



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103648505 B

(45)授权公告日 2016.09.28

(21)申请号 201180061049.2

(22)申请日 2011.11.11

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103648505 A

(43)申请公布日 2014.03.19

(30)优先权数据
61/413,180 2010.11.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.06.19

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2011/060349 2011.11.11

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/065049 EN 2012.05.18

(73)专利权人 俄亥俄州立大学研究基金会
地址 美国俄亥俄

(72)发明人 C·M·卡洛斯 N·瓦勒里

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 李程达

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

(56)对比文件

Yang等.Context-Dependent
Bidirectional Regulation of the MutS
Homolog 2 by Transforming Growth Factor b
Contributes to Chemoresistance in Breast
Cancer Cells.《Molecular Cancer Research》
.2010,第8卷(第12期),第1633-1642页.

Asangani等.MicroRNA-21 (miR-21) post-
transcriptionally downregulates tumor
suppressor Pcd4 and stimulates invasion,
intravasation and metastasis in
colorectal cancer.《Oncogene》.2008,第27卷
(第15期),第2128-2136页.

审查员 孟晋东

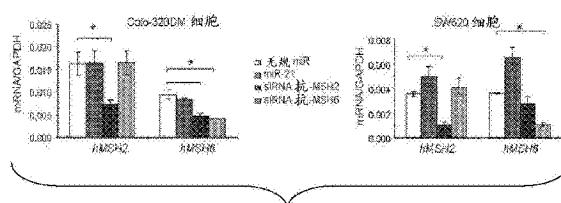
权利要求书1页 说明书24页
序列表3页 附图12页

(54)发明名称

与微RNA-21、错配修复和结肠直肠癌相关的
材料和方法

(57)摘要

本发明公开了下列发现:miR-21靶向并且下
调核心错配修复(MMR)识别蛋白复合物hMSH2和
hMSH6。反义miR-21从而在本文中被证明为治疗
剂。因此,在本发明中公开了组合物、试剂盒、疗
法和其它方法,包括治疗/改善症状的方法。



1. 反义miR-21在制备用于调节受试者的肿瘤细胞中的hMSH2蛋白表达的试剂中的用途,其中所述受试者被诊断为患有结肠直肠癌(CRC)。

2. 反义miR-21在制备用于治疗具有降低的hMSH2表达的结肠直肠癌患者的试剂中的用途,其中在施用miR-21之后施用5-氟尿嘧啶。

3. 权利要求2的用途,其中所述反义miR-21包含锁核酸(LNA)。

4. 权利要求2的用途,其中所述患者具有选自下列的至少一种病况:原发性抗5-氟尿嘧啶的结肠直肠癌、获得性抗5-氟尿嘧啶的结肠直肠癌、缺陷的错配修复蛋白、II期结肠直肠癌和III期结肠直肠癌。

5. 反义miR-21在制备用于影响至少一种hMSH2表达不足的肿瘤细胞的试剂中的用途。

6. 权利要求5的用途,其中所述至少一种hMSH2表达不足的细胞是至少一种结肠直肠癌细胞。

7. 权利要求5的用途,其中所述至少一种hMSH2表达不足的细胞存在于体外。

8. 权利要求5的用途,其中所述至少一种hMSH2表达不足的细胞存在于体内。

9. 权利要求5的用途,其中所述试剂导致所述至少一种hMSH2表达不足的细胞的凋亡。

10. 权利要求5的用途,其中所述至少一种hMSH2表达不足的细胞是形成肿瘤的很多细胞。

11. 权利要求5的用途,其中在将反义miR-21引入所述肿瘤细胞后所述肿瘤尺寸减小。

12. 权利要求5的用途,其中影响至少一种hMSH2表达不足的肿瘤细胞还包括向所述细胞引入5-氟尿嘧啶。

13. 用于治疗特征在于减少的hMSH2蛋白表达的结肠直肠癌的试剂盒,所述试剂盒包括:

用于鉴定hMSH2表达状态的物质;

处于药学上可接受的载体中的反义miR-21。

14. 权利要求13的试剂盒,其中所述用于鉴定hMSH2表达状态的物质是抗体。

15. 权利要求13的试剂盒,还包括5-氟尿嘧啶。

与微RNA-21、错配修复和结肠直肠癌相关的材料和方法

[0001] 发明人:Carlo M.Croce,Nicola Valeri

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求2010年11月12日提交的美国临时申请号61/413,180的利益,将所述美国临时申请的公开内容通过引用并入本文。本申请是2011年11月11日提交的PCT申请号PCT/US2011/060349进入中国国家阶段的申请,将所述PCT申请的公开内容通过引用并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请包括已以ASCII格式通过EFS-Web提交的并且通过引用整体并入本文的序列表。所述ASCII拷贝(2011年11月7日创建的)命名为53-52535_SEQ_LIST_OSURF11085.txt并且大小为3,139字节。

[0006] 发明领域

[0007] 本发明总体上涉及分子生物学领域。更具体地,其涉及癌症相关技术。本发明的某些方面包括在miR-21相关的结肠直肠癌的诊断、治疗和预后中的应用。特别地,本文中论述了miR21、错配修复和结肠直肠癌。

[0008] 发明背景

[0009] 结肠直肠癌(CRC)是美国最常发生的癌症之一,预期2017年发生超过140,000例新病例和约50,000例死亡。基于5-氟尿嘧啶(5-FU)的化学疗法代表了在辅助以及转移情况下CRC治疗的黄金标准。然而,对嘧啶类似物治疗的原发性或获得性抗性代表了CRC患者管理中的共同问题。这些观察突显了对抗性机制的更好理解以及更有效疗法的需要。

[0010] 微RNA是一类用作基因表达和细胞的动态平衡的转录后调节剂的小非编码RNA。miR-21的过表达是很多实体恶性肿瘤和恶性血液病(hematological malignancy)的共同特性。已在患有CRC的患者的血液和粪便样品中发现了miR-21的过表达。此外,miR-21过表达与II期和III期CRC的5-FU辅助化学疗法的疗效不佳相关。

[0011] 错配修复(MMR)系统参与DNA损伤识别和修复。hMSH2和hMLH1用作核心MMR蛋白并且分别与蛋白质同源物hMSH3或hMSH6和hMLH3或hPMS2形成异二聚体。异二聚体形成是DNA损伤识别的基础并且代表了对于MMR蛋白同源物的稳定性至关重要的步骤。MMR蛋白的缺乏与临床试验中5-FU辅助化学疗法的减少的或不存在的益处相关。MMR受损似乎引起减少的5-FU代谢产物至DNA的掺入,从而导致5-FU治疗后减少的G2/M阻滞和细胞凋亡。

[0012] miR-21的过表达与很多人肿瘤包括结肠直肠癌关联,其中其似乎调节肿瘤抑制基因、包括p21、PTEN、TGFβRII和Bax的表达。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明证明了miR-21靶向并且下调核心错配修复(MMR)识别蛋白复合物hMSH2和hMSH6。表达高水平的miR-21的结肠直肠肿瘤显示减少的hMSH2蛋白表达。过量产生miR-21的细胞显示作为核心MMR组分缺乏的特征的显著减少的5-氟尿嘧啶(5-FU)诱导的G2/M损伤停滞和细胞凋亡。此外,异种移植物研究证明miR-21过表达显著降低5-FU的疗效。本研究显示与miR-21过表达相关的MMR增变基因(mutator gene)下调可以是结肠直肠癌的疗效的重

要临床指标。

[0015] 本发明提供了包含至少一种反义miRNA和至少一种另外的成分的物质组合物,其中反义miRNA是miR-21并且能够下调至少一种核心MMR蛋白,并且其中至少一种另外的成分用于治疗MMR相关疾病。优选地,所述至少一种另外的成分选自化疗药物、干细胞、AG1478、吉非替尼(Iressa)、埃罗替尼(Tarceva)、西妥昔单抗、帕尼单抗(panitumab)、扎鲁木单抗(zalutumamab)、尼妥珠单抗、马妥珠单抗和拉帕替尼。优选地,至少一种核心MMR蛋白选自hMSH1、hMSH6和hMLH1。

[0016] 本发明从而提供了包含反义miR-21和5-氟尿嘧啶或其药学上可接受的制剂的物质组合物。

[0017] 还提供了物质组合物,其包含反义miR-21和增加人MutS同源物2的物质或其药学上可接受的制剂。

[0018] 还提供了包含反义miR-21和结肠直肠癌治疗化合物或其药学上可接受的制剂的物质组合物。

[0019] 还提供了包含有义或反义miR-21和嘧啶类似物的物质组合物。

[0020] 还提供了其中嘧啶类似物是5-氟尿嘧啶的物质组合物。

[0021] 本发明提供了包括权利要求4的组合物的试剂盒。

[0022] 还提供了还包含用于鉴定hMSH2表达状态的物质的试剂盒。

[0023] 还提供了其中用于鉴定hMSH2表达状态的物质是抗体的试剂盒。

[0024] 还提供了还包含用于筛选测试化合物作为潜在结肠直肠癌治疗的说明书的试剂盒。

[0025] 本发明提供了影响至少一种人细胞的方法,包括向至少一种hMSH2-表达不足的细胞引入减少表达不足的量的反义miR-21。

[0026] 还提供了其中至少一种hMSH2表达不足的细胞为至少一种结肠直肠癌细胞的方法。

[0027] 还提供了其中至少一种hMSH2表达不足的细胞体外存在的方法。

[0028] 还提供了其中至少一种hMSH2表达不足的细胞原位存在的方法。

[0029] 还提供了其中至少一种hMSH2表达不足的细胞体内存在的方法。

[0030] 还提供了导致至少一种hMSH2表达不足的细胞的细胞凋亡的方法。

[0031] 还提供了其中至少一种hMSH2表达不足的细胞是形成肿瘤的很多细胞的方法。

[0032] 还提供了其中肿瘤在引入反义miR-21后尺寸减小的方法。

[0033] 还提供了还包括将5-氟尿嘧啶引入至少一种hMSH2表达不足的细胞的方法。

[0034] 还提供了还包括将5-氟尿嘧啶引入至少一种hMSH2表达不足的细胞的方法。

[0035] 本发明提供了治疗具有原发性或获得性抗嘧啶类似物的结肠直肠癌的患者的方法,包括给患有原发性或获得性抗嘧啶类似物的结肠直肠癌的患者施用反义miR-21。

[0036] 还提供了其中患者具有下调的hMSH2的方法。

[0037] 还提供了还包括给患者施用另外的结肠直肠癌辅助或治疗的方法。

[0038] 还提供了还包括给患者施用5-氟尿嘧啶的方法。

[0039] 还提供了治疗患有II期或III期结肠直肠癌的患者的方法,包括给患有II期或III期结肠直肠癌的患者施用反义miR-21。

[0040] 还提供了其中患者具有下调的hMSH2的方法。

[0041] 还提供了还包括给患者施用另外的结肠直肠癌辅助或治疗的方法。

[0042] 还提供了还包括给患者施用5-氟尿嘧啶的方法。

[0043] 本发明提供了治疗患有结肠直肠癌患者的方法,包括:a.)鉴定结肠直肠癌患者是否具有减少的hMSH2表达,和b.)如果患者具有减少的hMSH2表达则利用反义miR-21治疗患者。

[0044] 本发明提供了治疗结肠直肠癌患者的方法,包括:a.)鉴定结肠直肠癌患者相较于对照是否具有减少的hMSH2表达,和b.)如果患者具有减少的hMSH2表达则利用反义miR-21治疗患者。

[0045] 本发明提供了治疗结肠直肠癌患者的方法,包括:a.)鉴定结肠直肠癌患者相较于对照是否具有减少的hMSH2表达,b.)鉴定结肠直肠癌患者相较于对照是否具有增加的miR-21表达,和c.)如果患者相较于对照具有增加的miR-21表达和减少的hMSH2表达,则利用反义miR-21治疗患者。

[0046] 本发明提供了鉴定有用的化合物的方法,包括a.)将测试化合物和反义和/或有义miR-21引入表达hMSH2的细胞,和b.)鉴定对于影响表达hMSH2的细胞是有用的测试化合物。

[0047] 本发明提供了鉴定癌细胞样品状态的方法,包括:a.)使细胞测试样品中的hMSH2和miR-21状态与对照关联,和b.)鉴定癌细胞样品状态。

[0048] 本发明提供了预测结肠直肠癌细胞样品状态的方法,包括:a.)使包含结肠直肠癌细胞的测试样品中的hMSH2和miR-21状态与对照关联,和b.)预测结肠直肠癌细胞样品状态。

[0049] 本发明提供了鉴定生物体癌症状态的方法,包括:a.)使生物体来源的测试样品中的hMSH2和miR-21状态与对照关联,和b.)鉴定生物体状态。

[0050] 本发明提供了预测生物体的结肠直肠癌状态的方法,包括:a.)使生物体来源的测试样品中的hMSH2和miR-21状态与对照关联,和b.)鉴定生物体的结肠直肠癌状态。

[0051] 本发明提供了抑制抗5-氟尿嘧啶的结肠直肠癌细胞中的G2/M阻滞和细胞凋亡的方法,包括将抑制G2/M阻滞和细胞凋亡的量的反义miR-21引入抗5-氟尿嘧啶的结肠直肠癌细胞。

[0052] 本发明提供了抑制抗5-氟尿嘧啶的结肠直肠癌细胞的炎症的方法,包括将抑制炎症的量的反义miR-21引入抗5-氟尿嘧啶的结肠直肠癌细胞。

[0053] 当根据附图进行阅读时,根据优选实施方案的下列详细描述本发明的各个方面对于本领域技术人员将变得显然。

[0054] 附图概述

[0055] 本专利或申请文件可包含一个或多个以彩色完成的附图和/或一张或多张照片。具有彩色附图和/或照片的本专利或专利申请公开案的 拷贝将在应请求和支付必要的费用后由专利局提供。

[0056] 图1A-1F.MSH2和MSH6是miR-21的直接靶。

[0057] 图1A显示了hMSH2(SEQ ID NO:11)和hMSH6(SEQ ID NO:13)3'UTR中miR-21(分别为SEQ ID NO:12和14)的预测的种子区域。

[0058] 图1B:利用miR-21、无规-miR、抗-MSH2或抗-MSH6siRNA瞬时转染Colo-320DM和

SW620,进行48小时。通过实时PCR分析hMSH2和hMSH6mRNA表达。

[0059] 图1C:hMSH2和hMSH6的miR-21依赖性下调的Western印迹分析。转染与图1B相似。

[0060] 图1D:利用抗-miR-21或抗-miR对照的LNA转染包含高内源水平的miR-21的HCT-116、SW480和RKO细胞,进行48小时,随后进行hMSH2和hMSH6蛋白的western印迹分析。

[0061] 图1E:将hMSH2和hMSH63'UTR分别亚克隆在萤光素酶基因的下游(分别为MSH2-Luc-WT和MSH6-Luc-WT)以及将包含miR-21靶位点的缺失的hMSH2和hMSH63'UTR分别亚克隆在萤光素酶基因的下游(MSH2-Luc-突变体和MSH6-Luc-突变体),并且用miR-21或无规miR共转染所述细胞。24小时后记录萤光素酶活性。数据代表来自4个独立转染的至少3个测定的平均值和S.D.* $p < 0.01$ 。

[0062] 图1F:以hMSH2和hMSH63'UTR萤光素酶报告分子+LNA抗-miR-21或抗-miR对照共转染SW480细胞。miR-21的LNA沉默诱导了萤光素酶活性的增加。

[0063] 图2A.MMR核心蛋白hMSH2的表达与CRC样品中mir-21的表达反相关

[0064] 图2A:用抗-miR-21的LNA探针或无规探针以及抗hMSH2的IHC抗体温育石蜡包埋的福尔马林固定的CRC组织。利用Nuance系统软件捕捉代表性照片。显示其中对于miR-21和hMSH2染色都呈阳性的CRC样品。蓝色和红色染色分别鉴定miR-21和hMSH2蛋白。

[0065] 图2B:从新鲜冷冻的人结肠直肠组织提取RNA和蛋白质。通过northern印迹评估一系列人CRC样品的miR-21的表达,通过western印迹评估MMR蛋白的表达。

[0066] 图3A-3B.miR-21在体外抑制5-FU诱导的细胞凋亡。

[0067] 通过血清饥饿48小时使SW620和Colo-320DM细胞同步于G0-G1。随后使细胞接受胰蛋白酶作用,计数细胞,用无规miR、miR-21、抗-MSH2siRNA或siRNA-对照转染细胞,将细胞重涂铺在含10%FBS的培养基中。在释放后16小时(相应于正好在进入S期之前但在p53-介导的G1-S细胞周期检查点之后的时间)添加5-FU。在5-FU施用后48小时分析细胞周期。显示了G2/M阻滞和凋亡的(sub-G1)细胞的百分比的定量,其代表了来自3个独立转染的3个测定的平均值和S.D.* $p < 0.001$ 。

[0068] 图4A-4C.miR-21介导的5-FU抗性依赖于hMSH2的下调。

[0069] 通过血清饥饿48小时使Lovo(MSH2+)和Lovo(MSH2-)细胞同步于G0-G1,利用miR-对照、miR-21、抗MSH2siRNA、siRNA-对照以及编码全长hMSH2cDNA(具有或不具有miR-21种子区域)的载体转染所述细胞。在5-FU施用后48小时分析细胞周期。显示了Lovo(MSH2+)细胞(蓝色条柱)和Lovo(MSH2-)细胞(粉红色条柱)中G2/M阻滞和凋亡的(sub-G1)细胞的百分比的定量,其代表了来自3个独立实验的2个测定的平均值和S.D. (* $p < 0.001$)。

[0070] 图5A-5B.miR-21在体内引起对5-FU的抗性。

[0071] 利用编码miR-21或抗-MSH2siRNA的慢病毒载体稳定地感染Lovo(MSH2+)细胞。作为对照,利用空载体感染Lovo(MSH2+)和Lovo(MSH2-)细胞。利用Lovo(MSH2+)-空(n=6)、Lovo(MSH2+)-miR-21(n=6)、Lovo(MSH2+)-抗-MSH2(n=6)和Lovo(MSH2-)-空(n=6)注射裸小鼠。当异种植物达到可触知的体积时,通过腹膜内注射施用5-FU,每周进行连续5天,进行2周(灰色区域)。在治疗前测量肿瘤体积,随后每周测量一次。如下计算单个相对肿瘤体积(RTV): $RTV = V_x / V_1$,其中 V_x 是在给定时间的以立方毫米表示的体积, V_1 是在治疗开始时的体积。结果表示为每一组小鼠的肿瘤体积的变化的百分比和S.D。

[0072] 图5A(左侧图板):hMSH2蛋白在取出的肿瘤中的表达的Western分析。

- [0073] 图5B:在第6周的代表性肿瘤异种移植物。
- [0074] 图5A(右侧图板):在5-FU治疗期间和之后的肿瘤生长。
- [0075] 图6A-6B。
- [0076] 图6A:利用miR-21、无规-miR、抗-MSH2或抗-MSH6siRNA瞬时转染Colo-320DM和SW620,进行48小时。通过实时PCR评估miR-21的表达。
- [0077] 图6B:通过密度计量分析测量蛋白质的表达。条柱代表3个实验的平均值和S.D.* $P<0.05$ 。
- [0078] 图7A-7C。
- [0079] 利用针对miR-21的LNA(抗-miR-21)或LNA对照转染HCT-116、SW480和RKO细胞。转染后48小时,收获转染细胞,收集RNA和蛋白质。
- [0080] 图7A:通过抗-miR-21转染的细胞相较于对照的实时PCR分析的miR-21的表达。
- [0081] 图7B:通过密度计量分析测量蛋白质表达。
- [0082] 图7C:hMSH2和hMSH6mRNA表达的实时PCR分析。条柱代表3个实验的平均值和S.D.* $P<0.05$ 。
- [0083] 图8.显示高miR-21和低hMSH2表达的病例的散布图和回归曲线+置信区间(红色)。
- [0084] 通过Northern印迹分析miR-21以及通过Western印迹分析来分析肿瘤和正常相邻组织中的hMSH2。在图中,miR-21和hMSH2表达为肿瘤与正常组织之间的比率。相关性(Correlation)为-0.81,95%的置信区间:-0.96至-0.25, $p<0.02$ 。
- [0085] 图9.通过血清饥饿48小时使SW620和Colo-320DM细胞同步于G0-G1。随后使细胞接受胰蛋白酶作用,计数细胞,用无规miR、miR-21、抗-MSH2siRNA或siRNA-对照转染细胞,将细胞重涂铺在含10%FBS的培养基中。在释放后16小时(相应于正好在进入S期之前但在p53-介导的G1-S细胞周期检查点之后的时间)添加5-FU(5 μ g/ml)。在碘化丙啶和膜联蛋白V染色后48小时,通过FACS分析来分析凋亡细胞的百分比。图显示G2/M阻滞和凋亡的(sub-G1)细胞的百分比。数据代表了来自至少3个独立实验的平均值和S.D.* $p<0.01$ 。
- [0086] 序列表的概述
- [0087] 本申请包含已通过EFS-网络提交并且通过引用整体并入本文的序列表。2011年11月7日创建的ASCII拷贝命名为53-52535_SEQ_LIST_OSURF11085.txt,其大小为3,139字节。

[0088]

引物名称	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
SEQ ID NO:1 和 6 <i>hMSH2</i> -LUC-WT	CAGAAAGCCCTGGAAC TTGA	TCAATTGCAAACAGTCC TCAG
SEQ ID NO:2 和 7 <i>hMSH2</i> -LUC-突变体	TTTCCATAGTGTTAACT GTCAGTGC	TCAATTGCAAACAGTCC TCAG
SEQ ID NO:3 和 8 <i>hMSH2</i> -cDNA-突变体	CCCAGTAATGGAATGAA GGGTCTGTAATAGTTTT ATATTG	CAATATAAAACTATTACA GACCCTTCATTCCATTAC TGGG
SEQ ID NO:4 和 9 <i>hMSH6</i> -LUC-WT	AAATGTTGCTGTGCGCC TA	TAGCTTTTCCTCCCCCAT TT
SEQ ID NO:5 和 10 <i>hMSH6</i> -LUC-突变体	AAATGTTGCTGTGCGCC TA	CCACCTTTGTCAGAAGT CAACTC

[0089] 发明详述

[0090] MiR-21通常在很多人肿瘤、包括结肠直肠癌中过表达。近年来,已鉴定了若干可加速肿瘤进展的miR-21肿瘤抑制物靶标。本发明人在本文中发现过表达miR-21的结肠直肠肿瘤细胞与表达hMSH2肿瘤抑制蛋白的细胞之间的相反关系。此外,本发明人确定miR-21似乎直接靶向hMSH2和hMSH6mRNA的3'-UTR,从而导致蛋白质表达的显著下调。

[0091] 结肠直肠癌的治疗的现有技术水平包括5-氟尿嘧啶(5-FU)。5-FU 通过氟代核苷酸(fluoronucleotide)至RNA和DNA的错掺以及通过靶向胸苷合成酶(TS)抑制核苷酸合成来发挥其细胞毒性作用。TS过表达、5-FU代谢的缺乏、TP53突变和MMR系统受损全都是5-FU抗性的标志和临床结果的预测指标。更近期以来,微RNA和基因表达分析都已显示预测5-FU在经历辅助化学疗法的II期和III期CRC患者中的益处的更高水平的复杂性。事实上,利用5-FU类似物治疗的II和III期CRC患者的回顾分析显示了具有高miR-21表达的患者的减少的存活率。相同的发现仅在III期CRC患者的亚组中得到确认,然而II期CRC患者未显示统计学上显著的相关性。较少的患者人数可解释该后一种结果。具有MMR机构的遗传或表观遗传缺陷的细胞似乎因G2/M阻滞和细胞凋亡的缺乏而耐受5-FU代谢产物。

[0092] 本发明显示miR-21对hMSH2的下调在细胞模型和异种移植物肿瘤模型中诱导了对5-FU的抗性。综合起来,本发明的结果显示miR-21肿瘤状态可能是5-FU的疗效的重要指标。

[0093] miR-21似乎调节很多细胞周期和肿瘤抑制基因。本发明还显示hMSH2的下调在5-FU抗性的发生中起着中心作用。事实上,miR-21对5-FU诱导的细胞凋亡和G2/M阻滞的抑制可与由siRNA-介导的hMSH2的选择性抑制引起的所述抑制相当。此外,利用miR-21转染Lovo (MSH2-)细胞不改变细胞周期阻滞或细胞凋亡,这证明了miR-21诱导的效应依赖于hMSH2表达。综合起来,本发明的结果显示miR-21的抑制代表了克服5-FU抗性的协同治疗。

[0094] 本发明还显示hMSH2-hMSH6的miR-21依赖性下调促成对5-FU的原发性和获得性抗性。在临床实践中,通常以连续输注的方式在48小时的时间内施用5-FU。有趣地,miR-21的

表达在连续暴露于5-FU的细胞系中似乎增加。根据本发明,本发明人认为该过表达可能是抗性的第二机制,细胞获得miR-21过表达以克服5-FU细胞毒性。如果认为hMSH2在直肠和卵巢癌的主化疗(包括5-FU或顺铂)后通常被下调,则存在另外的临床相关性。

[0095] 概括而言,本发明已显示,因miR-21的过表达直接下调核心 MMR蛋白hMSH2和hMSH6而引起结肠直肠肿瘤的5-FU药物抗性,最终导致损伤诱导的G2/M阻滞和细胞凋亡的缺乏。

[0096] 定义和缩写

[0097] DNA 脱氧核糖核酸

[0098] mRNA 信使RNA

[0099] PCR 聚合酶链式反应

[0100] pre-miRNA 前体微RNA

[0101] qRT-PCR 定量逆转录酶聚合酶链式反应

[0102] RNA 核糖核酸

[0103] 应理解,上述一般说明和下列详细说明仅仅是示例性的和解释性的,并且无意限定本教导的范围。在本申请中,除非明确地另有所指,否则单数的使用包括复数。

[0104] 除非另有所指,否则按照常规惯用法来使用技术术语。分子生物学中的常用术语的定义可见于Benjamin Lewin, Genes V, published by Oxford University Press, 1994 (ISBN0-19-854287-9); Kendrew等人(eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, 由Blackwell Science Ltd. 出版, 1994 (ISBN0-632-02182-9); 和Robert A. Meyers(ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, 由VCH Publishers, Inc. 出版, 1995 (ISBN1-56081-569-8)。

[0105] 为了帮助总览本公开内容的各种实施方案,提供了特定术语的下列解释:

[0106] 辅助化疗:与主治疗(primary treatment)组合使用以改善主治疗的效果的治疗。

[0107] 临床结果:是指在疾病或障碍的治疗后或在治疗不存在的情况下患者的健康状态。临床结果包括但不限于直至死亡的时间长度的增加、直至死亡的时间长度的减少、存活机会的增加、死亡风险的增加、存活、无疾病存活、慢性疾病、转移、晚期或攻击性疾病、疾病复发、死亡和对疗法的有利或不良反应。

[0108] 存活的减少:如本文中所用,“存活的减少”是指患者死亡之前时间长度的减少或患者的死亡风险的增加。

[0109] 检测表达水平:例如,“检测miR或miRNA的表达水平”是指定量存在于样品中的miR或miRNA的量。检测特定miR或任何微RNA的表达,可使用本领域已知或本文中描述的任何方法,例如通过qRT-PCR来实现。检测miR的表达包括检测miRNA的成熟形式的表达或与miRNA表达相关联的前体形式的表达。常见地,miRNA检测法包括序列特异性检测,例如通过RT-PCR。miR特异性引物和探针可使用前体和成熟miR核酸序列来设计,其在本领域是已知的并且在本文中以SEQ ID NO形式来提供。

[0110] 微RNA(miRNA):调控基因表达的单链RNA分子。微RNA在长度上通常为21-23个核苷酸。微RNA从被称为pri-miRNA的初级转录物加工成被称为前体(pre)-miRNA的短茎环结构,并且最终被加工成功能性成熟微RNA。成熟微RNA分子与一个或多个信使RNA分子部分互补,并且其主要功能是下调基因表达。微RNA通过RNAi途径调控基因表达。

[0111] miR表达:如本文中所用,“低miR表达”和“高miR表达”是表示样品中发现的miRNA的水平的相对术语。在一些实施方案中,低或高miR表达通过比较一组对照样品与测试样品中的miRNA水平来测定。随后可基于miR在样品中的表达是高于(高)还是低于(低)平均或中位miR表达水平来将低和高表达赋予每一个样品。对于个体样品,高或低miR表达可通过将样品与已知具有高或低表达的对照或参照样品相比较,或通过标准值相比较来确定。低和高miR表达可包括miRNA的前体或成熟形式或两种形式的表达。

[0112] 患者:如本文中所用,术语“患者”包括人和非人动物。进行治疗的优选患者是人。“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0113] 药学上可接受的媒介物:本说明书中使用的药学上可接受的载体(媒介物)是常规的。《雷氏药学大全》(Remington's Pharmaceutical Sciences),E.W.Martin,Mack Publishing Co.,Easton,PA,第15版(1975)描述了适用于一种或多种治疗性化合物、分子或试剂的药物递送的组合物和制剂。

[0114] 一般而言,载体的性质将取决于待使用的具体施用模式。例如,胃肠外制剂通常包括注射液,其包括药学上和生理上可接受的液体例如水、生理盐水、平衡盐溶液、含水葡萄糖、甘油等作为媒介物。对于固体组合物(例如,粉剂、丸剂、片剂或胶囊形式),常规非毒性固体载体可包括例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉或硬脂酸镁。除了生物学中性载体以外,待施用的药物组合物可包含较少量的非毒性辅助物质,例如湿润剂或乳化剂、防腐剂 and pH 缓冲剂等,例如醋酸钠或脱水山梨醇单月桂酸酯。

[0115] 预防、治疗或改善疾病:“预防”疾病是指抑制疾病的完全发展。“治疗”是指在疾病开始发展后改善疾病或病理状态的指征或症状的治疗干预。“改善”是指疾病的指征或症状的数目或严重度的减少。

[0116] 筛选:如本文中所用,“筛选”是指用于评估和鉴定影响这样的疾病的候选试剂的过程。可使用本领域已知的和本文中描述的很多技术的任一种、例如通过微阵列分析或通过qRT-PCR定量微RNA的表达。

[0117] 小分子:通常具有低于约1000道尔顿或在一些实施方案中低于约500道尔顿的分子量的分子,其中分子能够调节靶分子的活性达到一定的可测量的程度。

[0118] 治疗:包括诊断和治疗的总称。

[0119] 治疗剂:当给受试者适当地施用时,能够诱导期望的治疗性或预防性效应的化合物、小分子或其它组合物例如反义化合物、抗体、蛋白酶抑制剂、激素、趋化因子或细胞因子。

[0120] 如本文中所用,“候选试剂”或“测试化合物”是被选择来进行筛选以确定其是否可用作治疗剂的化合物。“温育”包括使试剂与细胞或组织相互作用的充足量的时间。“接触”包括将固体或液体形式的试剂与细胞或组织温育。利用试剂“治疗”细胞或组织包括将试剂与细胞或组织接触或温育。

[0121] 治疗有效量:足以在待利用试剂治疗的受试者或细胞中实现期望的效应的指定的药物或治疗性试剂的量。试剂的有效量将取决于若干因素,包括但不限于待治疗的受试者或细胞以及治疗性组合物的施用方式。

[0122] 在本方法的一些实施方案中,对照的使用是期望的。在该方面,对照可以是获自相同患者的非癌性组织样品或获自健康受试者例如健康组织供体的组织样品。在另一个实例

中,对照是从历史值计算的标准。肿瘤样品和非肿瘤组织样品可按照本领域已知的任何方法来获得。例如,肿瘤和非癌性样品可获自己已经历切除手术的癌症患者,或它们可通过使用皮下注射针抽取,通过显微解剖或通过激光捕获来获得。对照(非癌性)样品可以例如从尸体供体或从健康供体获得。

[0123] 在一些实施方案中,筛选包括将候选试剂/测试化合物与细胞接触。细胞可以是获自患者的原代细胞或细胞可以是永生生化或转化的细胞。

[0124] 候选试剂/测试化合物可以是任何类型的试剂,例如蛋白质、肽、小分子、抗体或核酸。在一些实施方案中,候选试剂是细胞因子。在一些实施方案中,候选试剂是小分子。筛选包括高通量筛选和筛选个别或小组的候选试剂。

[0125] 微RNA检测

[0126] 在本文中的一些方法中,期望鉴定存在于样品中的miRNA。

[0127] 前体微RNA(pre-miRNAs)和成熟miRNA的序列是可公共获得的,例如通过miRBase数据库,可通过桑格研究所(Sanger Institute)(参见Griffiths-Jones等人,Nucleic Acids Res.36:D154-D158,2008;Griffiths-Jones等人,Nucleic Acids Res.34:D140-D144,2006;和Griffiths-Jones,Nucleic Acids Res.32:D109-D111,2004)在线获得。本文中提供了目前公开的优选家族成员的前体和成熟形式的序列。

[0128] RNA表达的检测和定量可通过本领域公知的(参见,例如,美国专利申请公开号2006/0211000和2007/0299030,通过引用并入本文)和下文中描述的很多方法之任一来实现。通过使用已知的RNA家族成员的序列,适当时可设计特异性探针和引物来用于下文中描述的检测法。

[0129] 在一些情况下,RNA检测法需要从样品例如细胞或组织样品分离核酸。可使用本领域已知的任何适当技术分离核酸,包括RNA、特别是miRNA。例如,基于酚的提取是用于RNA分离的常用法。基于酚的试剂包含用于细胞和组织破碎以及随后RNA与污染物的分离的变性剂和RNA酶抑制剂的组合。基于酚的分离程序可回收10-200个核苷酸范围内的RNA种类(例如,前体和成熟miRNA、5S和5.8S核糖体RNA(rRNA)以及U1小核RNA(snRNA))。此外,提取程序例如使用TRIZOL™或TRI REAGENT™的提取程序将纯化所有RNA(大的和小的),是用于从包含miRNA和小干扰RNA(siRNA)的生物样品分离总RNA的有效率的方法。

[0130] 在一些实施方案中,期望使用微阵列。微阵列是使得能够进行复杂生物化学样品的平行分析的核酸、蛋白质、小分子、细胞或其它物质的微型有序阵列。DNA微阵列由被化学连接至固体基底上的不同核酸探针(称为捕获探针)组成,所述基底可以是微芯片、载玻片或微球尺寸的珠粒。可使用微阵列例如同时测量大量信使RNA(mRNA)和/或miRNA的表达水平。

[0131] 可使用多种技术制造微阵列,包括利用尖细针头打印至载玻片上,使用预制掩膜的光刻法,使用动态微镜设备的光刻法,喷墨打印或微电极阵列上的电化学法。

[0132] 例如可按照本领域已知的任何方法(参见例如,PCT公开号W02008/054828;Ye等人,Nat.Med.9(4):416-423,2003;Calin等人,N.Engl.J.Med.353(17):1793-1801,2005,将其每一个通过引用并入本文)实现例如miRNA的微阵列分析(尽管此类方法可以以改进形式用于任何RNA分析)。在一个实例中,从细胞或组织样品提取RNA,使用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳从总RNA按尺寸选择小RNA(18-26个核苷酸的RNA)。将寡核苷酸连接子连接至小RNA的

5'和3'末端,将所得的连接产物用作RT-PCR反应(使用10个扩增循环)的模板。有义链PCR引物具有连接至其5'末端的荧光团,从而荧光标记PCR产物的有义链。使PCR产物变性,随后与微阵列杂交。称为与阵列上相应 miRNA捕获探针序列互补的靶核酸的PCR产物将通过碱基配对与在其上固定了捕获探针的点杂交。当使用微阵列激光扫描仪激发时,点将随后发射荧光。随后使用多个阳性和阴性对照以及阵列数据标准化法,就特定miRNA的拷贝数估计每一个点的荧光强度,这将产生特定miRNA的表达水平的估量。

[0133] 在备选方法中,直接使用从细胞或组织样品提取的包含小RNA级分(包括miRNA)的总RNA,而不进行小RNA的尺寸选择,使用T4RNA连接酶标记3'末端和荧光标记的短RNA连接子。通过在30°C温育2小时,随后在80°C热灭活T4RNA连接酶5分钟来标记RNA样品。与阵列上相应的miRNA捕获探针序列互补的荧光团标记的miRNA将通过碱基配对与在其上固定了捕获探针的点杂交。如上所述进行微阵列扫描和数据处理。

[0134] 存在几种类型的待使用的微阵列,包括斑点寡核苷酸微阵列、预制造的寡核苷酸微阵列和斑点长寡核苷酸阵列。在斑点寡核苷酸微阵列中,捕获探针是与miRNA序列互补的寡核苷酸。通常将该类型的阵列与从两个待比较的样品(例如非癌性组织和癌症或样品组织)尺寸选择的小RNA的扩增PCR产物(利用两种不同荧光团标记的)杂交。或者,从两个样品提取包含小RNA级分(包括miRNA)的总RNA,将其直接使用而不进行小RNA的尺寸选择,使用T4RNA连接酶标记3'末端和利用两种不同的荧光团标记短RNA连接子。可混合样品,将其与一个单阵列杂交,随后扫描阵列,从而允许在一个测定中使上调的和下调的miRNA基因可视化。

[0135] 在预制寡核苷酸微阵列或单通道微阵列中,探针被设计为与已知的或预测的miRNA的序列匹配。存在覆盖完整基因组的商购可得的设计(例如,来自Affymetrix或Agilent)。此类微阵列提供了基因表达的绝对值的评估,从而两个条件的比较需要使用两个单独的微阵列。

[0136] 斑点长寡核苷酸阵列由50至70聚体的寡核苷酸捕获探针组成,并且通过喷墨或自动化打印来产生。短寡核苷酸阵列由20-25聚体寡核苷酸探针组成,并且通过光刻合成(Affymetrix)或通过自动化打印来产生。

[0137] 在一些实施方案中,期望使用定量RT-PCR。定量RT-PCR(qRT-PCR)是用于快速测量聚合酶链式反应的产物的量的聚合酶链式反应的改进。qRT-PCR通常用于确定基因序列例如miR是否存在于样品中,并且如果其存在,确定样品中的拷贝数。可测定核酸分子、包括miRNA的表达的PCR的任何方法落在本公开内容的范围内。存在几个本领域已知的qRT-PCR方法的变型,下面描述其中的3个方法。

[0138] 用于定量聚合酶链式反应的方法包括但不限于通过琼脂糖凝胶电泳、SYBR Green(双链DNA染料)的使用和荧光报道探针的使用。后两者可进行实时分析。

[0139] 关于琼脂糖凝胶电泳,利用已知浓度的具有类似尺寸的区段的靶DNA进行扩增来制备未知样品和已知样品。在相同的条件(优选使用相同的此物,或至少具有相似退火温度的引物)下运行两个反应,进行相同的时间长度。将琼脂糖凝胶电泳用于将反应产物与其原始DNA和多余引物分离。测量已知和未知样品的相对量以测定未知样品的量。

[0140] SYBR Green染料的使用比琼脂糖凝胶法更准确,并且可实时产生结果。DNA结合染料结合所有新合成的双链DNA,测量荧光强度的增加,从而允许测定初始浓度。然而,SYBR

Green将标记所有双链DNA,包括任何预料之外的PCR产物以及引物二聚体,从而导致潜在的复杂化和人工假象。通过添加荧光双链DNA染料,照常准备反应。运行反应,监测荧光水平(染料仅当结合至双链DNA时才发荧光)。参考标准样品或标准曲线,可测定PCR中的双链DNA浓度。

[0141] 荧光报道探针法使用基于序列特异性核酸的探针以仅定量探针序列而非所有双链DNA。通常利用具有荧光报道分子和保持在相邻位置上的猝灭剂的基于DNA的探针(所谓的双标记探针)来进行该荧光报道探针法。报道分子与猝灭剂的紧密靠近阻止其荧光;只有在探针分解时才可检测荧光。该方法依赖于涉及的聚合酶的5'至3'外切核酸酶活性。

[0142] 通过添加双标记探针来准备实时定量PCR反应。当双链DNA模板变性时,探针能够结合模板DNA的目标区域中的其互补序列。当将PCR反应混合物加热以活化聚合酶时,聚合酶开始合成引发的单链模板DNA的互补链。随着聚合继续,其到达结合至其互补序列的探针,随后该探针因聚合酶的5'-3'外切核酸酶活性而被水解,从而使荧光报道分子与猝灭剂分子分离。这导致荧光增加,荧光增加被检出。在实时PCR反应的热循环中,监测每一个PCR循环中从水解的双标记探针释放的荧光的增加,这允许准确测定DNA的最终量和从而初始量。

[0143] 在一些实施方案中,期望使用原位杂交。原位杂交(ISH)将核酸杂交的技术应用和推广至单细胞水平,并且通过与细胞化学、免疫细胞化学以及免疫组织化学的技术组合,允许形态得以维持并且鉴定待维持和鉴定的细胞标志物,以及允许将序列定位至群体例如组织和血液样品内的特定细胞。ISH是一种类型的杂交,其使用互补核酸来将一种或多种特异性核酸序列定位在组织的部分或切片(原位)中,或如果组织足够小,定位在整个组织(整装ISH)中。RNA ISH可用于测定组织中的表达模式,例如miRNA的表达。

[0144] 处理样品细胞或组织以增加其通透性来允许探针例如miRNA特异性探针进入细胞。将探针添加至处理的细胞,允许在相关温度杂交,洗掉过量的探针。利用放射性、荧光或抗原性标记物标记互补探针,以便可使用放射自显影术、荧光显微镜检查或免疫测定来测定探针在组织中的位置和量。样品可以是本文中描述的任意样品,例如非癌性或癌性组织样品。由于miR-155家族成员的序列是已知的,因此可相应地设计miR-155探针以便探针特异性结合miR-155。

[0145] 在一些实施方案中,期望使用原位PCR。原位PCR是在ISH之前的靶核酸序列的基于PCR的扩增。为了检测RNA,引入细胞内逆转录步骤以在进行原位PCR之前从RNA模板产生互补DNA。这使得能够检测低拷贝的RNA序列。

[0146] 在进行原位PCR之前,将细胞或组织样品进行固定和透化以保持形态并且允许PCR试剂接触待扩增的细胞内序列。随后在保持悬浮的完整细胞中或直接在细胞离心制备物或载玻片上的组织切片中进行靶序列的PCR扩增。在前一种方法中,使用常规热循环仪对悬浮在PCR反应混合物中的固定的细胞进行热循环。PCR后,将细胞进行细胞离心至载玻片上,通过ISH或免疫组织化学显现细胞内PCR产物。通过在盖玻片下用PCR混合物覆盖样品而在载玻片上进行原位PCR,随后密封盖玻片以阻止反应混合物蒸发。通过将载玻片直接置于常规或专门设计的热循环仪的加热块的顶部或通过使用热循环炉来实现热循环。

[0147] 通常通过两个不同技术(利用PCR产物特异性探针通过ISH进行的间接原位PCR,或通过直接检测标记的核苷酸(例如地高辛配基-11-dUTP、荧光素-dUTP、3H-CTP或生物素-

16-dUTP,所述标记核苷酸已在热循环过程中掺入PCR产物)而不用ISH进行的直接原位PCR)之一实现细胞内PCR产物的检测。

[0148] 差异表达的miR和miRNA用作预后的预测标志物和用于鉴定治疗剂的用途。本文中公开了miR-155以及状态指标的某些表达模式是某些患者的存活预后的预测剂。如本文中所用,“不良预后”通常是指存活的减少或换句话说,死亡风险的增加或直至死亡的时间的减少。不良预后还可指疾病严重度的增加,例如癌症至其它器官的扩散(转移)的增加。在一个实施方案中,各标志物显示相对于对照至少1.5倍的表达的增加或减少。在其它实施方案中,不良预后利用相对于野生型肿瘤对照数值至少2倍、至少2.5倍、至少3倍、至少3.5倍或至少4倍的标志物的增加或减少来指示。

[0149] 筛选候选试剂以鉴定用于治疗疾病的治疗剂的方法在本领域是公知的。检测RNA和蛋白质的表达水平的方法在本领域是已知的并且描述于本文中,例如但不限于微阵列分析、RT-PCR(包括qRT-PCR)、原位杂交、原位PCR和Northern印迹分析。在一个实施方案中,筛选包括高通量筛选。在另一个实施方案中,单个地筛选候选试剂。

[0150] 候选试剂可以是任何类型的分子例如但不限于核酸分子、蛋白质、肽、抗体、脂质、小分子、化学药品、细胞因子、趋化因子、激素或可直接或间接改变癌症疾病状态的任何其它类型的分子。

[0151] 通常,内源基因、miRNA或mRNA在细胞中受到调控。在具体的实施方案中,核酸序列包含至少一个在核酸序列上与表1所列的一个或多个miRNA序列具有至少70、75、80、85、90、95或100%的同一性的区段。可通过调节mRNA的加工来调节内源基因、miRNA或mRNA的表达或加工,此类加工包括细胞内的转录、转运和/或翻译。还可通过抑制或增强miRNA在细胞、组织或器官中的活性来实现调节。这样的加工可影响编码的产物的表达或mRNA的稳定性。在其它实施方案中,核酸序列可包含修饰的核酸序列。在某些方面,一个或多个miRNA序列可包括或包含修饰的核碱基或核酸序列。

[0152] 在本发明的方法中应理解,可通过给细胞或生物体施用一旦存在于细胞内即可以相应miRNA发挥作用的核酸分子来为细胞或其它生物物质例如生物体(包括患者)提供相应于特定miRNA的miRNA或miRNA分子。提供给细胞的分子的形式可以不是一旦存在于细胞内即可用作miRNA的形式。因此,考虑到在一些实施方案中为生物物质提供合成的miRNA或非合成的miRNA,例如一旦其已进入细胞的miRNA加工机构就被加工成成熟的活性miRNA的那些。在某些实施方案中,特别考虑到提供给生物物质的miRNA分子不是成熟miRNA分子而是一旦其进入miRNA加工机构就可被加工成成熟miRNA的核酸分子。术语“非合成的”在miRNA的上下文中意指miRNA不是“合成的”,如本文中所定义的。此外,考虑到在涉及合成的miRNA的用途的本发明的实施方案中,相应的非合成的miRNA的使用也被认为是本发明的方面,并且反之亦然。应理解,术语“提供”试剂用于包括给患者“施用”试剂。

[0153] 在某些实施方案中,方法还包括靶向miRNA以在细胞或生物体中调节。术语“靶向miRNA以调节”意指将使用本发明的核酸以调节选择的miRNA。在一些实施方案中,利用相应于靶向的miRNA的合成的或非合成的miRNA实现调节,所述合成的或非合成的miRNA有效地将靶向的miRNA提供给细胞或生物体(正调节)。在其它实施方案中,利用miRNA抑制剂实现调节,所述抑制剂有效地抑制细胞或生物体中的靶向的miRNA(负调节)。

[0154] 在一些实施方案中,待被调节的靶向miRNA是影响疾病、病况或途径的miRNA。在某

些实施方案中,miRNA被靶向,因为可通过靶向的miRNA的负调节来提供治疗。在其它实施方案中,miRNA被靶向,因为可通过靶向的miRNA的正调节来提供治疗。

[0155] 在本发明的某些方面中,存在给需要与靶向的miRNA的调节相关的治疗或需要本文中论述的生理学或生物学结果(例如在特定细胞途径或结果方面,如细胞存活的减少)的细胞、组织、器官或生物体(统称为“生物物质”)施用选择的miRNA调节剂的另外的步骤。因此,在本发明的一些方法中,存在鉴定需要可由miRNA调节剂提供的治疗的患者的步骤。考虑到可在一些实施方案中施用有效量的miRNA调节剂。在具体实施方案中,存在赋予生物物质的治疗益处,其中“治疗益处”是指与疾病或病况相关的一个或多个状况或症状的改善或关于疾病的预后、持续时间或状态的改善。考虑到治疗益处包括但不限于疼痛的减轻、发病率的降低、症状的减少。例如,关于癌症,考虑到治疗益处可以是肿瘤生长的抑制、转移的阻止、转移灶数目的减少、癌细胞增殖的抑制、癌细胞的细胞死亡的诱导、癌细胞附近血管生成的抑制、癌细胞的细胞凋亡的诱导、疼痛的减轻、复发风险的降低、癌细胞的化学或放射敏感性的诱导、寿命的延长和/或与癌症直接或间接相关的死亡的延迟。

[0156] 此外,考虑到可将miRNA组合物作为疗法的一部分与常规疗法或预防性试剂结合提供给患者。此外,考虑到疗法的上下文中论述的任何方法可预防性使用,特别是用于经鉴定潜在地需要疗法或处于患需要疗法对其进行治疗的病况或疾病的风险中的患者。

[0157] 此外,本发明的方法涉及使用一种或多种相应于miRNA的核酸和治疗性药物。核酸可增强药物的作用或功效、减小任何副作用或毒性、改变其生物利用度和/或减少所需的剂量或频率。在某些实施方案中,治疗性药物是癌症治疗剂。因此,在一些实施方案中,存在治疗患者的癌症的方法,包括给患者施用癌症治疗剂和有效量的至少一种miRNA分子,所述miRNA分子改善癌症治疗剂的功效或保护非癌细胞。癌症疗法还包括多种利用基于化学和放射的治疗的联合疗法。联合化学疗法包括但不限于例如贝伐单抗、顺铂(CDDP)、卡铂、EGFR抑制剂(吉非替尼和西妥昔单抗)、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、COX-2抑制剂(例如,塞来考昔)、异环磷酰、美法仑、苯西酸氮芥、白消安、亚硝基脲、更生霉素、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、博来霉素、普利霉素、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合试剂、紫杉醇、泰素帝、吉西他滨、诺维本、法尼酯蛋白转移酶抑制剂、反铂、5-氟尿嘧啶、长春花新碱、长春碱和甲氨蝶呤或前述化合物的任意类似物或衍生变体。

[0158] 一般而言,可提供miRNA的抑制剂以获得与提供相应于成熟miRNA的核酸分子相比较相反的作用。类似地,可提供相应于成熟miRNA的核酸分子以获得与提供miRNA的抑制剂相比较相反的作用。例如,可给细胞提供增加细胞增殖的miRNA分子以增加增殖或可给细胞提供此类分子的抑制剂以减少细胞增殖。本发明涉及在对于本文中公开的不同miRNA分子和miRNA抑制剂观察到的不同生理作用的上下文中的此类实施方案。此类生理作用包括但不限于下列生理作用:增加和减少细胞增殖、增加或减少细胞凋亡、增加转化、增加或减少细胞存活、减少或增加活细胞数目以及增加或减少细胞周期的特定时期的细胞数目。通常考虑到本发明的方法包括提供或引入相应于一种或多种不同miRNA分子的一种或多种不同的核酸分子。考虑到可提供或引入下列、至少下列或至多下列数目的不同核酸分子:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、

81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100或可从其中引出的任何范围。这也适用于可提供或引入细胞的不同miRNA分子的数目。

[0159] 已在其优选实施方案中解释和举例说明了本发明的操作的原理或模式。然而，必须理解本发明可按照与明确解释和举例说明的方式不同的方式实践本发明而不背离其范围。

实施例

[0160] 实施例1

[0161] 材料和方法

[0162] 细胞培养和转染

[0163] 将Colo-320DM、SW620、SW480、HCT-116和RK0结肠直肠癌(CRC)细胞(美国典型培养物保藏中心ATCC Manassas, VA)培养在RPMI1640(Gibco, Carlsbad, CA)中, 包装细胞293TN(System Biosciences, Mountain View, CA)生长在DMEM(Gibco, Carlsbad, CA)中。Lovo+chr2hMSH2+/2和Lovo(DT40.2)-4-1hMSH22/21生长在含700mg/ml G418(Gibco)的IMDM(Gibco, Carlsbad, CA)中。用10%胎牛血清(Sigma, St. Louis, MO)+抗生素补充所有细胞。定期就支原体污染检查细胞, 发现总是阴性的。按照制造商的方案, 通过使用Lipofectamine2000(Invitrogen, Carlsbad, CA)在6孔板中转染细胞。为了进行过表达研究, 特定的miRNA或对照前体寡核苷酸购自Ambion(Austin, TX)并且以50nM使用。将针对hMSH2和hMSH6的Ontarget-plus siRNA(Dharmacon, CO)用作对照。为了进行沉默实验, 以50nM使用miRCURY LNATM抗-miR-21或对照miRCURY敲低探针(Exiqon, Vedbaek, Denmark)。如下所述通过定量实时PCR在48小时后验证miRNA表达。编码全长MSH2cDNA的质粒购自Origene。使用QuikChange定点诱变试剂盒(Stratagene, San Diego, CA)(表2)制备针对miR-21种子区域的hMSH2突变体(表2)。

[0164]

表 2.用于克隆的引物的列表		
引物名称	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
SEQ ID NO:1 和 6 <i>hMSH2</i> -LUC-WT	CAGAAAGCCCTGGAAGTTGA	TCAATTGCAAACAGTCCTCA G
SEQ ID NO:2 和 7 <i>hMSH2</i> -LUC-突变体	TTTCCATAGTGTTAACTGTCA GTGC	TCAATTGCAAACAGTCCTCA G
SEQ ID NO:3 和 8 <i>hMSH2</i> -cDNA-突变体	CCCAGTAATGGAATGAAGGG TCTGTAATAGTTTTATATTG	CAATATAAAACTATTACAG ACCCCTTCATTCCATTACTGG G
SEQ ID NO:4 和 9 <i>hMSH6</i> -LUC-WT	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	TAGCTTTTCCTCCCCCATTT
SEQ ID NO:5 和 10 <i>hMSH6</i> -LUC-突变体	AAATGTTGCTGTGCGCCTA	CCACCTTTGTCAGAAGTCAA CTC

[0165] 萤光素酶测定

[0166] 如下将*hMSH2*和*hMSH6*的3'-UTR中的预测的miRNA结合位点克隆在萤火虫萤光素基因的下游。使用分别用于*hMSH2*和*hMSH6*克隆的特异性引物(表2)通过PCR扩增来自SW-480细胞的互补性DNA(cDNA)和基因组DNA。随后用SpeI和SacII(New England Biolabs Ipswich, MA)消化产物并插入先前经修饰以在萤火虫萤光素酶基因的终止密码子的紧挨着的下游具有SpeI和SacII位点的pGL3对照载体(Promega, Madison, WI)。为每一个单个基因(MUT-21)构建具有突变的miRNA识别序列的报道构建体。对于*hMSH2*和*hMSH6*miR-21种子区域,使用位于预测的miRNA结合位点上游或下游的引物获得突变构建体,以不包括种子区域互补位点。

[0167] 利用1μg的pGL3萤火虫萤光素酶报道对照载体、0.1μg的phRL-SV40对照载体(Promega, Madison, WI)和50nM miRNA、对照前体、抗miR-21的LNA或LNA对照在12孔板中共转染Colo-320DM 和SW480细胞。通过在转染后24小时使用双萤光素酶测定(Promega)连续地测量萤火虫和海肾萤光素酶活性。

[0168] Western印迹

[0169] 为了进行免疫印迹分析,利用冰冷的细胞裂解缓冲液+蛋白酶抑制剂(Cell Signaling Technology Inc. Danvers, MA)裂解细胞。溶解等量的蛋白质,将其与4X SDS-PAGE样品缓冲液混合,在4%-20%和7.5%的线性梯度Tris-HCL标准预制凝胶(Bio-Rad)中进行电泳,转移至硝酸纤维素或PVDF膜(Bio-Rad)。利用Tris缓冲盐溶液pH7.4(包含0.05% Tween20)中的5%的脱脂奶粉封闭膜,按照制造商的说明书用一抗和二抗温育膜。使用下列一抗:小鼠单克隆抗-MSH2(1:200, Invitrogen)、小鼠单克隆抗-MSH6(1:500, BD Biosciences San Jose, CA)、小鼠单克隆抗-肌动蛋白(1:5000, Sigma)、小鼠单克隆抗-GAPDH(1:1000, SantaCruz Biotechnology)。

[0170] 成熟miRNA和基因的实时PCR

[0171] 利用Trizol(Invitrogen)分离总RNA。利用单管TaqManMicroRNA测定来评估成熟miRNA,利用下列探针通过基因表达测定来评估目标mRNA的表达:hMSH2=Hs00953523_m1、hMSH6=Hs00943001_m1(Applied Biosystems,Foster City,CA)。将miRNA表达针对RNU44和RNU48的表达进行标准化。将基因表达针对β-actin进行标准化。在GeneAmp PCR9700热循环仪(Applied Biosystems)中运行所有逆转录酶(RT)反应,包括无模板对照和RT负对照。除非另有所指,否则以一式三份测试每一个样品。

[0172] Northern印迹

[0173] 为了进行成熟miRNA检测,如先前所述2,进行丙烯酰胺Northern印迹。

[0174] 福尔马林固定的石蜡包埋的组织切片的MiRNA锁核酸(LNA)原位杂交

[0175] 如先前所述3,通过原位杂交(ISH)以一式二份在包含50个正常和癌症结肠核心的结肠癌组织阵列(US Biomax BC05118)上进行微RNA检测。阴性对照包括探针的省略和无规LNA探针的使用。在miRNA的原位杂交后,使用针对hMSH2的最佳条件(Ventana cat#760-4265)分析载玻片的免疫组织化学。为了进行免疫组织化学,本发明人使用了来自Ventana Medical System(Tucson,AZ)的Ultrasensitive Universal Fast Red系统。利用Nuance系统(Ventana)制作代表性点的图。基于核心中阳性细胞的数目对癌症核心的miR-21和hMSH2蛋白表达进行评分。

[0176] 组织的收集

[0177] 在伦理委员会批准后在Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori,Meldola,Italy收集来自83个CRC的连续病例的肿瘤组织和正常相邻组织的新鲜冷冻组织。如上所述提取细胞裂解物以进行蛋白质和RNA提取。

[0178] 细胞周期分析和细胞凋亡分析

[0179] 碘化丙啶染色(PI)染色:利用胰蛋白酶使细胞脱离,利用冷磷酸缓冲盐溶液(PBS)-5%FCS洗涤细胞,随后在70%乙醇中固定24小时。在用PBS洗涤后,在利用Coulter Epics XL流式细胞仪(BeckmanCoulter,Fullerton,CA)进行FACS分析之前,在25°C下利用1 μg/mlPI温育细胞3小时。当其DNA含量<2N时,细胞被认为是凋亡的。膜联蛋白V染色:利用胰蛋白酶使细胞脱离,利用PBS-5%FCS洗涤细胞,随后将其放置在含有0.14M NaCl、2.5mM CaCl₂和0.01MN-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸(pH7.4)的结合缓冲液中,在FACS分析之前向所述缓冲液中添加7-氨基-放线菌素D(7-AAD)和膜联蛋白V-FITC(Pharmingen, San Diego, CA)。当膜联蛋白V-FITC为阳性并且7-AAD为阴性时细胞被认为是凋亡的。

[0180] 如下进行同步化实验:通过汇合和低血清处理48小时使Lovo-MSH2阳性、Lovo-MSH2阴性的SW620和Colo-320DM细胞阻滞在G0-G1来进行同步化,随后利用胰蛋白酶使细胞脱离,计数细胞,按照制造商的说明书使用Cell **Nucleofector**® 试剂盒(Lonza Walkersville, Inc ME)或Lipofectamine2000TM(Invitrogen, Carlsbad, CA),以Pre-miR-对照、Pre-miR-21、抗hMSH2siRNA、siRNA-对照和编码全长MSH2cDNA的载体(具有或不具有miR-21种子区域)转染细胞,将细胞重涂铺在含10%FBS的培养基中。在释放后16小时(对应于正好在进入S期之前但在p53介导的G1-S细胞周期检查点之后的时间)添加5-氟尿嘧啶(50ug/ml)。

[0181] 稳定的过表达miR-21的克隆的产生

[0182] 利用包含处于两个不同启动子的控制之下的全长miR-21和GFP基因的pCDH-CMV-MCS-EF1-miRNA表达质粒(System Biosciences, Mountain View, CA)稳定地感染Lovo-MSH2阳性和Lovo-MSH2阴性细胞。将空载体用作对照。利用pPACKH1Lentivector包装质粒混合物(System Biosciences)在293-TN包装细胞系中包装pre-miR-21表达和对照构建体。使用PEG-itTM病毒沉淀溶液浓缩病毒,使用UltraRapid Lentiviral Titer试剂盒(System Biosciences)分析滴度。通过FACS分析(FACS Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems)选择感染的细胞。利用荧光显微镜验证感染效率>90%,进一步就miR-21的表达通过实时PCR来确认。

[0183] 异种移植研究

[0184] 按照机构指导方针进行动物研究。在裸鼠的侧腹中注射利用编码miR-21、针对hMSH2的siRNA的慢病毒载体或空载体(作为对照)感染的Lovo MSH2阳性细胞,和利用空病毒感染的Lovo hMSH2阴性细胞(5×10^6)。当异种移植(每一组6只动物)达到可触知的体积时,通过腹膜内注射施用5-FU(50mg/kg/天),每周进行连续5天,进行2周。在治疗开始时测量肿瘤体积,随后每周测量一次。利用下式计算估计的肿瘤体积(V): $V = W \times L \times 0.5$,其中W代表以厘米表示的最大肿瘤直径,L代表次最大肿瘤直径。如下计算单个相对肿瘤体积(RTV): $RTV = V_x / V_1$,其中 V_x 是在给定时间以立方毫米表示的体积, V_1 是治疗开始时的体积。

[0185] 实施例2

[0186] miR-21直接靶向hMSH2和hMSH6蛋白表达

[0187] 计算机分析显示miR-21可能靶向hMSH2和hMSH6mRNA(TargetScan, Whitehead Institute, MIT, 图1A)。本发明人鉴定了hMSH2(NCBI NM_000249.2)和hMSH6(NCBI NM_000179.2)3'-UTR中的miR-21的假定的结合位点。本发明人检查了miR-21表达对内源hMSH2和hMSH6mRNA在CRC Colo-320DM和SW620细胞中的表达的影响。两个细胞系都显示了低基线miR-21表达。本发明人利用miR-21前体(miR-21)或无规miR前体对照转染了这些细胞系(图6)。针对hMSH2(抗-MSH2)或hMSH6(抗-MSH6)的特异性小干扰RNA(siRNA)的过表达不影响miR-21的水平(图6A)。hMSH2和hMSH6的mRNA水平不受miR-21的过表达影响(图1B)。相反地,抗-MSH2和抗-MSH6siRNA分别特异性减少hMSH2和hMSH6mRNA的表达(图1B)。本发明人注意到抗-MSH2siRNA对hMSH6mRNA的表达的一致减少。该减少可以是抗-MSH2siRNA与hMSH6mRNA的简并杂交或由减少的异二聚体蛋白伴侣hMSH2引起的减小的hMSH6mRNA稳定性的结果。本结果显示miR-21过表达不影响hMSH2或hMSH6的mRNA水平。

[0188] 本发明人通过western印迹分析检查了miR-21转染后Colo-320DM和SW620细胞的hMSH2和hMSH6的蛋白质水平(图1C, 图6B)。hMSH2和hMSH6蛋白在过表达miR-21的细胞中相较于在过表达无规miR的细胞中显著减少。在这些细胞系中平行地转染抗-MSH2和抗-MSH6siRNA。本发明人观察到miR-21转染的细胞显示了与利用siRNA转染的细胞相当的hMSH2和hMSH6的下调。相反地,本发明人利用抗miR-21的锁核酸(LNA)(抗-miR-21)或无规LNA(抗-miR对照)转染包含高水平的内源miR-21的CRC SW480、HCT116和RKO细胞。本发明人发现利用抗-miR-21转染的细胞显示出hMSH2和hMSH6蛋白表达的增加(图1D; 图7B),而在mRNA水平上未观察到改变(图7C)。

[0189] 将hMSH2或hMSH6的整个3'UTR亚克隆在萤光素酶基因的下游。随后将萤光素酶报告构建体与前体miR-21(miR-21)或无规miR一起转染进入Colo-320DM细胞。本发明人观察

到对于包含针对hMSH2或hMSH6的miR-21种子区的构建体,荧光素酶活性分别下降50%和37% ($p < 0.001$; 图1E)。miR-21种子区的缺失导致包含hMSH2或hMSH6的载体的荧光素酶活性的恢复(图1E)。本发明人利用包含野生型(WT)或突变的(突变体)hMSH2和hMSH6 3'-UTR种子区域的荧光素酶报道载体转染显示高水平的miR-21表达的SW480细胞(图1F)。如所预期的,本发明人发现miR-21结合位点的消除导致hMSH2和hMSH6载体转染的细胞的荧光素酶活性增加。为了确认这些观察,利用hMSH2和hMSH6 3'-UTR荧光素酶受体+LNA抗-miR-21或抗-miR对照共转染SW480细胞。miR-21的LNA沉默诱导荧光素酶活性的增加(图1F)。综合起来,本结果显示miR-21对hMSH2和hMSH6 3'-UTR产生了直接作用,该作用最终调节hMSH2和hMSH6蛋白的表达。由于hMSH2蛋白状态可影响hMSH6蛋白的稳定性和表达(9),因此本发明人不能排除miR-21调控和hMSH2蛋白丢失可促成hMSH6下调的可能性。

[0190] 实施例3

[0191] miR-21与CRC组织中的MMR核心蛋白hMSH2反相关

[0192] 本发明人检查了两个不同CRC组群的miR-21和hMSH2表达(图2)。将包含50个未选择的CRC病例和配对的正常相邻组织的组织微阵列与LNA抗-miR-21或非特异性LNA抗-miR对照杂交,结合hMSH2蛋白的免疫组织化学(IHC)染色(图2A)。按照核心中阳性细胞的百分比为miR-21和hMSH2的蛋白质表达评分。55个核心中有42个核心可获得用于肿瘤与配对的正常组织的匹配分析。本发明人发现当将肿瘤与正常配对的组织相比较时miR-21在28(66%)个这些病例中被上调。42个病例中有14个病例(33%)在肿瘤中相较于正常组织具有hMSH2的强烈下调。在所有这些病例中,发现miR-21被上调。该患者亚组的皮尔逊相关分析显示-0.82的r值($p < 0.001$)。对于整个病例组群的关联分析显示-0.63的r值。对于miR-21和hMSH2评分都为阳性的CRC组织在相同的癌巢中未显示共表达(参见图2A,共标记)。

[0193] 本发明人检查了来自可获得其癌症和正常相邻组织的第二CRC样品组群的新鲜冷冻肿瘤(图2B)。通过northern分析和RT-PCR测定miR-21的表达,通过western分析测定hMSH2蛋白的表达。26个病例显示肿瘤中相较于正常相邻组织的hMSH2下调。当将肿瘤与相邻正常组织相比较时,发现miR-21的表达在这些病例的24个病例(90%)中增加。由于miR-155可影响hMSH2和其它MMR蛋白的表达,因此本发明人从该分析中排除了显示miR-155和miR-21的同时过表达的病例(16个病例)。在剩余的8个病例中反相关($r = -0.81$, $p < 0.02$)仍然是明显的,这突显了CRC肿瘤中miR-21过表达与hMSH2的下调之间的反相关(图2B:图8)。

[0194] 实施例4

[0195] 在暴露于5-氟尿嘧啶后miR-21减少G2/M阻滞和细胞凋亡

[0196] MMR缺乏性细胞系显示对多种治疗性药物包括5-氟尿嘧啶(5-FU)的抗性。本研究已显示该抗性是向DNA中缺陷性掺入5-FU代谢产物的结果,其导致减少的损伤依赖性G2/M阻滞和随后的细胞凋亡。本发明人检查了miR-21转染后,Colo-320DM和SW620细胞的5-FU诱导的细胞周期阻滞和细胞凋亡。本发明人使用无规miR作为对照并且将这些结果与利用抗-hMSH2 siRNA的相似转染相比较(图3)。本发明人发现miR-21的过表达在利用5-FU的治疗后减少了sub-G1(细胞凋亡)和G2/M细胞的百分比。miR-21转染的细胞显示与利用针对hMSH2的siRNA转染的细胞相似的减少的G2/M阻滞和细胞凋亡(图3)。通过膜联蛋白V染色在Colo-320DM和SW620中进一步确认了miR-21表达对5-FU介导的细胞凋亡的效应(图9)。在其中已通过引入染色体2补充了hMSH2突变[Lovo(MSH2-)]的同基因Lovo细胞[Lovo(MSH2+)]中观

观察到类似的反应(图4)。miR-21的过表达以及针对hMSH2的siRNA减少Lovo(MSH2+)细胞的sub-G1和G2/M的积累,而在Lovo(MSH2-)细胞中未观察到效应(图4)。利用编码全长hMSH2cDNA的质粒共转染Lovo(MSH2+)和Lovo(MSH2-)细胞促进了5-FU诱导的细胞凋亡和细胞周期阻滞。相同质粒与miR-21一起的共转染显著减少G2/M阻滞和细胞凋亡(图4)。此外,hMSH2cDNA的靶位点的缺失使信使对miR-21的调控不敏感并且细胞保持正常的损伤诱导的G2/M阻滞和细胞凋亡。综合起来,本结果与miR-21对hMSH2表达的下调导致对5-FU的细胞抗性的结论一致。

[0197] 实施例5

[0198] miR-21的过表达诱导结肠直肠癌异种移植物模型的5-FU抗性

[0199] 本细胞学研究显示miR-21通过减少hMSH2的表达抑制5-FU诱导的G2/M阻滞和细胞凋亡。本发明人开发了异种移植物结肠癌肿瘤模型,其中本发明人使用慢病毒表达系统产生了过表达miR-21[Lovo(MSH2+)-miR-21]或针对hMSH2的siRNA[Lovo(MSH2+)-抗-MSH2]的Lovo(MSH2+)的稳定克隆。包含空载体的稳定插入的Lovo(MSH2-)细胞和Lovo(MSH2+)用作对照。将包含稳定的慢病毒表达的细胞注射入裸鼠的侧腹(5×10^6 个细胞)。当异种移植物达到可触知的体积时,通过腹膜内注射施用5-FU(50mg/kg/天),每周进行连续的5天,进行2周。本发明人确认了hMSH2的表达在表达miR-21或抗-MSH2siRNA的Lovo(MSH2+)肿瘤异种移植物中相对于在表达空载体的所述肿瘤异种移植物中显著减少(图4A)。

[0200] 已证明5-FU治疗对于Lovo(MSH2+)肿瘤异种移植物相较于对于Lovo(MSH2-)肿瘤异种移植物更有效(图5;表1)。本结果显示MMR健全型细胞对5-FU疗法反应更好。重要地,miR-21的稳定过表达[Lovo(MSH2+)-miR-21]导致减弱的对5-FU的反应,并且引起与利用针对hMSH2的siRNA转染的Lovo(MSH2+)肿瘤细胞[Lovo(MSH2+)-抗-MSH2]的生长速率相当的肿瘤生长速率(图5;表1)。此外,在5-FU停药后(2周),Lovo(MSH2+)-miR-21感染的细胞的肿瘤生长相较于对照表现出显著更大;这显示了miR-21的过表达增强癌症进展。综合起来,本结果支持hMSH2-hMSH6异二聚体MMR蛋白的miR-21-依赖性下调在5-FU抗性中的中心作用。

[0201] 显示了P值,使用T-检验分析,通过将每一个组与对照组(Lovo(MSH2+)-空)相比较来计算P值。

[0202]

表 1. 体内实验的统计分析						
	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周
Lovo(MSH2+)-miR-21	0.13 6					
		0.008	0.026	0.040	0.048	0.035
Lovo(MSH2+)-抗-MSH2	0.18 3					
		0.019	0.049	0.004	0.080	0.159
Lovo(MSh2-)-空	0.18 6	<0.00 1				
		0.003	0.004	0.008	0.003	

[0203] 实施例6

[0204] 治疗性/防性方法和组合物

[0205] 本发明提供了通过在使用或不使用联合疗法的情况下给受试者施用有效量的本发明的治疗性反义miR-21来进行的治疗和预防的方法。在优选方面,治疗剂是基本上纯化的。受试者优选为动物,包括但不限于动物例如母牛、猪、鸡等,优选为哺乳动物,最优选为人。

[0206] 各种递送系统是已知的并且用于施用本发明的治疗剂,例如,于脂质体中的封装、微粒、微胶囊、通过重组细胞进行的表达、受体介导的胞吞作用、作为逆转录病毒或其它载体的部分的治疗性核酸的构建等。引入的方法包括但不限于真皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内和口服途径。通过任何方便的途径,例如通过输注或推注,通过经上皮或粘膜皮肤内衬(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)的吸收施用化合物,可将所述化合物与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身性的或局部的。此外,可期望通过任何适当的途径(包括脑室内和鞘内注射)将本发明的药物组合物导入中枢神经系统;脑室内注射可通过脑室内导管(例如连接至贮器例如奥马耶贮器)来帮助进行。

[0207] 在具体实施方案中,可期望将本发明的药物组合物局部施用至需要治疗的区域;这可通过例如(但非以限制的方式)在手术过程中局部输注、局部涂药(例如在手术后与创伤敷料结合)、通过注射、通过导管、通过栓剂或通过植入物(所述植入物是多孔的、无孔的或胶凝状材料,包括膜例如硅橡胶膜或纤维)来实现。在一个实施方案中,施用是通过在恶性肿瘤或肿瘤性或肿瘤前组织的位置(或原位置)直接注射。

[0208] 在其中治疗剂是编码蛋白质治疗剂的核酸的具体实施方案中,体内施用核酸以促进其编码的蛋白质表达,通过将其构建为适当的核酸表达载体的部分并且施用其以便其进入细胞内,或利用脂质或细胞表面受体或转染剂包被,或通过施用与已知进入细胞核的同源异形盒样肽连接的核酸来进行。或者,核酸治疗剂可被引入细胞内,并且通过同源重组引入进入宿主细胞DNA以进行表达。

[0209] 本发明还提供了药物组合物。此类药物组合物包含治疗有效量的治疗剂和药学上可接受的载体或赋形剂。这样的载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇及其组合。载体和组合物可以是无菌的。制剂将适合于施用模式。

[0210] 需要时,组合物还可包含少量湿润剂或乳化剂或pH缓冲剂。组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放制剂或粉剂。可利用常规粘合剂和载体例如甘油三酯将组合物配制为栓剂。口服制剂可包括标准载体例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0211] 在优选实施方案中,按照常规方法将组合物配制为适合给人类静脉内施用的药物组合物。通常,用于静脉内施用的组合物是无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还包括增溶剂和局部麻醉剂例如利诺卡因以减轻注射部位的疼痛。一般而言,以单位剂量形式例如以冻干的粉剂或无水浓缩物在熔封容器例如标明活性剂的量的安瓿或sachette中单独地或混合在一起地提供成分。在通过输注施用组合物的情况下,利用装有无菌药物级的水或盐水的输液瓶分配所述组合物。在通过注射施用组合物的情况下,提供一安瓿的无菌注射用水或盐水以便在施用之前混合成分。

[0212] 可以以中性或盐形式配制本发明的治疗剂。药学上可接受的盐包括与游离氨基形

成的盐例如从盐酸、磷酸、醋酸、草酸、酒石酸等衍生的盐,以及与游离羧基形成的盐例如从氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等衍生的盐。

[0213] 在特定障碍或病况的治疗中将是有效的本发明的治疗剂的量将取决于障碍或病况的性质,并且通过标准临床技术来测定。此外,体外测定可任选地用于帮助确定最佳剂量范围。待用于制剂中的精确剂量也将取决于施用途径以及疾病或障碍的严重度,并且根据医生的判断和每一个患者的状况来决定。然而,用于静脉内施用的适当的剂量范围通常为约20-500微克的活性化合物每千克体重。用于鼻内施用的适当的剂量范围通常为约0.01pg/kg体重至1mg/kg体重。可来源于体外或动物模型测试系统的剂量-反应曲线外推出有效剂量。

[0214] 本发明还提供了药物包装或试剂盒,其包含装有本发明的药物组合物的一个或多个成分的一个或多个容器。任选地与这样的容器相伴的是以由管理药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式存在的通告,该通告反映得到制造、使用或销售管理机构的批准用于人施用。

[0215] 实施例7

[0216] 治疗癌症患者的方法

[0217] 本实施例描述了选择和治疗可能对利用本文中的组合物的治疗具有有利的反应的患者的方法。

[0218] 经诊断患有癌症的患者通常首先经历目的在于治愈的组织切除。从患者取出的组织的部分获得肿瘤样品。随后使用任何适当的提取小RNA的方法(所述方法本领域是公知的),例如通过使用TRIZOL™从组织样品分离RNA。随后任选地与遗传分析结合,使用特异于miR21或公开的其它差异表达的miRNA的引物将纯化的RNA经历RT-PCR。运行这些测定以确定相关RNA在肿瘤中的表达水平。如果测定出差异表达的miR的表达模式,特别地如果确定了突变体的状态,则患者是利用本文中的组合物进行治疗的候选者。

[0219] 因此,按照本领域已知的方法利用治疗有效量的组合物治疗患者。组合物的剂量和给药方案将视多个因素例如患者的健康状态和癌症的分期而变化。通常,在一段时间内以多个剂量施用治疗。

[0220] 实施例8

[0221] 诊断癌症患者的方法

[0222] 在一个具体的方面,本文中提供了诊断受试者是否患有癌症或处于发生癌症的风险中的方法。方法通常包括测量相较于对照的miR-21的差异miR表达模式和/或差异MMR蛋白表达。如果确定了差异miR/MMR蛋白表达模式,则结果表示受试者患有结肠直肠癌或处于发生结肠直肠癌的风险中。在某些实施方案中,使用Northern印迹分析测量至少一种基因产物的水平。同样地,在某些实施方案中,测试样品中至少一种基因产物的水平低于对照样品中相应的miR基因产物和/或MMR蛋白表达的水平,和/或测试样品中至少一种miR基因产物和/或MMR蛋白表达的水平高于对照样品中相应的miR基因产物和/或MMR蛋白表达的水平。

[0223] 实施例9

[0224] 测量miR基因产物

[0225] 至少一种miR基因产物的水平可这样测定：逆转录来自获自受试者的测试样品的RNA以提供一组靶寡脱氧核糖核苷酸；将靶寡脱氧核糖核苷酸与包含miRNA-特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供测试样品的杂交谱；以及，将测试样品杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较。至少一种miRNA的信号的改变表示受试者患有结肠直肠癌或处于发生结肠直肠癌的风险中。

[0226] 实施例10

[0227] 诊断和治疗性应用

[0228] 在另一个方面，本文中提供了治疗受试者的癌症的方法，其中至少一种miRNA的信号相对于从对照样品产生的信号是脱调控的（例如，下调和/或上调）。

[0229] 本文中还提供了诊断受试者是否患有与受试者中的一个或多个不利预后标志物相关的癌症或处于发生所述癌症的风险中的方法，该方法通过逆转录来自获自受试者的测试样品的RNA以提供一组靶寡脱氧核糖核苷酸；将靶脱氧核糖核苷酸与包含miRNA-特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供测试样品的杂交谱；以及，将测试样品的杂交谱与从对照样品产生的杂交谱相比较来进行。信号的改变表示受试者患有癌症或处于发生所述癌症的风险中。

[0230] 实施例11

[0231] 试剂盒

[0232] 可将本文中描述的任何组合物包括在试剂盒中。在非限定性实例中，将用于分离miRNA、标记miRNA和/或使用阵列评估miRNA群体的试剂包括在试剂盒中。试剂盒还可包括用于产生或合成miRNA探针的试剂。试剂盒从而可在适当的容器装置中包含用于标记（通过掺入标记的核苷酸或随后被标记的未标记的核苷酸）miRNA的酶。其还可包括一种或多种缓冲液，例如反应缓冲液、标记缓冲液、洗涤缓冲液或杂交缓冲液、用于制备miRNA探针的化合物以及用于分离miRNA的组分。其它试剂盒可包括用于制备包含与miRNA互补的寡核苷酸的核酸阵列的组分，从而可包括例如固体载体。

[0233] 对于任何试剂盒的实施方案，包括阵列，可存在包含与本文中描述的序列的任何序列的全部或部分相同或互补的序列的核酸分子。

[0234] 可以以含水介质的形式或以冻干的形式包装试剂盒的组分。试剂盒的容器装置通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器或其它容器装置，可将组分置于其中，优选地，适当地在其中进行等分。当试剂盒中存在超过一种组分（可将标记试剂和标签包装在一起）时，试剂盒通常还可包括可将另外的组分分别放置于其中的第二、第三或其它另外的容器。然而，可将组分的各种组合包含在小瓶中。本发明的试剂盒通常还将包括包含核酸的装置以及严密封装的任何其它试剂容器以用于商业销售。这些容器可包括将期望的小瓶保留在其中的注射或吹模成型塑料容器。

[0235] 当在一个和/或多个液体溶液中提供试剂盒的组分时，液体溶液是水溶液，无菌水溶液是一种优选溶液。可包括在试剂盒中的其它溶液是参与从混合样品分离和/或富集miRNA的那些溶液。

[0236] 然而，可以以干燥粉剂的形式提供试剂盒的组分。当以干燥粉剂提供试剂和/或组分时，可通过添加适当的溶剂来对粉剂进行重建。预期还可以在另一个容器装置中提供溶剂。试剂盒还可包括有助于分离标记的miRNA的组分。其还可包括保持或维持miRNA或保护

其免受降解的组分。组分可以是不含RNA酶的或保护免受RNA酶降解。

[0237] 同样地,试剂盒通常还可以以适当的方式包括用于每一种单独的试剂或溶液的不同容器。试剂盒还可包括使用试剂盒组分以及使用未包括在试剂盒中的任何其它试剂的说明书。说明书可包括可被实现的变化。预期这些试剂是本发明的试剂盒的实施方案。同样地,试剂盒不限于上文中鉴定的特定项目,其可包括用于操作或表征miRNA的任何试剂。

[0238] 还预期miRNA阵列的上下文中论述的任何实施方案可更常见地用于筛选或表征本发明的方法或试剂盒。换句话说,描述什么可包括在特定阵列中的任何实施方案可更常见地在miRNA表征的上下文中进行实践并且无需牵涉阵列本身。

[0239] 还预期任何试剂盒、阵列或其它检测技术或工具或任何方法可包括表征这些miRNA的任何miRNA。同样地,预期可在本发明的方法中利用或不利用阵列形式执行在miRNA阵列的上下文中论述的任何实施方案;换句话说,可按照本领域技术人员已知的任何技术在本发明的任何方法中筛选或评估miRNA阵列中的任何miRNA。阵列形式不是待执行的筛选和诊断方法所必需的。

[0240] 本发明人在本文中考虑了将miRNA阵列用于治疗应用、预后应用或诊断应用的试剂盒和此类应用。试剂盒可包括miRNA阵列以及关于阵列上的miRNA的标准或标准化的miRNA谱的信息。同样地,在某些实施方案中,可将对照RNA或DNA包括在试剂盒中。对照RNA可以是可用作标记和/或阵列分析的阳性对照的miRNA。

[0241] 已在本文中广泛和一般性地描述了本教导的方法和试剂盒。落在一般公开内容内的每一个更窄的种类和亚属分组也形成了本教导的部分。这包括本教导的一般描述,条件或负面限制是从属中除去任何主题物质,无论切除的材料是否在本文中被明确地引述。

[0242] 实施例12

[0243] 阵列的制备和筛选

[0244] 本文中还提供了miRNA阵列的制备和使用,所述阵列是核酸分子(探针)的有序巨阵列或微阵列,所述核酸分子与多个miRNA分子或前体miRNA分子完全或几乎完全互补或同一,并且被以空间上分开的组织置于载体材料上。微阵列通常是已将探针点在其上的硝酸纤维素或尼龙片层。微阵列更密集地排放核酸探针以便可将达到10,000个核酸分子纳入通常1至4平方厘米的区域。

[0245] 可通过将核酸分子例如基因、寡核苷酸等点在基底上或在基底上原位产生寡核苷酸序列来制造微阵列。斑点的或制造的核酸分子可以以达到约30种不相同的核酸分子/平方厘米或更高,例如达到约100种或甚至超过1000种/平方厘米的高密度矩阵模式来进行使用。与过滤测定的基于硝酸纤维素的材料相反,微阵列通常使用涂覆的玻璃作为固体载体。通过使用miRNA-互补性核酸样品的有序阵列,可跟踪每一个样品的位置并且使其与原始样品关联。

[0246] 多种不同的阵列设备(其中已将多种不同的核酸探针与固体载体的表面稳定地结合)对于本领域技术人员来说是已知的。阵列的有用的基底包括尼龙、玻璃和硅。阵列可以以很多不同的方式变化,包括平均探针长度、探针的序列或类型、探针与阵列表面之间的键的性质,例如共价或非共价键等。就除探针检测miRNA外的任何参数而言,本文中描述的标记和筛选方法以及阵列不局限于其功用;因此,可将方法和组合物用于多种不同类型的miRNA阵列。

[0247] 根据可对其应用本发明人的发明的原理的很多可能的实施方案,应当承认举例说明性的实施方案仅是本发明的优选实例并且不应当用作对本发明的范围的限制。相反地,本发明的范围由下列权利要求确定。本发明人因此声明落在这些权利要求的范围和精神内的所有东西作为本发明的发明。

序列表

	<110> THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION	
	<120> 与微RNA-21、错配修复和结肠直肠癌相关的材料和方法	
	<130> 53-52535	
	<140>	
	<141>	
	<150> 61/413,180	
	<151> 2010-11-12	
	<160> 14	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 1	
	cagaaagccc tggaaactga	20
	<210> 2	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
[0001]	<400> 2	
	tttccatagt gttaactgtc agtgc	25
	<210> 3	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 3	
	cccagtaatg gaatgaaggg tetgtaatag ttttataatg	40
	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 4	
	aaatgttget gtgcgccta	19
	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 5	
	aaatgttget gtgcgccta	19

[0002]	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 6	
	tcaattgcaa acagtcctca g	21
	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 7	
	tcaattgcaa acagtcctca g	21
	<210> 8	
	<211> 40	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 8	
	caatataaaa ctattacaga ccccttcattc cattactggg	40
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 9	
	tagcttttcc tccccattt	20
	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 人工序列的描述：合成的引物	
	<400> 10	
	ccacctttgt cagaagtcac ctc	23
	<210> 11	
	<211> 26	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 11	
	gaaugaaggu aaiautigaua agcuau	26
	<210> 12	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 智人	

	<400> 12	
	uagcuuauca gacugauguu ga	22
	<210> 13	
	<211> 24	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
[0003]	<400> 13	
	acaacauuuu gaucuaauaa acuu	24
	<210> 14	
	<211> 22	
	<212> RNA	
	<213> 智人	
	<400> 14	
	uagcuuauca gacugauguu ga	22

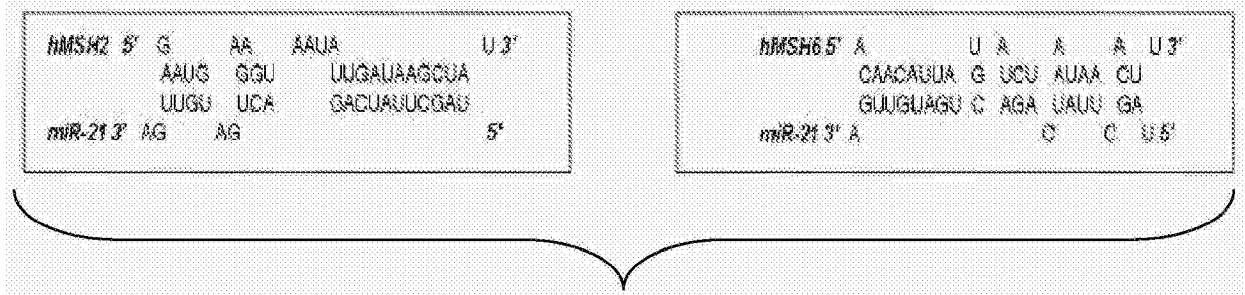


图1A

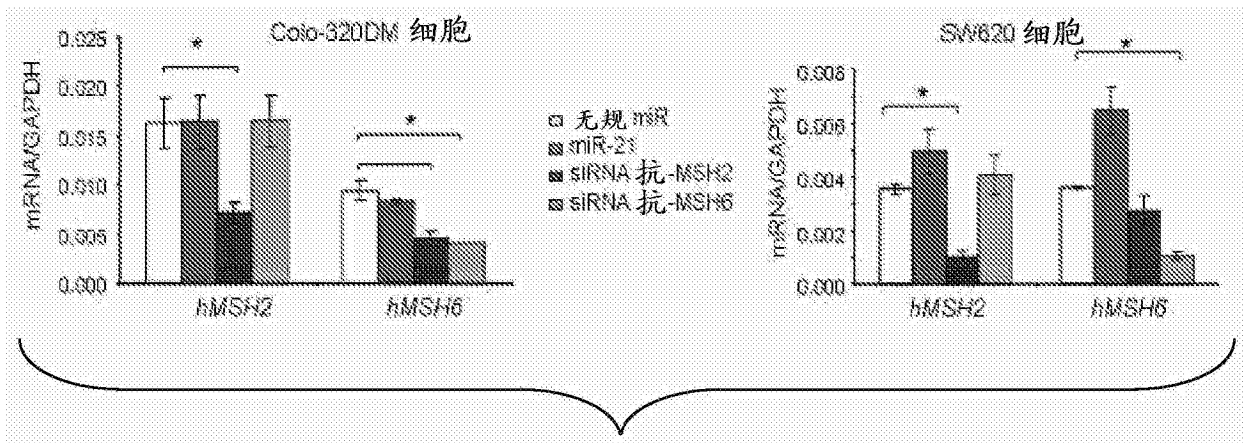


图1B

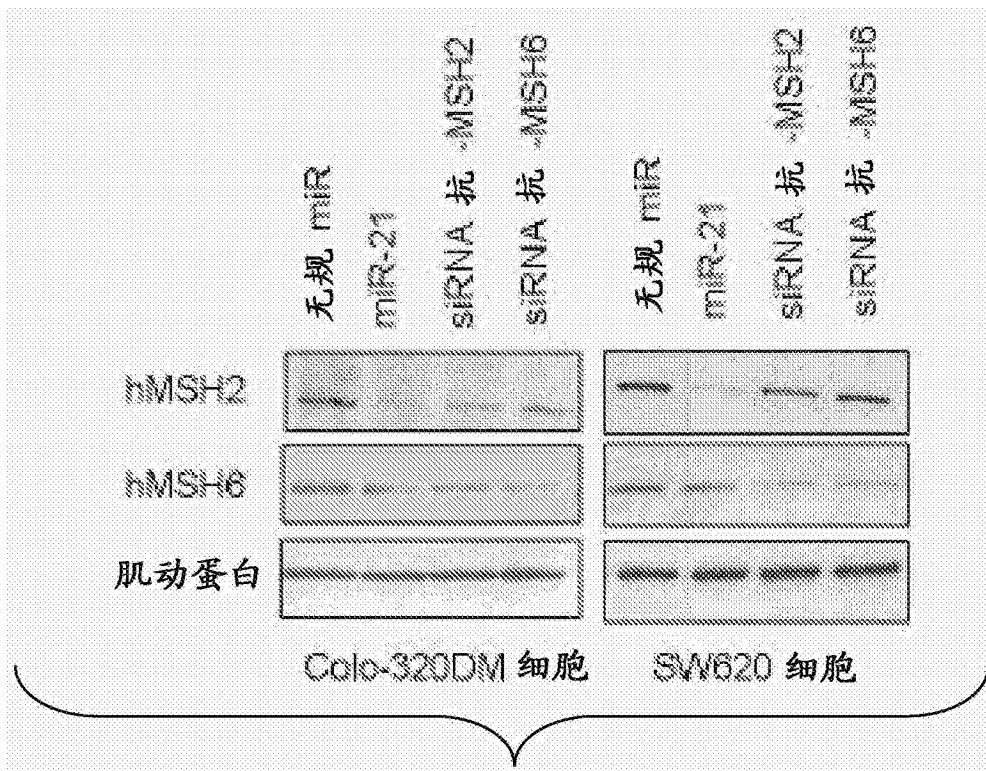


图1C

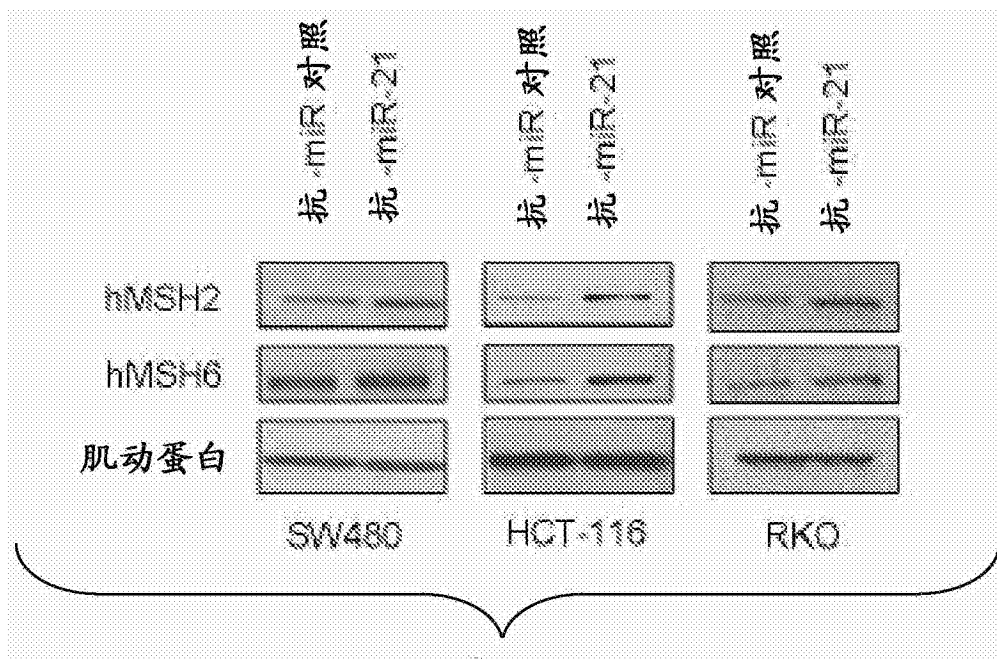


图1D

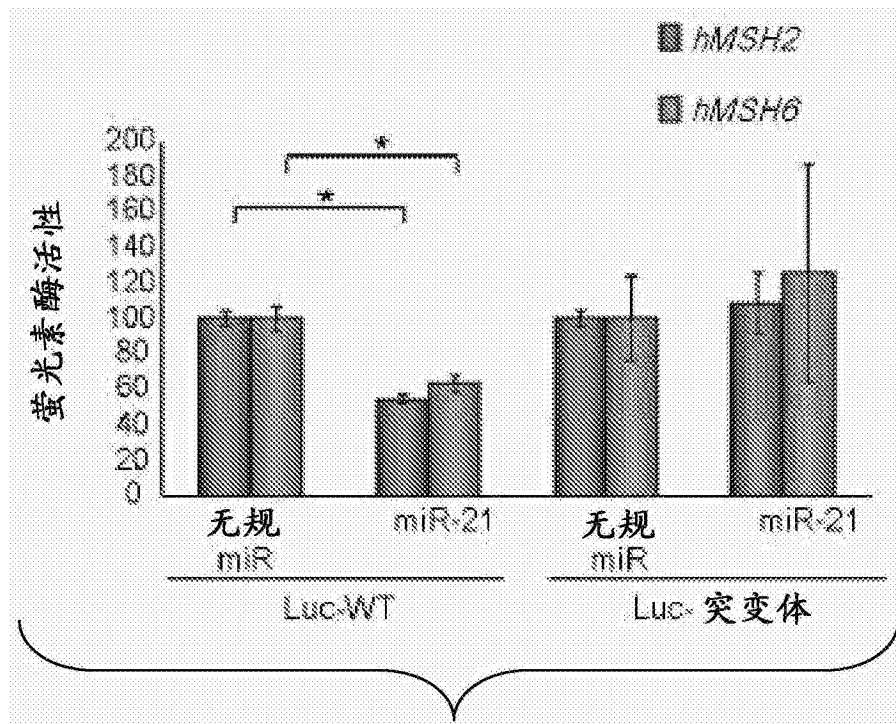


图1E

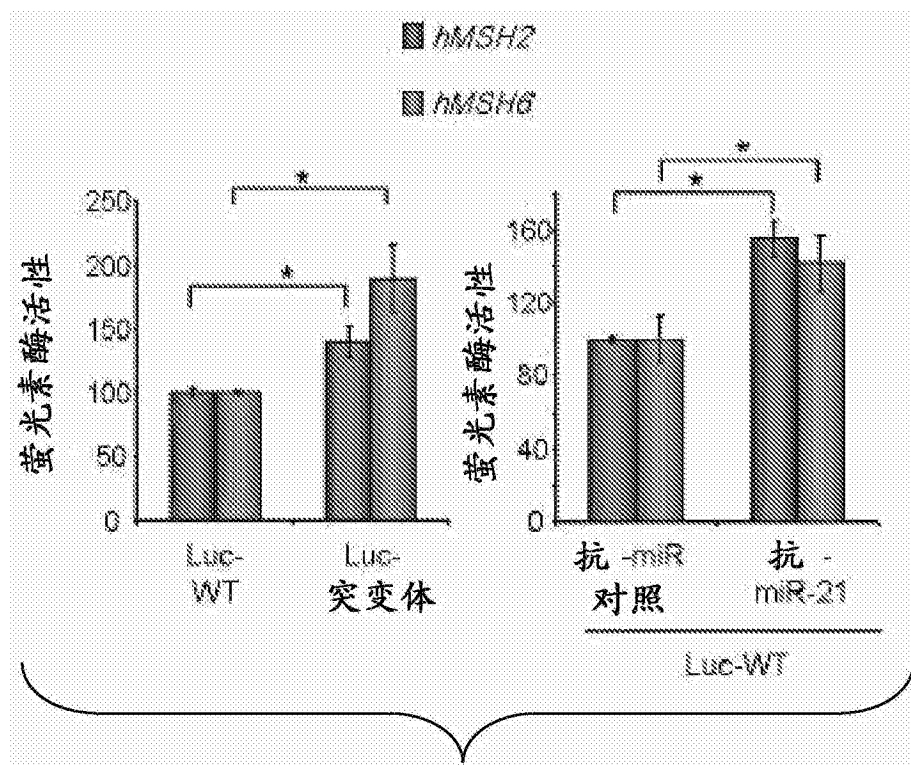


图1F

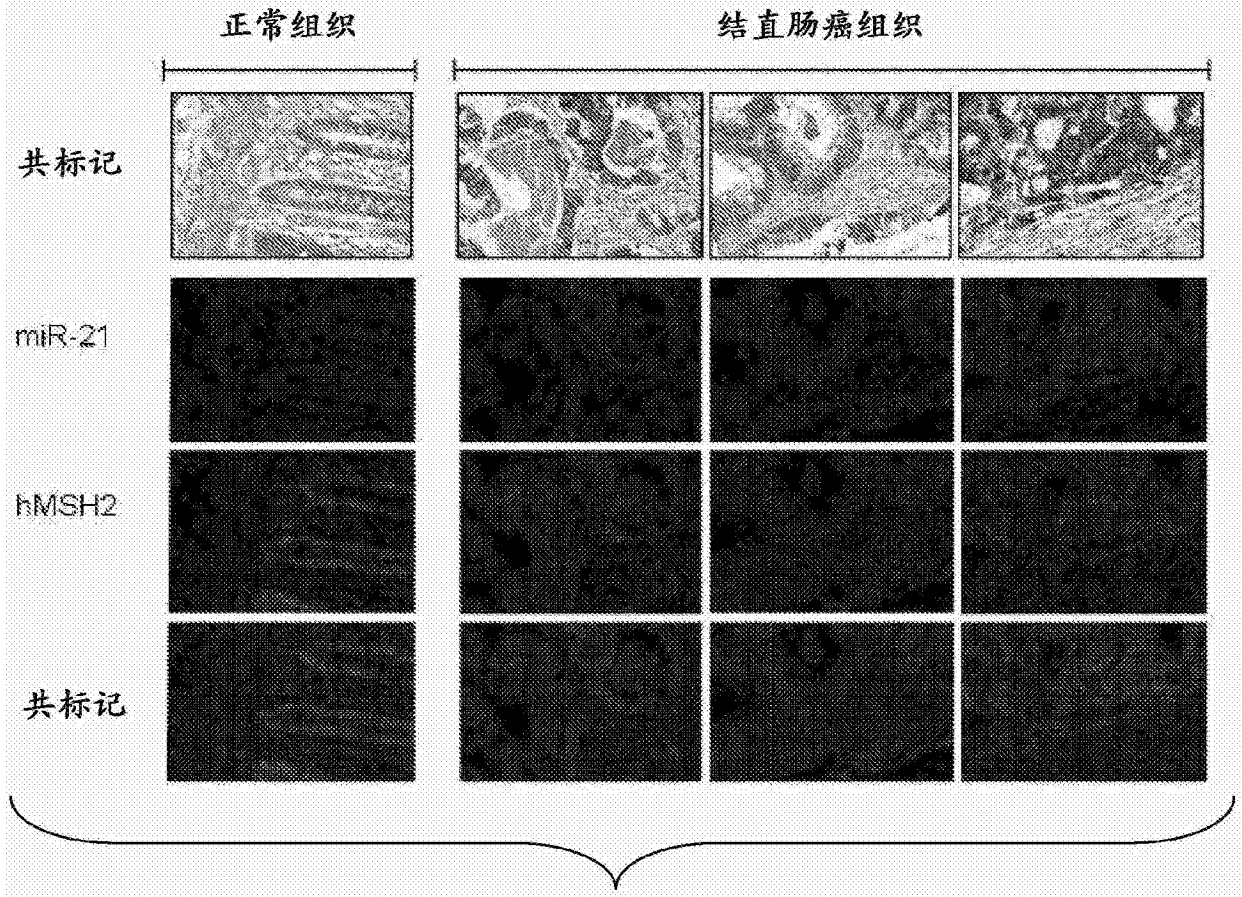


图2A

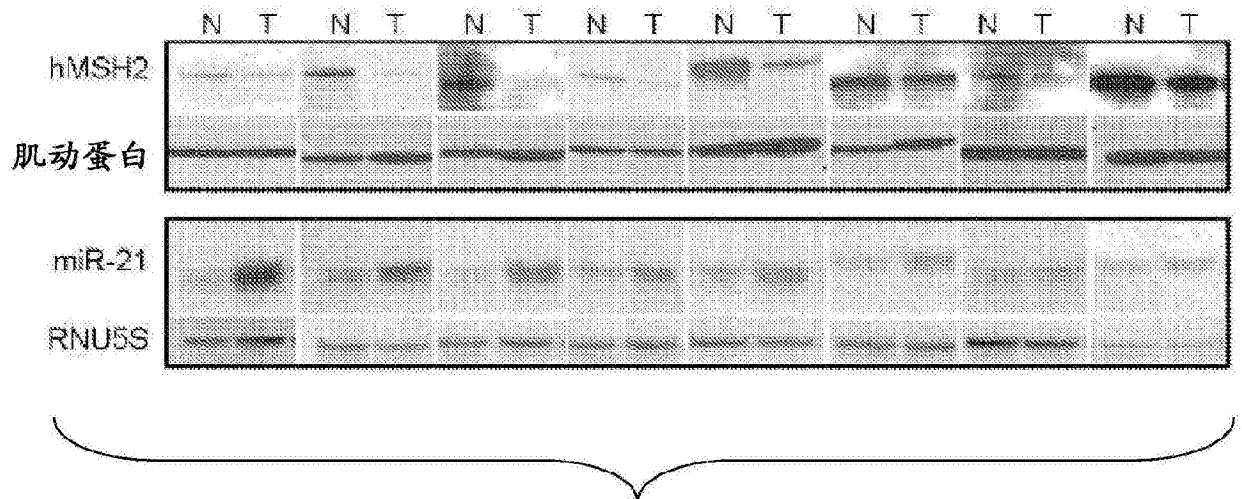


图2B

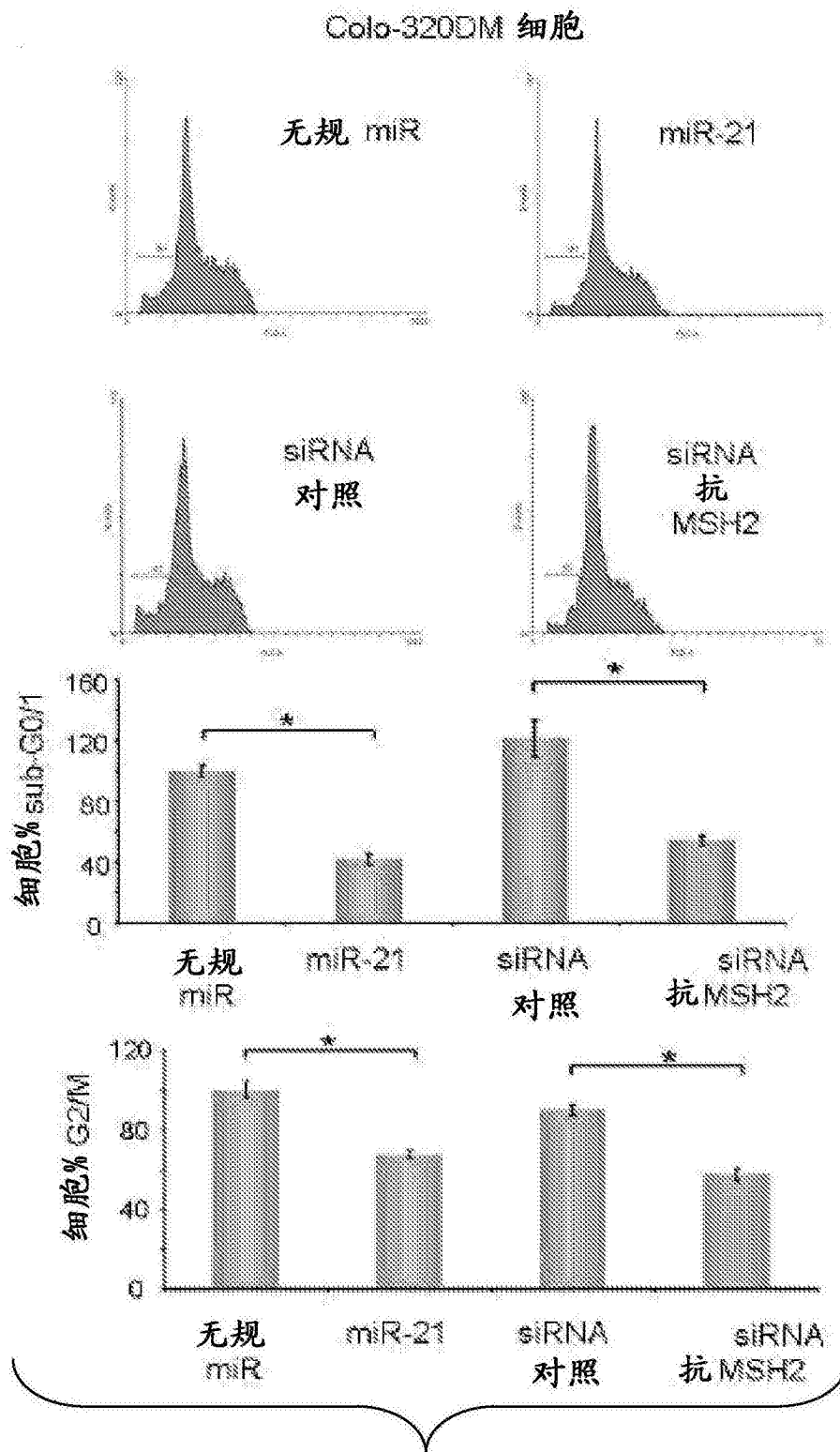


图3A

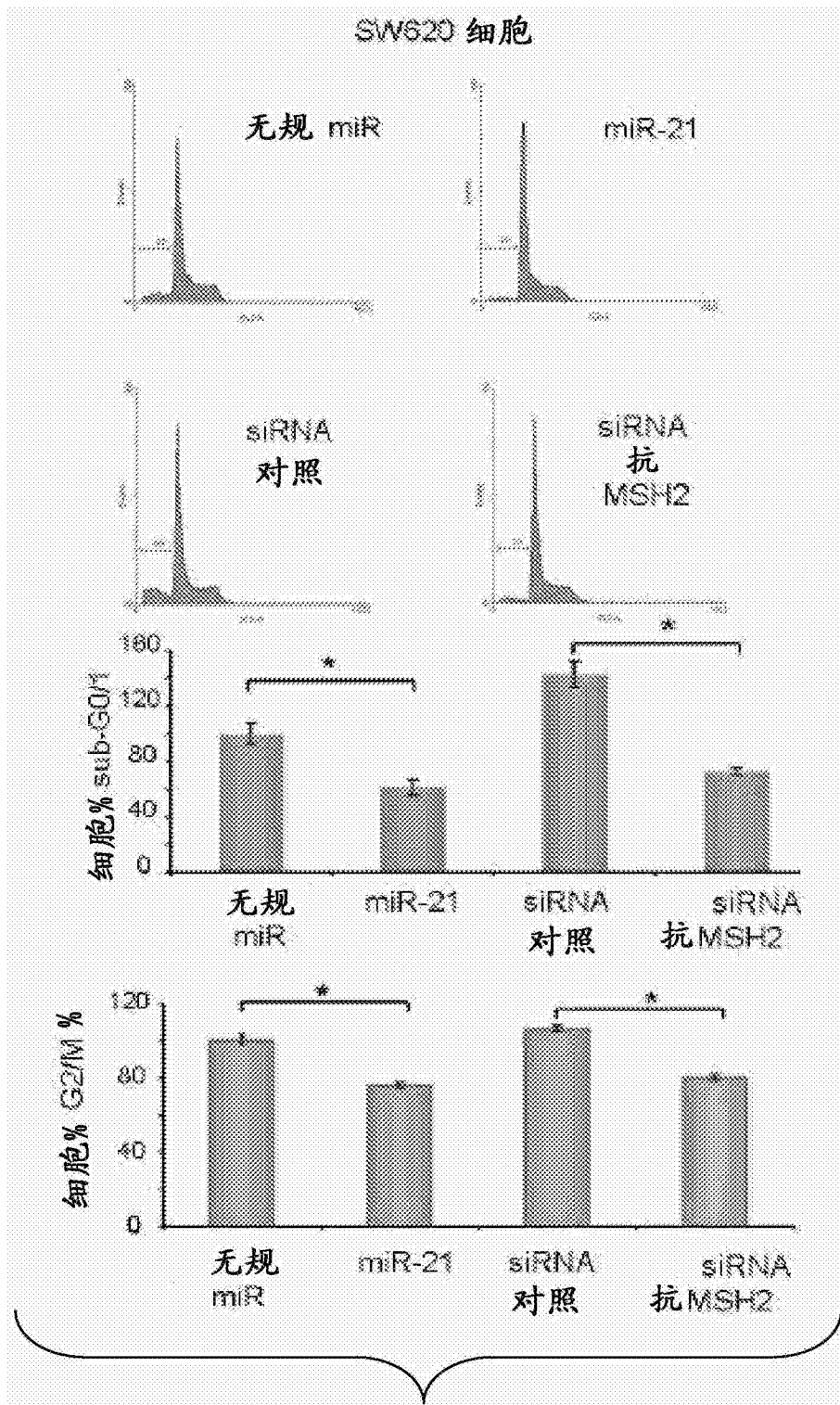


图3B

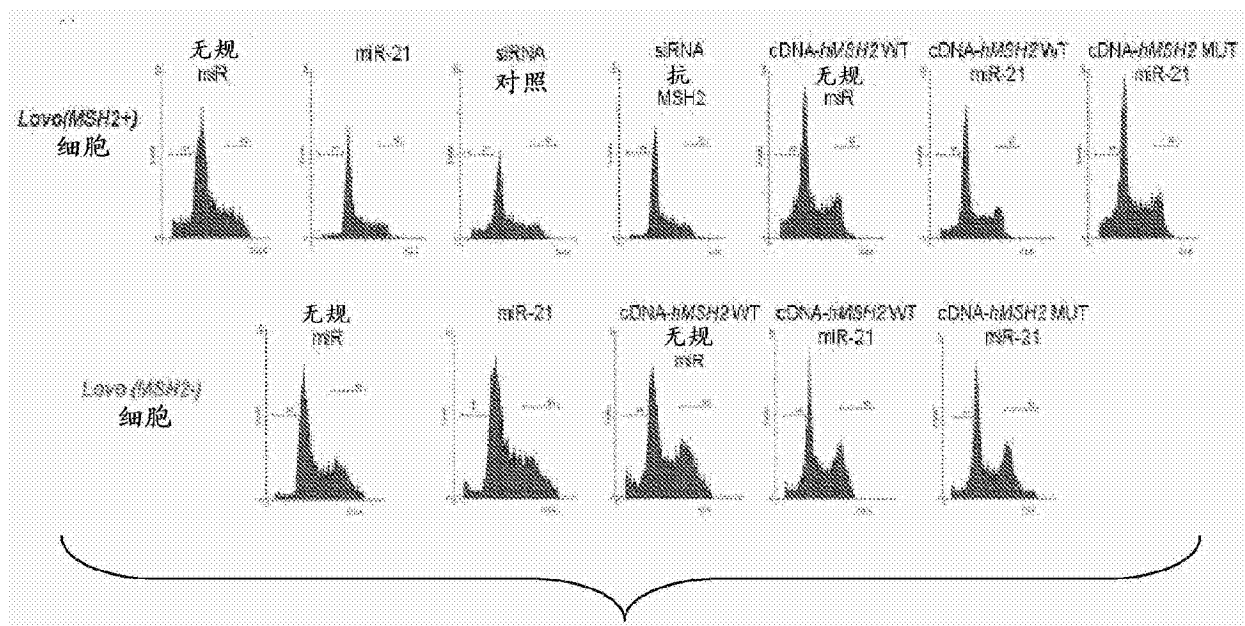


图4A

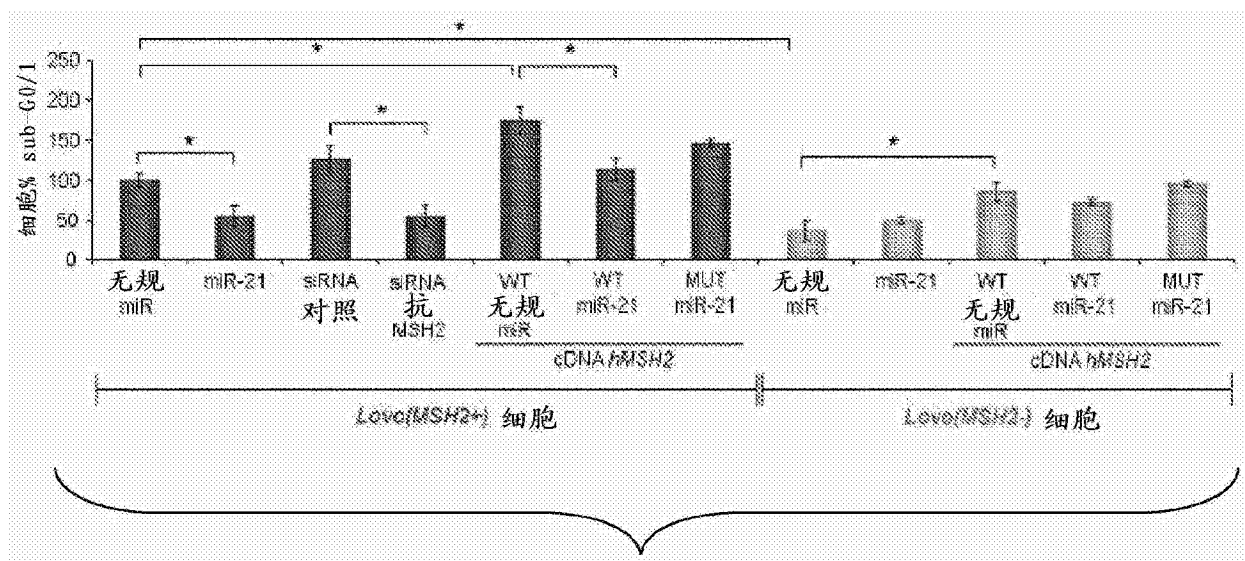


图4B

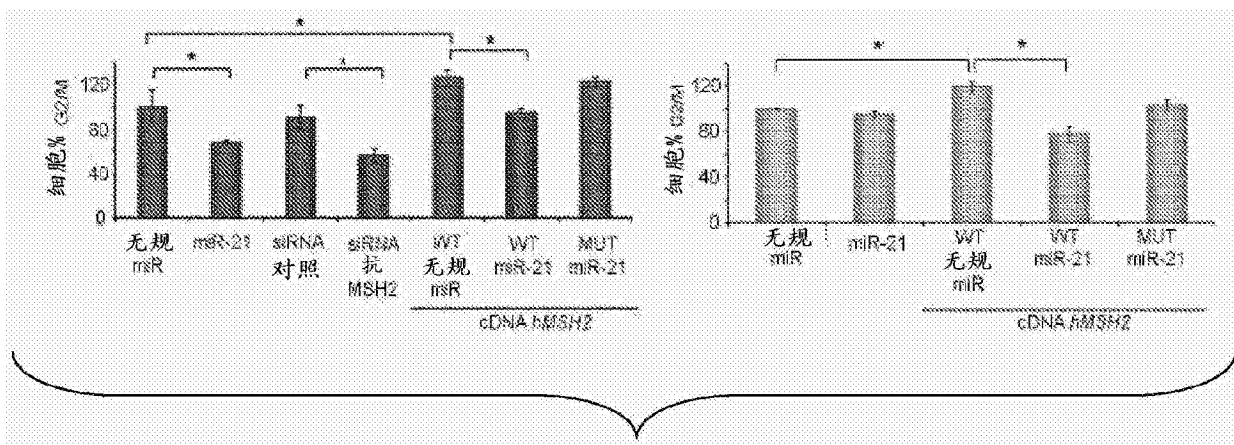


图4C

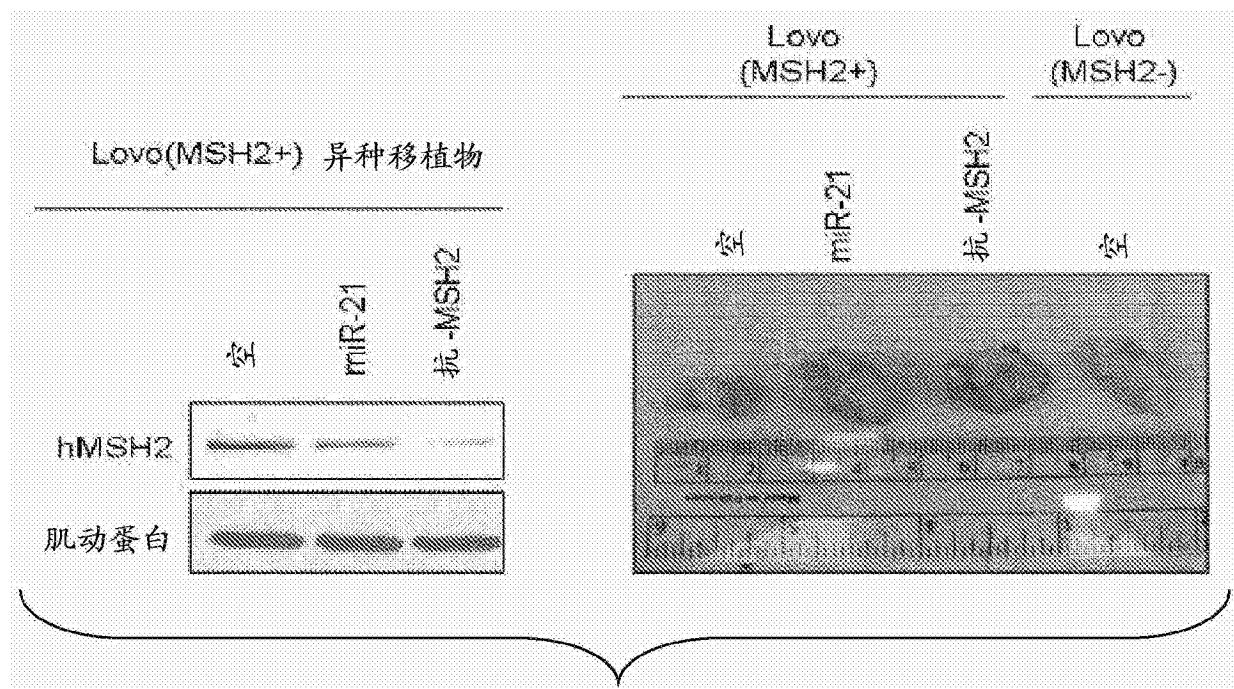


图5A

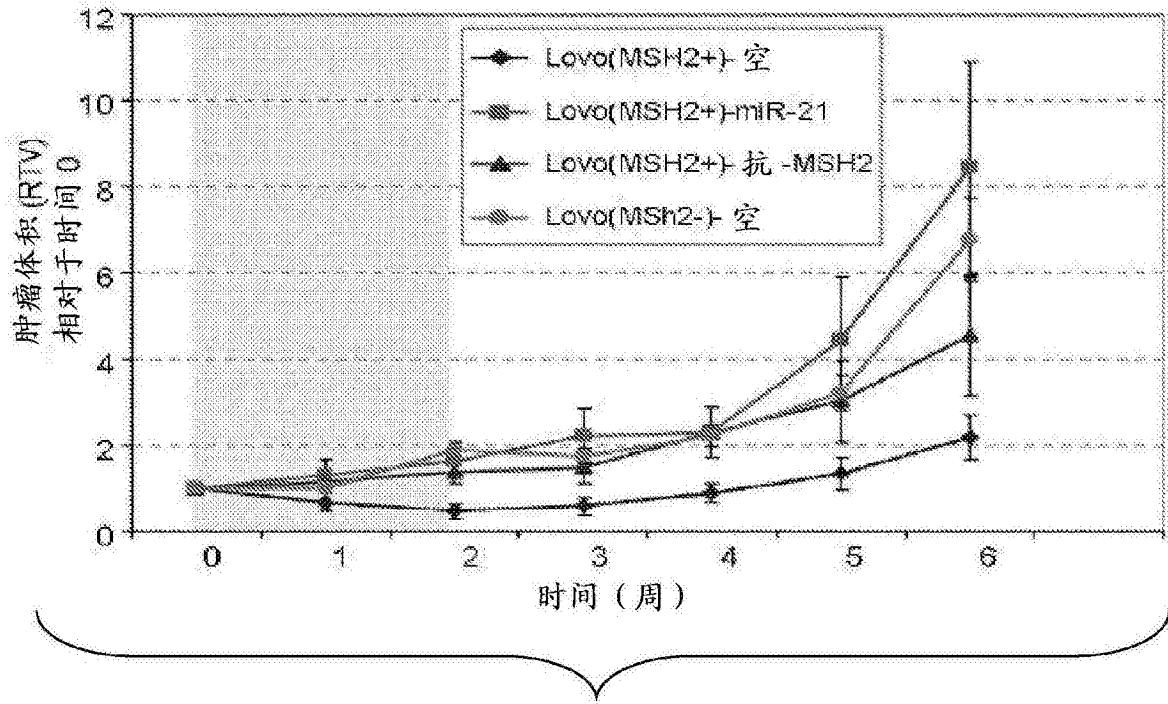


图5B

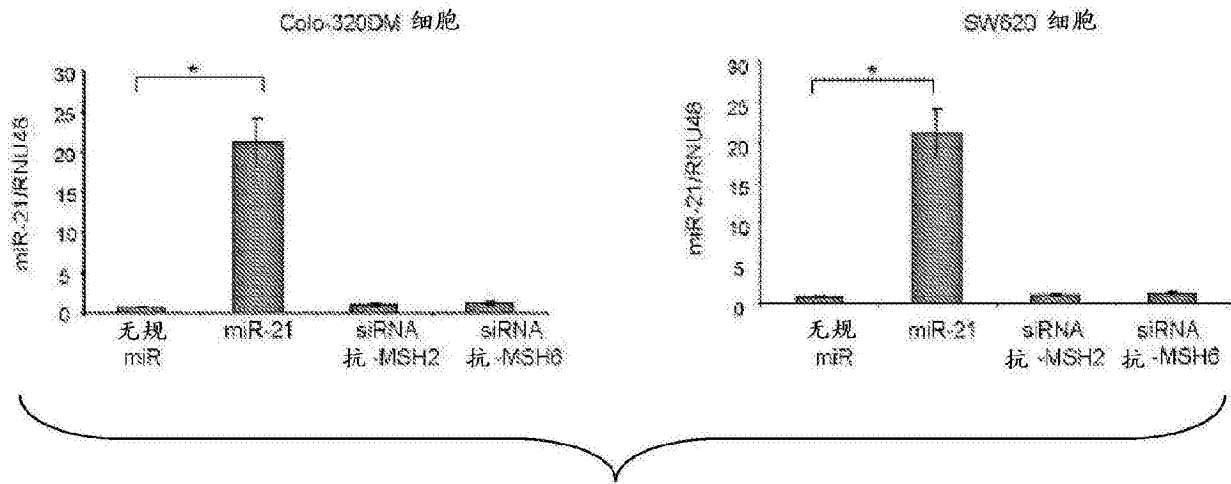


图6A

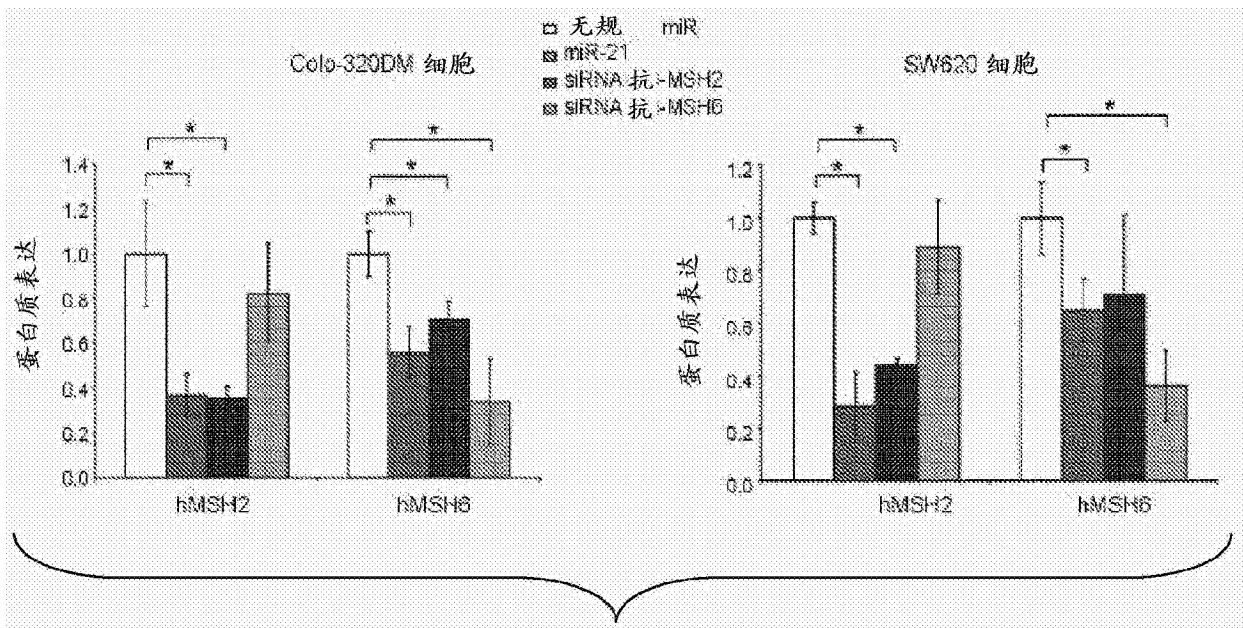


图6B

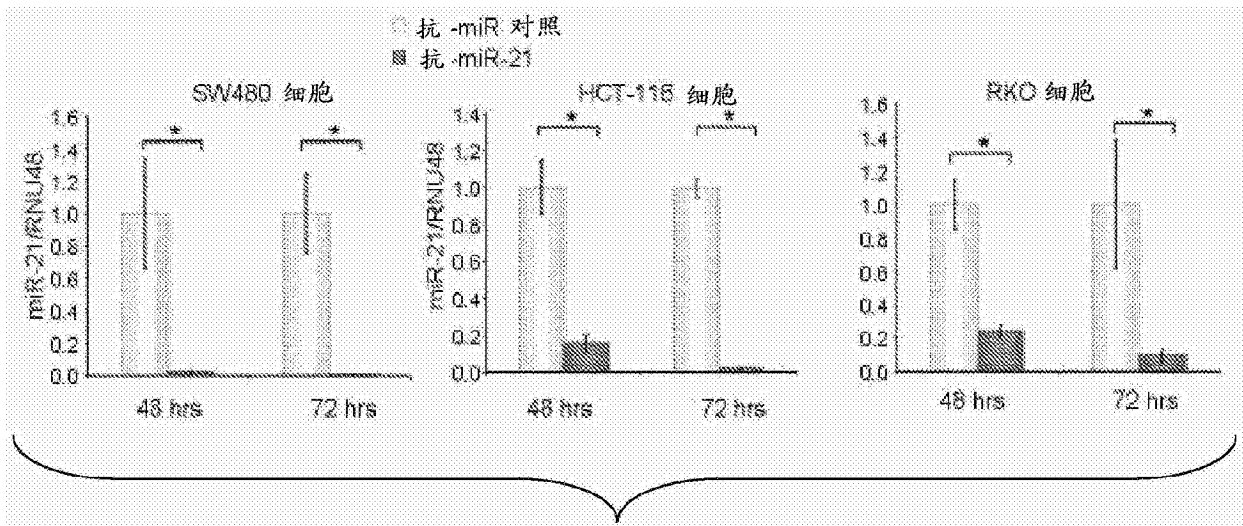


图7A

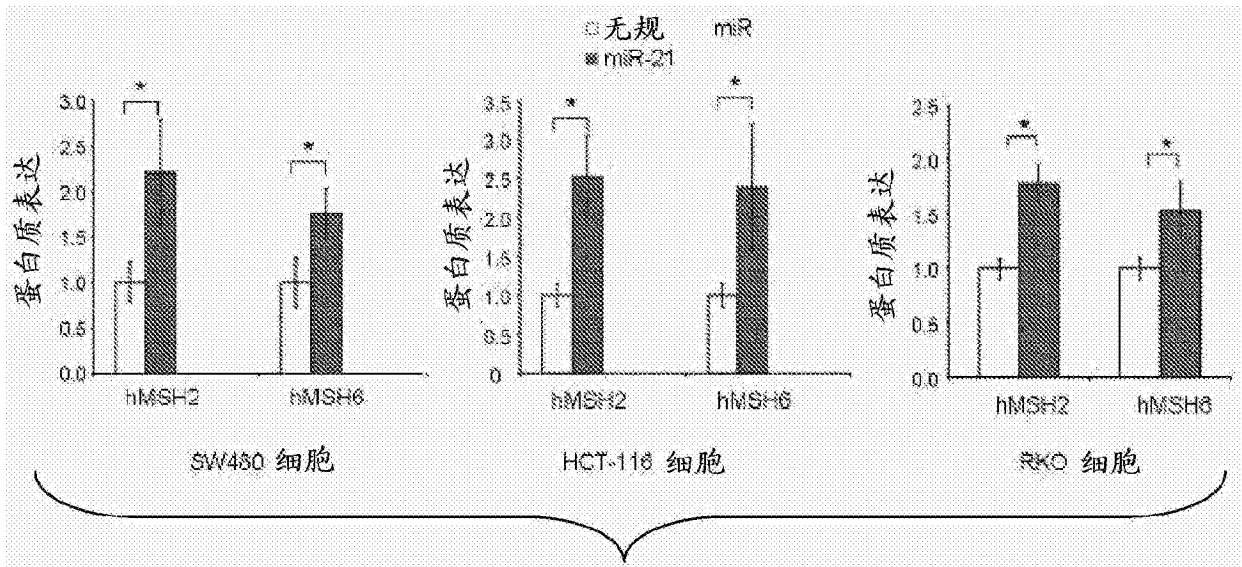


图7B

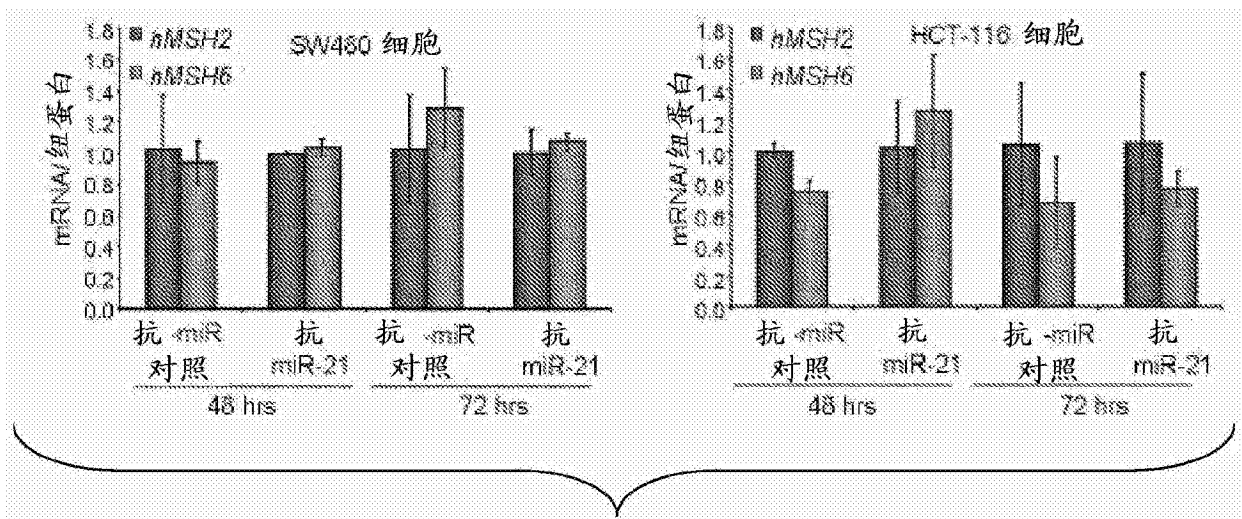


图7C

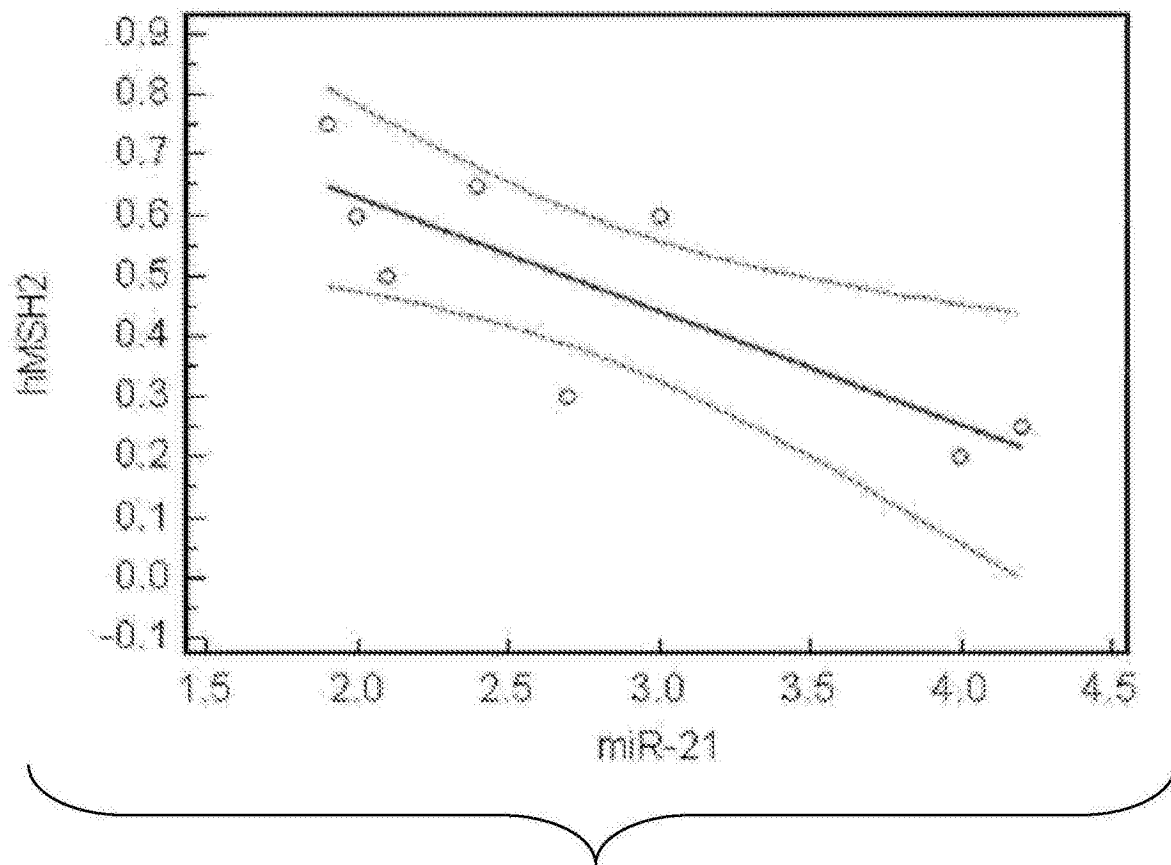


图8

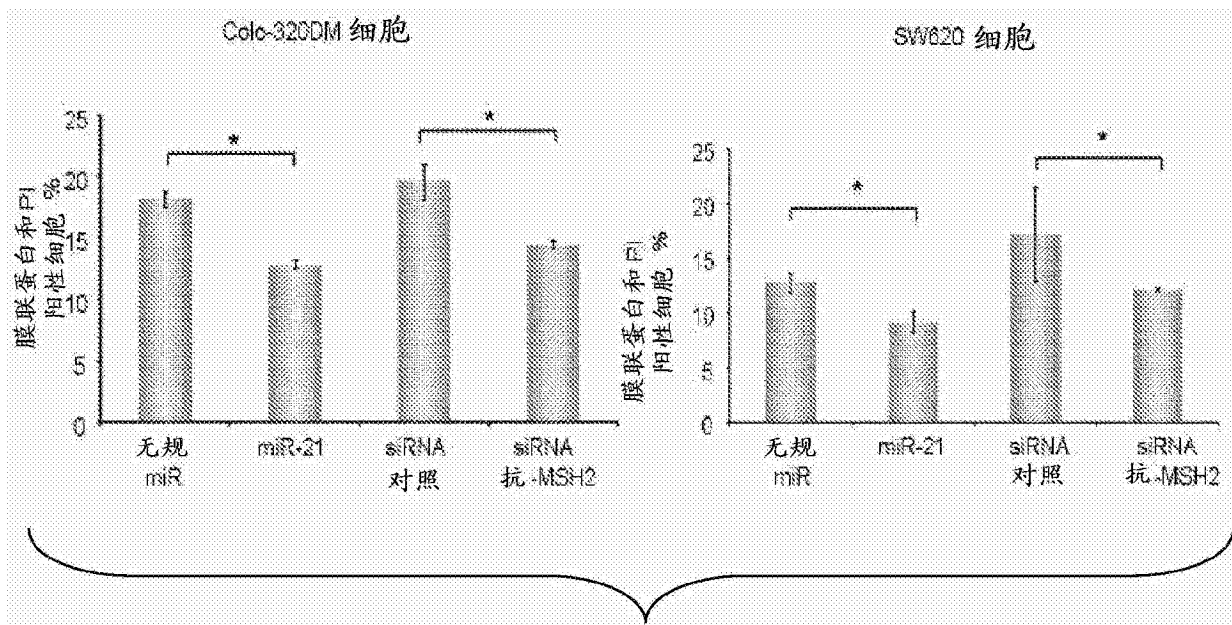


图9