



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102007408 A

(43) 申请公布日 2011.04.06

(21) 申请号 200980113258.X

C12Q 1/68 (2006.01)

(22) 申请日 2009.02.27

(30) 优先权数据

61/067,419 2008.02.28 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.10.14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/035482 2009.02.27

(87) PCT申请的公布数据

WO2009/108866 EN 2009.09.03

(71) 申请人 俄亥俄州立大学研究基金会

地址 美国俄亥俄

(72) 发明人 R · 伽赞 C · M · 克罗斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01)

权利要求书 7 页 说明书 32 页 附图 17 页

(54) 发明名称

与急性髓性白血病 (AML) 中的细胞遗传学和预后相关的微 RNA 特征及其用途

(57) 摘要

公开了用于白血病相关疾病, 特别地急性髓性白血病的诊断、预后和/或治疗的利用 miRNA 特征的方法和组合物。

1. 用于不依赖于其他因素而预测患有急性髓性白血病 (AML) 的患者的结果的 miRNA 特征,其包括:与正常 CD34⁺ 祖细胞相比较不同的 miRNA 表达特征,其中所述特征包括与 CD34⁺ 正常细胞相比较,AML 样品中一个或多个下调的 miRNA 并且无上调的 miRNA,所述 miRNA 选自图 5- 表 2 中所列的 miR :hsa-miR-126、hsa-miR-130a、hsa-miR-135、hsa-miR-93、hsa-miR-146、hsa-miR-106b、hsa-miR-224、hsa-miR-125a、hsa-miR-92、hsa-miR-106a、hsa-miR-95、hsa-miR-155、hsa-miR-25、hsa-miR-96、hsa-miR-124a、hsa-miR-18、hsa-miR-20、hsa-let-7d、hsa-miR-26a、hsa-miR-222、hsa-miR-101、hsa-miR-338、hsa-miR-371、hsa-miR-199b、hsa-miR-29b 和 hsa-miR-301。

2. 权利要求 1 的 mi RNA 特征,其中所述 miR 包括下列中的一个或多个 :miR-126、miR-130a、miR-93、miR-146、miR-106b 和 miR-125a。

3. miRNA 特征,其用于鉴定患有多系发育不良的患者,包括筛选在患有多系发育不良的 AML 中下调的 miR-181a。

4. miRNA 特征,其用于确定诊断受试者是否患有或将发生 AML,所述诊断包括检查来自受试者的样品和确定 miR 的表达与高白细胞计数是否存在正相关:如图 8- 表 S2 中所示,包括下列中的一个或多个 :hsa-miR-155、hsa-miR-30e、hsa-miR-23b、hsa-miR-181b、hsa-miR-221、hsa-miR-29b、hsa-miR-95、hsa-miR-128b、hsa-miR-27a、hsa-miR-181c、hsa-miR-921、hsa-miR-181a、hsa-miR-23a、hsa-miR-214、hsa-miR-30b、hsa-miR-30c、hsa-miR-26b、hsa-miR-21 和 hsa-miR-222。

5. miRNA 特征,其用于确定诊断受试者是否患有或将发生 AML,所述诊断包括检查来自受试者的样品和确定 miR 的表达与高骨髓 (BM) 母细胞是否存在正相关:如图 8- 表 S2 中所示,包括下列中的一个或多个 :hsa-miR-30b、hsa-miR-30c、hsa-miR-192、hsa-miR-181a、hsa-miR-155、hsa-let-7a-2、hsa-miR-181b、hsa-miR-181c、hsa-miR-219、hsa-miR-214 和 hsa-miR-26a。

6. miRNA 特征,其用于确定诊断受试者是否患有或将发生 AML,所述诊断包括检查来自受试者的样品和确定 miR 的表达与高骨髓 (BM) 母细胞是否存在正相关:如图 8,表 S2 中所示,包括下列中的一个或多个 :hsa-miR-133b、hsa-miR-214、hsa-miR-25、hsa-miR-181a、hsa-miR-181b、hsa-miR-220、hsa-miR-92、hsa-miR-184、hsa-miR-92、hsa-miR-124a、hsa-miR-100、hsa-miR-181b、hsa-miR-135、hsa-miR-155、hsa-miR-222 和 hsa-miR-181c。

7. 用于确定诊断受试者是否患有或将发生 AML 的方法,其包括检查来自受试者的样品和确定是否存在图 8- 表 S2 中所列的一个或多个 miR 的正相关,所述正相关包括下列中的一个或多个:

miR-155 和 miR-181b 与受试者的白细胞计数 (对于 WBC)、外周和骨髓母细胞百分比;
miR-30b 和 miR-30c 与受试者的白细胞计数 (对于 WBC) 和骨髓母细胞百分比,和
miR-25 与受试者的白细胞计数循环母细胞百分比。

8. 与确定的 11q23 平衡易位的细胞遗传学亚组相关的 miRNA 特征;包括选自图 9- 表 S3 中所列的 miR :miR-326、miR-219、miR-194、miR-301、miR-324、miR-339、miR-99b 和 miR-328 的一个或多个 miR;以及选自下列的一个或多个下调的 miR :miR-34b、miR-15a、miR-29a、miR-29c、miR-372、miR-30a、miR-29b、miR-30e、miR-196a、let-7f、miR-102、miR-331、miR-299 和 miR-193。

9. 与确定的 t(6;11)11q23 平衡易位的细胞遗传学亚组相关的 miRNA 特征;包括选自图 10-表 S4 中所列的 miR:hsa-miR-21、hsa-miR-26a、hsa-miR-128b、hsa-miR-130b、hsa-miR-27a、hsa-miR-99、hsa-miR-26b、hsa-miR-23a、hsa-miR-23b、hsa-miR-130a、hsa-miR-24、hsa-miR-30c、hsa-miR-103、hsa-miR-192、hsa-miR-1 和 hsa-miR-221 的一个或多个 miR。

10. 与确定的 8 号染色体三体的细胞遗传学亚组相关的 miRNA 特征;包括选自图 11-表 S 5 所列的 miR:hsa-miR-337、hsa-miR-184、hsa-miR-302b、hsa-miR-105、hsa-let-7d、hsa-miR-153、hsa-miR-124a*、hsa-miR-215、hsa-miR-1、hsa-miR-194、hsa-miR-29c、hsa-miR-208、hsa-miR-199a、hsa-miR-24-1、hsa-miR-302c、hsa-miR-367、hsa-miR-200a、hsa-miR-183、hsa-miR-199b、hsa-miR-143、hsa-miR-96、hsa-miR-29b、hsa-miR-202、hsa-miR-340、hsa-miR-102、hsa-miR-191、hsa-let-7i、hsa-miR-30d*、hsa-miR-9-3、hsa-miR-203、hsa-miR-302a、hsa-miR-199a、hsa-miR-206、hsa-miR-197、hsa-miR-198、hsa-miR-372、hsa-miR-182、hsa-miR-193、hsa-miR-325、hsa-miR-192、hsa-miR-204 和 hsa-miR-299 的一个或多个 miR。

11. 包含图 12-表 S6 中所列的 miR 的 NK-AML 的特征,其包括上调的 miRNA(miR-10a、miR-10b、miR-26a、miR-30c、let-7a-2、miR-16-2、miR-21、miR-181b、miR-368 和 miR-192),和下调的 miRNA(miR-126、miR-203、miR-200c、miR-182、miR-204、miR-196b、miR-193、miR-191、miR-199a、miR-194、miR-183、miR-299 和 miR-145)。

12. 与 AML 患者中确定的 FLT3-ITD 突变的细胞遗传学亚组相关的 miRNA 特征,其包括选自下列的一个或多个 miR:在 AML 患者中在 FLT3-ITD 突变中过表达的 miR-155:miR-155、miR-10a 和 miR-10b。

13. 与新近诊断的 AML 患者中的结果,总体存活(OS)和/或无事件存活(EFS)相关的 miRNA 特征,包括选自下列的一个或多个 miR:miR-199a、miR-199b、miR-191、miR-25 和 miR-20a,其中此类过表达表示不利的 OS。

14. 权利要求 13 的特征,其中 miR-199a 和 miR-191 与 OS 和/或 EFS 相关。

15. 与具有其他细胞遗传学异常包括正常核型的其他经治疗的 AML 患者相比较在具有 t(11q23)的经治疗的患者中差异表达的 miR 的 miRNA 特征,包括一个或多个图 14-表 S8 中所示的 miR。

16. 权利要求 15 的特征,其中包括一个或多个图 14-表 S8 中所示的上调的 miR:hsa-miR-326、hsa-miR-330、hsa-miR-99b、hsa-miR-194、hsa-miR-133b、hsa-miR-339、hsa-miR-138、hsa-miR-128a、hsa-miR-219、hsa-miR-129-2、hsa-miR-138、hsa-miR-210、hsa-miR-301、hsa-miR-200b、hsa-miR-328 和 hsa-miR-324。

17. 权利要求 15 的特征,其包括一个或多个图 14-表 S8 中所示的下调的 miR:hsa-miR-29c、hsa-miR-30a-3p、hsa-miR-15a、hsa-miR-29a、hsa-miR-133a、hsa-let-7d、hsa-miR-21、hsa-miR-29b、hsa-miR-370、hsa-miR-34b、hsa-miR-102、hsa-miR-142-5p、hsa-miR-195、hsa-let-7f、hsa-miR-203-prec、hsa-miR-181c、hsa-miR-19b、hsa-miR-194-1、hsa-miR-331-prec、hsa-miR-182*、hsa-miR-183-prec、hsa-miR-16、hsa-miR-302c*、hsa-miR-299-3p 和 hsa-miR-30e。

18. 与具有异常核型的经治疗的 AML 患者相比较在具有正常核型的经治疗的 AML 患者

中差异表达的 miR 的 miRNA 特征,其包括一个或多个图 15- 表 S9 中显示的 miR。

19. 权利要求 18 的特征,其包括一个或多个图 15- 表 S9 中显示的上调的 miR: hsa-miR-21、hsa-let-7d、hsa-miR-30c、hsa-miR-15b、hsa-miR-219、hsa-miR-302b*、hsa-miR-15a、hsa-miR-34b、hsa-miR-16-1、hsa-miR-16-2、hsa-miR-30e-5p、hsa-miR-140、hsa-miR-15a、hsa-let-7a-2、hsa-miR-30b、hsa-miR-222、hsa-miR-10b、hsa-miR-26a、hsa-miR-10a、hsa-miR-195、hsa-let-7a 和 hsa-miR-181b。

20. 权利要求 18 的特征,其包括一个或多个图 15- 表 S9 中显示的下调的 miR: hsa-miR-193a、hsa-miR-204、hsa-miR-196a、hsa-miR-205、hsa-miR-200b、hsa-miR-198、hsa-miR-212、hsa-miR-188、hsa-miR-200c、hsa-miR-194、hsa-miR-206、hsa-miR-203、hsa-miR-204-prec、hsa-miR-126、hsa-miR-182*、hsa-miR-199a、hsa-miR-183、hsa-miR-30b、hsa-miR-145、hsa-miR-187、hsa-miR-299-3p、hsa-miR-128a 和 hsa-miR-143。

21. 相对于具有 FLT3-wt 的经治疗的 AML 患者在具有 FLT3-ITD 突变的经治疗的 AML 患者中差异表达的 miR 的 miRNA 特征,其包括一个或多个图 16- 表 S10 中所示的 miR: has-miR-19a、has-miR-155、has-miR-10a、has-miR-99b 和 has-miR-192b。

22. 将前述权利要求的任一项的特征用于患有或可能发生 AML 的受试者的诊断、治疗或预后的确定中的一个或多个的方法。

23. 用于不依赖于其他因素而预测患有急性髓性白血病 (AML) 的患者的结果的方法,其包括:确定与正常细胞相比较, miRNA 表达的独特特征,其中所述特征包括一个或多个前述权利要求的任一项的 miRNA 特征。

24. 一种方法,其用于:i) 诊断受试者是否患有急性髓性白血病 (AML) 或处于发生急性髓性白血病 (AML) 的风险中, ii) 确定这样的受试者的预后,和 / 或 iii) 治疗这样的受试者,包括

测量来自受试者的测试样品中至少一个生物标志物的水平,其中所述生物标志物选自一个或多个前述权利要求的 AML 特征,和

其中相对于对照样品中相应的生物标志物的水平,测试样品中生物标志物的水平的改变表示受试者患有所述病症或处于发生所述病症的风险中。

25. 权利要求 24 的方法,其中测试样品中所述至少一个生物标志物的水平低于对照样品中相应的生物标志物的水平。

26. 权利要求 24 的方法,其中测试样品中所述至少一个生物标志物的水平高于对照样品中相应的生物标志物的水平。

27. 影响白血病中靶 mRNA 的转录物丰度和 / 或蛋白质表达的方法,其包括使有此需要的受试者中一个或多个微 RNA 失调。

28. 权利要求 27 的方法,其包括抑制癌症相关基因的蛋白质表达。

29. 微 RNA 和编码蛋白质的 RNA 的大规模基因表达特征谱分析的用途,其用于鉴定人白血病中发生的微 RNA 功能的改变。

30. 确定患有急性髓性白血病 (AML) 的受试者的预后的方法,其包括测量来自受试者的测试样品中至少一个生物标志物的水平,其中:

所述生物标志物与此类癌症中不利的预后相关;和

相对于对照样品中相应的生物标志物的水平,测试样品中所述至少一个生物标志物的水平的改变表示不利的预后。

31. 一种方法,其确定患有急性髓性白血病(AML)的受试者的预后,包括诊断受试者是否患有 AML 或处于发生 AML 的风险中,所述方法包括:

从获自受试者的测试样品逆转录 RNA 以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

将靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供测试样品的杂交特征谱;和

将测试样品杂交特征谱与从对照样品产生的杂交特征谱相比较,其中至少一个 miRNA 的信号的改变表示受试者患有所述 AML 或处于发生所述 AML 的风险中。

32. 权利要求 31 的方法,其中相对于从对照样品产生的信号,至少一个 miRNA 的信号下调,和 / 或其中相对于从对照样品产生的信号,至少一个 miRNA 的信号上调。

33. 权利要求 32 的方法,其中选自下列中所列的 miR 的至少一个生物标志物的信号的改变表示受试者患有具有不良预后的 AML 癌症或处于发生所述癌症的风险中:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10。

34. 用于调控白血病细胞中的蛋白质表达的方法,其包括调节白血病细胞中图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的 miR 的一个或多个的表达。

35. 用于调控白血病细胞中一个或多个蛋白质的表达水平的组合物,所述组合物包含下列中的一个或多个:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的 miR 或其功能性变体。

36. 一种组合物,其包含图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的 miR 的一个或多个反义 miR,用于在有此需要的受试者中增加白血病细胞中的蛋白质水平。

37. 治疗患有白血病的受试者的白血病的方法,在所述白血病中至少一个生物标志物在受试者的癌细胞中相对于对照细胞下调或上调,所述方法包括:

当所述至少一个生物标志物在癌细胞中下调时,给受试者施用有效量的至少一个分离的生物标志物,或其分离的变体或生物学活性片段,以便受试者中癌细胞的增殖被抑制;或

当所述至少一个生物标志物在癌细胞中上调时,给受试者施用有效量的至少一种抑制所述至少一个生物标志物表达的化合物,以便受试者中癌细胞的增殖被抑制。

38. 治疗受试者的白血病的方法,其包括:

测定相对于对照细胞,白血病细胞中至少一个生物标志物的量;其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体,和

通过下列来改变白血病细胞中表达的生物标志物的量:

如果癌细胞中表达的生物标志物的量低于对照细胞中表达的生物标志物的量,给受试者施用有效量的至少一个分离的生物标志物;或

如果癌细胞中表达的生物标志物的量高于对照细胞中表达的生物标志物的量,给受试者施用有效量的至少一种用于抑制所述至少一个生物标志物表达的化合物。

39. 用于治疗白血病的药物组合物,其包含至少一个分离的生物标志物和可药用载体,其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体。

40. 前述权利要求的药物组合物;其包含至少一种 miR 表达抑制剂化合物和可药用载体。

41. 鉴定抗白血病试剂的方法,其包括给细胞提供测试试剂和测量至少一个与白血病细胞中减少的表达水平相关的生物标志物的水平,其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体,

其中相对于对照细胞,细胞中生物标志物的水平的增加表示测试试剂是抗白血病试剂。

42. 鉴定抗白血病试剂的方法,其包括给细胞提供测试试剂和测量与白血病细胞中增加的表达水平相关的至少一个生物标志物的水平,其中相对于对照细胞,细胞中生物标志物的水平的减少表示测试试剂是抗癌剂,

其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体。

43. 评估疗法预防、诊断和 / 或治疗白血病相关疾病的有效性的方法,其包括:

使动物经历其有效性待评估的疗法,和

通过评估至少一个生物标志物来测定被测试的疗法在治疗或预防疾病中的有效性的水平,

其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体。

44. 前述权利要求的方法,其中候选治疗剂包括下列中的一种或多种:药物组合物、营养组合物和顺势疗法组合物。

45. 前述权利要求的方法,其中被评估的疗法用于人受试者。

46. 一种制品,其包含至少一种捕获试剂,所述捕获试剂结合包含至少一个生物标志物的白血病相关疾病的标志物,

其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体。

47. 用于筛选治疗白血病相关疾病的治疗剂的候选化合物的试剂盒,其中所述试剂盒包括:至少一个生物标志物的一个或多个试剂和表达至少一个生物标志物的细胞,

其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体。

48. 前述权利要求的试剂盒,其中使用包含特异性结合至少一个生物标志物的抗体或

抗体片段的试剂检测生物标志物的存在。

49. 干扰白血病相关疾病应答信号转导途径的试剂用于制造药剂的用途,所述药剂用于治疗、预防、逆转或限制个体的疾病并发症的严重度,其中所述试剂包含至少一个生物标志物,

其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体。

50. 用于治疗、预防、逆转或限制有此需要的个体的白血病相关疾病并发症的严重度的方法,其包括:给个体施用干扰至少白血病相关疾病应答级联的试剂,其中所述试剂包含至少一个生物标志物,

其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体。

51. 干扰至少白血病相关疾病应答级联的试剂用于制造药剂的用途,所述药剂用于治疗、预防、逆转或限制个体的白血病相关疾病并发症的严重度,其中所述试剂包含至少一个生物标志物,

其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体。

52. 一种组合物,其包含:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体的反义抑制剂。

53. 治疗有此需要的受试者的急性髓性白血病 (AML) 的方法,其包括给受试者施用治疗有效量的前述权利要求的组合物。

54. 前述权利要求的方法,其中预防性施用所述组合物。

55. 前述权利要求的方法,其中所述组合物的施用延迟了 AML 的一个或多个症状的发作。

56. 前述权利要求的方法,其中所述组合物的施用抑制了 AML 的发展。

57. 前述权利要求的方法,其中所述组合物的施用抑制了 AML。

58. 用于检测生物学样品中白血病的存在的方法,该方法包括:

将怀疑包含白血病的生物学样品暴露于用于其的标志物;

其中所述生物标志物选自:图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体,和

如果有的话,检测样品中所述标志物的存在或不存在。

59. 前述权利要求的方法,其中所述生物标志物包括可检测的标记。

60. 前述权利要求的方法,其还包括将来自受试者的生物学样品中生物标志物的量与来自正常受试者的相应的生物学样品中生物标志物的量相比较。

61. 前述权利要求的方法,其还包括在不同时间点从受试者收集多个生物学样品和比

较各生物学样品中标志物的量以确定标志物的量在受试者中是随时间增加还是减少。

62. 治疗受试者的急性髓性白血病 (AML) 的方法, 该方法包括: 白血病受体激动剂。

63. 前述权利要求的方法, 其中所述受体激动剂是: 图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体的反义抑制剂。

64. 制造用于治疗急性髓性白血病的药物的用途, 所述药物包含选自下列的核酸分子: 图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的 miR 或其功能性变体、来源于其的序列、此类 miR 的互补序列和来源于这样的互补序列的序列。

65. 前述权利要求的用途, 其中所述药物包含核酸分子, 所述核酸分子提供选自下列的序列: 图 5-表 2、图 8-表 S2、图 9-表 S3、图 10-表 S4、图 11-表 S5、图 12-表 S6、图 14-表 S8、图 15-表 S9 和图 16-表 S10 中所列的一个或多个 miR 或其功能性变体、来源于此类 miR 的序列、此类 miR 的互补序列和来源于这样的互补序列的序列。

66. 鉴定诱导急性髓性白血病 (AML) 细胞分化的有效治疗剂或治疗剂的组合的体外方法, 该方法包括步骤:

培养来源于 AML 细胞的细胞,

向细胞系的培养基中加入至少一种化合物,

分析步骤 (i) 与 (ii) 之间至少一个 miR 的表达水平的变化, 和

鉴定诱导步骤 (i) 与 (ii) 之间 miR 的表达水平的变化的化合物或化合物的组合。

67. 前述权利要求的方法, 其中步骤 (iii) 包括分析至少一个 miR 的表达水平。

68. 前述权利要求的方法, 其中步骤 (iv) 包括鉴定调控至少一个 miR 的表达水平的化合物或化合物的组合。

69. 前述权利要求的方法, 其中步骤 (iv) 包括鉴定减少至少一个 miR 的表达水平的化合物或化合物的组合。

70. 前述权利要求的方法, 其中所述化合物是治疗癌症的治疗剂。

与急性髓性白血病 (AML) 中的细胞遗传学和预后相关的微 RNA 特征及其用途

[0001] 发明者 :Carlo M. Croce, Ramiro Garzon

[0002] 交叉参考相关申请

[0003] 本申请要求 2008 年 2 月 28 日提交的美国临时申请案 61/067, 419 的权益, 其全部公开内容明确地通过引用合并入本文。

[0004] 关于联邦政府支助的研究的声明

[0005] 本发明是在 NCI 基金 CA76259 和 CA8134 下由政府支助进行的。政府在本发明中具有某些权利。

[0006] 本发明的技术领域和工业适用性

[0007] 本发明总地说来涉及分子生物学领域。本发明的某些方面包括在白血病相关病症的诊断、治疗和预后中的应用。

[0008] 发明背景

[0009] 不承认本部分中公开的背景技术在法律上构成了现有技术。

[0010] 急性髓性白血病 (Acute myeloid leukemia, AML) 是特征在于克隆性髓系前体细胞 (clonal myeloid precursor) 的分化停滞和恶性增殖的在细胞遗传学上和分子上异质的病症 (1)。具有中等风险和高风险的细胞遗传学的患者代表大多数 AML; 基于化学疗法的方案不能治愈大部分此类患者, 并且干细胞移植是通常选择的治疗 (2, 3)。由于众多原因异基因干细胞移植不适合于许多高危白血病患者, 因此存在对提高我们对此类白血病的生物学的理解以开发新型疗法的迫切需要。

[0011] 微 RNA (miRNA) 是长度为 19 至 25 个核苷酸的非编码 RNA, 其通过诱导翻译抑制和切割它们的靶 mRNA (经由与部分或完全互补位点碱基配对) 来调控基因表达 (4)。miRNA 参与至关重要的生物学过程, 包括发育、细胞分化、压力应答、细胞凋亡和增殖 (4)。最近, 已将 miRNA 的表达与造血作用和癌症相关联 (5-11)。在小鼠中, miR-181 在造血祖细胞中的异位表达导致 B 细胞区室中的增殖 (5)。同样, 已在人粒细胞、红细胞和巨核细胞的分化过程中发现 miRNA 的重要作用 (6-8)。将 miRNA 与癌症相关联的第一个报导涉及慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) (9)。已发现 2 个 miRNA (miR-15a 和 miR-16-1) 的簇位于 13q14 上的最小缺失区域 (约 30kb) 中, 并且在大约 60% 的 CLL 样品中缺失或下调 (9)。其他研究确认, miRNA 广泛参与癌症 (10, 11)。然而, 关于 AML 中的 miRNA 表达, 知之甚少。

[0012] 尽管对治疗此类疾病的疗法进行了相当多的研究, 但仍然难以有效地诊断和治疗它们, 并且在患者中观察到的死亡率表明, 需要改进所述疾病的诊断、治疗和预防。

[0013] 发明概述

[0014] 在第一广泛的方面, 本文中描述了……………。

[0015] 在确定权利要求后, 我们将在此处插入权利要求的概述……………。

[0016] 当根据附图进行阅读时, 根据下列优选实施方案的详细描述, 本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员将变得显然。

[0017] 附图概述

[0018] 本专利或申请文件可包括一个或多个以彩色制成的图和 / 或一个或多个照片。具有彩色附图和 / 或照片的本专利或专利申请公开案的拷贝将应请求且支付必要的费用后由专利局 (Patent Office) 提供。

[0019] 图 1 :相对于 CD34⁺ 细胞和成熟的造血前体细胞 (hematopoietic precursor), 在 AML 样品中下调的 miRNA。

[0020] 图 1A, 图 1B :我们根据 SAM 评分和倍数变化选择差异最大的 miRNA 并且通过定量 RT-PCR 在 6 个 AML 患者和获自健康供体的 4 个 CD34 样品的随机组中测量它们。在用 let-7i 进行标准化和 2^{ΔCt} 转换 (18) 后, 结果表示为相对于一个健康供体的 CD34⁺ 表达, AML 样品中 miRNA 表达的倍数变化 (细棒代表标准差)。根据 t 检验, 除了 miR-135 外 (P = .38), 4 个 CD34 与所有 6 个 AML 患者之间 miRNA 表达的差异在统计学上是显著的 :miR-106a (P = .001)、miR125a (P = .001)、miR-126 (P = .001)、miR-93 (P = .001)、miR-130a (P = .006)、miR-146 (P = .001)。

[0021] 图 1C :在标准化和 2^{ΔCt} 转换后, 与 CD34⁺ 细胞的平均 miRNA 表达相比较的外周血成熟粒细胞和单核细胞以及骨髓定向 (红细胞和巨核细胞) 前体细胞的平均 miRNA 表达 (来自 4 个不同的健康供体) 和 6 个 AML 患者的平均 miRNA 表达。结果表示为相对于 CD34⁺ 细胞, 平均 miRNA 表达的倍数变化。根据 t 检验 (P < .05), 相对于 CD34 细胞, 成熟外周血细胞和定向前体细胞中 mi RNA 表达的下调在统计学上是显著的。

[0022] 图 2 :具有 FLT3-ITD 突变的 AML 中 MiR-155 的表达。通过定量 RT-PCR 测量的具有 FLT3-WT (n = 12) 和 FLT3-ITD 阳性突变 (n = 4) 的 AML 患者中的平均 miR-155 表达。使用 t 检验 (SPSS) 比较不同组之间的 miRNA 表达。

[0023] 图 3A-3B :与新近诊断的 AML 患者中的总体存活相关的 miRNA。60 个具有高或低的 miR-191 (图 3A) 和 miR-199a (图 3B) 的表达 (通过定量 RT-PCR 进行检测) 的 AML 患者的总体存活的 Kaplan-Meier 评估。将时序检验用于比较存活曲线之间的差异。

[0024] 图 4 :表 1- 新近诊断的 AML 患者的临床和细胞遗传学特征。除了无成熟作用的 AML (x², P = .03) 的类别外, 通过 t 检验和 x² 未在两组患者 (微阵列对定量 RT-PCR) 之间观察到统计学上显著的差异。所有值代表频率 (%)。* 这些 AML 病例不满足将其包括在之前描述的亚组之一中的标准。† WHO 分类中未另外分类的其他细胞遗传学组。来自微阵列群组 (cohort) 的 122 个患者中总共 116 个以及来自定量 RT-PCR 群组的 60 个患者中总共 59 个已通过常规核型分析对至少 20 个或更多个中期进行了分析。复杂核型定义为 3 个及 3 个以上的染色体异常。‡ 并非所有患者都进行了 FLT3 的分析。显示的百分比与经历了 FLT3 突变研究的患者的总数相关。§ 122 个 AML 患者中活着的患者的中值随访期是 100 周 (范围, 1 至 586 周), 在 60 个 AML 的群组中该中值随访期是 124 周 (范围, 7-278 周)。

[0025] 图 5 :表 2- 相对于获自 10 个健康供体的 CD34⁺ 细胞, 在 122 个新近诊断的 AML 患者中下调的 MiRNA。

[0026] 图 6 :表 3-miRNA 对用于结果预测的临床多变量模型的影响。

[0027] 图 7 :表 S1。用于标准化微阵列数据的持家基因探针 (PDF, 15.2KB)。

[0028] 图 8 :表 S2。与 WBC 计数以及外周和骨髓母细胞 (blast) 百分比相关的微 RNA (PDF, 27.5KB)。所有 miRNA 都上调并且与 WBC 计数以及 PB 和 BM 母细胞百分比具有正相关。通过

使用定量 SAM 分析获得这些结果。以黄色突出显示的 MiRNA 由至少两个特征 (signature) 共有。

[0029] 图 9 :表 S3。与具有其他细胞遗传学异常 (包括正常核型) 的其他 AML 患者相比, 在具有 t(11q23) 的患者中差异表达的微 RNA (PDF, 19.3KB)。以红色标示的 MiRNA 上调, 以绿色标示的 MiRNA 下调。除了 miR-196a、miR-372 和 miR-193 外, 在具有 t(11q23) 的经治疗的患者 (4) 的独立组中与具有其他细胞遗传学异常的经治疗的患者 (44) 的独立组中观察到相同的特征。

[0030] 图 10 :表 S4- 在具有 t(6;11) 的患者 n = 4 与具有 t(9;11) 的患者 n = 5 之间差异表达的微 RNA (PDF, 17.3KB)。

[0031] 图 11 :表 S5- 与其他 AML 细胞遗传学亚组相比较, 在具有分离的 8 号染色体三体 (trisomy 8) 的患者中差异表达的微 RNA (PDF, 28.4KB)。为了进行该分析, 我们只包括具有分离的 8 号染色体三体的样品。将这些样品与具有已知的细胞遗传学的其他 AML 样品 (不包括具有 8 号染色体三体作为第二细胞遗传学异常的样品) 相比较。所有 miRNA 都上调。

[0032] 图 12 :表 S6- 与异常核型的 AML 相比较, 在正常核型的 AML 患者中差异表达的微 RNA (PDF, 19.6KB)。与具有异常核型的经治疗的 AML 患者 (38) 相比较, 除了 miR-368、miR-191 和 miR-192 以外, 发现所有 miRNA 也在具有正常核型的经治疗的 AML 患者 (10) 中差异表达。以红色标示的 MiRNA 上调, 以绿色标示的 MiRNA 下调。

[0033] 图 13 :表 S7-54 个经治疗的 AML 患者样品 (复发的 n = 34 或原发性难治的 n = 20) 的临床特征 (PDF, 68.9KB)。□ - 这些 AML 病例不满足将其包括在之前描述的亚组之一的标准。† - 在 WHO 分类中未另外分类的其他细胞遗传学组。来自微阵列群组的 122 个患者中的 116 个和来自 qRT-PCR 群组的 60 个患者中的 59 个已通过常规核型分析对至少 20 个或更多个中期进行了分析。‡复杂核型定义为: ● 3 个染色体异常。*- 并非所有患者都进行了 FLT3 分析。显示的百分比与进行了 FLT3 突变研究的患者的总数 (n = 30) 相关。

[0034] 图 14 :表 S8- 与具有其他细胞遗传学异常 (包括正常核型) 的其他经治疗的 AML 患者相比较, 在具有 t(11q23) 的经治疗的患者中差异表达的微 RNA (PDF, 28.2KB)。上调的以红色 (粗体) 标示, 下调的以绿色 (正常字体) 标示。

[0035] 图 15- 表 S9- 与具有异常核型的经治疗的 AML 患者相比, 在正常核型的经治疗的 AML 患者中差异表达的微 RNA (PDF, 29.3KB)。* 这些 miRNA 具有 FDR > 5。然而, 为了与在未经治疗的患者中观察到的特征进行比较的目的, 在此处显示它们。

[0036] 图 16 :表 S 10- 与具有 FLT3-wt 的经治疗的 AML 患者相比较, 在具有 FLT3-ITD 突变的经治疗的 AML 患者中上调的微 RNA (PDF, 13.7KB)。

[0037] 图 17 :通过 qRT-PCR 对微阵列数据的验证 (JPG, 33.8KB)。散点图显示各样品的 miRNA 微阵列表达值与标准化的 qRT-PCR (在 $2^{\Delta Ct}$ 转换后) 呈正相关。粉红色实线代表预测的 Y, 而蓝点是患者样品。qRT-PCR (ΔCt 值) 越低, miRNA 的表达水平越低。

[0038] 图 18A-18B :具有 t(9;11) 的患者中选择的 miRNA 的微阵列结果的验证 (JPG, 28.3KB)。通过 qRT-PCR 测量的新近诊断的具有 t(9;11) 的 AML 患者 (n = 3) 和非 11q23 AML 患者 (n = 10) 中 miR-326 (图 18A) 以及 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c (图 18B) 的平均表达。使用 t 检验 (SPSS) 比较不同组之间的 miRNA 表达。

[0039] 图 19A-19B :具有正常核型的患者中选择的 miRNA 的微阵列结果的验证 (JPG,

31.1KB)。通过 qRT-PCR 测量的新近诊断的具有正常核型 ($n = 12$) 和异常核型 ($n = 22$) 的 AML 患者中的 miR-10a (图 19A)、miR-126 (图 19B) 和 miR-30c (图 19C) 的平均表达。使用 t 检验 (SPSS) 比较不同组之间的 miRNA 表达。

[0040] 优选实施方案的详细描述

[0041] 在整个本公开内容中,通过标识引用来引用各种公开物、专利和公开的专利说明书。这些公开物、专利和公开的专利说明书的公开内容通过引用合并入本公开内容以更全面地描述本发明涉及的现有技术。

[0042] 使用 miRNA 微阵列分析一大组主要具有中等 (intermediate) 和不良预后的 AML 患者以研究 miRNA 表达是否与临床特征、细胞遗传学异常和结果相关。

[0043] 在下列实施例中进一步解释本发明,其中,除非另有说明,所有部分和百分比以重量计并且温度是摄氏度。应理解,表示本发明的优选实施方案的这些实施例仅通过举例说明的方式给出。根据上述讨论和这些实施例,本领域技术人员可以确定本发明的本质特征,并且无需背离其精神和范围,可以对本发明进行多种变化和改进以使其适应不同的用法和条件。本说明书中涉及的所有公开物,包括专利和非专利文献明确地通过引用并入本文。

[0044] 实施例 I

[0045] 患者和细胞样品

[0046] 从 M. D. Anderson Cancer Center (MDACC; $n = 172$) 和 Thomas Jefferson University ($n = 10$) 的 Cell and Tissue Bank 获得来自 182 个新近诊断的 AML 患者的治疗前骨髓和血液样品。使用微阵列平台,将总共 122 个 AML 样品用于分析 miRNA 的表达,同时使用定量实时聚合酶链式反应 (RT-PCR; 图 4-表 1),将 60 个未经治疗的 AML 样品用于验证结果特征 (outcome signature)。

[0047] 将获自 MDACC 的具有复发性 ($n = 34$) 或难治性 ($n = 20$) 疾病的 54 个 AML 患者的第二群组用于测定新近诊断的 AML 患者与复发性 / 原发性难治的 AML 患者之间 miRNA 表达的差异 (图 13-表 S7)。根据 Declaration of Helsinki,从患者获得知情同意书以获得和贮存细胞,以便将来根据制度指导方针进行研究。通过 Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 梯度离心制备患者的样品,通过 CD3/CD19 耗尽 (MACS; Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 富集白血病细胞并且冷藏保存 (12)。在使用或不使用直接方法和 G 分带 (G-banding) 的情况下,使用未受刺激的短期 (24-、48- 和 72- 小时) 培养物在诊断时或复发时进行样品的细胞遗传学分析。用于描述细胞遗传学克隆的标准和核型的描述遵从国际人类细胞遗传学术语命名法系统的推荐 (13)。在确定为具有正常核型的患者中分析了至少 20 个骨髓中期细胞。如之前所述 (14),对大多数样品进行 FLT3 内部串联重复 (in tandem duplication, ITD) 和激活环 D835 突变的分析。在收集期间,在 MDACC 的众多的制度审查委员会批准的方案中治疗 122 个 AML 的第一群组,所述方案包括伊达比星与 2 种不同阿糖胞苷的组合 ($n = 53$; 方案 91004 和 10193)、含有高剂量 ARA-C ($n = 20$) 的方案 (方案 330139 和 202074)、DCTER ($n = 5$; 方案 202089), 和临床试用药物例如 PKC 412 和白细胞介素-11 ($n = 24$; 方案 201591 和 20202)。所有 4 个具有急性早幼粒细胞白血病的患者接受包含全反式视黄酸的方案。使用相同的伊达比星和阿糖胞苷方案 ($n = 47$; 方案 91003)、含有高剂量 ARA-C 的方案 ($n = 5$; 方案 330139 和 202074) 和其他临床试用试剂例如 PKC 412 和白细胞介素-11 ($n = 6$; 方案 201591 和 20202) 治疗验证群组中 60 个患者的大多数 (78%)。来

自 4 个健康供体的血液成熟粒细胞和单核细胞以及骨髓 CD71⁺ 选择性红细胞前体细胞购自 Allcells(Emeryville,CA)。来自 10 个健康供体的骨髓 CD34⁺ 祖细胞购自 Allcells。如之前所述 (8), 获得体外分化的巨核细胞。

[0048] RNA 提取和 miRNA 微阵列实验

[0049] 如之前所述 (15), 进行 RNA 提取和 miRNA 微芯片实验。miRNA 微阵列基于单通道系统 (15)。芯片包含通过接触技术点印并且共价连接至聚合物基质的基因特异性寡核苷酸探针 (本文中的实施例 II, 关于 miRNA 寡核苷酸探针序列, 参见 EBI 的 ArrayExpress 数据库)。

[0050] miRNA 的实时定量

[0051] 如之前所描述的 (16), 使用 PCR 9700 Thermocycler ABI Prism7900HT 和序列检测系统 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 将单管 TaqMan miRNA 测定用于检测和定量成熟 miRNA。使用 let-7-i 进行标准化。选择 let-7-i 是因为其在微阵列患者数据集中具有最低的表达变异性。以一式三份进行比较实时 PCR (包括无模板对照)。使用比较 Ct 法 (17) 计算相对表达。

[0052] 数据分析

[0053] 使用 GENEPIX PRO 分析微阵列图像。将各 miRNA 的重复点的平均值减去背景; 使用一组管家基因 (表 S1) 和 BRB Array 工具 (linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html) 进行 log₂ 转换和标准化。在统计分析之前将不存在 (absent call) 的阈值设定为 22 (在 log₂ 标度中为 4.5)。该水平是在 miRNA 芯片实验中高于背景检测到的平均最小强度水平。在比较 2 个类别 (例如, CD34 对 AML) 时, 在微阵列显著性分析 (SAM) 中使用调整的 t 检验法鉴定差异表达的 miRNA (18)。此处使用的 SAM Excel plug-in 基于表达变化 (相对于所有测量的标准差) 计算各基因的评分。因为这是多重检验, 因此进行排列 (permutation) 以计算假发现率 (FDR) 或 q 值。FDR 低于 5% 且倍数变化大于 2 的 miRNA 被考虑用于进一步分析。为了研究与数量变量 (例如白细胞计数) 相关的 miRNA, 我们使用 SAM 中的定量回归分析。将微阵列数据集储存在 Array-Express (ebi.ac.uk/arrayexpress), 阵列登录号 E-TABM-405。

[0054] 存活分析和定义

[0055] 从诊断时间直至死亡日期 (在最后一次随访时检查活着的患者) 计算总体存活 (Overall survival, OS), 从诊断时间直至复发或死亡 (在最后一次随访时检查活着的患者) 计算无事件存活 (event-free survival, EFS)。在 122 个 AML 患者的第一群组中, 我们使用 SAM 法 (其包括改进的 Cox 比例 - 危险最大 - 似然评分) 来鉴定其表达与存活的持续时间显著相关的一组 miRNA。然后我们使用定量 RT-PCR 在 60 个新近诊断的 AML 患者的独立群组 (图 4-表 1) 中验证这些 miRNA。

[0056] 将单变量 Cox 比例危险法 (Cox proportional hazard method) 用于该 60 个患者的验证组中以鉴定与 OS 和 EFS 相关的 miRNA。然后利用 R 2.4.0 软件, 使用多变量比例危险分析来评估 miRNA 是否可不依赖于其他因素 (例如细胞遗传学和 FLT-ITD⁺) 而预测结果。为了在所有多变量模型中选择最佳模型, 我们使用 Akaike Information Criteria。将 Kaplan-Meier 曲线用于展示 miRNA 与结果的关联。为了产生 Kaplan-Meier 曲线, 通过将样品分成 2 类 (高和低表达, 根据整个样品组的中值表达), 将通过定量 RT-PCR 测量的 miRNA 水平转换成离散变量。获得各组的存活曲线, 然后使用时序检验进行比较。

[0057] 统计分析

[0058] 将 Fisher 精确检验、t 检验和 χ^2 用于比较患者组之间的基线特征和平均 miRNA 表达。十一 (11) 个报导的 P 值是双侧的并且使用 SPSS 软件包 (对于 Windows, SPSS 15.0) 获得。

[0059] 结果

[0060] AML 患者显示与正常 CD34⁺ 祖细胞相比不同的 miRNA 表达谱。

[0061] 我们使用之前描述的和经验证的 miRNA 微阵列平台 (15) 就差异 miRNA 表达将 122 个新近诊断的 AML 样品 (图 4-表 1) 与来自 10 个正常供体的 CD34⁺ 细胞相比较。我们鉴定了 26 个与 CD34⁺ 正常细胞相比较在 AML 样品中下调的 miRNA 并且未鉴定到上调的 miRNA (图 5-表 2)。

[0062] 为了验证这些结果,我们使用随机选择的 AML 样品的亚组和 4 个获自不同供体的 CD34⁺ 样品进行 7 个下调的 miRNA (miR-126、miR-130a、miR-135、miR-93、miR-146、miR-106b 和 miR-125a) 的定量 RT-PCR。如图 1A、图 1B 中所示,我们确认除了 miR-135 外,上述 miRNA 在 AML 样品中 (相对于骨髓 CD34⁺ 祖细胞) 下调。

[0063] 此外,为了验证微阵列平台的结果,我们在 12 个随机选择的 AML 样品中进行其表达在芯片上是高、中和低的 42 个 miRNA 的定量 RT-PCR。如图 17 中所示,通过微阵列测量的 miRNA 水平与通过定量 RT-PCR 测量的水平高度相关 ($r = 0.92$, $P < .001$),从而确认微阵列平台是测量 miRNA 表达的分析工具。

[0064] miRNA 的亚组与特定的造血谱系相关

[0065] 已显示 miRNA 表达提供了造血发育谱系和肿瘤分化期的信息 (11)。为了测定 AML 样品和 CD34⁺ 细胞之间最差异表达的 miRNA 与不同造血谱系相关的水平,我们通过定量 RT-PCR 在一组人造血细胞中评估了 26 个 miRNA 中的 5 个 (根据 SAM 评分进行选择) 的表达水平,所述造血细胞包括成熟粒细胞、单核细胞和红细胞以及巨核细胞前体细胞。

[0066] 与正常 CD34⁺ 细胞相比,在 AML 中下调的 miRNA 当中,miR-126、miR-130a、miR-93、miR-125a 和 miR-146 在成熟和前体造血细胞中也显著下调 (图 1C)。

[0067] miRNA-181a 在具有多系发育不良的 AML 中下调

[0068] 具有多系发育不良 (MLD) 的 AML 在老年患者中最频繁地发生并且通常与不利的细胞遗传学特征谱和对治疗的应答相关 (19)。为了研究该组是否具有特征性 miRNA 特征谱,我们将未经治疗的患有“初发 (de novo)”或原发性 AML 的 AML 患者 ($n = 79$) 与按照 AML 的 WHO 分类 (19) 定义的具有 MLD 的 AML 患者 ($n = 29$) 相比较。通过使用 SAM,我们只鉴定到 miR-181a 在具有 MLD 的 AML 中下调 (FDR 0%, $FC > 2$, 1.68 的 SAM 评分)。然后,我们将未经治疗的初发样品 ($n = 79$) 与具有治疗相关 AML 的未经治疗的患者 ($n = 12$) 相比较,并且在治疗相关 AML 患者中鉴定到 3 个上调的 miRNA (miR-190、miR-9 和 miR-188,全部具有 0% 的 FDR, $FC > 1.8$, SAM 评分 > 1.8)。我们在具有 MLD 的 AML 与治疗相关 AML 之间未检测到 miRNA 表达的任何显著差异。

[0069] miRNA 与白细胞和母细胞计数正相关

[0070] 我们使用本文中描述的 SAM 定量分析来研究 miRNA 是否与治疗前患者特征例如年龄、性别、白细胞 (WBC) 计数、骨髓或外周血母细胞百分比相关。我们检测到几种 miRNA 的正相关 (全部具有 0% 的 FDR, 高 SAM 定量评分大于 2), 包括 miR-155 和 miR-181b (对于

WBC、外周和骨髓母细胞百分比)、miR-30b 和 miR-30c(对于 WBC 和骨髓母细胞百分比)和 miR-25(对于循环母细胞百分比)(图 8-表 S2)。

[0071] 与确定的细胞遗传学亚组相关的 miRNA 特征

[0072] 为了鉴定 AML 中与已知的细胞遗传学异常相关的 miRNA,我们研究了 116 个具有已知核型的治疗前 AML 样品。使用 SAM 来检测在确定的细胞遗传学组与其他核型(包括正常核型)组之间差异表达的 miRNA。因为一些细胞遗传学亚组在一个批次中主要是混杂的(例如, t(11q23) 和正常核型),因此我们使用定量 RT-PCR 来验证特征。

[0073] 11q23 平衡易位

[0074] 相对于所有其他 AML 患者,我们在具有 t(11q23) 的患者 (n = 9) 中鉴定了 8 个上调的 miRNA (miR-326、miR-219、miR-194、miR-301、miR-324、miR-339、miR-99b、miR-328) 和 14 个下调的 miRNA (miR-34b、miR-15a、miR-29a、miR-29c、miR-372、miR-30a、miR-29b、miR-30e、miR-196a、let-7f、miR-102、miR-331、miR-299、miR-193)(图 9-表 S3)。

[0075] 我们使用来自结果验证特征群组的患者样品(非 t(11q23), n = 10;和 t(9;11), n = 3) 通过定量 RT-PCR 验证选择的 miRNA(根据更高的 SAM 评分进行选择)的微阵列结果(图 18A-18B)。

[0076] 在平衡 11q23 易位患者中下调的 miRNA 当中,许多是靶向至关重要的癌基因的肿瘤抑制 miRNA,即, miR-34b(CDK4 和 CCNE2)(20)、miR-15a(BCL-2)(21)、let-7 家族(RAS)(22)、miR-29 家族(MCL-1 和 TCL-1)(23,24)miR-372(LATS2)(25) 和 miR-196(HOX-A7、HOX-A8、HOX-D8、HOX-B8)(26)。然后我们探询 miRNA 的表达在具有 t(6;11)(n = 4) 和 t(9;11)(n = 5) 的患者之间是否不同。16 个 miRNA 在具有 t(6;11) 的患者中上调(图 10-表 S4),包括抗细胞凋亡 miR-21(其靶向肿瘤抑制基因 PTEN(27))以及 miR-26a 和 b(其靶向 TGFb1 调节剂 SMAD1(28))。已提出, SMAD1 的下调参与与癌症发生相关的 TGFb1 的失调(29)。

[0077] 8 号染色体三体

[0078] 使用 SAM 获得的特征包括,与具有其他核型的所有其他 AML 患者(除去具有次要 8 号染色体三体的患者)(n = 5;图 11-表 S5) 相比,在具有分离的 8 号染色体三体的患者样品(n = 5) 中上调的 42 个 miRNA 和无下调的 miRNA。

[0079] 在上调的 miRNA 当中, miR-124a 和 miR-30d 分别位于 8p21 和 8q23 上,从而显示基因剂量效应可以在它们的上调中起作用。有趣地, miR-124a 靶向骨髓转录因子 CEBPA。

[0080] 具有正常核型的 AML

[0081] 我们首先将正常核型 AML(NK-AML) 患者与具有异常核型的 AML 患者相比较。我们发现 NK-AML 中的特征包括 10 个上调的 miRNA(miR-10a、miR-10b、miR-26a、miR-30c、let-7a-2、miR-16-2、miR-21、miR-181b、miR-368 和 miR-192) 与 13 个下调的 miRNA(miR-126、miR-203、miR-200c、miR-182、miR-204、miR-196b、miR-193、miR-191、miR-199a、miR-194、miR-183、miR-299 和 miR-145)(图 12-表 S6)。可能由于该亚组的分子异质性(数据未显示),该特征不预测 NK-AML。我们使用来自结果验证特征群组的患者样品验证选择的 miRNA 的微阵列结果(NK-AML, n = 12;和异常核型 AML, n = 22,通过定量 RT-PCR;图 19A-19C)。

[0082] MiR-155 在 AML 患者中在 FLT3-ITD 突变中过表达

[0083] 为了鉴定 AML 中与 FLT3-ITD 突变 (FLT3-ITD⁺) 的存在相关的 miRNA, 我们首先使用 SAM 比较具有 FLT3-ITD⁺ 的未经治疗的 AML 患者 (n = 17) 与具有 FLT3-wt 的未经治疗的 AML 患者 (n = 73) (不包括 FLT3-D835 突变 (n = 2))。我们发现 3 个 miRNA 在 FLT3-ITD⁺ 中上调, miR-155 (3.1- 倍)、miR-10a (2.5- 倍) 和 miR-10b (2.27- 倍), 全都具有 0 的 FDR 和大于 2 的 SAM 评分。

[0084] 没有足够的具有 FLT3-D 835 突变的患者 (n = 2) 来进行统计评估。我们使用定量 RT-PCR 在 AML 患者的独立组 (来自结果特征验证组的 16 个患者) 中验证这些结果。具有 FLT3-ITD⁺ 的 AML 患者 (n = 4) 再次具有比 FLT3-wt 患者 (n = 12, P = .007, t 检验; 图 2) 更高的 miR-155 表达。

[0085] 复发性 and 原发性难治的 AML 患者中的 miRNA 表达

[0086] 通过使用我们的 miRNA 平台, 我们进一步研究了具有复发性 (n = 34) 或原发性难治的 AML (n = 20; 图 13- 表 S7) 的 54 个患者的 miRNA 特征谱。

[0087] 从与最初的 122 个患者的群组不同的患者获得该经治疗的患者样品的独立群组。在未经治疗的 (n = 122) 与经治疗的患者 (n = 54) 之间未检测到显著差异 (数据未显示)。通过使用该 54 个经治疗的患者组, 我们使用 SAM 分析不同细胞遗传学和分子亚组 (例如, 具有 t(11q23) 的 AML 对其他核型的 AML, FLT3-ITD⁺ 对 FLT3-wt 等) 间的 miRNA 表达。获得与未经治疗的患者 miRNA 特征相似的 miRNA 特征 (图 14- 表 S8, 图 15- 表 9, 图 16- 表 S10), 从而显示 miRNA 的表达主要由细胞遗传学驱动。

[0088] 与结果相关的 miRNA

[0089] 我们研究了 122 个新近诊断的 AML 患者的存活和 miRNA 表达。此处, 我们鉴定了少数 miRNA (其 FDR 低于 1%, SAM 存活评分 (Cox 回归) 大于 2)。所有鉴定的基因, miR-199a、miR-199b、miR-191、miR-25 和 miR-20a, 当过表达时, 负面影响 OS。

[0090] 为了验证该预后性 miRNA 特征, 我们用不同技术 (定量 RT-PCR) 在 60 个新近诊断的 AML 患者的独立组中测量 miR-199a、miR-191、miR-25 和 miR-20a。 (图 4- 表 1)。

[0091] 进行单变量 Cox 比例危险分析以确定各 miRNA 与 OS 和 EFS 的关联。我们确认, miR-199a 和 miR-191 与 OS (miR-199a, P = .001; miR-191, P = .03) 和 EFS (miR-199a, P = .002; miR-191, P = .02) 显著关联。我们未能验证 miR-20 和 miR-25 与 OS (miR-20P = .92; miR-25, P = .07) 和 EFS (miR-20, P = .8; miR-25, P = .07) 的关联。为了进一步确认和图解展示这些 miRNA 与结果的关联, 通过将样品分成 2 类 (高表达和低表达, 根据整个 60 个样品的组的中值表达), 将通过定量 RT-PCR 测量的 miRNA 表达水平转换成离散变量, 并产生 Kaplan-Meier 存活曲线。发现具有 miR-199a 和 miR-191 的高表达的患者具有显著更短的 OS (图 3) 和 EFS (miR-199a, P = .002; 和 miR-191, P = .02, 时序检验)。

[0092] 诊断时按照 Cancer and Leukemia Group B 标准 (31) 确定的不利细胞遗传学与 OS 和 EFS 相关 (通过单变量 Cox 分析, 两者 P < .001)。其他特征例如年龄 (P = .48)、白细胞 (P = .92) 和 FLT3-ITD⁺ (P = .2) 在该 60 个 AML 患者的独立组中都不与 OS 和 EFS 显著关联 (数据未显示)。FLT3-ITD 突变与我们的新近诊断的患者群组之间缺乏存活关联的背后原因可能是漏失数据的患者数目 (即, 无 FLT3 检验, n = 8) 和研究的群体的相当大的年龄 (中值年龄 = 59 岁)。与年轻 AML 患者相反, 未发现 FLT3-ITD 突变与 AML 老年患者的不良结果相关 (32)。

[0093] 为了评估 miRNA 是否可不依赖于其他因素（例如，细胞遗传学）而预测结果，首先我们使用 Cox 比例危险模型（允许任何可能的临床协变量（WBC、FLT3- 状态、细胞遗传学和年龄））来建立纯粹的临床模型以预测 OS 和 EFS。在应用 Akaike Information Criteria 从模型中消除冗余项后，细胞遗传学提供了 OS（危害比 = 3.87 ;95% 的置信区间, 1.83-8.18, $P < .001$ ）和 EFS（危害比 = 3 ;95% 的置信区间, 1.47-6.10, $P = .002$ ）的最佳预测器。然后，我们将 4 个 miRNA (miR-20a、miR-25、miR-191 和 miR-199) 作为二分 miRNA 变量（高或低 miRNA 表达，根据整个样品组的中值表达）加入至最佳临床模型。最佳模型保留 miR-191、miR-199 和细胞遗传学（用于 OS 和 EFS）（图 6- 表 3）。

[0094] 讨论

[0095] 我们使用微阵列平台来进行 AML 样品和正常祖先 CD34⁺ 细胞的基因组范围的 miRNome 分析。大多数 miRNA 相对于 CD34⁺ 细胞在 AML 患者中下调。两个最近的研究已显示，在 CD34⁺ 细胞体外分化成几个谱系期间存在广泛的 miRNA 下调 (8,33)。我们的数据确认，相对于 CD34⁺ 细胞在 AML 中下调的大多数 miRNA 也在健康的前体细胞和成熟外周骨髓系细胞中下调，这显示白血病中 miRNA 的亚组密切遵从正常造血中 miRNA 表达的分化模式。

[0096] 此处，我们鉴定了与几个细胞遗传学组关联的分子特征。2 个最强的特征是与平衡 11q23 易位和分离的 8 号染色体三体相关的特征。

[0097] 已知在具有 11q23 易位的患者中调控 HOX 基因 (26) 的 miR-196 的下调显示解释几个 HOX 基因在这些患者中上调的新机制。

[0098] 通过使用微阵列平台，我们还能够区分 t(6 ;11) 与 t(9 ;11)。在 t(6 ;11) 中上调的 miRNA 当中，已发现 miR-21 在许多实体瘤中过表达 (10)。另一个研究显示，miR-21 靶向 PTEN (27)（重要的肿瘤抑制剂），并且 miR-21 的反义抑制体外诱导肿瘤细胞的细胞凋亡并且在异种移植小鼠模型中抑制肿瘤生长 (34)。现认为 oncomiR 例如 miR-21 和 miR-26 在 t(6 ;11) 中的异常表达解释了该患者亚组的更差的预后 (31)。

[0099] 相反地，在平衡 11q23 易位中下调的 miR-29 家族成员靶向癌基因 TCL1 (24) 和 MCL1 (24)（已发现在抗多种化学治疗剂的细胞中上调的至关重要的细胞凋亡调节剂 (35)）。此外，其他 miR-29 家族成员在高危 CLL (25) 和肺癌 (37) 中下调。

[0100] 有趣地，已发现 miR-155 在具有高白细胞计数和 FLT3-ITD 突变的 AML 患者中上调。最近已描述，该 miRNA 体外阻断骨髓细胞集落形成 (38)、停止巨核细胞生成 (megakaryopoiesis) (38) 以及在小鼠中诱导 B 细胞淋巴瘤和白血病 (39)。

[0101] 存在少数具有有利的细胞遗传学例如 inv(16) [4] 和 t(15 ;17) [4] 的患者。我们未能在这 2 个 AML 患者组中鉴定任何特征性 miRNA 特征。关联的不存在可能是由于组内异质性和 / 或小样品量。

[0102] 我们描述了与 OS 和 EFS 显著关联的 miRNA 特征。几个观察巩固了我们的结果。miRNA 的这些亚组在 AML 中明显失调并且与细胞遗传学组和结果相关联。

[0103] 第一，我们鉴定了与存活相关的 miRNA（虽然本文研究的患者具有总体较差的预后和较短的存活），其中结果差异可能难以证实。第二，也在具有分离的 8 号染色体三体的患者（AML 的亚组）中鉴定了 miR-199a 和 miR-191 的高表达，这与不良结果相关联 (31)。第三，结果特征由上调的 miRNA 组成，所述 miRNA 与 6 个实体瘤的共有特征相同（例如，miR-20、miR-25、miR-199a 和 miR-191）(1)。

[0104] 实施例 II**[0105] 微 RNA (miRNA) 微阵列**

[0106] 以一式四份将 5 微克的总 RNA 用于在 miRNA 微阵列芯片上与相应于 250 个人成熟和前体 miRNA 的探针 (如 2005 年 11 月的 miRBase (microrna.sanger.ac.uk) 中所述) 杂交。分开地向 12 μ l 终体积的反应混合物 (含有 1 μ g 3'-(N)8-(A)12-生物素-(A)12-生物素-5' 随机寡核苷酸引物) 中加入总 RNA。将混合物在 70°C 下温育 10 分钟, 然后在冰上冷却。将混合物保持在冰上, 加入 4 μ l 5 \times 第一链缓冲液、2 μ l 0.1M DTT、1 μ l 10mM dNTP 混合物和 1 μ l SuperScript II RNaseH⁻ 逆转录酶 (200 个单位/ μ l) 至 20 μ l 的终体积, 将混合物在 37°C 水浴中温育 90 分钟。在温育以进行第一链 cDNA 合成后, 将 3.5 μ l 0.5M NaOH/50mM EDTA 加入至 20 μ l 的第一链反应混合物中, 并在 65°C 下温育 15 分钟以使 RNA/DNA 杂交体变性和降解 RNA 模板。然后, 加入 5 μ l 1M Tris·HCl (pH 7.6, Sigma) 以中和反应混合物, 在杂交之前将标记的靶贮存于 -80°C 下。将微阵列在 25°C 下于 6 \times SSPE (0.9M 氯化钠 /60mM 磷酸钠 /8mM EDTA, pH 7.4) /30% 甲酰胺中杂交 18 小时, 在 37°C 下于 0.75 \times TNT (Tris·HCl / 氯化钠 / Tween 20) 中清洗 40 分钟, 然后通过用链霉抗生物素蛋白 -Alexa647 缀合物直接检测含有生物素的转录物来对其进行处理。使用 GenePix Axon 4000B 微阵列扫描仪 (将激光设置至 635nm, 使用固定的 800 的 PMT 设置和 10mm 的扫描分辨率) 扫描经处理的载玻片。除了 miRNA 探针外, 还包括使用相似的设计标准产生的针对 8 个人 tRNA 和 3 个 snRNA 的寡核苷酸。(图 7-表 S1)。

[0107] 数据分析

[0108] 在使用 GenePix Pro 获得载玻片图像后, 将各 miRNA 的重复点的平均值减去背景, 然后进行标准化并经历进一步的分析。根据 GenePix Pro 质量控制标记为不存在或异常值 (outlier) 的点不包括在分析中。将 BRB Array Tools 用于标准化。作为单通道实验, 将阵列针对参照阵列进行标准化, 以使阵列与参照阵列之间的对数强度的差异具有为 0 的中值 (对于持家基因组)。参照阵列被自动地选择为中值阵列 (其中值对数-强度值是整个阵列组的所有中值对数-强度值的中值的阵列)。通过计算各阵列与参照阵列之间的各个基因的差异, 然后将该阵列上的对数-强度减去持家基因的中值差异来进行持家基因标准化。选择“持家”非编码基因, 因为它们与 miRNA 基因一样是非编码性的 (图 7-表 S1)。

[0109] 我们将第 1 版本的 tRNA 基因扩展至包括 U2、U4、U6 小非编码 RNA 基因和 GAPDH mRNA。U6 在来自不同实验室的 miRNA 论文中广泛地用于 Northern 印迹的标准化。由于 AML 的异质性, 当 miRNA 存在于至少 20% 的样品中时, 保留该 miRNA。在进行统计分析之前, 将不存在的阈值设置为 22 (log₂ 对数标度中为 4.5)。该水平是 miRNA 芯片实验中高于背景检测到的平均最小强度水平。MiRNA 命名根据 Sanger Center¹ 的 miRNA 数据库。通过使用微阵列显著性分析 (SAM) 中的调整的 t 检验法来鉴定差异表达的 miRNA²。SAM 2.0 应用程序的表达的阈值差异设置为 2、s₀ 百分位数设置为 0.05 (缺省值) 和排列的数目设置为 100 (缺省值)。此处使用的 SAM Excel plug-in 基于表达变化 (相对于所有测量的标准差) 计算各基因的评分。因为这是多重检验, 因此进行排列以计算假发现率 (FDR) 或 q-值。FDR 小于 5% 和倍数变化大于 2 的 MiRNA 被考虑用于进一步的分析。将微阵列数据集储存在 Array-Express (ebi.ac.uk/arrayexpress) 中。

[0110] MiRNA qRT-PCR 验证

[0111] 按照制造商的说明书 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 在 Applied Biosystem Real-Time PCR 仪上使用单管 TaqMan miRNA 测定来检测和定量成熟 miRNA。用不变的 let-7i (Applied Biosystems) 进行标准化。在 GeneAmp PCR 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) 上进行所有 RT 反应, 包括无模板对照和 RT 负对照。使用 ABI Prism 7900HT 序列检测系统 (Applied Biosystems) 定量基因表达水平。以一式三份进行比较实时 PCR (包括无模板对照)。使用比较 Ct 法³ 计算相对表达。为了验证微阵列数据, 我们使用 Pearson 相关和线性回归分析 (SPSS 软件包), 使用 12 个患者中的 42 个 miRNA 测量值。这些函数检查每一对测量值 (一个来自芯片, 另一个来自 qRT-PCR) 以确定两个变量是否趋向于一致地变化, 即来自芯片的较大的值 (高表达) 是否与来自 qRT-PCR 的较高的值 ($2^{\Delta Ct}$) 相关。

[0112] 其用途和定义的实例

[0113] 除非另外指出, 否则本发明的实施将使用在本领域技术人员的能力之内的药理学、化学、生物化学、重组 DNA 技术和免疫学的常规方法。此类技术在文献中得到详尽的解释。参见, 例如, Handbook of Experimental Immunology, 第 I-IV 卷 (D. M. Weir 和 C. C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第 2 版, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick 和 N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.)。

[0114] 因此, 本文中提供了用于进一步解释的定义, 所述定义不应解释为限定性的。

[0115] 冠词“a”和“an”在本文中是指一个或多于一个 (即, 至少一个) 冠词的语法对象。例如, “an element”是指一个元素或多于一个的元素。

[0116] “标志物”和“生物标志物”是与其在正常或健康组织或细胞中的表达水平相比, 其在组织或细胞中改变的表达水平与病症和 / 或疾病状态相关的基因和 / 或蛋白质和 / 或其功能性变体。

[0117] 标志物的“正常”的表达水平是标志物在未患病症和 / 或疾病状态的人受试者或患者的细胞中的表达水平。

[0118] 标志物的“过表达”或“显著更高的表达水平”是指测试样品中的表达水平, 所述表达水平高于用于估量表达的测定的标准误, 在某些实施方案中, 至少 2 倍, 在其他实施方案中, 3、4、5 或 10 倍于对照样品 (例如, 来自未患有标志物相关病症和 / 或疾病状态的健康受试者的样品) 中的标志物的表达水平和在某些实施方案中几个对照样品中的标志物的平均表达水平。

[0119] 标志物的“显著更低的表达水平”是指测试样品中的表达水平, 所述表达水平比对照样品 (例如, 来自未患有标志物相关病症和 / 或疾病状态的健康受试者的样品) 中的标志物的表达水平和在某些实施方案中几个对照样品中的标志物的平均表达水平低至少 2 倍, 在某些实施方案中低 3、4、5 或 10 倍。

[0120] 试剂盒是包含至少一种试剂, 例如用于特异性检测标志物的表达的探针的任何产品 (例如, 包装或容器)。可以以用于进行本发明的方法的单位的形式推销 (promote)、分配或销售试剂盒。

[0121] “蛋白质”包括标志物蛋白和它们的片段; 变异标志物蛋白和它们的片段; 包含标

志物或变异标志物蛋白的至少 15 个氨基酸的区段的肽和多肽；以及包含标志物或变异标志物蛋白，或标志物或变异标志物蛋白的至少 15 个氨基酸的区段的融合蛋白。

[0122] 本文中所述的组合物、试剂盒和方法特别地具有下列非限定性用途：

[0123] 评估受试者是否患有病症和 / 或疾病状态；

[0124] 评估受试者的病症和 / 或疾病状态的分期；

[0125] 评估受试者的病症和 / 或疾病状态的分级；

[0126] 评估受试者的病症和 / 或疾病状态的性质；

[0127] 评估受试者发生病症和 / 或疾病状态的可能性；

[0128] 评估与受试者的病症和 / 或疾病状态相关的细胞的组织学类型；

[0129] 制备可用于治疗受试者的病症和 / 或疾病状态的抗体、抗体片段或抗体衍生物；

[0130] 评估病症和 / 或疾病状态在受试者的细胞中的存在；

[0131] 评估一种或多种测试化合物抑制受试者的病症和 / 或疾病状态的功效；

[0132] 评估疗法抑制受试者的病症和 / 或疾病状态的功效；

[0133] 监控受试者的病症和 / 或疾病状态的进展；

[0134] 选择抑制受试者的病症和 / 或疾病状态的组合物或疗法；

[0135] 治疗患有病症和 / 或疾病状态的受试者；

[0136] 抑制受试者的病症和 / 或疾病状态；

[0137] 评估测试化合物的有害潜能；和

[0138] 预防处于发生病症和 / 或疾病状态的风险中的受试者的病症和 / 或疾病状态的发作。

[0139] 筛选方法

[0140] 可产生动物模型以使能够筛选可用于治疗或预防受试者的病症和 / 或疾病状态的治疗剂。因此，该方法可用于鉴定用于治疗或预防受试者的病症和 / 或疾病状态的治疗剂。该方法包括对由本文所述的方法产生的动物模型施用候选试剂，和评估与未施用候选试剂的对照动物模型相比动物模型中的至少一种应答。如果至少一种应答在症状上减轻或在发作上延迟，则候选试剂是用于治疗或预防疾病的试剂。

[0141] 候选试剂可以是本领域已知的药理学试剂 (pharmacologic agent) 或可以是之前未知具有任何药理活性的试剂。试剂可以是天然产生的或实验室中设计的。它们可从微生物、动物或植物分离，或可重组产生或通过任何适当的化学方法合成。它们可以是小分子、核酸、蛋白质、肽或模拟肽 (peptidomimetics)。在某些实施方案中，候选试剂是具有大于 50 且小于大约 2,500 道尔顿的分子量的小有机化合物。候选试剂包含与蛋白质结构性相互作用所必需的官能团。还在生物分子中发现候选试剂，包括但不限于：肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、其衍生物、结构类似物或组合。

[0142] 可从多种来源（包括合成的或天然化合物的文库）获得候选试剂。存在例如许多可获得用于随机和定向合成多种有机化合物和生物分子的方法，包括随机化寡核苷酸和寡肽的表达。备选地，以细菌、真菌、植物和动物提取物的形式存在的天然化合物的文库是可获得的或可容易地产生。此外，天然或合成产生的文库和化合物可容易地通过常规化学、物理和生物学方法进行修饰，并且可用于产生组合文库。在某些实施方案中，候选试剂可使用组合文库方法领域中的许多方法中的任一方法来获得，所述方法包括非限定性实例：生物

文库法 ;空间可定位平行固相或溶液相文库法 (spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries) ;需要解卷积 (deconvolution) 的合成文库法 ;“一珠一化合物 (one-bead one-compound)” 文库法 ;和使用亲和层析选择的合成文库法。

[0143] 在某些其他实施方案中,可将某些药理学药剂经历定向或随机化学修饰,例如酰化、烷化、酯化、酰胺化 (amidification) 等以产生结构类似物。

[0144] 用于鉴定治疗受试者的病症和 / 或疾病状态的治疗剂的相同方法还可用于验证体外研究产生的前导化合物 (lead compound) / 试剂。

[0145] 候选试剂可以是上调或下调受试者中一个或多个病症和 / 或疾病状态应答途径的试剂。在某些实施方案中,候选试剂可以是影响这样的途径的拮抗剂。

[0146] 用于治疗病症和 / 或疾病状态的方法

[0147] 本文提供了用于治疗、抑制、减轻或逆转病症和 / 或疾病状态应答的方法。在本文所述的方法中,对此需要的个体施用干扰信号级联的试剂,所述个体例如但不限于其中这样的并发症还不明显的受试者和已具有至少一种这样的应答的受试者。

[0148] 在前一种情况下,这样的治疗用于预防此类应答的发生和 / 或减轻它们发生的程度。在后一种情况下,这样的治疗用于减轻此类应答发生的程度,阻止它们进一步发展或逆转所述应答。

[0149] 在某些实施方案中,干扰应答级联的试剂可以是对此类应答特异的抗体。

[0150] 生物标志物的表达

[0151] 可以以许多方式抑制标志物的表达,所述方式包括非限定性实例 :可对疾病细胞提供反义寡核苷酸以抑制标志物的转录、翻译或两者。备选地,可对细胞提供编码特异性结合标志物蛋白的抗体、抗体衍生物或抗体片段并且与适当的启动子 / 调节子区域有效连接的多核苷酸,以产生抑制所述蛋白的功能或活性的细胞内抗体。标志物的表达和 / 或功能还可通过用特异性结合标志物蛋白的抗体、抗体衍生物或抗体片段处理疾病细胞来抑制。通过使用本文中描述的方法,可筛选多种分子,特别地包括足够小以使它们能够穿过细胞膜的分子,以鉴定抑制标志物的表达或抑制标志物蛋白的功能的分子。可对受试者提供如此鉴定的化合物以抑制受试者的疾病细胞。

[0152] 任何标志物或标志物的组合,以及与所述标志物组合的任何特定标志物可用于本文中描述的组合物、试剂盒和方法中。一般地,期望使用这样的标志物,对于所述标志物,疾病细胞中该标志物的表达水平与正常结肠系统细胞中相同标志物的表达水平之间的差异尽可能大。虽然该差异可以小至用于评估标志物的表达的方法的检测极限,但期望差异至少大于评估方法的标准误,在一些实施方案中,与正常组织中相同标志物的表达水平相比,至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、100、500、1000 倍或更大的差异。

[0153] 已公认,某些标志物蛋白被分泌至围绕细胞的细胞外空间。由于此类标志物蛋白可在体液样品中检测,因此将这些标志物用于组合物、试剂盒和方法的某些实施方案,所述体液样品可以比组织活检样品更容易地从人受试者收集。此外,用于检测标志物蛋白的体内技术包括将抗所述蛋白的标记抗体引入受试者。例如,抗体可用其在受试者中的存在和定位可利用标准成像技术来检测的放射性标记物进行标记。

[0154] 为了确定任何特定的标志物蛋白是否是分泌蛋白,在例如哺乳动物细胞例如人细胞系中表达标志物蛋白,收集细胞外液体,评估蛋白质在细胞外液体中的存在或不存在

(例如,使用特异性结合所述蛋白的标记抗体)。

[0155] 应理解,含有此类细胞的受试者样品可用于本文中所述的方法。在这些实施方案中,标志物的表达水平可通过评估样品中标志物的量(例如,绝对量或浓度)来评估。当然,可在评估样品中标志物的量之前将细胞样品经历多种收集后制备和贮藏技术(例如,核酸和/或蛋白质提取、固定、贮藏、冷冻、超滤、浓缩、蒸发、离心等)。

[0156] 还应理解,可使标志物流出细胞进入例如呼吸系统、消化系统、血流和/或间质间隙。可以例如通过检查痰、BAL、血清、血浆、尿、粪便等来检测流出的标志物。

[0157] 组合物、试剂盒和方法可用于检测标志物蛋白的表达,所述标志物蛋白具有至少一个展示于表达其的细胞的表面上的部分。例如,可将免疫学方法用于检测完整细胞上的此类蛋白,或可将基于计算机的序列分析法用于预测至少一个细胞外结构域(即,包括分泌蛋白和具有至少一个细胞表面结构域的蛋白质)的存在。可检测标志物蛋白的表达而无需裂解细胞(例如,使用特异性结合蛋白的细胞表面结构域的标记抗体),所述标志物蛋白具有至少一个展示于表达其的细胞的表面上的部分。

[0158] 标志物的表达可通过多种用于检测转录的核酸或蛋白质的表达的方法中的任一种来评估。此类方法的非限定性实例包括用于检测分泌蛋白、细胞表面蛋白、细胞质蛋白或核蛋白的免疫学方法、蛋白质纯化法、蛋白质功能或活性测定法、核酸杂交法、核酸逆转录法以及核酸扩增法。

[0159] 在特定的实施方案中,标志物的表达可使用特异性结合标志物蛋白或其片段(包括已经历所有或部分其正常翻译后修饰的标志物蛋白)的抗体(例如,放射性标记的、发色团标记的、荧光团标记的或酶标记的抗体)、抗体衍生物(例如,缀合有底物或蛋白质或蛋白质-配体对的配体的抗体)或抗体片段(例如,单链抗体、分离的抗体高变结构域等)来评估。

[0160] 在另一个特定的实施方案中,标志物的表达通过下述来评估:从受试者样品的细胞制备 mRNA/cDNA(即,转录的多核苷酸),然后将 mRNA/cDNA 与为标志物核酸的互补序列的参照多核苷酸或其片段杂交。任选地,可在与参照多核苷酸杂交前使用多种聚合酶链式反应方法中的任一种来扩增 cDNA;优选,其不进行扩增。同样可使用定量 PCR 检测一个或多个标志物的表达以评估标志物的表达水平。备选地,可使用检测标志物的突变或变体(例如,单核苷酸多态性、缺失等)的许多方法中的任一种来检测受试者中标志物的存在。

[0161] 在相关实施方案中,将获自样品的转录的多核苷酸的混合物与在其上固定有多核苷酸(其与标志物核酸的至少一部分(例如,至少 7、10、15、20、25、30、40、50、100、500 或更多个核苷酸残基)互补或同源)的基质接触。如果可在基质上差异地检测到互补或同源的多核苷酸(例如,可使用不同的发色团或荧光团检测或固定至不同的选择的位置),那么可使用单个基质(例如,固定在所选择的位置上的多核苷酸的“基因芯片”微阵列)同时评估多个标志物的表达水平。当使用包括将一个核酸与另一个核酸杂交的评估标志物表达的方法时,期望在严格杂交条件下进行杂交。

[0162] 在某些实施方案中,可使用质谱法或表面等离子共振术进行生物标志物测定(biomarker assay)。在不同的实施方案中,鉴定活性抗受试者的病症和/或疾病状态的试剂的方法可包括一个或多个下列步骤:a) 提供含有一个或多个标志物或其衍生物的细胞的样品;b) 从此类细胞制备提取物;c) 将所述提取物与含有标志物结合位点的标记

核酸探针混合 ;和, d) 在测试试剂存在或不存在的条件下测定标志物与核酸探针之间的复合物的形成。测定步骤可包括将所述提取物 / 核酸探针混合物经历电泳迁移率试验 (electrophoretic mobility shift assay)。

[0163] 在某些实施方案中,测定步骤包括选自酶联免疫吸附测定 (ELISA)、基于荧光的测定和超高通量测定,例如,表面等离子共振术 (SPR) 或荧光相关光谱 (FCS) 测定的测定。在此类实施方案中,SPR 传感器用于指导生物分子相互作用的实时观察,因为 SPR 对金属 - 电介质表面上的微小折射率改变非常敏感。SPR 是对大约 200nm 的 SPR 传感器 / 样品介面内的 10^5 至 10^6 折射率 (RI) 单位的改变敏感的表面技术。因此,SPR 光谱法用于监控沉积在传感层上的薄有机薄膜的生长。

[0164] 因为组合物、试剂盒和方法依赖于一种或多种标志物的表达水平的差异的检测,因此期望标志物的表达水平显著大于用于评估至少一种正常细胞和受结肠癌影响的细胞中的表达的方法的最小检测极限。

[0165] 应理解,通过使用一种或多种标志物对另外的受试者样品进行常规筛选,将了解某些标志物在不同类型的细胞,包括受试者的特定病症和 / 或疾病状态细胞中过表达。

[0166] 此外,通过就标志物的表达评估更大数量的受试者样品,并且使从其获得样品的个体受试者的结果相互关联,还将确认某些标志物的改变的表达与受试者的病症和 / 或疾病状态强相关以及其他标志物的改变的表达与其他疾病强相关。从而组合物、试剂盒和方法可用于表征受试者的病症和 / 或疾病状态的分期、分级、组织学类型和性质中的一种或多种。

[0167] 当组合物、试剂盒和方法用于表征受试者的病症和 / 或疾病状态的分期、分级、组织学类型和性质中的一种或多种时,期望选择标志物或标志物组以使在至少大约 20%,在某些实施方案中,至少大约 40%、60%或 80%和基本上所有受试者 (其患有相应分期、分级、组织学类型或性质的病症和 / 或疾病状态) 中获得阳性结果。可选择本发明的标志物或标志物组以使对于一般群体可获得大于大约 10%的阳性预测值 (在非限定性的实例中,外加大于 80%的测定特异性)。

[0168] 当多个标志物用于组合物、试剂盒和方法时,可在单个反应混合物 (即,使用针对各个标志物的试剂,例如不同的荧光探针) 或在相应于一个或多个标志物的单独的反应混合物中,将受试者样品中各标志物的表达水平与相同类型的非病症和 / 或非疾病样品中多个标志物中的每一个的正常表达水平相比较。在一个实施方案中,相对于相应的正常水平,样品中一个以上的标志物的显著增加的表达水平表示受试者患有病症和 / 或疾病状态。当使用多个标志物时,可使用 2、3、4、5、8、10、12、15、20、30 或 50 或更多个单独的标志物 ;在某些实施方案中,可能期望使用更少的标志物。

[0169] 为了使组合物、试剂盒和方法的灵敏性最大化 (即在干扰可归因于受试者样品中系统来源的细胞的情况下),期望本文中所使用的标志物是具有受限制的组织分布 (例如通常不在非系统组织中表达) 的标志物。

[0170] 应认识到,组合物、试剂盒和方法对于具有增加的发生受试者的病症和 / 或疾病状态的风险的受试者和他们的医学顾问将是特别有用的。被认为具有增加的发生病症和 / 或疾病的风险的受试者包括例如具有此类病症或疾病的家族史的受试者。

[0171] 可以以多种方法评估正常人系统组织中标志物的表达水平。在一个实施方案中,

该正常表达水平通过下述来评估：评估一部分表现正常的系统细胞中标志物的表达水平且将该正常表达水平与一部分怀疑为异常的系统细胞中的表达水平相比较。备选地，特别是当由于常规进行本文中所述的方法而可获得进一步的信息时，可使用标志物的正常表达的群体平均值。在其他实施方案中，标志物的“正常”表达水平可通过评估标志物在从未受影响的受试者获得的受试者样品、在怀疑病症和 / 或疾病状态在受试者中发作之前从受试者获得的受试者样品、编档保存的受试者样品等中的表达来进行测定。

[0172] 本文中还提供了用于评估病症和 / 或疾病状态细胞在样品（例如编档保存的组织样品或从受试者获得的样品）中的存在的组合物、试剂盒和方法。这些组合物、试剂盒和方法基本上与上述的相同，除了必要时，使组合物、试剂盒和方法适用于除了受试者样品外的样品。例如，当待使用的样品是石蜡包埋的（parafinized）编档保存的人组织样品时，可能必需在用于评估样品中标志物表达水平的组合物、试剂盒或方法中调整化合物的比例。

[0173] 试剂盒和试剂

[0174] 试剂盒可用于评估疾病细胞的存在（例如在样品例如受试者样品中）。试剂盒包括多种试剂，其各自能够特异性结合标志物核酸或蛋白质。用于与标志物蛋白结合的合适的试剂包括抗体、抗体衍生物、抗体片段等。用于与标志物核酸（例如基因组 DNA、MRNA、剪接的 MRNA、cDNA 等）结合的合适的试剂包括互补核酸。例如，核酸试剂可包括固定至基质的寡核苷酸（标记的或未标记的）、不与基质结合的标记的寡核苷酸、PCR 引物对、分子信标探针等。

[0175] 试剂盒可任选地包含用于进行本文中所述的方法的另外的成分。例如，试剂盒可包含适合于使互补核酸退火或适合于使抗体与其特异性结合的蛋白质结合的液体（例如 SSC 缓冲液）、一个或多个样品隔室、描述方法的进行的说明书、正常结肠系统细胞样品、结肠癌相关疾病细胞样品等。

[0176] 产生抗体的方法

[0177] 本文中还提供了制备产生用于评估受试者是否患有病症和 / 或疾病状态的抗体的分离的杂交瘤的方法。在该方法中，合成或分离（例如通过从表达其的细胞纯化或通过体内或体外转录和翻译编码蛋白质或肽的核酸）含有完整标志物蛋白或其区段的蛋白质或肽。使用蛋白质或肽免疫脊椎动物例如哺乳动物例如小鼠、大鼠、兔或绵羊。任选地（和优选地）可用蛋白质或肽免疫脊椎动物至少另外一次，从而使脊椎动物呈现强烈的针对蛋白质或肽的免疫应答。从免疫的脊椎动物分离脾细胞，使用多种方法中的任一种将其与永生化的细胞系融合从而形成杂交瘤。然后使用标准方法筛选以该方式形成的杂交瘤，从而鉴定一个或多个产生特异性结合标志物蛋白或其片段的抗体的杂交瘤。本文还提供了通过该方法制备的杂交瘤和使用这样的杂交瘤制备的抗体。

[0178] 评估功效的方法

[0179] 本文还提供了评估测试化合物抑制疾病细胞的功效的方法。如上所述，标志物的表达水平的差异与受试者的细胞的异常状态相关。虽然公认，某些标志物的表达水平的变化可能由此类细胞的异常状态引起，但同样公认，其他标志物的表达水平的变化诱导、维持和促进此类细胞的异常状态。因此，抑制受试者的病症和 / 或疾病状态的化合物将使一个或多个标志物的表达水平改变至更接近该标志物的正常表达水平（即，所述标志物在正常细胞中的表达水平）的水平。

[0180] 因此本方法包括将在测试化合物存在的情况下维持的第一细胞样品中的标志物的表达与在测试化合物不存在的情况下维持的第二结肠细胞样品中的标志物的表达相比较。在测试化合物存在的情况下,标志物的显著减少的表达表示该测试化合物抑制相关疾病。细胞样品可以例如是获自受试者的正常细胞的单个样品的等分、获自受试者的正常细胞的混合样品、正常细胞系的细胞、获自受试者的相关疾病细胞的单个样品的等分、获自受试者的相关疾病细胞的混合样品、相关疾病细胞系的细胞等。

[0181] 在一个实施方案中,样品是获自受试者的癌症相关疾病细胞,并且检测多种据认为对于抑制各种癌症相关疾病是有效的化合物,以鉴定可能最佳地抑制受试者的癌症相关疾病的化合物。

[0182] 同样可将该方法用于评估疗法抑制受试者的相关疾病的有效性。在该方法中,评估一个或多个标志物在样品对(一个样品经历疗法,另一个不经历疗法)中的表达水平。与评估测试化合物的有效性的方法一样,如果疗法诱导显著更低的标志物表达水平,则疗法对于抑制癌症相关疾病是有效的。如上,如果来自选择的受试者的样品用于本方法,那么可在体外评估备选疗法以选择对于抑制受试者的癌症相关疾病最可能有效的疗法。

[0183] 如本文中所述的,人细胞的异常状态与标志物的表达水平的变化相关。还提供了用于评估测试化合物的有害潜能的方法。该方法包括在测试化合物存在和不存的情况下维持分开的人细胞等分。比较各等分中标志物的表达。在测试化合物存在的情况下维持的等分中标志物的显著更高的表达水平(相对于在测试化合物不存在的情况下维持的等分)表示测试化合物具有有害的潜能。各种测试化合物的相对有害潜能可通过比较相关标志物的表达水平的增强或抑制的程度,通过比较其表达水平被增强或抑制的标志物的数目,或通过比较两者来评估。在下列部分更详细地描述了各个方面。

[0184] 分离的蛋白质和抗体

[0185] 一个方面涉及分离的标志物蛋白和其生物活性部分,以及适合用作免疫原以产生抗标志物蛋白或其片段的抗体的多肽片段。在一个实施方案中,天然标志物蛋白可使用标准蛋白质纯化技术通过适当的纯化方案从细胞或组织来源分离。在另一个实施方案中,含有完整的标志物蛋白或其区段的蛋白质或肽通过重组 DNA 技术产生。除重组表达外,可使用标准肽合成技术化学合成此类蛋白质或肽。

[0186] “分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物活性部分基本上不含细胞材料或来自细胞或组织来源(所述蛋白质源自于其)的其他污染性蛋白,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学药品。术语“基本上不含细胞材料”包括其中将蛋白质与从其分离或重组产生所述蛋白质的细胞的细胞组分分离的蛋白质制剂。因此,基本上不含细胞材料的蛋白质包括具有低于大约 30%、20%、10%或 5%(按干重计算)的异种蛋白质(在本文中也称为“污染性蛋白”)的蛋白质制剂。

[0187] 当重组产生蛋白质或其生物活性部分时,其也优选基本上不含培养基,即,培养基占据低于大约 20%、10%或 5%的蛋白质制剂的体积。当通过化学合成产生蛋白质时,其优选基本上不含化学前体或其他化学药品,即,其与参与蛋白质合成的化学前体或其他化学药品分离。因此,此类蛋白质制剂具有低于大约 30%、20%、10%、5%(按干重计算)的化学前体或除了目的多肽外的化合物。

[0188] 标志物蛋白的生物活性部分包括含有与标志物蛋白的氨基酸序列充分同一或源

自于其的氨基酸序列的多肽,其包含比全长蛋白质更少的氨基酸,并且展示相应的全长蛋白质的至少一种活性。通常,生物活性部分包含具有相应的全长蛋白质的至少一种活性的结构域或基序。标志物蛋白的生物活性部分可以是其长度为例如 10、25、50、100 或更多个氨基酸的多肽。此外,其中标志物蛋白的其他区域被缺失的其他生物活性部分可通过重组技术来制备,并且可就标志物蛋白的天然形式的一种或多种功能活性对其进行评估。在某些实施方案中,有用的蛋白质与此类序列之一基本上同一(例如,至少大约 40%,在某些实施方案中,50%、60%、70%、80%、90%、95%或 99%同一)并且保持相应的天然发生的标志物蛋白的功能活性但因天然等位基因变异或诱变而在氨基酸序列上不同。

[0189] 此外,标志物蛋白的区段文库可用于产生用于筛选和随后选择变异标志物蛋白或其区段的多肽的多样化(variegated)群体。

[0190] 预测医学

[0191] 本文中还提供动物模型和标志物在预测医学领域中的用途,其中诊断测定、预后测定、药物基因组学和监控临床试验用于预后(预测)目的,从而预防性治疗个体。因此,本文中还提供用于测定一个或多个标志物蛋白或核酸的表达水平以确定个体是否处于发生特定病症和/或疾病的风险中的诊断测定。此类测定可用于预后或预测目的,从而在病症和/或疾病发作之前预防性治疗个体。

[0192] 在另一个方面,方法可用于相同个体的至少周期性筛查以观察该个体是否已暴露于改变他/她的表达模式的化学药品或毒素。

[0193] 另一方面涉及监控被施用以抑制病症和/或疾病或治疗或预防任何其他病症的试剂(例如,药物或其他化合物)在临床试验中对标志物的表达或活性的影响(例如,以了解这样的治疗可能具有的任何系统性作用)。

[0194] 药物组合物

[0195] 化合物可进行配制以用于在合适的药物载体中局部(topically)、局域(locally)或全身性施用。Remington's Pharmaceutical Sciences,第 15 版,E. W. Martin(Mark Publishing Company,1975),公开了常用载体和制备方法。化合物还可以封装在用于靶向细胞的合适的生物相容性微胶囊、微粒或微球体(由生物可降解或非生物可降解聚合物或蛋白质或脂质体形成)。此类系统对于本领域技术人员来说是熟知的并且可进行最优化以与合适的核酸一起使用。

[0196] 在例如 Sambrook 等人,1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; 和 Ausubel 等人,1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 中描述了用于核酸递送的各种方法。此类核酸递送系统包括期望的核酸,例如但不限于,其以“裸露的”形式作为“裸露的”核酸,或配制于适合于递送的媒介物中例如与阳离子分子或形成脂质体的脂质的复合物中,或作为载体的成分或药物组合物的成分。可将核酸递送系统直接(例如通过将其与细胞接触)或间接(例如通过任何生物过程的作用)提供给细胞。

[0197] 用于局部施用的制剂可包括软膏、洗剂、乳膏剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂。需要时可使用常规药物载体(水性的、粉状的或基于油的)或增稠剂。

[0198] 适合用于胃肠外施用例如通过关节内(关节中)、静脉内、肌内、真皮内、腹膜内和皮下途径施用的制剂包括水性和非水性的等渗无菌注射液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑

菌剂和使制剂与期望的受者的血液等渗的溶质,以及水性和非水性无菌悬浮液、溶液或乳剂,其可包括悬浮剂、增溶剂、增稠剂、分散剂、稳定剂和防腐剂。用于注射的制剂可以以单位剂型、与加入的防腐剂一起存在,例如存在于安瓿中或存在于多剂量容器中。本领域技术人员可容易地确定制备和配制组合物的各种参数而无需过度的实验。可单独地或与其他合适的成分组合来使用化合物。

[0199] 一般地,施用化合物(包括核酸)的方法在本领域内是熟知的。特别地,已用于核酸治疗剂的施用途径,和目前使用的制剂一起,为选择的核酸提供了优选的施用和配制途径,当然这将取决于因素例如特定的制剂、待治疗的受试者的状态的严重度和治疗功效所需的剂量。如本文中通常使用的,“有效量”是指在对其施用了制剂的受试者(与未接受所述化合物的匹配的受试者相比较)中能够治疗病症的一个或多个症状,逆转病症的一个或多个症状的进展,终止病症的一个或多个症状的进展或预防病症的一个或多个症状的发生的量。化合物的实际有效量可根据待使用的特定化合物或其组合、配制的特定组合物、施用模式,和个体的年龄、体重、状况,和待治疗的病症或病况的严重度而变化。

[0200] 本领域技术人员已知的任何可接受的方法可用于给受试者施用制剂。取决于待治疗的病况,施用可以是局部的(即,至特定区域、生理系统、组织、器官或细胞类型)或全身性的。

[0201] 药物基因组学

[0202] 标志物还可用作药物基因组学标志物。如本文中所用的,“药物基因组学标志物”是其表达水平与受试者中特定临床药物应答或易感性相关的目的生物化学标志物。药物基因组学标志物表达的存在或量与预测的受试者应答和更特别地受试者的肿瘤对用特定药物或药物种类的疗法的应答相关。通过评估受试者中一个或多个药物基因组学标志物的表达的存在或量,可选择最适合于受试者的或预测具有更大的成功程度的药物疗法。

[0203] 监控临床试验

[0204] 监控试剂(例如,药物化合物)对标志物的表达水平的影响不仅可用于基础药物筛选,而且还可用于临床试验。例如,可在接受结肠癌相关疾病治疗的受试者的临床试验中监控试剂影响标志物表达的有效性。

[0205] 在一个非限定性实施方案中,本发明提供了用于监控利用试剂(例如,激动剂、拮抗剂、模拟肽、蛋白质、肽、核酸、小分子或其他药物候选物)治疗受试者的有效性的方法,该方法包括步骤:

[0206] 在施用试剂之前从受试者获得施用前的样品;

[0207] 检测一个或多个选择的标志物在施用前的样品中的表达水平;

[0208] 从受试者获得一个或多个施用后的样品;

[0209] 检测标志物在施用后的样品中的表达水平;

[0210] 将施用前的样品中标志物的表达水平与施用后的样品中标志物的表达水平相比较;和

[0211] 相应地改变试剂至受试者的施用。

[0212] 例如,在治疗过程中增加的标志物基因的表达可表明无效剂量,从而需要增加剂量。相反地,减少的标志基因的表达可表明有效治疗,从而不需要改变剂量。

[0213] 电子设备可读介质、系统、阵列和使用其的方法

[0214] 如本文中所使用的,“电子设备可读介质”是指用于存储、保存或包含可用电子设备直接阅读和存取的数据或信息的任何适当介质。此类介质可包括但不限于:磁性存储介质,例如软盘、硬盘存储介质以及磁带;光学存储介质例如光盘;电子存储介质例如 RAM、ROM、EPROM、EEPROM 等;以及普通硬盘和这些类别的混合体例如磁性/光学存储介质。可对介质进行改造或设定以用于在其上记录本文中所述的标志物。

[0215] 如本文中所用的,术语“电子设备”旨在包括任何适当的计算或处理设备或其他经改造或设定用于存储数据或信息的装置。适合用于本发明的电子设备的实例包括独立的计算设备;网络,包括局域网(LAN)、广域网络(WAN)因特网、内联网和外联网;电子器具例如个人数字助理(PDA)、手机、寻呼机(pager)等;以及局域和分布式处理系统。

[0216] 如本文中所使用的,“记录”是指在电子设备可读介质上存储或编码信息的过程。本领域技术人员可容易地采用任何用于在介质上记录信息的方法来产生包含本文中所述的标志物的材料。

[0217] 许多软件程序和格式可用于在电子设备可读介质上存储本发明的标志物信息。为了获得或产生在其上记录了标志物的介质,可使用许多数据处理程序构建格式(data processor structuring format)(例如,文本文件或数据库)。通过以可读形式提供标志物,可常规存取用于多种目的的标志物序列信息。例如,本领域技术人员可使用可读形式的核苷酸或氨基酸序列来将靶序列或靶结构基序与存储在数据存储工具中的序列相比较。搜索工具用于鉴定匹配特定靶序列或靶基序的序列的片段或区域。

[0218] 因此,本文中还提供了用于保存进行确定受试者是否具有癌症相关疾病或对癌症相关疾病的易感性的方法的说明书的介质,其中所述方法包括步骤:确定标志物的存在或不存在,并且基于标志物的存在或不存在来确定受试者是否具有癌症相关疾病或对癌症相关疾病的易感性,和/或推荐用于癌症相关疾病或癌症相关疾病前状况(pre-cancer-related disease condition)的特定治疗。

[0219] 本文中还提供了电子系统和/或在网络中提供了用于确定受试者是否患有癌症相关疾病或具有对与标志物相关的癌症相关疾病的易感性的方法,其中所述方法包括步骤:确定标志物的存在或不存在,并且基于标志物的存在或不存在来确定受试者是否患有特定病症和/或疾病或具有对此类病症和/或疾病的易感性,和/或推荐用于此类疾病或疾病和/或这样的癌症相关疾病前状况的特定治疗。该方法还可包括接收与受试者相关的表型信息和/或从网络获取与受试者相关的表型信息的步骤。

[0220] 本文中还提供了网络,用于确定受试者是否患有病症和/或疾病或具有对与标志物相关的病症和/或疾病的易感性的方法,所述方法包括步骤:接收与标志物相关的信息,接收与受试者相关的表型信息,从网络获取相应于标志物和/或病症和/或疾病的信息,并且基于表型信息、标志物和获取的信息中的一个或多个,确定受试者是否患有病症和/或疾病或具有对其的易感性。所述方法还包括推荐用于病症和/或疾病或对其的易感性的特定治疗的步骤。

[0221] 本文中还提供了用于确定受试者是否患有病症和/或疾病或具有对其的易感性的商业方法,所述方法包括步骤:接收与标志物相关的信息,接收与受试者相关的表型信息,从网络获取相应于标志物和/或病症和/或疾病的信息,并且基于表型信息、标志物和获得的信息中的一个或多个,确定受试者是否患有病症和/或疾病或具有对其的易感性。

所述方法还可包括推荐用于其的特定治疗的步骤。

[0222] 本文中还提供了可用于测定阵列中一个或多个基因的表达的阵列。在一个实施方案中,阵列可用于测定组织中基因的表达,从而确定阵列中基因的组织特异性。这样,可就表达同时测定直至大约 7000 或更多个基因。这使得能够产生显示在一个或多个组织中特异性表达的一组基因的特征谱。

[0223] 除了此类定性测定外,本文中还提供了基因表达的定量。因此,不仅组织特异性而且一组基因在组织中的表达水平也是可确定的。因此,可基于基因本身的组织表达和在该组织中的表达水平来对基因进行分类。这可用于例如确定组织间基因表达的关系。因此,可干扰一个组织,然后可测定对第二组织中的基因表达的影响。在本说明书中,可测定一种细胞类型对另一种细胞类型(响应生物刺激)的影响。

[0224] 此类测定可用于例如在基因表达的水平上了解细胞间相互作用的效果。如果试剂被治疗性施用以治疗一种细胞类型但其对另一种细胞类型具有不期望的作用,则所述方法提供了确定不期望的作用的分子基础的测定,从而提供共施用中和剂(counteracting agent)或另外治疗不期望的作用的机会。类似地,即使在单个细胞类型中,可在分子水平上测定不期望的生物学效应。因此,可确定和中和试剂对非靶基因的表达的作用。

[0225] 在另一个实施方案中,阵列可用于监控阵列中一个或多个基因的表达的时程。如本文中公开的,这可发生在各种生物学背景(例如病症和/或疾病的发生,其进展)和过程(例如与其相关的细胞转化)中。

[0226] 阵列还可用于确定基因的表达或其他基因的表达在相同细胞或不同细胞中的作用。如果不能调控最终或下游靶,那么这提供了例如用于治疗性干预的备选分子靶的选择。

[0227] 阵列还可用于确定一个或多个基因在正常和异常细胞中的差异表达模式。这提供了可用作诊断或治疗性干预的分子靶的一组基因。

[0228] 替代标志物(Surrogate Marker)

[0229] 标志物可用作一种或多种病症或疾病状态或导致其的状况的替代标志物。如本文中所使用的,“替代标志物”是与疾病或病症的不存在或存在,或与疾病或病症的进展相关的目的生物化学标志物。此类标志物的存在或量不依赖于疾病。因此,此类标志物可用于指示特定的疗程在减轻疾病状态或病症中是否有效。当疾病状态或病症的存在或程度难以通过标准方法来评估,或当在达到潜在危险的临床终点之前期望评估疾病进展时,替代标志物是特别有用的。

[0230] 标志物还可用作药效标志物(pharmacodynamic marker)。如本文中所使用的,“药效标志物”是与药物作用特异性相关的目的生物化学标志物。药效标志物的存在或量与将其施用药物的疾病状态或病症无关;因此,标志物的存在或量表示药物在受试者中的存在或活性。例如,药效标志物可表示药物在生物组织中的浓度,因为标志物在该组织中表达或转录,或者不表达或转录与药物的水平相关。这样,药物的分布或吸收可通过药效标志物来监控。类似地,药效标志物的存在或量可与药物的代谢产物的存在或量相关,这样标志物的存在或量表示药物在体内的相对分解速率。

[0231] 药效标志物在增加药物作用的检测的灵敏性中特别有用,特别是当以低剂量施用药物时。由于即使少量的药物也可足以激活多轮的标志物转录或表达,因此扩增的标志物可以以比药物本身更容易检测的量存在。同样,标志物由于其本身的性质而可以更容易地

进行检测；例如，通过使用本文中描述的方法，可将抗体用于针对蛋白标志物的基于免疫的检测系统，或可使用标志物特异性放射性标记探针来检测 mRNA 标志物。此外，药效标志物的使用可提供由于药物治疗超出可直接观察的范围而产生的风险的基于机制的预测。

[0232] 用于检测的方案

[0233] 检测病症和 / 或疾病的方法可包括例如在一段时间内测量各标志物基因在来自受试者的生物学样品中的表达水平和将该水平与对照生物学样品中标志物基因的水平相比较。

[0234] 当标志物基因是本文中描述的基因之一并且表达水平差异表达（例如，比对照中的表达水平更高或更低）时，受试者被判断为患有病症和 / 或疾病。当标志物基因的表达水平落在容许的范围内时，受试者不可能患有所述病症和 / 或疾病。

[0235] 可通过测量对照中标志物基因的表达水平来预先测定对照的标准值，以比较表达水平。例如，可基于上述标志物基因在对照中的表达水平来测定标准值。例如，在某些实施方案中，容许的范围基于标准值采用 $\pm 2S. D.$ 。在测定标准值后，可通过只测量来自受试者的生物学样品中的表达水平并将该值与测定的对照的标准值相比较来进行检测方法。

[0236] 标志物基因的表达水平包括标志物基因至 mRNA 的转录和至蛋白质的翻译。因此，基于相应于标志物基因的 mRNA 的表达强度或由标志物基因编码的蛋白质的表达水平的比较，进行检测病症和 / 或疾病的一个方法。

[0237] 可根据各种基因分析方法在病症和 / 或疾病的检测中测量标志物基因的表达水平。具体地，可使用例如利用与此类基因杂交的核酸作为探针的杂交技术，或利用与标志物基因杂交的 DNA 作为引物的基因扩增技术。

[0238] 可基于标志物基因的核苷酸序列设计用于检测的探针或引物。本文中描述了各标志物基因的核苷酸序列的标识号。

[0239] 此外，应理解，高等动物的基因通常伴有高频率的多态性。也存在许多在剪接过程中产生含有相互不同的氨基酸序列的同种型的分子。与结肠癌相关疾病相关的、具有与标志物基因的活性相似的活性的任何基因包括在标志物基因中，即使其由于多态性或为同种型而具有核苷酸序列差异。

[0240] 也应理解，标志物基因可包括除了人外的其他物种的同源物。因此，除非明确指出，否则表述“标志物基因”是指对于物种独特的标志物基因的同源物或已被导入个体的外源标志物基因。

[0241] 同样，应理解，“标志物基因的同源物”是指来源于除了人以外的物种的基因，其在严格条件下可作为探针与人标志物基因杂交。这样的严格条件对于本领域技术人员（其可通过实验或凭经验选择适当的条件来产生相同严格性）来说是已知的。

[0242] 含有标志物基因的核苷酸序列或与标志物基因的核苷酸序列的互补链互补并且具有至少 15 个核苷酸的核苷酸序列的多核苷酸可用作引物或探针。因此，“互补链”是指由 A:T（对于 RNA 为 U）和 G:C 碱基对组成的双链 DNA 中相对于另一条链的一条链。

[0243] 此外，“互补”不仅意指与至少 15 个连续核苷酸的区域完全互补的序列，而且还指具有在某些情况下至少 40%，在某些情况下 50%，在某些情况下 60%，在某些情况下 70%，在某些情况下 80%，在某些情况下 90% 和在某些情况下 95% 或更高的核苷酸序列同源性的序列。核苷酸序列之间的同源性的程度可利用算法 BLAST 等来测定。

[0244] 此类多核苷酸可用作检测标志物基因的探针,或用作扩增标志物基因的引物。当用作引物时,多核苷酸通常包含 15bp 至 100bp,在某些实施方案中 15bp 至 35bp 的核苷酸。当用作探针时,DNA 包含标志物基因的整个核苷酸序列(或其互补链),或具有至少 15bp 核苷酸的其部分序列。当用作引物时,3' 区域必须与标志物基因互补,而 5' 区域可连接至限制性内切酶识别序列或标签(tag)。

[0245] “多核苷酸”可以是 DNA 或 RNA。此类多核苷酸可以是合成的或天然发生的。同样,通常也标记用作杂交探针的 DNA。本领域技术人员易于理解此类标记方法。在本文中,术语“寡核苷酸”意指具有相对低的聚合程度的多核苷酸。寡核苷酸也包括在多核苷酸内。

[0246] 可使用例如 Northern 杂交、斑点印迹杂交或 DNA 微阵列技术进行利用杂交技术的病症和/或疾病的检测。此外,可使用基因扩增技术例如 RT-PCR 法。通过在 RT-PCR 的基因扩增步骤中使用 PCR 扩增监控法,可更加定量地分析标志物基因的表达。

[0247] 在 PCR 基因扩增监控法中,将检测靶(DNA 或 RNA 的反转录物)与用荧光染料和吸收荧光的猝灭剂标记的探针杂交。当 PCR 进行并且 Taq 聚合酶以其 5' -3' 外切核酸酶活性降解探针时,荧光染料与猝灭剂彼此分离,从而检测到荧光。实时检测荧光。通过同时测量其中靶的拷贝数是已知的标准样品,可利用循环数(其中 PCR 扩增是线性的)测定受试者样品中靶的拷贝数。同样,本领域技术人员公认 PCR 扩增监控法可使用任何适当的方法来进行。

[0248] 还可通过检测标志物基因编码的蛋白质来进行检测结肠癌相关疾病的方法。在下文中,标志物基因编码的蛋白质被描述为“标志物蛋白”。对于此类检测方法,可通过使用结合各标志物蛋白的抗体来应用例如,Western 印迹法、免疫沉淀法和 ELISA 法。

[0249] 用于检测的结合标志物蛋白的抗体可通过任何适当的技术来产生。同样,为了检测标志物蛋白,可适当地标记这样的抗体。备选地,可不标记抗体,而是标记特异性结合抗体的物质例如蛋白 A 或蛋白 G 以间接检测标志物蛋白。更特别地,此类检测方法可包括 ELISA 法。

[0250] 可以例如通过将标志物基因或其部分插入表达载体,将构建体导入适当的宿主细胞来产生转化株,培养所述转化株以表达重组蛋白,然后从培养物或培养上清液纯化表达的重组蛋白来获得用作抗原的蛋白质或其部分肽。备选地,可化学合成由基因编码的氨基酸序列或含有由全长 cDNA 编码的氨基酸序列的一部分的寡肽,以用作免疫原。

[0251] 此外,可通过将不仅生物样品中标志物基因的表达水平而且标志物蛋白的活性用作指标来进行结肠癌相关疾病的检测。标志物蛋白的活性意指蛋白本身固有的生物学活性。可使用各种方法测量每一种蛋白的活性。

[0252] 即使在常规检测中受试者未被诊断为患有病症和/或疾病(尽管症状暗示此类疾病),这样的受试者是否患有病症和/或疾病也可通过按照本文中所述的方法进行检测来容易地确定。

[0253] 更特别地,在某些实施方案中,当标志物基因是本文描述的基因之一时,其症状至少暗示对病症和/或疾病的易感性的受试者中,标志物基因的表达水平的增加或减少表明症状主要由所述病症和/或疾病引起。

[0254] 此外,检测可用于确定病症和/或疾病是否在受试者中得到改善。换句话说,本文中描述的方法可用于判断用于所述病症和/或疾病的治疗的治疗效果。此外,当标志物基

因是本文描述的基因之一时,已被诊断为患有所述病症和 / 或疾病的受试者中,标志物基因的表达水平的增加或减少意味着疾病已向前发展。

[0255] 还可基于表达水平的差异测定病症和 / 或疾病的严重度和 / 或对其的易感性。例如,当标志物基因是本文描述的基因之一时,标志物基因的表达水平的增加程度与病症和 / 或疾病的存在和 / 或严重度相关。

[0256] 动物模型

[0257] 还可产生病症和 / 或疾病的动物模型,其中一个或多个标志物基因或功能上与标志物基因等同的基因的表达水平在所述动物模型中已被提高。如本文中所述的,“功能上等同的基因”通常是编码具有与标志物基因编码的蛋白质的已知活性相似的活性的蛋白质的基因。功能上等同的基因的代表性实例包括受试动物的标志物基因对应物,其是动物本身固有的。

[0258] 动物模型可用于检测由于病症和 / 或疾病而引起的生理学变化。在某些实施方案中,动物模型可用于揭示标志物基因的另外的功能和评估其靶为标志物基因的药物。

[0259] 动物模型可通过控制对应物基因的表达水平或施用对应物基因来产生。方法可包括通过控制选自本文中所述的基因的基因的表达水平来产生动物模型。在另一个实施方案中,方法可包括通过施用由本文中所描述的基因编码的蛋白质或施用抗所述蛋白的抗体来产生动物模型。还应理解,在某些其他实施方案中,可过表达标志物,以便可使用适当的方法测量标志物。在另一个实施方案中,动物模型可通过导入选自此类基因的基因,或通过施用由这样的基因编码的蛋白质来产生。在另一个实施方案中,病症和 / 或疾病可通过抑制选自此类基因的基因的表达或由这样的基因编码的蛋白质的活性来诱导。反义核酸、核酶或 RNAi 可用于抑制表达。蛋白质的活性可通过施用抑制所述活性的物质例如抗体来有效地控制。

[0260] 动物模型可用于阐明病症和 / 或疾病背后的机制,还可用于检测通过筛选获得的化合物的安全性。例如,当动物模型产生特定病症和 / 或疾病的症状时,或当牵涉某种病症和 / 或疾病的测量值在动物中改变时,可构建筛选系统以探测具有减轻疾病的活性的化合物。

[0261] 如本文中所使用的,表述“表达水平的增加”是指下列情况的任一种:人工表达作为外源基因导入的标志物基因;受试动物本身固有的标志物基因的转录和其至蛋白质的翻译得到增强;或作为翻译产物的蛋白质的水解被抑制。

[0262] 如本文中所用的,表述“表达水平的减少”是指其中受试动物的标志物基因的转录和其至蛋白质的翻译被抑制的情况,或其中作为翻译产物的蛋白质的水解被增强的情况。基因的表达水平可以例如通过 DNA 芯片上信号强度的差异来测定。此外,翻译产物(蛋白质)的活性可通过与正常情况中的活性相比较来测定。

[0263] 也在预期的范围内的是:动物模型可包括转基因动物,包括例如其中已人工导入并且表达标志物基因的动物;标志物基因敲除动物;和其中已用另一个基因置换标志物基因的基因敲入动物。已向其中导入了标志物基因的反义核酸、核酶、具有 RNAi 作用的多核苷酸或用作诱饵核酸的 DNA 等的转基因动物可用作转基因动物。此类转基因动物还包括例如这样的动物,在所述动物中标志物蛋白的活性已通过将突变导入基因的编码区而得到增强或抑制,或氨基酸序列已被修饰而变得抗水解或对水解敏感。氨基酸序列中的突变包括

置换、缺失、插入和添加。

[0264] 表达的实例

[0265] 此外,标志物基因本身的表达可通过向基因的转录调控区导入突变来控制。本领域技术人员理解此类氨基酸置换。同样,被突变的氨基酸的数目不受特别限制,只要活性得到保持即可。通常,其在 50 个氨基酸以内,在某些非限定性实施方案中,在 30 个氨基酸以内,在 10 个氨基酸以内,或在 3 个氨基酸以内。突变的位点可以是任何位点,只要活性得到保持即可。

[0266] 在另一个方面,本文中提供了治疗特定病症和 / 或疾病的治疗剂的候选化合物的筛选方法。一个或多个标志物基因选自本文中描述的基因。可通过选择能够增加或减少标志物基因的表达水平的化合物来获得结肠癌相关疾病的治疗剂。

[0267] 应理解,表述“增加基因的表达水平的化合物”是指促进基因转录、基因翻译或蛋白质活性的表达的步骤中的任一步骤的化合物。另一方面,表述“减少基因的表达水平的化合物”,如本文中所述的,是指抑制这些步骤中的任一步骤的化合物。

[0268] 在特定的方面,可在体内或体外进行筛选用于病症和 / 或疾病的治疗剂的方法。该筛选方法可以例如通过下列步骤来进行:

[0269] 对动物受试者施用候选化合物;

[0270] 测量动物受试者的生物学样品中标志物基因的表达水平;或

[0271] 选择与对照(其未与候选化合物接触)中标志物基因的表达水平相比较增加或减少标志物基因的表达水平的化合物。

[0272] 在另一个方面,本文中提供了这样的方法,其通过将动物受试者与候选化合物接触,然后监控化合物对来源于动物受试者的生物学样品中标志物基因的表达水平的作用来评估药剂的候选化合物对标志物基因的表达水平的功效。来源于动物受试者的生物学样品中标志物基因的表达水平的变化可使用与上述检测方法中所用的相同的技术来监控。此外,基于评估,可通过筛选来选择药剂的候选化合物。

[0273] 本文中所引用的所有专利、专利申请和参考文献以其全文通过引用合并入本文。虽然对于制备和使用其的本领域技术人员来说已十分详尽地描述和例示了本发明,但各种改变、修饰和改进是显然的,且不背离本发明的精神和范围。本领域技术人员易于理解,本发明可进行适当地改变以适合于实现目的和获得提及的目标和有利方面以及其中固有的那些。

[0274] 某些核碱基 (Nucleobase) 序列

[0275] 本文中描述的成熟 miRNA 和它们的相应的茎 - 环序列的核碱基序列是见于 miRBase(见于 <http://microrna.sanger.ac.uk/> 的 miRNA 序列和注释的在线可搜索数据库) 中的序列。miRBase 序列数据库中的条目 (entry) 代表预测的 miRNA 转录物的发夹部分 (茎 - 环) 和关于成熟 miRNA 序列的定位和序列的信息。数据库中 miRNA 的茎 - 环序列严格说来不是前体 miRNA (pre-miRNA), 并且在一些情况下可包括 pre-miRNA 和来自假定的初级转录物的一些侧翼序列。本文中描述的 miRNA 核碱基序列包括 miRNA 的任何形式, 包括 miRBase 序列数据库的 Release 10.0 中描述的序列和 miRBase 序列数据库的任何更早的 Release 中描述的序列。序列数据库释放可导致某些 miRNA 的重新命名。序列数据库释放可导致成熟 miRNA 序列的变化。可包括此类修饰的寡核苷酸的化合物可与本文中描述的

miRNA 的任何核碱基序列形式互补。

[0276] 应理解,本文中所示的任何核碱基序列不依赖于对糖部分、核苷间连接或核碱基的任何修饰。还应理解,包含 U 的核碱基序列也包括其中在一个或多个具有‘U’的位点上‘U’被‘T’置换的相同核碱基序列。反过来,应理解,包含 T 的核碱基序列也包括其中在一个或多个具有‘T’的位点上‘T’被‘U’置换的相同核碱基序列。

[0277] 在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸具有与 miRNA 或其前体互补的核碱基序列,这意味着修饰的寡核苷酸的核碱基序列在 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多个核碱基的区域中与 miRNA 或其前体的互补序列至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 同一,或两个序列在严格杂交条件下杂交。因此,在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸的核碱基序列相对于其靶 miRNA 或靶 miRNA 前体序列可具有一个或多个错配的碱基对,并且能够与其靶序列杂交。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸具有与 miRNA 或其前体 100% 互补的核碱基序列。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸的核碱基序列具有对 miRNA 的全长互补性。

[0278] miRNA(miR) 疗法

[0279] 在一些实施方案中,本发明提供了抑制受试者的一个或多个基因的表达的微 RNA。微 RNA 表达特征谱可用作新型癌症生物标志物。

[0280] 本文中包括使用一个或多个 MiR 抑制基因表达和 / 或活性的方法。在一些实施方案中,miR 抑制蛋白质的表达。在其他实施方案中,miRNA 抑制基因活性(例如,细胞侵袭活性)。

[0281] 可通过本领域技术人员熟知的许多种技术从细胞或组织分离,重组产生或体外合成 miRNA。在一个实施方案中,从细胞或组织分离 miRNA。用于从细胞或组织分离 miRNA 的技术对于本领域技术人员来说是熟知的。例如,可使用来自 Ambion, Inc. 的 mirVana miRNA 分离试剂盒从总 RNA 分离 miRNA。另一种技术利用 flashPAGE™ Fractionator System(Ambion, Inc.) 来进行小核酸的 PAGE 纯化。

[0282] 关于 miRNA 治疗剂的使用,本领域技术人员理解,体内施用的核酸被吸收和分配至细胞和组织。

[0283] 可以以合适的方式递送核酸,所述方式使得能够组织特异性地吸收试剂和 / 或核酸递送系统。本文中描述的试剂可通过任何已知的常规疗法来补充治疗状况,所述疗法包括但不限于抗体施用、疫苗施用、细胞毒性剂、天然氨基酸多肽、核酸、核苷酸类似物和生物应答调节剂的施用。可一起或相继使用两个或多个组合的化合物。

[0284] 本发明的某些实施方案提供了包含 (a) 一种或多种核酸或小分子化合物以及 (b) 一种或多种其他化学治疗剂的药物组合物。

[0285] 另外的有用的定义

[0286] “受试者”是指经选择接受治疗或疗法的人或非人动物。“怀疑患有……的受试者”是指展示病症、疾病或病况的一个或多个临床指标的受试者。

[0287] “预防”或“防止”是指延迟或阻止病况或疾病的发作、发展或进展,持续一段时间,包括数周、数月或数年。“治疗”或“医治”是指一种或多种用于治愈或改善病症和 / 或疾病的特定方法的应用。在某些实施方案中,特定方法是一种或多种药剂的施用。

[0288] “改善”是指减轻病况或疾病的至少一个指标的严重度。在某些实施方案中,改善包括病况或疾病的一个或多个指标的进展的延迟或减缓。指标的严重度可通过对于本领域技术人员来说是已知的主观或客观量度来测定。

[0289] “有此需要的受试者”是指确定为需要治疗或疗法的受试者。

[0290] “施用”是指给受试者提供药剂或组合物,包括但不限于由医学专业人员施用和自我施用。

[0291] “胃肠外施用”是指通过注射或输注进行的施用。胃肠外施用包括但不限于皮下施用、静脉内施用、肌内施用、动脉内施用和颅内施用。“皮下施用”是指紧在皮肤下方施用。

[0292] “改善功能”是指使功能向正常参数改变。在某些实施方案中,通过测量在受试者的体液中发现的分子评估功能。“药物组合物”是指适合于给个体施用的物质的混合物,其包括药剂。例如,药物组合物可包含修饰的寡核苷酸和无菌水性溶液。

[0293] “靶核酸”、“靶 RNA”、“靶 RNA 转录物”和“核酸靶”都是指能够被反义化合物靶向的核酸。“靶向”是指与靶核酸杂交并且诱导期望的作用的核碱基序列的设计和选择的过程。“被靶向”是指具有核碱基序列,所述序列允许与靶核酸杂交以诱导期望的作用。在某些实施方案中,期望的作用是靶核酸的减少。

[0294] “调控”是指对功能或活性的干扰。在某些实施方案中,调控是指基因表达的增加。在某些实施方案中,调控是指基因表达的减少。

[0295] “表达”是指藉以将基因的编码信息转变成存在于细胞中和在细胞中运转的结构的功能和步骤。

[0296] “区域”是指核酸内一部分连接的核苷。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸具有与靶核酸的区域互补的核碱基序列。例如,在某些此类实施方案中,修饰的寡核苷酸与 miRNA 茎-环序列的区域互补。在某些此类实施方案中,修饰的寡核苷酸与 miRNA 序列的区域 100% 同一。

[0297] “区段”是指更小的区域或区域的亚部分。

[0298] “核碱基序列”是指以 5' 至 3' 方向,不依赖于任何糖、连接和 / 或核碱基修饰的连续核碱基的顺序。

[0299] “连续核碱基”是指核酸中彼此紧密相邻的核碱基。

[0300] “核碱基互补性”是指两个核碱基通过氢键非共价配对的能力。“互补”是指第一核碱基序列在 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多个核碱基的区域内与第二核碱基序列的互补序列至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98% 或 99% 同一,或 100% 同一,或两个序列在严格杂交条件下杂交。在某些实施方案中,具有与 miRNA 或其前体 100% 互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸可以在修饰的寡核苷酸的整个长度上不与 miRNA 或其前体 100% 互补。

[0301] “互补性”是指第一核酸与第二核酸之间的核碱基配对能力。“全长互补性”是指第一核酸的各核碱基能够与第二核酸中相应的位点上的各核碱基配对。例如,在某些实施方案中,其中各核碱基与 miRNA 中的核碱基具有互补性的修饰的寡核苷酸与 miRNA 具有全长互补性。

[0302] “百分比互补性”是指核酸中互补核碱基的数目除以核酸的长度。在某些实施方案

中,修饰的寡核苷酸的百分比互补性是指与靶核酸互补的核碱基的数目除以修饰的寡核苷酸的核碱基数目。在某些实施方案中,修饰的寡核苷酸的百分比互补性是指与 miRNA 互补的核碱基的数目除以修饰的寡核苷酸的核碱基的数目。

[0303] “百分比结合的区域”是指与寡核苷酸区域互补的区域的百分比。通过将寡核苷酸互补的靶区域的核碱基的数目除以靶区域的长度来计算百分比结合的区域。在某些实施方案中,百分比结合的区域是至少 80%,至少 85%,至少 90%,至少 95%,至少 96%,至少 97%,至少 98%,至少 99%或 100%。

[0304] “百分比同一性”是指第一核酸中与第二核酸相应的位点上的核碱基相同的核碱基的数目除以第一核酸中的核碱基的总数。

[0305] 本文中使用的“大体上同一的”可以指第一与第二核碱基序列在 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100 或更多个核碱基的区域上至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或 99%同一,或 100%同一。

[0306] “杂交”是指通过核碱基的互补性发生的互补核酸的退火。

[0307] “错配”是指不能够与第二核酸的相应的位点上的核碱基配对的第一核酸的核碱基。

[0308] “非互补核碱基”是指不能够通过氢键配对的两个核碱基。

[0309] “同一的”是指具有相同核碱基序列。

[0310] “miRNA”或“miR”是指长度在 18 至 25 个核碱基之间的非编码 RNA,其与编码 RNA 杂交并且调控编码 RNA 的表达。在某些实施方案中,miRNA 是 Dicer 切割 pre-miRNA 的产物。miRNA 的实例见于称为 miRBase 的 miRNA 数据库 (<http://microrna.sanger.ac.uk/>)。

[0311] “Pre-miRNA”或“pre-miR”是指具有发夹结构的非编码 RNA,其包含 miRNA。在某些实施方案中,pre-miRNA 是称为 Drosha 的双链 RNA 特异性核糖核酸酶切割 pri-miR 的产物。

[0312] “茎-环序列”是指具有发夹结构并且包含成熟 miRNA 序列的 RNA。Pre-miRNA 序列和茎-环序列可重叠。茎-环序列的实例可见于称为 miRBase 的 miRNA 数据库 (microrna.sanger.ac.uk)。

[0313] “miRNA 前体”是指源自基因组 DNA 并且包含含有一个或多个 miRNA 序列的非编码性结构化 RNA 的转录物。例如,在某些实施方案中,miRNA 前体是 pre-miRNA。在某些实施方案中,miRNA 前体是 pri-miRNA。

[0314] “反义化合物”是指具有允许与靶核酸杂交的核碱基序列的化合物。在某些实施方案中,反义化合物是具有与靶核酸互补的核碱基序列的寡核苷酸。

[0315] “寡核苷酸”是指连接的核苷的聚合物,各核苷可以彼此独立地被修饰或不被修饰。“天然发生的核苷间连接”是指核苷之间的 3' 至 5' 磷酸二酯连接。“天然核碱基”是指相对于其天然发生的形式未被修饰的核碱基。“miR 拮抗剂”是指经设计用于干扰或抑制 miRNA 的活性的试剂。在某些实施方案中,miR 拮抗剂包括靶向 miRNA 的反义化合物。在某些实施方案中,miR 拮抗剂包括具有与 miRNA 或其前体的核碱基序列互补的核碱基序列的修饰的寡核苷酸。在某些实施方案中,miR 拮抗剂包括干扰或抑制 miRNA 的活性的小分子等。

[0316] 本文中所描述的方法和试剂代表优选实施方案,是示例性的,并且不意欲限制本发明的范围。其中的改进和其他用途对于本领域技术人员来说显然的。这些改进包括在本发明的精神内并且由权利要求的范围界定。对于本领域技术人员来说,同样极显然的是可对本文中公开的发明进行各种替代和改进而不背离本发明的范围和精神。

[0317] 应理解,虽然本发明已通过优选实施方案和任选特征明确地公开,但本领域技术人员可采用本文中公开的概念的改进和变化,并且此类改进和变化被认为在由所附权利要求界定的本发明的范围内。

[0318] 虽然通过参考各种和优选实施方案描述了本发明,但本领域技术人员应当理解,可进行各种变化并且可用等同物替代其元素而不背离本发明的基本范围。此外,可进行许多改进以使特定的情况或材料适合于本发明的教导而不背离本发明的基本范围。

[0319] 参考文献

[0320] 本文中用于举例说明本发明或提供关于本发明的实施的另外的详细内容的公开案和其他材料通过引用合并入本文,并且为方便起见提供于下列参考书目中。

[0321] 本文中引用的任何文献的引用不意欲作为任何前述内容是相关现有技术的承认。关于日期的所有声明和关于这些文献的内容的所有陈述基于申请人可获得的信息,并且不构成关于这些文献的日期或内容的正确性的任何承认。

[0322] 实施例 I 的参考文献

[0323] 1. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999 ;341 :1051-1062.

[0324] 2. Burnett AK. Current controversies :which patients with acute myeloid leukemia should receive bone marrow transplantation? An adult theater' s view. *Br. J Haematol* 2002 ;118 :357-364.

[0325] 3. Drobyski WR. The role of allogeneic transplantation in high-risk acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004 ;10 :1565-1568.

[0326] 4. Bartel D. MicroRNAs :genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004 ;116 :281-297.

[0327] 5. Chen CZ, Li L, Lodish H, Bartel D. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004 ;303 :83-86.

[0328] 6. Fazi F, Rosa A, Fatica A, et al. A mini-circuitry comprising microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP α regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005 ;123 :819-831.

[0329] 7. Felli N, Fontana L, Pelosi L, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ;102 :18081-18086.

[0330] 8. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNAs fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ;103 :5078-5083.

[0331] 9. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 ;99 :15524-15529.

- [0332] 10. Volinia S, Calin G, Liu CG, et al. A microRNA expression signature in human solid tumors defines cancer targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2257-2261.
- [0333] 11. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-838.
- [0334] 12. Kornblau SM, Womble M, Cade JS, et al. Comparative analysis of the effects of sample source and test methodology on the assessment of protein expression in acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 2005;19:1550-1557.
- [0335] 13. ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. 2005; In Shaffer LG and Tommerup N (Eds.). Basel, Switzerland S. Karger.
- [0336] 14. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;93:3074-3080.
- [0337] 15. Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genomic-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;11755-11760.
- [0338] 16. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e179.
- [0339] 17. Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 2001;25:402-408
- [0340] 18. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significant analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5116-5121.
- [0341] 19. World Health Organization Classifications of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymph Tissues. 2001; In Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (Eds.). Lyon, France IARC.
- [0342] 20. He L, He X, Lim LP, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 2007;447:1130-1134.
- [0343] 21. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13944-13949.
- [0344] 22. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635-647.
- [0345] 23. Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007;26:6133-6140.
- [0346] 24. Pekarsky Y, Santaman U, Cimmino A, et al. T cell expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 2006;66:11590-11593.
- [0347] 25. Voorhoeve PM, Le Sage C, Schrier M, et al. A genetic screen implicates

miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell* 2006 ; 124 :1169-1181.

[0348] 26. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004 ;304 :594-596.

[0349] 27. Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006 ;130 :2113-2129.

[0350] 28. Lewis B, Shih I, Jones-Rhoades M, Bartel D, Burge C. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003 ;787-798.

[0351] 29. Ryu B and Kern S E. The essential similarity of TGFbeta and activin receptor transcriptional responses in cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2003 ;2 : 164-170.

[0352] 30. Lim LP, Lau LC, Garrett-Engele P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs down-regulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005 ;433 : 769-773.

[0353] 31. Zhou P, Qian L, Kozopas KM, et al. Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 1997 ;89 :630.

[0354] 32. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001 ;97 : 3589-3595.

[0355] 33. Felli N, Pelosi E, Beta R, et al. Lineage-specific expression and functional relevance of microRNA genes in normal hematopoiesis[abstract]. *Blood* 2006 ;106 :11aAbstract 2263.

[0356] 34. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. MiR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007 ;26 :2799-2803.

[0357] 35. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002 ;100 :4325-4336.

[0358] 36. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005 ;353 :1793-1801.

[0359] 37. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006 ;9 :189-198.

[0360] 38. Georgantas G, Hildreth R, Morisot S, et al. CD34+hematopoietic stem-cell progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 ;104 :2750-2755.

[0361] 39. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and

lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E μ -miR155 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 2006 ;103 :7024-7029.

[0362] 实施例 II 的参考文献

[0363] 1.Griffiths-Jones S.The microRNA registry.Nucleic Acids Res.2004 ;32, Database issue D109-D111.

[0364] 2.Tusher VG, Tibshirani R, Chu G.Significant analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.Proc Natl Acad Sci USA.2001 ;98 : 5116 :21.

[0365] 3.Livak KJ, Schmittgen TD.Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T))method. Methods. 2001 ;25 :402-408.

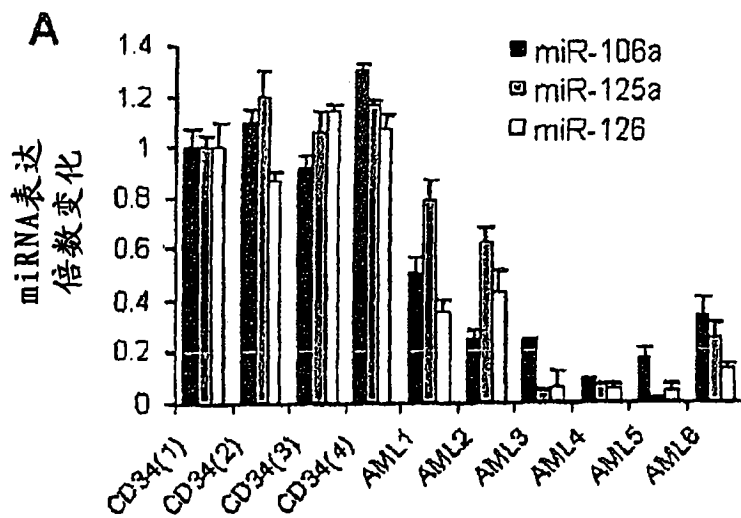


图 1A

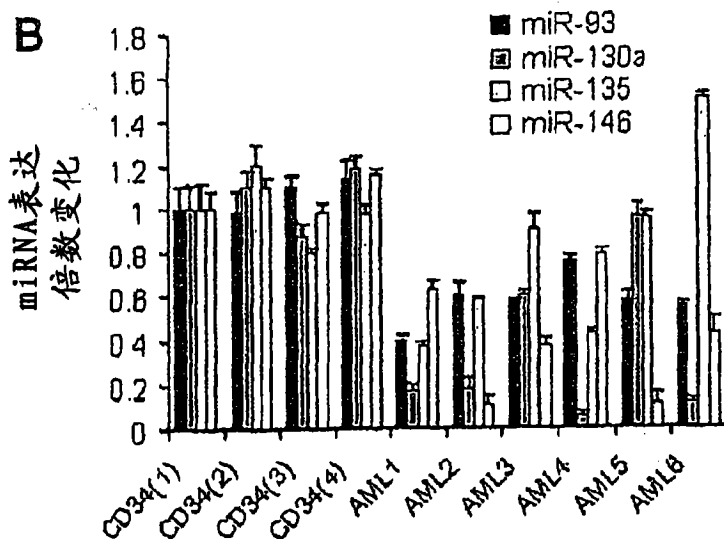


图 1B

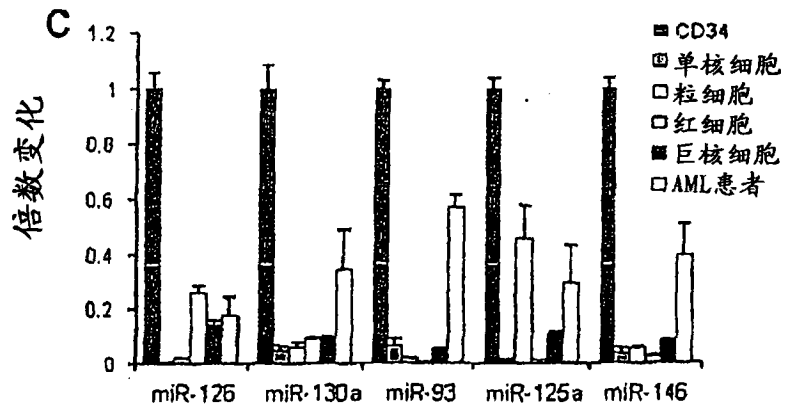


图 1C

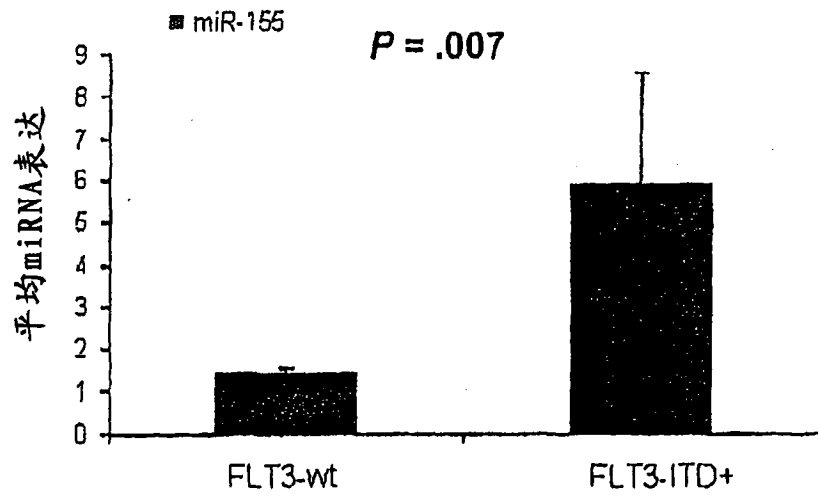


图 2

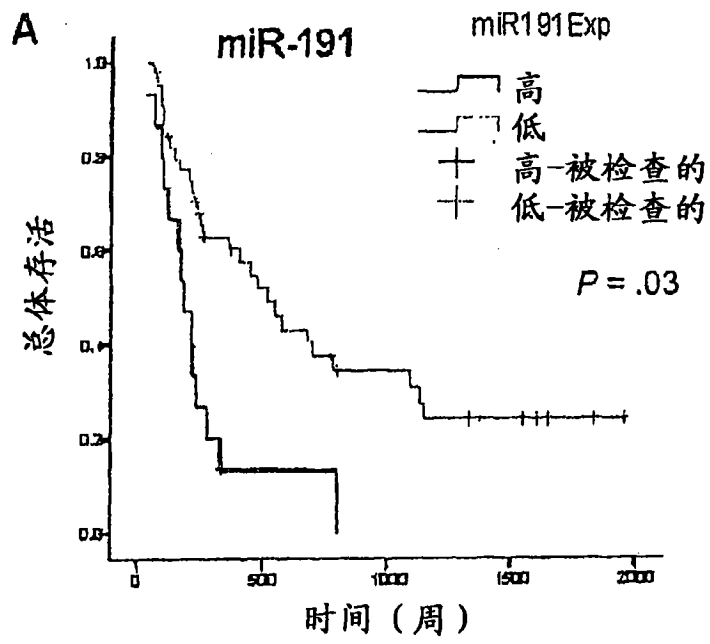


图 3A

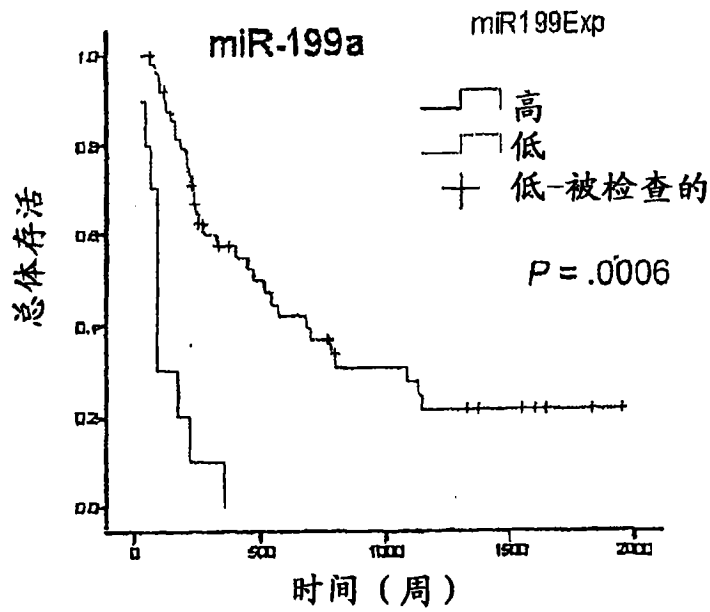


图 3B

表 1. 新近诊断的 AML 患者的临床和细胞遗传学特征		
特征	微阵列 群组 (n=122)	定量 RT-PCR (结果验证) 群组 (n=60)
年龄, 岁		
中值	60.3	59
范围	18-86	24-80
性别, 数目 (%)		
女性	47 (38)	29 (48)
男性	75 (62)	31 (52)
白细胞计数, $\times 10^3/L$		
中值	45.27	53.7
范围	0.7-278	1.3-273
骨髓母细胞, %		
中值	62	70.2
范围	20-99	25-93
WHO 分类, 数目 (%)		
具有复发的遗传异常的 AML		
t(15;17)(q22;q12)	4 (3.3)	0
inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)	4 (3.3)	0
t(6;11)或 t(9;11)	9 (7.5)	3 (5)
具有多系发育不良的 AML	29 (24)	7 (12)
AML 和 MDS, 治疗相关的	12 (10)	8 (13)
未另外分类的 AML		
最低限度分化的 AML	5 (4)	5 (8.3)
无成熟作用的 AML	9 (7.5)	9 (15)
具有成熟作用的 AML	10 (8)	12 (20)
AML 骨髓单核细胞性白血病	21 (17)	4 (6.6)
急性单核母细胞性和单核细胞性白血病	8 (6.5)	9 (15)
急性红白血病	6 (5)	0
急性巨核母细胞性白血病	3 (2.5)	0
未分类的	2 (1.5)	3 (5)
细胞遗传学 [†] , 数目 (%)		
正常核型	45 (37)	29 (48)
+8	5 (4)	1 (1.6)
复杂核型	23 (20)	12 (20)
其他核型	26 (19)	14 (24)
未进行分类的	6 (5)	1 (1.6)
FLT3 状态 [‡] , 数目 (%)		
FLT3-ITD*	17 (18)	14 (27)
FLT3-wt	73 (82)	38 (73)
FLT3-D835	2 (2)	2 (4)
未进行分类的	32	8
在最后一次随访时的状态, 数目 (%)		
死亡	81 (66)	42 (70)
存活	41 (33)	18 (30)

图 4- 表 1

表 2: 相对于获自 10 个健康供体的 CD34+细胞在 122 个新近诊断的 AML 患者中下调的 miRNA			
微RNA	SAM评分*	倍数变化	FDR, % [†]
<i>hsa-miR-126</i>	-3.28	0.21	0
<i>hsa-miR-130a</i>	-2.91	0.29	0
<i>hsa-miR-135</i>	-2.55	0.38	0
<i>hsa-miR-93</i>	-2.52	0.08	0
<i>hsa-miR-146</i>	-2.47	0.41	0
<i>hsa-miR-106b</i>	-2.43	0.36	0
<i>hsa-miR-224</i>	-2.39	0.32	0
<i>hsa-miR-125a</i>	-2.18	0.52	0
<i>hsa-miR-92</i>	-2.13	0.46	0
<i>hsa-miR-106a</i>	-2.12	0.46	0
<i>hsa-miR-95</i>	-2.07	0.04	0
<i>hsa-miR-155</i>	-2.03	0.49	0
<i>hsa-miR-25</i>	-2.01	0.51	0
<i>hsa-miR-96</i>	-1.94	0.25	0
<i>hsa-miR-124a</i>	-1.92	0.37	0
<i>hsa-miR-18</i>	-1.89	0.38	0
<i>hsa-miR-20</i>	-1.87	0.51	0
<i>hsa-let-7d</i>	-1.81	0.48	0
<i>hsa-miR-26a</i>	-1.76	0.48	0
<i>hsa-miR-222</i>	-1.71	0.51	0
<i>hsa-miR-101</i>	-1.67	0.51	0
<i>hsa-miR-338</i>	-1.54	0.31	0
<i>hsa-miR-371</i>	-1.51	0.38	0
<i>hsa-miR-199b</i>	-1.44	0.03	0
<i>hsa-miR-29b</i>	-1.41	0.12	0
<i>hsa-miR-301</i>	-1.37	0.47	0

*SAM 通过比较一组基因特异性评分 (即, 配对 t 检验) 鉴定了在表达上具有统计学上显著的变化了的基因。基于其基因表达的变化 (与对于该基因的重复测量的标准差相比较), 赋予各基因评分。具有大于阈值的评分的基因被认为是潜在重要的。

[†]偶然鉴定此类基因的百分比是 q 值或假发现率。

图 5- 表 2

	危害比	95% CI	P
总体存活 [*]			
miR-191 高表达	2.35	1.18-4.75	.01
miR-199 高表达	2.81	0.96-8.23	.05
不利的细胞遗传学	2.31	0.85-6.29	.09
无事件存活 [†]			
miR-199 高表达	2.57	0.89-2.57	.08
miR-191 高表达	2.29	1.15-4.55	.01
不利的细胞遗传学	1.78	0.66-1.49	.24

*似然比: 26.1, 3 df (p<.001)。†似然比: 20.76, 3 df (p<.001)。

图 6- 表 3

ID	名称
<i>HSHELA01</i>	人HeLa细胞 Jo-1 tRNA-His (GUG)
<i>HSTRNL</i>	人转移RNA-Leu (MAA)
<i>HSU2SNRNA3P</i>	智人 U2 snRNA
<i>HSU2SNRNA5P</i>	智人 U2 snRNA
<i>HSU4SNRNA3P</i>	智人 U4 snRNA
<i>HSU4SNRNA5P</i>	智人 U4 snRNA
<i>HSU6SNRNA3P</i>	智人 U6 snRNA
<i>HSU6SNRNA5P</i>	智人 U6 snRNA
人 GAPDH	智人 GAPDH
<i>HUMTR4B</i>	人 Ala-tRNA
<i>HUMTRF</i>	人 Phe-tRNA
<i>HUMTRMI No1</i>	人起始密码子 Met-tRNA-i
<i>HUMTRMI No2</i>	人起始密码子 Met-tRNA-i
<i>HUMTRMI3P</i>	人起始密码子 Met-tRNA-i
<i>HUMTRMI5P</i>	人起始密码子 Met-tRNA-i
<i>HUMTRN</i>	人 Asn-tRNA
<i>HUMTRS</i>	人转移RNA-Ser
<i>HUMTRV1A</i>	人 Val-tRNA-Ia

图 7- 表 S1

与高WBC相关的微RNA	SAM评分	FDR (%)
hsa-miR-155	2.96	0
hsa-miR-30e	2.79	0
hsa-miR-23b	2.73	0
hsa-miR-181b	2.59	0
hsa-miR-221	2.58	0
hsa-miR-29b	2.58	0
hsa-miR-95	2.56	0
hsa-miR-128b	2.54	0
hsa-miR-27a	2.52	0
hsa-miR-181a	2.52	0
hsa-miR-92	2.45	0
hsa-miR-181a	2.44	0
hsa-miR-23a	2.43	0
hsa-miR-214	2.42	0
hsa-miR-30b	2.39	0
hsa-miR-30c	2.36	0
hsa-miR-26b	2.35	0
hsa-miR-21	2.33	0
hsa-miR-222	2.32	0
与高BM母细胞%相关的微RNA		
hsa-miR-30b	4.54	0
hsa-miR-30c	4.31	0
hsa-miR-192	3.95	0
hsa-miR-181a	3.91	0
hsa-miR-155	3.82	0
hsa-let-7a-2	3.73	0
hsa-miR-181b	3.69	0
hsa-miR-181a	3.64	0
hsa-miR-219	3.55	0
hsa-miR-214	3.51	0
hsa-miR-26a	3.37	0

图 8- 表 S2

与高外周母细胞%相关的微RNA

<i>hsa-miR-133b</i>	2.97	0
<i>hsa-miR-219</i>	2.75	0
<i>hsa-miR-25</i>	2.71	0
<i>hsa-miR-193a</i>	2.63	0
<i>hsa-miR-193b</i>	2.54	0
<i>hsa-miR-220</i>	2.42	0
<i>hsa-miR-92</i>	2.39	0
<i>hsa-miR-184</i>	2.28	0
<i>hsa-miR-92</i>	2.26	0
<i>hsa-miR-124a</i>	2.22	0
<i>hsa-miR-100</i>	2.22	0
<i>hsa-miR-181</i>	2.12	0
<i>hsa-miR-135</i>	2.01	0
<i>hsa-miR-153</i>	2.04	0
<i>hsa-miR-292</i>	1.93	0
<i>hsa-miR-181c</i>	1.85	0

图8-表2续

微RNA	SAM评分	倍数变化	FDR (%)
<i>hsa-miR-326</i>	4.57	5.49	0
<i>hsa-miR-219</i>	3.59	2.91	0
<i>hsa-miR-194</i>	2.78	2.73	0
<i>hsa-miR-301</i>	3.56	3.45	0
<i>hsa-miR-324</i>	2.75	2.75	0
<i>hsa-miR-339</i>	2.82	2.81	0
<i>hsa-miR-99b</i>	3.45	3.43	0
<i>hsa-miR-328</i>	2.59	2.53	0
<i>hsa-miR-34b</i>	-5.46	0.12	0
<i>hsa-miR-15a</i>	-4.13	0.11	0
<i>hsa-miR-29a</i>	-4.03	0.12	0
<i>hsa-miR-29c</i>	-3.98	0.02	0
<i>hsa-miR-372</i>	-3.68	0.15	0
<i>hsa-miR-30a</i>	-3.62	0.18	0
<i>hsa-miR-29b</i>	-3.61	0.02	0
<i>hsa-miR-30e</i>	-3.58	0.13	0
<i>hsa-miR-196a</i>	-3.57	0.39	0
<i>hsa-let-7f</i>	-3.52	0.22	0
<i>hsa-miR-102</i>	-3.41	0.01	0
<i>hsa-miR-331</i>	-3.36	0.13	0
<i>hsa-miR-299</i>	-3.04	0.01	0
<i>hsa-miR-193</i>	-2.86	0.04	0

图9-表S3

微RNA	SAM评分	倍数变化	FDR (%)
<i>hsa-miR-21</i>	4.15	2.89	0
<i>hsa-miR-26a</i>	2.82	5.04	0
<i>hsa-miR-128b</i>	2.75	3.11	0
<i>hsa-miR-130b</i>	2.72	5.51	0
<i>hsa-miR-27a</i>	2.63	2.56	0
<i>hsa-miR-99</i>	2.47	2.81	0
<i>hsa-miR-26b</i>	2.33	4.11	0
<i>hsa-miR-23a</i>	2.29	3.63	0
<i>hsa-miR-23b</i>	2.25	3.11	0
<i>hsa-miR-130a</i>	2.22	14.03	0
<i>hsa-miR-24</i>	2.21	2.67	0
<i>hsa-miR-30c</i>	2.12	3.43	0
<i>hsa-miR-103</i>	2.05	2.58	0
<i>hsa-miR-192</i>	2.06	3.37	0
<i>hsa-miR-126</i>	2.02	12.31	0
<i>hsa-miR-221</i>	2.01	3.95	0

图 10- 表 S4

微RNA	SAM评分	倍数变化	FDR (%)
hsa-miR-337	3.49	29.94	0
hsa-miR-184	3.21	25.49	0
hsa-miR-302b	3.06	4.93	0
hsa-miR-105	2.94	11.05	0
hsa-let-7d	2.87	6.85	0
hsa-miR-153	2.86	14.2	0
hsa-miR-124a*	2.78	10.67	0
hsa-miR-215	2.69	13.19	0
hsa-miR-1	2.68	199.7	0
hsa-miR-194	2.62	18.13	0
hsa-miR-29c	2.59	8.19	0
hsa-miR-208	2.56	11.65	0
hsa-miR-199a	2.54	14.01	0
hsa-miR-24-1	2.49	5.21	0
hsa-miR-302c	2.47	6.37	0
hsa-miR-367	2.41	9.11	0
hsa-miR-200a	2.41	4.19	0
hsa-miR-183	2.38	33.93	0
hsa-miR-199b	2.38	7.23	0
hsa-miR-143	2.35	5.56	0
hsa-miR-96	2.31	11.59	0
hsa-miR-28b	2.26	6.91	0
hsa-miR-202	2.25	5.64	0
hsa-miR-340	2.23	4.75	0
hsa-miR-102	2.17	8.11	0
hsa-miR-191	2.13	9.48	0
hsa-let-7l	2.11	6.78	0
hsa-miR-30d*	2.09	2.84	0
hsa-miR-9-3	2.08	4.11	0
hsa-miR-203	2.03	6.99	0
hsa-miR-302a	2.02	11.36	0
hsa-miR-199a	2.01	8.93	0
hsa-miR-206	1.99	4.55	0
hsa-miR-197	1.98	5.25	0
hsa-miR-198	1.97	12.42	0
hsa-miR-372	1.95	4.99	0.68
hsa-miR-182	1.95	9.29	0.68
hsa-miR-193	1.92	8.72	0.68
hsa-miR-325	1.92	2.82	0.68
hsa-miR-192	1.89	8.62	0.68
hsa-miR-204	1.84	5.11	0.68
hsa-miR-299	1.84	3.37	0.68

* 这些miRNA位于第8号染色体上。

图 11- 表 S5

微RNA	SAM评分	倍数变化	FDR (%)
hsa-miR-10a	3.64	4.07	0
hsa-miR-10b	3.48	3.13	0
hsa-miR-26a	3.42	2.72	0
hsa-miR-30c	3.41	2.26	0
hsa-let-7a-2	3.24	2.25	0
hsa-miR-16-2	2.92	2.02	0
hsa-miR-21	2.84	2.58	0
hsa-miR-181b	2.64	2.21	0
hsa-miR-368	2.02	2.68	0
hsa-miR-192	1.97	2.75	0
hsa-miR-126	-3.85	0.31	0
hsa-miR-203	-3.21	0.41	0
hsa-miR-200c	-3.11	0.45	0
hsa-miR-182	-3.03	0.38	0
hsa-miR-204	-2.98	0.41	0
hsa-miR-196b	-2.94	0.42	0
hsa-miR-193	-2.82	0.42	0
hsa-miR-191	-2.76	0.43	0
hsa-miR-189a	-2.74	0.48	0
hsa-miR-194	-2.61	0.36	0
hsa-miR-183	-2.56	0.28	0
hsa-miR-299	-2.55	0.43	0
hsa-miR-145	-2.51	0.41	0

图 12-表 S6

特征	值
年龄(岁)	
中值	52
范围	(18-83)
性别 - 数目(%)	
女性	25(46)
男性	29(54)
白细胞计数 $\times 10^9/L$	
中值	50.3
范围	(2.4-335)
骨髓母细胞(%)	
中值	64.2
范围	(20-99)
WHO 分类 数目(%)	
具有复发的遗传异常的 AML	
t(15:17)(q22;q12)	0
inv(16)(p13q22)/t(16:16)(p13;q22)	0
t(6:11) 或 t(9:11)	4(7.4)
具有多系发育不良的 AML	11(20)
AML 和 MDS, 治疗相关的	6(11)
未另外分类的 AML	
最低限度分化的 AML	1(1.8)
无成熟作用的 AML	7(13)
具有成熟作用的 AML	10(18.5)
AML 骨髓单核细胞性白血病	7(13)
急性单核母细胞性和单核细胞性白血病	0
急性红白血病	1(1.8)
急性巨核母细胞性白血病	0
未分类的 ^o	7(13)
细胞遗传学 [†] , 数目(%)	
正常核型	10(18.6)
+8	5(9)
复杂核型 [‡]	16(30)
其他核型	15(28)
未分类的	4(7)
FLT3 状态*	
FLT3-ITD +	12(40)
FLT3-WT	18(60)
FLT3-TDK 835	2(6)
未分类的	24

图 13- 表 S7

微RNA	SAM评分	倍数变化	FDR(%)
<i>hsa-miR-326</i>	4.23	7.98	0
<i>hsa-miR-330</i>	3.78	10.4	0
<i>hsa-miR-99b</i>	3.39	5.83	0
<i>hsa-miR-194</i>	3.11	4.27	0
<i>hsa-miR-133b</i>	3.08	4.3	0
<i>hsa-miR-339</i>	2.65	3.49	0
<i>hsa-miR-138</i>	2.53	3.81	0
<i>hsa-miR-128a</i>	2.52	4.86	0
<i>hsa-miR-219</i>	2.48	3.13	0
<i>hsa-miR-129-2</i>	2.42	3.02	0
<i>hsa-miR-138</i>	2.33	3.19	0
<i>hsa-miR-210</i>	2.33	3.89	0
<i>hsa-miR-301</i>	2.27	3.71	0
<i>hsa-miR-200b</i>	2.24	2.88	0
<i>hsa-miR-328</i>	2.02	2.81	0
<i>hsa-miR-324</i>	1.88	2.63	1.63
<i>hsa-miR-29c</i>	-3.08	0.02	0
<i>hsa-miR-30a-3p</i>	-2.62	0.14	0
<i>hsa-miR-15a</i>	-2.53	0.15	0
<i>hsa-miR-29a</i>	-2.51	0.11	0
<i>hsa-miR-133a</i>	-2.19	0.6	1.82
<i>hsa-let-7d</i>	-2.18	0.13	1.82
<i>hsa-miR-21</i>	-2.11	0.07	1.82
<i>hsa-miR-29b</i>	-2.11	0.02	1.82
<i>hsa-miR-370</i>	-2.09	0.62	1.82
<i>hsa-miR-34b</i>	-2.09	0.03	1.82
<i>hsa-miR-102</i>	-2.08	0.01	1.82
<i>hsa-miR-142-5p</i>	-2.05	0.22	1.82
<i>hsa-miR-195</i>	-1.99	0.19	2.38
<i>hsa-let-7f</i>	-1.91	0.18	2.71
<i>hsa-miR-203-prec</i>	-1.89	0.02	2.71
<i>hsa-miR-181c</i>	-1.89	0.09	2.71
<i>hsa-miR-19b</i>	-1.82	0.35	3.67
<i>hsa-miR-194-1</i>	-1.81	0.36	3.67
<i>hsa-miR-331-prec</i>	-1.73	0.19	4.71
<i>hsa-miR-182^a</i>	-1.71	0.51	4.71
<i>hsa-miR-183-prec</i>	-1.61	0.31	4.71
<i>hsa-miR-16'</i>	-1.61	0.23	4.71
<i>hsa-miR-302c^a</i>	-1.61	0.16	4.71
<i>hsa-miR-299-3p</i>	-1.59	0.75	4.71
<i>hsa-miR-30e</i>	-1.38	0.25	8.21 ^a

*这些miRNA具有FDR>5。然而,为了与在未治疗的患者中的观察到特征进行比较的目的,在此处显示它们。

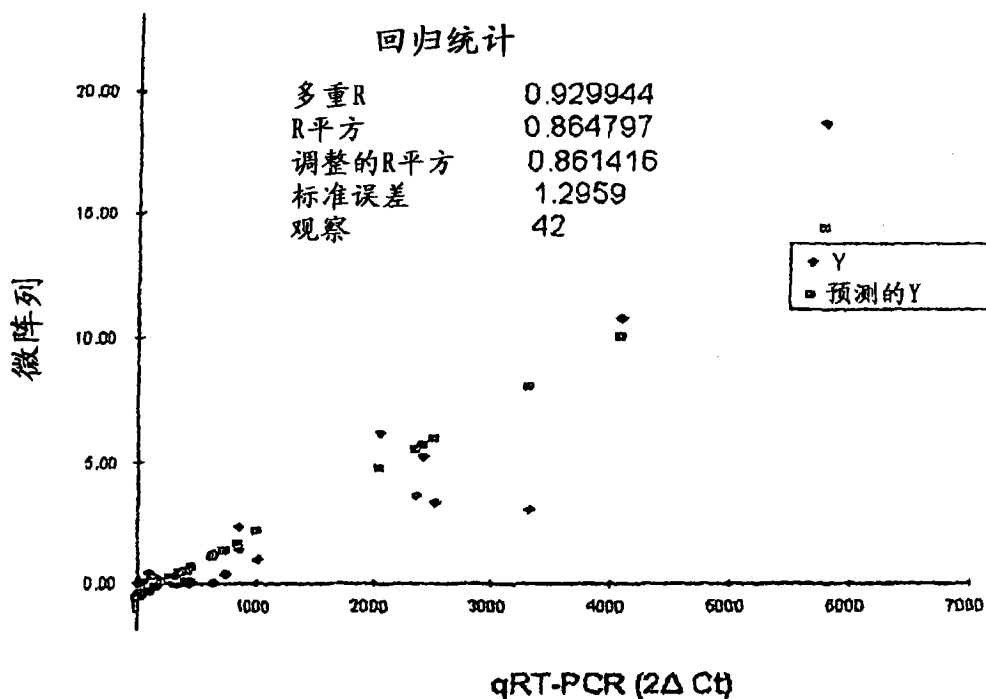
图 14- 表 S8

微RNA	SAM评分	倍数变化	FDR(%) ^a
hsa-miR-21	2.62	5.88	0
hsa-let-7d	2.38	2.51	0
hsa-miR-30c	2.35	3.58	0
hsa-miR-15b	2.28	2.39	0
hsa-miR-219	2.27	2.60	0
hsa-miR-302b [*]	2.18	1.98	0
hsa-miR-15a	2.17	2.80	0
hsa-miR-34b	2.13	2.09	0
hsa-miR-16-1	2.07	2.53	0
hsa-miR-16-2	2.05	2.38	0
hsa-miR-30e-5p	1.93	2.81	0
hsa-miR-140	1.81	3.06	4.92
hsa-miR-15a	1.72	2.44	4.92
hsa-let-7a-2	1.71	1.52	4.92
hsa-miR-30b	1.65	2.96	8.75
hsa-miR-222	1.65	2.20	8.75
hsa-miR-10b	1.64	2.72	8.75
hsa-miR-26a	1.62	2.69	8.75
hsa-miR-10a	1.61	3.13	8.75
hsa-miR-195	1.60	2.23	8.75
hsa-let-7a	1.60	2.18	8.75
hsa-miR-181b	1.55	1.58	13.32
hsa-miR-193a	-2.15	0.47	13.32
hsa-miR-204	-2.03	0.13	13.32
hsa-miR-196a	-1.96	0.18	13.32
hsa-miR-205	-1.95	0.22	13.32
hsa-miR-200b	-1.90	0.17	13.32
hsa-miR-198	-1.86	0.12	13.32
hsa-miR-212	-1.82	0.10	13.32
hsa-miR-188	-1.79	0.11	13.32
hsa-miR-200c	-1.77	0.54	13.32
hsa-miR-194	-1.72	0.07	13.32
hsa-miR-206	-1.71	0.27	13.32
hsa-miR-203	-1.69	0.41	13.32
hsa-miR-204-prec	-1.66	0.20	13.32
hsa-miR-126	-1.65	0.11	13.32
hsa-miR-182 [*]	-1.64	0.10	13.32
hsa-miR-199a	-1.64	0.15	13.32
hsa-miR-183	-1.62	0.07	13.32
hsa-miR-30b	-1.62	0.42	13.32
hsa-miR-145	-1.57	0.11	13.32
hsa-miR-187	-1.53	0.10	13.32
hsa-miR-299-3p	-1.53	0.60	13.32
hsa-miR-128a	-1.50	0.22	13.32
hsa-miR-143	-1.46	0.38	13.32

图 15- 表 S9

微RNA	SAM评分	倍数变化	FDR (%)
<i>hsa-miR-19a</i>	2.48	3.03	0
<i>hsa-miR-155</i>	2.33	2.63	0
<i>hsa-miR-10a</i>	2.24	13.07	0
<i>hsa-miR-99b</i>	2.08	2.09	0
<i>hsa-miR-192</i>	2.06	1.40	0

图 16- 表 S10



ANOVA	df	SS	MS	F	显著性P
回归	1	429.7	429.72	255.85	5.59622E-19
残差	40	67.18	1.6796		
总计	41	496.9			

图 17

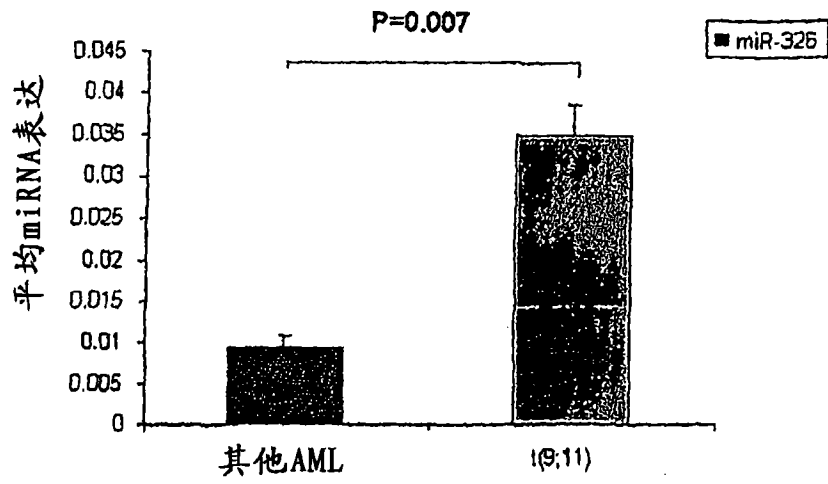


图 18A

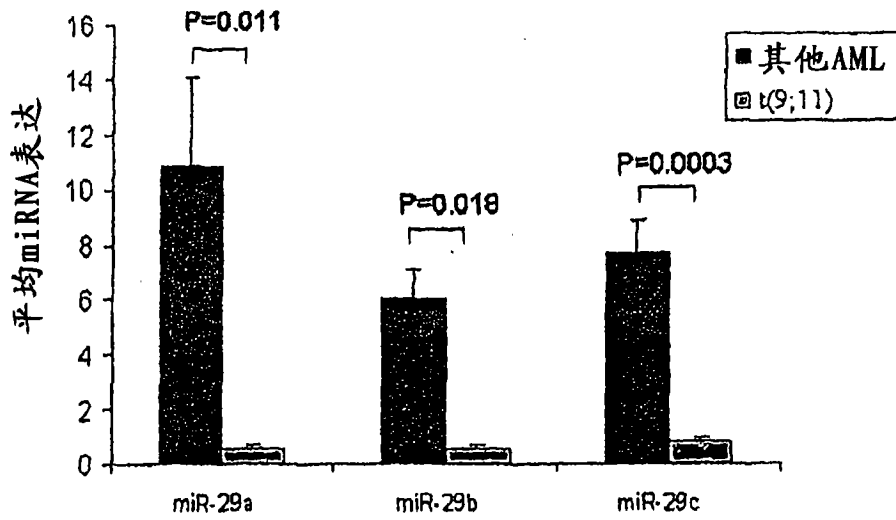


图 18B

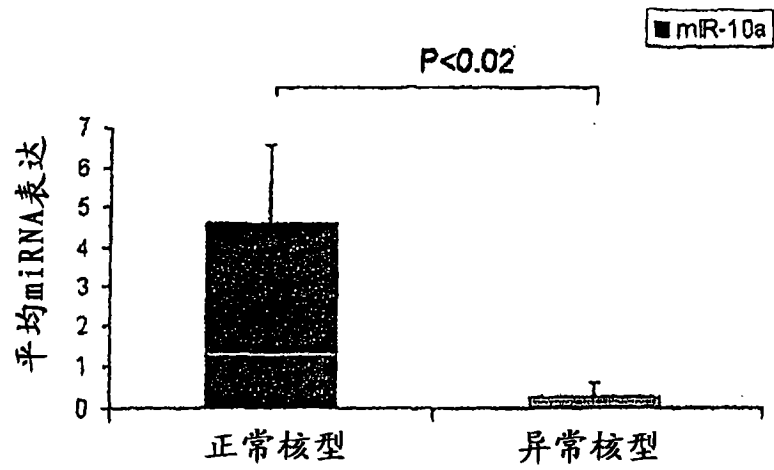


图 19A

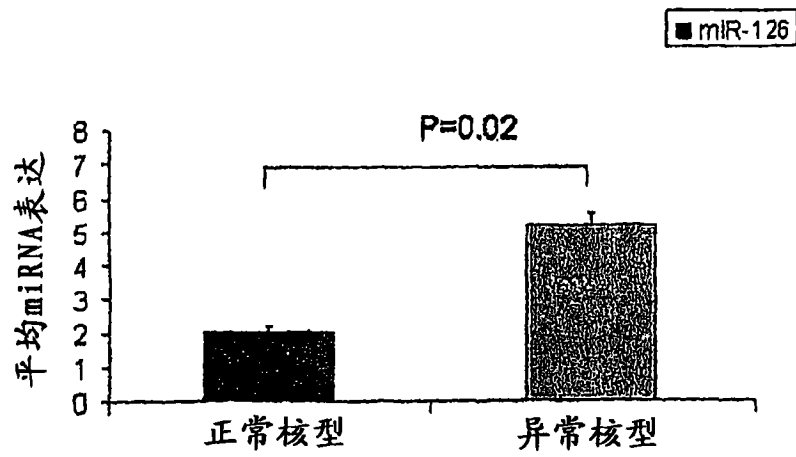


图 19B

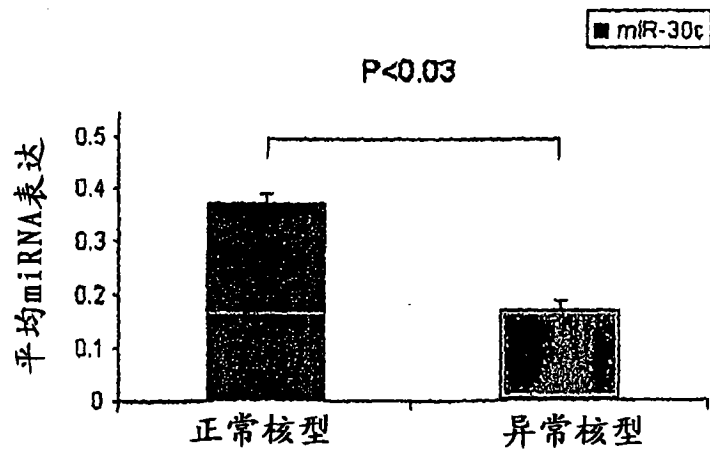


图 19C