



(45) 授权公告日 2015.01.21

审查员 赵桂芹

序列表14页 附图3页

[illegible]

1. 用于检测 miR15 或 miR16 基因产物的试剂在制备一种诊断药物中的应用,所述诊断药物用于诊断慢性淋巴性白血病 (CLL) 和前列腺癌。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述试剂是一种核酸。

3. 根据权利要求 2 所述的应用,其中,所述核酸是 DNA。

4. 根据权利要求 2 所述的应用,其中,所述核酸是 RNA。

5. 根据权利要求 2 所述的应用,其中,所述核酸包括 SEQ ID NO :5 或者 SEQ ID NO :6。

6. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述试剂是被标记的。

7. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,miR15 或者 miR16 基因产物选自由具有 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 所示序列的基因产物所组成的组中。

8. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述诊断药物在一种实验中被使用,所述实验选自由 northern blot 分析、原位杂交和定量反转录聚合物酶链式反应所组成的组中。

9. 用于检测 miR15 或 miR16 基因产物或其突变体的试剂在制备一种诊断药物中的应用,所述诊断药物用于诊断慢性淋巴性白血病 (CLL) 和前列腺癌。

10. 根据权利要求 9 所述的应用,其中,所述试剂是一种核酸。

11. 根据权利要求 10 所述的应用,其中,所述核酸是 DNA。

12. 根据权利要求 10 所述的应用,其中,所述核酸是 RNA。

13. 根据权利要求 9 所述的应用,其中,所述试剂是被标记的。

14. 根据权利要求 9 所述的应用,其中,miR15 或者 miR16 基因产物选自由具有 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :3 和 SEQ ID NO :4 所示序列的基因产物所组成的组中。

15. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述诊断药物在一种实验中被使用,所述实验选自由 northern blot 分析、原位杂交和定量反转录聚合物酶链式反应所组成的组中。

16. 用于检测 miR15 或 miR16 基因拷贝数或其突变体的试剂在制备一种诊断药物中的应用,所述诊断药物用于诊断慢性淋巴性白血病 (CLL) 和前列腺癌。

17. 根据权利要求 16 所述的应用,其中,所述试剂用于分析 13q14 处的 D13S273 或 D13S272 微卫星标记的杂合丢失。

18. 根据权利要求 17 所述的应用,其中,所述试剂用于分析 D13S1150 或 D13S273 微卫星标记的杂合丢失。

19. 根据权利要求 18 所述的应用,其中,所述试剂用于分析位点 Alu18 或 D13S273 微卫星标记的杂合丢失。

20. 根据权利要求 16 所述的应用,其中,所述试剂是一种核酸。

21. 根据权利要求 20 所述的应用,其中,所述核酸是 DNA。

22. 根据权利要求 20 所述的应用,其中,所述核酸是 RNA。

23. 根据权利要求 16 所述的应用,其中,所述试剂是被标记的。

24. 根据权利要求 16 所述的应用,其中所述诊断试剂用于 Southern blot 杂交。

用于癌症诊断和治疗的组合物和方法

[0001] 本申请是 2003 年 11 月 12 日递交的申请号为 200380104787.6, 发明名称为“用于癌症诊断和治疗的组合物和方法”的分案申请。

[0002] 政府许可

[0003] 本发明部分受到国家癌症研究所的支持, 许可号为 P01CA76259, P01CA81534, 和 P30CA56036。美国政府对于本发明具有一定的权利。

发明领域

[0004] 本发明涉及癌症的诊断, 特别是通过检测 miR15 和 miR16 拷贝数目, 突变情况, 或基因表达来诊断慢性淋巴性白血病或前列腺癌。本发明还涉及癌症的治疗, 包括 miR15 或 miR16 基因表达的减少或缺失, 特别是通过施用 miR15 或 miR16 基因产物治疗慢性淋巴性白血病或前列腺癌。

[0005] 发明背景

[0006] 在美国和全世界癌症都是死亡和发病的一个重要原因。特别是慢性淋巴性白血病 (“CLL”) 和前列腺癌在临床上是重要的成人肿瘤病。CLL 是西方世界是最普遍的一种成人白血病形式。而且在美国的男人中, 前列腺癌的年龄校正发病率目前超过了所有其它癌症, 仅次于肺癌, 是该国家所有男性癌症死亡的第二大原因。

[0007] 在多于一半的报道 CLL 病例中都会发生 13q14 的半合子丢失和 / 或纯合子丢失, 这构成了 CLL 中最频繁的染色体异常。CLL 患者的组织样品的染色体组型相对具有较少的染色体异常, 这表明所观察到的 13q14 缺失的特异性和频率具有病理学重要性。除此之外, 60% 的前列腺癌中也具有 13q14 缺失, 表明 CLL 和前列腺癌的发病机理涉及位于 13q14 的一种或多种肿瘤抑制基因。

[0008] CLL 和前列腺癌中同时存在克隆性纯合和杂合性缺失, 以及非常高的 13q4 丢失频率, 表明该区域的缺失与特定癌症类型的病因有关。对几种基因进行位置克隆以鉴别缺失部位的基因。至今从突发性 CLL 和遗传性 CLL 的 13q14 的缺失区域共鉴别了八个基因, 并检测了其 DNA 和 / 或 RNA 水平的改变: Leu1 (BCMS 或 EST70/Leu1), Leu 2 (ALT1 或 1B4/Leu2), Leu 5 (CAR), CLLD6, KPNA3, CLLD7, LOC51131 (推测的锌指蛋白 NY-REN-34 抗原) 和 CLLD8。但是, 详细的基因分析, 包括大范围的杂合性丢失 (LOH), 突变和表达研究, 却没能证明任何这些基因与致癌作用的关系。

[0009] 小分子 RNA (miRNA) 存在于超过一百种不同的生物体中, 包括果蝇, 线虫和人。认为在这些生物体中在多种发育调节过程中都涉及到 miRNA, miRNA 典型地是通过 60 到 70 个核苷酸的反馈 RNA 前体结构的处理得到的, 该反馈 RNA 前体结构是由 miRNA 基因转录而来的。RNA 前体或处理的 miRNA 产物很容易检测, 缺少这些分子表明相应 miRNA 基因的缺失或功能丢失。

[0010] 目前 CLL 的治疗典型地包括化学疗法, 单独施用或与自体同源骨髓移植一起进行。所使用的化学治疗剂通常对患者具有毒性, 在大部分患者中都只是达到部分缓解的效果。前列腺癌和其它癌症治疗的疗法也包括化学疗法, 通常是在外科手术切除肿瘤以后。但

是,对于 CLL,化学治疗剂(与外科手术一起进行或不与其一起进行)的治疗受到限制。

[0011] 前列腺癌也可以用外部射线照射或近距离放射疗法(例如使用具有放射活性的“种子”)治疗,也是单独使用或与外科手术一起使用。这种治疗的危险是将患者的正常组织暴露在放射线之中,以及可能不是完全有效。

[0012] CLL 或前列腺癌需要有快速,经济和准确的诊断性检测。对于癌症还需要有经济和有效的并且对患者没有显著的负面影响的,特别是 CLL 或前列腺癌。

[0013] 发明简述

[0014] 现已发现在人中,miR15 或 miR16 基因位于 13q14,而在很大一部分 CLL 或前列腺癌患者中 13q14 区域都缺失。还发现 miR15 或 miR16 基因的 RNA 产物抑制 CLL 和前列腺癌细胞的赘生物或肿瘤生长。这些 RNA 产物可以用于癌症治疗,对 miR15 或 miR16 基因进行负调控。

[0015] miR15 和 miR16 小分子 RNA 基因位于 13q14,在 CLL 和前列腺癌丢失的 30kb 区域中,在大部分 CLL 和前列腺癌中这两个基因都缺失或受到负调控。因此,本发明提供了一种 CLL 或前列腺癌的诊断性检测,包括检测这些基因的基因产物,检测 miR15 或 miR16 基因的拷贝数,或测定其突变情况。

[0016] 在一个实施方案中,所述诊断检测包括从怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者中分离 RNA,用 miR15 或 miR16 前体或处理过的 miRNA 的探针用 Northern blot 杂交检测 miR15 或 miR16 基因产物,其中 miR15 或 miR16 前体或处理过的 miRNA 与正常样品对照相比有所减少则诊断为 CLL 或前列腺癌。

[0017] 在另一个实施方案中,所述诊断检测包括从怀疑患有 miR15 或 miR16 介导的癌症例如 CLL 或前列腺癌的患者中分离 DNA,用 miR15 或 miR16 基因序列的探针用 Southern blot 杂交检测 miR15 或 miR16 基因拷贝数,其中基因拷贝数减少到 1 或 0 则诊断为 CLL 或前列腺癌。

[0018] 在另一个实施方案中,所述诊断检测包括通过评价 D13S273 和 D13S272 标记的杂合性丢失检测 miR15 或 miR16 基因拷贝数的减少,其中有这些标记的杂合性丢失诊断为 CLL 或前列腺癌。

[0019] 在另一个实施方案中,所述诊断检测包括从怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者中分离 DNA,用 PCR 扩增 miR15 或 miR16 基因片段检测 miR15 或 miR16 基因的缺失或突变并将该扩增片段与正常样品对照的扩增片段相比较,其中在 miR15 或 miR16 基因的一个或多个拷贝中检测到突变则诊断为 CLL 或前列腺癌。可以用单链构象多态性方法比较扩增片段。在一方面,所述突变为 miR15 或 miR16 基因序列的部分缺失。

[0020] 在另一个实施方案中,所述诊断检测包括从怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者中分离 RNA,检测到 miR15 或 miR16 基因产物的突变则诊断为 CLL 或前列腺癌。

[0021] 在另一个实施方案中,所述诊断检测包括从怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者中分离 RNA,用逆转录酶-聚合酶链式反应扩增 miR15 或 miR16 前体或处理过的 miRNA 从而检测 miR15 或 miR16 基因产物的水平,其中 miR15 或 miR16 前体或处理过的 miRNA 与内对照的扩增 RNA 相比有所减少则诊断为 CLL 或前列腺癌。

[0022] 本发明还提供了一种在需要治疗的患者中治疗 miR15 或 miR16 介导的癌症的方法,包括将有效量的 miR15 或 miR16 基因产物给予患者,由此癌细胞的增殖受到抑制。

[0023] 本发明还提供了一种在需要治疗的患者中治疗 miR15 或 miR16 介导的癌症的方法,其中分离患者的细胞并在离体条件下用有效量的含有编码 miR15 或 miR16 基因产物的序列的核酸转染。然后将这些细胞重新植入到患者体内,由此患者的癌细胞的增殖受到抑制。

[0024] 本发明进一步提供了一种在患者中抑制 miR15 或 miR16 介导的癌症的增殖的方法,包括向细胞递送有效量的 miR15 或 miR16 基因产物。

[0025] 本发明进一步还提供了一种治疗患有 miR15 或 miR16 介导的癌症的患者的药物组合,包括分离的 miR15 或 miR16 基因产物,或编码 miR15 或 miR16 基因产物的核酸,以及药学可接收的载体。

[0026] 附图简述

[0027] 图 1A 和图 1B 分别是预测的 miR15 和 miR16 前体 RNA 的二级结构的示意图。用“mfold”程序,3.1 版,Matthews et al. (1999),J. Mol. Biol. 288 :911-940 进行 RNA 二级结构预测,人工修饰以使螺旋区段内包含 G/U 摆动碱基对。处理的 miR15 和 miR16 miRNA 以下划线表示。根据 Lagos-Quintana et al. (2001),Science 294 :853-858 进行了修改。

[0028] 图 2A 是 CLL 中 13q14 肿瘤抑制子位点内的基因图谱,显示出 miR15/16 基因簇的定位。其中显示了遗传标记和基因在图谱上的位置。

[0029] 图 2B 是已报道过的 13q14 缺失图谱,用水平条框标记。

[0030] 图 2C 是 D13S1150 和 D13S272 标记之间的位点图谱。在此位点上每个基因的方向都在基因名称下方用箭头标出,彩色的垂直条表示每个基因相应外显子的位置。

[0031] 图 2D 是 Alu 18 和 D13S272 标记之间的位点图谱。条和框表示 LEU2/ALT1 和 LEU1 外显子的位置。短垂直箭头表示 miR15 或 miR16 基因的位置。圆点表示用于筛选衍生自两种独立的白血病细胞 (CLL-A 和 CLL-B) 的融合细胞的体细胞杂交克隆的 PCR 引物的位置。填充框表示杂交体中的染色体 13 的部分。“←~ 31.4kb →”表示在来自患有具有 t(2 ;13) (q12 ;q13) 移位的 CLL,两边眼癌,溃疡性结肠炎的患者克隆 CLL-A 中大约 31.4kb 的缺失区域。长垂直箭头表示具有 t(2 ;13) (q32 ;q14) 移位的克隆 CLL-B 的断点位置,“←~ 29kb →”表示该克隆中大约 29kb 的缺失区域。

[0032] 图 3A 是正常人肾,前列腺,肝脏,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 miR15 和 miR16 基因表达的 Northern blot 分析。

[0033] 图 3B 是在 18 个 CLL 患者中微卫星标记 D13S272 和 D13S273 的杂合丢失 (“LOH”) 分析。用来自正常人 CD5+ 细胞的 DNA 作为对照。样品的 LOH 状态用“+/+ 杂合”,“+/-LOH”,“-/- 纯合缺失”,“NI” (无意义),“?” (没有足够材料) 和 “ND” (未实施)。用溴化乙锭染色的 Northern 凝胶作为归一化对照。

[0034] 发明详述

[0035] 本文给出的所有核酸序列都是 5' 到 3' 方向的。此外,核酸序列中的所有脱氧核糖核苷酸都用大写字母表示 (例如,脱氧胸腺嘧啶为 “T”),核酸序列中的核糖核苷酸用小写字母表示 (例如尿嘧啶为 “u”)。

[0036] CLL 或前列腺癌可以通过检测 miR15 或 miR16 基因拷贝数的减少,或者通过检测 miR15 或 miR16 基因的一个或多个拷贝的突变来诊断。miR15 或 miR16 基因拷贝数从双倍

减少为单倍,或者减少到没有拷贝,则诊断为 CLL 或前列腺癌。同样地,miR15 或 miR16 基因的一个或多个拷贝的突变表示基因功能的丢失,则诊断为 CLL 或前列腺癌。

[0037] 这里所用的“CLL 细胞”是来自患有或怀疑患有 CLL 的患者的淋巴细胞,其中淋巴细胞的“CLL 分数”至少为 4,这是根据 Matutes et al. (1994), *Leukemia* 8(10):1640-1645 所述的评分系统确定的,在此引入其全文作为参考。这里所用的“前列腺癌细胞”是来源于的前列腺的赘生物或肿瘤细胞,不管其是否位于前列腺中。本领域技术人员可以容易地鉴别 CLL 或前列腺癌细胞。

[0038] miR15/miR16 基因簇的位置在 13q14。这些基因的核酸序列包含在克隆 317g11 中,其核苷酸序列的 GenBank 记录号是 AC069475。在此引入该记录的全部内容作为参考。可以通过测定怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者组织中的这些基因的结构或序列,并将其与该患者的未受影响的组织样品中,或正常对照组织的样品中的这些基因的结构或序列进行比较,从而检测 miR15 或 miR16 基因的缺失或突变。可以用任何适当的方法进行这种比较。

[0039] 根据本发明,要诊断 miR15 或 miR16 介导的癌症,要从患者中获取组织样品。然后制备样品并测定 miR15 或 miR16 基因产物的表达或 miR15 或 miR16 基因的缺失或突变。组织样品包括感兴趣的活组织,以及血液和体液样品。

[0040] 这里所说的“miR15 或 miR16 介导的癌症”是指在至少一部分与该癌症相关的肿瘤细胞或赘生物细胞中 miR15 或 miR16 基因减少或缺失的任何癌症。miR15 或 miR16 介导的癌症的实例包括 CLL 和前列腺癌。

[0041] miR15 或 miR16 缺失或突变的存在可以通过患者基因组 DNA 的 Southern blot 杂交来检测,使用 miR15 或 miR16 基因的探针,例如如下所述的。另外,可以从怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者中获取血液样品,分离白细胞进行 DNA 提取。优选血液或组织样品是从还没有开始放射疗法或化学疗法的患者中获得的。作为对照的相应的组织或血液样品可以从该患者的未受影响的组织中,或者从正常的人个体中获得。

[0042] Southern blot 杂交技术是本领域技术人员公知的。例如将从怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者组织或血液中分离的基因组 DNA 用限制性内切酶消化。消化产生基因组 DNA 的限制性片段,可以用电泳,例如琼脂糖电泳分离。然后将限制性片段点样在杂交膜(例如硝酸纤维素或尼龙)上,并与 miR15 或 miR16 基因特异的标记探针进行杂交。与该患者的 DNA 样品进行了相同处理的对照 DNA 样品相比,杂交膜上限制性片段类型的改变表示这些基因发生缺失或突变。本领域普通技术人员可以容易地确定适合于检测 miR15 或 miR16 基因拷贝数或突变的探针标记和杂交条件。这里所用的术语“缺失”是指基因的部分缺失或全部基因缺失。

[0043] 用于 Southern blot 杂交的 miR15 和 miR16 核酸探针可以根据公开的 miR15 和 miR16 小分子 RNA 的序列用 Lagos-Quintana et al. (2001), *Science* 294: 853-858 所述的方法设计,在此引入其全文作为参考。miR15 小分子 RNA 的核苷酸序列是 uagcagcacauaaugguuugug (SEQ ID NO:3)。miR16 小分子 RNA 的核苷酸序列是 uagcagcacguaaauauuggcg (SEQ ID NO:4)。检测 miR15 和 miR16 DNA 的合适探针分别是:

[0044] CACAAACCATATGTGCTTGCTA (SEQ ID NO:5)

[0045] GCCAATATTTACGTGCTGCTA (SEQ ID NO:6)

[0046] SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:6 的互补序列也可以用作 miR15 和 miR16 DNA 的探针。

[0047] 制备标记的 DNA 和 RNA 探针的方法, 以及与靶核苷酸序列杂交的条件如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., eds., 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Chapters 10 and 11 所述, 在此引入作为参考。

[0048] 例如, 核酸探针可以用例如放射性核素如 ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C 或 ^{35}S ; 重金属; 或者能与标记的配体特异性结合的配体 (例如生物素, 抗生物素蛋白或抗体), 荧光分子, 化学发光分子, 酶等物质进行标记。

[0049] 可以用 Rigby et al. (1977), J. Mol. Biol. 113:237-251 所述的缺口平移法或 Fienberg et al. (1983), Anal. Biochem. 132:6-13 所述的随机引物法获得高比活性的标记探针, 在此引入其全文作为参考。后者则是从单链 DNA 或 RNA 模板合成高比活性 ^{32}P 标记的探针的方法。例如, 根据缺口平移法, 通过用具有高放射活性的核苷酸替换已存在的核苷酸, 可以制备得具有超过 10^8cpm/mg 的比活性的 ^{32}P 标记的核酸探针。然后将杂交膜曝光在胶片上, 进行放射自显影检测。对杂交膜曝光的胶片进行光密度扫描, 得到 miR15 或 miR16 基因拷贝数的精确测量结果。而且 miR15 或 miR16 基因拷贝数还可以用计算机成像系统, 例如 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 的 Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager 进行定量分析。

[0050] 如果无法用放射性核素对 DNA 或 RNA 探针进行标记, 可以使用随机引物法将 dTTP 类似物 5-(N-(N-生物素基-氨基己酸基)-3-氨基烯丙基) 脱氧尿嘧啶三磷酸盐引入到探针分子中。生物素化的探针寡核苷酸可以通过与与荧光染色或能产生颜色反应的酶偶连的生物素结合蛋白如抗生物素蛋白, 抗生物素蛋白链菌素, 或抗生物素抗体反应来检测。

[0051] miR15 或 miR16 基因的缺失或突变还可以通过用聚合酶链式反应 (PCR) 扩增这些基因的片段, 用测序或电泳分析扩增的片段以确定患者 DNA 样品的扩增片段的序列和 / 或长度是否和对照 DNA 样品有所不同来检测。本领域普通技术人员可以容易地确定 DNA 片段的 PCR 扩增的合适反应和循环条件。如下所述的实施例中使用的方法给出了典型的 PCR 反应和循环条件。

[0052] miR15 或 miR16 介导的癌症的诊断可以通过检测不同染色体标记, 例如图 1A, 1B, 和 2A-2D 中所示的各标记之间 13q14 的缺失来进行。例如, 在含有 miR15 或 miR16 的微卫星标记 D13S272 和 D13S273 之间的 13q14 区域的缺失表明存在 miR15 或 miR16 介导的癌症。另外, 如果 13q14 的缺失是在微卫星标记 D13S1150 和 D13S273 之间或是在 Alu18 位点和微卫星标记 D13S273 之间, 其中 miR15 或 miR16 缺失, 则表明存在 miR15 或 miR16 介导的癌症。

[0053] 另外一种确定组织样品中每个二倍体基因组的 miR15 或 miR16 基因数目的方法是基于 miR15/miR16 基因簇位于 13q14 并且与标记 D13S272 和 D13S273 相连的事实。在与 D13S272 和 D13S273 标记相连的位点杂合的个体的 miR15 或 miR16 基因拷贝的丢失可以从这些标记杂合的丢失推知。确定染色体标记杂合丢失的方法是本领域技术人员公知的。下述实施例 3 中给出了杂合丢失研究的实例。

[0054] 另一种确定怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者中 miR15 或 miR16 基因是否突变的方法是单链构象多态性 (SSCP), 例如 Orita et al. (1989), Genomics 5:874-879 和 Hayashi (1991), PCR Methods and Applic. 1:34-38 中所述的, 在此引入其全文作为参考。SSCP 方法包括通过 PCR 扩增感兴趣的基因片段, 使片段变性并在非变性条件下用两条变性

单链进行电泳。单链呈现复杂的依赖于序列的链内二级结构,影响链的电泳迁移率。

[0055] miR15 或 miR16 基因中一个或全部的缺失或突变还会引起 miR15 或 miR16 基因表达的减少。因此,CLL 或前列腺癌还可以通过检测 miR15 或 miR16 基因产生的 RNA 的表达水平来诊断,miR15 或 miR16 基因表达的减少则诊断为 CLL 或前列腺癌。

[0056] miR15 和 miR16 基因每个都转录产生~70kb 的前体 RNA,形成茎环结构。前体 RNA 不翻译成蛋白质,而是进一步处理成为“小分子 RNA”或“miRNA”,认为这才是有功能的基因产物。

[0057] 这里所说的“miR15 或 miR16 基因产物”是指由 miR15 和 miR16 基因而来的处理过的或是未处理的 RNA 转录物,下面将进一步说明。术语“RNA”,“RNA 转录物”和“基因产物”在本文中述及 miR15 或 miR16 基因表达时可互换使用。

[0058] miR15 和 miR16 前体 RNA 如 Lagos-Quintana et al. (2001), Science 294, 853-858 所述,在此引入其全文作为参考。miR15 和 miR16 前体 RNA 的序列如 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 所示。预测的 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2 的茎环结构分别如图 1A 和图 1B 所示。

[0059] [SEQ ID NO:1]:

[0060] ccuuggaguaaaguagcagcacauaaugguuuguggauuuugaaaaggugcaggccauauugugcugcc
ucaaaaauacaagg

[0061] [SEQ ID NO:2]:

[0062] gucagcagugccuagcagcacguaaaauuuggcguaaagauucuaaaauuauuccagauuaacugu
g cugcugaagu aagguugac

[0063] 不受任何理论的限制,认为 miR15 和 miR16 前体 RNA 是由 miR15/miR16 基因簇共表达的,由 Dicer/Argonaute 复合体处理成为功能性 miRNA 产物。参见,例如 Lee et al. (2001), Science 294:862。这些基因产生的两个功能性 miRNA 产物都是长度为 22 个核苷酸的单链 RNA 分子,5' 端具有单磷酸盐,3' 端具有羟基。处理过的 miR15 小分子 RNA 的核苷酸序列是 uagcagcacauaaugguuugug (SEQ ID NO:3)。处理过的 miR16 小分子 RNA 的核苷酸序列是 uagcagcacguaaaauuuggcg (SEQ ID NO:4)。在本发明中,可以检测到由 miR15 或 miR16 基因产生的 60-70nt 的 RNA 前体分子。另外还可以检测到由 Dicer 和 Argonaute 蛋白对前体 RNA 进行处理产生的较短的 miR15 和 miR16 小分子 RNA 基因产物。

[0064] 确定 RNA 表达水平的方法是本领域技术人员公知的。例如,如上所述从怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者中获得组织或血液样品。如上所述从患者的未受影响的组织中,或从正常人个体中获得相应的组织或血液样品作为对照。对照组织或血液样品与患者的样品一同处理。然后将患者中 miR15 或 miR16 基因的表达水平与患者中未受影响的组织的相比,或者与正常对照的组织或血液中的 miR15 或 miR16 表达水平相比。例如,CLL 细胞或样品前列腺癌细胞中的相对 miR15 或 miR16 表达水平可以相对于一种或多种标准容易地确定。这些标准包括,例如,一种是表达水平为零,另一种是同一个患者的正常组织的基因表达水平,或正常对照组组织中的表达水平。所述标准还可以包括标准细胞系中的 miR15 或 miR16 表达水平。miR15 或 miR16 表达与正常表达水平相比减少的量表示治疗后将具有的临床效果。

[0065] 另外,还可以将怀疑患有 CLL 或前列腺癌的患者中的 miR15 或 miR16 基因表达水平与先前获得的正常对照人群的 miR15 或 miR16 基因表达的平均水平相比较。

[0066] 确定细胞中特定基因的 RNA 转录物水平的适当方法是本领域技术人员公知的。根据其中一种方法。用核酸提取缓冲液进行匀浆从细胞中提取总细胞 RNA, 然后离心。使核酸沉淀, 用 DNA 酶处理和沉淀除去 DNA。然后根据标准方法用琼脂糖凝胶电泳分离 RNA 分子, 用例如所谓的“Northern” blotting 技术转移到硝酸纤维素膜上。然后通过加热将 RNA 固定在膜上。用与所述 RNA 互补的具有适当标记的 DNA 或 RNA 探针对特定的 RNA 进行检测和定量。参见, 例如, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., eds., 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Chapter 7, 在此引入其全文作为参考。用于 miR15 或 miR16 RNA 的 Northern blot 杂交的适当探针包括 SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6。

[0067] 将杂交膜曝光在胶片上, 对与 miR15 或 miR16 RNA 杂交的探针进行放射自显影检测。对杂交膜曝光的胶片进行光密度扫描可以精确地测量 RNA 转录水平。另外, 还可以通过杂交结果的计算机成像对 RNA 转录水平进行定量分析, 例如用 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 的 the Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager。

[0068] 除了 Northern 和其它 RNA blotting 杂交技术, 还可以用原位杂交技术检测 RNA 转录水平。这种技术比 Northern blotting 技术需要的细胞要少, 包括将全细胞沉积在显微镜的盖片上, 用含有放射性标记或其它标记的 cDNA 或 cRNA 探针的溶液检测细胞的核酸含量。这种技术特别适用于分析来自怀疑患有前列腺癌患者的生物活组织样品。更详细的原位杂交的操作方法如美国专利序列号 5, 427, 916 所述, 在此引入其全文作为参考。适用于 miR15 或 miR16 RNA 的原位杂交的探针包括 SEQ ID NO :5 和 SEQ ID NO :6。

[0069] miR15 或 miR16 转录物的相对数目还可以通过 miR15 或 miR16 转录物的反向转录, 然后进行聚合酶链式反应扩增 (RT-PCR) 来测定。miR15 或 miR16 转录物水平可以与内标相比较定量, 例如, 相同样品中“持家”基因的 mRNA 水平。可用作内标的合适的“持家”基因包括肌球蛋白或甘油醛-3-磷酸酯脱氢酶 (G3PDH)。适用于定量 RT-PCR 的方法以及其它方法是本领域普通技术人员公知的。

[0070] 测量 miR15 和 miR16 表达的其它方法也是本领域技术人员公知的, 包括各种测量 RNA 转录和降解速度的方法。

[0071] 可以将分离的 miR15 或 miR16 基因产物, 单独或是组合给予 miR15 或 miR16 介导的癌症细胞, 从而治疗 miR15 或 miR16 介导的癌症。不希望受到任何理论的限制, 认为 miR15 或 miR16 基因产物能够抑制这些癌细胞的赘生物或肿瘤生长。

[0072] 特别是, 可以将分离的 miR15 或 miR16 基因产物单独或是组合给予 CLL 或前列腺癌细胞, 来治疗 CLL 或前列腺癌。

[0073] 这里所说的“miR15 或 miR16 介导的癌症细胞”是指从患有 miR15 或 miR16 介导的癌症的患者中分离得到的肿瘤或是赘生物细胞。miR15 或 miR16 介导的癌症细胞可以通过检测细胞中 miR15 或 miR16 基因产物的减少或缺失, 或者通过检测细胞中的癌症或赘生物表型来识别。本领域技术人员可以容易地识别具有癌症或赘生物表型的细胞。例如, 培养物中的细胞对于接触诱导的生长抑制不敏感, 继续培养的时候聚集在一起。癌症或赘生物细胞还表现出特有的形态学变化, 细胞集落无组织生长以及不贴壁生长。癌症或赘生物细胞还具有在易感动物中形成侵入性肿瘤的能力, 这可以用本领域的技术通过将细胞注射到无胸腺小鼠中来评价。

[0074] 这里所说的“分离的”基因产物是通过人为介入使得与其自然状态不同或从其自然状态中分离出来的基因产物。例如,天然存在于活的动物中的 RNA 不是“分离的”。合成的 RNA,或者从其自然状态的共存物中部分或全部分离出来的 RNA 是“分离的”。分离的 RNA 可以基本上纯的形式存在,也可以存在于 RNA 递送到其中的细胞中。因此,递送到细胞中,或者在细胞,例如 CLL 或前列腺癌细胞中表达的 miR15 或 miR16 基因产物认为是“分离的”基因产物。

[0075] 可以用多种标准方法得到 miR15 或 miR16 基因产物。例如,基因产物可以化学合成或者用本领域公知的方法重组产生。优选地,所述 RNA 产物用适当保护的核糖核苷亚磷酰胺和传统 DNA/RNA 合成仪化学合成。合成 RNA 分子或合成试剂的供应商包括 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)。

[0076] 另外,miR15 和 miR16 基因产物可以用任何适当的启动子用重组环形或线性 DNA 质粒表达。用于在质粒中表达 RNA 的适当启动子包括 U6 或 H1 RNA pol III 启动子序列,或巨细胞病毒启动子。本领域技术人员熟知如何选择其它合适的启动子。本发明的重组质粒还可以包括诱导型或调节型启动子,用以在 CLL,前列腺癌,或其它细胞中表达 miR15 和 miR16 基因产物。

[0077] 重组质粒表达的 miR15 和 miR16 基因产物可以用标准方法从培养的细胞表达系统中分离出来。重组质粒表达的 miR15 和 miR16 基因产物还可以递送到 CLL 或前列腺癌细胞中或直接在其中表达。用重组质粒将 miR15 和 miR16 基因产物递送到 CLL 或前列腺癌细胞中将在下面详细讨论。

[0078] miR15 和 miR16 基因产物可以分别在单独的重组质粒中表达,或者也可以在同一个重组质粒中表达。优选地,miR15 和 miR16 基因产物在单个质粒中作为 RNA 前体分子表达,然后用适当的处理系统将前体分子处理成为功能性 miRNA 分子。适当的处理系统包括体外果蝇细胞溶出液系统,如 Tuschl 等的美国公开申请 2002/0086356 中所述的,在此引入其全文作为参考。

[0079] 适于表达 miR15 和 miR16 基因产物的质粒的选择,向质粒中插入核酸序列并表达基因产物的方法,以及将重组质粒递送到感兴趣细胞中的方法都是本领域技术人员公知的。参见,例如 Zeng et al. (2002), Molecular Cell 9:1327-1333;Tuschl (2002), Nat. Biotechnol, 20:446-448;Brummelkamp et al. (2002), Science 296:550-553;Miyagishi et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:497-500;Paddison et al. (2002), Genes Dev. 16:948-958;Lee et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:500-505;和 Paul et al. (2002), Nat. Biotechnol. 20:505-508,在此引入其全文作为参考。

[0080] 在优选的实施方案中,用于表达 miR15 或 miR16 基因产物的质粒包括处于 CMV 中早期启动子控制之下的编码 miR15 或 miR16 前体 RNA 的序列。这里所述的“处于启动子控制之下”表示编码 miRNA 产物的核酸序列位于该启动子的 3' 端,使得该启动子可以起始 miRNA 产物编码序列的转录。

[0081] miR15 或 miR16 基因产物还可以用重组病毒载体表达。miR15 和 miR16 基因产物可以用两个单独的重组病毒载体表达,或者可以用同一个病毒载体表达。重组病毒载体表

达的 RNA 可以用标准方法从培养的细胞表达系统中分离出来。或者可以直接在 CLL 或前列腺癌细胞中表达。使用重组病毒载体将 miR15 或 miR16 基因产物递送到 CLL 或前列腺癌细胞中将在下面详细讨论。

[0082] 本发明的重组病毒载体包括编码 miR15 和 miR16 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,例如 U6 或 H1 RNA pol III 启动子序列,或巨细胞病毒启动子。本领域技术人员熟知如何选择其它合适的启动子。本发明的重组质粒还可以包括诱导型或调节型启动子,用以在 CLL 或前列腺癌细胞中表达 miR15 和 miR16 基因产物。

[0083] 可以使用能够接受 miR15 和 miR16 基因产物的编码序列的任何病毒载体;例如,来自腺病毒 (AV);腺相关病毒 (AAV);逆转录病毒(例如慢病毒 (LV),棒状病毒,鼠白血病病毒);疱疹病毒等的载体。还可以用包被蛋白或其它病毒的其它表面蛋白修饰载体从而改变病毒载体的趋向性。例如,可以用疱疹性口炎病毒 (VSV),狂犬病毒,埃博拉病毒,莫科拉病毒等修饰本发明的 AAV 载体。适用于本发明的重组病毒载体的选择,向载体中插入核酸序列并表达基因产物的方法,以及将病毒载体递送到感兴趣细胞中的方法都是本领域技术人员公知的。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, 在此引入其全文作为参考。

[0084] 优选的病毒载体是来自于 AV 和 AAV 的载体。适用于表达本发明的 miRNA 的 AV 载体,构建重组 AV 载体的方法,和将载体递送到靶细胞中的方法,在 Xia et al. (2002), Nat. Biotech. 20 :1006-1010 中有描述,在此引入其全文作为参考。适于表达本发明的 miRNA 的 AAV 载体,构建重组 AAV 载体的方法,和将载体递送到靶细胞中的方法,在 Samulski et al. (1987), J. Virol. 61 :3096-3101; Fisher et al. (1996), J. Viral., 70 :520-532; Samulski et al. (1989), J. Virol. 63 :3822-3826; 美国专利序列号 5, 252, 479; 美国专利序列号 5, 139, 941; 国际专利申请 WO 94/13788; 和国际专利申请 WO 93/24641, 在此引入其全文作为参考。优选地, miR15 和 miR16 基因产物用含有 CMV 中早期启动子的单个重组 AAV 载体表达。

[0085] 在一个实施方案中,本发明的重组 AAV 病毒载体包括编码 miR15 或 miR16 前体 RNA 的核酸序列,可操作地与 polyT 终止序列相连,并处于人 U6 RNA 启动子的控制之下。这里所述的“可操作地与 polyT 终止序列相连”是指编码有义链或反义链的核酸序列在 5' 方向紧邻 polyT 终止信号。在 miR15 或 miR16 序列在载体中转录的过程中, polyT 终止信号用于终止转录。

[0086] 在本发明中, miR15 或 miR16 基因产物用于抑制 miR15 或 miR16 介导的癌细胞,特别是 CLL 或前列腺癌细胞的赘生物或肿瘤生长。不希望受到任何理论的限制,认为处理过的 miR15 和 miR16 miRNA 与这些细胞中起始和 / 或维持赘生物或肿瘤细胞生长所必需的一个或多个靶 mRNA 中的互补序列相结合。因此,本发明提供了一种在需要这种治疗的患者中治疗 miR15 或 miR16 介导的癌症,例如 CLL 或前列腺癌的方法。所述方法包括给予患者有效量的 miR15 或 miR16 基因产物,使得 miR15 或 miR16 介导的癌细胞的增殖受到抑制。

[0087] 如上所述, miR15 或 miR16 介导的癌症是指其中在与该疾病相关的肿瘤或赘生物细胞的至少一部分中 miR15 或 miR16 基因中的任何一个或两者都减少或缺失的癌症。在

CLL 或前列腺癌的肿瘤或赘生物细胞中 miR15 或 miR16 基因的表达减少或缺失 ; 因此, CLL 和前列腺癌被认为是 miR15 或 miR16 介导的癌症。在其它癌症中也发现 miR15 或 miR16 基因表达的减少或缺失 ; 这些癌症也被视为是 miR15 或 miR16 介导的癌症。

[0088] 例如, 至少在下述组织分型的癌症的初级或转移性肿瘤或赘生物细胞中 miR15 或 miR16 基因表达减少或缺失 : 肉瘤 (中表层的结缔组织和其他组织癌症) ; 黑色素瘤 (源于黑色素细胞的癌症) ; 癌 (上皮癌症) ; 腺癌 (腺上皮癌症) ; 神经系统癌症 (神经胶质瘤 / 成胶质细胞瘤和星状细胞瘤) ; 和血液瘤, 例如白血病和淋巴瘤 (例如, 急性淋巴细胞白血病和慢性骨髓性白血病) 。

[0089] 在来源于至少下述器官或组织的癌症中 miR15 或 miR16 基因表达也减少或缺失, 不管其组织分型如何 : 乳腺 ; 男性和女性泌尿生殖组织 (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 ; 口腔和食道组织 ; 脑和脊髓 ; 肾 (肾脏) ; 胰腺 ; 肝胆系统 (例如, 肝, 胆囊) ; 淋巴系统 ; 平滑肌和横纹肌 ; 骨骼和骨髓 ; 皮肤和眼部组织。

[0090] 在癌症或肿瘤的预后阶段 miR15 或 miR16 基因表达也减少或缺失, 例如可用 “Overall Stage Groupings” (也称为 “Roman Numeral”) 或 “Tumor, Nodes, and Metastases” (TNM) 分期系统测量。对于给定癌症的适合的预后分期系统和分期描述是本领域公知的, 例如在 National Cancer Institute 的 “CancerNet” 国际互联网站上所述的。

[0091] 需要治疗 miR15 或 miR16 介导的癌症的患者可以通过下述方法鉴别 : 从该患者获得肿瘤或赘生物细胞 (或者怀疑是肿瘤或赘生物细胞) 样品, 测定其中至少一部分细胞与得自该患者正常组织的细胞相比 miR15 或 miR16 的表达是否减少或缺失。检测细胞中 miR15 或 miR16 基因表达水平的方法是本领域技术人员公知的 (如上所述) 。另外, 得自患者的细胞中的 miR15 或 miR16 表达还可以与这些基因在正常人群的细胞中的平均表达水平相比较。医生可以容易地用标准诊断技术鉴别需要治疗 CLL 的患者。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, 在此引入其全文作为参考。例如, 患有 CLL 的患者具有循环的 CLL 细胞, 表现出淋巴细胞增多 (即血液中的淋巴细胞数目等于或大于每立方毫米 10,000 个细胞) , 以及 CLL 细胞在骨髓和淋巴组织中逐渐积累。

[0092] 患者血液或其它组织中 CLL 细胞的鉴定可以通过直接目测观察血液样品, 和 / 或测定淋巴细胞的 “CLL 分数” 来验证。CLL 分数表示是否存在 CLL 细胞的五个淋巴细胞表面标记 : CD5+, CD23+, FMC7-, 和表面免疫球蛋白 (SmIg) 的微弱表达 (+/-) 和 CD22。该评分系统对这五个标记中的每一个都给出 1 或 0 的值, 依据是其对 CLL 是典型的还是非典型的。CLL 细胞的 CLL 分数为 4 或 5, 而其它白血病的淋巴细胞的 CLL 分数为 < 1 到 3。参见 Matutes et al. (1994), Leukemia 8 10 : 1640-1645 and Moreau et al. (1997), American Journal of Clinical Pathology, 108 : 378-82, 在此引入其全文作为参考。CLL 细胞与正常外周血 B 细胞相比膜表面的免疫球蛋白水平较低。淋巴细胞膜表面的免疫球蛋白水平可以容易地用标准方法检测 ; 参见, 例如 Rozman et al. (1995), New England Journal of Medicine 333 : 1052-1057, 在此引入其全文作为参考。

[0093] 医生也可以容易地根据标准诊断技术鉴别出需要治疗前列腺癌的患者, 所用的标

准例如患者年龄,用肛门触诊检查出前列腺增大,前列腺特异的抗原(“PSA”)水平,组织的格里森分数,以及存在在免疫组织化学水平上可检测到的遗传标记,例如前列腺组织细胞上的 p53, p21, 和细胞周期蛋白。血清 PSA 水平为 20ng/ml 或更高并且前列腺组织分化不佳(例如格里森分数为 8 或更高)表示患有前列腺癌。患者中前列腺肿瘤的存在也可以通过非侵入性的成像技术验证,例如 CT 扫描,对前列腺的经直肠的超声检查(“TRUSP”),以及磁共振成像(“MRI”),这些技术都是本领域公知的。

[0094] 这里所述的 miR15 或 miR16 基因产物的“有效量”是指足以抑制患有 miR15 或 miR16 介导的癌症的患者中 miR15 或 miR16 介导的癌细胞的量。例如,miR15 或 miR16 基因产物的有效量可以是足以抑制患有 CLL 的患者中 CLL 细胞增殖的量,或患有前列腺癌的患者中前列腺癌细胞增殖的量。应当理解,“前列腺肿瘤细胞”不一定存在于前列腺中,而是包括来源于前列腺的转移肿瘤细胞。

[0095] 这里所说的“抑制 miR15 或 miR16 介导的癌细胞的增殖”是指杀死细胞,或永久性 or 暂时性地使细胞停止生长。如果在施用了 miR15 或 miR16 产物以后患者中的这些细胞保持不变或减少,那么则可以推断出 miR15 或 miR16 介导的癌细胞的增殖受到了抑制。如果这些细胞的绝对数量增加,但是肿瘤生长的速度降低了,那么也认为 miR15 或 miR16 介导的癌细胞的增殖受到了抑制。

[0096] 患者体内 miR15 或 miR16 介导的癌细胞的数量可以通过直接测量确定,或者从原始或转移肿瘤块的尺寸估计确定。

[0097] 例如,患者 CLL 细胞的数目可以容易地确定,例如通过全血或白细胞计数。CLL 细胞的数目还可以通过免疫组织化学方法,流式细胞术,或其它用于检测 CLL 细胞的特征性表面标记容易地测定。

[0098] 前列腺肿瘤块可以通过直接目测观察,或者通过诊断性成像方法例如 X 射线,磁共振成像,超声波,和闪烁照相法来测定。用于确定肿瘤块尺寸的诊断性成像方法可以与对照试剂一起使用或者不与其一起使用,如本领域公知的。肿瘤块的尺寸还可以用物理方法测定,例如组织块的触诊或者用测量仪器例如测径器对组织块进行测量。对于前列腺肿瘤,优选的确定肿瘤块尺寸的物理方法是肛门触诊。

[0099] 本领域技术人员可以容易地确定给特定患者施用的 miR15 或 miR16 基因产物的有效量,其是根据下列参数,如患者的个头和体重;疾病的程度;患者的年龄,健康状况和性别;给药方式;以及给药是局部的还是全身性的。

[0100] 例如,本发明的化合物的有效量可以是基于要治疗的肿瘤块的近似重量。肿瘤块的近似重量可以通过计算肿瘤块的近似体积测定,其中一立方厘米的体积重约一克。基于肿瘤块重量的 miR15 或 miR16 基因产物的有效量可以是至少 10mg/g 肿瘤块,优选是 10-500mg/g 肿瘤块。更优选地,有效量是至少 60mg/g 肿瘤块。特别优选的是,有效量是至少 100mg/g 肿瘤块。优选将基于肿瘤块重量的有效量直接注射到肿瘤中。

[0101] miR15 或 miR16 基因产物的有效量可以是基于要治疗的患者的近似或估计体重。优选地,该有效量是肠胃外或肠给药,如下所述。例如,给予患者的 miR15 或 miR16 基因产物的有效量是 5-3000mg/kg 体重,优选是 700-1000mg/kg 体重,更优选是大于 1000mg/kg 体重。

[0102] 本领域技术人员可以容易地确定对给定患者给予 miR15 或 miR16 基因产物的合适

的给药方案。例如 miR15 或 miR16 基因产物可以一次性给予患者（例如单次注射或沉积）。另外，该基因产物还可以每天给予患者一到两次，给药时间持续大约三到大约二十八天，更优选是大约七到大约十天。在优选的给药方案中，miR15 或 miR16 基因产物每天给药一次，持续七天。如果给药方案是多次给药，应当理解给予患者的 miR15 或 miR16 基因产物的有效量是在整个给药方案中给予的基因产物的总量。

[0103] miR15 或 miR16 基因产物可以通过任何适于将该基因产物递送到患者细胞，例如造血干细胞（HSC），CLL 细胞或前列腺癌细胞中的方式给予患者。例如 miR15 或 miR16 基因产物可以用适合于用 miR15 或 miR16 基因产物，或者用含有编码 miR15 或 miR16 基因产物的序列的核酸转染患者细胞的方式给药。细胞可以直接用 miR15 或 miR16 基因产物（当其为核酸的时候）转染，或者可以用含有编码 miR15 或 miR16 基因产物的序列的核酸转染。优选地，细胞用含有编码 miR15 或 miR16 基因产物的序列的质粒或病毒载体转染，如上所述。

[0104] 真核细胞的转染方法是本领域公知的，包括将核酸直接注射到细胞核或细胞原核中；电穿孔；脂质体转化或者由亲脂性物质介导的转化；受体介导的核酸递送，生物弹或粒子加速；磷酸钙沉淀，病毒载体介导的转染。

[0105] 例如，细胞可以用脂质体转化化合物，例如 DOTAP（N-[1-(2,3-二油酰氧)丙基]-N,N,N-三甲基-甲硫酸铵，Boehringer-Mannheim）或其等同物例如 LIPOFECTIN 转染。所使用的核酸的量对于本发明的实施并不重要；用 0.1-100mg 核酸/ 10^5 个细胞都能得到满意的结果。例如，使用的量可以是每 10^5 个细胞 3mg DOTAP，其中含有 0.5mg 质粒载体。

[0106] 在一个实施方案中，从患者中分离出 miR15 或 miR16 介导的癌细胞，例如 CLL 或前列腺癌，用编码 miR15 或 miR16 基因产物的核酸转染，并重新植入患者中。在优选的实施方案中，转染的和重新植入的细胞是 CLL 细胞。在更优选的实施方案中，转染的和重新植入的细胞是诊断为 CLL 的患者的 HSC。

[0107] 从患者中提取 CLL 细胞的技术是本领域公知的，例如下述实施例 7 中所述的。从患者中提取、鉴别、分离和培养 HSC 的技术也是本领域公知的，例如美国专利序列号 5,635,387 和 5,643,741，以及 Campana et al. (1995) Blood 85:1416-1434 中所述的，在此引入其全文作为参考。优选地，在转染 HSC 之前从收集的骨髓中提取出肿瘤或赘生物细胞。合适的提取技术包括，例如固定化外周血细胞的白细胞去除，基于免疫亲和的选择或杀死肿瘤细胞，或者使用细胞毒性或者光敏试剂选择性地杀死肿瘤细胞，都是本领域公知的。参见，例如，Bone Marrow Processing and Purging, Part 5 (A. Gee, ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., 1991; Lydaki et al. (1996) J. Photochem. and Photobiol. 32:27-32; 和 Gazitt et al. (1995), Blood, 86:381-389，在此引入其全文作为参考。

[0108] 分离的 CLL 细胞或 HSC 可以用任何适当的技术转染，如上所述。转染之后检查一部分 CLL 细胞或 HSC 以验证所述基因产物是否具有适当的表达水平。一旦验证了 miR15 或 miR16 基因产物具有适当的表达，就将其余的转染细胞重新引入到患者中。转染的 CLL 细胞或 HSC 可以通过肠胃外方法重新引入到患者中，包括静脉输注或向骨髓中直接注射。转染细胞优选以盐溶液或其它药学可接收的载体重新引入患者。重新引入的转染细胞的合适的数量是每 kg 患者体重大约 10^5 到大约 10^8 个细胞。在转染之前可在培养基中扩张细胞从而增加可用于重新引入的转染细胞的数量。

[0109] 优选地，CLL 细胞或 HSC 用含有编码 miR15 或 miR16 基因产物的序列的核酸，例如

能稳定整合到 CLL 细胞或 HSC 基因组中以长期表达该化合物的质粒表达载体转染。稳定的整合和表达可以用本领域公知的技术验证,例如用 miR15 或 miR16 cDNA (或其片段) 作为探针对基因组 DNA 进行 Southern blot。miR15 或 miR16 基因产物的表达还可以用标准 Northern blot 技术来检测。用编码 miR15 或 miR16 基因产物的序列稳定转染的 CLL 细胞或 HSC 在重新植入患者中以后会继续表达该化合物。从患者中分离 HSC,用表达 miR15 或 miR16 基因产物的质粒转染,并将转染的 HSC 重新植入到患者中的示例性方法如下述实施例 8 所示。

[0110] miR15 或 miR16 基因产物还可以通过任何适当的肠或肠胃外给药方式给予患者。适用于本发明的适当的肠给药方式包括口服,直肠,或鼻内递送。适当的肠胃外给药方式包括血管内给药(例如静脉高剂量注射,静脉输注,动脉内高剂量注射,动脉内输注和经导管输注到脉管系统中);组织外和组织内注射(例如肿瘤外和肿瘤内注射,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(例如渗透泵);直接应用到感兴趣的组织上,例如通过导管或其它放置装置(例如视网膜颗粒或栓剂或含有多孔,无孔,或胶状物质的植入物);以及吸入。优选地,miR15 或 miR16 基因产物通过注射或输注给药。对于 miR15 或 miR16 介导的含有肿瘤块的癌症,优选 miR15 或 miR16 基因产物通过直接注射到肿瘤中给药。

[0111] 在本文的方法中,miR15 或 miR16 基因产物可以作为裸露的 RNA,或者和递送试剂一起,或者作为含有能表达该基因产物的序列的核酸(例如重组质粒或病毒载体)给药。适用于 miR15 或 miR16 基因产物给药的合适的递送试剂包括 Mirus Transit TKO 亲脂性试剂;lipofectin;lipofectamine;cellfectin;或聚阳离子(例如聚赖氨酸),或脂质体。

[0112] 含有能表达 miR15 或 miR16 基因产物的序列的重组质粒如上所述。含有能表达 miR15 或 miR16 基因产物的序列的重组病毒载体也如上所述,将这些载体递送到患者的 CLL 或前列腺癌细胞中的方法是本领域技术人员公知的。

[0113] 在优选的实施方案中,脂质体可用于将 miR15 或 miR16 基因产物,或含有编码该基因产物的序列的核酸递送到患者中。脂质体还可以增加该基因产物或核酸在血液中的半衰期。在本发明的该实施方案的实践中,所述的 miR15 或 miR16 基因产物,或含有编码该基因产物的序列的核酸可以在给患者施用之前装入到脂质体中。

[0114] 适用于本发明的脂质体可以用标准的可形成载体的脂类制备,通常包括中性的或具有负电荷的磷脂和甾醇例如胆固醇。脂类的选择通常可以依据各种因素例如所希望的脂质体大小和脂质体在血管中的半衰期。已知多种制备脂质体的方法,例如 Szoka et al. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467;和美国专利序列号 4,235,871,4,501,728,4,837,028,和 5,019,369 中所述的,在此引入其全文作为参考。

[0115] 包含有 miR15 或 miR16 基因产物,或含有编码该基因产物的序列的核酸的脂质体可以包含能够将所述脂质体靶定到 miR15 或 miR16 介导的癌细胞,例如 CLL 或前列腺癌细胞上的配体分子。在这些癌细胞中普遍能与受体结合的配体,例如能与肿瘤细胞抗原或 CLL 细胞表面标记的单克隆抗体是优选的。

[0116] 还可以对包含有 miR15 或 miR16 基因产物,或含有编码该基因产物的序列的核酸的脂质体进行修饰以避免被单核巨噬细胞系统(“MMS”)和网状内皮组织系统(“RES”)清除。这种修饰的脂质体的表面上或其脂质体结构中具有调理作用抑制分子。在特定的优

选的实施方案中,本发明的脂质体可以同时包含调理作用抑制分子和配体。

[0117] 用于制备本发明的脂质体的调理作用抑制分子典型地是能与脂质体膜结合的大分子的亲水性聚合物。这里所述的调理作用抑制分子与脂质体膜“结合”是指其与膜发生化学或物理连接,例如脂溶性锚定物插入到膜中,或者直接与膜脂的活性基团结合。这些调理作用抑制亲水性聚合物形成具有保护作用的表面层,能显著减少脂质体被 MMS 和 RES 吸收,例如美国专利序列号 4,920,016 中所述的,在此引入其全文作为参考。

[0118] 适用于修饰脂质体的调理作用抑制分子优选是水溶性聚合物,其平均分子量是大约 500 到大约 40,000Da,更优选是大约 2,000 到大约 20,000Da。这种聚合物包括聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇 (PPG) 衍生物;例如甲氧 PET 或 PPG,以及 PET 或 PPG 硬脂酸盐;合成聚合物例如聚丙烯酰胺或聚 N- 聚乙烯吡咯烷酮;直链,枝链和分枝聚酰胺基胺;聚丙烯酸;多元醇,例如聚乙烯醇和聚木糖醇,其中羧基和氨基以化学方法连接,以及神经节苷脂,例如神经节苷脂 GM1。也可以使用 PEG,甲氧 PEG,或甲氧 PPG,或其衍生物的共聚物。此外,调理作用抑制聚合物可以是 PEG 和聚氨基酸,多聚糖,聚酰胺,聚乙烯胺,或聚核苷酸中的任一个的嵌段共聚物。所述调理作用抑制聚合物还可以是天然的含有氨基酸或羧酸,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,角叉胶的多糖;胺化多糖或寡糖(直链或枝链);或羧化多糖或寡糖,例如可与碳酸衍生物反应最终连接羧基基团。优选地,所述调理作用抑制分子是 PEG,PPG,或其衍生物。用 PEG 或 PEG 衍生物修饰的脂质体有时被称为“PEG 化的脂质体”。

[0119] 调理作用抑制分子可以通过多种已知方法与脂质体膜结合。例如,PEG 的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯可与磷脂酰乙醇胺的脂溶性锚定物相结合,然后结合到膜上。类似地,右旋糖苷聚合物可以与十八胺脂溶性锚定物通过用 Na(CN)BH 和溶剂混合物如 30 : 12 的四氢呋喃:水在 60°C 进行的还原性胺化作用来衍生化。

[0120] 用调理作用抑制分子修饰的脂质体在循环系统中保留的时间比未修饰的脂质体长。鉴于此原因,这些脂质体有时称为“隐形”脂质体。隐形脂质体已知可在由多孔的或“有渗漏的”微脉管系统反馈的组织中积累。因此,具有微脉管系统毛病的组织,例如肿瘤块,可有效积累这些脂质体;参见 Gabizon, et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 18 : 6949-53。此外,RES 吸收的减少由于阻止了该脂质体在肝和脾中的积累从而降低了隐形脂质体的毒性。因此,用调理作用抑制分子修饰的脂质体适用于将 miR15 或 miR16 基因产物,或含有编码该基因产物的序列的核酸递送到肿瘤细胞中。

[0121] miR15 或 miR16 基因产物优选在给患者施用之前根据本领域公知的技术制成药物组合物。本发明的药物组合物至少是无菌的和不含热源的。这里所说的“药物制剂”包括用于人的和兽医使用的制剂。制备本发明的药物组合物的方法是本领域技术人员公知的,例如 Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985) 中所述的,在此引入其全文作为参考。

[0122] 本发明的药物制剂含有 miR15 或 miR16 基因产物,或含有编码该基因产物的序列的核酸(例如按重量计 0.1 到 90%),或其生理学可接收的盐,并与药学可接收的载体相混和。本发明的药物制剂还可以包括包含在脂质体中的 miR15 或 miR16 基因产物,或含有编码该基因产物的序列的核酸,以及药学可接收的载体。

[0123] 优选药学可接收的载体是水,缓冲液,生理盐水,0.4% 盐水,0.3% 甘氨酸,透明质

酸等。

[0124] 在优选的实施方案中,本发明的药物组合物包括能抵抗核酸酶降解的 miR15 或 miR16 基因产物。本领域技术人员可以容易地合成具有核酸酶抗性的 miR15 和 miR16 基因产物,例如在 miR15 和 miR16 基因产物的 2' 位置加入一种或多种核糖核苷酸。合适的 2' 修饰的核糖核苷酸包括在 2' 位置具有氟,氨基,烷基,烷氧基,和 O- 烯丙基修饰的核糖核苷酸。

[0125] 例如,本发明的药物组合物含有加入了一个或多个具有 2' AR- 核苷酸的通式的 2' 修饰的核糖核苷酸的 miR15 或 miR16 基因产物,其中:

[0126] A 是氧或卤素(优选氟,氯或溴);以及

[0127] R 是氢或直链或枝链 C₁₋₆ 烷基;

[0128] 其中当 A 是卤素的时候,没有 X 和 R。优选的修饰的 2- 核糖核苷酸是 2' -O 甲基核糖核苷酸。优选地,本发明的药物组合物包括其中每个核糖核苷酸都是 2' - 修饰的核糖核苷酸的 miR15 或 miR16 基因产物。

[0129] 本发明的药物组合物还可以包括传统的药物赋形剂和/或添加剂。合适的药物赋形剂包括稳定剂,抗氧化剂,调节摩尔渗透压浓度的试剂,缓冲液,和 pH 调节试剂。合适的添加剂包括生理学的生物相容的缓冲液(例如盐酸缓血酸胺),加入螯合剂(例如 DTPA 或 DTPA- 双酰胺)或者钙螯合复合物(例如 DTPA 钙,CaNaDTPA- 双酰胺),或者,可选择地,加入钙盐或钠盐(例如,氯化钙,抗坏血酸钙,葡萄糖酸钙或乳酸钙)。本发明的药物组合物可以以液体形式使用,也可以以冻干形式使用。

[0130] 对于本发明的固体药物组合物,可以使用传统的无毒的固体的药学可接收的载体;例如药物级的甘露醇,乳糖,淀粉,硬脂酸镁,糖精钠,纤维素,葡萄糖,蔗糖,碳酸镁等。

[0131] 例如,用于口服给药的固体药物组合物可以含有上述的任何载体以及 10-95%,优选 25% -75% 的 miR15 或 miR16 基因产物。用于喷雾(吸入)给药的药物组合物可以含有按重量计 0.01-20%,优选按重量计 1% -10% 的包含于上述脂质体中的 miR15 或 miR16 基因产物,和推进剂。还可以包含其它载体;例如用于鼻内递送的卵磷脂。

[0132] 下述非限制性实施例将对本发明作出说明。

实施例

[0133] 在实施例中使用下述方法:

[0134] 患者样品和细胞系- 患者样品是在得到了被 CLL Research Consortium institutions 诊断为 CLL 的患者的知情同意后获取的。简短来说,外周血是从 CLL 患者中获得的,单核细胞是通过 Ficoll-Hypaque 梯度离心(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway,NJ)分离的,然后进行处理以便按标准方法提取 RNA 和 DNA,如 Sambrook J et al. (1989), Molecular cloning :A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY) 中所述的,在此引入其全文作为参考。将相应患者的口腔粘膜 DNA 放置在小片(1-2mm²) 纸上,作为 LOH 研究中的正常对照。

[0135] 三十个人的细胞系是得自美国典型培养物保藏中心(ATCC;Manassas,VA) 并根据 ATCC 的说明培养。这些细胞系是 AS283, BL2, B1a, BJAB, CA46, Namalva, P3HRI, PAPB 682, PABm, Raji (Burkitt' s 淋巴瘤), Dell, SKDHL, ST486 (T- 细胞淋巴瘤), JM (免疫母细胞 B

细胞淋巴瘤), MC116(未分化的淋巴瘤), Mol t3, Supt 11(T-ALL), U266(多发性骨髓瘤), A549, H1299(肺癌), TE2, TE10(食道癌), HeLa(子宫颈癌), RC48(肾癌)和 2220, 2221, 11609, 11611, LNCAP, TSUR(前列腺癌)。

[0136] CD5+B-细胞的分离-从儿科组(3-9岁)通过常规的扁桃腺切除术获得扁桃腺。用唾液酸苷酶处理过的绵羊红血球使单核细胞散开,得到纯化的B细胞。将B细胞用不连续Percoll梯度(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)进一步分级,如Dono M et al. (2000), J. Immunol. 164:5596-5604中所述的,在此引入其全文作为参考。从50%的Percoll级分中收集B细胞,并与抗CD5 mAb一起培育,然后与和微磁珠结合的羊抗鼠Ig一起培育。收集细胞并置于磁性柱MS上,用MiniMACS系统(Miltenyi Biotec)通过正选择获得CD5+B细胞。

[0137] 体细胞杂交-用传统方法进行体细胞杂交,在次黄嘌呤-氨嘌呤-胸苷(HAT)介质上选择,如Negrini M et al. (1994), Cancer Res. 54:1818-1824中所述的,在此引入其全文作为参考。从单个细胞克隆和亚克隆中得到的DNA用DNeasy组织试剂盒(Qiagen)分离并用PCR检测是否存在染色体13和染色体2标记(引物序列见下述表1)。从一种带有t(2;13)(q32;q14)移位的CLL细胞(CL-LB)中分离得到十五个克隆,从另一种带有t(2;13)(q12;q13)移位的CLL细胞(CL-LA)中分离得到一个克隆。十二个来自CL-LB的克隆带有染色体13和2的完全互补序列,另外三个带有del(13q)和染色体2的完全互补序列。来自CL-LA的一个克隆含有在13q14位置具有染色体13的小缺失并且不含部分染色体2。

[0138] Northern blotting-用Tri Reagent方法(Molecular Research Center, Inc)分离总RNA。将RNA样品(每个30g)在15%丙烯酰胺变形(脲)Criterion预制凝胶(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)上分离并转移到Hybond-N+膜(Amersham Pharmacia Biotech)上。在42°C在7% SDS, 0.2M Na₂PO₄ pH 7.0的条件下与⁻³²P ATP杂交过夜。在42°C将膜用2x SSPE, 0.1% SDS洗涤两次,用0.5x SSPE, 0.1% SDS洗涤两次。用于检测miR15和miR16 RNA的探针分别是:

[0139] CACAAACCATTATGTGCTTGCTA (SEQ ID NO:5)

[0140] GCCAATATTTACGTGCTGCTA (SEQ ID NO:6)

[0141] 在0.1% SDS水溶液/0.1x SSC中煮沸10分钟剥离杂交膜并重新杂交几次。用溴化乙锭染色的5S rRNA作为对照。

[0142] 反向转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)-通过RT-PCR分析正常CD5+细胞和23个B-CLL样品中的基因表达水平。用Advantage2 PCR试剂盒(Clontech)每次扩增反应应用一微升cDNA,每种基因特异性引物10pmol进行35次循环,94°C 20秒,65°C 30秒,68°C 1分钟(引物列表见下述表1)。为了保证RT-PCR中使用的RNA具有足够的纯度,用G3PDH cDNA(Clontech, Palo Alto, CA)特异的引物进行PCR检测。用上述Sambrook J et al. (1989)中的标准方法用琼脂糖凝胶电泳分离RT-PCR产物。

[0143] Western blotting-对9个B-CLL患者的细胞溶解物的SDS/PAGE凝胶产物用GST-SLUG Middle抗体(Dr. Thomas Look-Harvard, MA赠与)和SNX2(N17)抗体(Santa Cruz Biotechnology, CA)检测。用ECL Western Blotting检测试剂盒(Amersham Pharmacia, UK)进行检测,根据制造商的说明操作。

[0144] 数据库分析-用由National Institutes of Health and the National Library

of Medicine 维护的 National Center for Biotechnology Information 网站提供的 BLAST 排列工具搜索“nr”和“dbEST”数据库,搜索短的几乎完全匹配的序列。还可参见 Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215 :403-10 和 Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402,在此引入其全文作为参考。也可以用 Biology workBench 网站提供的 FASTA 排列工具搜索短序列的同源序列。

[0145] 表 1- 用于检测体细胞杂交株的引物

[0146]

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 AAG1 GAC CTG GCT A	14
D13S263L	CCT GGC CTG TTA GTT TTT ATT GTT A	15
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

[0147]

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 AAC AGC	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
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

[0148]

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	54
TCC		

[0149] 实施例 1-CLL 患者的体细胞杂交株中的一段 30kb 的缺失区域

[0150] 至今还没有确定 CLL 患者 13q14 处丢失的最小区域。已经描述了 CLL 中 13q14 处缺失的多种以及相对较大的（在 130 到 550kb）区域（参见图 2B）。用 LOH 和 Southern blot 分析鉴别 Alu18 位点纯合子丢失的着丝粒边界，该位点位于 D13S1150 和 D13S272 之间小于 65kb 着丝粒到 LEU2 基因的外显子 5 处。但是，没有发现能使靶肿瘤抑制子定位的小的或重叠的纯合子缺失。

[0151] 为了更好的定义 CLL 中的丢失区域，制备鼠 LM-TK⁻ 的体细胞杂交株和带有 13q14 移位和 / 或缺失的 CLL 细胞。对得到的杂交克隆的 PCR 检测可以分开肿瘤中存在的染色体 13 的两个拷贝。用这种方法可以识别一种细胞中的 31.4kb 的缺失，以及另一种细胞中染色体断点的精确定位（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 的区域中。用于检测体细胞杂交株的引物如表 1 所示。

[0152] 如图 2 所示，体细胞杂交株中缺失的区域与所有已报道的丢失区域相同，包括几年前由 Liu et al. (1997) Oncogene 15 :2463-2473 报道的 10kb 的区域。LEU2 的外显子 1 和 2 也在此区域内，并且也在本文所定义的区域。但是 LEU2 并不是 B-CLL 的可能的候选肿瘤抑制子基因（参见 Bullrich et al. (2001), Cancer Res. 61 :6640-6648 ;Migliazza et al. (2001), Blood 97 :2098-2104 ;Wolf et al. (2001), Hum. Mol. Genet. 10 :1275-1285 ;和 Mertens et al. (2002) Blood 99 :4116-4121)

[0153] 实施例 2-miR15 和 miR16 基因位于染色体 13 的最小缺失区域内，并且在 CD5⁺ 细胞中高表达

[0154] 在已公开可用的序列信息和数据库中筛选 13q14 处的最小丢失区域中的新的调控基因。最近被克隆的两个 miRNA 基因簇，miR15 和 miR16 正是位于该缺失区域内（图 2A）。为了评价 miR15 和 miR16 在正常组织中的表达水平，对一组正常组织，包括分离自正常个体的扁桃腺的 CD5⁺B 细胞进行 miR15 和 miR16 RNA 的 Northern blot 分析（图 3A）。用 CD5⁺B 细胞做对照，这是因为 B-CLL 具有逐渐积累 CD5⁺B 淋巴细胞的特性。发现普遍存在 miR15 和 miR16 基因的表达，并且在正常 CD5⁺ 淋巴细胞中表达量最高。此外，在正常组织中 miR16 始终比 miR15 表达水平高。这些数据表明 miR15 和 miR16 基因在正常 CD5⁺B 细胞的动态平衡中具有重要作用。

[0155] 实施例 3-在 13q14 缺失的 CLL 样品中 miR15 和 miR16 基因常常缺失或受到负调控

[0156] 为了研究 miR15 和 miR16 基因是否与 CLL 的发病有关，用 Northern blotting 分析了 60 个 CLL 样品和 30 个人癌细胞系的 miR15 和 miR16 基因表达（图 3A）。CLL 患者中的 68% (41/60)，以及分析的 6 个前列腺癌细胞系中的 5 个与其正常组织对应物相比显示

出表达显著减少。这些发明证明 miR15 和 miR16 基因在所检测的大部分 B-CLL 和前列腺癌细胞中受到负调控。

[0157] 此外,60 个 CLL 样品中的 23 个 (38%) 显示出明显可识别的代表 miR15 前体 RNA 的大约 70nt 的条带。而除了骨髓之外的任何所分析的正常组织中都没有发现 70nt 的 miR15 条带 (图 3A),这表明 CLL 细胞对 miR15 前体 RNA 的处理效率较低。

[0158] 为了确定所观察到的表达的负调控是否与 CLL 的等位基因缺失有关,用微卫星标记 D13S272 和 D13S273 对 46 个 CLL 患者进行了 LOH 研究,从这些患者可以获得正常 DNA (图 3B)。我们发现 68% 的样品都在至少一个标记中表现出 LOH (35 个中的 24 个)。在除了 4 个样品以外的所有样品 (75%) 中 miR15/16 基因产物的表达都有所减少。有 12 个样品由于起始物质的问题不能得到可重复的结果。此外,在没有明显 LOH 的 11 个样品中的 6 个 (55%) 中表达水平也有所减少。在这些实验中,可能由于缺失片段太小而不能被所用的标记检测到。

[0159] Northern blot 分析表明在 13q14 处具有已知的较大纯合子缺失的细胞和少于 5% 的正常细胞中都表达 miR15 和 miR16 基因产物,表明在基因组中存在其它高度类似的小分子 RNA 基因。实际上,已有报道有一个与 miR15/miR16 基因簇非常类似的基因簇位于染色体 3q25-26.1 处 (参见 Lagos-Quintana et al. (2002), Curr. Biol. 12 :735-739)。为了表明 miR15/16 基因表达的变化确实与染色体 13q 的缺失有关,设计了对染色体 13 上的 miR16 前体 RNA 特异的和对染色体 3 上的基因产生的 miRNA 前体 RNA 特异的探针,用于进行 Northern blot。

[0160] 染色体 13 的 miR16 前体 RNA 只检测到很低的水平,在相同样品中用染色体 3 探针却没有发生特异性的杂交。此外,用两个跨越位于该基因簇着丝粒的 2Mb 区域的微卫星标记进行 LOH 研究。17 个有义样品中的 4 个在至少一个标记中显示出了 LOH,并且没有发现其与 miR15/16 的表达水平之间的关系。这些数据明显证明 CLL 中 miR15 和 miR16 基因表达的负调控与 13q14 处的等位基因丢失相关,表明 miR15 和 miR16 基因产物在 CLL 的发病中具有重要作用。

[0161] 实施例 4- 在小鼠中 miR15 和 miR16 也与 CLL 发病有关

[0162] 为了进一步研究 miR15 和 miR16 基因是否与 CLL 发病有关,继续用患有 CLL 的 E-TCL1 转基因小鼠进行研究 (Bichi et al., (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 :10 : 6955-6960)。检测 E-TCL1 转基因小鼠中细胞和基因的变化。如上所述进行 Northern blot 分析 (参见实施例 - “Northern blotting”,和实施例 3)。

[0163] 在大约 80% 的转基因小鼠中,与正常鼠脾淋巴细胞相比,CLL 细胞中 miR15 和 miR16 的鼠同系物都有所降低。这些结果与实施例 3 中所述的人 CLL 与正常人细胞相比较的结果一致。

[0164] 还将小鼠染色体 15 和人染色体 12 进行了比较。转基因小鼠的白血病的比较基因杂交 (CGH) 显示出大约 35% 扩增出了小鼠染色体 15 的一个区域,相应于人染色体 12 的区域。这些小鼠白血病的细胞分析也表明小鼠染色体 15 具有三倍体性或四倍体性。已知大约有 25% 的人 CLL 的染色体 12 具有三倍体性。

[0165] 比较基因杂交还显示了小鼠染色体 14 (51.6-78.5Mb) 具有丢失的区域,相应于人的 13q14 区域。

[0166] 这些研究结果表明 CLL 小鼠模型重现了人 CLL 发病中发生的事件。综合来说,实施例 1-4 的数据表明在哺乳动物中 miR15 和 miR16 在 CLL 发病中具有重要作用。

[0167] 实施例 5- 突变分析没有显示出在 CLL 和胃肠癌中 miR15 和 miR16 基因具有点突变

[0168] 为了进一步评价 miR15 和 miR16 基因在 CLL 中的作用,用对 PCR 扩增产物直接测序的方法检测了 120 个 B-CLL 以及 80 个结肠直肠癌和胃癌中是否具有突变。扩增了含有全部基因簇的 720bp 的染色体区域。在这三种情况下,发现 miR16 前体 RNA 具有同样的变化;在位点 2 具有 T 到 C 的置换。这种变化不会改变 miRNA 的发夹结构。还发现了几种非遗传性的多肽性。由于 miR16 基因较小 (70bp), miR16 基因仅具有极少的突变并不令人惊讶。

[0169] 为了识别在显示出 LOH 的 CLL 中其余的等位基因失活的可能机制,用“in silico”克隆鉴别位于 miR16 基因下游大约 215bp 的可能的启动子区域。已报道有几种癌相关基因具有启动子高度甲基化反应的负调控,包括 p16^{INK4a}, p73, hMLH1, 或 VHL (参见 Esteller (2002), Oncogene 21:5427-5440)。因此使用甲基化特异的 PCR 分析位于可能的 miR16 启动子的 5' 的一个富含 CpG 区域的甲基化状态。在十个 CLL 样品中,与 miR15 或 miR16 基因表达的水平 (八个表达减少,两个具有高表达) 无关,在任何所分析的 CpG 位点都没有检测到甲基化模式的差别。但是,也不能排除甲基化特异的 PCR 没有检测到 CpG 位点的不同区域或较小区域的甲基化。

[0170] 实施例 6-miR15 和 miR16 基因产物在人细胞中的表达

[0171] 将编码全长 70 个核苷酸的 miR15 和 miR16 RNA 前体的 cDNA 序列分别克隆到无关的 mRNA 中,该 mRNA 处于巨细胞立即早期 (CMV-IE) 启动子的控制之下,根据 Zeng et al. (2002), Mol. Cell 9:1327-1333 中所述的方法操作,在此引入其全文作为参考。

[0172] 简短来说,将 Xho I 连接子置于编码 miR15 和 miR16 RNA 前体的双链 cDNA 序列的末端,并将这些构建体分别克隆到 pBC12/CMV 质粒的 Xho I 位点。pBC12/CMV 质粒如 Cullen, (1986), Cell 46:973-982 所述,在此引入其全文作为参考。含有 miR15 前体 RNA 序列的所述质粒称为 pCMV-miR15,含有 miR16 前体 RNA 序列的所述质粒称为 pCMV-miR16。

[0173] 用 FuGene 6 试剂 (Roche) 用标准方法将 pCMV-miR15 和 pCMV-miR16 分别转染培养的人 293T 细胞。如上所述提取总 RNA,用 miR15 和 miR16 特异的探针用 Northern blot 分析检测是否存在处理过的 miR15 或 miR16 RNA。

[0174] 再使 pCMV-miR15 和 pCMV-miR16 分别转染培养的人前列腺癌细胞系 2220, 2221, 11609, 11611, LNCAP, TSUR。如上所述提取总 RNA,用 miR15 和 miR16 特异的探针用 Northern blot 分析检测前列腺癌细胞中是否存在处理过的 miR15 或 miR16 RNA。同时评估转染的前列腺癌细胞在形态上的变化,克服接触抑制的能力,以及能指示转化表型的其它标记。

[0175] 实施例 7- 用 miR15 和 miR16 基因产物转染 CLL 细胞

[0176] 从诊断患有 CLL 的患者中分离 CLL 细胞,如下所述用编码 miR15 和 miR16 小分子 RNA 的质粒转染。

[0177] 如上所述分离 CD5+B 细胞,用目测观察或者通过用 Matutes et al. (1994), Leukemia 8(10):1640-1645 的评分系统测定 CLL 分数来鉴别 CLL 细胞,在此引入其全文作为参考。CLL 分数至少为 4 的 CD5+B 细胞视为是 CLL 细胞。证实了在分离的 CLL 细胞中具

有 13q14 区域的缺失,从而除去了 miR15/miR16 基因簇。

[0178] 通过标准方法用 pCMV-miR15 和 pCMV-miR16 转染分离的 CLL 细胞。如上所述提取总 RNA,用 miR15 和 miR16 特异的探针用 Northern blot 分析检测是否存在处理过的 miR15 或 miR16 RNA。用 miR15 和 miR16 基因序列特异的探针进行 Southern blot 杂交也证实了 miR15 和 miR16 基因的稳定整合。

[0179] 实施例 8- 用 miR15 和 miR16 基因产物转染造血干细胞

[0180] 如下所述从诊断为 CLL 的患者的骨髓中获得造血干细胞 (HSC)。

[0181] 在手术室用标准方法在常规麻醉状态下在从患者的髂骨中收集骨髓。用肝素化注射器进行多次抽吸,得到总量为大约 750 到 1000ml 的骨髓。将抽出的骨髓立刻转移到运送介质 (TC-199, Gibco, Grand Island, New York) 中,每 100ml 该介质含有 10,000 单位的不含防腐剂的肝素。将抽出的骨髓通过三次逐渐精细的分筛过滤得到不含细胞聚集物,细胞碎片和骨骼颗粒的细胞悬液。然后将过滤得到的骨髓进一步用自动细胞分离器 (例如 Cobe 2991 Cell Processor) 得到“血沉棕黄层”(即不含红细胞和血小板的白细胞)。

[0182] 如下所述用免疫磁珠 (Dynal A. S., Oslo, Norway) 进行 CD34⁺ 细胞的正选择使血沉棕黄层制备物部分富集造血干细胞 (HSC)。将血沉棕黄层制备物重悬于加入添加物的介质中,并与小鼠抗 HPCA-I 抗体以 1 : 20 的稀释比率共培育,在 4℃ 轻轻颠倒试管 45 分钟。用加入添加物的介质洗涤细胞三次,然后与包覆有羊抗鼠 IgG₁ (75 1 免疫珠 /10⁷CD34⁺ 细胞) 的 Fc 片段的微珠共培育。在 4℃ 培育 45 分钟以后,用磁性微粒集中器对粘附在微珠上的细胞进行正选择,根据制造商的说明书操作。

[0183] 将富集 HSC 的制备物中的 2x10⁴ 个细胞在 5ml 聚丙烯管 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) 中的含有 2% 人 AB 血清和 10mM Hepes 缓冲液的总体积为 0.4ml 的 Iscove' s 修改的 Dulbecco' s 培养基 (IMDM) 中培育,并用标准方法用 pCMV-miR15 和 pCMV-miR16 转染。用一部分转染的 HSC 通过 Northern blot 分析证实其中表达 miR15 或 miR16 RNA,用一部分 HSC 通过 Southern blot 分析证实其中稳定整合了 miR15 或 miR16 基因序列。将其余的转染细胞以大约 4x10⁸/kg 体重到大约 8x10⁸/kg 体重的比率用标准骨髓移植方法重新植入到患者体内。

[0184] 重复该实验,除了用在转染和重新移植之前用电离辐射除去骨髓中的赘生物细胞,如下所述。调整血沉棕黄层制备物中的细胞至细胞浓度为在含有大约 20% 的自体血浆的 TC-199 中是 2x10⁷/ml。向细胞悬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,从而增加其对电离辐射的敏感性。然后将这些细胞暴露于 5-10Gy 的电离辐射中,在 4℃ 用含有大约 20% 的自体血浆的 TC-199 洗涤一次,然后如上所述用 pCMV-miR15 和 pCMV-miR16 转染。

[0185] 实施例 9- 含有 miR15 或 miR16 的脂质体的制备

[0186] 脂质体的制备 1- 由乳酰脑苷酯,磷脂酰甘油,卵磷脂和胆固醇以摩尔比率 1 : 1 : 4 : 5 组成的脂质体通过美国专利序列号 4, 235, 871 中所述的反相蒸发方法制备,在此引入其全文作为参考。在 100g/ml 的处理的 miR15 或 miR16 RNA 或 500g/ml 的 pCMV-miR15 或 pCMV-miR16 水溶液中制备脂质体,因此制备得到的脂质体含处理的 miR15 或 miR16 RNA,或 pCMV-miR15 或 pCMV-miR16 质粒。

[0187] 然后将脂质体通过 0.4 聚碳酸酯膜,重悬于盐水中,用 135mM 氯化钠,10mM 磷酸钠

pH 7.4 通过柱层析与未包覆的物质分离开来。所述脂质体无需修饰即可进一步使用,或者如下所述进行修饰。

[0188] 将一些如上所述制备的脂质体加入到适当的反应容器中,并边搅拌边加入含有 20mM 偏高碘酸钠,135mM 氯化钠和 10mM 磷酸钠 (pH 7.4) 的溶液。将得到的混合物在黑暗中在温度为大约 20℃的条件下放置 90 分钟。将反应混合物用 250ml 盐水缓冲液 (135mM 氯化钠,10mM 磷酸钠,pH 7.4) 透析 2 小时除去过量的高碘酸盐。得到的产品是表面碳水化合物羟基被氧化成乙醛基的脂质体。目标基团或调理作用抑制分子可以通过这些乙醛基团与脂质体表面结合。

[0189] 脂质体的制备 2- 如下所述制备由马来酰亚胺苯甲酰-磷脂酰乙醇胺 (MBPE),卵磷脂和胆固醇组成的第二种脂质体。MBPE 是能使含有巯基的化合物,包括蛋白质与脂质体偶合的活性磷脂。

[0190] 将十四酰磷脂酰乙醇胺 (DMPE) (100mmol) 溶解于含有 2 当量的三乙胺和 50mg m-马来酰亚胺苯甲酰-N-羟基琥珀酰亚胺酯的 5ml 无水甲醇中,如 Kitagawa et al. (1976), J. Biochem. 79 :233-236 中所述,在此引入其全文作为参考。在氮气气氛下在室温继续反应过夜,然后用氯仿/甲醇/水 (65/25/4) 在硅胶 H 上进行薄层层析,这可以定量显示出 DMPE 向更快的迁移产物的转变。减压除去甲醇,将产物重新溶于氯仿中。用 1% 氯化钠提取氯仿相两次,用氯仿/甲醇 (4/1) 作为溶剂用硅胶层析纯化马来酰亚胺苯甲酰-磷脂酰乙醇胺 (MBPE)。纯化以后,薄层层析指示出含有茚三酮阴性斑点的纯磷酸盐。

[0191] 在 100g/ml 处理的 miR15 或 miR16 RNA 水溶液或 500g/ml pCMV-miR15 或 pCMV-miR16 溶液中,用上述美国专利序列号 4,235,871 中的反相蒸发方法制备由 MBPE,卵磷脂和胆固醇以摩尔比为 1 : 9 : 8 组成的脂质体。用 100mM 氯化钠-2mM 磷酸钠 (pH 6.0) 通过柱层析使脂质体与未包覆的物质分离开来。

[0192] 实施例 10- 使抗 CD5+ 或抗前列腺肿瘤抗体与含有 miR15 或 miR16 的脂质体结合

[0193] 将 1.1ml (含有大约 10mmol) 的带有活性乙醛基团的脂质体制备物 1,或上述脂质体制备物 2 装入适当的容器中。向该制备物中边搅拌边加入 0.2ml 的 200mM 氰硼氢钠溶液和 1.0ml 的 3mg/ml 的直接针对 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。在室温继续反应过夜。将得到的混合物在 Biogel A5M 琼脂糖柱 (Biorad, Richmond, Ca. ;1.5X37cm) 上分离。

[0194] 实施例 11- 在体内用 miR15 或 miR16 基因产物抑制人前列腺肿瘤

[0195] 给裸鼠接种激素抗性人前列腺腺癌细胞系 (PC-3),将小鼠分为处理组和对照组。当小鼠中的肿瘤达到 100 到 250 立方毫米的时候,将包裹在脂质体中的处理过的 miR15 和 miR16 直接注射到处理组的肿瘤中。对照组的肿瘤中只注射包裹有载体溶液的脂质体。研究过程中一直测量肿瘤体积。还评价了 miR15 和 miR16 基因产物在 Dunning R-3327 鼠前列腺腺癌模型中抑制前列腺肿瘤生长的功效,如下所述。将 Dunning R-3327 前列腺腺癌细胞的高度转移性的和恶性克隆 (RT-3.1) 接种到 Copenhagen 鼠中,然后将其分为处理组和对照组。大约一周后两组都形成实体肿瘤块。然后向处理组的肿瘤中注射包裹在脂质体中的处理过的 miR15 和 miR16,两周一次,一共注射 5 周。对照组的肿瘤只注射含有载体溶液的脂质体。研究过程中一直测量肿瘤体积。

[0196] 所有本文所涉及的参考文献在此都引入作为参考。本领域技术人员应当容易理

解,本发明非常适于实施并达到本文所提及的以及其所固有的发明目的和优点。本发明还可以以其它特定方式实施而不背离其精神和基本属性,相应地可作为下述权利要求而不是上述说明书的参考,表征本发明的保护范围。

[0001]

序 列 表

<110> 托马斯杰斐逊大学
卡洛·M·克罗西
乔治·A·卡林

<120> 用于癌症诊断和治疗的组合物和方法

<130> 08321-0126PC

<150> 60/425,864

<151> 2002-11-13

<150> 60/469,464

<151> 2003-05-09

<160> 54

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 83

<212> RNA

<213> 人

<400> 1

ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau 60
ugugcugccu caaaaauaca agg 83

<210> 2

<211> 89

<212> RNA

<213> 人

<400> 2

gucagcagug ccuuagcagc acguaaaauu uggcguuaag auucuaaaa uaucuccagu 60
auuaacugug cugcugaagu aagguugac 89

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> 人

[0002]

<400> 3	
uagcagcaca uaaugguuug ug	22
<210> 4	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 4	
uagcagcacg uaaauauugg cg	22
<210> 5	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探针	
<400> 5	
cacaaaccat tatgtgcttg cta	23
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 探针	
<400> 6	
gccaatattt acgtgctgct a	21
<210> 7	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 7	
atacacctct aaatatctgt tccag	25

[0003]

<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 8
aagtaggacc attctaataag cc

22

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 9
gagtggcggt gagaaggat

20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 10
agccattgct atcttgagg

20

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 11
tgggatatgc ttcaggac

19

[0004]

<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 12	
agctgacctt ggaatctggt t	21
<210> 13	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 13	
agatattgtc tccgttccat ga	22
<210> 14	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 14	
cccagatata aggacctggc ta	22
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 15	
cctggcctgt tagttttat tgta	25

[0005]

<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 16
cccagtcttg ggtatgttt ta

22

<210> 17
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 17
gtttcgccaa gcctgtt

17

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 18
gttgacaata aaatagcca ca

22

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<221> misc_feature
<222> (1)...(20)
<223> n = A,T,C or G

[0006]

<400> 19 ctgnggcaaa aacaactctt	20
<210> 20 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 20 atctgtatgt cctccttca atg	23
<210> 21 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 21 aacctcattt aaatgtaaag catca	25
<210> 22 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 22 gtaatgtcat tgcttttgat ttgc	24
<210> 23 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	

[0007]

<400> 23	
ctcttgaggg aaaaaaaaaa tca	23
<210> 24	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 24	
ccaggcaacc aaccagtc	18
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 25	
atacagactt cccagtggct	20
<210> 26	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 26	
agctattaaa gttccctgga taaat	25
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	

[0008]

<400> 27	
aaggaatcag agaaatgggg	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 28	
gctgagtcag agggatttga	20
<210> 29	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 29	
agaggtaaac aaaccaaacc c	21
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 30	
gctgacaatc aagagaagat g	21
<210> 31	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	

[0009]

<400> 31 aaaatcaggt ggaaacagaa t	21
<210> 32 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 32 aaaggctaac atcgaaggga	20
<210> 33 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 33 cagaaccaga gaaacagc	18
<210> 34 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 34 atggcacaac agcttaac	18
<210> 35 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	

[0010]

<400> 35 gaatgcaggt gtacctatca ac	22
<210> 36 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 36 actgagtgac tgctaccag	20
<210> 37 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 37 agctagccct atcagggt	18
<210> 38 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 38 gtaagtggag gttacctg	18
<210> 39 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	

[0011]

<400> 39	
gaatcattcg tgctaagtgg at	22
<210> 40	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 40	
tgccaactgc ttgaagaatc tc	22
<210> 41	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 41	
acacctaact cctgggttgt tc	22
<210> 42	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 42	
actaaatgcc agcgtttgca tg	22
<210> 43	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	

[0012]

<400> 43 ggtcttactc tggtaaattc t	21
<210> 44 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 44 cattggttagc taaggaaaca c	21
<210> 45 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 45 ccattcaagc ctggacaattc tt	22
<210> 46 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<400> 46 gaaacttgag acaataagga gc	22
<210> 47 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	

[0013]

<400> 47	
catgtaacca agataaatcc gt	22
<210> 48	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 48	
ctggaaatg tatgtgatga gg	22
<210> 49	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 49	
ctgttgctat ctgtaataac ac	22
<210> 50	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 50	
cttggaattt tccactgaat c	21
<210> 51	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	

[0014]

<400> 51	
tcacagaag aaacaaggc ag	22
<210> 52	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 52	
cagtgtagg aatacgatt ca	22
<210> 53	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 53	
ccttgccagt acgcccacaa gctg	24
<210> 54	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 54	
ccccacctat gggtgtagtg agcatcc	27

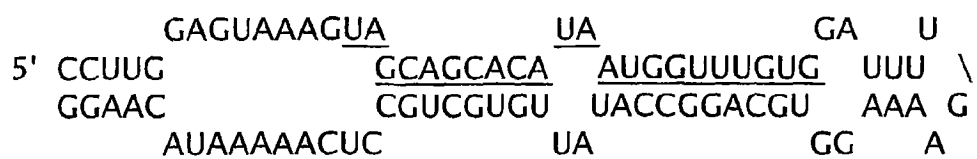


图 1a

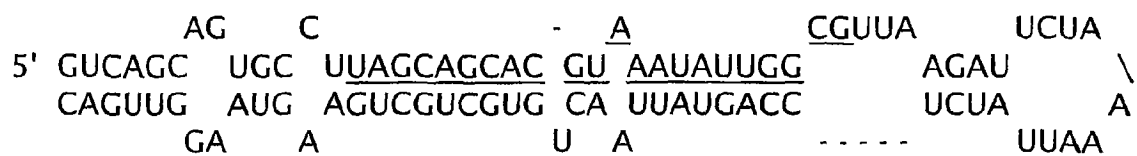


图 1b

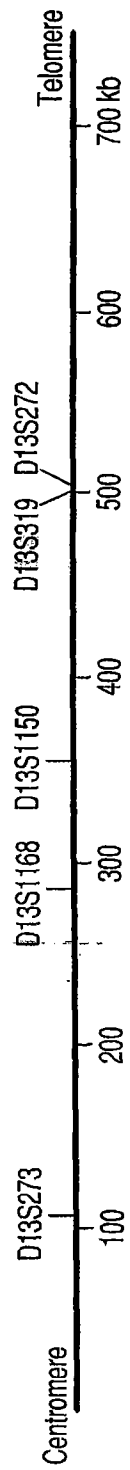


图 2a

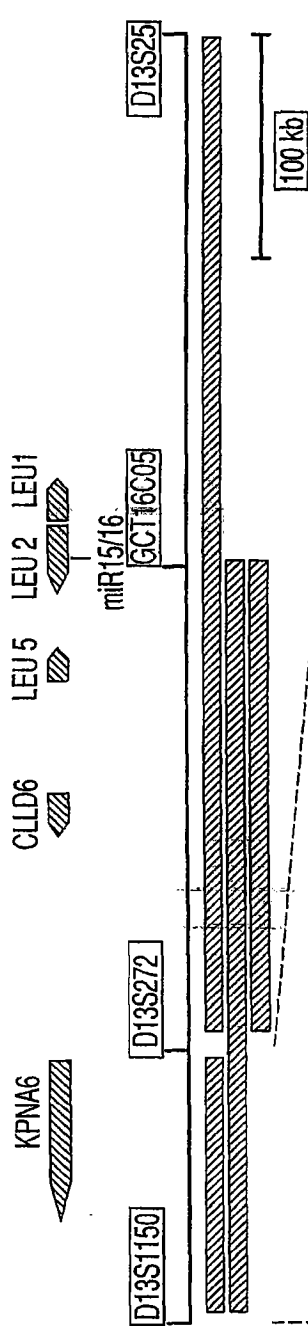


图 2b

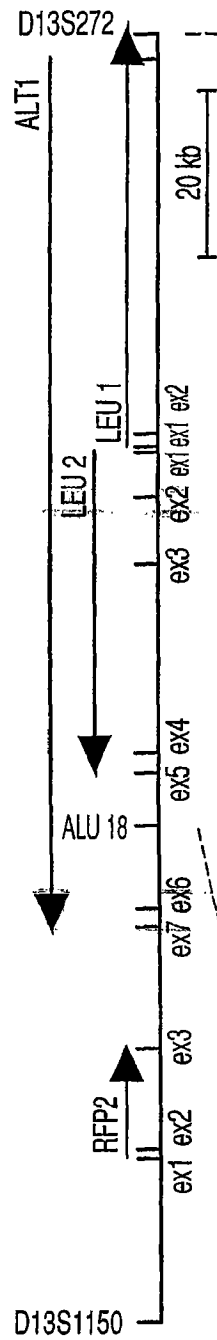


图 2c

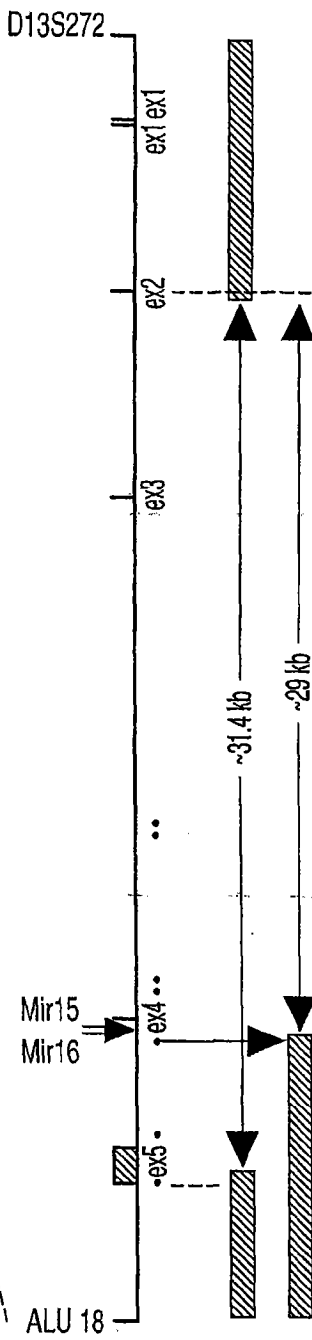


图 2d

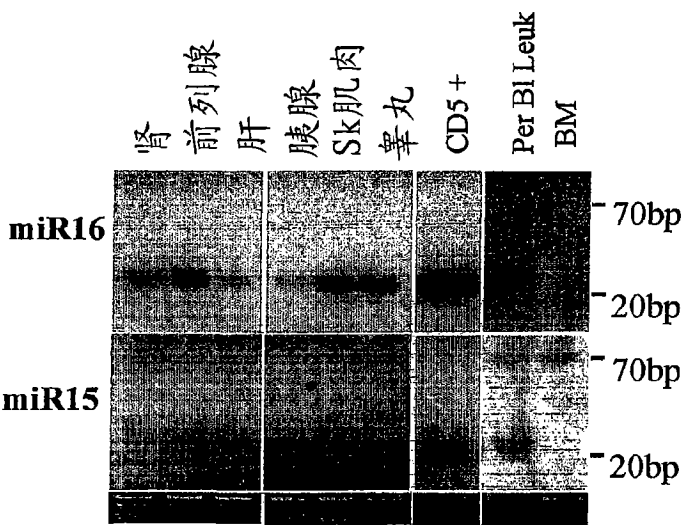


图 3a

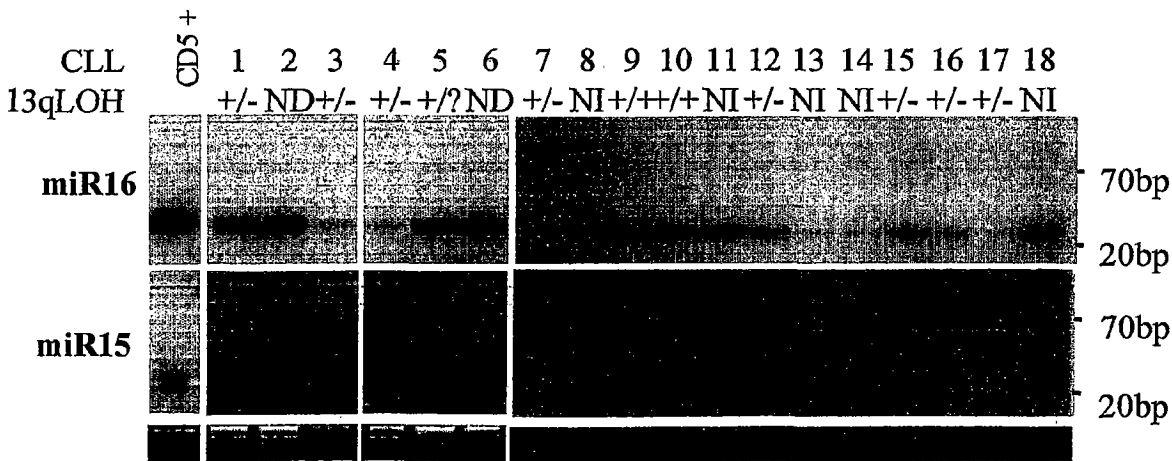


图 3b