA*, 11(6):985-993, 2005.
- Oyama 等人, *Pathol Int*, 45(1):45-50, 1995.
- Paquette 等人, *Oncogene*, 5(11):1659-1663, 1990.
- Pasgue 等人, *Cell*, 119(3):431-443, 2004.
- Payton and Coats, *Int J Biochem Cell Biol*, 34(4):315-320, 2002.
- Payton 等人, *Oncogene*, 21(55):8529-8534, 2002.
- Petit 等人, *Genomics*, 57(3):438-441, 1999.
- Pretner 等人, *Anticancer Res*, 26(1A):9-22, 2006.
- Prochownik 等人, *Genes Chromosomes Cancer*, 22(4):295-304, 1998.
- Qian 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23):14925-14930, 2002.
- Rabinovitz 等人, *Clin Exp Metastasis*, 13(6):481-491, 1995.
- Rajkumar 等人, *J Pathol*, 179(4):381-385, 1996.
- Ree 等人, *Cancer Res*, 59(18):4675-4680, 1999.
- Reinhart 等人, *Nature*, 403(6772):901-906, 2000.
- Reiter 等人, *Clin Cancer Res*, 12(17):5136-5141, 2006.
- Robles 等人, *J Biol Chem*, 277(28):25431-25438, 2002.
- Ru 等人, *Oncogene*, 21(30):4673-4679, 2002.
- Rutka 等人, *Int J Dev Neurosci*, 17(5-6):503-515, 1999.
- Saigusa 等人, *Cancer Sci*, 96(10):676-683, 2005.
- Sambrook 等人, In: *DNA microarrays: a molecular cloning manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 2001, 2003.
- Schaich 等人, *Br. J. Haematol.*, 112:300-307, 2001.
- Scheit, In: *Synthesis and Biological Function*, Wiley-Interscience, New York, 171-172, 1980.
- Segerson 等人, *Dev. Biol.*, 243:215, 2002.
- Seike 等人, *Lung Cancer*, 38(3):229-234, 2002.
- Serrano 等人, *Acta Haematol*, 116(2):77-89, 2006.
- Shah 等人, *Oncogene*, 21(54):8251-8261, 2002.
- Shapira 等人, *Cancer*, 103(7):1336-1346, 2005.
- Shetty 等人, *Br J Cancer*, 93(11):1295-1300, 2005.
- Shi 等人, *Cancer Res*, 51(10):2690-2693, 1991.
- Shibahara 等人, *Anticancer Res*, 25(3B):1881-1888, 2005.
- Shigeishi 等人, *Oncol Rep*, 15(4):933-938, 2006.
- Shimoyama 等人, *Clin Cancer Res*, 5(5):1125-1130, 1999.
- Singh 等人, *Cancer Res*, 63(9):2306-2311, 2003.

- Slack 等人, *Molec Cell*, 5(4):659-669, 2000.
- Slotky 等人, *Breast Cancer Res*, 7(5):R737-744, 2005.
- Smith 等人, *Br J Cancer*, 93(6):719-729, 2005.
- Sommers 等人, *Cancer Res*, 52(19):5190-5197, 1992.
- Soufla 等人, *Cancer Lett*, 221(1):105-118, 2005.
- Sparmann and Bar-Sagi, *Cancer Cell*, 6(5):447-458, 2004.
- Stark 等人, *Blood*, 63(2):415-420, 1984.
- Steensma 等人, *Blood*, 105(2):443-452, 2005.
- Strebhardt and Ullrich, *Nat Rev Cancer*, 6(4):321-330, 2006.
- Su 等人, *Clin Cancer Res*, 7(5):1320-1324, 2001.
- Sui 等人, *Oncol Rep*, 15(4):765-771, 2006.
- Sutter 等人, *Int J Cancer*, 102(4):318-327, 2002.
- Takamizawa 等人, *Cancer Res*, 64(11):3753-3756, 2004.
- Takanami, *Oncol Rep*, 13(4):727-731, 2005.
- Tanner 等人, *Clin Cancer Res*, 6(5):1833-1839, 2000.
- Tassi 等人, *Cancer Res*, 66(2):1191-1198, 2006.
- Teofili 等人, *Leukemia*, 17(5):919-924, 2003.
- Traub 等人, *Breast Cancer Res Treat*, 99(2):185-191, 2006.
- Tsai 等人, *J Natl Cancer Inst*. Jun 2;85(11):897-901, 1993.
- Uemura 等人, *Int J Mol Med*, 18(2):365-373, 2006.
- Ulisse 等人, *Int J Cancer*, 119(2):275-282, 2006.
- Upton 等人, *Am J Surg Pathol*, 10(8):560-567, 1986.
- Vella 等人, *Chem Biol*, 11(12):1619-1623, 2004b.
- Vella 等人, *Genes Dev*, 18(2):132-7, 2004a.
- Venkatasubbarao 等人, *Anticancer Res*, 20(1A):43-51, 2000.
- Vlodavsky and Soustiel, *J Neurooncol*, 81(1):1-7, 2007.
- Wang 等人, *Mol Carcinog*, 31(2):90-100, 2001.
- Wang 等人, *Oncogene*, 22(10):1486-1490, 2003.
- Wechsler 等人, *Cancer Res*, 57(21):4905-4912, 1997.
- Weichert 等人, *Int J Oncol*, 23(3):633-639, 2003.
- Weil 等人, *Biotechniques*. 2002 Dec;33(6):1244-8, 2002.
- Weiss and Bohmann, *Cell Cycle*, 3(2):111-113, 2004.
- Wewer 等人, *Am J Pathol*, 151(5):1191-1198, 1997.
- Wickborn 等人, *Mol Carcinog*, 45(8):572-581, 2006.
- Wilcoxon, *Biometrics*, 1:80-83, 1945.
- Wohlschlegel 等人, *Am J Pathol*, 161(1):267-273, 2002.

- Wolowiec 等人, *Leuk Lymphoma*, 35(1-2):147-157, 1999.
- Wooster and Weber, *N Engl J Med*, 348(23):2339-2347, 2003.
- Woszczyk 等人, *Med Sci Monit*, 10(1):CR33-37, 2004.
- Wu 等人, *Gynecol Oncol*, 102(1):15-21, 2006.
- Wu 等人, *Pathol Oncol Res*, 10(1):26-33, 2004.
- Xu 等人, *Curr. Biol.*, 13(9):790-795, 2003.
- Xue 等人, *Cancer Res*, 66(3):1418-1426, 2006.
- Yamamoto 等人, *Int J Oncol*, 13(2):233-239, 1998.
- Yang 等人, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 21(2):216-222, 1999.
- Yang 等人, *Blood*, 101(8):3205-3211, 2003.
- Yang 等人, *Clin Exp Metastasis*, 19(7):603-608, 2002.
- Yang 等人, *J Androl*, 22(3):471-480, 2001.
- Yano 等人, *Int J Mol Med*, 12(5):763-766, 2003.
- Yasui 等人, *Hepatology*, 35(6):1476-1484, 2002.
- Ye 等人, *Biochim Biophys Acta*, 1493(3):373-377, 2000.
- Zhang 等人, *Chin Med J (Engl)*, 112(4):330-332, 1999.
- Zhang 等人, *Oncogene*, 25(45):6101-6112, 2006.

<110>	查尔斯. D. 约翰逊 麦克. 拜罗姆 安德里斯. G. 巴德 弗兰克. J. 斯莱克 大卫. 布朗 德米特里. 奥弗切兰柯 凯文. 克尔纳尔	
<120>	LET-7 微小 RNA 的功能和靶标	
<130>	ASUR:020W0	
<140>	未知	
<141>	2007-12-10	
<150>	60/882,728	
<151>	2006-12-29	
<150>	60/869,295	
<151>	2006-12-08	
<160>	22	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	1 ugagguagua gguuguauag uu	22
<210>	2	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	2 ugagguagua gguuguauag uu	22
<210>	3	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	3	

ugagguagua gguuguauag uu 22

<210> 4
<211> 22
<212> RNA
<213> 人

<400> 4
ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 5
<211> 22
<212> RNA
<213> 人

<400> 5
ugagguagua gguuguauagg uu 22

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> 人

<400> 6
agagguagua gguugcauag u 21

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人

<400> 7
ugagguagga gguuguauag u 21

<210> 8
<211> 22
<212> RNA
<213> 人

<400> 8
ugagguagua gauuguauag uu 22

<210> 9
<211> 22
<212> RNA

<213>	人	
<400>	9	
ugagguagua	gauuguauag uu	22
<210>	10	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	10	
ugagguagua	guuuguacag u	21
<210>	11	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	11	
ugagguagua	guuugugcug u	21
<210>	12	
<211>	80	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	12	
ugggaugagg	uaguagguug uauaguuua gggucacacc caccacuggg agauaacuau	60
acaaucuacu	gucuuuccua	80
<210>	13	
<211>	72	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	13	
agguugaggu	aguagguugu auaguuuaga auuacaucaa gggagauaac uguacagccu	60
ccuagcuuuc	cu	72
<210>	14	
<211>	74	
<212>	RNA	
<213>	人	

<400> 14	
gggugaggua guagguugua uaguuuagggg cucugcccug cuaugggaua acuauacaau	60
cuacugucuu uccu	74
<210> 15	
<211> 83	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 15	
cggggugagg uaguagguug uguuguuua gggcagugau guugcccuc ggaagauaac	60
uauacaaccu acugccuucc cug	83
<210> 16	
<211> 84	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 16	
gcauccgggu ugagguagua gguuguauagg uuuagaguua caccugggga guuaacugua	60
caaccuucua gcuuuccuug gagg	84
<210> 17	
<211> 87	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 17	
ccuaggaaga gguaguaggu ugcauaguu uagggcaggg auuuugccca caaggaggua	60
acuauacgac cugcugccuu ucuuagg	87
<210> 18	
<211> 79	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 18	
cccgggcuga gguaggaggu uguauaguug aggaggacac ccaaggagau cacuauacgg	60
ccuccuagcu uuccccagg	79
<210> 19	

<211>	87	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	19	
ucagagugag	guaguagauu guauaguugu gggguaguga uuuuaccug uucaggagau	60
aacuauacaa	ucuauugccu ucccuga	87
<210>	20	
<211>	83	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	20	
ugugggauga	gguguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua	60
uacagucuac	ugucuuuccc acg	83
<210>	21	
<211>	84	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	21	
aggcugaggu	aguaguuuugu acaguugag ggucuanguu accacccggu acaggagaua	60
acuguacagg	ccacugccuu gcca	84
<210>	22	
<211>	84	
<212>	RNA	
<213>	人	
<400>	22	
cuggcugagg	uaguaguuuug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccgc uguggagaua	60
acugcgcaag	cuacugccuu gcua	84

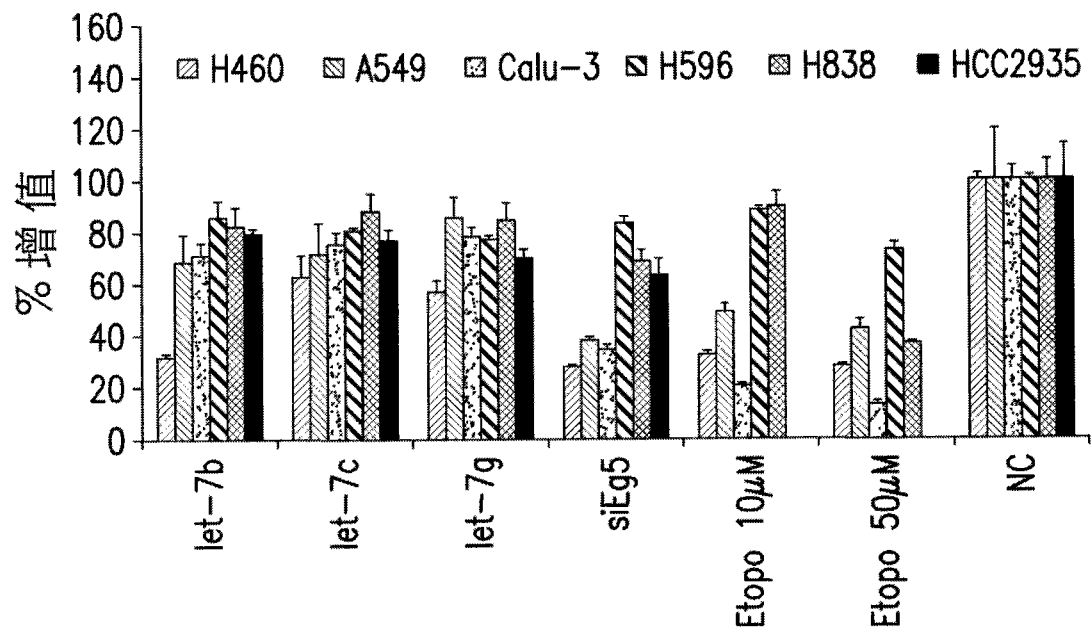


图 1

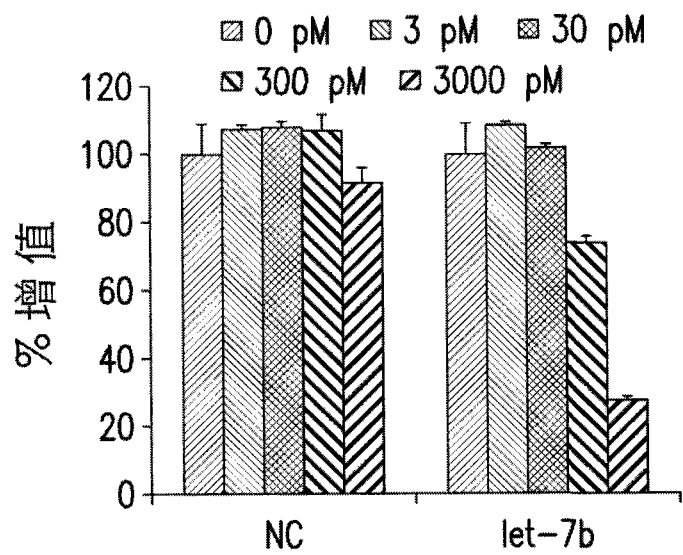


图 2

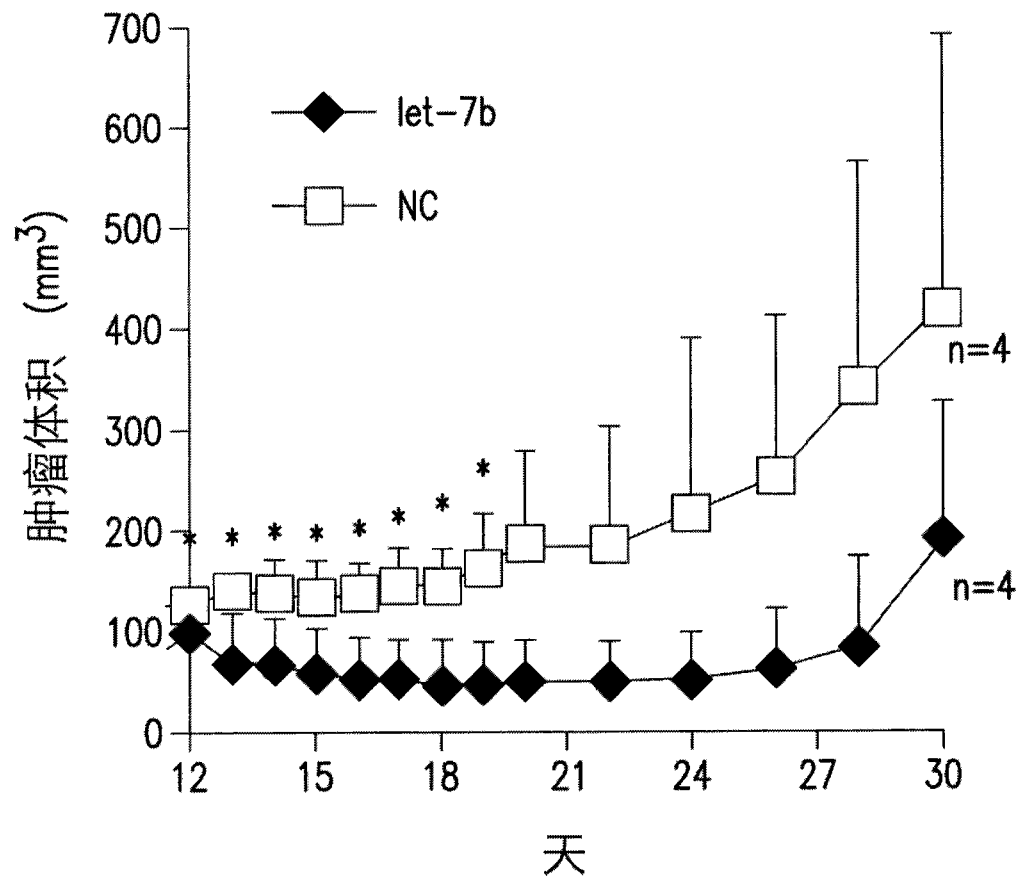


图 5