(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103890582 A
(43)申请公布日 2014.06.25

(21)申请号 201280038235.9
(22)申请日 2012.06.01
(30)优先权数据
61/492,738 2011.06.02 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/040361 2012.06.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/167011 EN 2012.12.06
(71)申请人 麻省理工学院
地址 美国马萨诸塞州
申请人 塔夫斯大学
(72)发明人 威廉·G·希利
艾连纳·V·寇斯特杰华
B·大卫·史多勒
(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
代理人 钟晶 於毓桢
(51)Int.Cl.
G01N 33/50(2006.01)
C12Q 1/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书25页 附图11页

(54)发明名称

后核干细胞的 dsRNA/DNA 杂合基因组复制中间体

(57)摘要

本发明提供鉴别后核干细胞的方法，以及通过检测中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组鉴别选择性地调节这些细胞的生长、迁移、复制和/或存活的试剂的方法。还提供了诊断、预测以及治疗例如动脉粥样硬化、再狭窄以及良性或恶性肿瘤的病症的方法。

CN 103890582 A

1. 一种用于鉴别后核干细胞的方法，包含以下步骤：

a）使样品中细胞的细胞核显色，其中所述样品是通过实质上保护具有最大直径长达约50微米的细胞核中的细胞核结构的完整性的方法制备的；和

b）鉴别所述样品中含有中间体dsRNA/DNA双链体基因组的细胞，

从而鉴别后核干细胞。

2. 根据权利要求1所述的方法，其中所述后核干细胞是动物干细胞。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法，进一步包含c）枚举步骤b）中所鉴别的细胞。

4. 根据权利要求1所述的方法，其中所述后核干细胞是选自胎儿、幼体、成体或肿瘤干细胞。

5. 根据权利要求2所述的方法，其中所述动物是哺乳动物，例如人类。

6. 根据权利要求3所述的方法，其中所述样品是分离的组织活组织检查样品或细胞培养样品。

7. 根据权利要求1所述的方法，其中所述显色是所述细胞与针对dsRNA/DNA双链体具有特异性的经可检测标记的抗体相接触的结果。

8. 根据权利要求7所述的方法，其中所述标记是荧光标记。

9. 根据权利要求1所述的方法，其中所述显色是所述细胞与区分单链与双链核酸的染料相接触的结果。

10. 根据权利要求9所述的方法，其中所述染料是吖啶橙并且在显色之前用RNAse处理所述细胞。

11. 根据权利要求1或9所述的方法，其中在使所述细胞核显色之前用RNAse处理所述样品。

12. 根据权利要求11所述的方法，其中所述显色是所述细胞与针对ssDNA具有特异性的经可检测标记的抗体相接触的结果。

13. 根据权利要求12所述的方法，其中所述标记是荧光标记。

14. 根据权利要求6所述的方法，其中所述样品是来自疑似含有肿瘤、伤口愈合病变或动脉粥样硬化病变的组织的组织活组织检查样品，其中所述伤口愈合病变可以任选地是再狭窄病变。

15. 一种用于鉴别调节后核干细胞的生长、迁移、复制或存活的试剂的方法，包含

a）测定样品细胞中包含中间体dsRNA/DNA双链体基因组的细胞核的存在和/或数目和/或分布，其中所述样品包含含有中间体dsRNA/DNA双链体基因组的后核干细胞并且维持与候选试剂在适于所述试剂与所述细胞核相互作用的条件下相接触，并且其中所述样品是通过实质上保护具有最大直径长达约50微米的细胞核的完整性的方法制备的；和

b）比较与所述候选试剂相接触的所述细胞中包含中间体dsRNA/DNA双链体基因组的细胞核的存在和/或数目与包含后核干细胞但不与所述候选试剂相接触的对照细胞中包含中间体dsRNA/DNA双链体基因组的细胞核的存在和/或数目，

藉此，与所述候选试剂相接触的所述细胞中包含中间体dsRNA/DNA双链体基因组的细胞核的数目和/或分布相对于不与所述候选试剂相接触的对照细胞中的所述数目和/或分布的变化指示所述试剂的有效性。

16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述细胞与所述候选试剂在培养物中相接触。

17. 根据权利要求 16 所述的方法，其中所述细胞是动物细胞。

18. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述动物细胞与所述候选试剂在体内相接触。

19. 根据权利要求 18 所述的方法，其中所述动物细胞是哺乳动物细胞，是从异种移植实体肿瘤获得。

20. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述显色是所述细胞与针对 dsRNA/DNA 双链体具有特异性的抗体相接触的结果。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述抗体经荧光标记。

22. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述显色是所述细胞与区分单链与双链核酸的染料相接触的结果。

23. 根据权利要求 22 所述的方法，其中所述染料是吖啶橙并且在显色之前用 RNAse 处理所述细胞。

24. 根据权利要求 15 或 22 所述的方法，其中在使所述细胞核显色之前用 RNAse 处理所述样品。

25. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述显色是所述细胞在 RNAse 处理后与针对 ssDNA 具有特异性的抗体相接触的结果。

26. 根据权利要求 25 所述的方法，其中所述抗体经荧光标记。

27. 根据权利要求 15 所述的方法，其中所述候选试剂靶向包含选自以下的分子的复制复合物 :DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ξ 或 RNAse H1。

28. 根据权利要求 27 所述的方法，其中所述候选试剂破坏 DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ξ 或 RNAse H1 与所述中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组的结合，或破坏 DNA 聚合酶 β 介导的或 DNA 聚合酶 ξ 介导的从所述中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组进行的 DNA 复制，或 RNAse H1 介导的从所述中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组去除 RNA。

29. 根据权利要求 15 所述的方法，其中检测到与所述候选试剂相接触的所述细胞中经历后核无丝分裂的钟形细胞核的数目增加。

30. 根据权利要求 15 所述的方法，其中检测到与所述候选试剂相接触的所述细胞中经历后核无丝分裂的钟形细胞核的数目减少。

31. 一种用于鉴别与后核干细胞复制相关的大分子的方法，包含检测含有中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组的后核干细胞中的候选大分子，其中所述候选大分子与所述中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组的共定位表明所述大分子与后核干细胞复制相关。

32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中用经可检测标记的抗体检测所述候选大分子。

33. 根据权利要求 31 所述的方法，其中所述后核干细胞是动物干细胞。

34. 根据权利要求 1、15 或 31 所述的方法，其中所述后核干细胞是植物干细胞。

后核干细胞的 dsRNA/DNA 杂合基因组复制中间体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请主张 2011 年 6 月 2 日提交的美国临时申请第 61/492,738 号的权益。以上申请的整个传授内容以引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 科学家们长期以来公认肿瘤细胞和病理学组织架构(例如腺癌)与中期妊娠胎儿的细胞和组织的相似性(孔海姆(Cohnheim),1876)。恶性肿瘤以类似于早期胎儿的速率生长并且类似的胎儿组织含有组织学上间叶细胞(局部紊乱)或上皮(局部组织化)的生态位。预期胎儿和癌症干细胞的数目增加并且产生存在于器官或肿瘤块内的高度异质性生态位中的各种分化细胞类型。因此预期胎儿和癌症干细胞对称地分裂产生两个干细胞,不对称地分裂产生干细胞和分化的非干细胞。对称干细胞分裂将推动器官或肿瘤的净生长而不对称分裂将提供移行细胞,移行细胞本身分裂并且提供器官或肿瘤中的绝大部分细胞。在类似的血管中,例如动脉粥样硬化或伤口愈合病症(例如术后再狭窄)的非癌性过度增生性病症也有可能受到对称和不对称干细胞分裂所引起的干细胞群体的异常生长的推动。一般公认癌症和其它过度增生性疾病的有效治疗将需要针对于选择性地调节作为这些病症的基础的干细胞的生长、迁移、复制或存活有关的新颖疗法。因此,需要一些手段来鉴别患者中作为这些病理学的基础的干细胞、鉴别为所述干细胞所特有的分子目标分子和生物化学路径以及鉴别杀死它们或限制它们生长的试剂。

发明内容

[0004] 本发明尤其提供鉴别干细胞,尤其是作为过度增生性、伤口愈合或肿瘤病症的基础的后核干细胞的方法,以及鉴别为所述病理学干细胞所特有的分子目标分子和生物化学路径以及鉴别杀死它们或限制其生长、迁移或存活的试剂的方法。本发明部分地基于申请人的如下发现:推动人类胎儿 / 幼体生长以及非癌性过度增生性、伤口愈合和肿瘤病理学的干细胞谱系(本文中称作后核细胞)具有一种为后核细胞所特有的但未被任何其它已知形式的植物、动物或细菌细胞类型所用的出人意料的细胞核 DNA 链分离和复制模式。这一新颖的细胞核基因组复制形式涉及形成复制中间体 dsRNA/DNA 杂合(也称为 dsRNA/DNA 螺旋双链体、dsRNA/DNA 双双链体、dsRNA/DNA 螺旋或简单的 dsRNA/DNA)基因组。这一观察结果与先前的人类真核非干细胞分裂的观察结果形成对比,后者中的细胞核 DNA 合成通过 DNA 的亚染色单体长度的反复复制,接着在有丝分裂时以双链 DNA(dsDNA/DNA)形式进行染色单体凝聚和分离来进行。然而,已经提出了证据,非干真核细胞中的一些或所有人类细胞线粒体 DNA 是通过 dsRNA/DNA 中间体合成的。具体来说,所述文献不包含呈细胞核基因组复制和 / 或分离的任何形式的 dsRNA/DNA 杂合基因组的参考或建议。

[0005] 因此,在一个方面,本发明提供用于鉴别后核干细胞,尤其是经历细胞核复制和分离的后核干细胞的方法。所述方法包括以下步骤:使样品中,例如组织或肿瘤样品或细胞培养物中的细胞的细胞核显色,其中所述样品是通过实质上保护具有最大直径长达约 50 微

米的细胞核中的中空钟形后核细胞核结构的完整性的方法制备；然后通过其钟形细胞核来鉴别样品中的后核细胞和/或辨别经历后核无丝分裂的后核细胞(即，与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关)。在某些具体实例中，所述方法可以进一步包括枚举所鉴别的细胞的步骤。在某些具体实例中，所述方法可以进一步包括分离所鉴别的细胞的步骤。在其它具体实例中，所述方法进一步包含鉴别与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组共定位的大分子。

[0006] 在特定具体实例中，后核干细胞是哺乳动物干细胞，例如人类细胞。在某些具体实例中，细胞可以是胎儿、幼体、成体和/或肿瘤干细胞和/或如动脉粥样硬化、静脉硬化、术后再狭窄中的过度增生性病理学病变的干细胞。

[0007] 通过本发明方法鉴别的细胞可以是在组织分离样品、肿瘤活组织检查样品或如动脉粥样硬化、静脉硬化、术后再狭窄中的其它过度增生性病理学病变或细胞培养样品中。在特定具体实例中，对细胞进行培养并且在使细胞核显色之前已经对培养物进行照射或以其它方式进行处理。在更特定的具体实例中，对所培养的细胞进行处理以便在观察后核干细胞之前从观察对象中优先杀死和去除大多数真核非干细胞。这类处理的实例包括以大于 400 拉德的剂量进行 x 照射或暴露于已知会引起真核非干细胞死亡但后核细胞死亡的程度显著较低的浓度的化学试剂(例如 5- 氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、秋水仙碱)。

[0008] 在其它具体实例中，所述细胞是在来自疑似含有肿瘤、伤口愈合病变(例如再狭窄病变)、动脉粥样硬化或静脉硬化病变的组织的组织活组织检查样品中。

[0009] 可以通过各种手段使采用 dsRNA/DNA 杂合基因组经历基因组复制和分离的后核干细胞的细胞核显色，并且在特定具体实例中，显色可以是样品细胞与针对 dsRNA/DNA 双链体具有特异性的经可检测标记的抗体相接触的结果。在更特定的具体实例中，抗体被荧光标记。在其它具体实例中，通过间接免疫荧光法使细胞显色，例如通过使其与特异性抗体相接触，然后使用经可检测标记的第二抗体检测第一抗体。

[0010] 在其它具体实例中，因为细胞与区分单链与双链核酸的染料(例如吖啶橙)相接触而使细胞核显色。在更特定的具体实例中，在使细胞核的核酸内含物显色之前，例如通过 RNAse 处理，对样品中的细胞进行处理以去除 RNA。在其它特定具体实例中，细胞核的显色是在处理以去除 RNA 之后，细胞与针对 ssDNA 具有特异性的经可检测标记的抗体(例如针对 ssDNA 具有特异性的经荧光标记的抗体)相接触的结果。类似地，含有 dsRNA/DNA 中间体的细胞可以通过例如放线菌素 D 的试剂检测，所述试剂与 dsRNA/DNA 特异性结合并且与荧光试剂结合。

[0011] 在另一个具体实例中，通过不存在染料荧光或染料荧光显著降低来辨别含有大量(1-24 皮克)dsRNA/DNA 的细胞核，所述染料例如 DAPI (4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚)和或赫斯特(Hoechst) 33258，它们在与 dsDNA 结合时发出明亮的荧光但不会使仅含有 dsRNA/DNA 的细胞核发出荧光。在此请注意，“赫斯特阴性(Hoechst-negative)”细胞核已经从来源于骨髓或肿瘤的细胞混合物中分离出，并且所述分离株已经在移植实验中被报告为针对造血或肿瘤干细胞“富集化(enriched)”。然而，具有赫斯特阴性细胞核的单一细胞尚未被报导为具有例如中空钟形细胞核的干细胞性质，也不具有先前与经历基因组复制和/或分离的细胞有关的“赫斯特阴性”条件，这种条件也不与含有大量 dsRNA/DNA 的细胞核有关。

[0012] 在另一个方面，本发明提供用于鉴别为经历基因组复制和分离的后核干细胞所特有的大分子和/或生物化学路径的方法。可以预期到，抑制这类大分子或路径的生物功能

可抑制后核干细胞的生长、迁移、复制和 / 或存活。这些方法包括鉴别含有中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组的细胞和检测候选大分子(直接或间接)的步骤,其中候选大分子与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组的共定位表明所述大分子与后核干细胞复制有关。在某些具体实例中,用经可检测标记的抗体检测候选大分子。在一些具体实例中,例如在显微镜下,检查经历无丝分裂的目前已知含有大量 dsRNA/DNA 的后核细胞核中特定大分子或生物化学路径的存在。特定大分子的显色可以是样品细胞与针对由人类基因组所编码的任何基因产物具有特异性的经可检测标记的抗体相接触的结果。在更特定的具体实例中,抗体被荧光标记。在其它具体实例中,通过间接免疫荧光法使细胞显色,例如通过使其与特异性抗体相接触,然后使用经可检测标记的第二抗体检测第一抗体。作为这些特定具体实例的实例,申请人提供了其如下发现 :三种特定大分子各自被发现大量(每个细胞核≥ 100,000 个分子)共定位于经历基因组复制和分离的后核细胞核中,但在分裂间期的后核细胞核中或在任何真核细胞核中检测不到,这三种特定大分子是 DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ξ 以及 RNAse H1。这些和其它大分子已经被他们假设为是在后核干细胞通过无丝分裂分离成单独细胞核之后将 dsRNA/DNA 转化成 dsDNA/DNA 形式的生物化学路径的必需部分。

[0013] 在另一个具体实例中,特定大分子(例如酶)的存在可以通过使含有处于无丝分裂状态并含有大量 dsRNA/DNA 的后核细胞核的细胞中的染色或荧光酶底物或产物的产生或破坏显色来检测。

[0014] 在另一个具体实例中,例如特定 RNA 序列(例如 mRNA、iRNA)的特定大分子的存在可以通过与针对各所需的 RNA 序列具有特异性的经标记探针杂交来检测。或者,可以通过例如原位 PCR 的方法来检测 RNA 序列。

[0015] 这些技术和类似技术领域的普通技术人员可以通过修改科学文献中所提供的或通过常规实验所设计的方法,容易地应用这类免疫或化学分析。

[0016] 这些方法包括以下步骤 :使包含具有经历后核无丝分裂的钟形细胞核的后核干细胞的细胞与候选试剂相接触并且使样品中细胞的细胞核显色,其中所述样品是通过实质上保护具有最大直径长达约 50 微米的细胞核中的细胞核结构的完整性的方法制备 ;以及测定所述细胞中经历后核无丝分裂的钟形细胞核的存在和 / 或数目。通过比较与候选试剂相接触的细胞中经历后核无丝分裂的钟形细胞核的存在和 / 或数目与包含后核干细胞但不与候选试剂相接触的对照细胞中经历后核无丝分裂的钟形细胞核的存在和 / 或数目,本领域的技术人员能够鉴别调节后核干细胞中与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关的无丝分裂从而调节后核干细胞的生长、迁移、复制或存活的试剂,例如通过检测与候选试剂相接触的细胞中经历与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关的无丝分裂的钟形细胞核数目相对于不与候选试剂相接触的对照细胞中的数目的变化。在不同应用中,后核干细胞的生长、迁移、复制或存活的增加或减少可能是所需要的。

[0017] 在另一个方面,本发明提供用于鉴别抑制后核干细胞的生长、迁移、复制和 / 或存活的试剂的方法。更具体来说,它提供一种发现某一试剂是否干扰包含干细胞谱系的后核细胞的病理学生长中增加的细胞数目所必需的无丝分裂过程的方法。这些方法包括以下步骤 :使包含具有经历后核无丝分裂的钟形细胞核的后核干细胞的细胞与候选试剂相接触并且使样品中细胞的细胞核显色,其中所述样品是通过实质上保护具有最大直径长达约 50 微米的细胞核中的细胞核结构的完整性的方法制备 ;以及测定所述细胞中经历后核无

丝分裂的钟形细胞核的存在和 / 或数目。通过比较与候选试剂相接触的细胞中经历后核无丝分裂的钟形细胞核的存在和 / 或数目与包含后核干细胞但不与候选试剂相接触的对照细胞中经历后核无丝分裂的钟形细胞核的存在和 / 或数目，本领域的技术人员能够鉴别调节后核干细胞中与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关的无丝分裂从而调节后核干细胞的生长、迁移、复制或存活的试剂，例如通过检测与候选试剂相接触的细胞中经历与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关的无丝分裂的钟形细胞核数目相对于不与候选试剂相接触的对照细胞中的数目的变化。更具体来说，可以通过上述用于检测含有大量 dsRNA/DNA 的细胞核的任何手段来检测和枚举采用 dsRNA/DNA 作为基因组复制中间体经历无丝分裂的后核细胞核的数目。举例来说，含有大量 dsRNA/DNA 的后核细胞核的数目可以通过针对 dsRNA/DNA 的免疫荧光分析、经 RNAse 处理的制剂中细胞核的亮橙色荧光，或用例如 DAPI 或赫斯特 33258 的染料处理的制剂中的细胞核中不存在荧光或荧光显著降低来检测。在一个更特定的具体实例中，在分离的姐妹细胞核中在 dsRNA/DNA 杂合基因组的形成过程中或在将 dsRNA/DNA 转化成 dsDNA/DNA 形式的过程中的后核细胞核可以通过使 dsDNA/DNA 和 dsRNA/DNA 同时显色来检测，例如通过用针对 dsDNA/DNA 的 DAPI 和针对 dsRNA/DNA 具有特异性的荧光抗体对固定组织或细胞同时染色，只要与所述抗体连接或结合的荧光标记在可区别于 DAPI 的蓝色荧光的波长下发荧光即可。

[0018] 在某些具体实例中，对所培养的细胞进行处理以在观察后核干细胞之前从观察对象中优先杀死和去除大多数真核非干细胞。这类处理的实例包括以大于 400 拉德的剂量进行 x 照射或暴露于已知会引起真核非干细胞死亡但后核细胞死亡的程度显著较低的浓度的化学试剂(例如 5- 氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、秋水仙碱)。

[0019] 在一些具体实例中，所述细胞是哺乳动物细胞。在更特定的具体实例中，所述哺乳动物细胞与候选试剂在体内接触，并且在更特定的具体实例中，所述哺乳动物细胞是从异种移植实体肿瘤获得的。

[0020] 对于体内和体外筛选方法，可以通过上述用于鉴别后核细胞的任何方法或本申请中所披露的任何其它方法使细胞核显色。

[0021] 本发明所提供的筛选方法能够鉴别调节后核干细胞的生长、迁移、复制或存活的各种试剂。在一些具体实例中，候选试剂靶向包含选自以下的分子的复制复合物 :DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ξ 和 / 或 RNAse H1。在更特定的具体实例中，候选试剂破坏 DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ξ 或 RNAse H1 与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组的结合，或破坏 DNA 聚合酶 β 介导的和 / 或 DNA 聚合酶 ξ 介导的从中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组进行的 DNA 复制，和 / 或 RNAse H1 介导的从中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组去除 RNA。本发明所提供的筛选方法将鉴别以各种方式调节后核细胞的生长、迁移、复制和 / 或存活的试剂。在一些具体实例中，检测到在与候选试剂相接触的细胞中，经历后核无丝分裂的钟形细胞核的数目增加，例如所述试剂抑制了复制完成并且复制中间体累积或所述试剂刺激了经历复制的后核干细胞的数目增加。在其它具体实例中，检测到在与候选试剂相接触的细胞中，经历后核无丝分裂的钟形细胞核的数目减少，例如所述试剂抑制了复制起始或触发异常复制，从而导致复制中间体消除。在其它具体实例中，例如伤口愈合或致病性病况(例如术后再狭窄)，鉴别出了调节经历后核无丝分裂的后核干细胞的迁移数目的试剂，例如增加或减少后核干细胞的迁移数目的试剂。

[0022] 在另一个方面，本发明提供用于治疗哺乳动物个体（例如人类）的病症的方法。这些方法包括使个体中的后核干细胞与调节后核干细胞的生长、迁移、复制或存活的试剂相接触。在一些具体实例中，所述试剂抑制包含选自以下的分子的复制复合物：DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ξ 和 / 或 RNAse H1。典型地，后核干细胞包含经历后核无丝分裂的钟形细胞核。在更特定的具体实例中，所述试剂是抑制 DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ξ 和 / 或 RNAse H1 与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组结合的化学试剂。

[0023] 在一些具体实例中，所述试剂包含 dsRNA/DNA 双链体结合部分。在更特定的具体实例中，dsRNA/DNA 双链体结合部分是针对 dsRNA/DNA 双链体具有特异性的单克隆抗体或其片段。在其它更特定的具体实例中，dsRNA/DNA 双链体结合部分是针对 dsRNA/DNA 双链体具有特异性的多克隆抗体或其片段。在特定具体实例中，适用于本发明所提供方法的抗体或其片段能够结合选自聚 (A)/ 聚 (dT)、聚 (dC)/ 聚 (I) 以及 ΦX174dsRNA/DNA 杂合体的至少一种免疫原。

[0024] 在一些具体实例中，本发明所提供的治疗方法中所用的试剂包含第二部分。在更特定的具体实例中，第二部分对 dsRNA/DNA 双链体进行降解或化学修饰。在一些具体实例中，第二部分具有放射性。

[0025] 在特定具体实例中，待用本发明所提供方法治疗的病症包含肿瘤或病变，其中所述病变与伤口愈合病症或非癌性过度增生性病症有关。在更特定的具体实例中，所述病变是动脉粥样硬化或静脉硬化病变。在其它具体实例中，所述病变与伤口愈合病症有关，例如再狭窄病变。待用本发明所提供方法治疗的病症可以包括单克隆（由单一异常后核干细胞推动）和多克隆（由两个或两个以上异常后核干细胞推动）病症。

[0026] 在另一个方面，本发明提供用于诊断哺乳动物个体的肿瘤、非癌性过度增生性病症或伤口愈合病症的方法，其中申请人传授，使用 dsRNA/DNA 复制中间体的后核细胞在无丝分裂时分离。这些方法包括以下步骤：使包含具有经历后核无丝分裂的钟形细胞核的后核干细胞的细胞与候选试剂相接触并且使样品中的细胞的细胞核显色，其中所述样品是通过实质上保护具有最大直径长达约 50 微米的细胞核中的细胞核结构的完整性的方法制备的；以及测定所述细胞中经历后核无丝分裂的钟形细胞核的存在和 / 或数目。在手术样品或活组织检查样品中，本领域的技术人员能够鉴别含有中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组的细胞核。更具体来说，可以检测并且枚举采用 dsRNA/DNA 作为基因组复制中间体经历无丝分裂的后核细胞核的数目。举例来说，含有大量 dsRNA/DNA 的后核细胞核的数目可以通过针对 dsRNA/DNA 的免疫荧光分析、在经 RNAse 处理的制剂中经吖啶橙处理的细胞核的亮橙色荧光，或用例如 DAPI 或赫斯特 33258 的染料处理的制剂中的细胞核中不存在荧光或荧光显著降低来检测。在一个更特定的具体实例中，在分离的姐妹细胞核中在 dsRNA/DNA 杂合基因组的形成过程中或在将 dsRNA/DNA 转化成 dsDNA/DNA 形式的过程中的后核细胞核可以通过使 dsDNA/DNA 和 dsRNA/DNA 同时显色来检测，例如通过用针对 dsDNA/DNA 的 DAPI 和针对 dsRNA/DNA 具有特异性的荧光抗体对固定组织或细胞同时染色，只要与所述抗体连接或结合的荧光标记在可区别于 DAPI 的蓝色荧光的波长下发荧光即可。所述具有大量 dsRNA/DNA 的细胞核的存在可以诊断癌性或癌症前期病变或病理学过度增生性病症，例如动脉粥样硬化或静脉硬化，或伤口愈合病症（例如术后再狭窄）。

[0027] 在更特定的具体实例中，这些方法的测定步骤包括测定样品中使用 dsRNA/DNA 基

因组复制中间体经历后核无丝分裂的后核干细胞的数目和 / 或分布。在某些具体实例中，所述方法可以进一步包括对个体(例如人类)进行预测的步骤，其中样品中经历后核无丝分裂的细胞的数目和 / 或分布表明肿瘤、非癌性过度增生性病症或伤口愈合病症的低、中或高风险预后，例如疑似会变成与断断续续的过度增殖状态相对的早期恶性肿瘤状态的前列腺的手术活组织检查。在更特定的具体实例中，所述方法可以进一步包括向所述个体给予合适的预防的步骤。举例来说，在个体中的肿瘤存在下，所述个体可以经历手术以及辅助疗法，例如化学疗法。在特定具体实例中，可以向个体给予如本文所披露的调节后核干细胞的生长、迁移、复制或存活的试剂和 / 或用本文所披露的任何治疗方法治疗。更具体来说，所给予的试剂可以是 dsRNA/DNA 杂合基因组形成和分离的抑制剂或将 dsRNA/DNA 抑制剂转化成分裂间期 dsDNA/DNA 基因组形式的过程的抑制剂。更具体来说，所述试剂可以抑制被发现与 dsRNA/DNA 杂合基因组实体结合的任何一种酶的功能，这些酶例如申请人所发现的那些酶 :DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ξ 或 RNAse H1。

附图说明

[0028] 所述专利或申请文件含有至少一个彩制图式。具有彩色图式的此专利或专利申请公开案的副本将在请求和支付必需费用之后由专利局提供。

[0029] 图 1 是显示人类胎儿结肠后核干细胞(5-7 周)的对称无丝分裂的显微照片。这示出了人类器官形成、癌形成以及致病性血管病变中所用的对称无丝分裂的一种常见模式，“叠杯(stacked cup)”。戈斯特杰瓦(Gostjeva)等人，2006, 2009。

[0030] 图 2 是显示胎儿结肠后核干细胞(5-7 周)的不对称无丝分裂的显微照片。不对称分裂是干细胞的基本性质。戈斯特杰瓦等人，2006, 2009。

[0031] 图 3 显示在胎儿器官(5-9 周)中在后核干细胞对称无丝分裂期间和之后 DNA 含量的定量福尔根(Feulgen)血细胞计数(上图，紫色 ；在下图中定量)。数据表明 DNA 在后核无丝分裂期间和之后不久加倍(如 y 轴中所示从 1× 增加到 2×)，但未展现基因组的中间体形式的生物化学性质。戈斯特杰瓦等人，2009。注意，钟口处的凝聚的 DNA 的两个环最先证明了 DNA 加倍。这些图像确定，在无丝分裂期间同时发生基因组 DNA 加倍和分离，并且一种解释尤其涉及 DNA 螺旋的相反链分离到姐妹细胞核中，接着复制以再造 dsDNA/DNA 基因组。

[0032] 图 4 显示后核复制的显微照片。左图(A)：两个后核无丝分裂，另一种形式的后核无丝分裂，“接吻钟(kissing bell)”，在胎儿期早期在透射光下使用定量福尔根染色(对于 DNA 来说是紫色)所常见的。右侧两幅图(B 和 C)：用 RNAse 预处理以去除核糖体 RNA (它会干扰 ssDNA 的检测)，然后用吖啶橙标记的呈“接吻钟”形式的两个后核无丝分裂。在这类 RNAse 处理的样品中，绿色荧光表示双链 DNA 而橙色荧光表示单链 DNA。后来了解到，在这种情况下双链 RNA/DNA 通过用 RNAse 预处理被转化成单链 DNA。箭头表示本发明者的解释 ：双链 RNA/DNA 中间体的形成开始于钟形细胞核口处的凝聚 DNA 的两个环中然后在分离两个姐妹细胞核之前继续“扩散(spread)”到细胞核主体内的约 90% 的基因组中。

[0033] 图 5 显示早期人类胎儿发育的两个后核多核合胞体的荧光显微照片。用 RNAse 预处理样本，然后用吖啶橙染色。上图(A)：没有通过处理被标记橙色的细胞核的合胞体。这是在取样和 RNAse 处理时没有经历基因组复制的合胞体的实例。下图(B)：在钟口处所有细胞核都被标记橙色的合胞体，表明在取样和染色时在细胞核的这一部分中存在大量 dsRNA/

DNA。这一显微照片进一步表明同一合胞体内的细胞核通过 dsRNA/DNA 杂合基因组经历同步的无丝分裂和基因组加倍。含有钟形后核细胞核的合胞体中的同步无丝分裂先前在福尔根血细胞计数的情况下观察到(戈斯特杰瓦等人,2006)。

[0034] 图 6 显示图 5 中所检查的使用相同组织的早期胎儿发育的多核合胞体的两张荧光显微照片。针对单链 DNA (ssDNA)的抗体显示在 RNAse 预处理之后在单核和合胞体后核细胞中的 ssDNA (绿色荧光)。本发明者已经将(A)中的钟形模板和(B)中的箭头叠加来说明表示后核细胞核的钟形。在未用 RNAse 处理的相同标本中未观察到信号。与双链 DNA 结合的染料 DAPI 产生蓝色荧光。这表示一种独立的论证手段,在 RNAse 处理之后,后核细胞核的无丝分裂图含有大量单链 DNA 组分。

[0035] 图 7 显示两张荧光显微照片。用来自图 5 和 6 中所用的相同人类胎儿标本的 RNAse 预处理合胞体,然后用针对单链 DNA 的绿色荧光抗体(A)或用吖啶橙(B)标记,吖啶橙在与单链 DNA 结合时发橙色荧光。此图表明在 RNAse 处理和用针对单链 DNA 的独立探针染色之后后核无丝分裂的标记分布的基本一致性。使用两种实际上独立的方法来辨别经历无丝分裂的经 RNAse 处理的后核细胞核中的 ssDNA 测试并且支持以下假设 :RNA 以某种方式牵涉于无丝分裂期间所产生的后核基因组中间体中。

[0036] 图 8 显示胎儿组织中管状合胞体内的后核钟形细胞核内 dsRNA/DNA 双链体的分布。图 8A 显示五个合胞体钟形细胞核含有 dsDNA/DNA (DAPI,蓝色)和 dsRNA/DNA (TRITC,红色),针对 dsRNA/NA 双链体具有特异性的经标记的抗体复合物。这五个钟形细胞核在合胞体内排成一行,显示与合胞体内正在分裂的“钟”有关。图 8B 显示红色荧光,这表明存在 dsRNA/DNA 双链体结合(TRITC,红色),显示在相同的五个钟形细胞核中没有来自 dsDNA/DNA 的 DAPI 染色的蓝色荧光。图 8C 显示相同的五个合胞体细胞核的消色差图像,显示它们是钟形细胞核,与不是钟形的若干其它细胞核相对比。比例尺是 5μm。人类胎儿(9 周),脊髓,合胞体。针对 dsRNA/DNA 双链体进行免疫荧光染色(AB n3 和 TRITC- 红色)。用 DAPI 进行复染(细胞核 - 蓝色)。

[0037] 图 9 显示第二组图像,展示了胎儿组织中无丝分裂后核钟形细胞核内 dsRNA/DNA 双链体的分布。图 9A 显示所有四个合胞体钟形细胞核含有 dsDNA/DNA (DAPI,蓝色)和 dsRNA/DNA (TRITC,红色),针对 dsRNA/DNA 双链体具有特异性的经标记的抗体复合物。这四个钟形细胞核在合胞体内排成一行,显示与合胞体内正在分裂的“钟”有关。图 9B 显示红色荧光,表明存在 dsRNA/DNA 双链体结合(TRITC,红色),显示在相同的四个钟形细胞核中没有来自 dsDNA/DNA 的 DAPI 染色的蓝色荧光。图 9C 显示相同的四个合胞体细胞核的消色差图像,显示它们是钟形细胞核,与不是钟形的另一个细胞核(左上方)相对比。比例尺是 5μm。人类胎儿(9 周),脊髓,合胞体。针对 dsRNA/DNA 双链体进行免疫荧光染色(AB n3 和 TRITC- 红色)。用 DAPI 进行复染(细胞核 - 蓝色)。

[0038] 图 10 显示在 HT-29 人类结肠腺癌衍生的细胞系的细胞中发现的单核后核细胞中的不对称无丝分裂期间钟形和衍生的球形细胞核的图像。图 10A 显示 DAPI 阳性蓝色钟形细胞核(左)和 TRITC 标记的抗体复合物,红色球形真核细胞核(右)。这一图像传授,在一些情况下,不对称无丝分裂中的一个细胞核可以被转化成分裂间期 dsDNA/DNA 形式而另一个至少暂时保持复制中间体的 dsRNA/DNA 形式。这一图像还传授,通过无丝分裂产生的姐妹细胞的基本上 100% 的基因组可以包含 dsRNA/DNA,图 10B 显示一个消色差图像,显示一个没

有检测到 dsRNA/DNA 质量存在的钟形细胞核(箭头)。比例尺是 5μm。然而,HT-29 细胞(人类结肠腺癌细胞系)。针对 dsRNA/DNA 双链体进行免疫荧光染色(AB n2 和 TRITC- 红色)。用 DAPI 进行复染(细胞核 - 蓝色)。

[0039] 图 11 显示人类结肠腺癌衍生的细胞系 HT-29 的活的未染色群体的图像。紫色钟形物体是刚刚产生作为钟口处的卵形体所见的真核细胞核的后核癌症干细胞的细胞核。此图像传授,在没有固定或染料的情况下,使用普通显微镜或相差光学器件观察到了无丝分裂过程中的后核细胞细胞核。

[0040] 图 12 显示如图 11 中所示的细胞系 HT-29 的后核细胞的紫色钟形细胞核在例如赫斯特 33342 或 33258 的赫斯特染料存在下特定地未染色。所描绘的群体内真核细胞的所有细胞核部分地通过染料与真核基因组(包括(图中未示)经历有丝分裂的真核细胞)的 dsDNA 结合而呈现亮蓝色。在上一行和下一行的左图中,紫色钟形细胞核(箭头)刚刚产生近似球形的真核细胞核,所述真核细胞核随后经历有丝分裂。在两行的中间图片中,看到赫斯特 33342 染料将除了钟形后核干细胞细胞核之外的所有细胞核标记成蓝色,所述钟形后核干细胞细胞核不发出蓝色荧光并且当申请人第一次观察到这个现象时将其称为“黑洞(black hole)”。两行的右图是左边和中间的图片的复合图,显示两个图像鉴别了同一种物体,即经历有丝分裂的钟形后核细胞核的细胞核。申请人注意到,他们在后核无丝分裂中发现的 dsRNA/DNA 杂合基因组将主要是“A”形式的核酸螺旋并且预期将不被例如赫斯特染料或 DAPI 或者特定地引起“B”形式的核酸螺旋(例如 dsDNA)发荧光的其它染料呈现荧光。

[0041] 图 13 显示一些图像,这些图像表明,通过观察与无丝分裂和基因组复制有关的大分子(本文中是酶)在使用 dsRNA/DNA 基因组复制中间体经历无丝分裂的人类后核胎儿细胞中的抗原性来鉴别它们。由此鉴别了三种酶作为实例 :图 13a、d、g :被特定的荧光(FITC- 绿色)人类 POLβ 抗体复合物染色的 DNA 聚合酶 β ;图 13b、e、h :被特定的荧光(TRITC- 红色)人类 POLξ 抗体复合物染色的 DNA 聚合酶 ξ ;图 13c、f、i :被特定的荧光(FITC- 绿色)人类抗体 RNAse H1 抗体复合物染色的 RNAse H1。图 13a、b、c、d、e、f、g、h、i 是人类胎儿,脊髓神经节,9 周。图 13a、b、c 显示具有正在分裂的钟形细胞核的后核管状合胞体。图 13d、e、f 显示呈“接吻钟”形式的对称无丝分裂。图 13g、h、i 显示后核钟形细胞核的对称和不对称无丝分裂的各种形式。

[0042] 以上内容将从以下对本发明的例示性具体实例的更具体描述中显而易知,如附图中所示,其中,贯穿不同视图,相同的参考符号是指相同部分。图式不必按比例绘制,实际上是强调展示本发明的具体实例。

具体实施方式

[0043] 以下描述本发明的例示性具体实例。

[0044] 科学家长期以来一直怀疑干细胞具有将其与发育中的器官和肿瘤的非干细胞区分开来的生理特性,并且已经设计出一些间接手段从通过在引入到人类或实验性动物中之后能够重新构成组织(即造白细胞(hematoleukopoietic)系统或肿瘤)而证明含有干细胞的组织样品或肿瘤富集干细胞。然而,申请人先前已经发现,这些形成器官的和致癌的干细胞可基于以下各项直接地并且特定地辨别 :其不同的细胞核形态,参与对称和不对称无丝分裂细胞核裂变以及附于被福尔根试剂呈现明亮的荧光的细胞质细胞器。发现这些出人意

料的特性在以下方面具有价值：辨别和枚举组织活组织检查样品中的干细胞用于诊断癌性或癌症前期病状和测试一种试剂或试剂组合限制生长能力和/或杀死致病性干细胞的能力。构成组织或肿瘤中绝大部分细胞的真核细胞与这些非有丝分裂干细胞之间的明显区别致使其被命名为独特的细胞生命形式：后核细胞。

[0045] 另外被广泛接受的是，人类遗传谱系是通过复制双链 DNA 螺旋（dsDNA/DNA）以形成呈两个姐妹 dsDNA/DNA 螺旋形式的两个复本而产生的。在生殖细胞的形成过程中，姐妹 dsDNA/DNA 螺旋随后通过减数分裂过程分离。在一般构成植物和动物中 99% 以上组织细胞的实质细胞中，姐妹 dsDNA/DNA 螺旋通过有丝分裂过程分离。已经假定负责生长和发育的器官形成的干细胞将类似地仅采用 dsDNA/DNA 螺旋进行基因组复制随后通过有丝分裂分离。然而，申请人目前已经发现，人类胎儿器官形成的干细胞以及人类癌形成的干细胞首先产生呈两个 dsRNA/DNA 螺旋复本形式的亲本 dsDNA/DNA 基因组的泛基因组复本，随后通过若干无丝分裂模式中的任一种分离成两个后代细胞。在无丝分裂分离过程期间和之后，dsRNA/DNA 基因组复制中间体与包括以下的酶实体上结合：RNAse-H1、DNA 聚合酶 β 和 ξ 以及与 dsRNA/DNA 中间体转化成 dsDNA/DNA 螺旋同时存在的其它分子。

[0046] 本文中披露了通过无丝分裂裂变图的细胞核中可辨别质量的 dsRNA/DNA 的存在来辨别和枚举经历细胞分裂的后核干细胞的独立手段，并且因此在以下方面具有价值：辨别和枚举组织活组织检查样品中的干细胞用于诊断癌性或癌症前期病状，以及鉴别细胞分裂和基因组复制期间被后核细胞而不是真核细胞所用的可以充当疗法目标的其它大分子和生物化学路径，以及测试一种试剂或试剂组合限制生长能力或杀死致病性干细胞的能力。进一步披露了，dsRNA/DNA 螺旋本身是用于设计和/或选择治疗剂的特定目标，因为它们是用于形成和分离 dsRNA/DNA 杂合基因组和用于将其转化成 dsDNA/DNA 形式所需的分子。

[0047] 本发明涉及先前发现：以异常形式分裂并且导致例如癌症的过度增生性病症的后核干细胞以钟形细胞核为特征并且经历独特形式的复制。参见戈斯特杰瓦，E.V. 等人，《癌症遗传学和细胞遗传学（Cancer Genet.Cytogenet.）》，164:16-24(2006)；戈斯特杰瓦，E.V. 和梯利（Thilly），W.G.，《干细胞评论（Stem CellRev.）》，243-252(2005)）。钟形细胞核通过非有丝分裂裂变过程在结肠和胰腺人类肿瘤中对称地和不对称地分裂。戈斯特杰瓦，E.V. 等人，《癌症遗传学和细胞遗传学》，164:16-24(2006)；戈斯特杰瓦，E.V. 和梯利，W.G.，《干细胞评论》，243-252(2005)。这些钟形细胞核大量出现在 5-7 周胚胎后肠中，其中它们被装在管状合胞体中；并且占所有细胞核和肿瘤组织中的例如 30%，其中它们大量存在于“未分化的（undifferentiated）”生态位中。它们具有若干类似干细胞的性质，尤其是与人类结肠肿瘤前和赘生性组织的生长速率一致的不对称分裂和细胞核裂变频率的独特特性（赫雷罗·吉梅内斯（Herrero-Jimenez）等人，《突变研究（Mutat.Res.）》400:553-78(1998)；赫雷罗·吉梅内斯等人，《突变研究》447:73-116(2000)）；还参见美国专利第 7,427,502 号，尤其显示后核细胞是干细胞。考虑到异常后核细胞作为癌症干细胞的作用且进一步考虑到癌症干细胞典型地在标准放射线疗法和化学疗法之后能够存活这一事实，具有先前未辨别的细胞核形式的这些细胞是治疗策略的目标。

[0048] 本发明观察到这些钟形细胞核经历了一个基因组完全或实质上呈现为中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组的阶段，由此实现鉴别它们的方法、诊断和预测方法、筛选治疗处

理的方法、以及通过例如靶向在无丝分裂细胞分裂期间负责其复制成双链 DNA 的 DNA 聚合酶来靶向并且破坏它们的方法。在某些具体实例中，在本发明中靶向包含 DNA 聚合酶 β 和 / 或 DNA 聚合酶 ξ 的复制复合物。含有这些聚合酶的复制复合物可以通过例如个别地或共同地直接靶向所述聚合酶来靶向。因此，本发明所提供的方法能够抑制 DNA 聚合酶 β 活性、DNA 聚合酶 ξ 活性或实质上同时或依次抑制 DNA 聚合酶 β 活性和 DNA 聚合酶 ξ 活性，从而抑制后核干细胞的复制。在一些具体实例中，例如通过靶向 RNAse H-1 本身来靶向包含 RNAse H-1 的复制复合物。在更特定的具体实例中，与聚合酶 β 和 / 或 ξ 一起靶向 RNAse H-1。

[0049] 后核细胞

[0050] 后核干细胞展现出引人注意的，但仅在近年来才被辨别的细胞核形态类型：中空钟形细胞核。关于综述，参见戈斯特杰瓦和梯利，《干细胞评论》2:243-252(2005)；还参见美国专利第 7,427,502 号的图 1、2、3、6 以及 7 和其说明书，其也以全文引用的方式并入本文中。这些细胞也经历对称(产生其他钟形细胞核)和不对称(产生非钟形细胞核)的“无丝分裂(amitosis)”，无丝分裂是没有典型的有丝分裂和完整的中期染色体凝聚的分裂。通过这些无丝分裂，后核干细胞能够产生异型细胞核形态类型，包括钟形、雪茄形、凝聚球形、球形、卵形、香肠形、肾形、子弹形、不规则梭形以及其组合。参见例如美国专利第 7,427,502 号的图 1。“后核细胞(metakaryote)”、“后核干细胞(metakaryotic stem cell)”、“后核干细胞(metakaryotic stem cell)”、“伤口愈合后核细胞(wound healing metakaryote)”等等是指具有中空钟形细胞核的细胞，其中所述细胞通过对称或不对称的无丝分裂进行分裂。已经在动物和植物细胞中观察到了后核细胞。

[0051] 本领域的技术人员在实践本发明所提供方法时将能够容易地鉴别后核干细胞。举例来说，本文所提供的鉴别、筛选、诊断、预测以及治疗方法可以包含以下步骤：通过检测中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组检测组织样品或培养细胞中的后核干细胞。以实质上保护细胞核结构完整性的方式制备通过本发明方法显色的培养细胞或来自组织样品内的细胞，其中细胞核的最大直径长达约 10、20、30、40、50、60 或 70 微米，并且在更特定的具体实例中长达约 50 微米。美国专利第 7,427,502 号中还描述了用于制备细胞的方法，所述专利的传授内容以全文引用的方式并入本文中。在某些具体实例中，所述制备实质上保护约 10-15 微米的细胞核的细胞核结构的完整性。举例来说，在一些具体实例中，可以组织样品可以作为厚度是至少约 20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、750、1000、1250、1500 或大于 1500 微米的制剂来加以分析。在某些具体实例中，在为分析做准备时，通过例如在约 45%（例如约 25%、30%、35%、40%、42%、45%、47%、50%、55%、60% 或 65%）乙酸中培育将组织样品浸软。

[0052] 在一些具体实例中，为了进一步便于后核细胞的检测，可以对培养细胞或组织样品进行染色。在特定具体实例中，所述染色可以包含用例如希夫碱(Schiff's base)试剂、福尔根试剂或品红(fuchsin)进行染色。在更特定的具体实例中，所述组织样品可以进一步用第二染色剂进行染色。在更特定的具体实例中，第二染色剂可以是吉姆沙染色剂(Giemsa stain)。

[0053] 在某些具体实例中，后核干细胞可以在用例如希夫试剂的非荧光染色剂处理之后，通过其细胞质的荧光进行检测。参见例如美国专利申请公开案第 2010/0075366A1 号，

包括实施例5、图20-27以及其说明书，所有这些都以引用的方式并入本文中。在本发明中，“与伤口愈合病症有关的后核干细胞(metakaryotic stem cells associated with wound healing disorders)”、“伤口愈合后核细胞(wound healing metakaryote)”等等是不展现气球状细胞质的后核干细胞，与例如美国专利申请公开案第2010/0075366A1号中所描述的后核干细胞的大型气球状细胞质形成对比。

[0054] 后核“细胞质细胞器(cytoplasmic organelle)”

[0055] 到目前为止所发现的所有非分裂后核细胞都具有中空凹形细胞核(钟形细胞核)，其在钟口边缘具有凝聚DNA的双带。钟口直径通常是约12-15微米，但钟形细胞核的深度从某些组织类型和衍生癌症中，例如来自外周循环的骨髓或白血病细胞的造血细胞制剂中的3-5微米延伸到肿瘤(例如人类结肠腺癌)中的一些后核细胞中的15-25微米。

[0056] 在真核细胞中，细胞核被细胞核膜包围作为由外部细胞膜定界的体积内的细胞器；通常所述细胞核定位在中心或靠近中心处并且所述细胞核膜不与细胞膜接触。然而，在后核细胞中，不存在显而易见的细胞核膜并且中空细胞核似乎被附加到包围这个细胞质细胞器的膜上而不是被它包围。在冷冻温度下，人类胎儿组织或肿瘤的某些处理(例如用MATRISPERSE™处理24小时)促使钟形细胞核与细胞质细胞器实体分离。

[0057] 后核细胞核以偏离中心方式结合的细胞质细胞器的大小和尺寸不同。几乎所有都通过用福尔根试剂(品红)处理呈现荧光并且被针对胎儿/致癌粘蛋白的抗体强烈标记。细胞质细胞器中粘蛋白强烈标记的一个例外是在胎儿器官的血管形成和术后再狭窄的病理学病状中产生平滑肌细胞的后核细胞。

[0058] 细胞质细胞器可以是与浅钟形细胞核结合的近似球形体。它们是最小的后核细胞，申请人观察到直径小于15微米。申请人传授，具有近似球形细胞质细胞器和以类似于亚莫克便帽(无边便帽)的浅钟形细胞核形式附加到其上的细胞核的这些最小后核细胞在文献中被描述为“印戒(signet ring)”细胞，通常在一些器官(例如胃小凹)、造血作用以及某些造血疾病(例如白血病)的发展过程中被注意到。申请人传授，这些最小后核细胞构成了其中发现它们的组织或疾病状况(例如白血病)中的重要干细胞谱系。

[0059] 细胞质细胞器还可以是具有极大长度的长椭球或气球状的。申请人已经在人类肿瘤中观察到了大于200微米的后核细胞质细胞器的实例。

[0060] 此外，在一些具体实例中，可以通过检测已经被证实适用于如下间接方法的特定标记基因来检测并进一步特性化后核细胞，所述间接方法用于通过“经富集化的”细胞材料的移植和异种移植分析来使骨髓、实体组织或肿瘤样品针对据推断存在的干细胞富集化。在特定具体实例中，标记基因可以包括CD133(普洛米宁1(prominin1)；人类基因ID8842，最长同功异构物的参考mRNA和蛋白质分别是NM_006017.2和NP_006008.1)和CD44(人类基因ID960，同功异构物1前体的参考mRNA和蛋白质序列分别是NM_000610.3和NP_000601.3)中的一种或多种。可以在核酸(例如RNA)或蛋白质层面上检测标记基因。在更特定的具体实例中，可以在后核细胞的气球状细胞质的周边检测标记基因。上述基因ID可以用来从NCBI网站检索公开可用的带注释的mRNA或蛋白质序列。与这些基因ID有关的信息包括参考序列和其相关注释，全都以引用的方式并入本文中。其它生物体的参考序列也可以容易地从NCBI网站获得。然而，申请人还传授，在与非后核细胞和其它非细胞结构有关的组织和肿瘤到处可见例如CD133和CD44的标记。

[0061] 本发明部分地基于如下发现，即后核干细胞可以特定地通过检测无丝分裂的中间体来鉴别，无丝分裂出乎意料地与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关。“中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组（intermediate dsRNA/DNA duplex genome）”或“中间体 dsRNA/DNA 杂合基因组（intermediate dsRNA/DNA hybrid genome）”或“dsRNA/DNA 杂合基因组（dsRNA/DNA hybrid genome）”等等是后核干细胞的复制中间体，其中先前 dsDNA/DNA 细胞核基因组的实质部分是呈包含一条核糖核酸链与脱氧核糖核酸的互补链杂交的双链核酸形式，即 dsRNA/DNA 双链体。实质部分是指至少 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、10%、20%、30%、40%、42%、45%、47%、50%、52%、55%、57%、60%、62%、65%、67%、70%、80%、90%、95%、99% 或 99% 以上的细胞核 DNA 是呈 dsRNA/DNA 双链体形式。在特定具体实例中，实质部分是指至少 50%、90%、95%、99% 或 99% 以上的细胞核 DNA 是呈 dsRNA/DNA 双链体形式。在其它具体实例中，实质部分是约 1-24 皮克，例如约 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22 或 24pg。这一独特结构与例如病毒基因组形成了鲜明的对比，病毒基因组尤其可以使用极小的 dsRNA/DNA 杂合基因组。此外，后核干细胞的中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组容易与真核细胞中在例如转录期间的 dsRNA/DNA 杂合体的报导相区分，因为这类报导不为复制中间体。此外，据估计，仅相对较小部分（0.01%-0.1%）的基因组呈 dsRNA/DNA 双链体形式。参见例如塞扎克（Szeszak）和皮赫尔（Pihl），《生物化学与生物物理学报（Biochem.Biophys.Acta）》247:363-67(1971)；阿尔科韦尔（Alcover）等人，《染色体（Chromosoma）》8:263-77(1982)。因此，如可以用于本申请中，“后核无丝分裂（metakaryotic amitosis）”是后核细胞的无丝分裂（对称或不对称），并且与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关。

[0062] 检测中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组

[0063] 后核干细胞的复制中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组可以通过各种手段检测，例如通过检测参与无丝分裂的蛋白质（下文所讨论）和 / 或通过检测 dsRNA/DNA 双链体本身。

[0064] dsRNA/DNA 双链体可以通过使用区分单链与双链核酸的核酸染料来检测。“区分单链与双链核酸（discriminate between single-stranded and double-stranded nucleic acids）”的染料对单链和双链核酸展现出有差异的亲和力和 / 或在与单链对比双链核酸结合时展现出不同的光谱性质（例如激发、吸收或发射光谱）。某些染料可以是比色的，例如荧光染料，而其它的可能不是比色的但对特定核酸具有亲和力，并且可能因此与其它分子结合以显色。

[0065] 举例来说，在一些具体实例中，区分单链与双链核酸的染料对双链核酸展现出更大的亲和力并且包括以下染料：例如 DAPI 或赫斯特染料，例如赫斯特 33342 或赫斯特 33258。举例来说，DAPI 不使 dsRNA/DNA 染色但确使 dsDNA/DNA 染色。当后核细胞核呈 100%dsDNA/DNA 形式时，它将呈现蓝色；而呈约 100%dsRNA/DNA 形式的细胞核将不展现可检测的 DAPI 染色。在其它具体实例中，区分单链与双链核酸的染料对单链核酸展现出更大的亲和力并且包括例如 TOTO®3 和 OLIGREEN®（INVITROGEN®）的染料。区分单链与双链核酸的其它染料在与单链或双链核酸结合时展现出不同的光谱性质，并且包括吖啶橙，它在与单链核酸结合时发红色荧光；并且在与双链核酸结合时发绿色荧光。在一些具体实例中，区分单链与双链核酸的染料还可以针对 dsRNA/DNA 杂合体具有增强的亲和力并且包括肖（Shaw）和阿维雅（Avya）《生物化学（Biochimie）》90:1026-39(2008)（以全文引用的方式并入本文中）的表 3 中所描述的分子，并且包括溴化乙锭、碘化丙锭、玫瑰树碱、放

线菌素 D 和衍生物(例如 N8 或 F8AMD)、巴龙霉素(paramomycin)、核糖霉素、新霉素和新霉素 - 氯化甲锭结合物“NM”以及来红菌素(lexitropsin)和聚酰胺,包括偏端霉素(例如双偏端霉素,尤其是邻位 / 对位)和纺锤菌素。

[0066] 区分单链与双链核酸的染料可以单独或与结合物结合使用以促进显色(例如在染料本身不是比色的情况下)并且可以进一步与 RNAse 一起使用。举例来说,RNAse 可以适用于通过检测上文所讨论的特定染料的预期比色反应的变化来鉴别 dsRNA/DNA 双链体。一个特定实例是在吖啶橙与单链核酸而不是双链核酸结合时观察到的光谱移动。因此,在某些具体实例中,通过在 RNAse 处理之后仅留下双链体的单链 DNA 时进行吖啶橙染色来检测 dsRNA/DNA 双链体。可以调整其它类似途径以用于本发明所提供方法中。举例来说,下表 1 提供在 RNA 降解(例如通过碱或优选地 RNAse 处理)之后,结合单链 DNA 并且因此能够用于本发明所提供方法的试剂。

[0067]

化学试剂	机制
放线菌素 D	广泛研究的抗肿瘤剂。与单链 DNA 中大量存在的发夹 DNA 结构结合。阻断由 DNA 模板进行的 RNA 合成。可能的 dsRNA/DNA 结合剂。
溴乙锭	在腺嘌呤和胞嘧啶的碱基配对位置处反应。优先与呈单链环和十字形的碱基反应。
氯乙锭	容易与单链 DNA 相互作用以主要形成亚乙烯基损伤的氯乙烯代谢物。
焦碳酸二乙酯	使 N-7 位置处的嘌呤羧乙基化,打开咪唑环。对 DNA 的单链区具有实质反应性。
四氧化锇	在吡啶存在下与嘧啶的 C-5、C-6 双键加成以形成锇酸酯。对单链 DNA 的反应性实质上大于对双链 DNA 的反应性。
高锰酸钾	嘧啶特异性和单链特异性。通过氧化来修饰碱基。

[0068] 表 1 :结合单链 DNA 的化学试剂。

[0069] 在某些具体实例中,使用抗体来检测 dsRNA/DNA 双链体。如本文所用的术语“抗体(antibody)”是指免疫球蛋白或其抗原结合片段,并且涵盖包含抗原结合位点的任何多肽,无论来源、起始物质、产生方法或特性如何。作为一个非限制性实例,术语“抗体”包括人类、猩猩、兔、小鼠、大鼠、山羊、绵羊以及鸡抗体。所述术语包括(但不限于)多克隆、单克隆、单特异性、多特异性、非特异性、人类化、骆驼化、单链、嵌合、合成、重组、杂合、突变以及 CDR 移植抗体。出于本发明的目的,除非另外说明,否则它还包括抗体片段,例如 Fab、F(ab')2、Fv、scFv、Fd、dAb、VHH (也称为纳米抗体)以及保留抗原结合功能的其它抗体片段。抗体还包括不是基于免疫球蛋白的抗原结合分子,如以下进一步所述。

[0070] 抗体可以例如通过传统的杂交瘤技术(科勒(Kohler)和米尔斯坦(Milstein),《自然(Nature)》256:495-499(1975))、重组 DNA 方法(美国专利第 4,816,567 号)或使用抗体库的噬菌体展示技术(克拉克森(Clackson)等人,《自然》352:624-628(1991) ;马克斯(Marks)等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》222:581-597(1991))来制造。关于各种其它抗体产生技术,参见《抗体 :实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,哈洛(Harlow)等人编,冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),1988。

[0071] 在一些具体实例中,术语“抗体”包括基于除免疫球蛋白以外的骨架的抗原结合分子。举例来说,本领域中已知的非免疫球蛋白骨架包括小模块免疫药物(参见例如分别在

2008 年 7 月 31 日和 2008 年 9 月 18 日公开的美国专利申请公开案第 2008/0181892 号和第 2008/0227958 号)、四连接素、粘连蛋白结构域(例如阿德尼可汀(AdNectin),参见 2007 年 4 月 12 日公开的美国专利申请公开案第 2007/0082365 号)、蛋白质 A、脂质运载蛋白(lipocalin)(参见例如美国专利第 7,118,915 号)、锚蛋白重复序列以及硫氧还蛋白。基于非免疫球蛋白骨架的分子一般通过噬菌体展示(参见例如霍根布姆(Hoogenboom),《分子生物学方法(Method Mol Biol.)》178:1-37(2002))、核糖体展示(参见例如汉斯(Hanes)等人,《欧洲生化学会联合会快报(FEBS Lett.)450:105-110(1999)》和何(He)与陶西格(Taussig),《免疫方法杂志(J.Immunol.Methods)297:73-82(2005)》)、或本领域中已知的其它技术(还参见宾兹(Binz)等人,《自然·生物技术(Nat.Biotech.)》23:1257-68(2005);罗思(Rothe)等人,《美国实验生物学联合会会刊(FASEB J.)》20:1599-1610(2006);以及美国专利第 7,270,950 号、第 6,518,018 号以及第 6,281,344 号)以鉴别高亲和力结合序列来进行体外库选择而产生。

[0072] 产生适用于本发明所提供方法的针对 dsRNA/DNA 双链体具有特异性的抗体的免疫原包括例如聚 (A)/ 聚 (dT)(参见例如北川政夫(Kitagawa)和斯托勒(Stollar)《分子免疫学(Mol Immunol)》19:413-20(1982) 和美国专利第 4,732,847 号 6:2-14,其以引用的方式并入本文中)、聚 (dC)/ 聚 (I)(参见例如北川政夫和斯托勒 1982)以及 ΦX174dsRNA/DNA 杂合体(参见例如中里(Nakazato)《生物化学(Biochemistry)》19:2835-40(1980) 或美国专利第 5,200,313 号 14:53-15:13,其以引用的方式并入本文中)。因此,在某些具体实例中,适用于本发明方法的抗体结合至少一种抗原,所述抗原选自聚 (A)/ 聚 (dT)、聚 (dC)/ 聚 (I) 以及 ΦX174dsRNA/DNA 杂合体;或另一个双链核酸分子,所述双链核酸分子包含具有互补的混合碱基序列的一条 RNA 链和一条 DNA 链。在特定具体实例中,抗体以大于约 1×10^{6}、5×10^{6}、1×10^{7}、5×10^{7}、1×10^{8}、5×10^{8}、$1\times10^{9}M^{-1}$ 或 $1\times10^{9}M^{-1}$ 以上的 Ka 结合这些抗原中的一种或多种。适用于本发明所提供方法的特异性抗体包括通过以下产生的抗体:用寄存编号 ATCC HB8730、HB8076、HB8077 以及 HB8078 寄存在ATCC®(美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection))的杂交瘤,以及这些抗体的嵌合物和 CDR 移植变体。

[0073] 在其它具体实例中,针对单链 DNA 具有特异性的抗体可以在双链体中的 RNA 降解之后,例如在 RNAse 处理之后,用于本发明所提供方法中。用于产生 ssDNA 结合抗体的合适的免疫原包括 DNA(例如小牛胸腺 DNA)的变性制剂。ssDNA 特异性抗体可以通过用甲基化 BSA 复合物和 ssDNA 的复合物(普莱夏(Plescia)等人,《美国科学院院报(PNAS)》,52:279,1964)或合成的单链聚核苷酸(西曼(Seaman)等人,《生物化学》,4:2091,1965)或用与蛋白质结合的 DNA 片段(斯托勒,《核酸抗原(Nucleic Acid Antigens)》,第 1 卷抗原中的表 1,M. 塞拉(Sela)编,学术出版社(Academic Press),1973)对动物进行免疫来诱导。SSDNA 特异性抗体还可以按多克隆自体抗体形式从患有全身性红斑狼疮的一些患者(斯托勒和莱文(Levine),《免疫学杂志(J.Immunol.)》,87:477,1961;《生物化学与生物物理学报》101:417,1963)或狼疮小鼠(芒斯(Munns)和弗里曼(Freeman),《生物化学》,28:10048,1989))的血清;或以单克隆自体抗体形式从人类或小鼠杂交瘤(休恩菲尔德(Shoenfeld)等人,《临床研究杂志(J.Clin.Invest.)》,70:205,1982;安杰耶夫斯基(Andrzejewsky)等人,《免疫学杂志》,126,226,1981;埃拉特(Eilat).D,《分子免疫

学(Molec Immunol.)》31:1377,1994)获得。

[0074] 在特定具体实例中,用于 ssDNA 的抗体是单克隆抗体,例如单克隆抗体 Mab F7-26(MILLIPORE®目录号 MAB3299)或其嵌合或 CDR 移植变体。具有 ssDNA 结合特异性的其它试剂也可以用于在从 dsRNA/DNA 杂合体去除 RNA 之后检测 ssDNA,包括单链寡核苷酸(包括 ssDNA、RNA、PNA 或能够与 ssDNA 杂交的其它人工核酸),或具有 ssDNA 特异性的蛋白质,包括例如聚 (ADP 核糖) 聚合酶、hnRNP 蛋白质、单链 DNA 结合蛋白质以及 RecA。

[0075] 适用于本发明所提供方法的任何试剂(例如 dsRNA/DNA 双链体或 ssDNA 抗体) 都可以经可检测标记。或者,可以不标记试剂并且可以使用第二试剂,例如经可检测标记的第二抗体进行间接检测。可检测标记可以是酶(例如 HRP 或碱性磷酸酶)、荧光标记、放射性标记、化学部分(小分子,例如生物素)、蛋白质部分(例如抗生物素蛋白或多肽标签)等等。

[0076] 参与无丝分裂的蛋白质

[0077] 通过本发明,申请人已经鉴别出若干可能参与后核细胞的无丝分裂复制的分子,包括 DNA 聚合酶 β、DNA 聚合酶 ξ 以及 RNAse H1。因此,在本发明所提供方法中,中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组可以通过以下来鉴别 :检测 dsRNA/DNA 双链体本身,例如通过以上所描述的方法,或通过检测参与后核干细胞复制的基因的表达产物(在核酸或蛋白质层面),例如聚合酶 β 和 ξ、RNAse H1,以及其组合,包括与检测 dsRNA/DNA 双链体一起的组合。

[0078] DNA 聚合酶 β 是碱基切除修复(base-excision repair ;BER)路径中主要的 DNA 修复聚合酶之一。DNA 聚合酶 β 是 39kDa 蛋白质和主要的 BER 聚合酶(基因库寄存编号 NM002690),但与高保真度复制 DNA 聚合酶形成对比,DNA 聚合酶 β 缺乏 3' 到 5' 核酸外切酶活性和校对(proof-reading)能力,导致保真度下降。齐岩(Chyan),Y. 等人,《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》,第 22 卷,第 14 期,第 2719-2725 页 (1994)。已经在多种生物体中鉴别到了聚合酶 β 基因,例如表 2 中所鉴别的那些。

[0079]

物种	基因 ID
智人(Homo sapiens)	5423
小家鼠(Mus musculus)	18970
褐家鼠(Rattus norvegicus)	29240
牛(Bos taurus)	614688
原鸡(Gallus gallus)	426794
黑猩猩(Pan troglodytes)	737210
家犬(Canis lupus familiaris)	494001

[0080] 表 2 :Pol β 基因

[0081] 易于出错的 DNA 聚合酶的一个实例是 DNA 聚合酶 ξ,一种由 Rev3 基因编码的

173kDa 蛋白质(吉布斯(Gibbs),P.E.M. 等人,《美国科学院院报(Proc Natl Acad Sci USA)》,第 95 卷,第 6876-6880 页 (1998);基因库寄存编号 AF058701))。DNA 聚合酶 ξ 是一种跨损伤合成聚合酶,它通过并入与序列损伤相反的核苷酸而不是对它进行修复来绕过 DNA 损伤,从而允许在错配的核苷酸留在序列中的情况下继续合成(甘(Gan)G.N. 等人,《细胞研究(Cell Res.)》18:174-183(2008))。已经在多种生物体中鉴别到了聚合酶 ξ 基因,例如表 3 中所鉴别的那些。

[0082]

物种	基因 ID
智人	5980
酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)	855936
黑猩猩	462942
褐家鼠	309812
小家鼠	19714
猕猴(Macaca mulatto)	695894
大熊猫(Ailuropoda melanoleuca)	100466621
家犬	481963
爪蟾(Xenopus laevis)	100316923

[0083] 表 3Pol ξ /REV3L 基因

[0084] 核糖核酸酶 H1 裂解 dsRNA/DNA 双链体的 RNA 链。RNAseH1 活性的分析在本领域中是已知的并且描述在例如美国专利申请公开案第 20050014708A1 号的第 32 段中,其以引用的方式并入本文中。已经在各种生物体中鉴别到了 RNAseH 基因,例如表 4 中所报导的那些。此外,MMDB ID:63294 提供了与 12- 聚体 KNA/DNA 复合的人类 RKAse H1 的杂合体结合域的结构。这一结构可以用于例如合理设计并选择适用于本发明所提供方法的治疗剂。

[0085]

物种	基因 ID
智人	246243
小家鼠	19819
褐家鼠	298933
马(Equus caballus)	100072832

黑猩猩	743012
牛	613354
原鸡	395848
斑马鱼(Danio rerio)	436932

[0086] 表 4 :RNAse H1 基因

[0087] 表 2-4 中的这些基因标识符可以用来从例如 NCBI 网站 //www.ncbi.nlm.nih.gov 的来源检索,尤其是检索公开可用的带注释的 mRNA 或蛋白质序列。与这些标识符有关的信息包括参考序列和其相关注释,全都以引用的方式并入本文中。用于转换 ID 或获得关于一种基因的额外信息的额外适用工具在本领域中是已知的并且包括例如 DAVID、克隆 / 基因 ID 转换器以及 SNAD。参见黄(Huang)等人,《自然·实验手册(Nature Protoc.)》4(1):44-57(2009) ;黄等人,《核酸研究》37(1)1-13(2009) ;阿利贝(Alibes)等人,《BMC 生物信息学(BMC Bioinformatics)》8:9(2007) ;西多罗夫(Sidorov)等人,《BMC 生物信息学》10:251(2009)。

[0088] 参与后核无丝分裂的其它大分子(例如蛋白质(以及脂质、碳水化合物以及核酸))可以通过本发明所提供方法鉴别,例如通过与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组共定位来检测候选大分子。然后能够靶向这些大分子(和其相关生物化学路径),如例如下一部分中所述。

[0089] 参与无丝分裂的蛋白质的抑制剂

[0090] 聚合酶 β 和 ξ 以及 RNAseH1 可以通过本领域中的常规手段加以抑制,例如中和抗体、显性负性突变体以及基于核酸的技术,例如反义 siRNA 以及三链形成寡核苷酸。在本领域中已知其它抑制剂。

[0091] 聚合酶 β 的抑制剂包括例如美国专利申请公开案第 2010/0048682 号的第 49 段、第 50 段以及表 1 中所披露的那些,所述公开案以引用的方式并入本文中。其它聚合酶 β 抑制剂包括威尔逊(Wilson)等人《细胞与分子生命科学(CellMol Life Sci.)》67(21):3633-47(2010) 和山口(Yamaguchi)等人,《生物科学、生物技术与生物化学(Biosci Biotechnol Biochem.)》74(4):793-801 (2010 ;描述了新颖的萜类和木霉酸(trichoderonic acid)A 和 B)中所描述的那些。

[0092] RNAse H1 抑制剂包括三链形成寡核苷酸(参见 WO94/05268, 杜瓦尔·瓦伦汀(Duval-Valentin)等人,《美国科学院院刊》89:504-508(1992) ;福克斯(Fox),《当代医学化学进展(Curr.Med.Chew.)》,7:17-37(2000) ;巴色(Praseuth)等人,《生物化学与生物物理学报》,1489:181-206(2000))。其它抑制剂包括 1-羟基 -1,8- 萘啶化合物,例如美国专利申请公开案第 2010/0056516A1 号的第 43-101 段中所披露的那些和美国专利第 7,501,503 号的发明内容中所披露的化合物,所述专利以引用的方式并入本文中。其它 RNAseH1 抑制剂可以包括靶向 dsRNA/DNA 双链体的试剂,例如氨基糖苷,包括新霉素、卡那霉素、巴龙霉素、托普霉素以及核糖霉素。

[0093] 其它 RNAseH1 抑制剂包括美国专利申请公开案第 2010/0056516A1 号的背景部

分中所提到的那些，包括经取代的噻吩（参见例如 WO2006/026619A2）、二硫代氨基甲酸酯（参见例如美国专利申请公开案第 2005/0203176A1 号）、二氢喹啉衍生物（参见例如美国专利申请公开案第 2005/0203129A1 号）、乙内酰脲衍生物（参见例如美国专利申请公开案第 2005/0203156A1 号）、寡核苷酸试剂（参见例如 US2004/0138166A1）、麦皮星（mappicine）相关化合物（参见例如美国专利第 5,527,819 号）、噻吩衍生物（参见例如 WO2006/026619A2）、氨基甲酸酯衍生物（参见例如美国专利申请公开案第 2005/203176A1 号）、乙内酰脲（参见例如美国专利申请公开案第 2005/203156A1 号）、1,2- 二氢喹啉衍生物（参见例如美国专利申请公开案第 2005/203129A1 号）、内酯（参见例如达特（Dat）等人，《天然产物杂志（Journal of Natural Products）》，70:839-841(2007)）、羟基化托酚酮（参见例如迪迪埃让（Didierjean）等人，《抗微生物剂与化学疗法（Antimicrobial Agents and Chemotherapy）》，49:4884-4894(2005)）、羟基化托酚酮（参见例如布迪哈斯（Budihas）等人，《核酸研究》33:1249-56(2005)）、DNA 含硫适体（参见例如索玛孙得拉姆（Somasunderam）等人，《生物化学》44:10388-95(2005)）、二酮酸（参见例如肖·里德（Shaw-Reid）等人，《生物化学》44:1595-1606(2005) 和肖·里德等人，《生物化学杂志（J.Biol.Chem.）》278:2777-80(2003)）、寡核苷酸发夹（参见例如汗诺希（Hannoush）等人，《核酸研究》32:6164-6175(2004)）、2- 羟基异喹啉 -1,3(2H,4H)- 二酮（参见例如克隆普（Klumpp）等人，《核酸研究》31:6852-59(2003) 和齐航（Qi Hang）等人，《生物化学与生物物理研究通讯（Biochem.Biophy.Res.Comm.）》317:321-29(2004)）、酰腙（参见例如 G. 博尔科（Borko）等人，《生物化学》，36:3179-3185(1997)）、奴凡胺菌素（novenamine）（参见例如阿尔陶斯（Althaus）等人，《实验 52（Experimentia52）》比克霍瑟·费尔拉格（Birkhauser-Verlag），第 329-335 页 (1996)）、萘磺酸衍生物（参见例如莫汉（Mohan）等人，《医药化学杂志（J.Med.Chem.）》，37:2513-2519(1994)）、头孢菌素降解产物（参见例如 P. 哈夫克迈尔（Hafkemer）等人，《核酸研究》19:4059-65(1991)）以及醌（参见例如洛亚（Loya）等人，《抗微生物剂与化学疗法》34:2009-12(1990)）。

[0094] 以上化合物（包括其组合，例如上述化合物中的至少 1、2、3、4、5 种或 5 种以上）可以用于本发明所提供方法中以抑制与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关的复制复合物，所述复制复合物包含 DNA 聚合酶 β 或 ξ 和 / 或 RNAseH1 中的一种或多种。

[0095] 方法

[0096] 本发明提供针对包含后核细胞的任何生物体的各种病症的诊断、预测以及治疗方法。例示性方法包括诊断、预测和 / 或治疗肿瘤、非癌性过度增生性病症以及伤口愈合病症，以及以下方法：鉴别后核干细胞、筛选调节后核干细胞的生长、迁移、复制和 / 或存活并且因此能够用于本发明所提供的治疗方法的试剂，以及通过发现在含有 dsRNA/DNA 杂合基因组的无丝分裂后核干细胞中所存在或表达的大分子或生物化学路径来鉴别抗干细胞疗法的其它目标。本发明方法包括鉴别经历与中间体 dsRNA/DNA 杂合基因组有关的无丝分裂（即后核无丝分裂）的后核干细胞的步骤。可以在鉴别后核细胞的方法以及筛选试剂或发现大分子或生物化学路径的方法中使用任何后核细胞，例如动物或多细胞植物（戈斯特杰瓦等人，2009）。

[0097] 个体和组织样品

[0098] 待用本发明所提供方法诊断、预测、筛选或治疗的个体包括包含后核细胞的任何

生物体。在某些具体实例中，所述生物体是多细胞动物，例如脊椎动物。在特定具体实例中，所述个体可以是哺乳动物，例如灵长类动物、啮齿动物、犬科动物、猫科动物、猪科动物、绵羊科动物、牛科动物或兔科动物。在更特定的具体实例中，所述个体是灵长类动物，例如人类。在其它具体实例中，所述个体是啮齿动物。

[0099] 在其它具体实例中，所述个体是植物，例如本发明提供用于鉴别植物中的病理学疾病状态和机制的方法，并且在其它方面，提供用于鉴别调节植物中后核干细胞的生长、迁移和 / 或增殖的试剂(例如除草剂)的方法。

[0100] 本发明提供针对肿瘤、非癌性过度增生性病症以及伤口愈合病症的诊断、预测以及治疗方法，以及筛选调节后核干细胞的生长、迁移、复制和 / 或存活并且因此能够用于本发明所提供的治疗方法中的试剂的方法。本发明方法包括鉴别经历与中间体 dsRNA/DNA 杂合基因组有关的无丝分裂(即后核无丝分裂)的后核干细胞的步骤。

[0101] 所述个体可以处于任何发育阶段，例如胚胎、胎儿、新生儿、婴儿、儿童、青少年、成年人或老年人。在特定具体实例中，所述个体是儿童、青少年、成年人或老年人。在更特定的具体实例中，所述个体是成年人或老年人。在某些具体实例中，所述个体是至少约 1、2、3、4、5、10、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 或大于 75 岁，例如约 1-5、5-10、10-20、18-25、25-35、35-45、45-55、55-65 或 65-75 岁或 75 岁以上。在某些具体实例中，所述个体是已故的，即所述方法是死后诊断方法。

[0102] 在某些具体实例中，个体的组织样品是以手术方式获得的，例如在手术期间，例如移植、血管成形术或支架置放术，或在活组织检查程序中。组织样品可以包括肿瘤组织、非肿瘤组织或其组合并且可以包括例如以下组织：血液、血管组织、脂肪组织、淋巴组织、结缔组织(例如筋膜、韧带、腱)、外膜、浆膜、腱膜、内分泌组织、粘膜组织、肝、肺、肾、脾、胃、胰腺、结肠、小肠、膀胱、性腺、乳腺组织、中枢神经组织、外周神经组织、皮肤、平滑肌、心肌或骨骼肌。在一些具体实例中，组织样品可以包含上述组织中的 1、2、3、4、5 种或 5 种以上。在更特定的具体实例中，组织样品可以包含主要一个组织或基本上由主要一个组织组成，例如所述组织样品是约 10 重量 %、20 重量 %、30 重量 %、40 重量 %、50 重量 %、60 重量 %、70 重量 %、80 重量 %、90 重量 %、95 重量 % 或 100 重量 % 的单一组织。在更特定具体实例中，所述组织样品包含血管组织并且在更特定具体实例中，所述组织样品包含血管壁组织。在一些具体实例中，所述组织样品基本上由血管组织组成。在某些具体实例中，所述血管组织进一步包含外膜。在更特定具体实例中，所述血管组织基本上由外膜和血管组织组成。在某些特定具体实例中，所述组织样品包含疑似肿瘤组织。

[0103] 诊断方法

[0104] 本发明所提供的诊断方法包含测定(例如测量)个体组织样品中后核干细胞的存在和 / 或数量和 / 或迁移以诊断个体病症，例如肿瘤、伤口愈合病症或非癌性过度增生性病症。在一个特定具体实例中，测定了经历后核无丝分裂的后核干细胞的存在和 / 或数量和 / 或分布。

[0105] 诊断病症

[0106] 可以使用本发明所提供方法来诊断各种病症，包括肿瘤、伤口愈合病症以及非癌性过度增生性病症。

[0107] “伤口愈合病症(wound healing disorder)”是一种以在手术干预、从感染(例

如食肉感染）和/或急性创伤恢复之后，在组织和/或器官的损伤修复期间的异常组织产生为特征的疾病或病症，其中所述异常组织产生是非癌性的和非癌症前期的。“非癌性(non-cancerous)”和“非癌症前期(non-precancerous)”生长的体细胞在培养时展现出正常的(野生型)染色体组型和正常的接触抑制。在一些具体实例中，伤口愈合病症以异常过度的组织产生为特征。在其它具体实例中，伤口愈合病症以异常不足的组织产生为特征。例示性伤口愈合病症包括血管伤口愈合病症、脊髓伤口愈合病症、与器官移植有关的伤口愈合病症以及与创伤性损伤有关的伤口。在更特定具体实例中，所述伤口愈合病症是术后的。手术通常导致再狭窄(动脉或静脉)，所述手术例如器官移植，例如心脏、肝、肺、角膜等等；或手术干预，例如血管成形术、支架置入术等等。这类再狭窄是移植接受者死亡的常见原因。急性创伤可以包括例如烧伤、切伤以及枪伤。

[0108] “血管伤口愈合病症(blood vessel wound healing disorder)”是血管组织中的伤口愈合病症。在某些具体实例中，血管伤口愈合病症以血管组织中，尤其是内腔表面(例如内膜)中异常过度的平滑肌产生和/或后核细胞增殖为特征。例示性血管伤口愈合病症包括例如损伤诱导的新生内膜增生和再狭窄(例如在移植或创伤之后)。在更特定具体实例中，所述血管壁病症是再狭窄。“再狭窄(restenosis)”是指动脉再狭窄，典型地为在手术干预(例如血管成形术、支架置放术或移植)之后，内膜表面变厚。在一些具体实例中，所述血管壁病症出现在手术、感染或急性创伤之后。在更特定具体实例中，所述血管壁病症是术后的。

[0109] 因此，在本发明所提供的诊断或预测方法的一些具体实例中，所述个体疑似具有伤口愈合病症。在更特定具体实例中，所述个体疑似具有血管伤口愈合病症。

[0110] 在某些具体实例中，疑似具有伤口愈合病症的个体先前已经进行了手术。在更特定具体实例中，所述手术是支架置放术和/或球囊血管成形术。在更特定具体实例中，所述个体先前已经接受了一个以上支架，例如至少2、3、4、5或5个以上支架。在这些具体实例中，所述支架可以是药物洗脱的(例如西罗莫司(sirolimus)或太平洋紫杉醇洗脱，包括其类似物；以及涂有抗CD-34或抗VEGF抗体的支架)、非药物洗脱的或其组合。

[0111] 在一些具体实例中，疑似具有伤口愈合病症的个体先前已经接受了移植，例如同种异体移植、自体移植或异种移植。在特定具体实例中，所述个体已经进行了完全或部分的器官移植(例如心脏、肝、肾、膀胱、皮肤、肺或角膜移植)或瓣膜或血管移植。移植的血管可以是动脉和/或静脉。在特定具体实例中，所述个体疑似在手术之后具有再狭窄。

[0112] 本领域的技术人员应该了解，出于本发明的目的，例如动脉粥样硬化的从头病症(de novo disorder)不是伤口愈合病症。然而，在某些具体实例中，本发明提供用于通过用本发明方法使疑似含有非癌性过度增生性病变的组织显色来诊断非癌性过度增生性病症(例如动脉粥样硬化)的方法。举例来说，使例如活组织检查样品的样品中细胞的细胞核显色并且测定经历与中间体dsRNA/DNA双链体基因组有关的无丝分裂的钟形细胞核的存在。

[0113] “肿瘤(tumor)”是指赘生性生长并且涵盖良性和恶性赘瘤，如由外科病理学家基于以下各项辨别：活跃分裂的有丝分裂细胞和具有不规则形状和染色的发育异常细胞核的细胞的生长速率、健康组织侵袭的位置度、转移以及存在。在实践本发明时，病理学家将能够观察并且枚举与抗dsRNA/DNA抗体或特定地使dsRNA/DNA分子染色的染料剧烈反应的样本的细胞核。在一种典型的腺癌中，例如结肠腺癌，预期后核干细胞将大约每十二天经历对

称或不对称的有丝分裂并且构成肿瘤样本中约 0.2% 到 2% 的后核细胞。根据赫雷罗·希门尼斯(Herrero-Juminez)等人,1988,2000。

[0114] “肿瘤前病变(Preneoplastic lesion)”是指与肿瘤有关的呈假定的前体形式的生长缓慢的鳞状或腺瘤状小体,正如结肠腺瘤性息肉,其具有那个组织的潜在转移性腺癌。因为肿瘤前干细胞的对称分裂是预期的但是 5-6 年一次,所以约每四十天一次的不对称分裂频率将产生以下预期:在肿瘤前病变(例如腺瘤结肠息肉)中将发现仅约 1/4000 后核细胞核具有 dsRNA/DNA 杂合基因组。

[0115] 在一些具体实例中,所述病症是单克隆的;即所述病症起因于单一后核干细胞面对面不对称分裂的线性生长,从而形成异常过度的组织生长。在其它具体实例中,所述病症是多克隆的,即所述病症(例如术后再狭窄)起因于两个或两个以上后核细胞的对称和不对称分裂。

[0116] 筛选方法

[0117] 本发明提供筛选调节后核干细胞的生长、复制、迁移和 / 或存活的试剂的体外和体内方法。在体外和体内方法中,评估候选试剂调节含有经历与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关的无丝分裂的钟形细胞核的细胞的数目和 / 或迁移的能力。候选试剂可以包含任何化学实体,包括小分子药物或生物制剂,例如蛋白质(例如生长因子、抗体或适体)、核酸(包括反义分子和适体)、脂质、碳水化合物或其组合。所述试剂典型地应该以例如 2、3、4、5、6 或 6 个以上剂量的剂量或剂量范围给予,从而在培养物或生物体中引起对经历与中间体 dsRNA/DNA 双链体基因组有关的无丝分裂的钟形细胞核数目的影响。

[0118] 体外筛选方法包含使包含增殖性后核干细胞的培养细胞与候选试剂相接触。在更特定具体实例中,所述细胞是从动物获得,例如脊椎动物,例如哺乳动物,例如灵长类动物、啮齿动物、犬科动物、猫科动物、猪科动物、绵羊科动物、牛科动物或兔科动物。在更特定具体实例中,所述细胞是从人类获得。在某些具体实例中,所述培养细胞是从脐带、外膜、间叶组织或主动脉弓获得。在其它具体实例中,所述培养细胞是从肿瘤获得,例如实体肿瘤,例如乳腺、前列腺、肺或结肠肿瘤。在特定具体实例中,培养细胞是 HT29 人类结肠腺癌细胞,如美国专利申请公开案第 2010/0075366A1 号的实施例 6 中所述,包括图 28-30 和其说明书,所有这些都以引用的方式并入本文中。在其它具体实例中,所述后核细胞是来自植物。在这些具体实例中,举例来说,有可能筛选出靶向特定针对于不合需要的植物(例如野草)而不是针对所需要的植物(例如作物)的后核细胞的除草剂。

[0119] 在某些特定具体实例中,所述培养细胞包含增殖性后核干细胞和肌肉细胞。在更特定具体实例中,所述细胞是原代细胞。在更特定具体实例中,所述原代细胞是从脐带、血管外膜或主动脉弓获得。

[0120] 可以按各种方式使培养物针对后核干细胞进行富集化。在某些具体实例中,用电离辐射(例如 X 射线)以足以杀死大多数真核细胞但不杀死后核干细胞(由于其例外的抗辐射性所致)的剂量处理培养物。在特定具体实例中,所述细胞进行 150、200、250、300、350、400、500、600、700、800、1000、1600 拉德或 1600 拉德以上剂量的 x 照射。在更特定具体实例中,所述细胞进行大于 400 拉德,例如 800 拉德或 1600 拉德剂量的 x 照射。

[0121] 体内筛选方法包含向包含后核干细胞的生物体(例如动物或植物)给予候选试剂。在特定具体实例中,所述生物体是动物,并且在更特定具体实例中,所述生物体是哺乳动

物。在更特定具体实例中，所述哺乳动物是非人类哺乳动物。在更特定具体实例中，所述哺乳动物是非人类灵长类动物、啮齿动物、犬科动物、猫科动物、猪科动物、绵羊科动物、牛科动物或兔科动物。在更特定具体实例中，所述哺乳动物是啮齿动物，例如小鼠、大鼠或豚鼠。在更特定具体实例中，所述哺乳动物是豚鼠。在一些具体实例中，所述哺乳动物倾向于(例如遗传上或通过饮食或药物处理)发展成伤口愈合病症、非癌性过度增生性病症或肿瘤。举例来说，在某些具体实例中，伤口愈合病症起因于手术干预，例如手术损害，例如移植、血管成形术、支架置放术；或直接有意的组织损伤，例如通过化学固定、辐射、过热或过冷、梗塞、刺伤、切伤或钝挫伤。在更特定具体实例中，所述哺乳动物倾向于发展成伤口愈合病症并且暴露于手术干预。在某些具体实例中，所述伤口愈合病症是血管伤口愈合病症。在更特定具体实例中，所述血管伤口愈合病症是再狭窄。

[0122] 在其它具体实例中，所述生物体倾向于发展成肿瘤或具有肿瘤。在更特定具体实例中，所述生物体是倾向于发展成肿瘤或具有肿瘤的动物，例如哺乳动物。在某些具体实例中，所述哺乳动物可以是经过工程改造以表达致癌基因(例如 RAS 或 HER2)的转基因动物或敲除肿瘤抑制基因(例如 p53)或为肿瘤抑制基因(例如 p53)的亚等位基因或其组合和 / 或可以给予诱变处理。在其它具体实例中，所述生物体是异种移植物，例如移植有人类肿瘤细胞。在更特定具体实例中，所述肿瘤细胞是来自实体肿瘤。在特定具体实例中，所述哺乳动物是啮齿动物，例如大鼠、小鼠或豚鼠。使所述异种移植物成熟为实体肿瘤，然后可以将其切离并作进一步研究。在这些具体实例中，所述啮齿动物典型地应该是具有免疫缺陷的。本领域的技术人员熟悉异种移植技术。

[0123] 治疗方法

[0124] 上述筛选方法提供了可以用于治疗由异常后核干细胞活性推动的病症的试剂，所述病症例如伤口愈合病症、非癌性过度增生性病症或肿瘤。因此，本发明还提供治疗具有由异常后核干细胞活性推动的病症的个体的方法。举例来说，可以向具有任何伤口愈合病症的个体给予有效量的调节例如增殖性后核干细胞的数目或增殖性后核干细胞的迁移的试剂。举例来说，在以异常过度的组织产生为特征的伤口愈合病症中，向所述个体给予一种减少增殖性后核干细胞的数目或增殖性后核干细胞的迁移的试剂。反之，在以异常不足的组织产生为特征的伤口愈合病症中，向所述个体给予有效量的增加增殖性后核干细胞的数目或增殖性后核干细胞的迁移的试剂。“试剂(agent)”是指单一活性剂化合物以及多种活性剂的组合。

[0125] 在具有肿瘤的个体中，向所述个体给予调节后核干细胞的数目、迁移、复制或存活的试剂。在特定具体实例中，所述试剂减少后核干细胞的数目、迁移、复制或存活。在更特定实施例中，所述试剂减少经历与中间体 dsRNA/DNA 杂合基因组有关的无丝分裂的复制性后核细胞的数目。在其它更特定具体实例中，所述试剂短暂地增加经历与中间体 dsRNA/DNA 杂合基因组有关的无丝分裂的复制性后核细胞的数目，但抑制复制的完成。

[0126] 术语“治疗(treatment)”是指减轻与所述病症有关的症状，包括例如降低、预防或延迟肿瘤转移；减少一个或多个肿瘤的数目、体积和 / 或大小；和 / 或减轻肿瘤或病理学症状的严重程度、持续时间或频率以及调节后核干细胞的数目、增殖性(通过对称或不对称无丝分裂)后核干细胞的数目和 / 或后核干细胞的迁移。

[0127] 一般来讲，抑制真核 dsDNA/DNA 合成和有丝分裂的试剂 / 病状预期构成一组一般

不重叠的试剂/病状，所述试剂/病状抑制后核 dsRNA/DNA 到 dsDNA/DNA 的加工和对称和/或不对称无丝分裂过程。这是因为预期在临床实践中发现会使肿瘤缩小，但随后出现肿瘤复发的化学药品不适用于杀死后核干细胞或最终治愈癌症。这是因为所述后核细胞对 x 照射和用放射线模拟药物处理引起的杀伤作用具有强烈的抗性，所述放射线模拟药物例如烷基化剂和攻击不被后核细胞采用的有丝分裂或 DNA 复制的真核模式的试剂。

[0128] 然而，在一些具体实例中，由本发明提供的治疗患肿瘤个体的方法与手术、激素消融疗法、放射线疗法或化学疗法中的一种或多种结合使用。所述化学治疗、激素和/或放射线治疗剂以及根据本发明的治疗可以同时、分开或依次给予。举例来说，在一些具体实例中，可以用一种或多种“杀后核细胞剂(metakaryocide)”(一种杀死或减少后核细胞数目的试剂)处理个体以消除肿瘤干细胞，以及用一种疗法处理个体以消除非干细胞肿瘤块。

[0129] 在某些具体实例中，适用于本发明所提供方法的治疗剂包含活性剂组分/部分和靶向剂组分/部分。靶向剂组分是或包含如本文所述的与 dsRNA/DNA 双链体特异性结合的试剂。在特定具体实例中，靶向剂包含上述试剂中的任一种，例如抗体或其抗原结合片段。靶向剂组分与活性剂组分连接。举例来说，它们可以彼此直接共价键结或通过连接分子共价键结。当两者通过共价键彼此直接键结时，所述键可以通过在每一个部分上形成通过活性基团的合适的共价键联来形成。举例来说，一个化合物上的酸基团可以与另一个化合物上的胺、酸或醇缩合以分别形成相应的酰胺、酸酐或酯。除羧酸基团、氨基以及羟基之外，用于形成靶向剂组分与活性剂组分之间的键联的其它合适的活性基团包括磺酰基、巯基以及羧酸的卤酸和酸酐衍生物。

[0130] 在另一个具体实例中，所述治疗剂可以包含两个或两个以上部分或组分，典型地是靶向剂部分与一种或多种活性剂部分。连接基团可以用于将活性剂连接到靶向剂组分，其中所述靶向剂特异性地与 dsRNA/DNA 杂合体相互作用，从而将活性剂递送到复制中间体构型，并且抑制钟形细胞核的进一步复制。

[0131] 与靶向剂组分连接的活性剂组分可以是或包含实现所需治疗结果的任何试剂，包括例如以下试剂：放射性核素(例如 I125、123、124、13 或其它放射性试剂)；化学治疗剂(例如抗菌素、抗病毒剂或抗真菌剂)；免疫刺激剂(例如细胞因子)；抗赘生剂；抗炎剂；促细胞凋亡剂(例如肽)；毒素(例如蓖麻毒素、肠毒素、LPS)；抗菌素；激素；蛋白质(例如表面活性蛋白、凝血蛋白以及生长因子)；溶解剂；小分子(例如无机小分子、有机小分子、小分子衍生物、复合小分子)；纳米粒子(例如基于脂质或非脂质的配制品)；脂质；脂蛋白；脂肽；脂质体；脂质衍生物；天然配体；变异蛋白(例如基于白蛋白或其它血液载体蛋白的递送系统)；溶核酶；调节肿瘤干细胞的生长或迁移的试剂；基因或核酸(例如反义寡核苷酸)；病毒性或非病毒性基因递送载体或系统；或前药或前分子。本领域的技术人员应该熟悉活性剂的设计和应用。

[0132] 在选择性靶向易受攻击的肿瘤细胞的有限群体中的 dsRNA/DNA 杂合体的情况下，有理由相信可以重新计算给药方案以提高功效。

[0133] 以下实施例是为了说明本发明而提供的并且并不打算以任何方式加以限制。

[0134] 例证说明：

[0135] 使用以下一般方案来产生图中所示和说明书中所描述的数据。实验条件汇总在表 5 中。

[0136] 表 5.

[0137]

方案	0.1% Triton-X-100	阻断溶液 n1	阻断溶液 n2	第一抗体	第二抗体	DAPI
N1	1h30'	1% BSA + 3 滴正常山羊血清	无	1:10，在冰箱中过夜	驴抗山羊 IgG-TRITC，1:200，1 h，室温	1:1000
N2	合胞体 40'; 细胞 20'	1% BSA，1 h	5%正常牛血清，1 h	1:10，在冰箱中过夜	牛抗山羊 IgG-TRITC，1:200，1 h，室温	1:1000
N3	40'	1% BSA，1 h	5%，正常山羊血清，1 h	1:10，在冰箱中过夜	驴抗山羊 IgG-TRITC，1:200，1 h，室温	1:1000
N4	合胞体 40'; 细胞 20'	1% BSA，1 h	5%，正常山羊血清，1 h	1:10，在冰箱中过夜	驴抗山羊 IgG-TRITC，1:200，1 h，室温	1:1000
N5	合胞体 40'; 细胞 20'	1% BSA	5%，正常山羊血清，1 h	1:20，在冰箱中过夜	驴抗山羊 IgG-TRITC，1:200，1 h，室温	1:1000
N6	合胞体 40'; 细胞 20'	1% BSA	5%，正常山羊血清，1 h	1:20，在冰箱中过夜	驴抗山羊 IgG-TRITC，1:200，1 h，室温	1:1000
N7	1h20'	1% BSA	5%正常驴血清，1 h	1:20，在冰箱中过夜	驴抗山羊 IgG-TRITC，1:200，1 h，室温	1:1000
N8	20'	1% BSA	5%正常驴血清，1 h	1:20，在冰箱中过夜	驴抗山羊 IgG-TRITC，1:200，1 h，室温	1:1000

[0138] 由于合胞体自身荧光引起了高背景噪声和厚的合胞体细胞壁，这阻止了抗体越过细胞壁，因此对合胞体进行染色需要与 Triton-X-100 一起培育以渗透细胞膜。此外，有必要添加第二阻断剂以减少背景噪声（表 5 中的阻断溶液 n2）。

[0139] 使用以下抗体进行检测 dsRNA-DNA 双链体的实验：1）山羊 4A-E，吸收有聚 (dT) 的 IgG，批次 JH012680，1.07mg/ml 储备溶液，分别以 1:20 和 1:10 稀释的 0.05 和 0.1mg/ml 最终测定浓度；2）山羊 4H，吸收有聚 (dT)、聚 (A) 以及聚 (A)．聚 (U) 以去除与变性 DNA 或 dsRNA 的任何反应性的 IgG，A280=3.4，2.4mg/ml 储备溶液，以 1:20 稀释的 0.12mg/ml 最终测定浓度；以及 3）山羊 4A-E，吸收有聚 (dT) 的 IgG，批次 021580，A280=3.2，2.3mg/ml 储备溶液，以 1:20 稀释的 0.12mg/ml 最终测定浓度。

[0140] 在以下组织上个别地测试上述三种抗体中的每一种：1）人类胎儿组织，9-10 周，脊髓或肋间肌肉制剂；2）人类胎儿结肠；3）人类结肠腺癌，M.68；4）HT-29 细胞系，达尔伯克氏改良伊格尔培养基（Dulbecco's Modified Eagle'sMedium；DMEM），5% 马血清或 DMEM，10%BSA；以及 5）HT-29 细胞系，DMEM，5% 马血清，照射 1600 拉德。

[0141] 使用以下方案固定并且针对 dsRNA/DNA 进行免疫荧光（immunoflubrescence；IF）染色。用卡诺固定液（Carnoy fixative）固定所有组织（包括 HT-29 细胞、胎儿以及赘生性组织）3 小时。卡诺氏溶液是 3:1 的乙醇（4℃）：冰醋酸（在即将要固定之前混合在一起）。在三小时的持续时间中，用新鲜样品替换固定液三次。用 70% 甲醇替换卡诺氏固定液并且储存在 4℃下。通过展布胎儿或赘生性组织制备载片（在 37℃下，与胶原酶 II（卡尔生物化学公司（Calbiochem），100mg（活性 277U/mg），稀释到 15U/ml 操作浓度）一起培育所述组织 1 小时之后，接着在一滴 45% 乙酸中展布以获得更温和的浸软条件）。在 HT-29 细胞的实验中省略此展布 / 浸软步骤。

[0142] 然后使具有所述组织的载片空气干燥。接着将载片转移到 1×PBS 缓冲液中持续 5 分钟然后用含 0.1%Triton X-100 的 1×PBS 在室温下处理 20-80 分钟(参见表 5)。接着,用 1×PBS 洗涤缓冲液洗涤载片两次,每次 5 分钟。然后在室温下涂覆含 1%BSA 的 1×PBS (阻断溶液 n1)持续 60 分钟。然后在室温下涂覆含 5% 驴血清的 1×PBS (阻断溶液 n2)持续 60 分钟。

[0143] 在含 0.1%BSA 的 1×PBS 溶液中将 dsRNA/DNA 特异性第一抗体稀释到操作浓度(1:20-1:10,对于制剂 1、2 以及 3 分别产生 0.05mg/ml (有时以 1:10 稀释为 0.1mg/ml)、0.12mg/ml 以及 0.12mg/ml 的操作浓度),并且在冰箱(4℃)中培育过夜。

[0144] 接着,用 1×PBS 缓冲液洗涤载片三次(每次 10 分钟)。在即将要使用之前制备在 1×PBS 中稀释的第二抗体(TRITC- 结合(TRITC-conjugated),圣克鲁斯(Santa-Cruz))(1:200)并且在室温下与载片一起培育 60 分钟。用 1×PBS 缓冲液洗涤载片三次(每次 10 分钟)。

[0145] 然后通过以下进行细胞核复染 :在室温下使组织与 DAPI (MILLIPORE®公司,0.1mg/ml 储备溶液,1:1000 稀释)一起培育 1-5 分钟,接着用 1×PBS 缓冲液洗涤组织三次(每次 5-10 分钟)。

[0146] 通过用聚 (A)- 聚 (dT)进行阻断测试来检查抗体染色的特异性,所述阻断测试如下进行 :

[0147] 测试 10μg/ml 的聚 (A)- 聚 (dT) 作为阻断剂。

[0148] 将相同体积的聚 (A)- 聚 (dT) (20μg/ml)和抗体(1/10)混合,得到 10μg/mlA.dT 和 1/20 血清(抗体)的最终浓度。关于对照组,使用 PBS 代替聚 (A)- 聚 (dT)。在室温下培育样品 10-15 分钟。

[0149] 测试不同浓度的聚 (A)- 聚 (dT)

[0150] 然后在 10、2.0、0.5 以及 0.08 微克 / 毫升的最终浓度下测试样品,在每种情况下,培育相同体积的聚核苷酸和抗体,这为如上所述的最终浓度的两倍。用 dsRNA/DNA 特异性抗体染色是阴性的并且通过添加 10 微克 / 毫升聚 (A)- 聚 (dT) 完全阻断。

[0151] 应该了解,关于在本申请中描述一些参数的所有数值界限,例如“约(about)”、“至少(at least)”、“小于(less than)”以及“多于(more than)”,所述描述也必定涵盖以所述值为边界的任何范围。因此,举例来说,描述至少 1、2、3、4 或 5 也尤其描述范围 1-2、1-3、1-4、1-5、2-3、2-4、2-5、3-4、3-5 以及 4-5 等等。

[0152] 关于本文中所引用的所有专利、申请或其它参考文献,例如非专利文献和参考序列信息,应该了解这是出于所有目的以及出于所述议题而以全文引用的方式并入本文中的。当在以引用的方式并入的文献和本申请之间存在任何冲突时,应该以本申请为准。与本申请中所披露的参考基因序列有关的所有信息以全文引用的方式并入本文中,所述信息例如基因 ID 或寄存编号(典型地参见 NCBI 寄存编号),包括例如基因组基因座、基因组序列、功能注释、等位基因变体以及参考 mRNA (包括例如外显子边界或反应元件)和蛋白质序列(例如保守结构域结构)。

[0153] 本申请中所用的标题仅是为了方便起见并且不影响本申请的解释。

[0154] 虽然已经参考本发明的优选具体实例来具体地显示并且描述本发明,但是本领域的技术人员应该理解,在不脱离如由随附权利要求书所涵盖的本发明范围的情况下,可以作出形式和细节的各种变化。

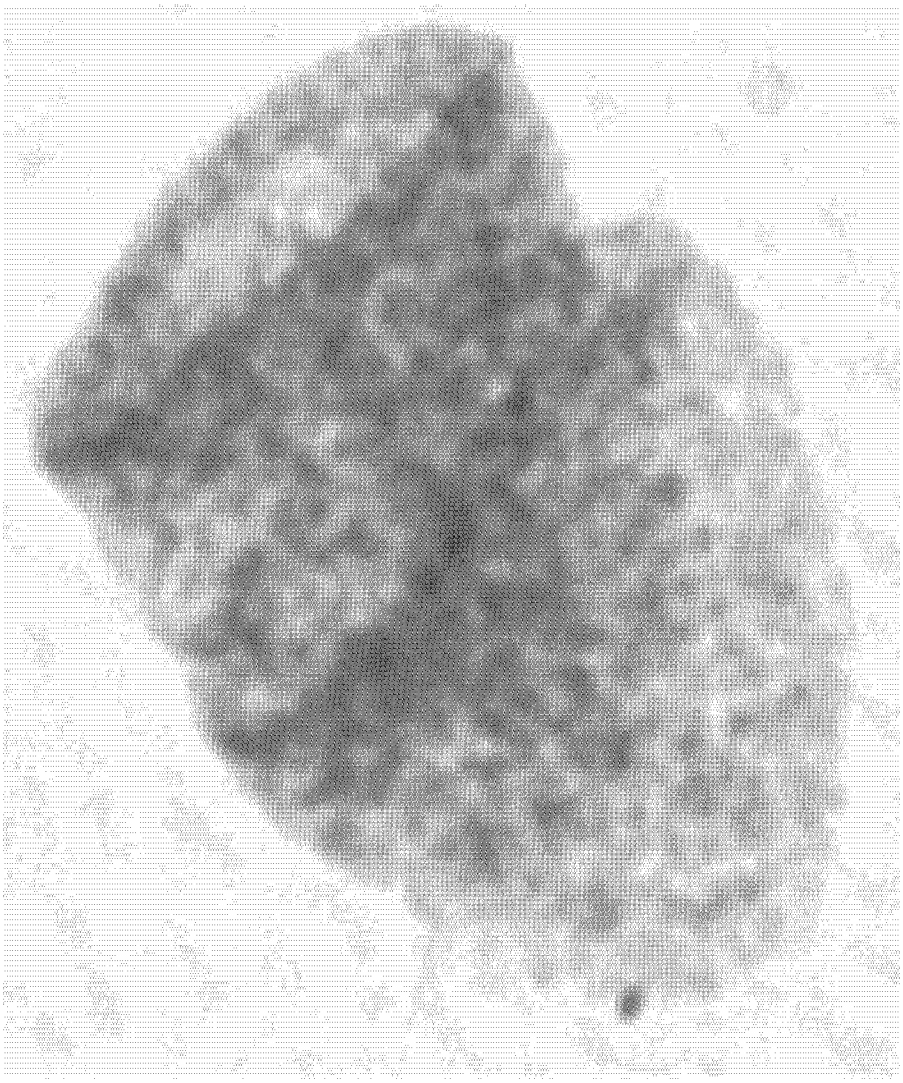


图 1

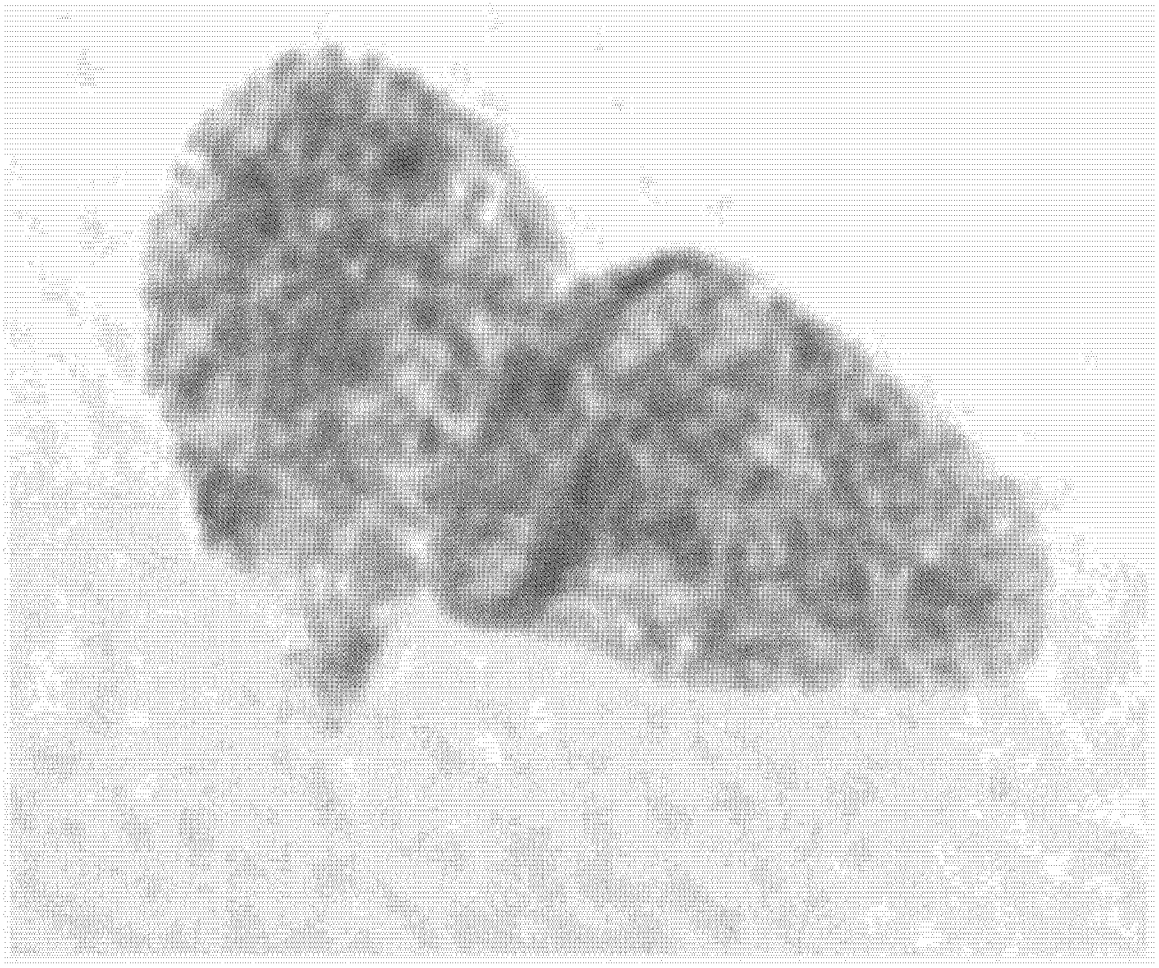


图 2

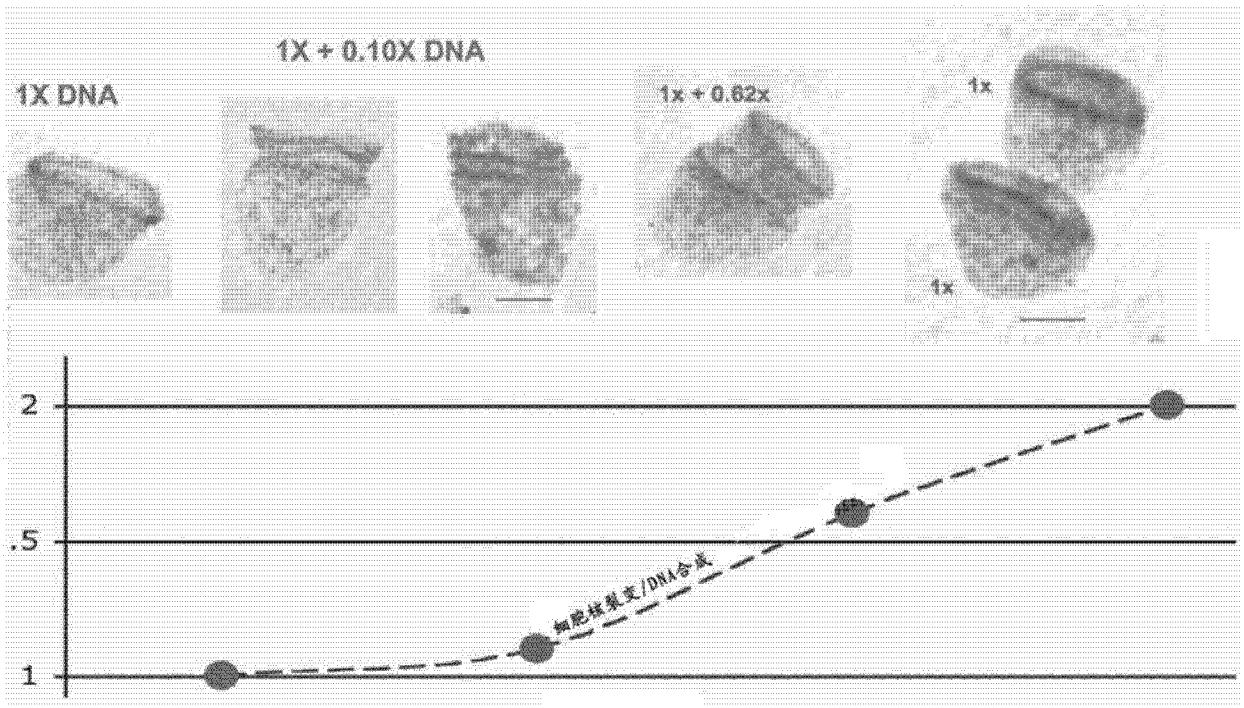


图 3

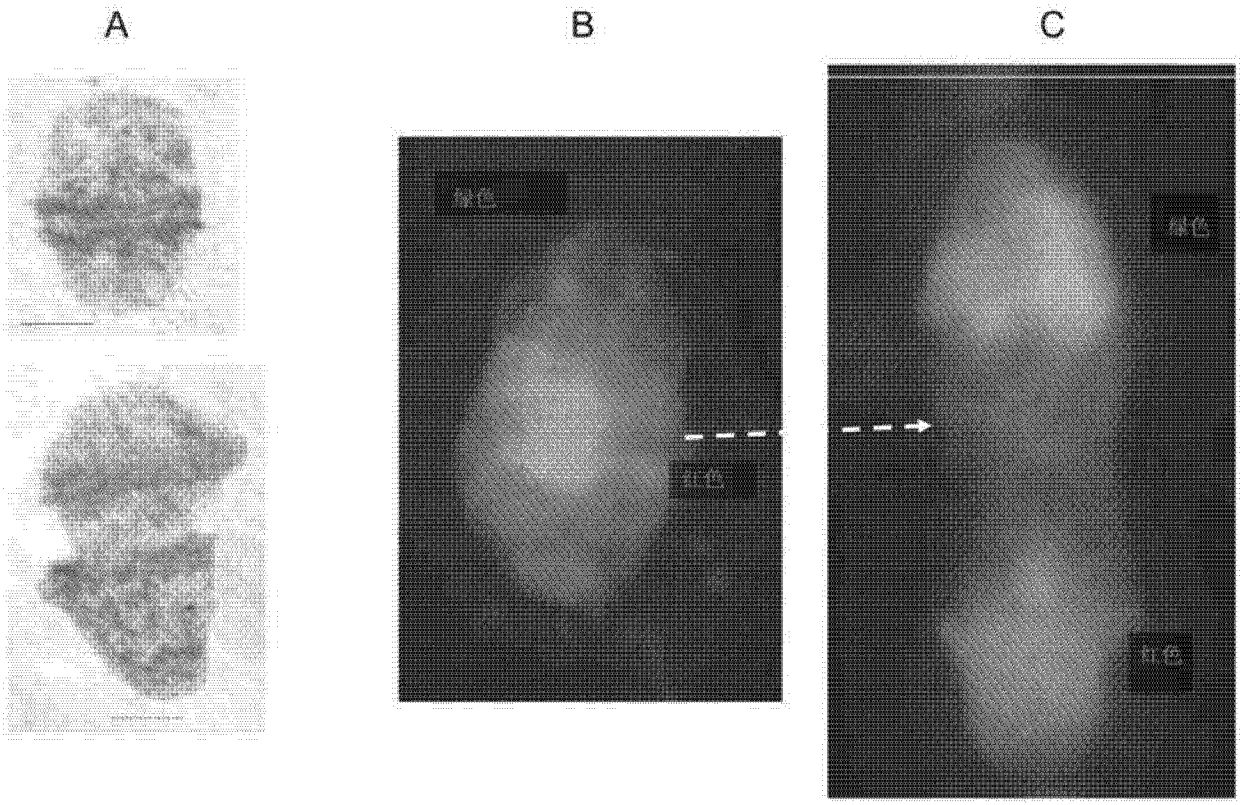


图 4

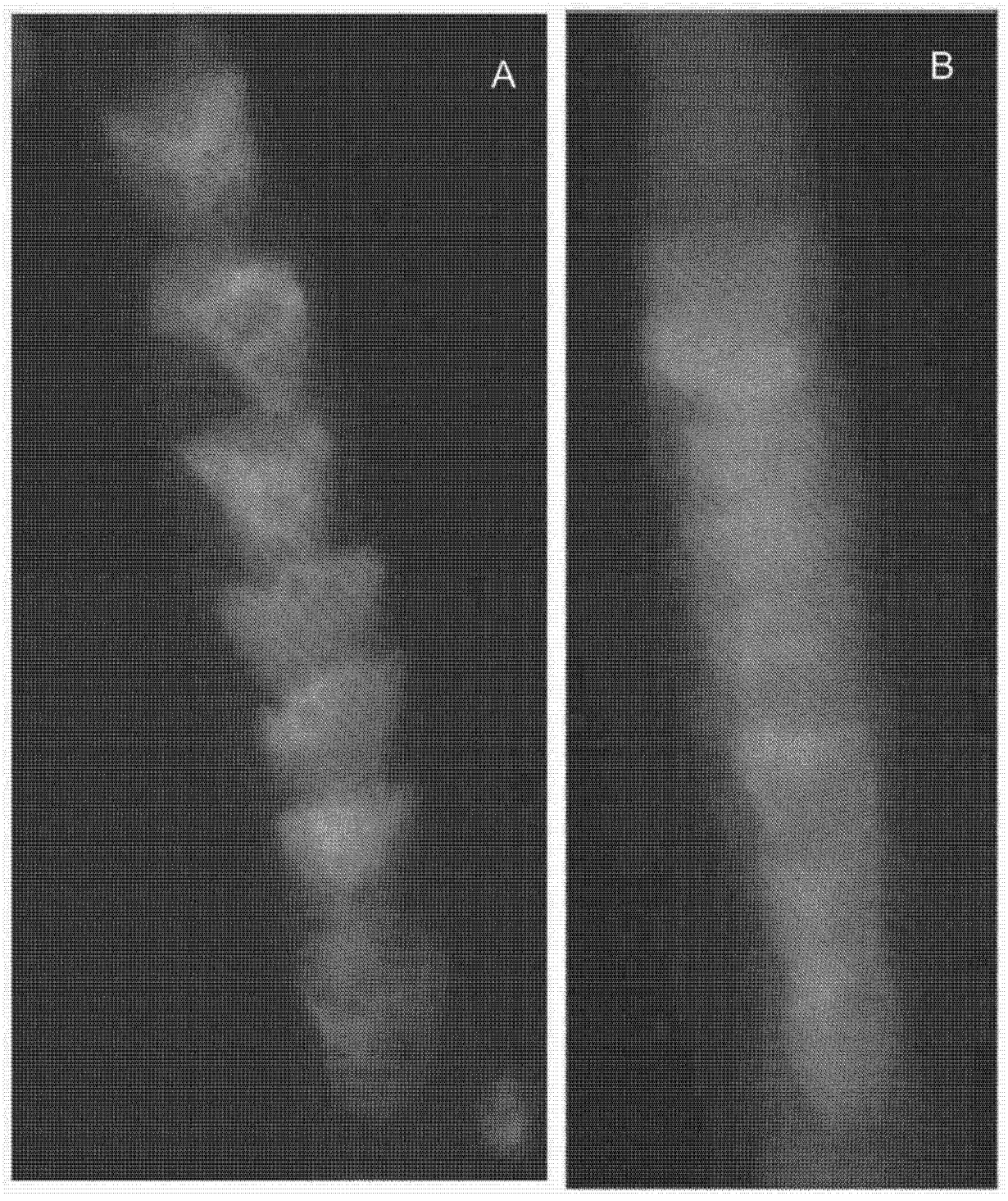


图 5

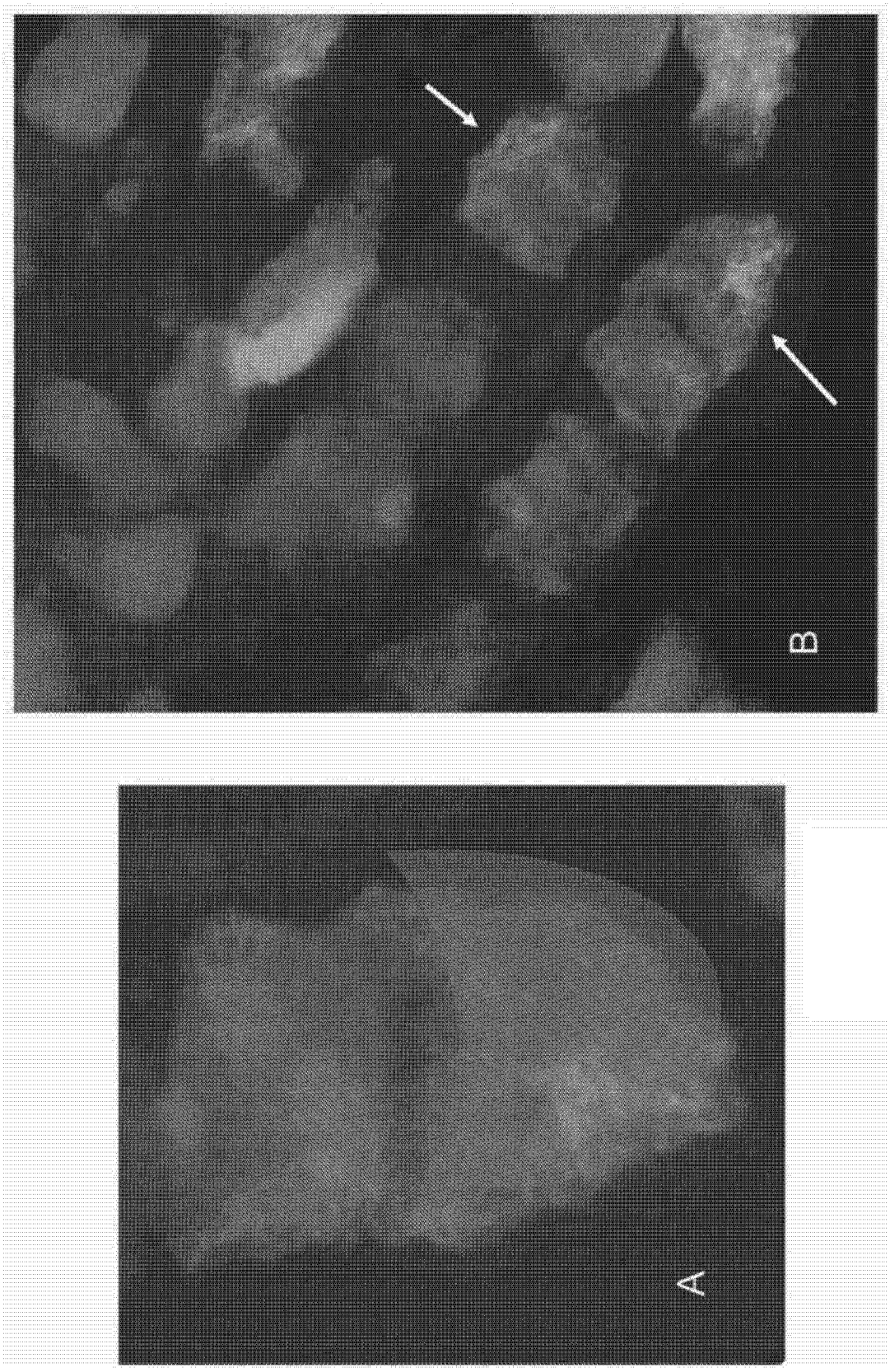


图 6

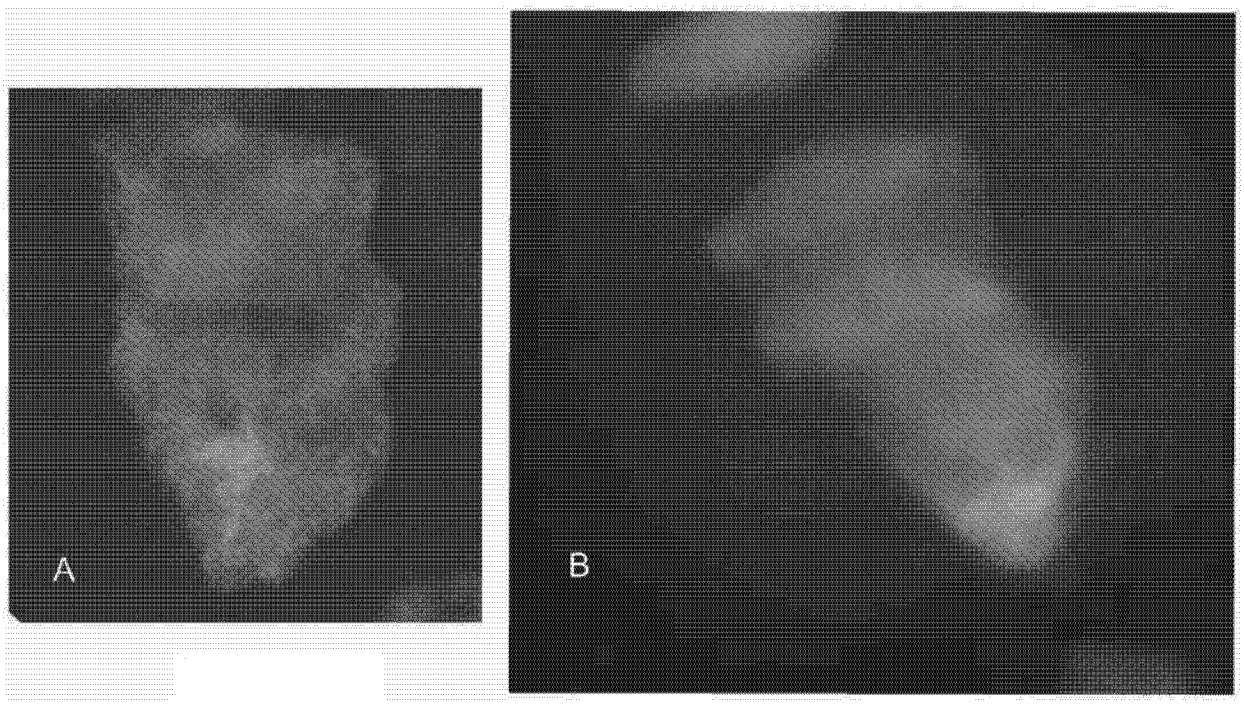


图 7

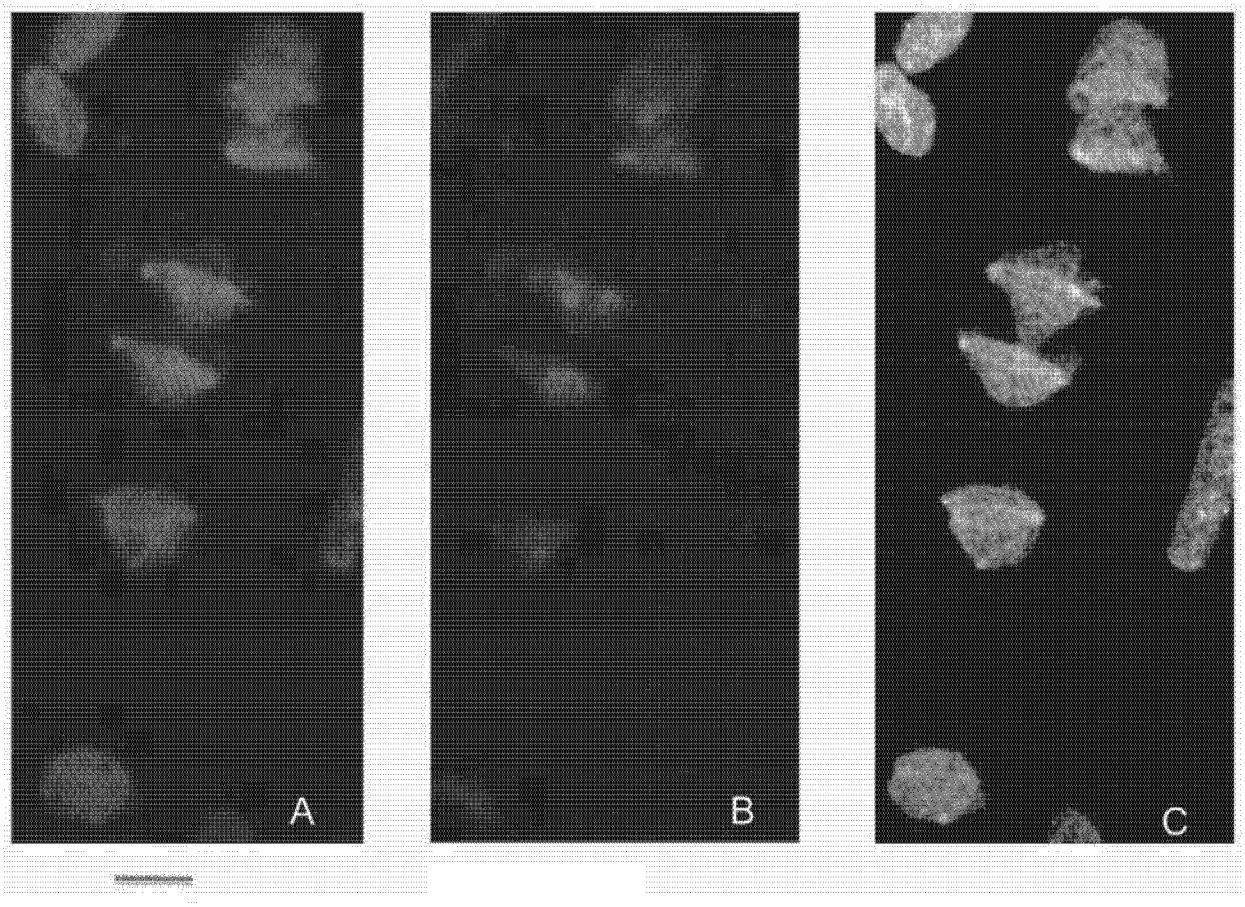


图 8

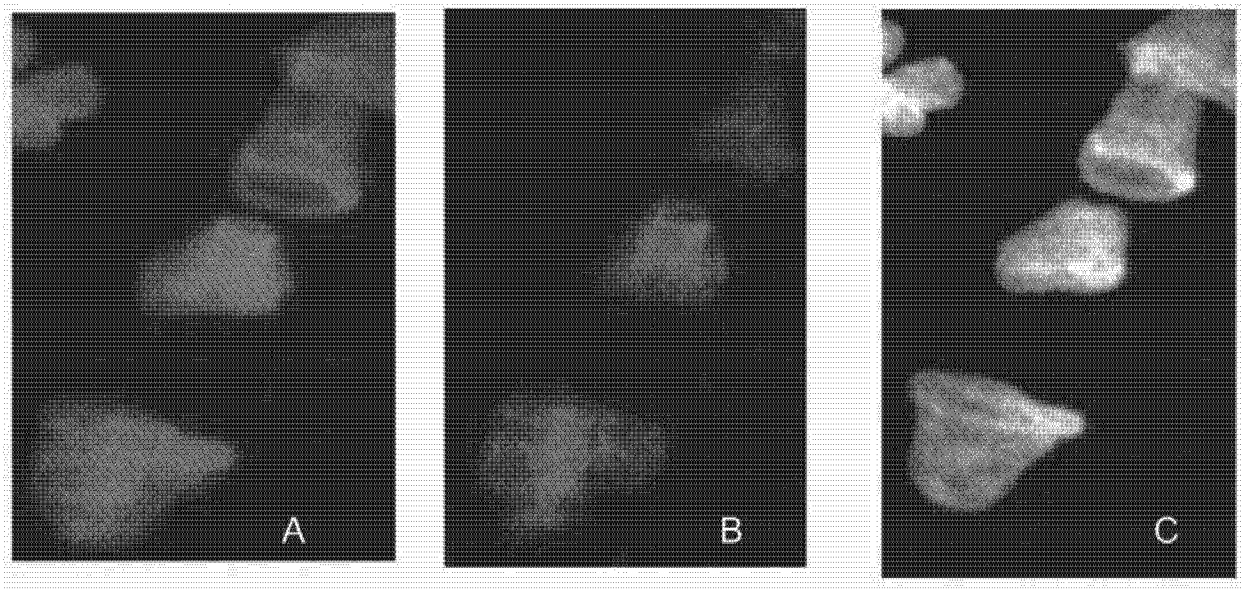


图 9

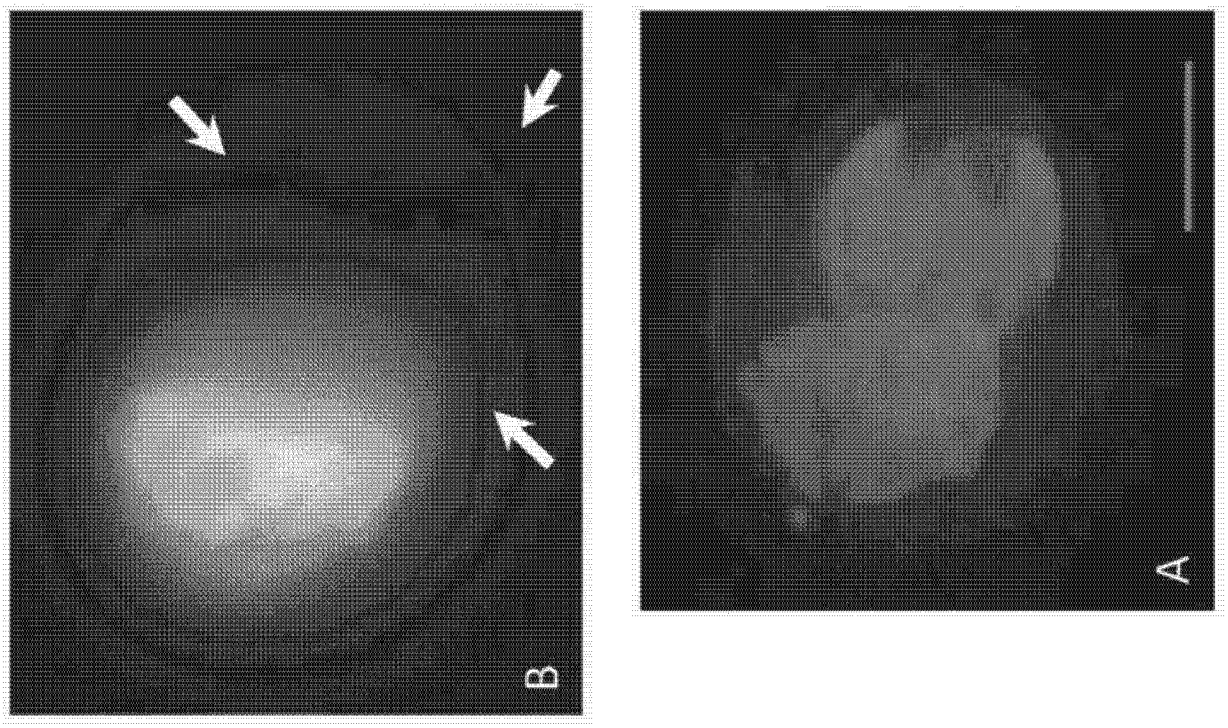


图 10

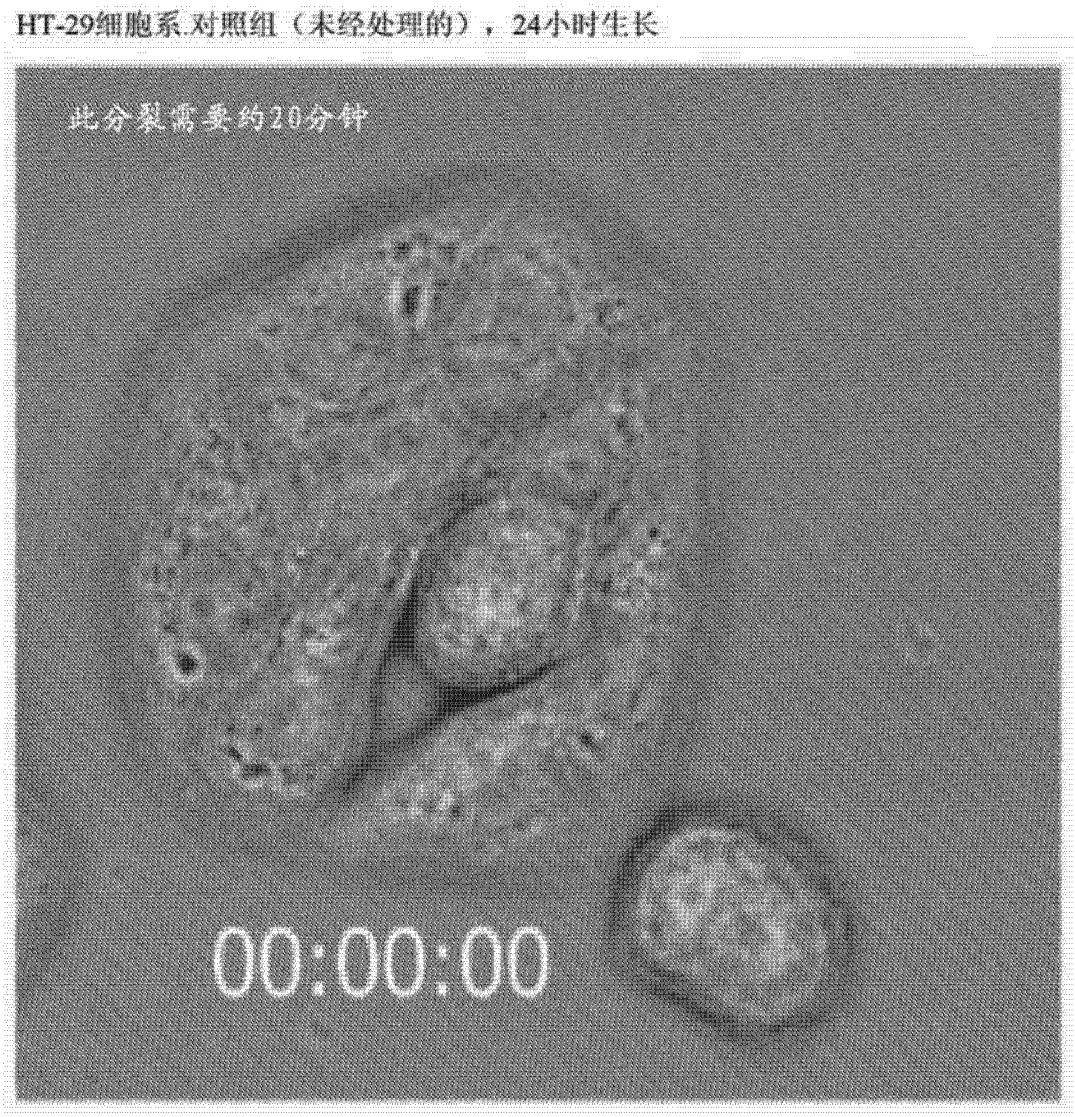


图 11

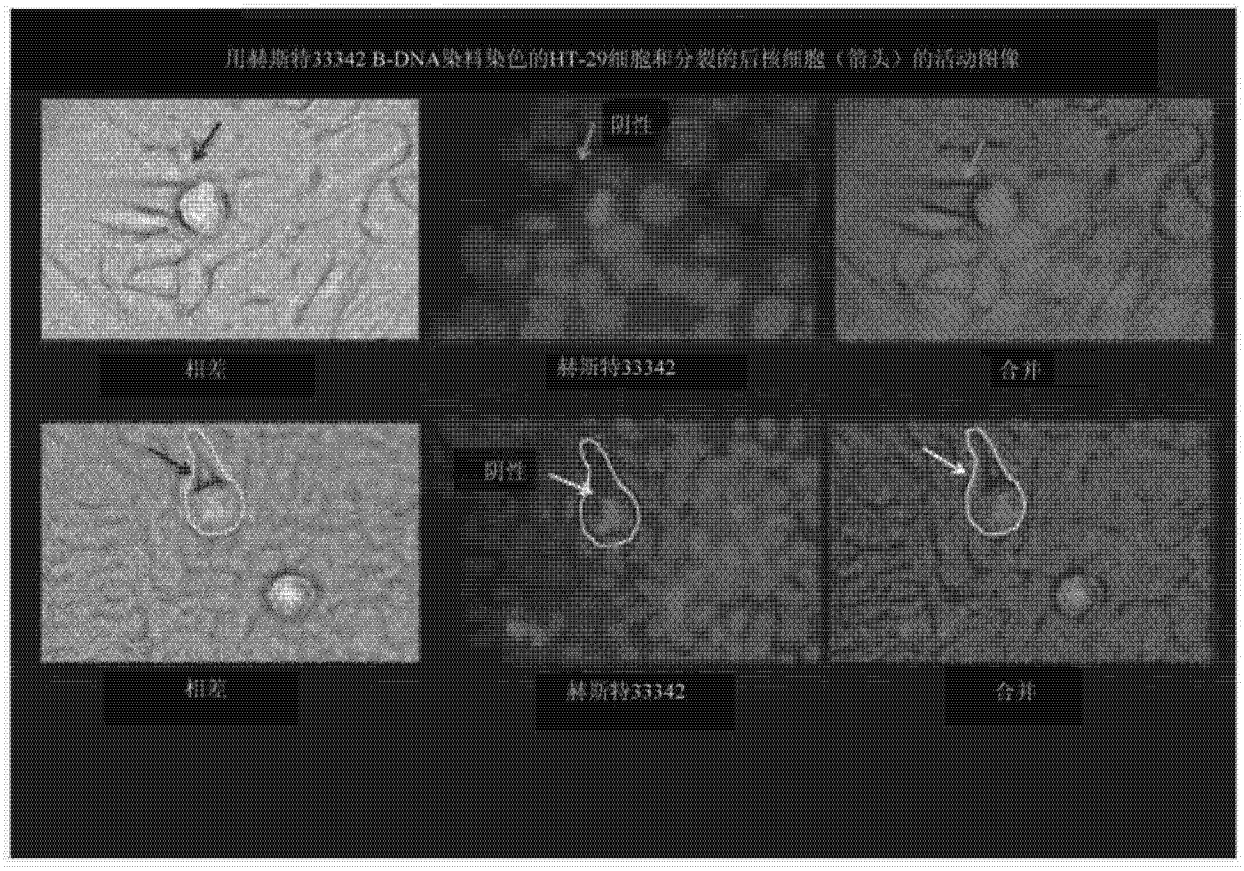

用赫斯特33342 B-DNA染料染色的HT-29细胞和分裂的后核细胞（箭头）的活动图像
阴性
相差
赫斯特33342
合并
阴性
相差
赫斯特33342
合并

图 12

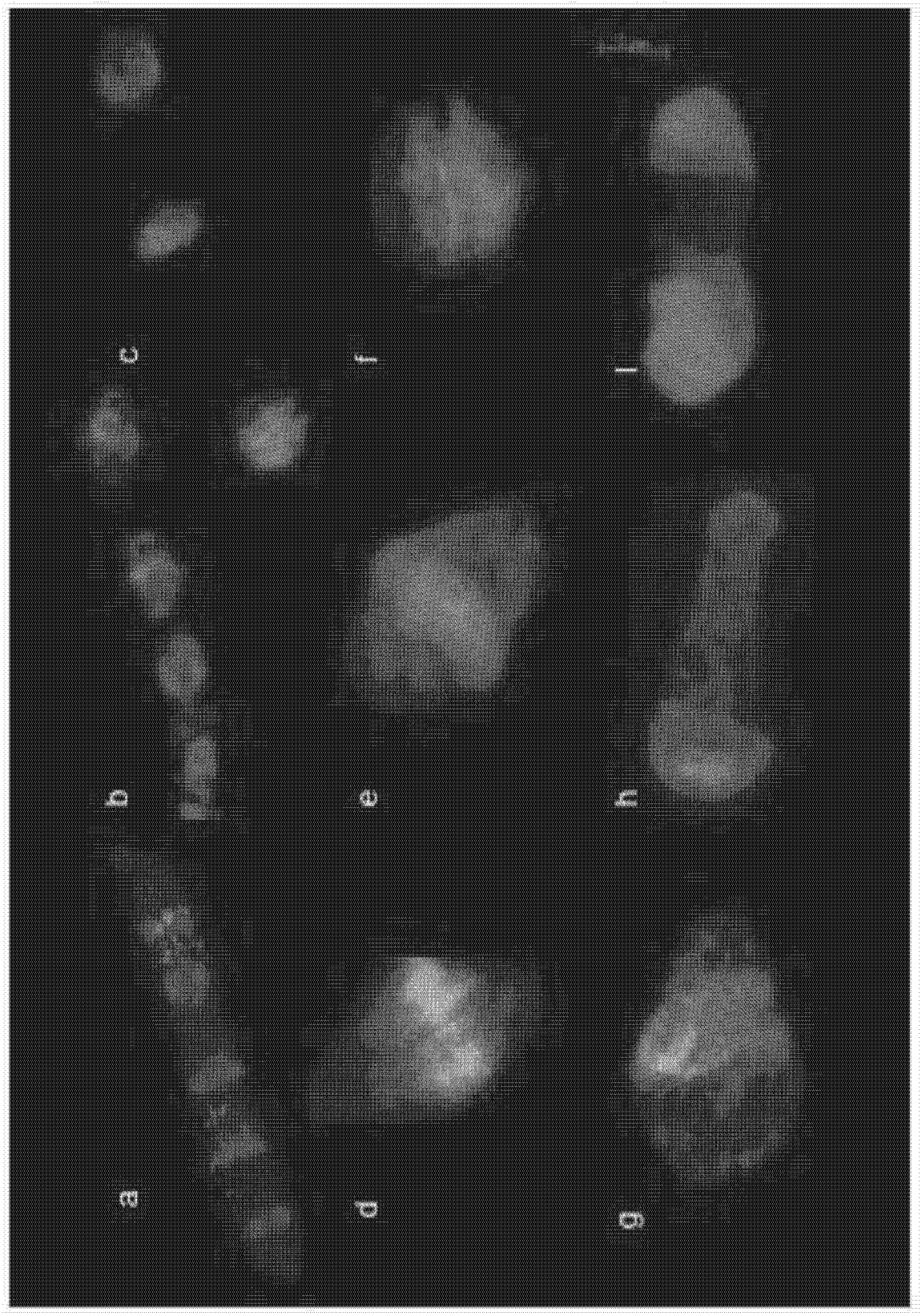


图 13