



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101827941 A

(43) 申请公布日 2010.09.08

(21) 申请号 200880022612.3

(22) 申请日 2008.04.29

(30) 优先权数据

60/926,933 2007.04.30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.12.29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/005503 2008.04.29

(87) PCT申请的公布数据

W02008/136971 EN 2008.11.13

(71) 申请人 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·克罗斯

(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 罗菊华

(51) Int. Cl.

G12P 19/34 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 24 页 序列表 14 页
附图 5 页

(54) 发明名称

用于区分胰腺癌与正常胰腺功能和 / 或慢性
胰腺炎的方法

(57) 摘要

本文提供了用于诊断、预后和治疗胰腺癌的方法
和组合物,以及鉴定抗胰腺癌剂的方法。

1. 一种诊断受试者是否患有胰腺癌或是否处于发展胰腺癌的风险中的方法,其包括测量来自所述受试者的测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平,其中测试样品中的 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平的改变指示受试者患有胰腺癌或处于发展胰腺癌的风险中。

2. 一种在人类患者中将胰腺癌与正常胰腺组织和慢性胰腺炎中的至少一种区别开来的方法,其包括:

检测来自表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表 2b、表 2c 和表 3 中的至少一个的至少一种 miR 基因产物在组织样品中的表达水平;

其中差异表达指示胰腺癌而不是正常的胰腺或慢性胰腺炎。

3. 一种确定患有胰腺癌的受试者的预后的方法,其包括测量来自所述受试者的测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平,其中:

所述 miR 基因产物与胰腺癌中的不利的预后相关;并且

胰腺测试样品中的所述至少一种 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平的改变指示不利的预后。

4. 一种诊断人类患者中的胰腺癌的方法,其包括:

a) 检测来自表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表 2b、表 2c 和表 3 中的至少一个的一种或多种 miR 基因产物在来自患者的组织样品中的表达水平;和

b) 将在步骤 (a) 中检测的基因表达与包括表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表 2b、表 2c 和表 3 中的数据的一部分的数据库进行比较;

其中在步骤 (a) 中检测的所述 miR 基因产物的差异表达指示胰腺癌。

5. 一种诊断人类患者中的胰腺癌的方法,其包括:

a) 检测来自表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表 2b、表 2c 和表 3 中的至少一个的一种或多种 miR 基因产物在胰腺组织样品中的表达水平;和

b) 将检测的表达水平与胰腺癌组织样品中的所述一种或多种 miR 基因产物的表达水平进行比较,从而诊断患者中的胰腺癌。

6. 一种诊断受试者是否患有胰腺癌或是否处于发展胰腺癌的风险中的方法,其包括:

(1) 将来自从受试者处获得的测试样品的 RNA 逆转录以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

(2) 使所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供所述测试样品的杂交谱;和

(3) 将所述测试样品的杂交谱与由对照样品产生的杂交谱进行比较,其中至少一种 miRNA 的信号的改变指示受试者患有胰腺癌或处于发展胰腺癌的风险中。

7. 一种诊断受试者是否患有在受试者中具有不利的预后的胰腺癌或是否处于发展在受试者中具有不利的预后的胰腺癌的风险中的方法,其包括:

(1) 将来自从受试者处获得的测试样品的 RNA 逆转录以提供一组靶寡脱氧核苷酸;

(2) 使所述靶寡脱氧核苷酸与包含 miRNA- 特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供所述测试样品的杂交谱;和

(3) 将所述测试样品的杂交谱与由对照样品产生的杂交谱进行比较,

其中信号的改变指示受试者患有具有不利的预后的胰腺癌或处于发展具有不利的预后的胰腺癌的风险中。

8. 一种治疗患有胰腺癌的受试者中的胰腺癌的方法,在所述胰腺癌中至少一种 miR 基因产物在受试者的癌细胞中相对于对照细胞是下调的或上调的,所述方法包括:

(1) 当所述至少一种 miR 基因产物在所述癌细胞中是下调的时,将有效量的至少一种分离的 miR 基因产物或其分离的变体或生物学活性片段施用于受试者,使得受试者中的癌细胞的增殖被抑制;或

(2) 当所述至少一种 miR 基因产物在所述癌细胞中是上调的时,将有效量的用于抑制所述至少一种 miR 基因产物的表达的至少一种化合物施用于受试者,使得受试者中的癌细胞的增殖被抑制。

9. 一种治疗受试者中的胰腺癌的方法,其包括:

a) 确定相对于对照细胞,胰腺癌细胞中的至少一种 miR 基因产物的量;和

b) 通过以下方法改变在所述胰腺癌细胞中表达的 miR 基因产物的量:

(i) 如果在所述癌细胞中表达的所述 miR 基因产物的量小于在对照细胞中表达的所述 miR 基因产物的量,则将有效量的至少一种分离的 miR 基因产物或其分离的变体或生物学活性片段施用于受试者;或

(ii) 如果在所述癌细胞中表达的所述 miR 基因产物的量大于在对照细胞中表达的所述 miR 基因产物的量,则将有效量的用于抑制所述至少一种 miR 基因产物的表达的至少一种化合物施用于受试者。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中测试样品中的所述至少一种 miR 基因产物的水平小于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中测试样品中的所述至少一种 miR 基因产物的水平大于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中检测了来自表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表 2b、表 2c 和表 3 中的一个或多个的一种或多种 miR 基因产物的表达水平。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中将所述表达水平与在表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表 2b、表 2c 和表 3 中的一个或多个中的基因信息进行比较。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述数据库包含来自表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表 2b、表 2c 和表 3 的所有数据。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述数据库包含来自表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表 2b、表 2c 和表 3 的所有 miR 基因产物的基因表达信息。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种 miR 基因产物包括: miR-21、miR-221、miR-222、miR-181a、miR-181b、miR-181d 和 miR-155 及其组合。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中一种或多种 miR 基因产物用于区分长期存活者。

18. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述至少一种 miR 基因产物包括 miR-196a-2 和 miR-219 中的一种或多种。

19. 根据权利要求 13 所述的方法,其中 miR-196a-2 和 miR-219 中的至少一种的信号的改变指示受试者患有具有不利的预后的胰腺癌或处于发展具有不利的预后的胰腺癌的风险中。

20. 根据权利要求 3 所述的方法,其中微阵列包含针对 miR-196a-2、miR-219 及其组合的至少一种 miRNA- 特异性探针寡核苷酸。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其用于区分胰腺内分泌肿瘤与胰腺外分泌肿瘤。

22. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述胰腺癌是胰腺腺癌。

23. 根据前述权利要求所述的方法,其中所述胰腺癌是导管腺癌。

24. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中至少一种 miRNA 的所述信号相对于由对照样品产生的信号是下调的。

25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中至少一种 miRNA 的所述信号相对于由对照样品产生的信号是上调的。

26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述 miR 基因产物包括与所述 miR 基因产物互补的反义寡核苷酸。

27. 一种用于治疗胰腺癌的药物组合物,其包含至少一种分离的 miR 基因产物或其分离的变体或生物学活性片段以及药学上可接受的载体。

28. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述至少一种分离的 miR 基因产物对应于相对于对照细胞是下调的 miR 基因产物。

29. 一种用于治疗胰腺癌的药物组合物,其包含至少一种 miR 表达抑制剂化合物和药学上可接受的载体。

30. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述至少一种 miR 表达抑制剂化合物对相对于对照细胞在胰腺癌细胞中是上调的 miR 基因产物是特异性的。

31. 一种鉴定抗胰腺癌剂的方法,其包括将试剂提供给细胞和测量与胰腺癌细胞中改变的表达水平相关的至少一种 miR 基因产物的水平,其中相对于对照细胞,所述细胞中的所述 miR 基因产物的水平的改变指示所述试剂为抗胰腺癌剂。

32. miRNA 的全局表达模式的生物标记物,其用于区分胰腺的导管腺癌与正常胰腺和慢性胰腺炎中的一种或多种,如表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表 2b、表 2c 和表 3 中所示的。

用于区分胰腺癌与正常胰腺功能和 / 或慢性胰腺炎的方法

[0001] 发明人 : 卡洛 · M · 克劳斯

[0002] 优先权要求

[0003] 本申请要求于 2007 年 4 月 30 日提交的美国临时专利申请第 60/926,933 号的优先权, 该临时专利申请以其整体通过引用并入本文。

[0004] 本项目由 NIH 基金 CA081534 和 CMC 的 CA128609 资助, 并且政府对本项目享有一定的权利。

[0005] 序列列表或计算机程序列表光盘附件的引用

[0006] 把以光盘提交的“序列列表”、表格或计算机程序列表附件的引用以及通过引用对光盘中的材料包括每个光盘中的副本和文件的并入载入说明书。

[0007] 背景

[0008] 胰腺癌是致命的疾病, 且在美国, 每年的死亡率接近等于约 33,000 例。¹ 虽然分期迁移是较少存活的部分起因, 但胰腺导管腺癌的生物学是侵袭性局部入侵、早期转移和对化疗与辐射的抗性之一。包括 TP53、KRAS、CDKN2A 和 SMAD4² 的已知的基因突变在胰腺癌中是重要的, 但单独地并不是胰腺癌的侵袭行为的原因。

[0009] 微小 RNA (miRNA) 是小的非编码 RNA, 其通过 RNase III Dicer 来从细胞质中的 70 个核苷酸至 100 个核苷酸的发夹前-miRNA 前体切割为它们的 19 个核苷酸至 25 个核苷酸的成熟形式。³ 单链的 miRNA 以完全或接近完全的互补性与潜在地数百基因的 mRNA 在 3' 非翻译区结合, 这分别导致靶 mRNA 的降解或抑制。在人类中, miRNA 的异常表达通过促进原癌基因的表达或抑制肿瘤抑制基因的表达而促进致癌作用。⁴ 这样的“致癌 miR (oncomiR)”已在多种血液恶性肿瘤和实体恶性肿瘤中被证实。⁵⁻⁷

[0010] 对在胰腺癌细胞中差异表达的微小 RNA 的鉴定可有助于确认胰腺癌 (例如, 胰腺内分泌肿瘤、腺泡癌) 中所涉及的特定 miRNA。此外, 对这些 miRNA 的推定靶的鉴定可有助于阐明它们的致病作用。本文所描述的是用于胰腺癌的诊断、预后和治疗的方法和组合物。

[0011] 本发明的另外的优势、目的和特征将在后面的描述中部分地阐明, 并且对于本领域普通技术人员来说, 在研究了以下内容后, 所述优势、目的和特征将部分地变得明显或者可以从本发明的实施中认识到。本发明的目的和优势可如所附权利要求中特别指出的来实现和获得。

[0012] 概述

[0013] 在一个广泛的方面中, 本文提供了对与胰腺癌细胞中改变的表达水平有关的特定 miRNA 的鉴定。

[0014] 在另一个广泛的方面中, 本文提供了一种诊断受试者是否患有胰腺癌或是否处于发展胰腺癌的风险中的方法, 其包括测量来自所述受试者的测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平, 其中测试样品中的 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平的改变指示该受试者患有胰腺癌或处于发展胰腺癌的风险中。

[0015] 在另一个广泛的方面中, 本文提供了一种将胰腺癌与人类患者中的正常胰腺组织和慢性胰腺炎中的至少一种区别开来的方法, 其包括: 检测来自表 1a、表 1b、表 1c、表 2a、表

2b、表 2c 和表 3 中的至少一个的至少一种 miR 基因产物在组织样品中的表达水平；其中差异表达指示胰腺癌而不是正常的胰腺或慢性胰腺炎。

[0016] 仍在另一个广泛的方面中，本文提供了一种确定患有胰腺癌的受试者的预后的方法，其包括测量来自所述受试者的测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平，其中：miR 基因产物与胰腺癌中的不利的预后相关；并且胰腺测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平的改变指示不利的预后。

[0017] 因此，一种方法包括诊断受试者是否患有胰腺癌或是否处于发展胰腺癌的风险中。在一个特定的方面中，将来自受试者的测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平与对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平进行比较。测试样品中的 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平的改变（例如，增加、减少）指示该受试者患有胰腺癌或处于发展胰腺癌的风险中。

[0018] 在一个实施方案中，被诊断的胰腺癌是胰腺外分泌肿瘤（例如，腺癌）。在又一个实施方案中，所述方法能够区分胰腺内分泌肿瘤（PET）和胰腺外分泌肿瘤（例如，腺癌）。仍在另一个实施方案中，诊断方法可用于诊断任何类型的胰腺癌。

[0019] 在一个实施方案中，提供了一种诊断受试者是否患有胰腺腺癌或是否处于发展胰腺腺癌的风险中的方法。在该方法中，将来自受试者的测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平与对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平进行比较。测试样品中的 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平的改变（例如，增加、减少）指示该受试者患有胰腺腺癌或处于发展胰腺腺癌的风险中。在一个实施方案中，测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平。

[0020] 在一个实施方案中，提供了一种诊断受试者患有的胰腺癌的类型的方法。在该方法中，将来自该受试者的测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平与对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平进行比较。测试样品中的 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平的改变（例如，增加、减少）指示胰腺癌的类型。

[0021] 在一个实施方案中，被诊断的胰腺癌的类型选自腺癌组成的组。在另一个实施方案中，测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平。

[0022] 在另一个实施方案中，测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平。

[0023] 在一个实施方案中，提供了一种确定患有胰腺癌的受试者的预后的方法。在该方法中，在来自该受试者的测试样品（例如，胰腺癌样品）中测量与胰腺癌中不利的预后有关的至少一种 miR 基因产物的水平。测试样品中的 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平的改变（例如，增加、减少）指示不利的预后。在一个实施方案中，测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平。在另一个实施方案中，所测量的至少一种 miR 基因产物为 miR-196a-2[SEQ ID NO：52]。在又一个实施方案中，胰腺癌与转移和 / 或高增殖指数有关。

[0024] 在一个实施方案中，提供了一种确定受试者中的胰腺癌是否是转移性的方法。在该方法中，在来自受试者的测试样品（例如，胰腺癌样品）中测量至少一种 miR 基因产物的水平。测试样品中的 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平

的改变（例如，增加、减少）指示转移。在一个实施方案中，测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平。

[0025] 在一个实施方案中，提供了一种确定受试者中的胰腺癌是否具有高增殖指数的方法。在该方法中，在来自受试者的测试样品（例如，胰腺癌样品）中测量至少一种 miR 基因产物的水平。测试样品中的 miR 基因产物的水平相对于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平的改变（例如，增加、减少）指示高增殖指数。在一个实施方案中，测试样品中的至少一种 miR 基因产物的水平大于对照样品中的相应的 miR 基因产物的水平。在另一个实施方案中，至少一种 miR 基因产物是 miR-196a-2[SEQ ID NO :52] 或 miR-219[SEQ ID NO :64]。

[0026] 在一个实施方案中，提供了一种确定患有胰腺癌的受试者的预后的方法。在该方法中，在来自受试者的测试样品（例如，胰腺癌样品）中测量 PDCD4 的水平。测试样品中的 PDCD4 的水平相对于对照样品中的 PDCD4 的水平的改变（例如，增加、减少）指示不利的预后。在一个实施方案中，测试样品中的 PDCD4 的水平小于对照样品中的 PDCD4 的水平。在另一个实施方案中，胰腺癌与转移和 / 或高增殖指数有关。

[0027] 可使用本领域技术人员众所周知的各种技术（例如，定量或半定量的 RT-PCR、Northern 印迹分析、溶液杂交检测）来测量至少一种 miR 基因产物的水平。在一个特定的实施方案中，至少一种 miR 基因产物的水平通过以下方法来测量：将来自受试者处获得的测试样品的 RNA 逆转录以提供一组靶寡脱氧核苷酸，使所述靶寡脱氧核苷酸与一种或多种 miRNA-特异性探针寡核苷酸（例如，包括 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 (hybridization profile)，并将测试样品的杂交谱与由对照样品产生的杂交谱进行比较。测试样品中的至少一种 miRNA 的信号相对于对照样品的信号的改变指示该受试者患有胰腺癌或处于发展胰腺癌的风险中。在一个实施方案中，至少一种 miRNA 的信号相对于由对照样品产生的信号是上调的。在另一个实施方案中，至少一种 miRNA 的信号相对于由对照样品产生的信号是下调的。在一个特定的实施方案中，微阵列包括针对所有已知的人类 miRNA 中的大部分的 miRNA-特异性探针寡核苷酸。

[0028] 还提供了诊断受试者是否患有具有不利的预后的胰腺癌或是否处于发展具有不利的预后的胰腺癌的风险中的方法。在一个方法中，通过将来自受试者处获得的测试样品的 RNA 逆转录以提供一组靶寡脱氧核苷酸，来测量与胰腺癌中的不利的预后有关的至少一种 miR 基因产物的水平。然后将靶寡脱氧核苷酸与一种或多种 miRNA-特异性探针寡核苷酸（例如，包括 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，并将测试样品的杂交谱与由对照样品产生的杂交谱进行比较。测试样品中的至少一种 miRNA 的信号相对于对照样品的信号的改变指示该受试者患有具有不利的预后的胰腺癌或处于发展具有不利的预后的胰腺癌的风险中。

[0029] 还提供了治疗受试者中的胰腺癌的方法，其中至少一种 miR 基因产物在受试者的癌细胞中是失调的（例如，下调的、上调的）。当至少一种分离的 miR 基因产物在胰腺癌细胞中是下调的时，所述方法包括施用有效量的分离的 miR 基因产物或其分离的变体或生物学活性片段，使得受试者中的癌细胞的增殖被抑制。

[0030] 当至少一种分离的 miR 基因产物在癌细胞中是上调的时，所述方法包括将有效量的用于抑制至少一种 miR 基因产物的表达的至少一种化合物施用于受试者，使得胰腺癌细胞的增殖被抑制。

[0031] 在一个相关的实施方案中,治疗受试者中的胰腺癌的方法还包括以下步骤:首先确定来自受试者的胰腺癌细胞中的至少一种 miR 基因产物的量,并将该 miR 基因产物的水平与对照细胞中的相应的 miR 基因产物的水平进行比较。如果 miR 基因产物的表达在胰腺癌细胞中是失调的(例如,下调的、上调的),那么所述方法还包括改变在胰腺癌细胞中表达的至少一种 miR 基因产物的量。在一个实施方案中,在癌细胞中表达的 miR 基因产物的量小于在对照细胞中表达的 miR 基因产物的量,并将有效量的 miR 基因产物或其分离的变体或生物学活性片段施用于受试者。在另一个实施方案中,在癌细胞中表达的 miR 基因产物的量大于在对照细胞中表达的 miR 基因产物的量,并将有效量的用于抑制至少一种 miR 基因的表达的至少一种化合物施用于受试者。抑制 miR 基因的表达的合适的 miR 和化合物包括,例如本文描述的那些。

[0032] 还提供了用于治疗胰腺癌的药物组合物。在一个实施方案中,药物组合物包括至少一种分离的 miR 基因产物或其分离的变体或生物学活性片段以及药学上可接受的载体。在一个特定的实施方案中,至少一种 miR 基因产物对应于这样的 miR 基因产物:其相对于合适的对照细胞在胰腺癌细胞中具有降低的表达水平(即,它是下调的)。

[0033] 在另一个实施方案中,药物组合物包括至少一种 miR 表达-抑制化合物和药学上可接受的载体。在一个特定的实施方案中,至少一种 miR 表达-抑制化合物对 miR 基因产物是特异性的,所述 miR 基因产物在胰腺癌细胞中的表达大于在对照细胞中的表达(即,它是上调的)。

[0034] 还提供了鉴定抗胰腺癌剂的方法,其包括将试剂(test agent)提供给细胞以及测量细胞中的至少一种 miR 基因产物的水平。在一个实施方案中,所述方法包括将试剂提供给细胞以及测量与胰腺癌细胞中降低的表达水平有关的至少一种 miR 基因产物的水平。相对于合适的对照细胞,细胞中的 miR 基因产物的水平的增加指示所述试剂为抗胰腺癌剂。

[0035] 在其他实施方案中,所述方法包括将试剂提供给细胞以及测量与胰腺癌细胞中增加的表达水平有关的至少一种 miR 基因产物的水平。相对于合适的对照细胞,与胰腺癌细胞中增加的表达水平有关的 miR 基因产物的水平的降低指示所述试剂为抗胰腺癌剂。

[0036] 附图简述

[0037] 可从构成本申请的一部分的以下的详述、附图和序列描述更充分地理解本发明。附于此的序列描述和序列表依照如 37 CFR § § 1.821-1.825 中提出的专利申请中管理核苷酸和/或氨基酸序列公开内容的规则。序列描述包含如通过引用并入本文的 37CFR § § 1.821-1.825 中所定义的氨基酸的三字母代码。

[0038] 图 1A、图 1B 和图 1C 显示了说明通过组织类型之间的成对比较被发现是差异表达的多组 miRNA 之间的关系的维恩图;并且显示了列出通过组织类型之间的成对比较被发现是差异表达的多组 miRNA 的表 1a、表 1b 和表 1c。

[0039] 圆包括在所示的成对比较中差异表达的 miRNA 的总数。相交的区域表示在每次比较之间共同的差异表达的 miRNA 的数目。对每一组列出了共同的 miRNA。NP, 正常的胰腺; P, 胰腺癌; CP, 慢性胰腺炎。

[0040] 图 2A 和图 2B 显示差异表达的微小 RNA 的分析。图 2A 显示通过实时 RT-PCR 测定的微小 RNA 在胰腺癌中相比于在匹配的正常胰腺对照中的相对表达。图 2B 显示 5 个新鲜的胰腺癌样品和 2 个不匹配的正常胰腺对照的 miR-21 的 Northern 印迹。

[0041] 图 3 是显示基于 miR-196a-2 的相对表达的患有胰腺癌的患者 Kaplan-Meier 总存活曲线的图。

[0042] 图 4A、图 4B 和图 4C 显示表 2a、表 2b 和表 2c, 其中列出对于胰腺癌 (P)、慢性胰腺炎 (CP) 和正常胰腺功能 (NP) 的差异表达的 miRNA 和分类预测物 (class predictor) 及其相对表达。倍数变化表示为表达的实际变化。

[0043] 图 5 显示表 3, 表 3 包括与 24 个月内死于疾病的那些患者相比, 在存活至少 24 个月的淋巴结阳性患者中的经由 SAM 确定的差异表达的成熟微小 RNA。倍数变化表示为表达的实际变化。将 SAM 变量设置为默认值 (最低的零倍数变化, 100 次置换和 0.05 的 s0 百分点)。

[0044] 发明详述

[0045] 现将不时地参考本发明的具体实施方案来描述本发明。然而, 本发明可以不同形式来体现, 并且不应被解释为限于本文提出的实施方案。更确切地说, 提供这些实施方案, 以便本公开内容是全面的和完整的, 并将本发明的范围充分地传达给本领域技术人员。

[0046] 除非另外定义, 本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本发明的描述中使用的术语在此仅为了描述特定的实施方案, 而并非意图限制本发明。如本发明的说明书和所附权利要求中使用的, 单数形式“一 (a)”、“一 (an)”和“该 (the)”也意图包括复数形式, 除非上下文明确地另外说明。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献以其整体通过引用并入。

[0047] 除非另外说明, 如说明书和权利要求中使用的, 表达各成分的量、诸如分子量的性质、反应条件等的所有数值应被理解为在一切情况下通过术语“约”来修正。因此, 除非另外说明, 在以下说明书和权利要求中提出的数值性质是可随本文所述的实施方案中试图获得的期望的性质而变化的近似值。虽然表达本发明的宽范围的数值范围和参数是近似值, 但在具体实施例中提出的数值尽可能准确地进行报告。然而, 任何数值固有地包含由在其相应的测量中发现的误差必然地导致的某些误差。

[0048] 贯穿本说明书提及的所有专利、专利申请 (和授权的任何专利, 以及任何相关的、公布的外国专利申请)、GenBank 和其他登录号与相关数据以及出版物的公开内容在此通过引用并入本文。然而, 明确地不承认, 通过引用并入本文的任何文件教导或公开了本发明。

[0049] 通过参考以下的本发明实施方案的详细描述和本文所包括的实施例可更容易地理解本发明。然而, 在公开和描述本方法、化合物和组合物之前, 应当理解, 本发明并不限于具体的方法、具体的细胞类型、具体的宿主细胞或具体的条件等, 因为这些当然可以改变, 并且其中的许多更改和变化对本领域技术人员来说将是明显的。还应当理解, 本文使用的术语仅是为了描述具体的实施方案的目的, 而不意图是限制性的。

[0050] 定义

[0051] “化学敏感性”是指细胞受细胞毒剂影响的倾向, 其中细胞对这样的试剂可在敏感的至抗性的范围内变化。单独地或与其他因子或基因表达产物结合的化学敏感性基因的表达可以是化学敏感性的标志物或化学敏感性的指示物。

[0052] “化学敏感性基因”是指其蛋白产物影响细胞对一种或多种细胞毒剂的化学敏感性的基因。例如, 沿着连续的数值范围 (scale), 给定的基因在药物敏感细胞系中相对高的

表达被视为正相关,而在药物抗性细胞中的高表达被视为负相关。因此,负相关表示化学敏感性基因与癌细胞对药物的抗性相关,而正相关表示化学敏感性基因与癌细胞对药物的敏感性相关。化学敏感性基因自身可使细胞对一种或多种细胞毒剂的作用更敏感或更具有抗性,或者可以与直接影响化学敏感性的其他因子相关。换句话说,某些化学敏感性基因可以直接或不直接参与使细胞对药物敏感或具有抗性,但这样的基因的表达可以与可影响化学敏感性的其他因子的表达相关。化学敏感性基因的表达能够与细胞或细胞类型对试剂的敏感性相关,其中负相关可表示该基因影响细胞对药物的抗性,并且正相关可表示该基因影响细胞对药物的敏感性。

[0053] 在本文中应当注意,说明书列出了已知基因的登录号,由此可参考基因的完整序列,并且基因的完整序列在本专利申请提交时通过引用而明确并入本文。

[0054] “阵列”或“微阵列”是指诸如多核苷酸的可杂交的阵列元件的排列,阵列元件在某些实施方案中可以是在基质上。多核苷酸的排列可以是有序的。在某些实施方案中,阵列元件被排列以使得存在至少 10 个或更多个不同的阵列元件,并且在其他实施方案中,存在至少 100 个或更多个阵列元件。此外,来自阵列元件中的每一个的杂交信号可以是可单独地辨别的。在一个实施方案中,阵列元件包括核酸分子。在某些实施方案中,阵列包括针对两个或更多个化学敏感性基因的探针,并且在其他实施方案中,阵列包括针对 10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200、250 个或更多个化学敏感性基因的探针。在某些实施方案中,阵列包括针对编码不同于化学敏感性蛋白的产物的基因的探针。在某些实施方案中,阵列包括针对 5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 个或更多个编码不同于化学敏感性蛋白的产物的基因的探针。

[0055] 当在本文中使用时,“基因”宽泛地指与生物分子或生物学功能相关的 DNA 的任何区域或区段。因此,基因包括编码序列,并且还可以包括其表达所需的调节区域或区段。基因还可包括非表达的 DNA 区段,该 DNA 区段例如形成其他蛋白的识别序列。基因可由多种来源获得并且可包括编码所需参数的序列,所述来源包括从感兴趣的来源克隆或从已知的或预测的序列信息合成。

[0056] “杂交复合物”是指两个核酸分子之间依靠嘌呤和嘧啶之间形成氢键的复合物。

[0057] 当在本文中的两个或更多个核酸或多肽序列的背景中使用时,“相同的”或“同一性”百分比是指在比较和比对最大一致性时,可能是相同的或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸的两个或更多个序列或子序列。为了进行序列比较,一个序列通常作为测试序列与其比较的参考序列。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机,指定子序列坐标,如果需要,并且指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法基于指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0058] 当在本文中的核酸或蛋白的背景中使用时,“分离的”表示核酸或蛋白基本上不含在自然状态时与其相伴的其他细胞组分。虽然核酸或蛋白可以在无水溶液(dry solution)中或水溶液中,但其优选处于均态。通常使用诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法的分析化学技术来测定纯度和均一性。作为存在于制品中的主要分子种类的蛋白被充分地纯化。将分离的基因和开放阅读框分离,所述开放阅读框在基因侧面并且编码不同于感兴趣的基因的蛋白。

[0059] 如本文在提及化学敏感性基因时使用的,“标志物”或“生物标志物”是指化学敏感

性的指示物。标志物可直接地或间接地影响细胞对细胞毒剂的化学敏感性,或其可与影响化学敏感性的其他因子相关。

[0060] 当在本文中使用时,“核酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸、核苷酸、寡核苷酸、多核苷酸聚合物及其片段。核酸可以是天然来源或合成来源的、双链或单链的,且与糖类、脂类、蛋白、其他核酸或其他物质分离或结合,并且可进行诸如转化的特定活动或形成诸如肽核酸(PNA)的有用的组合物。除非明确限制,该术语涵盖包含天然核苷酸的已知类似物的核酸,所述天然核苷酸的已知类似物具有与参考核酸类似的结合性质,并且可以以与天然存在的核苷酸类似的方式代谢。除非另外说明,特定的核酸序列还隐含地包括其保守修饰的变体(例如,简并密码子替换)和互补序列,以及明确说明的序列。具体地,简并密码子替换可通过产生序列而获得,在所述序列中,一个或多个所选的(或全部)密码子的第三位用混合碱基和/或脱氧肌苷残基替换(Batzer等人(1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081;Ohtsuka等人(1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608;Cassol等人(1992);Rossolini等人(1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98)。术语核酸与基因、cDNA和由基因编码的mRNA可互换使用。

[0061] “寡核苷酸”或“低聚核苷酸”是核酸,并且与术语扩增引物、引物、低聚物、元件、靶和探针基本上等价,并且可以是双链的或单链的。

[0062] “多个”是指一组至少2个或更多个的成员。

[0063] “多核苷酸”是指具有25至3,500个核苷酸的长度的核酸。

[0064] “探针”或“多核苷酸探针”是指能够在严格的条件下与靶序列的靶区域杂交以形成多核苷酸探针/靶复合物的核酸。探针包括长度为15个连续的核苷酸的多核苷酸。探针可以是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或100个多核苷酸的长度。在某些实施方案中,探针为70个核苷酸的长度。探针对靶区域可以小于100%互补,并且与对靶区域100%互补的探针相比较,可包括以一个或多个缺失、插入或置换的形式的序列改变。

[0065] 当在本文中的核酸或蛋白的背景中使用时,“纯化的”表示核酸或蛋白在电泳凝胶中基本上产生一个带。特别地,这意味着相对于存在的任何其他的核酸或蛋白种类,核酸或蛋白为至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%纯的。

[0066] “样品”是指包含核酸分子的分离的物质样品,例如从有机体获得的物质。样品可包括体液;细胞;来自细胞的提取物、染色体、细胞器或从细胞分离的膜;在溶液中的或与基质结合的基因组DNA、RNA或cDNA;或生物组织或其活检物(biopsy)。样品可以从任何体液(血液、尿、唾液、粘液、胃液等)、培养的细胞、活检物或其他组织制品中获得。

[0067] 在诸如Southern杂交和northern杂交的核酸杂交试验的背景中的“严格的杂交条件”和“严格的杂交洗涤条件”是序列依赖性的,并且在不同的环境参数下是不同的。具有较长序列的核酸特别地在较高温度下杂交。对于核酸的杂交的大量指导见于Tijssen(1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*(生物化学和分子生物

学的实验室技术 - 与核酸探针的杂交) 第 I 部分第 2 章" Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays (杂交原理概述和核酸探针测定的策略)," Elsevier, N. Y. 通常, 高严格的杂交和洗涤条件被选择为比在规定的离子强度和 pH 下的具体序列的热解链温度 (thermal melting point, T_m) 低 5°C 。通常, 在“严格的条件”下, 探针将与它的靶序列杂交, 但不与任何其他序列杂交。 T_m 是在其下 50% 靶序列与完全匹配的探针杂交的温度 (在规定的离子强度和 pH 下)。非常严格的条件被选择为等于特定探针的 T_m 。用于具有超过 100 个互补残基的互补核酸在 Southern 或 northern 印迹中的滤器上杂交的严格杂交条件的实例是 42°C 下、50% 甲酰胺与 1mg 肝素, 且杂交进行过夜。高严格的洗涤条件的实例是 72°C 下 0.15M NaCl 达 15 分钟。严格的洗涤条件的实例是 65°C 下 0.2 倍 SSC 洗涤 15 分钟 (见 Sambrook, 下文, 对于 SSC 缓冲液描述)。通常, 在高严格的洗涤之前是低严格的洗涤, 以除去背景探针信号。对于诸如超过 100 个核苷酸的双链体的示例性中严格的洗涤是 45°C 下 1 倍 SSC 达 15 分钟。对于诸如超过 100 个核苷酸的双链体的示例性低严格的洗涤是 40°C 下 4-6 \times SSC 达 15 分钟。对于短的探针 (例如 10 至 50 个核苷酸), 严格的条件通常涉及小于 1.0M Na 离子的盐浓度, 通常为 pH 7.0 至 8.3 下的 0.01M 至 1.0M Na 离子浓度 (或其他盐), 并且温度通常为至少 30°C 。还可通过添加诸如甲酰胺的去稳定剂来获得严格的条件。通常, 2 倍 (或更高) 于对于在特定杂交测定中的不相关的探针所观察到的信噪比的信噪比, 表示特异性杂交的检出。如果在严格的条件下不互相杂交的核酸所编码的多肽是基本上类似的, 那么所述核酸仍然基本上是类似的。这在例如使用由遗传密码所允许的最大密码子简并产生核酸的拷贝时出现。

[0068] “基质”是指核酸分子或蛋白应用于其上或与其结合的诸如刚性或半刚性的支持体的支持体, 并且包括膜、滤器、芯片、载玻片、干胶片、纤维、磁性珠或非磁性珠、凝胶、毛细管或其他管、板、聚合物和微粒以及其他类型的支持体, 它们可具有多种表面形式, 包括孔 (well)、沟、针 (pin)、通道和小孔 (pore)。

[0069] 如本文使用的, “靶多核苷酸”是指多核苷酸探针能够通过碱基配对与其杂交的并且包括编码为化学敏感性标志物的蛋白的基因的全部或片段的核酸。在某些情况下, 靶和探针的序列在比对时可以是 100% 互补的 (没有错配)。在其他情况下, 可存在多达 10% 的错配。靶多核苷酸表示在样品中的全部多核苷酸的子集 (subset), 所述多核苷酸编码在由其制备多核苷酸样品的细胞或组织中转录的和表达的全部基因的表达产物。靶多核苷酸的基因产物是化学敏感性的标志物; 一些可通过介导药物转运而直接影响化学敏感性。可选择地, 它们可指导或影响细胞特征, 所述细胞特征间接地赋予或影响敏感性或抗性。例如, 这些蛋白可通过建立或维持电化学梯度、或为细胞提供必要的营养而起作用。或者它们可能较少被直接涉及, 而是与直接影响化学敏感性的其他因子一起表达。

[0070] “靶区域”是指包括靶序列的全部或一部分的一段连续的核苷酸, 所述靶序列例如编码作为化学敏感性的标志物的蛋白的基因或寡核苷酸。靶区域可以是 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、200 或更多个多核苷酸的长度。在某些实施方案中, 靶区域为 70 个核苷酸的长度, 并且缺少二级结构。可以使用计算机软件程序来鉴别靶区域, 计算机

软件程序例如 OLIGO 4.06 软件 (National Biosciences, Plymouth Minn.)、LASERGENE 软件 (DNASTAR, Madison Wis.)、MACDNASIS (Hitachi Software Engineering Co., San Francisco, Calif.) 等。

[0071] 可按照本领域技术人员众所周知的许多方法中的任一种从样品中分离 DNA 或 RNA。例如,纯化核酸的方法在以下文献中描述:Tijssen(1993)Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology:Hybridization With Nucleic Acid Probes(生物化学和分子生物学的实验室技术:与核酸探针的杂交)第 I 部分,Theory and Nucleic Acid Preparation(理论与核酸制备),Elsevier,New York N.Y.。在一种情况下,使用 TRIZOL 试剂 (Life Technologies, Gaithersburg Md.) 分离总 RNA,并且使用 oligo d(T) 柱色谱法或玻璃珠分离 mRNA。可选择地,当多核苷酸样品源自于 mRNA 时,该多核苷酸可以是来自 mRNA 逆转录的 cDNA、从该 cDNA 转录的 RNA、从该 cDNA 扩增的 DNA、从扩增的 DNA 转录的 RNA 等。当多核苷酸源自于 DNA 时,该多核苷酸可以是来自 DNA 扩增的 DNA 或从 DNA 逆转录的 RNA。

[0072] 用于测量多核苷酸样品中的靶多核苷酸转录物的相对量的合适方法是 Northern 印迹、RT-PCR 或实时 PCR 或 RNase 保护测定。为了易于测量靶多核苷酸的转录物,可使用各种阵列中的任一种。

[0073] 可以用一种或多种标记部分 (labeling moiety) 标记靶多核苷酸,以允许检测杂交的探针/靶多核苷酸复合物。标记部分可包括可通过光谱手段、光化学手段、生物化学手段、生物电子手段、免疫化学手段、电学手段、光学手段或化学手段来检测的组合物。标记部分包括放射性同位素(例如 P^{32} 、 P^{33} 或 S^{35})、化学发光化合物、标记的结合蛋白、重金属原子、光谱标志物例如荧光标志物和染料、磁性标记、联接的酶、质谱标签、自旋标记、电子传递供体和受体等。

[0074] 杂交复合物

[0075] 杂交使变性的多核苷酸探针和变性的互补靶多核苷酸通过碱基配对形成稳定的双链体。杂交方法是本领域技术人员众所周知的(参见,例如, Ausubel(1997;Short Protocols in Molecular Biology(精编分子生物学实验指南), John Wiley & Sons, New York N.Y., 单元 2.8-2.11、3.18-3.19 和 4-6-4.9)。可选择用于杂交的条件,其中精确互补的靶和多核苷酸探针可杂交,即,每个碱基对必须与其互补碱基对相互作用。可选择地,可选择这样的条件,其中靶和多核苷酸探针存在错配但仍然能够杂交。可以例如通过改变在预杂交、杂交和洗涤溶液中的盐的浓度或者通过改变杂交和洗涤温度来选择合适的条件。对于某些膜,可以通过将甲酰胺加入预杂交和杂交溶液中来降低温度。

[0076] 杂交条件基于核酸结合复合物或探针的解链温度 (T_m), 如 Berger 和 Kimmel(1987)Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology(分子克隆技术指南, 酶学方法), 第 152 卷, Academic Press 中所描述的。如本文使用的,术语“严格的条件”是发生在从 T_m-5 (低于探针的解链温度 5°) 至低于 $T_m-20^\circ\text{C}$ 范围内的“严格性”。如本文使用的,“高严格的”条件使用至少 0.2 倍 SSC 缓冲液和至少 65°C 。如本领域中公认的,严格的条件可通过改变多种因素而获得,所述因素例如探针的长度和特性(即, DNA 或 RNA);靶序列的长度和特性;杂交溶液的盐和诸如甲酰胺、葡聚糖硫酸酯和聚乙二醇的其他组分的浓度。可改变所有这些因素以产生等价于以上所列条件的严格条件。

[0077] 可在于 37°C 下采用诸如含有 0.005% Triton X-100 的 $6\times$ SSPE 的缓冲液的低严

格性下进行杂交,这允许靶和包含某些错配的多核苷酸探针之间的杂交以形成靶多核苷酸/探针复合物。在于 50°C 下采用诸如含有 0.005% Triton X-100 的 0.5×SSPE 的缓冲液的较高严格性下进行随后的洗涤,以保持仅包含精确互补序列的靶/探针复合物的杂交。可选择地,可在 60°C 下采用诸如 5×SSC/0.2% SDS 的缓冲液进行杂交,并且洗涤是在 2 倍 SSC/0.2% SDS 中且然后在 0.1×SSC 中进行。背景信号可通过使用诸如十二烷基硫酸钠、十二烷基肌氨酸钠或 Triton X-100 的去污剂或诸如鲑精 DNA 的封闭剂而减少。

[0078] 阵列构建

[0079] 核酸序列可用于诸如微阵列的阵列的构建。用于构建微阵列的方法以及这样的微阵列的用途是本领域公知的,其实例可在以下专利中找到:美国专利第 5,445,934 号、第 5,744,305 号、第 5,700,637 号和第 5,945,334 号,所述专利中的每一个的全部公开内容在此通过引用并入。微阵列可以是核酸探针阵列、肽或寡肽探针阵列或嵌合探针-肽核酸(PNA)探针阵列。本领域技术人员将认识到所收集的信息的用途。

[0080] 一个特定的实例,即原位合成的寡核苷酸 Affymetrix GeneChip 系统,广泛用于许多具有苛刻的质量控制标准的研究应用中。(Rouse R. 和 Hardiman G., " Microarray technology-an intellectual property retrospective(微阵列技术-知识产权回顾)," Pharmacogenomics 5:623-632(2003))。目前,Affymetrix GeneChip 使用了 11 个 25-寡聚体探针对的组,其包含有待在阵列上鉴定的每个基因序列的完全匹配和单核苷酸错配。使用光引导化学合成法(光刻法技术),可在作为杂交室的约 3×3-cm 塑料筒中构建高度密集的玻璃寡核苷酸探针阵列组(glass oligo probe array set)(> 1,000,000 个 25-寡聚体探针)。将待杂交的核糖核酸分离、扩增、片段化、用荧光报道基团标记并且在温育后用荧光染料染色。仅在荧光报道基团结合至探针时,从该荧光报道基团发出光。在扫描器中检测从与单碱基对错配的寡核苷酸探针比较的完全匹配的寡核苷酸探针发出的光的强度,其又通过生物信息学软件来分析(<http://www.affymetrix.com>)。GeneChip 系统提供了用于阵列制作和数据分析的标准平台,该平台允许在不同试验和实验室之间进行数据比较。

[0081] 微阵列因此可用于多种目的,如本文进一步所描述的,目的包括但不限于,基于患者的基因表达谱来筛选患者对药物的抗性或易感性。

[0082] 预测对治疗剂的响应的方法

[0083] 在另一个方面中,本文提供了预测患者对用治疗剂治疗的响应的方法。该方法包括从患者处获得的多核苷酸样品与多核苷酸探针接触,以测量一种或在某些实施方案中为多种的靶多核苷酸的表达水平。然后将靶多核苷酸的表达水平用于提供患者的表达谱,然后将该表达谱与药物-基因相关性进行比较,其中药物和在患者中表达的基因之间的正相关表示患者将对药物敏感,并且其中药物和在患者中表达的基因之间的负相关表示患者将不对药物响应。

[0084] 鉴定新治疗剂的方法

[0085] 本文还提供了用于鉴定和表征调节患者中的 ACE 活性的新药剂的方法。该方法包括用药剂处理来自受试者的细胞样品以及然后确定基因的表达中的任何变化,所述基因例如本文描述的作为化学敏感性的标志物的 SNP。

[0086] 所述方法还包括比较对照和处理的细胞的基因表达谱,以确定该药剂是否改变了

化学敏感的基因或化学抗性的基因中的任一种的表达。在某些实施方案中,将分离的细胞培养物暴露于不同剂量的候选药剂。药剂改变化学敏感性的能力的有效性可使用标准测定来测试。通过进行测定而测试药剂,在测定中样品用新鉴定的药剂连同先前已知的治疗剂一起共处理。基于在其表达受新药剂影响的一种或多种基因之间的基因-药物相关性来确定先前已知的治疗剂的选择。还提供了用于鉴定和表征新药剂的方法,所述新药剂调节对ACE的化学敏感性。该方法包括用药剂处理来自受试者的细胞样品,这能够抑制化学敏感性中所牵涉的ACE活性(通过基因表达与药效之间的相关分析)。

[0087] 能够被保持在培养物中的任何细胞系可用于本方法中。在某些实施方案中,所述细胞系是人类细胞系。根据一个方法,将RNA从这样的细胞中提取出来、转化为cDNA并应用于阵列,其中探针已应用于所述阵列,如上所述的。

[0088] 胰腺腺癌中的miRNA表达模式

[0089] 在一个特定的方面中,本文提供了对胰腺腺癌中的miRNA表达的全局模式(global pattern)的鉴定,所述全局模式实现若干目的。定义能够区分胰腺癌与正常胰腺的miRNA。由于胰腺癌通常在慢性胰腺炎的背景下出现,所以使用慢性胰腺炎样本作为第二对照。单独的miRNA表达的模式用于勾画出具有较短存活的患者和更可能获得长期存活的患者。鉴定了其表达与存活相关的miRNA。

[0090] 如本文可互换使用的,“miR基因产物”、“微小RNA”、“miR”或“miRNA”是指来自miR基因的未加工的或加工的RNA转录物。由于miR基因产物不被翻译为蛋白,所以术语“miR基因产物”并不包括蛋白。未加工的miR基因转录物还被称为“miR前体”,并且通常包括长度为约70-100个核苷酸的RNA转录物。miR前体可通过用RNase(例如Dicer、Argonaut、RNase III(例如,大肠杆菌RNase III))消化为具有活性的19-25个核苷酸的RNA分子而加工。该具有活性的19-25个核苷酸的RNA分子还被称为“加工的”miR基因转录物或“成熟的”miRNA。

[0091] 具有活性的19-25个核苷酸的RNA分子能够经过自然加工途径(例如,使用完整细胞或细胞裂解液)或通过合成加工途径(例如,使用分离的加工酶,如分离的Dicer、Argonaut或RNase III)从miR前体获得。应当理解,具有活性的19-25个核苷酸的RNA分子还能够直接通过生物合成或化学合成制备,而不必从miR前体加工。当本文通过名称提及微小RNA时,该名称对应于前体和成熟形式,除非另外说明。

[0092] 本文还提供了诊断受试者是否患有胰腺癌或是否处于发展胰腺癌的风险中的方法,其包括测量来自受试者的测试样品中的至少一种miR基因产物的水平,并且将测试样品中的miR基因产物的水平与对照样品中的相应的miR基因产物的水平进行比较。如本文使用的,“受试者”可以是患有或被怀疑患有胰腺癌的任何哺乳动物。在一个优选实施方案中,受试者是患有或被怀疑患有胰腺癌的人。

[0093] 胰腺癌可以是任何形式的胰腺癌,例如不同组织学的胰腺癌(例如,外分泌肿瘤、内分泌肿瘤、癌、淋巴瘤)。在一个实施方案中,被诊断的胰腺癌是胰腺腺癌)。在又一个实施方案中,被诊断的胰腺癌选自由胰腺内分泌肿瘤(PET)和胰腺外分泌肿瘤(例如,腺癌)组成的组。此外,如本文所述,胰腺癌可与特定预后(例如,低存活率、快速进展)相关。

实施例

[0094] 为了本文公开的发明可以被更有效地理解,以下提供了实施例。应当理解,这些实施例仅是为了说明的目的,而不应当被解释为以任何方式限制本发明。在所有这些实施例中,使用商业可得的试剂,根据在 Maniatis 等人, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (分子克隆 - 实验室手册), 第 2 版, Cold Spring Harbor Press (1989) 中描述的方法进行分子克隆反应及其他标准重组 DNA 技术, 除非另外说明。

[0095] 提供了用于改变靶细胞中的基因组数量的方法和组合物。在题述方法中, miRNA 的活性以足以改变靶细胞中基因组数量的方式来改变; 例如, 通过将 miRNA 调节剂引入靶细胞中。还提供了用于实施题述方法的药物组合物、试剂盒和系统。题述发明在多种应用中发现用途, 包括治疗遭受胰腺疾病状况的受试者。

[0096] 在进一步描述本发明之前, 应当理解, 本发明并不限于所描述的特定的实施方案, 因为这些当然可以改变。还应当理解, 本文使用的术语仅是为了描述特定实施方案的目的, 而并不意图是限制性的, 因为本发明的范围仅由所附权利要求限定。

[0097] 当提供数值范围时应当理解, 在该范围的上限和下限之间的每个居中值以及在所述范围中的任何其他所述数值或居中值, 都以下限单位的十分之一 (除非上下文另外明确地说明) 误差的程度被包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地被包括在较小范围中并且也被包括在本发明内, 以所述范围中任何特别排除的界限为条件。当所述范围包括界限中的一个或两个时, 排除所包括的界限中的任一个或两个的范围也被包括在本发明中。

[0098] 本文所叙述的方法可按照所叙述事件的任何逻辑上可能的顺序以及所叙述的事件顺序而进行。

[0099] 除非另外定义, 本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。虽然与本文描述的那些方法和材料类似或等价的任何方法和材料也能够用于本发明的实施或测试, 但现在描述优选的方法和材料。

[0100] 本文提及的所有出版物通过引用并入本文, 以公开和描述与被引用的出版物相关的方法和 / 或材料。

[0101] 必须注意, 如本文中和所附权利要求中使用的, 单数形式 “一 (a)”、“一 (an)” 和 “该 (the)” 包括复数指示物, 除非上下文另外明确地说明。还应当注意, 权利要求可以被设计为排除任何可选择的元素。因而, 本陈述意图作为与权利要求元素的引述相关的如 “只”、“仅” 等的这样的排他性术语的使用的前置基础, 或 “否定的” 限制的使用的前置基础。

[0102] 只提供在本申请的申请日之前的本文所讨论的出版物的公开内容。本文不应被解释为, 承认本发明没有资格使依赖于先前发明的这样的出版物提前。此外, 所提供的公布日期可能与实际的公布日期不同, 实际的公布日期可能需要单独地确认。

[0103] 如以上所概述, 题述发明提供了改变靶细胞中的靶基因组的量的方法和组合物。在进一步描述题述发明中, 首先更详细地描述题述方法, 然后是综述题述发明在其中找到用途的各种代表性应用以及在实施题述发明中找到用途的试剂盒。

[0104] 导管腺癌中的 miRNA

[0105] 虽然已经描述了许多胚胎学过程、生理学过程和致癌过程 (oncogenic process) 的全局微小 RNA (miRNA) 表达模式, 但缺乏对 miRNA 在胰腺的导管腺癌中的作用的描述。因此, 在一个方面中, 提供了 miRNA 在胰腺癌中的表达模式的定义并将其与正常胰腺和慢性

胰腺炎的那些表达模式进行比较。

[0106] 一般地,从切除的胰腺癌试样和所匹配的邻近的正常胰腺及慢性胰腺炎试样中收获的 RNA 与 miRNA 微阵列杂交。微阵列显著性分析 (SAM) 和微阵列预测分析 (Prediction of Analysis of Microarray, PAM) 用于鉴定对组织类型和预后具有预测性的 miRNA,并且通过使用被调整用于多重检验的 t 检验来计算 p- 值。以平均 miRNA 表达为阈值 (高对低) 构建 Kaplan-Meier 存活曲线,并通过 log-rank 分析进行比较。

[0107] 患者群体由患有胰腺导管腺癌 (N = 65) 或慢性胰腺炎 (N = 42) 的连续患者 (consecutive patient) 组成。在所有患者中进行包括介入的治疗性根治性胰切除术 (curative radical pancreatectomy)。患有胰腺癌的患者是未经历过化疗的。

[0108] 鉴定了差异表达的 miRNA,其能够区分胰腺癌与正常胰腺功能和 / 或慢性胰腺炎以及鉴定了预测长期 (即 > 24 个月) 存活的 miRNA 表达的模式。

[0109] 鉴定了 21 个表达增加的 miRNA 和 4 个表达减少的 miRNA,其通过交叉验证在 90% 的样品中正确地归类胰腺癌与正常的胰腺。15 个过表达的 miRNA 和 9 个表达不足的 (underexpressed) miRNA 区分胰腺癌和慢性胰腺炎,准确率为 93%。6 个 miRNA 的子群能够区分患有淋巴结阳性疾病的长期 (即 > 24 个月) 存活者与在 24 个月内死亡的存活者。最后,发现 miR-196a-2 的高表达预示差的存活 (中值 14.3 个月 [95% CI 12.4 至 16.2] 对 26.5 [95% CI 23.4 至 29.6], p = 0.009)。

[0110] 胰腺癌可能具有独特的 miRNA 表达模式,该独特的 miRNA 表达模式可以将胰腺癌与正常的胰腺功能和慢性胰腺炎区分开。该独特的 miRNA 表达模式可用于区分长期存活者和短期存活者。

[0111] 材料和方法

[0112] 组织样品

[0113] 在由俄亥俄州立大学的伦理审查委员会同意免除法律状况之后,从俄亥俄州立大学病理学系的档案文件中确定 2000 年 1 月至 2005 年 12 月的试样,所述试样来自经过胰腺导管腺癌切除术的 65 个连续患者和 42 个患有慢性胰腺炎的患者。由一个病理学者检查了所有病例并确认了诊断。从胰腺癌和匹配的邻近的良性胰腺的或从慢性胰腺炎的、显微解剖的石蜡块获得三个 2 毫米的核芯 (core)。邻近的良性胰腺可从所有胰腺癌试样得到。

[0114] 微小 RNA 微阵列

[0115] 用二甲苯在 50°C 下将组织核芯脱蜡 (deparaffinize) 3 分钟。总 RNA 提取使用 RecoverAll 试剂盒 (Ambion, Inc., Austin, TX) 按照制造商说明书进行。如先前所述进行 RNA 标记和在 miRNA 微阵列芯片上的杂交。⁷ 简单地说,通过使用生物素末端 - 标记的随机八聚体寡核苷酸引物对来自每个样品的 5 μg 总 RNA 进行逆转录。在定做的 miRNA 微阵列芯片 (OSU_CCC 版本 3.0) 上进行生物素 - 标记的 cDNA 的杂交,所述微阵列芯片包括 ~ 1100 个 miRNA 探针,包括 326 个人类的和 249 个小鼠的 miRNA 基因,重复点样。洗涤并处理杂交的芯片,以通过链霉亲和素 - Alexa647 缀合物检测包含生物素的转录物,并在 Axon 4000B (Axon Instruments, Sunnyvale, CA) 上扫描。

[0116] 统计分析和生物信息学分析

[0117] 通过使用 GENEPLX PRO 6.0 (Axon Instruments) 分析微阵列图像。每个 miRNA 的平行测定点 (replicate spot) 的平均值经过减去背景、标准化并经过进一步分析。通过使

用每个芯片中值标准化法和中值阵列而进行标准化。⁸最后,我们选择在至少与数据集中最小分类一样多的样品中测量为存在的 miRNA (25%)。在统计分析前将不存在信号 (absent call) 的阈值定为 4.5 (log₂ 标尺),表示在系统中可检测的平均最小强度水平。大于 95% 的空白探针 (即阴性对照) 落在 4.5 的阈值以下。通过使用微阵列显著性分析 (SAM) 3.0 应用 (其中表达的阈值差异设置为 2, s₀ 百分点设置为 0.05 (默认值) 并且置换次数设置为 100 (默认值)) 来鉴定胰腺癌与正常的胰腺之间、胰腺癌与慢性胰腺炎之间以及慢性胰腺炎与正常胰腺之间的差异表达的 miRNA。⁹SAM 以相对于所有测量的标准偏差的表达变化为基础计算每个基因的分值。仅报导了差异表达的成熟 miRNA。通过微阵列预测分析 (PAM) 确定 miRNA 特征 (signature), 所述微阵列预测分析执行最近收缩质心法 (nearest shrunken centroids)。¹⁰通过 10- 倍交叉验证计算预测误差。对于层次分析,我们使用在正常胰腺和胰腺癌之间由 SAM 和 PAM 鉴定的微小 RNA 的平均连接聚类法 (Cluster 3.0)。Java Treeview 1.0 用于树状结构可视化 (tree visualization)。

[0118] 为了进行存活分析并生成 Kaplan-Meier 存活曲线,使用 miRNA 表达的各自的平均水平作为阈值,通过将样品分为两类 (高表达和低表达) 而将在 miRNA 芯片上测量的 miRNA 水平转化为离散变量。通过 log-rank 分析比较存活曲线。接受具有 95% 的置信度的显著性。

[0119] 定量 RT-PCR

[0120] 按照制造商说明书 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 使用单管 TaqMan miRNA 测定在 Applied Biosystems Real-Time PCR 仪器上检测并量化成熟 miRNA。使用小核 RNA U6 (RNU6B; Applied Biosystems) 进行标准化。在 GeneAmp PCR 9700 Thermocycler (Applied Biosystems) 上运行所有的 RT 反应,包括无-模板的对照和 RT 负对照 (minus control)。使用 ABI Prism 7900HT 序列检测系统 (Applied Biosystems) 量化基因表达水平。以一式三份进行比较实时 PCR,包括无-模板的对照。使用比较 C_t 法计算相对表达。

[0121] 类似地,使用从 Applied Biosystems 得到的用于 KRAS 表达测定的引物和探针 (预先设计的,预先最优化的) 进行 TaqMan 基因表达测定。每个样品使用 150 纳克 RNA 用于测定,并且使用 18S 标准化所有 RNA 样品。

[0122] 组织微阵列 (TMA)

[0123] 已描述了我们制作 TMA 的方法。¹¹简单地说,从每个石蜡块压出两个组织核芯 (每个直径为 2mm) 并使用精密仪器 (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) 转移至每一个受者 TMA 块 (recipient TMA block), 所述石蜡块用于获得进行微小 RNA 分析的 RNA。石蜡包埋的组织以 4 微米切片并置于带正电的载玻片上,然后加热至 40°C 达 30 分钟。在均染石蜡和核芯后,将阵列冷至 4°C 达 15 分钟。

[0124] 免疫组织化学 (IHC)

[0125] 已描述了免疫组织化学的方法。¹¹分别以 1 : 50、1 : 20 和 1 : 100 的稀释度使用 TP53 (目录 #M7001, 克隆 DO-7, Dako, Carpinteria, CA)、CDKN2 (目录 #CMC802, 克隆 JC2, Cell Marque Corp., Rocklin, CA) 和 SMAD4/DPC4 (目录 #sc-7966, 克隆 B-8, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) 的一抗。将载玻片在 Richard Allen 苏木精中复染、经分级的乙醇溶液脱水并盖片。对阳性对照和阴性对照适当地染色。

[0126] 如果在至少 5% 的细胞中观察到核染色,则 TP53 的染色被视为阳性的。对于

CDKN2, 在至少 5% 的细胞中的核染色和细胞质染色被视为阳性的, 并且对于 SMAD4/DPC4, 小于 10% 的细胞的核染色与细胞质染色被视为缺少表达。所有的染色由对肿瘤阶段和临床特征不知情的单个病理学者 (WLF) 读取。

[0127] 结果

[0128] 利用 miRNA 微阵列⁸, 鉴定在胰腺癌与匹配的邻近的正常胰腺之间、胰腺癌与慢性胰腺炎之间以及慢性胰腺炎与正常胰腺之间的差异表达的 miRNA。SAM 鉴定了在胰腺癌中上调的 31 个 miRNA 和相比于正常胰腺下调的 3 个 miRNA。当将胰腺癌样品与慢性胰腺炎比较时, 3 个 miRNA 被过表达, 并且 4 个 miRNA 在癌症中表达不足。最后, 与正常胰腺相比, 16 个 miRNA 显示了在慢性胰腺炎中增加的表达, 1 个 miRNA 显示了减少的表达。

[0129] 表 2a、表 2b 和表 2c (分别在图 4A、图 4B 和图 4C 中显示) 列出通过 SAM 确定的具有至少两倍的表达变化的差异表达的 miRNA 和通过 PAM 鉴定为分类预测物的另外的 miRNA (见下)。被发现区分胰腺癌与正常胰腺的 miRNA 中有三分之一也区分癌症与慢性胰腺炎 (还显示表 1a、表 1b、表 1c 的图 1A-C)。在所有的三组样品之间没有共同的 miRNA。

[0130] 图 1A、图 1B 和图 1C 显示了说明通过组织类型之间的成对比较被发现是差异表达的多组 miRNA 之间的关系维恩图; 并且显示了列出通过组织类型之间的成对比较被发现是差异表达的多组 miRNA 的表 1a、表 1b 和表 1c。

[0131] 圆包括在所示的成对比较中差异表达的 miRNA 的总数。相交的区域表示在每次比较之间共同的差异表达的 miRNA 的数目。对每一组列出了共同的 miRNA。NP, 正常的胰腺; P, 胰腺癌; CP, 慢性胰腺炎。

[0132] 基于在慢性胰腺炎、正常的胰腺和胰腺癌之间差异表达的 miRNA 的聚类分析表明了每种样品类型之间的一般差别 (数据未显示)。表达模式看起来在慢性胰腺炎与正常胰腺之间最相似, 且在这些良性组织与胰腺癌之间具有较明显的差别。胰腺癌的大部分聚簇在一起, 且某些例外包括在正常胰腺和慢性胰腺炎样品之间聚簇的一组 8 个癌。后一组与具有 50% 更长但统计学上不显著的存活的剩余的癌具有类似的临床病理学特征 (中值 23.1 个月 [95% CI 19.6 至 26.6] 对 15.2 [95% CI 10.9 至 19.5], $p = 0.15$)。8 个肿瘤的这个组与其他胰腺癌相比具有显著更低水平的 miR-21 表达 (中值 10.9 对 8.3, $p = 0.0003$)。

[0133] PAM 允许每个样品基于 miRNA 表达水平通过组织类型分类 (显示表 2a、表 2b、表 2c 的图 4A、图 4B、图 4C)。鉴定了 21 个过表达的 miRNA 和 4 个表达不足的 miRNA 的子集, 其能够在 90% 的样品中通过交叉验证测试正确地区分胰腺癌与正常胰腺。当在慢性胰腺炎与胰腺癌之间进行比较时, 基于癌中 15 个过表达的 miRNA 和 9 个表达不足的 miRNA, 93% 的样品被正确地分类。

[0134] 在慢性胰腺炎与正常胰腺之间的比较鉴定了 15 个表达增加的 miRNA 和 2 个表达减少的 miRNA。该表达模式在所有样品中正确地区分了慢性胰腺炎与正常胰腺。最后, 当与慢性胰腺炎和正常胰腺一起比较时, 95% 的胰腺癌样品被正确分类。

[0135] 为了证实微阵列研究结果, 在 8 个胰腺癌样品和 8 个匹配的正常胰腺对照中对 miR-21、miR-155、miR-221、miR-222、miR-181a、miR-181b 和 miR-181d 进行定量实时 PCR。

[0136] 所有这些 miRNA 在肿瘤样品中相对于正常胰腺被过表达 (图 2A)。

[0137] 对 miR-21 的 Northern 印迹分析也证实, 相对于两个不匹配的新鲜的正常的胰腺

对照,在 5 个另外的新鲜的胰腺癌样品中表达增加(图 2B)。

[0138] 为了确定 miRNA 表达对存活的影响,我们使用两种方法分析我们的微阵列数据。首先,我们需要确定 miRNA 表达的绝对水平是否能够区分患有淋巴结阳性疾病的短期存活者和长期存活者。已知患有转移至局部淋巴结的胰腺癌且在切除术以后 2 年仍存活的患者通常被视为长期存活者,我们比较了具有大于 24 个月的存活的淋巴结阳性患者的微阵列数据与在 24 个月内死于疾病的淋巴结阳性患者的微阵列数据。SAM 鉴定了在具有较长存活的患者中差异地过表达的 6 个 miRNA,如图 5 中的表 3 中所示。

[0139] 然后,我们需要基于 miRNA 的相对表达确定存活。生成 Kaplan-Meier 存活曲线,并使用高表达或低表达(相对于微阵列上的每个 miRNA 的平均表达)的二项变量,通过 Log-Rank 分析进行比较。基于此,鉴定了两个感兴趣的 miRNA:miR-196a-2[SEQ ID NO:62] 和 miR-219[SEQ ID NO:64]。

[0140] 具有高 miR-196a-2 表达的肿瘤具有 14.3 个月(95% CI 12.4 至 16.2)的中值存活,与具有低表达的肿瘤的 26.5 个月(95% CI 23.4 至 29.6)相对比($p = 0.009$)。在 75% 的肿瘤中观察到的高 miR-196a-2 表达导致 17% 的 2- 年存活,与低表达的 64% 相对比(图 3)。

[0141] 在具有高 miR-219 表达的患者中的中值存活为 13.6 个月(95% CI 11.8 至 15.4),与具有低表达的患者的 23.8 个月(95% CI 18.7 至 28.9)相对比,二者分别具有 25% 和 49% 的 2- 年存活($p = 0.067$)。所有患者的中值存活为 15.5 个月(95% CI 9.9 至 21.1),2- 年和 5- 年存活分别为 33% 和 12.5%。众所周知地,淋巴结状况、T 分期和组织学级别(histologic grade)不预测存活(数据未显示)。

[0142] 我们接下来设法使在胰腺癌中观察到的常见的基因异常的表达与存活和微小 RNA 表达相关联。在 54 个肿瘤中的 31 个(57%)中观察到增加的 TP53 表达。在 56 个肿瘤中的 49 个(88%)中观察到 CDKN2 表达的缺失,而在 56 个肿瘤中的 39 个(70%)中观察到 SMAD4/DPC4 表达缺失。未发现与存活或在表 3(图 5 中所示)中列出的微小 RNA 中的任何一种(包括 miR-196a-2)的相关性。此外,在通过基因表达分析评价的 10 个肿瘤中的 8 个(80%)中鉴定了 KRAS 突变,但 KRAS 突变不与微小 RNA 表达相关。

[0143] 讨论

[0144] 已描述了在多种血液学和实体器官恶性肿瘤中的异常 miRNA 表达模式。所鉴定的是能够以 95% 的准确度区分胰腺的导管腺癌与正常胰腺和慢性胰腺炎的 miRNA 的全局表达模式。同样地,我们已鉴定了可显著影响存活的一种 miRNA,miR-196a-2。

[0145] 对于该一系列的试验,选择两个对照用于比较:相邻的正常的胰腺和慢性胰腺炎。虽然我们的肿瘤样品是显微切割的,但被在胰腺癌中常见的周围炎性变化所污染是不可避免的。仍然地,仅 7 个被发现相对于正常胰腺在癌中过表达的 miRNA(miR-99、miR-100、miR-100-1/2、miR-125a、miR-125b-1、miR-199a-1、miR-199a-2)也在慢性胰腺炎中过表达。

[0146] 虽然这些 miRNA 在癌和慢性胰腺炎中的过表达可提示对于肿瘤生长的共同诱发事件(common inciting event),但不能排除污染的可能性。通常,正常的胰腺功能和慢性胰腺炎倾向于聚簇在一起,同时与胰腺癌保持很大程度地分离,极少例外。有趣的是,一组 8 个癌确实与良性胰腺样品聚簇。虽然这组患者相对于其他患者在存活上不具有显著改善,但他们将近 2- 年的中值存活长于大部分胰腺癌的报导。

[0147] 在该较小的组中值得注意的是 miR-23、miR-103 和 miR-107 的簇,所述簇在这 8 个癌中比在剩余的癌或大部分良性胰腺中观察到的少(数据未显示)。这些 miRNA 以及其他 miRNA,目前已显示被癌细胞中的缺氧通过依赖于缺氧诱导因子(HIF)的机制所诱导。¹²事实上,大部分描述的缺氧相关的 miRNA 在我们的胰腺癌中被差异地过表达。假定 HIF 与胰腺癌攻击性相关,那么可以证明这些缺氧相关的 miRNA 的减少的表达对患者亚组中的存活是重要的。

[0148] 通常与恶性肿瘤相关的若干 miRNA 在我们的胰腺癌中被鉴定为显著失调的。最显著地,miR-21 和 miR-155 在胰腺癌中相对于正常胰腺和慢性胰腺炎被独特地过表达。已认为 miR-21 在预防细胞凋亡中起重要作用,由此作为原癌基因起作用¹³,并且 miR-21 已显示在肺癌、胃癌、乳腺癌、结肠癌和前列腺癌中被过表达以及在胰腺的神经内分泌肿瘤中被表达。^{4,7}虽然 miR-21 在瘤形成中的作用还未被完全阐明,但使用 miRNA 特异性反义寡核苷酸对其的抑制作用增加了胆管癌细胞对吉西他滨的体外易感性。¹⁴尽管 miR-155 与弥漫性大 B-细胞淋巴瘤以及霍奇金淋巴瘤和伯基特氏淋巴瘤^{15,16}的活化的 B-细胞类型相关,但是其也在诸如结肠癌、肺癌和乳腺癌的实体瘤中被过表达^{4,7}。还显示其在转基因小鼠中参与引起白血病。¹⁷

[0149] 当与正常胰腺和慢性胰腺炎比较时,在我们的胰腺癌中最一致地高表达的 miRNA 是 miR-221。虽然该关联先前未显示在肠胃道肿瘤中,但 miR-221 表达在甲状腺癌中是重要的,并且被认为在血管形成中起作用。^{18,19}通过与 miR-222 合作,miR-221 靶向干细胞因子受体 KIT,miR-222 在我们所研究的胰腺癌中也被发现过表达。

[0150] 少得多的 miRNA 在胰腺癌中是下调的。在这些中值得注意的是 miR-375,其在胰岛中但不在外分泌胰腺中大量存在。²⁰理所当然地,该 miRNA 在我们的胰腺癌中将是显著地表达不足的,因为它们全部源自外分泌胰腺(导致所干预的岛(intervening islet)的去除)。

[0151] 将 40 个胰腺内分泌肿瘤(PET)和 4 个腺泡癌的 miRNA 表达模式与正常胰腺进行比较。²¹在该研究中,87 个 miRNA 在肿瘤中被差异地过表达,并且 8 个 miRNA 相对于正常胰腺表达不足。这明显多于在导管源的胰腺腺癌中鉴定的 31 个过表达的 miRNA 和 3 个表达不足的 miRNA。鉴于 PET 相比于导管腺癌其起源不同,所以在 miRNA 表达中的该宽泛的变化并不意外。已报导了利用 Affymetrix 基因阵列的类似的研究结果。²²类似于我们在导管腺癌中的研究结果,miR-21 看起来在 PET 中是重要的。然而,在内分泌肿瘤中,miR-21 与更具攻击性的肿瘤相关,如由 Ki67 的增加的增殖指数和肝转移的存在所表明的。类似地,miR-21 表达在本文报导的与良性胰腺试样聚簇的 8 个癌中显著较低,表明其在肿瘤攻击性中的作用。另一个方面,miR-155 在 PET 中相对于正常胰腺是表达不足的,而我们发现它在导管腺癌中是过表达的。该差异再次强调了在两个肿瘤类型之间的细胞起源的不同。

[0152] 已知不良预后通常与胰腺癌相关,我们设法鉴定了能够区分可被视为长期(即大于 24 个月)存活者与短期存活者的高风险患者的 miRNA 表达谱。一组 6 个 miRNA 被鉴定(图 5,表 3)。

[0153] miR-127 是有趣的,因为它位于染色体 14 的 CpG 岛内,并且在前列腺癌和结肠癌中显示为沉默的。²³在我们的胰腺癌中,miR-127 表达在近半肿瘤中增加,而在另一半中减少。虽然单独的 miR-127 表达并不显著影响存活,但当与图 5-表 3 中列出的其他 miRNA 一

起时,它可用于预测长期存活者。

[0154] 仅鉴定了一个显著预测存活期的 miRNA,即 miR-196a-2。该 miRNA 不被 SAM 鉴定为区分“长期”存活者和“短期”存活者的质的区别。虽然 miR-196 与恶性肿瘤的直接关联还未被描述,但其确实看起来与 HOXB8 完美地相互作用并使 HOXB8 降解,HOXB8 是涉及动物中多种至关重要的发育程序的同源框家族簇 (homeobox family cluster) 的成员²⁴,所述发育程序包括内分泌腺。²⁵ 在我们的患者中,75%的肿瘤以高于该组的平均值的水平表达 miR-196a-2。虽然该 miRNA 并未帮助区分胰腺癌与正常胰腺或慢性胰腺炎,但它可以是存活的预测物。

[0155] 所使用的样品代表典型的导管腺癌,如通过对在胰腺癌中观察到的 4 个最常见的基因异常的分析试验所说明的:TP53、CDKN2、SMAD4 和 KRAS。在我们的肿瘤中观察到的这些感兴趣的基因的改变与在文献中描述的改变类似。²⁶⁻²⁸ 与早期的报导类似,这些肿瘤抑制剂和致癌基因并不与我们的患者的存活相关,它们也不与 miRNA 表达相关。

[0156] 认为这些结果现在显示了胰腺腺癌中的 miRNA 的全局表达模式。这样的模式可用于指导对患有未知原发性的转移性肿瘤的治疗,或帮助区分良性肿瘤和恶性肿瘤(其通过常规组织学分析和免疫组织化学分析难以确定)。这样的数据还可用于区分具有较好预后或较差预后的患者,以在决定谁将接受或将不接受攻击性疗法时帮助指导临床医生。除了微小 RNA 表达模式如何能被临床应用的这些诊断实例和预测实例以外,微小 RNA 以多种途径影响多个基因的能力使它们可用于抗肿瘤治疗。

[0157] 应用

[0158] 上述方法在多种不同应用中发现了用途,典型的应用类型在本文中描述。

[0159] 效用

[0160] 本题述方法在治疗多种不同的状况中发现了用途,在所述状况中,靶细胞或包括靶细胞的宿主中的靶基因组的量的减少是所期望的。在许多实施方案中,本题述方法在治疗患有胰腺癌介导的疾病状况的宿主中发现了用途。治疗是指至少获得了与折磨宿主状况相关的症状的改善,其中改善在广义上用于指至少与待治疗的状况相关的参数例如症状的量级的减少。因而,治疗还包括这样的情形:其中病理状况或至少与病理状况相关的症状被完全抑制(例如防止发生)或停止(例如终止)使得宿主不再遭受状况或至少表征该状况的症状。

[0161] 多种宿主可根据本题述方法进行治疗。通常,这样的宿主是“哺乳动物 (mammal)”或“哺乳动物 (mammalian)”,其中这些术语被广泛地用于描述在哺乳动物纲内的生物,包括食肉动物目(例如,狗和猫)、啮齿目(例如,小鼠、豚鼠和大鼠)和灵长目(例如,人类、黑猩猩和猴子)。在许多实施方案中,宿主将是人类。

[0162] 本发明通过研究来自正常胰腺、转移的恶性胰腺癌 (metastatic malignant pancreatic cancer) 和慢性胰腺炎的组织中的基因表达鉴定了与胰腺癌相关的基因表达的全局变化。

[0163] 本发明还鉴定了作为有用的诊断标志物以及作为能够用于监测疾病状态、疾病进展、药物毒性、药物功效和药物代谢的标志物的表达谱。

[0164] 本发明包括诊断患者中胰腺癌的存在或不存在的方法,其包括以下步骤:检测来自表 1-2 的 2 种或更多种基因在组织样品中的表达水平,其中,表 1-2 中的基因的差异表达

指示胰腺癌。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 2 中列出的基因组成的组。

[0165] 本发明还包括检测胰腺癌的进展和 / 或区分癌性疾病与慢性炎症的方法。例如,本发明的方法包括检测患者中胰腺癌的进展,所述方法包括以下步骤:检测来自表 1-2 的 2 种或更多种基因在组织样品中的表达水平;其中,表 1-2 中的基因的差异表达指示胰腺癌进展。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 2 中列出的基因组成的组。

[0166] 在某些方面中,本发明提供了监测患有胰腺癌的患者治疗的方法,其包括将药物组合物施用于患者;从来自患者的细胞或组织样品制作基因表达谱;和将患者的基因表达谱与来自包括正常胰腺细胞的细胞群体的基因表达或与来自包括胰腺癌细胞的细胞群体的基因表达谱进行比较或与两者进行比较。在某些实施方案中,基因谱将包括表 1-3 中的一种或多种基因的表达水平。在其他实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。

[0167] 在另一个方面中,本发明提供了治疗患有胰腺癌的患者方法,其包括将药物组合物施用于患者,其中所述组合物改变了表 1-3 中的至少一种基因的表达;从来自患者的包括肿瘤细胞的细胞或组织样品制作基因表达谱;和将患者的表达谱与来自包括胰腺癌细胞的未经治疗的细胞群体的基因表达谱进行比较。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。

[0168] 在一个方面中,本发明提供了诊断患者中的胰腺癌的方法,其包括检测来自表 1-3 的 2 种或更多种基因在组织样品中的表达水平,其中表 1-3 中的基因的差异表达指示胰腺癌。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。

[0169] 在另一个方面中,本发明提供了检测患者中胰腺癌的进展的方法,其包括检测来自表 1-3 的 2 种或更多种基因在组织样品中的表达水平;其中表 1-3 中的基因的差异表达指示胰腺癌进展。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。

[0170] 在一个相关的方面中,本发明提供了监测患有转移性胰腺肿瘤 (metastatic pancreatic tumor) 的患者的治疗的方法,其包括将药物组合物施用于患者;从来自患者的细胞或组织样品制作基因表达谱;和将患者的基因表达谱与来自包括正常胰腺细胞的细胞群体的基因表达或与来自包括转移性胰腺肿瘤细胞的细胞群体的基因表达谱进行比较或与两者进行比较。在某些实施方案中,本发明的方法可包括检测选自表 1-3 中列出的基因的一种或多种基因的表达水平。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。

[0171] 在某些实施方案中,本发明提供了治疗患有转移性胰腺肿瘤的患者方法,其包括将药物组合物施用于患者,其中所述组合物改变了表 1-3 中的至少一种基因的表达;从来自患者的包括转移性胰腺肿瘤细胞的细胞或组织样品制作基因表达谱;和将患者的表达谱与来自包括转移性胰腺肿瘤细胞的未经治疗的细胞群体的基因表达谱进行比较。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。

[0172] 本发明还包括区分患者中的胰腺癌与其他胰腺病症的方法,其包括以下步骤:检测来自表 1-3 的 2 种或更多种基因在组织样品中的表达水平;其中表 1-3 中的基因的差异表达指示胰腺癌而不是另一种胰腺病症。

[0173] 本发明还包括筛选能够调节胰腺癌的发作或进展的药剂的方法,其包括以下步

骤:将细胞暴露于该药剂;和检测来自表 1-3 的 2 种或更多种基因的表达水平。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。

[0174] 以上描述的本发明方法中的任一种可包括检测来自表中的至少 2 种基因。在某些实施方案中,所述方法可检测表中的全部或几乎全部的基因。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 1-3 中列出的基因组成的组。

[0175] 本发明还包括包含至少两种寡核苷酸以及固相支持体的组合物,其中所述寡核苷酸中的每一种包括特异性地与表 1-3 中的基因杂交的序列,所述固相支持体包含至少两种探针,其中所述探针中的每一种包括特异性地与表 1-3 中的基因杂交的序列。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。

[0176] 本发明还包括计算机系统,其包括数据库和用户界面,所述数据库包含确定包括表 1-3 中的至少两种基因的一组基因在胰腺组织中的表达水平的信息;所述用户界面用于查看所述信息。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。所述数据库还可包括基因的序列信息、确定一组基因在正常胰腺组织和恶性组织(转移性的和非转移性的)中的表达水平的信息,并且可包括至诸如 GenBank 的外部数据库的链接;所述 GenBank 数据库由国家生物技术信息中心或 NCBI(ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/) 维护。可用于本发明的其他外部数据库包括由化学文摘社(stnweb.cas.org/) 和 IncyteGenomics(incyte.com/sequence/index.shtml) 提供的数据库。

[0177] 本发明还包括可用于本发明方法中的一种或多种的实施的试剂盒。在某些实施方案中,试剂盒可包含已连接有一种或多种寡核苷酸的一种或多种固相支持体。固相支持体可以是高密度寡核苷酸阵列。试剂盒还可包括与所述阵列一起使用的一种或多种试剂、一种或多种信号检测和/或阵列处理仪器、一种或多种基因表达数据库和一种或多种分析与数据库管理软件包。

[0178] 本发明还包括使用数据库的方法,例如使用所公开的计算机系统以呈现确定表 1-3 中的至少一种基因在组织或细胞中的表达水平的信息的方法,所述使用数据库的方法包括以下步骤:将表 1-3 中的至少一种基因在组织或细胞中的表达水平与数据库中的基因的表达水平进行比较。在某些实施方案中,一种或多种基因可选自由表 3 中列出的基因组成的组。

[0179] 本发明提供了检测基因的表达水平的组合物和方法,取决于细胞状态(即,正常的对癌性的),所述基因可以是差异表达的。如本文使用的,短语“检测表达水平”包括测定表达水平的量的方法以及确定感兴趣的基因是否被表达的方法。因此,提供是或否的结果而不必提供表达的量的量化的测定是需要“检测表达水平”的测定,正如该短语在本文使用的。

[0180] 药物组合物

[0181] 还提供的是包含用于本题述方法的 miRNA 化合物的药物组合物。因此,可配制适于口服或胃肠外施用的例如以药学上可接受的盐的形式的化合物,以使用在本题述方法中,如上所述。

[0182] 作为实例,所述化合物可与常规的药物载体和赋形剂(即,媒介物)混合并以以下形式使用:水溶液、片剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆剂、干胶片等。在某些实施方案中,这样的药物组合物包含按重量计约 0.1% 至约 90% 的活性化合物,并且更通常地按重量计约 1%

至约 30% 的活性化合物。所述药物组合物可包含常见的载体和赋形剂。非限制性的实例包括玉米淀粉或明胶、乳糖、右旋糖、蔗糖、微晶纤维素、高岭土、甘露醇、磷酸二钙、氯化钠和海藻酸。通常在本发明的制剂中使用的崩解剂包括交联羧甲基纤维素、微晶纤维素、玉米淀粉、羟基乙酸淀粉钠和海藻酸。

[0183] 液体组合物通常由所述化合物或药学上可接受的盐在合适的液体载体中的悬浮液或溶液组成。非限制性的实例包括乙醇、甘油、山梨醇、诸如聚乙二醇的非水溶剂、油或水，连同悬浮剂、防腐剂、表面活性剂、润湿剂、调味剂或着色剂。可选择地，液体制剂可以从可重新构建的粉末 (reconstitutable powder) 制备。

[0184] 例如，包含活性化合物、悬浮剂、蔗糖和增甜剂的粉末可用水重新构建以形成悬浮液；并且糖浆剂可由包含活性成分、蔗糖和增甜剂的粉末制备。

[0185] 可使用常规用于制备固体组合物的任何合适的药物载体来制备片剂形式的组合物。这样的载体的非限制性的实例包括硬脂酸镁、淀粉、乳糖、蔗糖、微晶纤维素和粘合剂，例如聚乙烯吡咯烷酮。片剂还可提供有彩色膜包衣 (color film coating)，或者包含为载体的一部分的颜色。此外，活性化合物可以被配制为控释剂型，如包含亲水的或疏水的基质的片剂。

[0186] 可使用常规的封装过程制备胶囊形式的组合物，例如，通过将活性化合物和赋形剂加入硬明胶胶囊中。可选择地，可制备活性化合物和高分子量聚乙二醇的半固体基质并将其填充进硬明胶胶囊中；或者可制备活性化合物在聚乙二醇中的溶液或在诸如液体石蜡或分馏的椰子油的食用油中的悬浮液并将其填充进软明胶胶囊中。

[0187] 可包含的片剂粘合剂是阿拉伯树胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮 (聚维酮)、羟丙基甲基纤维素、蔗糖、淀粉和乙基纤维素。可使用的润滑剂包括硬脂酸镁或其他金属硬脂酸盐、硬脂酸、硅油、滑石、蜡、油和胶态二氧化硅。还可使用诸如薄荷、冬青油、樱桃调味品等的调味剂。此外，添加着色剂以使剂型在外观上更有吸引力或帮助识别产品可能是所期望的。可将本发明的化合物及其在胃肠外给予时是活性的药学上可接受的盐配制用于肌肉内施用、鞘内施用或静脉内施用。用于肌肉内施用或鞘内施用的典型组合物将是活性成分在诸如花生油或芝麻油的油中的悬浮液或溶液。用于静脉内施用或鞘内施用的典型组合物将是包含诸如活性成分以及右旋糖或氯化钠或右旋糖与氯化钠的混合物的无菌等渗水溶液。其他实例为乳酸林格注射液、乳酸林格注射液加右旋糖注射液、Normosol-M 和右旋糖、Isolyte E、酰化的林格注射液等。任选地，诸如聚乙二醇的共溶剂、诸如乙二胺四乙酸的螯合剂和诸如焦亚硫酸钠的抗氧化剂可以被包括在制剂中。可选择地，溶液可被冻干并然后紧在施用前用合适的溶剂重新构建。本发明的化合物及其在直肠施用是活性的药学上可接受的盐可被配制为栓剂。典型的栓剂制剂将通常由活性成分与粘合剂和 / 或润滑剂 (例如明胶或可可油或其他低熔点的植物的或合成的蜡或脂肪) 组成。本发明的化合物及其在局部施用是活性的药学上可接受的盐可被配制为透皮组合物或透皮递送装置 (“贴片 (patch)”)。这样的组合物包括，例如，背衬、活性化合物贮库、控制膜 (control membrane)、衬垫和接触型胶粘剂。这样的透皮贴片可用于以控制的量提供本发明化合物的连续或不连续的输入。贴片可被构建为连续的、脉动的或在需求时递送的药剂。任选地，药物组合物可包含其他药学上可接受的组分，例如缓冲剂、表面活性剂、抗氧化剂、粘度调节剂、防腐剂等。适于在本发明的制剂中使用的其他组分可在

Remington's Pharmaceutical Sciences (雷明顿药物科学), Mace Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第 17 版 (1985) 中找到。

[0188] 试剂盒

[0189] 还提供的是用于实施上述方法中的一种或多种的试剂及其试剂盒。题述试剂及其试剂盒可变化很大。通常,试剂盒至少包括如上所述的 miRNA 剂。试剂盒还可包括药学上可接受的递送媒介物,所述递送媒介物可与试剂盒中的 miRNA 剂结合或者分开,例如,这两种组分可在试剂盒中的相同容器中或单独的容器中。

[0190] 除了以上的组分,题述试剂盒还将包括用于实施题述方法的说明书。这些说明书可以多种形式存在于题述试剂盒中,所述形式中的一种或多种可以存在于试剂盒内。这些说明书可以存在的一种形式是作为在合适的介质或基材上(例如,该信息印刷于其上的一张或多张纸)、在试剂盒的包装中、在包装说明书中等的印刷的信息。又一种方式将是计算机可读介质,例如,信息已被记录在其上的磁盘、CD 等。可存在的又一种方式是可经因特网使用以访问在远处的信息的网址。任何方便的方式可存在于试剂盒中。

[0191] 系统

[0192] 还提供的是在实施题述方法中找到用途的系统,如上所述。例如,用于实施题述方法的系统可包括包含 miRNA 剂的一种或多种药物制剂。如本文使用的,术语“系统”是指为了实施题述方法的目的而被组合在一起的组分(例如,存在于单一组合物中或作为完全不同的组合物的活性剂、递送媒介物等)的集合。例如,根据本发明,分别获得的、组合在一起并共同施用于受试者的活性剂和递送媒介物是根据本发明的系统。

[0193] 前述实施方案和优势仅为示例性的,并且不应当被解释为限制本发明。本教导可容易地应用于其他类型的设备。本发明的描述意欲是示例性的,而不是限制权利要求的范围。许多可选方案、修改和变化对本领域技术人员来说将是明显的。在权利要求中,方式-加-功能的语句意图涵盖本文所描述的进行所述功能的构成以及不仅构成上的等价物还有等价的构成。

[0194] 本文引用的所有科学出版物和专利公布据此通过引用并入。现已经过书面的说明书和实施例描述了本发明,本领域技术人员将认识到,本发明可以多种实施方案来实施,前述说明书和实施例是为了说明的目的,而不是限制以下权利要求。

[0195] 参考文献

[0196] 1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin. Mar-Apr 2006 ;56(2) :106-130.

[0197] 2. Cowgill SM, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. Am J Surg. Sep 2003 ;186(3) :279-286.

[0198] 3. Bartel DP. MicroRNAs :genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. Jan 23 2004 ;116(2) :281-297.

[0199] 4. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res. Aug 15 2005 ;65(16) :7065-7070.

[0200] 5. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med. Oct 27 2005 ;353(17) :1793-1801.

- [0201] 6. Esquela-Kerscher A, Slack FJ, Oncomirs -microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. Apr 2006 ;6(4) :259-269.
- [0202] 7. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. Feb 14 2006 ;103(7) :2257-2261.
- [0203] 8. Liu CG, Calin GA, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jun 29 2004 ;101(26) :9740-9744.
- [0204] 9. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA*. Apr 24 2001 ;98(9) :5116-5121.
- [0205] 10. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunk centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. May 14 2002 ;99(10) :6567-6572.
- [0206] 11. De Lott LB, Morrison C, Suster S, Cohn DE, Frankel WL. CDX2 is a useful marker of intestinal-type differentiation: a tissue microarray-based study of 629 tumors from various sites. *Arch Pathol Lab Med*. Sep 2005 ;129(9) :1100-1105.
- [0207] 12. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA Signature of Hypoxia. *Mol. Cell. Biol*. December 28, 2006 2006 ;MCB. 01395-01306.
- [0208] 13. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. Jul 15 2005 ;65(14) :6029-6033.
- [0209] 14. Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. Jun 2006 ;130(7) :2113-2129.
- [0210] 15. Kluiver J, Haralambieva E, de Jong D, et al. Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. Feb 2006 ;45(2) :147-153.
- [0211] 16. Kluiver J, Poppema S, de Jong D, et al. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*. Oct 2005 ;207(2) :243-249.
- [0212] 17. Costinean S, Zanesi N, Pekarsky Y, et al. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. May 2 2006 ;103(18) :7024-7029.
- [0213] 18. Pallante P, Visone R, Ferracin M, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. Jun 2006 ;13(2) :497-508.
- [0214] 19. Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVEC. *Blood*. Jul 18 2006.
- [0215] 20. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. Nov 11 2004 ;432(7014) :226-230.

- [0216] 21. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol.* Oct 10 2006; 24(29) :4677-4684.
- [0217] 22. Bloomston M, Durkin A, Yang I, et al. Identification of molecular markers specific for pancreatic neuroendocrine tumors by genetic profiling of core biopsies. *Ann Surg Oncol.* Apr 2004; 11(4) :413-419.
- [0218] 23. Saito Y, Liang G, Egger G, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell.* Jun 2006; 9(6) :435-443.
- [0219] 24. Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science.* April 23, 2004; 304(5670) :594-596.
- [0220] 25. Mizusawa N, Hasegawa T, Ohigashi I, et al. Differentiation phenotypes of pancreatic islet[beta]- and [alpha]-cells are closely related with homeotic genes and a group of differentially expressed genes. *Gene.* 2004; 331 :53-63.
- [0221] 26. Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer.* Oct 2005; 41(15) :2213-2236.
- [0222] 27. Ghaneh P, Kawesha A, Evans JD, Neoptolemos JP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002; 9(1) :1-11.
- [0223] 28. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* May 15 2006; 20(10) : 1218-1249.

序列表

<110>OHIO STATE UNIVERSITY

<120> 用于区分胰腺癌与正常胰腺功能和 / 或慢性胰腺炎的方法

<130>53-29071

<140>

<141>

<150>60/926, 933

<151>2007-04-30

<160>64

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>23

<212>RNA

<213> 智人

<400>1

agcuacauug ucugcugggu uuc

23

<210>2

<211>23

<212>RNA

<213> 智人

<400>2

aacauucaac gcugucggug agu

23

<210>3

<211>23

<212>RNA

<213> 智人

<400>3	
uuaaugcuaa ucgugauagg ggu	23
<210>4	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>4	
cugugcgugu gacagcggcu ga	22
<210>5	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>5	
aacauucaac gcugucggug agu	23
<210>6	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>6	
aacauucauu gcugucggug ggu	23
<210>7	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>7	
aacauucauu gcugucggug ggu	23
<210>8	
<211>21	
<212>RNA	
<213> 智人	

<400>8	
agcuacaucu ggcucacuggg u	21
<210>9	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>9	
uagcuuauca gacugauguu ga	22
<210>10	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>10	
aacauucaac cugucgguga gu	22
<210>11	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>11	
aacauucauu guugucggug ggu	23
<210>12	
<211>21	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>12	
ccacaccgua ucugacacuu u	21
<210>13	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	

<400>13	
ugucaguuug ucaaauaccc ca	22
<210>14	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>14	
aaccguaga uccgaacuug ug	22
<210>15	
<211>24	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>15	
uccugagac ccuuuaccu guga	24
<210>16	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>16	
uccugagac ccuaacuugu ga	22
<210>17	
<211>21	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>17	
ugagaugaag cacuguagcu c	21
<210>18	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	

<400>18	
uaccuguag auccgaauuu gug	23
<210>19	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>19	
ugagaacuga auuccauggg uu	22
<210>20	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>20	
aaccguaga uccgaucuug ug	22
<210>21	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>21	
cccaguguuc agacuaccug uuc	23
<210>22	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>22	
cccaguguuc agacuaccug uuc	23
<210>23	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	

<400>23	
cccaguguuu agacuaucug uuc	23
<210>24	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>24	
uaccuguag aaccgaauu gug	23
<210>25	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>25	
agcagcauug uacagggcua uca	23
<210>26	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>26	
agcagcauug uacagggcua uga	23
<210>27	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>27	
uccuucuuc caccggaguc ug	22
<210>28	
<211>21	
<212>RNA	
<213> 智人	

<400>28	
aucacauugc cagggauuac c	21
<210>29	
<211>21	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>29	
aucacauugc cagggauuuc c	21
<210>30	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>30	
ucagugcacu acagaacuuu gu	22
<210>31	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>31	
ucagugcauc acagaacuuu gu	22
<210>32	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>32	
uuuguucguu cggcucgcgu ga	22
<210>33	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	

<400>33	
uuuggcacua gcacauuuuu gcu	23
<210>34	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>34	
uggcaguguc uuagcugguu gu	22
<210>35	
<211>21	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>35	
cagcagcaca cugugguuug u	21
<210>36	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>36	
gugaaauguu uaggaccacu ag	22
<210>37	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>37	
agguuguccg uggugaguuc gca	23
<210>38	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	

<400>38	
caaagugcug uucgugcagg uag	23
<210>39	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>39	
uauugcacuu gucccggccu gu	22
<210>40	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>40	
ugaaacauac acgggaaacc uc	22
<210>41	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>41	
aagacgggag gaaagaagg ag	22
<210>42	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>42	
ucccuguccu ccaggagcuc acg	23
<210>43	
<211>21	
<212>RNA	
<213> 智人	

<400>43	
uugugcuuga ucuaaccaug u	21
<210>44	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>44	
gaauguugcu cggugaaccc cu	22
<210>45	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>45	
agaucagaag gugauugugg cu	22
<210>46	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>46	
uucaccaccu ucuccaccca gc	22
<210>47	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>47	
uguaacagca acuccaugug ga	22
<210>48	
<211>22	
<212>RNA	

<213> 智人	
<400>48	
gguccagagg ggagauaggu uc	22
<210>49	
<211>23	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>49	
uggaagacua gugauuuugu ugu	23
<210>50	
<211>21	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>50	
ucacagugaa ccggucucuu u	21
<210>51	
<211>21	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>51	
uagcagcaca gaaauauugg c	21
<210>52	
<211>22	
<212>RNA	
<213> 智人	
<400>52	
uagguaguuu cauguuguug gg	22
<210>53	
<211>22	
<212>RNA	

<213> 智人

<400>53

aacuguuugc agaggaaacu ga 22

<210>54

<211>23

<212>RNA

<213> 智人

<400>54

ucaaaugcuc agacuccugu ggu 23

<210>55

<211>22

<212>RNA

<213> 智人

<400>55

cugaagcuca gagggcucug au 22

<210>56

<211>20

<212>RNA

<213> 智人

<400>56

cugcaaaggg aagccuuuc 20

<210>57

<211>22

<212>RNA

<213> 智人

<400>57

ucgugucuug uguugcagcc gg 22

<210>58

<211>22

<212>RNA

<213> 智人

<400>58

uguaaacauc cucgacugga ag 22

<210>59

<211>22

<212>RNA

<213> 智人

<400>59

ucccugagac ccuaacuugu ga 22

<210>60

<211>22

<212>RNA

<213> 智人

<400>60

ucguaccgug aguaauaaug cg 22

<210>61

<211>22

<212>RNA

<213> 智人

<400>61

aaccguga uccgaacuug ug 22

<210>62

<211>22

<212>RNA

<213> 智人

<400>62

uagguaguuu cauguuguug gg 22

<210>63

<211>22

<212>RNA

<213> 智人

<400>63

uguaacagca acuccaugug ga

22

<210>64

<211>21

<212>RNA

<213> 智人

<400>64

ugauugucca aacgcaauuc u

21

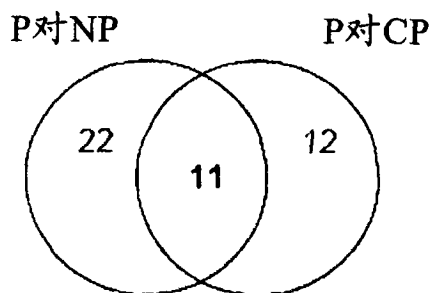


表1a - P对(NP和CP)

- miR-148a
- miR-148b
- miR-155
- miR-181a
- miR-181b
- miR-181b-1
- miR-181c
- miR-181d
- miR-21
- miR-221
- miR-375

图 1A

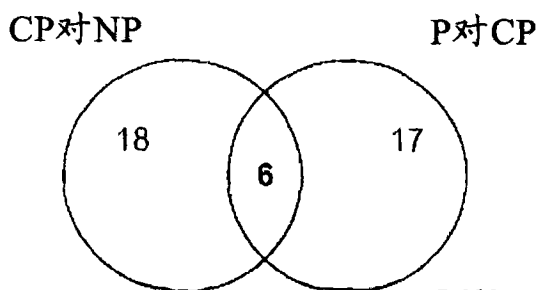


表1b - CP对(NP和P)

- miR-339
- miR-409-3p
- miR-483
- miR-494
- miR-497
- miR-96

图 1B

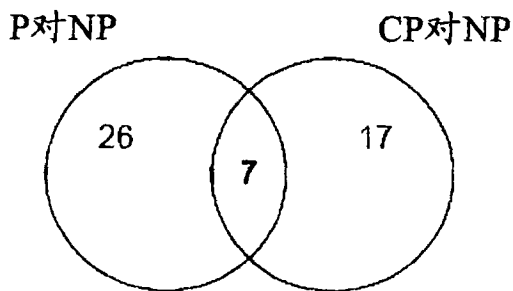


表1c - NP对(P和CP)

- miR-100
- miR-10b
- miR-125a125b-1
- miR-199a-1
- miR-199a-2
- miR-99

图 1C

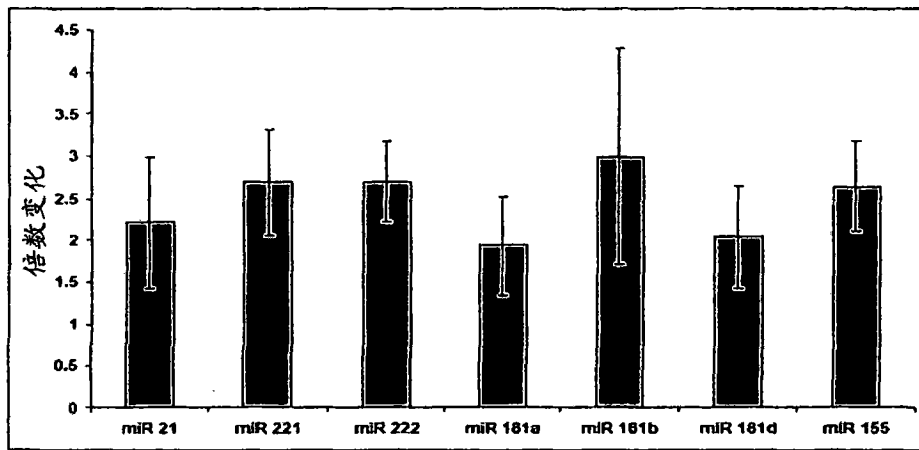


图 2A

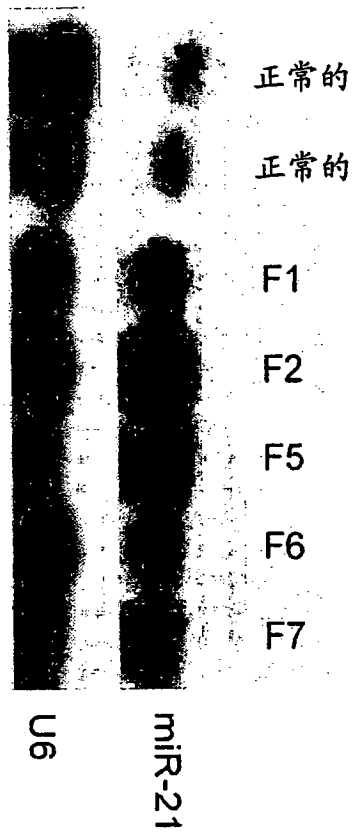


图 2B

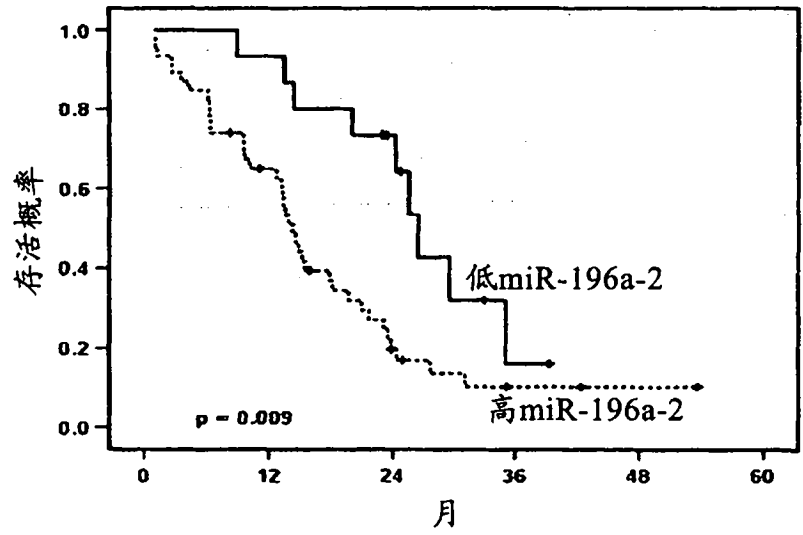


图 3

SEQ ID NO:	胰腺癌对正常胰腺 (s0百分点=0.05)			微阵列预测分析 (PAM)分数†	
	微小RNA	倍数变化	q-值 (%)	试样	对照
				癌	正常的
1	miR-221	3.42	0	0.1605	-0.1717
5	miR-181a	3.01	0	0.125	-0.1337
3	miR-155	2.10	0	0.0232	-0.0249
4	miR-210	2.97	0	0.1143	-0.1224
2	miR-213	2.16	0	0.0146	-0.0156
7	miR-181b	2.85	0	0.1099	-0.1176
8	miR-222	2.70	0	0.0751	-0.0804
7	miR-181b-2	2.20	0	0.0102	-0.0109
9	miR-21	3.08	0	0.0658	-0.0704
6	miR-181b-1	2.55	0	0.03	-0.0321
10	miR-181c	2.36	0	0.0217	-0.0232
12	miR-220	2.11	0	0.0135	-0.0145
11	miR-181d	2.74	0	0.0259	-0.0277
13	miR-223	2.53	0	0.0219	-0.0234
14	miR-100-1/2	2.27	0	0.0111	-0.0119
15	miR-125a	2.09	0	0.0037	-0.004
17	miR-143	2.19	0	0.0052	-0.0056
18	miR-10a	2.67	0	--	--
19	miR-146	2.44	0	0.0007	-0.0007
20	miR-99	2.08	0	--	--
61	miR-100	2.49	0	--	--
21	miR-199a-1	2.46	0	--	--
24	miR-10b	2.40	0	--	--
22	miR-199a-2	2.13	0	--	--
25	miR-107	2.28	0	--	--
26	miR-103-2	2.28	0	--	--
16	miR-125b-1	2.03	0	--	--
27	miR-205	2.24	0	--	--
28	miR-23b	2.00	0	--	--
29	miR-23a	2.01	0	--	--
30	miR-148a	0.18	0	-0.189	0.2022
31	miR-148b	0.31	0	-0.0676	0.0724
32	miR-375	0.46	0	-0.0444	0.0475

†两类PAM的质心分数

图 4A- 表 2a

SEQ ID NO:	胰腺癌对慢性胰腺炎(CP) (s0百分点=0.05)			微阵列预测分析 (PAM)分数†	
	微小RNA	倍数变化	q-值 (%)	癌	慢性胰腺炎
33	miR-96	1.77	0	0.0115	-0.0212
1	miR-221	2.48	0	0.0866	-0.1601
34	miR-34	1.75	0	0.0212	-0.0392
35	miR-497	1.91	0	0.2434	-0.45
36	miR-203	4.11	0	0.0392	-0.0724
3	miR-155	1.88	0	0.0133	-0.0245
5	miR-181a2	1.95	0	0.0422	-0.0779
37	miR-453	1.64	0	2.00E-04	-4.00E - 04
39	miR-92	1.86	0	0.0024	-0.0043
7	miR-181b	1.67	0	0.0316	-0.0583
11	miR-181d	2.17	0	0.0204	-0.0377
38	miR-93	1.64	0	0.0098	-0.0182
6	miR-181b-1	1.67	0	0.0211	-0.039
9	miR-21	1.88	0	0.0185	-0.0342
10	miR-181c	1.65	0	0.0013	-0.0024
40	miR-494	0.32	0	-0.1491	0.2755
41	miR-483	0.51	0	-0.0598	0.1106
42	miR-339	0.51	0	-0.0481	0.089
43	miR-218-2	0.62	0	-0.0058	0.0107
30	miR-148a	0.22	0	-0.1053	0.1946
32	miR-375	0.46	0	-0.0298	0.0551
44	miR-409-3p	0.62	0	-0.0055	0.0102
31	miR-148b	0.33	0	-0.0318	0.0587

† 两类PAM的质心分数

图 4B- 表 2b

SEQ ID NO:	慢性胰腺炎(CP)对正常胰腺组织 (s0百分点=0.05)			微阵列预测分析 (PAM)分数†	
	微小RNA	倍数变化	q-值 (%)	慢性胰 腺炎	正常的
40	miR-494	4.67	0	0.4051	-0.2345
41	miR-483	1.82	0	0.0511	-0.0296
45	miR-383	1.93	0	0.114	-0.066
46	miR-197	1.79	0	.0391	-0.0227
42	miR-339	1.87	0	0.0649	-0.0376
47	miR-194	1.69	0	0.045	-0.0261
48	miR-198	1.78	0	0.0227	-0.0131
44	miR-409-3p	1.68	0	0.0285	-0.0165
23	miR-199b	2.22	0	0.0658	-0.0381
22	miR-199a-2	2.59	0	0.072	-0.0417
21	miR-199a-1	2.66	0	0.0538	-0.0311
49	miR-007-3	2.32	0	0.0221	-0.0128
50	mir-128b	2.21	0	0.0008	-0.0005
14	mir-100-1/2	3.29	0	0.0276	-0.016
15	miR-125a	3.04	0	0.0153	-0.0088
59	miR-125b-2	3.16	0	--	--
51	miR-195	2.19	0	--	--
60	miR-126	2.10	0	--	--
16	miR-125b-1	3.06	0	--	--
61	miR-100	2.62	0	--	--
24	miR-10b	2.37	0	--	--
20	miR-99	2.10	0	--	--
33	miR-96	0.53	0	-0.0459	0.0266
35	miR-497	0.49	0	-0.4271	0.2473

† 两类PAM的质心分数

图 4C- 表 2c

SEQ ID NO:	微小RNA	倍数变化	q-值(%)
53	miR-452	1.81	0
54	miR-105	1.66	31.0
55	miR-127	1.37	31.0
56	miR-518a-2	1.31	31.0
57	miR-187	1.40	46.5
58	miR-30a-3p	1.45	46.5

图 5- 表 3