



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110139936 A

(43)申请公布日 2019.08.16

(21)申请号 201780064236.3

(22)申请日 2017.08.18

(30)优先权数据

2016903272 2016.08.18 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2017/050887 2017.08.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/032062 EN 2018.02.22

(71)申请人 N·特兰

地址 澳大利亚,新南威尔士州

申请人 S·库利

(72)发明人 N·特兰 S·库利

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6886(2018.01)

权利要求书2页 说明书25页  
序列表7页 附图12页

(54)发明名称

口腔癌、咽癌和喉癌的生物标记

(57)摘要

本文提供了用于检测口腔或咽喉的头颈癌、任选地口腔鳞状细胞癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中两种或更多种miRNA的表达的步骤,其中该两种或更多种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中所述两种或更多种miRNA的表达水平,生物样品中所述两种或更多种miRNA的表达水平是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示。

1. 一种用于检测受试者中口腔或咽喉的头颈癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中两种或更多种miRNA的表达的步骤,其中该两种或更多种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中所述两种或更多种miRNA的表达水平,该生物样品中所述两种或更多种miRNA的表达水平是该受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中该口腔或咽喉的头颈癌是口腔癌、口咽癌、咽癌或喉癌。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中该癌症是鳞状细胞癌。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述从受试者获得的生物样品是血液样品。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中该血液样品是全血或血清样品。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,该方法包括确定所述miRNA的三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、或六种或更多种的表达。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中该方法包括确定hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中该方法包括确定hsa-miR-16、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达。

9. 一种用于检测受试者中口腔或咽喉的头颈癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中miRNA hsa-miR-16、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达的步骤,其中相比于一种或多种无癌症参比样品中所述miRNA的表达水平,该生物样品中所述miRNA的表达水平增加是该受试者中存在口腔癌的指示。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中该癌症是口腔鳞状细胞癌。

11. 一种用于预测患有口腔或咽喉的头颈癌的受试者的存活概率的方法,该方法包括执行确定从患有口腔癌的受试者获得的生物样品中miRNA hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达的步骤,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中所述miRNA的表达水平,该生物样品中所述miRNA的表达水平的增加是个体超过约四年的降低的生存可能性的指示。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中该癌症是口腔鳞状细胞癌。

13. 一种用于筛选口腔和咽喉的头颈癌的试剂盒,其中该试剂盒包含用于确定如权利要求1至12中任一项所定义的一种或多种miRNA的表达的一种或多种试剂。

14. 一种计算机系统或装置,其被配置成用于帮助检测或诊断口腔或咽喉的头颈癌,其中采用计算机软件来分析从受试者获得的生物样品中涉及如权利要求1至12中任一项所定义的一种或多种miRNA的表达的数据,并且来提供关于该受试者的诊断预测。

15. 一种根据权利要求14所述的计算机系统或装置,其中还采用该计算机软件将所述数据与涉及一种或多种无癌症参比样品中一种或多种miRNA的表达的数据进行比较。

16. 一种选择用于治疗口腔或咽喉的头颈癌的受试者的方法,该方法包括:

(a) 执行确定从受试者获得的生物样品中如权利要求1至12中任一项所定义的一种或多种miRNA的表达水平的步骤,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中该至少一种miRNA

的表达水平,该生物样品中该至少一种miRNA的该表达水平是该受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示;以及

(b) 选择受试者用于治疗所述癌症,该受试者在(a)中鉴定为患有口腔或咽喉的头颈癌。

17. 一种用于监测口腔或咽喉的头颈癌的治疗性治疗的功效的方案,该方案包括:

(a) 从受试者获得第一生物样品,其中该第一生物样品是在开始治疗之前或之后获得的;

(b) 从相同受试者获得第二生物样品,其中该第二生物样品是在开始治疗之后以及获得该第一生物样品之后的时间点获得的;

(c) 执行测量该第一和第二生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中该至少一种miRNA是如权利要求1至12中任一项所定义的;以及

(d) 将该第一生物样品中该至少一种miRNA的表达与该第二生物样品中相同至少一种miRNA的表达进行比较;

其中在该第一与第二生物样品之间的该至少一种miRNA的表达的改变是该治疗性治疗是否有效的指示。

18. 一种根据权利要求17所述的方案,该方案进一步包括获得和执行关于第三或随后的样品的步骤。

19. 一种根据权利要求17或18所述的方案,将该方案用于筛选用于治疗癌症的候选试剂。

## 口腔癌、咽癌和喉癌的生物标记

### 技术领域

[0001] 本披露总体上涉及用于口腔或咽喉的头颈癌,特别是口腔癌、咽癌和喉癌,并且更特别地口腔鳞状细胞癌、口咽鳞状细胞癌、咽鳞状细胞癌和喉鳞状细胞癌的诊断和预后的方法和方案。

### 背景技术

[0002] 尽管我们对多种形式癌症的理解和治疗性治疗取得了进展,但癌症仍然是全世界死亡的主要原因之一,并且许多癌症的患病率呈上升趋势。口腔癌、咽癌和喉癌影响对如言语和吞咽等基本功能至关重要的器官,并通常对生活质量有很大影响。他们通常具有不良预后并且与显著的发病率相关,大约43%的患者在诊断后存活不超过5年。

[0003] 口腔癌的比率逐年增加。仅在美国,每年大约有42,000人被诊断患有口腔癌,并且这是印度最常见的癌症,每年诊断出超过50,000例。令人忧虑的,诊断的年龄也在降低。虽然口腔癌在男性中仍然最为普遍(主要是由于吸烟和饮酒的比例更高),但年龄40-49岁的女性是快速增长的诊断患者群体。同样重要的公共卫生问题是口咽、扁桃体、和舌根部的人乳头瘤病毒16 (HPV16)感染的增加。在美国,HPV16是口咽鳞状细胞癌的主要原因,并且与HPV16相关的口咽癌的比例在全世界范围内增长。

[0004] 口腔癌、咽癌和喉癌通常产生很少的症状直至非常晚期。结果是,相当一部分患者首先出现晚期(3期或4期)疾病,并且这是高发病率的主要原因。通过早期有效的诊断可以显著改善预后。例如,通过早期检测,口腔癌患者的存活率可以显著提高至80%-90%。早期诊断允许用最有效的治疗性治疗和/或患者管理进行早期干预。然而,目前口腔癌、咽癌和喉癌的诊断通常需要侵入性和疼痛性的肿瘤活检,如细针抽吸。没有临床可用的生物标记使得能够早期检测这些癌症。

### 发明内容

[0005] 在一方面,本披露提供了用于检测受试者中口腔或咽喉的头颈癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中该至少一种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4327、hsa-miR-939、hsa-miR-663、hcmv-miR-UL70-3p、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-3648、hsa-miR-720、hsa-miR-92b、hsa-miR-1237、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-4270、hsa-miR-1202、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-149、hsa-let-7f-1、hsa-miR-23c和hsa-miR-1539,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示。

[0006] 口腔或咽喉的头颈癌典型地是口腔癌、口咽癌、咽癌或喉癌。更典型地,癌症是鳞状细胞癌。

[0007] 在具体的实施例中,从受试者获得的生物样品是血液样品,更典型地是血清样品。

典型地,一个或多个参比样品是血液样品,更典型地是血清样品。一个或多个参比样品可以来源于已知不患有口腔或咽喉的头颈癌的一个或多个个体。

[0008] 在一个实施例中,相对于一个或多个参比样品,从受试者获得的生物样品中选自 hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4327、hsa-miR-939、hsa-miR-663、hcmv-miR-UL70-3p、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-3648和hsa-miR-720的一种或多种miRNA的表达的增加是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示。在具体的实施例中,miRNA是选自 hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、或五种或更多种。

[0009] 在另一个实施例中,相对于一个或多个参比样品,从受试者获得的生物样品中选自 hsa-miR-92b、hsa-miR-1237、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-4270、hsa-miR-1202、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-149、hsa-let-7f-1、hsa-miR-23c和hsa-miR-1539的一种或多种miRNA的表达的减少是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示。

[0010] 在另一方面,本披露提供了用于检测受试者中口腔癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中该至少一种miRNA选自下组,该组由以下组成: hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-let-7b、hsa-miR-15b、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-3648、hsa-miR-320c、hsa-miR-365、hsa-miR-1238、hsa-miR-191、hsa-miR-1281、hsa-let-7f-1、hsa-miR-149、hsa-miR-23c、hsa-miR-1539、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-3676和hsa-miR-92b,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是受试者中存在口腔癌的指示。

[0011] 典型地,口腔癌是鳞状细胞癌。

[0012] 在具体的实施例中,从受试者获得的生物样品是血液样品,更典型地是血清样品。典型地,一个或多个参比样品是血液样品,更典型地是血清样品。一个或多个参比样品可以来源于已知不患有口腔癌的一个或多个个体。

[0013] 在一个实施例中,相对于一个或多个参比样品,从受试者获得的生物样品中选自 let-7a、miR-16、miR-21、miR-451、miR-486-5p、miR-92a-3p、hsa-let-7b、hsa-miR-15b、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-3648、hsa-miR-320c、和hsa-miR-365的一种或多种miRNA的表达的增加是受试者中存在口腔癌的指示。在具体的实施例中,miRNA是选自 hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、或五种或更多种。

[0014] 在另一个实施例中,相对于一个或多个参比样品,从受试者获得的生物样品中选自 hsa-miR-1238、hsa-miR-191、hsa-miR-1281、hsa-let-7f-1、hsa-miR-149、hsa-miR-23c、hsa-miR-1539、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-3676和hsa-miR-92b的一种或多种miRNA的表达的减少是受试者中存在口腔癌的指示。

[0015] 在一个实施例中,该方法包括确定生物样品中 hsa-let-7a、hsa-miR-15b、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-451、hsa-miR-16、hsa-miR-365和hsa-miR-21的两种或更多种的表达,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中所述miRNA表达,它们的表达的增加是受试者中口腔癌的指示。

[0016] 在另一方面,本披露提供了用于检测受试者中口咽癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中该至少一种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4327、hsa-miR-939、hsa-miR-720、hcmv-miR-UL70-3p、hsa-miR-663、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-3648、hsa-miR-1237、hsa-miR-92b、hsa-miR-23c、hsa-miR-149、hsa-miR-4310、hsa-let-7f-1、hsa-miR-1539、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-3676和hsa-miR-766,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是受试者中存在口咽癌的指示。

[0017] 典型地,该口咽癌是鳞状细胞癌。

[0018] 在具体的实施例中,从受试者获得的生物样品是血液样品,更典型地是血清样品。典型地,一个或多个参比样品是血液样品,更典型地是血清样品。一个或多个参比样品可以来源于已知不患有口咽癌的一个或多个个体。

[0019] 在一个实施例中,相对于一个或多个参比样品,从受试者获得的生物样品中选自hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4327、hsa-miR-939、hsa-miR-720、hcmv-miR-UL70-3p、hsa-miR-663、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268和hsa-miR-3648的一种或多种miRNA的表的增加是受试者中存在口咽癌的指示。在具体的实施例中,miRNA是选自hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、或五种或更多种。

[0020] 在另一个实施例中,相对于一个或多个参比样品,从受试者获得的生物样品中选自hsa-miR-1237、hsa-miR-92b、hsa-miR-23c、hsa-miR-149、hsa-miR-4310、hsa-let-7f-1、hsa-miR-1539、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-3676和hsa-miR-766的一种或多种miRNA的表的减少是受试者中存在口咽癌的指示。

[0021] 在另一方面,本披露提供了用于检测受试者中咽癌或喉癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表的步骤,其中至少一种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-2861、hsa-miR-1915、hsa-miR-766、hsa-miR-933、kshv-miR-K12-3、hsa-miR-33b、hsa-miR-720、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-4270、hsa-miR-1202、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-1249、hsv2-miR-H6、hsa-miR-4298、hsa-miR-1237和hsa-miR-92b,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是存在咽癌或喉癌的指示。

[0022] 典型地,咽癌或喉癌是鳞状细胞癌。

[0023] 在具体的实施例中,从受试者获得的生物样品是血液样品,更典型地是血清样品。典型地,一个或多个参比样品是血液样品,更典型地是血清样品。一个或多个参比样品可以来源于已知不患有咽癌或喉癌的一个或多个个体。

[0024] 在一个实施例中,相对于一个或多个参比样品,从受试者获得的生物样品中选自hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-2861、hsa-miR-1915、hsa-miR-766、hsa-miR-933、kshv-miR-K12-3、hsa-miR-33b和hsa-miR-720的一种或多种miRNA的表的增加是受试者中存在咽癌或喉癌的指示。在具

体的实施例中,miRNA是选自hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、或五种或更多种。

[0025] 在另一个实施例中,相对于一个或多个参比样品,从受试者获得的生物样品中选自hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-4270、hsa-miR-1202、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-1249、hsv2-miR-H6、hsa-miR-4298、hsa-miR-1237和hsa-miR-92b的一种或多种miRNA的表达的减少是受试者中存在咽癌或喉癌的指示。

[0026] 在另一方面,本披露提供了用于检测受试者中口腔或咽喉的头颈癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中该至少一种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4327、hsa-miR-939、hsa-miR-663、hcmv-miR-UL70-3p、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-3648、hsa-miR-720、hsa-let-7b、hsa-miR-15b、hsa-miR-320c、hsa-miR-365、hsa-miR-2861、hsa-miR-1915、hsa-miR-766、hsa-miR-933、kshv-miR-K12-3和hsa-miR-33b,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平的增加是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示。

[0027] 口腔或咽喉的头颈癌典型地是口腔癌、口咽癌、咽癌或喉癌。更典型地,癌症是鳞状细胞癌。

[0028] hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-3648和/或hsa-miR-451的表达的增加可以是口腔癌或口咽癌的指示。hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-let-7b、hsa-miR-15b、hsa-miR-320c、和/或hsa-miR-365的表达的增加可以是口腔癌的指示。hsa-miR-4327、hsa-miR-939、hcmv-miR-UL70-3p和/或hsa-miR-663的表达的增加可以是口咽癌的指示。hsa-miR-2861、hsa-miR-1915、hsa-miR-766、hsa-miR-933、kshv-miR-K12-3、hsa-miR-33b和/或hsa-miR-720的表达的增加可以是咽癌或喉癌的指示。

[0029] 在另一方面,本披露提供了用于检测受试者中口腔或咽喉的头颈癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中该至少一种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-miR-92b、hsa-miR-1237、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-4270、hsa-miR-1202、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-149、hsa-let-7f-1、hsa-miR-23c、hsa-miR-1238、hsa-miR-191、hsa-miR-1281、hsa-miR-4310、hsa-miR-766、hsa-miR-1249、hsv2-miR-H6、hsa-miR-4298和hsa-miR-1539,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平的减少是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示。

[0030] 口腔或咽喉的头颈癌典型地是口腔癌、口咽癌、咽癌或喉癌。更典型地,癌症是鳞状细胞癌。

[0031] hsa-miR-92b的表达的减少可以是口腔癌、口咽癌、咽癌或喉癌的指示。hsa-miR-149、hsa-let-7f-1、hsa-miR-23c、hsa-miR-3676和/或hsa-miR-1539的表达的减少可以是口腔癌或口咽癌的指示。hsa-miR-1237的表达的减少可以是口咽癌、咽癌或喉癌的指示。hsa-miR-1238、hsa-miR-191和/或hsa-miR-1281的表达的减少可以是口腔癌的指示。hsa-

miR-4310和/或hsa-miR-766的表达的减少可以是口咽癌的指示。hsa-miR-4270、hsa-miR-1202、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-1249、hsv2-miR-H6、hsa-miR-4298和/或hsa-miR-1225-5p的表达的减少可以是咽癌或喉癌的指示。

[0032] 在另一方面,本披露提供了用于检测受试者中口腔癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中两种或更多种miRNA的表达的步骤,其中该两种或更多种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-15b和hsa-miR-365,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中两种或更多种miRNA的表达水平,生物样品中两种或更多种miRNA的表达水平的增加是受试者中存在口腔癌的指示。

[0033] 在具体的实施例中,该方法包括确定所述miRNA的三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、或六种或更多种的表达。在一个示例性实施例中,该方法包括确定hsa-let-7a、hsa-miR-15b、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-451、hsa-miR-16和hsa-miR-365的表达。在另外的示例性实施例中,该方法包括确定hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达。在另外的示例性实施例中,该方法包括确定hsa-miR-16、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达。

[0034] 在另一方面,本披露提供了用于检测受试者中口腔癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中miRNA hsa-miR-16、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达的步骤,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中所述miRNA的表达水平,生物样品中所述miRNA的表达水平的增加是受试者中存在口腔癌的指示。

[0035] 在实施例中,口腔癌是口腔鳞状细胞癌。

[0036] 在另一方面,本披露提供了用于预测患有口腔癌的受试者存活概率的方法,该方法包括执行确定从患有口腔癌的受试者获得的生物样品中miRNA hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达的步骤,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中所述miRNA的表达水平,生物样品中所述miRNA的表达水平的增加是个体超过约四年的减少的生存的可能性的指示。

[0037] 在实施例中,口腔癌是口腔鳞状细胞癌。

[0038] 根据以上描述的方面和实施例,可以对所选择的miRNA的表达数据或谱进行一种或多种统计学分析以确定miRNA特征谱,从而促进诊断或预后方法。统计分析可以包括例如逻辑回归;具有k折验证的逻辑回归、机器学习、或具有k折验证的机器学习。统计分析可以包括确定所选择的miRNA的 $\Delta Ct$ 或 $Cq$ 值中的一个或多个。

[0039] 仅通过举例,在miRNA包括hsa-miR-16、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p或由其组成的情况下,被诊断患有口腔癌、任选地口腔鳞状细胞癌的概率可以根据以下式确定:

[0040]  $\text{Logit}[p=0C]$ ,其中 $\text{Log } p/1-p = (-) 59.5 + 0.73 \times Cq[\text{hsa-miR-16}] + (-) 2.23 \times Cq[\text{hsa-miR-92a-3p}] + 3.27 \times Cq[\text{hsa-miR-486-5p}]$

[0041] 仅通过举例,在miRNA包括hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p或由其组成的情况下,可以根据以下式确定受试者的减少的生存的可能性:

[0042]  $\text{let-7a} \times (-0.4729) + Cq[\text{hsa-miR-451}] \times 0.5305 + Cq[\text{hsa-miR-16}] \times 0.2646 + Cq[\text{hsa-miR-21}] \times (-0.2593) + Cq[\text{hsa-miR-92a-3p}] \times (-0.6423) + Cq[\text{hsa-miR-486-5p}] \times$

0.4272

[0043] 本文还提供的是用于筛选口腔和咽喉的头颈癌的试剂盒,其中该试剂盒包含用于确定如以上方面和实施例所定义的一种或多种miRNA的表达的一种或多种试剂。

[0044] 本文还提供的是计算机系统或装置,其被配置成用于帮助检测或诊断口腔或咽喉的头颈癌,其中采用计算机软件来分析从受试者获得的生物样品中涉及如以上方面和实施例所定义的一种或多种miRNA的表达的数据,并被配置成用于提供关于受试者的诊断预测。典型地,还采用该计算机软件将所述数据与涉及一种或多种无癌症参比样品中一种或多种miRNA的表达的数据进行比较。

[0045] 本文还提供的是选择用于治疗口腔或咽喉的头颈癌的受试者的方法,该方法包括:

[0046] (a) 执行确定从受试者获得的生物样品中如以上方面和实施例所定义的一种或多种miRNA的表达水平的步骤,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示;以及

[0047] (b) 选择受试者用于治疗所述癌症,该受试者在(a)中鉴定为患有口腔或咽喉的头颈癌。

[0048] 本文还提供的是用于监测口腔或咽喉的头颈癌的治疗性治疗的功效的方案,该方案包括:

[0049] (a) 从受试者获得第一生物样品,其中该第一生物样品是在开始治疗之前或之后获得的;

[0050] (b) 从相同受试者获得第二生物样品,其中该第二生物样品是在开始治疗之后以及获得该第一生物样品之后的时间点获得的;

[0051] (c) 执行测量第一和第二生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中至少一种miRNA是如以上方面和实施例所定义的;以及

[0052] (d) 将该第一生物样品中该至少一种miRNA的表达与该第二生物样品中相同至少一种miRNA的表达进行比较;

[0053] 其中在该第一与第二生物样品之间的该至少一种miRNA的表达的改变是该治疗性治疗是否有效的指示;

[0054] 该方案可以进一步包括获得和执行关于第三或随后的样品的步骤。

[0055] 以上描述的方案可以用于筛选用于治疗癌症的候选试剂。

## 附图说明

[0056] 参考以下附图,本文仅通过非限制性举例的方式描述了本披露的实施例。

[0057] 图1.如通过火山图分析(volcano plot analysis)鉴定,最大过表达和表达不足的miRNA在合并的头颈鳞状细胞癌样品中p值小于0.000001。

[0058] 图2.如通过火山图分析鉴定,最大过表达和表达不足的miRNA在合并的口腔鳞状细胞癌样品中p值小于0.000001。

[0059] 图3.在合并的口腔鳞状细胞癌样品中失调的miRNA的基因本体映射。将基因本体类型分为(A)生物过程和(B)分子功能。

[0060] 图4.来源于患有口腔鳞状细胞癌 (carcinoma、cancer) 的个体的合并的样品中、和来自无癌症个体 (健康) 的合并的样品中miRNA hsa-let-7a、hsa-miR-15b、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-365、hsa-miR-451和hsa-miR-486-5p的表达水平 (如通过qPCR所确定的)。

[0061] 图5.如通过火山图分析鉴定,最大过表达和表达不足的miRNA在合并的口咽鳞状细胞癌样品中p值小于0.000001。

[0062] 图6.在合并的口咽鳞状细胞癌样品中失调的miRNA的基因本体映射。将基因本体类型分为(A)生物过程和(B)分子功能。

[0063] 图7.如通过火山图分析鉴定,最大过表达和表达不足的miRNA在合并的咽/喉鳞状细胞癌样品中p值小于0.000001。

[0064] 图8.在合并的咽/喉鳞状细胞癌样品中失调的miRNA的基因本体映射。将基因本体类型分为(A)生物过程和(B)分子功能。

[0065] 图9.在来源于患有口腔鳞状细胞癌 (carcinoma、cancer) 的个体的溶血和非溶血合并的样品中、和来自无癌症个体 (健康) 的合并的样品中miRNA hsa-miR-365、hsa-let-7a、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-451、hsa-miR-15b和hsa-miR-16的表达水平 (如通过qPCR所确定的)。

[0066] 图10.来自患有头颈癌的患者和健康患者的血清中的miRNA let-7a、miR-16、miR-21、miR-451、miR-486-5p和miR-92a-3p的表达水平 (如通过RNAm测定所确定的)。A.各个miRNA单独的表达水平。B合并的miRNA的平均表达水平。黄色框表示癌症样品,并且灰色框表示健康样品。

[0067] 图11.口腔鳞状细胞癌样品和健康对照的6个个体生物标记Cq值的箱线图分类。每个图的粗体中间线表示数据集的中值。下面的线表示第25百分位,即Ct 92群的25%具有约Ct 25或更低的值。顶部的线是第75百分位的截止值。总之,这两个须状物表示100%的实际数据,而不在内的点则被认为是异常值。

[0068] 图12.miRNA诊断分类器 $Tri_{miR}$ 建立是通过逻辑回归模型建模,其中AUC 0.9 [0.734-0.978]、灵敏度为91.3、并且特异性为85.7。由 $Tri_{miR}$ 诊断为任何阶段的口腔鳞状细胞癌的预测的概率通过如下计算: $Logit [p=0C]$ ,其中 $Log p/1-p = (-) 59.5 + 0.73 \times hsa-miR-16 + (-) 2.23 \times hsa-miR-92a-3p + 3.27 \times hsa-miR-486-5p$ 。在此等式中,miRNA符号被Cq值取代。

[0069] 图13.多基因 $6_{miR}$ 特征与诊断时的低存活概率相关。个性化线性评分对具有存活风险的口腔鳞状细胞癌的个体进行排名。使用8个预测变量 (6种miRNA的年龄、性别和丰度),该指数为: $let-7a \times (-0.4729) + hsa-miR-451 \times 0.5305 + hsa-miR-16 \times 0.2646 + hsa-miR-21 \times (-0.2593) + hsa-miR-92a-3p \times (-0.6423) + hsa-miR-486-5p \times 0.4272$ 。风险评分超过4.8表明初次诊断时死亡的几率更高。

[0070] 图14.来自患有头颈癌的患者患者的血清中miRNA let-7a、miR-16、miR-21、miR-451、miR-486-5p和miR-92a-3p的表达水平 (如通过RNAm测定所确定的),其中血清含有不同水平的溶血,如不同量的游离血红蛋白为表示。

## 具体实施方式

[0071] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语均具有与本披露所属领域的技术人员通常所理解的相同的含义。除非另外指出,否则整个披露中自始至终参考的所有专利、专利申请、公开的申请和出版物、数据库、网站和其他公开的材料均通过引用以其全文而并入。在术语存在多个定义的情况下,在这个部分中的那些定义优先。应当理解,在提及URL或其他此类标识符或地址的情况下,此类标识符会变化,并且因特网上的具体信息也会改变,但是等效信息可以通过搜索因特网来找到。引用标识符证明这些信息的可用性和公开传播。

[0072] 如本文所用,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”还包括复数方面(即,至少一个或多于一个),除非上下文另有明确规定。因此,例如,提及“miRNA”包括单个miRNA,以及两个或更多个miRNA。

[0073] 在本说明书的背景下,术语“约”应理解为是指数字范围,本领域的技术人员认为该数字范围相当于在实现相同功能或结果的情况下引用的值。

[0074] 贯穿本说明书及其后的权利要求书,除非上下文另有要求,否则词语“包含(包括)(comprise)”以及变型如“包含(包括)(comprises)”或“包含(包括)(comprising)”应当被理解为是指包含一个提及的整体或步骤或者多个整体或步骤的组,但不排除任何其他整体或步骤或者多个整体或步骤的组。

[0075] 如本文所用,“微小RNA”或“miRNA”是指非编码RNA,通常长度为约18与25个核苷酸之间,其与编码RNA杂交并调节其表达。在某些实施例中,miRNA是切割前体(pre-miRNA)的产物,例如通过酶Dicer切割。如本文所用,“pre-miRNA”是指具有发夹结构的非编码RNA,其含有miRNA。典型地,术语“pre-miRNA”是指前体分子,将其加工和切割产生成熟的miRNA。在某些实施例中,pre-miRNA是通过双链RNA特异性核糖核酸酶切割pri-miR的产物。

[0076] 如本文所用,术语“受试者”是指哺乳动物,并且包括人、灵长类、家畜(例如绵羊、猪、牛、马、驴)、实验室试验动物(例如小鼠、兔、大鼠、豚鼠)、伴侣动物(例如狗、猫)和圈养的野生动物(例如狐狸、袋鼠、鹿)。典型地,哺乳动物是人或实验室试验动物。甚至更典型地,哺乳动物是人。

[0077] 近年来,人们对非编码RNA(ncRNA)有很大兴趣,其最好的理解是微小RNA(miRNA)。miRNA是一类短的、内源的、单链的、非编码的RNA分子,其与靶mRNA的3'非翻译区(3'-UTR)以不完全互补性结合。miRNA最初被转录为长的初级转录物(pri-miRNA或pri-miR)。这些通常由Drosha-DGCR8复合物在细胞核中加工,产生称为前体miRNA(pre-miRNA)的60-70个核苷酸(nt)茎环结构。然后将pre-miRNA输出到细胞质中并在与RNA诱导的沉默复合物(RISC)结合并成熟为单链miRNA之前进一步加工成中间体miRNA双链体。成熟miRNA与靶mRNA的3'非翻译区(UTR)中不完全互补的位点相互作用。这些靶转录物随后进行加速周转和翻译下调。

[0078] 虽然miRNA表示小于0.1%的整个哺乳动物转录组,它们最多可以控制在高达哺乳动物细胞中的基因表达的三分之二。现在有压倒性的证据表明许多miRNA在常见癌症中是失调的,如起源于乳腺癌、肺癌、结肠癌、肝癌、和前列腺癌中的起源。它们被认为是肿瘤发生过程中的关键调节子,并且许多研究表明使用特定的miRNA作为癌症的潜在生物标记。

[0079] 已经在大部分人体液中检测到循环miRNA,这些体液包括血浆、血清、唾液、汗液、

泪液、母乳和尿。因此,使用本领域技术人员熟知的标准技术和方法,可以使用非侵入性技术容易地确定miRNA水平。循环miRNA也非常稳定并且具有RNA酶抗性。这些特征使循环miRNA成为疾病的生物标记的优秀候选物。

[0080] 本披露基于诸位发明人的令人惊讶的发现,即特定miRNA和miRNA组在口腔癌、口腔咽癌、咽癌和喉癌中特异性过表达(上调)或表达不足(下调)。这些癌症在本文中统称为口腔或咽喉的头颈癌。可以在全血或血清中快速检测miRNA。

[0081] 因此,本披露首次提供了一套适用于快速和早期检测和诊断一系列头颈癌的生物标记,从而使得能够在疾病进展到后期不太适合治疗之前实施适当的治疗和患者管理策略。

[0082] 因此,本披露还提供了通过使用本文披露的生物标记的生物标记和套件进行早期检测和诊断,以及因此早期干预来改善口腔和咽喉的头颈癌患者的预后的手段。

[0083] 广义上讲,本文披露的是用于检测受试者中口腔或咽喉的头颈癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中该至少一种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4327、hsa-miR-939、hsa-miR-663、hcmv-miR-UL70-3p、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-3648、hsa-miR-720、hsa-miR-92b、hsa-miR-1237、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-4270、hsa-miR-1202、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-149、hsa-let-7f-1、hsa-miR-23c和hsa-miR-1539,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示。

[0084] 还在广义上讲,本文披露的是用于检测受试者中口腔癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中该至少一种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-let-7b、hsa-miR-15b、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-3648、hsa-miR-320c、hsa-miR-365、hsa-miR-1238、hsa-miR-191、hsa-miR-1281、hsa-let-7f-1、hsa-miR-149、hsa-miR-23c、hsa-miR-1539、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-3676和hsa-miR-92b,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是受试者中存在口腔癌的指示。

[0085] 还在广义上讲,本文披露的是用于检测受试者中口腔咽癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中该至少一种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-4327、hsa-miR-939、hsa-miR-720、hcmv-miR-UL70-3p、hsa-miR-663、hsa-miR-3195、hsa-miR-1268、hsa-miR-3648、hsa-miR-451、hsa-miR-1237、hsa-miR-92b、hsa-miR-23c、hsa-miR-149、hsa-miR-4310、hsa-let-7f-1、hsa-miR-1539、hsa-miR-1225-3p、hsa-miR-3676和hsa-miR-766,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是受试者中存在口腔癌的指示。

[0086] 还在广义上讲,本文披露的是用于检测受试者中咽癌或喉癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中至少一种miRNA选

自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-92a-3p、hsa-miR-2861、hsa-miR-1915、hsa-miR-766、hsa-miR-933、kshv-miR-K12-3、hsa-miR-33b、hsa-miR-720、hsa-miR-1225-5p、hsa-miR-4270、hsa-miR-1202、hsa-miR-1207-5p、hsa-miR-1249、hsv2-miR-H6、hsa-miR-4298、hsa-miR-1237和hsa-miR-92b,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是存在咽癌或喉癌的指示。

[0087] 在本文披露的一些实施例中,该方法包括测量选自本文披露的miRNA的组的至少两种miRNA(例如,2种、3种、4种、5种、6种、7种、或更多种)的表达。使用miRNA生物标记的组合可用于改善癌症检测和诊断的灵敏度和/或特异性。可以采用本文披露的任何miRNA的组合。例如,对于口腔癌的检测,该方法可以包括执行确定从受试者获得的生物样品中两种或更多种miRNA的表达的步骤,其中该两种或更多种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-15b、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-451、hsa-miR-16、hsa-miR-365和hsa-miR-21,并且其中相对于一种或多种无癌症参比样品中两种或更多种miRNA的表达水平,生物样品中两种或更多种miRNA的表达水平的增加是受试者中存在口腔癌的指示。在另一个实例中,对于检测受试者中口腔或咽喉的头颈癌,该方法可以包括执行确定从受试者获得的生物样品中两种或更多种miRNA的表达的步骤,其中该两种或更多种miRNA选自下组,该组由以下组成:hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-486-5p、hsa-miR-451和hsa-miR-92a-3p,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中两种或更多种miRNA的表达水平,生物样品中两种或更多种miRNA的表达水平的增加是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示。

[0088] 在具体的实施例中,本披露提供了用于检测受试者中口腔癌、任选地口腔鳞状细胞癌的方法,该方法包括执行确定从受试者获得的生物样品中miRNA hsa-miR-16、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达的步骤,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中所述miRNA的表达水平,生物样品中所述miRNA的表达水平的增加是受试者中存在口腔癌的指示。

[0089] 在另一个具体的实施例中,本披露提供了用于预测患有口腔癌的受试者存活概率的方法,该方法包括执行确定从患有口腔癌的受试者获得的生物样品中miRNA hsa-let-7a、hsa-miR-16、hsa-miR-21、hsa-miR-451、hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p的表达的步骤,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中所述miRNA的表达水平,生物样品中所述miRNA的表达水平的增加是个体超过约四年的减少的生存的可能性的指示。

[0090] 术语“表达”在本文中以其最广泛的内容使用,以表示可测量的生物标记miRNA的存在。如下文所述,考虑了多种确定或测量miRNA表达的方法。在一些实施例中,测量miRNA的表达包括确定miRNA的水平。如本文所用,术语“水平”和“量”可互换使用,是指定量、半定量、相对量、浓度等。因此,这些术语涵盖样品中miRNA的绝对或相对量或浓度,包括表示为平均水平和标准偏差的受试者群体中的水平。

[0091] 本披露的主题的成熟miRNA、和相应的pre-miRNA的序列通过miRBase数据库([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org))公开可获得。根据下面的表1和2,本说明书结尾出现的序列列表中也提供了本文披露的成熟miRNA的序列。

[0092] 表1

[0093]

miRNA	SEQ ID NO.
hsa-let-7a-5p	1
hsa-let-7b-5p	2
hsa-miR-15b-5p	3
hsa-miR-16-5p	4
hsa-miR-21-5p	5
hsa-miR-33b-5p	6
hcmv-miR-UL70-3p	7
hsa-miR-320c	8
hsa-miR-365-5p	9
hsa-miR-451a	10
hsa-miR-486-5p	11
hsa-miR-663a	12
hsa-miR-720	13
hsa-miR-766-5p	14
hsa-miR-933	15
hsa-miR-939-5p	16
hsa-miR-1268a	17
hsa-miR-1915-5p	18
hsa-miR-2861	19
hsa-miR-3195	20
hsa-miR-3648	21
hsa-miR-4327	22
kshv-miR-K12-3-5p	23

[0094] 表2

[0095]	miRNA	SEQ ID NO.
--------	-------	------------

miRNA	SEQ ID NO.
hsa-let-7f-1-5p	24
hsa-miR-23c	25
hsa-miR-92b-5p	26
hsa-miR-149-5p	27
hsa-miR-191-5p	28
hsa-miR-766-5p	29
hsa-miR-1202	30
hsa-miR-1207-5p	31
hsa-miR-1225-3p	32
hsa-miR-1225-5p	33
hsa-miR-1237-5p	34
hsa-miR-1238-5p	35
hsa-miR-1249-5p	36
hsa-miR-1281	37
hsa-miR-1539	38
hsa-miR-3676	39
hsa-miR-4270	40
hsa-miR-4298	41
hsa-miR-4310	42
hsv2-miR-H6-5p	43
hsa-miR-92a-3p	44

[0096] 根据本披露评估的miRNA可以从任何适合的生物样品中获得,并且确定哪种类型的样品最适合于确定一种或多种任何特定miRNA的表达水平以及最适合于检测特定的癌症完全在本领域技术人员的技能范围内。生物样品可以是其中可以检测或测量一种或多种生物标记miRNA的表达以鉴定受试者口腔或咽喉的头颈癌的存在(或不存在的)的任何样品。适合的生物样品可由本领域技术人员确定,其说明性实例包括血液、血清、血浆、唾液、尿、泪液、腹膜液、腹水、乳腺液、母乳、淋巴液、脑脊髓液、或粘膜分泌物。在具体的实施例中,本文披露的生物样品包括全血或血清。

[0098] 可以处理和分析(几乎在收集后立即(即,作为新鲜样品)、或者可以存储以供后续分析)生物样品用于根据本披露确定口腔或咽喉的头颈癌的存在。如果需要或要求存储生物样品,本领域技术人员将理解,应该理想地在保留样品中的目的生物标记的完整性的条件下存储(例如,在-80℃)。

[0099] 典型地,miRNA表达的检测和确定需要从样品中分离核酸。可以使用本领域已知的任何适合的技术分离核酸(包括RNA、并且特别是miRNA)。例如,基于酚的分离程序可以回收10-200个核苷酸范围内的RNA种类(例如,前体和成熟miRNA)。如使用Trizol™或Tri-Reagent™的提取程序可用于纯化所有RNA(大的和小的),并且是从含有miRNA的生物样品中分离总RNA的有效方法。任何数量的适合的RNA提取技术和可商购的RNA提取试剂盒(例如Qiagen RNeasy®试剂盒)是本领域技术人员熟知的,并且可以根据本披露而被采用。

[0100] 检测和测量样品中miRNA表达的任何方法均可用于本文披露的方法中,其中说明性实例如下所述。在具体的实施例中,确定或测量miRNA的表达包括确定或测量成熟miRNA

的水平。可替代地,可以确定或测量相应的pre-miRNA或编码基因的表达。

[0101] 在一些实施例中,基于生物芯片的技术(如微阵列)可以是确定和测量表达所需的(例如描述于Hacia等人,1996,Nature Genetics[自然遗传学]14:441-447)。通过用寡核苷酸或使用固定探针阵列标记核酸,人们可以采用生物芯片技术将靶分子分离为高密度阵列并在杂交的基础上筛选这些分子。适合的核酸探针或寡核苷酸的设计完全在本领域技术人员的能力和专业知识范围内。可以使用多种技术制造微阵列,并且可以根据本领域已知的任何方法完成miRNA的微阵列分析。可以采用本领域技术人员已知的若干种类型的微阵列,这些微阵列包括点样寡核苷酸微阵列、预制寡核苷酸微阵列、长寡核苷酸阵列和短寡核苷酸阵列。

[0102] 悬浮液或平面阵列中的颗粒(例如珠)也可用作测定的基础。可以将如寡核苷酸的生物分子缀合到珠的表面以捕获目的miRNA。然后可以使用本领域技术人员已知的一系列检测方法(如流式细胞术或其他适合的成像技术)来表征珠并检测miRNA的存在。

[0103] 在本披露的具体的实施例中,会需要PCR方法或其他模板依赖性扩增技术。例如,可以确定核酸分子(包括miRNA)的表达的任何PCR方法都落入本披露的范围内。示例性PCR方法包括但不限于逆转录酶PCR、实时PCR、定量PCR(qPCR)、定量实时PCR(qRT-PCR)、和多重PCR。对于任何给定的一种或多种miRNA,本领域技术人员将能够确定在任何给定情况下测量表达的适当手段,而无需过度负担或实验。

[0104] 使用本文披露的miRNA的已知序列,可以设计特异性探针和引物以用于适当描述的检测方法。

[0105] 本领域技术人员将理解,确定或测量生物样品中miRNA表达的方法本质上可以是定量的、半定量的或定性的。例如,定量分析通常将在适当的误差范围内(例如,平均值 $\pm$ 标准偏差)提供样品中miRNA的浓度。相反,半定量或定性分析通常将提供样品中miRNA的相对量的指示。这会涉及将第一样品中的miRNA的量与第二样品中的相同miRNA的量进行比较,并确定第一与第二样品之间的相对量。

[0106] 可以采用本披露的方法来检测或诊断的受试者中的口腔或咽喉的头颈癌,这些受试者先前不存在诊断或确诊。典型地,将本文披露的miRNA的表达水平与参比水平进行比较,其中参比水平表示不存在口腔或咽喉的头颈癌。参比水平可以来自一个或多个参比样品。在此上下文中,术语“参比”或“参比样品”意指来自被诊断为未患有口腔或咽喉的头颈癌的个体或个体组的一种或多种生物样品。“参比样品”可以包含来自一个或多个个体的数据的汇编,出于本披露的目的,这些个体已经确认诊断为“参比”或“对照”。也就是说,为了与从在评估下的受试者获得的一个或多个样品进行比较,不需要特别或立即获得用作参比样品或对照的样品。

[0107] 因此,可以使用来自一群健康受试者(即没有口腔或咽喉的头颈癌)的生物样品预先确定miRNA的参比水平,以获得准确的中值或平均值。可以确定各种样品的参比水平,如各种细胞和组织类型以及各种体液。对于最准确的检测,用于比较的参比样品包括与在所提供的方法中评估的受试者中取得的相同类型的样品。参比水平也可以通过年龄、性别或其他因素来匹配。

[0108] 根据本文披露的实施例进行的诊断可以与诊断口腔和咽喉的头颈癌的其他方式相关。因此,本披露的方法可单独使用或与一种或多种其他诊断方法和测试结合使用,或作

为其辅助,以诊断口腔和咽喉的头颈癌。此类其他诊断方法和测试对于本领域技术人员来说是熟知的,并且包括例如细针抽吸活组织检查。

#### [0109] 试剂盒

[0110] 测量至少一种生物标记的表达所需的所有必需材料和试剂可以在试剂盒中组装在一起。因此,本披露还提供了用于检测或确定生物样品中本文披露的一种或多种miRNA的表达水平的诊断和测试试剂盒,以便于检测或诊断口腔或咽喉的头颈癌。此类试剂盒典型地包含用于实施本文披露的方法的一种或多种试剂和/或装置。例如,该试剂盒可以含有用于测量生物样品中一种或多种miRNA的表达的试剂。因此,试剂盒可以包含一种或多种用于检测miRNA和便于miRNA测量的试剂,包括引物、探针或其他试剂,和/或可以包含用于确定或测量miRNA表达的适合试剂(例如稀释剂、反应缓冲液、洗涤缓冲液、标记试剂、酶等)。试剂盒还可以包含用于从待分析的样品中提取RNA的必要试剂。例如,一些试剂盒还可以包括用于制备包含与miRNA互补的寡核苷酸的阵列的组分,因此,可以包括例如固体支持物。

[0111] 用于实施本披露的方法的试剂盒可以包括(在适合的容器装置中包含)或适于接收所需的试剂。容器装置可包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶子、注射器和其他容器。试剂盒还可以包括用于含有严格限制的试剂用于商业销售的装置。此类容器可包括注射和/或吹塑塑料容器。

[0112] 试剂盒还可包括用于接收生物样品的适合装置、用于实施本文所述方法的一个或多个容器或器皿、阳性和阴性对照(包括参比样品)、以及根据本文披露的方法使用其中含有的试剂盒组分的说明书。

#### [0113] 治疗性方案

[0114] 可以选择根据上文描述的本披露的方法鉴定为患有口腔或咽喉的头颈癌的受试者,用于治疗、或分级为治疗组,其中适当的治疗性方案可以被采纳或进行处方,目的是治疗癌症。

[0115] 因此,在实施例,本文披露的方法包括将被鉴定为患有口腔或咽喉的头颈癌的受试者暴露(即,经受)治疗性方案以治疗所述癌症的步骤。

[0116] 因此,本披露的方法提供了选择用于治疗口腔或咽喉的头颈癌的受试者的方法,该方法包括:

[0117] (a) 执行确定从受试者获得的生物样品中如以上方面和实施例所定义的一种或多种miRNA的表达水平的步骤,其中相对于一种或多种无癌症参比样品中至少一种miRNA的表达水平,生物样品中至少一种miRNA的表达水平是受试者中存在口腔或咽喉的头颈癌的指示;以及

[0118] (b) 选择受试者用于治疗所述癌症,该受试者在(a)中鉴定为患有口腔或咽喉的头颈癌。

[0119] 所采用的治疗性治疗或方案的性质可由本领域技术人员确定,并且通常取决于以下因素,如但不限于受试者的年龄、体重和一般健康状况。适合的治疗性治疗和方案是本领域技术人员已知的,其非限制性实例包括化学治疗剂和/或放射疗法。

[0120] 如本文所用,术语“治疗(treating、treatment)”是指救治病症或症状或疾病,或以其他方式阻止、阻碍、延迟或逆转病症或疾病或其他不希望的症状的进展的任何和所有用途。因此,术语“治疗”等应以其最广泛的内容来考虑。例如,治疗并不一定意味着治

疗患者直至完全恢复。在显示多种症状或其特征在于多种症状的病症中,该治疗或阻止不一定需要救治、阻止、阻碍、延迟或逆转所有所述症状,而是可以阻止、阻碍、延迟或逆转所述症状中的一种或多种。

[0121] 不受理论或特定实践模式的约束,从本披露也可以已知,本文披露的方法可以用于监测治疗口腔或咽喉的头颈癌的功效,由此本文披露的是确定(例如测量)从受试者获得的生物样品中一种或多种miRNA在两个或更多个分开的时间点(包括开始治疗前、在疗程期间、和停止治疗之后)的表达,以确定所述治疗是否有效,例如,在抑制癌症的进展方面。

[0122] 因此,本文还提供的是用于监测口腔或咽喉的头颈癌的治疗性治疗的功效的方案,该方案包括:

[0123] (a) 从受试者获得第一生物样品,其中该第一生物样品是在开始治疗之前或之后获得的;

[0124] (b) 从相同受试者获得至少第二生物样品,其中该第二生物样品是在开始治疗之后以及获得第一生物样品之后的时间点获得的;

[0125] (c) 执行测量第一和第二生物样品中至少一种miRNA的表达的步骤,其中至少一种miRNA是如以上方面和实施例所定义的;以及

[0126] (d) 将该第一生物样品中该至少一种miRNA的表达与该第二生物样品中相同至少一种miRNA的表达进行比较;

[0127] 其中在该第一与第二生物样品之间的该至少一种miRNA的表达的改变是该治疗性治疗是否有效的指示。

[0128] 该方案可以进一步包括获得和执行关于第三或随后的样品的步骤。

[0129] 在实施例中,第一与第二(或随后的)样品之间的miRNA的表达的改变可以是有效的治疗性方案的指示。当本文披露的方案表明治疗性方案无效(即第一与第二或后续样品之间的一种或多种miRNA的表达没有变化)时,考虑到提供更有效或更积极的治疗,该方案可以进一步包括改变或另外修改治疗性方案。这可以包括向受试者给予与其治疗相同的药剂的另外的剂量或改变药物的剂量和/或类型。

[0130] 本文还提供的是作为治疗口腔或咽喉的头颈癌的治疗剂的候选化合物和组合物的筛选方法。例如,可以通过选择能够增加或降低本文披露的一种或多种miRNA的表达水平的化合物或组合物来获得癌症的适合治疗剂。

[0131] 筛选治疗剂的此类方法可以在体内或体外进行。例如,筛选方法可以通过将候选化合物或组合物给予受试者(如实验室试验动物受试者)来进行;测量来自受试者的生物样品中miRNA的表达水平;与未与候选化合物或组合物接触的对照相比,选择增加或降低miRNA表达水平的化合物或组合物。

[0132] 选择用于治疗口腔或咽喉的头颈癌的化合物或组合物的方法、用于监测此种治疗的功效的方法、或用于筛选候选试剂的方法也可以通过以下而被采用,例如:从受试者获得生物样品,如实验室试验动物受试者;在多种化合物或组合物的存在下分别保持样品的等分试样;比较每个等分试样中miRNA的表达;并且选择一种化合物或组合物,相对于存在其它化合物或组合物时mRNA的表达水平,其显著改变含有该化合物或组合物的等分试样中miRNA的表达水平。

[0133] 应当理解,上述术语和相关定义仅用于解释的目的,而不旨在具有限制性。

[0134] 为了使本发明易于理解并付诸实践,现在将通过以下非限制性实施例描述特别优选的实施例。

[0135] 本说明书中对任何在先公开文件(或从其中所获得的信息)的提及或者对任何已知的事物的提及不是并且不应当被理解为这样一种承认或准许或任何形式的建议,即该在先公开文件(或从其中获得的信息)或已知的事物形成了在本说明书所涉及的研究领域内的公知常识的一部分。

[0136] 实例

[0137] 一般方法

[0138] 通过知情同意书,通过科技大学和皇家阿尔弗雷德王子医院的伦理委员会批准,从受试者获得头颈鳞状细胞癌(HNSCC)血清样品。血清样品选自病理学诊断患有口腔肿瘤(n=42;平均年龄62.1岁;68%男性)、口-咽肿瘤(n=5;平均年龄71.4岁;60%男性)、或咽/喉肿瘤(n=5;平均年龄60.8岁;80%男性)的52名HNSCC患者。细节在以下表3中提供。

[0139] 表3

[0140]

年龄	性别	肿瘤部位	肿瘤阶段
73	F	右上颌骨	4a
73	M	舌前 2/3	2
56	M	软腭	2
60	M	舌前 2/3	1
69	M	下颌骨	4a
76	M	舌 SCC	2
66	F	舌部分切除术	1
56	M	左腮腺切除术	4a
71	M	舌头腹侧面	3
32	M	硬腭	2
68	M	舌前 2/3	2
69	F	舌前 2/3	2
65	M	舌前 2/3	1
75	M	舌前 2/3	1
47	M	下牙床	4
71	F	右牙槽 SCC	2
86	F	下颌 SCC	4
53	M	右舌 SCC	1
71	M	口腔癌	2
79	M	磨牙后三角	3
71	F	口腔癌 (复发性 SCC)	2
76	M	舌 SCC	2
50	F	下颌骨	4a
81	F	舌前 2/3	4
?	?	颊黏膜	2
59	M	右下颌 SCC	4a
49	M	前口底	3
57	F	右颈部解剖肿瘤节点	0
71	F	左口底	4
73	M	口底	4
77	F	左颊	1

[0141]

年龄	性别	肿瘤部位	肿瘤阶段
62	M	右口底	1
60	M	右口底	4a
49	M	左口底	3
85	F	右颊	2
35	F	舌	2
63	M	舌	4
77	F	左下方磨牙后三角	4a
61	M	左下方牙槽 SCC	4a
71	F	软腭	4
53	?	右舌	2
78	M	左舌	3
82	F	扁桃体	1
75	F	左扁桃体	1
72	F	左舌根	3
50	M	舌根	4
78	M	扁桃体	2
82	F	喉全切除术	2
87	M	右声门 SCC	4
96	M	声门	1
64	M	咽 (复发性 SCC)	4a
55	M	右下咽	4
62	M	无肿瘤对照	
39	M	无肿瘤对照	
	M	无肿瘤对照	
32	M	无肿瘤对照	
54	M	无肿瘤对照	
71	F	无肿瘤对照	
66	M	无肿瘤对照	
61	F	无肿瘤对照	
63	M	无肿瘤对照	
51	F	无肿瘤对照	
58	F	无肿瘤对照	

[0142] 还从11名健康(无HNSCC)受试者(平均年龄55.7岁;63%男性)收集血清用作此研究的对照(也参见以上表3)。

[0143] 从每个受试者中,将5mL血液直接收集到BD Vacutainer®血液收集管中。在室温收

集所有样品(在HNSCC患者的情况下在手术之前)并通过在800rpm离心BD Vacutainer®管10分钟来分离血清。收集含血清的上清液并等分到Eppendorf 1.7ml管中并储存在-80℃下用于RNA分离。

[0144] 对于总RNA的提取和纯化,将储存在-80℃的血清在冰上解冻大约15分钟。将400μl的血清缓慢分配到新鲜标记的无RNA酶/DNA酶Eppendorf离心管中,并用100μl的无RNA酶H<sub>2</sub>O和蛋白酶K稀释在1mg/ml的浓度。将此混合物在37℃孵育20分钟以洗脱任何蛋白质。将Tri-试剂RT-LS(分子研究中心(Molecular Research Centre))与100μl溴苯甲醚一起的混合物1.5倍体积的量添加至溶液中以均化。将匀浆倒置5秒并倒入标记的2ml锁相管中。将此在4℃以12000g离心20分钟。然后,将至少1ml所得水溶液倒入新鲜的DNA Eppendorf Lobind管中。将5μl的5mg/ml的糖原和500μl的100%异丙醇添加至水溶液中,通过倒置混合,并在-20℃孵育过夜。然后将该样品在4℃以12000g离心20分钟。弃去澄清的上清液,并将剩余的沉淀物以16000g快速离心2分钟。除去沉淀物周围的澄清溶液,并将沉淀物通过以10000g离心10分钟用1mL冷的70%乙醇洗涤两次。将沉淀物重悬于10μl无RNA酶的H<sub>2</sub>O中。使用Nanodrop UV-Vis分光光度计对重悬的RNA进行定量,并使用Agilent 2100生物分析仪评估RNA质量。

[0145] 将总RNA样品混合为四组:无肿瘤对照;口腔肿瘤;口咽肿瘤;和咽/喉肿瘤。对于每组,使用Nanodrop 1000分光光度计(赛默飞世尔科技公司(Thermo Scientific))评估总RNA。纯化后,使用Agilent 2100生物分析仪(安捷伦科技有限公司(Agilent Technologies, Inc.))确定总RNA的质量和完整性,并确定小RNA(主要是miRNA)的百分比。四个合并的总RNA样品中的每一个含有大小范围在10与40个核苷酸之间的小RNA(数据未显示)。具有最突出的小RNA群体的样品是合并的口腔肿瘤和合并的咽/喉肿瘤样品(分别为76%和93%的小RNA/miRNA)。口咽肿瘤合并的样品含有54%的小RNA/miRNA,并且无肿瘤对照合并的样品含有49%的小RNA/miRNA。

[0146] 然后使用Agilent 8X60K miRNA微阵列平台(安捷伦科技有限公司(Agilent Technologies, Inc.))对合并的总RNA样品进行miRNA表达分析。这些微阵列使得能够在超过5个对数的动态范围内对miRNA进行高灵敏度检测,并全面覆盖miRBase数据库中的miRNA([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org))。然后使用Partek Genomic Suite 6.6Beta确定每个HNSCC亚组(口腔、口咽和咽/喉)和无肿瘤对照组之间miRNA的差异表达。还确定了HNSCC样品(作为单一组)与无肿瘤对照组之间的差异miRNA表达。

[0147] 使用火山图分析差异表达模式。在初始分析中使用2倍变化(向上或向下)和具有小于0.05的FDR的p值的截止值。在汇编初始列表后,选择具有小于0.000001的p值的miRNA。

[0148] 为了限制阵列数据和RT-qPCR量化值之间的可变性并增加稳健性,如下文所述输出数据。使用Partek Genomic Suite (Partek, 美国)分析发现阶段期间的微阵列miRNA分析,其中根据制造商的说明书(应用生物系统公司(Applied Biosystems)),使用预扩增RT-qPCR技术在早期验证群中验证结果。所有后期验证RT-qPCR原始荧光分析文件都从Step One plus中输出,格式为LinRegPCR分析的EXCEL电子表格。确定了基线,并为扩增子组分配了以下排除标准:在分析下的样品;没有扩增的样品;没有平台期的样品;具有低Cq值(>37)的样品;以及超出每扩增子组中值效率的5%的样品。此外,还包括在估计基线期间的对数线性相位参数。输出定量PCR效率并进行统计分析。所有样品均通过此优化的LinRegPCR方

案进行处理,准确评估每个分析样品中每个扩增子的内源丰度。所分析的样品中扩增子的丰度被证实,而没有与参比基因混淆。一旦这些值被认为是准确的,使用C<sub>q</sub> (C<sub>q</sub><37) 和NO值统计地确定真值和假值的阈值。然后分析这些标准化的数据集,并记录在早期和晚期验证中患有口腔鳞状细胞癌的个体与健康个体之间的差异miRNA表达水平。根据过表达的miRNA的严格阵列分析的标准从阵列中选择七种候选过表达的miRNA,其具有健康个体与口腔鳞状细胞癌个体的数据集之间的显著的p值和大于十倍的变化。

[0149] 为了构建miRNA诊断分类器,从而将患有口腔鳞状细胞癌的个体与健康对照区分开,将从RT-qPCR获得的C<sub>q</sub>数据应用于以下分类模型:逻辑回归;具有k折验证的逻辑回归;机器学习;和具有k折验证的机器学习。理想的miRNA诊断分类器,在本文中表示为Tri<sub>miR</sub>,建立是通过逻辑回归建模。

[0150] 诸位发明人还在后期验证组中进行了Cox比例风险模型,研究了4年监测患者的生存时间与8个预测变量之间的关联;六种miRNA的年龄、性别和丰度。

[0151] 实例1-HNSCC与无肿瘤对照组之间的差异miRNA表达

[0152] 诸位发明人首先研究了与无肿瘤对照血清样品 (n=11) 相比,汇编的合并的HNSCC血清样品 (n=52) 中miRNA的表达。与来自无肿瘤对照受试者的血清相比,火山图分析鉴定了来自HNSCC受试者的血清中显著过表达(上调)的53种miRNA,以及其表达显著不足(下调)的40种miRNA。

[0153] 图1显示了与来自无肿瘤对照受试者的血清相比,来自HNSCC受试者的血清中p值小于0.000001的十种最过表达和十种最低表达的miRNA,如从火山图分析所确定的。表4呈现了来自图1的六种最过表达的和三种最低表达的miRNA的p值和倍数变化,以及每种miRNA的已知基因靶的数量。

[0154] 表4

过表达的 miRNA			
微小 RNA	p 值	倍数变化	基因靶
miR 451	1.32E-09	129.732	14
miR-720	2.97E-07	73.9955	5
miR-486-5p	1.42E-08	72.0939	106
miR-1268	1.09E-10	41.2989	9
miR-939	1.64E-08	10.3577	97
miR-4327	1.08E-10	8.15604	-
下调的 miRNA			
miR-1202	3.58E-10	-12.0132	179
miR-1237	1.28E-07	-24.989	177
miR-4270	3.08E-08	-20.7995	-

[0156] 实例2-口腔肿瘤组和无肿瘤对照组之间的差异miRNA表达

[0157] 然后,诸位发明人研究了miRNA在口腔肿瘤合并的血清样品 (n=42) 和无肿瘤对照样品 (n=11) 中的表达。与来自无肿瘤对照受试者的血清相比,火山图分析鉴定了来自患有口腔肿瘤的受试者的血清中显著过表达(上调)的130种miRNA,以及其表达显著不足(下调)的36种miRNA。

[0158] 图2显示了与来自无肿瘤对照受试者的血清相比,来自患有口腔肿瘤的受试者的

血清中p值小于0.000001的十种最过表达和十种最低表达的miRNA,如从火山图分析所确定的。发现大多数差异表达的miRNA过表达(在100与1000倍之间增加)。最低表达的miRNA(miR-129-3p)表现出相对适度的100倍表达降低。

[0159] 口腔肿瘤样品中差异表达的miRNA的基因本体映射表明转录调节子活性和细胞增殖的高富集评分(图3)。表5中总结了涉及图2中四种最过表达的miRNA的转录调节和细胞增殖的预测基因靶。这些miRNA中的一种(miR-21)未发现在来自患有口咽或咽/喉肿瘤的受试者的血清中差异表达(参见下面的实例3和4),表明此miRNA作为口腔鳞状细胞癌的单一生物标记的潜在适用性。值得注意的是,miR-21具有超过200个推定的基因靶。

[0160] 表5

miRNA	基因靶
<b>细胞增殖</b>	
miR-486-5p	PIM1、PTEN
miR-21	CDC25A、PTCH1、TGFB1、YAP1、ZFP36L2
miR-320c	BCAT1、E2F1、ENPEP、EVI5、KITLG、MYH10、PTEN
Let-7a	BCAT1、CBFA2T3、CDC25A、CDV3、FGF5、MXD1、OSMR、TNFSF9、TP53、TUSC2、UHRF1、UHRF2
<b>转录调控</b>	
miR-486-5p	ARID1A、FOXO1、MKL1、NKX2-3、SMAD2、TBL1X
miR-21	ALX1、CL2、ELF2、GLIS2、PPARA、YAP1
miR-320c	CDKN1C、CNOT7、E2F1、E2F3、ESRRG、FOXO3、FOXq1、GABPB2、HDAC4、HLTF、IKZF2、MYST4、MYT1L、NR3C1、ONECUT1、PGR、SP1、TBL1XR1、ZIC3
Let-7a	ANKRD49、CD86、COL1A1、ELF4、FOXP1、GABPA、HAND1、HOXA9、IKZF2、MEF2D、PPARA、PPARGC1A、SMAD2、TEAD3、TP53、WNT1、NPAT、TEAD1

[0162] 对微阵列数据的进一步分析揭示,一组7种miRNA在诊断口腔鳞状细胞癌方面显示出强大的预测能力,每种癌症的p值均小于0.000001:let-7a、miR-15b、miR-16、miR-21、miR-365、miR-451和miR-486。这些中的之一(miR-16)似乎不是口腔肿瘤样品中十种最过表达的miRNA之一(见图2)。诸位发明人使用TaqMan®基因表达测定(应用生物系统公司(Applied Biosystems))通过qPCR确认了这7种miRNA在患者样品中的表达。采用应用生物系统公司(Applied Biosystems) TaqMan®反应混合物(2X)-2.5μL、TaqMan®基因探针(20X)-0.5μL、稀释的cDNA-1.0μL、无RNA酶去离子水-1.0μL修改TaqMan®方案。小体积qPCR反应增加了检测特定miRNA的灵敏度。一式三份进行的所有反应均使用StepOnePlus™或QuantStudio 12K Flex系统(生命技术公司(Life Technologies),美国)进行。然后使用ΔCT或ΔΔCT分析数据。PCR热参数为95℃持续10分钟,随后是95℃持续15秒以及在60℃延伸60秒的40个循环。结果(图4)清楚地证实,与健康血清相比时,这些miRNA仅在口腔癌血清中升高。

[0163] 实例3-口咽肿瘤组和无肿瘤对照组之间的差异miRNA表达

[0164] 诸位发明人还研究了miRNA在口咽肿瘤合并的血清样品(n=5)和无肿瘤对照样品(n=11)中的表达。与来自无肿瘤对照受试者的血清相比,火山图分析鉴定了来自患有口咽肿瘤的受试者的血清中显著过表达(上调)的19种miRNA,以及其表达显著不足(下调)的15种miRNA。

[0165] 图5显示了与来自无肿瘤对照受试者的血清相比,来自患有口咽肿瘤的受试者的血清中p值小于0.000001的最过表达和最低表达的miRNA,如从火山图分析所确定的。与口腔肿瘤样品数据(实例2)一样,发现大多数差异表达的miRNA过表达(在100与1000倍之间增加)。

[0166] 最过表达的miRNA是miR-486-5p(388倍改变)。如上文实例2中所述,miR-486-5p也在来自患有口腔肿瘤的受试者的血清中高度表达(72倍增加)。相比之下,miR-129\*(最高下调的miRNA)在肿瘤血清中低51倍。

[0167] 从基因本体论分析,与差异表达的miRNA相关的主要本体组在生物学过程、节律过程、运动和细胞增殖方面,并且在分子功能方面是转录调节子活性(图6)。后一种功能组是被鉴定为在口咽血清样品miR-486-5p中最过表达的miRNA的特别关注点(参见图4),具有超过100种已知的基因靶。此数据和口腔肿瘤样品中相同miRNA的显著过表达的发现表明miR-486-5p在HNSCC中具有中心作用的可能性。还注意到被鉴定为在来自患有口咽肿瘤的受试者的血清中显著过表达的miRNA之一(在来自患有口腔肿瘤的受试者的血清中也显著过表达;实例2)具有非常大量的推定的靶基因(超过530)。

[0168] 实例4-咽/喉肿瘤组和无肿瘤对照组之间的差异miRNA表达

[0169] 诸位发明人还研究了miRNA在咽/喉肿瘤合并的血清样品(n=5)和无肿瘤对照样品(n=11)中的表达。与来自无肿瘤对照受试者的血清相比,火山图分析鉴定了来自患有口咽肿瘤的受试者的血清中显著过表达(上调)的8种miRNA,以及其表达显著不足(下调)的14种miRNA。

[0170] 图7显示了与来自无肿瘤对照受试者的血清相比,来自患有咽/喉肿瘤的受试者的血清中p值小于0.000001的最过表达和最低表达的miRNA,如从火山图分析所确定的。从此数据中立即明显的是,与过表达的miRNA相比时,在表达不足的miRNA中观察到更大的倍数变化。例如,与无肿瘤对照相比,发现来自患有咽/喉肿瘤受试者的血清中miR-1225-5p表达降低了800倍,而miR-720(最过表达的miRNA)仅过表达80倍。这种差异血清miRNA表达模式对于咽/喉组是独特的,因为口腔和口咽肿瘤样品显示miRNA的一般过表达。

[0171] 从基因本体论分析,与差异表达的miRNA相关的主要本体组是细胞增殖和转录调节子活性(图8)。鉴定为调节这些本体组内最多靶的差异表达的miRNA是miR-92b、miR-1225-5p、miR-1202、miR-1207-5p、miR-630和miR-129-3p(血清中所有显著表达不足均来自患有咽/喉肿瘤的受试者)。

[0172] 应注意,与无肿瘤对照相比,发现miR-129-3p和miR-92b在所有三个HNSCC肿瘤组中显著表达不足。

[0173] 实例5-溶血不是血清miRNA表达谱的因素

[0174] 在血清的miRNA分析中,常见的问题是样品中溶血的可能性以及这可能对miRNA群体产生的影响。使用Drabkin测定法作为游离血红蛋白和qPCR的量度,诸位发明人已经证实来自患有口腔肿瘤的受试者的血清样品未被溶血。为了测试溶血的影响,通过多次冷冻融

化循环、煮沸和剧烈混合对血清样品进行物理破坏。这涉及在室温下在5分钟的时间吸取血清以确保血清内所含细胞的完全溶血。

[0175] 如图9所示,口腔肿瘤血清样品与无肿瘤对照血清样品之间的六种miRNA(miR-365、let-7a、miR-486、miR-451、miR-15b和miR-16)的差异表达没有受到溶血的影响。图9中的数据还表明这些miRNA中的每一种作为口腔鳞状细胞癌诊断的生物标记的潜力。

[0176] 实例6-miRNA表达的验证和miRNA特征的诊断和预后值的验证

[0177] 使用可替代的测定验证了在头颈癌中被鉴定为上调的六种miRNA(let-7a、miR-16、miR-21、miR-451、miR-486-5p和miR-92a-3p)。此可替代的测定(称为RNAm)是TaqMan方法的改编。

[0178] 获得来自76名患有头颈癌(不同亚型)患者的血清样品和来自健康患者的血清样品。如上所述提取总RNA并重悬于100 $\mu$ l无RNA酶的dH<sub>2</sub>O中,然后用Nanodrop1000(赛默飞世尔科技公司(ThermoScientific))和Qubit Fluormeter 2.0(赛默飞世尔公司(ThermoFisher))评估RNA质量和浓度。然后将分离的RNA以5ng/ $\mu$ l、10ng/ $\mu$ l、15ng/ $\mu$ l或30ng/ $\mu$ l的浓度配制,用于第一链cDNA合成,并单独评估。

[0179] 使用高容量TaqMan®miRNA逆转录试剂盒进行第一链cDNA合成。简而言之,为了产生15.0 $\mu$ l miRNA合成cDNA反应,将4U的20U/ $\mu$ L RNA酶抑制剂、总体积为6 $\mu$ l的miRNA RT引物混合物、50U的MultiScribe™逆转录酶、50单位/ $\mu$ L 1 $\times$ 体积的10 $\times$ 将RT缓冲液、和1mM dNTP合并,并与10至50ng总RNA混合。

[0180] 将cDNA产物以1:4稀释,并将1 $\mu$ L添加至RT-PCR反应混合物(含有0.5 $\mu$ L 20 $\times$  TaqMan® Assay、5 $\mu$ L 2 $\times$  TaqMan®通用PCR反应混合物、3 $\mu$ L水(10 $\mu$ L的最终体积))中。然后使用Applied Biosystems Step One机器进行一式三份qRT-PCR反应,其具有以下热循环程序:按照制造商的规定(应用生物系统公司(Applied Biosystems)),95 $^{\circ}$ C持续10min,随后是95 $^{\circ}$ C持续15s和60 $^{\circ}$ C持续1min(1.6 $^{\circ}$ C/s温速率)的40个循环。然后使用 $\Delta$ Ct分析数据。

[0181] 结果(图10A)清楚地显示,与来自健康患者的血清相比时,来自患有头颈癌患者的血清中let-7a、miR-16、miR-451、miR-486-5p和miR-92a-3p升高。在这项大群研究中,与来自健康的血清中的表达相比时,来自癌症患者的血清中miR-21的表达仅略高。该观察结果与图2中显示的口腔癌数据之间的差异可能是由于该群中的患者出现了一系列头颈癌症亚型(不仅仅是口腔癌),这可能会使数据偏斜。

[0182] 与健康患者相比,这六种miRNA组合的平均值在患有头颈癌的患者中升高,因此可用于将患有头颈癌的患者与健康患者区分开(图10B)。

[0183] 通过绘制上述六种miRNA之间的数据相互关系来开发数据集质量的概述。发现在标记上分布是一致的。该分析证实了标记(特别是miR-486-5p和miR-92a-3p[0.84](数据未显示))的强诊断鉴别能力。

[0184] 图11中显示了对口腔鳞状细胞癌样品和健康对照中6种miRNA(let-7a、miR-16、miR-21、miR-451、miR-486-5p和miR-92a-3p)系列的Cq值进行分类的箱线图(R-Studio)。癌症组在所有miRNA中的值表现出非常小的变化。Hsa-miR-486-5p和hsa-miR-92a-3p体现了最明显的差异,其中在第75百分位数没有重叠。通过这种清晰的分离,可以区分癌样品与正常(无癌)样品。

[0185] 然后,诸位发明人使用选自上述miRNA的单个或多个miRNA标记确定诊断特征的功能。

效。临床标准与阳性或阴性口腔鳞状细胞癌诊断的病理学发现相关。为了构建miRNA诊断分类器,从而将患有口腔鳞状细胞癌的个体与健康对照区分开,将从RT-qPCR获得的C<sub>q</sub>数据应用于以下分类模型:逻辑回归;具有k折验证的逻辑回归、机器学习、和具有k折验证的机器学习。特异性miRNA诊断特征分类器(在本文称为Tri<sub>miR</sub>)建立是通过逻辑回归模型建模,其中AUC 0.9[0.734-0.978]、灵敏度为91.3、并且特异性为85.7(图12)。Tri<sub>miR</sub>特征构成三种miRNA,hsa-miR-16、hsa-miR-92a-3p和hsa-miR-486-5p。(包含所有六种miRNA-let-7a、miR-16、miR-21、miR-451、miR-486-5p和miR-92a-3p的特征在本文中被称为‘6<sub>miR</sub>’。)最终Tri<sub>miR</sub>诊断和6<sub>miR</sub>存活评分的准确性发生在早期和晚期的两个验证集中。根据以下式计算被Tri<sub>miR</sub>诊断为口腔鳞状细胞癌的任何阶段的预测概率(其中miRNA指示符被取代为miRNA的计算的C<sub>q</sub>值)。本领域技术人员将理解,此式仅是可以采用的式的示例。

[0186]  $\text{Logit}[p=0C]$ ,其中 $\text{Log } p/1-p = (-) 59.5 + 0.73 \times \text{hsa-miR-16} + (-) 2.23 \times \text{hsa-miR-92-3p} + 3.27 \times \text{hsa-miR-486-5p}$ 。

[0187] 多基因6<sub>miR</sub>特征与诊断时的低存活概率相关。个性化线性评分对具有存活风险的口腔鳞状细胞癌的个体进行排名,同时6<sub>miR</sub>特征的高分(4.8)使其在4年内死亡增加3.1倍(图13)。使用以下式(其中miRNA指示符被取代为该miRNA的计算的C<sub>q</sub>值),风险评分超过4.8表明初次诊断时死亡的机会更高:

[0188]  $\text{let-7a} \times (-0.4729) + \text{hsa-miR-451} \times 0.5305 + \text{hsa-miR-16} \times 0.2646 + \text{hsa-miR-21} \times (-0.2593) + \text{hsa-miR-92a-3p} \times (-0.6423) + \text{hsa-miR-486-5p} \times 0.4272$ 。

[0189] 实例7-在溶血条件下验证miRNA表达

[0190] 还使用RNAmP测定评估溶血对let-7a、miR-16、miR-21、miR-451、miR-486-5p和miR-92a-3p表达的影响。如上文实例5中所述,在来自患有头颈癌的患者血清样品中诱导溶血,并评估游离血红蛋白水平。然后将样品分为4个子类别的溶血(1-2mg/mL游离血红蛋白;2.5mg/mL游离血红蛋白;5-10mg/mL游离血红蛋白;和>10mg/mL游离血红蛋白),然后miRNA表达水平为如实例6中所述使用RNAmP测定评估。

[0191] 如图11所示,六种miRNA中的每一种的表达仅在严重溶血(>10mg/mL游离血红蛋白)的条件下受损。所有六种miRNA在整个三个更低等级的溶血中表现出一致的CT值(1-2mg/mL游离血红蛋白;2.5mg/mL游离血红蛋白;和5-10mg/mL游离血红蛋白)。

[0192] 用包含所有血清的金标准溶血测试的质量控制平台评估所有样品、溶血和总RNA输入浓度的分子分析的两个混杂因素,并根据血液破坏程度对分层样品进行分级。针对它们提供一致的C<sub>q</sub>值的能力,仔细检查两种不同的RNA浓度。随后进行统计检验,其中使用Student t检验、Welch t检验和Wilcoxon秩和检验来测量所讨论的每个群的中值之间的偏差。这些分析证实,本文所述的miRNA的诊断和预后价值在溶血条件下不受损害,C<sub>q</sub>值也不会因变化的RNA浓度而受到不利影响(数据未显示)。

[0193] 实例8-血清miRNA的稳定性

[0194] 为了确定血液样品的收集和储存条件是否影响miRNA生物标记的可检测表达,收集血液样品并在室温或4℃存储,然后测试miRNA的血清水平。具体地,从健康志愿者抽取血液,并且然后在室温下从血液中分离血清。然后将样品储存于4℃或室温下,并每隔24小时处理持续7天的时间。使用如上文描述的RNAmP测定评估let-7a、miR-16、miR-21、miR-451、miR-486-5p和miR-92a-3p的表达。

[0195] 观察到,当在两个储存温度下进行比较时,六种miRNA的Ct值没有显著差异(数据未显示)。这表明生物标记在室温或在4℃下可稳定多达七天。

## 序列表

<110> 悉尼科技大学

<120> 口腔癌、咽癌和喉癌的生物标记

<130> 35271579/GDR

<150> AU 2016903272

<151> 2016-08-18

<160> 44

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 1

ugagguagua gguuguauag uu 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 2

ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 3

uagcagcaca ucaugguua ca 22

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 4

uagcagcacg uaaaauuugg cg 22

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 5

uagcuuauca gacugauguu ga 22

<210> 6  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 6  
gugcauugcu guugcauugc 20  
<210> 7  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 7  
ggggaugggc uggcgcgcg 20  
<210> 8  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 8  
aaaagcuggg uugagaggu 20  
<210> 9  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 9  
agggacuuuu gggggcagau gug 23  
<210> 10  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 10  
aaaccguuac cauucugag uu 22  
<210> 11  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 11  
uccuguacug agcugccccg ag 22  
<210> 12  
<211> 22  
<212> RNA

<213> 智人  
<400> 12  
aggcggggcg ccgcgggacc gc 22  
<210> 13  
<211> 18  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 13  
accuccgggg ucgcucua 18  
<210> 14  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 14  
aggaggaauu ggugcugguc uu 22  
<210> 15  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 15  
ugugcgcagg gagaccucuc cc 22  
<210> 16  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 16  
uggggagcug aggcucuggg ggug 24  
<210> 17  
<211> 18  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 17  
cgggcguggu gguggggg 18  
<210> 18  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 18  
accuugccuu gcugcccggg cc 22

<210> 19  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 19  
ggggccuggc ggugggcgg 19  
<210> 20  
<211> 17  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 20  
cgcgccgggc ccggguu 17  
<210> 21  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 21  
agccgcgggg aucgccgagg g 21  
<210> 22  
<211> 19  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 22  
ggcuugcaug ggggacugg 19  
<210> 23  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> 卡波西肉瘤相关的疱疹病毒  
<400> 23  
ucacauucug aggacggcag cga 23  
<210> 24  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 24  
ugagguagua gauuguauag uu 22  
<210> 25  
<211> 22  
<212> RNA

<213> 智人  
<400> 25  
aucacauugc cagugauuac cc 22  
<210> 26  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 26  
agggacggga cgcggugcag ug 22  
<210> 27  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 27  
ucuggcuccg ugucuucacu ccc 23  
<210> 28  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 28  
caacggaau ccaaaagcag cug 23  
<210> 29  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 29  
aggaggaau ggugcugguc uu 22  
<210> 30  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 30  
gugccagcug cagugggga g 21  
<210> 31  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 31  
uggcaggag gcugggagg g 21

<210> 32  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 32  
ugagccccug ugccgcccc ag 22  
<210> 33  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 33  
guggguacgg cccagugggg gg 22  
<210> 34  
<211> 21  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 34  
cgggggcggg gccgaagcgc g 21  
<210> 35  
<211> 23  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 35  
gugaguggga gccccagugu gug 23  
<210> 36  
<211> 24  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 36  
aggagggagg agaugggcca aguu 24  
<210> 37  
<211> 17  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 37  
ucgccuccuc cucucc 17  
<210> 38  
<211> 21  
<212> RNA

<213> 智人  
<400> 38  
uccugcgcgu cccagaugcc c 21  
<210> 39  
<211> 15  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 39  
aggagauccu ggguu 15  
<210> 40  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 40  
ucagggaguc aggggagggc 20  
<210> 41  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 41  
cugggacagg agggaggagc ag 22  
<210> 42  
<211> 16  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 42  
gcagcauuca uguccc 16  
<210> 43  
<211> 20  
<212> RNA  
<213> 单纯疱疹病毒2  
<400> 43  
aauggaaggc gaggggaugc 20  
<210> 44  
<211> 22  
<212> RNA  
<213> 智人  
<400> 44  
uauugcacuu gucccggccu gu 22

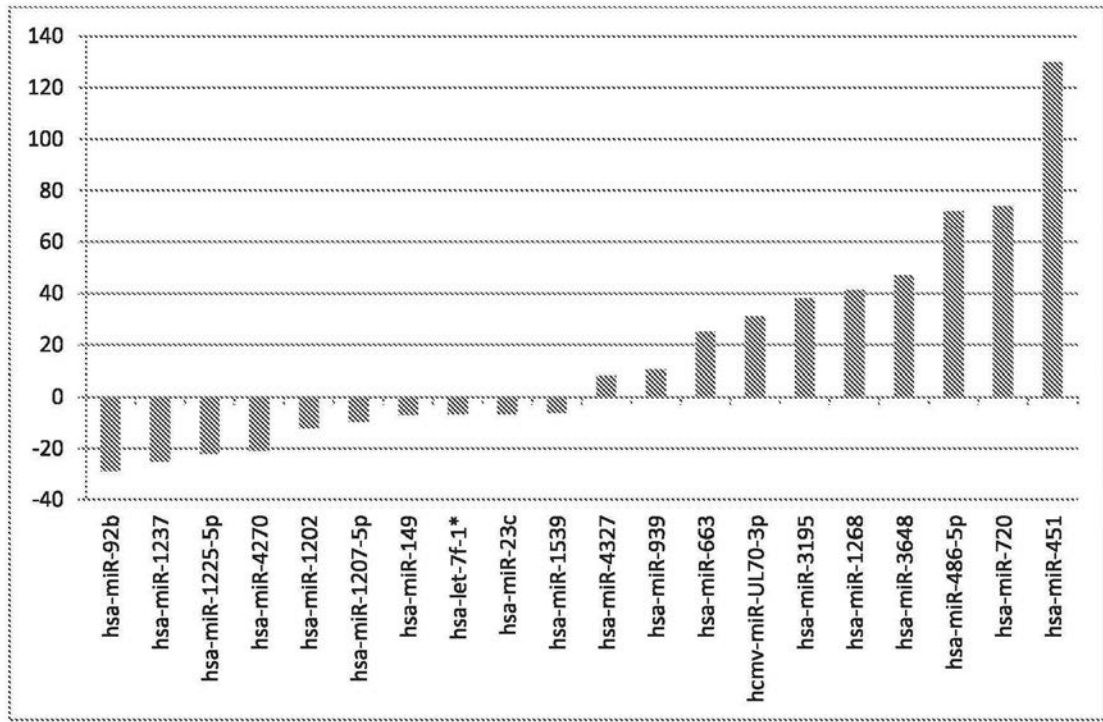


图1

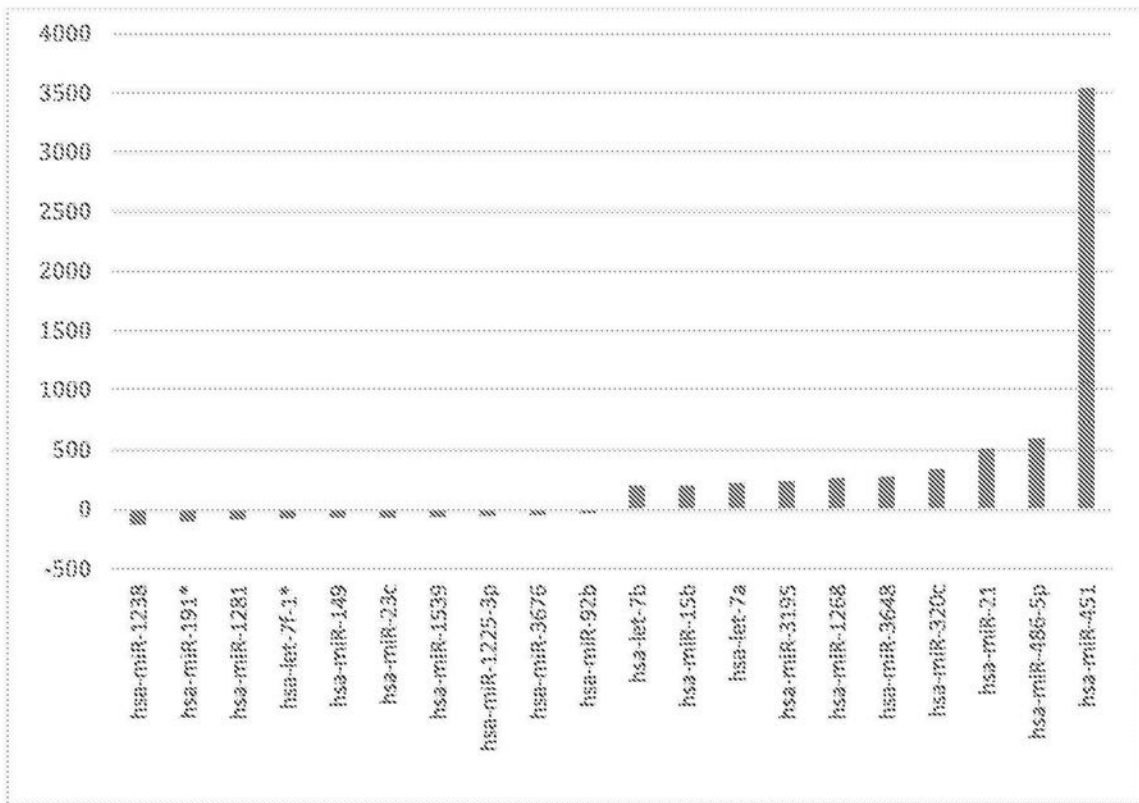
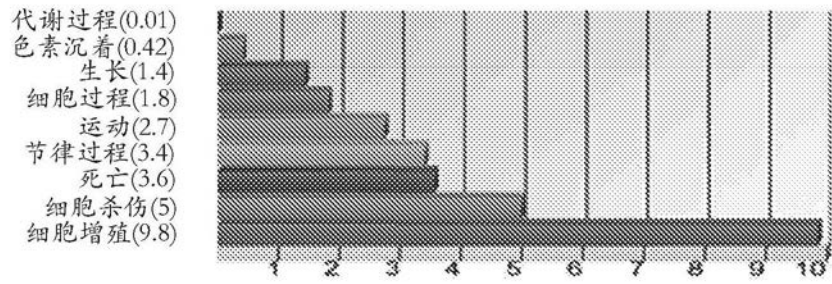


图2

(A)生物过程



(B)分子功能

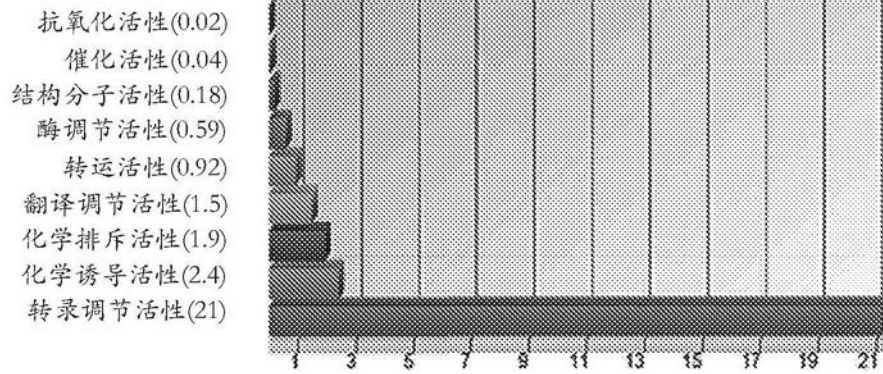


图3

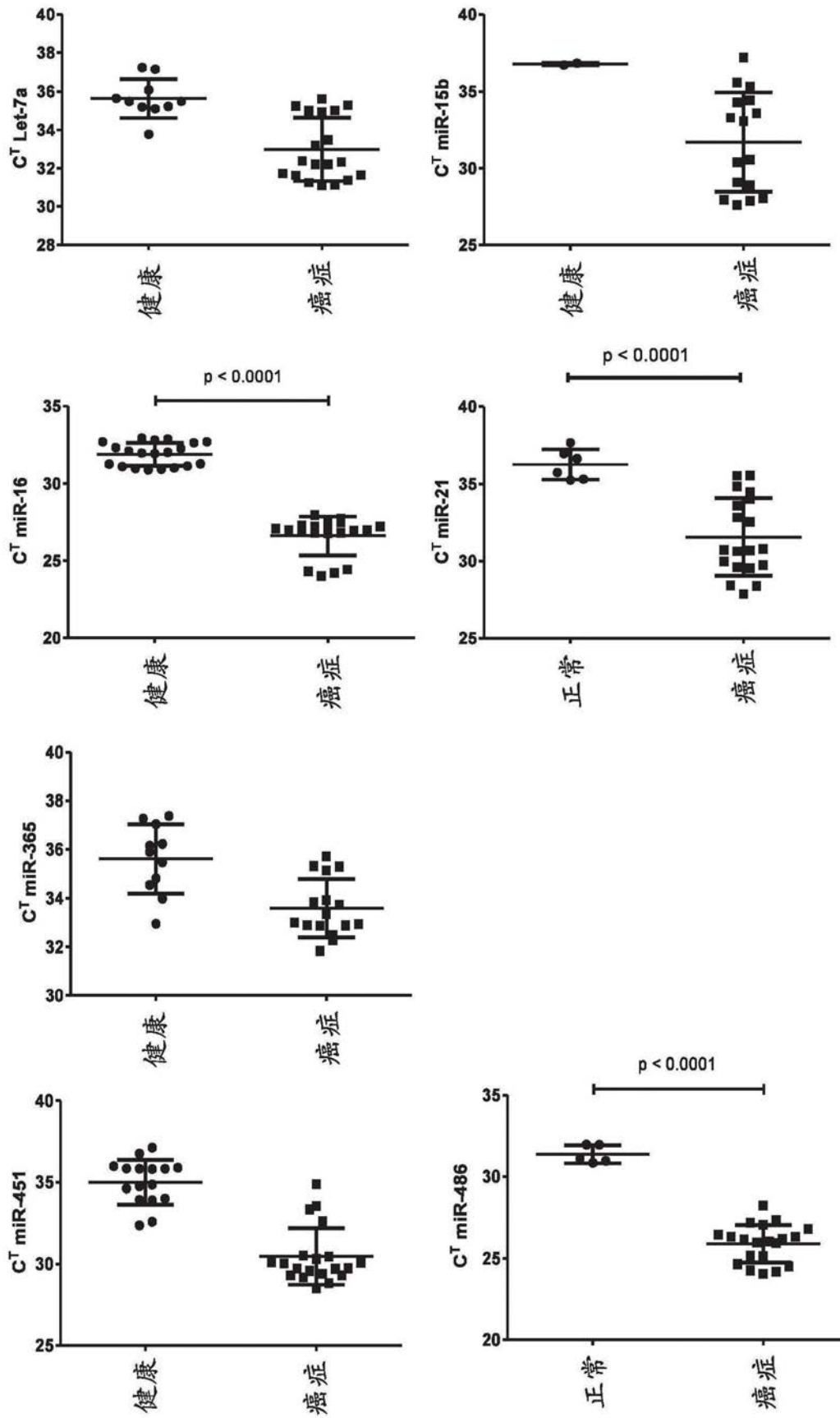


图4

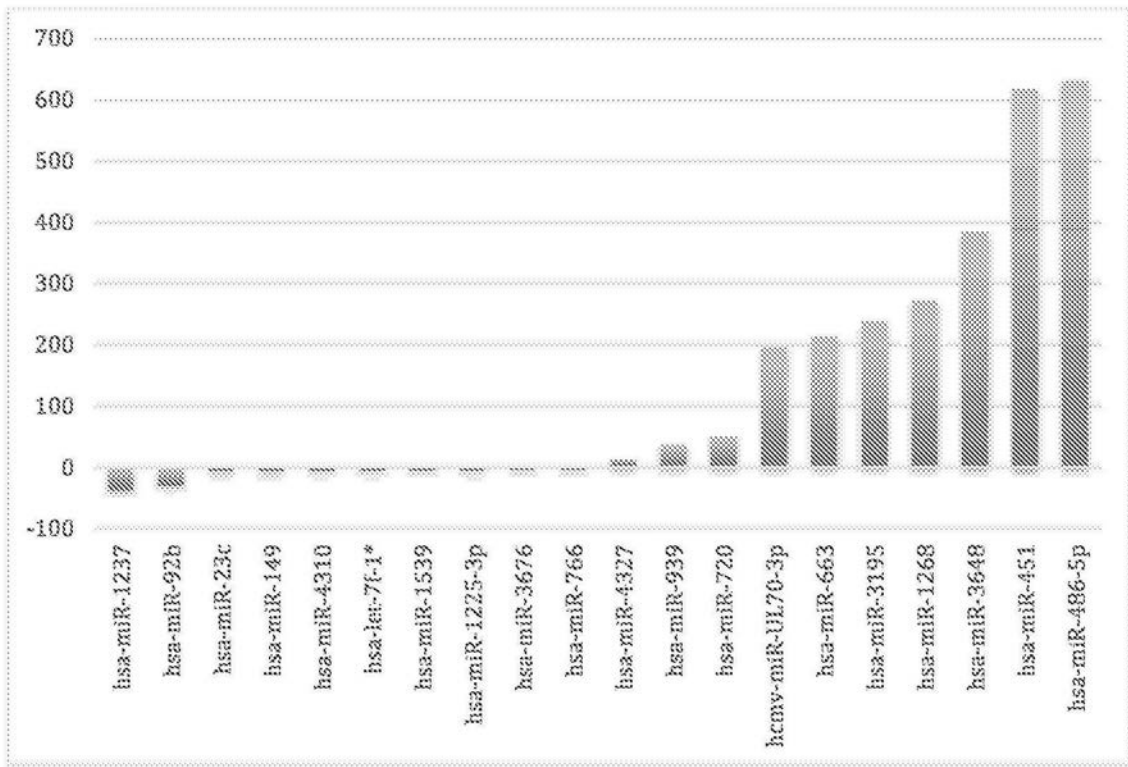
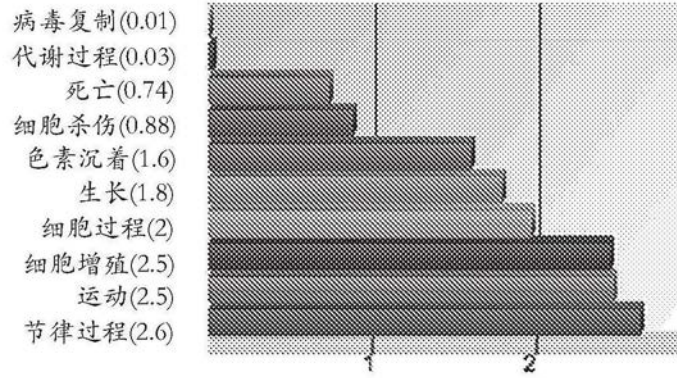


图5

(A)生物过程



(B)分子功能

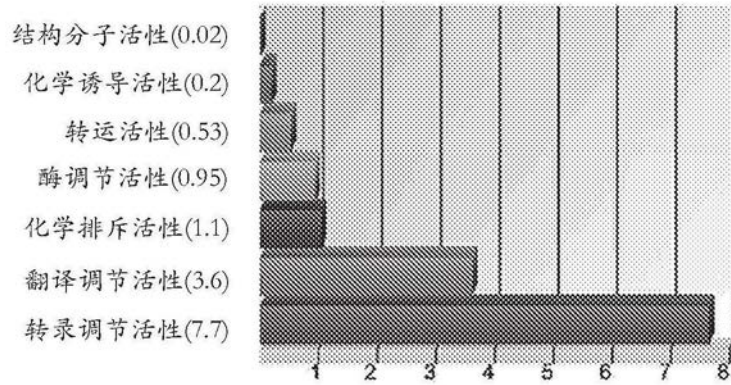


图6

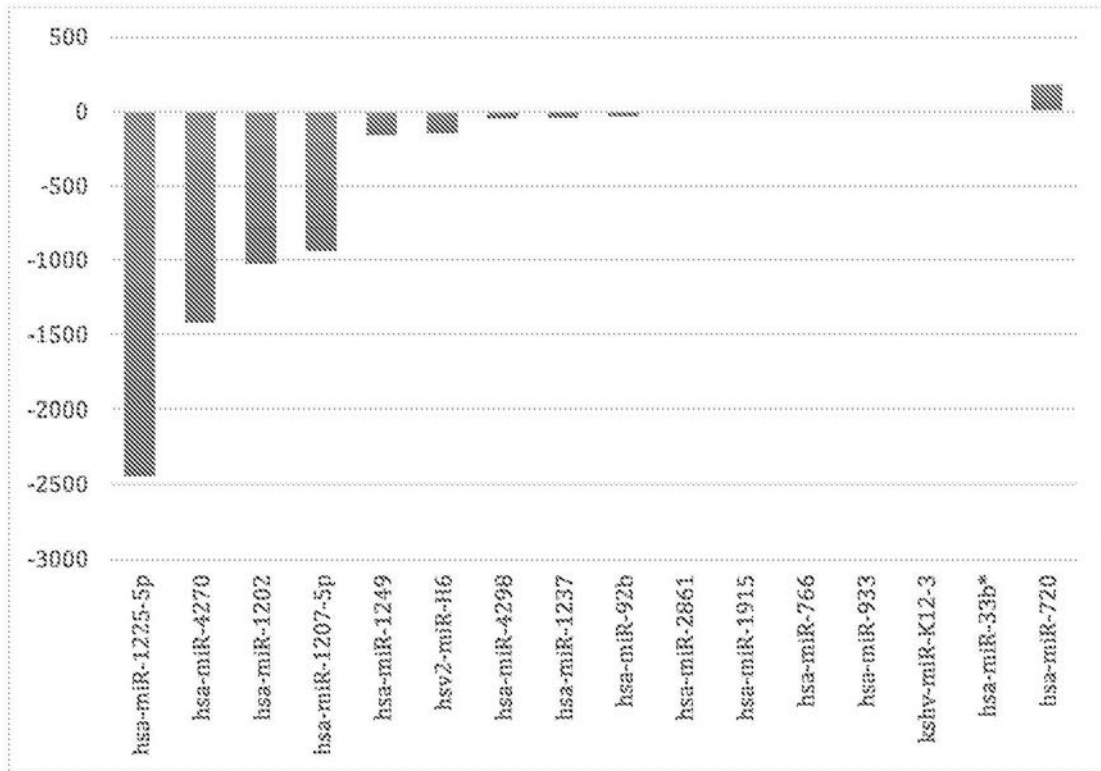
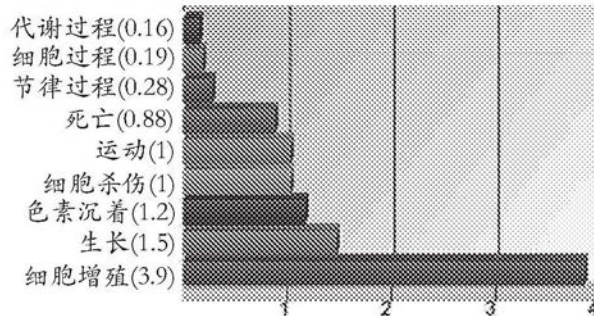


图7

(A) 生物过



(B) 分子功能

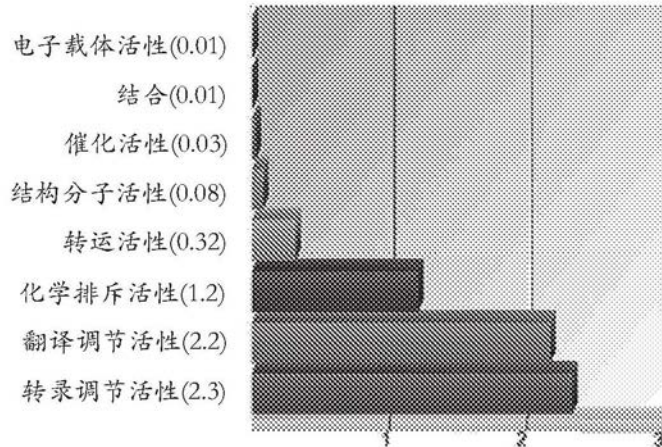


图8

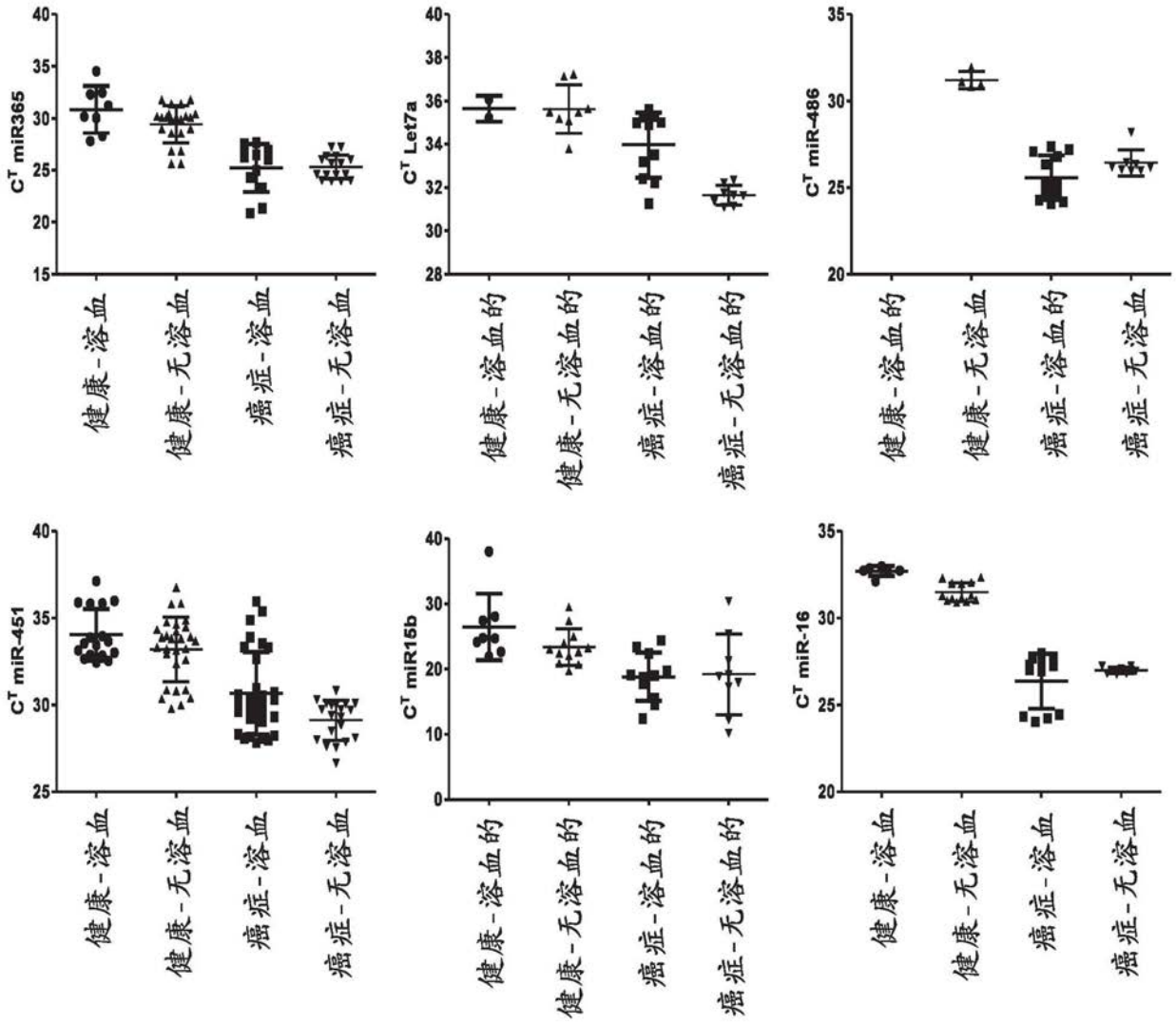
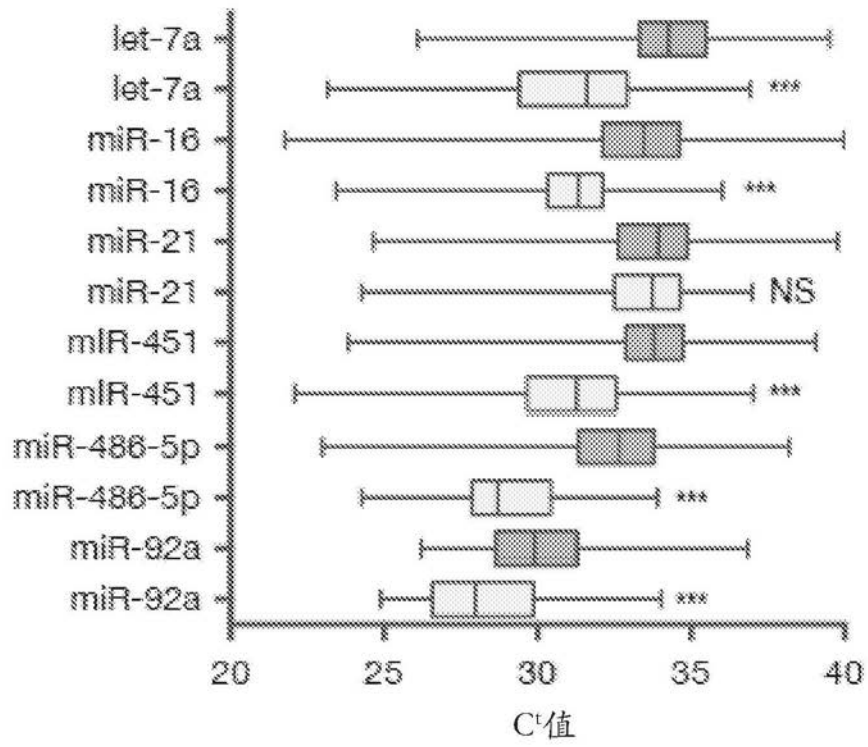


图9

A.



B.

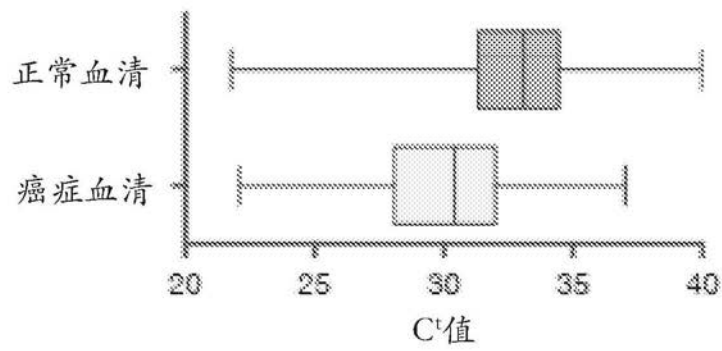


图10

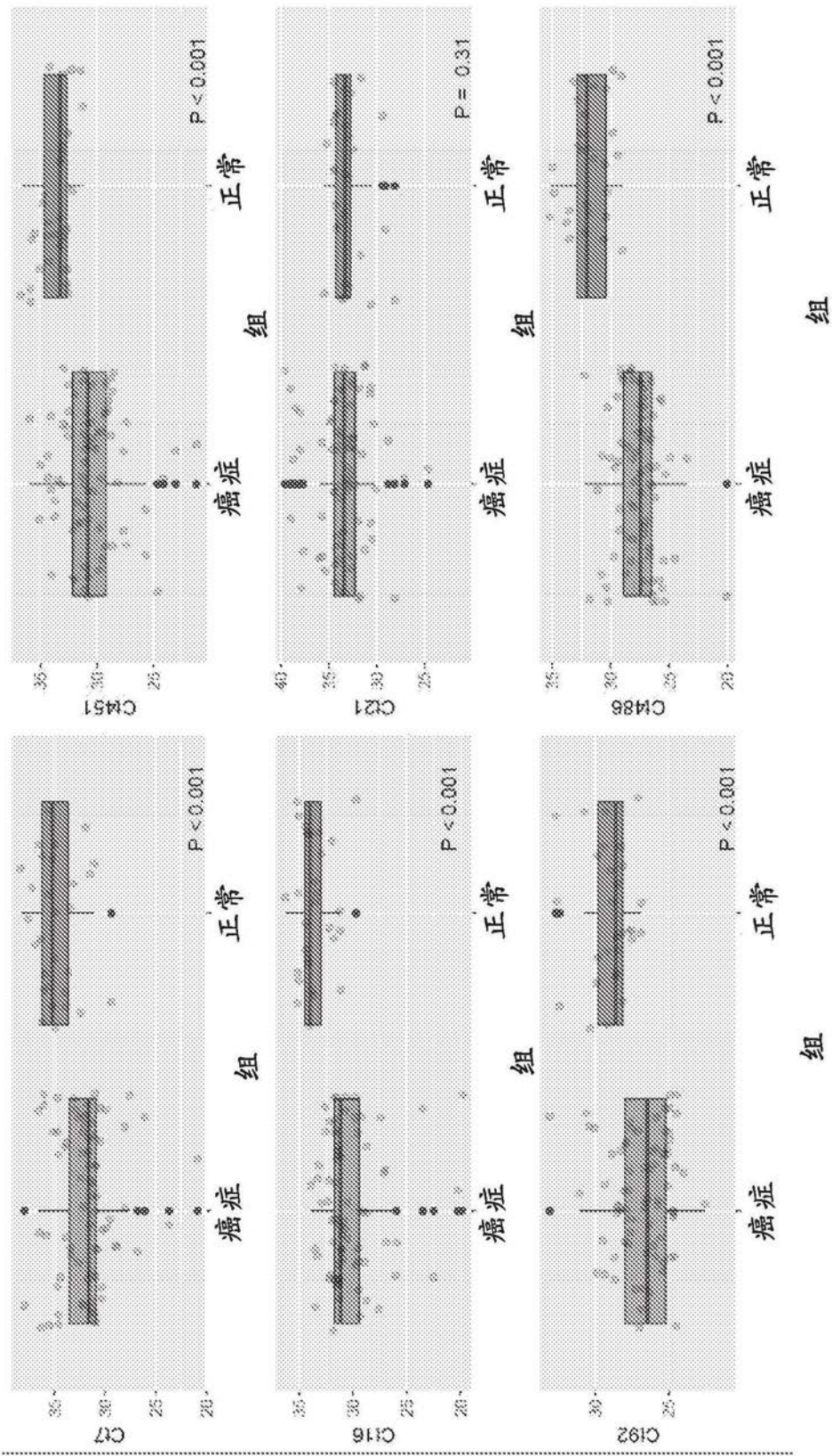


图11

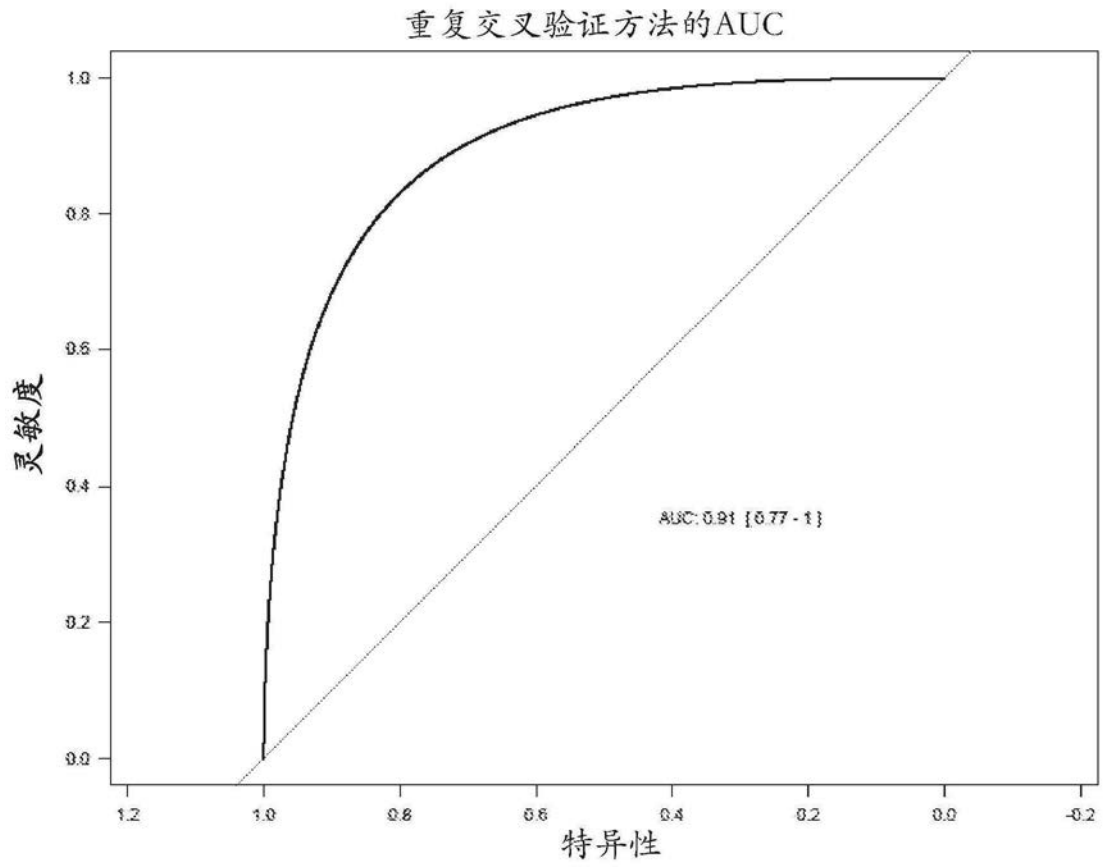


图12

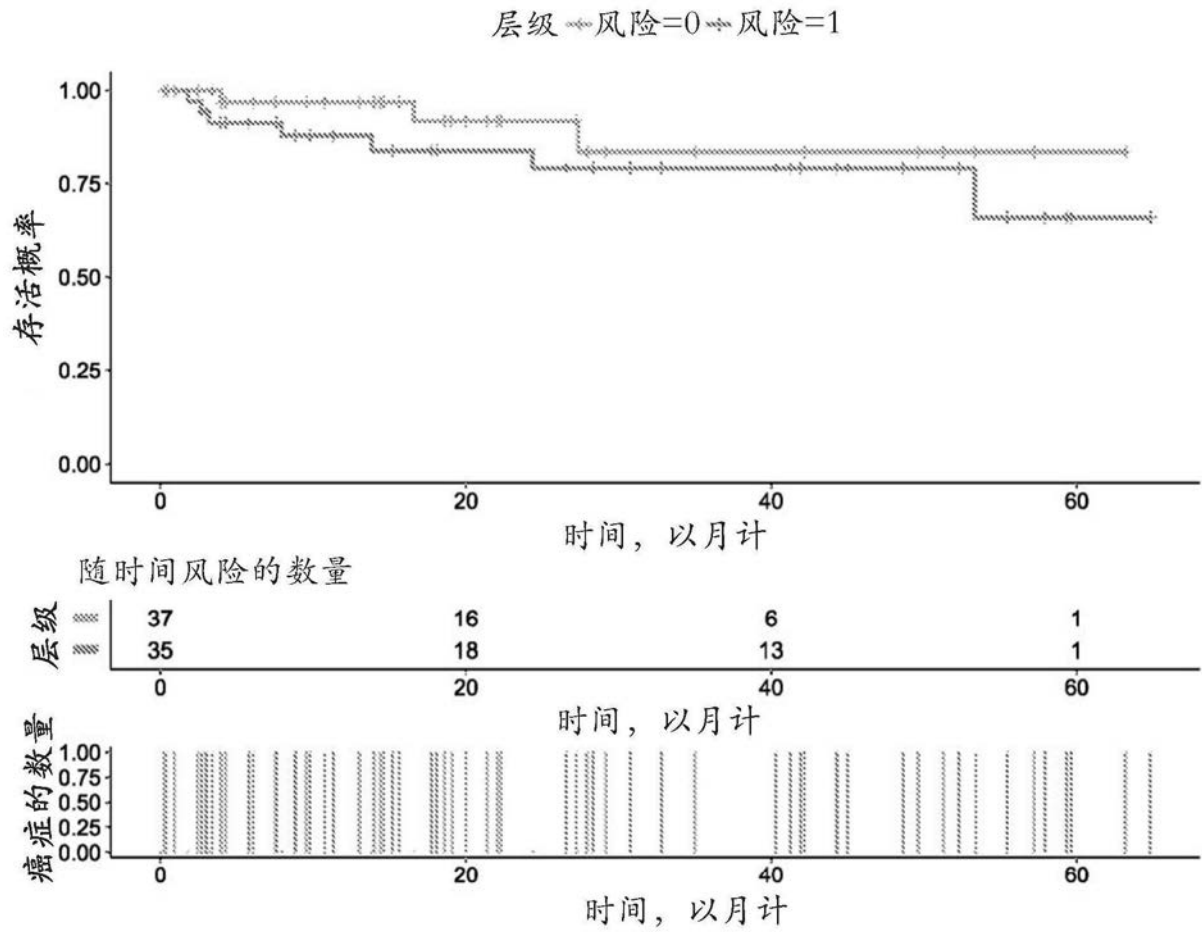


图13

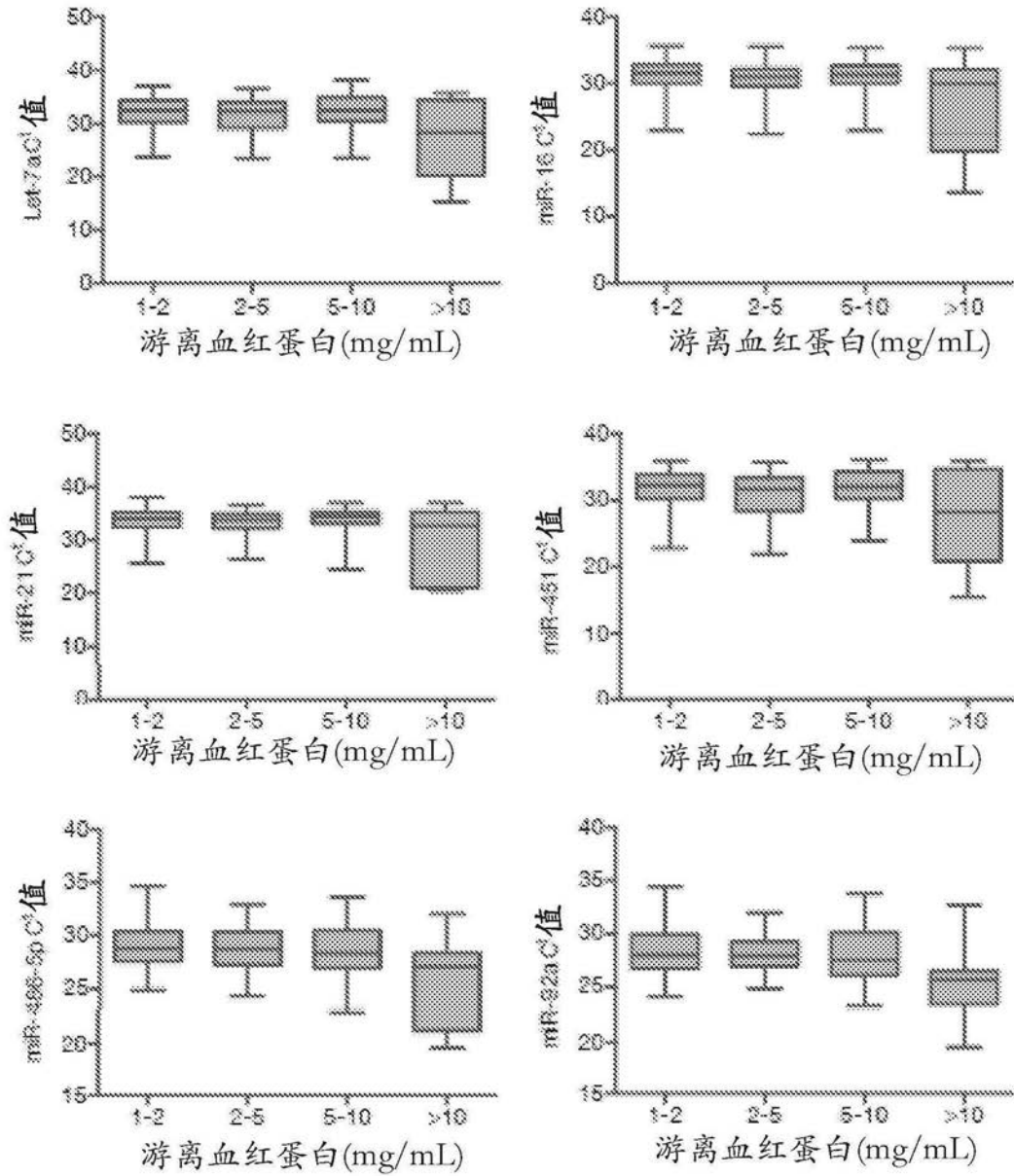


图14