



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104160038 B

(45)授权公告日 2018.06.12

(21)申请号 201280067832.4

(22)申请日 2012.11.23

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104160038 A

(43)申请公布日 2014.11.19

(30)优先权数据
11306568.4 2011.11.25 EP
12306042.8 2012.08.31 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.07.23

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/073535 2012.11.23

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/076282 EN 2013.05.30

(73)专利权人 国家健康科学研究所
地址 法国巴黎
专利权人 英特盖根公司
国家科学研究中心
法国公立援助医院
巴黎笛卡尔大学

(72)发明人 T·里奥弗里奥 P·劳伦-皮格
S·因班德

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟 程云

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6886(2018.01)

(56)对比文件
W0 2010/121238 A2,2010.10.21,
W0 2010/121238 A2,2010.10.21,
Neda Mosakhani et al..MicroRNA
Profiling Differentiates Colorectal
Cancer According to KRAS Status.《GENES,
CHROMOSOMES & CANCER》.2011,第51卷第1-9页.
Neda Mosakhani et al..MicroRNA
Profiling Differentiates Colorectal
Cancer According to KRAS Status.《GENES,
CHROMOSOMES & CANCER》.2011,第51卷第1-9页.

审查员 李恩

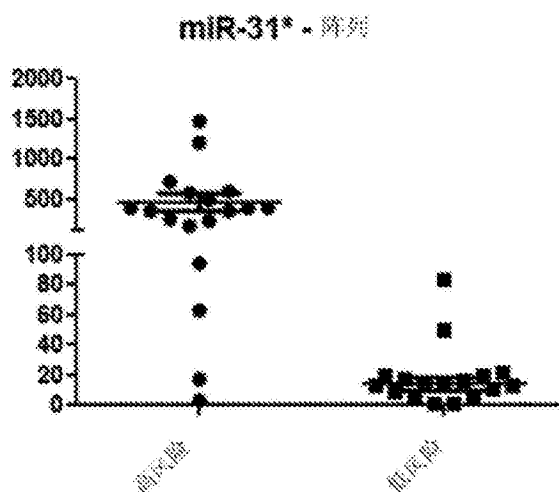
权利要求书2页 说明书19页
序列表5页 附图7页

(54)发明名称

一种用于预测对采用EGFR抑制剂的治疗的
响应性的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于预测患有癌症的患者是否会响应表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂的方法,该方法包括确定所述患者样本中的hsa-miR-31-3p miRNA表达水平。本发明也涉及EGFR抑制剂在经预测对所述EGFR抑制剂有响应的患者中的治疗用途。



1. 确定癌症患者样本中hsa-miR-31-3p miRNA的表达水平的试剂在制备用于预测所述患者是否可能响应表皮生长因子受体抑制剂的试剂盒中的用途,其中:

所述的hsa-miR-31-3p miRNA是SEQ ID NO:1所示,

所述患者患有结肠直肠癌,以及

所述表皮生长因子受体抑制剂是抗表皮生长因子受体抗体或者酪氨酸激酶表皮生长因子受体抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中患者患有KRAS野生型癌症。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中所述癌症是转移性结肠直肠癌。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中所述表皮生长因子受体抑制剂是抗表皮生长因子受体抗体。

5. 根据权利要求4所述的用途,其中所述癌症是转移性结肠直肠癌,并且所述抗表皮生长因子受体抗体是西妥昔单抗或者帕尼单抗。

6. 根据权利要求1所述的用途,其中所述酪氨酸激酶表皮生长因子受体抑制剂是厄洛替尼、吉非替尼或者拉帕替尼。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中所述样本是肿瘤样本。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中所述的样本是肿瘤组织活检或者完整或部分的肿瘤外科切除。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中所述的miRNA的表达水平由定量RT-PCR来确定。

10. 根据权利要求1所述的用途,其中所述miRNA的表达水平越低,则患者越有可能响应表皮生长因子受体抑制剂治疗。

11. 根据权利要求1所述的用途,其中所述试剂盒还包括说明书,所述说明书基于miRNA表达水平用来确定预后分数,其中所述预后分数表明患者是否可能响应表皮生长因子受体抑制剂。

12. 根据权利要求11所述的用途,其中所述预后分数按照下式所示:

预后分数 = $a \cdot x + b$,

其中:

● x 是所测患者样本中测量的hsa-miR-31-3p表达水平的对数,

● a 和 b 是基于参考样本池所预定的参数,以及

● 如果患者的预后分数小于或等于阈值 c , 则预测他/她响应表皮生长因子受体抑制剂; 以及如果其预后分数大于阈值 c , 则预测他/她不响应表皮生长因子受体抑制剂, 其中所述 c 的值是基于相同的参考样本池所确定的。

13. 根据权利要求12所述的用途,其中所述 a 、 b 和 c 在以下范围内:

● a : $[0.1; 0.25]$;

● b : $[-2; -0.5]$; 以及

● c : $[-0.11; -0.01]$ 。

14. 根据权利要求13所述的用途,其中所述 a 、 b 和 c 在以下范围内:

● a : $[0.17; 0.21]$;

● b : $[-1.8; -0.6]$; 以及

● c : $[-0.10; -0.01]$ 。

15. 确定hsa-miR-31-3p miRNA表达水平的试剂和确定癌症患者BRAF状态的试剂在制备用于预测所述患者是否可能响应表皮生长因子受体抑制剂的试剂盒中的用途,其中:

所述的hsa-miR-31-3p miRNA是SEQ ID NO:1所示,

所述患者患有结肠直肠癌,以及

所述表皮生长因子受体抑制剂是抗表皮生长因子受体抗体或者酪氨酸激酶表皮生长因子受体抑制剂。

16. 根据权利要求15所述的用途,所述试剂盒还包括用于计算组合分数的说明书,其中考虑hsa-miR-31-3p的表达水平和BRAF的状态计算出组合分数,所述组合分数表明患者是否可能响应表皮生长因子受体抑制剂。

17. 根据权利要求16所述的用途,其中组合分数还包括年龄和性别。

一种用于预测对采用EGFR抑制剂的治疗的响应性的方法

技术领域

[0001] 本发明提供癌症治疗的个体化化疗的方法,尤其是在使用一种或者多种表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂进行治疗之前,评价患者对这种药剂响应性的方法。

背景技术

[0002] 蛋白酶体在调节由激活的细胞膜生长因子受体所诱导的转导蛋白周转(turnover)中发挥关键的作用。表皮生长因子受体(EGFR)通路在人类上皮细胞癌的发生和发展中起到关键作用。在具有功能性EGFR依赖的自分泌生长通路的不同人类癌症细胞中,同EGFR抑制剂的联合治疗具有协同的生长抑制和促凋亡活性,从而更加高效和持续的抑制Akt。

[0003] EGFR抑制剂已经在多种癌症治疗中被批准或者测试,包括非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈癌、结肠直肠癌和Her2-阳性的乳癌,同时也更多的被引入到标准的治疗中。EGFR抑制剂可以靶向EGFR靶标的胞内酪氨酸激酶结构域或者胞外的结构域,EGFR抑制剂的普遍困扰是人群响应率低,并导致化疗在许多病例中无效或者非最佳,以及不必要的药物毒性和费用。比如,据报道,西妥昔单抗(一种靶向EGFR胞外结构域的嵌合型单克隆抗体)在治疗结肠直肠癌时的临床响应率约为11%(Cunningham等人,N Engl Med 2004;351:337-45),埃罗替尼对于NSCLC的临床响应率约为8.9%(Shepherd F A等人,N Engl J Med 2005;353:123-132)。

[0004] 尤其在KRAS突变的情况中,已经观察到了耐受性。

[0005] 在结肠直肠癌中,由于KRAS突变与抗EGFR抗体的耐受性有明确的相关性(Lievre等人,Cancer Res.200666(8):3992-5),主要的挑战之一是在不带有KRAS突变的患者中鉴定能够预测对这种治疗缺乏响应的其它标记物。在其中,上述原癌基因的扩增或者激活突变、以及肿瘤抑制基因的失活突变作为候选,比如通过测量EGFR下游磷酸化蛋白的表达评价EGFR下游信号通路的激活水平。

[0006] 在肺癌中有三类患者:一类患者带有EGFR突变的肿瘤,对于这类患者使用EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR TKI)被证明是可以改善结果的,第二类患者带有KRAS突变的肿瘤,对于这类患者抗EGFR的治疗很可能不是好的选择,以及第三类既没有EGFR突变也没有KRAS突变的肿瘤,对于这类患者无法预测响应。在没有突变肿瘤的患者中,至今没有药物响应相关的标记物被证明是有价值的。

[0007] 因此,为了更好的对患者进行个性化治疗,在使用EGFR抑制剂治疗之前,需要预测患者对这种药剂的响应性。

[0008] 在现有技术中,有很多文献涉及将微小RNA(micro RNA)(miRNA)与多种抗癌治疗的敏感性或者耐受性相联系。然而,在大多数情况下,研究是部分的、不完整的,并且实际上也不允许真正预测对治疗的临床响应或非响应。事实上,在很多情况下,研究只局限在体外、在对具体治疗敏感或耐受的细胞系中、或者在分离自患者肿瘤的肿瘤细胞中分析miRNA的表达。此外,许多研究中虽然显示出两种细胞群或患者群之间表达水平上的差异,但并没

有给出阈值或者分数以允许真正在新的患者中预测响应或非响应。这与许多研究缺乏获自临床环境(setting)的数据的第一缺点部分相关。此外,即使存在一些获自临床环境的数据时,这些数据大多时候仅仅是回顾性的,而通常缺少在新群体中进行预测方法验证的数据。

[0009] 作为一个实例,W02010/121238描述了对EGFR酪氨酸激酶抑制剂敏感或耐受的肺癌细胞系培养物中进行的体外miRNA表达分析。没有显示获自临床环境的数据。

[0010] W02009/080437广泛要求了用于预测对抗癌治疗响应或非响应的方法。但是,W02009/080437中显示的数据只局限于多种传统化疗治疗,并没有提供与EGFR抑制剂(既没有抗EGFR的单克隆抗体,也没有EGFR酪氨酸激酶抑制剂)相关的数据。此外,基于miRNA在肿瘤细胞中的表达,获得针对其它化疗分子所显示的数据,其中所述肿瘤细胞分离自体外培养的患者肿瘤。没有显示获自临床环境的数据。

[0011] 类似的,尽管W02011/135459广泛要求用于预测对抗癌治疗响应或非响应的方法,此文件中显示的数据仅限于体外预测癌细胞系对各种抗癌药物的敏感性或耐受性。此处也仍然没有显示获自临床环境的数据,因此没有表明miRNA表达水平跟临床响应或者患者存活之间的相关性。

[0012] Ragusa等人2010(Ragusa M.等人,Mol Cancer Ther.2010十二月;9(12):3396-409)分析了在结肠直肠癌细胞系中用西妥昔单抗治疗之后miRNA的表达水平,已知所述细胞系对西妥昔单抗治疗是敏感或耐受的。在KRAS野生型和KRAS突变的患者中显示有两个miRNA的表达是有差异的。然而,KRAS野生型和KRAS突变的患者中的差异表达不允许在KRAS野生型患者中预测对EGFR抑制剂的响应。此外,跟许多其它研究一样,并没有显示获自临床环境的数据以表明这些miRNA的表达水平在患者中独立预测对EGFR抑制剂响应的能力。

[0013] Hatakeyama等人2010(Hatakeyama H.等人,PLoS One.2010九月13;5(9):e12702)公开了两种细胞系在体外用西妥昔单抗处理后蛋白被激活的比较,这两种细胞系来源于头颈部的鳞状细胞癌,一种对西妥昔单抗敏感而另一种耐受。EGFR的配体(HB-EGF或者TGFA)以较高量见于西妥昔单抗耐受的细胞系中。这种蛋白受miR-22所调控。在这个研究中也并没有显示获自临床环境的数据以表明miR-22的表达水平在患者中预测对西妥昔单抗响应的能力。

[0014] 因此,许多研究缺乏临床数据来说明特定miRNA的表达水平真正允许区分临床上响应治疗(导致存活提高)的患者和疾病进展且存活降低的患者。然而,在体外的细胞系或者肿瘤细胞上的数据可以被视为对用于在临床环境中预测响应或非响应的其它分析的支持,它显然不足以被视为提供了在患者中预测临床响应的真正方法。这尤其得到这一事实的证明,即上述文件中提到的体外发现的在敏感和耐受细胞系或肿瘤细胞中差异表达的miRNA,在本申请分析的临床数据中没有发现与临床响应(无进展存活或总体存活)显著相关。

[0015] 因此,需要真正的经验证的用于在患者中预测对EGFR抑制剂的响应的方法,其中针对所述患者这种治疗只是多种选择之一。本发明针对这种需求给出了回应。

发明内容

[0016] 本发明提供了一种用于预测患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂的体外方法,该方法包括确定所述患者样本中hsa-miR-31-3p(曾用名hsa-

miR-31*, SEQ ID NO:1) miRNA的表达水平。

[0017] 优选患者患有KRAS野生型的癌症。

[0018] 癌症优选是结肠直肠癌, 优选转移性结肠直肠癌。

[0019] 在最优选的实施方式中, 本发明提供了一种用于预测患有转移性结肠直肠癌的患者是否可能响应表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂如西妥昔单抗或者帕尼单抗的体外方法, 该方法包括确定所述患者的肿瘤组织样本中hsa-miR-31-3p (SEQ ID NO:1) miRNA的表达水平。

[0020] 本发明还提供了一种用于确定患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂的试剂盒, 其包含或由以下组成: 用于确定所述患者样本中hsa-miR-31-3p (SEQ ID NO:1) miRNA表达水平的试剂, 以及用于确定患者BRAF状态的试剂。

[0021] 本发明还涉及一种EGFR抑制剂, 其用于治疗患有癌症的患者, 其中所述患者根据本发明的方法被分类为可能有响应。

[0022] 本发明还涉及EGFR抑制剂用于制备预期用于在患者中治疗癌症的药物的用途, 其中根据本发明的方法所述患者被分类为“响应者”。

[0023] 本发明还涉及一种治疗患有癌症的患者的方法, 该方法包括 (i) 通过权利要求1至15任一项所述的方法, 确定患者是否可能响应EGFR抑制剂, 以及 (ii) 如果确定所述患者可能响应EGFR抑制剂, 则向所述患者施用EGFR抑制剂。

附图说明

[0024] 图1是显示通过阵列所定量的hsa-miR-31-3p的表达水平的图 ($n=43$; 平均值 $\pm$ SEM)。分子量在图中显示。 $P<0.0001$ 。

[0025] 图2A是显示通过定量RT-PCR定量的表达水平的图 ($n=23$; 平均值 $\pm$ SEM)。分子量如图所示。 $P<0.0001$ 。图2B显示非突变KRAS的患有结肠直肠癌的患者的Kaplan-Meier存活模型, 根据优化预测值的表达阈值分为hsa-miR-31-3p的高表达组 ($n=12$) 或低表达组 ($n=11$)。在该Cox比例风险模型中, $p=0.02$ 。 p 值用来检验表达数据是否可以预测存活的假设。基于100次置换 (permutation) 的对数秩检验的置换 p 值: $p=0.08$ 。

[0026] 图3显示非突变KRAS的患有结肠直肠癌的患者的Kaplan-Meier存活模型, 根据优化预测值的表达阈值分为hsa-miR-31-3p的高表达组 ($n=17$) 或低表达组 ($n=16$)。在该Cox比例风险模型中, $p=0.016$ 。

[0027] 图4A至4C显示非突变KRAS的患有结肠直肠癌的患者的Kaplan-Meier无进展存活模型, 根据优化预测值的表达阈值分为hsa-miR-31-3p的高表达组或低表达组。图4A: 第二组+第三组 (38名患者), 图4B: 第二组 (用西妥昔单抗治疗的19名患者), 图4C: 第三组 (用帕尼单抗治疗的19名患者)。

[0028] 图5: KRAS突变型患者 (KRASM) 和两类KRAS野生型患者群的Kaplan-Meier存活模型, 基于hsa-miR31-3p的表达水平和相关的预后进行分离 (良好组: 基于hsa-miR31-3p的表达, 预后良好, 以及不良组: 基于hsa-miR31-3p的表达, 预后不良)。

[0029] 图6A: 用来建立多变量逻辑回归模型而进行的建模分析, 所述多变量逻辑回归模型使用BRAF的突变状态和miR表达因素的对数用以预测进展 (PFS) 的可能性。图6B: 基于BRAF的突变状态 (brafm, NM: 未突变的; M: 突变的) 和miR表达 (miR) 的对数所构建的用来预

测存活风险进展的PFS列线图。为了对每个患者进行个体化风险预测,通过从点数等级(scale)中选择相应的点数,将点数分配给每一个变量,例如,带有突变BRAF的患者将记8分;miR对数=0.5的患者将记12分。然后将这些点数的总和绘制在对应于进展预测率的总点数等级上。在运行150轮引导程序(bootstrap)后,PFS列线图的一致性指数为0.75。

[0030] 图7A:用于建立多变量逻辑回归模型而进行的建模分析,所述多变量逻辑回归模型使用BRAF的突变状态、年龄、性别和miR表达因素对数用以预测进展(PFS)的可能性。图7B:基于BRAF突变状态(brafm,NM:未突变的;M:突变的)、年龄、性别(性别,1:男性,2:女性)以及miR表达(miR)的对数所构建的用来预测存活风险进展的PFS列线图。为了对每个患者进行个体化风险预测,通过从点数等级中选择相应的点数,将点数分配给每一个变量,例如,带有突变BRAF的患者将记17分;性别=2的患者将记22分,10到25岁的患者将记1分,miR对数=0.5的患者将记12分。然后将这些点数的总和绘制在对应于进展预测率的总点数等级上。在运行150轮引导程序后,PFS列线图的一致性指数为0.77。

[0031] 图8:在FFPE样本和冷冻样本中miR31-3p表达水平的散点图。线性回归分析显示两个变量之间的紧密相关性,这可以用一条直线来表示并且数学上计算为 $y = 40.439 * x - 397.3$ 。圆圈代表个体样本;线,代表线性回归。

[0032] 图9:在“预期冷冻(FE)”的hsa-miR-31-3p表达水平上进行的用来预测进展(PFS)可能性的逻辑回归模型。曲线对应于miR表达水平(以10为底的对数)的四分位数分布。灰色表示95%的置信区间。

[0033] 图10:在“进展风险”分数上进行的用来预测进展(PFS)可能性的逻辑回归模型,其中“进展风险”分数是根据实施例2中细化的基于PFS的列线图,用BRAF突变状态和hsa-miR31-3p表达对数计算所得的。曲线上的数字对应于分数。灰色表示95%的置信区间。

具体实施方式

[0034] 定义

[0035] “患者”可以为任意哺乳动物,最优为人类,年龄或性别不限。患者患有癌症。患者可以是已经接受任意化疗剂的治疗,或者是尚未接受治疗的。

[0036] 癌症优选为其中涉及EGFR信号通路的癌症。尤其,它可以是例如结肠直肠癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、头颈癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌或脑癌(Ciardello F等人.N Engl J Med.2008三月13;358(11):1160-74;Wheeler DL等人.Nat Rev Clin Oncol.2010九月;7(9):493-507;Zeineldin R等人.J Oncol.2010;2010:414676;Albitar L等人.Mol Cancer2010;9:166;Leslie KK等人.Gynecol Oncol.2012十一月;127(2):345-50;Mimeault M等人.PLoSOne.2012;7(2):e31919;Liebner DA等人.Ther Adv Endocrinol Metab.2011十月;2(5):173-95;Leboulleux S等人.Lancet Oncol.2012九月;13(9):897-905;Pan J等人.Head Neck.2012九月13;Chan SL等人.Expert Opin Ther Targets.2012三月;16增刊1:S63-8;Chu H等人.Mutagenesis.2012十月15;Li Y等人.Oncol Rep.2010十月;24(4):1019-28;Thomasson M等人.Br J Cancer2003;89:1285-1289;Thomasson M等人.BMC Res Notes.2012五月3;5:216)。在特定的实施方式中,肿瘤本质上为实体组织肿瘤和/或是上皮性的。例如,患者可以为结肠直肠癌患者、Her2阳性或Her2阴性的乳癌患者(尤其是三阴性,即Her2阴性、雌激素

受体阴性及孕激素受体阴性)、非小细胞肺癌(NSCLC)患者、头颈癌患者(尤其是头颈部鳞状细胞癌患者)、胰腺癌患者、或子宫内膜癌患者。更尤其是,患者可以为结肠直肠癌患者、Her2阳性或者Her2阴性(尤其是三阴性)的乳癌患者、肺癌患者(尤其是NSCLC)、头颈癌患者(尤其是头颈部鳞状细胞癌患者)、或胰腺癌患者。

[0037] 在优选的实施方式中,癌症是结肠直肠癌,进一步癌症优选是转移性结肠直肠癌。实际上,实施例1-3中显示的数据以及Mosakhani等人2012中公布的数据(Mosakhani N.等人.Cancer Genet.2012十月22.doi:pii:S2210-7762(12)00229-3.10.1016/j.cancergen.2012.08.003),清晰地表明hsa-miR-31-3p的表达水平可以在结肠直肠癌治疗中用作响应EGFR抑制剂(和尤其是抗EGFR单克隆抗体,例如西妥昔单抗和帕尼单抗)的预测物。

[0038] 这些从已知涉及EGFR信号通路的癌症中得到的结果明确表明hsa-miR-31-3p表达水平可以在任意其它已知涉及EGFR信号通路的癌症中(例如肺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、头颈癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌、或脑癌)用作响应EGFR抑制剂(和尤其是抗EGFR单克隆抗体,例如西妥昔单抗和帕尼单抗)的预测物。这一点尤其正确,因为hsa-miR-31-3p在一些其它癌症中显示过度表达(见Chang KW等人.Oral Oncol.2012七月30,Xiao W等人.2012.PLoS ONE7(6):e38648,以及Zhao L.等人.Int J Biochem Cell Biol.2012十一月;44(11):2051-9)。由于hsa-miR-31-3p与对EGFR抑制剂的响应相关,进而与EGFR的信号通路相关,并且由于它在已知涉及EGFR信号通路的一些癌症中表达,因此可以合理地预期它可用于在任意其它已知涉及EGFR信号通路的癌症中预测对EGFR抑制剂(和尤其是抗EGFR单克隆抗体,例如西妥昔单抗和帕尼单抗)的响应。

[0039] 在另一优选的实施方式中,癌症是Her2阳性或者Her2阴性(尤其是三阴性)的乳癌、优选Her2阴性(尤其是三阴性)的乳癌。

[0040] 在另一优选的实施方式中,癌症是肺癌,尤其是非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0041] 在另一优选的实施方式中,癌症是胰腺癌。

[0042] 显而易见地,由于该预测与EGFR抑制剂的治疗相关,因此患者的肿瘤优选为EGFR阳性。

[0043] 优选地,患者有KRAS野生型肿瘤,也就是患者的肿瘤中KRAS基因在第12位、13位密码子(第一外显子)、或者第61位密码子(第三外显子)中没有出现突变。换句话说,KRAS基因在第12位、13位和第61位密码子上是野生型的。

[0044] 野生型,也就是非突变的,第12位、13位密码子(第一外显子),和第61位密码子(第三外显子)分别对应甘氨酸(Gly,第12位密码子)、甘氨酸(Gly,第13位密码子)和谷氨酰胺(Gln,第61位密码子)。野生型参考KRAS氨基酸序列可见于Genbank登陆号NP_004976.2(SEQ ID NO:2)。

[0045] 尤其是,患者肿瘤中的KRAS基因未呈现出以下任一突变(Bos.Cancer Res1989;49:4682-4689;Edkins等人.Cancer Biol Ther.2006八月;5(8):928-932;Demiralay等人.Surgical Science,2012,3,111-115):

[0046] Gly12Ser (GGT>AGT)

[0047] Gly12Arg (GGT>CGT)

[0048] Gly12Cys (GGT>TGT)

[0049] Gly12Asp (GGT>GAT)

[0050] Gly12Ala (GGT>GCT)

[0051] Gly12Val (GGT>GTT)

[0052] Gly13Arg (GGC>CGC)

[0053] Gly13Cys (GGC>TGC)

[0054] Gly13Asp (GGC>GAC)

[0055] Gly13Ala (GGC>GCC)

[0056] Gly13Val (GGC>GTC)

[0057] 优选地,患者肿瘤中的KRAS基因也未呈现出以下任一突变(Demiralay等人.Surgical Science,2012,3,111-115):

[0058] Gly12Phe (GGT>TTT)

[0059] Gly13Ser (GGC>AGC)

[0060] 优选地,患者肿瘤中的KRAS基因也未呈现出以下任一突变(Bos.Cancer Res1989;49:4682-4689;Tam等人.Clin Cancer Res2006;12:1647-1653;Edkins等人.Cancer Biol Ther.2006八月;5(8):928-932;Demiralay等人.Surgical Science,2012,3,111-115):

[0061] Gln61His (CAA>CAC)

[0062] Gln61His (CAA>CAT)

[0063] Gln61Arg (CAA>CGA)

[0064] Gln61Leu (CAA>CTA)

[0065] Gln61Glu (CAA>GAA)

[0066] Gln61Lys (CAA>AAA)

[0067] Gln61Pro (CAA>CCA)

[0068] 本领域内已知的任何方法均可被用来获知患者的KRAS状态。

[0069] 例如,肿瘤组织被显微切割,并从石蜡包埋的组织块中提取DNA。用聚合酶链式反应(PCR)对KRAS基因中覆盖第12、13和61位密码子的区域进行扩增。突变状态可以通过用PCR探针进行的等位基因分型(Laurent-Puig P,等人,J Clin Oncol.2009,27(35):5924-30)或通过任何其它方法,如焦磷酸测序(Ogino S,等人.J Mol Diagn2008;7:413-21)来确定。

[0070] “样本”可以为源自患者的任何生物样本,其中包含核酸。这种样本的实例包含生物液(包含血液、血浆、唾液、尿液、精液)、组织、细胞样本、器官、活检等。优选地,样本为肿瘤样本,优选为肿瘤组织活检或者完整或部分肿瘤外科切除。样本可以根据常规的技术进行收集,并直接用于诊断或贮存。肿瘤样本可以是新鲜的、冷冻的或者石蜡包埋的。通常地,可用的肿瘤样本是冷冻的或者石蜡包埋的,大多数时候是石蜡包埋的。本发明人已经证明冷冻的和石蜡包埋的肿瘤组织均是可用的。

[0071] “参考样本”是指对EGFR抑制剂治疗阳性或者阴性响应已知的患者的肿瘤样本(尤其是肿瘤活检或者完整或部分的肿瘤外科切除)。优选地,参考样本池包含至少一名(优选地为数名,更优选地为至少5名,更优选地至少6名,至少7名,至少8名,至少9名,至少10名)响应的患者和至少一名(优选地为数名,更优选地至少6名,至少7名,至少8名,至少9名,至少10名)无响应的患者。响应者(也被称为“阳性”)和无响应者(也被称为“阴性”)参考样本

的数目越多,则根据本发明的预测方法的可靠性就越好。

[0072] 在本发明的上下文中,患者是“可能响应的”或是“响应者”指的是患者对抗EGFR抑制剂的治疗有响应,即他的至少一个症状得到缓解,或者是疾病的发展被终止或减慢。依据RECIST标准(Eisenhauer等人,European Journal of Cancer,2009,45:228-247),完全响应者、部分响应者、或者稳定患者在本发明的上下文中均被认为是“可能响应的”或是“响应者”。

[0073] 在实体肿瘤中,RECIST标准是基于出现至少一个可测量病变的国际标准。“完全响应”是指所有靶病变都消失;“部分响应”是指靶病变最长直径总和减少30%，“进展性疾病”是指靶病变最长直径总和增加20%，“稳定的疾病”是指不符合上述标准的变化。

[0074] 更优选地,“响应”患者被预测显示有良好的无进展存活(PFS),即患者可能至少存活25周而没有疾病症状的加重,和/或该患者显示良好的总体存活(OS),即患者可能至少存活14个月。

[0075] 术语“预测”或者“预后”是指患者对EGFR抑制剂治疗响应的概率或可能性。

[0076] 根据本发明,肿瘤细胞生长对EGFR抑制剂抑制的灵敏度是通过该肿瘤细胞是否表达hsa-miR-31-3p miRNA来预测的。

[0077] 术语“处理”或者“治疗”是指稳定、缓解、治愈或者减轻癌症的进展。

[0078] “miRNA”或者“微小RNA(microRNA)”是约21到24个核苷酸的单链分子,优选地长度为21-23个,它们由转录自DNA的基因所编码,但不被翻译成蛋白(非编码RNA);而是由被称为pri-miRNA的初级转录物加工成被称为pre-miRNA的短的茎环结构,并最终加工成功能性miRNA。在成熟的过程中,每一个pre-miRNA都产生两个高度互补的不同片段,一个源自编码该pri-miRNA的基因的5' 臂,另一个源自3' 臂。成熟的miRNA分子部分地与一个或者多个信使RNA(mRNA)分子互补,它们的主要功能是下调基因的表达。

[0079] 有一个miRNA的国际命名方式(见Ambros V等人,RNA20039(3):277-279;Griffiths-Jones S.NAR200432(数据库发布):D109-D111;Griffiths-Jones S等人.NAR200634(数据库发布):D140-D144;Griffiths-Jones S等人.NAR200836(数据库发布):D154-D158;以及Kozomara A等人.NAR201139(数据库发布):D152-D157),可以在miRBase数据库<http://www.mirbase.org/>中获取。每一个miRNA都被以预定格式分派一个唯一名称,如下:

[0080] • 针对成熟miRNA:sss-miR-X-Y,其中“

[0081] ○sss是用来表明miRNA物种的三字母编码,“has”表示人类,

[0082] ○miR中的大写“R”表示它是成熟miRNA。然而一些作者在文献中也滥用“mir”来表示成熟miRNA。在这种情况下,也可以通过“-Y”的存在来识别它是成熟miRNA,

[0083] ○X是任意的唯一数字用来指定特定物种中miRNA的序列,如果已知有多个高度同源的miRNA,那么后面可以再加一个字母。如,“20a”和“20b”表示高度同源的miRNA。

[0084] ○Y表示切割pre-miRNA得到的成熟miRNA是对应于编码pri-mRNA的基因的5' 臂(那么Y为“5p”)还是3' 臂(那么Y为“3p”)。在前述的miRNA国际命名中,没有出现“-Y”。然后通过n后面“*”符号的存在或缺失来区分获自编码pri-mRNA的基因的5' 臂或3' 臂的两个成熟miRNA。带有“*”符号表明该序列对应着较少检测到的miRNA。由于这种分类方式已经发生改变,因此采用“3p”和“5p”编码的新命名已经得以实施。

[0085] • 对于pri-miRNA:sss-mir-X,其中

[0086] ○sss是用来表明miRNA物种的三字母编码,“has”表示人类,

[0087] ○mir中的小写“r”表示它是pri-miRNA而不是成熟的miRNA,这可以通过不存在“-Y”来确认,

[0088] ○n是任意唯一数字用来指定特定物种中miRNA的序列,如果已知有数个高度同源的miRNA,后面可以加上一个字母。

[0089] 对每个miRNA的序列也指定一个登陆号。

[0090] 本发明中所检测的miRNA为hsa-miR-31-3p(曾被命名为hsa-miR-31*)。在该命名中,“hsa”表示其为人miRNA,“miR”表示成熟的miRNA,“31”是指该特定miRNA所指定的任意编号,以及“3p”表示该成熟miRNA获自编码pri-mRNA的基因的3' 臂。

[0091] miR-31-3p为UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU (SEQ ID NO:1)

[0092] (<http://www.mirbase.org>中登陆号为MIMAT0004504)。

[0093] 样本中miRNA水平的检测方法

[0094] miRNA的表达水平可由本领域中任何技术人员所熟知的方法来确定,如miRNA可被定量。尤其地,可以用实时定量RT-PCR(qRT-PCR)。

[0095] 还可以采用核酸分析或阵列来评价样本中miRNA的水平。

[0096] 在一些实施方式中,可以制备或购买寡核苷酸阵列。阵列通常包括固态的支持物和至少一个与该支持物接触的寡核苷酸,其中寡核苷酸与miRNA的至少部分相对应。

[0097] 样本中miRNA的存在可以由任何合适的分析平台来确定。例如,分析的形式可以是膜、芯片、皿、测试条、滤器、微球、多孔板等。分析系统可具有附着有寡核苷酸的固态支持物,寡核苷酸与miRNA相对应。固态支持物可以包含例如塑料、硅、金属、树脂或者玻璃。可以制备分析组成,并包装到一起构成用来检测miRNA的试剂盒。

[0098] 在一些实施方式中,qRT-PCR可以被用来对靶标RNA进行检测和定量(Bustin等人,2005,Clin.Sci.,109:365-379)。通过qRT-PCR得到的定量结果往往比定性的数据具有更大的信息量,并能简化标准分析流程和质量控制。因此,在一些实施方式中,基于qRT-PCR的分析可以被用来在基于细胞的分析中测量miRNA的水平。qRT-PCR方法也可以被用来监测患者的治疗。基于qRT-PCR方法的实例可以在如U.S.Pat.No.7,101,663中找到。商品化可获得的基于qRT-PCR的方法(如Taqman[®]阵列)。也可以采用来自Applied Biosystems的人miRNA盘。

[0099] 在另一实施方式中,miRNA的定量可以通过测序来进行。

[0100] 患者分类

[0101] hsa-miR-31-3p的表达越低,对于患者来说就越好。因此,miRNA的表达水平越低,患者对EGFR抑制剂治疗响应的可能性就越大。在一个实施方式中,当患者的hsa-miR-31-3p的表达低于对照值时,其就被认为是“响应者”,或可能对EGFR抑制剂的治疗有响应。

[0102] 这种对照值可以基于如上所定义的参考样本池来确定。特别地,图1和图2A清晰地表明,基于参考样本池,可以定义hsa-miR-31-3p表达水平的对照值(hsa-miR-31-3p表达水平的对数)来允许预测对EGFR抑制剂的治疗响应或者不响应。

[0103] 然而,在一个优选的实施方式中,方法还包括基于miRNA的表达水平来确定预后分数或指数,其中预后分数表明患者是否可能对EGFR抑制剂响应。尤其是,所述预后分数可表明患者是否可能对EGFR抑制剂响应取决于是否预后分数高于或低于预定的阈值(二分的结

果)。在另一个实施方式中,可以从预后分数得到对EGFR抑制剂响应或者不响应的离散概率。

[0104] 如果对所述患者施用EGFR抑制剂的治疗,患者对EGFR抑制剂治疗响应的概率与患者的存活概率相关,而无论是否有疾病进展。

[0105] 因此,预后分数可以基于分析如上所定义的参考样本池的hsa-miR-31-3p的表达水平与无进展存活(PFS)或总体存活(OS)的相关性来确定。于是,可以将PFS和/或OS分数作为预后分数来预测对EGFR抑制剂的响应,PFS和/或OS分数是关联PFS或OS与hsa-miR-31-3p表达水平的函数。因为无病进展是对EGFR抑制剂治疗响应的明确指示,所以优选地采用PFS分数。

[0106] 在一个优选的实施方式中,预后分数为实施例部分所示的所确定的预后分数之一:

[0107] 预后分数可以通过下式计算(基于实施例1所公开的22个参考样本的池所确定):

[0108] • PFS分数 $=0.203738*x-1.453362$,其中x是hsa-miR-31-3p表达的对数。

[0109] • OS分数 $=0.190677*x-1.360191$,其中x是hsa-miR-31-3p表达的对数。

[0110] 如果患者的预后分数小于或等于-0.098088(PFS)和/或-0.0918(OS),那么他/她就被预测为响应者。优选地,如果患者的预后分数小于或等于-0.098088(PFS),那么他/她就被分类认为是响应者。

[0111] 在另一个实施方式中,预后分数可以通过下式计算(基于实施例2所公开中的33个参考样本的池所确定):

[0112] • PFS分数 $=0.178366*x-1.363693$,其中x是hsa-miR31-3p表达的对数。

[0113] • OS分数 $=0.102142*x-0.780927$,其中x是hsa-miR31-3p表达的对数。

[0114] 如果患者的预后分数小于或等于-0.03123(PFS)和/或-0.017884(OS),那么他/她就被预测为响应者。优选地,如果患者的预后分数小于或等于-0.03123(PFS),那么他/她就被分类认为是响应者。

[0115] 实验部分所确定的PSF和OS分数是基于23个和33个参考样本的池所得到的,这就解释了实施例1和2中所确定的PFS分数中PSF与hsa-miR-31-3p表达水平对数相关性的线性函数的参数之间的微小偏差。尽管纳入更多参考样本可能在这些参数中带来一些其它微小偏差,但是本发明人所获得的结果证实了患者的存活(PFS或者OS)与肿瘤样本中hsa-miR-31-3p表达对数之间存在线性相关性。因此,从本发明人获得的实验数据中可以得出结论,患者对EGFR抑制剂治疗响应的概率与hsa-miR-31-3p表达水平的对数线性相关。在一个优选的实施方式中,所述预后分数于是可以采用下式表示:

[0116] 预后分数 $=a*x+b$,其中x是患者样本中所测量的hsa-miR-31-3p表达水平的对数,a和b是按照上述定义的预先基于参考样本池所确定的参数。

[0117] 如果患者的预后分数小于或等于阈值c,那么他/她就可以被预测为对EGFR抑制剂响应,如果患者的预后分数大于阈值c,则对EGFR抑制剂不响应,其中c值也基于相同的参考样本池所确定。

[0118] 基于本发明人所进行的实验中可以确定,在该例中,a、b和c优选在以下范围:

[0119] • a: [0.1;0.25],优选为[0.17;0.21];

[0120] • b: [-2;-0.5],优选为[-1.8;-0.6],优选为[-1.5;-0.7];以及

[0121] • c : $[-0.11; -0.01]$, 优选为 $[-0.10; -0.01]$ 。如果采用PFS分数, c 优选在 $[-0.10; -0.03]$ 的范围内; 如果采用OS分数, c 优选在 $[-0.1; -0.015]$ 的范围内。

[0122] 在另一实施方式中, 对EGFR抑制剂响应或不响应的离散概率可以源自上面的预后分数 $a \cdot x + b$ 。预后分数越低, 对EGFR抑制剂治疗的响应概率越高。预后分数与对EGFR抑制剂治疗的响应概率之间的精确相关性可以基于相同的参考样本组所确定。

[0123] 尽管对EGFR抑制剂的响应可以仅基于hsa-miR-31-3p的表达水平来预测(见实施例1和2), 本发明人还确定如果综合考虑hsa-miR-31-3p的表达水平和BRAF的状态(见实施例2), 甚至可以得到更加可信的预测。因此, 在一个优选的实施方式中, 本发明的方法进一步包含确定所述患者BRAF的状态, 并通过考虑hsa-miR-31-3p表达水平和BRAF的状态计算出组合分数, 其中组合分数表明患者是否可能对EGFR抑制剂有响应。

[0124] BRAF基因也被称为原致癌基因B-Raf和v-Raf小鼠肉瘤病毒致癌基因同源物B1, 而蛋白较正式地被称为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶B-Raf。该蛋白在调节MAP激酶/ERKs信号通路中发挥作用, 从而影响细胞分裂、分化和分泌。该基因的突变与多种癌症相关, 包括非霍奇金淋巴瘤、结肠直肠癌、恶性黑色素瘤、甲状腺癌、非小细胞肺癌和肺的腺癌。

[0125] 与登陆号为NP_004324.2 (SEQ ID NO:3) 限定的野生型BRAF蛋白序列相比, 根据患者肿瘤中的BRAF蛋白包含或不包含V600E突变(在600位密码子上的缬氨酸被谷氨酸的取代), 可将“BRAF状态”定义为野生型或突变型。如果与蛋白序列NP_004324.2相比, BRAF蛋白不包含V600E突变, 则BRAF状态被认为是“BRAF野生型”。反之, 如果与蛋白序列NP_004324.2相比, 患者肿瘤中的BRAF蛋白包含V600E突变, 则BRAF状态被定义为“BRAF突变型”。

[0126] 可以在肿瘤样本上, 优选在采用EGFR抑制剂处理之前, 采用例如等位基因鉴别分析(如Laurent-Puig P, 等人, J Clin Oncol. 2009, 27 (35): 5924-30和Lièvre等人, J Clin Oncol. 2008一月20; 26 (3): 374-9中所述) 或者直接测序来确定BRAF状态。

[0127] 组合分数可以进一步包括与预测对EGFR抑制剂响应相关的附加参数。这样的附加参数可以包括例如年龄和性别。

[0128] 组合分数尤其可以基于列线图, 其中对组合分数的每个变量建立点数等级。对于指定的患者, 通过从每个变量的点数等级中选取相应的点数将点数分配给每个变量。对于离散的变量(如hsa-miR-31-3p的表达水平或者年龄), 归属于变量的点数目与变量的值线性相关。对于二分的变量(只有两种可能的值, 如BRAF的突变状态或者性别), 将两个不同的值归属于变量的两个可能的值中的每一个。

[0129] 然后, 通过将每个变量所分配的点数相加来计算组合分数。在组合分数值的基础上, 根据组合分数是否小于或大于阈值(二分的分数), 然后对患者作出良好或者不良的响应预后, 或给出对治疗响应或者不响应的概率。

[0130] 可以基于相同的参考样本池确定每个变量的分数等级, 以及阈值或者组合分数与响应或不响应概率之间的相关性, 其中在所述阈值之上/之下响应预后是良好或不良。

[0131] 实施例2中给出了这样的组合分数的具体实例(同时参见图6B和图7B), 具体实例对应于本发明的优选实施方式。

[0132] EGFR抑制剂

[0133] 本发明使得能够在用一种或者多种表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂进行治疗之前预测患者对这种药剂的响应性。

[0134] EGFR抑制剂可以是EGFR酪氨酸激酶的抑制剂,或者可以靶向EGFR靶的胞外结构域。

[0135] 优选的,该EGFR抑制剂是抗EGFR的抗体,优选为单克隆抗体。

[0136] 在一些实施方式中,EGFR抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂,如厄洛替尼、吉非替尼、或拉帕替尼,或者是靶向EGFR胞外结构域的分子,如西妥昔单抗或帕尼单抗。

[0137] 靶向EGFR胞外结构域的分子包括主要被用来治疗结肠直肠癌或乳癌的抗EGFR单克隆抗体,如西妥昔单抗或帕尼单抗。因此,如果患者的癌症是结肠直肠癌(尤其是转移性结肠直肠癌)或者乳癌,那么根据本发明的方法优选用于预测对分子的响应,其中所述分子靶向EGFR胞外结构域,尤其是抗EGFR单克隆抗体,如西妥昔单抗或帕尼单抗。

[0138] 相反地,酪氨酸激酶EGFR抑制剂主要被用来治疗肺癌(尤其是非小细胞肺癌,NSCLC),因此如果患者的癌症是肺癌(尤其是非小细胞肺癌,NSCLC),那么根据本发明的方法优选用于预测对酪氨酸激酶EGFR抑制剂(如厄洛替尼、吉非替尼、或拉帕替尼)的响应。

[0139] 在胰腺癌或者头颈癌(尤其是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN))中,酪氨酸激酶EGFR抑制剂和抗EGFR单克隆抗体都被作为治疗进行了测试,因此,如果患者的癌症是胰腺癌或者头颈癌(尤其是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN)),那么根据本发明的方法用于预测对酪氨酸激酶EGFR抑制剂(如厄洛替尼、吉非替尼、或拉帕替尼)或者抗EGFR单克隆抗体(如西妥昔单抗或帕尼单抗)的响应。

[0140] 西妥昔单抗和帕尼单抗是目前临床上应用最多的抗EGFR单克隆抗体。然而,更多的抗EGFR单克隆抗体也在开发中,如Nimotuzumab(无对应中译文)(TheraCIM-h-R3)、Matuzumab(无对应中译文)(EMD72000)和Zalutumumab(无对应中译文)(HuMax-EGFr)。根据本发明的方法也可以用来预测对这些抗EGFR单克隆抗体或者对任何其它可能被进一步开发出来的抗EGFR单克隆抗体(包括其片段)的响应,尤其是如果患者患有结肠直肠癌(尤其是转移性的结肠直肠癌)、乳癌、胰腺癌或者头颈癌(尤其是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN))。

[0141] 类似的,厄洛替尼、吉非替尼、和拉帕替尼是目前临床上应用最多的酪氨酸激酶EGFR抑制剂。然而,更多的酪氨酸激酶EGFR抑制剂也在开发中,如卡奈替尼(CI-1033)、来那替尼(HKI-272)、阿法替尼(BIBW2992)、Dacomitinib(无对应中译文)(PF299804,PF-00299804)、TAK-285、AST-1306、ARRY334543、AG-1478(Tyrphostin AG-1478(无对应中译文))、AV-412、OSI-420(DesmethylErlotinib(无对应中译文))、AZD8931、AEE788(NVP-AEE788)、培利替尼(EKB-569)、CUDC-101、AG490、PD153035HCl、XL647和BMS-599626(AC480)。根据本发明的方法也可以用来预测对这些酪氨酸激酶EGFR抑制剂,或者任何其它可能被进一步开发出来的酪氨酸激酶EGFR抑制剂的响应,尤其是如果患者患有肺癌(尤其是非小细胞肺癌,NSCLC)、胰腺癌、或头颈癌(尤其是头颈部鳞状细胞癌(SCCHN))。

[0142] 试剂盒

[0143] 本发明还涉及一种用于确定患有癌症的患者是否可能对表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂响应的试剂盒,其包含或由如下组成:

[0144] a) 用于确定所述患者样本中hsa-miR-31-3p(SEQ ID NO:1)miRNA表达水平的试剂(优选肿瘤样本,例如肿瘤活检,或者完整或部分肿瘤外科切除),以及

[0145] b) 用于确定患者BRAF状态的试剂。

[0146] 用于确定所述患者的样本中hsa-miR-31-3p(SEQ ID NO:1)miRNA表达水平的试

剂,尤其包括引物对(正向引物和反向引物)和/或特异于hsa-miR-31-3p (SEQ ID NO:1) miRNA的探针,或者包括特异于hsa-miR-31-3p (SEQ ID NO:1)miRNA的序列的miRNA微阵列。

[0147] 用于确定患者BRAF状态的试剂可以包括用来在测序之前扩增全部或者部分BRAF基因的至少一对引物对,或者用于等位基因鉴别分析的在5'端标记有荧光报告染料FAM和VIC的一组特异性探针,例如ABI7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems,福斯特城,CA) (参见Laurent-Puig P,等人,J Clin Oncol.2009,27 (35): 5924-30以及Lièvre等人.J Clin Oncol.2008一月20;26 (3):374-9)。

[0148] 本发明的试剂盒进一步包含说明书,基于hsa-miR-31-3p (SEQ ID NO:1)miRNA的表达水平和BRAF的状态用于确定患者是否可能会对EGFR抑制剂有响应,以及任选地包含其它额外的参数。尤其,如图5B和6B所示,包括组合分数所含全部变量的点数等级的列线图、以及组合分数(点数的总数)与预测(响应/非响应、或者响应或非响应的概率)之间的相关性,可以包括在内。

[0149] 药物、治疗用途以及治疗方法

[0150] 本发明方法预测出的患者对EGFR抑制剂响应性的比例与临床所报道的对EGFR抑制剂的响应比例相匹配。

[0151] 因此,进一步提供了一种用于治疗患有癌症的患者的方法,该方法包括向患者施用至少一种EGFR抑制剂,其中患者依据上述方法被分类为“响应者”。

[0152] 尤其地,本发明涉及到一种用于治疗患有癌症的患者的方法,该方法包括(i)根据本发明的方法确定患者是否可能对EGFR抑制剂响应,以及(ii)如果患者被确定为可能对EGFR抑制剂有响应,则对所述患者施用EGFR抑制剂。

[0153] 如果患者被确定为不可能对EGFR抑制剂响应,那么方法进一步包括步骤(iii)对患者施用替代性抗癌治疗。这种替代性抗癌治疗依赖于特定的癌症和之前测试的治疗,然而可以尤其选自放射疗法、其它化疗分子、或者其它生物制剂,如针对其它抗原的单克隆抗体(抗Her2、抗VEGF、抗EPCAM、抗CTLA4等)。

[0154] 尤其地,在结肠直肠癌中,如果患者被确定为不可能对EGFR抑制剂有响应,那么步骤(iii)中的替代性抗癌治疗可以选自:

[0155] • VEGF抑制剂,尤其是抗VEGF单克隆抗体(如贝伐单抗),有利地与FOLFOX(甲酰四氢叶酸(叶醛酸)、5-氟尿嘧啶(5-FU)和奥沙利铂的组合)或FOLFIRI(甲酰四氢叶酸(叶醛酸)、5-氟尿嘧啶(5-FU)和依立替康的组合)化疗联用。

[0156] • 作为替代,如果患者对任选地与FOLFOX或者FOLFIRI化疗联用的VEGF抑制剂的治疗不成功,可施用5-FU,任选地与丝裂霉素B联用。可进一步对患者施用最好的支持性护理,即在不采用特定的抗肿瘤方案(即没有抗癌治疗)的前提下,意图最大可能提高生活质量所施用的治疗。

[0157] 本发明另一主题涉及到一种EGFR抑制剂,其用于治疗患有癌症的患者,其中按上述方法患者分类为可能有响应。所述患者可能患有结肠直肠癌,更尤其是转移性结肠直肠癌。或者,所述患者可能患有乳癌,尤其是三阴性乳癌。或者,所述患者可能患有肺癌,尤其是非小细胞肺癌(NSCLC)。或者,所述患者可能患有头颈癌,尤其是头颈部鳞状细胞癌。或者,所述患者可能患有胰腺癌。本发明也涉及EGFR抑制剂用于制备药物的用途,所述药物用于在通过本发明上述方法被分类为“响应者”的患者中治疗癌症。

[0158] 在优选的实施方式中,EGFR抑制剂为抗EGFR抗体,优选为西妥昔单抗或帕尼单抗。或者,EGFR抑制剂可以是酪氨酸激酶EGFR抑制剂,尤其是厄洛替尼、吉非替尼或拉帕替尼。

[0159] 在优选的实施方式中:

[0160] • 患者患有结肠直肠癌,尤其是转移性结肠直肠癌,并且EGFR抑制剂是抗EGFR抗体,优选为西妥昔单抗或帕尼单抗;

[0161] • 患者患有乳癌,尤其是三阴性乳癌,并且EGFR抑制剂是抗EGFR抗体,优选为西妥昔单抗或帕尼单抗;

[0162] • 患者患有肺癌,尤其是非小细胞肺癌(NSCLC),并且EGFR抑制剂是酪氨酸激酶EGFR抑制剂,尤其是厄洛替尼、吉非替尼或拉帕替尼;

[0163] • 患者患有头颈癌,尤其是头颈部鳞状细胞癌、或者胰腺癌,并且EGFR抑制剂是抗EGFR抗体(优选为西妥昔单抗或帕尼单抗)或者是酪氨酸激酶EGFR抑制剂(尤其是厄洛替尼、吉非替尼或拉帕替尼)。

[0164] 实施例和附图用以说明本发明而不限其范围。

[0165] 实施例

[0166] 实施例1:KRAS野生型结肠直肠癌中miRNA的水平决定了接受抗EGFR治疗的患者的存活差异。

[0167] 患者和方法

[0168] 患者组

[0169] 第一组患者(本文中称为“研究组”)由43名患者组成,其中男性29人,女性14人。年龄的中位数为 61.3 ± 11.4 岁。所有患者在被纳入本研究之时均已患有转移性疾病。所有这些患者均发展成KRAS野生型结肠癌。

[0170] KRAS状态按照以下确定。对于每个患者,在术后立即将肿瘤组织块冻存。根据制造商的建议,在确定肿瘤组织块中肿瘤细胞的比例后,用Qiagen试剂盒提取肿瘤组织中的DNA(仅挑选包含50%以上肿瘤细胞的肿瘤组织块进行DNA和RNA的提取)。根据Laurent-Puig P,等人,J Clin Oncol.2009,27(35):5924-30中报道的方法,用Taqman探针针对密码子12和13去核实所提取的肿瘤DNA中的KRAS状态。通过KRAS基因的3号外显子进行测序来检测密码子61的突变。在这第一组中所选的所有肿瘤在密码子12、13和61上均为KRAS野生型。患者的响应状态按照RECIST标准进行评估。两名患者被视为完全响应者,12名被视为部分响应者,17名被视为疾病稳定,12名在第一次评估时被视为是进展的。

[0171] 34名患者在随访时有被记录为进展,同时31名患者在随访时死亡。

[0172] 随访直至进展的中位值为16.14周,总体存活的中位值为12.4个月。除2名患者外,所有患者对伊利替康耐受,2名对奥沙利铂耐受;33名接受西妥昔单抗和伊利替康的联合治疗,1名接受帕尼单抗和伊利替康的联合治疗,6名接受西妥昔单抗和FOLFIRI的联合治疗,2名接受西妥昔单抗和FOLFOX的联合治疗,以及1名接受西妥昔单抗和XELODA的联合治疗。记录引入西妥昔单抗和帕尼单抗前的化疗线数。

[0173] miRNA表达水平的定量

[0174] 采用Ambion公司的mirVanamiRNA分离试剂盒,从23名患者亚组的冷冻肿瘤中提取小RNA。根据制造商建议,将从每个样本中提取的750ng RNA标记并固定在Illumina Human v2 microRNA表达珠芯片上,进行全局的microRNA(miRNA)谱分析。用Illumina扫描阅读器

扫描珠芯片,将数据导入GenomeStudio (Illumina),并进行分位数归一化处理 and 以2为底的对数转换。

[0175] 通过对ng级别的逆转录RNA采用特异的TaqMan预设分析和ABI7900HT实时PCR系统,对miRNA hsa-miR-31-3p的表达水平进行特异性定量分析。采用 $\Delta \Delta Ct$ 方法将表达水平对参考snRNA RNU6B的水平进行归一化处理。

[0176] 统计分析

[0177] 使用GraphPad Prism软件进行统计学分析。定量实时PCR表达数据以平均值 $\pm$ SEM (平均标准偏差)表示。采用曼-惠特尼 (Mann-Whitney) (MW) 非参数检验进行定量值的比较。所有报告的p值均为双尾。

[0178] 存活模型预测

[0179] 采用Cox比例风险模型 (Cox, D.R. (1972). Regression models and life-tables. Journal of the Royal Statistical Society, Series B34 (2), 187-220) 结合监督主成分的方法 (E Bair & R Tibshirani, Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data, PLOS Biology 2:511-522, 2004), 计算基于microRNA表达的存活风险组预测物。

[0180] 用单变量的Cox比例风险模型对那些表达水平对数与存活时间相关的miRNA进行分类。通过对存活时间与表达水平无关这一假设进行检验,并用多变量置换检验假阳性比例 ($N=1000, p<0.05$)。选择miRNA后,计算主成分,并进行Cox比例风险回归分析得到每一主成分的回归系数(权重)。

[0181] 对患者计算出组合预后分数,其中患者的表达谱用表达水平对数的向量x进行描述,其组合了x成分与每一主成分值的加权平均。高的预后分数值对应高的死亡风险值,同时对应相对低的存活预测。采用留一法交叉验证对预测值进行评价。将产生对预后好坏最佳分离度的分数阈值用于Kaplan-Meier分析。

[0182] 结果

[0183] 发明人使用测量1145种miRNA表达水平的Illumina人类microRNA表达谱分析v2, 对非突变KRAS结肠直肠肿瘤组织样本进行了全局miRNA的表达分析。在这1145种分析的miRNA中,其中一种显示出表达水平和预后之间的相关性。图1显示了hsa-miR-31-3p在与存活高度相关的肿瘤样本上表现出了显著的表达水平差异,并且展示出对无病存活 (PFS) 和总体存活 (OS) 的预测前景。尽管其它miRNA被发现与预后之间有显著的相关性 ($p<0.05$), 以下miRNA并未被发现与预后显著相关 ($p>0.05$): hsa-miR-29a、hsa-let-7d、hsa-miR-100、hsa-miR-1260、hsa-miR-25、hsa-let-7i、hsa-miR-146a、hsa-miR-594-pre、hsa-miR-24、hsa-miR-1826、hsa-miR-30c-2*、hsa-miR-34b*、hsa-miR-34c-3p、hsa-miR-34c-5p、hsa-miR-489、hsa-miR-191、hsa-miR-491-5p、hsa-miR-130a、hsa-miR-149、hsa-miR-193a-3p、hsa-miR-27a、hsa-miR-30a*、hsa-miR-30a、hsa-miR-30c-2*、hsa-miR-30c、hsa-miR-30e*、hsa-miR-320a、hsa-miR-320b、hsa-miR-320c、hsa-miR-362-5p、hsa-miR-500*、hsa-miR-500、502-3p、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-532-5p、hsa-miR-652、hsa-miR-671-5p、hsa-miR-146b-3p、hsa-miR-486-5p、hsa-let-7b、hsa-let-7e、hsa-miR-17*、hsa-miR-212、hsa-miR-128b、hsa-miR-21和hsa-miR-23b。

[0184] 为了进一步调查预测物风险组的稳定性,使用特定的TaqMan预设分析对23名患者

的样本进行了实时miRNA定量PCR分析以便对miRNA的表达水平进行定量,患者全部接受西妥昔单抗作为EGFR抑制剂。由两种技术测量出来的hsa-miR-31-3p表达水平之间发现有很好的相关性, $r=0.88$ 。在具有不良预后的患者肿瘤样本和具有良好预后的患者样本之间,hsa-miR-31-3p的表达水平表现出显著差异(图2)。使用来自训练数据集的主成分对Cox比例风险模型拟合的系数进行评估,PFS为3.271,OS为3.061。如果样本的预后分数高于/低于或等于-0.098088(PFS)和-0.0918(OS)的话,它就被预测具有高/低风险。

[0185] PPV是被预测为响应者的样本实际上属于响应者组的概率。NPV是被预测为非响应者的样本实际上不属于响应者组的概率。

[0186] 11个具有低水平hsa-miR-31-3p表达的患者中,一共有9个以无病状态存活了超过25周,并且总体存活超过14个月($PPV=82\%$, $[95\%CI:48\%-98\%]$),而12个具有高水平hsa-miR-31-3p表达的患者中有8个患者,在25周内表现出疾病进展,并在14个月内死亡($NPV=67\%$ $[95\%CI:35\%-90\%]$)。这些值显示出对于hsa-miR-31-3p表达,有80% $[95\%CI:44\%-97\%]$ 的存活特异性(8/10)以及69%的灵敏度 $[95\%CI:38\%-91\%]$ (9/13)。

[0187] 预后分数可以由下式进行计算:

[0188] $PFS\text{分数}=0.203738*x-1.453362$,其中x是hsa-miR-31-3p表达的对数

[0189] $OS\text{分数}=0.190677*x-1.360191$,其中x是hsa-miR-31-3p表达的对数。

[0190] 为了验证hsa-miR-31-3p的预测能力,对4份独立的样本用TaqMan进行该miRNA表达水平的测量(1份进行帕尼单抗处理,1份进行(西妥昔单抗+5FU+伊立替康)处理,以及2份进行(西妥昔单抗+伊立替康)处理),并计算预后分数(表1)。两名患者被预测为在高风险存活组中,两名在低风险存活组中。两名具有低hsa-miR-31-3p表达的患者中的一个显示超过34个月的总体存活,表明PPV为50%,两名具有高水平hsa-miR-31-3p的患者中的一个在9个月内去世,表明NPV为100%,由于第二名患者的存活依然在观察中。这些值显示hsa-miR-31-3p表达的存活特异性为50% (1/2),灵敏度为100% (1/1)。

[0191] 表1:表达水平和预后分数

[0192]

样本	存活时间 (PFS) 周	检查指示 (PFS)	存活时间 (OS) 月	检查指示 (OS)	预测的风 险 (Taqman)	hsa-miR31-3p 表 达 (Taqman)
405_T	7.3	1	2.8	1	低	15.66
406_T	16.3	1	5.0	0	高	2481.18
417_T	10.7	1	34.6	1	低	31.64
421_T	15.7	1	8.8	1	高	787.69

[0193] “存活时间”指从患者观察期开始(例如手术)到复发事件(PFS,周)或死亡事件(OS,月)的时间。

[0194] “检查指示”对观察期发生的目标事件(复发或者死亡)进行标记。1:个体出现该事件;0:个体在观察期未出现任何事件,或者对其观察不完整时进行检查观察。

[0195] “预测的风险”根据PFS分数阈值分为“低”(低死亡风险)或“高”(高死亡风险)。

[0196] “hsa-miR31-3p表达”指hsa-miR31-3p的表达水平(任意单位)。

[0197] 实施例2:确认miRNA在用不同抗EGFR治疗的患者中的预后能力和预后列线图的细

化

[0198] 患者与方法

[0199] 训练组(组1)的患者由33名患者组成,24名男性和9名女性。平均年龄为 58.58 ± 11.6 岁。在他们之中,24名接受(西妥昔单抗+伊立替康)治疗,5名接受(西妥昔单抗+5FU+伊立替康)治疗,2名接受(西妥昔单抗+5FU+奥沙利铂)治疗,1名接受(西妥昔单抗+希罗达)治疗,以及1名接受(帕尼单抗+伊立替康)治疗。11位对治疗有响应,21位无响应。

[0200] 验证组由38名患者组成,患者来自独立的两组,每组19名患者:

[0201] • 其中一组患者(组2),由19名患者组成,11名男性和8名女性,平均年龄 67.65 ± 11.61 岁。在他们之中,11位接受(西妥昔单抗+伊立替康)治疗,4位接受(西妥昔单抗+5FU+伊立替康)治疗,以及4位接受帕尼单抗治疗。4位对治疗有响应,15位对治疗无响应。

[0202] • 另一组患者(组3)由19名患者组成,12名男性,7名女性,平均年龄 61.84 ± 12.28 岁。在纳入本研究时均有转移性疾病。所有患者都发展成KRAS野生型结肠癌。所有患者都接受(帕尼单抗+伊立替康)治疗。8位对治疗有响应,11位无响应。

[0203] 确定KRAS状态、定量miRNA表达水平和统计分析如在实施例1所述的进行。

[0204] 根据等位基因鉴别分析(如Lievre等人在Cancer Res,2006.66:3992-3995所描述的;以及Laurent-Puig P等人,J Clin Oncol.2009,27(35):5924-30)对肿瘤样本中BRAF状态进行确定。若BRAF基因没有出现V600E取代(T1799A),则肿瘤细胞中的BRAF基因被视为野生型。

[0205] 存活模型的预测按实施例1所述计算。

[0206] 患者的反应状态根据RECIST标准进行评估。随访直至进展的中位值为19.86周,总体存活的中位值为11.67个月。

[0207] 结果

[0208] 对训练组33名患者使用特定的TaqMan预设分析进行了实时miRNA定量PCR分析,来定量hsa-miR31-3p的表达水平。在不良预后患者的肿瘤样本和良好预后患者的样本之间,hsa-miR31-3p的表达水平呈现出显著差异(图3)。使用来自训练数据集的主成分对Cox比例风险模型拟合的系数进行评估,PFS为3.388。如果样本的预后分数高于/低于或等于-0.03123(PFS),那么样本被预测具有高/低风险。

[0209] 16名具有低表达水平的hsa-miR31-3p表达的低风险患者中,共有10名无病存活超过25周,PPV=63% [95%CI:35%-85%],而17名具有hsa-miR31-3p高表达水平的患者中的13名在20周内呈现出疾病进展,NPV=76% [95%CI:50%-93%]。这些值表明,对于hsa-miR31-3p表达具有68% [95%CI:43%-87%]特异性(13/19),和71% [95%CI:41%-91%] (10/14)灵敏度。

[0210] 无预后存活分数可以根据下式进行计算:

[0211] PFS分数= $0.178366 \times x - 1.363693$,其中x是hsa-miR31-3p表达的对数。

[0212] 为了验证hsa-miR31-3p的预测能力,对38个独立的样本用TaqMan进行该miRNA的表达水平的测量。我们应用了从组1到组2和组3中获得的多变量模型,以预测患者的无病存活。使在Mantel-Cox检验和Gehan-Breslow-Wilcoxon检验中,具有不良预后样本的患者样本和具有良好预后患者样本之间的存活率具有显著差异。如果对验证组所接受到的治疗加以区分,在组2和组3使用Mantel-Cox检验的结果依然具有显著差异(图4)。16名具有低hsa-

miR31-3p表达的患者中13名在超过21周时间里表现出无进展存活(PFS),PPV为81% [95% CI:54%-96%],22位具有高hsa-miR31-3p水平的患者中有14名在20个月内呈现PFS,NPV为64% [95% CI:41%-83%]。这些值显示对于hsa-miR31-3p表达具有82% [95% CI:56%-96%]的特异性和62% [95% CI:38%-82%]的灵敏度。

[0213] 此外,基于hsa-miR31-3p表达水平的预后评价在临床方面具有重大意义,因为具有高hsa-miR31-3p表达的KRAS野生型患者到目前为止被视为可能只对KRAS状态响应,而实际上不太可能对抗EGFR抗体响应,因此预后极差。这一点在图5中进行了阐述,其中显示了KRAS突变患者(KRAS^M)以及两类KRAS野生型患者群体的存活曲线以及相关的预后(低hsa-miR31-3p表达为良好预后,高hsa-miR31-3p表达为不良预后),在基于hsa-miR31-3p表达水平上患者群体得以分离。KRAS突变患者(KRAS^M)的存活曲线与基于hsa-miR31-3p表达水平被归类到不良预后组(不良)的KRAS野生型患者的存活曲线类似。这一点表明,当患者因hsa-miR31-3p表达水平而被归类为“高风险”时,抗EGFR的治疗完全无效。

[0214] 基于这些结果,利用BRAF突变状态和miR表达的对数作为变量,采用多变量Cox比例风险模型构建PFS的列线图,用于预测进展的可能性(见图6A和6B)。我们将已有的患者数据分为用于开发预测模型的训练集(包括组1中的患者)和验证集(包括组2和组3中的患者)。模型的预测准确性采用以下在独立的验证数据集上进行定量:i)一致性指数,其数值上等于在受试者工作特征曲线下面积(0.7535888)和ii)基于进展风险分数的单变量Cox存活分析($p<0.0001$) (图6B)。它显示了hsa-miR31-3p表达水平与无进展存活之间的相关性。hsa-miR31-3p的表达水平越高,预后则越不好。

[0215] 考虑了年龄、性别和是否出现BRAF突变,而细化基于hsa-miR31-3p表达水平的另一个列线图,模型的预测准确性为AUC=0.77,单变量cox $p<0.0001$ (图7A和7B)。

[0216] 实施例3:福尔马林固定的石蜡包埋样本和冷冻肿瘤样本结果之间的相关性,以及细化的列线图对FFPE无关肿瘤样本预测值的证实

[0217] 患者和方法

[0218] 患者样本由41名患者组成,27名男性,14名女性。平均年龄为 60.5 ± 12.4 岁。所有患者都进行基于伊立替康的化疗,在双周周期(每十四天的周期)第一天接受6mg/kg剂量的帕尼单抗作为60分钟静脉输注,之后施用90分钟180mg/m²伊立替康。对于所有这些患者,可以获得福尔马林固定的石蜡包埋的肿瘤样本(FFPE),其中15名也有冷冻肿瘤样本,这样能够直接对两种类型样本的hsa-miRNA-31-3p表达水平进行比较。

[0219] 使用miRNeasy提取试剂盒(Qiagen)从FFPE肿瘤样本中提取小RNA,并使用Ambion公司的mirVanamiRNA分离试剂盒从冷冻肿瘤样本中提取小RNA。

[0220] 进行回归分析来比较相同患者($n=15$)的冷冻和FFPE值。使用直线进行线性回归模型,从而试图解释变量之间的关系,其中直线允许确定拟合数据的等式。

[0221] KRAS和BRAF状态的确定、miRNA表达水平的定量和统计分析按实施例1和2中所述进行。两名患者因出现KRAS突变而被排除在外。患者的响应状态按照RECIST标准进行评估。在39名患者之中,17名有响应,21名对治疗没有响应,还有一名患者无法评估。随访直至进展的中位值为28.3周,总体存活的中位值为12.9个月。

[0222] 剩下的39名患者的存活分析和模型预测按实施例2中所述进行。

[0223] 结果

[0224] 采用特异性的TaqMan预设分析对FFPE和冷冻样本进行实时miRNA (miR) 定量PCR分析,以对所有39名患者的hsa-miR31-3p表达水平进行定量。

[0225] 线性回归模型(参见图8)在13个冷冻样本和相应的FFPE样本的表达值之间产生了强烈的相关性(经校正的 $R^2=0.78$),并且估计无实质证据反对线性关系($p=7.6e-06$,F检验=50.98,DF=13),因此产生了下面的等式:

[0226] $y=40.439*x-397.3$,其中y对应hsa-miR-31-3p在冷冻的患者样本中的表达水平,而x对应hsa-miR-31-3p在相应的FFPE患者样本中的表达水平。该式被用于确定每个收集到的FFPE样本上的‘预期冷冻’(FE)表达值。

[0227] Cox比例风险模型的单变量存活分析证实了仅对于hsa-miR-31-3p FE表达水平(Wald检验, $p=0.004$)存活风险进展的预测值(见图9)。

[0228] hsa-miR-31-3p的FE表达水平的预测准确性也基于实施例2中PFS细化的列线图,用BRAF突变状态和miR表达对数进行了测量。在进行150轮引导程序后,模型显示一致性指数为0.664。每个样本值都得到一个‘进展风险’的分数(如实施例2中所述),该分数被发现进展存活风险方面具有预测性(Wald检验, $p=0.0005$) (见图10)。

[0229] 参考文献

[0230] Albitar Let al.Mol Cancer2010;9:166;

[0231] Ambros V et al,RNA2003 9 (3):277-279;

[0232] Bair E.&R Tibshirani,PLOS Biology2:511-522,2004;

[0233] Bos.Cancer Res1989;49:4682-4689;

[0234] Bustin et al.,2005,Clin.Sci.,109:365-379;

[0235] Chan SL et al.Expert OpinTher Targets.2012三月;16Suppl1:S63-8;

[0236] Chang KW et al.Oral Oncol.2012七月30,

[0237] Chu H et al.Mutagenesis.2012十月15;

[0238] Ciardello F et al.N Engl J Med.2008三月13;358(11):1160-74;

[0239] Cox,D.R.(1972).Journal of the Royal Statistical Society, Series B 34 (2),187-220;

[0240] Cunningham et al,N Engl Med 2004;351:337-45;

[0241] Demiralay et al.Surgical Science,2012,3,111-115;

[0242] Edkins et al.Cancer BiolTher.2006八月;5 (8):928-932

[0243] Eisenhauer et al,European Journal of Cancer,2009,45:228-247;

[0244] Griffiths-Jones S.NAR 2004 32(数据库发布):D109-D111;

[0245] Griffiths-Jones S et al.NAR 2006 34(数据库发布):D140-D144;

[0246] Griffiths-Jones S et al.NAR 2008 36(数据库发布):D154-D158;

[0247] HatakeyamaH.et al.PLoS One.2010九月13;5 (9):e12702;

[0248] Kozomara A et al.NAR 2011 39(数据库发布):D152-D157;

[0249] Laurent-Puig P,et al,J Clin Oncol.2009,27 (35):5924-30;

[0250] Leboulleux S et al.Lancet Oncol.2012九月;13 (9):897-905;

[0251] Leslie KK et al.GynecolOncol.2012十一月;127 (2):345-50;

[0252] Li Y et al.Oncol Rep.2010十月;24 (4):1019-28;

- [0253] Liebner DA et al. Ther Adv Endocrinol Metab. 2011 十月; 2 (5) :173-95;
- [0254] Lievre et al, Cancer Res. 2006 66 (8) :3992-5;
- [0255] Lièvre et al. J Clin Oncol. 2008 一月 20; 26 (3) :374-9;
- [0256] Mimeault M et al. PLoS One. 2012; 7 (2) :e31919;
- [0257] Mosakhani N. et al. Cancer Genet. 2012 十月 22. doi: pii: S2210-7762 (12) 00229-3.
- [0258] 10.1016/j.cancergen.2012.08.003;
- [0259] Ogino S, et al. J Mol Diagn 2008; 7:413-21;
- [0260] Pan J et al. Head Neck. 2012 九月 13;
- [0261] Ragusa M. et al. Mol Cancer Ther. 2010 十二月; 9 (12) :3396-409;
- [0262] Shepherd F A, et al, N Engl J Med 2005; 353:123-132;
- [0263] Tam et al. Clin Cancer Res 2006; 12:1647-1653;
- [0264] Thomasson M et al. Br J Cancer 2003; 89:1285-1289;
- [0265] Thomasson M et al. 2012 五月 3; 5:216;
- [0266] U.S. Pat. No. 7,101,663;
- [0267] Wheeler DL et al. Nat Rev Clin Oncol. 2010 九月; 7 (9) :493-507;
- [0268] W02009/080437;
- [0269] W02010/121238;
- [0270] W02011/135459;
- [0271] Xiao W et al. 2012. PLoS ONE 7 (6) :e38648;
- [0272] Zeineldin R et al. J Oncol. 2010; 2010:414676,
- [0273] Zhao L. et al. Int J Biochem Cell Biol. 2012 十一月; 44 (11) :2051-9.

序列表

<110> 英特盖根公司
国家健康科学研究所

<120> 一种用于预测对采用EGFR抑制剂的治疗的响应性的方法

<130> 361889D31497

<150> EP 11306568.4

<151> 2011-11-25

<150> EP 12306042.8

<151> 2012-08-31

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人类

<400> 1

ugcuaugeca acauauugcc au

22

<210> 2

<211> 188

<212> PRT

<213> 人类

[0001]

<400> 2

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr

[0002]

Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile	195	200	205
Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val	210	215	220
Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys	225	230	235 240
Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe	245	250	255
Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys	260	265	270
Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu	275	280	285
Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu	290	295	300
Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala	305	310	315 320
[0003] Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro	325	330	335
Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp	340	345	350
His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn	355	360	365
Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg	370	375	380
Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala	385	390	395 400
Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu	405	410	415
Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser	420	425	430
Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp	435	440	445
Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly	450	455	460

	Ser	Gly	Ser	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys	Gly	Lys	Trp	His	Gly	Asp	Val	
	465					470					475					480	
	Ala	Val	Lys	Met	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Pro	Thr	Pro	Gln	Gln	Leu	Gln	
					485					490					495		
	Ala	Phe	Lys	Asn	Glu	Val	Gly	Val	Leu	Arg	Lys	Thr	Arg	His	Val	Asn	
				500					505					510			
	Ile	Leu	Leu	Phe	Met	Gly	Tyr	Ser	Thr	Lys	Pro	Gln	Leu	Ala	Ile	Val	
		515						520					525				
	Thr	Gln	Trp	Cys	Glu	Gly	Ser	Ser	Leu	Tyr	His	His	Leu	His	Ile	Ile	
		530					535					540					
	Glu	Thr	Lys	Phe	Glu	Met	Ile	Lys	Leu	Ile	Asp	Ile	Ala	Arg	Gln	Thr	
	545					550					555					560	
	Ala	Gln	Gly	Met	Asp	Tyr	Leu	His	Ala	Lys	Ser	Ile	Ile	His	Arg	Asp	
				565						570					575		
	Leu	Lys	Ser	Asn	Asn	Ile	Phe	Leu	His	Glu	Asp	Leu	Thr	Val	Lys	Ile	
				580					585					590			
[0004]	Gly	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala	Thr	Val	Lys	Ser	Arg	Trp	Ser	Gly	Ser	His	
			595					600					605				
	Gln	Phe	Glu	Gln	Leu	Ser	Gly	Ser	Ile	Leu	Trp	Met	Ala	Pro	Glu	Val	
		610					615					620					
	Ile	Arg	Met	Gln	Asp	Lys	Asn	Pro	Tyr	Ser	Phe	Gln	Ser	Asp	Val	Tyr	
	625					630					635				640		
	Ala	Phe	Gly	Ile	Val	Leu	Tyr	Glu	Leu	Met	Thr	Gly	Gln	Leu	Pro	Tyr	
				645						650					655		
	Ser	Asn	Ile	Asn	Asn	Arg	Asp	Gln	Ile	Ile	Phe	Met	Val	Gly	Arg	Gly	
				660					665					670			
	Tyr	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Arg	Ser	Asn	Cys	Pro	Lys	Ala	
		675						680					685				
	Met	Lys	Arg	Leu	Met	Ala	Glu	Cys	Leu	Lys	Lys	Lys	Arg	Asp	Glu	Arg	
		690					695					700					
	Pro	Leu	Phe	Pro	Gln	Ile	Leu	Ala	Ser	Ile	Glu	Leu	Leu	Ala	Arg	Ser	
	705					710					715					720	
	Leu	Pro	Lys	Ile	His	Arg	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Ser	Leu	Asn	Arg	Ala	
				725						730					735		

Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys
740 745 750

[0005]

Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
755 760 765

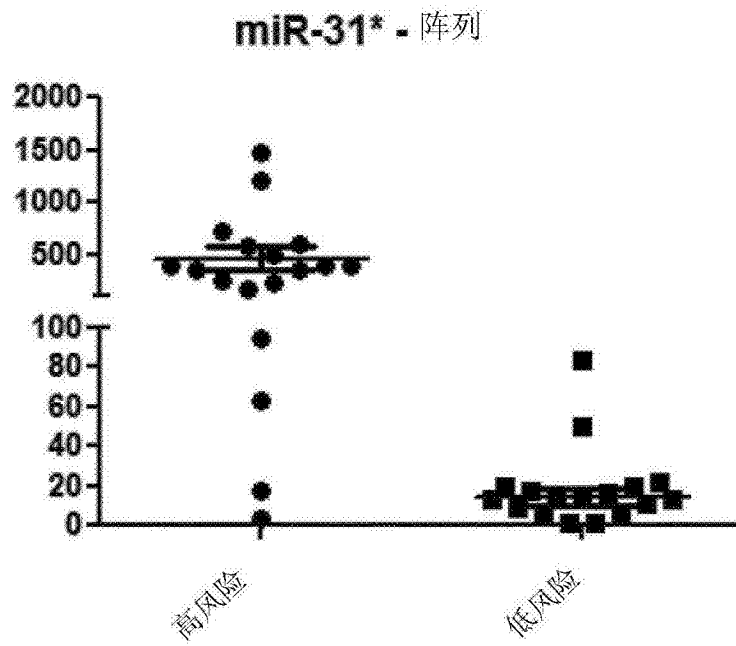


图1

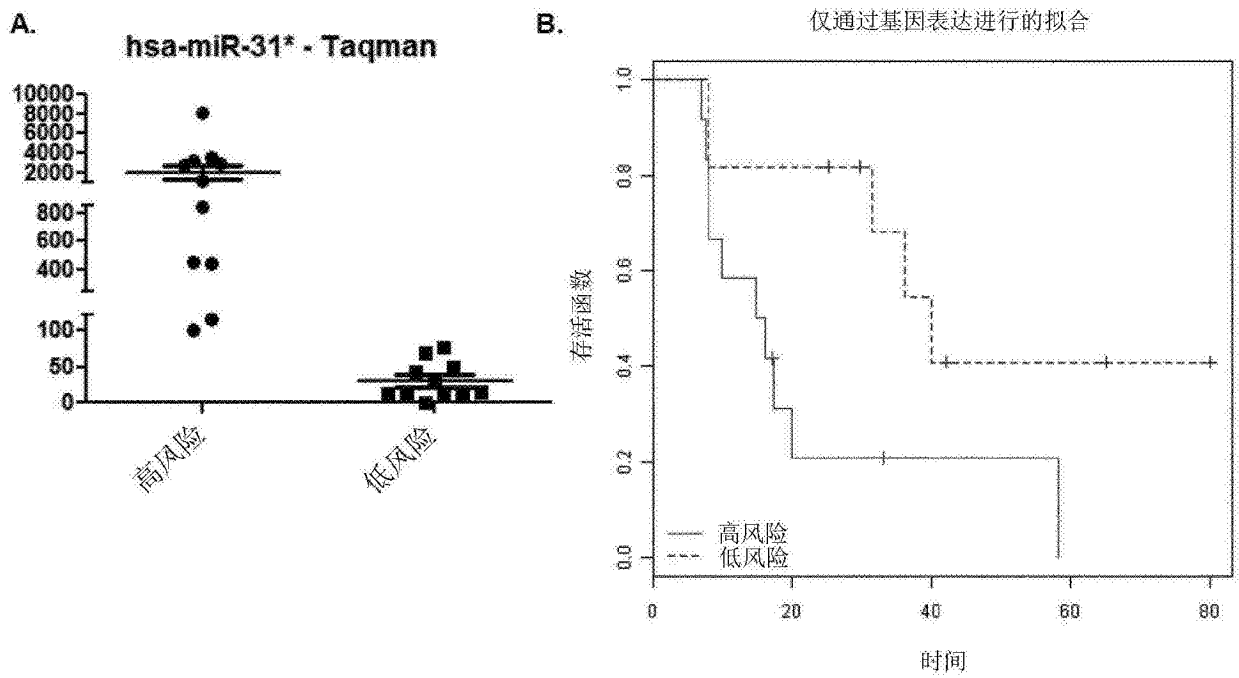


图2

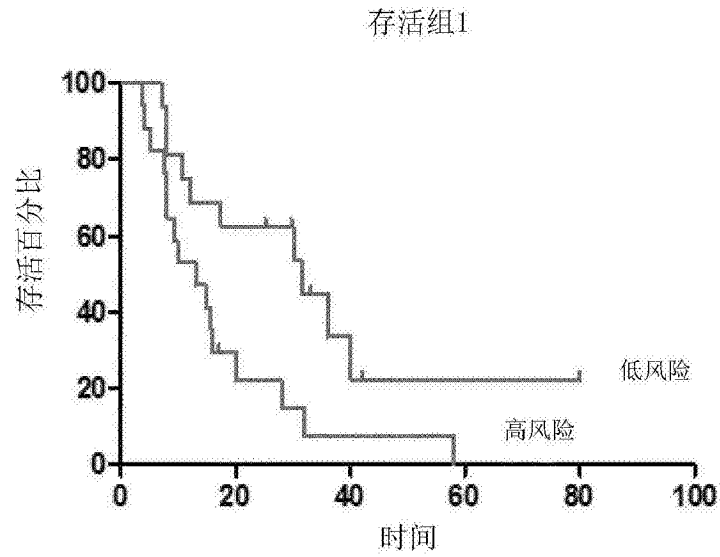


图3

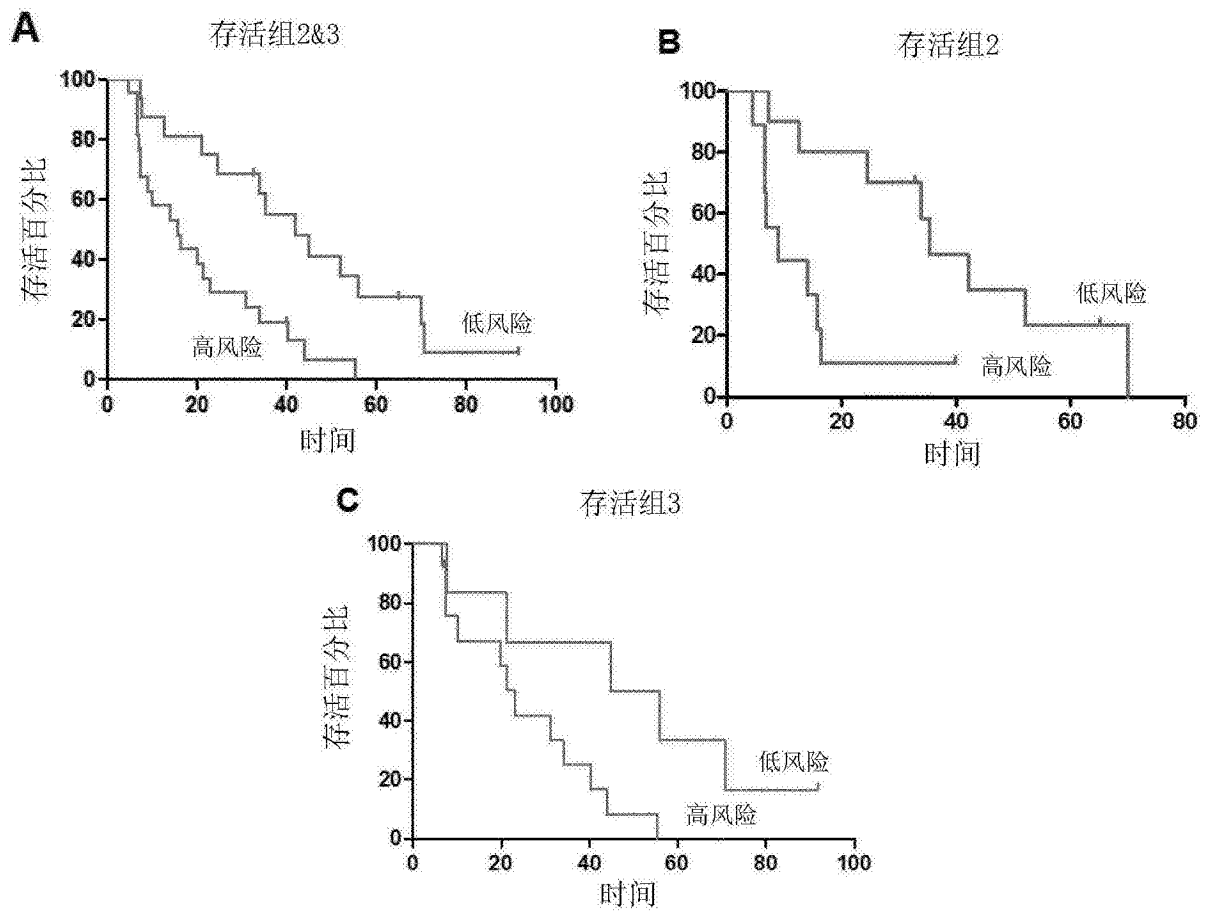


图4

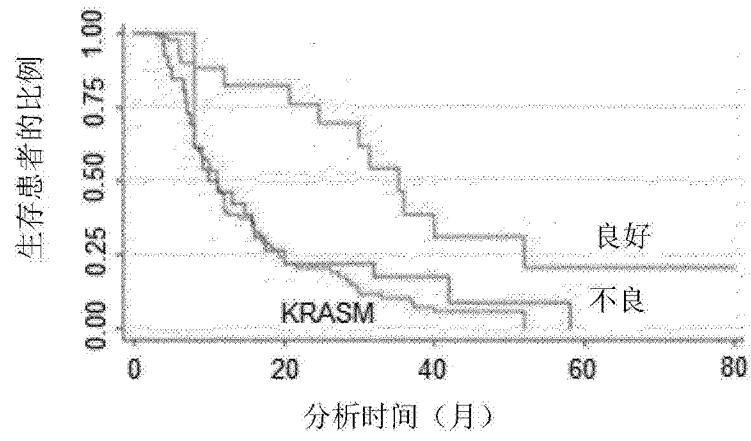


图5

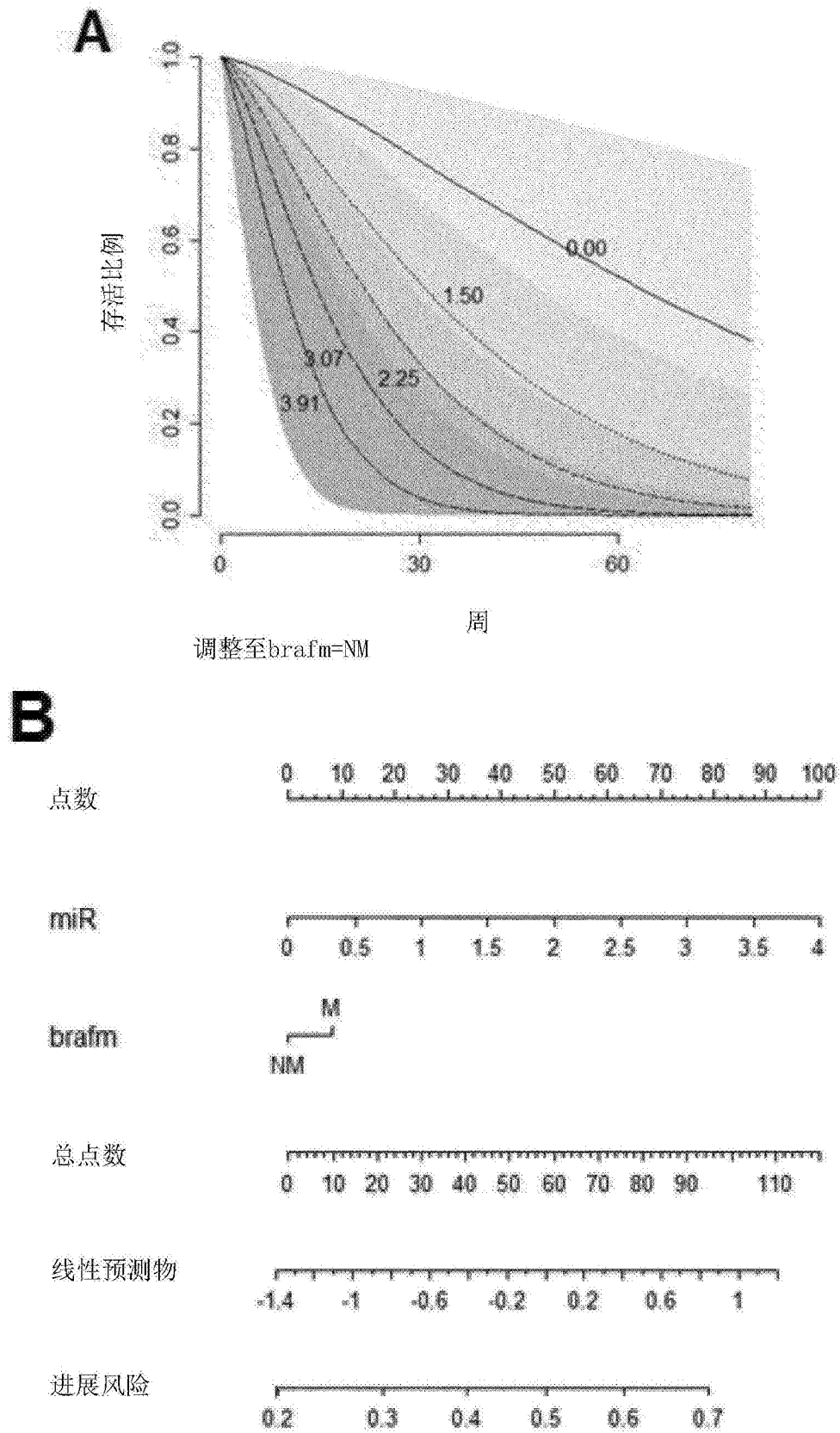
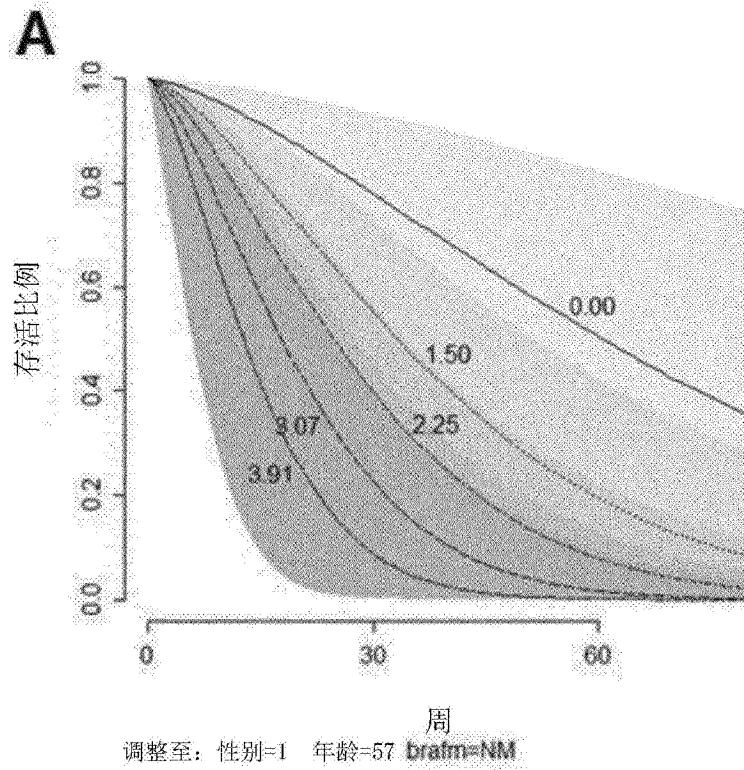


图6



B

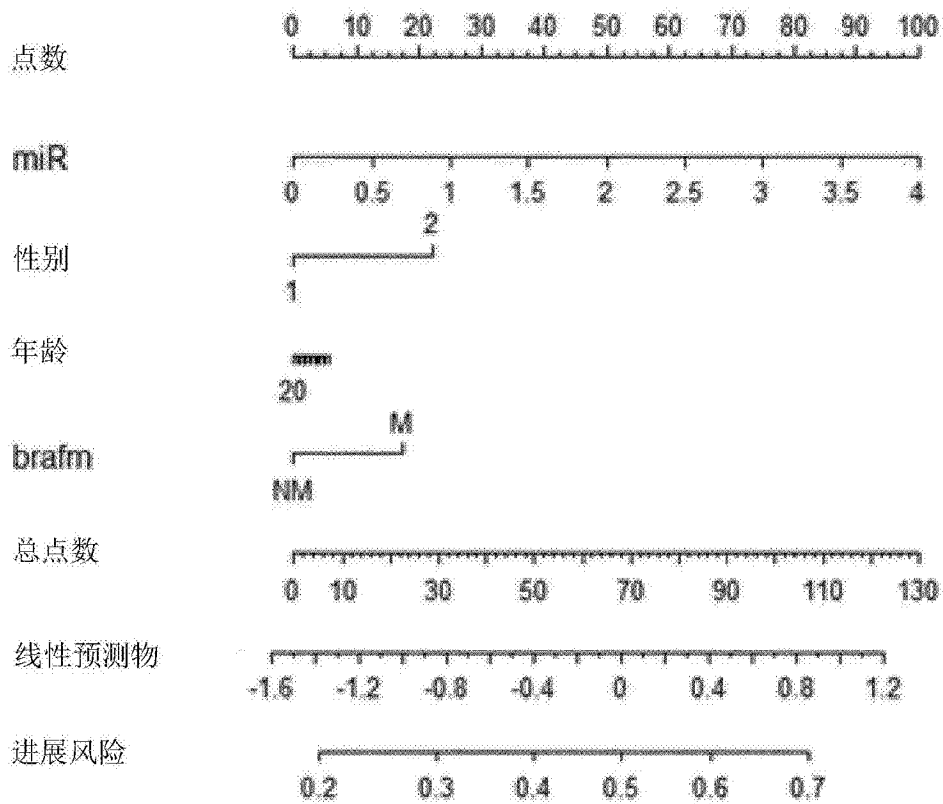


图7

miR31-3p表达水平的线性回归分析

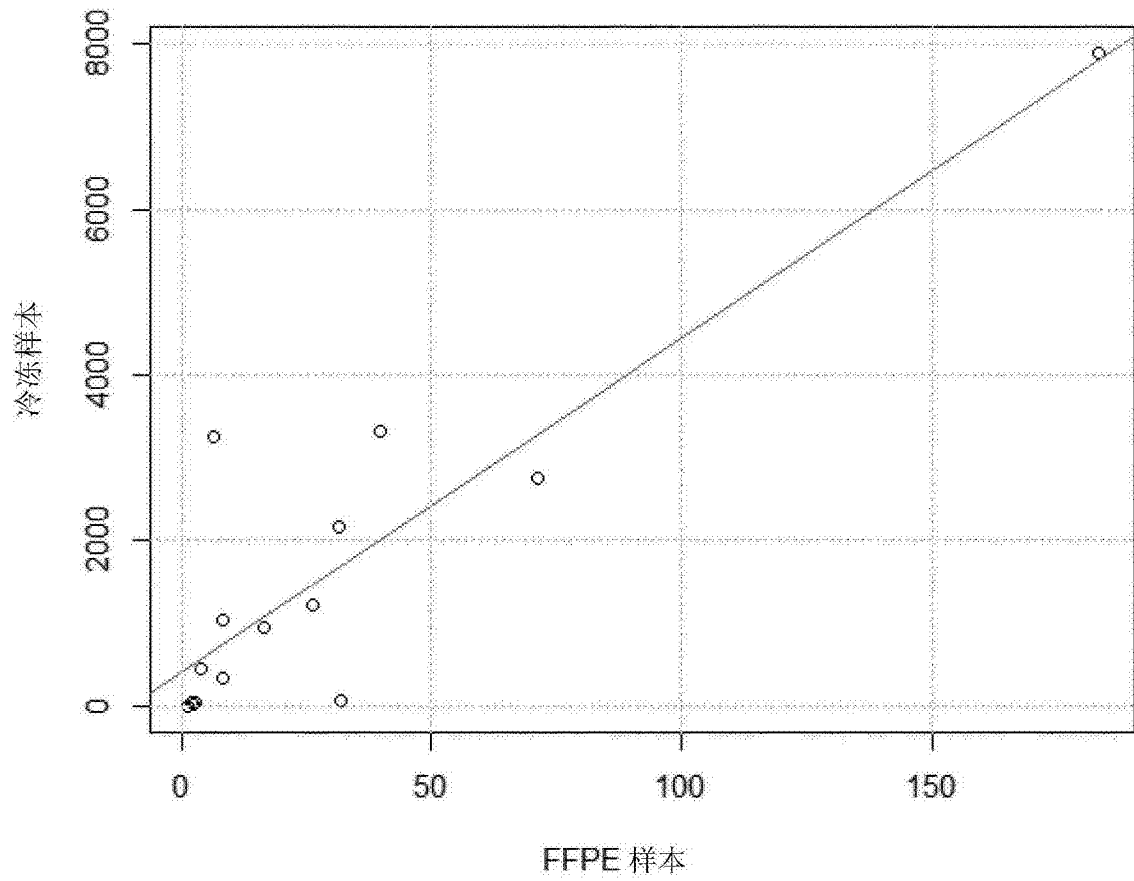


图8

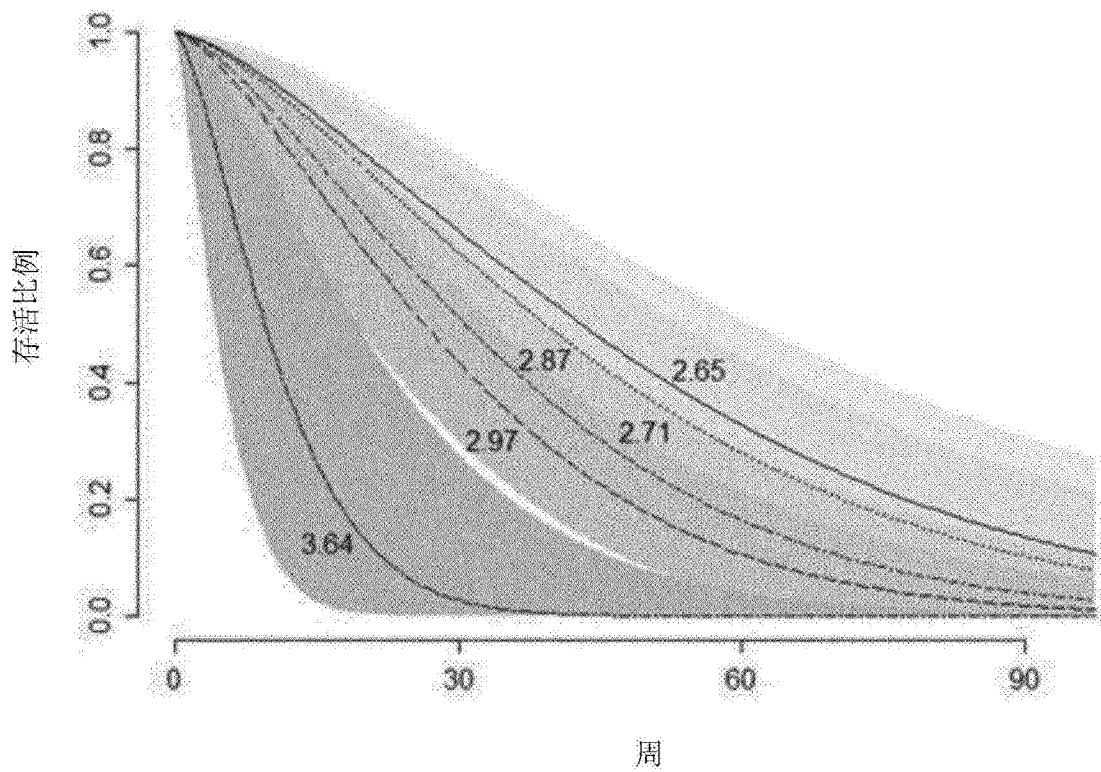


图9

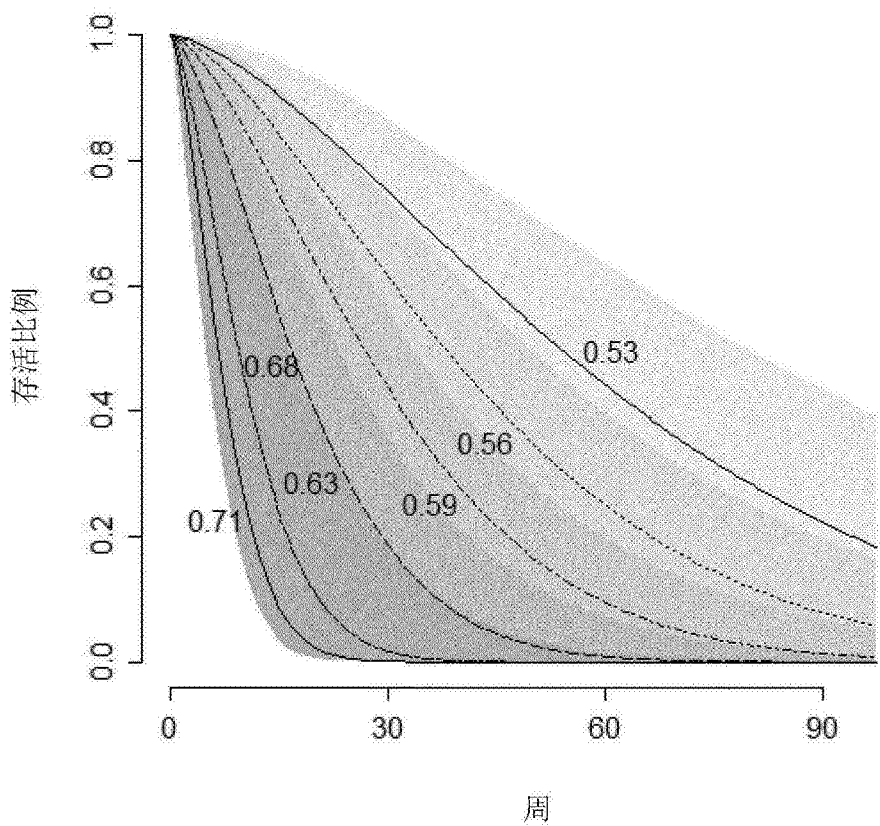


图10