

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-504847

(P2015-504847A)

(43) 公表日 平成27年2月16日(2015.2.16)

(51) Int.Cl.

A61K 31/7105 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

F 1

A 61 K 31/7105
C 12 Q 1/68
C 12 M 1/00
C 12 Q 1/02
A 61 P 35/00

Z N A
A
A
4 C O 8 4
4 C O 8 6

テーマコード(参考)

4 B O 2 4

4 B O 2 9

4 B O 6 3

4 C O 8 4

4 C O 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-544946 (P2014-544946)
(86) (22) 出願日 平成24年11月30日 (2012.11.30)
(85) 翻訳文提出日 平成26年7月10日 (2014.7.10)
(86) 国際出願番号 PCT/US2012/067403
(87) 国際公開番号 WO2013/082499
(87) 国際公開日 平成25年6月6日 (2013.6.6)
(31) 優先権主張番号 61/565,226
(32) 優先日 平成23年11月30日 (2011.11.30)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 514135801
シーダーズーサイナイ メディカル センター
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス ビバリー ブールバード 87
OO
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】前立腺癌骨転移および薬剤耐性肺癌を治療するためのマイクロRNA miR-409-5p、miR-379、およびmiR-154*の標的化

(57) 【要約】

本発明は、miRNA阻害剤、例えば、miR-409-5pの阻害剤を使用して、癌、癌転移、および薬剤耐性癌を治療する方法を説明する。同様に、例えば、抗癌剤に対する応答性を予測するか、癌の病態を検出するために、miRNAをバイオマーカーとして使用する方法も説明する。

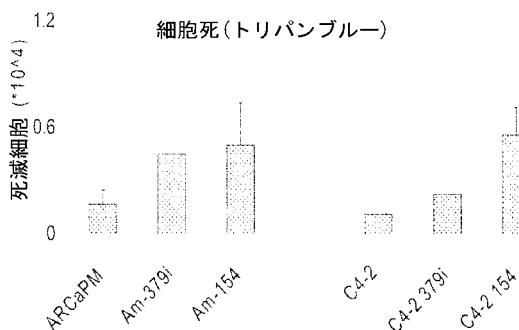
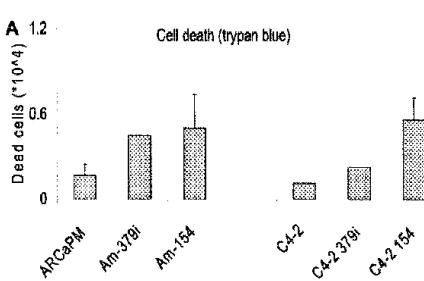


Fig. 9



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

miRNA阻害剤を提供する工程と、

癌を治療する、癌転移を治療する、または抗癌剤耐性を低下させるもしくは治療するために、前記miRNA阻害剤を、癌の治療を必要とする、癌転移の治療を必要とする、または抗癌剤耐性の低下もしくは治療を必要とする対象に投与する工程とを含む、方法。

【請求項 2】

前記対象に放射線治療または化学療法治療を投与する工程を更に含む、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記癌が、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記miRNA阻害剤が、miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154、および/またはmiR-154*を阻害することが可能である、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記miRNA阻害剤が、成熟miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154、および/またはmiR-154*を阻害することが可能である、請求項1に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記miRNA阻害剤が、成熟miRNAに対するshRNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記miRNA阻害剤が、成熟miRNAに対するsiRNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記miRNA阻害剤が、配列番号1、配列番号4、配列番号7、または配列番号10によって開示されるポリヌクレオチドによってコードされ、かつ投与する工程が、前記ポリヌクレオチドを投与することを含む、請求項1に記載の方法。 30

【請求項 9】

前記miRNA阻害剤が、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12の発現を干渉することが可能なshRNAまたはsiRNAである、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

対象から生体試料を獲得する工程；

前記生体試料をmiRNAの相対的に増加した、減少した、または安定した発現について試験する工程；および

前記miRNA発現レベルの相対的増加を、抗癌剤応答性のより低い可能性と関連付ける工程、または前記miRNAの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付ける工程、

前記miRNA発現レベルの相対的増加を、抗癌剤耐性病態を有するより高い可能性と関連付ける工程、または前記miRNAの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付ける工程、あるいは、

DLK1-miRNAの相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける工程、またはDLK1-miRNAの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付ける工程を含む、方法。 40
50

【請求項 11】

薬剤応答性のより高い可能性または抗癌剤感受性病態が検出された場合、前記対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記薬剤が、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)である、請求項10に記載の方法。

【請求項 13】

前記TKIが、エルロチニブ、ゲフィチニブ、アバチニブ(Apatinib)、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ(Crenolanib)、ダムナカンタール、フォレチニブ(Foretinib)、フォスタマチニブ、インテダニブ(Intedanib)、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである、請求項11に記載の方法。10

【請求項 14】

miRNAが、miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154、miR-154*、成熟miR-379、成熟miR-379*、成熟miR-193b、成熟miR-193b*、成熟miR-409-5p、成熟miR-409-3p、成熟miR-154、成熟miR-154*、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12である、請求項10に記載の方法。

【請求項 15】

前記癌が、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌である、請求項10に記載の方法。20

【請求項 16】

対象から生体試料を獲得する工程；

前記生物試料をDLK1-DI03クラスタ／領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程；および

前記DLK1-DI03クラスタ／領域の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける工程、または前記DLK1-DI03クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付ける工程。30

前記DLK1-DI03領域の相対的に増加した発現レベルを、抗癌剤耐性病態と関連付ける工程、または前記DLK1-DI03クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付ける工程、あるいは、

前記DLK1-DI03クラスタ／領域の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける工程、またはDLK1-DI03クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付ける工程を含む、方法。

【請求項 17】

薬剤応答性のより高い可能性または抗癌剤感受性病態が検出された場合、前記対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含む、請求項16に記載の方法。40

【請求項 18】

前記薬剤が、チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)である、請求項16に記載の方法。

【請求項 19】

前記TKIが、エルロチニブ、ゲフィチニブ、アバチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記病態が、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌である、請求項16に記載の方法。50

【請求項 2 1】

対象から生体試料を獲得する工程と、
前記生体試料をM E G 9の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、

前記M E G 9の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける工程、またはM E G 9の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤応答性のより高い可能性と関連付ける工程と
を含む、方法。

【請求項 2 2】

薬剤応答性のより高い可能性の場合に、前記対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含む、請求項 2 1 に記載の方法。 10

【請求項 2 3】

前記薬剤が、チロシンキナーゼ阻害剤(T K I)である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記T K Iが、エルロチニブ、ゲフィチニブ、アバチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである、請求項 2 3 に記載の方法。 20

【請求項 2 5】

対象から生体試料を獲得する工程と、

前記生体試料をM E G 9の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、

前記M E G 9の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける工程、またはM E G 9の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付ける工程と
を含む、方法。

【請求項 2 6】

前記病態が、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌である、請求項 2 5 に記載の方法。 20

【請求項 2 7】

対象からの生体試料と、

前記生体試料を、m i R N Aの相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するためのプローブと
を備える、システム。 30

【請求項 2 8】

前記m i R N A発現レベルの相対的増加を、薬剤応答性のより低い可能性と関連付けるため、または前記m i R N Aの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤応答性のより高い可能性と関連付けるため、

前記m i R N A発現レベルの相対的増加を、抗癌剤耐性病態を有するより高い可能性と
関連付けるため、または前記m i R N Aの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付けるため、あるいは、

前記D L K 1 - m i R N Aの相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付けるため、
またはD L K 1 - m i R N Aの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付けるため

の機械を更に備える、請求項 2 7 に記載のシステム。

【請求項 2 9】

m i R N Aが、m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 9 3 b、m i R - 1 9 3 b *、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、m i R - 1 5 4、m i R - 1 5 4 *、成熟m i R - 3 7 9、成熟m i R - 3 7 9 *、成熟m i R - 1 9 3 b、成熟m i R - 1 9 3 b *、成熟m i R - 4 0 9 - 5 p、成熟m i R - 4 0 9 - 3 p、成熟m i R - 1 5 4、成熟m i R - 1 5 4 *、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列

番号 8、配列番号 9、配列番号 11、または配列番号 12 である、請求項 27 に記載のシステム。

【請求項 30】

前記癌または病態が、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌である、請求項 28 に記載のシステム。

【請求項 31】

対象からの生体試料と、

前記生体試料を、D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するためのプローブと
を備える、システム。

10

【請求項 32】

前記 D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付けるため、または前記 D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付けるため、

前記 D L K 1 - D I O 3 領域の相対的に増加した発現レベルを、抗癌剤耐性病態と関連付けるため、または前記 D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付けるため、あるいは、

前記 D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付けるため、または D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付けるため
の機械を更に備える、請求項 31 に記載のシステム。

20

【請求項 33】

前記癌または病態が、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌である、請求項 32 に記載のシステム。

【請求項 34】

対象からの生体試料と、

前記生体試料を、M E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するためのプローブと
を備える、システム。

30

【請求項 35】

M E G 9 の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付けるため、または M E G 9 の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤応答性のより高い可能性と関連付けるための機械を更に備える、請求項 34 に記載のシステム。

【請求項 36】

対象からの生体試料と、

前記生体試料を、M E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するためのプローブと
を備える、システム。

【請求項 37】

前記 M E G 9 の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付けるため、または M E G 9 の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付けるための機械を更に備える、請求項 36 に記載のシステム。

40

【請求項 38】

前記病態が、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌である、請求項 37 に記載のシステム。

【請求項 39】

試験化合物を提供する工程と、

前記試験化合物を、m i R N A を発現している細胞と接触させる工程と、

前記 m i R N A の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出する工程と

50

、前記m i R N A 発現の相対的減少が検出された場合、前記試験化合物を阻害剤として特定する工程、または前記m i R N A 発現の相対的増加が検出された場合、前記試験化合物を作動物質として特定する工程と

を含む、方法。

【請求項 4 0】

m i R N A が、m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 9 3 b、m i R - 1 9 3 b *、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、m i R - 1 5 4、m i R - 1 5 4 *、成熟m i R - 3 7 9、成熟m i R - 3 7 9 *、成熟m i R - 1 9 3 b、成熟m i R - 1 9 3 b *、成熟m i R - 4 0 9 - 5 p、成熟m i R - 4 0 9 - 3 p、成熟m i R - 1 5 4、成熟m i R - 1 5 4 *、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12である、請求項39に記載の方法。

【請求項 4 1】

試験化合物を提供する工程と、

前記試験化合物を、D L K 1 - D I O 3 領域を発現している細胞と接触させる工程と、

前記D L K 1 - D I O 3 領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出する工程と、

前記D L K 1 - D I O 3 領域発現の相対的減少が検出された場合、前記試験化合物を阻害剤として特定する工程、または前記D L K 1 - D I O 3 領域発現の相対的増加が検出された場合、前記試験化合物を作動物質として特定する工程と
を含む、方法。

【請求項 4 2】

試験化合物を提供する工程と、

前記試験化合物を、M E G 9 を発現している細胞と接触させる工程と、

M E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出する工程と、

M E G 9 発現の相対的減少が検出された場合、前記試験化合物を阻害剤として特定する工程、またはM E G 9 発現の相対的増加が検出された場合、前記試験化合物を作動物質として特定する工程と

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

連邦政府による資金提供を受けた研究開発の記載

合衆国政府は、国立衛生研究所によって付与される補助金番号C A 1 2 2 6 0 2 によって定めるところにより、本発明における一括払いライセンス、および特許権者に適切な条件にて他者にライセンスを供与するよう要求する限定的状況における権利を有する。

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は、マイクロR N A ならびに癌、具体的には、前立腺癌骨転移および薬剤耐性肺癌に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

本明細書における全ての刊行物は、それぞれの個々の刊行物または特許出願が、参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのように、同程度に参照により組み込まれる。以下の説明は、本発明の理解に有用であり得る情報を含む。本明細書に提供される情報のいずれも、先行技術である、もしくは本明細書に主張される発明に関するか、または具体的にもしくは暗黙的に参照される任意の刊行物が先行技術であることを認めるものではない。

10

20

30

40

50

【0004】

ATP結合ドメインに関して競合し、上皮成長因子受容体(EGFR)経路を阻害する小分子チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)は、化学療法が不成功であった進行期の非小細胞肺癌(NSCLC)患者を治療するために認可されている。EGFR-TKIに最も応答性であるNSCLCは、EGFRキナーゼドメイン内に遺伝子増幅EGFRおよび/または体細胞変異のクラスタを過剰発現させる。著しい臨床的利益にもかかわらず、患者の大部分は、一年以内にEGFR-TKIに対する耐性を得、疾患の進行を見せる。EGFR-TKI中に進行を開始するような患者を特定するための非侵襲的バイオマーカーの特定は、極めて有用であろう。

【0005】

10

骨は、第2番目に一般的な癌転移の部位であり、前立腺癌および乳癌からの癌転移の70%超を含む(1)。進行期癌患者は、ホルモン療法、放射線療法、化学療法、および免疫療法に伴ってか、または伴わずに骨転移を発症し、現在有効な治療は無い。骨転移の病因は、ほとんど理解されていないままである。癌微環境における間質細胞機能の機能障害は、腫瘍進行における重要なステップであると考えられる。前立腺内の癌細胞に隣接する線維芽細胞は、前立腺内の正常な線維芽細胞と構造的および機能的に異なる(2、3)。これらの癌関連線維芽細胞(CAF)は、正常な線維芽細胞と異なる遺伝子発現プロファイルを有する。癌細胞および間質細胞は、物理的接触、可溶性因子、および不溶性細胞外マトリックス因子を通じて相互作用する。CAFは、腫瘍形成に決定的な役割を果たすことが示されている。研究は、形質転換成長因子-II型受容体遺伝子の欠失は、マウス線維芽細胞において前立腺内の上皮内新生物をもたらしたことを示している(4)。癌細胞が転移するメカニズムの1つは、上皮間葉移行(EMT)を経ることによってである。EMTは、極性の不動性上皮細胞が無極運動性間葉細胞に移行する、保存された胚性プロセスである(5)。EMTは、癌の移動、浸潤、および転移に関連する(6)。EMTの一般的特徴は、E-カドヘリンの欠失ならびにビメンチンおよびN-カドヘリンの増加である。癌において、EMTは、良性腫瘍が周辺組織に侵入して、他の臓器に転移することを可能にする。

20

【0006】

30

miRNAは、メッセンジャーRNAの3'非翻訳領域内の相補性の部位に結合し、その翻訳を阻害する、18~24ヌクレオチドの非コードRNAである(7)。単一のmiRNAは、幾つかのmRNAを標的にし、細胞経路および細胞運命を制御することができる。幾つかのmiRNAは、癌において制御不全になり、その幾つかは発癌性であるか(オンコmiR)、またはそれらは腫瘍抑制物質として働く(8)。miRNAは、転移においてある役割を果たすことも示されており、また「metastamirs」と称される(9,10)。幾つかのmiRNAは、転移を促進することが示されており、例えば、脳癌ではmiR-10b(11)、結腸直腸癌ではmiR-21(12)、PCAではmiR-184(10,13)等である。少数のmiRNAは、PCA骨転移を抑制することが説明されており、例えば、miR-143、miR-145、およびmiR-203等である(14)。発明者は、放射線治療が、前立腺癌細胞におけるマイクロRNA発現を変調すること、およびマイクロRNA発現の操作が、癌細胞を放射線療法に対して感作することを以前に報告している。幾つかのマイクロRNAはまた、転移を促進または抑制することが近年示されている。とりわけ、miR-200は近年、乳癌において、E-カドヘリン転写抑制体Zeb1およびZeb2の直接標的化によってEMTを阻害し、METを促進することが示されている。

40

【0007】

骨転移の蔓延を伴う癌、特に、薬剤耐性癌に対する有効な治療の欠如は、追加の療法、ならびに癌治療学を発見および開発するためのバイオマーカーに対する当該技術分野における必要性を示す。

【発明の概要】

【0008】

50

以下の実施形態およびその態様は、例示的および図示的であり、範囲を制限することを意味しない組成物および方法と共に説明および図示される。

【0009】

本発明の種々の実施形態は、m i R N A 阻害剤を提供する工程と、癌を治療する、癌転移を治療する、または抗癌剤耐性を低下させるもしくは治療するために、m i R N A 阻害剤を、癌の治療を必要とする、癌転移の治療を必要とする、または抗癌剤耐性の低下もしくは治療を必要とする対象に投与する工程と、を含む方法を提供する。

【0010】

種々の実施形態では、本方法は、対象に放射線治療または化学療法治療を投与する工程を更に含むことができる。

10

【0011】

種々の実施形態では、癌は、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌であり得る。

【0012】

種々の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、m i R - 379、m i R - 379^{*}、m i R - 193b、m i R - 193b^{*}、m i R - 409 - 5p、m i R - 409 - 3p、m i R - 154、および／またはm i R - 154^{*}を阻害することが可能であり得る。具体的実施形態では、m i R N A 阻害剤は、成熟m i R - 379、m i R - 379^{*}、m i R - 193b、m i R - 193b^{*}、m i R - 409 - 5p、m i R - 409 - 3p、m i R - 154、および／またはm i R - 154^{*}を阻害することが可能であり得る。

20

【0013】

種々の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、成熟m i R N A に対するs i R N A であり得る。

【0014】

具体的実施形態では、m i R N A 阻害剤は、成熟m i R N A に対するs h R N A であり得る。特定の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、配列番号1、配列番号4、配列番号7、または配列番号10によって開示されるポリヌクレオチドによってコードされることができ、かつ該ポリヌクレオチドを投与する工程を含むことができる。

【0015】

種々の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12の発現を干渉することが可能なs h R N A またはs i R N A であり得る。

30

【0016】

本発明の種々の実施形態では、

対象から生体試料を獲得する工程；

生体試料をm i R N A の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程；および

m i R N A 発現レベルの相対的増加を、抗癌剤応答性のより低い可能性と関連付ける工程、またはm i R N A の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付ける工程、

m i R N A 発現レベルの相対的増加を、抗癌剤耐性病態を有するより高い可能性と関連付ける工程、またはm i R N A の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付ける工程、あるいは、

D L K 1 - m i R N A の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける工程、またはD L K 1 - m i R N A の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付ける工程

を含む方法を提供する。

40

【0017】

種々の実施形態では、本方法は、薬剤応答性のより高い可能性または抗癌剤感受性病態が検出された場合、対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含むことができる

50

。種々の実施形態では、薬剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）であり得る。種々の実施形態では、TKIは、エルロチニブ、ゲフィチニブ、アパチニブ（Apatinib）、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ（Crenolanib）、ダムナカンタール、フォレチニブ（Foretinib）、フォスタマチニブ、インテダニブ（Intedanib）、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブであり得る。

【0018】

種々の実施形態では、miRNAは、miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154、miR-154*、成熟miR-379、成熟miR-379*、成熟miR-193b、成熟miR-193b*、成熟miR-409-5p、成熟miR-409-3p、成熟miR-154、成熟miR-154*、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12であり得る。

【0019】

種々の実施形態では、癌は、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌であり得る。

【0020】

本発明の種々の実施形態は、

対象から生体試料を獲得する工程；

生体試料をDLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程；および

DLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける工程、またはDLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付ける工程、

DLK1-DIO3領域の相対的に増加した発現レベルを、抗癌剤耐性病態と関連付ける工程、またはDLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付ける工程、あるいは、

DLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける工程、またはDLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付ける工程を含む方法を提供する。

【0021】

種々の実施形態では、本方法は、薬剤応答性のより高い可能性または抗癌剤感受性病態が検出された場合、対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含むことができる。種々の実施形態では、薬剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）であり得る。種々の実施形態では、TKIは、エルロチニブ、ゲフィチニブ、アパチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブであり得る。

【0022】

種々の実施形態では、病態は、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌であり得る。

【0023】

本発明の種々の実施形態は、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料を、MEG9の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、MEG9の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける工程、またはMEG9の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤応答性のより高い可能性と関連付ける工程と、を含む方法を提供する。

【0024】

10

20

30

40

50

種々の実施形態では、本方法は、薬剤応答性のより高い可能性の場合に、対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含むことができる。種々の実施形態では、薬剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）であり得る。種々の実施形態では、TKIは、エルロチニブ、ゲフィチニブ、アバチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブであり得る。

【0025】

本発明の種々の実施形態は、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料を、MEG9の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、MEG9の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける工程、またはMEG9の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付ける工程と、を含む方法を提供する。
10

【0026】

種々の実施形態では、病態は、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌であり得る。

【0027】

種々の実施形態は、対象からの生体試料と、生体試料を、miRNAの相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するためのプローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、miRNA発現レベルの相対的増加を、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける、またはmiRNAの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤応答性のより高い可能性と関連付けるため、miRNA発現レベルの相対的増加を、抗癌剤耐性病態を有するより高い可能性と関連付ける、またはmiRNAの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付けるため、あるいは、DLK1-miRNAの相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける、またはDLK1-miRNAの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付けるための、機械を備えることができる。
20

【0028】

種々の実施形態では、miRNAは、miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154、miR-154*、成熟miR-379、成熟miR-379*、成熟miR-193b、成熟miR-193b*、成熟miR-409-5p、成熟miR-409-3p、成熟miR-154、成熟miR-154*、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12であり得る。
30

【0029】

種々の実施形態では、癌または病態は、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌であり得る。

【0030】

種々の実施形態は、対象からの生体試料と、生体試料を、DLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するためのプローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、DLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける、またはDLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付けるため、DLK1-DIO3領域の相対的に増加した発現レベルを、抗癌剤耐性病態と関連付ける、またはDLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付けるため、あるいは、DLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける、またはDLK1-DIO3クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付けるための、機械を更に備えることができる。
40
50

【0031】

種々の実施形態では、癌または病態は、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌であり得る。

【0032】

種々の実施形態は、対象からの生体試料と、生体試料を、M E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するためのプローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、M E G 9 の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける、またはM E G 9 の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤応答性のより高い可能性と関連付けるための機械を更に備えることができる。

10

【0033】

種々の実施形態は、対象からの生体試料と、生体試料を、M E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するためのプローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、M E G 9 の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける、またはM E G 9 の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付けるための機械を更に備えることができる。

【0034】

種々の実施形態では、病態は、前立腺癌、肺癌、乳癌、転移性癌、骨への癌転移、転移性前立腺癌、転移性肺癌、または転移性乳癌であり得る。

20

【0035】

種々の実施形態は、試験化合物を提供する工程と、試験化合物を、m i R N A を発現している細胞と接触させる工程と、m i R N A の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出する工程と、m i R N A 発現の相対的減少が検出された場合、該試験化合物を阻害剤として特定する工程、またはm i R N A 発現の相対的増加が検出された場合、該試験化合物を作動物質として特定する工程と、を含む方法を提供する。

【0036】

種々の実施形態では、m i R N A は、m i R - 3 7 9 、m i R - 3 7 9 * 、m i R - 1 9 3 b 、m i R - 1 9 3 b * 、m i R - 4 0 9 - 5 p 、m i R - 4 0 9 - 3 p 、m i R - 1 5 4 、m i R - 1 5 4 * 、成熟m i R - 3 7 9 、成熟m i R - 3 7 9 * 、成熟m i R - 1 9 3 b 、成熟m i R - 1 9 3 b * 、成熟m i R - 4 0 9 - 5 p 、成熟m i R - 4 0 9 - 3 p 、成熟m i R - 1 5 4 、成熟m i R - 1 5 4 * 、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12であり得る。

30

【0037】

種々の実施形態は、試験化合物を提供する工程と、試験化合物を、D L K 1 - D I O 3 領域を発現している細胞と接触させる工程と、D L K 1 - D I O 3 領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出する工程と、D L K 1 - D I O 3 領域発現の相対的減少が検出された場合、該試験化合物を阻害剤として特定する工程、またはD L K 1 - D I O 3 領域発現の相対的増加が検出された場合、該試験化合物を作動物質として特定する工程と、を含む方法を提供する。

40

【0038】

種々の実施形態は、試験化合物を提供する工程と、試験化合物を、M E G 9 を発現している細胞と接触させる工程と、M E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出する工程と、M E G 9 発現の相対的減少が検出された場合、該試験化合物を阻害剤として特定する工程、またはM E G 9 発現の相対的増加が検出された場合、該試験化合物を作動物質として特定する工程と、を含む方法を提供する。

【0039】

本発明の他の特徴および利点は、例として、本発明の実施形態の様々な特徴を図示する添付の図面と共に、以下の詳細な説明から明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

50

【0040】

例示的な実施形態は、参照の図面に図示される。本明細書に開示される実施形態および図面は、限定的ではなく、むしろ図示的であると考えられることが意図される。

【0041】

【図1】本発明の種々の実施形態に従って、DLK1-DI03 miRNAクラスタにおける上昇したmiRNAを伴う前立腺癌骨転移性モデルのマイクロRNAゲノムプロファイリングを描写する。A. ARCaP_EおよびARCaP_MにおけるグローバルなmiRNAプロファイリングのヒートマップ。緑は低発現を示し、赤は高発現を示す。B. ARCaP EMTモデルにおけるmiR-200ファミリー-miRNA発現。C. ARCaP EMTモデルにおける長い非コードRNA MEG9における発現分析。D. miRNAは、転移性間葉細胞ARCaP_MにおいてARCaP_Eと比較して高度に発現した。E. miRNAは、非転移性ARCaP_E細胞において高度に発現した。F. miRNAは、C4-2前立腺癌細胞におけるDLK1-DI03クラスタにおいて、LNCaP前立腺癌細胞と比較して上昇した。

【図2】本発明の種々の実施形態に従って、インサイツハイブリダイゼーションを用いて量子ドット分析によって検出されたグリソングレード組織アレイにおけるmiR-409-5p検出を描写する。A. グリソングレードに伴う腫瘍細胞内のmiR-409-5p発現。B. グリソングレードに伴う間質細胞内のmiR-409-5p発現。C. 腫瘍および間質内のmiR-409-5p(赤)発現の40Xでの代表的画像。スクランブルは、負の対照として使用した。DAPI(青)は、核を染色するために使用する。

【図3】本発明の種々の実施形態に従って、腫瘍発症をもたらす前立腺内のmiR-409の過剰発現を描写する。A. 正常な前立腺とmiR-409発現前立腺との比較。上段パネルは、対照プラスミドまたはmiR-409発現プラスミドを含有する緑色蛍光タンパク質(GFP)を含有する細胞からの緑色蛍光を表す。下段パネルは、miR-409発現前立腺における腫瘍特異的近赤外色素(IR783)取り込みを表す。B. 正常な対照前立腺およびmiR-409発現前立腺のH&E染色(40X)、その後のインサイツハイブリダイゼーションおよび量子ドット検出(40X)による、対照のスクランブルmiRNAおよびmiR-409-5pならびにmiR-409発現組織のmiRNA検出。

【図4】EMTの逆転をもたらすmiR-409-5pの阻害を描写する。A. miR-409-5p阻害剤の一過性トランスフェクション後のARCaP_M-CおよびARCaP_M-409-5p細胞のパーセント生存率。B. リアルタイムPCRによって分析した、RN6Bに対して正規化されたmiR-409-5p阻害剤を伴うARCaP_M前立腺癌細胞内のmiR-409-5pの発現。C. リアルタイムPCRによって分析した、ARCaP_M前立腺癌細胞内のmiR-409-5p標的のRNA発現。miR-409-5p mRNA標的: TUSC4、PHC3、およびSTAG2。D. miR-409-5p阻害されたARCaP_M細胞における形態学的EMT変化。倍率10x。E. およびF. EMTマーカー、E-カドヘリン、ビメンチン、およびN-カドヘリンのリアルタイムPCRによって分析されたRNA発現。G. ARCaP_M-CおよびARCaP_M-409-5pi細胞の移動および浸潤分析。

【図5】本発明の種々の実施形態に従って、患者からの正常な間質および癌関連間質ならびに3次元細胞モデルのマイクロRNAゲノムプロファイリングを描写する。A. i. 前立腺および骨正常線維芽細胞および癌関連線維芽細胞内のグローバルなmiRNAプロファイリングのヒートマップ。数字はC_t値を表し、緑は低発現を示し、赤は高発現を示した。SON(患者の正常な前立腺線維芽細胞)、SOC(患者の前立腺癌関連線維芽細胞)、HS-27a_{RWV}およびMG_{RWV}は骨間質細胞であり、HS-27a_{c4-2}、MG_{LN}、およびMG_{c4-2}は3次元培養によって得られた骨癌関連間質細胞である。MG_{H2O2}は、過酸化水素に曝露されたMG-63線維芽細胞である。ii. 正常な間質および癌関連間質内のmiR-409-5pの発現レベル。

【図6】本発明の種々の実施形態に従って、活性化された線維芽細胞をもたらす正常な間

10

20

30

40

50

質細胞内のm i R - 4 0 9の過剰発現を示す。A . 正常な前立腺間質線維芽細胞、S O N - C およびW H N - C 、ならびにm i R - 4 0 9発現細胞S O N - 4 0 9 およびW H N - 4 0 9 内のm i R - 4 0 9 のm i R N A 発現レベル。B . 正常な前立腺間質およびm i R - 4 0 9 過剰発現間質内のビメンチン、2 - M 、および - アクチンのタンパク質発現レベル。C . 前立腺間質細胞内のm i R - 4 0 9 - 5 p の標的m R N A 。m i R - 4 0 9 - 5 p 標的：T a r g e t S c a n から8 m e r マッチのシード配列を有する、P H C 3 (ポリホメオティックタンパク質3)、T U S C 4 (腫瘍抑制物質1)、R S U 1 (R a s 抑制タンパク質1)、およびS T A G 2 (間質抗原1)。

【図7】本発明の種々の実施形態に従って、正常な間質細胞内のm i R - 4 0 9 の過剰発現は前立腺癌腫瘍成長に誘導的役割を果たすことを示す。A . 皮下腫瘍注射の5週後の又10ドマウスにおける異なる群を比較する腫瘍発生。群：C 4 - 2 (前立腺癌細胞株)、S O N - C (対照プラスミドをトランスフェクトした正常な前立腺間質細胞)、S O N - 4 0 9 (m i R - 4 0 9 過剰発現プラスミドをトランスフェクトした正常な前立腺間質細胞)、C 4 - 2 / S O N - C (癌間質細胞と正常な前立腺間質細胞との組み合わせ)、C 4 - 2 / S O N - 4 0 9 (前立腺癌とm i R - 4 0 9 過剰発現を伴う前立腺間質細胞との組み合わせ)。B . 腫瘍注射の5週後における異なる群の腫瘍サイズ。C . 間質細胞に関して緑色蛍光撮像、腫瘍細胞に関して近赤外線撮像を用いた、C 4 - 2 / S O N - C およびC 4 - 2 / S O N - 4 0 9 腫瘍における腫瘍の画像。D . スクランブルおよびh s a - m i R - 4 0 9 - 5 p m i R N A プローブを用いた、C 4 - 2 / S O N - C 腫瘍およびC 4 - 2 / S O N - 4 0 9 腫瘍上のインサイツハイブリダイゼーション。m i R N A の量子ドット撮像。青：核に対するD A P I 染色、赤：h s a - m i R - 4 0 9 - ピオチンプローブ。

【図8】ヒト胚性幹細胞およびヒト誘導多分化能性幹細胞内で上昇したm i R - 4 0 9 - 5 p を描写する。A . ヒト胚性幹細胞内のm i R - 4 0 9 クラスタメンバーのm i R N A 発現。B . 誘導多分化能性幹細胞内のm i R - 4 0 9 クラスタのm i R N A 発現。C . 正常な前立腺間質細胞およびm i R - 4 0 9 過剰発現前立腺間質細胞内の幹細胞マーカーのm R N A 発現分析。

【図9】m i R - 1 5 4 * およびm i R - 3 7 9 の阻害は、侵攻性前立腺癌細胞において細胞死およびEMTを誘発することを描写する。A . 対照、m i R - 1 5 4 * 、およびm i R - 3 7 9 阻害剤をレンチウイルス形質導入によってトランスフェクトしたA R C a P M およびC 4 - 2 細胞内の、トリパンブルー分析によって分析した細胞死。B . 対照およびm i R - 1 5 4 * 阻害剤をトランスフェクトしたA R C a P M 細胞の画像。C . m i R - 1 5 4 およびm i R - 3 7 9 阻害剤をトランスフェクトしたA R C a P M 細胞内のM E T。D . A R C A P m - C およびA m - 1 5 4 内のE - カドヘリン、N - カドヘリン、およびビメンチンのm R N A 発現。E . A m - C およびA M - 1 5 4 内の移動および浸潤。F . A m - C およびA m - 1 5 4 細胞内のm i R - 1 5 4 * 標的。

【図10】本発明の種々の実施形態に従って、異なる腫瘍／間質群における前立腺特異性抗原(P S A)の血清検出、および異なる腫瘍／間質群における2 - マイクログロブリン(2 - M)の血清検出を描写する。

【図11】本発明の種々の実施形態に従って、H & E 染色およびm i R N A 検出を描写する。

【図12】本発明の種々の実施形態に従って、2つの独立した肺癌モデルにおけるE G F R - T K I 獲得耐性的生成および実証を描写する。E G F R - T K I に対する耐性を獲得するN S C L C 患者に代表的なものである、2つの細胞株A 4 3 1 およびH C C 8 2 7 が選択された。A 4 3 1 は、遺伝子増幅E G F R を有し、一方H C C 8 2 7 は、キナーゼドメイン体細胞変異を伴う遺伝子増幅E G F R を有する。双方の細胞株とも、E G F R - T K I に対して感受性が高い。細胞株は、細胞生存率分析にて示される際に薬剤(A 4 3 1 - R およびH C C 8 2 7 - R)に対する耐性を獲得するまで、徐々に増加する用量(最大1 0 m M)のE G F R - T K I 、タルセバを用いて漸進的に処理された。

【図13】本発明の種々の実施形態に従う、上皮間葉移行(EMT)をもたらすE G F R

10

20

20

30

40

50

- T K I 獲得耐性を描写する。E G F R - T K I に対する耐性を獲得する N S C L C 細胞は E M T の分化転換プロセスを受けることが、本明細書において実証される。EMT マーカー、N - カドヘリンおよびビメンチンは、間葉細胞内により高く、一方 E - カドヘリンは、上皮細胞内により高い。EMT 転写因子 S N A I 1 、S N A I 2 、T W I S T 1 、Z E B 1 、Z E B 2 は典型的には、間葉細胞内により高い。図 13 a は、EMT 遺伝子、E - カドヘリン (C D H 1) 、N - カドヘリン (C D H 2) 、ビメンチン (V I M) 、F S P 1 、S M A 、T G b R 1 、T G F b 、および E M T 転写因子、S N A I 1 、S N A I 2 、T W I S T 1 、Z E B 1 、Z E B 2 、F O X C 1 、F O X C 2 、T C F 3 、T C F 4 に関する RNA 分析データを要約する。Z E B 1 、Z E B 2 、および T C F 4 は、間葉表現型のものである耐性細胞内により高い。図 13 b は、耐性モデルにおけるウエスタンプロット法およびフローサイトメトリー分析における、E - カドヘリンにおける減少および N - カドヘリンタンパク質における増加を示す。これらの変化は、EMT 現象を示唆している。

【図 14】本発明の種々の実施形態に従って、m i R - 2 0 0 ファミリーのメンバーは、E G F R - T K I 耐性の獲得に伴って減少することを示す。合計 3 3 0 のマイクロ RNA (m i R) を、EMT に伴って変調される m i R を特定するためにスクリーニングした。これらの m i R のうちの 2 9 を、N S C L C E G F R - T K I 獲得耐性モデルシステムにおいて試験して、これらの m i R のうちのどれが E G F R - T K I 獲得耐性に伴って同様に異なって発現されるのかを評価した。m i R - 2 0 0 ファミリーメンバーは、それらは E - カドヘリンを抑制する E M T 転写因子、Z E B 1 および Z E B 2 を阻害する。これらは、上皮細胞内ではより高くなることが予想され、一方 Z E B 1 および Z E B 2 の発現は、それらの間葉の対応物と比較してより低い。それらの薬剤感受性のある対応物と比較した、双方の耐性モデルにおける m i R 発現が示されており、C t として表される。より高い C t の値はより低い発現を表し、一方 1 C t 値は 2 倍の発現と等しい。m i R - 2 0 0 a および m i R - 2 0 0 c は、H C C - 8 2 7 R 間葉細胞内で下方制御される。一方 m i R - 2 0 0 a 、m i R - 2 0 0 b 、m i R - 2 0 0 c 、および m i R - 2 0 0 * は、A 4 3 1 R 間葉細胞内で下方制御される。

【図 15】本発明の種々の実施形態に従って、m i R - 3 7 9 および m i R - 1 5 4 ファミリーのメンバーは、E G F R - T K I 耐性の獲得に伴って増加することを示す。m i R - 3 7 9 ファミリー (m i R - 3 7 9) および m i R - 1 5 4 ファミリー (m i R - 4 8 7 、m i R - 4 0 9 - 3 p 、m i R - 4 0 9 - 5 p 、および m i R - 1 5 4 *) のメンバーは、E G F R - T K I 耐性間葉 N S C L C 細胞内で上方制御される。A 4 3 1 R では、A 4 3 1 を観察する場合と比較して、m i R - 3 7 9 (~ 4 倍) および m i R - 1 5 4 * (~ 2 0 倍) における増加が観察される。H C C - 8 2 7 R では、H C C 8 2 7 細胞を観察する場合と比較して、m i R - 3 7 9 (~ 6 倍) 、m i R - 4 8 7 (~ 8 - 9 倍) 、m i R - 4 0 9 - 3 p (> 4 6 倍) 、m i R - 4 0 9 - 5 p (~ 1 4 倍) 、および m i R - 1 5 4 * (~ 8 倍) における増加が観察される。

【図 16】本発明の種々の実施形態に従って、m i R - 3 7 9 および m i R - 1 5 4 ファミリーのメンバーにおける増加が、薬剤耐性獲得の中間生成中に見られることを示す。薬剤濃度が増加するにつれ E G F R - T K I 薬剤耐性が漸進的に獲得されるため、薬剤耐性プロセス中に生成される中間細胞集団を実験した。薬剤耐性のマーカーは、薬剤耐性の獲得と調和しているべきであり、また耐性が強くなるにつれて増加すべきである。図 5 に示される通り、m i R - 3 7 9 、4 0 9 - 3 p 、4 0 9 - 5 p 、および 1 5 4 * は、H C C 8 2 7 R 内の最高発現 (1 0 m M E G F R - T K I にて生成される) を伴う、中間 E G F R - T K I 耐性 T K I 集団 (中間集団の薬剤濃度が示される) に伴って増加する。

【図 17】本発明の種々の実施形態に従って、m i R - 3 7 9 および m i R - 1 5 4 ファミリーのメンバーは多分化能性幹細胞内で増加されることを示す文献内の証拠を描写する。同様に、成体肺内では失われる胎児肺内の m i R - 1 5 4 ファミリーメンバーの存在を実証する証拠も存在する。

【図 18】本発明の種々の実施形態に従って、E G F R - T K I 耐性 N S C L C モデルに

おける幹細胞性に関連する遺伝子の要約を描写する。他のシステムにて癌幹細胞遺伝子として提案されている遺伝子のパネルを、EGFR-TKI耐性システムにおいて調べ、その発現の要約を示す。A431Rシステムと比較して、HCC827Rにおいてより多数の幹細胞性に関連する遺伝子が上方制御される。

【発明を実施するための形態】

【0042】

発明の説明

本明細書に引用される全ての参照文献は、完全に記載されているかのように、参照によりその全体が組み込まれる。特に定義されない限り、本明細書で使用される技術的および科学的用語は、本発明が属する当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、およびSambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001)は、当業者に本明細書で使用される用語の多くに対して一般的な手引書を提供する。

10

20

30

【0043】

当業者は、本発明の実践に使用することができる、本明細書に記載されるものに類似するまたは同等の多くの方法および材料を認識するだろう。実際、本発明は、記載される方法および材料を決して限定するものではない。本発明の目的に関して、次の語が以下に定義される。

【0044】

「癌」および「癌性」とは、典型的に、未制御の細胞成長を特徴とする、哺乳類における生理学的状態を指すか、または説明する。癌の例としては、肺癌、前立腺癌、乳癌、結腸癌、肝細胞癌、胃癌、膵臓癌、子宮頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路癌、甲状腺癌、腎癌、癌腫、黒色腫、頭頸部癌、および脳癌が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0045】

本明細書で使用される「哺乳類」とは、哺乳類綱のいずれかのメンバーを指し、ヒト、ならびにチンパンジーおよび他の類人猿、ならびにサル種等のヒト以外の靈長類、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、およびウマ等の農場動物、犬およびネコ等の飼いならされた哺乳類、マウス、ラット、およびモルモット等のゲッ歯類を含む実験動物を含むが、これらに限定されない。本用語は、特定の年齢および性別を示さない。したがって、成体および新生児対象、ならびに胎児は、雌雄にかかわらず、本用語の範囲内に含まれることを意図される。

40

【0046】

「治療」もしくは「治療すること」とは、本明細書で使用するとき、治療処置および予防的(prophylactic)もしくは予防的(preventative)措置の双方を指し、目的は、例え治療が最終的に不成功であったとしても、疾患を予防する、緩徐にさせる、および/または低減させることである。

50

【0047】

マイクロRNAは、本明細書で説明される通り、種々の癌において発癌性であることが実証され、発明者は、多数のヒト骨転移性前立腺癌細胞株ならびに前立腺および骨の癌関連間質におけるマイクロRNA発現をプロファイルした。miR-409-5p、miR-379、およびmiR-154^{*}は、癌細胞と隣接する間質との双方にて高度に発現され、またマイクロRNAmiR-409-5pは、生体内で発癌性であり、EMTにおい

て重要な役割を果たし、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 3 7 9、およびm i R - 1 5 4 * を標的にすることは、前立腺癌細胞の細胞死をもたらす。

【0048】

最も大きいマイクロRNAクラスタのうちの1つは、ヒト染色体14q32にある。マウスにおけるそのオーソロガス領域は、染色体12の長腕上にある。マウスおよびヒトにおいて現在既知であるマイクロRNAの約10%は、このクラスタ内に位置する。このクラスタは、包含される遺伝子の親の起源に特異的な単一対立遺伝子性発現によって特徴付けられる周知の刷り込み領域内部に位置する（遺伝子刷り込みは、母方対立遺伝子または父方対立遺伝子がメチル化される後世遺伝性のメカニズムである）。この研究において、発明者は、マイクロRNA m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 3 7 9、およびm i R - 1 5 4 * を含む、ヒト染色体内に位置するD L K - D I O 3 クラスタのマイクロRNAメンバーが、骨転移性間葉型前立腺癌細胞株内で高度に発現されることを実証する。正常な前立腺におけるm i R - 4 0 9 の過剰発現は、マウスにおいて腫瘍発症をもたらし、また発症した腫瘍は、良性の過形成から腺癌にわたった。より重要なことに、m i R - 4 0 9 - 5 p 発現は、高グリソースコアのヒト前立腺癌組織アレイにおいて上方制御された。m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 3 7 9、およびm i R - 1 5 4 * の単独での阻害、またはs i RNAに基づいたアプローチを用いた3つ全てのマイクロRNAを一緒に遮断する阻害は、増加した細胞死、上皮間葉移行（EMT）の逆戻りを生化学的および機能的にもたらした。癌細胞に加えて、m i R - 4 0 9 - 5 p は、前立腺および骨由来の癌関連間質内で、正常な間質と比較して著しく上方制御された。正常な間質内のm i R - 4 0 9 の異所性発現は、間質の癌関連間質への変換につながり、また侵攻性のより低い癌細胞と共に注射されたm i R - 4 0 9 発現間質は、生体内で爆発的な腫瘍成長を有した。これは、生体内における前立腺癌内の発癌性マイクロRNAの初めて実証された証拠である。したがって、m i R - 4 0 9 - 5 p は、前立腺癌における二方向性の腫瘍間質相互作用に関与する悪循環を阻害するための有望な治療標的であるように思われる。

【0049】

発明者の腫瘍微環境の理解における最新の開発は、抗癌剤発見へのアプローチの根本的变化に対する新しい機会を提供している。癌細胞の標的化に加えて、近年の研究によって癌成長を促進することが実証されている間質細胞を含む、癌細胞の周囲の細胞に不可欠な新規分子標的および経路に注目する必要がある。癌微環境における間質細胞機能の機能障害は、腫瘍進行における重要なステップであると考えられる。それに加えて、癌細胞に加えて間質細胞を同時に標的することは、癌細胞のより良好な死滅につながるであろう。線維筋性間質および間質線維芽細胞は、前立腺発生および前立腺癌発生において制御役割を果たすことが実証されている。これらの研究では、尿生殖洞間葉（UGM）または胚性／成体間質線維芽細胞は、UG上皮および前立腺癌の成長を推進することが示された（25）。これらの研究は、間質からのアンドロゲン受容体のシグナル伝達は、正常な前立腺上皮の発生および分化に決定的であることを始めて提案した（25、26）。細胞組み換え研究を用いて、アンドロゲン依存性からアンドロゲン独立性状態への前立腺癌の進行、および骨転移性表現型へのその後の進行は、マウスの生体内で、または3次元（3D）条件下で共培養した場合に、前立腺癌と前立腺または骨の間質細胞との間の細胞相互作用によって達成されることができる（27）。癌組織に隣接する線維芽細胞または癌関連線維芽細胞（CAF）は、正常な上皮に隣接する線維芽細胞と構造的および機能的に異なることが認められている。これらの細胞は、遺伝子発現プロファイルにおいて顕著な差異を示し、また前立腺癌の進行を予測することが示されている（28）。発明者はこれまでに、前立腺癌とCAFまたは異なる区域起源からの間質線維芽細胞との間の双方向的な細胞相互作用を実証している（27）。これらの発見は、総合すると、前立腺癌進行における間質および腫瘍の微環境の重要な役割を強調した（16, 29～31）。これらの研究は、癌進行における腫瘍・間質の二方向性相互作用および共進化を強調している（32）。間質因子の多くを標的とする治療は、前立腺癌および他の固形腫瘍を治療するための前臨床モデルおよび／または臨床試験において、成功的に試験されている。

10

20

30

40

50

【0050】

EMTは、極性の不動性上皮細胞が運動性間葉細胞に移行する、高度に保存されたプロセスである。EMTは一般的に、癌の移動、浸潤、および転移と関連付けられる。EMTの一般的特徴は、E-カドヘリンの欠失およびビメンチンの増加である。癌において、EMTは、良性腫瘍が周辺組織に侵入して、軟組織および骨に転移するのを促進する。前立腺癌において、EMTは、アンドロゲン難治性前立腺癌（ARCap）細胞モデルにて説明されている（3、17、23、28、33）。前立腺癌細胞株および臨床標本は、RANKLを発現し、また2M等の可溶性因子を分泌することが示されており、それはヒト前立腺癌細胞のEMTおよび骨転移を推進する原因となるだけでなく、ヒト乳癌、腎癌、および肺癌細胞におけるEMTおよび骨転移を促進することによって同じ効果を及ぼした。得られたARCap細胞は、ビメンチン、N-カドヘリン、およびスネイルなどの高レベルの間葉マーカーを有しており、心臓内に注入されるときに100%の骨転移の発生を示す。

10

【0051】

結論として、発明者は、線維芽細胞内遺伝子発現の発癌性マイクロRNA miR-409-5p媒介性制御は、上皮成長および発癌に差別的に作用するという証拠を提供する。先行研究は、TGF-等の分泌性因子、および間質細胞内のその受容体を通じたそのシグナル伝達は、隣接する上皮内の発癌プロセスに影響を及ぼすことを示唆している。発明者の研究は、遺伝子発現の転写後制御遺伝子（マイクロRNA）の役割は、腫瘍抑制遺伝子を抑制し、例えば、間質細胞内の2マイクログロブリンなどの多面的成長因子を活性化することができ、また従って生体内で隣接する上皮細胞に効果を有することができると定義している。癌の表現型は、前立腺上皮内新生物から腺癌にわたる。著しいことに、miR-409-5pは転移性前立腺癌細胞によっても発現され、その阻害は細胞死につながる。miR-409-5pに加えて、miR-379およびmiR-154*を含むDLK-DIO3クラスタの他のメンバーの標的化は、前立腺癌における二方向性の腫瘍間質相互作用に関与する悪循環を阻害するための有望な治療標的であるように思われる。

20

【0052】

本発明の種々の実施形態は、少なくとも部分的に、本明細書に説明される発明者の発見に基づく。

30

【0053】

治療

本発明の種々の実施形態は、治療を必要とする対象において癌を治療する方法であって、miRNA阻害剤を提供する工程と、miRNA阻害剤を対象に投与する工程と、を含む方法を提供する。

【0054】

本発明の種々の実施形態は、それを必要とする対象において癌転移を治療する方法であって、miRNA阻害剤を提供する工程と、miRNA阻害剤を対象に投与する工程と、を含む方法を提供する。

40

【0055】

本発明の種々の実施形態は、それを必要とする対象において抗癌剤耐性を低下させるまたは治療する方法であって、miRNA阻害剤を提供する工程と、miRNA阻害剤を対象に投与する工程と、を含む方法を提供する。

【0056】

本発明の種々の実施形態は、治療を必要とする対象において癌を治療する方法であって、miRNA阻害剤を提供する工程と、miRNA阻害剤を放射線治療または化学療法治療と組み合わせて対象に投与する工程と、を含む方法を提供する。

【0057】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である

50

。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0058】

種々の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 9 3 b、m i R - 1 9 3 b *、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、m i R - 1 5 4、および／またはm i R - 1 5 4 *を阻害することが可能である。特定の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、成熟m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 9 3 b、m i R - 1 9 3 b *、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、m i R - 1 5 4、および／またはm i R - 1 5 4 *を阻害することが可能である。具体的な実施形態では、m i R N A 阻害剤は、成熟m i R - 3 7 9、m i R - 1 9 3 b、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、またはm i R - 1 5 4 *を阻害することが可能である。
10

【0059】

特定の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12の発現を干渉することが可能なs h R N A またはs i R N Aである。具体的な実施形態では、m i R N A 阻害剤は、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号9、または配列番号12の発現を干渉することが可能なs h R N A またはs i R N Aである。

【0060】

特定の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、成熟m i R N Aに対するショートヘアピン型R N A (s h R N A)である。特定の実施形態では、s h R N Aは、配列番号1、配列番号4、配列番号7、または配列番号10によって開示されるポリヌクレオチドによってコードされる。配列番号1、配列番号4、配列番号7、または配列番号10を含む、またはそれらによって開示されるポリヌクレオチドを、例えば、プラスミドとして含む組成物を、対象に投与することができる。したがって、s h R N Aは、ポリヌクレオチドの投与後に生体内で発現され、その標的m i R N A配列を阻害する。
20

【0061】

特定の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、成熟m i R N Aに対するs i R N Aである。種々の実施形態では、s i R N Aは、配列番号3 (m i R N A 3 7 9を標的とし阻害する)、配列番号6 (m i R N A 1 9 3 bを標的とし阻害する)、または配列番号11 (m i R N A 1 5 4 *を標的とし阻害する)によって開示される通りである。
30

【0062】

種々の実施形態では、m i R N A 阻害剤は、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12の発現を干渉することが可能なモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドである。具体的な実施形態では、m i R N A 阻害剤は、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号9、または配列番号12の発現を干渉することが可能なモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドである。種々の実施形態では、モルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号13、配列番号14、または配列番号15によって開示される通りである。
40

【0063】

種々の実施形態では、本発明は、薬学的に許容される賦形剤を治療的有効量のm i R N A 阻害剤と共に含む薬学的組成物を提供する。「薬学的に許容される賦形剤」は、一般的に安全で、非毒性で、また望ましい薬学的組成物を調製するのに有用な賦形剤を意味し、獣医用の使用およびヒト用の薬学的使用に対して許容される賦形剤を含む。そのような賦形剤は、固体、液体、半固体であってもよく、またはエアゾール組成物の場合は気体であってもよい。

【0064】

種々の実施形態では、本発明による薬学的組成物は、任意の投与経路を介する送達のために製剤化されてよい。「投与経路」とは、当該技術分野において既知の任意の投与経路を指すことができ、エアゾール、経鼻、経口、経粘膜、経皮、または非経口を含むがそれ

らに限定されない。「経皮」投与は、局所クリームもしくは軟膏を使用して、または経皮パッチの手段によって達成することができる。

【0065】

「非経口」とは、一般的に、眼窩内、点滴、動脈内、関節内、心臓内、皮内、筋肉内、腹腔内、肺内、脊髄内、胸骨内、くも膜下腔内、子宮内、静脈内、くも膜下、囊下、皮下、経粘膜、または経気管を含む注射に関連する投与経路を指す。非経口経路を介しては、組成物は、点滴もしくは注射用の溶液または懸濁液の形態であるか、あるいは凍結乾燥した粉末としてあり得る。

【0066】

腸内経路を介しては、薬学的組成物は、制御放出を可能にする錠剤、ゲルカプセル、糖衣錠剤、シロップ、懸濁液、溶液、粉末、顆粒、エマルジョン、小球体もしくはナノ球体、または脂質小胞もしくはポリマー小胞の形態であり得る。非経口経路を介しては、組成物は、点滴もしくは注射用の溶液または懸濁液の形態であり得る。

10

【0067】

局所投与を介しては、本発明による化合物に基づく薬学的組成物は、皮膚および粘膜を治療するために製剤化され得、軟膏、クリーム、乳剤、油薬、粉末、含浸パッド、溶液、ゲル、スプレー、ローション、または懸濁液の形態である。それらはまた、制御放出を可能にする小球体もしくはナノ球体、または脂質小胞もしくはポリマー小胞、またはポリマーパッチおよびヒドロゲルの形態でもあり得る。これらの局所経路組成物は、臨床適応により、無水形態か水性形態のいずれかであり得る。眼球経路を介しては、それらは点眼液の形態であり得る。

20

【0068】

本発明による薬学的組成物は、任意の薬学的に許容される担体を含むことができる。本明細書で使用される、「薬学的に許容される担体」とは、ある組織、臓器、または身体の一部から別の組織、臓器、または身体の一部への関心対象の化合物の運搬または輸送に関与する、薬学的に許容される材料、組成物、またはビヒクルを指す。例えば、担体は、液体であるか、あるいは固形充填剤、希釈剤、賦形剤、溶剤、もしくは封入材料、またはそれらの組み合わせであり得る。担体のそれぞれの構成成分は、製剤の他の成分と適合しなければならないという点で、「薬学的に許容され」なければならない。これは、接触し得る任意の組織または臓器との接觸の使用にも適切でなければならない、つまり、毒性、刺激、アレルギー反応、免疫原性、またはその治療利益を過剰に上回る任意の他の合併症のリスクを保持してはならないということである。

30

【0069】

本発明による薬学的組成物はまた、経口投与用に封入される、錠剤化される、またはエマルジョンもしくはシロップにも調製され得る。薬学的に許容される固形または液体の担体は、組成物を強化する、もしくは安定させるため、または組成物の調製を容易にするために添加され得る。液体担体は、シロップ、ピーナッツ油、オリーブ油、グリセリン、生理食塩水、アルコール、および水を含む。固形担体は、デンブン、ラクトース、硫酸カルシウム、二水和物、白土、ステアリン酸マグネシウム、もしくはステアリン酸、タルク、ペクチン、アカシア、寒天、またはゼラチンを含む。担体は、単独で、またはワックスと共に、グリセリルモノステアレートまたはグリセリルジステアレート等の持続放出材料も含み得る。

40

【0070】

医薬調製物は、錠剤形態用に、必要であれば、粉碎、混合、造粒、および圧縮を伴う、または硬ゼラチンカプセル形態用に粉碎、混合、および充填を伴う、薬学の従来の技法に従い作製される。液体担体が使用されるとき、調製物は、シロップ、エリキシル剤、エマルジョン、または水性もしくは非水性懸濁液の形態である。そのような液体製剤は、直接経口投与されるか、または軟ゼラチンカプセル内に充填され得る。

【0071】

本発明による薬学的組成物は、治療有効量で送達され得る。正確な治療有効量は、所与

50

の対象における治療の有効性について、最も有効な結果をもたらす組成物の量である。この量は、治療化合物の特性（活性、薬物動態、薬力学、および生物学的利用能を含む）、対象の生理学的状態（年齢、性別、疾患の種類および段階、一般的な健康状態、所与の投薬量に対する応答性、および薬物治療の種類を含む）、製剤中の薬学的に許容される担体もしくは複数の担体の性質、および投与経路を含むがこれらに限定されない様々な因子により変動する。臨床および薬理分野の者は、例えば化合物の投与に対する対象の応答を監視する、およびそれに応じて投薬量を調節することによって、日常的な実験を通して治療有効量を決定することができるだろう。さらなる手引きに関しては、Remington : The Science and Practice of Pharmacy (Genaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins P.A., USA) (2000) を参照。10

【0072】

バイオマーカー

本発明の種々の実施形態は、miRNA、DLK1 - DIO3領域、およびMEG9を癌および/または癌関連組織に対するバイオマーカーとして使用することを提供する。

【0073】

したがって、本発明の種々の実施形態は、抗癌剤に対する応答性を予測する方法であって、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料を、miRNAの相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、miRNA発現レベルの相対的増加を薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける工程、またはmiRNAの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを薬剤応答性のより高い可能性と関連付ける工程と、を含む方法を提供する。種々の実施形態では、本方法は、薬剤応答性のより高い可能性が予測された場合、対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含む。更なる実施形態では、本方法は、選択された抗癌剤を対象に投与する工程を含む。20

【0074】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）である。特定の実施形態では、TKIは、EGFR - TKIである。具体的実施形態では、EGFR - TKIは、エルロチニブ（タルセバ）である。具体的実施形態では、TKIは、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、TKIは、アバチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。30

【0075】

種々の実施形態では、miRNAは、miR - 379、miR - 379^{*}、miR - 193b、miR - 193b^{*}、miR - 409 - 5p、miR - 409 - 3p、miR - 154、および/またはmiR - 154^{*}である。種々の実施形態では、miRNAは、成熟miR - 379、miR - 379^{*}、miR - 193b、miR - 193b^{*}、miR - 409 - 5p、miR - 409 - 3p、miR - 154、および/またはmiR - 154^{*}である。具体的実施形態では、miRNAは、成熟miR - 379、miR - 193b、miR - 409 - 5p、miR - 409 - 3p、および/またはmiR - 154^{*}である。種々の実施形態では、miRNAは、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、miRNAは、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号9、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。40

【0076】

具体的実施形態では、miRNAは、miR - 379、miR - 379^{*}、miR - 154、および/またはmiR - 154^{*}である。種々の実施形態では、miRNAは、成熟miR - 379、miR - 379^{*}、miR - 154、および/またはmiR - 154^{*}である。具体的実施形態では、miRNAは、成熟miR - 379および/またはmiR - 154^{*}である。種々の実施形態では、miRNAは、配列番号2、配列番号3、配50

列番号 11、または配列番号 12 によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、m i R N A は、配列番号 2 または配列番号 1 2 によって開示される通りの配列を有する。

【 0 0 7 7 】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【 0 0 7 8 】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出する方法であって、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料を m i R N A の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、m i R N A 発現レベルの相対的増加を、抗癌剤耐性病態を有するより高い可能性と関連付ける工程、または m i R N A の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付ける工程と、含む方法を提供する。種々の実施形態では、本方法は、抗癌剤感受性病態が検出された場合、対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含む。更なる実施形態では、本方法は、選択された抗癌剤を対象に投与する工程を含む。

10

【 0 0 7 9 】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤 (T K I) である。特定の実施形態では、T K I は、E G F R - T K I である。具体的実施形態では、E G F R - T K I は、エルロチニブ (タルセバ) である。具体的実施形態では、T K I は、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、T K I は、アパチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。

20

【 0 0 8 0 】

種々の実施形態では、m i R N A は、m i R - 3 7 9 、 m i R - 3 7 9 * 、 m i R - 1 9 3 b 、 m i R - 1 9 3 b * 、 m i R - 4 0 9 - 5 p 、 m i R - 4 0 9 - 3 p 、 m i R - 1 5 4 、および / または m i R - 1 5 4 * である。種々の実施形態では、m i R N A は、成熟 m i R - 3 7 9 、 m i R - 3 7 9 * 、 m i R - 1 9 3 b 、 m i R - 1 9 3 b * 、 m i R - 4 0 9 - 5 p 、 m i R - 4 0 9 - 3 p 、 m i R - 1 5 4 、および / または m i R - 1 5 4 * である。具体的実施形態では、m i R N A は、成熟 m i R - 3 7 9 、 m i R - 1 9 3 b 、 m i R - 4 0 9 - 5 p 、 m i R - 4 0 9 - 3 p 、および / または m i R - 1 5 4 * である。種々の実施形態では、m i R N A は、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 5 、配列番号 6 、配列番号 8 、配列番号 9 、配列番号 1 1 、または配列番号 1 2 によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、m i R N A は、配列番号 2 、配列番号 5 、配列番号 8 、配列番号 9 、または配列番号 1 2 によって開示される通りの配列を有する。

30

【 0 0 8 1 】

具体的実施形態では、m i R N A は、m i R - 3 7 9 、 m i R - 3 7 9 * 、 m i R - 1 5 4 、および / または m i R - 1 5 4 * である。種々の実施形態では、m i R N A は、成熟 m i R - 3 7 9 、 m i R - 3 7 9 * 、 m i R - 1 5 4 、および / または m i R - 1 5 4 * である。具体的実施形態では、m i R N A は、成熟 m i R - 3 7 9 および / または m i R - 1 5 4 * である。種々の実施形態では、m i R N A は、配列番号 2 、配列番号 3 、配列番号 1 1 、または配列番号 1 2 によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、m i R N A は、配列番号 2 または配列番号 1 2 によって開示される通りの配列を有する。

40

【 0 0 8 2 】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である

50

。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0083】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出する方法であって、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料をD L K 1 - m i R N A の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、m i R N A の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける工程、またはD L K 1 - m i R N A の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付ける工程と、含む方法を提供する。
10

【0084】

種々の実施形態では、m i R N A は、m i R - 3 7 9 、m i R - 3 7 9 * 、m i R - 1 9 3 b 、m i R - 1 9 3 b * 、m i R - 4 0 9 - 5 p 、m i R - 4 0 9 - 3 p 、m i R - 1 5 4 、および／またはm i R - 1 5 4 * である。種々の実施形態では、m i R N A は、成熟m i R - 3 7 9 、m i R - 3 7 9 * 、m i R - 1 9 3 b 、m i R - 1 9 3 b * 、m i R - 4 0 9 - 5 p 、m i R - 4 0 9 - 3 p 、m i R - 1 5 4 、および／またはm i R - 1 5 4 * である。具体的実施形態では、m i R N A は、成熟m i R - 3 7 9 、m i R - 1 9 3 b 、m i R - 4 0 9 - 5 p 、m i R - 4 0 9 - 3 p 、および／またはm i R - 1 5 4 * である。種々の実施形態では、m i R N A は、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、m i R N A は、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号9、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。
20

【0085】

特定の実施形態では、転移性病態は、骨転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0086】

本発明の種々の実施形態は、抗癌剤に対する応答性を予測する方法であって、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料を、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける工程、またはD L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付ける工程と、を含む方法を提供する。種々の実施形態では、本方法は、薬剤応答性のより高い可能性が検出された場合、対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含む。更なる実施形態では、本方法は、選択された抗癌剤を対象に投与する工程を含む。
30

【0087】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（T K I）である。特定の実施形態では、T K I は、E G F R - T K I である。具体的実施形態では、E G F R - T K I は、エルロチニブ（タルセバ）である。具体的実施形態では、T K I は、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、T K I は、アパチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。
40

【0088】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。
50

【 0 0 8 9 】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出する方法であって、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料を D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、D L K 1 - D I O 3 領域の相対的に増加した発現レベルを、抗癌剤耐性病態と関連付ける工程、または D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付ける工程と、含む方法を提供する。種々の実施形態では、本方法は、抗癌剤感受性病態が検出された場合、対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含む。更なる実施形態では、本方法は、選択された抗癌剤を対象に投与する工程を含む。

10

【 0 0 9 0 】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) である。特定の実施形態では、TKIは、EGFR-TKIである。具体的な実施形態では、EGFR-TKIは、エルロチニブ (タルセバ) である。具体的な実施形態では、TKIは、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、TKIは、アパチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。

【 0 0 9 1 】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

20

【 0 0 9 2 】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出する方法であって、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料を D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける工程、または D L K 1 - D I O 3 クラスタ / 領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付ける工程と、含む方法を提供する。

30

【 0 0 9 3 】

特定の実施形態では、転移性病態は、骨転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【 0 0 9 4 】

本発明の種々の実施形態は、抗癌剤に対する応答性を予測する方法であって、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料を M E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、M E G 9 の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける工程、または M E G 9 の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付ける工程と、含む方法を提供する。種々の実施形態では、本方法は、薬剤応答性のより高い可能性が検出された場合、対象に投与するための抗癌剤を選択する工程を更に含む。更なる実施形態では、本方法は、選択された抗癌剤を対象に投与する工程を含む。

40

【 0 0 9 5 】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) である。特定の実施形態では、TKIは、EGFR-TKIである。具体的な実施形態では、EGFR-TKIは、エルロチニブ (タルセバ) である。具体的な実施形態では、TKIは、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、TKIは、アパチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。

50

【0096】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0097】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出する方法であって、対象から生体試料を獲得する工程と、生体試料をM E G 9の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験する工程と、M E G 9の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける工程、またはM E G 9の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付ける工程と、含む方法を提供する。
10

【0098】

特定の実施形態では、転移性病態は、骨転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0099】

システム

本発明の種々の実施形態は、抗癌剤に対する応答性を予測するシステムであって、対象から獲得される生体試料と、生体試料を、m i R N Aの相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するための検出プローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、m i R N A発現レベルの相対的増加を、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける、またはm i R N Aの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付けるための機械（例えば、コンピュータ）を更に備える。
20

【0100】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（T K I）である。特定の実施形態では、T K Iは、E G F R - T K Iである。具体的実施形態では、E G F R - T K Iは、エルロチニブ（タルセバ）である。具体的実施形態では、T K Iは、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、T K Iは、アバチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。
30

【0101】

種々の実施形態では、m i R N Aは、m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 9 3 b、m i R - 1 9 3 b *、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、m i R - 1 5 4、および／またはm i R - 1 5 4 *である。種々の実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 9 3 b、m i R - 1 9 3 b *、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、m i R - 1 5 4、および／またはm i R - 1 5 4 *である。具体的実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 3 7 9、m i R - 1 9 3 b、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、および／またはm i R - 1 5 4 *である。種々の実施形態では、m i R N Aは、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、m i R N Aは、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号9、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。
40

【0102】

具体的実施形態では、m i R N Aは、m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 5 4、および／またはm i R - 1 5 4 *である。種々の実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 5 4、および／またはm i R - 1 5 4 *である。具体的実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 3 7 9 および／またはm i
50

R - 154^{*}である。種々の実施形態では、m i R N Aは、配列番号2、配列番号3、配列番号11、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、m i R N Aは、配列番号2または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。

【0103】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

10

【0104】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出するシステムであって、対象からの生体試料と、生体試料を、m i R N Aの相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するための検出プローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、m i R N A発現レベルの相対的増加を、抗癌剤耐性病態を有するより高い可能性と関連付ける、またはm i R N Aの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付けるための機械（例えば、コンピュータ）を更に備える。

【0105】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（T K I）である。特定の実施形態では、T K Iは、E G F R - T K Iである。具体的実施形態では、E G F R - T K Iは、エルロチニブ（タルセバ）である。具体的実施形態では、T K Iは、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、T K Iは、アパチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。

20

【0106】

種々の実施形態では、m i R N Aは、m i R - 379、m i R - 379^{*}、m i R - 193b、m i R - 193b^{*}、m i R - 409 - 5p、m i R - 409 - 3p、m i R - 154、および/またはm i R - 154^{*}である。種々の実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 379、m i R - 379^{*}、m i R - 193b、m i R - 193b^{*}、m i R - 409 - 5p、m i R - 409 - 3p、m i R - 154、および/またはm i R - 154^{*}である。具体的実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 379、m i R - 193b、m i R - 409 - 5p、m i R - 409 - 3p、および/またはm i R - 154^{*}である。種々の実施形態では、m i R N Aは、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、m i R N Aは、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号9、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。

30

【0107】

具体的実施形態では、m i R N Aは、m i R - 379、m i R - 379^{*}、m i R - 154、および/またはm i R - 154^{*}である。種々の実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 379、m i R - 379^{*}、m i R - 154、および/またはm i R - 154^{*}である。具体的実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 379および/またはm i R - 154^{*}である。種々の実施形態では、m i R N Aは、配列番号2、配列番号3、配列番号11、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、m i R N Aは、配列番号2または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。

40

【0108】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である

50

。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0109】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出するシステムであって、対象からの生体試料と、生体試料を、D L K 1 - m i R N Aの相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するための検出プローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、m i R N Aの相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける、またはD L K 1 - m i R N Aの相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付けるための機械（例えば、コンピュータ）を更に備える。

10

【0110】

種々の実施形態では、m i R N Aは、m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 9 3 b、m i R - 1 9 3 b *、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、m i R - 1 5 4、および／またはm i R - 1 5 4 *である。種々の実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 3 7 9、m i R - 3 7 9 *、m i R - 1 9 3 b、m i R - 1 9 3 b *、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、m i R - 1 5 4、および／またはm i R - 1 5 4 *である。具体的実施形態では、m i R N Aは、成熟m i R - 3 7 9、m i R - 1 9 3 b、m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 4 0 9 - 3 p、および／またはm i R - 1 5 4 *である。種々の実施形態では、m i R N Aは、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、m i R N Aは、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号9、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。

20

【0111】

特定の実施形態では、転移性病態は、骨転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0112】

本発明の種々の実施形態は、抗癌剤に対する応答性を予測するシステムであって、対象からの生体試料と、生体試料を、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するための検出プローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、システムは、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける、またはD L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付けるための機械（例えば、コンピュータ）を更に備える。

30

【0113】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（T K I）である。特定の実施形態では、T K Iは、E G F R - T K Iである。具体的実施形態では、E G F R - T K Iは、エルロチニブ（タルセバ）である。具体的実施形態では、T K Iは、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、T K Iは、アパチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。

40

【0114】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

50

【0115】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出するシステムであって、対象からの生体試料と、生体試料を、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するための検出プローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、D L K 1 - D I O 3 領域の相対的に増加した発現レベルを、抗癌剤耐性病態と関連付ける、またはD L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、抗癌剤感受性病態と関連付けるための機械（例えば、コンピュータ）を更に備える。

【0116】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）である。特定の実施形態では、TKIは、EGFR-TKIである。具体的実施形態では、EGFR-TKIは、エルロチニブ（タルセバ）である。具体的実施形態では、TKIは、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、TKIは、アパチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。

10

【0117】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

20

【0118】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出するシステムであって、対象からの生体試料と、生体試料を、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するための検出プローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける、またはD L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付けるための機械（例えば、コンピュータ）を更に備える。

30

【0119】

特定の実施形態では、転移性病態は、骨転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0120】

本発明の種々の実施形態は、抗癌剤に対する応答性を予測するシステムであって、対象からの生体試料と、生体試料を、M E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するための検出プローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、M E G 9 の相対的に増加した発現レベルを、薬剤応答性のより低い可能性と関連付ける、またはM E G 9 の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、薬剤応答性のより高い可能性と関連付けるための機械（例えば、コンピュータ）を更に備える。

40

【0121】

種々の実施形態では、抗癌剤は、チロシンキナーゼ阻害剤（TKI）である。特定の実施形態では、TKIは、EGFR-TKIである。具体的実施形態では、EGFR-TKIは、エルロチニブ（タルセバ）である。具体的実施形態では、TKIは、ゲフィチニブである。特定の実施形態では、TKIは、アパチニブ、カボザンチニブ、カネルチニブ、クレノラニブ、ダムナカンタール、フォレチニブ、フォスタマチニブ、インテダニブ、リニファニブ、モテサニブ、ムブリチニブ、バタラニブ、またはベムラフェニブである。

【0122】

特定の実施形態では、癌は、前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、肺癌である

50

。特定の実施形態では、癌は、乳癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性癌である。特定の実施形態では、転移性癌は、骨への転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0123】

本発明の種々の実施形態はまた、対象における癌の病態を検出するシステムであって、対象からの生体試料と、生体試料を、M E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現に関して試験するための検出プローブと、を備えるシステムを提供する。種々の実施形態では、本システムは、M E G 9 の相対的に増加した発現を、転移性病態と関連付ける、またはM E G 9 の相対的に減少したもしくは安定した発現レベルを、非転移性病態と関連付けるための機械（例えば、コンピュータ）を更に備える。

10

【0124】

特定の実施形態では、転移性病態は、骨転移である。特定の実施形態では、癌は、転移性前立腺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性肺癌である。特定の実施形態では、癌は、転移性乳癌である。

【0125】

本発明の方法およびシステムに関して、m i R N A、D L K 1 - m i R N A、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域、またはM E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現とは、対照と比較したものである（例えば、確立された対照、非癌性生体試料、同種類の非癌性生体試料（例えば、生物学的試験物としての癌性肺組織に対する、対照としての非癌性肺組織））。

20

【0126】

本発明の方法およびシステムに関する対象は、癌を有する、癌を有する疑いのある、癌と診断される、または癌を罹患している対象である。癌の例は、本明細書に説明される。

【0127】

本発明の方法およびシステムに関する生体試料の例としては、哺乳類の体液、例えば、血液（全血ならびにその血漿および血清を含む）等の血清、C S F（髄液）、尿、汗、唾液、涙、気道内分泌物、胸部穿刺液、前立腺液、精液、糞便、子宮頸管剥離物、囊胞、羊水、眼内液、粘液、呼吸の湿気、動物性組織、細胞溶解物、腫瘍組織、毛髪、皮膚、頬剥離物、爪、骨髓、軟骨、プリオン、骨粉、耳垢等、または例えば、腫瘍標本等の外的もしくは保管された供給源（即ち、新鮮な、冷凍された、またはパラフィン包埋されている）からのものさえ挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0128】

本発明のシステムまたは方法にて使用される検出プローブの例としては、核酸、抗体、m i R N A、D L K 1 - m i R N A、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域、またはM E G 9 と反応する基質が挙げられる。種々の実施形態では、検出プローブは、m i R N A、D L K 1 - m i R N A、D L K 1 - D I O 3 クラスタ／領域、またはM E G 9 の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出するためのシグナルを生成するための標識を備える。種々の実施形態では、検出プローブは、チップ、マイクロアレイ、またはゲルの中にある。

40

【0129】

薬剤スクリーニング

本発明の種々の実施形態は、m i R N A の阻害剤または作動物質をスクリーニングする方法であって、試験化合物を提供する工程と、試験化合物を、m i R N A を発現している細胞と接触させる工程と、m i R N A の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出する工程と、m i R N A 発現の相対的減少が検出された場合、該試験化合物を阻害剤として特定する工程、m i R N A 発現の相対的増加が検出された場合、該試験化合物を作動物質として特定する工程と、を含む方法を提供する。

【0130】

種々の実施形態では、m i R N A は、m i R - 379、m i R - 379 *、m i R - 1

50

93b、miR-193b^{*}、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154、および/またはmiR-154^{*}である。種々の実施形態では、miRNAは、成熟miR-379、miR-379^{*}、miR-193b、miR-193b^{*}、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154、および/またはmiR-154^{*}である。具体的実施形態では、miRNAは、成熟miR-379、miR-193b、miR-409-5p、miR-409-3p、および/またはmiR-154^{*}である。種々の実施形態では、miRNAは、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号8、配列番号9、配列番号11、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。具体的実施形態では、miRNAは、配列番号2、配列番号5、配列番号8、配列番号9、または配列番号12によって開示される通りの配列を有する。

10

【0131】

本発明の種々の実施形態は、DLK1-DI03領域の阻害剤または作動物質をスクリーニングする方法であって、試験化合物を提供する工程と、試験化合物を、DLK1-DI03領域を発現している細胞と接触させる工程と、DLK1-DI03領域の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出する工程と、DLK1-DI03領域発現の相対的減少が検出された場合、該試験化合物を阻害剤として特定する工程、DLK1-DI03領域発現の相対的増加が検出された場合、該試験化合物を作動物質として特定する工程と、を含む方法を提供する。

20

【0132】

本発明の種々の実施形態は、MEG9の阻害剤または作動物質をスクリーニングする方法であって、試験化合物を提供する工程と、試験化合物を、MEG9を発現している細胞と接触させる工程と、MEG9の相対的に増加した、減少した、または安定した発現を検出する工程と、MEG9発現の相対的減少が検出された場合、該試験化合物を阻害剤として特定する工程、MEG9発現の相対的増加が検出された場合、該試験化合物を作動物質として特定する工程と、を含む方法を提供する。

30

【0133】

本発明はまた、本発明の種々の実施形態を実施するためのキットに関する。キットは、本発明の組成物のうちの少なくとも1つを含む、材料または構成成分の集合体である。したがって、幾つかの実施形態では、キットは、上記で説明するようなmiRNA阻害剤を含む組成物を含有する。他の実施形態では、キットは、種々の診断、予後、予測、ならびに/または検出方法およびシステムにおける使用のためのプローブを含む組成物を含有する。

40

【0134】

本発明のキット内に構成される構成成分の正確な性質は、その意図される目的に依存する。例えば、幾つかの実施形態は、癌を治療する目的のために構成される。一実施形態では、キットは、哺乳類対象を治療する目的のために特に構成される。別の実施形態では、キットは、ヒト対象を治療する目的のために特に構成される。更なる実施形態では、キットは、獣医用途、例えば、農場動物、家畜、および実験動物等があるがそれらに限定されない対象の治療用に構成される。

40

【0135】

使用説明書は、キットに含まれてもよい。「使用説明書」は典型的には、例えば、癌転移を阻害する等の所望の結果を達成するためにキットの構成成分の使用において採用される技術を説明する具体的表現を含む。所望により、キットはまた、例えば、希釈剤、緩衝液、薬学的に許容される担体、注射器、カテーテル、塗布器、分注もしくは測定用器具、包帯材料、または当業者によって容易に認識されるであろう他の有用な道具類等の他の有用な構成成分も含有する。

【0136】

キット内に組み込まれる材料または構成成分は、その操作可能性および有用性を保つ任意の便利で好適な方法で保管されて、施術者に提供され得る。例えば、構成成分は、溶解

50

、脱水、または凍結乾燥された形態であり得、室温、冷藏温度、または凍結温度にて提供され得る。構成成分は典型的には、好適なパッケージ材料（単数または複数）内に含有される。明細書で採用するとき、語句「パッケージ材料」は、例えば、本発明の組成物および同類のもの等のキットの内容物を収容するために使用される、1つ以上の物理的構造物を指す。パッケージ材料は、好ましくは無菌で汚染物を含まない環境を提供するような、周知の方法によって構築される。本明細書で使用するとき、用語「パッケージ」は、好適な固体マトリックス、または例えば、ガラス、プラスチック、紙、ホイル等、個々のキット構成成分を保持することが可能な材料を指す。したがって、例えば、パッケージは、mRNA 阻害剤を含有する好適な量の本発明の組成物を含有するために使用されるガラス瓶であり得る。パッケージ材料は、一般的に、内容物および／もしくはキットの目的ならびに／またはその構成成分を示す外部ラベルを有する。

10

【実施例】

【0137】

以下の実施例は、主張される本発明をより良く図示するために提供され、本発明の範囲を制限するものと解釈されない。特定の材料が記述される場合においては、単に図示の目的であり、本発明を制限することが意図されない。当業者は、本発明の能力を訓練することなく、また本発明の範囲から逸脱することなく、同等の手段または反応物質を発達させることができる。

20

【0138】

実施例 1

前立腺癌の骨転移性モデルのマイクロRNA 発現プロファイリングは、miR - 409 - 5 p の上昇した発現を示す

PCA 患者に由来する2つのPCA 骨転移性細胞ベースモデル、即ち、ヒトARCAP モデル (ARCap_E および ARCap_M) (E - 上皮、M - 間葉) の mRNA プロファイリングの実施 (図1A)、およびLNCAP モデル (LNCAP および C4 - 2) (15, 16)。ARCap_E および LNCAP は、侵攻性がより少なく骨に転移しないが、それに対して C4 - 2 および ARCap_M は、高度に侵攻性であり骨に転移する。これらの細胞株のうち、miR - 409 - 5 p、miR - 379、および miR - 154* は、高度骨転移性 ARCap_M 細胞内で上方制御される (図1D)。miR - 409 - 5 p は、未成熟転写産物から生成され、pre-miRNA の 5'末端から転写される。ARCap_M 細胞は、マウスに心臓内注射した場合、100% の骨転移性能力を有する (17)。ARCap モデルは、上皮間葉移行モデルである (17)。先に説明したEMT 関連 miRNA と一致して、miR - 200 ファミリーメンバーは、間葉 ARCap_M 細胞と比較して、上皮 ARCap_E 細胞内でより高い (図1B)。miR - 409 - 5 p、miR - 379、および miR - 154* は、刷り込み DLK1 - DIO3 クラスタ内、および長い非コード RNA、MEG9 内部に位置する。興味深いことに、MEG9 はまた、骨転移性 ARCap_M 前立腺癌細胞内でも上昇される (図1C)。miR - 154*、miR - 379、miR - 487、および miR - 409 - 3 p 等の DLK1 - DIO3 クラスタからの幾つかの miRNA は、ARCap_M 細胞内で上昇した (図1D)。miR - 495、miR - 329、miR - 485 - 3 p、および miR - 299 - 3 p 等の幾つかの miRNA は、ARCap_E 細胞と比較して ARCap_M 細胞内で下方制御された (図1E)。miR - 154* および 379 は、LNCAP 前立腺癌細胞と比較して骨転移性 C4 - 2 細胞内で上方制御された。発明者は、前立腺 EMT モデル (図1D) および肺癌 EMT モデル (データ図示無し)において、miR - 409 - 5 p における増加を観察した。発明者は、インサイツハイブリダイゼーションおよび量子ドット検出法を用いて、腫瘍組織アレイ内の miR - 409 - 5 p の発現を決定するための研究を実施した (BP H / PIN, n = 23、グリソンスコア 6 - 7, n = 36、グリソンスコア 8, n = 24、n = グリソンスコア 10 n = 6) (18)。miR - 409 - 5 p 発現が、腫瘍および腫瘍細胞の双方において検出された。miR - 409 - 5 p は、高グリソンスコアのヒト前立腺癌組織アレイ内で上方制御され、全てのグリソン 10 スコア組織において 100

30

40

50

%のm i R - 4 0 9 - 5 p陽性染色であった(図2A)。負の対照(スクランブル)は、最小の染色を有し、またm i R - 4 0 9 - 5 p発現(赤)レベルは、腫瘍組織内により高かった(図2C)。核は、D A P Iで染色された。

【0139】

実施例2

正常前立腺内のm i R - 4 0 9 の過剰発現は腫瘍成長をもたらす

m i R - 4 0 9 が発癌性かどうかを試験するため、発明者は、ヒト胚性腎臓、緑色蛍光タンパク質(G F P)を担持するm i R - 4 0 9 発現レンチウイルスベクターを用いてトランスフェクトした2 9 3 T細胞、またはG F Pプラスミド(S y s t e m b i o s c i e n c e s)を担持する対照ベクターを注射した。2 9 3 T細胞をヌードマウスに同所的に投与し、腫瘍発症を腫瘍特異性赤外線染料(I R 7 8 3)を用いて観察した(19)。この手順の論拠は、レンチウイルスは、産生細胞(2 9 3 T)によって分泌され、前立腺上皮および間質に感染するであろうというものである。著しいことに、腫瘍が、m i R - 4 0 9 発現前立腺内で4匹のマウスのうち3匹において3~5ヶ月で発症した(図3A)。対照マウスは、腫瘍を発症しなかった。腫瘍は、緑色蛍光を有し、腫瘍特異性染料取り込みを示した(図3A)。腫瘍部分を、ホルマリン固定してパラフィン包埋し、H & E染色を実施した。腫瘍部分を、病理学者によって等級付けした。腫瘍は、良性過形成からm i R - 4 0 9 前立腺内腺癌にわたった。該部分を、m i R - 4 0 9 - 5 p レベルに関して分析した。インサイツハイブリダイゼーションおよび量子ドットを用いて、m i R - 4 0 9 発現が、m i R - 4 0 9 発現前立腺内でのみ観察され、対照前立腺では観察されなかっ(図3B)。スクランブルm i R N Aを、負の対照として使用した。総合すると、これらの研究は、m i R - 4 0 9 発現は、正常前立腺内の腫瘍成長を推進するのに十分であり、m i R - 4 0 9 は、前立腺癌進行において発癌性の役割を果たしている可能性があることを示唆する。発明者の知る限り、これは前立腺癌における発癌性m i R N Aの初めての実証である。

【0140】

実施例3

間葉型転移性前立腺癌細胞(A R C a P M)におけるm i R - 4 0 9 - 5 p の阻害は、細胞死、m i R - 4 0 9 - 5 p 標的遺伝子(腫瘍抑制物質)の上方制御、および上皮間葉移行の逆転(E M TからM E Tへ)をもたらす

レンチウイルスベースの抗m i R - 4 0 9 - 5 p を用いたm i R - 4 0 9 - 5 p の阻害は、転移性前立腺癌細胞の著しい細胞死をもたらした(図4A)。m i R - 4 0 9 - 5 p 発現は、対照と比較して、m i R - 4 0 9 - 5 p 阻害剤構築物をトランスフェクトしたA R C a P M 細胞内で安定して減少した。T U S C 4、P H C 3、およびS T A G 2を含むm i R - 4 0 9 - 5 p 標的m R N Aが評価され、これらは、A R C a P M 対照(A R C a P M - C)細胞と比較してm i R - 4 0 9 - 5 p ノックダウン細胞(A R C a P M - 4 0 9 - 5 p i)転移性前立腺癌細胞内で増加した。T U S C 4は、固体腫瘍において欠損している腫瘍抑制タンパク質である。P H C 3は、転写抑制および細胞運命の制御に関するポリコーム群タンパク質の一部である(20)。T U S C 4のs i R N A媒介性の下方制御は、細胞増殖を誘発し、それに対して異所性T U S C 4 発現は、A k t およびp 7 0 リボソームタンパク質S 6 キナーゼを含むP D K 1下流シグナル伝達経路を不活性化し、幾つかの抗癌剤に対する癌細胞感受性を増加させた。ポリホメオティックホモログ3(P H C 3)は、ヒトポリコーム複合体のメンバーであり、骨肉種の腫瘍抑制物質候補と考えられている。腫瘍細胞のコロニー形成を著しく抑制したP H C 3 発現は、癌細胞内のポリコーム抑制複合体1の組成の改変によって引き起こされる可能性がある。S T A G 2は、凝集複合体の一部であり、該凝集複合体のメンバーの脱制御は、癌の開始および進行を引き起こすと考えられる(21)。S T A G 2内の変異は、ヒト癌において異数性をもたらす。したがって、m i R - 4 0 9 標的是は、発癌遺伝子の抑制物質であり、またしたがって、m i R - 4 0 9 - 5 p の阻害は、そのような腫瘍抑制物質の上方制御に起因する細胞死につながる。発明者が該クラスタの他のメンバーの役割を単独かまたは組み合わせかで評

10

20

30

40

50

価すると、レンチウイルスベースの抗m i R - 3 7 9 および抗m i R - 1 5 4 * 、または3つ全てのマイクロRNA (m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 3 7 9、m i R - 1 5 4 *)を遮断するsiRNAを用いた、m i R - 3 7 9 およびm i R - 1 5 4 * の阻害は、転移性前立腺癌細胞の著しい細胞死をもたらすことが見出された（図10）。

【0141】

臨床データと実験データとの双方が、癌細胞が、EMTを受けることによってその転移可能性を獲得するという考えを支持している。ロバストARCap EMTモデルを用いて、発明者は、EMTと前立腺癌骨転移との間の密接な関連をこれまでに実証している。間葉転移性癌細胞内でのm i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 3 7 9、およびm i R - 1 5 4 * の単独でまたは組み合わせでの阻害が、EMTを逆転させ得る [すなわち、間葉から上皮への移行 (MET) を誘発する] かどうかを決定するために、発明者は、ARCap_M前立腺癌細胞内でのm i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 3 7 9、およびm i R - 1 5 4 * 配列特異性siRNAを単独でまたは組み合わせてノックダウンする研究を実施した。対照細胞は、スクランブルsiRNA配列 (Scram) を用いて同様に処理した。m i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 3 7 9、およびm i R - 1 5 4 * ノックダウン細胞は、ARCap_M Scram対象と比較してより低いm i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 3 7 9、およびm i R - 1 5 4 * を有した。ノックアウト細胞（個別にまたは組み合わせでノックアウトされたm i R）は、安定した形態学的な間葉から上皮移行 (MET) を受け、それは増加したE-カドヘリンと減少したビメンチン発現によって達成された。減少したm i R - 4 0 9 - 5 p、m i R - 3 7 9、およびm i R - 1 5 4 * はまた、癌細胞の減少した移動をもたらした。
10

【0142】

実施例4

患者からの正常な間質および癌関連間質のマイクロRNA発現プロファイリング、ならびに3次元細胞培養モデルは、前立腺から骨への癌関連間質においてm i R - 4 0 9 - 5 p レベルの上昇した発現を示す

反応性間質におけるm i R - 4 0 9 - 5 p の役割：癌細胞に加えて、発明者は、前立腺の臨床試料および骨間質モデルにおいて正常な間質および癌関連間質のm i RNAプロファイリングも実施した（図3A）。
20

【0143】

前立腺間質：前立腺間質細胞を、レーザー捕捉顕微鏡検査によって患者試料から単離した（3）。これらの患者試料は、m i R - 4 0 9 - 5 p における増加を有した（図3B）。m i R - 4 0 9 - 5 p も、3名の患者試料のうち2名において増加した（データ図示無し）。

【0144】

骨間質：細胞ベースモデルを用いて、正常な骨芽細胞および癌関連骨の骨芽細胞（正常骨芽細胞：HS - 2 7 a_{R W V}、癌関連間質：HS - 2 7 c_{4 - 2}）および骨肉種細胞（正常：MG_{R W V}、ならびに癌関連：MG_{L N} および MG_{c 4 2}）を抽出した。生成された全CAFは、増加したレベルのm i R - 4 0 9 - 5 p を有した（図3B）。これらの結果は、間質細胞は、癌細胞に加えて、m i R - 4 0 9 - 5 p を上方制御することを実証する。
30

【0145】

実施例5

正常前立腺間質細胞内のm i R - 4 0 9 の過剰発現は、骨転移性マーカーの上方制御および腫瘍抑制物質の下方制御を通じて、癌関連間質様表現型をもたらす

間質内のm i R - 4 0 9 発現が、PCa進行に誘導的役割を果たすかを決定するために、発明者は、患者から抽出した幾つかの正常前立腺線維芽細胞（通常m i R - 4 0 9 を発現しない）内でm i R - 4 0 9 を過剰発現させた（SONおよびWHNは、正常前立腺線維芽細胞である）（図4A）。ウイルス形質導入後、高レベルのm i R - 4 0 9 - 5 p が観察された。m i R - 4 0 9 過剰発現は、ビメンチンおよび 2 - Mタンパク質レベルの
40

10

20

30

40

50

増加した発現をもたらした(図4B)。ビメンチンは、活性化線維芽細胞である筋線維芽細胞に関するマーカーである(22)。miR-409-5p標的mRNAが評価され、これらは、miR-409を発現している正常間質細胞内で減少した。TargetScanからの予測によって決定した際、miR-409-3p mRNA標的は、ポリホメオティックタンパク質3(PHC3)、腫瘍抑制物質4(TUSC4)、およびRSU1(Ras抑制タンパク質1)であった。これらの標的は、miR-409を発現している正常間質細胞株内で著しく下方制御される(図4C)。miR-409-5pはまた、間質抗原1(STAG2)を標的とし、それはmiR-409を発現している正常間質細胞内で著しく下方制御された(図4D)。ras抑制タンパク質の阻害は、発癌性ras経路を通じた活性シグナル伝達を可能にするであろう。したがって、miR-409標的は、発癌遺伝子の抑制物質であり、またしたがって正常間質内のmiR-409-5pの発現は、正常線維芽細胞を癌関連線維芽細胞へと変換する。

10

【0146】

実施例6

正常間質細胞内のmiR-409の過剰発現は、マウスモデルにおいて癌細胞の侵攻性腫瘍原性を誘発する

正常線維芽細胞(間質)内のmiR-409過剰発現が、癌細胞成長を誘発/強化するかを決定するために、ヌードマウスを用いた生体内研究を実施した。マウスに、間質細胞単独(SON-C; 対照正常間質)、miR-409を発現している正常間質(SON-409)、癌細胞単独(C4-2)、および腫瘍・間質の組み合わせ(C4-2/SON-CまたはC4-2/SON-409)を皮下注射した。4週後、腫瘍成長を有した唯一の群は、C4-2/SON-409を共に注射したものであった(PCa細胞およびmiR-409過剰発現間質細胞)(図5A)。腫瘍取得は、C4-2/SON-409群(n=4)で75%であり(図5A)、著しく増加した腫瘍体積を有した(図5B、C)。インサイツハイブリダイゼーションおよび量子ドットを使用して、mRNA 409-5pおよび-3pの発現を分析した。H&Eも、全ての腫瘍において実施した。対照(C4-2、SON-C、SON-409、C4-2/SON-C)は、腫瘍成長を有さなかつたが、腫瘍/間質細胞が注射部位内の皮膚下に存在した場合もあった。これらの腫瘍を、mRNA分析に使用した。miR-409-5p発現は、C4-2/SON-409組織部分内でのみ観察された。興味深いことに、miR-409-5p発現は、miR-409を過剰発現している間質細胞内でのみ見られず、しかし周辺の癌細胞内で同様に見られた(図5D)。第一に、C4-2細胞はmiR-409を発現せず、またC4-2腫瘍細胞は、miR-409を過剰発現しているレンチウイルスで形質導入されなかった。これは、間質細胞からのmiR-409が、外部に分泌され(エキソソーム分泌)、周辺の癌細胞によって取り込まれ、それ故C4-2癌細胞内に加速された腫瘍成長が存在しているという可能性があることを示唆する。発明者の知る限り、これは、癌進行を促進するような周辺腫瘍に対する侵攻性をもたらす単一のマイクロRNAの間質特異性発現の初めての実証である。これらの結果は、癌関連間質の機能および侵攻性PCaの発症におけるmiR-409の決定的な役割を実証する。腫瘍成長は、前立腺特異性抗原(PSA)および2-M分泌タンパク質等の血清マーカーの分析によって更に確認された。PSAは、癌特異性マーカーであり、C4-2癌細胞単独によって分泌される。2-M分泌は、C4-2/SON-409群で増加される。これらの結果は、SON-409間質細胞が増加した2-Mレベルを有したという生体外研究と一致している。高い血清2-Mレベルは、PCaにおける骨転移のマーカーである(23, 24)。興味深いことに、miR-409発現はまた、癌関連骨間質細胞内でも増加される(図3B)。

20

30

40

【0147】

実施例7

配列

【表1】

miRNAまたは阻害剤	配列(5'-3')	配列番号
miRZIP379	GGATCC GTGGTAGATTATGGAACATAAGCTTCCTGTC AGCCTACGTTCCATAGTCTACCATTTT GAATTC	1
miR379 成熟	ugguagacuauggaacguagg	2
miR379* 成熟	uauguaacaugguccacuaacu	3
miRZIP193b	GGATCC GAACGGCACTCAAAGTCACGATCTCCTGT CAGAGCGGGACTTGAGGGCCAGTTTTTT GAATTC	4
miR193b-成熟	aacuggccucaaagucccgcu	5
miR193b*-成熟	cgggguuuugaggcgagaua	6
miRZIP409-5p	GGATCC GAGGTTACCaGAGCAACTTGCACCTCCTGTC AGTGCAAAGTTGCTCGGGTAACCTTTTT Gaattc	7
miR409-5p 成熟	AGGUUACCCGAGCAACUUUGCAU	8
miR409-3p-成熟	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCCC U	9
miRZIP154	GGATCC GTAGGTTACCGTGTGCATTAGCTTCCTGTC AGCGAAGGCAACACGGATAACCTATTTT GAATTC	10
miR154 成熟配列	uagguuaucgcguguugccuucg	11
miR154* 成熟	aaucauacacgguugaccuauu	12

miRZIPは、前立腺癌細胞の細胞死を引き起こすマイクロRNA阻害剤をコードするDNA（成熟マイクロRNAに対するショートヘアピン型RNA）を指す

成熟は、成熟マイクロRNA配列を指し、癌を引き起こす

*は、相補性マイクロRNA配列を指す

全てのmiRZIPは、特注品である

全ての成熟マイクロRNA構築物は、System Biosciencesから購入する

【0148】

実施例8

前立腺骨成長モデルを、PBS内に懸濁した 1×10^6 ARCapM骨転移性前立腺癌細胞の雄Nu/Nuヌードマウスの両脚への脛骨内注射によって確立した。注射の1週後、マウスを、ビヒクル($n = 5$)またはVivo Morpholino(注射1回あたり12.5mg/kgまたは25nモル)($n = 5$)で一日おきに2週間処置した。Morpholinoの注射の様式は、マウスの尾静脈内の静脈内経路である。腫瘍進行を、骨損傷のX線撮像を用いて測定した。マウスを、第30日目で安楽死させ、組織病理学のために骨を採取した。

【0149】

マイクロRNA、例えば、miR-409-5pのVivo-Morpholinoを用いた標的化は、マウスにおいて、ビヒクルを注入したマウスと比較して骨損傷を低減させると予想される(X線撮像および組織病理学研究の双方による)。

【0150】

10

20

30

40

【表2】

モルホリノアンチセンス標的	モルホリノアンチセンス配列	配列番号
miR379 成熟	5' CGCCTACGTTCCATAGTCTACCATC 3'	13
miR409-5p 成熟	5' GGGTTCACCGAGCAACATTGTCGT 3'	14
miR154* 成熟	5' AGCGAAGGCAACACGGATAACCTAT 3'	15

【0151】

参考文献

1. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med* 2004;350(16):1655-1664.
2. Dakhova O, Ozen M, Creighton CJ, Li R, Ayala G, Rowley D, Ittmann M. Global gene expression analysis of reactive stroma in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(12):3979-3989.
3. Sung SY, Hsieh CL, Law A, Zhau HE, Pathak S, Multani AS, Lim S, Coleman IM, Wu LC, Figg WD, Dahut WL, Nelson P, Lee JK, Amin MB, Lyles R, Johnstone PA, Marshall FF, Chung LW. Coevolution of prostate cancer and bone stroma in three-dimensional coculture: implications for cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 2008;68(23):9996-10003.
4. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, Gorska AE, Dumont N, Shappell S, Washington MK, Neilson EG, Moses HL. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science* 2004;303(5659):848-851.

10

20

5. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 1982;95(1):333-339.
6. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008;14(6):818-829.
7. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 2009;10(10):704-714.
8. Olive V, Jiang I, He L. mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int J Biochem Cell Biol*;42(8):1348-1354. 10
9. Valastyan S, Reinhardt F, Benaich N, Calogrias D, Szasz AM, Wang ZC, Brock JE, Richardson AL, Weinberg RA. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 2009;137(6):1032-1046.
10. White NM, Fatoohi E, Metias M, Jung K, Stephan C, Yousef GM. Metastamirs: a stepping stone towards improved cancer management. *Nat Rev Clin Oncol*;8(2):75-84.
11. Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. *Int J Cancer* 2009;125(6):1407-1413. 20
12. Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, Nenutil R, Vyzula R. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2007;72(5-6):397-402.
13. Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *Rna* 2008;14(3):417-424. 30
14. Peng X, Guo W, Liu T, Wang X, Tu X, Xiong D, Chen S, Lai Y, Du H, Chen G, Liu G, Tang Y, Huang S, Zou X. Identification of miRs-143 and -145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT. *PLoS One*;6(5):e20341.
15. Zhau HY, Chang SM, Chen BQ, Wang Y, Zhang H, Kao C, Sang QA, Pathak SJ, Chung LW. Androgen-repressed phenotype in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(26):15152-15157.
16. Thalmann GN, Anezinis PE, Chang SM, Zhau HE, Kim EE, Hopwood VL, Pathak S, von Eschenbach AC, Chung LW. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res* 1994;54(10):2577-2581. 40

17. Xu J, Wang R, Xie ZH, Odero-Marah V, Pathak S, Multani A, Chung LW, Zhau HE. Prostate cancer metastasis: role of the host microenvironment in promoting epithelial to mesenchymal transition and increased bone and adrenal gland metastasis. *Prostate* 2006;66(15):1664-1673.
18. Shi C, Zhou G, Zhu Y, Su Y, Cheng T, Zhau HE, Chung LW. Quantum dots-based multiplexed immunohistochemistry of protein expression in human prostate cancer cells. *Eur J Histochem* 2008;52(2):127-134.
19. Yang X, Shi C, Tong R, Qian W, Zhau HE, Wang R, Zhu G, Cheng J, Yang VW, Cheng T, Henary M, Strekowski L, Chung LW. Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging. *Clin Cancer Res*;16(10):2833-2844.
20. Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* 2009;9(11):773-784.
21. Xu H, Tomaszewski JM, McKay MJ. Can corruption of chromosome cohesion create a conduit to cancer? *Nat Rev Cancer*;11(3):199-210.
22. Wang J, Ying G, Wang J, Jung Y, Lu J, Zhu J, Pienta KJ, Taichman RS. Characterization of phosphoglycerate kinase-1 expression of stromal cells derived from tumor microenvironment in prostate cancer progression. *Cancer Res*;70(2):471-480.
23. Josson S, Nomura T, Lin JT, Huang WC, Wu D, Zhau HE, Zayzafoon M, Weizmann MN, Gururajan M, Chung LW. beta2-microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer research*;71(7):2600-2610.
- 30
24. Gross M, Top I, Laux I, Katz J, Curran J, Tindell C, Agus D. Beta-2-microglobulin is an androgen-regulated secreted protein elevated in serum of patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(7):1979-1986.
25. Chung LW. The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer surveys* 1995;23:33-42.
26. Chung LW. Fibroblasts are critical determinants in prostatic cancer growth and dissemination. *Cancer metastasis reviews* 1991;10(3):263-274.
- 40
27. Rhee HW, Zhau HE, Pathak S, Multani AS, Pennanen S, Visakorpi T, Chung LW. Permanent phenotypic and genotypic changes of prostate cancer cells cultured in a three-dimensional rotating-wall vessel. *In vitro cellular & developmental biology* 2001;37(3):127-140.

28. Josson S, Matsuoka Y, Chung LW, Zhau HE, Wang R. Tumor-stroma co-evolution in prostate cancer progression and metastasis. *Seminars in cell & developmental biology*;21(1):26-32.

29. Thalmann GN, Rhee H, Sikes RA, Pathak S, Multani A, Zhau HE, Marshall FF, Chung LW. Human prostate fibroblasts induce growth and confer castration resistance and metastatic potential in LNCaP Cells. *European urology*;58(1):162-171.

30. Thalmann GN, Sikes RA, Wu TT, Degeorges A, Chang SM, Ozen M, Pathak S, Chung LW. LNCaP progression model of human prostate cancer: androgen-independence and osseous metastasis. *The Prostate* 2000;44(2):91-103 Jul 101;144(102).

31. Camps JL, Chang SM, Hsu TC, Freeman MR, Hong SJ, Zhau HE, von Eschenbach AC, Chung LW. Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87(1):75-79.

32. Chung LW, Baseman A, Assikis V, Zhau HE. Molecular insights into prostate cancer progression: the missing link of tumor microenvironment. *The Journal of urology* 2005;173(1):10-20.

33. Zhau HE, Odero-Marah V, Lue HW, Nomura T, Wang R, Chu G, Liu ZR, Zhou BP, Huang WC, Chung LW. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human prostate cancer: lessons learned from ARCaP model. *Clinical & experimental metastasis* 2008;25(6):601-610.

【 0 1 5 2 】

本発明の様々な実施形態が発明を実施するための形態において上述される。これらの説明は上の実施形態を直接説明するが、当業者は、本明細書に示され、説明される特定の実施形態に対して修正および/または変形を考案することができることを理解する。本説明の範囲内に入る任意のそのような修正または変形も、本明細書に含まれることが意図される。特に記載されない限り、本明細書および特許請求の範囲における用語および句は、関係する分野（複数可）の者に通常の意味および慣れている意味を与えることが、発明者の意図である。

【 0 1 5 3 】

本願の出願時に出願者に既知の本発明の様々な実施形態の先の説明は、図示および説明の目的のために提示され、またそのためである。本説明は、開示された正確な形態に本発明を網羅することも制限することも意図せず、多くの修正および変形が上記の教示の観点から可能である。記載される実施形態は、本発明の原理およびその実際の用途を説明し、当業者が様々な実施形態において、そして想定される特定の使用に適するように様々な修正を加えて本発明を利用することを可能とするのに役立つ。したがって、本発明は、本発明を行うために開示される特定の実施形態に制限されないものとする。

【 0 1 5 4 】

本発明の特定の実施形態が示され、説明されてきたが、本明細書の教示に基づき、変更および修正は本発明およびその広義の態様から逸脱することなく行うことができ、したがって、付属の特許請求の範囲は、本発明の真の趣旨および範囲内であるように、その範囲内に全てのそのような変更および修正を包含することは当業者には明らかであろう。一般

10

20

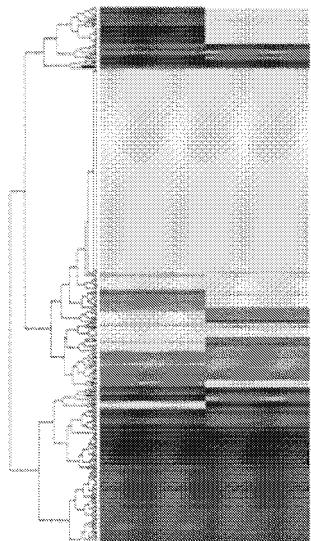
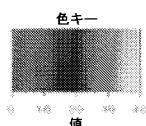
30

40

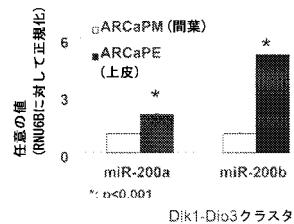
50

に、本明細書で使用される用語は、一般的に、「開放」用語である（例えば、用語「含む（includ-ing）」は、「含むが～に限定されない」と解釈されるべきであり、用語「有する」は、「少なくとも～を有する」と解釈されるべきであり、用語「含む（in clude-s）」は、「含むが～に限定されない」と解釈されるべきである）ことが意図されることを、当業者は理解するだろう。

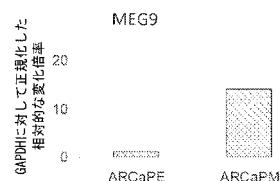
【図1A】

ARCaP_E ARCaP_M

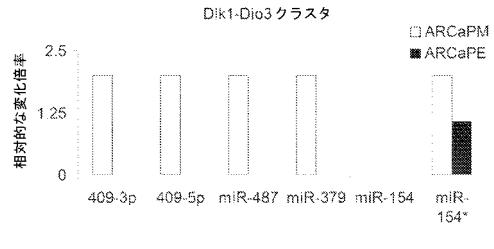
【図1B】



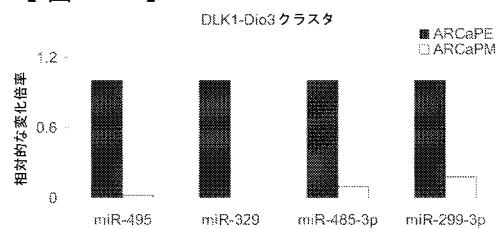
【図1C】



【図1D】



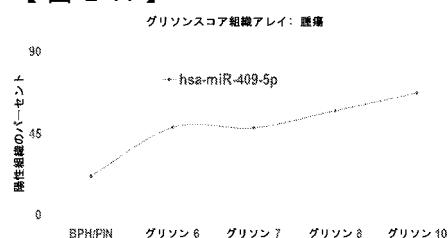
【図 1 E】



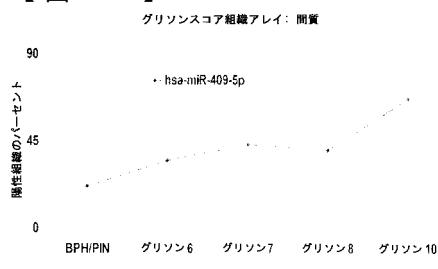
【図 1 F】



【図 2 A】

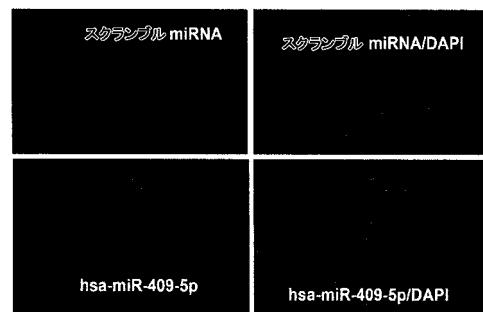


【図 2 B】

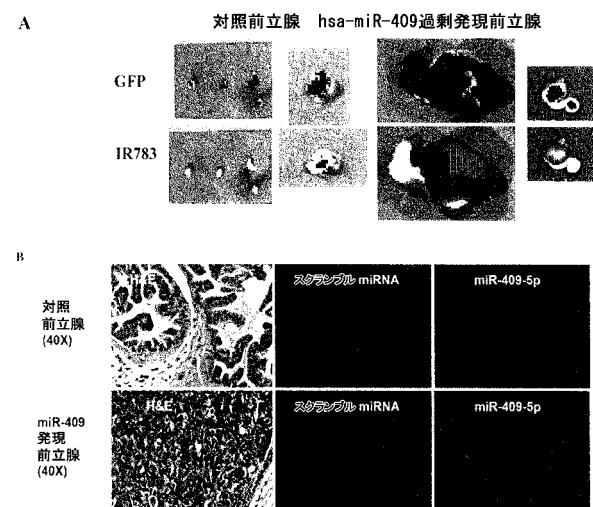


	合計 (N)
BPH/PIN	23
グリソン 6-7	35
グリソン 7-8	24
グリソン 9-10	6

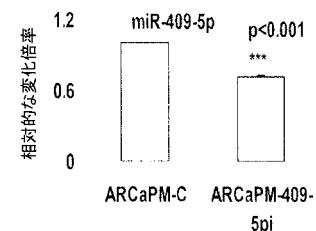
【図 2 C】



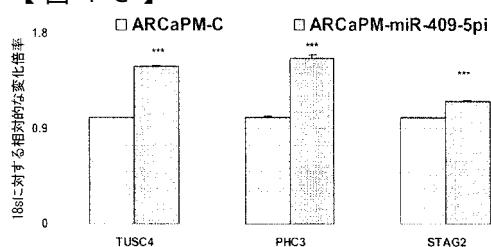
【図 3】



【図 4 B】



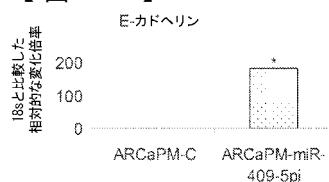
【図 4 C】



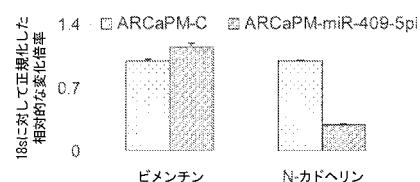
【図 4 D】



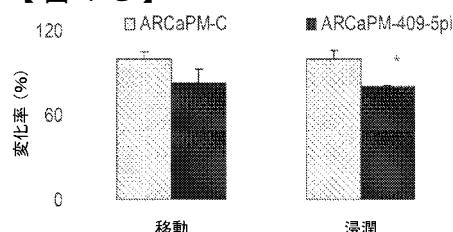
【図4 E】



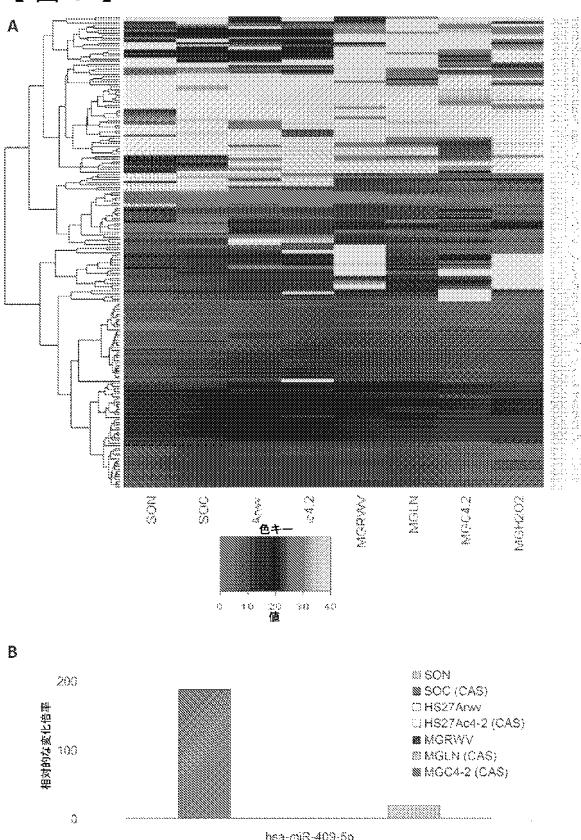
【図4 F】



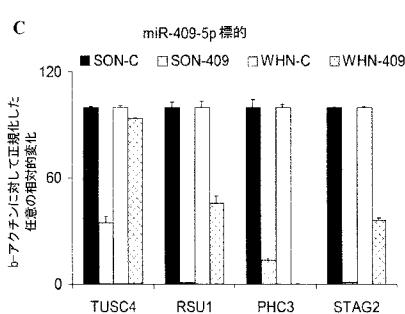
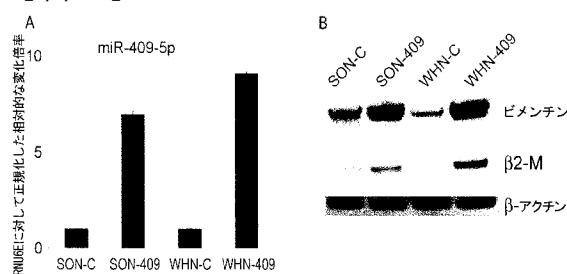
【図4 G】



【図5】



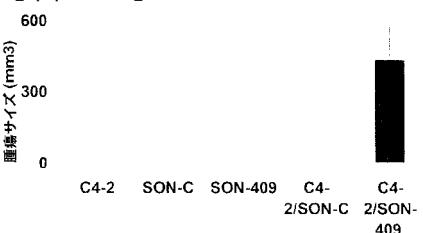
【図6】



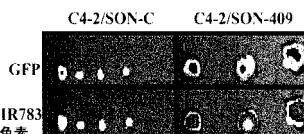
【図7 A】

	腫瘍発生
C4-2	0%
SON-C	0%
SON-409	0%
C4-2/SON-C	0%
C4-2/SON-409	75%

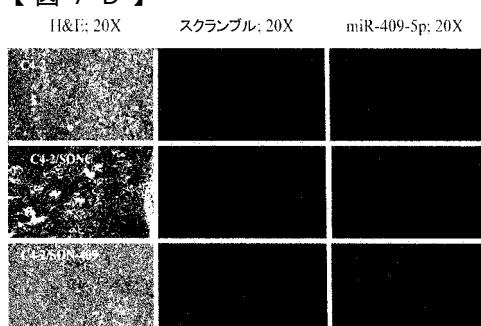
【図7 B】



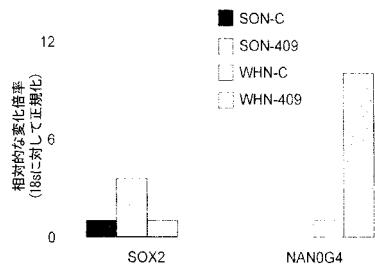
【図7 C】



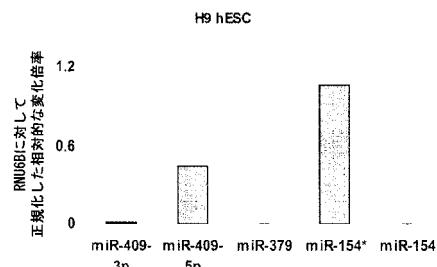
【図7 D】



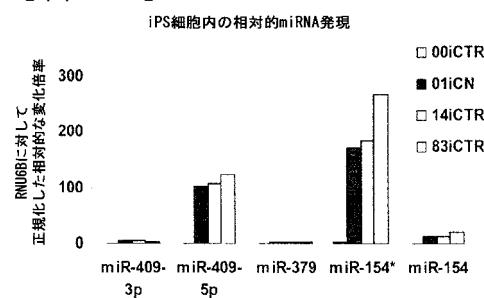
【図 8 A】



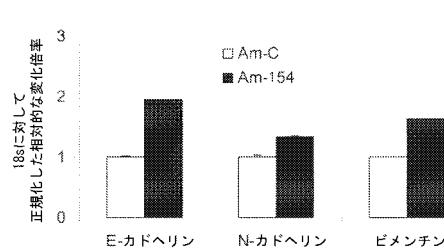
【図 8 B】



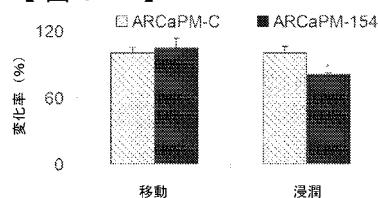
【図 8 C】



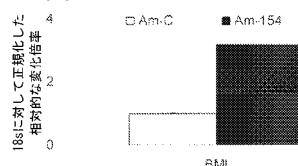
【図 9 D】



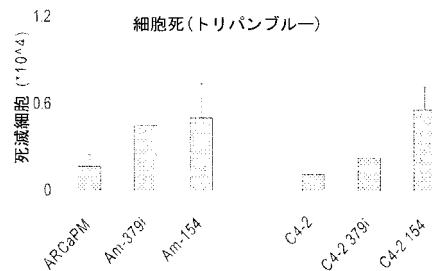
【図 9 E】



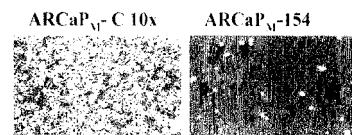
【図 9 F】



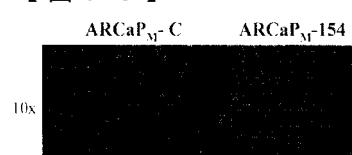
【図 9 A】



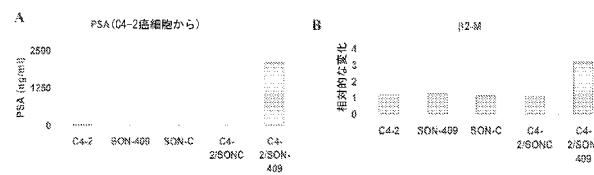
【図 9 B】



【図 9 C】

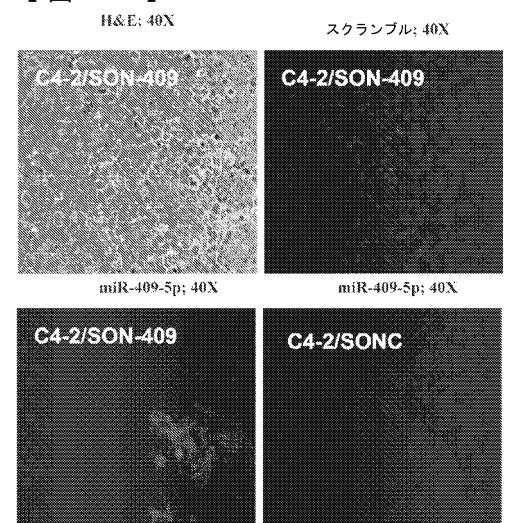


【図 10】

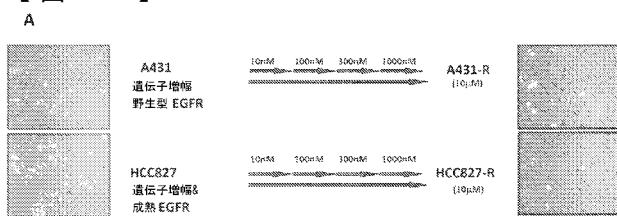


A. 異なる腫瘍/間質群における前立腺特異的抗原 (PSA) の血清検出
B. 異なる腫瘍/間質群における β -2-ミクログロブリン (β 2-M) の血清検出

【図 11】



〔 図 1 2 〕



細胞生存率(対照に対する%)

$\text{TAK-226 } (\mu\text{M})$

A431
A431-R

$\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{M}$

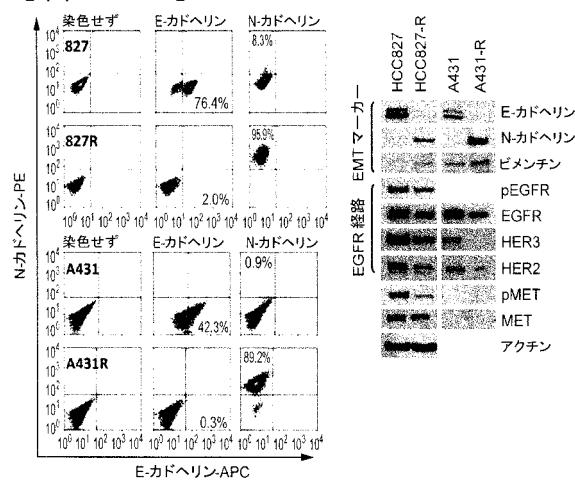
細胞生存率(対照に対する%)

タルセバ(μM)

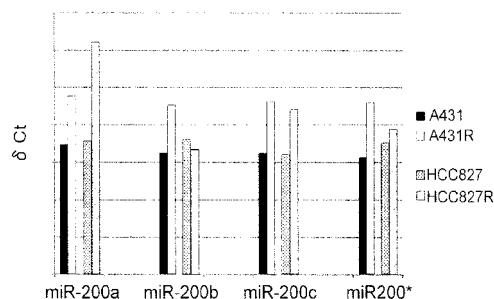
$IC_{50} = 20.4 \text{ nM}$

HCC827
HCC827-R

(义 1 3 B)



【 図 1 4 】



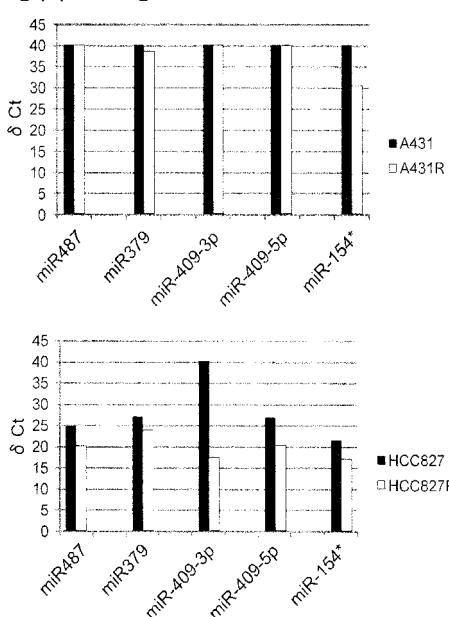
【 13A 】

EGFR-TKI耐性モデルにおけるEMT遺伝子					
	HCC827 R 対 S	A431 R 対 S		HCC827 R 対 S	A431 R 対 S
CDH1	↓	↓	SNAI1	↓	↑
CDH2	↑	↑	SNAI2	↑	↓
VIM	↑	↑	TWIST1	—	↑
S100A4 (FSP1)	↓	↓	ZEB1	↑	↑
ACTA2 (SMA)	↓	↓	ZEB2	↑	↑
TGF β R1	↑	↑	FOXC1	↑	↓
TGF β	↑	↑	FOXC2	↑	↓
GSC	—	NA	TCF3	—	NA
			TCF4	↑	↑
			HEY1	—	NA
			HEY2	—	NA

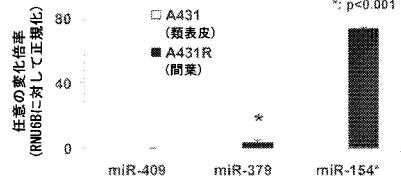
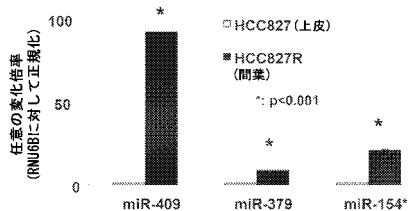
NA = 分析されず

— = R対Sにおける発現において変化なし

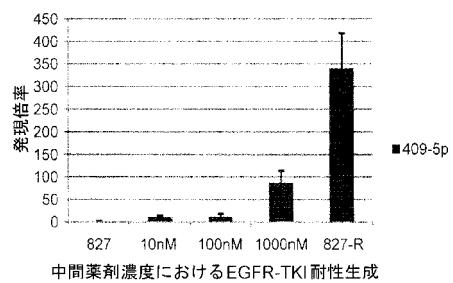
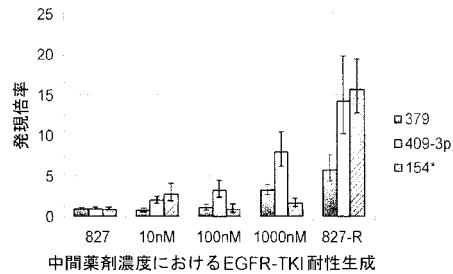
(四 15)



【図16】



【図17】



【図18】

	EGFR-TKI耐性モデルにおける幹細胞性関連遺伝子			
	HCC827 R対S	A431 R対S	HCC827 R対S	A431 R対S
PSCA	—	↓↑	↓↑	↑↑
CD133(PROM1)	↓↑	↓↑	CD90(THY-1)	—
CD10f(ITGA6)	—	↓↑	CD24	↓↑
p63	↓↑	↓↑	FSA	NA NA
Sca-1(ATXN1)	↓↑	↓↑	ABCG2(BCRP)	— —
ALDH1	↑↑	↓↓	ITGA2	↓↓
CD61(ITGB3)	↑↑	↑↑	PECAM	— —
CD29(ITGB1)	↑↑	↑↑	EpCAM (TACSTD1)	↓↓
MUC1	NA	NA	PDX1	↑↑
CD44	↑↑	↑↑	SHH	↑↑
OCT-4	↓↓	—	GLI-1	↑↑

NA = 分析されず

— = R剤Sにおける発現において変化無し

【配列表】

2015504847000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/67403

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC(8) - A61K 31/7088, C12Q 1/68, A61P 35/00 (2013.01)
 USPC - 514/44R; 435/6.14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC(8): A61K 31/7088, C12Q 1/68, A61P 35/00 (2013.01)
 USPC: 514/44R; 435/6.14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 USPC: 435/6.13, 435/6.11

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 PubWEST, PatBase, Google Scholar; Search terms: MIRNA, microRNA, shRNA, siRNA, miR*, expression, cancer or tumor or neoplas* or proliferative, administer*, drug or therap*, respon* or sensitiv*, metasta*, increase, decrease, steady state, Erlotinib, Gefitinib, Apalitinib, cabozantinib, canertinib, crenolanib, dianacanthal, foretinib, fostamatinib,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2008/0261908 A1 (CROCE et al.) 23 October 2008 (23.10.2008); para [0012], [0013], [0015], [0016], [0017], [0018], [0034], [0039], [0081], [0086], [0098], claim 13	1-7, 27, 29, 39, 40
---		9, 28, 30
Y		8
—		
A		
X	US 2007/0065844 A1 (GOLUB et al.) 22 March 2007 (22.03.2007), para [0054], [0130], [0147], [0204], Table 10-b	10-11, 14-15
—		12-13, 28, 30
Y	US 7,709,616 B2 (BENTWICH et al.) 04 May 2010 (04.05.2010); abstract; SEQ ID NO: 16096, Table 3	9
Y	US 2009/0092974 A1 (DAVISON et al.) 09 April 2009 (09.04.2009); para [0051], [0054], [0057], [0145], [0148], [0153]	12-13
A	GenBank ED385484. AUAC-aap88g05.b1 Ascaris suum whole genome shotgun library (PMAG_4 GSS) Ascaris suum genomic, genomic survey sequence, 28 August 2006, [online]. [Retrieved on 2013-03-28]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucgss/ED385484>.	8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
---	--

30 March 2013 (30.03.2013)

19 APR 2013

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/67403

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GenBank FP089691. <i>Sus scrofa</i> chromosome 9 clone CH242-273B10, WORKING DRAFT SEQUENCE, 7 unordered pieces, 22 August 2009, [online]. [Retrieved on 2013-03-28]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FP089691 >.	8
A	GenBank FD724631. CAAA6996.rev CAAA <i>Petromyzon marinus</i> <i>Petromyzon marinus</i> cDNA clone CAAA6996 3-, mRNA sequence, 05 February 2008, [online]. [Retrieved on 2013-03-28]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/FD724631 >.	8
A	GenBank EB330539. CNSN01-F-135479-501 Normalized CNS library (Juvenile 1) <i>Aplysia californica</i> cDNA clone CNSN01-F-135479 5-, mRNA sequence, 07 January 2007, [online]. [Retrieved on 2013-03-28]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/EB330539 >.	8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/67403

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-15, 27-30, and 39-40, drawn to methods and systems for modulating or determining the expression level of miRNA

Group II: Claims 16-20, 31-33, and 41, drawn to methods and systems for modulating or determining the expression level of DLK1-DIO3

Group III: Claims 21-26, 34-38, and 42, drawn to methods and systems for modulating or determining the expression level of MEG9

—please see continuation on extra sheet—

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-15, 27-30, 39-40

Remark on Protest

- | | |
|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. |
| <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. |
| <input type="checkbox"/> | No protest accompanied the payment of additional search fees. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/67403

Continuation of:

Box No. III Observations where unity of Invention is lacking

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Groups II and III do not require a method of treating cancer using a miRNA inhibitor (as recited in claim1) as required by Group I.
 Groups I and III do not require DLK1-DIO3, as required by Group II.
 Groups I and II do not require MEG9, as required by Group III.

A feature shared by Groups I-III is a method (as recited in claims 10, 16, 21, and 25), comprising: obtaining a biological sample from a subject; testing the biological sample for a relative increase, decrease, or steady expression of a marker; and associating a relative increased expression of the marker with metastatic disease state or associating a relative decreased or a steady expression level of marker with a non-metastatic disease state.
 However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is made obvious by US 20090092974 A1 to Davison et al. (published 9 April 2009; hereinafter "Davison"). Davison discloses a method comprising:
 obtaining a biological sample from a subject (para [0054] - "isolating cells from a group of individuals");
 testing the biological sample for a relative increase, decrease, or steady expression of a miRNA (para [0054] - "identifying differentially expressed microRNAs"); and
 associating a relative increase of the miRNA expression level with a lower likelihood of cancer drug responsiveness or associating a relative decrease or a steady expression level of the miRNA with a higher likelihood of drug responsiveness (para [0054] - "a microRNA expression signature is identified associated with . . . response to treatment").
 associating a relative increase of the miRNA expression level with a higher likelihood of having a cancer drug resistant disease state or associating a relative decrease or a steady expression level of the miRNA with cancer drug susceptible disease state (para [0057] - "In one embodiment, the set of marker genes is a chemotherapy resistant versus chemotherapy sensitive marker gene set"), or
 associating a relative increased expression of miRNA with metastatic disease state or associating a relative decreased or a steady expression level of miRNA with a non-metastatic disease state (para [0057] - "In one embodiment, the set of marker genes is a metastatic versus non-metastatic marker gene set."). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

A further feature shared by Groups I-III is a system (as recited in claims 27, 31, 34, and 36), comprising: a biological sample from a subject; and a probe to test the biological sample for a relative increase, decrease, or steady expression of a marker. However, this shared technical feature does not represent a contribution over US 2008/0261908 A1 to Croce et al. (published 23 October 2008; hereinafter "Croce"). Croce discloses a system, comprising: a biological sample from a subject (para [0012] - "breast cancer test sample from a subject"); and a probe to test the biological sample for a relative increase, decrease, or steady expression of a miRNA (para [0012] - "miRNA-specific probe oligonucleotides to provide a hybridization profile for the test sample, and comparing the test sample hybridization profile to a hybridization profile generated from a control sample"). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

A final feature shared by Groups I-III is a method (as recited in claims 39, 41, and 42), comprising: providing a test compound; contacting the test compound with a cell expressing a marker; detecting a relative increase, decrease, or steady expression of the marker; and identifying the test compound as an inhibitor when a relative decrease of the marker expression is detected, or identifying the test compound as an agonist when a relative increase of the marker expression is detected. However, this shared technical feature does not represent a contribution over Croce, which discloses a method, comprising:
 providing a test compound (para [0017]-[0018] - "test agent");
 contacting the test compound with a cell expressing a miRNA (para [0017]-[0018] - "providing a test agent to a cell and measuring the level of at least one miR gene product in the cell"; para [0034]);
 detecting a relative increase, decrease, or steady expression of the miRNA (para [0017]-[0018]); and
 identifying the test compound as an inhibitor (para [0016] - "miR expression inhibition compound") when a relative decrease of the miRNA expression is detected (para [0018] - "A decrease in the level of the miR gene product in the cell, relative to a suitable control cell, is indicative of the test agent being an anti-breast cancer agent.", para [0013] indicating miR inhibitor is anti cancer agent when the cancer cells overexpress miR gene product),
 or identifying the test compound as an agonist (para [0015] - "miR gene product") when a relative increase of the miRNA expression is detected (para [0017] - "An increase in the level of the miR gene product in the cell, relative to a suitable control cell, is indicative of the test agent being an anti-breast cancer agent"; para [0013] indicating miR gene product agonist is anti cancer agent when the cancer cells underexpress miR gene product). As the technical feature was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Groups I-III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 13/08	(2006.01)	A 6 1 P 13/08
A 6 1 P 11/00	(2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 15/00	(2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 K 31/517	(2006.01)	A 6 1 K 31/517
A 6 1 K 31/5377	(2006.01)	A 6 1 K 31/5377
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00
C 1 2 N 9/99	(2006.01)	C 1 2 N 9/99

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74)代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(74)代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光
(74)代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(74)代理人	100129506 弁理士 小林 智彦
(74)代理人	100130845 弁理士 渡邊 伸一
(74)代理人	100114340 弁理士 大関 雅人
(74)代理人	100114889 弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人	100121072 弁理士 川本 和弥
(72)発明者	チュン リーランド ダブリュ. ケイ. アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ビバリーヒルズ サミットリッジ ドライブ 1404
(72)発明者	ジョッソン サジニ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス サウス オグデン ドライブ 464
(72)発明者	グルラジョン ムラリ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス サウス オグデン ドライブ 464
(72)発明者	ジェイン アンジャリ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス サウス ポイント ビュー ストリート 1 444 #104

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 GA11 HA11 HA17
4B029 AA07 BB11 CC02 FA15

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55
QR62 QS32
4C084 AA13 AA19 MA02 NA05 NA14 ZA591 ZA811 ZA961 ZB261 ZB262
ZC202
4C086 AA01 AA02 BC46 BC73 EA16 GA02 GA07 MA01 MA04 NA14
ZB26