



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101981206 A

(43) 申请公布日 2011.02.23

(21) 申请号 200980112473.8

(22) 申请日 2009.01.30

(30) 优先权数据

61/025,574 2008.02.01 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.09.29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/000593 2009.01.30

(87) PCT申请的公布数据

W02009/097136 EN 2009.08.06

(71) 申请人 利兰·斯坦福青年大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·克拉克 Y·西莫诺

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 韦东 崔佳佳

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 27 页 附图 8 页

(54) 发明名称

与癌症干细胞相关的方法和组合物

(57) 摘要

本文提供乳腺癌干细胞 (BCSC) 的微小 RNA 标记。所述标记是与正常对应细胞相比,在 BCSC 中差别表达的多核苷酸。所述标记的应用包括用作治疗性干预的靶标;用作药物开发和乳腺癌及 BCSC 细胞群体相关诊断或预后方法的靶标。与正常乳腺上皮细胞或并非癌症干细胞的癌症细胞相比,BCSC 具有某些 miRNA 表达较低的表型。

1. 一种鉴定癌症干细胞的方法,包括:

使样品与至少一种选自以下 miRNA 的特异性试剂接触:miR-214;miR-127;miR-142-3p;miR-199a;miR-409-3p;miR-125b;miR-146b;miR-199b;miR-222;miR-299-5p;miR-132;miR-221;miR-31;miR-432;miR-495;miR-150;miR-155;miR-338;miR-34b;miR-212;miR-146a;miR-126;miR-223;miR-130b;miR-196b;miR-521;miR-429;miR-193b;miR-183;miR-96;miR-200a;miR-200c;miR-141;miR-182;miR-200a;miR-200b;

其中与非致瘤性细胞相比,癌症干细胞表达所述至少一种 miRNA 的水平发生改变。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,通过原位杂交定量测定 miRNA 表达。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,通过实时聚合酶链式反应进行定量测定。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述患者是人。

5. 如权利要求 4 所述的方法,其特征在于,所述人正经历癌症治疗。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,该方法还包括使样品与受所述 miRNA 调节的蛋白质的特异性试剂接触,

其中与非致瘤性细胞相比,癌症干细胞表达所述蛋白质的水平发生改变。

7. 一种筛选有效抵御 CSC 的候选化疗剂的方法,该方法包括:

使所述药剂与 CSC 接触,和

测定所述药剂改变至少一种选自以下 miRNA 胞内水平的效果:miR-214;miR-127;miR-142-3p;miR-199a;miR-409-3p;miR-125b;miR-146b;miR-199b;miR-222;miR-299-5p;miR-132;miR-221;miR-31;miR-432;miR-495;miR-150;miR-155;miR-338;miR-34b;miR-212;miR-146a;miR-126;miR-223;miR-130b;miR-196b;miR-521;miR-429;miR-193b;miR-183;miR-96;miR-200a;miR-200c;miR-141;miR-182;miR-200a;miR-200b。

8. 一种改变癌症干细胞致瘤性的方法,该方法包括:

改变所述细胞中表达的微小 RNA 活性,其选自:miR-214;miR-127;miR-142-3p;miR-199a;miR-409-3p;miR-125b;miR-146b;miR-199b;miR-222;miR-299-5p;miR-132;miR-221;miR-31;miR-432;miR-495;miR-150;miR-155;miR-338;miR-34b;miR-212;miR-146a;miR-126;miR-223;miR-130b;miR-196b;miR-521;miR-429;miR-193b;miR-183;miR-96;miR-200a;miR-200c;miR-141;miR-182;miR-200a;和 miR-200b。

9. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述微小 RNA 选自:miR-200c、miR-141、miR-200b、miR-200a、miR-429、miR-182、miR-96 和 miR-183,其中所述方法包括上调活性。

10. 如权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述药剂包含选自以下的 miRNA 基因序列:miR-200c、miR-141、miR-200b、miR-200a、miR-429、miR-182、miR-96 和 miR-183,该序列操作性连接于在所述细胞中有活性的启动子。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述改变步骤在体外进行。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述改变步骤在体内进行。

13. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述癌症干细胞是乳腺癌干细胞。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述乳腺癌干细胞是 CD44⁺CD24^{-/-}低谱系。

15. 如权利要求 8 所述的方法,其特征在于,所述改变步骤包括给予所述细胞降低所述

细胞中所述 miRNA 水平的药剂。

16. 如权利要求 15 所述的方法,其特征在于,所述药物是反义寡核苷酸。

与癌症干细胞相关的方法和组合物

[0001] 政府权利

[0002] 本发明在 NIH 国立癌症研究 (NIH National Cancer Institute) 所授予合同 CA104987 的政府支持下取得。政府对本发明享有一定权利。

[0003] 发明背景

[0004] 乳腺癌是美国妇女中最常见的恶性肿瘤。虽然目前可采用的治疗法能缩小转移,但这些作用是暂时的,绝大多数 4 期乳腺癌患者死于转移。包括放疗、化疗和激素治疗在内的传统治疗方法虽有用,但出现了对治疗有耐受性的癌细胞使其受限。需要新的方法来检测和治疗乳腺癌。

[0005] 与许多其它类型实体瘤相似,死亡率的主要原因是癌症从原发部位扩散至远端器官和组织。这是癌细胞从初始肿瘤入侵周围乳腺组织以及淋巴组织和血管所致。入侵的癌细胞然后形成新肿瘤,最终损伤了癌症所扩散的关键器官,例如肝、肺或脑的功能,最终导致患者死亡。由于乳腺癌死亡率的主要原因是癌症播散至其它器官,为改善存活必须既要防止肿瘤细胞扩散又需根除远端肿瘤。

[0006] 肿瘤可视作通过突变积累而获得无限增殖能力的致癌性癌细胞所产生的异常器官。在将肿瘤视作异常器官的此种观点中,应用正常干细胞的生物学原理可更好地理解肿瘤如何产生和播散。许多观察提示正常干细胞与致癌性细胞之间有相似性是合适的。正常干细胞和致癌性细胞均具有广泛的增殖潜力以及产生新(正常或异常)组织的能力。致癌性细胞可视作经历器官发生异常和不佳调控过程的癌症干细胞(CSC),与正常干细胞的经历相似。肿瘤和正常组织均由表型特征不同和增殖潜力不同的异质细胞组合构成。

[0007] 发现急性髓性白血病中只有一个小亚组的癌细胞有引发肿瘤的潜能和维持自我更新的能力。由于白血病细胞中集落生成的差异反映了正常造血细胞中集落生成的差异,故可将集落生成性白血病细胞描述为白血病干细胞。实体瘤还显示细胞表型为异质性,只有少部分细胞有致癌性能在体内自我更新。与白血病干细胞的情况一样,这些观察导致上皮肿瘤中只存在稀少干细胞这一假设。

[0008] 还可根据细胞表达的表面标记分离致癌性和非致癌性乳腺癌细胞群。在许多乳腺癌病例中,只有一个小细胞亚群能形成新肿瘤。许多患者的乳腺癌肿瘤含有能在免疫缺陷小鼠中形成肿瘤的癌细胞亚群,而其它癌细胞则不能。注射免疫缺陷小鼠时,最少 100 个致癌性癌细胞即能形成肿瘤,所产生的肿瘤含有在患者的原始肿瘤中发现的表型异质的致癌性和非致癌性癌细胞群。

[0009] 在中枢神经系统(CNS)恶性肿瘤中发现了实体瘤中存在 CSC 的进一步证据。采用类似于培养正常神经元干细胞所用的培养技术,已证明神经元 CNS 恶性肿瘤含有一小群在体外具有集落生成活性在体内能引发肿瘤的癌细胞,而肿瘤中的其余细胞没有这些特性。重要的是,干细胞生物学的原理极其适用于理解乳腺癌肿瘤生物学。

[0010] 癌症干细胞的存在对癌症治疗有深远影响。目前,对肿瘤中表型相异癌细胞的所有治疗仿佛将它们看成均具有无限增殖潜力和获得转移的能力。然而,多年来已认识到,在从未表现出转移性疾病的患者中距原发性肿瘤远处部位可检测到少量播散的癌细胞。一种

可能性是大多数癌细胞缺乏形成新肿瘤的能力,因此只有稀少癌症干细胞的播散才能导致转移性疾病。因此,治疗的目的必须是鉴定和杀伤此类癌症干细胞群。

[0011] 已开发的现有疗法很大程度上是针对肿瘤细胞大群 (bulk population), 因为是通过能否缩小肿瘤块来鉴定这些疗法。然而, 由于癌症的大多数细胞增殖潜力有限, 能否缩小肿瘤主要反映了能否杀伤这些细胞。专门针对癌症干细胞的治疗可能产生更持久的反应并治愈转移性肿瘤。

[0012] MiRNA 是小的非编码调节性 RNA, 通过抑制核糖体功能、使 5' 帽结构脱帽、使多聚腺苷酸尾脱腺苷化和降解靶 mRNA 而调节 mRNA 翻译。MiRNA 能同时调节数百种 mRNA 的表达, 因此能调控各种细胞功能, 包括细胞增殖、干细胞维持和分化。已充分研究的 miRNA 之一为秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*) let-7, 最初是通过遗传分析发育期缺陷的突变体得以鉴定。随后, 将 Dicer1 鉴定为 miRNA 加工和功能中的关键酶; Dicer1 无效突变可导致胚胎死亡和干细胞消除。此外, 组织特异性缺失 Dicer 会影响到胚胎干细胞的自我更新, B 淋巴细胞谱系细胞的发育和组织形态发生。在皮肤中, miR-203 对发育至关重要。缺失 miRNA 加工的另一种关键酶 DGCR8 也会改变胚胎干细胞分化中自我更新基因的沉默。这些发现证明 miRNA 是组织维持和分化的关键调节剂。近年研究显示, 癌症中所见的许多共同染色体扩增和缺失含有 miRNA 编码序列, 一些 miRNA 起着癌基因或肿瘤抑制基因的作用。例如, miR-17-92 簇失调可诱生 B- 细胞淋巴瘤, let-7 下调与肺癌患者的肿瘤发展和预后差相关。在体内异种移植肿瘤试验中, 表达 let-7 也能防止乳腺细胞系形成肿瘤球 (tumorsphere) 和抑制其致癌性。

[0013] 本发明涉及检测和操纵癌症干细胞的微小 RNA。预计若能够鉴定干细胞丰富的细胞群, 将得以研究这些细胞, 从而获得关键的干细胞功能分子调节剂线索。

[0014] 癌症干细胞的描述, 例如可参见 Pardal 等, (2003) Nat Rev Cancer 3, 895-902; Reya 等, (2001) Nature 414, 105-11; Bonnet 和 Dick (1997) Nat Med 3, 730-7; Al-Hajj 等, (2003) Proc Natl Acad Sci U S A 100, 3983-8; Dontu 等, (2004) Breast Cancer Res 6, R605-15; Singh 等, (2004) Nature 432, 396-401。

[0015] 发明概述

[0016] 本文提供了乳腺癌干细胞 (BCSC) 的微小 RNA 标记。与正常对应细胞相比和与腺癌中发现的非致癌性细胞相比, 这些标记是在 BCSC 中差别表达的多核苷酸。采用此类标记物包括将其用作治疗性干预的靶标; 药物开发的靶标和涉及乳腺癌和 BCSC 细胞群的诊断或预后方法。

[0017] 本发明的一些实施方式提供治疗乳腺癌的方法, 该方法包括提供微小 RNA 活性, 例如通过引入表达载体或向 BCSC 直接提供微小 RNA。在本文中, 用于上调的感兴趣微小 RNA 显示在 BCSC 中下调, 包括但不限于 200c-141 簇 (miR200c, miR141); 200b-200a-429 簇 (miR200b, miR200a, miR429); 和 182-96-183 簇 (miR182, miR96, miR183) 中的微小 RNA。

[0018] 其它实施方式提供治疗乳腺癌的方法, 该方法中下调微小 RNA 的表达。用于下调的感兴趣微小 RNA 包括但不限于: miR214; miR-127; miR142-3p; miR-199a; miR1-125b; miR-146b; miR199b 和 miR-222。

[0019] 本发明的一些实施方式提供癌症分类或临床分期的方法, 其中 BCSC 数量越多表明癌症表型的侵袭性更强。分期可用于预后和治疗。在本发明的一些实施方式中, 用包括免

疫组化方法、原位杂交等组织化学方法分析肿瘤样品中是否存在本文鉴定的 miRNA 表达降低细胞。存在此类细胞表明存在 BCSC, 从而能明确原发性肿瘤中的 BCSC 微域 (microdomain) 以及淋巴结或远端转移灶中的细胞。通过 BCSC 的独特表型鉴定它们从而提供比常规治疗更有特异性的靶标。此外, 实施本发明的一种方式还提供预测疾病发展、复发和产生药物耐受性的方法。

[0020] 在本发明的另一实施方式中, miRNA 或它们的靶标可用于, 例如能增加此类 miRNA 在癌症干细胞中表达或降低它们的靶蛋白表达的化合物的筛选方法。该方法包括混合该化合物与 miRNA 表达低的细胞群, 然后测定该化合物产生的调节作用。这可包括检测细胞活性, 或检测某些靶蛋白质、活力、毒性、代谢变化或对细胞功能的影响。还提供给予治疗剂的方法, 所述治疗剂靶向与本文所述 miRNA 的功能相关的癌症干细胞。

[0021] 附图简述

[0022] 图 1. 人乳腺癌干细胞 miRNA 表达概况 (A) 乳腺癌 miRNA 筛选。显示了用于鉴定 CD44⁺CD24⁻ 谱系⁻ 致瘤性癌细胞 (TG 细胞) 和其余谱系⁻ 非致瘤性癌细胞 (NTG 细胞) 差别表达的 37 种 miRNA 的筛选细节。(B) 致瘤性人乳腺癌细胞中 37 种 miRNA 的表达概况。采用流式细胞术分离 11 份人乳腺癌样品 (BC1-BC11) 中的 TG 细胞和 NTG 细胞。用多重定量实时 PCR 分析 100 个分选癌细胞中的 miRNA 表达量 (Ct 值)。数值代表从 TG 细胞和 NTG 细胞获得的 Ct 值的差别 (Δ Ct)。(C) 在致瘤性人乳腺癌细胞中下调的 3 种 miRNA 簇的示意图。具有相同种子序列 (seed sequence) (2-7 个碱基对) 的 miRNA 用同一颜色标注。(D) 与人乳腺癌细胞相比, Tera-2 胚胎癌细胞中的 miRNA 表达。用多重定量实时 PCR 比较 100 个 Tera-2 细胞中 miRNA 表达的强度与 100 个人乳腺癌 TG 和 NTG 细胞 (BC1-BC11) 中 miRNA 表达。对 11 组乳腺癌 TG 和 NTG 细胞的 Ct 值取平均值。数值表示为从 Tera-2 细胞获得的 Ct 值与 NTG 细胞相比的差别 (Δ Ct)。

[0023] 图 2. 正常和恶性乳腺干细胞之间共有的 miRNA 下调概况。(A), CD45⁻CD31⁻CD140a⁻Ter119⁻ 小鼠乳腺细胞依据它们 CD24 和 CD49f 表达的分布情况。MRU 是富含乳腺干细胞的细胞群。MaCFC 是在体内不能再生乳腺的祖细胞。(B) 与 MaCFC 相比, MRU 中 miRNA 的表达。分析了用流式细胞术分离正常小鼠乳房脂肪垫的 MRU 和 MaCFC 中, 致瘤性人乳腺癌细胞的 miRNA 表达下调。用定量实时 PCR 检测了 100 个 MRU 和 MaCFC 中 miRNA 的表达水平。采用衍生自独立分离的 MRU 和 MaCFC 细胞群两组样品重复分析两次。数值代表从 MRU 和 MaCFC 获得的 Ct 值的差别。

[0024] 图 3. MiR-200c 的靶标 SOX2。(A) SOX2 的 3' UTR 内 miR-200bc/429 靶序列的示意图。在 SOX2 的 3' UTR 中有两个核苷酸 (对应于 miR-200bc/429 的核苷酸 6 和 8) 发生突变。数字表示参比野生型序列 (NM_003106) 中该核苷酸的位置。(B) 与 SOX2 的 3' UTR 相连的萤光素酶基因的活性。将含 SOX2 野生型或突变型 3' UTR 序列的 pGL3 萤火虫萤光素酶报告基因质粒与用于标准化的 Renilla 萤光素酶报告基因一起瞬时转染入 HEK293T 细胞。48 小时后检测萤光素酶活性。将 pGL3 对照载体转染细胞结果的平均值设为 100%。数据是分别不同转染 (n = 4) 的平均值和 S.D.。(C) 胚胎癌细胞的 SOX2 蛋白表达。感染 6 天后用流式细胞术收集被表达所示 miRNA 慢病毒感染的 Tera-2 胚胎癌细胞。将被对照慢病毒或被表达所示 miRNA 慢病毒感染的 30,000 个分选 Tera-2 细胞的裂解液加载于各泳道, 用蛋白质印迹分析 SOX2 表达。用 β -肌动蛋白的表达作为对照。(D) 从原代人乳腺癌样品

分离的 TG 和 NTG 癌细胞中 SOX2 蛋白的差别表达。解离原代人乳腺癌样品,通过流式细胞术收集 CD44⁺CD24^{-/-低}谱系⁻致瘤性癌细胞和其余非致瘤性谱系⁻癌细胞。将 6,000 个分选细胞的裂解液加载于各泳道,用蛋白质印迹分析 SOX2 表达。用 β -肌动蛋白的表达作为对照。

[0025] 图 4. miR-200c 和 miR-183 抑制胚胎癌细胞的生长。(A) 表达 miRNA 的胚胎癌细胞的图像。感染 4 天后,用流式细胞术收集被表达所示 miRNA 慢病毒感染的 Tera-2 细胞。收集 Tera-2 细胞 19 天,用姬姆萨怀特 (Giemsa Wright) 染色液染色。(B) miR-200c 和 miR-183 增强了胚胎癌细胞的分化。用针对早期有丝分裂后神经元标记 TuJ 1 的第一抗体,然后用 Alexa-488 标记的第二抗体染色如 (A) 所述被感染和收集的 Tera-2 细胞。用 DAPI 复染细胞。(C) miR-200c 和 miR-183 抑制了体外胚胎癌细胞的生长。如 (A) 所述收集表达对照 miRNA 或所示 miRNA 的 3000 个 Tera-2 细胞在 96-孔板中培养。计数 7、12 和 19 天时的细胞总数。结果为 3 个独立孔的平均值和 S. D.。

[0026] 图 5. miR-200c 和 miR-183 对 MMTV-Wnt-1 鼠乳腺癌细胞集落生成的影响。(A) 表达 miR-200c 和 miR-183 的 MMTV-Wnt-1 乳腺癌细胞形成集落的发生率。解离 MMTV-Wnt-1 乳腺癌细胞,用流式细胞术去除谱系阳性细胞。用表达所示 miRNA 的慢病毒感染 15,000 个乳腺癌细胞,在含经辐照的 3T3 饲养细胞层的 24-孔板中培养。培育 6 天后,计数含 10 个以上 GFP 阳性细胞的集落数。结果显示为 4 个独立孔的平均值和 S. D.。(B) 用细胞角蛋白 14、19 和 8/19 的抗体染色集落的免疫荧光图像。用抗细胞角蛋白第一抗体,然后用 Alexa-488 和 Alexa-594 标记的第二抗体,标记和染色 GFP 阳性集落。用 DAPI 复染细胞。

[0027] 图 6. 体内表达 miR-200c 和 miR-183 的胚胎癌细胞的肿瘤生长。(A) 注射了 Tera-2 胚胎癌细胞小鼠中的代表性肿瘤。用流式细胞术收集被表达所示 miRNA 慢病毒感染的 Tera-2 细胞和表达 GFP 的细胞。将被所示慢病毒感染的 50,000 个 GFP⁺Tera-2 细胞皮下注射入免疫缺陷 NOD/SCID 小鼠中。注射后监测肿瘤生长 3 个月。通过实时 PCR 分析证实被感染的 Tera-2 细胞表达了 miRNA。(B) 表达 miRNA 的 Tera-2 细胞的肿瘤发生率。3 个月后,3 个被对照慢病毒感染的 Tera-2 细胞均产生了肿瘤。表达 miR-200c 或 miR-183 的 Tera-2 细胞不形成肿瘤。结果是 3 次独立肿瘤注射实验的小结。

[0028] 图 7. miRNA 表达对乳腺过度生长 (mammary outgrowth) 的作用。

[0029] 实施方式详述

[0030] 在进一步描述本发明之前,应理解本发明不限于以下所述的本发明具体实施方式,可对具体实施方式作出某些改变但仍属于本发明权利要求的范围内。还应理解所用术语目的是描述特定的实施方式,并非限制。本发明的范围是由所附权利要求书所确定。除非文中另有明确表述,本说明书和随附的权利要求书中,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数形式。

[0031] 提供数值范围时,除非文中另有明确说明,应理解该范围上限和下限之间的各插入值(至下限的十分之一单位)和所述范围内的任何其它所述值或插入值都包括在本发明中。这些较小范围的上限和下限可独立地包含在该较小范围内,也包括在本发明中,包括所述范围中任何专门排除的界限。当所述范围包括上限和下限之一或二者时,不包括所述上限或下限之一或二者的范围也包括在本发明中。

[0032] 除非另有定义,本文所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员

共同理解的相同含义。虽然可采用与本文所述相似或等价的方法、装置和材料来实施或检验本发明,但是本文描述的是优选的方法、装置和材料。

[0033] 本文述及的所有出版物通过引用纳入本文,目的是描述和公开这些出版物中所述的本发明组分,这些组分可与当前描述的本发明联用。

[0034] 如上所述,本发明涉及癌症分类的方法以及用于实施本发明方法的试剂和试剂盒。所述方法也可测定治疗具体癌症的合适水平。

[0035] 还提供了优化治疗的方法,先分类,根据分类信息选择合适的疗法、剂量、治疗方式等,从而优化将抗增殖治疗递送给不需要的靶细胞之间的差异,同时最大程度降低有害毒性。通过选择最大程度降低有害毒性同时提供有效的抗增殖活性而优化治疗。

[0036] 本发明可用于癌症,例如乳腺癌的预防、治疗、检测或研究。癌症是包含上皮来源赘生细胞的癌症。上皮细胞覆盖了机体外表面,形成内腔和腺体组织的衬里。在成人中,癌症是最常见的癌形式。癌症包括各种腺癌,例如前列腺癌、肺癌等等;肾上腺皮质癌(adrenocortical carcinoma);肝细胞癌;肾细胞癌、卵巢癌、原位癌、导管癌、乳腺癌、基底细胞癌;鳞状细胞癌;移行细胞癌;结肠癌;鼻咽癌;多房囊性肾细胞癌;燕麦细胞癌、大细胞肺癌;小细胞肺癌等等。癌症可见于前列腺、胰腺、结肠、脑(通常作为继发性转移)、肺、乳腺、皮肤等等。

[0037] 本领域已描述了癌干细胞的某些表型属性,包括诸如 CD44、CD133、CD24、CD49f;ESA;CD166 和谱系组(lineage panel)等标记。具体标记组合和表型的例子描述可参见,例如 Al-Hajj 等.(2003)Prospective identification oftumorigenic breast cancer cells(致瘤性乳腺癌细胞的预期鉴定).Proc Natl Acad Sci U S A 100,3983-8;Singh 等.(2004)Identification of human braintumour initiating cells(人脑肿瘤引发细胞的鉴定).Nature 432,396-401;Dalerba 等.(2007)Phenotypic characterization of human colorectal cancerstem cells(人结肠直肠癌干细胞的表型表征).Proc Natl Acad Sci U S A 104,10158-63;O'Brien 等.(2006)A human colon cancer cell capable of initiatingtumour growth in immunodeficient mice(能在免疫缺陷小鼠中引发肿瘤生长的人结肠癌细胞).Nature;Prince 等.(2007)Identification of a subpopulationof cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cellcarcinoma(在头和颈鳞状细胞癌中鉴定到具有癌症干细胞特性的细胞亚群).Proc Natl Acad Sci U S A,各篇文献通过引用纳入本文说明癌症干细胞的标记表型。本发明的一些实施方式联用此类表型鉴定和微小 RNA 检测。

[0038] 本文定义的术语“癌症干细胞”指具有自我更新和分化能力的致瘤性癌细胞亚群。这些致瘤性细胞负责维持肿瘤,也能产生大量非致瘤性的异常分化后代。与 CD44 阴性肿瘤细胞相比,这些细胞在约 10^2 个细胞、约 5×10^2 个细胞、约 10^3 个细胞的剂量时能引发肿瘤生长,提供至少 100 倍的肿瘤引发潜能增长。细胞膜 CD44 染色阳性能确定原发肿瘤中的癌症干细胞微域。存在此类微域可用于诊断原发和转移部位的癌细胞,此类微域数增加表明肿瘤具有更高的肿瘤发生能力。这些细胞能在体内形成肿瘤,自我更新产生致瘤性后代;产生异常分化的非致瘤性后代并差别表达至少一种干细胞相关基因。可通过选择表达细胞表面标记 CD44 的细胞来富集癌症干细胞群。以乳腺癌为例,在功能试验中,CD44+CD24⁻低谱系群的细胞具有癌症干细胞自我更新和分化的癌症干细胞独特特性,能形成有助于癌症诊

断的独特组织学微域。与其它癌症细胞亚组,如采用小鼠异种移植试验所示的相比,该群细胞的致癌能力更高。这种谱系组通常包括正常白细胞、成纤维细胞、内皮细胞、间充质细胞等标记的特异性试剂。

[0039] 本文所指的“微小 RNA(miRNA)”是一类丰富的非编码 RNA,认为其通过调节基因表达在许多生物学过程中起着至关重要的作用。它们是长度约 20-25 个核苷酸,例如约 21-24 个核苷酸,例如 22 或 23 个核苷酸的单链 RNA 分子。这些非编码 RNA 能使蛋白质编码基因的信息靶向从而切断或抑制生产性翻译从而在发育中起着关键作用。人类有 200-255 种编码 miRNA 的基因,丰度对应于大约 1% 的蛋白质编码基因。miRNA 是长度约 20-25 个核苷酸,例如约 21-24 个核苷酸,如 22 或 23 个核苷酸的单链 RNA 分子。

[0040] 在一些实施方式中,miRNA 标记差别表达,其水平低于相当的非致瘤性细胞,可低于至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 10 倍或更多。

[0041] 本发明提供采用本文所述标记,诊断癌症、分类和治疗癌症,特别是癌瘤的方法。可用这些方法特征鉴定 CSC、有利于诊断对象癌症的严重程度(例如,肿瘤等级、肿瘤负荷等)、有利于测定对象的预后和评估对象对治疗的反应。可在体外或体内,可对分离的细胞,或完整组织或体液,例如血液、淋巴结活检样品等实施本发明的检测方法。

[0042] 本文所用的术语“在癌症干细胞中差别表达的 miRNA”和“在癌症干细胞中差别表达的多核苷酸”在本文中可互换使用,通常指代表或对应于在癌症干细胞中与同一细胞类型的非致瘤性细胞相比差别表达的 miRNA 的多核苷酸,例如发现 mRNA 水平有至少约 25%、至少约 50%-75%、至少约 90%、至少约 1.5-倍、至少约 2-倍、至少约 3-倍、至少约 5-倍、至少约 10-倍、或至少约 50-倍或更多的差别表达。

[0043] 可通过某多核苷酸“鉴定”所述 miRNA,如果该多核苷酸对应于或代表该 miRNA 的话,其中“可鉴定性序列”是某序列中唯一可鉴定或确定某多核苷酸序列或其互补序列的连续核苷酸小片段。

[0044] 术语“生物学样品”包括获自生物体的各种类型样品,可用于诊断或监测试验。该术语包括生物学来源的血液和其它液体样品、实体组织样品,例如活检样本或组织培养物或其衍生的细胞及其后代。该术语包括获取后以任何方式处理的样品,例如用试剂处理、溶解或富集某些组分。该术语包括临床样品,还包括细胞培养物中的细胞、细胞悬液、细胞裂解液、血清、血浆、生物学液体和组织样品。

[0045] 本发明方法所用的临床样品可得自各种来源,特别是活检样品,但是在一些例子中,可采用诸如血液、骨髓、淋巴液、脑脊液、滑膜液等样品。可先通过离心、淘选、密度梯度分离、血浆分离置换、亲和选择、淘洗、FACS、泛影葡胺(Hypaque)离心等分离此类样品再分析。一旦获得样品,可直接使用,冷冻,或短时维持在合适的培养基中。可采用各种培养基维持细胞。可用任何常规方法,例如抽血、静脉穿刺、活检等获得样品。样品通常包含至少约 10^2 个细胞,更常至少约 10^3 个细胞,优选 10^4 、 10^5 或更多细胞。样品通常获自人患者,虽然可采用动物模型,例如马、牛、猪、犬、猫、啮齿类如小鼠、大鼠、仓鼠,灵长类动物等。

[0046] 可采用合适的溶液制备细胞样品的分散液或悬浮液。此类溶液通常是平衡盐溶液,例如生理盐水、PBS、汉克平衡盐溶液等,可方便地添加了胎牛血清或其它天然因子,连用低浓度的通常 5-25mM 的可接受缓冲液。方便的缓冲液包括 HEPES、磷酸缓冲盐水、乳酸盐缓冲液等。

[0047] 可用常规方法分析细胞染色。精确计数的技术包括复杂程度不同,例如多色通道(multiple color channel)、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道等荧光活化细胞分选术。可采用死细胞相关染料(例如,碘化丙啶)选出死细胞。

[0048] 特别感兴趣的是采用抗体作为亲和试剂。这些抗体可方便地偶联于标记物用于分离。标记物包括用于直接分离的磁珠,可用结合于支持物的亲和素或链霉亲和素来除去生物素,可利用荧光分选荧光活化的细胞等等,而易于分离特定类型的细胞。可用的荧光染料包括藻胆蛋白,例如藻红蛋白和别藻蓝蛋白、荧光素和德克萨斯红。通常用不同的荧光染料标记各抗体,从而能独立分选各标记(细胞)。

[0049] 将抗体加入细胞悬液并培育足够时间使之结合细胞表面可用的抗原。通常培育至少约 5 分钟,常常少于约 30 分钟。反应混合物中宜含有足够浓度的抗体,从而不会因缺乏抗体而限制分离效率。可通过滴定确定合适的浓度。分离细胞的培养基可以是能维持细胞活力的任何培养基。优选的培养基是含有 0.1-0.5% BSA 的磷酸缓冲盐水。可商品化购得和按照细胞的性质使用各种培养基,包括 Dulbecco 改进 Eagle 培养基(dMEM)、汉克基础盐溶液(HBSS)、Dulbecco 磷酸缓冲盐水(dPBS)、RPMI、Iscove 培养基、含 5mM EDTA 的 PBS 等,常补加胎牛血清、BSA、HAS 等。然后如前文所述定量测定表达细胞表面标记的细胞。

[0050] 本文所用的“诊断”通常包括测定对象对某疾病或病症的易感性,测定对象目前是否受某疾病或病症的影响,预后患某疾病或病症的对象(例如,鉴定癌性状态、癌症阶段或癌症对治疗的反应)和可用的治疗方法(therapeutics)(例如,监测对象的状况从而提供治疗作用或效果的信息)。

[0051] 本文所用的术语“治疗”、“处理”等通常指获得所需的药理学和/或生理学作用。这种作用可以是预防性的完全或部分阻止疾病或其症状的发生,和/或可以是治疗性的部分或完全稳定或治愈疾病和/或该疾病所致的不良作用。本文所用的“治疗”包括治疗哺乳动物,特别是人的疾病,包括:(a) 预防易感该疾病或症状但尚未作出该疾病或症状诊断的对象产生该疾病或症状;(b) 抑制疾病症状,即停止其发展;或(c) 减轻疾病症状,即导致该疾病或症状消退。

[0052] 术语“个体”、“对象”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用,指需要诊断、处理或治疗的任何哺乳动物对象,特别是人。

[0053] 本文所用的“宿主细胞”指培养成单细胞实体的微生物或真核细胞或细胞系,可用作或已用作重组载体或其它转移多核苷酸的受者,包括经过转染的原始细胞的后代。应理解,由于天然、偶然或特意的突变,单细胞的后代在形态或基因组或总 DNA 互补上不一定与原始亲代完全相同。

[0054] “治疗靶标”指调节其活性后(例如,通过调节表达、生物学活性等),基因或基因产物可调节癌症的表型。通篇使用的“调节”表示所示现象的增加或降低(例如,调节生物学活性指生物学活性增加或生物学活性降低)。

[0055] 乳腺细胞癌

[0056] 乳腺癌是美国妇女中最常见的恶性肿瘤,有八分之一的妇女在其一生中受该病影响。某些病例,例如携带突变型 BRCA1 或 BRCA2 基因而具有遗传倾向者产生乳腺癌的风险增加。“乳腺癌癌瘤”本文指细胞衬里导管或小叶产生的上皮肿瘤。它们的来源还常是腺体。癌症分成原位癌和侵袭癌。

[0057] 原位癌是癌细胞在导管或小叶内增殖但不侵入基质组织。然而，原位癌也可能变得具有侵袭性。乳腺癌局部侵入和扩散最初通过局部淋巴结、血流或二者。转移性乳腺癌可影响体内的几乎任何器官，最常见为肺、肝、脑和皮肤。

[0058] 可能的乳腺恶性肿瘤症状包括纤维变性改变、存在团块和不正常排出物。如果产生此类症状，需要检验以区分良性病损与癌症。怀疑晚期癌症时，通常先进行活检。活检可以是针刺（如果肿瘤小的话）或切开式活检或者切除活检。

[0059] 对于大多数患者，初步治疗是外科手术，常联用放疗。也可根据肿瘤和患者特征采用化疗、激素治疗或二者。对于炎性或晚期乳腺癌，初步治疗是全身性治疗，对于炎性乳腺癌，随后进行外科手术和放疗；外科手术通常对晚期癌症无帮助。

[0060] 对于侵入性癌症患者，通常在外科手术后不久开始化疗或激素治疗，持续数月或数年；这些治疗能延迟或阻止几乎所有患者的复发并延长一些患者的存活。组合化疗方案（例如，环磷酰胺、氨甲蝶呤、5-氟尿嘧啶；阿霉素加环磷酰胺）常比单一药物更有效。

[0061] 癌症转移时，治疗仅延长中值存活 3-6 个月，虽然毒性较大的治疗（如化疗）可缓解症状并提高生活质量。治疗的选择取决于肿瘤的激素-受体状态、无病间隔的长度（从诊断到出现转移）、转移部位和受影响器官的数量和患者的绝经期状态。可用全身性激素治疗或化疗治疗具有转移疾病症状的大多数患者。治疗转移性乳腺癌的一些细胞毒性药物是卡培他滨、阿霉素（包括其脂质体制剂）、吉西他滨和紫杉烷类（紫杉醇、多西他赛和长春瑞滨）。

[0062] 微小 RNA 探针和癌干细胞中的靶标

[0063] 在一些实施方式中，用于本发明方法的微小 RNA (miRNA) 包括相对于非治疗性细胞可在 BCSC 中差别表达的那些 miRNA。微小 RNA 能使蛋白质编码基因的信息靶向从而切断或抑制生产性翻译在调节细胞基本功能中起着重要作用。在某些实施方式中，显示感兴趣的 miRNA 通常在 BCSC 中下调。一个感兴趣的人 miRNA 亚组的核苷酸序列见表 1。其它感兴趣序列列于图 1B 中，这些 miRNA 包括 miR-214 ;miR-127 ;miR-142-3p ;miR-199a ;miR-409-3p ;miR-125b ;miR-146b ;miR-199b ;miR-222 ;miR-299-5p ;miR-132 ;miR-221 ;miR-31 ;miR-432 ;miR-495 ;miR-150 ;miR-155 ;miR-338 ;miR-34b ;miR-212 ;miR-146a ;miR-126 ;miR-223 ;miR-130b ;miR-196b ;miR-521 ;miR-429 ;miR-193b ;miR-183 ;miR-96 ;miR-200a ;miR-200c ;miR-141 ;miR-182 ;miR-200a ;miR-200b。

[0064] 表 1 :在致瘤性与非致瘤性乳腺癌细胞中差别表达的微小 RNA 的部分列表

[0065] 表 1miRNA 序列

[0066]

	茎环序列	成熟序列
miR-200a	SEQ ID NO:1 ccgggccccugugagcaucuaccggacagucuggauuucc cagcuugacucuaacacugucugguaacgaugucaaaggug acccgc	SEQ ID NO:2 uaacacugucugguaacga ugu
miR-141	SEQ ID NO:3 cggccggccccuggguccaucuuccagucaguguuggauggu cuauuugugaagcuccuaacacugucugguaaagauggcucc cggguggguuc	SEQ ID NO:4 uaacacugucugguaaaga ugg
miR-200b	SEQ ID NO:5 ccagcucgggcagccguggccaucuacugggcagcauugga uggagucaggucucuaauacugccugguaaугаугаcggcg agccugcag	SEQ ID NO:6 uaauacugccugguaaug auga
miR-200c	SEQ ID NO:6 cccucgucuuaaccagcaguguuugggugcgguugggaguc ucuaauacugccgguaaугаугаggagg	SEQ ID NO:7 uaauacugccgguaaug augga
miR-429	SEQ ID NO:8 cgccggccgaugggcgucuuaaccagacaugguuagaccuggc ccucugucuaauacugucugguaaaaccguccauccgcugc	SEQ ID NO:9 uaauacugucugguaaaac cgu
miR-182	SEQ ID NO:10 gagcugcuugccuccccccguuuuuggcaaugguagaacuca cacuggugagguaacaggauccggugguucuagacuugccaa cuauggggagaggacucagccggcac	SEQ ID NO:11 uuuggcaaugguagaacu cacacu
miR-96	SEQ ID NO:12 uggccgauuuuggcacuagcacauuuugcuugugucucuc cgucugagcaaucaugugcagugccaauaugggaaa	SEQ ID NO:13 uuuggcacuagcacauuu uugcu
miR-183	SEQ ID NO:14 ccgcagagugugacuccguucuguguauggcacugguagaa uucacugugaacagucucagucagugaauuaccgaaggcca uaaacagagcagagacagauccacga	SEQ ID NO:15 uauggcacugguagaauu cacu

[0067] 所述 miRNA 包括序列与公开的核酸不相同的那些序列及其变体。变体序列可包含核苷酸取代、添加或缺失。

[0068] 在一些实施方式中,提供表达和调节受上述 miRNA 下调影响的靶蛋白用于本发明方法。该组蛋白包括抗凋亡蛋白例如 BCL-2 家族成员、转录调节物、原癌基因、癌基因和参与自我更新过程的其它蛋白质。下文更详细地描述了一些靶蛋白。

[0069] ZFH1B 是通过调节 E-钙粘蛋白参与 TGF β 信号转导途径和上皮-间充质过渡 (EMT) 过程的转录阻抑物。ZFH1B 和 miR-200b 在成年小鼠脑中局部共表达。miR-200b 过表达导致内源性 ZFH1B 阻遏,抑制 miR-200b 可缓解 ZFH1B 阻遏。发现 E-钙粘蛋白启动子的活性受 miR-200b 和 miR-200c 调节。

[0070] BCL-2 家族成员既能促进促凋亡过程又能促进抗凋亡过程。参与抗凋亡的成员包括 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-w、Mcl-1 和 A1。已知它们能通过线粒体膜的渗透性调节凋亡。该蛋白质家族的高水平表达参与致癌作用和正常干细胞的自我更新。

[0071] 作为所公开的 miRNA 靶标的另一组蛋白是 polycomb-组蛋白。属于该家族的蛋白能重塑染色质,作转录因子不能结合 DNA 中的启动子序列。Polycomb 家族蛋白能调节经历更新或衰老的细胞的关键事件。此类家族的一个成员是 BMI1,其 mRNA 靶序列在物种之间高

度保守。发现 BMI1 在非致瘤性癌细胞中下调。

[0072] miRNA 的其它靶标包括造血细胞系和组织中表达的 MYB 原癌基因家族成员,认为它们与增殖和分化的调节相关。

[0073] Myc- 家族蛋白参与肿瘤发生和干细胞基因调节(例如, NMYC)。还发现胰岛素样生长因子结合蛋白,例如 IGFBP1 与某些癌症有关,也受 miRNA 的调节。

[0074] miRNA 可调节的另一蛋白质家族是癌基因的 Ras 家族。Ras 癌基因能调节信号转导和细胞增殖。在许多癌病例中, K-ras 蛋白的累积与潜在的 K-ras 基因突变相关。

[0075] 叉头盒 01A (FOXO1A) 是参与细胞分化和细胞融合早期步骤的一种必需转录因子。它在干细胞维持中也起着重要作用。

[0076] miRNA 调节的另一靶标是转录因子的 SRY- 相关 HMG- 盒 (SOX) 家族。该家族参与胚胎发育的调节和决定细胞命运。与其它蛋白形成蛋白质复合物后, 该家族的成员 SOX2- 起着转录活化剂的作用。它在细胞修复和 DNA 重组中也有作用。

[0077] 这些多核苷酸、多肽及其片段的用途包括但不限于: 本文所述的作为探针和引物起始材料的诊断探针和引物, 用作癌症诊断和治疗抗体的免疫原等。

[0078] 核酸组合物包含片段和引物, 至少长约 15bp、至少长约 30bp、至少长约 50bp、至少约 100bp、至少长约 200bp、至少长约 300bp、至少长约 500bp、至少长约 800bp、至少长约 1kb、至少长约 2.0kb、至少长约 3.0kb、至少长约 5kb、至少长约 10kb、至少长约 50kb, 长度通常少于约 200kb。在一些实施方式中, 多核苷酸片段是多核苷酸的编码序列。还包括本文所提供序列的变体或简并变体。本文提供的多核苷酸的变体具有与所提供序列相同大小的片段相比, 通过牛津分子公司 (Oxford Molecular) 的 MPSRCH 程序执行 Smith-Waterman 同源性检索算法测定的序列相同性高于至少约 65%、高于至少约 70%、高于至少约 75%、高于至少约 80%、高于至少约 85%、或高于至少约 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高 (即 100%) 的片段。可通过在低严谨性条件下 - 例如 50°C 和 10XSSC (0.9M 盐水 / 0.09M 柠檬酸钠) - 杂交来检测具有序列相似性的核酸, 该核酸在 55°C, 1XSSC 中洗涤时维持结合。可通过在高严谨性条件下 - 例如 50°C 或更高和 0.1XSSC (9mM 盐水 / 0.9mM 柠檬酸钠) - 杂交来检测序列相同性。杂交方法和条件是本领领域熟知的, 参见, 例如美国专利号 5,707,829。与所提供多核苷酸序列基本上相同的核酸, 例如等位基因变体 (该基因的遗传改变形式) 在严谨性杂交条件下能结合所提供的多核苷酸序列。

[0079] 可利用本文所述多核苷酸序列产生本文所述 miRNA 的特异性探针。探针通常是本文提供的多核苷酸序列的片段。可化学合成或用限制性酶从较长的多核苷酸产生所述探针。例如, 可用放射性、生物素化的或荧光标签标记探针。优选根据本文提供的多核苷酸序列之任一种鉴定的序列设计探针。

[0080] 癌干细胞的特征

[0081] 在癌症中, 特征分析癌症干细胞能开发专门靶向该关键细胞群, 特别是它们自我更新能力的新治疗方法, 从而获得更有效的治疗。

[0082] 在人类癌症中, 致瘤性癌细胞亚群具有自我更新和分化能力。这些致瘤性细胞负责肿瘤维持, 还产生大量非致瘤性的异常分化后代, 因此符合癌症干细胞的标准。所有致癌潜能 (细胞) 包括在癌细胞的 CD44⁺ 谱系 - 亚群中。这些细胞在约 10³ 个细胞、约 5×10³ 个细胞、约 10⁴ 个细胞剂量下能引发肿瘤生长, 与之相比, 肿瘤悬液需要约 10⁶ 个细胞剂量才能

形成肿瘤, CD44⁺ 谱系 - 细胞在高得多的剂量下也不能形成肿瘤。

[0083] 乳腺癌干细胞 (BCSC) 可通过它们特定标记的表型和 / 或它们的功能表型鉴定。在一些实施方式中, 通过在例如有或没有特定 miRNA 存在下使该细胞与感兴趣标记的特异性试剂结合, 来鉴定和 / 或分离 BCSC。待分析的细胞最初可以是活细胞, 或者可以是固定或包埋的细胞。在一个实施方式中, 采用实时 PCR 分析来分析 miRNA 表达。表 1 所列 miRNA 的高水平表明该细胞是非致瘤性或非侵入性细胞, 而低水平表明为 CSC 细胞。

[0084] 可根据表 1 所列 miRNA 表达水平来鉴定和 / 或特征分析 BCSC。表达水平低或不可检测表明存在癌症干细胞。比较 miRNA 或蛋白质的表达水平时, 可用正常乳腺上皮细胞或非致瘤性癌细胞作为对照。

[0085] 在一些实施方式中, 感兴趣标记的特异性试剂是可直接或间接标记的抗体或多核苷酸。在某些情况中, 抗体可特异性结合受所公开的特异性 miRNA 调节的靶蛋白质, 例如 SOX2。

[0086] 上文所述的蛋白质或多核苷酸探针可用于, 例如测定样品中是否存在任一种本文提供的多核苷酸或其变体。下文更详细描述了这些和其它应用。

[0087] 用本文公开的各种标记染色或与之杂交还能测定原发肿瘤中的癌症干细胞微域。存在此类微域可用于诊断原发和转移部位的鳞状细胞癌, 此类微域数量增加表明肿瘤具有更高的致瘤性能。

[0088] 差别细胞分析

[0089] 患者样品中存在 BCSC 可表明癌的阶段或等级。知晓癌细胞亚型和 BCSC 的位置对诊断和治疗极有帮助。此外, 可利用检测 BCSC 来监测对治疗的反应并有助于预后。预后因素有助于确定治疗方案和强度; 具有强阴性预后特征的患者通常给予更强形式的治疗, 因为认为其潜在的效益能弥补治疗毒性的增加。

[0090] 可定量测定具有本文所述干细胞表型的细胞来测定 BCSC 是否存在。除细胞表面表型鉴定外, 可用于定量测定样品中具有“干细胞”特征的细胞, 可通过特定基因的表达概况、所提供 miRNA 和靶蛋白的表达或通过功能标准, 例如自我更新、体内产生肿瘤的能力来测定, 例如采用异种移植模型等等。

[0091] 可采用的一种方法是本文公开的 miRNA 种类原位杂交。考虑到 miRNA 片段的长度短, 可采用锁定核酸 (LNA) 作为探针, 考虑到其解链温度高以及已知道各 miRNA 的阳性和阴性对照。可在较宽范围内改变解链温度以确定最佳的探针标记条件。还可采用含 1、2、3 或 4 个错配的错配 LNA 探针构成阴性对照。本文所述 miRNA 的检测 (水平) 低或检测不到是 BCSC 的标志之一。

[0092] 测定是否存在 miRNA 种类以供诊断或预后的另一方法是联用 RT-PCR 与激光捕获显微解剖。可用多重 RT-PCR (逆转录 -PCR) 测定组织样品中是否存在 miRNA 种类。

[0093] 也可用任何已知方法进行检测, 包括但不限于采用合适标记的多核苷酸进行原位杂交、PCR (聚合酶链式反应) 和 “Northern” 或 RNA 印迹、阵列、微阵列等或此类技术的组合。在本发明测定方法中可采用本领域已知的多核苷酸的各种标记物和标记方法。

[0094] 采用合适的演绎方案、AI 系统、统计学比较等, 可比较获自患者样品的差别祖细胞分析和参比样品的差别祖细胞分析。与正常细胞、患相似疾病组织的细胞等参比组织分析进行比较, 能表明疾病的阶段。可编辑参比组织分析的数据库。本发明方法可检测临床症

状发作前对更具侵袭性肿瘤生长的易感性,因此能进行早期治疗干预,例如启动化疗、提高化疗剂量、改变化疗药物的选择等。

[0095] 在某些实施方式中,乳腺癌的诊断和预后可包括组织样品的细胞染色。在某些病例中,细胞染色有助于描绘肿瘤内的癌细胞亚型和侵袭性癌细胞定位。可采用本领域已知的常规方法通过细胞染色进行分析。精确计数的技术包括共聚焦显微术、荧光显微术、复杂程度不同的,例如多色通道、低角度和钝角光散射检测通道、阻抗通道等荧光活化细胞分选术。可采用死细胞相关染料(例如碘化丙啶)选出死细胞。

[0096] 抗体试剂可以是 miRNA 靶向蛋白的特异性抗体,或者也可采用 miRNA 本身的特异性多核苷酸探针。与正常细胞或非致瘤性对照相比,miRNA 靶标的高表达或 miRNA 低表达表明存在 BCSC。抗体可以是单克隆或多克隆抗体,可用转基因动物、经免疫的动物、无限增殖的人或动物 B-细胞、编码该抗体或 T 细胞受体的 DNA 载体转染的细胞等产生。制备抗体和它们用作特异性结合成员是否适合的细节是本领域技术人员熟知的。

[0097] 可依据原位杂交分析或抗体结合于组织切片进行分析。此类分析能鉴定肿瘤块中组织学不同的细胞并鉴定此类细胞表达的基因。杂交切片可包含一个或多个实体瘤样品,例如利用组织微阵列(参见,例如 West 和 van de Riin(2006)Histopathology 48(1):22-31;和 Montgomery 等.(2005)Appl Immunohistochem Mol Morphol. 13(1):80-4)。组织微阵列(TMA)包含多张切片。可用本领域已知的方法标记选择的探针,例如感兴趣标记的特异性抗体使之结合于组织切片。染色可与其它组织化学或免疫组织化学方法联用。所选基因在肿瘤基质组分中表达就能根据与软组织肿瘤相关基质细胞的相似性特征鉴定细胞。

[0098] 筛选试验

[0099] 在本发明的某些实施方式中,可将 miRNA 或它们的靶标用于可能有助于研究或药物开发的化合物的筛选方法中。在一些实施方式中,进行筛选以发现能提高所提供 miRNA 的表达或降低其靶蛋白质在癌症干细胞中表达的化合物或细胞因子。这包括混合候选药物与 miRNA 表达量低或不表达的细胞群,例如干细胞或癌症干细胞群,然后测定候选药物产生的任何调节作用。这还包括测定细胞的活性或检测某些靶蛋白、活力、毒性、代谢改变或对细胞功能的影响。

[0100] 尤其感兴趣的是对人细胞有活性药物的筛选试验。为此目的可采用各种试验,包括结合 miRNA 的靶蛋白的免疫试验;测定细胞生长、分化和功能活性;产生的因子等等。具体地说,试验包括分析本文鉴定的受 miRNA 调节的蛋白质的表达。

[0101] 可采用体外培养的细胞、新鲜分离的细胞、遗传改变的细胞或动物、纯化的 miRNA、纯化的 miRNA 调节的蛋白质等进行筛选。在一个实施方式中,进行筛选以测定能减弱 miRNA 靶蛋白活性的候选药物活性。可通过使纯化蛋白质与候选药物接触来测试此类药物。或者,可将细胞与候选物质接触以调节这些蛋白质各自的转录或翻译。在此类试验中,本文公开的 miRNA 可用作协调调节这些蛋白质表达的阳性对照。化合物筛选可鉴定到能调节 miRNA 调节蛋白的活性或 miRNA 本身的药物。能提高特定 miRNA 活性或表达的候选化合物,可进一步了解癌症的生物学对开发癌症治疗剂至关重要。尤其感兴趣的是对人细胞毒性低药物的筛选试验。

[0102] 本文所用的术语“药物”描述了能改变或模拟与缺血相关基因对应的缺血相关激酶生理功能的任何分子,例如蛋白质或药物。通常可采用不同的药物浓度平行运作多个试

验混合物以获得对各种浓度的不同反应。通常取这些浓度之一,即零浓度或检测水平以下浓度作为阴性对照。

[0103] 候选药物包括许多化学类别,虽然它们通常是有机分子,但优选分子量大于 50 而小于约 2,500 道尔顿的小有机化合物。候选药物包含能与蛋白质结构上相互作用的官能团,特别是氢键,通常包含至少一个胺基、羰基、羟基或羧基,优选至少两个化学官能基团。候选药物常包含一个或多个被以上官能团取代的碳环结构或杂环结构和 / 或芳族或多聚芳族结构。也可在生物分子中寻找候选药物,包括肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、它们的衍生物、结构类似物或组合。

[0104] 从各种来源获得候选药物,包括合成或天然化合物的文库。例如,可采用已有的许多方法随机和直接合成各种有机化合物和生物分子,包括表达随机化的寡核苷酸和寡肽。或者,可获得或不难制备细菌、真菌、植物和动物提取物形式的天然化合物文库。此外,不难通过常规的化学、物理和生物化学方法修饰天然或合成产生的文库和化合物,可利于产生组合文库。可对已知的药物进行直接或随机的化学修饰,例如酰化、烷化、酯化、酰胺化等以产生结构类似物。可从文库,例如天然产物文库或组合文库获得测试药物。许多不同类型的组合文库和制备此类文库方法的描述可参见,例如各自通过引用纳入本文的 PCT 出版物 WO 93/06121、WO 95/12608、WO 95/35503、WO 94/08051 和 WO 95/30642。

[0105] 各种其它试剂可包括在筛选试验中。这些试剂包括盐、天然蛋白质(如白蛋白),用于促进最佳蛋白质-蛋白质结合和 / 或降低非特异性或背景相互作用的洗涤剂试剂。可采用能改进试验效率的试剂,例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗微生物剂等。可以任何顺序加入各组分的混合物以提供所需的结合。可在任何合适温度,通常 4-40℃ 下培育。选择(达到)最佳活性的培育时间,但也可优化培育时间以促进快速高通量筛选。通常 0.1-1 小时足够了。

[0106] 某些筛选方法包括筛选能调节 miRNA 靶蛋白,例如 ZFH1B、MYB 原癌基因和 IGFBP1 表达的化合物。此类方法通常包括进行细胞试验,使测试化合物与表达靶蛋白的一种或多种细胞接触,然后检测靶蛋白的表达水平变化。用富含致瘤性或非致瘤特性的细胞进行一些试验。

[0107] 可采用多种不同方法检测表达。可用能与基因转录物(或其衍生的互补核酸)特异性杂交的探针,检测细胞中表达的 mRNA 来测定细胞中基因的表达水平。可裂解细胞进行 Northern 印迹,或不裂解细胞而用原位杂交技术进行检测。或者,可用免疫学方法检测蛋白,其中用能特异性结合该蛋白的抗体检测细胞裂解物。

[0108] 其它细胞试验是报道试验。用操作性连接于编码可检测产物的报道基因的异源核酸构建物进行某种这些试验。可采用许多不同的报道基因。一些报道物本身可检测。此类报道物的一个例子是发射可用荧光检测器检测荧光的绿色荧光蛋白。其它报道物产生可检测产物。此类报道物常常是酶。示范性酶报道物包括但不限于:β-葡萄糖醛酸酶、CAT(氯霉素乙酰转移酶;Alton 和 Vapnek (1979) *Nature* 282 :864-869)、萤光素酶、β-半乳糖苷酶和碱性磷酸酶(Toh 等, (1980) *Eur. J. Biochem.* 182 :231-238 ;和 Hall 等. (1983) *J. Mol. Appl. Gen.* 2 :101)。

[0109] 在这些试验中,使含报道构建物的细胞与测试化合物接触。能结合启动子使之活化或触发产生感兴趣的 miRNA 级联反应的测试化合物将导致可检测报道基因的表达。某些

其它报道试验采用包含异源构建物的细胞进行,所述异源构建物包含能活化表达的转录调控元件。在本文中,还可通过报道基因表达相关信号的产生,来鉴定能结合转录调控元件而活化报道基因表达的,或触发能与转录调控元件结合而活化报道基因表达的物质形成的药物。

[0110] 可将表达或活化水平与基线值比较。如上所述,基线值可以是对照样品的数值或代表对照群体(如健康个体)的统计学数值。还可测定不表达所提供的作为对照的多核苷酸或蛋白质的细胞的表达水平。此类细胞在遗传学上通常与测试细胞基本相同。

[0111] 报道试验中可采用各种不同的细胞类型。可采用真核细胞,该细胞可以是通常用于产生包含重组核酸构建物的细胞的任何细胞。示范性真核细胞包括但不限于:酵母菌和各种高等真核细胞,例如 COS、CHO 和 HeLa 细胞系。

[0112] 可实施各种对照以确保观察到的活性真实,包括用缺乏报道构建物的细胞进行平行反应或使含报道构建物的细胞与测试化合物不接触。也可如下所述进一步验证化合物。

[0113] 可进一步检验通过任何前述筛选方法初步鉴定到的化合物和细胞物质以验证其表观活性。此类方法的基本形式包括将初步筛选鉴定到的候选物给予用作人模型的动物,然后测定特定 miRNA 或靶蛋白的表达是否改变。用于验证研究的动物模型通常是哺乳动物。合适动物的具体例子包括但不限于:灵长类、小鼠和大鼠。

[0114] 设计某些方法来不仅检验前导候选物能否改变模型动物的活性,而且可提供抗侵袭性癌症的保护作用。在此类方法中,将前导化合物给予模型动物(即动物,通常是除人外的哺乳动物)。该动物因其自身的遗传组成或环境因素而易于产生侵袭性癌或已患有该癌。能实现减少侵袭性癌症所需作用的化合物或蛋白质是进一步研究的良好候选对象。

[0115] 本文所述筛选方法鉴定到的活性测试药物可用作合成类似化合物的前导化合物。通常合成的类似化合物具有类似于前导化合物的电子构型和分子构象。可采用例如自洽场(self-consistent field SCF)分析、构型相互作用(CI)分析和简正模式动态分析(normal mode dynamics analysis)等技术鉴定类似化合物。可得到实施这些技术的计算机程序。参见,例如 Rein 等,(1989)Computer-Assisted Modeling of Receptor-Ligand Interactions(受体-配体相互作用的计算机辅助建模)(Alan Liss,纽约)。

[0116] 癌症的治疗

[0117] 本发明还提供降低癌细胞生长的方法。该方法能减少带有本文提供的特异性标记或组合标记的癌细胞数量,降低在癌细胞中差别表达基因的表达,改变 miRNA 表达水平,或降低癌症相关多肽的水平和/或活性。该方法还包括引入可减少癌症(细胞)生长作用的多核苷酸或多肽。例如,可将编码表 1 所列 miRNA 的遗传构建物引入癌症干细胞以提高该细胞的 miRNA 水平。

[0118] 术语 miRNA 指提供的任何序列,通常指提供的成熟序列。术语“微小 RNA”的范围中包括活性与天然微小 RNA 基本上相同的合成分子,例如本领域已知的化学性质改变的合成寡核苷酸。

[0119] 实施本发明方法时,将有效量的以下簇(但不限于)中的微小 RNA 的特异性 miR 制剂:200c-141 簇(miR200c, miR141);200b-200a-429 簇(miR200b, miR200a, miR429);和 182-96-183 簇(miR182, miR96, miR183)引入靶细胞中,可采用任何方便的方法将该制剂引入靶细胞中。靶细胞通常是癌,包括乳腺癌,更具体地说包括乳腺癌干细胞,例如具有

CD44⁺CD24^{-/低}谱系⁻细胞表型的细胞。

[0120] 本发明方法可用于预防或治疗目的。本文所用的术语“治疗”用于指预防疾病和治疗已有的疾病。例如,可在疾病明显发生前给予药物来预防自身免疫疾病。尤其感兴趣的是治疗现有疾病,即通过治疗来稳定或改善患者的临床症状。

[0121] 如本领域所知,miRNA 是长度约 20-25 个核苷酸,例如约 21-24 个核苷酸,例如 22 或 23 个核苷酸的单链 RNA 分子。靶标 miR181a 可与或不与引入的 miR181a 制剂完全互补。如果不完全互补,miRNA 及其相应靶病毒基因组应至少基本上互补,这样该 miRNA 长度上(约 20-25 个核苷酸)的错配数不超过约 8 个核苷酸,在某些实施方式中,不超过约 6 或 5 个核苷酸,例如 4 个核苷酸、3 个核苷酸、2 个核苷酸或 1 个核苷酸。

[0122] miRNA 制剂可提高或降低靶 miRNA 在靶细胞内的水平。当该制剂是抑制性药物时,其通过降低靶细胞中 miRNA 的存在量而抑制靶 miRNA 的活性,所述靶细胞可以存在于体外或体内。“降低含量”表示与对照,即未用本发明方法处理的相同靶细胞相比,靶细胞中的靶 miRNA 水平或含量降低了至少约 2- 倍、通常至少约 5- 倍,例如 10- 倍、15- 倍、20- 倍、50- 倍、100- 倍或更多。

[0123] 当 miRNA 制剂提高了细胞中的靶 miRNA 活性时,靶细胞中 miRNA 的含量提高,所述靶细胞可以存在于体外或体内。“提高含量”表示与对照,即未用本发明方法处理的相同靶细胞相比,靶细胞中的靶 miRNA 水平或含量提高至少约 2- 倍、通常至少约 5- 倍,例如 10- 倍、15- 倍、20- 倍、50- 倍、100- 倍或更多。

[0124] miRNA 抑制制剂表示能抑制靶 miRNA 活性的制剂。抑制性制剂可通过各种不同的机制抑制靶 miRNA 的活性。在某些实施方式中,抑制性制剂是能结合靶 miRNA 并藉此抑制其活性的制剂。代表性 miRNA 抑制性药物包括但不限于:反义寡核苷酸等。其它感兴趣的药物包括但不限于:感兴趣的天然产生或合成的小分子化合物,包括许多化学类别,虽然它们通常是有机分子,但优选分子量大于 50 小于约 2,500 道尔顿的小有机化合物。候选药物包含有与蛋白质结构相互作用的官能团,特别是氢键,通常包含至少一个胺基、羰基、羟基或羧基,优选至少两个化学官能基团。候选药物常常包含一个或多个以上官能团取代的碳环或杂环结构和/或芳族或多聚芳族结构。还在生物分子中寻找候选药物,包括肽、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、它们的衍生物、结构类似物或组合。可用合适的筛选方案鉴定此类分子。

[0125] 反义试剂可以是反义寡核苷酸(ODN),特别是含有化学修饰的天然核酸的合成 ODN,或表达此类反义分子的核酸构建物,例如 RNA。反义序列与靶 miRNA 互补并抑制其表达。可给予一种反义分子或反义分子的组合,所述组合可包含多个不同的序列。

[0126] 可通过表达合适载体中的所有或部分靶 miRNA 序列而产生反义分子,其中对转录起始定向从而将反义链制备成 RNA 分子。或者,反义分子是合成的寡核苷酸。反义寡核苷酸的长度通常至少约 7 个、通常至少约 12 个、更常至少约 20 个核苷酸,不超过约 25 个、通常不超过约 23-22 个核苷酸,其中该长度受抑制效率、特异性(包括不存在交叉反应性)等控制。

[0127] 可用本领域已知的方法化学合成反义寡核苷酸(参见 Wagner 等.(1993) 同上和 Milligan 等,同上)。优选的寡核苷酸含有化学修饰的天然磷酸二酯键结构以提高它们的胞内稳定性和结合亲和力。参考文献中已描述了改变骨架、糖或杂环碱基化学性质的许多

此类修饰。

[0128] 骨架化学性质中有用的改变是硫代磷酸酯；二硫代磷酸酯（其中两个非桥连氧被硫取代）；磷酸酰胺酯（phosphoroamidite）；烷基磷酸三酯和硼磷酸酯（boranophosphate）（键）。非手性磷酸酯衍生物包括 3′ -O′ -5′ -S- 硫代磷酸酯、3′ -S-5′ -O- 硫代磷酸酯、3′ -CH₂-5′ -O- 磷酸酯和 3′ -NH-5′ -O- 氨基磷酸酯。肽核酸用肽键替代整个核糖磷酸二酯骨架。也可采用糖修饰来增强稳定性和亲和力。可采用脱氧核糖的 α-端基异构体，其中碱基相对于天然的 β-端基异构体是倒置的。可改变核糖的 2′ -OH 以形成 2′ -O- 甲基或 2′ -O- 烯丙基糖，从而提供对降解的抗性而不损害亲和力。杂环碱基的修饰必须维持适当的碱基配对。一些有用的取代包括脱氧尿苷取代脱氧胸苷；5- 甲基 -2′ - 脱氧胞苷和 5- 溴 -2′ - 脱氧胞苷取代脱氧胞苷。当分别取代脱氧胸苷和脱氧胞苷时，已证明 5- 丙炔基 -2′ - 脱氧尿苷和 5- 丙炔基 -2′ - 脱氧胞苷能提高亲和力和生物学活性。

[0129] 感兴趣的反义分子包括拮抗性（antagomir）RNA，例如通过引用专门纳入本文的 Krutzfeldt 等（同上）所述。经工程改造使之具有某些“药物-样”特性，例如为稳定性而作化学修饰和偶联胆固醇以便递送的小干扰性双链 RNA（siRNA）已显示在体内能实现内源基因的治疗性沉默。为开发体内沉默性 miRNA 的药理学方法，开发了与 miRNA 互补的、经化学修饰的偶联胆固醇的单链 RNA 类似物，称为“拮抗物”。可采用标准固相寡核苷酸合成方案合成拮抗性 RNA。将 RNA 偶联于胆固醇，还可在一个或多个位置含有硫代磷酸酯骨架。

[0130] 某些实施方式感兴趣的也是 RNAi 制剂。在代表性的实施方式中，RNAi 制剂靶向微小 RNA 的前体分子，称为前-微小 RNA 分子。RNAi 制剂指能通过 RNA 干扰机制调节微小 RNA 表达的制剂。本发明一个实施方式中采用的 RNAi 制剂是以双链体结构存在的小核糖核酸分子（本文也称为干扰性核糖核酸），即寡核糖核苷酸，例如两种不同的寡核糖核苷酸彼此杂交或一种寡核糖核苷酸承担形成小发夹而产生双链体结构。寡核糖核苷酸指长度不超过约 100 个核苷酸的核糖核酸，通常长度不超过约 75 个核苷酸，在某些实施方式中长度小于约 70 个核苷酸。当该 RNA 制剂是两种不同核糖核酸彼此杂交形成的双链体结构，例如 siRNA，该双链体结构的长度通常约 15-30bp，常见约 15-29bp，在某些实施方式中，约 20-29bp 长度，例如尤其感兴趣 21bp、22bp。当该 RNA 制剂是以发夹形式存在的一种核糖核酸的双链体结构，即 shRNA，发夹杂交部分的长度通常与以上 siRNA 类型制剂所提供的相同，或更长 4-8 个核苷酸。该实施方式的 RNAi 重量通常约为 5,000 道尔顿至约 35,000 道尔顿，在许多实施方式中，至少约 10,000 道尔顿 - 小于约 27,500 道尔顿，常常小于约 25,000 道尔顿。

[0131] 当需要提高细胞中 miRNA 表达，例如诱导分化，药物可以是微小 RNA 本身，包括以上关于反义所述的任何修饰的寡核苷酸，例如胆固醇偶联物、硫代磷酸酯键连接等。或者，可采用表达 miRNA 的载体，包括与靶向生物相关的前-miRNA（发夹）序列。

[0132] 可利用表达载体将靶基因引入细胞内。此类载体通常在启动子序列附近含有方便的限制性位点以供插入核酸序列。可制备包含转录起始区、靶基因或其片段和转录终止区的转录盒。可将转录盒引入各种载体，例如质粒；逆转录病毒，例如慢病毒、腺病毒等中，所述载体能在细胞中短暂或稳定维持，通常至少约 1 天，更常至少约数天到数周。

[0133] 表达盒通常采用外源性转录起始区，即除在正常产生的染色体中与 T 细胞受体结合的启动子外的启动子。该启动子在宿主细胞，特别是表达盒靶向的宿主细胞中具有功能。

可用体外重组方法引入启动子,或由合适宿主细胞对该序列作同源整合。该启动子操作性连接于自身抗原的编码序列从而产生可翻译的 mRNA 转录物。表达载体在启动子序列附近方便地含有限制性位点以利于自身抗原序列的插入。

[0134] 将表达盒制备成含有组成型或诱导型转录起始区、编码自身抗原序列的基因和转录终止区。可将表达盒引入各载体中。感兴趣的启动子可以是诱导型或组成型启动子,通常是组成型启动子,可在疫苗接受细胞中提供高水平的转录。启动子可以仅在接受细胞类型中具有活性,或者可在许多不同细胞类型中具有广泛活性。许多哺乳动物细胞的强启动子是本领域已知的,包括 β -肌动蛋白启动子、SV40 早期和晚期启动子、免疫球蛋白启动子、人巨细胞病毒启动子、逆转录病毒 LTR 等等。启动子可与增强子结合或不结合,其中增强子可以天然与特定启动子结合或与不同启动子结合。

[0135] 在编码区的 3' 端提供终止区,该终止区可以天然与可变区结构域结合或可衍生自不同来源。可采用不会有害地影响表达的各种终止区。可在体外或可在合适的宿主细胞,例如大肠杆菌中进行各种操作。各次操作后,可克隆所得的构建物,分离载体,筛选 DNA 或测序以确保构建物的正确性。可通过限制性分析、测序等筛选序列。

[0136] 如上所示,可采用任何便利的方案将 miRNA 药物引入靶细胞内,所述方案根据靶细胞是在体外还是体内而有所不同。可采用许多选项将 dsRNA 递送入细胞或细胞群,例如细胞培养物、组织、器官或胚胎中。例如,可在胞内直接引入 RNA。在此类情况中,通常采用各种物理方法,例如显微注射给予(参见,例如 Zernicka-Goetz 等, (1997) *Development* 124 : 1133-1137 ;和 Wianny 等, (1998) *Chromosoma* 107 :430-439)。细胞递送的其它选择包括在 dsRNA 存在时渗透处理细胞膜和电穿孔、脂质体介导的转染或用诸如磷酸钙等化学物质转染。也可采用许多已建立的基因治疗技术将 dsRNA 引入细胞内。例如,通过将病毒构建物引入病毒颗粒内可实现将表达构建物有效引入细胞内以转录该构建物编码的 RNA。

[0137] 例如,可将抑制性药物直接喂入、注射入含靶基因的宿主生物。可将该药物直接引入细胞内(即胞内);或胞外引入体腔、细胞间隙,引入宿主的循环系统,口服引入等。口服引入的方法包括直接混合 RNA 与生物体的食物。引入核酸的物理方法包括将 RNA 溶液直接注射入细胞或胞外注射入生物体。该药物的引入量应能递送每个细胞至少一拷贝。该药物的更高剂量(例如,每个细胞至少 5、10、100、500 或 1000 个拷贝)可产生更有效的抑制;对于具体应用,较低剂量也可能有用。

[0138] 采用脂质体时,可将能结合胞吞作用相关细胞表面膜蛋白的物质连接于脂质体使脂质体靶向 T 细胞而促进摄取。可连接的蛋白质的例子包括能结合 T 细胞的衣壳蛋白或其片段,能特异性结合循环性 T 细胞上经历内化的表面蛋白的抗体和靶向 T 细胞内胞内定位的蛋白质。基因标记和基因治疗方案的综述见 Anderson 等, (1992) *Science* 256 :808-813。

[0139] 在某些实施方式中,采用流体动力学核酸给予方案(hydrodynamic nucleic acid administration protocol)。当药物是核糖核酸时,特别感兴趣的是下文详细描述流体动力学核糖核酸给予方案。当药物是脱氧核糖核酸时,感兴趣的是 Chang 等., *J. Virol.* (2001) 75 :3469-3473 ;Liu 等., *Gene Ther.* (1999) 6 :1258-1266 ;Wolff 等., *Science* (1990) 247 :1465-1468 ;Zhang 等., *Hum. Gene Ther.* (1999) 10 :1735-1737 ;和 Zhang 等., *Gene Ther.* (1999) 7 :1344-1349 所述的流体动力学脱氧核糖核酸给予方案。

[0140] 其它感兴趣的核酸递送方案包括但不限于以下文献所述的那些:感兴趣的美国专

利包括 5,985,847 和 5,922,687 (其内容通过引用纳入本文);WO/11092;Acsadi 等., New Biol. (1991)3:71-81;Hickman 等., Hum. Gen. Ther. (1994)5:1477-1483;和 Wolff 等., Science(1990)247:1465-1468 等等。

[0141] 根据药物的性质,可采用能在靶细胞中产生所需 miRNA 调节作用的任何方便方法给予宿主活性药物。因此,可将药剂掺入各种制剂以便治疗性给药。更具体地说,可通过与合适的药学上可接受的运载体或稀释剂混合将本发明的药物配制成药物组合物,可配制成固体、半固体、液体或气体形式的制品,例如片剂、胶囊、粉末、颗粒、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂和气溶胶。因此,可以各种方式给予该药物,包括口服、口腔含化、直肠、胃肠外、腹膜内、真皮内、透皮、鞘内等给予。

[0142] 本文所用的术语“单位剂型”指适合人和动物对象单位剂量的物理上不连续的单位,每个单位含有经计算足以产生所需作用的预定量的本发明化合物以及药学上可接受的稀释剂、运载体或载体。本发明新型单位剂型的规格取决于所用的特定化合物和要达到的效果以及各化合物在宿主中的相关药代动力学。

[0143] 药学上可接受的赋形剂,例如载体、佐剂、运载体或稀释剂不难公开获得。而且,药学上可接受的辅助物质,例如 pH 调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、润湿剂等不难公开获得。

[0144] 本领域技术人员不难理解剂量水平可随具体化合物的功能、递送载体的性质等不同。本领域技术人员不难采用各种方式测定给定化合物的优选剂量。如上所述将有效量的 miRNA 物质引入哺乳动物细胞内以调节靶基因的表达,导致修饰癌的致癌活性,从而提供用靶向癌症干细胞的方法治疗癌症的方式。

[0145] “降低癌细胞生长”包括但不限于:降低癌细胞增殖,降低非癌细胞变成癌细胞的发生率。采用任何已知的试验,包括但不限于 [³H]-胸苷掺入,一段时期内的细胞计数;检测和/或测量 BCSC 相关标记等,不难测定是否实现了癌细胞生长的降低。

[0146] 本发明提供治疗癌症的方法,通常包括给予有此需要的个体能降低癌细胞生长的物质,给予量应足以降低癌细胞生长并治疗癌症。可采用各种已知的癌症诊断试验,包括但不限于:活检、对比放射照相研究、CAT 扫描和检测个体血液中癌症相关的肿瘤标记,来评估某物质或该物质的具体用量是否有效治疗了癌症。可全身或局部,通常是全身给予该物质。

[0147] 可使能降低癌细胞生长的药物,例如化疗药物靶向癌细胞。因此,在一些实施方式中,本发明提供将药物递送给癌细胞的方法,包括将药物-多肽或药物-多核苷酸复合物给予对象,其中所述复合物对于 miRNA-调节的多肽或 miRNA 本身具有特异性,所述药物是能降低癌细胞生长的药物,各种药物是本领域已知和上文讨论过的。可通过将药物偶联于(例如,共价或非共价直接连接或通过接头分子连接,从而形成药物-抗体复合物)miRNA 的特异性抗体或受 miRNA 调节的多肽来实现靶向。偶联药物形成复合物的方法是本领域熟知的,本文无需赘述。

[0148] 本说明书述及的各出版物出于所有目的通过引用全部纳入本文。

[0149] 应理解本发明不限于具体的方法、方案、细胞系、动物种或属和所述的试剂,因为这些均可改变。还应理解本文所用的术语目的只是描述特定的实施方式,不是要限制本发明的范围,本发明的范围只由随附的权利要求书限制。

[0150] 除非文中另有明确表述,本文所用的单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数形式。因此,例如,述及“一个细胞”包括多个此类细胞,述及“该培养物”包括述及一个或多个培养物和本领域技术人员已知的其等价形式,等等。除非另有表述,本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域普通技术人员共同理解相同含义。

[0151] 实验

[0152] 实施例 1

[0153] 鉴定乳腺癌干细胞的基因标签

[0154] 我们曾根据 CD44 和 CD24 表达将 BCSC 鉴定为 CD44⁺CD24^{-/低}谱系。将从三份乳腺还原 (breast reduction) 样品分离的正常乳腺上皮细胞以细胞表面标记的表达定义为 ESA⁺谱系⁻(CD64⁻、CD31⁻、CD140b⁻、CD45⁻)。我们通过微阵列分析,寻找分离自 6 位患者(有原发性恶性胸膜渗出的 3 个人和在免疫缺陷小鼠中乳腺肿瘤生长为实体瘤异种移植物的 3 个人)的 BCSC 与 3 次还原乳房成形术 (reduction mammoplasties) 产生的正常人乳腺上皮细胞之间差别表达的基因。根据表达水平有两倍差异选出一组 186 种基因,所有样品的 t- 检验 P 值 < 0.005。用本-赫氏方法 (Benjamini-Hochberg procedure) 控制假发现率 (FDR)。根据以上标准,清单中基因的 FDR 不到 5%。如预计的那样,作为癌症干细胞基因标签的 186 种基因的基因表达模式足以鉴别乳腺癌干细胞与正常乳腺上皮细胞。我们还对 3 份异种移植物的 BCSC 样品和 1 份正常乳腺上皮样品中随机选择的 14 种基因进行实时 PCR 来验证这 186 种基因的差别表达。实时 PCR 所见的各肿瘤样品中的基因表达模式在很大程度上与微阵列数据观察到的相一致:在检验的 3 个肿瘤中,我们观察到所有 14 种基因的表达模式相一致,在第三个肿瘤中,14 种基因中有 9 种表达模式与阵列数据相一致。(参见 Liu, M. F. Clarke, M. F. Association of a GeneSignature from Tumorigenic Breast Cancer Cells with Clinical Outcome(致瘤性乳腺癌细胞的基因标签与临床结果相关), The New England Journal of Medicine, 356 :217-226, 2007, 通过引用专门纳入本文)。

[0155] 用 ABI 阵列进一步筛选 10 个患者肿瘤的 BCSC 和非致瘤性癌细胞表达了 500 种以上的 miRNA。用实时 RT-PCR 证实了这些结果(表 2)。

[0156] 根据微小 RNA 表达的结果,发现 miRNA 在调节基本 BCSC 功能中起着重要作用。由 miR-182、miR-182、miR-200a、miR-200b、miR-200c 组成的一组 miRNA 在乳腺癌干细胞中一致下调。在胚胎癌细胞 (EC 细胞) 中完全丧失所有 5 种 miRNA 的表达,但它们在正常胚胎干细胞 (ES 细胞) 中表达。这些数据证明乳腺癌中存在具有干细胞-样特性的引发肿瘤的细胞群,其 miRNA 可用作诊断或治疗靶标。

[0157] 然后研究了这些 miRNA 的靶标。认为 m200b 和 m200c 具有相同的靶标。已经验证的 m200b 的一个靶标是抑制 E- 钙粘蛋白表达并在正常干细胞生物学和 EMT 中起作用的蛋白质 ZFH1B。据报道, BCL-2 家族中抗凋亡蛋白的多个成员也是靶标。BCL-2 家族蛋白不受控制的表达涉及正常干细胞的致癌作用和自我更新。

[0158] 这些 mRNA 中的四种 (m183, m200a, m200b, and m200c) 可靶向 BMI1。BMI1 在许多组织的正常干细胞和至少一些癌症干细胞自我更新中起作用。重要的是,我们发现 BMI1 蛋白在许多患者的肿瘤中所见的非致瘤性癌细胞中下调。BMI1 mRNA 中的靶序列在物种之间高度保守,使它很可能成为真正的靶标,

[0159] 这些 miRNA 的其它感兴趣靶标是 MYB 原癌基因、NMYC、IGFBP1、KRAS、FOXO1A 和

Sox2。MYB 和 NMYC 基因与正常和恶性干细胞更新相关。近年（发现）MYB 涉及乳腺癌的肿瘤发生。FOXO1A 在干细胞维持中起作用。CSC 在微阵列上过表达了这些基因中的几种。Affymetrix 阵列检测到 BCSC 表达的这些基因中有几种差别达 2-14 倍。

[0160] 实施例 2

[0161] 依据福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）肿瘤标本开发可用作预后和预测工具的标记。利用本文鉴定的在 BCSC 中差别表达的序列产生标记（原位杂交探针）以测定福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）组织中肿瘤干细胞的数量和位置。通过组织学检验分析了所有乳腺癌活检和切片标本，该检验采用福尔马林固定后石蜡包埋材料的薄切片。因此，全国外科病理学部门档案室中保存了大量收集的肿瘤标本，可用于组织学研究肿瘤干细胞和它们在临床结果中所起的作用以及对辅助治疗的反应。

[0162] 利用含有福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）的临床结果已知的肿瘤标本的组织微阵列（TMA）测定这些发现的临床意义。测定了包括肿瘤中的正常基质细胞、乳腺 CSC 和其它癌细胞的各肿瘤细胞群所表达的预后或预测标记。

[0163] 开发了原位杂交探针（ISH）以评价石蜡包埋组织中的基因表达。在约 10 天中产生 ISH 探针。这些探针具有成功率。St Croix 等和 Iacobuzio-Donahue 等描述了 ISH 技术。它采用长度为 400-600 个核苷酸的长 RNA 探针，依赖于信号的酪胺放大，然后用生色或荧光底物显色。这些试剂对石蜡包埋福尔马林固定的组织工作得极好。ISH 探针优于常规抗血清或单克隆抗体在于其可包括有义链或错义探针作为对照。对于所选择的探针，对乳腺癌冷冻标本的激光捕获解剖材料进行 RT-PCR 以验证其表达模式。

[0164] 构建了含多达 500 个乳腺癌的 TMA 可用一个 TMA 模块代表。乳腺的 TMA 包括 1) 正常乳腺组织的微阵列；2) 注释乳腺癌组织的微阵列。将获得这些病例的临床随访报告。3) 为研究乳腺癌之间的变异性，具体地说是患者 - 特异性因素（与各肿瘤 - 特异性因素相反）所确定的各癌症标本中肿瘤干细胞存在数量的（变异）程度，用患者的 2 个独立原发乳腺癌（breast cancer primary）的乳腺癌材料产生 TMA。4) 为研究转移过程对乳腺癌中肿瘤干细胞数量的影响，产生了代表 20 位患者材料的组织微阵列。对于各患者，原发性乳腺肿瘤用一个或多个淋巴结转移灶和远端部位，例如脑、肺或骨的转移灶一起代表。5) 还可采用含有原发侵袭性乳腺癌标本的乳腺癌组织微阵列，可采用全部患者的结果数据，随访中值为 15.4 年（6.3-26.6 年）。随访包括总存活数、疾病特异性存活数和首次复发时间。

[0165] 测定组织学切片中存在的 miRNA 种类。miRNA 种类可用作肿瘤干细胞的标记。采用解链温度远高于 RNA 的锁定核酸（LNA）进行 miRNA 种类的原位杂交。

[0166] 采用 LNA 探针和各 miRNA 种类的已知阳性和阴性对照检查组织微阵列（由 RT-PCR 验证），实验方法的解链温度变化范围很大。采用含 1、2、3 或 4 个错配的错配 LNA 探针组成的阴性对照。

[0167] 测定各种组分中（肿瘤细胞与基质细胞）是否存在 miRNA 种类的第二种方案联用 RT-PCR 与激光捕获显微解剖。采用少至 25 个细胞，线性扩增后可产生足够的材料以可靠地定量测定约 500 种不同的 miRNA。通过激光捕获显微解剖不难获得细胞数。用 miRNA 标记分析这些乳腺癌 TMA 能测定最佳探针的回溯方式（retrospective manner）。

[0168] 实施例 3

[0169] 赋予 CSC 对抗标准细胞毒性化疗的靶途径。采用外源性 miRNA 或合成 shRNA 靶向

使 CSC 对抗治疗的途径。采用了以下三种不同的公布方法递送 shRNA：脂质体递送（参见 Sorensen 等. (2003) *J Mol Biol* 327,761-6）、将 shRNA 与去端肽胶原 (atellocollagen) 偶联（参见 Takeshita 等. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* 102,12177-82）和将 shRNA 与单克隆抗体 / 鱼精蛋白复合物偶联（参见 Song 等. (2005) *Nat Biotechnol* 23,709-17）。第三种方法采用能特异性靶向癌细胞的抗体。在后一情况中，检验了特异性结合 CSC 的抗体或靶向所有癌细胞的抗体。用流式细胞术鉴定靶向特定异种移植肿瘤中 CSC 或所有癌细胞的抗体。

[0170] 检验了 6 位不同患者的肿瘤产生的异种移植肿瘤以确定全身递送 shRNA 是否增强了化疗（环磷酰胺、紫杉醇和阿霉素）或放疗效果。产生异种移植肿瘤，当它们达到 0.5cm 大小时，用一种细胞毒药物和脂质体递送的偶联于去端肽胶原的实验性 shRNA 或对照 shRNA，或一种单克隆抗体 / 鱼精蛋白复合物治疗小鼠。治疗后继续检测肿瘤体积 4 个月。各实验组至少包括 10 只小鼠，重复实验 3 次。此外，取出用对照或实验性 shRNA 治疗的 5 只小鼠的肿瘤进行分析以确定 shRNA 在体内下调了感兴趣蛋白的表达。

[0171] 递送靶向诸如 BMI1、MYB、PTEN、STAT 等途径（CSC 差别表达的 miRNA）和其它途径的 shRNA 以测定对乳腺癌干细胞存活和自我更新的影响。如上所述进行这些实验。例如全身性递送在 CSC 中低表达的 miRNA 以测定其治疗潜力。

[0172] 实施例 4

[0173] 下调微小 RNA 簇将正常与恶性乳腺干细胞相联系

[0174] 人乳腺癌包含具有回忆正常成人和胚胎干细胞特性的明显癌症干细胞群 (BCSC)。正常和恶性干细胞共有的自我更新和分化的分子调节剂尚未见描述。我们发现 BCSC 和非致瘤性癌细胞差别表达 37 种 miRNA。在正常乳腺干细胞、人乳腺癌干细胞和胚胎癌细胞中，miR-200c-141、miR-200b-200a-429 和 miR-183-96-182 三簇下调。miR-200c 可调节已知的胚胎干细胞自我更新和分化的调节剂 SOX2 的表达。此外，miR-200c 和 miR-183 的表达抑制了胚胎癌细胞的体外生长，消除了它们体内形成肿瘤的能力并抑制了乳腺癌细胞的体外集落生成。这三簇 miRNA 的下调可提供联系乳腺癌干细胞和正常干细胞生物学的分子连接。

[0175] 在本项研究中，我们鉴定到在正常小鼠乳腺干细胞、人乳腺癌干细胞和人胚胎癌细胞中特异性下调的 3 簇 miRNA。miR-200c 和 miR-183（位于下调簇中 2 簇的 miRNA）的表达通过损伤干细胞 / 祖细胞的维持而抑制胚胎癌细胞的体外生长，抑制了它们体内的致瘤性并强烈抑制乳腺癌细胞的集落生成。我们的结果表明下调这三簇 miRNA 调节了正常和恶性干细胞的干细胞自我更新途径。

[0176] 结果

[0177] 人乳腺和胚胎干细胞的 MiRNA 模式分析。由于 miRNA 是参与正常胚胎和组织干细胞自我更新和分化的关键调节剂，我们比较了人 CD44⁺CD24^{- / 低}谱系⁻乳腺癌细胞 (TG 细胞) 与其余⁻非致瘤性乳腺癌细胞谱系 (NTG 细胞) 之间的 miRNA 表达模式。在许多乳腺癌患者中，与其余谱系的乳腺癌细胞相比，小群 CD44⁺CD24^{- / 低}谱系⁻癌细胞在免疫缺陷小鼠中具有高度致瘤性。CD44⁺CD24^{- / 低}谱系⁻细胞具有干细胞样特性，例如自我更新和分化能力，可从少至 200 个细胞产生原始肿瘤，而数万个其余谱系的非致瘤性癌细胞不能。

[0178] 采用多重实时 PCR 检测了分离自 3 个人乳腺肿瘤 TG 细胞和 NTG 细胞中 460 种

miRNA 的表达。我们发现在分析的所有 3 个样品中,与 NTG 细胞相比,有 37 种 miRNA 在 TG 细胞中上调或下调(图 1A)。然后检测到总共 11 组人 TG 细胞和 NTG 细胞中有这 37 种差别表达的 miRNA 表达,该分析证实这 37 种 miRNA 确实为差别表达(图 1B)。三簇 miRNA 中,miRNA-200c-141 簇位于染色体 12p13 上,miR-200b-200a-429 簇位于染色体 1p36 上和 miR-183-96-182 簇位于染色体 7q32 上,在人乳腺癌 TG 细胞中均下调(图 1C)。例如,与 NTG 细胞相比,TG 细胞的 miR-200a、miR-200b 和 miR-200c 表达低 2-218 倍。

[0179] 据认为 CD44⁺CD24^{-/-低}谱系⁻细胞是正常乳腺干细胞或早期祖细胞的对应恶性细胞。类似地,胚胎癌细胞是生殖细胞产生的恶性细胞,它们共有多能干细胞的许多特性。因此,检验了 Tera-2 胚胎癌细胞的这些 miRNA 表达。值得注意的是,Tera-2 细胞或不表达可检测水平的各 miRNA,或表达水平正好在可检测水平(图 1D)。当表达水平与乳腺癌细胞相比时,Tera-2 细胞表达的所有这些 miRNA 比乳腺癌 NTG 细胞低至少 4 倍。miRNA 种子序列的作用是使 miRNA 指向其 mRNA 靶标。显然两组含有基本上相同种子序列的 miRNA(miR-200c/miR-200b/miR-429miRNA 和 miR-200a/miR-141miRNA)形成了 miR-200c-141 簇和 miR-200b-200a-429 簇(图 1C)。鉴于此种相似性和观察到的表达模式,所有这 3 簇 miRNA 在乳腺癌 CD44⁺CD24^{-/-低}谱系⁻细胞和 Tera-2 胚胎癌细胞中的下调对维持癌细胞的干细胞功能至关重要。

[0180] MiRNA 表达将正常乳腺发育与乳腺癌干细胞分化相联系。癌细胞与正常组织干细胞功能的相似性提示,正常干细胞自我更新和/或分化途径的活化可解释与恶变相关的许多特性。因此,我们检验了早期乳腺干细胞和祖细胞及更多的分化乳腺上皮祖细胞中乳腺癌 TG 细胞和 NTG 细胞差别表达的 miRNA 表达。虽然仍然只部分了解小鼠乳腺上皮的细胞体系(cellularhierarchy),但已知 CD24⁺CD49f^高CD29^高Sca-1⁻小鼠乳房脂肪垫细胞富含在体内能再生整个乳腺的乳腺干细胞。我们收集的 CD24⁺CD49f^高CD45⁻CD31⁻CD140a⁻Ter119⁻细胞(MRU)富含乳腺干细胞,收集的 CD24^高CD49f^低CD45⁻CD31⁻CD140a⁻Ter119⁻细胞(MaCFC)富含更加分化的乳腺上皮祖细胞(图 2A)。我们发现与 MaCFC 相比,在人乳腺癌 TG 细胞中下调的所有这三簇 miRNA 在小鼠 MRU 细胞中也下调(图 2B)。这证明在乳腺癌 TG 细胞与 NTG 细胞之间差别表达的这 3 簇 miRNA 是正常乳腺细胞发育途径的关键组分。

[0181] MiR-200c 靶向 SOX2. 通过 TargetScan 4.2 预测 miR-200bc/429 的潜在分子靶标。在潜在的靶标中,我们关注 SOX2,因为它具有正统靶标标志性的关键保守核苷酸并且已知它是调节其它类型干细胞(包括胚胎干细胞)自我更新和分化所必须。通过萤光素酶报道试验评价了 miR-200c 调节 SOX2 的 3' UTR 能力。采用不表达 miR-200c 和 miR-429 和仅表达可检测水平 miR-200b 的 HEK293T 细胞。将 SOX2 的 3' UTR 靶位点克隆入 pGL3- 对照载体中萤光素酶小基因的下游。用 pGL3 萤光素酶载体、pRL-TK Renilla 萤光素酶载体和 miR-200c 前体 RNA 共转染 HEK293T 细胞。我们观察到对于 SOX2,萤光素酶活性被抑制了 60% (图 3B);而且,miRNA-200bc/429 种子区的突变消除了 miRNA 抑制 SOX2 表达的能力,从而证明该靶序列对 SOX2 的特异性(图 3A 和 3B)。

[0182] 还检验了 miR-200c 调节内源性 SOX2 蛋白的能力。为此,我们用表达 miR-200c 的慢病毒感染 Tera-2 细胞。用流式细胞术收集被感染的细胞。蛋白质印迹显示表达 miR-200c 的细胞中 SOX2 蛋白表达降低(图 3C)。相反,阴性对照 -miR-30a 和 miR-183 不调节 SOX2

蛋白表达。随后我们检测了收集自人原发乳腺癌样品的致瘤性 CD44⁺CD24^{-/-}谱系⁻细胞 (TG 细胞) 和 NTG 细胞中的 SOX2 表达。如图 3D 所示, 乳腺癌 NTG 细胞的 SOX2 蛋白表达明显低于 TG 细胞。

[0183] MiR-200c 和 miR-183 体外抑制癌细胞生长。观察到相同的 miRNA 簇在正常乳腺干细胞、致瘤性 CD44⁺CD24^{-/-}谱系⁻乳腺癌细胞和胚胎癌细胞中下调, 暗示这些 miRNA 是干细胞关键功能, 例如自我更新和 / 或分化的调节剂。实际上, 近年业已证明 miR-200 家族的 miRNA 通过抑制 ZEB1 和 ZEB2 (E- 钙粘蛋白的转录阻抑物) 表达而防止了 EMT (上皮向间充质的过渡)。EMT 是干细胞的一种特性, 与正常和癌症干细胞相关联。为测定这些 miRNA 的一些表达如何影响细胞, 我们用表达 miR-200c 或 miR-183 的慢病毒载体感染细胞。被 miR-200c 或 miR-183 慢病毒感染的细胞的形态提示它们已分化 (图 4A)。实际上, 用抗-神经元特异性 III 类微管蛋白 (Tuj-1) 抗体染色显示被 miR-200c 感染的 Tera-2 细胞优先表达有丝分裂后早期神经元的标记 Tuj1 抗原, 提示该 miRNA 诱导了神经分化 (图 4B)。

[0184] 我们发现被 miR-200c 或 miR-183 慢病毒感染, 但不是被对照慢病毒感染的 Tera-2 细胞显示生长迟滞 (图 4C)。miR-200c 导致的生长迟滞强于 miR-183, 反映为所观察到的神经发育强度 (图 4B 和 4C)。小鼠 MMTV-Wnt-1 乳腺肿瘤由腔上皮和肌上皮细胞及扩增的乳腺干细胞库组成。我们用表达 miR-200c 或 miR-183 的慢病毒感染 MMTV-Wnt-1 鼠乳腺癌细胞。被 miR-183 或 miR-200c 感染细胞的集落形成几乎受到完全抑制, 与对照慢病毒感染的细胞相比, miR-200c 的集落数降低 96%, miR-183 降低 94% (图 5A)。

[0185] 正常乳腺干细胞 / 祖细胞 (MRU, 乳腺再生单位) 和 MMTV-Wnt-1 乳腺癌干细胞, 是肌上皮细胞细胞角蛋白 CK14 和上皮细胞细胞角蛋白 CK8/18 双表型表达细胞。成熟上皮细胞表达 CK8/18 或 CK19 但不表达 CK14。肌上皮细胞表达 CK14 但不表达 CK8/18 或 CK19。对照病毒感染的乳腺癌细胞形成了大集落并表达 CK14 和 CK8/18, 偶有细胞表达 CK19 (图 5B), 而被表达 miR-183 或 miR-200c 的病毒感染的细胞仅形成显示 CK14 水平低的小细胞聚集体 (图 5B)。这些结果显示 miR-183 和 miR-200c 感染的乳腺癌细胞丧失了祖细胞的表型, miR-183 和 miR-200c 的表达诱导了乳腺癌干细胞的体外分化。

[0186] miR-200c 和 miR-183 抑制胚胎癌细胞的致瘤性。为测定 miR-200c 和 miR-183 对体内癌细胞生长影响的意义, 用表达 miR-200c 或 miR-183 的慢病毒或对照慢病毒感染 Tera-2 胚胎癌细胞, 通过流式细胞术收集被感染的细胞。然后将被感染的 Tera-2 细胞皮下注射入免疫缺陷 NOD/SCID 小鼠。两个月后, 我们观察到注射被对照慢病毒感染的 50,000 个 Tera-2 细胞的 3/3 只小鼠明显形成了肿瘤, 而接受 miR-200c 感染和 miR-183 感染的 Tera-2 细胞的 3 只小鼠无一形成肿瘤 (图 6)。

[0187] 本文报道的结果证明 miR-200c-141、miR-200b-200a-429 和 miR-183-96-182 在正常乳腺干细胞、人乳腺癌干细胞和胚胎癌细胞中下调, SOX2 表达受 miR-200c 调节。SOX2 是 HMG- 结构域蛋白家族的一员, 与 OCT4 形成的复合物可结合 DNA、调节转录并指导胚胎干细胞和一些谱系的特异性干细胞 (例如神经干细胞) 的自我更新和分化。在本文中, 我们观察到 miR-200c 和 miR-183 表达还抑制了胚胎干细胞的体外生长、诱导它们的神经分化、消除它们的体内肿瘤形成能力并抑制乳腺癌细胞的体外集落生成性能。因此, 我们关于差别 miRNA 表达的数据提供了癌症干细胞与胚胎干细胞之间的分子联系, 以及对许多患者的肿瘤中 CD44⁺CD24^{-/-}谱系⁻乳腺癌细胞亚群显示致瘤性增加的分子解释。

[0188] 我们的分析揭示有 5 种差异表达的 miRNA 下调、它们共有相同的种子序列、尚未绘制不同染色体上的两簇图谱。这些 miRNA 家族的功能性冗余度可能反映了通过确保单一突变不会干扰它们靶标的调节从而维持干细胞稳态和防止肿瘤的可靠机制。miRNA 可调节 SOX2 引起了人们的兴趣。实际上, SOX2 与 OCT4 不仅为 ESC 的自我更新和维持多能性所必须,而且是体细胞重新编程诱导多能干细胞 (iPSC) 的核心因子。考虑到这些观察以及报道的 SOX2 与乳腺癌的联系,构成癌症干细胞和胚胎干细胞自我更新和分化基础的是共有广泛的调节基因网络。

[0189] 这些研究描述的 miRNA 模式无疑指出了可能有许多其它因素使致命癌症与正常干细胞功能相联系。预测程序,例如 Targetscan4.2 提示可能有受 miRNA-200c-141、miR-200b-200a-429 和 miR-183-96-182 调节的许多其它基因在功能上对于干细胞至关重要。

[0190] 我们筛选中鉴定到的其它 miRNA 可能对致癌性也至关重要。例如,我们的数据分析还表明,乳腺癌干细胞的 miR-155 表达比其它癌细胞要高。值得注意的是,最初将 miR-155 鉴定为是 B 细胞淋巴瘤的致癌 BIC 基因座的产物,其高水平表达与乳腺癌患者预后差相关。当血液系统持续表达 miR155 时,观察到异常增殖和脊髓发育不良。因此,miR-155 表达增加也是乳腺癌干细胞增殖比其它非致癌性对应细胞更快的标志。

[0191] EMT 是一种广泛分布的发育程序,可调节许多组织和器官的细胞迁移,与正常和恶性乳腺干细胞功能相关。近年的研究显示在 $CD44^+CD24^{-/低}$ 谱系 - 乳腺癌细胞中,包括 SNAI2 在内的 EMT 途径诸组分表达最高。我们在此证明,在人乳腺致癌性 $CD44^+CD24^{-/低}$ 谱系 - 细胞中 miR-200 家族 miRNA 受到强烈抑制。miRNA 的 miR-200 家族抑制了用作 EMT 诱导物的 ZEB 1 和 ZEB2 的翻译。miR-200 家族 miRNA 靶向 ZEB1 和 ZEB2 的 3' UTR 中多个位点,抑制 ZEB1 和 ZEB2 上调 E-钙粘蛋白的表达而抑制 EMT。总之这些发现证明 miR-200 家族 miRNA 通过调控正常和恶性乳腺癌细胞中的 EMT 程序而成为干细胞功能的重要调节剂。

[0192] 小结,本发明的发现提供了正常乳腺干细胞 / 祖细胞、 $CD44^+CD24^{-/低}$ 谱系 - 乳腺癌细胞与胚胎癌细胞之间的强效分子联系。人乳腺癌细胞亚组和正常乳腺干细胞中 miR-200a、miR-200b、miR-200c 和 miR-141 显著下调以及 miR-200c 能调节自我更新基因的事实,提示正常干细胞和 $CD44^+CD24^{-/低}$ 谱系 - 乳腺癌细胞共有调节干细胞功能 (例如自我更新和 EMT) 的分子机制。

[0193] 实验步骤

[0194] 细胞培养.

[0195] 将人胚胎肾脏 (HEK) 293T 细胞维持在含 10% FBS、100U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素和 250ng/mL 两性霉素 B (英杰公司 (Invitrogen)) 的 Dulbecco 改进 Eagle 培养基 (DMEM) 中,5% CO_2 和 37°C 下培养。人胚胎癌细胞系 Tera-2 (HTB-106) 购自 ATCC,在含 100 单位 / 毫升青霉素 G、100 μ g/ml 链霉素和 250ng/ml 两性霉素 B 和补加 15% 胎牛血清的改进 McCoy 培养基 (英杰公司) 中生长,5% CO_2 和 37°C 下培养。

[0196] 制备单细胞悬液和流式细胞检测. 获得斯坦福大学研究伦理委员会 (Research Ethics Boards at Stanford University) 和加利福尼亚州希望癌症中心城市 (City of Hope Cancer Center in California) 批准,原发性乳腺癌标本得自知情同意患者。用机械方法解剖分离肿瘤标本,与 200U/ml Liberase Blendzyme 2 (罗氏公司 (Roche)) 一起培

育。如前文所述进行细胞染色和流式细胞检测。将用机械方法解剖分离的小鼠正常乳腺标本与 200U/ml LiberaseBlendzyme 4(罗氏公司)一起培育。如前文所述进行细胞染色和流式细胞检测。

[0197] 将胚胎癌细胞移植入 NOD/SCID 小鼠。用 1-3% 异氟烷麻醉 NOD/SCID 小鼠(杰克逊实验室(Jackson laboratory))。将胚胎癌细胞悬浮于 Matrigel(BD 生物科学公司(BD Biosciences)),皮下注射入 NOD/SCID 小鼠。在斯坦福大学实验动物管理行政委员会(Administrative Panel on Laboratory Animal Care of Stanford University)批准下进行所有实验。

[0198] 多重实时 PCR 试验。采用前文描述的 BD FACS Aria 分选仪分离 11 组 CD44⁺CD24^{-/-}低谱系⁻致瘤性和其余谱系非-致瘤性人乳腺癌细胞。通过多重实时 PCR 进行 miRNA 模式分析。对于 RNA 制备,将 100 个致瘤性 CD44⁺CD24^{-/-}低谱系⁻人乳腺癌细胞和其它非-致瘤性谱系-癌细胞作双重分选进入 Trizol(英杰公司),按照生产商的方案提取 RNA。糖原(英杰公司)用作沉淀运载体。如前文所述进行 RT-前-PCR 和多重实时 PCR。简言之,用 466 组第二链合成引物进行多重逆转录反应。然后用 466 组正向引物和通用反向引物进行多重前-PCR 反应。将多重前-PCR 产物稀释 8 倍,等份加入 384 孔反应平板,分别检测各 miRNA 的丰余度。各引物和探针含有为各 miRNA 专门指定的邮编序列(zip-coded sequences)以提高各反应的特异性,因此甚至 miRNA 中的微小序列差异也能放大和检测到。该方案专用于检测成熟 miRNA 并且可靠,因为 RT-PCR 和微阵列的 miRNA 检测值相一致。结果按小的核 RNA(C/D 盒 96A 和 C/D 盒 84)表达标准化。两群细胞之间 miRNA 表达的差异计算为 $\Delta\text{Act} = \text{标准化 Ct(致瘤性细胞)} - \text{标准化 Ct(非致瘤性细胞)}$ 。

[0199] 质粒载体和诱变。用 PCR 扩增 pGEM-T-Easy 载体(普罗迈格公司(Promega))的多个克隆位点,将其插入到 pGL3 对照载体(普罗迈格公司)的 XbaI 位点(pGL3-MC)。用 HEK293T 细胞的 cDNA 作为模板,以 PCR 扩增 SOX2 3'UTR 的 553bp 片段(对应于 NM_003106.2 的 1620-2172 位置),将其克隆入 pGEM-T-Easy 载体中。将 SOX2 3'UTR 产物克隆在 pGL3-MC 载体萤光素酶基因的 3'端。测序所有产物。用斯特拉塔基因公司的快变定点诱变试剂盒(QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit, Stratagene)在 SOX2 的 3'UTR 内产生推定的 miR-200c 靶序列突变。

[0200] 萤光素酶报道基因分析。转染前一天,将 HEK293T 细胞以每孔 1×10^5 个细胞接种 48-孔板。按照生产商使用说明书,用脂质转染胺(Lipofectamine)2000(英杰公司)进行所有转染。用含有人 SOX2 的 3'UTR 的 320ng pGL3 萤光素酶表达构建物、40ng pRL-TK Renilla 萤光素酶载体(普罗迈格公司)和 50nM hsa-miR-200c 前体(安毕公司(Ambion))转染细胞。转染后 48 小时,裂解细胞,用普罗迈格公司的双-萤光素酶报道试验系统(Dual-Luciferase Reporter Assay System)检测萤光素酶活性,报道基因试验系统按 Renilla 萤光素酶活性标准化。所有实验一式两份进行,合并三次独立实验的数据。

[0201] 慢病毒产生。用 HEK293T 或 MCF7 细胞的 cDNA 作为模板,以 PCR 克隆 miR-200c 和 miR-183 的序列,包括茎环结构和侧接基因组序列的上游和下游 200-300 碱基对。将产物克隆入 pLentiLox 3.7 载体的 HpaI 和 XhoI 位点。为产生对照载体,通过 XbaI 和 HpaI 消化除去 U6 启动子序列,与 Klenow 酶一起培育并连接。如 Tiscornia 等.(2006). Nat Protoc 1, 241-245 所述产生了慢病毒。

[0202] 蛋白质印迹. 用表达 miRNA 的慢病毒感染 Tera-2 细胞, 以流式细胞术收集被感染的细胞。如上所述通过流式细胞术收集人乳腺癌细胞。用 SDS 样品缓冲液 (50mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% 甘油, 5mM EDTA, 0.02% 溴酚蓝, 3% β -巯基乙醇) 裂解收集的细胞。用 SDS-8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离样品后转移至聚偏(二)氟乙烯滤膜(阿玛西亚公司(Amersham))上。用 0.05% 吐温 20/PBS 配制的 5% 脱脂奶封闭后, 培育滤膜与 1 : 2000 (对于原发性乳腺癌样品作 1 : 1000 稀释) 稀释的抗-SOX2 多克隆抗体(米利波公司(Millipore))或 1 : 2000 稀释的抗- β -肌动蛋白抗体(圣克鲁兹生物技术公司(Santa Cruz Biotech))。然后加入 1 : 10,000 稀释的过氧化物酶-偶联的驴抗-兔或绵羊抗-小鼠 IgG 抗体(阿玛西亚公司), 用圣克鲁兹生物技术公司的蛋白质印迹鲁米诺试剂显色。

[0203] 乳腺癌细胞集落形成试验. 用 200U/ml Liberase Blendzyme 2(罗氏公司)消化小鼠 MMTV-Wnt1 肿瘤, 如(Cho 等., 2008 Stem Cells 26, 364-371)所述解剖分离。用抗-CD31、CD45 和 CD140a 抗体染色细胞, 用流式细胞术去除谱系阳性细胞。通过自旋感染(spin infection)2 小时, 然后 37°C 在补加了 5% BSA、2% 热灭活 FBS、1 : 50 B27、20ng/mL EGF、20ng/mL bFGF、10 μ g/mL 胰岛素和 10 μ g/mL 肝素的 DMEM/F12 中培育 2 小时, 用 20MOI 表达 miRNA 的慢病毒感染 15,000 个细胞。用相同培养基洗涤被感染的细胞两次, 然后用含 5% FBS 的 Epicult 培养基(干细胞技术公司(Stemcell technologies))替换该培养基。将被感染的细胞接种含 30,000 个经过辐照的 3T3 饲养细胞层的 24-孔板。接种后 24 小时, 再次用不含血清的 Epicult 培养基替换原培养基, 5% CO₂ 和 37°C 下培育细胞 6 天。

[0204] 免疫荧光. 用表达 miRNA 的慢病毒感染 Tera-2 细胞, 以流式细胞术收集被感染的细胞。1 $\times$ 10⁴ 个细胞生长在 24-孔板的孔中, 用 PBS (20mM 磷酸钾 pH 7.4, 150mM NaCl) 洗涤两次。用甲醇/丙酮 (1 : 1) 固定细胞, 用 0.1% 吐温 20/PBS 洗涤两次, 在 1% 曲通 X/PBS 中培育 30 分钟。用 PBS 配制的 4% 山羊血清封闭细胞, 与第一抗体 (1 : 750 稀释的抗-Tuj1 单克隆抗体(康万斯公司(Covance))) 培育后, 再用 0.1% 吐温 20/PBS 洗涤三次, 然后用 1 : 300 稀释的 Alexa Fluor 488-偶联抗-小鼠 IgG 抗体(英杰公司)染色。采用 BD 法玛金公司 BrDU 流式试剂盒 (BrDU Flow Kits, BD Pharmingen) 的固定液染色乳腺癌细胞。用 PBS 配制的 4% 山羊血清封闭细胞, 与第一抗体 (1 : 200 稀释的兔抗-细胞角蛋白 14(康万斯公司), 大鼠抗-细胞角蛋白 19 和大鼠抗-细胞角蛋白 8/18 抗体(开发研究杂交瘤库 (Developmental Studies Hybridoma Bank), DSHB) 的 1 : 200 稀释液) 一起培育后, 再用 0.1% 吐温 20/PBS 洗涤三次, 然后用 1 : 200 稀释的 Alexa Fluor 488-偶联抗-大鼠 IgG 抗体和 1 : 200 稀释的 Alexa Fluor 594-偶联抗-兔 IgG 抗体(英杰公司)染色。用荧光显微镜 (Leica DMI 6000B) 观察着色细胞。

[0205] 实施例 5

[0206] miR-200 抑制正常乳腺过度生长

[0207] 如图 7 所示, miR-200 抑制正常乳腺干细胞。用表达 miR-200c 的慢病毒或对照慢病毒感染 50,000 个小鼠正常乳腺细胞后, 将其注射入断奶年龄小鼠的清洁乳房脂肪垫中。注射后 6 周, 分析表达 GFP 的乳腺树 (mammary tree) 的生长。图 7 说明对照慢病毒感染的乳腺细胞形成了表达 GFP 的乳腺树, 如 2/5 分支形成所示。相反, GFP 表达 (表明 miR-200c 表达) 形成了 0/5 分支。

[0208] 还发现 miR-200c 和 miR-183 抑制了人乳腺癌生长。分离人乳腺异种移植肿瘤的 10,000 个致瘤性癌症 (TG) 细胞,用表达 miRNA 的慢病毒或对照慢病毒感染后注射入 NOD/SCID 小鼠的乳房脂肪垫中。注射后 16 周分析肿瘤发生率。在对照动物中,4/5 只动物有肿瘤,而表达 miR-200c 细胞 (注射的动物) 中,1/5 有肿瘤;表达 miR-183 细胞 (注射的动物) 中,0/2 有肿瘤。



图 1A

	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7	BC8	BC9	BC10	BC11
miR-214	1.4	1.1	1.2	3.4	3.8	5.3	2.4	3.6	6.3	2.9	4
miR-127	1.7	1.8	0.7	3.6	4.4	6.9	5	15.8	4.7	2.9	6.8
miR-142-3p	4.4	1.3	3.3	1.5	2.2	3.2	2	1.3	6.2	0.9	4.8
miR-199a	2.8	1.2	1	3.6	3.1	4.8	2.1	2	5.7	1.6	3.1
miR-199a*	1.6	0.9	1.1	4.1	2.9	3.5	1.9	3	5.5	2.6	4
miR-409-3p	2.2	-2.4	1.1	4	15.8	13.4	15.3	11.2	17.4	17.6	2.1
miR-125b	2.6	0.9	0.3	2.7	2.6	3	1.2	2.1	5.4	2.3	1.9
miR-146b	2.5	1.6	0.6	3	1.6	2.1	0.8	2.2	2.6	2.2	3.1
miR-199b	2.1	1	0.8	4.5	5.3	3.2	9.8	4.1	3.1	2.7	10.9
miR-222	2.5	1.9	-0.2	3.1	3.2	2.3	1.4	0.5	5.3	3.9	2.5
miR-299-5p	1.2	-9.2	0.1	2.2	1.8	12.3	1.2	12	5.9	1.8	1.6
miR-132	1.3	1.2	0.2	2.1	0.3	1.8	1.3	0.5	1.6	1.9	2.5
miR-221	1.6	2.3	0.4	3.4	2.5	2.9	0	0	4.7	3.8	2.4
miR-31	1.5	2.1	-0.9	1.3	1.4	5.7	0.5	-0.9	5.2	4.4	2.8
miR-432	1.8	-6.6	0.2	13.2	9.7	8.2	10	0.7	11.5	10.5	2.1
miR-495	3	-6.2	-1.2	4	11.4	9.6	11.2	0.7	11.4	12.9	2.1
miR-150	0.7	0	1.6	0.4	3.7	3	1.9	1	7.9	2.1	8.4
miR-155	7.8	1.4	0.3	1.1	0.3	3.2	1	-1.2	5.2	9.8	6
miR-338	12.6	13.9	0	11	9.1	1.7	11.6	0.1	-12.5	0.4	11.5
miR-34b	2.3	3.1	0.5	1.2	8	2.4	-10.7	0.3	1.8	9.8	-0.1
miR-212	1.5	0.4	-0.3	0.7	11.4	1	1.5	1.4	2.1	1.3	0.4
miR-146a	3.5	1.7	-1.7	1	1	2.7	-2.3	-2.4	6.5	2.2	1.1
miR-126*	-15.9	13.5	11.4	-10	-11.4	-12.2	1.6	11.8	11.7	0.4	2.1
miR-223	6.3	-0.3	-0.1	4.5	2.8	4	0.6	1	3.6	0.6	-3.8
miR-130b	4.7	-0.3	0.8	-0.4	2.3	12.4	-4.1	-3.2	-1.5	1.9	1.4
miR-196b	2.6	-3.5	0	1.6	0.6	2.6	-11.6	-3.4	13.7	0.7	-11.1
miR-521	-5.8	3.3	-1.6	-9.5	-2.4	-2.9	10.8	0.9	-8.4	-0.5	2.6
miR-429	0	-8.1	-1.2	-0.5	-10.6	-3	3.8	1.2	-6.8	0.4	-6.7
miR-193b	-3.9	-5.5	0	7.1	-5.9	-6.6	-1.2	-1.1	-1.9	20.3	-8
miR-183	-2.1	-10.9	-7.9	-9.3	-0.5	-10.9	-1.7	-5.1	-15.6	0.4	2.1
miR-96	-12	-9.9	-0.5	-3.5	-12.8	-12	-2.3	-11	-3.7	1.3	-9.9
miR-200a*	-4.3	-12.6	-3	-6.9	-5.1	-3.9	-0.5	-1.3	-4	0.4	-11.6
miR-200c	-3.1	-3.2	-2.9	-4.4	-7.7	-2.2	-2.5	-1	-4.3	-5.7	-18.7
miR-141	-2.1	-3.6	-2.8	-2.8	-15.2	-1.5	-2.8	-1.5	-4.7	-11.8	-2.7
miR-182	-8	-1.9	-2.9	-6.4	-15.6	-2.4	-2.1	-2	-4.6	-8.8	-11.1
miR-200a	-3.5	-2.6	-2.5	-3.7	-17.2	-2.2	-2.7	-1.9	-4.3	-9.2	-3.7
miR-200b	-4.1	-4.9	-2.7	-5.5	-9	-2.8	-3.5	-1.6	-4.6	-8.6	-4

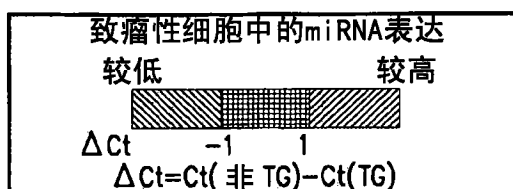


图 1B

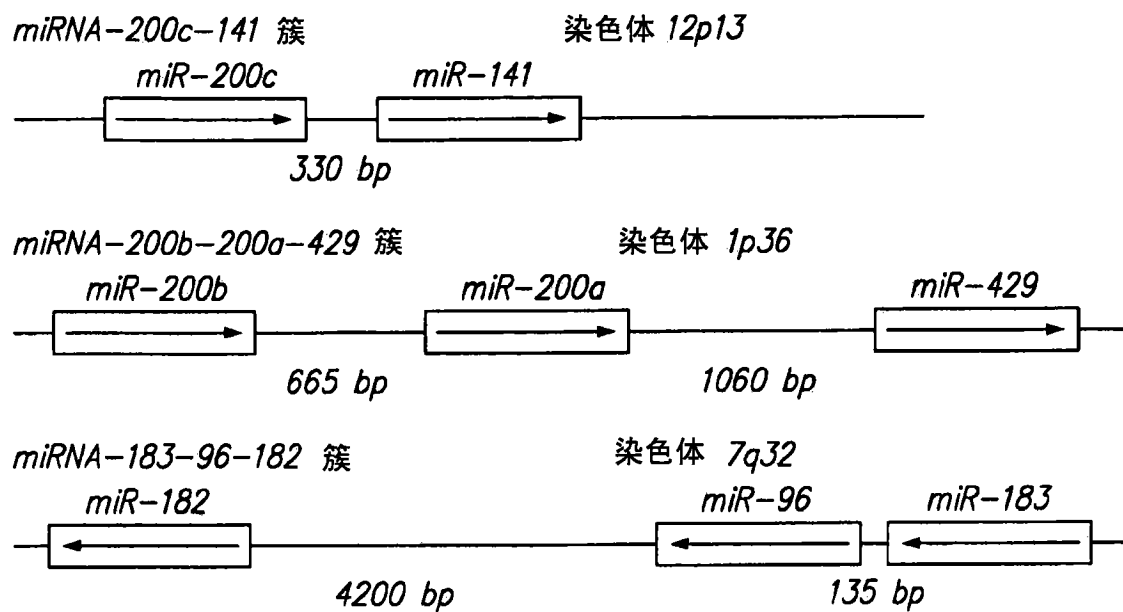


图 1C

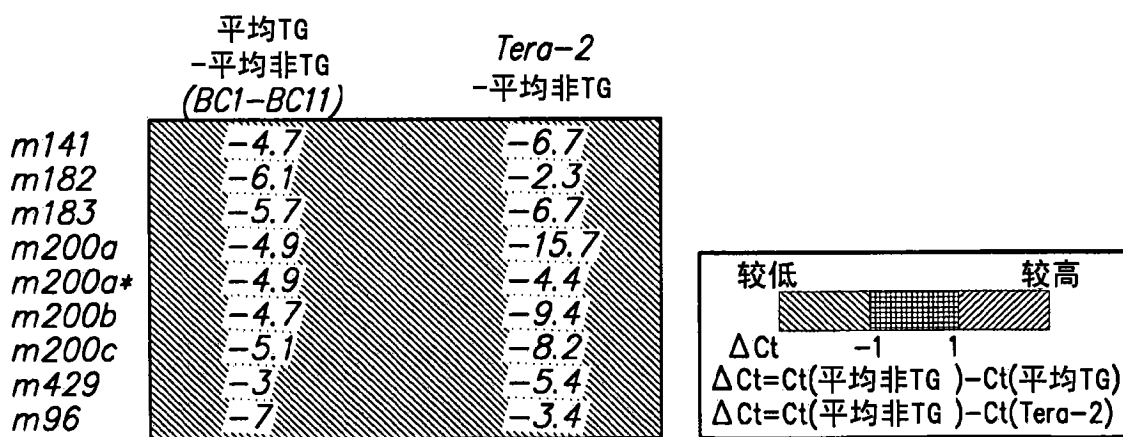


图 1D

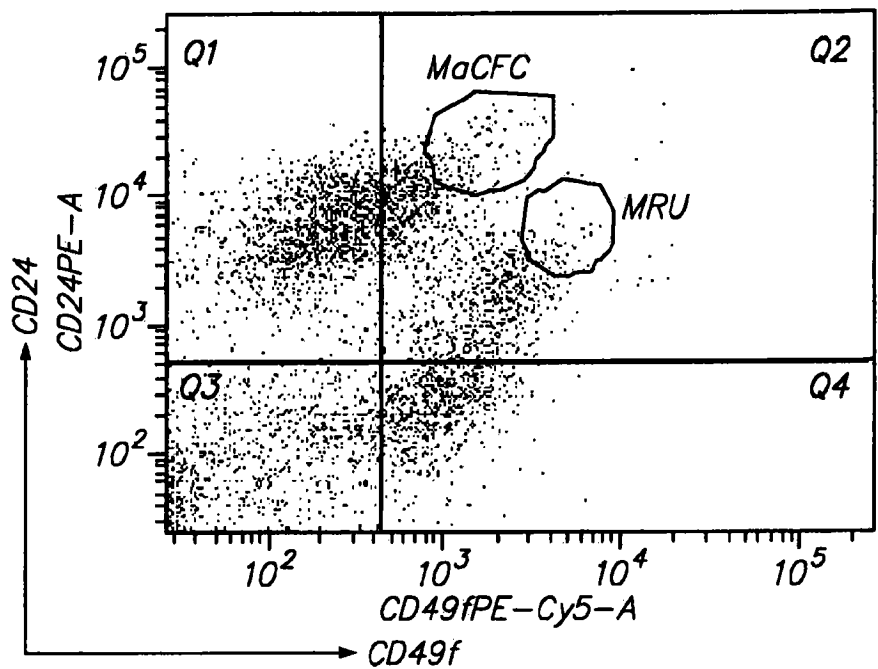


图 2A

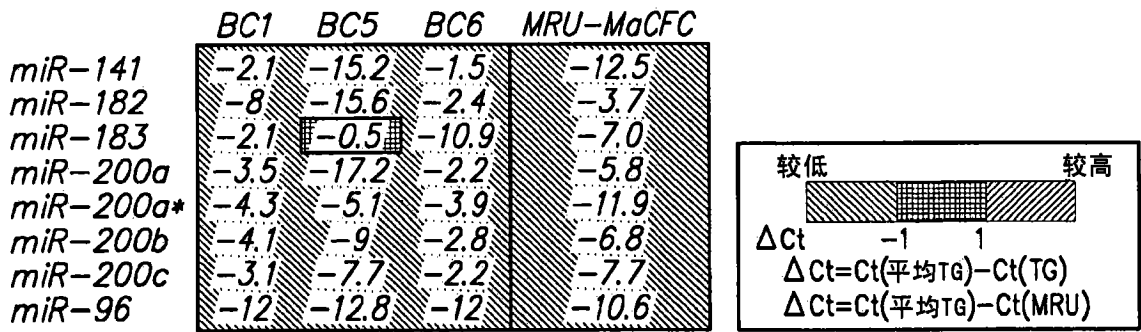


图 2B

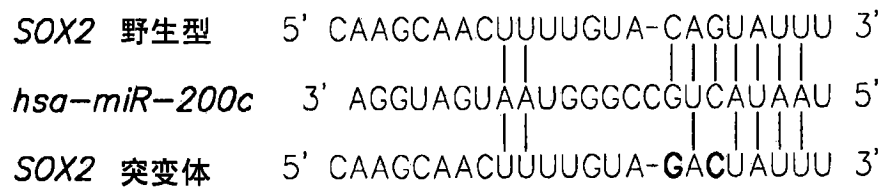


图 3A

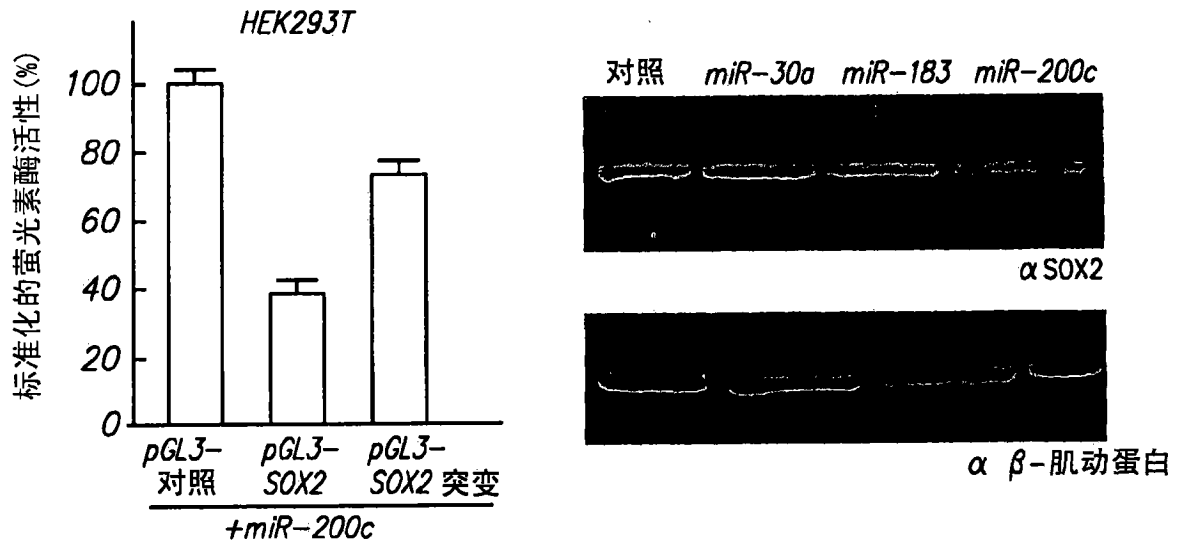


图 3B

图 3C

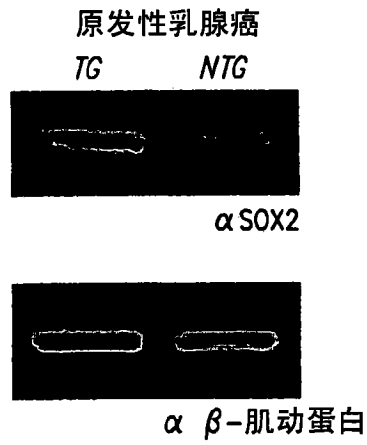


图 3D



图 4A

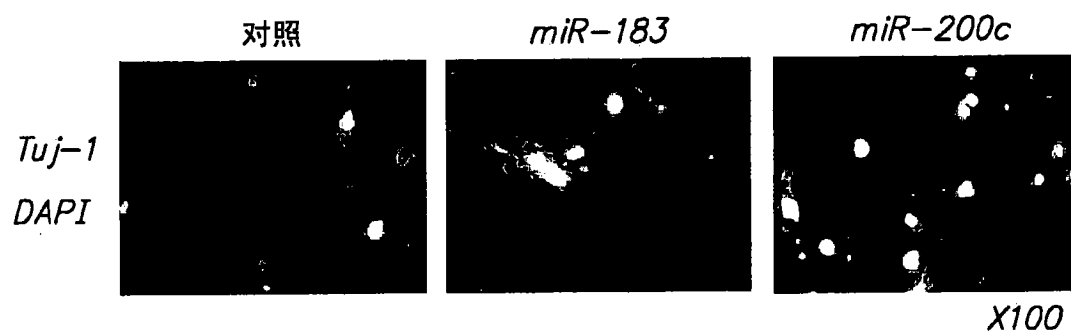


图 4B

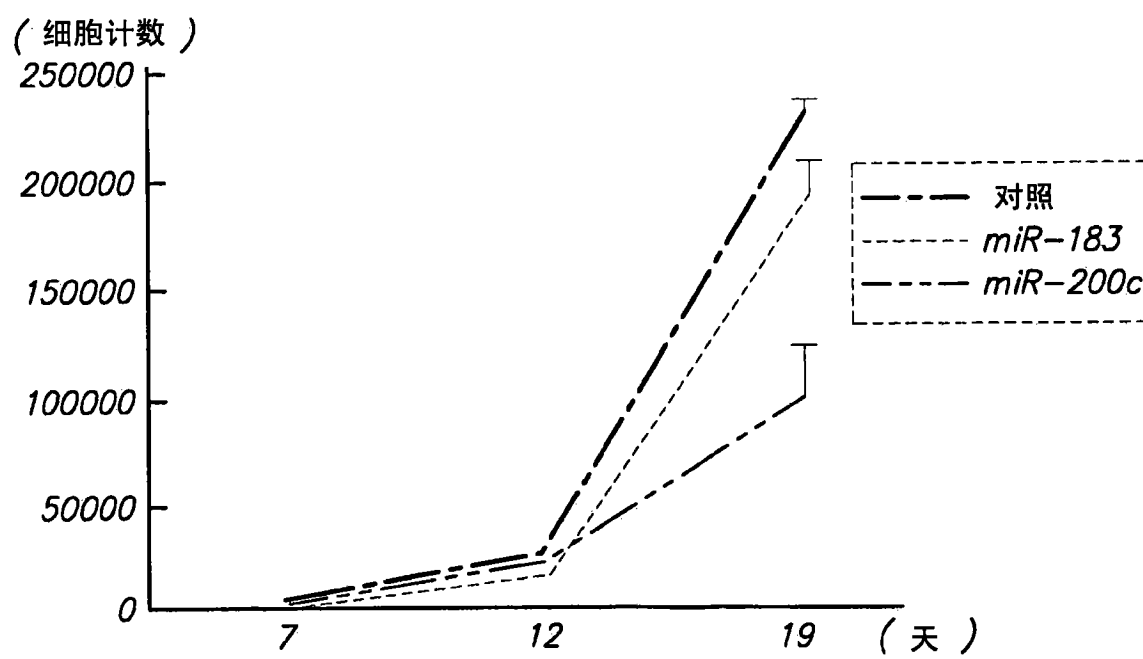


图 4C

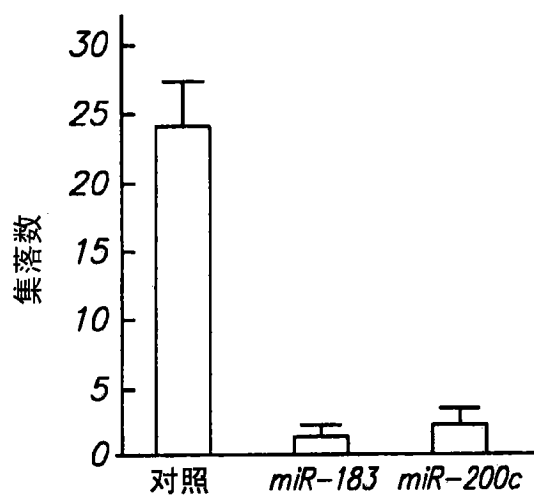


图 5A

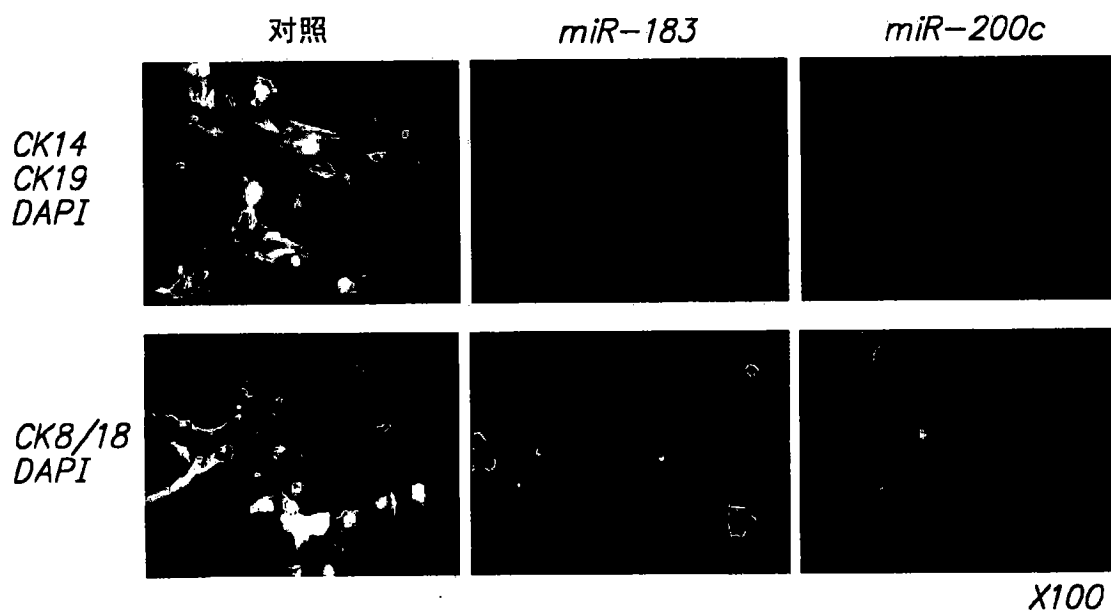


图 5B

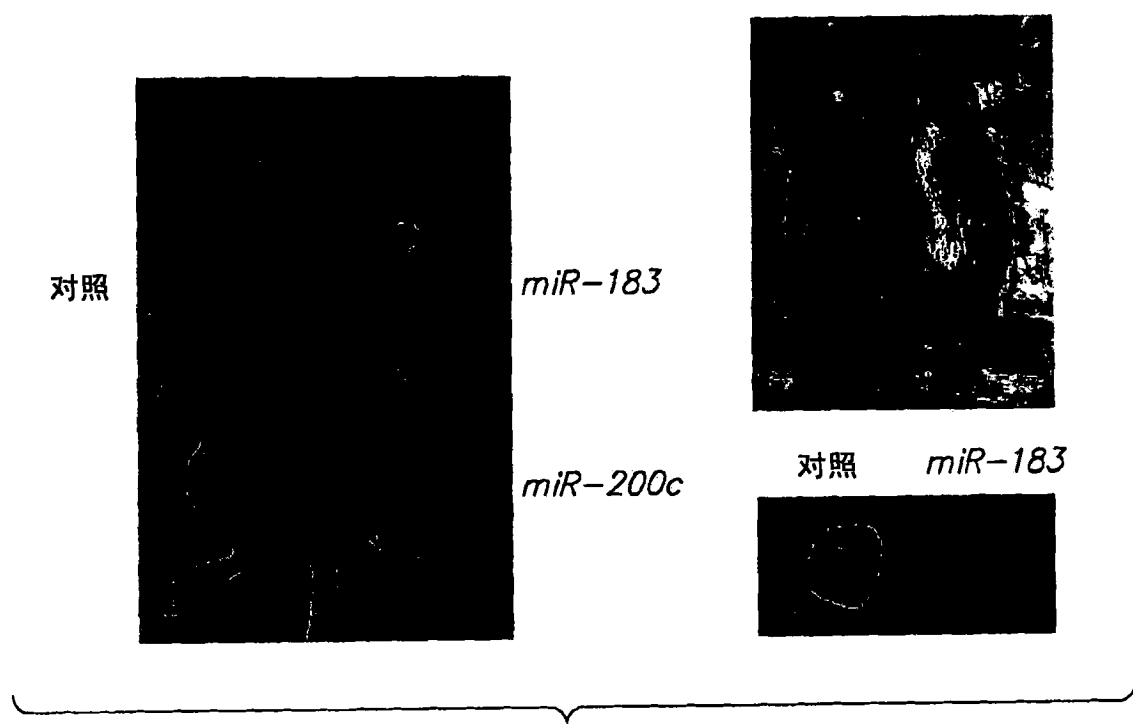


图 6A

对照	miR-183	miR-200c
3/3	0/3	0/3

图 6B

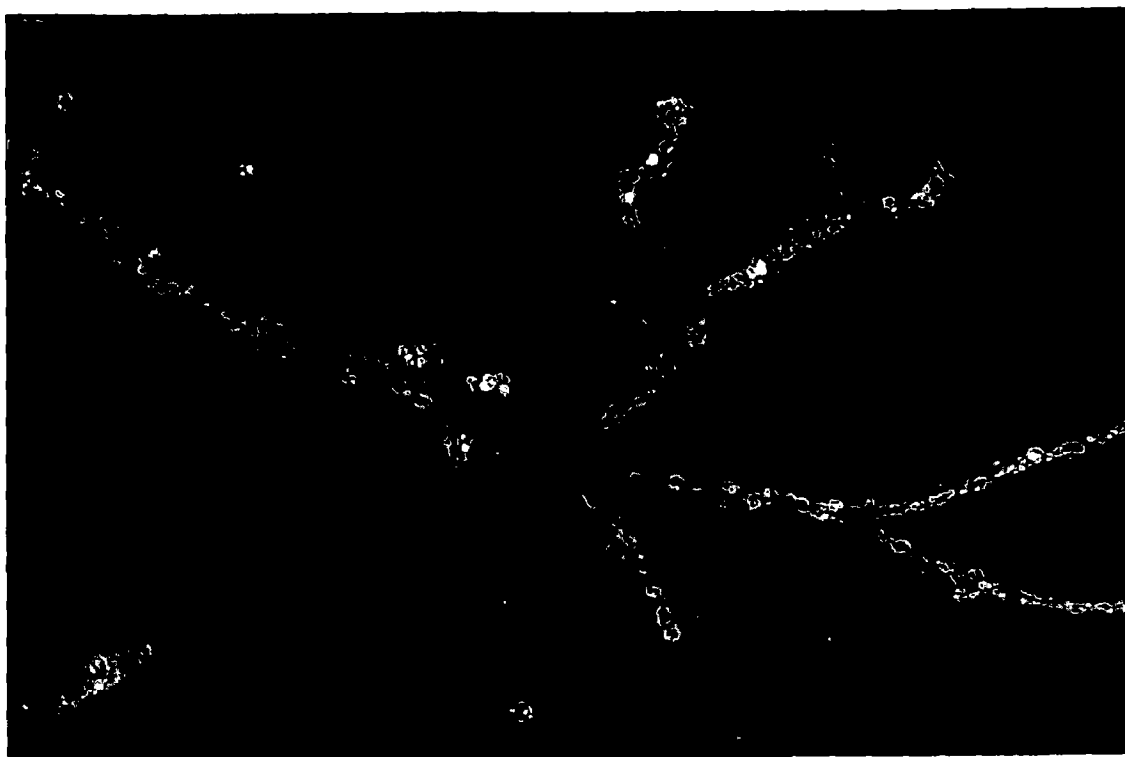


图 7