



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201309807 A1

(43) 公開日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 01 日

(21) 申請案號：101107522

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 06 日

(51) Int. Cl. : *C12Q1/68 (2006.01)*

(30) 優先權：2011/03/18 美國 61/454,053

(71) 申請人：貝勒研究協會 (美國) BAYLOR RESEARCH INSTITUTE (US)
美國

(72) 發明人：高爾 艾嘉 GOEL, AJAY (US)；鮑蘭 C 理查 BOLAND, C. RICHARD (US)；
許根 HUR, KEUN (KR)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：35 項 圖式數：0 共 27 頁

(54) 名稱

作為人類大腸直腸癌轉移中上皮至間質轉化之生物標記的微型 RNA miR-200c/141 叢集表現之變化

CHANGES IN THE EXPRESSION OF MIR-200C/141 CLUSTER OF MICRORNAS AS BIOMARKERS FOR EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION IN HUMAN COLORECTAL CANCER METASTASIS

(57) 摘要

本發明包括用於檢測及確定大腸直腸癌(CRC)轉移發生的方法、套組及生物標記，該檢測及確定係基於包括 miR-200/141 家族之一或多種微型 RNA(miR)或 miR 叢集之表現模式的變化。



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201309807 A1

(43) 公開日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 01 日

(21) 申請案號：101107522

(22) 申請日：中華民國 101 (2012) 年 03 月 06 日

(51) Int. Cl. : *C12Q1/68 (2006.01)*

(30) 優先權：2011/03/18 美國 61/454,053

(71) 申請人：貝勒研究協會 (美國) BAYLOR RESEARCH INSTITUTE (US)
美國

(72) 發明人：高爾 艾嘉 GOEL, AJAY (US)；鮑蘭 C 理查 BOLAND, C. RICHARD (US)；
許根 HUR, KEUN (KR)

(74) 代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：35 項 圖式數：0 共 27 頁

(54) 名稱

作為人類大腸直腸癌轉移中上皮至間質轉化之生物標記的微型 RNA miR-200c/141 叢集表現之變化

CHANGES IN THE EXPRESSION OF MIR-200C/141 CLUSTER OF MICRORNAS AS BIOMARKERS FOR EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION IN HUMAN COLORECTAL CANCER METASTASIS

(57) 摘要

本發明包括用於檢測及確定大腸直腸癌(CRC)轉移發生的方法、套組及生物標記，該檢測及確定係基於包括 miR-200/141 家族之一或多種微型 RNA(miR)或 miR 叢集之表現模式的變化。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：(01107522)

※申請日：(01.7.6) ※IPC 分類：C12Q 1/68 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

作為人類大腸直腸癌轉移中上皮至間質轉化之生物標記的微型
RNAmiR-200c/141叢集表現之變化

CHANGES IN THE EXPRESSION OF miR-200c/141 CLUSTER OF
microRNAs AS BIOMARKERS FOR EPITHELIAL-TO-
MESENCHYMAL TRANSITION IN HUMAN COLORECTAL CANCER
METASTASIS

二、中文發明摘要：

本發明包括用於檢測及確定大腸直腸癌(CRC)轉移發生的方法、套組及生物標記，該檢測及確定係基於包括miR-200/141家族之一或多種微型RNA(miR)或miR叢集之表現模式的變化。

三、英文發明摘要：

The present invention includes methods, kits and biomarkers for detecting and determining the development of colorectal cancer (CRC) metastasis based on changes in the expression pattern of one or more microRNAs (miR) or miR clusters that include the miR-200/141 family.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明概言之係關於癌症檢測領域，且更具體而言，係關於用於監測微型RNA之miR-200家族表現之變化及其在大腸直腸癌轉移發展中之作用的方法。

聯邦資助研究之聲明

本發明係根據美國國家癌症研究所(National Cancer Institute) (NCI)/美國國家衛生研究院(National Institutes of Health) (NIH)所簽訂的第R01 CA72851號及第CA129286號合同在美國政府支持下作出的。政府具有本發明之某些權利。

【先前技術】

不限制本發明之範疇，結合癌症轉移發展之生物標記闡述其背景。

美國專利申請案第20100317533號(Lou等人，2010)提供一組腫瘤轉移生物標記，其包含以下中之任兩者：碳酸酐酶-9 (CAIX)、血管內皮生長因子C (VEGF-C)、Eph家族受體相互作用蛋白(ephra) A5 (EFNA5)、eph受體B2 (EPHB2)、轉化生長因子 β 3 (TGF- β 3)、丙酮酸脫氫酶激酶同功異構酶-3 (PDK3)、碳酸酐酶-12 (CAXII)、角蛋白14 (KRT14)、缺氧誘導因子1 α 亞單位(HIF-1 α)或腱糖蛋白C (TNC)。CAIX、VEGF-C、EFNA5、EPHB2、TGF- β 3或PDK3可為具有中度轉移潛力之指示物，而CAXII、KRT14、HIF-1 α 或TNC可為具有高度轉移潛力之指示物。

亦提供使用上述生物標記測定腫瘤轉移風險之方法。該等生物標記可用於診斷、預後、治療選擇或測試推定的治療方法。該等生物標記可用於評估具有缺氧區域之惡性腫瘤或癌症，例如乳癌。

美國專利申請案第20100120898號(Croce等人，2010)揭示用於診斷、預後及治療肝細胞癌(HCC)之方法及組合物。亦提供識別抗HCC劑之方法。Croce之發明提供診斷個體是否患有肝細胞癌(HCC)或具有發生肝細胞癌(HCC)之風險的方法，其包含量測來自個體之測試試樣中至少一種miR基因產物之含量，其中相對於對照試樣中對應miR基因產物之含量該測試試樣中miR基因產物含量之改變指示個體患有HCC或具有發生HCC之風險。

【發明內容】

本發明者證實miR-200家族成員(miR-200b、miR-200c、miR-141及miR-429)在大腸直腸癌(CRC)轉移發展中之作用。

在一個實施例中，本發明提供診斷或檢測人類個體之癌前(pre-cancer)、大腸直腸癌(CRC)腫瘤進展或轉移的方法，其包含以下步驟：自個體獲得一或多種生物試樣，其中該等生物試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、一或多種生物流體或其任何組合，量測自個體生物試樣獲得之一或多種細胞中一或多種微型RNA(miR)或miR叢集之總體表現模式或程度，及將來自懷疑患有大腸直腸癌個體之生物試樣的一或多種miR或miR叢集

之總體表現模式與來自正常個體生物試樣之一或多種miR或miR叢集之總體表現模式進行比較，其中該正常個體係未患有大腸直腸癌之健康個體，其中個體生物試樣中一或多種miR或miR叢集之總體表現模式的變化指示CRC腫瘤進展、轉移或二者。

在上文所揭示方法之一個態樣中，生物試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、血液試樣、一或多種生物流體或其任何組合。在另一態樣中，一或多種miR包含miR-200家族之微型RNA，其中miR-200家族包含miR-200b、miR-200a、miR-200c、miR-141及miR-429。在再一態樣中，一或多種miR叢集包含miR200c/141叢集、miR200b, a/429叢集或二者。

在一相關態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展。在另一態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。在一具體態樣中，藉由定量即時PCR來量測一或多種miR或miR叢集之表現程度。在另一態樣中，該方法係用於治療具有患大腸直腸癌風險或患有大腸直腸癌之患者，選擇用於具有患大腸直腸癌風險或患有大腸直腸癌之患者的DNA交聯劑療法，將患者分至大腸直腸癌亞組或用於大腸直腸癌療法臨床試驗，確定對大腸直腸癌治療方案之抗性或反應性，研發用於診斷大腸直腸癌之套組或其任何組合。

本發明之另一實施例係關於大腸直腸癌疾病進展、轉移

或二者之生物標記，其中該生物標記包含一或多種微型RNA (miR)或miR叢集，且自患者獲得之大腸直腸癌細胞中該一或多種miR、miR叢集或二者之總體表現與正常大腸直腸癌細胞或在早期時間點自相同患者獲得之大腸直腸癌細胞中該一或多種miR、miR叢集或二者表現之總體表現相比之變化指示大腸直腸癌疾病進展、轉移或二者。在上文所述生物標記之一個態樣中，一或多種miR包含miR-200家族之微型RNA，其中miR-200家族包含miR-200b、miR-200a、miR-200c、miR-141及miR-429。在另一態樣中，一或多種miR叢集包含miR200c/141叢集、miR200b, a/429叢集或二者。在再一態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展。在另一態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。

在再一實施例中，本發明揭示大腸直腸癌(CRC)疾病進展、轉移或二者之生物標記，其中該生物標記包含miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合，且自患者獲得之大腸直腸癌細胞中miR-200c、miR-141或miR-200c/141叢集之總體表現與正常CRC細胞或在早期時間點自相同患者獲得之大腸直腸癌細胞中miR-200c、miR-141或miR-200c/141叢集表現之總體表現相比之變化指示大腸直腸癌疾病進展、轉移或二者。在上文所述生物標記之一個態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其

任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展。在另一態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。

本發明亦揭示用於診斷大腸直腸癌(CRC)之套組，其包含：用於確定miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之差異表現程度的生物標記檢測試劑，及關於該等試劑在診斷患大腸直腸癌風險中之使用的說明書，其中該說明書包含逐步指導，以將自懷疑患有大腸直腸癌之個體獲得之一或多種試樣中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度與來自正常個體之一或多種試樣中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度進行比較，其中該正常個體係未患有大腸直腸癌之健康個體。

在上文所揭示套組之一個態樣中，試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、血液試樣、一或多種生物流體或其任何組合。在本文所揭示套組之另一態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展。在再一態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。

在一個實施例中，本發明提供選擇用於經診斷患有大腸直腸癌之患者之癌症療法的方法，該方法包含：確定來自患者生物試樣之miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之總體表現程度，以確定CRC疾病進展、轉

移或二者；及基於患者中之CRC疾病進展、轉移或二者之確定來選擇癌症療法。

在上文所揭示方法之一個態樣中，生物試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、血液試樣、一或多種生物流體或其任何組合。在另一態樣中，確定miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之總體表現程度的步驟包含針對miR-200c、miR-141或miR-200c/141叢集表現對懷疑為大腸直腸癌之組織試樣進行分析。在再一態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展。在另一態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。

本發明之一個實施例係關於將患者分至大腸直腸癌(CRC)亞組之方法，該方法包含以下步驟：確定來自患者之懷疑為CRC細胞的細胞中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之總體表現，及藉由檢驗miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度與正常CRC細胞中miR-200c、miR-141或miR-200c/141叢集之表現相比之顯著降低來預測CRC階段。

在再一實施例中，本發明提供實施臨床試驗以評估候選藥物之方法，該候選藥物據信可用於治療與miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合表現之變化有關之疾病狀態，該方法包含：a)量測來自一組患者之懷疑患有大腸直腸癌(CRC)之組織中miR-200c、miR-141或miR-

200c/141叢集之表現程度；b)將候選藥物投與給第一子組患者，且將安慰劑投與給第二子組患者；將相當的藥物投與給第二子組患者；或將候選藥物與另一活性劑之藥物組合投與給第二子組患者；c)在投與候選藥物或安慰劑、相當的藥物或藥物組合後重複步驟a)；及d)確定候選藥物使miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合表現降低之大腸直腸細胞的數量的減少與第二子組患者中發生之任何減少相比是否具有統計學顯著性，其中統計學顯著減少指示候選藥物可用於治療該疾病狀態。

此外，本發明闡述一種診斷或檢測人類個體之癌前、大腸直腸癌(CRC)、腫瘤進展或轉移之方法，其包含以下步驟：i)識別患有或懷疑患有大腸直腸癌之人類個體，ii)自個體獲得一或多種生物試樣，其中生物試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、一或多種生物流體，或其任何組合，iii)測量自個體生物試樣獲得之一或多種細胞中一或多種微型RNA(miR)或miR叢集之總體表現模式或程度，及iv)比較懷疑患有大腸直腸癌個體之生物試樣之一或多種miR或miR叢集之總體表現模式與正常個體生物試樣之一或多種miR或miR叢集之總體表現模式，其中該正常個體係未患有大腸直腸癌之健康個體，其中該個體生物試樣中一或多種miR或miR叢集之總體表現模式的變化指示CRC腫瘤進展、轉移或二者。

在一個態樣中，生物試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、血液試樣、一或多種生物流

體，或其任何組合。在另一態樣中，一或多種miR包含miR-200家族之微型RNAs，其中miR-200家族包含miR-200b、miR-200a、miR-200c、miR-141及miR-429。在另一態樣中，一或多種miR叢集包含miR200c/141叢集、miR200b, a/429叢集或二者。在相關態樣中，miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展，及miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。在另一態樣中，由定量即時PCR測量一或多種miR或miR叢集之表現程度。最後，如上文所述之本發明方法係用於治療有大腸直腸癌罹患風險或罹患患者，選擇DNA交聯劑療法用於有大腸直腸癌罹患風險或罹患患者，將患者分至大腸直腸癌亞組或用於大腸直腸癌療法臨床試驗，測定對大腸直腸癌治療方案之抵抗性或反應性，研發用於診斷大腸直腸癌之套組，或其任何組合。

【實施方式】

當下文詳細論述本發明多個實施例之製備及使用時，應瞭解，本發明提供許多可在多種具體背景下實施之實用發明概念。本文論述之具體實施例僅係製備及使用本發明之具體方式的例示性說明且並不界定本發明之範疇。

為便於理解本發明，下文將定義大量術語。本文所定義之術語具有熟習與本發明相關領域之一般技術者通常理解之含義。諸如「一(a、an)」及「該」等術語並非僅欲指單數實體，而係包括可使用具體實例說明之一般類別。本文

術語用於闡述本發明之具體實施例，而除申請專利範圍所概述之外，其用法並不界定本發明。

本文所用之術語「大腸直腸癌」包括將大腸直腸癌定義為特徵在於小腸下方之腸道(即大腸(結腸)，包括盲腸、升結腸、橫結腸、降結腸、乙狀結腸及直腸)的細胞癌之醫學病況之廣泛接受的醫學定義。另外，本文所用之術語「大腸直腸癌」亦進一步包括特徵在於十二指腸及小腸(空腸及迴腸)之細胞癌的醫學病況。

術語「組織試樣」(術語「組織」與術語「組織試樣」可互換使用)應理解為包括由一或多種細胞單獨或與任一基質複合或與任一化學物質聯合構成的任何物質。該定義應包括任何生物或有機物質及任何細胞次部分(subportion)、其產物或副產物。「組織試樣」之定義應理解為包括(但不限於)精子、卵、胚胎及血液組份。為本發明之目的，「組織」之定義內亦包括某些定義之非細胞結構，例如具有細胞來源但不再描述為細胞之皮膚之皮層(dermal layers)。本文所用之術語「大便」係一個臨床術語，其係指由人類排泄之糞便。

本文所用之術語「基因」係指功能蛋白、多肽或肽編碼單元。如熟習此項技術者所瞭解，此功能術語包括基因組序列、cDNA序列，或其片段或組合，以及基因產物，包括可能已由人工改變者。經純化之基因、核酸、蛋白質及諸如此類用以指已自至少一種通常結合之污染核酸或蛋白質鑒定及分離出來之實體。術語「對偶基因」或「對偶基

因形式」係指一個基因之一個選擇形式，相對於相同基因之另一形式，編碼相同功能蛋白但含有核苷酸序列差異。

本文所用之「核酸」或「核酸分子」係指多核苷酸，諸如去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)；寡核苷酸；由聚合酶鏈反應(PCR)產生之片段；及由接合、剪切、內切核酸酶作用及外切核酸酶作用中之任一者產生之片段。核酸分子可由單體構成，該等單體係天然存在核苷酸(例如DNA及RNA)、或天然存在核苷酸之類似物(例如天然存在核苷酸之 α -對映異構體形式)、或二者之組合。經修飾核苷酸之糖部分及/或嘧啶或嘌呤鹼基部分可經改變。糖修飾包括例如用鹵素、烷基、胺及疊氮基替換一或多個羥基，或可將糖官能化成醚或酯。而且，可用空間及電子類似結構(例如氮雜糖及碳環糖類似物)來替換整個糖部分。鹼基部分修飾的實例包括烷基化嘌呤及嘧啶、醯化嘌呤或嘧啶，或其他熟知之雜環取代基。核酸單體可藉由磷酸二酯鍵或該等連接之類似物來連接。磷酸二酯連接之類似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯、苯胺基磷酸酯、胺基磷酸酯及諸如此類。術語「核酸分子」亦包括所謂的「肽核酸」，其包含附接至多醯胺主鏈之天然存在或經修飾核酸鹼基。核酸可為單鏈或雙鏈。

在多個實施例中，本文所用之術語「生物標記」係指體內之具體生物化學物質，其具有特定分子特徵以使其可用於診斷及量測疾病進展或治療效果。例如，人呼吸中發現

之常見代謝產物或生物標記及提供該代謝產物之人的相應診斷病況包括(但不限於)乙醛(來源：乙醇、X-蘇胺酸；診斷：中毒)、丙酮(來源：乙醯乙酸鹽；診斷：飲食/糖尿病)、氨(來源：胺基酸脫胺；診斷：尿毒癥及肝疾病)、CO (一氧化碳)(來源：CH₂Cl₂，COHb%升高；診斷：室內空氣污染)、氯仿(來源：鹵化化合物)、二氯苯(來源：鹵化化合物)、二乙胺(來源：膽鹼；診斷：腸細菌過度生長)、H (氫)(來源：腸；診斷：乳糖不耐受)、異戊二烯(來源：脂肪酸；診斷：代謝應激)、甲烷硫醇(來源：甲硫胺酸；診斷：腸細菌過度生長)、甲基乙基酮(來源：脂肪酸；診斷：室內空氣污染/飲食)、O-甲苯胺(來源：癌代謝產物；診斷：枝氣管原癌)、戊烷硫化物及硫化物(來源：脂質過氧化；診斷：心肌梗塞)、H₂S (來源：代謝；診斷：牙周病/排卵)、MeS (來源：代謝；診斷：硬化)及Me₂S (來源：感染；診斷：戰壕口炎(trench mouth))。

本文所用之術語「免疫組織化學(IHC)」當應用於細胞時亦稱為「免疫細胞化學(ICC)」，其係指診斷病理學之工具，其中數組單株抗體可用於未分化贅瘤之差異診斷(例如，以區別淋巴瘤、上皮癌(carcinoma)及肉瘤)，以揭示對於某些腫瘤類型及其他疾病具有特異性之標記、以診斷惡性淋巴瘤及確定表型、及證實病毒抗原、癌蛋白、激素受體及增殖相關核蛋白之存在。

術語所研究群組間之「統計學顯著」差異係指，當使用合適統計學分析(例如卡方檢驗(Chi-square test)、t-檢驗)

時群組相同之概率小於5% (例如 $p < 0.05$) 的情況。換言之，基於完全隨機獲得相同結果之概率小於每100次嘗試中之5次。

本發明闡述 miR-200 家族成員 (miR-200b、miR-200c、miR-141 及 miR-429) 在大腸直腸癌 (CRC) 轉移發展中之作用、及微型 RNA 之 miR-200 家族之表現模式變化與 CRC 轉移間之關係的量測、及利用此變化作為用於檢測或預測 CRC 轉移之生物標記。

轉移發展係 CRC 之癌症相關死亡之主要原因之一。在腫瘤進展期間發生上皮至間質轉化 (EMT)，其提供具有侵襲性及轉移性之癌細胞。大腸直腸癌細胞開拓肝臟微環境以選擇性生長及存活所藉由之分子機制尚不清楚。近來，已將微型 RNA 之 miR-200 家族之表現損失與乳癌之侵襲性癌症表型聯繫起來。在此上下文中，提出 miRNA 之 miR-200 家族藉由靶向 *E*-鈣黏連蛋白轉錄阻抑蛋白 *ZEB1* 及 *ZEB2* 來抑制 EMT 過程。儘管 EMT 在轉移中起重要作用，但 miR-200 家族成員在 CRC 遠端轉移發展中之貢獻仍不清楚。

本發明者分析了一組具有不同轉移潛力之 CRC 細胞系 (HCT116、SW480 及 SW620) 以及 55 名患有原發性 CRC 之患者之臨床樣本及匹配之肝轉移組織。miR-200b、miR-200c、miR-141 及 miR-429 之微型 RNA 表現係藉由定量即時 PCR 來確定，且相對於 miR-16 表現將數據標準化。

與 HCT116 及 SW480 細胞系 (衍生自原發性 CRC) 相比，在 SW620 (衍生自淋巴結轉移) 中觀察到較低程度之 miR-

200c/141 叢集表現，但在任一細胞系中均未觀察到 miR-200b/429 表現之顯著變化。當本發明者分析臨床樣本中之 miR-200 家族表現程度時，miR-200c 之相對表現程度隨著原發性 CRC 組織中之腫瘤階段升高而進行性地降低 ($P < 0.05$)。然而，與對應匹配原發性 CRC 相比，miR-200c 之表現在肝轉移中顯著上調 ($P < 0.001$)。對於 miR-141 表現，與對應匹配原發性 CRC 相比，在肝轉移灶中觀察到類似結果。

本研究對 miR-200/141 家族成員與 CRC 轉移發展間之關係提供了新見解。原發性 CRC 中 miR-200/141 叢集之表現降低證明該等 miRNA 參與 EMT 過程。相反，肝轉移中 miR-200/141 叢集之表現增加表明在間質至上皮轉化 (MET) 過程起始中之潛在作用，其中該等 miRNA 之表現增加促進該等轉移性腫瘤細胞在其沉降於肝中後增殖增強。

本發明涵蓋，本說明書中所論述之任一實施例可根據本發明之任一方法、套組、試劑或組合物實施，且反之亦然。此外，本發明之組合物可用於達成本發明之方法。

應瞭解，本文所述之特定實施例係以舉例說明方式顯示而非限制本發明。本發明之主要特徵可在多個實施例中應用，此並不背離本發明之範疇。熟習此項技術者使用常規實驗即可瞭解或能夠確定本文所述具體程序之諸多等效物。該等等效物被認為在本發明範疇內且為申請專利範圍所囊括。

本說明書中提及之所有出版物及專利申請案皆表示熟習

本發明所涉及技術者之技術程度。所有出版物及專利申請案均係以引用的方式併入本文中，其程度如同將每一個別出版物或專利申請案特定地及個別地指出以引用方式併入本文中。

在申請專利範圍及/或說明書中，詞語「一(a或an)」在與術語「包含」連用時可意指「一個」，但亦與「一或多個」、「至少一個」及「一個或多於一個」之含義吻合。儘管本發明支持所用術語「或」可僅指替代及指「及/或」之定義，但除非明確表明此術語僅指替代或該等替代相互排斥，否則申請專利範圍中所用術語「或」皆係用來指「及/或」。在整個本申請案中，術語「約」係用來表明一值包括用來測定該值之裝置、方法之內在誤差改變或存在於研究個體中之改變。

本說明書及申請專利範圍中所用之詞語「包含(comprising)」(及comprising之任一形式，例如「comprise」及「comprises」)、「具有(having)」(及having之任一形式，例如「have」及「has」)、「包括(including)」(及including之任一形式，例如「includes」及「include」)或「含有(containing)」(及containing之任一形式，例如「contains」及「contain」)皆係指囊括各種情況或無限制，且並不排除另外的未列出之要素或方法步驟。本文所用之片語「基本上由...組成(consisting essentially of)」將技術方案之範疇限制至指定材料或步驟及彼等不會實質上影響所主張本發明之基本及新穎特徵者。本文所用之片語

「由...組成(consisting of)」排除未在申請專利範圍中指定之任一要素、步驟或成份，例如通常與該要素或限制結合之雜質除外。

本文所用之術語「或其組合」係指該術語之前列舉之項目的所有排列及組合。例如，「A、B、C或其組合」意欲包括以下中之至少一者：A、B、C、AB、AC、BC或ABC，且若在特定上下文中順序很重要，則亦包括BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC或CAB。繼續該實例，表述上包括含有重複一或多個項目或術語之組合，例如BB、AAA、MB、BBC、AAABCCCC、CBBAAA、CABABB及諸如此類。熟習此項技術者應瞭解，除非上下文中另外指明，否則任一組合中之項目或術語數量通常並無限制。

本文所用之近似詞語(例如但不限於「約」、「實質的」或「實質上」)係指當如此修飾時理解為未必絕對或精確但對於熟習此項技術者而言應認為足夠接近以確保指示所存在情況之情況。描述可變化之程度將取決於可建立變化之大小，且仍使熟習此項技術之一般技術人員將經修飾特徵視為仍具有未經修飾特徵之所需特性及能力。通常，但在前述論述條件下，經近似詞語(例如「約」)修飾之本文數值可自所述值變化至少 $\pm 1\%$ 、 2% 、 3% 、 4% 、 5% 、 6% 、 7% 、 10% 、 12% 或 15% 。

根據本發明無需過多實驗即可獲得並實施本文所揭示及所主張之所有組合物及/或方法。儘管本發明之組合物及

方法已根據較佳實施例予以闡述，但熟習此項技術者應明瞭，可改變該等組合物及/或方法及本文所述方法之步驟或步驟之順序，此並不背離本發明之概念、精神及範疇。對熟習此項技術者顯而易見之所有該等類似替代物及修改皆視為涵蓋於隨附申請專利範圍所界定的本發明之精神、範疇及概念內。

參考文獻

美國專利申請案第 20100317533 號：*Biomarkers of Cancer Metastasis*.

美國專利申請案第 20100120898 號：*MicroRNA Expression Signature for Predicting Survival and Metastases in Hepatocellular Carcinoma*.

七、申請專利範圍：

1. 一種診斷或檢測人類個體之癌前(pre-cancer)、大腸直腸癌(CRC)腫瘤進展或轉移之方法，其包含以下步驟：

自該個體獲得一或多種生物試樣，其中該等生物試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、一或多種生物流體，或其任何組合；

測量獲自該個體之該等生物試樣之一或多種細胞中一或多種微型RNA (miR)或miR叢集之總體表現模式或程度；及

比較懷疑患有大腸直腸癌之個體之生物試樣的該一或多種miR或miR叢集之總體表現模式與正常個體之生物試樣之該一或多種miR或miR叢集之總體表現模式，其中該正常個體係未患有大腸直腸癌之健康個體，其中該個體之生物試樣中該一或多種miR或miR叢集之總體表現模式的變化指示CRC腫瘤進展、轉移或二者。

2. 如請求項1之方法，其中該等生物試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、血液試樣、一或多種生物流體，或其任何組合。
3. 如請求項1之方法，其中該一或多種miR包含miR-200家族之微型RNAs，其中該miR-200家族包含miR-200b、miR-200a、miR-200c、miR-141及miR-429。
4. 如請求項1之方法，其中該一或多種miR叢集包含miR200c/141叢集、miR200b, a/429叢集或二者。
5. 如請求項1之方法，其中miR-200c、miR-141、miR-

- 200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展。
6. 如請求項1之方法，其中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。
 7. 如請求項1之方法，其中該一或多種miR或miR叢集之表現程度係由定量即時PCR測量。
 8. 如請求項1之方法，其中該方法係用於治療有大腸直腸癌罹患風險或罹患患者，選擇DNA交聯劑療法用於有大腸直腸癌罹患風險或罹患患者，將患者分至大腸直腸癌亞組或用於大腸直腸癌療法臨床試驗，測定對大腸直腸癌治療方案之抵抗性或反應性，研發用於診斷大腸直腸癌之套組，或其任何組合。
 9. 一種用於大腸直腸癌疾病進展、轉移或二者之生物標記，其中該生物標記包含一或多種微型RNA (miR)或miR叢集，且自患者獲得之大腸直腸癌細胞中該一或多種miR、miR叢集或二者之總體表現與正常大腸直腸癌細胞或在早期時間點自同一患者獲得之大腸直腸癌細胞中該一或多種miR、miR叢集或二者之總體表現相比之變化指示大腸直腸癌疾病進展、轉移或二者。
 10. 如請求項9之生物標記，其中該一或多種miR包含miR-200家族之微型RNAs，其中該miR-200家族包含miR-200b、miR-200a、miR-200c、miR-141及miR-429。
 11. 如請求項9之生物標記，其中該一或多種miR叢集包含

miR200c/141叢集、miR200b, a/429叢集或二者。

12. 如請求項9之生物標記，其中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展。
13. 如請求項9之生物標記，其中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。
14. 一種用於大腸直腸癌(CRC)疾病進展、轉移或二者之生物標記，其中該生物標記包含miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合，且自患者獲得之大腸直腸癌細胞中該miR-200c、miR-141或miR-200c/141叢集之總體表現與正常CRC細胞或在早期時間點自同一患者獲得之大腸直腸癌細胞中該miR-200c、miR-141或miR-200c/141叢集表現之總體表現相比之變化指示大腸直腸癌疾病進展、轉移或二者。
15. 如請求項14之生物標記，其中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展。
16. 如請求項14之生物標記，其中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。
17. 一種用於診斷大腸直腸癌(CRC)之套組，其包含：
用於測定miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之差異表現程度的生物標記檢測試劑；及

關於該等試劑用於診斷患大腸直腸癌風險之說明書，其中該說明書包含逐步指導，以比較獲自懷疑患有大腸直腸癌之個體之一或多種試樣中 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之表現程度與正常個體之一或多種試樣中 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之表現程度，其中該正常個體係未患有大腸直腸癌之健康個體。

18. 如請求項 17 之套組，其中該等試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、血液試樣、一或多種生物流體，或其任何組合。
19. 如請求項 17 之套組，其中 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示 CRC 腫瘤進展。
20. 如請求項 17 之套組，其中 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。
21. 一種選擇用於經診斷患有大腸直腸癌患者之癌症療法的方法，該方法包含：

測定該患者之生物試樣之 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之總體表現程度，以測定 CRC 疾病進展、轉移或二者；及

基於該患者中該 CRC 疾病進展、轉移或二者之測定來選擇該癌症療法。

22. 如請求項 21 之方法，其中該等生物試樣係選自由下列組

成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、血液試樣、一或多種生物流體，或其任何組合。

23. 如請求項 21 之方法，其中測定 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之總體表現程度的步驟包含分析懷疑為大腸直腸癌之組織試樣之 miR-200c、miR-141 或 miR-200c/141 叢集表現。

24. 如請求項 21 之方法，其中 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示 CRC 腫瘤進展。

25. 如請求項 21 之方法，其中 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。

26. 一種將患者分至大腸直腸癌 (CRC) 亞組之方法，該方法包含以下步驟：

測定來自該患者之懷疑為 CRC 細胞的細胞中 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之總體表現；及

藉由檢驗 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合之表現程度與正常 CRC 細胞中 miR-200c、miR-141 或 miR-200c/141 叢集之表現相比之顯著降低來預測該 CRC 之階段。

27. 一種實施臨床試驗以評估候選藥物之活體外方法，該候選藥物被認為可用於治療與 miR-200c、miR-141、miR-200c/141 叢集或其任何組合表現之變化有關之疾病狀

態，該方法包含：

a)在將藥物或安慰劑投與一組患者之前及之後，測量來自該等患者之懷疑患有大腸直腸癌(CRC)之組織中miR-200c、miR-141或miR-200c/141叢集之表現程度；

其中第一子組之患者接受候選藥物，第二子組之患者接受安慰劑、相當藥物、或該候選藥物與另一活性劑之藥物組合，及

b)測定該候選藥物使miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現降低之大腸直腸細胞的數量減少與第二子組之患者中發生之任何減少相比是否在統計學上顯著，其中在統計學上顯著減少指示該候選藥物可用於治療該疾病狀態。

28. 一種診斷或檢測人類個體之癌前、大腸直腸癌(CRC)、腫瘤進展或轉移之方法，其包含以下步驟：

識別患有或懷疑患有大腸直腸癌之人類個體；

自該個體獲得一或多種生物試樣，其中該等生物試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、一或多種生物流體，或其任何組合；

測量自該個體之該等生物試樣獲得之一或多種細胞中一或多種微型RNA(miR)或miR叢集之總體表現模式或程度；及

比較懷疑患有大腸直腸癌之個體之生物試樣的該一或多種miR或miR叢集之總體表現模式與正常個體之生物試樣之該一或多種miR或miR叢集之總體表現模式，其中該

正常個體係未患有大腸直腸癌之健康個體，其中該個體之生物試樣中該一或多種miR或miR叢集之總體表現模式的變化指示CRC腫瘤進展、轉移或二者。

29. 如請求項28之方法，其中該等生物試樣係選自由下列組成之群：組織試樣、糞便試樣、細胞勻漿、血液試樣、一或多種生物流體，或其任何組合。
30. 如請求項28之方法，其中該一或多種miR包含miR-200家族之微型RNAs，其中該miR-200家族包含miR-200b、miR-200a、miR-200c、miR-141及miR-429。
31. 如請求項28之方法，其中該一或多種miR叢集包含miR200c/141叢集、miR200b, a/429叢集或二者。
32. 如請求項28之方法，其中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著降低指示CRC腫瘤進展。
33. 如請求項28之方法，其中miR-200c、miR-141、miR-200c/141叢集或其任何組合之表現程度之顯著增加指示肝轉移。
34. 如請求項28之方法，其中該一或多種miR或miR叢集之表現程度係由定量即時PCR測量。
35. 如請求項28之方法，其中該方法係用於治療有大腸直腸癌罹患風險或罹患患者，選擇DNA交聯劑療法用於有大腸直腸癌罹患風險或罹患患者，將患者分至大腸直腸癌亞組或用於大腸直腸癌療法臨床試驗，測定對大腸直腸癌治療方案之抵抗性或反應性，研發用於診斷大腸直腸癌之套組，或其任何組合。