



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103877069 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201310718172. 8

(22) 申请日 2013. 12. 23

(30) 优先权数据

61/745, 348 2012. 12. 21 US

14/109, 301 2013. 12. 17 US

(71) 申请人 香港中文大学

地址 中国香港新界

(72) 发明人 陈扬超

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51) Int. Cl.

A61K 31/12 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书27页 附图22页

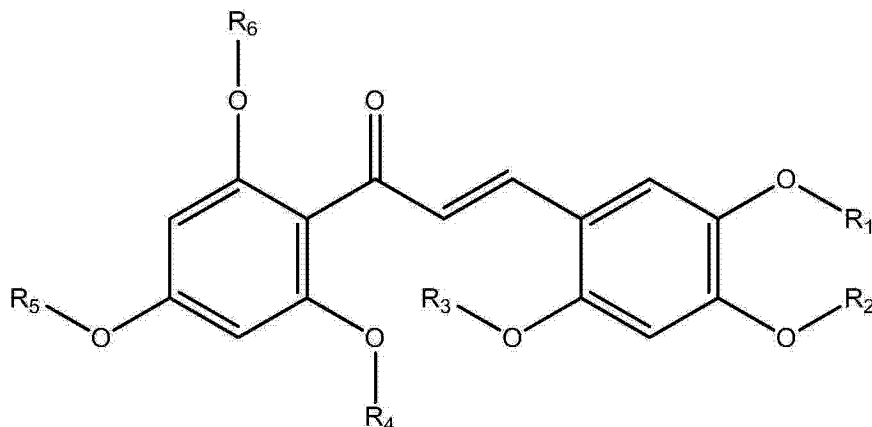
(54) 发明名称

微 RNA-34a 的小分子调节剂

(57) 摘要

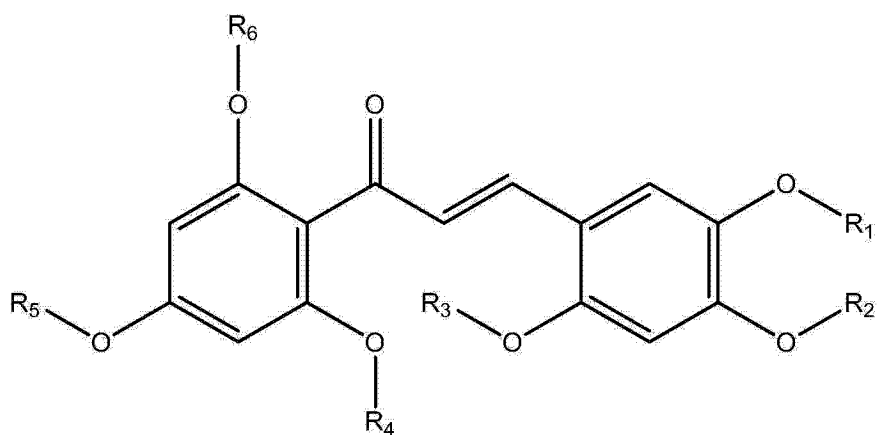
本发明提供了鉴定作为 miR-34a 调节剂的化合物的方法。本发明还提供了 miR-34a 调节剂和含有该调节剂的组合物。本发明还提供了通过给予 miR-34a 调节剂来治疗疾病的方法。

1. 抑制细胞增殖的方法,包括将细胞与有效量的以下化合物接触:



其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 独立地选自 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、F、Cl、Br、 NO_2 、OH、COOH、 NH_2 、 CF_3 和 CN。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中 R_1 - R_5 各自为 CH_3 ,且 R_6 为 H。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞为癌细胞。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述癌细胞为肝癌细胞。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞为内皮细胞。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述细胞增殖包括血管生成。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞存在于患者体内。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述接触步骤包括经皮下、肌肉内、静脉内、腹膜内或经口给予。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述方法还包括调节 miRNA-34a。
10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述方法还包括给予抗贫血化合物、抗呕化合物、抗炎剂、免疫调节剂或化学治疗剂。
11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述方法还包括激活 miRNA-34a。
12. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述方法还包括下调细胞周期蛋白 D1。
13. 根据权利要求 9 所述的方法,其中相比没有被接触的细胞,所述 miRNA-34a 的活性或表达增加了至少 3 倍或者降低至至少 1/3。
14. 根据权利要求 9 所述的方法,其中使用编码报告基因的多核苷酸检测所述调节 miRNA-34a 的步骤。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述编码报告基因的多核苷酸包含编码荧光素酶或荧光蛋白的序列。
16. 组合物,其包含以下化合物和药学可接受的赋形剂:



其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 独立地选自 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、F、Cl、Br、 NO_2 、OH、COOH、 NH_2 、 CF_3 和 CN。

17. 根据权利要求 16 所述的组合物,其中所述组合物还包含抗贫血化合物、抗呕化合物、抗炎剂、免疫调节剂或化学治疗剂。

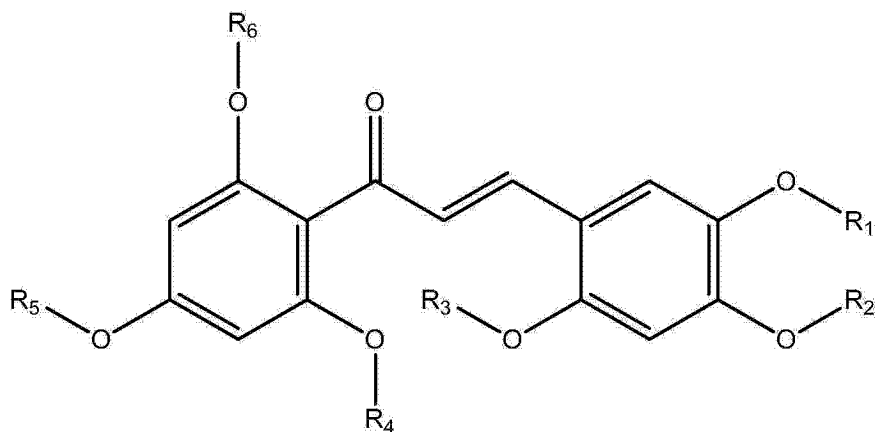
18. 用于抑制细胞增殖的试剂盒,其包含权利要求 16 所述的组合物。

19. 根据权利要求 18 所述的试剂盒,其中所述组合物被配制用于经皮下、肌肉内、静脉内、腹膜内、局部或经口给予。

20. 根据权利要求 18 所述的试剂盒,其还包含用于检测细胞增殖的检测试剂。

21. 根据权利要求 18 所述的试剂盒,其还包含抗贫血药物、抗呕药物、抗炎药物、化学治疗剂或免疫调节剂。

22. 有效量的以下化合物在制备用于抑制细胞增殖的药物中的用途,



其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 独立地选自 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、F、Cl、Br、 NO_2 、OH、COOH、 NH_2 、 CF_3 和 CN。

23. 根据权利要求 22 所述的用途,其中 R_1 - R_5 各自为 CH_3 ,且 R_6 为 H。

24. 根据权利要求 22 所述的用途,其中所述细胞为癌细胞。

25. 根据权利要求 24 所述的用途,其中所述癌细胞为肝癌细胞。

26. 根据权利要求 22 所述的用途,其中所述细胞为内皮细胞。

27. 根据权利要求 26 所述的用途,其中所述细胞增殖包括血管生成。

28. 根据权利要求 22 所述的用途,其中所述细胞存在于患者体内。

29. 根据权利要求 22 所述的用途,其中所述药物用于调节 miRNA-34a。

30. 根据权利要求 22 所述的用途,其中所述药物还包含抗贫血化合物、抗呕化合物、抗炎剂、免疫调节剂或化学治疗剂。

31. 根据权利要求 29 所述的用途,其中所述药物能激活 miRNA-34a。

32. 根据权利要求 29 所述的用途,其中所述药物能下调细胞周期蛋白 D1。

33. 根据权利要求 22 所述的用途,其中所述药物被配制用于经皮下、肌肉内、静脉内、腹膜内、局部或经口给予。

微 RNA-34a 的小分子调节剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2012 年 12 月 21 日递交的美国临时申请第 61/745,348 号的优先权, 为所有目的其内容通过引用全部并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 微 RNA 通过调控基因表达在多种生物过程中起着关键作用。微 RNA 由真核生物核 DNA 编码, 其被认为是通过与 mRNA 分子中的互补序列进行碱基配对来起作用。微 RNA 能提供对基因活性和表达的负调控 (转录本降解和扣留 (sequestering)、翻译抑制) 和正调控 (转录激活和翻译激活)。

[0005] 微 RNA 在真核生物中具有良好的保守性, 并被认为是基因调控的重要的且进化上古老的成分。人类基因组可编码 1000 多种微 RNA, 其可靶向约 60% 的哺乳动物基因, 且在很多人类细胞类型中很丰富。

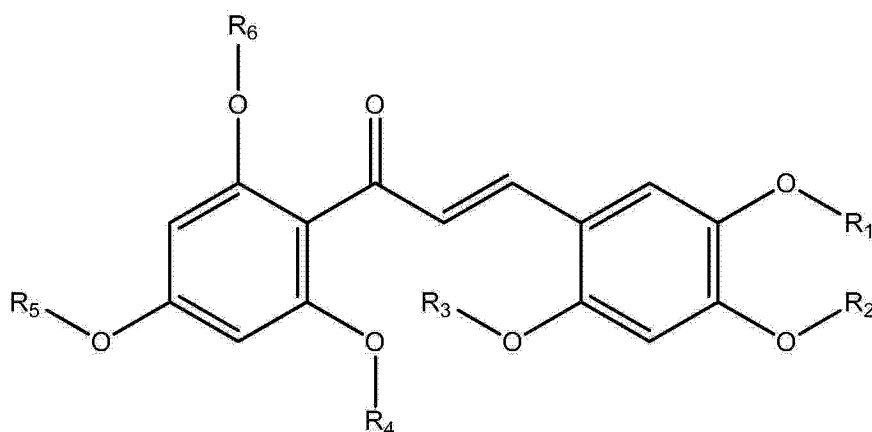
[0006] 哺乳动物的微 RNA 通常仅表现出对其 mRNA 靶标的部分互补性。该部分互补性能够使得由较少数目的微 RNA 来组合调控大量基因。的确, 组合调控是微 RNA 调控的一般特征; 且给定的微 RNA 可具有多种不同的 mRNA 靶标, 而给定的靶标可类似地被多种微 RNA 所靶向。

[0007] 已充分证实在多种癌症中存在微 RNA 的异常表达。例如, 微 RNA 可发挥作用以促进致癌基因或肿瘤抑制基因的效果。因而, 微 RNA 代表了有前景的用于癌症治疗的治疗靶标, 存在提供能够调节微 RNA 水平和 / 或活性以用于治疗目的的分子的需求。本发明满足了该需求和其他相关需求。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了抑制细胞增殖的方法, 包括将细胞与有效量的以下化合物接触:

[0010]



[0011] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 独立地选自 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、F、Cl、Br、 NO_2 、OH、 COOH 、 NH_2 、 CF_3 和 CN。

[0012] 在另一方面, R_1 - R_5 各自为 CH_3 , 且 R_6 为 H。

[0013] 在另一方面, 所述细胞为癌细胞。

[0014] 在另一方面, 所述癌细胞包括肝癌细胞。

[0015] 在另一方面,所述细胞为内皮细胞。

[0016] 在另一方面,所述细胞增殖包括血管生成。

[0017] 在另一方面,所述细胞存在于患者体内。

[0018] 在另一方面,接触步骤包括经皮下、肌肉内、静脉内、腹膜内或经口给予前述化合物。在一些情况下,所述给予是针对有需要的受试者,如表现出由细胞增殖引起的疾病的受试者。在一些情况下,所述由细胞增殖引起的疾病为癌症。在一些情况下,所述癌症为诸如肝癌的癌。

[0019] 在一些情况下,所述方法还包括同时或顺次给予化学治疗剂、抗炎药物、免疫调节剂、抗呕化合物或抗贫血药物如诱导红细胞产生的药物。例如,抗贫血药物可为红细胞生成素。

[0020] 在另一方面,所述方法还包括调节 miRNA-34a。

[0021] 在另一方面,所述方法还包括激活 miRNA-34a。

[0022] 在另一方面,所述方法还包括下调细胞周期蛋白 D1。

[0023] 在另一方面,相比没有被接触的细胞,所述 miRNA-34a 的活性或表达增加了至少 3 倍或者降低至至少 1/3。

[0024] 在另一方面,使用编码报告基因的多核苷酸检测调节 miRNA-34a 的步骤。

[0025] 在另一方面,所述编码报告基因的多核苷酸包含编码荧光素酶或荧光蛋白的序列。

[0026] 在一个实施方案中,本发明提供了一种方法,其包括如下步骤:(a) 将细胞与候选化合物接触,所述细胞含有表达盒,所述表达盒包含:(i) 编码报告基因的多核苷酸序列,其可操作地连接至在细胞内具有活性或可诱导的 5' 启动子;和(ii) 编码 miRNA-34a 结合位点的多核苷酸序列,其可操作地连接至所述报告基因的 3' 端;(b) 当所述细胞至于允许所述报告基因表达的条件下时,检测所述报告基因的表达水平;和(c) 当相比缺少所述化合物的情况下的报告基因的表达水平,报告基因的表达水平降低时,鉴定所述化合物作为 miRNA-34a 激活剂,而当相比缺少所述化合物的情况下的报告基因的表达水平,报告基因的表达水平增加时,鉴定所述化合物作为 miRNA-34a 抑制剂。

[0027] 在另一方面,所述报告基因为荧光素酶或荧光蛋白。

[0028] 在另一方面,所述细胞为癌细胞。

[0029] 在另一方面,所述 miRNA-34a 结合位点包含 CTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTA。

[0030] 在一个实施方案中,本发明提供了一种表达盒,其包含:(a) 编码报告基因的多核苷酸序列,其可操作地连接至在细胞内具有活性或可诱导的 5' 启动子;和(b) 编码 miRNA-34a 结合位点的多核苷酸序列,其可操作地连接至所述报告基因的 3' 端。

[0031] 在另一方面,所述细胞为癌细胞。

[0032] 在另一方面,所述报告基因为荧光素酶或荧光蛋白。

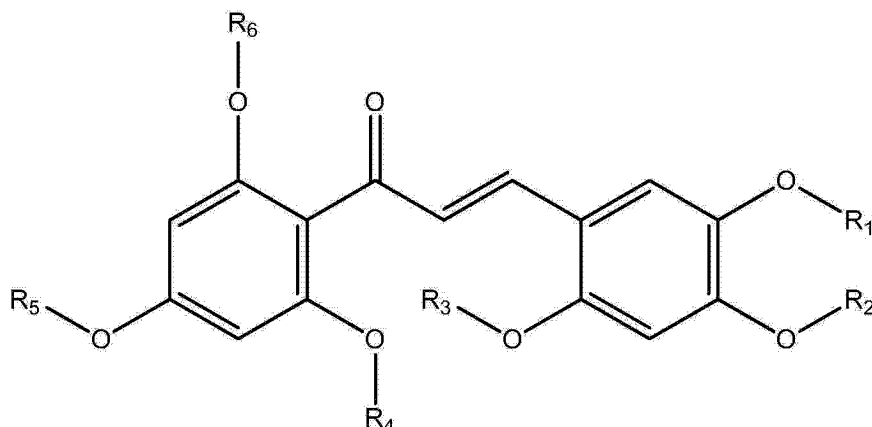
[0033] 在另一方面,所述组合物还包含测试细胞。

[0034] 在另一方面,所述测试细胞为癌细胞。

[0035] 在另一方面,所述癌细胞为肝癌细胞。

[0036] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种组合物,其包含以下化合物和药学可接受的赋形剂:

[0037]

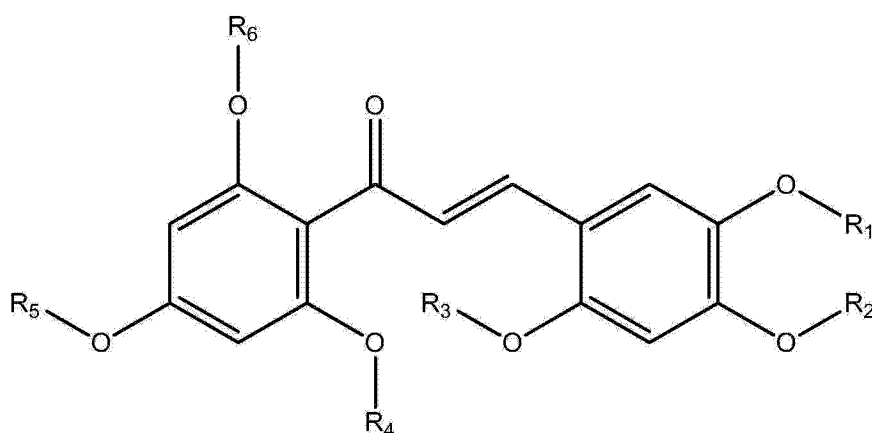


[0038] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 独立地选自 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、F、Cl、Br、 NO_2 、OH、 COOH 、 NH_2 、 CF_3 和 CN。

[0039] 在一个方面中,所述组合物还包含抗贫血药物或促进红细胞产生的药剂。例如,所述组合物可包含红细胞生成素。在一些情况下,所述组合物可包含抗炎剂如泼尼松(prednisone)或地塞米松。在一些情况下,所述组合物可包含化学治疗剂。在一些情况下,所述组合物可包含免疫调节剂。

[0040] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于抑制细胞增殖的试剂盒,所述试剂盒包含组合物,所述组合物包含以下化合物和药学可接受的赋形剂:

[0041]



[0042] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 独立地选自 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、F、Cl、Br、 NO_2 、OH、 COOH 、 NH_2 、 CF_3 和 CN。

[0043] 在另一方面,所述组合物被配制用于经皮下、肌肉内、静脉内、腹膜内、局部或经口给予。

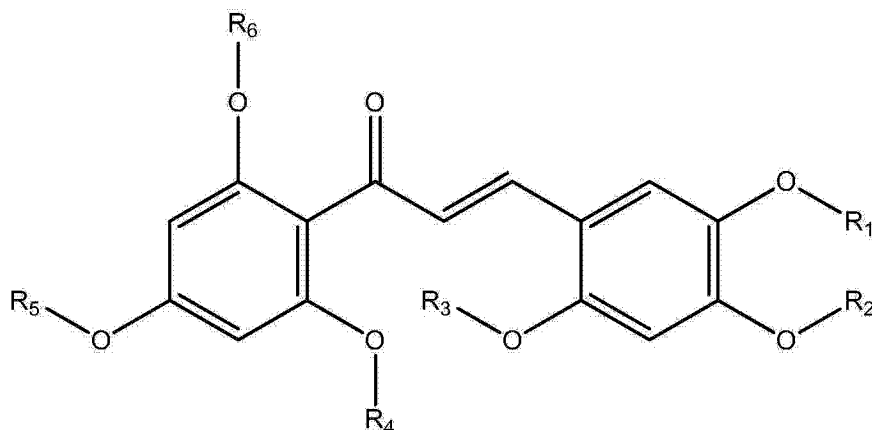
[0044] 所述试剂盒可进一步包含用于检测细胞增殖的检测试剂。例如,所述用于检测细胞增殖的检测试剂可选自: CyQuant、CyQuant NF、CyQuant GR、羧基荧光素琥珀酰亚胺酯、VPD450、溴脱氧尿苷、3H-胸苷、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷、2,3-双(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-5-[(苯基氨基)-羰基]-2H-四唑钠盐、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑、[3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐和吩噻硫酸乙酯。

[0045] 在一些情况下,所述试剂盒可包含抗贫血药物或促进红细胞产生的药剂如红细胞生成素。在一些情况下,所述试剂盒可包含抗炎剂如泼尼松或地塞米松。在一些情况下,所述试剂盒可包含化学治疗剂。在一些情况下,所述试剂盒可包含免疫调节剂。在一些情况下,所述试剂盒可包含抗呕化合物。

[0046] 据此,本申请还涉及以下方面或保护的主体。

[0047] 主题 1. 有效量的以下化合物在制备用于抑制细胞增殖的药物中的用途,

[0048]



[0049] 其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 独立地选自 H、 CH_3 、 CH_2CH_3 、F、Cl、Br、 NO_2 、OH、COOH、 NH_2 、 CF_3 和 CN。

[0050] 主题 2. 根据主题 1 所述的用途,其中 R_1 - R_5 各自为 CH_3 ,且 R_6 为 H。

[0051] 主题 3. 根据主题 1 所述的用途,其中所述细胞为癌细胞。

[0052] 主题 4. 根据主题 3 所述的用途,其中所述癌细胞为肝癌细胞。

[0053] 主题 5. 根据主题 1 所述的用途,其中所述细胞为内皮细胞。

[0054] 主题 6. 根据主题 5 所述的用途,其中所述细胞增殖包括血管生成。

[0055] 主题 7. 根据主题 1 所述的用途,其中所述细胞存在于患者体内。

[0056] 主题 8. 根据主题 1 所述的用途,其中所述药物用于调节 miRNA-34a。

[0057] 主题 9. 根据主题 1 所述的用途,其中所述药物还包含抗贫血化合物、抗呕化合物、抗炎剂、免疫调节剂或化学治疗剂。

[0058] 主题 10. 根据主题 8 所述的用途,其中所述药物能激活 miRNA-34a。

[0059] 主题 11. 根据主题 8 所述的用途,其中所述药物能下调细胞周期蛋白 D1。

[0060] 主题 12. 根据主题 1 所述的用途,其中所述药物被配制用于经皮下、肌肉内、静脉内、腹膜内、局部或经口给予。

附图说明

[0061] 图 1:通过文库筛选鉴定 miR-34a 调节剂。(A)miR-34a 报告基因系统的示意图。将成熟 miR-34a 的互补系列和对照连接子序列分别引入到 pMIR-REPORTTMmiRNA Reporter Vector(Ambion)中以建立 miR-34a 报告基因载体和对照载体。(B)miR-34a 报告基因的工作机理。miR-34a 报告基因可以通过荧光素酶信号的抑制来检测功能上成熟的 miR-34a 的存在。(C)用于鉴定 miR-34a 调节剂的文库筛选过程。(D)一种被称为 Rubone 的小分子化合物以剂量依赖的方式显著抑制 miR-34a 报告基因的荧光素酶活性。用 miR-34a 报告基因

载体和对照载体转染 Huh7 细胞,然后用指定浓度的 Rubone 处理 48 小时。细胞裂解物接受荧光素酶测定。结果表示为荧光素酶活性值。数据是平均值和误差棒,表示来自三个独立实验的 95% 置信区间。

[0062] 图 2:建立的 miR-34a 报告基因对内源 miR-34a 水平敏感。(A) 利用 qRT-PCR 对 Huh7 和 HepG2 细胞系中 miR-34a 表达水平进行定量。HepG2 细胞中 miR-34a 水平显著高于 Huh7 细胞中 miR-34a 水平。(B) 将 miR-34a 报告基因转染进 HepG2 和 Huh7 细胞并测量荧光素酶活性。Huh7 细胞中荧光素酶活性显著高于 HepG2 细胞中荧光素酶活性。平均值和误差棒表示来自三个独立实验的 95% 置信区间。

[0063] 图 3:Rubone 提高 HCC 细胞中 miR-34a 表达水平。用 10 μ M 浓度的 Rubone 或赋形剂对照处理 Huh7、HepG2 和 Hep3B 细胞 48 小时。然后制备 RNA 样品并通过 qRT-PCR 测量原始和成熟 miR-34a 水平的倍数变化。平均值和误差棒表示来自三个独立实验的 95% 置信区间。

[0064] 图 4:Rubone 特异性激活 mir-34a 的表达。(A) 用 10 μ M Rubone 处理 Huh7 细胞 48 小时。制备 RNA 样品并使用 qRT-PCR 测量随机选择的 miRNA 组(miR-7a, miR-21, miR-29c, miR-34c, miR-219) 和 p53 调节的 miRNA(miR-34c, miR-145, miR-192, miR-215) 的水平。Rubone 不引起选择的 miRNA 的表达的变化。(B) 用通常使用的抗癌药物:5-氟尿嘧啶(5-Fu);顺铂(CDDP);阿霉素(doxorubicin)(Dox) 和索拉非尼(Sorafenib) 处理 HepG2 细胞。通过 qRT-PCR 测量 pri-miR-34a 和成熟 miR-34a 的水平。误差棒 = 来自三个独立实验的 95% 置信区间。(C) 通过 qRT-PCR, Rubone 降低 miR-34a 靶标的表达。用 10 μ M 浓度的 Rubone 或赋形剂对照处理 Huh7、HepG2 和 Hep3B 细胞 48 小时。在第 48 小时收集的 RNA 样品用于通过 qRT-PCR 测量 miR-34a 靶标:CDK6, FOXF1, Noctch1, SIRT1。平均值和 95% 置信区间(误差棒)由三个独立实验的提供。使用双尾学生 t 检验计算 P 值。

[0065] 图 5:Rubone 降低 mir-34a 靶标的表达。用 10 μ M 浓度的 Rubone 或赋形剂对照处理 Huh7、HepG2 和 Hep3B 细胞 48 小时或 72 小时。在第 48 小时收集的 RNA 样品用于通过 qRT-PCR 测量 miR-34a 靶标:细胞周期蛋白 D1 和 Bcl2。平均值和 95% 置信区间(误差棒)由三个独立实验的提供。使用双尾学生 t 检验计算 P 值。在第 72 小时收集的细胞裂解物接受 Western 印迹。使用针对细胞周期蛋白 D1(1:2500 稀释), Bcl-2(1:2500 稀释) 和 β -肌动蛋白(1:5000 稀释) 的特异性抗体。

[0066] 图 6:Rubone 抑制体外 HCC 细胞生长。(A) 用化合物 Rubone 在指定的浓度和时间点处理 HCC 细胞系:HepG2, Huh7, Hep3B, Bel-7404, PLC/PRF/5 和非致瘤性人肝细胞系 MIHA。使用 MTT 测定测量细胞活力。测量 570nm 处的吸光度。实验的吸光度平均值和 95% 置信区间代表进行的三个独立实验。(B) Rubone 通过调节 miR-34a 表达抑制 HCC 细胞生长。仅用 10 μ M 浓度的 Rubone,或与 2 μ M miR-34a 模拟物或抑制剂组合处理 Bel-7404 和 PLC 细胞 72 小时。进行 MTT 测定以测量细胞活力。平均值和误差棒表示来自三个独立实验的 95% 置信区间。

[0067] 图 7:Rubone 抑制裸小鼠中 HepG2 异种移植的肿瘤的生长。(A) Rubone 以剂量依赖的方式抑制体内肝细胞肿瘤生长。将 HepG2 细胞皮下注射进裸小鼠的左侧以建立异种移植肿瘤小鼠模型。荷瘤的裸小鼠被经口强饲 20mg/kg 和 50mg/kg 剂量的 Rubone 或 50mg/kg 剂量的索拉非尼,每两天一次。测量小鼠的肿瘤体积和体重。强饲后 24 天,通过二氧化碳

麻醉处死小鼠。切除肿瘤,切片并称重。误差棒=95%置信区间。在第24天从裸小鼠切除的代表性肿瘤的照片。比例尺=1cm。(B)比较Rubone和索拉非尼在体内的肝细胞肿瘤抑制。(C)Rubone在体内对miR-34a及其靶标的调节。从切除的肿瘤提取RNA。通过qRT-PCR测量miR-34a、细胞周期蛋白D1和Bcl-2水平。平均值和误差棒表示来自三个独立实验的95%置信区间。

[0068] 图8:Rubone激活HepG2异种移植肿瘤中pri-miR-34a的表达。荷瘤的裸小鼠被强饲Rubone、索拉非尼或赋形剂,每两天一次。处死小鼠后切除肿瘤。从肿瘤提取RNA。使用qRT-PCR测量这些肿瘤中的pri-miR-34a水平。误差棒=来自三个独立实验的95%置信区间。

[0069] 图9:Rubone激活pri-miR-34a的表达而不改变p53表达。(A)在10 μ M Rubone处理后,通过RT-PCR对HepG2、Huh7和Bel-7404细胞中p53表达水平进行定量。(B)HepG2和Bel-7404细胞中p53mRNA和蛋白水平被sip53降低。(C)HCC细胞中由Rubone诱导提高的pri-miR-34a水平被p53敲低逆转。所有平均值和95%置信区间(误差棒)由三个独立实验提供。

[0070] 图10:Rubone抑制HepG2异种移植的肿瘤的血管生成。(A)Rubone减小来自裸小鼠的HepG2异种移植的肿瘤中的血管分布。通过在来自Rubone处理组的肿瘤中对CD31抗原进行IHC染色评估肿瘤血管分布。IHC染色在照片中表示内皮细胞(棕色)和肿瘤细胞核(蓝色)。图形(右图)显示来自每个处理组的平均微血管密度(比例尺=50 μ m)。通过对每个载片上三个随机视野的血管数进行平均来计算平均微血管密度。每个载片代表来自一只小鼠的肿瘤。每个处理组检查至少3片。误差棒代表95%置信区间。通过学生t检验进行组间比较。(B)Rubone抑制内皮细胞血管形成。将2 $\times 10^4$ 个人脐静脉内皮细胞(HUVEC)接种在涂布Matrigel的48孔板中,在全内皮细胞生长培养基中维持。在接种前向HUVEC加入Rubone或赋形剂。在孵育16小时后评估血管形成(比例尺=10 μ m)。对血管形成进行定量。借助于图像分析软件从显微照片中分析全部血管。在40倍放大倍数下对每个孔成像。结果表示为相对于对照(赋形剂DMSO处理的HUVEC)的血管数量。误差棒代表来自三个独立实验的95%置信区间。通过学生t检验进行组间比较。

[0071] 图11:Rubone通过提高p53活性激活miR-34a表达。(A)Rubone调节miR-34a启动子活性。将pGL-3质粒中的包含p53结合位点的全长miR-34a启动子转染进HepG2, Hep3B和Bel-7404细胞。在10 μ M Rubone处理后测量荧光素酶活性。(B,C)敲低p53逆转HepG2和Bel-7404细胞中由Rubone诱导的miR-34a表达和细胞生长抑制。用2 μ M靶向p53的siRNA转染HepG2和Bel-7404细胞,然后用10 μ M Rubone处理。通过qRT-PCR测量miR-34a水平。通过MTT测定测量细胞活力。(D)Rubone提高p53对miR-34a启动子的占据率。对用10 μ M Rubone处理的HepG2和Bel-7404细胞进行ChIP测定。利用qPCR对p53对miR-34a启动子区域的占据率进行定量。误差棒代表来自三个独立实验的95%置信区间。通过学生t检验进行组间比较。

[0072] 发明详述

[0073] I. 定义

[0074] 除非文中另外明确指明,本说明书和所附权利要求中所使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”均包括复数引用。

[0075] 本文所使用的“癌症”通常指由失控、异常生长的细胞导致的超过 100 种疾病组中的一种。癌细胞可形成实体瘤，其中癌细胞聚集在一起或以分散细胞存在于如白血病中。不同的实施方案中，“癌症”包括但不限于，乳腺癌、胰腺癌、结肠癌和 / 或直肠癌、白血病、皮肤癌、骨癌、前列腺癌、肝癌（例如肝细胞癌（HCC））、肺癌、脑癌、喉癌、胆囊癌、甲状旁腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、神经组织癌、头颈癌、胃癌、支气管癌、肾癌、基底细胞癌、溃疡型和乳头型鳞状细胞癌、转移性皮肤癌、骨肉瘤、尤因氏肉瘤、网状细胞肉瘤（reticulum cell sarcoma）、骨髓瘤、巨细胞瘤，小细胞肺癌，胰岛细胞癌、原发性脑瘤、急性和慢性淋巴细胞和粒细胞瘤、毛细血管瘤、腺瘤、增生、髓样癌、嗜铬细胞瘤、粘膜神经瘤、肠神经节细胞瘤、增生性角膜神经瘤、马方综合习惯性瘤、肾母细胞瘤（Wilm's tumor）、精原细胞瘤、卵巢肿瘤、平滑肌瘤、宫颈非典型增生和原位癌、神经母细胞瘤，视网膜母细胞瘤、软组织肉瘤、恶性类癌、局部皮肤损伤，蕈样肉芽肿，横纹肌肉瘤、卡波西氏肉瘤、成骨和其他肉瘤、恶性高钙血症、肾细胞瘤、真性红细胞增多症、腺癌、多形性成胶质细胞瘤、白血病、淋巴瘤、恶性黑色素瘤和表皮样癌。

[0076] 本文所使用的术语“抑制”（“inhibiting”或“inhibition”）是指对靶生物过程，例如基因表达、蛋白活性、细胞信号传导、细胞增殖、致癌性或转移潜能的任何可检测的负面影响。一般来讲，抑制反映为与对照相比，靶过程（例如 miR-34a 活性或癌扩散）或上述下游参数的任何一个降低至少 10%、20%、30%、40% 或 50%。在某些情况下，miR-34a 活性的抑制通过下调 pri-miRNA-34a 的表达或活性来提供。在某些情况下，miR-34a 的抑制导致细胞周期蛋白 D1、BCL-2、 β -Klotho、MDM4、Notch1、Notch-2 和 CDK6、Jagged1、Sirt1、生存素、Fra1、EphA5、YY1、FOXO1、MAPKK1 或 c-Met 的表达或活性上调。

[0077] 本文所使用的术语“激活”（“activating”或“activation”）是指对靶生物过程，例如基因表达、蛋白活性、细胞信号传导、细胞增殖、致癌性、细胞周期蛋白 D1 活性或转移潜能的任何可检测的正面影响。一般来讲，激活反映为与对照相比，靶过程（例如 miR-34a 活性或癌扩散）或上述下游参数的任何一个增加至少 10%、20%、30%、40% 或 50%。在某些情况下，miR-34a 活性的激活导致细胞周期蛋白 D1 或 BCL-2 的表达或活性下调。在某些情况下，miR-34a 活性的激活通过上调 pri-miRNA-34a 的表达或活性来提供。

[0078] 术语“核酸”或“多核苷酸”是指脱氧核糖核酸（DNA）或核糖核酸（RNA）及其单链或双链形式的聚合物。除非特别限定，该术语包括含有天然核苷酸的已知类似物的核酸，该核酸与参照核酸具有类似的结合特性且以与天然存在的核苷酸类似的方式进行代谢。除非另外指明，具体的核酸序列还暗含其保守修饰的变体（例如简并密码子取代）、等位基因、直系同源物、SNPs、互补序列及明确指明的序列。具体地，简并密码子取代可通过形成一个或多个所选择的（或全部）密码子中第三位被混合碱基和 / 或脱氧肌苷残基取代的序列来实现（Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081(1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608(1985); 以及 Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98(1994)）。术语核酸可与基因、cDNA 和由基因编码的 mRNA 互换使用。

[0079] 术语“基因”指参与产生多肽链的 DNA 片段。其可包括编码区前部和后部区域（前导序列和尾随序列）以及单个编码片段（外显子）之间的间插序列（内含子）。

[0080] “启动子”定义为指导核酸转录的一系列核酸控制序列。本文所使用的启动子包括转录起始位点附近的必需核酸序列，例如对于聚合酶 II 型启动子而言，是 TATA 元件。启动

子还任选包括末端增强子或阻遏元件,其可位于远离转录起始位点多达数千个碱基对的位置。

[0081] “表达盒”是由一系列特定核酸元件重组或合成而形成的核酸构建体,所述特定核酸元件允许特定多核苷酸序列在宿主细胞中转录。表达盒可以是质粒、病毒基因组或核酸片段的一部分。一般而言,表达盒包括待转录的、可操作连接至启动子的多核苷酸。

[0082] “报告基因”编码因生化特性(例如酶活或化学荧光特征)而可易于检测的蛋白质。这种报告基因的一个具体例子是绿色荧光蛋白。由此蛋白产生的荧光可用多种可商购的荧光检测系统来检测。其他报告基因可通过染色检测。在某些情况下,报告基因是与合适底物接触时产生可检测信号的酶。通常报告基因是催化可检测产物形成的酶。合适的酶包括但不限于,蛋白酶、核酸酶、脂肪酶、磷酸酶和水解酶。一般而言,报告基因编码的酶的底物基本上不穿透真核生物膜,因而可以严格控制信号的产生。编码酶的合适的报告基因的具体例子包括但不限于,CAT(氯霉素乙酰转移酶, Alton & Vapnek(1979) Nature 282:864-869); 荧光素酶(lux); β -半乳糖苷酶; LacZ; β -葡萄糖醛酸酶; 以及碱性磷酸酶(Toh, et al. (1980) Eur. J. Biochem. 182:231-238; 和 Hall et al. (1983) J. Mol. Appl. Gen. 2:101), 其中每一篇文献都通过引用整体并入本文。其它合适的报告基因包括编码特定表位的那些基因,该表位可用特异性识别该表位的标记抗体来检测。

[0083] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些氨基酸,以及后来修饰的那些氨基酸,如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和 O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即结合氢原子的 α 碳,羧基,氨基和 R 基)的化合物,如高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基砷。这样的类似物具有修饰的 R 基(如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但是保留了与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。“氨基酸模拟物”是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但是以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化合物。

[0084] 本领域中存在多种已知的允许将非天然氨基酸衍生物或类似物以位点特异性的方式并入多肽链的方法,参见如 W002/086075。

[0085] 本文中氨基酸可通过众所周知的三字母符号或通过由 IUPAC-IUB 生物化学命名法委员会推荐的单字母符号来提及。同样地,核苷酸可通过它们被普遍接受的单字母代码来提及。

[0086] 本文互换使用的“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指氨基酸残基的聚合物。这三个术语全部应用于氨基酸聚合物(其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物),以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。本文所使用的该术语包括任意长度的氨基酸链,包括全长蛋白质,其中氨基酸残基由共价肽键相连接。

[0087] 术语“调节”(“modulate”, “modulation”)、“修饰”、“调节剂”、“改性剂”等是指化合物增加或减少 miR-34a 的活性和/或表达的能力,其中这样的功能可包括转录调控活性和/或结合核酸。调节可发生于体外或体内。本文所述的调节,包括直接或间接抑制、拮抗、部分拮抗、激活、激动或部分激动与 miR-34a 相关的功能或特征,和/或直接或间接上调或下调 miR-34a 的表达。在某些情况下,调节是直接的。抑制剂或拮抗剂是如结合、部分或全部阻断、减少、阻止、抑制、延迟激活、失活、脱敏或下调 miR-34a 活性或表达的化合物。激

活剂或激动剂是如结合、刺激、增加、激活、促进、增强激活、敏化或上调 miR-34a 活性或表达的化合物。化合物调节 miR-34a 功能的能力可在生化检验如报告基因检验中验证。

[0088] 本文所限定的“受试者”包括动物,如哺乳动物,包括但不限于灵长类(如人类)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔子、大鼠、小鼠等。在一些实施方案中,受试者是人。

[0089] 本文所使用的术语“治疗”(“treat”, “treating”, “treatment”及其语法变体)包括部分或完全延迟、缓解、减轻或减少失调或病症的一种或多种伴随症状,和/或缓解、减轻或阻止失调或病症的一种或多种起因。根据本发明,可防止性、预防性、减轻性或矫正性应用治疗。

[0090] 术语“给予”是指口服给药、以栓剂给药、外用接触、静脉内、腹膜内、肌肉内、病灶内、鼻内或皮下给药,或者给受试者植入缓释装置如小型渗透泵。可通过任何途径给药,包括肠胃外和透粘膜(如面颊、舌下、上颚、牙龈、鼻腔、阴道、直肠或透皮)。肠胃外给药包括,如静脉内、肌肉内、小动脉内、皮肤内、皮下、腹膜内、心室内和颅内。其他递送方式包括但不限于,利用脂质体制剂、静脉输液、透皮贴片等。

[0091] 本文所使用的术语“有效量”是指所给予的物质产生疗效的量。效果包括疾病/病症及相关并发症的症状发展至任何可检测的程度的预防、矫正或抑制。确切的量将取决于治疗剂的性质、给予方式和治疗目的,并且本领域技术人员利用已知技术即可确定(参见,例如 Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); 以及 Pickar, Dosage Calculations (1999))。

[0092] 具有相同分子式但是它们的原子键合性质或顺序或者它们的原子空间排列不同的化合物被称为“异构体”。原子空间排列不同的异构体被称为“立体异构体”。“立体异构体”是指如果化合物具有一个或多个不对称中心或具有不对称取代的双键,并因而可作为单一立体异构体或作为混合物产生,则存在不同立体异构形式的化合物。立体异构体包括对映体和非对映体。相互不为镜像的立体异构体被称为“非对映体”,相互为不重叠镜像的立体异构体被称为“对映体”。当化合物具有不对称中心,例如其与四个不同的基团键合时,一对对映体是可能的。对映体可通过其不对称中心的绝对构型来表征,且通过 Cahn 和 Prelog 的 R- 和 S- 顺序规则来描述,或者通过分子旋转偏振光平面的方式来表征,并且被称为右旋的或左旋的(即分别为 (+) 或 (-)- 异构体)。手性化合物可作为单一对映体或作为其混合物存在。含有等比例对映体的化合物被称为“外消旋化合物”。除非另外指明,说明书意图包括单一立体异构体及混合物。测定立体化学和分离立体异构体的方法是本领域所熟知的(参见 ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (第4版, J. March, John Wiley and Sons, New York, 1992) 第4章的讨论)。

[0093] 本发明的某些化合物具有不对称碳原子(光学中心)或双键。外消旋体、非对映体、几何异构体、区域异构体(regioisomer)和单一异构体(如分离的对映体)均意图包括在本发明的范围内。这些异构体可利用常规方法来分解或不对称地合成,以致使异构体为“光学上纯的”,即基本上不含它的其他异构体。例如,如果需要本发明化合物的特定对映体,其可通过不对称合成或通过用手性助剂衍生来制备,其中将所得到的非对映体混合物分离,并将辅助基团裂解,以提供所需纯的对映体。可选择地,如果分子含有碱性官能团如氨基,或酸性官能团如羧基,用合适的光学活性的酸或碱形成非对映体的盐,之后溶解的非

对映体从而通过本领域所熟知的分级结晶或层析法形成,并随后回收纯的对映体。

[0094] “互变异构体”是指质子位置不同的分子变形,如烯醇-酮和亚胺-烯胺互变异构体,或杂芳基的互变异构形式,如吡唑类、咪唑类、苯并咪唑类、三唑类和四唑类。本领域普通技术人员将认识到,其他互变异构的环原子排列是可能的。

[0095] 术语“药学可接受的盐”意指包括用相对无毒的酸或碱制备的活性化合物的盐,其取决于本文所述化合物上存在的具体取代基。当本发明的化合物含有相对酸性的官能团时,可通过在无水或合适的惰性溶剂中,用足量所需的碱来接触该化合物的中性形式来获得碱加成盐。药学可接受的无机碱衍生的盐的例子包括铝、铵、钙、铜、三价铁、二价铁、锂、镁、三价锰、二价锰、钾、钠、锌等。药学可接受的有机碱衍生的盐包括伯胺、仲胺和叔胺的盐,包括取代胺类、环胺类、天然存在的胺类等,如精氨酸、甜菜碱、咖啡因、胆碱、N,N'-二苄基乙二胺、二乙胺、2-二乙胺基乙醇、2-二甲基乙醇胺、乙醇胺、乙二胺、N-乙基吗啉、N-乙基哌啶、麝香胺、葡萄糖胺、组氨酸、哈胺、异丙胺、赖氨酸、甲葡萄糖胺、吗啉、哌嗪、哌啶、聚胺树脂、普鲁卡因、嘌呤、可可碱、三乙胺、三甲胺、三丙胺、氨丁三醇等。当本发明的化合物包含相对碱性的官能团时,可通过在无水或合适的惰性溶剂中,用足量所需的酸来接触该化合物的中性形式来获得酸加成盐。药学可接受的酸加成盐的例子包括衍生自无机酸的那些盐,所述无机酸如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、单氢碳酸(monohydrogencarbonic)、磷酸、单氢磷酸(monohydrogenphosphoric)、二氢磷酸(dihydrogenphosphoric)、硫酸、单氢硫酸(monohydrogensulfuric)、氢碘酸、或亚磷酸等,以及衍生自相对无毒的有机酸的盐,所述有机酸如乙酸、丙酸、异丁酸、丙二酸、苯甲酸、丁二酸、辛二酸、富马酸、扁桃酸、邻苯二甲酸、苯磺酸、对苯磺酸、柠檬酸、酒石酸、甲基磺酸等。还包括氨基酸的盐,如精氨酸等,以及有机酸的盐,如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸等(参见,如 Berge, S. M. et al., "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Science*, 66:1-19, 1977)。本发明的某些特定化合物包含碱性和酸性官能团,其允许将化合物转化为碱加成盐或酸加成盐。

[0096] 可通过用碱或酸接触盐并以常规方式分离母体化合物来再生化合物的中性形式。化合物的母体形式与不同的盐形式在某些物理特性上不同,如在极性溶液中的溶解度,但是在其他方面,为了本发明的目的,盐相当于化合物的母体形式。

[0097] 除了盐形式外,本发明提供了前体药物酯类形式的化合物。本文所述的化合物的“前体药物”是容易在生理条件下经历化学变化,从而提供本发明化合物的那些化合物。此外,可在离体环境下通过化学或生化法,将前体药物转化成本发明的化合物。例如,当被置于透皮贴片储库中时,可将前体药物用合适的酶或化学试剂逐步转化为本发明的化合物。在被转化为活性药物之前,前体药物经常(但非必需)是无药理学活性的。前体药物一般通过用前体基团(以下限定)掩蔽药物中被认为是活性部分需要的官能团来形成前体部分,该前体部分在用于释放官能团的指定条件下经过转化如切割,从而得到活性药物。前体部分的切割可通过如水解反应自发进行,或者其可通过其他因素催化或诱导,所述其他因素如通过酶、通过光照、通过酸或碱、或者通过物理或环境参数的改变或暴露于物理或环境参数如改变温度。该因素可以是使用条件内在的,如被给予前体药物的细胞中存在的酶或胃的酸性条件,或者其可外在提供。

[0098] 本发明的某些化合物可以非溶剂化物的形式和溶剂化物的形式存在,包括水合的形式。“溶剂化物”是指通过将溶剂分子与溶质分子或离子相结合而形成的复合物。溶剂

可以是有机化合物、无机化合物或它们的混合物。溶剂的一些例子包括但不限于：甲醇、N, N- 二甲基甲酰胺、四氢呋喃、二甲亚砜以及水。通常，溶剂化物形式相当于非溶剂化物形式，并且意图包括在本发明的范围内。本发明的某些化合物可以多晶体或无定形形式存在。通常，所有的物质形态在本发明中等同使用，并且意图包括在本发明的范围内。

[0099] 本发明的化合物还可在组成该化合物的一个或多个原子处包含非天然比例的原子同位素。例如，可用放射性同位素来放射性标记化合物，所述放射性同位素如，例如氚 (^3H)、碘-125 (^{125}I) 或碳-14 (^{14}C)。本发明化合物的所有同位素变体，无论是否是放射性的，都意图包括在本发明的范围之内。

[0100] 本文所使用的术语“化学治疗剂”等是指治疗疾病的药物或其他化合物。化学治疗剂包括但不限于抗癌药物。示例性化学治疗剂特别包括 5- α -还原酶抑制剂，如非那雄胺 (finasteride)、度他雄胺 (dutasteride) 或伊唑雄胺 (izonsteride)；选择性雄激素受体调节剂，如 RU-58642、RU-56279、WS9761A 或 B、RU-59063、RU-58841、倍氯特来 (bexlosteride)、LG-2293、L-245976、LG-121071、LG-121091、LG-121104、LGD-2226、LGD-2941、LGD-3303、YM-92088、YM-175735、LGD-1331、BMS-357597、BMS-391197、S-40503、BMS-482404、EM-4283、EM-4977、BMS-564929、BMS-391197、BMS-434588、BMS-487745、BMS-501949、GSK971086、GSK2420A、SA-766、YM-92088、YM-580、LG-123303、LG-123129、PMCo1、YM-175735、BMS-591305、BMS-591309、BMS-665139、BMS-665539、CE-590、116BG33、154BG31、arcarine、或 ACP-105；选择性雌激素受体调节剂，如它莫昔芬 (tamoxifen)、4-羟基它莫昔芬、爱多昔芬 (idoxifene)、托瑞米芬 (toremifene)、欧司哌米芬 (ospemifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、雷洛昔芬 (raloxifene)、阿佐昔芬 (arxoxifene)、巴多昔芬 (bazedoxifene)、PPT(1,3,5-三(4-羟基苯基)-4-丙基-1H-吡唑)、二芳基丙腈 (DPN)、拉索昔芬 (lasofoxifene)、哌喷昔芬 (pipendoxifene)、EM-800、EM-652、萘福昔定 (nafoxidine)、秦唑昔芬 (zindoxifene)、替米利芬 (tesmilifene)、磷酸米普昔芬 (miproxifene phosphate)、RU58,688、EM139、ICI164,384、ICI182,780、克罗米酚 (clomiphene)、MER-25、己烯雌酚 (diethylstilbestrol)、拟雌内酯 (coumestrol)、染料木黄酮 (genistein)、GW5638、LY353581、珠氯米芬 (zuclomiphene)、恩氯米芬 (enclomiphene)、乙酸地马孕酮 (delmadinone acetate)、DPPE、(N, N-二乙基-2-{4-(苯甲基)-苯氧基}乙胺)、TSE-424、WAY-070、WAY-292、WAY-818、cyclocommunol、普林贝瑞 (prinabere1)、ERB-041、WAY-397、WAY-244、ERB-196、WAY-169122、MF-101、ERb-002、ERB-037、ERB-017、BE-1060、BE-380、BE-381、WAY-358、[18F]FEDNP、LSN-500307、AA-102、CT-101、CT-102、或 VG-101；促性腺素释放激素激动剂或拮抗剂，如亮丙瑞林 (leuprolide)、戈舍瑞林 (goserelin)、曲普瑞林 (triptorelin)、阿法前列醇 (alfaprostol)、组氨瑞林 (histrelin)、地肽瑞克 (detirelix)、加尼瑞克 (ganirelix)、抗排卵伊妥瑞克 (antide iturelix)、西曲瑞克 (cetrorelix)、雷莫瑞克 (ramorelix)、加尼瑞克 (ganirelix)、安雷瑞克 (antarelix)、替维瑞克 (teverelix)、阿巴瑞克 (abarelix)、奥扎瑞克 (ozarelix)、舒伐格瑞克 (sufugolix)、普拉瑞克 (prazarelix)、地加瑞克 (degarelix)、NBI-56418、TAK-810 或酰化物；促卵泡激素受体激动剂 / 拮抗剂、黄体化激素激动剂 / 拮抗剂、芳香酶抑制剂，如来曲唑 (letrozole)、阿那曲唑 (anastrozole)、阿他美坦 (atamestane)、法偈唑 (fadrozole)、米那美坦

(minamestane)、依西美坦 (exemestane)、普洛美坦 (plomestane)、利阿唑 (liarozole)、NKS-01、伏罗唑 (vorozole)、YM-511、芬罗唑 (finrozole)、4- 羟雄固烯二酮、氨基米特 (aminogluethimide)、或罗谷亚胺 (rogletimide) ;类固醇或非类固醇类糖皮质激素受体拮抗剂、激动剂或配体,如泼尼松龙 (prednisolone)、甲基泼尼松龙、泼尼松、ZK-216348、ZK-243149、ZK-243185、LGD-5552、米非司酮 (mifepristone)、RPR-106541、ORG-34517、GW-215864X、sesquicillin、CP-472555、CP-394531、A-222977、AL-438、A-216054、A-276575、CP-394531、CP-409069 或 UGR-07 ;类固醇或非类固醇类孕酮受体配体 ;类固醇或非类固醇类雄激素受体拮抗剂,如氟他胺 (flutamide)、羟基氟他胺、比卡鲁胺 (bicalutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 或羟基类固醇脱氢酶抑制剂 ;PPAR α 配体,如苯扎贝特 (bezafibrate)、非诺贝特 (fenofibrate) 或吉非罗齐 (gemfibrozil) ;PPAR δ 配体,如达格列酮 (darglitazone)、吡格列酮 (pioglitazone)、罗格列酮 (rosiglitazone)、伊沙列酮 (isaglitazone)、利格列酮 (rivoglitazone) 或萘格列酮 (netoglitazone) ;双重作用 PPAR 配体,如那格列扎 (naveglitazar)、法格列扎 (farglitazar)、替格列扎 (tesaglitazar)、拉格列扎 (ragaglitazar)、奥格列扎 (oxeglitazar)、或 PN-2034、PPAR δ ;17- 酮还原酶抑制剂 ;3 β - Δ H Δ 4, 6- 异构酶抑制剂 ;3 β - Δ H Δ 4, 5- 异构酶抑制剂 ;17, 20 碳链分解酶抑制剂 ;p450c17 抑制剂 ;p450ssc 抑制剂 ;17, 20- 裂解酶抑制剂 ;DNA- 修饰药物,如环磷酰胺 (cyclophosphamide)、异环磷酰胺、顺铂、卡铂、卡莫司汀 (carmustine)、美法仑 (melphalan) 或达卡巴嗪 (dacarbazine) ;抗代谢物例如 5- 氟尿嘧啶、卡培他滨 (capecitabine)、6- 巯基嘌呤、甲氨蝶呤、吉西他滨 (gemcitabine)、阿糖胞苷 (cytarabine) 或氟达拉滨 (fludarabine) ;有丝分裂抑制剂,如紫杉醇、多西他赛 (docetaxel)、长春花碱 (vinblastine) 或长春新碱 (vincristine) ;蒽环类药物,如道诺霉素 (daunorubicin)、阿霉素、表阿霉素 (epirubicin)、伊达比星 (idarubicin) 或米托蒽醌 (mitoxantrone) ;拓扑异构酶 I 或 II 抑制剂,如托普替康 (topotecan)、伊立替康 (irinotecan)、依托泊苷 (etoposide)、喜树碱 (camptothecin)、7- 乙基-10- 羟基喜树碱或替尼泊苷 (teniposide) ;蛋白酶体抑制剂,如硼替佐米 (bortezomib)、来那度胺 (carfilzomib) 或 MG132 ;干扰素 ;酪氨酸激酶抑制剂,如厄洛替尼 (erlotinib)、伊马替尼 (imatinib)、吉非替尼 (gefitinib)、依鲁替尼 (ibrutinib)、索拉非尼或舒尼替尼 (sunitinib) ;激酶抑制剂,如 mTOR 抑制剂西罗莫司 (sirolimus)、依维莫司 (everolimus) 或替西罗莫司 (temsirolimus) ;干扰素- α 2b ;白细胞介素-2 ;膜海鞘素 (didemnin),如 aplidine,或其任意组合、异构体或衍生物。

[0101] 本文所使用的术语“免疫调节剂”等是指诱导或抑制免疫应答的化合物。在某些情况下,免疫调节剂诱导造血细胞包括树突状细胞和 / 或单核细胞 / 巨噬细胞产生一种或多种细胞因子,如干扰素 (α)、肿瘤坏死因子或细胞白介素 12。这种化合物的例子包括 CpG 寡核苷酸,脂多糖,多聚肌苷酸 : 多聚胞苷酸复合物,以及已知诱导树突状细胞和 / 或单核细胞 / 巨噬细胞产生细胞因子的多肽和蛋白质。免疫调节剂特别包括环肽如环孢霉素、他克莫司 (tacrolimus)、曲培莫司 (tresperimus)、吡美莫司 (pimecrolimus)、西罗莫司 (sirolimus(rapamycin))、依维莫司 (everolimus)、拉氟莫司 (laflunimus)、拉喹莫德 (laquinimod) 以及咪唑喹啉胺类如咪喹莫特 (imiquimod)。本领域技术人员将理解的是,在本发明中可使用其他免疫调节剂。

[0102] II. 简介

[0103] 微 RNAs(miRNA) 是 21 - 23 个核苷酸的单链非编码 RNA,其在转录后水平调控很多基因的表达。miRNA 代表一种新型内源基因调控因子,其通过结合至靶 mRNA 的 3' 或 5' 非翻译区 (UTR) 起作用,从而导致通过抑制或者激活翻译或降解来进行调控 (Carthew et al.;He et al.;Lytle et al.)。

[0104] 癌细胞中 miRNA 表达的研究表现出 miRNA 表达模式和癌症类型、阶段和诊断变量之间的相关性。这表明 miRNA 表达可用作癌症诊断和预后的工具。这还表明 miRNA 可能具有致癌或肿瘤抑制作用。事实上,miRNA 可在癌症生物学的几乎所有方面起作用,如增殖、细胞凋亡、入侵 / 转移和血管生成。鉴于癌症中许多 miRNA 被解除调控,但还未得到进一步研究,预期越来越多的 miRNA 将作为癌症病因学和进展中的成员而出现。

[0105] 微 RNA-34 家族包括 miR-34a、miR-34b 和 miR-34c。miR-34 家族成员均指向 p53 靶标,且其上调一致地诱导细胞凋亡、细胞周期阻滞和衰老。因此,诱导上述细胞响应的 miR-34 家族成员的激活,有利于癌症治疗。例如,miR-34a 作为肿瘤抑制剂,其表达在癌症模型如人肝细胞癌 (HCC) 组织中被高度下调,且其可抑制 HCC 细胞的迁移和入侵 (Welch et al.;Sun et al.;Li et al.)。因此,激活 miR-34a 表达以减少癌细胞迁移和入侵是潜在的治疗形式。

[0106] 已报道了 miR-21 的两种小分子抑制剂 (Gumreddy, et al.),以及 miR-122 的抑制剂和激活剂 (Young, et al.);然而,还没有报道过,在很多癌症中作为重要肿瘤抑制 miRNA 的 miR-34a 的小分子改性剂 (Bommer et al.;Chang et al.;He et al.;Tarasov et al.;Tazawa et al.;Raver et al.)。本发明提供了用于筛选 miR-34a 的小分子改性剂 (例如,激活剂和抑制剂) 的测定。本发明还提供了从天然产物文库 (NPL, TimTec) 中发现的 miR-34a 的激活剂,并公开了其对外体和体内癌细胞的治疗潜力。

[0107] 在 Huh7 细胞中对 640 种化合物详细筛选后,提供了两种苗头化合物 (hit compound) 金合欢素 (Acacetin) 和 Rubone,用 miR-34a 报告基因系统对这两种化合物的功能进行一式三份的再测定,确认了它们作为 miR-34a 激活剂的功能。相比未处理的细胞的荧光素酶信号强度,由于 miR-34a 激活,这些化合物能导致荧光素酶信号强度的降低。在一些情况下,这些化合物能将荧光素酶信号强度降低至未处理细胞中强度的约 1/4 或 1/6。在一些情况下,这些化合物能将荧光素酶信号强度降低至未处理的对照细胞中荧光素酶信号强度的约 1/1000、1/500、1/250、1/100、1/75、1/50、1/25、1/12、1/10、1/9、1/8、1/7、1/6t、1/5t、1/4、1/3 或大约一半。

[0108] 金合欢素 (5, 7- 二羟基 -4' - 甲氧基黄酮) 是广泛分布于植物中的黄酮类化合物 (Cody et al.),并在癌症中表现出重要作用,表现为:抗过氧化剂、抗炎剂和抗疟原虫效应 (Cholbi et al.;Liao et al.;Kraft et al.);抑制入侵、迁移和增殖;以及诱导细胞周期阻滞和多种人癌细胞的凋亡 (Hsu et al.Bioch.Pharm.;Hsu et al.Cancer Lett.;Singh et al.;Pan et al.;Shim et al.;Shem et al.)。然而,本发明阐述了此前未知的金合欢素和 miRNA 之间的关系。Rubone (2' - 羟基 -2, 4, 4', 5, 6' - 戊甲氧基查耳酮) 是一种此前未报道过其具有任何已知生物活性的化合物。这些化合物提供了新的癌症治疗策略。

[0109] III. miR-34a 改性剂的鉴定

[0110] miR-34a 表达或活性的改性剂实际上可具有任何化学或结构特性:它们可为多

肽、多核苷酸和小分子。只要它们作为下游靶标表达的调节物具有确认的对 miR-34a 活性的抑制或激活作用,这种改性剂就可用于抑制癌细胞增殖,并因此可用于治疗癌症。例如,miR-34a 激活剂可激活 miR-34a 表达,或在转录后激活 miR-34a 的活性。类似地,miR-34a 抑制剂可抑制 miR-34a 表达,或在转录后抑制 miR-34a 的活性。

[0111] A. 报告基因测定

[0112] 基于报告基因和 miR-34a 结合序列之间的相互作用,体外测定可用于筛选潜在的 miR-34a 信号转导改性剂。通过将候选化合物与含有表达盒的细胞接触来筛选候选化合物,所述表达盒含有可操作地连接至 miR-34a 结合序列的报告基因。改性剂可被鉴定为与对照细胞相比,上调或下调报告基因活性的那些化合物。例如,miR-34a 激活剂可被鉴定为下调报告基因表达或活性的化合物。类似地,miR-34a 抑制剂可被鉴定为上调报告基因表达或活性的化合物。一旦在报告基因测定中鉴定了化合物,可进行进一步的测试来确认和验证所述化合物调节 miR-34a 表达或活性的能力。可在以下条件下进行这样的检测:在存在内源性产生 miR-34a 的细胞的情况下,在表达低水平 miR-34a 的细胞中,或在允许 miR-34a 结合至 miR-34a 结合序列的条件下通常不产生 miR-34a 的细胞中。例如,可在下调 miR-34a 表达或活性的癌细胞如 HCC 细胞中进行所述筛选。

[0113] 在一些情况下,miR-34a 测定可在无细胞环境下进行。例如在体外转录系统中,所述系统包括含有可操作地连接至 miR-34a 结合位点的报告基因的表达式。

[0114] B. 下游靶标调控的测定

[0115] 在一些情况下,可通过筛选 miR-34a 活性或表达改性剂对直接或间接下游靶标的效果来对其进行筛选。例如,miR-34a 激活剂可表现出上调 pri-miRNA-34a 或 miR-34a 表达或活性,或者下调细胞周期蛋白 D1(Sun et al.) 或 BCL-2(Cole et al.)。或者,miR-34a 抑制剂可表现出下调 pri-miRNA-34a 或 miR-34a 表达或活性,或者上调细胞周期蛋白 D1、BCL-2、 β -Klotho、MDM4、Notch1、Notch-2 和 CDK6、Jagged1、Sirt1、survivin、Fra1、EphA5、YY1、FOXO1、MAPKK1 或 c-Met。可在体外或体内通过候选化合物进行测定来确认 miR-34a 的调控。体外测定通常涉及将培养细胞暴露于抑制剂,并监测细胞中随后的生物学变化和生化变化。例如,暴露于 10 μ M 的候选化合物达 0.5-48 小时后,对合适的细胞(如具有下调的 miR-34a 的细胞,例如,HCC 细胞如 Huh7 或 HepG2 细胞)检测其增殖/存活状态,所使用的方法如下:例如直接细胞计数、BrdU 或 H^3 -胸腺嘧啶掺入、四唑盐 3, [4, 5-二甲基噻唑-2-基]-2, 5-二苯基溴化四唑(MTT) 细胞增殖测定、3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(MTS) 细胞增殖测定、鸡胚尿囊膜(CAM)测定、TUNNEL 测定、膜联蛋白 V 结合测定等。还可以监测由于 miR-34a 调控的其他下游变化,例如,pri-miR-34a 表达、miR-34a 表达、细胞周期蛋白 D1 表达或 BCL-2 表达,例如,通过定量 RT-PCR(qPCR) 或 Western 印迹法。此外,癌细胞的致瘤性和/或转移潜能也可作为监测的有用参数,并可通过集落形成测定或软琼脂测定等方法来测定。当观察到 miR-34a 活性变化了至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更大(如通过前述参数中的任何一个参数所显示)时,则检测到效果。

[0116] 本发明 miR-34a 激活剂的抗癌效果也可在体内测定中证明。例如,可将候选激活剂注入具有受损免疫系统,并因此允许异种移植肿瘤的动物(例如,裸小鼠、SCID 小鼠或 NOD/SCID 小鼠)中。注入方法可为经皮下、肌肉内、静脉内、腹膜内或实质上的肿瘤内。随

后通过多种方法监测肿瘤发展,如测量肿瘤体积并对因转移导致的二次损伤打分,与患有类似肿瘤但没有给予所述抑制剂的对照动物组进行比较。本公开的实施例部分提供了一些示例的体内测定的详细描述。当在测试组中确立了对肿瘤生长或转移的负作用时,检测到效果。优选地,对肿瘤生长的负作用为至少 10% 的降低;更优选地,所述降低为至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90%。

[0117] miR-34a 激活剂可具有不同的化学和结构特征。本质上任何化合物均可作为潜在的 miR-34a 活性激活剂来测试。最优选的通常是可溶于含水或有机(例如, DMSO-基)溶液中的化合物。可通过筛选包含大量潜在有效的化合物的组合文库来鉴定抑制剂。如本文所述,可在一个或多个测定中筛选这类组合的化学文库,以鉴定展现出期望的特征活性的那些文库成员(尤其是化学物质种类或亚类)。如此鉴定的化合物可作为常规的“先导化合物(lead compound)”或可将其本身用作潜在的或实际上的治疗剂。

[0118] 本领域技术人员熟知化学文库的制备和筛选。这类化学文库包括但不限于天然产物文库。天然产物文库为已经从有机体(例如,植物、微生物、细胞等)或其他天然来源(例如,土壤、岩石等)中分离出来的化合物的文库。在一些情况下,天然产物文库包括纯的或基本上纯的单一化合物的文库。在一些情况下,天然文库的化合物的结构式和/或化学式是已知的。在其他情况下,天然产物文库包括还没有完全表征的或没有完全纯化的产物的文库。例如,天然产物文库可由多种有机体(例如,植物、微生物、细胞等)的多种提取物(例如,水提取物、甲醇提取物、乙醇提取物、DMSO 提取物、己烷提取物等)组成。

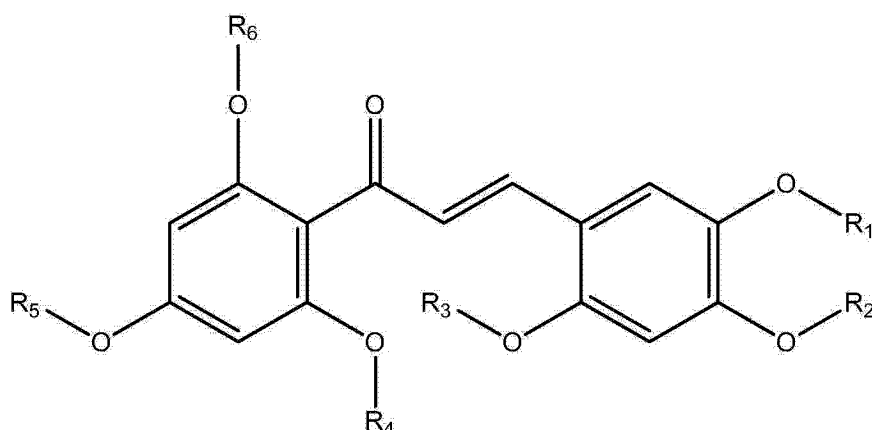
[0119] 化学文库也可包括组合的化学文库。本领域技术人员熟知组合化学文库的制备和筛选。这类组合的化学文库包括但不限于肽文库(参见,例如,美国专利第 5,010,175 号, Furka, Int. J. Pept. Prot. Res. 37:487-493(1991) 和 Houghton et al., Nature 354:84-88(1991)), 以及碳水化合物文库(参见,例如, Liang et al., Science, 274:1520-1522(1996) 和美国专利第 5,593,853 号)。也可使用其他产生化学上的不同文库的化学物质。这类化学物质包括但不限于:类肽(PCT 公开第 W091/19735 号)、编码的肽(PCT 公开第 W093/20242 号)、随机的生物寡聚物(PCT 公开第 W092/00091 号)、苯二氮卓类(美国专利第 5,288,514 号)、多样体(diversomer)如乙内酰脲、苯二氮卓类和二肽(Hobbs et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:6909-6913(1993))、插烯多肽(vinylogous polypeptide)(Hagihara et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:6568(1992))、具有 β -D-葡萄糖骨架的非肽性肽模拟物(Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218(1992))、小化合物文库的类似有机合成物(Chen et al., J. Amer. Chem. Soc. 116:2661(1994))、寡聚氨基甲酸酯(Cho et al., Science 261:1303(1993))和/或肽基磷酸酯(Campbell et al., J. Org. Chem. 59:658(1994))、核酸文库(参见, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, 1987)、肽核酸文库(参见,例如,美国专利第 5,539,083 号)、抗体文库(参见,例如, Vaughn et al., Nature Biotechnology, 14(3):309-314(1996) 和 PCT/US96/10287)、小有机分子文库(参见,例如,苯二氮卓类(benzodiazepines), Baum C&EN, Jan 18, 第 33 页(1993); 类异戊二烯, 美国专利第 5,569,588 号; 噻唑烷酮和偏噻唑烷酮(metathiazanone), 美国专利第 5,549,974 号; 吡咯烷, 美国专利第 5,525,735 号和第 5,519,134 号; 吗啉代化合物, 美国专利第 5,506,337 号; 和苯二氮卓类, 美国专利第

5, 288, 514 号)。

[0120] IV. 组合物

[0121] 本发明提供了调控 miR-34a 活性 (例如, 表达或结合至 miR-34a 结合位点) 的组合物和化合物。在一些情况下, 本发明化合物通过增加 miR-34a 表达或促进 miR-34a 结合至 miR-34a 结合位点来激活 miR-34a 活性。在其他情况下, 本发明化合物通过降低 miR-34a 表达或抑制 miR-34a 结合至 miR-34a 结合位点来抑制 miR-34a。在一些实施方案中, 由于直接调控 miR-34a 的本发明化合物对 miR-34a 活性或表达的作用, 它们直接上调或下调下游靶标的表达。例如, miR-34a 激活剂可下调细胞周期蛋白 D1 或 BCL-2。在一些情况下, 调控 miR-34a 活性的本发明化合物可用于治疗与快速细胞分裂有关的疾病或病症, 包括但不限于癌症如肝癌。例如, 本发明提供了式 I 的化合物:

[0122]



[0123] 其中 R₁、R₂、R₃、R₄、R₅、R₆ 独立地选自 H、CH₃、CH₂CH₃、F、Cl、Br、NO₂、OH、COOH、NH₂、CF₃ 和 CN。在一些情况下, R₁-R₅ 各自为 CH₃, 且 R₆ 为 H。

[0124] V. 药物组合物和给予

[0125] 本发明还提供了药物组合物或生理学组合物, 其包含有效量的调控 miR-34a 活性或表达从而抑制癌症的发展的化合物, 例如 miR-34a 激活剂。本发明的 miR-34a 调节剂包括在预防和治疗应用上的小化学品、肽类、蛋白类或天然产物。这类药物组合物或生理学组合物还包含一种或多种药学可接受的或生理学可接受的赋形剂或载体。本发明的药物组合物适合用于多种药物递送系统。用于本发明中的合适制剂可参见, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)。关于药物递送方法的概述, 参见, Langer, Science 249:1527-1533 (1990)。

[0126] 本发明的药物组合物可通过多种途径给予, 例如, 经口、皮下、透皮、肌肉内、静脉内或腹膜内。给予所述药物组合物的途径包括局部递送至患有由 miR-34a 下调而加重的病症的器官或组织 (例如, 瘤内注射至肿瘤), 对于 70kg 的成年人每日剂量为, 约 0.01-2500mg, 优选 2.5-500mg 的 miR-34a 激活剂。合适剂量可按单次每日剂量或以适当间隔的分开剂量来给予, 例如每日以 2、3、4 或更多个亚剂量给予。

[0127] 为了制备含有 miR-34a 调节剂的药物组合物, 可使用惰性物质和药学可接受的载体。药用载体可为固体或液体。固体形式制剂包括例如, 粉剂、片剂、可分散颗粒、胶囊剂、扁囊剂和栓剂。固体载体可为一种或多种可作为稀释剂、矫味剂、增溶剂、润滑剂、悬浮剂、粘结剂或药片崩解剂的物质; 其也可为包封材料。

[0128] 在粉剂中,载体通常为与细磨的活性成分例如,金合欢素、Rubone 或其衍生物混合的细磨固体。在片剂中,活性成分(例如,miR-34a 表达或活性激活剂)与具有必要的粘合性能的载体以适当比例混合,并压制期望的形状和大小。

[0129] 为了制备栓剂形式的药物组合物,首先熔化低熔点的蜡如脂肪酸甘油酯和可可油的混合物,然后将活性成分通过例如搅拌分散于其中。然后将熔化的均匀混合物倒入适当大小的模具中,以使其冷却和固化。

[0130] 粉剂和片剂优选含有约 5% 至约 70% 重量比的 miR-34a 活性调节剂活性成分。合适的载体包括例如,碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、乳糖、食用糖、果胶、葡聚糖、淀粉、黄耆胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可油等。

[0131] 所述药物组合物可包括 miR-34a 调节剂活性化合物和作为载体的包封材料的制剂,所述包封材料提供提供这样的胶囊,其中调节剂(带有或没有其他载体)被所述载体包围,从而所述载体与所述化合物联合。以类似方式,还可包括扁囊剂。片剂、粉剂、扁囊剂和胶囊剂可适于口服的固体剂型。

[0132] 液体药物组合物包括,例如,适于经口或肠胃外给予的溶液、悬浮液和适于口服的乳液。活性组分(例如,miR-34a 调节剂如激活剂,包括但不限于,金合欢素或 Rubone 或其衍生物)的无菌水溶液,或者活性组分在包括水、缓冲水、盐、PBS、乙醇或丙二醇的溶剂中的无菌溶液是适于肠胃外给予的液体组合物的实例。所述组合物可包含近似生理条件所需的药学可接受的助剂物质,如 pH 调节和缓冲剂、张度调节剂、湿润剂、清洁剂等。

[0133] 可通过以下来制备无菌溶液:将活性组分(例如 miR-34a 调节剂)溶解于期望的溶剂系统中,然后使所得溶液流过滤膜器来除菌,或者可选地,在无菌条件下将无菌化合物溶于此前灭菌的溶剂中。所得水溶液可包装后备用,或进行冻干,给予前将冻干的制剂与无菌含水载体组合。制剂的 pH 通常为 3-11,优选为 5-9,最优选为 7-8。

[0134] 含有 miR-34a 调节剂的药物组合物可用于预防和/或治疗性给药。在治疗性应用中,将组合物给予已患有可因 miR-34a 下调而加重的病症的患者,其用量足以预防、治疗、逆转或至少部分缓解或阻止该病症症状或其并发症如一些癌症类型的发作、发展和转移。足以实现这一点的用量被定义为“治疗有效量”。该应用的有效量取决于疾病或病症的严重性,以及患者的体重和总体状况,但对于 70kg 的患者通常为每日为范围约 0.1mg 至约 2,500mg 的抑制剂,对于 70kg 的患者更通常使用每日为约 2.5mg 至约 500mg 的抑制剂剂量。

[0135] 在预防性应用中,用足以延缓或预防症状发作的用量,将含有 miR-34a 调节剂(例如,miR-34a 表达或活性激活剂或抑制剂)的药物组合物给予患者,所述患者易患其中 miR-34a 下调为不可取的疾病或病症或者以其它方式具有发展为其中 miR-34a 下调为不可取的疾病或病症的风险。该用量被定义为“预防有效量”。在该应用中,调节剂的精确用量还是取决于患者的健康状况和体重,但通常对于 70kg 的患者每日为范围约 0.1mg 至约 2,500mg 的抑制剂,对于 70kg 的患者更通常使用每日为约 2.5mg 至约 500mg 的抑制剂。

[0136] 单次或多次给予所述组合物可由治疗医生选定的剂量水平和给予方式来实现。在任何事件中,所述药物制剂应提供的调节剂用量足以在治疗上或预防上有效地激活或抑制患者体内的 miR-34a 活性或表达。

[0137] 为所有目的,本申请中引用的所有专利、专利申请和其他出版物,包括 GenBank 登录号均通过引用全部并入本文。

实施例

[0138] 提供下述实施例仅为说明而非限制。本领域技术人员会容易地认识到,可以改变或修改多种非关键参数以产生基本上相同或相似的结果。

[0139] 实施例 1

[0140] 材料和方法

[0141] 报告基因质粒构建

[0142] pMIR-REPORT™ 荧光素酶质粒 (1 μg; Ambion) 用 Sac I 和 Hind III (每种 10 单位, 50 μL 反应; NEB) 依次双消化并通过凝胶纯化。通过标准寡核苷酸合成方法合成编码 miR-34a 结合位点的双链插入片段 DNA。使用的序列为: 正向: 5' CTGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGTA3' 和反向: 5' AGCTTACAACCAGCTAAGACACTGCCAGAGCT3'。杂交插入片段 (加热至 95°C 并在 30 分钟内冷却至 4°C, 然后在 4°C 保持 60 分钟), 并用 T4 连接酶 (200 单位, 10 μL 反应, 1:10 载体 / 插入片段比; NEB) 将其连接进消化的 pMIR-REPORT™ 荧光素酶载体。通过 PCR 菌落筛选选择阳性菌落, 并通过利用 NheI, MluI 和 Nhe I, Hind III (NEB) 的双酶消化确认 pMIR-REPORT™-miR-34a 载体的构建。包含 miR-34a 启动子的荧光素酶报告基因载体由约翰霍普金斯大学 (Johns Hopkins University) 的 Mendell JT 教授 (21) 友情提供。

[0143] 细胞培养

[0144] 在发明人的实验室中保存了非致瘤性人肝细胞系 MIHA 和五种 HCC 细胞系: HepG2, Huh7, Bel-7404, PLC/PRF/5 (PLC) 和 Hep3B (25)。所有细胞在之前所述的条件 (25) 下培养。羧甲基纤维素由联技化工 (Unitech Chemicals, 淄博, 中国) 提供。索拉非尼购自 Bayer Healthcare (Germany)。二甲基亚砜 (DMSO), 顺铂 (CDDP), 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 和阿霉素 (Dox) 均购自 Sigma (USA)。

[0145] miR-34a 模拟物双螺旋, 单链 miR-34a 抑制剂和靶向 p53 的 siRNA (5'-CUA CUU CCU GAA AAC AAC G dTdT-3') 购自上海吉玛制药技术有限公司 (Shanghai GenePharma Co.)。使用 DharmaFECT siRNA 转染试剂 (Thermo Scientific, Lafayette, CO) 根据制造商的说明书将 miR-34a 模拟物、抑制剂和 siRNA 转染进 HCC 细胞。使用 Lipofectamin2000 (Invitrogen) 根据制造商的说明书将本研究中所提及的质粒转染进 HCC 细胞。

[0146] 荧光素酶测定

[0147] 在转染前 12 小时将 Huh7 细胞接种进 96 孔板。将 miR-34a 报告基因载体和对照载体分别与 Renilla 荧光素酶 pRL-SV40 共转染进 Huh7 细胞。所有转染一式三份进行。在 37°C 孵育细胞 4 小时, 然后用添加了 10 μM 的天然产物文库 (NPL) 化合物的标准 DMEM 生长培养基 (Tim Tec; 0.1% DMSO 终浓度) 替换转染培养基。该文库包含 640 种化合物, 包括天然产物和它们的衍生物。孵育 48 小时之后, 移除培养基并裂解细胞, 如以下所述通过荧光素酶测定测量荧光素酶信号。

[0148] 在化合物处理前 12 小时, 将 miR-34a 报告基因、含有 miR-34a 启动子的荧光素酶报告基因载体和对照载体转染进 HCC 细胞。Renilla 荧光素酶载体 pRL-SV40 作为内参共转染。然后用化合物处理 HCC 细胞 48-72h。使用 Wallac VICTOR³V 光度计通过 Dual Luciferase Reporter Assay (Promega) 测量荧光素酶活性。对于三个重复中的每一个计算萤火虫荧光

素酶与 Renilla 表达之比。

[0149] 总 RNA 和蛋白提取

[0150] 使用 Trizol (Invitrogen) 根据制造商的说明书提取来自细胞培养物和 HCC 异种移植肿瘤的总 RNA。将总 RNA 溶解进无核酸酶的 ddH₂O。对于蛋白提取,细胞和 HCC 异种移植肿瘤在具有 1mM PMSF 和 1× 完全蛋白酶抑制剂混合物 (Roche, Indianapolis, IN) 的 1×RIPA 缓冲液中裂解。RNA 和蛋白均在 -80℃ 储存。

[0151] 定量 RT-PCR(qPCR)

[0152] 分别使用大容量 cDNA 逆转录试剂盒 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) 和裸 RT 试剂盒 (nude RT kit, Invitrogen) 将总 RNA 逆转录成 cDNA。使用 SYBR Green PCR master mix (宝生物工程, 大连, 中国) (TaKaRa, Dalian, China) 进行 qRT-PCR。使用 GAPDH 作为内参。为测量 miR-34a 表达水平,使用 SYBR Green PCR master mixture (Invitrogen) 进行 qPCR,并将 U6 用作内参。用于扩增所涉及基因的引物在表 1 中列出。所有样品相对于内参标准化并通过相对定量计算倍数变化 ($2^{-\Delta \Delta C_t}$)。

[0153] 表 1

[0154]

引物	序列
GAPDH	正向 :5' -TGCCTCCTGCACCACCAACT-3'
	反向 :5' -CCCGTTCAGCTCAGGGATGA-3'
p53	正向 :5' -CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG-3'
	反向 :5' -TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC-3'
细胞周期蛋白 D1	正向 :5' -TCTACACCGACAACCTCCATCCG-3'
	反向 :5' -TCTGGCATTTTGGAGAGGAAGTG-3'
Bcl-2	正向 :5' -ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT-3'
	反向 :5' -GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC-3'
CDK6	正向 :5' -GGATAAAGTTCCAGAGCCTGGAG-3'
	反向 :5' -GCGATGCACTACTCGGTGTGAA-3'
FOXP1	正向 :5' -CAAAGAACGCCTGCAAGCCATG-3'
	反向 :5' -GGAGTATGAGGTAAGCTCTGTGG-3'
Notch1	正向 :5' -GGTGAAGTCTCTGAGGAGATC-3'
	反向 :5' -GGATTGCAGTCGTCCACGTTGA-3'

SiRT1	正向 :5' -TAGACACGCTGGAACAGGTTGC-3'
	反向 :5' -CTCCTCGTACAGCTTCACAGTC-3'
pri-miR-34a	正向 :5' -CGTCACCTCTTAGGCTTGGA-3'
	反向 :5' -CATTGGTGTCGTTGTGCTCT-3'
miR-34a 启动子	正向 :5' -GAGGCCCTCGGACTGGGCGT-3'
	反向 :5' -GGACTCCCCGGCCATCGCGACCC-3'
miR-34a	正向 :5' -TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT-3'
miR-145	正向 :5' -GTCCAGTTTTCCCAGGAATCCCT-3'
miR-7a	正向 :5' -TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT-3'
miR-192	正向 :5' -CTGACCTATGAATTGACAGCC-3'
miR-215	正向 :5' -ATGACCTATGAATTGATTGACACAC
miR-21	正向 :5' -TAGCTTATCAGACTGATGATGTTGA-3'
miR-23a	正向 :5' -ATCACATTGCCAGGGATTTC-3'
miR-29c	正向 :5' -TAGCACCATTGAAATCGGTTA-3'
miR-34c	正向 :5' -AGGCAGTGTAGTTAGCYGATTGC-3'
miR-219	正向 :5' -TGATTGTCCAAACGCAATTCT-3'
U6	正向 :5' -CGGCAGCACATATAC-3'
	反向 :5' -TTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'

[0155] Western 印迹

[0156] 使用 BCA 蛋白测定试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 进行蛋白定量。通过 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳) 分离 25-50 μ g 蛋白并转移到 PVDF 膜上 (Bio-Rad)。在本研究中使用的一抗包括抗细胞周期蛋白 D1 (1:1000 稀释), 抗 BCL2 (1:1000 稀释), β -肌动蛋白 (1:5000) 和抗 p53 (均来自 Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)。膜与一抗在 4℃ 孵育过夜, 然后用 TBST (Tris 缓冲盐水吐温 -20) 洗涤 3 次。然后将膜与 1:3000 稀释的过氧化物酶偶联的二抗 (Santa Cruz) 在室温下孵育 1h, 然后在 TBST 中洗涤三次。使用 Amersham ECL Plus™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 通过放射自显影法检测蛋白表达。

[0157] 体内 HCC 异种移植小鼠模型。

[0158] 将 5×10^6 个 HepG2 细胞悬浮在 100 μ l 无血清培养基中,皮下 (s. c.) 注射进裸小鼠的背两侧。当肿瘤直径达到 5-10mm 时,将小鼠随机分成 4 组 (n=5)。将 Rubone 和索拉非尼悬浮在含有 0.4% 羧甲基纤维素钠和 0.9%NaCl 的羧甲基纤维素赋形剂配方中。每两天一次通过强饲法使用于 200 μ l 赋形剂中的 20mg/kg 或 50mg/kg Rubone 处理荷瘤小鼠。单独赋形剂和索拉非尼分别被用作阴性对照和阳性对照。每两天一次测量肿瘤体积和体重。以 $[(\text{长} \times \text{宽} \times \text{高}) \div 2]$ 计算肿瘤体积。处理持续 24 天。最终,处死所有小鼠并切除肿瘤。记录肿瘤重量。肿瘤组织被储存并准备用于随后的 RNA 提取或组织切片。所有动物实验由香港中文大学动物实验伦理委员会批准。

[0159] 体外血管形成测定

[0160] 使用体外血管生成测定试剂盒 (Cell Biolabs) 进行利用人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的体外血管形成测定。以 2×10^4 /孔的密度接种 HUVEC 并分别用二甲基亚砜 (DMSO) 或 Rubone (1 μ M 或 2 μ M) 处理 24h。然后将 HUVEC 接种在 ECM 凝胶表面培养 4 小时。随后,将 100 μ l $1 \times$ 染色溶液加入到每个孔中并在 37°C 下孵育 30 分钟,使用 Olympus SC35 相机 (Olympus America, Inc., Melville, NY) 捕获图像。通过计算每个图像上的分支点的数量来对血管形成进行定量。

[0161] 细胞活力测定

[0162] 通过 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基溴化四唑 (MTT) 测定测量细胞活力。将 1×10^3 个细胞一式三份接种在 96 孔板中,并使其生长至指定的时间点。在每个时间点,用稀释于 $1 \times$ PBS 中的 0.5mg/ml MTT 孵育一组细胞。2-4 小时孵育后,移除 MTT 溶液。将不溶性 MTT 溶解于 DMSO 中。通过 ELISA 酶标仪测量 570nm 处的吸光度。

[0163] 免疫组织化学染色

[0164] 使用 CD31 特异性抗体 (Cat#:Y059114, Abcam, Cambridge, MA) 对 HepG2 异种移植肿瘤组织进行免疫组织化学染色。将皮下肿瘤组织切片与抗 CD31 在 4°C 下孵育过夜。通过对每个载片上三个随机视野的血管数进行平均来计算平均微血管密度。

[0165] 染色质免疫沉淀 (ChIP) 测定

[0166] 如前所述 (26) 进行 ChIP 测定。将交联染色质与抗 H3 (Cat#:9003, Cell Signaling Technology)、IgG (Cat#:9003, Cell Signaling Technology)、p53 (Cat#:sc-106, Santa Cruz, Cambridge, MA) 孵育过夜。通过实时 PCR 对沉淀的 DNA 进行绝对定量并通过各自的 2% 输入标准化。

[0167] 统计学分析

[0168] 使用 GraphPad Prism5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) 进行统计学分析。使用四参数逻辑模型计算 IC_{50} 。使用双尾学生 t 检验进行数据分析。以平均值 $\pm$ 95% 置信区间 (CI) 表示数据。小于 0.05 的 P 值被认为是统计学上显著的。

[0169] 结果

[0170] 通过文库筛选鉴定 miR-34a 的小分子调节剂

[0171] 本发明人首先通过将 miR-34a 的互补序列克隆进 pmiR- 报告基因载体中来构建荧光素酶报告基因 (图 1A)。该 miR-34a 报告基因可以用于通过测量荧光素酶信号来筛选 miR-34a 调节剂 (图 1B)。通过 qRT-PCR 测量, HepG2 细胞中的内源 miR-34a 水平显著高于 Huh7 细胞的内源 miR-34a 水平 (22.29 倍, $p=0.0017$)。本发明人将 miR-34a 报告基因分

别转染进 HepG2 和 Huh7 细胞并测量荧光素酶活性。Huh7 细胞中的荧光素酶活性显著高于 HepG2 细胞的荧光素酶活性 (15.66 倍, $p=0.044$, 图 2B)。这些结果表明 miR-34a 报告基因对内源 miR-34a 水平敏感。

[0172] 通过该 miR-34a 报告基因系统, 本发明人使用 Huh7 细胞筛选天然产物文库以鉴定小分子 miR-34a 调节剂。筛选方法在图 1C 中示出。在用 640 种化合物在 Huh7 细胞中初次筛选后, 一种被称为 Rubone 的苗头化合物被发现是潜在的 miR-34a 调节剂。用 miR-34a 报告基因系统一式三份对 Rubone 进行再测定。图 1D 显示 Rubone 以剂量依赖的方式抑制荧光素酶活性。计算的 IC_{50} 值为 $3.8 \mu M$ 。Rubone 的化学机构在图 1D 中示出, 其分子量为 374.39。

[0173] 然后, 本发明人检查 Rubone 是否在 HCC 细胞中调节 miR-34a 表达。如图 3 所示, 在用 Rubone 处理 Huh7 和 HepG2 细胞之后, 原始和成熟 miR-34a 水平显著增加。然而, Rubone 处理不会导致 Hep3B 细胞中原始和成熟 miR-34a 的表达水平的改变 (图 3)。Huh7 细胞表达突变的 p53 而 HepG2 细胞包含野生型 p53。然而, Hep3B 细胞中 p53 被缺失。这些结果表明, Rubone 显著地调节表达野生型或突变的 p53 的 HCC 细胞中 miR-34a 的表达, 而不调节具有 p53 缺失的 HCC 细胞中 miR-34a 的表达。

[0174] 为排除 Rubone 对 miR-34a 表达的非特异性调节的可能性, 我们随机测量了一组细胞内微 RNA。结果表明 miR-7a, miR-21, miR-23a, miR-29c, miR-34c 和 miR-219 的表达不受 Rubone 处理的影响 (图 4A)。我们进一步证明了其他化疗药物顺铂 (CDDP)、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、阿霉素 (Dox) 和索拉非尼对 HCC 细胞中的 miR-34a 表达没有影响 (图 4B)。这些结果表明, Rubone 特异性地显著调节 HCC 细胞中的 miR-34a 表达。细胞周期蛋白 D1 和 Bcl-2 是两种被研究最多的 miR-34a 靶标, 其在 HCC 中有重要作用。在 Rubone 处理后我们检查了细胞周期蛋白 D1 和 Bcl-2 的表达水平。Rubone 显著降低 Huh7 和 HepG2 细胞中细胞周期蛋白 D1 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白水平, 但不降低 Hep3B 细胞中细胞周期蛋白 D1 和 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白水平 (图 5)。同时, 我们测量了其他 miR-34a 靶标的表达水平, 包括 CDK6、FOXP、Notch1 和 Sirtuin。类似地, 在用该化合物处理后, Huh7 和 HepG2 中这些靶标的表达水平降低, 而 Hep3B 细胞中这些靶标的表达水平不降低 (图 4C)。

[0175] miR-34a 调节剂抑制体外 HCC 细胞生长

[0176] 然后, 我们检查了 Rubone 的体外抗癌活性。在指定的时间点用不同浓度的 Rubone 处理五种 HCC 细胞系和 MIHA 细胞系。通过 MTT 测定测量细胞活力。Rubone 在 $5 \mu M$ 的低浓度轻微抑制 HCC 细胞的生长。该化合物的 $10 \mu M$ 的较高浓度显著抑制 HepG2, Huh7, Bel-7404 和 PLC 细胞的生长。然而, 在用 Rubone 处理后, MIHA 和 Hep3B 细胞的生长速度几乎没有改变 (图 6A)。

[0177] 然后, 我们探寻 Rubone 是否是通过 miR-34 抑制 HCC 细胞生长。用 miR-34a 模拟物或抑制剂转染 Bel-7404 和 PLC 细胞, 然后用 Rubone 处理。图 6B 显示, miR-34a 模拟物提高了两种 HCC 细胞系对 Rubone 的化学敏感性。然而, miR-34a 抑制剂逆转了 Rubone 的生长抑制效果。这些结果表明, Rubone 通过调节 miR-34a 表达抑制 HCC 生长。

[0178] miR-34a 调节剂抑制体内肝细胞肿瘤生长

[0179] 然后, 我们检查了 Rubone 在 HepG2 异种移植裸小鼠模型中的体内抗癌活性。用 Rubone 强饲荷瘤小鼠。抗 HCC 试剂索拉非尼用作阳性对照。如图 7A 和表 2 所示, 赋形剂对

照中的肿瘤表现快速稳定的生长。HepG2 异种移植对索拉非尼敏感,在 50mg/kg 的剂量肿瘤生长抑制率为 84.22% ($p=0.0013$ 对赋形剂对照)。Rubone 在 20mg/kg 和 50mg/kg 的剂量分别使肿瘤生长延迟了 78.27% ($p=0.0070$ 对赋形剂对照) 和 89.64% ($p=0.0010$ 对赋形剂对照)。在同样的 50mg/kg 的剂量, Rubone 表现出比索拉非尼更强的肿瘤生长抑制 ($p=0.047$, 对索拉非尼处理组, 表 2)。在整个处理过程中比较 Rubone 和索拉非尼的抗癌活性, 结果也揭示了 Rubone 表现比索拉非尼更高的抗癌活性 (图 7B)。

[0180] 表 2

[0181]

HepG2 异种移植 模型	药物和剂量	存活的小鼠 (n) 开始/结束	体重(g)a 开始/结束	肿瘤重量 (g)b	肿瘤生长 抑制 (%)
	赋形剂	5/5	18.80(95% CI =16.96-20.64)/ 23.00(95% CI =21.04-24.96)	1.178 (95% CI=0.82-1.54)	-
	Rubone (20 mg/kg)	5/5	19.60(95% CI =18.49-20.71)/ 23.60(95% CI =21.93-25.27)	0.256 (95% CI=0.08-0.42) **	78.27
	Rubone (50 mg/kg)	5/5	20.00(95% CI =20.00-20.00)/ 23.60(95% CI =21.03-26.17)	0.122 (95% CI=0.067-0.18)** #	89.64

[0182]

	索拉非尼 (50 mg/kg)	5/5	20.00(95% CI =18.76-21.24)/ 24.00(95% CI =21.22-26.78)	0.186 (95% CI=0.14-0.23) **	84.22
--	--------------------	-----	---	-----------------------------------	-------

[0183] 通过 qRT-PCR 测量异种移植的肿瘤中 pri-miR-34a, miR-34a, 细胞周期蛋白 D1 和 Bcl-2 的表达水平。在 Rubone 处理的肿瘤中, pri-miR-34a 和 miR-34a 水平被上调, 而 miR-34a 靶标细胞周期蛋白 D1 和 Bcl-2 被下调 (图 7C 和图 8)。索拉非尼处理没有导致 miR-34a 及其靶标的表达的变化 (图 7C)。此外, 与赋形剂对照相比, 处理的小鼠中没有明显的体重减轻 (表 2)。在实验的结束时没有观察到明显的副作用。这些结果表明, Rubone 是动物中有效安全的抗 HCC 试剂。

[0184] miR-34a 调节剂抑制血管生成

[0185] 我们发现, 与对照组相比, 用 Rubone 处理的皮下肿瘤明显较少地形成血管。然后用内皮标志物 CD31 对肿瘤进行免疫染色。在对照组中新的血管显著形成, 而用 Rubone 处理的肿瘤具有显著较低的微血管 (图 10A, Rubone 处理的组: 血管评分平均值 =12.50, 95%CI=0.4865-24.51, $p=0.0098$, 对照组: 血管评分平均值 =67.50, 95%CI=41.95-93.04)。

[0186] 然后, 我们检查了 Rubone 是否抑制体外 HUVEC 的血管形成。用赋形剂对照处理的 HUVEC 经历快速重组 (1-2h 内可见) 并随后形成毛细管样结构。相比之下, 在第 4 小时,

Rubone 处理导致 ECM 凝胶诱导的网络形成的剂量依赖的抑制。与对照组相比, 1 μ M 的较低浓度的 Rubone 产生显著抑制 (Rubone 处理的组: 血管评分平均值, 3.667, 95%CI=2.232-5.101, $p=0.0036$; 对照组: 血管评分平均值, 42.33, 95%CI=34.35-50.32)。同时, 用 Rubone 处理后, 血管长度较短; 血管数量较少、更薄并缩短。用 2 μ M 的较高剂量的 Rubone 处理, 完全不形成血管 (图 10B)。这些发现确认了 miR-34a 调节剂可以改变内皮细胞功能并表明 Rubone 可能确实阻止血管生成过程以抑制肿瘤生长。

[0187] miR-34a 调节剂增加 miR-34a 启动子活性和 p53 对 miR-34a 启动子的占据率

[0188] 由于 Rubone 处理后原始和成熟 miR-34a 均显著增加, 我们接下来检查了 Rubone 是否能调节 miR-34a 启动子活性。具有不同的 p53 状态的 HCC 细胞系 (HepG2:p53 野生型, Bel-7404:p53 突变体, Hep3B:p53 缺失) 被用于启动子活性测定。首先用 miR-34a 启动子转染这三种细胞系, 然后用 Rubone 处理。Rubone 处理后, HepG2 和 Bel-7404 细胞中 miR-34a 启动子活性均提高。然而, Rubone 处理后 Hep3B 细胞中 miR-34a 启动子活性没有改变 (图 11A)。这些结果暗示了 p53 在 Rubone 对 miR-34a 启动子活性的调节中的潜在作用。

[0189] 我们利用 siRNA 在 HepG2 和 Bel-7404 细胞中敲低 p53 (图 9B)。然后用 Rubone 处理 HepG2 和 Bel-7404 细胞。使用的 siRNA 靶向野生型和突变的 p53。qRT-PCR 结果表明, p53 敲低后 miR-34a 水平降低 (图 11B)。此外, 由 Rubone 提高的 miR-34a 表达水平被 p53 敲低显著逆转 (图 11B)。同时, HepG2 和 Bel-7404 细胞中 pri-miR-34a 表达表现出与 miR-34a 表达的类似的变化 (图 9C)。MTT 测定进一步揭示了 Rubone 对 HCC 细胞的生长抑制效果也被敲低 p53 显著逆转 (图 11C)。这些结果暗示了 p53 在 Rubone 的生物活性中起重要作用。然后我们利用 ChIP 测定检查 Rubone 是否能够调节 p53 活性。结果表明 Rubone 处理显著提高 HepG2 和 Bel-7404 细胞中 p53 对 miR-34a 启动子的占据率 (图 11D)。

[0190] 讨论

[0191] 在本研究中, 一种被称为 Rubone 的苗头化合物被发现在 miR-34a 沉默的 HCC 细胞中恢复 miR-34a 表达。Rubone 是化学合成的植物查耳酮衍生物。Rubone 之前未被报道过具有任何已知生物活性。该化合物向我们提供了癌症治疗的新选择。

[0192] 我们的研究表明, Rubone 能够显著提高 miR-34a 表达同时降低 miR-34a 靶标表达 (图 3 和图 5)。此外, Rubone 不引起 HCC 细胞中其他微 RNA 的表达的变化。特别是, 该化合物不改变 p53 调节的其他 miRNA 的表达, 例如 miR-34c, miR-145, miR-192, miR-215 (27)。此外, 其他常用的抗 HCC 试剂处理, 包括 CDDP、5-Fu、Dox 和索拉非尼, 对 miR-34a 表达没有影响 (图 4B)。这些结果表明 Rubone 特异性调节 miR-34a 表达。我们发现 Rubone 可以以剂量依赖和时间依赖的方式抑制 HCC 细胞生长。我们还发现 Rubone 通过 miR-34a 表现其抗癌活性, 因为 miR-34a 模拟物提高了 HCC 细胞对该化合物的化学敏感性。然而, miR-34a 抑制剂逆转了 Rubone 对 HCC 细胞的生长抑制效果。我们的结果暗示了 miR-34a 是 Rubone 的药物靶标。

[0193] 我们还证明了 Rubone 在 HepG2 异种移植的小鼠模型中表现出强抗癌效力。我们还发现在用 Rubone 处理后, 体内 HCC 肿瘤中 pri-miR-34a 和 miR-34a 表达水平均被上调。在 HepG2 异种移植的肿瘤中 miR-34a 靶标细胞周期蛋白 D1 和 Bcl-2 被下调。所有这些结果与体外研究一致。体内测定进一步确认了 Rubone 的强抗癌活性。

[0194] 目前,化疗药物对 HCC 的效力有限 (28)。索拉非尼是 HCC 治疗的最前沿。索拉非尼通过抑制 Raf-1 和血管内皮生长因子 (VEGF) 通路对 HCC 患者表现出某些效力 (29)。然而,索拉非尼表现严重的副作用,例如手足皮肤反应 (30)、发疹性黑素细胞病变 (31) 等。因此,对开发具有更好效力和更少副作用的新疗法仍有迫切的临床需要。

[0195] 我们的结果表明 Rubone 的抗癌效力高于索拉非尼。因此, Rubone 需要作为潜在的有效抗 HCC 试剂进一步研究。同时,体外和体内研究均证明 Rubone 可以改变内皮细胞功能。之前的研究表明 miR-34a 过表达导致显著提高的内皮祖细胞 (EPC) 衰老和减少的 EPC 血管生成 (32)。我们的研究暗示了 Rubone 可能确实阻止血管生成过程以抑制肿瘤生长。

[0196] 之前的研究已经揭示了 p53 能直接正向调节 miR-34a 的表达 (9)。超过 50% 的人类肿瘤包含 p53 基因的突变或缺失 (33)。然而,对 miR-34a 与突变 p53 之间的关系仍没有报道。Rubone 调节具有野生型和突变的 p53 的 HCC 细胞中 miR-34a 的表达,但不调节具有 p53 缺失的 HCC 细胞中 miR-34a 的表达。我们的结果表明, miR-34a 通过 Rubone 的上调在 p53 敲低后被显著逆转。并且, Rubone 对这些细胞系的生长抑制效果也被 p53 敲低逆转。结果首次表明突变的 p53 也可以调节 miR-34a 表达。Rubone 提高 miR-34a 启动子活性,暗示了 Rubone 在转录水平调节 miR-34a 表达。然而,我们发现 p53 表达不受 Rubone 处理影响 (图 9A)。我们猜测 Rubone 是否通过提高 p53 活性来调节 miR-34a 表达。最终,ChIP 测定结果表明, Rubone 处理显著提高 p53 对 miR-34a 启动子的占据率。总而言之,我们的研究首次鉴定了对 HCC 具有强抗癌活性的小 miR-34a 调节剂。Rubone 通过提高 p53 活性来调节 miR-34a 表达。其抗癌机理与通常使用的抗癌试剂截然不同。

[0197] 参考文献

[0198] 1. Pisani P, Parkin DM, Bray FI, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from twenty five major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83:18-29.

[0199] 2. Carthew RW. Gene regulation by microRNAs. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16:203-8.

[0200] 3. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120:15-20.

[0201] 4. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19:92-105.

[0202] 5. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455:58-63.

[0203] 6. Ha TY. MicroRNAs in Human Diseases: From Cancer to Cardiovascular Disease. *Immune Netw* 2011; 11:135-54.

[0204] 7. Hwang HW, Mendell JT. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer* 2006; 94:776-80.

[0205] 8. Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, et al. Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 2013; 368:1685-94.

- [0206] 9. He L, He X, Lim LP, Stanchina ED, Xuan Z, Liang Y, et al. MicroRNA component of the p53 tumor suppressor network. *Nature* 2003; 447: 1130-4.
- [0207] 10. Welch C, Chen Y, R. L. Stallings. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 2007; 26: 5017-22.
- [0208] 11. Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, et al. Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett* 2008; 582: 1564-8.
- [0209] 12. Ji XM, Wang ZW, Geamanu A, Goja A, Sarkar FH, Gupta SV. Delta-tocotrienol suppresses Notch-1 pathway by upregulating miR-34a in nonsmall cell lung cancer cells. *Int J Cancer* 2012; 131: 2668-77.
- [0210] 13. Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 4123-32.
- [0211] 14. Hashimi ST, Fulcher JA, Chang MH, Gov L, Wang S, Lee B. MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood* 2009; 114: 404-14.
- [0212] 15. Li Y, Guessous F, Zhang Y, Dipierro C, Kefas B, Johnson E, et al. microRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res* 2009; 69: 7569-76.
- [0213] 16. Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. MiR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 13421-6.
- [0214] 17. Li N, Fu H, Tie Y. MiR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2009; 275: 44-53.
- [0215] 18. Gumireddy K, Young DD, Xiong X, Hogenesch JB, Huang Q, Deiters A. Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008; 47: 7482-4.
- [0216] 19. Young DD, Connelly CM, Grohmann C, Deiters A. Small molecule modifiers of microRNA miR-122 function for the treatment of hepatitis C virus infection and hepatocellular carcinoma. *J Am Chem Soc* 2010; 132: 7976-81.
- [0217] 20. Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE. P53-mediated activation of miRNA-34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 2007; 17: 1298-307.
- [0218] 21. Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007; 26: 745-52.
- [0219] 22. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, et al. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel

sequencing:miR-34a is a p53target that induces apoptosis and G1-arrest.Cell Cycle2007;6:1586-93.

[0220] 23.Tazawa H,Tsuchiya N,Izumiya M,Nakagama H.Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells.Proc Natl Acad Sci USA2007;104:15472-7.

[0221] 24.Raver-Shapira N,Marciano E,Meiri E,Spector Y,Rosenfeld N,Moskovits N,et al.Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis.Mol Cell2007;26:731-43.

[0222] 25.Chen Y,Lin MC,Yao H,Wang H,Zhang AQ,Yu J,et al.Lentivirus-mediated RNA interference targeting enhancer of zeste homolog2inhibits hepatocellular carcinoma growth through down-regulation of stathmin.Hepatology2007;46:200-8.

[0223] 26.Li CH,To KF,Tong JH,Xiao Z,Xia T,Lai PB,et al.Enhancer of zeste homolog2silences miR-218in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells by inducing formation of heterochromatin.Gastroenterology2013;144:1086-97.

[0224] 27.Feng Z,Zhang C,Wu R,Hu W.Tumor suppressor p53meets microRNAs.J Mol Cell Biol2011;3:44-50.

[0225] 28.Lee J,Park JO,Kim WS,Park SH,Park KW,Choi MS,et al.Phase II study of doxorubicin and cisplatin in patients with metastatic hepatocellular carcinoma.Cancer Chemother Pharmacol2004;54:385-90.

[0226] 29.Llovet JM,Ricci S,Mazzaferro V,Hilgard P,Gane E,Blanc JF,et al.Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma.N Engl J Med2008;359:378-90.

[0227] 30.Lacouture ME,Reilly LM,Gerami P,Guitart J.Hand foot skin reaction in cancer patients treated with the multikinase inhibitors sorafenib and sunitinib.Ann Oncol2008;19:1955-61.

[0228] 31.Kong HH,Sibaud V,Chanco Turner ML.Sorafenib-induced eruptive melanocytic lesions Arch Dermatol2008;144:820-2.

[0229] 32.Zhao t,Li J,Chen AF.MicroRNA-34a induces endothelial progenitor cell senescence and impedes its angiogenesis via suppressing silent information regulator1.Am J Physiol Endocrinol Metab2010;299:110-6.

[0230] 33.Levine AJ.p53:the cellular gatekeeper for growth and division.Cell1997;88:323-31.

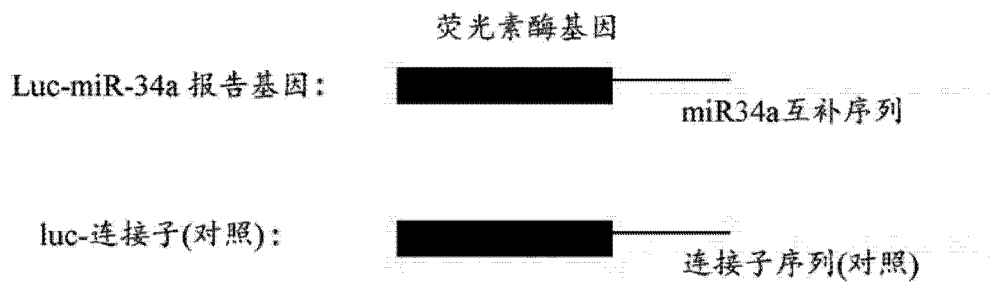
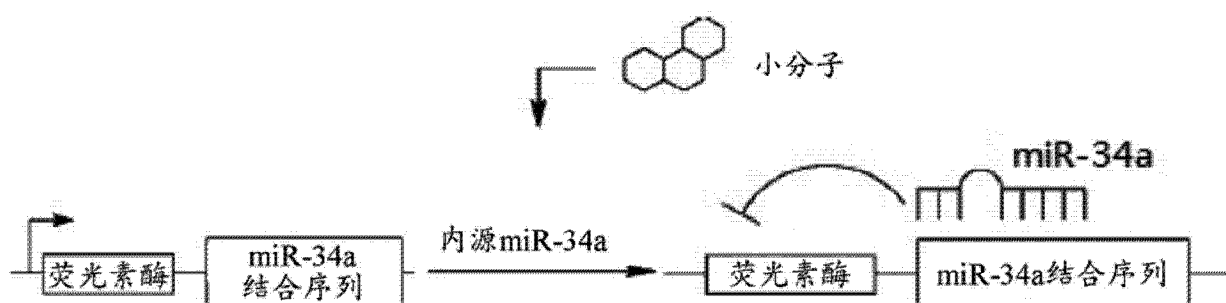
A**B**

图 1

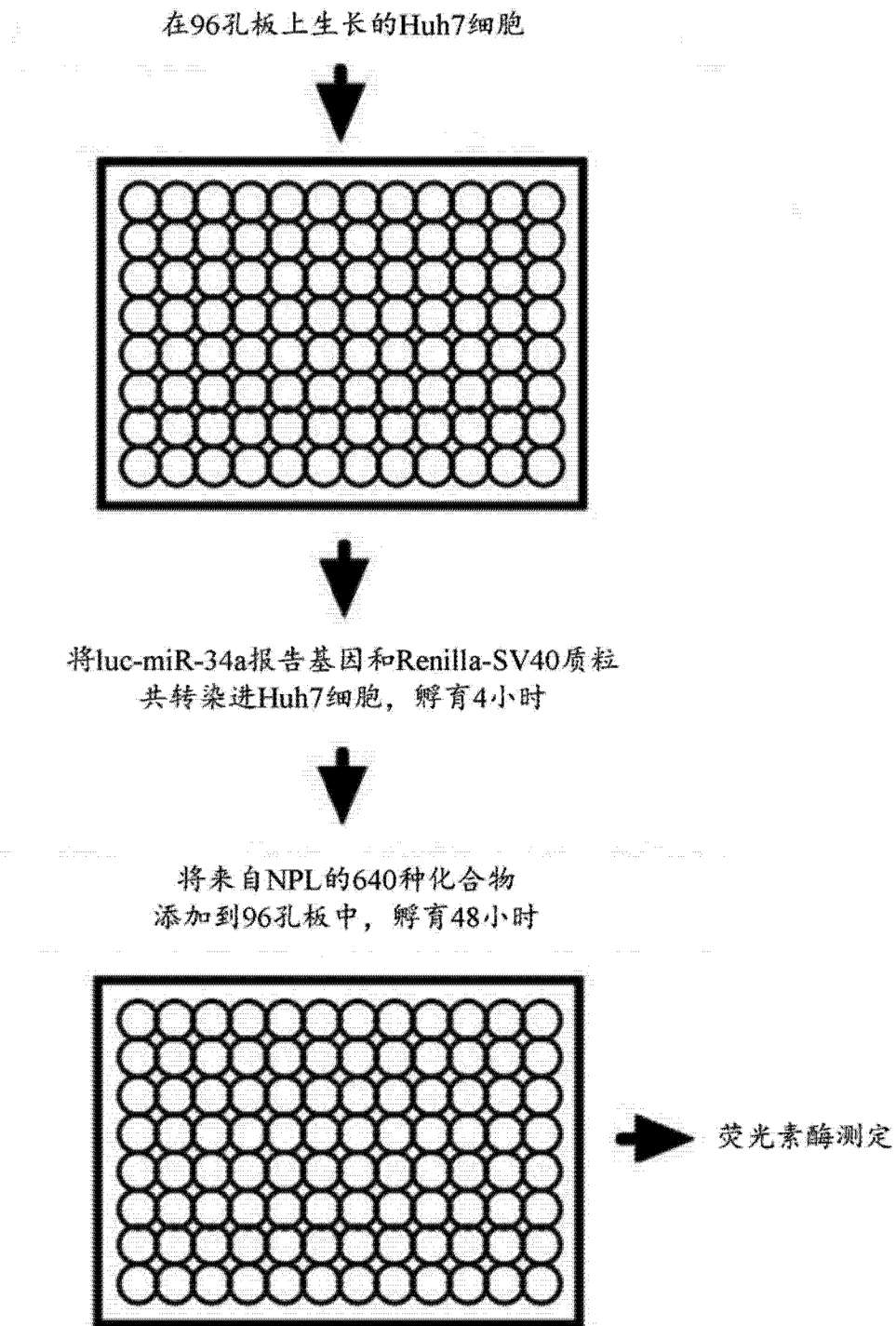
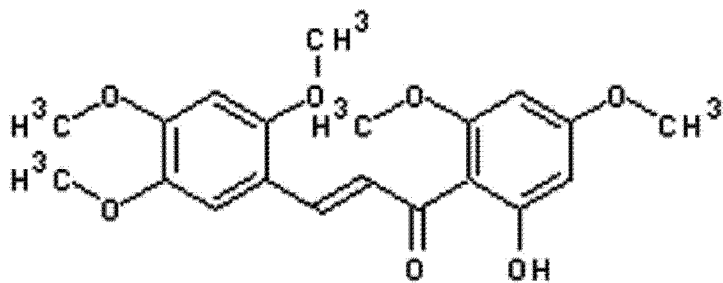
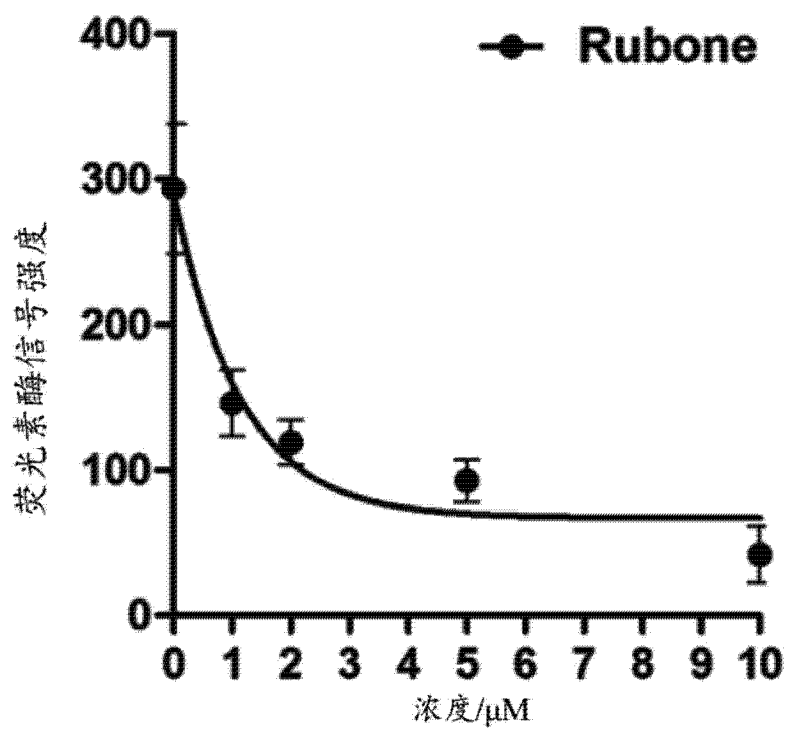
C

图1(续)

D



Rubone(MW-374.39)

2'-羟基-2,4,4',5,6'-戊甲氧基查耳酮

图1(续)

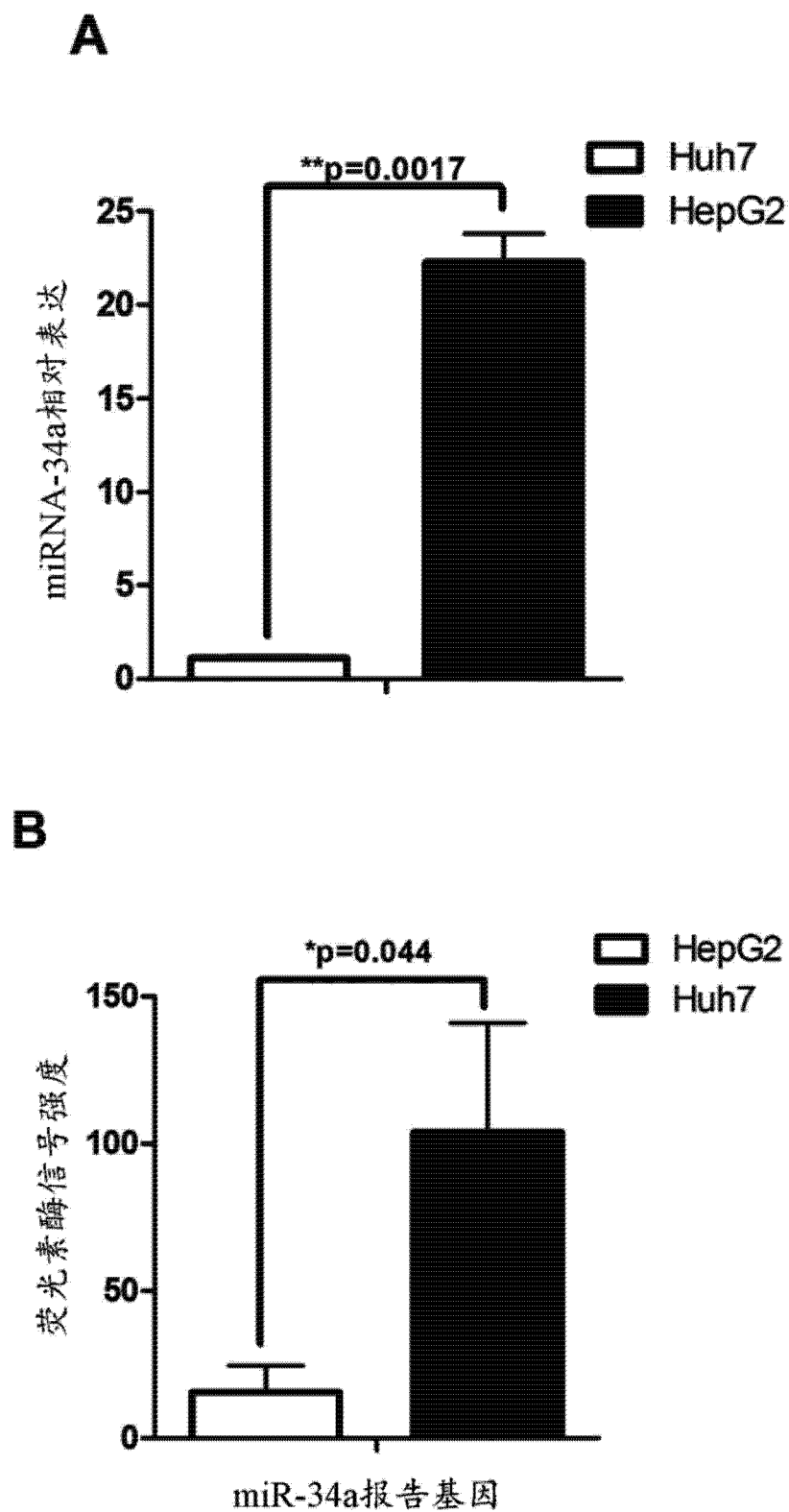
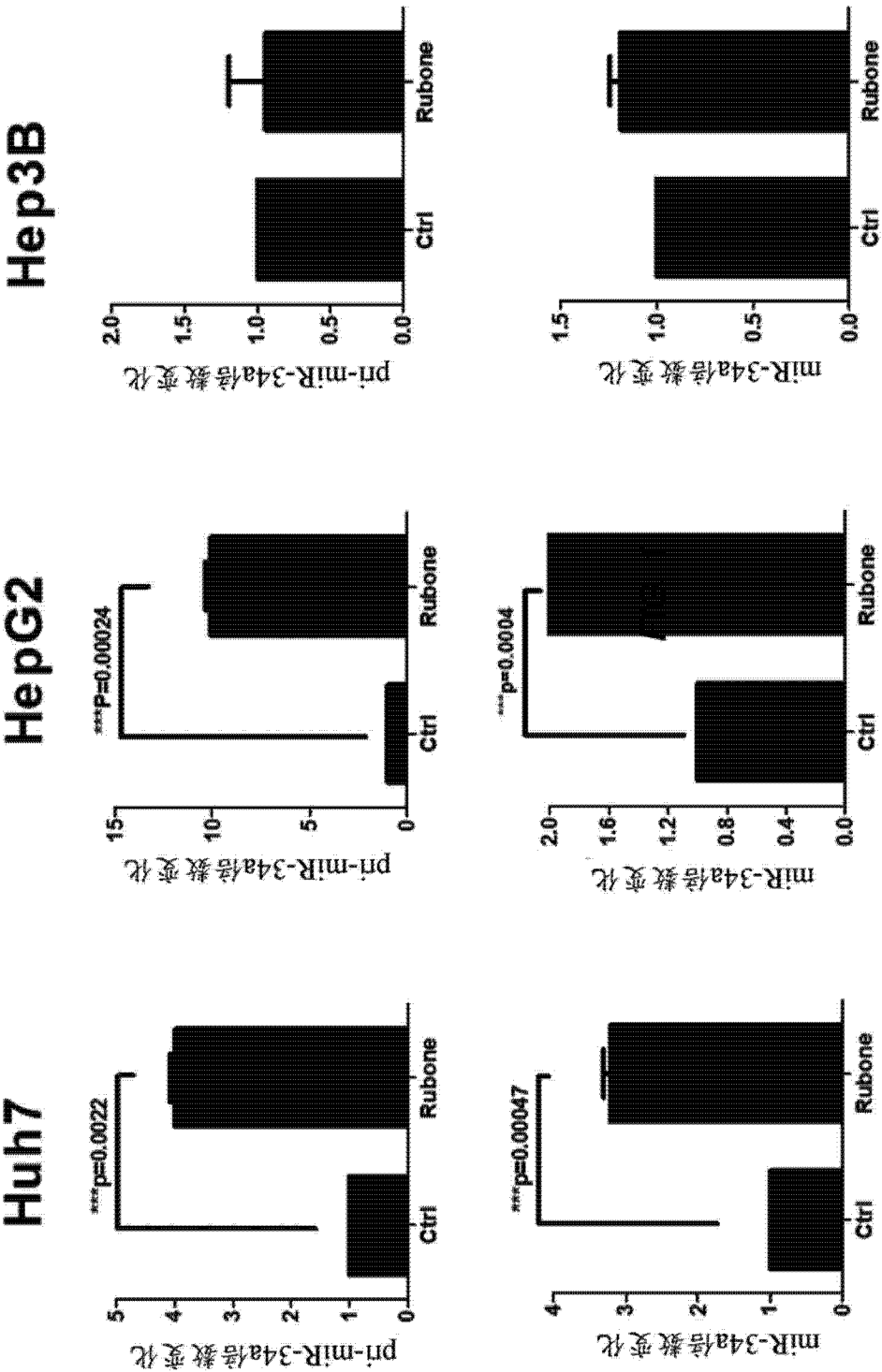


图 2



HepG2: p53野生型, Huh7: p53突变体, Hep3B: p53缺陷型

图 3

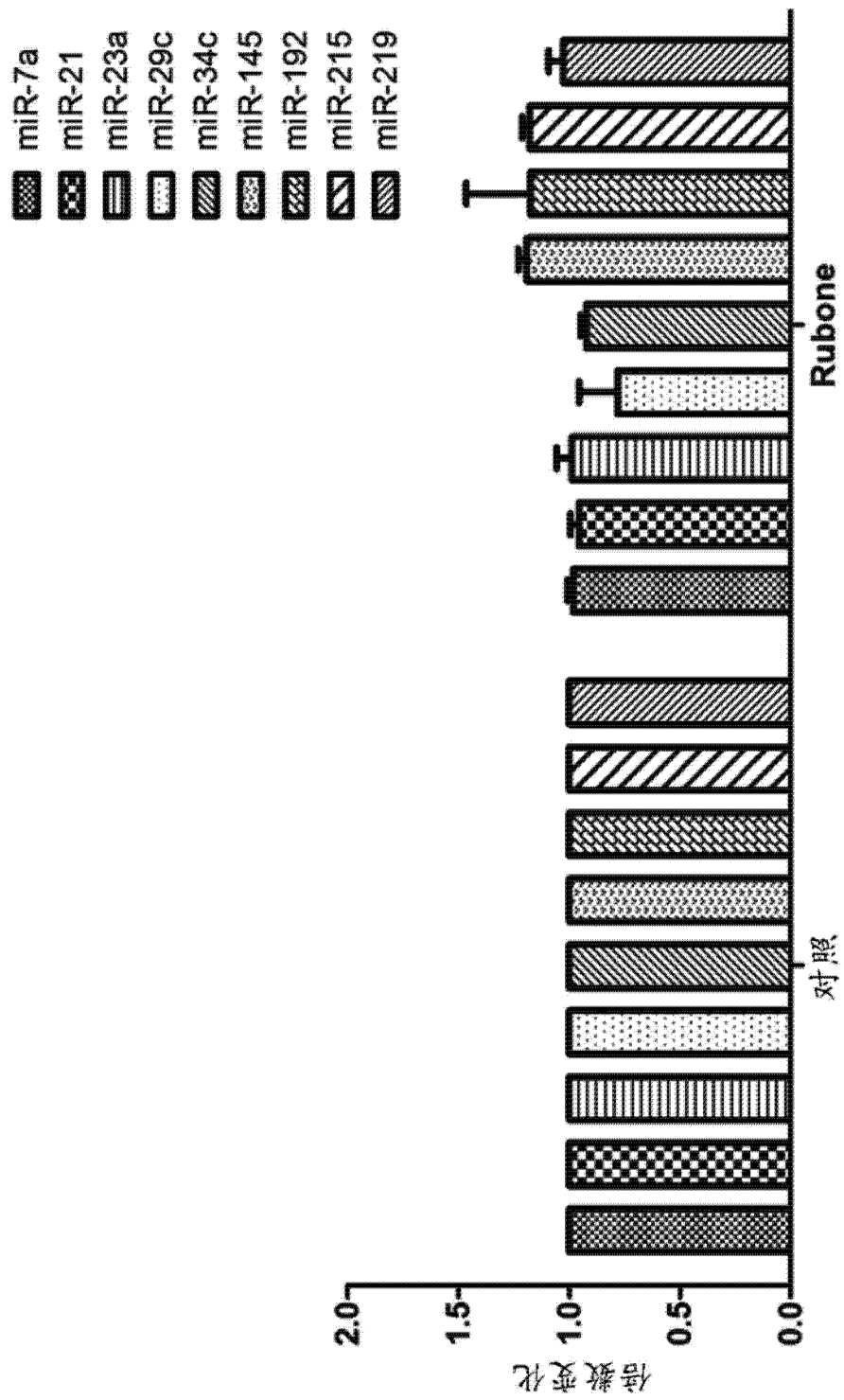
**A**

图 4

B

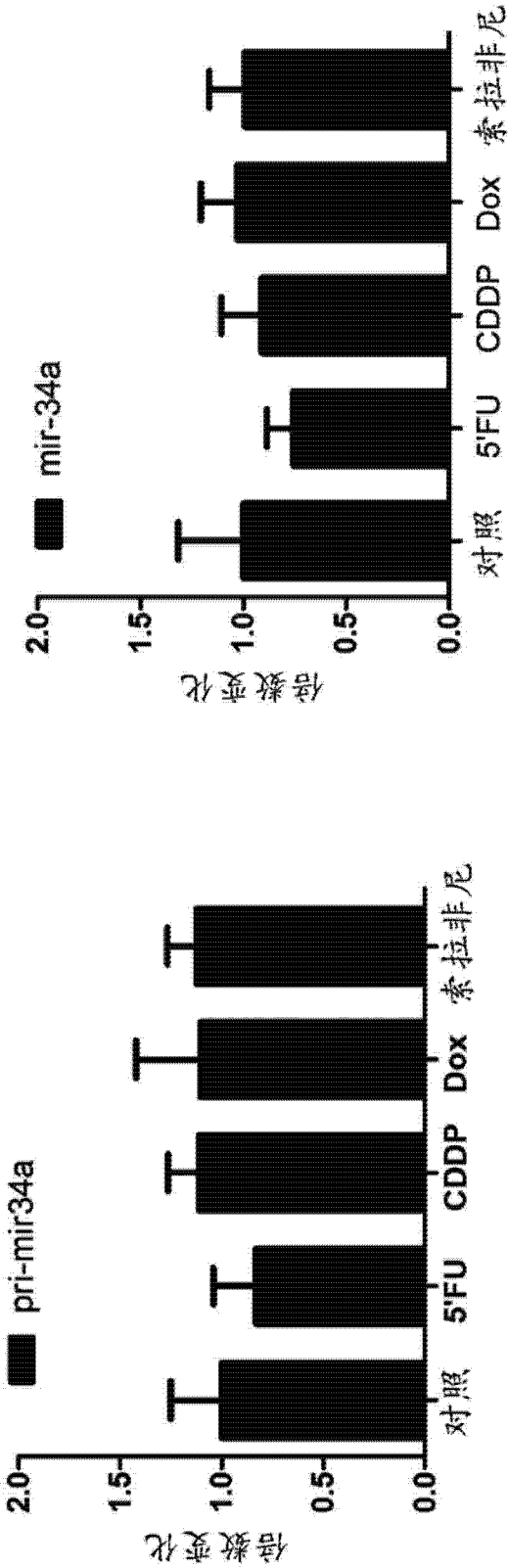


图 4(续)

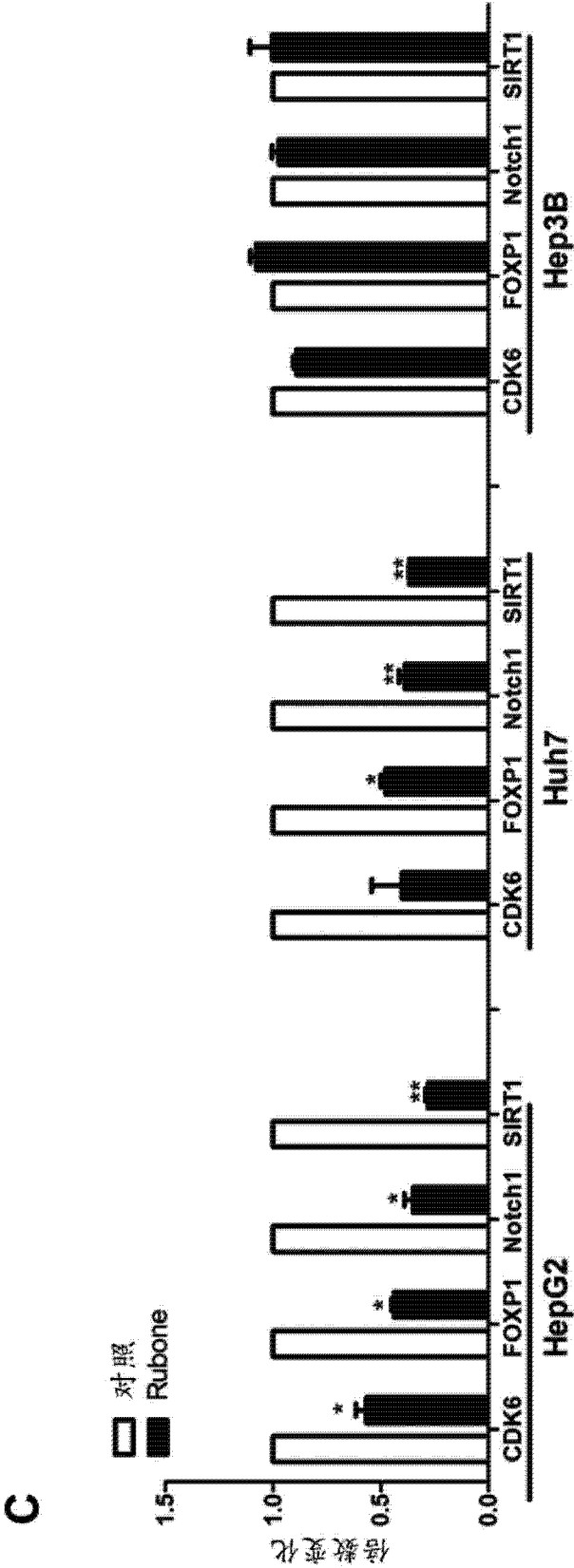


图 4(续)

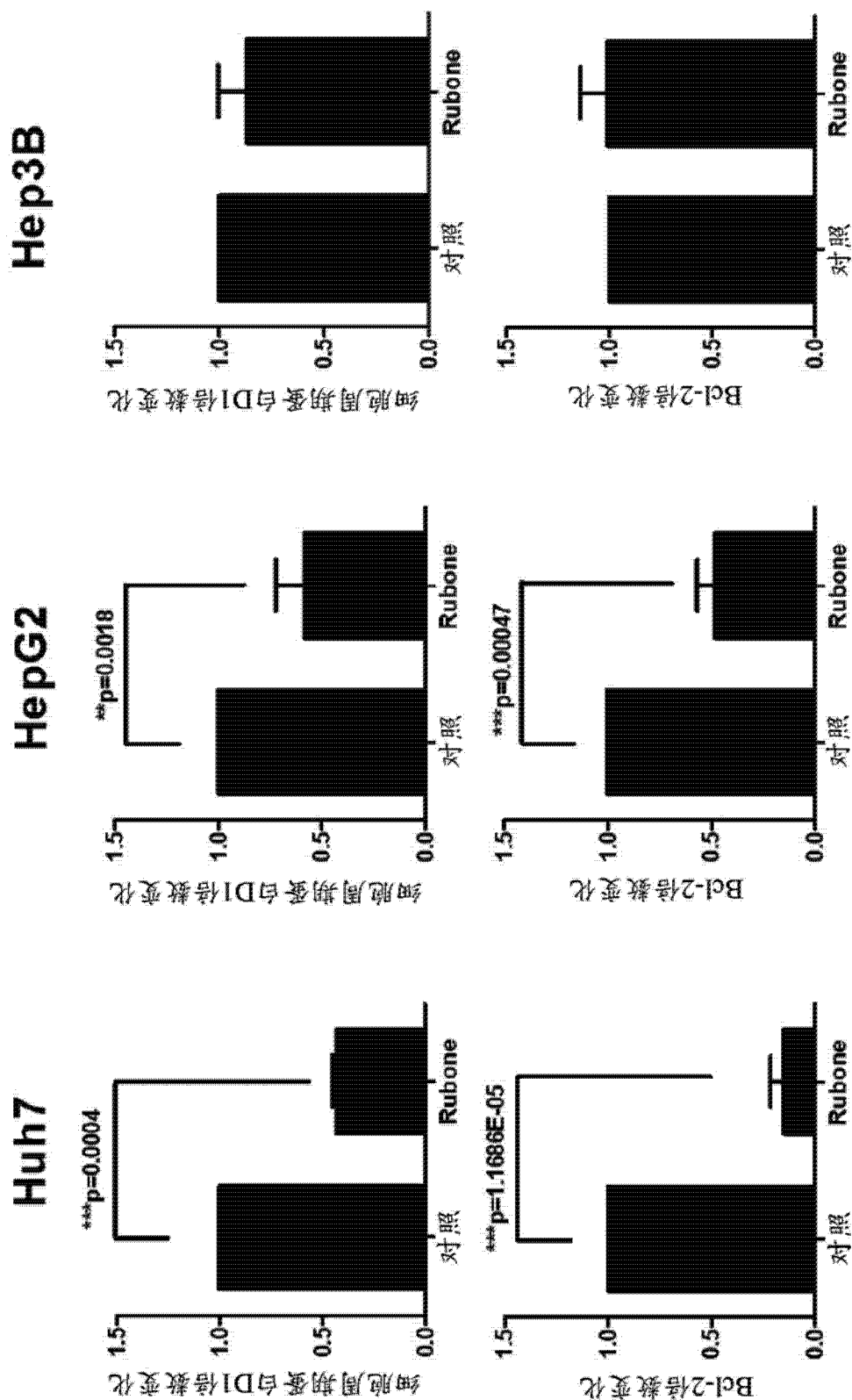


图 5

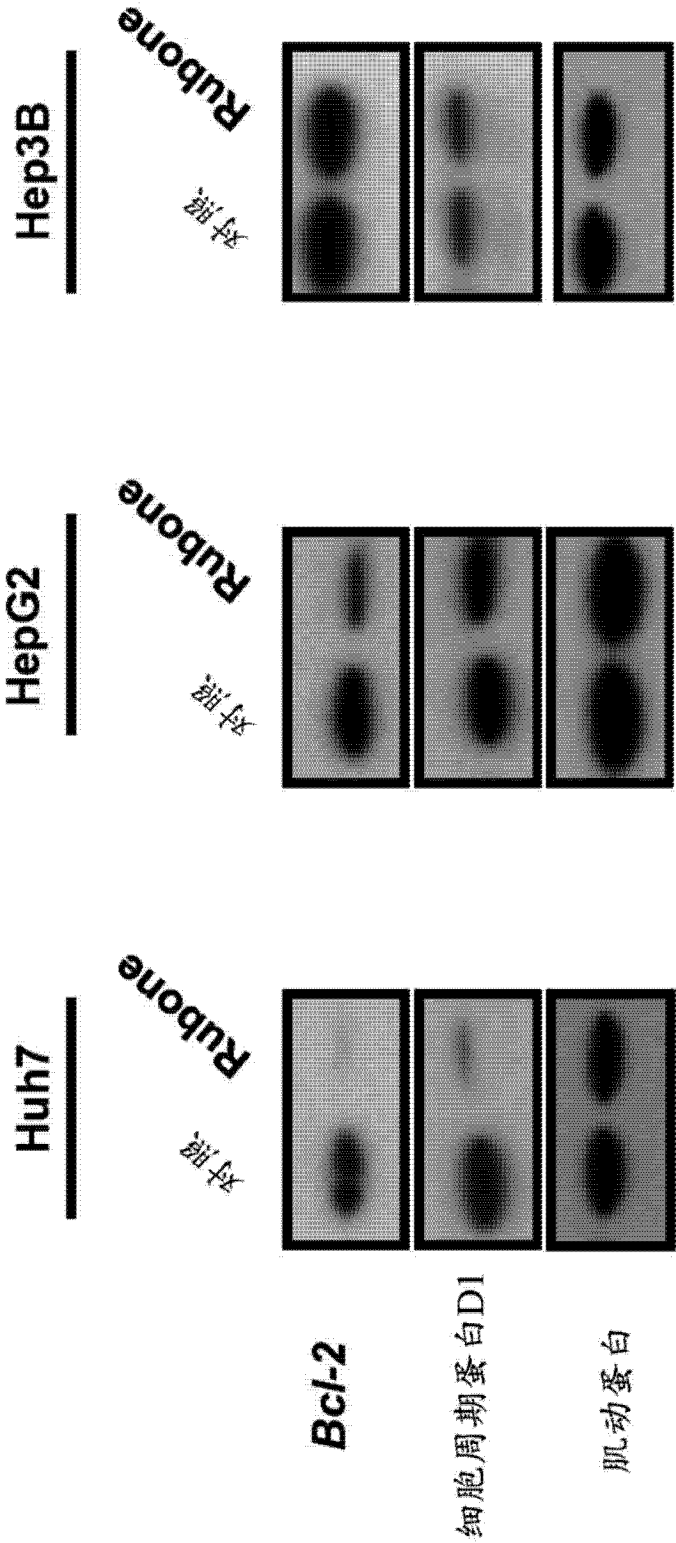


图 5(续)

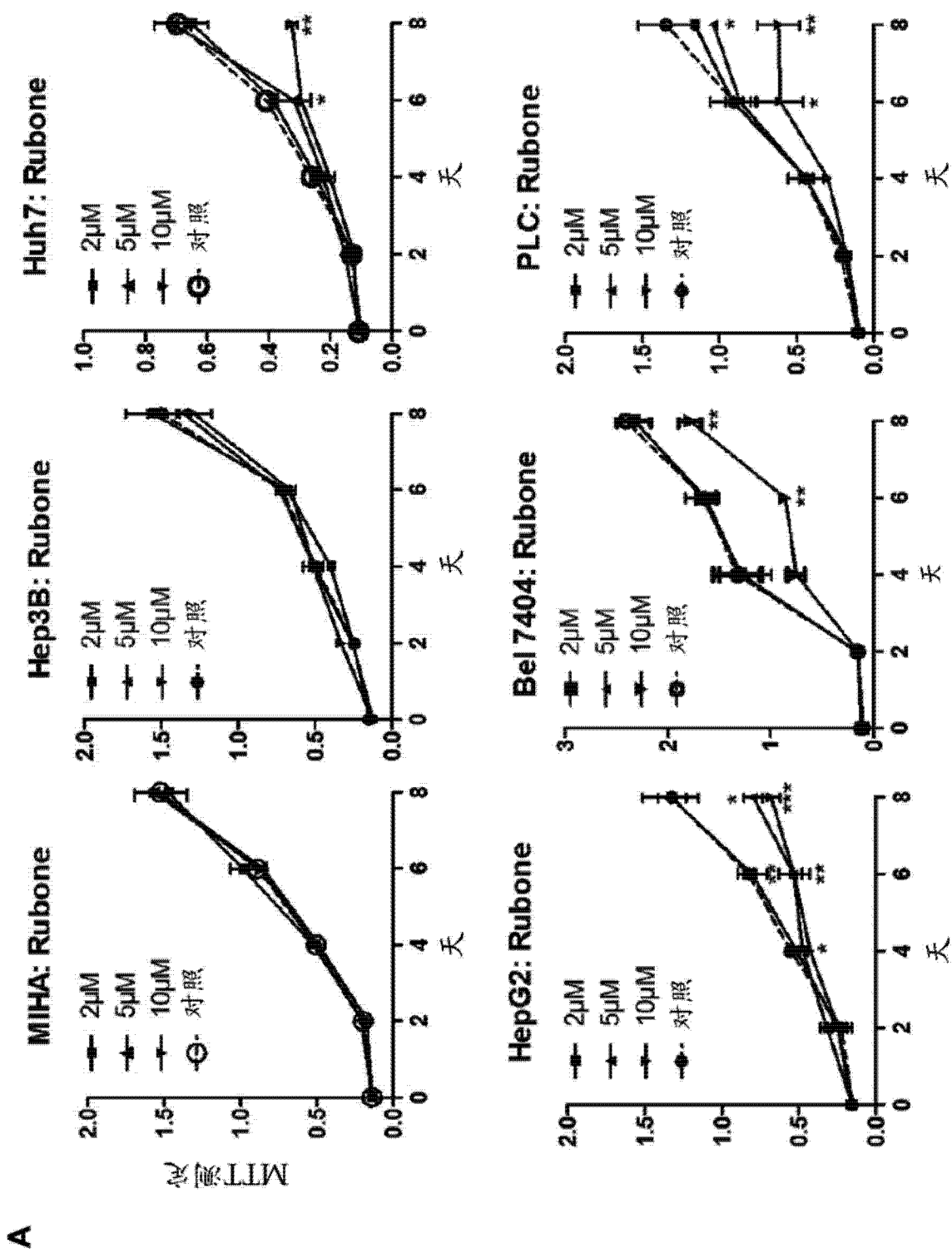


图 6

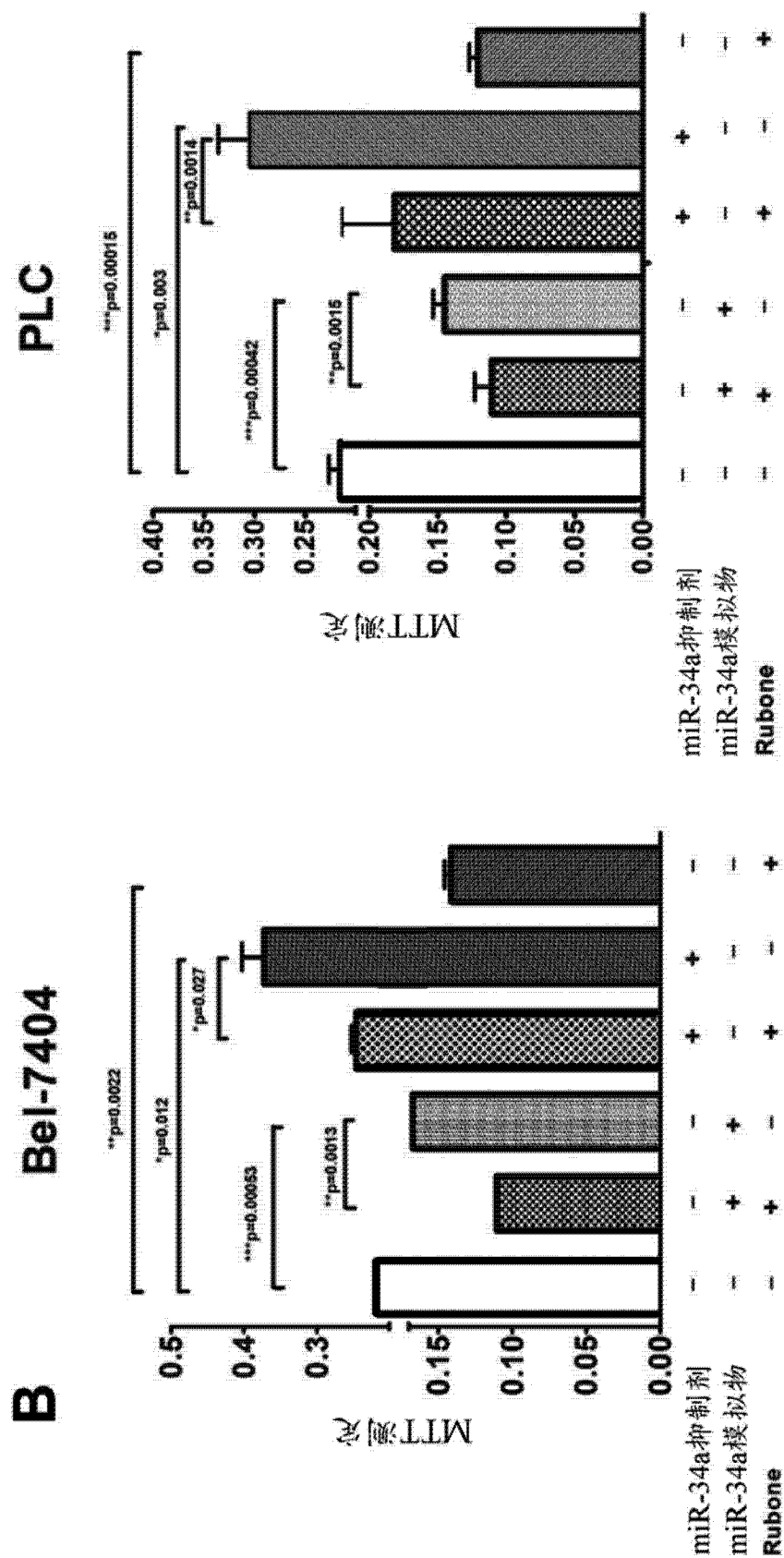


图6(续)

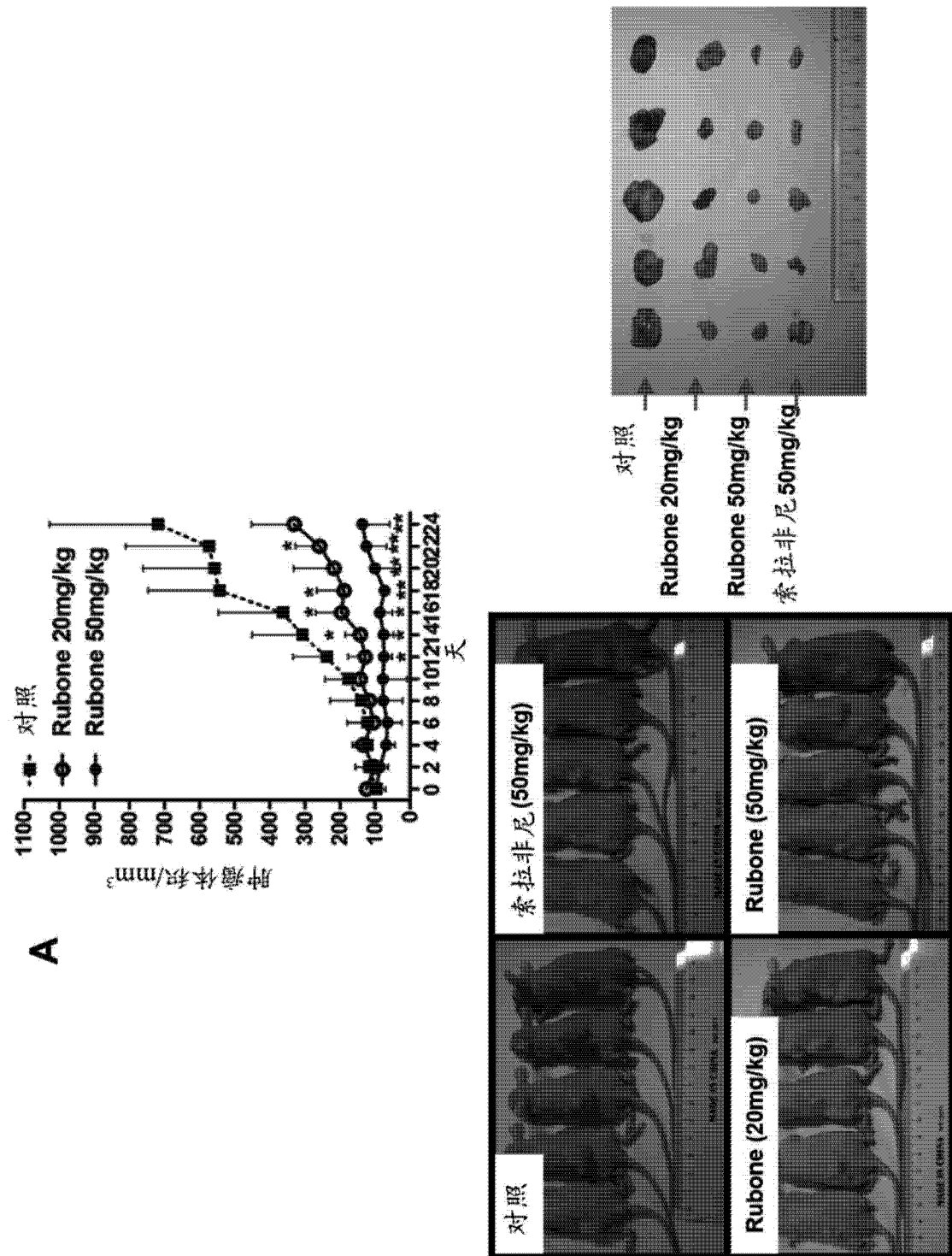


图 7

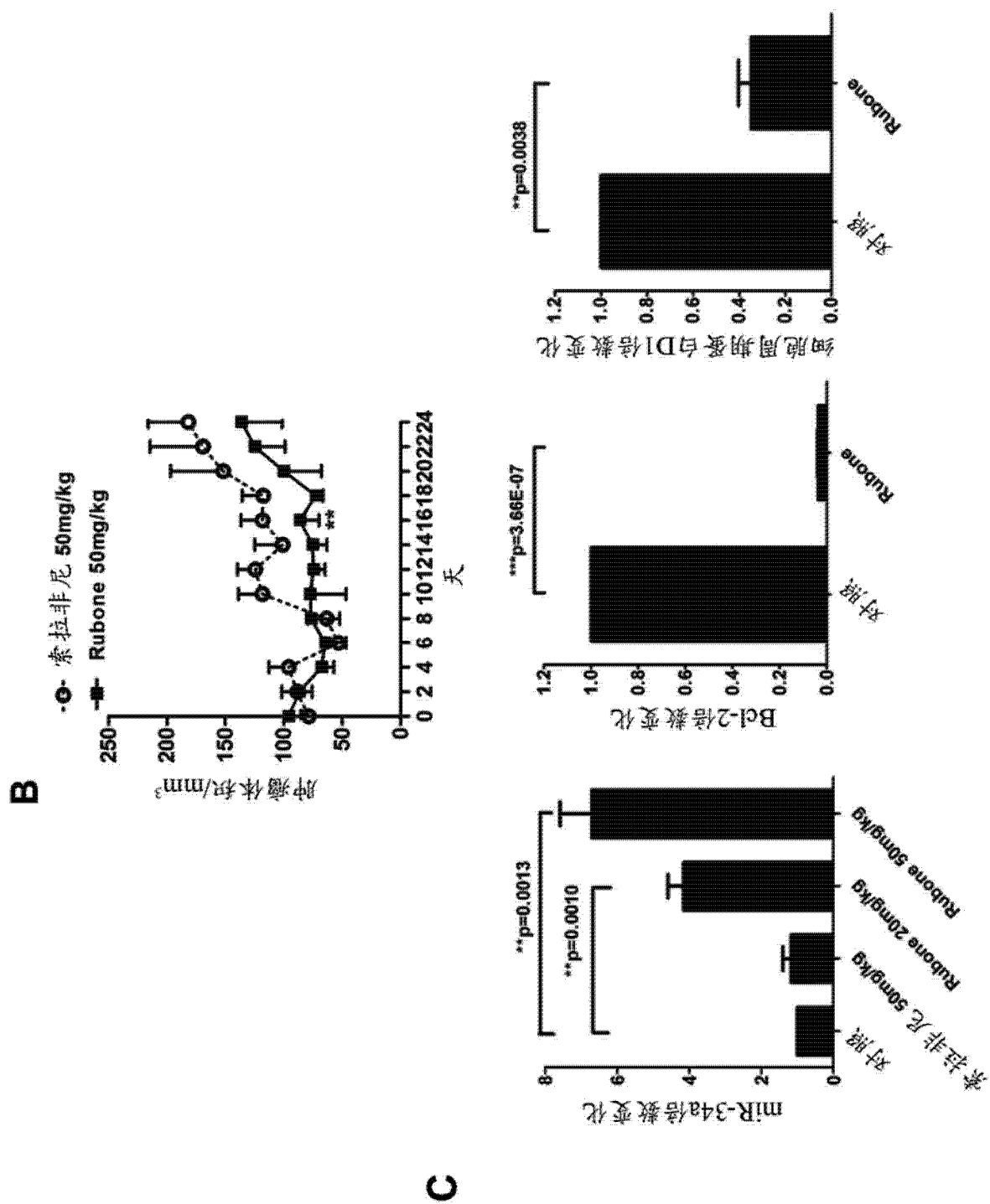


图 7(续)

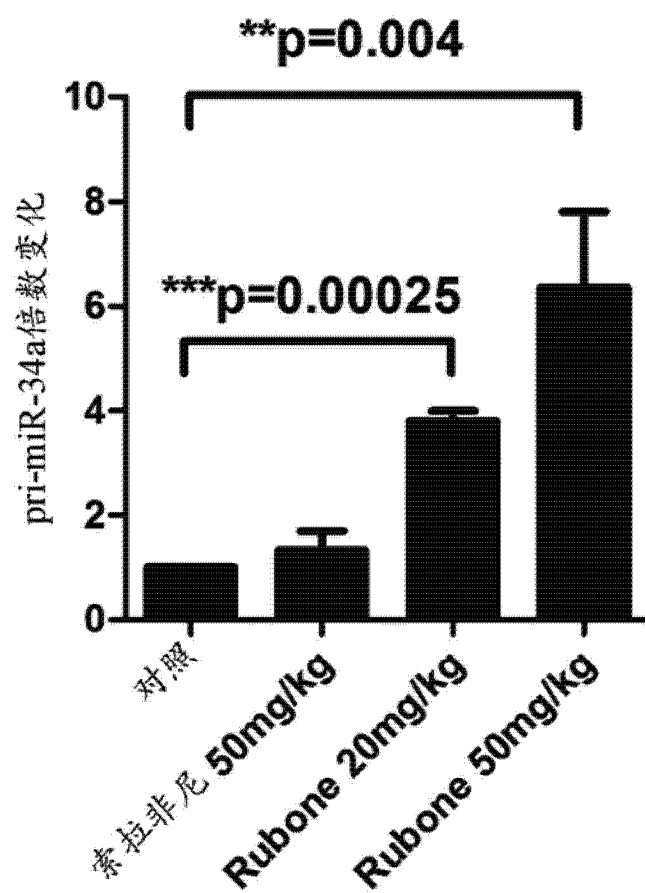


图 8

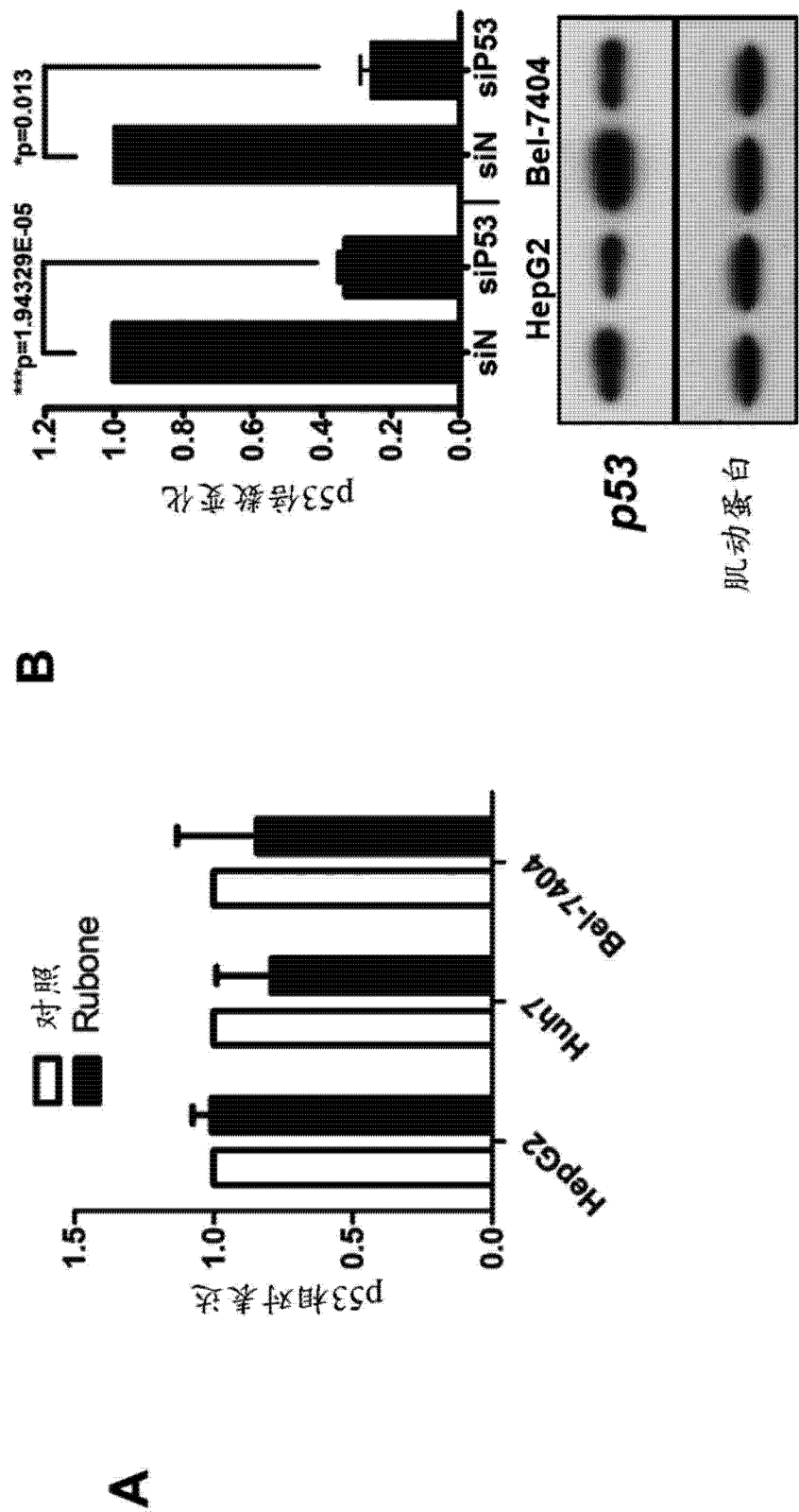


图 9

C

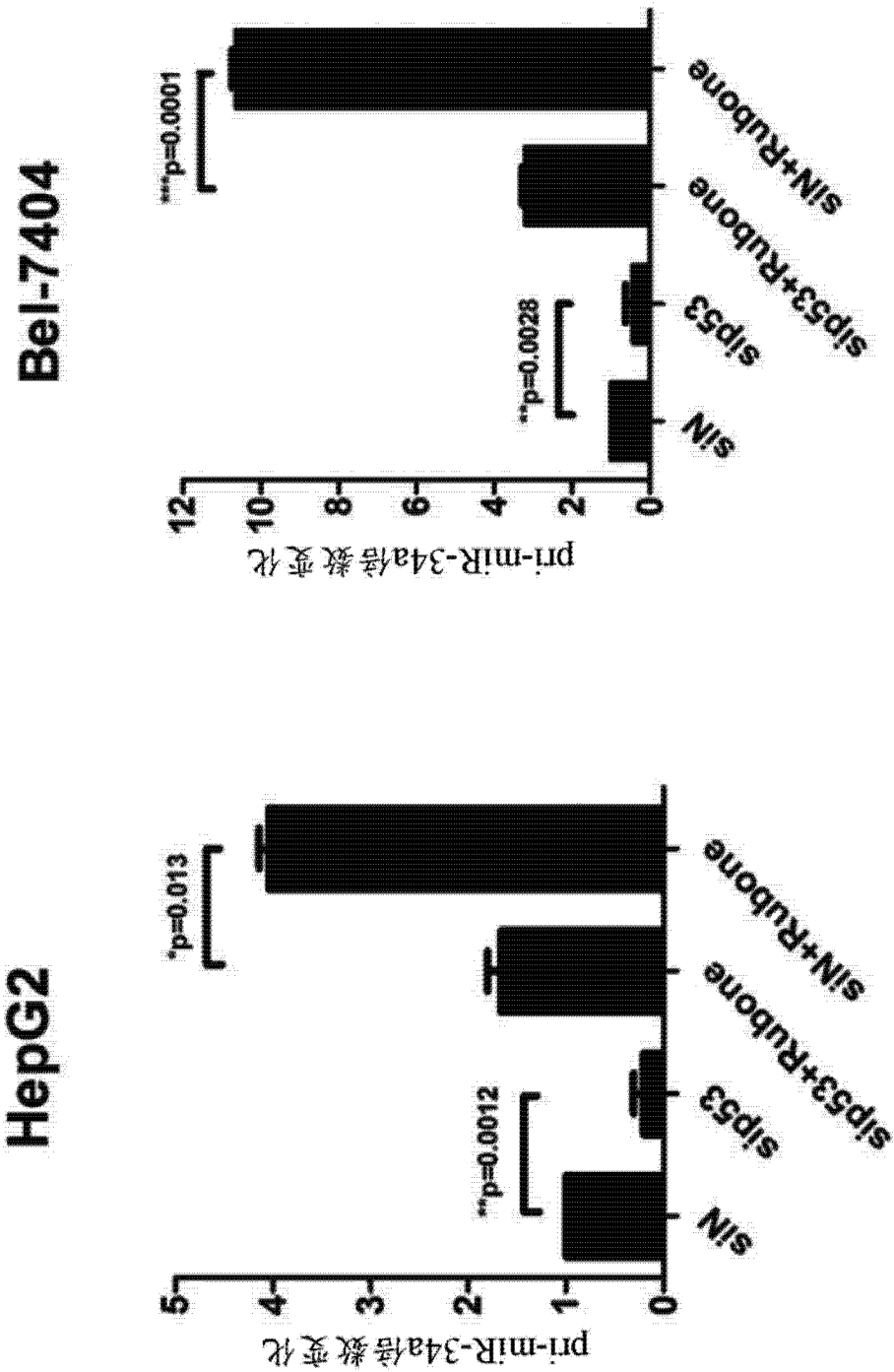


图9(续)

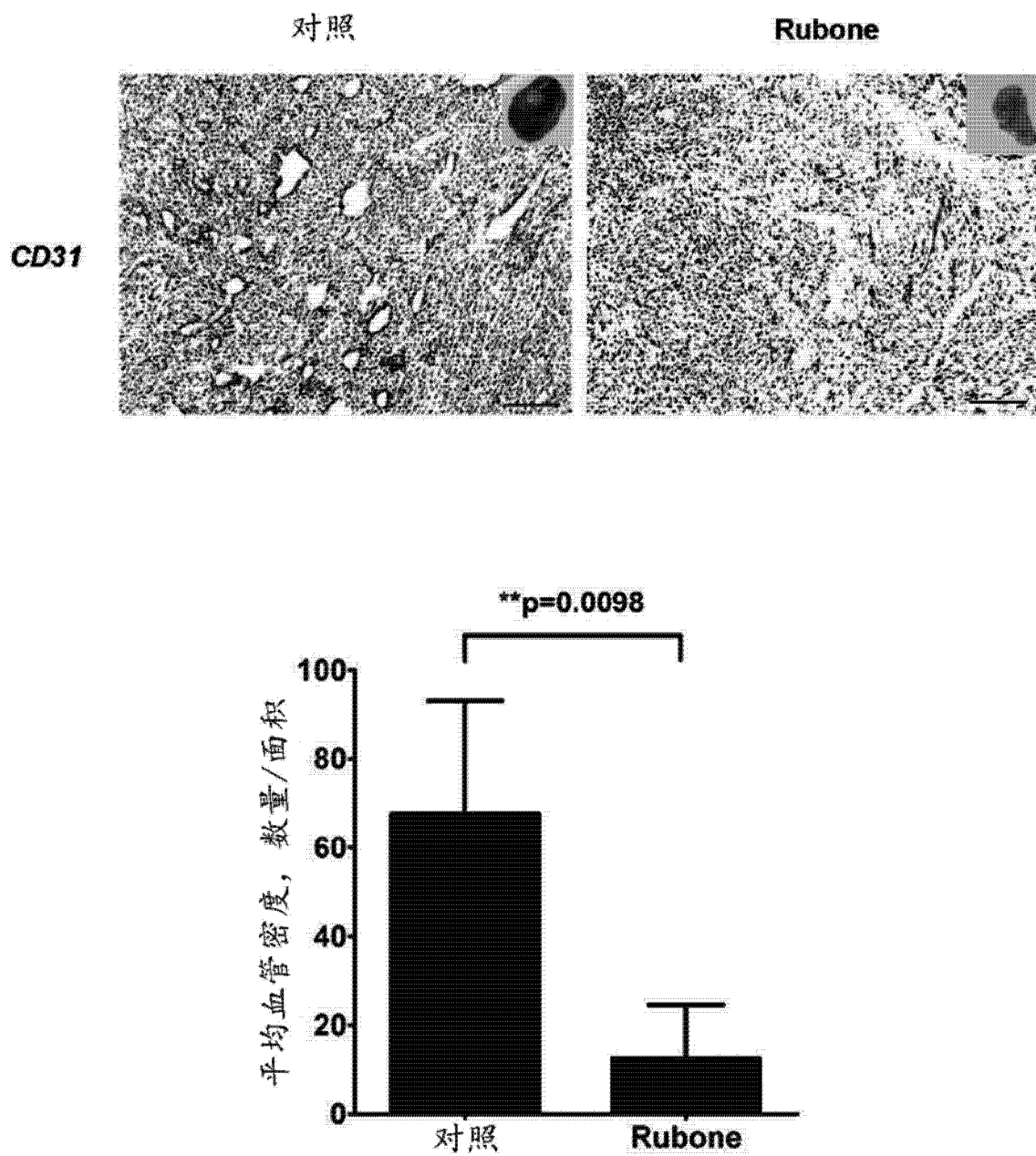
A

图 10

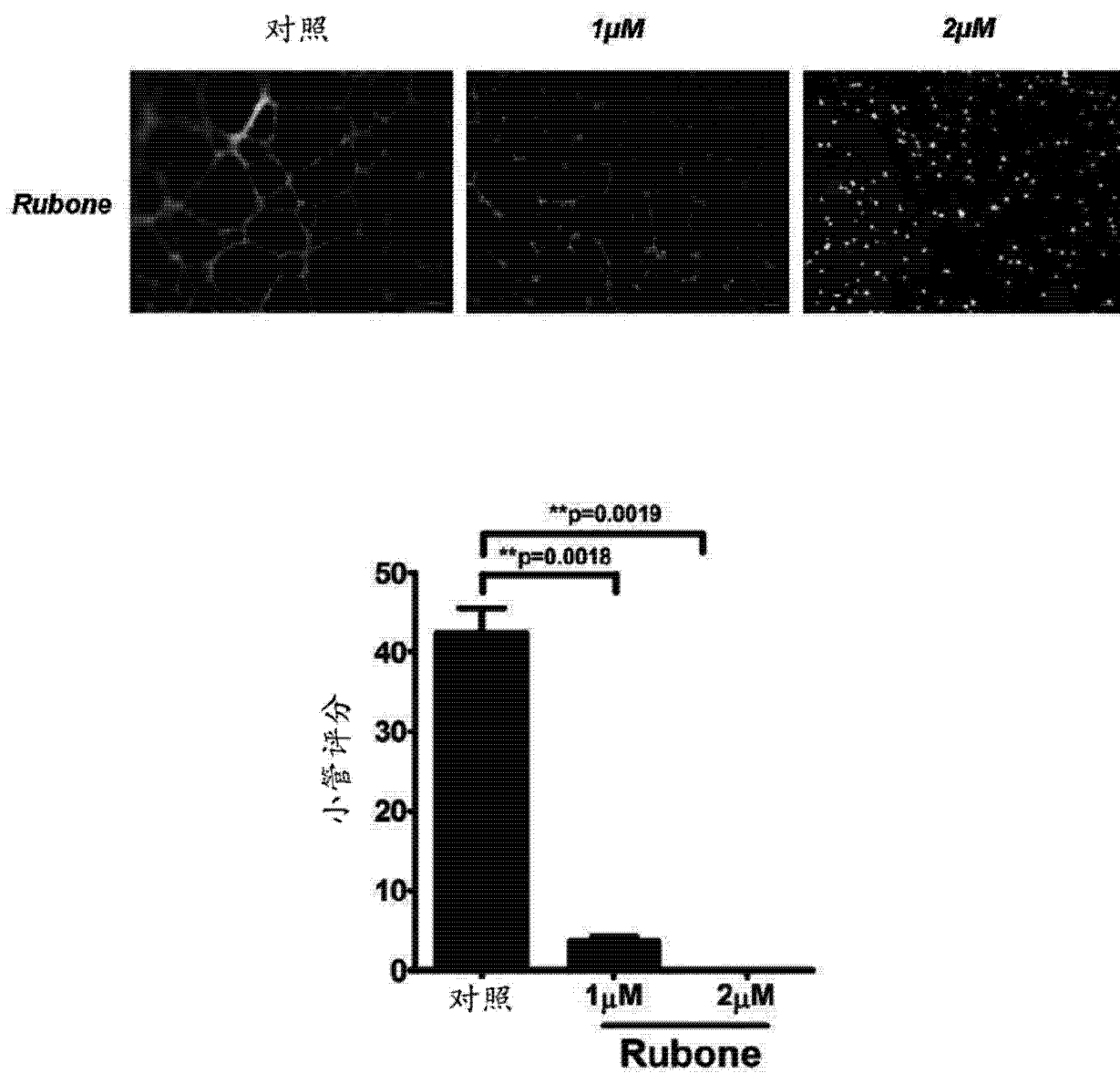


图 10(续)

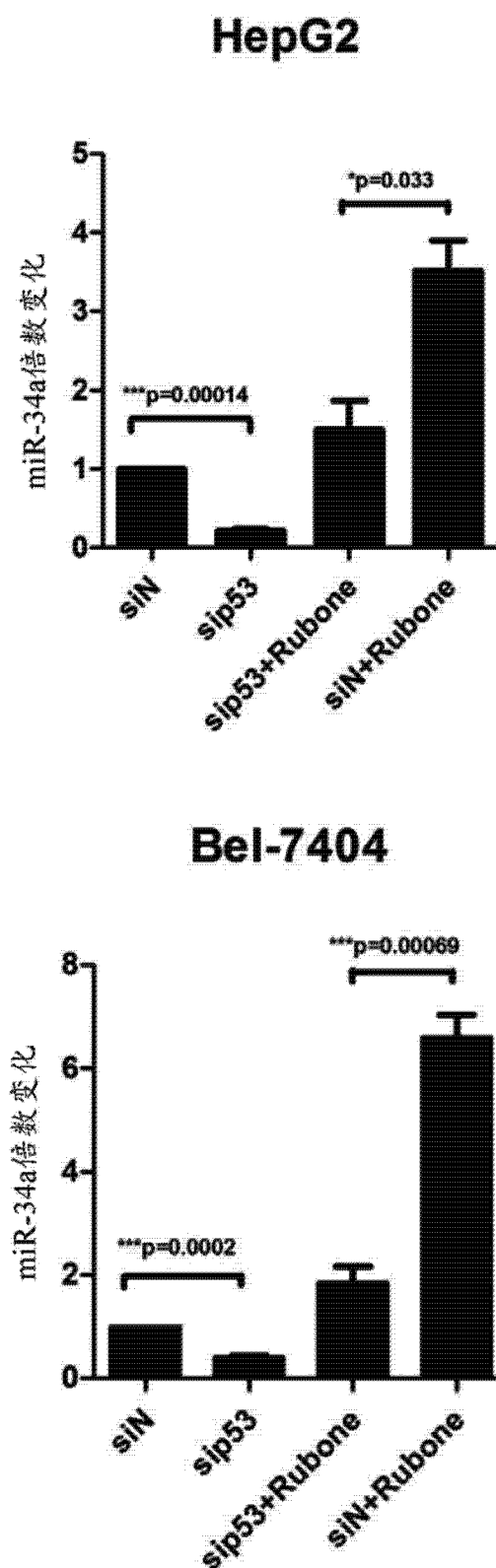
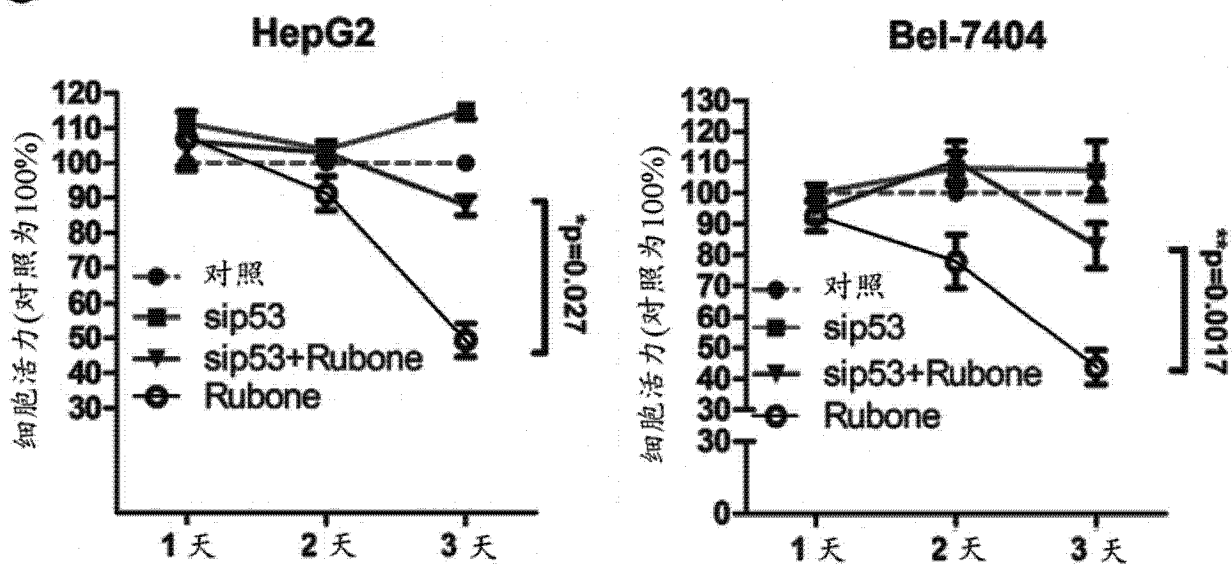
B

图 11(续)

C



D

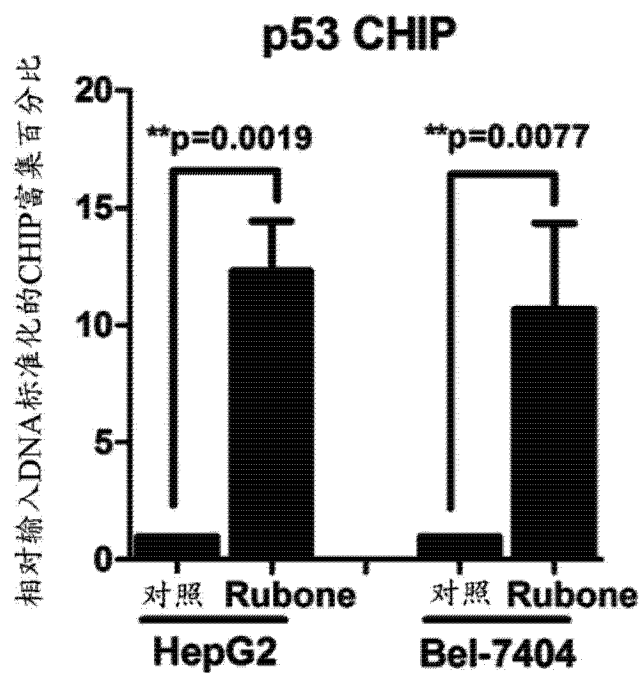


图 11(续)