



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105256004 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201510615615. X

(22) 申请日 2008. 01. 29

(30) 优先权数据

60/898, 578 2007. 01. 31 US

(62) 分案原申请数据

200880003736. 7 2008. 01. 29

(71) 申请人 俄亥俄州立大学研究基金会

地址 美国俄亥俄

(72) 发明人 C·M·克罗斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

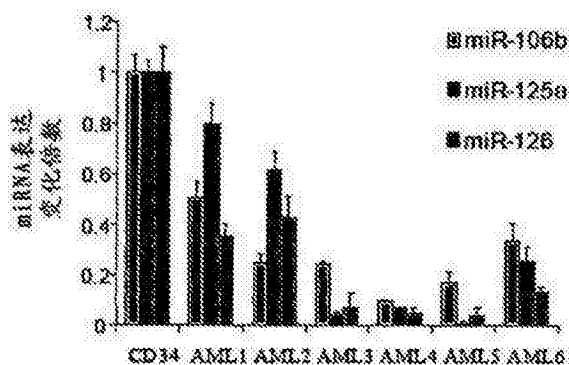
权利要求书4页 说明书28页 附图28页

(54) 发明名称

用于急性髓细胞白血病 (AML) 的诊断、预后和治疗的基于微 RNA 的方法和组合物

(57) 摘要

本发明提供了用于急性髓细胞白血病 (AML) 的诊断、预后和治疗的新的方法和组合物。本发明还提供了鉴别抗 AML 试剂的方法。



1. 确定患有急性髓细胞白血病 (AML) 的受试者的存活率预后的方法, 包括:

从患有或疑似患有 AML 的受试者获得测试样品, 其中所述样品从下列中的至少一种中提取: 血、骨髓和疑似具有白血病细胞的组织,

通过杂交测定法测量所述测试样品中 miR-182 的至少一种基因产物的水平,

比较所述测试样品中 miR-182 基因产物的水平相对于至少一种对照样品中 miR-182 基因产物的对照水平, 及

确定受试者的存活率预后, 其中如果所述测试样品中 miR-182 基因产物的水平相对于对照样品中对应 miR-182 基因产物的水平高, 则所述受试者被确定为具有更短的总存活率预后。

2. 权利要求 1 的方法, 其还包括测量选自下列的至少一种 miR 基因产物的水平: miR-20、miR-25、miR-191、miR-199a 和 miR-199b 及它们的组合。

3. 权利要求 1 的方法, 其中所述测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平小于所述对照样品中对应 miR 基因产物的水平。

4. 权利要求 1 的方法, 其中所述测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于所述对照样品中对应 miR 基因产物的水平。

5. 确定患有急性髓细胞白血病 (AML) 的受试者的预后的方法, 包括:

从患有 AML 的受试者获得测试样品, 其中所述样品从下列中的至少一种中提取: 血、骨髓和疑似具有白血病细胞的组织,

通过杂交测定法测量所述测试样品中至少一种 miR-182 基因产物的水平,

比较所述测试样品中 miR-182 基因产物的水平相对于至少一种对照样品中 miR-182 基因产物的对照水平, 及

确定受试者的预后, 其中

所述 miR-182 基因产物与 AML 的不利预后相关, 且

所述测试样品中至少一种 miR-182 基因产物的水平相对于所述对照样品中对应 miR-182 基因产物的水平增加表示不利预后。

6. 权利要求 1 的方法, 其包括:

(1) 逆转录来自获自受试者的测试样品的 miR-182RNA, 以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

(2) 将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miR-182miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交, 以提供测试样品的杂交谱; 和

(3) 将测试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较,

其中至少一种 miR-182miRNA 的信号的增加表示受试者患有更短的总存活率型 AML 或处于发展更短的总存活率型 AML 的风险中。

7. 权利要求 5 的方法, 其包括:

(1) 逆转录来自获自受试者的测试样品的 miR-182RNA, 以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

(2) 将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miR-182miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交, 以提供所述测试样品的杂交谱; 和

(3) 将测试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较,

其中信号增加表示受试者患有具有不利预后的 AML 或处于发展具有不利预后的 AML 的风险中。

8. 确定患有急性髓细胞白血病 (AML) 的受试者的存活率预后的方法, 包括:

从患有或疑似患有 AML 的受试者获得测试样品, 其中所述样品从下列中的至少一种中提取: 血、骨髓和疑似具有白血病细胞的组织,

通过杂交测定法测量所述测试样品中 miR-191 的至少一种基因产物的水平,

比较所述测试样品中 miR-191 基因产物的水平相对于至少一种对照样品中 miR-191 基因产物的对照水平, 及

确定受试者的存活率预后, 其中如果所述测试样品中 miR-191 基因产物的水平相对于对照样品中对应 miR-191 基因产物的水平高, 则所述受试者被确定为具有更短的总存活率预后。

9. 权利要求 8 的方法, 其还包括测量选自下列的至少一种 miR 基因产物的水平: miR-20、miR-25、miR-182、miR-199a 和 miR-199b 及它们的组合。

10. 权利要求 8 的方法, 其中所述测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平小于所述对照样品中对应 miR 基因产物的水平。

11. 权利要求 8 的方法, 其中所述测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于所述对照样品中对应 miR 基因产物的水平。

12. 确定患有急性髓细胞白血病 (AML) 的受试者的预后的方法, 包括:

从患有 AML 的受试者获得测试样品, 其中所述样品从下列中的至少一种中提取: 血、骨髓和疑似具有白血病细胞的组织,

通过杂交测定法测量所述测试样品中 miR-191 的至少一种 miR 基因产物的水平,

比较所述测试样品中 miR-191 基因产物的水平相对于至少一种对照样品中 miR-191 基因产物的对照水平, 及

确定受试者的预后, 其中

所述 miR-191 基因产物与 AML 的不利预后相关, 且

所述测试样品中至少一种 miR-191 基因产物的水平相对于所述对照样品中对应 miR-191 基因产物的水平增加表示不利预后。

13. 权利要求 8 的方法, 其包括:

(1) 逆转录来自获自受试者的测试样品的 miR-191RNA, 以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

(2) 将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miR-191miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交, 以提供所述测试样品的杂交谱; 和

(3) 将测试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较,

其中至少一种 miR-191miRNA 的信号的增加表示受试者患有更短的总存活率型 AML 或处于发展更短的总存活率型 AML 的风险中。

14. 权利要求 12 的方法, 其包括:

(1) 逆转录来自获自受试者的测试样品的 miR-182RNA, 以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

(2) 将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miR-182miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交, 以提供所述测试样品的杂交谱; 和

(3) 将测试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较,

其中信号增加表示受试者患有具有不利预后的 AML 或处于发展具有不利预后的 AML 的风险中。

15. 确定患有或疑似患有急性髓细胞白血病 (AML) 的受试者的存活率预后的方法, 包括:

从患有或疑似患有 AML 的受试者获得测试样品, 其中所述样品从下列中的至少一种中提取: 血、骨髓和疑似具有白血病细胞的组织,

通过杂交测定法测量所述测试样品中 miR-25 的至少一种 miR 基因产物的水平,

比较所述测试样品中 miR-25 基因产物的水平相对于 miR-25 基因产物的对照水平, 及确定受试者的存活率预后, 其中如果所述测试样品中 miR-25 基因产物的水平相对于对照样品中对应 miR-25 基因产物的水平高, 则所述受试者被确定为具有更短的总存活率预后。

16. 权利要求 15 的方法, 其还包括测量选自下列的至少一种 miR 基因产物的水平: miR-20、miR-181、miR-191、miR-199a 和 miR-199b 及它们的组合。

17. 权利要求 15 的方法, 其中所述测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平小于所述对照样品中对应 miR 基因产物的水平。

18. 权利要求 15 的方法, 其中所述测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于所述对照样品中对应 miR 基因产物的水平。

19. 权利要求 15 的方法, 其中所述测试样品中至少 miR-25 基因产物的测量通过用微阵列和 / 或 RNA 印迹电泳装置分析所述测试样品来进行。

20. 确定患有或疑似患有急性髓细胞白血病 (AML) 的受试者的预后的方法, 包括:

从患有或疑似患有 AML 的受试者获得测试样品, 其中所述样品从下列中的至少一种中提取: 血、骨髓和疑似具有白血病细胞的组织,

通过杂交测定法测量所述测试样品中 miR-25 的至少一种 miR 基因产物的水平,

比较所述测试样品中 miR-25 基因产物的水平相对于 miR-25 基因产物的对照水平, 及确定受试者的预后, 其中

所述 miR-25 基因产物与 AML 的不利预后相关, 且

所述测试样品中至少一种 miR-25 基因产物的水平相对于所述对照中对应 miR-25 基因产物的水平增加表示不利预后。

21. 诊断是否受试者患有更短的总存活率型急性髓细胞白血病 (AML) 或处于发展更短的总存活率型 AML 的风险中的方法, 其包括:

(1) 逆转录来自获自受试者的测试样品的 miR-25RNA, 以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

(2) 将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miR-25miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交, 以提供测试样品的杂交谱; 和

(3) 将测试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较,

其中至少一种 miR-25miRNA 的信号的增加表示受试者患有更短的总存活率型 AML 或处于发展更短的总存活率型 AML 的风险中。

22. 诊断是否受试者患有具有不利预后的急性髓细胞白血病 (AML) 或处于发展具有不利预后的 AML 的风险中的方法, 其包括:

(1) 逆转录来自获自受试者的测试样品的 miR-25miRNA, 以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

(2) 将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miR-25RNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交, 以提供测试样品的杂交谱; 和

(3) 将测试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较，  
其中信号增加表示受试者患有具有不利预后的 AML 或处于发展具有不利预后的 AML 的风险中。

## 用于急性髓细胞白血病 (AML) 的诊断、预后和治疗的基于 微 RNA 的方法和组合物

[0001] 本申请是以 2008 年 1 月 29 日提交的同名申请 200880003736.7 和 201310439889.9 的分别作为原始母案和直接母案的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 急性髓细胞白血病 (AML) 是一种异质病症,它包括许多具有不同遗传异常状况和临床特征的实体<sup>1</sup>。已知相对少数类型的白血病的发病机理<sup>2</sup>。具有中等和差的危险细胞遗传学的患者代表大多数 AML;基于化疗的方案不能治愈这些患者中的大多数,干细胞移植经常是治疗选择<sup>3,4</sup>。由于同种异体干细胞移植不是许多高危白血病患者选择,迫切需要我们提高我们对这些白血病的生物学的理解和开发改良的疗法。

[0004] AML 中 mRNA 表达水平的系统性高通量分析,已经描述了 AML 的新的分子亚群;已经提出,它们中的一些可预测结果<sup>5,6</sup>。尽管有该进展,聚焦于已知的基因可能不足以揭示 AML 的分子难题。包括非编码 RNA 的完整基因组方案的整合,可能提高对 AML 生物学的理解。

[0005] 微 RNA (microRNA, miRNA) 是长度为 19-25 个核苷酸的非编码 RNA,其通过与部分或完全互补的位点进行碱基配对来诱导翻译抑制或切割它们的靶 mRNA,从而调节基因表达<sup>7</sup>。miRNA 参与关键的生物学过程,包括发育、细胞分化、细胞凋亡和增殖<sup>8</sup>。最近,已经将 miRNA 表达与造血作用和癌症相关联<sup>9-11</sup>。Calin 等人已经证实了慢性淋巴细胞性白血病中 miR-15a 和 miR-16-1 的缺失和下调<sup>12</sup>。几个研究组已经报道了大细胞淋巴瘤<sup>13</sup>和小儿 Burkitt 淋巴瘤<sup>14</sup>中 miRNA 表达的变化。更近地,已经证实转基因小鼠的 B 细胞中 miR-155 的过表达导致多克隆 B 细胞增殖和 B 细胞瘤形成<sup>15</sup>。这些发现表明,miRNA 参与人癌症的起始和进展。

[0006] 如本文所公开的,使用 miRNA 微阵列来描绘一大组具有明显中等和较差预后的 AML 患者,以研究 miRNA 谱与细胞遗传组和临床特征之间的关联。

[0007] 在急性髓细胞白血病癌细胞中差异表达的微 RNA 的鉴别,将辅助诊断、预知和治疗白血病。此外,这些 miRNA 的推定靶的鉴别,将辅助解释它们的致病作用。在一个主要方面,本文提供了用于急性髓细胞白血病的诊断、预后和治疗的新的方法和组合物。

### 发明内容

[0008] 本发明部分基于与正常对照细胞相比在乳腺癌细胞中差异表达的 miRNA 的急性髓细胞白血病癌症特异性特征 (signature) 的鉴定。

[0009] 因此,本发明包括诊断受试者是否患有急性髓细胞白血病 (AML) 或处于发展该疾病的风险中的方法,该方法包括测量来自所述受试者的受试样品中至少一种 miR 基因产物的水平,其中与对照样品中相应的 miR 基因产物水平相比,受试样品中 miR 基因产物水平的改变表示受试者患有 AML 或处于发展 AML 的风险中。

[0010] 在某些实施方案中,至少一种 miR 基因产物是 miR-29 或 miR-181。在某些实施方案中,至少一种 miR 基因产物是 miR-29b 和 / 或 miR-181b。

[0011] 可使用多种本领域技术人员熟知的技术测量至少一种 miR 基因产物的水平。在一个实施方案中,使用 RNA 印迹分析测量至少一种 miR 基因产物的水平。在另一个实施方案中,受试样品中至少一种 miR 基因产物的水平低于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平。此外,在另一个实施方案中,受试样品中至少一种 miR 基因产物的水平可高于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平。

[0012] 本发明还提供了诊断与受试者中一个或多个预后标记关联的 AML 的方法,该方法包括测量来自所述受试者的 AML 样品中至少一种 miR 基因产物的水平,其中与对照样品中相应的 miR 基因产物水平相比,受试样品中至少一种 miR 基因产物水平的改变表示受试者患有与一个或多个预后标记关联的 AML。在一个实施方案中,这样测量至少一种 miR 基因产物的水平,即通过逆转录获自受试者的受试样品的 RNA 以提供一组靶寡脱氧核苷酸;将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供受试样品的杂交谱;和,将受试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较来进行测量。至少一种 miRNA 的信号的改变表示受试者患有 AML 或处于发展 AML 的风险中。

[0013] 本发明还包括治疗受试者的 CLL 的方法,其中与从对照样品产生的信号相比,至少一种 miRNA 的信号失调(例如,下调,上调)。

[0014] 在某些实施方案中,微阵列包含针对选自 miR-29 或 miR-181 和其组合的一种或多种 miRNA 的 miRNA- 特异性探针寡核苷酸。

[0015] 本发明还包括诊断受试者是否患有与受试者中一种或多种不利的预后标记关联的 AML 或处于发展该疾病的风险中的方法,即通过逆转录获自受试者的受试样品的 RNA 以提供一组靶寡脱氧核苷酸;将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供所述受试样品的杂交谱;和,将受试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较来进行诊断。信号的改变表示受试者患有癌症或处于发展癌症的风险中。

[0016] 本发明还包括治疗患有 AML 的受试者的 AML 的方法,其中,与对照细胞相比,受试者的癌细胞中至少一种 miR 基因产物被下调或上调。当至少一种 miR 基因产物在癌细胞中下调时,该方法包括对受试者施用有效量的至少一种分离的 miR 基因产物,从而抑制受试者中癌细胞的增殖。当至少一种 miR 基因产物在癌细胞中上调时,该方法包括对受试者施用有效量的至少一种用于抑制至少一种 miR 基因产物表达的化合物,从而抑制受试者中癌细胞的增殖。在某些实施方案中,至少一种分离的 miR 基因产物选自 miR-29、miR-181 和其组合。

[0017] 在相关实施方案中,本发明提供了在受试者中治疗 AML 的方法,该方法包括:测定与对照细胞相比,AML 细胞中至少一种 miR 基因产物的量;和如下改变 AML 细胞中表达的 miR 基因产物的量:如果癌细胞中表达的 miR 基因产物的量低于对照细胞中表达的 miR 基因产物的量,对受试者施用有效量的至少一种分离的 miR 基因产物;或如果癌细胞中表达的 miR 基因产物的量高于对照细胞中表达的 miR 基因产物的量,对受试者施用有效量的至少一种用于抑制至少一种 miR 基因产物的表达的化合物,从而抑制受试者中癌细胞的增殖。在某些实施方案中,至少一种分离的 miR 基因产物选自 miR-29、miR-181 和其组合。

[0018] 本发明还提供了用于治疗 AML 的药物组合物,所述药物组合物包含至少一种分离的 miR 基因产物和药学上可接受的载体。在具体的实施方案中,药物组合物中至少一种分离的 miR 基因产物相应于在 AML 细胞中下调(与合适的对照细胞相比)的 miR 基因产物。

在具体的实施方案中,药物组合物选自 miR-29、miR-181 和其组合。在另一个具体的实施方案中,药物组合物包含至少一种 miR 表达抑制剂化合物和药学上可接受的载体。此外,在具体的实施方案中,药物组合物包含至少一种特异于在 AML 细胞中上调(与合适的对照细胞相比)的 miR 基因产物的 miR 表达抑制剂化合物。

[0019] 在其它实施方案中,本发明提供了鉴定抗 AML 试剂的方法,该方法包括对细胞提供受试试剂和测量与 AML 细胞中减少的表达水平关联的至少一种 miR 基因产物的水平,其中与合适的对照细胞相比,细胞中 miR 基因产物水平的增加表示受试试剂为抗 AML 试剂。在某些实施方案中,至少一种 miR 基因产物选自图 5-6, 8-18 和 21(表 1-2, 5-15 和 18)的任一个中所示的 miRNA。在一个具体实施方案中,至少一种 miR 基因产物选自: miR-20, miR-25, miR-191, miR-199a, 和 miR-199b 和其组合。

[0020] 本发明还提供了鉴定抗 AML 试剂的方法,该方法包括给细胞提供受试试剂和测量与 AML 细胞中增加的表达水平关联的至少一种 miR 基因产物的水平,其中与合适的对照细胞相比,细胞中 miR 基因产物水平的减少表示受试试剂为抗 AML 试剂。在一个具体实施方案中,miR 基因产物选自 miR-29、miR-181 和其组合。

[0021] 本发明的其它优点、目的和特征将在下面的描述中予以部分阐述,且本领域普通技术人员在检查下述内容后其将部分地显而易见,或可以从本发明的实践中学习。如所附权利要求书特别指出的,可以实现和达到本发明的目的和优点。

[0022] 附图简述

[0023] 图 1A-F. 通过 qRT-PCR 来定量成熟的 miRNA, 验证微阵列数据。

[0024] 图 1A. 6 个 AML 样品相对于 CD34+ 祖细胞的微 RNA(miRNA) 表达。将结果表示为用 let-7<sup>i</sup> 标准化(Ct) 和 2<sup>-ΔCt</sup> 转换<sup>18</sup> 后 AML 样品中的 miRNA 表达相对于 CD34+ 表达值的变化倍数(细条代表标准差)。

[0025] 图 1B. 使用 qRT-PCR 验证微阵列数据。散布图显示了每个样品的 miRNA 微阵列表达值(2log) 和标准化的 qRT-PCR Oct 值(对数尺度)之间的负相关(Pearson 相关系数 R = 0.88p<0.001)。粉色实线代表预测的 Y。qRT-PCR(Ct 值)越低,miRNA 的表达水平越高。例如,在底部右侧的点具有低 ΔCt 值(高表达),且与高微阵列(芯片)值对应。

[0026] 图 1C. 成熟的和造血定向的前体细胞中相对于 CD34+ 干细胞的 miRNA 表达。将结果表示为用 18S 标准化和 2<sup>-ΔCt</sup> 转换后不同成熟的和定向的前体细胞的平均 miRNA 表达相对于 CD34+ 细胞的表达的变化倍数。

[0027] 图 1D. 根据 FAB 分类分组的 AML 样品中 miR-181b 的平均 qRT-PCR 表达;每个种类中患者样品的数目如下:M0-M1(6), M2(8) 和 M6M7(5)。

[0028] 图 1E. 与其它异常核型(26) 相比具有正常核型(10) 的 AML 患者中的平均 miR-10qRT-PCR 表达。

[0029] 图 1F. 通过 qRT-PCR 测得的具有复杂核型的患者(6) 和具有其它细胞遗传异常情况的患者(22) 中 miR-126 的平均表达。使用 t 检验(SPSS), 对比不同组之间的 miRNA 表达。

[0030] 图 2A-D. 新诊断的 AML 患者中与总存活率(overall survival) 有关的微 RNA。通过微阵列检测的具有高或低 miR-20(图 2A) 和 miR-25(图 2B) 表达的 122 位 AML 患者的总存活率的 Kaplan-Meier 估计值。使用时序检验(log-rank test) 来对比存活曲线之间的差



异。使用不同的技术 (miRNA qRT-PCR), 使用具有类似临床特征 (图 4(表 1)) 的 36 位 AML 患者的独立组来验证 miR-20 和 miR-25 的结果预测力。显示出通过 qRT-PCR 测得的具有高或低 miR-20 (图 2C) 和 miR-25 (图 2D) 表达的 36 位 AML 患者的总存活率的 Kaplan-Meier 估计值。通过 Kaplan-Meier 方法, 得到具有 95% 置信区间 (CI 95%) 的危害比 (hazard ratio)。

[0031] 图 3A. 从 4 位不同健康供体得到的骨髓红细胞 / 巨核细胞前体和外周血成熟的粒细胞 / 单核细胞中的 miR-181b 和 miR-135a 的平均 qRT-PCR 表达。将结果表示为不同谱系中的 miRNA 表达相对于 4 种 CD34+ 细胞中 miR-181b 和 miR-135b 的表达的变化倍数。

[0032] 图 3B. 10 位具有正常核型的患者和 22 位具有异常核型的患者中 miR-30c 的平均 qRT-PCR 表达值。使用 t 检验 (SPSS), 对比来自两组 (正常对异常核型) 的 miRNA 表达值。

[0033] 图 3C. 在实现完全缓解 (6) 或诱导化疗失败 (6) 的具有新诊断的 AML 的 12 位独立患者中, 通过 qRT-PCR 测得的接受伊达比星和阿糖胞苷诱导化疗的 AML 患者中的平均 miR-29b 表达。使用 t 检验 (SPSS), 对比来自两组 (完全缓解对失败) 的 miRNA 表达值。

[0034] 图 4. 表 1. 158 位新诊断的 AML 患者的临床和细胞遗传学特征。

[0035] 图 5. 表 2. 与 FAB 分类和细胞遗传学相关的微 RNA。

[0036] 图 6. 表 3. 与 122 位 AML 患者中的总存活率相关的微 RNA。

[0037] 图 7. 表 4. 用于微阵列数据的标准化的持家基因探针。

[0038] 图 8. 表 5. 在 CD 34+ 细胞和 122 位 AML 患者之间差异表达的 MiRNA。

[0039] 图 9 (表 6). 与其它 AML FAB 亚型相比在 AML FAB M0-M1 中差异表达的 MiRNA。

[0040] 图 10. 表 7. 在 AML FAB M3[t(15;17)] 中差异表达的 MiRNA。

[0041] 图 11. 表 8. 与其它 AML 相比在 AML FAB M4 和 M5 中差异表达的 MiRNA。

[0042] 图 12. 表 9. 与其它 AML 相比在 AML FAB M6 和 M7 中差异表达的 MiRNA。

[0043] 图 13. 表 10. 与高 WBC 以及外周血 (PB) 和骨髓 (BM) 母细胞 (blast) 相关的 MiRNA。

[0044] 图 14. 表 11. 与其它 AML 相比在正常核型 AML 中差异表达的 MiRNA。

[0045] 图 15. 表 12. 与 11q23 重排相关的 MiRNA。

[0046] 图 16. 表 13. 与非复杂的或正常的核型相比, 在具有复杂核型的患者中差异表达的 MiRNA。

[0047] 图 17. 表 14. 与染色体 7 相关的 MiRNA。

[0048] 图 18. 表 15. 与三体性 8 相关的 MiRNA。

[0049] 图 19. 表 16. 最初诱导化疗后首次复发或患有原发性难治病的 54 位 AML 患者的特征。

[0050] 图 20. 表 17. 用伊达比星和阿糖胞苷治疗的 24 位患者的临床特征。

[0051] 图 21. 表 18. 与对伊达比星和阿糖胞苷的响应有关的 MiRNA。

[0052] 发明详述

[0053] 本发明部分地基于, 与正常对照细胞相比在急性髓细胞白血病 (AML) 癌细胞中具有改变的表达的特定微 RNA 的鉴别, 和这些微 RNA 与特定诊断、预后和治疗特征的关联。

[0054] 如在本文中可互换使用的, “miR 基因产物”、“微 RNA”、“miR”或“miRNA”是指来自 miR 基因的未加工或已加工的 RNA 转录物。由于 miR 基因产物不翻译成蛋白质, 因此术语 “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”, 其通常包括

长度大约 70-100 个核苷酸的 RNA 转录物。可通过用 RNA 酶（例如，Dicer、Argonaut 或 RNA 酶 III（例如大肠杆菌 RNA 酶 III））将其消化成具有活性的 19 至 25 个核苷酸的 RNA 分子来加工 miR 前体。该具有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子也称为“已加工的”miR 基因转录物或“成熟的”miRNA。

[0055] 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 前体获得具有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子。应理解，还可通过生物或化学合成（而不用从 miR 前体加工），直接产生具有活性的 19-25 个核苷酸的 RNA 分子。当在本文中用名称提及微 RNA 时，该名称对应着前体和成熟形式，除非另有说明。

[0056] 本发明包括诊断受试者是否患有 AML 或处于发展 AML 的风险中的方法，该方法包括测量来自受试者的受试样品中至少一种 miR 基因产物的水平和将受试样品中的 miR 基因产物水平与对照样品中的相应 miR 基因产物水平相比较。如本文所使用的，“受试者”可以是患有或怀疑患有 AML 的任何哺乳动物。在一个优选的实施方案中，受试者是患有或怀疑患有 AML 的人。

[0057] 可在从受试者获得的生物样品的细胞中，测量至少一种 miR 基因产物的水平。例如，可通过常规的活组织检查技术，从怀疑患有 AML 的受试者中取出组织样品。在另一个实施方案中，可从受试者中取出血液样品，并且可通过标准技术分离白细胞以用于 DNA 提取。优选在开始放射疗法、化学疗法或其它疗法之前从受试者获得血液或组织样品。可从受试者的未受影响的组织、从正常人个体或正常群体的群体或从相应于受试者的样品的大部分细胞的培养细胞获得相应的对照组织或血液样品或对照参照样品。然后将对照组织或血液样品与来自受试者的样品一起进行处理，以便可将来自受试者的样品的细胞中给定的 miR 基因产生的 miR 基因产物的水平与来自对照样品的细胞的相应的 miR 基因产物的水平进行比较。可选地，可以从受试样品分开地得到和加工参照样品（例如，在不同时间），并且可以将来自受试样品的细胞中的给定的 miR 基因生成的 miR 基因产物的水平与来自参照样品的相应 miR 基因产物水平相对比。

[0058] 在一个实施方案中，受试样品中至少一种 miR 基因产物水平高于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平（即，miR 基因产物的表达“上调”）。如本文中所使用的，当来自受试者的细胞或组织样品中 miR 基因产物的量大于对照细胞或组织样品中相同基因产物的量时，miR 基因产物的表达“上调”。在另一个实施方案中，受试样品中至少一种 miR 基因产物水平低于对照样品中相应 miR 基因产物的水平（即，miR 基因产物的表达“下调”）。如本文中所使用的，当来自受试者的细胞或组织样品中的该基因产生的 miR 基因产物的量低于从对照细胞或组织样品中的相同基因产生的量时，miR 基因的表达“下调”。可根据一个或多个 RNA 表达标准确定对照和正常样品中相对 miR 基因表达。所述标准可包括例如 0miR 基因表达水平、标准细胞系中的 miR 基因表达水平、受试者的未受影响的组织中的 miR 基因表达水平或之前从正常人对照群体获得的 miR 基因表达的平均水平。

[0059] 与对照样品中相应的 miR 基因产物的水平相比，从受试者获得的样品中 miR 基因产物水平的改变（即增加或减少），指示受试者中存在 AML 癌。在一个实施方案中，受试样品中至少一种 miR 基因产物水平高于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平。在另一个实施方案中，受试样品中至少一种 miR 基因产物水平低于对照样品中相应的 miR 基因产物的

水平。

[0060] 在某个实施方案中,至少一种 miR 基因产物选自本文的表和图中所示的组。

[0061] 可使用适合用于检测生物样品中 RNA 表达水平的任何技术测量样品中 miR 基因产物的水平。适用于测定生物样品(例如,细胞,组织)中的 RNA 表达水平的技术(例如, RNA 印迹分析、RT-PCR、原位杂交)对于本领域技术人员来说是熟知的。在具体的实施方案中,使用 RNA 印迹分析检测至少一种 miR 基因产物的水平。例如,可通过在核酸提取缓冲液存在的情况下进行匀浆,接着进行离心来从细胞纯化总的细胞 RNA。沉淀核酸,然后通过用 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,并将其转移至硝酸纤维素滤器。然后通过加热将 RNA 固定在滤器上。使用适当标记的与所述 RNA 互补的 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, Chapter 7, 其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0062] 从本文表中提供的核酸序列,可以生成适用于特定 miR 基因产物的 RNA 印迹杂交的探针(例如, DNA 探针, RNA 探针),包括、但不限于,与目标 miR 基因产物具有至少约 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 互补性的探针,以及与目标 miR 基因产物具有完全互补性的探针。标记的 DNA 和 RNA 探针的制备方法和其与靶核苷酸序列杂交的条件,描述在 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook 等人, eds., 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Chapters 10 和 11, 其公开内容通过引用合并入本文。

[0063] 例如,可用例如放射性核素例如  $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{33}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$  或  $^{35}\text{S}$ 、重金属或能够用作已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、酶等来标记核酸探针。

[0064] 可通过 Rigby 等人 (1977), *J. Mol. Biol.* 113:237-251 的切口平移法或 Fienberg 等人 (1983), *Anal. Biochem.* 132:6-13 的随机引物法(其全部公开内容通过引用合并入本文)将探针标记至高比放射性(specific activity)。后者是选择用于从单链 DNA 或从 RNA 模板合成高比放射性的  $^{32}\text{P}$ - 标记的探针的方法。例如,按照切口平移法通过用高放射性的核苷酸置换预先存在的核苷酸,可能制备具有大大超过  $10^8$  cpm/微克的比放射性的  $^{32}\text{P}$ - 标记的核酸探针。然后可通过将杂交滤器暴露于照相胶片来进行杂交的放射自显影检测。暴露于杂交滤器的照相胶片的光密度扫描提供了 miR 基因转录物水平的精确测量。使用另一个方法,可通过计算机化的成像系统例如可从 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 获得的 Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager 定量 miR 基因转录物水平。

[0065] 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类似物例如 dTTP 类似物 5-(N-(N-生物素基- $\epsilon$ -氨基己酰基)-3-氨基烯丙基)脱氧尿苷三磷酸掺入探针分子。可通过与结合生物素的蛋白质例如偶联至荧光染料或产生颜色反应的酶的抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和抗体(例如抗生物素抗体)反应来检测生物素化的探针寡核苷酸。

[0066] 除了 Northern 和其它 RNA 杂交技术外,可使用原位杂交技术来测定 RNA 转录物的水平。该技术需要比 Northern 印迹技术更少的细胞,其包括将整个细胞置于显微镜盖玻片上和用含有放射性标记的或另外标记的核酸(例如, cDNA 或 RNA) 探针的溶液探测细胞的核

酸含量。该技术特别适合用于分析来自受试者的组织活组织检查样品。原位杂交技术的实施在美国专利 5,427,916(其全部公开内容通过引用合并入本文)中进行了更详细的描述。用于给定的 miR 基因产物的原位杂交的合适的探针可从本文表中提供的核酸序列生产,包括、但不限于,与目标 miR 基因产物具有至少约 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% 或 99% 互补性的探针,以及与目标 miR 基因产物具有完全互补性的探针,如上所述。

[0067] 细胞中 miR 基因转录物的相对数目还可通过对 miR 基因转录物进行逆转录,然后通过聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增经逆转录的转录物来进行测定。可通过与内部标准例如存在于相同样品中的来自“持家”基因的 mRNA 的水平相比较来定量 miR 基因转录物的水平。用作内部标准的合适的“持家”基因包括例如,肌球蛋白或甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (G3PDH)。用于定量和半-定量 RT-PCR 和其变型的方法是本领域技术人员众所周知的。

[0068] 在一些情况下,可能期望同时测定样品中多个不同 miR 基因产物的表达水平。在其它情况下,可能期望测定与癌症关联的所有已知 miR 基因的转录物的表达水平。评估数百种 miR 基因或基因产物的癌症特异性表达水平非常费时,并且需要大量的总 RNA(例如,对于每一个 Northern 印迹需要至少 20  $\mu$ g) 和需要放射性同位素的放射自显影技术。

[0069] 为了克服这些限制,可构建以微芯片形式(即,微阵列)存在的寡核苷酸文库,该文库包含一组特异于一组 miR 基因的寡核苷酸(例如,寡脱氧核苷酸)探针。使用该微阵列,可通过逆转录 RNA 以产生一组靶寡脱氧核苷酸,将它们与微阵列上的探针寡核苷酸杂交以产生杂交谱或表达谱,来测定生物样品中多个微 RNA 的表达水平。然后将受试样品的杂交谱与对照样品的杂交谱比较,从而确定在 AML 癌细胞中具有改变的表达水平的微 RNA。如本文中所使用的,“探针寡核苷酸”或“探针寡脱氧核苷酸”是指能够与靶寡核苷酸杂交的寡核苷酸。“靶寡核苷酸”或“靶寡脱氧核苷酸”是指待检测(例如,通过杂交)的分子。“miR-特异性探针寡核苷酸”或“特异于 miR 的探针寡核苷酸”是指具有选择用于与特定 miR 基因产物或特定 miR 基因产物的逆转录物杂交的序列的探针寡核苷酸。

[0070] 特定样品的“表达谱”或“杂交谱”本质上是样品的状态指纹;虽然两种状态可能具有相似表达的任何特定基因,但同时评价大量基因允许产生对于细胞的状态是独特的基因表达谱。即,正常组织可与 AML 细胞相区别,并且在 AML 细胞内,可确定不同的预后状态(例如,良好的或不良的长期存活希望)。通过比较不同状态中 AML 细胞的表达谱,获得关于在这些状态的每一个状态中为重要的基因的信息(包括基因的上调或下调)。在 AML 细胞或正常细胞中差异表达的序列的鉴定以及导致不同预后结果的差异表达允许以许多方法使用该信息。例如,可评估特定的治疗方案(例如,确定化疗药物是否改善特定患者的长期预后)。类似地,可通过将患者样品与已知的表达谱比较来进行或确认诊断。此外,这些基因表达谱(或个体基因)允许筛选抑制 AML 表达谱或将不良预后谱转变成更好的预后谱的药物候选物。

[0071] 因此,本发明提供了诊断受试者是否患有 AML 或处于发展 AML 的风险中的方法,该方法包括逆转录获自受试者的受试样品的 RNA 以提供一组靶寡脱氧核苷酸,将靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA-特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供受试样品的杂交谱,并将受试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱比较,其中至少一种 miRNA 的信号的改变表示受试者患有 AML 或处于发展 AML 的风险中。在一个实施方案中,微阵列包含针对所有已知的人 miRNA 的大部分的 miRNA-特异性探针寡核苷酸。

[0072] 在一个具体实施方案中,微阵列包含针对选自下述的一种或多种 miRNA 的 miRNA- 特异性探针寡核苷酸:图 5-6、8-18 和 21(表 1-2,5-15 和 18) 的任一个中所示的 miRNA。在一个实施方案中,至少一种 miR 基因产物选自: miR-20, miR-25, miR-191, miR-199a, 和 miR-199b 和其组合。

[0073] 可从基因特异性寡核苷酸探针(所述探针从已知的 miRNA 序列产生)制备微阵列。对于各 miRNA,阵列可包含两种不同的寡核苷酸探针,一种探针包含活性成熟序列,而另一种探针特异于 miRNA 的前体。阵列还可包含可用作杂交严格条件的对照的对照,例如与人直系同源物只相异于少数几个碱基的一个或多个小鼠序列。还可将来自两个物种的 tRNA 和其它 RNA(例如, rRNA, mRNA) 印制在微芯片上,从而为特异性杂交提供内部的、相对稳定的阳性对照。还可将用于非特异性杂交的一个或多个合适的对照包含在微芯片上。为了该目的,基于与任何已知的 miRNA 不存在任何同源性选择序列。

[0074] 可使用本领域内已知的技术制备微阵列。例如,在位置 C6 上对合适长度例如 40 个核苷酸的探针寡核苷酸进行 5' - 胺修饰,并且使用可商购获得的微阵列系统例如 GeneMachine OmniGrid™ 100Microarrayer 和 Amersham CodeLink™ 活化的载玻片进行印制。通过用标记的引物逆转录靶 RNA 来制备相应于靶 RNA 的标记的 cDNA 寡聚物。在第一链合成后,使 RNA/DNA 杂交物变性以降解除 RNA 模板。然后将所制备的标记的靶 cDNA 在杂交条件(例如在 25°C 下于 6X SSPE/30% 甲酰胺中进行 18 小时,然后在 37°C 下于 0.75X TNT 中清洗 40 分钟)下与微阵列芯片杂交。在阵列上的其中固定的探针 DNA 识别样品中的互补靶 cDNA 的位置上,发生杂交。标记的靶 cDNA 标记阵列上的其中发生结合的确切位置,从而允许自动检测和定量。输出信号由一系列杂交事件组成,其标示了特定 cDNA 序列的相对丰度,从而标示了患者样品中相应的互补 miR 的相对丰度。根据一个实施方案,标记的 cDNA 寡聚物是从生物素标记的引物制备的生物素标记的 cDNA。然后通过使用例如链霉抗生物素蛋白 -Alexa647 缀合物直接检测包含生物素的转录物来处理微阵列,和使用常规扫描方法扫描微阵列。阵列上的各点的图像强度与患者样品中相应的 miR 的丰度成比例。

[0075] 使用阵列对于 miRNA 表达的检测具有几个有利方面。第一,可在一个时间点上鉴定同一样品中的数百个基因的整体表达。第二,通过寡核苷酸探针的仔细设计,可鉴定成熟分子和前体分子的表达。第三,与 Northern 印迹分析相比,芯片需要少量 RNA,并且使用 2.5 μg 总 RNA 可提供可重现的结果。数目相对有限的 miRNA(每物种数百个)允许对数个物种构建共同的微阵列,其中对每一物种使用不同的寡核苷酸探针。这样的工具允许分析各已知的 miR 在不同条件下的跨物种表达。

[0076] 除了用于特定 miR 的定量表达水平测定外,包含相应于 miRNome 的大部分(优选整个 miRNome)的 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微芯片可用于进行 miR 基因表达谱分析,以分析 miR 的表达模式。可使不同的 miR 特征与已建立的疾病标记关联或直接与疾病状态关联。

[0077] 按照本文中描述的表达谱分析法,对来自怀疑患有癌症(例如 AML)的受试者的样品的总 RNA 进行定量逆转录以提供一组与样品中的 RNA 互补的标记的靶寡脱氧核苷酸。然后将靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交,从而提供样品的杂交谱。结果是显示样品中 miRNA 的表达模式的样品的杂交谱。杂交谱包括来自靶寡脱氧核苷酸(其来自样品)与微阵列中的 miRNA- 特异性探针寡核苷酸结合的信号。所述谱可

记录为结合的存在或不存在（信号对 0 信号）。更优选地，记录的谱包括来自各杂交的信号强度。将所述谱与从正常的（例如非癌的）对照样品产生的杂交谱相比较。信号的改变表示受试者中存在癌症或发展癌症的倾向。

[0078] 用于测量 miR 基因表达的其它技术也在本领域技术人员的能力之内，其包括用于测量 RNA 转录和降解的速率的各种方法。

[0079] 本发明也提供了测定具有 AML 癌的受试者的预后的方法，其包括，测量来自受试者的受试样品中至少一种 miR 基因产物的水平（其与 AML 的特定预后例如好的或积极的预后、差的或不利的预后相关）。根据这些方法，与对照样品中相应的 miR 基因产物的水平相比，受试样品中与特定预后相关的 miR 基因产物水平的改变，指示受试者患有具有特定预后的 AML。在一个实施方案中，miR 基因产物与不利（即，差）预后相关。不利预后的实例包括、但不限于，低存活率和疾病快速进展。

[0080] 在某些实施方案中，这样测量至少一种 miR 基因产物的水平，即通过逆转录获自受试者的受试样品的 RNA 以提供一组靶寡脱氧核苷酸，将该靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交，从而提供受试样品的杂交谱，然后将受试样品的杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较来进行测量。

[0081] 不希望受任何理论束缚，据信，细胞中一种或多种 miR 基因产物水平的改变可导致这些 miR 的一种或多种预期的靶失调，这可导致 AML 形成。因此，改变 miR 基因产物水平（例如，通过减少在 AML 癌细胞中上调的 miR 的水平，通过增加在 AML 癌细胞中下调的 miR 的水平）可成功地治疗 AML 癌。

[0082] 因此，本发明包括治疗受试者的 AML 的方法，其中至少一种 miR 基因产物在受试者的细胞（例如，AML 癌细胞）中失调（例如，下调、上调）。在一个实施方案中，受试样品（例如，AML 癌样品）中的至少一种 miR 基因产物的水平大于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平。在另一个实施方案中，受试样品（例如，AML 癌样品）中的至少一种 miR 基因产物的水平小于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平。当至少一种分离的 miR 基因产物在 AML 癌细胞中下调时，该方法包括施用有效量的该至少一种分离的 miR 基因产物或其分离的变体或生物学活性片段，从而抑制受试者中癌细胞的增殖。例如，当 miR 基因产物在受试者的癌细胞中下调时，对受试者施用有效量的分离的 miR 基因产物，可以抑制癌细胞的增殖。对受试者施用的分离的 miR 基因产物可以与在癌细胞中下调的内源野生型 miR 基因产物（例如，本文表中所示的 miR 基因产物）相同，或可以是其变体或生物学活性片段。

[0083] 如本文定义的，miR 基因产物的“变体”是指与对应的野生型 miR 基因产物具有小于 100% 同一性且具有对应的野生型 miR 基因产物的一种或多种生物学活性的 miRNA。这样的生物学活性的实例包括、但不限于，抑制靶 RNA 分子的表达（例如，抑制靶 RNA 分子的翻译，调控靶 RNA 分子的稳定性，抑制靶 RNA 分子的加工）和抑制与 AML 有关的细胞过程（例如，细胞分化，细胞生长，细胞死亡）。这些变体包括物种变体和由于 miR 基因中的一个或多个突变（例如，置换，缺失，插入）产生的变体。在某些实施方案中，变体与对应的野生型 miR 基因产物具有至少约 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、或 99% 同一性。

[0084] 如本文定义的，miR 基因产物的“生物学活性片段”是指具有对应的野生型 miR 基因产物的一种或多种生物学活性的 miR 基因产物的 RNA 片段。如上所述，这样的生物学活性的实例包括、但不限于，抑制靶 RNA 分子的表达和抑制与 AML 有关的细胞过程。在某些实施

方案中,生物学活性片段的长度是至少约 5, 7, 10, 12, 15, 或 17 个核苷酸。在一个具体实施方案中,可以将分离的 miR 基因产物与一种或多种其它抗癌治疗组合地施用给受试者。合适的抗癌治疗包括、但不限于,化疗,放疗,和其组合(例如,放化疗(chemoradiation))。

[0085] 当至少一种分离的 miR 基因产物在癌细胞中上调时,该方法包括给受试者施用有效量的抑制至少一种 miR 基因产物的表达的化合物,从而抑制 AML 癌细胞的增殖。这样的化合物在本文中称作抑制 miR 基因表达的化合物。合适的抑制 miR 基因表达的化合物的实例包括、但不限于,本文所述的那些(例如,双链 RNA,反义核酸和酶促 RNA 分子)。在一个具体实施方案中,可以将抑制 miR 基因表达的化合物与一种或多种其它抗癌治疗组合地施用给受试者。合适的抗癌治疗包括、但不限于,化疗,放疗,和其组合(例如,放化疗)。

[0086] 在一个特定实施方案中,在 AML 癌中失调的分离的 miR 基因产物选自:图 5-6, 8-18 和 21(表 1-2, 5-15 和 18)的任一个中所示的 miRNA。

[0087] 在一个具体实施方案中,至少一种 miR 基因产物选自:miR-20, miR-25, miR-191, miR-199a, 和 miR-199b 和其组合。

[0088] 如本文中所使用的,术语“治疗”、“医治”和“疗法”是指改善与疾病或病况例如 AML 癌相关的症状,包括预防或延迟疾病症状的发作,和/或减少疾病或病况的症状的严重程度或频率。术语“受试者”和“个体”在本文中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、小鼠或其它牛科、羊科、马科、犬科、猫科、啮齿目或鼠科物种。在优选实施方案中,动物是人。

[0089] 如本文中所使用的,分离的 miR 基因产物的“有效量”是足以在患有 AML 癌的受试者中抑制癌细胞增殖的量。通过考虑因素例如受试者的大小和体重、疾病侵入的程度、受试者的年龄、健康和性别、施用的途径以及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 miR 基因产物的有效量。

[0090] 例如,分离的 miR 基因产物的有效量可基于待治疗的肿瘤块的近似重量。通过计算块的近似体积,可以确定肿瘤块的近似重量,其中 1 立方厘米的体积大致相对于 1 克。基于肿瘤块的重量,分离的 miR 基因产物的有效量可以在约 10-500 微克/g 肿瘤块的范围内。在某些实施方案中,有效量可以是至少约 10 微克/g 肿瘤块,至少约 60 微克/g 肿瘤块或至少约 100 微克/g 肿瘤块。

[0091] 分离的 miR 基因产物的有效量也可基于待治疗的受试者的大致或估计的体重。优选,如本文中所描述的,胃肠外或肠内施用这样的有效量。例如,对受试者施用的分离的 miR 基因产物的有效量可在大约 5-3000 微克/kg 体重、大约 700-1000 微克/kg 体重的范围内或大于大约 1000 微克/kg 体重。

[0092] 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分离的 miR 基因产物的合适的给药方案。例如,可对受试者施用一次(例如,作为单次注射或沉积(deposition))miR 基因产物。或者,可以每天 1 次或 2 次对受试者施用 miR 基因产物,进行大约 3 至大约 28 天,特别地大约 7 至大约 10 天的时期。在特定的给药方案中,每天 1 次施用 miR 基因产物,进行 7 天。当给药方案包括多次施用时,应理解,对受试者施用的 miR 基因产物的有效量可包括在整个给药方案中施用的基因产物的总量。

[0093] 如本文中所使用的,“分离的”miR 基因产物是合成的或通过人工介入从天然状态改变或取出的 miR 基因产物。例如,合成的 miR 基因产物,或部分或完全从其天然状态的共存

材料分离的 miR 基因产物被认为是“分离的”。分离的 miR 基因产物可以以大体上纯化的形式存在,或可以存在于已将所述 miR 基因产物递送入其中的细胞中。因此,有意地被递送至细胞或在细胞中表达的 miR 基因产物被认为是“分离的”miR 基因产物。在细胞内从 miR 前体分子产生的 miR 基因产物也被认为是“分离的”分子。根据本发明,本文所述的分离的 miR 基因产物可以用于制备用于治疗受试者(例如,人)的 AML 癌的药剂。

[0094] 分离的 miR 基因产物可使用许多标准技术获得。例如,可使用本领域已知的方法化学合成或重组产生 miR 基因产物。在一个实施方案中,使用适当保护的核糖核苷亚磷酸酰胺和常规的 DNA/RNA 合成仪化学合成 miR 基因产物。合成的 RNA 分子或合成试剂的提供商包括例如 Proligo (Hamburg, Germany)、Dharmacon Research (Lafayette, CO, U. S. A.)、Pierce Chemical (part of Perbio Science, Rockford, IL, U. S. A.)、Glen Research (Sterling, VA, U. S. A.)、ChemGenes (Ashland, MA, U. S. A.) 和 Cruachem (Glasgow, UK)。

[0095] 或者,可使用任何合适的启动子从重组环形或线性 DNA 质粒表达 miR 基因产物。用于从质粒表达 RNA 的合适的启动子包括例如 U6 或 H1 RNA pol III 启动子序列或巨细胞病毒启动子。其它合适启动子的选择在本领域技术人员的能力之内。本发明的重组质粒还可包括用于在癌细胞中表达 miR 基因产物的诱导型或可调控的启动子。

[0096] 可通过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 基因产物递送至癌细胞并且在其中直接表达。下面更详细地论述重组质粒将 miR 基因产物递送至癌细胞的用途。

[0097] miR 基因产物可从分开的重组质粒表达,或它们可从相同的重组质粒表达。在一个实施方案中,miR 基因产物从单个质粒表达为 RNA 前体分子,然后通过合适的加工系统(包括但不限于癌细胞中现有的加工系统)将该前体分子加工成功能性 miR 基因产物。其它合适的加工系统包括例如体外果蝇细胞裂解物系统(例如,如属于 Tuschl 等人的美国公开专利申请 2002/0086356 中所描述的,其全部公开内容通过引用合并入本文)和大肠杆菌 RNA 酶 III 系统(例如,如属于 Yang 等人的美国公开专利申请 2004/0014113 中所描述的,其全部公开内容通过引用合并入本文)。

[0098] 适合用于表达 miR 基因产物的质粒的选择、用于将核酸序列插入质粒以表达基因产物的方法以及将重组质粒递送至目的细胞的方法在本领域技术人员的能力之内。参见,例如,Zeng 等人(2002),Molecular Cell 9:1327-1333;Tuschl(2002),Nat. Biotechnol, 20:446-448;Brummelkamp 等人(2002),Science 296:550-553;Miyagishi 等人(2002),Nat. Biotechnol. 20:497-500;Paddison 等人(2002),Genes Dev. 16:948-958;Lee 等人(2002),Nat. Biotechnol. 20:500-505;和 Paul 等人(2002),Nat. Biotechnol. 20:505-508,其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0099] 在一个实施方案中,表达 miR 基因产物的质粒包含在 CMV 立即早期启动子(intermediate-early promoter)控制下编码 miR 前体 RNA 的序列。如本文中所使用的,“在启动子的控制下”是指编码 miR 基因产物的核酸序列位于启动子的 3' 端,以便启动子可起始 miR 基因产物编码序列的转录。

[0100] miR 基因产物还可从重组病毒载体表达。预期 miR 基因产物可从两个分开的重组病毒载体或从相同的病毒载体表达。可通过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 或所述 RNA 可在癌细胞中直接表达。下面更详细地论述重组病毒载体将 miR 基因产物递送至癌细胞的用途。

[0101] 本发明的重组病毒载体包含编码 miR 基因产物的序列和用于表达 RNA 序列的任何合适的启动子。合适的启动子包括、但不限于 U6 或 H1 RNA pol III 启动子序列,或巨细胞病毒启动子。其它合适的启动子的选择在本领域技术人员的能力之内。本发明的重组病毒载体还可包含用于在癌细胞中表达 miR 基因产物的诱导型或可调控的启动子。

[0102] 可使用能够接受 miR 基因产物的编码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。可通过用来自其它病毒的包膜蛋白或其它表面抗原假型化载体或通过置换不同的病毒衣壳蛋白(如果合适)来改变病毒载体的趋向性。

[0103] 例如,可用来自水泡性口膜炎病毒(VSV)、狂犬病病毒(rabies)、埃博拉病毒(Ebola)、莫科拉病毒(Mokola)等的表面蛋白假型化本发明的慢病毒载体。可通过对载体进行工程改造以表达不同的衣壳蛋白血清型来制备本发明的 AAV 载体,使之靶向不同的细胞。例如,表达血清型 2 型基因组上的血清型 2 型衣壳的 AAV 载体称为 AAV 2/2。AAV 2/2 载体中的该血清型 2 型衣壳基因可用血清型 5 型衣壳基因替换,从而产生 AAV 2/5 载体。用于构建表达不同衣壳蛋白血清型的 AAV 载体的技术在本领域技术人员的能力之内;参见,例如,Rabinowitz, J. E., 等人(2002), *J. Virol.* 76:791-801, 其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0104] 适合用于本发明的重组病毒载体的选择、用于将用于表达 RNA 的核酸序列插入载体的方法、将病毒载体递送至目的细胞的方法和表达的 RNA 产物的回收在本领域技术人员的能力之内。参见,例如,Dornburg(1995), *Gene Therap.* 2:301-310; Eglitis(1988), *Biotechniques* 6:608-614; Miller(1990), *Hum. Gene Therap.* 1:5-14; 和 Anderson(1998), *Nature* 392:25-30, 其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0105] 特别合适的病毒载体是来源于 AV 和 AAV 的载体。用于表达 miR 基因产物的合适的 AV 载体、用于构建重组 AV 载体的方法以及用于将载体递送至靶细胞的方法描述于 Xia 等人(2002), *Nat. Biotech.* 20:1006-1010, 其全部公开内容通过引用合并入本文。用于表达 miR 基因产物的合适的 AAV 载体、用于构建重组 AAV 载体的方法以及用于将载体递送至靶细胞的方法描述于 Samulski 等人(1987), *J. Virol.* 61:3096-3101; Fisher 等人(1996), *J. Virol.* 70:520-532; Samulski 等人(1989), *J. Virol.* 63:3822-3826; 美国专利 5, 252, 479; 美国专利 5, 139, 941; 国际专利申请 WO 94/13788; 和国际专利申请 WO 93/24641, 其全部公开内容通过引用合并入本文。在一个实施方案中,从包含 CMV 立即早期启动子的单个重组 AAV 载体表达 miR 基因产物。

[0106] 在某些实施方案中,本发明的重组 AAV 病毒载体包含在人 U6RNA 启动子控制下的与 polyT 终止序列有效连接的编码 miR 前体 RNA 的核酸序列。如本文中所使用的,“与 polyT 终止序列有效连接”是指编码有义或反义链的核酸序列以 5' 方向与 polyT 终止信号紧密邻接。在从载体转录 miR 序列的过程中, polyT 终止信号用于终止转录。

[0107] 在本发明的治疗方法的其它实施方案中,可对受试者施用有效量的至少一种抑制 miR 表达的化合物。如本文中所使用的,“抑制 miR 表达”是指治疗后 miR 基因产物的前体和/或有活性的成熟形式的产量低于治疗前产生的量。通过使用例如本文讨论的测定 miR 转

录物水平的技术,本领域技术人员可容易地确定 miR 的表达在癌细胞中是否已被抑制。抑制可在基因表达的水平上(即,通过抑制编码 miR 基因产物的 miR 基因的转录)或在加工的水平上(例如,通过抑制 miR 前体至成熟的活性 miR 的加工)发生。

[0108] 如本文中所使用的,抑制 miR 表达的化合物的“有效量”是足以在患有癌症(例如,AML 癌)的受试者中抑制癌细胞的增殖的量。通过考虑因素,例如受试者的体重和体重、疾病侵入的程度、受试者的年龄、健康和性别、施用的途径以及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抑制 miR 表达的化合物的有效量。

[0109] 例如,抑制表达的化合物的有效量可基于待治疗的肿瘤块的近似重量,如本文所述。抑制 miR 表达的化合物的有效量也可基于待治疗的受试者的大致或估计的体重,如本文所述。

[0110] 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抑制 miR 表达的化合物的合适的给药方案,如本文所述。

[0111] 用于抑制 miR 基因表达的合适的化合物包括双链 RNA(例如短的或小干扰 RNA 或“siRNA”)、反义核酸和酶促 RNA 分子例如核酶。这些化合物中的每一种可被靶向给定的 miR 基因产物,并且干扰靶 miR 基因产物的表达(例如,通过抑制翻译,通过诱导切割和/或降解)。

[0112] 例如,给定的 miR 基因的表达可通过用分离的双链 RNA(“dsRNA”)分子诱导 miR 基因的 RNA 干扰来抑制,所述双链 RNA 分子与 miR 基因产物的至少一部分具有至少 90%、例如至少 95%、至少 98%、至少 99% 或 100% 的序列同源性。在具体的实施方案中,dsRNA 分子是“短的或小干扰 RNA”或“siRNA”。

[0113] 用于本方法的 siRNA 包括长度大约 17 个核苷酸至大约 29 个核苷酸、优选长度大约 19 至大约 25 个核苷酸的短双链 RNA。siRNA 包含通过标准 Watson-Crick 碱基配对相互作用(在下文中“碱基配对”)退火在一起的有义 RNA 链和互补反义 RNA 链。有义链包含与靶 miR 基因产物内包含的核酸序列大体上同一的核酸序列。

[0114] 如本文中所使用的,siRNA 中与靶 mRNA 内包含的靶序列“大体上同一”的核酸序列是与靶序列同一的核酸序列或与靶序列相异于 1 或 2 个核苷酸的核酸序列。siRNA 的有义和反义链可包括两个互补的单链 RNA 分子或可包括其中两个互补部分碱基配对并且通过单链“发夹结构”区域共价连接的单个分子。

[0115] siRNA 还可以是与天然存在的 RNA 相异于一个或多个核苷酸的添加、缺失、置换和/或改变的经改变的 RNA。这样的改变可包括非核苷酸材料的添加,例如至 siRNA 的末端或至 siRNA 的一个或多个内部核苷酸的添加,或使 siRNA 抵抗核酸酶降解的修饰或用脱氧核糖核苷酸对 siRNA 中的一个或多个核苷酸的置换。

[0116] siRNA 的一条或两条链还可包含 3' 突出端。如本文中所用的,“3' 突出端”是指从双链 RNA 链的 3' - 末端延伸的至少一个未配对的核苷酸。因此,在某些实施方案中,siRNA 包含至少一个长度为 1 至大约 6 个核苷酸(其包括核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)、长度为 1 至大约 5 个核苷酸、长度为 1 至大约 4 个核苷酸或长度为大约 2 至大约 4 个核苷酸的 3' 突出端。在具体的实施方案中,3' 突出端存在于 siRNA 的两条链上,且其长度为 2 个核苷酸。例如,siRNA 的各条链可包含二胸苷酸(“TT”)或二尿苷酸(“uu”)的 3' 突出端。

[0117] siRNA 可通过化学或生物方法产生,或可从重组质粒或病毒载体表达,如上文对分

离的 miR 基因产物所描述的。用于产生和检测 dsRNA 或 siRNA 分子的示例性方法描述于属于 Gewirtz 的美国公开专利申请 2002/0173478 和属于 Reich 等人的美国公开专利申请 2004/0018176, 二者的全部公开内容通过引用合并入本文。

[0118] 给定的 miR 基因的表达还可通过反义核酸抑制。如本文中所使用的,“反义核酸”是指通过 RNA-RNA 或 RNA-DNA 或 RNA-肽核酸相互作用与靶 RNA 结合的核酸分子,其改变靶 RNA 的活性。适合用于本方法的反义核酸是通常包含与 miR 基因产物中的连续核酸序列互补的核酸序列的单链核酸(例如, RNA、DNA、RNA-DNA 嵌合物、肽核酸(PNA))。反义核酸可包含与 miR 基因产物中的连续核酸序列 50-100% 互补、75-100% 互补或 95-100% 互补的核酸序列。本文表中提供了特定人 miR 基因产物的核酸序列。不希望受任何理论束缚,据信,反义核酸激活 RNA 酶 H 或降解 miR 基因产物/反义核酸双链体的另一种细胞核酸酶。

[0119] 反义核酸还可包含对核酸主链或对糖和碱基部分(或它们的等价物)的修饰,从而增加靶特异性、核酸酶抗性、递送或与分子的功效相关的其它性质。此类修饰包括胆固醇部分、双链体插入剂例如吡啶或一种或多种抗核酸酶基团。

[0120] 反义核酸可通过化学或生物方法产生,或可从重组质粒或病毒载体表达,如上文对分离的 miR 基因产物所描述的。用于产生和检测的示例性方法在本领域技术人员的能力之内;参见,例如,Stein 和 Cheng(1993), *Science* 261:1004 以及属于 Woolf 等人的美国专利 5,849,902,其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0121] 给定的 miR 基因的表达还可通过酶促核酸(enzymatic nucleic acid)抑制。如本文中所使用的“酶促核酸”是指包含与 miR 基因产物的连续核酸序列具有互补性的底物结合区并且能够特异性切割 miR 基因产物的核酸。酶促核酸底物结合区可以例如与 miR 基因产物中的连续核酸序列 50-100% 互补、75-100% 互补或 95-100% 互补。酶促核酸还可包括在碱基、糖和/或磷酸基团上的修饰。用于本方法的示例性酶促核酸是核酶。

[0122] 酶促核酸可通过化学或生物方法产生,或可从重组质粒或病毒载体表达,如上文对分离的 miR 基因产物所描述的。用于产生和检测 dsRNA 或 siRNA 分子的示例性方法描述于 Werner 和 Uhlenbeck(1995), *Nucl. Acids Res.* 23:2092-96; Hammann 等人(1999), *Antisense and Nucleic Acid Drug Dev.* 9:25-31; 以及属于 Cech 等人的美国专利 4,987,071,其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0123] 至少一种 miR 基因产物或至少一种用于抑制 miR 表达的化合物的施用将在患有癌症(例如, AML) 的受试者中抑制癌细胞的增殖。如本文中所使用的,“抑制癌细胞的增殖”是指杀死细胞或永久性或暂时地阻止或减缓细胞的生长。如果受试者中癌细胞的数目在施用 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物后保持恒定或减少,那么可推断癌细胞增殖被抑制。如果癌细胞的绝对数目增加但肿瘤生长的速度下降,则也可推断癌细胞增殖被抑制。

[0124] 受试者体内的癌细胞数目可通过直接测量或通过对于原发性或转移性肿瘤块的大小的估计来确定。例如,受试者中癌细胞的数目可通过免疫组织学方法、流式细胞术或经设计用于检测癌细胞的特征表面标记的其它技术来测量。

[0125] 可通过适合用于将此类化合物递送至受试者的癌细胞的任何方法来对受试者施用 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物。例如,可通过适合于用此类化合物或用包含编码此类化合物的序列的核酸转染受试者的细胞的方法来施用 miR 基因产物或抑制 miR

表达的化合物。在一个实施方案中,用包含编码至少一种 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物的序列的质粒或病毒载体转染细胞。

[0126] 用于真核细胞的转染方法在本领域内是熟知的,包括例如核酸至细胞的细胞核或前核 (pronucleus) 的直接注射、电穿孔、脂质体转移和由亲脂材料介导的转移、受体介导的核酸递送、基因枪或微粒加速、磷酸钙沉淀以及由病毒载体介导的转染。

[0127] 例如,细胞可用质脂体转移化合物例如 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) 或等价物例如 LIPOFECTIN 进行转染。使用的核酸的量对于实施本发明不是至关重要的;可接受的结果可用 0.1-100 微克核酸/ $10^5$  个细胞来获得。例如,可使用在 3 微克 DOTAP 中的大约 0.5 微克质粒载体/ $10^5$  个细胞的比例。

[0128] 还可通过任何合适的肠内或胃肠外施用途径对受试者施用 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物。用于本方法的合适的肠内施用途径包括例如口服、直肠或鼻内给药。合适的胃肠外施用途径包括例如血管内给药(例如,静脉内团注 (bolus injection)、静脉内输注、动脉内团注、动脉内输注和至脉管系统内的导管滴注);组织外周 (peri-tissue) 和组织内注射(例如,肿瘤外周和肿瘤内注射,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);对目的组织的直接施用,例如通过导管或其它安置装置(例如,视网膜丸剂 (retinal pellet) 或栓剂或包含多孔的、无孔的或凝胶状材料的植入物);以及吸入。特别合适的施用途径是注射、输注和直接注射进肿瘤。

[0129] 在本方法中,miR 基因产物或抑制 miR 基因产物表达的化合物可以作为裸 RNA、与递送试剂一起或作为包含表达 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物的序列的核酸(例如,重组质粒或病毒载体)对受试者进行施用。合适的递送试剂包括例如 Mirus Transit TKO 亲脂试剂、LIPOFECTIN、lipofectamine、cellfectin、聚阳离子(例如,多聚赖氨酸)和脂质体。

[0130] 本文中公开了和/或本领域熟知包含表达 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物的序列的重组质粒和病毒载体、以及用于将此类质粒和载体递送至癌细胞的技术。

[0131] 在具体的实施方案中,脂质体用于将 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物(或包含编码它们的序列的核酸)递送至受试者。脂质体还可增加基因产物或核酸的血液半衰期。可从标准的形成小囊泡的脂质形成用于本发明的合适的脂质体,所述脂质通常包括中性的或带负电荷的磷脂和固醇例如胆固醇。脂质的选择通常通过考虑因素例如期望的脂质体大小和脂质体在血流中的半衰期来进行指导。已知许多用于制备脂质体的方法,例如如 Szoka 等人 (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467; 和美国专利 4,235,871、4,501,728、4,837,028 和 5,019,369(其全部公开内容通过引用合并入本文)中所描述的方法。

[0132] 用于本方法的脂质体可包含将脂质体靶向癌细胞的配体分子。结合癌细胞中普遍的受体的配体例如结合肿瘤细胞抗原的单克隆抗体是优选的。

[0133] 用于本方法的脂质体还可进行修饰以避免被单核巨噬细胞系统 (“MMS”) 和网状内皮系统 (“RES”) 清除。此类经修饰的脂质体在表面具有调理作用 - 抑制部分或所述部分被整合入脂质体结构。在特别优选实施方案中,本发明的脂质体可包含调理作用 - 抑制

部分和配体。

[0134] 用于制备本发明的脂质体的调理作用 - 抑制部分通常是与脂质体膜结合的巨大的亲水聚合物。如本文中所使用的, 调理作用 - 抑制部分, 当其通过化学或物理方式 (例如通过将脂溶性锚嵌入膜本身或通过膜脂质的活性基团直接结合) 附着至膜时, 与脂质体膜“结合”。此类抑制调理作用的亲水聚合物形成了显著减少脂质体被 MMS 和 RES 吸收的保护性表面层; 例如, 如美国专利 4, 920, 016 中所描述的, 其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0135] 适合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) 或其衍生物; 例如甲氧基 PEG 或 PPG 以及 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、分支的或树枝状聚酰胺胺; 聚丙烯酸; 多元醇, 例如与羧基或氨基化学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 或其衍生物的共聚物也是合适的。此外, 抑制调理作用的聚合物可以是 PEG 和多聚氨基酸、多糖、聚酰胺胺、聚乙烯胺或多聚核苷酸的嵌段共聚物。抑制调理作用的聚合物还可以是包含氨基酸或羧酸的天然多糖, 例如半乳糖醛酸、葡糖醛酸、甘露糖醛酸、透明质酸、果胶酸、神经氨酸、褐藻酸、角叉菜胶 (carrageenan); 胺化的多糖或低聚糖 (线性或分支的); 或羧基化的多糖或低聚糖, 例如与具有所得的羧基的连接碳酸的衍生物反应的多糖或低聚糖。优选, 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”。

[0136] 可通过许多熟知的技术中的任一种将调理作用 - 抑制部分结合至脂质体膜。例如, 可将 PEG 的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯与磷脂酰乙醇胺脂质可溶性锚结合, 然后再与膜结合。类似地, 可使用 Na (CN) BH<sub>3</sub> 和溶剂混合物 (例如以 30:12 比例的四氢呋喃和水) 在 60°C 下通过还原胺化作用, 用硬脂酰胺脂质可溶性锚衍生葡聚糖 (dextran) 聚合物。

[0137] 用调理作用 - 抑制部分修饰的脂质体在循环中比未修饰的脂质体保持更长时间。因此, 此类脂质体有时称为“隐形 (stealth)”脂质体。已知隐形脂质体在通过多孔或“渗漏”微血管系统饲喂的组织中积累。因此, 由此类微血管系统缺陷表征的组织例如实体瘤 (例如, AML 癌) 将有效地积累这些脂质体; 参见 Gabizon, 等人 (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 18:6949-53。此外, 减少的通过 RES 的吸收通过阻止脂质体在肝和脾中的大量积累来降低隐形脂质体的毒性。因此, 用调理作用 - 抑制部分修饰的脂质体特别适合用于将 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物 (或包含编码它们的序列的核酸) 递送至肿瘤细胞。

[0138] 可在对受试者施用前, 按照本领域已知的技术将 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物配制为药物组合物, 有时称为“药剂”。因此, 本发明包括用于治疗 AML 癌的药物组合物。在一个实施方案中, 药物组合物包含至少一种分离的 miR 基因产物、或分离的其变体或生物学活性片段和药学上可接受的载体。在具体的实施方案中, 该至少一种 miR 基因产物相应于与适合的对照细胞相比在 AML 癌细胞中具有减少的表达水平的 miR 基因产物。

[0139] 在其它实施方案中, 本发明的药物组合物包括至少一种抑制 miR 表达的化合物。在具体的实施方案中, 至少一种抑制 miR 基因表达的化合物特异于其在 AML 癌细胞中的表

达高于对照细胞的 miR 基因。

[0140] 本发明的药物组合物表征为是至少无菌的和无热原的。如本文中所使用的,“药物组合物”包括用于人和兽医用途的制剂。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之内,例如在 Remington's Pharmaceutical Science, 第 17 版, Mack Publishing Company, Easton, PA. (1985) 中所描述的,其全部分公开内容通过引用合并入本文。

[0141] 本药物组合物包含与药学上可接受的载体混合的至少一种 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物(或至少一种包含编码 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物的序列的核酸)(例如,按重量计算 0.1 至 90%)或其生理上可接受的盐。在某些实施方案中,本发明的药物组合物另外包含一种或多种抗癌剂(例如,化疗剂)。本发明的药物制剂还可包含由脂质体封装的至少一种 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物(或至少一种包含编码 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物的序列的核酸)和药学上可接受的载体。在一个实施方案中,所述药物组合物包含其不是 miR-15, miR-16, miR-143 和 / 或 miR-145 的 miR 基因或基因产物。

[0142] 特别适合的药学上可接受的载体是水、缓冲水溶液、常用盐溶液、0.4% 的盐溶液、0.3% 的甘氨酸、透明质酸等。

[0143] 在具体的实施方案中,本发明的药物组合物包含抗核酸酶降解的至少一种 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物(或至少一种包含编码 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物的序列的核酸)。本领域技术人员可以例如通过将一个或多个在 2' - 位置被修饰的核糖核苷酸掺入 miR 基因产物来容易地合成具有核酸酶抗性的核酸。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。

[0144] 本发明的药物组合物还可包含常规药物赋形剂和 / 或添加剂。合适的药物赋形剂包括稳定剂、抗氧化剂、重量摩尔渗透压浓度调节剂、缓冲剂和 pH 调节剂。合适的添加剂包括例如生理上生物相容性缓冲剂(例如,氨丁三醇盐酸盐)、螯合剂(例如, DTPA 或 DTPA- 双酰胺)或钙螯合络合物(例如,钙 DTPA、CaNaDTPA- 双酰胺)的添加或任选地,钙或钠盐(例如,氯化钙、抗坏血酸钙、葡萄糖酸钙或乳酸钙)的添加。本发明的药物组合物可以以液体形式包装使用或可以进行冻干。

[0145] 对于本发明的固体药物组合物,可使用常规无毒性的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。

[0146] 例如,用于口服施用的固体药物组合物可包含上文所列的任何载体和赋形剂以及 10-95%, 优选 25% -75% 的至少一种 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物(或至少一种包含编码它们的序列的核酸)。用于气雾剂(吸入)施用的药物组合物可包含按重量计算 0.01-20%, 优选 1% -10% 的封装在上文所述的脂质体中的至少一种 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物(或至少一种包含编码 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物的序列的核酸)和喷射剂。还可如所期望的包含载体例如卵磷脂以用于鼻内递送。

[0147] 本发明的药物组合物还可以包含一种或多种抗癌剂。在一个具体实施方案中,所述组合物包含至少一种 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物(或至少一种包含编码 miR 基因产物或抑制 miR 基因表达的化合物的序列的核酸)和至少一种化疗剂。适用于本

发明方法的化疗剂包括、但不限于，DNA-烷化剂，抗肿瘤抗生素，抗代谢剂，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，胱天蛋白酶抑制剂，金属蛋白酶抑制剂，反义核酸，三螺旋 DNA，核酸适配体，和分子上修饰的病毒、细菌和外毒素剂。适用于本发明组合物的试剂的实例包括、但不限于，胞苷阿拉伯糖苷，甲氨蝶呤，长春新碱，依托泊苷 (VP-16)，多柔比星 (阿霉素)，顺铂 (CDDP)，地塞米松，arglabin，环磷酰胺，沙可来新，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，伊立替康，托泊替康，亚叶酸，卡莫司汀，链佐星，CPT-11，紫杉酚，他莫昔芬，达卡巴嗪，利妥昔单抗，柔红霉素，1-β-D-阿糖呋喃糖胞嘧啶 (1-β-D-arabinofuranosylcytosine)，伊马替尼，氟达拉滨，多西他赛和 FOLFOX4。

[0148] 本发明还包括鉴定抗 AML 癌试剂的方法，该方法包括给细胞提供受试试剂和测量细胞中至少一种 miR 基因产物的水平。在一个实施方案中，该方法包括给细胞提供受试试剂和测量与 AML 癌细胞中减少的表达水平关联的至少一种 miR 基因产物的水平。与合适的对照 (例如，对照细胞中 miR 基因产物的水平) 相比，细胞中 miR 基因产物水平的增加指示受试试剂为抗 AML 癌试剂。

[0149] 在一个具体实施方案中，与 AML 癌细胞中降低的表达水平有关的至少一种 miR 基因产物选自：图 5-6, 8-18 和 21 (表 1-2, 5-15 和 18) 的任一个中所示的 miRNA 和其组合。

[0150] 在其它实施方案中，该方法包括给细胞提供受试试剂和测量与 AML 癌细胞中增加的表达水平关联的至少一种 miR 基因产物的水平。与合适的对照 (例如，对照细胞中 miR 基因产物的水平) 相比，细胞中 miR 基因产物水平的降低指示受试试剂为抗 AML 癌试剂。

[0151] 在一个具体实施方案中，与 AML 癌细胞中增加的表达水平有关的至少一种 miR 基因产物选自：miR-20, miR-25, miR-191, miR-199a5 和 miR-199b 和其组合。

[0152] 合适的试剂包括但不限于药物 (例如，小分子、肽) 和生物大分子 (例如，蛋白质、核酸)。试剂可通过重组、合成产生，或其可从天然来源分离 (即，纯化)。用于给细胞提供此类试剂的各种方法 (例如，转染) 在本领域内是熟知的，并且在上文中描述了几种此类方法。用于检测至少一种 miR 基因产物的表达的方法 (例如，RNA 印迹、原位杂交、RT-PCR、表达谱分析) 在本领域内也是熟知的。本文也描述了这些方法中的几种。

[0153] 现将通过下列非限定性实施例来说明本发明。

## 实施例

### [0154] 方法

[0155] 患者和细胞样品。根据惯例指南 (institutional guideline) 签署知情同意后，从在 MD Anderson Cancer Center 的 Cell and Tissue Bank (n = 202) 和 Thomas Jefferson University (n = 10)，得到 158 份来自新诊断的 AML 患者的白血病样品和 54 份来自处于复发 (34) 或患有难治病 (20) 的 AML 患者的样品 (图 4 (表 1))。

[0156] 收集骨髓或外周血样品，通过 Ficoll-Hypaque (Nygaard) 梯度离心来制备，并冷藏保存。如前所述<sup>16</sup>，进行样品的细胞遗传分析。用于描述细胞遗传克隆和核型的标准遵循人细胞遗传命名法国际系统 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) 的推荐<sup>17</sup>。使用 36 位 AML 患者的独立组，使用 qRT-PCR 验证微阵列内的

miRNA 特征 (图 4(表 1))。通过骨髓抽吸物中 <5% 的母细胞的存在、绝对外周嗜中性粒细胞数  $>1 \times 10^9/l$  和血小板  $>100 \times 10^9/l$ , 定义完全缓解 (CR)。

[0157] 除了 CD34+ (10 位供体) 以外, 从 Allcells 购买外周血成熟粒细胞和单核细胞、骨髓 CD71+ 选择的红细胞前体和来自 4 位健康供体的 CD34+ 细胞。如前所述<sup>18</sup>, 得到体外分化的巨核细胞。

[0158] RNA 提取和 miRNA 微阵列实验。

[0159] 如别处详细描述<sup>19</sup>, 进行 RNA 提取和 miRNA 微芯片实验。简而言之, 使来自 176 位 AML 患者的 5ug 总 RNA 一式四份地与对应于 250 个人成熟和前体 miRNA 的探针 (如 2005 年 11 月 miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk>) 所述)<sup>20</sup> 杂交。

[0160] 微 RNA 的实时定量。

[0161] 选择如前所述<sup>21</sup> 的使用 PCR 9700 Thermocycler ABI Prism7900HT 和序列检测系统 (Applied Biosystems) 的单管 TaqMan miRNA, 因为它在微阵列患者数据集中具有最小的表达变异性。一式三份地进行对比实时 PCR, 包括无模板对照。使用比较  $C_t$  方法, 计算相对表达。

[0162] 数据分析。

[0163] 使用 GENEPIX PRO 分析微阵列图像。当测得在至少 10% 样品中存在时, 将每个 miRNA 的重复点的平均值减去背景, 进行  $\log_2$  转化, 标准化, 并保持在表达表中。针对印制在芯片上的散布于 miRNA 探针中的一组持家基因 (图 7(表 4)) 进行标准化。在两类的对比 (即, CD34 对 AML) 中, 使用在微阵列显著性分析 (SAM) 内的检验程序<sup>22</sup>, 鉴别出差异表达的 miRNA。SAM 在相对于所有测量的标准偏差的表达变化的基础上, 计算每个基因的评分。由于这是多重检验, 进行排列来计算假发现率 (false discovery rate) (FDR) 或  $q$ -值。将具有小于 5% 的 FDR 和超过 2 的变化倍数的 MiRNA 考虑用于进一步分析。使用 MIAMEExpress, 将所有数据呈递给 Array Express 数据库 (登记号未定)。

[0164] 统计分析。

[0165] 使用 Fisher 精确检验 (Fisher's exact test)、 $t$  检验和卡方检验 (chi-square) 来对比患者组之间的基线特征和平均 miRNA 表达。所有报道的  $P$  值是双侧的并且通过使用 SPSS 软件包 (SPSS 10.0) 得到。计算从诊断时直到最后一次随访时的总存活率, 并计算从诊断时直到复发或死亡的无事件存活率 (event-free survival) (EFS)。检查在最后一次随访时存活的数据。为了进行存活和建立 Kaplan-Meier (KM) 图, 通过将样品分成 2 类 (高和低表达, 根据整组样品中的中值 (median) 表达), 将通过 qRT-PCR 和在芯片上测量的 miRNA 水平转化成离散变量。得到每个组的存活曲线, 并通过使用时序检验进行对比。还报道了从 KM 方法得到的具有 95% 置信区间的危害比。

[0166] 靶预测和微阵列验证

[0167] 数据验证。为了验证微阵列数据, 使用在 10 位患者中的 42 个 miRNA 测量, 使用 Pearson 关联和线性回归分析 (SPSS 软件)。这些函数检查每对测量 (一个来自芯片, 另一个来自 RT-PCR), 以确定两个变量是否倾向于一起移动, 即来自芯片的大  $r$  值 (高表达) 是否与来自 qRT-PCR 的低值 ( $\delta Ct$ ) 相关。预期负相关, 因为 qRT-PCR 值 ( $\delta Ct$ ) 反比于 miRNA 的表达水平。使用芯片和 qRT-PCR miRNA 测量值的  $\log$  值。

[0168] 靶预测。使用 TARGETSCAN<sup>32</sup> ([www.genes.mit.edu/targetscan](http://www.genes.mit.edu/targetscan)) 和 PICTAR<sup>33</sup> ([www.](http://www.)



pictar.bio.nyu.edu), 在计算机上预测微 RNA 靶, 所述两个数据库都预测保守的 3' UTR miRNA 靶。

[0169] 结果

[0170] AML 患者显示出与正常 CD34+ 祖细胞相比不同的 miRNA 表达谱。

[0171] 作为理解 miRNA 在 AML 发病机理中的可能作用的第一步, 我们使用 miRNA 微阵列平台<sup>19</sup>, 分析了 122 个新诊断的 AML 患者样品和来自 10 个不同供体的 CD34+ 细胞中的 miRNA 表达 (图 4(表 1) 中的临床数据)。SAM 仅鉴别出与 CD34+ 细胞相比在 AML 样品中下调的 miRNA (表 S2, 支持信息)。我们使用 qRT-PCR 证实了许多这些差异表达的 miRNA (图 1A)。另外, 为了验证微阵列平台, 我们对在芯片上高、中等和低表达的 miRNA 进行 qRT-PCR。如图 1B 所示, 通过微阵列或 qRT-PCR 测得的 miRNA 水平非常一致, 2 个平台的测量值之间存在非常显著的关联 ( $r = 0.88, p < 0.001$ )。

[0172] miRNA 特征与造血分化和 FAB 分类相关联

[0173] 已经显示, miRNA 表达提示肿瘤的造血发育谱系和分化阶段<sup>11</sup>。由于不同的谱表征 AML 患者中的正常和恶性细胞, 我们通过 qRT-PCR 测定 AML 样品和人造血细胞组 (包括成熟的粒细胞和单核细胞, 以及红细胞和巨核细胞前体) 中的 CD34+ 细胞之间最差异表达的 miRNA 的表达模式。许多在 AML 中下调的 miRNA 也在成熟和前体造血细胞中下调 (图 1C 和 3A)。2 个近期的研究已经描述了在 CD34+ 细胞体外分化成几个谱系的过程中 miRNA 普遍下调<sup>18,23</sup>。这些结果暗示, 白血病中 miRNA 的子集紧密遵循正常造血中 miRNA 表达的分化模式。如果 miRNA 反映白血病患者中的细胞分化阶段, 那么它们也应与 AML 的法-美和英 (FAB) 分类相关<sup>24</sup>, 所述分类基于细胞形态学和免疫表型, 二者都与白血病的分化阶段密切相关。实际上, 我们鉴别出与 FAB 分类有关的特征 (图 9-12, 表 6-9)。在 FAB M0-M1 内, 我们鉴别出几个 miR-181 家族成员, 以及在 CD34+ 细胞中高表达的其它 miRNA, 这暗示表达谱与干细胞的表达谱更接近 (图 9(表 6))。miR-181b 的表达实际上在来自所有谱系的成熟的和定向的前体造血细胞中下调 (图 3A), 并且在最分化的白血病如 FAB M6-M7 中观察到类似的结果 (图 1D)。

[0174] MiRNA 与白细胞和母细胞计数正相关

[0175] 我们然后研究了 miRNA 是否与治疗前患者特征例如年龄、性别、白细胞 (WBC) 计数、骨髓或外周血母细胞百分比相关。我们检测到几种 miRNA (包括 miR-155, miR-30b, miR-30c, miR-25 和 miR-181b) 与白细胞计数、外周血和骨髓母细胞百分比正相关 (图 13(表 10))。

[0176] 微 RNA 特征与定义的细胞遗传亚组相关。

[0177] 为了鉴别与 AML 中的已知的细胞遗传异常情况相关的 miRNA, 我们使用 SAM 内的排列校正的 t 检验, 研究了 116 个 AML 样品, 所述样品具有至少 20 个中期 (通过常规核型分析)。这些数据总结在图 5(表 2) 中。

[0178] 具有正常核型的 AML。

[0179] 我们鉴别出将具有正常核型的 AML 病例与具有异常核型的所有其它 AML 病例区分开的特征 (图 14(表 11), 图 3B)。在上调的基因中, miR 位于 HOX 基因簇内, 已经证实其在具有正常核型 6 的 AML 中过表达 (图 1E, 图 5(表 2))。更具体地, 已经证实, Hox 内含的 miRNA 如 miR-10a 和 miR-196b 靶向几个 Hox 基因, 这揭示该转录因子家族的复杂调节层<sup>18</sup>。

25

[0180] 2项以前的研究鉴别出正常核型AML样品中DNA甲基转移酶基因DNMT3A和3B的高水平表达,这暗示异常甲基化在该亚型的发病机理中的潜在作用<sup>5 6</sup>。有趣地,在正常核型组的下调的miRNA中,存在预测靶向DNMT3A的2种miRNA(miR-200c和miR-182)和miR-(推测其靶向DNMT3B)。因而,这些miRNA的下调可能促成两种DNMT3基因在正常核型AML细胞中的过表达。

[0181] 11q23异常情况

[0182] 在具有t(9;11)[5]和t(6;11)[4]的患者中下调的基因中(图15(表12)),预测许多基因靶向已经描述成在该组患者中过表达且与预后不良有关的Hox基因,即HOXA9(1et7f),HOSA10(iR-15a),PBX3(let07f,miR-15a和miR-196b)和MEISI(miR-331)<sup>6</sup>(图15(表12))。同样地,预测在该组中也下调的miR-29家族的成员靶向抗细胞凋亡的MCL1基因。

[0183] 复杂的核型

[0184] 具有3种或更多种细胞遗传学异常情况的样品共有—个共同的特征,其包括miR-126、miR-26a、miR-34b、miR-30c和miR-301作为该组的最具差别的基因(图16(表13))。同样地,在分离地缺失染色体7的患者中,miR-126被上调(表S11)。有趣地,该miRNA在CD34+干细胞中高表达,且在其它AML(具有复杂核型的那些除外)中下调。使用qRT-PCR,在具有复杂(N=6)和非复杂的细胞遗传异常情况(N=22)的AML患者独立组中证实了这些结果(图1F)。

[0185] 三体性8

[0186] 使用SAM得到的特征在具有分离的三体性8的患者样品中鉴别出许多上调的miRNA(图18(表15))。在上调的miRNA中,miR124a和miR-30d分别位于8p21和8q23,这表明基因剂量效应可能在这些miRNA的上调中起作用。

[0187] 复发的AML患者中的微RNA表达

[0188] 使用我们的miRNA平台,我们进一步研究了54位具有复发的急性髓细胞白血病的患者的miRNA表达谱(图19(表16))。我们在新的和治疗过的患者之间没有发现显著差异,正如非显著的统计评分和小于2的变化倍数所反映的(数据未显示)。但是,我们在这些患者中观察到,FAB和细胞遗传学特征非常类似于新患者(图8-17;表5-14),从而证实以前描述的发现。这些数据暗示,miRNA表达主要由细胞遗传学和白血病的分化阶段驱动。

[0189] 与结果有关的微RNA

[0190] 我们在122位新诊断的AML患者中鉴别出少数具有低于1%的假发现率和与总存活率有关的高于2的SAM存活评分(Cox消退)的miRNA。所有鉴别出的基因:miR-17-5p, MIR-20, miR-miR-182, miR-191, miR-199a和miR-199b在过表达时,都不利地影响总存活率(图6(表3))。我们然后使用Kaplan-Meier方法和用于存活曲线对比的时序检验,估计了122位高或低表达上述miRNA的AML患者的存活概率(survival probability)。我们证实了miR-20(图2A)、miR-25(图2B)、miR-191、miR-199a和miR-199b的SAM结果,miR-17-5p和miR-182(p=0.06)除外[数据未显示]。为了进行评估,我们使用qRT-PCR在36位AML患者的独立样品中测量了miR-20和miR-25。

[0191] 发现高表达miR-20或miR-25的患者具有比低表达的AML患者显著更短的总存活率(OS)(图2A和2B)和无事件存活率(miR-20 p=0.012, HR=2.39 CI 95%:1.3-5.2

和 miR-25  $p = 0.018$ ,  $HR = 2.23$  CI 95% :1.7-4.9)。其它临床特征,包括性别、年龄、不利的细胞遗传学、白细胞和外周母细胞计数,都不与该 36 位 AML 患者的独立组的存活率显著相关(数据未显示)。

[0192] 与用诱导治疗缓解失败有关的 MiRNA

[0193] 由于我们已经证实,AML 患者中的生物学和遗传学发现与不同 miRNA 的表达相关,我们然后进一步研究了治疗响应和 miRNA 表达之间的关系。为了鉴别与诱导治疗响应有关的 miRNA,我们分析了诊断出的 24 位 AML 患者的 miRNA 表达,他们都在第 1 至 3 天每天用伊达比星 12mg/m<sup>2</sup> 治疗,并且用阿糖胞苷 1500mg/m<sup>2</sup> 连续输注 4 天(图 20(表 17))。SAM 在已经治疗失败的患者中鉴别出 25 个在诊断时下调的 miRNA(图 21(表 18))。其中,预期 miR-29b 和 miR-29c 靶向 MCL1,即与对许多化疗剂的抗性有关的基因<sup>26</sup>。为了证实这些结果,我们通过 qRT-PCR 在具有类似基线特征、但是用不同化疗方案治疗的 AML 患者的独立组中测量了 miR-29b。我们发现,与实现完全缓解的患者相比,miR-29b 在治疗诱导失败的患者中下调(图 3C)。

[0194] 讨论

[0195] 在该研究中,我们使用微阵列平台进行 AML 样品和它们的祖细胞 CD34+ 细胞的基因组范围的 miRNome 分析。尽管存在有些 miRNA 在 AML 患者中与 CD34+ 细胞相比上调的事实,但大多数 miRNA 下调。有些下调的 miRNA 包括白血病分化阶段的标志物,它们与 AML 的 FAB 分类密切相关。Lu 等人报道,miRNA 反映肿瘤的发育谱系和分化状态<sup>11</sup>。这里鉴别出的 miRNA 子集是否是分化阶段的唯一标志物,或这些 miRNA 中的一些是否具有致病作用,仍然有待阐述。

[0196] 使用 SAM,我们鉴别出与几个细胞遗传组有关的分子特征。其中,最强的特征是与 11q23 重排、正常核型和三体性 8 有关的那些。

[0197] miRNA 子集作为致癌 miRNA 起作用。

[0198] 跨 miR-17 和 miR-20 的上调簇靶向 E2F1<sup>27</sup>,从而影响细胞周期调节。相反,预测在 AML 中下调且与缓解失败有关的 miR-29 家族的成员靶向 MCL1(一种关键的细胞凋亡调节剂,发现它在抗许多化疗剂的细胞中上调<sup>26</sup>)。此外,已经在 CLL 患者<sup>28</sup>和 AML 癌<sup>29</sup>中的与短无事件存活率相关的特征中鉴别出该家族的其他成员,表明该 miRNA 可能是肿瘤抑制剂非编码基因。

[0199] 我们描述了与总和无事件存活率 (OS) 有关的分子特征。几个发现加强了我们的结果。首先,我们鉴别出了与存活率有关的 miRNA,尽管研究的患者具有总预后不良和短存活率(其中结果差异难以证实)。其次,与存活率有关的 2 个 miRNA(miR-20 和 miR-25) 也与高白细胞和母细胞计数有关,所有特征与存活率密切相关。第三,我们鉴别了几个上调的 miRNA,它们与 6 个实体癌的共有特征相同(例如 miR-17,miR-20 和 miR-191)<sup>10</sup>,它们中的一些(如 miR-17 和 miR-20) 在肿瘤发生中具有非常确定的作用<sup>27 30</sup>。

[0200] 总之,我们证实了 miRNA 的子集是白血病分化阶段的标志物,且与 FAB 分类相关,而其它的 miRNA 在 AML 中明显失调,与细胞遗传组和结果有关。最后,我们显示 miRNA 可能参与白血病发生,作为癌基因和肿瘤抑制剂起作用。

[0201] 前述实施方案和优点仅仅是示例性的,且不应理解为限制本发明。本发明的教导可以容易地应用于其它类型的装置。本发明的描述意在举例说明,而不是限制权利要求的

范围。许多替代方案、改变和变型是本领域技术人员显而易见的。在权利要求中,方式+功能的条款意在覆盖本文所述的结构以执行所述的功能,不仅是结构等同物,而且包括等效结构。

[0202] 本文提及的所有科学和专利出版物都通过引用并入本文。本发明现在已经通过书面描述和实施例予以描述,本领域技术人员将认识到,本发明可以在多种实施方案中实现,前面的描述和实施例用于举例说明目的,而不限制下述权利要求。

[0203] 未明确通过引用并入的本文引述的所有出版物的相关教导以其全部内容通过引用并入本文。尽管已通过优选实施方案明确地显示和描述了本发明,但本领域技术人员将理解其中可进行形式和细节上的各种变化,而不背离所附权利要求包括的本发明的范围。

[0204] 参考文献

[0205] 1. Lowenberg B, Downing J. R., Burnett A. Acute Myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999 ;341:1051-1062.

[0206] 2. Grim wade D, Haferlach T. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 200A ;350:1676-7.

[0207] 3. Burnett AK. Current controversies: which patients with acute myeloid  
[0208] leukemia should receive bone marrow transplantation ? An adult theater' s view. *Br. J Haematol* 2002 ;1 18:357-64.

[0209] 4. Drobyski WR. The role of allogeneic transplantation in high-risk acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2004 ;10:1565-8.

[0210] 5. Bullinger L, Dohner K, Bair E. et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Eng J Med* 2004 ; 350:1605-1 61 6.

[0211] 6. VaIk PJM, Verhaak GW, Beijen MA. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Eng J Med* 2004 ;350:1617-1628.

[0212] 7. Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J. MicroRNAs: a developing story. *Curr O, Genet Dev* 2005 ;15:200-5.

[0213] 8. Bartel D. MicroRNAs: genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004 ;116:281-297.

[0214] 9. Chen CZ, Li L, Lodish H, Bartel D. MicroRNAs Modulate Hematopoietic lineage Differentiation. *Science* 2004 ;303:83-86.

[0215] 10. Volinia S, Calin G, Liu CG, et al. A microRNA expression signature in human solid tumors defines cancer targets. *Proc Nad Acad Sci USA* 2006 ; 103:2257-61.

[0216] 11. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005 ;Jun 9 ;435:834-8.

[0217] 12. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B-Cell Chronic Lymphocytic leukemias. *Proc Nad Acad Sci USA* 2004 ;101:1175560.

[0218] 13. Eis PS, Tarn W, Sun, L. Accumulation of m iR-155 and BIC RNA in human B

cell lymphomas. Proc Natl Acad Sci USA 2005 ;102:3627-32.

[0219] 14. Metzler M, Wilda M, Busch K, et al. High expression of miR-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. Genes Chromosomes and Cancer 2004 ;39:167-9.

[0220] 15. Costinean, S. et al. Pre B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high grade lymphoma in E $\mu$  miR155 transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 2006 ;103:7024-9.

[0221] 16. Bloomfield CD. Prognostic factors for selecting curative therapy for adult acute myeloid leukemia. Leukemia 1992 ;6:65-67. 21.

[0222] 17. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature(1985) ISCN 1985. Report of the Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. Bi Orig Artie Ser 1985 ;21:1-117.

[0223] 18. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNAs fingerprints during human megakaryocytopoiesis. Proc Natl Acad Sci USA 2006 ;103:5078-83.

[0224] 19. Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genomic-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. Proc Natl Acad Sci USA 2004 ;101:11755-60.

[0225] 20. Griffiths-Jones S. The microRNA registry. Nucleic Acids Res 2004 ; 32, Database issue D 109-D1 11.

[0226] 21. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-Time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Res 2005;33:e179.

[0227] 22. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significant analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci USA 2001 ; 98:5116:21.

[0228] 23. Felli N, Pelosi E. Beta R5 et al. Lineage-Specific Expression and functional Relevance of MicroRNA genes in Normal Hematopoiesis. Blood (ASH national meetings abstract) 2006 ;106:2263.

[0229] 24. French-American-British (FAB) Cooperative Group. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Ann Intern Med. 1985 ; 103:620-685.

[0230] 25. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. Micro-RNA direct cleavage of HOXB8 mRNA. Science 2004 ;304:594-6.

[0231] 26. Zhou P, Qian L, Kozopas KM, Craig RW: McI-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. Blood 1997 ;89:630.

[0232] 27. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. C-myc regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 2005 ;435:839-43.

[0233] 28. Calin GA, Terracing M, Camino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. 2005 ; 353:1793-801.

[0234] 29. Yanaihara N, Caplen N, Bowman, E, et al. Unique microRNA molecular profiles in AML cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006 ;9:189-98.

[0235] 30. He L, Thomson JM, Hemann MT. A microRNA polycistron as a potential oncogene, *re* 2005 ;435:828-33.

[0236] 31. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel P, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003 ;115:787-798. 32. Krek A, Griin D, Poy M, et al. Combinatorial microRNA target *Nature G* 37:495-500.

[0237] 32. Lewis BP, Burge CB, Bartel D. Conserved seed pairing often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005 ;120:15-20.

[0238] 33. Krek A, Grun D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 2005 ;37:495-500.

[0239] 本说明书还包括下列内容：

[0240] 1. 诊断受试者是否患有急性髓细胞白血病或处于发展该疾病的风险中的方法，该方法包括测量来自所述受试者的受试样品中至少一种 miR 基因产物的水平，其中与对照样品中相应的 miR 基因产物水平相比，受试样品中 miR 基因产物水平的改变表示受试者患有 AML 或处于发展 AML 的风险中。

[0241] 2. 实施方式 1 的方法，其中所述至少一种 miR 基因产物选自图 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA。

[0242] 3. 实施方式 1 的方法，其中所述至少一种 miR 基因产物选自 miR-20, miR-25, miR-191, miR-199a, 和 miR-199b 及它们的组合。

[0243] 4. 实施方式 1 的方法，其中受试样品中所述至少一种 miR 基因产物的水平低于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平。

[0244] 5. 实施方式 1 的方法，其中受试样品中所述至少一种 miR 基因产物的水平高于对照样品中相应的 miR 基因产物的水平。

[0245] 6. 确定患有急性髓细胞白血病的受试者的预后的方法，其包括测量来自所述受试者的受试样品中至少一种 miR 基因产物的水平，其中：

[0246] 所述 miR 基因产物与 AML 中的不利预后有关；且

[0247] 与对照样品中相应的 miR 基因产物水平相比，受试样品中所述至少一种 miR 基因产物水平的改变表示不利预后。

[0248] 7. 实施方式 6 的方法，其中所述至少一种 miR 基因产物选自图 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA。

[0249] 8. 诊断受试者是否患有 AML 或处于发展 AML 的风险中的方法，该方法包括：

[0250] (1) 逆转录获自受试者的受试样品的 RNA，以提供一组靶寡脱氧核苷酸；

[0251] (2) 将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交，以提供受试样品的杂交谱；和，

[0252] (3) 将受试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较，

[0253] 其中至少一种 miRNA 的信号的改变表示受试者患有 AML 或处于发展 AML 的风险中。

[0254] 9. 实施方式 8 的方法,其中与从对照样品产生的信号相比,至少一种 miRNA 的信号下调。

[0255] 10. 实施方式 8 的方法,其中与从对照样品产生的信号相比,至少一种 miRNA 的信号上调。

[0256] 11. 实施方式 8 的方法,其中微阵列包含针对选自图 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA 的一种或多种 miRNA 的 miRNA- 特异性探针寡核苷酸。

[0257] 12. 诊断受试者是否患有具有不利预后的 AML 或处于发展其的风险中的方法,该方法包括:

[0258] (1) 逆转录获自受试者的受试样品的 RNA,以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

[0259] (2) 将所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交,以提供所述受试样品的杂交谱;和

[0260] (3) 将受试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较,

[0261] 其中信号的改变表示受试者患有具有不利预后的 AML 或处于发展其的风险中。

[0262] 13. 实施方式 12 的方法,其中选自表 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物的信号的改变表示受试者患有具有不利预后的 AML 或处于发展其的风险中。

[0263] 14. 实施方式 12 的方法,其中所述微阵列包含针对选自 miR-20、miR-25、miR-191、miR-199a 和 miR-199b 及其组合的 miRNA 的至少一种 miRNA- 特异性探针寡核苷酸。

[0264] 15. 治疗患有 AML 的受试者的 AML 的方法,其中与对照细胞相比,受试者的癌细胞中至少一种 miR 基因产物被下调或上调,该方法包括:

[0265] (1) 当所述至少一种 miR 基因产物在癌细胞中下调时,对受试者施用有效量的至少一种分离的 miR 基因产物或分离的其变体或生物学活性片段,条件是所述 miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1,从而抑制受试者中癌细胞的增殖;或

[0266] (2) 当所述至少一种 miR 基因产物在癌细胞中上调时,对受试者施用有效量的至少一种用于抑制所述至少一种 miR 基因产物的表达的化合物,从而抑制受试者中癌细胞的增殖。

[0267] 16. 实施方式 15 的方法,其中步骤 (1) 中所述至少一种分离的 miR 基因产物选自图 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA 及其组合。

[0268] 17. 实施方式 16 的方法,其中步骤 (2) 中所述至少一种 miR 基因产物选自 miR-20, miR-25, miR-191, miR-199a, 和 miR-199b 和其组合。

[0269] 18. 在受试者中治疗 AML 的方法,该方法包括:

[0270] (1) 测定与对照细胞相比,AML 细胞中至少一种 miR 基因产物的量;和

[0271] (2) 如下改变 AML 细胞中表达的 miR 基因产物的量:

[0272] (i) 如果癌细胞中表达的 miR 基因产物的量低于对照细胞中表达的 miR 基因产物的量,对受试者施用有效量的至少一种分离的 miR 基因产物、或分离的其变体或生物学活性片段,条件是所述 miR 基因产物不是 miR-15a 或 miR-16-1;或

[0273] (ii) 如果癌细胞中表达的 miR 基因产物的量高于对照细胞中表达的 miR 基因产物的量,对受试者施用有效量的至少一种用于抑制所述至少一种 miR 基因产物的表达的化合物。

- [0274] 19. 实施方式 18 的方法, 其中步骤 (i) 中所述至少一种分离的 miR 基因产物选自图 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA 及其组合。
- [0275] 20. 实施方式 19 的方法, 其中步骤 (ii) 中所述至少一种 miR 基因产物选自 miR-20, miR-25, miR-191, miR-199a, 和 miR-199b 和其组合。
- [0276] 21. 用于治疗 AML 的药物组合物, 其包含至少一种分离的 miR 基因产物、或分离的其变体或生物学活性片段和药学上可接受的载体。
- [0277] 22. 实施方式 21 的药物组合物, 其中所述至少一种分离的 miR 基因产物相应于与对照细胞相比在 AML 细胞中下调的 miR 基因产物。
- [0278] 23. 实施方式 21 的药物组合物, 其中所述分离的 miR 基因产物选自图 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA 及其组合。
- [0279] 24. 用于治疗 AML 的药物组合物, 其包含至少一种 miR 表达抑制剂化合物和药学上可接受的载体。
- [0280] 25. 实施方式 24 的药物组合物, 其中所述至少一种 miR 表达抑制剂化合物对与对照细胞相比在 AML 细胞中上调的 miR 基因产物是特异性的。
- [0281] 26. 实施方式 24 的药物组合物, 其中所述至少一种 miR 表达抑制剂化合物对选自下述的 miR 基因产物是特异性的: 图 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA 及其组合。
- [0282] 27. 鉴定抗 AML 试剂的方法, 该方法包括对细胞提供受试试剂和测量与 AML 细胞中减少的表达水平关联的至少一种 miR 基因产物的水平, 其中与对照细胞相比细胞中 miR 基因产物水平的增加表示受试试剂为抗 AML 试剂。
- [0283] 28. 实施方式 27 的方法, 其中所述 miR 基因产物选自图 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA 及其组合。
- [0284] 29. 鉴定抗 AML 试剂的方法, 该方法包括给细胞提供受试试剂和测量与 AML 细胞中增加的表达水平关联的至少一种 miR 基因产物的水平, 其中与对照细胞相比细胞中 miR 基因产物水平的减少表示受试试剂为抗 AML 试剂。
- [0285] 30. 实施方式 29 的方法, 其中所述至少一种 miR 基因产物选自图 5-6、8-18 和 21 的任一个中所示的 miRNA 及其组合。
- [0286] 31. 测定与 FAB 分类和细胞遗传学有关的微 RNA 的方法, 其包括, 选择选自图 5 中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。
- [0287] 32. 测定与 122 位 AML 患者的总存活率有关的微 RNA 的方法, 其包括, 选择选自图 6(表 3) 中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。
- [0288] 33. 测定在 CD 34+ 细胞和 122 位 AML 患者之间差异表达的 MiRNA 的方法, 其包括, 选择选自图 8(表 5) 中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。
- [0289] 34. 测定与其它 AML FAB 亚型相比在 AML FAB M0-M1 中差异表达的 MiRNA 的方法, 其包括, 选择选自图 9(表 6) 中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。
- [0290] 35. 测定在 AML FAB M3[t(15;17)] 中差异表达的 MiRNA 的方法, 其包括, 选择选自图 10(表 7) 中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。
- [0291] 36. 测定与其它 AML 相比在 AML FAB M4 和 M5 中差异表达的 MiRNA 的方法, 其包括, 选择选自图 11(表 8) 中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。
- [0292] 37. 测定与其它 AML 相比在 AML FAB M6 和 M7 中差异表达的 MiRNA 的方法, 其包



括,选择选自图 12(表 9)中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。

[0293] 38. 测定与高 WBC,和外周血 (PB) 和骨髓 (BM) 母细胞相关的 MiRNA 的方法,其包括,选择选自图 13(表 10)中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。

[0294] 39. 测定与其它 AML 相比在正常核型 AML 中差异表达的 MiRNA 的方法,其包括,选择选自图 14(表 11)中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。

[0295] 40. 测定与 11q23 重排有关的 MiRNA 的方法,其包括,选择选自图 15(表 12)中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。

[0296] 41. 测定与非复杂的或正常核型相比在具有复杂核型的患者中差异表达的 MiRNA 的方法,其包括,选择选自图 16(表 13)中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。

[0297] 42. 测定与染色体 7 有关的 MiRNA 的方法,其包括,选择选自图 17(表 14)中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。

[0298] 43. 测定与三体性 8 有关的 MiRNA 的方法,其包括,选择选自图 18(表 15)中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。

[0299] 44. 测定与对伊达比星和阿糖胞苷的响应有关的 MiRNA 的方法,其包括,选择选自图 21(表 18)中所示的 miRNA 的至少一种 miR 基因产物。

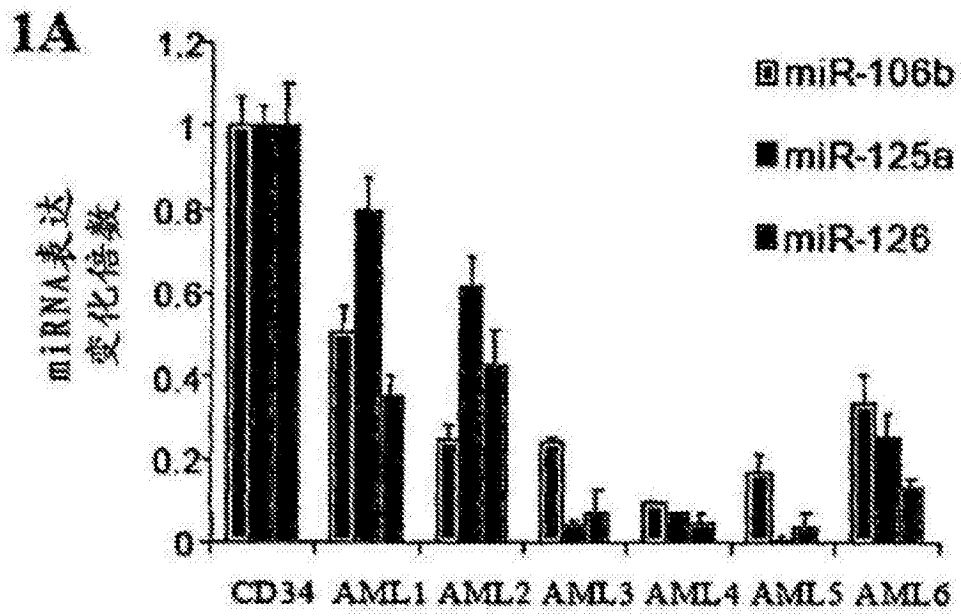


图 1A

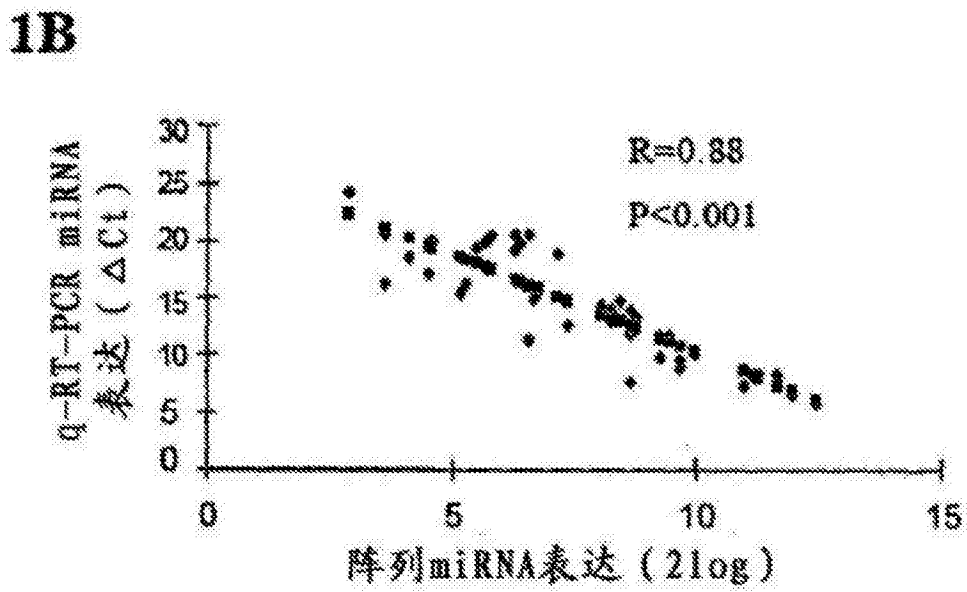


图 1B

### 1C

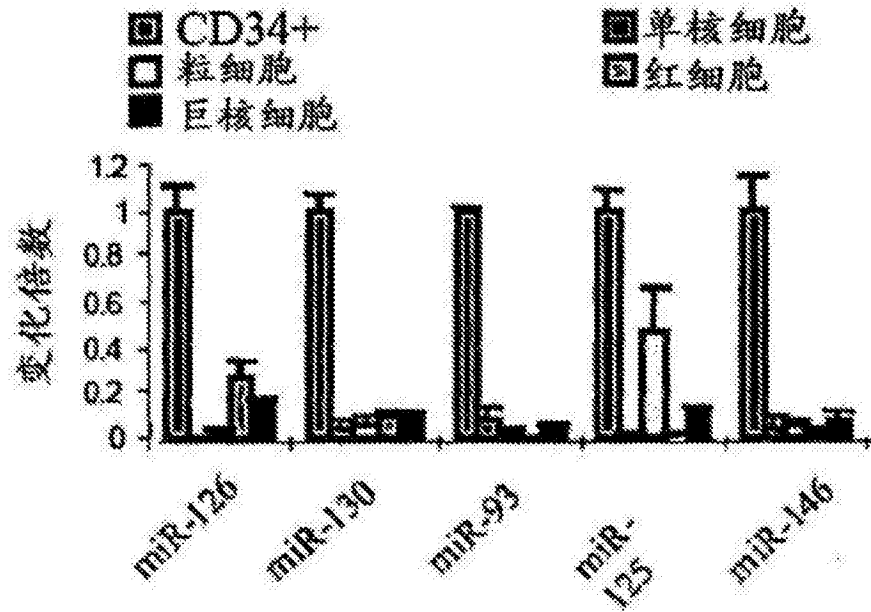


图 1C

### 1D

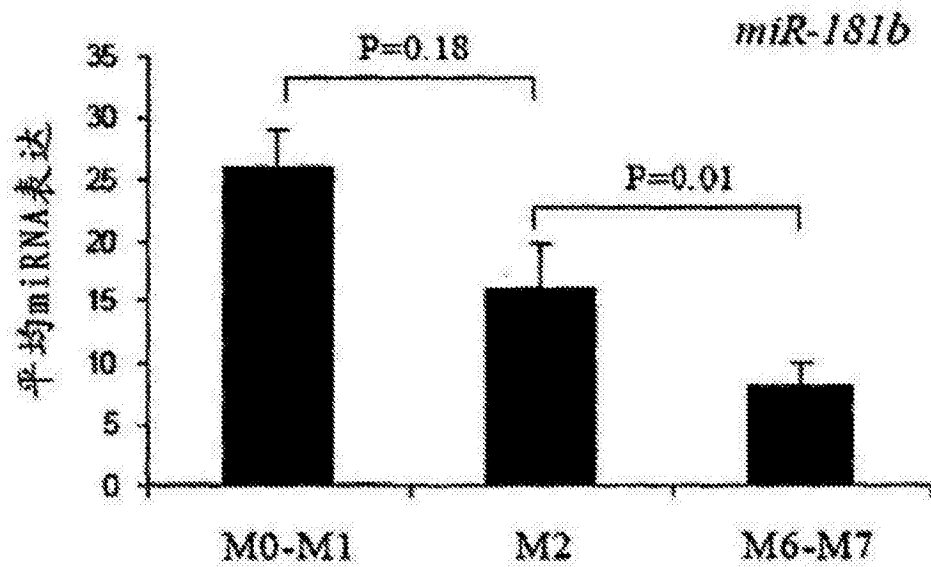


图 1D

1E

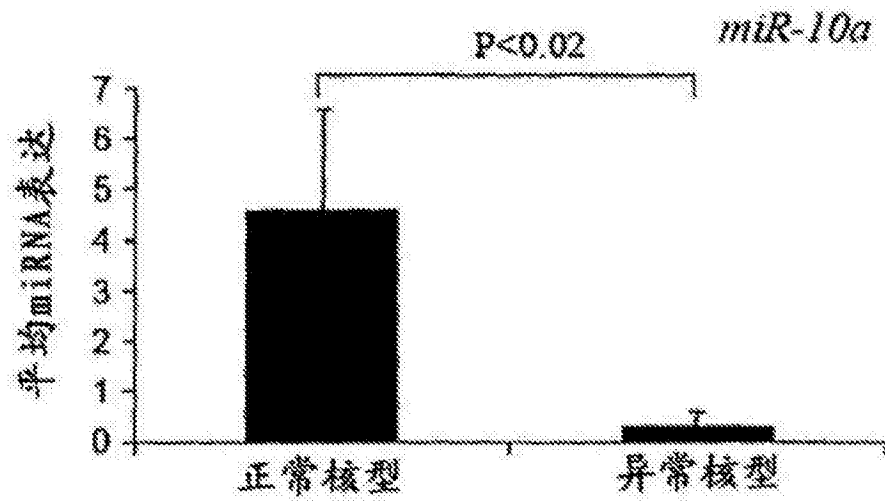


图 1E

1F

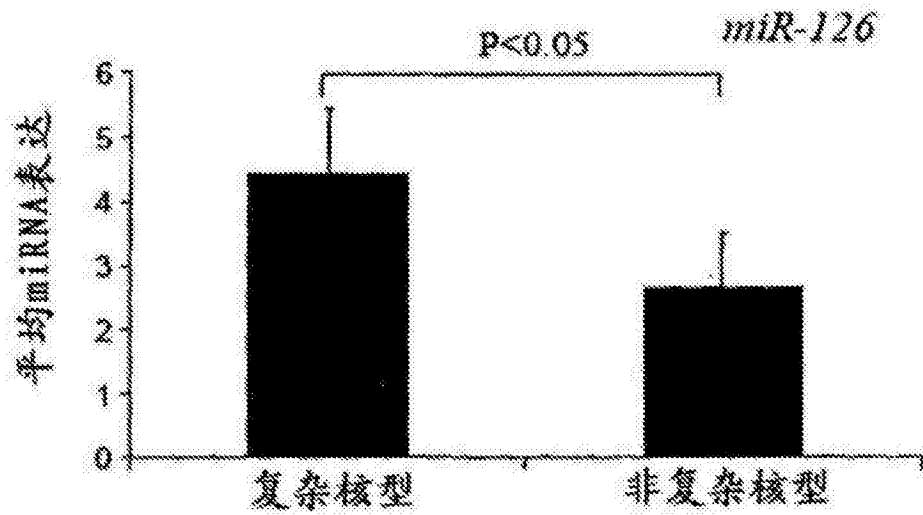


图 1F

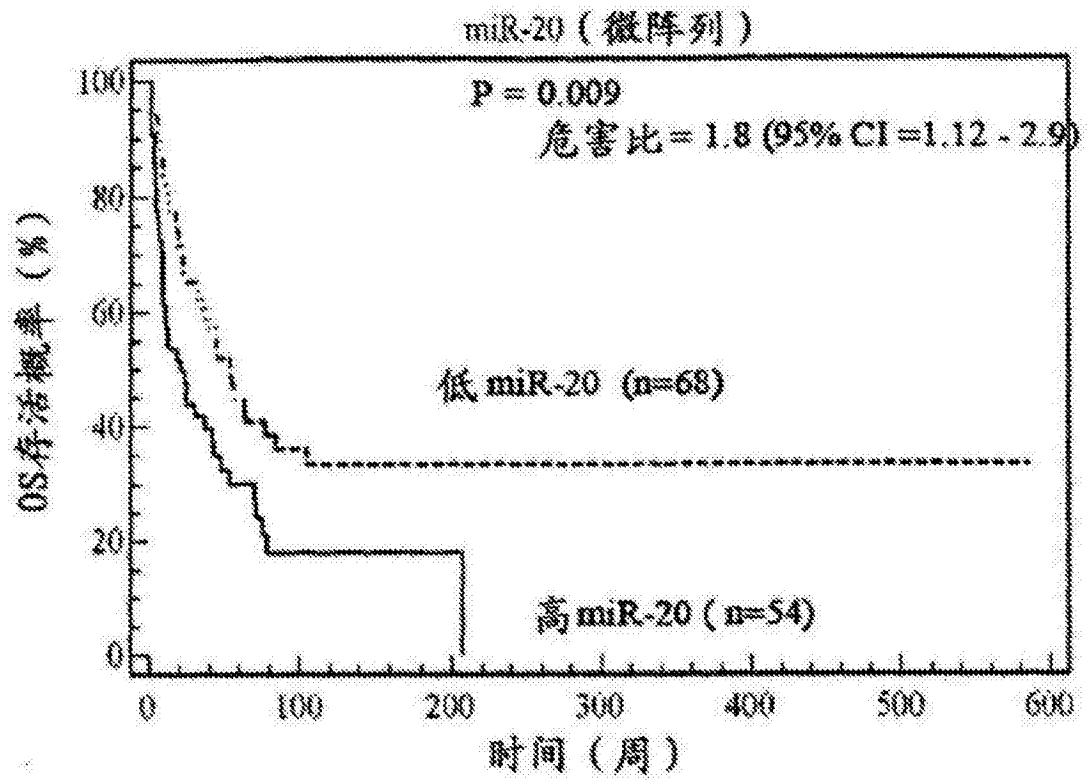


图 2A

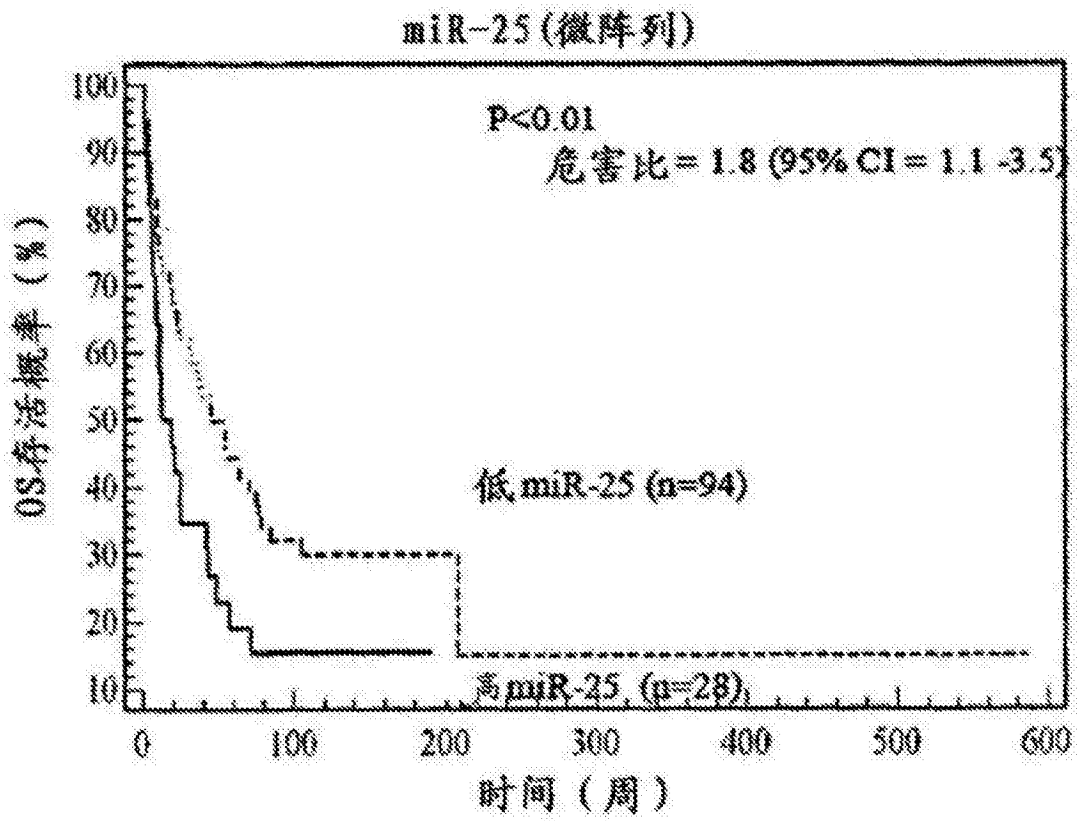


图 2B

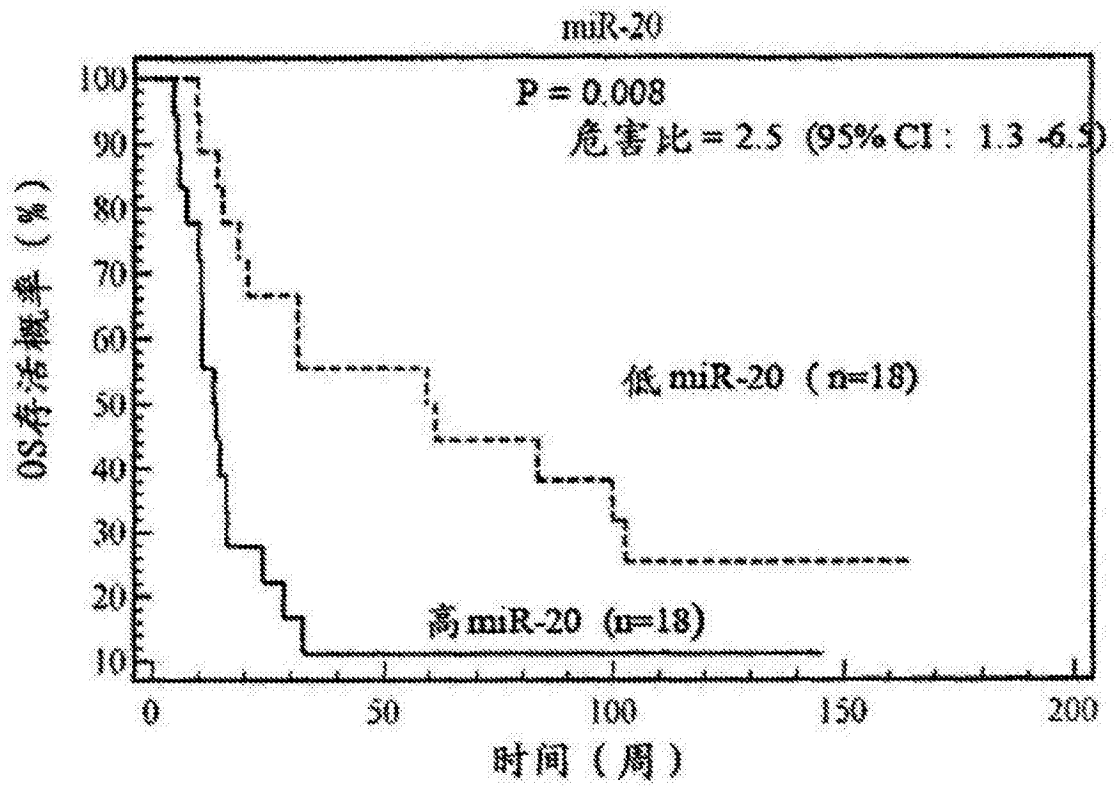


图 2C

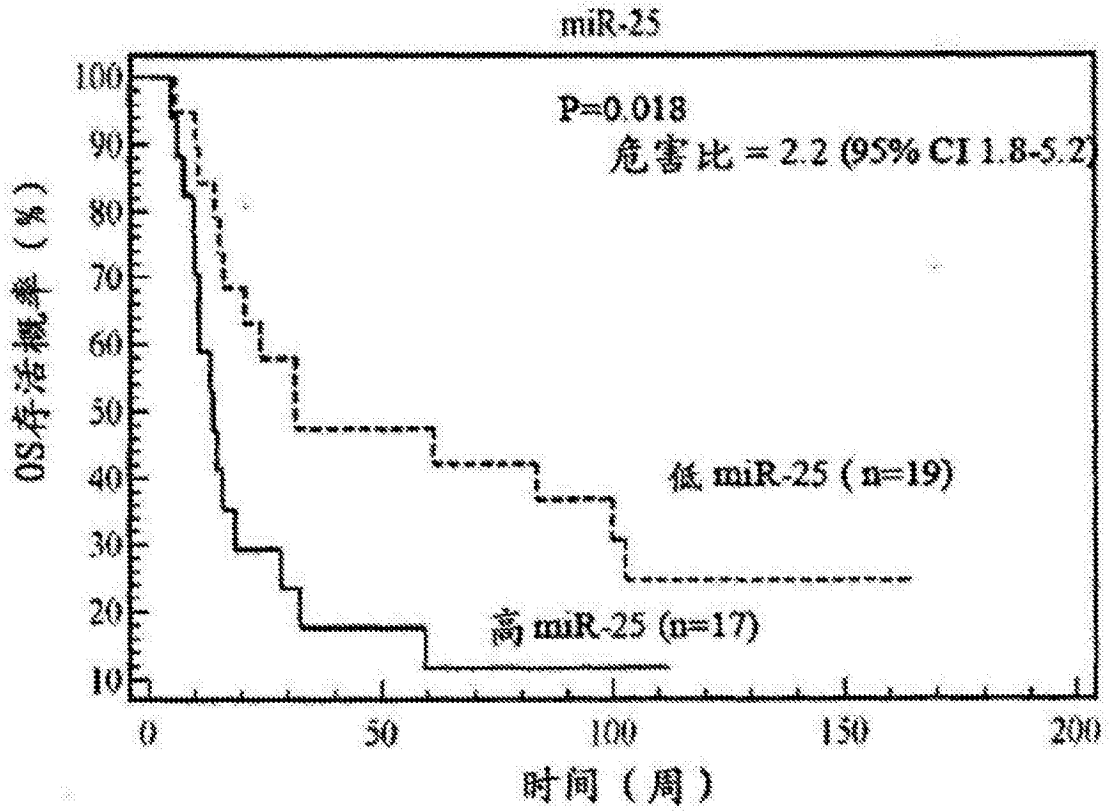


图 2D

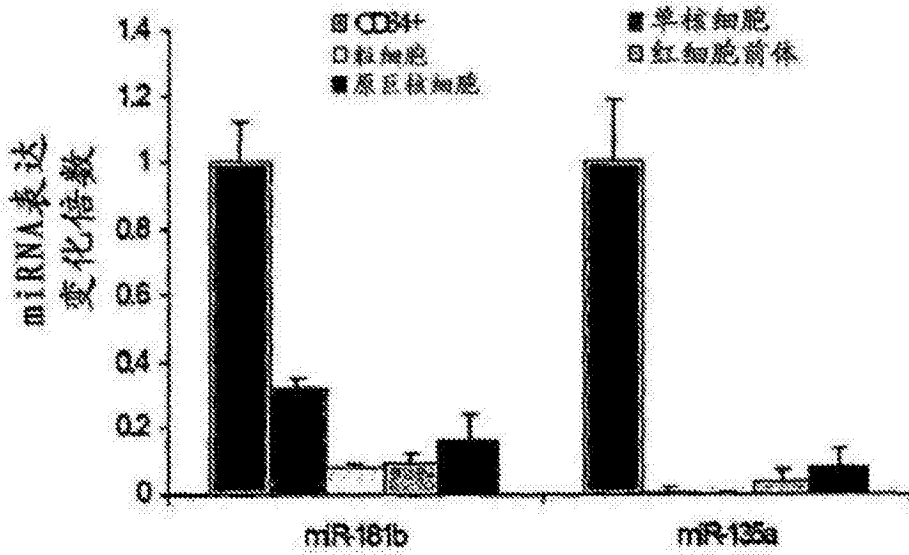


图 3A



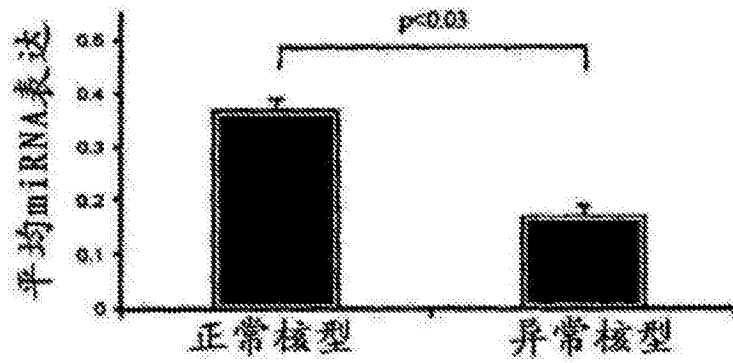


图 3B

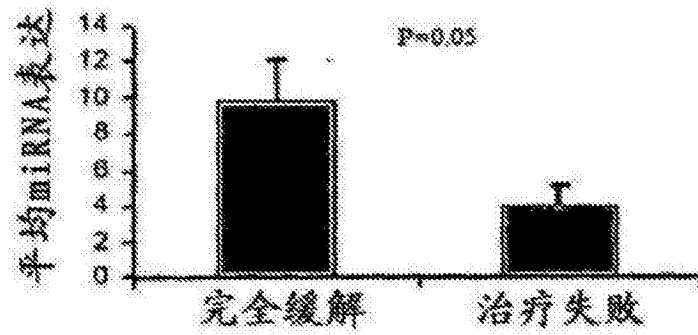


图 3C

特征	122个AML患者 值	验证组 (36)患者 值
年龄		
中值	60.3	55.17
范围	(18-86)	(20-78)
性别-数目 (%)		
女	47(38)	19(53)
男	75(62)	17(47)
白细胞计数 $\times 10^9/L$		
中值	46.83	68.1
范围	(0.7-278)	(1.2-147)
骨髓母细胞计数%		
中值	62	69
范围	20-99	(20-98)
<b>FAB</b>		
M0	7 (5)	2 (5.5)
M1	12 (10)	5 (14)
M2	22 (18)	11(30.5)
M3	4 (3)	0
M4	38 (31)	7(19)
M5	15 (12)	3 (8.4)
M6	11 (9)	1(2.8)

图 4

M7	5 (4)	1(2.8)
不确定的*	8 (6)	6 (17)
细胞遗传学†		
t(15;17) (q22;q21)	4 (3.4)	0
inv(16)/t(16;16)	4 (3.4)	0
正常核型	45 (39)	12 (33.7)
11q23重排	9 (7.8)	3 (8.4)
-7	4 (3.4)	0
-5	1 (0.8)	0
del 5(q)	3 (2.6)	1(2.8)
del 9(q)	2 (1.7)	1(2.8)
del 13 (q12;q22)	2 (1.7)	0
+8	5 (4.4)	1 (2.8)
+4	2 (1.7)	0
复杂核型‡	25 (21.5)	11 (30.5)
其他异常核型	10 (8.6)	7 (19)
生命状态-数目 (%)		
死亡	81 (66)	28 (77)
存活	41 (33)	8 (23)

图 4 续

微RNA	组特征	位置	推定的靶
<i>miR-131a,b</i>	在 AML M0-M1 中上调	9q33	<i>RUNX1, KIT</i>
<i>miR-146</i>	在 AML M0-M1 中上调	5q33	<i>KIT, SDFRI</i>
<i>miR-145</i>	在 AML M6-M7 中上调, 在 M4-M5 中下调	5q32	<i>FLII, CBFβ</i>
<i>miR-126</i>	在 AML M6-M7 和复杂核型中上调 在正常核型和 M4-M5 中下调	9q34	<i>Cxk, HOXA9</i>
<i>miR-135b</i>	在 t(15;17) 中下调	1q32	<i>LTZS1, AKT3</i>
<i>miR-10a</i>	在正常核型中上调	17q21	<i>HOXA1, VEGFR</i>
<i>miR-10b</i>	在正常核型中上调	2q31	<i>HOXA1, VEGFR</i>
<i>miR-326</i>	在 11q23 重排中上调	11q13	<i>CEBPA, RAPIB</i>
<i>miR-194</i>	在 11q23 重排中上调	11q13	<i>MEIS1, EIF2C1</i>
<i>miR-29b</i>	在 11q23 重排中下调	7q32	<i>MCL1, DNMT3B</i>
<i>miR-34b</i>	在 11q23 中下调, 在正常核型中上调	11q23	<i>NOTCH1, MYB</i>
<i>miR-124a</i>	在 +8 中上调	8p23	<i>SP3, MTF</i>
<i>miR-30d</i>	在 +8 中上调	8q24	<i>RARB, JUNB</i>

图 5

微RNA	短存活的 患者中的 表达	基因组 位置	推定的 靶
<i>miR-25</i>	高	7q22	<i>JUN, GATA2</i>
<i>miR-20</i>	高	13q31	<i>E2F3, RUNX1</i>
<i>miR-17-5p</i>	高	13q31	<i>E2F3, RUNX1</i>
<i>miR-182</i>	高	7q32	<i>MITF, CEBPA</i>
<i>miR-199a</i>	高	19q13	<i>RUNX1, PAX3</i>
<i>miR-199b</i>	高	9q34	<i>RUNX1, PAX3</i>
<i>miR-191</i>	高	3p21	<i>CEBPB, MECP</i>

图 6

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

图 7

在AML中下调	SAM 评分*	变化 倍数	FDR (%) <sup>†</sup>
<i>hsa-mir-126</i>	-3.28	0.21	0
<i>hsa-mir-130a</i>	-2.90	0.29	0
<i>hsa-mir-130b prec</i>	-2.56	0.37	0
<i>hsa-mir-135</i>	-2.55	0.38	0
<i>hsa-mir-93</i>	-2.52	0.08	0
<i>hsa-mir-146</i>	-2.47	0.41	0
<i>hsa-mir-106b</i>	-2.43	0.36	0
<i>hsa-mir-224</i>	-2.39	0.32	0
<i>hsa-mir-125a</i>	-2.18	0.50	0
<i>hsa-mir-92</i>	-2.13	0.46	0
<i>hsa-mir-106a</i>	-2.12	0.46	0
<i>hsa-mir-95</i>	-2.07	0.04	0
<i>hsa-mir-155</i>	-2.03	0.49	0
<i>hsa-mir-25</i>	-2.01	0.50	0
<i>hsa-mir-96</i>	-1.94	0.25	0
<i>hsa-mir-124a</i>	-1.92	0.37	0
<i>hsa-mir-18</i>	-1.89	0.38	0
<i>hsa-mir-20</i>	-1.87	0.50	0
<i>hsa-let-7d</i>	-1.80	0.48	0
<i>hsa-mir-26a</i>	-1.76	0.48	0
<i>hsa-mir-128b-prec</i>	-1.72	0.32	0
<i>hsa-mir-222</i>	-1.71	0.50	0
<i>hsa-mir-101</i>	-1.67	0.50	0
<i>hsa-mir-338</i>	-1.54	0.31	0
<i>hsa-mir-184-prec</i>	-1.52	0.48	0
<i>hsa-mir-371</i>	-1.51	0.38	0
<i>hsa-mir-199b</i>	-1.44	0.03	0
<i>hsa-mir-29b</i>	-1.40	0.12	0
<i>hsa-mir-301</i>	-1.37	0.47	0

\* SAM 通过比较一组基因特异性评分（即，配对 t 检验）鉴别统计上表达显著变化的基因。各基因基于与该基因的重复测量的标准差相比其基因表达的变化被赋予评分。评分超过阈值的基因视为潜在地显著的。

† 偶然鉴别到的此类基因的百分比为 q 值或假发现率。

图 8

微RNA	Sam 评分	变化 倍数	FDR (%)
* <i>hsa-mir-181c</i>	2.58	2.78	0
* <i>hsa-mir-181a</i>	2.49	2.71	0
<i>hsa-mir-30b</i>	2.48	2.66	0
* <i>hsa-mir-192</i>	2.46	4.89	0
<i>hsa-mir-130a</i>	2.45	2.53	0
<i>hsa-mir-30c</i>	2.44	2.71	0
* <i>hsa-mir-146</i>	2.40	2.11	0
<i>hsa-mir-30c-prec</i>	2.31	2.67	0
* <i>hsa-mir-26a-prec</i>	2.26	2.15	0
* <i>hsa-mir-181b</i>	1.99	2.67	0
* <i>hsa-mir-124a</i>	1.99	2.16	0
* <i>hsa-mir-128b</i>	1.95	2.83	0

所有 miRNA 被上调。

\* 与其他 FAB 亚型相比，发现 miRNA 在治疗过的 AML FAB M0-M1 患者中也上调。

图 9

微RNA	SAM 评分	变化 倍数	FDR (%)
<i>hsa-mir-135b</i>	-3.51	0.36	0
<i>hsa-mir-99b-prec</i>	-2.25	0.35	0
<i>hsa-mir-132-prec</i>	-2.19	0.28	0
<i>hsa-mir-95</i>	-1.93	0.07	0
<i>hsa-let-7d</i>	-1.75	0.3	0

所有 miRNA 被下调。

图 10



miRNA	SAM 评分	变化 倍数	FDR (%)
<i>hsa-mir-21</i>	2.53	2.52	0
<i>hsa-mir-126</i>	-2.85	0.49	0
<i>hsa-mir-331-prec</i>	-2.55	0.45	0
<i>hsa-mir-145</i>	-2.37	0.38	0
<i>hsa-mir-143</i>	-2.35	0.44	0
<i>hsa-mir-193</i>	-2.33	0.37	0
<i>hsa-mir-340</i>	-2.04	0.44	0
<i>hsa-mir-204</i>	-1.90	0.43	0
<i>hsa-mir-206</i>	-1.90	0.47	0
<i>hsa-mir-29c</i>	-1.86	0.48	0
<i>hsa-mir-188</i>	-1.81	0.50	0
<i>hsa-mir-204-prec</i>	-1.76	0.37	0
<i>hsa-mir-128a</i>	-1.75	0.48	2.5
<i>hsa-mir-202</i>	-1.74	0.48	2.5
<i>hsa-mir-194</i>	-1.72	0.45	2.5
<i>hsa-mir-299</i>	-1.72	0.48	2.5
<i>hsa-mir-126-prec</i>	-1.71	0.36	2.5
<i>hsa-mir-190</i>	-1.71	0.45	2.5
<i>hsa-mir-183-prec</i>	-1.54	0.45	2.5

红色的 miRNA 被上调，绿色的 miRNA 被下调。

与其他 FAB 亚型相比，也发现所有 miRNA (miR-21 和 miR-331 除外) 在治疗过的 AML FAB M4-M5 患者中差异表达。

图 11

miRNA	SAM 评分	变化 倍数	FDR (%)
* <i>hsa-mir-126</i>	4.61	4.42	0
<i>hsa-mir-204</i>	4.58	3.51	0
<i>hsa-mir-190</i>	4.27	3.51	0
* <i>hsa-mir-145</i>	4.22	5.22	0
<i>hsa-mir-183-prec</i>	4.19	2.72	0
<i>hsa-mir-203</i>	4.18	2.66	0
<i>hsa-mir-196b</i>	4.11	3.32	0
<i>hsa-mir-203-prec</i>	4.09	2.44	0
<i>hsa-mir-200c</i>	3.94	2.29	0
<i>hsa-mir-206</i>	3.92	3.07	0
<i>hsa-mir-203</i>	3.92	2.53	0
* <i>hsa-mir-125a-prec</i>	3.89	2.79	0
<i>hsa-mir-204-prec</i>	3.87	2.92	0
<i>hsa-mir-197</i>	3.85	3.09	0
<i>hsa-mir-168</i>	3.85	2.62	0
* <i>hsa-mir-143</i>	3.75	3.16	0
<i>hsa-let-7a-2-prec</i>	-3.95	0.12	0
* <i>hsa-mir-181b</i>	-3.82	0.30	0
* <i>hsa-mir-26a</i>	-3.77	0.02	0
<i>hsa-mir-30b</i>	-3.54	0.32	0
<i>hsa-mir-181c</i>	-3.37	0.27	0
<i>hsa-mir-181b</i>	-3.01	0.28	0
<i>hsa-mir-30c-prec</i>	-3.01	0.20	0
<i>hsa-mir-30c</i>	-2.85	0.35	0
* <i>hsa-mir-34bNo2</i>	-2.83	0.03	0
<i>hsa-mir-23a</i>	-2.79	0.50	0
<i>hsa-mir-324</i>	-2.60	0.27	0
<i>hsa-mir-21</i>	-2.60	0.22	0
<i>hsa-mir-181b-prec</i>	-2.57	0.45	0
<i>hsa-mir-16-2</i>	-2.55	0.41	0

红色的 miRNA 被上调，绿色的 miRNA 被下调。

\* 与所有其他 FAB 亚型(48)相比,发现这些 miRNA 在治疗过的 AML FAB M6-M7 患者中(4)也差异表达。

图 12

与高WBC 相关的miRNA	SAM 评分	FDR (%)
<i>hsa-mir-155</i>	2.96	0
<i>hsa-mir-30a</i>	2.79	0
<i>hsa-mir-23b</i>	2.73	0
<i>hsa-mir-181b</i>	2.59	0
<i>hsa-mir-213</i>	2.59	0
<i>hsa-mir-221</i>	2.58	0
<i>hsa-mir-29b</i>	2.58	0
<i>hsa-mir-95</i>	2.56	0
<i>hsa-mir-128b</i>	2.54	0
<i>hsa-mir-27a</i>	2.52	0
<i>hsa-mir-181c</i>	2.52	0
<i>hsa-mir-92</i>	2.45	0
<i>hsa-mir-181a</i>	2.44	0
<i>hsa-mir-23a</i>	2.43	0
<i>hsa-mir-214</i>	2.42	0
<i>hsa-mir-30b</i>	2.39	0
<i>hsa-mir-30c</i>	2.36	0
<i>hsa-mir-26b</i>	2.35	0
<i>hsa-mir-21</i>	2.33	0
<i>hsa-mir-222</i>	2.32	0
与高BM母细胞% 相关的miRNA		
<i>hsa-mir-30b</i>	4.54	0
<i>hsa-mir-30c</i>	4.31	0
<i>hsa-mir-192</i>	3.95	0
<i>hsa-mir-181a</i>	3.90	0
<i>hsa-mir-155</i>	3.82	0
<i>hsa-let-7a-2</i>	3.73	0
<i>hsa-mir-181b</i>	3.69	0
<i>hsa-mir-181b-prec</i>	3.65	0
<i>hsa-mir-34b</i>	3.65	0
<i>hsa-mir-181c</i>	3.64	0
<i>hsa-mir-219</i>	3.55	0
<i>hsa-mir-214</i>	3.51	0
<i>hsa-mir-213</i>	3.49	0
<i>hsa-mir-301No2</i>	3.38	0
<i>hsa-mir-26a</i>	3.37	0
与高外周母细胞% 相关的miRNA		
<i>hsa-mir-133b</i>	2.97	0
<i>hsa-mir-213</i>	2.91	0
<i>hsa-mir-214</i>	2.75	0
<i>hsa-mir-25</i>	2.71	0
<i>hsa-mir-181a</i>	2.63	0
<i>hsa-mir-181b</i>	2.54	0

图 13

<i>hsa-mir-220</i>	2.42	0
<i>hsa-mir-92</i>	2.39	0
<i>hsa-mir-184</i>	2.28	0
<i>hsa-mir-92</i>	2.26	0
<i>hsa-mir-124a</i>	2.22	0
<i>hsa-mir-129-prec</i>	2.22	0
<i>hsa-mir-100</i>	2.20	0
<i>hsa-mir-181b</i>	2.12	0
<i>hsa-mir-133</i>	2.01	0
<i>hsa-mir-155</i>	2.00	0
<i>hsa-mir-222</i>	1.93	0
<i>hsa-mir-181c</i>	1.85	0

所有 miRNA 被上调 (红色) 并且与 WBC 计数, PB 和 BM 母细胞百分比正相关。这些结果通过定量 SAM 分析获得。以黄色突出显示的 miRNA 为至少 2 个特征所共有。

图 13 续

微RNA	SAM 评分	变化 倍数	FDR (%)
<i>hsa-mir-34b</i>	4.27	3.03	0
<i>hsa-mir-10a</i>	3.64	4.07	0
<i>hsa-mir-10b</i>	3.48	3.13	0
<i>hsa-mir-26a</i>	3.42	2.72	0
<i>hsa-mir-30c</i>	3.41	2.26	0
<i>hsa-let-7a-2</i>	3.24	2.25	0
<i>hsa-mir-16-2</i>	2.92	2.02	0
<i>hsa-mir-21</i>	2.84	2.58	0
<i>hsa-mir-181b</i>	2.54	2.21	0
<i>hsa-mir-368</i>	2.02	2.68	0
<i>hsa-mir-192</i>	1.97	2.75	0
<i>hsa-mir-126</i>	-3.85	0.31	0
<i>hsa-mir-203</i>	-3.21	0.41	0
<i>hsa-mir-200c</i>	-3.10	0.45	0
<i>hsa-mir-200c-prec</i>	-3.03	0.39	0
<i>hsa-mir-203-prec</i>	-3.00	0.43	0
<i>hsa-mir-182</i>	-3.00	0.38	0
<i>hsa-mir-198-prec</i>	-2.98	0.36	0
<i>hsa-mir-204</i>	-2.98	0.41	0
<i>hsa-mir-205-prec</i>	-2.97	0.5	0
<i>hsa-mir-183-prec</i>	-2.96	0.42	0
<i>hsa-mir-196b</i>	-2.94	0.42	0
<i>hsa-mir-193</i>	-2.80	0.42	0
<i>hsa-mir-182-prec</i>	-2.78	0.38	0
<i>hsa-mir-191</i>	-2.76	0.43	0
<i>hsa-mir-199a</i>	-2.70	0.42	0
<i>hsa-mir-194</i>	-2.61	0.36	0
<i>hsa-mir-204-prec</i>	-2.60	0.24	0
<i>hsa-mir-183</i>	-2.56	0.28	0
<i>hsa-mir-299</i>	-2.55	0.43	0
<i>hsa-mir-193-prec</i>	-2.43	0.45	0
<i>hsa-mir-30b-prec</i>	-2.28	0.55	0

与治疗过的具有异常核型的 AML 患者 (38) 相比, 发现所有 miRNA (miR-368 和 miR-192 除外) 在治疗过的具有正常核型的 AML 患者 (10) 中也差异表达。

红色的 miRNA 被上调, 绿色的 miRNA 被下调。

图 14

微RNA	SAM 评分	变化 倍数	FDR (%)
<i>hsa-mir-328</i>	3.74	5.49	0
<i>hsa-mir-219</i>	2.42	2.60	6.2
<i>hsa-mir-194</i>	2.24	2.73	6.2
<i>hsa-mir-301</i>	2.19	2.65	6.2
<i>hsa-miR-324</i>	2.05	2.33	6.9
<i>hsa-mir-339</i>	2.04	2.51	6.9
<i>hsa-mir-99b</i>	1.86	2.03	7.3
<i>hsa-mir-328</i>	1.80	2.31	7.6
<i>hsa-mir-34b</i>	-5.46	0.12	0
<i>hsa-mir-15a</i>	-4.13	0.11	0
<i>hsa-mir-29a</i>	-4.00	0.10	0
<i>hsa-mir-29c</i>	-3.98	0.02	0
<i>hsa-mir-372</i>	-3.68	0.15	0
<i>hsa-mir-30a</i>	-3.62	0.18	0
<i>hsa-mir-29b</i>	-3.60	0.02	0
<i>hsa-mir-30e</i>	-3.58	0.13	0
<i>hsa-mir-196a</i>	-3.57	0.39	0
<i>hsa-let-7f</i>	-3.52	0.20	0
<i>hsa-mir-102</i>	-3.40	0.01	0
<i>hsa-mir-331</i>	-3.36	0.10	0
<i>hsa-mir-299</i>	-3.04	0.01	0
<i>hsa-mir-29a-prec</i>	-3.00	0.16	0
<i>hsa-mir-193</i>	-2.86	0.04	0

红色的 miRNA 被上调，绿色的 miRNA 被下调。

与其他细胞遗传异常情况（44）相比，在治疗过的具有 11q23 的患者（4）的独立组中观察到相同的特征，miR-372，miR-196a 和 miR-193 除外。

图 15

miRNA	SAM 评分 (d)	变化 倍数	FDR (%)
* <i>hsa-mir-126</i>	3.03	2.71	0
* <i>hsa-mir-193</i>	3.00	2.19	0
* <i>hsa-mir-204</i>	2.96	2.39	0
* <i>hsa-mir-9-3</i>	2.51	2.08	0
<i>hsa-mir-145</i>	2.45	2.20	0
* <i>hsa-mir-128a-prec</i>	2.11	2.13	0
<i>hsa-mir-30c</i>	-2.90	0.30	0
* <i>hsa-mir-30f</i>	-2.83	0.32	0
<i>hsa-mir-30b</i>	-2.62	0.35	0
<i>hsa-mir-30c-prec</i>	-2.57	0.33	0
<i>hsa-mir-23a-prec</i>	-2.50	0.46	0
* <i>hsa-mir-26a</i>	-2.36	0.49	0
<i>hsa-mir-10a</i>	-2.26	0.17	0
* <i>hsa-mir-26a-prec</i>	-2.18	0.47	0
<i>hsa-mir-16-2</i>	-2.06	0.46	0
<i>hsa-mir-222-prec</i>	-1.94	0.49	0
<i>hsa-mir-16-1</i>	-1.93	0.45	0
<i>hsa-mir-10b-prec</i>	-1.87	0.38	0
<i>hsa-mir-30e</i>	-1.84	0.48	0
<i>hsa-mir-21</i>	-1.77	0.49	0
<i>hsa-mir-155</i>	-1.62	0.49	0
<i>hsa-mir-181e</i>	-1.61	0.46	0
<i>hsa-mir-10a-prec</i>	-1.24	0.49	2.3
<i>hsa-mir-192</i>	-1.20	0.44	2.3

红色的 miRNA 被上调，绿色的 miRNA 被下调。

\* 与非复杂核型（包括正常核型）（34）相比，也发现这些 miRNA 在治疗过的具有复杂核型的患者（14）中差异表达。

图 16

miRNA	SAM 评分	变化 倍数	FDR (%)
<i>hsa-mir-204</i>	2.27	2.15	0
<i>hsa-mir-126</i>	2.26	4.03	0
<i>hsa-mir-205</i>	2.19	2.05	0
<i>hsa-mir-190</i>	2.14	2.46	0
<i>hsa-let-7d</i>	2.12	2.62	0
<i>hsa-mir-196a</i>	1.95	2.42	0
<i>hsa-mir-197</i>	1.95	2.00	0
<i>hsa-mir-188</i>	1.89	2.13	0
<i>hsa-mir-204-prec</i>	1.87	2.89	0
<i>hsa-mir-125a-prec</i>	1.86	2.38	0
<i>hsa-mir-18</i>	1.64	6.05	2.53
<i>hsa-mir-186</i>	1.55	2.74	4.21
<i>hsa-mir-196a-prec</i>	1.54	2.05	4.21
<i>hsa-mir-9</i>	1.49	2.02	4.21

所有 miRNA 被上调。

图 17

miRNA	SAM 评分	变化 倍数	FDR (%)
<i>hsa-mir-337</i>	3.49	29.94	0
<i>hsa-mir-192-prec</i>	3.41	13.49	0
<i>hsa-mir-337-prec</i>	3.25	14.05	0
<i>hsa-mir-184</i>	3.21	25.49	0
<i>hsa-mir-302b</i>	3.06	4.93	0
<i>hsa-mir-206-prec</i>	2.95	13.16	0
<i>hsa-mir-105</i>	2.94	11.05	0
<i>hsa-let-7d</i>	2.87	8.85	0
<i>hsa-mir-153</i>	2.86	14.2	0
* <i>hsa-mir-124a</i>	2.78	10.67	0
<i>hsa-mir-215</i>	2.69	13.19	0
<i>hsa-mir-1</i>	2.68	199.7	0
<i>hsa-mir-194</i>	2.62	18.13	0
<i>hsa-mir-199b-prec</i>	2.61	9.87	0
<i>hsa-mir-29c</i>	2.59	8.19	0

图 18



<i>hsa-mir-208</i>	2.56	11.65	0
<i>hsa-mir-199a</i>	2.54	14.01	0
<i>hsa-mir-24-1</i>	2.49	5.21	0
<i>hsa-miR-302c</i>	2.47	6.37	0
<i>hsa-mir-318-prec</i>	2.42	5.67	0
<i>hsa-mir-367</i>	2.41	9.11	0
<i>hsa-mir-200a</i>	2.41	4.19	0
<i>hsa-mir-183</i>	2.38	33.93	0
<i>hsa-mir-199b</i>	2.38	7.23	0
<i>hsa-mir-372-prec</i>	2.35	6.11	0
<i>hsa-mir-143</i>	2.35	5.56	0
<i>hsa-mir-96</i>	2.31	11.59	0
<i>hsa-mir-204-prec</i>	2.26	6.16	0
<i>hsa-mir-29b</i>	2.26	6.91	0
<i>hsa-mir-202</i>	2.25	5.64	0
<i>hsa-mir-340</i>	2.23	4.75	0
<i>hsa-mir-102</i>	2.17	8.11	0
<i>hsa-mir-191</i>	2.13	9.48	0
<i>hsa-let-7i</i>	2.11	6.78	0
<i>hsa-mir-184-prec</i>	2.11	5.69	0
<i>hsa-miR-302b-prec</i>	2.11	4.76	0
<i>hsa-mir-30a</i>	2.09	2.84	0
<i>hsa-mir-9-3</i>	2.08	4.11	0
<i>hsa-mir-26a-prec</i>	2.07	3.72	0
<i>hsa-mir-124a-3</i>	2.07	7.55	0
<i>hsa-mir-203</i>	2.03	6.99	0
<i>hsa-mir-302a</i>	2.02	11.36	0
<i>hsa-mir-199a</i>	2.01	6.93	0
<i>hsa-mir-206</i>	1.99	4.55	0
<i>hsa-mir-197</i>	1.98	5.25	0
<i>hsa-mir-198</i>	1.97	12.42	0
<i>hsa-mir-372</i>	1.95	4.99	0.68
<i>hsa-mir-182</i>	1.95	9.29	0.68
<i>hsa-mir-129-prec</i>	1.95	8.72	0.68
<i>hsa-mir-193</i>	1.92	8.72	0.68
<i>hsa-mir-325</i>	1.92	2.82	0.68
<i>hsa-mir-183-prec</i>	1.92	7.61	0.68
<i>hsa-mir-196b-prec</i>	1.92	4.89	0.68
<i>hsa-mir-182-prec</i>	1.92	8.62	0.68
<i>hsa-mir-192</i>	1.89	5.6	0.68
<i>hsa-mir-367-prec</i>	1.87	2.82	0.68

图 18 续

<i>hsa-mir-299-prec</i>	1.87	6.83	0.68
<i>hsa-mir-200c-prec</i>	1.85	6.65	0.68
<i>hsa-mir-204</i>	1.84	5.11	0.68
<i>hsa-mir-299</i>	1.84	3.37	0.68
<i>hsa-mir-29a</i>	1.83	2.29	1
<i>hsa-mir-203-prec</i>	1.77	6.73	1
<i>hsa-mir-331-prec</i>	1.76	3.81	1
<i>hsa-mir-95</i>	1.75	3.52	1
* <i>hsa-mir-30d-prec</i>	1.73	2.04	1
<i>hsa-mir-200c</i>	1.72	5.72	1
<i>hsa-mir-205</i>	1.71	5.41	1
<i>hsa-mir-196a-prec</i>	1.67	3.76	1
<i>hsa-mir-17-prec</i>	1.66	1.97	1
<i>hsa-mir-103</i>	1.65	2.56	1
<i>hsa-mir-193-prec</i>	1.63	4.16	1
<i>hsa-mir-93</i>	1.61	2.66	1
<i>hsa-mir-373-prec</i>	1.57	2.92	1
<i>hsa-mir-190</i>	1.54	5.38	1
<i>hsa-miR-373</i>	1.53	3.24	1
<i>hsa-mir-196b-prec</i>	1.53	3.66	1
<i>hsa-mir-134</i>	1.48	4.06	1.88
<i>hsa-mir-19b-1</i>	1.47	2.48	1.88
<i>hsa-mir-196-1</i>	1.46	2.88	1.88
<i>hsa-let-7f</i>	1.46	1.67	1.88
<i>hsa-mir-324</i>	1.42	2.84	1.88
<i>hsa-mir-371-prec</i>	1.34	2.95	2.75

\* 这些 miRNA 位于染色体 8。

对于该分析，我们仅纳入具有分离的三体性 8 的样品。将这些样品与具有已知的细胞遗传学的其他 AML 样品（具有三体性 8 作为第二细胞遗传异常情况的那些样品除外）比较。

所有 miRNA 被上调。

图 18 续

特征	值
年龄	52 (18-83)
性别	女 25(46)
	男 29(54)
白细胞计数 $\times 10^9/L$	
中值	50.3
范围	(2.4-335)
骨髓母细胞%	64.2 (20-99)
FAB 数目 (%)	
M0	1(1.8)
M1	10(18)
M2	15(28)
M4	8(15)
M5	2(3.7)
M6	3(5.5)
M7	2(3.7)
未知	13(24)
细胞遗传学	
正常核型	10(18)
-7	1(1.8)
11q23 重排	4(7)
t(6;9)(p23;q34)	2(3.7)
+8	5(9)
复杂核型	15(27)
其他	10(20)
未进行	7(13)
病人状态	
原发性难治性	20(37)
复发的	34(63)

图 19

特征	完全缓解	治疗失败
N	11	13
年龄		
中值	62.82	61.85
范围	41-74	43-75
性别		
女	7(63)	7(53)
男	4(37)	6(47)
白细胞计数 $\times 10^9/L$		
中值	48.48	40.15
范围	2.1-156	3.2-102
BM 母细胞 (%)		
中值	45.5	50.6
范围	21-91	21-88
FAB 数目 (%)		
M0-M1	3(27.5)	4(30.4)
M2	3(27.5)	1(7.6)
M4-M5	5(45)	6(46)
未知	0	2(16)
细胞遗传学数目 (%)		
正常核型	6(55)	5(38)
复杂核型*	4(36)	3(23)
T(9;11)	0	1(7)
其他	0	2(16)
未进行	1(9)	2(16)
随访(周)		
中值	64.2	81.37
范围	8-125	8-207

\* 复杂核型定义为 3 种或更多种细胞遗传异常情况。

关于表中所示的特征，2 组患者之间未观察到统计上显著的差异 (t-检验和 Fisher 精确检验, SPSS)。

在诱导化疗(在第 1 至 3 天每天伊达比星  $12\text{mg}/\text{m}^2$ , 和每天以  $1500\text{mg}/\text{m}^2$  连续输注阿糖胞苷, 进行 4 天) 后 4 周通过骨髓和外周血检查评价响应。通过骨髓抽吸物中  $< 5\%$  的母细胞的存在, 绝对外周嗜中性粒细胞计数  $> 1 \times 10^9/L$ , 血小板  $> 100 \times 10^9/L$  和无髓外疾病的残留定义完全缓解 (CR)。

图 20

微RNA	SAM 评分	变化 倍数	FDR (%)
<i>hsa-mir-183</i>	-3.04	5.50	0
<i>hsa-mir-208-prec</i>	-2.99	3.20	0
<i>hsa-mir-184</i>	-2.96	5.60	0
<i>hsa-mir-29b</i>	-2.92	3.10	0
<i>hsa-mir-194</i>	-2.89	4.30	0
<i>hsa-mir-183-prec</i>	-2.73	3.20	0
<i>hsa-mir-205</i>	-2.71	3.10	0
<i>hsa-mir-337</i>	-2.66	4.30	0
<i>hsa-mir-199a</i>	-2.65	3.50	0
<i>hsa-mir-199a-prec</i>	-2.64	3.10	0
<i>hsa-mir-193</i>	-2.61	3.10	0
<i>hsa-mir-204</i>	-2.59	4.50	0
<i>hsa-mir-203</i>	-2.58	3.10	0
<i>hsa-mir-182</i>	-2.57	3.10	0
<i>hsa-mir-299-prec</i>	-2.57	3.10	0
<i>hsa-mir-198</i>	-2.57	2.70	0
<i>hsa-mir-337-prec</i>	-2.55	3.50	0
<i>hsa-mir-203-prec</i>	-2.55	2.70	0
<i>hsa-mir-204-prec</i>	-2.55	2.90	0
<i>hsa-mir-200c</i>	-2.55	2.90	0
<i>hsa-mir-200cprec</i>	-2.54	2.60	0
<i>hsa-mir-192</i>	-2.46	2.70	0
<i>hsa-mir-199b</i>	-2.45	2.60	0
<i>hsa-mir-182-prec</i>	-2.45	2.50	0
<i>hsa-mir-29c</i>	-2.38	2.60	0

所有 miRNA 在用伊达比星和阿糖胞苷诱导后未实现完全缓解的患者中下调。

图 21