



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101755208 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 200880025224. 0

(22) 申请日 2008. 07. 25

(30) 优先权数据

60/951, 812 2007. 07. 25 US

61/050, 438 2008. 05. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 01. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/071235 2008. 07. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/015357 EN 2009. 01. 29

(73) 专利权人 路易斯维尔大学研究基金会公司

地址 美国肯塔基州

(72) 发明人 D·D·泰勒 C·格塞欧-泰勒

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2005/111211 A2, 2005. 11. 24, 全文.

CN 1753993 A, 2006. 03. 29, 全文.

Hadi Valadi et al.. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between

cells. 《Nature Cell Biology》. 2007, 第 9 卷 (第 6 期), 全文.

Hadi Valadi et al.. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. 《Nature Cell Biology》. 2007, 第 9 卷 (第 6 期), 全文.

Douglas D. Taylor et al.. Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling. 《The Journal of Immunology》. 2006, 第 176 卷 (第 3 期), 1534-1542.

Koga et al.. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. 《Anticancer Research》. 2005, 第 25 卷 (第 6A 期), 3703-3707.

Beth L. Pineles et al.. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. 《American Journal of Obstetrics and Gynecology》. 2007, 第 196 卷 (第 3 期), 261. e1-261. e6.

审查员 胡晓佳

权利要求书2页 说明书44页 附图9页

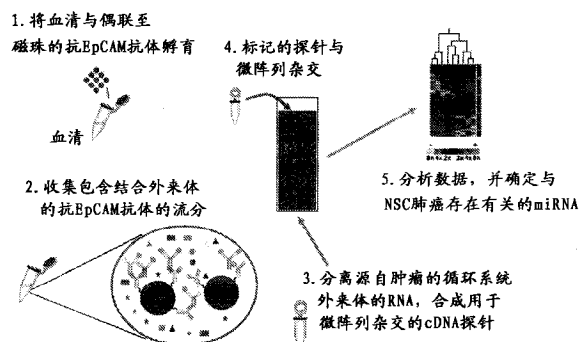
(54) 发明名称

作为诊断标记物的外来体相关微 RNA

(57) 摘要

本申请公开的主题提供了在受试者中诊断癌症或不利妊娠结果的方法, 所述方法是通过测量在从所述受试者的生物样品分离的且源自癌症的外来体中存在的一种或多种微 RNA 的量实施。

外来体微RNA的分离



1. 一种确定源自癌症的外来体中微 RNA 的量的方法,包括确定分离自一个包含外来体的样品的的外来体中的一种或多种微 RNA 的量,其中所述外来体为源自上皮癌的外来体,并且所述外来体通过使用抗上皮细胞粘附分子抗体经免疫吸附捕获与非源自癌症的外来体相分离。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述源自上皮癌的外来体来自选自如下的上皮癌:卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、黑色素瘤和胰腺癌。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述外来体从一个包含分子排阻色谱的过程中分离。

4. 权利要求 3 的方法,其中分离所述外来体进一步包括离心包含所述外来体的色谱流分。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述色谱流分为外水体积流分。

6. 权利要求 1 的方法,其中确定所述一种或多种微 RNA 的量包括标记所述一种或多种微 RNA。

7. 权利要求 1 的方法,其中确定所述一种或多种微 RNA 的量包括以各自选择性结合所述一种或多种微 RNA 的一种或多种多核苷酸探针捕获所述一种或多种微 RNA。

8. 权利要求 1 的方法,其中确定所述一种或多种微 RNA 的量包括使用实时聚合酶链反应,以定量测定所述一种或多种微 RNA 的量。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种微 RNA 为表 2 中列出的一种或多种微 RNA。

10. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种微 RNA 选自 miR-21、miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-203、miR-205 和 miR-214。

11. 权利要求 1 的方法,其中确定所述一种或多种微 RNA 的量包括确定所述外来体中所述微 RNA 的总量。

12. 一种确定源自癌症的外来体中微 RNA 的量的方法,包括确定分离自一系列包含外来体的样品的的外来体中的一种或多种微 RNA 的量,其中所述外来体为源自上皮癌的外来体,并且所述外来体通过使用抗上皮细胞粘附分子抗体经免疫吸附捕获与非源自癌症的外来体相分离。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述源自上皮癌的外来体来自选自如下的上皮癌:卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、黑色素瘤和胰腺癌。

14. 权利要求 12 的方法,其中所述外来体从一个包含分子排阻色谱的过程中分离。

15. 权利要求 14 的方法,其中分离所述外来体进一步包括离心包含所述外来体的色谱流分。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述色谱流分为外水体积流分。

17. 权利要求 12 的方法,其中确定所述一种或多种微 RNA 的量包括标记所述一种或多种微 RNA。

18. 权利要求 12 的方法,其中确定所述一种或多种微 RNA 的量包括以各自选择性结合所述一种或多种微 RNA 的一种或多种多核苷酸探针捕获所述一种或多种微 RNA。

19. 权利要求 12 的方法,其中确定所述一种或多种微 RNA 的量包括使用实时聚合酶链反应,以定量测定所述一种或多种微 RNA 的量。

20. 权利要求 12 的方法,其中所述一种或多种微 RNA 为表 2 中列出的一种或多种微 RNA。

-
21. 权利要求 12 的方法,其中所述一种或多种微 RNA 选自 miR-21、miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-203、miR-205 和 miR-214。
22. 权利要求 12 的方法,其中所述样品为在一段时间内采集的样品。

作为诊断标记物的外来体相关微 RNA

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求以 2007 年 7 月 25 日提交的序列号为 60/951,812 及 2008 年 5 月 5 日提交的序列号为 61/050,438 的美国临时申请为优先权基础,这些申请的全部公开内容通过引用的方式纳入本文。

技术领域

[0003] 本申请公开的主题涉及对癌症和不利妊娠结果诊断和预后的方法。具体而言,本申请公开的主题涉及这样的诊断和预后方法,即这种方法是基于在来自一个受试者的生物样品中确定与癌症或不利妊娠结果相关的一种或多种源自外来体(exosome)的微 RNA(microRNA) 的量。

背景技术

[0004] 对适合于癌症的早期检测和诊断的癌症生物标记物的鉴定为改善受试者的临床结果提供了很大的希望。对于呈现模糊症状或无症状的受试者或者对于具有相对难以进行物理检查的肿瘤的受试者,这一点尤其重要。虽然有很多尝试针对于早期检测,但是仍几乎没有开发出能在早期阶段诊断癌症的可靠且低成本的筛查试验。

[0005] 例如,在全世界女性中,卵巢癌仍是第六大常见癌症,每年造成大约 125,000 例死亡(Sankaranarayanan & Ferlay,2006)。大多数患卵巢癌的女性在晚期被诊断,有 75%被诊断为卵巢外疾病(Berek et al.,2003)。与女性相关的其他癌症相比,73%的子宫内膜癌、55%的乳腺癌和 50%的宫颈癌被诊断为 I 期疾病(Menon & Jacobs,2000)。虽然患 I 期卵巢癌的患者 5 年存活率超过 90%,但仅 21%的晚期卵巢癌患者在初次诊断后存活 5 年(Berek et al.,2003)。由于在过去的几十年中长期存活没有显著地变化,对于进一步提高卵巢癌的存活率的最大希望在于早期诊断(Menon & Jacobs,2000)。

[0006] 现在经核准用于卵巢癌检测的唯一生物标记物是 CA125,并且从 1983 年将它引入后,通过 ELISA 对它定量一直是卵巢癌检测的“黄金标准”。CA125 的评估通常被用于疾病管理中,用于疾病检测以及监测疾病的复发;然而,CA125 的使用被局限于早期阶段的癌症检测(敏感性为 50-60%)。CA125 定量仅被核准用于并且一贯被证实用于减轻的监测。CA125 对于新生(de novo) 卵巢癌检测既不敏感也不特异,这是因为它虽在 > 50%的患 I 期疾病的女性中升高,但它在超过 80%的患晚期卵巢癌的患者中升高。CA125 的特异性很差,这表现为它的升高与良性和恶性的乳房和结肠疾病、腹膜刺激和良性妇科疾病等有关。

[0007] 通过显著简化预分析样品的分离并通过与质谱(MS) 偶联而促进蛋白组学分析的新策略已被引入用于生物标记物发现的研究。表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱(SELDI-TOF-MS) 已受到很多关注,原因是它通过与生物化学不同的蛋白质芯片阵列结合用于解析生物标本中的蛋白质。在一项技术中,通过 ELISA 检查了 4 种血清蛋白质,而另一项技术使用患者血清中的 7 种具体血清组分或总体肽模式的质谱来确定癌症的存在。SELDI-TOF-MS 作谱已被成功地用于从对照区分卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌和肝癌。

[0008] 在区分患卵巢癌的患者与患良性卵巢疾病的患者、健康对照方面,血清的 SELDI-TOF-MS 作谱已表现出显著好于现用的标准血清标记物 CA125。研究已表明,对由 SELDI-TOF-MS 解析的多种蛋白质的结合物进行选择有可能作为一种诊断方法。用于卵巢癌的有效筛选测试需要达到高敏感性和特异性,并且现行用于分辨峰的不同蛋白组学技术以及计算分析工具会生成不同的结果。这些对 SELDI-TOF-MS 作谱探索的初步研究是有希望的,并且该观念在一系列不同背景中是可重复的;然而,将该方法转变成为常规诊断试验仍很困难。

[0009] 据计算,要成为一个有效的筛选试验,一个测试需要达到最低 99.6% 的特异性。为了达到该特异性水平,需要将肿瘤性状的多个组分整合至新的诊断试验中用于有效检测,这是因为卵巢癌以及其他癌症的多因素特性。质谱技术的一个缺点是,一些重要的样品不但在谱测定的结果分析中而且在 MS 中被丰度更大的蛋白质掩盖。通过多种技术的预纯化可除去具体的蛋白质群,所述技术例如高效液相色谱以及通过亲和结合的阳性选择或阴性选择。在大多数现行的质谱方法中的最大困难是动态范围,而不是敏感性。虽然除去高丰度的蛋白质或肽可大大提高从具体样品可获得的信息含量,但是高丰度的蛋白质例如白蛋白可作为诊断重要的蛋白质亚类的载体。在考虑将该平台应用于筛选卵巢癌之前,需要另外的具有更大样本量以及独立、细致的盲法验证的研究,或者应该考虑任何其他的指标。

[0010] 因此,一直需要开发在几乎所有癌症和其他障碍(包括升高的不利妊娠结果的风险)中改良的生物标记物。基于血液的测定仍然是一个有吸引力的目标,这是由于样品采集的可用性和便利。癌症和不利妊娠结果风险升高的早期确诊将有利于对患者更及时和可能更有效的治疗。由此,仍存在尚未满足的对这样的新生物标记物的需求,即该生物标记物单独或与其他生物标记物或诊断方式结合,可提供癌症和不利妊娠结果的早期诊断和预后所需的敏感性和特异性。具体而言,需要在容易获取的生物液体上进行对癌症生物标记物和不利妊娠结果的简单试验。

发明内容

[0011] 发明内容部分列出了本申请公开的主题的数个实施方案,并且在许多情况中列出了这些实施方案的调整方案及变化方案。该发明内容部分纯粹是数目众多不同实施方案的示例。提及一个给定实施方案的一个或多个代表性特征时同样也是示例。这样的实施方案一般可以以具有或不具有所提及的一种或多种特征而存在;同样,这些特征可适用于本申请公开的主题的其他实施方案,而不管其是否在该发明内容部分中列出。为了避免过度重复,该发明内容部分不再列出或显示这些特征的所有可能的组合。

[0012] 在本申请公开的主题的一些实施方案中,提供了一种用于在受试者中诊断癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括:提供来自一个受试者的一个生物样品;从所述生物样品分离源自癌症且包含微 RNA(miRNA) 的外来体;确定一种或多种所述 miRNA 的量;以及将所述一种或多种 miRNA 的量与一种或多种 miRNA 对照的水平比较。如果所述源自癌症的外来体的所述一种或多种 miRNA 的量与所述一种或多种 miRNA 对照的水平相比有可测量的差异,那么所述受试者被诊断为患所述癌症。在一些实施方案中,所述方法进一步包括基于所确定的所述一种或多种 miRNA 的量为所述癌症选择一种疗法或改变一种疗法。

[0013] 在本申请公开的主题的另一些实施方案中,提供了一种用于评估受试者中癌症治

疗效果和 / 或癌症进展的方法。在一些实施方案中,所述方法包括:提供来自一个受试者在一段时间内的一系列生物样品;从所述系列生物样品分离源自癌症且包含 miRNA 的外来体;确定所述系列生物样品的每一个生物样品中一种或多种所述 miRNA 的量;以及确定所述系列生物样品的每一个生物样品中所述一种或多种 miRNA 的任何可测量的量变化,从而在评估受试者中癌症治疗效果和 / 或癌症进展。

[0014] 还在本申请公开的主题的另一些实施方案中,提供了一种用于在受试者中表征癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括:提供来自一个受试者的一个生物样品;从所述生物样品分离源自癌症且包含 miRNA 的外来体;确定一种或多种所述 miRNA 的量;以及将所述一种或多种 miRNA 的量与所述一种或多种 miRNA 对照的水平比较。然后,基于所述源自癌症的外来体的一种或多种 miRNA 的量与所述一种或多种 miRNA 对照的水平相比的可测量差异,表征所述癌症。在一些实施方案中,表征所述癌症包括确定所述癌症的类型、等级和 / 或阶段。而且,在一些实施方案中,确定所述一种或多种 miRNA 的量包括确定源自所述肿瘤的外来体中所述 miRNA 的总量。

[0015] 在这些方法的一些实施方案中,所述癌症为一种选自卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、黑色素瘤和胰腺癌的癌症。

[0016] 而且,在这些方法的一些中,分离所述源自癌症的外来体进一步包括使用分子排除色谱来分离所述源自癌症的外来体。在一些实施方案中,分离所述源自癌症的外来体包括离心包含所述源自癌症的外来体的色谱流分。在一些实施方案中,所述色谱流分可为外水体积流分。

[0017] 而且,还在一些实施方案中,使用一种抗癌症抗原的抗体(例如抗上皮细胞粘附分子(抗 EpCAM) 抗体),通过免疫吸附捕获使非源自癌症的外来体与所述源自癌症的外来体分离开。

[0018] 在这些方法的一些中,确定所述一种或多种 miRNA 的量包括标记所述一种或多种 miRNA,在一些实施方案中,然后以各自选择性结合所述一种或多种 miRNA 的一种或多种多核苷酸探针捕获所述一种或多种 miRNA。在这些方法的其他实施方案中,确定所述一种或多种 miRNA 的量包括使用实时聚合酶链反应,以定量测定所述一种或多种 miRNA 的量。而且,在这些方法的一些实施方案中,所述 miRNA 为表 2 中列出的一种或多种 miRNA,包括例如一种或多种选自 miR-21、miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-203、miR-205 和 miR-214 的 miRNA。

[0019] 还在本申请公开的主题的另一些实施方案中,提供了一种用于在受试者中诊断不利妊娠结果的方法。在一些实施方案中,所述方法包括:提供来自一个受试者的一个生物样品;从所述生物样品分离包含 miRNA 的外来体;确定一种或多种所述 miRNA 的量;以及将所述一种或多种 miRNA 的量与所述一种或多种 miRNA 对照的水平比较。如果来自所述外来体的一种或多种 miRNA 的量与所述一种或多种 miRNA 对照的水平相比有可测量的差异,那么所述受试者被诊断具有所述不利妊娠结果。在一些实施方案中,所述不利妊娠结果为一种选自胎膜早破、先兆子痫、早产、子宫内发育受限和反复妊娠丢失的障碍。

[0020] 在本文公开的一些实施方案中,所述受试者为人。而且,在本文公开的一些实施方案中,所述生物样品包括乳汁、血液、血清、血浆、腹水、囊内液、胸膜液、腹膜液、脑脊液、泪液、尿液、唾液、痰液或它们的结合物。

[0021] 因此,本申请公开的主题的一个目标是利用外来体相关的 miRNA 作为诊断标记物。通过本申请公开的主题完全地或部分地实现了该目标。

[0022] 本领域普通技术人员在研读以下的对本申请公开的主题的说明、附图和非限制性的实施例后,上文已述的本申请公开的主题的目标(可通过本申请公开的主题完全地或部分地实现)、其他目标和优点对于他们来说将是显而易见的。

附图说明

[0023] 图 1 的示意图显示的示例性方法用于:通过色谱分离源自癌症的外来体及来自所述外来体的 miRNA,通过微阵列确定所述 miRNA 的量,以及分析所述数据以确定所测受试者中是否存在癌症。

[0024] 图 2 的示意图显示的示例性方法用于:分离源自癌症的外来体及来自所述外来体的 miRNA,通过实时 PCR 确定所述 miRNA 的量,以及分析所述数据以确定所测受试者中是否存在癌症及癌症的阶段。

[0025] 图 3A 的图表显示了循环系统中源自肿瘤的外来体的水平与卵巢癌的阶段比较。外来体分离自从年龄匹配的女性对照($n = 10$)、年龄匹配的患良性卵巢疾病的女性($n = 10$)和被诊断为卵巢癌的女性(I-IV 期各 $n = 10$)的血清。外来体的水平表示为蛋白质浓度。

[0026] 图 3B 是通过磁珠分离的循环系统外来体的电子显微照片。切超薄切片(65nm),并以乙酸双氧铀(uranyl acetate)和 Reynold 柠檬酸铅染色。用 Jeol 1210 透射电子显微镜检查所述切片。

[0027] 图 4A 的图表显示与来自卵巢癌患者的循环系统 EpCAM- 阳性的外来体相关的小 RNA 的存在。显示了使用 Agilent 2100Bioanalyzer 对从肿瘤外来体分离的 RNA 的代表性分析。

[0028] 图 4B 的照片为来自循环系统外来体和相应肿瘤的总 RNA 的琼脂糖凝胶(1%)分离。这种总 RNA 被用作 miRNA 作谱的起始材料。

[0029] 图 5 的系列图表显示源自晚期卵巢肿瘤(□)或从同样这些患者的血清分离的 EpCAM- 阳性的外来体(■)的具体 miRNA 的强度。已证明 miR-21、miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-203、miR-205 和 miR-214 为上调的卵巢癌标记物。每个棒代表双份样品的平均强度,显示了 4 个代表性患者的结果。

[0030] 图 6 的图表显示了源自从患良性卵巢疾病的患者和患卵巢癌的患者的外周血(2.5mL)分离的 EpCAM- 阳性的外来体的具体 miRNA 的强度。患卵巢癌的患者被区分为 I 期、II 期和 III 期。棒代表每组患者(每组均 $n = 10$)的归一化强度的平均值 ± 标准差。

[0031] 图 7A 和 7B 的图表显示了源自卵巢癌患者血清的具体外来体 miRNA 的比较,分别在取血后立即;在 4℃ 下保存血清 24、48 和 96 小时后(图 7A);或者在 -70℃ 下保存 7-28 天后(图 7B)的比较。使用抗 EpCAM 通过 MACS 分离肿瘤外来体。

[0032] 图 8 的示意图显示的示例性方法用于:分离源自癌症的外来体及来自所述外来体的 miRNA,通过微阵列确定所述 miRNA 的量,以及分析所述数据以确定所测受试者中是否存在癌症。

[0033] 图 9 的系列图表显示源自晚期肺肿瘤(浅灰色)或从同样这些患者的血清分离的

EpCAM- 阳性的外来体（深灰色）的具体 miRNA 的强度。每个棒代表双份样品的平均强度，显示了 4 个代表性患者的结果。

具体实施方式

[0034] 在如下附随的说明中将详细地给出本申请公开的主题的一个或多个实施方案。通过该说明书、附图和权利要求书，本申请公开的主题的其他特征、目标和优点将是显而易见的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献都通过引用的方式全文纳入本文。在出现冲突的情况下，以本说明书（包括定义）为准。

[0035] 除非另外定义，否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有等同于本申请公开的主题所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。尽管任何类似于或等价于本文所述的方法、设备和材料均可用于实施或测试本申请公开的主题，但在此只描述代表性的方法、设备和材料。

[0036] 按照长期形成的专利法惯例，术语“一种”、“一个”和“该”在用于本申请（包括权利要求书）中时是指“一个或多个”。因此，例如提及“一个肽”包括多个这种肽，等等。

[0037] 除非另外指出，否则在本说明书和权利要求书中使用的表示分量、反应条件等的所有数字应被理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。因此，除非相反指出，否则在本说明书和附随的权利要求书中列出的数值参数是可依赖于本申请公开的主题意欲获得的所需性质而变化的近似值。

[0038] 在提及质量、重量、时间、体积、浓度或百分率的值或量的时候，本文使用的术语“约”的意思是涵盖偏离所述指定量如下区间以内的变化范围，即在一些实施方案中为 $\pm 20\%$ ，在一些实施方案中为 $\pm 10\%$ ，在一些实施方案中为 $\pm 5\%$ ，在一些实施方案中为 $\pm 1\%$ ，在一些实施方案中为 $\pm 0.5\%$ ，以及在一些实施方案中为 $\pm 0.1\%$ ，只要这样的变化适合于实施本申请公开的方法。

[0039] 经过过去的 5 年，表达作谱技术已鉴定了新的具有诊断应用的生物标记物。一组这种生物标记物为一类的小非编码 RNA，被称作微 RNA (miRNA) (Iorio et al. 2007 ;De Cecco et al., 2004 ;Calin & Croce, 2006)。通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区结合，微 RNA——小（长度 22-25 个核苷酸）非编码 RNA——可抑制它们的翻译 (Esquela-Kerscher & Slack, 2006 ;Bartel, 2004)。通过切割同源的 mRNA 或者通过特异性抑制蛋白质合成，可发生 miRNA 对靶基因的转录后沉默。

[0040] 通过 miRNA 作谱分析的所有肿瘤与来自相同组织的正常细胞相比都表现出了显著不同的 miRNA 标志 (Iorio et al. 2007 ;Calin & Croce, 2006a ;Calin & Croce, 2006b)。Lu et al. (2005) 进行了白血病和实体癌的分析，并且确定了 miRNA 表达谱可通过发展谱系和分化状态对人癌症分类。个体 miRNA 和特定 miRNA 标志的表达已与许多的人癌症的诊断和预后联系起来。

[0041] Iorio et al. (2007) 使用组织标本证明了，与正常卵巢相比，特定 miRNA 在卵巢癌中是异常表达的，最显著地过量表达的有 miR-141、miR-200a、miR-200b 和 miR-200c。他们进一步证明了，在卵巢肿瘤中的低甲基化导致了与正常卵巢相比 miR-21、miR-203 和 miR-205 的上调。这些上调 miRNA 中的两个——miR-200a 和 miR-200c——在所有这三种检查的组织类型（浆液细胞、子宫内膜样细胞和透明细胞）中都升高，而 miR-200b 和 miR-141

在子宫内膜样和浆液组织类型中都上调。通常,将卵巢癌的不同组织类型(浆液细胞、子宫内膜样细胞、透明细胞和它们的混合物)与所述正常组织比较获得的 miRNA 标志在大多数情况下是重叠的。他们对卵巢肿瘤的分析还证明了不存在与肿瘤阶段或等级相关的差异表达 miRNA,这可能是由于他们的样品集主要源自晚期肿瘤的原因。

[0042] 在最显著上调的 miRNA 中,miR-200a 和 miR-141 属于相同的家族,miR-200b 位于染色体 1p36.33,与 miR-200a 在同一区域;miR-200c 位于染色体 12p13.31,与 miR-141 在同一区域(Iorio et al. (2007))。这种关联与 Zhang 等人(2006)的结果相符,后者提出特定 miRNA 的上调可能是所述 miRNA 基因的扩增。使用基于高分辨率阵列的比较基因组杂交,异常高比例的包含 miRNA 基因的位点呈现 DNA 拷贝数的改变。在卵巢癌中,37.1%的包含 miRNA 基因的基因组位点与 DNA 拷贝数的改变有关(Zhang et al., 2006)。在乳腺癌和黑色素瘤中,甚至更大比例的这些位点呈现出改变的 DNA 拷贝数变化(分别 72.8%和 85.9%)(Zhang et al., 2006)。结果是,miRNA 表达模式或标志似乎比 mRNA 表达模式更能表征肿瘤发生的源,并且可关联于诊断、确定阶段、进展、预后和对疗法的响应。然而,在本申请公开的主题之前,对 miRNA 标志的分析作为癌症的诊断工具局限在活组织检查。

[0043] 最近描述的癌细胞的特征是它们释放或脱落质膜的完整小泡部分(在本文中称为“外来体”,并且在现有技术中也被称作膜碎片、膜小泡或微泡)的能力。本文公开的数据首次意外地鉴定出了与起源自癌细胞的外来体(即“源自癌症的外来体”)相关的 miRNA。本申请公开的主题进一步首次公开了,从源自癌症的外来体分离的 miRNA 在患有癌症的受试者中呈现的表达水平不同于(例如升高或降低)在无癌症的受试者中测量的 miRNA 表达水平(本文中被称作“miRNA 对照水平”)。而且,本申请公开的主题提供了从容易获得的测试受试者的生物液体对源自癌症的外来体的分离。由此,本申请公开的主题第一次提供了这样的癌症诊断和预后的方法,即这种方法基于采集并测量来自容易获取的生物样品的且源自癌症的外来体 miRNA 水平,无需直接对癌细胞取样。

[0044] “外来体”是从各种不同细胞包括从癌细胞分泌的微泡(即“源自癌症的外来体”)。这些小泡(直径 50-100nm)源自大的多泡内体,并被分泌至细胞外环境中。外来体释放/脱落的确切机制仍不清楚;然而,这种释放是需要能量的现象,受细胞外信号的调节。它们的形成似乎是通过内陷及从晚期内体的限制膜芽出,形成包含胞质溶胶并且在其表面暴露膜结合的细胞蛋白质的细胞外域的小泡。使用电子显微镜的研究已显示多泡内体与质膜的融合谱,引起内部小泡向细胞外环境的分泌。外来体释放的速率在大多数新生物细胞中显著增大,并持续地发生。外来体释放的增加和它们的聚积似乎在恶性转化过程中是重要的。除了癌细胞之外,外来体的释放也被证明与胚胎源(例如胎盘)的细胞和激活的淋巴样细胞有关。

[0045] 虽然在特定生理条件下,外来体的细胞外脱落也出现于其他类型的细胞中,但来自非新生物细胞的外来体的聚积很少在体内观察到。相反,由肿瘤细胞释放的外来体会在生物液体中聚积,所述生物液体包括血浆液、腹水和胸膜液。外来体的释放及其聚积似乎是恶性转化的重要特征。脱落的源自癌症的外来体不反映原始肿瘤细胞的质膜一般组成,而代表具有增强的肿瘤抗原表达的“微地图”。

[0046] 外来体的释放似乎是细胞通讯的一个重要特征。由于释放的外来体表达具有生物活性的分子(例如 Fas 配体、PD-1、MICA/B、mdr1、MMP、CD44 和自身反应性抗原),已在多个

模型中分析了这些微泡调节淋巴细胞和单核细胞功能的能力。已建立了这样的理论,即这些释放的外来体通过模拟“激活诱导的细胞死亡”(AICD)调节淋巴细胞的功能。淋巴样细胞似乎在激活后分泌外来体,并且这些淋巴样细胞似乎通过防止过度的免疫应答和自身免疫的形成在免疫调节中起到重要作用。已有这样的假说,即肿瘤细胞的外来体释放是胎细胞外来体的再表达并且二者组成通路,以绕过免疫监视。

[0047] 微RNA是天然存在的小非编码RNA,其生物活性形式的长度为约17-约25个核苷酸碱基(nt)。通过抑制靶mRNA翻译,miRNA在转录后调节基因表达。miRNA被认为作为负调节因子发挥作用,即更大量的特异性miRNA与较低水平的靶基因表达相关。

[0048] 体内存在3种类型的miRNA:原始miRNA(pri-miRNA)、成熟前miRNA(pre-miRNA)和成熟miRNA。原始miRNA(pri-miRNA)被表达为约数百碱基至1kb以上的茎环结构的转录物。该转录物pri-miRNA在核内被称为Drosha的RNase II内切核酸酶切割,该酶切割在茎环基部附近的茎的两条链。Drosha将RNA双链体切割为交错切口,余出一个5'磷酸和3'端的2nt突出。所述切割产物——成熟前miRNA(pre-miRNA)——长约60-约110nt,具有一个以折回方式形成的发夹结构。Pre-miRNA被Ran-GTP和Exportin-5从核转运到细胞质。Pre-miRNA在细胞质中被另一种叫作Dicer的RNase II内切核酸酶进一步加工。Dicer可识别5'磷酸和3'突出,并且在茎环交汇处将环切离,以形成miRNA双链体。该miRNA双链体与RNA诱导的沉默复合体(RISC)结合,在此反义链优先被降解,并且有义链的成熟miRNA,将RISC指导至其靶点。成熟miRNA是miRNA的生物活性形式,长度约17-约25nt。

[0049] 微RNA通过与其靶基因信使(mRNA)的特异性序列进行碱基配对(完全匹配或不完全匹配)发挥作用。该miRNA降解所述mRNA或抑制所述mRNA的翻译,引起所述靶基因的表达在转录后的下调、抑制或沉默。在动物中,miRNA不必与它们的靶点完全同源,并且部分同源可导致翻译的抑制,而在植物中的情况是miRNA倾向于表现出与靶点完全同源,降解信使(mRNA)的情况比较普遍。

[0050] 微RNA广泛分布于基因组中,控制基因调节并积极地参与至多种生理或病理过程中。例如,某些miRNA的调节形式是控制细胞增殖、分化和凋亡;并且异常miRNA谱与肿瘤发生有关。另外,已表明,病毒感染可引起靶向沉默“原始细胞(pro-cell)存活”基因的miRNA的升高以及抑制与凋亡(程序性细胞死亡)有关基因的miRNA的降低,从而使得向增大凋亡信号传递方向倾斜。

[0051] 数千种mRNA处于迄今为止鉴定的数百miRNA种类的这种选择压力下。这种选择过程的作用是消弱例如可能不再被需要来使细胞将其生理程序导向新的基因表达通路的特定组的基因表达。对靶组的miRNA依赖性基因表达消弱是使细胞离开原来的程序并转换成新的程序的一种强大且快速的调节。这一点的典型示例在胚胎发育过程中被证明,在该过程中一组具体的细胞被定向形成独特的专门细胞类型,例如神经元、心肌细胞、肌肉等。

[0052] 人们认为大概有三分之一的人基因的表达水平受miRNA调节,并且独特的基因表达的miRNA调节与每种具体细胞类型的特异性信号传递通路有联系。例如,凋亡信号传递通路可受这样的一组miRNA控制,即该组miRNA靶向以使促存活基因信使去稳定,使得备用的促凋亡基因处于优势地位并因此激活死亡程序。另一个实例是对癌症生长的控制;最近的发现已表明,miRNA在防止细胞变成新生物中也是必要的。例如,两个癌基因——cMyc

和 cRas——也被发现受一类 miRNA 的控制,该 miRNA 的表达在癌症中是下调的。换言之,该 miRNA 的缺乏使得 cMyc 和 cRas 的表达不受控制,从而使这两个基因变得在癌细胞中大量存在,使得癌细胞获得不受控制的细胞增殖能力,并起始新生物生长的阶段。另外,已报道,miRNA 突变是起源于比利时的绵羊中的肌肉发达表型的原因,这表明与遗传障碍相关的突变可出现于 miRNA 中,而在启动子区、编码区域和剪接位点中没有出现突变迹象。

[0053] 多个通路的协调作用有可能用于控制具体的细胞状态,其中可能涉及某些分子“核心”,它们通过分级的顺序和众多的分子控制发挥功能。事实上,数十种 miRNA 可通过只抑制它们自身或它们的功能相反物的表达起作用,以确保这些“核心”在细胞中可行使主要功能或次要功能。因此,一个基因产物在一个细胞类型中可作为一个信号传递通路的主要“核心”发挥作用,并且在另一个细胞类型中,它可以为次要“核心”或者可根本不被使用。然后,微 RNA 对“核心”基因表达的控制可为一种方便的机制以对多种分子提供这种多能性,以将所述多种分子用作不同类型的细胞作用形式的主要“核心”或次要“核心”或者根本不作为“核心”。

[0054] 鉴于 miRNA 在基因调节以及在许多生理和病理过程中的作用,需要获得有关它们的相互作用模型和它们的表达模式的信息。定量和鉴定哪些组的推定 miRNA 在一种具体的细胞类型中起作用或者与目标具体过程或病症有关的系统或方法可提供这样的信息,即这些信息可用于理解每种细胞状态怎样发展和维持,以及怎样通过以下方式刺激功能障碍的维持:不适宜地降低或增加独特组的 miRNA 以调节关键基因的表达。这些理解在多种障碍(包括癌症和不利妊娠结果)的诊断和表征中被证明是有用的。

[0055] 作为潜在的临床诊断工具,已表明 miRNA 对许多但非全部癌症是重要且精确的决定因素。越来越多的证据显示 miRNA 基因的表达在人癌症中是不受调控的。miRNA 的表达是高度组织和发展阶段特异的,并且最近已用于肿瘤的分子分类。迄今为止,所有通过 miRNA 作谱分析的肿瘤已显示出与来自同一组织的正常细胞显著不同的 miRNA 谱。流式细胞术 miRNA 作谱证明,miRNA 表达谱可依照肿瘤的发育谱系和分化状态将人癌症分类。具体的过量表达和表达量过低已显示与具体的肿瘤类型有关。微 RNA 过量表达可引起肿瘤抑制基因的下调,而它们的表达量过低可导致癌基因上调。使用大规模微阵列分析,癌细胞显示了不同于正常细胞的 miRNA 谱,与正常细胞相比,在癌细胞中 228 种 miRNA 基因的 36 种过量表达,21 种下调。层次聚类分析显示,该 miRNA 标志能够使得肿瘤样品以它们的组织来源为基础分组。基因组水平的作谱研究已在多种癌症类型上进行,包括 CLL、乳腺癌、胶质母细胞瘤、甲状腺乳头状癌、肝细胞癌、卵巢癌、结肠癌和内分泌腺肿瘤。在对 104 匹配对的原发癌和非癌卵巢组织的研究中,出现了 43 种差异表达的 miRNA;在肿瘤中 28 种被下调,15 种过量表达。

[0056] 以两种不同方法获得的微阵列数据的统计分析,来自 6 种实体瘤(卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、前列腺癌和内分泌腺肿瘤)的微阵列的显著性分析(SAM)和微阵列的预测分析(PAM)表明了一种这样的共同标志,即该标志由在至少三个肿瘤类型中差异表达的 21 种 miRNA 组成。处于该列表顶部是 miR-21 以及 miR-17-5p 和 miR-191,前一种在 6 种类型的癌细胞中过量表达,后两种在 5 种中过量表达。由于所分析肿瘤的胚胎源是不同的,这些结果的重要意义可能在于这些共同 miRNA 参与在许多类型的肿瘤中改变的基本信号传递通路。以下的发现支持了这些基因在肿瘤发生中的功能,该发现即对所述差异表

达的 miRNA 的推定靶显著地集中在那些靶向已知的肿瘤抑制基因和癌基因的基因。再者, miR-21——在所有 6 种类型的癌症中唯一过量表达的 miRNA 发现直接靶向肿瘤抑制基因 PTEN, 该基因编码一种抑制生长和 / 或存活通路的磷酸酶。PTEN 的功能在多种类型的晚期肿瘤 (包括乳腺癌、卵巢癌、胃癌和前列腺癌) 中有变化。

[0057] 在本申请公开的主题的一些实施方案中, 提供了一种用于在受试者中诊断癌症的方法。在一些实施方案中, 所述方法包括: 提供来自一个受试者的一个生物样品; 从所述生物样品分离源自癌症且包含 miRNA 的外来体; 确定一种或多种所述 miRNA 的量; 以及将所述一种或多种 miRNA 的量与一种或多种 miRNA 对照的水平比较。如果所述样品中所述源自癌症的外来体的一种或多种 miRNA 的量与所述一种或多种 miRNA 对照的水平相比有可测量的差异, 那么所述受试者被诊断为患所述癌症。可测量的示例性 miRNA 的非限制性列表在表 1 和 2 中提供。在一些实施方案中, 所测量的 miRNA 选自表 2 中列出的 miRNA, 并且在一些具体的实施方案中, 所测量的 miRNA 选自 miR-21、miR-141、miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-203、miR-205 和 miR-214。

[0058] 本文使用的术语“癌症”是指动物中出现的所有类型的癌症、新生物或恶性肿瘤, 包括白血病、癌 (carcinoma) 和肉瘤。癌症的实例有脑癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌和子宫癌。

[0059] “白血病”广义上包括造血器官的进行性恶性疾病, 其特征通常在于血液和骨髓中的白细胞及其前体异常的增殖及发育。白血病包括, 例如急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性早幼粒细胞性白血病、成人 T 细胞性白血病、非白血性白血病 (aleukemic leukemia)、非白血球性白血病 (aleukocytic leukemia)、嗜碱性白血病 (basophilic leukemia)、母细胞性白血病、牛白血病、慢性髓细胞性白血病、皮肤白血病、胚胎白血病 (embryonal leukemia)、嗜酸性白血病 (eosinophilic leukemia)、格罗斯白血病 (Gross' leukemia)、毛细胞性白血病、成血性白血病 (hemoblastic leukemia)、成血细胞性白血病 (hemocytoblastic leukemia)、组织细胞性白血病、干细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞减少性白血病、淋巴白血病 (lymphatic leukemia)、成淋巴细胞性白血病 (lymphoblastic leukemia)、淋巴细胞性白血病、成淋巴性白血病 (lymphogenous leukemia)、淋巴样白血病 (lymphoid leukemia)、淋巴肉瘤细胞性白血病、肥大细胞性白血病、巨核细胞性白血病、小成髓细胞性白血病、单核细胞性白血病、成髓性白血病 (myeloblastic leukemia)、髓细胞性白血病、髓样粒细胞性白血病 (myeloid granulocytic leukemia)、髓单核细胞性白血病 (myelomonocytic leukemia)、Naegeli 白血病、浆细胞性白血病 (plasma cell leukemia)、浆细胞性白血病 (plasmacytic leukemia)、早幼粒细胞性白血病、李德尔细胞性白血病 (Rieder cell leukemia)、希林氏白血病 (Schilling' s leukemia)、干细胞性白血病、亚白血性白血病和未分化细胞性白血病。

[0060] 术语“癌”是指由倾向于浸润周围组织并发生转移的上皮细胞组成的恶性新生物。示例性的癌包括, 例如腺泡癌 (acinar carcinoma)、腺泡癌 (acinous carcinoma)、腺囊性癌 (adenocystic carcinoma)、腺样囊性癌 (adenoid cystic carcinoma)、腺癌 (carcinoma adenomatousum)、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌

(basal cellcarcinoma)、基底细胞癌 (carcinoma basocellulare)、基底细胞样癌 (basaloid carcinoma)、基底鳞状细胞癌 (basosquamous cellcarcinoma)、细支气管肺泡癌 (bronchioalveolar carcinoma)、支气管癌 (bronchiolar carcinoma)、支气管源性癌 (bronchogenic carcinoma)、脑样癌 (cerebriform carcinoma)、肝内胆管细胞癌 (cholangiocellularcarcinoma)、绒毛膜癌 (chorionic carcinoma)、胶样癌 (colloidcarcinoma)、粉刺癌 (comedo carcinoma)、子宫体癌 (corpuscarcinoma)、筛状癌 (cribriform carcinoma)、胸廓癌 (carcinoma encuirasse)、皮肤癌 (carcinoma cutaneum)、柱状细胞癌 (cylindricalcarcinoma)、柱状细胞癌 (cylindrical cell carcinoma)、导管癌、硬癌 (carcinoma durum)、胚胎性癌 (embryonal carcinoma)、髓样癌 (encephaloid carcinoma)、epiennoid 癌 (epiennoid carcinoma)、腺样上皮癌 (carcinoma epitheliale adenoides)、外植癌 (exophyticcarcinoma)、溃疡性癌 (carcinoma ex ulcere)、硬癌 (carcinomafibrosum)、胶状癌 (gelatiniform carcinoma)、胶样癌 (gelatinouscarcinoma)、巨大细胞癌 (giant cell carcinoma)、巨细胞癌 (carcinomagigantocellulare)、腺癌 (glandular carcinoma)、颗粒细胞癌、毛母质癌 (hair-matrix carcinoma)、多血癌 (hematoid carcinoma)、肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma)、大嗜酸细胞癌 (Hurthle cell carcinoma)、透明质癌 (hyaline carcinoma)、hypemephroid 癌 (hypemephroidcarcinoma)、幼稚型胚胎性癌 (infantile embryonal carcinoma)、原位癌、表皮内癌 (intraepidermal carcinoma)、上皮内癌 (intraepithelialcarcinoma)、克龙派切尔癌 (Krompecher ' s carcinoma)、Kulchitzky 细胞癌 (Kulchitzky-cell carcinoma)、大细胞癌 (large-cell carcinoma)、豆状癌 (lenticular carcinoma)、脂瘤癌 (lipomatous carcinoma)、淋巴上皮癌 (lymphoepithelial carcinoma)、髓样癌 (carcinoma medullare)、髓样癌 (medullary carcinoma)、黑色素癌 (melanotic carcinoma)、软癌 (carcinoma molle)、粘液癌 (mucinous carcinoma)、粘液癌 (carcinomamuciparum)、粘液细胞癌 (carcinoma mucocellulare)、粘液表皮样癌 (mucoepidermoid carcinoma)、粘液癌 (carcinoma mucosum)、粘液癌 (mucous carcinoma)、粘液瘤样癌 (carcinoma myxomatodes)、鼻咽癌 (naspharyngeal carcinoma)、燕麦细胞癌 (oat cell carcinoma)、骨化性癌 (carcinoma ossificans)、类骨质癌 (osteoid carcinoma)、乳头状癌 (papillary carcinoma)、门脉周癌 (periportal carcinoma)、原位癌 (preinvasive carcinoma)、棘细胞癌 (prickle cell carcinoma)、软糊状癌 (pultaceous carcinoma)、肾的肾细胞癌 (renal cell carcinoma ofkidney)、储备细胞癌 (reserve cell carcinoma)、肉瘤样癌 (carcinomasarcomatodes)、施奈德癌 (schneiderian carcinoma)、硬癌 (scirrhouscarcinoma)、阴囊癌 (carcinoma scroti)、印戒细胞癌 (signet-ring cellcarcinoma)、单纯癌 (carcinoma simplex)、小细胞癌 (small-cellcarcinoma)、硬癌 (solanoid carcinoma)、球状细胞癌 (spheroidal cellcarcinoma)、梭形细胞癌 (spindle cell carcinoma)、髓样癌 (carcinomaspongiosum)、鳞癌 (squamous carcinoma)、鳞状细胞癌 (squamous cellcarcinoma)、绳捆癌 (string carcinoma)、血管扩张性癌 (carcinomatelangiectaticum)、血管扩张性癌 (carcinoma telangiectodes)、移行细胞癌 (transitional cell carcinoma)、结节性皮癌 (carcinoma tuberosum)、结节性

皮癌 (tuberous carcinoma)、疣状癌 (verrucous carcinoma) 和绒毛状癌 (carcinoma villosum)。

[0061] 术语“肉瘤”通常是指这样的肿瘤,即这种肿瘤由胚胎结缔组织之类的物质构成,并且通常由镶嵌于纤维物质或同质物质中紧密压实的细胞组成。肉瘤包括,例如软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、Abemethy 肉瘤 (Abemethy' s sarcoma)、脂肪肉瘤 (adipose sarcoma)、脂肪肉瘤 (liposarcoma)、腺泡状软组织肉瘤 (alveolar soft part sarcoma)、成釉细胞肉瘤、葡萄状肉瘤 (botryoid sarcoma)、绿色瘤肉瘤、绒毛膜癌、胚胎性肉瘤 (embryonal sarcoma)、Wilms 肿瘤肉瘤 (Wilms' tumor sarcoma)、子宫内膜肉瘤 (endometrial sarcoma)、间质肉瘤 (stromal sarcoma)、尤因肉瘤 (Ewing' s sarcoma)、筋膜肉瘤 (fascial sarcoma)、纤维母细胞肉瘤 (fibroblastic sarcoma)、巨细胞肉瘤 (giant cell sarcoma)、粒细胞肉瘤 (granulocytic sarcoma)、霍奇金肉瘤 (Hodgkin' s sarcoma)、特发性多发性色素沉着出血性肉瘤 (idiopathic multiple pigmented hemorrhagic sarcoma)、B 细胞免疫母细胞肉瘤 (immunoblastic sarcoma of B cells)、淋巴瘤、T 细胞免疫母细胞肉瘤 (immunoblastic sarcoma of T-cells)、詹森肉瘤 (Jensen' s sarcoma)、卡波西肉瘤 (Kaposi' s sarcoma)、肝巨噬细胞肉瘤 (Kupffer cells sarcoma)、血管肉瘤 (angiosarcoma)、白血病性肉瘤 (leukosarcoma)、恶性间叶肉瘤 (malignant mesenchymoma sarcoma)、骨膜外肉瘤 (parosteal sarcoma)、网织红细胞肉瘤 (reticulocytic sarcoma)、劳斯肉瘤 (Rous sarcoma)、浆液囊性肉瘤 (serocystic sarcoma)、滑膜肉瘤和毛细血管扩张性肉瘤 (telangiectatic sarcoma)。

[0062] 术语“黑色素瘤”用以指一种起源于皮肤和其他器官的黑色素细胞体系的肿瘤。黑色素瘤包括,例如肢端雀斑样痣黑色素瘤 (acral-lentiginous melanoma)、无黑色素性黑色素瘤 (amelanotic melanoma)、良性幼年黑色素瘤 (benign juvenile melanoma)、克劳德曼黑色素瘤 (Cloudman' s melanoma)、S91 黑色素瘤、哈-帕二氏黑色素瘤 (Harding-Passey melanoma)、幼年黑色素瘤 (juvenile melanoma)、恶性雀斑样痣黑色素瘤 (lentigo maligna melanoma)、恶性黑色素瘤 (malignant melanoma)、结节性黑色素瘤 (nodular melanoma)、甲下黑色素瘤 (subungal melanoma) 和浅表扩散性黑色素瘤 (superficial spreading melanoma)。

[0063] 在一些具体实施方案中,所述癌症选自卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、子宫内膜癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、黑色素瘤和胰腺癌。

[0064] 本文使用的术语“生物样品”是指这样的样品,即该样品包括生物分子并且 / 或者源自于一个受试者。代表性的生物分子包括但不限于总 DNA、RNA、miRNA、mRNA 和多肽。所述生物样品可用于检测与源自癌症的外来体有关的目标 miRNA 的存在及 / 或表达水平。任何细胞、细胞群、细胞碎片或细胞产物均可与本申请要求的主题的方法一块使用,但最适宜的是被预测包含与正常对照相比呈现 miRNA 差异表达的且源自癌症的外来体的生物液体和器官。在一些实施方案中,所述生物样品为相对容易获得的生物样品,例如血液或其组分。在一些实施方案中,所述生物样品包括乳汁、血液、血清、血浆、腹水、囊内液、胸膜液、腹膜液、脑脊液、泪液、尿液、唾液、痰液或它们的结合物。

[0065] 在一些实施方案中,分子排阻色谱可用于分离所述源自癌症的外来体。见例如图

1 和 2。分子排阻色谱技术是现有技术中公知的。示例性的非限制性技术在本发明的实施例中提供。在一些实施方案中,分离了外水体积流分并且该流分包含目标外来体。而且,在一些实施方案中,在通过(对一个或多个色谱流分的)离心技术的色谱分离后可进一步分离所述源自癌症的外来体,这是本领域中公知的。在一些实施方案中,例如,密度梯度离心可用于进一步分离所述外来体。而且,在一些实施方案中,需要进一步从其他来源的外来体进一步分离所述源自癌症的分离的外来体。例如,通过使用抗肿瘤抗原的抗体的免疫吸附捕获,可使非源自癌症的外来体与所述源自癌症的外来体分离开。见,例如图 8。示例性抗癌癌症抗原的抗体包括但不限于抗上皮细胞粘附分子(抗 EpCAM)抗体,例如本发明的实施例中列对这种抗体的利用。

[0066] 本文使用的术语“进行诊断”和“诊断”是这样的方法,即本领域技术人员通过这些方法可估计乃至确定一个受试者是否患有的一种给定的疾病或病症。本领域技术人员经常以一种或多种诊断指示物为基础进行诊断,所述指示物例如一种生物标记物(例如一种 miRNA 的表达水平),其量(包括存在或不存在)可指示所述病症的存在、严重性或不存在。

[0067] 除了诊断,临床癌症的预后也是一个很受关注和注意的方面。为了设计最有效的治疗,知晓癌细胞的侵袭力及肿瘤复发的可能性很重要。例如,一些癌症可被多种候选策略处理。在一些情况下使用局部及全身放射疗法,而在其他情况下应用外科介入和/或化学疗法。现行对个体癌症受试者的疗法决策可基于(1)疾病涉及的淋巴结的数目、(2)一种或多种癌症标记物的状态、(3)原发肿瘤的大小和(4)被诊断疾病的阶段。然而,即使有这些要素,对所有癌症受试者的疾病过程的准确预测仍是不可能的。如果可进行更加准确的预后,那么就可以为患者选择合适的治疗,以及在某些情况下更缓和的治疗。可将本文公开的源自癌症的外来体 miRNA 水平的测量基于以下目的使用,即依照癌症的进展将受益于具体疗法的患者分类并将他们与可能更适合其他或另外疗法的其他受试者相区分。由此,在本申请公开的主题的一些实施方案中,提供了一种用于在受试者中表征癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括:提供来自一个受试者的一个生物样品;从所述生物样品分离源自癌症且包含微 RNA(miRNA)的外来体;确定一种或多种所述 miRNA 的量;以及将所述一种或多种 miRNA 的量与一种或多种 miRNA 对照的水平比较。在这种实施方案中,基于所述源自癌症的外来体的一种或多种 miRNA 的量与所述一种或多种 miRNA 对照的水平相比的可测量差异,表征所述癌症。在一些实施方案中,表征所述癌症包括,确定所述癌症的类型、等级和/或阶段。

[0068] 本文使用的“进行诊断”或“诊断”还包括,基于对源自癌症的外来体的诊断性 miRNA 水平的测量确定预后(这可提供对进行或未进行医学治疗的临床结果的预测)、对合适疗法的选择(或疗法是否有效)或者对现行疗法的监测及可能的疗法改变。而且,在本申请公开的主题的一些实施方案中,可以随时间多次测定一种或多种 miRNA 的量以有利于癌症的诊断(包括预后)、治疗效果评估和/或进展。一种或多种源自癌症的外来体的 miRNA 水平(即生物样品中的 miRNA 量)的时间性变化可用于预测临床结果、监测癌症的进展和/或所提供的癌症治疗的效果。在一个这样的实施方案中,例如,人们可能会观察到生物样品中具体 miRNA 的量在治疗的过程中会随时间减少,从而表明疗法的有效性。

[0069] 在本申请公开的主题的另一些实施方案中,进一步提供了一种用于评估受试者中癌症治疗效果和/或癌症进展的方法。在一些实施方案中,所述方法包括:提供来自一个受

试者在一段时间内的一系列生物样品；从所述系列生物样品分离源自癌症且包含 miRNA 的外来体；确定所述系列生物样品的每一个生物样品中一种或多种所述 miRNA 的量；以及确定所述系列生物样品的每一个生物样品中所述一种或多种 miRNA 的任何可测量的量变化，从而评估所述受试者中癌症治疗效果和 / 或癌症进展。测量的 miRNA 在所述时间段上量的任何变化可用于预测临床结果、确定是否起始或继续对所述癌症的疗法及现行的疗法是否有效地治疗所述癌症。例如，可以在疗法起始之前选择一个第一时间点，并且在该疗法起始后的某个时间点选择一个第二时间点。可以测量取自不同时间点的每个样品中的 miRNA 水平，并记录定性和 / 或定量差异。来自所述第一份和第二份样品的一种或多种所述测量的 miRNA 水平的量变化可与所述受试者中的预后、治疗效果确定和 / 或疾病进展相关联。

[0070] 本文使用的术语“相关的”和“相关联”在言及癌症相关的诊断性和预后性 miRNA 水平的用途时是指，将受试者中所述 miRNA 水平的存在或量与其在以下的受试者中的存在或量进行对比：已知患一种癌症的受试者，或者已知未患所述癌症的受试者即“正常受试者”或“对照受试者”。例如，可以将生物样品中一种或多种 miRNA 水平与已被试验并确定与一种癌症相关的每种具体 miRNA 的 miRNA 水平进行对比。所述样品的一种或多种 miRNA 水平被认为已与一种诊断有关；即本领域技术人员可使用所述一种或多种 miRNA 水平来确定所述受试者是否患有所述癌症，并作出相应处理。或者，可将所述样品的一种或多种 miRNA 水平与已知与良好结果（如无癌症）相关的一种或多种对照 miRNA 水平（例如正常受试群中存在的平均水平）进行比较。

[0071] 在某些实施方案中，诊断性或预后性 miRNA 水平仅通过其存在与否与一种癌症相关联。在其他实施方案中，可确立一种诊断性或预后性 miRNA 水平的阈值水平，并可只将受试者样品中的所述 miRNA 水平与该阈值水平进行比较。

[0072] 如所述的，在一些实施方案中，可多次进行一种或多种诊断性或预后性 miRNA 水平的测定，所述水平的时间性变化可用于确定诊断或预后。例如，一种或多种具体 miRNA 水平可在初始时间被测定，并在第二时间再次被测定。在这样的实施方案中，所述一种或多种 miRNA 水平从初始时间至第二时间内的增加是一种癌症的诊断指标，或者是一种给定的预后指标。同样，所述一种或多种 miRNA 水平从初始时间至第二时间内的降低是所述癌症的指示，或者一种给定的预后指示。再者，可以将一种或多种 miRNA 水平的变化程度与所述癌症的严重度和 / 或疾病进展的时间线和未来的不良事件相关联。

[0073] 本领域技术人员应理解，虽然在某些实施方案中可以在多个时间点进行相同的一种或多种 miRNA 水平的比较测量，但是也可以在一个时间点测量给定的一种或多种 miRNA 水平并在另一时间点测量另外的一种或多种 miRNA 水平，对这些水平的比较可提供诊断信息。

[0074] 本文使用的短语“确定预后”是指这样的方法，即本领域技术人员通过该方法可预测受试者中一种病症的过程或结果。术语“预后”不是指基于一种生物标记物的存在、不存在或水平以 100% 的准确性预测一种病症的过程或结果的能力，甚至也不是指基于一种生物标记物的存在、不存在或水平预测一种给定过程或结果更可能发生或更不可能发生的能力。相反，本领域技术人员应理解，术语“预后”是指某一过程或结果出现的可能性增加；即当与没有呈现一种给定病症的那些个体相比时，一种过程或结果更可能出现在呈现该病症的受试者中。例如，在不呈现该病症（例如不表达或者以降低的水平表达所述一种或多种

miRNA 水平)的个体中,给定结果(例如患一种癌症)出现的可能性可以很低(如 $<1\%$)甚或没有。相反,在呈现该病症(例如表达或以大大高于对照的水平表达所述一种或多种 miRNA 水平)的个体中,给定结果(例如患一种形式/阶段的癌症)出现的可能性可以较高。在某些实施方案中,预后是有约 5%的可能性、约 7%的可能性、约 10%的可能性、约 12%的可能性、约 15%的可能性、约 20%的可能性、约 25%的可能性、约 30%的可能性、约 40%的可能性、约 50%的可能性、约 60%的可能性、约 75%的可能性、约 90%的可能性或约 95%的可能性出现一种给定预期结果。

[0075] 本领域技术人员应理解,将预后指示物与产生不良结果的倾向进行关联是一项统计分析。例如,在一些实施方案中,高于或低于对照水平的一种或多种 miRNA 水平(例如一个样品中的一种或多种 miRNA 的量)可预兆受试者比具有低于或等于所述对照水平的受试者更有可能患一种癌症,这由统计显著性水平来确定。另外,一种或多种 miRNA 水平相对于基线水平的变化可以反映出受试者的预后情况,并且标记物水平变化的程度可以与不良事件的严重度相关联。统计显著性经常通过以下方式确定,即比较两个或多个群并确定置信区间及/或 p 值。例如,见 Dowdy and Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, New York, 1983, 该参考文献通过引用的方式全文纳入本文。本发明主题的示例性置信区间为 90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.9% 和 99.99%, 而示例性 p 值为 0.1、0.05、0.025、0.02、0.01、0.005、0.001 和 0.0001。

[0076] 在其他实施方案中,可确立一种或多种预后性和诊断性 miRNA 水平的水平变化阈值度,并可只将生物样品中的该指示物的水平变化度与该水平变化阈值度进行比较。本申请公开的主题的一种或多种 miRNA 水平的水平变化阈值优选为约 5%、约 10%、约 15%、约 20%、约 25%、约 30%、约 50%、约 60%、约 75%、约 100% 和约 150%。在又一个实施方案中,可确立一种“诺模图 (nomogram)”,通过该图可以将预后性和诊断性指示物水平与一个给定结果的相关倾向进行直接关联。本领域技术人员知晓使用这种诺模图来关联两个数值,并同时理解由于所参照的是个体样品的测量值而非群体的平均值,因此该测量的不确定性与该标记物浓度的不确定性相同。

[0077] 一个样品中 miRNA 的特征 (identity) 和相对量可用于为具体的样品提供 miRNA 谱。一个样品的 miRNA 谱包括所述样品中包含的 miRNA 特征的信息、所述样品中包含的 miRNA 的定量水平及/或 miRNA 的定量水平相对于另一个样品的变化。例如,一个样品的 miRNA 谱包括这样的信息,即该信息是关于与一种具体癌症有关的 miRNA 的特征、定量水平及/或定量水平的变化。

[0078] 进一步,对于本申请公开的主题的诊断方法,优选的受试者是脊椎动物受试者。优选的脊椎动物是温血动物;优选的温血脊椎动物是哺乳动物。优选的哺乳动物最优选人。如本文中使用的,术语“受试者”包括人受试者和动物受试者。因此,根据本申请公开的主题提供了兽医的治疗用途。

[0079] 由此,本申请公开的主题提供了对哺乳动物的治疗,所述哺乳动物例如人以及那些由于濒临灭绝而重要的哺乳动物,例如东北虎 (Siberian tiger); 具有重要经济学价值的哺乳动物,例如在农场中饲养用于人消费的动物;以及/或者在社会关系上对人来说重要的动物,例如作为宠物或在动物园中的动物。这些动物的实例包括但不限于:食肉动物例如猫和狗;猪类 (swine), 包括猪 (pig)、阉猪 (hog) 和野猪 (wild boar); 反刍动物及/或

有蹄动物例如牛 (cattle)、公牛 (ox)、绵羊、长颈鹿、鹿、山羊、野牛和骆驼；以及马。还提供了对鸟类的治疗方法，不但包括对禽类特别是家养禽（即家禽，例如火鸡、鸡、鸭、鹅、珍珠鸡 (guinea fowl) 等）的治疗方法，而且包括对那些濒临灭绝并 / 或在动物园中的鸟种类的治疗方法，这是因为它们对人也有着重要的经济学价值。因此，还提供了对家畜的治疗方法，所述家畜包括但不限于家猪、反刍动物、有蹄动物、马（包括竞赛马）、家禽等。

[0080] 如上文所述的，本申请公开的主题提供了对受试者的生物液体中的源自癌症的外来体且与癌症相关的 miRNA 进行量确定，所述生物液体尤其是来自受试者的血清学样品，例如血液。这提供的试验生物样品的优点是易于从所述受试者获取。然后，可以利用本领域中公知的多种方法的任一种确定所述生物样品中的一种或多种目标 miRNA 的量，并将该量与 miRNA 对照水平比较。

[0081] 确定的一种或多种 miRNA 的“量”是指所述一种或多种 miRNA 的定性测量值（例如在所述测量样品中存在或不存在）和 / 或定量测量值（例如存在多少）。“对照水平”是指未患癌症的受试者中的可比较样品中存在的一种或多种 miRNA 的量（包括定性存在或不存在）或量区间。作为计算该对照水平的一个非限制性实例，可计算正常生物样品（例如血液）中存在的一种或多种目标 miRNA 的量并将其外推至全体受试者。

[0082] 用于从生物样品的外来体测量 miRNA 水平的一种示例性方法是微阵列技术，该技术是基因表达研究中应用的一个强大工具。该技术提供了大量具有已知序列信息的多核苷酸作为探针，以在一个样品中寻找并杂交互补链，从而通过选择性结合捕获所述互补链。图 1 和 8 提供的示例方案的流程图可用于通过微阵列分离并测量源自外来体的 miRNA。

[0083] 本文使用的术语“选择性结合”是指探针与靶多核苷酸特异性杂交的能力的测量值。因此，所述探针包括这样的多核苷酸序列，即其与至少部分的靶多核苷酸序列互补或基本互补。“互补的”核酸序列可依照标准的 Watson-Crick 互补规则进行碱基配对。本文使用的术语“互补序列”是指基本互补的核酸序列，这可以通过与上文列出的相同的核苷酸比较进行评估，或者被定义为在相对严格的条件（例如本文描述的那些条件）能够与论及的所述核酸区段杂交。被考虑的互补核酸区段的一个具体实例是反义寡核苷酸。关于本文公开的对 miRNA 具有结合亲和性的探针，所述探针与所述靶多核苷酸序列可以是 100% 互补。然而，所述探针不必与所述靶多核苷酸在所述多核苷酸的全长上完全互补，条件是所述探针可以与所述靶多核苷酸以特异性结合，并将其从所述样品中捕获。

[0084] 除了碱基组成、互补链的长度和所述杂交核酸之间的核苷酸碱基错配的数目之外，核酸杂交还将受诸如盐浓度、温度或有机溶剂这类条件的影响，这是本领域技术人员容易理解的。严格的温度条件通常包括超过 30℃ 的温度，一般超过 37℃，并优选超过 45℃。严格的盐条件通常低于 1,000mM，一般低于 500mM，并且优选低于 200mM。然而，参数的结合比任何单个参数的测量值更重要。为鉴定及 / 或分离包含高同源性水平的序列确定合适的杂交条件是本领域中公知的。为了指定高严格度的条件之目的，优选的条件为约 200mM 的盐浓度和约 45℃ 的温度。

[0085] 数据挖掘的工作通过生物信息学完成，包括扫描芯片、信号获取、图像处理、归一化、统计处理和数据比较，以及通路分析。由此，微阵列可以以高通量的性能同时对数百和数千种多核苷酸进行作谱。在基础研究中，mRNA 表达的微阵列作谱分析已成功地为基因表达研究提供了有用的数据。并且，该技术还已被进一步应用于制药工业和临床诊断中。随

着可获得的 miRNA 的量的增加并且随着 miRNA 在基因调控中的重要性证据的积累,微阵列已经成为用于高通量 miRNA 研究的一种有用的技术。

[0086] 对与癌症有关的 miRNA 的分析可以在一个试验样品中单独进行与多个多核苷酸探针同时地进行。例如,可将数种探针联合到一个试验,用于多个样品的有效处理,并且有可能用于提供更为准确的诊断和 / 或预后。另外,本领域技术人员应了解对来自相同受试者的多个样品(例如在连续的时间点)进行测试的价值。这种系列样品的测试使得可鉴定 miRNA 水平随时间的变化。miRNA 水平的升高或降低以及无变化可提供有关所述疾病状态的有用信息。

[0087] 在一些实施方案中,可构建由与源自癌症且与一种或多种癌症相关的外来体 miRNA 选择性结合的多核苷酸探针组成的面板,以提供与癌症诊断或预后以及与对患癌症的受试者进行管理的有关的相关信息。例如,可使用 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、75、100、150、200、250、300、400、500 或 1000 种个体的多核苷酸探针构建这种面板。本领域技术人员可对单个探针或包含一个较大探针面板的探针亚组进行分析,以在多种临床环境下优化临床敏感性或特异性。它们包括但不限于门诊、紧急护理、危重症护理、重症监护、监测室、住院受试者、门诊受试者、医生办公室、医疗诊所和健康筛查环境。再者,本领域技术人员可使用单个探针或者构成较大探针面板的另外探针的亚组与对每一前述的环境下的诊断阈值的调整相结合,以优化临床敏感性和特异性。一项测定的临床敏感性被定义为该测定正确预测的患所述疾病的患者的百分数,一项测定的特异性被定义为该测定正确预测的无所述疾病的患者的百分数。

[0088] 在一些实施方案中,确定所述一种或多种 miRNA 的量包括标记所述一种或多种 miRNA。然后,所述标记的 miRNA 可以被各自选择性结合所述一种或多种 miRNA 的一种或多种多核苷酸探针捕获。

[0089] 本文使用的术语“标记”和“标记的”是指一个能够通过分光计方法、放射学方法或其他方法检测的部分与一个探针分子的附着。因此,术语“标记”或“标记的”是指任选共价地或非共价地将一种可探测的标记物结合或附着于一种分子例如多核苷酸之中或之上。多种标记多肽的方法在现有技术中是已知的并且可被使用。用于多核苷酸的标记的实例包括但不限于下列:放射性同位素、荧光标记、重原子、酶标记或报告基因、化学发光基团、生物素基团、被第二报告物(例如亮氨酸拉链对序列、抗体的结合位点、金属结合区域、表位标签等)识别的预设的多肽表位。在一些实施方案中,标记通过不同长度的间隔子臂附着,以降低潜在的位阻。

[0090] 利用多核苷酸探针分析 miRNA 水平也可以以多种物理形式进行。例如,微量滴定板或自动控制可用于帮助大量试验样品的处理。或者,可开发单样品形式,以有利于及时地进行即刻治疗和诊断。

[0091] 在一些实施方案中,多种多核苷酸探针各自结合于一种基底。在一些实施方案中,所述基底包括多个地址。每个地址可与所述阵列的至少一种多核苷酸探针相关联。如果一个阵列具有不同部分(如不同的多核苷酸序列)的多个区域,使得位于所述阵列上一个具体的预设位置(即一个“地址”)的一个区域(即所述阵列的一个“要素”或“点”)可检测一种具体的靶或一类靶(虽然一个要素可能偶然地检测非该要素的靶),那么该阵列是“可寻址的”。阵列要素通常但不必须由插入空间分隔。对于阵列而言,所述“靶”miRNA 可以被

看作流动相（一般是流体）中待被结合于所述基底不同区域的探针（“靶向探针”）检测的一个部分。

[0092] 通过将此前已获得的生物聚合物（例如来自合成源或天然源）沉积于一个基底之上或者通过原位合成方法，可制造生物聚合物阵列（如多核苷酸微阵列）。沉积获得生物聚合物的方法包括但不限于：将针或毛细管装载，然后接触一个表面，例如美国专利 5,807,522 中的描述；通过从脉冲喷射口例如墨水喷射头喷发进行沉积，例如 PCT 公开文本 W095/25116 和 W0 98/41531 中以及别处的描述。原位制造方法包括以下的方法并且还可将脉冲喷射用于沉积试剂：美国专利 5,449,754 中描述用于合成肽阵列的那些方法，以及美国专利 6,180,351、W0 98/41531 和本文引用的参考文献用于多核苷酸的那些方法。通过沉淀此前已获得的生物聚合物或者通过原位方法制造生物聚合物阵列的细节进一步记载于美国专利 6,242,266、6,232,072、6,180,351 和 6,171,797 中。在通过沉淀已获得的生物聚合物或者通过原位方法制造阵列中，在其上将要形成或已形成阵列的基底表面上的每个区域（“阵列区域”）通常被完全地暴露于一种或多种试剂中。例如，在两种方法之一中，所述阵列区经常被暴露于一种或多种试剂，以在所述表面形成一层合适的层，该层可同时结合所述基底和生物聚合物或生物单体。在原位制造中，所述阵列区域还通常被暴露于氧化试剂、去封闭试剂及任选的加帽试剂中。类似地，特别是在通过沉积已获得的生物聚合物进行制造中，可能需要将所述阵列区域暴露于一种合适的封闭试剂，以阻断所述表面上的无要素的位置与靶的非特异性结合的位置。

[0093] 备选地或除微阵列分析之外，对源自癌症的 miRNA 的量进行测定可包括使用实时多聚酶链反应 (PCR)，例如在本申请实施例中详细公开的。实时 PCR (RT-PCR) 可准确且快速地提供有关 miRNA 在一个样品中的存在和量的数据。图 2 提供的一个示例性方案的流程图可用于通过 RT-PCR 分离并测量源自外来体的 miRNA。示例性方法的其他细节在本发明的实施例中列出。

[0094] 在本申请公开的主题的一些实施方案中，提供了一种用于在受试者中诊断潜在的不利妊娠结果的方法。可应用在上文详细公开的用于分离包含 miRNA 的外来体并测定 miRNA 量的方法，这种应用类似于对与不利妊娠结果相关的具体 miRNA 进行定量，有如下面描述的几点改良。

[0095] 为了预测不利妊娠结果，可从生物样品分离源自胎盘的循环系统外来体，所述生物样品例如血液或其组分。虽然胎盘源自胚胎，但它是唯一真正与母体系统接触的胚胎组织。由此，由胎盘细胞产生的外来体可在母亲的血液中循环。为了分离源自胎盘的外来体，可以使用连接于磁珠上的抗 EpCAM 抗体（这用于肿瘤外来体分离）或抗胎盘型碱性磷酸酶抗体 (PLAP)（见例如图 8）。

[0096] 例如，在一些实施方案中，所述方法包括提供一个来自一个受试者的生物样品，并从所述生物样品分离包含微 RNA (miRNA) 的外来体。然后，确定一种或多种所述 miRNA 的量并将该量与一种或多种 miRNA 对照的水平比较。如果来自所述外来体的所述一种或多种 miRNA 的量与所述一种或多种 miRNA 对照的水平相比有可测量的差异，那么所述受试者被诊断为处于不利妊娠结果的风险。在一些实施方案中，所述不利妊娠结果为一种选自先兆子痫、早产（例如在妊娠 32 周之前分娩）、胎膜早破、子宫内发育受限和反复妊娠丢失的障碍。

[0097] 除非另外指出,对本申请公开的主题的实施可应用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA 和免疫学的常规技术,这些技术是在本领域技术人员能力范围内的。这些技术在文献中有充分的描述。例如,见 Molecular Cloning A Laboratory Manual(1989),2nd Ed., ed.by Sambrook, Fritsch and Maniatis, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapters 16 and 17; 美国专利 4,683,195; DNACloning, Volumes I and II, Glover, ed., 1985; Oligonucleotide Synthesis, M. J. Gait, ed., 1984; Nucleic Acid Hybridization, D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984; Transcription and Translation, B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984; Culture Of Animal Cells, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987; Immobilized Cells And Enzymes, IRL Press, 1986; Perbal(1984), A Practical Guide To Molecular Cloning; See Methods In Enzymology(Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, J. H. Miller and M. P. Calos, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1987; Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155, Wu et al., eds., Academic Press Inc., N.Y.; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987; Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986。

[0098] 实施例

[0099] 引入以下的实施例来说明本申请公开的主题的实施方式。考虑到本申请的公开内容及本领域中的一般技术水平,本领域技术人员应了解,以下的实施例仅被意欲作为示例,并且只要不偏离本申请公开的主题的范围可进行多种改变、修饰和修改。

[0100] 本申请公开的主题公开了 miRNA 存在于生物液体的外来体中并可从中分离。所述分离的 miRNA 可被用作癌症和不利妊娠结果的诊断工具。本发明的实施例为这些应用提供了支持。

[0101] 实施例 1-5 的材料和方法

[0102] 患者样品和细胞系

[0103] 这些实施例利用作为示例性生物液体的血清,其源自被诊断为卵巢的浆液性乳头状腺癌的女性(n = 50; I 期 n = 10、II 期 n = 10、III 期 n = 20 且 IV 期 n = 10)、年龄匹配的患良性卵巢腺癌的女性(n = 10)和年龄匹配的无卵巢疾病症状的女性(n = 10)。基于与患早期卵巢癌的患者匹配的年龄选择对照、患良性卵巢疾病的患者、III 期卵巢癌的患者和 IV 期卵巢癌的患者。这些实施例进一步包括这样的数据,即这些数据来自对从 6 名患有 IIIc 期卵巢囊腺癌的女性建立的原代肿瘤细胞培养物及其相应的手术前血清样品的研究。所有这些材料的获得经路易斯维尔大学(University of Louisville)的大学人类研究委员会(University Human Studies Committee)的知情同意审查。

[0104] 在本发明人的实验室中,已经建立了所述原代卵巢肿瘤细胞培养物,被命名为 UL-1、UL-2、UL-3、UL-6、UL-B 和 UL-0。UL-2 和 UL-3 来自遗传性卵巢癌,而 UL-1、UL-6、UL-B 和 UL-0 来自自发癌。这些卵巢肿瘤细胞在湿润 5% CO₂ 空气中被培养于补充有 10% 的无外来体的(经超滤)的胎牛血清、0.1mM 非必需氨基酸、1mM 丙酮酸钠、200mM L-谷氨酰胺、100mg/ml 链霉素和 100IU/ml 青霉素的 RPMI 1640 培养基中。通过台盼蓝拒染法评估细胞活性,使用的所有培养物活率都 > 95%。

[0105] 循环系统外来体的分离

[0106] 使用抗上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 抗体,通过改良的磁激活细胞分选 (MACS) 方法特异地分离源自肿瘤的外来体。本发明人以前的研究已证明,在来自上皮肿瘤的外来体的表面上表达 EpCAM,并可被用于它们的选择性分离。将来自正常对照、患良性疾病的患者和患早期卵巢癌的血清样品 (2.5ml) 与偶联于磁性微珠上的抗 EpCAM 抗体 (50 μ l) 孵育。将它们混合并在 4°C 下孵育 2 小时。将 LD 微柱置于 MACS 分离器的磁场中,以 500 μ l 的 Tris- 缓冲盐水 (TBS) 冲洗该柱。将磁性免疫复合物加样至该柱,未结合的 (未标记的) 物质流过该柱并被丢弃。以 500 μ l 的 TBS 洗涤该柱 4 次。通过将该柱从所述分离器中取出并将其置于一个采集管中,回收所述特异性选择的外来体。将 TBS (1ml) 添加至该柱,通过施用随该柱提供的柱塞获得所述磁性标记的外来体。将所分离的外来体 / 微珠稀释于 IgG 洗脱缓冲液 (Pierce Chemical Co, Rockford, IL) 中,以 10,000rpm 离心该复合物,以从所述外来体分离所述微珠 (上清液)。然后,在 4°C 下以 100,000g 离心该上清液 1 小时。将沉淀的外来体重新悬浮于 250 μ l 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中,并测定这些源自肿瘤的外来体的总蛋白质。使用牛血清白蛋白 (BSA) 作为标准,通过 Bradford 微测定方法 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 确定所述蛋白质的量。

[0107] 透射电子显微术

[0108] 为进行透射电子显微术,将沉淀的外来体在 2.5% (w/v) 戊二醛的 PBS 溶液中固定、脱水并包埋入环氧树脂 (Epon) 中。切超薄切片 (65nm) 并以乙酸双氧铀和 Reynold 柠檬酸铅染色。用 Jeol 1210 透射电子显微镜检查所述切片。

[0109] miRNA 的分离和作谱

[0110] 使用 mirVana miRNA 分离试剂盒依照生产商的说明书 (Ambion, Austin, TX) 从肿瘤细胞和外来体分离总 RNA。使用 Agilent 2100Bioanalyzer (Agilent Technologies, Foster City, CA) 分析该 RNA 的质量、产率及 miRNA 部分的大小。使用 mirVana miRNA 阵列标记试剂盒 (Ambion) 和标记后反应染料试剂盒 (Post Labeling Reactive Dye kit) (Amersham Bioscience, Pittsburgh, PA), 以 Cy3 标记所分离 miRNA 的 3' 端。使用包含针对 467 种人成熟 miRNA 的探针的微阵列,由 OceanRidge Biosciences (Jupiter, FL) 重复进行两次微 RNA 作谱。该分析使用覆盖了存在于 Sanger Institute mirBASE v9.0 中的 467 种 miRNA 的定制开发的 miRNA 阵列,该阵列由 35-44-mer 的寡核苷酸组成、由 Invitrogen 制作并进行两次重复点样。在杂交之后,使用 GenePix 4000A 阵列扫描仪 (Axon Instruments, Union City, CA) 扫描所述 miRNA 阵列,使用 GeneSpring 7.0 软件 (Silicon Genetics, Redwood City, CA) 归一化和分析原始数据。归一化是通过相对于添加至每个样品的对照 miRNA (Ambion) 表示每个 miRNA 重复,使得可在阵列之间进行比较来进行。基于来自阴性对照探针的杂交信号计算阈值和阴性对照的第 95 百分位 (TPT95),所述对照探针包括:38 个错配和混洗的对照探针及 87 个非保守的秀丽线虫 (*C. elegans*) 探针。为了确定敏感性,NCcode 合成的 miRNA 以 1/500,000 质量比参与到反应的标记,并检测了信号强度。对于特异性,使用 miR-93、miR-27a 和 miR-152 的完全匹配探针及其 2 个错配的探针。所述 2 碱基对错配探针在所有阵列上都呈现 TPT95 的信号或低于 TPT95 的信号。

[0111] 为了评估所述外来体作谱在存储和操作方面的稳定性,从患卵巢癌的患者获得血清,并分成 4 个 4ml 的样品的等分部分。经 MACS 步骤立即从第一等分部分分离肿瘤外来体,

分离总 RNA 并存储于 -70°C 直至将所有样品分离。将剩下的血清样品存储于 4°C ，用于后续的外来体分离。在 4°C 下，在 24 小时后从第二等分部分、在 48 小时后从第三等分部分以及在 96 小时后从第四等分部分分离肿瘤外来体。从每个外来体制品分离 RNA 并保存。在类似的研究中，将另外 3 个血清等分部分存储于 -70°C 下 7-28 天，然后分离外来体和 RNA 以模拟储存标本的用途。

[0112] 一般性统计考虑

[0113] 使用统计软件包 SAS9.1 (SAS Institute, Cary, NC) 分析数据。每组患者的循环系统外来体水平被表示为来自至少两个独立的重复 3 次的实验的平均值 $\pm$ 标准差。用单因素 ANOVA 进行这些组之间的比较，然后是试验后比较每个群体的 Tukey 多重比较。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法 (Applied Biosystems User Bulletin No. 2) 计算 miRNA 表达的相对量，数据被分析表示为靶 miRNA 的相对量 (RQ) 的 $\log_{10}$ 值，相对于添加至每个样品的对照 miRNA 进行归一化，使得可在阵列之间进行比较。对每个亚组计算 miRNA 随置信区间的分布和相关性。统计显著性被设定为 $p \leq 0.05$ 。

[0114] 实施例 1

[0115] 在患良性和恶性卵巢疾病的女性中存在 EPCAM 阳性的循环系统外来体

[0116] 使用抗 EpCAM 抗体的磁珠特异性地分离 EpCAM 阳性的外来体，测定这些循环系统外来体的总蛋白质，并相对于疾病的阶段作图 (图 3A)。年龄匹配的正常志愿者 (对照) 中 EpCAM 阳性的外来体的水平为 $0.039 \pm 0.030\text{mg/ml}$ 的外来体蛋白质，这代表该测定的背景值。被诊断为良性卵巢疾病的患者具有 $0.149 \pm 0.065\text{mg/ml}$ 的外来体蛋白质，这显著高于对照值。被诊断为卵巢癌的患者都呈现显著高水平的 EpCAM 阳性的外来体 (与良性疾病或对照比较)。患 I 期卵巢癌的女性呈现 $0.320 \pm 0.056\text{mg/ml}$ 的循环系统外来体蛋白质，这显著高于对照和良性疾病 ($p < 0.01$)。循环系统外来体的水平随阶段的进展升高，II 期癌症为 $0.640 \pm 0.053\text{mg/ml}$ ，III 期为 $0.995 \pm 0.084\text{mg/ml}$ ，且 IV 期呈现 $1.42 \pm 0.228\text{mg/ml}$ 。这三个阶段相关的外来体水平显著高于患良性疾病的女性或对照 ($p < 0.001$)。通过电子显微术进一步分析了所生成的部分，证明了外来体的小泡结构特征 (图 3B)。通过蛋白质免疫印迹，四旋蛋白 (tetraspanin)、I 类抗原和胎盘型碱性磷酸酶的存在进一步确证了该材料的外来体性质。

[0117] 实施例 2

[0118] 小 RNA 与源自肿瘤的外来体的关联

[0119] 为了鉴定这些分离的外来体是否包含小 RNA，使用 Bio-Analyzer2100 检查它们 (图 4)。这些分析鉴定了在不与通常与源自细胞的 RNA 一块出现的 18S 和 28S RNA 的情况下，存在显著数量的小 RNA。这些材料随后用于 miRNA 作谱。

[0120] 实施例 3

[0121] 源自外来体的与源自细胞的 MIRNA 的作谱

[0122] 使用探测 467 种 miRNA 的微阵列分析 (图 1) 确定源自细胞的和源自外来体的 miRNA 的特异性 miRNA 的存在和水平。示例性结果显示于表 1 中。本发明人的卵巢肿瘤的 miRNA 谱确证了以前报道的这些差别 (Iorio et al., 2007)。而且，本发明人已证明，467 种 miRNA 中的 218 种在基于细胞和外来体中阴性对照探针信号的第 95 百分位计算的归一化阈值以上 (表 2)。所述 218 种阳性 miRNA 的 175 种的水平在所述卵巢肿瘤细胞和它们的相应

外来体之间没有显著性差异。通过比较,12种在所述细胞中以较高比例存在,而31种在外来体内以升高的水平存在。

[0123] 以前,已证明特定的miRNA在人卵巢癌细胞中过量表达(miR-21、miR-141、miR-200a、miR-200c、miR-200b、miR-203、miR-205和miR-214)。为了将这些结果与源自外来体的材料相关联,从所述源肿瘤细胞和同一患者的循环系统肿瘤外来体分离RNA部分(图5)。通过微阵列分析,在源自肿瘤的miRNA谱和源自外周血的外来体的miRNA之间的比较表明,它们没有显著差异。而且,源自肿瘤的miRNA谱的水平与源自外周血的外来体的miRNA呈现出强相关性(miR-21, $r = 0.77$; miR-141, $r = 0.88$; miR-200a, $r = 0.76$; miR-200b, $r = 0.85$; miR-200c, $r = 0.83$; miR-203, $r = 0.85$; miR-205, $r = 0.91$; 且 miR-214, $r = 0.71$)。

[0124] 表1

[0125] 来自癌症受试者的循环系统外来体和肿瘤细胞中的miRNA的定量性比较*

[0126]

		患者1 外来体	患者1 细胞	患者2 外来体	患者2 细胞
名称	ID	866A	866B	866C	866D
hsa-miR-296	1098	5.05	4.33	4.24	4.79
hsa-miR-330	1002	2.98	3.09	4.1	1.08
hsa-miR-20a	1007	11.46	11.35	12	11.93

[0127]

hsa-miR-28	1024	9.4	10.05	9.19	9.23
hsa-miR-302c	1032	-0.58	3.08	3.5	1.08
hsa-miR-302a	1036	2.17	3.66	3.47	4.33
hsa-miR-214	1057	6.58	3.93	6.17	2.99
hsa-miR-99b	1063	9.59	10.08	9.86	9.16
hsa-miR-99a	1068	3.81	4.53	7.34	6.46
hsa-miR-10a	1072	10.1	10.76	9.63	9.55
hsa-let-7d	1085	12.53	13.32	12.65	12.5
hsa-miR-138	1089	5.37	5.26	4.18	3.61
hsa-miR-140	1106	3.23	4.3	2.01	0.58
hsa-miR-23a	1114	14.51	15.08	14.99	14.78
hsa-miR-215	1122	0.71	1.79	0.51	1.38
hsa-miR-183	1127	9.08	9.63	8.99	8.9
hsa-miR-32	1135	2	2.49	2.42	0.58
hsa-miR-25	1139	11.34	11.3	12.23	12.01
hsa-miR-218	1143	2.71	3.37	4.61	5.33
hsa-miR-107	1163	11.68	12.18	11.29	11.31
hsa-miR-145	1168	1.74	2.38	3.47	1.38
hsa-miR-181a	1172	11.9	12.62	11.35	11.15
hsa-miR-125a	1193	12.34	13.07	11.67	11.84
hsa-miR-222	1198	12.37	12.53	11.77	10.99
hsa-miR-372	1105	-0.58	3.08	2.51	1.08
hsa-miR-142-3p	1253	2.72	3.06	4.59	3.91
hsa-miR-198	1258	4.2	3.92	3.32	3.67
hsa-miR-196a	1263	4.78	5.07	3.42	4.04
hsa-miR-16	1272	12.28	12.05	12.98	12.6
hsa-miR-200a	1287	8.29	8.72	7.17	7.44
hsa-miR-18a	1292	6.41	6.66	7.98	8.5
hsa-miR-101	1297	4.62	4.87	5.55	6.01
hsa-miR-195	1311	6.09	6.58	6.03	6.43
hsa-miR-136	1203	3.69	3.77	3.52	3.65
hsa-miR-153	1225	1.71	2.08	0.51	0.58
hsa-miR-31	1227	8.97	9.49	9.6	9.32
hsa-miR-33	1274	2.01	3.66	3.58	3.75
hsa-miR-147	1278	4.65	2.95	3.47	3.17
hsa-miR-106b	1282	9.47	9.19	10.59	10.38
hsa-miR-212	1288	2.67	1.81	2.89	3.75
hsa-miR-15a	1312	9.92	10.12	10.79	11.06
hsa-miR-135b	1331	4.51	4.03	4.42	4.07
hsa-miR-92	1335	12.29	12.63	12.62	12.26
hsa-miR-342	1349	9.14	9.62	8.36	8.39
hsa-miR-205	1368	6.15	5.74	15.25	14.33
hsa-miR-150	1385	4.02	2.87	3.33	1.38
hsa-miR-149	1392	6.23	5.65	5.92	4.79
hsa-let-7b	1431	12.73	12.43	13.73	14.06
hsa-miR-370	1445	4.14	3.7	4.37	2.58
hsa-miR-206	1449	5.22	4.34	5.58	4.91
hsa-miR-128a	1350	7.54	7.9	8.06	8.01
hsa-miR-197	1487	11.05	9.76	10.03	9.28
hsa-miR-182	1506	10.11	10.89	10.09	10.41
hsa-miR-553	1750	2.77	2.95	4.05	3.17
hsa-miR-519d	1766	2.17	3.28	0.51	3.04

[0128]

hsa-miR-520g	1770	-0.58	1.9	3.51	2.49
hsa-miR-520e	1774	-0.58	1.79	0.51	3.75
hsa-miR-329	1778	2.67	2.08	3.32	2.91
hsa-miR-634	1782	6.69	2.64	3.32	1.08
hsa-miR-614	1786	1.21	-0.01	1.31	2.91
hsa-miR-223	1467	2.71	2.49	4.17	3.17
hsa-miR-485-5p	1863	4.27	2.49	2.6	0.58
hsa-miR-369-5p	1867	2	1.49	0.51	0.58
hsa-miR-575	1871	2.75	2.69	4.36	3.75
hsa-miR-663	1891	5.41	5	6.17	5.76
hsa-miR-520f_hsa-miR-520c	1802	1.61	1.79	2.97	3.15
hsa-miR-382	1806	4.48	4.14	4.04	3.25
hsa-miR-655	1920	1.21	2.3	2.1	3.17
hsa-miR-545	1932	2.5	2.66	2.92	3.58
hsa-miR-502	1940	3.46	4.16	4.99	3.75
hsa-miR-200a*	1952	5.35	5.86	3.42	2.25
hsa-miR-640	1956	2.24	-0.51	2.51	0.58
hsa-miR-514	1972	2	2.95	1.01	1.38
hsa-miR-548b	1988	1.92	-0.01	2.51	0.58
hsa-miR-609	1899	2.55	2.58	3.6	3.54
hsa-miR-377	1929	1.74	-0.01	2.6	0.58
hsa-miR-433	1937	2.71	2.19	3.74	1.08
hsa-miR-500	1957	4.67	4.88	6.34	5.8
hsa-miR-652	1961	6.26	6.6	5.52	5.05
hsa-miR-518c	1981	0.92	1.81	3.68	1.38
hsa-miR-561	1985	-0.58	2.49	0.51	1.38
hsa-miR-551a	2018	3.77	3.27	4.06	3.91
hsa-miR-525	2034	-0.58	2.06	3.1	0.58
hsa-miR-570	2054	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-617	2062	2	2.49	0.51	2.91
hsa-miR-556	2070	-0.58	1.81	1.31	1.08
hsa-miR-551b	2074	1.37	1.79	3.97	3.38
hsa-miR-424	1993	5.87	5.84	4.54	4.79
hsa-miR-612	1997	2.87	0.29	2.83	0.58
hsa-miR-130a	2005	8.07	8.66	9.08	9.2
hsa-miR-429	2134	5.68	5.39	3.89	4.83
hsa-miR-365	2138	8.7	8.73	7.51	7.31
hsa-miR-29a	2154	13.45	13.83	12.21	12.27
hsa-miR-503	2162	5.44	6.25	1.31	4.39
hsa-miR-624	2166	-0.58	1.99	0.51	3.39
hsa-miR-550	2097	4.34	4.26	3.89	2.58
hsa-miR-581	2227	2.32	1.65	2.31	0.58
hsa-miR-422a	2263	8.33	8.48	9.59	9.25
hsa-miR-449	2267	2.91	2.48	1.31	0.58
hsa-miR-585	2271	3.58	3.74	4.51	4.12
hsa-miR-92b	2182	7.86	8.04	7.75	7.13
hsa-miR-629	2316	6.12	5.93	6.82	7.03
hsa-miR-580	2320	-0.58	1.49	0.51	2.58
hsa-miR-448	2324	1.74	-0.51	2.83	0.58
hsa-miR-592	2332	0.21	2.95	2.83	0.58
hsa-miR-671	2839	4.15	3.98	4.21	0.58

[0129]

hsa-miR-767-3p	2863	1.42	2.3	2.51	0.58
hsa-miR-608	2279	3.74	1.29	2.47	0.58
hsa-miR-210	2291	9.13	8.6	8.39	7.96
hsa-miR-26a	2299	12.6	12.61	12.27	12.73
hsa-miR-493-5p	2329	2	2.65	2.17	1.08
hsa-miR-202*	2337	2.55	2.08	3.32	1.88
hsa-miR-454-5p	2840	11.51	11.6	12.87	13.07
hsa-miR-770-5p	2844	2.24	-0.01	1.01	0.58
hsa-miR-769-3p	2865	3.8	3.74	3.01	2.88
hsa-miR-758	2869	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-765	2864	5.35	5.13	6.08	5.77
hsa-miR-301	1103	3.96	4.08	4.04	4.68
hsa-miR-191	1017	9.84	10.87	11.01	10.9
hsa-miR-93	1029	9.68	9.58	10.93	9.75
hsa-let-7f	1033	11.59	12.43	11.79	11.94
hsa-miR-373	1037	3.54	2.4	4.51	3.08
hsa-miR-200b	1042	10.9	11.07	10.17	9.02
hsa-miR-100	1064	7.25	6.69	7.81	5.54
hsa-miR-324-3p	1082	5.67	4.71	5.64	3.99
hsa-miR-34b	1096	3.27	3.49	3.83	4.54
hsa-miR-324-5p	1115	3.84	2.29	4.16	4.49
hsa-miR-199a*	1124	1.82	2.24	1.01	4.17
hsa-miR-103	1164	11.27	10.65	11.3	9.18
hsa-miR-220	1173	3.67	3.04	4.26	3.99
hsa-miR-151	1199	9.73	9.47	10.22	10.45
hsa-miR-186	1141	4.72	4.93	3.86	4.49
hsa-miR-128b	1153	6.29	6.26	6.7	6.1
hsa-miR-130b	1165	7.72	6.96	7.99	6.49
hsa-miR-338	1174	2.42	2.66	2.67	2.91
hsa-miR-199b	1178	1.98	-0.01	3.67	3.46
hsa-miR-125b	1182	9.34	8.81	9.86	8.11
hsa-miR-122a	1243	5.11	3.49	4.97	4.71
hsa-miR-30d	1251	11.72	11.93	11.32	11.69
hsa-miR-203	1260	1.42	2.9	9.1	9.56
hsa-let-7c	1268	11.91	12.72	13.09	12.47
hsa-miR-216	1294	2	2.45	2.71	3.38
hsa-miR-15b	1313	11.75	12.27	12.66	12.77
hsa-miR-192	1205	7.05	8.48	6	6.14
hsa-miR-133a	1215	3.27	3.07	3.82	4.11
hsa-miR-126	1380	6.42	6.42	5.94	7.51
hsa-miR-326	1393	3.32	0.29	0.51	3.17
hsa-miR-98	1423	6.58	7.21	6.9	7.33
hsa-let-7g	1432	10.8	11.21	10.01	10.06
hsa-miR-190	1437	3.16	3.57	4.02	4.29
hsa-miR-189	1442	2.59	2.79	2.92	3.38
hsa-miR-137	1339	2.66	3.06	4.36	3.88
hsa-miR-105	1345	2.37	2.48	4.32	3.17
hsa-miR-96	1507	4.66	4.17	4.58	4.58
hsa-miR-519e	1767	-0.08	2.3	2.83	1.08
hsa-miR-520a	1771	1.42	1.99	3.1	0.58
hsa-miR-451	1783	1	-0.51	3.32	2.58
hsa-miR-523	1787	-0.58	-0.51	0.51	0.58

[0130]

hsa-miR-299-5p	1458	1.74	2.06	2.51	0.58
hsa-miR-95	1482	3.94	3.78	2.71	3.08
hsa-miR-593	1832	4.92	1.08	4.1	2.91
hsa-miR-574	1840	11.34	9.36	11.12	9.45
hsa-miR-202	1864	2.59	1.9	2.97	3.67
hsa-miR-519b	1799	-0.08	3.49	3.97	3.83
hsa-miR-520d	1803	2.58	3.56	3.89	4.36
hsa-miR-622	1829	1.42	2.66	0.51	1.38
hsa-miR-483	1845	8.06	3.91	7.36	4.34
hsa-miR-383	1865	2.17	1.95	0.51	1.88
hsa-miR-29b	1869	6.67	6.05	5.9	6.65
hsa-miR-613	1881	2.42	-0.01	1.31	0.58
hsa-miR-453	1904	3.93	3.59	4.76	4.17
hsa-miR-23b	1930	13.2	13.81	12.99	13.61
hsa-miR-501	1942	2.87	2.72	1.31	3.25
hsa-miR-517c	1946	3.01	3.02	4.36	4.39
hsa-miR-625	1897	6.54	7.16	5.67	5.65
hsa-miR-630	1905	2.74	1.49	2.92	3.49
hsa-miR-644	1913	0.21	2.29	2.51	2.91
hsa-miR-527	2039	3.42	1.87	2.51	1.08
hsa-miR-589	2055	-0.08	-0.51	1.31	0.58
hsa-miR-508	2071	2.81	2.79	3.21	4.04
hsa-miR-449b	2083	2.41	2.48	3.97	2.58
hsa-miR-603	1990	4.74	2.84	3.76	0.58
hsa-miR-200c	2131	4.25	3.75	13.3	13.7
hsa-miR-29c	2155	2.75	3.24	3.6	4.2
hsa-miR-411	2167	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-455	2179	2.87	2.52	2.6	0.58
hsa-miR-378	2208	2.24	2.3	3.6	2.58
hsa-miR-638	2212	7.37	6.34	8.56	7.57
hsa-miR-518f*	2220	-0.58	-0.51	3.17	3.67
hsa-let-7i	2244	12.8	13.03	10.86	10.79
hsa-miR-422b	2264	9.17	8.72	10.51	10.23
hsa-miR-193b	2268	9.68	8.44	8.63	7.54
hsa-miR-491	2272	1.74	0.79	2.81	0.58
hsa-miR-484	2191	8.32	7.81	8.29	7.72
hsa-miR-623	2203	1.74	2.45	0.51	0.58
hsa-miR-486	2209	3.86	3.3	4.2	4.6
hsa-miR-639	2213	1.87	1.49	2.31	1.38
hsa-miR-517a_hsa-miR-517b	2217	2.11	2.56	3.87	3.28
hsa-miR-645	2221	3.12	1.29	0.51	2.58
hsa-miR-146b	2237	5.56	5.29	4.21	5.59
hsa-miR-571	2249	3.33	2.99	4.1	2.91
hsa-miR-191*	2257	2.42	2.95	1.31	0.58
hsa-miR-7	2261	2.44	3.02	2.51	3.54
hsa-miR-647	2269	4.95	4.27	5.5	6.01
hsa-miR-637	2273	4.65	2.84	4.9	4.17
hsa-miR-30b	2280	9.94	9.87	9.86	9.66
hsa-miR-431	2288	1.74	-0.01	0.51	2.58
hsa-miR-452	2292	4.68	5.15	5.14	5.85
hsa-miR-361	2296	10.36	11.32	10.53	10.83

[0131]

hsa-miR-576	2314	1.87	-0.51	2.83	0.58
hsa-miR-432	2326	3.74	3.47	3.51	2.58
hsa-miR-375	2342	3.42	2.15	0.51	3.75
hsa-miR-766	2841	9.66	6.37	8.18	7.59
hsa-miR-768-3p	2845	9.89	9.61	9.2	9.48
hsa-miR-769-5p	2861	4.03	4.07	4.47	3.46
hsa-miR-513	2301	3.8	2.56	3.97	4.38
hsa-miR-362	2017	2.93	4.53	4.88	4.38
hsa-miR-565	2045	7.04	4.89	5.13	6.45
hsa-miR-30e-3p	2053	8.97	9.4	7.84	7.61
hsa-miR-320	1005	12.75	13.28	13.11	13.09
hsa-miR-132	1014	4.94	6.57	6.22	7.04
hsa-miR-193a	1018	4.56	4.32	3.66	4.58
hsa-miR-22	1022	8.71	8.95	8.69	8.79
hsa-miR-224	1026	6.69	7.1	6.4	6.96
hsa-let-7a	1030	13.37	14.07	14.63	14.91
hsa-miR-302d	1034	2.32	2.74	3.76	3.28
hsa-miR-369-3p	1038	2.72	2.38	4.68	3.83
hsa-miR-106a	1006	12.01	12.48	12.09	12.36
hsa-miR-181c	1015	5.67	6.09	4.64	4.27
hsa-miR-17-5p	1031	11.57	11.85	11.34	11.83
hsa-miR-302b	1035	-0.08	2.66	3.26	4.04
hsa-miR-19b	1039	10.14	10.07	11.3	11.47
hsa-miR-24	1044	12.91	13.2	13.13	13.4
hsa-miR-17-3p	1079	4.95	5.02	4.83	5.34
hsa-miR-221	1088	13.67	13.73	12.88	12.76
hsa-miR-335	1146	-0.58	-0.51	6.66	7.68
hsa-miR-199a	1167	2.31	-0.51	0.51	3.17
hsa-miR-126*	1171	3.12	1.95	3.68	3.15
hsa-miR-337	1175	2.22	-0.51	3.97	2.91
hsa-miR-181a*	1179	5.67	5.34	5.91	5.76
hsa-miR-331	1183	6.46	5.25	5.55	4.95
hsa-miR-340	1187	2.96	2.99	3.86	4.17
hsa-miR-188	1116	3.94	3.31	3.86	4.39
hsa-miR-9	1231	2.96	3.25	4	4.53
hsa-miR-34a	1235	6.95	6.56	7.17	7.33
hsa-miR-30c	1252	13.78	13.97	12.46	12.24
hsa-miR-19a	1271	5.93	5.76	8.01	8.36
hsa-miR-371	1276	3.67	2.19	3.36	3.38
hsa-miR-10b	1301	6.91	7.36	7.73	8.03
hsa-miR-21	1315	13.13	13.2	12.28	12.88
hsa-miR-217	1206	2.53	2.49	0.51	3.57
hsa-miR-302b*	1210	1.87	2.49	2.51	2.99
hsa-miR-135a	1216	2.41	3.62	3.47	3.89
hsa-miR-148a	1361	3	1.45	6.87	7.35
hsa-miR-339	1366	4.85	4.26	5.12	5.2
hsa-miR-187	1381	3.69	2.4	4.21	3.75
hsa-miR-346	1390	5.77	3.2	4.09	4.87
hsa-miR-146a	1409	9.7	9.88	7.17	7.56
hsa-miR-143	1415	-0.58	-0.51	2.51	3.75
hsa-miR-219	1426	2	1.81	3.32	4.04
hsa-miR-185	1451	8.4	8.73	9.33	9.46

[0132]

hsa-miR-328	1455	7.15	4.5	4.92	4.33
hsa-miR-196b	1321	4.65	4.44	5.08	5.68
hsa-miR-204	1489	0.71	2.49	0.51	1.38
hsa-miR-133b	1498	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-129	1512	6.33	6.08	7.2	8.02
hsa-miR-649	1756	3.32	2.93	3.17	2.17
hsa-miR-522	1776	2.87	3.4	5.74	5.87
hsa-miR-618	1788	2.22	1.65	0.51	1.08
hsa-miR-30a-5p	1460	12.45	12.55	11.09	11.04
hsa-miR-27a	1485	11.64	11.67	11.97	12.27
hsa-miR-30a-3p	1505	12.22	12.57	10	10.48
hsa-miR-494	1753	4.47	3.87	6.12	5.48
hsa-miR-20b	1769	10.41	10.8	10.92	11.2
hsa-miR-521	1785	3.42	0.49	3.31	3.75
hsa-miR-363	1822	-0.58	-0.51	3.32	1.08
hsa-miR-181b	1830	11.53	11.96	10.84	11.02
hsa-miR-18a*	1850	4.52	2.99	4.97	3.83
hsa-miR-423	1874	8.9	8.85	9.09	8.46
hsa-miR-595	1805	9.11	6.55	8.47	6.49
hsa-miR-487b	1817	4.65	4.3	5.22	5.53
hsa-miR-425-3p	1943	4.14	4.02	3.39	3.96
hsa-miR-594	1951	10.94	10.48	11.55	11.22
hsa-miR-532	1959	5.87	5.79	6.62	6.14
hsa-miR-544	1971	1.08	2.49	1.01	2.91
hsa-miR-512-3p	1910	2.56	2.74	4.41	3.83
hsa-miR-526a	2036	-0.58	-0.51	5.78	5.87
hsa-miR-619	2044	2.01	1.49	1.01	4.08
hsa-miR-578	2048	3.54	2.79	3.17	2.38
hsa-miR-492	2060	-0.08	1.49	2.71	2.67
hsa-miR-590	2064	3.27	3.4	5.51	5.08
hsa-miR-515-3p	2068	1.74	2.88	3.51	1.08
hsa-miR-539	2080	2.74	1.81	2.51	4.28
hsa-miR-497	1995	3.05	3.11	3.26	0.58
hsa-miR-152	2007	7.72	8.44	6.59	7.2
hsa-miR-181d	2011	8.56	8.9	7.83	7.49
hsa-miR-660	2144	5.3	5.36	6.62	6.8
hsa-miR-584	2176	10.1	10.43	7.6	7.99
hsa-miR-511	2109	2.59	-0.01	2.83	2.91
hsa-miR-141	2117	-0.58	-0.51	7.91	8.21
hsa-miR-18b	2125	5.18	5.41	6.65	6.98
hsa-miR-582	2141	-0.58	-0.51	4.9	4.87
hsa-miR-586	2173	2.11	1.49	2.47	1.08
hsa-miR-505	2184	5.06	5.45	4.16	4.58
hsa-miR-642	2200	4.22	1.15	2.42	0.58
hsa-miR-628	2222	3.59	2.19	2.17	3.83
hsa-miR-425-5p	2234	8.86	9.29	9.01	8.92
hsa-miR-661	2274	2.42	1.81	0.51	0.58
hsa-miR-421	2185	4.06	5.49	6.41	6.43
hsa-miR-27b	2303	10.82	11.2	11.39	11.55
hsa-miR-651	2335	1.71	1.69	3.39	2.91
hsa-miR-557	2339	3.37	2.49	3.51	0.58
hsa-miR-801	2846	5.97	3.08	4.59	1.88

[0133]	hsa-miR-768-5p	2854	8.68	8.01	8.5	8.38
	hsa-miR-454-3p	2858	3	3.37	4.32	3.78
	hsa-miR-498	2298	2.87	-0.51	0.51	2.67
	hsa-miR-148b	1362	6.83	6.76	6.82	6.69
	hsa-miR-194	1416	8.57	8.28	4.64	5.81
	hsa-let-7e	1421	7.42	9.18	8.74	9.52
	hsa-miR-345	1444	4.63	4.62	3.68	3.17
	hsa-miR-155	1476	8.21	9.31	4.32	6.17
	hsa-miR-374	1480	1.42	1.79	0.51	1.38
	hsa-miR-26b	1484	9.52	10	9.72	10.43

[0134] *原始数据经背景消减、Log2-转化及归一化。每个寡核苷酸探针的强度基于对两个重复点进行平均。基于 $\text{Log}_2(5 * \text{非点背景的标准差} + \text{去头尾平均阴性对照探针信号})$ 计算归一化的阈值。

[0135] 表 2

[0136] miRNA 与源自外周血肿瘤的外来体的关联,与从它们的相应肿瘤分离的 miRNA 相比较

[0137] 微 RNA 与源自外周血肿瘤的外来体的关联,与从它们的相应肿瘤分离的微 RNA 相比较。

[0138]

在细胞中升高	在细胞和外来体之间相等	在外来体中升高
--------	-------------	---------

miR-218, miR-196a, miR-195, miR-15a, miR-519d, miR-382, miR-503, miR-34b, miR-520d, miR-29c, miR-135a, miR-155	miR-296, miR-20a, miR-28, miR-302a, miR-99a, miR-99b, miR-10a, let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7f, let-7g, let-7i, miR-138, miR-23a, miR-183, miR-25, miR-107, miR-181a, miR-125a, miR-222, miR-198, miR-16, miR-200a, miR-18a, miR-101, miR-136, miR-31, miR-106b, miR-92, miR-342, miR- 128a, miR-182, miR-663, miR-502, miR-500, miR- 652, miR-424, miR-130a, miR-429, miR-365, miR- 29a, miR-550, miR-422a, miR-585, miR-92b, miR- 629, miR-671, miR-210, miR-26a, miR-454-5p, miR- 769-3p, miR-765, miR-301, miR-191, miR-93, miR- 200b, miR-100, miR-324-5p, miR-220, miR-151, miR-186, miR-128b, miR-130b, miR-125b, miR-122a, miR-30d, miR-203, miR-15b, miR-192, miR-133a, miR-126, miR-98, miR-190, miR-137, miR-105, miR-96, miR-95, miR-519b, miR- 29b, miR-453, miR-23b, miR-517c, miR-625, miR- 200c, miR-193a, miR-22, miR-224, miR-369-3p, miR-106a, miR-181c, miR-17-5p, miR-19b, miR-24, miR-17-3p, miR-221, miR-335, miR-126, miR-181a, miR-331, miR-188, miR-9, miR- 34a, miR-30c, miR-19a, miR-371, miR-10b, miR-21, miR-148a, miR-339, miR-187, miR-346, miR-146a, miR-185, miR-328, miR-196b, miR-129, miR-522, miR-30a-5p, miR-27a, miR-30a-3p, miR-494, miR-20b, miR-521, miR-181b, miR-423, miR-487b, miR-425-3p, miR-594, miR-532, miR-512-3p, miR-526a, miR-578, miR-638, miR-422b, miR-484, miR-486, miR-645, miR-146b, miR-571, miR-647, miR-637, miR-30b, miR-452, miR-361, miR-432, miR-375, miR-766, miR-768-3p, miR-769-5p, miR-513, miR-362, miR-565, miR-30e-3p, miR-320, miR-590, miR-152, miR-181d, miR-660, miR-584, miR-141, miR-18b, miR-582, miR-505, miR-628, miR-425-5p, miR-421, miR-27b, miR-768-5p, miR-454-3p, miR-148b, miR-194, miR-345, miR-26b	miR-214, miR-140, miR-147, miR-135b, miR-205, miR-150, miR-149, miR-370, miR-206, miR-197, miR-634, miR-485-5p, miR-612, miR-608, miR-202, miR-373, miR-324-3p, miR-103, miR-593, miR-574, miR-483, miR-527, miR-603, miR-649, miR-18a, miR-595, miR-193b, miR-642, miR-557, miR-801, let-7e
---	--	--

[0139] 实施例 4

[0140] 外来体 miRNA 与疾病存在和阶段的关联

[0141] 本发明人以前对晚期患者在肿瘤和循环系统外来体之间进行了比较。为了在多个阶段比较具体 miRNA 与疾病存在的关联,确定了外来体 miRNA 的平均强度。对于 8 种诊断性 miRNA 的大多数而言,在 I 期、II 期和 III 期患者中它们的存在没有显著性差异(图 6)。与 II 期和 III 期患者相比,I 期患者中的 miR-200c 和 miR-214 更低。然而,在所有这些情形中,这些 miRNA 都显著高于在源自良性疾病的外来体中检测到的水平。无法证明在正常受试者中存在所述小 RNA 部分,并且评估 miRNA 存在的尝试结果是否定的。

[0142] 实施例 5

[0143] 外来体 MIRNA 谱的稳定性

[0144] 由于对循环系统外来体 miRNA 的测量在本文中已证明是有诊断价值的,接着对它的稳定性的技术问题进行说明。当对在 4℃ 下经短时间(最长至 96 小时)保存的血清样品进行 miRNA 作谱并将强度进行比较时(图 7A),在所分析的 3 种诊断性 miRNA 中没有出现显著差异。当血清样品在 -70℃ 下保存更长的时间间隔时,所述微阵列上这些 miRNA 的强度无显著差异(图 7B)。这些结果表明,这些外来体 miRNA 的水平是稳定的,不会随保存而显著变化。

[0145] 实施例 1-5 的讨论

[0146] 微 RNA 表达作谱可用作当前缺乏可靠分子标记物的癌症(例如卵巢癌)的诊断工具。虽然以前的研究已表明 miRNA 标志可作为卵巢癌的诊断的和预后的标记物,但是这些数据是基于它们在组织标本中的表达。本发明的实施例提供的数据第一次证明了 miRNA 与源自肿瘤的循环系统外来体的关联。在以前的研究中,miRNA 已经被证明在人卵巢癌中异常表达,并且总 miRNA 表达可区分正常组织与癌症组织(Iorio et al.,2007)。Lu 等人(2005)的研究证明了 miRNA 标志的使用在癌症诊断中是一项重大进步。他们的工作表明,基于 miRNA 的癌症鉴定在正确诊断不明原发灶的癌症中优于 mRNA 分类。然而,在本申请公开的主题之前,在不存在待进行生物活检的组织块的情况下,不可能使用 miRNA 作谱。

[0147] 本发明人最初对外来体的电子显微术表征表明,它们是中空的(即无病毒样结构)(Taylor & Black,1986)。结果是,本发明人的小组与其他人一起将目光聚焦于外来体的外部蛋白质及外来体暴露的生物后果。然而,在本发明的实施例中,本发明人意外地第一次证明了与循环系统肿瘤外来体有关的小 RNA 种类的存在(图 4)。这种小 RNA 缺乏与细胞 RNA 相关的 18S 和 28S。而且,本文公开的微阵列分析表明,至少部分的所鉴定的小 RNA 是 miRNA。

[0148] 本发明人的卵巢肿瘤细胞的 miRNA 表达谱确证了以前研究中报道的 miRNA 异常。对循环系统肿瘤外来体和来自相同患者的肿瘤细胞的分析表明,两者均有 46% 的测试 miRNA (218/467) 是阳性的。当将所述 miRNA 的强度归一化后,大多数的这些 miRNA 在所述细胞和外来体之间以类似的水平表达或者在所述外来体中升高(175 种无显著性差异,31 种在外来体中升高)。因此,用于确立癌症特异性标志的异常表达的 miRNA 存在于卵巢癌患者的细胞区室和外来体区室中。

[0149] 本发明人对具体 miRNA 的比较——以前被证明是有诊断价值的——表明了来自肿瘤和其相应外来体的 miRNA 之间的高水平的相关(在 0.71-0.90 之间)。这种高相关甚至适用于似乎以更高比例出现于外来体中的 miRNA,例如 miR-214。特定 miRNA 在外来体中一致升高已说明,对于至少部分 miRNA,miRNA 在外来体中的区室化是一个主动的(选择的)过程。这种过程可能被在肿瘤外来体上异常表达的组分例如核仁素(nucleolin)或核磷蛋白介导。

[0150] 由于这些结果证明了外来体 miRNA 作谱可用作组织 miRNA 的代表物并且筛查的目标可以是对早期疾病进行鉴定,所以在早期疾病中检查了对循环系统外来体 miRNA 进行检测的能力。在患早期卵巢癌与晚期卵巢癌的患者之间,所述诊断性 miRNA 的外来体 miRNA 表达对于大多数的这些 miRNA 没有显著差别(图 6)。与 II 期和 III 期相比,miR-200c 和

miR-214 在患 I 期的患者中更低；然而，在所有情况下，这些 miRNA 比源自良性疾病的外来体中检测的水平显著升高。无法证明在正常受试者中存在所述小 RNA 部分，并且评估 miRNA 存在的尝试结果是否定的。因此，不存在外来体和 / 或外来体小 RNA 与正常个体、非携带癌症的个体有关，映射正常组织 miRNA 谱的外来体 miRNA 似乎与良性疾病有关。在卵巢癌的阶段之间的相似性可能是对起始的外来体小 RNA 的量的标准化和对所产生的阵列数据归一化的结果。尽管有这种标准化和归一化，以来自患良性疾病的患者的外来体 miRNA 获得的谱仍然是不同的。这些结果表明，对与循环系统外来体相关的具体 miRNA 的分析可适用于卵巢癌的所有阶段，并且基于本文中提及的 8 种具体 miRNA 的水平似乎可区分良性疾病和恶性疾病。

[0151] 外来体的 miRNA 特征平行与起源肿瘤细胞的 miRNA 表达谱相当，这表明 miRNA 作谱可在无组织的条件下进行并且可准确地反映所述肿瘤的谱。本发明人还发现，来自肺癌患者的且源自肿瘤的外来体包含类似于相应肿瘤 miRNA 特征的 miRNA (见实施例 6)。使用肿瘤标记物例如 EpCAM 可分离来自循环系统肿瘤的外来体，然后对外来体相关的 miRNA 进行分析。由于该方法是非侵入性的——原因是它不需要一个组织块来进行活组织检查，外来体 miRNA 作谱可用作一种检测多种不同癌症的筛查工具。由于鉴定了可预测预后 (包括治疗性抗拒) 且与肿瘤组织有关的具体 miRNA (例如 let-7i、miR-16、miR-21 和 miR-214) (Yang et al., 2008; Blower et al., 2008)，还可评估它们在肿瘤外来体中的存在，以进一步确定外来体的 miRNA 作谱作为一种预后指示物的效用。外来体 miRNA 作谱的应用可将该方法扩展至对无症状个体的筛查，以及用于监测疾病复发。

[0152] 实施例 6

[0153] miRNA 与源自外周血的肺肿瘤外来体的关联，与从它们的相应肺肿瘤分离的 miRNA 相比较

[0154] 在证明非小细胞肺癌 (NSCLC) 的诊断性 miRNA 特征的研究中，与正常肺组织相比，特定 miRNA 是过量表达的 (miR-17-3p、miR-21、miR-106a、miR-146、miR-155、miR-191、miR-192、miR-203、miR-205、miR-210、miR-212 和 miR-214)。为了将这些结果与源自患者的材料相关联，使用上文公开的和图 8 中显示的方法，从循环系统肿瘤外来体和原始肿瘤分离 miRNA 部分并作谱。使用 mirVana miRNA 阵列标记试剂盒，以 Cy3 标记所分离 miRNA 的 3' 端。使用包含针对 467 种成熟人 miRNA 的探针的微阵列，重复进行两次 miRNA 作谱。在杂交之后，使用 GenePix 4000A 阵列扫描仪扫描所述 miRNA 阵列，使用 GeneSpring 7.0 软件 (Silicon Genetics, Redwood City, CA) 归一化和分析原始数据。归一化是通过相对于添加至每个样品的对照微 RNA (Ambion) 表示每个 miRNA 重复，使得可在芯片之间进行比较来进行。

[0155] 在源自外周血的肿瘤外来体和肿瘤之间的比较表明 miRNA 标志没有显著差异 (图 9)。该方法确证了，至少 12 种特定 miRNA 在 NSCLC 中有升高，并且这 12 种的相关性被映射于源自肿瘤的循环系统外来体中。因此，对这些 miRNA 的评估可用作它们在所述肿瘤中水平的代表物，因此对癌症 (在这个具体情形下为 NSCLC) 的存在有诊断价值。

[0156] 实施例 7

[0157] 用于与不利妊娠结果关联的源自胎盘的外来体 miRNA 作谱

[0158] 为了确定循环系统外来体是否包含可诊断不利妊娠结果 (如早产) 的 miRNA，收

集来自怀孕的受试者的血清样品并使用连接于磁珠的抗胎盘碱性磷酸酶抗体分离源自胎盘组织的外来体部分。如上文公开的和图 8 中显示的,从分离的源自胎盘的循环系统外来体及直接来自相同受试者的胎盘组织分离 miRNA 并对其作谱。简而言之,使用 mirVana miRNA 阵列标记试剂盒,以 Cy3 标记所分离 miRNA 的 3' 端。使用包含针对 467 种成熟人 miRNA 的探针的微阵列,重复进行两次 miRNA 作谱。在杂交之后,使用 GenePix 4000A 阵列扫描仪扫描所述 miRNA 阵列,使用 GeneSpring 7.0 软件 (Silicon Genetics, Redwood City, CA) 归一化和分析原始数据。归一化是通过相对于添加至每个样品的对照微 RNA (Ambion) 表示每个 miRNA 重复,使得可在芯片之间进行比较来进行。

[0159] 结果在表 3 中列出。DT1 样品为从怀孕至足月的女性的胎盘组织分离的 miRNA。DT2 样品为从怀孕至足月的女性的源自胎盘的外来体分离的 miRNA。DT3 样品为从早产 (在妊娠 32 周之前分娩) 女性的胎盘组织分离的 miRNA。DT4 样品为从早产女性的源自胎盘的外来体分离的 miRNA。阴影的单元格表示 miRNA 存在于测试样品中。

[0160] 这些数据表明,已实现对源自胎盘的外来体的 miRNA 作谱并且这些数据与来自胎盘的 miRNA 谱有关。由此,从胎盘细胞产生的外来体分离的 miRNA 的 miRNA 谱可用于不利妊娠结果的诊断目的。

[0161] 表 3

[0162] 来自源自外周血的胎盘外来体和相关胎盘组织的 miRNA 的检测和定量*

[0163]

归一化的阈值		3.11	3.14	4.26	4.85
归一化的 TPT95		4.61	5.07	5.53	5.20
		DT1	DT2	DT3	DT4
Name	ID	866A	866B	866C	866D
hsa-miR-296	1098	5.05	4.33	4.24	4.79
hsa-miR-330	1002	2.98	3.09	4.1	1.08
hsa-miR-20a	1007	11.46	11.35	12	11.93
hsa-miR-28	1024	9.4	10.05	9.19	9.23
hsa-miR-302c	1032	-0.58	3.08	3.5	1.08
hsa-miR-302a	1036	2.17	3.66	3.47	4.33
hsa-miR-214	1057	6.58	3.93	6.17	2.99
hsa-miR-99b	1063	9.59	10.08	9.86	9.16
hsa-miR-99a	1068	3.81	4.53	7.34	6.46
hsa-miR-10a	1072	10.1	10.76	9.63	9.55
hsa-let-7d	1085	12.53	13.32	12.65	12.5
hsa-miR-138	1089	5.37	5.26	4.18	3.61
hsa-miR-140	1106	3.23	4.3	2.01	0.58
hsa-miR-23a	1114	14.51	15.08	14.99	14.78
hsa-miR-215	1122	0.71	1.79	0.51	1.38
hsa-miR-183	1127	9.08	9.63	8.99	8.9
hsa-miR-32	1135	2	2.49	2.42	0.58
hsa-miR-25	1139	11.34	11.3	12.23	12.01
hsa-miR-218	1143	2.71	3.37	4.61	5.33
hsa-miR-107	1163	11.68	12.18	11.29	11.31
hsa-miR-145	1168	1.74	2.38	3.47	1.38
hsa-miR-181a	1172	11.9	12.62	11.35	11.15
hsa-miR-125a	1193	12.34	13.07	11.67	11.84
hsa-miR-222	1198	12.37	12.53	11.77	10.99
hsa-miR-372	1105	-0.58	3.08	2.51	1.08
hsa-miR-9*	1232	-0.58	-0.01	0.51	0.58
hsa-miR-142-3p	1253	2.72	3.06	4.59	3.91
hsa-miR-198	1258	4.2	3.92	3.32	3.67
hsa-miR-196a	1263	4.78	5.07	3.42	4.04
hsa-miR-16	1272	12.28	12.05	12.98	12.6
hsa-miR-200a	1287	8.29	8.72	7.17	7.44
hsa-miR-18a	1292	6.41	6.66	7.98	8.5
hsa-miR-101	1297	4.62	4.87	5.55	6.01
hsa-miR-195	1311	6.09	6.58	6.03	6.43
hsa-miR-136	1203	3.69	3.77	3.52	3.65
hsa-miR-153	1225	1.71	2.08	0.51	0.58
hsa-miR-31	1227	8.97	9.49	9.6	9.32
hsa-miR-184	1242	-0.08	-0.51	3.1	0.58
hsa-miR-33	1274	2.01	3.66	3.58	3.75
hsa-miR-147	1278	4.65	2.95	3.47	3.17

[0164]

hsa-miR-106b	1282	9.47	9.19	10.59	10.38
hsa-miR-212	1288	2.67	1.81	2.89	3.75
hsa-miR-15a	1312	9.92	10.12	10.79	11.06
hsa-miR-135b	1331	4.51	4.03	4.42	4.07
hsa-miR-92	1335	12.29	12.63	12.62	12.26
hsa-miR-342	1349	9.14	9.62	8.36	8.39
hsa-miR-205	1368	6.15	5.74	15.25	14.33
hsa-miR-150	1385	4.02	2.87	3.33	1.38
hsa-miR-149	1392	6.23	5.65	5.92	4.79
hsa-let-7b	1431	12.73	12.43	13.73	14.06
hsa-miR-370	1445	4.14	3.7	4.37	2.58
hsa-miR-206	1449	5.22	4.34	5.58	4.91
hsa-miR-128a	1350	7.54	7.9	8.06	8.01
hsa-miR-197	1487	11.05	9.76	10.03	9.28
hsa-miR-182	1506	10.11	10.89	10.09	10.41
hsa-miR-553	1750	2.77	2.95	4.05	3.17
hsa-miR-606	1758	-0.58	-0.51	1.01	0.58
hsa-miR-518f	1762	1	-0.01	2.51	0.58
hsa-miR-519d	1766	2.17	3.28	0.51	3.04
hsa-miR-520g	1770	-0.58	1.9	3.51	2.49
hsa-miR-520e	1774	-0.58	1.79	0.51	3.75
hsa-miR-329	1778	2.67	2.08	3.32	2.91
hsa-miR-634	1782	6.69	2.64	3.32	1.08
hsa-miR-614	1786	1.21	-0.01	1.31	2.91
hsa-miR-596	1794	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-182*	1457	-0.08	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-223	1467	2.71	2.49	4.17	3.17
hsa-miR-512-5p	1843	-0.58	0.79	2.51	0.58
hsa-miR-643	1855	-0.08	-0.51	0.51	2.91
hsa-miR-591	1859	0.21	1.29	0.51	0.58
hsa-miR-485-5p	1863	4.27	2.49	2.6	0.58
hsa-miR-369-5p	1867	2	1.49	0.51	0.58
hsa-miR-575	1871	2.75	2.69	4.36	3.75
hsa-miR-626	1879	-0.58	0.29	0.51	0.58
hsa-miR-650	1883	-0.08	-0.51	3.68	0.58
hsa-miR-663	1891	5.41	5	6.17	5.76
hsa-miR-520f_hsa-miR-520c	1802	1.61	1.79	2.97	3.15
hsa-miR-382	1806	4.48	4.14	4.04	3.25
hsa-miR-656	1810	-0.58	0.29	2.83	0.58
hsa-miR-605	1814	1.08	-0.51	1.31	0.58
hsa-miR-655	1920	1.21	2.3	2.1	3.17
hsa-miR-545	1932	2.5	2.66	2.92	3.58
hsa-miR-502	1940	3.46	4.16	4.99	3.75
hsa-miR-200a*	1952	5.35	5.86	3.42	2.25
hsa-miR-640	1956	2.24	-0.51	2.51	0.58
hsa-miR-620	1960	-0.58	-0.51	0.51	1.08
hsa-miR-514	1972	2	2.95	1.01	1.38
hsa-miR-583	1980	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-548b	1988	1.92	-0.01	2.51	0.58
hsa-miR-609	1899	2.55	2.58	3.6	3.54
hsa-miR-563	1903	-0.58	-0.51	0.51	0.58

[0165]

hsa-miR-377	1929	1.74	-0.01	2.6	0.58
hsa-miR-376a	1933	-0.58	0.29	0.51	0.58
hsa-miR-433	1937	2.71	2.19	3.74	1.08
hsa-miR-500	1957	4.67	4.88	6.34	5.8
hsa-miR-652	1961	6.26	6.6	5.52	5.05
hsa-miR-384	1969	-0.58	2.3	0.51	0.58
hsa-miR-548d	1977	-0.58	2.3	0.51	0.58
hsa-miR-518c	1981	0.92	1.81	3.68	1.38
hsa-miR-561	1985	-0.58	2.49	0.51	1.38
hsa-miR-551a	2018	3.77	3.27	4.06	3.91
hsa-miR-554	2026	-0.08	0.29	1.01	1.08
hsa-miR-510	2030	2.59	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-525	2034	-0.58	2.06	3.1	0.58
hsa-miR-570	2054	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-617	2062	2	2.49	0.51	2.91
hsa-miR-556	2070	-0.58	1.81	1.31	1.08
hsa-miR-551b	2074	1.37	1.79	3.97	3.38
hsa-miR-424	1993	5.87	5.84	4.54	4.79
hsa-miR-612	1997	2.87	0.29	2.83	0.58
hsa-miR-130a	2005	8.07	8.66	9.08	9.2
hsa-miR-569	2110	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-302a*	2114	-0.58	1.95	0.51	0.58
hsa-miR-499	2122	-0.58	-0.01	1.01	0.58
hsa-miR-429	2134	5.68	5.39	3.89	4.83
hsa-miR-365	2138	8.7	8.73	7.51	7.31
hsa-miR-598	2150	-0.58	0.29	0.51	0.58
hsa-miR-29a	2154	13.45	13.83	12.21	12.27
hsa-miR-503	2162	5.44	6.25	1.31	4.39
hsa-miR-624	2166	-0.58	1.99	0.51	3.39
hsa-miR-409-5p	2089	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-550	2097	4.34	4.26	3.89	2.58
hsa-miR-627	2101	-0.58	1.49	0.51	0.58
hsa-miR-33b	2105	-0.58	0.29	0.51	0.58
hsa-miR-581	2227	2.32	1.65	2.31	0.58
hsa-miR-493-3p	2231	2.17	0.29	0.51	0.58
hsa-miR-610	2239	4.57	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-516-3p	2259	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-422a	2263	8.33	8.48	9.59	9.25
hsa-miR-449	2267	2.91	2.48	1.31	0.58
hsa-miR-585	2271	3.58	3.74	4.51	4.12
hsa-miR-379	2275	2.22	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-92b	2182	7.86	8.04	7.75	7.13
hsa-miR-629	2316	6.12	5.93	6.82	7.03
hsa-miR-580	2320	-0.58	1.49	0.51	2.58
hsa-miR-448	2324	1.74	-0.51	2.83	0.58
hsa-miR-659	2328	-0.58	0.29	0.51	0.58
hsa-miR-592	2332	0.21	2.95	2.83	0.58
hsa-miR-587	2336	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-671	2839	4.15	3.98	4.21	0.58
hsa-miR-802	2851	1.42	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-767-3p	2863	1.42	2.3	2.51	0.58
hsa-miR-608	2279	3.74	1.29	2.47	0.58

[0166]

hsa-miR-668	2287	1.21	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-210	2291	9.13	8.6	8.39	7.96
hsa-miR-26a	2299	12.6	12.61	12.27	12.73
hsa-miR-493-5p	2329	2	2.65	2.17	1.08
hsa-miR-202*	2337	2.55	2.08	3.32	1.88
hsa-miR-454-5p	2840	11.51	11.6	12.87	13.07
hsa-miR-770-5p	2844	2.24	-0.01	1.01	0.58
hsa-miR-767-5p	2848	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-769-3p	2865	3.8	3.74	3.01	2.88
hsa-miR-758	2869	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-765	2864	5.35	5.13	6.08	5.77
hsa-miR-301	1103	3.96	4.08	4.04	4.68
hsa-miR-191	1017	9.84	10.87	11.01	10.9
hsa-miR-93	1029	9.68	9.58	10.93	9.75
hsa-let-7f	1033	11.59	12.43	11.79	11.94
hsa-miR-373	1037	3.54	2.4	4.51	3.08
hsa-miR-200b	1042	10.9	11.07	10.17	9.02
hsa-miR-100	1064	7.25	6.69	7.81	5.54
hsa-miR-324-3p	1082	5.67	4.71	5.64	3.99
hsa-miR-34b	1096	3.27	3.49	3.83	4.54
hsa-miR-324-5p	1115	3.84	2.29	4.16	4.49
hsa-miR-199a*	1124	1.82	2.24	1.01	4.17
hsa-miR-103	1164	11.27	10.65	11.3	9.18
hsa-miR-142-5p	1169	-0.58	-0.51	2.31	0.58
hsa-miR-220	1173	3.67	3.04	4.26	3.99
hsa-miR-151	1199	9.73	9.47	10.22	10.45
hsa-miR-186	1141	4.72	4.93	3.86	4.49
hsa-miR-128b	1153	6.29	6.26	6.7	6.1
hsa-miR-130b	1165	7.72	6.96	7.99	6.49
hsa-miR-338	1174	2.42	2.66	2.67	2.91
hsa-miR-199b	1178	1.98	-0.01	3.67	3.46
hsa-miR-125b	1182	9.34	8.81	9.86	8.11
hsa-miR-124a	1213	1.74	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-122a	1243	5.11	3.49	4.97	4.71
hsa-miR-30d	1251	11.72	11.93	11.32	11.69
hsa-miR-203	1260	1.42	2.9	9.1	9.56
hsa-let-7c	1268	11.91	12.72	13.09	12.47
hsa-miR-216	1294	2	2.45	2.71	3.38
hsa-miR-144	1300	0.71	0.49	1.01	2.91
hsa-miR-15b	1313	11.75	12.27	12.66	12.77
hsa-miR-192	1205	7.05	8.48	6	6.14
hsa-miR-133a	1215	3.27	3.07	3.82	4.11
hsa-miR-126	1380	6.42	6.42	5.94	7.51
hsa-miR-326	1393	3.32	0.29	0.51	3.17
hsa-miR-98	1423	6.58	7.21	6.9	7.33
hsa-let-7g	1432	10.8	11.21	10.01	10.06
hsa-miR-190	1437	3.16	3.57	4.02	4.29
hsa-miR-189	1442	2.59	2.79	2.92	3.38
hsa-miR-137	1339	2.66	3.06	4.36	3.88
hsa-miR-105	1345	2.37	2.48	4.32	3.17
hsa-miR-96	1507	4.66	4.17	4.58	4.58
hsa-miR-518b	1759	-0.58	-0.51	0.51	0.58

[0167]

hsa-miR-519e	1767	-0.08	2.3	2.83	1.08
hsa-miR-520a	1771	1.42	1.99	3.1	0.58
hsa-miR-552	1779	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-451	1783	1	-0.51	3.32	2.58
hsa-miR-523	1787	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-518e	1795	-0.08	-0.51	2.83	0.58
hsa-miR-299-5p	1458	1.74	2.06	2.51	0.58
hsa-miR-95	1482	3.94	3.78	2.71	3.08
hsa-miR-520h	1824	1.74	1.08	0.51	0.58
hsa-miR-593	1832	4.92	1.08	4.1	2.91
hsa-miR-574	1840	11.34	9.36	11.12	9.45
hsa-miR-641	1856	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-504	1860	-0.58	1.81	0.51	0.58
hsa-miR-202	1864	2.59	1.9	2.97	3.67
hsa-miR-564	1884	0.42	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-604	1892	1.71	-0.51	2.83	0.58
hsa-miR-519b	1799	-0.08	3.49	3.97	3.83
hsa-miR-520d	1803	2.58	3.56	3.89	4.36
hsa-miR-602	1825	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-622	1829	1.42	2.66	0.51	1.38
hsa-miR-483	1845	8.06	3.91	7.36	4.34
hsa-miR-600	1853	0.21	-0.01	0.51	2.38
hsa-miR-631	1861	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-383	1865	2.17	1.95	0.51	1.88
hsa-miR-29b	1869	6.67	6.05	5.9	6.65
hsa-miR-613	1881	2.42	-0.01	1.31	0.58
hsa-miR-453	1904	3.93	3.59	4.76	4.17
hsa-miR-489	1908	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-23b	1930	13.2	13.81	12.99	13.61
hsa-miR-376b	1934	-0.58	-0.01	0.51	0.58
hsa-miR-501	1942	2.87	2.72	1.31	3.25
hsa-miR-517c	1946	3.01	3.02	4.36	4.39
hsa-miR-516-5p	1950	-0.08	-0.51	1.01	0.58
hsa-miR-548c	1978	-0.58	-0.51	1.01	1.08
hsa-miR-625	1897	6.54	7.16	5.67	5.65
hsa-miR-630	1905	2.74	1.49	2.92	3.49
hsa-miR-644	1913	0.21	2.29	2.51	2.91
hsa-miR-488	2015	-0.58	0.29	0.51	0.58
hsa-miR-633	2023	1.42	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-527	2039	3.42	1.87	2.51	1.08
hsa-miR-589	2055	-0.08	-0.51	1.31	0.58
hsa-miR-508	2071	2.81	2.79	3.21	4.04
hsa-miR-566	2075	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-449b	2083	2.41	2.48	3.97	2.58
hsa-miR-603	1990	4.74	2.84	3.76	0.58
hsa-miR-607	2111	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-559	2115	-0.58	0.29	0.51	0.58
hsa-miR-506	2123	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-200c	2131	4.25	3.75	13.3	13.7
hsa-miR-29c	2155	2.75	3.24	3.6	4.2
hsa-miR-411	2167	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-381	2171	-0.58	-0.51	0.51	0.58

[0168]

hsa-miR-455	2179	2.87	2.52	2.6	0.58
hsa-miR-363*	2086	1.42	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-380-5p	2090	0.21	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-567	2094	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-378	2208	2.24	2.3	3.6	2.58
hsa-miR-638	2212	7.37	6.34	8.56	7.57
hsa-miR-542-5p	2216	1.42	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-518f*	2220	-0.58	-0.51	3.17	3.67
hsa-miR-549	2232	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-558	2240	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-let-7i	2244	12.8	13.03	10.86	10.79
hsa-miR-560	2256	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-636	2260	-0.58	-0.51	0.51	3.17
hsa-miR-422b	2264	9.17	8.72	10.51	10.23
hsa-miR-193b	2268	9.68	8.44	8.63	7.54
hsa-miR-491	2272	1.74	0.79	2.81	0.58
hsa-miR-484	2191	8.32	7.81	8.29	7.72
hsa-miR-662	2199	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-623	2203	1.74	2.45	0.51	0.58
hsa-miR-486	2209	3.86	3.3	4.2	4.6
hsa-miR-639	2213	1.87	1.49	2.31	1.38
hsa-miR-517a_hsa-miR-517b	2217	2.11	2.56	3.87	3.28
hsa-miR-645	2221	3.12	1.29	0.51	2.58
hsa-miR-653	2229	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-146b	2237	5.56	5.29	4.21	5.59
hsa-miR-571	2249	3.33	2.99	4.1	2.91
hsa-miR-191*	2257	2.42	2.95	1.31	0.58
hsa-miR-7	2261	2.44	3.02	2.51	3.54
hsa-miR-647	2269	4.95	4.27	5.5	6.01
hsa-miR-637	2273	4.65	2.84	4.9	4.17
hsa-miR-30b	2280	9.94	9.87	9.86	9.66
hsa-miR-431	2288	1.74	-0.01	0.51	2.58
hsa-miR-452	2292	4.68	5.15	5.14	5.85
hsa-miR-361	2296	10.36	11.32	10.53	10.83
hsa-miR-576	2314	1.87	-0.51	2.83	0.58
hsa-miR-432	2326	3.74	3.47	3.51	2.58
hsa-miR-375	2342	3.42	2.15	0.51	3.75
hsa-miR-766	2841	9.66	6.37	8.18	7.59
hsa-miR-768-3p	2845	9.89	9.61	9.2	9.48
hsa-miR-769-5p	2861	4.03	4.07	4.47	3.46
hsa-miR-542-3p	2289	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-513	2301	3.8	2.56	3.97	4.38
hsa-miR-362	2017	2.93	4.53	4.88	4.38
hsa-miR-325	2025	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-520a*	2033	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-517*	2037	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-565	2045	7.04	4.89	5.13	6.45
hsa-miR-526b	2049	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-30e-3p	2053	8.97	9.4	7.84	7.61
hsa-miR-601	2088	2.87	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-519a	2104	-0.58	1.49	0.51	1.08

[0169]

hsa-miR-632	2108	-0.08	2.3	0.51	0.58
hsa-miR-320	1005	12.75	13.28	13.11	13.09
hsa-miR-132	1014	4.94	6.57	6.22	7.04
hsa-miR-193a	1018	4.56	4.32	3.66	4.58
hsa-miR-22	1022	8.71	8.95	8.69	8.79
hsa-miR-224	1026	6.69	7.1	6.4	6.96
hsa-let-7a	1030	13.37	14.07	14.63	14.91
hsa-miR-302d	1034	2.32	2.74	3.76	3.28
hsa-miR-369-3p	1038	2.72	2.38	4.68	3.83
hsa-miR-154*	1047	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-368	1059	1.42	0.49	0.51	0.58
hsa-miR-373*	1078	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-34c	1095	1.42	1.49	0.51	2.99
hsa-miR-154	1101	1.61	-0.51	1.31	2.75
hsa-miR-106a	1006	12.01	12.48	12.09	12.36
hsa-miR-181c	1015	5.67	6.09	4.64	4.27
hsa-miR-17-5p	1031	11.57	11.85	11.34	11.83
hsa-miR-302b	1035	-0.08	2.66	3.26	4.04
hsa-miR-19b	1039	10.14	10.07	11.3	11.47
hsa-miR-24	1044	12.91	13.2	13.13	13.4
hsa-miR-367	1052	2.17	-0.01	1.01	0.58
hsa-miR-17-3p	1079	4.95	5.02	4.83	5.34
hsa-miR-221	1088	13.67	13.73	12.88	12.76
hsa-miR-335	1146	-0.58	-0.51	6.66	7.68
hsa-miR-323	1154	-0.58	1.81	0.51	0.58
hsa-miR-199a	1167	2.31	-0.51	0.51	3.17
hsa-miR-126*	1171	3.12	1.95	3.68	3.15
hsa-miR-337	1175	2.22	-0.51	3.97	2.91
hsa-miR-181a*	1179	5.67	5.34	5.91	5.76
hsa-miR-331	1183	6.46	5.25	5.55	4.95
hsa-miR-340	1187	2.96	2.99	3.86	4.17
hsa-miR-208	1108	1.42	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-188	1116	3.94	3.31	3.86	4.39
hsa-miR-9	1231	2.96	3.25	4	4.53
hsa-miR-34a	1235	6.95	6.56	7.17	7.33
hsa-miR-30c	1252	13.78	13.97	12.46	12.24
hsa-miR-19a	1271	5.93	5.76	8.01	8.36
hsa-miR-371	1276	3.67	2.19	3.36	3.38
hsa-miR-10b	1301	6.91	7.36	7.73	8.03
hsa-miR-21	1315	13.13	13.2	12.28	12.88
hsa-miR-217	1206	2.53	2.49	0.51	3.57
hsa-miR-302b*	1210	1.87	2.49	2.51	2.99
hsa-miR-135a	1216	2.41	3.62	3.47	3.89
hsa-miR-148a	1361	3	1.45	6.87	7.35
hsa-miR-339	1366	4.85	4.26	5.12	5.2
hsa-miR-187	1381	3.69	2.4	4.21	3.75
hsa-miR-346	1390	5.77	3.2	4.09	4.87
hsa-miR-146a	1409	9.7	9.88	7.17	7.56
hsa-miR-143	1415	-0.58	-0.51	2.51	3.75
hsa-miR-219	1426	2	1.81	3.32	4.04
hsa-miR-185	1451	8.4	8.73	9.33	9.46
hsa-miR-328	1455	7.15	4.5	4.92	4.33

[0170]

hsa-miR-196b	1321	4.65	4.44	5.08	5.68
hsa-miR-204	1489	0.71	2.49	0.51	1.38
hsa-miR-133b	1498	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-129	1512	6.33	6.08	7.2	8.02
hsa-miR-649	1756	3.32	2.93	3.17	2.17
hsa-miR-518a	1760	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-562	1764	-0.58	-0.51	0.51	1.08
hsa-miR-526b*	1772	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-522	1776	2.87	3.4	5.74	5.87
hsa-miR-490	1784	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-618	1788	2.22	1.65	0.51	1.08
hsa-miR-525*	1796	-0.58	1.49	1.31	0.58
hsa-miR-30a-5p	1460	12.45	12.55	11.09	11.04
hsa-miR-302c*	1474	0.42	-0.01	0.51	0.58
hsa-miR-27a	1485	11.64	11.67	11.97	12.27
hsa-miR-30a-3p	1505	12.22	12.57	10	10.48
hsa-miR-494	1753	4.47	3.87	6.12	5.48
hsa-miR-518d	1761	-0.58	2.08	0.51	0.58
hsa-miR-519c	1765	-0.08	0.29	0.51	3.75
hsa-miR-20b	1769	10.41	10.8	10.92	11.2
hsa-miR-520b	1773	-0.08	1.49	1.01	2.58
hsa-miR-495	1777	-0.58	-0.51	0.51	2.91
hsa-miR-521	1785	3.42	0.49	3.31	3.75
hsa-miR-646	1793	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-648	1804	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-410	1808	1.42	-0.51	0.51	1.08
hsa-miR-487a	1812	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-409-3p	1820	-0.58	-0.51	1.01	0.58
hsa-miR-363	1822	-0.58	-0.51	3.32	1.08
hsa-miR-181b	1830	11.53	11.96	10.84	11.02
hsa-miR-616	1842	2.22	-0.51	0.51	2.49
hsa-miR-18a*	1850	4.52	2.99	4.97	3.83
hsa-miR-635	1854	-0.58	-0.51	1.31	0.58
hsa-miR-423	1874	8.9	8.85	9.09	8.46
hsa-miR-611	1882	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-524	1797	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-595	1805	9.11	6.55	8.47	6.49
hsa-miR-487b	1817	4.65	4.3	5.22	5.53
hsa-miR-425-3p	1943	4.14	4.02	3.39	3.96
hsa-miR-594	1951	10.94	10.48	11.55	11.22
hsa-miR-532	1959	5.87	5.79	6.62	6.14
hsa-miR-568	1963	-0.58	-0.51	0.51	1.38
hsa-miR-496	1967	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-544	1971	1.08	2.49	1.01	2.91
hsa-miR-509	1975	-0.08	-0.51	0.51	3.75
hsa-miR-548a	1979	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-658	1894	-0.58	-0.51	1.01	0.58
hsa-miR-555	1898	1.42	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-657	1902	-0.58	-0.51	0.51	1.38
hsa-miR-512-3p	1910	2.56	2.74	4.41	3.83
hsa-miR-524*	2024	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-515-5p	2032	-0.58	-0.51	0.51	0.58

[0171]

hsa-miR-526a	2036	-0.58	-0.51	5.78	5.87
hsa-miR-619	2044	2.01	1.49	1.01	4.08
hsa-miR-578	2048	3.54	2.79	3.17	2.38
hsa-miR-573	2056	-0.58	2.08	0.51	0.58
hsa-miR-492	2060	-0.08	1.49	2.71	2.67
hsa-miR-590	2064	3.27	3.4	5.51	5.08
hsa-miR-515-3p	2068	1.74	2.88	3.51	1.08
hsa-miR-621	2076	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-539	2080	2.74	1.81	2.51	4.28
hsa-miR-497	1995	3.05	3.11	3.26	0.58
hsa-miR-152	2007	7.72	8.44	6.59	7.2
hsa-miR-181d	2011	8.56	8.9	7.83	7.49
hsa-miR-660	2144	5.3	5.36	6.62	6.8
hsa-miR-526c	2152	-0.58	-0.51	2.42	0.58
hsa-miR-584	2176	10.1	10.43	7.6	7.99
hsa-miR-299-3p	2180	1.42	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-376a*	2087	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-597	2107	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-511	2109	2.59	-0.01	2.83	2.91
hsa-miR-599	2113	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-141	2117	-0.58	-0.51	7.91	8.21
hsa-miR-18b	2125	5.18	5.41	6.65	6.98
hsa-miR-582	2141	-0.58	-0.51	4.9	4.87
hsa-miR-577	2153	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-586	2173	2.11	1.49	2.47	1.08
hsa-miR-380-3p	2177	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-505	2184	5.06	5.45	4.16	4.58
hsa-miR-485-3p	2196	3.74	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-642	2200	4.22	1.15	2.42	0.58
hsa-miR-615	2204	3.94	-0.01	0.51	0.58
hsa-miR-572	2206	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-520d*	2218	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-628	2222	3.59	2.19	2.17	3.83
hsa-miR-518c*	2226	0.21	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-425-5p	2234	8.86	9.29	9.01	8.92
hsa-miR-432*	2266	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-661	2274	2.42	1.81	0.51	0.58
hsa-miR-421	2185	4.06	5.49	6.41	6.43
hsa-miR-452*	2193	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-27b	2303	10.82	11.2	11.39	11.55
hsa-miR-412	2307	2.59	-0.01	0.51	2.58
hsa-miR-579	2311	-0.58	-0.01	0.51	0.58
hsa-miR-519e*	2315	-0.58	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-588	2327	1.42	-0.51	0.51	0.58
hsa-miR-651	2335	1.71	1.69	3.39	2.91
hsa-miR-557	2339	3.37	2.49	3.51	0.58
hsa-miR-507	2343	-0.58	0.29	0.51	3.39
hsa-miR-801	2846	5.97	3.08	4.59	1.88
hsa-miR-768-5p	2854	8.68	8.01	8.5	8.38
hsa-miR-454-3p	2858	3	3.37	4.32	3.78
hsa-miR-654	2278	2.22	-0.51	1.31	0.58
hsa-miR-498	2298	2.87	-0.51	0.51	2.67

[0172]	hsa-miR-148b	1362	6.83	6.76	6.82	6.69
	hsa-miR-211	1367	3.56	-0.51	0.51	0.58
	hsa-miR-127	1377	1.8	-0.51	0.51	0.58
	hsa-miR-139	1384	-0.58	-0.51	0.51	0.58
	hsa-miR-194	1416	8.57	8.28	4.64	5.81
	hsa-let-7e	1421	7.42	9.18	8.74	9.52
	hsa-miR-345	1444	4.63	4.62	3.68	3.17
	hsa-miR-1	1448	-0.58	0.29	0.51	0.58
	hsa-miR-30e-5p	1461	-0.58	-0.51	0.51	0.58
	hsa-miR-134	1470	-0.58	-0.51	0.51	0.58
	hsa-miR-155	1476	8.21	9.31	4.32	6.17
	hsa-miR-374	1480	1.42	1.79	0.51	1.38
	hsa-miR-26b	1484	9.52	10	9.72	10.43

[0173] *原始数据经背景消减、Log2-转化及归一化。

[0174] 每个寡核苷酸探针的强度基于对两个重复点进行平均。

[0175] 显示了所有 467 种人寡核苷酸探针的数据。

[0176] 基于 $\text{Log}_2(5 * \text{非点背景标准差} + \text{去头尾平均阴性对照探针信号})$

[0177] 计算归一化的阈值。

[0178] 基于阴性对照探针信号的第 95 百分位计算归一化的阈值。

[0179] 总共 236 种人探针在至少一个样品中高于阈值。

[0180] 总共 158 种人探针在至少一个样品中高于 TPT95。

[0181] 本发明的实施例证明了对癌症和不利妊娠结果的诊断测定的成功应用,具有大大优于现行可用诊断的特异性、敏感性和阳性预测的价值;并且还提供了在任何其他测定形式中无法得到的有关阶段、等级和治疗反应的附加的信息。

[0182] 参考文献

[0183] Andre F, Schartz NE, Movassagh M, et al. Malignant effusions and immunogenictumour-derived exosomes. Lancet 2002 ;360 :295-305.

[0184] Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, et al. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. Am J Respir Cell Mol Biol 2004 ; 31 :114-21.

[0185] Bartel DP. MicroRNAs :Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004 ;116 :281-97.

[0186] Berek JS, Schultes BC, Nicodemus CF. Biologic and immunologic therapies for ovarian cancer. J Clin Oncol 2003 ;21(s10) :168-74.

[0187] Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection :the beginning of a new tale. Cancer Res 2006a ;66 :7390-94.

[0188] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nature Rev Cancer 2006b ;6 :857-66.

[0189] Choi DS, Lee JM, Park GW, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer cells. J Proteome Res 2007 ;6 :4646-55.

[0190] De Cecco L, Marchionni L, Gariboldi M, Reid JF, Lagonigro MS, Caramuta S,

et al. Gene expression profiling of advanced ovarian cancer : Characterization of a molecular signature involving fibroblast growth factor 2. *Oncogene* 2004 ; 23 : 8171-83.

[0191] Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Rev Cancer* 2006 ; 6 : 259-69.

[0192] Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activation platelets release two types of membrane vesicles : Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha granules. *Blood* 1999 ; 94 : 3791-9.

[0193] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, et al. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 8699-707.

[0194] J. M. Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W, Griffith JM, Yoshie O, Geuze HJ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 20121-7.

[0195] Koga K, Matsumoto K, Akiyoshi T, Kubo M, et al. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes, *Anticancer Res* 2005 ; 25 : 3703-7.

[0196] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005 ; 435 : 834-8.

[0197] Mears R, Craven RA, Hanrahan S, et al. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2004 ; 4 : 4019-31.

[0198] Menon U, Jacobs IJ. Recent developments in ovarian cancer screening. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000 ; 12 : 39-42.

[0199] Miska EA. How microRNAs control cell division, differentiation, and death. *Curr Opin Genet Dev* 2005 ; 5 : 563-8.

[0200] Olver C, Vidal M. Proteomic analysis of secreted exosomes. *Subcell Biochem.* 2007 ; 43 : 99-131.

[0201] Paul E, Blower PE, Chung JH, Verducci JS, Lin S, Park JK, Dai Z, Liu CG, Schmittgen TD, Reinhold WC, Croce CM, Weinstein JN, Sadee W. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Therap* 2008 ; 7 : 1-9.

[0202] Raposo G, Tenza D, Mecheri S, Peronet R, Bonnerot C, Desaymard C. Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Mol Biol Cell* 1997 ; 8 : 2631-45.

[0203] Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors : Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* 2006 ; 20 : 847-56.

- [0204] Sabapatha A, Gercel-Taylor C, Taylor DD. Specific isolation of placental-derived exosomes from the circulation of pregnant women and their immunoregulatory consequences. *Am J. Reprod Immunol* 2006;56:345-55.
- [0205] Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet&Gynaecol* 2006;20:207-25.
- [0206] Taylor DD, Doellgast GJ. Quantitation of peroxidase-antibody binding to membrane fragments using column chromatography. *Anal Biochem* 1979;98:53-9.
- [0207] Taylor DD, Homesley H D, Doellgast GJ. Binding of specific peroxidase-labeled antibody to placental-type alkaline phosphatase on tumor-derived membrane fragments. *Cancer Res* 1980;40:4964-69.
- [0208] Taylor DD, Black PH. Shedding of plasma membrane fragments: Neoplastic and developmental importance. In: Developmental Biology, (M. Steinberg, ed.) vol. 3, 1986:33-57.
- [0209] Taylor DD, Gercel-Taylor C. Tumour-derived exosomes as mediators of T-cell signaling defects. *Brit J Cancer* 2005;92:305-11.
- [0210] Taylor, D. D., Bohler, H. C., Gercel-Taylor, C. Pregnancy-linked suppression of TcR signaling pathways by a circulating factor absent in recurrent spontaneous pregnancy loss. *Molecular Immunology* 2006;43:1872-80.
- [0211] Valadi, H, Ekstrom K, Bossius A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNA and microRNA is a novel mechanism of genetic exchange. *Nature Cell Biol.* 2007;9:652-9.
- [0212] Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* 2006;66:9290-8.
- [0213] Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, Wenham WM, Coppola D, Kruk PA, Nicosia SV, Cheng JQ. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res* 2008;68:425-33.
- [0214] Zhang L, Huang J, Yang N, et al. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9136-41.

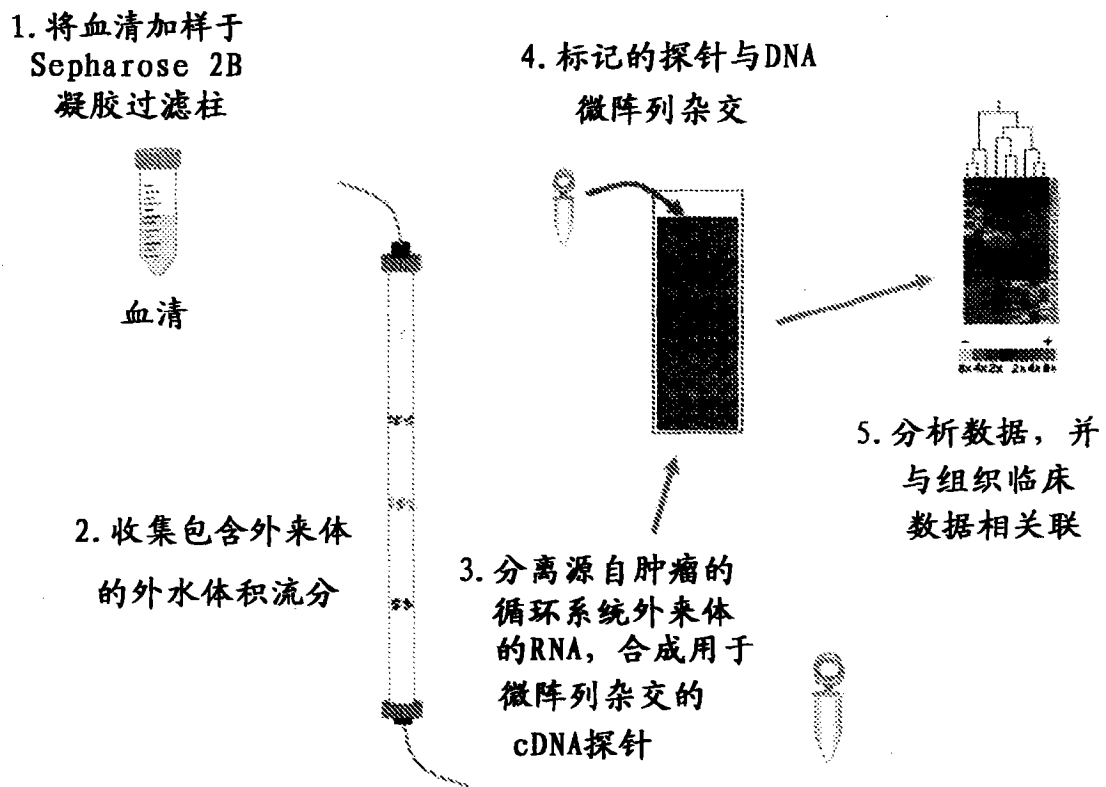


图 1

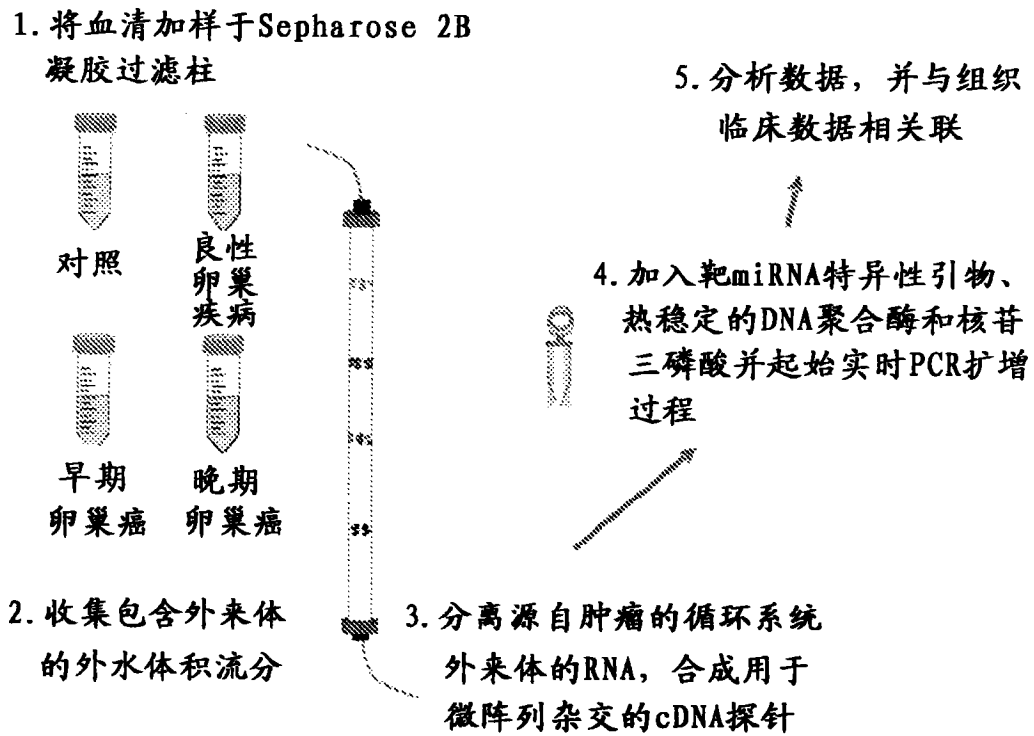
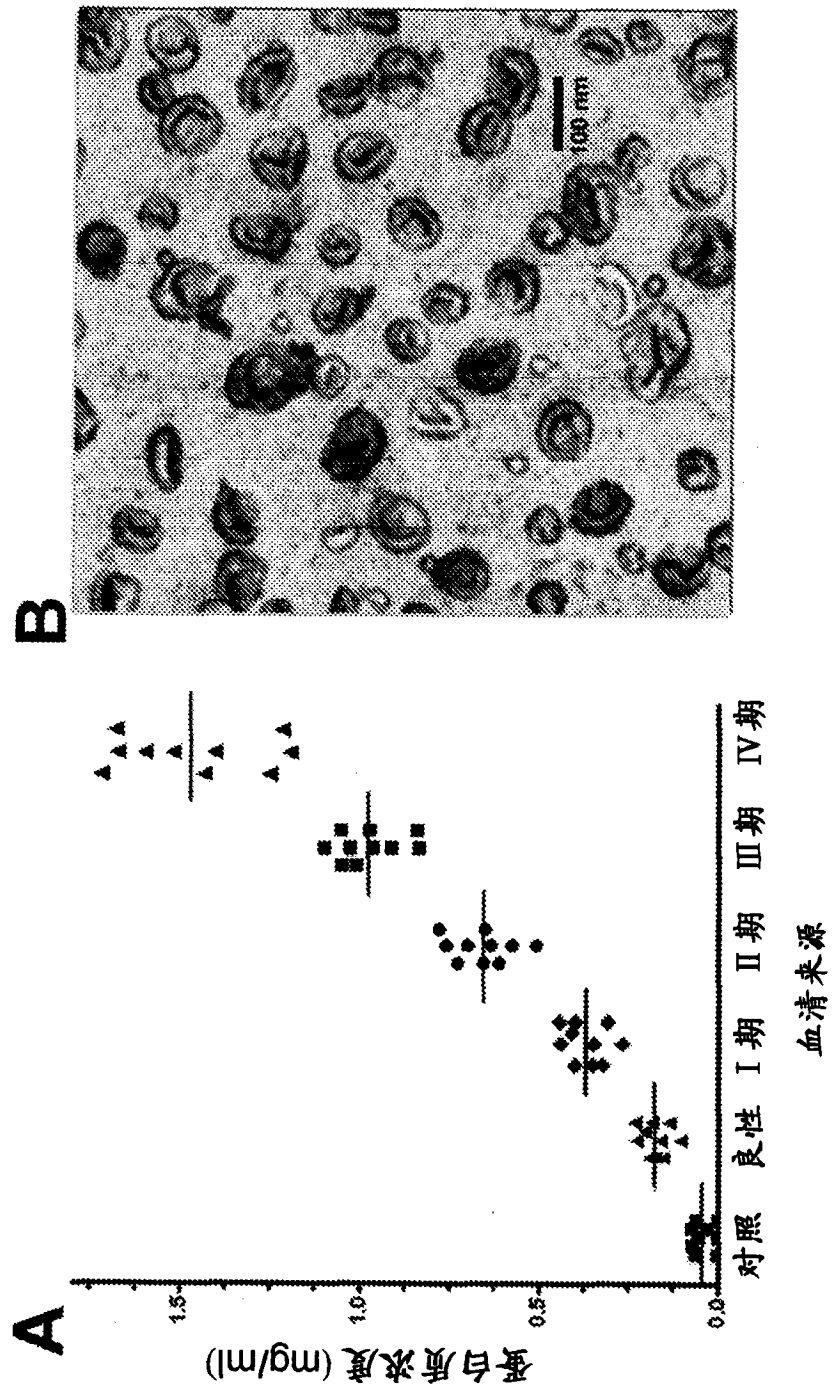


图 2



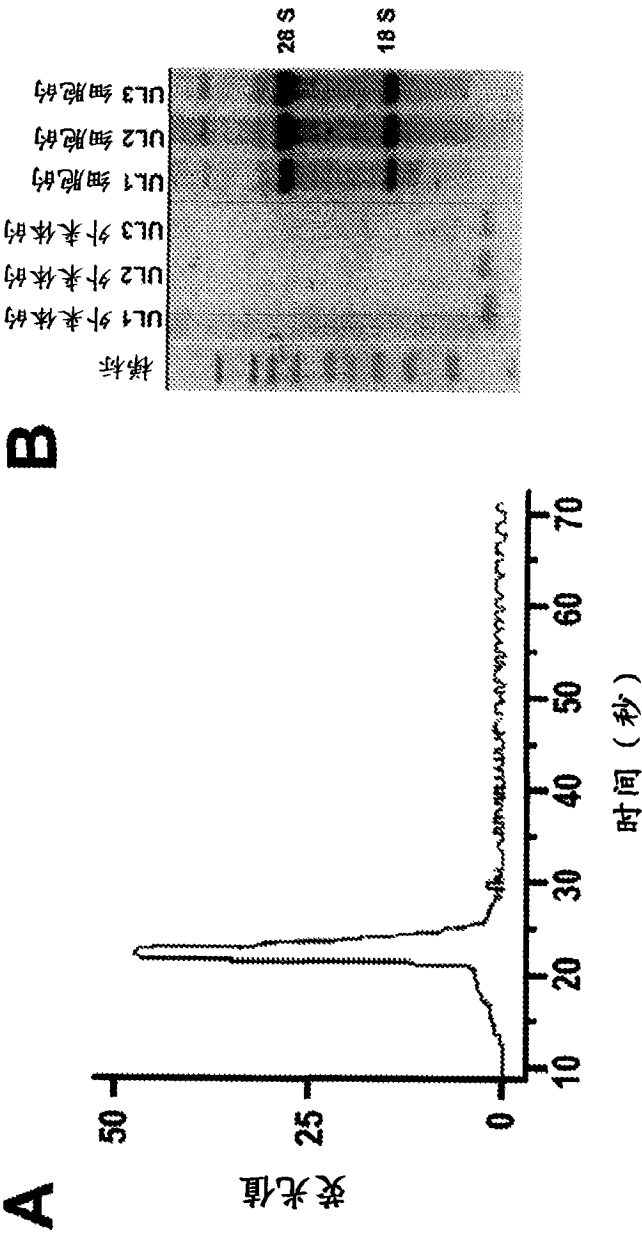


图 4

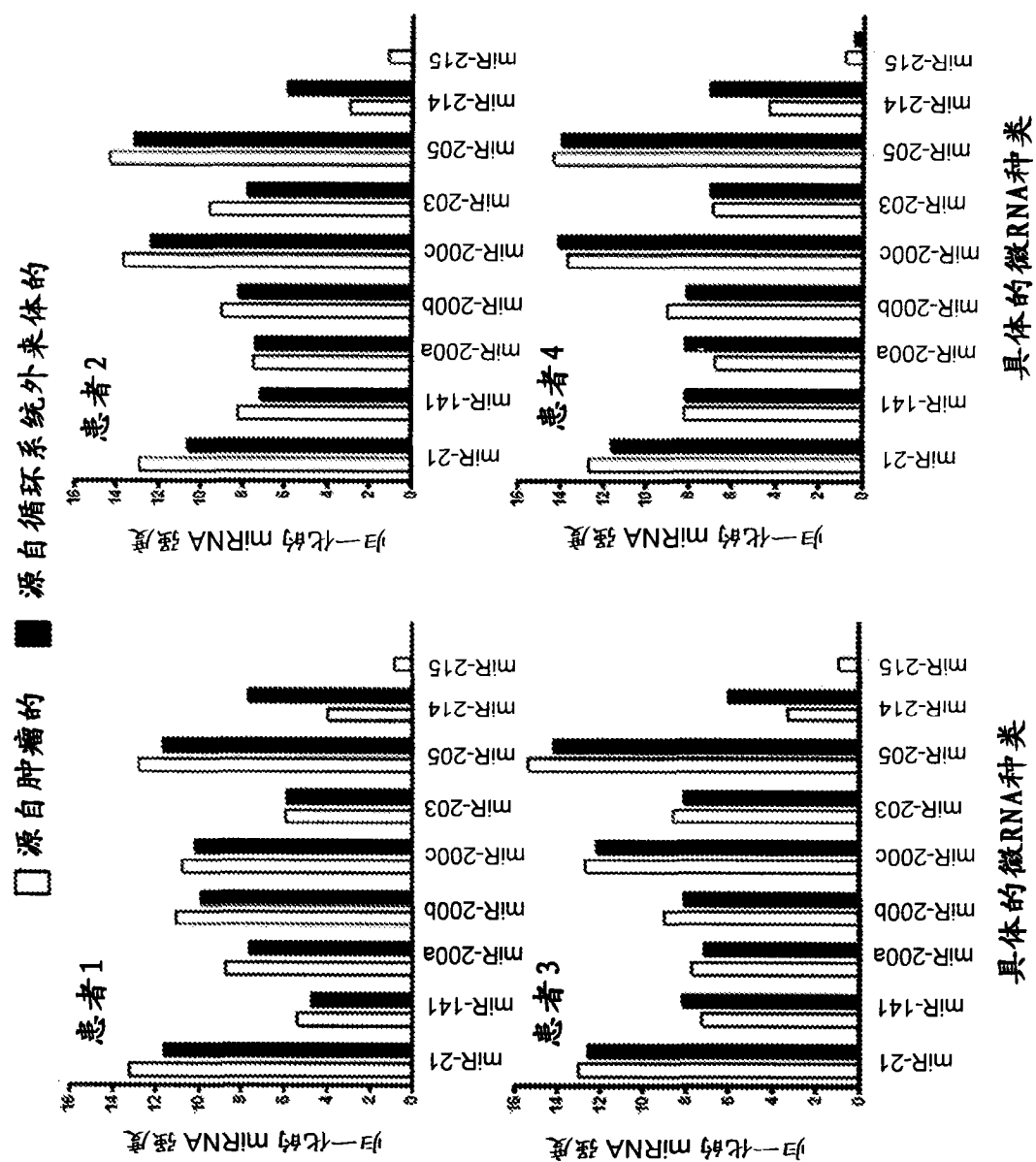


图 5

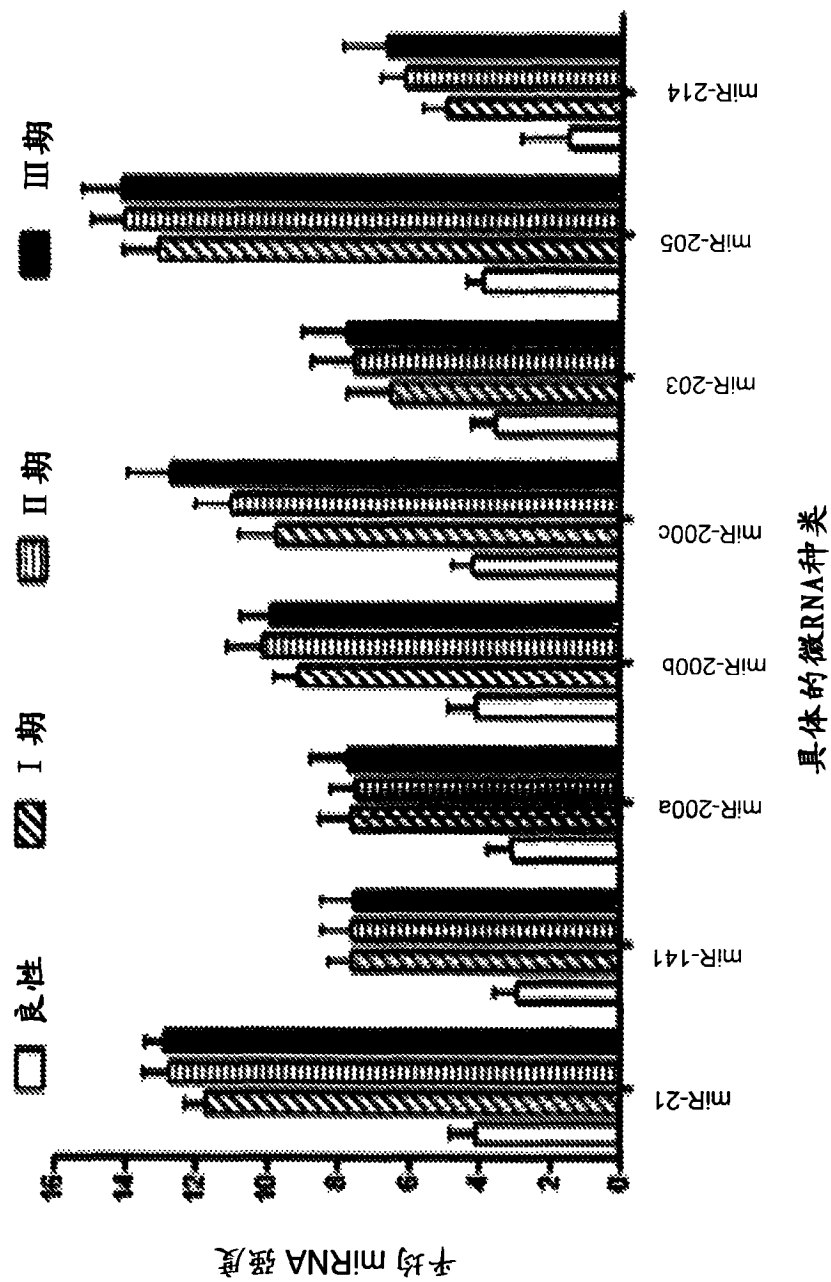


图 9

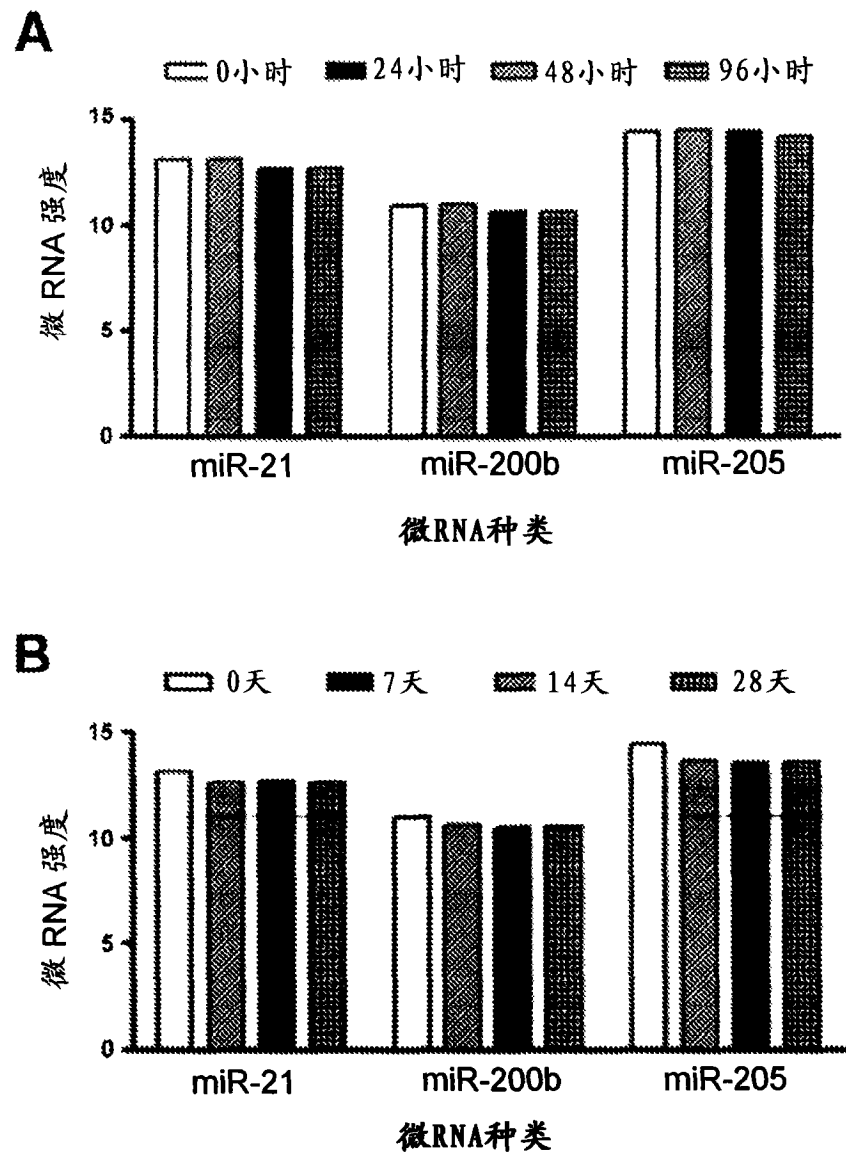


图 7

外来体微RNA的分离

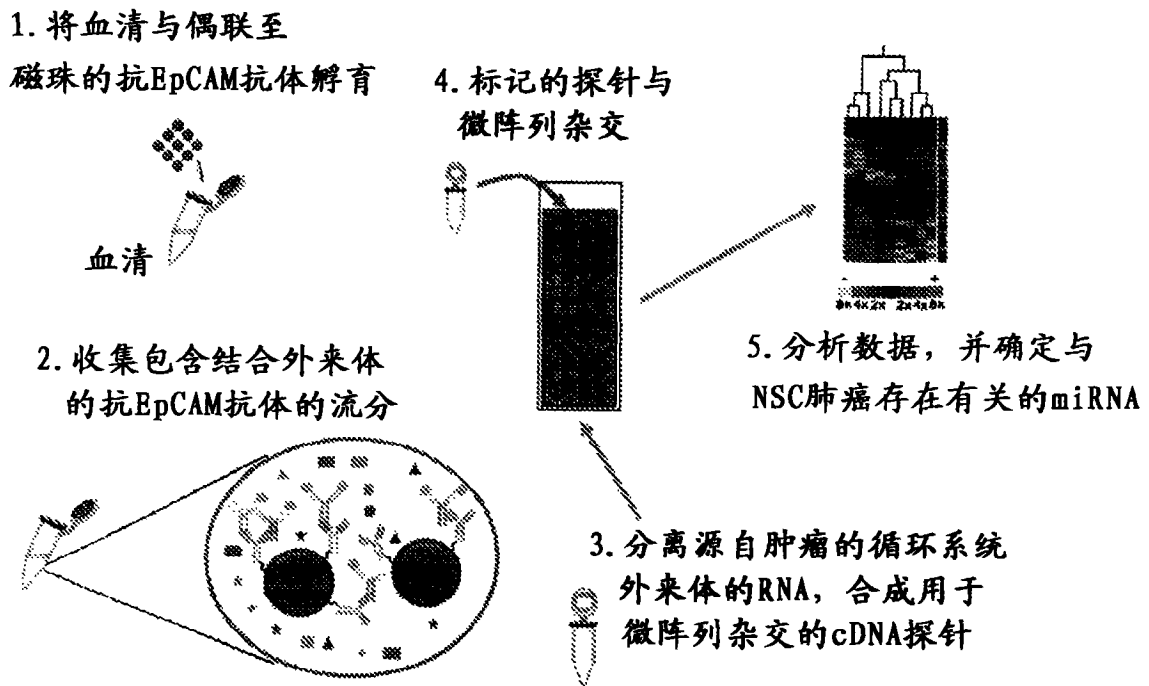


图 8

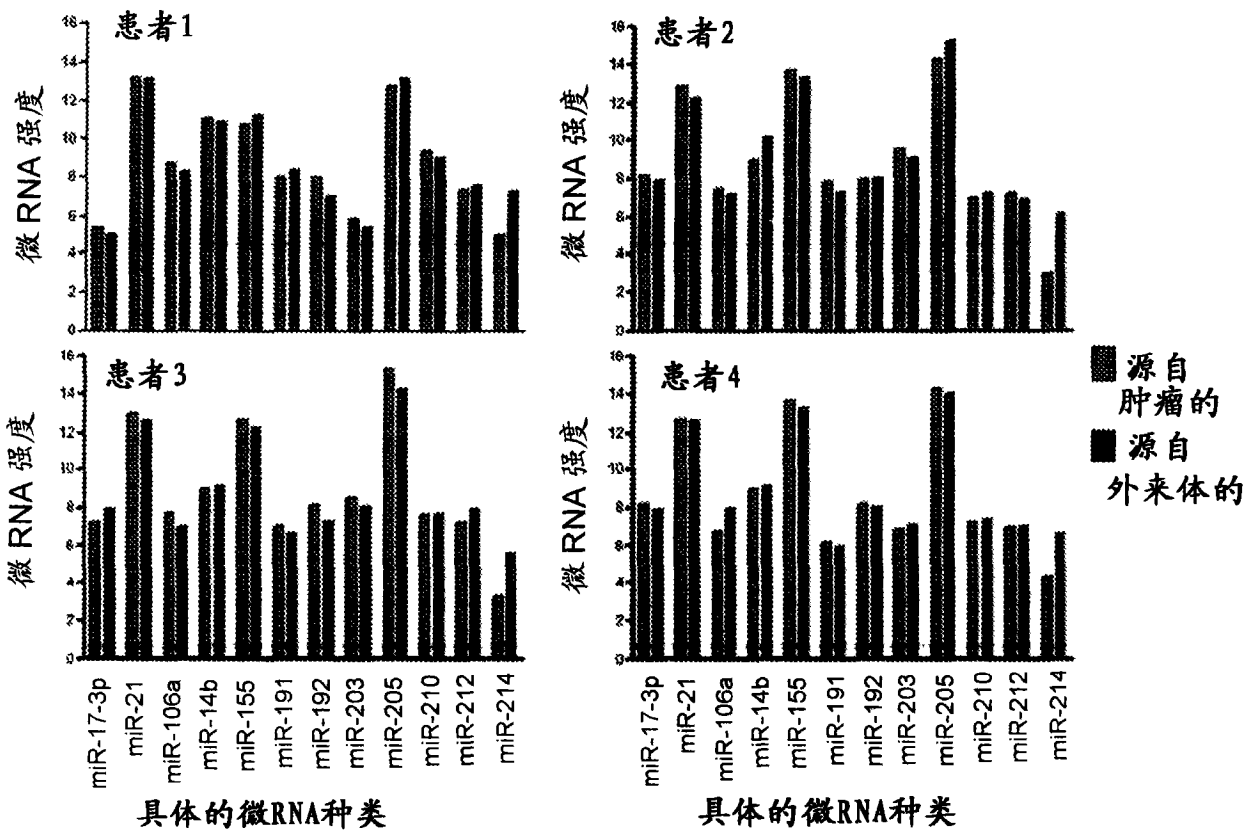


图 9

专利名称(译)	作为诊断标记物的外来体相关微RNA		
公开(公告)号	CN101755208B	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN200880025224.0	申请日	2008-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	路易斯维尔大学研究基金会公司		
申请(专利权)人(译)	路易斯维尔大学研究基金会公司		
当前申请(专利权)人(译)	路易斯维尔大学研究基金会公司		
[标]发明人	DD泰勒 C·格塞欧·泰勒		
发明人	D·D·泰勒 C·格塞欧·泰勒		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6809 C12Q1/6886 C12Q2600/178 C12Q2600/112		
代理人(译)	姜建成		
审查员(译)	胡晓佳		
优先权	60/951812 2007-07-25 US 61/050438 2008-05-05 US		
其他公开文献	CN101755208A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本申请公开的主题提供了在受试者中诊断癌症或不利妊娠结果的方法，所述方法是通过测量在从所述受试者的生物样品分离的且源自癌症的外来体中存在的一种或多种微RNA的量实施。

外来体微RNA的分离

