

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 93/14182

※ 申請日期： 93-12-31

※IPC 分類：A61B

A61K 31/282, C12Q 1/68

A61P 35/00, A61K 48/00

一、發明名稱：(中文/英文)

預測並克服卵巢癌中化療抗性及預測大腸癌發生的方法

METHODS FOR PREDICTING AND OVERCOMING RESISTANCE TO
CHEMOTHERAPY IN OVARIAN CANCER AND FOR PREDICTING
COLON CANCER OCCURRENCE

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

賓州研究基金會

THE PENN STATE RESEARCH FOUNDATION

代表人：(中文/英文)

羅諾德 J 休斯

HUSS, RONALD J.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國賓州校園市老緬恩街 304 號

304 OLD MAIN, UNIVERSITY PARK, PA 16802, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 1 人)

姓 名：(中文/英文)

薩瑪 艾-穆蘭尼

AL-MURRANI, SAMER

國 籍：(中文/英文)

伊拉克 IRAQ

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2003 年 12 月 31 日；60/533,505

2. 美國；2004 年 12 月 30 日；11/026,734

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

相關專利之交叉參考資料

本申請案係關於及主張2003年12月31日申請之美國臨時專利申請案第60/533,505號之優先權，該案之揭示以引用的方式併入本文中。

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用以預測卵巢癌患者之腫瘤是否對化療抗性之方法及用以決定一個體病患是否有大腸癌的方法。本發明亦關於用以監測對於治療卵巢癌的病患之治療的有效性之方法。本發明更關於用以治療卵巢癌及大腸癌之方法。此外，本發明係關於用以篩選可以抑制腫瘤細胞，尤其是卵巢癌或大腸癌細胞的生長之化合物的方法。本發明亦關於用以降低或抑制對於化療藥物治療或療法抗性之方法，特別是於對習見化療處理法有抗性的卵巢癌細胞中。

【先前技術】

卵巢癌為具有60%死亡率之最致命的婦科惡性腫瘤。此疾病於不同臨床階段之五年存活率為如下：第一期>90%，第二期=80%，第三期=20%及第四期=10%；於此疾病的晚期存活率有顯著的下降。對此疾病後期之照護標準治療包括減積手術(cytoreductive surgery)接著化療。

對於大部分患者，有低存活概率，因為所有病患之大約75%於疾病的第三及四期被診斷出，及不良預後與於其後期時疾病的過遲診斷有關。對於現在可行的化療藥劑之抗性為另一個主要問題。雖然於開始治療後在75%病患中達

到完全臨床反應，大部分將逐漸產生復發疾病及需要再治療。不幸的是，絕大多數將終於逐漸產生化學抗性及屈服於此疾病。

化學抗性為一種複雜的現象，其包含數種基因及基因產物在表現及生物活性之改變。可使用不同地表現於反應的及不反應的個體之基因或基因家族作為分子標記來預測何者病患可能對特定化學療法藥劑或其組合有抗性，如同臨床上典型使用。此外，於化學抗性的個體中過量表現的基因可為抑制的目標，其可能降低癌細胞對化療試劑的抗性。

如同具有卵巢癌，當疾病於早期被診斷時，具有結腸直腸癌的病患之存活率為最佳。若將癌症早期偵測出，大腸癌病患的5年存活率大約為90%；不幸的是，雖然增加的檢查及預防措施，僅有37%癌症於此早期發現。當癌症已區域地展開至包含其他器官，存活率降低至大約64%，在癌症已轉移後，其劇烈地降低(8%)(Cancer Facts and Figures 2002; American Cancer Society publication)。

因此，有需要於疾病過程的進程中早期鑑定大腸及卵巢癌，且特別需要鑑定為化學抗性的癌症。更明確而言，因為技藝中已知癌細胞的行為，關於其腫瘤生成能力(tumorigenicity)及其對化療藥物的抗性兩者係由尚未完全清楚的特定基因組合之表現居間作用，技藝中有需要鑑定擔任卵巢癌化學抗性之有效分子標記之基因及集合或基因組合，以及提供卵巢癌及大腸癌臨床上有效治療目標之此類基因或基因組合。

【發明內容】

本發明提供方法及試劑以鑑定基因涉及(或其表現受其調控，或其中該受調控的表現有關於或負責)對化療藥物治療之抗性。特別是，本發明提供與化療藥物治療之抗性有關的基因(或其表現受如此調控，或其中該受調控的表現有關或負責化療藥物治療之抗性)，以及多個基因之受調控基因表現模式，其中該模式為化療藥物抗性細胞之特性，特別是藥物抗性卵巢癌細胞。本發明更提供方法用以鑑定與一或多個該基因交互作用或影響其表現或活性之化合物。同時提供的是該化合物，其有用於作為用以治療卵巢癌之化療藥劑之另一選擇或結合使用，特別是對已變成或為對習見化療處理有抗性的癌症。本發明更提供用以監測化療處理之方法及試劑以鑑定病患的腫瘤為或已變成對化療藥劑有抗性。

本發明提供方法以鑑定降低化療藥物抗性及抑制、延遲或避免對化療試劑有抗性之腫瘤細胞(最佳的是卵巢癌細胞)生長之化合物，此方法包含步驟有：(a)使在化療藥物存在中生长的化療藥物抗性細胞與測試化合物接觸一段時間或於一濃度，其中細胞對藥物有抗性及其中細胞表現於化學抗性卵巢癌細胞中過量表現之至少一種基因，其中過量表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、

SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082(如由表1中提出的基因庫登錄號確認)；(b)分析該細胞在有或無測試化合物存在中一或多種該基因或基因產物之表現或活性；及/或(c)比較在有或無測試化合物存在中細胞生長及/或至少一種基因或基因產物之表現或活性，其中若在測試化合物存在中基因或基因產物之表現或活性相對於在無測試化合物中基因表現降低，或若在化合物存在中細胞生長受抑制，或兩者，將化合物鑑定為抑制化學抗性腫瘤細胞生長之化合物。於某些具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

再者，本發明提供方法以鑑定降低藥物抗性及抑制、延遲或避免對化療試劑有抗性之腫瘤細胞(最佳的是卵巢癌細胞)生長之化合物，此方法包含步驟有：(a)使在化療藥物存在中生長的化療藥物抗性細胞與測試化合物接觸一段時間或於一濃度，其中細胞對藥物有抗性及其中相較於測試化合物細胞表現於化學抗性卵巢癌細胞中以少於正常量表現的基因，其中基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10(如由表1中提出的基因庫登錄號確認)；(b)分析該細胞在有或無測試化合物存在中之細胞生長及/或基因表現或基因產物活性；及(c)比較在有或無測試化合物存在中基因表現或基因產物活性，其中若(i)在測試化合物存在中基因表現或基因產物活性相對於在無測試化合

物中基因表現或基因產物活性增加，及/或(ii)若在化合物存在中細胞生長受抑制，或(iii)若細胞生長受抑制同時基因的表現及/或活性增加，將化合物鑑定為抑制化學抗性腫瘤細胞生長之化合物。於某些具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

本發明提供方法以降低藥物抗性，或抑制、延遲或避免腫瘤細胞之生長，或兩者，其包含步驟有：使腫瘤細胞與細胞基因的至少一種抑制劑接觸，其中細胞基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082在化療藥物存在中一段時間或以一濃度，其中細胞在不存在細胞基因抑制劑時對藥物有抗性。於較佳具體實施例中，腫瘤細胞為人類腫瘤細胞，及更佳的是為卵巢癌細胞。於特別的觀點中，將根據本發明確認的一或多個基因用專門設計來鎖定一或多種該基因之反意義RNA或siRNA分子來抑制。於其他的觀點中，將該基因的基因產物利用此等蛋白質之抑制劑來抑制。

本發明提供用以降低腫瘤細胞之藥物抗性的方法，包含步驟有使腫瘤細胞與至少一種化合物接觸，其增加細胞基

因的表現或活性，其中細胞基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10，在化療藥物存在或不存在一段時間或以一濃度，其中在不存在增加HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10之表現或活性的化合物時細胞對藥物有抗性。於較佳具體實施例中，腫瘤細胞為人類腫瘤細胞，及更佳的是為卵巢癌細胞。

本發明也提供用以抑制、延遲或避免腫瘤細胞生長之方法，包含步驟有使腫瘤細胞與至少一種化合物接觸，其增加細胞基因的表現或活性，其中細胞基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10，在化療藥物存在或不存在一段時間或以一濃度，其中在存在增加HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10之表現或活性的化合物時與不存在該化合物時細胞增殖相較，細胞增殖減緩或受抑制。於較佳具體實施例中，腫瘤細胞為人類腫瘤細胞，及更佳的是為卵巢癌細胞。

於另一個觀點中，本發明提供用以抑制、延遲或避免腫瘤細胞(最佳的是卵巢癌細胞)生長之方法，方法包含步驟有使腫瘤細胞與化療藥物及細胞基因的至少一種抑制劑之組合接觸，其中細胞基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、Grancalcin、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、或KIAA0082。於特別的觀點中，細胞基因為

MetAP2，化療藥物為以鉑為基礎，及至少一種抑制劑為煙曲黴素(fumagillin)或煙曲黴素的衍生物。於另一個特別的觀點中，細胞基因為鈣活化酶(Calpain)2，化療藥物為以鉑為基礎，及至少一種抑制劑為N-乙醯基-白胺醯基-白胺醯基-正白胺醛(ALLN, N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal)或其衍生物。示於表1中的細胞基因之抑制劑可為例如專門設計來鎖定示於表1中的基因之siRNA分子或shRNA分子，或小分子抑制劑。

於另一個觀點中，本發明提供用以抑制、延遲或避免腫瘤細胞(最佳的是卵巢癌細胞)生長之方法，方法包含步驟有使腫瘤細胞與化療藥物及增加細胞基因的表現或活性之至少一種化合物之組合接觸，其中細胞基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10。於較佳具體實施例中，腫瘤細胞為人類腫瘤細胞，及更佳的是為卵巢癌細胞。

本發明也提供用以預測卵巢癌患者的腫瘤是否將對化療處理有抗性之方法，包含步驟有：(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、

SRB1或KIAA0082；(b)於包含有非腫瘤組織樣品之控制組樣品(最佳的是來自腫瘤起源的組織)中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，相當於在子部件(a)中偵測的一或多個表現的基因或基因產物，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082；及(c)比較於步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與於步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中若於步驟(a)中偵測的量比步驟(b)中偵測的量至少20%，則預測患者將對化療有抗性。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。於特別的觀點中，控制組樣品為取自對化療有反應的癌症病患之生物樣品。於某些具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

於特別的觀點中，當表現於來自癌症患者的生物樣品中的MetAP2之測量量大於有反應的個體或於來自無卵巢癌的個體之卵巢組織中偵測的量，本方法預測患者將對以鉑為基礎的化療有抗性。

本發明也提供用以預測卵巢癌患者的腫瘤是否將對化療處理有抗性之方法，包含步驟有：(a)於取自患者的生物樣

品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10；(b)於控制組樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，相當於在子部件(a)中偵測的一或多個表現的基因或基因產物，其中表現的基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10；及(c)比較於步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與於步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中若於步驟(a)中偵測的量比步驟(b)中偵測的量小至少20%，更佳至少50%，則預測患者將對化療有抗性。於特別的觀點中，控制組樣品為取自對化療有反應的癌症病患之生物樣品。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。於某些具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

本發明更提供用以監測卵巢癌患者的疾病發展之方法，特別是以化療處理治療的卵巢癌病患，包含步驟有：(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262、MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、

FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082；(b)利用取自患者隨後收集的生物樣品重複步驟(a)；及(c)比較於步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與於步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中藉由偵測於隨後收集的生物樣品中表現的基因或基因產物之量與取自步驟(a)中的生物樣品比較之變化而監測疾病的發展，及當於步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量大於在步驟(a)中偵測的表現的基因或基因產物之量，藉而偵測到疾病發展。於某些具體實施例中，病患於步驟(a)中偵測基因表現量及於步驟(b)中偵測基因表現量之間的時期中接受化療或其他治療。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。於較佳具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

本發明更提供用以監測卵巢癌患者的疾病發展之方法，特別是以化療處理治療的卵巢癌病患，包含步驟有：(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為HMT1、NAIP、eEF1ε、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10；(b)利用取自患者隨後收集的生物樣品重複步驟(a)；及(c)比較於步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與於步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中藉由偵測於隨後收集的生物樣品中表現的基因或基因產物之量與取自步驟(a)中的生物樣品比較之變化而監測疾病的發展，及當於步驟(b)中

偵測的表現的基因或基因產物之量小於或等於在步驟(a)中偵測的表現的基因或基因產物之量，藉而偵測到疾病發展。於某些具體實施例中，病患於步驟(a)中偵測基因表現量及於步驟(b)中偵測基因表現量之間的時期中接受化療或其他治療。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。於某些具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

此外，本發明提供用以監測醫藥組合物作為治療癌症藥劑的有效性之方法，特別是卵巢或大腸癌於病患中，包含步驟有：(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082；(b)給予患者適當量之醫藥組合物；(c)利用取自患者隨後收集的生物樣品重複步驟(a)；及(d)比較於步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與於步驟(c)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中藉由偵測於隨後收集的生物樣品中表現的基因或基因產物之量與取自步驟(a)中的生物樣品比較之變化而監測醫藥組合物之有效性，及當於步驟(c)中偵測的

表現的基因或基因產物之量小於在步驟(a)中偵測的表現的基因或基因產物之量及當醫藥組合物存在時腫瘤的生長減少(即減緩、延遲或抑制)，因此醫藥組合物為有效。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。於某些具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

本發明也提供用以監測醫藥組合物作為治療癌症藥劑的有效性之方法，特別是卵巢或大腸癌於病患中，包含步驟有：(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10；(b)給予患者適當量之醫藥組合物；(c)利用取自患者隨後收集的生物樣品重複步驟(a)；及(d)比較於步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與於步驟(c)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中藉由偵測於隨後收集的生物樣品中表現的基因或基因產物之量與取自步驟(a)中的生物樣品比較之變化而監測醫藥組合物之有效性，及當於步驟(c)中偵測的表現的基因或基因產物之量大於在步驟(a)中偵測的表現的基因或基因產物之量及當醫藥組合物存在時腫瘤的生長減少(即減緩、延遲或抑制)，因此醫藥組合物為有效。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。於某些具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

本發明也提供偵測大腸癌之方法，包含步驟有：(a)自動

物(較佳為人類)得到生物樣品；(b)於生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、或MetAP2；(c)於包含有非腫瘤大腸組織樣品之控制組樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量；(d)比較來自步驟(b)中一或多個表現的基因或基因產物之量與於步驟(c)中的量，其中若與步驟(c)中的量相較，於步驟(b)中的量有差異，偵測到大腸癌。於步驟(a)中取得的生物樣品中與於步驟(c)中取得的生物樣品比較，偵測的差異可為一或多個該基因之過度表現，或可為一或多個該基因之缺乏或過少表現。例如，若S100A10、S100A11、SPARC、及/或MetAP2之量於步驟(b)中比於步驟(c)中的量大，及/或若鈣活化酶(Calpain)2之量於步驟(b)中比於步驟(c)中的量小，偵測到大腸癌。於某些具體實施例中，動物為人類，較佳的是，具有大腸癌的人類。較佳的是，生物樣品為大腸組織樣品，更佳的是息肉及再更佳的是腺瘤性息肉(Adematous polyp)，其一般用於本技藝中作為大腸篩選活動的組織樣品。於某些具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

於再另一個具體實施例中，本發明提供用以在動物中(較佳的是人類)診斷癌症及/或化療藥物抗性之方法，包含步驟有偵測於二或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量的變化模式。於特別的具體實施例中，表現的基因為示於

表1中的基因。一般而言，本發明的此等方法包含步驟有：

(a)自動物(較佳為人類)得到生物樣品；(b)於生物樣品中偵測二或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為示於表1中；(c)於控制組樣品中偵測二或多個表現的基因或基因產物之量；(d)藉由比較來自步驟(b)之二或多個表現的基因或基因產物之量與於步驟(c)中的量，決定二或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量的變化模式，其中模式與癌症例如大腸或卵巢癌，或藥物抗性例如對順鉑的抗性有關。於某些具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

本發明也提供用以於具有卵巢癌動物中偵測化療藥物抗性之方法，方法包含步驟有：

(a)於取自動物的生物樣品中偵測多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082；(b)於包含有非腫瘤卵巢組織或來自對化療有反應的病患之腫瘤組織之控制組樣品中偵測該多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，相當於在子部件(a)中偵測的多個表現的基因或基因產物，其中表現的基因為

S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082；及(c)比較於步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與於步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中若於步驟(a)中偵測的量比步驟(b)中偵測的量至少20%，則預測患者將對化療有抗性。如本文中提供，多個該基因其中於步驟(a)中偵測的量比步驟(b)中偵測的量至少1.2倍定義為腫瘤樣品之對化療藥物有抗性之特定基因表現模式。於特別的觀點中，控制組樣品為取自對化療有反應的癌症病患之生物樣品。較佳的是，一或多種該基因之表現於步驟(a)中偵測的腫瘤樣品中比於步驟(b)中偵測的控制組樣品為大。於較佳具體實施例中，動物為人類，最佳的是人類癌症患者。如本文中揭示，本發明更提供一種基因表現模式，當偵測到該基因表現模式，其預測對該化療藥物的抗性。於較佳具體實施例中，藉由分析生物樣品，尤其是利用一系列對本文中確認的多種基因產物專一的核酸(基因)探針或抗體，偵測基因表現。

有利地，一些本文中鑑定的基因從未確認為與卵巢或大腸癌相關且可證實為用於介入此等疾病之新穎目標。

本發明之明確較佳具體實施例由下列某些較佳具體實施

例之更詳細說明及專利申請範圍將變成更明白。

【實施方式】

本發明提供用以抑制、延遲或避免腫瘤細胞生長之方法，包含步驟有使腫瘤細胞在細胞有抗性的濃度之化療藥物存在中與一或多種細胞基因之表現或活性的至少一種調控劑接觸，其中細胞基因為示於表1中的基因，及其中使腫瘤細胞與該基因表現調控劑接觸降低、抑制、延遲或避免腫瘤細胞中的藥物抗性。腫瘤細胞可為例如卵巢癌。於一個具體實施例中，可將腫瘤細胞於活體內接觸(如未曾自病患取出的細胞)。

使用於本文中之用詞"生物樣品"包括(但不限於)得自動物的組織或體液，較佳的是哺乳類及最佳的是人類。例如，生物樣品可為切片材料、骨髓樣品、血液、血漿、血清或其細胞部分、尿、唾液、眼淚、或衍生自生物來源的細胞。於一個具體實施例中，哺乳類為可能具有或先前診斷為具有或需要篩選癌症的人類，特別是卵巢或大腸癌。於某些具體實施例中，生物樣品為腫瘤樣品。

如本文中使用，將知用詞"卵巢癌"普遍地意指上皮卵巢癌，其包含由卵巢組織所有診斷的人類癌症之約80%。其餘(包含生殖細胞衍生的卵巢癌及透亮細胞卵巢癌)為罕見，及常被誤診。在這個範圍內，如本文中揭示的基因表現變化也見於此等較少腫瘤類型中，本發明之方法及組合物也適用。

如本文中使用，基因表現或基因產物活性之"調控劑"可

為可造成基因表現或基因產物之活性增加或減少之任何化學化合物、核酸分子、胜肽或多胜肽。於某些具體實施例中，本發明的調控劑為造成一或多種細胞基因之表現或活性增加之化合物，其表現或活性於對化療試劑有抗性的腫瘤細胞中為降低；此類調控劑於本文中稱為"活化劑"。於其他具體實施例中，調控劑為一或多種細胞基因之表現或活性之抑制劑，特別是其表現於對化療試劑有抗性的腫瘤細胞中為增加之基因；此類調控劑於本文中稱為"抑制劑"。

如本文中使用的，"抑制劑"可為可降低基因產物活性或直接干擾基因表現之任何化學化合物、核酸分子、胜肽或多胜肽，如針對一基因產物之抗體。例如，本發明之抑制劑可直接或間接抑制由一基因編碼的蛋白質之活性。例如，藉由結合蛋白質及因而避免蛋白質與其原先的目標(如受體)結合，可達到直接抑制。例如，藉由結合至蛋白質原先的目標，如受體或結合伴侶，因而阻擋或降低蛋白質活性，可達到間接抑制。再者，本發明的抑制劑可藉由降低或抑制基因的表現而抑制基因，尤其是藉由干擾基因表現(轉錄、加工、轉譯、轉譯後修飾)，例如，藉由干擾基因的mRNA及阻擋基因產物的轉譯或藉由基因產物之轉譯後修飾，或藉由造成細胞內定位的改變。

如本文中使用的，"活化劑"可為可增加基因產物活性(如藉由穩定基因產物、避免其蛋白質水解分解或增加其酵素或結合活性或直接活化基因之表現)之任何化學化合物、核酸分子、胜肽或多胜肽。本發明之活化劑可直接或間接增加

由一基因編碼的蛋白質之活性。例如，藉由結合蛋白質及因而增強蛋白質與其原先的目標(如受體)之結合，可達到直接活化。例如，藉由結合至蛋白質原先的目標，如受體或結合伴侶，及增強活性，如藉由增加目標的有效濃度，可達到間接活化。再者，本發明的活化劑可藉由增加基因的表現而活化基因，如藉由增加基因表現(轉錄、加工、轉譯、轉譯後修飾)，例如，藉由穩定基因的 mRNA 及阻擋 mRNA 轉錄體的分解，或藉由基因產物之轉譯後修飾，或藉由造成細胞內定位的改變。

如本文中所述，於有化療抗性的卵巢腫瘤細胞中的數種基因之表現實質上不同於化療敏感性卵巢腫瘤細胞中的表現。表 1 提供利用說明於以下實例中的方法確認的此類基因清單。表也摘要此等基因於對廣泛使用的化療藥劑順鉑敏感性或有抗性細胞中之表現模式。

表 1

基因庫 登錄 #	名稱	染色體 位置	蛋白質 資訊	當於細胞株中有效時的 表現模式
BC015973	S100A10 P11 CLP11 依鈣結合蛋白 (Calpactin)1 輕鏈 42C	1q21.3	細胞外96個 胺基酸	隨之增加而增加 對順鉑抗性
BC001410	S100A11 S100C Calgizzarin	1q21.3	細胞外 105個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
AF261089	鈣活化酶(Calpain)2 CANPL2 MCANP	1q41- q42.11	細胞質及細 胞膜 700個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC004974	SPARC 骨聯蛋白 (Osteonectin) BM-40	5q31.3-q33.1	細胞外 303個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC013782	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	12q22	細胞質 478個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC015525	KLK6 Zyme Neurosin 蛋白質分解酶M	19q13.33	細胞外 244個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	19q13.33	核 361個胺基酸	隨之減少而增加對順鉑 抗性
U31913	ARA9 XAP2	11q13.3	細胞質 330個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
D83735	肌動蛋白結合蛋白 (Calponin)2	19q13.3	細胞質 309個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
U19251	NAIP	5q13.1-13.2	細胞質 1403個胺基 酸	隨之減少而增加對順鉑 抗性
BC005291	eEF1ε p18	6p24.3-p25.1	細胞質 174個胺基酸	隨之減少而增加對順鉑 抗性
AF015608	RNPS1	16p13.3	細胞質	隨之增加而增加對順鉑 抗性
U49436	eIF5 eIF5A	14q32.32	細胞質 431個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC013590	eIF2Bε	3q27.1	細胞質	隨之增加而增加對順鉑

基因庫 登錄 #	名稱	染色體 位置	蛋白質 資訊	當於細胞株中有效時的 表現模式
			721個 胺基酸	抗性
M65217	HSF2 HSTF2	6q22.31	細胞質及核 536個 胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
AB010427	WDR1 NORI-1	4p16.1	細胞質 606個 胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC001134	融合的腳趾 (Ft1)	16q12.2	未知 292個 胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC004880	NM23D mn23-H4	16p13.3	粒腺體內膜 空間 187個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
U10439	ADAR1	1q21.1-q21.2	核 1226個胺基 酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC005214	Grancalcin	2q24.2	細胞質/膜 217個	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC009808	NBR1	17q21.1-q21.31	966個胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	17p11.2-p12	細胞質 399個 胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
AB007885	鋅指狀蛋白質-262 MYM	1p32-p34.3	未知	隨之增加而增加對順鉑 抗性
D88153	HYA22	3p21.3	未知	隨之增加而增加對順鉑 抗性
AB049635	MRPL4 CGI-28	19p13.2	粒腺體	隨之增加而增加對順鉑 抗性
AF037261	Vinexin β	8p21.3	與細胞骨架 結合	隨之增加而增加對順鉑 抗性
M59818	G-CSFR	1p35-34.3	細胞膜或可 溶形式 836個 胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC015710	RAB22A	20q13.32	與膜結合 194個 胺基酸	隨之減少而增加對順鉑 抗性
BC017201	IGFBP-7 MAC25	4q12	分泌的 282個	隨之增加而增加對順鉑 抗性

基因庫 登錄 #	名稱	染色體 位置	蛋白質 資訊	當於細胞株中有效時的 表現模式
	FSTL2		胺基酸	
BC011770	FAST激酶	7q36.1	細胞質 549個 胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
AB057597	TESK2	1p34.1	核/與細胞骨 架結合	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	12q24.31	細胞膜	隨之增加而增加對順鉑 抗性
BC031890	KIAA0082	6p21.1	未知 836個 胺基酸	隨之增加而增加對順鉑 抗性
NM_006312	NCOR2	12q24	核 2517個 胺基酸	隨之減少而增加對順鉑 抗性
BC032338	MT1	16q13	大部分核，可 分泌	隨之減少而增加對順鉑 抗性
X98494	MPP10	2p12-2p13.2	大部分核，可 分泌	隨之減少而增加對順鉑 抗性

於表I中以粗體表現的染色體位置已被報導為與卵巢癌相關(Pejoic, 1995, Ann. Med. 27:73-78)。

於一個具體實施例中，示於表I中的細胞基因之抑制劑可為例如小分子抑制劑、抗體、核酸如反意義核酸、短干擾RNA(siRNA, short interfering RNA)分子、或短法夾RNA(shRNA, short hairpin RNA)分子。此外，利用本文中說明的方法或利用技藝中已知的方法可明確地設計此類抑制劑。例如，針對由示於表I的基因編碼的蛋白質之抗體，特別是中和抗體及較佳的是單株抗體，可由習見的方式產生，如說明於例如由Harlow及Lane所著的"Antibodies: A Laboratory Manual"(Cold Spring Harbor Press, 1988)，將其以參考資料併於本文中。

於特別的具體實施例中，本發明的抑制劑為結合至編碼目標基因之mRNA的siRNA，其中目標基因為示於表I中的基因。

於較佳具體實施例中，由本發明提供的某些抑制劑為短干擾RNA(siRNA, short interfering RNA)類別。如本文中使用的用詞"短干擾RNA"或"siRNA"意指能夠RNA干擾或"RNAi"的雙股核酸分子，如揭示於例如Bass, 2001, Nature 411:428-429; Elbashir等人，2001, Nature 411:494-498;及Kreutzer等人，世界專利編號WO 00/44895; Zernicka-Goetz等人，世界專利編號WO 01/36646; Fire，世界專利編號WO 99/32619; Plaetinck等人，世界專利編號WO 00/01846; Mello及Fire，世界專利編號WO 01/29058; Deschamps-Depaillette，世界專利編號WO 99/07409；及Li等人，世界專利編號WO 00/44914。如本文中使用的，siRNA分子不一定限制於僅含有RNA的分子，也更包含具有RNAi能力或活性之經化學改質的核苷酸及非核苷酸。

短干擾RNA介導的RNAi已於許多系統中被研究。Fire等人為第一個觀察到RNAi於線蟲(*C. elegans*)中(1998, Nature 391:806)。Wianny及Goetz說明由dsRNA介導的RNAi於老鼠胚胎(1999, Nature Cell Biol. 2:70)。Hammond等人說明RNAi於以dsRNA(2000, Nature 404:293)轉染的果蠅細胞中。Elbashir等人說明藉由導入雙股合成的21個核苷酸之RNA於培養的哺乳類細胞，包括人類胚胎腎臟及子宮頸癌細胞株(HeLa)細胞而引發RNAi(2001, Nature 411:494)。此

等研究已證實當含有2個核苷酸3'突出時，包含有21個核苷酸之siRNA雙股為最有活性。再者，用2'-去氧或2'-O-甲基核苷酸取代siRNA股的一或兩股徹底破壞RNAi活性，而以去氧核苷酸取代3'端siRNA核苷酸則證實為可容忍。也證實於siRNA雙股中心的錯誤配對序列破壞RNAi活性。此外，此等研究也指出目標RNA中斷裂處的位置係由siRNA引導序列之5'端界定而非3'端(Elbashir等人，2001, EMBO J. 20:6877)。其他研究已指出siRNA雙股之目標互補股上的5'-磷酸為siRNA活性所必須及於細胞中利用ATP來維持siRNA上的5'-磷酸部分(Nykanen等人，2001, Cell 107:309)。然而，缺少5'-磷酸的siRNA分子當外生地導入時為有活性，暗示siRNA構體之5'-磷酸化可能於活體內發生。可將經化學改質的siRNA直接注入血液中做某些應用。

於某些具體實施例中，本發明提供表現載體，包含有編碼至少一種本發明siRNA分子之核酸序列，其方式為允許siRNA分子之表現。例如，載體可含有編碼包含有雙股之siRNA分子的兩股之序列。載體也可含有編碼為自身互補及因此形成siRNA分子之單一核酸分子的序列。此表現載體之非限制性實例係說明於Paul等人，2002, Nature Biotechnology 19:505; Miyagishi及Taira, 2002, Nature Biotechnology 19:497; Lee等人，2002, Nature Biotechnology 19:500; 及Novina等人，2002, Nature Medicine，線上發行，2003年6月3日。

於某些具體實施例中，根據本發明之siRNA分子可包含

傳遞媒介，尤其包括微脂粒、載子及稀釋劑及其鹽類，以給予對象，及可存在於醫藥組合物中。傳遞核酸分子之方法係說明於例如 Akhtar 等人，1992, Trends Cell Bio. 2:139; 反意義寡核苷酸療法用的傳遞策略，Akhtar 編著，1995，Maurer 等人，1999, Mol. Membr. Biol. 16:129- 140; Hofland 及 Huang, 1999, Handb. Exp. Pharmacol., 137:165-192; 及 Lee 等人，2000, ACS Symp. Ser. 752:184- 192，其皆以參考資料併於本文中。Beigelman 等人之美國專利編號 6,395,713 及 Sullivan 等人之世界專利 WO 94/02595 更說明用以傳遞核酸分子之一般方法。可利用此等規範來傳遞幾乎任何核酸分子。藉由許多熟悉本技藝者已知的方法可將核酸分子給予細胞，包括(但不限於)裝入微脂粒內、藉電離子透入法、或藉併入其他傳遞媒介，如水膠、環糊精、生物可分解的奈米膠囊、及生物黏附性微球、或藉由蛋白質載體(見例如 O'Hare 及 Normand 世界專利 WO 00/53722)。

或者，核酸/媒介組合可藉由直接注射或藉由利用灌流泵局部傳遞。本發明核酸分子之直接注射，無論是皮下、肌肉內、或皮膚內，利用標準針頭及針筒方法可進行，或藉由無針頭技術如說明於 Conry 等人，1999, Clin. Cancer Res. 5:2330-2337 及 Barry 等人，世界專利編號 WO 99/31262 中者。技藝中許多實例說明寡核苷酸之傳遞方法，藉由滲透泵(見 Chun 等人，1998, Neuroscience Letters 257:135-138, D'Aldin 等人，1998, Mol. Brain Research 55:151-164, Dryden 等人，1998, J. Endocrinol. 157:169-175, Ghirnikar 等人，

1998, *Neuroscience Letters* 247:21-24) 或 直接 灌 流 (Broaddus 等人, 1997, *Neurosurg. Focus* 3 條文 4)。其他傳遞途徑包括(但不限於)口服傳遞(如以藥片或藥丸形式)及/或腦脊髓膜內傳遞 (Gold, 1997, *Neuroscience* 76:1153-1158)。核酸傳遞及給予的更詳細說明係提供於 Sullivan 等人世界專利 WO 94/02595, Draper 等人, 世界專利 WO 93/23569, Beigelman 等人, 世界專利 WO 99/05094, 及 Klimuk 等人, 世界專利 WO 99/04819, 將其皆以參考資料併入本文中。

或者, 可將本發明的某些 siRNA 分子由真核生物啟動子表現於細胞內(見例如, Izant 及 Weintraub, 1985, *Science* 229:345; McGarry 及 Lindquist, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:399; Scanlon 等人, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1591-5; Kashani-Sabet 等人, 1992, *Antisense Res. Dev.*:3-5; Dorpulich 等人, 1992, *J. Virol.* 66:1432-41; Weerasinghe 等人, 1991, *J. Virol.* 65:5531-4; Ojwang 等人, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10802-6; Chen 等人, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:4581-9; Sarver 等人, 1990, *Science* 247: 1222-1225; Thompson 等人, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:2259; Good 等人, 1997, *Gene Therapy* 4:45; Miyagishi 等人, 2001, *Nucleic Acids Research* 29:2502; 及 Kunkel 及 Pederson, 1989 *Nucleic Acids Research* 17:7371)。熟悉本技藝者將知利用適當 DNA/RNA 載體可將任何核酸表現於真核細胞中。此核酸的活性可由其藉酵素的核酸自

原始轉錄體釋放而增加(Draper等人，世界專利 WO 93/23569,及 Sullivan等人，世界專利 WO 94/02595; Ohkawa 等人，1992, Nucleic Acids Symp. Ser. 27:15-6; Taira等人，1991, Nucleic Acids Res. 19:5125-30; Ventura等人，1993, Nucleic Acids Res. 21:3249-55; Chowrira等人，1994, J. Biol. Chem. 269: 25856)。

於本發明的另一個觀點中，可將本發明的RNA分子表現自插入DNA或RNA載體的轉錄單元(見例如，Couture等人，1996, TIG 12:510)。重組載體可為DNA質體或病毒載體。可將siRNA表現病毒載體基於例如(但不限於)腺相關病毒、反轉錄病毒、腺病毒、慢病毒(lentivirus)或 α 病毒。於另一個具體實施例中，使用pol III為基礎的構體來表現本發明的核酸分子(見例如 Thompson, 美國專利編號 5,902,880 及 6,146,886)。可將能夠表現siRNA分子的重組載體如上述傳遞，及存留於目標細胞中。或者，可使用病毒載體提供核酸分子的短暫表現。可將此載體視需要重複給予。一旦表現，siRNA分子與目標mRNA交互作用及產生RNAi反應。siRNA分子表現載體之傳遞可為全身性，如藉靜脈內或肌肉內給予，藉由給予自對象外植的目標細胞之後重新導入對象，或藉由允許導入理想目標細胞的任何其他方式(回顧見 Couture等人，1996, TIG.12:510)。

於一個具體實施例中，本發明提供一種表現載體，包含有編碼至少一種本發明siRNA分子之核酸序列。表現載體可編碼siRNA雙股之一或兩股，或自身雜交成為siRNA雙股之

單一自身互補股。可將編碼siRNA分子之核酸序列可操作地連接使得siRNA分子得以表現(見例如Paul等人, 2002, Nature Biotechnology 19:505; Miyagishi及Taira, 2002, Nature Biotechnology 19:497; Lee等人, 2002, Nature Biotechnology 19:500;及Novina等人, 2002, Nature Medicine, 線上發表6月3日)。於本文中使用的用詞"可操作地連接"來意指側邊序列的排列, 其中將如此說明的側邊序列配置或組合以便實施其平常功能。因此, 可操作地連接至編碼序列的側邊序列可能可以影響編碼序列的複製、轉錄及/或轉譯。例如, 當啟動子能夠指揮該編碼序列的轉錄時, 將編碼序列可操作地連接至啟動子。側邊序列不一定與編碼序列連續, 只要其正確地作用。因此, 例如, 介於未轉譯但轉錄的序列可存在於啟動子序列及編碼序列之間, 啟動子序列仍可被視為"可操作地連接"至編碼序列。

於另一個觀點中, 本發明提供一種表現載體, 包含有:
a)轉錄起始區域(如真核pol I, II或III起始區域); b)轉錄終止區域(如真核pol I, II或III終止區域); 及c)編碼至少一種本發明siRNA分子之核酸序列; 其中將該序列可操作地連接至該起始區域及該終止區域, 使得允許siRNA分子之表現及/或傳遞。視情況載體可包括蛋白質的開放讀碼區 (ORF, open reading frame)可操作地連接至編碼本發明siRNA之序列的5'側或3'側; 及/或內含子(介入序列)。

siRNA分子序列之轉錄可由真核RNA聚合酶I (pol I)、RNA聚合酶II (pol II)、或RNA聚合酶III (pol III)之啟動子

驅動。由 pol II 或 pol III 啟動子之轉錄於所有細胞中以高量表現；於特定細胞類型中之特定 pol II 啟動子量視附近存在的基因調控序列(增強子、沉默子等)的性質而定。也使用原核 RNA 聚合酶啟動，其限制條件為將原核 RNA 聚合酶酵素表現於適當細胞中(Elroy-Stein 及 Moss, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6743-7; Goa 及 Huang 1993, Nucleic Acids Res. 21:2867-72; Lieber 等人，1993, Methods Enzymol. 217:47-66; Zhou 等人，1990, Mol. Cell. Biol. 10:4529-37)。數個研究員已證實由此啟動子表現的核酸分子可於哺乳類細胞中作用(如 Kashani-Sabet 等人，1992, Antisense Res. Dev. 2:3-15; Ojwang 等人，1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10802-6; Chen 等人，1992, Nucleic Acids Res. 20:4581-9; Yu 等人，1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6340-4; L'Huillier 等人，1992, EMBO J. 11:4411-8; Lisiewicz 等人，1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8000-4; Thompson 等人，1995, Nucleic Acids Res. 23:2259; Sullenger 及 Cech, 1993, Science 262:1566)。更明確而言，轉錄單元如由編碼 U6 小核(snrRNA)、轉移 RNA(tRNA)及腺病毒 VA RNA 的基因衍生者有用於細胞中產生高濃度理想 RNA 分子如 siRNA Thompson 等人，1995, Nucleic Acids Res. 23:2259; Couture 等人，1996, TIG.12: 510; Noonberg 等人，1994, Nucleic Acid Res. 22:2830; Noonberg 等人，美國專利編號 5,624,803; Good 等人，1997, Gene Ther 4:45; Beigelman 等人，世界專利編號 WO 96/18736)。可將上述 siRNA 轉錄單元併入許多載

體以導入哺乳類細胞中，包括但不限於質體DNA載體、病毒DNA載體(如腺病毒或腺相關病毒載體)、或病毒RNA載體(如反轉錄或 α 病毒；回顧見Couture等人，1996, TIG. 12: 510)。

於另一個具體實施例中，本發明提供一種表現載體，包含有編碼至少一種本發明siRNA分子之核酸序列，其方式為允許該siRNA分子之表現。於特別的具體實施例中，表現載體包含有：a)轉錄起始區域；b)轉錄終止區域；及c)編碼siRNA分子之至少一股之核酸序列；其中將序列可操作地連接至起始區域及終止區域，使得允許siRNA分子之表現及/或傳遞。

於另一個具體實施例中，表現載體包含有：a)轉錄起始區域；b)轉錄終止區域；c)開放讀碼區；及d)編碼siRNA分子之至少一股之核酸序列，其中將序列可操作地連接至開放讀碼區的3'端；及其中將序列可操作地連接至起始區域、開放讀碼區及終止區域，使得允許siRNA分子之表現及/或傳遞。

於再另一個具體實施例中，表現載體包含有：a)轉錄起始區域；b)轉錄終止區域；c)內含子；及d)編碼至少一種siRNA分子之核酸序列，其中將序列可操作地連接至起始區域、內含子及終止區域，使得允許siRNA分子之表現及/或傳遞。

於另一個具體實施例中，表現載體包含有：a)轉錄起始區域；b)轉錄終止區域；c)內含子；d)開放讀碼區；及e)編碼

siRNA分子之至少一股之核酸序列，其中將序列可操作地連接至開放讀碼區的3'端；及其中將序列可操作地連接至起始區域、內含子、開放讀碼區及終止區域，使得允許siRNA分子之表現及/或傳遞。

於一個具體實施例中，藉由使腫瘤細胞與抑制SPARC的siRNA接觸而抑制腫瘤細胞的生長。或者，可將腫瘤細胞在腫瘤細胞有抗性的濃度之化療藥物存在下與siRNA接觸。為SPARC抑制劑之siRNA分子實例包括例如：

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

AAGCT CCA CCT GGA CTA CAT C (SEQ ID NO:2)；及

AATGA CAA GTA CAT CGC CCT G (SEQ ID NO:3)。

於另一個具體實施例中，藉由使腫瘤細胞與抑制MetAP2/p67的siRNA接觸而抑制腫瘤細胞的生長。或者，可將腫瘤細胞在腫瘤細胞有抗性的濃度之化療藥物存在下與siRNA接觸。為MetAP2/p67抑制劑之siRNA分子實例包括例如：

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

AAGCA CAT CGA CAA GTT AGA A (SEQ ID NO:5)；及

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

於另一個具體實施例中，藉由使腫瘤細胞與抑制鈣活化酶(Calpain)2的siRNA接觸而抑制腫瘤細胞的生長。或者，可將腫瘤細胞在腫瘤細胞有抗性的濃度之化療藥物存在下與siRNA接觸。為鈣活化酶(Calpain)2抑制劑之siRNA分子實例包括例如：

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

AAACT TCT TCC TGA CGA ATC G (SEQ ID NO:8) ; 及

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

於另一個具體實施例中，藉由使腫瘤細胞與S100A10的siRNA接觸而抑制腫瘤細胞的生長。或者，可將腫瘤細胞在腫瘤細胞有抗性的濃度之化療藥物存在下與siRNA接觸。為S100A10抑制劑之siRNA分子實例包括例如：

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

AAATT CGC TGG GGA TAA AGG (SEQ ID NO:60) ; 及

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

本發明提供用以抑制、延遲或避免腫瘤細胞生長之方法，包含步驟有使腫瘤細胞與化療藥物及至少一種細胞基因的抑制劑之組合接觸，其中細胞基因為示於表1中的基因。較佳的是，腫瘤細胞為卵巢癌細胞。化療藥物為技藝中已知，包括例如順鉑、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、卡鉑(carboplatin)、依託泊苷(etoposide)、六甲基胺、威克瘤(melphalan)及蒽環黴素(anthracyclines)。

於一個具體實施例中，示於表1中的細胞基因抑制劑可為小分子抑制劑。如本文中使用的，用詞"小分子"意指具有分子量小於約1500 g/Mol之分子。小分子可為例如小有機分子、胜肽或似胜肽分子。藉由實例，適用於本發明方法中的小分子抑制劑可為鈣活化酶(Calpain)抑制劑，如PD 147631、(25,35)-反-環氧基琥珀醯基-L-白胺醯基-胺基-3-甲基丁烷乙基醚(E-64-d)、N-乙醯基-白胺醯基-白胺醯基-

正白胺醛(ALLN, N-Acetyl-Leucyl-Leucyl-Norleucinal)、N-乙醯基-Leu-Leu-Met-al(ALLM 或 $C_{19}H_{35}N_3O_4S$)、或 MDL 18270；或 MetAP-2 抑制劑，如 TNP-470(也已知為 AGM 1170 或 $C_{19}H_{28}ClNO_6$)、煙曲黴素(fumagillin)($C_{26}H_{34}O_7$)、順-煙曲黴素(見 Kwon 等人，2000, J. Antibiot. 53:799-806)、fumagalone(見 Zhou 等人，2003, J. Med. Chem. 46:3452-3454)、或卵假散囊菌素(ovalicin)($C_{16}H_{24}O_4$)。也見 Han 等人，2000, Bioorganic & Medicinal Chem. Letters 10:39-43。

於一個具體實施例中，示於表 1 中的細胞基因抑制劑可為如上述界定之抑制劑。可使用抑制劑之任何組合，例如示於表 1 中特定基因之多重抑制劑、各抑制一或多個特定基因之抑制劑組合、或抑制示於表 1 中的多重基因之一種抑制劑，或其任何組合。

於特別的具體實施例中，發明的方法包含步驟有使腫瘤細胞與 MetAP2 抑制劑及以鉑為基礎的化療藥物之組合接觸。若藥物的主要成分為順鉑或卡鉑，視情況與紫杉醇或環磷琉胺(cyclophosphamide)組合，化療藥物為"以鉑為基礎"。MetAP2 之抑制劑可為例如煙曲黴素或煙曲黴素的衍生物，或 MetAP2 siRNA 如不限於 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、或 SEQ ID NO:6。

本發明也提供用以預測卵巢癌病患的腫瘤是否對化療處理有抗性的方法。於此等具體實施例中，方法包含步驟有：
(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由

此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為示於表1中；(b)於控制組樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為示於表1中；及(c)比較於步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與於步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中若於步驟(a)中偵測的量比步驟(b)中偵測的量相差至少20%，則預測患者將對化療有抗性。於一個具體實施例中，偵測的量為可為示於表1基因之mRNA量或由示於表1中的基因編碼的蛋白質量。於另一個具體實施例中，控制組樣品為取自有反應或正常的對象之生物樣品，即對治療有反應的個體或無癌症如卵巢癌者。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。

於一個具體實施例中，於步驟(a)及步驟(b)中表現的基因為一或多個 S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082，及若於步驟(a)中表現基因的量比步驟(b)中表現基因的量高至少約20%，則預測患者的腫瘤將對化療處理有抗性。

於特別的具體實施例中，於步驟(a)及步驟(b)中表現的基因為一或多個 Vinexin β 、G-CSFR、KLK6、SPARC、HYA22、鈣活化酶(Calpain)2、ARA9、肌動蛋白結合蛋白

(Calponin)2、MRPL4、eIF5、eIF2B ϵ 、IGFBP-7、FAST激酶、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、Grancalcin、鋅指狀蛋白質-262 MYM、RNPS1、KIAA0082、S100A10、S100A11、或MetAP2，及若於步驟(a)中表現基因的量比步驟(b)中表現基因的量高至少約20%，則預測患者的腫瘤將對化療處理有抗性。

於另一個具體實施例中，於步驟(a)及步驟(b)中表現的基因為一或多個HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MPP10或MT1，及若於步驟(a)中表現基因的量比步驟(b)中表現基因的量少至少約20%，較佳50%，則預測患者的腫瘤將對化療處理有抗性。

於特別的具體實施例中，於步驟(a)及步驟(b)中表現的基因為一或多個HMT1、eEF1 ϵ 、MPP10、RAB22A或MT1，及若於步驟(a)中表現基因的量比步驟(b)中表現基因的量少至少約20%，較佳50%，則預測患者的腫瘤將對化療處理有抗性。

因此如本文中揭示，本發明提供一或多種基因表現或基因產物模式，包含於化療藥物抗性卵巢癌細胞中比正常(即非腫瘤)細胞中有不同(即以較大或較小量)表現的多個該基因或其中由該基因編碼的蛋白質產物具有不同活性。根據本發明的方法使用該不同基因表現模式或蛋白質產物活性來偵測生物(最佳的是腫瘤)樣品中有化療藥物抗性的細胞，及因此有用於個體在臨床醫生開始關於重要的發病率及死亡率無效果的治療過程前預測腫瘤中藥物抗性。

普通熟悉本技藝者將知於本發明方法的實行中，可將病患的腫瘤樣品評估本文中確認的一或多個基因之表現。本文中確認的多個基因各預期顯示利用立即揭示的方法偵測的不同基因表現於自特定卵巢癌病患分離的個別腫瘤之比例，最佳的是高比例。也預期利用發明的預測方法所得的結果之正確性將隨顯示本文中揭示的不同基因表現分析的該基因數目增加而增加。

於一個具體實施例中，可使用本發明的方法於實際用化療藥物處理該病患前篩選需要化療處理的人類病患。因此，可使用發明的方法來篩選病患以使照護提供者決定用特定化療藥物治療該病患是否會無效。基於發明的方法預測為對化療無抗性的病患為用化療及/或示於表1中的基因抑制劑治療的人選。基於發明的方法預測為對化療有抗性的病患為用手術及/或化療處理結合示於表1中的基因抑制劑，或其他治療方法的人選。

於本發明方法的實行中，基因表現之偵測係藉由偵測編碼本文中確認的任何基因之mRNA表現於生物樣品中之量，例如藉由雜交分析如北方墨點或點漬墨點，或藉由放大方法如聚合酶鏈反應(PCR, polymerase chain reaction)，更佳的是與mRNA反轉錄成cDNA結合(RT-PCR)，及再更佳的是利用技藝中已知的定量即時RT-PCR方法，如本文中更詳細的說明。其他方式包括偵測該基因的蛋白質產物之量，於非限制性實例中藉由分析生物樣品利用蛋白質專一的抗血清，更佳的是抗體及再更佳的的是專一於本文中確

認的任何特定基因之單株抗體。也可藉由分析生物樣品之蛋白質產物的酵素或抗原活性決定蛋白質表現量。本發明也提供基因或抗體陣列來偵測於化療藥物抗性腫瘤(特別是卵巢及大腸腫瘤)中過量或過低表現之基因表現，其中核酸探針或抗體於陣列中的排列產生可識別的，較佳為機器可讀的模式顯示腫瘤樣品為化療藥物有抗性，及/或不同的、可識別的模式顯示腫瘤樣品為化療藥物敏感性。

例如，根據發明的方法決定表現於病患生物樣品中之MetAP2量並與具有卵巢癌並對化療有反應的人或具有卵巢癌及對化療無反應的人表現之MetAP2量比較。如本文中使用，若化療具有降低腫瘤大小或停止腫瘤生長的作用，人對"化療"具有"反應"。再者，用詞"有反應的病患"用來意指在手術切除後用化療處理並保持無臨床疾病徵兆至少6個月的病患。若於病患中MetAP2量等於或小於具有卵巢癌及對化療有反應的人表現的MetAP2量，預測病患對某些化療藥物(如以鉑為基礎的化合物)有反應。若於病患中MetAP2量大於具有卵巢癌及對化療有反應的人表現的MetAP2量，預測病患對化療藥物有抗性。類似地，若於病患中MetAP2量大於具有癌症但對化療無反應的人表現的MetAP2量，預測病患對化療藥物有抗性。

如表1及以下實例中所示，於卵巢癌中增加的MetAP2表現係相關於對順鉑(一種以鉑為基礎的化療藥物)增加的抗性。因此，於一個具體實施例中，當來自癌症病患的生物樣品中測量的MetAP2表現量大於在有反應的個體中偵測

的預定量時，本發明的方法可預測病患的腫瘤將對以鉑為基礎的化療有抗性。於另一個具體實施例中，當來自癌症病患的生物樣品中測量的MetAP2表現量等於在有反應的個體中偵測的預定量但一或多種基因之表現(其中基因為：S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082)增加超過有反應的病患中之表現，及/或一或多個HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10基因之表現相較於有反應病患中之表現減少，本發明的方法可預測病患的腫瘤將對以鉑為基礎的化療有抗性。

本發明更提供用以監測卵巢癌患者的疾病發展之方法，特別是以化療處理治療的卵巢癌病患，包含步驟有：(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1、KIAA0082、MPP10、HMT1、

NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2或MT1；(b)利用取自患者隨後收集的生物樣品重複步驟(a)；及(c)比較於步驟(a)中偵測的表現基因或基因產物之量與於步驟(b)中偵測的表現基因或基因產物之量，其中藉由偵測於隨後收集的生物樣品中表現的基因或基因產物之量與取自步驟(a)中的生物樣品比較之差異而監測疾病的發展。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。

如本文中提出，當於步驟(a)及(b)中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082，及於步驟(b)中偵測的表現基因或基因產物之量大於在步驟(a)中表現的基因或基因產物之量時，偵測到疾病的發展。於某些具體實施例中，病患於步驟(a)中偵測基因表現量及於步驟(b)中偵測的量之間的時期中接受化療或其他治療。

如本文中提出，當於步驟(a)及(b)中表現的基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10，及於步驟(b)中偵測的表現基因或基因產物之量小於在步驟(a)中表現的基因或基因產物之量時，偵測到疾病的發展。

於某些具體實施例中，病患於步驟(a)中偵測基因表現量及於步驟(b)中偵測的量之間的時期中接受化療或其他治

療。於某些具體實施例中，偵測的量可為示於表1中基因之 mRNA 量或由示於表1中基因編碼之蛋白質量。

例如，可使用根據本發明用以於患者中監測卵巢癌的發展之方法來決定是否患者對某些治療方式如化療處理方式有或無反應。

例如，當 S100A10、S100A11、鈣活化酶 (Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白 (Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾 (Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST 激酶、TESK2、SRB1 或 KIAA0082 之表現在病患開始某一處理方式後一段時間取自病患的生物樣品相較於處理方式開始之時或之前取出的生物樣品中基因表現量相等或更高，病患為無反應。於另一個實例中，當 HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1 或 MPP10 之表現在病患開始某一處理方式後一段時間取自病患的生物樣品相較於處理方式開始之時或之前取出的生物樣品中基因表現量相等或更少，病患為無反應。於此種情況中，照護提供者可決定治療方式為無效。

或者，當 S100A10、S100A11、鈣活化酶 (Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白 (Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾 (Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、

Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082之表現在病患開始某一處理方式後一段時間取自病患的生物樣品相較於處理方式開始之時或之前取出的生物樣品中基因表現量更小，病患為有反應，不需改變治療。再者，當HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10之表現在病患開始某一處理方式後一段時間取自病患的生物樣品相較於處理方式開始之時或之前取出的生物樣品中基因表現量更多，病患為有反應。

此外，本發明提供用以監測醫藥組合物於病患中作為治療癌症藥劑的有效性之方法，包含步驟有：(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082；(b)給予患者適當量之醫藥組合物；(c)利用取自患者隨後收集的生物樣品重複步驟(a)；及(d)比較於步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與於步驟(c)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中藉由偵測於隨後收集的生物樣品中表現的基因或基因產物之量與取自步驟(a)中的生物樣品比較之變化而監測醫藥組合物之有效性。若基因表現於在以醫藥組合物治療後收集的生物樣品

中高於在以醫藥組合物治療前收集的生物樣品中及於以醫藥組合物治療期間腫瘤生長未曾被減緩、延遲或抑制，可將醫藥組合物視為無效於治療患者的癌症。例如，若S100A10 mRNA量於病患已用醫藥組合物治療後更高，預期病患用該醫藥組合物進一步治療將有抗性。因此，將醫藥組合物視為對病患的癌症無效。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。

本發明更提供用以監測醫藥組合物於病患中作為治療癌症藥劑的有效性之方法，包含步驟有：(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10；(b)給予患者適當量之醫藥組合物；(c)利用取自患者隨後收集的生物樣品重複步驟(a)；及(d)比較於步驟(a)中偵測的表現基因或基因產物之量與於步驟(c)中偵測的表現基因或基因產物之量，其中藉由偵測於用醫藥組合物治療後收集的生物樣品中表現基因或基因產物之量與取自步驟(a)中(即於用醫藥組合物治療前收集)的生物樣品比較之變化而監測醫藥組合物之有效性。若一或多個該基因的基因表現於隨後收集的生物樣品中(即用醫藥組合物治療後收集)低於先前收集的生物樣品(即用醫藥組合物治療前收集)，及於以醫藥組合物治療期間腫瘤生長未曾被減緩、延遲或抑制，可將醫藥組合物視為無效於治療患者的癌症，及預期病患用該醫藥組合物進一步治療將有抗性。因此，將醫藥組合物視為對病患的癌症無效。於特

別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。

如本文中使用的，"醫藥組合物"可為包含有用來治療或測試治療癌症(如大腸或卵巢癌)能力之化合物(如蛋白質、胜肽或擬胜肽分子、非胜肽有機分子、無機小分子、或核酸分子)之任何配方。

本發明也提供方法以鑑定抑制腫瘤細胞生長之化合物，特別是有化療抗性的腫瘤細胞，最特別的是有化療抗性的卵巢癌細胞。於此等具體實施例中，方法包含步驟有：(a)使表現在有化療抗性的卵巢癌細胞中為過度表現的一或多個基因之細胞與測試化合物接觸，其中基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262、MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082；(b)偵測在有或無測試化合物存在中基因之表現；及(c)比較在測試化合物存在中基因表現與無測試化合物存在中基因表現，其中若在測試化合物存在中基因表現相對於在無測試化合物中基因表現降低，將化合物鑑定為抑制化療抗性腫瘤細胞生長之化合物。於特別的觀點中，生物樣品為腫瘤樣品。於某些具體實施例中，化合物在化療藥物存在中可抑制腫瘤細胞的生長。

此外，本發明提供方法以鑑定抑制腫瘤細胞生長之化合

物，特別是有化療抗性的腫瘤細胞，最特別的是有化療抗性的卵巢癌細胞，包含步驟有：(a)使表現在有化療抗性的卵巢癌細胞中為比正常量少的一或多個基因之細胞與測試化合物接觸，其中基因為HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10；(b)偵測在有或無測試化合物存在中基因之表現；及(c)比較在有及無測試化合物存在中的基因表現，其中若在測試化合物存在中基因表現相對於在無測試化合物中基因表現增加，將化合物鑑定為抑制化療抗性腫瘤細胞生長之化合物。於一個具體實施例中，化合物在化療藥物存在中可抑制腫瘤細胞的生長。

下列實例，包括實施的實驗及達到的結果僅為說明的目的提出，不應將其視為限制本發明。

實例

實例 1

MTT細胞增殖分析

利用標準MTT細胞增殖分析法，將五個卵巢癌細胞株(OVCA 429、OVCA 433、OVCA 432、HEY及HEYA8)根據其對順鉑敏感性程度而評級。

將細胞生長於Minimal Eagle's Media(MEM α ，得自Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)、5%胎牛血清(FBS, fetal bovine serum，經加熱去活性)、1%抗生素/抗真菌劑混合物(Invitrogen)中。將MTT原液(5 mg/mL; CALBIOCHEM, San Diego, CA)藉由溶解染料於Hank's 平衡的鹽溶液(HBSS, Hank's Balanced Salt Solution)，過濾該混合物而製備及以1

ml份量儲存於-20℃。使用1 ml MTT原液於每9 ml培養基(總體積為10 ml)。將盤子以不透明蓋子覆蓋以保護細胞免於光線。

將各細胞株以5、25、50、100及200 μ M順鉑處理4、8及24小時。在順鉑處理後96小時，將MTT分析法實施於96孔盤上。將培養基自細胞移除並將200微升新鮮MTT培養基加至細胞及至空白孔作為控制組。於正常細胞培養條件下將細胞培養3-4小時。而後檢查細胞假臍(Formazan)晶體之形成(代謝活性之指示)。將培養基去除並將200微升2-丙醇加至孔及控制組孔中。在所有晶體均衡地溶解後，將細胞於室溫黑暗中培養20分鐘。將結果於微量盤讀取機上於570 nm讀取。

圖39(上圖)顯示在暴露至不同濃度之順鉑4小時後於此等研究中使用的5個卵巢癌細胞株之MTT分析結果。在考慮各細胞株對順鉑濃度及使用的處理時間之整個範圍的表現後，將細胞以減少抗性程度評等為OVCA 429<OVCA 433<HEY A8<OVCA 432<HEY(下圖)。

將包含暴露細胞至對特定基因之siRNA或藥物抑制劑之MTT分析法以基本上如上述之方式實施。將細胞在以0、3.12、6.25、12.5、25、50、100及200 μ M順鉑處理24小時前預先以siRNA處理48小時。對於組合藥物處理實驗(煙曲黴素或ALLN)，將細胞暴露至增加待測藥物濃度及0、3.12、6.25、12.5、25、50、100及200 μ M順鉑之組合處理24小時。

實例2

cDNA微量陣列、北方墨點、及定量即時PCR分析

使用於實例1中定性的細胞株來進行微量陣列分析。自各細胞株收集細胞沉澱及藉由溶解沉澱於1 ml TRI試劑(得自Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH) 或Trizol(Invitrogen)中自細胞分離RNA。而後使樣品靜置5分鐘。藉由加入100微升1-溴-3-氯丙烷(BCP, 1-bromo-3-chloropropane)至樣品達到相分離。搖動15秒後, 將樣品於室溫培養15分鐘及而後以13,000 RCF於4-25°C 離心16分鐘。藉移液管將上層清液取出及放入新的微量離心管中。而後藉由混合上層清液與500微升新鮮異丙醇而將RNA沉澱, 於室溫培養10分鐘, 及以13,000 RCF於4-25°C 離心9分鐘。而後將上層清液自管子取出及藉加入1 ml 75%乙醇至管子、漩渦震盪、及而後以13,000 RCF於4-25°C 離心6分鐘而清洗沉澱物。將液體去除, 將沉澱物風乾約8分鐘。而後將沉澱物溶解於無RNase水及置於冰上立即使用或儲存於-80°C。

使用含有超過5000個序列證實的cDNA純系之微量陣列(得自Research Genetics Inc.)來審視此等細胞中的基因表現; 根據製造商的操作指南進行所有的微量陣列分析法。已知各純系被表現於卵巢組織中。使用最有抗性的細胞株(OVCA 429)作為其他細胞株中基因表現比較的標準。數據分析顯示相較於更敏感的細胞株, OVCA 429有196個基因以增加量表現及有83個基因以減少的量表現。

將基因選擇做進一步分析, 只要其滿足下列標準: 於二

重複膜上偵測到相較於標準至少2倍表現差異；相較於標準(OVCA 429)於4個細胞株中有3個偵測到差異表現；及表現量與各細胞株對順鉑的敏感性一致。過度表現的基因為在OVCA 429細胞中最高度表現及表現逐漸減少直到表現最低量到達於最少抗性的細胞株HEY(及對於在OVCA 429細胞中較低量表現之基因反之亦然)。

當相較於其他細胞株，於最有抗性的細胞株(OVCA 429)中不同表現(更高或更低量)的基因之北方墨點及定量即時PCR分析被用來確認微量陣列數據及鑑定有興趣做進一步分析的基因。將確認的基因列於表2中，其顯示基因名稱、細胞株中表現模式的摘要、及代表表現分析結果的圖。

表 2

基因庫 登錄#	基因卡 cDNA id#	名稱	當於細胞株中有效 時的表現模式	圖
BC015973	756595	S100A10 P11 CLP11 依鈣結合蛋白(Calpactin)1 輕鏈 42C	隨之增加而增加對 順鉑抗性	1
BC001410	810612	S100A11 S100C Calgizzarin	隨之增加而增加對 順鉑抗性	2
AF261089	549728	鈣活化酶(Calpain)2 CANPL2 mCANP	隨之增加而增加對 順鉑抗性	6
BC004974	250654	SPARC 骨聯蛋白(osteonectin) BM-40	隨之增加而增加對 順鉑抗性	4
BC013782	39093	MetAP2 p67eIF2 MNPEP	隨之增加而增加對 順鉑抗性	8

基因庫 登錄#	基因卡 cDNA id#	名稱	當於細胞株中有效 時的表現模式	圖
BC015525	809784	KLK6 Zyme Neurosin 蛋白質分解酶M	隨之增加而增加對 順鉑抗性	17
AF222689	246120	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	隨之減少而增加對 順鉑抗性	18
U31913	814731	ARA9 XAP2	隨之增加而增加對 順鉑抗性	19
D83735	713886	肌動蛋白結合蛋白 (Calponin)2	隨之增加而增加對 順鉑抗性	20
U19251	1046522	NAIP	隨之減少而增加對 順鉑抗性	21
BC005291	306921	eEF1ε P18	隨之減少而增加對 順鉑抗性	13
AF015608	897594	RNPS1	隨之增加而增加對 順鉑抗性	22
U49436	884867	eIF5 eIF5A	隨之增加而增加對 順鉑抗性	10
BC013590	1630998	eIF2Bε	隨之增加而增加對 順鉑抗性	12
M65217	669443	HSF2 HSTF2	隨之增加而增加對 順鉑抗性	23
AB010427	714196	WDR1 NORI-1	隨之增加而增加對 順鉑抗性	24
BC001134	321247	融合的腳趾 (Ft1)	隨之增加而增加對 順鉑抗性	25
BC004880	203003	NM23D mn23-H4	隨之增加而增加對 順鉑抗性	26
U10439	950367	ADAR1	隨之增加而增加對 順鉑抗性	27
BC005214	34140	Grancalcin	隨之增加而增加對 順鉑抗性	7
BC009808	882511	NBR1	隨之增加而增加對 順鉑抗性	28
L36870	726147	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	隨之增加而增加對 順鉑抗性	14

基因庫 登錄#	基因卡 cDNA id#	名稱	當於細胞株中有效 時的表現模式	圖
AB007885	427980	鋅指狀蛋白質-262 MYM	隨之增加而增加對 順鉑抗性	29
D88153	123980	HYA22	隨之增加而增加對 順鉑抗性	31
AB049635	824568	MRPL4 CGI-28	隨之增加而增加對 順鉑抗性	30
AF037261	1636620	Vinexin β	隨之增加而增加對 順鉑抗性	32
M59818	809639	G-CSFR	隨之增加而增加對 順鉑抗性	33
BC015710	838636	RAB22A	隨之減少而增加對 順鉑抗性	36
BC017201	68605	IGFBP-7 MAC25 FSTL2	隨之增加而增加對 順鉑抗性	35
BC011770	345077	FAST激酶	隨之增加而增加對 順鉑抗性	16
AB057597	845441	TESK2	隨之增加而增加對 順鉑抗性	15
BC022087	756687	SRB1 CLA1 CD36L1	隨之增加而增加對 順鉑抗性	34
BC031890	825293	KIAA0082	隨之增加而增加對 順鉑抗性	37
NM_006312	743230	NCOR2	隨之減少而增加對 順鉑抗性	38
BC032338	297392	MT1	隨之減少而增加對 順鉑抗性	51
X98494	825214	MPP10	隨之減少而增加對 順鉑抗性	52

北方墨點分析

為了確認由微陣列分析確認的表現模式，根據製造商的操作指南，利用 NorthernMax Protocol(Ambion Corp., Austin, TX) 進行北方墨點分析及利用 Strip-EZ DNA 標記套組(Ambion)將DNA探針標記。

定量即時PCR

cDNA之合成係藉由混合1微克自卵巢癌細胞株分離的總細胞RNA、1微克寡dT、及水至最終體積12微升，於70℃培養此混合物10分鐘，及而後加入至混合物5微升2X反應混合、2微升DTT、及1微升Superscript II酵素(Invitrogen)。而後將反應混合物於42℃培養60分鐘。製備由1：4至1：256之cDNA稀釋。利用Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR Handbook(Qiagen Corp., Valencia CA)將主混合以最終體積50微升/孔準備。對使用的盤之各孔，將25微升2X QuantiTect SYBR Green PCR主混合(Qiagen)、0.3 μ M正向引子、0.3 μ M反向引子、及無RNase水加至最終體積45微升。

將各基因的主混合徹底混合及如下列將適當體積分配入PCR試管或盤：無模板(控制組)=45微升主基因混合+5微升水；緩衝液空白=25微升水+25微升SYBR混合；及測試樣品=45微升主基因混合+5微升cDNA(如上述稀釋)。

利用ABI Prism 7700(Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)序列偵測系統或MJ研究(Waltham, MA)Opticon II系統如下列決定序列偵測：將PCR起始活化步驟於95℃實施15分鐘；將樣品於94℃變性15秒，於53℃煉合30秒(當使用Opticon II系統時為55℃)，及於72℃延伸30秒(於此步驟期間得到資料)；將PCR反應重複50個循環。藉由加入於下列步驟：15秒於95℃，20秒於60℃，及20秒於95℃準備融化曲線分析。

此外，RNA之製備係由得自己用以鉑為基礎的化療藥物治療之化療敏感性(即有反應的)及有化療抗性(即無反應的)

卵巢癌病患的組織樣品。RNA之分離係藉由均質化50-100毫克組織樣品於1毫升TRI試劑或Trizol直到組織被液化。而後使樣品靜置5分鐘。藉由加入100微升BCP至樣品達到相分離。搖動15秒後，將樣品於室溫培養15分鐘及而後以13000×g(相對離心力，RCF)於4-25℃離心9分鐘。藉移液管將上層清液取出及放入新的微量離心管中。而後藉由混合上層清液與500微升新鮮異丙醇而將RNA沉澱，於室溫培養20分鐘，及以13000 RCF於4-25℃離心9分鐘。而後將上層清液自管子取出及藉加入1 ml 75%乙醇至管子、漩渦震盪、及而後以13000 RCF於4-25℃離心6分鐘而清洗沉澱物。將液體去除，將沉澱物風乾約8分鐘。而後將沉澱物溶解於無RNase水及置於冰上立即使用或儲存於-80℃。

利用示於表3中基因的引子進行定量即時PCR來偵測化療敏感性及化療抗性的病患之間基因表現改變。使用18S RNA之表現來校正表現的基因之值。將結果示於下表3中。結果證實以來自細胞株之RNA進行的實驗之觀察。

表 3

基因名稱	基因庫登錄#	於化療敏感性病患中表現倍數	於化療抗性病患中表現倍數	倍數差異
Vinexin β	AF037261	1.4	2.8	2.0
G-CSFR	M59818	1.7	2.6	1.5
KLK6	BC015525	0.3	3.3	11.0
SPARC	BC004974	3.6	6.0	1.7
HYA22	D88153	1.75	2.4	1.4
MRPL4	AB049635	0.3	0.8	2.7
eIF5	U49436	0.8	1.3	1.6
RAB22A	BC015710	0.15	0.075	2.0*
MT1	BC032338	0.9	0.6	1.5*
MYM	AB007885	0.6	1.5	2.5
RNPS1	AF015608	0.7	1.4	2.0
S100A11	BC001410	1.0	2.0	2.0

MetAP2	BC013782	0.175	0.21	1.2
S100A10	BC015973	0.15	0.25	1.7
SAPK	L36870	0.40	0.95	2.4
鈣活化酶Calpain)2	AF261089	0.12	0.19	1.6
NM23D	BC004880	0.70	1.3	1.9
NIAP	U19251	4	2	2.0*
SRB1	BC022087	0.08	0.13	1.6
WDR1	AB010427	1.5	5	3.3
HMT1	AF222689	0.19	0.05	3.8*
eEF1ε	BC005291	0.65	0.15	4.3*
eIF2Bε	BC013590	0.40	0.75	1.9
ADAR1	U10439	0.65	0.8	1.2

*此差異反映於化療抗性的病患中基因表現之減少。

利用即時PCR使用下列引子序列來確認基因表現：

250654(起始將此基因以特定分子信標探針確認，然而，用SYBR綠進行隨後的研究)

分子信標確認：

信 標： FAM-CGCGTATGAACTGGGCTTATGTGACGCG-DABCYL (SEQ ID NO:13)

側邊正向引子：CTGGGCTCTGCCTTAAACAC (SEQ ID NO:14)

側邊反向引子：GCTCCCAAAGTTTGAACCA (SEQ ID NO:15)

內部正向引子：TTGCCTGAGGCTGTAACTGA (SEQ ID NO:16)

內部反向引子：GCTCCCAAAGTTTGAACCA (SEQ ID NO:62)

對SYBR綠：

正向：CCA CTT CTT TGC CAC AAA GT (SEQ ID NO:17)

反向：GAA TTC GGT CAG CTC AGA GT (SEQ ID NO:18)

810612(將此基因以特定分子信標探針確認)

信標：FAM-CGCCTGGGTGGGTTTGAAGGAGGCG-DABCYL

(SEQ ID NO:19)

側邊正向引子：ATCGAGTCCCTGATTGCTGT (SEQ ID NO:20)

側邊反向引子：GCCTGCATGAGGTGGTTAGT (SEQ ID NO:21)

內部正向引子：CTTGCCATGACTCCTTCCTC (SEQ ID NO:22)

內部反向引子：GCCTGCATGAGGTGGTTAGT (SEQ ID NO:63)

39093

正向：GCA GAA GCA CAT CGA CAA GT (SEQ ID NO:23)

反向：GCC TGC ATT TAA TCC ATT CTC (SEQ ID NO:24)

882511

正向：TAA CCA CGT CCT GCT GAA GT (SEQ ID NO:25)

反向：GCT TTA AGA AAG TTC TTA TCA AC (SEQ ID NO:26)

950367

正向：GCA CAG CGG AGT GGT AAG A (SEQ ID NO:27)

反向：CAG AGG AGT CAG ACA CAT TG (SEQ ID NO:28)

34140

正向：GAT TAC TTA CTT CAG TGC TGT T (SEQ ID NO:29)

反向：CAT TCT TGC TAT AAC GTT TAA CA (SEQ ID NO:30)

726147

正向：CTC TGT GAC TTC GGC ATC A (SEQ ID NO:31)

反向：CAG ACA TCA GAG GGG ACA T (SEQ ID NO:32)

427980

正向：AAG AAC TGG GTT CAG TGG AAA (SEQ ID NO:33)

反向：GAG AGT GCA TGG TCT TGA GA (SEQ ID NO:34)

123980

正向：AGC CAC CAG CTA AGT ACC TT (SEQ ID NO:35)

反向：CAT CGA TTT CAA CCG GAA CAA (SEQ ID NO:36)

824568

正向：GTG TGT GGA CCT CCA TGT TA (SEQ ID NO:37)

反向：AGC ACA CCA TTA CAG ACA AGT (SEQ ID NO:38)

1636620

正向：GGA ACC AGT TTC TGC AGG AA (SEQ ID NO:39)

反向：CTC CAG CAG CAC CTC AAT G (SEQ ID NO:40)

809639

正向：ATC CAA GGT TAT GTG GTT TCT T (SEQ ID NO:41)

反向：CAC CTC CTG GGC TTC TGA A (SEQ ID NO:42)

786687

正向：GAT CCA TGA AGC TAA TGT ACA A (SEQ ID NO:43)

反向：ACG GGC AGA AGC CTT CGT T (SEQ ID NO:44)

845441

正向：CCT GAG GTT CTC CGA GAT G (SEQ ID NO:45)

反向：TCC AGC CCG AAA TTC TCT GT (SEQ ID NO:46)

68605

正向：CAA GAG GCG GAA GGG TAA A (SEQ ID NO:47)

反向1：CAG CCG CTC GGG TAG GT (SEQ ID NO:48)

反向2：CAC TAT GGA AGG ACC TTG CT (SEQ ID NO:49)

838636

正向：GGA TAC AGG TGT AGG TAA ATC (SEQ ID NO:50)

反向：TCC CAG ATT AGG AAT TTA TGT A (SEQ ID NO:51)

345077

正向：CTT CTG GAA CAG GCG AAG A (SEQ ID NO:52)

反向1：GCT GGC CCA GAC GAC GAA (SEQ ID NO:53)

反向2：GCA GAC ACA CGT GGA TGG T (SEQ ID NO:54)

825214

正向：GAT GAA GTT AAA TCC TCC TTT G (SEQ ID NO:55)

反向：CCT CTT CTG TGC TGT CAC TT (SEQ ID NO:56)

297392

正向：CCT GCA AGA AGA GCT GCT G (SEQ ID NO:57)

反向：CAC AGC TGT CCT GGC ATC A (SEQ ID NO:58)

897594

正向：AGC ACC AGC ACT GGC TCA TCA A (SEQ ID NO:109)

反向：AGA GCC AGA AGA GCT GCT A (SEQ ID NO:110)

713886

正向：AAC CGA CAA GTG TGA CAA CT (SEQ ID NO:111)

反向：TGT GCC TTG CGG GCA GTA (SEQ ID NO:112)

884867

正向：C ACC ACC ACC ACC AAA TGA A (SEQ ID NO:113)

反向CA TCC ATT CGA CGC CTT TGA (SEQ ID NO:114)

321247

正向：CCA GCA GCA CAG TCA ACA AA (SEQ ID NO:115)

反向：TGG TAG CTT CTG CTT CAC AA (SEQ ID NO:116)

1630998

正向：CCA GAG CTG CAC TCA TTC C (SEQ ID NO:117)

反向：CAC TGT TGG TGA TAA AGC AAT T (SEQ ID NO:118)

756595

正向：GGA TAA AGG CTA CTT AAC AAA G (SEQ ID NO:119)

反向：CCA CTT TGC CAT CTC TAC AC (SEQ ID NO:120)

549728

正向：GAG CCG AGG AGG TTG AAA G (SEQ ID NO:121)

反向：CTC CTC TGG GTC TAT AGT GT (SEQ ID NO:122)

203003

正向：GAC CCT GGT GGC GGT GAA (SEQ ID NO:123)

反向：GGT GCC TGC AGC ATC TTC A (SEQ ID NO:124)

814731

正向：GGA GAG CCC TGG CAC GTA (SEQ ID NO:125)

反向：CCT TCA TCT GCA GGT TCT TG (SEQ ID NO:126)

714196

正向：ACG ACG GAC ACA TTA ATT ACT (SEQ ID NO:127)

反向：TCC ATG CTG CAG CTG ATG A (SEQ ID NO:128)

809784

正向：C CTT CGG CAA AGG GAG AGT (SEQ ID NO:129)

反向：CTG GAT GAG TTC AGA GAG TTT (SEQ ID NO:130)

825293

正向：GCC TCG ACT GGC AGA GAT (SEQ ID NO:131)

反向：CTT GTA GCT GAA GAT GTC AAT (SEQ ID NO:132)

246120

正向：CTC TAT GCC CGG GAC AAG T (SEQ ID NO:133)

反向：AAG ACA TGT CGA AGC CAT ACA (SEQ ID NO:134)'

於對順鉑有抗性的卵巢癌細胞中向上或向下調控的基因之摘要

編碼EF-手蛋白質之基因：

將編碼鈣活化的EF-手蛋白質的五個基因鑑定，亦即S100A10、S100A11、SPARC、鈣活化酶(Calpain)2及Grancalcin。四個基因的其中兩者S100A10及S100A11係位於染色體1上1q21處彼此相鄰(Pejovic, 1995, Ann. Med. 27:73-78; Ridinger等人，1998, Biochimica et Biophysica Acta 1448:254-263)。染色體1之此區域曾被報導為卵巢癌中染色體重排的一個溫床(Pejovic, 1995, Ann. Med. 27:73-78)。S100A10及S100A11的實際生物功能為未知。S100A10及S100A11兩者於更有抗性的卵巢癌細胞株中以較高程度表現(分別見圖1及圖2)。圖3顯示相較於來自更有反應的病患，在對化療更有抗性之病患中S100A10及S100A11之mRNA提高。

SPARC(也稱為骨聯蛋白(osteonectin)及BM-40)為一種分泌的蛋白質(Lane及Sage, 1994, FASEB J. 8: 163-173)。已證實SPARC於瘤性卵巢之基質中高度表現(Paley等人，2000, Gynecologic Oncology 78:336-341)及已證實在卵巢癌細胞中引發細胞凋亡(Yiu等人，2001, Am. J. Pathol.

159:609-622)。然而，曾偵測到高量SPARC於黑色素瘤中(Ledda等人，1997, *J. Invest. Dermatol.* 108:210-214)及結腸直腸癌中(Porte等人，1995, *Int. J. Cancer* 64:70-5)，及也曾被報導促進細胞遷移及入侵於前列腺癌中(Thomas等人，2000, *Clin. Cancer Res.* 6:1140 -9)及神經膠母細胞瘤(glioblastoma)(Golembieski等人，1999, *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:463-72)。SPARC過度表現也促成乳癌細胞增加的移動性及入侵(Briggs等人，2002, *Oncogene* 21:7077-91)。如本文中顯示，發現SPARC在更有化療抗性的卵巢癌細胞株中以較高程度表現(圖4)。SPARC mRNA也升高於取自腫瘤復發的病患之樣品中，如圖5中所示。

鈣活化酶(Calpain)2為一種鈣活化的蛋白酶。最近，報導一種鈣活化酶(Calpain)2活性的抑制劑引發細胞凋亡於人類急性淋巴性血癌及非霍奇金氏淋巴瘤以及實體腫瘤細胞(Huang及Wang, 2001, *TRENDS in Molecular Medicine* 7:355)。鈣活化酶(Calpain)2 mRNA於更有化療抗性的卵巢癌細胞株中為增加(圖6)。

Grancalcin為最近說明的 Ca^{2+} 結合蛋白質，其屬於EF-手蛋白質之五-EF-手亞族及在 Ca^{2+} 結合時改變位置至膜(Lolike等人，2001, *J. Biol. Chem.* 276:17762-9)。發現相較於對以順鉑處理更有反應的細胞株，Grancalcin mRNA於對順鉑更有抗性的細胞株中為升高(圖7)。

編碼蛋白質涉及蛋白質轉譯及轉譯控制之基因：

MetAP2：甲硫胺酸胺基胜肽酶(也稱為eIF-2相關的p67)

之表現從未曾與卵巢癌連結。由此基因編碼的蛋白質似乎有兩個功能。其自新近合成的蛋白質去除第一個甲硫胺酸 (Li 及 Chang, 1996, Biochem. Biophys. Res. Commun. 227:152-9) 及也與真核起始因子 2 α (eIF-2 α , eukaryotic initiation factor 2 α ;一種GTP結合蛋白質)相關及抑制其磷酸化 (Wu等人, 1993, J. Biol. Chem. 268:10796-10801)。利用針對MetAP2的抗體,顯見MetAP2表現於最有抗性的細胞株OVCA 429中升高及於Hey(對順鉑最敏感的細胞株)中向下調控(見圖8)。再者,當於得自對順鉑為基礎的化療有不同程度抗性的三個病患之組織樣品中檢視MetAP2 mRNA表現,相較於對化療抗性具有中等(圖9中的CAP2)及低等(圖9中的CAP1)程度之病患, MetAP2顯見於最有抗性的病患的樣品中最為提高(圖9中的CAP3)。一種藥物TNP-470,其專一地針對MetAP2,目前正於臨床測試作為數種人類腫瘤的血管新生抑制劑(Kruger及Figg, 2000, Expert Opin. Investig. Drugs 9:1383-96)。再者,利用反意義寡核苷酸降低MetAP2的細胞濃度已被證實引發細胞凋亡(Datta及Datta, 1999, Exp. Cell Res. 246:376-83)。此等觀察建議此蛋白質可能為卵巢癌的治療中重要的目標。

eIF5為另一個用於轉譯起始及蛋白質合成之中心蛋白質,其作用為GTPase活化因子蛋白質(Paulin等人, 2001, Current Biol. 11:55-9; Das等人, 2001, J. Bio. Chem. 276:6720-6)。偵測到兩個轉錄體及兩者的表現程度提高於對順鉑具有最高抗性程度的卵巢癌細胞株中(圖10)及於更

有抗性的病患中(圖 11)。

eIF2B ϵ 之 mRNA 向上調控於顯示對順鉑最高抗性的卵巢癌細胞株中(圖 12)。由此基因編碼的蛋白質為包含有 5 個次單元之鳥糞嘌呤核苷酸交換因子複合物之調控 ϵ 次單元(Proud, 2001, Prog. Mol. Subcell. Biol. 26:95- 114)。

eEF1 ϵ mRNA 於顯示對順鉑最高抗性程度的卵巢癌細胞株中為向下調控(圖 13)。EEF 有關於多胜肽排列(Browne及 Proud, 2002, Eur. J. Biochem. 269:5360-8)。

激酶：

SAPK/Erk 激酶 1 為一種雙重專一性的激酶，其活化 JNK1、JNK2 及 p38 但非 Erk1 或 Erk2(Cuenda, 2000, Int. J. Biochem. Cell Biol. 32:581-7)。此基因及其蛋白質在此以前尚未曾與卵巢癌相關。相較於更敏感的細胞株，發現此基因的 mRNA 濃度於更有抗性的細胞株中更為提高(圖 14)。

TESK2：此絲胺酸/羥丁胺酸激酶主要位於細胞核中。然而，當無活性時，其移動位置至細胞質。TESK2 專一地磷酸化肌動蛋白素(cofilin)(於 Ser-3)，此蛋白質與肌動蛋白去聚合因子一起藉由刺激肌動蛋白細絲之去聚合及分離而在肌動蛋白細絲的快速更替及以肌動蛋白為基礎的辨識扮演重要角色(Toshima, 2001, J. Biol. Chem. 276: 31449-58)。先前未曾有報導與卵巢癌有連結。TESK2 mRNA 於更有抗性的細胞株中為升高(圖 15)。

FAST 激酶：此為 Fas-活化的絲胺酸/羥丁胺酸激酶，吾人認為其涉及由 Fas 媒介的細胞凋亡(Tian 等人，1995, J. Exp.

Med. 182:865-74)。FAST激酶mRNA於更有化療抗性的細胞株中為升高(圖16)。

其他：

KLK6：此為一種絲胺酸蛋白酶，也稱為Zyme及Neurosin。此基因屬於人類kallilrein基因家族，其也包括較了解的分子如前列腺專一的抗原(PSA, prostate specific antigen)早已被用作為前列腺癌的標記及也被研究為卵巢癌的標記(Diamandis, 2000, Clinical Biochem. 33:579-83)。已報導於具有卵巢癌的病患中相較於正常控制組KLK6之血清濃度升高(Diamandis, 2000, Clinical Biochem. 33:579-83)。此基因之表現程度於測試的更有化療抗性的細胞株中為更高(圖17)。也值得注意的是此基因位於卵巢癌中時常染色體重新排列之另一個區域(Pejovic, 1995, Ann. Med. 27:73-78)。

HMT1(也稱為PRMT1)：此基因編碼一種蛋白質精胺酸N-甲基轉移酶，發現其兩個變體之表現於乳癌中為向下調控(Scorlis等人，2000, Biochem. Biophys. Res. Commun. 278:349-59)。HMT1表現於對順鉑更有抗性的細胞中為向下調控(見圖18)。同時令人感興趣注意的是HMT1係位於染色體19的19q13.3處與編碼KLK6基因之存在處相同的染色體區域。

ARA9(也稱為芳基烴受體-交互作用蛋白質(AIP, Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein)及XAP2)被視為在AHR-媒介的信號傳遞中扮演角色(Kazlauskas等人，2002, J.

Biol. Chem. 277:11795-801)。來自此基因的mRNA於對順鉑更有抗性的細胞株中為升高(圖19)。其也位於染色體11(於11q13.3處)，此為與卵巢癌相關的增加的頻率之染色體重排的另一個區域(Pejovic, 1995, Ann. Med. 27:73-78)。

肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2曾於肌肉上皮癌中被研究(Mosunjac等人, 2000, Diagn. Cytopathol. 23:151-5)但未於卵巢癌中。相較於更敏感的卵巢癌細胞株，於對順鉑更有抗性的細胞株中肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2的表現為稍微升高(圖20)。

發現神經細胞凋亡抑制蛋白質(NAIP, neuronal apoptosis inhibitory protein)於對順鉑最有抗性的細胞株中為稍微向下調控(圖21)。NAIP從未被連結至卵巢癌(Tamm等人, 2000, Clin. Cancer Res. 6:1796-1803)。

RNA結合蛋白質S1(RNPS1)為前-mRNA接合之普遍活化因子及可與涉及促進細胞凋亡的ASAP及SART3腫瘤排斥抗原形成複合物(Schwerk等人, 2003, Mol. Cell Biol. 23:2981-90; Harada等人, 2001, Int. J. Cancer 93: 623-8)。

發現於對順鉑有抗性的細胞株中其量升高(圖22)。

熱休克轉錄因子2(HSF2, Heat Shock Transcription Factor 2)調控熱休克蛋白質基因之表現(Mathew等人, 1998, Mol. Cell Biol. 18:5091-8)。HSF2也似乎能夠與蛋白質磷解酶2A(PP2A, protein phosphatase 2A)之催化次單元競爭結合其調控次單元PR65，及被認為作用為新穎PP2A調控蛋白質(Hong等人, 2000, Biochem. Biophys. Res. Commun.

272:84-9)。HSF2的mRNA量於更有抗性的細胞株中升高(圖23)。

WDR1：發現WD重複蛋白質於所有真核細胞中及在許多細胞功能包括信號傳導、轉錄及增殖之調控中扮演重要角色(Li等人，2000, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274:117-23)。然而，WDR1之實際功能為未知。相較於更敏感的細胞株，此基因之mRNA於更有抗性的細胞株中為升高(圖24)。

Ft1：此基因的開放讀碼區呈現與泛素(ubiquitin)-結合的酵素類似及於老鼠中其基因圖譜靠近Rb相關的p130基因(Lesche等人，1997, *Mamm. Genome* 8:879-83)。細胞遺傳學上，Ft1定位於染色體16之區域16q12.2，此區域於人類癌症中反覆地改變。於卵巢癌中失去異質性(heterozygosity)已被報導於此染色體位置。Ft1 mRNA之量於對順鉑更有抗性之細胞株中為更高(圖25)。

NME4(也稱為nm24-h4)為一種核苷二磷酸激酶，其適度地過量表現於腎臟細胞癌中及強烈過量表現於結腸直腸癌中(Hayer等人，2001, *Anticancer Res.* 21:2821-5)。NME4 mRNA於更有抗性的細胞株中為升高(圖26)。

ADAR1：由腺苷酸去胺酶包括ADAR1編輯的腺苷-至-肌核苷RNA造成交替接合位置的產生或密碼子的改變，因此導致蛋白質功能的改變(Wang等人，2000, *Science* 290:1765)。同時令人感興趣注意的是ADAR1基因係位於染色體1的1q21.1-q21.2處，於如同S100A10及S100A11之時常

重排的染色體區域(Pejoic, 1995, Ann. Med. 27:73-78)。
ADAR1 mRNA於對順鉑更有抗性的細胞株中為升高(圖27)。

NBR1：NBR1的實際分子功能為未知。(熟悉本技藝者將知於本發明方法中的基因之有效並非依賴基因的功能性質之細節或實際概念。)基因定位研究已顯示NBR1基因與BRCA1基因頭對頭排列(Whitehouse等人，2002, Eur. J. Biochem. 269:538-45)。NBR1未曾被報導與卵巢癌相關。NBR1 mRNA於對順鉑最有抗性的細胞株OVCA 429中為升高(圖28)。

鋅指狀蛋白質262/MYM：編碼含有MYM鋅結合序基(motif)蛋白質的基因家族之一員(Smedley等人，1999, Genomics 60:244-7)。此蛋白質未曾與卵巢癌有關；然而，相較於其他測試的細胞株，此基因的mRNA於最有化療抗性的細胞中為升高(圖29)。

MRPL4：此基因及其蛋白質從未與卵巢癌有關。然而，此基因係位於染色體19的19p13.2處，於卵巢癌中時常重排的區域(Pejoic, 1995, Ann. Med. 27:73-78)。MRPL4 mRNA於有化療抗性的細胞株中為升高(圖30)。

HYA22：此基因及其蛋白質從未與卵巢癌有關。然而，此基因係位於染色體3的3p21.3處，於卵巢癌中與染色體重排有關的區域(Pejoic, 1995, Ann. Med. 27:73-78; Protopopov等人，2003, Cancer Res. 63:404-12; Senchenko等人，2003, Oncogene 22:2984-92)。相較於更敏感的細胞

株，HYA22 mRNA於對順鉑更有抗性的細胞株中為升高(圖31)。

Vinexin β ：也稱為SCAM-1，此基因編碼適應子蛋白質，屬於也包括Vinexin β 、CAP/Ponsin及ArgBP2之蛋白質家族(Kioka等人，2002, Cell Structure and Function 27:1-7)。先前技藝中不知道Vinexin與卵巢癌有關聯。Vinexin β mRNA於有化療抗性的細胞株中為升高(圖32)。

G-CSFR：有粒細胞菌落-刺激因子受體(G-CSFR, Granulocyte colony-stimulating factor receptor)於初期卵巢癌中為幾乎普遍地表現。然而，僅於研究的案例之一半發現其配體(G-CSF)之表現於相同細胞中，暗示自體內分泌(autocrine)系統之存在(Savarese等人，2001, Cancer Letters 162:105-15)。於研究案例的另三分之一中發現G-CSF全部於基質，暗示可能存在旁體內分泌(paracrine)系統，其中間葉(mesenchymal)細胞可能提供配體制表現受體的癌細胞(Savarese等人，2001, Cancer Letters 162:105-15)。一個初步、回顧的評估建議相較於卵巢癌表現自體內分泌軸心的病患，單獨表現旁體內分泌環的病患中整體存活率更差(Savarese等人，2001, Cancer Letters 162:105-15)。G-CSF及其受體也可共同表現於正常卵巢及一些良性卵巢腫瘍中。G-CSFR mRNA於有化療抗性的細胞株中為升高(圖33)。

SRB1：也稱為CLA-1，此基因編碼辨識負電荷微脂粒及細胞凋亡細胞兩者的受體。曾報導腫瘤細胞參與細胞凋亡細胞及組織的攝取及去除(Fukasawa等人，1996, Exp. Cell

Res. 222:246-50)。此等觀察的生物重要性不為人們了解。於SRB1及卵巢癌之間沒有先前揭示的連結。SRB1 mRNA於有化療抗性的細胞株中為升高(圖34)。

IGFBP-7：一個更近來確認的IGF結合蛋白質之一員，此蛋白質以較低親合力結合IGF-I及IGF-II(Oh, 1998, Breast Cancer Res. Treat. 47:283-93)。IGFBP-7 mRNA於有化療抗性的細胞株中為升高(圖35)。

RAB22A屬於Ras蛋白質之RAB亞族(Kauppi等人, 2002, J. Cell Science 115:899-911)。RAB22A mRNA於有化療抗性的細胞株中為降低及於對順鉑更有反應的細胞株中為升高(圖36)。

KIAA0082：KIAA0082為一個全長基因，對於其沒有發表的資訊。此基因的mRNA表現於對順鉑有抗性的細胞株中為升高(圖37)。

NCOR2：此為於SMRT緊密相關的共同抑制子蛋白質，具有對甲狀腺荷爾蒙受體專一的交互作用區塊(Jepsen及Rosenfeld, 2002, J. Cell Science 115:689-98)。相較於對順鉑敏感的細胞株，於有化療抗性的細胞株中此基因的mRNA表現為降低(圖38)。

MT1：金屬硫蛋白1L(MT1, Metallothionein L)之確實角色為未知，然而，先前的研究已報導MT量於順鉑抗性的人類卵巢癌細胞中為升高(Andrews and Howell, 1990, Cancer Cells 2:35-43)及以MT基因轉染的細胞變成對順鉑有抗性(Nakano等人, 2003, Anticancer Res. 23:299-304)。吾人認

為MT作用於在細胞質中隔離順鉑，所以增加細胞對藥物的抗性(Nakano等人，2003, *Anticancer Res.* 23:299-304)。矛盾的是，MT1 mRNA的量似乎於對順鉑最敏感的細胞中(Hey)為高度地升高(圖51)。

MPP10：M-相磷蛋白(MPP10, M-phase phosphoprotein)為大部分細胞質蛋白質但可被分泌及為人類U3小核仁核糖蛋白質的成分。多數此蛋白質與核仁纖維蛋白(fibrillarin)同在一起(Baserga等人，1997, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 36:64-7)，及涉及rRNA加工。從未有報導此基因或其產物與卵巢癌有關。隨著對順鉑敏感度的增加MPP10表現量增加(圖52)。

實例3

試管內測試SPARC作為治療目標

相較於其他測試的細胞株，SPARC於最有順鉑抗性的細胞株(OVCA 429)中以最高量表現(圖4)。於技藝中已知此蛋白質為一種鈣結合糖蛋白，其調控黏著及可於組織重建及血管新生促進腫瘤發展及侵入扮演重要角色(Ledda等人，1997, *J. Invest. Dermatol.* 108:210-214)。

將SPARC表現測試於人類腹水體液樣品中，其得自當病患的腫瘤已復發時個體之細胞縮減手術前及手術後9個月(圖5；SPARC觀察到兩個轉錄體係由於不同的多腺苷化；Ledda等人，1997, *J. Invest. Dermatol.* 108:210-214)。手術後SPARC表現量大幅增加並與此病患之不良結果相關聯。此觀察也與其他團體研究其他實體癌症形式所發現的一致

(Golembieski等人，1999, Int. J. Dev. Neurosci. 17:463-72; Briggs等人，2002, Oncogene 21:7077-91; Huang及Wang, 2001, TRENDS in Molecular Medicine 7:355; Lollike等人，2001, J. Biol. Chem. 276:17762-9)，代表增加的SPARC表現可為除了卵巢癌，於其他類型實體腫瘤中化療處理成功及疾病發展的預兆。

為了測試於OVCA 429(最有抗性的卵巢癌細胞株)中是否降低SPARC蛋白質表現可降低其對順鉑的抗性，設計三種siRNA針對SPARC信息之不同區域。使用的SPARC siRNA為：

#1目標序列：AATCC TGT CCA GGT GGA AGT A (SEQ ID NO:1)；

#2目標序列：AAGCT CCA CCT GGA CTA CAT C (SEQ ID NO:2)；及

#3目標序列：AATGA CAA GTA CAT CGC CCT G (SEQ ID NO:3)。

利用 siPORT 脂質流程 (Ambion) 進行本文中說明的 siRNA 實驗。轉染前，將細胞植入含有 10% FBS 的 MEM α 培養基中 24 小時，以便在進行實驗之時細胞為 30-70% 緻密度 (confluent)。利用無 FBS 或抗生素之培養基製備 siPORT 及 siRNA 複合物。對於 siPORT，將 6 孔盤每孔 4 微升及 96 孔盤每孔 0.5 微升加至培養基，由漩渦震盪混合，及於室溫培養 25 分鐘。對於 siRNA，使用稀釋於培養基 1-25 nM (普通使用 12.5 nM) 濃度之 siRNA。將 siPORT 加至 siRNA 混合物，溫和

地混合，及於室溫培養20分鐘。將細胞以無血清培養基清洗後，將細胞加至盤中(當使用96孔盤，將細胞以 4.5×10^4 之密度植入；當使用6孔盤，將細胞以 $1-5 \times 10^5$ 之密度植入)。siPORT/siRNA複合物加至各盤/孔及將盤溫和地搖動以分散複合物遍佈細胞表面。於正常細胞培養條件下4小時後，將額外含10% FBS的培養基加至細胞。48小時後，萃取總RNA。

遵守供應商(Ambion)的操作指南將細胞以siRNA構體轉染。對於6孔盤，使用12.5 nM siRNA/孔於轉染。以1:100稀釋二重複進行siRNA的OD₂₆₀讀值。將讀值平均，而後乘上稀釋因子及而後乘上40(1之OD₂₆₀等於40微克/毫升RNA)以得到單位為微克/毫升之siRNA最終濃度。將數字除以14(RNA之微克數於1 nmole平均21員dsRNA)以得到最終siRNA濃度(單位 μM)，及而後轉變使得濃度以nM呈現。

將此等研究之結果示於圖48中。所有三個siRNA皆降低於此等細胞中之SPARC mRNA量。僅以siPORT或單獨以siRNA #2之有意義股處理的細胞於SPARC mRNA表現未顯示任何顯著降低。然而，包括所有三種siRNA之組合處理確實具有些效果(圖48)。

也研究在SPARC siRNA存在中對OVCA 429細胞對抗順鉑之能力。將細胞以單獨siPORT處理或以單獨siRNA #2之有意義股或完整siRNA #2轉染。在轉染後48小時使細胞復原及而後以增加濃度順鉑或相對應濃度DMOS作為控制組處理。將細胞暴露至藥物24小時，之後將藥物去除及使細

胞復原再72小時。而後藉MTT分析法評估此處理對細胞生存力之影響。將結果示於圖49中；圖50顯示定量對細胞效果後之此等結果。數據建議在暴露至順鉑前以完整siRNA #2處理細胞降低其抗性程度一半(僅以siPORT或僅以有意義股處理的控制組之 $IC_{50} \sim 25-50 \mu M$ 至以siRNA #2處理後之 $IC_{50} \sim 12.5 \mu M$)。

此等實驗的結果指出SPARC為卵巢癌的治療目標及標記物。

實例4

試管內測試MetAP2/p67作為治療目標

MetAP2/p67為一種雙功能蛋白質，其兩個功能對細胞生長皆為重要(Li及Chang, 1996, Biochem. Biophys. Res. Commun. 227:152-9; Wu等人, 1993, J. Biol. Chem. 268:10796-10801)。於一個角色中，蛋白質結合至真核起始因子2(eIF-2, eukaryotic initiation factor 2)及抑制其磷酸化，及於其另一個角色中其C-端區塊具有酵素活性催化N-端甲硫胺酸自許多細胞蛋白質水解(Wu等人, 1993, J. Biol. Chem. 268:10796-10801)。eIF-2之磷酸化改變其轉譯結果使得不同信息於不同磷酸化位置被轉譯。此外，甲硫胺酸胺基胜肽酶活性普遍地對蛋白質活性為重要及無法去除N-端甲硫胺酸常製造無活性的蛋白質(Li及Chang, 1996, Biochem. Biophys. Res. Commun. 227:152-9)。

來自煙曲黴菌(*Aspergillus fumigatus*)的煙曲黴素及其合成的類似物TNP-470共價鍵地結合至及抑制MetAP-2的甲

硫胺酸胺基胜肽酶活性但不影響密切相關的MetAP-1之活性(Griffith等人, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 15183-8)。同樣重要需注意的是以煙曲黴素處理數種不同細胞類型造成MetAP-2之增加表現(Wang等人, 2000, J. Cell Biochem. 77:465-73); 吾人認為細胞藉由增加其表現量而適應MetAP-2的功能喪失。

說明於本文中的實驗建議OVCA 429表現比對順鉑最敏感的細胞株(Hey)多大約7倍MetAP-2(圖8)。北方墨點分析也證實MetAP-2表現量於臨床上對順鉑為基礎的化療更有抗性之病患中也為升高。圖9顯示MetAP-2 mRNA之量於最有抗性的病患(CAP3)中比最小抗性的病患(CAP1)中高大約3倍。對以順鉑為基礎的化療具有中等抗性程度之病患也呈現MetAP-2 mRNA中等量。

將以MTT為基礎的分析法進行於將OVCA 429細胞以單獨煙曲黴素、單獨順鉑、及以不同濃度順鉑及煙曲黴素組合處理4、8及24小時。將結果示於圖40、41及42。圖40(上圖)顯示增加煙曲黴素濃度對OVCA 429細胞存活之影響。觀察到一些細胞死亡但高達80%細胞存活, 即使於非常高濃度煙曲黴素。單獨以順鉑處理細胞(下圖)造成IC₅₀大約為100 μ M順鉑。除了增加順鉑量, 0.1微克/毫升煙曲黴素的存在降低IC₅₀至大約為50 μ M。然而, 在10微克/毫升煙曲黴素存在中以順鉑處理細胞造成增加的細胞存活, 其IC₅₀大約為200 μ M。

無論培養時間的長度, 在0.1微克/毫升煙曲黴素存在中順

鉑的效果增強但是當在10微克/毫升煙曲黴素存在中以順鉑處理細胞時效果相反(圖41及42)。此等觀察建議低量煙曲黴素時，達到有利的平衡及藥物與順鉑協同地作用導致更多細胞死亡。

設計三種siRNA針對MetAP-2信息之不同區域(圖43)以決定抑制MetAP-2表現之效果。MetAP-2 siRNA為：

#1目標序列：AAAGA TCA GCA TTG GAA GAT A (SEQ ID NO:4)

#2目標序列：AAGCA CAT CGA CAA GTT AGA A (SEQ ID NO:5)

#3目標序列：AAACA GTG CCG ATT GTG AAA G (SEQ ID NO:6)

圖44顯示siRNA #1對OVCA 429中MetAP-2之量的影響。將控制組細胞以單獨相同siRNA之有意義股轉染或以轉染試劑(siPort脂質)處理。以siRNA #1轉染細胞降低MetAP-2表現量一半，即使轉染效率不是100%。於彼等細胞中未觀察到對GAPDH表現量之影響，代表由此處理未普遍地影響基因表現。再者，以siRNA #2及#3處理細胞未造成MetAP-2表現之降低。

藉由以siRNA #1、單獨有意義股#1、或單獨siPort脂質處理OVCA 429細胞，測試當阻止MetAP-2表現時OVCA 429抵抗順鉑之能力。與siRNA培養48小時後，將細胞暴露至不同濃度順鉑或其溶劑DMSO相對應濃度24小時。將此實驗之結果定量及示於圖45。結果指出siRNA #1之存在降低OVCA

429之 IC_{50} 由25 μM 至大約3 μM 。圖46顯示進行MTT分析後96孔盤之照片。

綜合結果指出MetAP-2為卵巢癌中治療介入之有用目標。

實例5

試管內測試作鈣活化酶(Calpain)2及S100A10為治療目標及降低S100A11表現於OVCA 429細胞

549728(鈣活化酶(Calpain)2)

利用上述方法設計三種siRNA針對鈣活化酶(Calpain)2信息之不同區域。鈣活化酶(Calpain)2 siRNA為：

#1 AA GGC ATA CGA CAA GAT CAA C (SEQ ID NO:7)；

#2 AA ACT TCT TCC TGA CGA ATC G (SEQ ID NO:8)；及

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

如上述將各siRNA導入OVCA 429中。圖53顯示於OVCA 429細胞中利用此等序列破壞實驗之結果。利用上述流程，序列#1及#3破壞基因表現量約50%。此外，將包含有siRNA #3之OVCA 429細胞以不同濃度順鉑處理。通常，在暴露至藥物24小時後OVCA 429細胞之 IC_{50} 為大約25 μM 順鉑。如圖54中所示，鈣活化酶(Calpain)2 siRNA #3降低 IC_{50} 至3.12 μM 順鉑，因而增加細胞對順鉑的敏感性數倍。同樣地，將OVCA 429細胞在順鉑的存在或不存在下以增加濃度之鈣活化酶(Calpain)抑制劑I(ALLN)處理。如圖55中所示，ALLN在順鉑的存在中降低此等細胞的 IC_{50} 至12.5 μM 。因此，鈣活化酶(Calpain)2 siRNA #3比ALLN對於OVCA 429細胞對順鉑的敏感性具有更大效果。

756595(S100A10)

產生三種 siRNA 針對 S100A10 信息：

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

#2 AA ATT CGC TGG GGA TAA AGG C (SEQ ID NO:60)；及

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

如圖 56 中顯示，siRNA #3 降低 OVCA 429 之 IC_{50} 由 25 μ M 至 6.25 μ M 順鉑，因而增加細胞對順鉑的敏感性。

810612(S100A11)

利用上述方法設計三種 siRNA 針對 S100A11 信息之不同區域。S100A11 siRNA 為：

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

#2 AA GAA ACT GGA CAC CAA CAG T (SEQ ID NO:11)；及

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

如上述將各 siRNA 導入 OVCA 429 中。圖 57 顯示利用上述方法 siRNA #1 及 #2 分別破壞 OVCA 429 細胞中基因表現量 50% 及 25%。

實例 6

MetAP-2、SPARC、鈣活化酶 (Calpain)2、S100A10 及 S100A11 之表現於大腸癌

大腸 cDNA 之市售配對組合係得自 BD Biosciences, Inc. (San Jose, CA)，其係由得自非腫瘤組織及也自相鄰腫瘤組織之五個個體分離。

進行定量即時PCR實驗以決定於正常及腫瘤大腸組織中MetAP-2、SPARC、S100A10、S100A11及鈣活化酶(Calpain)2之表現量。圖58顯示MetAP-2之表現量於5對配對的大腸cDNA中。資料指出兩個病患具有高度升高的表現量於腫瘤cDNA相較於其配對的非腫瘤cDNA(病患B及C；圖58)。另一個病患僅顯示稍微升高的表現於腫瘤cDNA相較於其配對的非腫瘤cDNA(病患A；圖58)。使用OVCA 429中的表現量作為參考。先前報告已證實人類大腸癌之肝轉移可由MetAP-2抑制劑TNP-470避免(Tanaka等人，1995，Cancer Res. 55:836-9)。

圖59顯示SPARC mRNA之表現量於5個配對的腫瘤樣品的其中4個相較於其配對的非腫瘤cDNA為升高。圖60顯示S100A11 mRNA之表現量於所有的配對腫瘤樣品相較於其配對的非腫瘤cDNA為升高。圖61顯示S100A10 mRNA之表現量於5個配對的腫瘤樣品的其中4個相較於其配對的非腫瘤cDNA為升高。圖62顯示鈣活化酶(Calpain)2 mRNA之表現量於所有的配對腫瘤樣品相較於其配對的非腫瘤cDNA為升高。

綜合此等觀察建議MetAP-2以及SPARC、S100A10、S100A11及鈣活化酶(Calpain)2為大腸癌病患的治療目標。

實例7

三明治ELISA用以偵測血清中分泌的蛋白質

將96孔微量滴定盤之孔塗佈針對研究的基因產物培養的抗體。將純化的重組目標基因產物之部分連續稀釋及用來

產生定量的標準曲線。而後將病患血清的部分加至各孔。將盤子加蓋以避免蒸發及於4°C培養數小時至隔夜。將抗原取出，及將孔以磷酸緩衝的鹽水(PBS, phosphate buffered saline)清洗3次。將300微升阻擋溶液(3% w/v魚膠溶液於PBS)加至各孔及於室溫培養2小時。將阻擋溶液去除及將孔以PBS清洗3次。而後將連結辣根過氧化酶之適當抗體加至各孔(每孔100微升)及於室溫培養1-2小時。而後將抗體去除及將孔以NP-40溶液(0.05% v/v NP-40於PBS)清洗3次。藉由加入ABTS(Rockland Immunochemicals)至各孔(以每孔100微升)於室溫30分鐘及利用微量盤讀值器於405 nm讀吸收值而偵測結合。若使用鹼性磷酸連結取代過氧化酶，使用pNPP(Rockland Immunochemicals)代替ABTS偵測結合。

一旦由利用純化的蛋白質產生的標準曲線決定偵測極限，測試一些沒有癌症的對象及一些曾被診斷具有癌症或良性症狀的病患以決定特定研究的基因產物之預期濃度範圍。具有癌症的病患之預期範圍定義可用來鑑定或區分具有卵巢癌的病患或具有復發疾病的病患與有反應的病患或不具癌症的健康對象之界線。

實例8

siRNA媒介的基因表現"破壞"：

遵照上述流程測試針對數種基因的siRNA於卵巢癌細胞株中降低(或"破壞")其個別基因的能力。於各例中，將數個siRNA針對GC-內容配對(來自Dharmacon, Inc, Lafayette, CO)於測試的siRNA的控制組(非專一性)siRNA測試。於一

些情況中，也包括負控制組(無處理)。表現破壞量隨不同 siRNA 改變。將特定的基因及對各特定基因之 siRNA 序列說明於下：

1. 將兩個 siRNA 產生 SAPK/Erk1(L36870)：

L36870(726147)

目標序列 #1 (SEQ ID NO:64): AAA TGG GAC GAG GAG CTT ATG (開始於編碼序列中的 bp 320)

目標序列 #2 (SEQ ID NO:65): AAG CGC ATC ACG ACA AGG ATA (開始於編碼序列中的 bp 831)

兩序列皆成功降低 SAPK 的表現，其中序列 #2 產生 mRNA 量之 60% 降低。

2. 為 eEF1 ϵ (BC005291) 將三個 siRNA 產生：

BC005291(306921)

目標序列 #1 (SEQ ID NO:66): AAC AGG ATT GAC TAC TAT AGC (開始於編碼序列中的 bp 123)

目標序列 #2 (SEQ ID NO:67): AAT ACA GGG TCA CTC AAG TAG (開始於編碼序列中的 bp 227)

目標序列 #3 (SEQ ID NO:68): AAA TAT CTT AAT GTG TCT CGC (開始於編碼序列中的 bp 412)

目標序列 #1 及 2 皆成功降低 eEF1 ϵ 的表現，其中序列 #1 產生 mRNA 量之 65% 降低。

3. 為 G-CSFR(M59818) 將三個 siRNA 產生：

M59818(809639)

目標序列 #1 (SEQ ID NO:69): AAG TGT GAG CTG GCG

CAC AAG (開始於編碼序列中的 bp 793)

目標序列#2(SEQ ID NO:70): AAG AGC CCC CTT ACC

CAC TAC (開始於編碼序列中的 bp 1666)

目標序列#3(SEQ ID NO:71): AAC AGG AAG AAT CCC

CTC TGG (開始於編碼序列中的 bp 1957)

目標序列#1及3降低 G-CSFR 的表現程度，其中序列#1產生 mRNA 量之 53% 降低。

4. 為 ARA9/XAP2(U31913)將三個 siRNA 產生：

U31913(814731)

目標序列#1(SEQ ID NO:72): AAA CGT GTG ATA CAG

GAA GGC (開始於編碼序列中的 bp 48)

目標序列#2(SEQ ID NO:73): AAC AAG TAC GAC GAC

AAC GTC (開始於編碼序列中的 bp 775)

目標序列#3(SEQ ID NO:74): AAC GTC AAG GCC TAC

TTC AAG (開始於編碼序列中的 bp 790)

目標序列#2及3造成 ARA9 表現的降低，其中序列#3產生 mRNA 量之 50% 降低。

5. 為 RNPS1(AF015608)將三個 siRNA 產生：

AF015608(897594)

目標序列#1(SEQ ID NO:75): AAT ATT CAT ACG GCA

TGG ACT (開始於編碼序列中的 bp 327)

目標序列#2(SEQ ID NO:76): AAC CTA AAA TAG AAG

ACC CCT (開始於編碼序列中的 bp 680)

目標序列#3(SEQ ID NO:77): AAA AGA TGC TGA CTC

AGA AAA (開始於編碼序列中的 bp 752)

所有三個序列皆成功降低RNPS1之表現，其中序列#1產生 mRNA 量之 35% 降低。

6. 為融合的腳趾(BC001134)將三個 siRNA 產生：

BC001134(321247)

目標序列#1(SEQ ID NO:78)：AAC CTA AAA TAG AAG
ACC CCT (開始於編碼序列中的 bp 680)

目標序列#2(SEQ ID NO:79)：AAG ACC CCT ATG CAA
TTA GCT (開始於編碼序列中的 bp 692)

目標序列#3(SEQ ID NO:80)：AAA AAG CCT GAA GAA
CAG CAC (開始於編碼序列中的 bp 769)

所有三個序列皆成功降低融合的腳趾之表現，其中序列#2 產生 mRNA 量之 43% 降低。

7. 為 Grancalcin(BC005214)將三個 siRNA 產生：

BC005214(34140)

目標序列#1(SEQ ID NO:81)：AAA TGG GAT TTA ATG
CAT TCA (開始於編碼序列中的 bp 323)

目標序列#2(SEQ ID NO:82)：AAC TTC ATG ACT GTT
GAT CAA (開始於編碼序列中的 bp 379)

目標序列#3(SEQ ID NO:83)：AAC ATC ATG AGT TGC
GTC AAG (開始於編碼序列中的 bp 419)

所有三個序列皆成功降低 Grancalcin 之表現，其中序列 #2 產生 mRNA 量之 83% 降低。

8. 為 SRB1/CLA1/CD3611(BC022087)將三個 siRNA 產生：

BC022087(756687)

目標序列#1(SEQ ID NO:84): AAG CAG CAG GTC CTT
AAG AAC (開始於編碼序列中的 bp 109)

目標序列#2(SEQ ID NO:85): AAT CTC ATC AAC AAG
TAC TTT (開始於編碼序列中的 bp 565)

目標序列#3(SEQ ID NO:86): AAT TCA GAA CGT CAG
CAC CTG (開始於編碼序列中的 bp 981)

目標序列#1及3成功降低SRB1之表現，其中序列#1產生
mRNA量之60%降低。

9.為 KIAA0082(BC031890)將三個 siRNA 產生：

BC031890(825293)

目標序列#1(SEQ ID NO:87): AAG AGG AGA ACT GAC
CCA GAA (開始於編碼序列中的 bp 4)

目標序列#2(SEQ ID NO:88): AAA TGA GCG ATT GGA
TGG TGG (開始於編碼序列中的 bp 509)

目標序列#3(SEQ ID NO:89): AAG ATC ATC AAG GGC
TCC AGT (開始於編碼序列中的 bp 2164)

序列#1產生 mRNA 量之 65% 降低。序列#2及#3對 mRNA 量
無影響。

10.為 eIF2Bε(BC013590)將三個 siRNA 產生：

BC013590(1630998)

目標序列#1(SEQ ID NO:90): AAT GTG GTT CGA ATA
ATT ACA (開始於編碼序列中的 bp 352)

目標序列#2(SEQ ID NO:91): AAA CTC GAG ATG ACT

TTG TGC (開始於編碼序列中的bp 800)

目標序列#3(SEQ ID NO:92): AAT CAA CAG CTG CAG
AGG TTC (開始於編碼序列中的bp 2098)

序列#1產生mRNA量之57%降低，序列#2產生mRNA量之54%降低，及序列#3產生mRNA量之43%降低。

11.為肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2(D83735)將三個siRNA產生：

D83735(713886)

目標序列#1(SEQ ID NO:93): AAG GAT GGA ACT ATC
TTA TGC (開始於編碼序列中的bp 163)

目標序列#2(SEQ ID NO:94): AAT TTC GAC GAT GCC
ACC ATG (開始於編碼序列中的bp 457)

目標序列#3(SEQ ID NO:95): AAC CGA CAA GTG TGA
CAA CTC 開始於編碼序列中的bp 708)

所有三個序列皆降低基因表現程度，其中序列#3產生mRNA量之75%降低。

12.為HYA22(D88153)將三個siRNA產生：

D88153(123980)

目標序列#1(SEQ ID NO:96): AAA GAA ATG TGT GGT
CAT TGA (開始於編碼序列中的bp 507)

目標序列#2(SEQ ID NO:97): AAA TCG ATG GAA CTA
TAC ATC (開始於編碼序列中的bp 596)

目標序列#3(SEQ ID NO:98): AAC TAT ACA TCA GGT
GTA TGT (開始於編碼序列中的bp 606)

所有三個序列皆降低基因表現程度，其中序列#3產生 mRNA 量之 60% 降低。

13. 為 CA 125(BC009808)將三個 siRNA 產生：

BC009808(CA 125)

目標序列#1(SEQ ID NO:99)：AAT GGT TTC ACC CAT
CAG AGC (開始於編碼序列中的 bp 235)

目標序列#2(SEQ ID NO:100)：AAG GGC TCA GCT
ACA TTC AAC (開始於編碼序列中的 bp 2203)

目標序列#3(SEQ ID NO:101)：AAT ACA ACG TCC
AGC AAC AGT (開始於編碼序列中的 bp 3380)

序列#3產生 mRNA 量之 50% 降低。

14. 為 HMT1(AF222689)將兩個 siRNA 產生及於 Hey 細胞中測試：

AF222689

目標序列#1(SEQ ID NO:102)：AAC TCC ATG TTT CAT
AAAC CGG (開始於編碼序列中的 bp 202)

目標序列#2(SEQ ID NO:103)：AAC GTG TAT GGC TTC
GAC ATG (開始於編碼序列中的 bp 619)

兩序列皆成功降低 HMT1 mRNA 的表現，其中序列#1產生大約 70% 降低及#2恰巧超過 60% 降低。

15. 為 MPP10(X98494)將三個 siRNA 產生及於 Hey 細胞中測試：

X98494

目標序列#1(SEQ ID NO:104)：AAG TTC CAG AAA

TCT GAA ATA (開始於編碼序列中的 bp 357)

目標序列#2(SEQ ID NO:105): AAG AAA ATC CAG
AAC ATG TAG (開始於編碼序列中的 bp 1043)

目標序列#3(SEQ ID NO:106): AAA ACA GTA GCT
TCG GAG AAG (開始於編碼序列中的 bp 1414)

所有三個序列皆產生 mRNA 表現降低，其中序列#1產生幾乎 90% 降低，及序列#2及3分別具有大約 30% 及 40% 降低。

16. 為 IGFBP -7(BC017201)將兩個 siRNA 產生及於 OVCA 429 中測試：

BC017201

目標序列#1: AAG GTA AAA AGG GGT CAC TAT (開始於編碼序列中的 bp 583)(SEQ ID NO:107)

目標序列#2: AAA GGG GTC ACT ATG GAG TTC (開始於編碼序列中的 bp 590)(SEQ ID NO:108)

僅有序列#1產生 mRNA 量降低，相較於控制組其為大約 60%。

17. 為 NM23-D(BC004880)將一個 siRNA 產生及於 OVCA 429 細胞中測試：

BC004880(203003)

目標序列#3 AAT GTC ATC CAC GCC AGC GAC (開始自第一個 ATG 之 bp 442)(SEQ ID NO:135)

僅有目標序列#3降低 mRNA 量，相較於控制組大約 50%。

18. 為 WDR1(AB010427)將三個 siRNA 產生及於 OVCA 429 細

胞中測試：

AB010427

目標序列#1：AAT GGA AAG TGC GTC ATC CTA (開始自第一個ATG之bp 106)(SEQ ID NO:136)

目標序列#2：AAG TTC ACA ATT GGC GAC CAC (開始自第一個ATG之bp 544)(SEQ ID NO:137)

目標序列#3：AAG TGC TTC AGC ATC GAC AAC (開始自第一個ATG之bp 1309)(SEQ ID NO:138)

所有目標序列皆降低mRNA量，相較於控制組#1為大約85%，#2為大約75%及#3為大約70%。

19.為 Vinexin β (AF037261)將一個 siRNA 產生及於 OVCA 429細胞中測試：

AF037261

目標序列#2：AAG AGT TAC CTA GAA GCA CCT (SEQ ID NO:139)

相較於控制組，目標序列#1及#3不降低mRNA量，而#2降低mRNA大約50%。

20.為 KLK6(BC015525)將三個 siRNA 產生及於 OVCA 429細胞中測試：

BC015525

目標序列#1：AAA AAA CCG AAT CTT CAG GTC (SEQ ID NO:140)

目標序列#2：AAA CTC TCT GAA CTC ATC CAG (SEQ ID NO:141)

目標序列#3：AAC TGG ATC CAA AAA ACC ATT (SEQ ID NO:142)

相較於控制組，目標序列#1不降低mRNA量，而#2降低mRNA大約42%及#3降低大約55%。

21.為eIF5(U49436)將一個siRNA產生及於OVCA 429細胞中測試：

U49436

目標序列#1 mRNA目標序列：AAT GAC CGT TAC ATT GTC AAT (SEQ ID NO:143)

相較於控制組，目標序列#2及#3不降低mRNA量，而#1降低mRNA大約59%。

22.為鋅指狀蛋白質262/MYM(AB007885)將一個siRNA產生及於OVCA 429細胞中測試：

AB007885

目標序列#3：AAA ATA TGG GAA CCT ACA ATA (開始自第一個ATG之bp 3058)(SEQ ID NO:144)

相較於控制組，目標序列#1及#2不降低mRNA量，而#3降低mRNA大約45%。

實例9

有效的基因之試管內功能測試：

將特定siRNA增加OVCA 429及OVCAR-3細胞對於順鉑敏感度之能力如上述實例3-5中所揭示大體上檢視。於各例中，在特定siRNA存在中順鉑敏感性增加及以非專一的(控制組)siRNA或負控制組(無處理)則不會。數據指出測試的

基因可能功能上涉及卵巢癌細胞株中順鉑抗性的發展。將結果摘要於表4中。

表4：試管中順鉑敏感度測試

登錄號	名稱	siRNA序列	於OVCA 429細胞中測試	429：對順鉑增加的敏感度	於OVCAR-3細胞中測試	OVCAR-3：對順鉑增加的敏感度
M59818	G-CSFR		是	是		
U31913	ARA9 XAP2	#3	是	是	是	是
AF015608	RNPS1	#1	是	是		
BC001134	融合的腳趾	#2	是	是	是	是
BC005214	Grancalcin	#2	是	是	是	是
BC022087	SRB1	#1	是	是	是	是
BC031890	KIAA0082	#1	是	是	是	是
AB007885	鋅指狀蛋白質	#3	是	是	是	是
BC004880	NM23D	#3	是	是	是	是
AB010427	WDR1	#1		非	是	是
U49436	eIF5 eIF5A	#1	是	是	是	是
D83735	肌動蛋白結合蛋白 (Calponin)2	#3	是	是	是	是
BC015525	KLK 6	#3	是	是	是	是
AF037261	Vinexin β	#2		非	是	是
BC017201	IGFBP -7	#1	是	是	是	是
D88153	HYA22	#3	是	微小	是	是
BC013590	eIF2B ϵ	#1	是	是	是	是
L36870	SAPK/Erk1	#2	是	是	是	是

實例 10

活體內實驗：

利用 OVCAR-3 細胞及裸鼠發展下列流程於檢視腫瘤生長：將 OVCAR-3 細胞 (15 百萬 / 注射) 接種於裸鼠的上臂區域。25 天後可見的腫塊出現。接種後約 35 天時測量腫瘤及而後將動物以 4 微克順鉑 / 公斤體重 IP 注射每週給予 3 次共 2 週，之後 1 週不處理或僅以鹽水溶液作為控制組處理。圖 63 顯示腫瘤體積為兩隻小鼠體重之函數。數據證實帶有腫瘤的控制組動物在無任何化療中繼續生長腫瘤 (小鼠 #1)。相反地，接受順鉑處理的動物呈現腫瘤大小的穩定 (小鼠 #2)。也

顯示順鉑處理前及後腫瘤的照片。

利用表現針對本文中確認基因 (MetAP-2、SPARC、S100A10、S100A11及鈣活化酶(Calpain)2)之 siRNA 的穩定細胞株將此流程重複。已發展表現鈣活化酶(Calpain)2或 S100A11 siRNA 之穩定 OVCAR-3 細胞株以及表現穩定針對綠螢光蛋白質 (GFP, green fluorescent protein, 一種生長無關標記蛋白質) siRNA 之控制組 OVCAR-3 細胞株；將由即時定量 PCR 測量之鈣活化酶(Calpain)-2 及 S100A11 的表現及 siRNA 表現之作用示於圖 64 中。將 15 隻小鼠分成 5 隻之三組。將一組作為控制組處理，注射無 siRNA 表現的 OVCAR-3 細胞，第二組注射 siRNA 表現的 OVCAR-3 細胞及第三組注射 GFP 專一的 siRNA 表現的 OVCAR-3 細胞。在可測量的腫瘤變成明顯後，控制組接受鹽水注射，而第二及第三組接受標準順鉑治療。如上述將腫瘤生長觀察為體重的函數。

可將實例中揭示的資訊摘要如下：

表 5

登錄 #	名稱	於卵巢癌病患組 織樣品小組中測 試	通過試管內功能確 認於OVCA 429、 OVCAR-3(或兩者) 或Hey*
BC015973	S100A10 P11 CLP11 依鈣結合蛋白 (Calpactin)1 輕鏈 42C	是	是
BC001410	S100A11 S100C Calgizzarin	是	是

登錄 #	名稱	於卵巢癌病患組 織樣品小組中測 試	通過試管內功能確 認於OVCA 429、 OVCAR-3(或兩者) 或Hey*
AF261089	鈣活化酶(Calpain)2 CANPL2 MCANP	是	是
BC004974	SPARC 骨聯蛋白(osteonectin) BM-40	是	是
BC013782	MetAP-2 p67eIF2 MNPEP	是	是
BC015525	KLK6 Zyme Neurosin 蛋白質分解酶M	是	是
AF222689	HMT1 HMT2 ANM1 HCP1	是	非
U31913	ARA9 XAP2	非	是
D83735	肌動蛋白結合蛋白 (Calponin)2	非	是
U19251	NAIP	是	非
BC005291	eEF1ε p18	是	非
AF015608	RNPS1	是	是
U49436	eIF5 eIF5A	是	是
BC013590	eIF2Bε	是	是
M65217	HSF2 HSTF2	非	非
AB010427	WDR1 NORI-1	是	是
BC001134	融合的腳趾	非	是
BC004880	NM23D mn23-H4	是	是
U10439	ADAR1	是	非
BC005214	Grancalcin	非	是
BC009808	NBR1	非	非
L36870	SAPK/Erk1 JNKK1 MEK4 MKK4 MAPKK4	是	是

登錄 #	名稱	於卵巢癌病患組 織樣品小組中測 試	通過試管內功能確 認於OVCA 429、 OVCAR-3(或兩者) 或Hey*
AB007885	鋅指狀蛋白質-262 MYM	是	是
D88153	HYA22	是	是
AB049635	MRPL4 CGI-28	是	非
AF037261	Vinexin β	是	是
M59818	G-CSFR	是	是
BC015710	RAB22A	是	非
BC017201	IGFBP -7 MAC25 FSTL2	非	是
BC011770	FAST激酶	非	非
AB057597	TESK2	非	非
BC022087	SRB1 CLA1 CD36L1	是	是
BC031890	KIAA0082	非	是
NM_006312	NCOR2	非	非
BC032338	MT1	是	非
X98494	MPP10	非	非

*：在有藥物抗性的腫瘤細胞中表現升高的所有基因 (KLK6、ARA9、鈣活化酶 (Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、WDR1、融合的腳趾、NM23D、Grancalcin、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP -7、SRB1或KIAA0082)皆於OVCAR-3或OVCA 429細胞中測試，及在最有抗性的腫瘤細胞中表現降低的所有基因 (MPP10、HMT1、NAIP、Eef1 ϵ 、RAB22A、NCOR2或MT1)皆於Hey細胞中測試。

應了解前述揭示強調本發明之某些特定具體實施例及其所有修飾或替代的相等件皆於如隨附專利申請範圍中提出的本發明精神及範圍內。

【圖式簡單說明】

圖1為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明S100A10在對化療藥物具有增加的抗性之卵巢癌細胞株中以增加的程度表現。

圖2為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明S100A11在對化療藥物具有增加的抗性之卵巢癌細胞株中以增加的程度表現。

圖3為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明相較於來自更有反應的病患之樣品，在對化療更有抗性之病患腫瘤樣品中S100A10及S100A11之mRNA量提高。

圖4為代表定量即時PCR結果之圖表，說明SPARC於有化療抗性細胞株中以增加的程度表現。

圖5為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，說明取自癌症復發的病患之樣品中SPARC mRNA升高。

圖6為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明鈣活化酶(Calpain)2 mRNA之量在有化療抗性的卵巢癌細胞株中增加。

圖7為北方墨點分析之圖表代表，說明相較於對順鉑治療敏感的細胞株，於有化療抗性之細胞株中Grancalcin之mRNA量提高。

圖8為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明MetAP-2之表現於高度化療抗性之細胞株OVCA 429中升高及於對順鉑治療敏感的

Hey細胞中下向調節。

圖9為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於得自對以順鉑為基礎的化療具有不同程度之抗性的三個病患之組織樣品中MetAP-2 mRNA之表現。在來自具有最有抗性腫瘤(CAP3)之病患相較於具有中等(CAP2)及低(CAP1)程度之化療抗性之病患之樣品中MetAP-2最為提高。

圖10為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明偵測到兩個eIF5轉錄體及於對順鉑具有最高程度抗性之卵巢癌細胞株中兩者的表現程度升高。

圖11為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於化療抗性病患腫瘤樣品中於腫瘤的復發前(CAP2)及之後(CAP2+)eIF5之表現。

圖12為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中eIF2B ϵ 之mRNA升高。

圖13為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑最有抗性的卵巢癌細胞株中eEF1 ϵ mRNA受到向下調節。

圖14顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑有抗性的細胞株中相較於敏感性細胞株，SAPK/Erk1 mRNA量升高。

圖 15 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑有抗性的細胞株中 TESK2 mRNA 升高。

圖 16 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑有抗性的細胞株中 FAST 激酶 mRNA 升高。

圖 17 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於測試的對順鉑有抗性的細胞株中 KLK6 表現程度升高。

圖 18 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑有抗性的細胞中 HMT1 之表現受到向下調節。

圖 19 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑有抗性的細胞株中來自 ARA9 之 mRNA 升高。

圖 20 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中相較於化療敏感性卵巢癌細胞株，肌動蛋白結合蛋白 (Calponin)2 之表現升高。

圖 21 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑最有抗性的細胞株中神經細胞凋亡抑制蛋白質基因表現減少。

圖 22 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑有抗性的細胞株中 RNPS1 量升高。

圖 23 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結

果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中HSF2之mRNA量升高。

圖 24 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中相較於化療敏感性細胞株，WDR1之mRNA升高。

圖 25 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑有抗性的細胞株中Ft1 mRNA量升高。

圖 26 為自動放射攝影之照片，顯示北方墨點分析之結果，及北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中NME4 mRNA升高。

圖 27 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於對順鉑有抗性的細胞株中ADAR1 mRNA升高。

圖 28 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於相較於其他測試的細胞株最有化療抗性之細胞株OVCA 429中NBR1 mRNA升高。

圖 29 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於相較於其他測試的細胞株最有順鉑抗性之細胞株中鋅指狀蛋白質262之mRNA升高。

圖 30 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中MRPL4 mRNA升高。

圖 31 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中相較於化療敏感性細胞株，HTYA22 mRNA升高。

圖 32 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中 Vinexin β 之 mRNA 升高。

圖 33 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中 G-CSFR 之 mRNA 升高。

圖 34 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中 SRB1 mRNA 升高。

圖 35 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明於有化療抗性的細胞株中 IGFBP -7 mRNA 升高。

圖 36 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明 RAB22A mRNA 於有化療抗性的細胞株中減少及於更有反應的細胞株中升高。

圖 37 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明 KIAA0082 mRNA 之表現於有化療抗性的細胞株中升高。

圖 38 顯示北方墨點分析及結果之圖表代表，說明 NCOR2 之 mRNA 於對順鉑有抗性的細胞株中相較於敏感性細胞株減少。

圖 39 顯示基於 MTT 分析結果，根據對於順鉑敏感性的程度，五種卵巢癌細胞株之等級。

圖 40(上圖)描繪一圖表，顯示在暴露至藥物 4 小時後，增加煙曲黴素濃度對 OVCA 429 細胞存活之影響。下圖描繪一圖表，顯示在 0.1 微克/毫升煙曲黴素存在中順鉑的效果有增強但當細胞於 10 微克/毫升煙曲黴素存在中以順鉑治療 4 小時則無。

圖 41(上圖)描繪一圖表，顯示在暴露至藥物 8 小時後，增

加煙曲黴素濃度對OVCA 429細胞存活之影響。

圖41(下圖)描繪一圖表，顯示在0.1微克/毫升煙曲黴素存在中順鉑的效果有增強但當細胞於10微克/毫升煙曲黴素存在中以順鉑治療8小時則無。

圖42(上圖)描繪一圖表，顯示在暴露至藥物24小時後，增加煙曲黴素濃度對OVCA 429細胞存活之影響。

圖42(下圖)描繪一圖表，顯示在0.1微克/毫升煙曲黴素存在中順鉑的細胞毒性效果有增強但當細胞於10微克/毫升煙曲黴素存在中以順鉑治療24小時則無。

圖43為設計來鎖定MetAP-2傳訊RNA之不同區域之三種siRNA(#1, SEQ ID NO:4; #2, SEQ ID NO:5;及#3, SEQ ID NO:6)的概略代表。

圖44顯示siRNA #1對OVCA 429中MetAP-2表現量的影響，由定量即時PCR決定。

圖45為一圖表，代表在siRNA #1存在中暴露OVCA 429至順鉑後由MTT分析決定的細胞存活量。

圖46為含有進行MTT分析後(量係示於圖45中)之OVCA 429細胞的96孔盤照片，顯示順鉑對以MetAP-2 siRNA #1轉染的此等細胞之作用。

圖47為設計來鎖定SPARC傳訊RNA之不同區域之三種siRNA(#1, SEQ ID NO:1; #2, SEQ ID NO:2;及#3, SEQ ID NO:3)的概略代表。

圖48為一圖表，代表以示於圖47中的siRNA轉染的OVCA 429細胞中SPARC表現之定量即時PCR分析的結果。

圖 49 為含有進行 MTT 分析後之 OVCA 429 細胞的 96 孔盤照片，以決定在 SPARC siRNA #2 存在中順鉑對 OVCA 429 細胞之作用。

圖 50 為一圖表，代表於 OVCA 429 細胞中經 siRNA 介導的 SPARC 基因表現降低對順鉑敏感性之影響。

圖 51 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明 MT1 mRNA 於對順鉑最敏感的細胞株 (Hey) 中大大升高。

圖 52 顯示北方墨點結果之圖表代表，說明 MPP10 mRNA 隨著對順鉑的敏感性增加而增加。

圖 53 為一圖表，代表於 OVCA 429 細胞中經 siRNA 介導的鈣活化酶 (Calpain)2 基因表現降低之影響。

圖 54 為一圖表，代表於 OVCA 429 細胞中鈣活化酶 (Calpain)2 siRNA #3 對順鉑敏感度之影響。

圖 55 為一圖表，代表於 OVCA 429 細胞中鈣活化酶 (Calpain)2 抑制劑 ALLN 對順鉑敏感度之影響。

圖 56 為一圖表，代表於 OVCA 429 細胞中經 siRNA 介導的 SA100A10 基因表現降低對順鉑敏感度之影響。

圖 57 為一圖表，代表於 OVCA 429 細胞中 siRNA 對 SA100A1 基因 mRNA 表現程度之影響。

圖 58 為一圖表，代表於正常及大腸癌細胞 cDNA 中 MetAp-2 mRNA 之表現量。

圖 59 為一圖表，代表於正常及大腸癌細胞 cDNA 中 SPARC mRNA 之表現量。

圖 60 為一圖表，代表於正常及大腸癌細胞 cDNA 中

S100A11 mRNA之表現量。

圖 61 為一圖表，代表於正常及大腸癌細胞 cDNA 中 S100A10 mRNA 之表現量。

圖 62 為一圖表，代表於正常及大腸癌細胞 cDNA 中鈣活化酶 (Calpain)-2 mRNA 之表現量。

圖 63 顯示腫瘤體積為兩隻裸鼠體重之函數，將其以 OVCAR-3 細胞注射 (15 百萬個/注射，得自美國典型培養物保藏中心 (American Type Culture Collection, Manassas, VA), 登錄號碼 HTB-161) 及 35 天後以 4 微克/公斤體重之順鉑用 IP 注射一週給予 3 次共 2 週，接著 1 週無治療或僅以鹽水溶液治療作為控制組。

圖 64 為一圖表，顯示於 OVCAR-3 細胞中針對鈣活化酶 (Calpain)-2 或 S100A11 之 siRNA 的穩定表現。於控制組行中，測量兩者 mRNA 之表現於完全無治療的細胞中，鈣活化酶 (Calpain)-2 及 S100A11 之 mRNA 表現於相關的 siRNA 行中大幅降低。

序列表

<110> 賓州研究基金會

<120> 預測並克服卵巢癌中化療抗性及預測大腸癌發生的方法

<130> 03-303-B

<140> 093141829

<141> 2004-12-31

<150> US 60/533,505

<151> 2003-12-31

<160> 144

<170> PatentIn version 3.3 版

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 1

aatcctgtcc aggtggaagt a 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 2

aagctccacc tggactacat c 21

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 3
 aatgacaagt acatcgccct g

21

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 4
 aaagatcagc attggaagat a

21

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 5
 aagcacatcg acaagttaga a

21

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 現代人

<400> 6
 aaacagtgcc gatttgaaa g

21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA

<213> 現代人

<400> 7

aaggcatacg ccaagatcaa c

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 8

aaacttcttc ctgacgaatc g

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 9

aaacgctatt caagatattt a

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 10

aaaggatggt tataactaca c

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 11

aagaaactgg acaccaacag t

21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 12

aatctgattg gtggcctagc t

21

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 分子信標探針

<220>

<221> Unsure

<222> (1)..(1)

<223> c連接至FAM

<220>

<221> Unsure

<222> (28)..(28)

<223> g連接至DABCYL

<400> 13

cgcgtatgaa ctgggcttat gtgacgcg

28

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	14	
ctgggctctg ccttaaacac		20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	15	
gctcccaaaa gtttgaacca		20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	16	
ttgcctgagg ctgtaactga		20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	PCR引子	

<400> 17

ccacttcctt gccacaaagt

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 18

gaattcgggc agctcagagt

20

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 分子信標探針

<220>

<221> Unsure

<222> (1)..(1)

<223> c連接至FAM

<220>

<221> Unsure

<222> (25)..(25)

<223> g連接至DABCYL

<400> 19

cgcctgggtg ggtttgaagg aggcg

25

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 20

atcgagtccc tgattgctgt

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 21

gcctgcatga ggtggtagt

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 22

cttgccatga ctccttctc

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 23

gcagaagcac atcgacaagt

20

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 24

gcctgcattt aatccattct c

21

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 25

taaccacgtc ctgctgaagt

20

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 26

gctttaagaa agttcttatac aac

23

<210> 27

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 27

gcacagcgga gtggtaaga

19

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 28

cagaggagtc agacacattg

20

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400>	29		
gtataacttac ttcagtgctg tt			22
<210>	30		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	人 造		
<220>			
<223>	PCR引 子		
<400>	30		
cattcttgct ataacgttta aca			23
<210>	31		
<211>	19		
<212>	DNA		
<213>	人 造		
<220>			
<223>	PCR引 子		
<400>	31		
ctctgtgact tcggcatca			19
<210>	32		
<211>	19		
<212>	DNA		
<213>	人 造		
<220>			
<223>	PCR引 子		
<400>	32		
cagacatcag agcggacat			19

<210> 33
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人 造

<220>
 <223> PCR引 子

<400> 33
 aagaactggg ttcagtggaa a

21

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人 造

<220>
 <223> PCR引 子

<400> 34
 gagagtgcac ggtcttgagt

20

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人 造

<220>
 <223> PCR引 子

<400> 35
 agccaccagc taagtacctt

20

<210> 36
 <211> 21

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 36

catcgatttc aaccggaaca a

21

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 37

gtgtgtggac ctccatgtta

20

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 38

agcacacccat tacagacaag t

21

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 39

ggaaccagtt tctgcaggaa

20

<210> 40

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 40

ctccagcagc acctcaatg

19

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 41

atccaagggtt atgtggtttc tt

22

<210> 42

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 42
cacctcctgg gcttctgaa 19

<210> 43
<211> 22
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 43
gatccatgaa gctaattgtac aa 22

<210> 44
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 44
acgggcagaa gccttcgtt 19

<210> 45
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 45
cctgagggttc tccgagatg 19

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> 人 造

<220>

<223> PCR 引 子

<400> 46

tccagcccga aattctctgt

20

<210> 47

<211> 19

<212> DNA

<213> 人 造

<220>

<223> PCR 引 子

<400> 47

caagaggcgg aagggtaaa

19

<210> 48

<211> 17

<212> DNA

<213> 人 造

<220>

<223> PCR 引 子

<400> 48

cagccgctcg ggtaggt

17

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 49

cactatggaa ggaccttgct

20

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 50

ggatacaggt gtaggtaaatt c

21

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 51

tcccagatta ggaatttatg ta

22

<210> 52

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 52

cttctggaac aggcgaaga

19

<210> 53

<211> 18

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 53

gctggcccag acgacgaa

18

<210> 54

<211> 19

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 54

gcagacacac gtggatggt

19

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 55
gatgaagtta aatcctcctt tg 22

<210> 56
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 56
cctcttctgt gctgtcactt 20

<210> 57
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 57
cctgcaagaa gagctgctg 19

<210> 58
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR引子

<400> 58
cacagctgtc ctggcatca 19

<210>	59	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	59	
aaatggaaca cgccatggaa a		21
<210>	60	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	60	
aaattcgctg gggataaagg c		21
<210>	61	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	61	
aataatgaag gacctggacc a		21
<210>	62	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	PCR引子	
<400>	62	
gctcccaaaa gtttgaacca		20

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR引子

<400> 63

gcctgcatga ggtggtagt

20

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 64

aaatgggacg aggagcttat g

21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 65

aagcgcatca cgacaaggat a

21

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 66

aacaggattg actactatag c

21

<210> 67

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 67

aatacagggt cactcaagta g

21

<210> 68

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 68

aaatatctta atgtgtctcg c

21

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 69

aagtgtgagc tgcgccacaa g

21

<210> 70

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 70

aagagccccc ttaccacta c

21

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213>	現代人		
<400>	71		
aacaggaaga atcccctctg g		21	
<210>	72		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	現代人		
<400>	72		
aaacgtgtga tacaggaagg c		21	
<210>	73		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	現代人		
<400>	73		
aacaagtacg acgacaacgt c		21	
<210>	74		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	現代人		
<400>	74		
aacgtcaagg cctacttcaa g		21	
<210>	75		
<211>	24		
<212>	DNA		
<213>	現代人		

<220>		
<221>	misc_feature	
<222>	(3)..(3)	
<223>	n is a, c, g, or t	
<400>	75	
	sdnaatattc atacggcatg gact	24
<210>	76	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	76	
	aacctaaaat agaagacccc t	21
<210>	77	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	77	
	aaaagatgct gactcagaaa a	21
<210>	78	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	78	
	aacctaaaat agaagacccc t	21
<210>	79	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213> 現代人

<400> 79

aagacccta tgcaattagc t

21

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 80

aaaaagcctg aagaacagca c

21

<210> 81

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 81

aaatgggatt taatgcattc a

21

<210> 82

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 82

aacttcatga ctgtgatca a

21

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 83

aacatcatga gttgcgtcaa g

21

<210> 84

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 84

aagcagcagg tccttaagaa c

21

<210> 85

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 85

aatctcatca acaagtactt t

21

<210> 86

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 86

aattcagaac gtcagcacct g

21

<210> 87

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 87

aagaggagaa ctgacccaga a

21

<210> 88

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 88

aaatgagcga ttggatggtg g

21

<210> 89

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 89

aagatcatca agggctccag t

21

<210> 90

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 90

aatgtggttc gaataattac a

21

<210> 91

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 91

aaactcgaga tgactttgtg c

21

<210> 92

<211> 21

<212> DNA

<213>	現代人		
<400>	92		
aatcaacagc tgcagaggtt c		21	
<210>	93		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	現代人		
<400>	93		
aaggatggaa ctatcttatg c		21	
<210>	94		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	現代人		
<400>	94		
aatttcgacg atgccaccat g		21	
<210>	95		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	現代人		
<400>	95		
aaccgacaag tgtgacaact c		21	
<210>	96		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	現代人		
<400>	96		

aaagaaatgt gtggtcattg a 21

<210> 97

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 97

aaatcgatgg aactatacat c 21

<210> 98

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 98

aactatacat caggtgtatg t 21

<210> 99

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 99

aatggtttca cccatcagag c 21

<210> 100

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 100

aagggctcag ctacattcaa c 21

<210> 101

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 101

aatacaacgt ccagcaacag t

21

<210> 102

<211> 22

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 102

aactccatgt ttcataaacc gg

22

<210> 103

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 103

aacgtgtatg gcttcgacat g

21

<210> 104

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 104

aagttccaga aatctgaaat a

21

<210> 105

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 105

aagaaaatcc agaacatgta g

21

<210> 106

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 106

aaaacagtag cttcggagaa g

21

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 107

aaggtaaaaa ggggtcacta t

21

<210> 108

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 108

aaaggggtca ctatggagtt c

21

<210> 109

<211> 22

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 109

agcaccagca ctggctcatc aa

22

<210> 110

<211> 19

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 110

agagccagaa gagctgcta

19

<210> 111

<211> 20

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 111

aaccgacaag tgtgacaact

20

<210> 112

<211> 18

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 112

tgtgccttgc gggcagta

18

<210> 113

<211> 20

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 113

caccaccacc accaaatgaa

20

I301066

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 114

catccattcg acgcctttga

20

<210> 115

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 115

ccagcagcac agtcaacaa a

21

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 116

tggtagcttc tgcttcacaa

20

<210> 117

<211> 19

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 117

ccagagctgc actcattcc

19

<210> 118

<211> 22

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 118

cactgttggt gataaagcaa tt

22

<210> 119

<211> 22

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 119

ggataaaggc tacttaacaa ag

22

<210> 120

<211> 20

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 120

ccactttgcc atctctacac

20

<210> 121

<211> 19

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 121

gagccgagga ggttgaa g

19

<210> 122

<211> 20

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 122

ctcctctggg tctatagtgt

20

<210> 123

<211> 18

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 123

gaccctgggtg gcggtgaa

18

<210> 124

<211> 19

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 124

ggtgcctgca gcatcttca

19

<210> 125

<211> 18

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 125

ggagagccct ggcacgta

18

<210> 126

<211> 20

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 126

ccttcacctg caggttcttg

20

I301066

<210> 127

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 127

acgacggaca cattaattac t

21

<210> 128

<211> 19

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 128

tccatgctgc agctgatga

19

<210> 129

<211> 19

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 129

ccttcggcaa agggagag

19

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 130

ctggatgagt tcagagagtt t

21

<210> 131

<211> 18

<212> DNA

<213>	現代人	
<400>	131	
gcctcgacag	gcagagat	18
<210>	132	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	132	
cttgtagctg	aagatgtcaa t	21
<210>	133	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	133	
ctctatgcc	gggacaagt	19
<210>	134	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	134	
aagacatgtc	gaagccatac a	21
<210>	135	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	現代人	
<400>	135	
aatgtcatcc	acgccagcga c	21

<210> 136

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 136

aatggaaagt gcgtcatcct a

21

<210> 137

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 137

aagttcaciaa ttggcgacca c

21

<210> 138

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 138

aagtgcattca gcatcgacaa c

21

<210> 139

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 139

aagagttacc tagaagcacc t

21

<210> 140

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 140

aaaaaaccga atcttcaggt c

21

<210> 141

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 141

aaactctctg aactcatcca g

21

<210> 142

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 142

aactggatcc aaaaaaccaa t

21

<210> 143

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 143

aatgaccgtt acattgtcaa t

21

<210> 144

<211> 21

<212> DNA

<213> 現代人

<400> 144

aaaatatggg aacctacaat a

21

五、中文發明摘要：

本發明提供預測卵巢癌患者之腫瘤是否對化療具抗性的方法。本發明也提供監測對於治療卵巢癌病患之治療有效性，特別是化療處理的方法。本發明更提供藉由降低於該細胞中的化療藥物抗性以治療卵巢癌的方法。此外，本發明提供篩選化合物以鑑定腫瘤細胞生長抑制劑於對習見化療處理法有抗性的腫瘤細胞中的方法。

六、英文發明摘要：

十一、圖式：

公告本

756595 mRNA 於上皮卵巢癌細胞株中之表現

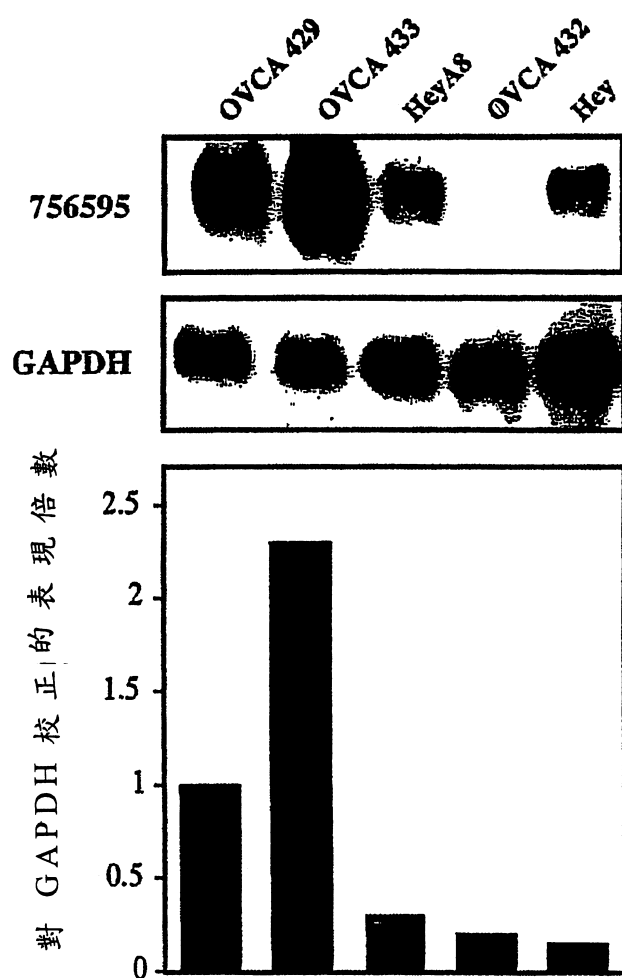


圖 1

810612 mRNA 於上皮卵巢癌細胞株中之表現

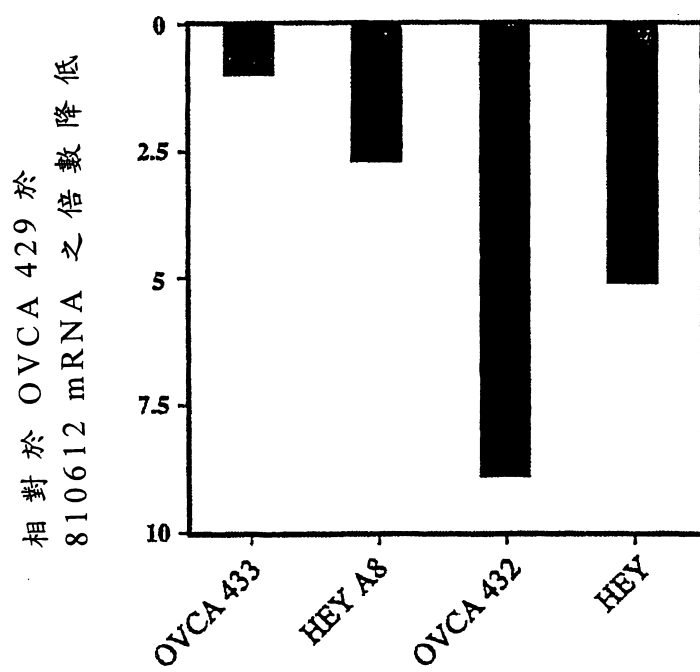


圖 2

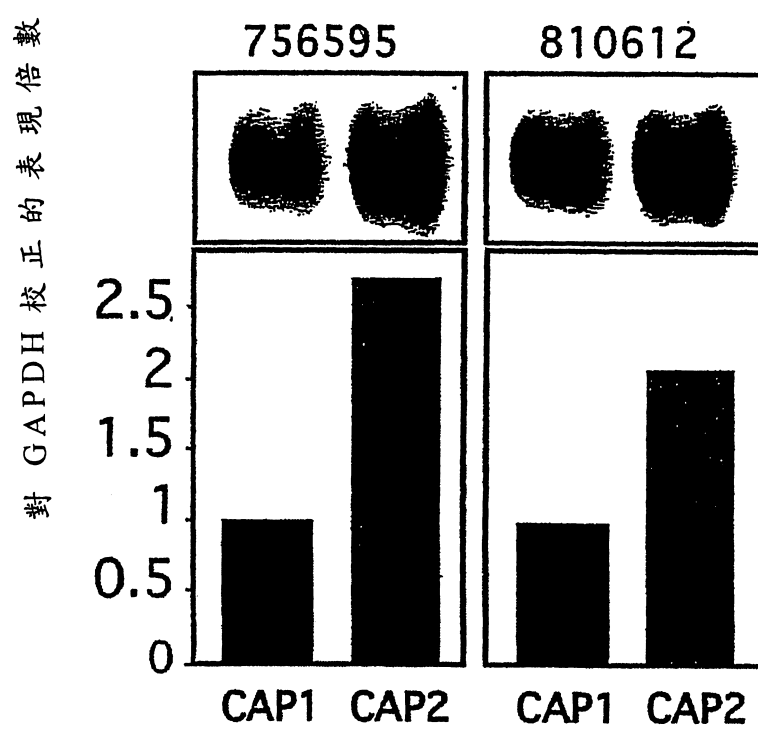
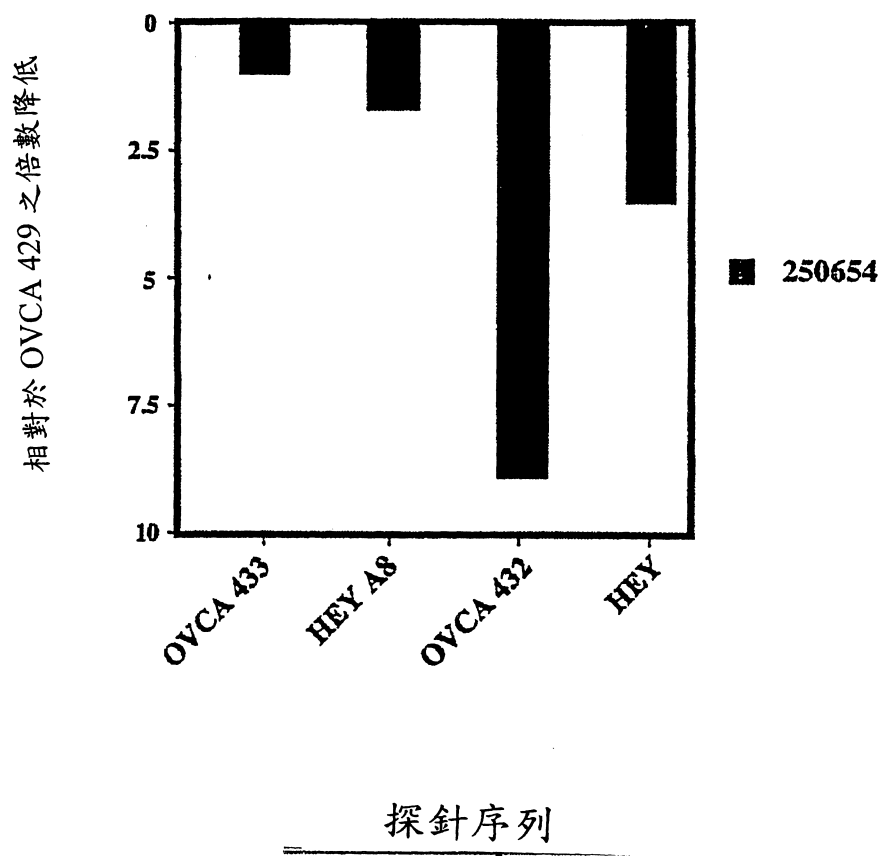


圖 3

藉定量即時 PCR 確認 250654 於
上皮卵巢癌細胞株之表現



FAM-CGCGTATGAACTGGGCTTATGTGACGCG-DABCYL

圖 4

隨時間 250654 表現於無反應的
上皮卵巢癌病患

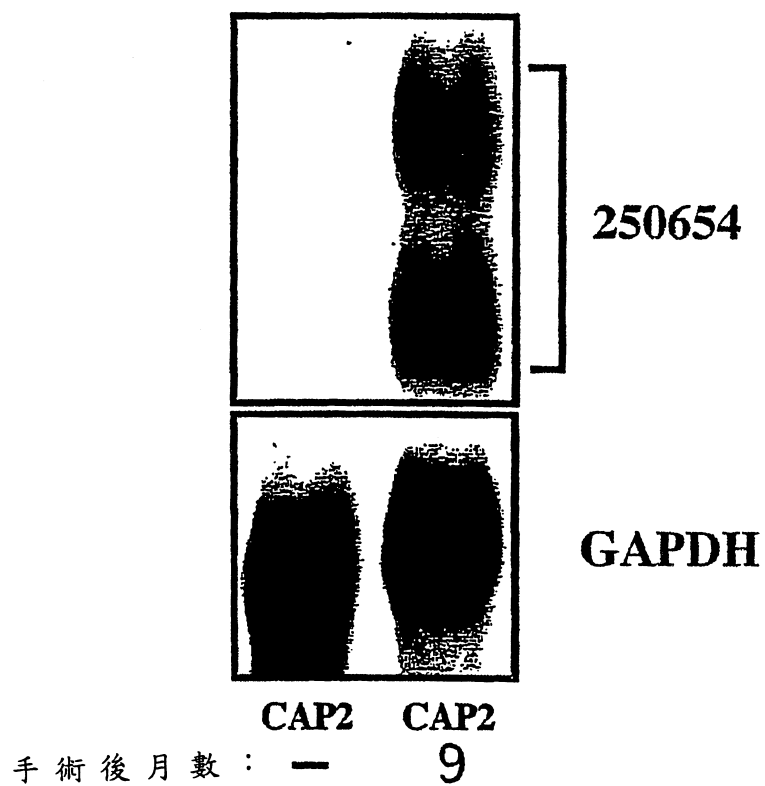
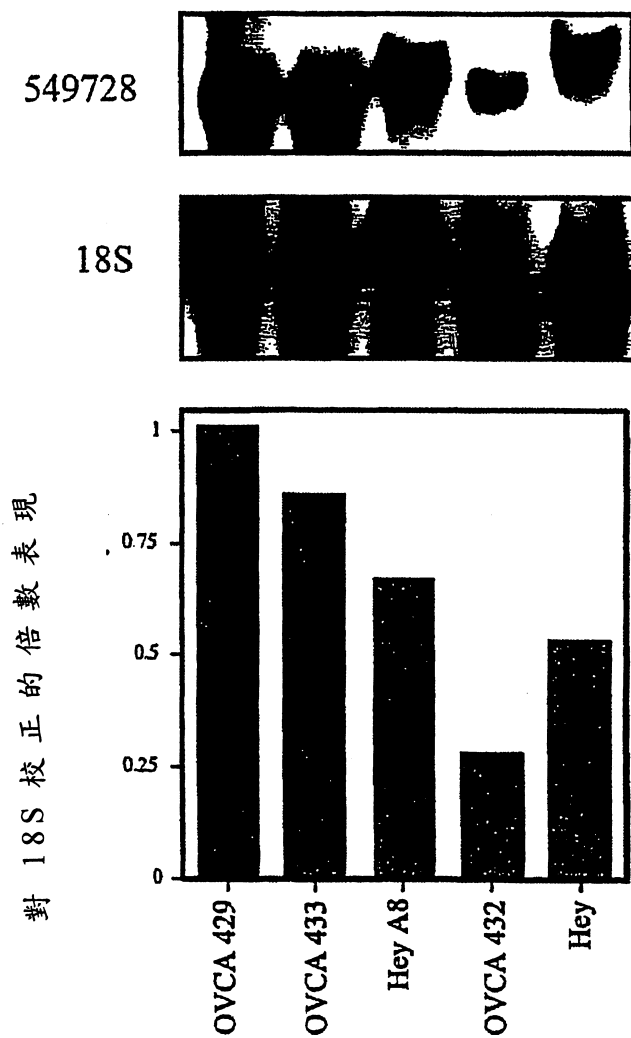


圖 5

549728 之北方墨點分析



*點顯示二重複之平均



對順鉑抗性

圖 6

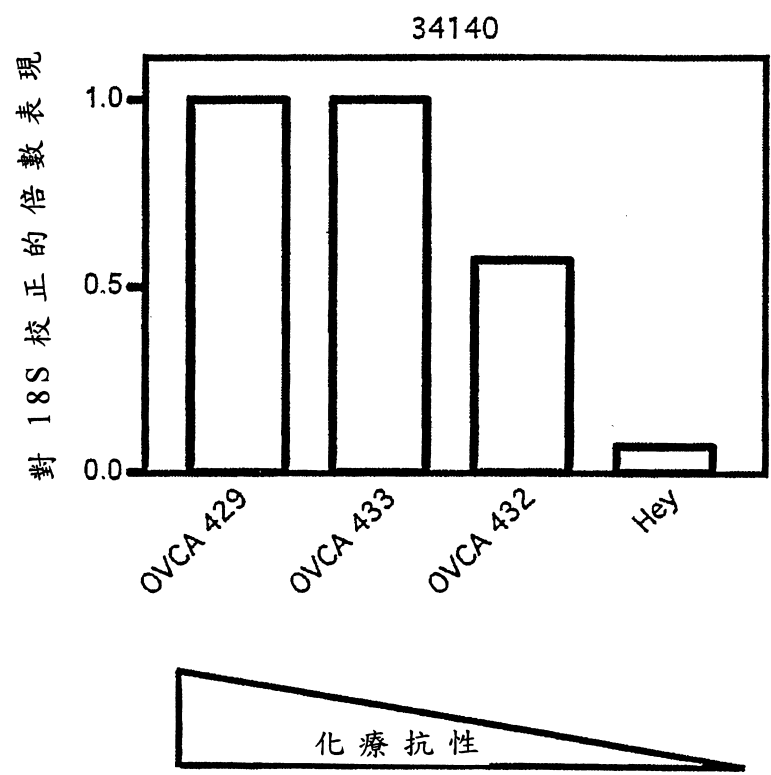


圖 7

由上皮卵巢癌細胞株之總蛋白萃取中之
39093 蛋白質表現

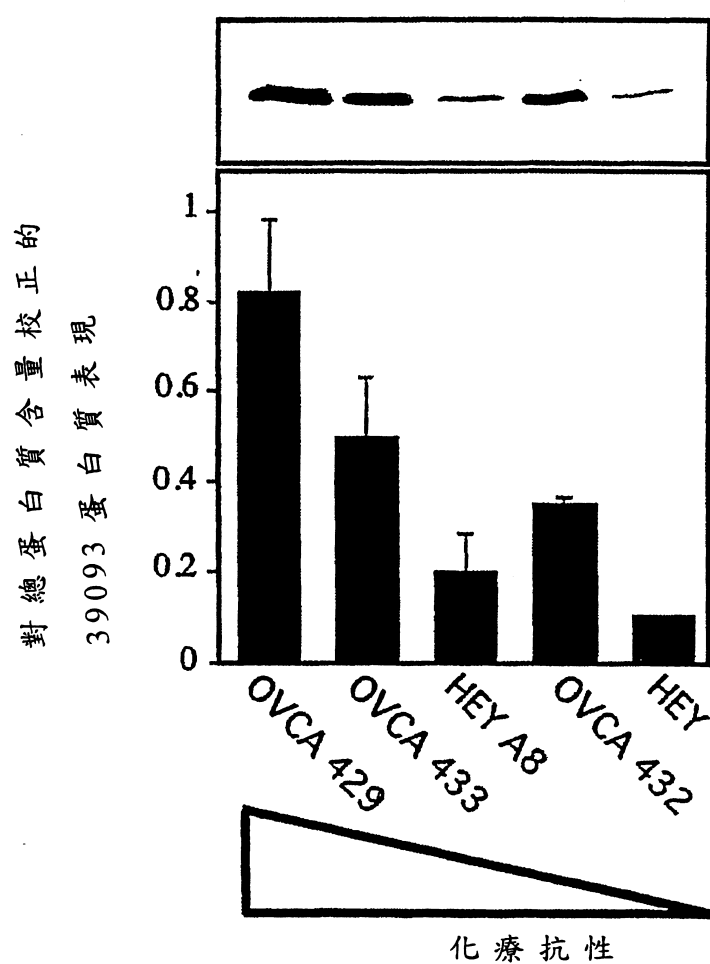


圖 8

於具有上皮卵巢癌病患中之
39093 mRNA 表現

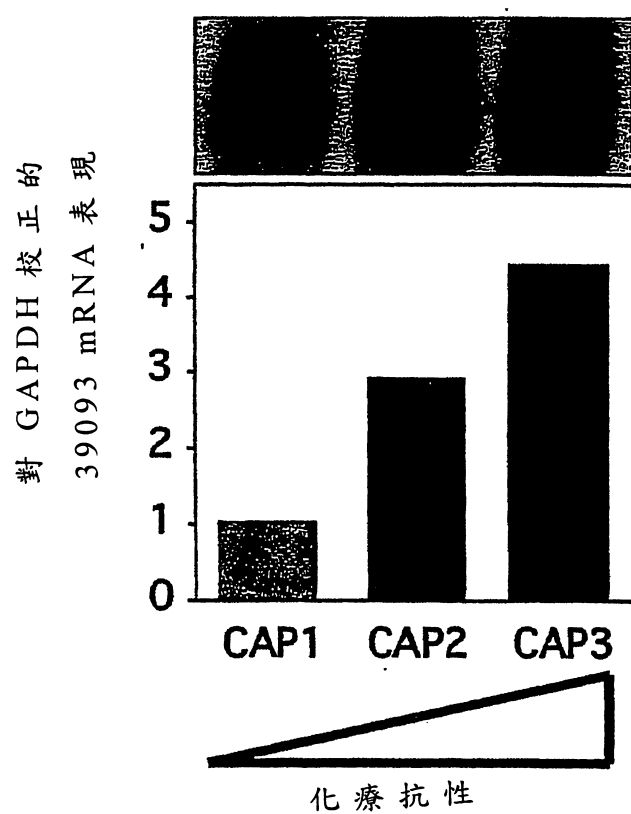


圖 9

於具有上皮卵巢癌病患中之

884867 mRNA 表現

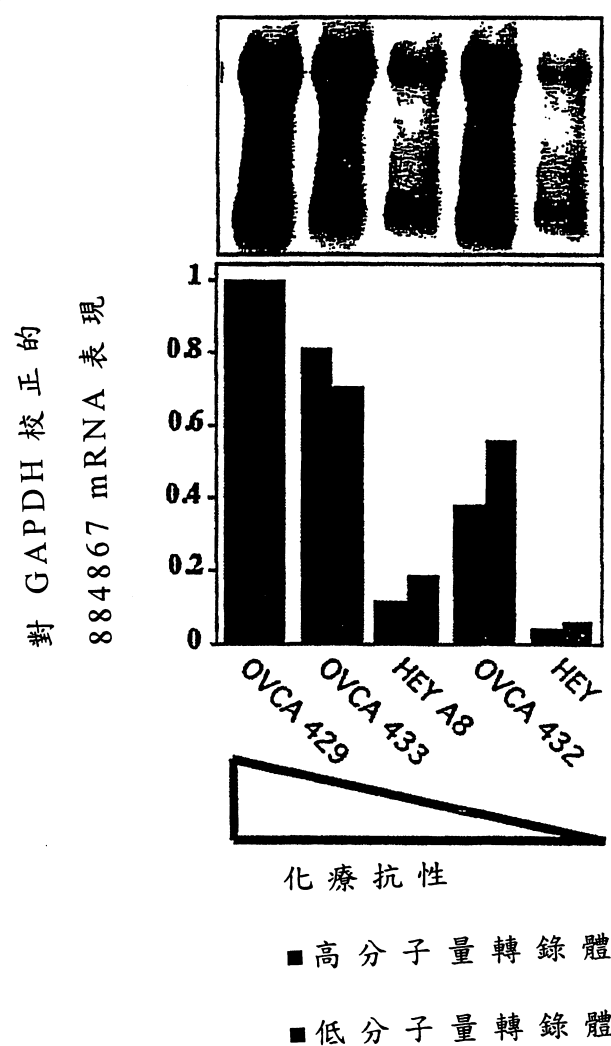


圖 10

於具有上皮卵巢癌病患中隨時間之
884867 mRNA 表現

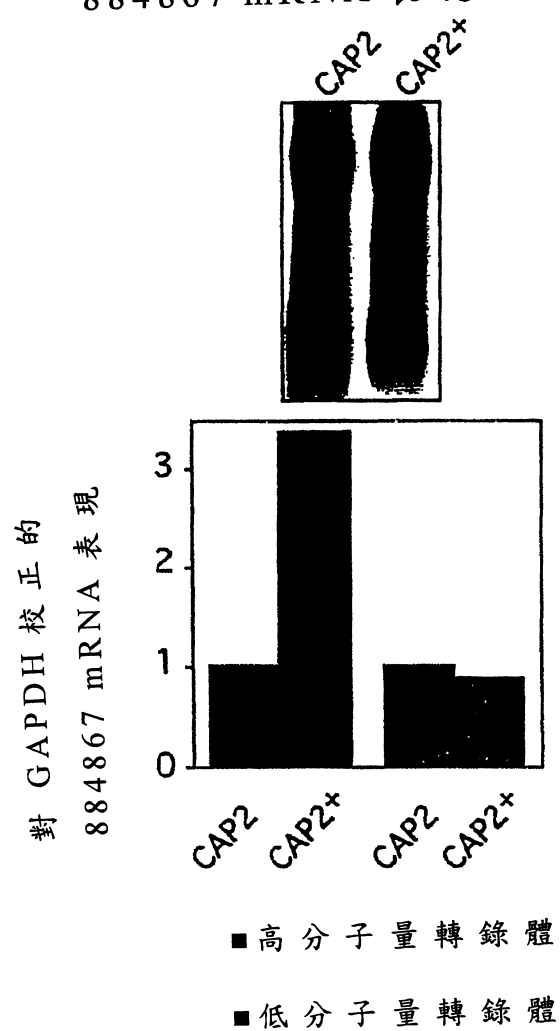
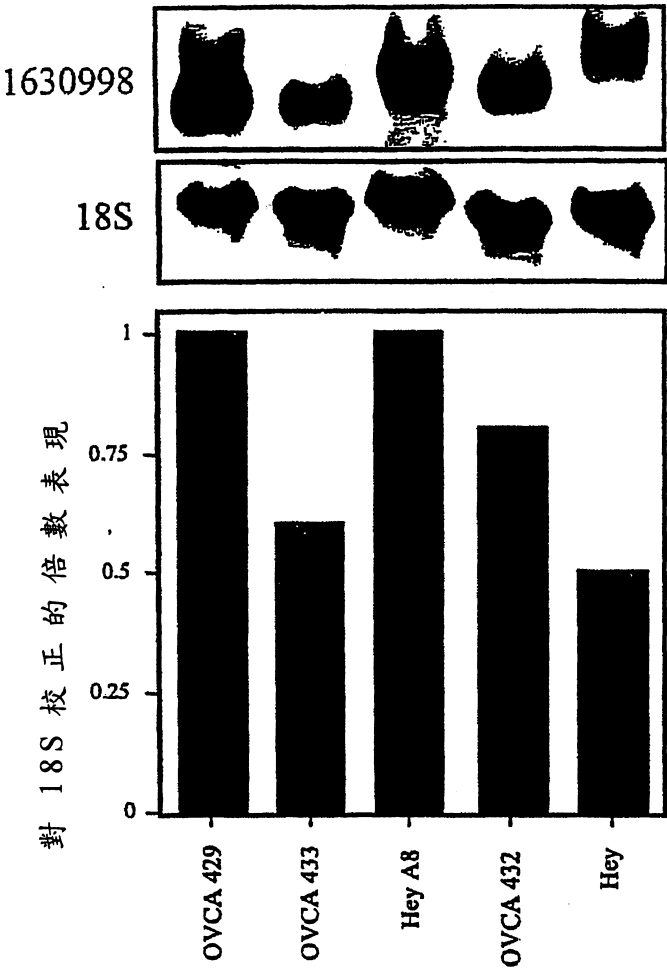


圖 11

1630998 之 北 方 墨 點 分 析



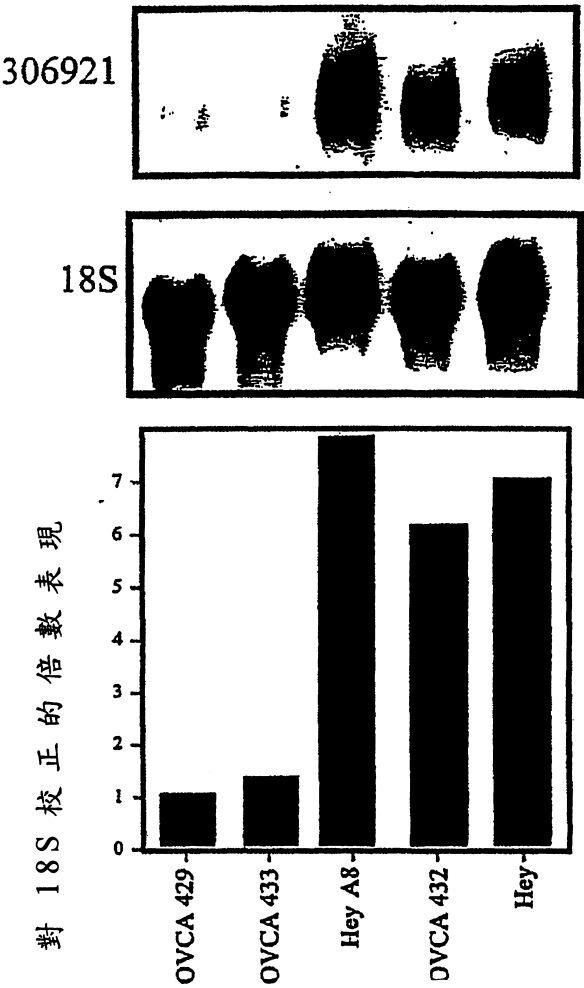
*顯示的點為二重複之平均



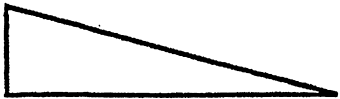
對 順 鉑 抗 性

圖 12

306921 之 北 方 墨 點 分 析



*顯示的點為二重複之平均



對 順 鉑 抗 性

圖 13

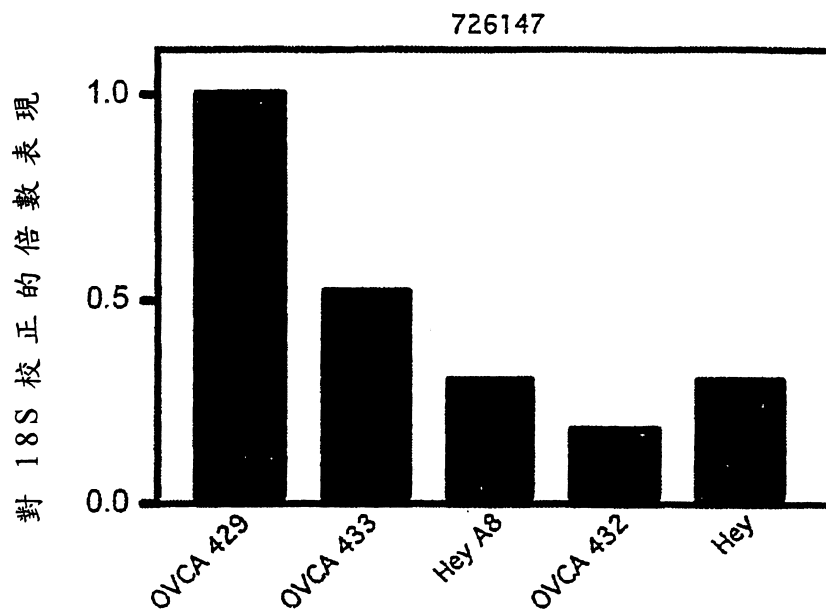


圖 14

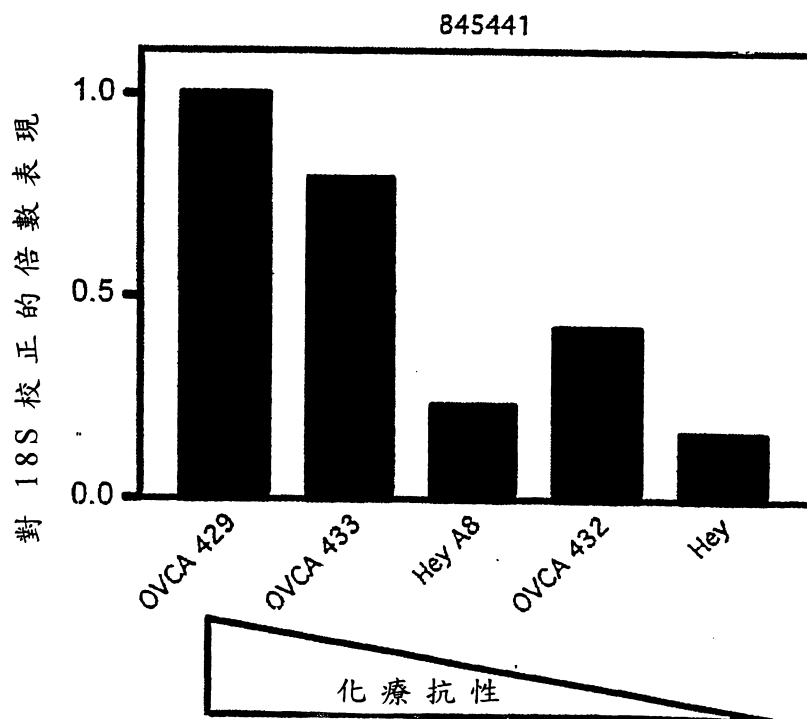


圖 15

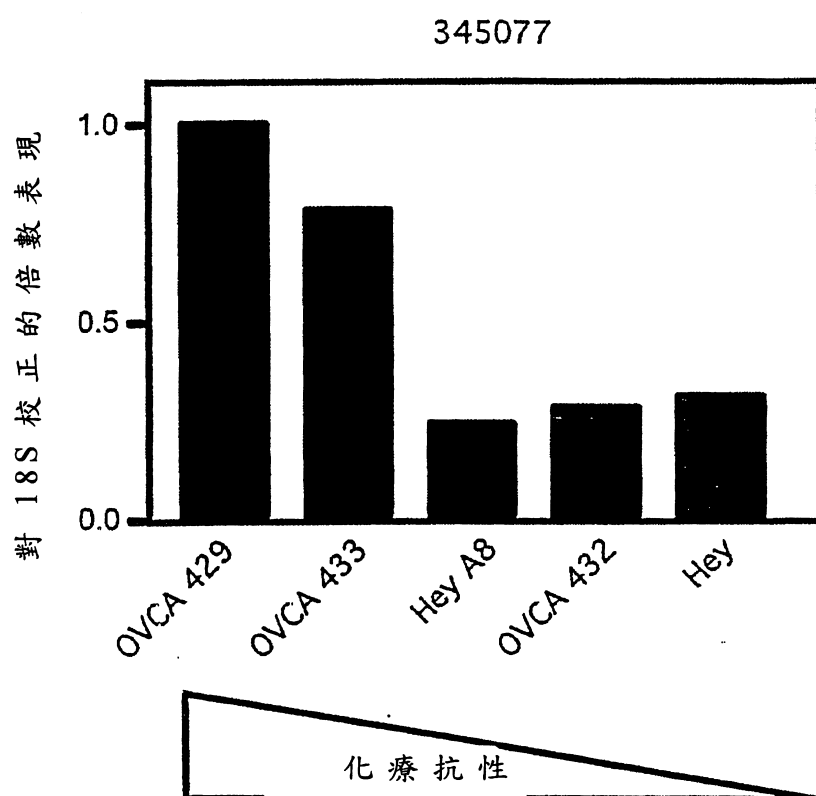


圖 16

於上皮卵巢癌細胞株中之
809784 mRNA 表現

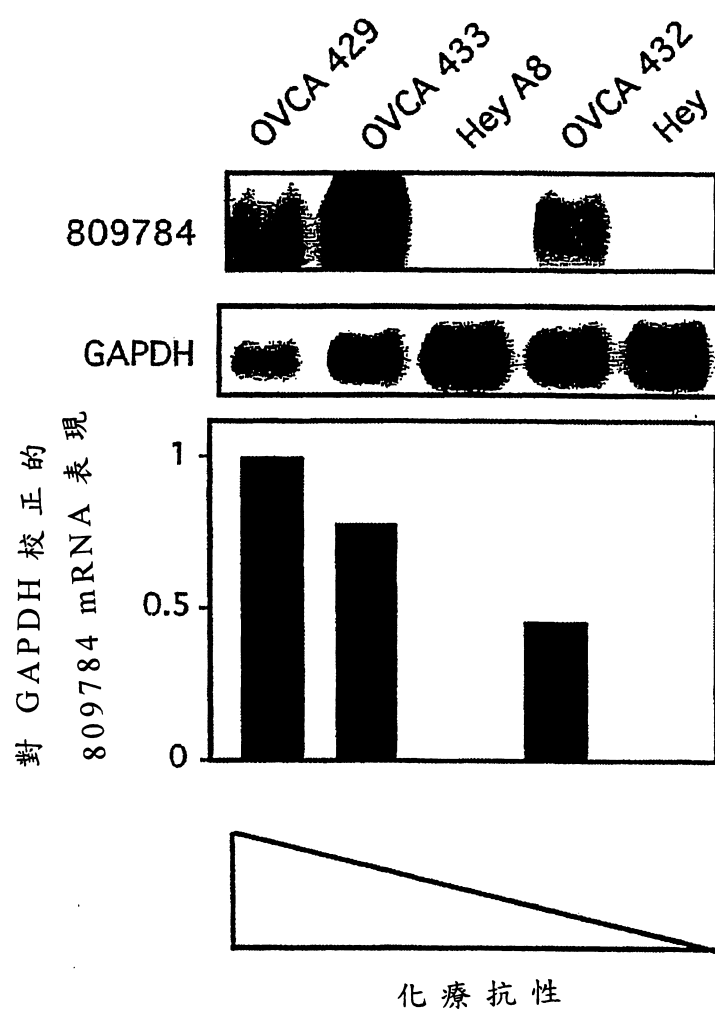


圖 17

246120 之 北 方 墨 點 分 析

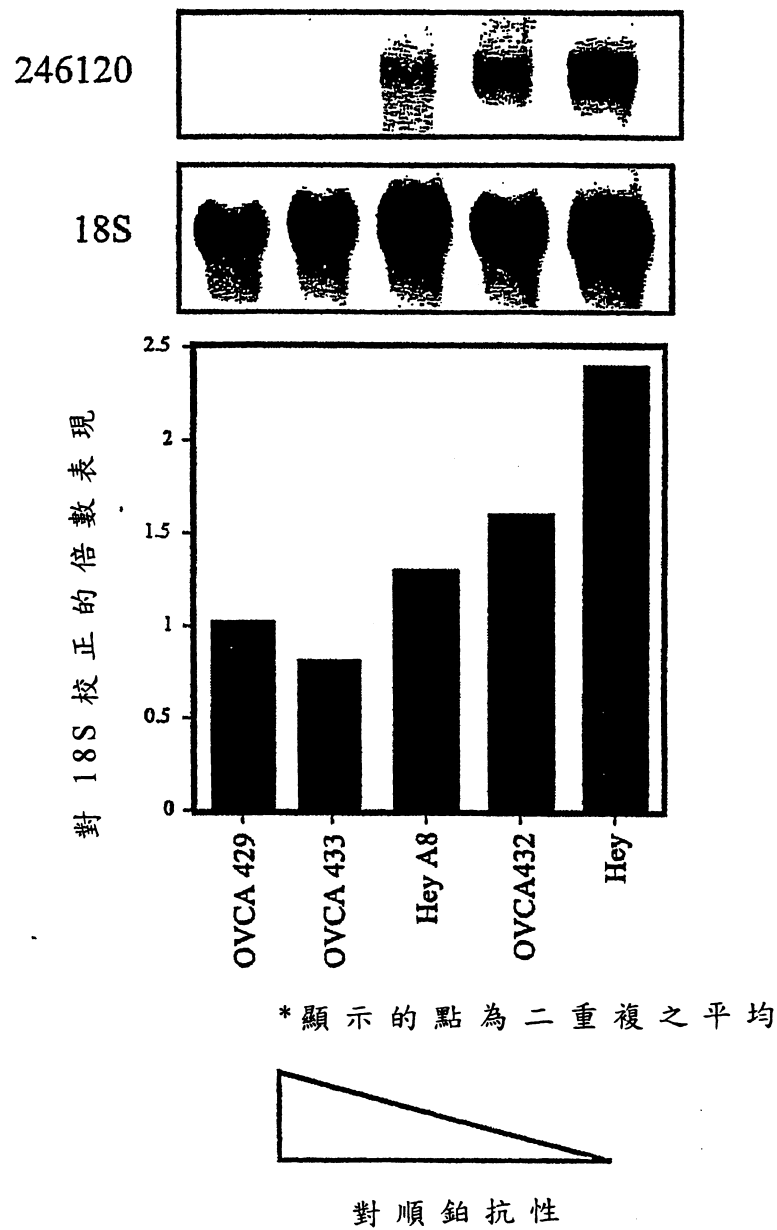
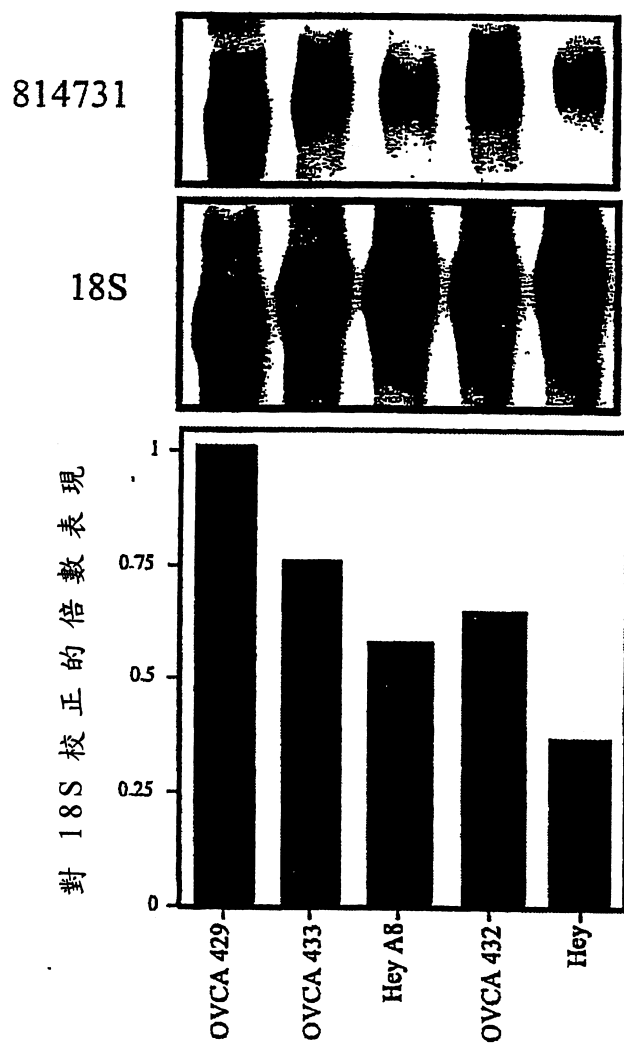


圖 18

814731 之北方墨點分析



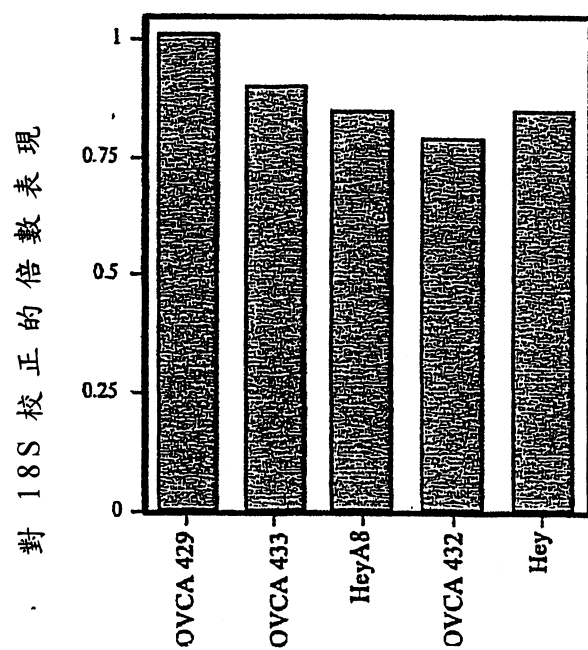
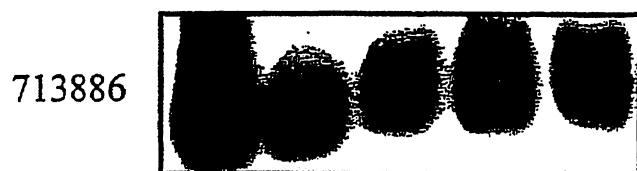
*顯示的點為二重複之平均



對順鉑抗性

圖 19

713886 之北方墨點分析



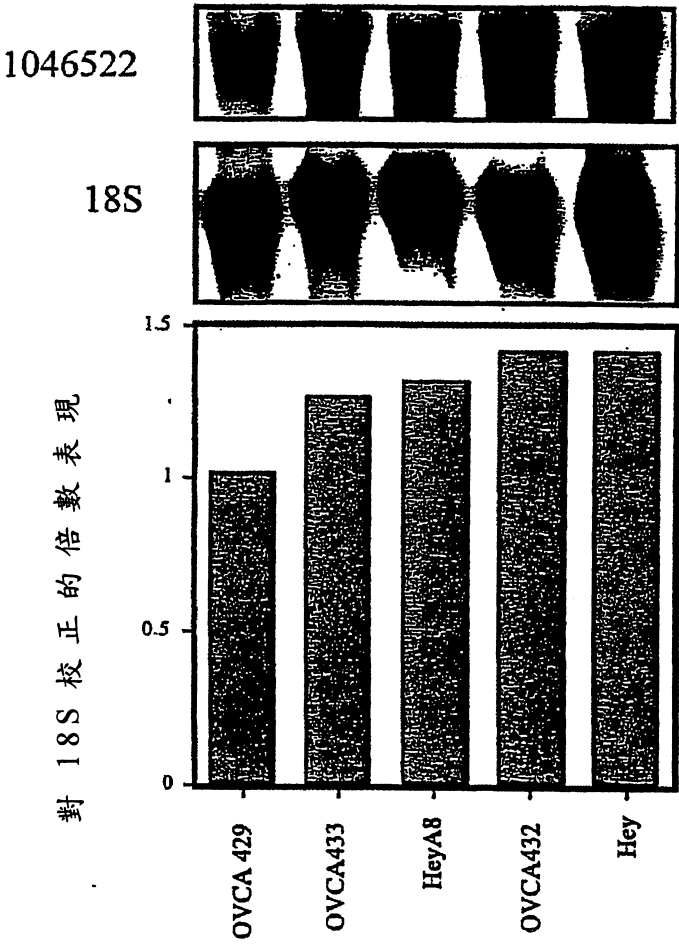
*顯示的點為二重複之平均



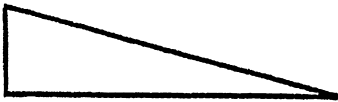
對順鉑抗性

圖 20

1046522 之 北 方 墨 點 分 析



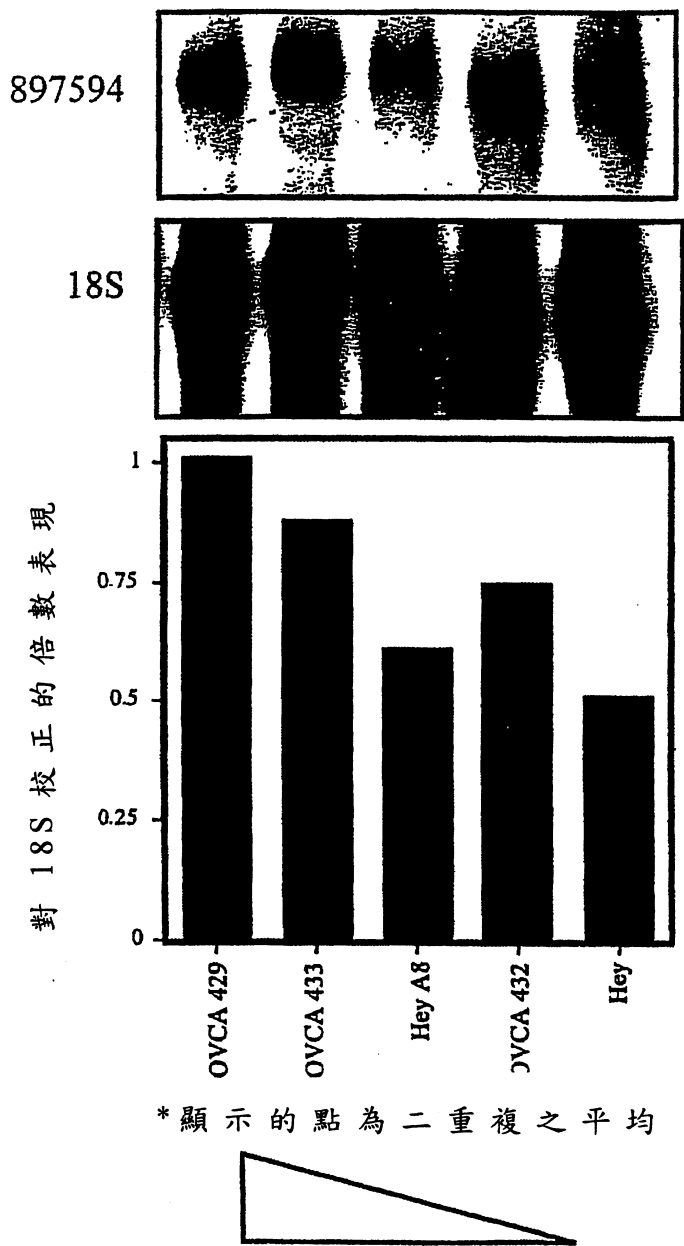
* 顯 示 的 點 為 二 重 複 之 平 均



對 順 鉑 抗 性

圖 21

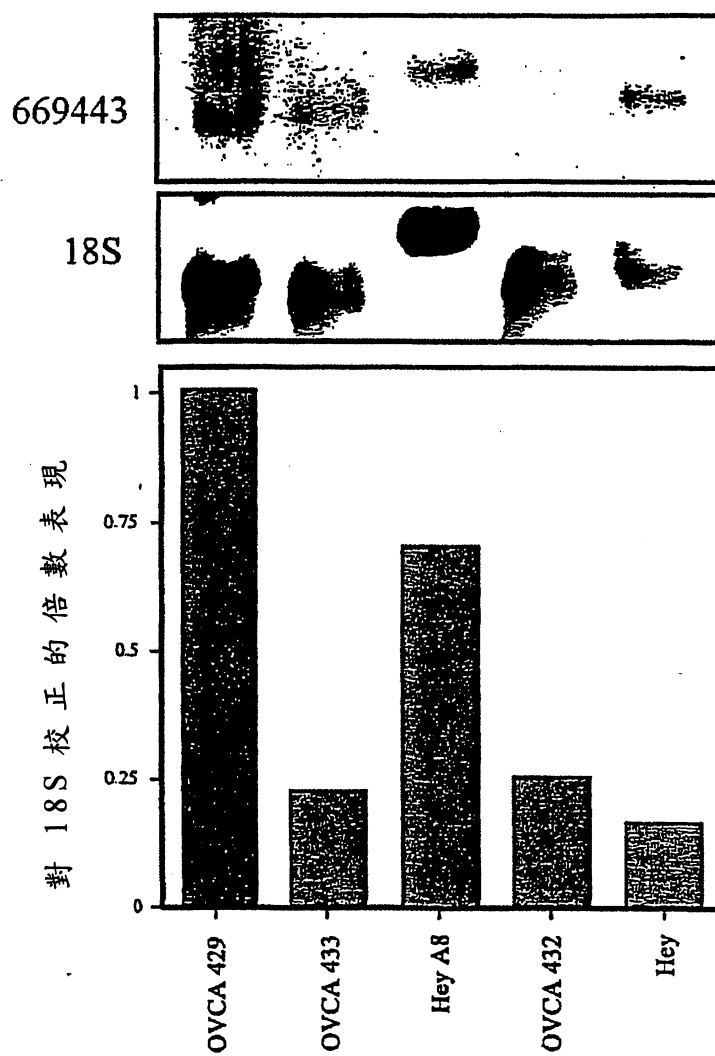
897594 之 北 方 墨 點 分 析



對 順 鉑 抗 性

圖 22

669443 之北方墨點分析



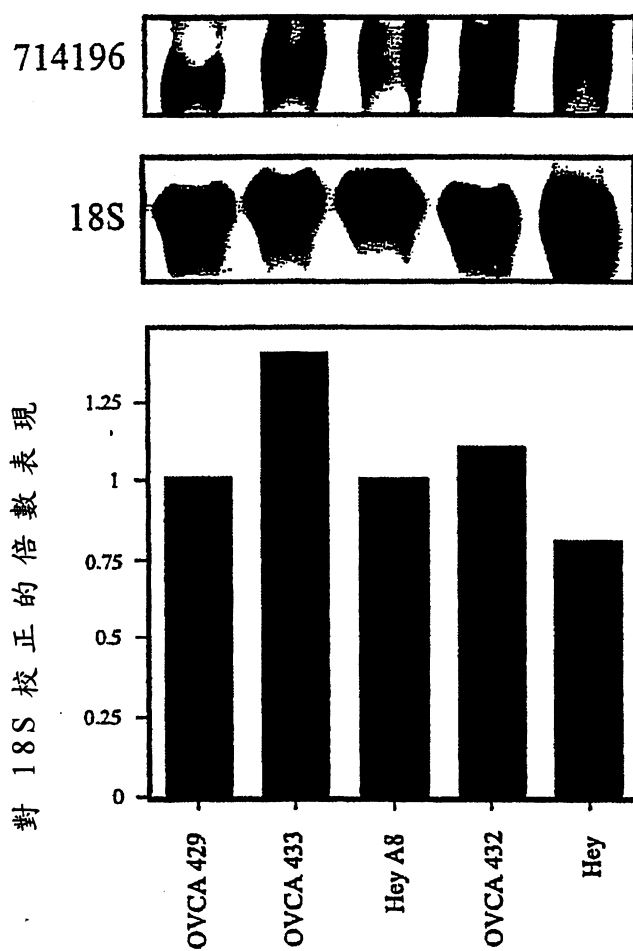
*顯示的點為二重複之平均



對順鉑抗性

圖 23

714196 之北方墨點分析



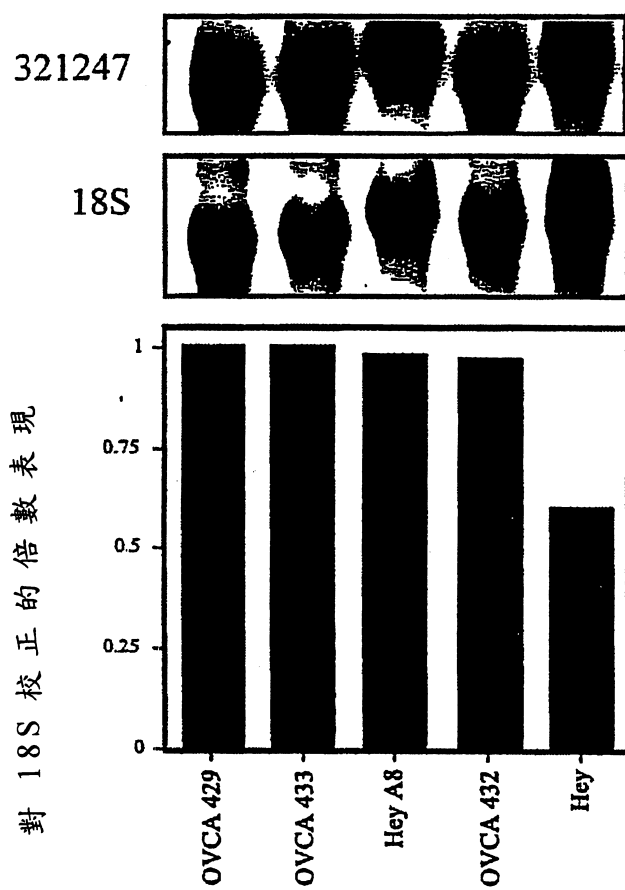
*顯示的點為二重複之平均



對順鉑抗性

圖 24

321247 之北方墨點分析



*顯示的點為二重複之平均



對順鉑抗性

圖 25

203003 之北方墨點分析

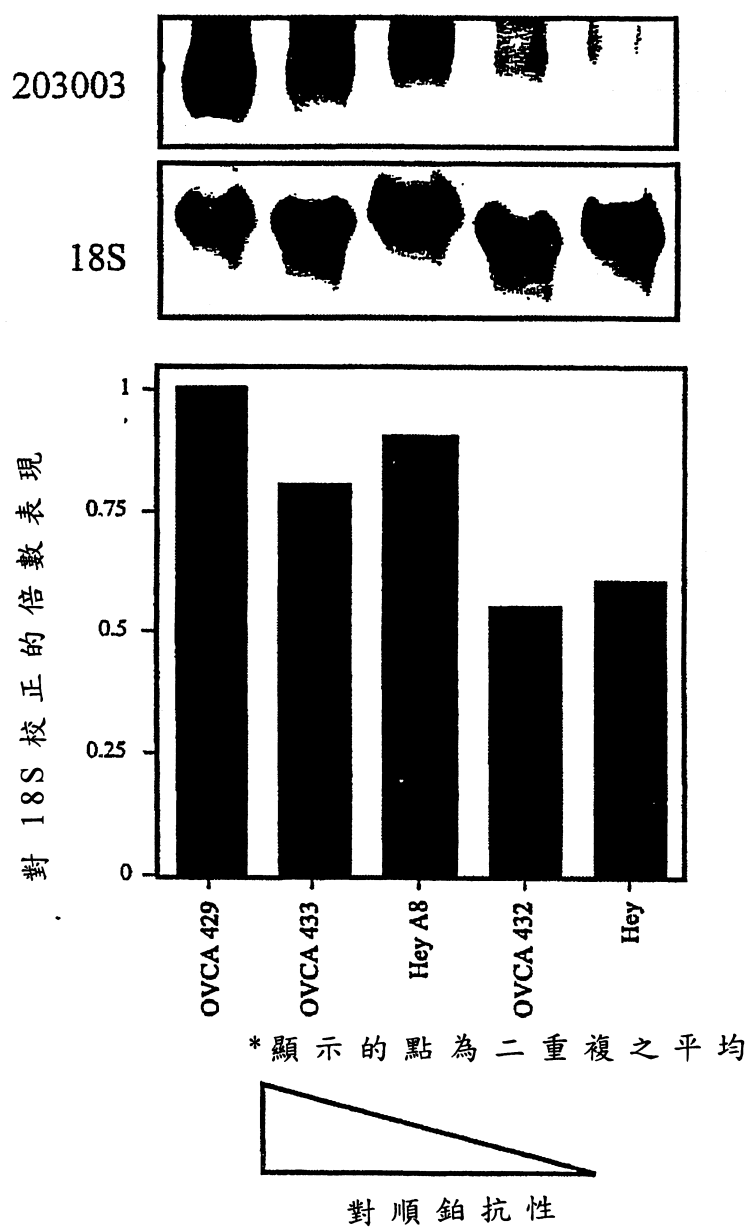


圖 26

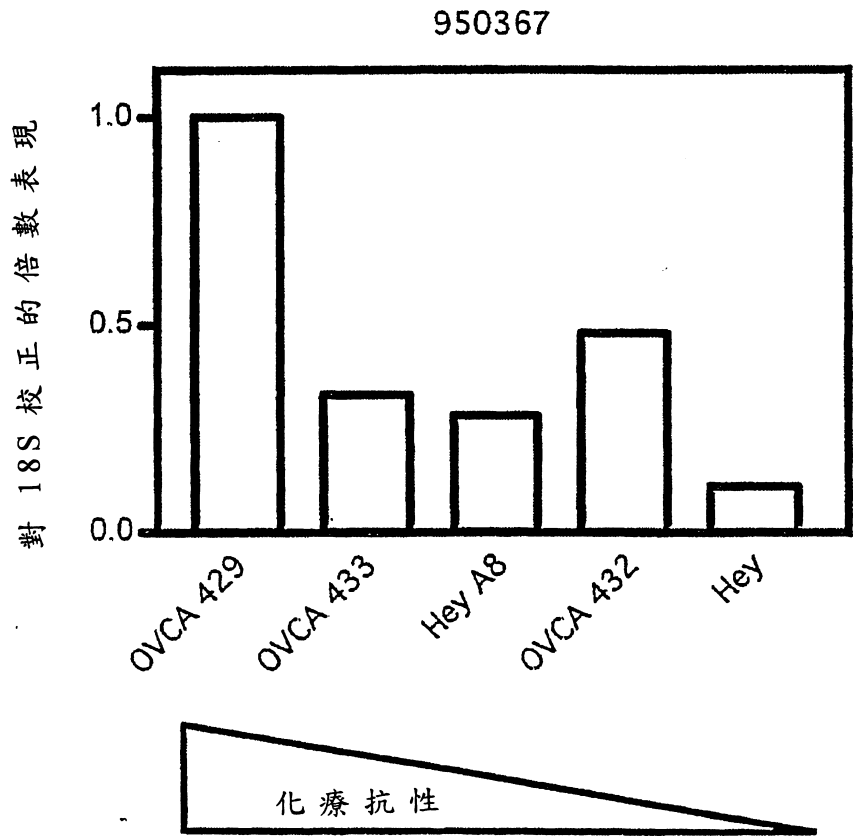


圖 27

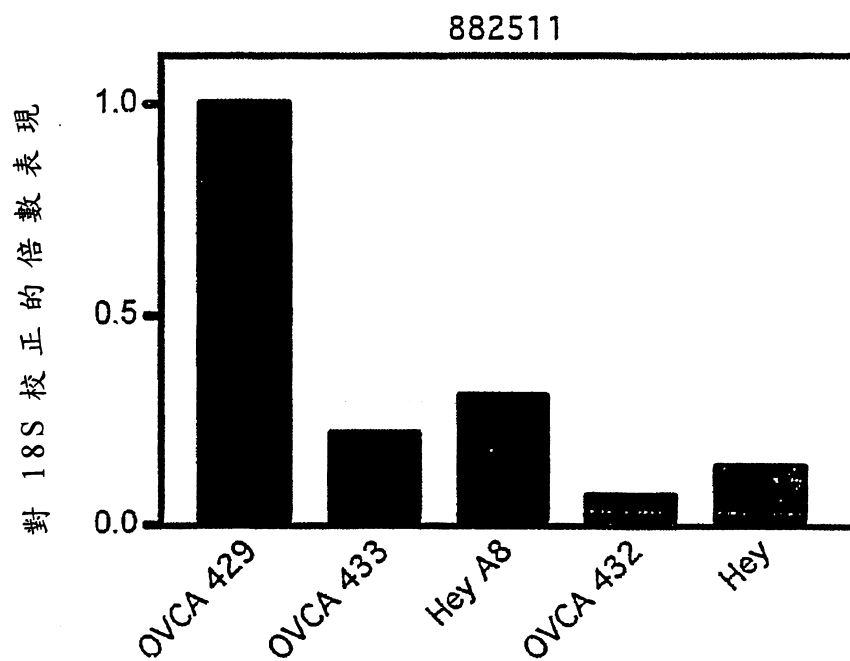


圖 28

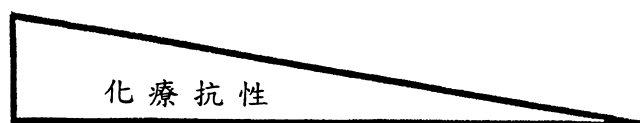
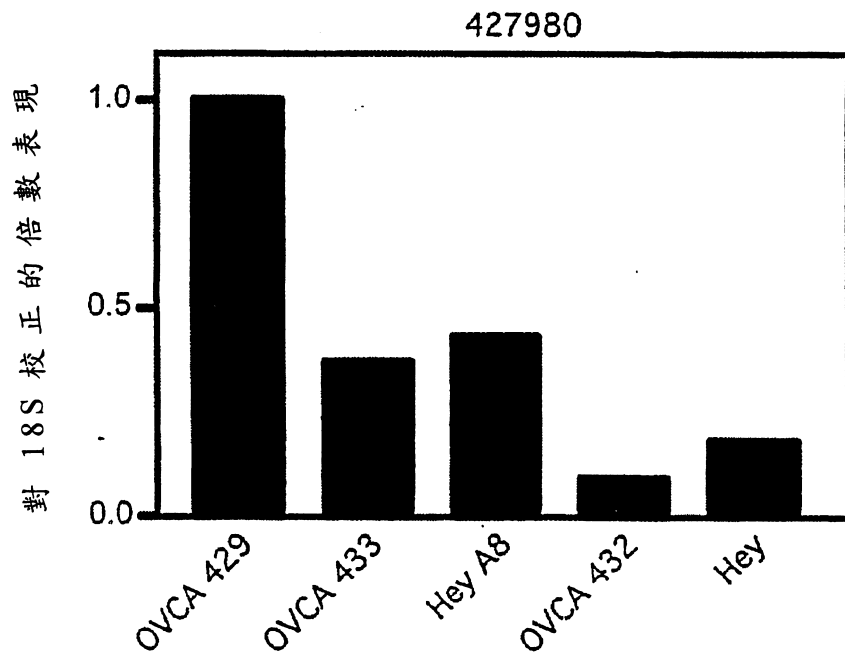


圖 29

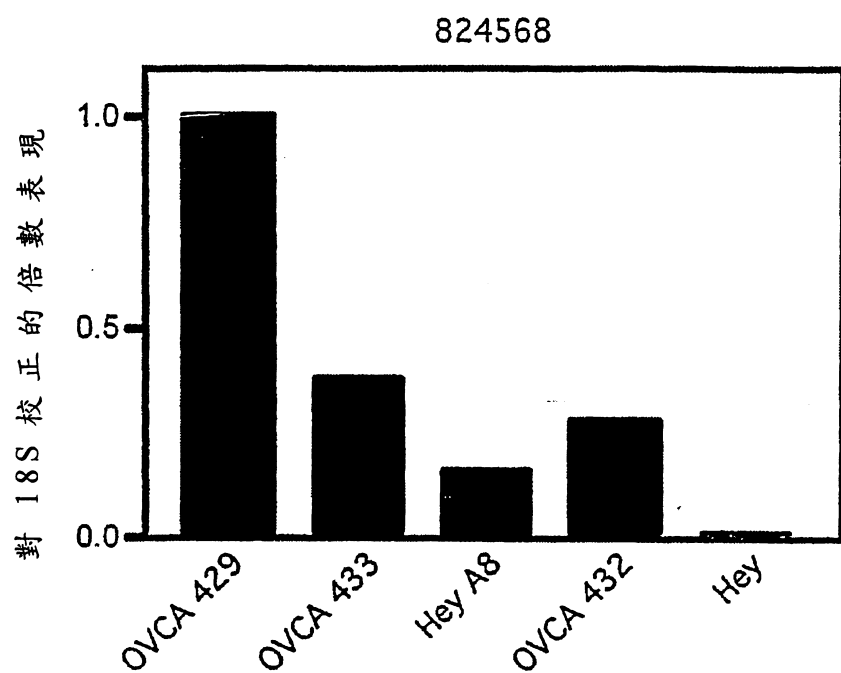


圖 30

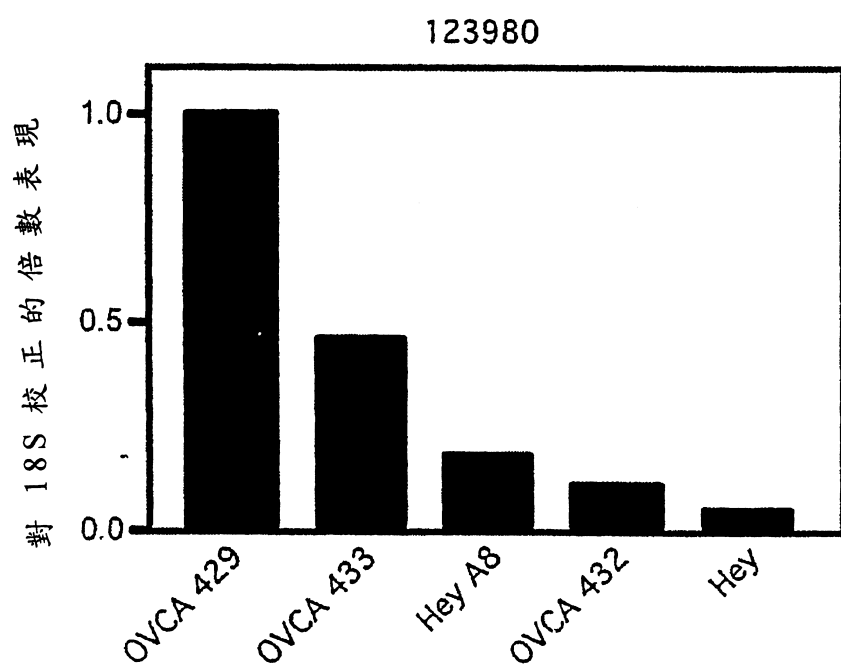


圖 31

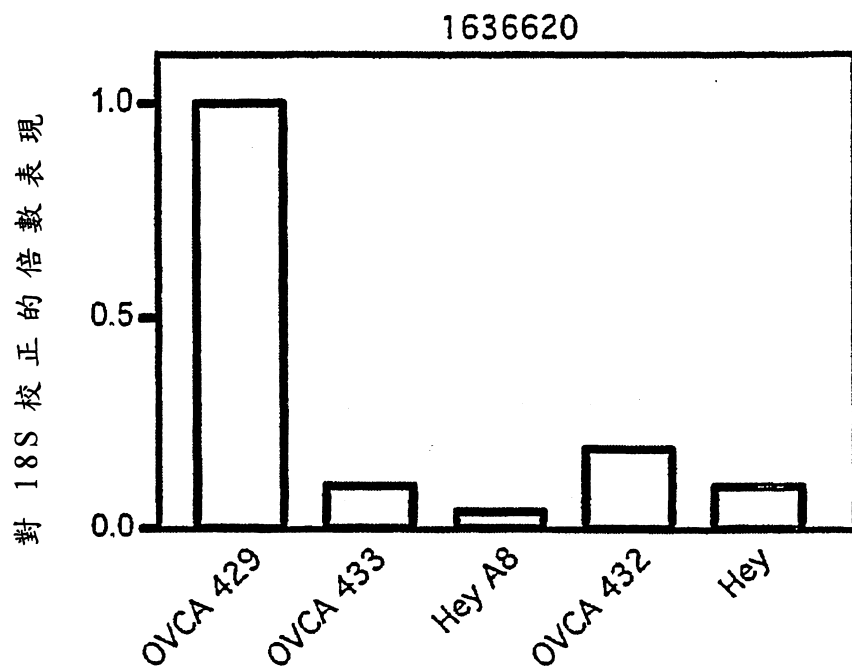


圖 32

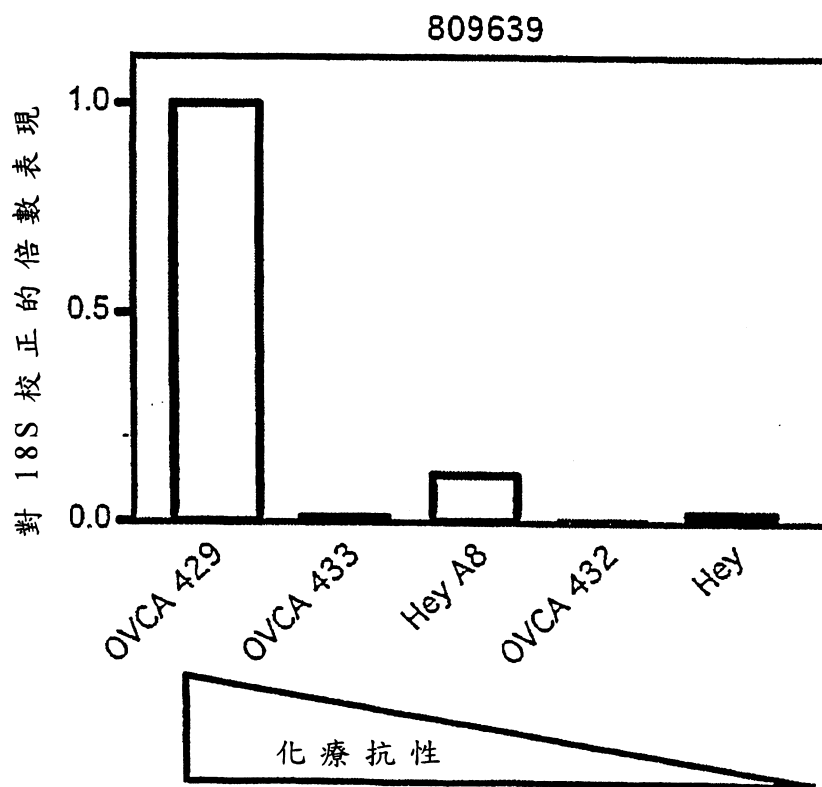


圖 33

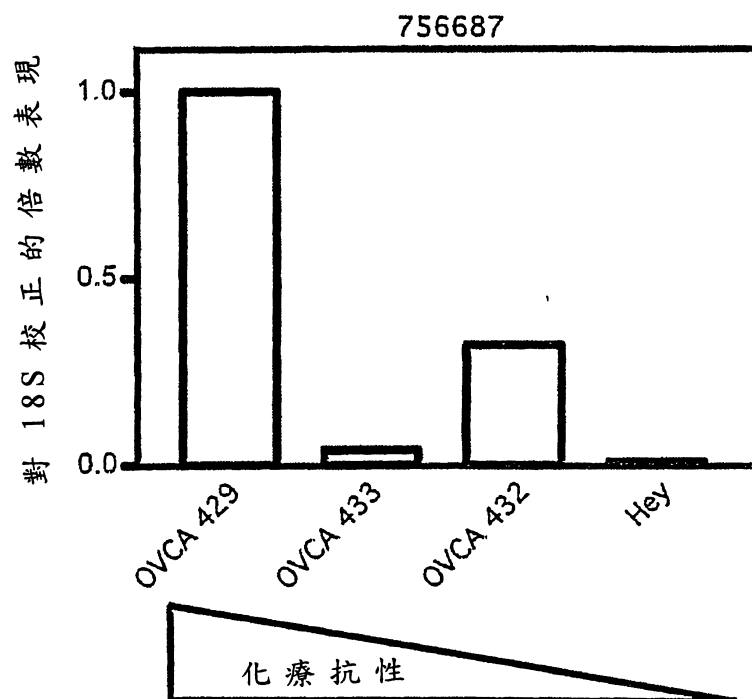


圖 34

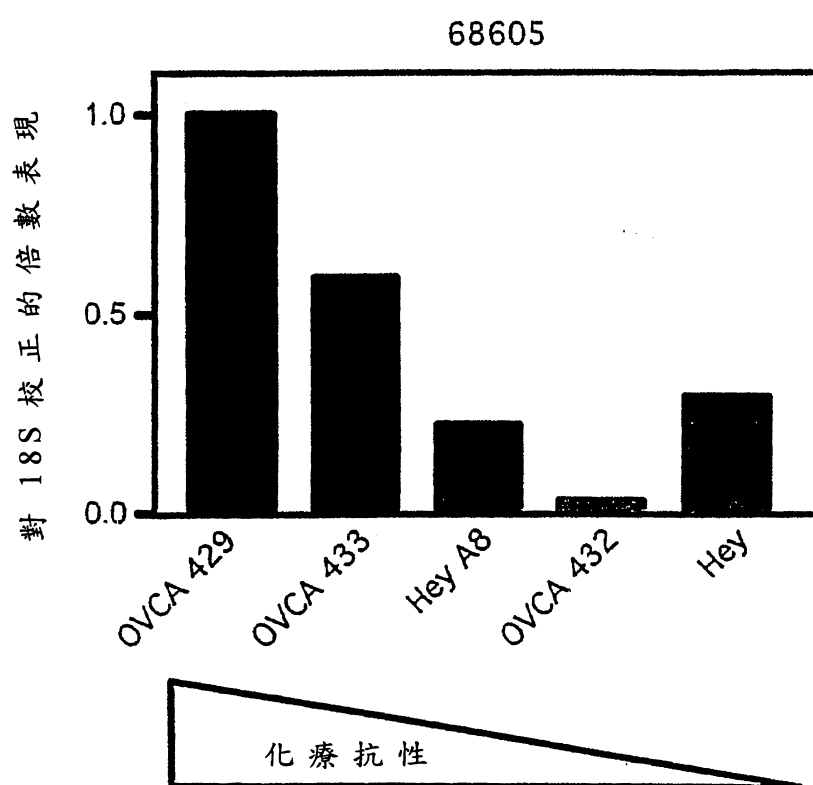


圖 35

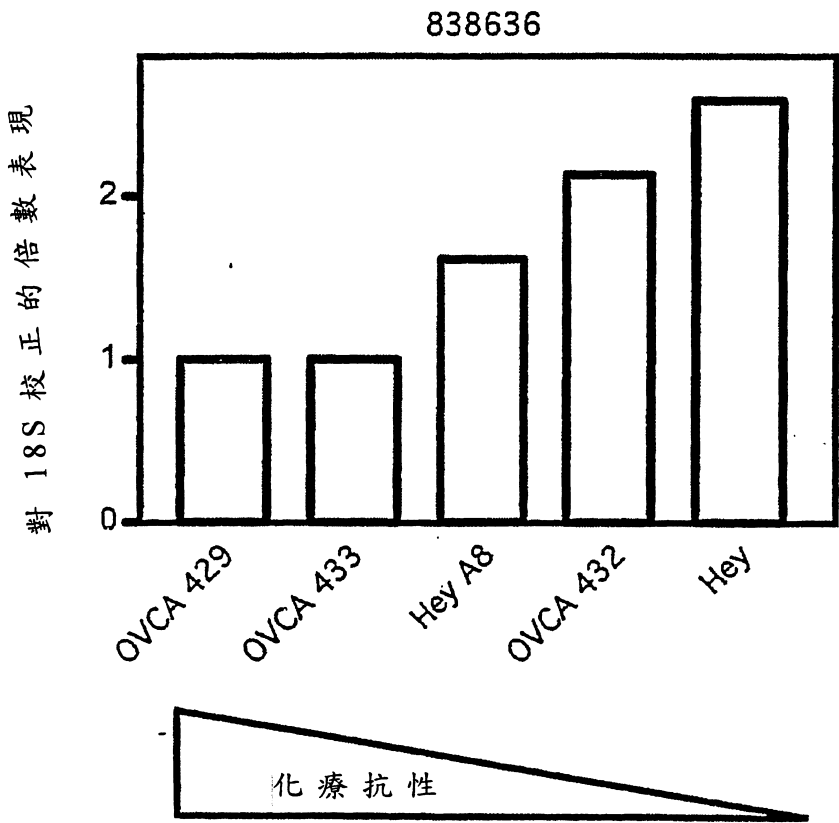
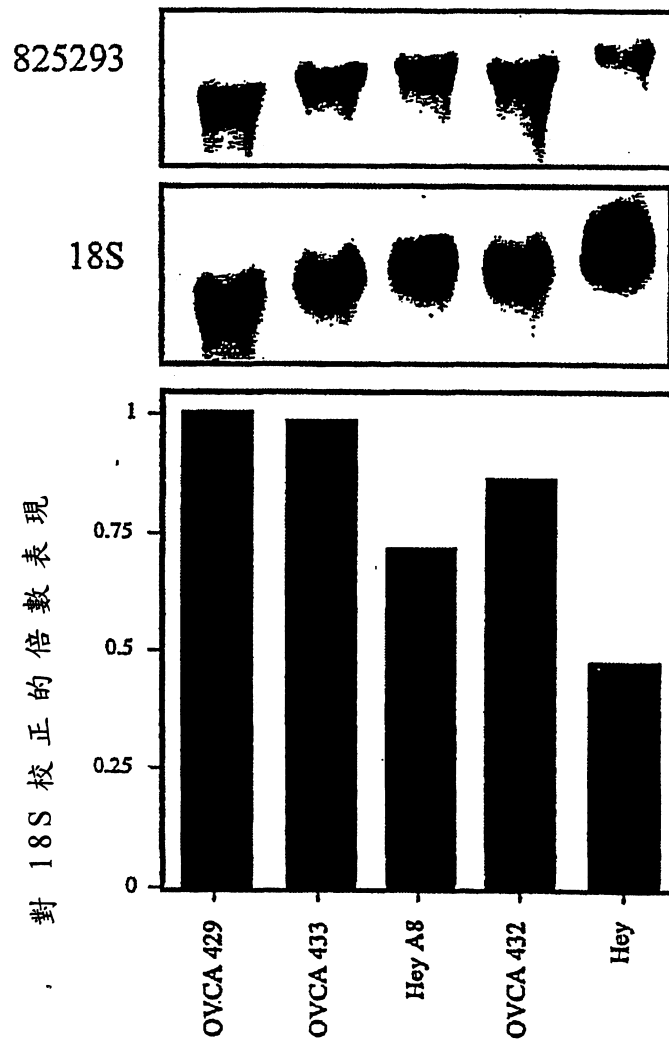


圖 36

825293 之北方墨點分析



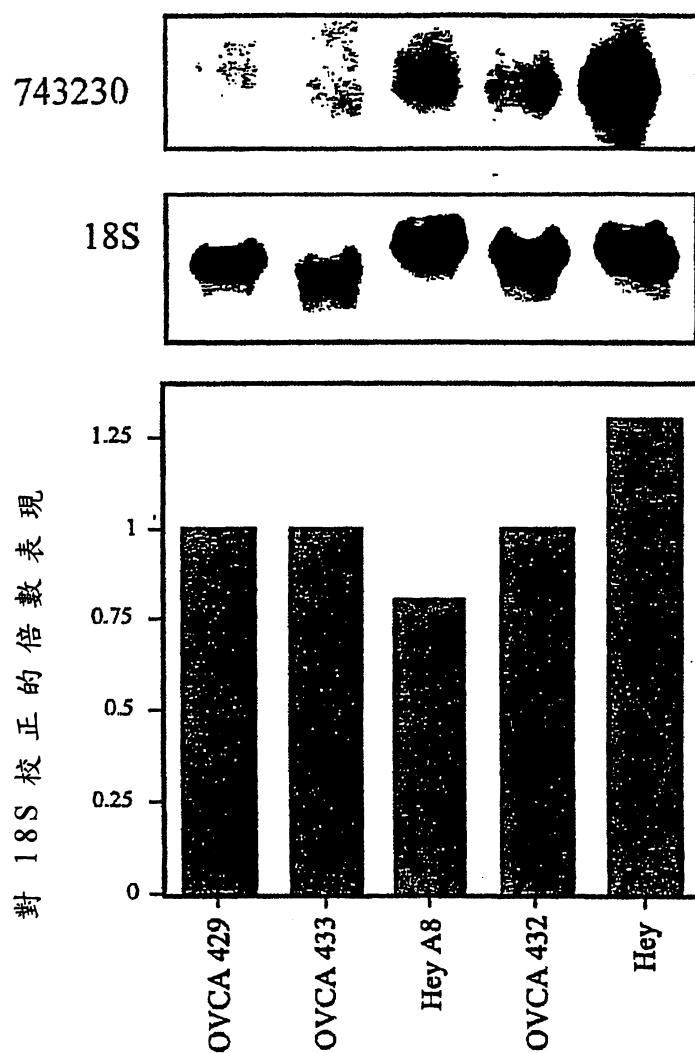
*顯示的點為二重複之平均



對順鉑抗性

圖 37

743230 之北方墨點分析



*顯示的點為二重複之平均



對順鉑抗性

圖 38

根據對於順鉑抗性的程度
將上皮卵巢癌細胞株分級

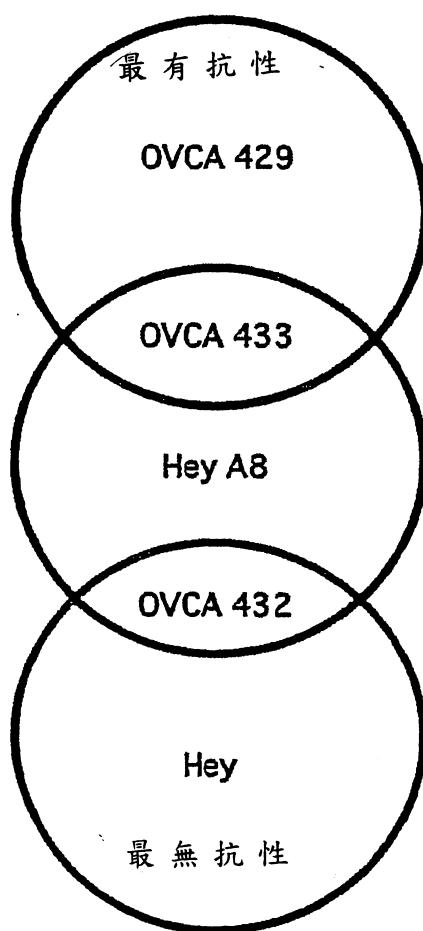
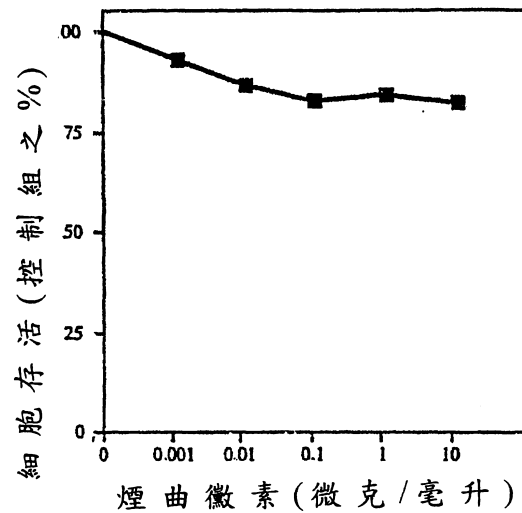


圖 39

暴露至煙曲黴素 4 小時後 OVCA 429 細胞之存活(顯示的所有資料點為兩次獨立實驗之平均)



暴露至單獨順鉑或順鉑及煙曲黴素之組合 4 小時後 OVCA 429 細胞之存活(顯示的所有資料點為兩次獨立實驗之平均)

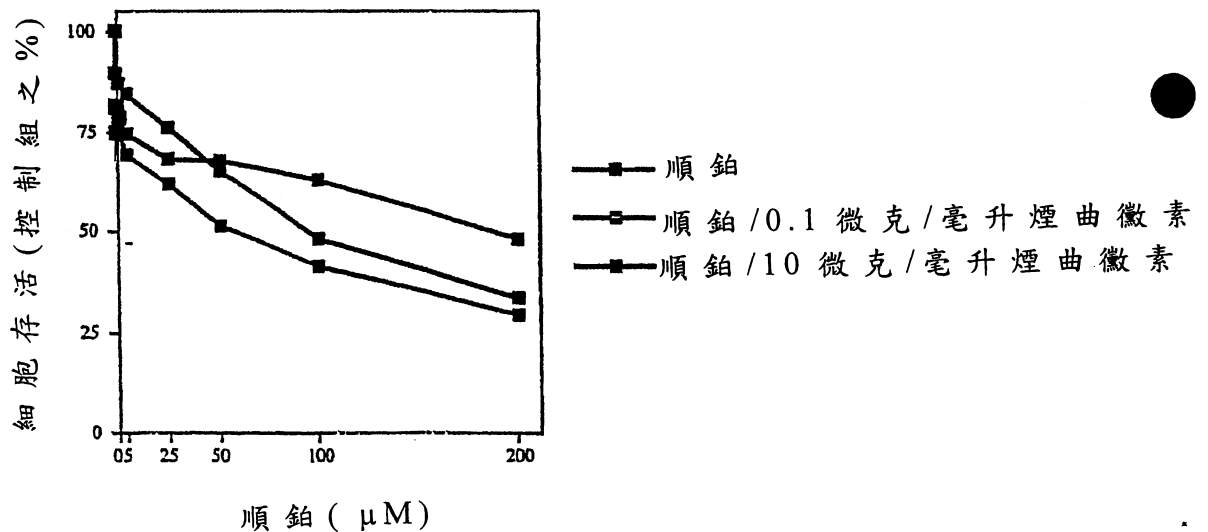
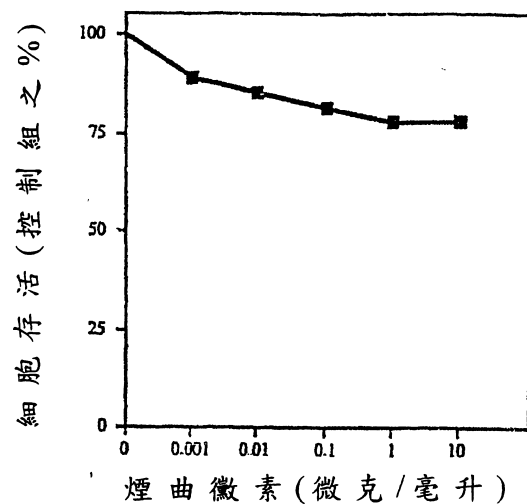


圖 40

暴露至煙曲黴素 8 小時後 OVCA 429 細胞之存活(顯示的所有資料點為兩次獨立實驗之平均)



暴露至單獨順鉑或順鉑及煙曲黴素之組合 8 小時後 OVCA 429 細胞之存活(顯示的所有資料點為兩次獨立實驗之平均)

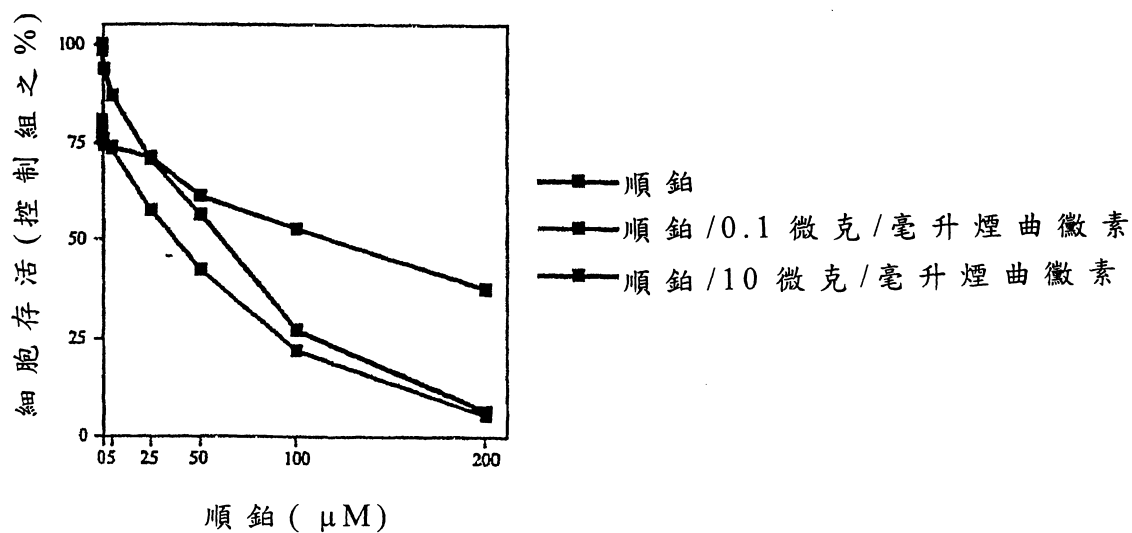
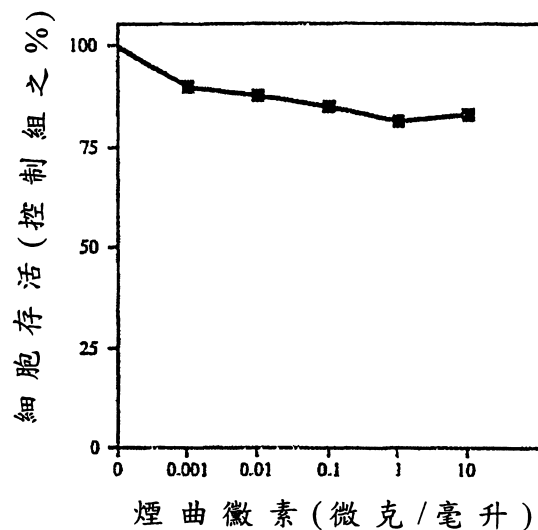


圖 41

暴露至煙曲黴素 24 小時後 OVCA 429 細胞之存活(顯示的所有資料點為兩次獨立實驗之平均)



暴露至單獨順鉑或順鉑及煙曲黴素之組合 24 小時後 OVCA 429 細胞之存活(顯示的所有資料點為兩次獨立實驗之平均)

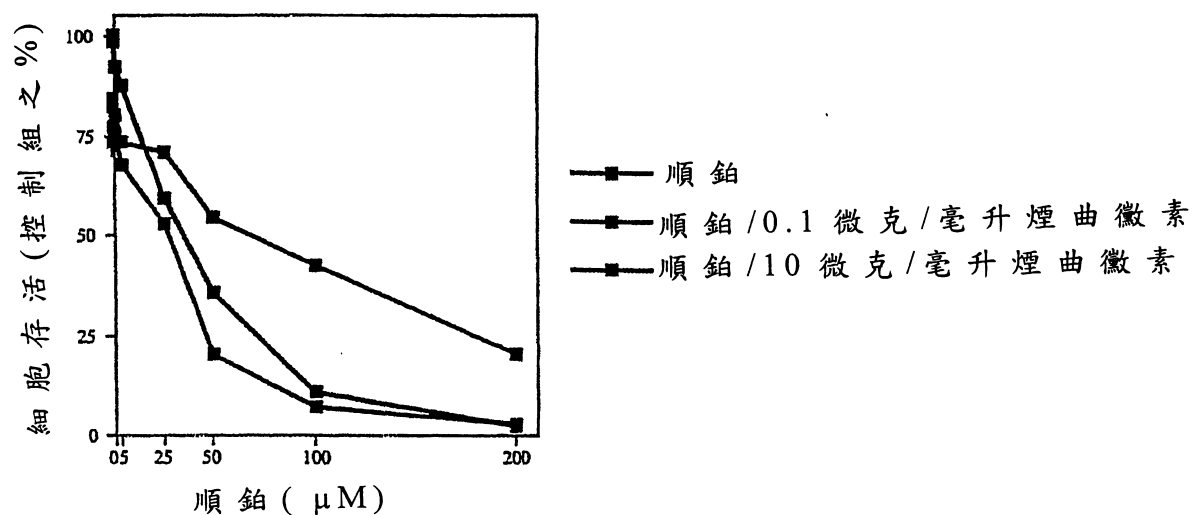


圖 42

沉默 39093 mRNA

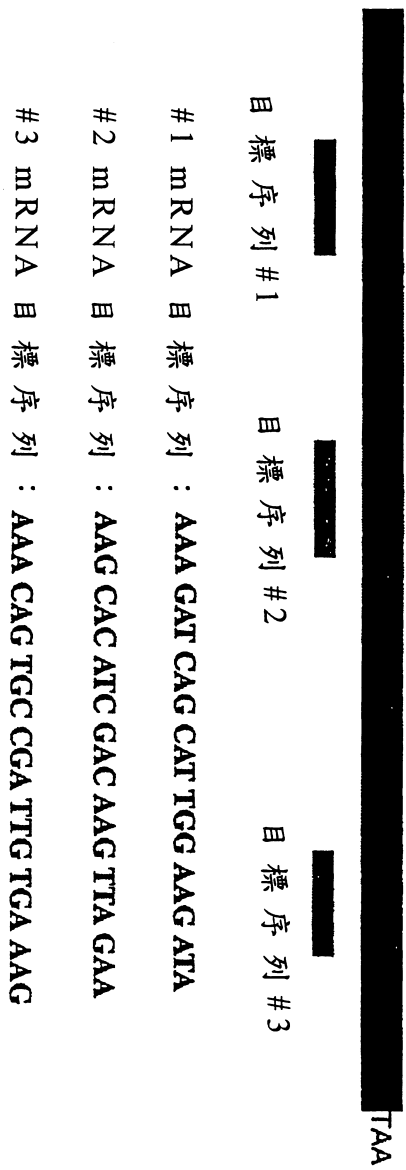
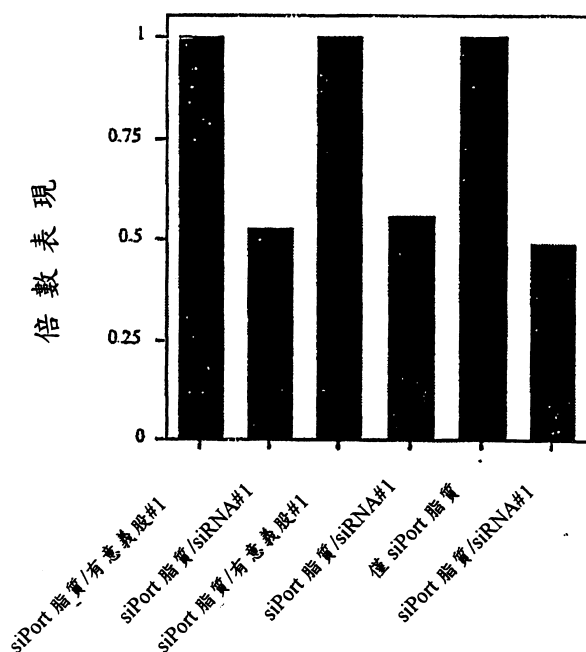


圖 43

定量即時 PCR 分析 39093 mRNA 表現於用單獨有意義股#1 或以 siRNA #1 轉染的 OVCA 429 細胞中



定量即時 PCR 分析 GAPDH mRNA 表現於用單獨 siPort 脂質處理或以 39093 siRNA #1 轉染的 OVCA 429 細胞中

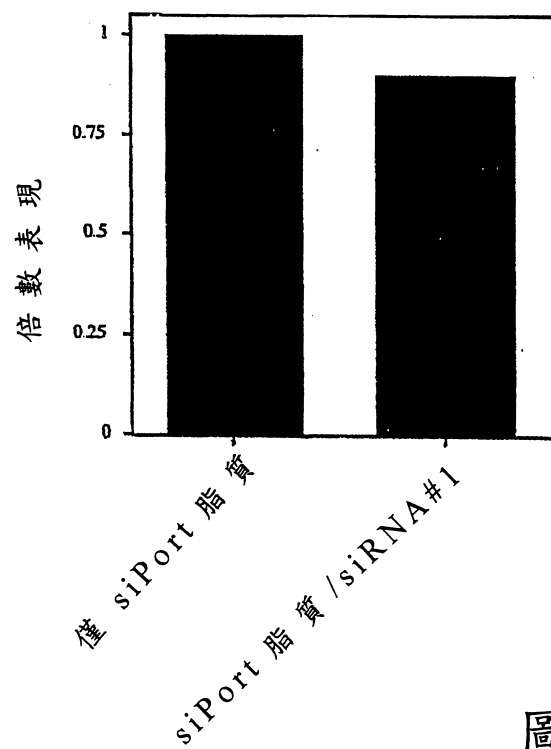


圖 44

順鉑對用 39093 siRNA #1 轉染的 OVCA 429 細胞之影響

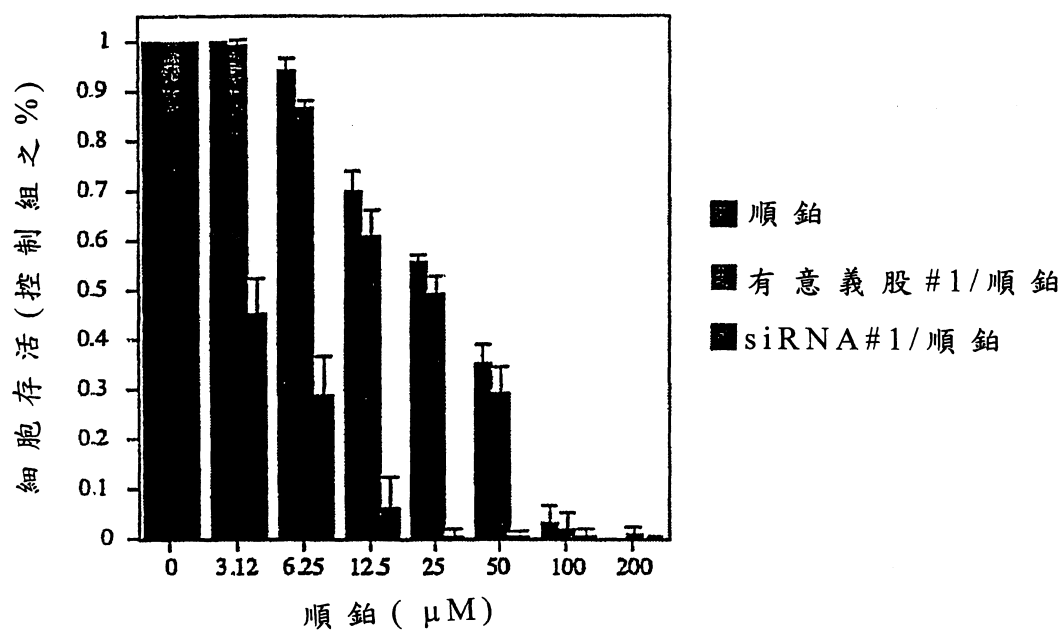


圖 45

順鉑對用 39093 siRNA #1 轉染的 OVCA 429 細胞之影響

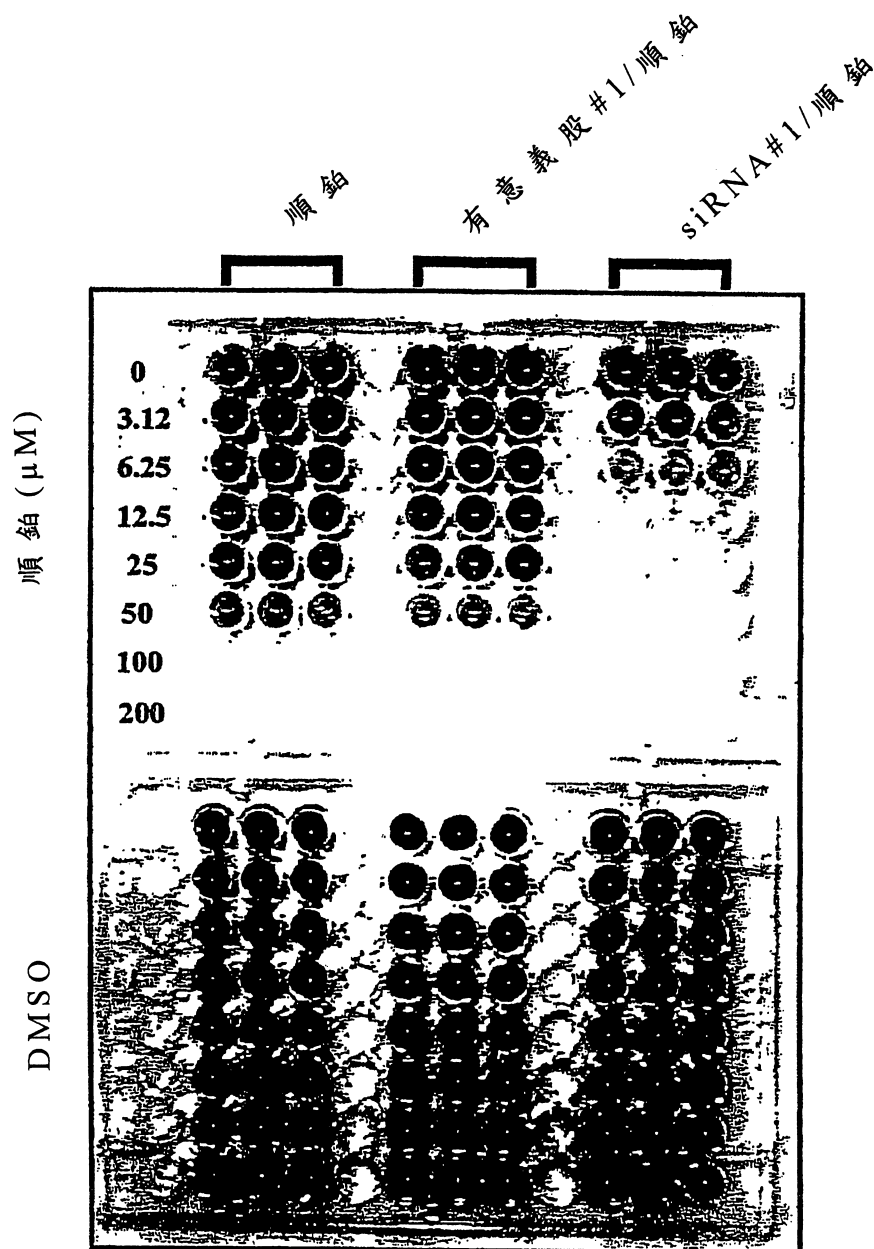


圖 46

TAA

目標序列 #3

#2 mRNA 目標序列：AAGCTC CACCTGGAC TACATC

#3 mRNA 目標序列：AAT GAC AAG TAC ATC GCC CTG

- 43 -

定量即時PCR分析 250654 mRNA 表現於以不同 siRNA 及控制組轉染的 OVCA 429 細胞中

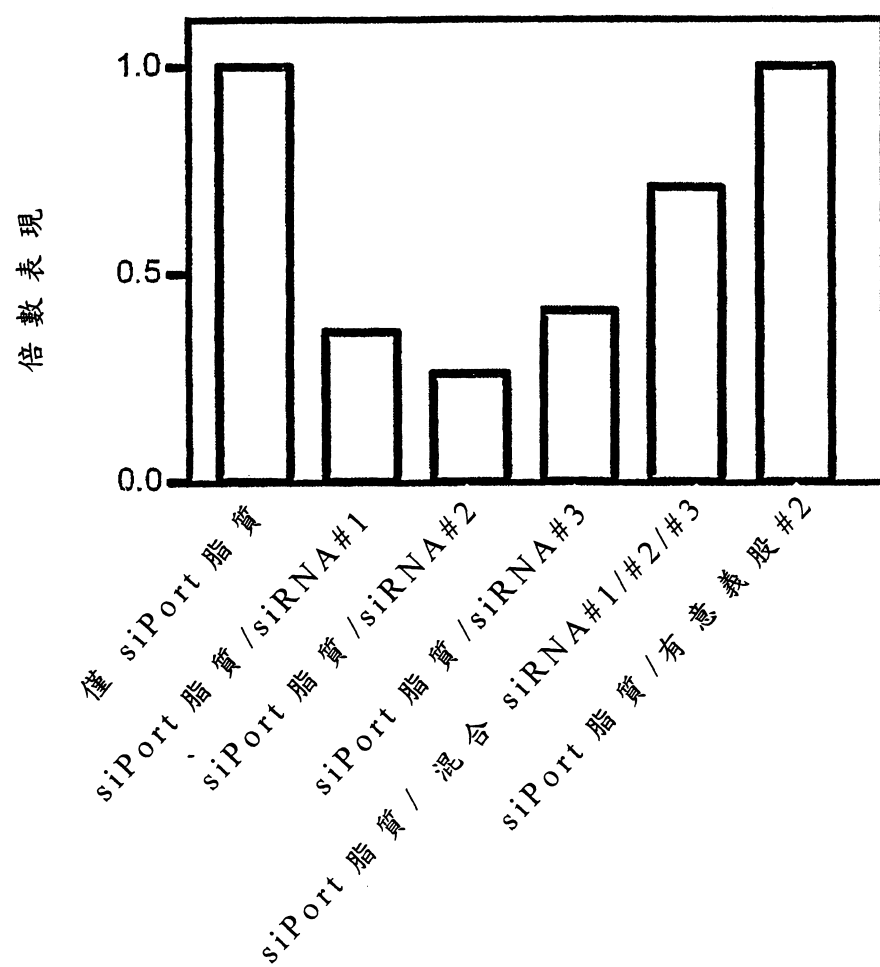


圖 48

MTT 分析法研究 250654 siRNA #2 對 OVCA 429 對順鉑敏感性之影響



圖 49

siRNA 媒介的破壞 250654 對 OVCA 429 中順鉑敏感度之影響

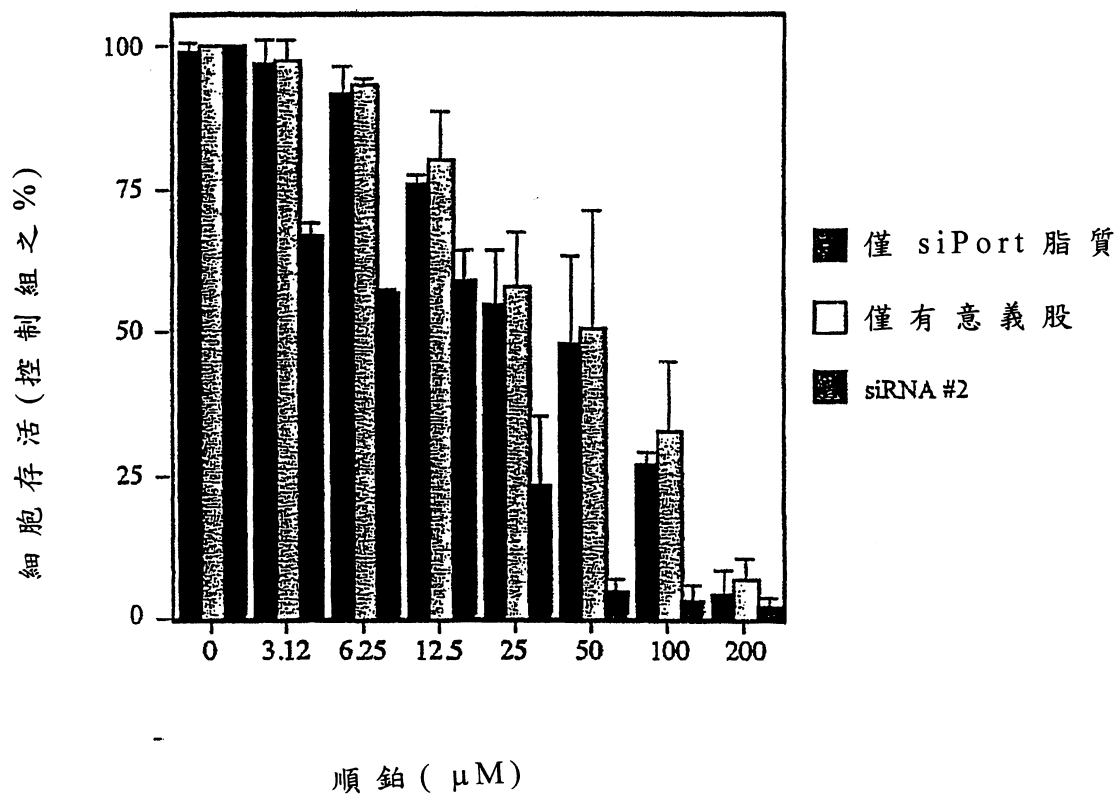


圖 50

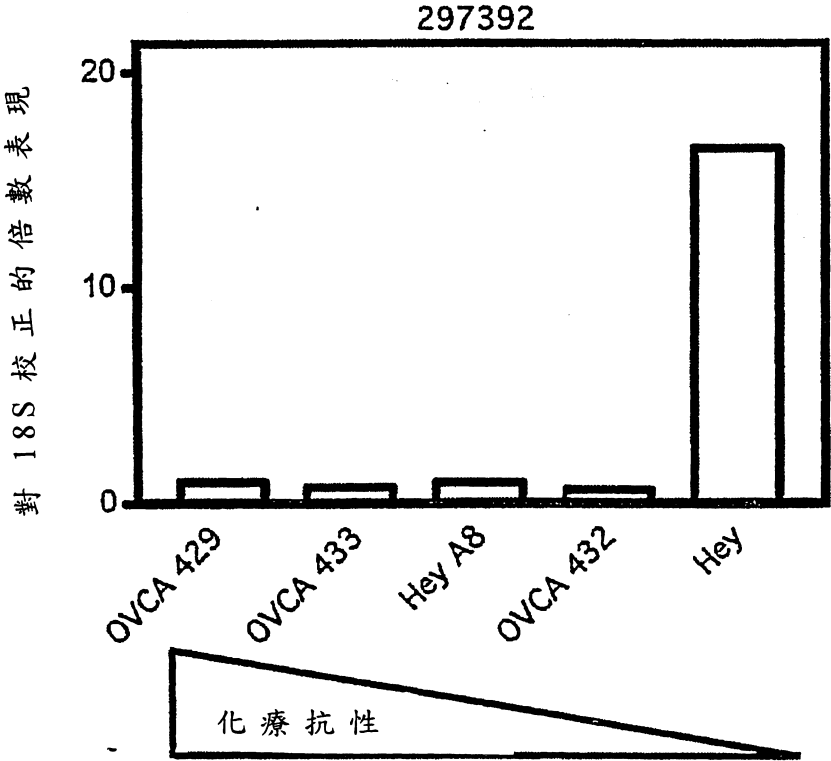


圖 51

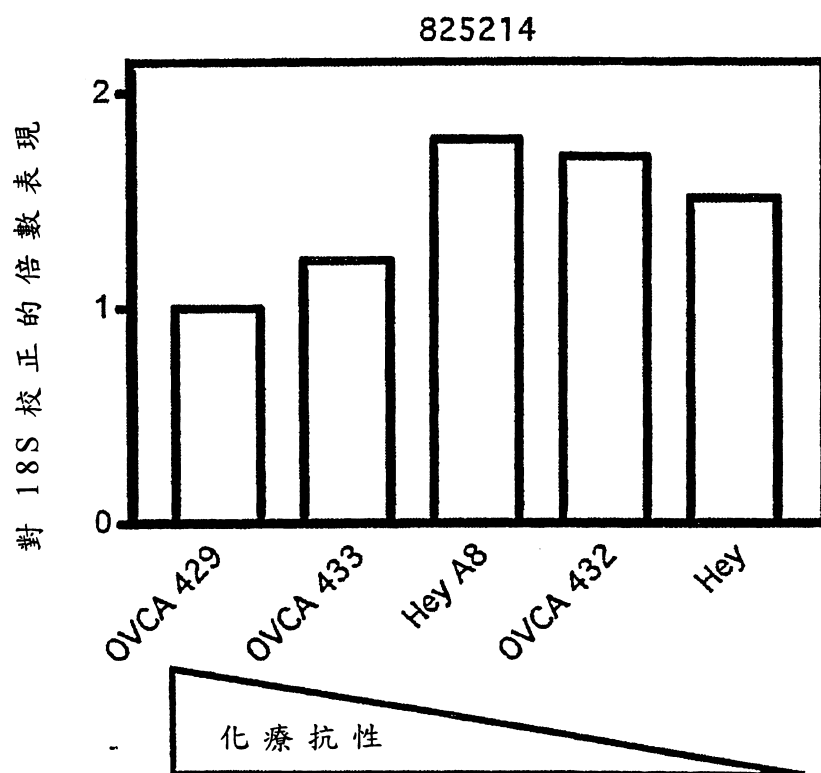


圖 52

於 OVCA 429 中破壞鈣活化酶 (Calpain)2

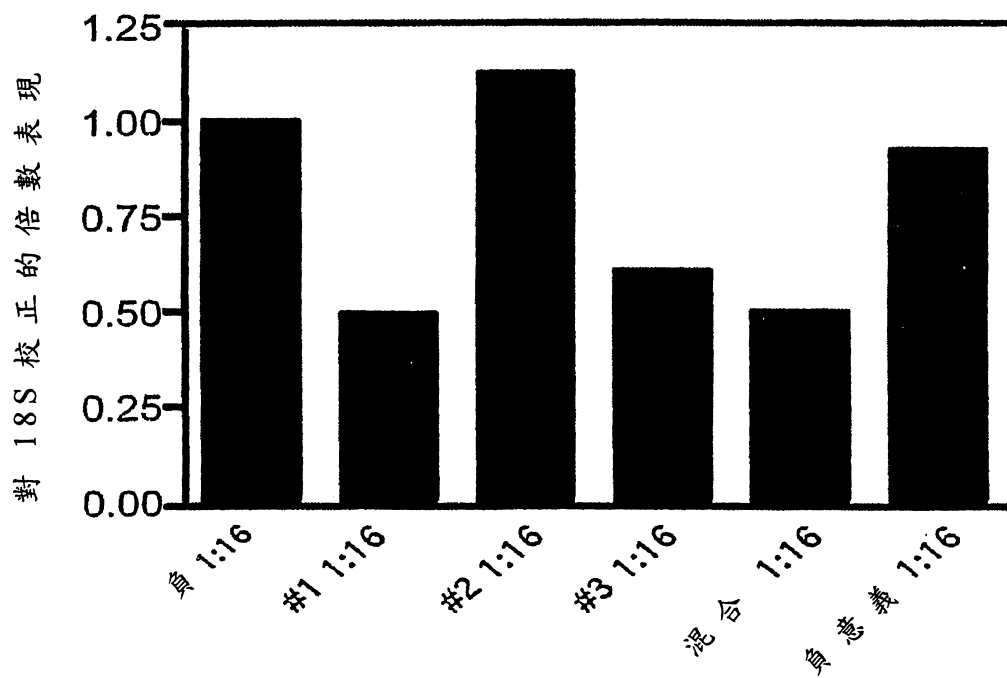


圖 53

順鉑對以不轉錄寡核苷酸及針對 AF261089 產生的
siRNA#3 轉染之 OVCA 429 細胞之影響

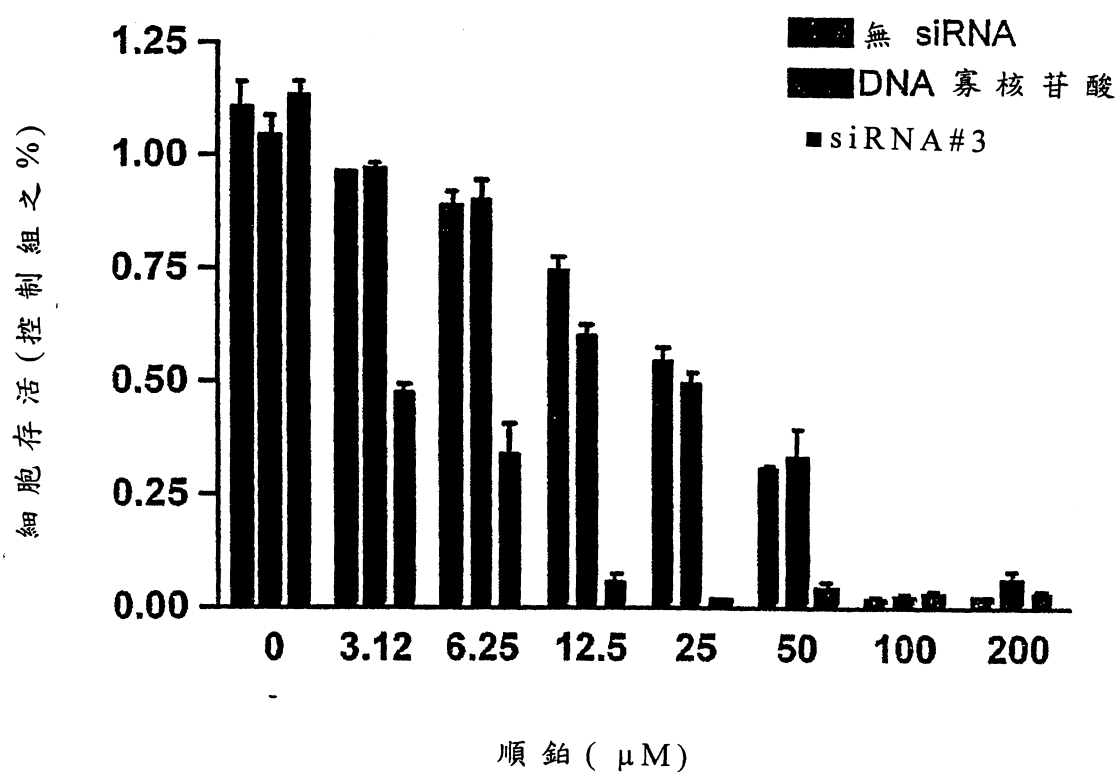


圖 54

以鈣活化酶 (Calpain) 抑制劑 I (ALLN) /
順鉑處理 OVCA 429

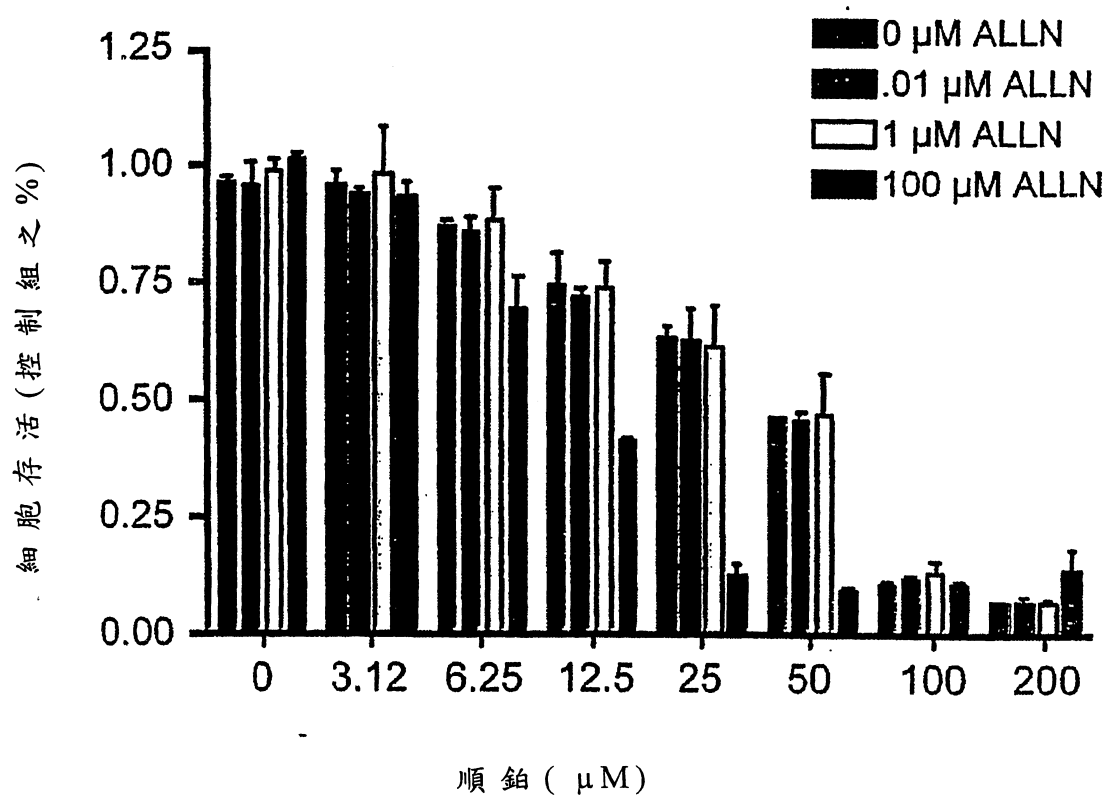


圖 55

順鉑對以 BC015973 siRNA#3 轉染的
OVCA 429 細胞之作用

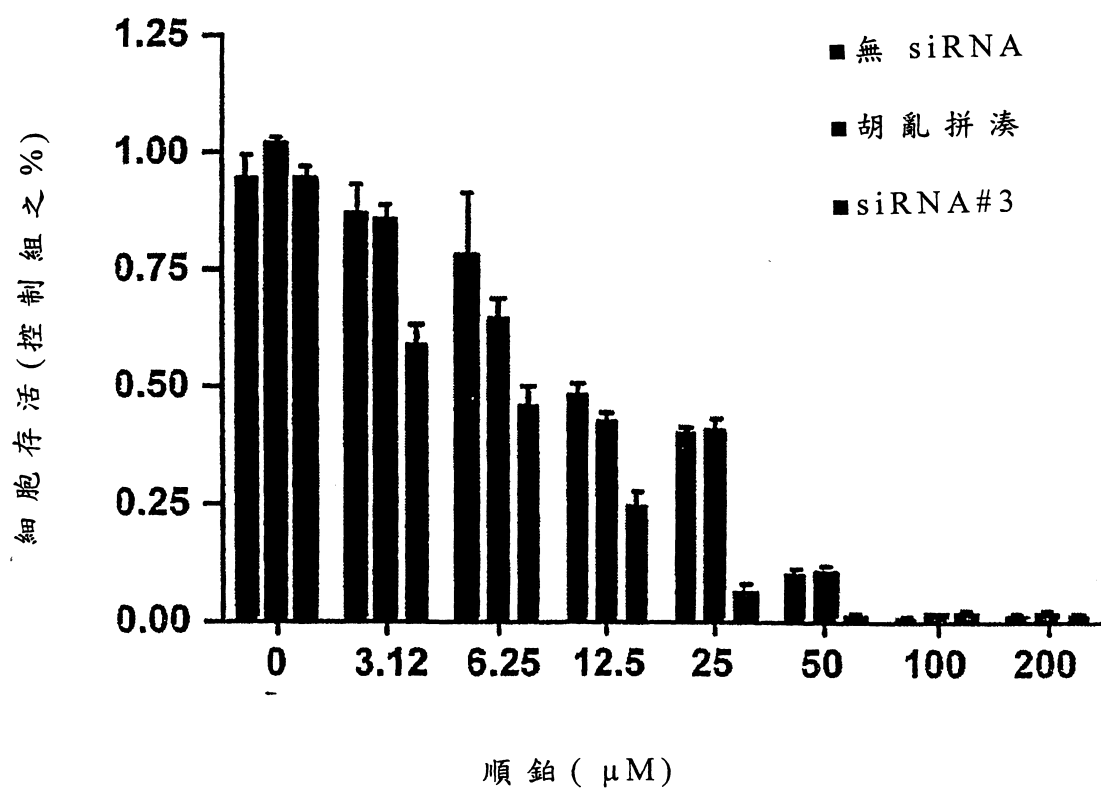


圖 56

於 OVCA 429 中破壞 S100A11

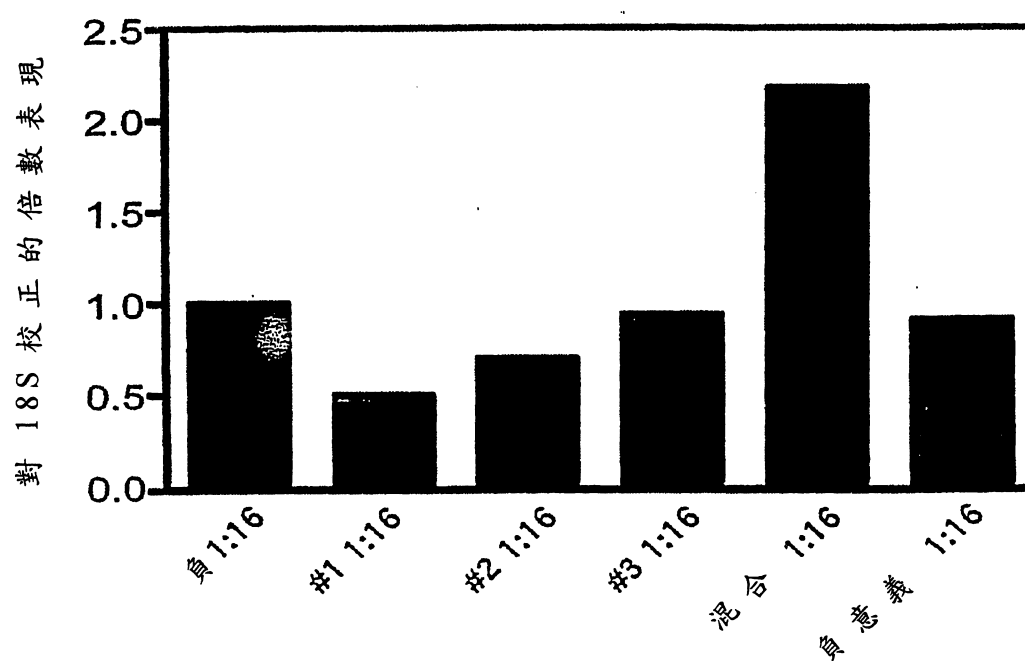


圖 57

於配對的正常與腫瘤大腸 cDNA 中
MetAP-2 之表現

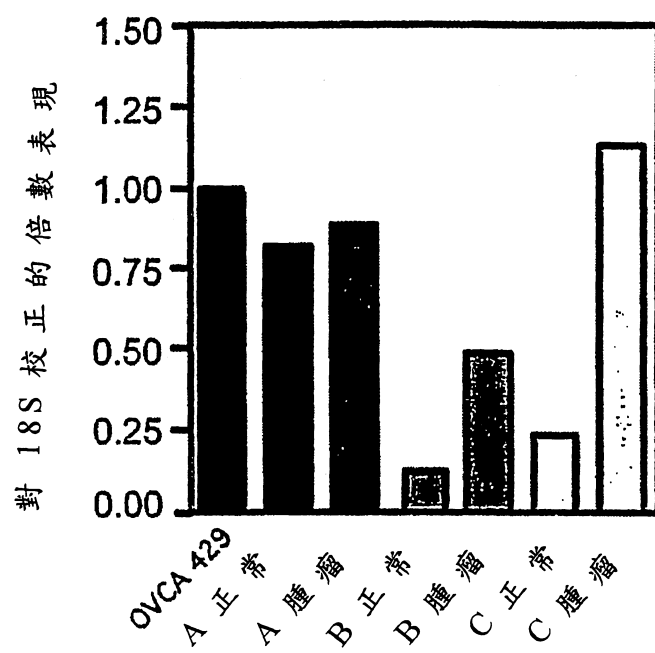


圖 58

於配對的非腫瘤與腫瘤大腸 cDNA
中 250654(SPARC)之表現

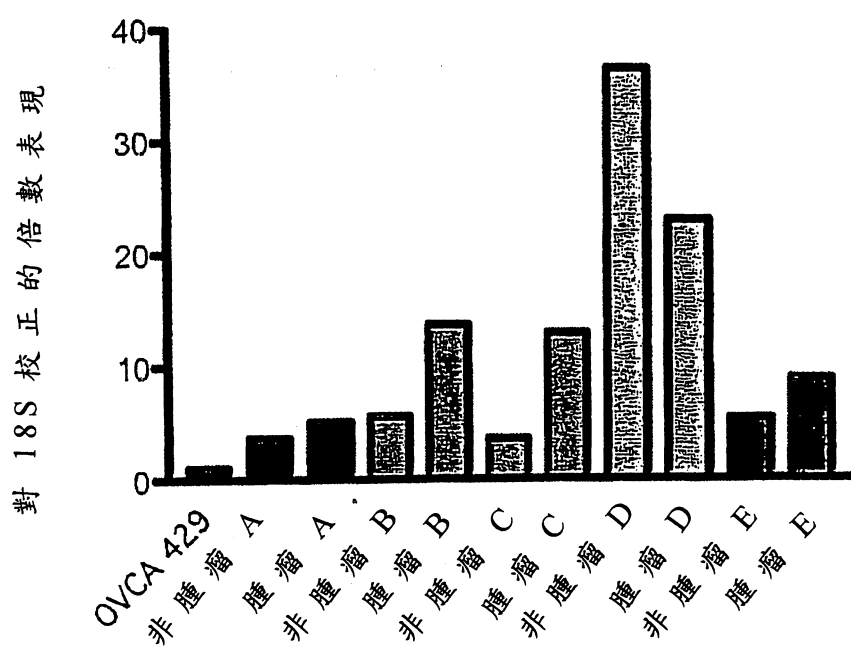


圖 59

於配對的非腫瘤與腫瘤大腸 cDNA 中
810612(S100A11)之表現(由兩回分開
的實驗合併的數據)

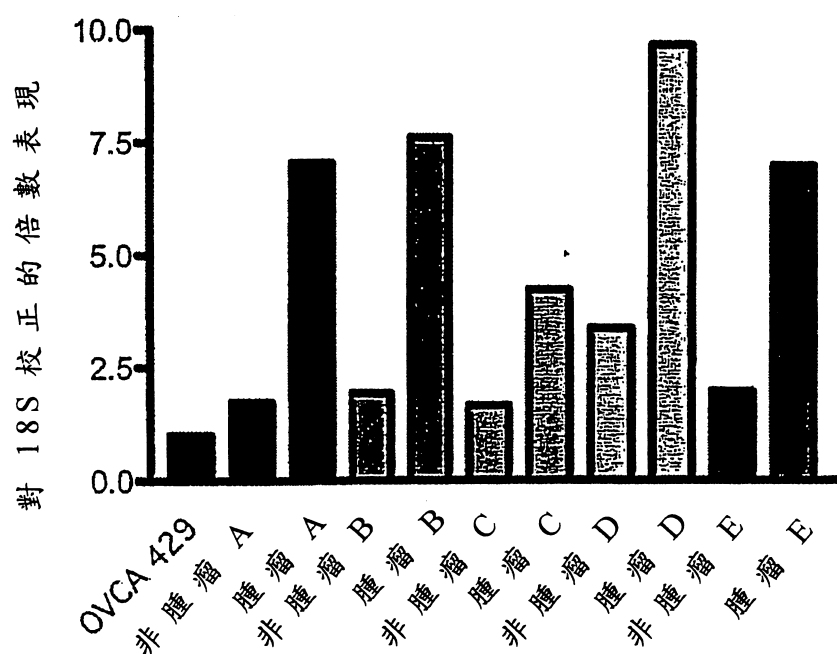


圖 60

於配對的大腸組織中基因 BC015973 之表現

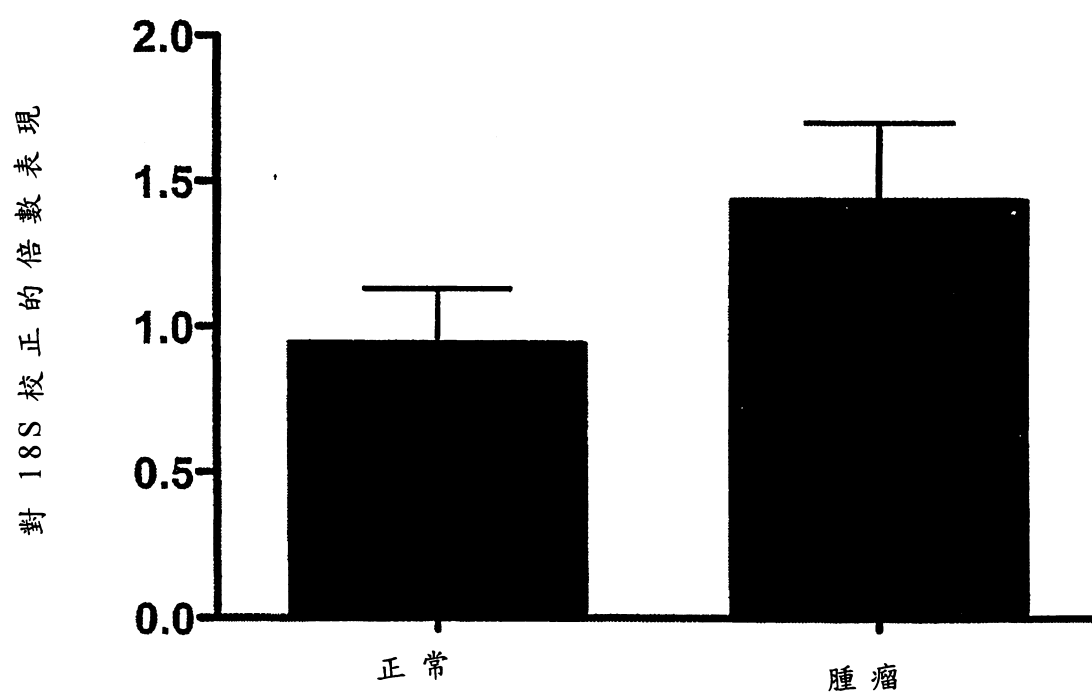


圖 61

於配對的大腸組織中基因 AF261089
之表現(各樣品二重複進行之平均值)

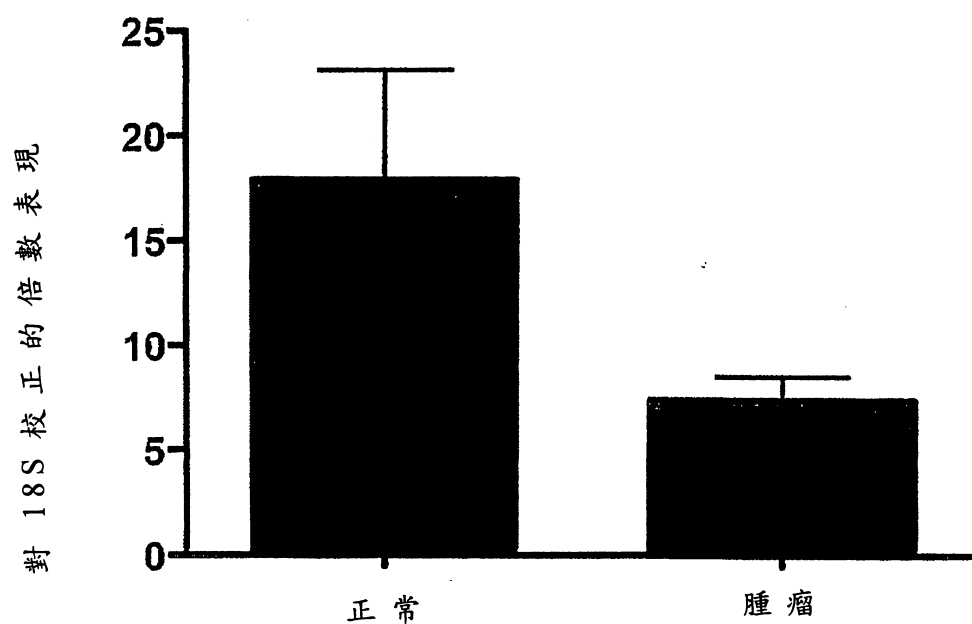


圖 62

腫瘤體積為體重之函數：小鼠#1
(未處理)與小鼠#2(順鉑處理)

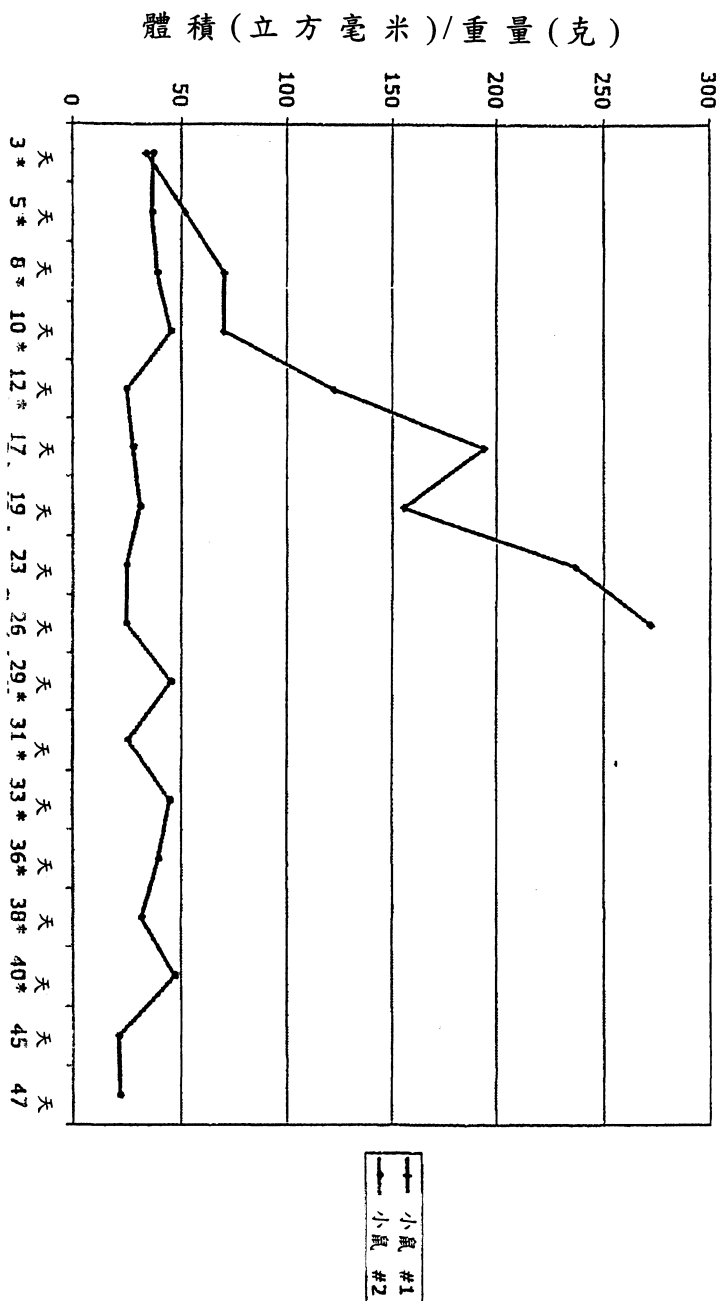
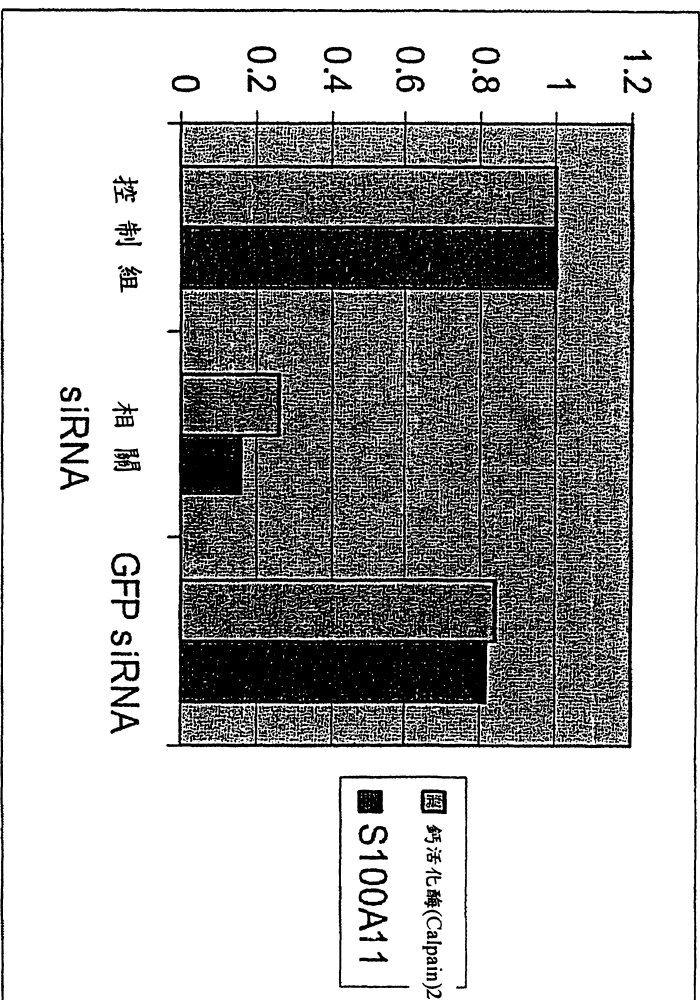


圖 63

第 3 天為注射腫瘤細胞後 48 天
* 順鉑以 4 微克/公斤體重給予

於具有針對鈣活化酶(Calpain)2或S100A11專一siRNA穩定表現之OVCAR-3細胞中即時PCR測量鈣活化酶(Calpain)2或S100A11之mRNA表現量



控制組=不具 siRNA 之細胞
相關 siRNA=具有穩定 siRNA 專一於鈣活化酶(Calpain)2 或 S100A11 之細胞
GFP siRNA=具有穩定 siRNA 針對綠螢光蛋白質之細胞作為不相關控制組

圖 64

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (39) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

十、申請專利範圍：

1. 一種細胞基因的調控劑之用途，其係用以製備用於降低腫瘤細胞中化療藥物抗性之藥物，其中該細胞基因為S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP-2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1、KIAA0082、MPP10、HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2或MT1；其中在調控劑存在的細胞比調控劑不存在的細胞對化療藥物較無抗性。
2. 如請求項1之用途，其中化療藥物為順鉑。
3. 如請求項1之用途，其中調控劑為抑制劑及基因為MetAP-2。
4. 如請求項3之用途，其中抑制劑為siRNA。
5. 如請求項4之用途，其中siRNA為SEQ ID NO:4，SEQ ID NO:5，或SEQ ID NO:6。
6. 如請求項3之用途，其中抑制劑為煙曲黴素(fumagillin)或煙曲黴素的衍生物。
7. 如請求項1之用途，其中腫瘤細胞為卵巢癌腫瘤細胞。
8. 如請求項1之用途，其中調控劑為抑制劑及基因為SPARC。
9. 如請求項8之用途，其中抑制劑為siRNA。

10. 如請求項9之用途，其中siRNA為SEQ ID NO:1，SEQ ID NO:2，或SEQ ID NO:3。
11. 如請求項1之用途，其中調控劑為抑制劑及基因為鈣活化酶(Calpain)2。
12. 如請求項11之用途，其中抑制劑為ALLN或ALLN的衍生物。
13. 如請求項11之用途，其中抑制劑為siRNA。
14. 如請求項13之用途，其中siRNA為SEQ ID NO:7，SEQ ID NO:8，或SEQ ID NO:9。
15. 如請求項1之用途，其中調控劑為抑制劑及基因為S100A11。
16. 如請求項15之用途，其中抑制劑為siRNA。
17. 如請求項16之用途，其中siRNA為SEQ ID NO:10，SEQ ID NO:11，或SEQ ID NO:12。
18. 如請求項1之用途，其中調控劑為抑制劑及基因為KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、Grancalcin、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP -7、SRB1、或KIAA0082。
19. 如請求項18之用途，其中抑制劑為siRNA。
20. 如請求項19之用途，其中siRNA為SEQ ID NO:64-108或134-144之任一者。
21. 一種細胞基因的抑制劑與化療試劑(類)組合之用途，其係

用以製備用於抑制腫瘤細胞生長之藥物，其中該細胞基因為 SPARC、鈣活化酶(Calpain)2、S100A11、MetAP-2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、Grancalcin、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP -7、SRB1、或 KIAA0082。

22. 如請求項21之用途，其中化療試劑為以鉑為基礎。

23. 如請求項21之用途，其中至少一種抑制劑為MetAP-2活性之抑制劑。

24. 如請求項23之用途，其中至少一種抑制劑為煙曲黴素或煙曲黴素的衍生物。

25. 如請求項21之用途，其中腫瘤細胞為卵巢癌細胞。

26. 如請求項21之用途，其中抑制劑為siRNA。

27. 如請求項26之用途，其中siRNA係確認為SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, 或SEQ ID NO:64-108或SEQ ID NO:134-144之任一者。

28. 一種預測卵巢癌患者的腫瘤是否將對化療藥物有抗性之方法，其包含下列步驟：

(a)於取自患者的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由該表現的基因編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP-2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白

(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP -7、FAST激酶、TESK2、SRB1、KIAA0082、MPP10、HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2或MT1；

(b)於控制組樣品中偵測一或多個相對應表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP-2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP -7、FAST激酶、TESK2、SRB1、KIAA0082、MPP10、HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2或MT1；

(c)比較步驟(a)中偵測的表現的基因或基因產物之量與步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中當步驟(a)中偵測的量與步驟(b)中偵測的量相差至少20%之因子時，則預測患者將對化療藥物有抗性。

29. 如請求項28之方法，其中化療為以鉑為基礎的化療。

30. 如請求項28之方法，其中表現的基因為MetAP-2或SPARC。

31. 一種監測卵巢癌患者的疾病發展之方法，其包含下列步

驟：

(a)於取自患者的生物腫瘤樣品中偵測一或多個表現的基因或由表現的基因編碼的基因產物之量，其中表現的基因為 S100A11、鈣活化酶 (Calpain)2、SPARC、MetAP-2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白 (Calponin)2、RNPS1、eIF5、eIF2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾 (Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1、KIAA0082、MPP10、HMT1、NAIP、eEF1 ϵ 、RAB22A、NCOR2或MT1；

(b)利用取自患者隨後收集的生物腫瘤樣品重複步驟(a)；及

(c)比較步驟(a)中測量的表現的基因或基因產物之量與步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中當於步驟(b)中偵測的量

i. 對於 S100A11、鈣活化酶 (Calpain)2、SPARC、MetAP-2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白 (Calponin)2、RNPS1、Eif5、Eif2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾 (Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082為不小於在步驟(a)中偵測的量；及

ii 對於MPP10、HMT1、NAIP、Eef1 ϵ 、RAB22A、NCOR2

或MT1為不大於在步驟(a)中偵測的量時，

癌症已進展。

32. 如請求項31之方法，其中表現的基因為eIF5或SPARC。

33. 一種用以鑑定降低化療抗性的腫瘤細胞藥物抗性之化合物的方法，其包含下列步驟：

(a)使測試化合物與細胞可耐受的濃度之化療藥物一起與表現在有化療抗性的卵巢癌細胞中為過度表現的基因之細胞接觸，其中基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP-2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、Eif5、Eif2B ϵ 、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262 MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β 、G-CSFR、IGFBP -7、FAST激酶、TESK2、SRB1或KIAA0082；

(b)偵測在有或無測試化合物存在中基因之表現；及

(c)比較在有或無測試化合物存在中基因之表現，其中若在測試化合物存在中基因表現相對於在無測試化合物中基因表現降低，及在化合物存在中腫瘤細胞生長減少，將化合物鑑定為抑制化療抗性腫瘤細胞生長之化合物。

34. 一種用以鑑定降低化療抗性的腫瘤細胞藥物抗性之化合物的方法，其包含下列步驟：

(a)使測試化合物與細胞可耐受的濃度之化療藥物一起與表現在有化療抗性的卵巢癌細胞中以低於正常量表現

的基因之細胞接觸，其中基因為HMT1、NAIP、Eef1ε、RAB22A、NCOR2、MT1或MPP10；

(b)偵測在有或無測試化合物存在中基因之表現；及

(c)比較在有或無測試化合物存在中基因之表現，其中若在測試化合物存在中基因表現相對於在無測試化合物中基因表現增加，及在化合物存在中腫瘤細胞生長減少，將化合物鑑定為抑制化療抗性腫瘤細胞生長之化合物。

35. 一種用以監測醫藥組合物作為治療病患癌症之藥劑的有效性之方法，其包含下列步驟：

(a)於取自患者於投予醫藥組合物前的生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、MetAP-2、KLK6、ARA9、肌動蛋白結合蛋白(Calponin)2、RNPS1、Eif5、Eif2Bε、HSF2、WDR1、融合的腳趾(Fused toes)、NM23D、ADAR1、Grancalcin、NBR1、SAPK/Erk1、鋅指狀蛋白質-262、MYM、HYA22、MRPL4、Vinexin β、G-CSFR、IGFBP-7、FAST激酶、TESK2、SRB1、KIAA0082或MPP10、HMT1、NAIP、Eef1ε、RAB22A、NCOR2、MT1；

(b)利用取自患者於投予一劑量醫藥組合物後接續收集的生物樣品重複步驟(a)；及

(c)比較步驟(a)中偵測的表現的基因或基因產物之量與步驟(b)中偵測的表現的基因或基因產物之量，其中藉由

偵測於隨後收集的生物樣品中表現的基因或基因產物之量與取自步驟(a)中的生物樣品比較之變化而監測醫藥組合物之有效性，及當組合物存在時腫瘤細胞的生長減少。

36. 一種偵測大腸癌之方法，其包含下列步驟：

(a)得到病患於投予醫藥組合物前的生物樣品；

(b)於取自病患生物樣品中偵測一或多個表現的基因或由此編碼的基因產物之量，其中表現的基因為S100A10、S100A11、鈣活化酶(Calpain)2、SPARC、或MetAP-2；

(c)偵測於控制組樣品中偵測的一或多個表現的基因或基因產物之量；

(d)比較來自步驟(b)中一或多個表現的基因或基因產物之量與步驟(c)中的量；

其中若與步驟(b)中偵測的一或多個基因量不同於步驟(c)中偵測的一或多個基因量，則偵測到大腸癌。

37. 如請求項36之方法，其中若S100A10、S100A11、SPARC、或MetAP-2之量於步驟(b)中比於步驟(c)中的量有增加，則偵測到大腸癌。

38. 如請求項36之方法，其中若鈣活化酶(Calpain)2之量於步驟(b)中比於步驟(c)中的量有減少，則偵測到大腸癌。

39. 如請求項1之用途，其中調控劑為siRNA或shRNA。

40. 如請求項39之用途，其中調控劑為19、20、或21個核苷酸長之siRNA。

41. 如請求項39之用途，其中調控劑為形成具有臂長19、20、

或 21 個核 苷 酸 之 髮 夾 環 的 shRNA。