



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104080461 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 01

(21) 申请号 201280067969. X

C12Q 1/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 11. 30

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/565, 226 2011. 11. 30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 07. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/067403 2012. 11. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/082499 EN 2013. 06. 06

(71) 申请人 雪松 - 西奈医学中心

地址 美国加利福尼亚州洛杉矶

(72) 发明人 L · W · K · 钟 S · 乔尔森

M · 古鲁拉扬 A · 杰恩

(74) 专利代理机构 北京市浩天知识产权代理事

务所 11276

代理人 刘云贵

(51) Int. Cl.

A61K 31/7088 (2006. 01)

权利要求书4页 说明书28页

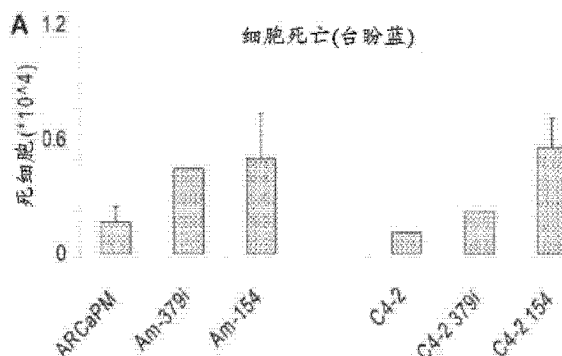
序列表4页 附图23页

(54) 发明名称

靶向微小 RNA MIR-409-5P、MIR-379 和 MIR-154* 来治疗前列腺癌骨转移和耐药性肺癌

(57) 摘要

本发明描述利用例如 miR-409-5p 抑制剂的 miRNA 抑制剂治疗癌症、癌症转移和耐药性癌症的方法。本发明也描述使用 miRNA 作为生物标记物；例如用于预测对癌症药物的反应性，检测癌症的疾病状态的方法。



1. 一种方法,所述方法包括:
提供 miRNA 抑制剂;以及
向需要治疗癌症、需要治疗癌症转移、或需要降低或治疗耐药性癌症的受试者给予所述 miRNA 抑制剂以治疗癌症、治疗癌症转移或降低或治疗耐药性癌症。
2. 如权利要求 1 所述的方法,所述方法进一步包括向所述受试者给予放射治疗或化学疗法的治疗。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述癌症是前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。
4. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 miRNA 抑制剂能够抑制 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 miRNA 抑制剂能够抑制成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 miRNA 抑制剂是针对成熟 miRNA 的 shRNA。
7. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 miRNA 抑制剂是针对成熟 miRNA 的 siRNA。
8. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 miRNA 抑制剂是由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:10 公开的聚核苷酸编码,且给予包括给予所述聚核苷酸。
9. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述 miRNA 抑制剂是能够干扰 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 的表达的 shRNA 或 siRNA。
10. 一种方法,所述方法包括:
从受试者获得生物样本;
测试所述生物样本的 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达;以及
使所述 miRNA 表达水平的相对增加与癌症药物反应性的较低可能性相关联或使所述 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联,
使所述 miRNA 表达水平的相对增加与具有癌症耐药性疾病病况的较高可能性相关联或使所述 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病病况相关联,或
使 DLK1-miRNA 的表达相对增加与转移性疾病病况相关联或使 DLK1-miRNA 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病病况相关联。
11. 如权利要求 10 所述的方法,所述方法进一步包括当检测到药物反应性的可能性较高或癌症药物易感性疾病病况时,选择给予所述受试者的癌症药物。
12. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述药物是酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)。
13. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述 TKI 是埃罗替尼、吉非替尼、阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。
14. 如权利要求 10 所述的方法,其中 miRNA 是 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*、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12。

15. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述癌症是前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、癌症向骨转移、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

16. 一种方法,所述方法包括:

自受试者获得生物样本;

测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇/区域的相对增加、降低或稳定表达;以及

使所述 DLK1-DIO3 簇/区域的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使所述 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联,

使所述 DLK1-DIO3 区域的表达水平相对增加与癌症耐药性疾病病况相关联或使所述 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病病况相关联,或

使所述 DLK1-DIO3 簇/区域的表达相对增加与转移性疾病病况相关联或使 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病病况相关联。

17. 如权利要求 16 所述的方法,所述方法进一步包括当检测到药物反应性的较高可能性或癌症药物易感性疾病病况时,选择给予所述受试者的癌症药物。

18. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述药物是酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述 TKI 是埃罗替尼、吉非替尼、阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

20. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述疾病病况是前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

21. 一种方法,所述方法包括:

从受试者获得生物样本;

测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达;以及

使 MEG9 的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物反应性的较高可能性相关联。

22. 如权利要求 21 所述的方法,所述方法进一步包括当药物反应性的较高可能性时,选择给予所述受试者的癌症药物。

23. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述药物是酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述 TKI 是埃罗替尼、吉非替尼、阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

25. 一种方法,所述方法包括:

从受试者获得生物样本;

测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达;以及

使所述 MEG9 的表达相对增加与转移性疾病病况相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病病况相关联。

26. 如权利要求 25 所述的方法,其中所述疾病病况是前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

27. 一种系统,所述系统包括:

来自受试者的生物样本 ;以及

用以测试所述生物样本的 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达的探针。

28. 如权利要求 27 所述的系统,所述系统进一步包括用于以下的机器 :

使所述 miRNA 表达水平的相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使所述 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物反应性的较高可能性相关联,

使所述 miRNA 表达水平的相对增加与具有癌症耐药性疾病病况的较高可能性相关联或使所述 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病病况相关联,或

使 DLK1-miRNA 的表达相对增加与转移性疾病病况相关联或使 DLK1-miRNA 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病病况相关联。

29. 如权利要求 27 所述的系统,其中 miRNA 是 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*、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12。

30. 如权利要求 28 所述的系统,其中所述癌症或疾病病况是前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

31. 一种系统,所述系统包括 :

来自受试者的生物样本 ;以及

用以测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对增加、降低或稳定表达的探针。

32. 如权利要求 31 所述的系统,所述系统进一步包括用于以下的机器 :

使所述 DLK1-DIO3 簇 / 区域的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使所述 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联,

使所述 DLK1-DIO3 区域的表达水平相对增加与癌症耐药性疾病病况相关联或使所述 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病病况相关联,或

使所述 DLK1-DIO3 簇 / 区域的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

33. 如权利要求 32 所述的系统,其中所述癌症或疾病状态是前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

34. 一种系统,所述系统包括 :

来自受试者的生物样本 ;以及

用以测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达的探针。

35. 如权利要求 34 所述的系统,所述系统进一步包括用以使 MEG9 的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物反应性的较高可能性相关联的机器。

36. 一种系统,所述系统包括 :

来自受试者的生物样本 ;以及

用以测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达的探针。

37. 如权利要求 36 所述的系统,所述系统进一步包括用以使所述 MEG9 的表达相对增加

与转移性疾病状态相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联的机器。

38. 如权利要求 37 所述的系统,其中所述疾病状态是前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

39. 一种方法,所述方法包括:

提供待测试化合物;

使所述待测试化合物与表达 miRNA 的细胞接触;

检测所述 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达;以及

当检测到所述 miRNA 表达的相对降低时鉴定所述待测试化合物为抑制剂,或当检测到所述 miRNA 表达的相对增加时鉴定所述待测试化合物为激动剂。

40. 如权利要求 39 所述的方法,其中 miRNA 是 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*、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12。

41. 一种方法,所述方法包括:

提供待测试化合物;

使所述待测试化合物与表达 DLK1-DIO3 区域的细胞接触;

检测所述 DLK1-DIO3 区域的相对增加、降低或稳定表达;以及

当检测到所述 DLK1-DIO3 区域表达的相对降低时鉴定所述待测试化合物为抑制剂,或当检测到所述 DLK1-DIO3 区域表达的相对增加时鉴定所述待测试化合物为激动剂。

42. 一种方法,所述方法包括:

提供待测试化合物;

使所述待测试化合物与表达 MEG9 的细胞接触;

检测 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达;以及

当检测到 MEG9 表达的相对降低时鉴定待所述测试化合物为抑制剂,或当检测到 MEG9 表达的相对增加时鉴定所述待测试化合物为激动剂。

靶向微小 RNA MIR-409-5P、MIR-379 和 MIR-154* 来治疗前列腺癌骨转移和耐药性肺癌

[0001] 关于联邦资助研究的声明

[0002] 美国政府具有本发明的已付费专利使用权且在有限情况下有权根据如由国立卫生研究所授予的授予号 CA122602 的条款的规定合理条款要求专利所有人许可他人实施本发明。

技术领域

[0003] 本发明涉及微小 RNA 和癌症 ;特别涉及前列腺癌骨转移和耐药性肺癌。

背景技术

[0004] 本文中的所有公布都以引用的方式并入本文,该引用的程度就如同已明确且个别地指示将各个公开出版物或专利申请以引用的方式并入本文一样。以下描述包括可有利于理解本发明的信息。并不承认本文提供的任何信息都是先前技术或与目前要求保护的本发明有关,或并不承认明确或含蓄引用的任何公开出版物是现有技术。

[0005] 竞争 ATP 结合结构域且抑制表皮生长因子受体 (EGFR) 通路的小分子酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 被核准用于治疗化学疗法失效的晚期非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者。对 EGFR-TKI 的反应性最大的 NSCLC 过度表达基因扩增的 EGFR 和 / 或在 EGFR 激酶结构域内的一簇体细胞突变。尽管具有显著临床益处,但大多数患者在 1 年内获得对 EGFR-TKI 的抗性且显示疾病继续进展。鉴定用以在所述患者在采用 EGFR-TKI 中开始进展时鉴定所述患者的非侵袭性生物标记物将极其有用。

[0006] 骨是癌症转移的第二最常见部位,占自前列腺癌和乳腺癌开始的癌症转移的 70% 以上 (1)。在进行或不进行激素疗法、放射疗法、化学疗法和免疫疗法下,晚期癌症患者仍发展骨转移,且当前没有有效治疗法。对骨转移的发病机制的了解仍然不充分。癌症微环境中的基质细胞功能损害被认为是肿瘤进展中的重要步骤。前列腺中邻近于癌细胞的成纤维细胞在结构上以及在功能上不同于前列腺中的正常成纤维细胞 (2, 3)。这些癌症相关成纤维细胞 (CAF) 具有不同于正常成纤维细胞的基因表达谱。癌细胞和基质细胞通过物理接触、可溶性因子和不溶性细胞外基质因子进行相互作用。已显示 CAF 在肿瘤发生中起关键作用。研究显示在小鼠成纤维细胞中丧失转化生长因子- β II 型受体基因导致前列腺中上皮内瘤样病变的形成 (4)。癌细胞转移所依据的机制之一是通过经受上皮向间质转化 (EMT) 来达成。EMT 是一种保守胚胎过程,其中极化不运动上皮细胞向无极运动间质细胞转化 (5)。EMT 与癌症迁移、侵袭和转移相关 (6)。EMT 的普遍特征是 E-钙粘着蛋白损失以及波形蛋白和 N-钙粘着蛋白增加。在癌症中,EMT 使良性肿瘤浸润周围组织且向其它器官转移。

[0007] MiRNA 是具有 18-24 个核苷酸的非编码 RNA,其结合信使 RNA 的 3' 未翻译区域中的互补性位点且抑制它们的翻译 (7)。单一 miRNA 能够靶向若干 mRNA 且调控细胞通路和细胞命运。若干 miRNA 已在癌症中被异常调控,这些 miRNA 中的一些具有致癌性 (oncomiR)

或它们成为肿瘤抑制子发挥功能 (8)。也已显示 miRNA 在转移中起作用且已被称为 ‘转移 MiR(metastamir)’ (9, 10)。已显示一些 miRNA 会促进转移, 如脑癌中的 miR-10b (11)、结肠直肠癌中的 miR-21 (12)、PCa 中的 miR-184 (10, 13)。已描述遏制 PCa 骨转移的少量 miRNA, 如 miR-143、miR-145 和 miR-203 (14)。发明者早先报道放射治疗调节前列腺癌细胞中的微小 RNA 表达且操纵微小 RNA 表达而使癌细胞对放射疗法敏感。近来也已显示一些微小 RNA 会促进或遏制转移。值得注意的是, 近来已显示 miR-200 通过在乳腺癌中直接靶向 E- 钙粘着蛋白转录阻遏子 Zeb1 和 Zeb2 来抑制 EMT 且促进 MET。

[0008] 缺乏针对癌症, 且特别是耐药性癌症的有效治疗法以及骨转移的盛行, 这显示本领域中需要其它疗法以及生物标记物来发现和开发癌症治疗剂。

[0009] 发明概述

[0010] 连同组合物和方法一起描述且说明以下实施方式及其方面, 其意图为示例性和说明性而非限制范围的。

[0011] 本发明的各种实施方式提供一种方法, 所述方法包括: 提供 miRNA 抑制剂; 以及向需要治疗癌症、需要治疗癌症转移、或需要降低或治疗耐药性癌症的受试者给予所述 miRNA 抑制剂以治疗癌症、治疗癌症转移或降低或治疗耐药性癌症。

[0012] 在各种实施方式中, 方法可进一步包括向受试者给予放射治疗或化学疗法治疗。

[0013] 在各种实施方式中, 癌症可为前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

[0014] 在各种实施方式中, miRNA 抑制剂能够抑制 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中, miRNA 抑制剂能够抑制成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。

[0015] 在各种实施方式中, miRNA 抑制剂可为针对成熟 miRNA 的 siRNA。

[0016] 在具体实施方式中, miRNA 抑制剂可为针对成熟 miRNA 的 shRNA。在某些实施方式中, miRNA 抑制剂是由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:10 公开的聚核苷酸编码, 且可包括给予所述聚核苷酸。

[0017] 在各种实施方式中, miRNA 抑制剂可为能够干扰 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 表达的 shRNA 或 siRNA。

[0018] 本发明的各种实施方式提供一种方法, 所述方法包括: 从受试者获得生物样本; 测试所述生物样本的 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达; 以及使所述 miRNA 表达水平的相对增加与癌症药物反应性的较低可能性相关联或使所述 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联, 使所述 miRNA 表达水平的相对增加与具有癌症耐药性疾病状态的较高可能性相关联或使所述 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病状态相关联, 或使 DLK1-miRNA 表达的相对增加与转移性疾病状态相关联或使 DLK1-miRNA 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0019] 在各种实施方式中, 该方法可进一步包括当检测到药物反应性的较高可能性或癌症药物易感性疾病状态时, 选择用以向受试者给予的癌症药物。在各种实施方式中, 药物可为酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)。在各种实施方式中, TKI 可为埃罗替尼 (Erlotinib)、吉非替

尼 (Gefitinib)、阿帕替尼 (Apatinib)、卡博替尼 (Cabozantinib)、卡拉替尼 (Canertinib)、克瑞兰尼 (Crenolanib)、单宁卡 (Damanacanthal)、氟瑞替尼 (Foretinib)、福他替尼 (Fostamatinib)、因特达尼 (Intedanib)、利尼伐尼 (Linifanib)、莫特塞尼 (Motesanib)、木利替尼 (Mubritinib)、瓦他拉尼 (Vatalanib) 或威罗菲尼 (Vemurafenib)。

[0020] 在各种实施方式中, miRNA 可为 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*、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12。

[0021] 在各种实施方式中, 癌症可为前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

[0022] 本发明的各种实施方式提供一种方法, 所述方法包括: 从受试者获得生物样本; 测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对增加、降低或稳定表达; 以及使所述 DLK1-DIO3 簇 / 区域的表达水平的相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使所述 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联, 使所述 DLK1-DIO3 簇 / 区域的表达水平的相对增加与癌症耐药性疾病状态相关联或使所述 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病状态相关联, 或使所述 DLK1-DIO3 簇 / 区域的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0023] 在各种实施方式中, 方法可进一步包括当检测到药物反应性的较高可能性或癌症药物易感性疾病状态时, 选择给予受试者的癌症药物。在各种实施方式中, 药物可为酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)。在各种实施方式中, TKI 可为埃罗替尼、吉非替尼、阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0024] 在各种实施方式中, 疾病状态可为前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

[0025] 本发明的各种实施方式提供一种方法, 所述方法包括: 从受试者获得生物样本; 测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达; 以及使 MEG9 的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物反应性的较高可能性相关联。

[0026] 在各种实施方式中, 方法可进一步包括当药物反应性的较高可能性时, 选择给予受试者的癌症药物。在各种实施方式中, 药物可为酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)。在各种实施方式中, TKI 可为埃罗替尼、吉非替尼、阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0027] 各种实施方式提供一种方法, 所述方法包括: 从受试者获得生物样本; 测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达; 以及使所述 MEG9 的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0028] 在各种实施方式中, 疾病状态可为前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

[0029] 各种实施方式提供一种系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;以及用以测试所述生物样本的 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达的探针。在各种实施方式中,系统可包括用以实现下述关联的机器,使 miRNA 表达水平的相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物反应性的较高可能性相关联,使 miRNA 表达水平的相对增加与具有癌症耐药性疾病状态的较高可能性相关联或使 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病状态相关联,或使 DLK1-miRNA 的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 DLK1-miRNA 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0030] 在各种实施方式中,miRNA 可为 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*、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12。

[0031] 在各种实施方式中,癌症或疾病状态可为前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

[0032] 各种实施方式提供一种系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;以及用以测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇/区域的相对增加、降低或稳定表达的探针。在各种实施方式中,系统可进一步包括用以实现以下关联的机器,使 DLK1-DIO3 簇/区域的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联,使 DLK1-DIO3 区域的表达水平相对增加与癌症耐药性疾病状态相关联或使 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病状态相关联,或使 DLK1-DIO3 簇/区域的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0033] 在各种实施方式中,癌症或疾病状态可为前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

[0034] 各种实施方式提供一种系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;以及用以测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达的探针。在各种实施方式中,系统可进一步包括用以使 MEG9 的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物反应性的较高可能性相关联的机器。

[0035] 各种实施方式提供一种系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;以及用以测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达的探针。在各种实施方式中,系统可进一步包括用以使 MEG9 的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联的机器。

[0036] 在各种实施方式中,疾病状态可为前列腺癌、肺癌、乳腺癌、转移性癌症、向骨转移的癌症、转移性前列腺癌、转移性肺癌或转移性乳腺癌。

[0037] 各种实施方式提供一种方法,所述方法包括:提供待测试化合物;使所述待测试化合物与表达 miRNA 的细胞接触;检测所述 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达;以及当检测到所述 miRNA 表达的相对降低时鉴定所述待测试化合物为抑制剂,或当检测到所述 miRNA 表达的相对增加时鉴定所述待测试化合物为激动剂。

[0038] 在各种实施方式中,miRNA 可为 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*、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12。

[0039] 各种实施方式提供一种方法,所述方法包括:提供待测试化合物;使所述待测试化合物与表达 DLK1-DIO3 区域的细胞接触;检测所述 DLK1-DIO3 区域的相对增加、降低或稳定表达;以及当检测到所述 DLK1-DIO3 区域表达的相对降低时鉴定所述待测试化合物为抑制剂,或当检测到所述 DLK1-DIO3 区域表达的相对增加时鉴定所述待测试化合物为激动剂。

[0040] 各种实施方式提供一种方法,所述方法包括:提供待测试化合物;使所述待测试化合物与表达 MEG9 的细胞接触;检测 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达;以及当检测到 MEG9 表达的相对降低时鉴定所述待测试化合物为抑制剂,或当检测到 MEG9 表达的相对增加时鉴定所述待测试化合物为激动剂。

[0041] 本发明的其它特征和优势将根据连同附图一起进行的以下详细描述而变得显而易见,所述附图举例说明本发明的实施方式的各种特征。

附图说明

[0042] 在参照的图中说明示例性实施方式。本文这里公开的实施方式和附图意图被视为说明性的而非限制性的。

[0043] 图 1 描绘根据本发明的各种实施方式,DLK1-DIO3miRNA 簇中的 miRNA 升高的前列腺癌骨转移性模型的微小 RNA 基因组谱。A. ARCaP_E 和 ARCaP_M 中的整体 miRNA 谱分析的热图。绿色指示低表达,且红色指示高表达。B. 在 ARCaP EMT 模型中的 miR-200 家族 miRNA 表达。C. 在 ARCaP EMT 模型中对长非编码 RNA MEG9 进行的表达分析。D. 相比于 ARCaP_E,miRNA 在转移性间质细胞在 ARCaP_M 中高度表达。E. miRNA 在非转移性 ARCaP_E 细胞中高度表达。F. 相比于 LNCaP 前列腺癌细胞,在 C4-2 前列腺癌细胞中,DLK1-DIO3 簇中的 miRNA 升高。

[0044] 图 2 描绘根据本发明的各种实施方式,使用原位杂交且通过量子点分析进行检测来在格里森 (Gleason) 计分组织阵列中进行的 miR-409-5p 检测。A. miR-409-5p 在肿瘤细胞中的表达与格里森等级。B. miR-409-5p 在基质细胞中的表达与格里森等级。C. 肿瘤和基质中的 miR-409-5p (红色) 表达在 40X 下的代表图。混杂是用作阴性对照。DAPI (蓝色) 用于将核染色。

[0045] 图 3 描绘根据本发明的各种实施方式,miR-409 在前列腺腺体中过度表达会导致肿瘤产生。A. 正常前列腺与 miR-409 表达性前列腺的比较。上部分表示来自含有具有绿色荧光蛋白 (GFP) 的对照质粒或 miR-409 表达性质粒的细胞的绿色荧光。下部分表示 miR-409 表达性前列腺中的肿瘤特异性近红外染料 (IR783) 的摄取。B. H&E 染色正常对照前列腺和 miR-409 表达性前列腺 (40X),随后通过原位杂交和量子点检测 (40X) 对对照和 miR-409 表达性组织的混杂 miRNA 和 miR-409-5p 进行 miRNA 检测。

[0046] 图 4 描绘抑制 miR-409-5p 会导致 EMT 逆转。A. 在 miR-409-5p 抑制剂的短暂转染

之后的 ARCaP_M-C 和 ARCaP_M-409-5p 细胞的活力百分比。B. 通过实时 PCR 测定在 ARCaP_M 前列腺癌细胞中的 miR-409-5p 表达,其中 miR-409-5p 抑制剂相对于 RNU6B 进行标准化。C. 通过实时 PCR 测定的 miR-409-5p 靶向在 ARCaP_M 前列腺癌细胞中的 RNA 表达。miR-409-5p mRNA 的靶标:TUSC4、PHC3 和 STAG2。D. miR-409-5p 抑制的 ARCaP_M 细胞的形态学 EMT 变化;放大倍数 10x。E. 和 F. 通过对 EMT 标记物、E-钙粘着蛋白、波形蛋白和 N-钙粘着蛋白的实时 PCR 测定的 RNA 表达。G. ARCaP_M-C 和 ARCaP_M-409-5pi 细胞的迁移和侵袭测定。

[0047] 图 5 描绘根据本发明的各种实施方式,来自患者和 3 维细胞模型的正常的和癌症相关的基质的微小 RNA 基因组谱分析。A. i. 前列腺以及骨正常成纤维细胞和癌症相关成纤维细胞中的整体 miRNA 谱分析的热图。数值表示 Ct 值,其中绿色指示低表达,且红色指示高表达。SON(患者正常前列腺成纤维细胞)、SOC(患者前列腺癌相关成纤维细胞)、HS-27a_{RWV} 和 MG_{RWV} 是骨基质细胞,HS-27a_{C4-2}、MG_{LN} 和 MG_{C4-2} 是通过 3D 培养获得的骨癌相关基质细胞。MG_{H2O2} 是暴露于过氧化氢的 MG-63 成纤维细胞。ii. 正常和癌症相关基质中的 miR-409-5p 表达水平。

[0048] 图 6 显示根据本发明的各种实施方式,在正常基质细胞中 miR-409 的过度表达会导致成纤维细胞活化。A. 在正常前列腺基质成纤维细胞 SON-C 和 WHN-C 以及 miR-409 表达性细胞 SON-409 和 WHN-409 中 miR-409 的 miRNA 表达水平。B. 正常前列腺基质和 miR-409 过度表达性基质中的波形蛋白、β 2-M 和 β-肌动蛋白(β-actin)的蛋白质表达水平。C. 前列腺基质细胞中靶向于 mRNA 的 miR-409-5p。miR-409-5p 靶标:由 TargetScan 获得的具有 8 聚体匹配种子序列的 PHC3(多同源异形蛋白 3)、TUSC4(肿瘤抑制子 1)、RSU1(Ras 抑制蛋白 1) 和 STAG2(基质抗原 1)。

[0049] 图 7 显示根据本发明的各种实施方式,在正常基质细胞中 miR-409 的过度表达在前列腺癌肿瘤生长中起诱导作用。A. 在裸小鼠中皮下肿瘤注射之后 5 周时的比较不同组的肿瘤发生率。组:C4-2(前列腺癌细胞系)、SON-C(用对照质粒转染的正常前列腺基质细胞)、SON-409(用 miR-409 过度表达质粒转染的正常前列腺基质细胞)、C4-2/SON-C(癌细胞与正常前列腺基质细胞的组合)、C4-2/SON-409(前列腺癌细胞与 miR-409 过度表达的前列腺基质细胞的组合)。B. 在肿瘤注射之后 5 周时不同组的肿瘤尺寸。C. 使用针对基质细胞的绿色荧光成像以及在 C4-2/SON-C 和 C4-2/SON-409 肿瘤中的肿瘤细胞的近红外成像获得的肿瘤图像。D. 使用混杂和 hsa-miR-409-5p miRNA 探针对 C4-2/SON-C 肿瘤和 C4-2/SON-409 肿瘤进行的原位杂交。miRNA 的量子点成像。蓝色:DAPI 对核的染色,红色:hsa-miR-409-生物素探针。

[0050] 图 8 描绘人胚胎干细胞和人诱导多能干细胞中的 miR-409-5p 升高。A. 人胚胎干细胞中的 miR-409 簇成员的 miRNA 表达。B. 诱导多能干细胞中的 miR-409 簇的 miRNA 表达。C. 对正常和 miR-409 过度表达性前列腺基质细胞中的干细胞标记物进行的 mRNA 表达分析。

[0051] 图 9 描绘抑制 miR-154* 和 miR-379 会诱导侵袭性前列腺癌细胞的细胞死亡和 EMT。A. 通过台盼蓝测定用对照、miR-154* 和 miR-379 抑制剂转染的 ARCaP_M 和 C4-2 细胞的细胞死亡,是通过慢病毒转导的。B. 用对照和 miR-154* 抑制剂转染的 ARCaP_M 细胞的图像。C. 用 miR-154 和 miR-379 抑制剂转染的 ARCaP_M 细胞中的 MET。D. E-钙粘着蛋白、N-钙粘着蛋白和波形蛋白在 ARCaP_M-C 和 Am-154 中的 mRNA 表达。E. 在 Am-C 和 AM-154 中的迁

移和侵袭。F.miR-154* 靶向在 Am-C 和 Am-154 细胞中。

[0052] 图 10 描绘根据本发明的各种实施方式,不同肿瘤/基质组中的血清前列腺特异性抗原(PSA)检测,以及不同肿瘤/基质组中的血清 β 2-微球蛋白(β 2-M)检测。

[0053] 图 11 描绘根据本发明的各种实施方式的 H&E 染色和 miRNA 检测。

[0054] 图 12 描绘根据本发明的各种实施方式,在两种独立肺癌模型中产生和证明 EGFR-TKI 获得的耐受性。选择代表着获得的对 EGFR-TKI 的耐受性的 NSCLC 患者的两种细胞系 A431 和 HCC827。A431 具有基因扩增的 EGFR,而 HCC827 具有基因扩增的含有激酶结构域体细胞突变的 EGFR。两种细胞系均对 EGFR TKI 高度敏感。用递增剂量(达到 10mM)的 EGFR-TKI、塔西瓦(TARCEVA)渐进处理细胞系,直至通过细胞活力测定中显示它们获得了对药物的耐受性(A431-R 和 HCC827-R)。

[0055] 图 13 描绘根据本发明的各种实施方式,EGFR-TKI 获得的耐受性会导致上皮向间质转化(EMT)。本文证明获得对 EGFR-TKI 的耐受性的 NSCLC 细胞经受 EMT 的转分化过程。间质细胞中的 EMT 标记物 N-钙粘着蛋白和波形蛋白较高,而上皮细胞中的 E-钙粘着蛋白较高。EMT 转录因子 SNAIL1、SNAIL2、TWIST1、ZEB1、ZEB2 通常在间质细胞中较高。图 13a 概述 EMT 基因、E-钙粘着蛋白(CDH1)、N-钙粘着蛋白(CDH2)、波形蛋白(VIM)、FSP1、SMA、TGFR1、TGFB 以及 EMT 转录因子 SNAIL1、SNAIL2、TWIST1、ZEB1、ZEB2、FOXC1、FOXC2、TCF3、TCF4 的 RNA 分析数据。ZEB1、ZEB2 和 TCF4 在具有间质表型的耐受性细胞中较高。图 13b 显示在耐受性模型中,在蛋白质印迹和流式细胞术分析中,E-钙粘着蛋白降低且 N-钙粘着蛋白增加。这些变化是通过 EMT 现象表示。

[0056] 图 14 显示根据本发明的各种实施方式,miR-200 家族的成员随着 EGFR-TKI 耐受性的获得而减少。筛选总计 330 个微小 RNA(miR)用来鉴定受 EMT 调节的 miR。在 NSCLC EGFR-TKI 获得耐受性模型系统中测试这些 miR 中的 29 个以评估这些 miR 中的哪些 miR 也伴随有 EGFR-TKI 耐受性的获得而进行差异性表达。miR-200 家族成员抑制阻遏 E-钙粘着蛋白的 EMT 转录因子 ZEB1 和 ZEB2。预期它们在上皮细胞中较高,相较于上皮细胞的间质对应物,ZEB1 和 ZEB2 在上皮细胞中的表达较低。相较于两种耐受性模型的药物敏感性对应物显示两种耐受性模型中的 miR 表达且表示为 δ Ct。 δ Ct 值较高表示表达较低,其中 1Ct 值等于 2 倍表达。在 HCC-827R 间质细胞中,miR-200a 和 miR-200c 被下调,而在 A431R 间质细胞中,miR-200a、miR-200b、miR-200c 和 miR-200* 被下调。

[0057] 图 15 显示根据本发明的各种实施方式,miR-379 和 miR-154 家族的成员随着 EGFR-TKI 耐受性的获得而增加。在 EGFR-TKI 耐受性间质 NSCLC 细胞中,miR-379 家族的成员(miR-379)和 miR-154 家族的成员(miR-487、miR-409-3p、miR-409-5p 和 miR-154*)被上调。在 A431R 中,观察到 miR-379(约 4 倍)和 miR-154*(约 20 倍)相较于 A431 增加。在 HCC-827R 中,观察到 miR-379(约 6 倍)、miR-487(约 8-9 倍)、miR-409-3p(>46 倍)、miR-409-5p(约 14 倍)和 miR-154*(约 8 倍)相较于 HCC827 增加。

[0058] 图 16 显示根据本发明的各种实施方式,在中间阶段的耐药性获得中观察到 miR-379 和 miR-154 家族的成员增加。因为 EGFR-TKI 耐药性随药物浓度增加而渐进获得,所以检查在耐药性过程期间产生的中间细胞群体。耐药性的标记物应与耐药性的获得一致且应随耐受性变强而增加。如图 5 中所示,miR-379、409-3p、409-5p 和 154* 随中间 EGFR-TKI 耐受性 TKI 群体而增加(显示中间群体的药物浓度),其中 HCC827R 中的表达最高(在 10mM

EGFR-TKI 下产生的)。

[0059] 图 17 描绘根据本发明的各种实施方式,文献中的证据指示 miR-379 和 miR-154 家族的成员在多能干细胞中增加。也有证据证明在胎儿肺中存在成人肺中丧失的 miR-154 家族成员。

[0060] 图 18 描绘根据本发明的各种实施方式,EGFR-TKI 耐受性 NSCLC 模型中的干性相关基因的概要。在 EGFR-TKI 耐受性系统中询问已表明为其它系统中的癌症干细胞基因的一组基因并显示它们的表达概要。相较于 A431R 系统,在 HCC827R 中,更高数目的干性相关基因被上调。

[0061] 发明描述

[0062] 本文中引用的所有参考文献都以引用的方式整体并入本文,如同全文引用一般。除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解相同的含义。Singleton 等人,Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第 3 版, J. Wiley & Sons (New York, NY2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 第 5 版, J. Wiley & Sons (New York, NY2001); 以及 Sambrook 和 Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY2001) 提供本领域技术人员对本申请中使用的许多术语的常规指导。

[0063] 本领域技术人员将认识到与本文所述的方法和材料类似或等效的许多方法和材料,这些方法和材料都可用于本发明的实践中。实际上,本发明决不限于所述方法和材料。出于本发明的目的,以下术语定义如下。

[0064] “癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中一般以细胞生长不受调控为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于肺癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌、胃癌、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、泌尿道癌、甲状腺癌、肾癌、癌瘤、黑素瘤、头颈部癌和脑癌。

[0065] 如本文所用的“哺乳动物”是指哺乳纲的任何成员,包括,但不限于人和非人灵长类动物,如黑猩猩以及其它猿和猴类;农场动物,如牛、绵羊、猪、山羊和马;家养哺乳动物,如狗和猫;实验室动物,包括啮齿动物,如小鼠、大鼠和豚鼠等。所述术语不表示具体年龄或性别。因此,成年和新生受试者以及胎儿,无论雄性或雌性都意图包括在这个术语的范围内。

[0066] 如本文所用的“治疗”是既指治疗性治疗又指防治性或预防性措施,其中目标在于预防、减缓和/或减轻疾病,即使治疗最终不成功。

[0067] 在本文所述的多种癌症中,微小 RNA 被证明具有致癌性,发明人分析了多种人骨转移性前列腺癌细胞系和前列腺和骨的相关基质中癌症的微小 RNA 表达谱。MiR-409-5p、miR-379 和 miR-154* 在癌细胞与邻近基质两者中均高度表达,且微小 RNA miR-409-5p 在体内具有致癌性,在 EMT 中起重要作用且靶向 miR-409-5p、miR-379 和 miR-154* 会导致前列腺癌细胞的细胞死亡。

[0068] 最大微小 RNA 簇之一在人染色体 14q32 上。它在小鼠中的直系同源区域位于染色体 12 的长臂上。当前已知小鼠和人类中约 10% 的微小 RNA 中位于这个簇中。这个簇位于以涵盖的基因进行亲本来源特异性单等位表达为特征的熟知印记区域内(基因组印记是一种表观遗传的可遗传机制,其中母亲或父亲等位基因被甲基化)。在这个研究中,发明人证

明位于人染色体中的 DLK-DIO3 簇的微小 RNA 成员在骨转移性间质型前列腺癌细胞系中高度表达,所述微小 RNA 成员包括微小 RNA miR-409-5p、miR-379 和 miR-154*。miR-409 在正常前列腺中过度表达导致在小鼠中产生肿瘤且产生的肿瘤自良性增生至腺癌变化。更重要的是,在高格里森计分人前列腺癌组织阵列中,miR-409-5p 表达上调。使用 siRNA 基方法抑制单独 miR-409-5p、miR-379 和 miR-154* 或同时阻断全部三种微小 RNA 在生物化学方面以及在功能上导致细胞死亡增加,上皮向间质转化 (EMT) 的逆转。除癌细胞之外,相较于正常基质,在源于前列腺和骨的癌症相关基质中,miR-409-5p 是显著上调。miR-409 在正常基质中的异位表达导致基质转化成癌症相关基质,且与侵袭性较小的癌细胞共同注射的 miR-409 表达性基质使体内出现爆发性肿瘤生长。这是在体内在前列腺癌中存在致癌性微小 RNA 的首个被证明的证据。因此,miR-409-5p 似乎是一种有希望治疗靶标,用以抑制前列腺癌中涉及双向肿瘤基质相互作用的恶性循环。

[0069] 发明人理解的肿瘤微环境的最新进展,这已提供针对癌症药物的发现方法的根本变化的新机遇。除靶向癌细胞之外,还需要集中于为已由新近研究证明会促进癌症生长的癌细胞周围的细胞(包括基质细胞)所必需的新型分子靶标和通路。癌症微环境中的基质细胞功能损害被认为是肿瘤进展中的重要步骤。此外,除癌细胞之外,共靶向的基质细胞也将导致对癌细胞的更佳杀伤。已证明纤维肌性基质和基质成纤维细胞在前列腺发育和前列腺癌发生中起调控作用。在这些研究中,显示泌尿生殖窦间质 (UGM) 或胚胎 / 成熟基质成纤维细胞会驱动 UG 上皮和前列腺癌的生长 (25)。这些研究首次表明来自基质的雄激素受体信号传导对正常前列腺上皮的发育和分化至关重要 (25, 26)。使用细胞重组研究,前列腺癌自雄激素依赖性状态进展至雄激素非依赖性状态以及随后进展至骨转移性表型可在体内通过小鼠中前列腺癌与前列腺或骨基质细胞之间的细胞相互作用来实现或在三维 (3D) 条件下共培养时实现 (27)。已确定邻近于癌症组织或癌症相关成纤维细胞 (CAF) 的成纤维细胞在结构上以及在功能上不同于邻近于正常上皮的成纤维细胞。这些细胞在基因表达谱方面展现显著差异且已显示其可预测前列腺癌的进展 (28)。发明人先前证明在前列腺癌与来自不同地带来源的 CAF 或基质成纤维细胞之间存在交互细胞的相互作用 (27)。这些研究结果一起强调基质和肿瘤微环境在前列腺癌进展中具有重要作用 (16, 29-31)。这些研究强调肿瘤-基质在癌症进展中的双向相互作用和共进化 (32)。靶向许多基质因子的疗法已在临床前模型中和 / 或在临床试验中用以治疗前列腺癌和其它实体肿瘤得以成功测试。

[0070] EMT 是一种高度保守的过程,在这个过程中,极化不运动上皮细胞向运动间质细胞转变。EMT 通常与癌症迁移、侵袭和转移相关。EMT 的共同特征是 E- 钙粘着蛋白缺失以及波形蛋白的增加。在癌症中,EMT 促进良性肿瘤浸润周围组织且向软组织和骨转移。在前列腺癌中,EMT 已描述在雄激素难治性前列腺癌 (ARCaP) 细胞模型中的 (3, 17, 23, 28, 33)。显示前列腺癌细胞系和临床样本会表达 RANKL 且分泌可溶性因子,如 β 2M,所述 β 2M 不仅负责驱动人前列腺癌细胞的 EMT 和骨转移,而且也通过促进人乳腺癌细胞、肾癌细胞和肺癌细胞中的 EMT 和骨转移来发挥相同作用。所得的 ARCaP_M 细胞具有高水平的间质标记物如波形蛋白、N- 钙粘着蛋白和 Snail,且在心内注射时表现 100% 的骨转移发生率。

[0071] 总之,发明人提供证据表明致癌性的介导对成纤维细胞中的基因表达调控的微小 RNA miR-409-5p 差异性影响上皮生长和肿瘤发生。先前研究已指示如 TGF- β 的分泌因子和它在基质细胞中通过它的受体的信号传导会影响邻近上皮的癌发生过程。发明人的研究

确定了基因表达的转录后调控子（微小 RNA）的作用是可遏制肿瘤抑制基因并活化基质细胞中的如 β 2- 微球蛋白的多效性生长因子，且因此可在体内对邻近上皮细胞产生影响。癌症的表型的范围前列腺上皮内瘤变至腺癌。惊人的是，转移性前列腺癌细胞也 miR-409-5p，且抑制其会导致细胞死亡。除 miR-409-5p 之外，靶向 DLK-DIO3 簇的其它成员，包括 miR-379 和 miR-154*，这似乎是用以抑制前列腺癌中涉及双向肿瘤基质相互作用的恶性循环的一种有希望的治疗靶标。

[0072] 本发明的各种实施方式至少部分基于本文所述的发明人的研究结果。

[0073] 治疗

[0074] 本发明的各种实施方式提供一种治疗有需要受试者癌症的方法，所述方法包括提供 miRNA 抑制剂以及向所述受试者给予所述 miRNA 抑制剂。

[0075] 本发明的各种实施方式提供一种治疗有需要的受试者的癌症转移的方法，所述方法包括提供 miRNA 抑制剂以及向所述受试者给予所述 miRNA 抑制剂。

[0076] 本发明的各种实施方式提供一种降低或治疗有需要受试者癌症耐药性的方法，所述方法包括提供 miRNA 抑制剂以及向所述受试者给予所述 miRNA 抑制剂。

[0077] 本发明的各种实施方式提供一种治疗有需要受试者癌症的方法，所述方法包括提供 miRNA 抑制剂，并且将所述 miRNA 抑制剂与放射治疗或化学疗法治疗组合给予所述受试者。

[0078] 在某些实施方式中，癌症是前列腺癌。在某些实施方式中，癌症是肺癌。在某些实施方式中，癌症是乳腺癌。在某些实施方式中，癌症是转移性癌症。在某些实施方式中，转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中，癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中，癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中，癌症是转移性乳腺癌。

[0079] 在各种实施方式中，miRNA 抑制剂能够抑制 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在某些实施方式中，miRNA 抑制剂能够抑制成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中，miRNA 抑制剂能够抑制成熟 miR-379、miR-193b、miR-409-5p、miR-409-3p 或 miR-154*。

[0080] 在某些实施方式中，miRNA 抑制剂是能够干扰 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 表达的 shRNA 或 siRNA。在具体实施方式中，miRNA 抑制剂是能够干扰 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:12 表达的 shRNA 或 siRNA。

[0081] 在某些实施方式中，miRNA 抑制剂是针对成熟 miRNA 的短发夹 RNA (shRNA)。在某些实施方式中，shRNA 是由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:10 公开的聚核苷酸编码的。可向受试者给予包含例如呈质粒形式的聚核苷酸的组合物，所述聚核苷酸包含或者如 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:10 或由 SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:7 或 SEQ ID NO:10 所示。此后，在给予聚核苷酸之后，shRNA 在体内表达，且抑制其靶向的 miRNA 序列。

[0082] 在某些实施方式中，miRNA 抑制剂是针对成熟 miRNA 的 siRNA。在各种实施方式中，siRNA 如 SEQ ID NO:3 (用以靶向且抑制 miRNA379)、SEQ ID NO:6 (用以靶向且抑制 miRNA193b) 或 SEQ ID NO:11 (用以靶向且抑制 miRNA154*) 公开的所示。

[0083] 在各种实施方式中,miRNA 抑制剂是能够干扰 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 的表达的咪啉代反义寡核苷酸。在具体实施方式中,miRNA 抑制剂是能够干扰 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:12 表达的咪啉代反义寡核苷酸。在各种实施方式中,咪啉代反义寡核苷酸如 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:15 公开所示。

[0084] 在各种实施方式中,本发明提供包括药学上可接受的赋形剂以及治疗有效量的 miRNA 抑制剂的药物组合物。“药学上可接受的赋形剂”是指适用于制备药物组合物的通常安全、无毒且合乎需要的赋形剂,且包括可为兽医学用途以及人医药用途所接受的赋形剂。这种赋形剂可为固体、液体、半固体,或在气雾剂组合物的情况下可为气体。

[0085] 在各种实施方式中,本发明的药物组合物可被配制来通过任何给药途径进行递送。“给药途径”可指本领域中已知的任何给药路径,包括但不限于气雾剂、经鼻、经口、经粘膜、经皮或胃肠外给药。“经皮”给药可使用表面霜剂或软膏剂达成或借助于经皮贴片实现。

[0086] “胃肠外”是指通常与注射相关的给药途径,包括眶内、输注、动脉内、囊内、心内、皮内、肌肉内、腹膜内、肺内、脊椎内、胸骨内、鞘内、子宫内、静脉内、蛛网膜下、囊下、皮下、经粘膜或经气管。通过胃肠外途径,组合物可以以溶液或混悬液形式用于输注或用于注射,或以冻干粉末形式。

[0087] 通过肠内途径,药物组合物可呈片剂、凝胶胶囊剂、糖包衣片剂、糖浆剂、混悬剂、溶液剂、粉剂、颗粒剂、乳剂、允许控制释放的微球体或纳米球体或脂质囊泡或聚合物囊泡的形式。通过胃肠外途径,组合物可以是用于输注或用于注射的溶液剂或混悬剂形式。

[0088] 通过局部途径,基于本发明的化合物的药物组合物可被配制来治疗皮肤和粘膜,且以软膏剂、霜剂、乳剂、油膏剂、粉剂、浸渍垫、溶液剂、凝胶剂、喷雾剂、洗剂或混悬剂形式。它们也可以以允许控制释放的微球体或纳米球体或脂质囊泡或聚合物囊泡或聚合物贴片和水凝胶形式。根据临床适应症,这些局部给药途径的组合物可以是无水形式或水溶液形式。通过经眼途径,它们可以以滴眼剂形式。

[0089] 本发明的药物组合物也可含有任何药学上可接受的载体。如本文所用的“药学上可接受的载体”是指药学上可接受的物质、组合物或媒介物,其将目标化合物从身体的一种组织、器官或部分携带或运送至身体的另一组织、器官或部分。举例而言,载体可为液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或囊封材料或其组合。载体的各组分必须是“药学上可接受的”,因为它必须可与制剂的其它成分相容。它也必须适合于可能与之接触的任何组织或器官的接触,这意味它必须在毒性、刺激、过敏反应、免疫原性或过度胜于它的治疗益处的任何其它并发症的风险。

[0090] 本发明的药物组合物也可被囊封、压片或制成乳剂或糖浆剂形式用以口服给药。可添加药学上可接受的固体或液体载体用以增强或稳定化组合物,或有助于组合物的制备。液体载体包括糖浆、花生油、橄榄油、甘油、生理食盐水、醇和水。固体载体包括淀粉、乳糖、硫酸钙、二水合物、白土、硬脂酸镁或硬脂酸、滑石、果胶、阿拉伯胶、琼脂或明胶。载体还可包括持续释放物质,如单独或与蜡组合的单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0091] 药物制剂的制备遵循常规制药技术进行,所述技术涉及研磨、混合、粒化以及,针对片剂形式必要时压片(针对片剂形式);或研磨、混合和针对硬质明胶胶囊形式进行填

充。当使用液体载体时,制剂将以糖浆、酏剂、乳剂或水性或非水性混悬液形式。所述液体制剂可直接口服给予或填充至软质明胶胶囊中。

[0092] 本发明的药物组合物可以以治疗有效量进行递送。精确的治疗有效量是就在给定受试者中的治疗功效而言,组合物将产生最有效结果的那个量。这个量将视多种因素而变化,所述因素包括但不限于治疗化合物的特征(包括活性、药物代谢动力学、药效学和生物利用度)、受试者的生理状况(包括年龄、性别、疾病类型和阶段、一般身体状况、对给定剂量的反应性和药物类型)、制剂中一种或多种药学上可接受的载体的性质以及给药途径。临床和药理学领域的技术人员将能够通过常规实验,例如通过监测受试者对给予化合物的反应以及相应调整剂量来确定治疗有效量。对于其它指导,参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy(Gennaro 编第 20 版,Williams & Wilkins PA,USA) (2000)。

[0093] 生物标记物

[0094] 本发明的各种实施方式提供使用 miRNA、DLK1-DIO3 区域和 MEG9 作为癌症和 / 或癌症相关组织的生物标记物。

[0095] 因此,本发明的各种实施方式提供一种预测对癌症药物的反应性的方法,所述方法包括:从受试者获得生物样本;测试所述生物样本的 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达;以及使所述 miRNA 表达水平的相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使所述 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联。在各种实施方式中,方法进一步包括当预测药物反应性的可能性较高时,选择用以向受试者给予的癌症药物。在进一步的实施方式中,所述方法包括向受试者给予所选癌症药物。

[0096] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼(塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0097] 在各种实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-193b、miR-409-5p、miR-409-3p 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有如由 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有如由 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。

[0098] 在具体实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有如由 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有如由 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。

[0099] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方

式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0100] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的方法,所述方法包括:从受试者获得生物样本;测试所述生物样本的 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达;以及使所述 miRNA 表达水平的相对增加与具有癌症耐药性疾病状态的较高可能性相关联或使所述 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病状态相关联。在各种实施方式中,该方法进一步包括当检测到癌症药物易感性疾病状态时,选择用以向受试者给予的癌症药物。在其它实施方式中,该方法包括向受试者给予所选癌症药物。

[0101] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼(塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0102] 在各种实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-193b、miR-409-5p、miR-409-3p 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。

[0103] 在具体实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有如由 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。

[0104] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0105] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的方法,所述方法包括:从受试者获得生物样本;测试所述生物样本的 DLK1-miRNA 的相对增加、降低或稳定表达;以及使所述 miRNA 的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 DLK1-miRNA 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0106] 在各种实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-193b、miR-409-5p、miR-409-3p 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ

ID NO:12 公开的序列。

[0107] 在某些实施方式中,转移性疾病状态是骨转移。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0108] 本发明的各种实施方式提供一种预测对癌症药物的反应性的方法,所述方法包括:从受试者获得生物样本;测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇/区域的相对增加、降低或稳定表达;以及使所述 DLK1-DIO3 簇/区域的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使所述 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联。在各种实施方式中,方法进一步包括当检测到药物反应性的可能性较高时,选择用以向受试者给予的癌症药物。在其它实施方式中,方法包括向受试者给予所选癌症药物。

[0109] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼(塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0110] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0111] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的方法,所述方法包括:从受试者获得生物样本;测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇/区域的相对增加、降低或稳定表达;以及使所述 DLK1-DIO3 簇/区域的表达水平相对增加与癌症耐药性疾病状态相关联或使所述 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病状态相关联。在各种实施方式中,方法进一步包括当检测到癌症药物易感性疾病状态时,选择用以向受试者给予的癌症药物。在其它实施方式中,方法包括向受试者给予所选癌症药物。

[0112] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼(塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0113] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0114] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的方法,所述方法包括:自受试者获得生物样本;测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇/区域的相对增加、降低或稳定表达;以及使所述 DLK1-DIO3 簇/区域的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0115] 在某些实施方式中,转移性疾病状态是骨转移。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺

癌。

[0116] 本发明的各种实施方式提供一种预测对癌症药物的反应性的方法,所述方法包括:自受试者获得生物样本;测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达;以及使 MEG9 的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联。在各种实施方式中,方法进一步包括当检测到药物反应性的可能性较高时,选择用以向受试者给予的癌症药物。在其它实施方式中,方法包括向受试者给予所选癌症药物。

[0117] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼 (塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0118] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0119] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的方法,所述方法包括:自受试者获得生物样本;测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达;以及使所述 MEG9 的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0120] 在某些实施方式中,转移性疾病状态是骨转移。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0121] 系统

[0122] 本发明的各种实施方式提供一种预测对癌症药物的反应性的系统,所述系统包括:从受试者获得的生物样本;用以测试所述生物样本的 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达的检测探针。在各种实施方式中,系统进一步包括实现以下关联的机器 (例如电脑),使 miRNA 表达水平的相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联。

[0123] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼 (塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0124] 在各种实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-193b、miR-409-5p、miR-409-3p 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ

ID NO:12 公开的序列。

[0125] 在具体实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。

[0126] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0127] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;用以测试所述生物样本的 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达的检测探针。在各种实施方式中,系统进一步包括实现以下关联的机器(例如电脑),使 miRNA 表达水平的相对增加与具有癌症耐药性疾病状态的较高可能性相关联或使 miRNA 的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病状态相关联。

[0128] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼(塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0129] 在各种实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-193b、miR-409-5p、miR-409-3p 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。

[0130] 在具体实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。

[0131] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0132] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;用以测试所述生物样本的 DLK1-miRNA 的相对增加、降低或稳定表达的检测探针。在各种实施方式中,系统进一步包括用以实现以下关联的机器

(例如电脑),使 miRNA 的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 DLK1-miRNA 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0133] 在各种实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和 / 或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-193b、miR-409-5p、miR-409-3p 和 / 或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。

[0134] 在某些实施方式中,转移性疾病状态是骨转移。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0135] 本发明的各种实施方式提供一种预测对癌症药物的反应性的系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;用以测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对增加、降低或稳定表达的检测探针。在各种实施方式中,系统进一步包括用以实现以下关联的机器(例如电脑),使 DLK1-DIO3 簇 / 区域的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联。

[0136] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼(塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0137] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0138] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;用以测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对增加、降低或稳定表达的检测探针。在各种实施方式中,系统进一步包括用以实现以下关联的机器(例如电脑),使 DLK1-DIO3 区域的表达水平相对增加与癌症耐药性疾病状态相关联或使 DLK1-DIO3 簇 / 区域的相对降低或稳定表达水平与癌症药物易感性疾病状态相关联。

[0139] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼(塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0140] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方

式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0141] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;用以测试所述生物样本的 DLK1-DIO3 簇/区域的相对增加、降低或稳定表达的检测探针。在各种实施方式中,系统进一步包括用以实现以下关联的机器(例如电脑),使 DLK1-DIO3 簇/区域的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 DLK1-DIO3 簇/区域的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0142] 在某些实施方式中,转移性疾病状态是骨转移。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0143] 本发明的各种实施方式提供一种预测对癌症药物的反应性的系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;用以测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达的检测探针。在各种实施方式中,系统进一步包括用以实现以下关联的机器(例如电脑),使 MEG9 的表达水平相对增加与药物反应性的较低可能性相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与药物反应性的较高可能性相关联。

[0144] 在各种实施方式中,癌症药物是酪氨酸激酶抑制剂(TKI)。在某些实施方式中,TKI 是 EGFR-TKI。在具体实施方式中,EGFR-TKI 是埃罗替尼(塔西瓦)。在具体实施方式中,TKI 是吉非替尼。在某些实施方式中,TKI 是阿帕替尼、卡博替尼、卡拉替尼、克瑞兰尼、单宁卡、氟瑞替尼、福他替尼、因特达尼、利尼伐尼、莫特塞尼、木利替尼、瓦他拉尼或威罗菲尼。

[0145] 在某些实施方式中,癌症是前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是肺癌。在某些实施方式中,癌症是乳腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性癌症。在某些实施方式中,转移性癌症是向骨转移的癌症。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0146] 本发明的各种实施方式也提供一种检测受试者的癌症的疾病状态的系统,所述系统包括:来自受试者的生物样本;用以测试所述生物样本的 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达的检测探针。在各种实施方式中,系统进一步包括用以实现以下关联的机器(例如电脑),使 MEG9 的表达相对增加与转移性疾病状态相关联或使 MEG9 的相对降低或稳定表达水平与非转移性疾病状态相关联。

[0147] 在某些实施方式中,转移性疾病状态是骨转移。在某些实施方式中,癌症是转移性前列腺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性肺癌。在某些实施方式中,癌症是转移性乳腺癌。

[0148] 关于本发明的方法和系统,miRNA、DLK1-miRNA、DLK1-DIO3 簇/区域或 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达是相对于对照(例如确定的对照、非癌性生物样本、相同类型的非癌性生物样本(例如将非癌性肺组织作为对照,相对于癌性肺组织作为待测试的生物制品))而言。

[0149] 关于本发明的方法和系统的受试者是患有癌症、怀疑患有癌症、诊断有癌症或正罹患癌症的受试者。癌症的实例如在本文描述的。

[0150] 关于本发明的方法和系统的生物样本的实例包括但不限于哺乳动物体液、如血液(包括全血以及它的血浆和血清)的血清、CSF(脊髓液)、尿、汗、唾液、泪、肺分泌液、乳房吸出物、前列腺液、精液、粪便、子宫颈刮擦物、囊肿、羊水、眼内液、粘液、呼吸中的水分、动

物组织、细胞溶解产物、肿瘤组织、毛发、皮肤、颊刮擦物、甲、骨髓、软骨、蛋白感染素、骨粉、耳垢等或甚至来自外部或存档来源,如肿瘤样本(即新鲜、冷冻或石蜡包埋的肿瘤样本)。

[0151] 用于本发明的系统或方法中的检测探针的实例包括核酸、抗体、与 miRNA、DLK1-miRNA、DLK1-DIO3 簇/区域或 MEG9 反应的底物。在各种实施方式中,检测探针包含用以产生信号以便检测 miRNA、DLK1-miRNA、DLK1-DIO3 簇/区域或 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达的标记。在各种实施方式中,检测探针在芯片、微阵列或凝胶中。

[0152] 药物筛选

[0153] 本发明的各种实施方式提供一种筛选 miRNA 的抑制剂或激动剂的方法,所述方法包括:提供待测试化合物;使所述待测试化合物与表达 miRNA 的细胞接触;检测所述 miRNA 的相对增加、降低或稳定表达;以及当检测到所述 miRNA 表达的相对降低时鉴定所述待测试化合物为抑制剂,当检测到所述 miRNA 表达的相对增加时鉴定所述待测试化合物为激动剂。

[0154] 在各种实施方式中,miRNA 是 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和/或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-379*、miR-193b、miR-193b*、miR-409-5p、miR-409-3p、miR-154 和/或 miR-154*。在具体实施方式中,miRNA 是成熟 miR-379、miR-193b、miR-409-5p、miR-409-3p 和/或 miR-154*。在各种实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。在具体实施方式中,miRNA 具有 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9 或 SEQ ID NO:12 公开的序列。

[0155] 本发明的各种实施方式提供一种筛选 DLK1-DIO3 区域的抑制剂或激动剂的方法,所述方法包括:提供待测试化合物;使所述待测试化合物与表达所述 DLK1-DIO3 区域的细胞接触;检测所述 DLK1-DIO3 区域的相对增加、降低或稳定表达;以及当检测到所述 DLK1-DIO3 区域表达的相对降低时鉴定所述待测试化合物为抑制剂,当检测到所述 DLK1-DIO3 区域表达的相对增加时鉴定所述待测试化合物为激动剂。

[0156] 本发明的各种实施方式提供一种筛选 MEG9 的抑制剂或激动剂的方法,所述方法包括:提供待测试化合物;使所述待测试化合物与表达 MEG9 的细胞接触;检测 MEG9 的相对增加、降低或稳定表达;以及当检测到 MEG9 表达的相对降低时鉴定所述待测试化合物为抑制剂,当检测到 MEG9 表达的相对增加时鉴定所述待测试化合物为激动剂。

[0157] 本发明也涉及用于实施本发明的各种实施方式的试剂盒。所述试剂盒是包括至少一种本发明组合物的材料或组分的集合体。因此,在一些实施方式中,试剂盒含有包括如上所述的 miRNA 抑制剂的组合物。在其它实施方式中,试剂盒含有包括用于各种诊断、预后、预测和/或检测方法和系统的探针的组合物。

[0158] 本发明试剂盒中配置的组分的确切种类取决于所述试剂盒的预定目的。举例而言,一些实施方式被配置来达成治疗癌症的目的。在一个实施方式中,试剂盒被具体配置来达成治疗哺乳动物受试者的目的。在另一实施方式中,试剂盒被具体配置来达成治疗人受试者的目的。在其它实施方式中,试剂盒被配置来用于治疗例如但不限于农场动物、家养动物和实验室动物的受试者的兽医学应用。

[0159] 在试剂盒中可包括使用说明书。“使用说明书”通常包括描述在使用试剂盒的组分

来实现所需结果如抑制癌症转移时采用的技术的明确表述。任选地,试剂盒也含有其它有用组分,如稀释剂、缓冲剂、药学上可接受的载体、注射器、导管、给药器、移液工具或测量工具、绑扎材料或如将易于由本领域技术人员认识到的其它有用附件。

[0160] 可向从业者提供试剂盒中组装的材料或组分,将其以保持材料或组分的可操作性和效用的任何便利和适合方式储存。举例而言,组分可呈溶解、脱水或冻干形式;它们可提供在室温、冷藏温度或冷冻温度下。组分通常含于适合包装材料中。如本文所用,短语“包装材料”是指一种或多种用于容纳试剂盒的内含物如本发明组合物等的物理结构。包装材料是通过熟知方法构造,优选以提供无菌、无污染的环境。如本文所用,术语“包装”是指能够容纳各个试剂盒组分的合适固体基质或材料,如玻璃、塑料、纸、箔等。因此,举例而言,包装可为用于含有适量的含有 miRNA 抑制剂的本发明组合物的玻璃小瓶。包装材料通常具有指示试剂盒和 / 或它的组分的内含物和 / 或目的的外部标签。

实施例

[0161] 提供以下实施例以更好说明要求保护的本发明且不应解释为限制本发明的范围。就提及的特定材料而言,仅出于说明目的且不意图限制本发明。本领域技术人员可在不背离本发明的实质和不脱离本发明的范围下开发等效手段或反应物。

[0162] 实施例 1

[0163] 前列腺癌的骨转移性模型的微小 RNA 表达谱分析揭示 miR-409-5p 的表达升高

[0164] 对源于 PCa 患者的两个 PCa 骨转移性细胞基模型,即人 ARCaP 模型 (ARCaP_E 和 ARCaP_M) (E- 上皮, M- 间质) 和 LNCaP 模型 (LNCaP 和 C4-2) 进行 MiRNA 谱分析 (图 1A) (15, 16)。ARCaP_E 和 LNCaP 具有较小侵袭性,且不向骨转移,而 C4-2 和 ARCaP_M 具有高度侵袭性且向骨转移。在这些细胞系中,miR-409-5p、miR-379 和 miR-154* 在高度骨转移性 ARCaP_M 细胞中是上调的 (图 1D)。miR-409-5p 是由不成熟转录物产生的,且自前 miRNA 的 5' 末端转录。当心内注射给小鼠时,ARCaP_M 细胞具有 100% 骨转移能力 (17)。ARCaP 模型是上皮向间质转化模型 (17)。与先前描述的 EMT 相关 miRNA 一致,相较于间质 ARCaP_M 细胞,上皮 ARCaP_E 细胞中的 miR-200 家族成员较多 (图 1B)。miR-409-5p、miR-379 和 miR-154* 位于印记 DLK1-DIO3 簇中且位于长非编码 RNA, MEG9 内。引起关注的是,在骨转移性 ARCaP_M 前列腺癌细胞中,MEG9 也升高 (图 1C)。在 ARCaP_M 细胞中,来自 DLK1-DIO3 簇的若干 miRNA 升高,如 miR-154*、miR-379、miR-487 和 miR-409-3p (图 1D)。相较于 ARCaP_E 细胞,在 ARCaP_M 细胞中,若干 miRNA 被下调,如 miR-495、miR-329、miR-485-3p 和 miR-299-3p (图 1E)。相较于 LNCaP 前列腺癌细胞,在骨转移性 C4-2 细胞中,miR-154* 和 379 是上调的。发明人在前列腺 EMT 模型 (图 1D) 和肺癌 EMT 模型 (数据未显示) 中观察到 miR-409-5p 增加。发明人使用原位杂交和量子点检测方法进行用以测定 miR-409-5p 在肿瘤组织阵列 (BPH/PIN, n = 23, 格里森计分 6-7, n = 36, 格里森计分 8, n = 24, n = 格里森计分 10, n = 6) 中的表达的研究 (18)。在肿瘤与肿瘤细胞内均检测到 miR-409-5p 表达。在高格里森计分人前列腺癌组织阵列中,miR-409-5p 被上调,其中在所有格里森 10 计分组织中存在 100% miR-409-5p 阳性染色 (图 2A)。阴性对照 (混杂) 具有最小染色,且肿瘤组织中的 miR-409-5p 表达 (红色) 水平较高 (图 2C)。核用 DAPI 染色。

[0165] 实施例 2

[0166] miR-409 在正常前列腺中过度表达导致肿瘤生长

[0167] 为测试 miR-409 是否具有致癌性,发明人注射用携带绿色荧光蛋白 (GFP) 的 miR-409 表达性慢病毒载体或携带 GFP 质粒的对照载体 (System biosciences) 转染的人胚胎肾 293T 细胞。将 293T 细胞常位注射至裸小鼠,且使用肿瘤特异性红外染料 (IR783) 监测肿瘤进展 (19)。这个程序背后的基本原理是将由产生的细胞 (293T) 分泌慢病毒,且感染前列腺上皮和基质。惊人的是在 3 至 5 个月内在四个小鼠中的三者的 miR-409 表达性前列腺中产生肿瘤 (图 3A)。对照小鼠不产生肿瘤。肿瘤具有绿色荧光且显示肿瘤特异性染料摄取 (图 3A)。肿瘤切片用福尔马林固定且用石蜡包埋并进行 H&E 染色。肿瘤切片由病理学家进行分级。miR-409 前列腺中的肿瘤自良性增生至腺癌变化。分析切片的 miR-409-5p 水平。使用原位杂交和量子点,仅在 miR-409 表达性前列腺中而非在对照前列腺中观察到 miR-409 表达 (图 3B)。混杂 miRNA 用作阴性对照。总之,这些研究表明 miR-409 表达足以驱动肿瘤在正常前列腺中的生长,且 miR-409 可在前列腺癌进展中起致癌性作用。据发明人所知,这是首次证明前列腺癌中的致癌性 miRNA。

[0168] 实施例 3

[0169] 抑制间质型转移性前列腺癌细胞 (ARCaPM) 中的 miR-409-5p 会导致细胞死亡、miR-409-5p 靶基因 (肿瘤抑制因子) 上调以及上皮向间质转化的逆转 (EMT 至 MET)

[0170] 使用慢病毒基抗 miR-409-5p 抑制 miR-409-5p 导致转移性前列腺癌细胞的显著细胞死亡 (图 4A)。相较于对照,在用 miR-409-5p 抑制剂构建体稳定转染的 ARCaP_M 细胞中,miR-409-5p 表达降低。评估包括 TUSC4、PHC3 和 STAG2 的 miR-409-5p 靶向 mRNA,且相较于 ARCaP_M 对照 (ARCaP_M-C) 细胞,在 miR-409-5p 敲低细胞 (ARCaP_M-409-5pi) 转移性前列腺癌细胞中,这些 mRNA 增加。TUSC4 是一种在实体肿瘤中缺失的肿瘤抑制蛋白。PHC3 是细胞命运的转录阻遏和调控中涉及的多梳组蛋白 (polycomb group protein) 的一部分 (20)。siRNA 介导的 TUSC4 下调诱导细胞增殖,而异位 TUSC4 表达使包括 Akt 和 p70 核糖体蛋白 S6 激酶的 PDK1 下游信号传导通路失活,且增加癌细胞对若干抗癌药物的敏感性。多同源异形同源物 3 (PHC3) 是人多梳复合物的成员,且已被视为骨肉瘤的候选肿瘤抑制因子。PHC3 表达显著遏制肿瘤细胞的集落形成,可能是由癌细胞中多梳抑制性复合物 1 的组成的改变所引起。STAG2 是粘连复合体的一部分,其中粘连复合体的成员的去调控 (deregulation) 被认为会导致癌症起始和进展 (21)。STAG2 中的突变会导致人癌症中的异倍性。因此,miR-409 靶标是致癌基因的抑制因子且因此抑制 miR-409-5p 会由于上调所述肿瘤抑制因子而导致细胞死亡。当发明人评估所述簇的其它成员单独或组合的作用时,发现使用慢病毒基抗 miR-379 和抗 miR-154* 或阻断全部三种微小 RNA (miR-409-5p、miR-379、miR-154*) 的 siRNA 抑制 miR-379 和 miR-154* 导致转移性前列腺癌细胞的显著细胞死亡 (图 10)。

[0171] 临床数据与实验数据两者均支持癌细胞通过经受 EMT 获得它们的转移潜力的主张。使用一种强健 ARCaP EMT 模型,发明人先前已证明 EMT 与前列腺癌骨转移之间存在密切关联。为确定在抑制间质转移性癌细胞中单独或组合的 miR-409-5p、miR-379 和 miR-154* 是否可逆转 EMT [即诱导间质向上皮转化 (MET)],发明人进行敲低单独或组合的 ARCaP_M 前列腺癌细胞中的 miR-409-5p、miR-379 和 miR-154* 序列特异性 siRNA 的研究。使用混杂 siRNA 序列 (Scram) 类似地处理对照细胞。相较于 ARCaP_M Scram 对照,miR-409-5p、miR-379 和 miR-154* 敲低细胞具有较低 miR-409-5p、miR-379 和 miR-154*。基因敲除细胞 (个别

或组合敲除 miR) 经受稳定形态学间质向上皮转化 (MET), 此伴随有 E-钙粘着蛋白增加和波形蛋白表达的降低。miR-409-5p、miR-379 和 miR-154* 降低也导致癌细胞的迁移降低。

[0172] 实施例 4

[0173] 来自患者和 3 维细胞培养模型的正常和癌症相关基质的微小 RNA 表达谱分析揭示来自前列腺和骨的癌症相关基质中的 miR-409-5p 表达水平升高 miR-409-5p 在反应性基质中的作用: 除癌细胞之外, 发明人也前在前列腺临床样本和骨基质模型中的正常和癌症相关基质的进行 miRNA 谱分析 (图 3A)。

[0174] 前列腺基质: 通过激光捕获显微术从患者样本分离前列腺基质细胞 (3)。这些患者样本的 miR-409-5p 增加 (图 3B)。在三个患者样本中的两者中, miR-409-5p 也增加 (数据未显示)。

[0175] 骨基质: 细胞基模型用于获得正常和癌症相关骨成骨细胞 (正常成骨细胞: HS-27a_{RWV}, 癌症相关基质: HS-27_{C4-2}) 和骨肉瘤细胞 (正常: MG_{RWV} 以及癌症相关: MG_{LN} 和 MG_{C42})。产生的全部 CAF 都具有增加的 miR-409-5p 水平 (图 3B)。这些结果证明除癌细胞之外, 基质细胞 miR-409-5p 也上调。

[0176] 实施例 5

[0177] 在正常前列腺基质细胞中过度表达 miR-409 会通过上调骨转移性标记物以及下调肿瘤抑制因子来赋予癌症相关基质样表型

[0178] 为确定 miR-409 在基质中的表达是否在 PCa 进展中起诱导作用, 发明人在来源于患者的若干正常前列腺成纤维细胞 (其通常不表达 miR-409) 中过度表达 miR-409 (SON 和 WHN 是正常前列腺成纤维细胞) (图 4A)。在病毒转导之后观察到高水平的 miR-409-5p。miR-409 过度表达导致波形蛋白和 β 2-M 蛋白表达水平增加 (图 4B)。波形蛋白是作为成肌纤维细胞的标记物, 其活化成纤维细胞 (22)。评估 miR-409-5p 靶标 mRNA, 且在 miR-409 表达性正常基质细胞中, 这些 mRNA 降低。miR-409-3p mRNA 靶标是如通过由 TargetScan 预测所确定的多同源异形蛋白 3 (PHC3)、肿瘤抑制因子 4 (TUSC4) 和 RSU1 (Ras 抑制蛋白 1)。在 miR-409 过度表达性正常基质细胞系中, 这些靶标被显著下调 (图 4C)。miR-409-5p 也靶向基质抗原 1 (STAG2), 所述基质抗原 1 在 miR-409 表达性正常基质细胞中被显著下调 (图 4D)。抑制 ras 抑制蛋白将使活性信号传导通过致癌性 ras 路径进行。因此, miR-409 靶标是致癌基因的抑制因子且因此在正常基质中表达 miR-409-5p 会使正常成纤维细胞转化成癌症相关成纤维细胞。

[0179] 实施例 6

[0180] 在正常基质细胞中过度表达 miR-409 会在小鼠模型中诱导癌细胞的侵袭性致肿瘤性

[0181] 为确定 miR-409 在正常成纤维细胞 (基质) 中过度表达是否将诱导 / 增强癌细胞生长, 使用裸小鼠进行体内研究。用单独基质细胞 (SON-C; 对照正常基质)、正常基质表达 miR-409 (SON-409)、单独癌细胞 (C4-2) 以及肿瘤基质组合 (C4-2/SON-C 或 C4-2/SON-409) 皮下注射小鼠。4 周后, 具有肿瘤生长的唯一组是用 C4-2/SON-409 (PCa 细胞和 miR-409 过度表达性基质细胞) 共注射的那些小鼠 (图 5A)。在 C4-2/SON-409 组 (n = 4) 中, 肿瘤获取率是 75% (图 5A), 且肿瘤体积显著增加 (图 5B、5C)。用原位杂交和量子点分析 miRNA409-5p 和 miRNA409-3p 的表达。也对所有肿瘤进行 H&E 染色。对照 (C4-2、SON-C、SON-409、C4-2/

SON-C) 不具有肿瘤生长,然而在一些情况下在注射部位中的皮肤以下存在肿瘤 / 基质细胞。这些肿瘤用于 miRNA 分析。仅在 C4-2/SON-409 组织切片中观察到 miR-409-5p 表达。引起关注的是仅在过度表达 miR-409 的基质细胞中未发现 miR-409-5p 表达,但在周围癌细胞中也发现 miR-409-5p 表达 (图 5D)。开始, C4-2 细胞不表达 miR-409 且 C4-2 肿瘤细胞未用过度表达 miR-409 的慢病毒转导。这表明有可能的是来自基质细胞的 miR-409 被外分泌 (外泌体分泌) 并由周围癌细胞摄取且因此在 C4-2 癌细胞中存在肿瘤加速生长。据发明人所知,这是首次证明基质特异性表达单一微小 RNA 会向周围肿瘤赋予侵袭性以促进癌症进展。这些结果证明 miR-409 在癌症相关基质的功能中以及在侵袭性 PCa 的发展中具有关键作用。通过分析如前列腺特异性抗原 (PSA) 和 β 2-M 分泌蛋白的血清标记物进一步确认肿瘤生长。PSA 是由单独 C4-2 癌细胞分泌的癌症特异性标记物。在 C4-2/SON-409 组中, β 2-M 分泌增加。这些结果与 SON-409 基质细胞的 β 2-M 水平增加的体外研究一致。高血清 β 2-M 水平是 PCa 中骨转移的标记 (23, 24)。引起关注的是,在癌症相关骨基质细胞中, miR-409 表达也增加 (图 3B)。

[0182] 实施例 7

[0183] 序列

[0184] 表 1.

[0185]

miRNA 或抑制剂	序列(5'-3')	SEQ ID NO.
miRZIP379	GGATCC	1
	GTGGTAGATTATGGAACATAAGCT	

[0186]

	TCCTGTCAGCCTACGTTCCATAGT CTACCATTTTT GAATTC	
成熟 miR379	ugguagacuauggaacguagg	2
成熟 miR379*	uauguaacaugguccacuaacu	3
miRZIP193b	GGATCC GAACTGGCACTCAAAGTCACGATC TTCCTGTCAGAGCGGGACTTTGAG GGCCAGTTTTTTTT GAATTC	4
miR193b-成熟	aacuggcccucaaagucccgc	5
miR193b*-成熟	cgggguuuugaggcgagauga	6
miRZIP409-5p	GGATCC GAGGTTACCaGAGCAACTTTGCAC TTCCTGTCAGTGCAAAGTTGCTCG GGTAACCTTTTTT Gaattc	7
miR409-5p 成熟	AGGUUACCCGAGCAACUUUGCAU	8
miR409-3p-成熟	GAAUGUUGCUCGGUGAACCCC U	9
miRZIP154	GGATCC GTAGGTTACCCGTGTTGCATTAGC TTCCTGTCAGCGAAGGCAACACGG ATAACCTATTTTT GAATTC	10
miR154 成熟序列	uagguuauccguguugccuucg	11
miR154*成熟	aaucauacacgguugaccuauu	12

[0187] miRZIP 是指编码导致前列腺癌细胞的细胞死亡的微小 RNA 抑制剂（针对成熟微小 RNA 的短发夹 RNA）的 DNA

[0188] 成熟是指成熟微小 RNA 序列且导致癌症

[0189] * 是指互补的微小 RNA 序列

[0190] 所有 miRZIP 都是定制的

[0191] 所有成熟微小 RNA 构建体都自 System Biosciences 购买

[0192] 实施例 8

[0193] 将混悬于 PBS 中的 1×10^6 个 ARCaPM 骨转移性前列腺癌细胞通过胫骨内注射至雄性 Nu/Nu 裸小鼠的两腿来建立前列腺骨生长模型。在注射之后 1 周, 小鼠隔天用媒介物 (n

= 5) 或体内吗啉基寡核苷酸 (Vivo Morpholinos) (12.5mg/kg 或每次注射 25nmol) (n = 5) 处理 2 周。吗啉基寡核苷酸的注射模式是在小鼠的尾部静脉中采取静脉内的给药途径。通过骨病变的 X 射线成像来测量肿瘤进展。在第 30 天以人道方式处死小鼠且收集骨用于组织病理学分析。

[0194] 靶向例如 miR-409-5p 的微小 RNA, 使用体内吗啉基寡核苷酸预期会相较于已用媒介物注射的小鼠, 减轻小鼠的骨病变 (通过 X 射线成像与组织病理学研究两者)。

[0195] 表 2.

[0196]

吗啉基寡核苷酸 反义靶标	吗啉基寡核苷酸反义序列	SEQ ID NO.
miR379 成熟	5' CGCCTACGTTCCATAGTCTACCATC 3'	13
miR409-5p 成熟	5' GGGTTCACCGAGCAACATTCGTCGT 3'	14
miR154*成熟	5'AGCGAAGGCAACACGGATAACCTAT 3'	15

[0197] 参考文献

[0198] 1. Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. N Engl J Med2004 ; 350(16):1655-1664.

[0199] 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 Res2009 ;15(12):3979-3989.

[0200] 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 Res2008 ; 68(23):9996-10003.

[0201] 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. Science2004 ;303(5659):848-851.

[0202] 5. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. J Cell Biol1982 ;95(1):333-339.

[0203] 6. Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Dev Cell2008 ;14(6):818-829.

[0204] 7. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. Nat Rev Genet2009 ;10(10):704-714.

[0205] 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.

[0206] 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.

[0207] 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.

[0208] 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.

[0209] 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.

[0210] 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.

[0211] 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.

[0212] 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 USA* 1996 ;93(26):15152-15157.

[0213] 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.

[0214] 17. Xu J, Wang R, Xie ZH, Otero-Marrah 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.

[0215] 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.

[0216] 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.

[0217] 20. Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* 2009 ;9(11):773-784.

[0218] 21. Xu H, Tomaszewski JM, McKay MJ. Can corruption of chromosome cohesion create a conduit to cancer? *Nat Rev Cancer* ;11(3):199-210.

- [0219] 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.
- [0220] 23. Jossion 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.
- [0221] 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.
- [0222] 25. Chung LW. The role of stromal-epithelial interaction in normal and malignant growth. *Cancer surveys* 1995; 23:33-42.
- [0223] 26. Chung LW. Fibroblasts are critical determinants in prostatic cancer growth and dissemination. *Cancer metastasis reviews* 1991; 10(3):263-274.
- [0224] 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.
- [0225] 28. Jossion 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.
- [0226] 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.
- [0227] 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).
- [0228] 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.
- [0229] 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.
- [0230] 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.

[0231] 以上在详细描述中描述本发明的各种实施方式。尽管这些描述直接描述以上实施方式,但应了解本领域技术人员可设想本文所示以及所述的具体实施方式的修改和/或变化。属于本描述的范围内的任何所述修改或变化都意图包括在本描述中。除非明确指示,否则发明人意图说明书和权利要求书中的用词和短语被给与对于适用领域中的普通技术人员而言普通且惯常的含义。

[0232] 已递呈在提交本申请时为申请人所知的本发明的各种实施方式的上文描述,且所述上文描述意图出于说明和描述的目的。本描述不意图是详尽的,也非将本发明限于公开的精确形式,且根据以上教导,许多修改和变化是可能的。所述实施方式用于解释本发明的原理和本发明的实际应用,且用于使本领域其他技术人员能够以各种实施方式且在如适于涵盖的具体用途的各种修改下利用本发明。因此,意图本发明不限于所公开的用于执行本发明的具体实施方式。

[0233] 尽管已显示且描述本发明的具体实施方式,但将为本领域技术人员显而易见的是基于本文教导,可在不脱离本发明和它的更广泛方面的情况下进行改变和修改,且因此随附权利要求书将在它们的范围内涵盖如在本发明的真实精神和范围内的所有所述改变和修改。本领域技术人员应了解,一般而言,本文使用的术语通常意图为“开放”术语(例如术语“包括”应解释为“包括但不限于”,术语“具有”应解释为“具有至少”,术语“包括”应解释为“包括但不限于”等)。

[0001]

Sequence Listing
SEQUENCE LISTING

<110> 雪松-西奈医学中心
L • W • K • 钟
S • 乔尔森
M • 古鲁拉扬
A • 杰恩

<120> 靶向微小RNA MIR-409-5P、MIR-379和MIR-154*来治疗前列腺癌骨转移和耐药性肺癌

<130> 65472-351W00

<150> 61/565, 226

<151> 2011-11-30

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 71

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 智人

<400> 1

ggatccgtgg tagattatgg aacataagct tectgtcagc ctacgttcca tagtctacca 60

ttttitgaatt c 71

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> 智人

<400> 2

ugguagacua uggaacguag g 21

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 3

uauguaacau gguccacuaa cu 22

<210> 4

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 智人

<400> 4

ggatccgaac tggcactcaa agtcacgate ttcctgtcag agcgggactt tgagggccag 60

tttttttgaa ttc 73

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 5

aacuggcccu caaagucccg cu 22

<210> 6

<211> 22

<212> RNA

<213> 智人

<400> 6

cgggguuuug agggcgagau ga 22

<210> 7

<211> 73

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 智人

<400> 7

ggatccgagg ttaccagagc aactttgcac ttcctgtcag tgcaaagttg ctcgggtaac 60

cttttttgaa ttc 73

<210> 8

<211> 23

<212> RNA

<213> 智人

<400> 8

agguuacccg agcaacuug cau 23

<210> 9

<211> 22

<212> RNA

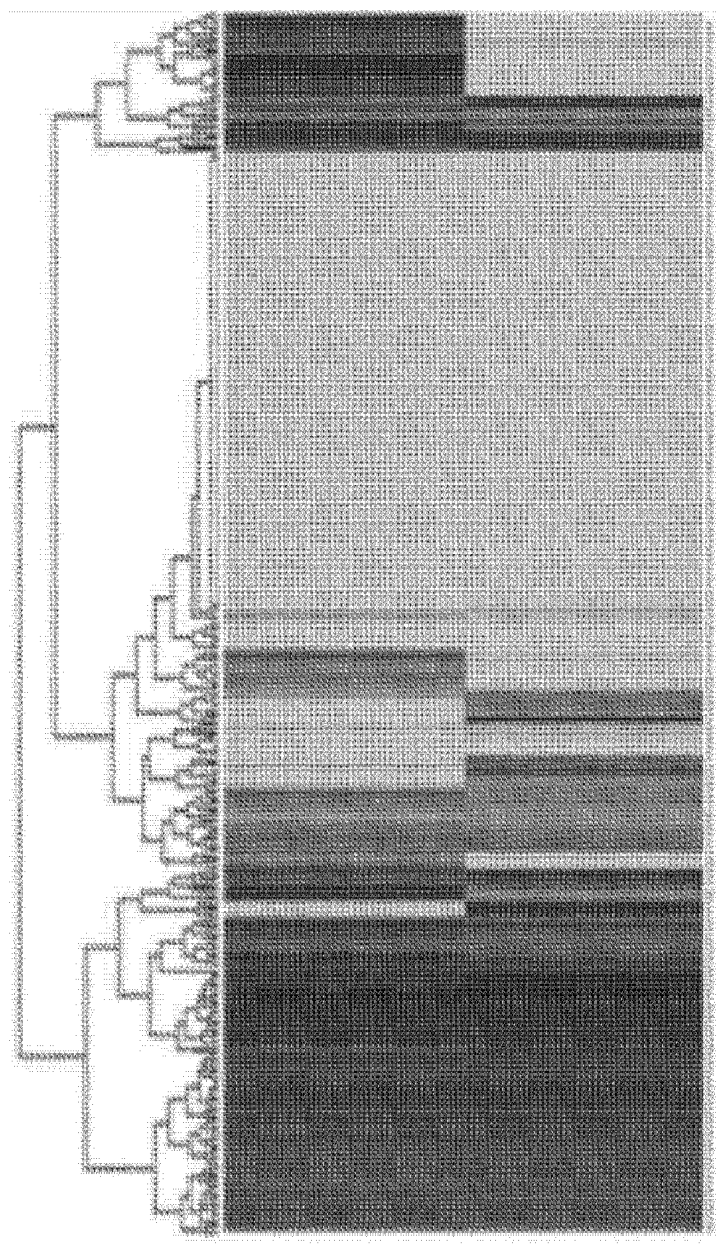
<213> 智人

[0003]

<400> 9	
gaauguugcu cggugaaccc cu	22
<210> 10	
<211> 73	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 智人	
<400> 10	
ggatccgtag gttaccegtg ttgcattagc ttcctgtcag cgaaggcaac acggataacc	60
tatTTTTgaa ttc	73
<210> 11	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 11	
uagguuaucc guguugceuu cg	22
<210> 12	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 智人	
<400> 12	
aaucAUacac gguugaccua uu	22
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的构建体	
<400> 13	
cgctacgtt ccatagtcta ccate	25
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的构建体	

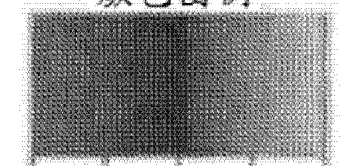
[0004]

<400> 14	
gggttcaccg agcaacattc gtcgt	25
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成的构建体	
<400> 15	
agcgaaggca acacggataa cctat	25



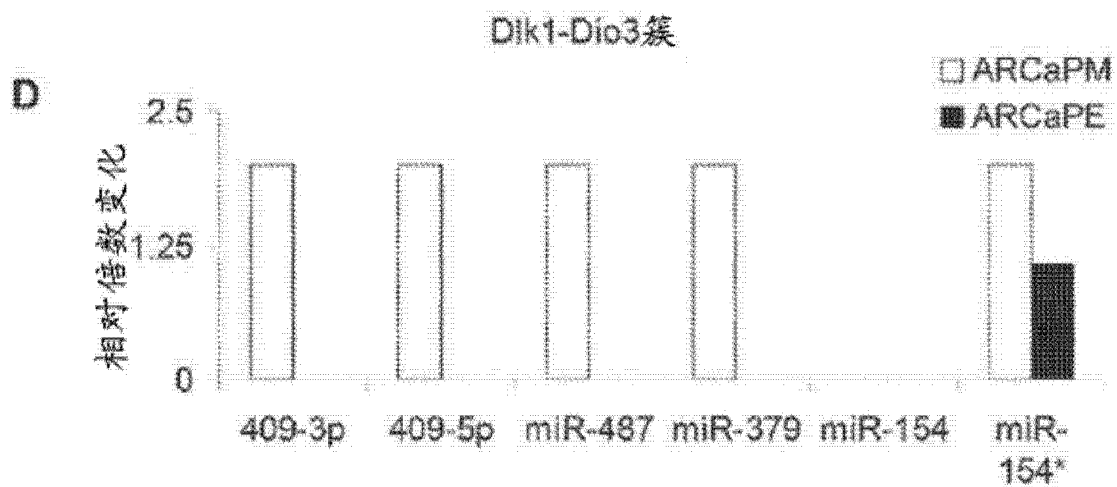
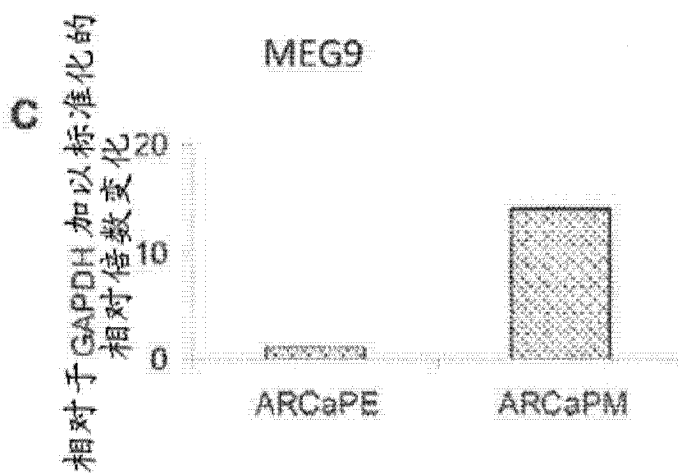
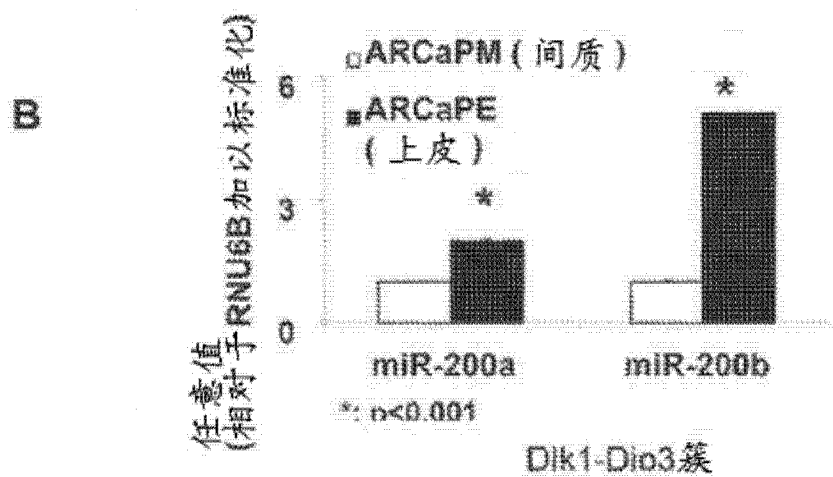
ARCaP_E ARCaP_M

颜色图例



0 10 20 30 40

值



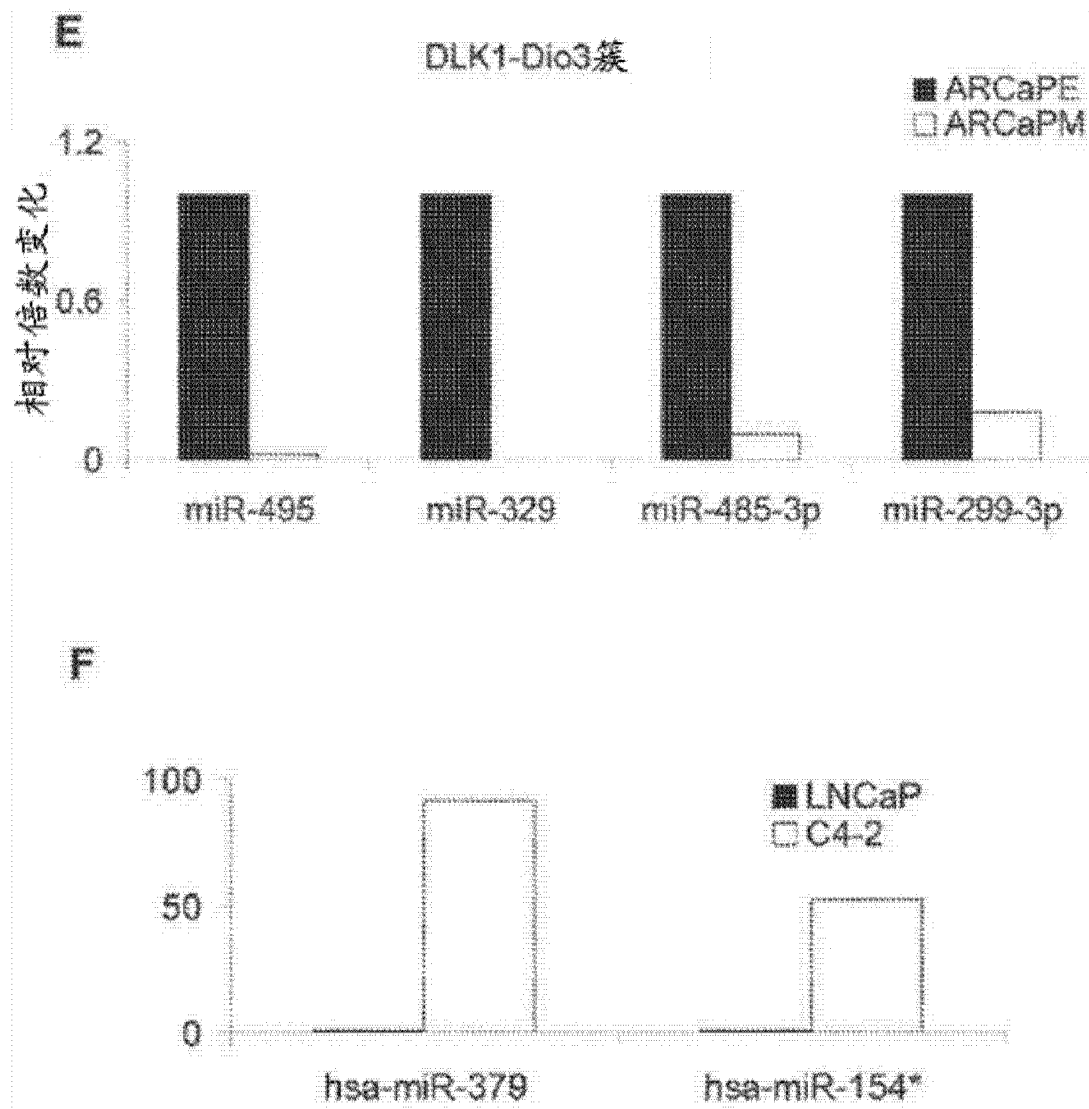
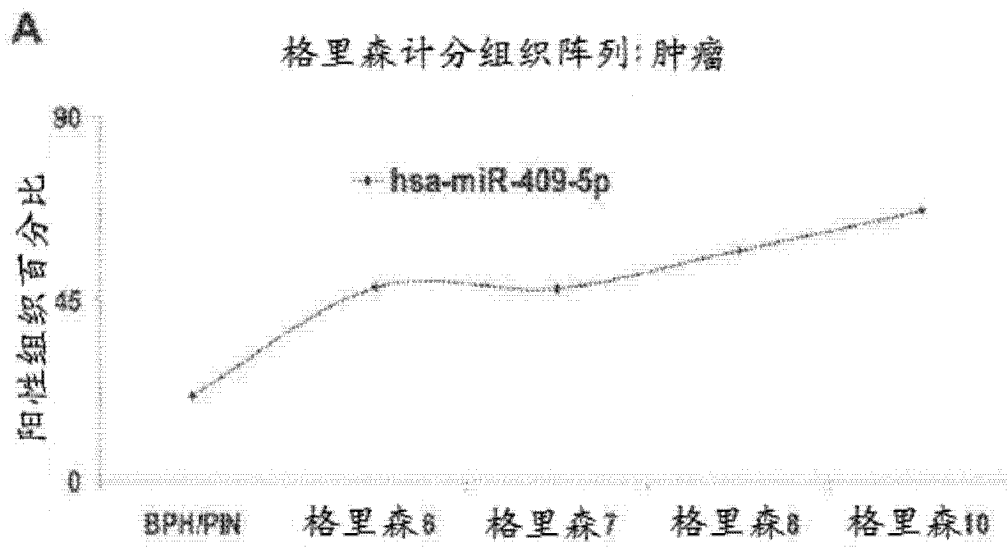


图 1



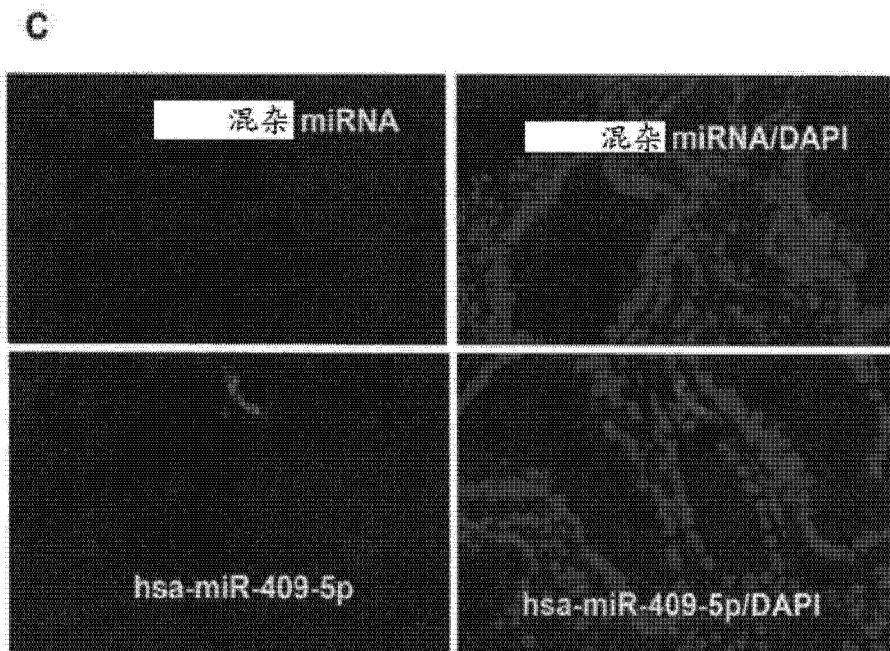
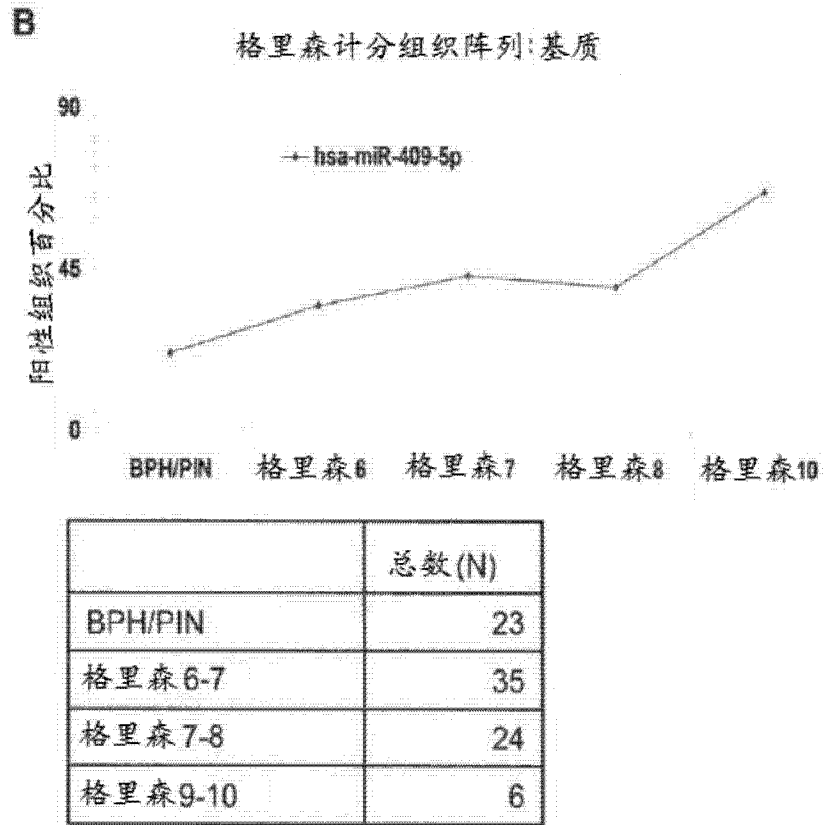


图 2

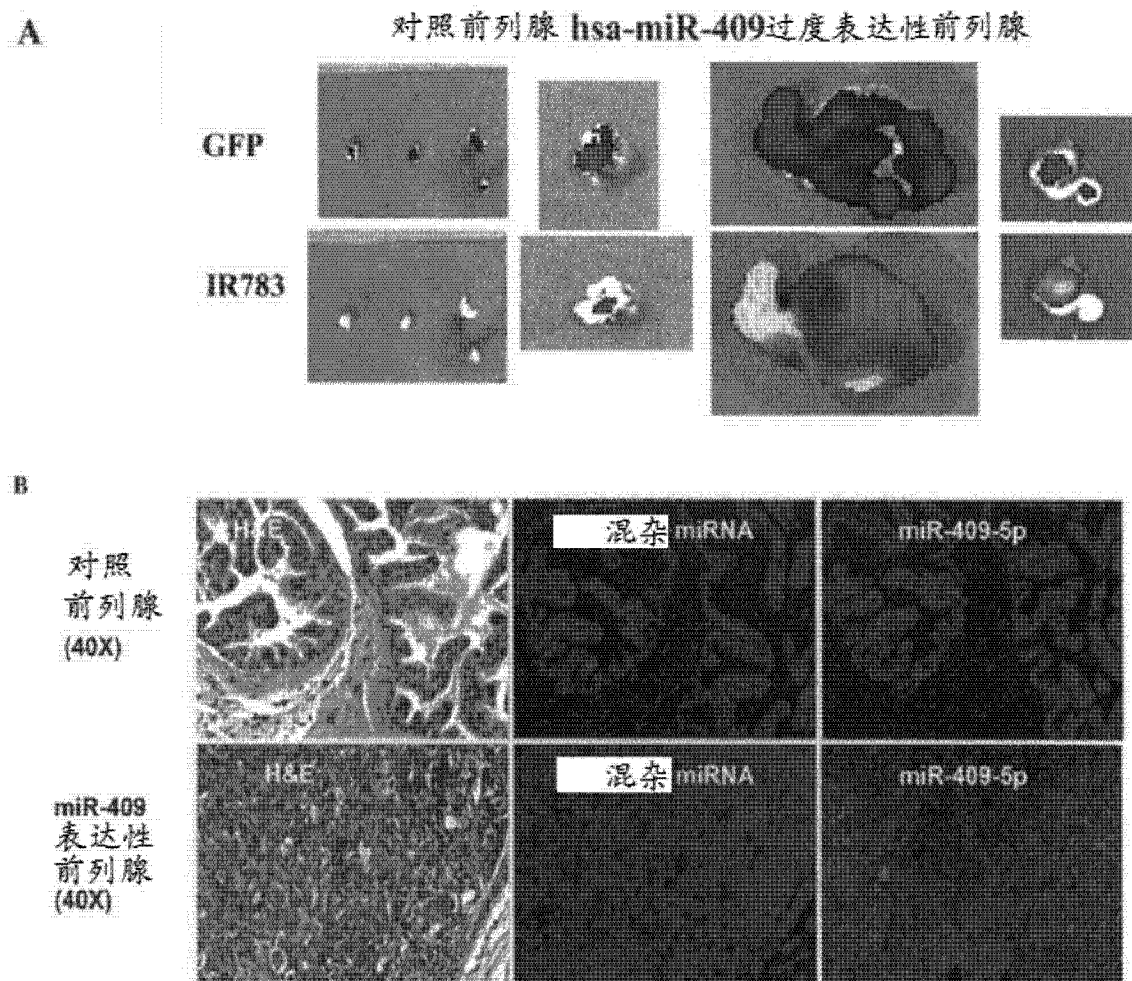
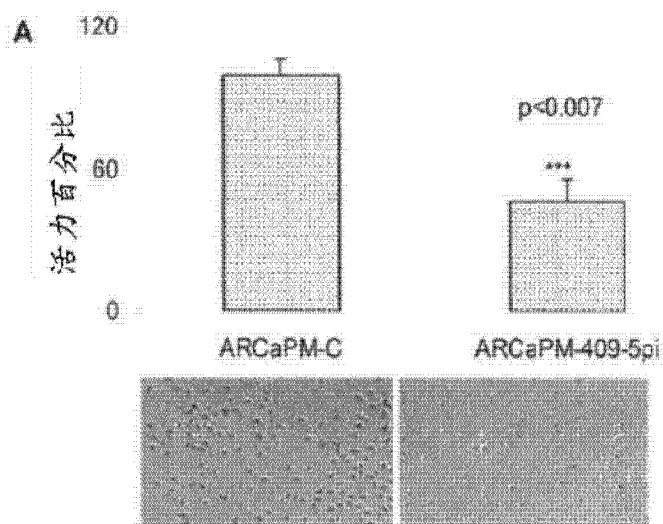
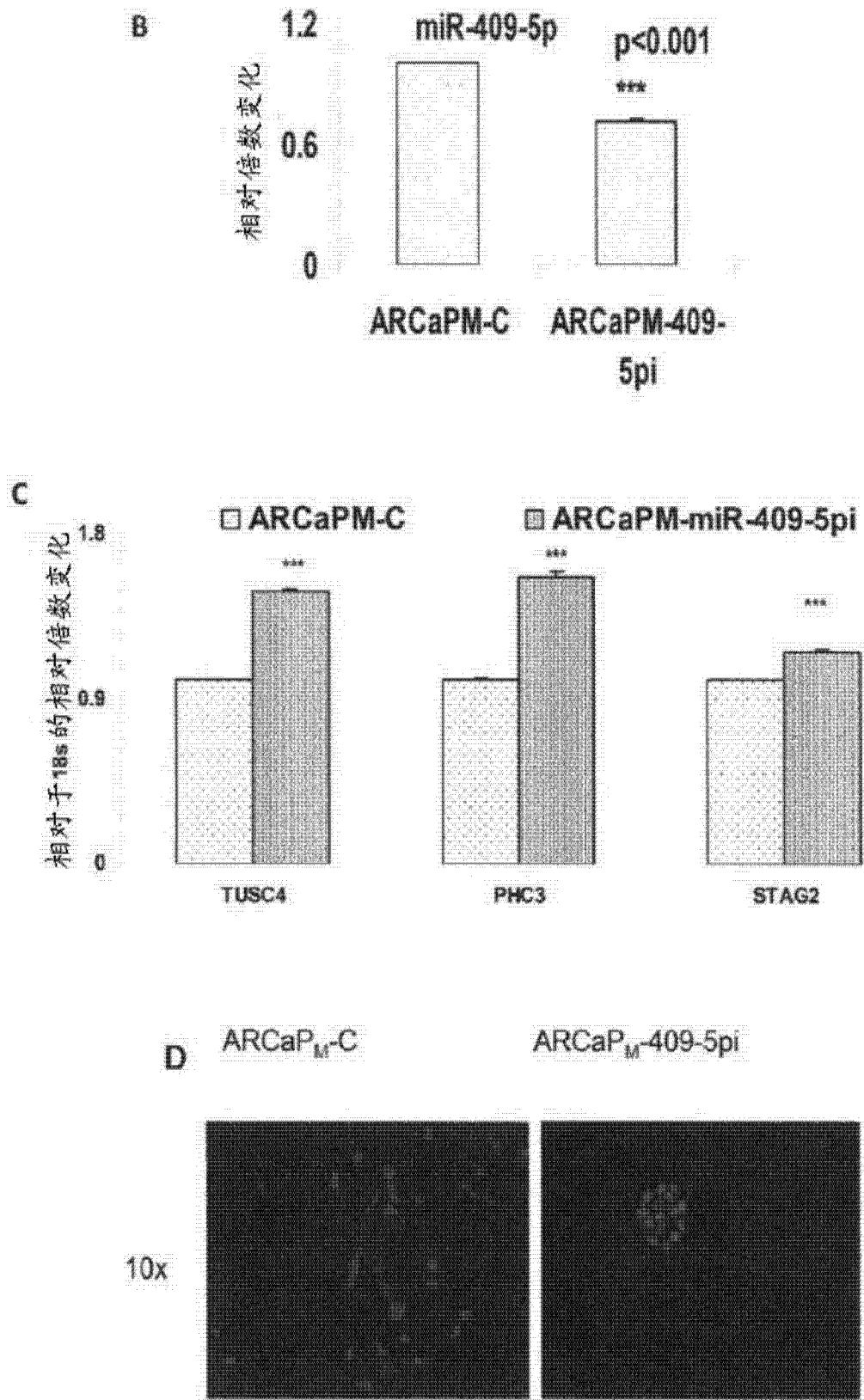


图 3





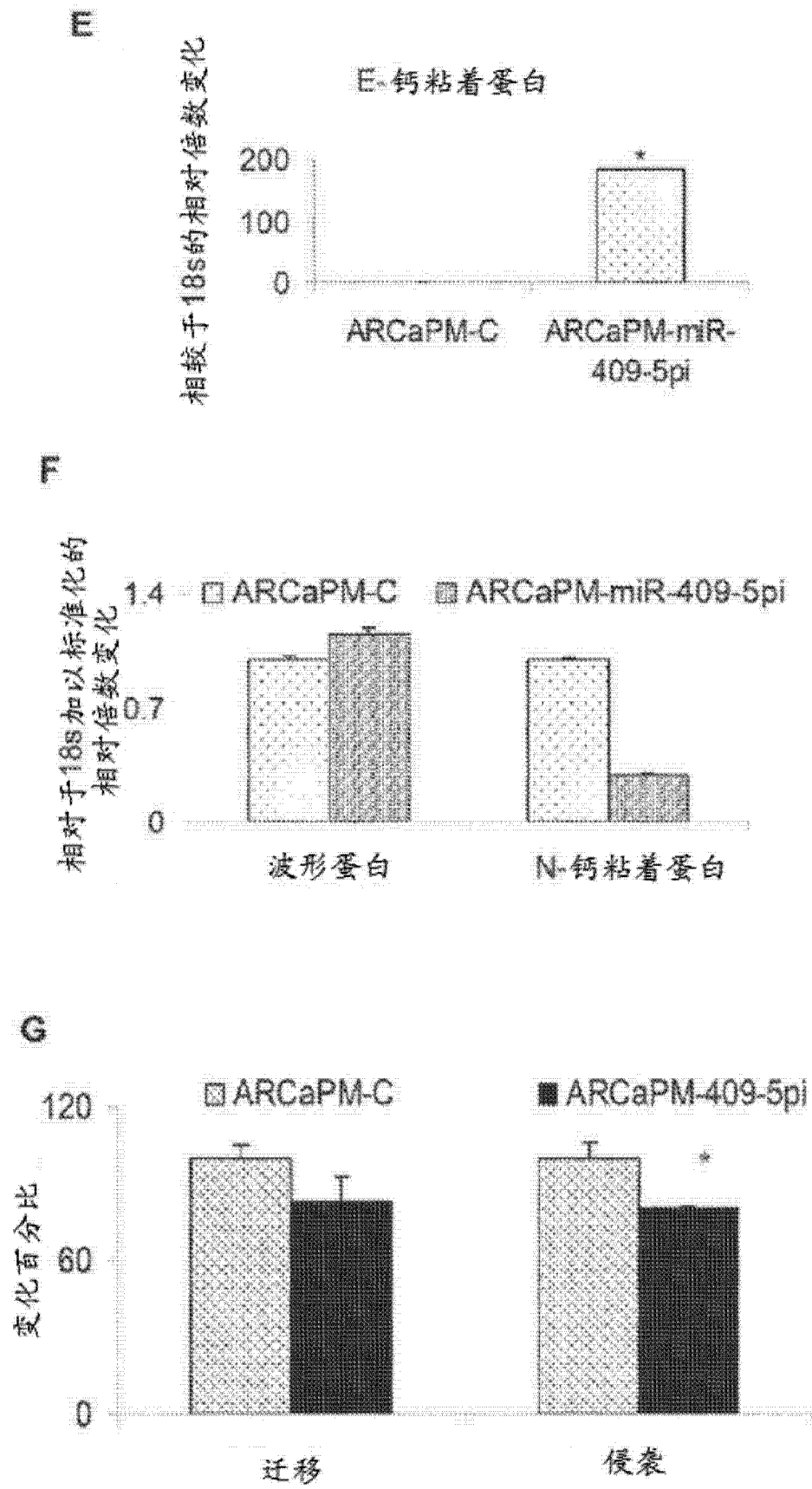


图 4

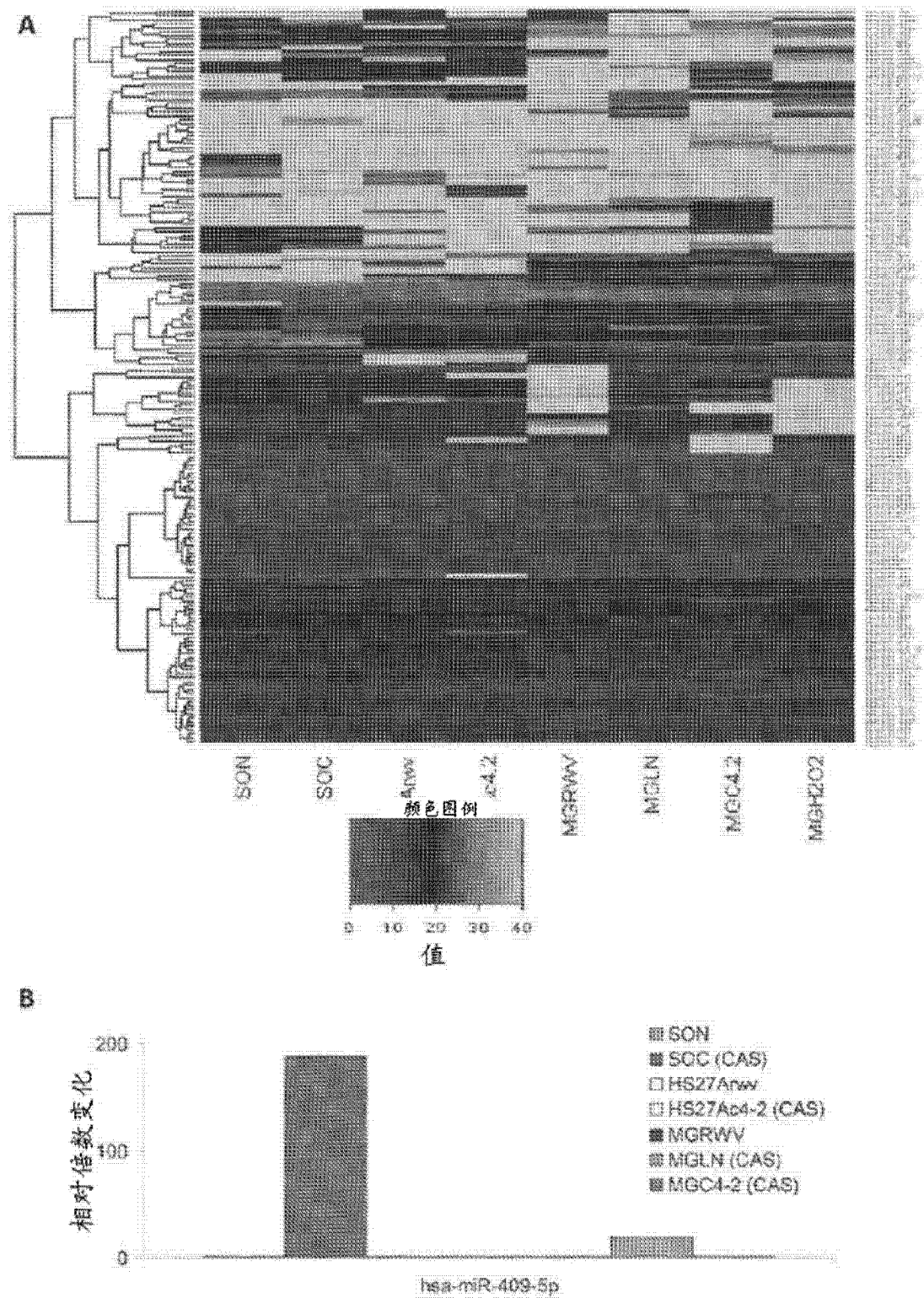


图 5

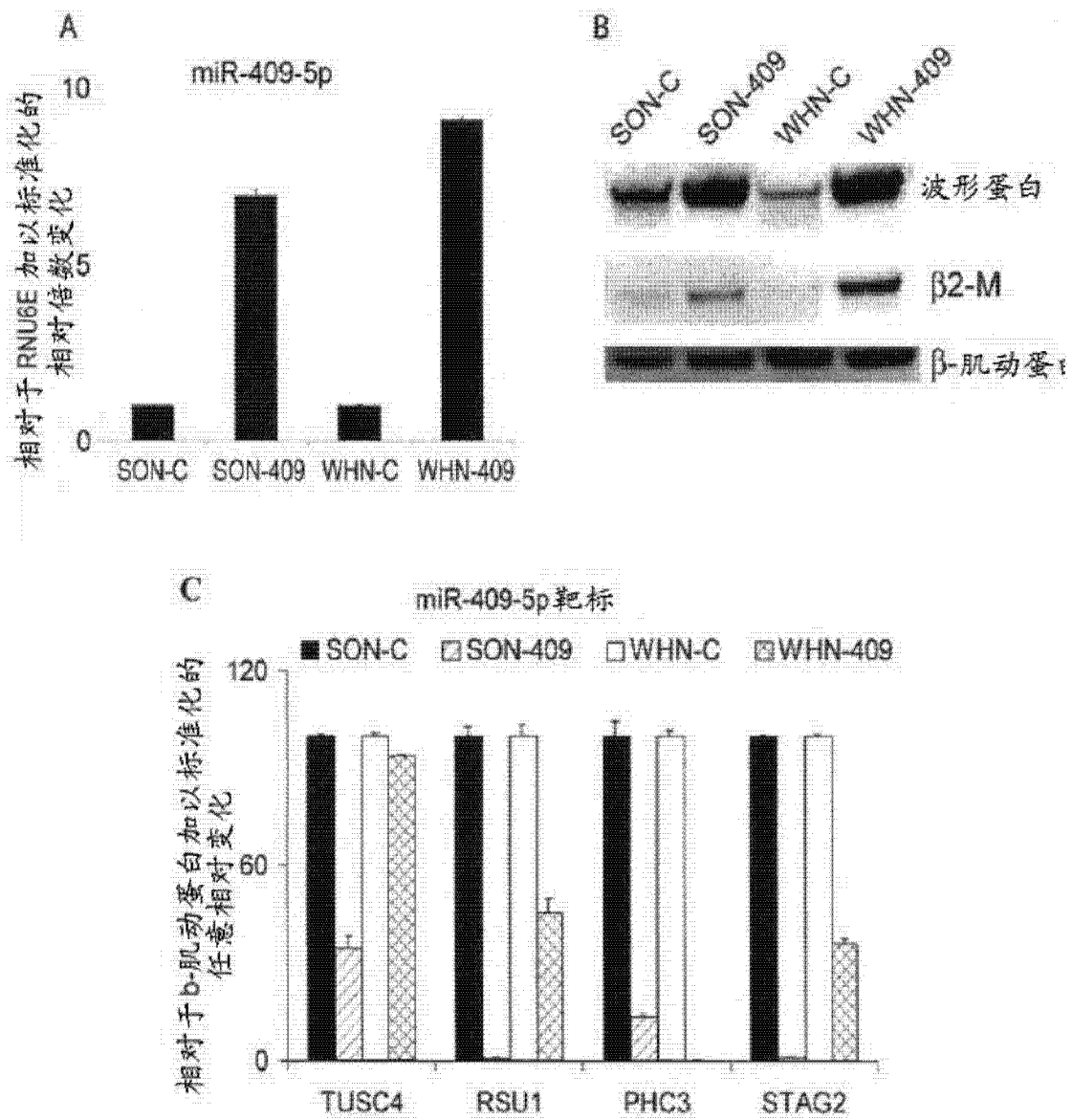
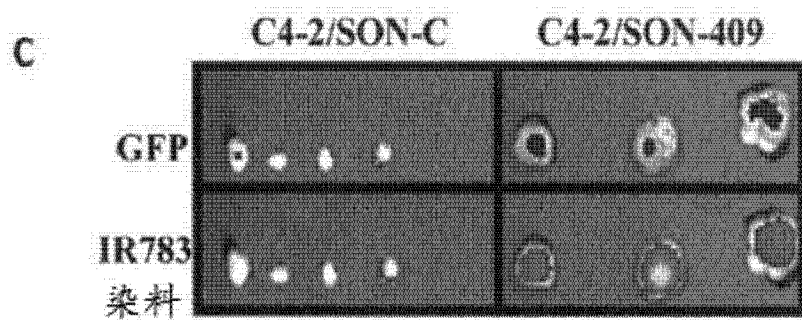
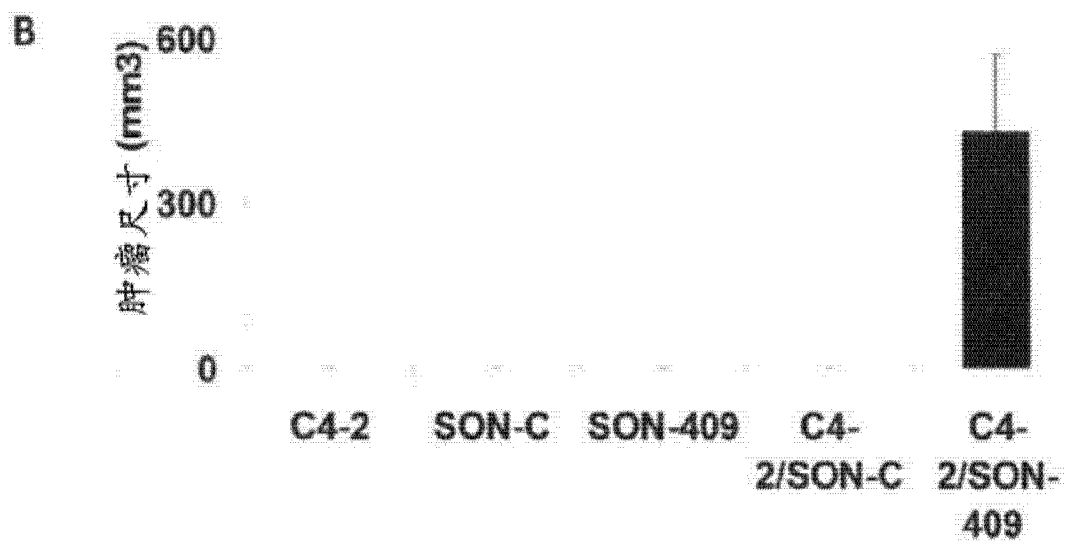


图 6

A

	肿瘤发生率
C4-2	0%
SON-C	0%
SON-409	0%
C4-2/SON-C	0%
C4-2/SON-409	75%



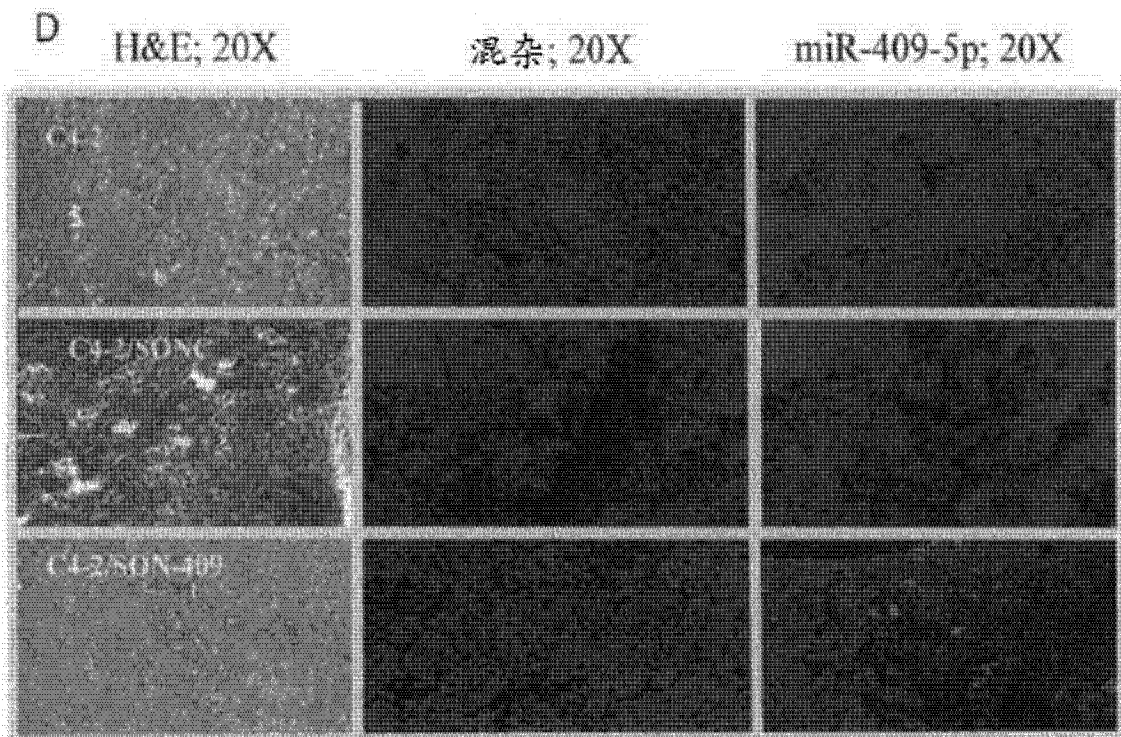
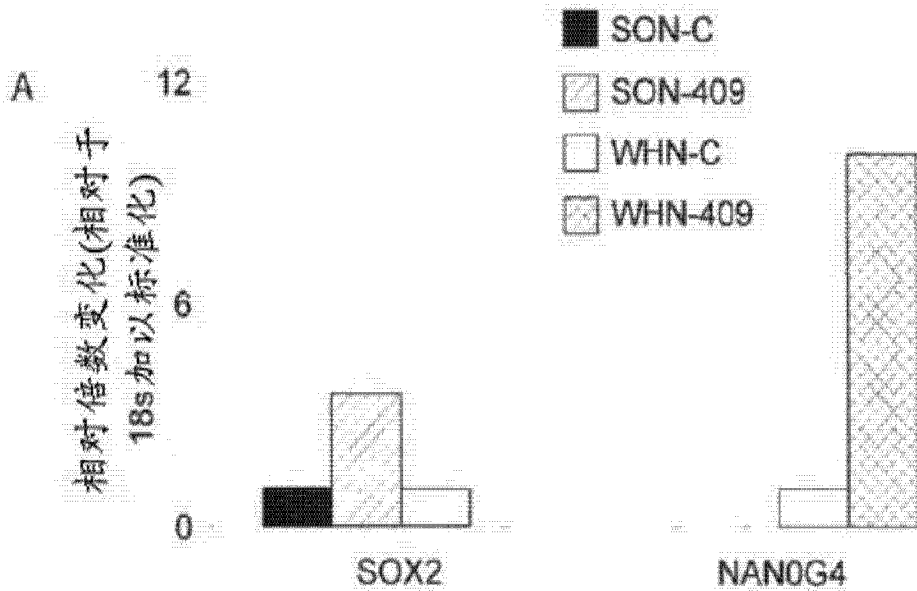


图 7



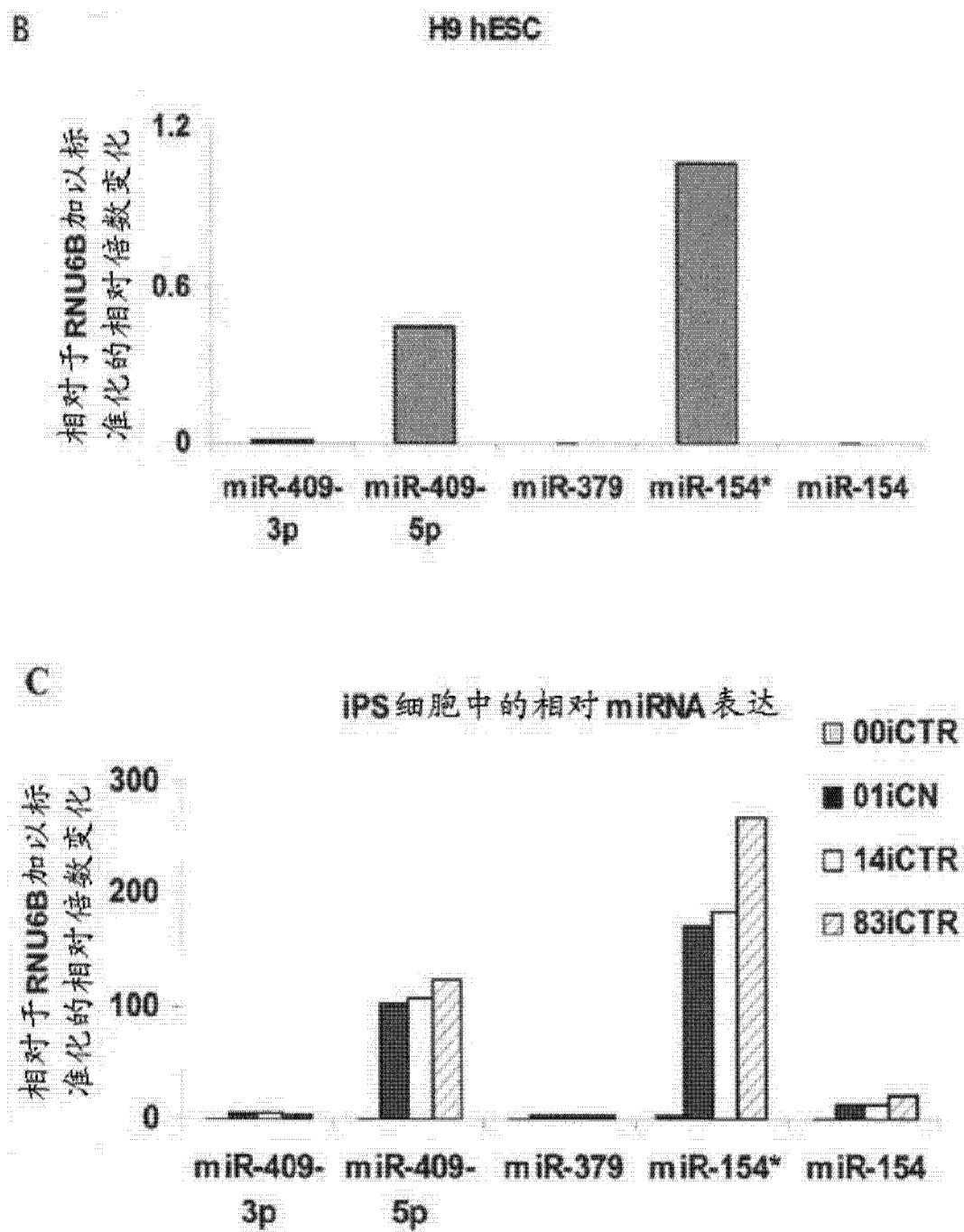
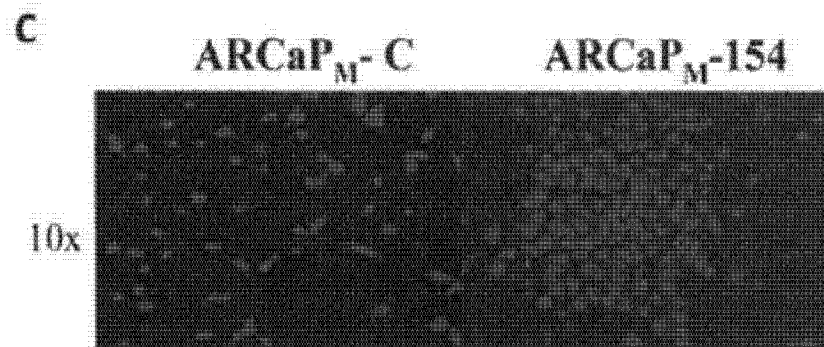
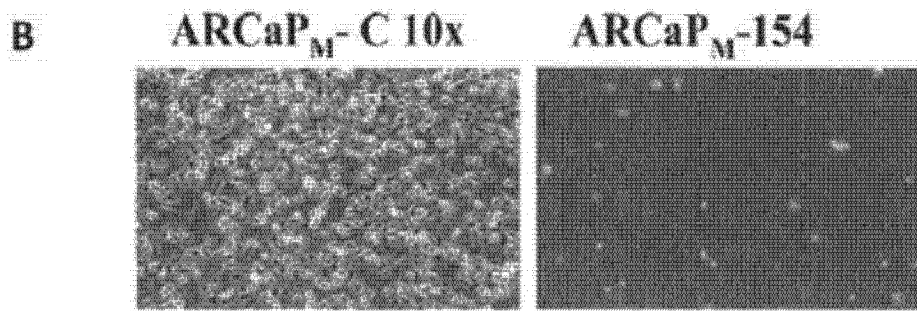
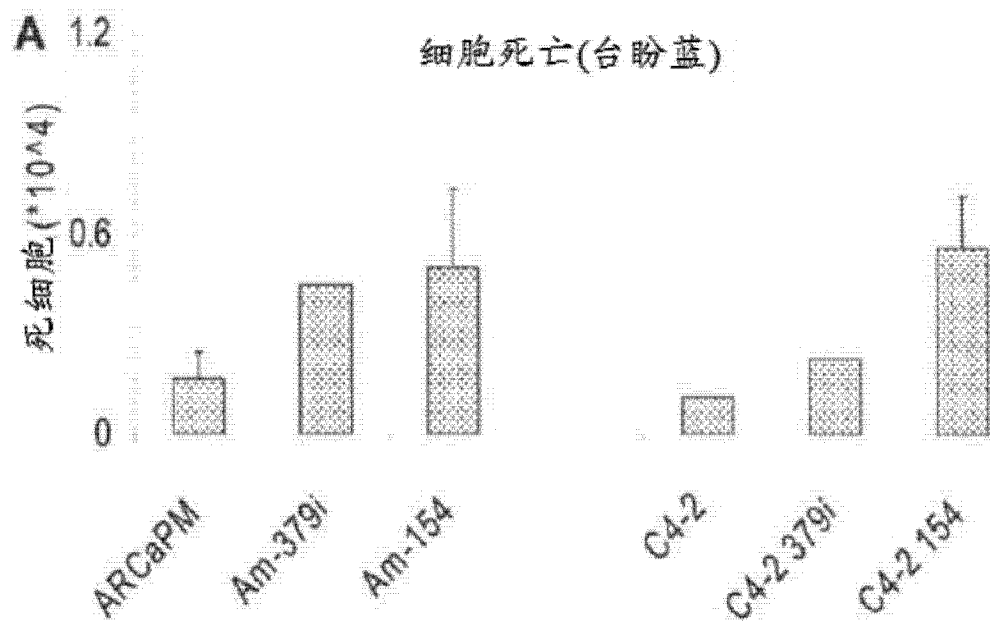


图 8



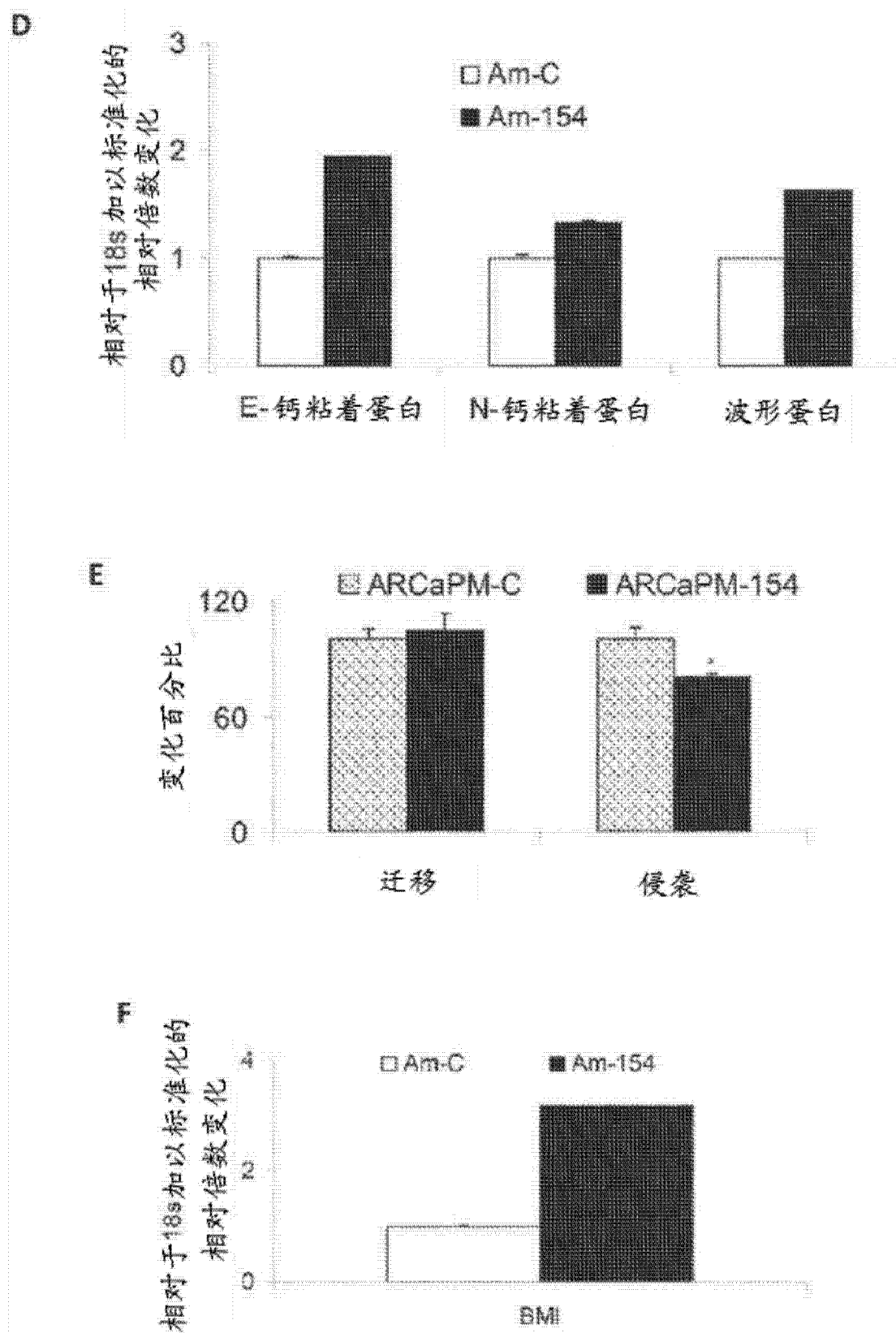


图 9

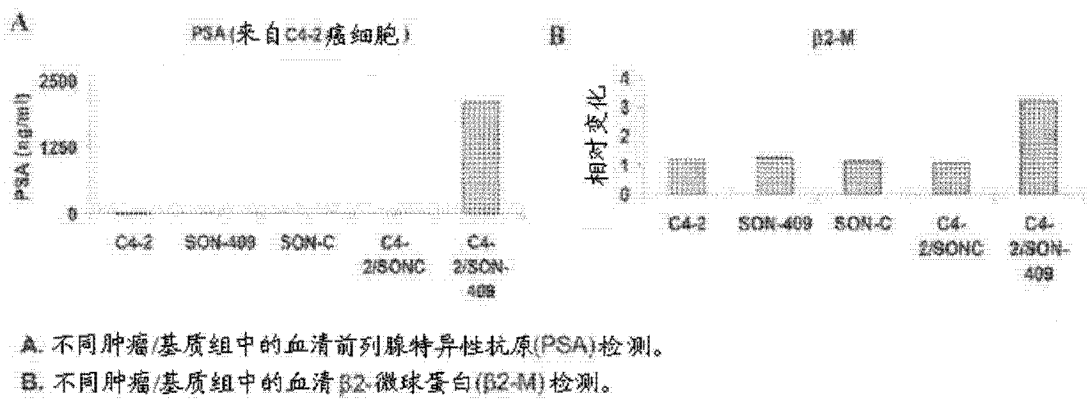


图 10

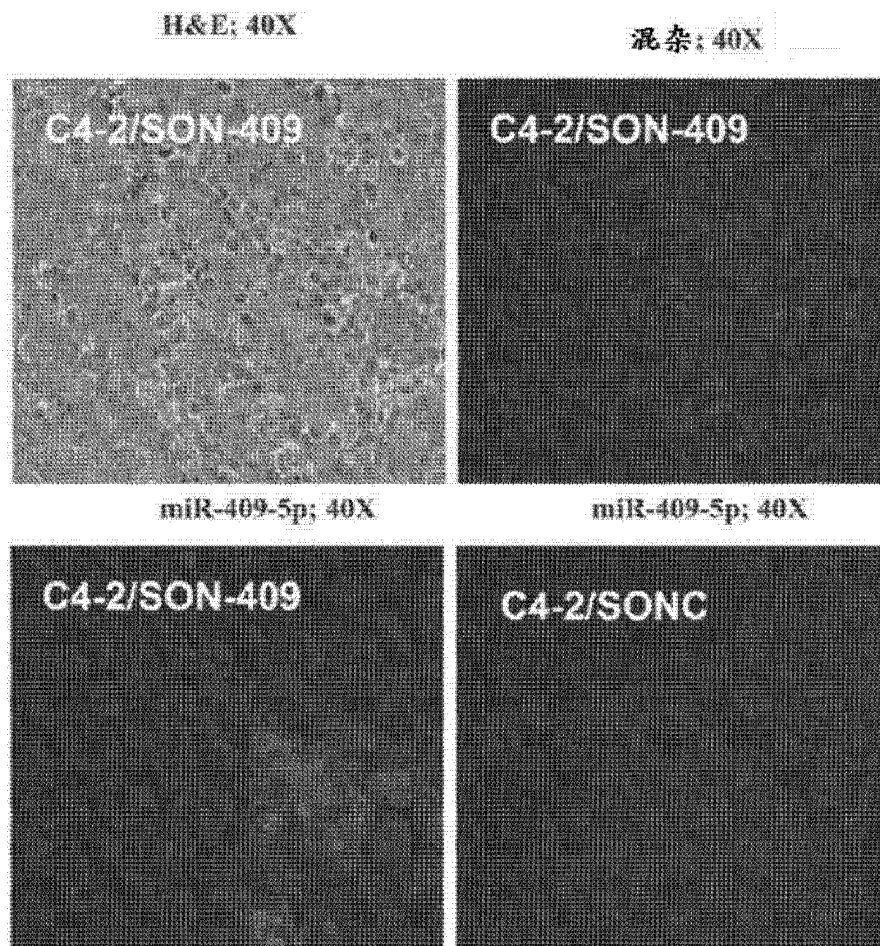


图 11

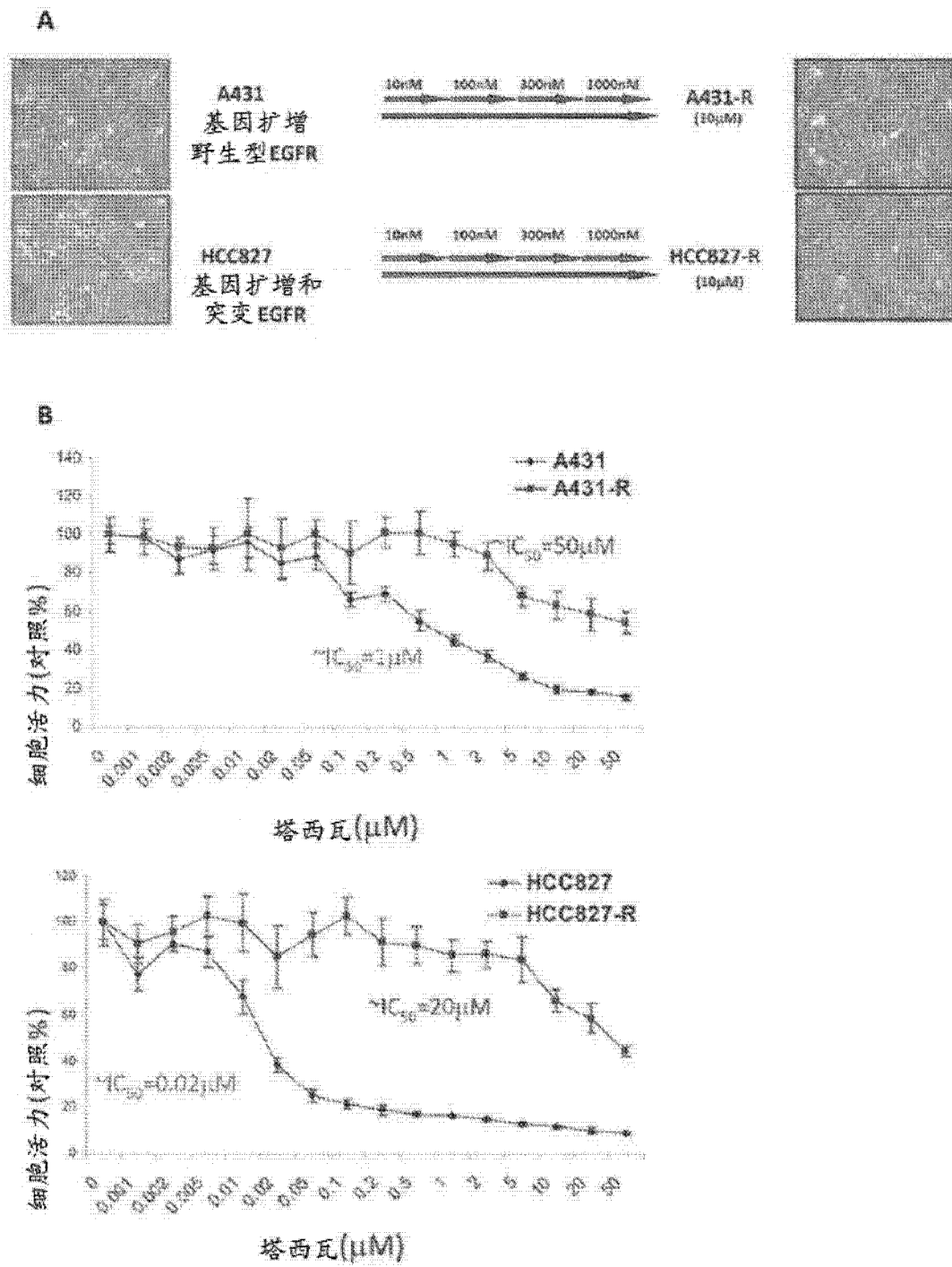


图 12

EGFR-TKI 抗性模型中的 EMT 基因					
	HCC827 R相对于S	A431 R相对于S		HCC827 R相对于S	A431 R相对于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 = 未分析出

— = R相对于S在表达方面无变化

图 13A

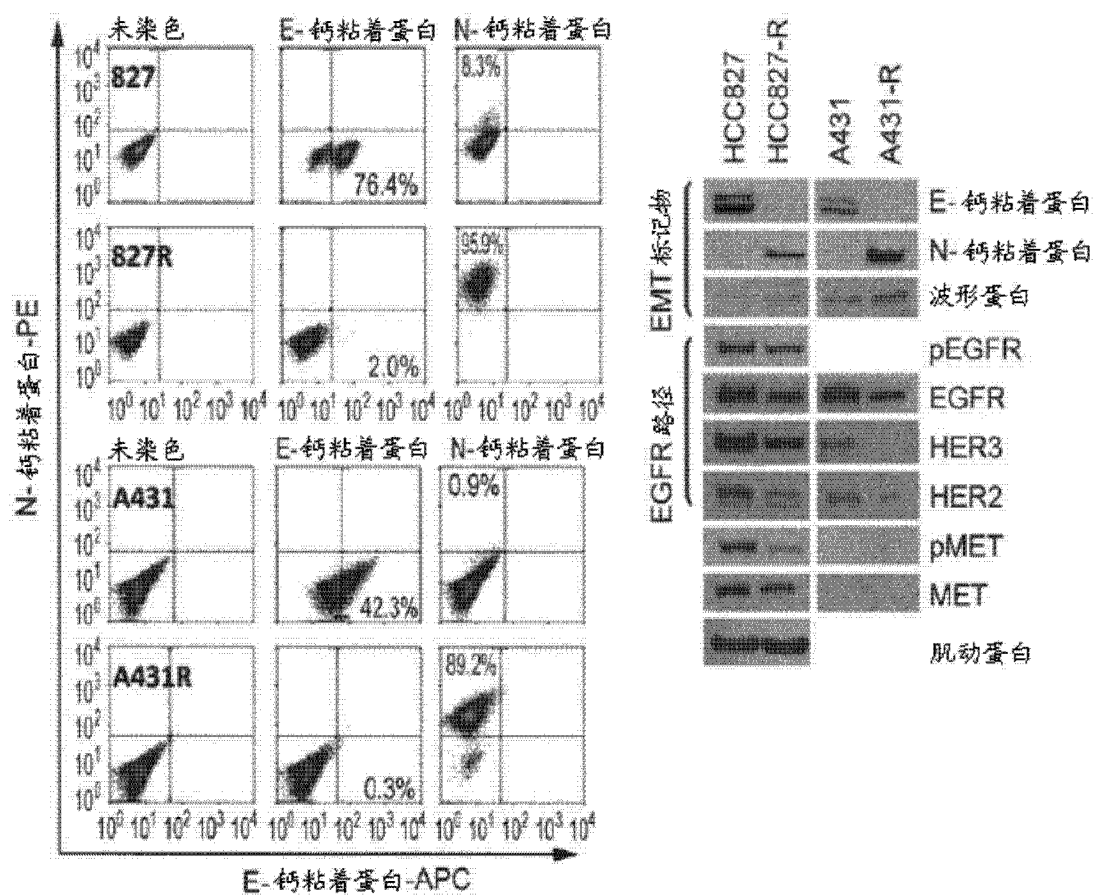


图 13B

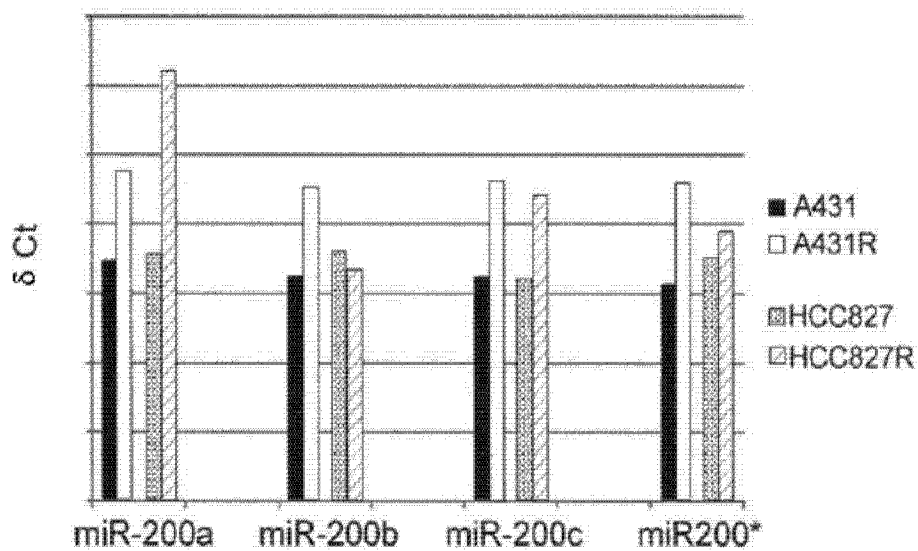


图 14

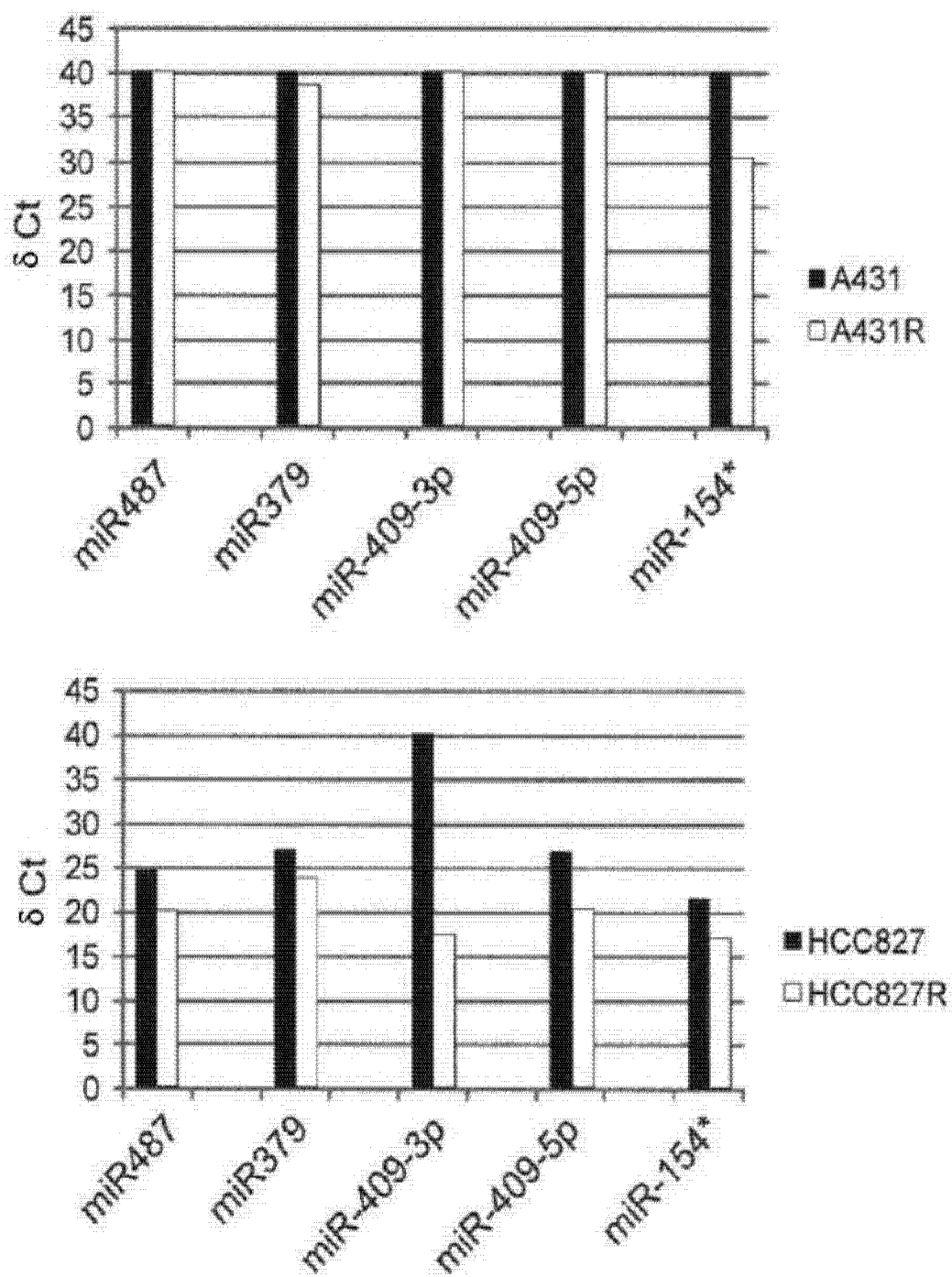


图 15

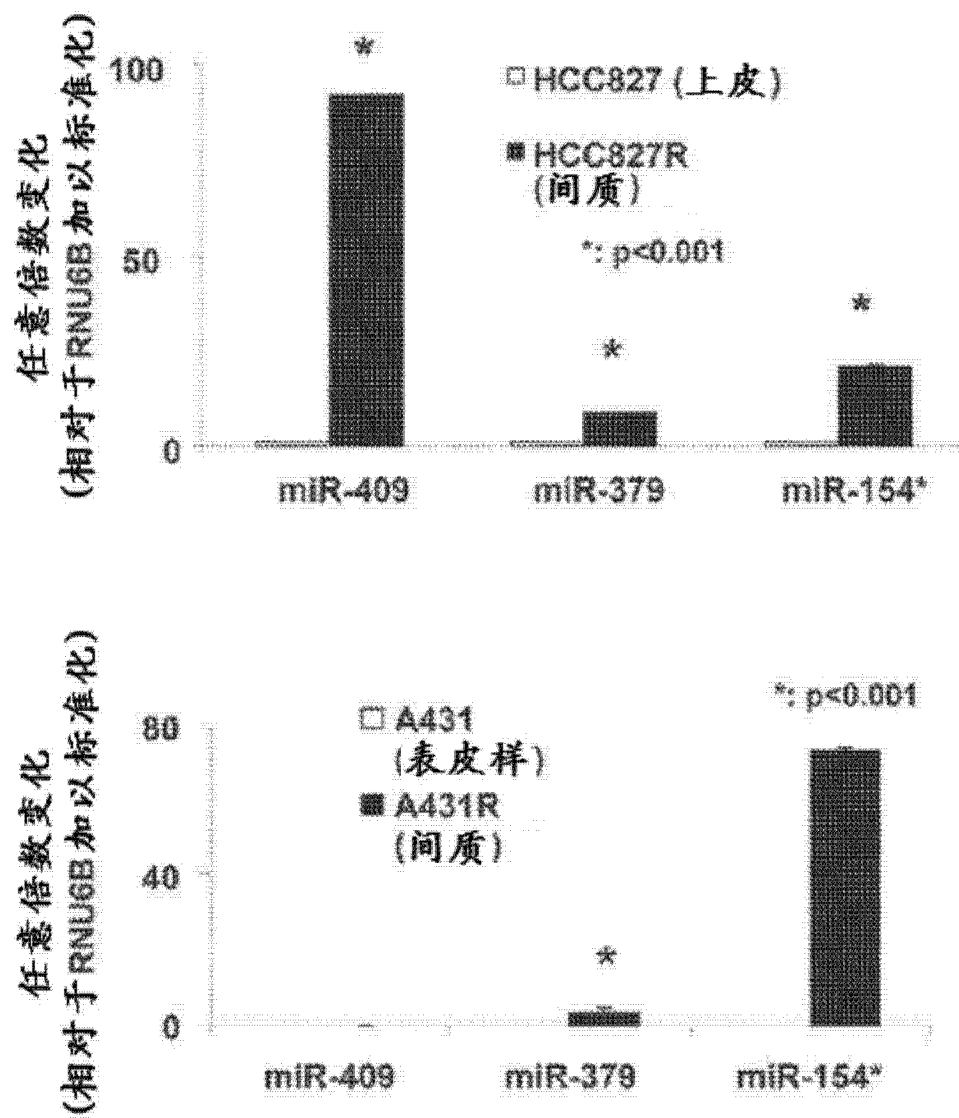
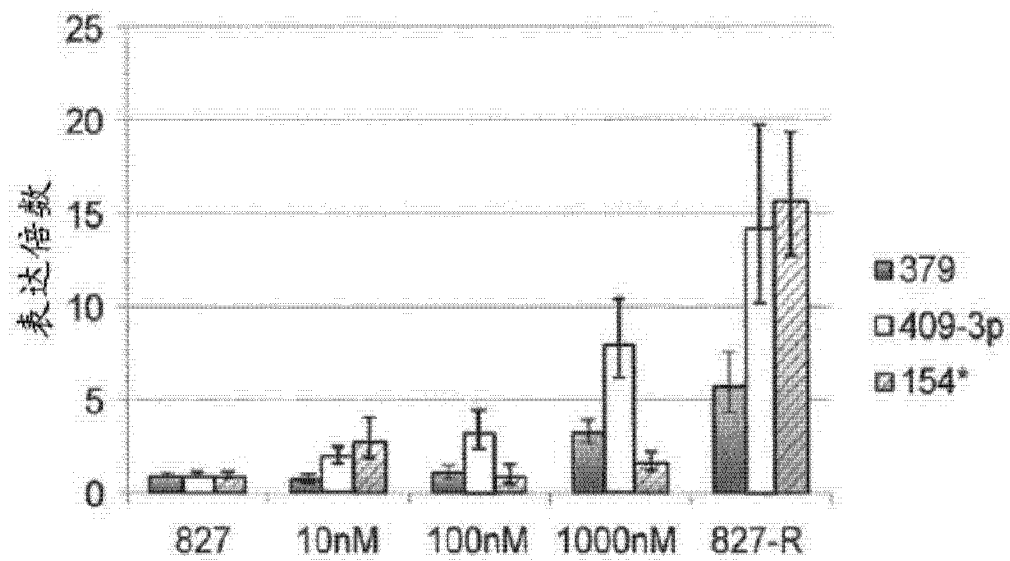
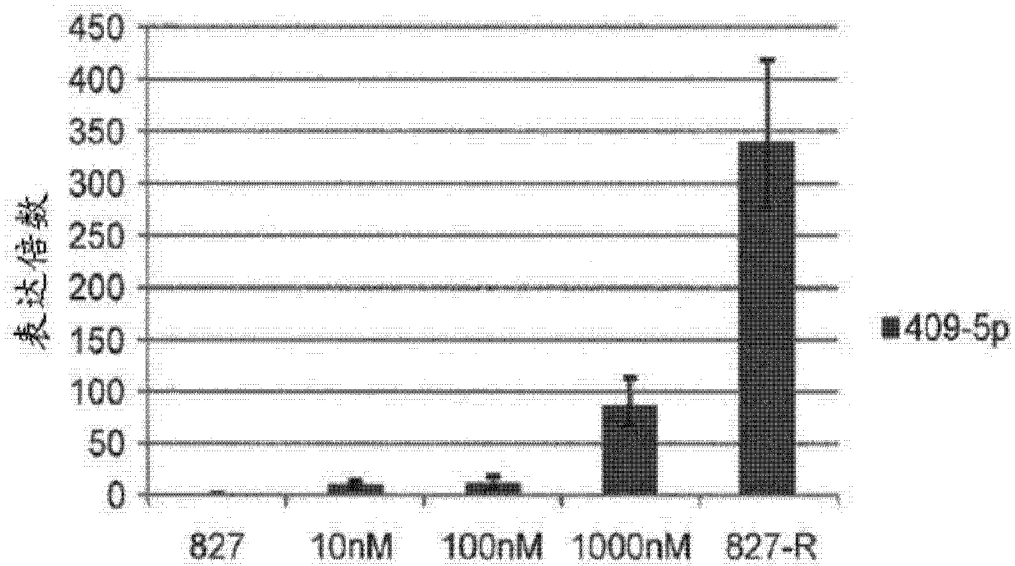


图 16



在中间药物浓度下的EGFR-TKI抗性阶段



在中间药物浓度下的EGFR-TKI抗性阶段

图 17

EGFR-TKI 抗性模型中的干性相关基因								
	HCC827 R 相对于 S	A431 R 相对于 S		HCC827 R 相对于 S	A431 R 相对于 S		HCC827 R 相对于 S	A431 R 相对于 S
PSCA	—	↓	CD34	↓	↑	GFI1	↑	NA
CD133(PROM1)	↓	↓	CD90 (THY-1)	—	↓	WNT1	—	NA
CD49f (ITGA6)	—	↓	CD24	↓	↓	NANOG	↑	NA
p63	↓	↓	ESA	NA	NA	8MI1	—	NA
Scα-1 (ATXN1)	↓	↓	ABCG2 (BCRP)	—	—	SOX2	—	NA
ALDH1	↑	↓	ITGA2	↓	↓	NOTCH1	—	NA
CD61 (ITGB3)	↑	↑	PECAM	↓	—	NOTCH2	—	NA
CD29 (ITGB1)	↑	↑	EdCAM (TACSTD1)	↓	↓			
MUC1	NA	NA	PDX1	↑	↓			
CD44	↑	↑	SHH	↑	↓			
OCT-4	↓	—	GLI-1	↑	↓			

NA = 未分析出

— = R 相对于 S 在表达方面无变化

图 18