



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102321584 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 08

(21) 申请号 201110195193. 7

(22) 申请日 2004. 12. 30

(30) 优先权数据

60/533, 505 2003. 12. 31 US

(62) 分案原申请数据

200480042148. 6 2004. 12. 30

(73) 专利权人 宾夕法尼亚州研究基金会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 萨默·阿尔-穆拉尼

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

C12N 5/09 (2010. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 01/12781 A1, 2001. 02. 22, 全文.

E. J. Moler et al.. Analysis of molecular

profile data using generative and
discriminative methods. 《Physiological
Genomics》. 2000, 第 4 卷 109-126.

Lu PY et al.. siRNA-mediated
antitumorigenesis for drug target
validation and therapeutics. 《Europe PubMed
Central》. 2003, 第 5 卷 (第 3 期), 225-234.

审查员 曹丙洲

权利要求书1页 说明书53页
序列表23页 附图59页

(54) 发明名称

预测并克服对卵巢癌化疗的抗性的方法及预测结肠癌发生的方法

(57) 摘要

本申请涉及预测并克服对卵巢癌化疗的抗性的方法及预测结肠癌发生的方法。本发明提供了预测卵巢癌患者的肿瘤是否对化疗有抗性的方法。本发明也提供了检测治疗、具体为化疗在治疗卵巢癌的患者中的有效性的方法。本发明还提供了通过降低所述细胞中化疗药物抗性来治疗卵巢癌的方法。另外, 本发明提供了筛选化合物的方法来鉴定对传统化疗方案有抗性的肿瘤细胞的肿瘤细胞生长抑制剂。

1. 由 SEQ ID NO:4 编码的 siRNA 分子作为在卵巢癌细胞中表达的细胞基因的抑制剂在制备用于通过与卵巢癌肿瘤细胞接触而降低肿瘤细胞对顺铂的抗性的药剂中的用途,其中所述受到抑制的细胞基因是 MetAP2,其中所述卵巢癌肿瘤细胞对顺铂的抗性在所述抑制剂存在时比所述抑制剂缺无时弱。

2. 由 SEQ ID NO:4 编码的 siRNA 分子作为在卵巢癌细胞中表达的细胞基因的抑制剂与顺铂组合在制备用于通过与卵巢癌肿瘤细胞接触而抑制肿瘤细胞生长的药物中的用途,其中所述受到抑制的细胞基因是 MetAP2。

预测并克服对卵巢癌化疗的抗性的方法及预测结肠癌发生的方法

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 12 月 30 日、中国申请号为 200480042148.6、发明名称为“预测并克服对卵巢癌化疗的抗性的方法及预测结肠癌发生的方法”的发明申请的分案申请。本申请涉及并权利要求 2003 年 12 月 31 日提交的系列号为 60/533,505 的美国临时申请的优先权,其公开在此全文引入作为参考。

[0002] 发明背景

[0003] 本发明涉及预测卵巢癌患者是否会对化疗有抗性的方法及确定是否个体患者患结肠癌的方法。本发明也涉及监测在接受卵巢癌治疗的患者中的治疗有效性的方法。本发明还涉及治疗卵巢癌及结肠癌的方法。另外,本发明涉及筛选能抑制肿瘤细胞,具体是卵巢癌细胞或结肠癌细胞的生长的化合物的方法。本发明也涉及具体在对常用化疗方案有抗性的卵巢癌细胞中,降低或抑制对化疗药物治疗或疗法的抗性的方法。

背景技术

[0004] 卵巢癌是死亡率达 60% 的致死性最强的妇科恶性肿瘤。对于此疾病的多个临床阶段的五年存活率如下:阶段 I > 90%,阶段 II = 80%,阶段 III = 20% 和阶段 IV = 10%; 在此疾病的较晚阶段存活率有显著的降低。对于此疾病的晚期 (advanced) 阶段的标准 (Standard-of-care) 治疗包括减少细胞数的手术后化疗。

[0005] 大多数患者存活的可能性低,因为所有患者中的大约 75% 是在疾病的阶段 III 和 IV 诊断的,且预后差与疾病在晚期阶段的晚诊断相关。对于现存的化疗剂的抗性是另一个主要问题。尽管在最初的治疗后 75% 的患者出现了完全临床反应 (complete clinical response), 大多数会疾病复发并需要再治疗。不幸的是,绝大多数会最终患化学抗性并死于此疾病。

[0006] 化学抗性是一种复杂的现象,它涉及多种基因和基因产物的表达和生物活性的改变。所述在反应性和非反应性个体差异表达的基因或基因家族可被用作分子标记物,来预测哪位患者可能会对临床中通常所用的具体化疗剂或其组合有抗性。另外,在化学抗性个体过表达的基因可以是抑制作用的靶标,它可能降低癌细胞对化疗剂或药剂 (agents) 的抗性。

[0007] 与卵巢癌一样,当疾病诊断得早时,患结肠直肠癌的患者的存活最好。如果癌症检出早,结肠癌患者的 5 年存活率大约为 90%; 不幸的是,尽管监测和预防手段增多,只有 37% 的癌症发现于早期阶段。当癌症在区域 (regionally) 扩散涉及到其他器官时,存活率降到大约 64%,并且在癌症转移后存活率急剧降低 (8%) (Cancer Facts and Figures 2002; American Cancer Society publication)。

[0008] 因此,在疾病进行的过程中需要及早鉴定出结肠癌和卵巢癌,并具体需要鉴定出化学抗性的癌症。更具体地,因为癌细胞的表现本领域公知,考虑到它们的致癌性 (tumorigenicity) 及它们对化疗药物的抗性是由具体基因的不完全确定的组和 (defined set) 的表达所介导的,所以本领域需要鉴定可作为卵巢癌中化学抗性的有效分子标记物的

基因及基因的集合 (collection) 或组, 以及为卵巢癌和结肠癌提供临床有效的治疗靶标的基因或基因组。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供了鉴定这样的基因的方法和试剂, 所述基因涉及对化疗药物治疗的抗性、或其表达受对化疗药物治疗的抗性的调控、或其中所述受调控的表达与对化疗药物治疗的抗性有关或导致该抗性。具体地, 本发明提供了这样的基因, 所述基因涉及对化疗药物治疗的抗性、或其表达受对化疗药物治疗的抗性调控, 或其中所述受调控的表达与对化疗药物治疗的抗性有关或导致该抗性, 以及多种基因的受调控基因表达的模式, 其中所述模式是化疗药物抗性细胞, 具体为药物抗性卵巢癌细胞的特征。本发明还提供了鉴定与一或多种所述基因的表达或活性相互作用或对其有影响的化合物的方法。本发明还提供了用作化疗剂的替代或与其联用的所述化合物, 所述化疗剂治疗卵巢癌, 具体治疗对通常的化疗有抗性或发展出抗性的癌症。本发明还提供了监测化疗的方法和试剂来鉴别其肿瘤对化疗剂是有抗性的或已变为有抗性的患者。

[0011] 本发明提供了鉴定化合物的方法, 所述化合物降低化疗药物抗性并抑制、推迟或预防有化疗剂抗性的肿瘤细胞、最优选卵巢癌细胞的生长, 所述方法包含如下步骤: (a) 使化疗药物抗性细胞接触被试化合物, 所述细胞在化疗药物存在的条件下生长了一段时间或在使得所述细胞对所述药物有抗性的化疗药物浓度条件下生长, 并且其中所述细胞表达至少一种在化学抗性卵巢癌细胞中过表达的基因, 其中所述过表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 (Calpain) 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 (Calponin) 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白 (Grancalcin), NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1 或 KIAA0082 (如表 1 所列 GenBank 登录号所鉴定); (b) 测定所述细胞的一或多种所述基因或基因产物在被试化合物存在或缺无时的表达或活性; 和 / 或 (c) 比较细胞生长和 / 或至少一种所述基因或基因产物在被试化合物存在或缺无时的表达或活性, 其中如果所述基因或基因产物在被试化合物存在时的表达或活性相对于所述基因在被试化合物缺无时的表达降低, 或如果细胞生长在所述化合物存在时受抑制, 或两种情况都出现, 那么该化合物被鉴定为抑制化学抗性肿瘤细胞生长的化合物。在某些具体实施方案中, 通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸 (基因) 探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0012] 本发明还提供鉴定这样的化合物的方法, 所述化合物可降低药物抗性并抑制、推迟或预防有化疗剂抗性的肿瘤细胞、最优选卵巢癌细胞的生长, 所述方法包含如下步骤: a) 使细胞接触被试化合物, 其中所述细胞在化疗药物存在的条件下生长了一段时间或在使得所述细胞对所述药物有抗性的化疗药物浓度下生长, 并且其中所述细胞表达与在化学敏感性细胞中的情况相比在化学抗性卵巢癌细胞中以较低水平表达的基因, 其中所述基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10 (如表 1 所列 GenBank 登录号所鉴定); b) 测定在被试化合物存在或缺无时所述细胞的细胞生长和 / 或基因表达或基因产物活性; 和 c) 比较在被试化合物存在或缺无时的基因表达或基因产物活性, 其中如果 (i) 所述基因的表达或基因产物的活性在被试化合物存在时相比所述基因的表达或基因产物的活性在被试化合物缺无时升高, 和 / 或 (ii) 如果细胞生长在所述化合物存在时受抑制, 和 / 或 (iii)

如果细胞生长受抑制且所述基因表达和 / 或活性升高,那么该化合物被鉴定为抑制化学抗性肿瘤细胞生长的化合物。在某些具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0013] 本发明提供了降低化疗药物抗性和 / 或抑制、推迟或预防肿瘤细胞生长的方法,所述方法包含使所述肿瘤细胞与细胞基因的至少一种抑制剂接触的步骤,所述步骤在化疗药物存在一段时间、或该化疗药物的浓度使得所述细胞在缺乏细胞基因抑制剂时对所述药物有抗性的条件下进行,其中所述细胞基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1 或 KIAA0082。在优选的具体实施方案中,所述肿瘤细胞是人肿瘤细胞,更优选卵巢癌细胞。在具体方面,根据本发明鉴定的一或多种基因用具体设计为靶向一或多种所述基因的反义 RNA 或 siRNA 分子来抑制。其他方面,所述基因的基因产物用这些蛋白的抑制剂来抑制。

[0014] 本发明提供了降低肿瘤细胞的药物抗性的方法,所述方法包含使所述肿瘤细胞与至少一种提高细胞基因的表达或活性的化合物接触的步骤,其中所述细胞基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10,所述步骤中的条件为化疗药物缺无或存在一段时间或该药物以使得可提高 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10 的表达或活性的化合物缺无时所述细胞对其有抗性的浓度存在。在优选的具体实施方案中,所述肿瘤细胞是人肿瘤细胞,更优选卵巢癌细胞。

[0015] 本发明也提供了抑制、推迟或预防肿瘤细胞生长的方法,所述方法包含使所述肿瘤细胞与至少一种提高细胞基因的表达或活性的化合物接触的步骤,其中所述细胞基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10,所述步骤中的条件为在化疗药物缺无或存在一段时间或该化疗药物以使得存在所述提高 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10 的表达或活性的化合物时的细胞增殖相对于该所述化合物缺无时的细胞增殖变慢或受抑制的浓度存在。在优选的具体实施方案中,所述肿瘤细胞是人肿瘤细胞,更优选卵巢癌细胞。

[0016] 另一方面,本发明提供了抑制、推迟或预防肿瘤细胞、最优选卵巢癌细胞生长的方法,所述方法包含使所述肿瘤细胞接触一或多种化疗剂与细胞基因的至少一种抑制剂的组合的步骤,其中所述细胞基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , WDR1, Fused toes, NM23D, 粒钙蛋白, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262MYM, HYA22, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, 或 KIAA0082。在一个具体方面,所述细胞基因是 MetAP2,所述化疗剂是基于铂的化疗剂(platinum-based),并且所述至少一种抑制剂是烟曲霉素(fumagillin)或烟曲霉素的衍生物。在另一个具体方面,所述细胞基因是需钙蛋白酶 2,所述化疗剂是基于铂的化疗剂,并且所述至少一种抑制剂是 N-乙酰基-亮氨酸酰基-亮氨酸酰基-正亮氨酸(N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal, ALLN)或其衍生物。表 1 所示细胞基因的抑制剂可以是,例如具体设计为靶向表 1 所示基因的 siRNA 分子或 shRNA 分子,或小分子抑制剂。

[0017] 另一方面,本发明提供了抑制、推迟或预防肿瘤细胞、最优选卵巢癌细胞生长的方法,所述方法包含使所述肿瘤细胞接触化疗剂或药剂与至少一种提高细胞基因的表达或活

性的化合物的步骤,其中所述细胞基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10。在优选的具体实施方案中,所述肿瘤细胞是人肿瘤细胞,更优选卵巢癌细胞。

[0018] 本发明也提供预测卵巢癌患者的肿瘤是否对化疗有抗性的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082;(b) 对应于在亚部分 (a) 中检测的一或多种被表达的基因或基因产物,检测所述一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在对照样本中的量,所述样本包括非肿瘤组织样本,最优选来自肿瘤来源的组织或来自对化疗反应良好的患者的组织样本,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082;和 (c) 比较在步骤 (a) 中测定的所述被表达的基因或基因产物的量和在步骤 (b) 中检测的所述被表达的基因或基因产物的量,其中如果步骤 (a) 中的检出量比步骤 (b) 中的检出量高至少 20% 的因数,那么预测所述患者对化疗有抗性。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。在具体方面,所述对照样本是得自对化疗有反应的癌症患者的生物样本。在某些具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0019] 在具体方面,当在来自癌症患者的生物样本中表达的 MetAP2 的测得量高于在对化疗药物有反应的个体中或在来自不患卵巢癌的个体的卵巢组织中的检出量时,所述方法可预测所述患者会对基于铂的化疗有抗性。

[0020] 本发明也提供预测卵巢癌患者的肿瘤是否对化疗有抗性的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1, 或 MPP10;(b) 对应于在亚部分 (a) 中检测的一或多种被表达的基因或基因产物,检测所述一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在对照样本中的量,其中所述被表达的基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10;和 (c) 比较在步骤 (a) 中测定的被表达的基因或基因产物的量和在步骤 (b) 中检测的被表达的基因或基因产物的量,其中如果在步骤 (a) 中的检出量比在步骤 (b) 中的检出量高至少 20%、更优选至少 50% 的因数,那么预测所述患者对化疗有抗性。在具体方面,所述对照样本是得自对化疗有反应的癌症患者的生物样本。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。在某些具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0021] 本发明还提供监测在卵巢癌患者、具体为接受化疗的卵巢癌患者中的疾病进展的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082;(b) 用随后收集自所述患者的生物

样本重复步骤 (a) ;和 (c) 比较步骤 (a) 中被表达的基因或基因产物的检出量和步骤 (b) 中被表达的基因或基因产物的检出量,其中通过检测被表达的基因或基因产物在随后收集的生物样本中的量相对于其在步骤 (a) 中的生物样本中的量的变化来监测疾病进展,并且在步骤 (b) 中所述被表达的基因或表达的基因产物的检出量高于步骤 (a) 中所述被表达的基因或基因产物的检出量时检测到疾病的进展。在某些具体实施方案中,所述患者在检测步骤 (a) 中的基因表达量与检测步骤 (b) 中的检出量之间的时期接受化疗或其他治疗。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。在优选具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0022] 本发明还提供监测在卵巢癌患者、具体为接受化疗的卵巢癌患者中的疾病进展的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10 ;(b) 用随后收集自所述患者的生物样本重复步骤 (a) ;和 (c) 比较步骤 (a) 中被表达的基因或基因产物的检出量和步骤 (b) 中被表达的基因或基因产物的检出量,其中通过检测被表达的基因或基因产物在随后收集的生物样本中的量相对于其在步骤 (a) 中的生物样本中的量的变化来监测疾病进展,并且在步骤 (b) 中所述被表达的基因或表达的基因产物的检出量低于或等于步骤 (a) 中所述被表达的基因或基因产物的检出量时检测到疾病的进展。在某些具体实施方案中,所述患者在检测步骤 (a) 中的基因表达量与检测步骤 (b) 中的检出量之间的时期接受化疗或其他治疗。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。在某些具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0023] 另外,本发明提供监测药物组合物作为治疗患者的癌症、具体为卵巢癌或结肠癌的药剂的有效性的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082 ;(b) 将一定量的药物组合物给予所述患者 ;(c) 用随后收集自所述患者的生物样本重复步骤 (a) ;和 (d) 比较步骤 (a) 中被表达的基因或基因产物的检出量和步骤 (c) 中被表达的基因或基因产物的检出量,其中通过检测被表达的基因或基因产物在随后收集的生物样本中的量相对于其在步骤 (a) 中的生物样本中的量的变化来监测所述药物组合物的有效性,并且其中在步骤 (c) 中所述被表达的基因或基因产物的检出量低于步骤 (a) 中所述被表达的基因或基因产物的检出量时,且在所述药物组合物存在时肿瘤生长下降(即减慢、推迟或抑制)时,所述药物组合物是有效的。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。在某些具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0024] 本发明也提供监测药物组合物作为治疗患者的癌症、具体为卵巢癌或结肠癌的药剂的有效性的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10 ;(b) 将一定量的药物组合物给予所述患者 ;(c) 用随

后收集自所述患者的生物样本重复步骤 (a) ;和 (d) 比较步骤 (a) 中被表达的基因或基因产物的检出量和步骤 (c) 中被表达的基因或基因产物的检出量,其中通过检测被表达的基因或基因产物在随后收集的生物样本中的量相对于其在步骤 (a) 中的生物样本中的量的变化来监测所述药物组合物的有效性,并且其中如果步骤 (c) 中所述被表达的基因或表达的基因产物的检出量高于步骤 (a) 中所述被表达的基因或基因产物的检出量,且在所述药物组合物存在时肿瘤生长下降(即减慢、推迟或抑制),所述药物组合物是有效的。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。在某些具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0025] 本发明也提供检测检测结肠癌的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 从动物、优选人获得生物样本;(b) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在所述生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, 或 MetAP2 ;(c) 检测在对照样本中检出的所述一或多种被表达的基因或基因产物的量,所述对照样本包括非肿瘤结肠组织样本;(d) 比较所述一或多种被表达的基因或基因产物在步骤 (b) 中的量和在步骤 (c) 中的量,其中如果步骤 (b) 中的量与步骤 (c) 中的量相比有差别,则可检出结肠癌。在步骤 (a) 中用的生物样本和步骤 (c) 中用的生物样本中检出的差别可以是一或多种所述基因的过表达,或可以是一或多种所述基因的缺乏或不足表达 (underexpression)。例如,如果 S100A10, S100A11, SPARC 和 / 或 MetAP2 在步骤 (b) 中的量比步骤 (c) 中的量高,和 / 或如果需钙蛋白酶 2 在步骤 (b) 中的量低于在步骤 (c) 中的量,则检出了结肠癌。在某些具体实施方案中,所述动物是人,优选患结肠癌的人。优选,所述生物样本是结肠组织样本,更优选息肉并更优选腺癌性息肉 (adenomatous polyp),它们在本领域常用作结肠筛选活性的组织样本。在某些具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0026] 在另一具体实施方案中,本发明提供了诊断动物、优选人的癌症和 / 或化疗药物抗性的方法,所述方法包含检测两或多种被表达基因或由其编码的基因产物的量的改变模式的步骤。在具体的具体实施方案中,所述被表达的基因是表 1 所示的基因。通常地,本发明的这些方法包含如下步骤:(a) 从动物、优选人获得生物样本;(b) 检测两或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在所述生物样本中的量,其中所述被表达的基因如表 1 所示;(c) 检测两或多种被表达的基因或基因产物在对照样本中的检出量;(d) 通过比较两或多种被表达的基因或基因产物在步骤 (b) 中的量和在步骤 (c) 中的量,确定所述两或多种被表达基因或由其编码的基因产物的量的改变模式,其中所述模式与癌症例如结肠或卵巢癌、或药物抗性例如顺铂 (cis-platin) 抗性相关。在某些具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0027] 本发明也提供了检测患卵巢癌的动物的化疗药物抗性的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述动物的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082 ;(b) 对应于在亚部分 (a) 中检测的所述多种被表达的基因或

基因产物,检测所述多种被表达的基因或由其编码的基因产物在对照样本中的量,所述对照样本包含非肿瘤卵巢组织或来自对化疗有反应的患者的肿瘤组织,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082 ;和 (c) 比较在步骤 (a) 中测定的所述被表达的基因或基因产物的量和步骤 (b) 中所述被表达的基因或基因产物的检出量,其中如果步骤 (a) 中的检出量比步骤 (b) 中的检出量高至少 20% 的因数,则预测所述患者对化疗有抗性。如本文所公开,其中在步骤 (a) 中的检出量比在步骤 (b) 中的检出量高至少 20% 的因数的多种所述基因,可限定对化疗药物有抗性的肿瘤样本所特有的基因表达模式。在具体方面,所述对照样本是得自对化疗有反应的患者的生物样本。优选地,一或多种所述基因的表达在步骤 (a) 中所检测的肿瘤样本中的水平比在步骤 (b) 中所检测的对照样本中的水平高。在优选的具体实施方案中,所述动物是人,最优选人癌症患者。如本文所公开,本发明还提供了预测对所述化疗药物的抗性的基因表达模式,条件是所述基因表达模式被检出。在优选的具体实施方案中,通过用对本发明所鉴定的多种基因产物特异的核酸(基因)探针或抗体等的阵列测定生物样本来检测基因表达。

[0028] 有利地,一些本文鉴定的基因从未被认识到与卵巢癌或结肠癌有关,并可证明是其干涉这些疾病的新靶标。

[0029] 通过下面对某些优选的具体实施方案及权利要求书更具体的描述,本发明的具体优选的具体实施方案将会变得明显。

[0030] 本发明涉及下述各项。

[0031] 1. 一种降低肿瘤细胞对化疗药物的抗性的方法,所述方法包含使所述肿瘤细胞接触细胞基因的至少一种调节剂的步骤,其中所述细胞基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, KIAA0082, MPP10, HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2 或 MT1 ;其中所述细胞对所述化疗药物的抗性在所述调节剂存在时比所述调节剂缺失时无时弱。

[0032] 2. 项 1 所述的方法,其中所述化疗药物是顺铂。

[0033] 3. 项 1 所述的方法,其中所述调节剂是抑制剂并且所述基因是 MetAP-2。

[0034] 4. 项 3 所述的方法,其中所述抑制剂是 siRNA。

[0035] 5. 项 4 所述的方法,其中所述 siRNA 是 SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6。

[0036] 6. 项 3 所述的方法,其中所述抑制剂是烟曲霉素或烟曲霉素的衍生物。

[0037] 7. 项 1 所述的方法,其中所述肿瘤细胞是卵巢癌肿瘤细胞。

[0038] 8. 项 1 所述的方法,其中所述调节剂是抑制剂并且所述基因是 SPARC。

[0039] 9. 项 8 所述的方法,其中所述抑制剂是 siRNA。

[0040] 10. 项 9 所述的方法,其中所述 siRNA 是 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :3。

- [0041] 11. 项 1 所述的方法,其中所述调节剂是抑制剂并且所述基因是需钙蛋白酶 2。
- [0042] 12. 项 11 所述的方法,其中所述抑制剂是 ALLN 或 ALLN 的衍生物。
- [0043] 13. 项 11 所述的方法,其中所述抑制剂是 siRNA。
- [0044] 14. 项 13 所述的方法,其中所述 siRNA 是 SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8 或 SEQ ID NO:9。
- [0045] 15. 项 1 所述的方法,其中所述调节剂是抑制剂并且所述基因是 S100A11。
- [0046] 16. 项 15 所述的方法,其中所述抑制剂是 siRNA。
- [0047] 17. 项 16 所述的方法,其中所述 siRNA 是 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12。
- [0048] 18. 项 1 所述的方法,其中所述调节剂是抑制剂并且所述基因是 S100A10。
- [0049] 19. 项 18 所述的方法,其中所述抑制剂是 siRNA。
- [0050] 20. 项 19 所述的方法,其中所述 siRNA 是 SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60 或 SEQ ID NO:61。
- [0051] 21. 项 1 所述的方法,其中所述调节剂是抑制剂并且所述基因是 KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , WDR1, Fused toes, NM23D, 粒钙蛋白, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, SRB1, 或 KIAA0082。
- [0052] 22. 项 21 所述的方法,其中所述抑制剂是 siRNA。
- [0053] 23. 项 22 所述的方法,其中所述 siRNA 是 SEQ ID NO:64-108 或 134-144 之一。
- [0054] 24. 一种抑制肿瘤细胞生长的方法,所述方法包含使所述肿瘤细胞接触一或多种化疗剂与细胞基因的至少一种抑制剂的组合的步骤,其中所述细胞基因是 SPARC, 需钙蛋白酶 2, S100A10, S100A11, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , WDR1, Fused toes, NM23D, 粒钙蛋白, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, SRB1, 或 KIAA0082。
- [0055] 25. 项 24 所述的方法,其中所述化疗剂是基于铂的化疗剂。
- [0056] 26. 项 24 所述的方法,其中所述至少一种抑制剂是 MetAP-2 活性的抑制剂。
- [0057] 27. 项 26 所述的方法,其中所述至少一种抑制剂是烟曲霉素或烟曲霉素的衍生物。
- [0058] 28. 项 24 所述的方法,其中所述肿瘤细胞是卵巢癌细胞。
- [0059] 29. 项 24 所述的方法,其中所述抑制剂是 siRNA。
- [0060] 30. 项 29 所述的方法,其中所述 siRNA 被鉴定为 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:59, SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61, 或 SEQ ID NO:64-108 或 SEQ ID NO:134-144 之一。
- [0061] 31. 一种预测卵巢癌患者的肿瘤是否对化疗药物有抗性的方法,所述方法包含如下步骤:
- [0062] (a) 检测一或多种被表达的基因或由该被表达的基因编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β ,

G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, KIAA0082, MPP10, HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2 或 MT1 ;

[0063] (b) 检测一种或对应的多种被表达的基因或由其编码的基因产物在对照样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, KIAA0082, MPP10, HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2 或 MT1 ;

[0064] (c) 比较所述被表达的基因或基因产物在步骤 (a) 中的检出量和所述被表达的基因或基因产物在步骤 (b) 中的检出量,

[0065] 其中当步骤 (a) 中的检出量与步骤 (b) 中的检出量相差至少 20% 的因数时,预测所述患者对所述化疗药物有抗性。

[0066] 32. 项 31 所述的方法,其中所述化疗是基于铂的化疗。

[0067] 33. 项 31 所述的方法,其中所述被表达的基因是 MetAP2 或 SPARC。

[0068] 34. 一种监测患者中卵巢癌的疾病进展的方法,所述方法包含如下步骤:

[0069] (a) 检测一或多种被表达的基因或由该被表达的基因编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, KIAA0082, MPP10, HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, 或 MT1 ;

[0070] (b) 用随后收集自所述患者的生物样本重复步骤 (a) ;和

[0071] (c) 比较所述被表达的基因或基因产物在步骤 (a) 中的检出量和所述被表达的基因或基因产物在步骤 (b) 中的检出量,其中如果所述步骤 (b) 中的检出量

[0072] i) 不低于步骤 (a) 中 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, Eif5, Eif2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1 或 KIAA0082 的检出量 ;并且

[0073] ii) 不超过步骤 (a) 中 MPP10, HMT1, NAIP, Eef1 ϵ , RAB22A, NCOR2, 或 MT1 的检出量,

[0074] 则认为所述癌症有进展。

[0075] 35. 项 34 所述的方法,其中所述被表达的基因是 Eif5 或 SPARC。

[0076] 36. 一种鉴定降低化学抗性肿瘤细胞的药物抗性的化合物的方法,所述方法包含如下步骤:

[0077] (a) 使细胞接触被试化合物及使细胞对其产生抗性的浓度的化疗药物,所述细胞表达在化学抗性卵巢癌细胞中过表达的基因,其中所述基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, Eif5, Eif2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082 ;

[0078] (b) 检测所述基因在所述被试化合物存在和缺无时的表达 ;和

[0079] (c) 比较所述基因在所述被试化合物存在和缺无时的表达,其中如果所述基因在所述被试化合物存在时的表达相对于所述基因在所述被试化合物缺无时的表达降低,且肿瘤细胞生长在所述化合物存在时下降,则该化合物被鉴定为抑制化学抗性肿瘤细胞生长的化合物。

[0080] 37. 一种鉴定降低化学抗性肿瘤细胞的药物抗性的化合物的方法,所述方法包含如下步骤:

[0081] (a) 使细胞接触被试化合物及使细胞对其产生抗性的浓度的化疗药物,所述细胞表达在化学抗性卵巢癌细胞中以低于正常的水平表达的基因,其中所述基因是 HMT1, NAIP, Eef1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10;

[0082] (b) 检测所述基因在所述被试化合物存在和缺无时的表达;和

[0083] (c) 比较所述基因在所述被试化合物存在和缺无时的表达,其中当所述基因在所述被试化合物存在时的表达相对于所述基因在所述被试化合物缺无时的表达升高,且肿瘤细胞生长在所述化合物存在时下降,该化合物被鉴定为抑制化学抗性肿瘤细胞生长的化合物。

[0084] 38. 一种监测药物组合物作为治疗患者中癌症的药剂的有效性的方法,所述方法包含如下步骤:

[0085] (a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调蛋白 2, RNPS1, Eif5, Eif2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, KIAA0082, 或 MPP10, HMT1, NAIP, Eef1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1;

[0086] (b) 给予所述患者一定量的所述药物组合物;

[0087] (c) 用随后收集自所述患者的生物样本重复步骤 (a);和

[0088] (d) 比较所述被表达基因或基因产物在步骤 (a) 中的检出量和所述被表达基因或基因产物在步骤 (c) 中的检出量,其中所述药物组合物的有效性通过检测所述被表达基因或基因产物在随后收集的生物样本中的量相对于在步骤 (a) 中所述生物样本中的量的变化来进行监测,且肿瘤细胞生长在所述组合物存在时下降。

[0089] 39. 一种检测结肠癌的方法,所述方法包含如下步骤:

[0090] (a) 从患者获得生物样本;

[0091] (b) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在所述生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, 或 MetAP2;

[0092] (c) 检测在对照样本中检出的所述一或多种被表达的基因或基因产物的量;

[0093] (d) 比较所述一或多种被表达的基因或基因产物在步骤 (b) 中的检出量和其在步骤 (c) 中的检出量;

[0094] 其中如果所述一或多种基因在步骤 (b) 中的检出量与所述一或多种基因在步骤 (c) 中的检出量不同,则认为检出结肠癌。

[0095] 40. 项 39 所述的方法,其中如果 S100A10, S100A11, SPARC, 或 MetAP2 在步骤 (b) 中的检出量相对于其在步骤 (c) 中的检出量增加,则认为检出结肠癌。

[0096] 41. 项 39 所述的方法,其中如果需钙蛋白酶 2 在步骤 (b) 中的检出量相比在步骤

(c) 中的检出量降低,则认为检出结肠癌。

[0097] 42. 项 1 所述的方法,其中所述调节剂是 siRNA 或 shRNA。

[0098] 43. 项 42 所述的方法,其中所述调节剂是 19,20 或 21 个核苷酸长的 siRNA。

[0099] 44. 项 42 所述的方法,其中所述调节剂是形成发夹环且臂是 19,20 或 21 个核苷酸长的 shRNA。

[0100] 附图简述

[0101] 图 1 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 S100A10 在对化疗药物抗性增加的卵巢癌细胞系中以升高的水平表达。

[0102] 图 2 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 S100A11 在对化疗药物抗性增加的卵巢癌细胞系中以升高的水平表达。

[0103] 图 3 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 S100A10 和 S100A11 的 mRNA 在对化疗抗性较强的患者肿瘤样本中水平相对在来自反应性较强的患者的样本中的水平升高。

[0104] 图 4 是定量实时 PCR 结果的图示,其显示 SPARC 在化学抗性细胞系中以升高的水平表达。

[0105] 图 5 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片,其显示 SPARCmRNA 在取自癌症已经复发的患者的样品中升高。

[0106] 图 6 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示需钙蛋白酶 2mRNA 的水平在化学抗性卵巢癌细胞系中升高。

[0107] 图 7 是 Northern 印迹结果的图示,显示粒钙蛋白 mRNA 在化学抗性细胞系中的水平相对于在对顺铂处理敏感的细胞系中的水平升高。

[0108] 图 8 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 MetAP2 蛋白质的表达在高度化学抗性的细胞系 OVCA429 中升高,并在对顺铂处理敏感的 Hey 细胞系中下调。

[0109] 图 9 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示在组织样本中的 MetAP2 蛋白质的表达,所述组织样本得自三个对基于顺铂的化疗抗性水平不同的患者。相比具有中等 (CAP2) 和低 (CAP1) 化疗抗性水平的患者,在患抗性最强的肿瘤 (CAP3) 的患者样本中 MetAP2 升高得最多。

[0110] 图 10 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示可检出 eIF5 的两种转录物,并且这两者的表达水平在对顺铂抗性水平最高的卵巢癌细胞系中是升高的。

[0111] 图 11 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示在肿瘤复发前 (CAP2) 和肿瘤复发后 (CAP2+) 的化学抗性患者肿瘤样本中的 eIF5 表达。

[0112] 图 12 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 eIF2B ϵ 的 mRNA 在化学抗性细胞系中升高。

[0113] 图 13 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 eEF1 ϵ mRNA 在对顺铂抗性最强的卵巢癌细胞系中下调。

[0114] 图 14 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示相对于敏感细胞系, SAPK/Erk1mRNA

水平在对顺铂有抗性的细胞系中升高。

[0115] 图 15 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 TESK2 mRNA 在对顺铂有抗性的细胞系中升高。

[0116] 图 16 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 FAST 激酶 mRNA 在对顺铂有抗性的细胞系中升高。

[0117] 图 17 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 KLK6 的表达水平在被试的对顺铂有抗性的细胞系中升高。

[0118] 图 18 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 HMT1 的表达水平在对顺铂有抗性的细胞中下调。

[0119] 图 19 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 ARA9 的 mRNA 在对顺铂有抗性的细胞系中升高。

[0120] 图 20 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示钙调蛋白 2 的表达在化学抗性细胞系中与在化学敏感的卵巢癌细胞系中相比升高。

[0121] 图 21 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示神经元细胞凋亡抑制型蛋白 (neuronal apoptosis inhibitory protein) 的基因表达在对顺铂抗性最强的细胞系中降低。

[0122] 图 22 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 RNPS1 水平在对顺铂有抗性的细胞系中升高。

[0123] 图 23 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 HSF2 的 mRNA 水平在化学抗性细胞系中升高。

[0124] 图 24 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 WDR1 的 mRNA 在化学抗性细胞系中的水平与在化学敏感细胞系中的水平相比升高。

[0125] 图 25 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 Ft1 mRNA 的水平在对顺铂有抗性的细胞系中升高。

[0126] 图 26 是显示 Northern 印迹分析结果的放射自显影照片及该 Northern 印迹结果的图示,显示 NME4mRNA 在化学抗性细胞系中升高。

[0127] 图 27 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 ADAR1 mRNA 在对顺铂有抗性的细胞系中升高。

[0128] 图 28 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 NBR1 mRNA 在化学抗性最强的细胞系 OVCA 429 中的水平与在其他被试细胞系中的水平相比升高。

[0129] 图 29 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示锌指蛋白 262 的 mRNA 在顺铂抗性最强的细胞系中相比其他被试细胞系升高。

[0130] 图 30 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 MRPL4 mRNA 在化学抗性细胞系中升高。

[0131] 图 31 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 HYA22 mRNA 在化学抗性细胞系中相比化学敏感的细胞系升高。

[0132] 图 32 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 vinexin β 的 mRNA 在化学抗性细胞

系中升高。

[0133] 图 33 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 G-CSFR 的 mRNA 在化学抗性细胞系中升高。

[0134] 图 34 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 SRB1 mRNA 在化学抗性细胞系中升高。

[0135] 图 35 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 IGFBP-7 mRNA 在化学抗性细胞系中升高。

[0136] 图 36 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 RAB22A mRNA 在化学抗性细胞系中降低并在反应性更强的细胞系中升高。

[0137] 图 37 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 KIAA0082 mRNA 的表达在化学抗性细胞系中升高。

[0138] 图 38 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 NCOR2 的 mRNA 在对顺铂有抗性的细胞系中的水平与敏感的细胞系中的水平相比降低。

[0139] 图 39 显示了基于 MTT 分析结果,根据五个卵巢癌细胞系对顺铂的敏感性水平对其进行的等级划分。

[0140] 图 40(上图)图示了浓度升高的烟曲霉素对暴露于该药物 4 小时后的 OVCA429 细胞存活的影响。下图图示在 0.1 μ g/ml 烟曲霉素存在时顺铂的作用增强,但当在 10 μ g/ml 烟曲霉素存在时用顺铂处理所述细胞 4 小时不导致顺铂作用的增强。

[0141] 图 41(上图)图示了浓度升高的烟曲霉素对暴露于该药物 8 小时后的 OVCA429 细胞存活的影响。

[0142] 图 41(下图)图示在 0.1 μ g/ml 烟曲霉素存在时顺铂的作用增强,但存在 10 μ g/ml 烟曲霉素时用顺铂处理所述细胞 8 小时不导致顺铂作用的增强。

[0143] 图 42(上图)图示了浓度升高的烟曲霉素对暴露于该药物 24 小时后的 OVCA429 细胞存活的作用。

[0144] 图 42(下图)图示在 0.1 μ g/ml 烟曲霉素存在时顺铂的细胞毒性作用增强,但当存在 10 μ g/ml 烟曲霉素时用顺铂处理细胞 24 小时不导致顺铂作用的增强。

[0145] 图 43 是三种 siRNA(#1, SEQ ID NO:4;#2, SEQ ID NO:5;和 #3, SEQ ID NO:6)的示意图,所述三种 siRNA 被设计为靶向 MetAP-2 信使 RNA 的不同区域。

[0146] 图 44 显示了通过定量实时 PCR 测定的 siRNA#1 对于 MetAP-2 在 OVCA429 中的表达水平的影响。

[0147] 图 45 图示在 siRNA#1 存在时将 OVCA 429 暴露于顺铂后,通过 MTT 分析测定对细胞存活定量。

[0148] 图 46 是进行 MTT 分析后含 OVCA429 细胞的 96 孔板的照片(定量显示在图 45),该照片显示顺铂对用 MetAP-2siRNA#1 转染的这些细胞的作用。

[0149] 图 47 是三种 siRNA(#1, SEQ ID NO:1;#2, SEQ ID NO:2;和 #3, SEQ ID NO:3)的示意图,所述三种 siRNA 被设计为靶向 SPARC 信使的不同区域。

[0150] 图 48 图示在用图 47 所示的 siRNAs 转染的 OVCA 429 细胞中的 SPARC 表达的定量实时 PCR 分析结果。

[0151] 图 49 是进行 MTT 分析后含 OVCA 429 细胞的 96 孔板的照片,来确定顺铂在 SPARC

siRNA#2 存在时对 OVCA 429 细胞的作用。

[0152] 图 50 图示 siRNA- 介导的 SPARC 基因表达降低对 OVCA 429 细胞的顺铂敏感性的影响。

[0153] 图 51 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 MT1 mRNA 在对顺铂最敏感的细胞系 (Hey) 中显著升高。

[0154] 图 52 显示了 Northern 印迹结果的图示,显示 MPP10 mRNA 随着对顺铂的敏感性的提高而增加。

[0155] 图 53 图示 siRNA- 介导的需钙蛋白酶 2 基因表达降低在 OVCA 429 细胞中的影响。

[0156] 图 54 图示需钙蛋白酶 2 siRNA#3 对 OVCA 429 细胞的顺铂敏感性的影响。

[0157] 图 55 图示需钙蛋白酶 2 抑制剂 ALLN 对 OVCA 429 细胞的顺铂敏感性的影响。

[0158] 图 56 图示 siRNA- 介导的 SA100A10 基因表达降低对 OVCA 429 细胞的顺铂敏感性的影响。

[0159] 图 57 图示 siRNAs 对 OVCA429 细胞中的 S100A11 基因 mRNA 表达水平的影响。

[0160] 图 58 图示在正常和结肠癌细胞 cDNA 中的 MetAp-2mRNA 表达水平。

[0161] 图 59 图示在正常和结肠癌细胞 cDNA 中的 SPARC mRNA 表达水平。

[0162] 图 60 图示在正常和结肠癌细胞 cDNA 中的 S100A11 mRNA 表达水平。

[0163] 图 61 图示在正常和结肠癌细胞 cDNA 中的 S100A10 mRNA 表达水平。

[0164] 图 62 图示在正常和结肠癌细胞 cDNA 中的需钙蛋白酶 -2mRNA 表达水平。

[0165] 图 63 显示肿瘤体积为两只裸鼠体重的函数,这两只裸鼠注射了 OVCAR-3 细胞 (15 百万 / 每次注射,得自美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Manassas, VA, 保藏号 HTB-161),并在 35 天后用顺铂以 4 μ g/kg 体重、通过 IP 注射、每周三次、持续处理 2 周,之后的 1 周不处理或用单独的生理盐水溶液作为对照来处理。

[0166] 图 64 是显示针对需钙蛋白酶 2 或 S100A11 的 siRNAs 在 OVCAR-3 细胞中的稳定表达的图。在对照道 (lane),在无处理或含有无关 GFP siRNA 的细胞 (cells without treatment or the irrelevant GFPsiRNA) 中测定两种 mRNA 的表达。需钙蛋白酶 2 和 S100A11 的 mRNA 表达在相关的 siRNA 道中明显降低。

发明内容

[0167] 本发明提供了抑制、推迟或预防肿瘤细胞生长的方法,所述方法包含在化疗药物以所述细胞产生抗性的浓度存在时使所述肿瘤细胞接触一或多种细胞基因的表达或活性的至少一种调节剂的步骤,其中所述细胞基因是表 1 所示的基因,并且其中使所述肿瘤细胞接触所述基因表达的调节剂会降低、抑制、推迟或预防所述肿瘤细胞的药物抗性。所述肿瘤细胞可以是例如,卵巢癌。在一个具体实施方案中,可以在体内接触所述肿瘤细胞 (例如未从患者取出的细胞)。

[0168] 本文所用术语“生物样本”包括但不限于得自动物、优选哺乳动物、最优选人的组织或体液。例如,生物样本可以是活体解剖材料、骨髓样本、血、血浆、血清或或其细胞级分,尿、唾液、泪液或来自生物来源的细胞。在一个具体实施方案中,所述哺乳动物是疑似患有或以前诊断出患有或需要筛查癌症、具体为卵巢癌或结肠癌的人。在某些具体实施方案中,生物样本是组织样本。

[0169] 本文所用术语“卵巢癌”据理解通常指上皮卵巢癌,其包括所有诊断为来自卵巢组织的人癌症的几乎 80% 的一些癌症。其余的癌症,包括源自种系 (germline) 的卵巢癌和透明细胞 (clear cell) 卵巢癌,是罕见并通常被误诊的。鉴于在这些少数肿瘤类型中也发现本文公开的基因表达的改变,本发明的方法和组合物可以适用于所述疾病。

[0170] 本文所用的基因表达或基因产物活性的“调节剂”可以是任何会造成基因表达或基因产物活性升高或降低的化学化合物、核酸分子、肽或多肽。在某些具体实施方案中,本发明的调节剂是造成一或多种细胞基因的表达或活性升高的化合物,所述一或多种细胞基因的表达或活性在对化疗剂有抗性的肿瘤细胞中是降低的;这些调节剂在本文被称为“活化剂”。在其他具体实施方案中,调节剂是一或多种细胞基因、具体为其表达在对化疗剂有抗性的肿瘤细胞中升高的基因的表达或活性的抑制剂;这些调节剂在本文被称为“抑制剂”。

[0171] 本文所用的“抑制剂”可以是任何能降低基因产物活性或直接干扰基因表达的化学化合物、核酸分子、肽或多肽,如抗基因产物的抗体。例如本发明的抑制剂能直接或间接地抑制基因编码的蛋白质的活性。直接抑制可通过,诸如结合蛋白质从而预防该蛋白质结合意向的靶标,如受体进行来实现。间接抑制可通过,诸如结合蛋白质的意向靶标,如受体或结合配偶体,从而阻断或降低所述蛋白质的活性来实现。并且,本发明的抑制剂可通过降低或抑制所述基因的表达等来抑制基因,这可通过干扰基因表达(转录、加工、翻译、翻译后修饰),例如通过干扰所述基因的 mRNA 并阻断所述基因产物的翻译或通过基因产物的翻译后修饰,或通过造成细胞内定位的改变来进行。

[0172] 本文所用的“活化剂”可以是任何能提高基因产物活性(例如通过稳定化所述基因产物,预防其蛋白水解降解或增强其酶活性或结合活性或直接活化基因表达)的化学化合物、核酸分子、肽或多肽。本发明的活化剂可直接或间接地增强基因编码的蛋白质的活性。直接活化可通过,诸如结合蛋白质从而增强该蛋白质与意向靶标,如受体的结合来实现。间接活化可通过,诸如结合蛋白质的意向靶标,如受体或结合配偶体,并增强活性,例如通过提高所述靶标的有效浓度来实现。并且,本发明的活化剂可通过,提高所述基因的表达来活化基因,这可通过例如提高基因表达(转录、加工、翻译、翻译后修饰),例如通过稳定化所述基因的 mRNA 或阻断所述 mRNA 转录物的降解,或通过基因产物的翻译后修饰,或通过造成细胞内定位的改变来进行。

[0173] 如本文所述,在化学抗性卵巢肿瘤细胞中的数种基因的表达显著不同于其在化学敏感卵巢肿瘤细胞中的表达。表 1 提供了用下面实施例中的所述的方法鉴定的所述基因的列表。该表也汇总了对广泛使用的化疗剂顺铂敏感或有抗性的细胞中的这些基因的表达模式。

[0174] 表 1

[0175]

GenBank 登录号#	名称	染色体位置	蛋白质信息	在细胞系中证实 的表达模式
BC015973	S100A10 p11 CLP11 依钙结合蛋白 (Calpactin) 1 轻链 42C	1q21.3	胞外型 96 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC001410	S100A11 S100C Calgizzarin	1q21.3	胞外型 105 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
AF261089	需钙蛋白酶 2 CANPL2 MCANP	1q41-q42.11	胞质型和细胞膜 型 700 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC004974	SPARC 骨粘连蛋白 BM-40	5q31.3-q33. 1	胞外型 303 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC013782	MetAP2 p67eIF2	12q22	胞质型 478 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加

[0176]

GenBank 登录号#	名称	染色体位置	蛋白质信息	在细胞系中证实 的表达模式
	MNPEP			
BC015525	KLK6 酶(Zyme) 甘油磷酸钙蛋 白酶(Neurosin Protease) M	19q13.33	胞外型 244 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	19q13.33	细胞核型 361 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而减少
U31913	ARA9 XAP2	11q13.3	胞质型 330 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
D83735	钙调理蛋白 2	19p13.3	胞质型 309 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
U19251	NAIP	5q13.1-13.2	胞质型 1403 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而减少
BC005291	eEF1ε p18	6p24.3-p25. 1	胞质型 174 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而减少
AF015608	RNPS1	16p13.3	胞质型	随着对顺铂的抗 性增强而增加
U49436	eIF5 eIF5A	14q32.32	胞质型 431 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC013590	eIF2Bε	3q27.1	胞质型 721 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
M65217	HSF2 HSTF2	6q22.31	胞质型和细胞核 型 536 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
AB010427	WDR1 NORI-1	4p16.1	胞质型 606 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC001134	Fused toes (Ft1)	16q12.2	未知的 292 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC004880	NM23D mn23-H4	16p13.3	线粒体型内膜空 间 187 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
U10439	ADAR1	1q21.1- q21.2	细胞核型 1226 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC005214	粒钙蛋白	2q24.2	胞质型/细胞膜 型 217 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC009808	NBR1	17q21.1- q21.31	966 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4	17p11.2-p12	胞质型 399 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加

[0177]

GenBank 登录号#	名称	染色体位置	蛋白质信息	在细胞系中证实 的表达模式
	MKK4 MAPKK4			
AB007885	锌指蛋白-262 MYM	1p32-p34.3	未知的	随着对顺铂的抗 性增强而增加
D88153	HYA22	3p21.3	未知的	随着对顺铂的抗 性增强而增加
AB049635	MRPL4 CGI-28	19p13.2	线粒体型	随着对顺铂的抗 性增强而增加
AF037261	Vinexin β	8p21.3	与细胞骨架相连	随着对顺铂的抗 性增强而增加
M59818	G-CSFR	1p35-34.3	细胞膜型或可溶 形式 836 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC015710	RAB22A	20q13.32	与膜相连 194 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而减少
BC017201	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	4q12	分泌型 282 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC011770	FAST 激酶	7q36.1	胞质型 549 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
AB057597	TESK2	1p34.1	细胞核型/与细 胞骨架相连	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	12q24.31	细胞膜型	随着对顺铂的抗 性增强而增加
BC031890	KIAA0082	6p21.1	未知的 836 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而增加
NM_00631 2	NCOR2	12q24	细胞核型 2517 个氨基酸	随着对顺铂的抗 性增强而减少
BC032338	MT1	16q13	大多数为细胞核 型, 可被分泌	随着对顺铂的抗 性增强而减少
X98494	MPP10	2p12-2p13.2	大多数为胞质 型, 可被分泌	随着对顺铂的抗 性增强而减少

[0178] 已经报道在表 1 中以粗体显示的染色体位置与卵巢癌有关 (Pejoic, 1995, Ann. Med. 27 :73-78)。

[0179] 在一个具体实施方案中, 表 1 所示细胞基因的抑制剂可以是, 例如, 小分子抑制剂, 抗体, 核酸如反义核酸, 短干扰 RNA (siRNA) 分子, 或短发夹 RNA (shRNA) 分子。另外, 这些抑制剂可以用本文所述的方法或用本领域已知方法具体地设计。例如针对表 1 所示的基因所编码的蛋白质的抗体, 具体为中和抗体并优选单克隆抗体, 可用如“Antibodies :A Laboratory Manual”by Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, 1988) 所述的常用手段来产生, 其引入本文作为参考。

[0180] 在具体的具体实施方案中,本发明的抑制剂是结合编码靶基因的 mRNA 的 siRNA,其中所述靶基因是表 1 所示的基因。

[0181] 在优选具体实施方案中,本发明提供的某些抑制剂是短干扰 RNA(siRNA) 种类(species)。本文所用术语“短干扰 RNA”或“siRNA”指能够起 RNA 干扰作用的双链核酸分子或“RNAi”,如下所述,例如 Bass,2001, Nature 411:428-429;Elbashir et al.,2001, Nature 411:494-498;和 Kreutzer 等,国际 PCT 公开号 WO 00/44895;Zernicka-Goetz 等,国际 PCT 公开号 WO 01/36646;Fire,国际 PCT 公开号 WO 99/32619;Plaetinck 等,国际 PCT 公开号 W000/01846;Mello and Fire,国际 PCT 公开号 WO 01/29058;Deschamps-Depaillette,国际 PCT 公开号 WO 99/07409;和 Li 等,国际 PCT 公开号 WO 00/44914。本文所用的 siRNA 分子不需被限制为那些仅包含 RNA 的分子,其还包括具有 RNAi 能力或活性的经化学修饰的核苷酸和非核苷酸。

[0182] 已经在多种体系中研究了短干扰 RNA 介导的 RNAi。Fire 等首先在 *C. elegans* 中观察 RNAi(1998, Nature 391:806)。Wianny and Goetz 描述了在小鼠胚胎中通过 dsRNA 介导的 RNAi(1999, Nature Cell Biol. 2:70)。Hammond 等描述了用 dsRNA 转染的果蝇细胞中的 RNAi(2000, Nature 404:293)。Elbashir 等描述了通过向培养的哺乳动物细胞(包括人胚胎肾细胞和 HeLa 细胞)中引入合成的 21 个核苷酸的 RNAs 的双链体而诱导的 RNAi(2001, Nature 411:494)。这些研究已经显示包含 21 个核苷酸的 siRNA 双链体在含有两个核苷酸 3' - 突出端时是最活跃的。而且,用 2' - 脱氧或 2' - O- 甲基核苷酸取代一或两条 siRNA 链会消除(abolish)RNAi 活性,而用脱氧核苷酸取代 3' - 末端 siRNA 核苷酸显示是可耐受的。在 siRNA 双链体中心的错配序列也显示会消除 RNAi 活性。另外,这些研究也表明切割点在靶 RNA 中的位置是由 siRNA 引导序列的 5' - 末端而不是 3' - 末端来限定的(Elbashir 等,2001, EMBO J. 20:6877)。其他研究表明 siRNA 双链体的靶 - 互补链上的 5' - 磷酸是 siRNA 活性所需的并且 ATP 在细胞中用于维持所述 siRNA 上的 5' - 磷酸部分(Nykanen 等,2001, Cell 107:309)。然而,缺乏 5' - 磷酸的 siRNA 分子在外源性引入时是有活性的,这提示 siRNA 构建体的 5' - 磷酸化可能在体内出现。化学修饰的 siRNA 可为了某种应用被直接注射到血流中。

[0183] 在某些具体实施方案中,本发明以允许本发明 siRNA 分子表达的方式,提供了包含编码至少一个所述 siRNA 分子的核酸序列的表达载体。例如所述载体可包含编码包含双链体的 siRNA 分子双链的序列。所述载体也可包含编码自身互补从而形成 siRNA 分子的单个核酸分子的序列。这些表达载体的非限制性实施例见下所述,Paul 等,2002, Nature Biotechnology 19:505;Miyagishi and Taira,2002, Nature Biotechnology 19:497;Lee 等,2002, Nature Biotechnology 19:500;和 Novina 等,2002, Nature Medicine, June 3, 2003 网上公开。

[0184] 在某些具体实施方案中,本发明的 siRNA 分子可包含递送载体,包括给予受试者的脂质体、载体和稀释剂及其盐等,并可在药物组合物中存在。递送核酸分子的方法如下所述,例如 Akhtar 等,1992, Trends Cell Bio. 2:139;Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar,1995, Maurer 等,1999, Mol. Membr. Biol. 16:129-140;Hofland and Huang,1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137:165-192;和 Lee 等,2000, ACS Symp. Ser. 752:184-192,其全部引入本文作为参考。Beigelman 等,美国专利

6, 395, 713 和 Sullivan 等, PCT WO 94/02595 进一步描述了递送核酸分子的常用方法。这些方案可用于递送几乎任何核酸分子。核酸分子可通过多种本领域技术人员已知的方法给予细胞,包括但不限于包裹在脂质体中、通过离子电渗 (iontophoresis)、或通过掺入其他递送载体,诸如水凝胶、环糊精 (cyclodextrins)、生物降解纳米胶囊 (nanocapsules) 及生物胶粘微球 (bioadhesive microspheres),或通过蛋白质性载体 (见例如 O' Hare and Normand, 国际 PCT 公开号 WO 00/53722)。

[0185] 或者,核酸/载体的组合可通过直接注射或通过使用输注泵来局部递送。直接注射本发明的核酸分子,无论是皮下、肌肉还是皮内,都可用标准针头和注射器方法进行,或通过无针头技术如 Conry 等,1999, Clin. Cancer Res. 5:2330-2337 和 Barry 等,国际 PCT 公开号 WO 99/31262 所述的那些。很多本领域内的实施例描述了通过渗透泵 (见 Chun 等, 1998, Neuroscience Letters 257:135-138, D' Aldin 等,1998, Mol. Brain Research 55:151-164, Dryden 等,1998, J. Endocrinol. 157:169-175, Ghirnikar 等,1998, Neuroscience Letters 247:21-24) 或直接输注 (Broaddus 等,1997, Neurosurg. Focus 3, article 4) 递送寡核苷酸的方法。其他递送途径包括但不限于口服递送 (如以药片或药丸的形式) 和/或经鞘内递送 (Gold, 1997, Neuroscience 76:1153-1158)。对于核酸递送和给予的更具体的描述见 Sullivan 等, PCT WO 94/02595, Draper 等, PCT W093/23569, Beigelman 等, PCT W099/05094, 和 Klimuk 等, PCT W099/04819, 其全部引入本文作为参考。

[0186] 或者,本发明的某些 siRNA 分子可以在细胞内从真核生物启动子表达 (见例如 Izant and Weintraub, 1985, Science 229:345; McGarry and Lindquist, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 83:399; Scanlon 等, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10591-5; Kashani-Sabet 等, 1992, Antisense Res. Dev. 2:3-15; Dropulic 等, 1992, J. Virol. 66:1432-41; Weerasinghe 等, 1991, J. Virol. 65:5531-4; Ojwang 等, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10802-6; Chen 等, 1992, Nucleic Acids Res. 20:4581-9; Sarver 等, 1990, Science 247:1222-1225; Thompson 等, 1995, Nucleic Acids Res. 23:2259; Good 等, 1997, Gene Therapy 4:45; Miyagishi 等, 2001, Nucleic Acids Research 29:2502; and Kunkel and Pederson, 1989 Nucleic Acids Research 17:7371)。那些本领域技术人员可认识到任何核酸都可用合适的 DNA/RNA 载体在真核生物细胞中表达。这些核酸的活性可通过它们通过有酶活性的核酸 (enzymatic nucleic acid) 从原始转录物释放而得到加强 (Draper 等, PCT WO 93/23569, 和 Sullivan 等, PCT WO 94/02595; Ohkawa 等, 1992, Nucleic Acids Symp. Ser. 27:15-6; Taira 等, 1991, Nucleic Acids Res. 19:5125-30; Ventura 等, 1993, Nucleic Acids Res. 21:3249-55; Chowrira 等, 1994, J. Biol. Chem. 269:25856)。

[0187] 在本发明的另一方面,本发明的 RNA 分子可以从插入 DNA 或 RNA 载体的转录单元表达 (见例如, Couture 等, 1996, TIG 12:510)。所述重组载体可以是 DNA 质粒或病毒载体。表达病毒载体的 siRNA 可以基于如下病毒来构建,例如但不限于腺伴随病毒、逆转录病毒、腺病毒、慢病毒或甲病毒 (alphavirus)。在另一具体实施方案中,基于 pol III 的构建体用来表达本发明的核酸分子 (见例如, Thompson, 美国专利 5, 902, 880 和 6, 146, 886)。能表达所述 siRNA 分子的重组载体可以如上递送并保持在靶细胞中。或者,可用提供核酸分子瞬时表达的病毒载体。必要时可重复给予这些载体。一旦表达,所述 siRNA 分子与靶 mRNA 相互作用并产生 RNAi 反应。可以全身给予表达 siRNA 分子的载体,如通过静脉内或肌

内给予,通过给予从受试者取出 (ex-planted) 之后重新导入 (reintroduction) 所述受试者的靶细胞,或通过任何其他可引入理想靶细胞的方法 (综述见 Couture 等,1996,TIG. 12:510)。

[0188] 在一个具体实施方案中,本发明提供了包含编码至少一个本发明 siRNA 分子的核酸序列的表达载体。所述表达载体可编码 siRNA 双链体的一或两条链,或单条自身杂交成 siRNA 双链体的自身互补链。编码所述 siRNA 分子的核酸序列可以允许所述 siRNA 分子表达的方式可操作地连接 (见例如 Paul 等,2002,Nature Biotechnology 19:505;Miyagishi and Taira,2002,Nature Biotechnology 19:497;Lee 等,2002,Nature Biotechnology 19:500;和 Novina 等,2002,Nature Medicine,online publication June 3)。本文所用术语“可操作地连接”指侧翼序列的排列,其中所述侧翼序列被构型或装配以执行它们通常的功能。因此,可操作地连接于编码序列的侧翼序列可以影响所述编码序列的复制、转录和/或翻译。例如,当启动子能指导编码序列的转录时,该编码序列可操作地与所述启动子连接。只要编码序列正确地发挥功能,侧翼序列就不需要与编码序列邻接。因此,例如间插型未翻译的但已转录的序列可存在于启动子序列和编码序列之间,并且所述启动子序列仍被认为是“可操作地连接于”所述编码序列。

[0189] 在另一方面,本发明提供了表达载体,其包含:a) 转录起始区 (例如真核生物 polI、II 或 III 起始区);b) 转录终止区 (例如真核生物 polI、II 或 III 终止区);和 c) 编码至少一个本发明 siRNA 分子的核酸序列;其中所述序列以允许所述 siRNA 分子表达和/或递送的方式可操作地连接于所述起始区和所述终止区。所述载体任选包括可操作地连接在编码本发明 siRNA 的序列的 5' 侧或 3' - 侧的蛋白质的开放阅读框架 (ORF) 和/或内含子 (间插序列)。

[0190] 所述 siRNA 分子序列的转录可以源自真核生物 RNA 聚合酶 I (pol I)、RNA 聚合酶 II (pol II) 或 RNA 聚合酶 III (pol III) 的启动子。pol II 或 pol III 启动子的转录物在所有细胞都以高水平表达;在已知细胞类型中已知的 polIII 启动子的水平依赖于存在于其旁边的基因调节序列 (增强子、沉默基因等等) 的性质。也使用原核生物 RNA 聚合酶启动子,前提是该原核生物 RNA 聚合酶在合适的细胞中表达 (Elroy-Stein and Moss,1990,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6743-7;Gao and Huang 1993,Nucleic Acids Res. 21:2867-72;Lieber 等,1993,Methods Enzymol. 217:47-66;Zhou 等,1990,Mol. Cell. Biol. 10:4529-37)。多个研究者已经阐述了从这些启动子表达的核酸分子可在哺乳动物细胞中发挥功能 (例如 Kashani-Sabet 等,1992,Antisense Res. Dev. 2:3-15;Ojwang 等,1992,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10802-6;Chen 等,1992,Nucleic Acids Res. 20:4581-9;Yu 等,1993,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6340-4;L' Huillier 等,1992,EMBO J. 11:4411-8;Lisziewicz 等,1993,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 90:8000-4;Thompson 等,1995,Nucleic Acids Res. 23:2259;Sullenger and Cech,1993,Science 262:1566)。更具体地,转录单元如源自编码 U6 小核 (snRNA)、转运 RNA (tRNA) 和腺病毒 VA RNA 的基因的那些,可用于在细胞中产生高浓度的所需 RNA 分子如 siRNA (Thompson 等,1995,Nucleic Acids Res. 23:2259;Couture 等,1996,TIG 12:510;Noonberg 等,1994,Nucleic Acid Res. 22:2830;Noonberg 等,美国专利 5,624,803;Good 等,1997,Gene Ther. b45;Beigelman 等,国际 PCT 公开号 WO 96/18736。上述 siRNA 转录单元可被掺入多种引入哺乳动物细胞的载体中,包

括但不限于质粒 DNA 载体、病毒 DNA 载体（如腺病毒或腺伴随病毒载体）、或病毒 RNA 载体（如逆转录病毒或甲病毒载体；综述见 Couture 等,1996, TIG 12:510）。

[0191] 在另一具体实施方案中,本发明以允许本发明 siRNA 分子表达的方式提供了包含编码至少一个所述 siRNA 分子的核酸序列的表达载体。在具体的具体实施方案中,所述表达载体包含:a) 转录起始区;b) 转录终止区;和 c) 编码所述 siRNA 分子的至少一条链的核酸序列;其中所述序列以允许所述 siRNA 分子表达和/或递送的方式可操作地连接于所述起始区和所述终止区。

[0192] 在另一具体实施方案中,所述表达载体包含:a) 转录起始区;b) 转录终止区;c) 开放阅读框架;和 d) 编码 siRNA 分子的至少一条链的核酸序列;其中所述序列可操作地连接到所述开放阅读框架的 3' - 末端;并且其中所述序列以允许所述 siRNA 分子表达和/或递送的方式可操作地连接于所述起始区、所述开放阅读框架和所述终止区。

[0193] 在另一具体实施方案中,所述表达载体包含:a) 转录起始区;b) 转录终止区;c) 内含子;和 d) 编码至少一个 siRNA 分子的核酸序列;其中所述序列以允许所述核酸分子表达和/或递送的方式可操作地连接于所述起始区、所述内含子和所述终止区。

[0194] 在另一具体实施方案中,所述表达载体包含:a) 转录起始区;b) 转录终止区;c) 内含子;d) 开放阅读框架;和 e) 编码 siRNA 分子的至少一条链的核酸序列;其中所述序列可操作地连接到所述开放阅读框架的 3' - 末端;并且其中所述序列以允许所述 siRNA 分子表达和/或递送的方式可操作地连接于所述起始区、所述内含子、所述开放阅读框架和所述终止区。

[0195] 在一个具体实施方案中,肿瘤细胞的生长通过使所述肿瘤细胞接触抑制 SPARC 的 siRNA 而受抑制。或者,所述肿瘤细胞可在化疗药物以所述肿瘤细胞有抗性的浓度存在时与 siRNA 接触。作为 SPARC 抑制剂的 siRNA 分子实例包括,例如:

[0196] AATCC TGT CCA GGT GGA AGT A (SEQ ID NO:1);

[0197] AAGCT CCA CCT GGA CTA CAT C (SEQ ID NO:2);和

[0198] AATGA CAA GTA CAT CGC CCT G. (SEQ ID NO:3)。

[0199] 在另一具体实施方案中,肿瘤细胞的生长通过使所述肿瘤细胞接触抑制 MetAP2/p67 的 siRNA 而受抑制。或者,所述肿瘤细胞可在化疗药物以所述肿瘤细胞有抗性的浓度存在时接触所述 siRNA。作为 MetAP2/p67 抑制剂的 siRNA 分子实例包括,例如:

[0200] AAAGA TCA GCA TTG GAA GAT A (SEQ ID NO:4);

[0201] AAGCA CAT CGA CAA GTT AGA A (SEQ ID NO:5);和

[0202] AAACA GTG CCG ATT GTG AAA G (SEQ ID NO:6)。

[0203] 在另一具体实施方案中,肿瘤细胞的生长通过使所述肿瘤细胞接触抑制需钙蛋白酶 2 的 siRNA 而受抑制。或者,所述肿瘤细胞可在化疗药物以所述肿瘤细胞有抗性的浓度存在时接触所述 siRNA。作为需钙蛋白酶 2 抑制剂的 siRNA 分子实例包括,例如:

[0204] AAGGC ATA CGC CAA GAT CAA C (SEQ ID NO:7);

[0205] AAAC TCT TCC TGA CGA ATC G (SEQ ID NO:8);和

[0206] AAACG CTA TTC AAG ATA TTT A (SEQ ID NO:9)。

[0207] 在另一具体实施方案中,肿瘤细胞的生长通过使所述肿瘤细胞接触抑制 S100A10 的 siRNA 而受抑制。或者,所述肿瘤细胞可在化疗药物以所述肿瘤细胞有抗性的浓度存在

时接触所述 siRNA。作为 S100A10 抑制剂的 siRNA 分子实例包括,例如:

[0208] AAATG GAA CAC GCC ATG GAA A(SEQ ID NO:59);

[0209] AAATT CGC TGG GGA TAA AGG C(SEQ ID NO:60);和

[0210] AATAA TGA AGG ACC TGG ACC A(SEQ ID NO:61)。

[0211] 本发明也提供抑制、推迟或预防肿瘤细胞的生长的方法,该方法包括使所述肿瘤细胞接触一或多种化疗剂与细胞基因的至少一种抑制剂的组合的步骤,其中所述细胞基因是表 1 所示的基因。优选,所述肿瘤细胞是卵巢癌细胞。化疗剂在本领域已知,其包括例如,顺铂、紫杉醇 (paclitaxel)、脱羧铂氨、表鬼臼毒吡喃葡萄糖苷 (etoposide)、六甲基胺 (hexamethylamine)、苯丙氨酸氮芥和蒽环类。

[0212] 在一个具体实施方案中,表 1 所示的细胞基因的抑制剂可以是小分子抑制剂。本文所用的术语“小分子”指具有小于大约 1500g/Mol 的分子量的分子。小分子可以是例如,小的有机分子、肽或肽样分子。举个例子,适合于本发明方法的小分子抑制剂可以是需钙蛋白酶抑制剂,如 PD 147631、(25,35)-反-环氧琥珀酰-L-亮氨酸-酰胺基-3-甲基丁烷乙酯 ((25,35)-trans-epoxysuccinyl-L-leucyl-amido-3-methylbutane ethyl ester), (E-64-d)、N-乙酰基-亮氨酸基-亮氨酸基-正亮氨酸 (ALLN)、N-乙酰基-Leu-Leu-Met-al (ALLM 或 $C_{19}H_{35}N_3O_4S$)、或 MDL 18270;或 MetAP-2 抑制剂,如 TNP-470 (也称为 AGM 1470 或 $C_{19}H_{28}ClNO_6$)、烟曲霉素 ($C_{26}H_{34}O_7$)、顺-烟曲霉素 (见 Kwon 等,2000, J. Antibiot. 53:799-806)、fumagalone (见 Zhou 等,2003, J. Med. Chem. 46:3452-3454)、或 ovalicin ($C_{16}H_{24}O_4$)。也见 Han 等,2000, Bioorganic & Medicinal Chem. Letters 10:39-43。

[0213] 在一个具体实施方案中,表 1 所示的细胞基因的抑制剂可以是如上所限定的抑制剂。可用抑制剂的任何组合,例如表 1 所示的具体基因的多重 (multiple) 抑制剂、每种抑制一或多种具体基因的抑制剂组合、或抑制表 1 所示多种基因的抑制剂、或其任意组合。

[0214] 在具体的具体实施方案中,本发明方法包含使肿瘤细胞接触 MetAP2 的抑制剂和基于铂的化疗剂的组合的步骤。如果药剂的主要组分是任选与紫杉醇 (taxol) 或环磷酰胺组合的顺铂或脱羧铂氨,那么化疗剂是“基于铂的化疗剂”。MetAP2 的抑制剂可以是,例如烟曲霉素或烟曲霉素的衍生物、或 MetAP2 siRNA 诸如但不限于 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、或 SEQ ID NO:6。

[0215] 本发明也提供了预测卵巢癌患者的肿瘤是否对化疗有抗性的方法。在这些具体实施方案中,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因如表 1 所示;(b) 检测所述一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在对照样本中的量,其中所述被表达的基因是表 1 所示的基因;和 (c) 比较在步骤 (a) 中测定的被表达的基因或基因产物的量和步骤 (b) 中被表达的基因或基因产物的检出量,其中如果步骤 (a) 中的检出量与步骤 (b) 中的检出量相差达至少 20% 的因数,那么预测所述患者对化疗有抗性。在一个具体实施方案中,该检出量可以是表 1 所示基因的 mRNA 的量或由表 1 所示基因编码的蛋白质的量。在另一具体实施方案中,所述对照样本是来自有反应的或正常的受试者的生物样本,即对治疗有反应的个体或无癌症如卵巢癌的个体。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。

[0216] 在一个具体实施方案中,步骤 (a) 和步骤 (b) 中被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ ,

HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082 的一或多种, 并且如果步骤 (a) 中所述被表达基因的量比步骤 (b) 中所述被表达基因的量高至少约 20%, 则预测患者的肿瘤对化疗有抗性。

[0217] 在具体的具体实施方案中, 步骤 (a) 和步骤 (b) 中被表达的基因是 Vinexin β , G-CSFR, KLK6, SPARC, HYA22, 需钙蛋白酶 2, SAPK/Erk1, SRB1, ADAR1, MRPL4, eIF5, eIF2B ϵ , WDR1, NM23D, 锌指蛋白 -262 MYM, RNPS1, S100A10, S100A11, 或 MetAP2 的一或多种, 并且如果步骤 (a) 中所述被表达基因的量比步骤 (b) 中所述被表达基因的量高至少约 20%, 则预测患者的肿瘤对化疗有抗性。

[0218] 在另一具体实施方案中, 步骤 (a) 和步骤 (b) 中被表达的基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MPP10, 或 MT1 的一或多种, 并且如果步骤 (a) 中所述被表达基因的量比步骤 (b) 中所述被表达基因的量低至少约 20%、优选约 50%, 则预测患者的肿瘤对化疗有抗性。

[0219] 在具体的具体实施方案中, 步骤 (a) 和步骤 (b) 中被表达的基因是 HMT1, eEF1 ϵ , NAIP, RAB22A 或 MT1 的一或多种, 并且如果步骤 (a) 中所述被表达基因的量比步骤 (b) 中所述被表达基因的量低至少 20%、优选 50%, 则预测患者的肿瘤对化疗有抗性。

[0220] 因此, 如本文所公开, 本发明提供了基因表达或基因产物活性的一或多种模式, 其包含多种差异 (即以较高或较低量) 表达的所述基因, 或其中由所述基因编码的蛋白质产物在化疗药物抗性卵巢肿瘤细胞中的活性与在正常 (即非肿瘤或化学敏感的) 细胞中的活性不同。根据本发明方法, 用所述差异的基因表达或蛋白质产物活性的模式来检测生物样本、最优选肿瘤样本中的化疗药物抗性细胞, 并因此在医生开始与高发病率和死亡率有关的无效疗程之前可用于预测来自个体的肿瘤的药物抗性。

[0221] 那些本领域一般技术人员应理解在本发明方法的实施中, 可评估在患者肿瘤样本中本发明鉴定的一或多种基因的表达。预计本发明鉴定的多种基因中的每一种都会显示在一部分、最优选很大一部分的分离自具体卵巢癌患者的个体肿瘤中用本文公开的方法检测到的差异性基因表达。也希望随显示本发明公开的差异性基因表达的所述被分析基因的数量增加, 用本发明预测方法获得的结果的可信度会增加。

[0222] 在一个具体实施方案中, 本发明方法可用于在实际上用化疗剂治疗病人之前筛选需要化疗的所述病人。因此, 本发明方法可用于筛选患者, 从而使护理者确定是否用具体化疗剂治疗该患者会无效。根据本发明方法预测为对化疗无抗性的患者是用化疗和 / 或表 1 所示基因的抑制剂治疗的候选者。根据本发明方法预测对化疗有抗性的患者可以是手术及其他和 / 或化疗联合表 1 所示基因的抑制剂、或其他治疗方法的候选者。

[0223] 在本发明方法的实施中, 检测基因表达可通过检测编码本发明鉴定的任何基因的 mRNA 在生物样本中表达的量, 例如通过杂交分析如 Northern 印迹或斑点印迹, 或通过扩增方法如聚合酶链式反应 (PCR), 更优选与 mRNA 到 cDNA 的逆转录 (RT-PCR) 结合, 甚更优选用本领域已知的方法作定量实时 RT-PCR, 这些在本文都具体作了描述。其它方法包括检测所述一或多种基因的蛋白质产物的量, 在非限制性实施例中通过用蛋白质特异性抗血清、更优选对本发明鉴定的任何具体基因特异的抗体、更优选单克隆抗体来分析生物样本。蛋白质表达水平也可通过分析生物样本中所述蛋白质产物的酶或抗原活性来确定。本发明也提

供了基因或抗体阵列来检测基因在化疗药物抗性肿瘤、具体为卵巢和结肠肿瘤中的过表达或不足表达,其中在所述阵列中的核酸探针或抗体的排列在肿瘤样本对化疗药物有抗性的时候产生了可识别的、优选机器可读的模式,和/或在肿瘤样本对化疗药物敏感的时候产生不同的可识别模式。

[0224] 例如,根据本发明方法,确定在来自患者的生物样本中表达的 MetAP2 的量,并与在患卵巢癌并对化疗有反应的人或患卵巢癌但不对化疗有反应的人中表达的 MetAP2 的量作比较。根据本文,如果化疗具有减小肿瘤体积或停止肿瘤生长的作用,那么此人对化疗“有反应”。另外,术语“有反应的患者”意指在手术切除后用化疗治疗并保持没有疾病的临床症状达至少 6 个月的个体。如果 MetAP2 在患者中的表达量等于或低于 MetAP2 在患卵巢癌并对化疗有反应的人中表达的量时,那么预测该患者对某种化疗剂(例如基于铂的化合物)有反应。如果 MetAP2 在患者中的表达量高于 MetAP2 在患卵巢癌并对化疗有反应的人中表达的量时,那么预测该患者对化疗剂有抗性。同样,如果 MetAP2 在患者中的表达量高于 MetAP2 在患有癌症但不对化疗有反应的人中表达的量时,那么预测该患者对化疗剂有抗性。

[0225] 如表 1 及下面的实施例所示, MetAP2 在卵巢癌中的表达增加与对基于铂的化疗剂顺铂的抗性增加有关。所以,在一个具体实施方案中,当 MetAP2 在来自癌症患者的生物样本中表达的测得量高于在有反应个体中检出的预确定量时,本发明方法可预测患者的肿瘤会对基于铂的化疗有抗性。在另一具体实施方案中,当测定的 MetAP2 在来自癌症患者的生物样本中的表达量等于在有反应个体中检出的预确定量,但其中一或多种基因的表达比在有反应患者中的表达增加,其中所述基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, KLK6, ARA9, 钙调蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082, 和/或一或多种 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10 基因的表达相比在有反应患者中的表达降低时,本发明方法可预测患者的肿瘤会对基于铂的化疗有抗性。

[0226] 本发明还提供监测在卵巢癌患者、具体为接受化疗的卵巢癌患者中的疾病进展的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, KIAA0082, MPP10, HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2 或 MT1;(b) 用随后收集自所述患者的生物样本重复步骤(a);和(c) 比较步骤(a)中被表达的基因或基因产物的检出量和步骤(b)中被表达的基因或基因产物的检出量,其中通过检测被表达的基因或基因产物在随后收集的生物样本中的量相对于其在步骤(a)中的生物样本中的量的变化来监测疾病进展。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。

[0227] 如本文所述,当步骤(a)和(b)中被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1 或 KIAA0082, 并且步骤(b)中所述被表达基因

或基因产物的检出量高于步骤 (a) 中所述被表达基因或基因产物的量时,检测到疾病的进展。在某些具体实施方案中,所述患者在检测步骤 (a) 中的基因表达量与检测步骤 (b) 中的检出量之间的时期接受化疗或其他治疗。

[0228] 如本文所述,当步骤 (a) 和 (b) 中被表达的基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10, 并且步骤 (b) 中所述被表达基因或基因产物的检出量低于步骤 (a) 中所述被表达基因或基因产物的量时,检测疾病的进展。

[0229] 在某些具体实施方案中,所述患者在检测步骤 (a) 中的基因表达量与检测步骤 (b) 中的检出量之间的时期接受化疗或其他治疗。在某些具体实施方案中,所述检出量可以是表 1 所示的基因的 mRNA 的量或表 1 所示的基因编码的蛋白质的量。

[0230] 根据本发明监测患者的卵巢癌进展的方法可用于,例如确定患者是否对某种治疗方案,如化疗方案有正或负反应 (responding positively or negatively)。

[0231] 例如,当 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082 在取自开始某治疗方案后患者的生物样本中的表达量与在所述治疗方案开始前或开始时所取的生物样本中所述基因的表达量相比相等或较高时,该患者有负反应。另一实施例中,当 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10 在患者开始某治疗方案后取自该患者的生物样本中的表达与所述被表达基因在所述治疗方案开始前或开始时所取的生物样本中的量相比相等或较低时,该患者有负反应。此时,护理者可确定该治疗方案不太有效。

[0232] 或者,当 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082 在患者开始某治疗方案后一段时间取自该患者的生物样本中的表达比所述被表达基因在所述治疗方案开始前或开始时所取的生物样本中的量低时,该患者有正反应,并且不需要改变治疗。另外,当 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10 在患者开始某治疗方案后一段时间取自该患者的生物样本中的表达比所述被表达基因在所述治疗方案开始前或开始时所取的生物样本中的量高时,该患者有正反应。

[0233] 另外,本发明提供监测药物组合物作为治疗患者癌症的药剂的有效性的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082;(b) 将一定量的药物组合物给予所述患者;(c) 用随后收集自所述患者的生物样本重复步骤 (a);和 (d) 比较步骤 (a) 中所述被表达的基因或基因产物的检出量和步骤 (c) 中所述被表达的基因或基因产物的检出量,其中通过检测所述被表达的基因或基因产物在随后收集的生物样本中的量相对于其在步骤 (a) 中的生物样本中的量的变化来监测所述药物组合物的有效性。如果基因表达在用所述药物组合物治疗后收集的生物样本中相比在用所述药物组合物治疗前收集的生物样本

中较高或相等,并且在用所述药物组合物治疗过程中肿瘤生长未变慢、推迟或被抑制,所述药物组合物可被认为对于治疗所述患者的癌症是无效的。例如,如果 S100A10 mRNA 在取自用药物组合物治疗后的患者的样本中的量较高,那么预测该患者对于用该药物组合物进一步治疗是有抗性的。因此,该药物组合物被认为对于所述患者的癌症无效。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。

[0234] 本发明还提供监测药物组合物作为治疗患者癌症的药剂的有效性的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 检测一或多种被表达的基因或由其编码的基因产物在取自所述患者的生物样本中的量,其中所述被表达的基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10;(b) 将一定量的药物组合物给予所述患者;(c) 用随后收集自所述患者的生物样本重复步骤(a);和(d) 比较步骤(a)中所述被表达的基因或基因产物的检出量和步骤(c)中所述被表达的基因或基因产物的检出量,其中通过检测所述被表达的基因或基因产物在用所述药物组合物治疗后收集的生物样本中相对于在步骤(a)中用的生物样本(即在用所述药物组合物治疗前)中的量的变化来监测所述药物组合物的有效性。如果一或多种所述基因的基因表达在随后收集的生物样本(即在用所述药物组合物治疗后收集)中相比在之前收集(即在用所述药物组合物治疗前收集)的生物样本中较低或相等,并且在用所述药物组合物治疗中肿瘤生长未变慢、推迟或被抑制,所述药物组合物可被认为对于治疗所述患者的癌症无效,并且预测该患者对于用该药物组合物进一步治疗有抗性。因此,该药物组合物被认为对于该患者的癌症无效。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。

[0235] 本文所用的“药物组合物”可以是包含化合物的任何配制剂(例如蛋白质、肽、肽模拟物、非肽有机分子、无机小分子、或核酸分子),所述化合物用于治疗或检测治疗癌症如结肠或卵巢癌的能力。

[0236] 本发明也提供鉴定抑制肿瘤细胞、具体为化学抗性肿瘤细胞、最具体为化学抗性卵巢癌细胞的生长的化合物的方法。在这些具体实施方案中,所述方法包含如下步骤:(a) 使表达在化学抗性卵巢癌细胞中过表达的一或多种基因的细胞接触被试化合物,其中所述基因是 S100A10, S100A11, 需钙蛋白酶 2, SPARC, MetAP2, KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , HSF2, WDR1, Fused toes, NM23D, ADAR1, 粒钙蛋白, NBR1, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262 MYM, HYA22, MRPL4, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, FAST 激酶, TESK2, SRB1, 或 KIAA0082;(b) 检测所述基因在所述被试化合物存在和缺无时的表达;和(c) 比较所述基因在所述化合物存在时的表达和所述基因在所述被试化合物缺无时的表达,其中当所述基因在所述被试化合物存在时的表达相对所述基因在所述被试化合物缺无时的表达降低时,该化合物被鉴定为抑制化学抗性肿瘤细胞生长的化合物。在具体方面,所述生物样本是肿瘤样本。在某些具体实施方案中,所述化合物能在化疗药物存在时抑制肿瘤细胞的生长。

[0237] 另外,本发明提供了鉴定抑制肿瘤细胞、具体为化学抗性肿瘤细胞、最具体为化学抗性卵巢癌细胞的生长的化合物的方法,所述方法包含如下步骤:(a) 使表达在化学抗性卵巢癌细胞中以低于正常的水平表达的一或多种基因的细胞接触被试化合物,其中所述基因是 HMT1, NAIP, eEF1 ϵ , RAB22A, NCOR2, MT1 或 MPP10;(b) 检测所述基因在所述被试化合物存在和缺无时的表达;和(c) 比较所述基因在所述被试化合物存在时和缺无时的表达,其中当所述基因在所述被试化合物存在时的表达相对所述基因在所述被试化合物缺无时的表达升高时,该化合物被鉴定为抑制化学抗性肿瘤细胞生长的化合物。在一个具体实施

方案中,所述化合物能在化疗药物存在时抑制肿瘤细胞的生长。

[0238] 如下实施例,包括所进行的试验及获得的结果,均仅为举例的目的来提供,并非旨在限制本发明。

实施例

[0239] 实施例 1

[0240] MTT 细胞增殖分析

[0241] 利用 MTT 细胞增殖分析,根据五种卵巢癌细胞系 (OVCA 429,OVCA 433,OVCA 432,HEY 和 HEYA8) 对顺铂的敏感性水平来对其进行分级。

[0242] 使细胞在含 5 % 胎牛血清 (FBS, 热灭活), 1 % 抗生素 / 抗真菌的混合物 (Invitrogen) 的极限 Eagle's 培养基 (Minimal Eagle's Media, MEM α , 得自 Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) 中生长。通过将染料溶解于 HBSS (Hank's 平衡盐溶液 (Hank's Balanced Salt Solution)), 过滤该混合物并在 -20°C 以 1ml 等份贮存, 来制备 MTT 母液 (5mg/mL; CALBIOCHEM, San Diego, CA)。每 9ml 培养基使用 1ml 的 MTT 母液 (总体积 10ml)。用不透明的盖覆盖平板来使细胞避光。

[0243] 将每个细胞系用 5, 25, 50, 100 和 200 μ M 顺铂处理 4, 8 和 24 小时。在 96 孔板上用顺铂处理后 96 小时后进行 MTT 分析。从所述细胞中取出培养基并将 200 μ l 新鲜 MTT 培养基加入所述细胞以及作对照的空白孔。在正常细胞培养条件温育细胞 3-4 小时。然后检查细胞的甲月替晶体形成, 这是代谢活性的指标。取出培养基并向孔和对照孔加入 200 μ l 的 2- 丙醇。在所有晶体都均匀溶解后, 在黑暗中于室温温育所述细胞 20 分钟。在 570nm 在微量培养板读数器 (reader) 上读结果。

[0244] 图 39 (上图) 显示了在这些研究中使用的 5 个卵巢癌细胞系暴露于不同浓度的顺铂 4 小时之后的 MTT 分析结果。根据每个细胞系在整个顺铂浓度范围及所用的处理时间中的表现, 以降低的抗性水平将这些细胞划分等级为 OVCA 429 < OVCA 433 < HEYA8 < OVCA 432 < HEY (下图)。

[0245] 对于具体基因, 基本如上述进行包括使细胞暴露于 siRNA 或药物抑制剂的 MTT 分析。所述细胞在用 0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 和 200 μ M 顺铂处理 24 小时前预先用 siRNAs 处理 48 小时。对于组合型药物处理试验 (烟曲霉素或 ALLN), 使所述细胞接受浓度增加的所述被试药物及 0, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 和 200 μ M 顺铂的组合治疗 24 小时。

[0246] 实施例 2

[0247] cDNA 微阵列, Northern 印迹, 和定量实时 PCR 分析

[0248] 用实施例 1 所述的细胞系进行微阵列分析。从每个细胞系收集细胞沉淀物 (pellet), 并通过将沉淀物溶解在 1ml TRI-Reagent (得自 Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, OH) 或 Trizol (Invitrogen) 中来从所述细胞分离 RNA。然后将样本静置 5 分钟。通过向样本加入 100 μ l 的 1- 溴 -3- 氯丙酮 (BCP) 来完成相分离。振摇 15 秒后, 在室温温育样本 15 分钟, 然后在 4-25°C 以 13,000RCF 离心 16 分钟。用移液管移取上清并置于新的微量离心 (microfuge) 管中。然后通过将此上清与 500 μ 新鲜异丙酮混合、在室温温育 10 分钟、再在 4-25°C 以 13,000RCF 离心 9 分钟来沉淀 RNA。然后从试管中取出上清, 通过向试管加入 1ml 的 75% 乙醇、涡旋振荡、再在 4-25°C 以 13,000RCF 离心 6 分钟来洗涤

沉淀物。取出液体并空气干燥所述沉淀物约 8 分钟。所述然后将沉淀物溶解于无 RNase 的水中并置于冰上待用或贮存于 -80°C 。

[0249] 用包含已确认超过 5000 个序列的 cDNA 克隆的微阵列 (得自 Research Genetics Inc.) 来研究 (interrogate) 在这些细胞中的基因表达;根据生产者的说明书进行所有的微阵列分析。已知在卵巢组织中表达每个克隆。用在抗性最强的细胞系 (OVCA 429) 中的基因表达作为在其他所比较细胞系中的基因表达的标准。这些数据的分析表明 OVCA 429 相对于更敏感的细胞系以升高的水平表达了 196 个基因并以降低的水平表达了 83 个基因。

[0250] 选择满足如下标准的基因作进一步分析:其表达与在双份膜上检出的标准相比有至少 2- 倍的差异;在 4 个细胞系中的 3 个检出其相对于标准 (OVCA 429) 的差异表达;和其表达水平与每个细胞系对顺铂的敏感性一致。过表达的基因在 OVCA429 细胞中表达很高,并且表达通常递减 (tapered off) 直到在抗性最弱的细胞系 HEY 中达到了最低的表达水平 (对于在 OVCA 429 细胞中以较低水平表达的基因反之亦然)。

[0251] 将与在其它细胞系中的情况相比在抗性最强的细胞系 (OVCA 429) 中差异表达 (较高或较低的水平) 的基因的 Northern 印迹分析和定量实时 PCR 分析用于确认微阵列的数据并鉴定目的基因来作进一步分析。所鉴定出的基因列于表 2,表中显示了基因名称,在细胞系中的表达模式的总结,及显示表达分析结果的图。

[0252] 表 2

[0253]

GenBank 登 录号#	GeneCard cDNA id #	名称	在细胞系中证实的 表达模式	图
BC015973	756595	S100A10 p11 CLP11 依钙结合蛋白 1 轻 链 42C	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	1
BC001410	810612	S100A11 S100C Calgizzarin	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	2
AF261089	549728	需钙蛋白酶 2 CANPL2 mCANP	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	6
BC004974	250654	SPARC BM-40	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	4
BC013782	39093	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	8
BC015525	809784	KLK6 酶甘油磷酸钙蛋白 酶 M	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	17
AF222689	246120	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	伴随对顺铂的抗性 增强而减少	18

[0254]

GenBank 登录号#	GeneCard cDNA id #	名称	在细胞系中证实的表达模式	图
U31913	814731	ARA9 XAP2	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	19
D83735	713886	钙调蛋白 2	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	20
U19251	1046522	NAIP	伴随对顺铂的抗性 增强而减少	21
BC005291	306921	eEF1ε P18	伴随对顺铂的抗性 增强而减少	13
AF015608	897594	RNPS1	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	22
U49436	884867	eIF5 Eif5A	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	10
BC013590	1630998	EIF2Bε	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	12
M65217	669443	HSF2 HSTF2	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	23
AB010427	714196	WDR1 NORI-1	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	24
BC001134	321247	Fused-toes (Ft1)	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	25
BC004880	203003	NM23D nm23-H4	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	26
U10439	950367	ADAR1	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	27
BC005214	34140	粒钙蛋白	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	7
BC009808	882511; M17S2	NBR1	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	28
L36870	726147	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	14
AB007885	427980	锌指蛋白-262 MYM	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	29
D88153	123980	HYA22	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	31
AB049635	824568	MRPL4 CGI-28	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	30
AF037261	1636620	Vinexin β	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	32
M59818	809639	G-CSFR	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	33
BC015710	838636	RAB22A	伴随对顺铂的抗性	36

[0255]	GenBank 登录号#	GeneCard cDNA id #	名称	在细胞系中证实的表达模式	图
				增强而减少	
	BC017201	68605	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	35
	BC011770	345077	FAST 激酶	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	16
	AB057597	845441	TESK2	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	15
	BC022087	756687	SRB1 CLA1 CD36L1	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	34
	BC031890	825293	KIAA0082	伴随对顺铂的抗性 增强而增加	37
	NM_006312	743230; NCOR2	NCOR2	伴随对顺铂的抗性 增强而减少	38
	BC032338	297392	MT1	伴随对顺铂的抗性 增强而减少	51
	X98494	825214	MPP10	伴随对顺铂的抗性 增强而减少	52

[0256] *GeneCard是在Rehovot,以色列的Weizmann Institute of Science的注册商标,并且在任何时候可以做多次转让。

[0257] Northern 印迹分析

[0258] 为确认微阵列分析鉴定的表达模式,根据生产商的说明书,用 NorthernMax Protocol(Ambion Corp., Austin, TX) 来进行 Northern 印迹分析,且 DNA 探针用 Strip-EZ DNA 标记试剂盒(Ambion)来标记。

[0259] 定量实时 PCR

[0260] 合成 cDNA 是通过将 1 μ g 从卵巢癌细胞系分离的总细胞 RNA, 1 μ l oligodT 和水混合至最终体积 12 μ l, 在 70 $^{\circ}$ C 温育此混合物 10 分钟, 然后向该混合物加入 5 μ l 2X Reaction Mix, 2 μ l DTT, 和 1 μ l 的 Superscript II Enzyme(Invitrogen)。然后在 42 $^{\circ}$ C 温育此反应混合物 60 分钟。制备从 1 : 4 到 1 : 256 的 cDNA 稀释物。用 Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR Handbook(Qiagen Corp., Valencia, CA) 制备终体积为 50 μ l/ 孔的主混合物(master mixes)。对于平板所用的每个孔, 将 25 μ l 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix(Qiagen), 0.3 μ M 正向引物, 0.3 μ M 反向引物, 和无 RNase 的水加至终体积 45 μ l。

[0261] 将每个基因的主混合物充分混合, 并将合适的体积如下分散到 PCR 试管或平板中: 无模板(对照) = 45 μ l 主基因混合物 + 5 μ l H₂O; 缓冲液空白 = 25 μ l H₂O + 25 μ l SYBR 混合物; 及被试样本 = 45 μ l 主基因混合物 + 5 μ l cDNA(如上稀释)。

[0262] 用 ABI Prism 7700(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 序列检测系统或 MJ Research(Waltham, MA) Opticon II 系统如下确定序列: 在 95 $^{\circ}$ C 进行 PCR 起始活化步骤 15 分钟; 将样本在 94 $^{\circ}$ C 变性 15 秒, 在 53 $^{\circ}$ C 退火 30 秒(使用 Opticon II 系统时是

55℃),并在 72℃延伸 30 秒(在此步骤获得数据);重复此 PCR 反应 50 个循环。通过加入如下步骤:95℃ 15 秒,60℃ 20 秒,和 95℃ 20 秒来进行解链曲线分析。

[0263] 另外,从得自化学敏感的(即有反应的)和化学抗性的(即无反应的)卵巢癌患者的组织样本制备 RNA,所述患者已经用基于铂的化疗剂治疗过。通过在 1ml TRI-Reagent 或 Trizol 中匀浆化 50-100mg 组织样本直至该组织液化来分离 RNA。然后将所述样本静置 5 分钟。通过向该样本加入 100 μ l BCP 来完成相分离。振摇 15 秒后,在室温温育样本 15 分钟,再在 4-25℃以 13,000xg(相对离心力,RCF)离心 9 分钟。用移液管取出上清并置于新的微量离心管。然后通过将此上清与 500 μ l 新鲜异丙酮混合、在室温温育 20 分钟、再在 4-25℃以 13,000RCF 离心 9 分钟来沉淀 RNA。然后从试管中取出上清,通过向试管加入 1ml 的 75%乙醇、涡旋振荡、再在 4-25℃以 13,000RCF 离心 6 分钟来洗涤沉淀物。取出液体并空气干燥所述沉淀物约 8 分钟。然后将该沉淀物溶解于无 RNase 的水中并置于冰上待用或贮存于 -80℃。

[0264] 用针对表 3 所示基因的引物进行定量实时 PCR 来检测化学敏感和化学抗性患者的基因表达改变。用 18S RNA 的表达来校对被表达基因的值。结果见下表 3 所示。这些结果证明了用细胞系的 RNA 进行实验的观察结果。

[0265] 表 3

[0266]

基因名称	GenBank 登录号	在化学敏感的患者中 的成倍表达	在化学抗性患者中的 成倍表达	倍数差 异
Vinexin β	AF037261	1.4	2.8	2.0

[0267]

基因名称	GenBank 登录号	在化学敏感的患者中 的成倍表达	在化学抗性患者中的 成倍表达	倍数差 异
G-CSFR	M59818	1.7	2.6	1.5
KLK6	BC015525	0.3	3.3	11.0
SPARC	BC004974	3.6	6.0	1.7
HYA22	D88153	1.75	2.4	1.4
MRPL4	AB049635	0.3	0.8	2.7
eIF5	U49436	0.8	1.3	1.6
RAB22A	BC015710	0.15	0.075	2.0*
MT1	BC032338	0.9	0.6	1.5*
MYM	AB007885	0.6	1.5	2.5
RNPS1	AF015608	0.7	1.4	2.0
S100A11	BC001410	1.0	2.0	2.0
MetAP2	BC013782	0.175	0.21	1.2
S100A10	BC015973	0.15	0.25	1.7
SAPK	L36870	0.40	0.95	2.4
需钙蛋白 酶 2	AF261089	0.12	0.19	1.6
NM23D	BC004880	0.70	1.3	1.9
NIAP	U19251	4	2	2.0*
SRB1	BC022087	0.08	0.13	1.6
WDR1	AB010427	1.5	5	3.3
HMT1	AF222689	0.19	0.05	3.8*
eEF1ε,	BC005291	0.65	0.15	4.3*
eIF2Bε,	BC013590	0.40	0.75	1.9
ADAR1	U10439	0.65	0.8	1.2

[0268] * 此差异反映了在化学抗性患者中的基因表达降低

[0269] 用下述引物序列通过实时 PCR 来证实基因表达：

- [0270] 250654(此基因最初用特异的分子信标 (beacon) 探针来证实,但随后的研究是用 SYBR green 进行的)
- [0271] 分子信标证实:
- [0272] 信标:FAM-CGCGTATGAACTGGGCTTATGTGACGCG-DABCYL(SEQ ID NO:13)
- [0273] 侧接的正向引物:CTGGGCTCTGCCTTAAACAC(SEQ ID NO:14)
- [0274] 侧接的反向引物:GCTCCCAAAAGTTTGAACCA(SEQ ID NO:15)
- [0275] 内部的正向引物:TTGCCTGAGGCTGTAAGTGA(SEQ ID NO:16)
- [0276] 内部的反向引物:GCTCCCAAAAGTTTGAACCA(SEQ ID NO:62)
- [0277] 对于 SYBR green:
- [0278] 正向:CCA CTT CTT TGC CAC AAA GT(SEQ ID NO:17)
- [0279] 反向:GAA TTC GGT CAG CTC AGA GT(SEQ ID NO:18)
- [0280] 810612(此基因用特异的分子信标探针来证实)
- [0281] 信标:FAM-CGCCTGGGTGGGTTTGAAGGAGGCG-DABCYL(SEQ ID NO:19)
- [0282] 侧接的正向引物:ATCGAGTCCCTGATTGCTGT(SEQ ID NO:20)
- [0283] 侧接的反向引物:GCCTGCATGAGGTGGTTAGT(SEQ ID NO:21)
- [0284] 内部正向引物:CTTGCCATGACTCCTTCCTC(SEQ ID NO:22)
- [0285] 内部反向引物:GCCTGCATGAGGTGGTTAGT(SEQ ID NO:63)
- [0286] 39093
- [0287] 正向:GCA GAA GCA CAT CGA CAA GT(SEQ ID NO:23)
- [0288] 反向:GCC TGC ATT TAA TCC ATT CTC(SEQ ID NO:24)
- [0289] 882511
- [0290] 正向:TAA CCA CGT CCT GCT GAA GT(SEQ ID NO:25)
- [0291] 反向:GCT TTA AGA AAG TTC TTA TCA AC(SEQ ID NO:26)
- [0292] 950367
- [0293] 正向:GCA CAG CGG AGT GGT AAG A(SEQ ID NO:27)
- [0294] 反向:CAG AGG AGT CAG ACA CAT TG(SEQ ID NO:28)
- [0295] 34140
- [0296] 正向:GTA TAC TTA CTT CAG TGC TGT T(SEQ ID NO:29)
- [0297] 反向:CAT TCT TGC TAT AAC GTT TAA CA(SEQ ID NO:30)
- [0298] 726147
- [0299] 正向:CTC TGT GAC TTC GGC ATC A(SEQ ID NO:31)
- [0300] 反向:CAG ACA TCA GAG CGG ACA T(SEQ ID NO:32)
- [0301] 427980
- [0302] 正向:AAG AAC TGG GTT CAG TGG AAA(SEQ ID NO:33)
- [0303] 反向:GAG AGT GCA TGG TCT TGA GT(SEQ ID NO:34)
- [0304] 123980
- [0305] 正向:AGC CAC CAG CTA AGT ACC TT(SEQ ID NO:35)
- [0306] 反向:CAT CGA TTT CAA CCG GAA CAA(SEQ ID NO:36)
- [0307] 824568

- [0308] 正向 :GTG TGT GGA CCT CCA TGT TA (SEQ ID NO :37)
[0309] 反向 :AGC ACA CCA TTA CAG ACA AGT (SEQ ID NO :38)
[0310] 1636620
[0311] 正向 :GGA ACC AGT TTC TGC AGG AA (SEQ ID NO :39)
[0312] 反向 :CTC CAG CAG CAC CTC AAT G (SEQ ID NO :40)
[0313] 809639
[0314] 正向 :ATC CAA GGT TAT GTG GTT TCT T (SEQ ID NO :41)
[0315] 反向 :CAC CTC CTG GGC TTC TGA A (SEQ ID NO :42)
[0316] 756687
[0317] 正向 :GAT CCA TGA AGC TAA TGT ACA A (SEQ ID NO :43)
[0318] 反向 :ACG GGC AGA AGC CTT CGT T (SEQ ID NO :44)
[0319] 845441
[0320] 正向 :CCT GAG GTT CTC CGA GAT G (SEQ ID NO :45)
[0321] 反向 :TCC AGC CCG AAA TTC TCT GT (SEQ ID NO :46)
[0322] 68605
[0323] 正向 :CAA GAG GCG GAA GGG TAA A (SEQ ID NO :47)
[0324] 反向 1 :CAG CCG CTC GGG TAG GT (SEQ ID NO :48)
[0325] 反向 2 :CAC TAT GGA AGG ACC TTG CT (SEQ ID NO :49)
[0326] 838636
[0327] 正向 :GGA TAC AGG TGT AGG TAA ATC (SEQ ID NO :50)
[0328] 反向 :TCC CAG ATT AGG AAT TTA TGT A (SEQ ID NO :51)
[0329] 345077
[0330] 正向 :CTT CTG GAA CAG GCG AAG A (SEQ ID NO :52)
[0331] 反向 1 :GCT GGC CCA GAC GAC GAA (SEQ ID NO :53)
[0332] 反向 2 :GCA GAC ACA CGT GGA TGG T (SEQ ID NO :54)
[0333] 825214
[0334] 正向 :GAT GAA GTT AAA TCC TCC TTT G (SEQ ID NO :55)
[0335] 反向 :CCT CTT CTG TGC TGT CAC TT (SEQ ID NO :56)
[0336] 297392
[0337] 正向 :CCT GCA AGA AGA GCT GCT G (SEQ ID NO :57)
[0338] 反向 :CAC AGC TGT CCT GGC ATC A (SEQ ID NO :58)
[0339] 897594
[0340] 正向 :AGC ACC AGC ACT GGC TCA TCAA (SEQ ID NO 109)
[0341] 反向 :AGA GCC AGA AGA GCT GCT A (SEQ ID NO 110)
[0342] 713886
[0343] 正向 :AAC CGA CAA GTG TGA CAA CT (SEQ ID NO 111) '
[0344] 反向 :TGT GCC TTG CGG GCA GTA (SEQ ID NO 112)
[0345] 884867
[0346] 正向 :C ACC ACC ACC ACC AAA TGA A (SEQ ID NO 113)

- [0347] 反向 :CA TCC ATT CGA CGC CTT TGA (SEQ ID NO 114)
- [0348] 321247
- [0349] 正向 :CCA GCA GCA CAG TCA ACA AA (SEQ ID NO 115)
- [0350] 反向 :TGG TAG CTT CTG CTT CAC AA (SEQ ID NO 116)
- [0351] 1630998
- [0352] 正向 :CCA GAG CTG CAC TCA TTC C (SEQ ID NO 117)
- [0353] 反向 :CAC TGT TGG TGA TAA AGC AAT T (SEQ ID NO 118)
- [0354] 756595
- [0355] 正向 :GGA TAA AGG CTA CTT AAC AAA G (SEQ ID NO 119)
- [0356] 反向 :CCA CTT TGC CAT CTC TAC AC (SEQ ID NO 120)
- [0357] 549728
- [0358] 正向 :GAG CCG AGG AGG TTG AAA G (SEQ ID NO 121)
- [0359] 反向 :CTC CTC TGG GTC TAT AGT GT (SEQ ID NO 122)
- [0360] 203003
- [0361] 正向 :GAC CCT GGT GGC GGT GAA (SEQ ID NO 123)
- [0362] 反向 :GGT GCC TGC AGC ATC TTC A (SEQ ID NO 124)
- [0363] 814731
- [0364] 正向 :GGA GAG CCC TGG CAC GTA (SEQ ID NO 125)
- [0365] 反向 :CCT TCA TCT GCA GGT TCT TG (SEQ ID NO 126)
- [0366] 714196
- [0367] 正向 :ACG ACG GAC ACA TTA ATT ACT (SEQ ID NO 127)
- [0368] 反向 :TCC ATG CTG CAG CTG ATG A (SEQ ID NO 128)
- [0369] 809784
- [0370] 正向 :C CTT CGG CAA AGG GAG AGT (SEQ ID NO 128)
- [0371] 反向 :CTG GAT GAG TTC AGA GAG TTT (SEQ ID NO 130)
- [0372] 825293
- [0373] 正向 :GCC TCG ACA GGC AGA GAT (SEQ ID NO 131)
- [0374] 反向 :CTT GTA GCT GAA GAT GTC AAT (SEQ ID NO 132)
- [0375] 246120
- [0376] 正向 :CTC TAT GCC CGG GAC AAG T (SEQ ID NO 133)
- [0377] 反向 :AAG ACA TGT CGA AGC CAT ACA (SEQ ID NO 134) ’
- [0378] 在对顺铂有抗性的卵巢癌细胞中上调或下调的基因的总结
- [0379] 编码 EF- 手性 (Hand) 蛋白质的基因 :

[0380] 鉴定五个编码钙 - 活化性 EF- 手性蛋白质的基因, 即 S100A10, S100A11, SPARC, 需钙蛋白酶 2 和粒钙蛋白。四个基因中的两个, S100A10 和 S100A11 的位置在第 1 条染色体的 1q21 彼此毗连 (Pejovic, 1995, Ann. Med. 27 :73-78 ;Ridinger 等, 1998, Biochimica et Biophysica Acta 1448 :254-263)。第 1 条染色体的此区域已经被报道为卵巢癌中染色体重排的温床 (hotbed) 之一 (Pejovic, 1995, Ann. Med. 27 :73-78)。S100A10 和 S100A11 的确切生物学功能未知。S100A10 和 S100A11 都在抗性较强的卵巢癌细胞系中以较高水平表达

(分别见图 1 和图 2)。图 3 显示 S100A10 和 S100A11 的 mRNA 在对化疗抗性较强的患者中相对于对化疗反应性较强的患者中也是升高的。

[0381] SPARC(也称为骨粘连蛋白和 BM40)是分泌型蛋白质(Lane and Sage,1994,FASEB J. 8:163-173)。已经显示 SPARC 在患肿瘤的卵巢(neoplastic ovaries)的基质中是高表达的(Paley 等,2000, Gynecologic Oncology 78:336-341),并会诱导卵巢癌细胞的凋亡(Yiu 等,2001, Am. J. Pathol. 159:609-622)。然而,已经在黑素瘤(Ledda 等,1997, J. Invest. Dermatol. 108:210-214)和结肠直肠癌(Porte 等,1995, Int. J. Cancer 64:70-5)中检出 SPARC 的高水平,还已经报道它在前列腺癌(Thomas 等,2000, Clin. Cancer Res. 6:1140-9)和成胶质细胞瘤(Golembieski 等,1999, Int. J. Dev. Neurosci. 17:463-72)中促进细胞的迁移和侵入。SPARC 的过表达也有助于乳腺癌细胞的移动性和侵入性增强(Briggs 等,2002, Oncogene 21:7077-91)。如本文所示,发现 SPARC 在化学抗性较强的卵巢癌细胞系中以较高水平表达(图 4)。如图 5 所示,SPARC mRNA 在取自肿瘤复发的患者的样本中也是升高的。

[0382] 需钙蛋白酶 2 是钙-活化性蛋白酶。近来报道需钙蛋白酶 2 活性的抑制剂诱导了在人急性成淋巴细胞性白血病和非霍奇金淋巴瘤以及实体肿瘤细胞中的凋亡(Huang and Wang,2001, TRENDS in Molecular Medicine 7:355)。需钙蛋白酶 2mRNA 的水平在化学抗性较强的卵巢癌细胞系中是升高的(图 6)。

[0383] 粒钙蛋白是近来描述的 Ca^{2+} -结合型蛋白质,其属于 EF-手性蛋白质的五(penta)-EF-手性亚家族,并经 Ca^{2+} 结合易位到膜(Lollike 等,2001, J. Biol. Chem. 276:17762-9)。发现与对用顺铂处理反应性较强的细胞系相比,粒钙蛋白 mRNA 在对顺铂抗性较强的细胞系中是升高的(图 7)。

[0384] 编码参与蛋白质翻译和翻译控制的蛋白质的基因:

[0385] MetAP2:蛋氨酸氨基肽酶 2(也称为 eIF-2 相关的 p67)的表达从未与卵巢癌有关。此基因编码的蛋白质似乎具有两种功能。它从新合成的蛋白质除去了第一个蛋氨酸(Li and Chang,1996, Biochem. Biophys. Res. Commun. 227:152-9),并且它也与真核生物起始因子 2(eIF-2;GTP 结合蛋白质)相关并抑制其磷酸化(Wu 等,1993, J. Biol. Chem. 268:10796-10801)。用针对 MetAP2 的抗体,显示 MetAP2 表达在抗性最强的细胞系 OVCA 429 中是升高的并且在 Hey(对顺铂最敏感的细胞系;见图 8)中是下调的。并且,在检查组织样本中的 MetAP2 mRNA 表达时,所述样本来自对基于顺铂的化疗具有不同抗性水平的三名患者,显示出相对于对化疗具有中等(CAP2;图 9)和低(CAP1;图 9)水平抗性的患者, MetAP2 在来自抗性最强的患者(CAP3;图 9)的样本中升高得最多。特异性靶向 MetAP2 的药物 TNP-470 现在是临床试验中对于多种人类肿瘤的血管生成抑制剂(Kruger and Figg,2000, Expert Opin. Investig. Drugs 9:1383-96)。并且,用反义寡核苷酸降低 MetAP2 的细胞水平已经显示诱导凋亡(Datta and Datta,1999, Exp. Cell Res. 246:376-83)。这些观察结果提示此蛋白质可以是卵巢癌疗法的重要靶标。

[0386] eIF5 是起 GTPase-活化剂蛋白质作用的翻译起始和蛋白质合成的另一种中心(central)蛋白质(Paulin 等,2001, Current Biol. 11:55-9;Das 等,2001, J. Bio. Chem. 276:6720-6)。检出两种转录物且它们的表达水平在对顺铂抗性水平最强的卵巢癌细胞系(图 10)和抗性较强的患者(图 11)中都是升高的。

[0387] eIF2B ϵ 的 mRNA 在显示对顺铂抗性最强的卵巢癌细胞系中上调 (图 12)。由此基因编码的蛋白质是由 5 个亚单位组成 (comprised of) 的鸟苷酸交换因子复合物的调节性 ϵ -亚单元 (Proud, 2001, Prog. Mol. Subcell. Biol. 26 :95-114)。

[0388] eEF1 ϵ mRNA 在显示了对顺铂的最高抗性水平的卵巢癌细胞系中下调 (图 13)。eEFs 涉及多肽装配 (Browne and Proud, 2002, Eur. J. Biochem. 269 :5360-8)。

[0389] **激酶:**

[0390] SAPK/Erk 激酶 1 是活化 JNK1, JNK2 和 p38 但不活化 Erk1 或 Erk2 的双特异性激酶 (Cuenda, 2000, Int. J. Biochem. Cell Biol. 32 :581-7)。目前未发现此基因及其蛋白质至今都不与卵巢癌有关。发现此基因的 mRNA 水平在抗性较强的细胞系中相对于较敏感的细胞系中是升高的 (图 14)。

[0391] TESK2 :此丝氨酸 / 苏氨酸激酶主要位于细胞核。然而它在未活化时易位到胞质。TESK2 特异性磷酸化肌动蛋白丝切蛋白 (cofilin) (在 Ser-3), 肌动蛋白丝切蛋白是与肌动蛋白解聚因子一起通过刺激肌动蛋白纤维的解聚和切割 (severance) 在肌动蛋白纤维的快速转换 (turnover) 和基于肌动蛋白的再组织中起主要作用的蛋白质 (Toshima, 2001, J. Biol. Chem. 276 :31449-58)。以前没有报道过 TESK2 与卵巢癌的联系。TESK2 mRNA 在抗性较强的细胞系中升高 (图 15)。

[0392] FAST 激酶 :这是 Fas- 活化的丝氨酸 / 苏氨酸激酶, 它被认为与 Fas 介导的凋亡有关 (Tian 等, 1995, J. Exp. Med. 182 :865-74)。FAST 激酶 mRNA 在化学抗性较强的细胞系中升高 (图 16)。

[0393] **其他:**

[0394] KLK6 :这是也称作酶和甘油磷酸钙的丝氨酸蛋白酶。此基因属于人激肽释放酶 (kallilrein) 基因家族, 该家族也包括了解得较多的分子, 如前列腺特异性基因 (PSA), 该基因已经被用作前列腺癌的标记物并且也作为卵巢癌的标记物被研究过 (Diamandis, 2000, Clinical Biochem. 33 :579-83)。已经报道在患卵巢癌的患者中 KLK6 的血清水平相对于正常对照升高 (Diamandis, 2000, Clinical Biochem. 33 :579-83)。此基因的表达水平在化学抗性较强的被试细胞系中升高 (图 17)。也应注意到此基因位于在卵巢癌中通常发生染色体重排的另一区域 (Pejovic, 1995, Ann. Med. 27 :73-78)。

[0395] HMT1 (也称作 PRMT1) :此基因编码蛋白质精氨酸 N- 甲基转移酶, 发现其两种变体的表达在乳腺癌中下调 (Scorlis 等, 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 278 :349-59)。HMT1 的表达在对顺铂抗性较强的细胞中下调 (见图 18)。有趣的是注意到 HMT1 位于第 19 条染色体 19q13.3 上与编码 KLK6 残基的基因相同的染色体区域。

[0396] ARA9 (也称作芳香烃受体相互作用蛋白质 (AIP) 和 XAP2) 据认为在 AHR- 介导的信号传导中起作用 (Kazlauskas 等, 2002, J. Biol. Chem. 277 :11795-801)。此基因的 mRNA 在对顺铂抗性较强的细胞系中升高 (图 19)。它也位于与卵巢癌相关的、染色体重排频率升高的另一个区域, 即第 11 条染色体 (在 11q13.3) (Pejovic, 1995, Ann. Med. 27 :73-78)。

[0397] 钙调理蛋白 2 已经在肌上皮癌中但未在卵巢癌中被研究过 (Mosunjac 等, 2000, Diagn. Cytopathol. 23 :151-5)。相对于较敏感的卵巢癌细胞系中的情况, 钙调理蛋白 2 的表达在对顺铂抗性较强的细胞系中轻微升高 (图 20)。

[0398] 神经元凋亡抑制性蛋白质 (neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP) 据

发现在对顺铂抗性最强的细胞系中轻微下调(图 21)。NAIP 从未与卵巢癌有联系(Tamm 等, 2000, Clin. Cancer Res. 6:1796-1803)。

[0399] RNA 结合性蛋白质 S1(RNPS1) 是前信使 mRNA 剪接的常用活化剂并可形成参与促进凋亡的 ASAP 及 SART3 肿瘤抵抗抗原(tumor rejection antigen)的复合体(Schwerk 等, 2003, Mol. Cell Biol. 23:2981-90; Harada 等, 2001, Int. J. Cancer 93:623-8)。据发现其水平在对顺铂有抗性的细胞系中升高(图 22)。

[0400] 热休克转录因子 2(HSF2) 调节热休克蛋白质基因的表达(Mathew 等, 1998, Mol. Cell Biol. 18:5091-8)。HSF2 也显示能够与蛋白磷酸酶 2A(PP2A) 的催化亚单元竞争结合其调节亚单元 PR65, 并被认为是作为新的 PP2A 调节蛋白质(Hong 等, 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 272:84-9)。HSF2 的 mRNA 水平在抗性较强的细胞系中升高(图 23)。

[0401] WDR1:WD- 重复蛋白质发现于所有真核生物中, 并在调节广泛的细胞功能包括信号转导、转录和增殖中起重要作用(Li 等, 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 274:117-23)。然而, WDR1 的确切功能未知。此基因的 mRNA 在抗性较强的细胞系中相对较敏感的细胞系升高(图 24)。

[0402] Ft1:此基因的开放阅读框架显示了与遍在蛋白结合酶的相似性, 且在小鼠中它的位置与 Rb- 相关的 p130 基因邻近(Lesche 等, 1997, Mamm. Genome 8:879-83)。从细胞遗传学角度, Ft1 位于第 16 条染色体的区域 16q12.2, 此区域在人类癌症中反复发生改变。已经报道了在卵巢癌中此染色体区域出现了杂合性的丢失。Ft1 mRNA 的水平在对顺铂抗性较强的细胞系中升高(图 25)。

[0403] NME4(也称作 nm23-h4) 是在肾细胞癌中中度过表达并且在结肠直肠癌中高度过表达的二磷酸核苷激酶(Hayer 等, 2001, Anticancer Res. 21:2821-5)。NME4 mRNA 在抗性较强的细胞系中升高(图 26)。

[0404] ADAR1:包括 ADAR1 腺苷脱氨酶所编辑的腺苷到肌苷(adenosine-to-inosine) RNA 导致旁路剪接位点产生或密码子改变, 从而导致蛋白质的功能改变(Wang 等, 2000, Science 290:1765)。有意思的是还注意到 ADAR1 基因位于第 1 条染色体的 1q21.1-q21.2 上与 S100A10 和 S100A11 相同的频繁重排的染色体区域中(Pejovic, 1995, Ann. Med. 27:73-78)。ADAR1 mRNA 在对顺铂抗性较强的细胞系中升高(图 27)。

[0405] NBR1:NBR1 的确切分子功能未知。(那些本领域技术人员会认识到在本发明方法中基因的有用性不依赖于基因的具体或确切概念或功能特征)。作图研究显示 NBR1 基因与 BRCA1 基因头对头(Whitehouse 等, 2002, Eur. J. Biochem. 269:538-45)。NBR1 未报道与卵巢癌相关。NBR1 mRNA 在顺铂抗性最强的细胞系 OVCA 429 中升高(图 28)。

[0406] 锌指蛋白 262/MYM:编码包含 MYM 锌结合基序的蛋白质的基因家族的成员(Smedley 等, 1999, Genomics 60:244-7)。此蛋白质从未与卵巢癌相关;然而, 与其他被试的细胞系中的情况相比, 此基因的 mRNA 在化学抗性最强的细胞系中升高(图 29)。

[0407] MRPL4:此基因及其蛋白质从未与卵巢癌相关。然而, 此基因位于在卵巢癌中频繁重排的染色体区域, 第 19 条染色体的 19p13.2(Pejovic, 1995, Ann. Med. 27:73-78)。MRPL4mRNA 在化学抗性细胞系中升高(图 30)。

[0408] HYA22:此基因及其蛋白质从未与卵巢癌相关。然而, 此基因位于在卵巢癌中与染色体重排有关的区域, 第 3 条染色体的 3p21.3(Pejovic, 1995, Ann. Med. 27:73-78);

Protopopov 等,2003, *Cancer Res.* 63:404-12; Senchenko 等,2003, *Oncogene* 22:2984-92)。HYA22 mRNA 在对顺铂抗性较强的细胞系中相对较敏感的细胞系升高(图 31)。

[0409] Vinexin β :也称作 SCAM-1,此基因编码衔接蛋白质,该蛋白质属于也包括 Vinexin β 、CAP/Ponsin 和 ArgBP2 的蛋白质家族(Kioka 等,2002, *Cell Structure and Function* 27:1-7)。现有技术不知道 Vinexin 与卵巢癌有联系。Vinexin β mRNA 在化学抗性细胞系中升高(图 32)。

[0410] G-CSFR:粒细胞集落刺激因子受体(G-CSFR)差不多在原发的卵巢癌中广泛表达。然而,在只有一半的研究的病例中发现其配体 G-CSF 表达在相同细胞中,这表明存在自分泌系统(Savarese 等,2001, *Cancer Letters* 162:105-15)。在另外三分之一的病例研究中,发现 G-CSF 全部在基质中,这表明可能存在旁分泌系统,其中间充质细胞可向表达所述受体的癌性细胞提供配体(Savarese 等,2001, *Cancer Letters* 162:105-15)。原先的回顾性评估显示仅表达旁分泌环(loop)的患者的总体存活与卵巢癌表达自分泌轴(axis)的患者的情况相比较差(Savarese 等,2001, *Cancer Letters* 162:105-15)。G-CSF 及其受体也可以在正常卵巢和一些良性卵巢肿瘤中共同表达。G-CSFR mRNA 在化学抗性细胞系中升高(图 33)。

[0411] SRB1:也称作 CLA-1,此基因编码了识别带负电荷的脂质体和凋亡细胞的受体。已经报道肿瘤细胞参与了凋亡细胞和小体的摄入和去除(Fukasawa 等,1996, *Exp. Cell Res.* 222:246-50)。对这些观察结果的生物显著性了解得不多。从未披露过 SRB1 的表达和卵巢癌之间的联系。SRB1 mRNA 在化学抗性细胞系中升高(图 34)。

[0412] IGFBP-7:IGF 结合蛋白质的最近鉴定的成员,此蛋白质以相对低的亲和力结合 IGF-I 和 IGF-II(Oh,1998, *Breast Cancer Res. Treat.* 47:283-93)。IGFBP-7mRNA 在化学抗性细胞系中升高(图 35)。

[0413] RAB22A 属于 Ras 蛋白质的 RAB 亚家族(Kauppi 等,2002, *J. Cell Science* 115:899-911)。RAB22A mRNA 在化学抗性细胞系中降低并在对顺铂反应性较强的细胞系中升高(图 36)。

[0414] KIAA0082:KIAA0082 是没有公开信息的全长基因。此基因的 mRNA 表达在对顺铂有抗性的细胞系中升高(图 37)。

[0415] NCOR2:这是与 SMRT 紧密相关的共抑制蛋白质,其带有对甲状腺激素受体特异的相互作用结构域(Jepsen and Rosenfeld,2002, *J. Cell Science* 115:689-98)。此基因的 mRNA 表达在化学抗性细胞系中的水平相对于对顺铂敏感的细胞系中的水平降低(图 38)。

[0416] MT1:金属硫蛋白 1L(MT1)的精确生理功能未知,但以前的研究已经报道 MT 水平在对顺铂有抗性的人类卵巢癌细胞中升高(Andrews and Howell,1990, *Cancer Cells* 2:35-43)并且用 MT 基因转染的细胞变成对顺铂有抗性(Nakano 等,2003, *Anticancer Res.* 23:299-304)。据认为 MT 对于将顺铂螯合在胞质中、从而增强细胞对所述药物产生抗性的能力有作用(Nakano 等,2003, *Anticancer Res.* 23:299-304)。矛盾的是,MT1 mRNA 的水平显示在对顺铂最敏感的细胞(Hey)中显著升高(图 51)。

[0417] MPP10:M 期磷蛋白(MPP10)大多数是胞浆(is mostly cytoplasmic)蛋白质,但它可以被分泌并且是人类 U3 核仁小核糖核蛋白的组分。此蛋白质的大部分与核仁纤维蛋白(fibrillarin)共定位(Baserga 等,1997, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 36:64-7)并涉及

rRNA 的加工。从未有报道此基因或其产物与卵巢癌相关。MPP10 表达水平随对顺铂的敏感性增加而增加 (图 52)。

[0418] 实施例 3

[0419] SPARC 作为治疗靶标的体外试验

[0420] SPARC 在顺铂抗性最强的细胞系 (OVCA 429) 中的表达水平相对在其他被试细胞系中的表达水平而言是最高的 (图 4)。本领域已知此蛋白质是调节粘附 (adhesion) 并能够在促进肿瘤发展和侵入性的组织重构和血管生成中起重要作用的钙 - 结合糖蛋白 (Ledda 等, 1997, J. Invest. Dermatol. 108:210-214)。

[0421] 检测在取自肿瘤大部切除术 (cyto-reductive surgery) 前的个体及术后 9 个月患者肿瘤已经复发时的人腹水样本中 SPARC 的表达 (图 5; 观察到由于差异性聚腺苷酸化而出现 (arise) SPARC 的两种转录物; Ledda 等, 1997, J. Invest. Dermatol. 108:210-214)。术后 SPARC 的表达水平显著升高并与此患者的预后差相关。此观察结果也与其他组研究其他形式的实体癌的发现一致 (Golembieski 等, 1999, Int. J. Dev. Neurosci. 17:463-72; Briggs 等, 2002, Oncogene 21:7077-91; Huang and Wang, 2001, TRENDS in Molecular Medicine 7:355; Lollike 等, 2001, J. Biol. Chem. 276:17762-9), 这表明升高的 SPARC 表达可以是化疗成功和疾病在除卵巢癌外的其他类型的实体癌中的发展的预测物 (predictive)。

[0422] 为了测试是否降低在抗性最强的卵巢癌细胞系 OVCA 429 中的 SPARC 蛋白质表达水平会降低其对顺铂的抗性的能力, 设计三种针对 SPARC 信使不同区域的 siRNAs。所用的 SPARC siRNA 是:

[0423] #1 靶序列: AATCC TGT CCA GGT GGA AGT A (SEQ ID NO:1);

[0424] #2 靶序列: AAGCT CCA CCT GGA CTA CAT C (SEQ ID NO:2); 和

[0425] #3 靶序列: AATGA CAA GTA CAT CGC CCT G (SEQ ID NO:3)。

[0426] 本发明描述的 siRNA 试验用 siPORT Lipid 方案 (Ambion) 来进行。在转染前 24 小时将细胞接种 (plate) 在含 10% FBS 的 MEM ∞ 培养基中, 所以细胞在进行试验时 30-70% 满底 (confluent)。用无 FBS 或抗生素的培养基制备 siPORT 和 siRNA 复合物。对于 siPORT, 对于 6 孔板以每孔 4 微升或对于 96 孔板以每孔 0.5 微升加入培养基, 通过涡旋振荡混合, 并在室温温育 25 分钟。对于 siRNA, 使用在培养基中稀释的 1-25nM (常使用 12.5nM) 浓度的 siRNA。将所述 siPORT 加入所述 siRNA 混合物, 并在室温温育 20 分钟。在用无血清培养基洗涤细胞后, 将所述细胞加入平板 (使用 96 孔板时, 以密度 4.5×10^4 接种细胞; 使用 6 孔板时, 以密度 $1-5 \times 10^5$ 接种细胞)。将 siPORT/siRNA 复合物加到每个平板 / 孔并轻柔摇动 (rock) 平板来使复合物分散在细胞表面。在于正常细胞培养条件温育 4 小时后, 将另外含 10% FBS 的培养基加入所述细胞。48 小时后, 提取总 RNA。

[0427] 根据生产者的说明书 (Ambion) 用所述 siRNA 构建体转染细胞。对于 6-孔板, 用 12.5nM siRNA / 孔来转染。在 1 : 100 的稀释度一式两份读取 siRNA 的 OD₂₆₀ 读数。将所述读数取均数, 然后乘以稀释系数然后乘以 40 (OD₂₆₀ 为 1 等于 40 μ g/ml 的 RNA) 来得到 siRNA 的 μ g/ml 最终浓度。将该数字除以 14 (在 1nmole 平均为 21mer 的 dsRNA 中的 RNA 的 μ g 数) 来得到 siRNA 的 μ M 最终浓度, 然后转变为浓度用 nM 表示。

[0428] 这些研究的结果见图 48 所示。所有三种 siRNAs 降低这些细胞中的 SPARC mRNA

水平。仅用 siPORT 或仅用 siRNA#2 有义链处理细胞不显示任何 SPARC mRNA 表达的显著降低。然而,包括所有三种 siRNAs 的组合处理却有一些效果(图 48)。

[0429] 也研究了在 SPARC siRNAs 存在时 OVCA 429 细胞对顺铂有抗性的能力。所述细胞仅用 siPORT 处理或仅用 siRNA#2 有义链或完整的 siRNA#2 转染。让所述细胞在转染后恢复(recover)48 小时,然后用浓度增加的顺铂或作为对照的相应浓度的 DMSO 进行处理。使所述细胞暴露于所述药物 24 小时,之后去除所述药物,并让所述细胞再恢复 72 小时。用 MTT 分析来评估此处理对细胞生存力的影响。结果见图 49 所示;图 50 显示了在定量对所述细胞的影响后的结果。所述数据提示在暴露于顺铂前用完整的 siRNA#2 处理所述细胞可使它们的抗性水平减半(仅用 siPORT 或有义链处理的对照的 $IC_{50} \sim 25-50 \mu M$ 到在用 siRNA#2 处理后 IC_{50} 为 $\sim 12.5 \mu M$)。

[0430] 这些试验的结果表明 SPARC 是卵巢癌的治疗性靶标及标记物。

[0431] 实施例 4

[0432] MetAP2/p67 作为治疗靶标的体外实验

[0433] MetAP-2/p67 是双功能蛋白质,其两种功能对细胞生长都重要(Li and Chang, 1996, Biochem. Biophys. Res. Commun. 227:152-9;Wu 等,1993, J. Biol. Chem. 268:10796-10801)。在一种功能中,所述蛋白质结合真核生物起始因子 2(eIF-2) 并抑制其磷酸化,而在另一种功能中它的 C-末端结构域具有催化多种细胞蛋白质的 N-末端蛋氨酸水解的酶活性(Wu 等,1993, J. Biol. Chem. 268:10796-10801)。eIF-2 的磷酸化改变了它的翻译库(repertoire),这允许在不同的磷酸化状态翻译不同的信使。另外,蛋氨酸氨肽酶活性通常对于蛋白质功能是重要的,且不去除 N-末端蛋氨酸常导致蛋白质失活(Li and Chang, 1996, Biochem. Biophys. Res. Commun. 227:152-9)。

[0434] 来自烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) 的烟曲霉素与其合成的同系物 TNP-470 共价结合并抑制 MetAP-2 但不是紧密相关的 MetAP-1 的蛋氨酸氨肽酶活性(Griffith 等, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15183-8)。意识到用烟曲霉素处理多种不同细胞类型导致 MetAP-2 表达升高也是重要的(Wang 等,2000, J. Cell. Biochem. 77:465-73);据认为该细胞通过升高其表达水平来适应 MetAP-2 功能丧失。

[0435] 本文描述的试验提示 OVCA 429 比对顺铂最敏感的细胞系 Hey 多表达了大约 7 倍的 MetAP-2(图 8)。Northern 印迹分析也证明在临床上 MetAP-2 的表达水平对于基于顺铂的化疗抗性较强的患者而言也是升高的。图 9 显示 MetAP-2 mRNA 在抗性最强的患者(CAP3) 中的水平比抗性最弱的患者(CAP1) 中的水平高大约 3 倍。针对基于顺铂的化疗具有中等抗性水平的患者也表现出中等的 MetAP-2 mRNA 水平。

[0436] 进行基于 MTT 的分析,其中用单独的烟曲霉素、用单独的顺铂以及用不同浓度的顺铂和烟曲霉素的组合处理 OVCA 429 细胞达 4,8 和 24 小时。所述结果见图 40、41 和 42 所示。图 40(上图)显示了浓度增加的烟曲霉素对 OVCA 429 细胞存活的作用。观察到一些细胞死亡,但多达 80% 的所述细胞甚至在很高的烟曲霉素浓度存活。用单独的顺铂处理所述细胞(下图)使 IC_{50} 为大约 $100 \mu M$ 顺铂。除了顺铂水平升高之外 $0.1 \mu g/ml$ 烟曲霉素的存在使 IC_{50} 降低至大约 $50 \mu M$ 。然而,在 $10 \mu g/ml$ 烟曲霉素存在时用顺铂处理细胞使所述细胞的存活增强, IC_{50} 达大约 $200 \mu M$ 。

[0437] 不考虑温育时间的长度,顺铂在 $0.1 \mu g/ml$ 烟曲霉素存在时作用增强,但在

10 μ g/ml 烟曲霉素存在时用顺铂处理所述细胞时作用相反(图 41 和 42)。这些观察结果提示在烟曲霉素的低水平达到了有利的平衡,并且所述药物与顺铂的协同作用导致了更多细胞的死亡。

[0438] 设计靶向 MetAP-2 信使的不同区域的三种 siRNAs(图 43),来确定抑制 MetAP-2 表达的效果。MetAP-2 siRNAs 是:

[0439] #1 靶序列:AAAGA TCA GCA TTG GAA GAT A(SEQ ID NO:4)

[0440] #2 靶序列:AAGCA CAT CGA CAA GTT AGA A(SEQ ID NO:5)

[0441] #3 靶序列:AAACA GTG CCG ATT GTG AAA G(SEQ ID NO:6)

[0442] 图 44 显示了 siRNA#1 对于 OVCA429 中的 MetAP-2 表达水平的影响。对照细胞用单独的相同 siRNA 的有义链转染或用转染剂(siPort 脂质)处理。即使转染有效性并不是 100%,用 siRNA#1 转染所述细胞也会使 MetAP-2 表达水平减半。对于 GAPDH 在那些细胞中的表达水平几乎观察不到影响,这表明基因表达通常不受这些处理的影响。另外,用 siRNAs#2 和 #3 处理所述细胞不会使 MetAP-2 表达降低。

[0443] 当阻断 MetAP-2 的表达时,通过用 siRNA#1、单独的有义链 #1、或单独的 siPort 脂质自身来处理 OVCA 429 细胞来检测 OVCA 429 对顺铂产生抗性的能力。用所述 siRNA 温育 48 小时后,所述细胞暴露于不同浓度的顺铂或对应浓度的溶剂 DMSO 达 24 小时。定量此试验的结果并见图 45 所示。这些结果表明 siRNA#1 的存在使 OVCA 429 的 IC_{50} 从 25 μ M 降低到大约 3 μ M。图 46 显示在进行 MTT 分析后的 96 孔板的照片。

[0444] 总体考虑这些结果表明 MetAP-2 是治疗干扰卵巢癌的有效靶标。

[0445] 实施例 5

[0446] 在 OVCA 429 细胞中需钙蛋白酶 2 和 S100A10 作为治疗性靶标及 S100A11 表达降低的体外试验

[0447] 549728(需钙蛋白酶 2)

[0448] 用上述方法设计了靶向需钙蛋白酶 2 信使的不同区域的三种 siRNAs。需钙蛋白酶 2 siRNAs 是:

[0449] #1AA GGC ATA CGC CAA GAT CAA C(SEQ ID NO:7);

[0450] #2AA ACT TCT TCC TGA CGA ATC G(SEQ ID NO:8);和

[0451] #3AA ACG CTA TTC AAG ATA TTT A(SEQ ID NO:9)。

[0452] 如上所述将每个 siRNA 引入 OVCA 429 细胞。图 53 显示在 OVCA 429 细胞中击倒(knockdown)试验的结果。用上述方案,序列 #1 和 #3 击倒了基因表达水平的大约 50%。另外,用多种浓度的顺铂处理包含 siRNA#3 的 OVCA429 细胞。通常 OVCA 429 细胞的 IC_{50} 在暴露于所述药物 24 小时后是大约 25 μ M 顺铂。如图 54 所示,需钙蛋白酶 2 siRNA#3 使 IC_{50} 降低到 3.12 μ M,从而提高所述细胞对顺铂的敏感度数倍。并且,用浓度升高的需钙蛋白酶抑制剂 I (ALLN) 在顺铂存在或缺无时处理 OVCA 429 细胞。如图 55 所示,在顺铂存在时 ALLN 使这些细胞的 IC_{50} 降低到 12.5 μ M。因此对于 OVCA 429 细胞对顺铂的敏感性,需钙蛋白酶 2 siRNA#3 具有比 ALLN 强的影响。

[0453] 756595(S100A10)

[0454] 针对 S100A10 信使制备了三种 siRNAs:

[0455] #1AA ATG GAA CAC GCC ATG GAA A(SEQ ID NO:59);

[0456] #2AA ATT CGC TGG GGA TAA AGG C(SEQ ID NO:60);和

[0457] #3AA TAA TGA AGG ACC TGG ACC A(SEQ ID NO:61)。

[0458] 如图 56 所示,siRNA#3 将 OVCA 429 细胞的 IC_{50} 从 25 μ M 降低到 6.25 μ M 顺铂,从而提高了所述细胞对顺铂的敏感性。

[0459] 810612(S100A11)

[0460] 用上述方法设计了靶向 S100A11 信使的不同区域的三种 siRNAs。所述 S100A11 siRNAs 是:

[0461] #1AA AGG ATG GTT ATA ACT ACA C(SEQ ID NO:10);

[0462] #2AA GAA ACT GGA CAC CAA CAG T(SEQ ID NO:11);和

[0463] #3AA TCT GAT TGG TGG CCT AGC T(SEQ ID NO:12)。

[0464] 如上所述将每个 siRNA 引入 OVCA 429 细胞。图 57 显示用上述方法 siRNAs#1 和 2 分别击倒了 OVCA 429 细胞中的基因表达水平的达 50%和 25%。

[0465] 实施例 6

[0466] MetAP-2, SPARC, 需钙蛋白酶-2, S100A10 和 S100A11 在结肠癌中的表达

[0467] 从 BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA) 获得结肠 cDNAs 的可商购的匹配组,它们分离自取自非肿瘤组织及邻近的肿瘤组织的五个个体。

[0468] 进行定量实时 PCR 试验来确定 MetAP-2, SPARC, S100A10, S100A11 和需钙蛋白酶-2 在正常结肠组织和肿瘤结肠组织中的表达水平。图 58 显示了 MetAP-2 在 5 对匹配的结肠 cDNAs 中的表达水平。该数据表明其中两名患者的肿瘤 cDNA 的表达水平相对于其匹配的非肿瘤 cDNA 有显著升高(患者 B 和 C;图 58)。另一名患者显示肿瘤 cDNA 相对于它的匹配非肿瘤 cDNA 仅有轻微的表达升高(患者 A;图 58)。在 OVCA 429 中的表达水平被用作参照。以前的报道显示了人类结肠癌的肝转移可以通过 MetAP-2 抑制剂 TNP-470 来预防(Tanaka 等, 1995, Cancer Res. 55:836-9)。

[0469] 图 59 显示相对于它们的匹配非肿瘤 cDNA 而言, SPARC mRNA 的表达水平在 5 个匹配肿瘤样本中的 4 个升高。图 60 显示在所有匹配肿瘤样本中, S100A11 mRNA 的表达水平相对于它们的匹配非肿瘤 cDNA 升高。图 61 显示在 5 个匹配肿瘤样本中的 4 个中, S100A10 mRNA 的表达水平相对于它们的匹配非肿瘤 cDNA 升高。图 62 显示在所有匹配肿瘤样本中, 需钙蛋白酶-2mRNA 的表达水平相对于它们的匹配非肿瘤 cDNA 升高。

[0470] 总体考虑这些观察结果显示 MetAP-2 以及 SPARC, S100A11, S100A10 和需钙蛋白酶-2 是结肠癌患者的治疗靶标。

[0471] 实施例 7

[0472] 检测血清中分泌型蛋白的夹心 ELISA

[0473] 用针对目的基因产物的抗体包被 96 孔微滴板的孔。等份的经纯化的重组靶基因产物被连续稀释,并用于产生定量用的标准曲线。然后将等份的患者血清加到每个孔中。盖住平板以使蒸发最小化并在 4°C 温育几小时过夜。将抗原取出并用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤所述孔 3 次。将 300 μ l 的封闭溶液(PBS 的 3% w/v 鱼胶溶液(fish gel solution))加入每个孔并在室温温育 2 小时。取出封闭溶液并用 PBS 洗涤所述孔 3 次。然后将与辣根过氧化物酶偶联的合适抗体加入每个孔(每孔 100 μ l)并在室温温育 1-2 小时。取出所述抗体并用 NP-40 溶液(PBS 中的 0.05% v/v NP-40)洗涤所述孔 3 次。结合的检测通过在室

温向每个孔加入 ABTS(Rockland Immunochemicals) (每孔 100 μ l) 30 分钟,并用微量培养板读数器在 405nm 读取吸光度来进行的。如果使用碱性磷酸酶偶联物 (alkaline phosphate conjugate) 而不是过氧化物酶,那么用 pNPP (Rockland Immunochemicals) 而不是 ABTS 来检测结合。

[0474] 一旦根据用纯化蛋白质产生的标准曲线确定了检出限,就对一些不患癌症的受试者和一些被诊断患有癌症或良性疾病的患者进行检验,来确定具体所需基因产物的预测浓度范围。癌症患者的预测范围决定该范围可用于鉴别患卵巢癌的患者或患复发疾病的患者或将他们与相应的患者或无癌症的健康受试者相区分。

[0475] 实施例 8

[0476] siRNA-介导的基因表达“敲除”:

[0477] 根据如上述的方案,检验对多种基因特异的 siRNAs 在卵巢癌细胞系中降低(或“击倒”)它们分别的基因的能力。在每项试验中,相对于与被试 siRNAGC-含量匹配的对照(非特异性)siRNA(来自 Dharmacon, Inc, Lafayette, CO) 检验几种 siRNA。有些试验中,也包括阴性对照(无处理)。表达被击倒的水平随 siRNA 不同而变化。所述具体基因及针对每个具体基因的 siRNA 序列见下:

[0478] 1. 制备了针对 SAPK/Erk1 的两种 siRNAs(L36870):

[0479] L36870(726147)

[0480] #1 靶序列 (SEQ ID NO :64):AAA TGG GAC GAG GAG CTT ATG(始于编码序列的 320bp 处)

[0481] #2 靶序列 (SEQ ID NO :65):AAG CGC ATC ACG ACA AGG ATA(始于编码序列的 831bp 处)

[0482] 这两个序列均成功降低了 SAPK 的表达,#2 序列使 mRNA 水平降低了 60%。

[0483] 2. 制备了针对 eEF1 ϵ 的三种 siRNAs(BC005291):

[0484] BC005291(306921)

[0485] #1 靶序列 (SEQ ID NO :66):AAC AGG ATT GAC TAC TAT AGC(始于编码序列的 123bp 处)

[0486] #2 靶序列 (SEQ ID NO :67):AAT ACA GGG TCA CTC AAG TAG(始于编码序列的 227bp 处)

[0487] #3 靶序列 (SEQ ID NO :68):AAA TAT CTT AAT GTG TCT CGC(始于编码序列的 412bp 处)

[0488] #1 和 #2 靶序列成功降低了 eEF1 ϵ 的表达,#1 序列使 mRNA 水平降低了 65%。

[0489] 3. 制备了针对 G-CSFR 的三种 siRNAs(M59818):

[0490] M59818(809639)

[0491] #1 靶序列 (SEQ ID NO :69):AAG TGT GAG CTG CGC CAC AAG(始于编码序列的 793bp 处)。

[0492] #2 靶序列 (SEQ ID NO :70):AAG AGC CCC CTT ACC CAC TAC(始于编码序列的 1666bp 处)。

[0493] #3 靶序列 (SEQ ID NO :71):AAC AGG AAG AAT CCC CTC TGG(始于编码序列的 1957bp 处)。

- [0494] #1 和 #3 靶序列降低了 G-CSFR 的表达水平, #1 序列使 mRNA 水平降低了 53%。
- [0495] 4. 制备了针对 ARA9/XAP2 的三种 siRNAs(U31913) :
- [0496] U31913(814731)
- [0497] #1 靶序列 (SEQ ID NO :72) :AAA CGT GTG ATA CAG GAA GGC(始于编码序列的 48bp 处)
- [0498] #2 靶序列 (SEQ ID NO :73) :AAC AAG TAC GAC GAC AAC GTC(始于编码序列的 775bp 处)
- [0499] #3 靶序列 (SEQ ID NO :74) :AAC GTC AAG GCC TAC TTC AAG(始于编码序列的 790bp 处)
- [0500] #2 和 #3 靶序列使得 ARA9 表达降低, #3 序列使 mRNA 水平降低了 50%。
- [0501] 5. 制备了针对 RNPS1 的三种 siRNAs(AF015608) :
- [0502] AF015608(897594)
- [0503] #1 靶序列 (SEQ ID NO :75) :AAT ATT CAT ACG GCA TGG ACT(始于编码序列的 327bp 处)
- [0504] #2 靶序列 (SEQ ID NO :76) :AAC CTA AAA TAG AAG ACC CCT(始于编码序列的 680bp 处)
- [0505] #3 靶序列 (SEQ ID NO :77) :AAA AGA TGC TGA CTC AGA AAA(始于编码序列的 752bp 处)
- [0506] 所有三个序列均成功降低了 RNPS1 的表达, #1 序列使 mRNA 水平降低了 35%。
- [0507] 6. 制备了针对 Fused toes 的三种 siRNAs(BC001134) :
- [0508] BC001134(321247)
- [0509] #1 靶序列 (SEQ ID NO :78) :AAC CTA AAA TAG AAG ACC CCT(始于编码序列的 680bp 处)
- [0510] #2 靶序列 (SEQ ID NO :79) :AAG ACC CCT ATG CAA TTA GCT(始于编码序列的 692bp 处)
- [0511] #3 靶序列 (SEQ ID NO :80) :AAA AAG CCT GAA GAA CAG CAC(始于编码序列的 769bp 处)
- [0512] 所有三个序列均成功降低了 Fused toes 的表达, #2 序列使 mRNA 水平降低了 43%。
- [0513] 7. 制备了针对粒钙蛋白的三种 siRNAs(BC005214) :
- [0514] BC005214(34140)
- [0515] #1 靶序列 (SEQ ID NO :81) :AAA TGG GAT TTA ATG CAT TCA(始于编码序列的 323bp 处)
- [0516] #2 靶序列 (SEQ ID NO :82) :AAC TTC ATG ACT GTT GAT CAA(始于编码序列的 379bp 处)
- [0517] #3 靶序列 (SEQ ID NO :83) :AAC ATC ATG AGT TGC GTC AAG(始于编码序列的 419bp 处)
- [0518] 所有三个序列均成功降低了粒钙蛋白的表达, #2 序列使 mRNA 水平降低了 83%。
- [0519] 8. 制备了针对 SRB1/CLA1/CD3611 的三种 siRNAs(BC022087) :
- [0520] BC022087(756687)

- [0521] #1 靶序列 (SEQ ID NO :84) :AAG CAG CAG GTC CTT AAG AAC (始于编码序列的 109bp 处)
- [0522] #2 靶序列 (SEQ ID NO :85) :AAT CTC ATC AAC AAG TAC TTT (始于编码序列的 565bp 处)
- [0523] #3 靶序列 (SEQ ID NO :86) :AAT TCA GAA CGT CAG CAC CTG (始于编码序列的 981bp 处)
- [0524] #1 和 #3 靶序列使得 SRB1 表达降低, #1 序列使 mRNA 水平降低了 60%。
- [0525] 9. 制备了针对 KIAA0082 的三种 siRNAs (BC031890) :
- [0526] BC031890 (825293)
- [0527] #1 靶序列 (SEQ ID NO :87) :AAG AGG AGA ACT GAC CCA GAA (始于编码序列的 4bp 处)
- [0528] #2 靶序列 (SEQ ID NO :88) :AAA TGA GCG ATT GGA TGG TGG (始于编码序列的 509bp 处)
- [0529] #3 靶序列 (SEQ ID NO :89) :AAG ATC ATC AAG GGC TCC AGT (始于编码序列的 2164bp 处)
- [0530] #1 序列使 mRNA 水平降低了 65%。#2 和 #3 序列对 mRNA 水平无作用。
- [0531] 10. 制备了针对 eIF2B ϵ 的三种 siRNAs (BC013590) :
- [0532] BC013590 (1630998)
- [0533] #1 靶序列 (SEQ ID NO :90) :AAT GTG GTT CGA ATA ATT ACA (始于编码序列的 352bp 处)
- [0534] #2 靶序列 (SEQ ID NO :91) :AAA CTC GAG ATG ACT TTG TGC (始于编码序列的 800bp 处)
- [0535] #3 靶序列 (SEQ ID NO :92) :AAT CAA CAG CTG CAG AGG TTC (始于编码序列的 2098bp 处)
- [0536] #1 序列使 mRNA 水平降低了 57%, #2 序列使 mRNA 水平降低了 54%, 而 #3 序列使 mRNA 水平降低了 43%。
- [0537] 11. 制备了针对钙调蛋白 2 的三种 siRNAs (D83735) :
- [0538] D83735 (713886)
- [0539] #1 靶序列 (SEQ ID NO :93) :AAG GAT GGA ACT ATC TTA TGC (始于编码序列的 163bp 处)
- [0540] #2 靶序列 (SEQ ID NO :94) :AAT TTC GAC GAT GCC ACC ATG (始于编码序列的 457bp 处)
- [0541] #3 靶序列 (SEQ ID NO :95) :AAC CGA CAA GTG TGA CAA CTC (始于编码序列的 708bp 处)
- [0542] 所有三个序列均使基因表达水平降低, #3 序列使 mRNA 水平降低了 75%。
- [0543] 12. 制备了针对 HYA22 的三种 siRNAs (D88153) :
- [0544] D88153 (123980)
- [0545] #1 靶序列 (SEQ ID NO :96) :AAA GAA ATG TGT GGT CAT TGA (始于编码序列的 507bp 处)

[0546] #2 靶序列 (SEQ ID NO :97) :AAA TCG ATG GAA CTA TAC ATC (始于编码序列的 596bp 处)

[0547] #3 靶序列 (SEQ ID NO :98) :AAC TAT ACA TCA GGT GTA TGT (始于编码序列的 606bp 处)

[0548] 所有三个序列均使基因表达水平降低, #3 序列使 mRNA 水平降低了 60%。

[0549] 13. 制备了针对 CA 125 的三种 siRNAs(BC009808) :

[0550] BC009808(CA 125)

[0551] #1 靶序列 (SEQ ID NO :99) :AAT GGT TTC ACC CAT CAG AGC (始于编码序列的 235bp 处)

[0552] #2 靶序列 (SEQ ID NO :100) :AAG GGC TCA GCT ACA TTC AAC (始于编码序列的 2203bp 处)

[0553] #3 靶序列 (SEQ ID NO :101) :AAT ACA ACG TCC AGC AAC AGT (始于编码序列的 3380bp 处)

[0554] #3 序列使 mRNA 水平降低了 50%。

[0555] 14. 制备了针对 HMT1 的两个 siRNAs(AF222689) 并在 Hey 细胞中进行试验 :

[0556] AF222689

[0557] #1 靶序列 (SEQ ID NO :102) :AAC TCC ATG TTT CAT AAAC CGG (始于编码序列的 202bp 处)

[0558] #2 靶序列 (SEQ ID NO :103) :AAC GTG TAT GGC TTC GAC ATG (始于编码序列的 619bp 处)

[0559] 两个序列成功降低了 HMT1mRNA 的表达, #1 序列降低了大约 70% 而 #2 序列仅降低了刚超过 60%。

[0560] 15. 制备了针对 MPP10 的三种 siRNAs(X98494) 并在 Hey 细胞中进行试验 :

[0561] X98494

[0562] #1 靶序列 (SEQ ID NO :104) :AAG TTC CAG AAA TCT GAA ATA (始于编码序列的 357bp 处)

[0563] #2 靶序列 (SEQ ID NO :105) :AAG AAA ATC CAG AAC ATG TAG (始于编码序列的 1043bp 处)

[0564] #3 靶序列 (SEQ ID NO :106) :AAA ACA GTA GCT TCG GAG AAG 始于编码序列的 1414bp 处)

[0565] 所有三个序列均降低了 mRNA 的表达, #1 序列降低了将近 90%, 而 #2 和 #3 序列分别降低了大约 30% 和 40%。

[0566] 16. 制备了针对 IGFBP-7 的两个 siRNAs(BC017201) 并在 OVCA 429 中进行试验。

[0567] BC017201

[0568] #1 靶序列 :AAG GTA AAA AGG GGT CAC TAT (始于编码序列的 583bp 处). (SEQ ID NO. 107)

[0569] #2 靶序列 :AAA GGG GTC ACT ATG GAG TTC (始于编码序列的 590bp 处). (SEQ ID NO. 108)

[0570] 与对照相比, 仅 #1 序列使 mRNA 水平降低了大约 60%。

- [0571] 17. 制备了针对 NM23-D 的一个 siRNA (BC004880) 并在 OVCA 429 细胞中进行试验 :
- [0572] BC004880 (203003)
- [0573] #3 靶序列 AAT GTC ATC CAC GCC AGC GAC (始于自第一个 ATG 起的 442bp 处) (SEQ ID NO 135)
- [0574] 与对照相比, 仅 #3 序列使 mRNA 水平降低了大约 50%。
- [0575] 18. 制备了针对 WDR1 的三种 siRNA (AB010427) 并在 OVCA 429 细胞中进行试验 :
- [0576] AB010427
- [0577] #1 靶序列 :AAT GGA AAG TGC GTC ATC CTA (始于自第一个 ATG 起的 106bp 处) (SEQ ID NO 136)
- [0578] #2 靶序列 :AAG TTC ACA ATT GGC GAC CAC (始于自第一个 ATG 起的 544bp) (SEQ ID NO 137)
- [0579] #3 靶序列 :AAG TGC TTC AGC ATC GAC AAC (始于自第一个 ATG 起的 1309bp) (SEQ ID NO 138)
- [0580] 与对照相比所有的靶序列都降低了 mRNA 水平, #1 降低了大约 85%, #2 降低了大约 75% 而 #3 降低了大约 70%。
- [0581] 19. 制备了针对 Vinexin β 的一种 siRNA (AF037261) 并在 OVCA 429 细胞中进行试验 :
- [0582] AF037261
- [0583] #2 靶序列 :AAG AGT TAC CTA GAA GCA CCT (SEQ ID NO 139)
- [0584] #1 和 #3 靶序列与对照相比不降低 mRNA 的水平, 但与对照相比 #2 使 mRNA 降低了大约 50%。
- [0585] 20. 制备了针对 KLK6 的三种 siRNA (BC015525) 并在 OVCA 429 细胞中进行试验 :
- [0586] BC015525
- [0587] #1 靶序列 :AAAAAA CCG AAT CTT CAG GTC (SEQ ID NO 140)
- [0588] #2 靶序列 :AACTC TCT GAA CTC ATC CAG (SEQ ID NO 141)
- [0589] #3 靶序列 :AAC TGG ATC CAA AAA ACC ATT (SEQ ID NO 142)
- [0590] #1 靶序列与对照相比没有降低 mRNA 水平, 但与对照相比 #2 使 mRNA 降低了大约 42% 而 #3 使 mRNA 降低了大约 55%。
- [0591] 21. 制备了针对 eIF5 的一种 siRNA (U49436) 并在 OVCA 429 细胞中进行试验 :
- [0592] U49436
- [0593] #1 mRNA 靶序列 :AAT GAC CGT TAC ATT GTC AAT (SEQ ID NO 143)
- [0594] #2 和 #3 靶序列与对照相比不降低 mRNA 的水平, 但与对照相比 #1 使 mRNA 降低了大约 59%。
- [0595] 22. 制备了针对锌指蛋白 262/MYM 的一个 siRNA (AB007885) 并在 OVCA 429 细胞中进行试验 :
- [0596] AB007885
- [0597] #3 靶序列 :AAA ATA TGG GAA CCT ACA ATA (始于自第一个 ATG 起的 3058bp 处) (SEQ ID NO 144)
- [0598] #1 和 #2 靶序列与对照相比不降低 mRNA 的水平, 但与对照相比 #3 使 mRNA 降低了

大约 45%。

[0599] 实施例 9

[0600] 已被证实的基因的体外功能试验：

[0601] 具体 siRNAs 增强 OVCA429 和 OVCAR-3 细胞对顺铂的敏感性的能力，基本如上面实施例 3-5 所述来进行检测。在每个例子中，对顺铂的敏感性都在特异性 siRNAs 存在时增强，但不在非特异性（对照）siRNA 存在时或在阴性对照（未处理）中增强。此数据表明被试基因可以在功能上与卵巢癌细胞系产生对顺铂的抗性有关。结果汇总见表 4。

[0602] 表 4：体外顺铂敏感性试验

[0603]

登录号	名称	siRNA 序列	在 OVCA 429 细胞中试验	429: 对顺铂增加的敏感性	在 OVCAR-3 细胞中试验	OVCAR-3: 对顺铂增加的敏感性
M59818	G-CSFR	#1	是	是		
U31913	ARA9 XAP 2	#3	是	是	是	是
AF015608	RNPS1	#1	是	是		
BC001134	Fused toes	#2	是	是	是	是
BC005214	粒钙蛋白	#2	是	是	是	是
BC022087	SRB1	#1	是	是	是	是
BC031890	KIAA0082	#1	是	是	是	是
AB007885	锌指蛋白	#3	是	是	是	是
BC004880	NM23D	#3	是	是	是	是
AB010427	WDR1	#1		否	是	是
U49436	eIF5 eIF5A	#1	是	是	是	是
D83735	钙调蛋白 2	#3	是	是	是	是
BC015525	KLK6	#3	是	是	是	是
037261	Vinexin β	#2		否	是	是
BC017201	IGFBP-7	#1	是	是	是	是
D88153	HYA22	#3	是	空白	是	是
BC013590	eIF2B ϵ	#1	是	是	是	是
L36870	SAPK/Erk1	#2	是	是	是	是

[0604] 实施例 10

[0605] 体内试验：

[0606] 用 OVCAR-3 细胞和裸鼠开发如下方案来检测肿瘤生长：OVCAR-3 细胞（15 百万 / 注射）接种到裸鼠上臂区下（under upper arm region）。25 天后出现可见肿块。在接种后大约 35 天测定所述肿瘤，然后要么将动物用 4 μ g/kg 体重的顺铂通过 IP 注射一周 3 次、持续 2 周进行治疗，之后 1 周不进行处理，要么仅用作为对照的生理盐水溶液来处理。图 63 显示肿瘤体积为两只小鼠体重的函数。此数据表明，在无任何化疗时，肿瘤在仍有肿瘤的对照动物中持续生长（小鼠 #1）。接受顺铂处理的动物与此相比，显示出肿瘤尺寸的稳定化

(小鼠 #2)。也显示了顺铂治疗前后的肿瘤照片。

[0607] 用表达针对本发明所鉴定基因 (MetAP-2, SPARC, S100A10, S100A11 和需钙蛋白酶-2) 的 siRNAs 的稳定细胞系重复此方案。已经开发了表达需钙蛋白酶 2 或 S100A11 的 siRNAs 的稳定 OVCAR-3 细胞系, 以及表达针对绿色荧光蛋白 (GFP, 细胞生长-无关的标记蛋白) 的稳定 siRNA 的对照 OVCAR-3 细胞系; 通过实时定量 PCR 测定的需钙蛋白酶 2 和 S100A11 的表达及 siRNA 表达的影响见图 64 所示。十五只小鼠被分成五只一组的三组。第一组作为对照来处理, 被注射无 siRNA 表达的 OVCAR-3 细胞, 第二组被注射表达 siRNA 的 OVCAR-3 细胞, 而第三组被注射表达 GFP- 特异性 siRNA 的 OVCAR-3 细胞。在可测定的肿瘤变得明显后, 对照组接受了生理盐水注射, 而第二和第三组接受了标准的顺铂处理。如上所述, 可观察到肿瘤生长是体重的函数。

[0608] 另一个实验中, 分成五只一组的十五只小鼠接种了未掺杂 (即未重组的) 的 OVCAR-3 细胞, 并允许肿瘤生长。第一组作为对照来处理。在可测定的肿瘤变得明显后, 对照组接受了生理盐水注射, 第二组如上述接受了标准的顺铂处理, 第三组接受了与 TNP-470 (临床可识别的烟曲霉素衍生物) 联合的标准顺铂处理。如上所述, 可观察到肿瘤生长是体重的函数。

[0609] 实施例中公开的信息可汇总如下:

[0610] 表 5

[0611]

登录号#	名称	在卵巢癌患者 组织样本组 (panel) 中检验	通过了在 OVCA 429、 OVCAR-3 (或两种) 或 Hey* 中的体外功能证实
BC015973	S100A10 p11 CLP11	是	是

[0612]

登录号#	名称	在卵巢癌患者 组织样本组 (panel)中检验	通过了在 OVCA 429、 OVCAR-3 (或两种)或 Hey*中的体外功能证实
	依钙结合蛋白 1 轻链 42C		
BC001410	S100A11 S100C Calgizzarin	是	是
AF261089	需钙蛋白酶 2 CANPL2 MCANP	是	是
BC004974	SPARC 骨粘连蛋白 BM-40	是	是
BC013782	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	是	是
BC015525	KLK6 Zyme Neurosin Protease M	是	是
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	是	否
U31913	ARA9 XAP2	否	是
D83735	钙调理蛋白 2	否	是
U19251	NAIP	是	否
BC005291	eEF1ε p18	是	否
AF015608	RNPS1	是	是
U49436	eIF5 eIF5A	是	是
BC013590	eIF2Bε	是	是
M65217	HSF2 HSTF2	否	否
AB010427	WDR1 NORI-1	是	是
BC001134	Fused toes	否	是
BC004880	NM23D mn23-H4	是	是
U10439	ADAR1	是	否
BC005214	粒钙蛋白	否	是
BC009808	NBR1	否	否
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4	是	是

[0613]

登录号#	名称	在卵巢癌患者 组织样本组 (panel)中检验	通过了在 OVCA 429、 OVCAR-3 (或两种)或 Hey*中的体外功能证实
	MKK4 MAPKK4		
AB007885	锌指蛋白-262 MYM	是	是
D88153	HYA22	是	是
AB049635	MRPL4 CGI-28	是	否
AF037261	Vinexin	是	是
M59818	G-CSFR	是	是
BC015710	RAB22A	是	否
BC017201	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	否	是
BC011770	FAST 激酶	否	否
AB057597	TESK2	否	否
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	是	是
BC031890	KIAA0082	否	是
NM_006312	NCOR2	否	否
BC032338	MT1	是	否
X98494	MPP10	否	否

[0614] *:所有其表达在药物抗性的肿瘤细胞中升高的基因 (KLK6, ARA9, 钙调理蛋白 2, RNPS1, eIF5, eIF2B ϵ , WDR1, Fused toes, NM23D, 粒钙蛋白, SAPK/Erk1, 锌指蛋白 -262MYM, HYA22, Vinexin β , G-CSFR, IGFBP-7, SRB1, 或 KIAA0082) 都在 OVCAR-3 或 OVCA 429 细胞中进行试验, 并且所有其表达在抗性最强的肿瘤细胞中降低的基因 (MPP10, HMT1, NAIP, EEF1E, RAB22A, NCOR2, 或 MT1) 都在 Hey 细胞中进行试验。

[0615] 应该认识到前面的说明书着重公开了本发明的某些具体实施方案, 对其所做的等同改变或替换都是在所附权利要求书所述的精神和范围内。

[0001]

序列表

<110>	宾夕法尼亚州研究基金会 Al-Murrani, Samer	
<120>	预测并克服对卵巢癌化疗的抗性的方法及预测结肠癌发生的方法	
<130>	03-303-A	
<140>	US	
<141>	2004	
<150>	US 60/533, 505	
<151>	2003-12-31	
<160>	144	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	1 aatcctgtcc aggtggaagt a	21
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	2 aagctccacc tggactacat c	21
<210>	3	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	3 aatgacaagt acatgccct g	21
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	4 aaagatcagc attggaagat a	21
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	5 aagcacatcg acaagttaga a	21
<210>	6	
<211>	21	

[0002]

<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	6	
	aaacagtgcc gattgtgaaa g	21
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	7	
	aaggcatacg ccaagatcaa c	21
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	8	
	aaacttcttc ctgacgaatc g	21
<210>	9	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	9	
	aaacgctatt caagatattt a	21
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	10	
	aaaggatggt tataactaca c	21
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	11	
	aagaaactgg acaccaacag t	21
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	12	
	aatctgattg gtggcctage t	21
<210>	13	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工的	

[0003]

<220>		
<223>	分子信标探针(Molecular Beacon Probe)	
<220>		
<221>	不确定的	
<222>	(1)..(1)	
<223>	c 连接到 FAM	
<220>		
<221>	不确定的	
<222>	(28)..(28)	
<223>	g 连接到 DABCYL	
<400>	13	
	cgcgatatgaa ctgggcttat gtgacgcg	28
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	14	
	ctgggctctg ccttaaaca	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	15	
	gctcccaaaa gtttgaacca	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	16	
	ttgcctgagg ctgtaactga	20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	17	
	ccacttcttt gccacaaagt	20

[0004]

<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	18	
	gaattcggtc agctcagagt	20
<210>	19	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	分子信标探针	
<220>		
<221>	不确定的	
<222>	(1).. (1)	
<223>	c 连接到 FAM	
<220>		
<221>	不确定的	
<222>	(25).. (25)	
<223>	g 连接到 DABCYL	
<400>	19	
	cgctgggtg ggtttgaagg aggcg	25
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	20	
	atcgagtccc tgattgctgt	20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	21	
	gcctgcatga ggtggtagt	20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	

[0005]

<400> 22 cttgccatga ctccttcctc	20
<210> 23 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 23 gcagaagcac atcgacaagt	20
<210> 24 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 24 gcctgcattt aatccattct c	21
<210> 25 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 25 taaccacgtc ctgctgaagt	20
<210> 26 <211> 23 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 26 gctttaagaa agttcttatac aac	23
<210> 27 <211> 19 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 27 gcacagcgga gtggtaga	19
<210> 28	

[0006]

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	28	
	cagaggagtc agacacattg	20
<210>	29	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	29	
	gtatacttac ttcagtgtg tt	22
<210>	30	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	30	
	cattcttget ataacgttta aca	23
<210>	31	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	31	
	ctctgtgact teggcacga	19
<210>	32	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	
<400>	32	
	cagacatcag agcggacat	19
<210>	33	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	PCR 引物	

[0007]

<400> 33 aagaactggg ttcagtggaa a	21
<210> 34 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 34 gagagtgcac ggtcttgagt	20
<210> 35 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 35 agccaccagc taagtacatt	20
<210> 36 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 36 catcgatttc aaccggaaca a	21
<210> 37 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 37 gtgtgtggac ctccatgtta	20
<210> 38 <211> 21 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 38 agcacaccat tacagacaag t	21
<210> 39	

[0008]

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 39	
ggaaccagtt tctgcaggaa	20
<210> 40	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 40	
ctccagcagc acctcaatg	19
<210> 41	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 41	
atccaaggtt atgtggttcc tt	22
<210> 42	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 42	
cacctcctgg gcttctgaa	19
<210> 43	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 43	
gatccatgaa gctaatgtac aa	22
<210> 44	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	

[0009]

<400> 44 acgggcagaa gccttcgtt	19
<210> 45 <211> 19 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 45 cctgaggttc tccgagatg	19
<210> 46 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 46 tccagcccga aattctctgt	20
<210> 47 <211> 19 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 47 caagaggcgg aagggtaaa	19
<210> 48 <211> 17 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 48 cagccgctcg ggtaggt	17
<210> 49 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 49 cactatggaa ggaccttget	20
<210> 50	

[0010]

<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 50	
ggatacaggt gtaggtaaat c	21
<210> 51	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 51	
tcccagatta ggaatttatg ta	22
<210> 52	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 52	
cttctggaac aggcgaaga	19
<210> 53	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 53	
getggcccag acgacgaa	18
<210> 54	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 54	
gcagacacac gtggatggt	19
<210> 55	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	

[0011]

<400> 55 gatgaagtta aatcctcctt tg	22
<210> 56 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 56 cctctttctgt getgtcactt	20
<210> 57 <211> 19 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 57 cctgcaagaa gagctgctg	19
<210> 58 <211> 19 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> PCR 引物	
<400> 58 cacagctgtc ctggcatca	19
<210> 59 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 59 aaatggaaca cgccatggaa a	21
<210> 60 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 60 aaattcgctg gggataaagg c	21
<210> 61 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 61 aataatgaag gacctggacc a	21

[0012]

<210> 62	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 62	
gctcccaaaa gtttgaacca	20
<210> 63	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 63	
gcctgcatga ggtggttagt	20
<210> 64	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 64	
aaatgggacg aggagcttat g	21
<210> 65	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 65	
aagcgcatca cgacaaggat a	21
<210> 66	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 66	
aacaggattg actactatag c	21
<210> 67	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 67	
aatacagggt cactcaagta g	21
<210> 68	
<211> 21	
<212> DNA	

[0013]

<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	68	
	aaatatctta atgtgtctcg c	21
<210>	69	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	69	
	aagtgtgagc tgcgccacaa g	21
<210>	70	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	70	
	aagagccccc ttacceacta c	21
<210>	71	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	71	
	aacaggaaga atccctctg g	21
<210>	72	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	72	
	aaacgtgtga tacaggaagg c	21
<210>	73	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	73	
	aacaagtacg acgacaacgt c	21
<210>	74	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	74	
	aacgtcaagg cctacttcaa g	21
<210>	75	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	

[0014]

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(3)..(3)	
<223>	n 是 a, c, g, 或 t	
<400>	75	
	sdnaatattc atacggcatg gact	24
<210>	76	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	76	
	aacctaaaat agaagacccc t	21
<210>	77	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	77	
	aaaagatgct gactcagaaa a	21
<210>	78	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	78	
	aacctaaaat agaagacccc t	21
<210>	79	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	79	
	aagacccta tgcaattagc t	21
<210>	80	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	80	
	aaaaagcctg aagaacagca c	21
<210>	81	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	81	
	aatgggatt taatgcattc a	21
<210>	82	
<211>	21	

[0015]

<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	82	
	aacttcatga ctgttgatca a	21
<210>	83	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	83	
	aacatcatga gttgcgtcaa g	21
<210>	84	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	84	
	aagcagcagg tccttaagaa c	21
<210>	85	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	85	
	aatctcatca acaagtactt t	21
<210>	86	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	86	
	aattcagaac gtcagcacct g	21
<210>	87	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	87	
	aagaggagaa ctgaccaga a	21
<210>	88	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	88	
	aaatgagcga ttggatggtg g	21
<210>	89	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	

[0016]

<400> 89 aagatcatca agggtccag t	21
<210> 90 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 90 aatgtggttc gaataattac a	21
<210> 91 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 91 aaactcgaga tgactttgtg c	21
<210> 92 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 92 aatcaacagc tgcagaggtt c	21
<210> 93 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 93 aaggatggaa ctatcttatg c	21
<210> 94 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 94 aatttcgacg atgccaccat g	21
<210> 95 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 95 aaccgacaag tgtgacaact c	21
<210> 96 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 96 aaagaaatgt gtggtcattg a	21

[0017]

<210>	97	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	97	
	aaatcgatgg aactatacat c	21
<210>	98	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	98	
	aactatacat caggtgtatg t	21
<210>	99	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	99	
	aatggtttca cccatcagag c	21
<210>	100	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	100	
	aagggctcag ctacattcaa c	21
<210>	101	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	101	
	aatacaacgt ccagcaacag t	21
<210>	102	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	102	
	aactccatgt ttcataaacc gg	22
<210>	103	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	103	
	aacgtgtatg gettcgacat g	21
<210>	104	
<211>	21	

[0018]

<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 104	
aagttccaga aatctgaaat a	21
<210> 105	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 105	
aagaaaatcc agaacatgta g	21
<210> 106	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 106	
aaaacagtag cttcggagaa g	21
<210> 107	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 107	
aaggtaaaaa ggggtcacta t	21
<210> 108	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 108	
aaaggggtca ctatggagtt c	21
<210> 109	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 109	
agcaccagca ctggetcatc aa	22
<210> 110	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 110	
agagccagaa gagctgcta	19
<210> 111	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人(Homo Sapiens)	

[0019]

<400> 111 aaccgacaag tgtgacaact	20
<210> 112 <211> 18 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 112 tgtgccttgc gggcagta	18
<210> 113 <211> 20 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 113 caccaccacc accaaatgaa	20
<210> 114 <211> 20 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 114 catccattcg acgcctttga	20
<210> 115 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 115 ccagcagcac agtcaacaa a	21
<210> 116 <211> 20 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 116 tggtagcttc tgcttcacaa	20
<210> 117 <211> 19 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 117 ccagagctgc actcattcc	19
<210> 118 <211> 22 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 118 cactgttggg gataaagcaa tt	22

[0020]

<210>	119	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	119	
	ggataaaggc tacttaacaa ag	22
<210>	120	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	120	
	ccactttgcc atctctacac	20
<210>	121	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	121	
	gagccgagga ggttgaa g	19
<210>	122	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	122	
	ctcctctggg tctatagtgt	20
<210>	123	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	123	
	gaccctggtg gcggtgaa	18
<210>	124	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	124	
	ggtgcctgca gcatcttca	19
<210>	125	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	125	
	ggagagccct ggcacgta	18
<210>	126	

[0021]

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	126	
	ccttcacatctg caggttcttg	20
<210>	127	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	127	
	acgacggaca cattaattac t	21
<210>	128	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	128	
	tccatgctgc agctgatga	19
<210>	129	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	129	
	ccttcggcaa agggagagt	19
<210>	130	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	130	
	ctggatgagt tcagagagtt t	21
<210>	131	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	131	
	gcctcgacag gcagagat	18
<210>	132	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	132	
	cttgtagctg aagatgtcaa t	21
<210>	133	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	

[0022]

<400> 133 ctctatgcc gggacaagt	19
<210> 134 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 134 aagacatgtc gaagccatac a	21
<210> 135 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 135 aatgtcatcc acgccagcga c	21
<210> 136 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 136 aatggaaagt ggcgtcatcct a	21
<210> 137 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 137 aagttcaciaa ttggcgacca c	21
<210> 138 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 138 aagtgttca gcatcgacaa c	21
<210> 139 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 139 aagagttacc tagaagcacc t	21
<210> 140 <211> 21 <212> DNA <213> 人(Homo Sapiens)	
<400> 140 aaaaaacga atcttcaggt c	21

[0023]

<210>	141	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	141	
	aaactctctg aactcatcca g	21
<210>	142	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	142	
	aactggatcc aaaaaccat t	21
<210>	143	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	143	
	aatgaccgtt acattgtcaa t	21
<210>	144	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人(Homo Sapiens)	
<400>	144	
	aaaatatggg aacctacaat a	21

756595mRNA在上皮卵巢癌细胞系中的表达

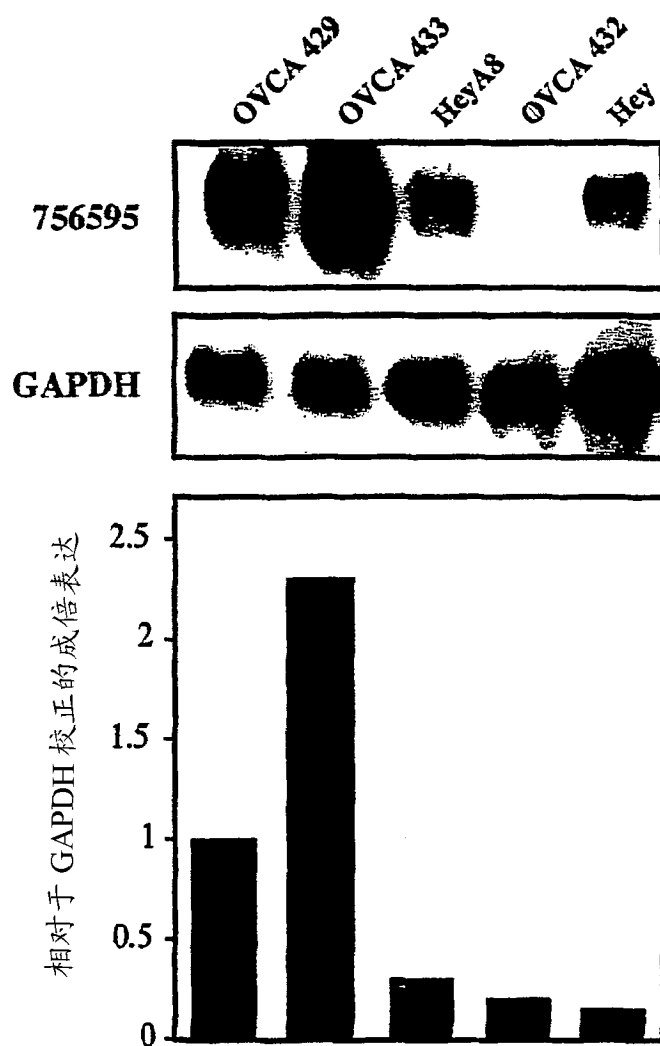


图 1

810612mRNA在上皮卵巢癌细胞系中的表达

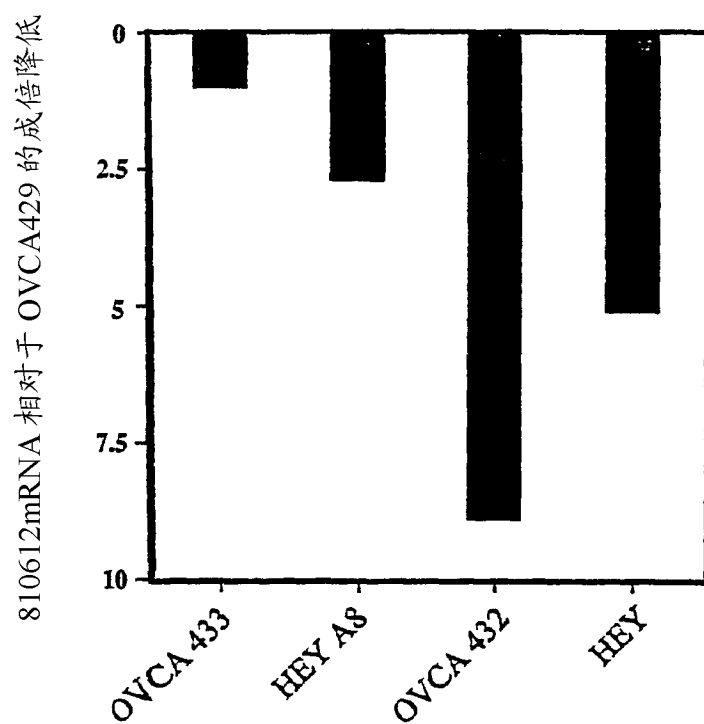


图 2

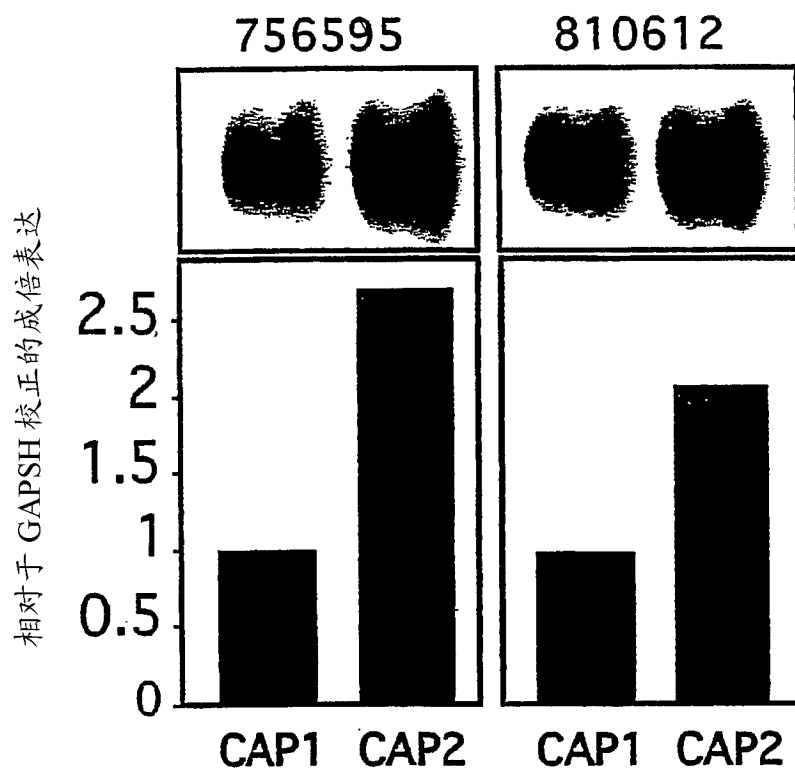


图 3

通过定量实时PCR证实250654在上皮卵巢癌细胞系中的表达

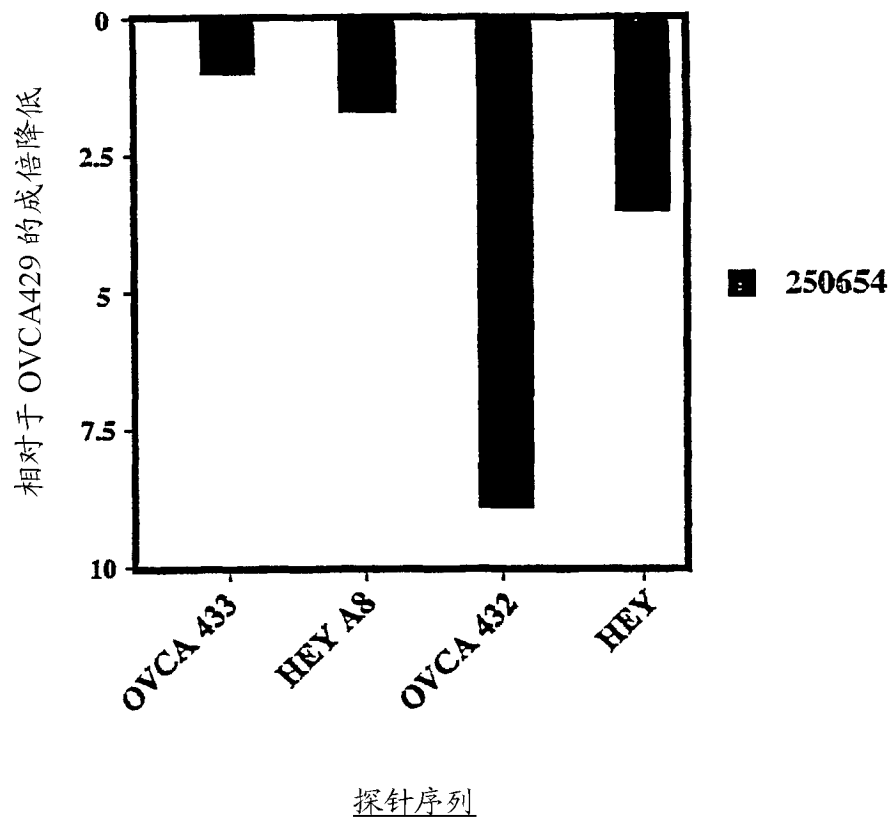


图 4

在非反应性上皮卵巢癌患者中250654随时间的表达

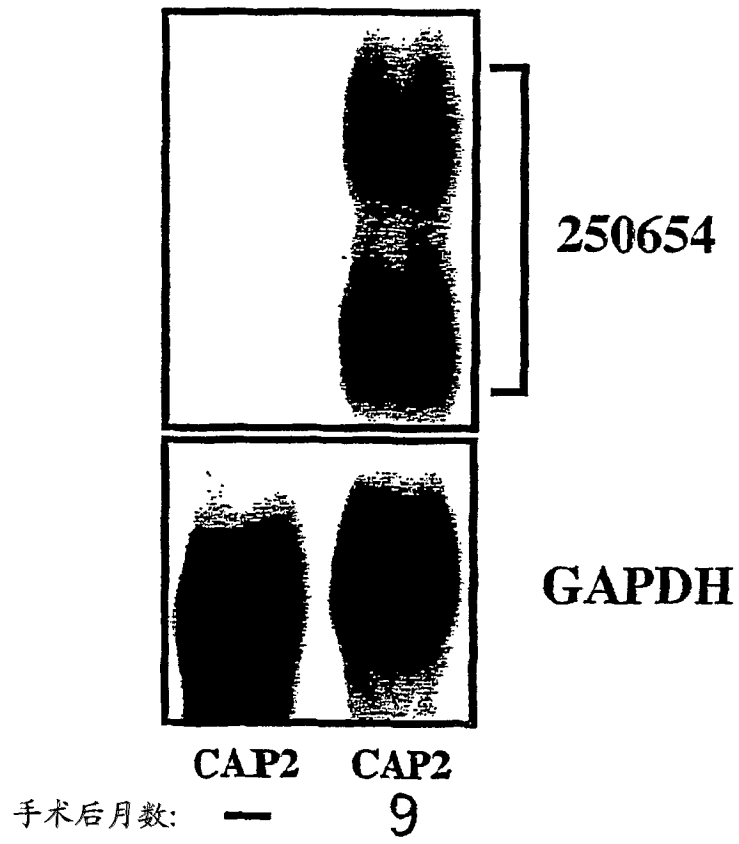
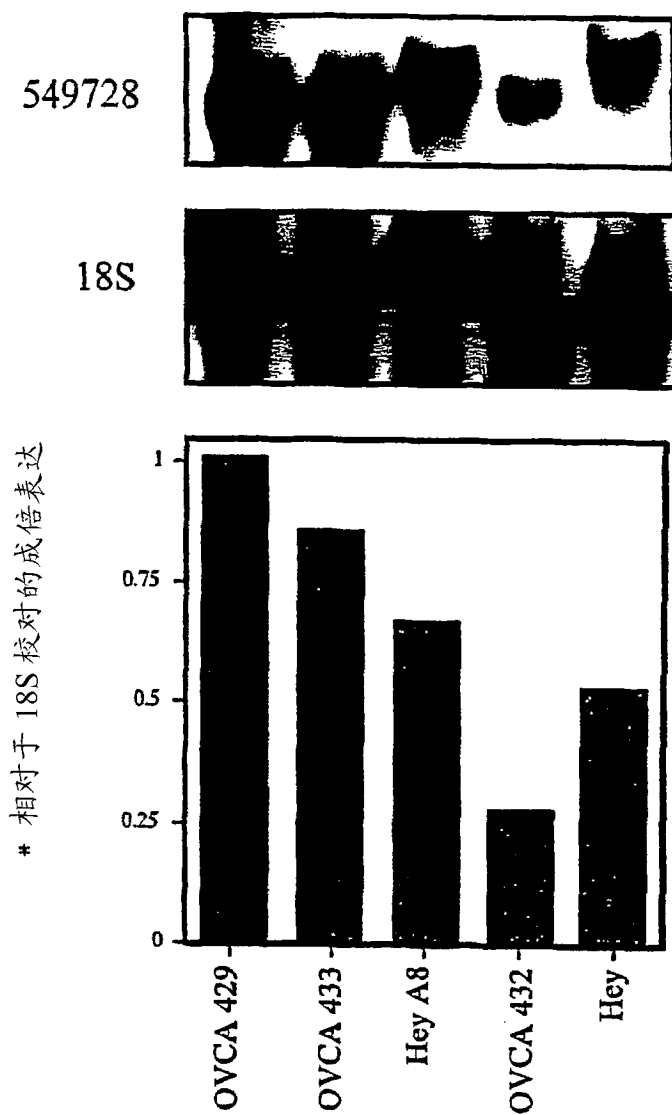
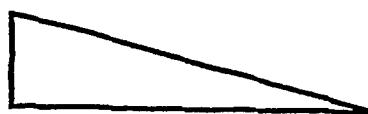


图 5

549728的Northern印迹分析



* 所示点为一式两份的均值



对顺铂的抗性

图 6

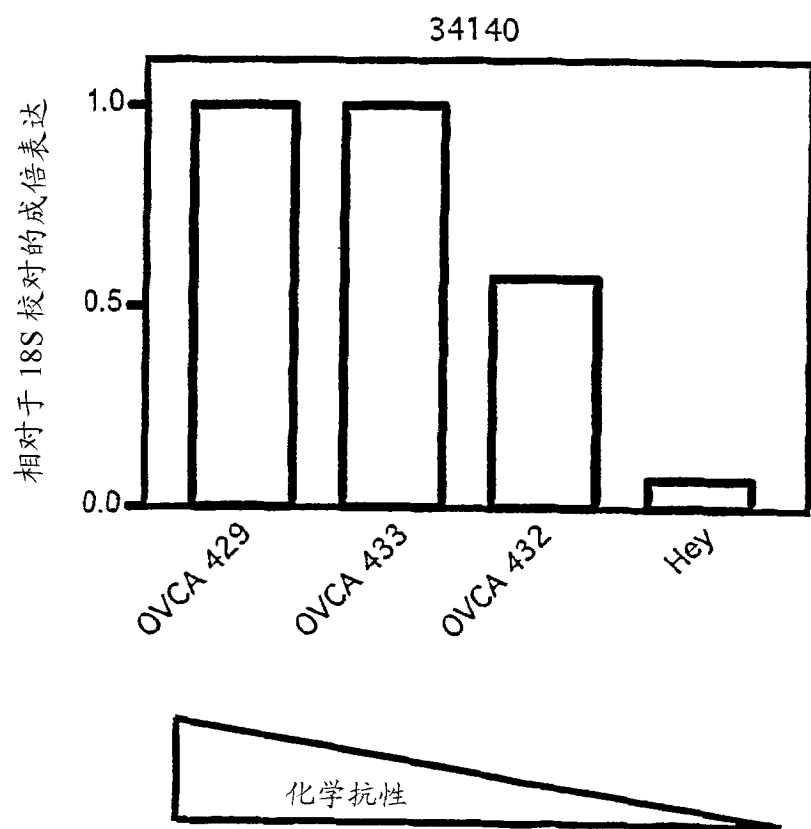


图 7

在来自上皮卵巢癌细胞系的总蛋白质提取物中的39093蛋白质表达

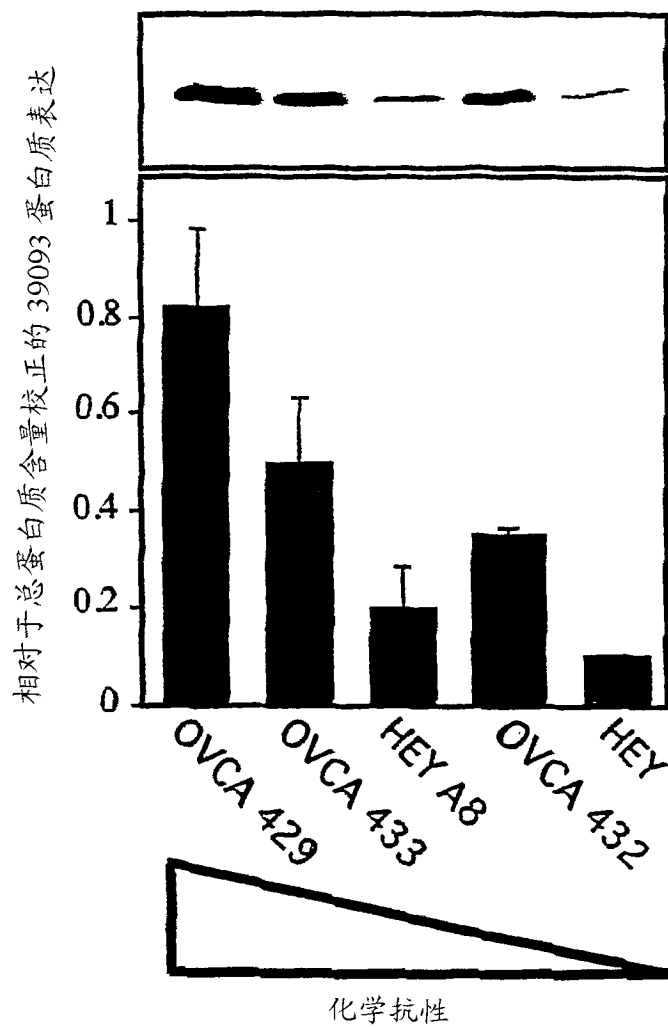


图 8

39093mRNA在上皮卵巢癌患者中的表达

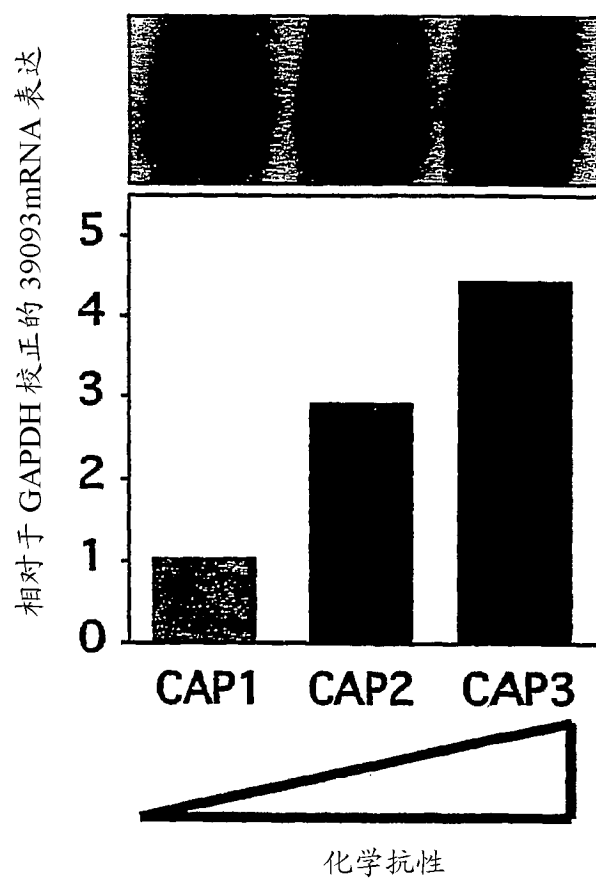


图 9

884867mRNA在上皮卵巢癌细胞系中的表达

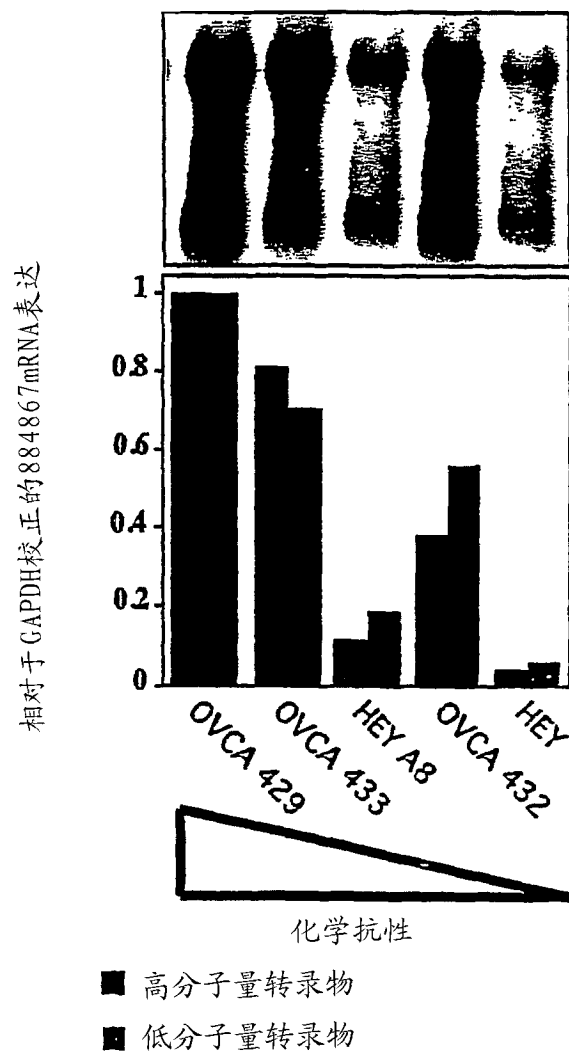
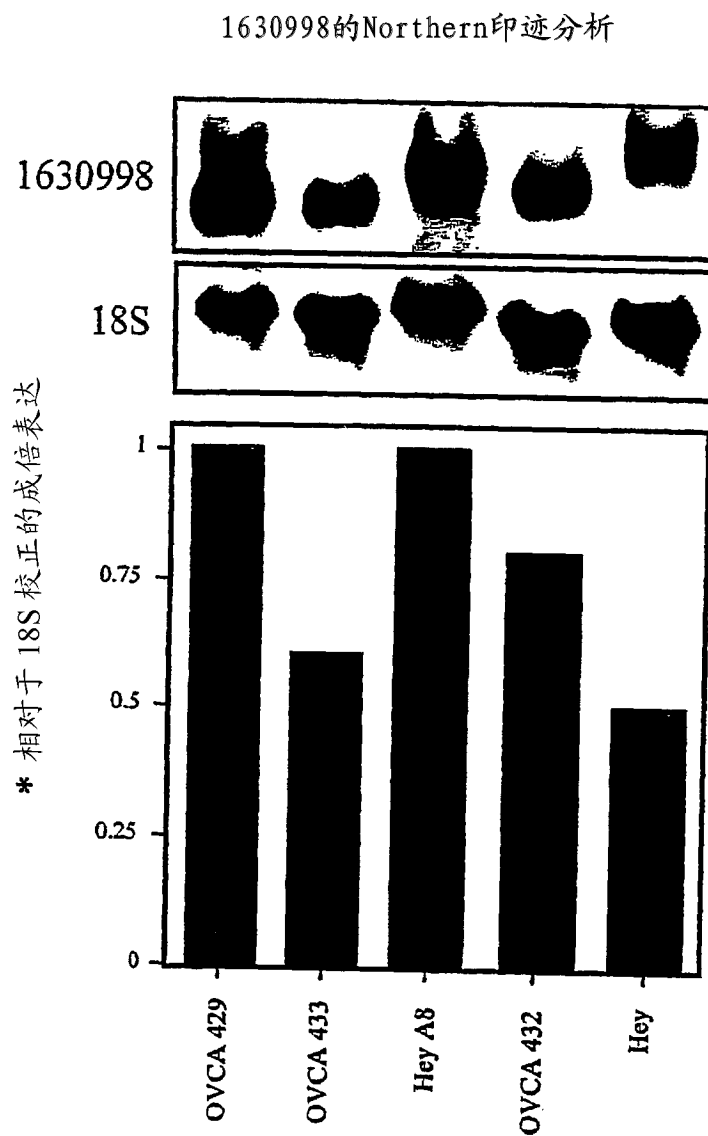


图 10

在上皮卵巢癌患者中884867mRNA随时间的表达



图 11



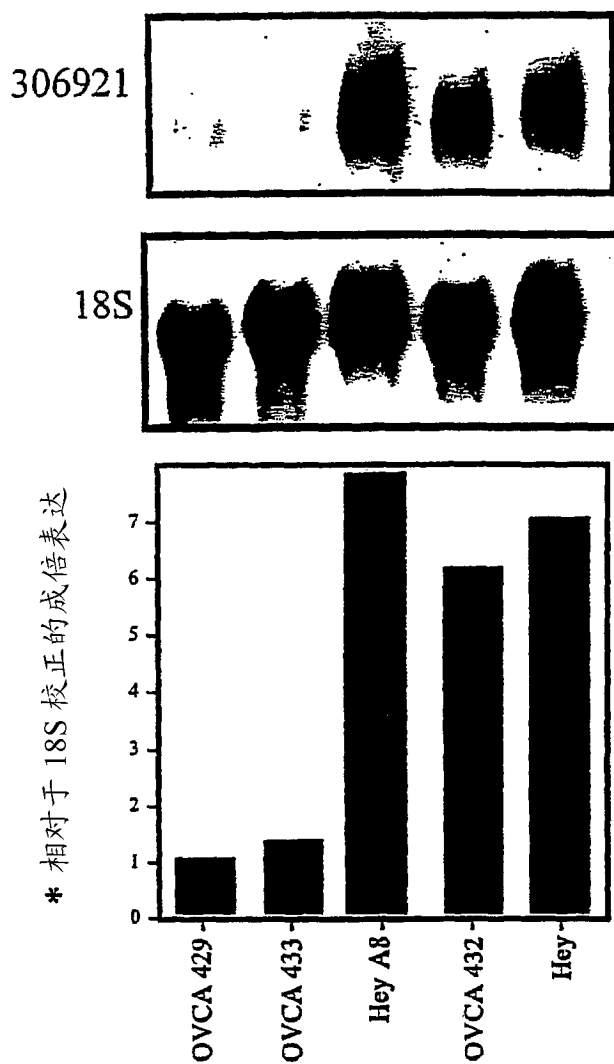
* 所示点为一式两份的均值



对顺铂的抗性

图 12

306921的Northern印迹分析



* 所示点为一式两份的均值



对顺铂的抗性

图 13

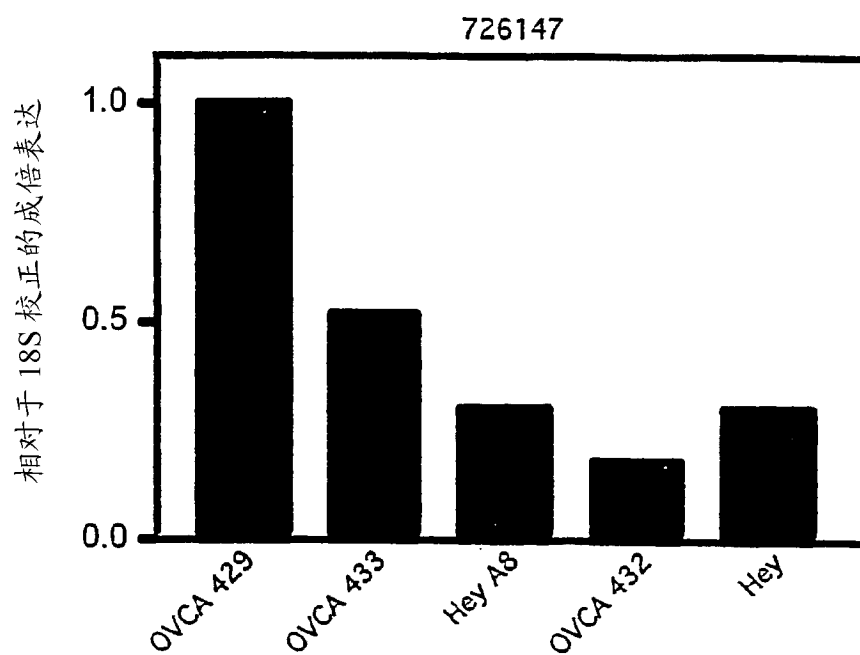


图 14

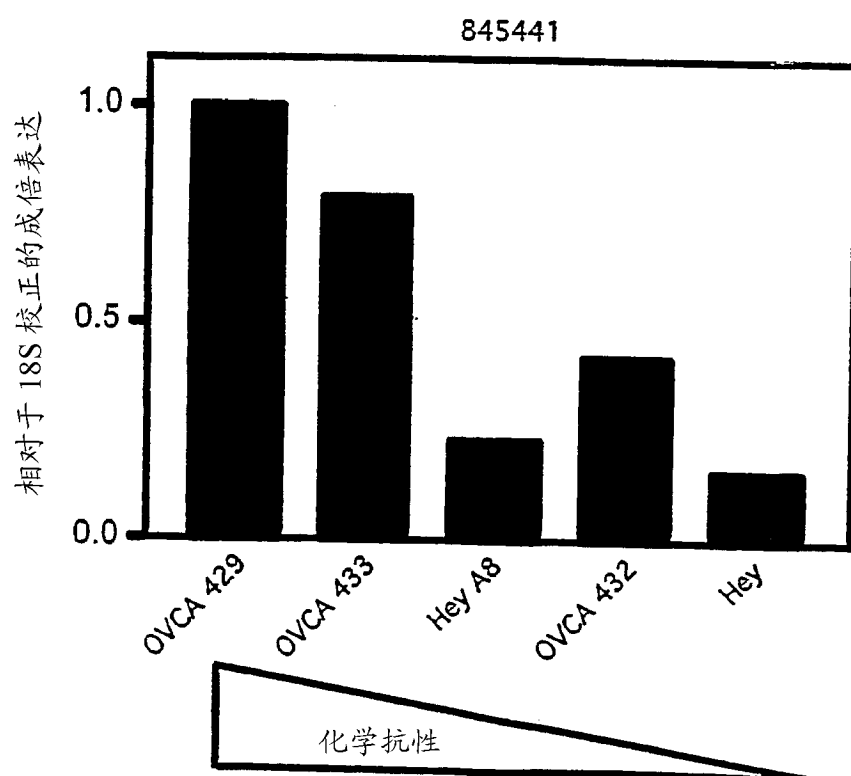


图 15

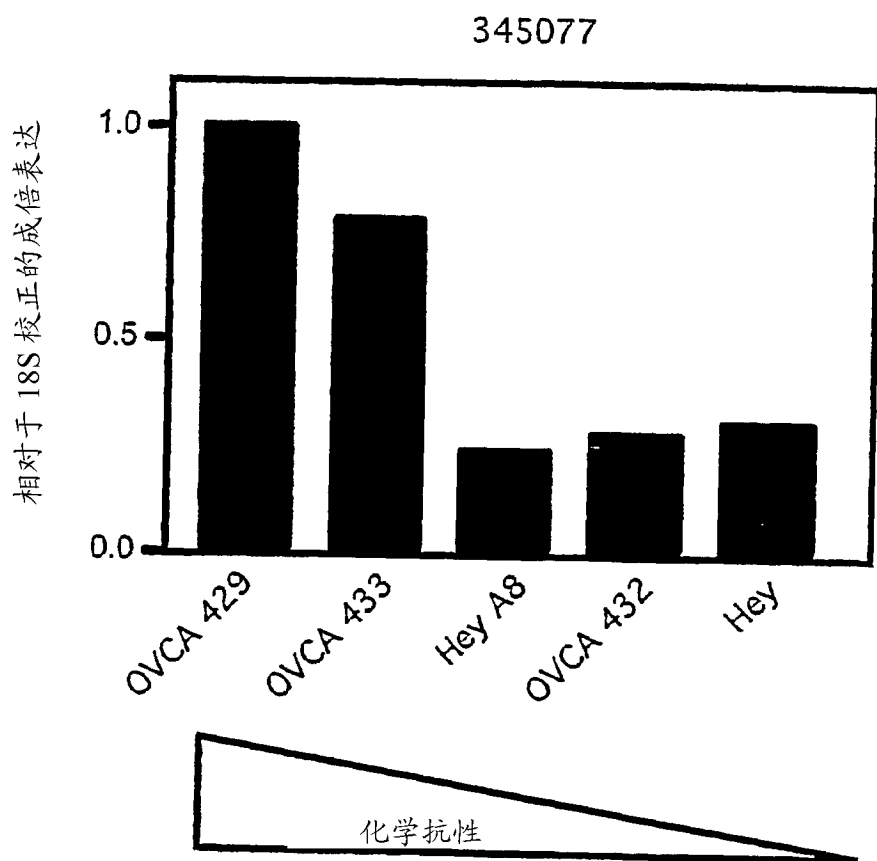


图 16

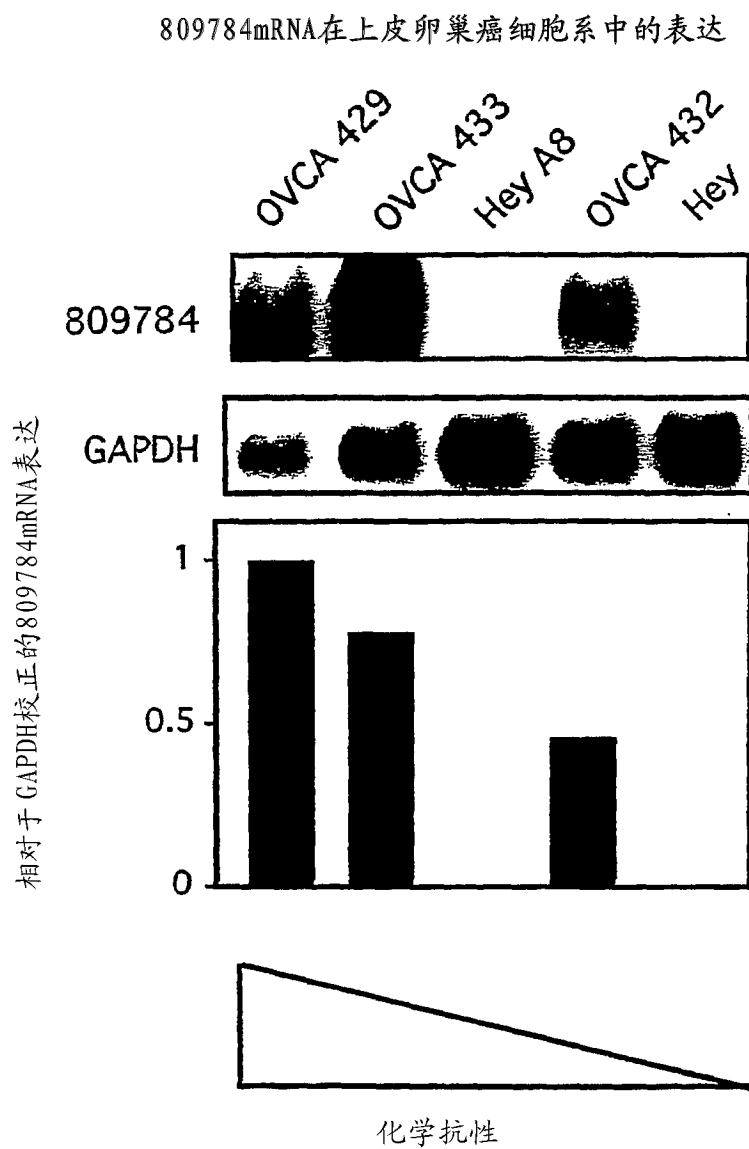
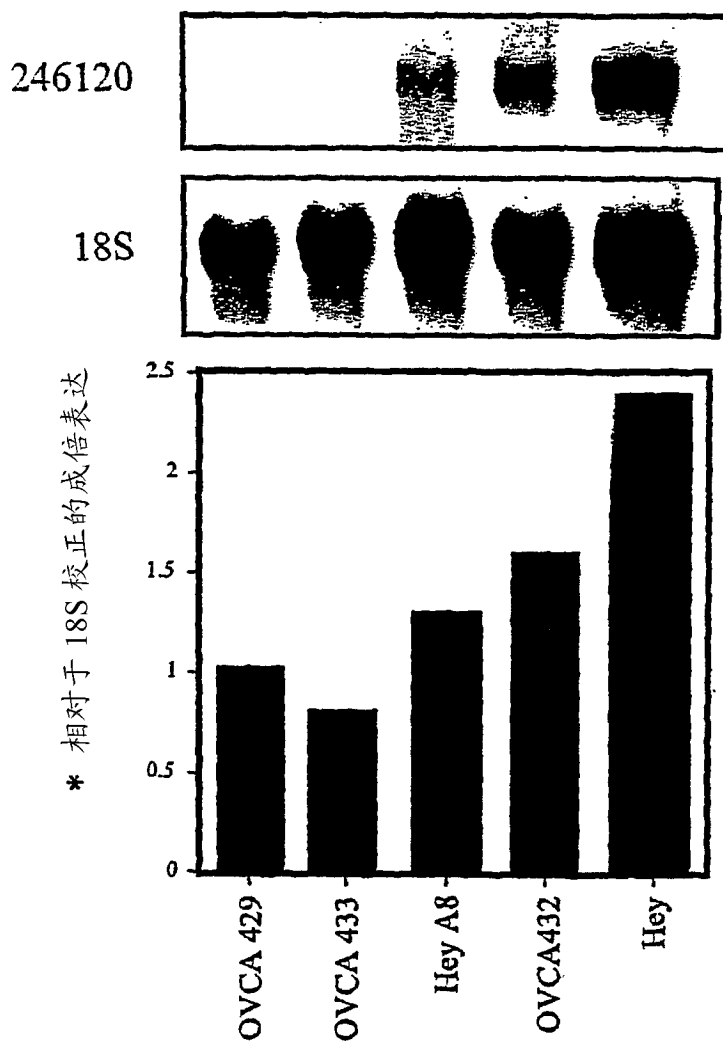


图 17

246120的Northern印迹分析

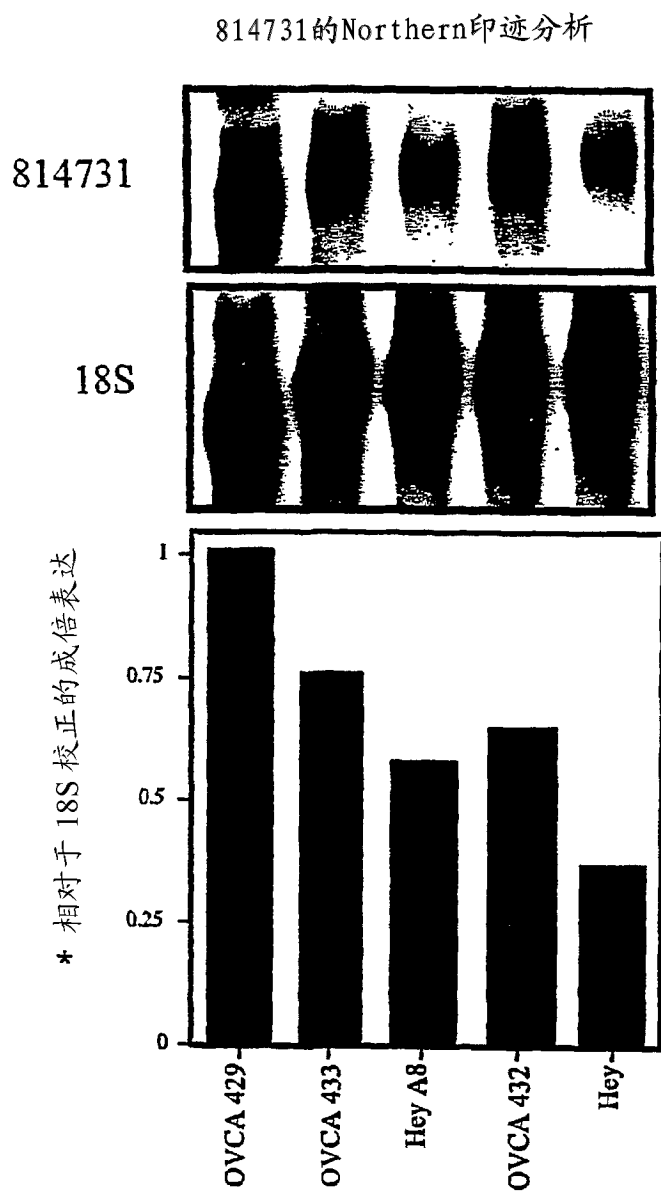


* 所示点为一式两份的均值



对顺铂的抗性

图 18



* 所示点为一式两份的均值

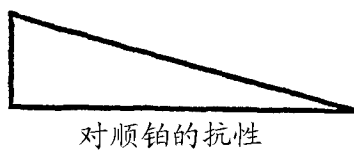
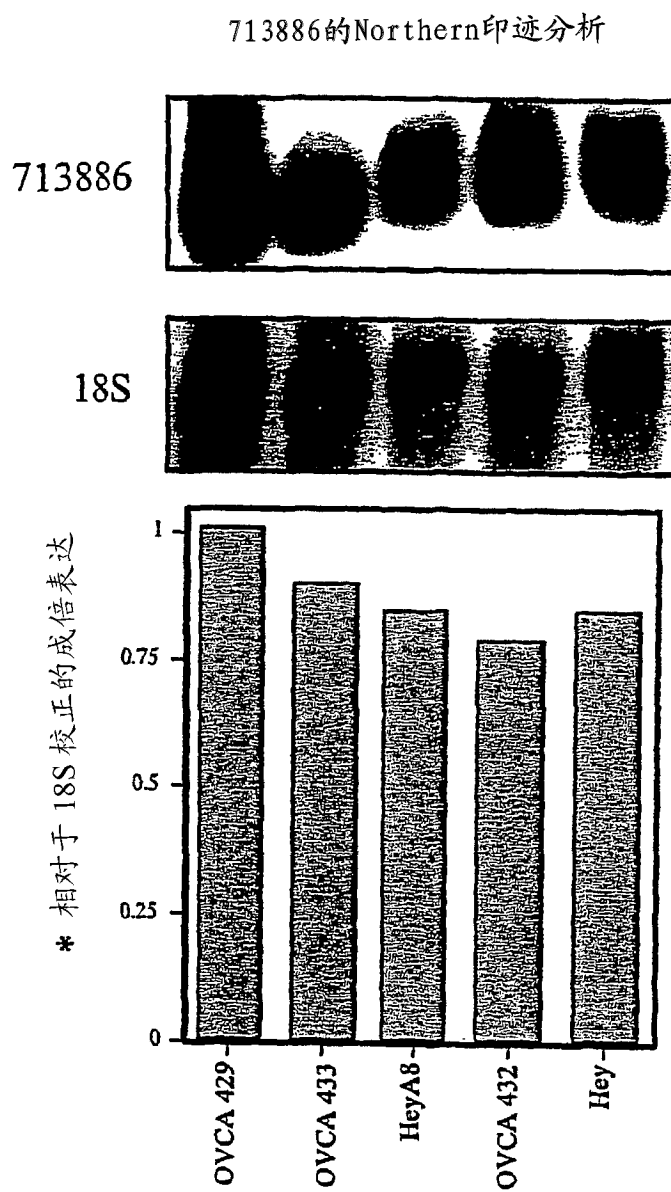


图 19



* 所示点为一式两份的均值

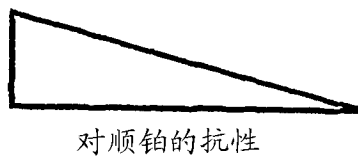
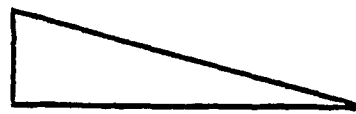
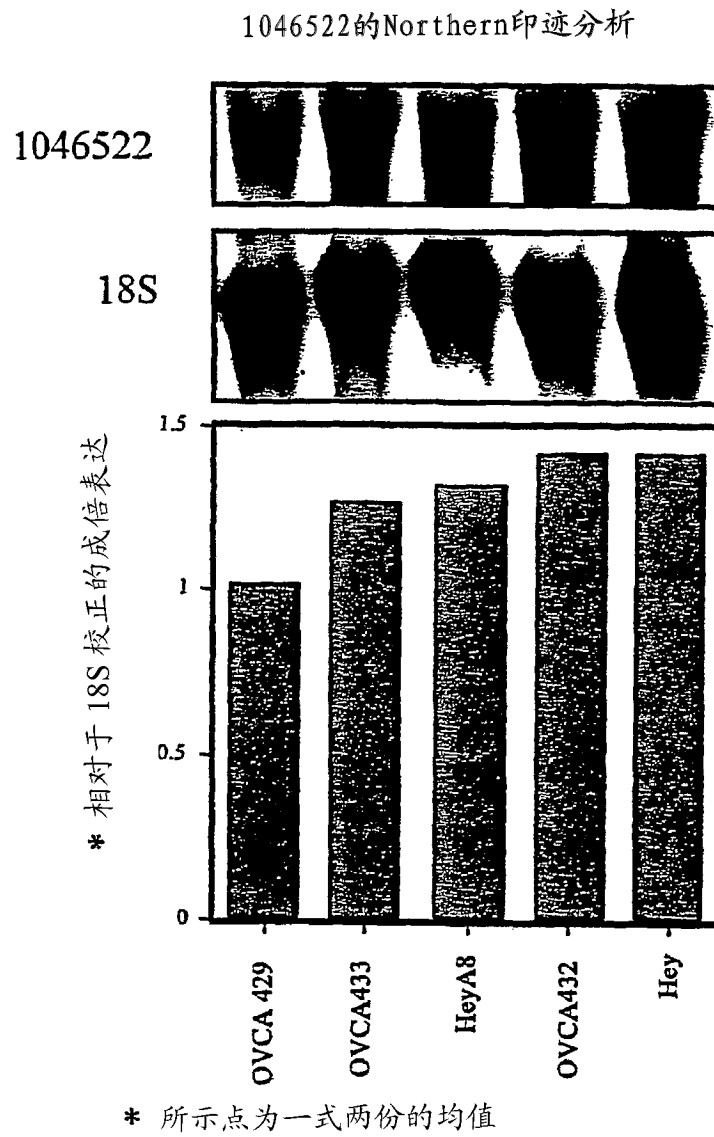
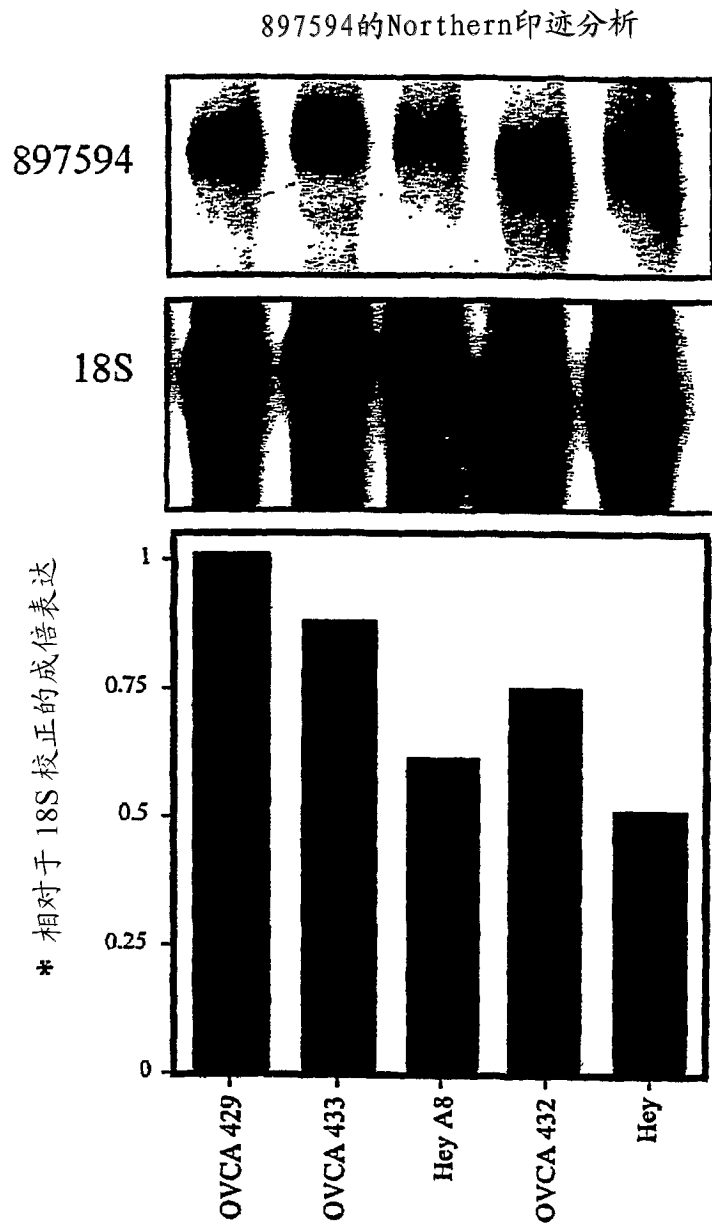


图 20



对顺铂的抗性

图 21



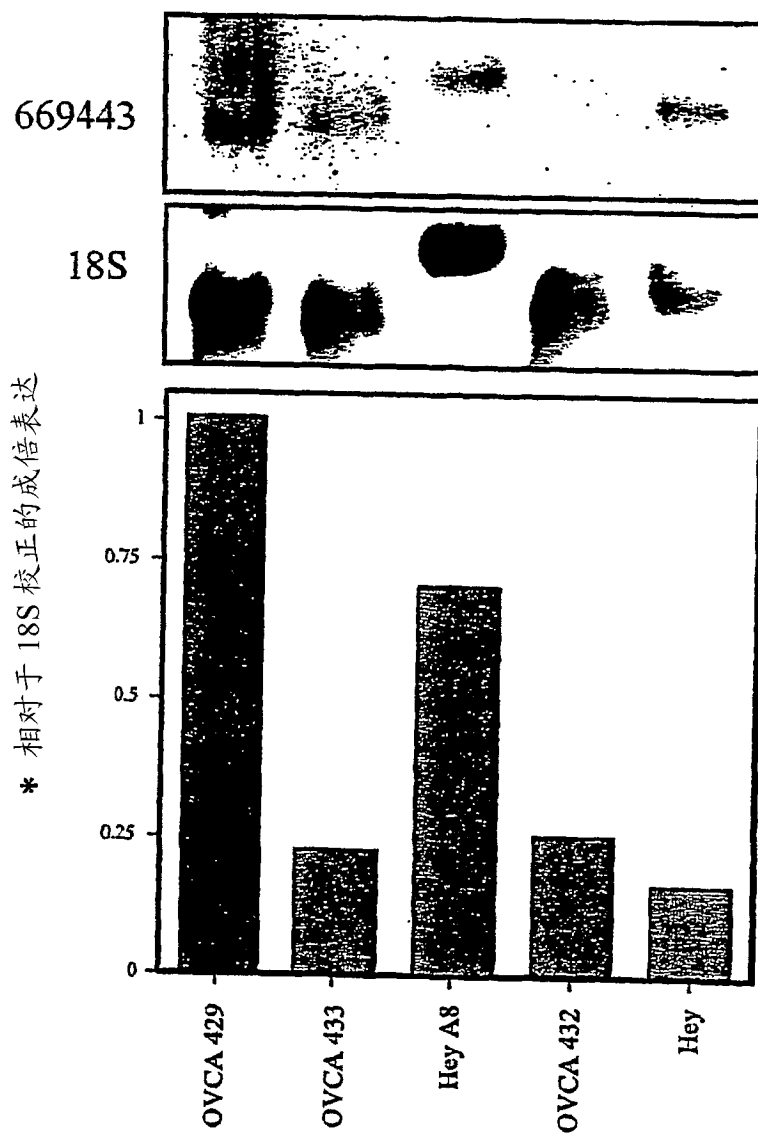
* 所示点为一式两份的均值



对顺铂的抗性

图 22

669443的Northern印迹分析



* 所示点为一式两份的均值

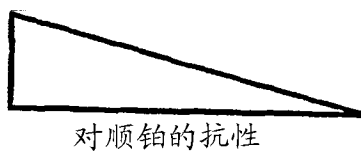
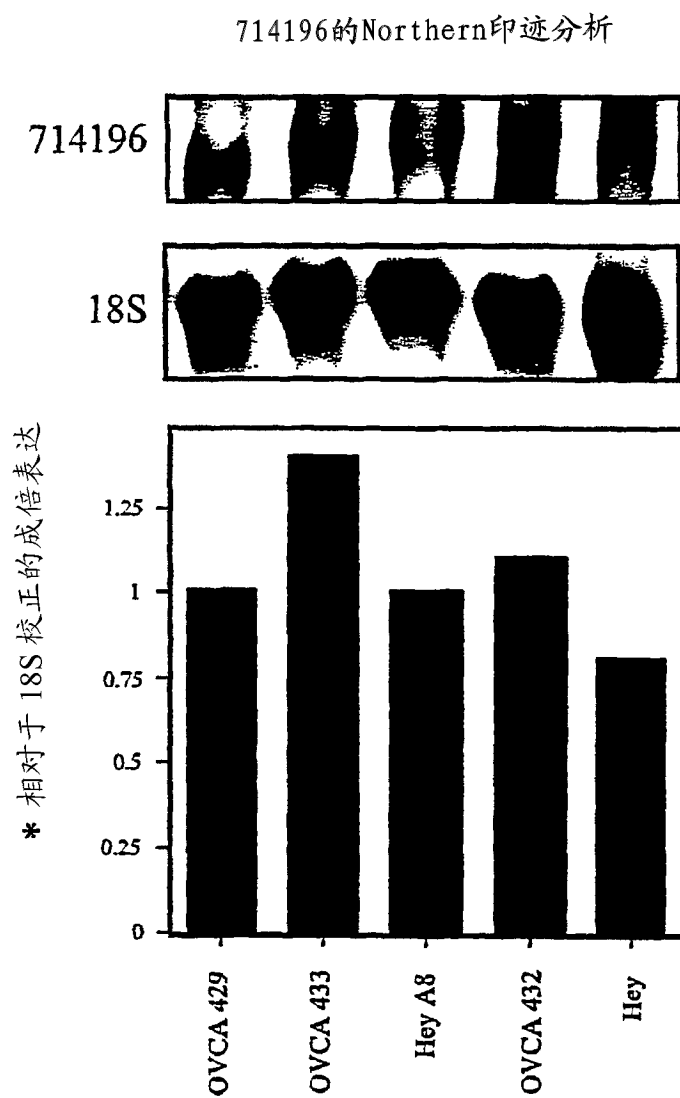


图 23



* 所示点为一式两份的均值

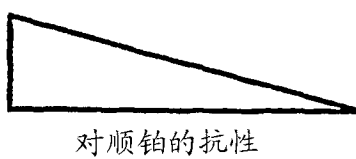
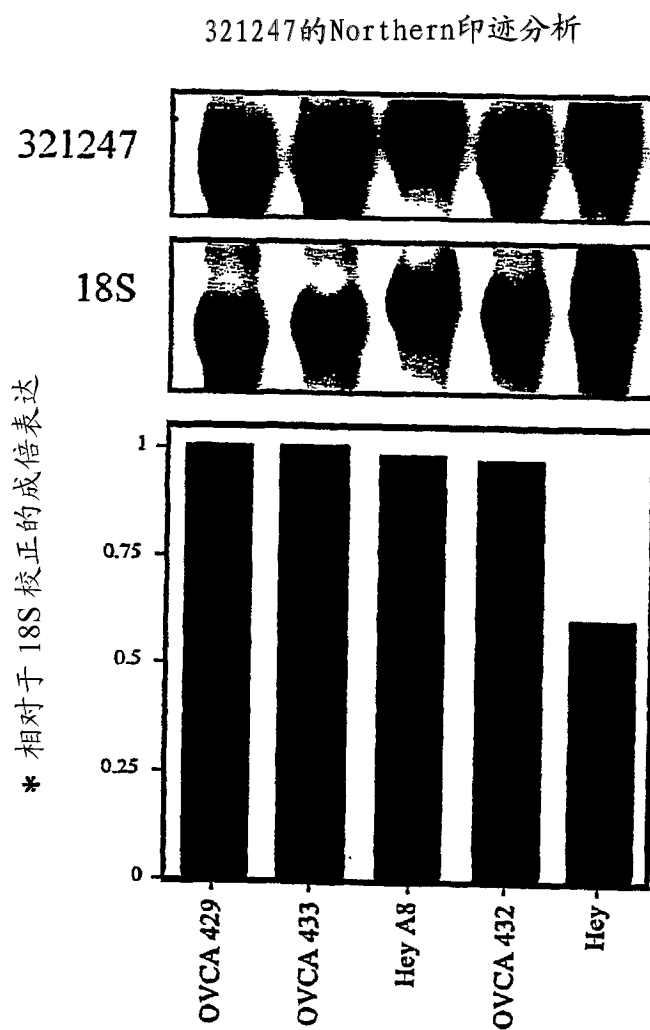
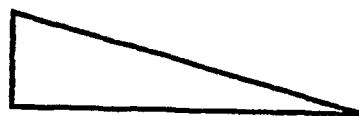


图 24



* 所示点为一式两份的均值



对顺铂的抗性

图 25

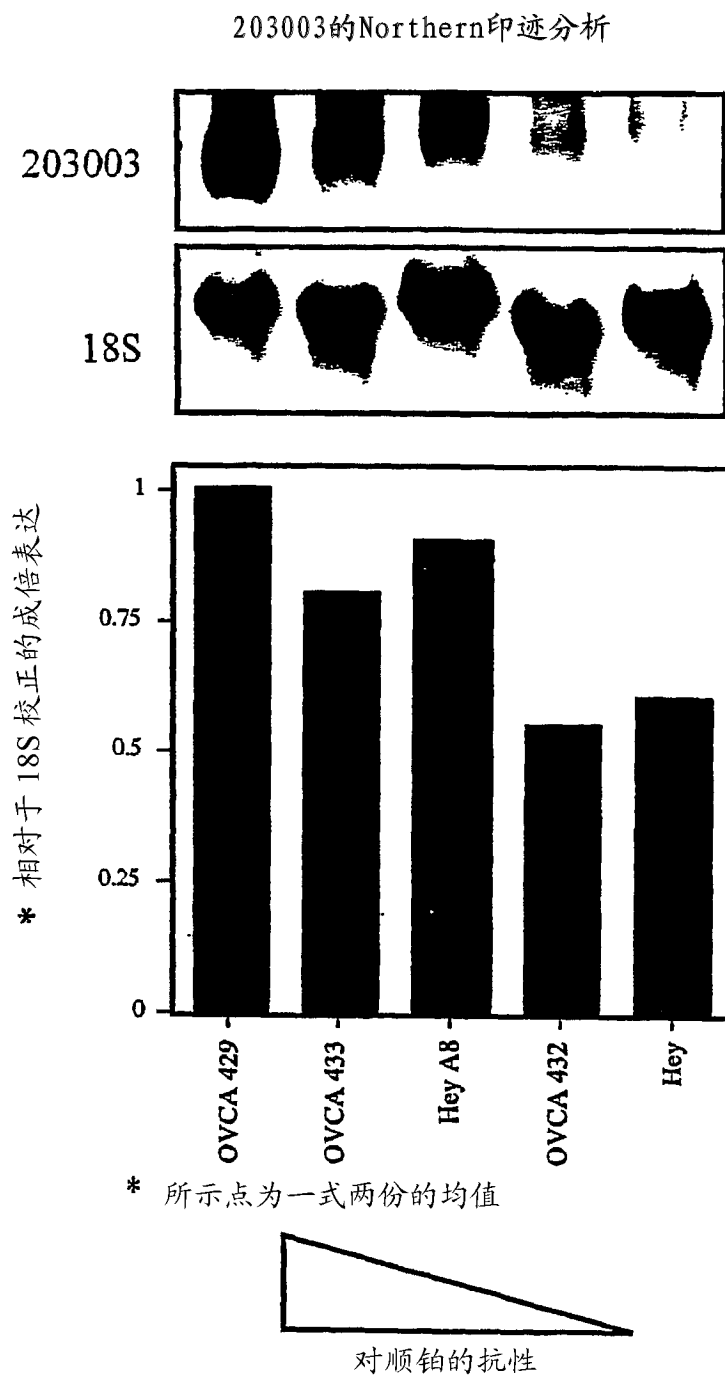


图 26

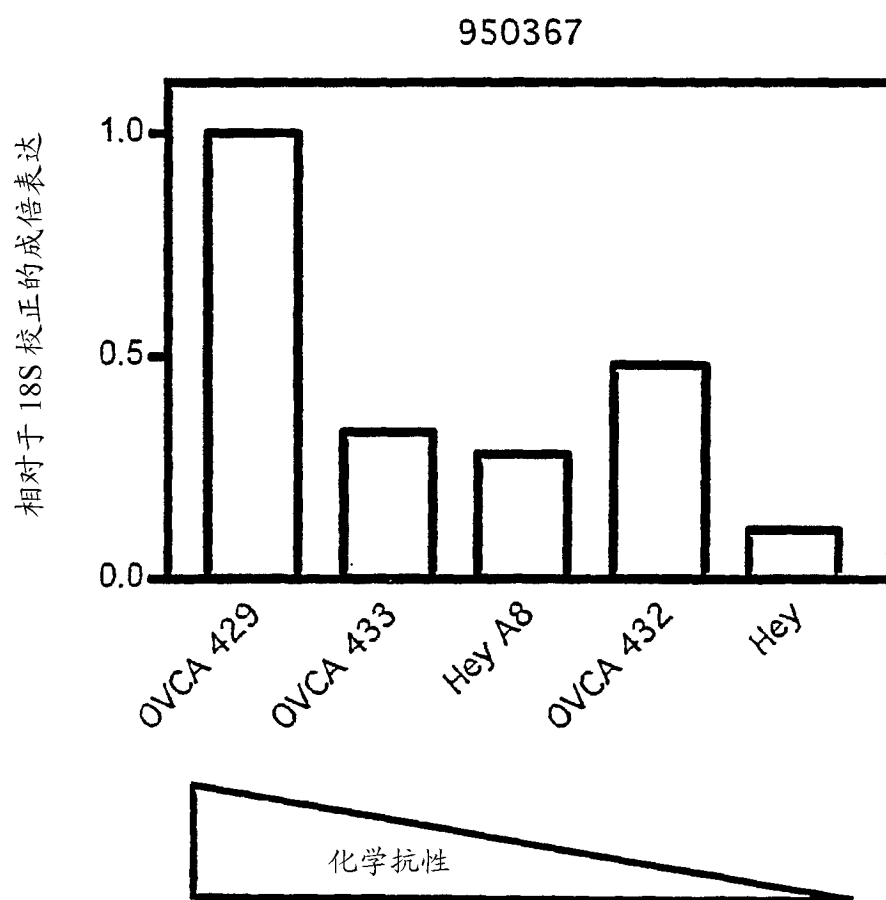


图 27

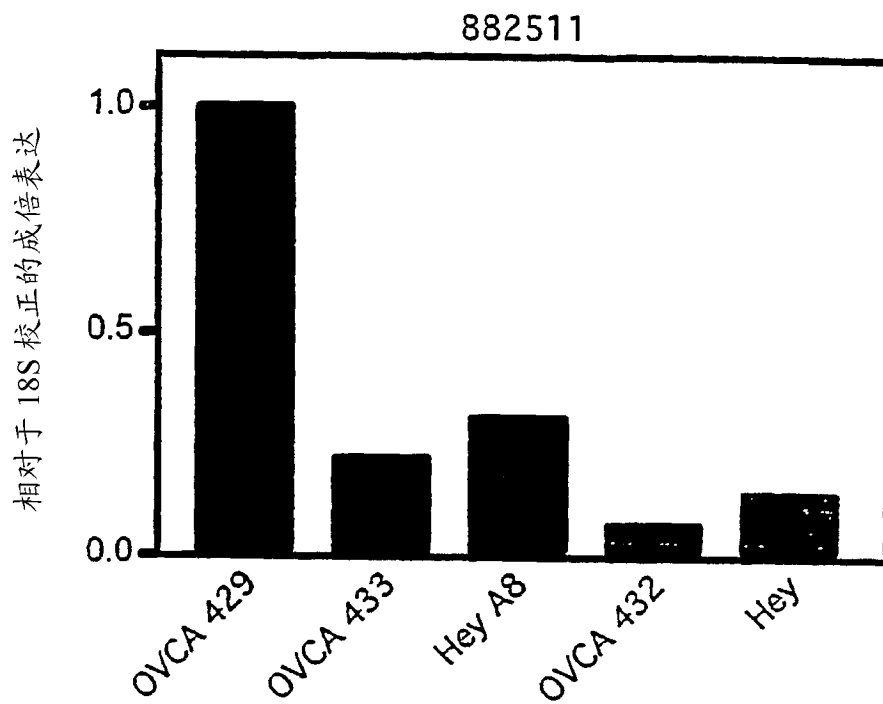


图 28

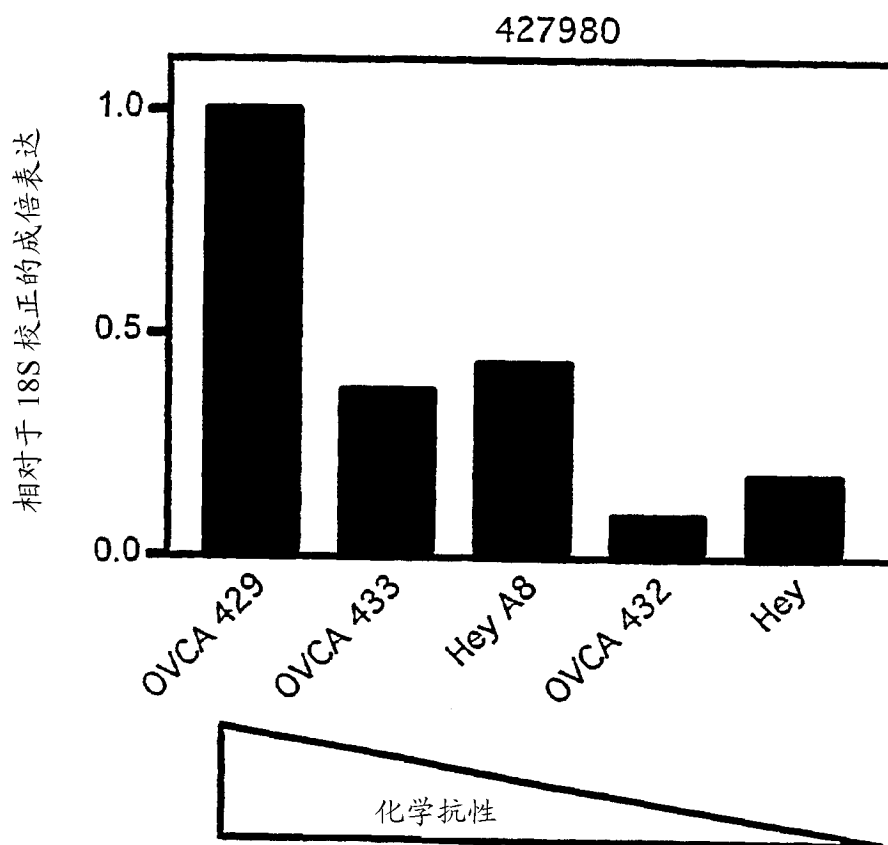


图 29

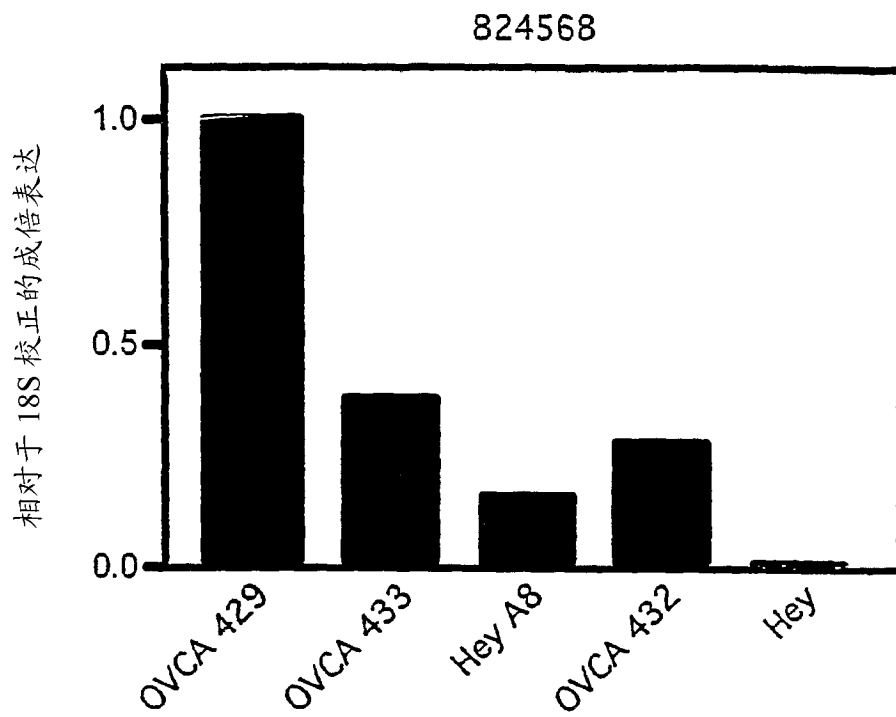


图 30

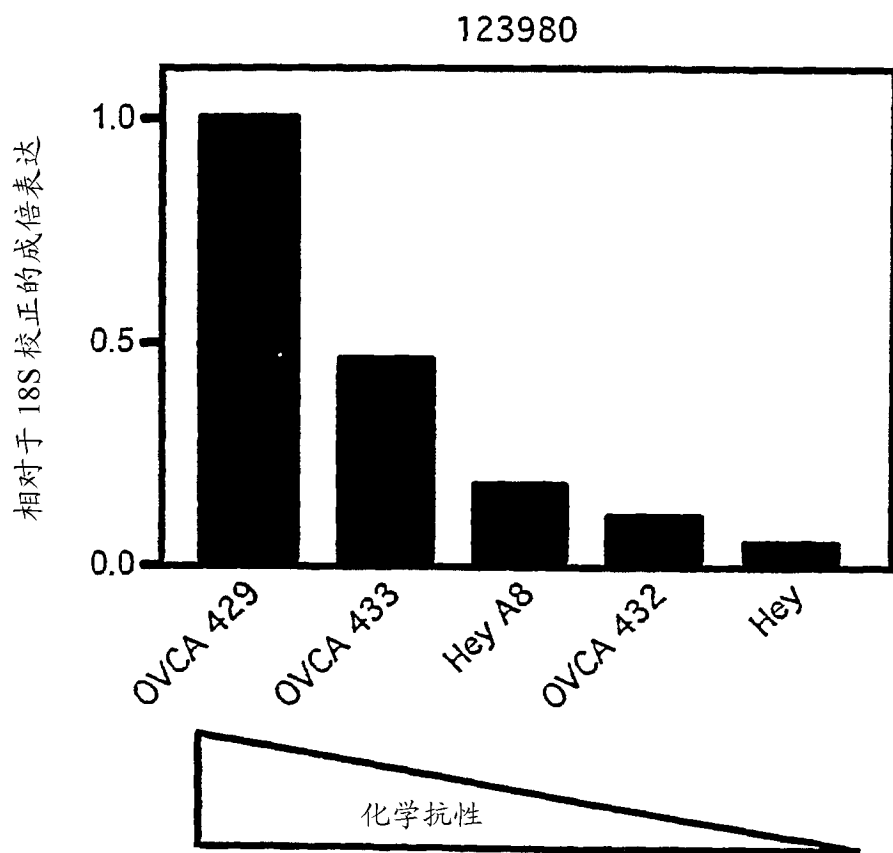


图 31

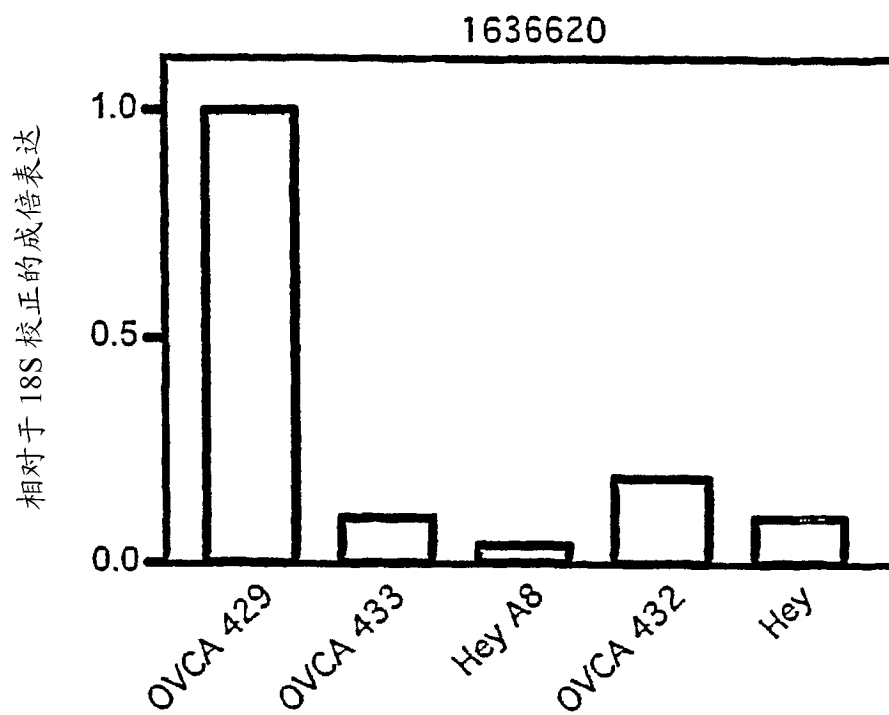


图 32

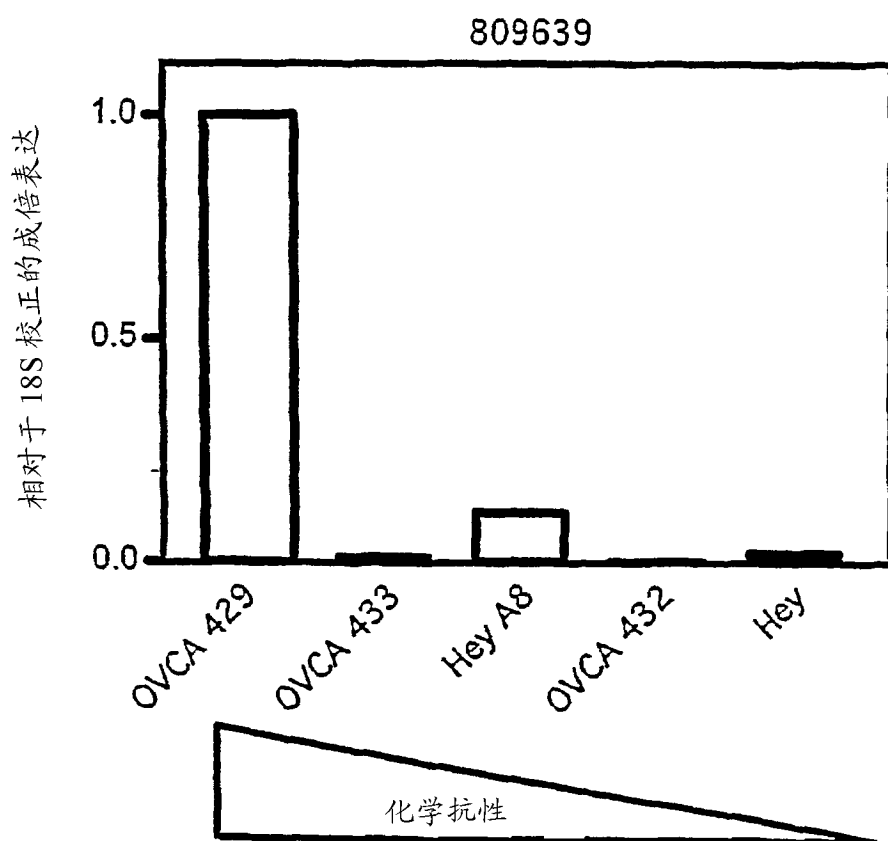


图 33

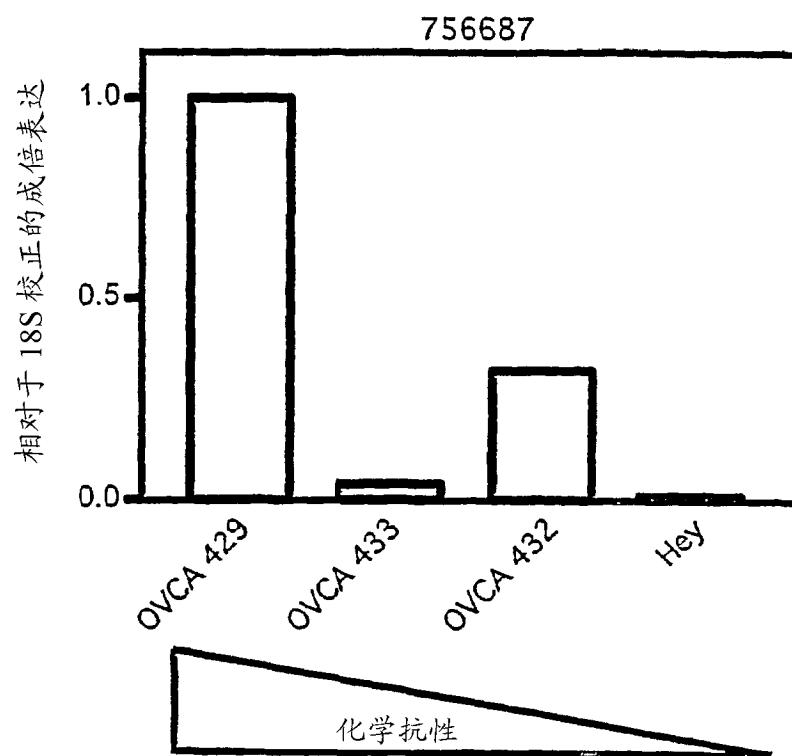


图 34

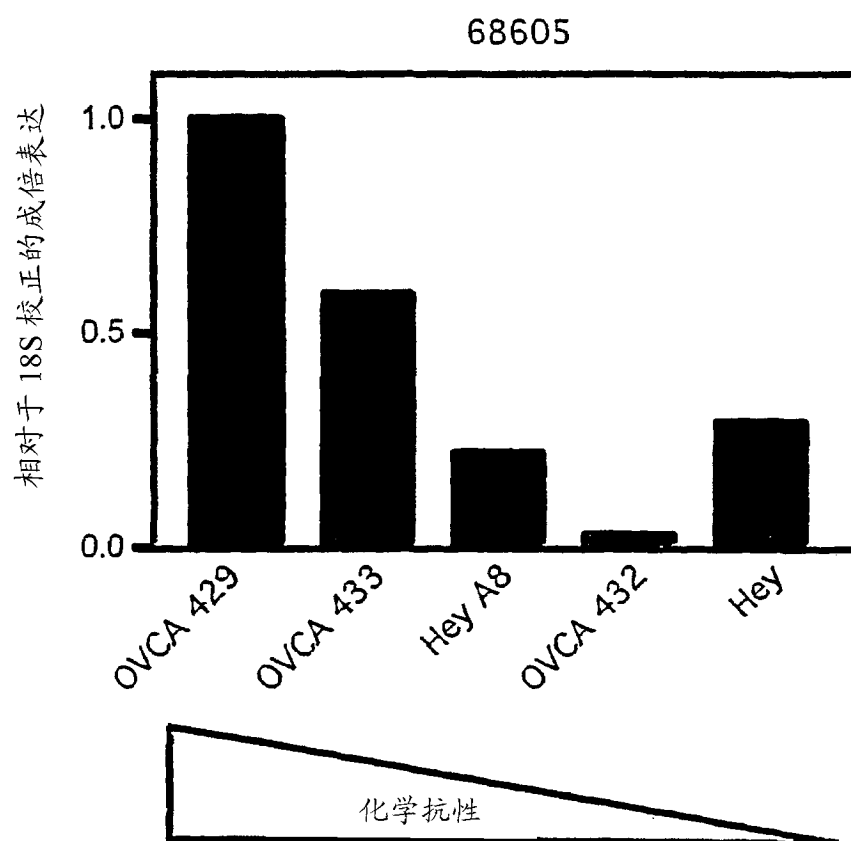


图 35

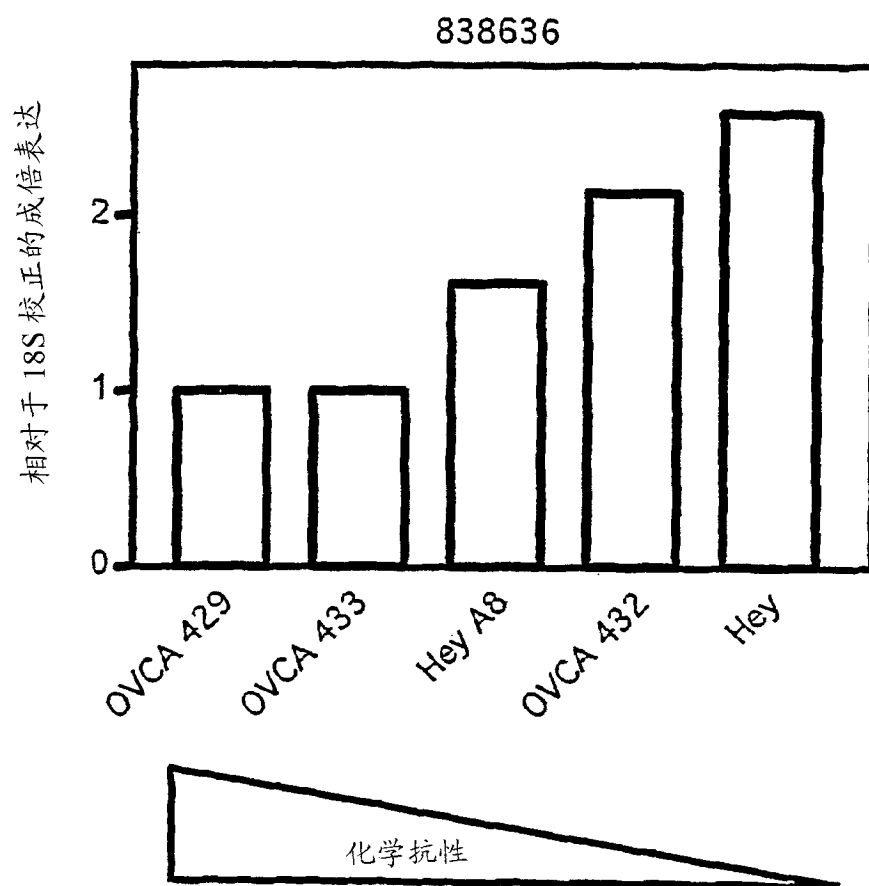
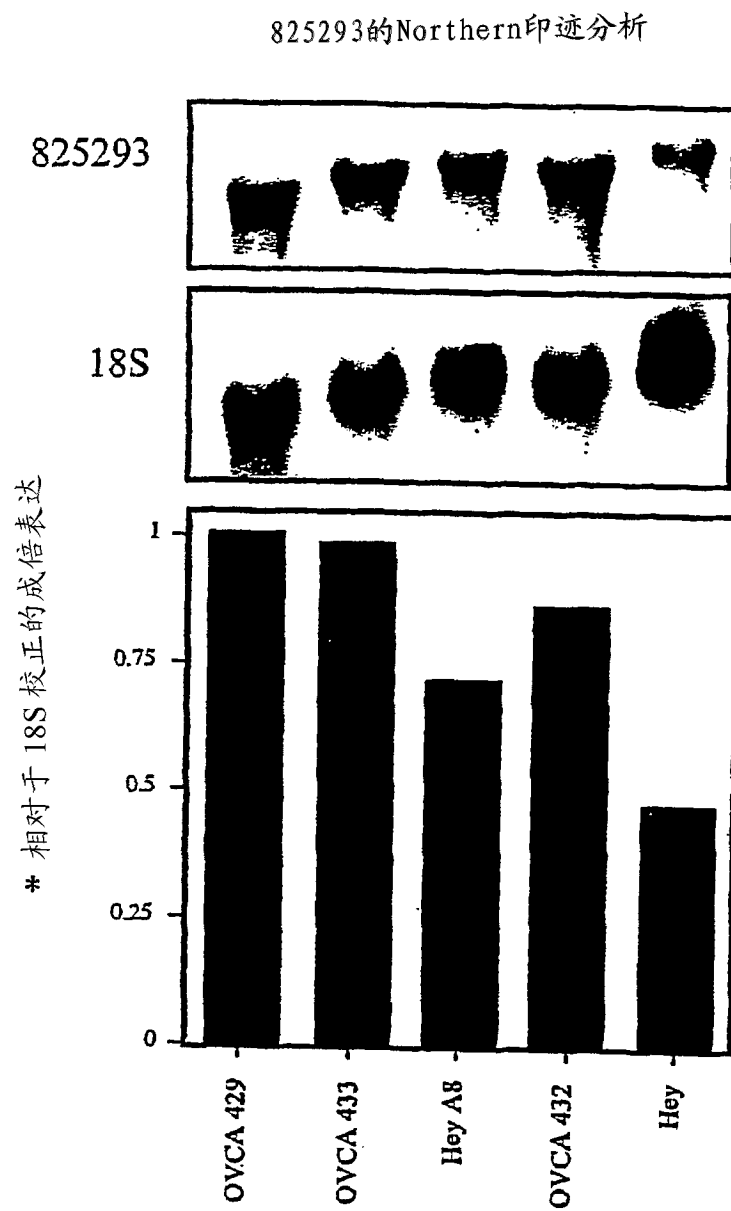


图 36



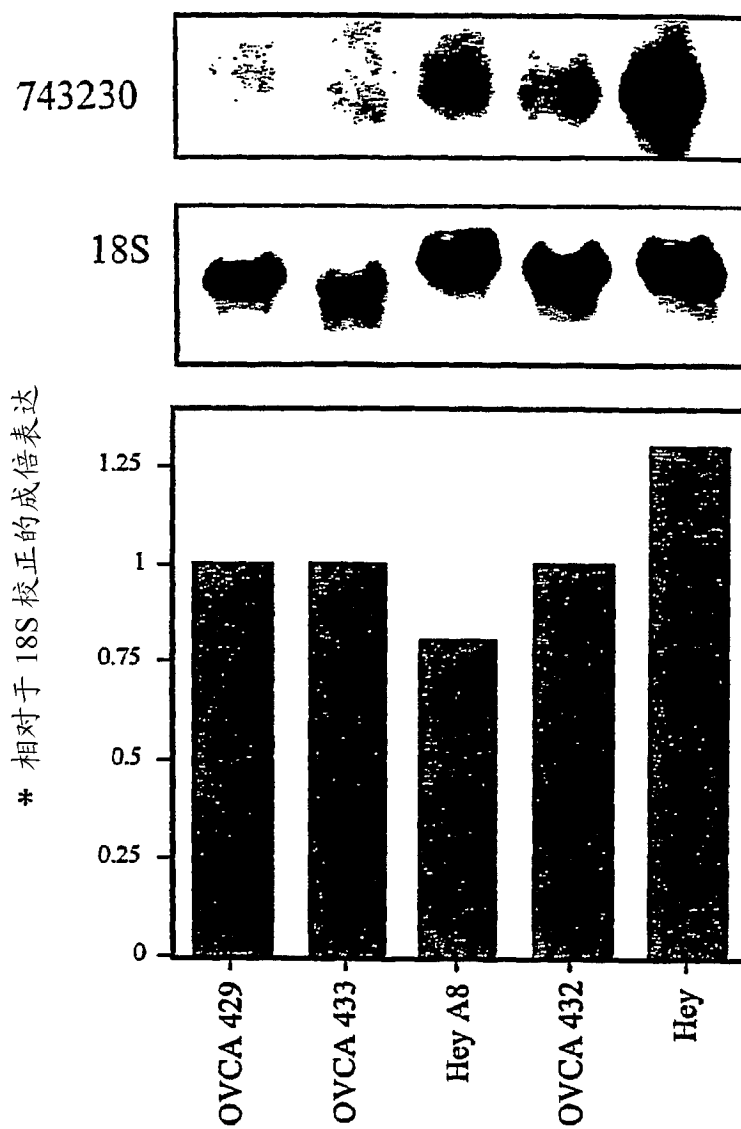
* 所示点为一式两份的均值



对顺铂的抗性

图 37

743230的Northern印迹分析



* 所示点为一式两份的均值



图 38

根据上皮卵巢癌细胞系对顺铂的抗性
水平而对它们进行分级

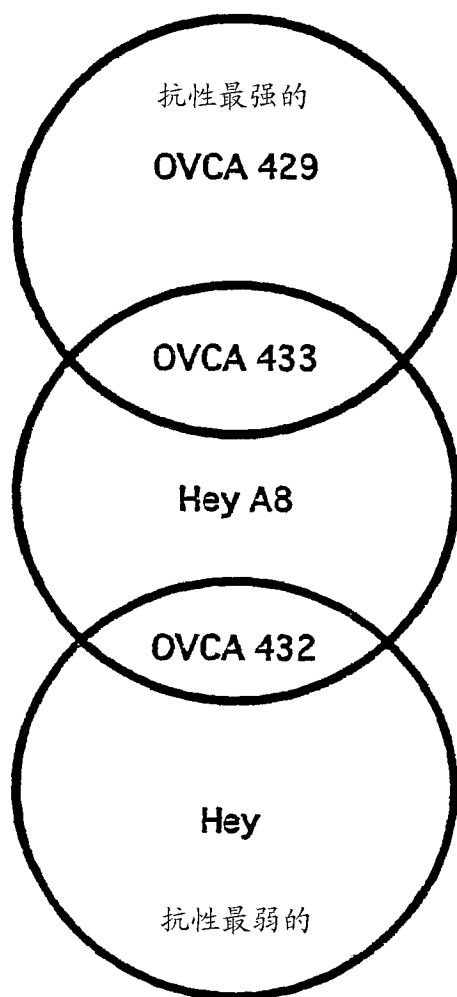
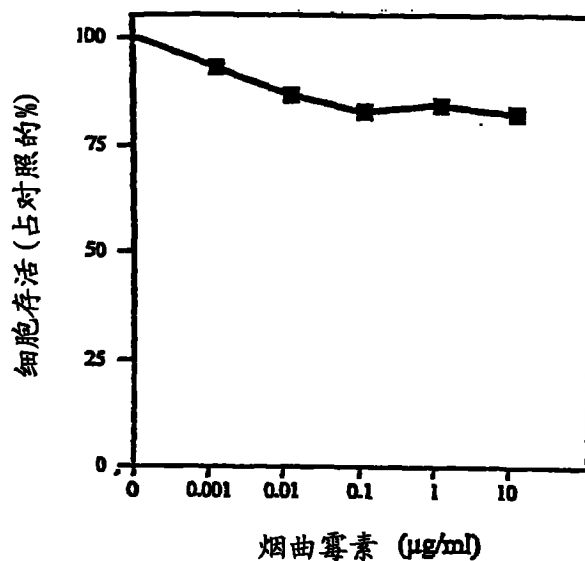


图 39

暴露于烟曲霉素4小时后OVCA429细胞的存活
(所有显示的数据点都是两个独立试验的均值)



暴露于单独的顺铂或顺铂与烟曲霉素的组合4小时后OVCA429细胞的存活
(所有显示的数据点都是两个独立试验的均值)

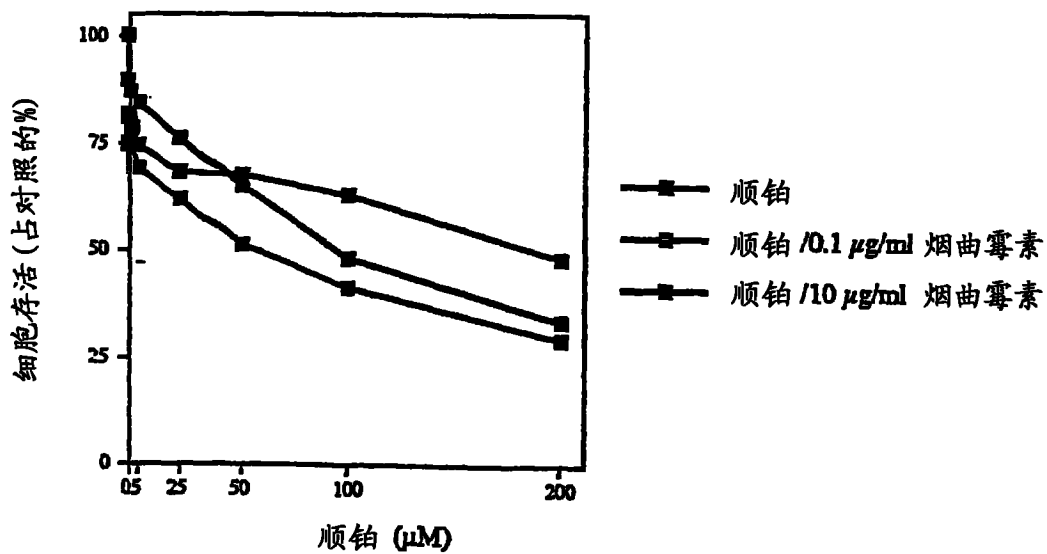
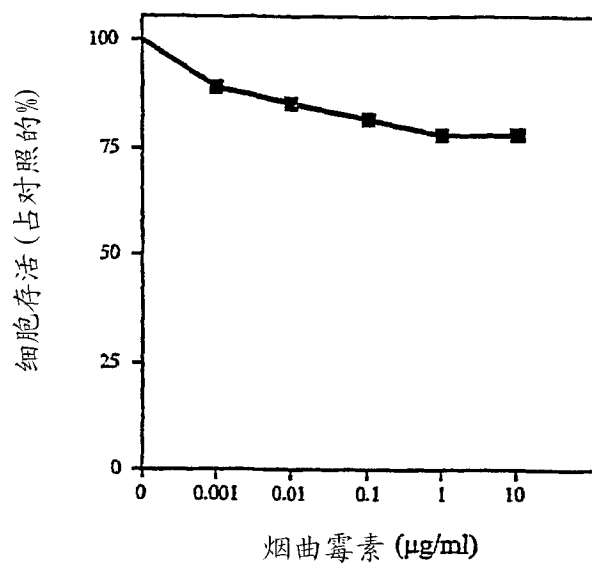


图 40

暴露于烟曲霉素8小时后OVCA429细胞的存活
(所有显示的数据点都是两个独立试验的均值)



暴露于单独的顺铂或顺铂与烟曲霉素的组合8小时后OVCA429细胞的存活
(所有显示的数据点都是两个独立试验的均值)

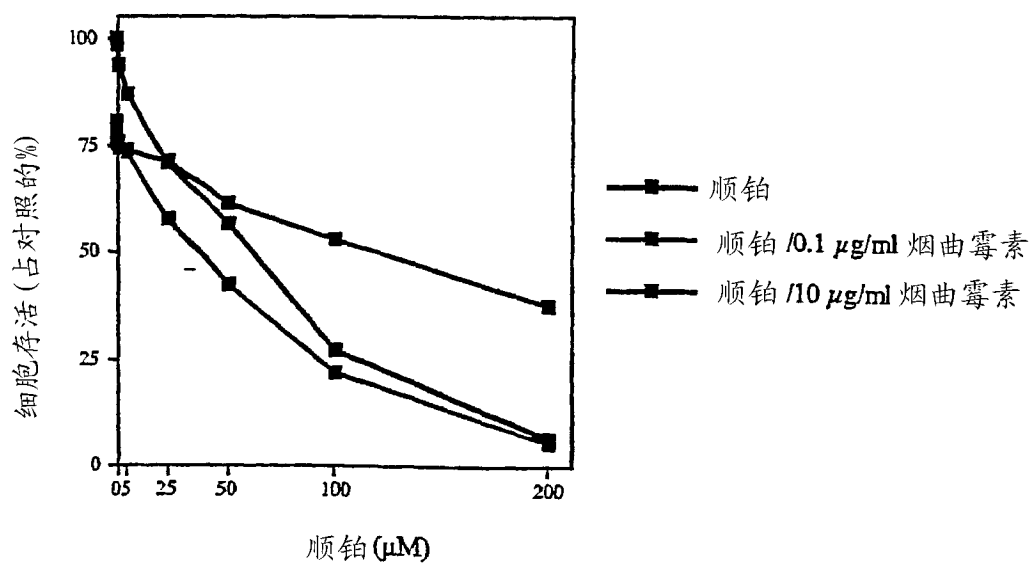
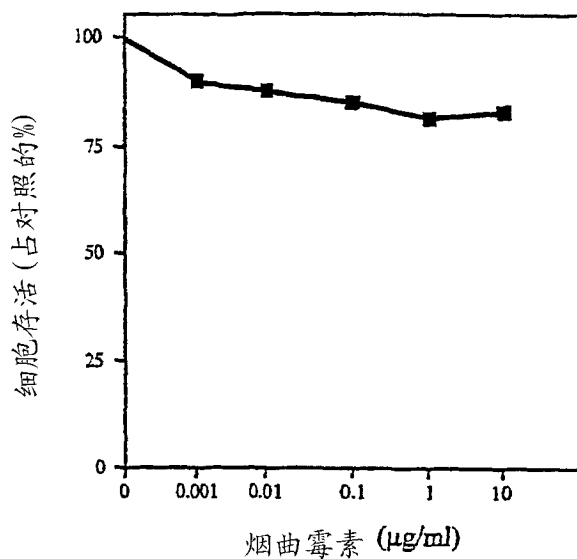


图 41

暴露于烟曲霉素24小时后OVCA429细胞的存活
(所有显示的数据点都是两个独立试验的均值)



暴露于单独的顺铂或顺铂与烟曲霉素的组合24小时后OVCA429细胞的存活
(所有显示的数据点都是两个独立试验的均值)

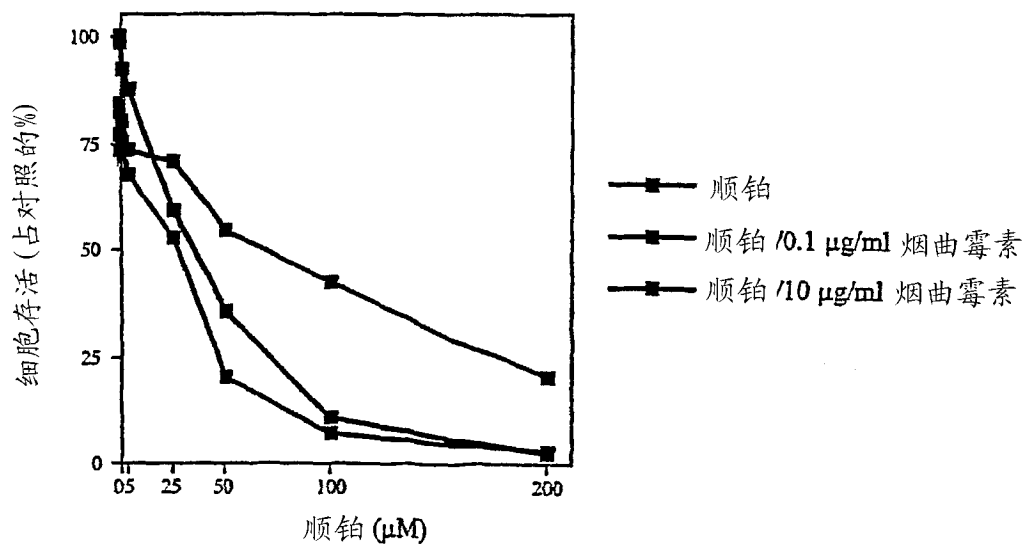


图 42

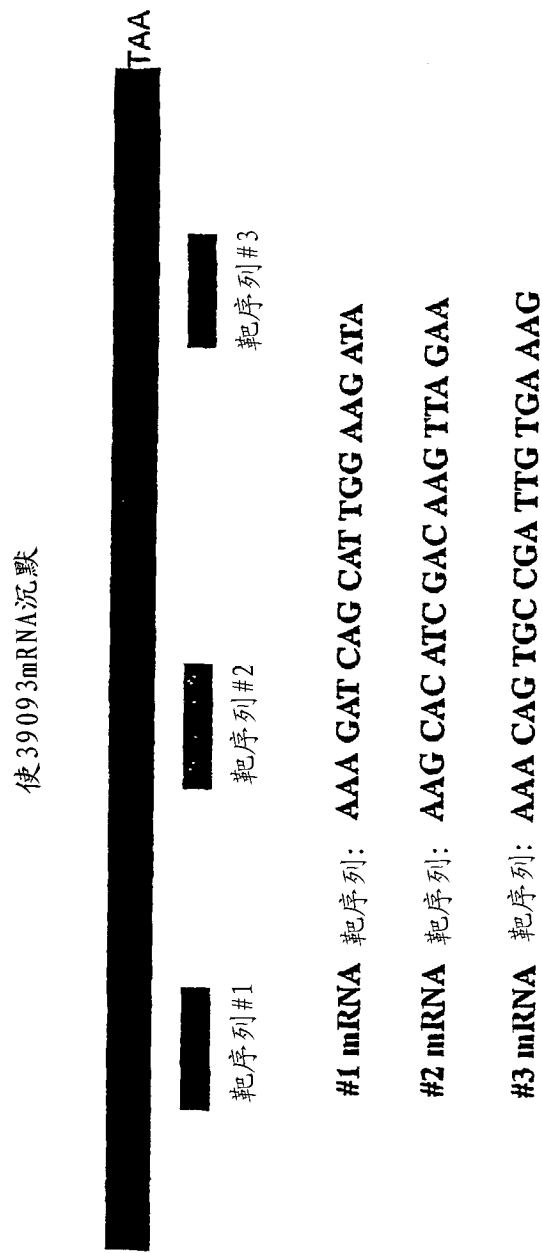
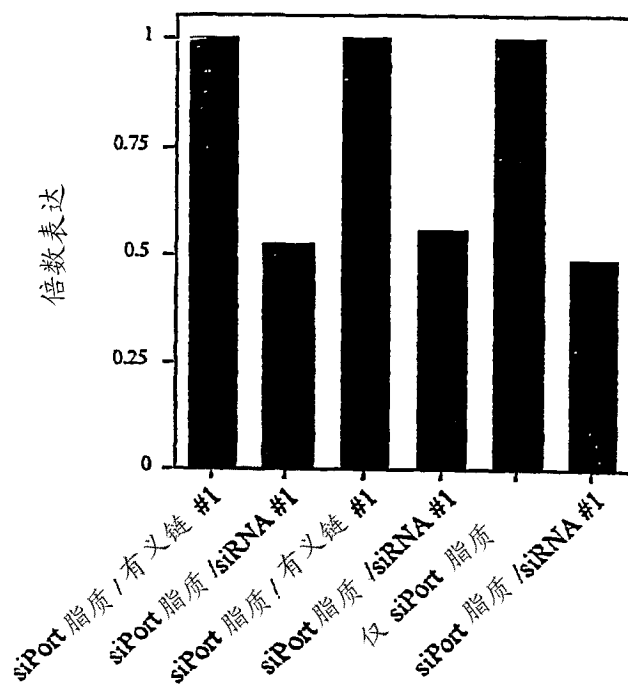


图 43

对于用有单独的义链#1或用siRNA#1转染的OVCA429细胞中
39093mRNA表达的定量实时PCR分析



对于在用单独的siPort脂质处理的或用39093siRNA#1转染的OVCA429
细胞中的GAPDHmRNA表达的定量实时PCR分析

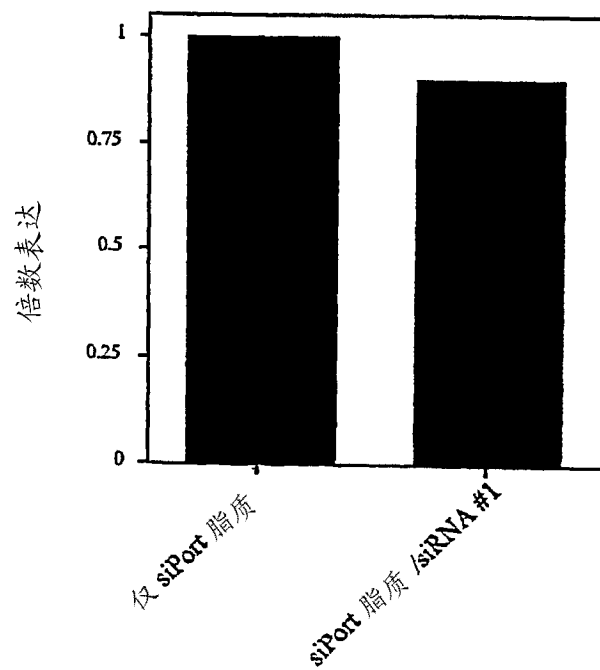


图 44

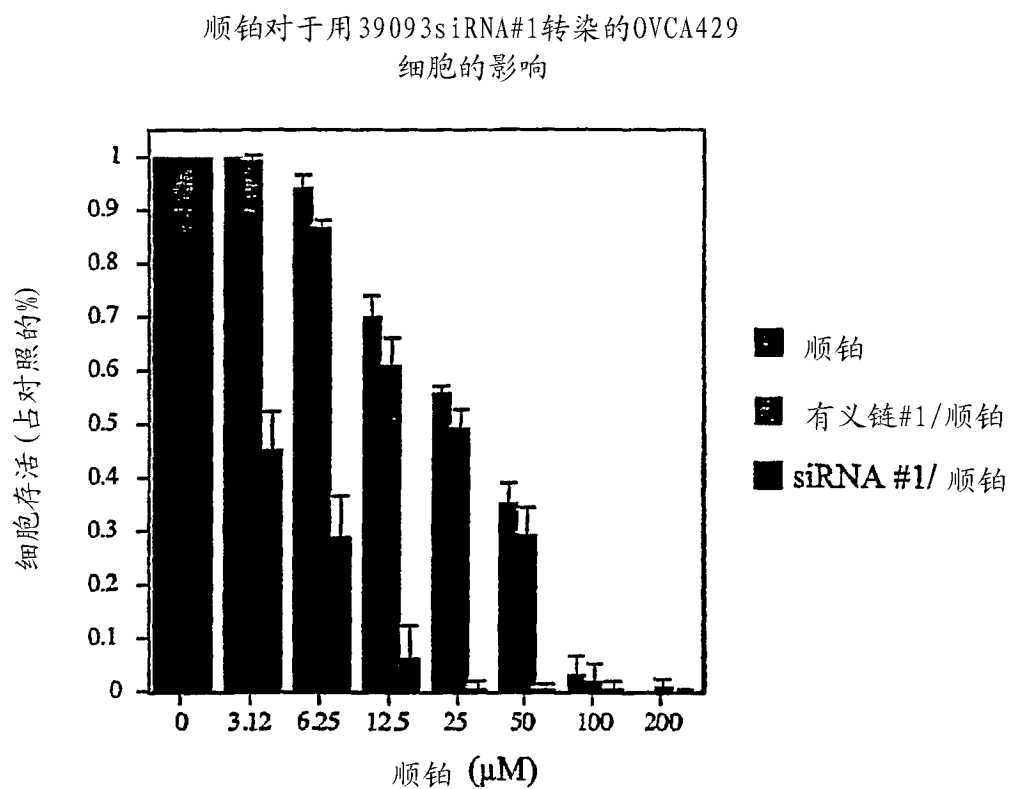


图 45

顺铂对于用39093siRNA#1转染的OVCA429细胞的影响

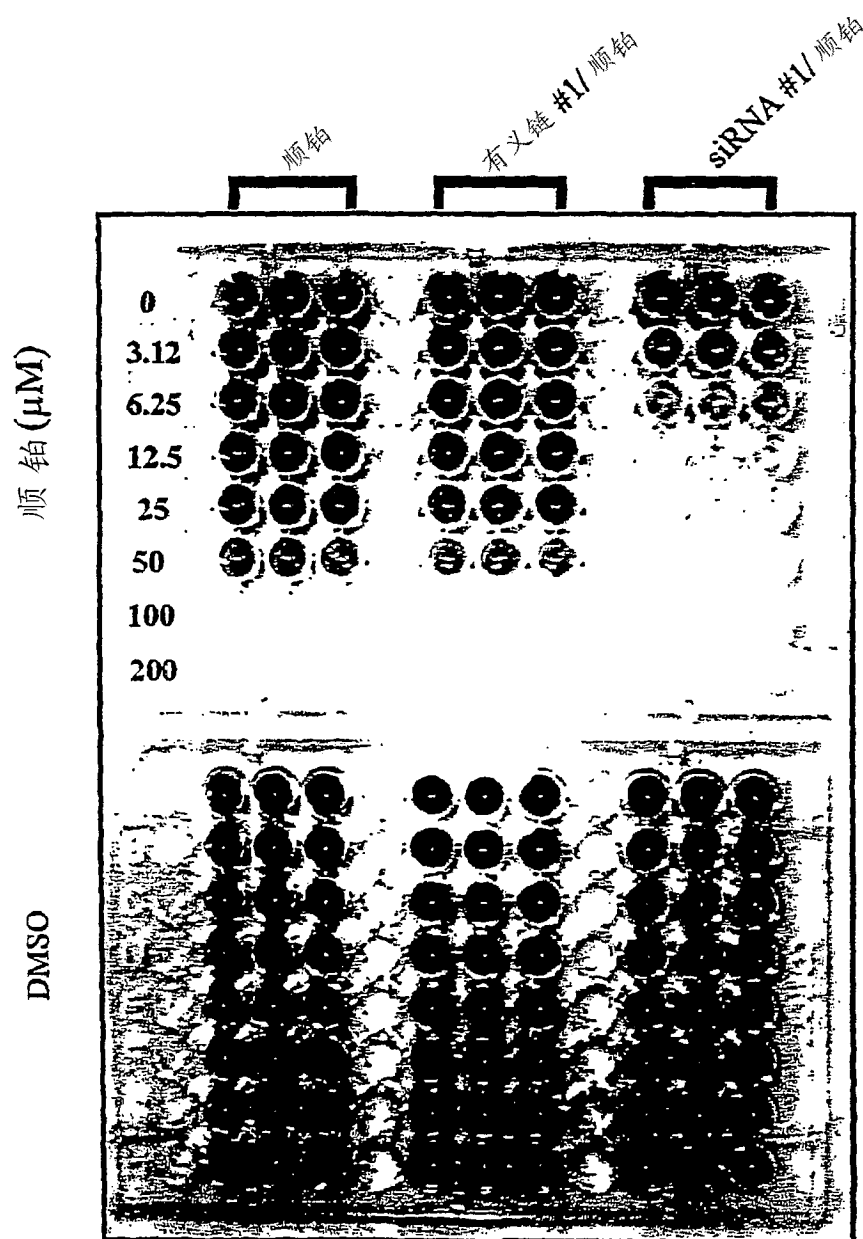


图 46

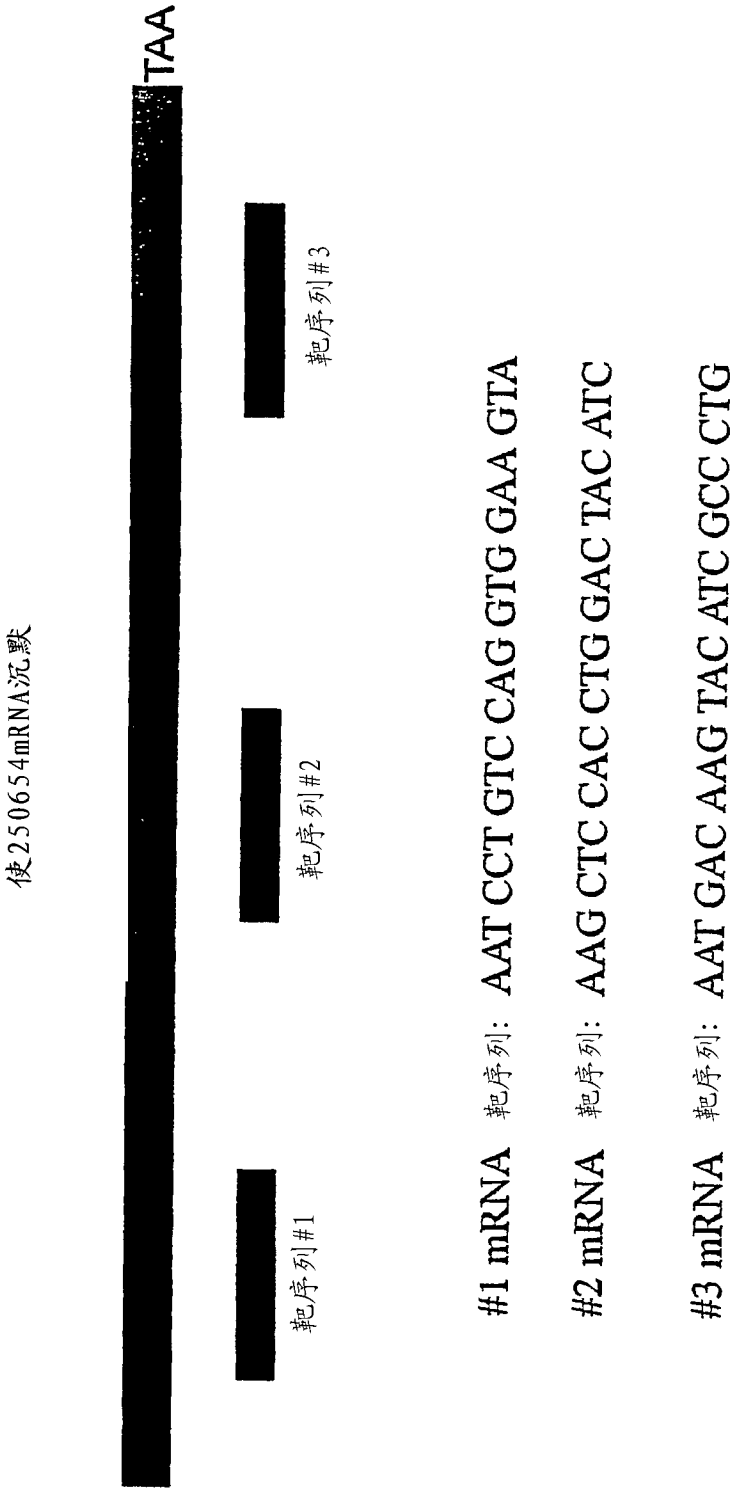


图 47

对于在用不同的siRNA和对照转染的OVCA429细胞中的
250654mRNA表达的定量实时PCR分析

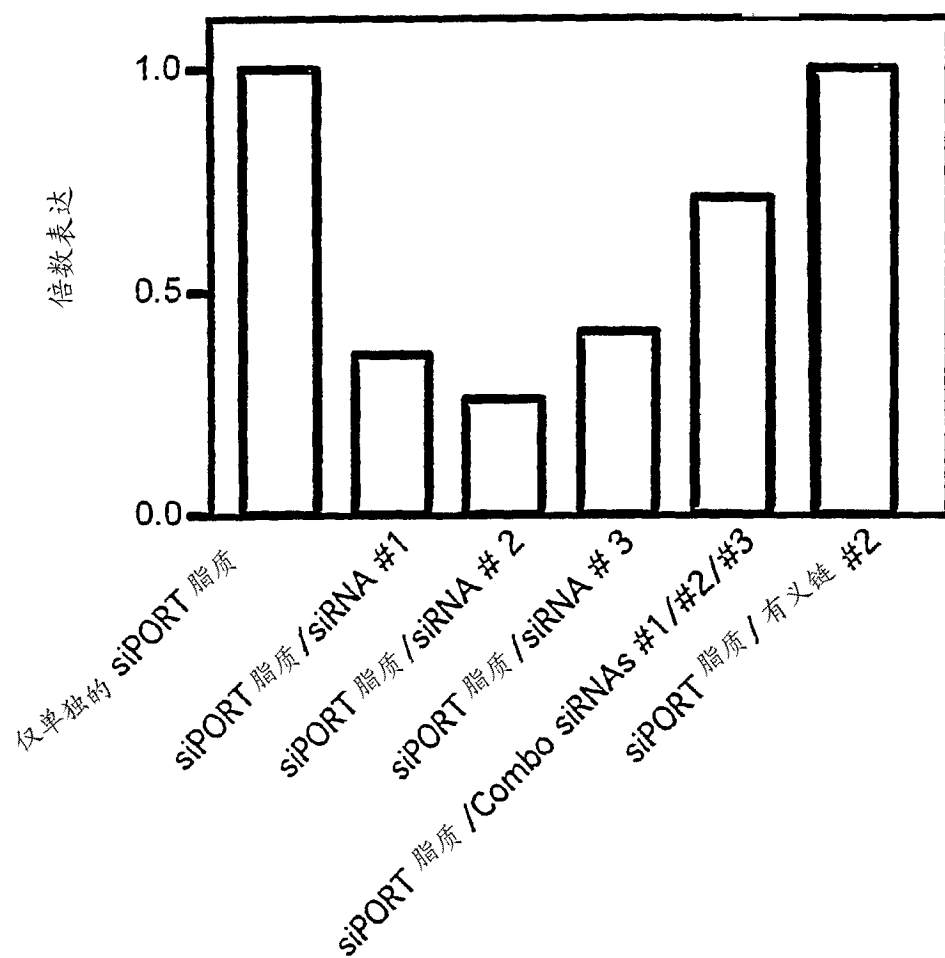


图 48

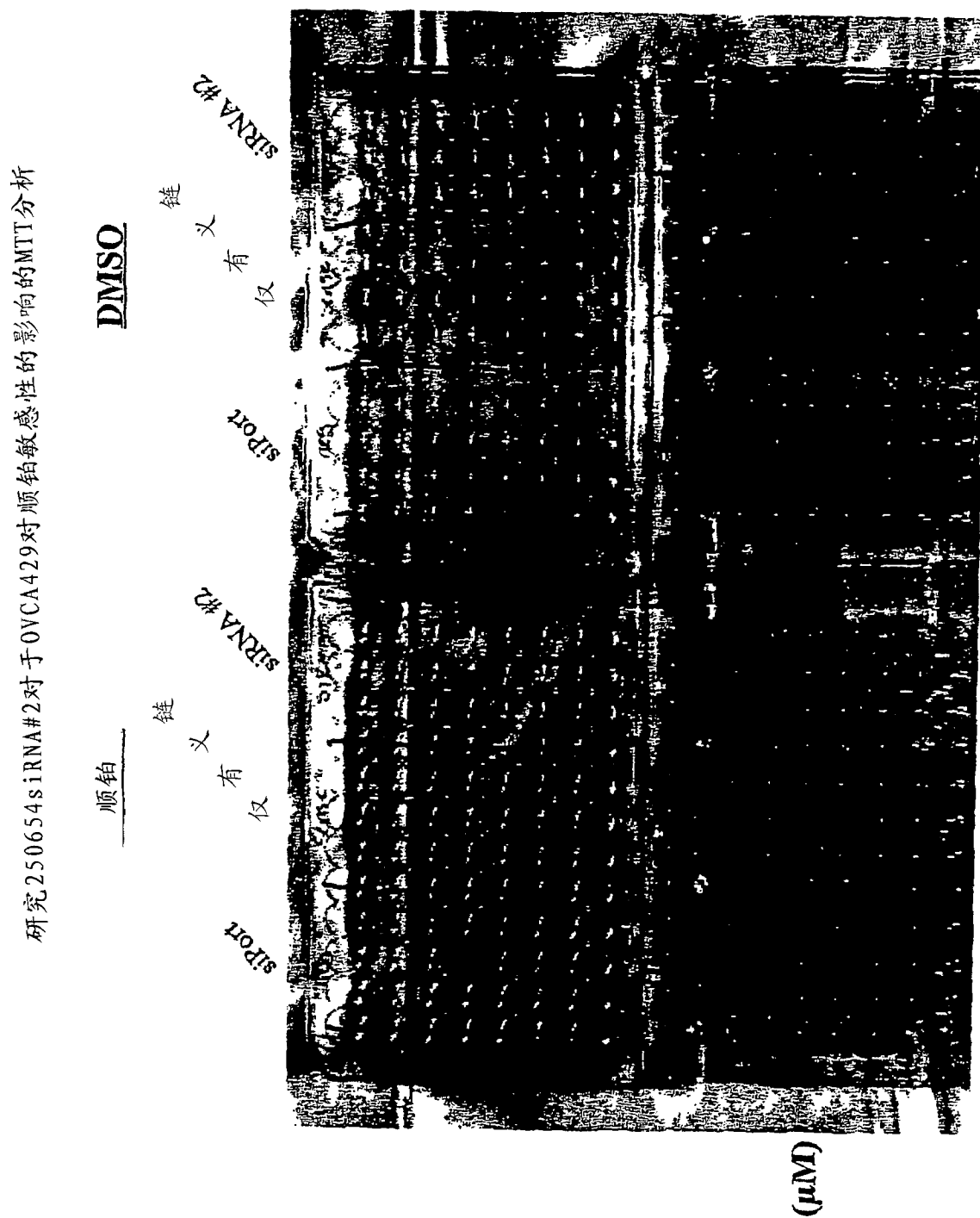


图 49

250654的siRNA介导的敲除对于OVCA429
对顺铂敏感性的影响

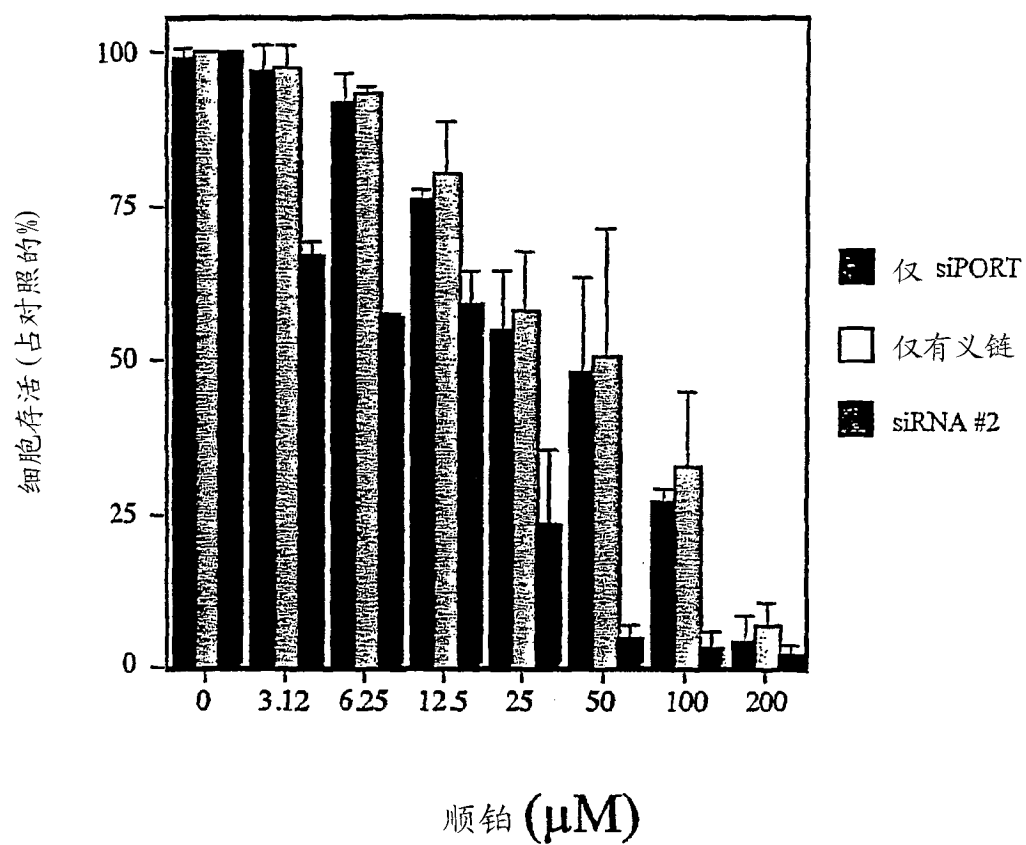


图 50

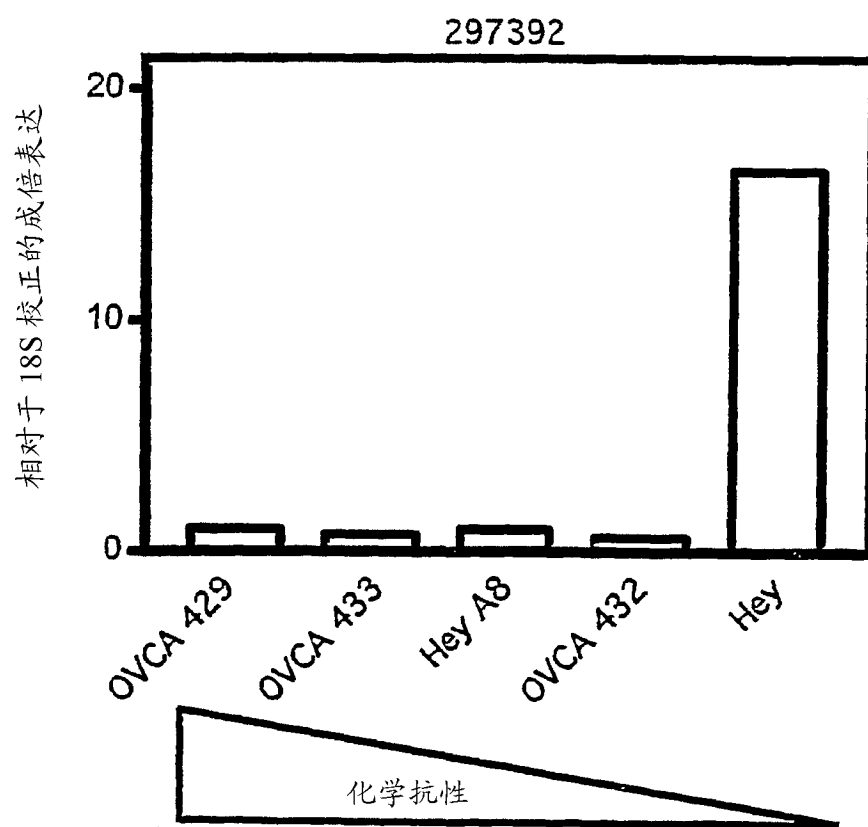


图 51

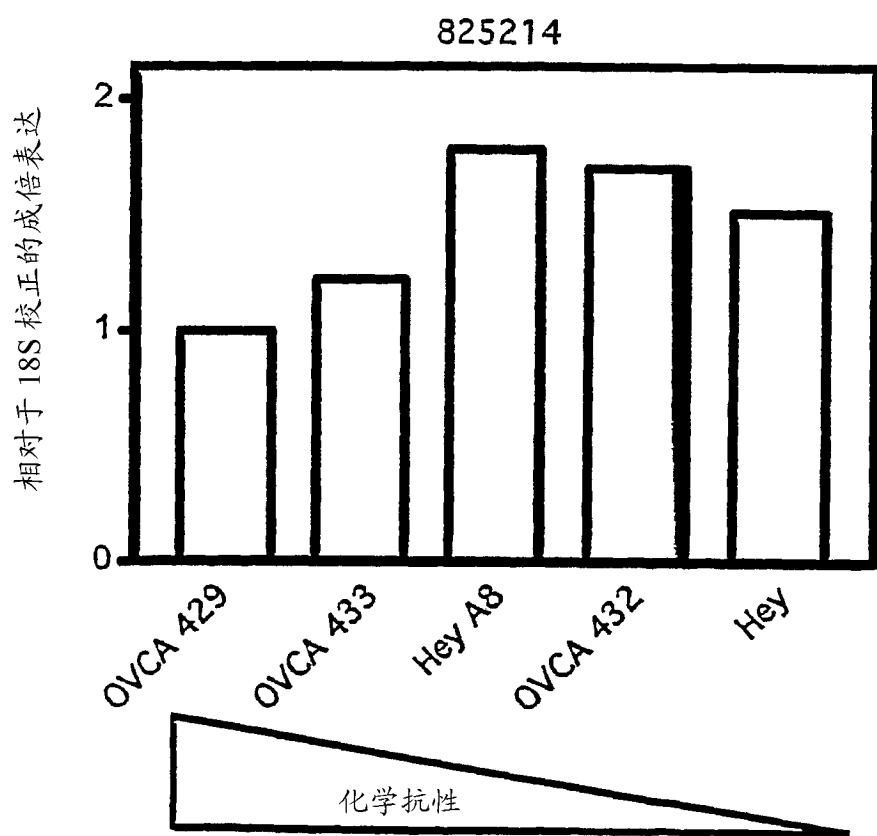


图 52

在OVCA429中敲除需钙蛋白酶-2

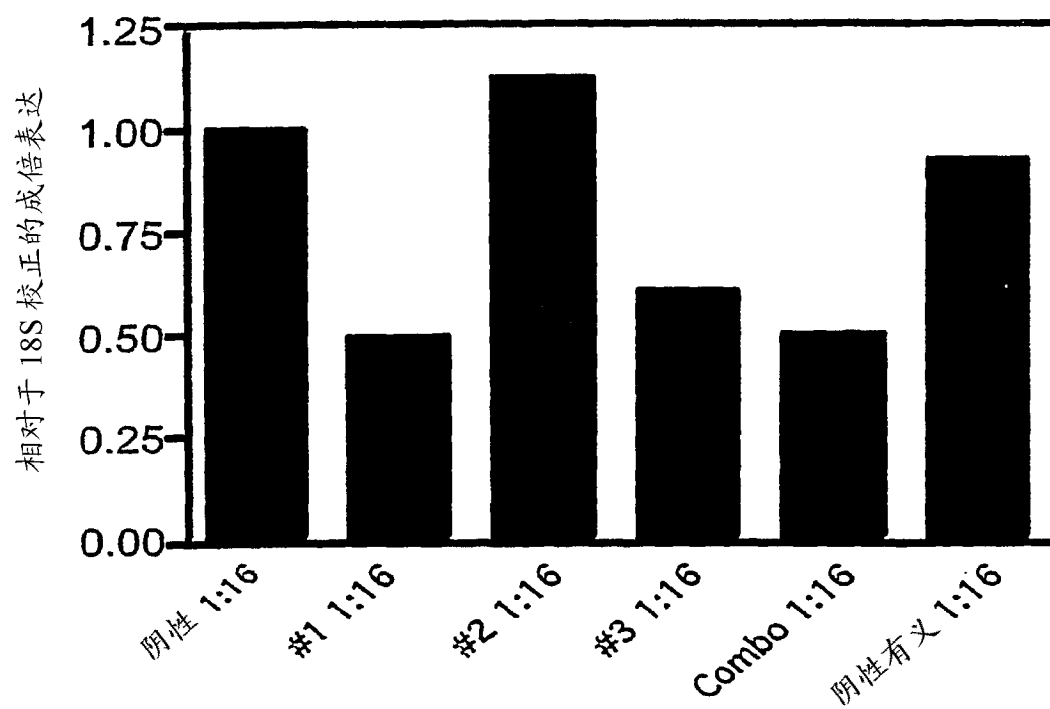


图 53

顺铂对于用非转录的寡聚体和制备针对AF261089的
siRNA#3转染的OVCA429细胞的作用

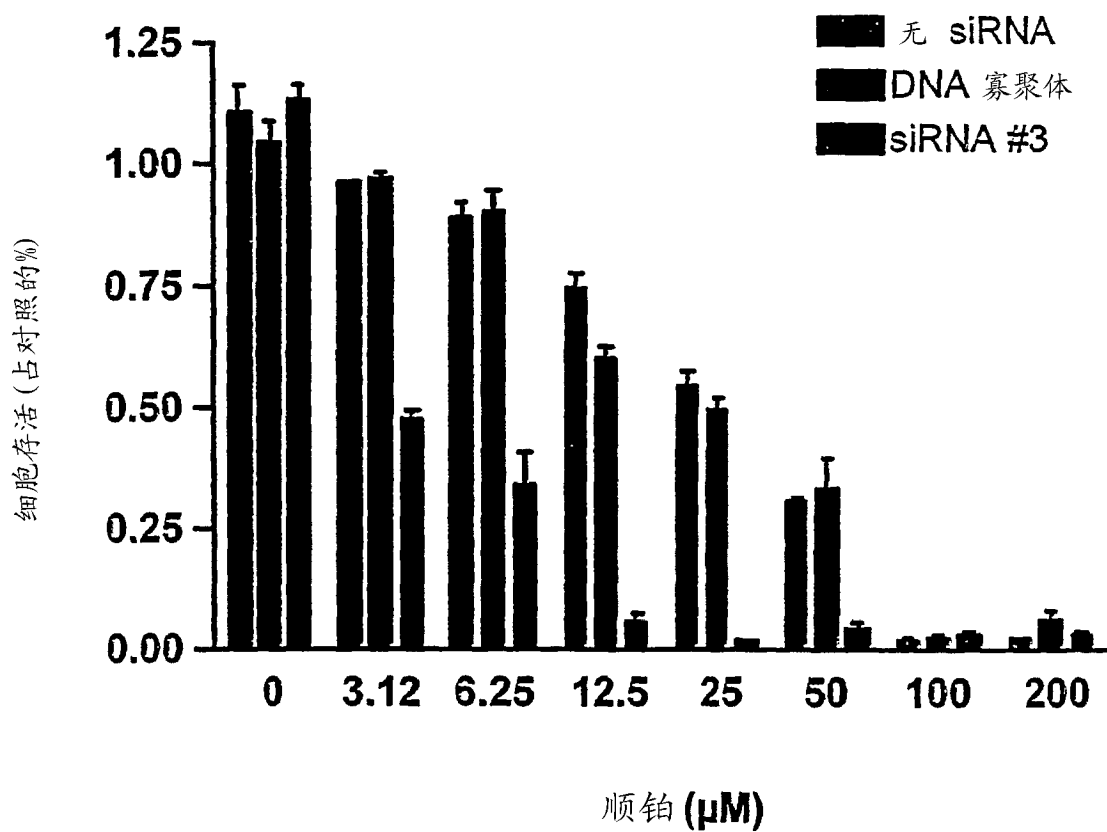


图 54

用需钙蛋白酶抑制剂1 (ALLN) /顺铂处理OVCA429

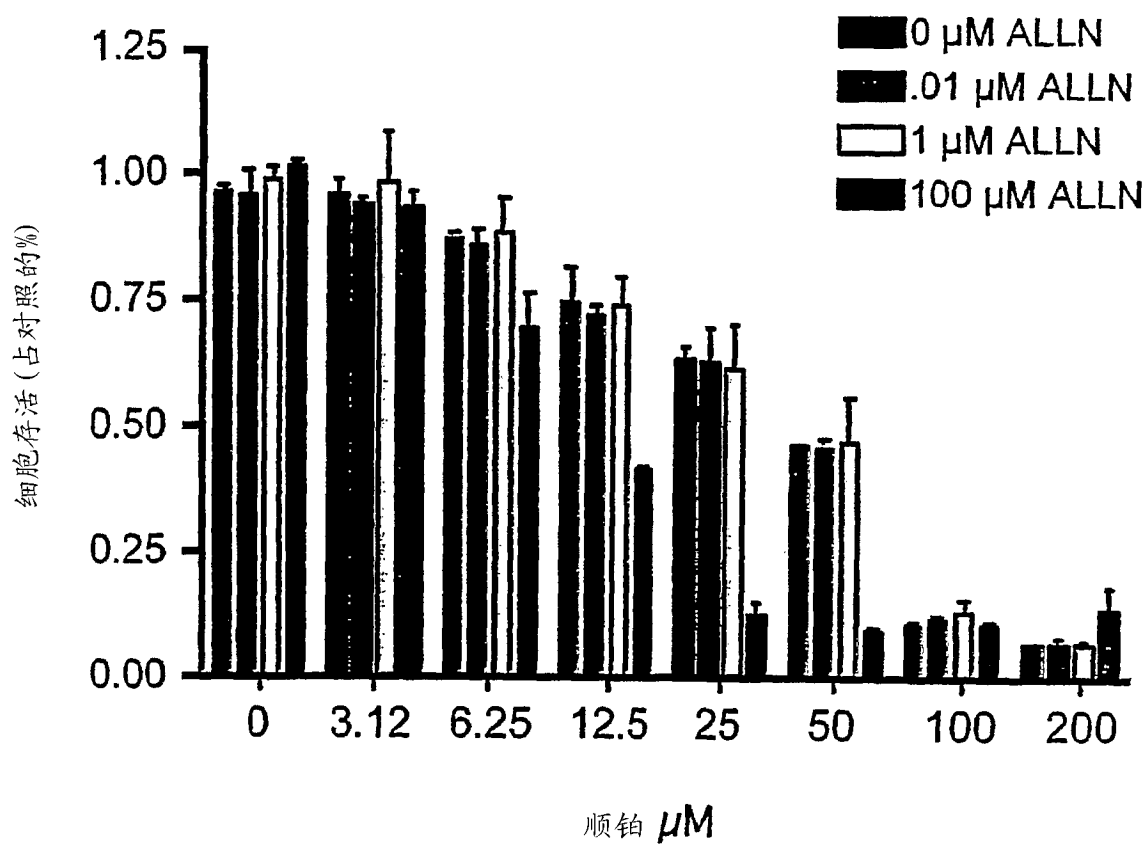


图 55

顺铂对于用BC015973siRNA#3转染的
OVCA429细胞的作用

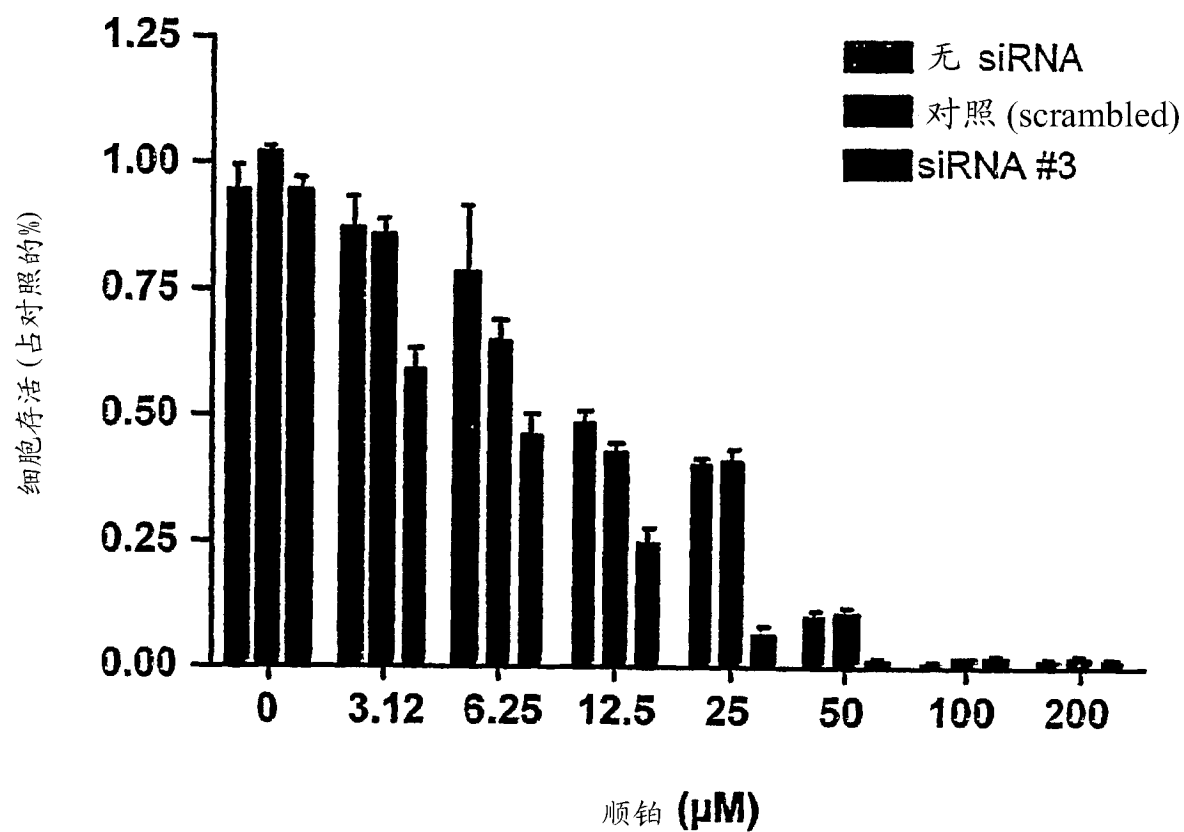


图 56

在OVCA429中敲除S100A11

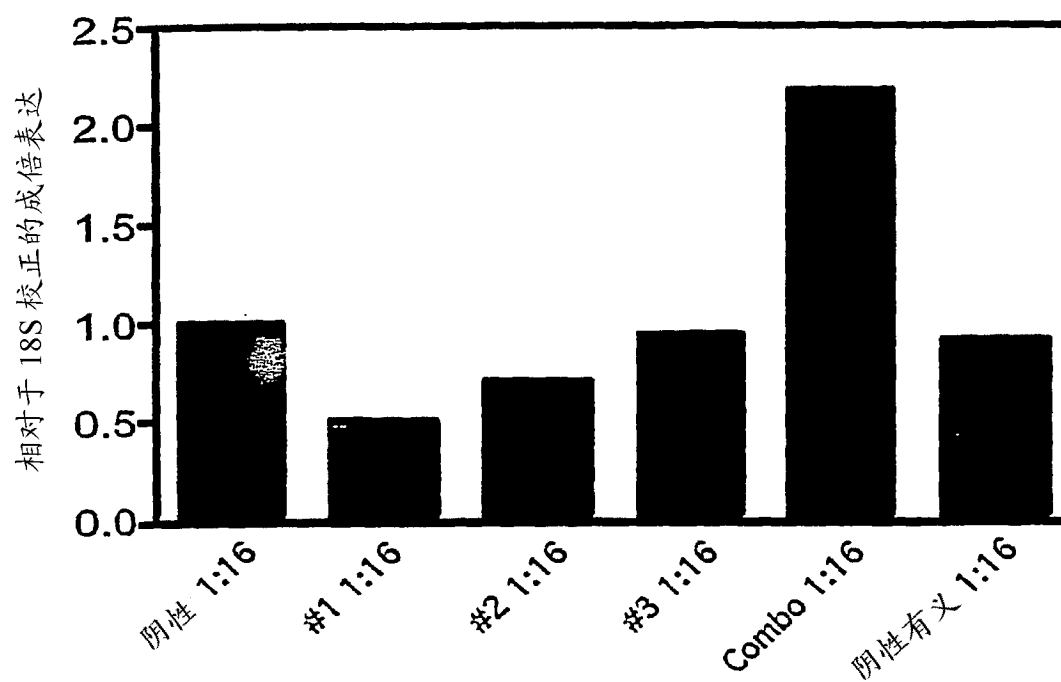


图 57

MetAP-2在匹配的正常结肠cDNA中的
表达相对于其在肿瘤结肠cDNA中的表达

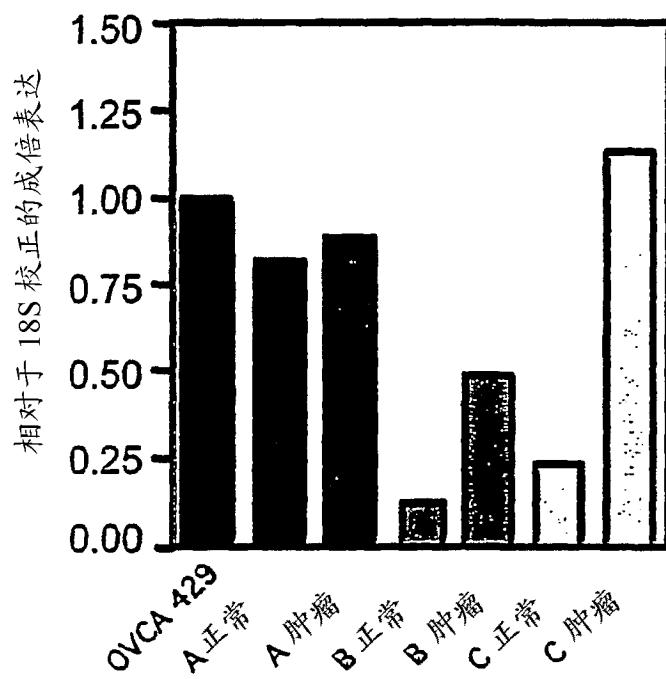


图 58

250654 (SPARC) 在匹配的非肿瘤结肠cDNA中的表达
相对于其在肿瘤结肠cDNAs中的表达
(2次分别试验(run)的组合)

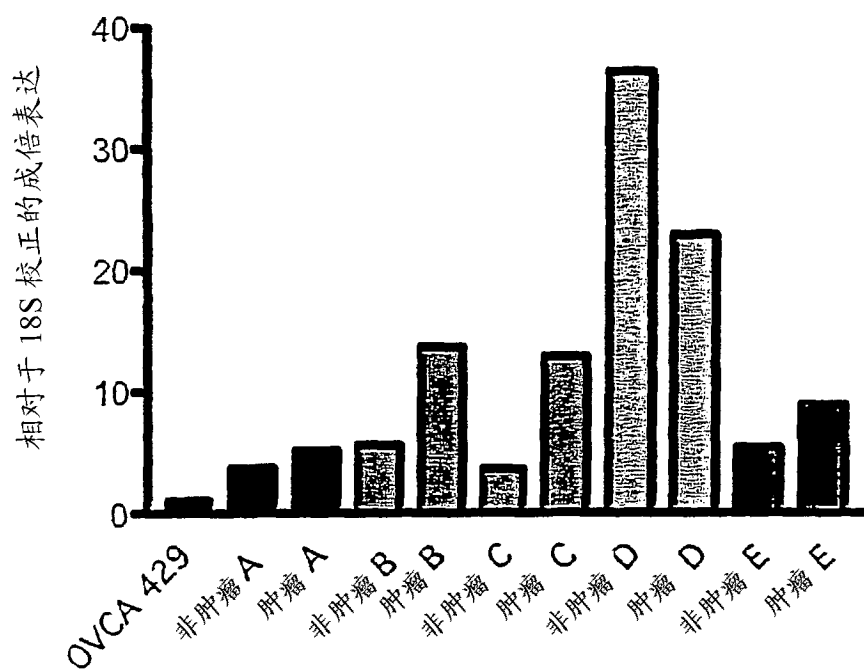


图 59

810612 (S100A11) 在匹配的非肿瘤结肠cDNA中的表达
相对于其在肿瘤结肠cDNAs中的表达
(来自2次分别试验的组合数据)

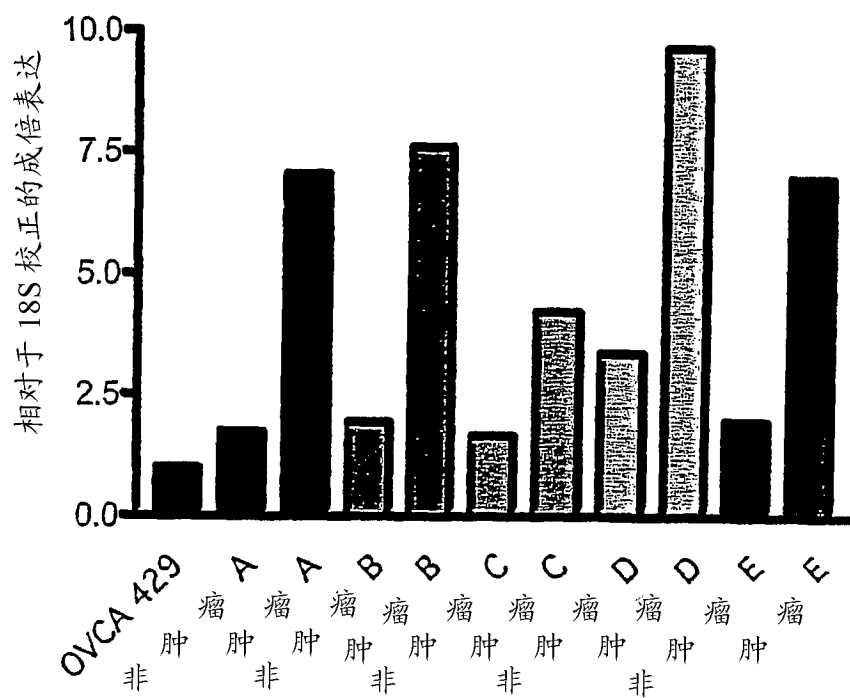


图 60

在匹配的结肠组织中的基因BC015973的表达
(每份样本的一式两份试验的均值)

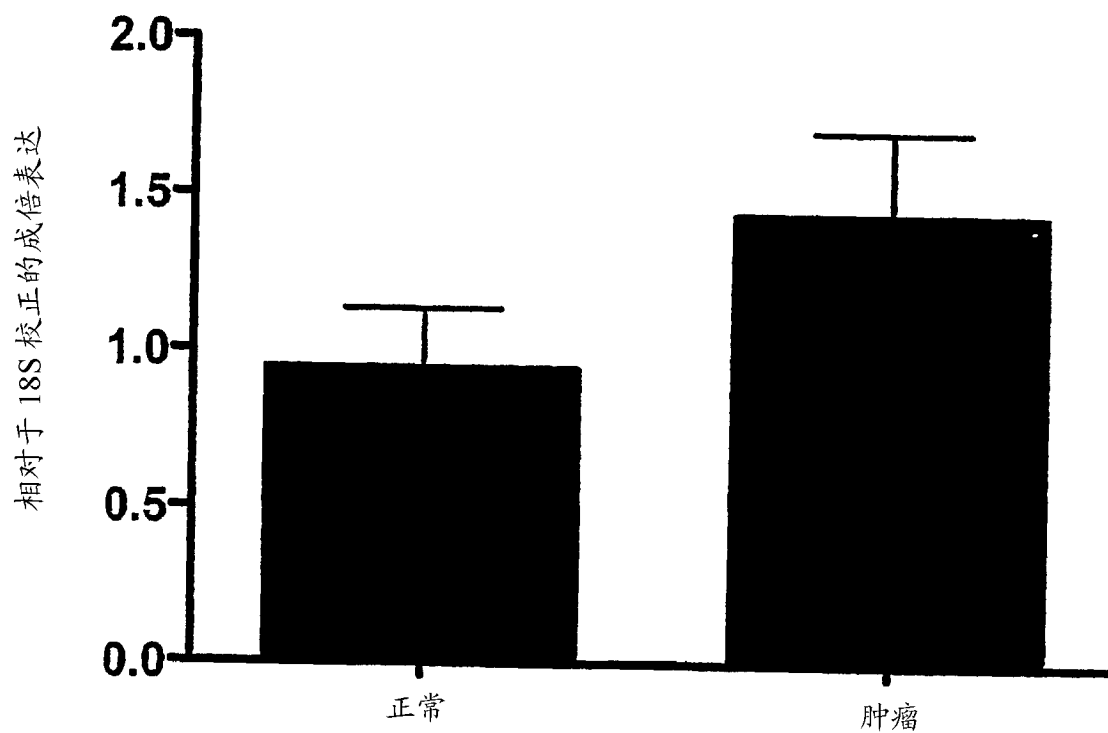


图 61

在匹配的结肠组织中的基因AF261089的表达
(每份样本的一式两份试验的均值)

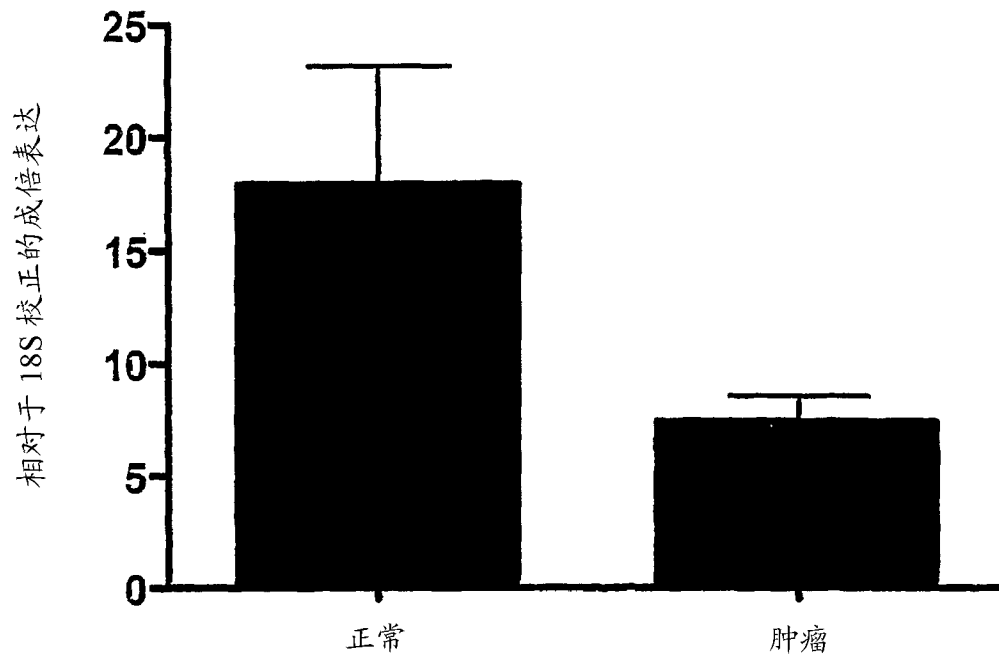
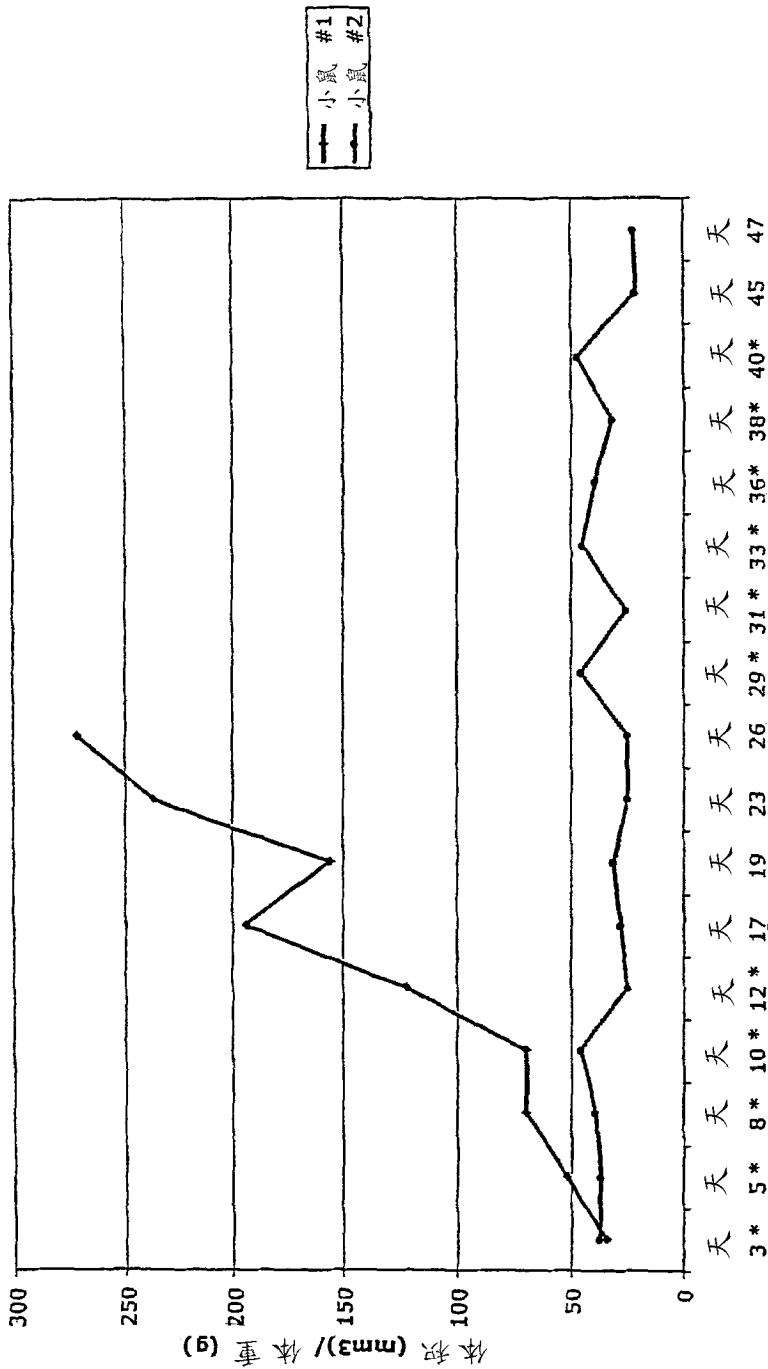


图 62

肿瘤体积为体重的函数:小鼠#1 (未处理)相对于小鼠#2 (顺铂处理)



第3天是注射肿瘤细胞后48天
*顺铂以4 μg/kg体重给予

图 63

在稳定表达抗需钙蛋白酶2或S100A11的特异性siRNA的OVCAR-3细胞中，
对需钙蛋白酶2或S100A11的mRNA表达水平的实时PCR检测

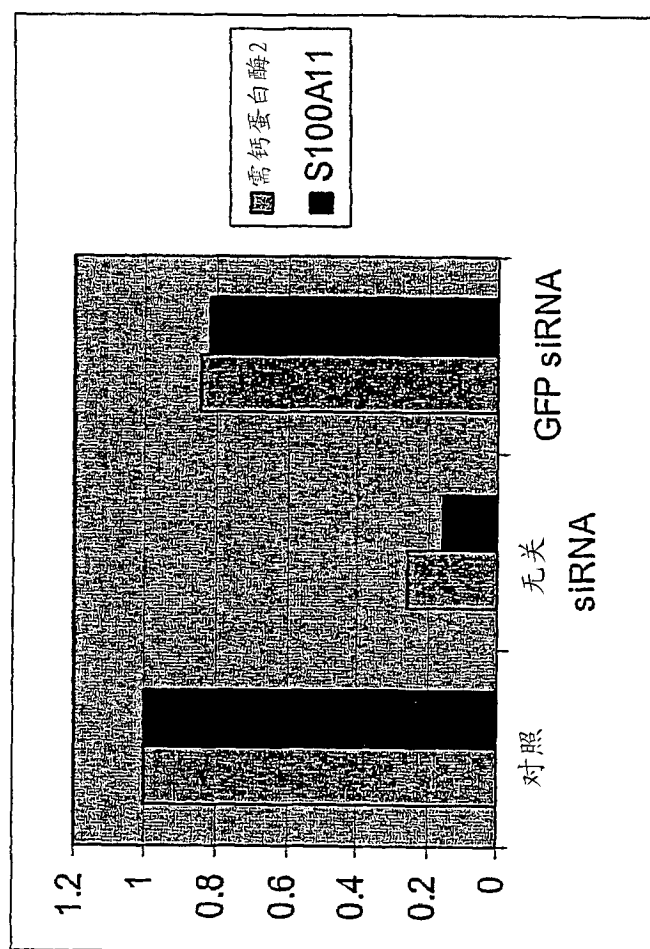


图 64

对照=无siRNA的细胞
相对siRNA=带有对需钙蛋白酶2或S100A11特异的稳定siRNA的细胞
GFP siRNA=带有抗体内无关对照的绿色荧光蛋白的稳定siRNA的细胞