



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104894132 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201510290993. 5

(22) 申请日 2015. 06. 01

(71) 申请人 北京泱深生物信息技术有限公司

地址 100080 北京市海淀区善缘街1号立方
庭大厦 3103

(72) 发明人 杨承刚 宋宏涛

(51) Int. Cl.

C12N 15/113(2010. 01)

A61K 48/00(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

权利要求书1页 说明书13页

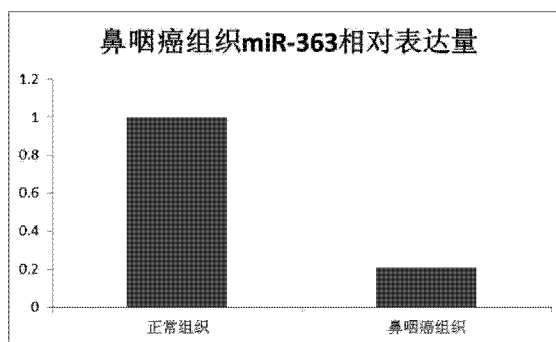
序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

一种鼻咽癌抑制剂及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种鼻咽癌抑制剂及其应用,更具体的涉及 miR-363 和 / 或 miR-363 在诊治鼻咽癌中的新用途。发明通过高通量测序分析鼻咽癌组织,获得其 miRNA 表达数据,进而进行生物信息学分析,选取 miR-363 进行分子生物学验证及靶标基因验证,结果显示, miR-363 和鼻咽癌密切相关,可用于临床诊断及预防检测,具有很好的实际应用价值。



1. mir-363 和 / 或 miR-363 在制备预防、诊断和 / 或治疗鼻咽癌试剂中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的预防、诊断鼻咽癌试剂包括基于高通量测序方法和 / 或基于定量 PCR 方法和 / 或基于探针杂交方法检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录或基于免疫检测方法检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况,优选采用 northern 杂交方法、miRNA 表达谱芯片、核酶保护分析技术、RAKE 法、原位杂交、基于微球的流式细胞术检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录;采用 ELISA 和 / 或胶体金试纸条检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况。

3. 根据权利要求 2 所述的应用,其特征在于,所述的基于定量 PCR 方法包括特异性扩增 mir-363 和 / 或 miR-363 的引物;所述的基于探针杂交方法包括与 mir-363 和 / 或 miR-363 的核酸序列杂交的探针;所述免疫检测方法包括与 miR-363 调控基因表达蛋白特异性结合的抗体。

4. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于,所述的治疗鼻咽癌试剂包括上调 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录和 / 或促进 miR-363 的活性的试剂。

5. 根据权利要求 4 所述的应用,其特征在于,采用基于 RNA 的 microRNA 功能获得性技术和 / 或基因特异性 miR Mimics 技术上调 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录和 / 或促进 miR-363 的活性。

6. 一种治疗鼻咽癌药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含:

(a) 上调 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录和 / 或促进 miR-363 的活性的试剂;

(b) 药剂学上能接受的载体。

7. 根据权利要求 6 所述的药物组合物,其特征在于,采用基于 RNA 的 microRNA 功能获得性技术和 / 或基因特异性 miR Mimics 技术上调 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录和 / 或促进 miR-363 的活性。

8. 一种鼻咽癌诊断试剂,其特征在于,所述鼻咽癌诊断试剂能够检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录或免疫检测方法检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况。

9. 根据权利要求 8 所述的鼻咽癌诊断试剂,其特征在于,所述鼻咽癌诊断试剂基于高通量测序方法和 / 或基于定量 PCR 方法和 / 或基于探针杂交方法检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录或基于免疫方法检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况,优选采用 northern 杂交方法、miRNA 表达谱芯片、核酶保护分析技术、RAKE 法、原位杂交、基于微球的流式细胞术检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录;采用 ELISA 和 / 或胶体金试纸条检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况。

10. 根据权利要求 9 所述的鼻咽癌诊断试剂,其特征在于,所述的用于定量 PCR 方法包括特异性扩增 mir-363 和 / 或 miR-363 的引物;所述的基于探针杂交方法包括与 mir-363 和 / 或 miR-363 的核酸序列杂交的探针;所述免疫检测方法包括与 miR-363 调控基因表达蛋白特异性结合的抗体。

一种鼻咽癌抑制剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,具体的涉及一种鼻咽癌抑制剂及其应用,更具体的涉及 mir-363 和 / 或 miR-363 在诊治鼻咽癌中的新用途。

背景技术

[0002] 鼻咽癌 (Nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是一种发生于鼻咽粘膜,具有较高恶性程度和极强转移能力的恶性肿瘤。鼻咽癌是多基因遗传性疾病,其发病与遗传因素 (遗传易感性)、EB 病毒感染、环境因素、饮食习惯等多种因素有关,早期诊断、早期治疗是挽救患者生命和提高生活质量的最有效手段。遗憾的是,鼻咽癌起病隐匿,具有强烈的转移倾向。据统计,约 75% 的患者在就诊时就已到达晚期,发生局部淋巴结和 / 或远处转移,治疗后复发或转移则预后极差,成为鼻咽癌治疗失败的主要原因。因此,筛查鼻咽癌的肿瘤标记物,争取早期发现、选择最佳治疗方案、预测预后、监测复发或转移对鼻咽癌诊疗具有重要的临床意义。

[0003] miRNA 通常由 RNA 聚合酶 II (Pol II) 转录生成。Pol II 结合在以后形成发夹结构的颈环 DNA 序列附近。生成的转录本经修饰添加 5' 帽子结构和 3' 末端多腺苷酸尾巴结构,并剪切,生成的产物称为初级 miRNA (pri-miRNA),该产物可能长达数千或数百核苷酸,可能包含多个 miRNA 环结构。

[0004] 单个 pri-miRNA 可能含一到六个 miRNA 前体。这些发夹结构每个由约 70nt 左右的核苷酸组成。每个发卡结构附以部分序列以利于有效剪切处理。pri-miRNA 中的双链发夹 RNA 结构被叫做 DGCR8 的核蛋白 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) 辨认, DGCR8 同 Drosha 酶一起形成微处理 (microprocessor) 复合体。在该复合体中, DGCR8 组织 Drosha 蛋白的 RNase III 结构域使其在距离发卡结构约 11 个核苷酸处切割 pri-miRNA, 使其释放发卡结构。释放的发卡结构即为前 miRNA (pre-miRNA), pre-miRNA 在 3' 存在两个悬空的核苷酸, pre-miRNA 5' 为磷酸集团, 3' 为羟基集团。

[0005] 在胞浆中, pre-miRNA 发夹结构经 RNase III Dicer 切割处理。这种内源性核糖核酸酶 (endoribonuclease) 与发夹结构的 3' 相互作用并在环的 3' 和 5' 臂上完成切割, 产生长约 22nt 并不完美匹配的 miRNA : miRNA* 双链结构。

[0006] miRNA 与靶 mRNA 的典型作用方式主要有两种。在大多数情况下, 复合物中的单链 miRNA 与靶 mRNA 的 3' UTR 不完全互补配对, 阻断靶基因的翻译, 从而调节基因表达。这种方式主要影响蛋白表达水平, 并不影响 mRNA 的稳定性。近来, 有研究对翻译抑制理论提出质疑, 发现被抑制的靶 mRNAs 和 miRNAs 共同聚集于胞浆中被称为 P 小体 (processing bodies, P-bodies) 的区域, 这个区域还浓缩了许多参与 mRNA 降解的酶类。P 小体可能是作为未翻译 mRNA 进行暂时的可逆储存的容器, 减少一些特定 P 小体组成蛋白的表达能够缓和 miRNA 介导的基因表达抑制作用。P 小体是胞浆中的一部分区域, 它包含参与多种转录后过程的蛋白质, 例如 : mRNA 降解 (mRNA degradation)、无义介导 mRNA 衰退 (nonsense-mediated mRNA decay, NMD), 转录抑制及 RNA 介导的基因沉默 (RNA-mediated gene silencing)。

[0007] 另一种作用方式与 siRNA 类似,当 miRNA 与 mRNA 完全互补配对时,Ago2 蛋白通过切割 mRNA 直接导致其降解,实现基因沉默。以 siRNA 参与的 RNAi 为例:siRNA 可与 RISC 结合,作为模板识别 mRNA 靶子,通过碱基互补配对原则,mRNA 与 siRNA 中的反义链结合,置换出正义链。双链 mRNA 在 Dicer 酶、ATP 和解旋酶共同作用下产生 22nt 左右的 siRNA,siRNA 继续同 RISC 形成复合体,与 siRNA 互补的 mRNA 结合,使 mRNA 被 RNA 酶裂解。这个过程也称为转录后基因沉默 (PTGS)。

[0008] 总之,当前认为 miRNA 以何种方式与目的基因作用和 miRNA 与目的基因的配对程度有关。miRNA 与目的基因配对不完全时,miRNA 就以抑制目的基因的表达发挥作用;miRNA 与目的基因某段序列配对完全时,就可能引起目的基因在互补区断裂而导致基因沉默。另外,miRNAs 有时候也导致组氨酸修饰和启动子区的 DNA 甲基化,从而影响靶基因的表达。除此外,近来发现快速脱腺苷酸化 (accelerated deadenylation) 是 miRNA 抑制基因表达的新机制。在哺乳动物细胞中发现 miR-125b 和 let-7 能够促进 mRNA 聚腺苷酸尾巴 (polyA tail) 的去除。用 3' 组蛋白茎-环结构取代聚腺苷酸尾巴,不但可以消除 miR-125b 对 mRNA 含量的影响,还可以降低对蛋白质合成的作用,可见 miRNA 能通过降低翻译效率和聚腺苷酸化 mRNA 的浓度来抑制基因表达。

[0009] 本发明通过高通量测序分析鼻咽癌组织,获得其 miRNA 表达数据,进而进行生物信息学分析,选取后备 miRNA 进行分子生物学验证及靶标验证,结果显示,本发明提供的 miRNA 和鼻咽癌密切相关,可用于临床诊断及预防检测,具有很好的实际应用价值。

发明内容

[0010] 本发明的目的还在于提供 mir-363 和 / 或 miR-363 在制备预防、诊断和 / 或治疗鼻咽癌试剂中的应用。mir-363 的序列见序列表 SEQ ID NO 1。mir-363 的成熟 miRNA 为 miR-363 序列见序列表 SEQ ID NO 2。

[0011] 进一步,所述的预防、诊断鼻咽癌试剂包括基于高通量测序方法和 / 或基于定量 PCR 方法和 / 或基于探针杂交方法检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录或基于免疫检测方法检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况,优选采用 northern 杂交方法、miRNA 表达谱芯片、核酶保护分析技术、RAKE 法、原位杂交、基于微球的流式细胞术检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录;采用 ELISA 和 / 或胶体金试纸条检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况。优选所述 miR-363 调控的靶基因为 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、C5orf30、CAND1、CCND2、CCNE2,更优选的 miR-363 调控的靶基因为 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、CCND2、CCNE2。

[0012] 优选的,所述的基于定量 PCR 方法包括特异性扩增 mir-363 和 / 或 miR-363 的引物,进一步优选特异性扩增 mir-363 引物序列为 SEQ ID NO 18 和 SEQ ID NO 19,特异性扩增 miR-363 引物序列为 SEQ ID NO 3;所述的基于探针杂交方法包括与 mir-363 和 / 或 miR-363 的核酸序列杂交的探针;所述免疫检测方法包括与 miR-363 调控基因表达蛋白特异性结合的抗体,进一步优选调控的靶基因为 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、C5orf30、CAND1、CCND2、CCNE2 蛋白特异性结合的抗体,更优选的,调控的靶基因为 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、CCND2、CCNE2。

[0013] 进一步,所述的治疗鼻咽癌试剂包括上调 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录和 / 或

促进 miR-363 的活性的试剂。优选的,采用基于 RNA 的 microRNA 功能获得性技术和 / 或基因特异性 miR Mimics 技术上调 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录和 / 或促进 miR-363 的活性。更优选人工合成 mir-363 成熟 miRNA 的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA) 或通过调控启动子上调 mir-363。

[0014] 本发明的目的在于提供一种治疗鼻咽癌药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包含:

[0015] (a) 上调 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录和 / 或促进 miR-363 的活性的试剂;

[0016] (b) 药剂学上能接受的载体。

[0017] 进一步,采用基于 RNA 的 microRNA 功能获得性技术和 / 或基因特异性 miR Mimics 技术上调 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录和 / 或促进 miR-363 的活性。优选人工合成 mir-363 成熟 miRNA 的短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA) 或通过调控启动子上调 mir-363。

[0018] 本发明的目的在于提供一种鼻咽癌诊断试剂,所述鼻咽癌诊断试剂能够检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录或免疫检测方法检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况。

[0019] 进一步,所述鼻咽癌诊断试剂基于高通量测序方法和 / 或基于定量 PCR 方法和 / 或基于探针杂交方法检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录或基于免疫方法检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况,优选采用 northern 杂交方法、miRNA 表达谱芯片、核酶保护分析技术、RAKE 法、原位杂交、基于微球的流式细胞术检测鼻咽癌样本中 mir-363 和 / 或 miR-363 的转录;采用 ELISA 和 / 或胶体金试纸条检测鼻咽癌样本中 miR-363 调控的靶基因的表达情况。优选所述 mir-363 的成熟 miRNA 调控的靶基因为 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、C5orf30、CAND1、CCND2、CCNE2 蛋白特异性结合的抗体,更优选的,调控的靶基因为 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、CCND2、CCNE2。

[0020] 优选的,所述的用于定量 PCR 方法包括特异性扩增 mir-363 和 / 或 miR-363 的引物;所述的基于探针杂交方法包括与 mir-363 和 / 或 miR-363 的核酸序列杂交的探针;所述免疫检测方法包括与 miR-363 调控基因表达蛋白特异性结合的抗体,进一步优选调控的靶基因为 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、C5orf30、CAND1、CCND2、CCNE2 蛋白特异性结合的抗体,更优选的,调控的靶基因为 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、CCND2、CCNE2 蛋白特异性结合的抗体。

[0021] 定义:

[0022] 现阶段检测 miRNA 的表达水平的方法主要包括基于高通量测序技术、基于核苷酸杂交和基于 PCR 的 miRNA 检测方法。基于探针杂交技术的 miRNA 检测方法是一种直接检测法,不需要对样本 RNA 进行预扩增,包括 northern 杂交方法、miRNA 表达谱芯片、核酶保护分析技术、RAKE 法、原位杂交、基于微球的流式细胞术等技术。

[0023] (1) Northern 杂交

[0024] 又称 RNA 印迹技术为最经典的检测真核生物 RNA 大小,估计其丰度的实验方法。基本原理如下:首先在载体(如硅片、微球或膜等)上固定 miRNA 样本,再与经过标记的探针杂交,洗涤多余的杂交探针后进行信号检测;也可以在载体上先固定与靶 miRNA 序列互补的 DNA 探针,然后与经过标记的样本 miRNA 杂交,再进行信号检测。信号标记的方法包括同

位素标记、荧光标记和纳米金标记等。

[0025] (2) miRNA 表达谱芯片

[0026] 原理同样使用标记探针检测固相支持物上的目标分子。通过设计芯片上 miRNA 基因及内参序列,可精确分析出样品中相应 miRNA 的表达水平。基因芯片具有高通量的优点,可以一次在同一样本中检测出几百个基因的全部表达。Luminex 公司研制的液相芯片 (Liquid chip) 又称多功能悬浮点阵 (Multi analyte suspension array, MASA), 是出的新一代生物芯片技术。液相芯片体系由许多小球体为主要基质构成, 每种小球体上固定有不同的探针分子, 为了区分不同的探针, 每一种用于标记探针的球形基质都带有一个独特的色彩编号, 将这些小球体悬浮于一个液相体系中, 就构成了液相芯片系统。该系统可以对同一个微量样本中的多个不同分子同时进行快速的定性、定量分析, 这种检测技术被称为 FMAP (Flexible multianalyte profiling) 技术。分子杂交在悬浮溶液中进行, 检测速度极快。

[0027] (3) 核酶保护分析技术 (RPA)

[0028] miRNA 的检测还可以采用核酶保护分析技术, 将标记好的探针和待测 RNA 样本混合, 热变性后杂交, 未杂交的 RNA 和多余的探针用单链核酸酶消化, 热失活核酸酶后纯化受保护的 RNA 分子, 最后通过变性 PAGE 电泳分离探针, 显色。这种基于液相杂交的新方法简单快速, 灵敏度高, 但也只能用于分析已知 miRNA。

[0029] (4) RAKE 法

[0030] RAKE 法 (RNA primed array based Klenow enzyme) 是在 miRNA microarray 的基础上利用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段, 使 miRNA 与固定的 DNA 探针杂交的方法。RAKE 可以敏感特异地检测 miRNA, 适用于大量快速的筛选所有已知的 miRNA。能够在特定的细胞和肿瘤中检测 miRNA 表达谱情况。不仅如此, RAKE 法还可以从由福尔马林固定了的石蜡包埋的组织中分离出 miRNA 并对其进行分析, 为从存档标本中分析 miRNA 开启了希望之门。

[0031] (5) 原位杂交 (in situ hybridization)

[0032] 原位杂交技术可直观了解 miRNA 表达方式, 是观测 miRNA 时空表达的一种较简便的方法, 常标记方式包括地高辛、生物素、荧光标记等。锁定核酸基础上的原位杂交 (Locked Nucleic Acid (LNA) based in situ hybridization (LNA-ISH)) 是当前应用较多的探针方式。

[0033] (6) 基于微球的流式细胞术 (bead-based flow cytometry)

[0034] 是一种液相芯片技术, 该方法将流式细胞检测与芯片技术有机地结合起来, 兼有通量大、检测速度快、灵敏度高和特异性好等特点。

[0035] (7) 实时荧光定量 PCR 技术 (Real-time PCR, RT-PCR)

[0036] 荧光检测 PCR 仪可对整个 PCR 过程中扩增序列的累积速率绘制动态变化曲线。在反应混合体系中靶序列的起始浓度越大, 要求获得扩增产物某特定产量的 PCR 循环数 (一般用特定阈值循环数 Ct 来表达) 越少。由于 miRNA 长度仅为 22nt, 传统的 qRT-PCR 不适合扩增如此短的片段。现今有几种用于 miRNA 的实时定量 PCR 方法, 如加尾法、颈环法等。颈环法是一种理想的 miRNA 检测 qRT-PCR 方法: 首先设计特殊的茎环结构引物, 以待测 miRNA 为模板逆转录合成 cDNA 第一链, 该 cDNA 一端为茎环状引物, 茎环状结构被打开便增加了 cDNA 的长度, 随后以合成的 cDNA 为模板设计引物进行实时定量 PCR 扩增。qRT-PCR 具有特

异性高、灵敏度好、快速简单等多种优点。

[0037] (8) 测序法

[0038] 大部分已知的 miRNA 都是通过 cDNA 克隆测序发现和鉴定的。该法需要先构建 miRNA 的 cDNA 文库,再进行 PCR 扩增,扩增产物随后克隆到表达载体上测序。Takada 开发了一种改进的扩增克隆法(miRNA amplification profiling,mRAP),mRAP 法先在 miRNA 的 3' 端连上接头,然后用与接头互补的反转录引物反转录。因为特定的反转录酶具有末端脱氧核苷酸转移酶活性,一些核苷酸(主要是脱氧胞苷酸)会连接到反转录出的 cDNA 链的 3' 末端。当 5' 端接头与 cDNA 链的 poly(C) 粘性末端退火后,加入一对共用引物即可实现对 cDNA 的 PCR 扩增。由于 mRAP 高度灵敏,可以直接用克隆和测序技术检测少量组织中 miRNA 的表达量。标签序列克隆法是一种在基因表达系列分析(SAGE)技术的基础上发展了检测效率更高的 miRAGE(miRNA SAGE)克隆法,该法通过生成大的串联子,通过单个测序反应可检测多个 miRNA,明显提高了检测效率。

[0039] 高通量测序(High-throughput sequencing)又称下一代测序技术(next generation sequencing)是对传统测序一次革命性的改变,一次对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定,极大提高了测序效率。这类大规模测序技术极大的提高了多个物种遗传信息的解读速度,为获取所有 miRNA 的序列信息,解密 miRNA 图谱提供了保证。同时高通量测序使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能,所以又被称为深度测序(deep sequencing)。高通量测序平台的代表是罗氏公司(Roche)的 454 测序仪(Roch GSFLX sequencer),Illumina 公司的 Solexa 基因组分析仪(Illumina Genome Analyzer)和 ABI 的 SOLiD 测序仪(ABI SOLiD sequencer)。

[0040] 免疫检测方法是以一种抗体或多种抗体作为分析试剂,对待测物进行定量或定性分析的检测方法。其基本原理是抗体和抗原之间的相互作用。为提高抗原和抗体检测的敏感性,将已知抗体或抗原标记上易显示的物质,通过检测标记物,反映有无抗原抗体反应,从而间接测出微量的抗原或抗体。常用的标记物有酶、荧光素、放射性同位素、胶体金及电子致密物质等。这种抗原或抗体标记上显示物所进行的特异性反应称为免疫标记技术(immunolabelling technique)。目前应用最广的免疫检测技术主要有:酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA),胶体金免疫层析法等。

[0041] 酶联免疫吸附试验原理是将抗原或抗体与底物(酶)结合,使其保持免疫反应和酶的活性。把标记的抗原或抗体与包被于固相载体上的配体结合,再使之与相应的无色底物作用而显示颜色,根据显色深浅程度目测或用酶标仪测定 OD 值判定结果。

[0042] 胶体金试纸条一般由样品垫、金标垫、层析膜、吸水垫四部分组成。层析材料有硝化纤维膜(NC)、聚酯膜、尼龙膜和 PVDF 膜等,根据试验需要可选择不同要求的膜,其中 NC 膜最为常用,使用前可根据试验具体情况确定是否需要活化或处理,多数情况下无需处理,即可直接使用。将金标蛋白溶液均匀喷涂在金标垫上,于室温下晾干备用。NC 膜可捕获一定量的包被(抗体)和二抗作为检测线和质控线。最后将样品垫、金标垫、NC 膜和吸水纸依次固定于 PVC 板,即成试纸条。

[0043] 基于 RNA 的 microRNA 功能获得性技术即通过外源性补充 miRNAs 合成的前体物质来升高 miRNAs 的水平。例如,可以人工合成与内源性 miRNA 序列一致的短发夹样 RNA(short hairpin RNA,shRNA),由聚合酶 II 或 III 做启动子,以病毒为载体转染细胞,被 Dicer 酶修

饰后载入 RISC 发挥作用,相当于升高 pre-miRNA 的水平,作用效果稳定而持久。

[0044] 基因特异性 miR Mimics 技术该技术避免了 miRNA 与基因的非特异性作用。这种人工合成的与靶基因 3' UTR 互补结合的特异性寡核苷酸链,能够起到与 miRNA 相同的转录后调节作用。

[0045] 包含在本发明的药剂学组合物的药剂学上许可的载体为在制剂时通常利用的载体,该载体包含乳糖 (lactose)、右旋糖 (dextrose)、蔗糖 (sucrose)、山梨醇 (sorbitol)、甘露醇 (mannitol)、淀粉、阿拉伯橡胶、磷酸钙、藻酸盐 (alginate)、凝胶 (gelatin)、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone)、纤维素 (cellulose)、水、糖浆、甲基纤维素 (methyl cellulose)、羟基苯甲酸甲酯 (methyl hydroxybenzoate)、丙基羟苯甲酸丙酯 (propyl hydroxybenzoate)、滑石、硬脂酸镁 (stearic acid magnesium) 及矿物油 (mineral oil) 等,但并非局限于此。

[0046] 本发明的药剂学组合物除了上述成分以外还可以包含润滑剂、湿润剂、甜味剂、香味剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂等。药剂学上许可的适合的载体和制剂详细记载于雷明登氏药学全书。

[0047] 本发明的药剂学组合物能通过口服或非口服进行给药,作为非口服给药时,能通过静脉内注射,鼻腔内注射,局部注射,脑室内注射,脊髓腔注射,皮下注射,腹腔注射,经皮给药等方式进行给药。

[0048] 本发明的药剂学组合物的适合的给药剂量根据制剂化方法、给药方式、患者的年龄、体重、性别、病态、食物、给药时间、给药途径、排泄速度及反应灵敏性之类的因素而可以进行多种处方,通常,熟练的医生能够容易地决定及处方对所希望的治疗或预防有效的给药剂量。

[0049] 本发明的药剂学组合物根据本发明所属技术领域的普通技术人员可以容易实施的方法,利用药剂学上能接受的载体和 / 或赋形剂来进行制剂化,从而能够以单位用量形态制备或者内装在多容量容器内来制备。此时,剂型是油性或者水性介质中的溶液、悬浮液或乳化液形态,或者也可以是浸膏剂、粉末剂、颗粒剂、片剂或者胶囊剂形态,还可以包括分散剂或者稳定剂。

附图说明

[0050] 图 1 RT-PCR 检测鼻咽癌组织 miR-363 表达水平

[0051] 图 2 RT-PCR 检测转染 miR-363 后预测靶基因 mRNA 水平变化

具体实施方式

[0052] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照厂商所建议的条件实施检测。

[0053] 实施例 1 样品的收集及总 RNA 提取

[0054] 组织均来自北京友谊医院 (2010 年 1 月 -2011 年 12 月),实验组选择病检确诊为

鼻咽癌的 9 例患者,对照组选取同期 5 例正常人的鼻咽组织。

[0055] 实验方法:

[0056] 1 提取方法

[0057] 1) 取 80mg 组织块,加入 800 μ l Lysis/Binding 缓冲液,使用匀浆器对组织块进行匀浆。匀浆的过程中样品要置于冰上保持低温状态。

[0058] 2) 再加入 1/10 体积 Homogenate Additive 到上述已经匀浆的组织样品中,冰上放置 10min。

[0059] 3) 加入与 Lysis/Binding 缓冲液等量体积的水饱和酚,震荡 45s, 10,000 $\times$ g 室温离心 5min。

[0060] 4) 小心取出上清到新的试管中,加入 1.25 倍体积的无水乙醇,混匀后,移入纯化柱中,10,000 $\times$ g,离心 15s,倒掉收集管中的液体。由于柱子的最大的体积只有 700 μ l,因此重复此步操作,直到所有的上清都过滤完成。

[0061] 5) 向离心柱子中加入 700 μ l miRNA 洗脱液 1,室温,10,000 $\times$ g,离心 15s,倒掉收集液,换用新的收集管。

[0062] 6) 再用 500 μ l 洗脱液 2/3 加入离心柱中,10,000 $\times$ g,离心 10s,重复这一步骤一次。

[0063] 7) 离心 1min,10,000 $\times$ g,弃去多余的液体。

[0064] 8) 将上述液体转移到新的离心管,加 100 μ l 95 $^{\circ}$ C 预热的 DEPC 处理 30s,10,000 $\times$ g,离心。

[0065] 9) 使用 nanodrop 测定 RNA 浓度和 260nm/280nm 的比值。

[0066] 10) 得到的 RNA 保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

[0067] 2 提取标准

[0068] 测定 RNA 浓度和 260nm/280nm 的比值:总 RNA 的纯度要求是 OD260/OD280 值应在 1.8 至 2.2 之间;RNA 完整性的检测:用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性;

[0069] 根据测序公司的要求,小 RNA 测序总量 3 μ g 以上,浓度在 300ng/ μ l 以上。

[0070] 实施例 2 测序及数据分析

[0071] 由测序公司进行测序文库的建立及上机测序,所使用的测序仪为 Illumina 公司的 HiSeq2000 测序仪。

[0072] 根据公司提供的数据分析结果:肿瘤组(9 例)和正常对照组(5 例)进行统计学分析,P 值小于 0.05,并且肿瘤组与正常对照组的差异至少要超过 2 倍以上的差异表达 miRNA,对差异表达 miRNA 人为挑选过滤中下调表达明显的 has-mir-363 进入我们的研究范围。

[0073] 实施例 3 电子验证 miR-363 与鼻咽癌的关系

[0074] 限制研究类型为“expression profiling by array”、“non-coding RNA profiling by array”符合以下标准的数据集将纳入我们的研究中:①所选数据集必须同时包括全基因组的 mRNA 转录组数据和 miRNA 表达数据;②这些数据来自于鼻咽癌病例组和对照组的鼻咽组织;③本研究均考虑经标准化或者原始数据集;经筛选将 5 套 miRNA 数据集(表 1)纳入我们的研究中。

[0075] 表 1 数据的选择

[0076]

GEO ID	Author	Platform	Samples(N:P)	Year
GSE32906	Luo Z	GPL11350 Illumina Custom Prostate Cancer DASL Panel miRNA	6:16	2014
GSE46172	Bethony JM	GPL16770Agilent-031181 Unrestricted_Human_miRNA_V16.0_Microarray (miRBase release 16.0 miRNA ID version)	4:4	2013
GSE22587	YANG S	GPL8933Illumina Human Beta-version microRNA expression BeadChip	4:8	2012
GSE32960	Ma J	GPL14722microRNA array	18:312	2012
GSE36682	Wei R	Human miRNA 1K	6:62	2012

[0077] 通过转录组数据分析软件对 5 套 miRNA 原始数据进行背景校正和标准化后进行 t-test 得到 P 值, 计算效应量, 然后利用 Fisher 检验合并 P 值, 采用随机效应模型合并效应量, 筛选差异表达 miRNA, 设定 F. D. R. 值 < 0.05 , 共筛选出 27 个差异表达的 miRNA, 其中表达水平上调的 miRNA 有 12 个, 表达水平下调的 miRNA 有 15 个。在下调的基因中 miR-363 下调表达明显。

[0078] 实施例 4 Real-time PCR 检测鼻咽癌组织中 miR-363 的表达

[0079] 1 样品采集：

[0080] 78 例鼻咽癌肿瘤组织和 21 例正常鼻咽组织均来自北京友谊医院（采集时间 2009 年 6 月-2011 年 12 月），78 例肿瘤组织经两位病理科医生确定病理性质和组织学分化程度，21 例对照组病理标本都证实为正常的鼻咽组织。

[0081] 2miRNA 提取：

[0082] 相关实验物品的去 Rnase 的处理：

[0083] ①将所有玻璃器皿应用前均用 DEPC 冲洗浸泡, 120℃ 高压 20min, 180℃ 高温烤干 2 小时以上。

[0084] ②将塑料器皿（如：EP 管 / 枪头）使用前需用 0.1% DEPC 水浸泡过夜, 后控干液体, 120℃ 高压 20min, 烤箱烤干备用。

[0085] (1) 从液氮中取出冻存肿瘤组织, 称重, 放入离心管中, 按 50-100mg 组织 /ml Trizol 的量加入 Trizol, 组织体积不能超过 Trizol 体积的 10%, 充分匀浆约 1-2min；

[0086] (2) 组织加入 Trizol 后, 15-30℃ 孵育 5min, 使其充分裂解；

[0087] (3) 加入 1/10 体积的 miRNA 匀浆添加剂, 漩涡数下混合均匀, 冰上放置 10 分钟；

[0088] (4) 向裂解物中加入同体积的三氯甲烷, 漩涡 30-60s 混匀；

[0089] (5) 室温最大转速 (10000g) 离心 5 分钟, 使水相有机相分离, 中间相析出；中间相如果没有析出, 再次离心；

- [0090] (6) 小心吸取上层水相至新的收集管中,记录水相体积;
- [0091] (7) 向收集管中加入 1/3 体积的无水乙醇,漩涡或颠倒数下混匀;
- [0092] (8) 将裂解液 / 乙醇混合液加入过滤芯过滤,过滤芯放入新的收集管中,每个样本用一个过滤芯;
- [0093] (9) 用移液管将上步中的混合液移入过滤芯,一次可容纳体积 700 μ l。超过 700 μ l 继续用同样的过滤芯再次过滤;
- [0094] (10) 10000g 离心 15s 使液体通过过滤芯;
- [0095] (11) 收集滤液,如果裂解液 / 乙醇体积多于 700 μ l,继续过滤时用新的收集管,直到所有裂解液 / 乙醇混合液过滤完毕,收集过滤液,记录体积;
- [0096] (12) 向上一步中收集到的过滤液中加入 2/3 体积的室温无水乙醇;
- [0097] (13) 将过滤液 / 乙醇混合液加入第二个过滤芯中过滤,弃去过滤液,每个样本用一个过滤芯,将过滤芯放入提供的收集管中;
- [0098] (14) 用移液管将上步中的混合液移入过滤芯,一次可容纳体积 700 μ l 时。超过 700 μ l 继续用同样的过滤芯再次过滤;
- [0099] (15) 10000g 离心 15s 使液体通过过滤芯;
- [0100] (16) 弃去过滤出的液体,留过滤芯用于下一步洗脱;
- [0101] (17) 向过滤芯中加入 700 μ l 的 miRNA 洗液 1(工作液中加入乙醇),离心 5-10s,弃去洗脱出的液体,收集管继续使用;
- [0102] (18) 向过滤芯中加入 500 μ l 的 miRNA 洗液 2/3(工作液中加入乙醇),离心 5-10s,弃去洗脱出的液体;
- [0103] (19) 重复上一步骤;
- [0104] (20) 将过滤芯放入新的收集管(试剂盒中提供)中。向过滤芯中心加入 100 μ l 95 $^{\circ}$ C 预热的洗脱液或不含核酸酶的水,最大转速离心 20-30s 收集 RNA 溶解液。
- [0105] 3miRNA 逆转录
- [0106] RT 体系的配制:
- [0107]

组分	浓度	体积 (μ l)
Total RNA	-	1 μ g
miScript HiSpec Buffer	5 $\times$	4
Nucleics Mix	10 $\times$	2
miScript Reverse Transcriptase Mix	-	2
Nuclease-free H ₂ O	-	Up to 20
Total Volume	-	20

- [0108] ABI 9700 型 PCR 仪上 37 $^{\circ}$ C 保温 60min 使逆转录反应完全后,95 $^{\circ}$ C 5min 终止反应。
- [0109] 加入 80 μ l Nuclease-free H₂O 稀释至 100 μ l 储存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱,用于后续实验。

[0110] 4 荧光定量 PCR

[0111] RT-PCR 体系的配制：

[0112]

反应组分	浓度	体积 (μl)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	2×	5
Universal primer	10 μM	0.2
microRNA-specific primer (SEQ ID NO 3)	10 μM	0.2
cDNA	—	1
Nuclease-free H ₂ O	—	3.6
Total Volume	—	补平至 10 μl

[0113] miRNAs 的表达检测每次设置 3 个平行管反应,以 snRNA U6 作为内参。

[0114] PCR 程序：

[0115] 95℃ 10min;40 个循环 (95℃ 10s,60℃ 30s)。循环结束后利用熔解曲线检测产物特异性:从 60℃ 缓慢升温至 97℃,每℃采集 5 次荧光信号。

[0116] 5 统计学分析

[0117] 采用 OriginPro8.1 软件进行分析。统计方法均数间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ (差异显著) 和 $P < 0.01$ (差异非常显著) 定为有统计学意义,分析肿瘤组织和正常组织中 miR-363 表达水平,结果显示正常组织中 miR-363 的表达明显高于肿瘤组织,前者是后者的近 5 倍,具体见图 1。

[0118] 实施例 5 一种鼻咽癌检测试剂盒

[0119] 小 RNA 提取试剂盒:mirVana™ miRNA Isolation Kit

[0120] miRNA 逆转录

[0121] RT 体系的配制：

[0122]

组分	浓度	体积 (μl)
Total RNA	—	1 μg
miScript HiSpec Buffer	5×	4
Nucleics Mix	10×	2
miScript Reverse Transcriptase Mix	—	2
Nuclease-free H ₂ O	—	Up to 20
Total Volume	—	20

[0123] 荧光定量 PCR

[0124] RT-PCR 体系的配制：

[0125]

反应组分	浓度	体积 (μl)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	2×	5
Universal primer	10 μM	0.2
microRNA-specific primer (SEQ ID NO 3)	10 μM	0.2
cDNA	—	1
Nuclease-free H ₂ O	—	3.6
Total Volume	—	补平至 10 μl

[0126] miRNAs 的表达检测每次设置 3 个平行管反应,以 snRNA U6 作为内参。

[0127] 实施例 6 一种鼻咽癌检测试剂盒

[0128] 试剂盒包括:UltraSYBR 一步法荧光定量 PCR 试剂盒 (With ROX) (货号: CW0660, 康为世纪) 内参使用 actin。

[0129] 引物：

[0130]

pre-miRNA	序号	序列 5' -3'
mir-363	SEQ ID NO 18	TGTTGTCGGGTGGATCAC
	SEQ ID NO 19	GGTTTACAGATGGATACCGTG

[0131] 进一步还可以包括 miRNA 提取试剂盒 (货号: CW0627, 康为世纪)

[0132] 实施例 7 miR-363 靶基因的预测及验证

[0133] 靶基因预测：

[0134] 利用六种广泛使用且能够准确预测 miRNA 靶基因的算法,包括 DIANAmt, miRanda, miRDB, miRWalk, PICTAR5 及 Targetscan 预测差异表达 miR-363 的靶基因,同时结合我们测序结果,我们选定 miR-363 可能的 7 个靶基因: ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、C5orf30、CAND1、CCND2、CCNE2。

[0135] 引物设计：

[0136] ARMC1 扩增引物：

[0137] 正向引物: 5' -GGCATCAGCAATAGCATCAA-3' SEQ ID NO 4

[0138] 反向引物: 5' -ACCAACATCTCTTCTCCACTT-3' SEQ ID NO 5

[0139] 扩增产物长度 78bp。

[0140] ATP6V1B2 扩增引物：

[0141] 正向引物: 5' -AAGGCAGTAGTTCAGGTA-3' SEQ ID NO 6

[0142] 反向引物: 5' -CGGTGTTTCGGAGAATATC-3' SEQ ID NO 7

[0143] 扩增产物长度 90bp。

[0144] C12orf5 扩增引物：

- [0145] 正向引物 :5' -TGGAGCAGAAGATAGAAGAA-3' SEQ ID NO 8
- [0146] 反向引物 :5' -GTTAGATAAGAAGCAAGTGGATA-3' SEQ ID NO 9
- [0147] 扩增产物长度 113bp。
- [0148] C5orf30 扩增引物 :
- [0149] 正向引物 :5' -TTCCACTGAAGCACTTAT-3' SEQ ID NO 10
- [0150] 反向引物 :5' -GAACAGGTCTCATAGGTAA-3' SEQ ID NO 11
- [0151] 扩增产物长度 175bp。
- [0152] CAND1 扩增引物 :
- [0153] 正向引物 :5' -GCACATAACAAGCCATCA-3' SEQ ID NO 12
- [0154] 反向引物 :5' -AGACCATCATCAACCGTAT-3' SEQ ID NO 13
- [0155] 扩增产物长度 137bp。
- [0156] CCND2 扩增引物 :
- [0157] 正向引物 :5' -AGTCCAACCTTGAGAATAG-3' SEQ ID NO 14
- [0158] 反向引物 :5' -GAGTCCACACCAATAGAA-3' SEQ ID NO 15
- [0159] 扩增产物长度 118bp。
- [0160] CCNE2 扩增引物 :
- [0161] 正向引物 :5' -GTTCTTCTACCTCAGTATTCTC-3' SEQ ID NO 16
- [0162] 反向引物 :5' -AGCAGCAGTCAGTATTCT-3' SEQ ID NO 17
- [0163] 扩增产物长度 114bp。
- [0164] 材料准备 :
- [0165] 人鼻咽癌细胞株 CNE 购于中国科学院细胞库 / 中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。
- [0166] 1. 细胞培养
- [0167] 鼻咽癌细胞株采用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素双抗的 RPMI 1640 培养基, 在 37℃, 5% CO₂、饱和湿度的条件下传代培养, 细胞生长状态良好时用于 RNA 抽提或下一步实验。
- [0168] 2. miRNA 瞬时转染
- [0169] 采用阳离子脂质体法进行瞬时转染, 操作按照 Lipofectamin™2000 试剂说明书进行。转染前 24h 将生长状态良好的 5-8F 及 6-10B 细胞接种到 12 孔板中, 细胞计数约 2×10^4 , 常规培养至转染当天, 细胞融合度为 50-60% 是进行试验。将 20nM/40nM/80nM miRNA mimic 加入到 100u1Opti-MEM 培养基中, 轻柔混匀; 另用 100u1Opti-MEM 培养基稀释 2u1Lipofectamin™2000 脂质体, 轻柔混匀, 室温孵育 5min; 混合 Opti-MEM- 脂质体与 Opti-MEM-miRNAs, 室温孵育 20min, 以形成转染复合物; 然后将上述混合物加到细胞培养基中, 轻轻混匀, 培养 6h 后更换完全培养基。其中, 非特异性的 miR 序列作为阴性对照。培养 48h 后提取细胞总 RNA 或进行下一步实验。
- [0170] 3. 实验结果 :
- [0171] 将 miR-363mimics 转染至人鼻咽癌细胞株中, 48h 后提取细胞总 RNA, 空白对照为未转入 miRNA 的人鼻咽癌细胞株细胞, 非特异性的 miR 序列作为阴性对照。定量 PCR 检测上述 7 个预测靶基因 mRNA 的水平变化。结果显示 7 个基因都有不同水平的下调 (具体见

图 2), 其中 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、CCND2、CCNE2 下调最为明显, 所以我们认为 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、C5orf30、CAND1、CCND2、CCNE2 都是 miR-363 的靶基因, 其中 ARMC1、ATP6V1B2、C12orf5、CCND2、CCNE2 是 miR-363 主要靶标基因。

[0172] 虽然已参考各种优选实施方案描述了本发明, 但本领域技术人员理解, 可进行各种变化, 并且可用等同物替代其组件而不背离本发明的基本范围。此外, 可进行许多改动来使特定情况或材料适合于本发明的教导而不背离其基本范围。

[0173] 因此, 本发明无意限定于本文中公开的用于进行本发明的特定实施方案; 相反地, 本发明意欲包括落在权利要求书范围内的所有实施方案。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 北京决深生物信息技术有限公司

<120> 一种鼻咽癌抑制剂及其应用

<160> 19

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 75

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 1

uguugueggg uggaucacga ugcauuuug augagauca uaggagaaaa auugcacggu 60

auccaucugu aaacc 75

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列

<400> 2

aaugcacgg uauccaucug ua 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<400>	3	
aattgcacgg tatccatctg ta		22
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	4	
ggcatcagca atagcatcaa		20
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	5	
accaacatct etctccact t		21
<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	6	
aaggcagtag ttcaggta		18
<210>	7	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	7	
cgggtgttcgg agaataac		18

[0003]

<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	8	
tgagcagaa gatagaagaa		20
<210>	9	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	9	
gttagataag aagcaagtgg ata		23
<210>	10	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	10	
ttccactgaa gcacttat		18
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	11	
gaacaggtct cataggtaa		19
<210>	12	

[0004]

<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	12	
gcacataaca agccatca		18
<210>	13	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	13	
agaccatcat caaccgtat		19
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	14	
agtccaacct tgagaatag		19
<210>	15	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	15	
gagtccacac caatagaa		18
<210>	16	
<211>	22	
<212>	DNA	

[0005]

<213> 人工序列

<400> 16

gtctctctac ctcagtattc tc

22

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17

agcagcagtc agtattct

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18

tggtgtcggg tggatcac

18

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 19

ggtttacaga tggataccgt g

21

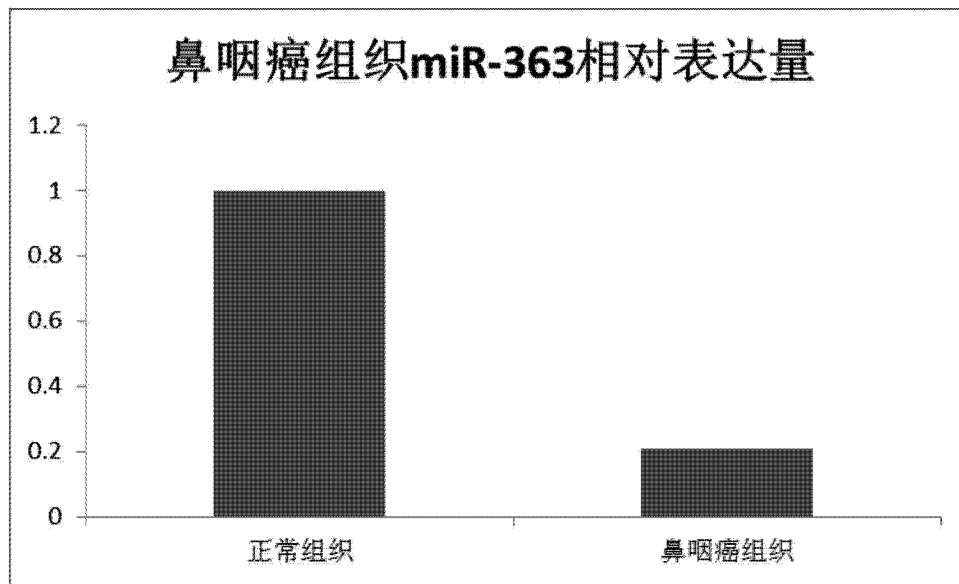


图 1

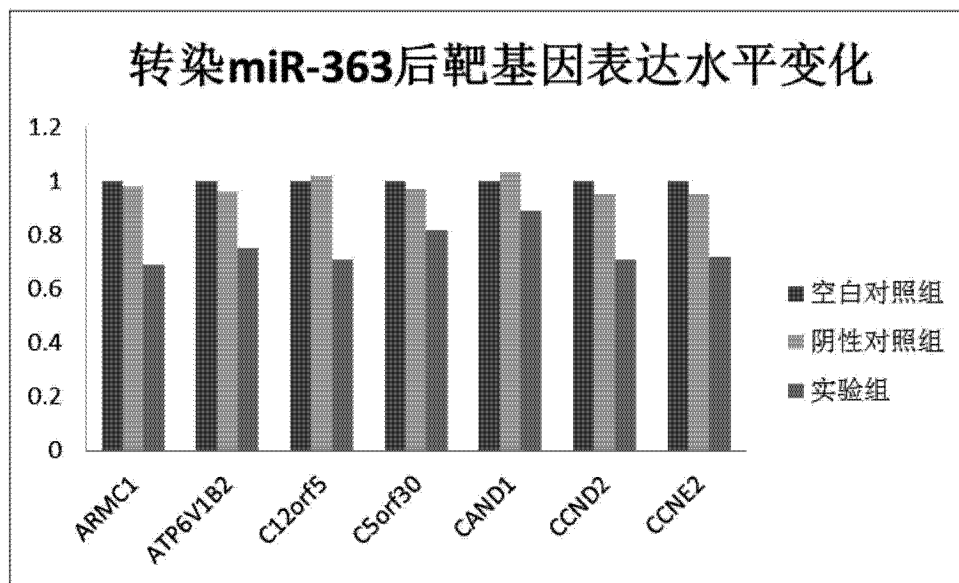


图 2

专利名称(译)	一种鼻咽癌抑制剂及其应用		
公开(公告)号	CN104894132A	公开(公告)日	2015-09-09
申请号	CN201510290993.5	申请日	2015-06-01
[标]申请(专利权)人(译)	北京泱深生物信息技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京泱深生物信息技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京泱深生物信息技术有限公司		
[标]发明人	杨承刚 宋宏涛		
发明人	杨承刚 宋宏涛		
IPC分类号	C12N15/113 A61K48/00 A61P35/00 C12Q1/68 G01N33/53		
其他公开文献	CN104894132B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种鼻咽癌抑制剂及其应用，更具体的涉及mir-363和/或miR-363在诊治鼻咽癌中的新用途。发明通过高通量测序分析鼻咽癌组织，获得其miRNA表达数据，进而进行生物信息学分析，选取miR-363进行分子生物学验证及靶标基因验证，结果显示，miR-363和鼻咽癌密切相关，可用于临床诊断及预防检测，具有很好的实际应用价值。

