



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101044249 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200580035896. 6

(72) 发明人 三桥将人

(22) 申请日 2005. 10. 20

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243

(30) 优先权数据

60/620, 603 2004. 10. 20 US

60/653, 557 2005. 02. 16 US

60/688, 741 2005. 06. 08 US

代理人 钟晶

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 04. 19

审查员 张起

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/037925 2005. 10. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02006/045053 EN 2006. 04. 27

(73) 专利权人 日立化成工业株式会社

地址 日本东京都

专利权人 日立化成研究中心公司

权利要求书 2 页 说明书 24 页
序列表 16 页 附图 15 页

(54) 发明名称

通过定量 mRNA 定制给药的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种为个体病人定制药物方案的方法, 该方法是基于用候选药物刺激病人的全血后所测定的白细胞中的标记 mRNA 的水平。一种测定病人对药物的反应性的方法也被公开了, 所述方法包括使病人的全血暴露到药物 7 个小时或者更少; 暴露后, 测定血细胞中与药物的效果相关的 mRNA 的数量; 和根据测定的结果确定病人对药物的反应性, 其中 mRNA 数量的改变表明病人对该药物的反应性。测定的血细胞中的 mRNA 的数量可与暴露前存在于细胞中的 mRNA 的水平或在暴露到对照载体相同长度时间后存在于细胞中的 mRNA 的水平比较。用于本发明的标记 mRNA 包括编码 p21、BAX、PUMA、NOXA 和 IL-2 基因的基因产物的 mRNA。该方法可用于患有或连同其它症状的需要免疫抑制的癌症或者疾病或者症状的病人。

1. 用于测定 mRNA 的引物或探针在制备用于测定白血病或白血病淋巴瘤病人对药物的反应性的产品中的应用,所述 mRNA 是编码 PUMA 基因产物的 mRNA 和编码 p21 基因产物的 mRNA,所述药物选自以下的组:依托泊苷、阿得里亚霉素、氟达拉滨、米托蒽醌、利妥昔单抗、长春地辛、吡柔比星、卡铂、环磷酰胺、博来霉素、长春花碱、长春新碱、培来霉素、阿克拉霉素、红必霉素、顺氯氨铂、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、氮烯唑胺和紫杉醇,该应用包括:

在体外将病人的全血暴露到药物 2 ~ 7 个小时;

在所述暴露后,测定编码 PUMA 基因产物的 mRNA 和编码 p21 基因产物的 mRNA 的数量,血细胞中所述编码 PUMA 基因产物的 mRNA 与药物的凋亡效果相关,血细胞中所述编码 p21 基因产物的 mRNA 与药物的细胞周期停滞效果相关;以及

根据测定的结果确定对药物的反应性,其中所述 mRNA 数量的改变表明病人对药物的反应性。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中存在于血细胞中的所述 mRNA 的数量在所述暴露前被测定,通过比较暴露前测定的所述 mRNA 的量与暴露后测定的所述 mRNA 的量来确定所述 mRNA 数量的变化。

3. 根据权利要求 1 所述的应用,其另外包括:

在体外将病人的全血暴露到对照载体 2 ~ 7 个小时;

在所述暴露后,测定暴露到对照载体的血细胞中编码 PUMA 基因产物的 mRNA 和编码 p21 基因产物的 mRNA 的数量;以及

鉴定对药物的反应性包括比较暴露到对照载体后获得的测定结果与暴露到药物后获得的测定结果。

4. 根据权利要求 3 所述的应用,其中对照载体选自磷酸缓冲盐溶液和二甲亚砜组成的组。

5. 根据权利要求 1 所述的应用,其中对病人的全血进行暴露包括加入肝素。

6. 根据权利要求 1 所述的应用,其中全血被刺激 2 ~ 5 个小时。

7. 根据权利要求 1 所述的应用,其中全血被刺激 2 ~ 4 个小时。

8. 根据权利要求 1 所述的应用,其中将病人的全血暴露包括用植物凝血素刺激。

9. 根据权利要求 8 所述的应用,其中所述植物凝血素选自植物血细胞凝集素-P 和商陆丝裂素组成的组。

10. 用于测定 mRNA 的引物或探针在制备用于测定白血病或白血病淋巴瘤病人对药物的反应性的产品中的应用,所述 mRNA 是编码 PUMA 基因产物的 mRNA 和编码 p21 基因产物的 mRNA,所述药物选自下组:依托泊苷、阿得里亚霉素、氟达拉滨、米托蒽醌、利妥昔单抗、长春地辛、吡柔比星、卡铂、环磷酰胺、博来霉素、长春花碱、长春新碱、培来霉素、阿克拉霉素、红必霉素、顺氯氨铂、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、氮烯唑胺和紫杉醇,所述应用包括:

在体外将病人的全血暴露到药物 2 ~ 4 个小时;

在体外将病人的全血与暴露到对照载体 2 ~ 4 个小时;

在所述暴露之后,测定血液细胞中编码 PUMA 基因产物的 mRNA 和编码 p21 基因产物的 mRNA 的量;

比较暴露到对照载体后获得的测定结果与暴露到药物后获得的测定结果;

基于比较的结果确定对药物的反应性,其中所述 mRNA 数量的变化表明病人对药物的反应性。

通过定量 mRNA 定制给药的方法

[0001] 有关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以下优先权：美国临时专利申请号 60/620,603, 申请日为 2004 年 10 月 20 日；和美国临时专利申请号 60/688,741, 申请日为 2005 年 6 月 8 日。

[0003] 相关的序列表、表格或计算机程序目录

[0004] 本申请包含单独的序列表。

[0005] 发明背景

发明领域

[0006] 本发明涉及用于定制给药的方法。在该方法中，病人的全血被暴露到药物。在被暴露到药物后和仅被暴露到对照载体后，测定白细胞中与该药物的效果有关的标记 mRNA 的水平。通过比较被暴露到药物后 mRNA 水平和被暴露到对照载体后的 mRNA 值，或与被暴露到药物前测定的值比较，从而有可能确定药物是否对病人有效。通过筛选针对许多可能药物治疗的病人的血液，有可能建立对所述特定病人的定制的最优治疗方案。

[0007] 相关技术的描述

[0008] 药典为医生提供了用于大多数疾病的多种可能的治疗剂。然而，每种药物制剂的效力实质上在病人之间会有所不同。通常，对特定疾病有较低效力的药剂事实上可以对患有这种疾病的特定病人是高度有效的。因此，能够预先确定哪种药物或药物组合最适合每一个病人，和预先确定什么样的剂量将有助于发挥最大效力而不引起副作用，对于医生和病人将具有重大意义。作出这些确定的能力通常被称为“定制医学”，目前还没有普遍应用。

[0009] 通过测定血液中药物浓度进行治疗药物的监测已经被尝试作为接近定制医学的初步手段。然而，计算结果的值并不总是与药物在每个病人中的实际效果相关。另一种途径是基于利用有关药物毒性相关基因的药物遗传学或单核苷酸多态性 (SNP) 信息进行基因分型，以鉴别有关药物代谢的基因的变异。然而，这种以发现适当基因上的“热点”及其特征为目的的研究需要花费大量的时间和资源。而且，仅有限的与药物代谢有关的基因已经被识别出来。此外，已知基因突变导致的功能削弱是否被其它在相同或其它相关基因中至今未经确认的突变加重或者改善是不知道的。

[0010] 选择适当的治疗方式在癌症病例中是尤其迫切需要的，因为如果最初选择了无效的方案，那么这些疾病能够相当迅速地发展。有许多抗癌药物可购买获得。由于药物的选择是基于癌细胞的类型，所以需要进行大规模的细胞学检测来充分鉴定个体的癌细胞。病人间的差异甚至存在于相同的细胞类型中，然而，一旦病人对某些药物没有反应，主动治疗就会被放弃。如果有可能筛选到一大批体外有效的药物和它们的组合，那么有效的药物疗法可被确定用于这种病人。

[0011] 癌细胞可以从血液中被分离，在体外，在存在或不存在的适当的抗癌药物的培养基中被维持。这种伴随高强度操作步骤的试验需花费 2 ~ 3 天，然而，这些人工培养条件经常没有反映出体内的药物敏感性。根据这些原理的试验因此不适用于作为常规的临床检测。

[0012] 许多抗癌药物通过诱导病态细胞停止进入细胞周期或进入凋亡而发挥功能。已知

与细胞周期停滞相关的一个基因是 p21。此外,已知一些促进凋亡 (pro-apoptotic) 的 mRNA 在细胞发生凋亡时被诱导。其中,包括所谓的 Bcl-2/Bax 家族基因,其由 Bax、Bak、Bok 和 Bcl-XS 组成。其中,截短形式的 Bax,如所谓的仅 BH3 (BH3-only) Bcl-2 家族成员,也是已知的促进凋亡的 mRNA,这组包括 Bid、Bad、Bik、Bim、NOXA 和 PUMA (p53 凋亡的上调调节子)。这些基因共有个相似的结构基元,该结构基元结合线粒体膜,通过控制细胞色素 C 的释放来调节凋亡。虽然许多促进凋亡的基因已经被鉴定,但我们并不知道是否所有的基因对于凋亡的发生同样重要。基于组织或者细胞的类型,或者基于刺激的类型或程度,特定基因可以被显著地表达出来。做为选择,相关的基因在个体中可以变化。凋亡在癌症和炎症的病程中起着决定性的作用,如果主要的和普遍的促进凋亡的 mRNA 或者一套这种 mRNA 被鉴定出来,那么它们将非常适合于用作癌症和炎症公共的药物靶。而且,它们也可用作通用的凋亡相关疾病的诊断工具。

[0013] 此外,当化疗药物被应用于抗实体肿瘤时,一个主要潜在的副作用是对白细胞的抑制。在严重的情况下,这种作用可以是致命的。然而,不幸的是,不能做到预知哪个病人将经历白细胞抑制,也不能预知治疗期间什么时候可能发生这种作用。因此,对药物反应的个体模式的识别不仅对诊断目的有用,而且通过减少药物-相关死亡的可能性利于改善临床试验的结果和避免有害的公知状况。在这些领域的改善对于制药工业将很有价值。

[0014] 因为大多数抗癌药物是经静脉内使用,每种药物的血液水平已经很好地被鉴定,所以另一种途径是利用药物的已知效果,通过细胞基础的功能性试验来评估离体的白细胞毒性。例如,已知博来霉素 (BLM) 在人淋巴细胞中经由 DNA 和染色体断裂诱导凋亡。依托泊苷 (Etoposide, VP-16),一种有效的局部异构酶 II 抑制剂,引起人淋巴细胞中 DNA 链断裂和凋亡。虽然细胞基础的功能性试验在研究中广泛使用,但由于这种工作的复杂性,其中包括大的偏差和目前的定量困难,使得它们在鉴定个体药物的应答器和非应答器中的应用不能在临床实践中被广泛接受。

[0015] 在病人的器官和骨髓移植中也有定制药物的需要,因为这些病人必须终身服用免疫抑制剂。由于环孢霉素 A (“CsA”) 和藤霉素 (“FK”) 已经示范了在处理这些病人方面的良好记录,所以这些药物现在被用于许多其它的疾病,例如干癣、炎症性肠病和肾综合症。然而,这些药物的效力在个体病人之中有所不同,有的病人显示出对这两种药物中的一种更好的反应性。因为这些药物的初步作用是抑制白细胞介素 -2 (IL-2) mRNA 的转录,所以定量淋巴细胞中 IL-2 的水平是合理的。可是这些已经被使用的方法并不适合于常规临床检测,这主要是因为操作 mRNA 的难度。大规模地分析变化也不宜用于确定病人到病人的变化。

发明概要

[0016] 本发明公开了一种为个体病人定制药物方案的方法,该方法是基于用候选药物刺激病人的全血后所测定的白细胞中的标记 mRNA 的水平。

[0017] 发明的一个方面包括衡量病人对药物的反应性的方法,包括使病人的全血暴露到药物 7 个小时或者更少;暴露后,测定血液细胞中与该药物的效果相关的 mRNA 的数量;和根据测定的结果确定病人对该药物的反应性,其中 mRNA 数量的改变表明对该药物的病人的反应性。

[0018] 在所述方法的一个优选方案中,存在于血细胞中的 mRNA 的数量在暴露到药物前被测定,mRNA 数量的变化通过比较暴露前测定的 mRNA 的量与暴露后测定的 mRNA 的量来确定。

[0019] 在所述方法的另一个优选方案中,使病人的全血与一对照载体暴露 7 个小时或者更少;暴露后,暴露到该对照载体的血细胞中的与该药物效果相关的 mRNA 的数量被测定,对该药物的反应性至少部分地通过比较暴露到对照载体后获得的测定结果暴露到该药物后获得的测定结果确定。对照载体优选自由磷酸缓冲盐溶液和二甲亚砷组成的组。

[0020] 在所述方法的一个优选方案中,使病人的全血暴露包括加入肝素。

[0021] 在所述方法的一个优选方案中,全血被刺激 5 个小时或者更少。更优选,全血被刺激 2 ~ 4 个小时或者更少。

[0022] 在所述方法的一个优选方案中,所述药物的效果是血细胞的凋亡。

[0023] 在所述方法的一个优选方案中,mRNA 选自自由编码 Bcl-2/Bax 基因家族的基因产物的 mRNA 组成的组。更优选地,mRNA 编码 Bax 基因产物。

[0024] 在所述方法的另一个优选方案中,mRNA 选自自由编码仅 BH3 Bcl-2 基因家族的基因产物的 mRNA 组成的组。更优选地,mRNA 选自自由编码 PUMA 和 NOXA 基因产物的 mRNA 组成的组。

[0025] 在所述方法的一个优选方案中,所述药物的效果是血细胞中的细胞周期停滞,所述 mRNA 编码 p21 基因产物。

[0026] 在所述方法的另一个优选方案中,血液细胞中与药物的第二种效果相关的第二种 mRNA 的数量也被测定,所述药物的第一种效果是血细胞的凋亡,第一种 mRNA 编码 FUMA 基因产物;所述药物的第二种效果是血液中细胞的细胞周期停滞,第二种 mRNA 编码 p21 基因产物。

[0027] 在所述方法的另一个优选方案中,所述药物选自包含依托泊苷 (etoposide)、阿得里亚霉素 (doxorubicin)、氟达拉宾 (fludarabine)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、利妥昔单抗 (rituximab)、长春地辛 (vindesine)、吡柔比星 (pirarubicin)、卡铂 (carboplatin)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、博来霉素 (bleomycin)、长春花碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine)、培来霉素 (peplomycin)、阿克拉霉素 (acliarubicin)、红必霉素 (daunorubicin)、阿得里亚霉素 (doxorubicin)、顺氯氨铂 (cisplatin)、氨甲喋呤 (methotrexate)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)、阿糖胞苷 (cytarabine)、氮烯唑胺 (dacarbazine)、环磷酰胺 (cyclophosphamide) 和紫杉醇 (paclitaxel) 的组。在所述方法的另一个优选方案中,所述病人患有白血病或者白血病淋巴瘤。

[0028] 在所述方法的另一个个优选方案中,使病人的全血暴露时包括用植物凝血素刺激。更优选地,所述植物凝血素选自自由植物血细胞凝集素 -P 和商陆丝裂素 (tacrolimus) 组成的组。

[0029] 在所述方法的另一个优选方案中,所述药物的效果是 IL-2 转录的抑制,mRNA 编码 IL-2 基因产物。

[0030] 在所述方法的另一个优选方案中,所述药物是一免疫抑制剂。更优选地,所述药物选自自由环孢霉素 (cyclosporine)A 和藤霉素 (tacrolimus) 组成的组。

[0031] 在所述方法的另一个优选方案中,mRNA 选自自由编码来自 ATP 结合盒的亚家族 A、B、

C、D、E、F 和 G 的基因产物的 mRNA 组成的组。

[0032] 本发明的另一个方面包括一种测定病人对药物的反应性的方法,其中所述药物选自以下药物组成的组:依托泊苷、阿得里亚霉素、氟达拉滨、米托蒽醌、利妥昔单抗、长春地辛、吡柔比星、卡铂、环磷酰胺、博来霉素、长春花碱、长春新碱、培来霉素、阿克拉霉素、红必霉素、阿得里亚霉素、顺氯氨铂、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、氮烯唑胺、环磷酰胺和紫杉醇,所述方法包括:使病人的全血暴露到所述药物 4 个小时和更少;使该病人的全血暴露到对照载体 4 个小时或者更少;在所述暴露之后,测定血液细胞中一种 mRNA 的量,所述 mRNA 选自自由编码 p21、BAX 和 PUMA 基因产物的 mRNA 组成的组;比较暴露到所述对照载体后获得的测定结果与暴露到所述药物后获得的测定结果;基于比较的结果确定对药物的反应性,其中 mRNA 数量的变化表明该病人对所述药物的反应性。

[0033] 本发明的另一个方面包括衡量病人对药物的反应性的方法,所述药物选自自由环孢霉素 A 和藤霉素组成的组,包括:使病人的全血暴露到所述药物和植物凝血素 4 个小时或者更少;使病人的全血暴露到对照载体和植物凝血素 4 个小时或者更少;暴露后,测定血液细胞中编码 IL-2 基因产物的 mRNA 的数量;比较暴露到对照载体后获得的测定结果与暴露到药物后获得的测定结果;根据比较的结果确定对所述药物的反应性,其中所述 mRNA 数量的改变表明该病人对所述药物的反应性。

[0034] 附图的简要说明

[0035] 图 1 是显示了药物诱导的 p21 mRNA 在人血液(空圈)和培养的人白血病细胞中的表达的图。

[0036] 图 2 是显示依托泊苷诱导的来自混入 50 μ L 健康成人血液中的 U937 细胞的 p21mRNA 的表达的图。

[0037] 图 3 包括显示药物诱导的 p21(上面的)和 BAX(下面的)mRNA 在白血病淋巴瘤(左,中)和健康成人(右)中的表达的柱状图。

[0038] 图 4 显示了来自图 3 的病人 2 的临床过程。

[0039] 图 5 显示了在凋亡期间的早期基因表达。

[0040] 图 6 显示了筛选多种促进凋亡的 mRNA 的结果。

[0041] 图 7 显示了剂量反应的评定结果。

[0042] 图 8 显示了在白血病和淋巴瘤病人中,药物诱导的基因表达的评定结果。

[0043] 图 9 显示了 VP-16 诱导的凋亡相关基因在人全血中的表达。

[0044] 图 10 显示了 BLM 诱导的凋亡相关基因在人全血中的表达。

[0045] 图 11 显示了 p21 与 PUMA 引起的反应、VP-16 与 BLM 引起的反应的比较。

[0046] 图 12 显示了 mRNA 水平测定的每日变化。

[0047] 图 13 显示了 taxol 诱导的凋亡相关基因在人全血中的表达。

[0048] 图 14 显示了药物诱导的 BAX、p21 和 PUMA 的表达之间的比较。

[0049] 图 15 显示了在健康的供体和血癌病人中 BLM 诱导的 p21 mRNA 的表达。

[0050] 图 16 显示了癌症病人的全血中, p21 和 Bax mRNA 经由大量抗癌药的激活的测定结果。

[0051] 图 17 显示了癌症病人的全血中, p21、BAX 和 PUMA mRNA 经由大量抗癌药的激活的测定结果。

[0052] 图 18 是显示 PHA-P 诱导的白细胞 IL-2mRNA 在肝素化全血中被诱导的图。

[0053] 图 19 显示了 PHA-P 诱导的白细胞 IL-2 mRNA 在肝素化全血中的表达的动力学。

[0054] 图 20 显示了 CsA 抗 PHA-P 诱导的白细胞 IL-2 mRNA 表达的剂量依赖性效果。

[0055] 图 21 显示了 CsA 抗 PHA-P 诱导的白细胞 IL-2 mRNA 表达的效果。

[0056] 图 22 显示了在健康供体血液中,对 100 和 500ng/mL CsA 作用于 PHA-P 诱导的 IL-2 mRNA 的表达的反应。

[0057] 图 23 显示了接受了 CsA 或者 FK 的健康成人和病人之间比较的结果。

[0058] 图 24A 显示了 CsA 的血液水平 (X 轴) 和 IL-2 mRNA 的值 / 基准的白细胞数量之间的关系。

[0059] 图 24B 显示了 CsA 的血液水平 (X 轴) 和后 PHA-A 的刺激 (右) 之间的关系。

[0060] 图 25A 显示了 FK 的血液水平 (X 轴) 和基准 IL-2 mRNA 的值 / 白细胞数量之间的关系。

[0061] 图 25B 显示了 FK 的血液水平 (X 轴) 和基准 IL-2 mRNA 的值 / PHA-A 刺激后白细胞数量之间的关系。

[0062] 优选方案的详细描述

[0063] 方案 1 :p21/BAX 在定制给药治疗白血病和淋巴瘤中的应用

[0064] 在本方法中,由医药制剂的作用引起的白细胞细胞死亡与 p21 和 BaxmRNA 的转录水平相关。在这两个标记 mRNA 中,p21 引起细胞周期停滞,BAX 则作为凋亡的启动信号。如果一种药物诱导了癌细胞中的 p21,这表明这种药物显示出了癌细胞抑制活性,而对 BAX 的诱导则意味着这种药物具有杀细胞活性。虽然在凋亡的过程中涉及许多基因,但这两种早期基因标记的表达表明了药物的细胞毒性活性。

[0065] 血液从健康成人和两个白血病的非霍奇金恶性淋巴瘤病人中获得。U937、KG-1 和 Jurkat 细胞获自美国模式培养物保藏所 (ATCC, 马纳萨斯, VA),在补充有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 中培养。其中,U937 细胞是一种人组织细胞的淋巴瘤细胞系,KG-1 是一种人骨髓粒细胞性白细胞血病细胞系, Jurkat 细胞是一种人 T 细胞淋巴瘤母细胞样、白血病来源的细胞系。细胞被悬浮在无血清培养液中,在 37°C 下暴露到依托泊苷 (Sigma, St. Louis, MO) 2 个小时后对 p21 进行测定。用于人体实验的血液部分在 37°C 由多种抗癌药物刺激 2 个小时,然后对 p21 和 Bax mRNA 进行测定。用于这些研究的抗癌药物是临床药物,在静脉内给药后 3-6 个小时,每种药物的浓度调节到典型的血液水平。所使用的药物是:阿得里亚霉素 (阿霉素, Kyowa Hakko)、Fludara (氟达拉宾, Schering)、Novantron (米托蒽醌, Wyeth)、Vepesid (VP-16, 依托泊苷, Bristol-Myers Squibb)、Randa (顺氯氨铂, Nihon Kayaku)、Rituxan (利妥昔单抗, 抗 CD20 的单克隆抗体, Chugai)、Fildesin (长春地辛, Shionogi)、Therarubicin (吡柔比星, Meiji Seika)、Paraplatin (卡铂, Bristol) 和 Endoxan (环磷酰胺, Shionogi)。

[0066] 从全血中制备 mRNA 和 cDNA。简言之,将国内制造的 96 孔过滤板置于收集盘中,加入 150 μ l 15mM Tris, pH7.4。以 120xg 在 4°C 离心 1 分钟后,将 50 μ l 的血样加入每个孔中,立即以 120xg 在 4°C 离心 2 分钟,接着用 300 μ l PBS 清洗每个孔一次,以 2000xg 在 4°C 离心 5 分钟。然后,将 60 μ l 预备的裂解缓冲液加入过滤板中并于 37°C 孵育 10 分钟,所述的裂解液含有例如:0.5% N-十二烷基肌氨酸钠,4XSSC,10mM Tris-HCl, pH7.4,1mM EDTA,0.1%

IGEPALCA-630 和 1.791M 硫氰酸胍,并进一步添加了 1% 2-巯基乙醇 (BioRad, Hercules, CA, USA),0.5mg/ml 蛋白酶 K(Pierce Rockford IL USA),0.1mg/ml 鲑精 DNA(5Prime Eppendorf/Brinkmann, Westbury, NY, USA),0.1mg/ml 大肠杆菌 tRNA(Sigma),10mM 在表 1 中列出的每一种特异性反向引物的混合液和标准 RNA34 寡聚核苷酸。之后,过滤板被置于寡聚 (dT)-固定的微孔板 (GenePlate, RNature) 中,在 4°C 以 2000xg 离心 5 分钟。4°C 保存过夜后,在 4°C 用 100 μ l 普通裂解液清洗微孔板三次,再用 150 μ l 的清洗缓冲液 (0.5M NaCl, 10mM Tris, pH 7.4, 1mM EDTA) 清洗三次。通过在每个孔中加入 30 μ l 含有 1xRT-缓冲液、1.25mM 每一种 dNTP、4 单位的 rRNasin 和 80 单位的 MMLV 逆转录酶 (Promega) 的缓冲液 (无引物),在 37°C 孵育 2 个小时, cDNA 被直接合成。特异性引物引发的 cDNA 存在于溶液中,寡聚 (dT)-引发的 cDNA 被保留固定在微孔板中。对于 TaqMan PCR (图 1、3、4),生成的 4 μ l cDNA 溶液被直接转移到 384 孔 PCR 板中,所述板中加入了 5 μ l 的 TaqMan 通用样品混合物 (ABI) 和 1 μ l 的寡聚核苷酸混合液 (15 μ M 每一种正向和反向引物和 3-6 μ M TaqMan 探针), PCR 在 PRISM7900HT (ABI) 中进行,一个周期包括 95°C 10 分钟,接着 95°C 30 秒、55°C 30 秒和 60°C 1 分钟共 45 个循环。对于 SYBR Green PCR (见图 6), cDNA 在水中被稀释 3-4 倍,4 μ l 的 cDNA 溶液被直接转移到 384 孔 PCR 板中,所述 PCR 板中加入了 5 μ l 样品混合物 (BioRad, Hercules, CA) 和 1 μ l 寡聚核苷酸混合液 (15 μ M 每一种正向和反向引物), PCR 在 PRISM 7900HT (ABI) 中进行,95°C 10 分钟一个循环后,接着 95°C 30 秒和 60°C 1 分钟共 45 个循环。每种基因被加入独立的孔中。通过分析软件 (SDS, ABI) 确定 Ct。

[0067] 为了确定依托泊苷用于诱导血液和培养细胞中 p21 mRNA 的适宜浓度,将来自健康成人的血样在 37°C 经由多种浓度的这种药物刺激 2 个小时,然后测定 p21 mRNA 的水平。如图 1 所示,在 10 μ M 依托泊苷时没有在健康的白细胞中检测到显著的 p21 mRNA 表达,尽管 p21 在 100 μ M 依托泊苷时显著地表达。相反,当 U937 细胞暴露到 10 μ M 依托泊苷时,从 U937 细胞中检测到了细微但显著的 p21 表达 (图 1, 空圈, 箭头标记)。KG-1 细胞的药物敏感性 (图 1, 闭合三角形) 类似于人血液中的那些,即使当 100 μ M 依托泊苷使用时 Jurkat 细胞也有抗性 (图 1, 闭合的钻石形)。这些结果表明 p21 mRNA 的表达是一种用于药物细胞毒性的有用标记,以及 10 μ M 依托泊苷是用于选择易感癌细胞的一种方法。

[0068] 图 1 中显示的结果表明 10 μ M 依托泊苷是用于区别健康血液和 U937 之间的一个边界值。为了使用培养细胞模拟白血病,不同数量的 U937 与血液混合并暴露到 10 μ M 依托泊苷。结果在图 2 中显示。为了避免血液-U937 的交互作用,将分开的管中的血液和细胞暴露到依托泊苷,并被加入到相同过滤板的孔中。为了确定 U937 中天然 p21 mRNA 的表达,相同数量的未经处理的 U937 被加入到血样中作为对照。在图中,空正方形表明 DMSO 处理的 U937 细胞,实菱形表明 10 μ M 依托泊苷处理的 U937 细胞。如图 2 所示,当 1,250 U937 细胞中加入了 1 μ L 血液时鉴定到显著的 ($p = 0.04$) p21 mRNA 表达 (箭头)。这些结果表明当癌细胞群体只有 20% (每 1 μ L 血液每 5,000 个正常白细胞 1,250 个癌细胞) 少时,癌细胞的药物敏感性可以在全血中鉴定。

[0069] 产生图 1-2 所示结果的培养的细胞条件是人为的,未必反映了体内的药效。源于培养细胞的结果可能难以解释。相反,来自全血的数据产生自非常接近于生理条件的条件,这种数据是容易解释的。

[0070] 图 3 显示了在适应大量药物的两位白血病淋巴瘤病人和 1 位健康成人中,由药

物诱导的 p21 和 Bax mRNA 表达的结果。在该图中, Adr 表示阿霉素 (400nM), Fur 表示 Fludara (0.2 μ g/ml), Nov 表示 Novantron (10ng/ml), Vep 表示 Vepesid (5 μ g/ml), Ran 表示 Randa (顺氯氨铂) (1 μ g/ml), Rit 表示 Rituxan (200 μ g/ml), Fid 表示 Fildesin (10ng/ml), Ter 表示 Therarubicin (50ng/ml), Par 表示 Paraplatin (5 μ g/ml) 和 End 表示 Endoxan (1 μ g/ml)。它们的浓度根据静脉注射后 1-4 小时后的血液水平来确定。黑色的长条表示 $p < 0.001$, 而浅灰色的长条表示 $p < 0.05$ 。

[0071] 当血液用 Therarubicin 和 Paraplatin 刺激时, 虽然所有的药物均未能诱导健康成人中的 p21 和 Bax mRNA, 但病人 1 显示出对 p21 和 Bax mRNA 显著的诱导。Endoxan 也诱导 p21 mRNA。病人 2 显示出由 Adriacin 和 Fludara 引起的显著的 p21 mRNA 诱导, 以及由 Novantron 引起的 Bax mRNA 诱导。在病人 2 中, Vepesid 诱导了 p21 和 Bax mRNA。虽然对全血进行了测定, 但由于两个病人中不正常的淋巴细胞群超过了 80%, 故这些结果来自于有害的细胞。图 3 中显示的结果表明 1) 所述方法对于确定全血中癌症细胞来源的基因表达是足够灵敏的, 和 2) 药物反应性变化很大, 即使这些病人中的癌细胞是来源于 B 细胞。

[0072] 图 4 显示了病人 2 的进一步的临床过程, 该病人未能对 CHOP 化疗 (环磷酰胺 (Endoxan), 阿得里亚霉素 (Adriacin), 长春花新碱和泼尼松龙 (predonisolone)) 和随后的脾放射作出反应, 并显示出连续的血小板减少。然而如图所示, 当给予了 Vepesid (VP-16, 依托泊苷) 时, 血小板计数实质上增加了。由于粒细胞群刺激因子 (G-CSF) 没有抗血小板的功能, 故血小板减少的改善可归于依托泊苷的作用。因为依托泊苷是唯一诱导病人 2 中 p21 和 Bax mRNA 两者的唯一药物, 这些临床结果表明对全血中药物诱导的 p21 和 Bax mRNA 表达的测定可用于对每个病人的敏感药物的鉴定。

[0073] 在所有情况下, 敏感药物通过检测全血中药物诱导的 p21 和 Bax mRNA 的表达来确定。因为这种试验偏差非常小及初始原料是一式三份的等分全血, 故结果在统计上有显著意义。有趣的是, 虽然这两个病人患的均是 B 细胞性非霍奇金淋巴瘤, 但敏感药物的清单在这两个病人之间是不同的。如果没有 mRNA 检测就不能完成对这些药物的选择。因此, 这种检测是定制医学的有效手段。

[0074] 与实体肿瘤不同, 血癌细胞存在于血液中。因此, 当根据 p21 和 Bax mRNA 的诱导 (图 3, 右面的图表), 确定了每一种药物在全血中最大的耐受药物浓度, 那么癌细胞的药物敏感性就可以通过将候选药物简单混入全血鉴定出来 (图 3, 左面和中间的图表)。而且, 孵育药物单独 2 小时是有必要的, 这样可以去除潜在的副效应。虽然在 p21 和 BAX 表达后, 下游的凋亡级联可能被阻断, 但那些诱导 p21 和 BAX 表达的药物很可能比那些未能诱导这些基因的 mRNA 的药物更有效。在这个方案中的第二个病人对鉴定出的药物作出反应的事实 (图 4) 表明本方法对于将来用于癌症化疗的定制医学是有用的。

[0075] 方案 2 : p22 和 PUMA mRNA 在定制给予白血病和淋巴瘤药物中的应用

[0076] PUMA 或 Bcl-2 结合成分 3 (bbc3) 是由三个独立的小组在 2001 年几乎相同的时间发现的, 在 GenBank 中给出的登录号分别为 HSU82987、AF332558 和 AF354656。根据 GenBank 的信息, 这些序列是在 1996 年 12 月、2000 年 12 月和 2001 年 3 月分别提交的, 最早的记录 UniGene (Hs. 467020) 使用了 bb3 作为该基因的名称。许多出版物使用 PUMA (p53 调节的凋亡的调节子) 而不是 bbc3。它在各种细胞中不是普遍表达的, 根据 UniGene (Hs. 467020) 的表达图谱可以看出, 它在血液、子宫颈、结肠、眼睛、肾喉、肺、乳腺、卵巢皮肤、小肠、胃和辜

丸中表达。也有报道 PUMA 是鼠中药物诱导的凋亡的一个主要调节子。虽然 PUMA 在每个实验体系中被广泛地表征,但 PUMA 与人血液白细胞中的促进凋亡的其它 mRNA 之间的联系还没有建立起来。血液是特别重要的,因为对血液中早期凋亡信号的检测被认为能促进新的诊断进展,用于对每个血液病病人有效的抗癌药物的鉴定(见图 8)。而且,任何实体肿瘤的抗癌药物导致一些对白细胞的副作用,这种作用有时是致命的。因此,个体药物的毒性可以通过体外孵育血液和靶药物进行预测。对某些药物的反应者或非反应者的鉴定被认为有助于药物开发的过程。

[0077] 药物敏感性试验通常使用分离的单核白细胞进行,其中单核白细胞被悬浮于培养基中并被置于二氧化碳恒温箱中孵育几天,以证实发生了细胞死亡或者凋亡或确立了等效物生物学指标。由于这些条件与天然条件悬殊,所以难以解释获得的结果。这是为什么药物敏感性试验在临床实践中不普遍的一个主要的原因,尽管对合适药物的鉴定对于病人的生活质量是必不可少的。本方法避免了这个问题,其是通过使用全血和短的 2-4 小时的孵育本方法可以对仅仅 50 μ l 的人全血中任一产生的 mRNA 的绝对数量灵敏地测定。由于高通量平台容许使用一式三份的全血样品,故通过合理的统计分析得出的结果是可靠的。基因分型是目前用于药物敏感性试验的新趋势,然而,由于不知道其它基因中的遗传多态性或者突变是否能够抵偿第一个突变的异常,故它难以基于某一基因的一个或多个位点上的遗传多态性或者突变得出结论。本方法提供了一种使用遗传学作为工具的表型测试,从而避免这些问题。

[0078] 通过该体系对显著的药物诱导的 p21 和 / 或 PUMA mRNA 的诱导检测出来,阳性结果表明药物对生理学体外条件下早期的凋亡级联至少是有作用的。相比于显示阴性结果的那些,在这些测试中显示出阳性结果的药物很可能是用于治疗的好候选药物。每个血样中凋亡的最后确立可以通过一个较短孵育期的试验证实,以便更可靠地重现生理条件。p21 对于细胞周期停滞作出响应, PUMA 是促进凋亡的,对这些基因的分析与药物的癌细胞抑制和杀细胞的效果相符。

[0079] 以下方法被应用于实现本发明的方法。

[0080] 血样采自健康成人志愿者和患病的病人。各种 Bax 相关基因以及被报道的在凋亡期间被诱导的基因通过文献检索确定,相应的 PCR 引物和 TaqMan 探针由 PrimerExpress (Applied Biosystem, Foster City, CA) 和 HYBsimulator (RNAture, Irvine, CA) 设计。寡聚核苷酸通过 IDT (Coralville, IA) 合成。GenBank 登录号和引物序列列于下表 1 中。

[0081] 表 1: 基因引物序列

[0082]

mRNA	GeneBank 登录号	序列 (5'-3')	
		正向引物	反向引物
p21	HS431A	TTCTGCTGTCCTCCTCA	GGATTAGGGCTTCCTCTT

[0083]

	14	GATTTCT (SEQ ID NO:1)	GGA (SEQ ID NO:2)
<u>TaqMan 探针:FAM-CCACTCCAAACGCCGCTGATC-TAMRA (SEQ ID NO:3)</u>			
GADD 153	S40706	AGAACCAGGAAACGGA AACAGA (SEQ ID NO:4)	TCTCCTTCATGCGCTGCT TT (SEQ ID NO:5)
SUMO -1	BC0064 62	GGGTCAGAGAATTGCTG ATAATCAT (SEQ ID NO:6)	CCCCGTTTGTTCCCTGATA AACT (SEQ ID NO:7)
Apaf-1	AF0132 63	TGCGCTGCTCTGCCTTCT (SEQ ID NO:8)	CCATGGGTAGCAGCTCCT TCT (SEQ ID NO:9)
Bfl-1	U27467	CACAGGAGAATGGATAA GGCAA (SEQ ID NO:10)	CATCCAGCCAGATTTAGG TTCAA (SEQ ID NO:11)
Bcl-w	NM_004 050	TCCGGCGCACCTTCTCT (SEQ ID NO:12)	CCCAAAGACAAAGAAGG CTACAA (SEQ ID NO:13)
Bcl-2	BC0272 58	CATGTGTGTGGAGAGCG TCAA (SEQ ID NO:14)	GCCGGTTCAGGTA CTCA (SEQ ID NO:15)
PUMA	AF3546 54	GGGCCAGACTGTGAAT CCT (SEQ ID NO:16)	ACGTGCTCTCTCTAAACC TATGCA (SEQ ID NO:17)
<u>TaqMan 探针:FAM-CCCCGCCCATCAATCCCA (SEQ ID NO:18)</u>			
NOXA	BC0326 63	CTCAGGAGGTGCACGTT TCA (SEQ ID NO:19)	TTCCAAGGGCACCCATG A (SEQ ID NO:20)
HRK	HSU763 76	GGGAGCCCAGAGCTTGA AA (SEQ ID NO:21)	GCGCTGTCTTTACTCTCC ACTTC (SEQ ID NO:22)
BIM	BC0336 94	TCCAGGACAGTTGGATAT TGTC	TAAGGAGCAGGCACAGA GAAAGA

[0084]

		(SEQ ID NO:23)	(SEQ ID NO:24)
BNIP3	BC0219 89	AAATATTCCCCCAAGGA GTTC (SEQ ID NO:25)	CGCTCGTGTTCCTCATGC T (SEQ ID NO:26)
BIK	U34584	TCCTATGGCTCTGCAATT GTCA (SEQ ID NO:27)	GGCAGGAGTGAATGGCT CTTC (SEQ ID NO:28)
BID	BC0363 64	CATACACTTTTTCTCTTT CCATGACATC (SEQ ID NO:29)	GGGCATCGCAGTAGCTT CTG (SEQ ID NO:30)
BAD	BC0019 01	CAGGCCTATGCAAAAAG AGGAT (SEQ ID NO:31)	CGCACCGGAAGGGAATC T (SEQ ID NO:32)
Bcl-Xs	NM_001 191	GGCAGGCGACGAGTTTG A (SEQ ID NO:33)	GTTCCCATAGAGTTCCAC AAAAGTATC (SEQ ID NO:34)
BOK	NM_032 515	TCACATGCTGGTTGCTTA ATCC (SEQ ID NO:35)	GCACAAGGACCCCATCA CA (SEQ ID NO:36)
BAK	NM_001 188	CACGGCAGAGAATGCCT ATGA (SEQ ID NO:37)	CCCAATTGATGCCACTCT CA (SEQ ID NO:38)
BAX	AY2170 36	TTTCTGACGGCAACTTCA ACTG (SEQ ID NO:39)	GGTGCACAGGGCCTTGA G (SEQ ID NO:40)

[0085] 在 8 孔条状微管中加入 1.4 μ l 的 50 浓度的药物或者控制液 (磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 或者 DMSO), 使用前一直保存于 -20°C 。

[0086] 使用的化学制品是长春花碱 (VLB), 长春新碱 (VCL), 米托蒽醌 (MIT), 阿克拉霉素 (ACR), 博来霉素 (BLM), 红必霉素 (DNR), 阿得里亚霉素 (DXR), 依托泊苷 (VP-16), 卡铂 (CBDCA), 顺氯氨铂 (CDDP), 氟达拉滨 (FDB), 氨甲喋呤 (MTX), 5- 氟尿嘧啶 (5-FU), 阿糖胞苷 (Ara-C), 氮烯唑胺 (DTIC), 环磷酰胺 (CPA) (Sigma, StLouis, MO), 吡柔比星 (THP) 和培来霉素 (PEP) (WakoPureChemicals, Osaka, Japan)。70 μ l 的新鲜肝素化全血以一式三份加入每个孔, 闭合盖子于 37°C 孵育 2-8 小时。使用铯 -137 以指定的剂量刺激血液用于辐射处理。在每个处理后, 50 μ l 的全血被转移到如下所述的过滤板中。mRNA 和 cDNA 从全

血中制备。总之,自制的 96 孔过滤板被置于收集盘中,其中加入了 150 μ l 的 5mM Tris, pH7.4。在 4 $^{\circ}$ C 以 120xg 离心 1 分钟后,将 50 μ l 的血样加入到每个孔中并立即在 4 $^{\circ}$ C 以 120xg 离心两分钟,接着用 300 μ l PBS 清洗每个孔一次,在 4 $^{\circ}$ C 以 2000xg 离心 5 分钟。然后,将 60 μ l 预备的裂解缓冲液加到过滤板中并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟,所述的裂解液含有例如: 0.5% N-十二烷基肌氨酸钠,4XSSC,10mM TrisHCl, pH7.4,1mM EDTA,0.1% IGEPALCA-630 和 1.791M 硫氰酸胍,并进一步添加了 1% 2-巯基乙醇 (BioRad, Hercules, CA, USA),0.5mg/ml 蛋白酶 K (PierceRockfordILUSA),0.1mg/ml 鲑精 DNA (5PrimeEppendorf/Brinkmann, Westbury, NY, USA),0.1mg/ml 大肠杆菌 tRNA (Sigma),10mM 在表 1 中列出的每一种特异性反向引物的混合液和标准 RNA34 寡聚核苷酸。之后,将过滤板置于寡聚 (dT)-固定的微孔板 (GenePlate, RNAture) 中,在 4 $^{\circ}$ C 以 2000xg 离心 5 分钟。4 $^{\circ}$ C 过夜保存后,在 4 $^{\circ}$ C 用 100 μ l 普通裂解液清洗微孔板三次,再用 150 μ l 的清洗缓冲液 (0.5MNaCl,10mM Tris,pH7.4,1mM EDTA) 清洗三次。通过在每个孔中加入含有 1xRT 缓冲液、1.25mM 每一种 dNTP、4 单位的 rRNasin 和 80 单位的 MM LV 逆转录酶 (Promega) 的 30 μ l 缓冲液 (无引物) 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时, cDNA 被直接合成。特异性引物引发的 cDNA 存在于溶液中,寡聚 (dT) 引发的 cDNA 被保留固定在微孔板中。对于 TaqManPCR (图 1、3、4),生成的 4 μ l cDNA 溶液被直接转移到 384 孔 PCR 板中,所述板中加入了 5 μ l 的 TaqMan 通用样品混合物 (ABI) 和 1 μ l 的寡聚核苷酸混合液 (15 μ M 每一种正向和反向引物和 3-6 μ M TaqMan 探针),PCR 在 PRISM7900HT (ABI) 中进行,一个周期包括 95 $^{\circ}$ C 10 分钟,接着 95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒和 60 $^{\circ}$ C 1 分钟共 45 个循环。对于 SYBR Green PCR (见图 6), cDNA 在水中被稀释 3-4 倍,4 μ l 的 cDNA 溶液被直接转移到 384 孔 PCR 板中,所述 PCR 板中加入了 5 μ l 样品混合物 (BioRad, Hercules, CA) 和 1 μ l 寡聚核苷酸混合液 (15 μ M 每一种正向和反向引物),PCR 在 PRISM7900HT (ABI) 中进行,95 $^{\circ}$ C 10 分钟一个循环后,接着 95 $^{\circ}$ C 30 秒和 60 $^{\circ}$ C 1 分钟共 45 个循环。每种基因被加入独立的孔中。Ct 通过分析软件 (SDS, ABI) 确定。虽然 1xRT 缓冲液被作为阴性对照,但没有引物对在这些实验条件下产生非特异性的引物二聚物。对于图 8 中的 PUMA,固定在寡聚 (dT) 固定的微孔板上的 cDNA 在 icycler (BioRad) 上被直接扩增。

[0087] 使用商业试剂盒 (Puregene, Gentra, Minneapolis, MN), 从有或没有进行治疗的 300 μ l 每种全血中纯化出基因组 DNA。然后通过 3.5% 琼脂糖 (3 : 1NuSieve : agarose, FMC, Rockland, ME) 的凝胶电泳分析 DNA, 用 0.5 μ g/ml 溴化乙锭染色, 并由 Alphamager (AlphaInnotech, SanLeandroCA) 记录拍摄的图像。

[0088] 为了引起凋亡,肝素化人全血分别用 30Gy 的电离辐射、20 μ M 博来霉素 (BLM) 或者 100 μ M 依托泊苷 (VP-16) 刺激。15-25Gy 的放射疗法在临床上用于杀死受体白细胞以预防输血过程中的移植物抗宿主病。已知博来霉素诱导经由 DNA 和染色体断裂的人淋巴细胞的凋亡。依托泊苷 (Etoposide, VP-16), 一种有效的局部异构酶 II 抑制剂, 引起人淋巴细胞中 DNA 链断裂和凋亡。为了模仿生理条件, 使用没有分离单核细胞的全血。DNA 的断裂, 凋亡的一种典型标志, 对它的分析如图 5 中的插图所示。孵育 1 天后, 抽提基因组 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳并使用溴化乙锭染色分析 DNA 断裂。泳道 1 显示了 100bp 的 DNA ladder (最小的为 200bp, invitrogen, CA), 而泳道 2-6 分别表示与二甲基亚砷、PBS、100 μ M 的 VP-16、20 μ M 的 BLM 和 30Gy 的放射线孵育 1 天后的结果, 泳道 7 显示了对于新鲜血液 (图中的对照) 的结果。从该图可以观察到 DNA 的断裂。

[0089] 各种 mRNA 的定量使用下述方法进行。将 50 μ l 每一种肝素化全血的一式三份的等分试样加入 96 孔过滤板中以俘获白细胞。将过滤板置于收集盘中并加入 150 μ l 的 5mM Tris(pH7.4)。以 120xg 在 4 $^{\circ}$ C 离心 1 分钟后,将 50 μ l 的血样加入每个孔中,立即以 120xg 在 4 $^{\circ}$ C 离心 2 分钟,接着用 300 μ l 的 PBS 清洗每个孔一次,以 2000xg 在 4 $^{\circ}$ C 离心 5 分钟。然后,将 60 μ l 预备的裂解缓冲液加入过滤板中并于 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟,所述的裂解液含有例如:0.5% N-十二烷基肌氨酸钠,4XSSC,10mM TrisHCl,pH7.4,1mM EDTA,0.1% IGEPALCA-630 和 1.791M 硫氰酸胍,并进一步添加了 1% 2-巯基乙醇 (BioRad,Hercules,CA,USA),0.5mg/ml 蛋白酶 K(PierceRockfordILUSA),0.1mg/ml 鲑精 DNA(5PrimeEppendorf/Brinkmann,Westbury,NY,USA),0.1mg/ml 大肠杆菌 tRNA(Sigma),10mM 在表 1 中列出的每一种特异性反向引物的混合液和标准 RNA34 寡聚核苷酸。之后,过滤板被移至寡聚 (dT)-固定的微孔板 (GenePlate, RNAture) 中,在 4 $^{\circ}$ C 以 2000xg 离心 5 分钟。4 $^{\circ}$ C 过夜保存后,在 4 $^{\circ}$ C 用 100 μ l 普通裂解液清洗微孔板三次,再用 150 μ l 的清洗缓冲液 (0.5MNaCl,10mM Tris,pH7.4,1mM EDTA) 清洗三次。通过在每个孔中加入含有 1xRT 缓冲液、1.25mM 每一种 dNTP、4 单位的 rRNasin 和 80 单位的 MM LV 逆转录酶 (Promega) 的 30 μ l 缓冲液 (无引物),在 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 小时,cDNA 被直接合成。特异性引物引发的 cDNA 存在于溶液中,寡聚 (dT)-引发的 cDNA 被保留固定在微孔板中。对于 TaqManPCR(图 1、3、4),生成的 4 μ l cDNA 溶液被直接转移到 384 孔 PCR 板中,所述板中加入了 5 μ l 的 TaqMan 通用样品混合物 (ABI) 和 1 μ l 的寡聚核苷酸混合液 (15 μ M 每一种正向和反向引物和 3-6 μ M TaqMan 探针),PCR 在 PRISM7900HT (ABI) 中进行,一个周期包括 95 $^{\circ}$ C 10 分钟,接着 95 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒和 60 $^{\circ}$ C 1 分钟共 45 个循环。对于 SYBR Green PCR(见图 2),cDNA 在水中被稀释 3-4 倍,4 μ l 的 cDNA 溶液被直接转移到 384 孔 PCR 板中,所述 PCR 板中加入了 5 μ l 样品混合物 (BioRad,Hercules,CA) 和 1 μ l 寡聚核苷酸混合液 (15 μ M 每一种正向和反向引物),PCR 在 PRISM7900HT (ABI) 中进行,95 $^{\circ}$ C 10 分钟一个循环后,接着 95 $^{\circ}$ C 30 秒和 60 $^{\circ}$ C 1 分钟共 45 个循环。每种基因被加入独立的孔中。因为 Ct 是一个对数比例 (logscale),1 Δ Ct 通常意味着在数量上的两倍或者一半,负的 Δ Ct 意味着表达的增加。Ct 通过分析软件 (SDS,ABI) 确定。为了使该试验有效,对 spiked RNA 也进行了测定。虽然 1xRT 缓冲液被作为阴性对照,但并没有引物对在这些实验条件下产生非特异性的引物二聚物。对于图 8 中的 PUMA,固定在寡聚 (dT) 固定的微孔板上的 cDNA 在 icycler (BioRad) 上被直接扩增。

[0090] 结果在图 5 中显示。在图中,在 30Gy 放射线 (●)、20 μ MBLM (▲)、100 μ MVP-16 (◆) 或相应的对照 (没有放射线)、 Δ (PBS)、 \diamond (DMSO) 刺激后,肝素化全血在 37 $^{\circ}$ C 孵育 0-8 小时。对照 RNA34 (A)、p21 (B) 和 PUMA (C) 的 RNA 水平按如上所述进行定量,计算出 Δ Ct (Δ Ct, Y 轴)。每个数据点是来源于一式三份的等分全血的平均 \pm 标准偏差。如图 5A 中所示,在各种刺激和对照中,来源于 spiked RNA (RNA34) 的 Δ Ct 全都在 ± 1 之内。这些证实了试验是可重复和可靠的。p21 被用于证实实验条件,如已知它在 DNA 损伤期间经由转录因子 p53 的活化诱导。p21 mRNA 在没有任何刺激下增加了。然而,这三种刺激后 p21 的水平都显著地提高了 (图 5B)。当血液被放射线或者 BLM 刺激时,p21 水平连续 8 小时提高了,而 VP-16 显示出短暂的诱导,在 2-4 小时左右出现一个峰值 (图 5B)。因为目的是确定早期基因标记,所以在 37 $^{\circ}$ C 孵育接近 4 个小时时固定。cDNA 被用于通过 SYBRgreen 实时 PCR 来筛选各种促进凋亡的 mRNA。图 6 显示了筛选各种促进凋亡的 mRNA 的结果。在

图中,肝素化全血由 30Gy 放射线 (A)、20 μ MBLM(B) 或 100 μ MVP-16 (C) 于 37 $^{\circ}$ C 刺激 4 小时,然后定量各种 mRNA。每个条形为来自每个人全血 (5 个用于反射线 (3 个用于 Bcl-2 和 Bcl-w),3 个用于 BLM 和 VP-16) 的一式三份等分试样的 Δ Ct 的平均 \pm 标准偏差。如图 6 所示,所有测试的个体 (5 个用于反射线 (3 个用于 Bcl-2 和 Bcl-w),3 个用于 BLM 和 VP-16) 显示出显著的 p21 诱导, Δ Ct 大于 2。Bax 也被诱导;然而 Δ Ct 小于 p21 的 Δ Ct (图 6)。另外, Bax 也不是完全可靠的标志,因为它在 1 或者 2 个个体中没有被诱导出来,虽然它可以用于这里公开的方法。PUMA 是最主要的 mRNA,它的结果类似于 p21 的那些,反应在所有的个体中均得到了证实 (图 6)。NOXA 在所有的个体中也被诱导出,但诱导的程度要小于 PUMA 的那些 (图 6)。因此,在本方法测定的表明凋亡和这种药效的标记中, PUMA、NOXA 和 BAX 均可以被使用,其中 PUMA 是最优选的 mRNA。虽然应用了这些 mRNA,但本发明也期望通过利用上面描述的 Bcl-2/Bax 家族的其它成员和仅 BH3Bcl-2 家族成员。此外,显示癌细胞对医药制品敏感性的其它 mRNA 的使用也在预期中。例如,ATP 结合盒 (ABC) 亚家族 A-G 的 mRNA 也可以使用。这些基因编码膜转运蛋白,这些蛋白与跨膜生物分子的运输和对生物体内异物的宿主防御机制密切相关。具体地,这些基因包括:ABCA1、ABCA2 变体 1、ABCA2 变体 2、ABCA3、ABCA4、ABCA5 变体 1、ABCA5 变体 2、ABCA6 变体 1、ABCA6 变体 2、ABCA7 变体 1、ABCA7 变体 2、ABCA8、ABCA9 变体 1、ABCA9 变体 2、ABCA10、ABCA12 变体 1、ABCA12 变体 2、ABCA13、ABCB1、TAP1、TAP2 变体 1、TAP2 变体 2、ABCB4 变体 A、ABCB4 变体 B、ABCB4 变体 C、ABCB5、ABCB6、ABCB7、ABCB8、ABCB9 变体 1、ABCB9 变体 2、ABCB9 变体 3、ABCB9 变体 4、ABCB10、ABCB11、ABCC1 变体 1、ABCC1 变体 2、ABCC1 变体 3、ABCC1 变体 4、ABCC1 变体 5、ABCC1 变体 6、ABCC1 变体 7、ABCC2、ABCC3 变体 MRP3、ABCC3 变体 MRP3A、ABCC3 变体 MRP3B、ABCC4、ABCC5 变体 1、ABCC5 变体 2、ABCC6、ABCC8、ABCC9 变体 SUR2A、ABCC9 变体 SUR2B、ABCC9 变体 SUR2A- δ -14、ABCC10、ABCC11 变体 1、ABCC11 变体 2、ABCC11 变体 3、ABCC12 变体 A、ABCC12 变体 B、ABCC12 变体 C、ABCC12 变体 D、ABCC12 变体 E、ABCC13 变体 1、ABCC13 变体 2、ABCC13 变体 3、ABCC13 变体 4、ABCD1、ABCD2、ABCD3、ABCD4 变体 1、ABCD4 变体 2、ABCD4 变体 3、ABCD4 变体 4、ABCD4 变体 5、ABCF1 变体 1、ABCF1 变体 2、ABCF2 变体 1、ABCF2 变体 2、ABCF3、ABCE1、ABCG1 变体 1、ABCG1 变体 2、ABCG1 变体 3、ABCG1 变体 4、ABCG1 变体 5、ABCG1 变体 6、ABCG1 变体 7、ABCG2、ABCG4、ABCG5 和 ABCG8。在这些基因中,特别优选的 mRNA 是对应于 ABCC2 基因产物、包括长春花碱和 ABCG2 基因产物的底物的那些,ABCG2 基因产物已经被鉴定作为负责癌多种抗病性的候选蛋白。

[0091] 为了确认图 6 的结果, PUMA 被进一步通过 TaqMan 实时 PCR 在图 5 所示的相同条件下进行表征。与 p21 不同,基准 PUMA 表达在 37 $^{\circ}$ C 孵育 8 小时期间没有变化。在刺激下, PUMA 迅速地被诱导,其动力学和程度均与 p21 的那些相似 (图 5C)。图 7 中对 RNA34、p21 和 PUMA 也进行了研究。对照 RNA34 的 Δ Ct 没有变化 (图 7)。图 7 中,在用 0-30Gy 放射线 (A)、0-20 μ MBLM(B) 或 0-100 μ MVP-16 (C) 的刺激后,肝素化全血在 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 个小时,然后定量对照 RNA34 (○)、p21 (▲) 和 PUMA (●)。每个数据点是来源于一式三份的等分全血的平均 \pm 标准偏差。p21 和 PUMA 显著的诱导各自出现在超过 0.1 (PUMA)-1 (p21) Gy 的放射线、0.1 μ MBLM 和 100 μ MVP-16 时 (图 7)。

[0092] 对药物诱导的早期凋亡信号的检测可以应用到对白血病和淋巴瘤的药物敏感试验中,所述病症中大多数循环的白细胞是白血病的。为了确定在异常白细胞以及健康个体

的正常白细胞中, p21 和 PUMA 是否是好的凋亡标记 (图 5-7), 进一步采取了临床研究。图 8 显示了三例临床病例: 慢性淋巴细胞性白血病 (A: CLL)、急性骨髓性白血病 (B: AML) 和白血病性非霍奇金淋巴瘤 (C: NHL)。超过 70% 的外周血液白细胞是不正常的。肝素化全血在 37°C 与各种药物孵育两个小时, RNA34、Bax 和 PUMA 被定量。特别地, 来自患有 CLL(A)、AML(B) 和 NHL(C) 的病人的肝素化全血与各种抗癌药物在 37°C 孵育两个小时。然后按如上所述对 RNA34 (□)、p21 (■) 和 PUMA (▣) mRNA 进行定量。每个条形是来源于一式三份的等分全血的 ΔCt 的平均 \pm 标准偏差。使用的化学制品为长春花碱 (VLB, 终浓度 1 μ M), 长春新碱 (VCL, 0.5 μ M), 吡柔比星 (THP, 0.5 μ M), 米托蒽醌 (MIT, 0.1 μ M), 培来霉素 (PEP, 0.5 μ M), 阿克拉霉素 (ACR, 0.1 μ M), 博来霉素 (BLM, 0.5 μ M), 红必霉素 (DNR, 2.5 μ M), 阿得里亚霉素 (DXR, 1 μ M), 依托泊苷 (VP-16, 10 μ M), 卡铂 (CBDCA, 10 μ M), 顺氯氨铂 (CDDP, 10 μ M), 氟达拉滨 (FDB, 1 μ M), 氨甲喋呤 (MTX, 10 μ M), 5-氟尿嘧啶 (5-FU, 10 μ M), 阿糖胞苷 (Ara-C, 10 μ M), 氮烯唑胺 (DTIC, 10 μ M), 环磷酰胺 (CPA, 1 μ M)。因为这些药物在临床实践时是经静脉内给药的, 所以被采用的全血实验是真实临床条件的一种模拟。RNA34 (图 8A-C) 和 BAX (数据未给出) 的结果均小于 1 ΔCt 。如图 8 所示, PUMA 被 MIT 和 DNR 诱导, 其中在 CLL 病人中, p21 不被这些药物中的任何一种诱导。在图 8B 中, 显著的 p21 诱导仅出现于 VLB, 而 PUMA 的大量诱导则由 THP、MIT、PEP、VP-16、CDDP、FDB 和 MTX 得到了证实。图 8C 中的 NHL 病人显示了强烈的抗 THP、MIT、VP-16 和 MTX 的 PUMA 反应, 而 p21 反应均小于 2 ΔCt 。这些结果表明 PUMA 在异常白细胞中是功能性反应的, 这与在正常白细胞中不同, 它在一些病人中比 p21 更灵敏。

[0093] 本技术方案预期通过分析来自于遭受例如癌症的病人的血液, 以在采用的治疗方案中调整药物选择。在预期的方法中, 血液从病人分离并与暴露到预期用于治疗方案的特异的抗癌剂以预期的剂量。适当的抗癌剂包括为治疗癌症开出处方的全部药物; 预期的具体药物包括但不局限于依托泊苷博来霉素、长春花碱、吡柔比星、米托蒽醌、培来霉素、阿克拉霉素、红必霉素、阿得里亚霉素、卡铂、顺氯氨铂、氟达拉滨、氨甲喋呤、5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、氮烯唑胺、环磷酰胺, 和 Katzung 在基本临床药理学 (Basic&Clinical Pharmacology, 2001 年第 8 版, 第 923-958 页) 中论述的药剂, 该文引入本申请作为参考。p21 和 PUMA (或换 NOXA) 的 mRNA 水平随后被测定。优选暴露 7 小时或更少时间后测定。优选暴露 4 小时或更少之后测定。优选暴露 2 小时或更少之后测定。也可以选择暴露其它时间长度后进行测定。适合的测定方法包括, 例如使用 TaqMan 或者 SYBRGreen 体系的实时 PCR, 或者任何其它本领域技术人员已知的适合于 mRNA 水平测定的体系。然后将测定的水平暴露到药剂之前血液中的水平比较, 或优选与对照样品比较, 对照样品中病人的血液暴露到对照载体同样长的时间。这些对照载体包括用于本方法中的溶解了药物在其中的溶剂, 例如二甲基亚砜 (DMSO) 和磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。根据个体病人的血液对治疗方案的反应, 应用的实际方案可以通过增加或减少剂量或改变使用的药剂进行调整。在血癌的例子中, 结果被用于使治愈的概率最大化, 因为该方法提供了如癌性循环血液细胞的治疗方式有效性的直接数据。在实体肿瘤的例子中, 结果被用来评定伴随一个特定方案的副作用如血液白细胞抑制的风险, 以便在使毒性减到最小的同时使治疗的效果最大化。

[0094] 方案 3: 白细胞抑制的评定

[0095] 血样获自健康的志愿者或者患有白血病和淋巴瘤的病人。50 μ L 每种肝素化全

血的一式三份的等分血样与不同浓度的抗癌药物 (BLM, VP-16 和 taxol) 孵育特定长度的时间, 然后纯化 mRNA 并合成 cDNA, 通过上述的 TaqMan 实时聚合酶链式反应 (PCR) 测定 p21、PUMA 和 BAX 的水平。总之, 每个血样被加到 96 孔过滤板以俘获白细胞。在过滤板上加入含有人工 RNA (RNA34) 和特异性引物的混合物的裂解缓冲液, 细胞溶解产物被转移到寡聚 (dT) 固定的微孔板 (GenePlate, RNature, Irvine, CA) 上用于杂交。随后在没有另外的引物时, DNA 在寡聚 (dT) 固定的微孔板上合成并用于在 384 孔板中进行 TaqMan 实时 PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA)。为了证实每个试验条件, 对 spiked RNA 也进行了测定。引物和探针的序列通过计算机软件 Primer Express (Applied Biosystems) 和 HYBsimulator (RNature) 设计。使用的序列在下面表 2 列出。

[0096]

表 2: 引物和探针序列

[0097]

靶	序列 (5'-3')
RNA34	
TaqMan 探针 *	CCAAGGCCCCAGCCCTCACACA (SEQ ID NO:41)
正向引物	AGCCCCCTCACTCCCAA(SEQ ID NO:42)
反向引物	GGGTGCTGTGCTTCTGTGAAC (SEQ ID NO:43)
P21	
TaqMan 探针 *	CCACTCCAAACGCCGGCTGATC (SEQ ID NO:44)
正向引物	TTCTGCTGTCTCTCCTCAGATTCT (SEQ ID NO:45)
反向引物	GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA (SEQ ID NO:46)
PUMA	
TaqMan 探针 *	CCCCGCCCCATCAATCCCA (SEQ ID NO:47)
正向引物	GGGCCAGACTGTGAATCCT (SEQ ID NO:48)
反向引物	ACGTGCTCTCTCTAAACCTATGCA (SEQ ID NO:49)
BAX	
TaqMan 探针 *	TTGTCGCCCTTTTCTACTTTGCCAGCA (SEQ ID NO:50)
正向引物	TTTCTGACGGCAACTTCAACTG (SEQ ID NO:51)
反向引物	GGTGCACAGGGCCTTGAG (SEQ ID NO:52)

[0098] * :5' -FAM, 3' -TAMRA

[0099] 寡聚核苷酸通过 IDT (Coralville, IA) 合成。因为 Ct 是一个对数比例, $1 \Delta Ct$ 通常意味着在数量上的两倍或者一半, 负的 ΔCt 意味着提高的表达。一式三份的等分全血被用作起始材料用于精确的统计分析 (Student' s t-test)。由于 p21 对于细胞周期停滞作出响应, 而 PUMA 属于促进凋亡仅 BH3 基因家族, 所以对这些基因的分析将相应于每种药物的癌细胞抑制和杀细胞的效果。在仅 BAX 和 BH3 的基因家族中的许多促进凋亡基因中, 测定了 PUMA, 与方案 2 中公开的结果一致。在一些情况中也测定了 BAX。

[0100] 使用商业试剂盒 (Puregene, Gentra, Minneapolis, MN), 从经过治疗或没有经过治疗的 $300 \mu l$ 每种全血中纯化基因组 DNA。然后通过 3.5% 琼脂糖 (3 : 1 NuSieve : agarose,

FMC, Rockland, ME) 凝胶电泳分析 DNA, 用 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 溴化乙锭染色, 拍照的图像通过 α -Imager (Alpha Innotech, San Leandro, CA) 记录下来。

[0101] DNA 的断裂, 凋亡的典型标志, 在全血被 VP-16 或 BLM 刺激一天时得到了证实 (图 5A, 插图)。如图 5A 中所示, 在各种刺激和对照中, 来源于 spiked RNA (RNA34) 的 ΔCt 全都在 +1 之内。一式三份的等分全血之间的偏差也小于 $1 \Delta\text{Ct}$ (图 5A-C, 误差线)。这些数据证实了试验是可重复和可靠的。p21 mRNA 在没有任何刺激时增加了。然而, p21 的水平在 VP-16 或者 BLM 刺激下都显著地提高了 (图 5B)。当血液被 BLM 刺激时, p21 水平连续 8 小时提高了, 而 VP-16 显示出短暂的诱导, 在 2-4 小时左右出现一个峰值 (图 5B)。根据如上所示的 VP-16 和 BLM 对 p21 和 PUMA 表达的剂量反应曲线, 在随后的研究中使用 $10\text{-}100 \mu\text{M}$ 的 VP-16 和 $0.2\text{-}20 \mu\text{M}$ 的 BLM。

[0102] 在图 9A 和 C 中, 介质 (DMSO) 处理的血样的 p21 (A) 或 PUMA (C) 的 Ct 值 (X 轴) 与 VP-16 刺激的那些 (Y 轴) 比较。在图中, 一式三份的 $50 \mu\text{L}$ 每种肝素化全血的等分样品与 10 (○) 或 100 (●) μM 的 VP-16 在 37°C 孵育两小时。然后, 按如上所述测定 p21 (A, B) 和 PUMA (C, D) mRNA 的水平。在 A 和 C 中, 比较了未被刺激的样品的 Ct 值 (X 轴) 和被刺激的样品的 Ct 值 (Y 轴)。虚线表示未被刺激的和刺激的样品两者的等值线。实线是对每种剂量的回归线。在 B 和 D 中, 从被刺激样品的 Ct 值中减去未被刺激样品的 Ct 值得到 ΔCt 。在图中, ○表示非应答者, ●表示适中的应答者 (对 B, $n = 9$, 对 D, $n = 6$), ▲表示高应答者。每个数据代表了来源于每个个体一式三份的等分全血的平均 \pm 标准偏差。箭头 1 表示在 $10 \mu\text{M}$ 的 VP-16 时显示出 p21 诱导的一个个体, 箭头 2 表示在 $100 \mu\text{M}$ 的 VP-16 时显示出没有 p21 诱导的另一个个体。

[0103] 如图 9A 所示, 在多数情况下, 低剂量 ($10 \mu\text{M}$) 的 VP-16 未能诱导 p21。然而, 一个个体表达出显著的 p21 诱导 (图 9A: 箭头 1)。回归线是 $y = 1.0529x - 1.7719$ ($r^2 = 0.883$)。当 VP-16 剂量增加到 $100 \mu\text{M}$ 时, 大多数个体显示出增加的 p21 表达。然而, 一个个体显示完全没有诱导 (图 9A: 箭头 2, 9B: 空圈)。回归线是 $y = 0.7936x + 4.427$ ($r^2 = 0.7905$)。基于回归线 $y = 0.7529x + 4.9108$ ($r^2 = 0.625$), VP-16 在 $100 \mu\text{M}$ 时也诱导了 PUMA (图 9C)。有趣的是, 一旦这些资料被转化为图 9B 和 D 所示的 ΔCt , 非应答者 (空圈, $n = 1$)、适中的应答者 (实圆: 对 p21, $n = 9$ 和对 PUMA, $n = 6$) 和高应答者 (实三角形: 对 p21, $n = 2$ 和对 PUMA, $n = 3$) 就被确定。

[0104] 与 VP-16 相反, BLM 在浓度低至 $0.2 \mu\text{M}$ 时在所有情况下均诱导了 p21 和 PUMA (图 10A, C)。在图中, 一式三份的 $50 \mu\text{L}$ 每种肝素化全血的等分样品与 0.2 (△)、 2 (◇) 或 20 (●) μM 的 VP-16 在 37°C 孵育两小时。然后, 按如上所述测定 p21 (A, B) 和 PUMA (C, D) mRNA 的水平。在 A 和 C 中, 比较了未被刺激的样品的 Ct 值 (X 轴) 和被刺激的样品的 Ct 值 (Y 轴)。虚线和实线同图 9。在 B 和 D 中, 从被刺激样品的 Ct 值中减去未被刺激样品的 Ct 值得到 ΔCt 。在图中, ○表示非应答者, ●表示适中的应答者 (对 B, $n = 22$, 对 D, $n = 20$), ▲表示高应答者。每个数据代表了来源于每个个体一式三份的等分全血的平均值。

[0105] p21 对 0.2 、 2 和 $20 \mu\text{M}$ 的 BLM 的回归线分别是 $y = 0.8487x + 3.8275$ ($r^2 = 0.8367$)、 $y = 0.8082x + 4.513$ ($r^2 = 0.8444$) 和 $y = 0.8146x + 3.7147$ ($r^2 = 0.7552$)。PUMA 反应类似于 p21 的那些, PUMA 对 0.2 、 2 和 $20 \mu\text{M}$ 的 BLM 的回归线分别是 $y = 0.8387x + 3.7409$ ($r^2 = 0.8654$)、 $y = 0.793x + 4.4688$ ($r^2 = 0.7254$) 和 $y =$

$0.8764x+1.6353 (r^2 = 0.7546)$ (图 10C)。当这些资料被转化为 ΔCt , 非应答者 (空圈, $n = 1$)、适中的应答者 (实圆 : 对 p21, $n = 22$ 和对 PUMA, $n = 20$) 和高应答者 (实三角形 : $n = 3$) 就被确定 (图 10B 和 D)。

[0106] 图 11 总结了其中 p21 和 PUMA 被分析用于 VP-16 和 BLM 刺激的例子, 在图中, 图 9-10 的数据被重新绘图以比较 p21 (○) 和 PUMA (▲) 反应 (A), 和 VP-16 (▲) 和 BLM (●) 反应 (B)。实线同图 9 和 10。每个数据代表了来源于每个个体一式三份的等分全血的平均 \pm 标准偏差。图 11A 中, 通过 p21 鉴别的高和低应答者也被确定为与通过 PUMA 鉴别的应答者相似。同样地, 如图 11B 所示, 抗 VP-16 的高和低应答者也被确定为抗 BLM 的高和低的应答者。为了研究药物反应的每日变化, 在 1-3 天内从相同个体抽取血样将实验重复两次。结果在图 12 中显示。标记是来自每个个体的平均 \pm 标准偏差, 在图中, 分别地, ● 表示 2μ MBLM 诱导的 p21, ○ 表示 2μ MBLM 诱导的 PUMA, ◆ 表示 20μ MBLM 诱导的 p21, ◇ 表示 20μ MBLM 诱导的 PUMA, ▲ 表示 100μ MVP-16 诱导的 p21, △ 表示 100μ MVP-16 诱导的 PUMA, 和表示对照未被刺激的 RNA34。实线为两个数据相等的线。虚线是 $\pm 0.5 \Delta Ct$ 。如图 12 所示, VP-16 和 BLM 诱导的 p21 和 PUMA 的诱导在两个样品间是可比较的, 偏差在 $+0.5 \Delta Ct$ 之内。

[0107] 相同的方法被用于不同类的抗癌药物 taxol。Taxol 是一微管毒药, 已经表明它对凋亡的诱导增加了促进凋亡的 BAK 和 BAX 的表达。然而, taxol 对血细胞的效果是非常弱的, IC_{50} 大于 $10 \mu M$ 。在本研究中, 甚至在浓度高达 $100 \mu M$ 时, taxol 也未能诱导所有个体中 p21 和 PUMA 的 mRNA (图 13)。在图中, 一式三份的 $50 \mu L$ 每种肝素化全血的等分样品与 10 或 $100 \mu M$ 的 taxol 在 $37^\circ C$ 孵育两小时。然后, 按如上所述测定 p21 和 PUMA, ΔCt 按如上所述计算。每个数据代表来源于每个个体一式三份的等分全血的平均值。Taxol 使用浓度不高于 $100 \mu M$, 因为比 $100 \mu M$ 更高的浓度超出了血液水平。

[0108] 图 14 显示了 BAX 表达与 p21 和 PUMA 的表的比较。在图中, 一式三份的 $50 \mu L$ 每种肝素化全血的等分样品与 $100 \mu M$ 的 VP-16 (A) 或 20μ MBLM (B) 在 $37^\circ C$ 孵育两小时。然后, 按如上所述对 BAX、p21 和 PUMA mRNA 进行定量, ΔCt 按如上所述计算。每个数据点代表一式三份测定的平均值。BAX 对 VP-16 和 BLM 的反应显著小于 p21 和 PUMA 的那些 ($p < 0.01$)。在图 15 中, BLM 在健康供体中诱导的 p21 反应与在白血病和淋巴瘤病人中进行比较, 其中超过 80% 的白细胞是白血病细胞, 在图中, 一式三份的 $50 \mu L$ 每种肝素化全血的等分血样在有或没有 1μ MBLM 时在 $37^\circ C$ 孵育两小时。然后, 按如上所述对 p21 mRNA 进行定量。[来源于 27 个健康供体的血样的 ΔCt 值与来源于 13 个病人的血样的 ΔCt 值进行比较, 所述病人患有白血病和淋巴瘤, 血液中超过 80% 的白细胞是癌细胞。每个数据点是来自一式三份的测定的平均值。有趣地是, 在白血病和淋巴瘤群体中的 BLM 反应要显著小于在健康对照中的, 这意味着这些癌细胞对 BLM 有抗性。这些证实了 BLM 不是用于这些疾病药物的合适选择的这个事实。

[0109] 目前体外基因表达分析是足够灵敏的, 它可以从少至 $70 \mu L$ 的全血 ($50 \mu L$ 的实际容积加上 $20 \mu L$ 储备) 中检测出药物诱导的凋亡相关 mRNA 的基因表达, 提供对来自于 1 血管 ($6 mL$) ($6000/70/3 = 28.6$) 的一式三份 28 套数据的分析。这些对于只需要 11 套数据、研究 3 剂量 ($0.2-100 \mu M$) 的三种药物 (VP-16、BLM 和 taxol) 加上未被刺激的对照 (DMSO 用于 VP-16, PBS 用于 BLM 和 taxol) 足足有余。同血清实验不同, 血清实验中从 $6 mL$ 血液回

收的血清体积在个体间存在差异,而全血实验容许对来自固定体积的血液进行详细分析的设计。传统的试验使用悬浮在人工培养介质中的分离的单核细胞。虽然这些试验是用于细胞本身的极好的研究模型,但它们忽视了细胞-细胞和细胞-血浆的相互作用,以及对人生理条件的总体了解的不可避免的考虑。作为ACD和EDTA螯合钙,一种适合于许多生物学活性的重要组分,肝素是优选的抗凝剂。

[0110] 由于mRNA转录是蛋白质合成的上游事件,它发生在刺激之后的两个小时内,所以进行mRNA分析的条件要比随后的蛋白质分析或生物学活性检测要更接近于生理条件,后者需要较长的孵育时间。孵育得越久,越多的副效应可能发生。当考虑个体-个体的差异时,这些尤其重要。mRNA分析也具有使用基因扩增技术的优点,它使得检测比蛋白质分析或者基于细胞的功能分析更灵敏,50 μ L的全血就足以分析至少20个基因。

[0111] 虽然基因扩增技术能够检测试管中单一拷贝的靶基因,但当研究基因表达的正负调节时,分析灵敏度依赖于每个数据集的偏差。例如,如果两个数据集的变异系数(CV)在所有情况下为10%,通过统计显著性可以检测在基因表达方面约20%的改变。如果CV变成30%,对于统计显著性需要超过70%的变化。体外全血分析涉及大量能增加CV的因素。例如,粘滞全血的移液、RNA分离步骤、cDNA合成反应和PCR都会引起偏差。因为PCR按指数规律地扩增了靶基因,任何步骤中的小偏差最后变成大得无法接受。另外, Δ Ct的偏差变得非常大是因为它是两项分析的多重加和。即使当一式三份的全血等分血样被用作起始材料和计算了 Δ Ct时,本方法也只显示出极小的偏差。作为结果,确定药物诱导的p21、PUMA和BAX的上调方面的细微变化是可能的

[0112] 如果某些药物(例如VP-16和BLM)(图13-14)在体外生理条件下诱导p21和PUMA,那么这种药物在个体中应该比阴性药物(如taxol)的那些(图13)更可能诱导白细胞问题。值得注意的是,一个个体未能诱导p21和PUMA,甚至是在VP-16的浓度高达100 μ M时(图9),如果那些药物被应用,这样的个体将会有低的白细胞抑制的危险。癌细胞对BLM的反应性也很小(图15)。对这些非应答者或者高应答者的鉴定将使得对人类药物反应性和抗性的分析成为可能,这是动物或者培养的细胞试验所无法取代的。

[0113] 方案4:癌症治疗中的临床结果

[0114] 为了表明用于本发明的定制用药的方法在临床上产生了有益的结果,上面描述的方法被用于研究9个患有不同形式淋巴瘤和白血病的病人。病人群体在以下的表3中列出。在表中,“FL”表示滤泡性淋巴瘤,“MCL”表示套细胞淋巴瘤,“AML”是急性骨髓性白血病(M2表示阶段),“T-”表示T细胞类型,和“ALL”表示急性淋巴母细胞性白血病。

[0115] 表3:临床病人群体

[0116]

年龄/性别	诊断	早先的 Rx	染色体异常/表面标记
1 60F	FL	(-)	46XX:
2 66F	MCL	(-)	CD5-,10+,19+,20+,23+,DR+ CD5+,10-,19+,20+,cyclinDI+
3 71M	T-ALL	(-)	
4 41M	AML (M2)	(-)	t(8,21),t(10,20),del(9) (q21q31q31): CD13+,33+,34+,DR+
5 39F	t-AML	AraC,DNR,MIT,VP -16 IDR,ACR,I-PAM- 抗性	染色体 5 和 7 异常 CD13+,33+,34+,DR+
6 45F2	AML (M2)	(-)	del11q21,t(120)(q34,p13); [0117] CD13+,33+,34+,DR+
7 64M	AML (M2)	(-)	add(7)(q22),+8,+9: CD13+,33+,34+,DR+
8 57F	AML (M2)	(-)	46XX: CD13+,33+,34+,7+,19+,56+,D R+
9 75F	AML (M2)	(-)	t(3;8): CD13+.33+,34+,19+,5R+,DR+

[0118] 将病人的全血暴露到列于下面表 4 的药物,按如上所述的在暴露 4 小时后测定病人白细胞中的 p21、BAX 和一些例子中的 PUMA 的水平。对照血样只是暴露到对照载体溶剂(DMSO 或者 PBS,如表 4 所示),按如上所述的从测定的 mRNA 值中计算 Ct 和 ΔCt 。

[0119]

表 4:使用的抗癌药物

[0120]

	药物	最终剂量	溶剂
CPA	环磷酰胺	10 μ M	PBS
NIM	尼莫司汀 (Nimustine)	10 μ M	PBS
AraC	阿糖胞苷	10 μ M	PBS
5-FU	氟尿嘧啶	10 μ M	PBS
DXR	阿得里亚霉素	1 μ M	PBS
DNR	红必霉素	10 μ M	PBS
BLM	博来霉素	1 μ M	PBS
ACR	阿克拉霉素	0.1 μ M	PBS
PEP	培来霉素	1 μ M	PBS
VCR	长春新碱	1 μ M	PBS
VBL	长春花碱	1 μ M	PBS
CBFCA	卡铂	10 μ M	PBS
CDDP	顺氯氨铂	10 μ M	PBS
MIT	米托蒽醌	0.1 μ M	PBS
DTIC	氮烯唑胺	10 μ M	DMSO
L-PAM	米尔法兰 (Melphalan)	10 μ M	DMSO
Flu	氟达拉滨	1 μ M	DMSO
MTX	氨甲喋呤	10 μ M	DMSO
IDR	去甲氧基柔红霉素	10/1M	DMSO

[0121]

(Idarubicin)			
THP	Therarubicin	1 μ M	DMSO
VP-16	依托泊苷	10 μ M	DMSO

[0122] 结果在图 16 和 17 中显示,列于表 5 中。从图中可以看出,这些药物显示出 p21 或者 PUMA mRNA 的增加在病人到病人之间变化相当大。虽然在该相对小的病人群体中,BAX 普遍不被诱导,但本方法仍然包括对作为抗癌药物活性可能标记的 BAX 和 Bcl-2/BAX 家族另一个成员的测定。如图所示,作为在选择病人中用不同药物刺激的结果, p21 和 PUMA 均显示了提高的 mRNA 水平。

[0123]

表 5 :临床结果

[0124]

	WBC/ μ l (%bl)	处理	包括的敏感性药物	临床结果	判断 mRNA/临床的*
1	200 (92%)	CHOP	无	C	-/-
2	3,900 (52%a)	R-COP	无	C	-/-
		R-THP-CVPE	THP (p21) **	B	+/+
3	2,600(34%)	VP	VDS (p21)	B	+/+
4	25,800 (76%)	CAG	无	C	-/-
5	45,300 (85%)	RI	MIT,VP-16 (p21)	A	+/+
6	5,400(46%)	RI	DNR (p21,PUMA)	A	+/+
7	163,300 (54%)	RI	无	A	-/+
8	28,300 (49%)	RI	AraC,DNR (p21,PUMA) VP-16 (p21)	B	+/+
		CAG	ACR (p21,PUMA)	A	+/+
9	120,000 (78%)	CA	无	C	-/-
		VA'	无	C	-/-

[0125] 表 5 显示了使用任一种药物 (“敏感性药物”) 或其它药物的改进型治疗的结果, 其中使用的任一种药物的单独效力是通过本发明的方法获得的结果而暗示的。在表中, CHOP 表示用 CPA、Adriacin (ADR: 阿得里亚霉素)、VCR 和 predonisolone (PSL) 治疗; R- 表示利妥昔单抗; COP 表示用 CPA、VCR 和 PSL 治疗; VP 表示用 VDS 和 PSL 治疗; RI 表示用 AraC、DNR、MIT 和 VP-16 治疗; CAG 表示用低剂量 AraC、ACR 和 G-CSF 治疗; CA 表示用低剂量 AraC 和 ACR 治疗; 和 VA 表示用低剂量 AraC 和低剂量 VP-16 治疗。VDS 表示长春地辛。在“判定”栏, A 表示完全缓解, B 表示改善的血液学的试验结果, 和 C 表示没有改善。

[0126] 一些病人治疗不只一次。如表所示, 用敏感药物治疗的所有七种处理均引起了 mRNA 标记的增加和良好的临床结果 (图中显示为“+/+”)。其中, 三种完全缓解 (在临床结果为“A”)。受益于敏感药物疗法的病人中的两个对用非敏感药物的标准药物疗法没有反应。用非敏感药物治疗的六种处理中, 仅仅一个产生了良好的临床结果。其余显示没有改善。

[0127] 本发明的方法因此表明了药物方案适合于每个病人, 当接受相应的药物方案后产生了改善的临床结果, 包括在一半成功治疗病例中得到了完全缓解。这显然表明本发明的方法在个体病人的癌症病例中对定制治疗方案有用, 所述定制治疗方案是基于病人患病白细胞的药物敏感性, 如反映在那些白细胞内部的标记 mRNA 水平的变化。

[0128] 结果也显示在阳性 mRNA 结果与良好的临床结果之间有紧密的相关:除了一个结果之外都是 +/+ 或者 -/-。这些相关表明该方法也可用于定制治疗方案以避免在用化疗治疗实体肿瘤的例子中的白细胞抑制。如果在全血分析中,白细胞显示出标记 mRNA 适应于药物的显著增加,那么在用药物治疗期间,该病人白细胞的生长停滞或者凋亡有可能引起白细胞抑制。

[0129] 方案 5:用于免疫抑制的定制给药

[0130] 血液取自健康成人和患有干癣 (4)、再生障碍性贫血 (1)、肾病综合征 (1) 和骨髓移植 (2) 的病人。在血液提取的时候,一个 EDTA 管被送去临床实验室用于白细胞计数的测定,一个肝素管被存储在冰上。血液等分样品在有或没有 CsA 时在 37°C 被植物血细胞凝集素 -P (PHA-P) 刺激不同长度的时间。50 μ L 每种血样被加入过滤板的三个不同孔 (从最初起的一式三份的),通过在 800xg 离心 2 分钟在膜上收集白细胞。一旦离心后用 300 μ L 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 冲洗每个孔,上面描述的裂解缓冲液被加到每个孔中,于 37°C 孵育 10 分钟以从俘获的白细胞中释放出 mRNA。随后,通过以 2000xg 离心 5 分钟将裂解产物转移到寡聚 (dT)-固定的微量板 (GenePlate, RNAture) 中,在 4°C 孵育过夜用于杂交。用 100 μ L 裂解缓冲液冲洗每个孔三次后,接着用 150 μ L 的清洗缓冲液 (10mM Tris, pH7.4, 1mM EDTA, pH8.0 和 0.5M NaCl) 清洗三次,通过在每个孔中加入缓冲液、核苷酸、特异性引物的混合液、RNasin 和 MM LV 逆转录酶 (Promega, Madison, WI) 并于 37°C 孵育两个小时合成 cDNA。生成的 cDNA (4 μ L) 被用于 TaqMan 实时 PCR,置于 384 孔微孔板中,使用热循环仪 (ABI, PRISM7900),其终浓度为 10 μ L。

[0131] 图 18 显示了健康成人中 IL-2mRNA 经 PHA-P 的剂量依赖性诱导的结果。如图 18 所示,IL-2mRNA 从 5 μ g/mL PHA-P 时开始增加,在 40 μ g/mL PHA-P 时达到一个峰值 (图 19)。在图 19 中,三角形表示 10 μ g/mL 的 CsA 浓度,而菱形表示 40 μ g/mL 的浓度,圆形表示 100 μ g/mL 的浓度。为了使个体差异最小化,100 μ g/mL 的 PHA-P 被用于随后的分析。PHA-P 用于长期对淋巴细胞转化的诱导,其中 PHA-P 的作用在 10-20 μ g/mL 时最大,在更高的剂量时活性下降。IL-2mRNA 数据是不同的,即使当 100 μ g/mL PHA-P 使用时,其活性持续很高 (图 19)。也可以使用其它的植物凝血素如商陆丝裂素。与需要在培养基中花费 3-5 天的淋巴细胞转化分析不同,在全血中的 mRNA 分析仅需要 1-2 小时。在全血中短时间的孵育模仿了生理条件,基本上减少了分析偏差。

[0132] 不同浓度的 CsA 与健康自愿者的肝素化全血在 37°C 孵育 30 分钟,然后由 10 μ g/mL PHA-P 在 37°C 诱导 IL-2mRNA 两个小时。如图 20 所示,IL-2mRNA 的转录被 50-2000ng/mL 的 CsA 以一种剂量依赖性方式抑制,IL-2mRNA 的表达几乎被抑制了 100% (图 20)。在图 3 中,在加入 PHA-P 前的 30 分钟在血样中加入 CsA。然而,当 CsA 和 PHA-P 同时加入后鉴别到了相似的抑制 (数据未显示)。另外,即使使用了 100 μ g/mL PHA-P 时,CsA 的抑制作用仍然存在 (图 21)。为了使分析偏差最小化,我们使用了 100 μ g/mL PHA-P 用于随后的实验。

[0133] 图 19 中显示的对 15 个健康供体的试验在一个月的周期内重复,每个实验中用 1-5 个血样。每个样品中 CsA 的浓度为 0、100 和 500ng/ml。如图 22 所示,所有 15 个健康供体显示了超过 40% 的显著的抑制。有趣地是,100ng/ml CsA 时,健康的供体被分成两组:大约 1/3 的高应答者 (空圈) 和 2/3 低应答者 (实圆)。这表明临床实用性:低应答者可以给予高剂量的 CsA,或转换成 FK,和高应答者可以给予低剂量的 CsA 以减少任一副作用的可能

性。

[0134] 接着,在服用了 CsA 或者 FK 的健康成人和病人之间进行了比较。结果在图 23 中显示。在图中,IL-2mRNA 的值除以每个样品中的白细胞数目,因为白细胞计数在病人之间变化很大。在图中,实圆表示健康成人,空圈表示 CsA 病人和空三角形表示 FK 病人。病人具有以下疾病:1:骨髓移植性白血病,2:干癣,3:再生障碍性贫血,4:干癣,5:干癣,6:干癣,7:用骨髓移植性白血病和 8:肾病综合症。X 轴是没有 PHA-P 刺激的 IL-2mRNA 的基线值,Y 轴是 PHA-P 刺激后的值。实圆是来自健康成人的数据,空圈和三角形是来自于 CsA 或者 FK 病人的数据。如图 23 所示,具有低的基线 IL-2mRNA 的病人显示微弱的诱导。因此,当计算变化百分数(%)时,这些组之间没有显著差异。然而,一旦数据被转化成如图 6 所示的二维图表时,病人的绘图清楚地区别于那些健康成人。对于健康成人和病人的基线 IL-2mRNA 分别是 0.16 ± 0.10 和 0.03 ± 0.03 ,具有统计显著性 ($p = 0.001$)。在 PHA-P 刺激后,对于健康成人和病人,IL-2mRNA 分别是 26.68 ± 12.03 和 10.86 ± 16.97 ,具有统计显著性 ($p = 0.007$)。病人案例号 1 显示随高的 PHA-P 反应的低基线 IL-2 mRNA,表明了与其他病人相比,药物处理没有效果。病人案例号 4 显示对那些健康成人的下限相似的反应,也表明弱的药物反应。虽然药物反应是每个病人中合成物生物学活性的总和,但该功能的易感性分析将提供给临床医生有用信息以用于给他们的病人用药。

[0135] 图 24A 和 24B 显示了基线(图 24A)或者递送 PHA-P 刺激的 IL-2 mRNA(图 24B)和 CsA 的血液水平之间的关系。mRNA 值除以白细胞数目。如图所示,没有明确的关系被鉴定。由于 CsA 的血液水平在这些病人中约为 100ng/ml,其中存在高或低的应答者(图 22),所以这种功能分析相比药物浓度的简单测定具有优势,因为它可以区分这两个群体。

[0136] 图 25 显示了当 FK 被使用时的结果。虽然因为小的群体规模不可能有明确的结论,但使用 FK 的这种方法将是有益的也是可以预期的。

序列表

<110> 日立化成工业株式会社
日立化成研究中心公司
三桥将人

<120> 通过定量 mRNA 定制给药的方法

<130> HITACHI. 066VPC

<150> 60/620, 603

<151> 2004-10-20

<150> 60/653, 557

<151> 2005-02-16

<150> 60/688, 741

<151> 2005-06-08

<160> 52

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400> 1

ttctgctgtc tctctcaga tttct

25

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>2

ggattagggc ttcctcttgg a

21

<210>3

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸探针序列

<400>3

ccactccaaa cgccggtga tc

22

<210>4

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>4

agaaccagga aacggaaaca ga

22

<210>5

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>5

tctccttcat gcgctgcttt

20

<210>6

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>6

gggtcagaga attgctgata atcat 25

<210>7

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>7

ccccgtttgt tcctgataaa ct 22

<210>8

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>8

tgcgctgctc tgccttct 18

<210>9

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>9
ccatgggtag cagctccttc t 21

<210>10
<211>23
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>10
cacaggagaa tggataaggc aaa 23

<210>11
<211>23
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>11
catccagcca gatttaggtt caa 23

<210>12
<211>17
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>12
tccg'gcac ettetct 17

<210>13
<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>13

cccaaagaca aagaaggcta caa 23

<210>14

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>14

catgtgtgtg gagagcgtca a 21

<210>15

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>15

gccggttcag gtactcagtc a 21

<210>16

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>16
gggcccagac tgtgaatcct 20

<210>17
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>17
acgtgctctc tctaaacctg tgca 24

<210>18
<211>19
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡聚核苷酸探针序列

<400>18
ccccgcccc tcaatccca 19

<210>19
<211>20
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>19
ctcaggaggt gcacgtttca 20

<210>20
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>20

ttccaagggc acccatga 18

<210>21

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>21

gggagcccag agcttgaaa 19

<210>22

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>22

gcgctgtctt tactctccac ttc 23

<210>23

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>23

tccaggacag ttggatattg tca 23

<210>24

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>24

taaggagcag gcacagagaa aga 23

<210>25

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>25

aaatattccc cccaaggagt tc 22

<210>26

<211>19

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>26

cgctcgtggtt cctcatgct 19

<210>27

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>27

tcctatggct ctgcaattgt ca 22

<210>28

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>28

ggcaggagtg aatggctctt c 21

<210>29

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>29

catacacttt ttctctttcc atgacatc 28

<210>30

<211>20

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>30

gggcatcgca gtagcttctg 20

<210>31

- <211>22
<212>DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列
- <400>31
caggcctatg caaaaagagg at 22
- <210>32
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列
- <400>32
cgcaccggaa gggaatct 18
- <210>33
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列
- <400>33
ggcaggcgac gagtttga 18
- <210>34
<211>27
<212>DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>34
gttcccatag agttccacaa aagtatc 27
<210>35
<211>22
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>35
tcacatgctg gttgcttaat cc 22

<210>36
<211>19
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>36
gcacaaggac cccatcaca 19

<210>37
<211>21
<212>DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>37
cacggcagag aatgcctatg a 21

<210>38
<211>20
<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>38

cccaattgat gccactctca 20

<210>39

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>39

tttctgacgg caacttcaac tg 22

<210>40

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>40

ggtgcacagg gccttgag 18

<210>41

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸探针序列

<400>41

ccaaggccca gccctcacac a 21

<210>42

<211>18

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>42

agccccctca ctcccaaa 18

<210>43

<211>21

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>43

gggtgctgtg cttctgtgaa c 21

<210>44

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的寡聚核苷酸探针序列

<400>44

ccactccaaa cgccggctga tc 22

<210>45

<211>25

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>	
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列	
<400>45	
ttctgctgtc tctcctcaga tttct	25
<210>46	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列	
<400>46	
ggattagggc ttcctcttgg a	21
<210>47	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡聚核苷酸探针序列	
<400>47	
ccccgccccca tcaatccca	19
<210>48	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列	
<400>48	
gggcccagac tgtgaatcct	20

- <210>49
<211>24
<212>DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列
- <400>49
acgtgctctc tctaaccta tgca 24
- <210>50
<211>27
<212>DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡聚核苷酸探针序列
- <400>50
ttgtgcacct tttctacttt gccagca 27
- <210>51
<211>22
<212>DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列
- <400>51
tttctgacgg caacttcaac tg 22
- <210>52
<211>18
<212>DNA
<213> 人工序列
- <220>

<223> 合成的寡聚核苷酸引物序列

<400>52

ggtgcacagg gccttgag

18

2011274

102005

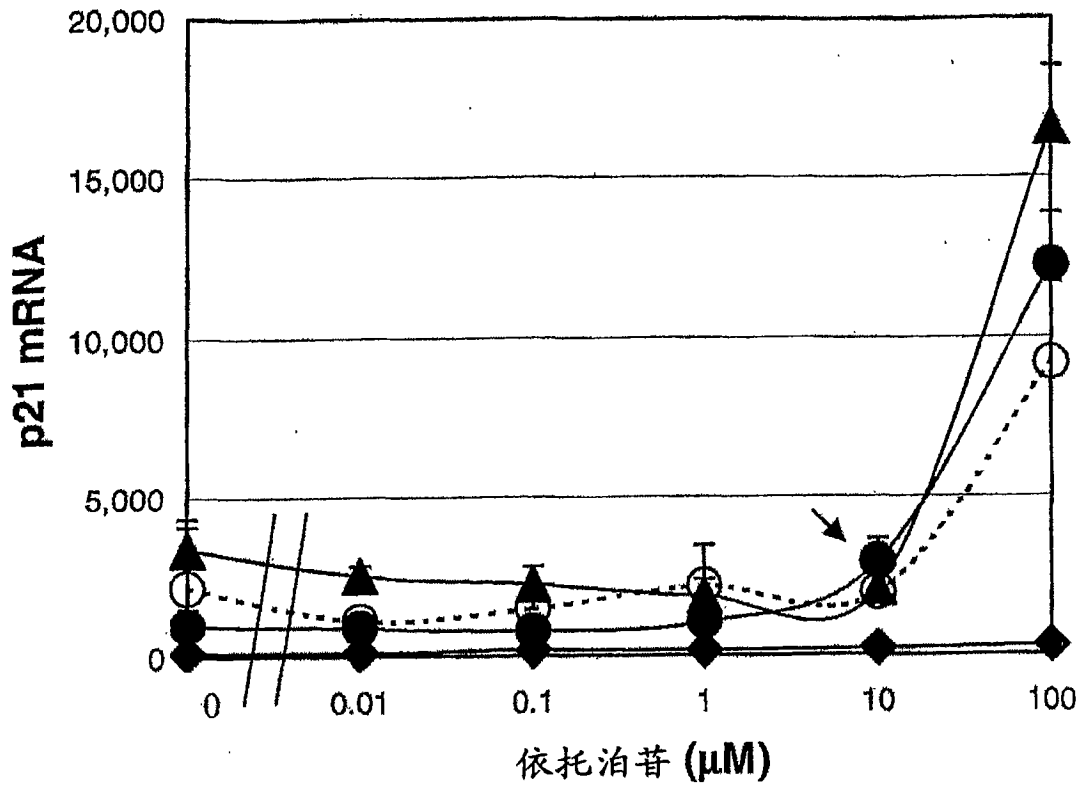


图 1

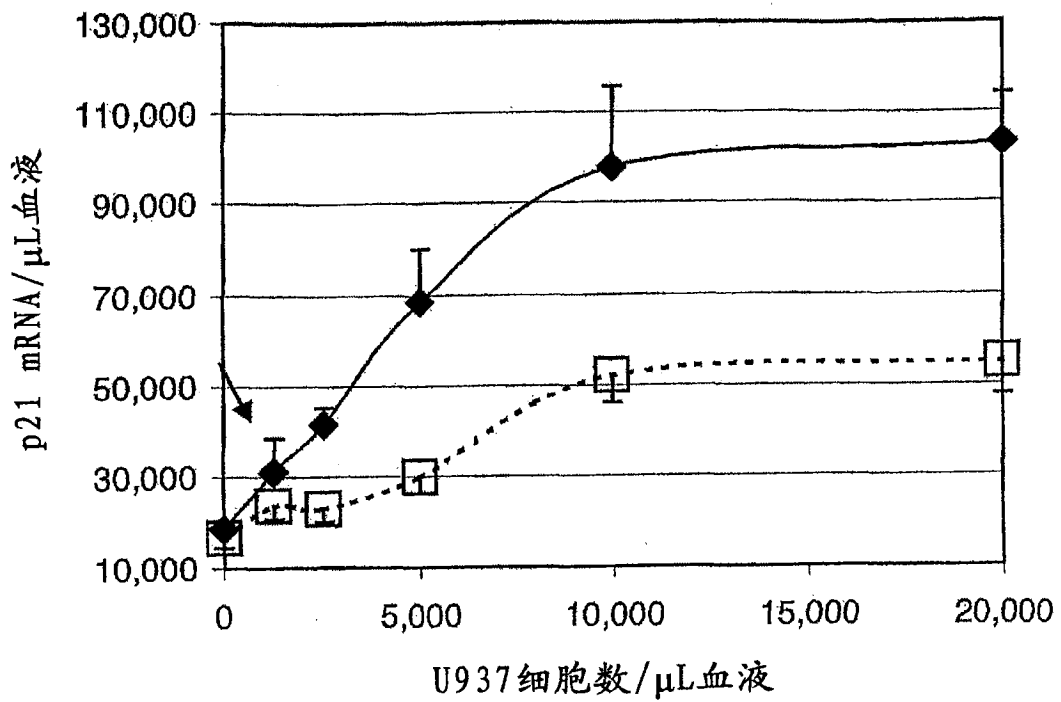


图 2

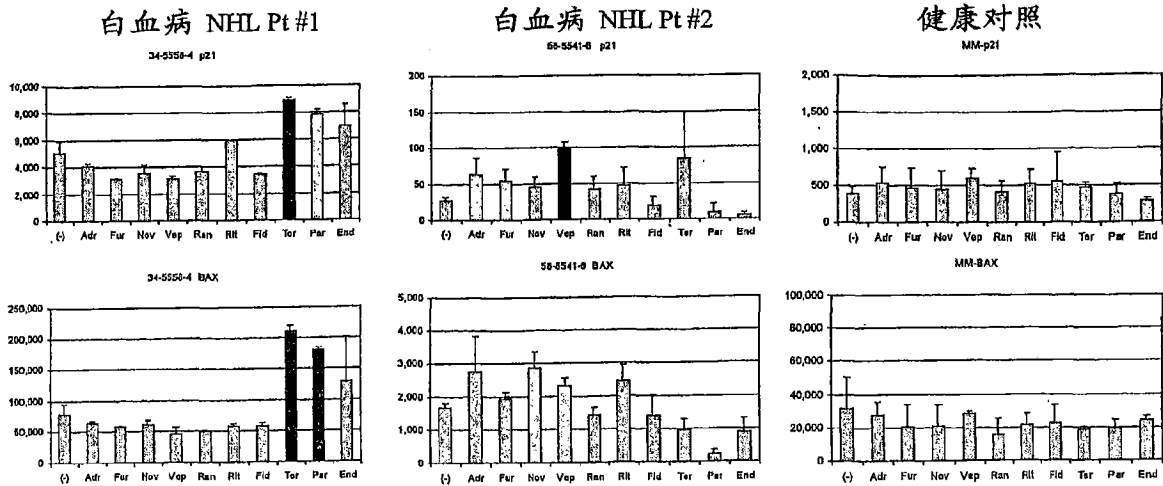


图 3

临床过程 (病例2)

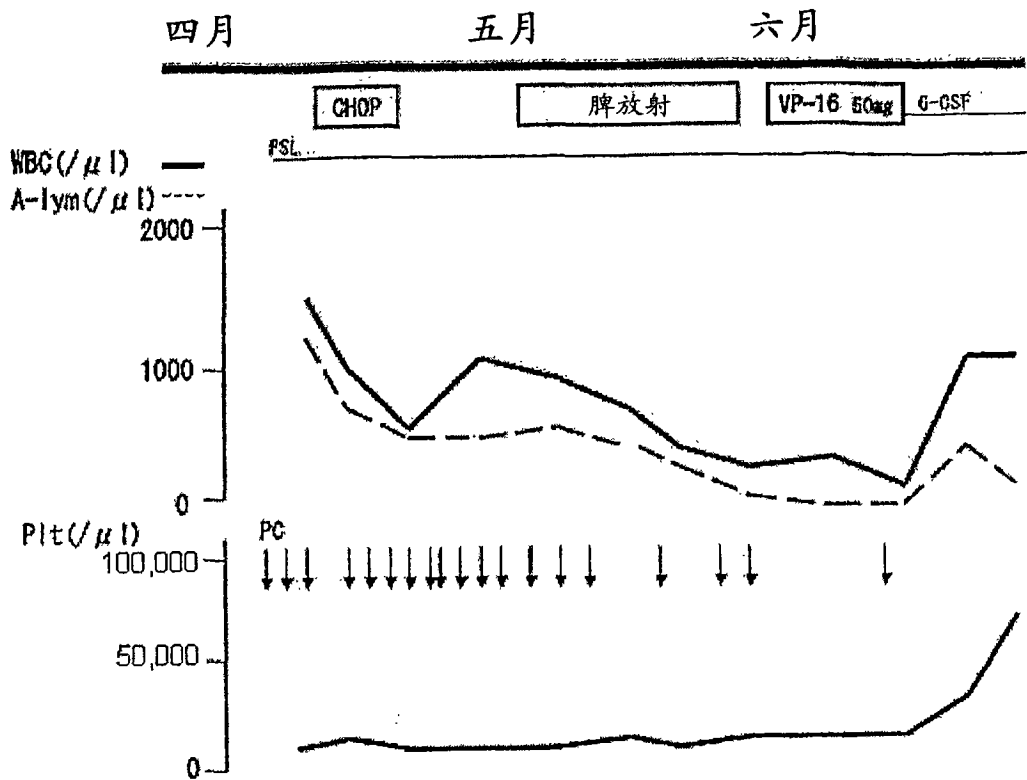


图 4

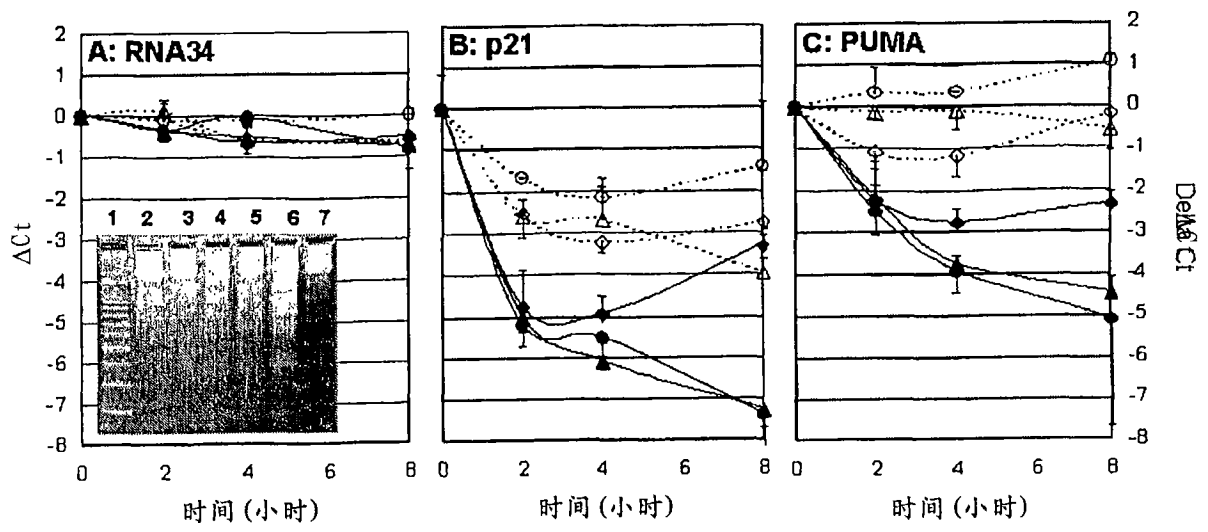


图 5

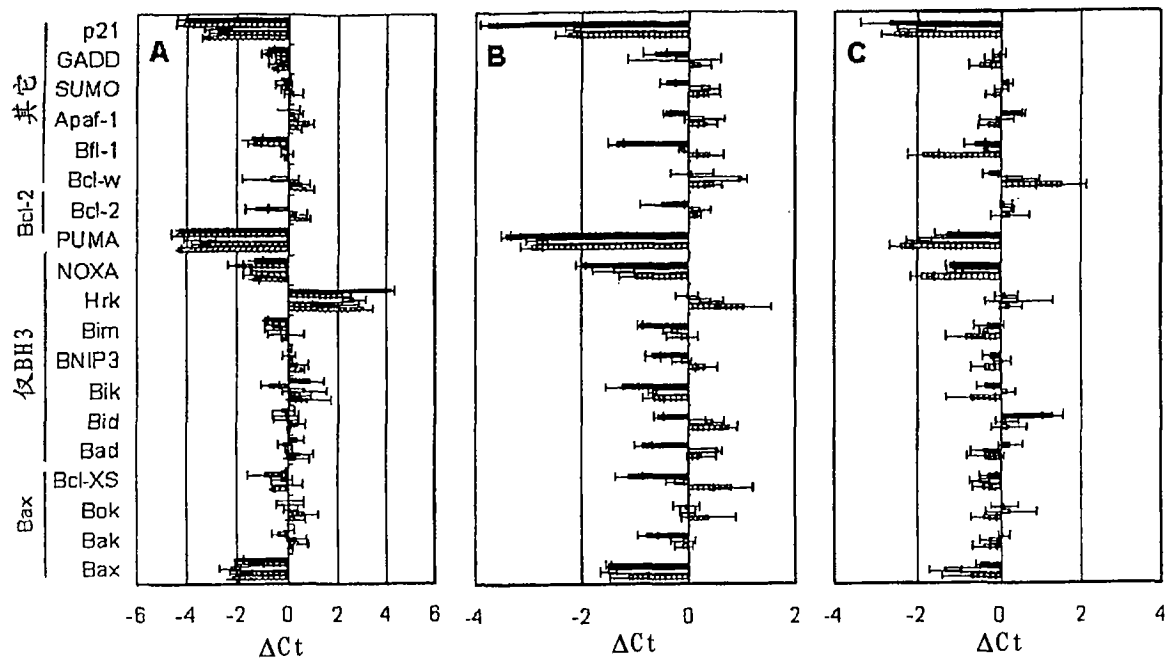


图 6

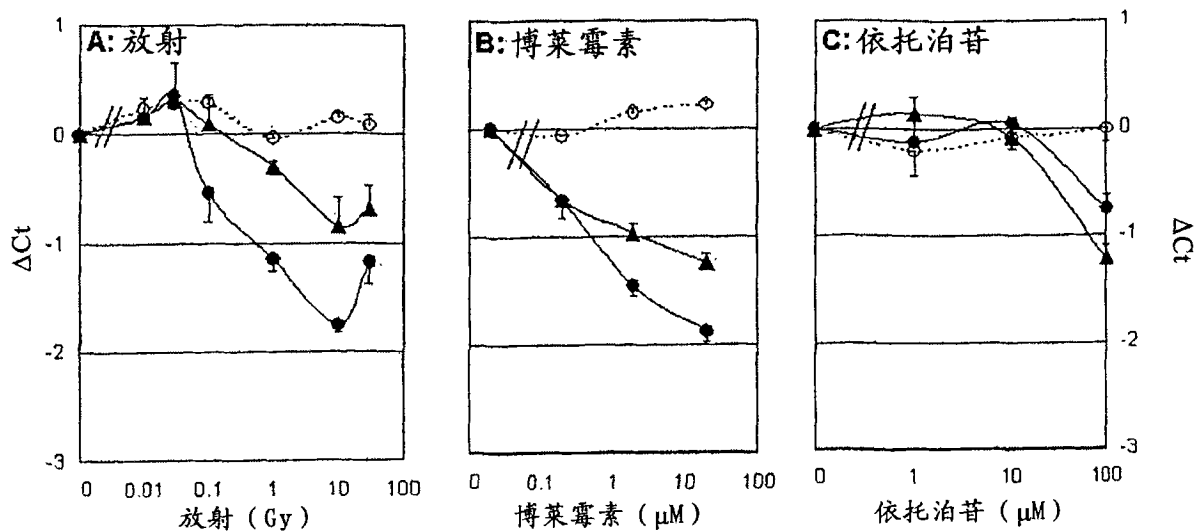


图 7

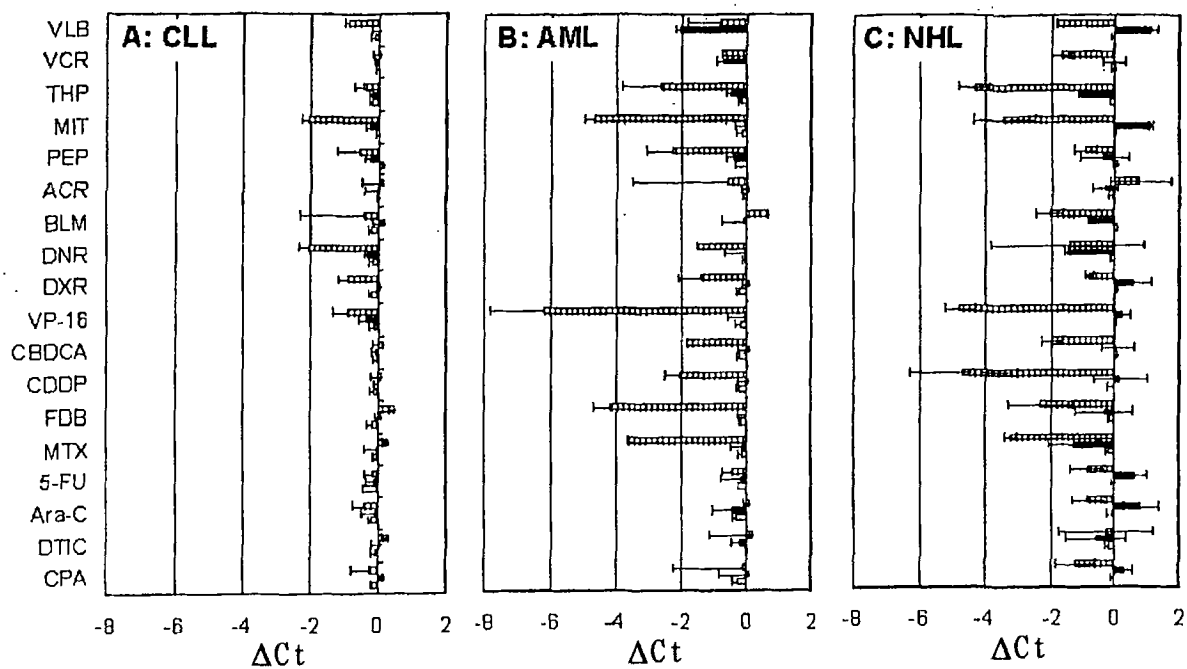


图 8

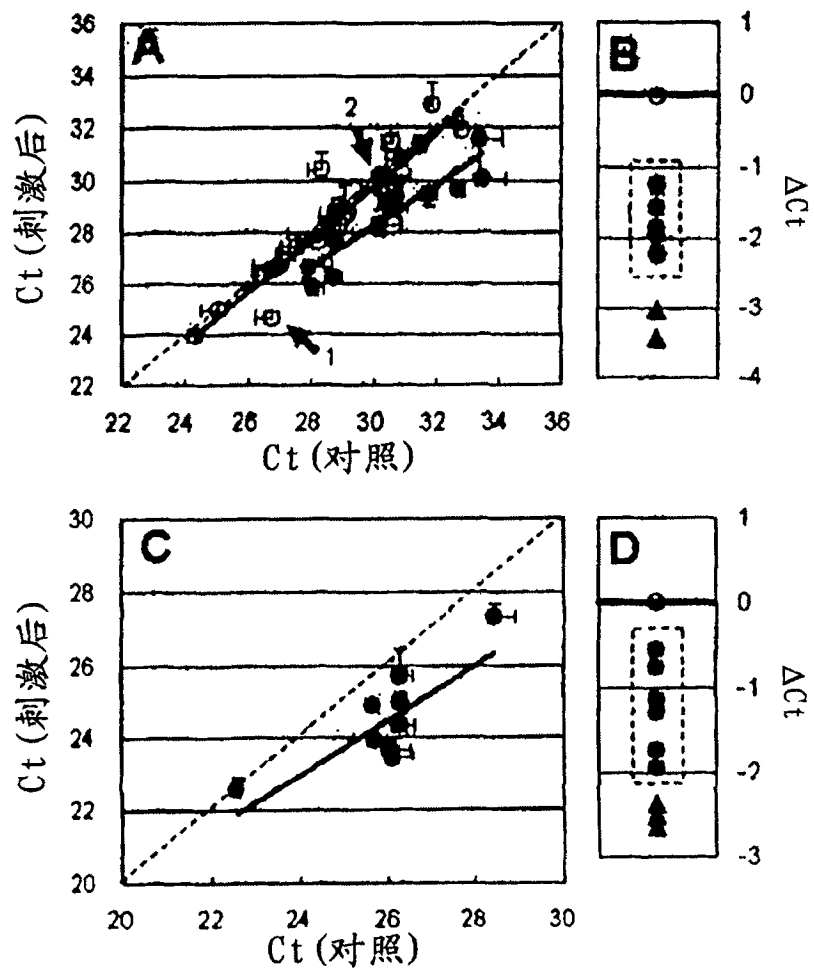


图 9

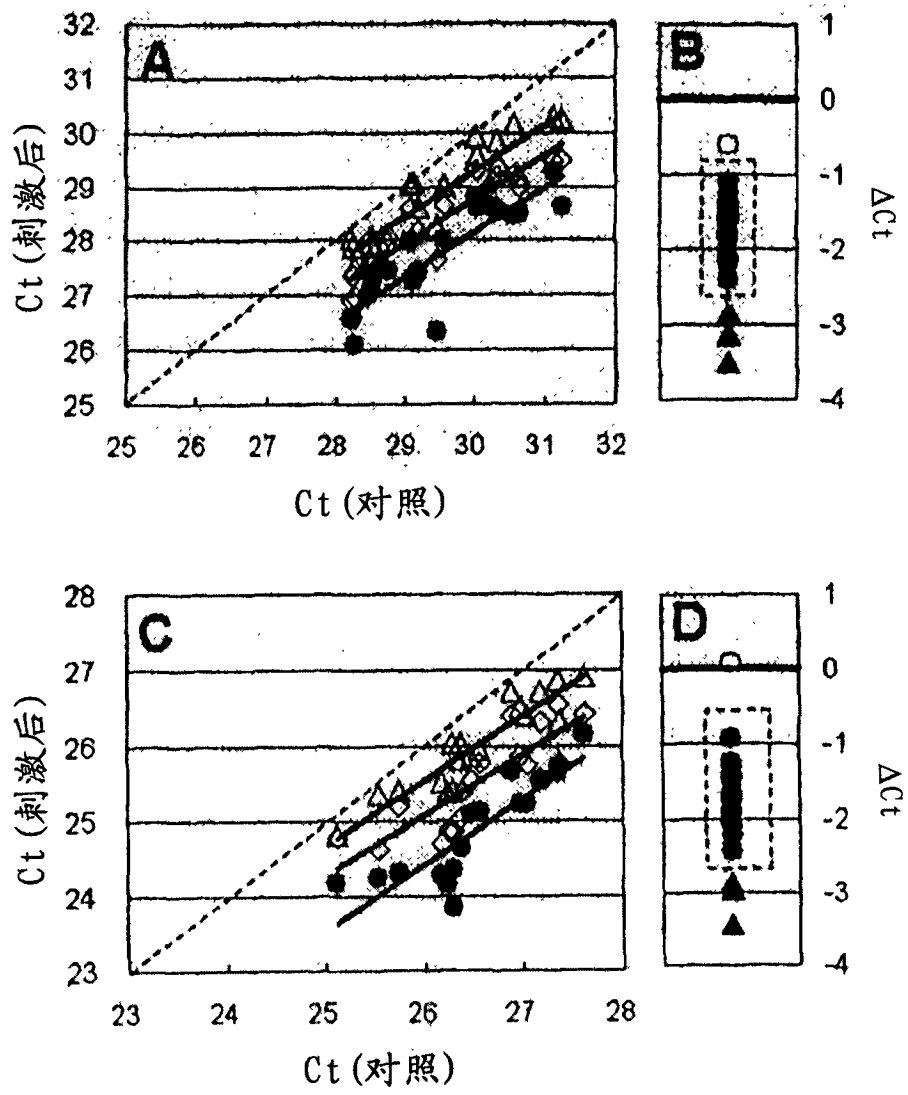


图 10

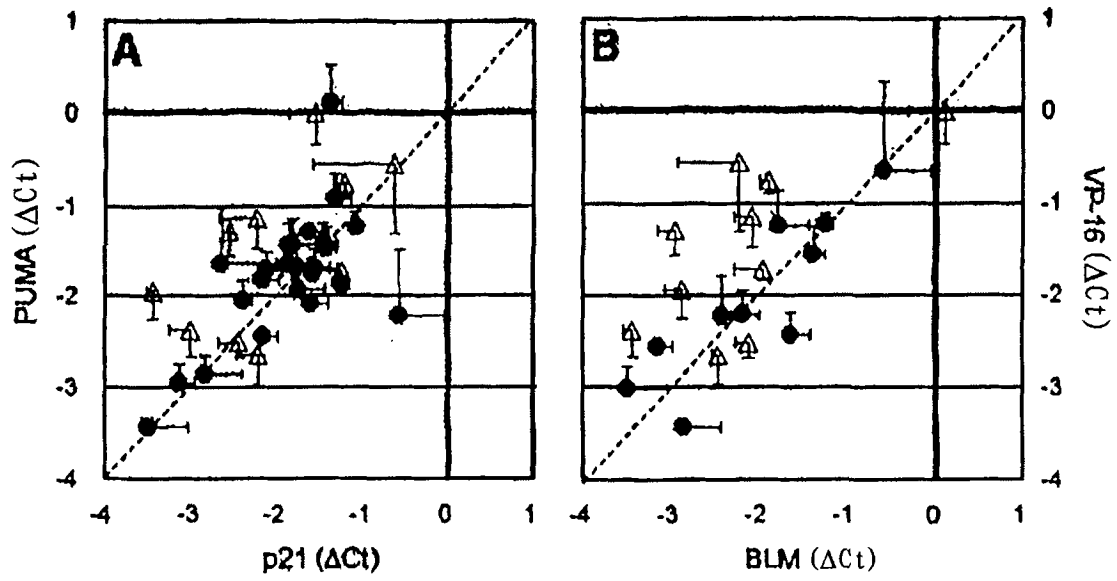


图 11

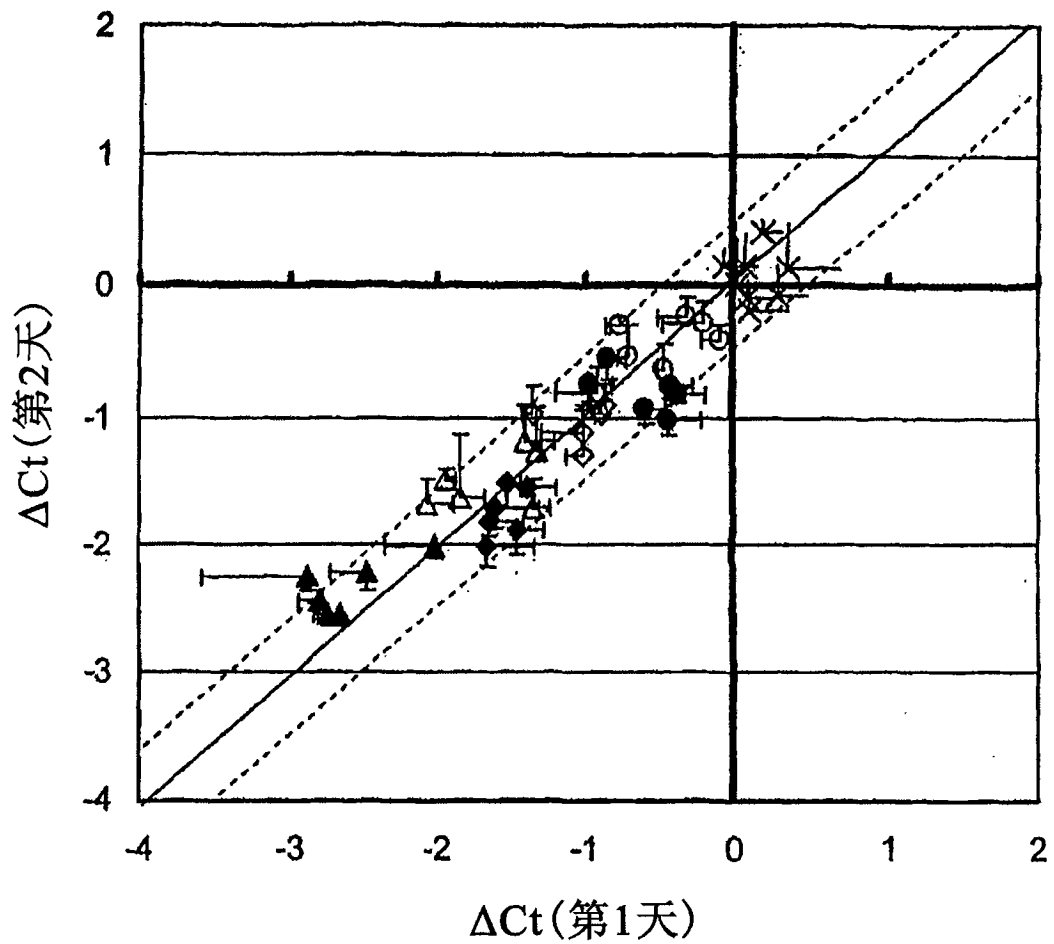


图 12

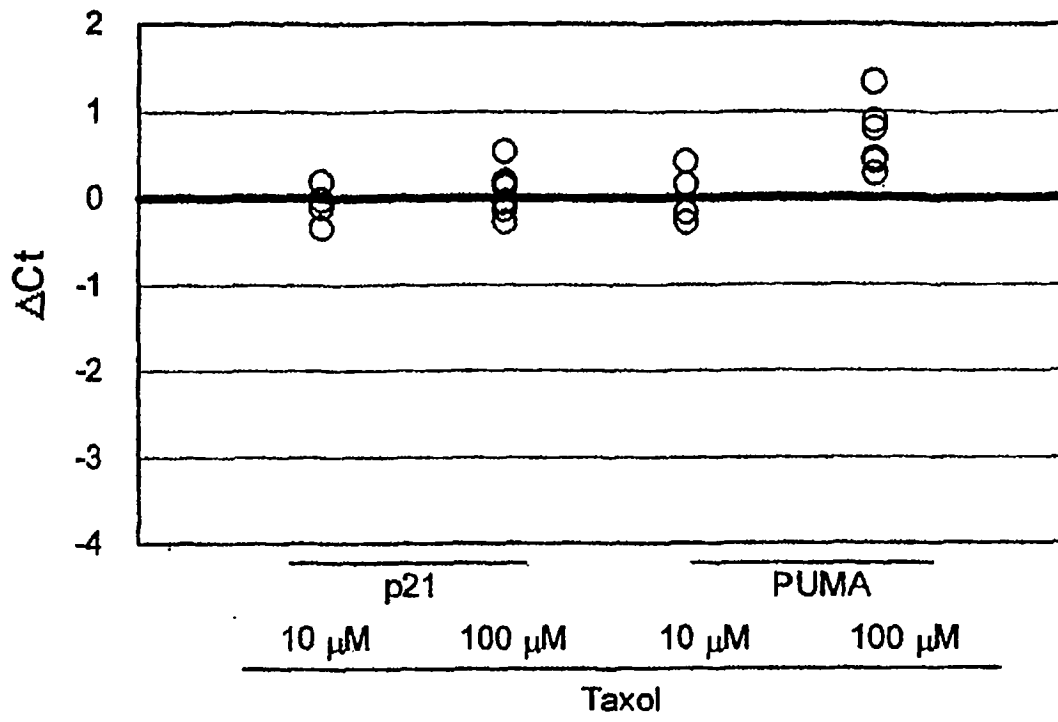


图 13

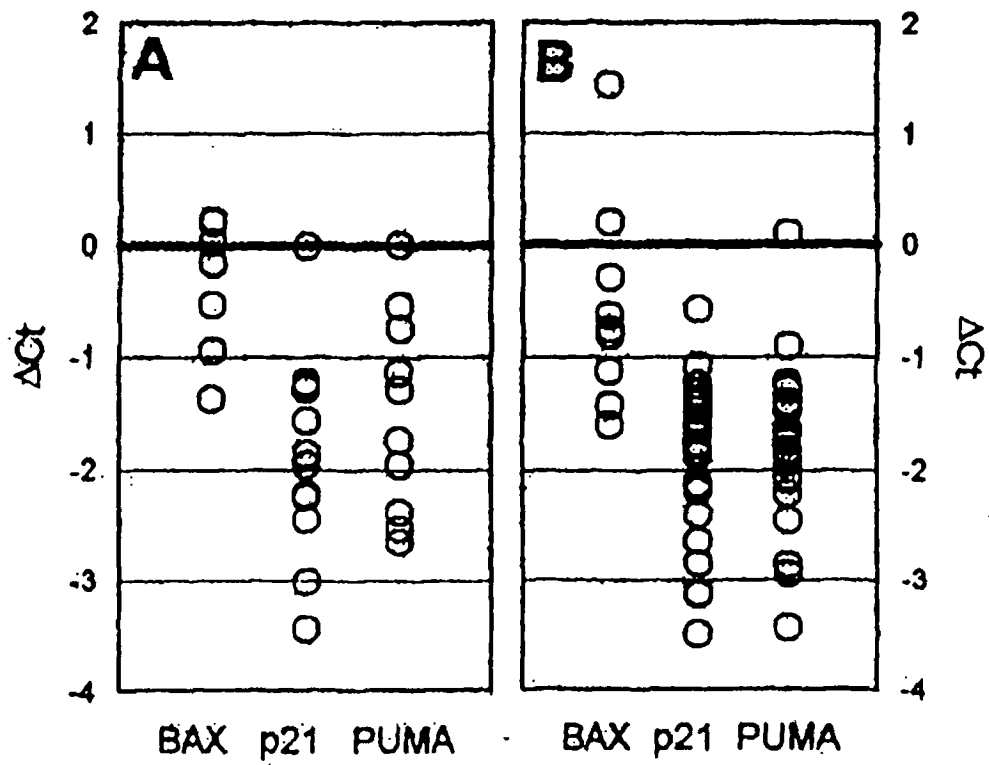


图 14

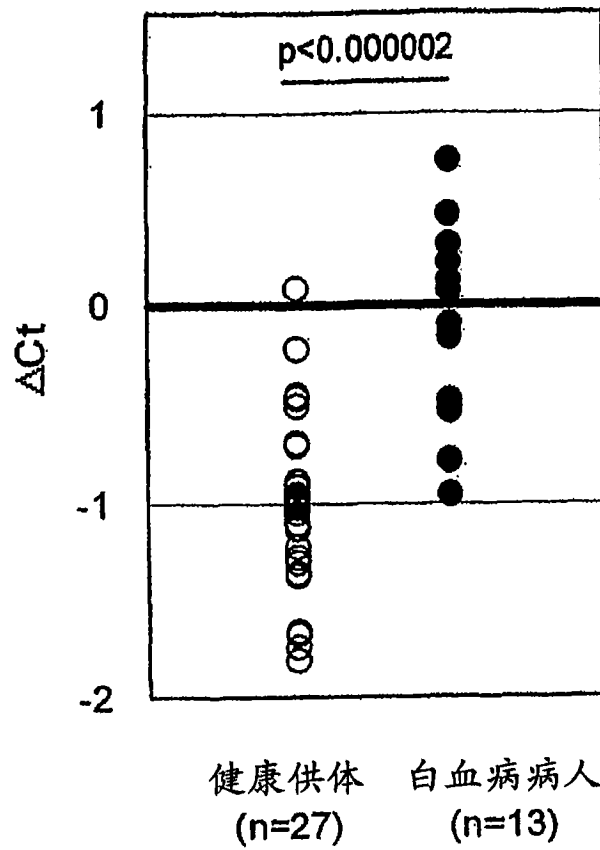


图 15

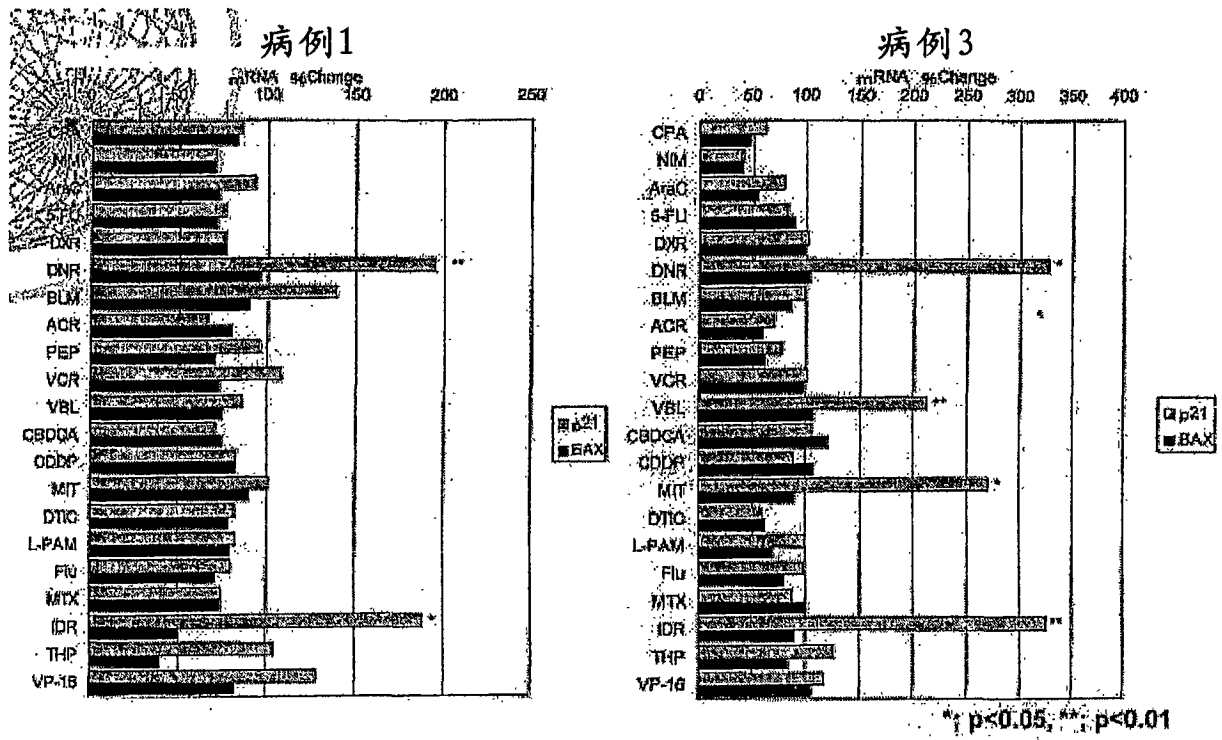


图 16

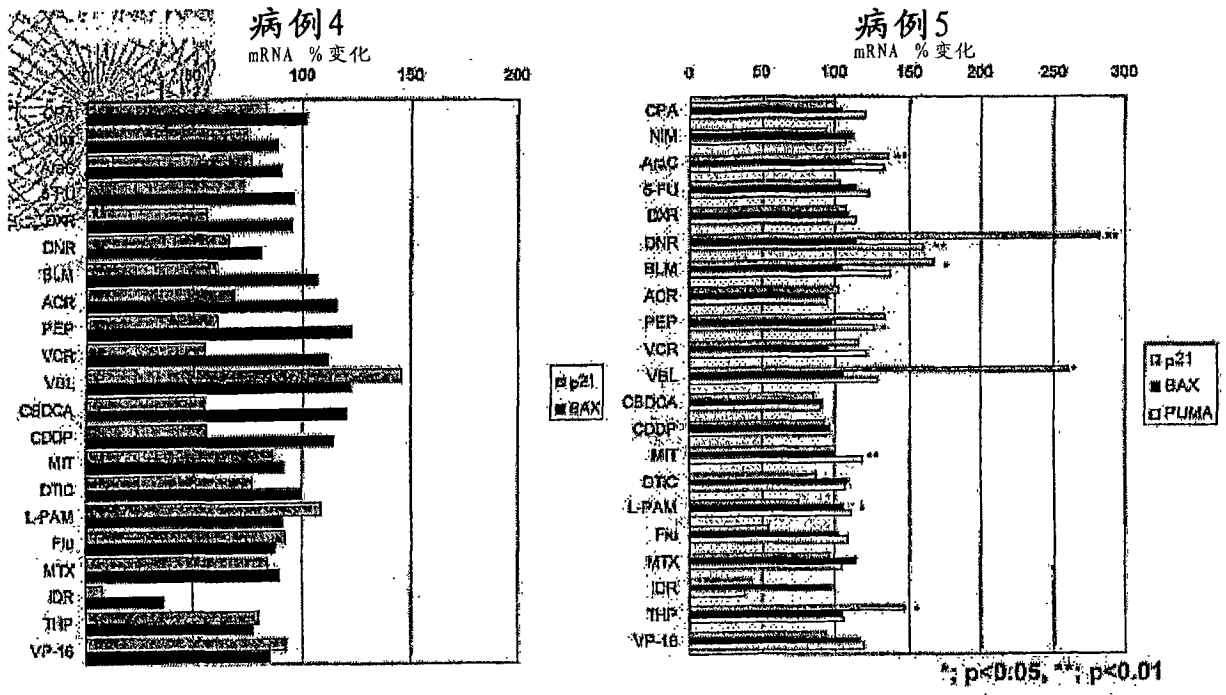


图 17

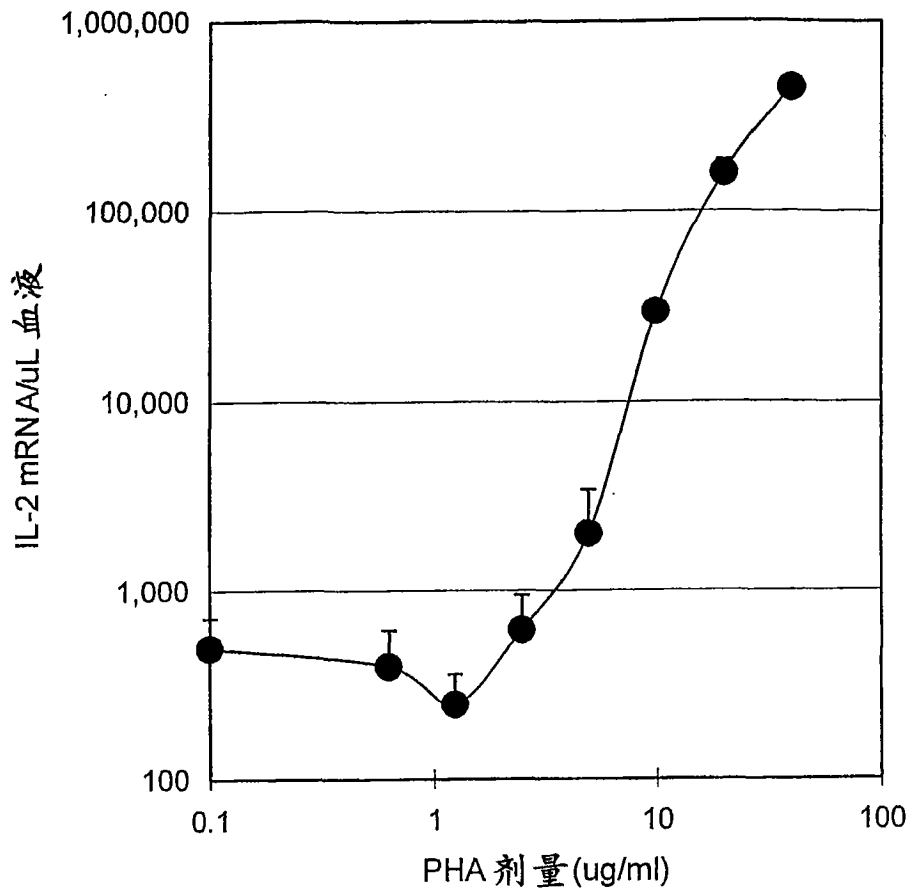


图 18

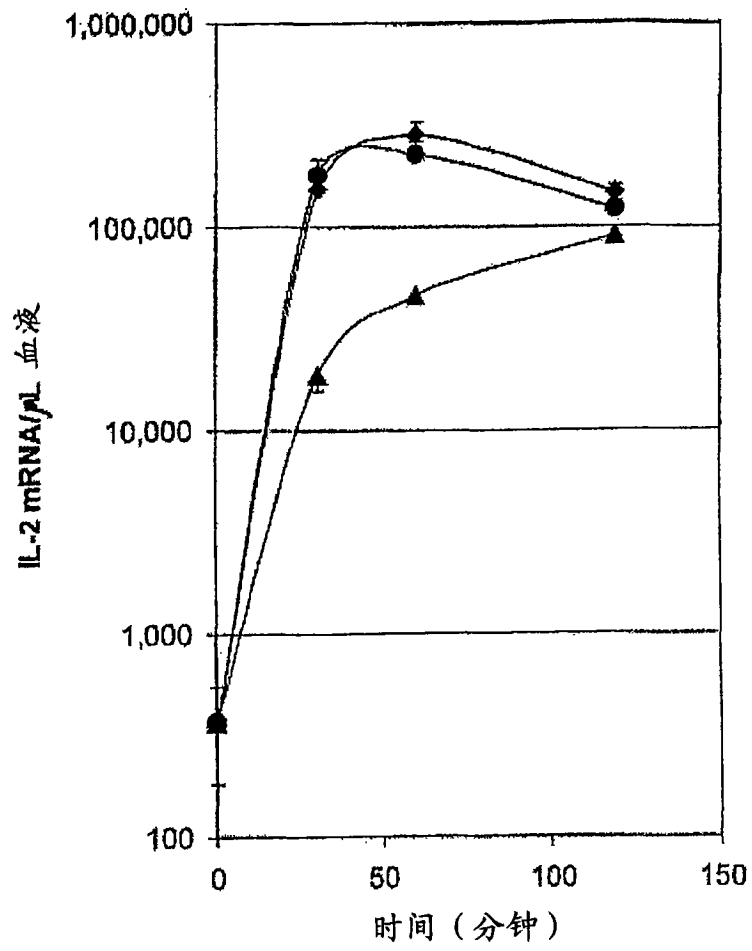


图 19

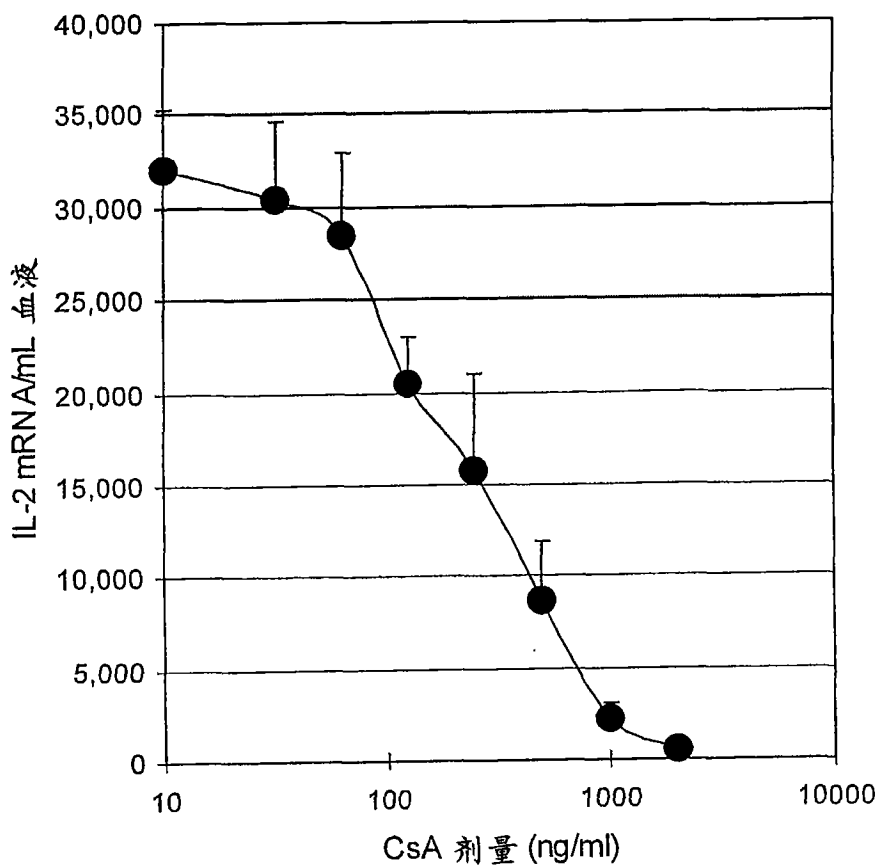


图 20

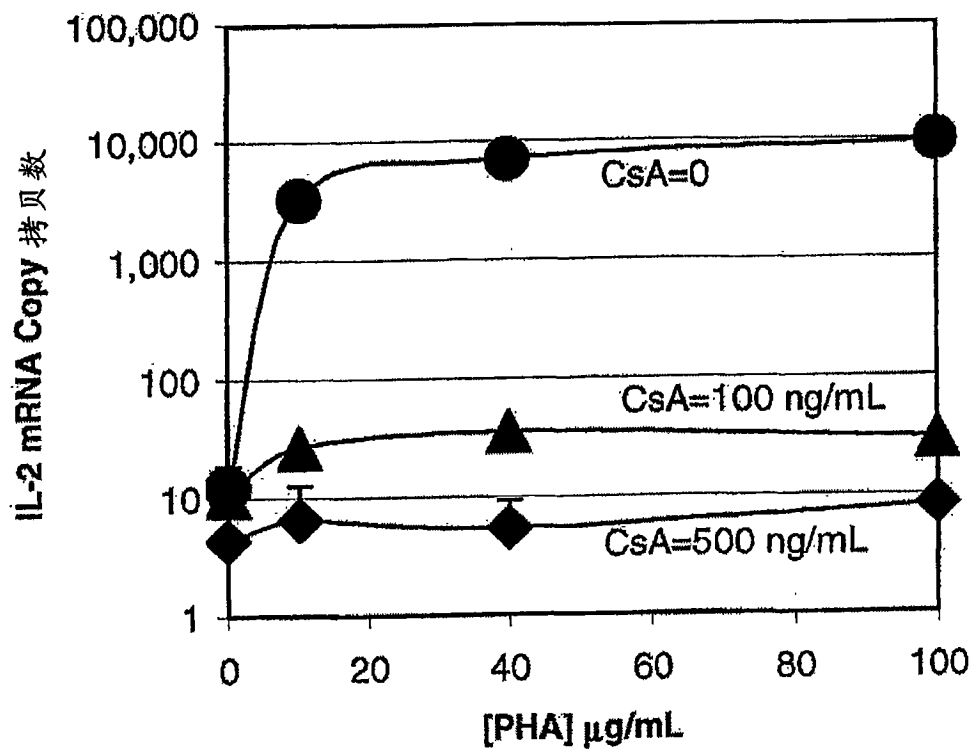


图 21

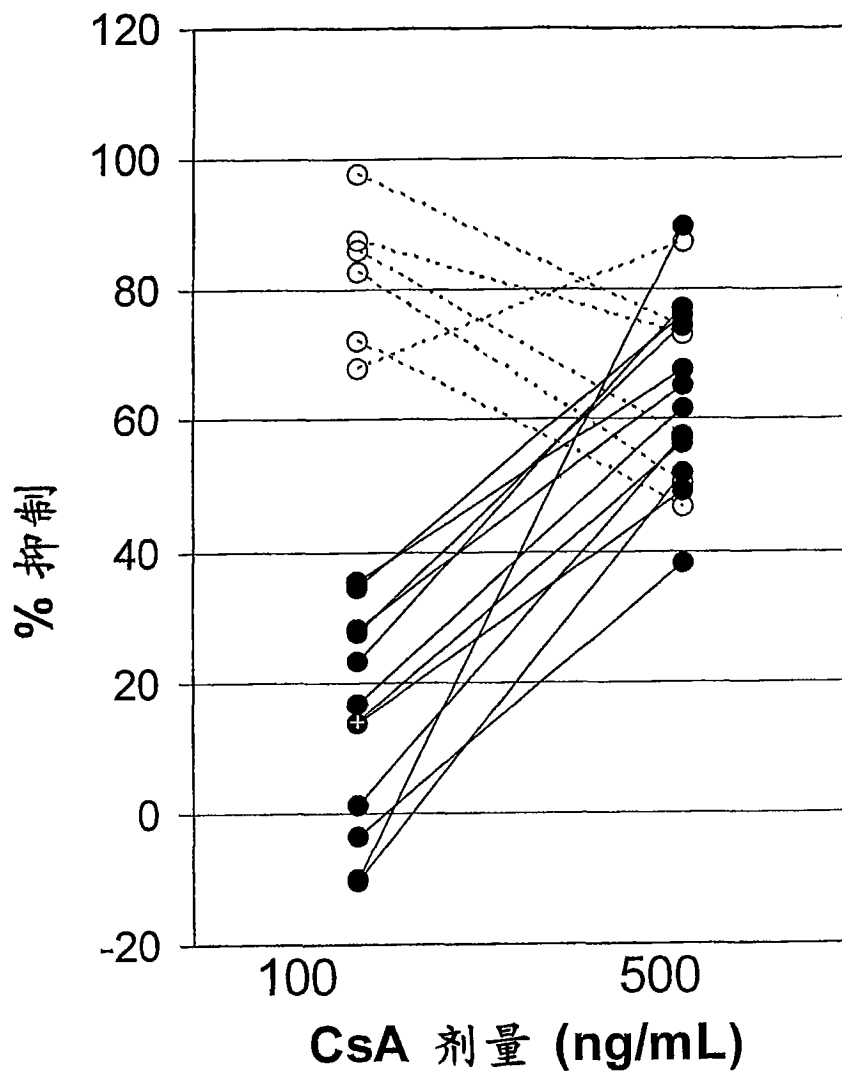


图 22

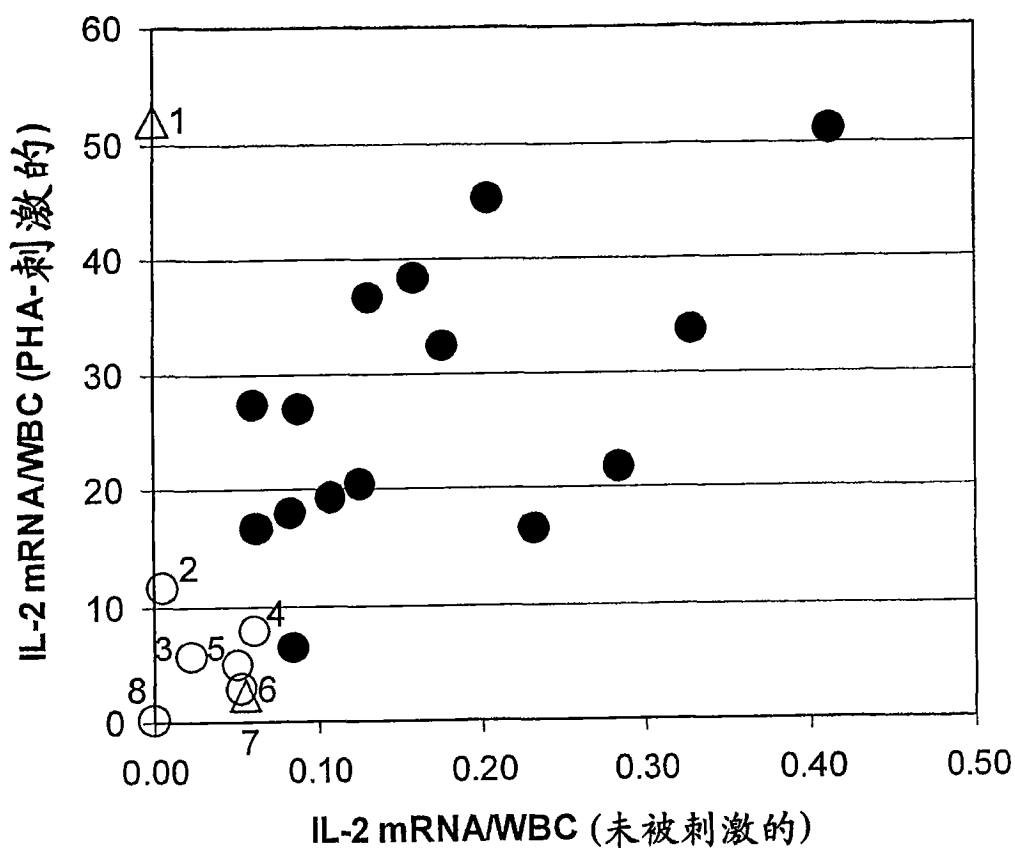


图 23

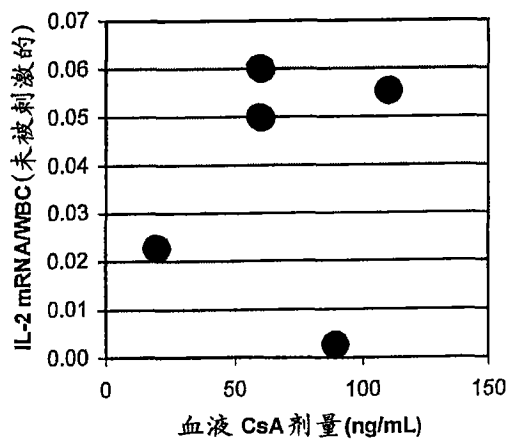


图 24A

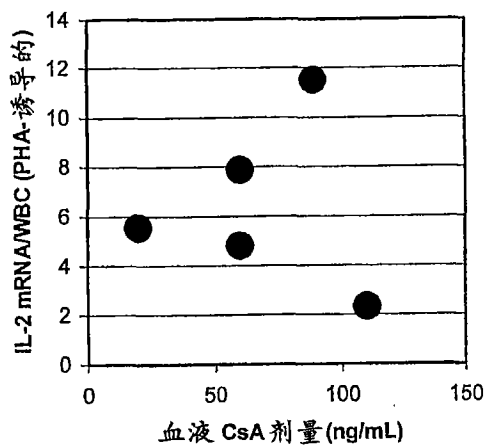


图 24B

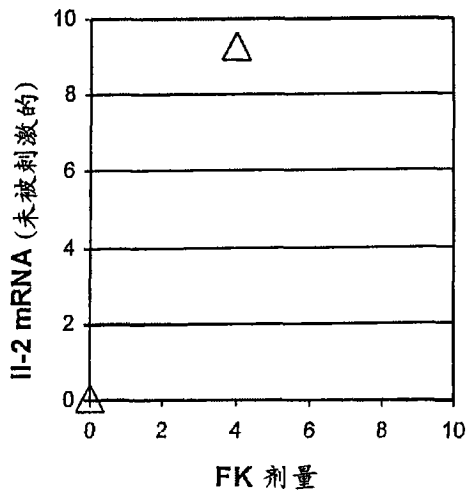


图 25A

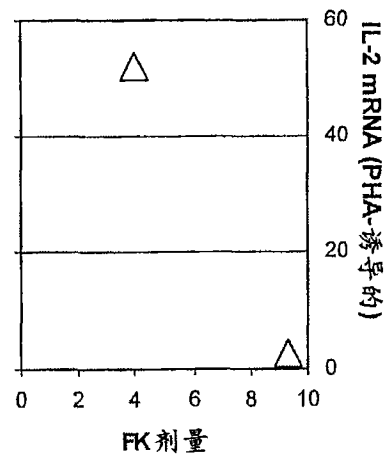


图 25B