



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103937876 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201410040769.6

(22)申请日 2008.10.10

(30)优先权数据

60/979,300 2007.10.11 US

(62)分案原申请数据

200880116343.7 2008.10.10

(73)专利权人 俄亥俄州立大学研究基金会

地址 美国俄亥俄

专利权人 由卫生与公众服务部代表的美利
坚合众国政府

(72)发明人 C·M·克劳斯 C·C·哈里斯

E·A·玛特赫

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 张琤

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件

WO 2005078139 A2,2005.08.25,全文.

US 20060185027 A1,2006.08.17,全文.

Watson, D. I., et al.,HP24 MicroRNA
Expression Profiles in Barrett's
Oesophagus.《Anz Journal of Surgery - Racs
Annual Scientific Congress, 2007》.2007,第
77卷A45.

审查员 曲凯

权利要求书2页 说明书42页 附图19页

(54)发明名称

用于诊断和治疗食管腺癌的方法和组合物

(57)摘要

公开了用于诊断,预后和/或治疗食管腺癌和Barrett's食管相关腺癌的方法和组合物,以及更多的标志物,其中差异指示食管腺癌和鳞状细胞癌,和/或Barrett's食管相关腺癌或对其的倾向。本发明还提供了鉴定用于此的抗癌试剂的方法和组合物。

1. 用于测量至少一种生物标志物的差异表达的试剂在制备组合物中的用途,所述组合物用于检测样品中的食管鳞状细胞癌,

其中所述至少一种生物标志物的改变的表达与样品中食管鳞状细胞癌的存在或不存在相关联;

其中食管鳞状细胞癌中的癌组织和非癌组织通过下列的一种或多种来区分:

选自mir-21,mir-223,mir-146b,mir-224,mir-155,mir-7-2,mir-181b,mir-146a,mir-181,mir-7,mir-16,mir-122a,mir-125a和mir-16的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

选自mir-202,mir-29c,mir-30b,mir-30c,mir-126,mir-99a,mir-220,mir-320,mir-499,mir-30c,mir-125b,mir-1,mir-145,mir-143,mir-378,mir-200b,mir-133a,mir-375和mir-203的至少一种生物标志物的减少的表达,

并且至少通过mir-155的增加的表达来区分。

2. 权利要求1的用途,其中所述鳞状细胞癌中的癌组织和非癌组织通过下组生物标志物的增加表达来区分:mir-21,mir-223,mir-146b,mir-224,mir-155,mir-181b和mir-146a。

3. 权利要求1的用途,其中所述鳞状细胞癌中的癌组织和非癌组织通过下组生物标志物的减少表达来区分:mir-133a,mir-375和mir-203。

4. 权利要求1的用途,其中所述鳞状细胞癌中的癌组织和非癌组织通过下组生物标志物的增加表达来区分:mir-21,mir-223,mir-146b,mir-224,mir-155,mir-7-2,mir-181b,mir-146a,mir-181,mir-7,mir-16,mir-122a,mir-125a和mir-16。

5. 权利要求1的用途,其中所述鳞状细胞癌中的癌组织和非癌组织通过下组生物标志物的减少表达来区分:mir-202,mir-29c,mir-30b,mir-30c,mir-126,mir-99a,mir-220,mir-320,mir-499,mir-30c,mir-125b,mir-1,mir-145,mir-143,mir-378,mir-200b,mir-133a,mir-375和mir-203。

6. 权利要求1-5任一项的用途,其中所述样品是血液或组织。

7. 权利要求6的用途,其中所述组织是食管组织。

8. 权利要求7的用途,其中所述食管组织选自肿瘤组织、非肿瘤组织和肿瘤邻近组织。

9. 权利要求1的用途,其中所述试剂是包含所述生物标志物的核苷酸序列或者所述生物标志物的核苷酸序列的互补核苷酸序列的多核苷酸或者识别由所述生物标志物编码的蛋白的抗体。

10. 包含miRNA特异性探针寡核苷酸的微阵列在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于诊断受试者是否患有食管鳞状细胞癌或处于发生食管鳞状细胞癌的风险中,其中所述试剂盒包括针对mir-155的探针。

11. 包含miRNA特异性探针寡核苷酸的微阵列在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于诊断受试者是否患有食管鳞状细胞癌或处于发生食管鳞状细胞癌的风险中,其中所述试剂盒包括针对下列的探针:

mir-21,mir-223,mir-146b,mir-224,mir-155,mir-181b,mir-146a,mir-133a,mir-375和mir-203。

12. 包含miRNA特异性探针寡核苷酸的微阵列在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于

诊断受试者是否患有食管鳞状细胞癌或处于发生食管鳞状细胞癌的风险中,其中所述试剂盒包括针对下列的探针:

mir-21,mir-223,mir-146b,mir-224,mir-155,mir-7-2,mir-181b,mir-146a,mir-181,mir-7,mir-16,mir-122a,mir-125a,mir-16,mir-202,mir-29c,mir-30b,mir-30c,mir-126,mir-99a,mir-220,mir-320,mir-499,mir-30c,mir-125b,mir-1,mir-145,mir-143,mir-378,mir-200b,mir-133a,mir-375和mir-203。

用于诊断和治疗食管腺癌的方法和组合物

[0001] 本申请是分案申请,母案的申请号为200880116343.7(国际申请号PCT/US2008/079482),申请日为2008年10月10日,发明名称为“用于诊断和治疗食管腺癌的方法和组合物”。

[0002] 发明人:Carlo M.Croce,Curtis C.Harris,Ewy A Mathè

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2007年10月11日提交的美国临时申请号60/979,300的权益,其全部公开内容明确地通过引用并入本文。

[0005] 关于联邦政府赞助的研究的声明

[0006] 本发明在National Cancer Institute Grant No.-----下得到政府支持。政府在本发明中具有某些权利。

[0007] 发明的技术领域和工业实用性

[0008] 本发明总的来说涉及分子生物学领域。更特别地,涉及牵涉食管癌和Barrett's食管(Barrett's esophagus)的生物标志物的方法和组合物。本发明的某些方面包括在Barrett's食管和食管癌(包括腺癌和鳞状细胞癌)的诊断、治疗和预后中的应用。

[0009] 发明背景

[0010] 不承认本节中公开的背景技术在法律上构成现有技术。

[0011] 食管癌是世界上第8大常见的癌症和第6大常见的癌症死亡原因¹。由于经常在晚期才被诊断出来,受影响的患者的存活率很低,在欧洲为10%²而在美国为16%。食管癌的发生率由于地理位置不同而非常不同(其中在中国、东南非洲和日本最常见),并且由于性别不同而不同(其中受影响的男性比女性更多(7:1的比率))⁴。然而最近几年,主要由胃反流和肥胖引起的Barrett's食管相关腺癌的发生率已经上升,而在美国主要由香烟和酒精消费引起的鳞状细胞癌的发生率已经下降⁴。

[0012] Barrett's食管由慢性胃-食管反流引起并且特征在于正常食管鳞状细胞上皮被化生柱状上皮取代。该慢性炎性病状是公认的食管腺癌的前兆^{5,6}。

[0013] miRNA是小的(20-24个核苷酸),非常保守的,非编码RNA分子,其调节mRNA的翻译⁷⁻⁹。自1993年在线虫(*C.elegans*)中发现第一个miRNA,lin-4¹⁰以来,记录的miRNA的序列已经从2002年的218种miRNA增加到2007年的4584种,包括灵长类、啮齿类、鸟类、鱼类、蠕虫、蝇类、植物和病毒中的miRNA^{11,12}。在人中,已经发现超过300种的miRNA。成熟miRNA从包含几百个碱基对的初级miRNA(pri-miRNA)分子产生,所述初级miRNA分子进一步通过细胞核中的Drosha和Pasha加工为pre-miRNA¹³⁻¹⁵。然后所述pre-miRNA输出到细胞质中并且进一步由Dicer加工成小的长度约22个核苷酸的RNA双链^{16,17}

[0014] 然后功能性miRNA链结合到RISC复合物内,所述的复合物包括Dicer,TRBP和Argonaute2蛋白^{3,18}。在动物中,该miRNA-RISC复合物经由部分序列互补性与它的靶mRNA结合,从而阻断翻译¹⁹。据认为,各个miRNA在数百种基因的转录后调节中起作用,并且给定基因的翻译阻断可能需要超过一种的miRNA的结合¹⁹。miRNA的广泛影响表明它们具有广泛的作用并且参与大多数的遗传和疾病途径。

[0015] 最近,越来越多的研究证明miRNA在不同的人癌症中的作用²⁰并且已经显示miRNA表达在大多数肿瘤类型中改变^{21,22}。另外,miRNA经常位于脆性位点(fragile sites)或癌症相关基因组区域^{23,24}。miRNA参与癌症首先在慢性淋巴细胞性白血病中报道,其中在~68%的肿瘤病例中mir-15和mir-16下调²⁵。后续的表达研究显示,mir-155²⁶和mir-17-92基因座²⁷参与B细胞淋巴瘤,结肠直肠癌中mir-143和mir-145的表达减少²⁸,胶质母细胞瘤中mir-21过表达²⁹,以及肺癌组织中let-7的表达减少并且它与存活率相关³⁰。最近,我们及其他人报道了let-7和miR-155牵涉肺癌诊断和预后(19-22)³¹并且miR-21的高表达与差的存活和结肠中的治疗结果有关[Schetter A, JAMA2008, PMID:18230780]。其他的表达特征谱研究允许鉴定胰腺癌³²、乳腺癌³³、和乳头状甲状腺癌³⁴中的miRNA特征。重要地,在小鼠³⁵和非人灵长类[Elmen J, Nature2008, PMID:18368051]中antagomirs用于沉默miRNA的成功使用表明miRNA在治疗中的可能用途。

[0016] 在食管癌背景中,最近的研究已经显示食管鳞状细胞癌患者的肿瘤样品中, RNASEN(细胞核中在pri-miRNA向pre-miRNA转化的水平上起作用的miRNA加工酶)的表达增加,这表明miRNA在食管肿瘤进程中起作用³⁶。最近,报道了鳞状食管、Barrett's食管、贲门和癌症间的miRNA差异表达,虽然它们的样本大小有限³⁷。

[0017] 对食管腺癌的生物学机制的更好的理解对于希望增加存活率的早期诊断和更有效的治疗选择是至关重要的。

[0018] 尽管对治疗这些疾病的疗法进行了相当多的研究,这些疾病仍然难以有效诊断和治疗,并且患者中观察到的死亡率表明疾病的诊断、治疗和预防需要改进。

[0019] 发明概述

[0020] 在第一个广泛的方面中,本文提供用于评估受试者的病理状况的方法,其包括测量一种或多种标志物的表达特征谱,其中差异表示食管癌和可以引起食管癌或对其的倾向的炎性前兆病状。

[0021] 在广泛的方面中,本文提供在受试者中检测食管腺癌、Barrett's食管和鳞状细胞癌中的一种或多种的方法。

[0022] 在另一个广泛的方面中,本文提供早期诊断怀疑患有食管腺癌、Barrett's食管或鳞状细胞癌的受试者的方法。

[0023] 在另一个广泛的方面中,本文提供确定受试者发生食管腺癌、Barrett's食管或鳞状细胞癌的可能性的方法。

[0024] 这些方法可以包括分析样品中与食管腺癌、Barrett's食管或鳞状细胞癌相关的至少一种生物标志物的改变的表达,和使所述至少一种生物标志物的改变的表达与样品中食管癌、Barrett's食管或鳞状细胞癌的存在或不存在相互关联,其中所述至少一种生物标志物选自本文列出的mir。

[0025] 在某些实施方案中,使用探针在样品中检测生物标志物,所述的探针选自本文列出的一种或多种mir探针。

[0026] 在某些实施方案中,所述关联区分下列的一种或多种:1)腺癌(ADC)患者中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);2)患有Barrett's食管(BE)的腺癌(ADC)患者中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);3)腺癌患者(ADC)中Barrett's食管(BE)和非Barrett's食管(NBE);4)鳞状细胞癌(SCC)中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);和5)癌组织(CT)中的腺癌(ADC)和鳞状细

胞癌(SCC)。

[0027] 在某些实施方案中,对于关联1),针对下列的一种或多种分析样品:选自mir-21, mir-223, mir-146a, mir-146b和mir-181a的至少一种生物标志物的增加的表达;和/或选自let-7c, mir-203和mir-205的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0028] 在某些实施方案中,对于关联2),针对下列的一种或多种分析样品:选自mir-21, mir-103和mir-107的至少一种生物标志物的增加的表达;和/或选自let-7c, mir-210, mir-203和mir-205的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0029] 在某些实施方案中,对于关联3),针对下列的一种或多种分析样品:选自mir-192, mir-215, mir-194, mir-135a, mir-92, mir-93, mir-7, mir-17, mir-20b, mir-107, mir-103和mir-191的至少一种生物标志物的增加的表达;和/或选自mir-30b, mir-193a, let-7b, let-7i, let-7d, let-7a, mir-369和let-7c的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0030] 在某些实施方案中,对于关联4),针对下列的一种或多种分析样品:选自mir-21, mir-223, mir-146b, mir-224, mir-155, mir-7-2, mir-181b, mir-146a, mir-181, mir-7, mir-16, mir-122a, mir-125a和mir-16的至少一种生物标志物的增加的表达;和/或选自mir-202, mir-29c, mir-30b, mir-30c, mir-126, mir-99a, mir-220, mir-320, mir-499, mir-30c, mir-125b, mir-1, mir-145, mir-143, mir-378, mir-200b, mir-133a, mir-375和mir-203的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0031] 在某些实施方案中,对于关联5),针对下列的一种或多种分析样品:选自mir-215, mir-192和mir-194的至少一种生物标志物的增加的表达;和/或选自mir-142, mir-224和mir-155的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0032] 样品可以是血液或组织,并且在某些实施方案中,所述组织是食管组织。组织可以选自肿瘤组织、非肿瘤组织和肿瘤邻近组织。

[0033] 在另一个广泛的方面中,本文提供治疗患有食管癌、Barrett's食管或鳞状细胞癌的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含与选自本文列出的mir的至少一种生物标志物互补的核酸。

[0034] 在另一个广泛的方面中,本文提供药物组合物,所述药物组合物包含与选自本文列出的mir的至少一种生物标志物互补的核酸。

[0035] 在另一个广泛的方面中,本文提供比较已经经历化学放射治疗的腺癌组织样品和没有经历化学放射治疗的癌组织样品的方法,其包括比较至少一种本文列出的mir的差异表达。

[0036] 在另一个广泛的方面中,本文提供比较鳞状细胞癌组织样品中的淋巴结转移(nodal involvement)的方法,其包括比较至少一种本文列出的mir的差异表达。

[0037] 在另一个广泛的方面中,本文提供比较鳞状细胞癌组织样品的分期的方法,其包括比较至少一种本文列出的mir的差异表达。

[0038] 在另一个广泛的方面中,本文提供诊断受试者是否患有食管癌,Barrett's食管或鳞状细胞癌或处于发生食管癌,Barrett's食管或鳞状细胞癌的风险中的方法,其包括测量来自受试者的受试样品中的至少一种mir的水平,其中与对照样品中对应的mir的水平相比,受试样品中mir水平的变化,指示受试者患有食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌或处于发生食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的风险中;其中所述mir选自一

种或多种本文列出的mir。

[0039] 在另一个广泛的方面中,本文提供在有此需要的受试者中抑制食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的方法,其包括施用至少一种选自本文列出的mir的基因。

[0040] 在另一个广泛的方面中,本文提供诊断受试者中与一种或多种预后标志物有关的食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的方法,其包括测量来自受试者的样品中至少一种mir的水平,其中与对照样品中相应的mir的水平相比,受试样品中所述至少一种mir的水平的变化指示受试者患有与一种或多种预后标志物有关的食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病;其中所述mir选自本文列出的mir。

[0041] 在另一个广泛的方面中,本文提供诊断受试者是否患有食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌或处于发生食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的风险中的方法,其包括:1)逆转录获自受试者的受试样品的RNA以提供一组靶寡脱氧核苷酸;2)将所述靶寡脱氧核苷酸与包含miRNA-特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供受试样品的杂交特征谱;和3)将受试样品的杂交特征谱与从对照样品产生的杂交特征谱相比较,其中至少一种mir的信号的改变表示受试者患有食管腺癌,或Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病或处于发展食管腺癌,或Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的风险中;其中mir选自本文列出的mir。在某些实施方案中,与从对照样品产生的信号相比,至少一种mir的信号下调。在某些其他的实施方案中,与对照样品产生的信号相比,至少一种mir的信号上调。

[0042] 在另一个广泛的方面中,本文提供治疗患病的受试者中的食管癌,Barrett's食管或鳞状细胞癌相关疾病的方法,其中与对照细胞相比,受试者的癌细胞中至少一种mir下调或上调,所述方法包括:1)当癌细胞中所述至少一种mir下调时,对受试者施用有效量的至少一种分离的mir,由此抑制受试者中的癌细胞的增殖;或2)当癌细胞中所述至少一种mir上调时,对受试者施用有效量的用于抑制所述至少一种mir的表达的至少一种化合物,由此抑制受试者中的癌细胞的增殖;其中所述mir选自本文列出的mir。

[0043] 在另一个广泛的方面中,本文提供治疗受试者的食管癌相关疾病的方法,其包括:1)测定与对照细胞相比,食管细胞中至少一种mir的量,其中mir选自本文列出的mir;和2)如下改变食管细胞中表达的mir的量:(i)如果食管细胞中表达的mir的量低于对照细胞中表达的mir的量,对受试者施用有效量的至少一种分离的mir;或(ii)如果食管细胞中表达的mir的量高于对照细胞中表达的mir的量,对受试者施用有效量的用于抑制所述至少一种mir的表达的至少一种化合物,从而抑制受试者中食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌细胞的增殖。

[0044] 在另一个广泛的方面中,本文提供了鉴定抗食管相关疾病试剂的方法,该方法包括对食管细胞提供受试试剂和测量与食管细胞中减少的表达水平关联的至少一种mir的水平,其中与合适的对照细胞相比,食管细胞中mir水平的增加表示受试试剂为抗癌试剂;其中所述mir选自本文列出的mir。

[0045] 在另一个广泛的方面中,本文提供用于评估受试者的病理状况或发生病理状况的风险的方法,其包括:测量来自受试者的样品中一种或多种标志物的表达特征谱,其中来自受试者的样品的表达特征谱和正常样品的表达特征谱的差异指示食管腺癌,Barrett's食

管或食管鳞状细胞癌或对其的倾向,其中所述标志物至少包括本文列出的一种或多种mir。

[0046] 在另一个广泛的方面中,本文提供组合物,所述组合物包含选自本文列出的mir的一种或多种mir。

[0047] 在另一个广泛的方面中,本文提供用于检测食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的试剂,其中所述试剂包括多核苷酸,所述多核苷酸包含本文列出的至少一种mir的核苷酸序列或与标志物的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

[0048] 在另一个广泛的方面中,本文提供用于检测食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的试剂,其中所述试剂包含识别由至少一种本文列出的mir编码的蛋白的抗体。

[0049] 在另一个广泛的方面中,本文提供评估预防、诊断和/或治疗食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的疗法的有效性的方法,其包括:1)对动物进行其有效性待评估的疗法,和2)通过评估本文列出的至少一种mir,确定待测试的疗法在治疗或预防食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌中的有效性水平。在某些实施方案中,候选治疗剂包含下列的一种或多种:药物组合物,营养食品组合物和顺势疗法组合物。在某些实施方案中,待评估的疗法用于人类受试者。

[0050] 在另一个广泛的方面中,本文提供一种制品,其包含:至少一种捕获试剂,所述捕获试剂与选自本文列出的至少一种mir的食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的标志物结合。

[0051] 在另一个广泛的方面中,本文提供用于筛选用于治疗食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的治疗剂的候选化合物的试剂盒,其中所述试剂盒包含:至少一种本文列出的mir的一种或多种试剂和表达至少一种mir的细胞。在某些实施方案中,使用包含特异性结合至少一种mir的抗体或抗体片段的试剂检测所述mir的存在。

[0052] 在另一个广泛的方面中,本文提供用于食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的筛选测试,其包括:将一种或多种本文列出的mir与所述mir的底物和与受试试剂接触,并且测定所述受试试剂是否调节所述mir的活性。在某些实施方案中,所有的方法步骤在体外进行。

[0053] 在另一个广泛的方面中,本文提供干扰食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的应答信号转导途径的试剂用于制备药物的用途,所述药物用于治疗、预防、逆转或限制个体中食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病并发症的严重性,其中所述试剂包含至少一种本文列出的mir。

[0054] 在另一个广泛的方面中,本文提供在有此需要的个体中治疗、预防、逆转或限制食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病并发症的严重性的方法,其包括将干扰至少食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病应答级联的试剂施用给个体,其中所述试剂包含至少一种本文列出的mir。

[0055] 在另一个广泛的方面中,本文提供干扰至少食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病应答级联的试剂用于制备药物的用途,所述药物用于治疗、预防、逆转或限制个体中的癌症相关疾病并发症的严重性,其中所述试剂包含至少一种本文列出的mir。

[0056] 在另一个广泛的方面中,本文提供用于诊断、预后和治疗食管癌和炎性前兆病状的新的方法和组合物。本发明还提供鉴定抗食管癌试剂和抗炎性前兆试剂的方法。

[0057] 当根据附图阅读时,根据优选实施方案的下列详细描述,本发明的各种目的和优势对本领域技术人员来说将变得显然。

[0058] 附图简述

[0059] 本专利或申请文件包含一个或多个以彩色制成的图和/或一幅或多幅照片。具有彩色附图和/或照片的本专利或专利申请公开案的拷贝将应请求且支付必要的费用后由 Patent Office 提供。

[0060] 图1A-1B:描述qRT-PCR miRNA表达和存活的关联的Kaplan-Meier分析。miRNA表达值划分为低组和高组,使用群组(cohort)内表达中值作为截断值(cutoff)。

[0061] 图1A:在没有Barrett's食管的ADC患者中观察到的关联。NCT中mir-203的减少的表达(N=11)与不良预后有关。用时序检验(logrank test)比较存活特征谱, $P \leq 0.05$ 表示统计学显著性。

[0062] 图1B:SCC患者中观察到的关联。在NCT中,mir-21(N=35),mir-155(N=35),mir-146b(N=35)和mir-181b(N=35)的增加的表达与不良预后有关,而CT中mir-375(N=35)的减少的表达与不良预后有关。

[0063] 图1C:差异表达的miRNA的比,显示倍数变化 <0.75 或 >1.25 。腺癌患者的癌组织(CT)和非癌组织(NCT)(1),患有Barrett's食管(BE)的ADC患者的CT和NCT(2),ADC患者的BE和非BE(NBE)的CT组织(3),SCC患者的CT和NCT(4),ADC和SCC患者的CT组织(5)之间的差异微阵列表达。色标相应于微阵列表达倍数变化。

[0064] 图2:比较癌组织和非癌组织时差异表达的miRNA的qRT-PCR验证。ADC患者(a)的和SCC患者(b)的癌组织(CT)和非癌组织(NCT)之间的相对对数表达差异。所有表达值针对RNAU66进行标准化。在ADC患者中,两个组中的mir-375的差异表达和训练组(training set)样品中的mir-194的差异表达是临界统计学显著的($0.005 < P < 0.05$),而所有其他的差异表达是统计学显著的($P < 0.005$)。在SCC患者中,验证组样品中的mir-181b,mir-155和mir-146b的差异表达和训练组样品中的mir-203的差异表达是临界统计学显著的,而所有其他的变化是统计学显著的。

[0065] 图3:比较腺癌病例的癌组织中的Barrett's食管(BE)和非Barrett's食管(NBE)时差异表达的mir的qRT-PCR验证。癌组织中BE和NBE之间的相对对数表达差异。所有表达值针对RNAU66进行标准化并且呈现的所有差异表达是临界统计学显著的($0.005 < P < 0.05$)。

[0066] 图4:ADC和SCC患者之间的癌组织中具有改变的表达的mir的qRT-PCR验证。ADC和SCC患者之间的癌组织中的相对对数表达差异。所有表达值针对RNAU66进行标准化并且此处图示的改变的表达是统计学显著的($P < 0.005$),除了训练组中的mir-375外($0.05 < P < 0.005$)。

[0067] 图5:表1:患者的临床,病理和人口统计学特征。

[0068] 图6:表2:训练组中mir探针的差异微阵列表达。

[0069] 图7:表3:用于评估mir的qRT-PCR表达水平和存活之间的关联的单变量和多变量Cox建模。

[0070] 图8:补充的表1显示比较腺癌样品的CT和NCT组织时,根据微阵列表达,代表成熟mir的差异表达的探针($P < 0.05$ 和DRF $< 10\%$)。

[0071] 图9:补充的表2:比较腺癌/Barrett's食管样品的CT和NCT组织时,根据微阵列表

达,代表成熟mir的差异表达的探针($P<0.05$ 和 $FDR<10\%$)。

[0072] 图10:补充的表3:比较Barrett's食管(BE)和非Barrett's食管(NBE)腺癌组织时,根据微阵列表达,代表成熟mir的差异表达的探针($P<0.05$ 和 $FDR<10\%$)。

[0073] 图11:补充的表4:比较已经经历化学放射治疗(CRT)的腺癌组织样品和没有经历化学放射治疗(nCRT)的样品时,根据微阵列表达,代表成熟mir的差异表达的探针($P<0.05$ 和 $FDR<10\%$)。

[0074] 图12:补充的表5:比较鳞状细胞癌样品的CT和NCT组织时,根据微阵列表达,代表成熟mir的差异表达的探针($P<0.05$ 和 $FDR<10\%$)。

[0075] 图13:补充的表6:比较鳞状细胞癌组织中的淋巴结转移($N=0$ 对 $N=1$)时,根据微阵列表达,代表成熟mir的差异表达的探针($P<0.05$ 和 $FDR<10\%$)。

[0076] 图14:补充的表7:比较鳞状细胞癌组织的分期(TNM0-I期对II-IV期)时,根据微阵列表达,代表成熟mir的差异表达的探针($P<0.05$ 和 $FDR<10\%$)。ADC和SCC患者之间的癌组织中的相对对数表达差异。所有表达值针对RNU66进行标准化并且此处图示的改变的表达是统计学显著的($P<0.005$),除了训练组中的mir-375外($0.05<P<0.005$)。

[0077] 图15:补充的表8:比较癌组织中的ADC和SCC样品时,根据微阵列表达,代表成熟mir的差异表达的探针($P<0.05$ 和 $FDR<10\%$)。

[0078] 图16:补充的表9:使用miRNA微阵列表达特征谱,根据其诊断、BE状态和组织学类别对样品进行的分类。

[0079] 图17:补充的表10:使用miRNA微阵列表达的最终PAM分类模型中使用的永存miRNA探针的列表

[0080] 图18:补充的表11:详细的单变量和多变量Cox模型。

[0081] 优选实施方案的详细描述

[0082] 本公开内容由始至终,通过标识引用来引用各种公开物、专利和公开的专利说明书。这些公开物、专利和公开的专利说明书的公开内容通过引用并入本公开内容以更充分地描述本发明所属领域的现有技术水平。

[0083] 在下列实施例中进一步定义本发明,其中,除非另有说明,所有部分和百分比以重量计并且温度是摄氏度。应理解,表示本发明的优选实施方案的这些实施例仅通过举例说明的方式给出。根据上述讨论和这些实施例,本领域技术人员可以确定本发明的本质特征,并且无需背离其精神和范围,可以对本发明进行多种变化和改进以使其适应不同的用法和条件。本说明书中涉及的所有公开物,包括专利和非专利文献明确地通过引用并入本文。

[0084] 用miRNA微阵列³⁸测量的肿瘤组织(CT)和邻近的非癌组织(NCT)对的miRNA表达水平用于评估CT和NCT组织之间以及Barrett's食管(BE)和非Barrett's食管(NBE)组织之间的表达差异。用qRT-PCR在包含CT/NCT对的独立群组中验证选择的成熟miRNA的表达差异。此外,我们评估miRNA作为临床病理结果(包括诊断、预后和Barrett's状态)的预测性生物标志物的用途。

[0085] 除研究食管腺癌之外,已经评估了鳞状细胞癌中的miRNA表达。我们已经鉴定并证实了腺癌和鳞状细胞癌患者中的癌组织和非癌组织miRNA之间的差异表达,并且成功地使用miRNA特征谱来预测诊断、Barrett's食管状态和组织学类型。显著地,我们鉴定了与存活有关的miRNA,其独立于其他已知的预后临床参数。因此,我们已经证明了miRNA、食管癌和

炎症之间的关联,并且提供了初步的证据证明它们作为早期诊断和预后生物标志物的潜在的临床应用。此外,这些miRNA可以用作新的个性化药物治疗的潜在的靶。

[0086] 与预后有关的微RNA(microRNA)表达水平可以进一步用于组织微阵列的原位杂交。该技术还允许高通量分析并且允许研究人员评估它是否可以改善微RNA生物标志物的预后用途。由于食管腺癌分期的模糊性和不确定性,miRNA预后预测物可以极大地帮助选择疗法。此外,人细胞系中的功能测定(借此特定的miRNA可以敲入或敲除)可用于评估肿瘤和Barrett's食管表型的变化。

[0087] 食管腺癌通常在晚期检测到并且通常与不良预后有关。可使个体易患Barrett's食管和/或食管腺癌的潜在的miRNA生物标志物可以提供早期检测的方法并且帮助更好地确定治疗方案。此外,antagomir已经成功地用于体内沉默miRNA,从而使得可能调节癌症相关基因的表达。因此,本申请为miRNA在鉴定新的药物靶和治疗中的可能用途打开了通道。

[0088] 本文中发明人进一步在大的群组中证明了miRNA参与人食管癌和Barrett's食管的发病机制,并且探究了它们与存活的关联。

[0089] 在下列实施例中进一步定义本发明,其中,除非另有说明,所有部分和百分比以重量计并且温度是摄氏度。应理解,表示本发明的优选实施方案的这些实施例仅通过举例说明的方式给出。根据上述讨论和这些实施例,本领域技术人员可以确定本发明的本质特征,并且无需背离其精神和范围,可以对本发明进行多种变化和改进以使其适应不同的用法和条件。本说明书中涉及的所有公开物,包括专利和非专利文献明确地通过引用并入本文。

实施例

[0090] 使用从划分为训练组和验证组的患者切除的癌组织(CT)和非癌组织(NCT),我们首先产生了miRNA微阵列³⁵特征谱,随后用qRT-PCR在所有样品中确认相关miRNA的表达差异。所有患者的临床特征在图5-表1中概括。

[0091] 对于ADC患者没有观察到两个群组中的临床变量之间的差异,而在SCC患者的群组之间观察到性别和分期的差异。首先评估训练组样品中的微RNA微阵列表达值,随后用qRT-PCR确认所有样品的微RNA微阵列表达值。

[0092] ADC病例中的微RNA的差异表达

[0093] 在32个CT和邻近的NCT对中评估对于ADC患者特异的miRNA微阵列表达水平的变化。图6-表2的上图列出了差异表达的miRNA($P < 0.05$, FDR < 10%),其探针包含成熟的miRNA序列。对miR-21,miR-223,miR-146a,miR-146b和miR-181a观察到增加的表达,并且对miR-203和miR-205检测到减少的表达。当评估Barrett's食管相关ADC患者时,miR-21,miR-103,miR-107和let-7c展示增加的表达,而miR-210,miR-203和miR-205展示减少的表达。在患有散发性ADC的患者中未鉴定到表达改变的miRNA。在Barrett's食管相关ADC和散发性ADC的CT之间,miR-192,miR-215,miR-194,miR-135a表达增加,而属于let-7家族的许多miRNA表达减少。

[0094] 许多差异表达的探针定位于脆性位点和癌症相关基因组区域(图8-补充的表1,图9-补充的表2,图10-补充的表3)。这些比较的miRNA倍数变化的可视化表示示于图1C中。

[0095] 用qRT-PCR在训练组样品的子集中测量的let-7a和let-7c的表达水平显示与微阵列的结果不一致。尽管如此,这些miRNA可保证进一步的研究,因为它们定位于脆性位点或

癌症相关基因组区域。此外,已经发现let-7在小鼠的肺中抑制肿瘤形成并且已在人肺癌组织中证明let-7的降低的表达和存活之间的关联。还在已经经历新辅助化学放射治疗和没有经历新辅助化学放射治疗的ADC患者的癌组织之间观察到差异表达。因为在组织采集前进行了治疗,所以不可能直接地将这些受影响的miRNA与治疗关联。当评估年龄、淋巴结转移、分期、吸烟状况和酒精消费时,没有观察到差异表达。

[0096] 用qRT-PCR验证选择的miRNA的表达测量值($P < 0.05$, $FDR < 10\%$, 并且最大倍数变化)。在训练组和验证组样品中证实了,与邻近的非癌组织相比,ADC癌组织中miR-21,miR-223的表达增加且miR-203和miR-375的表达降低(图2a)。

[0097] 此外,证实了Barrett's食管相关ADC患者和散发性ADC患者之间的癌组织中miR-194和miR-192的表达改变(图3)。与非癌组织相比,癌组织中这两种miRNA的增加的表达也增加,虽然这些变化在微阵列分析中不是统计学显著的。此外,与非癌组织相比,患有Barrett's食管的ADC患者在癌组织中显示miR-21,miR-192,miR-194的表达增加,并且miR-203的表达降低。这些miRNA的变化的表达也存在于未患Barrett's食管的患者中,但不具有统计学显著性(可能由于小的样本大小($N=14$))。

[0098] miRNA表达和存活之间的关联。

[0099] 为了更易于解释,基于群组内中值截断值划分来源于qRT-PCR的miRNA表达值(参见本文方法部分)。

[0100] 在ADC患者($N=73$)中没有观察到miRNA表达和存活之间的关联。当评估未患Barrett's食管的ADC患者时,非癌组织($N=22$)中miR-203的低表达与不良预后临界相关($HR=0.2$;95%置信区间[CI]=0.04-0.96),与结节状态和年龄无关($HR=0.2$;95%CI=0.04-1.02)(图5-表3,图18表11b)。

[0101] 经诊断患有Barrett's食管的ADC患者的miRNA表达与存活没有显示统计学显著的关联。

[0102] SCC病例中的微RNA的差异表达

[0103] 接着,在44个患者中调查对SCC特异的改变的miRNA表达。当比较癌组织和邻近的非癌组织时,观察到miR-21,miR-223,miR-146b,miR-224,miR-155,miR-181b,miR-146a的表达增加,而检测到miR-203,miR-375和miR-133a的表达降低($P < 0.05$ 和 $FDR < 10\%$)(参见图6-表2)。

[0104] 35%的探针定位于癌症相关基因组区域(图12-补充的表5)。当比较年龄,新辅助化学放射治疗的施用,吸烟和酒精消费状态时,没有观察到改变的表达。然而,在具有淋巴结转移的患者和具有低病理学TNM分期的患者的非癌组织中观察到改变的表达(图13-补充的表6)。差异表达的miRNA的倍数变化的可视概括在图1C中显示。

[0105] 用qRT-PCR确认所有可获得的病例(包括26个另外的验证组样品)中的表达测量结果。当比较癌组织和邻近的非癌组织时,确认miR-21,miR-181b,miR-155和miR-146b的表达水平增加而miR-203,miR-375的水平降低(图2b)。有趣地,在ADC样品中还观察到miR-21,miR-203的水平和miR-375的水平在癌组织中提高,这表明食管癌中这些miRNA的表达可能改变(无论组织学类型)。

[0106] miRNA表达和存活之间的关联。

[0107] 与对ADC患者的分析类似,基于各个群组内的中值截断值划分qRT-PCR表达值。

Kaplan-Meier分析显示非癌组织中miR-21的高表达(HR=4.99;95%CI=1.86-13.4)和不良预后之间存在统计学显著的关联(图1,图7-表3,图14-补充的表7)。

[0108] 非癌组织中miR-155(HR=3.15;95%CI=1.25-7.9),miR-146b(HR=2.72;95%CI=1.13-6.56)和miR-181b(HR=3.04;95%CI=1.21-7.67)的升高的水平显示与不良预后临界显著相关。此外,肿瘤组织中降低的miR-375的表达(HR=0.41;95%CI=0.17-0.95)与不良预后临界相关。多变量Cox建模显示miRNA表达和存活之间的关联与淋巴结转移和年龄无关。

[0109] ADC和SCC患者之间的微RNA的差异表达。

[0110] 当比较癌组织的组织学类型时,与SCC患者相比,在ADC患者中观察到miR-215,miR-192,miR-194的表达增加,而miR-155,miR-224和miR-142的表达降低(图4表2,图15-补充的表8和图1C)。

[0111] 在非癌组织中没有检测到差异表达,这表明不管组织学类型,邻近的非癌组织具有相似的miRNA特征谱。当仅考虑未患Barrett's食管的患者时,在SCC病例中观察到miR-192的表达增加而miR-155的表达减少($P<0.05$),但FDR升高了($>50\%$)。用qRT-PCR确认与SCC患者相比,ADC患者中miR-194和miR-192在癌组织中的表达水平增加(图4)。

[0112] 在我们的验证实验中还观察到与SCC患者相比,ADC患者的癌组织中miR-375的表达增加。这些miRNA的改变的表达表明在两种不同的组织学类型之间,癌细胞中根本的生物学机理可能不同,而且对各种组织学类型特异的治疗可能更有效。

[0113] 使用miRNA微阵列表达进行的样品分类。

[0114] 通过肿瘤状态和类型,通过将miRNA微阵列表达值输入微阵列预测分析(Prediction Analysis of Microarrays),对样品进行分类(图16-补充的表9)。当对ADC样品进行分类时,辨别癌组织与邻近的非癌组织时,获得71%的准确度($P=0.005$)。使用Barrett's食管相关ADC患者,准确度增加至77%($P=0.006$)而使用患有散发性ADC的患者,产生几乎随机的种类分配(58%的准确度),类似于上面描述的差异表达分析。此外,当对Barrett's食管相关ADC患者或散发性ADC患者的癌组织表达进行分类时,获得78%的准确度($P=0.003$)。如所意料的,当输入非癌组织中的表达时,获得随机的分类准确度。将SCC样品分类为癌组织和非癌组织产生86%的准确度($P<1e-4$),其基本上高于将ADC样品分类为它们的诊断类别时获得的准确度(71.2%)。

[0115] 这些发现表明ADC病例的miRNA特征谱比SCC案例的miRNA特征谱更不均一,其可能部分地由于Barrett's食管状态的差异。最后,使用癌组织和非癌组织表达特征谱,通过组织学对样品的分类分别产生82%和85%的准确度。重要地,对分类贡献最大的“永存”miRNA探针与显示差异表达的探针之间存在大的重叠(图17-补充的表10)。在所有情况下,使用所有探针的模型与除去“永存”探针后构建的模型之间的准确度的差异是统计学显著的($P<0.05$)。

[0116] 临床特征之间的差异表达。

[0117] 使用微阵列测量结果,与没有经历新辅助化学放射治疗的患者相比,在经历新辅助化学放射治疗的腺癌(ADC)患者的癌组织中观察到43种成熟miRNA探针的表达改变(图11-补充的表4)。然而,当比较非癌组织的新辅助化学放射治疗状态时,没有观察到差异表达。这些观察结果表明癌细胞中的miRNA表达可能受新辅助化学放射治疗影响,而邻近的非癌组织中的miRNA表达不受影响。此外,癌组织中被治疗改变的miRNA可能是抗治疗的肿瘤

的指示物。然而,这些假设只能通过比较施用化学治疗之前和之后的癌组织和邻近的非癌组织来验证。在所有这些病例中,化学放射治疗在手术前施用,因此在样品收集之前。

[0118] 在SCC患者中,当比较具有或不具有淋巴结转移的患者的非癌组织的表达水平时,19种探针显示差异表达(图13-补充的表6)。然而,当评估癌组织中的表达水平时,没有探针发生变化。这些观察结果表明miRNA调节和淋巴结转移之间可能存在关联,虽然ADC病例中不存在这些观察结果。尽管如此,与较高期病例相比(TNM II-IV期),在患有局限于食管内衬的肿瘤的较低期病例(TNM0-I期)的非癌组织中,也观察到差异表达。更具体地,在较低期病例中,包括mir-21的成熟序列的探针显示出升高的水平(图14-补充的表7)。与淋巴结状态类似,在癌组织中在分期之间没有观察到表达变化。

[0119] 在所有病例中,当比较已经经历化学放射治疗的患者和没有经历化学放射治疗的患者时,在癌组织中观察到差异表达(图18-补充的表11),而在非癌组织中没有。此外,因为治疗在手术切除前进行,所以难以直接评估表达差异是否仅仅是由于治疗。如在SCC患者中观察到的,在非癌组织中,在较低期(TNM0至I)和较高期(TNM II-IV)的病例之间,mir-21探针的表达变化。

[0120] 讨论

[0121] 本文实施例描述了这样的研究,其评估miRNA在食管癌中的潜在的诊断和预后用途。在143个癌组织和邻近的非癌组织对中评估了miRNA表达并且我们鉴定了对于将样品分类为诊断和Barrett's食管类别重要的miRNA。

[0122] 在SCC和ADC样品中独立地观察到miR-21的水平提高以及miR-203和miR-375的水平降低,这表明这些miRNA可能参与食管致癌作用,而与组织学类型无关。

[0123] 在癌组织中,在ADC患者中观察到miR-194,miR-192和miR-223的表达增加,而在SCC患者中检测到miR-181b,miR-155和miR-146b的表达增加。

[0124] 这些miRNA的改变的表达对于组织学类型是特异的,这表明组织学特异的治疗可能可以用于改善预后。

[0125] 使用qRT-PCR在所有样品中验证上述miRNA的表达水平。miR-21和miR-155的过表达引起极大的注意,因为他们在实体瘤(包括肺、乳腺、胃、前列腺、结肠、胰腺)和在慢性淋巴细胞性白血病中广泛地被诱导。miR-155的表达也在Burkitt's和B细胞淋巴瘤中提高,并且在应答小鼠的巨噬细胞驱动的炎症中被诱导,从而将miR-155在炎症和癌症中的作用联系在一起。miR-21靶向肿瘤和转移抑制基因,包括磷酸酶和张力蛋白同源物PTEN,肿瘤抑制基因原肌球蛋白1TPM1,程序性细胞死亡4PDCD4以及Sprouty2,从而证明它参与肿瘤生长、侵袭和转移。

[0126] miR-155还是肺癌的预后预测物(prognostic predictor)而且升高的miR-21癌/非癌比值表达水平与结肠癌的不良预后和治疗结果有关。此外,miR-181b在慢性淋巴细胞性白血病中差异表达并且负调节癌基因Tcl1的表达,并且miR-146b受促炎细胞因子诱导并且在Toll样受体和细胞因子信号转导中起作用。这些及其他结果证明miRNA和炎性细胞因子之间存在调节的相互影响。

[0127] 本文中发明人现证明SCC患者的非癌组织中miR-21的改变的水平与存活相关,这表明miR-21可能对SCC肿瘤具有间接的影响。之前我们已经确定,肺ADC患者的非癌组织和癌组织中细胞因子表达的组合是存活的预测物,这表明肿瘤和其周围肺环境之间可能存在

相互作用。此外,越来越多的证据证实miRNA在调节先天和获得性免疫应答中的作用。特别地,miR-21的表达与免疫相关疾病(包括B细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病)有关。此外,最近的研究证明了白介素-6对miR-21诱导的依赖于Stat3的作用,其促成Stat3的致癌潜力。因此,我们发现的非癌组织中miR-21的增加的水平与不良预后有关可能是与肿瘤发生有关的免疫应答的反映。

[0128] 与我们的观察结果一致,最近的基于7个患者的群组的研究报道,miR-21在ADC中过表达,miR-143在ADC中表达不足,而miR-194在Barrett's食管中过表达(30)。该研究还报道,miR-203,miR-205,miR-143和miR-215在Barrett's食管中过表达(这在我们的分析中没有观察到)。

[0129] 也与我们的结果一致,另一项研究报道了20个病例和9个正常上皮组织的分析并且揭示癌组织中,两种组织学亚型中,miR-21过表达且miR-203和miR-205表达不足(70)。

[0130] 评估SCC患者中的miRNA表达的之前研究中,miR-103和miR-107的高表达与30位患者的不良存活有关,该发现在22位SCC患者的独立组中得到证实(71)。这些结果与我们的分析不一致,可能由于他们使用了不同的微阵列平台和更有限的样本量。

[0131] 用于该实施例的患者中54%进行了新辅助化学放射治疗(在手术之前)并且患者中22%有完全病理应答,这限制了我们排除治疗对miRNA表达和诊断/预后之间的关联的作用的能力。值得注意地,具有完全病理应答的患者并非必然地被治愈,可能由于保持全身性过程或未能检测小的转移性疾病(72)。这些患者的存活率低于普通群体的存活率,并且此类患者是否具有比无完全病理应答的患者更长的存活仍存在争论(73)。该观察结果进一步证明鉴定分子生物标志物(例如miRNA)的重要性,所述标志物将有助于改进分期和预测治疗应答。此外,虽然长期酒精消费和吸烟可能对食管癌患者产生不利影响(74)(75),但是由于缺少值(对于吸烟和酒精消费,分别有16%和23%缺少值),我们未能充分地评估这些变量在我们的多变量Cox分析中的影响。

[0132] 这些实施例证明miRNA在食管癌中的作用并且鉴定了其表达在SCC和ADC癌组织中和之间,以及在Barrett's相关ADC癌组织和散发性ADC癌组织之间的癌组织中发生改变的miRNA。

[0133] 这些实施例还显示非癌组织中升高的miR-21水平与不良预后之间存在关联,从而表明miR-21,免疫应答和SCC之间的可能的关联。miRNA表达在非癌组织中的预后关联特别引人注意,因为这些miRNA的改变的水平在疾病晚期和症状出现之前可能是明显的。较不侵袭性的组织活检的miRNA表达水平可用于评估哪些患者可能受益或可能不受益于食管的手术切除(非常侵袭性的方法)。阻断miRNA转录的能力可以为miRNA在鉴定用于食管癌的新的药物靶和治疗中的可能用途打开了通道。

[0134] 材料和方法

[0135] 临床样品。

[0136] 总共143位患者被划分为训练组和验证组,所述患者具有可获得的来自手术切除的癌组织和邻近的非癌组织。训练组包括44个SCC病例和32个ADC病例,其中18个还被诊断为患有Barrett's食管,而验证组包括26个SCC病例和41个ADC病例,其中30位患者还被诊断为患有Barrett's食管。患者来自3个不同的群组:(1)巴尔的摩,MD的University of Maryland Medical System,(2)日本东京的Nippon Medical School,(3)美国纽约的New

York Presbyterian-Weill Cornell Medical Center。采集自Maryland群组的样品被分成两组:MD群组1归为训练组而MD群组2归为验证组(图5-表1)。

[0137] 从病历,病理学报告,State of Maryland记录和National Death Index获得疾病分期和存活情况。这些研究经参与机构的伦理审查委员会(Institutional Review Boards)批准。与该研究有关的临床病理数据由它们各自的来源提供并且包括性别、年龄、组织学、Barrett's食管的存在/不存在,新辅助化学放射治疗施用、酒精消费、吸烟状况和病理学分期(图5-表1)。

[0138] RNA分离和miRNA定量

[0139] 根据制造商的方法,利用TRIZOL(Invitrogen,cat.no.15596-026)在我们的实验室中从食管组织提取总RNA,用于定量miRNA水平。利用miRNA微阵列芯片版本3(Ohio State University)测量miRNA表达水平,所述芯片一式两份地包括329种人miRNA和249种小鼠miRNA探针(1)。将5 μ g总RNA转化为生物素标记的第一链cDNA,在芯片上进行杂交,并且通过直接检测包含生物素的转录物(经链霉抗生物素蛋白-Alexa647缀合物)进行处理。随后,用Axon4000B扫描仪(Molecular Device,Inc.)扫描载玻片并且用Genepix(版本Pro6.0.1.00)定量斑点强度。按照MIAME指南,将微阵列数据提交给Gene Expression Omnibus。

[0140] 利用Taqman miRNA逆转录测定法(Applied Biosystems,cat.no.4366596)和适当的引物,按照制造商的说明书,通过qRT-PCR验证miRNA的改变的水平。简单地说,将10ng总RNA用作模板,用于15 μ l的逆转录反应,所述反应使用为特定成熟miRNA特别设计的探针。使用7500RT-PCR系统(Applied Biosystems)对每种miRNA进行一式三份的反应并且将RNU66(Applied Biosystems,cat.no.4373382)用作对照。

[0141] 统计分析

[0142] 差异表达

[0143] 在R(版本2.6.0)(用于统计计算和制图的免费软件环境(2))中进行miRNA微阵列表达值的预处理和标准化,并且在Richard Simon博士和Amy Peng Lam开发的BRB ArrayTools(版本3.5.0)中进行差异表达分析(<http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>)。通过使用R,针对未被图象定量软件GenePix(版本Pro6.0.1.00)标记的点,提取各个样品的平均斑点强度值。此外,如果其背景强度高于其各自的前景强度,以及如果一式四份的斑点强度值相异超过1(在log2标尺上),则移除点。然后用针对单通道阵列数据改进的loess标准化法对剩余的斑点进行标准化,其中通过该斑点在所有阵列中的均值评估真实斑点强度(true spot intensity)。对各个阵列拟合loess曲线($z \sim$ “均值”),其中 z 为各个斑点在给定阵列中的强度,而均值为评估的真实斑点强度。然后通过将实际斑点强度减去预测值(获自拟合的loess曲线)获得标准化的斑点强度。

[0144] 将一式两份的斑点强度值平均以后,将标准化的数据输入BRBArrayTools(版本3.6.0)并且随后的分析限于具有存在于至少25%的样品中的强度值的人miRNA探针。用Class Comparison Tool(其进行t检验,并且认为 $P < 0.05$ 和相应的假发现率 $< 10\%$ 的表达变化是统计学显著的)测定miRNA探针的改变的表达。当比较癌组织和邻近的非癌组织的表达时,进行配对t检验,而具有按日期的随机区组设计的t检验用于所有其他比较。按日期的随机区组设计控制可能的日期偏好,以确保差异表达不受微阵列杂交和扫描的日期混淆。

[0145] qRT-PCR用于验证10%的随机选择的训练组样品中的13种miRNA的微阵列表达测量结果。表达量针对RNU66的量进行标准化。我们首先主张这些测量结果与训练组样品中来自微阵列的测量结果一致(统计学显著的和相同趋势的倍数变化)。其次,我们测量独立的验证组样品中的表达以进一步验证表达变化。确定9种miRNA的两个测量结果之间的一致性(统计学显著的和相同趋势的倍数变化),所述9种miRNA的表达随后在所有剩余的样品中用qRT-PCR进行测量。表达量针对RNU66的量进行标准化并且进行双侧配对或非配对t检验(分别用于比较癌组织和邻近的非癌组织,以及用于所有其他比较)。

[0146] 存活分析

[0147] 为了易于解释,使用各群组(即MD群组,日本群组和Cornell群组)内的中值表达值作为截断值,将miRNA表达值划分为高和低。构建Kaplan-Meier曲线并且用Mantel-Haenszel或时序检验评估存活差异。为了检验比例危险假定,使用R函数cox.zph(),将其将Schoenfeld残差(scaled Schoenfeld residuals)与适当的时间转化关联。进行单变量和多变量Cox分析以评估临床变量和预后之间的关联,且调整相关临床变量。

[0148] 多变量Cox模型包括临床协变量(covariate),所述临床协变量与单变量分析中的存活有关或已知为重要的临床变量(根据之前的公开物)。特别地,之前已经显示与存活有关(3)的淋巴结转移,和年龄包含于最终的多变量模型中。

[0149] 为了确保每组足够量的事件,组合验证群组 and 检验群组。虽然当单独分析时,对于给定的miRNA,危险比在两个群组中都显示相同的趋势,但是P值超过0.05(数据未显示),很可能由于每层的事件数量不足。重要地,对于miRNA表达和存活之间的所有统计学显著的关联,在显示完全病理应答和没有显示完全病理应答的患者之间没有观察到存活差异。当 $P < 0.005$ 时(相当于对9个多重比较应用严格Bonferroni校正后 $P < 0.05$),获得表达验证和存活分析的统计学显著性,并且当 $0.005 < P < 0.05$ 时,获得临界统计学显著性。

[0150] 分类

[0151] 利用R软件包“pamr”(版本1.34.0),微阵列预测分析(PAM)(4),根据肿瘤状态、组织学和Barrett's食管状态对样品进行分类。使用软件包程序“pamr.knnimpute”输入缺失的强度值,其使用最近邻平均算法。运行20次PAM迭代,并且对于每次迭代,计算10倍交叉验证(CV)的准确度。此外,对于每次迭代,记录用于最终模型的miRNA探针的列表,并且“永存”miRNA探针定义为在至少80%的迭代中在最终模型中出现的miRNA探针。为了进一步评估永存探针对于分类的重要性,从总探针列表中除去它们并且重复20次迭代。相似地,对于使用该精简组探针构建的模型,记录10倍CV百分比准确度,并且将这些准确度与从使用所有探针构建的模型获得的准确度相比。

[0152] 进行两种检验以评估模型的鲁棒性(robustness)。首先,自举(bootstrap)法用于评估再抽样(置换原始数据)的CV百分比准确度的分布(10,000次迭代)。为了评估获得的百分比准确度是否不是随机的,根据自举分布评估获得小于或等于50%的百分比准确度的概率。其次,为了评估在使用所有探针的模型和使用除永存探针以外的所有探针的模型之间观察到的准确度的差异,根据自举评估的分布计算获得小于或等于0的准确度差异的概率。根据自举评估的分布计算报道的置信区间。

[0153] 样品在每个种类中的极大不同的数目可以人为地导致高准确度。为了校正这种人工假象,将每个种类的先验概率校正用于PAM模型,其本质上扩大新样品和不同种类之间的

判别得分并且平衡真假阳性率。为了确定最优先验组(对于每个种类),我们使用不同的先验组运行PAM(即 $[0,1]$, $[0.01,0.99]$, $\dots$, $[1,0]$)并且构建ReceivingOperating Curve(其标绘假阳性率对真阳性率)。通过鉴定凸包上的点同时最小化假阳性率和最大化真阳性率,客观地确定最优先验组。

[0154] 用途实施例

[0155] 在一个方面,本发明提供用于预测患有癌症的受试者的存活的方法。该预测方法基于癌细胞中多个作为生物标志物的mir的差异表达。应理解,术语“生物标志物”可以与术语“mir”、“mirs”、“miR”、“miRNA”和“基因产物”互换。

[0156] 已发现一些生物标志物倾向于过表达,而其他的生物标志物倾向于表达不足。来自患有癌症的受试者的细胞样品中,这些生物标志物的独特的表达模式可以用于预测该受试者的相关存活时间和预后。

[0157] 用于预测患有癌症的受试者的存活的方法

[0158] 本发明的一个方面提供用于预测癌症存活的方法。该方法包括测定来自患有癌症的受试者的细胞样品中至少一个生物标志物(或在某些实施方案中,多个生物标志物)的差异表达。癌症的生物标志物表达特征可以用于推算风险评分,所述风险评分预测该癌症的存活。所述评分可以指示低风险,这样受试者可能长期存活(即5年以上),或所述评分可以指示高风险,这样受试者可能不能长期存活(即小于两年)。

[0159] 存活相关生物标志物

[0160] 一些生物标志物在长期存活者中过表达而一些生物标志物在短期存活者中过表达。通过影响细胞粘附、细胞运动、或炎症和免疫应答生物标志物可能在癌症转移中起作用。生物标志物还可能参与细胞凋亡。生物标志物可能在转运机制中起作用。生物标志物还可能与其他种类的癌症的存活有关。

[0161] 测量多个生物标志物的表达

[0162] 一种方法包括测量来自患有癌症的受试者的细胞样品中多个存活相关生物标志物的差异表达。然后,各种癌症中不同的表达模式,或基因表达特征,可以用于产生预测癌症存活的风险评分。与其他患有癌症的受试者相比,受试者中生物标志物的表达水平可以增加或减少。生物标志物在长期存活者中的表达可以比在短期存活者中的更高。可选地,生物标志物在短期存活者中的表达可以比在长期存活者中的更高。

[0163] 可以通过本领域公知的各种技术测量多个生物标志物的差异表达。生物标志物的信使RNA(mRNA)的水平的定量可以用于测量所述生物标志物的表达。可选地,生物标志物的蛋白产物的水平的定量可以用于测量所述生物标志物的表达。关于下述方法的另外的信息可见于Ausubel等(2003)Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,NY或Sambrook等(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY中。本领域技术人员将知道可以操作哪些参数来优化目的mRNA或蛋白的检测。

[0164] 核酸微阵列可以用于定量多个生物标志物的差异表达。可以按照制造商的方案使用商购可获得的设备,例如通过使用Affymetrix **GeneChip®** 技术(Santa Clara,CA)或来自Incyte的Microarray System(Fremont,CA)进行微阵列分析。一般地,将单链核酸(例如cDNA或寡核苷酸)铺板或排列在微芯片基质上。然后将排列的序列与来自目的细胞的特

定核酸探针杂交。可以通过逆转录从目的细胞提取的RNA经由掺入荧光标记的的脱氧核苷酸产生荧光标记的cDNA探针。可选地, RNA可以通过体外转录进行扩增并且用标志物(例如生物素)标记。然后在高严格条件下将标记的探针与微芯片上固定的核酸杂交。在严格清洗以除去非特异性结合的探针后, 通过共聚焦激光显微镜或通过另一种检测方法(例如CCD照相机)扫描芯片。一般地, 杂交文件中的原始荧光强度数据用鲁棒多芯片均值(RMA)算法进行预处理以产生表达值。

[0165] 定量实时PCR(qRT-PCR)也可以用于测量多个生物标志物的差异表达。在qRT-PCR中, 通常将RNA模板逆转录为cDNA, 然后cDNA经由PCR反应扩增。实时地逐个循环地追踪PCR产物的量, 这允许确定mRNA的起始浓度。为了测量PCR产物的量, 反应可以在结合双链DNA的荧光染料(例如SYBR Green)的存在下进行。反应还可以用特异于待扩增的DNA的荧光报告探针进行。荧光报告探针的非限制性实例是**TaqMan®**探针(Applied Biosystems, Foster City, CA)。当淬灭剂在PCR延伸循环期间除去时, 荧光报告探针发出荧光。可以通过使用多个基因特异性报告探针进行多重qRT-PCR, 其中每一个探针包含不同的荧光团。在各个循环期间记录荧光值并且荧光值代表扩增反应中扩增至该点的产物的量。为了使误差最小化并且降低任何样品间变异, 通常使用参照标准进行QRT-PCR。理想的参照标准在不同的组织间以恒定水平表达, 并且不受实验处理的影响。适当的参照标准包括但不限于持家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和 β -肌动蛋白的mRNA。可以使用本领域公知的计算来测定起始样品中的mRNA水平或各个生物标志物的表达的倍数变化。

[0166] 免疫组织化学染色也可以用于测量多个生物标志物的差异表达。该方法通过蛋白与特异性抗体的相互作用, 允许确定蛋白在组织切片的细胞中的位置。对于该方法, 组织可以在甲醛或另一种适当的固定剂中进行固定, 在石蜡或塑料中进行包埋, 并且用切片机切成薄片(厚度约0.1mm至几mm)。可选地, 组织可以使用冰冻切片机(cryostat)进行冷冻并切成薄片。组织切片可以排列并且附着在固体表面上(即组织微阵列)。将组织切片与抗目的抗原的一抗一起温育, 然后清洗以除去未结合的抗体。一抗可以偶联至检测系统, 或一抗可以用与检测系统偶联的二抗检测。检测系统可以是荧光团或其可以是酶(例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶), 其可以将底物转化为比色、荧光或化学发光产物。通常在显微镜下扫描染色的组织切片。因为来自患有癌症的受试者的组织样品可能是异质的, 即, 一些细胞可能是正常细胞而其他细胞可能是癌细胞, 所以可以测定组织中阳性染色的细胞的百分比。该测量, 与染色强度的定量一起, 可以用于产生生物标志物的表达值。

[0167] 酶联免疫吸附测定或ELISA可以用于测量多个生物标志物的差异表达。存在许多ELISA测定的变种。所有的ELISA测定基于抗原或抗体在固体表面(一般是微量滴定板)上的固定。最初的ELISA方法包括制备包含目的生物标志物蛋白的样品, 用所述样品包被微量滴定板的孔, 将各个孔与识别特定抗原的一抗一起温育, 洗掉未结合的抗体, 然后检测抗体-抗原复合物。可以直接检测抗体-抗体复合物。为此, 将一抗缀合至检测系统, 例如产生可检测的产物的酶。可以间接地检测抗体-抗体复合物。为此, 如上所述, 通过与检测系统缀合的二抗来检测一抗。然后扫描微量滴定板并且原始强度数据可以用本领域已知的方法转化为表达值。

[0168] 抗体微阵列也可以用于测量多个生物标志物的差异表达。为此, 将多个抗体排列并且共价连接到微阵列或生物芯片的表面。通常用荧光染料标记包含目的生物标志物蛋白

的蛋白质提取物。将标记的生物标志物蛋白质与抗体微阵列一起温育。在清洗以除去未结合的蛋白后,扫描微阵列。可以用本领域已知的方法将原始荧光强度数据转化为表达值。

[0169] Luminex multiplexing微球也可以用于测量多个生物标志物的差异表达。这些微小的聚苯乙烯珠用荧光染料进行内部颜色编码,从而每个珠具有独特的光谱特征(多达100种)。具有相同特征的珠用特定寡核苷酸或特定抗体进行标记,所述寡核苷酸或抗体将与目的靶(即分别地,生物标志物mRNA或蛋白)结合。所述靶依次还用荧光报告分子进行标记。因此,存在两种颜色来源,一种来自珠而另一种来自靶上的报告分子。然后将珠与包含靶的样品一起温育,在一个孔中可以检测到多达100种靶。珠的小的尺寸/表面面积和珠对靶的三维暴露在结合反应期间允许几乎液相的动力学。通过基于流式细胞术的高技术射流技术检测捕获的靶,其中激光激发识别各个珠的内部染料以及测定期间捕获的任何报告染料。可以用本领域已知的方法将来自采集文件的数据转化为表达值。

[0170] 原位杂交也可以用于测量多个生物标志物的差异表达。该方法允许定位组织切片的细胞中的目的mRNA。为此,组织可以进行冷冻或固定,并且包埋,然后切成薄片(其进行排列并且附着到固体表面)。组织切片与标记的反义探针(其与目的mRNA杂交)一起温育。通常在高严格条件下进行杂交和清洗步骤。探针可以用荧光团或小的标签(例如生物素或地高辛)进行标记,所述标签可以通过另一种蛋白或抗体检测,从而标记的杂交物可以在显微镜下进行检测和可视化。可以同时检测多种mRNA,只要各个反义探针具有可区分的标记。一般地,在显微镜下扫描杂交的组织阵列。因为来自患有癌症的受试者的组织样品可能是异质的,即,一些细胞可能是正常细胞而其他细胞可能是癌细胞,所以可以测定组织中阳性染色的细胞的百分比。该测量结果,与染色强度的定量一起,可以用于产生各个生物标志物的表达值。

[0171] 在来自患有癌症的受试者的细胞样品中测量其表达的生物标志物的数量可以变化。因为预测的存活评分基于生物标志物的差异表达,当测量更多的生物标志物的表达时,将获得更高的准确度。

[0172] 从患有癌症的受试者获得细胞样品

[0173] 在来自患有癌症的受试者的细胞样品中测量多个生物标志物的表达。癌症的类型和分类可以并且将不同。癌症可以是早期癌症,即I期或II期,或其可以是晚期癌症,即III期或IV期。

[0174] 一般地,可以通过活组织检查或手术切除从患有癌症的受试者获得细胞样品或组织样品。活组织检查的类型可以并且将不同,这取决于癌症的位置和性质。可以通过针吸活检取出细胞、组织或体液样品。为此,连接到注射器的细针刺穿皮肤并且插入目的器官或组织。一般地,用超声或计算机断层成像指导针到达目的区域。当针插入组织中时,用注射器产生真空,从而细胞或体液可以通过针吸取并且收集到注射器中。还可以通过切取或核心活检取出细胞或组织样品。为此,从目的区域取出锥形、圆柱形或微小的组织。通常用计算机断层成像、超声或内窥镜指导这类活组织检查。最后,可以通过切除活检或手术切除取出整个癌损伤。

[0175] 一旦从患有癌症的受试者中取出了细胞样品或组织样品,就可以用本领域公知的和标准分子生物学参考书(例如Ausubel等,(2003)Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, New York, NY)中公开的技术处理所述样品以分离RNA或蛋白。

还可以保存或迅速冷冻组织样品并且在-80℃贮存备用。还可以用固定剂,例如甲醛、多聚甲醛或乙酸/乙醇固定活组织检查的组织样品。可以将固定的组织样品包埋到蜡(石蜡)或塑料树脂中。可以将包埋的组织样品(或冷冻组织样品)切成薄片。也可以从固定的或石蜡包埋的组织样品中提取RNA或蛋白。

[0176] 患有癌症的受试者通常是哺乳动物受试者。哺乳动物可以包括灵长类动物、家畜动物和伴侣动物。非限制性实例包括:灵长类动物可以包括人、猿、猴子和长臂猿;家畜动物可以包括马、牛、山羊、绵羊、鹿和猪;伴侣动物可以包括狗、猫、兔和啮齿类动物(包括小鼠、大鼠和豚鼠)。在示例性实施方案中,受试者是人。

[0177] 产生风险评分

[0178] 在某些实施方案中,本发明的生物标志物与癌症存活有关。多个此类生物标志物的不同的表达模式可以用于预测患有癌症的受试者的存活结果。某些生物标志物倾向于在长期存活者中过表达而其他生物标志物倾向于在短期存活者中过表达。受试者中多个生物标志物的独特的表达模式(即表达特征)可以用于产生存活的风险评分。具有高风险评分的受试者在手术切除后可能具有短的存活时间(<2年)。具有低风险评分的受试者在手术切除后可能具有较长的存活时间(>5年)。

[0179] 无论用于测量多个生物标志物的差异表达的技术,通常将各个生物标志物的表达转换为表达值。然后,利用本领域公知的统计方法,将这些表达值用于计算患有癌症的受试者的存活的风险评分。还可以利用单变量Cox回归分析计算风险评分。在一个优选的实施方案中,可以利用部分Cox回归分析计算风险评分。

[0180] 通过部分Cox回归分析产生的评分分为两组:1)具有正值的评分;和2)具有负值的评分。具有正值的风险评分与短的存活时间相关,而具有负值的风险评分与长的存活时间相关。

[0181] 在该方法的一个实施方案中,可以通过手术切除从患有早期癌症的受试者中取出组织样品。组织样品可以保存在RNAlater中或进行快速冷冻,从而可以在之后进行RNA分离。RNA可以用作qRT-PCR的模板,在所述qRT-PCR中分析多个生物标志物的表达,并且利用部分Cox回归分类法,将表达数据用于推导风险评分。风险评分可以用于预测受试者是短期的还是长期的癌症存活者。

[0182] 在该方法的特别优选的实施方案中,可以从患有早期癌症的受试者采集组织样品。可以从所述组织分离RNA并且将其用于产生标记的探针以用于核酸微阵列分析。利用部分Cox回归分类法,从微阵列分析产生的表达值可以用于推导风险评分。风险评分可以用于预测受试者是短期的还是长期的癌症存活者。

[0183] 用于确定患病受试者的预后的方法

[0184] 本发明的另一个方面提供用于确定患有癌症的受试者的预后的方法。所述方法包括测量来自受试者的细胞样品中一个或多个生物标志物的差异表达。将各个生物标志物的差异表达转换为表达值,并且如上所述,利用统计方法,将表达值用于推导受试者的评分。具有正值的评分表示不良预后或不良结果,而具有负值的评分表示良好预后或良好结果。

[0185] 在该方法的一个实施方案中,通过核酸微阵列分析产生患有早期癌症的受试者的表达特征,并且将表达值用于计算评分。计算的评分可以用于预测受试者将具有癌症结果的良好预后还是不良预后。

[0186] 用于选择用于患有癌症的受试者的治疗的方法

[0187] 本发明的另一个方面提供用于选择用于患有癌症的受试者的有效治疗的方法。在计算出受试者的风险评分后,该信息可以用于决定对于受试者适当的疗程。具有正风险评分(即短的存活时间或不良预后)的受试者可能受益于侵入性治疗方案。侵入性治疗方案可以包括一种或多种适当的化学治疗剂。侵入性治疗方案还可以包括放射治疗。治疗方案可以并且将不同,这取决于癌症的类型和分期。具有负风险评分(即长的存活时间或良好预后)的受试者可能不需要额外的治疗,因为受试者不太可能发生复发的癌症。

[0188] 在其中一种或多种试剂抑制微RNA的表达或活性,抑制微RNA的一种或多种靶基因的表达,或抑制其组合的条件下维持细胞,从而抑制细胞的增殖。

[0189] 还提供鉴定可用于抑制癌细胞的增殖的试剂的方法。所述方法包括将一种或多种微RNA与待评估的试剂接触;将一种或多种靶基因与待评估的试剂接触;或接触其组合。如果微RNA的表达在所述试剂存在的情况下被抑制;或如果靶基因的表达在所述试剂存在的情况下增加,或在所述试剂存在的情况下发生其组合,那么所述试剂可用于抑制滤泡性甲状腺癌细胞的增殖。

[0190] 鉴定治疗剂的方法

[0191] 本文还提供鉴定可用于治疗有此需要的患者的试剂的方法。所述方法包括将一种或多种微RNA与待评估的试剂接触;接触一种或多种微RNA的一种或多种靶基因;或接触其组合。如果微RNA的表达在所述试剂存在的情况下被抑制;或如果靶基因的表达在所述试剂存在的情况下增加,或在所述试剂存在的情况下发生其组合,那么所述试剂可用于抑制滤泡性甲状腺癌细胞的增殖。

[0192] 可以在本文提供的方法中进行评估的试剂包括miRNA抑制剂。所述试剂的其他实例包括药剂、药物、化学化合物、离子化合物、有机化合物、有机配体(包括辅因子)、糖类、重组和合成肽、蛋白质、类肽、核酸序列(包括基因)、核酸产物、以及抗体和其抗原结合片段。可以单独筛选所述试剂,或可以根据本文的方法同时检测一种或多种化合物。可以检测通过组合化学合成或其他方法产生的化合物(例如有机化合物、重组或合成肽、类肽、核酸)的大的组合文库。当从组合文库选择的化合物携带独特的标签时,通过层析方法鉴定单独的化合物是可能的。还可以根据本文的方法检测(筛选)化学文库、微生物肉汤和噬菌体展示文库。

[0193] 用于预测受试者的存活或预后的试剂盒

[0194] 本发明的另一个方面提供用于预测患有癌症的受试者的存活或预后的试剂盒。试剂盒包括用于测量一个或多个生物标志物的差异表达的多种试剂,用于将表达数据转换为表达值的方法和用于分析表达值以产生预测存活或预后的评分的方法。试剂盒中用于测量生物标志物表达的试剂可包括一系列与生物标志物的mRNA互补的多核苷酸。在另一个实施方案中,试剂盒中用于测量生物标志物表达的试剂可包括用于qRT-PCR的多个PCR探针和/或引物。

[0195] 本发明还涉及用于检测个体中的癌症的试剂盒,其包括一种或多种试剂,所述试剂用于检测1)一种或多种微RNA;2)一种或多种微RNA的一种或多种靶基因;3)由靶基因表达的一种或多种多肽,或4)其组合。例如,试剂盒可以包括杂交探针、限制性酶(例如用于RFLP分析),等位基因特异性寡核苷酸,和与靶基因表达的多肽结合的抗体。

[0196] 在特定的实施方案中,试剂盒至少包括连续的核苷酸序列,所述核苷酸序列基本上或完全与一种或多种微RNA的区域互补。在一个实施方案中,标记试剂盒中的一种或多种试剂,并且因此,试剂盒可以进一步包括能够检测所述标记的试剂。试剂盒可以进一步包括使用所述试剂盒的组分检测癌症的说明书。

[0197] 核酸阵列

[0198] 本发明的另一个方面提供核酸阵列,所述核酸阵列包含与本发明的生物标志物的mRNA杂交的多核苷酸。一般而言,核酸阵列由具有至少一个地址的基质组成。核酸阵列是本领域公知的,而且包含核酸阵列的基质也是本领域公知的。基质材料的非限制性实例包括玻璃和塑料。基质可以塑造成载玻片或芯片(即四边形),或者可选地,基质可以塑造成孔。

[0199] 本发明的阵列由至少一个地址组成,其中地址之上已布置了可以与本发明的生物标志物的mRNA杂交的核酸。在一个实施方案中,阵列由多个地址组成,其中各个地址之上已布置了可以与生物标志物的mRNA杂交的核酸,所述生物标志物用于预测患有肺癌的受试者的存活。阵列还可以包含一个或多个这样的地址,其中所述地址之上已经布置了对照核酸。对照可以是内部对照(即阵列本身的对照)和/或外部对照(即应用于阵列的样品的对照)。一般地,阵列包含约1至约10,000个地址。在一个实施方案中,阵列包含约10至约8,000个地址。在另一个实施方案中,阵列包含不多于500个地址。在一个可选的实施方案中,阵列包含不少于500个地址。使用核酸阵列的方法是本领域公知的。

[0200] 使用方法

[0201] 在一个方面,本文提供诊断受试者是否患有待评估和/或治疗的疾病或处于发生待评估和/或治疗的疾病的风险中的方法,其包括测量来自受试者的受试样品中至少一个基因产物的水平和将受试样品中所述基因产物的水平与对照样品中相应的基因产物的水平相比较。如本文所用的,“受试者”可以是任何哺乳动物,所述哺乳动物患有或怀疑患有食管癌和/或Barrett's食管。在特定的实施方案中,受试者是患有或怀疑患有所述疾病的人。

[0202] 可在从受试者获得的生物样品的细胞中,测量至少一种基因产物的水平。例如,可通过常规的活组织检查技术,从怀疑患有所述疾病的受试者中取出组织样品。在另一个实例中,可从受试者中取出血液样品,并且可通过标准技术分离白细胞以用于DNA提取。优选在开始放射疗法、化学疗法或其它疗法之前从受试者获得血液或组织样品。可从受试者的未受影响的组织、从正常人个体或正常群体的群体或从相应于受试者的样品的大部分细胞的培养细胞获得相应的对照组织或血液样品。然后将对照组织或血液样品与来自受试者的样品一起进行处理,以便可将来自受试者的样品的细胞中给定的基因产生的基因产物的水平与来自对照样品的细胞的相应的基因产物的水平进行比较。

[0203] 与对照样品中相应的基因产物的水平相比,获自受试者的样品中基因产物的水平的变化(即增加或减少)表示受试者中存在所述疾病。在一个实施方案中,受试样品中至少一种基因产物水平高于对照样品中相应的基因产物的水平(即,基因产物的表达“上调”)。如本文中所使用的,当来自受试者的细胞或组织样品中基因产物的量大于对照细胞或组织样品中相同基因产物的量时,基因产物的表达“上调”。在另一个实施方案中,受试样品中至少一种基因产物的水平低于对照样品中相应基因产物的水平(即,基因产物的表达“下调”)。如本文中所使用的,当来自受试者的细胞或组织样品中的该基因产生的基因产物的量低于从对照细胞或组织样品中的相同基因产生的量时,基因的表达“下调”。可根据一

个或多个RNA表达标准确定对照和正常样品中相对miR基因表达。所述标准可包括例如0基因表达水平、标准细胞系中的基因表达水平、或之前从正常人对照群体获得的基因表达的平均水平。

[0204] 可使用适合用于检测生物样品中RNA表达水平的任何技术测量样品中基因产物的水平。适用于测定来自生物样品的细胞中的RNA表达水平的技术(例如,Northern印迹分析、RT-PCR、原位杂交)对于本领域技术人员来说是熟知的。在特定的实施方案中,使用Northern印迹分析检测至少一种基因产物的水平。例如,可通过在核酸提取缓冲液存在的情况下进行匀浆,接着进行离心来从细胞纯化总的细胞RNA。沉淀核酸,然后通过用DNA酶处理和沉淀来除去DNA。然后按照标准技术在琼脂糖凝胶上通过凝胶电泳分离RNA分子,并将其转移至硝酸纤维素滤器。然后通过加热将RNA固定在滤器上。使用适当标记的与所述RNA互补的DNA或RNA探针进行特定RNA的检测和定量。参见,例如,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J.Sambrook等人,eds.,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989,Chapter7,其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0205] 可以根据给定的基因产物的核酸序列产生适用于给定的基因产物的Northern印迹杂交的探针。标记的DNA和RNA探针的制备方法以及用于其与靶核苷酸序列杂交的条件描述于Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J.Sambrook等人,eds.,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989,Chapters10和11,其公开内容通过引用合并入本文。

[0206] 例如,可用例如放射性核素例如 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 或 ^{35}S ;重金属;或能够用作已标记的配体的特异性结合对成员的配体(例如,生物素、抗生物素蛋白或抗体)、荧光分子、化学发光分子、酶等来标记核酸探针。

[0207] 可通过Rigby等人(1977),J.Mol.Biol.113:237-251的切口平移法或Fienberg等人(1983),Anal.Biochem.132:6-13的随机引物法(其全部公开内容通过引用合并入本文)将探针标记至高比放射性(specific activity)。后者是选择用于从单链DNA或从RNA模板合成高比放射性的 ^{32}P -标记的探针的方法。例如,按照切口平移法通过用高放射性的核苷酸置换预先存在的核苷酸,可能制备具有大大超过 $10^8\text{cpm}/\mu\text{g}$ 的比放射性的 ^{32}P -标记的核酸探针。然后可通过将杂交滤器暴露于照相胶片来进行杂交的放射自显影检测。暴露于杂交滤器的照相胶片的光密度扫描提供了基因转录物水平的精确测量。使用另一个方法,可通过计算机化的成像系统例如可从Amersham Biosciences,Piscataway,NJ获得的Molecular Dynamics400-B2D Phosphorimager定量基因转录物水平。

[0208] 当不能进行DNA或RNA探针的放射性核素标记时,可使用随机引物法将类似物例如dTTP类似物5-(N-(N-生物素基- ϵ -氨基己酰基)-3-氨基烯丙基)脱氧尿苷三磷酸掺入探针分子。可通过与结合生物素的蛋白质例如偶联至荧光染料或产生颜色反应的酶的抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和抗体(例如抗生物素抗体)反应来检测生物素化的探针寡核苷酸。

[0209] 除了Northern和其它RNA杂交技术外,可使用原位杂交技术来测定RNA转录物的水平。该技术需要比Northern印迹技术更少的细胞,其包括将整个细胞置于显微镜盖玻片上和用含有放射性标记的或另外标记的核酸(例如,cDNA或RNA)探针的溶液探测细胞的核酸含量。该技术特别适合用于分析来自受试者的组织活组织检查样品。原位杂交技术的实施

在美国专利5,427,916(其全部公开内容通过引用合并入本文)中进行了更详细的描述。用于给定的基因产物的原位杂交的合适的探针可根据核酸序列产生。

[0210] 细胞中基因转录物的相对数目还可通过对基因转录物进行逆转录,然后通过聚合酶链式反应扩增经逆转录的转录物(RT-PCR)来进行测定。可通过与内部标准例如存在于相同样品中的来自“持家”基因的mRNA的水平相比较来定量基因转录物的水平。用作内部标准的合适的“持家”基因包括例如,肌球蛋白或甘油醛-3-磷酸脱氢酶(G3PDH)。用于定量RT-PCR和其变型的方法在本领域技术人员的能力之内。

[0211] 在一些情况下,可能期望同时测定样品中多个不同基因产物的表达水平。在其它情况下,可能期望测定与癌症关联的所有已知基因的转录物的表达水平。评估数百种基因的癌症特异性表达水平非常费时,并且需要大量的总RNA(对于每一个Northern印迹需要至少20 μ g)和需要放射性同位素的放射自显影技术。

[0212] 为了克服这些限制,可构建以微芯片形式(即,微阵列)存在的寡核苷酸文库,该文库包含一组特异于一组基因或基因产物的探针寡脱氧核苷酸。使用该微阵列,可通过逆转录RNA以产生一组靶寡脱氧核苷酸,将它们与微阵列上的探针寡脱氧核苷酸杂交以产生杂交特征谱或表达特征谱,来测定生物样品中多个微RNA的表达水平。然后将受试样品的杂交特征谱与对照样品的杂交特征谱比较,从而确定在所述疾病中具有改变的表达水平的微RNA。如本文中所使用的,“探针寡核苷酸”或“探针寡脱氧核苷酸”是指能够与靶寡核苷酸杂交的寡核苷酸。“靶寡核苷酸”或“靶寡脱氧核苷酸”是指待检测(例如,通过杂交)的分子。“特异性探针寡核苷酸”或“特异于基因产物的探针寡核苷酸”是指具有选择用于与特定基因产物或特定基因产物的逆转录物杂交的序列的探针寡核苷酸。

[0213] 特定样品的“表达特征谱”或“杂交特征谱”本质上是样品的状态指纹;虽然两种状态可能具有相似表达的任何特定基因,但同时评价大量基因允许产生对于细胞的状态是独特的基因表达特征谱。即,正常细胞可与所述细胞相区别,并且在所述细胞内,可确定不同的预后状态(例如,良好的或不良的长期存活希望)。通过比较不同状态中细胞的表达特征谱,获得关于在这些状态的每一个状态中为重要的基因的信息(包括基因的上调或下调)。在所述细胞或正常细胞中差异表达的序列的鉴定以及导致不同预后结果的差异表达允许以许多方法使用该信息。例如,可评估特定的治疗方案(例如,确定化疗药物是否改善特定患者的长期预后)。类似地,可通过将患者样品与已知的表达特征谱比较来进行或确认诊断。此外,这些基因表达特征谱(或个体基因)允许筛选抑制所述表达特征谱或将不良预后特征谱转变成更好的预后特征谱的药物候选物。

[0214] 因此,本发明提供诊断受试者是否患有所述疾病或处于发生所述疾病的风险中的方法,其包括逆转录来自从受试者获得的受试样品的RNA以提供一组靶寡脱氧核苷酸,使所述靶寡脱氧核苷酸与包含miRNA特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供受试样品的杂交特征谱,和将受试样品杂交特征谱与从对照样品产生的杂交特征谱比较,其中至少一个miRNA的信号的改变表示受试者患有所述疾病或处于发生所述疾病的风险中。

[0215] 本发明还提供诊断与一种或多种预后标志物有关的所述疾病的方法,其包括测量来自受试者的受试样品中至少一个基因产物的水平和将受试样品中所述至少一个基因产物的水平与对照样品中相应的基因产物的水平比较。与对照样品相比,受试样品中至少一个基因产物的信号的改变(例如增加,减少)表示受试者患有与一种或多种预后标志物有关

的所述疾病,或者处于发生与一种或多种预后标志物有关的所述疾病的风险中。

[0216] 疾病可以与一种或多种预后标志物或特征(包括与不良(即消极)预后有关的标志物,或与良好(即积极)预后有关的标志物)有关。在某些实施方案中,使用本文描述的方法诊断的所述疾病与一种或多种不良预后特征有关。

[0217] 本文描述了其表达在与这些预后标志物的每一种有关的细胞中改变的特定的微RNA。在一个实施方案中,通过下述测量至少一种基因产物的水平:逆转录来自从受试者获得的受试样品的RNA以提供一组靶寡脱氧核苷酸,将靶寡脱氧核苷酸与包含miRNA特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供受试样品的杂交特征谱,并将受试样品杂交特征谱与从对照样品产生的杂交特征谱相比较。

[0218] 不希望受任何理论束缚,据信,细胞中一种或多种基因产物水平的改变可导致这些基因产物的一种或多种预期的靶失调,这可导致所述疾病形成。因此,改变基因产物水平(例如,通过减少在所述细胞中上调的基因产物的水平,通过增加在癌细胞中下调的基因产物的水平)可成功地治疗所述疾病。本文描述了在细胞中失调的基因产物的推定基因靶的实例。

[0219] 因此,本发明包括治疗受试者的所述疾病的方法,其中至少一种基因产物在受试者的癌细胞中失调(例如,下调、上调)。当至少一种分离的基因产物在细胞中下调时,该方法包括施用有效量的所述至少一种分离的基因产物,从而抑制受试者中癌细胞的增殖。当至少一种分离的基因产物在癌细胞中上调时,该方法包括给受试者施用有效量的抑制所述至少一种基因的表达的至少一种化合物(在本文称为基因表达抑制化合物),从而抑制细胞的增殖。

[0220] 如本文中所使用的,术语“治疗”、“医治”和“疗法”是指改善与疾病或病况相关的症状,例如包括预防或延迟疾病症状的发作,和/或减少疾病或病况的症状的严重性或频率。术语“受试者”和“个体”在本文中定义为包括动物例如哺乳动物,包括但不限于灵长类动物、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔子、豚鼠、大鼠、小鼠或其它牛科、羊科、马科、犬科、猫科、啮齿目或鼠科物种。在优选实施方案中,动物是人。

[0221] 如本文中所使用的,分离的基因产物的“有效量”是足以在患有所述疾病的受试者中抑制癌细胞增殖的量。通过考虑因素例如受试者的大小和体重、疾病侵入的程度、受试者的年龄、健康和性别、施用的途径以及施用是局部的还是全身性的,本领域技术人员可容易地确定对给定的受试者施用的基因产物的有效量。

[0222] 例如,分离的基因产物的有效量可基于待治疗的受试者的大致或估计的体重。优选,如本文中所描述的,胃肠外或肠内施用这样的有效量。例如,对受试者施用的分离的基因产物的有效量可在大约5-3000微克/kg体重、大约700-1000微克/kg体重的范围内或大于大约1000微克/kg体重。

[0223] 本领域技术人员还可容易地确定用于对给定的受试者施用分离的基因产物的合适的给药方案。例如,可对受试者施用一次(例如,作为单次注射或沉积(deposition))基因产物。或者,可以每天1次或2次对受试者施用基因产物,进行大约3至大约28天,特别地大约7至大约10天的时期。在特定的给药方案中,每天1次施用基因产物,进行7天。当给药方案包括多次施用时,应理解,对受试者施用的基因产物的有效量可包括在整个给药方案中施用的基因产物的总量。

[0224] 如本文中使用的,“分离的”基因产物是合成的或通过人工介入从天然状态改变或取出的基因产物。例如,合成的基因产物,或部分或完全从其天然状态的共存材料分离的基因产物被认为是“分离的”。分离的基因产物可以以大体上纯化的形式存在,或可以存在于已将所述基因产物递送入其中的细胞中。因此,有意地被递送至细胞或在细胞中表达的基因产物被认为是“分离的”基因产物。在细胞内从前体分子产生的基因产物也被认为是“分离的”分子。

[0225] 分离的基因产物可使用许多标准技术获得。例如,可使用本领域已知的方法化学合成或重组产生基因产物。在一个实施方案中,使用适当保护的核糖核苷亚磷酸胺和常规的DNA/RNA合成仪化学合成基因产物。合成的RNA分子或合成试剂的提供商包括例如Proligo(Hamburg,Germany)、Dharmacon Research(Lafayette,CO,U.S.A.)、Pierce Chemical(part of Perbio Science,Rockford,IL,U.S.A.)、Glen Research(Sterling,VA,U.S.A.)、ChemGenes(Ashland,MA,U.S.A.)和Cruachem(Glasgow,UK)。

[0226] 可选地,可使用任何合适的启动子从重组环形或线性DNA质粒表达基因产物。用于从质粒表达RNA的合适的启动子包括例如U6或H1RNA pol III启动子序列或巨细胞病毒启动子。其它合适启动子的选择在本领域技术人员的能力之内。本发明的重组质粒还可包括用于在癌细胞中表达基因产物的诱导型或可调控的启动子。

[0227] 可通过标准技术从培养的细胞表达系统分离从重组质粒表达的基因产物。还可将从重组质粒表达的基因产物递送至癌细胞并且在其中直接表达。下面更详细地论述重组质粒将基因产物递送至癌细胞的用途。

[0228] 基因产物可从分开的重组质粒表达,或它们可从相同的重组质粒表达。在一个实施方案中,基因产物从单个质粒表达为RNA前体分子,然后通过合适的加工系统(包括但不限于癌细胞中现有的加工系统)将该前体分子加工成功能性基因产物。其它合适的加工系统包括例如体外果蝇细胞裂解物系统(例如,如属于Tuschl等人的美国公开专利申请2002/0086356中所描述的,其全部公开内容通过引用合并入本文)和大肠杆菌RNA酶III系统(例如,如属于Yang等人的美国公开专利申请2004/0014113中所描述的,其全部公开内容通过引用合并入本文)。

[0229] 适合用于表达基因产物的质粒的选择、用于将核酸序列插入质粒以表达基因产物的方法以及将重组质粒递送至目的细胞的方法在本领域技术人员的能力之内。参见,例如,Zeng等人(2002),Molecular Cell 9:1327-1333;Tuschl(2002),Nat.Biotechnol.20:446-448;Brummelkamp等人(2002),Science 296:550-553;Miyagishi等人(2002),Nat.Biotechnol.20:497-500;Paddison等人(2002),Genes Dev.16:948-958;Lee等人(2002),Nat.Biotechnol.20:500-505;和Paul等人(2002),Nat.Biotechnol.20:505-508,其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0230] 在一个实施方案中,表达基因产物的质粒包含在CMV立即早期启动子(intermediate-early promoter)控制下编码前体RNA的序列。如本文中所使用的,“在启动子的控制下”是指编码基因产物的核酸序列位于启动子的3'端,以便启动子可起始基因产物编码序列的转录。

[0231] 基因产物还可从重组病毒载体表达。预期基因产物可从两个分开的重组病毒载体或从相同的病毒载体表达。可通过标准技术从培养的细胞表达系统分离从重组病毒载体表

达的RNA或所述RNA可在癌细胞中直接表达。下面更详细地论述重组病毒载体将基因产物递送至癌细胞的用途。

[0232] 本发明的重组病毒载体包含编码基因产物的序列和用于表达RNA序列的任何合适的启动子。合适的启动子包括例如U6或H1RNA polIII启动子序列,或巨细胞病毒启动子。其它合适的启动子的选择在本领域技术人员的能力之内。本发明的重组病毒载体还可包含用于在癌细胞中表达基因产物的诱导型或可调控的启动子。

[0233] 可使用能够接受基因产物的编码序列的任何病毒载体;例如,来源于腺病毒(AV)、腺伴随病毒(AAV)、逆转录病毒(例如,慢病毒(LV)、弹状病毒(Rhabdoviruses)、鼠白血病毒病病毒)、疱疹病毒等的载体。可通过用来自其它病毒的包膜蛋白或其它表面抗原假型化载体或通过置换不同的病毒衣壳蛋白(如果合适)来改变病毒载体的趋向性。

[0234] 例如,可用来自水泡性口膜炎病毒(VSV)、狂犬病病毒(rabies)、埃博拉病毒(Ebola)、莫科拉病毒(Mokola)等的表面蛋白假型化本发明的慢病毒载体。可通过对载体进行工程改造以表达不同的衣壳蛋白血清型来制备本发明的AAV载体,使之靶向不同的细胞。例如,表达血清型2型基因组上的血清型2型衣壳的AAV载体称为AAV2/2。AAV2/2载体中的该血清型2型衣壳基因可用血清型5型衣壳基因替换,从而产生AAV2/5载体。用于构建表达不同衣壳蛋白血清型的AAV载体的技术在本领域技术人员的能力之内;参见,例如, Rabinowitz, J.E., 等人(2002), J. Virol. 76:791-801, 其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0235] 适合用于本发明的重组病毒载体的选择、用于将用于表达RNA的核酸序列插入载体的方法、将病毒载体递送至目的细胞的方法和表达的RNA产物的回收在本领域技术人员的能力之内。参见,例如, Dornburg(1995), Gene Therap. 2:301-310; Eglitis(1988), Biotechniques 6:608-614; Miller(1990), Hum. Gene Therap. 1:5-14; 和Anderson(1998), Nature 392:25-30, 其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0236] 在某些实施方案中,合适的病毒载体是来源于AV和AAV的载体。用于表达基因产物的合适的AV载体、用于构建重组AV载体的方法以及用于将载体递送至靶细胞的方法描述于 Xia等人(2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010, 其全部公开内容通过引用合并入本文。用于表达基因产物的合适的AAV载体、用于构建重组AAV载体的方法以及用于将载体递送至靶细胞的方法描述于 Samulski等人(1987), J. Virol. 61:3096-3101; Fisher等人(1996), J. Virol. 70:520-532; Samulski等人(1989), J. Virol. 63:3822-3826; 美国专利5,252,479; 美国专利5,139,941; 国际专利申请W094/13788; 和国际专利申请W093/24641, 其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0237] 在某些实施方案中,本发明的重组AAV病毒载体包含在人U6RNA启动子控制下的与polyT终止序列有效连接的编码前体RNA的核酸序列。如本文中所使用的,“与polyT终止序列有效连接”是指编码有义或反义链的核酸序列以5'方向与polyT终止信号紧密邻接。在从载体转录序列的过程中,polyT终止信号用于终止转录。

[0238] 在本发明的治疗方法的其它实施方案中,还可对受试者施用有效量的至少一种抑制表达的化合物。如本文中所使用的,“抑制基因表达”是指治疗后基因产物的活性成熟形式的产量低于治疗前产生的量。通过使用例如上述用于诊断方法的测定转录物水平的技术,本领域技术人员可容易地确定表达在癌细胞中是否已被抑制。抑制可在基因表达的水

平上(即,通过抑制编码基因产物的基因的转录)或在加工的水平上(例如,通过抑制前体至成熟的活性基因产物的加工)发生。

[0239] 如本文中所使用的,抑制表达的化合物的“有效量”是足以在患有与癌症相关染色体特征相关的癌症的受试者中抑制癌细胞的增殖的量。通过考虑因素,例如受试者的体重和体重、疾病侵入的程度、受试者的年龄、健康和性别、施用的途径以及施用是局部的还是全身性的,本领域技术人员可容易地确定对给定的受试者施用的抑制表达的化合物的有效量。

[0240] 例如,抑制表达的化合物的有效量可基于待治疗的受试者的大致或估计的体重。特别地,如本文中所描述的,胃肠外或肠内施用这样的有效量。例如,对受试者施用的抑制表达的化合物的有效量可在大约5-3000微克/kg体重、大约700-1000微克/kg体重的范围内或其可以大于大约1000微克/kg体重。

[0241] 本领域技术人员还可容易地确定用于对给定的受试者施用抑制表达的化合物的适当的给药方案。例如,可对受试者施用一次(例如,作为单次注射或沉积)抑制表达的化合物。可选地,可以每天1次或2次对受试者施用抑制表达的化合物,进行大约3至大约28天,更优选地大约7至大约10天的时期。在特定的给药方案中,每天1次施用抑制表达的化合物,进行7天。当给药方案包括多次施用时,应理解,对受试者施用的抑制表达的化合物的有效量可包括在整个给药方案中施用的化合物的总量。

[0242] 用于抑制表达的合适的化合物包括双链RNA(例如短或小干扰RNA或“siRNA”)、反义核酸和酶促RNA分子例如核酶。这些化合物中的每一种可被靶向给定的基因产物,并且破坏靶基因产物或诱导靶基因产物的破坏。

[0243] 例如,给定的基因的表达可通过用分离的双链RNA(“dsRNA”)分子诱导基因的RNA干扰来抑制,所述双链RNA分子与基因产物的至少一部分具有至少90%、例如至少95%、至少98%、至少99%或100%的序列同源性。在具体的实施方案中,dsRNA分子是“短或小干扰RNA”或“siRNA”。

[0244] 用于本方法的siRNA包括长度大约17个核苷酸至大约29个核苷酸、优选长度大约19至大约25个核苷酸的短双链RNA。siRNA包含通过标准Watson-Crick碱基配对相互作用(在下文中“碱基配对”)退火在一起的有义RNA链和互补反义RNA链。有义链包含与靶基因产物内包含的核酸序列大体上同一的核酸序列。

[0245] 如本文中所使用的,siRNA中与靶mRNA内包含的靶序列“大体上同一”的核酸序列是与靶序列同一的核酸序列或与靶序列相异于1或2个核苷酸的核酸序列。siRNA的有义和反义链可包括两个互补的单链RNA分子或可包括其中两个互补部分碱基配对并且通过单链“发夹结构”区域共价连接的单个分子。

[0246] siRNA还可以是与天然存在的RNA相异于一个或多个核苷酸的添加、缺失、置换和/或改变的经改变的RNA。这样的改变可包括非核苷酸材料的添加,例如至siRNA的末端或至siRNA的一个或多个内部核苷酸的添加,或使siRNA抵抗核酸酶降解的修饰或用脱氧核糖核苷酸对siRNA中的一个或多个核苷酸的置换。

[0247] siRNA的一条或两条链还可包含3'突出端。如本文中所用的,“3'突出端”是指从双链RNA链的3'-末端延伸的至少一个未配对的核苷酸。因此,在某些实施方案中,siRNA包含至少一个长度为1至大约6个核苷酸(其包括核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)、长度为1至大

约5个核苷酸、长度为1至大约4个核苷酸或长度为大约2至大约4个核苷酸的3'突出端。在特定的实施方案中,3'突出端存在于siRNA的两条链上,且其长度为2个核苷酸。例如,siRNA的各条链可包含二胸苷酸("TT")或二尿苷酸("uu")的3'突出端。

[0248] siRNA可通过化学或生物方法产生,或可从重组质粒或病毒载体表达,如上文对分离的基因产物所描述的。用于产生和检测dsRNA或siRNA分子的示例性方法描述于属于Gewirtz的美国公开专利申请2002/0173478和属于Reich等人的美国公开专利申请2004/0018176,其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0249] 给定的基因的表达还可通过反义核酸抑制。如本文中所使用的,"反义核酸"是指通过RNA-RNA或RNA-DNA或RNA-肽核酸相互作用与靶RNA结合的核酸分子,其改变靶RNA的活性。适合用于本方法的反义核酸是通常包含与基因产物中的连续核酸序列互补的核酸序列的单链核酸(例如,RNA、DNA、RNA-DNA嵌合物、PNA)。反义核酸可包含与基因产物中的连续核酸序列50-100%互补、75-100%互补或95-100%互补的核酸序列。本文提供了基因产物的核酸序列。不希望受任何理论束缚,据信,反义核酸激活RNA酶H或降解基因产物/反义核酸双链体的另一种细胞核酸酶。

[0250] 反义核酸还可包含对核酸主链或对糖和碱基部分(或它们的等价物)的修饰,从而增加靶特异性、核酸酶抗性、递送或与分子的药效相关的其它性质。此类修饰包括胆固醇部分、双链体插入剂例如吡啶或一种或多种抗核酸酶基团。

[0251] 反义核酸可通过化学或生物方法产生,或可从重组质粒或病毒载体表达,如上文对分离的基因产物所描述的。用于产生和检测的示例性方法在本领域技术人员的能力之内;参见,例如,Stein和Cheng(1993),Science261:1004以及属于Woolf等人的美国专利5,849,902,其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0252] 给定的基因的表达还可通过酶促核酸(enzymatic nucleic acid)抑制。如本文中所使用的"酶促核酸"是指包含与基因产物的连续核酸序列具有互补性的底物结合区并且能够特异性切割基因产物的核酸。酶促核酸底物结合区可以例如与基因产物中的连续核酸序列50-100%互补、75-100%互补或95-100%互补。酶促核酸还可包括在碱基、糖和/或磷酸基团上的修饰。用于本方法的示例性酶促核酸是核酶。

[0253] 酶促核酸可通过化学或生物方法产生,或可从重组质粒或病毒载体表达,如上文对分离的基因产物所描述的。用于产生和检测dsRNA或siRNA分子的示例性方法描述于Werner和Uhlenbeck(1995),Nucl.Acids Res.23:2092-96;Hammann等人(1999),Antisense andNucleic Acid Drug Dev.9:25-31;以及属于Cech等人的美国专利4,987,071,其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0254] 至少一种基因产物或至少一种用于抑制表达的化合物的施用将在患有与癌症相关染色体特征有关的癌症的受试者中抑制癌细胞的增殖。如本文中所使用的,"抑制癌细胞的增殖"是指杀死细胞或永久性或暂时地阻止或减缓细胞的生长。如果受试者中癌细胞的数目在施用基因产物或基因表达抑制化合物后保持恒定或减少,那么可推断癌细胞增殖被抑制。如果癌细胞的绝对数目增加但肿瘤生长的速度下降,则也可推断癌细胞增殖被抑制。

[0255] 受试者体内的癌细胞数目可通过直接测量或通过对原发性或转移性肿瘤块的大小的估计来确定。例如,受试者中癌细胞的数目可通过免疫组织学方法、流式细胞术或经设计用于检测癌细胞的特征表面标志物的其它技术来测量。

[0256] 可通过适合用于将此类化合物递送至受试者的癌细胞的任何方法来对受试者施用基因产物或基因表达抑制化合物。例如,可通过适合于用此类化合物或用包含编码此类化合物的序列的核酸转染受试者的细胞的方法来施用基因产物或抑制表达的化合物。

[0257] 还可通过任何合适的肠内或胃肠外施用途对受试者施用基因产物或基因表达抑制化合物。用于本方法的合适的肠内施用途包括例如口服、直肠或鼻内给药。合适的胃肠外施用途包括例如血管内给药(例如,静脉内团注(bolus injection)、静脉内输注、动脉内团注、动脉内输注和至脉管系统内的导管滴注);组织外周(peri-tissue)和组织内注射(例如,肿瘤外周和肿瘤内注射,视网膜内注射或视网膜下注射);皮下注射或沉积,包括皮下输注(例如通过渗透泵);对目的组织的直接施用,例如通过导管或其它安置装置(例如,视网膜丸剂(retinal pellet)或栓剂或包含多孔的、无孔的或凝胶状材料的植入物);以及吸入。特别合适的施用途是注射、输注和静脉内施用给患者。

[0258] 在本方法中,基因产物或抑制基因产物表达的化合物可以作为裸RNA、与递送试剂一起或作为包含表达基因产物或抑制表达的化合物的序列的核酸(例如,重组质粒或病毒载体)对受试者进行施用。合适的递送试剂包括例如Mirus Transit TKO亲脂试剂、lipofectin、lipofectamine、cellfectin、聚阳离子(例如,聚赖氨酸)和脂质体。

[0259] 本文中讨论了包含表达基因产物或基因表达抑制化合物的序列的重组质粒和病毒载体、以及用于将此类质粒和载体递送至癌细胞的技术。

[0260] 在特定的实施方案中,脂质体用于将基因产物或基因表达抑制化合物(或包含编码它们的序列的核酸)递送至受试者。脂质体还可增加基因产物或核酸的血液半衰期。可从标准的形成小囊泡的脂质形成用于本发明的合适的脂质体,所述脂质通常包括中性的或带负电荷的磷脂和固醇例如胆固醇。脂质的选择通常通过考虑因素例如期望的脂质体大小和脂质体在血流中的半衰期来进行指导。已知许多用于制备脂质体的方法,例如如Szoka等人(1980),Ann.Rev.Biophys.Bioeng.9:467;和美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369(其全部公开内容通过引用合并入本文)中所描述的方法。

[0261] 用于本方法的脂质体可包含将脂质体靶向癌细胞的配体分子。结合癌细胞中普遍的受体的配体例如结合肿瘤细胞抗原的单克隆抗体是优选的。

[0262] 用于本方法的脂质体还可进行修饰以避免被单核巨噬细胞系统(“MMS”)和网状内皮系统(“RES”)清除。此类经修饰的脂质体在表面具有调理作用-抑制部分或所述部分被整合入脂质体结构。在特别优选的实施方案中,本发明的脂质体可包含调理作用-抑制部分和配体。

[0263] 用于制备本发明的脂质体的调理作用-抑制部分通常是与脂质体膜结合的巨大的亲水聚合物。如本文中所使用的,调理作用-抑制部分,当其通过化学或物理方式(例如通过将脂溶性锚嵌入膜本身或通过与膜脂质的活性基团直接结合)附着至膜时,与脂质体膜“结合”。此类抑制调理作用的亲水聚合物形成了显著减少脂质体被MMS和RES吸收的保护性表面层;例如,如美国专利4,920,016中所描述的,其全部公开内容通过引用合并入本文。

[0264] 适合于修饰脂质体的调理作用-抑制部分优选是具有大约500至大约40,000道尔顿,更优选大约2,000至大约20,000道尔顿的数量平均分子量的水溶性聚合物。此类聚合物包括聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇(PPG)衍生物;例如甲氧基PEG或PPG以及PEG或PPG硬脂酸酯;合成的聚合物,例如聚丙烯酰胺或聚N-乙基吡咯烷酮;线性的、分支的或树枝状聚酰

胺胺(polyamidoamines);聚丙烯酸;多元醇,例如与羧基或氨基化学连接的聚乙烯醇和聚木糖醇,以及神经节苷脂,例如神经节苷脂GM1。PEG、甲氧基PEG或甲氧基PPG或其衍生物的共聚物也是合适的。此外,抑制调理作用的聚合物可以是PEG和多聚氨基酸、多糖、聚酰胺胺、聚乙烯胺或多核苷酸的嵌段共聚物。抑制调理作用的聚合物还可以是包含氨基酸或羧酸的天然多糖,例如半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、甘露糖醛酸、透明质酸、果胶酸、神经氨酸、褐藻酸、角叉菜胶(carrageenan);胺化的多糖或低聚糖(线性或分支的);或羧基化的多糖或低聚糖,例如与碳酸的衍生物反应从而与羧基连接的多糖或低聚糖。优选,调理作用-抑制部分是PEG、PPG或其衍生物。用PEG或PEG-衍生物修饰的脂质体有时称为“PEG化的脂质体”。

[0265] 可通过许多熟知的技术中的任一种将调理作用-抑制部分结合至脂质体膜。例如,可将PEG的N-羟基琥珀酰亚胺酯与磷脂酰乙醇胺脂质可溶性锚结合,然后再与膜结合。类似地,可使用Na(CN)BH₃和溶剂混合物(例如以30:12比例的四氢呋喃和水)在60℃下通过还原胺化作用,用硬脂酰胺脂质可溶性锚衍生葡聚糖(dextran)聚合物。

[0266] 用调理作用-抑制部分修饰的脂质体在循环中比未修饰的脂质体保持更长时间。因此,此类脂质体有时称为“隐形(stealth)”脂质体。已知隐形脂质体在通过多孔或“渗漏”微脉管系统饲喂的组织中积累。因此,由此类微脉管系统缺陷表征的组织例如实体瘤,将有效地积累这些脂质体;参见Gabizon,等人(1988),Proc.Natl.Acad.Sci.,U.S.A.,18:6949-53。此外,减少的被RES的吸收通过阻止脂质体在肝和脾中的大量积累来降低隐形脂质体的毒性。因此,用调理作用-抑制部分修饰的脂质体特别适合用于将基因产物或基因表达抑制化合物(或包含编码它们的序列的核酸)递送至肿瘤细胞。

[0267] 可在对受试者施用前,按照本领域已知的技术将基因产物或基因表达抑制化合物配制为药物组合物,有时称为“药剂”。因此,本发明包括用于治疗ALL的药物组合物。在一个实施方案中,药物组合物包含至少一种分离的基因产物和药学上可接受的载体。在特定的实施方案中,所述至少一种基因产物相应于与适合的对照细胞相比在ALL细胞中具有减少的表达水平的基因产物。

[0268] 在其它实施方案中,本发明的药物组合物包括至少一种抑制表达的化合物。在特定的实施方案中,至少一种基因表达抑制化合物特异于其在ALL细胞中的表达高于对照细胞的基因。

[0269] 本发明的药物组合物表征为是至少无菌的和无热原的。如本文中所使用的,“药物制剂”包括用于人和兽医用途的制剂。用于制备本发明的药物组合物的方法在本领域技术人员的能力之内,例如如Remington's Pharmaceutical Science,第17版,Mack Publishing Company,Easton,PA.(1985)中所描述的,其全部分公开内容通过引用合并入本文。

[0270] 本药物制剂包含与药学上可接受的载体混合的至少一种基因产物或基因表达抑制化合物(或至少一种包含编码它们的序列的核酸)(例如,按重量计算0.1至90%)或其生理上可接受的盐。本发明的药物制剂还可包含由脂质体封装的至少一种基因产物或基因表达抑制化合物(或至少一种包含编码它们的序列的核酸)和药学上可接受的载体。

[0271] 特别适合的药学上可接受的载体是水、缓冲水溶液、常用盐溶液、0.4%的盐溶液、0.3%的甘氨酸、透明质酸等。

[0272] 在特定的实施方案中,本发明的药物组合物包含抗核酸酶降解的至少一种基因产

物或基因表达抑制化合物(或至少一种包含编码它们的序列的核酸)。本领域技术人员可以例如通过将一个或多个在2'-位置被修饰的核糖核苷酸掺入基因产物来容易地合成具有核酸酶抗性的核酸。合适的2'-修饰的核糖核苷酸包括在2'-位置用氟、氨基、烷基、烷氧基和O-烯丙基修饰的核糖核苷酸。

[0273] 本发明的药物组合物还可包含常规药物赋形剂和/或添加剂。合适的药物赋形剂包括稳定剂、抗氧化剂、渗透压调节剂(osmolality adjusting agent)、缓冲剂和pH调节剂。合适的添加剂包括例如生理上生物相容性缓冲剂(例如,氨丁三醇盐酸盐)、螯合剂(例如,DTPA或DTPA-双酰胺)或钙螯合络合物(例如,钙DTPA、CaNaDTPA-双酰胺)的添加或任选地,钙或钠盐(例如,氯化钙、抗坏血酸钙、葡萄糖酸钙或乳酸钙)的添加。本发明的药物组合物可以以液体形式包装使用或可以进行冻干。

[0274] 对于本发明的固体药物组合物,可使用常规无毒性的固体的药学上可接受的载体;例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。

[0275] 例如,用于口服施用的固体药物组合物可包含上文所列的任何载体和赋形剂以及10-95%,优选25%-75%的至少一种基因产物或基因表达抑制化合物(或至少一种包含编码它们的序列的核酸)。用于气雾剂(吸入)施用的药物组合物可包含按重量计算0.01-20%,优选1%-10%的封装在上文所述的脂质体中的至少一种基因产物或基因表达抑制化合物(或至少一种包含编码它们的序列的核酸)和喷射剂。还可如所期望的包含载体例如卵磷脂以用于鼻内递送。

[0276] 本发明还包括鉴定抗癌试剂的方法,该方法包括给细胞提供受试试剂和测量细胞中至少一种基因产物的水平。在一个实施方案中,该方法包括给细胞提供受试试剂和测量与细胞中减少的表达水平关联的至少一种基因产物的水平。与合适的对照细胞相比,细胞中基因产物水平的增加指示受试试剂为抗癌试剂。

[0277] 在其它实施方案中,该方法包括给细胞提供受试试剂和测量与细胞中增加的表达水平关联的至少一种基因产物的水平。与合适的对照细胞相比,细胞中基因产物水平的降低指示受试试剂为抗癌试剂。

[0278] 合适的试剂包括但不限于药物(例如,小分子、肽)和生物大分子(例如,蛋白质、核酸)。试剂可通过重组、合成产生,或其可从天然来源分离(即,纯化)。用于给细胞提供此类试剂的各种方法(例如,转染)在本领域内是熟知的,并且在上文中描述了几种此类方法。用于检测至少一种基因产物的表达的方法(例如,Northern印迹、原位杂交、RT-PCR、表达特征谱分析)在本领域内也是熟知的。

[0279] 定义

[0280] 术语“阵列”在本文中可与术语“微阵列”互换使用。

[0281] 术语“癌症”,如本文中所使用的,是指哺乳动物中通常由不受调控的细胞增殖以及此类细胞侵袭其他组织的能力表征的生理状况。

[0282] 术语“表达”,如本文中所使用的,是指DNA序列信息转变为信使RNA(mRNA)或蛋白质。表达可通过测量全长mRNA、mRNA片段、全长蛋白质或蛋白质片段的水平来监测。

[0283] 术语“融合蛋白”意欲描述有效连接的至少两个通常来自不同来源的多肽。关于多肽,术语有效连接意指两个多肽以使各多肽可以发挥其预期的功能的方式连接。通常,两个

多肽通过肽键共价连接。融合蛋白优选通过标准重组DNA技术产生。例如,将编码第一多肽的DNA分子连接至编码第二多肽的另一个DNA分子,将所得的杂合DNA分子在宿主细胞中表达以产生融合蛋白。将DNA分子以5'至3'方向相互连接以使在连接后,编码的多肽的翻译框架(translational frame)不发生改变(即,将DNA分子符合读框地相互连接)。

[0284] 如本文中所使用的,短语“基因表达特征”是指细胞中,特别地癌细胞中基因表达的独特模式。

[0285] 术语“杂交”,如本文中所使用的,是指两条单链核酸之间的结合、退火或碱基配对的过程。“杂交的严格性”由温度和离子强度的条件确定。核酸杂交体的稳定性表示为解链温度或 T_m ,其是杂交体在确定的条件下发生50%变性时的温度。已得到公式来估计给定的杂交体的 T_m ;该公式考虑了核酸的G+C含量,杂交探针的长度等(例如,Sambrook等,1989)。为了使探针与其靶的退火率达到最大,通常在比 T_m 低大约20-25°C的温度下在高离子强度的溶液(6x SSC或6x SSPE)中进行杂交。如果待杂交的序列不同一,则对于每1%的错配,杂交温度降低1-1.5°C。通常,清洗条件应当尽可能严格(即,在比计算的 T_m 低大约12-20°C的温度下在低离子强度中)。例如,高严格条件通常包括在68°C下在6x SSC/5x Denhardt's溶液/1.0%SDS中进行杂交和在65°C下在0.2x SSC/0.1%SDS中进行清洗。在溶液中进行的杂交与使用固定的核酸进行的杂交之间的最适杂交条件通常不同。本领域技术人员将了解操纵哪些参数以最优杂交。

[0286] 术语“核酸”,如本文中所使用的,是指连接的核苷酸的序列。核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,它们可以是标准或非标准核苷酸;它们可以是经修饰的或衍生的核苷酸;它们可以是合成的类似物。核苷酸可通过磷酸二酯键或不可水解的(non-hydrolyzable)键连接。核酸可包含少许核苷酸(即,寡核苷酸),或其可包含许多核苷酸(即,多核苷酸)。核酸可以是单链或双链的。

[0287] 术语“预后”,如本文中所使用的,是指癌症的可能的过程和结果,和特别地,恢复的可能性。

[0288] 虽然已通过参考各种和优选实施方案描述了本发明,但本领域技术人员应当理解,可进行各种变化并且可用等价物替代其元素而不背离本发明的基本范围。此外,可进行许多改进以使特定的情况或材料适合于本发明的教导而不背离本发明的基本范围。

[0289] 参考文献

[0290] 本文中用于举例说明本发明或提供关于本发明的实施的另外的详细内容的公开物和其他材料通过引用合并入本文,并且为方便起见按下列文献目录提供。

[0291] 本文中引用的任何文献的引用不意欲作为任何前述内容是相关现有技术的承认。关于日期的所有声明或关于这些文献的内容的所有陈述基于申请人可获得的信息,并且不构成关于这些文献的日期或内容的正确性的任何承认。

[0292] 1. Pathin DM. Bray. F, Feilay, J, Pisani. P (2005) Globalcancerstatistics2002. CACancerJ Clin55:74-108.

[0293] 2. Sant, M et al. (2003) EUROCAE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. Ann. Oncol. 14 Suppl 5: v61-118.

[0294] 3. (2007) Surveillance and Epidemiology and End Results (SEER).

[0295] 4. Crew, KD, Neugut, AI (2004) Epidemiology of upper gastrointestinal

malignancies.Semin.oncol.31:450-464.

[0296] 5.Crew,KD,Neugut,AI(2004)Epidemiology of upper gastrointestinal malignancies.Semin.Oncol.31:450-464.

[0297] 6.Camemn,AJ,Ott,BJ.Payne,WS(1985)The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined(Barrett's)esophagus.N.Engl.J.Med.313:857-859.

[0298] 7.Maley,CC,Rustgi,AK(2006)Banett's esophagus and its progression to adenocarcinoma.J.Natl.Compr.Cane.Netw.4:367-374.

[0299] 8.Lagos-Quintana,M,Rauhut,R,Lendeckel,W,Tuschl,T(2001)Identification of novel genes coding for small expressed RNAs.Science294:853-858.

[0300] 9.Lau,NC.Lim,LP.Weinstein,EG,Bartel,DP(2001)An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*.Science294:858-862.

[0301] 10.Lee.RC,Ambros.V(2001)An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*.Science294:862-864.

[0302] 11.Lee,RC,Feinbaum.RL,Ambros.V(1993)The *C.elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.Cell75:843-854.

[0303] 12.Griffiths-Jones.S et al.(2006)miRBase:microRNA sequences,targets and gene nomenclature.Nucleic Acids Res34:D140-D144.

[0304] 13.Griffiths-Jones,S(2004)The microRNA Registry.Nucleic Acids Res.32:D109-D111.

[0305] 14.Bartel,DP(2004)MicroRNAs:genomics,biogenesis,mechanism,and function.Cell 116:281-297.

[0306] 15.Esquela-Kerscher,A,Slack'FJ(2006)Oncomirs-microRNAs with a role in cancer.Nat.Rev.Cancer6:259-269.

[0307] 16.Volinia.S et al.(2006)A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A103:2257-2261.

[0308] 17.Lu,J et al.(2005)MicroRNA expression profiles classify human cancers.Nature435:834-838.

[0309] 18.Sevignani.C,Calin,GA.Siracusa,LD,Croce,CM(2006)Mammalian microRNAs:a small world for fine-tuning gene expression.Mamm.Genome 17:189-202.

[0310] 19.Calin,GA et al.(2004)Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A101:2999-3004.

[0311] 20.Yahaihar.N et al.(2006)Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis.Cancer Cell9:189-198.

[0312] 21.Esquela-Kerscher,A et al.(2008)The let-7 microRNA reduces tumor

growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 7:759-764.

[0313] 22. Johnson, SM et al. (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120:635-647.

[0314] 23. Takamizawa, J et al. (2004) Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 64:3753-3756.

[0315] 24. Schetter, AJ et al. (2008) MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 299:425-436.

[0316] 25. Budhu, A et al. (2008) Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 47:897-907.

[0317] 26. Lee, EJ et al. (2007) Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 120:1046-1054.

[0318] 27. Iorio, MV et al. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 65:7065-7070.

[0319] 28. He, H et al. (2005) The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:19075-19080.

[0320] 29. Krutzfeldt, J et al. (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438:685-689.

[0321] 30. Elmen, J et al. (2008) LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature*

[0322] 31. Sugito, N et al. (2006) RNASen regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res* 12:7322-7328.

[0323] 32. Feber, A et al. (2008) MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 135:255-260.

[0324] 33. Warson, DI et al. (2007) Hp24 microRNA expression profiles in Barrett's esophagus. *ANZ. J. Surg.* 77 Suppl 1:A45.

[0325] 34. Warson, DI et al. (2007) Hp24 microRNA expression profiles in Barrett's esophagus. *ANZ. J. Surg.* 77 Suppl 1:A45.

[0326] 35. Liu, CG et al. (2004) An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101:9740-9744.

[0327] 36. Calin, GA et al. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:2999-3004.

[0328] 37. Esquela-Kerscher, A et al. (2008) The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle* 7:759-764.

[0329] 38. Kumar, MS et al. (2008) Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:3903-3908.

- [0330] 39.Takamizawa,J et al.(2004)Reduced expression of the let-7micrpRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival.Cancer Res.64:3753-3756.
- [0331] 40.Johnson.SM et al.(2005)J RAS is regulated by the let-7microRNA family.Cell120:635-647.
- [0332] 41.Yanaihara,N et al.(2006)Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis.Cancer Cell9:189-198.
- [0333] 42.Volinia,S et al.(2006)AmicroRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A103:2257-2261.
- [0334] 43.Iorio,MV et al.(2005)Micro0NA gene expression deregulation in human breast cancer.Cancer Res65:7065-7070.
- [0335] 44.Si.ML et al.(2007) miR-21-mediated tumor growth.Oncogene26:2799-2803.
- [0336] 45.Lee,EJ et al.(2007)Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer.Int.J Cancer120:1046-1054.
- [0337] 46.Fulci,V et al.(2007)Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia.Blood109:4944-4951.
- [0338] 47.Metzler.M et al.(2004)High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma.Genes Chromosomes.Cancer39:167-169.
- [0339] 48.Eis.PS et al.(2005)Accumulation of miR-155and BIC RNA in human B cell lymphomas.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A102:3627-3632.
- [0340] 49.O'Connell,RM et al.(2007)MicroRNA-155is induced during the macrophage inflammatory response.Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A104:1604-1609.
- [0341] 50.Meng.F et al.(2007)MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.Gastroenterology 133: 647-658.
- [0342] 51.Zhu,S.Si.ML,Wu.H.Mo,YY(2007)MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1(TPM1).J Biol Chem.282:14328-14336.
- [0343] 52.Zhu,S et al.(2008)MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis.Cell Res 18:350-359.
- [0344] 53.Frankel,LB et al.(2008)Programmed cell death4(PDCD4)is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells.J Biol Chem.283:1026-1033.
- [0345] 54.Asangani,IA et al.(2007)MicroRNA-21(miR-21)post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4and stimulates invasion,intravasation and metastasis in colorectal cancer.Oncogene
- [0346] 55.Zhu,S et al.(2008)MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis.Cell Res18:350-359.

- [0347] 56.Sayed,D et al.(2008)MicroRNA-21Targets Sprouty2and Promotes Cellular Outgrowths.Mol.Biol.Cell
- [0348] 57.Yanaihara.N et al.(2006)Unique microRNA moleeular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis.Cancar Cek19:189-198.
- [0349] 58.Schetter,AJ et al.(2008)MicroRNA explession profiles associated with progriosis and therapcutic outcome in colon ademocarcinoma.JAMA299:425-436.
- [0350] 59.Pekarsky,Y et al.(2006)Tcell expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29alld miR-181.Cancer Res66:11590-11593.
- [0351] 60.Tagaflov,KD,Boldin,MP,Challg,KJ,Ballimore,D(2006)NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146.an inhibitor targered to signaling proteins of innate immune responsqs.Proc Natl Acad Sci U.S.A103:12481-12486.
- [0352] 61.Scike,M et al.(2007)A cytokine gene signature of the lung adenocarcinoma and its tissue environment predicts prognosis.J Natl Cancer Inst99:1257-1269.
- [0353] 62.Croce,CM,Calin,GA(2005)miRNAs,cancer,and stem cell division.Cell122:6-7.
- [0354] 63.Calin.GA,Crote.CM(2006)MicroRNA signatures in human cancers.Nat.Rev.Cancer6:857-866.
- [0355] 64.Lodish,HF,Zhou,B,Liu,G,Chen,CZ(2008)Micromanagement of the immune system by microRNAs.Nat.Rev.Immunol.8:120-130.
- [0356] 65.Lindsay,MA(2008)microRNAs and the immune response.TrendsImmunol.
- [0357] 66.Hussain, SP,Harris,CC(2007)Inflammation and cancer:an ancient link with novel potentials.Int.J Cancer121:2373-2380.
- [0358] 67.Lawrie,CH et al.(2007)MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of djffuse large B cell lymphoma.Int.J.Cancer121:1156-1161.
- [0359] 68.Fulci.V et al.(2007)Quanlilalive technologies establish a novel microRNA profile of chroniclymphocytic leukemia.Blood 109:4944-4951.
- [0360] 69.Loffler,D et al.(2007)Interleukin-6dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of rllmicroRNA-21through a highly conserved enhancer.Blood 110:1330-1333.
- [0361] 70.Feber,A et al.(2008)MicroRNA expression profiles of esophageal cancer.J Thorac.Cardiovasc.Surg.135:255-260.
- [0362] 71.Guo,Y et al.(2008)Distinctive microRNA profiles relating to patoent survival in esophageal squamous cell carcinoma.Cancer Res68:26-33.
- [0363] 72.Chang,EY et al.(2007)Accuracy of pathologic examinaton in detection of complete response after chemoradiation for esophageal cancer.AmJ.Srrg.193:614-617.

[0364] 73.Mooney,MM(2005)Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for esophageal adenocarcinoma.J.Surg.Oncol.92:230-238.

[0365] 74.Trivers,KF et al.(2005)Demographic and lifestyle predictors of survival in patients with esophageal or gastric cancers.Clin.Gastroenterol.Hepatol.3:225-230.

[0366] 75.Sundelof,M,Lagergren.J,Ye.W(2008) Patient demographics and lifestyle factors influencing long-term survival of oesophageal cancer and gastric cardia cancer in a nationwide study in Sweden.Eur.J.Cancer

[0367] 76.Liu.CG et al.(2004)An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues.Proc Natl Acad Sci U.S.A 101: 9740-9744.

[0368] 77.Ihaka R.,GR(1996)R:A Language for Data Analysis and Graphics.Journal of Computational and Graphical Statistics5:299-314.

[0369] 本发明还包括下列实施方案:

[0370] 1-检测食管腺癌、Barrett's食管和食管鳞状细胞癌或样品中的一种或多种的方法,所述方法包括:

[0371] 分析样品中与食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关的至少一种生物标志物的改变的表达,和

[0372] 使所述至少一种生物标志物的改变的表达与样品中食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的存在或不存在关联,

[0373] 其中所述至少一种生物标志物选自表2(图6)中列出的mir。

[0374] 2.实施方案1的方法,其中所述关联区分下列中的一种或多种:

[0375] 1)腺癌(ADC)患者中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);

[0376] 2)患有Barrett's食管(BE)的腺癌(ADC)患者中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);

[0377] 3)腺癌患者(ADC)中的Barrett's食管(BE)和非Barrett's食管(NBE);

[0378] 4)鳞状细胞癌(SCC)中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);和

[0379] 5)癌组织(CT)中的腺癌(ADC)和鳞状细胞癌(SCC)。

[0380] 3.实施方案2的方法,其中对于关联1),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0381] 选自mir-21,mir-223,mir-146a,mir-146b和mir-181a的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0382] 选自mir-203和mir-205的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0383] 4.实施方案2的方法,其中对于关联2),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0384] 选自mir-21,mir-103和mir-107的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0385] 选自let-7c,mir-210,mir-203和mir-205的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0386] 5.实施方案2的方法,其中对于关联3),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0387] 选自mir-192,mir-215,mir-194,mir-135a,mir-92,mir-93,mir-7,mir-17,mir-20b,mir-107,mir-103和mir-191的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0388] 选自mir-30b,mir-193a,let-7b,let-7i,let-7d,let-7a,mir-369和let-7c的至少一种生物标志物的减少的表达。

- [0389] 6.实施方案2的方法,其中对于关联4),针对下列的一种或多种分析所述样品:
- [0390] 选自mir-21,mir-223,mir-146b,mir-224,mir-155,mir-7-2,mir-181b,mir-146a,mir-181,mir-7,mir-16,mir-122a,mir-125a和mir-16的至少一种生物标志物的增加的表达;和,
- [0391] 选自mir-202,mir-29c,mir-30b,mir-30c,mir-126,mir-99a,mir-220,mir-320,mir-499,mir-30c,mir-125b,mir-1,mir-145,mir-143,mir-378,mir-200b,mir-133a,mir-375和mir-203的至少一种生物标志物的减少的表达。
- [0392] 7.实施方案2的方法,其中对于关联5),针对下列的一种或多种分析所述样品:
- [0393] 选自mir-215,mir-192和mir-194的至少一种生物标志物的增加的表达;和,
- [0394] 选自mir-142,mir-224和mir-155的至少一种生物标志物的减少的表达。
- [0395] 8.实施方案1-7的任一项的方法,其中所述样品是血液或组织。
- [0396] 9.实施方案8的方法,其中所述组织是食管组织。
- [0397] 10.实施方案9的方法,其中所述食管组织选自肿瘤组织、非肿瘤组织和肿瘤邻近组织。
- [0398] 11.早期诊断怀疑患有食管腺癌、Barrett's食管或鳞状细胞癌的受试者的方法,所述方法包括:
- [0399] 获得来自所述受试者的样品,
- [0400] 分析所述样品中与食管腺癌、Barrett's食管或鳞状细胞癌有关的至少一种生物标志物的改变的表达;
- [0401] 使所述至少一种生物标志物的改变的表达与受试者中的食管腺癌、Barrett's食管或鳞状细胞癌的存在相关联,
- [0402] 其中所述至少一种生物标志物选自表2(图6)中列出的mir。
- [0403] 12.实施方案11的方法,其中所述关联区分下列中的一种或多种:
- [0404] 1)腺癌(ADC)患者中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);
- [0405] 2)患有Barrett's食管(BE)的腺癌(ADC)患者中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);
- [0406] 3)腺癌患者(ADC)中的Barrett's食管(BE)和非Barrett's食管(NBE);
- [0407] 4)鳞状细胞癌(SCC)中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);和,
- [0408] 5)癌组织(CT)中的腺癌(ADC)和鳞状细胞癌(SCC)。
- [0409] 13.实施方案12的方法,其中对于关联1),针对下列的一种或多种分析所述样品:
- [0410] 选自mir-21,mir-223,mir-146a,mir-146b和mir-181a的至少一种生物标志物的增加的表达;和
- [0411] 选自mir-203和mir-205的至少一种生物标志物的减少的表达。
- [0412] 14.实施方案12的方法,其中对于关联2),针对下列的一种或多种分析所述样品:
- [0413] 选自mir-21,mir-103,和mir-107的至少一种生物标志物的增加的表达;和,
- [0414] 选自let-7c,mir-210,mir-203和mir-205的至少一种生物标志物的减少的表达。
- [0415] 15.实施方案12的方法,其中对于关联3),针对下列的一种或多种分析所述样品:
- [0416] 选自mir-192,mir-215,mir-194,mir-135a,mir-92,mir-93,mir-7,mir-17,mir-20b,mir-107,mir-103和mir-191的至少一种生物标志物的增加的表达;和,
- [0417] 选自mir-30b,mir-193a,let-7b,let-7i,let-7d,let-7a,mir-369和let-7c的至

少一种生物标志物的减少的表达。

[0418] 16.实施方案12的方法,其中对于关联4),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0419] 选自mir-21,mir-223,mir-146b,mir-224,mir-155,mir-7-2,mir-181b,mir-146a,mir-181,mir-7,mir-16,mir-122a,mir-125a和mir-16的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0420] 选自mir-202,mir-29c,mir-30b,mir-30c,mir-126,mir-99a,mir-220,mir-320,mir-499,mir-30c,mir-125b,mir-1,mir-145,mir-143,mir-378,mir-200b,mir-133a,mir-375和mir-203的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0421] 17.实施方案12的方法,其中对于关联5),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0422] 选自mir-215,mir-192和mir-194的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0423] 选自mir-142,mir-224和mir-155的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0424] 18.实施方案1-7的任一项的方法,其中所述样品是血液或组织。

[0425] 19.实施方案18的方法,其中所述组织是食管组织。

[0426] 20.实施方案19的方法,其中所述食管组织选自肿瘤组织、非肿瘤组织和肿瘤邻近组织。

[0427] 21.测定受试者发生食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的可能性的方法,所述方法包括:

[0428] 分析样品中与食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌有关的至少一种生物标志物的改变的表达;

[0429] 使所述生物标志物的改变的表达的程度与所述受试者发生食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的可能性相关联;

[0430] 其中至少一种生物标志物选自表2(图6)中列出的mir。

[0431] 22.实施方案21的方法,其中所述关联区分下列中的一种或多种:

[0432] 1)腺癌(ADC)患者中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);

[0433] 2)患有Barrett's食管(BE)的腺癌(ADC)患者中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);

[0434] 3)腺癌患者(ADC)中的Barrett's食管(BE)和非Barrett's食管(NBE);

[0435] 4)食管鳞状细胞癌(SCC)中的癌组织(CT)和非癌组织(NCT);和

[0436] 5)癌组织(CT)中的腺癌(ADC)和鳞状细胞癌(SCC)。

[0437] 23.实施方案22的方法,其中对于关联1),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0438] 选自mir-21,mir-223,mir-146a,mir-146b和mir-181a的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0439] 选自let-7c,mir-203和mir-205的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0440] 24.实施方案22的方法,其中对于关联2),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0441] 选自mir-21,mir-103,mir-107的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0442] 选自let-7c,mir-210,mir-203和mir-205的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0443] 25.实施方案22的方法,其中对于关联3),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0444] 选自mir-192,mir-215,mir-194,mir-135a,mir-92,mir-93,mir-7,mir-17,mir-20b,mir-107,mir-103和mir-191的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0445] 选自mir-30b,mir-193a,let-7b,let-7i,let-7d,let-7a,mir-369和let-7c的至

少一种生物标志物的减少的表达。

[0446] 26.实施方案22的方法,其中对于关联4),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0447] 选自mir-21,mir-223,mir-146b,mir-224,mir-155,mir-7-2,mir-181b,mir-146a,mir-181,mir-7,mir-16,mir-122a,mir-125a和mir-16的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0448] 选自mir-202,mir-29c,mir-30b,mir-30c,mir-126,mir-99a,mir-220,mir-320,mir-499,mir-30c,mir-125b,mir-1,mir-145,mir-143,mir-378,mir-200b,mir-133a,mir-375和mir-203的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0449] 27.实施方案22的方法,其中对于关联5),针对下列的一种或多种分析所述样品:

[0450] 选自mir-215,mir-192和mir-194的至少一种生物标志物的增加的表达;和,

[0451] 选自mir-142,mir-224和mir-155的至少一种生物标志物的减少的表达。

[0452] 28.实施方案21-27的任一项的方法,其中所述样品是血液或组织。

[0453] 29.实施方案28的方法,其中所述组织是食管组织。

[0454] 30.实施方案29的方法,其中所述食管组织选自肿瘤组织、非肿瘤组织和肿瘤邻近组织。

[0455] 31.治疗患有食管癌、Barrett's食管或鳞状细胞癌的受试者的方法,其包括施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含与选自表2(图6)中列出的mir的至少一种生物标志物互补的核酸。

[0456] 32.一种药物组合物,其包含与选自表2(图6)中列出的mir的至少一种生物标志物互补的核酸。

[0457] 33.实施方案3、13或23的方法,其中在所述样品中用至少一种探针检测所述生物标志物,所述探针选自补充的表1(图8)中列出的miRNA探针。

[0458] 34.实施方案4、14或24的方法,其中在所述样品中用探针检测所述生物标志物,所述探针选自补充的表2(图9)中列出的miRNA探针。

[0459] 35.实施方案5、15或25的方法,其中在所述样品中用至少一种探针检测所述生物标志物,所述探针选自补充的表3(图10)中列出的miRNA探针。

[0460] 36.实施方案6、16或26的方法,其中在所述样品中用至少一种探针检测所述生物标志物,所述探针选自补充的表5(图12)中列出的miRNA探针。

[0461] 37.实施方案7、17或27的方法,其中在所述样品中用至少一种探针检测所述生物标志物,所述探针选自补充的表8(图15)中列出的miRNA探针。

[0462] 38.比较已经经历化学放射治疗的腺癌组织样品和未经历化学放射治疗的癌组织样品的方法,其包括:

[0463] 比较选自补充的表4(图11)中列出的mir的至少一种生物标志物的差异表达。

[0464] 39.比较鳞状细胞癌组织样品中的淋巴结转移的方法,其包括:

[0465] 比较选自补充的表6(图13)中列出的mir的至少一种生物标志物的差异表达。

[0466] 40.比较鳞状细胞癌组织样品中的分期的方法,其包括:

[0467] 比较选自补充的表7(图14)中列出的mir的至少一种生物标志物的差异表达。

[0468] 41.诊断受试者是否患有食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌,或处于发生食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的风险中的方法,其包括

- [0469] 测量来自受试者的受试样品中至少一种mir的水平,
- [0470] 其中与对照样品中相应的mir的水平相比,受试样品中所述mir的水平的改变表示受试者患有食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌或处于发生食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的风险中;
- [0471] 其中所述mir选自表2(图6)中列出的mir。
- [0472] 42.用于抑制有此需要的受试者中的食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的方法,其包括
- [0473] 施用选自表2(图6)中列出的mir的至少一种mir。
- [0474] 43.诊断受试者中的与一种或多种预后标志物有关的食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的方法,
- [0475] 其包括测量来自受试者的样品中至少一种mir的水平,
- [0476] 其中与对照样品中相应的mir的水平相比,受试样品中所述至少一种mir的水平的变化表示受试者患有与所述一种或多种预后标志物有关的食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病;
- [0477] 其中所述mir选自表2(图6)中列出的mir。
- [0478] 44.诊断受试者是否患有食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌,或处于发生食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的风险中的方法,所述方法包括:
- [0479] 逆转录来自从所述受试者获得的受试样品的RNA以提供一组靶寡脱氧核苷酸;
- [0480] 使所述靶寡脱氧核苷酸与包含miRNA特异性探针寡核苷酸的微阵列杂交以提供所述受试样品的杂交特征谱;和
- [0481] 将所述受试样品杂交特征谱与由对照样品产生的杂交特征谱相比较,
- [0482] 其中至少一种miRNA的信号的改变表示所述受试者患有食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病,或处于发生食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的风险中;
- [0483] 其中所述mir选自表2(图6)中列出的mir。
- [0484] 45.实施方案44的方法,其中与从所述对照样品产生的信号相比,所述至少一种mir的信号下调。
- [0485] 46.实施方案44的方法,其中与从所述对照样品产生的信号相比,所述至少一种mir的信号上调。
- [0486] 47.治疗患有食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的受试者中的食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的方法,其中与对照细胞相比,所述受试者的癌细胞中至少一种mir下调或上调,所述方法包括:
- [0487] 当癌细胞中所述至少一种mir下调时,对受试者施用有效量的至少一种分离的mir,从而抑制受试者中癌细胞的增殖;或
- [0488] 当癌细胞中所述至少一种mir上调时,对受试者施用有效量的用于抑制所述至少一种mir的表达的至少一种化合物,从而抑制受试者中癌细胞的增殖;
- [0489] 其中所述mir选自表2(图6)中列出的mir。
- [0490] 48.治疗受试者中的食管癌相关疾病的方法,所述方法包括:
- [0491] 测定与对照细胞相比,食管细胞中至少一种mir的量,其中所述mir选自表2(图6)

中列出的mir;和

[0492] 通过下述改变食管细胞中表达的mir的量:

[0493] (i)如果所述食管细胞中表达的mir的量小于对照细胞中表达的miR基因的量,则对所述受试者施用有效量的至少一种分离的mir;或

[0494] (ii)如果所述食管细胞中表达的mir的量大于对照细胞中表达的所述mir的量,则对所述受试者施用有效量的用于抑制所述至少一种mir的表达的至少一种化合物,

[0495] 从而抑制所述受试者中食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌细胞的增殖。

[0496] 49. 鉴定抗食管相关疾病的试剂的方法,所述方法包括:

[0497] 给食管细胞提供受试试剂,和

[0498] 测量所述食管细胞中与减少的表达水平相关的至少一种mir的水平,

[0499] 其中与适当的对照细胞相比,所述食管细胞中所述mir的水平的增加表示所述受试试剂是抗癌试剂;其中所述mir选自表2(图6)中列出的mir。

[0500] 50. 用于评估受试者中的病理状况或发生病理状况的风险的方法,所述方法包括:

[0501] 测量来自所述受试者的样品中一种或多种标志物的表达特征谱,

[0502] 其中来自所述受试者的样品的表达特征谱和正常样品的表达特征谱的差异表示食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌或对其的倾向,

[0503] 其中所述标志物至少包括一种或多种表2(图6)中列出的mir。

[0504] 51. 一种组合物,其包括选自表2(图6)中列出的mir的一种或多种mir。

[0505] 52. 一种用于检测食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的试剂,其中所述试剂包含多核苷酸,所述多核苷酸包含至少一种表2(图6)中列出的mir的核苷酸序列,或与标志物的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

[0506] 53. 一种用于检测食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌,相关疾病的试剂,其中所述试剂包含抗体,所述抗体识别由至少一种表2(图6)中列出的mir编码的蛋白。

[0507] 54. 评估用于预防、诊断和/或治疗食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌的治疗法的有效性的方法,所述方法包括:

[0508] 使动物经历其有效性待评估的疗法,和

[0509] 通过评估至少一种表2(图6)中列出的mir,测定待检测的疗法在治疗或预防食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌中的有效性水平。

[0510] 55. 实施方案54的方法,其中候选治疗剂包括下述中的一种或多种:药物组合物,营养食品组合物和顺势疗法组合物。

[0511] 56. 实施方案55的方法,其中待评估的疗法用于人类受试者。

[0512] 57. 一种制品,其包括:至少一种捕获试剂,所述捕获试剂与选自表2(图6)中列出的至少一种mir的食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的标志物结合。

[0513] 58. 用于筛选用于治疗食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的治疗剂的候选化合物的试剂盒,其中所述试剂盒包含:至少一种表2(图6)中列出的mir的一种或多种试剂,和表达至少一种mir的细胞。

[0514] 59. 实施方案58试剂盒,其中使用试剂检测所述mir的存在,所述试剂包含特异性结合至少一种mir的抗体或抗体片段。

[0515] 60. 用于食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病的筛选检测,其包

括：

[0516] 将一种或多种表2(图6)中列出的mir与所述mir的底物和与受试试剂接触,和

[0517] 测定所述受试试剂是否调节所述mir的活性。

[0518] 61.实施方案60的筛选检测,其中所有的方法步骤在体外进行。

[0519] 62.干扰食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病应答信号传导途径的试剂用于制备药物的用途,所述药物用于治疗、预防、逆转或限制个体中的食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病并发症的严重性,其中所述试剂包含至少一种表2(图6)中列出的mir。

[0520] 63.治疗、预防、逆转或限制有此需要的个体中的食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病并发症的严重性的方法,所述方法包括：

[0521] 对所述个体施用干扰至少食管腺癌、Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病应答级联的试剂,其中所述试剂包含至少一种表2(图6)中列出的mir。

[0522] 64.干扰至少食管腺癌,Barrett's食管或食管鳞状细胞癌相关疾病应答级联的试剂用于制备药物的用途,所述药物用于治疗、预防、逆转或限制个体中的癌症相关疾病并发症的严重性,其中所述试剂包含至少一种表2(图6)中列出的mir。

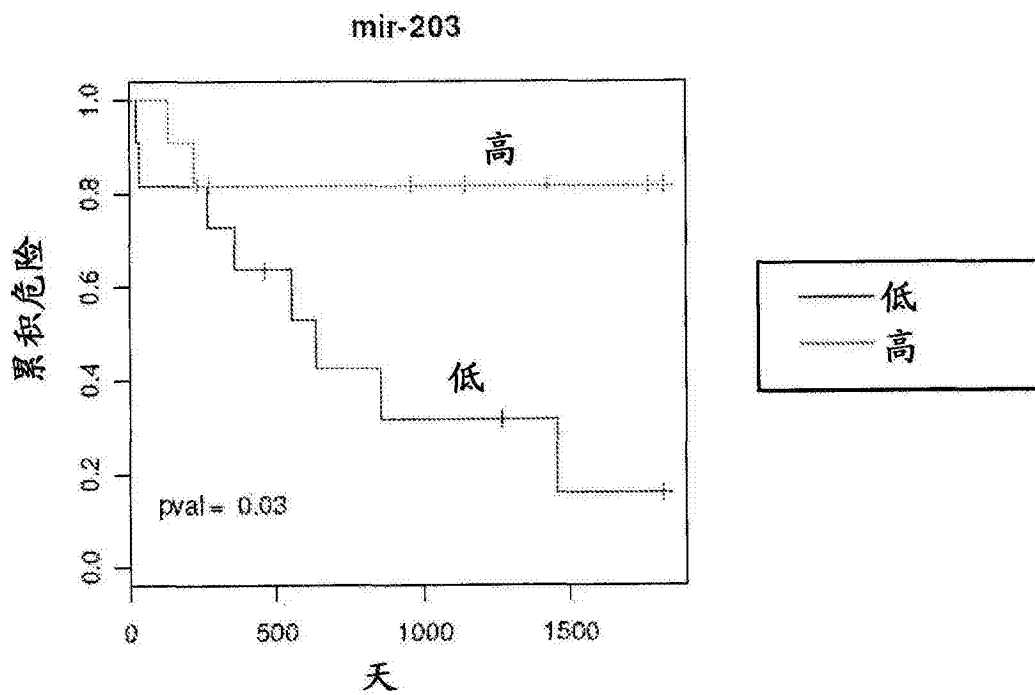
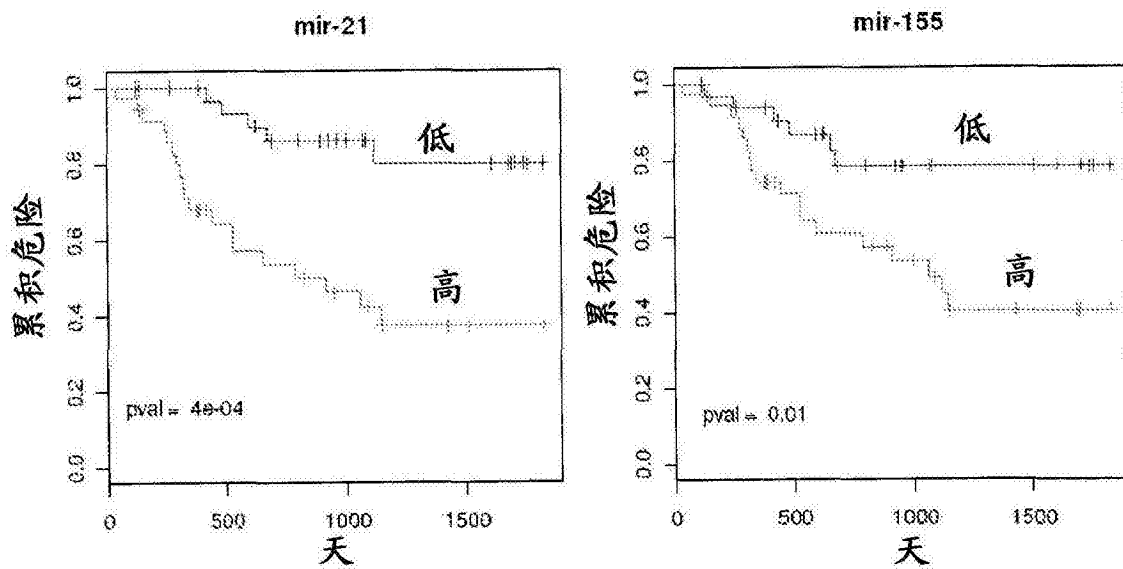


图1A

B. 非癌组织



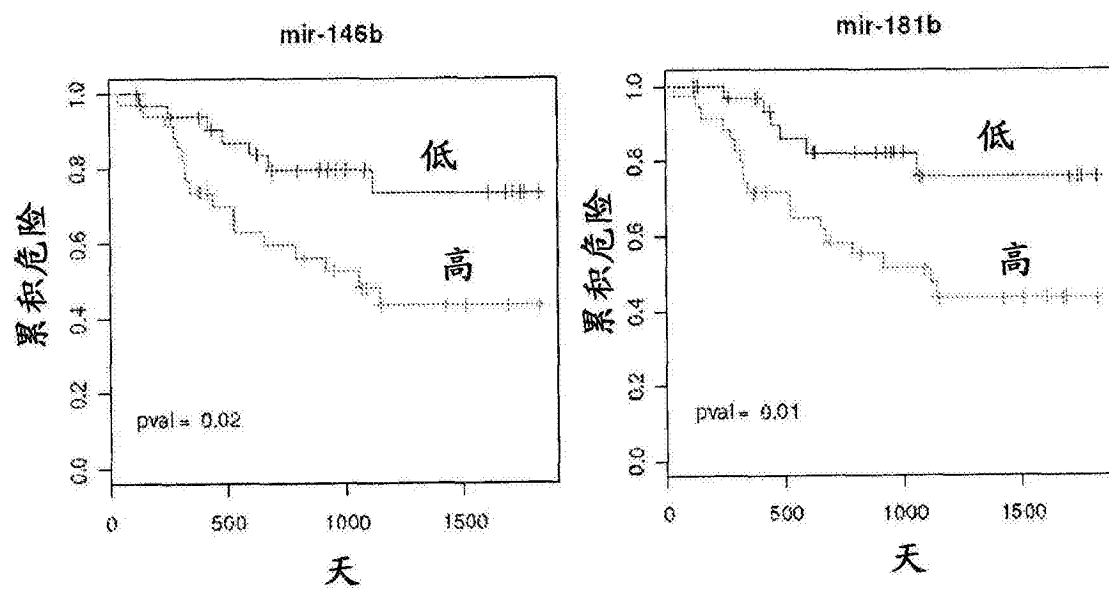


图1B

癌组织

mir-375

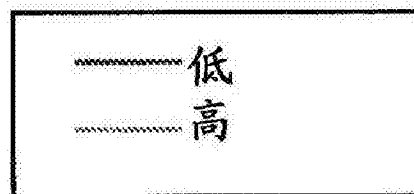
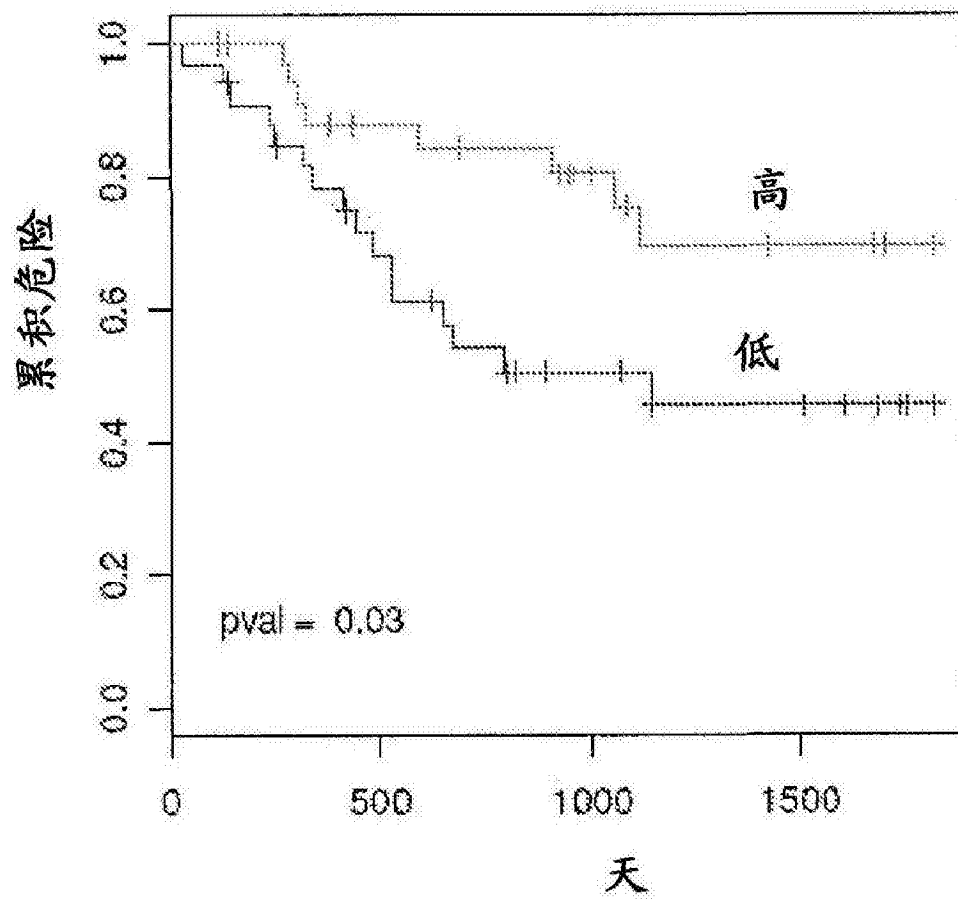


图1B续

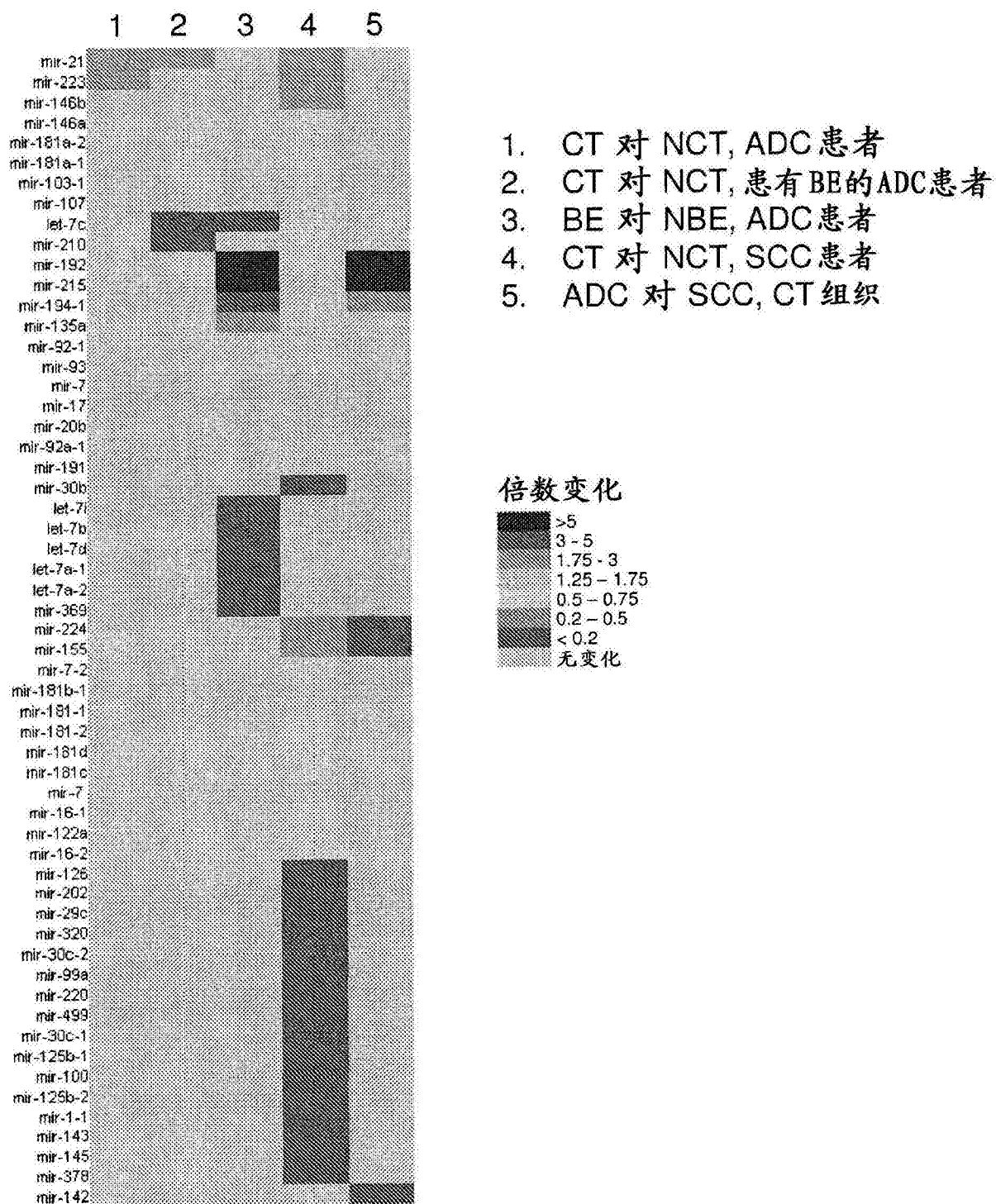


图1C

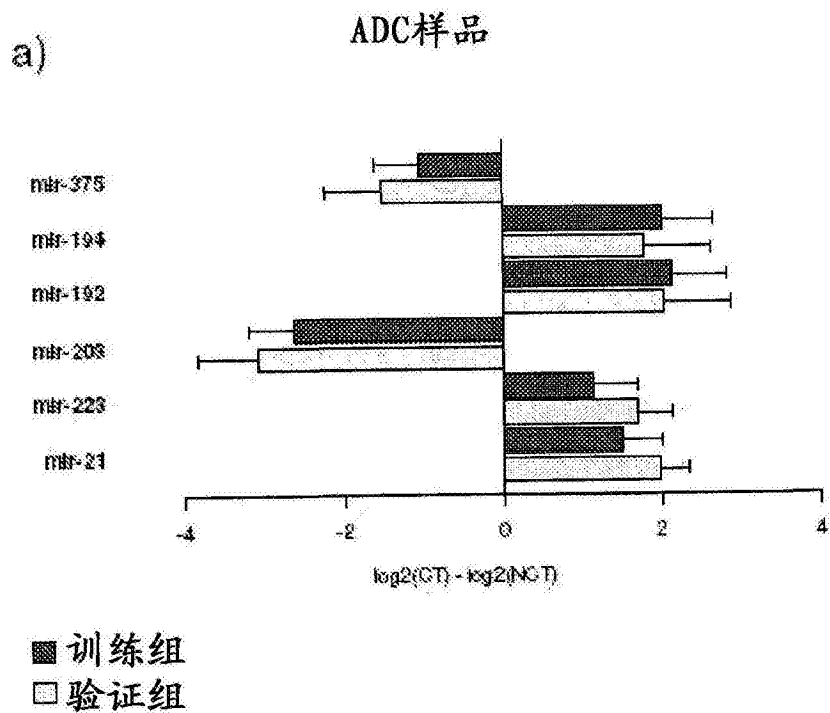


图2A

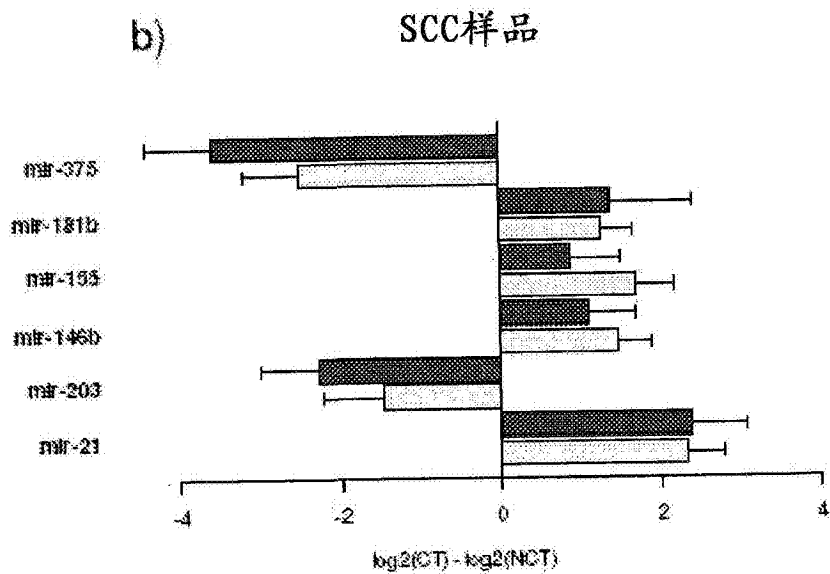


图2B

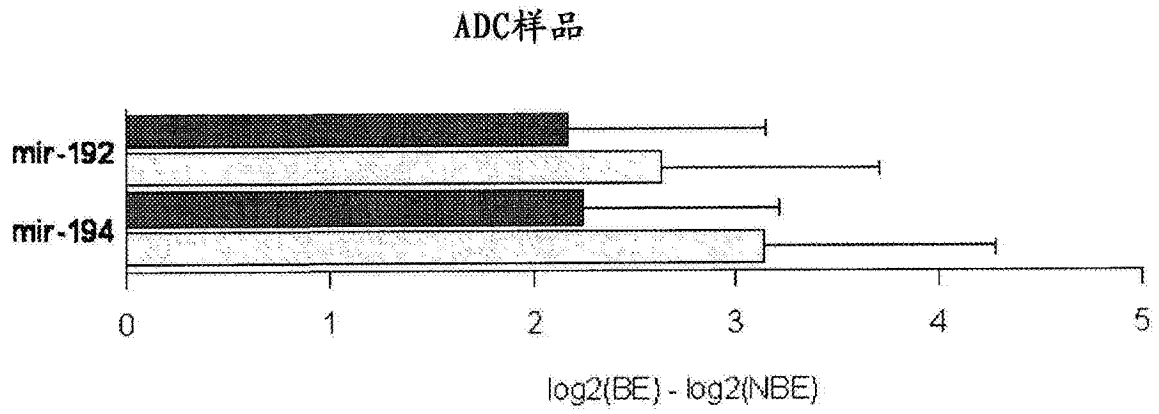


图3

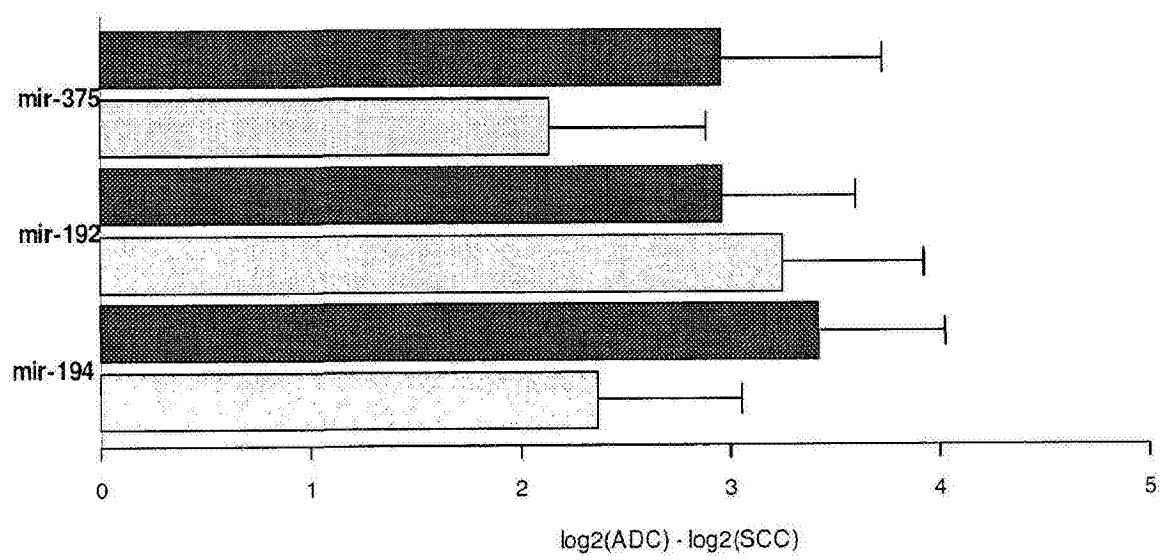


图4

样品类型	特征	训练组		验证组		P*
		MD群组1	日本群组	MD群组2	Cornell 群组	
腺癌和 Barrett's食管	总计	32	NA	41	NA	
	性别					0.5
	男	29		34		
	女	3		7		
	年龄					0.1
	< 62	21		18		
	≥ 62	11		23		
	Barrett's食管 (仅腺癌)					0.15
	是	18		30		
	否	14		11		
	化学放射治疗					0.8
	是	19		26		
	否	13		15		
	饮酒					0.4
	是	24		20		
	否	7		10		
	未知	1		11		
	吸烟					1
	是	25		20		
	否	6		5		
	未知	1		16		
	病理分期†					0.1
	0	9		11		
	I	4		14		
	II	13		7		
	III	4		7		
	IV	2		2		
鳞状细胞癌	总计	11	33	13	13	
	性别					0.002
	男	7	30	5	10	
	女	4	3	8	3	
	年龄					0.6
	< 62	5	14	6	3	
	≥ 62	6	19	7	10	
	化学放射治疗					0.16
	是	5	15	9	4	
	否	6	18	3	9	
	未知	0	0	1	0	
	饮酒					0.4
	是	7	26	11	0	
	否	1	5	0	0	
	未知	3	2	2	13	
	吸烟					0.8
	是	9	24	10	11	
	否	1	7	1	2	
	未知	1	2	2	0	
	病理分期†					0.002
	0	3	2	7	0	
	I	2	5	0	1	
	II	6	12	3	3	
	III	0	6	1	4	
	IV	0	8	1	5	
	未知	0	0	1	0	

*根据Fisher确切检验计算的P

†在手术时确定

图5

样品	比较	具有包含成熟序列的差异表达的探针的miRNA*
腺癌	表型	
	CT 对 NCT (32CT, 32NCT)	<u>mir-21</u> , <u>mir-223</u> , <u>mir-146b</u> , <u>mir-146a</u> , <u>mir-181a-2</u> , <u>mir-181a-1</u> , <u>mir-203</u> , <u>mir-205</u>
	CT 对 NCT, BE 病例 (18CT, 18 NCT)	<u>mir-21</u> , <u>mir-103-1</u> , <u>mir-107</u> , <u>let-7c</u> , <u>mir-210</u> , <u>mir-203</u> , <u>mir-205</u>
	Barrett's 食管状态	
	BE 对 NBE, CT 病例 (18 BE, 14 NBE)	<u>mir-192</u> , <u>mir-215</u> , <u>mir-194-1</u> , <u>mir-135a</u> , <u>mir-92-1</u> , <u>mir-93</u> , <u>mir-7</u> , <u>mir-17</u> , <u>mir-20b</u> , <u>mir-92a-1</u> , <u>mir-107</u> , <u>mir-103-1</u> , <u>mir-191</u> , <u>let-7b</u> , <u>let-7i</u> , <u>let-7d</u> , <u>let-7a-1</u> , <u>let-7a-2</u> , <u>mir-369</u> , <u>let-7c</u>
鳞状 细胞癌	表型	
	CT 对 NCT (44CT, 44 NCT)	<u>mir-21</u> , <u>mir-223</u> , <u>mir-146b</u> , <u>mir-224</u> , <u>mir-155</u> , <u>mir-7-2</u> , <u>mir-181b-1</u> , <u>mir-146a</u> , <u>mir-181-1</u> , <u>mir-181-2</u> , <u>mir-181d</u> , <u>mir-181e</u> , <u>mir-7</u> , <u>mir-16-1</u> , <u>mir-122a</u> , <u>mir-125a</u> , <u>mir-16-2</u> , <u>mir-202</u> , <u>mir-29c</u> , <u>mir-30b</u> , <u>mir-30c-2</u> , <u>mir-126</u> , <u>mir-99a</u> , <u>mir-220</u> , <u>mir-320</u> , <u>mir-499</u> , <u>mir-30c-1</u> , <u>mir-125b-1</u> , <u>mir-125b-2</u> , <u>mir-1-1</u> , <u>mir-145</u> , <u>mir-143</u> , <u>mir-378</u> , <u>mir-200b</u> , <u>mir-1-2</u> , <u>mir-133a-2</u> , <u>mir-133a-1</u> , <u>mir-375</u> , <u>mir-203</u>
所有样品	组织学	
	ADC 对 SCC, CT 病例 (32 ADC, 44 SCC)	<u>mir-215</u> , <u>mir-192</u> , <u>mir-194-1</u> , <u>mir-142</u> , <u>mir-224</u> , <u>mir-155</u>
* 对肿瘤组织中的表达测量结果进行分析。除非另有说明, 当比较 CT 和 NCT 样品时, 使用配对 t 检验鉴定差异表达的 miRNA, 而当进行其他比较时, 使用非配对 t 检验。使用假发现率方法调整多重比较的 P 值。列出的 miRNA 具有对应的差异表达的成熟探针 (P<0.01 和 FDR<10%), 其中倍数变化大于 1.25 或小于 0.75。按照倍数变化对 miRNA 排序, 下划线的 miRNA 上调而其他 miRNA 下调。CT: 癌组织, NCT: 非癌组织。BE: Barrett's 食管, NBE: 非 Barrett's 食管。		

图6

53

比较	单变量			多变量		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P ^a
具有NBE的ADC患者						
NCT 中的 mir-203(N=22)	0.2	0.04 - 0.96	0.04	0.2	0.04 - 1.02	0.05
SCC患者						
NCT 中的 mir-21(N=69)	4.99	1.86 - 13.4	0.001	5.21	1.86 - 14.6	0.002
NCT 中的 mir-155(N=69)	3.15	1.25 - 7.9	0.01	3.57	1.3 - 9.9	0.01
NCT 中的 mir-146b(N=69)	2.72	1.13 - 6.56	0.03	2.9	1.14 - 7.3	0.02
NCT 中的 mir-181b(N=69)	3.04	1.21 - 7.67	0.02	3.72	1.36 - 10.1	0.01
CT 中的 mir-375(N=68)	0.41	0.17 - 0.95	0.04	0.31	0.13 - 0.76	0.01
^a 就淋巴结状态和年龄进行调整。比例危险假定符合所有模型。缩写：ADC - 腺癌病例；SCC - 鳞状细胞癌病例；BE - Barrett's 食管；NCT - 非癌组织；CT - 癌组织。						

图7

比较	单变量			多变量			
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P*	
具有NBE的 ADC患者	NCT 中的 mir-203 (N=22)	0.2	0.04 - 0.96	0.04	0.2	0.04 - 1.02	0.05
SCC患者	NCT 中的 mir-21 (N=69)	4.99	1.86 - 13.4	0.001	5.21	1.86 - 14.6	0.002
	NCT 中的 mir-155 (N=69)	3.15	1.25 - 7.9	0.01	3.57	1.3 - 9.9	0.01
	NCT 中的 mir-146b (N=69)	2.72	1.13 - 6.56	0.03	2.9	1.14 - 7.3	0.02
	NCT 中的 mir-181b (N=69)	3.04	1.21 - 7.67	0.02	3.72	1.36 - 10.1	0.01
	CT 中的 mir-375 (N=68)	0.41	0.17 - 0.95	0.04	0.31	0.13 - 0.76	0.01

*就淋巴结状态和年龄进行调整。比例危险假定符合所有模型。
缩写: ADC - 腺癌病例; SCC - 鳞状细胞癌病例; BE - Barrett's 食管;
NCT - 非癌组织; CT - 癌组织。

图8

miRNA探针	miRNA	倍数 变化 CT/NCT	位置	癌相关基因组区域
hsa-mir-21no1	mir-21	2.43	17q23.2	FRA17B (17q23.1); 神经母细胞瘤; Amp (17q23.1). 乳腺癌
hsa-mir-G21-prec-17no1	mir-21	2.36	17q23.2	FRA17B (17q23.1); 神经母细胞瘤; Amp (17q23.1). 乳腺癌
hsa-mir-103-prec-5=103-1	mir-103-1	1.37	5q34	
hsa-mir-107no1	mir-107	1.36	10q23.31	
hsa-mir-107-prec-10	mir-107	1.34	10q23.31	
hsa-let-7c-prec	let-7c	0.68	21q21.1	
hsa-mir-210-prec	mir-210	0.55	11p15.5	Del (11p15.5, LOH11B: 11p15). 肺癌, 卵巢癌
hsa-mir-203-precno1	mir-203	0.18	14q32.33	Del (14q32). 鼻咽癌
hsa-mir-205-prec	mir-205	0.1	1q32.2	

图9

miRNA探针	miRNA	倍数 变化 BE/NBE	位置	癌相关基因组区域
hsa-mir-192no1	mir-192	10.42	11q13.1	FRA11A, Del (11q13), 散发性滤泡性甲状腺肿瘤
hsa-mir-215-precno1	mir-215	8.82	1q41	FRA1H
hsa-mir-192-2/3no1	mir-192	5.31	11q13.1	FRA11A, Del (11q13), 散发性滤泡性甲状腺肿瘤
hsa-mir-194-precno1	mir-194-1	3.42	1q41	FRA1H
hsa-mir-194-2no1	mir-194-1	2.68	1q41	FRA1H
hsa-mir-135-2-prec	mir-135a	1.94	3p21.1	Del (3p21.1-21.2), 肺癌, 乳腺癌
hsa-mir-92-prec-x=92-2	mir-92-1	1.73	13q31.3	
hsa-mir-93-prec-7.1=93-1	mir-93	1.69	7q22.1	FRA7F (7q22)
hsa-mir-007-1-prec	mir-7	1.68	9q21.33	
hsa-mir-017-precno2	mir-17	1.64	13q31.3	
hsa-mir-20bno1	mir-20b	1.62	Xq26.2	
hsa-mir-92-prec-13=92-1no2	mir-92a-1	1.55	13q31.3	
hsa-mir-107no1	mir-107	1.5	10q23.31	
hsa-mir-103-prec-5=103-1	mir-103-1	1.35	5q34	
hsa-mir-191-prec	mir-191	1.33	3p21.31	
hsa-mir-030b-precno2	mir-30b	0.79	8q24.22	
hsa-mir-193-precno2	mir-193a	0.76	17q11.2	Amp (17q11.2), 原发性乳腺癌
hsa-let-7ino1	let-7i	0.74	12q14.1	Amp (12q13-q14, 肺和食管腺癌; 12q13-q1
hsa-let-7b-prec	let-7b	0.71	22q13.31	Del (22q12.3-q13.33, 结肠直肠癌, 星形细胞瘤)
hsa-let-7d-v2-precno2	let-7i	0.71	12q14.1	Amp (12q13-q14, 肺和食管腺癌; 12q13-q1
hsa-let-7d-prec	let-7d	0.68	9q22.32	FRA9D, Del (9q22, 尿道上皮癌)
hsa-let-7a-3-prec	let-7a-1	0.67	9q22.32	FRA9D, Del (9q22, 尿道上皮癌)
hsa-let-7a-2-precno2	let-7a-2	0.63	11q24.1	Del (LOH11CR1, 11q23-124), 乳腺, 肺, 卵巢, 宫颈癌
hsa-mir-369no1	mir-369	0.62	14q32.31	Del (14q32), 鼻咽癌
hsa-let-7c-prec	let-7c	0.58	21q21.1	

图10

miRNA探针	miRNA	倍数 变化 CRT/nCRT	位置	癌相关基因组区域
hsa-mir-1-2no1	mir-1	2.57	18q11.2	
hsa-mir-125b-1	mir-125b	2	11q24.1	
hsa-mir-34ano1	mir-34a	1.92	1p36.22	
hsa-mir-34bno1	mir-34b	1.92	11q23.1	
hsa-mir-934precno1	mir-34a	1.74	1p36.22	
hsa-mir-193-precno2	mir-193a	1.52	17q11.2	Amp (17q11.2); 原发性乳腺癌
hsa-mir-122a-prec	mir-122a	1.51	18q.21.31	LOH (18q); 食管癌 (SCC和ADC)
hsa-mir-196a-1no1	mir-196a	1.51	17q21.32	
hsa-mir-377no1	mir-377	1.48	14q32.31	
hsa-let-7c-prec	let-7c	1.46	21q21.1	
hsa-mir-498no1	mir-498	1.37	19q13.42	
hsa-let-7b-prec	let-7b	1.33	22q13.31	Del (22q12.3-q13.33, 结肠直肠癌, 星形细胞瘤)
hsa-mir-198-prec	mir-198	1.2	3q13.33	
hsa-mir-412no1	mir-412	0.74	14q32.31	
hsa-mir-191-prec	mir-191	0.73	3p21.31	
hsa-mir-335no2	mir-335	0.68	7q32.2	
hsa-mir-007-1-prec	mir-7	0.63	9q21.33	
hsa-mir-010b-precno1	mir-10b	0.59	2q31.1	
hsa-mir-150-prec	mir-150	0.59	19q13.33	
hsa-mir-010a-precno1	mir-10a	0.56	17q21.32	
hsa-mir-015b-precno1	mir-15b	0.54	3q25.33	
hsa-mir-092-prec-13=092-1no2	mir-92a-1	0.52	13q31.3	
hsa-mir-20bno1	mir-20b	0.46	Xq26.2	
hsa-mir-017-precno2	mir-17	0.46	13q31.3	
hsa-mir-092-prec-x=092-2	mir-92-1	0.46	13q31.3	
hsa-mir-106ano1	mir-106a	0.46	Xq26.2	
hsa-mir-200bno2	mir-200b	0.44	1p36.33	
hsa-mir-020-prec	mir-20a	0.42	13q31.3	
hsa-mir-135-2-prec	mir-135a	0.42	3p21.1	Del (3p21.1-21.2); 肺癌, 乳腺癌
hsa-mir-093-prec-7.1=093-1	mir-93	0.41	7q22.1	FRA7F (7q22)
hsa-mir-106bno1	mir-106b	0.41	7q22.1	FRA7F (7q22)
hsa-mir-025-prec	mir-25	0.39	7q22.1	FRA7F (7q22)
hsa-mir-106-prec-x	mir-106a	0.38	Xq26.2	
hsa-mir-200bno1	mir-200b	0.3	1p36.33	Del (1p36.3), NSCLC
hsa-mir-200cno1	mir-200c	0.29	12p13.31	
hsa-mir-141-precno1	mir-141	0.28	12p13.31	
hsa-mir-194-2no1	mir-194-1	0.27	1q41	FRA1H
hsa-mir-375	mir-375	0.26	2q35	
hsa-mir-200a-prec	mir-200b	0.22	1p36.33	Del (1p36.3), NSCLC
hsa-mir-194-precno1	mir-194-1	0.21	1q41	FRA1H
hsa-mir-192-2/3no1	mir-192	0.08	11q13.1	FRA11A, Del (11q13), 散发性滤泡性甲状腺肿瘤
hsa-mir-215-precno1	mir-215	0.04	1q41	FRA1H
hsa-mir-192no1	mir-192	0.04	11q13.1	FRA11A, Del (11q13), 散发性滤泡性甲状腺肿瘤

图11

miRNA探针	miRNA	倍数 变化 CT/CT	位置	癌相关基因组区域
hsa-mir-21no1	mir-21	2.85	17q23.2	FRA17B (17q23.1): 神经母细胞瘤; Amp (17q23.1): 乳腺癌
hsa-mir-021-prec-17no1	mir-21	2.59	17q23.2	FRA17B (17q23.1): 神经母细胞瘤; Amp (17q23.1): 乳腺癌
hsa-mir-223-prec	mir-223	2.38	Xq12	
hsa-mir-146bno1	mir-146b	1.91	10q24.43	
hsa-mir-224-prec	mir-224	1.89	Xq28	FRA1E (Xq28)
hsa-mir-155-prec	mir-155	1.88	21q21.3	
hsa-mir-007-2-precno2	mir-7-2	1.56	15q26.1	
hsa-mir-181b-1no1	mir-181b-1	1.54	1q31.3	
hsa-mir-146-prec	mir-146a	1.45	21q21.1	
hsa-mir-181b-precno1	mir-181-1	1.44	1q31.3	
hsa-mir-181a-precno1	mir-181-2	1.4	9q33.3	Del (9q33-34.1): 膀胱癌, MSLC
hsa-mir-181cno1	mir-181d	1.38	19p13.12	
hsa-mir-181c-precno1	mir-181c	1.34	p13.12	
hsa-mir-007-1-prec	mir-7	1.34	9q21.33	
hsa-mir-016a-chr13	mir-16-1	1.32	13q14.2	Del (13q14): 成人成淋巴细胞性白血病, 脂肪瘤
hsa-mir-016b-chr3	mir-16-2	1.31	3q25.33	
hsa-mir-122a-prec	mir-122a	1.3	18q21.31	LOH (18q): 食管癌 (SCC和ADC)
hsa-mir-125a-precno2	mir-125a	1.29	19q13.41	
hsa-mir-16-2no1	mir-16-2	1.26	3q25.33	
hsa-mir-103-prec-S=103-1	mir-103-1	1.25	5q34	
hsa-mir-107-prec-10	mir-107	1.24	10q23.31	
hsa-mir-328no1	mir-328	1.21	16q22.1	
hsa-mir-130bno1	mir-130b	1.21	22q11.21	
hsa-mir-107no1	mir-107	1.19	10q23.31	
hsa-mir-324-5pno2	mir-324	0.86	17p13.1	Del (17p13): 肝细胞癌
hsa-mir-488no1	mir-488	0.86	19q13.42	
hsa-mir-010b-precno1	mir-10b	0.83	2q31.1	
hsa-mir-519dno1	mir-519d	0.81	10q13.42	
hsa-mir-026a-precno1	mir-26a	0.81	3p22.3	
hsa-mir-123-precno1	mir-126	0.8	9q34.3	
hsa-mir-320no1	mir-320	0.79	8p21.3	Del (8p21, MRL1): HCC
hsa-mir-196-1-precno1	mir-196a-1	0.77	17q21.32	
hsa-mir-028a-2no1	mir-28a	0.77	7q32.3	
hsa-mir-26a-1no1	mir-26a	0.77	3p22.3	
hsa-mir-032-precno2	mir-32	0.77	9q31.3	FRA1E (9q32-33.1):
hsa-mir-26a-2no1	mir-26a	0.76	3p22.3	
hsa-mir-202	mir-202	0.75	10q26.3	
hsa-mir-028c-prec	mir-25c	0.75	1q32.2	
hsa-mir-126/1no2	mir-126	0.74	9q34.3	
hsa-mir-123-precno2	mir-126	0.73	9q34.3	
hsa-mir-030c-prec	mir-30c-2	0.73	6q13	
hsa-mir-030b-precno1	mir-30b	0.73	8q24.22	
hsa-mir-099-prec-21	mir-99a	0.72	21q21.1	
hsa-mir-30c-2no1	mir-30c-2	0.72	6q13	
hsa-mir-126no1	mir-126	0.72	9q34.3	
hsa-mir-220-prec	mir-220	0.71	Xq26	Del (Xq25-26.1): 晚期卵巢癌
hsa_mir_320_hcd306 right	mir-320	0.71	8p21.3	Del (8p21, MRL1): HCC
hsa-mir-125a-precno1	mir-125a	0.68	19q13.41	
hsa-mir-499no1	mir-499	0.67	20q11.22	
hsa-mir-100-1/2-prec	mir-100	0.65	11q24.1	Del (LOH11CR1, 11q23-124): 乳腺, 肺, 卵巢, 宫颈癌
hsa-mir-30c-1no1	mir-30c-1	0.65	1p34.2	
hsa-mir-125b-1	mir-125b-1	0.64	11q24.1	Del (LOH11CR1, 11q23-124): 乳腺, 肺, 卵巢, 宫颈癌
hsa-mir-125b-2-precno2	mir-125b-2	0.62	21q21.1	
hsa-mir-100no1	mir-100	0.59	11q24.1	Del (LOH11CR1, 11q23-124): 乳腺, 肺, 卵巢, 宫颈癌
hsa-mir-145-prec	mir-145	0.59	5q22	Del (5q31-33; 5q32): 侵袭性前列腺癌, 骨髓增生异常
hsa-mir-143-prec	mir-143	0.59	5q32	Del (5q31-33; 5q32): 侵袭性前列腺癌, 骨髓增生异常
hsa-mir-1-1no1	mir-1-1	0.59	20q13.33	Amp (20q13): 结肠癌
hsa-mir-378no2	mir-378	0.58	5q32	Del (5q32; 5q31-33): 骨髓增生异常综合征, 侵袭性前列腺癌
hsa-mir-200a-prec	mir-200b	0.43	1p36.33	Del (1p36.3): NSCLC
hsa-mir-001b-2-prec	mir-1-2	0.45	18q11.2	
hsa-mir-001b-1-prec1	mir-1-2	0.44	18q11.2	LOH (18q): 食管癌 (SCC和ADC)
hsa-mir-1-2no1	mir-1-2	0.43	18q11.2	LOH (18q): 食管癌 (SCC和ADC)
hsa-mir-133a-2	mir-133a-2	0.41	20q13.33	Amp (20q13): 结肠癌
hsa-mir-133a-1	mir-133a-1	0.39	18q11.2	LOH (18q): 食管癌 (SCC和ADC)
hsa-mir-375	mir-375	0.36	2q35	
hsa-mir-203-precno1	mir-203	0.31	14q32.33	Del (14q32): 鼻咽癌

图12

miRNA探针	miRNA	倍数 变化 N=0/N=1	位置	癌相关基因组区域
hsa-mir-143-prec	mir-143	2.18	5q32	Del(5q31-33; 5q32); 侵袭性前列腺癌, 骨髓增生异常
hsa-mir-105-2no1	mir-105	2.08	Xp23	
hsa-mir-193bno1	mir-193b	2.03	16p13.12	
hsa-mir-378no2	mir-378	1.88	5q32	Del(5q32; 5q31-33); 骨髓增生异常综合征, 侵袭性前列腺癌
hsa-mir-185-precno1	mir-185	1.51	22q11.21	
hsa-mir-126no2	mir-126	1.42	9q34.3	
hsa-mir-024-1-precno1	mir-24	1.39	9q22.32	FRA9D, Del(9q22, 尿道上皮癌)
hsa-mir-126*no1	mir-126	1.37	9q34.3	
hsa-mir-129-2no1	mir-129-1	1.32	7q32.1	
hsa-let-7a-1-prec	let-7a	1.29	9q22.32	FRA9D, Del(9q22, 尿道上皮癌)
hsa-mir-092-prec-13=092-1no2	mir-92a-1	0.71	13q31.3	
hsa-let-7d-prec	let-7d	0.69	9q22.32	FRA9D, Del(9q22, 尿道上皮癌)
hsa-mir-412no1	mir-412	0.65	14q32.31	
hsa-mir-342no1	mir-342	0.64	14q32.2	
hsa-mir-34ano1	mir-34a	0.63	1p36.22	
hsa-mir-009-1no1	mir-9-1	0.62	1q23.1	
hsa-mir-150-prec	mir-150	0.62	19q13.33	
hsa-let-7c-prec	let-7c	0.57	21q21.1	

图13

<u>miRNA探针</u>	<u>miRNA</u>	<u>倍数变化</u> 0-III-IV	<u>位置</u>	<u>癌相关基因组区域</u>
hsa-mir-021-prec-17no1	mir-21	1.94	17q23.2	FRA17B (17q23.1); 神经母细胞瘤; Amp (17q23.1); 乳腺癌
hsa-mir-21no1	mir-21	1.83	17q23.2	FRA17B (17q23.1); 神经母细胞瘤; Amp (17q23.1); 乳腺癌

图 14

<u>miRNA探针</u>	<u>miRNA</u>	<u>倍数变化</u> ADC/SCC	<u>位置</u>	<u>癌相关基因组区域</u>
hsa-mir-215-precno1	mir-215	9.29	1q41	FRA1H
hsa-mir-192no1	mir-192	8.32	11q13.1	FRA11A, Del (11q13); 散发性滤泡性甲状腺肿瘤
hsa-mir-192-2/3no1	mir-192	4.9	11q13.1	FRA11A, Del (11q13); 散发性滤泡性甲状腺肿瘤
hsa-mir-194-precno1	mir-194-1	2.3	1q41	FRA1H
hsa-mir-194-2no1	mir-194-1	2.04	1q41	FRA1H
hsa-mir-142-prec	mir-142	0.72	17q23.2	
hsa-mir-224-prec	mir-224	0.7	Xq28	FRAXF (Xq28)
hsa-mir-155-prec	mir-155	0.67	21q21.3	

图 15

患者	分类	CV % 准确度 (P ¹)				自举 差异 P ²
		使用的所有 miRNA		“永存” miRNAs		
		% 准确度	95% CI	% 准确度	95% CI	
ADC	肿瘤状态					
	CT 对 NCT	<u>71.2 (0.005)</u>	69.7-72.6	42.6 (0.15)	21.4-51.6	<u>0.003</u>
	CT 对 NCT, BE 病例	<u>77.3 (0.006)</u>	76.2-78.5	53.4 (0.026)	13.6-53.7	<u>0.01</u>
	CT 对 NCT, NBE 病例	58.4 (0.4)	56.6-60.1	27.1 (0.5)	11.5-55.9	<u>0.05</u>
SCC	Barrett's 食管状态					
	BE 对 NBE, CT	<u>78.1 (0.003)</u>	78.1-78.1	58.6 (6e-4)	24.5-43.9	<u>0.02</u>
	肿瘤状态					
	CT 对 NCT	<u>85.6 (<1e-4)</u>	83.6-88.3	65.3 (<1e-4)	24.4-50.7	<u>1.00E-04</u>
全部	组织学					
	ADC 对 SCC, CT	<u>82 (<1e-4)</u>	79.7-84.3	48.6 (1e-4)	40.9-42.4	<u><1.00E-04</u>
	ADC 对 SCC, NCT	<u>84.6 (<1e-4)</u>	82.5-86.7	61.4 (5e-4)	23.7-51.9	<u>0.0002</u>
	ADC 对 SCC, 仅 CT NBE	<u>80.4 (0.0025)</u>	79.2-81.6	67.7 (0.74)	66.2-75.9	<u>0.03</u>
	ADC 对 SCC, 仅 NCT NBE	<u>80.3 (<0.0016)</u>	74.9-85.7	64.4 (0.33)	65.5-75.9	<u>0.01</u>

对每个分类进行 20 次 PAM 迭代并报道 10 倍交叉验证百分比准确度。永存 miRNA 用于至少 80 % 的迭代中的最终 PAM 模型中。C. I: 置信区间; P¹: 排列 p 值; 自举差异 P²: 准确度的差异的自举 P (参见补充材料)。

对每个分类进行 20 次 PAM 迭代并报道 10 倍交叉验证百分比准确度。永存 miRNA 用于至少 80 % 的迭代中的最终 PAM 模型中。C.I.: 置信区间; P¹: 排列 p 值; 自举差异 P²: 准确度的差异的自举 P (参见补充材料)。

图16

患者	分类	永存miRNA探针*
ADC	肿瘤状态	
	CT 对 NCT	hsa-mir-205-prec, hsa-mir-203-precno1, hsa-mir-202-prec
	CT 对 NCT, BE 病例	hsa-mir-205-prec, hsa-mir-202-prec
	CT 对 NCT, NBE 病例	hsa-mir-203-precno1, hsa-mir-148bno1, hsa-mir-135-2-prec, hsa-mir-375, hsa-mir-205-prec, hsa-mir-021-prec-17no1, hsa-mir-486, hsa-mir-21no1, hsa-mir-092-prec-x=092-2, hsa-mir-202-prec, hsa-mir-321no1
SCC	Barrett's食管状态	
	BE 对 NBE, CT	hsa-mir-194-precno1, hsa-mir-215-precno1, hsa-mir-192no1, hsa-mir-192-2/3no1, hsa-mir-194-2no1
全部	肿瘤状态	
	CT 对 NCT	hsa-mir-21no1, hsa-mir-021-prec-17no1, hsa-mir-375, hsa-mir-223-prec, hsa-mir-146bno1, hsa-mir-155-prec, hsa-mir-202-prec, hsa-mir-133a-2, hsa-mir-133a-1, hsa-mir-224-prec, hsa-mir-001b-1-prec1, hsa-mir-203-precno1, hsa-mir-1-2no1, hsa-mir-001b-2-prec, hsa-mir-007-2-precno2, hsa-mir-100no1
	ADC 对: SCC, CT	hsa-mir-215-precno1, hsa-mir-192-2/3no1, hsa-mir-192no1, hsa-mir-205-prec, hsa-mir-194-precno1, hsa-mir-301no2, hsa-mir-196-2-precno2, hsa-mir-194-2no1, hsa-mir-196a-2no1, hsa-mir-34ano1, hsa-mir-191-prec, hsa-mir-125b-1, hsa-mir-361no2, hsa-mir-375, hsa-mir-130bno1, hsa-mir-125b-2-precno2, hsa-mir-125a-precno1, hsa-mir-433no1, hsa-mir-222-precno1, hsa-mir-34bno1
	ADC 对: SCC, NCT	hsa-mir-301no2, hsa-mir-196-2-precno2, hsa-mir-361no2, hsa-mir-222-precno1, hsa-mir-34ano1
全部	ADC 对: SCC, 仅CT NBE	hsa-mir-34ano1, hsa-mir-205-prec, hsa-mir-125b-1, hsa-mir-301no2, hsa-mir-196-2-precno2, hsa-mir-215-precno1, hsa-mir-125b-2-precno2, hsa-mir-192-2/3no1, hsa-mir-130bno1, hsa-mir-34bno1, hsa-mir-192no1, hsa-mir-125a-precno1, hsa-mir-107no1, hsa-mir-034precno1, hsa-mir-148ano1, hsa-mir-106bno1, hsa-mir-20bno1, hsa-mir-389no1, hsa-mir-361no2, hsa-mir-383no1, hsa-mir-145-prec
	ADC 对: SCC, 仅NCT NBE	hsa-mir-34ano1, hsa-mir-361no2, hsa-mir-301no2, hsa-mir-196-2-precno2, hsa-mir-027a-prec, hsa-mir-383no1, hsa-mir-7c-prec, hsa-mir-222-precno1, hsa-mir-027b-prec, hsa-mir-371no2, hsa-mir-369no1, hsa-mir-7d-v2-precno2, hsa-mir-106ano1

* 永存miRNA 探针用于至少80%的迭代中的最终PAM分类模型中。

图17

A. 无Barrett's食管的腺癌患者

	比较	单变量			多变量 - mir-203		
		HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
非癌组织	mir-203						
	低: <中值	0.2	0.04 - 0.96	0.04	0.21	0.04 - 1.02	0.05
	高: ≥中值						
	CRT						
	是 (N=20)	0.76	0.09 - 6.1	0.8			
	否 (N=2)						
	分期						
	0_I (N=11)	1.69	0.48 - 6.01	0.42			
	II_IV (N=11)						
	淋巴结						
	0 (N=14)	2.4	0.69 - 8.39	0.17	2.01	0.54 - 7.5	0.3
	1 (N=8)						
	吸烟						
	是 (N=16)	1.54	0.19 - 12.2	0.68			
	否 (N=3)						
	酒精						
	是 (N=16)	0.37	0.1 - 1.49	0.16			
	消费						
	否 (N=4)						
	性别						
	男 (N=16)	1.43	0.3 - 6.8	0.65			
	女 (N=6)						
	年龄						
	< 62 (N=14)	0.34	0.07 - 1.63	0.18	0.59	0.14 - 2.5	0.47
	≥ 62 (N=8)						

缩写: CRT-化学放射治疗。比例危险假定符合所有模型。

图18A

B. 鳞状细胞癌患者

比较	单变量			多变量 - mir-21		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
mir-21	低:<中值 高:>=中值	4.99 1.86 - 13.4	0.001	5.21 1.86 - 14.6	0.002	
mir-155	低:<中值 高:>=中值	3.15 1.25 - 7.9	0.01			
mir-146b	低:<中值 高:>=中值	2.72 1.13 - 6.56	0.03			
mir-181b	低:<中值 高:>=中值	3.04 1.21 - 7.67	0.02			
CRT	是 (N=32) 否 (N=36)	1.51 0.68 - 3.36	0.3			
TNM 分期	0_I (N=20) II_IV (N=48)	1.49 0.59 - 3.77	0.4			
淋巴结	0 (N=33) 1 (N=35)	2.22 0.95 - 5.19	0.07	2.4 0.95 - 6.1	0.06	
吸烟	是 (N=53) 否 (N=11)	1.5 0.44 - 5.05	0.5			
酒精消费	是 (N=44) 否 (N=5)	1.85 0.25 - 13.9	0.5			
性别	男 (N=18) 女 (N=18)	1.21 0.48 - 3.05	0.7			
年龄	< 62 (N=41) ≥ 62 (N=28)	1.52 0.65 - 3.57	0.3	0.77 0.3 - 2.03	0.6	

缩写: CRT-化学放射治疗。比例危险假定符合所有模型。

比较	单变量			多变量 - mir-375		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
mir-375	低:<中值 高:>=中值	0.41 0.17 - 0.95	0.04	0.31 0.13 - 0.76	0.01	
CRT	是 (N=32) 否 (N=36)	1.51 0.68 - 3.36	0.3			
TNM分期	0_I (N=20) II_IV (N=48)	1.49 0.59 - 3.77	0.4			
淋巴结	0 (N=33) 1 (N=35)	2.22 0.95 - 5.19	0.07	2.5 1.05 - 6	0.04	
性别	男 (N=51) 女 (N=18)	1.21 0.48 - 3.05	0.7			
年龄	< 62 (N=41) ≥ 62 (N=28)	1.52 0.65 - 3.57	0.3	1.68 0.7 - 4.04	0.2	

缩写: CRT-化学放射治疗。比例危险假定符合所有模型。

图18B