



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101296702 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 28

(21) 申请号 200680039776. 8

C12Q 1/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2006. 09. 11

C07H 21/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

审查员 吕茂平

60/716, 134 2005. 09. 12 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 04. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2006/035100 2006. 09. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02007/033023 EN 2007. 03. 22

(73) 专利权人 俄亥俄州立大学研究基金会

地址 美国俄亥俄

(72) 发明人 C·M·克罗斯 G·A·卡林

(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 殷骏

(51) Int. Cl.

A61K 31/7088 (2006. 01)

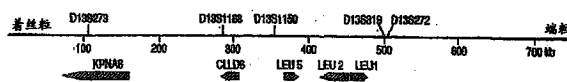
权利要求书 1 页 说明书 72 页 附图 8 页

(54) 发明名称

用于诊断或治疗 BCL2 相关癌症的组合物和方法

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗受试者中与 BCL2 基因和 / 或基因产物的过度表达相关的癌症的方法和组合物以及用于改进抗癌疗法例如化学疗法和放射疗法的方法和组合物。本发明还包括用于确定癌症疗法在受试者中的功效的方法和诱导细胞的凋亡的方法。



1. 至少一种 miR 基因产物在制备用于抑制表达 BCL2 的癌细胞中的 BCL2 的表达的试剂中的用途,其中所述至少一种 miR 基因产物是 miR-15a 或 miR-16-1 且包含与 SEQ ID NO: 55 的核苷酸 3741-3749 互补的核苷酸序列。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述癌细胞相对于对照细胞展示增加的 Bcl2 蛋白的表达。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述癌细胞选自 CLL 细胞、肺癌细胞和淋巴瘤细胞。

4. 权利要求 3 的用途,其中所述癌细胞是选自滤泡性淋巴瘤细胞、小细胞淋巴瘤细胞、大细胞淋巴瘤细胞和非何杰金淋巴瘤细胞的淋巴瘤细胞。

5. 权利要求 3 的用途,其中所述癌细胞是肺癌细胞。

6. 权利要求 5 的用途,其中所述肺癌是非小细胞肺癌细胞。

7. 权利要求 1 的用途,其中所述癌细胞是与选自急性髓细胞样白血病、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、血液的恶性肿瘤、结肠直肠癌、脑癌、乳腺癌、前列腺癌、EB 病毒相关淋巴细胞增生性疾病、肾癌、肝细胞癌和胃癌的癌症相关的细胞。

8. 权利要求 1 的用途,其中所述癌细胞存在于受试者中。

9. 权利要求 8 的用途,其中所述受试者是人。

10. 用于抑制表达 BCL2 的癌细胞中的 BCL2 的表达的药物组合物,其包含至少一种抗癌剂和至少一种 miR 基因产物,其中所述至少一种 miR 基因产物是 miR-15a 或 miR-16-1 且包含与 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741-3749 互补的核苷酸序列。

11. 至少一种 miR 基因产物在制备用于确定抑制受试者中的表达 BCL2 的癌细胞的 BCL2 表达的功用的试剂中的用途,其中所述 miR 基因产物是 miR-15a、miR-16-1 且包含与 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741-3749 互补的核苷酸序列。

12. 权利要求 11 的用途,其中所述受试者具有 CLL。

13. 权利要求 11 的用途,其中所述受试者具有与 Bcl2 蛋白的过度表达相关的癌症。

14. 权利要求 11 的用途,其中相对于合适的对照 miR 基因产物的表达的增加表明成功的治疗。

15. 至少一种 miR 基因产物在制备用于在受试者中诊断或预示 BCL2 相关癌症的试剂中的用途,所述试剂用于

i) 确定来自受试者的样品中的至少一种 miR 基因产物的水平;

ii) 将样品中所述至少一种 miR 基因产物的水平与对照相比较,其中相对于对照的 miR 基因产物的水平来自受试者的样品中的所述至少一种 miR 基因产物的水平的减少诊断或预示 BCL2 相关癌症,和

其中所述至少一种 miR 基因产物是 miR-15a 或 miR-16-1 且包含与 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741-3749 互补的核苷酸序列。

16. 权利要求 15 的用途,其中所述对照是来自不具有 BCL2 相关癌症的受试者的所述至少一种 miR 基因产物的水平。

17. 权利要求 15 的用途,其中所述对照是来自该受试者的非癌样品的所述至少一种 miR 基因产物的水平。

用于诊断或治疗 BCL2 相关癌症的组合物和方法

[0001] 发明者 :Carlo M. Croce 和 George A. Calin

[0002] 政府资助

[0003] 本发明全部或部分由来自国家癌症研究所的基金号 P01CA76259、P01CA81534 和 P30CA56036 资助。政府拥有本发明的某些权利。

发明领域

[0004] 本发明涉及癌症的诊断特别是 BCL2 相关癌症的诊断。本发明还包括用于治疗与 BCL2 基因和 / 或基因产物的过度表达相关的癌症的方法和组合物。本发明还提供了用于改进抗癌疗法例如化学疗法和其他常规癌症疗法的新的方法和组合物。

[0005] 发明背景

[0006] 在一百多种不同的生物 (包括果蝇、线虫和人) 中发现 MicroRNA (miRNA, miR)。据认为 miRNA 在这些生物中参与许多调节发育的过程。miRNA 通常从 60 至 70 个核苷酸的折叠 RNA 前体结构加工而来, 所述前体从 miRNA 基因转录而来。RNA 前体或加工的 miRNA 产物可容易被检测到, 并且这些分子的缺乏可表明相应的 miRNA 基因的功能的缺失或丢失。

[0007] 癌症是美国和全世界死亡率和发病率的重要来源。特别地, 慢性淋巴细胞性白血病 (“CLL”) 和其他 BCL2 相关癌症 (例如, 急性髓细胞性白血病、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、淋巴瘤 (例如, 滤泡性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤)、癌 (例如, 脑癌、乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、肾癌、肝细胞癌和胃癌)、血液的恶性肿瘤、实体瘤、结肠直肠癌、EB 病毒相关淋巴细胞增生性疾病) 是成年人的临床上重要的肿瘤性疾病 (neoplastic disease)。例如, CLL 是西方国家中成年人白血病的最常见形式, 在美国前列腺癌的年龄校正的发病率现在超过男性中所有其他癌症的年龄校正的发病率, 并且, 排在肺癌之后, 为该男性癌症死亡的第二大病因。

[0008] 在超过一半的报导的 CLL 病例中发生在 13q14 上的半合子和 / 纯合子丢失, 其构成了 CLL 中最常见的染色体异常。经鉴定来自 CLL 患者的组织样品的核型具有相对少量的染色体异常, 这表明观察到的 13q14 上的缺失的特异性和频率具有病理显著性。此外, 13q14 缺失也在 60% 的前列腺癌中发生, 这表明位于 13q14 的一种或更多种肿瘤抑制基因参与 CLL 和前列腺癌的发病机理。

[0009] CLL 和前列腺癌中 13q14 缺失的克隆纯合型和杂合型缺失的存在和非常高的频率表明该区域中的缺失与某些癌症类型的病因学相关。为了鉴定缺失区域中的基因, 已对几个组使用了定位克隆。迄今为止, 已就 DNA 和 / 或 RNA 水平上的改变在 CLL 的偶发性和家族性病例中鉴定和筛选了来自 13q14 的删除区域的总共 8 个基因 : Leu1 (BCMS 或 EST70/Leu1)、Leu 2 (ALT1 或 1B4/Leu2)、Leu 5 (CAR)、CLLD6、KPNA3、CLLD7、LOC51131 (假定的锌指蛋白 NY-REN-34 抗原) 和 CLLD8。然而, 详细的基因分析, 包括详尽的杂合子丢失 (LOH)、突变和表达的研究, 未能证明这些基因中任何基因在致癌作用中是固有涉及的。

[0010] CLL 的恶性的、大部分非分裂的 B 细胞过度表达 Bcl2 基因 (Kitada, S., 等人, Blood 91 :3379-3389 (1998)), 在通过抑制细胞死亡而促进真核细胞的存活中起着中心作

用的凋亡抑制因子 (Cory, S., 和 Adams, J. M., Nature Reviews 2:647-656 (2002))。Bcl2 的过度表达与许多类型的人癌症包括白血病、淋巴瘤和癌相关 (Sanchez-Beato, M., 等人, Blood 101:1220-1235 (2003))。在滤泡性淋巴瘤中和部分弥漫性 B 细胞淋巴瘤中,发现 BCL2 的活化机制是染色体易位 t(14;18)(q32;q21),该易位将 BCL2 基因置于免疫球蛋白重链增强子的控制之下,这导致该基因的表达脱离控制 (Tsujimoto, Y., 等人, Science 226:1097-1099 (1984); Tsujimoto, Y., 等人, Science 228:1440-1443 (1985))。然而, BCL2 基因在低于 5% 的 CLL 病例中与免疫球蛋白基因座紧靠 (Adachi, M., 等人, J. Exp. Med. 171:559-564 (1990)), BCL2 在大部分 CLL 癌症中的过度表达的机制仍然未知。

[0011] 目前对 CLL 的治疗通常包括化学疗法,单独地或与自体骨髓移植一起施用的化学疗法。使用的化学治疗剂通常对于患者是有毒性的,通常在相对大部分的患者只导致部分缓解。用于 BCL2 相关癌症的疗法也可包括化学疗法,通常在肿瘤的手术切除后进行。然而,对于 CLL,化学治疗剂的治疗特征(在进行或不进行手术的情况下)是有限的。

[0012] 单独使用化疗的治疗是有限的,因为癌细胞通常变得对广谱的结构上不相关的化学治疗剂具有抗性。该抗性,称为“多抗药性 (multidrug resistance)” (MDR),是治疗癌症患者中面临的共同问题,肿瘤细胞对化疗药物的抗性代表了临床肿瘤学中的主要问题。

[0013] 凋亡是事件顺序的重要组成部分,在所述事件顺序期间,化疗药物诱导抗肿瘤反应,并且研究已表明 Bcl2 在抗癌药物诱导的凋亡中具有至关重要的作用 (Kim, R 等人, Cancer 101(11):2491-2502 (2004))。此外,经工程改造过度表达 Bcl2 的肿瘤细胞产生对许多不同药物的细胞毒性效应的抗性 (Kamesaki 等人, Cancer Res. 53:4251-4256 (1993); Miyashita and Reed, Blood 81:151-157 (1993))。

[0014] 存在对用于 CLL 和其他 BCL2 相关癌症的快速、经济和准确的诊断的需要。也存在用于 BCL2 相关癌症例如 CLL 的经济、有效的对患者没有显著负影响的疗法的需要。还存在针对抑制 Bcl2 的表达的新的抗癌疗法的需要,只要广泛的普通癌症与 Bcl2 蛋白的过度表达相关。此外,存在对相对于其他常规抗癌疗法展示增加的功效率的改进的抗癌疗法的需要。此外,存在对鉴定可增加癌细胞对抗癌剂的细胞毒性效应的敏感性从而改进癌症疗法的试剂和方法的需要。还存在对在过度表达抗凋亡蛋白例如 Bcl2 的细胞中诱导凋亡的方法的需要。

[0015] 发明概述

[0016] 现已发现,某些具有与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的序列的 microRNA 在过度表达 Bcl2 蛋白的癌细胞中摆脱了控制。

[0017] 因此,本发明提供了在需要该治疗的受试者中预防癌症或治疗与 BCL2 基因或基因产物(例如, RNA、蛋白质)过度表达相关的癌症的方法,其包括施用有效量的至少一种 miR 基因产物。如此处所用的,术语“BCL2”是指 BCL2 核酸(例如, BCL2 基因、cDNA、RNA 转录物、DNA 构建体),而“Bcl2”是指 Bcl2 蛋白质产物。在特定的实施方案中,至少一种 miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在特定的实施方案中,至少一种 miR 基因产物包含与 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741 至 3749 互补的核苷酸序列。此类 miR 基因产物的实例包括但不限于 miR15、miR16、miR-15b 和 miR-16-2。miR15 和 miR16 基因位于 13q14,通常分别称为 mir-15a 和 miR-16-1。如此处所用的,术语“miR15”和“miR-15a”可互换使用,对于术语“miR16”和“miR-16-1”亦如此。在其他实施方案中,miR

基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217、miR-186 和其组合。在另一个实施方案中，miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195 和其组合。在特定的实施方案中，miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。

[0018] 本发明还提供了用于治疗患有与 Bcl2 过度表达相关的癌症的受试者的药物组合物，其包含至少一种化学治疗剂和至少一种 miR 基因产物，其中所述至少一种 miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在一个实施方案中，至少一种 miR 基因产物是 miR-15a。在另一个实施方案中，至少一种 miR 基因产物是 miR-16-1。在另一个实施方案中，至少一种 miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217、miR-186 和其组合。在另一个实施方案中，miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195 和其组合。在特定的实施方案中，miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。

[0019] 本发明还包括确定在具有 BCL2 相关癌症的受试者中癌症疗法的功效的方法，其包括对受试者施用至少一种药物，然后测量包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因产物的表达。在特定的实施方案中，在施用试剂后，miR 基因产物的表达的增加表明成功的治疗。在一个实施方案中，至少一种 miR 基因产物是 miR-15a。在另一个实施方案中，至少一种 miR 基因产物是 miR-16-1。在另一个实施方案中，至少一种 miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217、miR-186 和其组合。在另一个实施方案中，miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195 和其组合。在特定的实施方案中，miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。

[0020] 本发明还提供了用于增加抗癌疗法（例如，化学疗法、放射疗法）的功效的方法，其包括与至少一种抗癌疗法一起对肿瘤细胞提供至少一种 miR 基因产物。在特定的实施方案中，至少一种 miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在其他实施方案中，至少一种 miR 基因产物是 miR-15a 或 miR-16-1。在另一个实施方案中，至少一种 miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217、miR-186 和其组合。在另一个实施方案中，miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195 和其组合。在某些实施方案中，miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。

[0021] 本发明还提供了增加癌细胞对抗癌剂的细胞毒性的敏感性的方法，其包括对癌细胞提供至少一种 miR 基因产物，其中所述至少一种 miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在一个实施方案中，至少一种 miR 基因产物是 miR-15a 或

miR-16-1。在另一个实施方案中,至少一种 miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217、miR-186 和其组合。在另一个实施方案中,miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195 和其组合。在某些实施方案中,miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。在特定的实施方案中,抗癌剂是化疗剂。在另一个实施方案中,抗癌剂是辐照处理。

[0022] 本发明还包括诱导细胞的凋亡的方法,其包括将细胞与至少一种包含与 BCL2 基因转录物的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因产物接触。在特定的实施方案中,miR 基因产物包含与 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741-3749 互补的核苷酸序列。在进一步的实施方案中,至少一种 miR 基因产物是 miR-15a 或 miR-16-1。在另一个实施方案中,至少一种 miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217、miR-186 和其组合。在另一个实施方案中,miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195 和其组合。在某些实施方案中,miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。用于这些方法的合适的细胞包括,但不限于,表达 Bcl2 蛋白的癌细胞和其他细胞。

[0023] 本发明还提供了在受试者中诊断 BCL2 相关癌症的方法,其包括确定相对于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平,来自受试者的样品中的至少一种 miR 基因产物的水平,其中 miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。在特定的实施方案中,miR 基因产物包含与 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741-3749 互补的核苷酸序列。在进一步的实施方案中,至少一种 miR 基因产物是 miR-15a 或 miR-16-1。在另一个实施方案中,至少一种 miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217、miR-186 和其组合。在另一个实施方案中,miR 基因产物选自 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195 和其组合。在某些实施方案中,miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。

[0024] 附图概述

[0025] 本专利或申请文件包含至少一份彩色绘制的附图。在要求和支付必要的费用后由办公室提供具有彩色附图的本申请或专利申请出版物的拷贝。

[0026] 图 1A 和 1B 分别是预测的 miR15 和 miR16 前体 RNA 的二级结构的图示。使用 Matthews, 等人, J. Mol. Biol. 288:911-940(1999) 的“mfold”程序(版本 3.1)进行 RNA 二级结构预测,并进行手工加工以在螺旋片段中容纳 G/U 摆动碱基配对。经过加工的 miR15 和 miR16 miRNA 的序列以下划线标示。改编自 Lagos-Quintana, 等人, Science 294:853-858(2001)。

[0027] 图 2A 是 CLL 中 13q14 肿瘤抑制基因基因座内的基因图,该基因图显示 miR15/16 基因簇的定位。在图中显示了遗传标记的位置和基因的位置。

[0028] 图 2B 是由水平条纹框标记的之前报导的 13q14 缺失。

[0029] 图 2C 是 D13S1150 和 D13S272 标记之间的基因座的图。基因名称下面的箭头标示该基因座中各基因的方向,垂直条块标示与各基因相应的相应的外显子的位置。

[0030] 图 2D 是 Alu 18 和 D13S272 标记之间的基因座的图。条块和框标示 LEU2/ALT1 和 LEU1 的外显子的位置。短的垂直箭头标示 miR15 和 miR16 基因的位置。圆圈标示用于筛选来源于两个独立的白血病病例 (CLL-A 和 CLL-B) 的融合的体细胞杂交克隆的 PCR 引物的位置。加阴影线的框代表存在于杂种中的染色体 13 的位置。“ $\leftarrow \sim 31.4\text{kb} \rightarrow$ ”表示克隆 CLL-A 中大约 31.4kb 的缺失区域,其来源于具有 CLL (具有 t(2;13)(q12;q13) 易位)、双侧性视网膜母细胞瘤 (bilateral retinoblastoma) 和溃疡性结肠炎的患者。长垂直箭头表示具有 t(2;13)(q32;q14) 易位的克隆 CLL-B 中的断裂点,“ $\leftarrow \sim 29\text{kb} \rightarrow$ ”表示来自该 CLL 克隆的大约 29kb 的缺失区域。

[0031] 图 3A 是正常人肾、前列腺、肝、胰腺癌、骨骼肌 (“Sk 肌”)、睾丸、CD5+B 细胞 (CD5+)、白血病细胞 (“Per B1 Leuk”) 和骨髓 (“BM”) 中的 miR15 和 miR16 基因表达的 Northern 印迹分析。

[0032] 图 3B 是 18 个 CLL 患者中微卫星标记 D13S272 和 D13S272 的杂合子 (“LOH”) 丢失分析。来自正常人 CD5+ 细胞的 DNA 用作对照。样品的 LOH 状态表示为 “+/+”、“+/-”、“-/-”、“NI” (未提供资料)、“?” (无足够的材料) 和 “ND” (未进行)。溴化乙锭染色的 Northern 印迹凝胶用作标准化的对照。

[0033] 图 4A 描述了人 miRNA (miR-15a (Hsa_miR-15; SEQ ID NO:58) 或 miR-16-1 (Hsa_miR-16; SEQ ID NO:59)) 和人 BCL2 cDNA (Hsa_BCL2; SEQ ID NO:57)) 以及小鼠 miRNA (miR-15a (Mmu_miR-15; SEQ ID NO:61) 或 miR-16-1 (Mmu_miR-16; SEQ ID NO:62)) 与小鼠 BCL2 cDNA (Mmu_BCL2; SEQ ID NO:60) 之间的 miRNA::mRNA 互补区 (红色核苷酸)。标示两种不同的 3' UTR 突变型构建体: 3' M1 (其缺少负责 miRNA::mRNA 相互作用的所有 9 个 bp) 和 3' M2 (其缺少互补区域中的前 5 个 bp) 的 miR-15a 和 miR-16-1 中的被靶向的缺失的位点。

[0034] 图 4B 是描述 5 种不同的 CLL 样品 (CLL) 的每一种中以及来自正常患者的 CD5 阳性 B 淋巴细胞的混合样品 (CD5 混合物) 中的 Bcl2 蛋白的水平 Western 印迹。Jurkat 细胞 (T 细胞白血病细胞系) 用作 Bcl2 蛋白表达的对照。β-肌动蛋白 (肌动蛋白) 的水平用于标准化。如通过微阵列信号强度所确定的,各样品中的 miR-16-1 和 miR-15a microRNA 的相对表达在下面相应的泳道中示于印迹下面。

[0035] 图 5A 是描述未转染的 MEG-01 细胞 (MEG-01 WT) 以及用空载体 (MEG-01-pRS-neo-GFP) 转染的 MEG-01 细胞、用包含 mir-15a/miR-16-1 基因簇的载体 (MEG-01-pRS-15a/16-1WT) 转染的 MEG-01 细胞或用载体 (所述载体包含在 miR-16a 前体的 3' 区域具有 +7(C 至 T) 置换的 mir-15a/miR-16-1 基因簇) (MEG-01-pRS-15a/16-1 MUT) 转染的 MEG-01 细胞中, Bcl2 蛋白水平以及不同凋亡活性剂 (例如, APAF1、Pro-C9、C9、PARP 和经切割的 PARP) 的全长和切割的形式水平的 Western 印迹。以一式两份的重复实验确认数据。pRS-15a/16-1WT 转染的细胞显示 APAF1 (凋亡蛋白酶活化因子 1、细胞色素 C 相互作用因子 (interactor))、pro-半胱天冬酶 9 (内源性凋亡途径) 和多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP, 不同的凋亡途径的终效应物) 的断裂。肌动蛋白用作上样对照。

[0036] 图 5B 是描述用 miR-15a 和 / 或 miR-16-1 有义 (miR-15a, miR16-1) 或 miR-15a 和

/ 或 miR-16-1 反义 (miR-15a_AS、miR16-1_AS) RNA 寡核苷酸转染的 MEG-01 细胞中的 Bcl2 蛋白质水平的 Western 印迹 (WB)。未转染的细胞用作对照 (MEG-01-WT)。使用 β 肌动蛋白 (肌动蛋白) 的水平进行标准化。进行 Northern 印迹 (NB) 分析以估量 miR-15 有义和 miR-16 有义寡核苷酸的转染功效。RT-PCR 产物代表了相同细胞中 BCL2 转录物的 mRNA 水平, 将该水平针对 β 肌动蛋白 (肌动蛋白) mRNA 的水平 (RT-PCR) 标准化。

[0037] 图 6A 是描述在用 miR-15-a 和 / 或 miR-16-1 有义 RNA 寡核苷酸 (分别为 miR15a S 和 miR-16-1 S) 或 miR-15-a 和 / 或 miR-16-1 反义 RNA 寡核苷酸 (分别为 miR15a A 和 miR-16-1 A) 转染的细胞中, 相对肾荧光素酶转染对照标准化的萤火虫荧光素酶的表达的相对抑制 (抑制倍数) 的条形图。用空对照载体 (pGL-3-Cont) 或 miR-15-a 和 / 或 miR-16-1 有义或反义 RNA 寡核苷酸转染细胞。以一式三份重复 ($n = 6$) 进行所有实验 2 次。

[0038] 图 6B 是描述相对肾荧光素酶转染对照标准化的萤火虫荧光素酶的表达的相对抑制的条形图。用空对照载体 (pGL-3-Cont)、miR-15-a 和 miR-16-1 有义 RNA 寡核苷酸 (pSR-15a/16-1 S+3' UTR) 或 miR-15-a 和 miR-16-1 反义 RNA 寡核苷酸 (pSR-15a/16-1 A+3' UTR) RNA 寡核苷酸转染细胞。3' UTR 表示融合至野生型 BCL2 3' UTR 序列的荧光素酶报告基因。也转染两种不同的 3' UTR 突变体, 一种缺乏 miR-15-a 和 miR-16-1 中的互补性 miRNA::mRNA 区域的所有 9 个 bp (pSR-15a/16-1 S+3' M1), 另一个缺乏相同互补区域中的前 5 个 bp (pSR-15a/16-1 S+3' M2)。以一式三份重复 ($n = 6$) 进行所有实验 2 次。

[0039] 根据下列本发明的实施方案的更具体描述, 本发明的前述目的和其他目的、特征和有利方面将很显然。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明的优选的实施方案的描述如下。

[0042] 当通过参考其优选实施方案, 明确地显示和描述本发明时, 本领域技术人员将理解此处可在形式和内容上进行不同的改变而不背离由所附权利要求包含的本发明的范围。

[0043] 如此处可互换使用的, “miR 基因产物”、“microRNA”、“miR”或“miRNA”是指来自 miR 基因的未加工的或加工的 RNA 转录物。因为 miR 基因产物不翻译成蛋白质, 术语“miR 基因产物”不包括蛋白质。未加工的 miR 基因转录物也称为“miR 前体”, 通常包含长度大约为 70-100 个核苷酸的 RNA 转录物。可通过 RNA 酶 (例如 Dicer、Argonaut、RNAse III (例如, 大肠杆菌 RNA 酶 III)) 降解将 miR 前体加工成活性 19-25 个核苷酸的 RNA 分子。该活性 19-25 个核苷酸的 RNA 分子也称为“加工的”miR 基因转录物或“成熟的”miRNA。

[0044] 可通过天然加工途径 (例如使用完整的细胞或细胞裂解物) 或通过合成加工途径 (例如, 使用分离的加工酶, 例如分离的 Dicer、Argonaut 或 RNA 酶 III) 从 miR 前体获得活性 19-25 个核苷酸的 RNA 分子。应理解为还可通过生物或化学合成产生活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子而不必从 miR 前体加工。

[0045] 表 1 中提供了大量 miR 基因产物的序列。所有核苷酸序列此处以 5' 至 3' 的方向给出。

[0046] 表 1- 人 miR 基因产物的序列

[0047]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQID NO :
let-7a-1-prec	CACTGTGGGATGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTT TAGG GTCACACCCACCACTGGGAGATAACTATACAATCTAC TGTCTTTCCTAACGTG	63
let-7a-2-prec	AGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTT TAGAATTACAT CAAGGGAGATAACTGTACAGCCTCCTAGCTTTCCT	64
let-7a-3-prec	GGGTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTTT GGGGCTCTGCC CTGCTATGGGATAACTATACAATCTACTGTCTTTCCT	65
let-7a-4-prec	GTGACTGCATGCTCCCAGGTTGAGGTAGTAGGTT GTA TAGTTT TAGAATTACACAAGGGAGATAACTGTACAGC CTCCTAGCTTTCCTTGGGTCT TGCCTAAACAAC	66
let-7b-prec	GGCGGGGTGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTTT CAGGGC AGTGATGTTGCCCTCGGAAGATAACTATACAACCTA CTGCCTTCCCTG	67
let-7c-prec	GCATCCGGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT TAGAG TTACACCCTGGGAGTTAACTGTACAACCTTCTAGCTT TCCTTGGAGC	68
let-7d-prec	CCTAGGAAGAGGTAGTAGGTTGCATAGTTT TAGGGC AGGGATTTTGCCCAAGGAGGTAAGTATACGACCT GCTGCCTTTCCTTAGG	69
let-7d-v1-prec	CTAGGAAGAGGTAGTAGTTTGCATAGTTT TAGGGCAA AGATTTTGCCCAAGTAGTTAGCTATACGACCTGCA GCCTTTTGTAG	70
let-7d-v2-prec	CTGGCTGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTTGGT CGGGTTG TGACATTGCCCGCTGTGGAGATAACTGCGCAAGCTAC TGCCTTGCTAG	71
let-7e-prec	CCCGGGCTGAGGTAGGAGTTGTATAGTTGAGGAGG ACACCCAAGGAGATCACTATACGGCCTCCTAGCTTTC CCCAGG	72
let-7f-1-prec	TCAGAGTGAGGTAGTAGATTGTATAGTTGTGGGGTAG TGATTTTACCCTGTTT CAGGAGATAACTATACAATCTA TTGCCTTCCCTGA	73

let-7f-2-prec-1	CTGTGGGATGAGGTAGTAGATTGTATAGTTGTGGGGT AGTGATTTTACCCTGTTTCAGGAGATAACTATACAATC TATTGCCTTCCCTGA	74
let-7f-2-prec-2	CTGTGGGATGAGGTAGTAGATTGTATAGTTTtagGGT CATACCCCATCTTGGAGATAACTATACAGTCTACTGT CTTTCCACGG	75
let-7g-prec	TTGCCTGATTCCAGGCTGAGGTAGTAGTTTGTACAGT TTGAGGGTCTATGATACCCCGGTACAGGAGATAA CTGTACAGGCCACTGCCTTGCCAGGAACAGCGCGC	76
let-7i-prec	CTGGCTGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTTGGTCGGGTG TGACATTGCCCGCTGTGGAGATAACTGCGCAAGCTAC TGCCTTGCTAG	77

[0048]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-001b-1-prec-1	ACCTACTCAGAGTACATACTTCTTTATGTACCCATAT GAACATACAATGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTA TTTTTGGTAGGC	78
mir-001b-1-prec-2	CAGCTAACAACTTAGTAATACCTACTCAGAGTACATA CTTCTTTATGTACCCATATGAACATACAATGCTATGG AATGTAAAGAAGTATGTATTTTGGTAGGCAATA	79
mir-001b-2-prec	GCCTGCTTGGGAAACATACTTCTTTATATGCCCATAT GGACCTGCTAAGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTA TCTCAGGCCGGG	80
mir-001b-prec	TGGGAAACATACTTCTTTATATGCCCATATGGACCTG CTAAGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTATCTCA	81
mir-001d-prec	ACCTACTCAGAGTACATACTTCTTTATGTACCCATAT GAACATACAATGCTATGGAATGTAAAGAAGTATGTA TTTTTGGTAGGC	82
mir-007-1	TGGATGTTGGCCTAGTTCTGTGTGGAAGACTAGTGAT TTTGTGTTTTTAGATAACTAAATCGACAACAAATCA CAGTCTGCCATATGGCACAGGCCATGCCTCTACA	83

mir-007-1-prec	TTGGATGTTGGCCTAGTTCTGTGTGGAAGACTAGTGA TTTGTTGTTTTTAGATAACTAAATCGACAACAAATC ACAGTCTGCCATATGGCACAGGCCATGCCTCTACAG	84
mir-007-2-prec	CTGGATACAGAGTGGACCGGCTGGCCCCATCTGGAAGA GACTAGTGATTTTGTGTTGTCTTACTGCGCTCAACA ACAAATCCCAGTCTACCTAATGGTGCCAGCCATCGCA	85
mir-007-3-prec	AGATTAGAGTGGCTGTGGTCTAGTGCTGTGTGGAAGA CTAGTGATTTTGTGTTCTGATGTACTACGACAACAA GTCACAGCCGGCCTCATAGCGCAGACTCCCTTCGAC	86
mir-009-1	CGGGGTGGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA GTGGTGTGGAGTCTTCATAAAGCTAGATAACCGAAA GTAAAAATAACCCCA	87
mir-009-2	GGAAGCGAGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATG AGTGTATTGGTCTTCATAAAGCTAGATAACCGAAAGT	88
mir-009-3	GGAGGCCCGTTCTCTCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA GTGCCACAGAGCCGTCATAAAGCTAGATAACCGAAA GTAGAAATGATTCTCA	89
mir-010a-prec	GATCTGTCTGTCTTCTGTATATACCCTGTAGATCCGA ATTTGTGTAAGGAATTTTGTGGTCACAAATTCGTATC TAGGGGAATATGTAGTTGACATAAACACTCCGCTCT	90
mir-010b-prec	CCAGAGGTTGTAACGTTGTCTATATATACCCTGTAGA ACCGAATTTGTGTGGTATCCGTATAGTCACAGATTGG ATTCTAGGGGAATATATGGTCA\GATGCAAAAACCTCA	91

[0049]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-015a-2-prec	GCGCGAATGTGTGTTTAAAAAATAAAACCTTGGA GTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGATTTTGAA AAGGGTGCAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAAAATAC	92
mir-015a-prec	CCTTGGAGTAAAGTAGCAGCACATAATGGTTTGTGGA TTTTGAAAAGGTGGAGGCCATATTGTGCTGCCTCAAA AATACAAGG	93
mir-015b-prec-1	CTGTAGCAGCACATCATGGTTTACATGCTACAGTCAA GATGCGAATCATTATTTGCTGCTCTAG	94
mir-015b-prec-2	TTGAGGCCTTAAAGTACTGTAGCAGCACATCATGGTT TACATGCTACAGTCAAGATGCGAATCATTATTTGCTG CTCTAGAAATTTAAGGAAATTCAT	95
mir-016a-chr13	GTCAGCAGTGCCTTAGCAGCACGTAAATATTGGCGTT AAGATTCTAAAATTATCTCGAGTATTAAGTGTGCTGC TGAAGTAAGGTTGAC	96
mir-016b-chr3	GTTCCACTCTAGCAGCACGTA AATATTGGCGTAGTGA AATATATATTAAACACCAATATTACTGTGCTGCTTTA GTGTGAC	97
mir-016-prec-13	GCAGTGCCTTAGCAGCACGTAAATATTGGCGTTAAGA TTCTAAAATTATCTCCAGTATTAAGTGTGCTGCTGAA GTAAGGT	98
mir-017-prec	GTCAGAATAATGTCAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGT GATATGTGCATCTACTGCAGTGAAGGCACTTGTAGCA TTATGGTGAC	99
mir-018-prec	TGTTCTAAGGTGCATCTAGTGCAGATAGTGAAGTAGA TTAGCATCTACTGCCCTAAGTGCTCCTTCTGGCA	100
mir-018-prec-13	TTTTTGTTCTAAGGTGCATCTAGTGCAGATAGTGAAG TAGATTAGCATCTACTGCCCTAAGTGCTCCTTCTGGC ATAAGAA	101
mir-019a-prec	GCAGTCCTCTGTTAGTTTTGCATAGTTGCACTACAAG AAGAATGTAGTTGTGCAAATCTATGCAAACTGATG GTGGCCTGC	102

mir-019a-prec- 13	CAGTCCTCTGTTAGTTTTGCATAGTTGCACTACAAGA AGAATGTAGTTGTGCAAATCTATGCAAACTGATGGT GGCCTG	103
mir-019b-1-prec	CACTGTTCTATGGTTAGTTTTGCAGGTTTGCATCCAGC TGTGTGATATTCTGCTGTGCAAATCCATGCAAACTG ACTGTGGTAGTG	104
mir-019b-2-prec	ACATTGCTACTTACAATTAGTTTTGCAGGTTTGCATTT CAGCGTATATATGTATATGTGGCTGTGCAAATCCATG CAAACTGATTGTGATAATGT	105
mir-019b-prec- 13	TTCTATGGTTAGTTTTGCAGGTTTGCATCCAGCTGTGT GATATTCTGCTGTGCAAATCCATGCAAACTGACTGT GGTAG	106

[0050]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-019b-prec-X	TTACAATTAGTTTTGCAGGTTTGCATTTAGCGTATAT ATGTATATGTGGCTGTGCAAATCCATGCAAACTGAT TGTGAT	107
mir-020-prec	GTAGCACTAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAGTGTTAG TTATCTACTGCATTATGAGCACTTAAAGTACTGC	108
mir-021-prec	TGTCGGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGTTGAA TCTCATGGCAACACCAGTCGATGGGCTGTCTGACA	109
mir-021-prec-17	ACCTTGTCGGGTAGCTTATCAGACTGATGTTGACTGT TGAATCTCATGGCAACACCAGTCGATGGGCTGTCTGA CATTTTG	110
mir-022-prec	GGCTGAGCCGCAGTAGTTCTTCAGTGGCAAGCTTTAT GTCCTGACCCAGCTAAAGCTGCCAGTTGAAGAACTGT TGCCCTCTGCC	111
mir-023a-prec	GGCCGGCTGGGGTTCCTGGGGATGGGATTTGCTTCCT GTCACAAATCACATTGCCAGGGATTCCAACCGACC	112
mir-023b-prec	CTCAGGTGCTCTGGCTGCTTGGGTTCTGGCATGCTG ATTTGTGACTTAAGATTAAATCACATTGCCAGGGAT TACCACGCAACCACGACCTTGGC	113
mir-023-prec-19	CCACGGCCGGCTGGGGTTCCTGGGGATGGGATTTGCT TCCTGTCACAAATCACATTGCCAGGGATTCCAACCG ACCCTGA	114
mir-024-1-prec	CTCCGGTGCCTACTGAGCTGATATCAGTTCTCATTTTA CACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGGAG	115
mir-024-2-prec	CTCTGCCTCCCGTGCCTACTGAGCTGAAACACAGTTG GTTTGTGTACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGGG	116
mmir-024-prec-19	CCCTGGGCTCTGCCTCCCGTGCCTACTGAGCTGAAAC ACAGTTGGTTTGTGTACACTGGCTCAGTTCAGCAGGA ACAGGGG	117
mir-024-prec-9	CCCTCCGGTGCCTACTGAGCTGATATCAGTTCTCATTT TACACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGCATC	118

mir-025-prec	GGCCAGTGTTGAGAGGCGGAGACTTGGGCAATTGCT GGACGCTGCCCTGGGCATTGC <u>ACTTGTCTCGGTCTGA</u> CAGTGCCGGCC	119
mir-026a-prec	AGGCCGTGGCCTCGTTCAAGTAATCCAGGATAGGCTG TGCAGGTCCCAATGGCCTATCTTGGTTACTTGACACGG GGACGCGGGCCT	120
mir-026b-prec	CCGGGACCCAGTTCAAGTAATTCAGGATAGGTTGTGT GCTGTCCAGCCTGTTCTCCATTACTTGGCTCGGGGAC CGG	121
mir-027a-prec	CTGAGGAGCAGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCAGGGTC CACACCAAGTCGTGTTCA <u>CAGTGGCTAAGTCCGCCC</u> CCCAG	122

[0051]

名称	前体序列 (5' 至 3') *	SEQ ID NO :
mir-027b-prec-1	AGGTGCAGAGCTTAGCTGATTGGTGAACAGTGATTG GTTTCCGCTTTGTTACAGTGGCTAAGTTCTGCACCT	123
mir-027b-prec-2	ACCTCTCTAACAAGGTGCAGAGCTTAGCTGATTGGTG AACAGTGATTGGTTTCCGCTTTGTTACAGTGGCTAA GTTCTGCACCTGAAGAGAAGGTG	124
mir-027-prec-19	CCTGAGGAGCAGGGCTTAGCTGCTTGTGAGCAGGGT CCACACCAAGTCGTGTTACAGTGGCTAAGTTCCGCC CCCCAGG	125
mir-028-prec	GGTCCTTGCCCTCAAGGAGCTCACAGTCTATTGAGTT ACCTTTCTGACTTTCCCACTAGATTGTGAGCTCCTGG AGGGCAGGCACT	126
mir-029a-2	CCTTCTGTGACCCCTTAGAGGATGACTGATTTCTTTTG GTGTTTCAGAGTCAATATAATTTCTAGCACCATCTGA AATCGGTTATAATGATTGGGGAAGAGCACCATG	127
mir-029a-prec	ATGACTGATTTCTTTTGGTGTTCAGAGTCAATATAATT TTCTAGCACCATCTGAAATCGGTTAT	128
mir-029c-prec	ACCACTGGCCCATCTCTTACACAGGCTGACCGATTTC TCCTGGTGTTCAGAGTCTGTTTTGTCTAGCACCATT GAAATCGGTTATGATGTAGGGGAAAAGCAGCAGC	129
mir-030a-prec	GCGACTGTAAACATCCTCGACTGGAAGCTGTGAAGC CACAGATGGGCTTTCAGTCGGATGTTTGCAGCTGC	130
mir-030b-prec-1	ATGTAAACATCCTACACTCAGCTGTAATACATGGATT GGCTGGGAGGTGGATGTTTACGT	131
mir-030b-prec-2	ACCAAGTTTCAGTTCATGTAAACATCCTACACTCAGC TGTAATACATGGATTGGCTGGGAGGTGGATGTTTACT TCAGCTGACTTGA	132
mir-030c-prec	AGATACTGTAAACATCCTACACTCTCAGCTGTGAAA GTAAGAAAGCTGGGAGAAGGCTGTTTACTCTTTCT	133
mir-030d-prec	GTTGTTGTAAACATCCCCGACTGGAAGCTGTAAGACA CAGCTAAGCTTTCAGTCAGATGTTTGTGCTAC	134

mir-031-prec	GGAGAGGAGGCAAGATGCTGGCATAGCTGTTGAACT GGGAACCTGCTATGCCAACATATTGCCATCTTTCC	135
mir-032-prec	GGAGATATTGCACATTACTAAGTTGCATGTTGTCACG GCCTCAATGCAATTTAGTGTGTGTGATATTTTC	136
mir-033b-prec	GGGGGCCGAGAGAGGCGGGCGGCCCGCGGTGCATT GCTGTTGCATTGCACGTGTGTGAGGCGGGTGCACTGC CTCGGCAGTGCAGCCCGAGCCGGCCCCTGGCACCA C	137
mir-033-prec	CTGTGGTGCATTGTAGTTGCATTGCATGTTCTGGTGG TACCCATGCAATGTTTCCACAGTGCATCACAG	138
mir-034-prec	GGCCAGCTGTGAGTGTTCCTTTGGCAGTGTCTTAGCT GGTTGTTGTGAGCAATAGTAAGGAAGCAATCAGCAA GTATACTGCCCTAGAAGTTGCTGCAGGTTGTGGGGCCC	139

[0052]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-091-prec-13	TCAGAATAATGTCAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGTG ATATGTGCATCTACTGCAGTGAAGGCACTTGTAGCAT TATGGTGA	140
mir-092-prec- 13 = 092-1	CTTTCTACACAGGTTGGGATCGGTTGCAATGCTGTGT TTCTGTATGGTATTGCACTTGTCCCGCCTGTTGAGTT TGG	141
mir-092-prec- X = 092-2	TCATCCCTGGGTGGGGATTTGTTGCATTACTTGTGTTT TATATAAAGTATTGCACTTGTCCCGCCTGTGGAAGA	142
mir-093-prec- 7.1 = 093-1 (mir-093-prec- 7.2 = 093-2)	CTGGGGGCTCCAAAGTGCTGTTCTGTCAGGTAGTGTG ATTACCCAACCTACTGCTGAGCTAGCACTTCCCGAGC CCCCGG	143
mir-095-prec-4	AACACAGTGGGCACTCAATAAATGTCTGTTGAATTGA AATGCGTTACATTCAACGGGTATTTATTGAGCACCCA CTCTGTG	144
mir-096-prec-7	TGGCCGATTTTGGCACTAGCACATTTTGTCTGTGTCT CTCCGCTCTGAGCAATCATGTGCAGTGCCAATATGGG AAA	145
mir-098-prec-X	GTGAGGTAGTAAGTTGTATTGTTGTGGGTTAGGGATA TTAGGCCCAATTAGAAGATAACTATACAACCTACTA CTTTCC	146
mir-099b-prec- 19	GGCACCCACCCGTAGAACCGACCTTGCGGGGCCTTCG CCGCACACAAGCTCGTGTCTGTGGGTCCGTGTC	147
mir-099-prec-21	CCCATTGGCATAAACCCTAGATCCGATCTTGTGGTG AAGTGGACCGCACAAGCTCGCTTCTATGGGTCTGTGT CAGTGTG	148
mir-100-1/2-prec	AAGAGAGAAGATATTGAGGCCTGTTGCCACAAACCC GTAGATCCGAACCTTGTGGTATTAGTCCGCACAAGCTT GTATCTATAGGTATGTGTCTGTTAGGCAATCTCAC	149
mir-100-prec-11	CCTGTTGCCACAAACCCTAGATCCGAACCTTGTGGTA TTAGTCCGCACAAGCTTGTATCTATAGGTATGTGTCT GTTAGG	150

mir-101-1/2-prec	AGGCTGCCCTGGCTCAGTTATCACAGTGCTGATGCTG TCTATTCTAAAGGTACAGTACTGTGATAACTGAAGGA TGGCAGCCATCTTACCTTCCATCAGAGGAGCCTCAC	151
mir-101-prec	TCAGTTATCACAGTGCTGATGCTGTCCATTCTAAAGG <u>TACAGTACTGTGATAACTGA</u>	152
mir-101-prec-1	TGCCCTGGCTCAGTTATCACAGTGCTGATGCTGTCTA TTCTAAAGGT <u>TACAGTACTGTGATAACTGAAGGATGGC</u> A	153
mir-101-prec-9	TGTCCTTTTTTCGGTTATCATGGTACCGATGCTGTATAT CTGAAAGGTACAGTACTGTGATAACTGAAGAATGGT G	154

[0053]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-102-prec-1	CTTCTGGAAGCTGGTTTCACATGGTGGCTTAGATTTT CCATCTTTGTATCTAGCACCATTGAAATCAGTGTTTT AGGAG	155
mir-102-prec-7.1 (mir-102-prec- 7.2)	CTTCAGGAAGCTGGTTTCATATGGTGGTTTAGATTTA AATAGTGATTGTCTAGCACCATTGAAATCAGTGTTT TTGGGGG	156
mir-103-2-prec (mir-103-prec- 20)	TTGTGCTTTCAGCTTCTTTACAGTGCTGCCTTGTAGCA TTCAGGTCAAGCAACATTGTACAGGGCTATGAAAGA ACCA	157
mir-103-prec- 5 = 103-1	TACTGCCCTCGGCTTCTTTACAGTGCTGCCTTGTGCA TATGGATCAAGCAGCATTGTACAGGGCTATGAAGGC ATTG	158
mir-104-prec-17	AAATGTCAGACAGCCCATCGACTGGTGTGCCATGAG ATTCAACAGTCAACATCAGTCTGATAAGCTACCCGAC AAGG	159
mir-105-prec-X.1 (mir-105-1 ; mir-105-prec- X.2 ;mir-105-2)	TGTGCATCGTGGTCAAATGCTCAGACTCCTGTGGTGG CTGCTCATGCACCACGGATGTTTGAGCATGTGCTACG GTGTCTA	160
mir-106-prec-X	CCTTGCCATGTAAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGCT TTTTGAGATCTACTGCAATGTAAGCACTTCTTACATT ACCATGG	161
mir-107-prec-10	CTCTCTGCTTTCAGCTTCTTTACAGTGTTGCCTTGTGG CATGGAGTTCAAGCAGCATTGTACAGGGCTATCAAA GCACAGA	162
mir-122a-prec-1	CCTTAGCAGAGCTGTGGAGTGTGACAATGGTGTGTGT GTCTAAATATCAAACGCCATTATCACACTAAATAGC TACTGCTAGGC	163
mir-122a-prec-2	AGCTGTGGAGTGTGACAATGGTGTGTGTGTCCTAACT ATCAAACGCCATTATCACACTAAATAGCT	164
mir-123-prec	ACATTATTACTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAA CTCGTACCGTGAGTAATAATGCGC	165

mir-124a-1-prec-1	tccttctCAGGAGAAAGGCCTCTCTCCGTGTTACAGC GGACCTTGATTAAATGTCCATACAATTAAGGCACGC <u>GGTGAATGCCAAGAATGGGGCT</u>	166
mir-124a-1-prec-2	AGGCCTCTCTCTCCGTGTTACAGCGGACCTTGATT AAATGTCCATACAATTAAGGCACGCGGTGAATGCCA AGAATGGGGCTG	167
mir-124a-2-prec	ATCAAGATTAGAGGCTCTGCTCTCCGTGTTACAGCG GACCTTGATTAAATGTCCATACAATTAAGGCACGCGGT <u>GAATGCCAAGAGCGGAGCCTACGGCTGCACTTGAAG</u>	168

[0054]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-124a-3-prec-1	CCCGCCCCAGCCCTGAGGGCCCTCTGCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAATGTCTATACAATTAAGGCACGCGGTGAATGCCAAGAGAGGGCGCTCCGCCGCTCCTT	169
mir-124a-3-prec-2	TGAGGGCCCTCTGCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAATGTCTATACAATTAAGGCACGCGGTGAATGCCAAGAGAGGGCGCTCC	170
mir-124a-prec	CTCTGCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAATGTCTATACAATTAAGGCACGCGGTGAATGCCAAGAG	171
mir-124b-prec	CTCTCCGTGTTACAGCGGACCTTGATTTAATGTCTATACAATTAAGGCACGCGGTGAATGCCAAGAG	172
mir-125a-prec-1	TGCCAGTCTCTAGGTCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGAGGACATCCAGGGTCACAGGTGAGGTTCTTGGGAGCCTGGCGTCTGGCC	173
mir-125a-prec-2	GGTCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGAGGACATCCAGGGTCACAGGTGAGGTTCTTGGGAGCCTGG	174
mir-125b-1-1	ACATTGTTGCGCTCCTCTCAGTCCCTGAGACCCTAACCTGTGATGTTTACCGTTTAAATCCACGGGTAGGCTCTTGGGAGCTGCGAGTCGTGCTTTTGCATCCTGGA	175
mir-125b-1-2	TGCGCTCCTCTCAGTCCCTGAGACCCTAACTTGTGATGTTTACCGTTTAAATCCACGGGTAGGCTCTTGGGAGCTGCGAGTCGTGCT	176
mir-125b-2-prec-1	ACCAGACTTTTCTAGTCCCTGAGACCCTAACTTGTGAGGTATTTTAGTAACATCACAAGTCAGGCTCTTGGGACCTAGGCGGAGGGGA	177
mir-125b-2-prec-2	CCTAGTCCCTGAGACCCTAACTTGTGAGGTATTTTAGTAACATCACAAGTCAGGCTCTTGGGACCTAGGC	178
mir-126-prec-1	CGCTGGCGACGGGACATTATTACTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAACGTAACCGTGAGTAATAATGCGCCGTCCACGGCA	179
mir-126-prec-2	ACATTATTACTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAACGTAACCGTGAGTAATAATGCGC	180

mir-127-prec-1	TGTGATCACTGTCTCCAGCCTGCTGAAGCTCAGAGGG CTCTGATTCAGAAAGATCATCGGATCCGTCTGAGCTT <u>GGCTGGTCGGAAGTCTCATCATC</u>	181
mir-127-prec-2	CCAGCCTGCTGAAGCTCAGAGGGCTCTGATTCAGAA AGATCATCGGATCCGTCTGAGCTTGGCTGGTCGG <u>AGATCATCGGATCCGTCTGAGCTTGGCTGGTCGG</u>	182
mir-128a-prec	TGAGCTGTTGGATTCTGGGGCCGTAGCACTGTCTGAGA GGTTTACATTTCTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTCAG CTGCTTC	183
mir-128b-prec	GCCCGGCAGCCACTGTGCAGTGGGAAGGGGGCCGA TACACTGTACGAGAGTGAGTAGCAGGTCTCACAGTG AACCGGTCTCTTCCCTACTGTGTCACTCCTAATG G	184

[0055]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-128-prec	GTTGGATTTCGGGGCCGTAGCACTGTCTGAGAGGTTTA CATTTCACAGTGAACCGGTCTCTTTTTCAGC	185
mir-129-prec	TGGATCTTTTTCGGGTCTGGGCTTGCTGTTCCCTCTCAA CAGTAGTCAGGAAGCCCTTACCCCAAAAAGTATCTA	186
mir-130a-prec	TGCTGCTGGCCAGAGCTCTTTTCACATTGTGCTACTGT CTGCACCTGTCACTAGCAGTGAATGTTAAAAGGGCA TTGGCCGTGTAGTG	187
mir-131-1-prec	gccaggaggcggGTTGGTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCT GTATGAGTGGTGTGGAGTCTTCATAAAGCTAGATAAC <u>CGAAAGTAAAAATAACCCCATACACTGCGCAG</u>	188
mir-131-3-prec	CACGGCGCGGCAGCGGCACTGGCTAAGGGAGGCCCG TTTCTCTCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAGTGCCACAG AGCCGTCATAAAGCTAGATAACCGAAAGTAGAAATG	189
mir-131-prec	GTTGTTATCTTTGGTTATCTAGCTGTATGAGTGTATTG GTCTTCATAAAGCTAGATAACCGAAAGTAAAAAC	190
mir-132-prec-1	CCGCCCCCGCTCTCCAGGGCAACCGTGGCTTTCGAT TGTTACTGTGGGAAGTGGAGGTAACAGTCTACAGCCA <u>TGGTCGCCCCGCAGCACGCCACGCGC</u>	191
mir-132-prec-2	GGGCAACCGTGGCTTTCGATTGTTACTGTGGGAAGTGT GAGGTAACAGTCTACAGCCATGGTCGCCC	192
mir-133a-1	ACAATGCTTTGCTAGAGCTGGTAAAATGGAACCAAA TCGCCTCTTCAATGGATTGTTCCCTTCAACCAGCT <u>G</u> TAGCTATGCATTGA	193
mir-133a-2	GGGAGCCAAATGCTTTGCTAGAGCTGGTAAAATGGA ACCAAATCGACTGTCCAATGGATTGTTCCCTTCAA <u>CCAGCTGTAGCTGTGCATTGATGGCGCCG</u>	194
mir-133-prec	GCTAGAGCTGGTAAAATGGAACCAAAATCGCCTCTTCA ATGGATTGTTCCCTTCAACCAGCTGTAGC	195
mir-134-prec-1	CAGGGTGTGTGACTGGTTGACCAGAGGGGCATGCAC TGTGTTACCCTGTGGGCCACCTAGTCACCAACCCTC	196

mir-134-prec-2	AGGGTGTGTGACTGGTTGACCAGAGGGGCATGCACT GTGTTACCCCTGTGGGCCACCTAGTCACCAACCCT	197
mir-135-1-prec	AGGCCTCGCTGTTCTCTATGGCTTTTTATTCTATGTG ATTCTACTGCTCACTCATATAGGGATTGGAGCCGTGG CGCACGGCGGGGACA	198
mir-135-2-prec	AGATAAATCACTCTAGTGCTTTATGGCTTTTTATTCC TATGTGATAGTAATAAAGTCTCATGTAGGGATGGAA GCCATGAAATACATTGTGAAAAATCA	199
mir-135-prec	CTATGGCTTTTTATTCTATGTGATTCTACTGCTCACT CATATAGGGATTGGAGCCGTGG	200

[0056]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-136-prec-1	TGAGCCCTCGGAGGACTCCATTTGTTTTGATGATGGA TTCTTATGCTCCATCATCGTCTCAAATGAGTCTTCAGA GGGTTCT	201
mir-136-prec-2	GAGGACTCCATTTGTTTGATGATGGATTCTTATGCTC CATCATCGTCTCAAATGAGTCTTC	202
mir-137-prec	CTTCGGTGACGGGTATTCTTGGGTGGATAATACGGAT TACGTTGTTATTGCTTAAGAATACGCGTAGTCGAGG	203
mir-138-1-prec	CCCTGGCATGGTGTGGTGGGGCAGCTGGTGTGTGAA TCAGGCCGTTGCCAATCAGAGAACGGCTACTTCACAA CACCAGGGCCACACCACACTACAGG	204
mir-138-2-prec	CGTTGCTGCAGCTGGTGTGTGAATCAGGCCGACGAG CAGCGCATCCTCTTACCCGGCTATTTACGACACCAG GGTTGCATCA	205
mir-138-prec	CAGCTGGTGTGTGAATCAGGCCGACGAGCAGCGCA TCCTCTTACCCGGCTATTTACGACACCAGGGTTG	206
mir-139-prec	GTGTATTCTACAGTGCACGTGTCTCCAGTGTGGCTCG GAGGCTGGAGACGCGCCCTGTTGGAGTAAC	207
mir-140	TGTGTCTCTCTGTGTCTGCCAGTGGTTTTACCCTA TGGTAGGTTACGTCATGCTGTTCTACCACAGGGTAGA ACCACGGACAGGATACCGGGGCACC	208

mir-140as-prec	TCCTGCCAGTGGTTTTACCCTATGGTAGGTTACGTCA TGCTGTTCT <u>ACCACAGGGTAGAACCACGGACAGGA</u>	209
mir-140s-prec	CCTGCCAGTGGTTTTACCCTATGGTAGGTTACGTCAT GCTGTTCT <u>ACCACAGGGTAGAACCACGGACAGG</u>	210
mir-141-prec-1	CGGCCGGCCCTGGGTCCATCTTCCAGTACAGTGTGG ATGGTCTAATTGTGAAGCTCCTA <u>ACACTGTCTGGTAA</u> <u>AGATGGCTCCCGGGTGGGTTC</u>	211
mir-141-prec-2	GGGTCCATCTTCCAGTACAGTGTGGATGGTCTAATT GTGAAGCTCCTA <u>ACACTGTCTGGTAAAGATGGCCC</u>	212
mir-142as-prec (mir-142s-prec)	ACCCATAAAGTAGA <u>AAGCACTACTAACAGCACTGGA</u> GGGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGATG	213
mir-142s-pres	ACCCATAAAGTAGAAAGCACTACTA <u>ACAGCACTGGA</u> GGGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGATG	214
mir-143-prec-1	GCGCAGCGCCCTGTCTCCCAGCCTGAGGTGCAGTGTCT GCATCTCTGGTCAGTTGGGAGTCTGAGATGAAGCACT <u>GTAGCTCAGGAAGAGAGAAGTTGTTCTGCAGC</u>	215
mir-143-prec-2	CCTGAGGTGCAGTGTCTGCATCTCTGGTCAGTTGGGAG TCTGAGATGAAGCACTGTAGCTCAGG	216
mir-144-prec-1	TGGGGCCCTGGCTGGGATATCATCATATACTGTAAGT TTGCGATGAGACACTACAGTATAGATGATGTACTAGT CCGGGCACCCCC	217
mir-144-prec-2	GGCTGGGATATCATCATATACTGTAAGTTTGCATGA GACACTACAGTATAGATGATGTACTAGTC	218

[0057]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQID NO :
mir-145-prec-1	CACCTTGTCCTCACGGTCCAGTTTTCCCAGGAATCCC TTAGATGCTAAGATGGGGATTCTTGAAATACTGTTT TTGAGGTCATGGTT	219
mir-145-prec-2	CTCACGGTCCAGTTTTCCCAGGAATCCCTTAGATGCT AAGATGGGGATTCTTGAAATACTGTTCTTGAG	220
mir-146-prec-1	CCGATGTGTATCCTCAGCTTTGAGAACTGAATTCCAT GGGTGTGTGTCAGTGTGACCTCTGAAATTCAGTTCT TCAGCTGGGATATCTGTGTCATCGT	221
mir-146-prec-2	AGCTTTGAGAACTGAATTCATGGGTGTGTGTCAGTGT CAGACCTGTGAAATTCAGTTCTTCAGCT	222
mir-147-prec	AATCTAAAGACAACATTTCTGCACACACACCAGACTA TGGAAGCCAGTGTGTGGAATGCTTCTGCTAGATT	223
mir-148-prec	GAGGCAAAGTTCTGAGACACTCCGACTCTGAGTATG ATAGAAGTCAGTGCACCTACAGAACTTTGTCTC	224
mir-149-prec-1	GCCGGCGCCCGAGCTCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCC GTGCTTGTCCGAGGAGGGAGGGAGGGACGGGGGCTG TGCTGGGGCAGCTGGA	225
mir-149-prec-2	GCTCTGGCTCCGTGTCTTCACTCCCGTGCTGTCCGAG GAGG-GAGGGAGGGAC	226
mir-150-prec-1	CTCCCCATGGCCCTGTCTCCCAACCCTTGTACCACTG CTGGGCTCAGACCCTGGTACAGGCCTGGGGGACAGG GACCTGGGGAC	227
mir-150-prec-2	CCCTGTCTCCCAACCCTTGTACCACTGCTGGGCTCAG ACCCTGGTACAGGCCTGGGGGACAGGG	228
mir-151-prec	CCTGCCCTCGAGGAGCTCACAGTCTAGTATGTCTCAT CCCCTACTAGACTGAAGCTCCTTGAGGACAGG	229
mir-152-prec-1	TGTCCCCCGGCCAGGTTCTGTGATACACTCCGAC TCGGGCTCTGGAGCAGTCAGTGCATGACAGAACTTG GGCCCCGAAGGACC	230

mir-152-prec-2	GGCCCAGGTTCTGTGATACACTCCGACTCGGGCTCTG GAGCAGTCAGTGCATGACAGAACTTGGGCCCCGG	231
mir-153-1-prec-1	CTCACAGCTGCCAGTGTCAATTTTGTGATCTGCAGCT AGTATTCTCACTCCAGTTGCATAGTCACAAAAGTGAT CATTGGCAGGTGTGGC	232
mir-153-1-prec-2	tetctctctccctcACAGCTGCCAGTGTCAATTTGCACAAA GT GATCATTGGCAGGTGTGGCTGCTGCATG	233
mir-153-2-prec-1	AGCGGTGGCCAGTGTCAATTTTGTGATGTTGCAGCTA GTAATATGAGCCCAGTTGCATAGTCACAAAAGTGATC ATTGGAAACTGTG	234
mir-153-2-prec-2	CAGTGTCAATTTTGTGATGTTGCAGCTAGTAATATGA GCCCAGTTGCATAGTCACAAAAGTGATCATTG	235

[0058]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-154-prec-1	GTGGTAOTTGAAGATAGGTTATCCGTGTTTGCCTTCGGC TTTATTTGTGACGAATCATACACGGTTGACCTATTTT CAGTACCAA	236
mir-154-prec-2	GAAGATAGGTTATCCGTGTTGCCTTCCGCTTATTTGTG ACGAATCATACACGGTTGACCTATTTT	237
mir-155-prec	CTGTTAATGCTAATCGTGATAGGGTTTTTGCCTCCA ACTGACTCCTACATATTAGCATTAACAG	238
mir-16-2-prec	CAATGTCAGCAGTGCCTTAGCAGCACGTAAATATTGG CCGTTAAGATTCTAAAATTATCTCCAGTATTAAGTGT CTGCTGAAGTAAGGTTGACCATACTCTACAGTTG	239
mir-181a-prec	AGAAGGGCTATCAGGCCAGCCTTCAGAGGACTCCAA GGAACATTCAACGCTGTCGGTGAGTTTGGGATTTGAA AAAACCACTGACCGTTGACTGTACCTTGGGGTCCTTA	240
mir-181b-prec	TGAGTTTTGAGGTTGCTTCAGTGAACATTCAACGCTG TCGGTGAGTTTGGGAATTAATAACAAACCATCGACCG TTGATTGTACCCTATGGCTAACCATCATCTACTCCA	241
mir-181c-prec	CGGAAAAATTTGCCAAGGGTTTGGGGGAACATTCAAC CTGTCGGTGAGTTTGGGCAGCTCAGGCAAACCATCGA CCGTTGAGTGGACCCTGAGGCCTGGAATTGCCATCCT	242
mir-182-as-prec	GAGCTGCTTGCCTCCCCCGTTTTTGGCAATGGTAGA ACTCACACTGGTGAGGTAACAGGATCCGGTGGTTCTA GACTTGCCAACATATGGGGCGAGGACTCAGCCGGCAC	243
mir-182-prec	TTTTTGGCAATGGTAGAACTCACACTGGTGAGGTAAC AGGATCCGGTGGTTCTAGACTTGCCAACATATGG	244
mir-183-prec	CCGCAGAGTGTGACTCCTGTTCTGTGTATGGCACTGG TAGAATTCAGTGTGAACAGTCTCAGTCAGTGAATTAC CGAAGGGCCATAAACAGAGCAGAGACAGATCCACGA	245
mir-184-prec-1	CCAGTCACGTCCCCTTATCACTTTTCCAGCCCAGCTTT GTGACTGTAAGTGTGGACGGAGAACTGATAAGGGTT AGGTGATTGA	246

mir-184-prec-2	CCTTATCACTTTTCCAGCCCAGCTTTGTGACTGTAAGT <u>GTTGGACGGAGAACTGATAAGGGTAGG</u>	247
mir-185-prec-1	AGGGGGCGAGGGATTGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA TGGTCCCCTCCCCAGGGGCTGGCTTTCCTCTGGTCCTT CCCTCCCA	248
mir-185-prec-2	AGGGATTGGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGATGGTCCCC TCCCCAGGGGCTGGCTTTCCTCTGGTCCTT	249
mir-186-prec-1	TGCTTGTAACCTTCCAAAGAATTCTCCTTTTGGGCTTT CTGGTTTTATTTTAAGCCCAAAGGTGAATTTTTTGGG AAGTTTGAGCT	250
mir-186-prec-2	ACTTTCCAAAGAATTCTCCTTTTGGGCTTCTGGTTTT ATTTTAAGCCCAAAGGTGAATTTTTTGGGAAGT	251

[0059]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQID NO :
mir-187-prec	GGTCGGGCTCACCATGACACAGTGTGAGACTCGGGC TACAACACAGGACCCGGGGCGCTGCTCTGACCCCTCG <u>TGTCTTGTGTTGCAGCCGGAGGGACGCAGGTCCGCA</u>	252
mir-188-prec-1	TGCTCCCTCTCTCACATCCCTTGCATGGTGGAGGTG AGCTTTCTGAAAACCCCTCCACATGCAGGGTTTGCA GGATGGCGAGCC	253
mir-188-prec-2	TCTCACATCCCTTGCATGGTGGAGGGTTGAGCTTTCTG AAAACCCCTCCACATGCAGGGTTTGACAGGA	254
mir-189-prec-1	CTGTCGATTGGACCCGCCCTCCGGGTGCCTACTGAGCT <u>GATATCAGTTCTCATT</u> TACACACTGGCTCAGTTCAG CAGGAACAGGAGTCGAGCCCTTGAGCAA	255
mir-189-prec-2	CTCCGGTGCCTACTGAGCTGATATCAGTTCTCATTTTA CACACTGGCTCAGTTCAGCAGGAACAGGAG	256
mir-190-prec-1	TGCAGGCCTCTGTGTGATATGTTTGATATATTAGGTT GTTATTTAATCCAACATATATCAAACATATTCCTAC AGTGTCTTGCC	257
mir-190-prec-2	CTGTGTGATATGTTTGATATATTAGGTTGTTATTTAAT CCAACATATATCAAACATATTCCTACAG	258

mir-191-prec-1	CGGCTGGACAGCGGGCAACGGAATCCCAAAAGCAGC TGTGTCTCCAGAGCATTCCAGCTGCGCTTGGATTT GTCCCCTGCTCTCCTGCCT	259
mir-191-prec-2	AGCCGGCAACGGAATCCCAAAAGCAGCTGTTGTCTC CAGAGCATTCCAGCTGCGCTTGGATTTCTGCCCTGC T	260
mir-192-2/3	CCGAGACCGAGTGCACAGGGCTCTGACCTATGAATT GACAGCCAGTGCTCTCTCGTCTCCCCTCTGGCTGCCAAT TCCATAGGTCACAGGTATGTTGCGCTCAATGCCAG	261
mir-192-prec	GCCGAGACCGAGTGCACAGGGCTCTGACCTATGAAT TGACAGCCAGTGCTCTCGTCTCCCCTCTGGCTGCCAA TTCCATAGGTCACAGGTATGTTGCGCTCAATGCCAGC	262
mir-193-prec-1	CGAGGATGGGAGCTGAGGGCTGGGTCTTTGCGGGCG AGATGAGGGGTGCGGATCAACTGGCCTACAAAGTCC	263
mir-193-prec-2	GCTGGGTCTTTGCGGGCGAGATGAGGGGTGCGGATC AACTGGCCTACAAAGTCCCAGT	264
mir-194-prec-1	ATGGTGTTATCAAGTGTAACAGCAACTCCATGTGGAC TGTGTACCAATTTCCAGTGGAGATGCTGTTACTTTTG ATGGTTACCAA	265
mir-194-prec-2	GTGTAACAGCAACTCCATGTGGACTGTGTACCAATTT CCAGTGGAGATGCTGTTACTTTTGAT	266
mir-195-prec-1	AGCTTCCCTGGCTCTAGCAGCACAGAAATATTGGCAC AGGGAAGCGAGTCTGCCAATATTGGCTGTGCTGCTCC AGGCAGGGTGGTG	

[0060]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQID NO :
mir-195-prec-2	<u>TAGCAGCACAGAAATATTTGGCACAGGGAAGCGAGTC</u> <u>TGCCAATATTGGCTGTGCTGCT</u>	268
mir-196-1-prec	<u>CTAGAGCTTGAATTGGAAGTCTGAGTGAATTAGGTA</u> <u>GTTTCATGTTGTTGGCCTGGGTTTCTGAACACAACA</u> ACATTAAACCACCCGATTACGGCAGTTACTGCTCC	269
mir-196-1-prec	<u>GTGAATTAGGTAGTTTCATGTTGTTGGCCTGGGTTT</u> CTGAACACAACAACATTAAACCACCCGATTAC	270
mir-196-2-prec	<u>TGCTCGCTCAGCTGATCTGTGGCTTAGGTTAGTTTCAT</u> <u>GTTGTTGGGATTGAGTTTGAAGTCTGGCAACAAGAAA</u> CTGAACACAACAACATTAAACCACCCGATTAC	271
mir-196-prec	<u>GTGAATTAGGTAGTTTCATGTTGTTGG</u> GCCTGGGTTT CTGAACACAACAACATTAAACCACCCGATTAC	272
mir-197-PREC	GGCTGTGCCGGGTAGAGAGGGCAGTGGGAGGTAAGA GCTCTTACCCTTACCACCTTCTCCACCCAGCATGG CC	273
mir-198-prec	<u>TCATTGGTCCAGAGGGGAGATAGGTTCTCTGTGATTTT</u> TCCTTCTTCTCTATAGAATAAATGA	274
mir-199a-1-prec	<u>GCCAACCCAGTGTTCAGACTACCTGTTTCAGGAGGCTC</u> TCAATGTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGC	275
mir-199a-2-prec	<u>AGGAAGCTTCTGGAGATCCTGCTCCGTCGCCCCAGTG</u> <u>TTCAGACTACCTGTTTCAGGACAATGCCGTTGTACAGT</u> AGTCTGCACATTGGTTAGACTGGGCAAGGGAGAGCA	276
mir-199b-prec	<u>CCAGAGGACACCTCCACTCCGTCTACCCAGTGTTTAG</u> <u>ACTATCTGTTTCAGGACTCCCAAATTGTACAGTAGTCT</u> GCACATTGGTTAGGCTGGGCTGGGTTAGACCCTCGG	277
mir-200a-prec	<u>GCCAACCCAGTGTTCAGACTACCTGTTTCAGGAGGCTC</u> TCAATGTGTACAGTAGTCTGCACATTGGTTAGGC	278
mir-200b-prec	<u>GCCGTGGCCATCTTACTGGGCAGCATTGGATGGAGTC</u> <u>AGGTCTCTAATACTGCCTGGTAATGATGACGGC</u>	279

mir-200b-prec	CCAGCTCGGGCAGCCGTGGCCATCTTACTGGGCAGCA TTGGATGGAGTCAGGTCTCTAATACTGCCTGGTAATG <u>ATGACGGCGGAGCCCTGCACG</u>	280
mir-202-prec	GTTCCCTTTTCTATGCATATACTTCTTTGAGGATCTG GCCTAAAGAGGTATAGGGCATGGGAAGATGGAGC	281
mir-203-prec	GTGTTGGGGACTCGCGCGCTGGGTCCAGTGGTTCTTA ACAGTTCAACAGTTCTGTAGCGCAATTGTGAAATGTT <u>TAGGACCACTAGACCCGGCGGGCGGCGACAGCGA</u>	282
mir-204-prec	GGCTACAGTCTTTCTTCATGTGACTCGTGGACTTCCCT <u>TTGTCATCCTATGCCTGAGAATATATGAAGGAGGCTG</u> GGAAGGCAAAGGGACGTTCAATTGTCATCACTGGC	283
mir-205-prec	AAAGATCCTCAGACAATCCATGTGCTTCTCTTGTCT <u>TCATTCCACCGGAGTCTGTCTCATACCCAACCAGATT</u> TCAGTGGAGTGAAGTTCAGGAGGCATGGAGCTGACA	284

[0061]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQ ID NO :
mir-206-prec-1	TGCTTCCCGAGGCCACATGCTTCTTTATATCCCCATAT GGATTACTTTGCTATGGAATGTAAGGGAAGTGTGTGGT TTCGGCAAGTG	285
mir-206-prec-2	AGGCCACATGCTTCTTTATATCCCCATATGGATTACTT TGCTATGGAATGTAAGGAAGTGTGTGGTTTT	286
mir-208-prec	TGACGGGCGAGCTTTTGGCCCGGGTTATACCTGATGC TCACGTATAAGACGAGCAAAAAGCTTGTTGGTCA	287
mir-210-prec	ACCCGGCAGTGCCTCCAGGCGCAGGGCAGCCCCTGC CCACCGCACACTGCGCTGCCCCAGACCCACTGTGCGT GTGACAGCGGCTGATCTGTGCCTGGGCAGCGCGACC C	288
mir-211-prec	TCACCTGGCCATGTGACTTGTGGGCTTCCTTTGTCAT CCTTCGCCTAGGGCTCTGAGCAGGGCAGGGACAGCA AAGGGGTGCTCAGTTGTCACTTCCCACAGCACGGAG	289
mir-212-prec	CGGGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACCTTG GCTCTAGACTGCTTACTGCCCCGGCCGCCCTCAGTAA CAGTCTCCAGTCACGGCCACCGACGCCTGGCCCCGCC	290
mir-213-prec	CCTGTGCAGAGATTATTTTTTAAAAGGTCACAATCAA CATTCAATTGCTGTGCGTGGGTTGAACTGTGTGGACAA GCTCACTGAACAATGAATGCAACTGTGGCCCCGCTT	291
mir-213-prec-LIM	GAGTTTTGAGGTTGCTTCAGTGAACATTCAACGCTGT CGGTGAGTTTGAATTAAATCAAAACCATCGACCGT TGATTGTACCCTATGGCTAACCATCATCTACTCC	292
mir-214-prec	GGCCTGGCTGGACAGAGTTGTCATGTGTCTGCCTGTC TACACTTGCTGTGCAGAACATCCGCTCACCTGTACAG CAGGCACAGACAGGCAGTCACATGACAACCCAGCCT	293
mir-215-prec	ATCATTGAGAAATGGTATACAGGAAAATGACCTATG AATTGACAGACAATATAGCTGAGTTTGCTGTCAATT CTTTAGGCCAATATTCTGTATGACTGTGCTACTTCAA	294
mir-216-prec	GATGGCTGTGAGTTGGCTTAATCTCAGCTGGCAACTG TGAGATGTTCATACAATCCCTCACAGTGGTCTCTGGG ATTATGCTAAACAGAGCAATTCCTAGCCCTCACGA	295

mir-217-prec	AGTATAATTATTACATAGTTTTTGATGTCGCAGATAC <u>TGCATCAGGAACTGATTGGATAAGAATCAGTCACCAT</u> CAGTTCCTAATGCATTGCCTTCAGCATCTAAACAAG	296
mir-218-1-prec	GTGATAATGTAGCGAGATTTTCTGTTGTGCTTGATCT <u>AACCATGTGGTTGCGAGGTATGAGTAAACATGGTTC</u> CGTCAAGCACCATGGAACGTCACGCAGCTTTCTACA	297
mir-218-2-prec	GACCAGTCGCTGCGGGGCTTTCCTTTGTGCTTGATCT <u>AACCATGTGGTGGAACGATGGAAACGGAACATGGTT</u> CTGTCAAGCACCGCGGAAAGCACCGTGCTCTCCTGCA	298

[0062]

名称	前体序列 (5' 至 3')*	SEQID NO :
mir-219-prec	CCGCCCCGGGCGCGGCTCCTGATTGTCCAAACGCAA TTCTCGAGTCTATGGCTCCGGCCGAGAGTTGAGTCTG GACGTCCCAGACCGCGCCCCCAAACCTCGAGCGGG	299
mir-220-prec	GACAGTGTGGCATTGTAGGGCTCCACACCGTATCTGA CACTTTGGGCGAGGGCACCATGCTGAAGGTGTTTCATG ATGCGGTCTGGAACCTCCTCACGGATCTTACTGATG	300
mir-221-prec	TGAACATCCAGGTCTGGGGCATGAACCTGGCATACA ATGTAGATTTCTGTGTTTCGTTAGGCAACAGCTACATT GTCTGCTGGGTTTCAGGCTACCTGGAAACATGTTCTC	301
mir-222-prec	GCTGCTGGAAGGTGTAGGTACCCTCAATGGCTCAGTA GCCAGTGTAGATCCTGTCTTTTCGTAATCAGCAGCTAC ATCTGGCTACTGGGTCTCTGATGGCATCTTCTAGCT	302
mir-223-prec	CCTGGCCTCCTGCAGTGCCACGCTCCGTGTATTTGAC AAGCTGAGTTGGACACTCCATGTGGTAGAGTGTCAGT TTGTCAAATACCCCAAGTGCGGCACATGCTTACCAG	303
mir-224-prec	GGGCTTTCAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTAGTAGATG ATTGTGCATTGTTTCAAATGGTGCCTAGTACTAC AAAGCCC	304
mir-29b-1 = 102- precl	CTTCTGGAAGCTGGTTTCACATGGTGGCTTAGATTTTT CCATCTTTGTATCTAGCACCATTTGAAATCAGTGTTTT AGGAG	305
mir-29b-2 (miR-29b-3) = 102prec 7.1 = 7. 2	CTTCAGGAAGCTGGTTTCATATGGTGGTTTAGATTTA AATAGTGATTGTCTAGCACCATTTGAAATCAGTGTTTC TTGGGGG	306
mir-30* = mir- 097-prec-6	GTGAGCGACTGTAAACATCCTCGACTGGAAGCTGTG AAGCCACAGATGGGCTTTCAGTCGGATGTTTGCAGCT GCCTACT	307
mir-033b	ACCAAGTTTCAGTTCATGTAAACATCCTACACTCAGC TGTAATACATGGATTGGCTGGGAGGTGGATGTTTACT TCAGCTGACTTGA	308

mir-101- precursor-9 (mir-101-3)	TGCCCTGGCTCAGTTATCACAGTGCTGATGCTGTCTA TTCTAAAGGTACAGTACTGTGATAACTGAAGGATGGC A	309
mir-108-1-small	ACACTGCAAGAACAATAAGGATTTTTAGGGGCATTAT GACTGAGTCAGAAAACACAGCTGCCCCTGAAAGTCC CTCATTTTCTTGCTGT	310
mir-108-2-small	ACTGCAAGAGCAATAAGGATTTTTAGGGGCATTATG ATAGTGGAATGGAAACACATCTGCCCCAAAAGTCC CTCATTTT	311
mir-123-prec-1 (mir-126-prec-1)	CGCTGGCGACGGGACATTATTACTTTTGGTACGCGCT GTGACACTTCAAAC <u>TCGTACCGTGAGTAATAATGCGC</u> CGTCCACGGCA	312

[0063]

mir-123-prec-2 (mir-126-prec-2)	ACATTATTACTTTTGGTACGCGCTGTGACACTTCAAA CTCGTACCGTGAGTAATAATGCGC	313
mir-129-1-prec	TGGATCTTTTTGCGGTCTGGGCTTGCTGTTCTCTCAA CAGTAGTCAGGAAGCCCTTACCCCAAAAAGTATCTA	314
mir-129-2	TGCCCTTCGCGAATCTTTTGGCGGTCTGGGCTTGCTGT ACATAACTCAATAGCCGGAAGCCCTTACCCCAAAAA GCATTTGCGGAGGGCG	315
mir-133b-small	GCCCCGTGCTCTGGCTGGTCAAACGGAACCAAGTCCG TCTTCCTGAGAGGTTTGGTCCCCTCAACCAGCTACA GCAGGG	316
mir-135-small-2	AGATAAATCACTCTAGTGCTTTTATGGCTTTTATTCC <u>TATGTGATAGTAATAAAGTCTCATGTAGGGATGGAA</u> GCCATGAAATACATTGTGAAAAATCA	317
mir-148b-small	AAGCACGATTAGCATTTGAGGTGAAGTTCTGTTATAC ACTCAGGCTGTGGCTCTCTGAAAGTCAGTGCAT	318
mir-151-prec	CCTGTCCTCAAGGAGCTTCAGTCTAGTAGGGGATGAG ACATACTAGACTGTGAGCTCCTCGAGGGCAGG	319
mir-155- prec(BIC)	CTGTTAATGCTAATCGTGATAGGGGTTTTGCCTCCA ACTGACTCCTACATATTAGCATTAACAG	320
mir-156 = mir- 157 = overlap mir-141	CCTAACACTGTCTGGTAAAGATGGCTCCCGGGTGGGT TCTCTCGGCAGTAACCTTCAGGGAGCCCTGAAGACCA TGGAGGAC	321
mir-158-small = mir-192	GCCGAGACCGAGTGCACAGGGCTCTGACCTATGAAT <u>TGACAGCCAGTGCTCTCGTCTCCCTCTGGCTGCCAA</u> TTCCATAGGTCACAGGTATGTTGCGCTCAATGCCAGC	322
mir-159-1-small	TCCCGCCCCCTGTAACAGCAACTCCATGTGGAAGTGC CCACTGGTTCCAGTGGGGCTGCTGTTATCTGGGGCGA GGGCCA	323
mir-161-small	AAAGCTGGGTTGAGAGGGCGAAAAAGGATGAGGTGA CTGGTCTGGGCTACGCTATGCTGCGGCGCTCGGG	324
mir-163-1b-small	CATTGGCCTCCTAAGCCAGGGATTGTGGGTTTCGAGTC CCACCCGGGGTAAAGAAAGGCCGAATT	325

mir-163-3-small	CCTAAGCCAGGGATTGTGGGTTTCGAGTCCCACCTGGG GTAGAGGTGAAAGTTCCTTTTACGGAATTTTTT	326
mir-175- small = mir-224	GGGCTTTCAAGTCACTAGTGGTTCCGTTTAGTAGATG ATTGTGCATTGTTTCAAAATGGTGCCCTAGTGACTAC AAAGCCC	327
mir-177-small	ACGCAAGTGTCTTAAGGTGAGCTCAGGGAGCACAGA AACCTCCAGTGGAACAGAAGGGCAAAAGCTCATT	328
mir-180-small	CATGTGTCACTTTTCAGGTGGAGTTTCAAGAGTCCCTT CCTGGTTCACCGTCTCCTTTGCTCTTCCACAAC	329
mir-187-prec	GGTCGGGCTCACCATGACACAGTGTGAGACTCGGGC TACAACACAGGACCCGGGGCGCTGCTCTGACCCCTCG <u>TGTCTTGTGTTGCAGCCGGAGGGACGCAGGTCCGCA</u>	330

[0064]

mir-188-prec	TGCTCCCTCTCTCACATCCCTTGCA <u>TGGGTGGAGGGTG</u> AGCTTTCTGAAAACCCCTCCCACATGCAGGGTTTGCA GGATGGCGAGCC	331
mir-190-prec	TGCAGGCCTCTGTGTGATATGTTTGATATATTAGGTT GTTATTTAATCCAACATATATCAAACATATTCCTAC AGTGTCTTGCC	332
mir-197-2	GTGCATGTGTATGTATGTGTGCATGTGCATGTGTATG TGTATGAGTGCATGCGTGTGTGC	333
mir-197-prec	GGCTGTGCCGGGTAGAGAGGGCAGTGGGAGGTAAGA GCTCTTCACCCCTTCACCACCTTCTCCACCCAGCATGG CC	334
mir-202-prec	GTTCCCTTTTCCTATGCATATACTTCTTTGAGGATCTG GCCTAAAGAGGTATAGGGCATGGGAAGATGGAGC	335
mir-294-1 (chr16)	CAATCTTCCTTTATCATGGTATTGATTTTTTCAGTGCTT CCCTTTTGTGTGAGAGAAGATA	336
mir-hes1	ATGGAGCTGCTCACCCCTGTGGGCCTCAAATGTGGAGG AACTATTCTGATGTCCAAGTGGAAAGTGCTGCGACAT TTGAGCGTCACCGGTGACGCCCATATCA	337
mir-hes2	GCATCCCCTCAGCCTGTGGCACTCAAACGTGGGGGC ACTTTCTGCTCTCTGGTGAAAGTGCCGCCATCTTTGA GTGTTACCGCTTGAGAAGACTCAACC	338
mir-hes3	CGAGGAGCTCATACTGGGATACTCAAATGGGGGCG CTTTCCTTTTGTCTGTTACTGGGAAGTGCTTCGATTT TGGGGTGTCCCTGTTTGAGTAGGGCATC	339
mir-29b-1	CTTCAGGAAGCTGGTTTCATATGGTGGTTTAGATTTA AATAGTGATTGTCTAGCACCATTGAAATCAGTGTTT TTGGGGG	340

[0065] *前体序列内下划线标示的序列表示经加工的 miR 转录物（成熟的 microRNA）。所有序列是人的序列。

[0066] 诊断和预后方法

[0067] 根据本发明，可通过检测相对于对照样品，样品中的 miR 基因产物的量的减少、miR 基因拷贝数的减少或通过检测一个或更多个拷贝的 miR 基因的突变来诊断或预示 BCL2 相关癌症，其中 miR 基因包含与 BCL2 基因转录物（例如，如此处所描述的）中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR

基因的 miR 基因拷贝数目从二倍体至单倍体或至无拷贝的减少诊断或预示 BCL2 相关癌症。同样,包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因的一个或两个拷贝的突变意味着基因功能的丢失,且是 BCL2 相关癌症的诊断或预示。

[0068] 如此处所用的,“CLL 细胞”可以是来自具有或怀疑具有 CLL 的受试者的淋巴细胞,其中淋巴细胞具有至少为 4 的“CLL 评分”,如根据 Matutes 等人,Leukemia 8(10): 1640-1645(1994)(其全部分公开内容在此引用作为参考)的评分系统所确定的。如此处所用的,“前列腺癌细胞”可以是前列腺来源的赘生性细胞或肿瘤细胞,无论其是否位于前列腺。其他 BCL2 相关癌细胞对于本领域技术人员来说是已知的,并且在此进行了描述。

[0069] miR15 和 miR16 基因的核酸序列包含在克隆 317g11 内,在 GenBank 目录号: AC069475 中给出了其核苷酸序列。GenBank 目录号 AC069475 的全部公开内容在此引用作为参考。这样检测包含与 BCL2 基因产物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因的缺失或突变,即通过确定来自怀疑具有 BCL2 相关癌症(例如,CLL、急性髓细胞性白血病、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、滤泡性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、非小细胞肺癌、血液的恶性肿瘤、实体瘤、结肠直肠癌、脑癌、乳腺癌、前列腺癌、EB 病毒相关淋巴细胞增生性疾病、肾癌、肝细胞癌和胃癌)的受试者的组织中的基因的结构或序列,然后将其与来自受试者的未受影响的组织的样品中或来自正常对照的组织的样品中的这些基因的结构或序列进行比较来进行检测。可使用任何合适的技术(例如,此处描述的技术)进行该比较。

[0070] 在一个实施方案中,为诊断 BCL2 相关癌症,组织样品来源于受试者。然后制备样品以确定 miR 基因产物的表达或一个或多个 miR 基因的缺失或突变。合适的组织样品包括但不限于目标活检组织以及血液和/或液体样品。

[0071] 如此处所用的,“BCL2 相关癌症”是与 BCL2 基因或基因产物的过度表达相关的癌症,其可以是表征为相对于合适的对照细胞表达更高水平的一种或多种 BCL2 基因产物的细胞的任何癌症。根据本发明的方法,合适的对照细胞可以是来自未受过度表达 Bcl2 的癌症影响的个体,或它们可以是来自危难中的受试者的非癌细胞,或其可以是来自受过度表达 Bcl2 的癌症的影响的另一个个体的非癌细胞。

[0072] 可使用 miR 基因的探针(例如,如此处描述的)通过来自受试者的基因组 DNA 的 Southern 印迹杂交来检测 miR 基因缺失或突变的存在。例如,可使用常规活组织检查技术从怀疑具有 BCL2 相关癌症的受试者取出组织样品。可选择地,可从怀疑具有 BCL2 相关癌症的受试者取出血液样品,然后分离白细胞以进行 DNA 提取。可在开始放射疗法或化学疗法之前从患者获取血液或组织样品。可从受试者的未受影响的组织或从正常人个体获得用作对照的相应的组织或血液样品。

[0073] Southern 印迹杂交技术在本领域的技术范围之内。例如,可用限制性内切酶降解从来自怀疑具有 BCL2 相关癌症的受试者的组织或液体(例如,血液)分离的基因组 DNA。该降解产生可通过电泳在例如琼脂糖凝胶上分离的基因组 DNA 的限制性片段。然后将限制性片段转印至杂交膜(例如,硝酸纤维素膜、尼龙膜)上,然后用对于一种或更多种 miR 基因(例如,包含与 BCL2 基因的转录物的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因)是特异性的探针进行杂交。与对照 DNA 样品(所述对照 DNA 样品接受与来自受试者的 DNA 样品完全相同的处理)相比,杂交膜上的限制性片段模式的改变表明一个或多个基因的缺失或突变。可由本领域普通技术人员容易地确定用于检测 miR 基因拷贝数目或 miR 基因内的突

变的探针标记和杂交的条件。如此处所用的术语“缺失”是指基因的部分缺失或整个基因的缺失。

[0074] 例如,可基于 miR-15a 和 miR-16-1 microRNA 的公开的序列设计用于 Southern 印迹杂交的 miR-15a 和 miR-16-1 核酸探针,如在 Lagos-Quintana 等人, *Science* 294: 853-858 (2001) 中所描述,其全部公开内容在此引用作为参考。miR-15a microRNA 的核苷酸序列是 uagcagcacauaaugguuugug (SEQ ID NO :3)。miR-16-1 microRNA 的核苷酸序列是 uagcagcacguaaaauuuggcg (SEQ ID NO :4)。用于检测 miR-15a 和 miR-16-1 DNA 的合适的探针分别是:

[0075] CACAAACCATTATGTGCTTGCTA (SEQ ID NO :5)

[0076] GCCAATATTTACGTGCTGCTA (SEQ ID NO :6)

[0077] SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6 的互补序列还可用于探测 miR-15a 和 miR-16-1 DNA。可由本领域技术人员容易地确定用于检测 miR-15a、miR-16-1 或其他 miR 基因(例如,包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因)的其他合适的探针。

[0078] 在 *Molecular Cloning :A Laboratory Manual*, J. Sambrook 等人, eds., 第 2 版 Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第 10 和 11 章(其公开内容在此引用作为参考)中描述了用于制备标记的 DNA 和 RNA 探针的方法和其杂交的条件。

[0079] 例如,可用放射性核素例如 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 或 ^{35}S ; 重金属; 或能够用作标记的配体的特异性结合对成员的配体(例如,生物素、抗生物素蛋白或抗体)、荧光分子、化学发光分子和酶等来标记核酸探针。

[0080] 可通过 Rigby 等人, *J. Mol. Biol.* 113 :237-251 (1977) 的缺口平移法或 Fienberg 等人, *Anal. Biochem.* 132 :6-13 (1983) 的随机引物法将探针标记至高比放射性,所述两篇文献的全部公开内容在此引用作为参考。后者是选择用于从单链 DNA 或从 RNA 模板合成高比放射性的 ^{32}P 标记的探针的方法。例如,按照缺口平移法用高放射性核苷酸取代预先存在的核苷酸,可能制备具有超过 10^8cpm/微克 的比放射性的 ^{32}P 标记的核酸探针。然后通过将杂交滤膜 (hybridized filter) 暴露于照相胶片进行杂交的放射自显影检测。通过杂交滤膜暴光的照片胶片的光密度扫描提供了 miR15 或 miR16 基因拷贝数目的精确测量。可选择地,可用计算机化的成像系统例如可从 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 商购获得的 Molecular Dynamics 400-B 2DPhosphorimager 定量 miR15 或 miR16 基因拷贝数。

[0081] 当不能进行 DNA 或 RNA 探针的放射性核素标记时,可使用随机引物法将核苷酸类似物(例如, dTTP 类似物、5-(N-(N-生物素基-ε-氨基酰基)-3-氨基酰基)脱氧尿苷三磷酸)整合入探针分子。可通过与偶联至荧光染料或产生颜色反应的酶的、生物素结合蛋白例如抗生物素蛋白、链霉抗生物素或抗生物素抗体反应来检测生物素化探针寡核苷酸。

[0082] 还可通过使用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增这些基因的片段,然后通过测序或通过电泳分析扩增的片段以确定来自受试者的 DNA 样品的扩增的片段的序列和/或长度是否与对照 DNA 样品的扩增片段不同来检测 miR 基因的缺失或突变。可由本领域技术人员容易地确定用于 DNA 片段的 PCR 扩增的合适的反应和循环条件。在下列的实施例中描述的方法中提供了示例性 PCR 反应和循环条件。

[0083] 可通过检测 miR 基因(例如,包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因)的缺失来进行 BCL2 相关癌症的诊断。例如,不同染色体标记例如图

2A-2D 中标示的标记之间的 miR 的缺失。例如,包含 miR-15a 和 miR-16-1 的微卫星(小随体)标记 D13S272 和 D13S273 之间的 13q14 区域中的缺失可表明存在 BCL2 相关癌症。此外,当 13q14 中的缺失在其中缺失 miR15 或 miR16 的微卫星标记 D13S1150 和 D13S272 之间或在基因座 Alu18 和微卫星标记 D13S272 之间时,可表明存在 BCL2 相关癌症。

[0084] 确定组织样品中每双倍体基因组的包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因(例如,miR-15a 或 miR-16-1 基因)的拷贝数的可选择的方法依赖于这样的事实,即 miR-15a/miR-16-1 基因簇位于 13q14,并且与标记 D13S272 和 D13S273 连接。在与 D13S272 和 D13S273 标记连接的基因座上为杂合的个体中的 miR-15a 或 miR-16-1 的拷贝的丢失可从这些基因的杂合性丢失推断出来。用于确定染色体标记的杂合性丢失的方法在本领域技术人员的能力范围之内。下面的实施例 3 中描述了示例性杂交性丢失研究。

[0085] 用于研究怀疑具有 BCL2 相关癌症的受试者中一个或更多个 miR 基因是否突变的另一个技术是例如 Orita, 等人, Genomics 5:874-879(1989) 和 Hayashi, PCR Methods and Applic.1:34-38(1991) 中描述的单链构象多态性(single strand conformational polymorphism) (SSCP), 所述参考文献的全部公开内容在此引用作为参考。SSCP 技术由:通过 PCR 扩增目标基因(例如,miR 基因)的片段;使片段变性并在非变性条件下对两个变性的单链进行电泳组成。单链呈现影响链电泳迁移率的复杂序列依赖性链内二级结构。

[0086] 一种或更多种 miR 基因的缺失或突变也可使这些 miR 基因的表达减少。因此,也可通过检测从一种或更多种 miR 基因(例如,包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因)产生的 RNA 的表达水平来诊断 BCL2 相关癌症,其中 miR 基因表达的减少是 BCL2 相关癌症的诊断。

[0087] 转录 miR 基因以产生形成茎-环结构的前体 RNA。前体 RNA 不翻译成蛋白质,但加工成被认为是功能基因产物的“micro RNA”或“miRNA”。

[0088] 如此处所用的,“miR 基因产物”意指来自 miR 基因的加工的或未加工的 RNA 转录物,如下面更详细描述。术语“RNA”、“RNA 转录物”和“基因产物”此处 miR 基因表达的上下文中可互换使用。

[0089] 例如,在 Lagos-Quintana, 等人, Science 294,853-858(2001) 中描述 miR-15a 和 miR-16-1 前体 RNA。miR-15a 和 miR-16-1 前体 RNA 的序列表示为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2。预测的 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的茎-环结构分别示于图 1A 和 1B 中。

[0090] [SEQ ID NO:1]:

[0091] ccuuggaguaaaguagcagcacauaaugguuuuggauuuugaaaaggugcaggccauauugugcugccucaaaaauacaagg

[0092] [SEQ ID NO:2]:

[0093] gucagcagugccuuagcagcacguaaaauuuggcguaaagauucuaaaauuauuccagauuaacugugcugcugaagaaagguugac

[0094] 不希望受限于任何理论,据认为 miR-15a 和 miR16-1 前体 RNA 从 miR-15a/miR-16-1 基因簇共表达,并且由 Dicer/Argonaute 复合物加工成功能性 miRNA 产物。参见,例如, Lee 等人, Science 294:862(2001)。来自这些基因的两种功能性 miRNA 产物

是长度为 22 个核苷酸的单链 RNA 分子,其具有 5' 末端单磷酸和 3' 末端羟基。加工的 miR-15a microRNA 的核苷酸序列是 uagcagcacauaaugguuugug (SEQ ID NO:3)。加工的 miR-16-1 microRNA 的核苷酸序列是 uagcagcacguaaaauuuggcg (SEQ ID NO:4)。在本发明的实践中,可检测从 miR-15a 或 miR-16-1 基因产生的 60-70 nt 的 RNA 前体分子。可选择地,可检测通过 Dicer 和 Argonaute 蛋白加工前体 RNA 产生的更短的 miR-15a 和 miR-16-1 microRNA 基因产物。

[0095] 用于确定 RNA 表达水平的方法在本领域技术人员的水平之内。例如,如此处所述从怀疑具有 BCL2 相关癌症的受试者获得组织或血液样品。作为对照,如此处所描述的,可从受试者的未受影响的组织或从正常人个体获得相应的组织或血液样品。然后随同来自受试者的样品一起处理对照组织或血液样。然后可将受试者中的 miR 基因(例如,包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因)表达的水平与来自受试者的未受影响的组织的 miR 基因的表达水平比较,或与来自正常对照的组织或血液中的 miR 表达水平比较。例如,常规地就一个或多个标准确定 BCL2 相关癌症细胞中的相对 miR 表达水平。所述标准可包括,例如,一方面零表达水平和另一方面相同患者的正常组织中的基因的表达水平或正常对照组的组织中的表达水平。标准也可包括标准细胞系中的 miR 表达水平。在一个实施方案中,与正常表达水平相比,miR 表达减少的强度表示治疗后将来的临床结果。

[0096] 可选择地,可将怀疑具有 BCL2 相关癌症的受试者中的 miR 基因表达(例如,包含与 BCL2 基因转录物中核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因)的水平与之前获得的正常人对照群体的 miR 基因表达的平均水平比较。

[0097] 用于确定细胞中特定基因的 RNA 转录物的水平的合适技术对于本领域技术人员来说是熟知的。根据一个这样的方法,可通过在核酸提取缓冲液存在的情况下匀浆,然后离心来从细胞纯化总 RNA。沉淀核酸,然后用 DNA 酶处理和沉淀来除去 DNA。然后按照标准技术在琼脂糖凝胶上通过凝胶电泳分离 RNA 分子,然后使用例如所谓的“Northern”印迹技术将其转移至硝酸纤维素滤膜。然后通过加热将 RNA 固定在滤膜上。使用合适的与所述 RNA 互补的标记的 DNA 或 RNA 探针进行特定 RNA 的检测和定量。参见,例如,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook 等人, eds., 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第 7 章,其全部公开内容在此引用作为参考。用于 miR-15a 或 miR-16-1 RNA 的 Northern 印迹杂交的合适的探针包括,例如, SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6。

[0098] 可通过将杂交滤膜暴露于照相胶片来进行探针对 miR RNA 的杂交的放射自显影检测。接受杂交滤膜暴光的照相胶片的光密度扫描提供了 RNA 转录物水平的精确测量。可选择地,可使用例如可从 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 商购获得的 Molecular Dynamics 400-B2D Phosphorimager 通过杂交印迹的计算机化成像来定量 RNA 转录物的水平。

[0099] 除了 Northern 和其他 RNA 印迹杂交技术外,可按照原位杂交的技术进行 RNA 转录水平的定量。该技术需要比 Northern 印迹技术更少的细胞,其包括将整个细胞沉积在显微镜盖玻片上,然后用含有放射性标记或其他标记的寡核苷酸(例如, cDNA 或 cRNA) 探针的溶液探测细胞的核酸含量。该技术特别适合分析来自怀疑具有 BCL2 相关癌症(例如, CLL、前列腺癌)的受试者的组织活检样品。在美国专利号 5, 427, 916(其全部公开内容在此引

用作为参考)中更详细地描述了原位杂交技术的实施。用于 miR-15a 或 miR-16-1 RNA 的原位杂交的合适的探针包括例如 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6。

[0100] 还可通过 miR 转录物的反转录,然后在聚合酶链式反应(RT-PCR)中进行扩增来确定特定 miR 转录物的相对数目。可通过与内部标准例如来自存在于相同样品中的“管家”基因的 mRNA 的水平比较来确定 miR 转录物的水平。用作内部标准的合适的“管家”基因包括,例如,肌球蛋白和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(G3PDH)。用于定量 RT-PCR 和其变化形式的方法对于本领域技术人员来说是熟知的。

[0101] 用于测量 miR 基因转录物的表达的其他方法对于本领域技术人员来说也是已知的,包括用于测量 RNA 转录和降解率的各种方法。

[0102] 治疗法

[0103] 可通过对 BCL2 相关癌细胞单独地或联合施用一种或更多种 miR 基因(例如,包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因)的分离的基因产物来治疗 BCL2 相关癌症。不希望受限于任何理论,据认为 miR 基因产物抑制此类癌细胞的增生性或致癌性生长。

[0104] 特别地,可通过对癌细胞单独地或联合施用一种或更多种 miR 基因的分离的基因产物来治疗 BCL2 相关癌症。

[0105] 如此处所用的,“BCL2 相关癌细胞”是从遭受 BCL2 相关癌症的受试者分离的肿瘤细胞或增生性细胞。可通过检测相对于正常对照细胞,细胞中的 BCL2 基因产物的表达水平的增加或通过检测细胞中的癌性或增生性表型来鉴定 BCL2 相关癌细胞。本领域技术人员可容易地鉴定具有癌性或增生性表型的细胞。例如,此类细胞在培养中对接触诱导的生长抑制不敏感,当长期培养时可形成病灶集中点(foci)。癌细胞或增生性细胞还展示独特的形态学变化,集落生长的无组织模式和非停泊性生长(anchorage-independent growth)的获得。癌细胞或增生性细胞还具有在易感动物中形成侵袭性肿瘤的能力,可使用本领域技术人员的能力范围内的技术将细胞注射入例如无胸腺小鼠来估量该能力。

[0106] 如此处所用的,“分离的”基因产物是通过人工干预从天然状态改变或取出的基因产物。例如,天然地存在于活的动物中的 RNA 不是“分离的”。合成的 RNA 或者部分或完全从其天然状态的共存在的材料分离的 RNA 是“分离的”。分离的 RNA 可大体上以纯化的形式存在,或可存在于已将该 RNA 递送入其中的细胞中。因此,有意递送至细胞或在细胞(例如,BCL2 相关癌症细胞)中表达的 miR 基因产物被认为是“分离的”基因产物。

[0107] 可使用许多标准的技术获得 miR 基因产物。例如,可使用本领域已知的方法化学合成或重组产生基因产物。在一个实施方案中,使用合适地保护的核糖核苷亚磷酸胺和常规的 DNA/RNA 合成仪化学合成 RNA 产物。合成的 RNA 分子或合成试剂的商业提供商包括例如 Proligo(Hamburg, Germany)、Dharmacon Research(Lafayette, CO, USA)、Pierce Chemical(part of Perbio Science, Rockford, IL, USA)、Glen Research(Sterling, VA, USA)、ChemGenes(Ashland, MA, USA) 和 Cruachem(Glasgow, UK)。

[0108] 可选择地,可使用任何合适的启动子从重组的环状或线状 DNA 质粒表达一种或更多种 miR 基因产物。用于从质粒表达 RNA 的合适的启动子包括 U6 或 H1 RNA pol III 启动子序列或细胞巨化病毒(CMV)启动子。其他合适的启动子的选择在本领域技术人员的能力范围之内。此类重组质粒还可包含用于在细胞(例如,BCL2 相关癌细胞(例如,CLL 细胞、

前列腺癌细胞、其他癌细胞))中表达一种或更多种 miR 基因产物的诱导型或调控型启动子。

[0109] 可使用标准技术从培养的细胞表达系统分离从重组质粒表达的 miR 基因产物。还可将从重组质粒表达的 miR 基因产物递送至和直接在癌细胞(例如,BCL2 相关癌细胞(例如,CLL 细胞、前列腺癌细胞、其他癌细胞))中表达。在下面更详细地讨论重组质粒用于将 miR 基因产物递送至癌细胞的用途。

[0110] 可从分开的重组质粒表达多种 miR 基因产物,或可从相同的重组质粒表达多种 miR 基因产物。在一个实施方案中,一种或多种 miR 基因产物从单个质粒表达为 RNA 前体分子,然后使用合适的加工系统将所述前体分子加工成功能性 miRNA 分子。合适的加工系统包括,例如,Tuschl 等人的美国公开申请号 2002/0086356(其全部公开内容在此引用作为参考)中描述的体外果蝇细胞裂解系统。

[0111] 适合用于表达 miR 基因产物的质粒的选择、用于将表达 miR 基因产物的核酸序列插入质粒的方法和将重组质粒递送至目标细胞的方法在本领域技术人员的能力范围之内。参见,例如,Zeng,等人,MolecularCell 9:1327-1333(2002);Tuschl,Nat.Biotechnol, 20:446-448(2002);Brummelkamp,等人,Science 296:550-553(2002);Miyagishi,等人,Nat.Biotechnol. 20:497-500(2002);Paddison,等人,Genes Dev.16:948-958(2002);Lee,等人,Nat.Biotechnol. 20:500-505(2002);和 Paul,等人,Nat.Biotechnol. 20:505-508(2002),其全部公开内容在此引用作为参考。

[0112] 在特定的实施方案中,表达 miR 基因产物的质粒包含在细胞巨化病毒(CMV)立即早期启动子控制之下的编码 miR 前体 RNA 的序列。如此处所用的,“在启动子的控制之下”意指编码 miRNA 产物的核酸序列位于启动子的 3',这样启动子才可以起始 miRNA 编码序列的转录。

[0113] 还可从重组病毒载体表达 miR 基因产物。涉及到,可从两个分开的重组病毒载体或从相同的病毒载体表达 miR 基因产物。可使用标准技术从培养的细胞表达系统分离从重组病毒载体表达的 RNA,或可在 BCL2 相关癌细胞中直接表达。在下面更详细地描述重组病毒载体用于将 miR 基因产物递送至 BCL-2 相关癌细胞的用途。

[0114] 本发明的重组病毒载体包含编码一种或多种 miR 基因产物的序列和用于表达 RNA 序列的任何合适启动子。如此处所描述的,合适的启动子包括,例如,U6 或 H1RNA pol III 启动子序列,或细胞巨化病毒启动子。其他合适的启动子的选择在本领域技术人员的能力范围之内。本发明的重组病毒载体还可包含用于在 BCL2 相关癌细胞中表达一种或更多种 miR 基因产物的诱导型或调控型启动子。

[0115] 可使用能够接受编码 miR 基因产物的核苷酸序列的任何病毒载体;例如,来源于腺病毒(AV)、腺伴随病毒(AAV)、逆转录病毒(例如,慢病毒(LV)、弹状病毒(Rhabdoviruses)、鼠白血病病毒)、疱疹病毒等的载体。还可通过用包膜蛋白或来自其他病毒的其他表面抗原假型化(pseudotyping)载体来修饰病毒载体的向性。例如,可用来自水泡性口膜炎病毒(VSV)、狂犬病病毒、埃博拉病毒、Mokola 病毒等的表面蛋白假型化本发明的 AAV 载体。适合用于本发明的重组病毒载体的选择、用于将表达 RNA 的核酸序列插入质粒的方法、将病毒载体递送至目标细胞和回收表达的 RNA 产物的方法均在本领域技术人员的能力范围之内。参见,例如,Dornburg, Gene Therap. 2:301-310(1995);

Eglitis, *Biotechniques* 6 :608-614(1988) ;Miller, *Hum. Gene Therap.* 1 :5-14(1990) ;和 Anderson, *Nature* 392 :25-30(1998), 其全部公开内容在此引用作为参考。

[0116] 优选病毒载体是来源于 AV 和 AAV 的病毒载体。在 Xia, 等人, *Nat. Biotech.* 20 :1006-1010(2002) (其全部公开内容在此引用作为参考) 中描述了用于表达本发明的 miRNA 的合适的 AV 载体、用于构建重组 AV 载体的方法和用于将载体递送至靶细胞的方法。在 Samulski, 等人, *J. Virol.* 61 :3096-3101(1987)、Fisher, 等人, *J. Virol.* , 70 :520-532(1996)、Samulski, 等人, *J. Virol.* 63 :3822-3826(1989)、美国专利号 :5, 252, 479、美国专利号 :5, 139, 941、国际专利申请号 :WO 94/13788、和国际专利申请号 :WO 93/24641 (其全部公开内容在此引用作为参考) 中描述了用于表达本发明的 miRNA 的合适的 AAV 载体、用于构建重组 AAV 载体的方法和用于将载体递送至靶细胞的方法。在特定的实施方案中, 从包含 CMV 立即早期启动子的单个重组 AAV 载体表达一种或更多种 miR 基因产物。

[0117] 在一个实施方案中, 本发明的重组 AAV 病毒载体包含在人 U6 RNA 启动子控制下的编码与 polyT 终止序列有效连接的 miR 前体 RNA 的核酸序列。如此处所用的, “与 polyT 终止序列有效连接的”意指编码有义或反义链的核酸序列在 5' 方向紧邻 polyT 终止信号。在从载体转录 miR 序列的过程中, polyT 终止信号用于终止转录。

[0118] 在特定的实施方案中, 将一种或更多种 miR 基因产物用于抑制 BCL2 相关癌细胞 (例如, CLL 细胞、前列腺癌细胞、其他癌细胞) 的增生性生长或致癌性生长。不希望受限于任何一种理论, 据认为经加工的 miRNA 结合在一种或更多种启动和 / 或保持这些细胞的增生性生长或致癌性生长所必需的靶 mRNA 中的互补序列。因此, 本发明提供了在需要该治疗的受试者中治疗 BCL2 相关癌症例如 CLL、急性髓细胞样白血病、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、滤泡性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、非小细胞肺癌、血液的恶性肿瘤、实体瘤、结肠直肠癌、脑癌、乳腺癌、前列腺癌、EB 病毒相关淋巴细胞增生性疾病、肾癌、肝细胞癌和胃癌的方法。方法包括对受试者施用有效量的一种或更多种 miR 基因产物, 这样就抑制了 BCL2 相关癌细胞的增殖。在一个实施方案中, 一种或更多 miR 基因产物包含与 BCL2 转录物内的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

[0119] 例如, 可在来自至少下列组织亚型的癌症的原发性肿瘤或转移瘤或增生性细胞中减少一种或更多种 miR 基因的表达或使其表达不存在, 所述组织亚型的癌症为 : 肉瘤 (中胚层来源的结缔组织和其他组织的癌症) ; 黑色素瘤 (来源于色素黑色素细胞的癌症) ; 癌瘤 (上皮细胞来源的癌症) ; 腺癌 (腺上皮来源的癌症) ; 神经来源的癌症 (神经胶质瘤 / 胶质母细胞瘤和星形细胞瘤) ; 和血液瘤形成 (hematological neoplasias) 例如白血病和淋巴瘤 (例如, 急性成淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病 CLL)。

[0120] 也可在其来源至少为下列器官或组织 (无论什么组织学亚型) 的癌症中减少一种或更多种 miR 基因的表达或使其表达不存在, 所述器官或组织是 : 乳腺、男性和女性泌尿生殖系统的组织 (例如, 输尿管、膀胱、前列腺、睾丸、卵巢、子宫颈、子宫、阴道)、肺、胃肠系统的组织 (例如, 胃、大肠和小肠、结肠、直肠)、外分泌腺例如胰腺和肾上腺、口和食道的组织、脑和脊髓、肾 (肾脏)、胰腺、肝胆管系统 (例如, 肝、胆囊)、淋巴系统、平滑肌和横纹肌、骨和骨髓、皮肤以及眼的组织。

[0121] 例如通过“总体分期分类 (Overall Stage Grouping)” (也称为“罗马计数 (Roman

Numeral)”)或“肿瘤、结节和转移灶”(TNM)分期系统所测量的,发展的任何预后阶段的癌症或肿瘤中也可以减少一种或更多种 miR 基因的表达或使所述基因的表达不存在。给定的癌症的合适的预后分期系统和分期描述在本领域内是已知的,例如,如国立癌症研究所的“CancerNet”互联网站中所描述的。

[0122] 可通过从受试者获得肿瘤细胞或赘生性细胞(或怀疑为肿瘤或赘生性的细胞),然后确定与来自自受试者的正常组织的细胞(例如,对照细胞)相比,一种或更多种 miR 基因(例如,包含与 BCL2 转录物内核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因)的表达在至少部分细胞中是否减少或不存在来鉴定需要治疗 BCL2 相关癌症的受试者。用于检测细胞中 miR 基因的表达水平的方法在本领域技术人员的能力范围之内并且在此处进行了描述。可选择地,可将从受试者获得的细胞中的一种或更多种 miR 基因产物的表达与从正常受试者的群体获得的细胞中的这些基因的平均表达水平比较。可由医生使用标准的诊断技术容易地鉴定需要 BCL2 相关癌症的治疗的受试者。参见,例如,“Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia,”(1989) *Annals of Internal Medicine* 110(3):236-238, 其全部分公开内容在此引用作为参考。例如,具有 CLL 的受试者展示循环的 CLL 细胞、淋巴细胞增多(即,血液中淋巴细胞计数等于或高于每立方毫米 10,000 个细胞)和 CLL 细胞在骨髓和淋巴组织中的累进积累。

[0123] 可通过血液样品的直接目视观察和/或在 CLL 的情况下通过确定淋巴细胞的“CLL 评分”来确认受试者的血液或其他组织中 BCL2 相关癌细胞的鉴定。CLL 评分表明 CLL 细胞的 5 种淋巴细胞表面标记特征:CD5+、CD23+、FMC7- 和表面免疫球蛋白(SmIg)和 CD22 的弱表达(+/-)的存在或不存在。根据其对于 CLL 是典型的还是非典型的,该评分系统对这 5 个标记的各标记给出 1 或 0 的值。CLL 细胞具有 4 或 5 的 CLL 评分,而来自其他白血病的淋巴细胞具有小于 1 至 3 的 CLL 评分。参见 Matutes, 等人, *Leukemia* 8(10):1640-1645(1994) 和 Moreau, 等人, *American Journal of Clinical Pathology*, 108:378-82(1997), 其完整公开内容在此引用作为参考。CLL 细胞还具有与正常的外周血 B 细胞相比相对低水平的表面膜免疫球蛋白。可按照标准的技术容易地检测淋巴细胞上的表面膜免疫球蛋白的水平;参见,例如, Rozman, 等人, *New England Journal of Medicine* 333:1052-1057 1995), 其完整公开内容在此引用作为参考。

[0124] 如此处所用的, miR 基因产物的“有效量”是足以抑制遭受 BCL2 相关癌症的受试者中的 BCL2 相关癌细胞的增殖的量。如此处所用的,“抑制 BCL2 相关癌细胞的增殖”是指杀死细胞或永久地或暂时性地阻止细胞的生长。如果受试者中此类细胞的数目在施用 miR 基因产物后保持恒定或减少那么可推断出抑制 BCL2 相关癌细胞。如果此类细胞的绝对数目增加但肿瘤生长的速率减小也可推断出 BCL2 相关癌细胞增殖的抑制。

[0125] 可通过直接测量或根据原发性肿瘤或转移瘤的质量估量来确定受试者体内 BCL2 相关癌细胞的数目。

[0126] 例如,可使用全血或白细胞计数来容易地确定受试者中 BCL2 相关癌细胞的数目。还可使用设计用于检测 BCL2 相关癌细胞的特征表面标记的免疫组织学方法、流式细胞计量术或其他技术容易地确定 BCL2 相关癌细胞的数目。

[0127] 可通过直接的目视观察或通过诊断性影像学方法例如 X 射线、磁共振影像学

(MRI)、超声和闪烁照相术 (scintigraphy) 确定肿瘤块的大小。用于确定肿瘤块的大小的诊断性影像学如本领域内已知的,可采用或不采用造影剂。还可通过物理方法例如组织块的触诊或使用测量仪器例如测径器进行的组织块测量来确定肿瘤块的大小。

[0128] 通过考虑因素例如受试者的身材大小和重量、疾病侵袭的程度、受试者的年龄、健康状况和性别、给药途径和施用是局部的还是全身性的,本领域技术人员可容易地确定对给定的受试者施用的一种或更多种 miR 基因产物的有效量。

[0129] 例如,miR 基因产物的有效量可基于待治疗的肿瘤块的近似重量。可通过计算肿瘤块的近似体积来确定肿瘤块的近似重量,其中 1 立方厘米的体积大约等于 1 克。基于肿瘤块的重量,一种或更多种 miR 基因产物的有效量可以是至少大约 10 微克 / 克肿瘤块,和可以是大约 10 至 500 微克 / 克肿瘤块。此外,有效量可以是至少大约 60 微克 / 克肿瘤块或至少大约 100 微克 / 克肿瘤块。在特定的实施方案中,将基于肿瘤块的重量有效量直接注射入肿瘤。

[0130] 一种或更多种 miR 基因产物的有效量也可基于待治疗的受试者的近似或估计的体重。在一个实施方案中,如此处所描述的,胃肠外或肠内施用该有效量。例如,对受试者施用的一种或更多种 miR 基因产物的有效量可以在大约 5 至 3000 微克 /kg 体重的范围内变化,和可在大约 700 至 1000 微克 /kg 的体重之间,也可大于约 1000 微克 /kg 体重。

[0131] 本领域技术人员还可容易地确定用于对给定的受试者施用一种或更多种 miR 基因产物的合适的剂量方案。例如,可对受试者施用一种或更多种 miR 基因产物一次(例如,单次注射或沉积)。可选择地,可在从大约 3 至大约 28 天,更优选从大约 7 至大约 10 天的时期内每天 1 次或 2 次对受试者施用一种或更多种 miR 基因产物。在特定的剂量方案中,每天 1 次施用一种或更多种 miR 基因产物,进行 7 天。当剂量方案包含多次施用时,要理解对受试者施用的一种或更多种 miR 基因的有效量可包括在整个剂量方案中施用的基因产物的总量。

[0132] 可使用适合将基因产物递送至受试者的细胞例如造血干细胞 (HSC) 和 / 或 BCL2 相关癌细胞(例如,CLL 细胞、前列腺癌细胞、其他癌细胞))的任何方法对受试者施用一种或更多种 miR 基因产物。例如,可使用适合用 miR 基因产物或用包含编码 miR 基因产物的序列的核酸转染受试者的细胞的方法施用一种或更多种 miR 基因。可直接用一种或更多种 miR 基因产物(当这些产物是核酸时)直接转染细胞,或用包含编码一种或更多种 miR 基因产物的序列的核酸转染所述细胞。在一个实施方案中,用包含编码此处描述的一种或更多种 miR 基因产物的质粒或病毒载体转染细胞。

[0133] 用于真核细胞的转染方法在本领域内是熟知的,其包括核酸至细胞的细胞核或前核的直接注射、电穿孔、脂质体转移或通过亲脂材料介导的转移、受体介导的核酸递送、基因枪 (bioballistic) 或粒子加速、磷酸钙沉淀和病毒载体介导的转染。

[0134] 例如,可用脂质体转移化合物例如 DOTAP (N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基-甲基硫酸铵,Boehringer-Mannheim) 或等同物例如 LIPOFECTIN 转染细胞。使用的核酸的量对于本发明的实践不是至关重要的;可用 0.1-100 微克的核酸 / 10^5 个细胞获得可接受的结果。例如,可使用每 10^5 个细胞大约 0.5 微克质粒载体(于大约 3 微克 DOTAP 中)。

[0135] 在一个实施方案中,从受试者分离 BCL2 相关癌细胞例如 CLL 或前列腺癌细胞,用

编码 miR 基因产物的核酸将其转染,然后再导入受试者。在特定的实施方案中,转染的和再植的细胞是 CLL 细胞。在另一个实施方案中,转染的和再植的细胞是来自已诊断具有 BCL2 相关癌症的受试者的 HSC。

[0136] 用于从受试者分离 BCL2 相关癌细胞(例如,CLL 细胞)的技术在本领域技术人员的能力范围之内,例如,如下面的实施例中所描述的。用于从受试者分离、鉴定、分开和培养 HSC 的技术也在本领域技术人员的能力范围之内,例如,如在美国专利号 Nos. 5,635,387 和 5,643,741,以及 Campana,等人, Blood 85:1416-1434(1995)中所公开的,所述参考资料的全部公开内容在此引用作为参考。在一个实施方案中,在 HSC 的转染之前,从收获的骨髓中清除肿瘤细胞或赘生性细胞。合适的清除技术包括,例如,动员的外周血细胞的白细胞清除术、肿瘤细胞的基于免疫亲和力的选择或杀死肿瘤细胞或使用细胞毒性剂或光敏化剂以选择性杀死肿瘤细胞,这在本领域内是已知的。参见,例如, Bone Marrow Processing and Purging, Part 5 (A. Gee, ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., 1991; Lydaki, 等人, J. Photochem. and Photobiol. 32:27-32(1996); 和 Gazitt, 等人, Blood 86:381-389(1995), 其全部公开内容在此引用作为参考。

[0137] 可使用此处讨论的任何合适的技术转染分离的细胞(例如, HSC 细胞、BCL2 相关癌细胞(例如, CLL 细胞、前列腺癌细胞、其他癌细胞))。在转染后,可检查部分细胞以确认基因产物存在的合适的表达水平。在确认 miR 基因产物的合适的表达后,其余转染的细胞则可再导入受试者。可通过胃肠外方法包括静脉内输注或直接注射入骨髓将转染的细胞再导入受试者。优选在盐水溶液中或其他药学上可接受的载体中将转染的细胞再导入受试者。用于再导入的转染的细胞的合适数目是每千克受试者体重大约 10^5 至大约 10^8 个细胞。可通过在转染前扩增细胞来增加可获得的用于再导入的转染的细胞的数目。

[0138] 在一个实施方案中,用包含编码 miR 基因产物的序列的核酸例如质粒表达载体转染细胞(例如, HSC 细胞、BCL2 相关癌细胞(例如, CLL 细胞、前列腺细胞、其他癌细胞))的基因组,所述质粒表达载体稳定地整合入细胞的基因组以提供 miR 的长期表达。可使用本领域内已知的技术例如使用 miR 基因 cDNA(或其片段)作为探针的基因组 DNA 的 Southern 印迹分析确认稳定的整合和表达。还可使用标准的 Northern 印迹技术检测 miR 基因产物的表达。用编码 miR 基因产物的序列稳定转染的细胞在其重植入受试者后持续地表达 miR 基因产物。在下面的实施例中描述了从受试者分离 HSC,用表达一种或更多种 miR 基因产物的质粒将其转染,然后将转染的 HSC 再植入受试者的示例性方法。

[0139] 还可通过任何合适的肠内或胃肠外给药途径对受试者施用 miR 基因产物。用于本方法的合适的肠内给药途径包括口服、直肠或鼻内给药。合适的胃肠外给药途径包括血管内给药(例如,静脉内推注、静脉内输注、动脉内推注、动脉内输注和至脉管系统的导管滴注)、组织边缘和组织内注射(perி-and intra-tissue injection)(例如,肿瘤边缘注射和瘤内注射,视网膜内注射或视网膜下注射)、皮下注射或沉积包括皮下输注(例如通过渗透泵)、对目标组织的直接施用(例如,通过导管或其他配置装置(例如,视黄醛片剂或栓剂或包含多孔的、无孔的或胶状材料的植入体)进行的)和吸入。在一个实施方案中,通过注射或输注施用 miR 基因产物。为了治疗包括实体瘤的 BCL2 相关癌症,可通过直接注射入肿瘤来施用 miR 基因产物。

[0140] 在本方法中,可以裸露的 RNA 形式与递送试剂一起或以包含表达基因产物的序

列的核酸（例如，重组质粒或病毒载体）的形式对受试者施用 miR 基因产物。用于施用 miR 基因产物的合适的递送试剂包括例如 Mirus TTransit TKO 亲脂试剂、脂质转染试剂（lipofectin）、lipofectamine、cellfectin、多聚阳离子（例如，多聚赖氨酸）和脂质体。

[0141] 此处讨论包含表达 miR 基因产物的序列的重组质粒。此处讨论包含表达 miR 基因产物序列的重组病毒载体，用于将此类载体递送至受试者的细胞（例如，HSC 细胞、BCL2 相关癌细胞（例如，CLL 细胞、前列腺细胞、其他癌细胞））的方法在本领域技术人员范围之内。

[0142] 在特定的实施方案中，使用脂质体将 miR 基因产物或包含编码 miR 基因产物的序列的核酸递送至受试者。脂质体还可增加 miR 基因产物或核酸的血液半衰期。在本实施方案的实践中，在对受试者施用之前，将 miR 基因产物或包含编码 miR 基因产物的序列的核酸封装在脂质体内。

[0143] 可从标准的形成小囊泡的脂质（其通常包括中性的或带负电荷的磷脂和固醇例如胆固醇）形成适合用于本发明的脂质体。通常通过考虑因素例如希望的脂质体的大小和脂质体在血流中的半衰期来指导脂质的选择。用于制备脂质体的许多方法是已知的，如在 Szoka, 等人, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9 :467(1980) ; 和美国专利号 4, 235, 871、4, 501, 728、4, 837, 028 和 5, 019, 369（其全部公开内容在此引用作为参考）中所描述的方法。

[0144] 封装 miR 基因产物或包含编码 miR 基因产物序列的核酸的脂质体可包含将脂质体靶向 BCL2 相关癌细胞（例如，CLL 细胞、HSC 细胞、前列腺癌细胞、另一种癌细胞）的配体分子。在一个实施方案中，使用结合在此类癌细胞中广泛存在的受体的配体（例如，结合肿瘤细胞抗原或癌细胞表面标记的单克隆抗体）。

[0145] 还可修饰封装 miR 基因产物或包含编码 miR 基因产物的序列的核酸的脂质体以避免被单核巨噬细胞系统（“MMS”）和网状内皮系统（“RES”）清除。此类修饰的脂质体可具有表面上的或被整合入脂质体结构的调理作用抑制部分。在一个实施方案中，本发明的脂质体可包含调理作用抑制部分和配体。

[0146] 用于制备本发明的脂质体的调理作用抑制部分通常为典型的大的、结合脂质体膜的亲脂聚合物。如此处所用的，当其本身通过脂溶性的锚嵌入膜或通过直接结合膜脂质的活性基团而化学地或物理学地附着至膜时，调理作用抑制部分“结合”至脂质体膜。此类调理作用抑制亲水聚合物形成显著减少脂质体被 MMS 和 RES 吸收的保护性表面层（例如，如美国专利号 :4, 920, 016 中所描述的，其全部分公开内容在此引用作为参考）。

[0147] 适合用于修饰脂质体的调理作用抑制部分优选是具有大约 500 至大约 40,000 道尔顿，更优选大约 2,000 至大约 20,000 道尔顿的数量平均分子量的水溶性聚合物。此类聚合物包括聚乙二醇（PEG）或聚丙二醇（PPG）衍生物；例如甲氧基 PEG 或 PPG，和 PEG 或 PPG 硬脂酸酯；合成的聚合物例如聚丙烯酰胺或聚 N- 乙烯基吡咯烷酮；线性的、分支的或树枝状（dendrimeric）聚二胺（polyamidoamine）；聚丙烯酸；多元醇例如羧基或氨基化学与之连接的聚乙烯醇和聚木糖醇，以及神经节苷脂例如神经节苷脂 GM₁。PEG、甲氧基 PEG 或甲氧基 PPG 的共聚物或其衍生物也是合适的。此外，调理作用抑制聚合物可以是 PEG 和多聚氨基酸、多糖、聚二胺、聚乙烯胺或多核苷酸的嵌段共聚物。调理作用抑制聚合物还可以是包含氨基酸或羧酸例如半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、甘露糖醛酸、透明质酸、果胶酸、神经氨酸、褐

藻酸、角叉菜胶的天然多糖、氨化多糖 (aminated polysaccharide) 或寡聚糖 (线性的或分支的) 或羧化多糖或低聚糖 (例如与碳酸的衍生物反应产生羧基的连接)。在一个实施方案中, 调理作用抑制部分是 PEG、PPG 或其衍生物。用 PEG 或 PEG- 衍生物修饰的脂质体有时称为“PEG 化脂质体”。

[0148] 可使用许多熟知的技术中的任一技术将调理作用抑制部分与脂质体膜结合。例如, 可将 PEG 的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯与磷脂酰乙醇胺脂溶性锚结合, 然后再与膜结合。类似地, 可在 60°C 下使用 $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ 和溶剂混合物例如以 30 : 12 比例的四氢呋喃和水通过还原性胺化作用用硬脂酰胺脂溶性锚衍生葡聚糖聚合物。

[0149] 用调理抑制部分修饰的脂质体比未修饰的脂质体在循环中保持更长的时间。因此, 此类脂质体有时称为“隐秘 (stealth)”脂质体。已知隐秘脂质体在通过多孔的或“渗漏的”微血管滋养的组织中累积。因此, 表征为这样的微血管缺陷的组织例如实体瘤将有效地积累这些脂质体; 参见 Gabizon, 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 18 : 6949-53 (1988)。此外, 减少的被 RES 的吸收通过防止脂质体在肝和脾中的大量累积降低了隐秘脂质体的毒性。因此, 用调理作用抑制部分修饰的脂质体特别地适合用于将 miR 基因产物或包含编码所述基因产物的序列的核酸递送至肿瘤细胞。

[0150] 如此处所用的, 在一个实施方案中, 本发明是在需要该治疗的受试者中预防或治疗与 BCL2 基因或基因产物 (例如, RNA、蛋白质) 的过度表达相关的癌症的方法, 其包括对受试者施用有效量的至少一种 miR 基因产物。在 Cory, S., 和 Adams, J. M., *Nature Reviews* 2 : 647-656 (2002) 和 Sanchez-Beato, M., 等人, *Blood* 101 : 1220-1235 (2003) (其内容在此引用作为参考) 中描述了 Bcl2 蛋白和 Bcl2 家族的成员以及它们在癌症中的作用。人 BCL2 cDNA 和蛋白质的核苷酸和氨基酸序列示于表 2 中。

[0151]

[0152] 表 2. BCL2 cDNA 和蛋白质的序列

[0153]

名称	序列	SEQ ID NO:
BCL2 cDNA (Genbank Acc. No. NM_0006 33)	TTTCTGTGAAGCAGAAGTCTGGGAATCGATCTGGAAATCCTCCTAATTTTACTCCCTCTCCCGCGACTCCTGATTC ATTGGGAAGTTTCAATCAGCTATAACTGGAGAGTGCTGAAGATTGATGGGATCGTTGCCCTATGTCATTTGTTTGGT TTTACAAAAGGAACCTTGACAGAGGATCATGCTGACTTAAAAATACACATCACAGAGGAAGTAGACTGATATTA ACATACTTACTAATAATAACGTCCTCATGAATAAAGATCCGAAAGGAATTGGAATAAAATTTCTGCACTCAT GCCAAGGGGAAACACCAAGATCAAGTGTCCGCGTATGAAGACACCCCTCGTCCAAGATGCAAGACATCCA ATAAATAGCTGGATTATACTCTCTTTCTCTGGGGCCCGTGGGTGGAGCTGGGGCGAGAGGTGCCGTGGC CCCCGTTGCTTTCTCTCTGGGAAGGATGGCGACGCTGGGAGAACAGGTACGATAACCGGAGATAGTGATGAAGTA CATCCATTATAAGCTGTCCGAGAGGGGTACAGTGGGATCGGGAGATGTGGCGCCCGCCCGGGGGCGGCC CGACCGGGCATCTTCTCTCCAGCCCGGGCACACGCCCATCCAGCCGATCCCGGACCCCGTCCGAGGACCTC GCGCTGCAGACCCCGGCTGCCCCGCGCGCGGCTGCGTCAAGCCGCTGCCACCTGTGGTCCACCTGAC CCTCCCGCAGCGCGGACGACTTCTCCCGCGCTACCGCCGCGACTTCGCGGAGATGTCCAGCCAGCTGCACCTGAC GCCCTTCACCGCGGGGACGCTTTGCCACGGTGTGGAGAGCTCTTCAGGGACGGGTGAATCGGGGAGGATGT GGCTTCTTTGAGTTGGTGGGTCACTGTGTGGAGAGCGTCAACGGGAGATGTGCCCTGGTGGACAACTCGC CCTGTGGATGACTGAGTACTGAACCGGACCTGCACACCTGGATCCAGGATAACGGAGGCTGGGATGCCCTTGTGGA ACTGTACGGCCCGCAGCATCGGCCCTCTGTTGATTTCTCTGGCTGTCTCTGAAGACTCTGCTCAGTTTGGCCCTGGT GGGAGCTTGCATCACCTGGTGCCTATCTGGGCCACAAGTGAAGTCAACATGCCCTGCCCAACAAATATGCAAAAG GTTCACTAAGCAGTAGAATAATAATATGCATTTGAGTGTACCATGAACAAAGCTGCAGGCTGTTTAAGAAAAA TAACACACATATAACATCACACACAGACAGACACACACACAAATTAACAGTCTTCAGGCAAAACGTCGA ATCAGCTATTTACTGCCAAAGGAAATATCATTTATTTTACATTTAAGAAAAAAGATTTATTTATTAAGACA GTCCCATCAAACTCCTGTCTTTGGAATCCGACCACTAATGCCAAGCCTTCGTGGCTCCACCTGGATGTT CTGTGCCGTGAACATAGATTGCTTTCCATGTTGTGGCCGGATCACCATCTGAAGACGACGCGATGGAAGGA CCTGATCATTTGGGAAGCTGGCTTTCTGGCTGCTGGAGCTGGGAGAAAGTGTTCATTCACTTGCATTTCTTGGCCC TGGGGCTGTGATATTAACAGAGGGAGGGTTCTGTGGGGGGAAGTCCATGCCCTCCCTGGCTGAAGAGAGACTCTT TGCATATGACTCAGATGATGATACCTGCTGGGAGGAAAGAGTTGGGAACCTCAGATGGACCTAGTACCCACTGAGA TTTCCACGCCGAGGACAGCGATGGGAAAAATGCCCTTAATCATAGGAAGTATTTTAAAGTACCAATTTGTGCC GAGAAAGCATTTTAGCAATTTATACAATATCATCCAGTACCTTAAGCCCTGATTTGTATATTCATATATTTTGGAT ACGACCCCCCACTCCCAATACTGGCTCTGTCTGAGTAAAGAAACAGATCCCTCTGGAACCTTGAGGAAGTGAACATTT CGGTGACTTCCGCATCAGGAAGGCTAGAGTTACCCAGAGCATCAGGCCGCCCAAGTGCCTGCTTTTAGGAGACCCGAA	55

[0155]

G TAGCTCTGGCCCAAGTGGGAAAAATAGGAAGTGATTATAAATCGAGAGGAGTTATAATAATCAAGATTAAATGTAATA TAATCAGGGCAATCCCAACACATGCTAGCTTTCACTCCAGGATCTATTGAGTGAACAGAAATTCGAATAGTCTCTA TTTGTAATGAACCTATCCCTAAACAAATAGTTTAPAAATGTGAACCTAAACTCTAATTAATTCCTAATCTACTTTTA AGGCAGTGGCTGTTTTAGACTTTCTTATCACTTATAGTTAGTAATGTACACCTACTCTATCAGAGAAAAACAGGAAA GGCTCGAAATACAAAGCCATTCTAAGGAAATAGGAGTCAAGTGAATCTATCTGATCTTATCTGTGGTGTCTTT TGCAGCCAGACAAATGTTGTTACACACTTTTAAAGAAATACAATCTACATTTGCAAGCTTATGAAGTTCCAATCA GATCTTTTATTGTTTCAATTTGGAATCTTTTCAAGGATTTTTTTTAAATTTATATGGGACAAAGACATTTGTTGGA GGGTGGGAGGGAGGAAGAAATTTTAAATGTAAACATTTCCCAAGTTTGGATCAGGAGTTGGAAGTTTTCAGAATAA CCAGAACTAAGGGTATGAAGGACCTGTATTTGGGTCTGATGCTCTGGAAGAACCTTGTGTGACAAATGAGAA ACATTTTGAAGTTTGTGTACGACCTTTTAGATTTCCAGAGACATCAGCATGGCTCAAAGTGCAGTCCGTTTGGCAGTG CAATGGTATAAATTTCAAGCTGGATATGCTAATGGGTATTTAAACAATAAATGTGCAGTTTAACTAARCAAGGATAT TAATGACAACTCTCTGTTGGTAGGACATCTGTTCTAATGTTTATATGTACAAATACAGAAAAAATTTTATAAA ATTAAGCAATGTGAACTGAATTTGGAGAGTGATAATCAAGTCTTTAGTCTTACCAGTGAATCATCTGTTCATG TCTTTGGACAACTGACCTTGGACAAATCATGAAATATGCATCTCAGTGGATGCAAGAAATCAGATGGAGCATGAA TGGTACTGTACCGGTTTCTGGAATGCCCCAGAAAAATACTTCAAGCAAAACATCTTATCAACAAGGTTGTTCT GCATACCAAGCTGAGCAGAGAGATGGGAACACTGTTGGAGGATGGAAGGCTCGCTCAATCAAGAAATCTCGAGAC TATTAATAAATAAGACTGTAGTGTAGATACTGAGTAAATCCATGCACCTAAACCTTTTGAAAAATCTGCCGTGGCCCC TCCAGATAGCTCATTTTCAATTAAGTTTTCCTCCAGGTAGAAATTTGCAAGAGTGACAGTGGATTCATTTCTTTTGG GGAAGCTTCTTTTGGTGGTTTGTGTTATATACCTTCTTAAGTTTTCACCAAGGTTTGCCTTTTGTGAGTTACT GGGGTATTTTGTGTTTAAATAAATAAAGTGATCAATAAGTGTGTTTGTATGAAAGCTTTTGTATCAAGATTTTC ATACTTTTACCTCCATGGCTCTTTTAAAGATTGATACCTTTTAAAGGTGGCTGATATCTGCAACACTGTACACATA AAAAATACGGTAAGGATACCTTACATGGTTAAGTAAAGTCTCCAGTTGGCCACCATTAGCTATAATGGCACTT TGTTTGTGTGTTGGAAAAAGTCACATTTGCCATTAAACCTTCTCTGTCTGTCTAGTTAATATTGTGAAGAAAAATAAA GTACAGTGTGAGATACTG	56 MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAAGDVGAAPPAPAGIFSSQPGHTPHPAASRDPVARTSPLQTPAAP GAAAGPALSPVPVPHLTLRQAGDDEFRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRDGVNWNRIVAFEEFGGV MCVESVNREMSPLVDNIALNMTTEYNRHLHTWTQDNGGWDFAFVELYGPSMRPLEDFSWLSLKLTLALVGACITLGA YLGHK Bcl2 Protein (Genbank Acc. No. NM_0006 24)
--	---

[0156] 用于检测 BCL2 基因产物的表达水平的方法在本领域内是熟知的。例如，可使用此处已描述的技术（例如 Northern 印迹、原位杂交、RT-PCR）检测细胞样品中 BCL2 基因转录

物的表达水平。可使用通常使用的技术例如免疫染色或 Western 印迹检测 Bcl2 蛋白的表达水平,所述技术描述于 Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel 等人, eds., 第 2 卷, John Wiley and Sons, Inc., 1998, 第 10 章。

[0157] 过度表达 Bcl2 的癌症对于本领域技术人员来说是熟知的,包括,但不限于,白血病、淋巴瘤和癌(参见 Kim, R., 等人, Cancer 101(11):2491-2502(2004);美国专利号 5,789,389;和美国专利号:6,800,639,其内容在此引用作为参考)。已知与 Bcl2 的过度表达相关的特定的癌症包括,除其他以外,CLL、急性髓细胞样白血病、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、滤泡性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、非小细胞肺癌、血液的恶性肿瘤、实体瘤、结肠直肠癌、脑癌、乳腺癌、前列腺癌、EB 病毒相关淋巴细胞增生性疾病、肾癌、肝细胞癌和胃癌。

[0158] 在特定的实施方案中,对需要治疗的受试者施用的至少一种 miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

[0159] 如此处所用的,术语“互补核苷酸序列”是指能够通过氢键与另一个与其互补的核苷酸序列形成碱基对的多核苷酸序列。嘌呤和嘧啶之间(例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶或尿嘧啶之间,鸟嘌呤和胞嘧啶之间)通过标准的 Watson-Crick 碱基对形成所述氢键。如此处所用的,“Watson-Crick 碱基对”是指核酸的相对反向平行链上的成对的通过氢键结合的碱基。首先由 Watson 和 Crick 建立的碱基配对法则对于本领域技术人员来说是熟知的。例如,这些法则要求腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U)配对,以及鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对,互补链相互之间反向平行。如此处所用的,术语“Watson-Crick 碱基对”不仅包括标准的 AT、AU 或 GC 碱基对,还包括能够与标准碱基或另一种互补的非标准碱基氢键键合的核苷酸类似物的非标准或经修饰的碱基之间形成的碱基对。这样的非标准 Watson-Crick 碱基配对的一个实例是包括核苷酸类似物肌苷的碱基配对,其中其次黄嘌呤碱基可与腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶形成两个氢键。

[0160] 在一个实施方案中,至少一个 miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列 100%互补(即,完全互补)的核苷酸序列。在其他实施方案中,至少一个 miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列至少大约 70%、至少大约 80%、至少大约 90%、至少大约 95%或、至少大约 99%互补的核苷酸序列。互补区域长度可以是大约 5 至大约 25 个核苷酸,长度大约 5 至大约 15 个核苷酸,或更特别地,长度大约 7 至大约 12 个核苷酸。与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的 miR 基因产物的实例包括,但不限于,miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217 和 miR-186(参见,例如,表 5)。在一个实施方案中,miR 基因产物包含与 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741-3749 互补的核苷酸序列。此类 miR 基因产物的实例包括但不限于 miR-15a、miR-16-1、miR-15b 和 miR-16-2。在特定的实施方案中,miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。用于对受试者施用 miR 基因产物的方法(此处描述了其中的几种方法)在本领域内是熟知的。

[0161] 本发明还包括用于在具有癌症的受试者中增加抗癌疗法的功效的方法,其包括对受试者施用至少一种包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因产物,和额外地对受试者施用至少一种抗癌疗法。根据本发明,抗癌疗法可以是本领域技

术人员已知的任何抗癌疗法。合适的抗癌疗法包括但不限于化学疗法、放射疗法和其组合（例如，化学放射）。本发明还涉及增加非常规癌症疗法的功效的方法。

[0162] 如此处所用的，化疗法是指施用一种或更多种化学物质或药物来治疗癌症。用于本发明的方法的合适的化学治疗剂可以是已知用于治疗癌症的任何化学物质，例如，DNA-烷化剂、抗肿瘤抗生素药物、抗代谢药物、微管蛋白稳定剂、微管蛋白去稳定剂、激素拮抗剂、拓扑异构酶抑制剂、蛋白激酶抑制剂、HMG-CoA 抑制剂、CDK 抑制剂、细胞周期蛋白抑制剂、半胱天冬酶抑制剂、金属蛋白酶抑制剂、反义核酸、三螺旋 DNA、核酸适体和经分子经修饰的病毒 (molecularly-modified viral) 试剂、细菌或外毒素试剂 (bacterial or exotoxic agent)。用于本发明的方法的特别合适的试剂的实例包括但不限于胞二磷胆碱、阿糖胞苷、甲氨喋呤、长春新碱、依托泊甙 (etoposide) (VP-16)、阿得利亚霉素 (阿霉素)、顺铂 (CDDP)、地塞米松、arglabin、环磷酰胺、溶肉瘤素、甲基亚硝脒、氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶 (5FU)、长春碱、喜树碱、放线菌素 D、丝裂霉素 C、过氧化氢、奥沙利铂、依立替康、托泊替康、甲酰四氢叶酸、卡莫司汀、链脲菌素、CPT-11、泰素和其衍生物、它莫西芬、达卡巴嗪、利妥昔单抗、柔红霉素、1- β -D-阿糖呋喃糖胞嘧啶、伊马替尼、氟达拉滨、多西他奇和 FOLF0X4。

[0163] 如此处所用的，放射疗法是指使用高能辐射进行癌症的治疗。除其他以外，可由 X 射线、 γ 放射和中子提供用于放射疗法的高能辐射。不同的放射疗法在本领域内是熟知的并且适合用于本发明的方法。这些方法包括但不限于外照射放疗 (external beam radiation)、近距离放射疗法 (brachytherapy)、强度调控放射治疗 (intensity-modulated radiotherapy) (IMRT)、植入放射 (implant radiation)、全身性放射 (systemic radiation) 和立体定向放射治疗 (stereotactic radiotherapy)。

[0164] 术语“受试者”、“个体”和“患者”此处定义为包括动物例如哺乳动物，包括但不限于灵长类动物、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔子、豚鼠、大鼠、小鼠或其他牛、羊、马、犬、猫、啮齿目动物或鼠类物种。在优选的实施方案中，动物是人。在一个实施方案中，受试者是遭受一种或更多种 BCL2 相关癌症的哺乳动物（例如，人）。如此处所描述的，除其他以外，由本发明的方法治疗的合适的 BCL2 相关癌症包括淋巴瘤、癌和白血病。在特定的实施方案中，BCL2 相关癌症是表征为 BCL2 基因或基因产物（例如，RNA、蛋白质）的增加的表达（例如，过度表达、上调）的癌症。特别合适的 BCL2 相关癌症的实例包括，除其他以外，CLL、急性髓细胞样白血病、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、滤泡性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、非小细胞肺癌、血液的恶性肿瘤、实体瘤、结肠直肠癌、脑癌、乳腺癌、前列腺癌、EB 病毒相关淋巴细胞增生性疾病、肾癌、肝细胞癌和胃癌。在一个实施方案中，癌症是 CLL。在另一个实施方案中癌症是淋巴瘤。在另一个实施方案中，癌症是肺癌。在另一个实施方案中，癌症是前列腺癌。

[0165] 根据本发明的该实施方案的方法，通过对受试者施用至少一种 miR 基因产物来增加癌症治疗的功效。可将 miR 基因产物与化学治疗剂共施用（即，同时施用），或可将其分开施用。在一个实施方案中，miR 基因产物与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补。此类 miR 基因产物的实施例包括但不限于 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217 和 miR-186（参见

表 5)。在其他实施方案中,miR 基因产物包含与 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741 至 3749 互补的核苷酸序列,例如 miR-15a、miR-16-1、miR-15b 和 miR-16-2。在一个实施方案中,miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。

[0166] 可通过相对于合适的对照受试者中癌症的增加的好转来证明抗癌疗法的功效的增加。可根据接受的临床标准例如受试者中癌细胞数目的减少和 / 或肿瘤质量和 / 或大小的减少来确定癌症的好转。可通过直接测量或通过根据原发性肿瘤块或转移瘤块的大小估量来确定 BCL2 相关癌细胞的数目。

[0167] 本发明还提供了增加癌细胞对抗癌剂的细胞毒性效应的敏感性的方法,其包括为细胞提供至少一种包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列的 miR 基因产物。通过对细胞提供至少一种 miR 基因产物,增加细胞对抗癌剂的敏感性。

[0168] 在一个实施方案中,本发明是增加癌细胞对抗癌剂的细胞毒性效应的敏感性的方法,其包括对癌细胞提供至少一种抗癌剂并且额外地对癌细胞提供至少一种 miR 基因产物,其中所述至少一种 miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。抗癌剂可以是已知用于治疗癌症的任何试剂。此类试剂包括但不限于化学治疗剂和辐射照射。在下文中描述合适的试剂的实例。

[0169] 如此处所用的,短语“抗癌剂的细胞毒性效应”是指由于试剂的施用导致的任何细胞损伤和 / 或死亡。相对于其中只提供抗癌剂的对照细胞,可通过由施用至少一种抗癌剂和至少一种 miR 基因产物导致的细胞损伤的严重度的增加和 / 或细胞死亡的数量或比率的增加来证明癌细胞对抗癌剂的细胞毒性效应的敏感性的增加。用于评估细胞毒性(例如,细胞损伤和 / 或死亡)的技术在本领域内是熟知,其包括但不限于监控细胞增殖、细胞生长和细胞死亡(例如,凋亡、坏死)的测定法。

[0170] 用于本发明的该实施方案的合适的细胞包括癌细胞。在特定的实施方案中,癌细胞过度表达 BCL2 基因产物(例如, RNA、蛋白质)。在一个实施方案中,癌细胞是体内细胞(例如,哺乳动物(例如,人)中的 BCL2 相关癌细胞)。在另一个实施方案中,癌细胞获自患者样品(例如,活检组织、血液)或其可获自己建立的癌细胞系或来源于患者样品的癌细胞的细胞系。在某些实施方案中,癌细胞来自从具有与 Bcl2 的过度表达相关的癌症的受试者获得的患者样品。此类癌症的实例包括,除其他以外,CLL、急性髓细胞样白血病、多发性骨髓瘤、黑色素瘤、滤泡性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、非小细胞肺癌、血液的恶性肿瘤、实体瘤、结肠直肠癌、脑癌、乳腺癌、前列腺癌、EB 病毒相关淋巴细胞增生性疾病、肾癌、肝细胞癌和胃癌。在一个实施方案中,癌症是 CLL。在另一个实施方案中癌症是淋巴瘤。在另一个实施方案中,癌症是肺癌。

[0171] 根据本发明的方法,通过对癌细胞提供至少一种 miR 基因产物来增加癌细胞对化疗治疗剂的细胞毒性效应的敏感性。在特定的实施方案中,miR 基因产物与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补。此类 miR 基因产物的实例包括但不限于 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217 和 miR-186(参见表 5)。在其他实施方案中,miR 基因产物包含与 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741 至 3749 互补的核苷酸序列,例如,miR-15a、miR-16-1、miR-15b 和 miR-16-2。在另一个实施方案中,miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。

[0172] 在对受试者施用之前,按照本领域内已知的技术将用于本发明的方法的 miR 基因产物优选配制为药物组合物。因此,本发明包括包含至少一种 miR 基因产物的药物组合物。在一个实施方案中,miR 基因产物是 miR15 或 miR16(例如,miR-15a 或 miR-16-1)。在其他实施方案中,miR 基因产物包含与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的核苷酸序列。用于本发明的方法的合适的 miR 基因产物的实例包括但不限于 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217 和 miR-186(参见表 5)。在一个实施方案中,miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。

[0173] 在相关实施方案中,本发明的组合物还包含至少一种化学治疗剂。用于治疗癌症的许多化学治疗剂在本领域内是熟知的。此处描述了用于本发明的组合物的合适的化学治疗剂。在某些实施方案中,每剂量化学治疗剂的量为大约 0.0001 至 1000mg/kg、大约 0.5 至 70mg/kg 或大约 1 至 50mg/kg。

[0174] 本发明的药物组合物表征为无菌的和无热原的。如此处所用的,“药物组合物”包括用于人和兽医学用途的组合物。用于制备本发明的药物组合物的方法在本领域技术人员的能力范围之内,例如,如 Remington's Pharmaceutical Science,第 17 版,ed., MackPublishing Company, Easton, Pa. (1985)(其全部公开内容在此引用作为参考)中所描述的。

[0175] 在一个实施方案中,本药物组合物包含与药学上可接受的载体混合的 miR 基因产物或包含编码该基因产物的序列的核酸(例如,按重量计算 0.1 至 90%)或其生理上可接受的盐。本发明的药物组合物还可包含用脂质体封装的 miR 基因产物或包含编码该基因产物的序列的核酸以及药学上可接受的载体。

[0176] 优选药学上可接受的载体是水、缓冲水溶液、生理盐水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸、透明质酸等。

[0177] 在优选实施方案中,本发明的药物组合物可包含抗核酸酶降解的 miR 基因产物。本领域技术人员可通过例如将一个或多个在 2' 位置修饰的核糖核苷酸整合入 miR 基因产物容易地合成抗核酸酶的 miR 基因产物。合适的 2' - 修饰的核糖核苷酸包括在 2' - 位置用氟、氨基、烷基、烷氧基和 O- 烯丙基修饰的核糖核苷酸。

[0178] 例如,本发明的药物组合物包含整合一个或多个式 2' AR- 核苷酸的 2' - 修饰的核苷酸的 miR 基因产物,其中:

[0179] A 是氧或氢(优选氟、氯或溴);和

[0180] R 是氢或直链或支链 C₁₋₆ 烷基;

[0181] 假定当 A 是卤素时,则省略 R。优选的修饰的 2- 核糖核苷酸是 2' -O 甲基核糖核苷酸。在一个实施方案中,本发明的药物组合物包含其中各核糖核苷酸是 2' - 修饰的核糖核苷酸的 miR 基因产物。

[0182] 本发明的药物组合物还可包含常规的药物赋形剂和 / 或添加剂。合适的药物赋形剂包括稳定剂、抗氧化剂、渗透压调节剂、缓冲剂和 pH 调节剂。合适的添加剂包括生理上生物相容的缓冲剂(例如,盐酸氨基丁三醇(tromethamine hydrochloride))、螯合剂(例如,DTPA 或 DTPA- 双酰胺)或钙离子螯合复合物(calcium chelate complexes)(例如,钙

DTPA、CaNaDTPA- 双酰胺) 或任意地钙或钠盐(例如,氯化钙、抗坏血酸钙、葡萄糖酸钙或乳酸钙)的加入。可包装本发明的药物组合物从而以液体的形式进行使用,或可将其冻干。

[0183] 对于本发明的固体药物组合物,可使用常规的无毒固体的药学上可接受的载体;例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。

[0184] 例如,用于口服给药的固体药物组合物可包含上面所列的任何载体和赋形剂和 10-95%,优选 25%-75%的 miR 基因产物。用于喷雾(吸入)给药的药物组合物可包含按重量计算 0.01-20%,优选按重量计算 1%-10%的如上所述封装在脂质体中的 miR 基因产物和喷射剂。如果想要还可使用载体例如用于鼻内给药的卵磷脂。

[0185] 本发明还包括用于确定受试者中癌症疗法的功效的方法,其包括对受试者施用至少一种受试试剂,然后测量来自受试者的样品中的 miR 基因产物的表达。在一个实施方案中,miR 基因产物与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补。该 miR 基因产物的实例包括但不限于 miR-182、miR-181、miR-30、miR-15a、miR-16-1、miR-15b、miR-16-2、miR-195、miR-34、miR-153、miR-21、miR-217、miR-205、miR-204、miR-211、miR-143、miR-96、miR-103、miR-107、miR-129、miR-9、miR-137、miR-217 和 miR-186(参见表 5)。在进一步的实施方案中,miR 基因产物包含与核苷酸 SEQ ID NO:55 的核苷酸 3741 至 3749 互补的核苷酸序列,例如,miR-15a、miR-16-1、miR-15b 和 miR-16-2。在另一个实施方案中,miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1。

[0186] 在特定的实施方案中,在施用试剂后,与 BCL2 基因转录物中的核苷酸序列互补的 miR 基因产物的表达的增加表明对治疗的有利反应。用于检测 miR 基因产物的表达水平的方法在本领域内是熟知的,其包括但不限于此类技术如下文中描述的技术(例如,Northern 印迹分析、RT-PCR、原位杂交)。被检测的合适试剂包括,除其他以外,小有机分子、肽和天然发生的生物大分子。特别合适的受试者包括遭受一种或更多种与 Bcl2 过度表达相关的癌症的个体。

[0187] 通过下列非限定性实施例举例说明本发明。

[0188] 实施例

[0189] 在实施例 1 至 4 中使用下列技术:

[0190] 患者样品和细胞系

[0191] 在 CLL 科研联合体研究所(Chronic Lymphocytic Leukemia Research Consortium institutions),征得经诊断具有 CLL 的患者同意后获得患者的样品。简而言之,从 CLL 患者获得外周血,之后通过聚蔗糖-泛影钠密度梯度离心法(Ficoll-Hypaque gradient centrifugation)(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 分离单核细胞,然后按照 Sambrook, J., 等人(1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) (其全部公开内容在此引用作为参考)中描述的标准方案处理所述细胞以进行 RNA 和 DNA 提取。作为 LOH 研究的正常对照,将来自相应患者的颊粘膜的 DNA 放入小(1-2mm²) 纸片上。

[0192] 从美国典型培养物保藏中心(ATCC; Manassas, VA) 获得 30 个人细胞系并按照 ATCC 的说明进行保持。这些细胞系是 AS283、BL2、B1a、BJAB、CA46、Namalva、P3HRI、PAPB 682、PABm、Raji(伯基特淋巴瘤)、De11、SKDHL、ST486(T 细胞淋巴瘤)、JM(免疫母细胞性 B

细胞淋巴瘤)、MC116(未分化的淋巴瘤)、Molt3、Supt 11(T-ALL)、U266(多发性骨髓瘤)、A549、H1299(肺癌)、TE2、TE10(食道癌)、HeLa(宫颈癌)、RC48(肾癌)和 2220、2221、11609、11611、LNCAP、TSUR(前列腺癌)。

[0193] CD5+B 细胞的分离

[0194] 从经历常规扁桃体切除术的儿科年龄组(3-9岁)中的患者获得扁桃体。通过用神经氨酸酶处理的绵羊红细胞簇簇生化(rosetting)单核细胞来获得纯化的B细胞。通过Dono, M., 等人, J. Immunol. 164:5596-5604(2000)(其全部公开内容在此引用作为参考)中描述的不连续Percoll梯度法(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)进一步分级分离B细胞。将从50%Percoll级分收集的B细胞与抗CD5mAb一起温育,然后再与缀合有磁性微珠的山羊抗小鼠Ig一起温育。通过使用MiniMACS系统(Miltenyi Biotec)收集磁性柱子MS上保留的细胞进行正选择(positive selection)来获得CD5+B细胞。

[0195] 体细胞杂种

[0196] 按照常规方法产生体细胞杂种,然后在Negrini, M., 等人, Cancer Res. 54:1818-1824(1994)(其全部公开内容在此引用作为参考)中描述的次黄嘌呤-氨基嘌呤-胸苷(HAT)培养基中进行选择。使用DNeasy tissue试剂盒(Qiagen)分离来源于单个细胞克隆和亚克隆的DNA,并就染色体13和染色体2标记的存在或不存在对其进行PCR筛选(关于引物序列参见表3)。从具有t(2;13)(q32;q14)易位的CLL病例(CLL-B)的融合物分离15个克隆,从具有t(2;13)(q12;q13)易位的另一个CLL病例(CLL-A)的融合物中分离1个克隆。12个CLL-B来源的克隆具有染色体13和2的完全互补物,然而3个具有del(13q)和染色体2的完全互补物。来自CLL-A的单个克隆具有染色体13,所述染色体13在13q14具有小的缺失的染色体13但无染色体2的部分。

[0197] Northern 印迹法

[0198] 使用Tri-Reagent方案(Molecular Research Center, Inc)进行总RNA的分离。将RNA样品(各自30 µg)在15%的丙烯酰胺变性(尿素)标准预制凝胶(Criterion precast gel)(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)上跑胶,然后转移至Hybond-N+膜(Amersham Pharmacia Biotech)。在42℃下于7% SDS, 0.2M Na₂PO₄ pH 7.0中进行使用α-³²P ATP的杂交,进行过夜。在42℃下,在2x SSPE, 0.1% SDS中洗涤膜2次,然后用0.5x SSPE, 0.1% SDS洗涤2次。用于检测miR15和miR16 RNA的探针分别是:

[0199] CACAAACCATTATGTGCTTGCTA (SEQ ID NO :5); 和

[0200] GCCAATATTTACGTGCTGCTA (SEQ ID NO :6)

[0201] 通过在0.1% SDS/0.1x SSC水溶液中煮沸10分钟来剥离印迹,再探测印迹数次。作为上样对照,使用用溴化乙锭染色的5S rRNA。

[0202] 逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)

[0203] 进行RT-PCR以分析正常CD5+细胞和23B-CLL样品中的基因表达水平。对于使用Advantage2 PCR试剂盒(Clontech)的各扩增反应,使用1微升的cDNA,使用10pmol的各基因特异性引物进行35个循环:94℃下进行20秒,65℃下进行30秒,68℃下进行1分钟(关于使用的引物列表,参见下面的表3)。为了确保RNA对于RT-PCR是足够纯的,使用利用对于PCR G3PDH cDNA(Clontech, Palo Alto, CA)是特异性的引物进行的PCR测定。按照Sambrook, J., 等人(1989), (同上)中描述的标准方法通过琼脂糖凝胶电泳分离RT-PCR产

物。

[0204] Western 印迹法

[0205] 用 GST-SLUG Middle 抗体 (来自 Dr. Thomas Look-Harvard, MA 的赠品) 和 SNX2(N17) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA) 探测来自 9 个 B-CLL 患者的细胞裂解物的 SDS/PAGE 凝胶。按照厂商说明书使用 ECL Western 印迹检测试剂盒 (Amersham Pharmacia, UK) 进行检测。

[0206] 数据分析

[0207] 使用通过由美国国立卫生研究院和国立医学图书馆维持的美国国家生物技术信息中心网站获得的 BLAST 比对工具进行对“nr”和“dbEST”数据库的搜索和针对短的、几乎完全的配对的搜索。也参见 Altschul, 等人, J. Mol. Biol. 215 :403-10 (1990) 和 Altschul, 等人, Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402 (1997), 其全部公开内容在此引用作为参考。也使用由 Biology workBench 网站提供的 FASTA 比对工具进行对短序列的同源性的搜索。

[0208] 表 3 用于筛选体细胞杂种的引物

[0209]

名称	引物序列	SEQ ID No :
D2S396L	ATA CAC CTC TAA ATA TCT GTT CCA G	7
D2S396R	AAG TAG GAC CAT TCT AAT AGC C	8
D2S112L	GAG TGG CGG TGA GAA GGT AT	9
D2S112R	AGC CAT TGC TAT CTT TGA GG	10
D2S2243L	TGG GAT ATG CTT CAG GGA C	11
D2S2243R	AGC TGA CCT TGG AAT CTG GTT	12
D13S260L	AGA TAT TGT CTC CGT TCC ATG A	13
D13S260R	CCC AGA TAT AAG TGA CCT GGC TA	14
D13S263L	CCT GGC CTG TTA GTT TTT ATT GTT A	15

[0210]

D13S263R	CCC AGT CTT GGG TAT GTT TTT A	16
D13S165L	GTT TCG CCA AGC CTG TT	17
D13S165R	GTT GAC AAT AAA ATA CGC CAC A	18
D13S273L	CTG NGG CAA AAA CAA CTC TT	19

D13S273R	ATC TGT ATG TCC TCC TTT CAA TG	20
D13S1168L	AAC CTC ATT TAA ATG TAA AGC ATC A	21
D13S1168R	GTA ATG TCA TTG CTT TTG ATT TGC	22
D13S1150L	CTC TTG AGG GAA AAA AAA AAT CA	23
D13S1150R	CCA GGC AAC CAA CCA GTC	24
D13S272L	ATA CAG ACT TCC CAG TGG CT	25
D13S272R	AGC TAT TAA AGT TCC CTG GAT AAA T	26
GCT16C05L	AAG GAA TCA GAG AAA TGG GG	27
GCT16C05R	GCT GAG TCA GAG GGA TTT GA	28
D13S25FOR	AGA GGT AAA CAA ACC AAA CCC	29
D13S25REV	GCT GAC AAT CAA GAG AAG ATG	30
D13S284L	AAA ATC AGG TGG AAA CAG AAT	31
D13S284R	AAA GGC TAA CAT CGA AGG GA	32
01ALU18	CAG AAC CAG AGA AACAGC	33
02ALU18	ATG GCA CAA CAG CTT AAC	34
AFMA301WB5	GAA TGC AGG TGT ACC TAT CAA C	35
AFMA301WB5	ACT GAG TGA CTG CTA CCC AG	36
D13S272L1	AGC TAG CCC TAT CAG GGT	37
D13S272R1	GTA AGT GGA GGT TAC CTG	38
5279F	GAA TCA TTC GTG CTA AGT GGA T	39
5451R	TGC CAA CTG CTT GAA GAA TCT C	40
7130F	ACA CCT AAC TCC TGG GTT GTT C	41

[0211]

7371R	ACT AAA TGC CAG CGT TTG CAT G	42
-------	-------------------------------	----

9530F	GGT CTT ACT CTG GTT AAA TCT	43
9757R	CAT TGG TAG CTA AGG AAA CAC	44
11521F	CCA TTC AAG CCT GGA CAA TCT T	45
11802R	GAA ACT TGA GAC AAT AAG GAG C	46
12440F	CAT GTA ACC AAG ATA AAT CCG T	47
12558R	CTG GAA AAT GTA TGT GAT GAG G	48
17261F	CTG TTG CTA TCT GTA ATA ACA C	49
17494R	CTT GGA ATT TTC CAC TGA ATC	50
18701R	TCA TCA GAA GAA ATC AAG GCA G	51
18560F	CAG TGT TAG GAA TAC GCA TTC A	52
GSP2F4	CCT TGC CAG TAC GCC CAC AAG CTG	53
GSP1R1	CCC CAC CTA TGG TTG TAG TGA GCA TCC	54

[0212] 实施例 1 :CLL 患者的体细胞杂种中的 30kb 缺失区域

[0213] CLL 患者中 13q14 上的最小丢失区域一直不清楚。之前,在 CLL 中已描述 13q14 中缺失的不同的和相对大 (130 至 550kb 之间) 的区域 (参见图 2B)。使用 LOH 和 Southern 印迹分析鉴定 Alu18 基因座上的纯合子丢失的着丝粒边界 (图 2D),该丢失位于 D13S1150 和 D13S272 之间,与 LEU2 基因的外显子 5 相距少于 65kb 的 centromeric。然而,没有发现允许靶肿瘤抑制基因的更好的定位的小的或重叠的纯合子缺失。

[0214] 为更好地确定 CLL 中的丢失区域,产生小鼠 LM-TK⁻ 与具有 13q14 易位和 / 或缺失的 CLL 细胞的体细胞杂种。所得的杂种克隆的 PCR 筛选允许分离存在于肿瘤中的染色体 13 的两个拷贝。如此,在一个案例中鉴定了 31.4kb 缺失,在另一个案例中精确地定位了染色体断裂点 (图 2D)。这些结果表明 13q14 肿瘤抑制基因位于 LEU2 基因的外显子 2 和 5 之间的 29kb 区域内。表 3 中提供了用于筛选体细胞杂种的引物。

[0215] 如图 2 中所示,体细胞杂种中的缺失的区域与所有报导的丢失区域一致,包括 Liu,等人,Oncogene 15 :2463-2473(1997) 几年前报导的 10kb 区域。LEU2 的外显子 1 和 2 也存在于该区域内,并且存在于此处定义的区域。然而,已排除 LEU2 作为 B-CLL 的可能的候选肿瘤抑制基因 (参见 Bullrich,等人,Cancer Res. 61 :6640-6648(2001) ;Migliazza,等人,Blood 97 :2098-2104(2001) ;Wolf,等人,Hum. Mol. Genet. 10 :1275-1285(2001) ;和 Mertens,等人,Blood99 :4116-4121(2002))。

[0216] 实施例 2 :miR15 和 miR16 基因位于染色体 13 的最低限度缺失区域并且在 CD5+ 细胞中高度表达

[0217] 就 13q14 上最小的丢失区域中的新的调控基因筛选公共可获得的序列信息和数据库。两个最近克隆的 miRNA 基因 miR15 和 miR16 的基因簇恰好位于缺失的区域（图 2A）。为估量正常组织中 miR15 和 miR16 的表达水平，在系列正常组织（包括从正常个体的扁桃体分离的 CD5+B 细胞）上进行 miR15 和 miR16RNA 的 Northern 印迹分析（图 3A）。CD5+B 细胞用作对照，因为 B-CLL 的特征在于 CD5+B⁻ 淋巴细胞的累进积累。发现 miR15 和 miR16 基因的表达普遍存在，在正常 CD5⁺ 淋巴细胞中具有最高水平。此外，在正常组织中，miR16 始终以高于 miR15 的水平表达。这些数据表明 miR15 和 miR16 基因在正常 CD5+B⁻ 细胞动态平衡中起着重要作用。

[0218] 实施例 3 :miR15 和 miR16 基因经常缺失或在于 13q14 上具有缺失的 CLL 样品中下调

[0219] 为调查 miR15 和 miR16 基因是否参与 CLL 的发病机理，使用 Northern 印迹法就 miR15 和 miR16 的表达对 60 个 CLL 样品和 30 个人癌细胞系进行分析（图 3B）。68% 的 CLL 患者（41/60）以及 6 个分析的前列腺癌细胞系中的 5 个显示当与其正常的组织对应物比较时，表达显著减少。这些发现证明 miR15 和 miR16 基因在大部分受试 B-CLL 和前列腺癌病例中下调。

[0220] 此外，60 个 CLL 样品中的 23 个（38%）提供了代表 miR15 前体 RNA 的大约 70nt 的清晰可鉴定的条带。在除了骨髓外的任何分析的正常组织中未发现该 70nt miR15 条带（图 3A），这表明 miR15 前体 RNA 在 CLL 中不能被有效地加工。

[0221] 为确定 CLL 中观察到的表达的下调是否与等位基因丢失相关，使用微卫星标记 D13S272 和 D13S273 对 46 个可从其获得正常 DNA 的 CLL 患者进行 LOH 研究（图 3B）。我们发现 68% 的提供信息的样品在至少一个标记上展示 LOH（35 个案例中的 24 个）。在几乎 4 个样品（75%）中，miR15/16 基因产物的表达被减少。对于 12 个样品，由于起始材料的较差的质量导致未获得重现性结果。此外，在 11 个案例中的 6 个案例（55%）中，表达水平减少而无显著的 LOH。在这些情况下，缺失可能太小以至于不能用分析的标记检测。

[0222] Northern 印迹分析显示在存在已知的大纯合子缺失的情况下和在低于 5% 的正常细胞中 miR15 和 miR16 基因产物都表达，表明其他高度相似的大 RNA 基因存在于基因组中。事实上，已报导与 miR15/miR16 基因簇非常相似（但具有不同的前体）的基因簇在染色体 3q25-26.1 上（参见 Lagos-Quintana, 等人, Curr. Biol. 12 :735-739 (2002)）。为了显示 miR15/16 基因表达的变化与染色体 13q 上的缺失严格相关，设计和使用对于染色体 13 上的 miR16 前体 RNA 和从染色体 3 上的基因产生的 miRNA 前体 RNA 是特异性的探针来探测 Northern 印迹。

[0223] 尽管在较低的水平上检测到来自染色体 13 的 miR16 前体 RNA，但在相同的样品中未发现与染色体 3 的探针的特异性杂交。此外，使用两个横跨紧靠着丝粒的 2Mb 的区域的微卫星标记对该基因簇进行 LOH 研究。17 个提供信息的样品中的 4 个在至少一个标记中显示了 LOH，未发现与 miR15/16 的表达水平的相关性。这些数据清楚地证明 CLL 中 miR15 和 miR16 基因表达的下调与 13q14 上的等位基因丢失相关，从而提供了 miR15 和 miR16 基因产物在 CLL 发病机理中的作用的证据。

[0224] 实施例 4 :miR15 和 miR16 也参与小鼠中的 CLL 发病机理

[0225] 为进一步调查 miR15 和 miR16 基因是否参与 CLL 发病机理，将研究扩展至

发生 CLL 的 E μ -TCL1 转基因小鼠 (Bichi, 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(10) : 6955-6960 (2002))。在 E μ -TCL1 转基因小鼠中检查细胞遗传和遗传改变。如上所述进行 Northern 印迹分析 (参见实施例 - “Northern 印迹法”, 和实施例 3)。

[0226] 在大约 80% 的转基因小鼠中, 与正常小鼠脾淋巴细胞相比, 在 CLL 细胞中 miR15 和 miR16 的小鼠同源物的表达减少。这些结果与实施例 3 中关于 miR15 和 miR16 在人 CLL 和正常样品中的表达所描述的结果相似。

[0227] 在小鼠染色体 15 和人染色体 12 之间进行比较。转基因小鼠白血病的对比基因杂交技术 (Comparative gene hybridization) (CGH) 显示大约 35% 具有小鼠染色体 15 的区域 (其相应于人染色体 12 的区域) 的扩增。这些小鼠白血病的细胞遗传学分析也显示小鼠染色体 15 的三体性或四体性。已知染色体 12 的三体性在大约 25% 的人 CLL 中发生。

[0228] 对比基因杂交也显示相应于人中的区域 13q14 的小鼠染色 14 的区域 (51.6-78.5Mb) 的丢失。

[0229] 研究结果显示 CLL 小鼠模型概述了在人 CLL 的发病机理中发生的事件。

[0230] 总体来说, 实施例 1 至 4 中提供的数据提供了 miR15 和 miR16 在哺乳动物的 CLL 发病机理中的作用的证据。

[0231] 实施例 5-8 中使用下列技术:

[0232] 患者样品

[0233] 在征得同意后, 在 CLL 研究联合体研究所从诊断具有 CLL 的受试者获得 26 个 CLL 样品。简而言之, 从 CLL 患者获得血液, 通过聚蔗糖/泛影钠梯度离心 (Amersham Pharmacia Biotech) 分离单核细胞, 按照所描述的方案 (Sambrook J., 等人 Molecular Cloning : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab, Press, Plainview, NY (1989) 处理所述细胞以进行 RNA 提取。将包含来自两个不同的正常个体的各个体的 CD5 阳性细胞的正常混合物用作对照。从扁桃体淋巴细胞制备 CD5+B 细胞。简而言之, 在征得同意后, 从经历常规扁桃体切除术的儿科年龄组 (小于 18 岁) 的患者获得扁桃体。通过用神经氨酸酶处理的绵羊红细胞 (SRBC) 簇生化来自单核细胞 (MNCs) 的 T 细胞来制备纯化的 B 细胞群体。为了获得 CD5+B 细胞, 如所描述的, 将纯化的 B 细胞与抗 CD5 单克隆抗体 (mAb) 一起温育, 然后与缀合磁性微珠 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 的山羊抗小鼠 Ig 一起温育。通过使用 Mini MACS 系统 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 收集保留在磁性柱子 MS 上的细胞来正选择 CD5+B 细胞。如由流式细胞计量术所估量的, 细胞群体的纯化程度高于 95%。

[0234] BCL2 的 Western 印迹

[0235] 使用小鼠单克隆抗 BCL2 抗体 (Dako) 定量 BCL2 蛋白的水平, 然后使用用于 Western 印迹的标准方法 (Sambrook, J., 等人 Molecular Cloning : A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab, Press, Plainview, NY (1989)) 利用第二小鼠单克隆抗 BCL2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 进行确认。使用小鼠单克隆抗肌动蛋白抗体 (Sigma) 进行标准化。使用 ImageQuant TL (Nonlinear Dynamics Ltd.) 定量条件强度。

[0236] RNA 提取、Northern 印迹和 miRNACHIP 实验

[0237] 如 (Calin, G. A., 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 : 15524-15529 (2002) ; Liu, C. G., 等人, Proc Natl. Acad. Sci U. S. A. 101 : 9740-9744 (2004) ; Calin, G. A., 等人

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 :11755-11760 (2004)) 中所述进行方法。简而言之,将来自 5 μ g 总 RNA 的标记的靶用于在各 miRNACHIP 微阵列芯片上进行杂交,所述 miRNACHIP 微阵列芯片以一式三份重复包含相应于 245 个人和小鼠 miRNA 基因的 368 个探针。在 **GeneSpring®** 软件版本 7.2 (SiliconGenetics, Redwood City, CA) 中标准化和分析原始数据。使用 Bioconductor package (www.bioconductor.org) 的 **GeneSpring®** normalization option 或 Global Median normalization 使表达数据以中位数为中心 (median centered) 不存在任何本质差异。使用 **GeneSpring®** ANOVA 工具和 SAM 软件 (Significance Analysis of Microarray, www.stat.stanford.edu/~tibbs/SAM/index.html) 进行统计比较。如 Calin, G. A., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 : 11755-11760 (2004) 中所报导的,使用 Northern 印迹法就 mir-16-1 和 mir-15a 验证微阵列数据。

[0238] mir-16-1/mir-15a 表达载体

[0239] 通过将相关的读框以有义方向连接入哺乳动物的表达载体 pSR-GFP-Neo (OligoEngine, Seattle, WA) 来构建野生型 (mir-16-1-WT) 和突变型 (mir-16-1-MUT) mir-16-1/mir-15a 表达载体。各构建体包含含有 mir-16-1 和 mir-15a 的 832bp 的基因组序列。突变型构建体在 mir-16-1 的 3' 区域中的 +7 碱基对上包含 C 至 T 的置换。在通过测序确认后,按照厂商的说明书 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 使用 Lipofectamine 2000 将各构建体转染入 293 个细胞中。如实施例 5 中所述,通过 Northern 印迹分析估量两种构建体的表达。GFP 水平的 Western 印迹分析用于显示野生型和突变型 pRS-neo-GFP 构建体以相同的功效进行转染。

[0240] 转染测定法

[0241] 在 37°C 下,在含有 5% CO₂ 的潮湿气氛中,在 10% FBS (于补充以 1X 非必需氨基酸和 1mmol 丙酮酸钠的 RPMI-1640 培养基中) 中培养人巨核细胞 (MEG-01)。按照厂商的说明书使用 siPORT neoFX (Ambion), 用 0.4 μ g 萤火虫荧光素酶报告基因载体 (Promega) 和 0.08 μ g 包含肾荧光素酶的对照载体 pRLTK (Promega) 在 12 孔板中共转染细胞。对于各细胞,使用 10nM 的 mir-16-1-有义 (5' -uagcagcacguaaauuuggcg-3' ;SEQID NO:341) 和 / 或 mir-15a 有义 (5' -uagcagcacauaaugguuugug-3' ;SEQID NO:342) (Dharmacon) 或 miR-15a 反义和 / 或 miR-16-1 反义前体 miRNA 抑制剂 (Ambion)。在转染后 24 小时,使用 Dual-荧光素酶测定 (Promega) 连续测量萤火虫荧光素酶和肾荧光素酶的活性。

[0242] 荧光素酶报告基因实验

[0243] 为了产物荧光素报告基因构建体,通过 PCR 从人基因组 DNA 扩增 BCL2 基因的 3' UTR 的 546 个碱基对的片段,其然后使用紧接荧光素酶的终止密码子下游的 XbaI 位点将其插入 pGL3 对照载体 (Promega)。下列引物组用于产生特定片段:

[0244] BCL2-UTRF2

[0245] 5' -CTAGTCTAGAGCCTCAGGGAACAGAATGATCAG-3' (SEQ ID NO:343); 和

[0246] BCL2-UTRR2

[0247] (5' -CTAGTCTAGAAAGCGTCCACGTTCTTCATTG-3' ;SEQ ID NO:344)。

[0248] 也使用 QuikChange XL 定点诱变试剂盒 (Stratagene) 产生分别从与 miR-15a 和 miR-16-1 互补的位置缺失 5bp 和 9bp 的两种 BCL2 插入物 (图 4A)。通过测序确认野生型

和突变型插入物。

[0249] 实施例 5 :miR-15a 和 miR-16-1 展示与 BCL2 转录物的区域互补并且显示与 BCL2 蛋白的表达模式反相关的表达模式

[0250] 通过同源性检索将两种 microRNA (mir-16-1 和 mir-15a) 鉴定为具有对 BCL2 mRNA 序列的同源性。特别地,发现两种 miRNA 的 5' 末端上的前 9 个核苷酸与人 Bcl2 cDNA 克隆 NM_000633 的碱基 3741 至 3749 互补 (图 4A)。BCL2 转录物中的该核苷酸区域在小鼠中是保守的 (图 4A)。miR-15b 和 miR-16-2,来自染色体 3q26 的第二基因簇的两个成员,都鉴定为具有对 Bcl2 转录物的相同区域的互补性。

[0251] 为了估计 mir-16-1 和 / 或 mir-15a miRNA 是否与 BCL2 转录物相互作用,我们首先确定在 CLL 细胞和正常 CD5 阳性淋巴细胞中 miR-15a/miR-16-1 的表达水平和 Bcl2 蛋白的水平之间是否存在相关性。在正常 CD5 阳性 B 淋巴细胞中,来自染色体 13q14 的基因簇高度表达,然而 miR-15b 和 miR-16-2 前体几乎不能通过 Northern 印迹分析检测到 (Calin, G. A., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 :15524-15529 (2002))。通过 miRNACHIP 分析和 Western 印迹法,分析成组的 30 个样品,包括 26 个 CLL 样品和 4 个来自未受影响的个体的扁桃体的正常 CD5 阳性淋巴细胞。在正常的 CD5 阳性淋巴细胞中,miR-15a 和 miR-16-1 miRNA 的水平都很高。相反地,Bcl2 蛋白以非常低的水平表达。然而,在大部分白血病细胞中,miR-15a 和 miR-16-1 都以低水平表达,而 Bcl2 蛋白过度表达 (图 4B 和表 4)。此外,在所有被分析的白血病样品中,我们发现了 miR-15a/miR-16-1 的表达水平与 Bcl2 的表达水平之间的负相关性 (表 4)。因此,在 CLL 样品中,普遍观察到 miR-15a 和 miR-16-1 的表达水平的下调和 Bcl2 蛋白的过度表达。

[0252] 表 4 在 26 个 CLL 样品与两个正常 CD5 细胞库* 的组中,通过 Western 印迹产生的 BCL2 蛋白表达的标准化值和通过 miRNACHIP 产生的 miR-15a 和 miR-16-1 的表达的标准化值。

Sa name	Bcl2/ACT	mir-16-1 chip	mir-15a chip	mir16/Bcl2/ACT	mir15/Bcl2/ACT
N1+N2	0.06	9	3.5	142.08	55.25
N1+N2	0.05	9	3.5	169.27	65.83
N3+N4	0.07	6.24	2.3	83.58	30.81
CLL1	0.61	4.28	1.11	7.04	1.82
CLL2	1.02	2.65	1.17	2.61	1.15
CLL3	0.17	3.08	1.12	18.40	6.69
CLL4	0.67	2.65	1.17	3.96	1.75
CLL5	0.67	3.27	1.3	4.88	1.94
CLL6	2.95	1.42	1.02	0.48	0.35
CLL7	1.92	3.53	1.51	1.84	0.79
CLL8	1.27	4.34	1.24	3.43	0.98
CLL8	1.50	4.3	1.26	2.86	0.84
CLL9	2.26	2.5	1.1	1.11	0.49
CLL10	3.53	1.17	0.91	0.33	0.26
[0253] CLL11	2.50	1.2	1.01	0.48	0.40
CLL12	10.26	1.57	1.16	0.15	0.11
CLL13	7.85	1.8	1.17	0.23	0.15
CLL14	2.86	3.28	0.99	1.15	0.35
CLL15	1.28	9.1	2.62	7.09	2.04
CLL16	14.60	2.2	1.15	0.15	0.08
CLL17	0.99	1.54	1.08	1.55	1.09
CLL18	7.00	1.46	1.07	0.21	0.15
CLL19	1.97	2.71	1.22	1.37	0.62
CLL20	0.56	3.08	1.12	5.50	2.00
CLL21	0.65	2.43	1.26	3.71	1.93
CLL22	0.79	3.08	1.13	3.92	1.44
CLL23	1.30	2.2	1.15	1.69	0.88
CLL24	1.88	0.92	0.87	0.49	0.46
CLL25	8.48	5.03	1.66	0.59	0.20
CLL26	0.17	7.64	1.69	43.70	9.67

[0254] *—N1、N2、N3 和 N4 = 正常 CD5 样品 ;CLL1-CLL26 = 慢性淋巴细胞性白血病。以任意单位表示数据。以一式两份重复检测两种样品,例如,一种正常的混合物和样品 CLL 8,以估量数据的重现性。使用 ImageQuantTL(Nonlinear Dynamics Ltd.) 定量 Western 印迹(WB) 的条带强度。使用 Bioconductor package(www.bioconductor.org) 的 GeneSpring normalization option 和 Global Median normalization 使表达数据以中位数为中心不存

在任何本质差异。

[0255] 实施例 6 :microRNAs,miR-15a 和 miR-16-1 的表达减少了转染的 MEG-01 细胞中的 BCL2 蛋白的表达

[0256] 为调查表达包含 miR-15a/miR-16-1 的完全基因簇对 Bcl2 的表达的影响,使用 MEG-01 细胞,所述细胞是表达高水平的 Bcl2 但由于 miR-15a/16-1 基因座的一个等位基因的丢失和另一个等位基因的改变而不表达 miR-15a 或 miR-16-1 的急性白血病来源的细胞系。用 pSR-miR-15/16-WT 载体瞬时转染的 MEG-01 细胞与野生型 MEG-01 细胞 (MEG-01WT) 和用空载体转染的 MEG-01 (MEG-01-pRS-neo-GFP) 相比,展示高度减少的 Bcl2 的水平 (大约 7% 的标准化的表达) (图 5A)。为确认该效应,转染包含 miR-16-1 中的 +7 (C 至 T) 种系置换 (germlinesubstitution) 的相同表达载体 (pSR-miR-15/16-MUT),所述置换在家族 CLL 的情况下被检测到 (Calin, G. C., 等人, N. Engl. J. Med., 已接受等待印刷出版) 并且强烈地减少两种 miRNA 的表达。如所预期的, Bcl2 的水平与 WT 野生型细胞或用空载体转染的对照细胞中的 Bcl2 的水平相当 (75% 的标准化表达) (图 5A)。此外,用 pSR-miR-15a/16-1WT 转染的细胞显示内源性凋亡途径的激活 (如通过 APAF1- 半胱天冬酶 9-PARP 途径的激活确定的)。对样品包括用突变型构建体 (pSR-miR-15/16-MUT) 转染的细胞的样品都不显示这些促凋亡蛋白的水平改变 (图 5A)。

[0257] 为确定 miR-15a 和 miR-16-1 miRNA 是否都影响 Bcl2 蛋白的表达,我们将 miR-15a 和 miR-16-1 有义或反义寡核苷酸 RNA 瞬时转染入 MEG-01 细胞。如图 5B 中所示, miR-15a- 有义和 miR-16-1- 反义寡核苷酸的分开的转染完全消除了 Bcl2 的表达,而两种 miRNA 的反义 RNA 的转染都不影响 Bcl2 的表达。当共转染两种有义 RNA 或两种反义 RNA 时获得相似的结果 (图 5B),这确认了 miR-15a 和 miR-16-1 miRNA 都影响 Bcl2 蛋白的表达。

[0258] 实施例 7 :microRNA, miR-15a 和 miR-16-1, 与 BCL2 转录物的 3' UTR 之间的直接相互作用的证据

[0259] 可通过直接作用 (即, miRNA 通过 miRNA::mRNA 互补性直接对 Bcl2 转录物的杂交) 或通过间接相互作用 (即, miR-15a 和 miR-16-1 与另一个靶的相互作用, 从而导致 Bcl2 水平的下调) 解释在 miR-15a 和 miR-16-1 表达后 Bcl2 蛋白的水平下调。为了区分这些可能性,将来自人 Bcl2 的 3' UTR (SEQ ID NO :55 的核苷酸 3064 至 3599) 的 536bp 的序列 (所述序列显示与 miR-15a 和 miR-16-1 microRNA 的互补性) 融合至荧光素酶报告基因。任一种 miRNA 和 BCL2 mRNA 之间的相互作用应当减少萤火虫荧光素酶的活性 (其为相对转染对照质粒的 Renilla 荧光素活性标准化的活性), 同时任一种 miRNA 不能与 BCL2 mRNA 相互作用应当不影响报告基因的表达。图 6A 和 6B 中显示的数据符合 miR-15a/miR-16-1 miRNA 和 BCL2 转录物之间的直接相互作用, 因为与对照载体相比, 在用任一种或两种 microRNA 转染后观察到荧光素活性的显著抑制。使用两种类型的突变的靶 mRNA 序列进行对照实验, 所述靶 mRNA 缺少 miR-15a 和 miR-16-1 中与 BCL2 cDNA 互补的 9 个 (3' M1) 或 5 个 (3' M2) 碱基。如所预期的, 两种突变体完全消除了 miR-15a 和 miR-16-1 与 BCL2 的 3' UTR 之间的相互作用 (图 6B)。这些数据表明 miR-15a 和 miR-16-1 microRNA 都直接与 BCL2 的 3' UTR 相互作用。

[0260] 影响 Bcl2 基因的易位增加了两种信使 RNA 和蛋白质的水平 (Tsujimoto, Y., 等人, Science 228 :1440-1443 (1985))。因为最近显示 miRNA 可通过影响 mRNA 翻译或 mRNA 的稳

定性下调特定的靶 (Lim, L. P., 等人, Nature 433:769-773(2005)), 检测 miR15a/16-1 相互作用通过 mRNA 的稳定性下调 BCL2 的可能性。使用来自用 pSR-miR-15/16-WT 或特定的 miR-15a 和 miR-16-1 RNA 寡核苷酸转染的细胞的提取物通过 RT-PCR 扩增来估量 BCL2 mRNA 的水平。在对照细胞 (例如, 未转染的细胞或用空载体转染的细胞) 和用这些载体中的任何载体转染的细胞之间没有观察到 Bcl2 表达水平的差异 (图 6A)。这些结果表明 miR-15a 和 miR-16-1 不影响 mRNA 的稳定性, 但可能影响 Bcl2mRNA 的翻译。

[0261] 实施例 8:假定的 microRNA/BCL2 相互作用的鉴定

[0262] 在人基因组中, 存在 miRNA 的 mir15/16 家族的 4 个成员, 其全都具有与 Bcl2 转录物的区域互补的相同的 9bp 序列。该功能冗余表明存在调节 Bcl2 表达的非常精细的机制。此外, 通过使用靶预测软件 (TargetScan (Lewis, B. P., 等人, Cell 120:15-20(2005)), BCL2 鉴定为 14 种不同 miRNA (包括 mir15 和 mir16) 的潜在的靶 (表 5)。这些发现表明其他 microRNA 可在不同细胞类型中调节 Bcl2 蛋白的表达。

[0263] 表 5. 通过不同的靶预测程序预测的 miRNA::BCL2 相互作用。*

分类	microRNA	TargetScanS (p 值)	PicTar (评分)	Miranda (预测)
1	mir-182	0.031	4.79	N/A
2	mir-181	0.041	N/A	N/A
3	mir-30	0.065	N/A	N/A
4	mir-15	0.091	2.08	N/A
5	mir-16	0.091	2.08	N/A
6	mir-195	0.091	2.12	N/A
7	mir-34	0.15	1.34	Yes
8	mir-153	0.24	0.64	N/A
9	mir-21	0.33	0.64	N/A
[0264] 10	mir-217	0.36	2.37	N/A
11	mir-205	0.37	N/A	N/A
12	mir-204	0.4	0.73	Yes
13	mir-211	0.4	0.73	Yes
14	mir-143	0.41	3.86	N/A
15	mir-96	N/A	1.77	N/A
16	mir-103	N/A	1.23	N/A
17	mir-107	N/A	1.23	N/A
18	mir-129	N/A	N/A	Yes
19	mir-9	N/A	N/A	Yes
20	mir-137	N/A	N/A	Yes
21	mir-217	N/A	N/A	Yes
22	mir-186	N/A	N/A	Yes

[0265] * 注意: TargetScan (MIT) 的网址为 genes.mit.edu/targetscan/, PicTar (New

Your University) 的网址为 pictar.bio.nyu.edu/ 和 Miranda (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) 网址为 www.microrna.org/. N/A- 预计不可获得的。

[0266] 此处提供的数据表明作为 microRNA (例如, miR-15a、miR-16-1) 下调的结果 Bcl2 的过度表达是促成 B-CLL 的发病机理的重要机制。值得注意的是, 在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 的情况下也报导了的 miR-15a 和 miR-16-1 下调 (Eis, P. S., 等人, Proc Natl. Acad. Sci. USA 102:3627-3632 (2005))。因此, 作为 microRNA (例如, miR-15a、miR-16-1) 下调的结果的 Bcl2 的过度表达可能参与其他人恶性肿瘤。

[0267] 实施例 9: 人细胞中 miR 基因产物的表达

[0268] 按照 Zeng, 等人, Mol. Cell 9:1327-1333 (2002) (其全部公开内容在此引用作为参考) 的方法将编码一种或更多种完整的 miR 前体 RNA 的 cDNA 分别克隆入在细胞巨化病毒立即早期 (CMV-IE) 启动子的控制之下表达的不相关 mRNA 的背景。

[0269] 简而言之, 将 Xho I 连接体置于编码 miR 前体的双链 cDNA 序列的末端, 然后分别将这些构建体克隆入存在于 pBC12/CMV 质粒中的 XhoI 位点。在 Cullen, (1986), Cell 46: 973-982 (其全部公开内容在此引用作为参考) 中描述了 pBC12/CMV 质粒。包含 miR 前体 RNA 序列的质粒称为 pCMV-miR (例如, 用于 miR-16-1 的 pCMV-miR16)。

[0270] 使用 FuGene 6 试剂 (Roche) 通过标准技术将一种或更多种 pCMV-miR 构建体分别转染入培养的人 293T 细胞。如上所述提取总 RNA, 然后使用 miR 特异性探针通过 Northern 印迹分析检测加工的 microRNA 的存在。

[0271] 也将一种或更多种 pCMV-miR 构建体分别转染入培养的人癌细胞系 (例如, 癌细胞系 2220、2221、11609、11611、LNCAP、TSUR)。如上所述提取总 RNA, 然后使用 miR 特异性探针通过 Northern 印迹分析检测加工的 microRNA 在癌细胞中的存在。也就形态学的变化、克服接触抑制的能力和其他标志转化表型的标记评价转染的癌细胞。

[0272] 实施例 10: 使用 miR 基因产物对 BCL2 相关癌细胞进行的转染

[0273] 分离来自诊断患有 BCL2 相关癌症的受试者的 BCL2 相关癌细胞, 然后如下用编码一种或更多种 microRNA 的质粒转化所述细胞。

[0274] 如上所述分离 CD5+B, 通过目视检查 (如果癌症是 CLL, 按照 Matutes, 等人, Leukemia 8(10):1640-1645 (1994) (其全部公开内容在此引用作为参考) 的评分系统通过确定 CLL 评分) 鉴定 BCL2 相关癌细胞 (例如, CLL 细胞)。具有至少 4 的 CLL 评分的 CD5+B 细胞被认为是 CLL 细胞。

[0275] 通过标准技术用 miR 表达构建体 (例如, pCMV-miR15、pCMV-miR16) 转染分离的 BCL2 相关癌细胞。如上所述提取总 RNA, 然后使用对于特定 miR (例如, miR-15a、miR-16-1) 是特异性的探针通过 Northern 印迹分析检测加工的 microRNA 的存在。也使用对于某些 miR 基因序列是特异性的探针通过 Southern 印迹杂交来确认 miR 基因序列的稳定整合。

[0276] 实施例 11: 使用 miR 基因产物对造血干细胞进行的转染

[0277] 如下从骨髓获得来自诊断具有 BCL2 相关癌症 (例如, CLL) 的受试者的造血干细胞 (HSC)。

[0278] 在手术室中使用标准的技术在全身麻醉的情况下从受试者的髂骨 (iliac bone) 获取骨髓。将多次抽吸总共大约 750 至 1000ml 的骨髓放入肝素化的注射器。立即将吸出的骨髓转移入包含每 100ml 运载液 (transport medium) 10,000 个单位的无防腐剂的肝素

的运载液 (TC-199, Gibco, Grand Island, New York)。将吸出的骨髓通过 3 个逐渐变细的筛子进行过滤,从而获得不含细胞聚集体、碎片和骨颗粒的细胞悬浮液。然后将过滤的骨髓在自动化的细胞分离器 (例如, Cobe 2991 毛细腔式洗片器 (Cell Processor)) 中进行进一步加工以获得“血沉棕黄层” (即, 不含红细胞和血小板的白细胞)。

[0279] 通过如下使用免疫磁珠 (Dyna1 A. S., Oslo, Norway) 正选择 CD34⁺ 细胞来就部分富造血干细胞 (HSC) 部分富集血沉棕黄层制剂。将血沉棕黄层制剂悬浮于补充的 α 培养基中,并在轻轻倒转试管的情况下,在 4℃ 下与以 1 : 20 稀释的小鼠抗 HPCA-I 抗体一起温育 45 分钟。在补充的 α 培养基中洗涤细胞 3 次,然后与用山羊抗小鼠 IgG₁ 的 Fc 片段包被的小珠一起温育 (75 μ l 免疫珠 / 10⁷ 个 CD34⁺ 细胞)。在 4℃ 下温育 45 分钟后,按照厂商的指导。使用磁性颗粒浓缩器正选择附着至小珠的细胞。

[0280] 在 5ml 聚丙烯试管 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 中,将 2×10⁴ 个来自就 HSC 富集的制剂的细胞在总共 0.4ml 的包含 2% 的人 AB 血清和 10mM Hepes 缓冲剂的 Iscove's modified Dulbecco's 培养基 (IMDM) 中进行温育,通过标准技术使用表达 miR 的构建体 (例如, pCMV-miR15、pCMV-miR16) 进行转染。通过 Northern 印迹分析确认 microRNA 在部分转染的 HSC 中表达,通过 Southern 印迹分析确认 miR 基因序列稳定地整合在部分 HSC 中。按照标准的骨髓移植技术将大约 4×10⁸/kg 体重至大约 8×10⁸/kg 体重的其余的转染细胞再植入受试者。

[0281] 重复实验,但在转染和移植之前用电离辐射从骨髓清除赘生性细胞。将血沉棕黄层制剂中的细胞在包含大约 20% 的自体血浆的 TC-199 中调节至大约 2×10⁷/ml 的细胞浓度。向细胞悬浮液中加入重组人造血生长因子 rH IL-3 或 rH GM-CSF 以刺激造血赘生物的生长,从而增加它们对电离辐射的敏感性。然后将细胞暴露于 5-10Gy 的电离辐射,在 4℃ 下在包含大约 20% 的自体血浆的 TC-199 中洗涤一次,然后如上用表达 miR 的构建体 (例如, pCMV-miR15、pCMV-miR16) 进行转染。

[0282] 实施例 12 : 封装 microRNA 的脂质体的制备

[0283] 脂质体制剂 1- 按照美国专利 : 4, 235, 871 (其全部公开内容在此引用作为参考) 中描述的反相蒸发法制备以 1 : 1 : 4 : 5 的摩尔比的乳糖酰基脑苷脂、磷脂酰甘油、磷酸卵磷脂和胆固醇组成的脂质体。在 100 μ g/ml 加工的 microRNA 或 500 μ g/ml (例如, pCMV-miR15、pCMV-miR16) 的水溶液中制备脂质体。所制备的脂质体包含加工的 microRNA (例如, miR-15a、miR-16-1 RNA) 或表达 microRNA (例如, pCMV-miR15、pCMV-miR16 质粒) 的构建体。

[0284] 然后将脂质体通过 0.4 聚碳酸酯膜并且悬浮于盐溶液中,然后通过在 135mM 氯化钠, 10mM 磷酸钠 pH 7.4 中进行柱层析来将其与未封装的材料分离。使用脂质体而无需进一步修饰,或如下所述对其进行修饰。

[0285] 将一些上面制备的脂质体装满合适的反应器,在搅拌的条件下向该反应器中加入 20mM 高碘酸钠、135mM 氯化钠和 10mM 磷酸钠 (pH 7.4) 的溶液。将所得的混合物在 20℃ 的温度下在黑暗处静置 90 分钟。通过反应混合物对 250ml 的缓冲盐溶液 (135mM 氯化钠、10mM 磷酸钠, pH 7.4) 透析进行 2 小时以除去过量的高碘酸盐。产物是具有通过将糖类羟基氧化成醛基修饰的表面的脂质体。通过这些醛基将靶向基团或调理作用抑制部分缀合致脂质体表面。

[0286] 脂质体制剂 2 如下获得由顺丁烯酰胺苯甲酸 (maleimidobenzoyl)- 磷脂酰乙醇胺 (MBPE)、磷酸卵磷脂和胆固醇组成的第二脂质体制剂。MBPE 是用于将包含巯基的化合物包括蛋白质偶联至脂质体的活化的磷脂。

[0287] 如 Kitagawa, 等人, J. Biochem. 79 :233-236 (1976) (其全部公开内容在此引用作为参考) 中所述, 将十四酰基磷脂酰乙醇胺 (Dimyristoylphosphatidylethanolamine) (DMPE) (100 毫摩尔) 溶解在 5ml 包含 2 当量的三乙胺和 50mg 顺丁烯酰胺苯甲酸-N- 羟基琥珀酰亚胺酯的溶液中。然后在室温下在氮气氛下使所得的反应继续进行过夜, 将所述反应物在氯仿/ 甲醇/ 水 (65/25/4) 中的硅胶 H (Silicagel H) 上进行薄层层析, 这显示 DMPE 至更快速的迁移产物的定量转化。在减压的条件下除去甲醇, 将产物重新溶解于氯仿中。用 1% 氯化钠和顺丁烯酰胺苯甲酸- 磷脂酰乙醇胺 (MBPE) 洗涤氯仿相 2 次, 用使用氯仿/ 甲醇 (4/1) 作为溶剂的硅酸层析纯化对其进行纯化。在纯化后, 薄层层析显示单个的为水合茚三酮阴性的包含磷酸盐的斑点。

[0288] 按照美国专利号 4, 235, 871 (同上) 的反相蒸发法在 100 μ g/ml 加工的 microRNA 的水溶液中或编码 microRNA 的质粒的溶液中以 1 : 9 : 8 的摩尔比用 MBPE、磷酸卵磷脂和胆固醇制备脂质体。通过在 100mM 氯化钠-2mM 磷酸钠 (pH 6.0) 中进行柱层析来将脂质体与未封装的材料分离。

[0289] 实施例 13 : 抗 CD5+ 或抗前列腺肿瘤抗体至封装 miR 基因产物的脂质体的附着

[0290] 用 1.1ml (包含大约 10 毫摩尔) 的具有醛基的脂质体制剂 1 或上述的脂质体制剂 2 装满合适的反应器。在搅拌的条件下将 0.2ml 200mM 氰基硼氢化钠溶液和 1.0ml 3mg/ml 针对 CD5+ 细胞表面标记或前列腺肿瘤细胞抗原的单克隆抗体溶液加入制剂。在保持 4°C 的温度下使所得的反应混合物静置过夜。在 Biogel A5M 琼脂糖柱 (Biorad, Richmond, Ca. ; 1.5 $\times$ 37cm) 上分离反应混合物。

[0291] 实施例 14 : miR 基因产物在体内对人前列腺肿瘤生长的抑制

[0292] 将人激素抵抗性前列腺腺癌细胞系 (PC-3) 接种入裸小鼠, 并将小鼠分成治疗组 and 对照组。当小鼠中的肿瘤达到 100 至 250 立方毫米时, 将一种或更多种封装在脂质体中的加工的 microRNA (例如, miR-15a、miR-16-1) 直接注射入对照组的肿瘤中。用只封装载体溶液的脂质体注射对照组的肿瘤。在整个研究中测量肿瘤的体积。如下, 也在 DunningR-3327 大鼠前列腺模型中评估 miR 基因产物在抑制前列腺肿瘤生长中的功效。将 Dunning R-3327 前列腺腺癌细胞的高度转移和恶性的克隆 (RT-3.1) 接种入 Copenhagen 大鼠, 然后将其分成治疗 and 对照组。两组大鼠在大约一周后都形成肿瘤块。然后每周 2 次用封装在脂质体中的加工的 microRNA 注射治疗组中的大鼠的肿瘤, 进行 5 周。用只封装载体溶液的脂质体注射对照组的肿瘤。在整个研究过程中测量肿瘤的体积。

[0293] 之前未引用作为参考的所有参考文献的相关教导在此引用作为参考。本领域技术人员将容易地认识到本发明特别适合进行目的和获得提及的结果和有利方面, 以及其中固有的有利方面。本发明可以以其他特定的形式体现而不背离其精神或本质属性。

```

          GAGUAAAGUA      UA      GA  U
5' CCUUG      GCAGCACA  AUGGUUUGUG  UUU \
   GGAAC      CGUCGUGU  UACCGGACGU  AAA G
          AUAAAAACUC      UA      GG  A

```

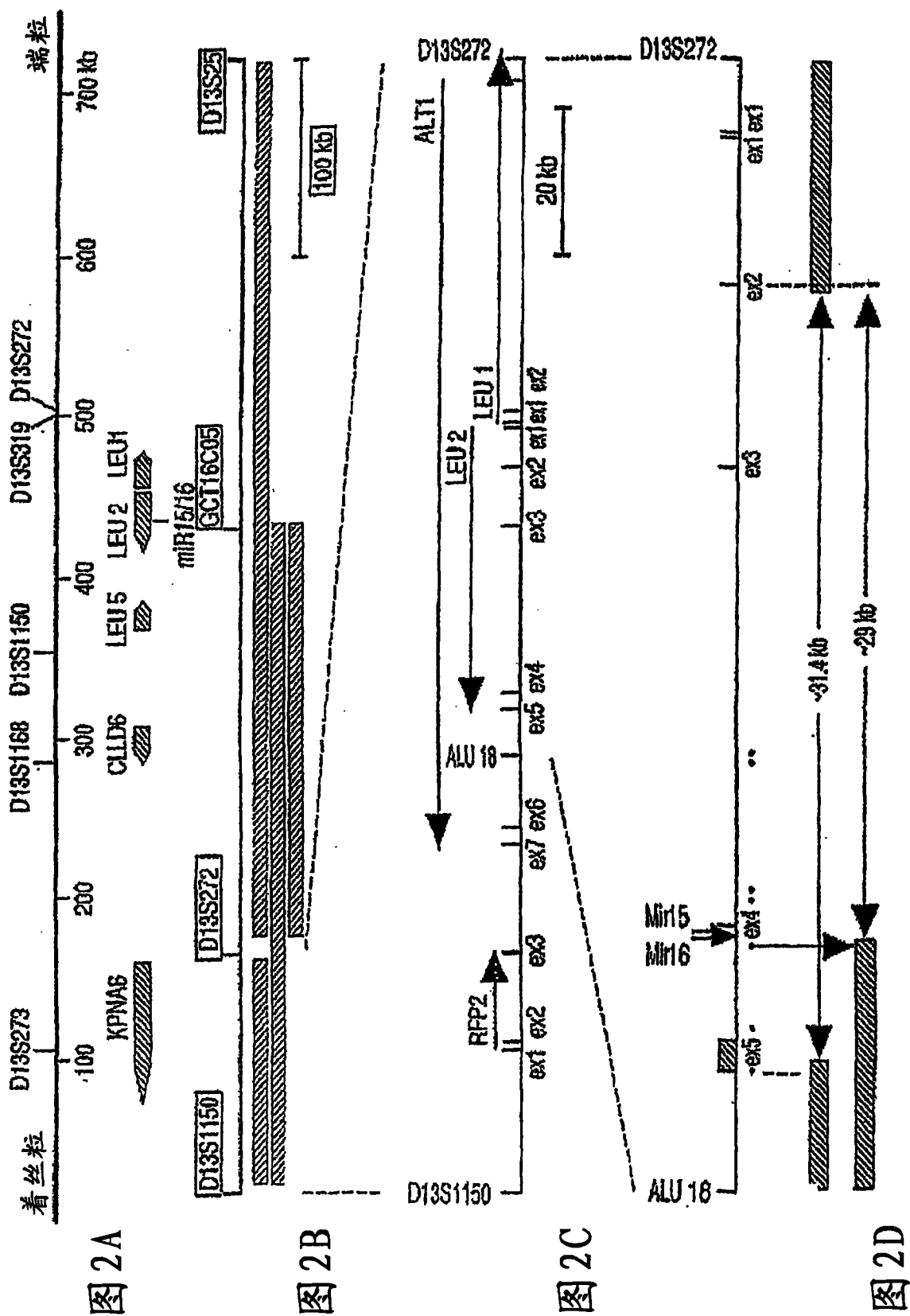
图 1A

```

          AG  C      -  A      CGUUA      UCUA
5' GUCAGC  UGC  UUAGCAGCAC  GU  AAUAUUGG  AGAU  \
   CAGUUG  AUG  AGUCGUCGUG  CA  UUAUGACC  UCUA  A
          GA  A      U  A      -----  UUAA

```

图 1B



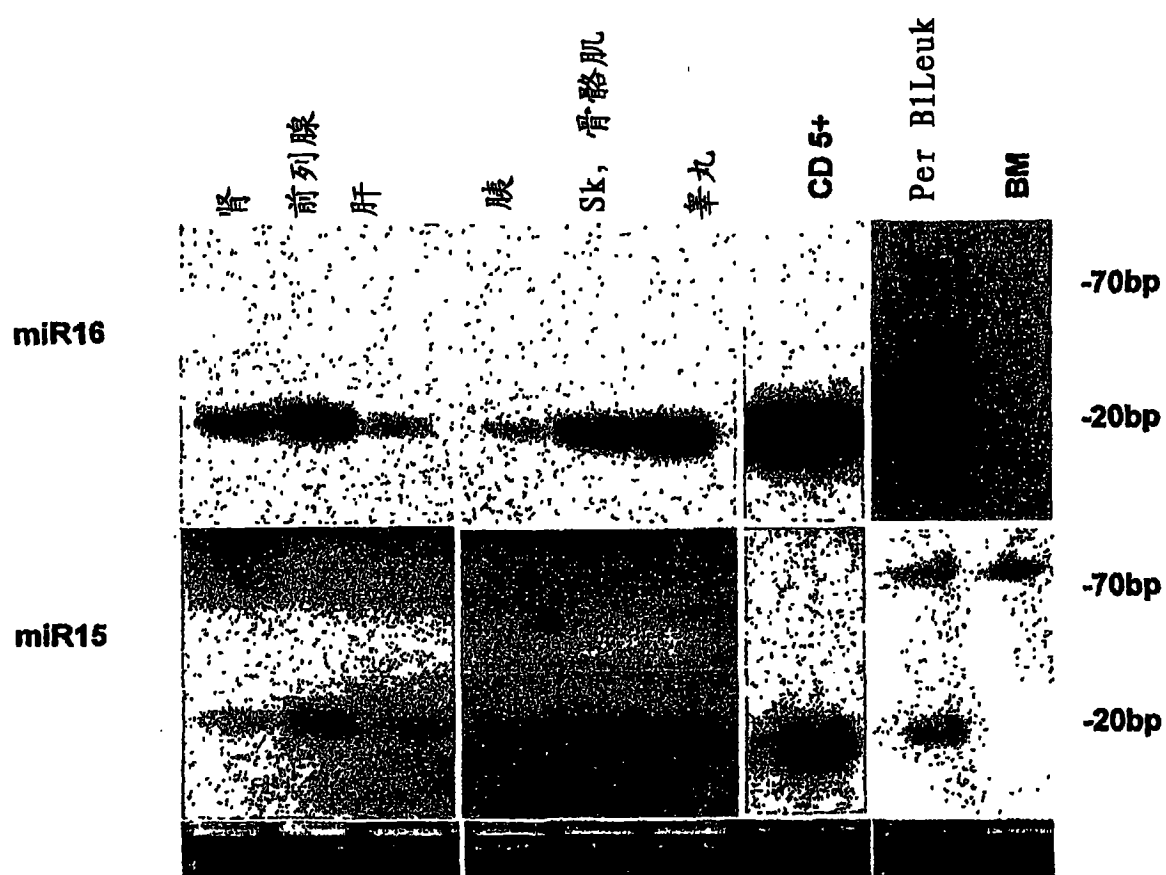


图 3A

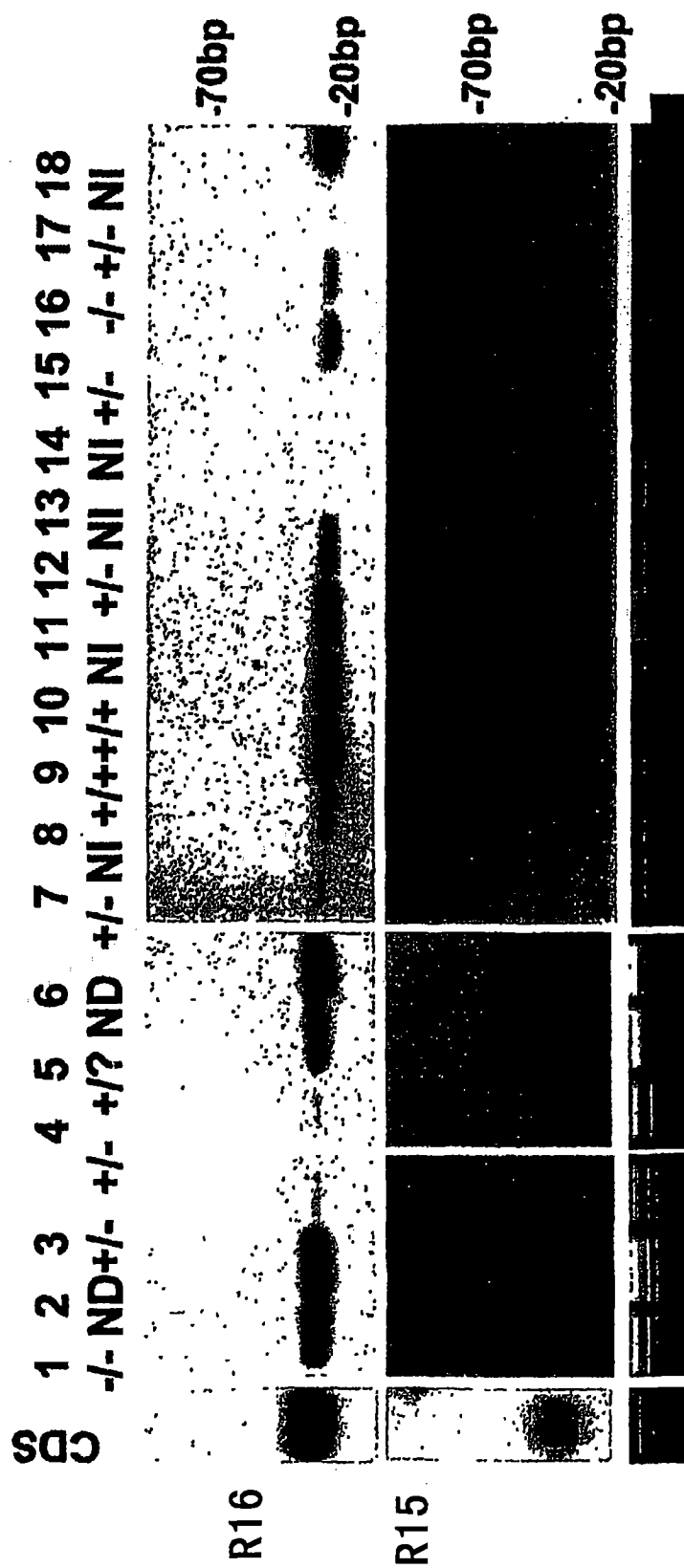


图 3B

3'M1

3'M2

Hsa_BCL2: 3260--TATGGAATATCCAAATCCTGTGCTATCC-3290

Hsa_miR-15: |||||

Hsa_miR-16: GTGTTGGTAATACACGACGAT

GCGETTATAAATGCACGACGAT

MMU_BCL2: 2200--TGGGGAAGCCTGCAGTC:TG:GCTGCTAGAR-2230

MMU_miR-15: | |||||

MMU_miR-16: GTGTTGGTAATACACGACGAT

GCGGTTATAAATGCACGACGAT

图 4A

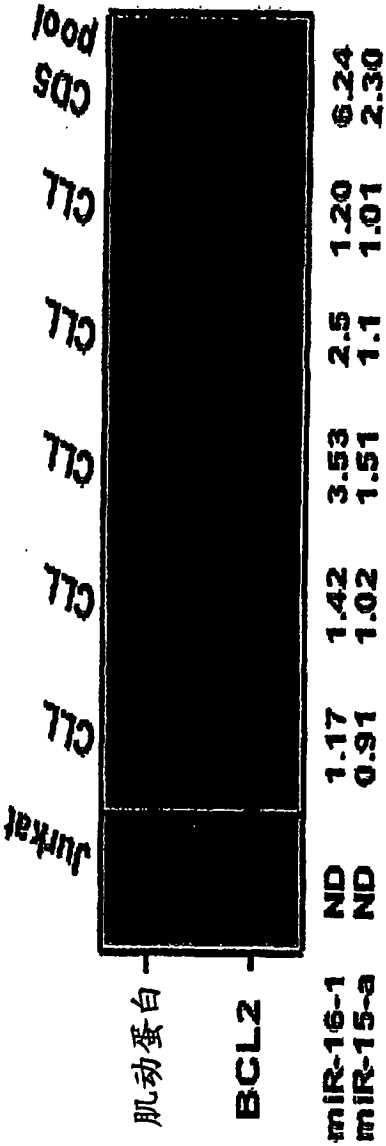


图 4B

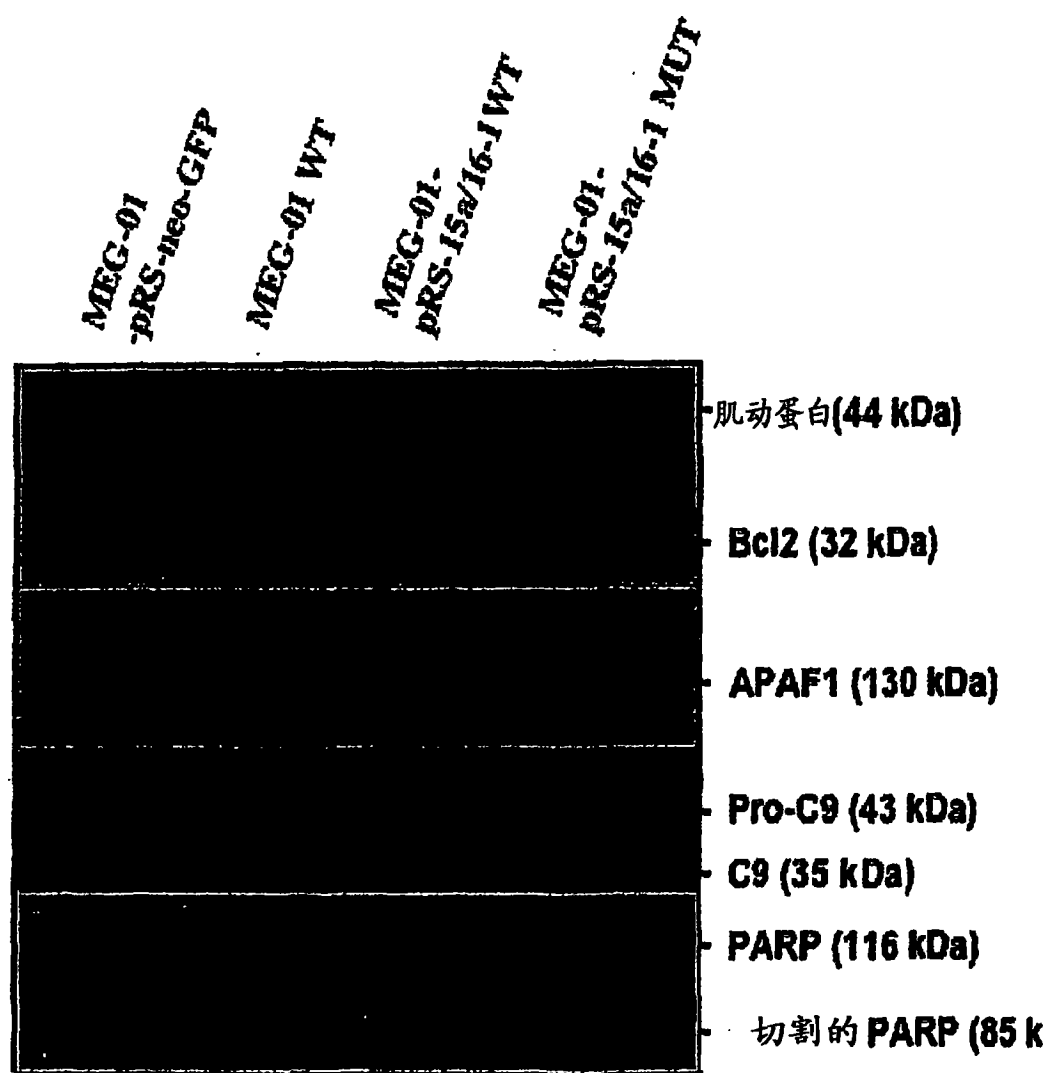


图 5A

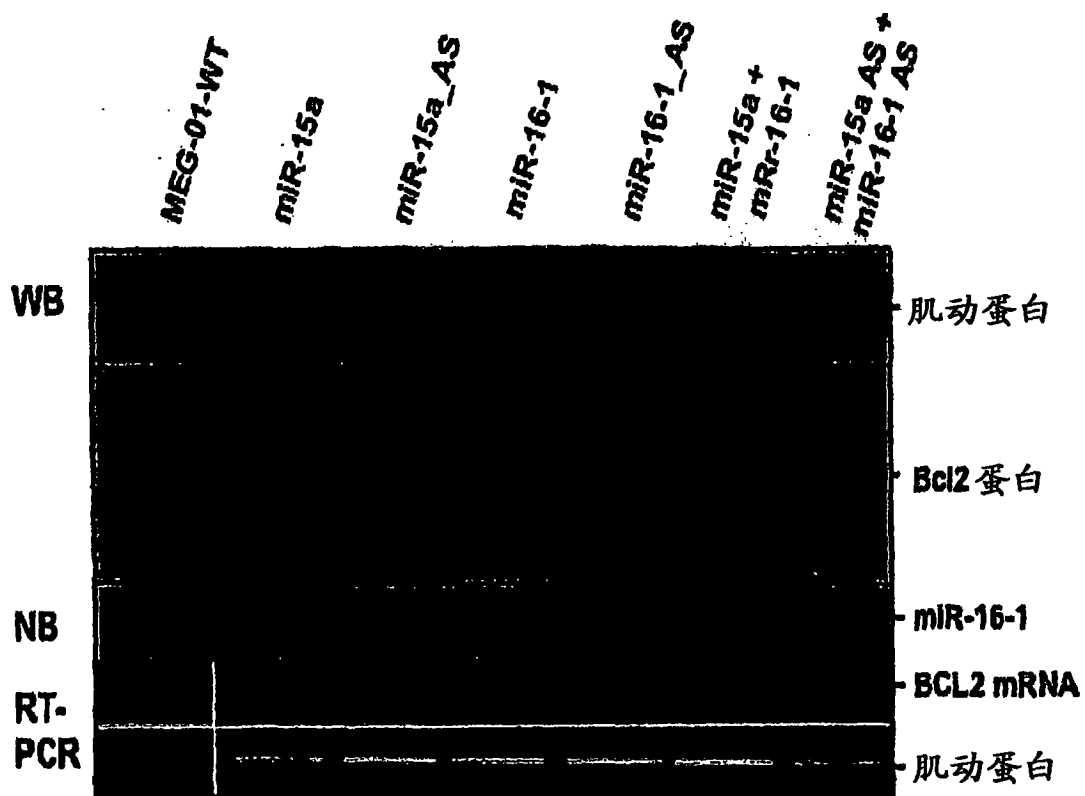


图 5B

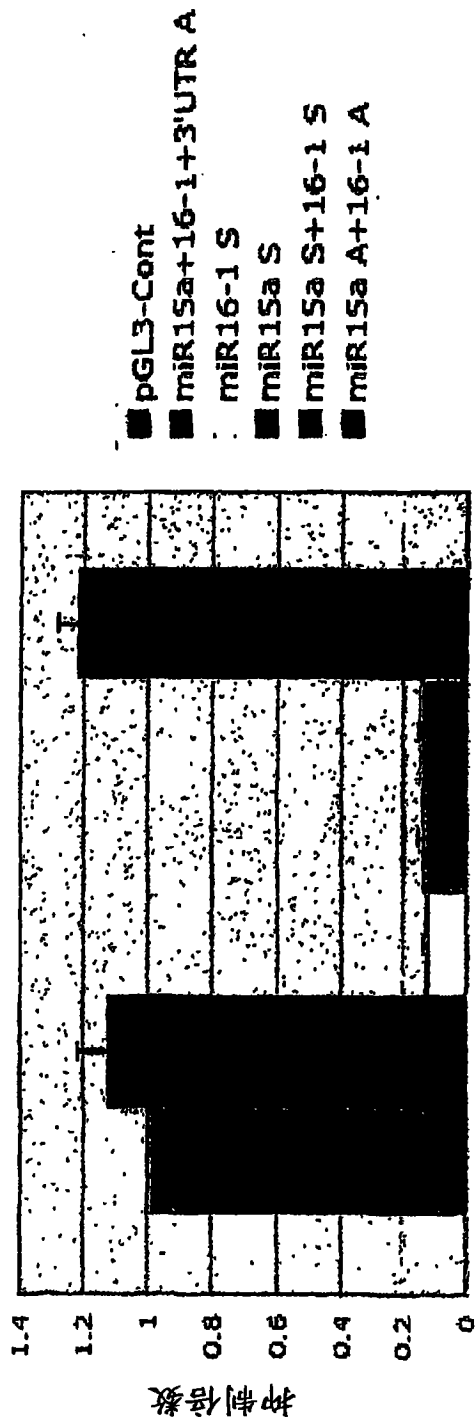


图6A

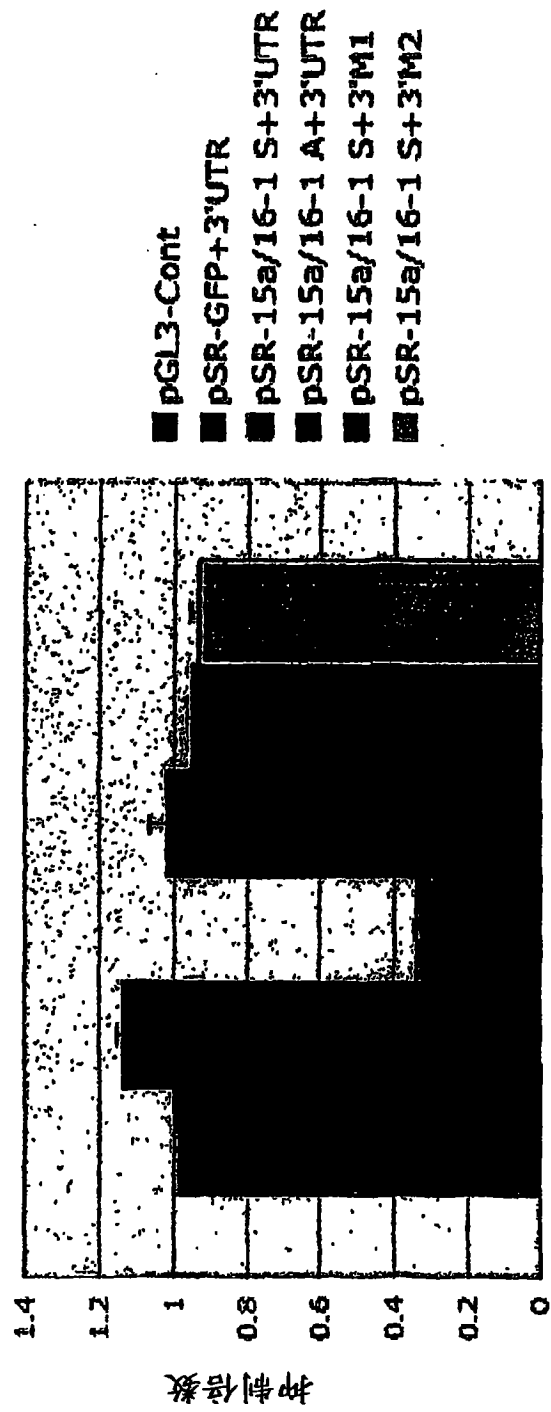


图6B