



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103602724 B

(45) 授权公告日 2016.03.16

(21) 申请号 201310394618.6

A61P 35/00(2006.01)

(22) 申请日 2008.06.09

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/942,833 2007.06.08 US

CN 1769495 A, 2006.05.10,

WO 03/102215 A2, 2003.12.11,

US 2007/0065840 A1, 2007.03.22,

US 2006/0084059 A1, 2006.04.20,

jinmai jiang, et al..real-time

(62) 分案原申请数据

200880025276.8 2008.06.09

(73) 专利权人 由卫生与公众服务部代表的美利坚合众国政府

地址 美国马里兰州

专利权人 俄亥俄州立大学研究基金会

expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. 《nucleic acids research》. 2005, 第 33 卷 (第 17 期), 第 5394-5403 页.

(72) 发明人 X·W·王 J·季 T·亚玛史塔 C·M·克罗斯

肖雪媛等. 体外培养的不同亚型肝细胞差异蛋白的初步筛查. 《解剖学报》. 2004, 第 35 卷 (第 6 期), 第 602-606 页.

(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

审查员 方晓云

代理人 林远成

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12Q 1/04(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 27/447(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书25页

序列表5页 附图18页

(54) 发明名称

确定肝细胞癌亚型和检测肝癌干细胞的方法

(57) 摘要

本发明提供了在受治疗者中确定 HCC 亚型的方法,其包括 a) 从所述受治疗者获得样品, b) 测定样品以检测 1 种或多种生物标志物的表达,以及 c) 将所述生物标志物的表达与受治疗者中的 HCC 亚型相关联。本发明还提供了在样品中检测 HCC 干细胞的方法。此外,本发明提供了用于治疗患有 HCC 的受治疗者的方法和组合物,其利用了与 HCC 干细胞相关的生物标志物。

1. 生物标志物特异性寡核苷酸探针在制备用于确定在受治疗者中肝干细胞样肝细胞癌 (HSC-HCC) 亚型的试剂中的用途, 其包括:

- a) 从所述受治疗者获得样品,
- b) 分析所述样品的生物标志物标记的表达, 以及
- c) 将所述生物标志物的表达与所述受治疗者中 HCC 的 HSC 亚型相关联, 其中所述生物标志物是 miR-181a 和 miR-181c。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其中所述样品选自由肝脏肿瘤组织、肝脏正常组织、冷冻的活检组织、石蜡包埋的活检组织、血清、血浆以及其组合组成的组。

3. 如权利要求 1-2 中任一项所述的用途, 其中通过选自由微阵列技术、PCR 扩增、RNA 杂交、原位杂交、凝胶电泳及其组合组成的组的一种或多种方法分析所述样品。

确定肝细胞癌亚型和检测肝癌干细胞的方法

[0001] 本申请是申请日为 2008 年 6 月 9 日、申请号为 200880025276.8 的同名申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉参考

[0003] 本申请要求 2008 年 6 月 9 日提交的 PCT 申请号 PCT/US08/007196 的权益,后者要求 2007 年 6 月 8 日提交的美国临时申请号 60/942,833 的优先权,其公开内容在此引入作为参考。

[0004] 关于联联邦政府资助的研究的声明

[0005] 本发明是在政府资助下完成的,由美国国家癌症协会的内部研究计划授予的 NCI 补助金号为 RO1CA128609。政府拥有本发明中的某些权利。

[0006] 发明背景

[0007] 肝细胞癌(HCC)是世界范围内癌症死亡的第三大主要原因。HCC 就其临床表现以及基因组模式和转录模式来说是非常异质的。HCC 的异质性和用于其检测和亚型鉴定的适当的生物标志物的缺乏已经妨碍了患者的预后和治疗层级。

[0008] 因此,存在对于能够在哺乳动物中鉴定 HCC 的亚型的一种或多种生物标志物以及对以 HCC 的亚型为基础提供适当治疗的方法的需求。

[0009] 发明简述

[0010] 本发明提供在受治疗者中确定 HCC 的亚型的方法,所述方法包括 a) 从受治疗者获得样品,b) 测定样品以检测至少 1 种生物标志物,以及 c) 将所检测的生物标志物与受治疗者中的 HCC 亚型相关联。在这一点上,所述生物标志物选自由 SEQ ID NO:1-39 标识的生物标志物所组成的组。

[0011] 本发明还提供在样品中检测 HCC 干细胞的方法,在一个实施方案中,本发明的方法包括 a) 获得样品,b) 测定样品以检测 mir-181 生物标志物的存在,以及 c) 将 mir-181 生物标志物的存在或不存在与样品中 HCC 干细胞的存在或不存在相关联。

[0012] 本发明还提供用于治疗患有 HCC 的受治疗者的方法和组合物,其利用与 HCC 干细胞相关的生物标志物。

[0013] 附图的不同视图的简述

[0014] 图 1A 显示 mir-181a1 的表达,其为以微小 RNA 分析为基础的 HSC-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0015] 图 1B 显示 mir-181a2 的表达,其为以微小 RNA 分析为基础的 HSC、DBE、HP 和 MH-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0016] 图 1C 显示 mir-181b1 的表达,其为以微小 RNA 分析为基础的 HSC、DBE、HP 和 MH-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0017] 图 1D 显示 mir-181b2 的表达,其为以微小 RNA 分析为基础的 HSC、DBE、HP 和 MH-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0018] 图 1E 显示 mir-181c 的表达,其为以微小 RNA 分析为基础的 HSC、DBE、HP 和 MH-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0019] 图 1F 显示 mir-181a 的表达,其为如通过 RT-PCR 所测定的 HSC、DBE、HP 和 MH-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0020] 图 1G 显示 mir-181b 的表达,其为如通过 RT-PCR 所测定的 HSC、DBE、HP 和 MH-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0021] 图 1H 显示 mir-181c 的表达,其为如通过 RT-PCR 所测定的 HSC、DBE、HP 和 MH-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0022] 图 1I 显示 mir-181d 的表达,其为如通过 RT-PCR 所测定的 HSC、DBE、HP 和 MH-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0023] 图 1J 显示 mir-213 的表达,其为如通过 RT-PCR 所测定的 HSC、DBE、HP 和 MH-HCC 细胞中(肿瘤与非肿瘤组织的) $\log(2)$ 比率。

[0024] 图 2A 显示 mir-181a1 的散布图。

[0025] 图 2B 显示 mir-181a2 的散布图。

[0026] 图 2C 显示 mir-181b1 的散布图。

[0027] 图 2D 显示 mir-181b2 的散布图。

[0028] 图 2E 显示 mir-181c 的散布图。

[0029] 图 3A 是显示 0、2 和 8 天时 ESC 培养基相比于常规培养中 mir-181a、mir-181b、mir-181c 和 mir-181d 产生倍数的图示。

[0030] 图 3B 是显示 0、2 和 8 天时 ESC 培养基相比于常规培养中 CAR 和 UGT2B7 的倍数的图示。

[0031] 图 3C 是显示 0、2 和 8 天时 ESC 培养基相比于常规培养中 CCND1 和 TACSTD1 产生倍数的图示。

[0032] 图 3D 是显示撤走 ESC 培养基后 0、1、2 和 8 天时 mir-181a、mir-181b、mir-181c 和 mir-181d 产生倍数的图示。

[0033] 图 3E 是显示撤走 ESC 培养基后 0、1、2 和 8 天时 CAR 和 UGT2B7 产生倍数的图示。

[0034] 图 3F 是显示撤走 ESC 培养基后 0、1、2 和 8 天时 CCND1 和 TCSTD1 产生倍数的图示。

[0035] 图 4 是在 pMSCV-hTR 和 pMSCV-mir-181b1 处理的 HuH1 细胞中 mir-181b 的相对表达的图示。

[0036] 图 5 是在用 2' -O- 甲基反义相比于对照转染的 HuH7 细胞中 mir-181 的相对表达的图示。

[0037] 图 6A 是在 pMSCV-hTR 和 p-MSCV-mir-181b1 处理的 HuH1 细胞中 CCND1 的相对表达的图示。

[0038] 图 6B 是在 pMSCV-hTR 和 p-MSCV-mir-181b1 处理的 HuH1 细胞中 TACTD1 的相对表达的图示。

[0039] 图 6C 是在 pMSCV-hTR 和 p-MSCV-mir-181b1 处理的 HuH1 细胞中 DKK1 的相对表达的图示。

[0040] 图 6D 是在对照和反义处理的 HuH7 细胞中 CCND1 的相对表达的图示。

[0041] 图 6E 是在对照和反义处理的 HuH7 细胞中 TACSTD1 的相对表达的图示。

[0042] 图 6F 是在对照和反义处理的 HuH7 细胞中 DKK1 的相对表达的图示。

[0043] 图 7A 显示在 DKK1 的 611-6323' -UTR 处的 mir-181a、mir-181b、mir-181c 和

mir-181d 的预测的结合位点。

[0044] 图 7B 显示在 DKK1 的 771-7993' -UTR 处的 mir-181a、mir-181b、mir-181c 和 mir-181d 的预测的结合位点。

[0045] 图 8A 是预测的 mir-181a1 和 mir-181b1 的 TCF-4 结合位点。

[0046] 图 8B 是预测的 mir-181a2 和 mir-181b2 的 TCF-4 结合位点。

[0047] 图 8C 是预测的 mir-181c 和 mir-181d 的 TCF-4 结合位点。

[0048] 图 8D 是预测的 mir-181c 和 mir-181d 的另一个 TCF-4 结合位点。

[0049] 图 9 是在每种细胞系(Hep3b B 型(HSC-HCC)、MHCC97C 型(HP-HCC)、Smmc7721D 型(MH-HCC))相比于原代肝细胞中 mir-181a、mir-181b、mir-181c 和 mir-181d 的倍数的图示。

[0050] 图 10 是在 HSC-HCC、BDE-HCC、HP-HCC 和 MH-HCC 亚型中具有升高和降低表达的 miRNA 的数目的图示。

[0051] 发明详述

[0052] 微小 RNA (或 miRNA) 是存在于许多生物中并且通过主要在 3' 未翻译区中与 mRNA 的部分互补位点的碱基配对而在 mRNA 翻译和降解中起到关键调节作用的小的非编码的 RNA 基因产物(例如,约 22nt)。Lee, Science, 294(5543):862-864(2001);Lau, Science, 294(5543):858-862(2001);Lagos, Science, 294(5543):853-858(2001)。miRNA 被表达为长的前体 RNA,其被 Drosha,一种细胞核酸酶加工并且随后通过输出蛋白 -5(exportin-5)依赖性的机制被运送至细胞质中。Yi, Genes Dev, 17(24):3011-3016(2003);Gregory, Cancer Res., 65(9):3509-3512(2005)。然后 miRNA 被 DICER 酶切割,产生与 RNA 诱导的沉默样复合体相关联的约 17-24nt 的 miRNA。Lee, EMBO J, 21(17):4663-4670(2002); Hutvagner, Science, 297(5589):2056-2060(2002)。

[0053] 本发明以发现 miRNA 生物标志物与 HCC 亚型相关为基础。为了本发明的目的,HCC 亚型是指肝干细胞样 HCC (HSC-HCC),其为上皮细胞黏附分子 (EpCAM)+ α -胎蛋白 (AFP)+;胆管上皮样 HCC (BDE-HCC),其为 EpCAM+AFP-;肝祖细胞样 HCC (HP-HCC),其为 EpCAM-AFP+;以及成熟肝细胞样 HCC (MH-HCC),其为 EpCAM-AFP-。本发明提供用于鉴定每一种 HCC 亚型的一套生物标志物。

[0054] 在一个实施方案中,本发明提供在受治疗者中确定 HCC 亚型的方法,其包括 a) 从受治疗者获得样品,b) 分析样品的 1 种或多种生物标志物的表达,以及 c) 将 1 种或多种生物标志物的表达与受治疗者中的 HCC 亚型相关联。所述生物标志物的表达可以是相对于正常对照降低或提高的。所述生物标志物是由 SEQ ID NO:1-39 (参见表 1) 标识的。在本发明的方法中,优选的是分析 2 种或更多种、5 种或更多种、10 种或更多种、15 种或更多种、20 种或更多种、25 种或更多种、30 种或更多种或者 35 种或更多种的生物标志物。更优选地,分析所有 39 种生物标志物。为了确定 HSC-HCC 亚型,优选地分析至少由 SEQ ID NO:1-19 标识的生物标志物。为了确定 BDE-HCC 亚型,优选地分析至少由 SEQ ID NO:2、9-17 和 19-35 标识的生物标志物。为了确定 HP-HCC 亚型,优选地分析至少由 SEQ ID NO:1-8、11-13、17-18、23、28-29 和 33-39 标识的生物标志物。为了确定 MH-HCC 亚型,优选地分析至少由 SEQ ID NO:1、8-12、14-17 和 19-39 标识的生物标志物。

[0055] 此外,已经发现与成熟的肝脏细胞相比,HCC 干细胞与 miRNA 生物标志物的 mir-181 家族,尤其是 mir-181a1、mir-181a2、mir-181b1、mir-181b2 和 mir-181c (即,它

们的表达)相关,并且样品中 HCC 干细胞的存在指示与不良预后相关的 HSC-HCC 亚型。相应地,在一个实施方案中,本发明提供检测样品中 HCC 干细胞存在的方法,其包括 a) 获得样品, b) 测定样品以检测 mir-181 生物标志物的存在,以及 c) 将 mir-181 生物标志物的存在或不存在与样品中 HCC 干细胞的存在或不存在相关联。例如,做为选择,EpCAM+AFP+HCC 干细胞可通过任何适合的方法例如免疫荧光、免疫组织化学、冷冻活化的细胞分选、侧群法、细胞表面标志物检测法或原位杂交来检测。例如,在侧群技术中,将细胞通透性 DNA 结合染料 Hoechst 33342 掺入到感兴趣的细胞群中;干细胞和早期祖细胞随后经由 ATP 结合盒膜泵依赖性机制将这种染料泵出,在通过流式细胞计分析细胞时产生低荧光“尾”。在一个实施方案中,该方法还包括将样品中 HCC 干细胞的存在与样品中 HSC-HCC 亚型的存在相关联。有利地,样品中 HCC 干细胞的检测允许受治疗者中的 HSC-HCC 亚型的更早检测并因此导致更大可能性的成功治疗和存活。

[0056] 如本文所用的,术语“生物标志物”可与“miRNA”交替使用并且是指与 HCC 相关的那些生物标志物,其包括至少表 1 中的 39 种生物标志物。在本发明的方法中,可检测一些(即 1、2、3、4、5、7、7、8、9、10、15、20、25、30 或 35 种)或全部 39 种生物标志物。优选地,至少 2 种或更多种,更优选地,至少 5 种或更多种生物标志物被检测。在检测 mir-181 生物标志物的实施方案中,该生物标志物优选地可以是 mir-181a1、mir-181a2、mir-181b1、mir-181b2 和 mir-181c 中的一种或多种。在这一点上,检测 mir-181 生物标志物中的一些(即,1、2、3 或 4 种)或全部 5 种。

[0057] 用于确定样品中生物标志物的表达的存在和水平的适合的技术在本领域技术的范围内。根据一个这样的方法,可在核酸提取缓冲液存在的情况下通过均质化,之后通过离心从细胞纯化总细胞 RNA。核酸被沉淀并且通过使用 DNA 酶处理和沉淀除去 DNA。然后根据标准技术通过琼脂糖凝胶上的凝胶电泳分离 RNA 分子并通过例如所谓“RNA 印迹”的印迹技术将 RNA 分子转移至硝酸纤维素滤膜。之后通过加热将 RNA 固定在滤膜上。使用与研究的 RNA 互补的适当标记的 DNA 或 RNA 探针完成特异性 RNA 的检测和定量。参见,例如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (分子克隆:实验室手册), J. Sambrook 等人编辑,第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第 7 章,其全部公开内容通过引用并入。

[0058] 用于制备标记的 DNA 和 RNA 探针的方法和用于其与靶核酸序列杂交的条件描述于 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook 等人编辑,第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 第 10 和 11 章中,其公开内容通过引用并入本文。例如,可使用例如放射性核素诸如 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 或 ^{35}S ; 重金属; 或对于标记的配体(例如生物素、抗生物素蛋白或抗体)、荧光分子、化学发光分子、酶或类似物能够起到特异性结合配对部分的作用的配体来标记核酸探针。

[0059] 可通过 Rigby 等人, J. Mol. Biol., 113:237-251(1977) 的切口平移法或通过 Fienberg, Anal. Biochem., 132:6-13(1983) 的随机引物法将探针标记至高比活性,其全部公开内容通过引用并入本文。后者可作为用于从 RNA 模板合成高比活性的 ^{32}p 标记的探针的方法。例如,根据切口平移法通过用高放射性核苷酸取代预先存在的核苷酸,能够制备具有超过 10^8 cpm/微克的比活性的 ^{32}p 标记的核酸探针。之后可通过将杂交滤膜对照相胶片曝光来进行杂交的放射自显影检测。通过杂交滤膜曝光的照相胶片的光密度扫描提供生

物标志物水平的精确测量。使用另一种方法,可通过计算机化的成像系统,例如 Molecular Dynamics400-B2D 磷光显像仪 (Amersham Biosciences,Piscataway,N. J) 定量生物标志物水平。

[0060] 当不能实行 DNA 或 RNA 探针的放射核素标记时,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)脱氧尿苷三磷酸酯,并入探针分子中。可通过使用与产生颜色反应的荧光染料或酶偶联的生物素结合蛋白例如抗生物素蛋白、链霉抗生物素和抗体(例如,抗生物素抗体)的反应检测生物素化的探针寡核苷酸。

[0061] 除了 RNA 印迹和其他的 RNA 印迹杂交技术,可使用原位杂交技术实现 RNA 表达水平的确定。这一技术需要比 RNA 印迹技术更少的细胞,其包括将整体细胞沉积在显微镜盖玻片上并且用含有放射性或其他方式标记的核酸(例如 cDNA 或 RNA)探针的溶液探查细胞的核酸含量。这一技术尤其适用于分析来自受治疗者的组织活检样品。原位杂交技术的实行更详细地描述于美国专利第 5,427,916 号中,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0062] 样品中 miRNA 的相对数目可通过反转录,以及之后的通过聚合酶链式反应(RT-PCR)的反转录的转录物的扩增来确定。可与内部标准,例如,来自同一样品中存在的标准基因的 mRNA 的水平相对比来定量 RNA 转录物的水平。用作内部标准的适合的基因包括例如肌球蛋白或 3-磷酸甘油醛脱氢酶(G3PDH)。定量 RT-PCR 的方法及其变化形式在本领域技术的范围内。

[0063] 在一些情况下,可以期望同时确定样品中多种不同生物标志物基因的表达水平。在某些情况下,可以期望确定与 HCC 相关联的所有已知生物标志物基因的转录物的表达水平。评估上百种生物标志物基因的癌症特异性表达水平是费时的并且需要大量的总 RNA(每个 RNA 印迹至少 20 μg)以及需要放射性同位素的放射自显影技术。为了克服这些限制,可构建含有对一套生物标志物基因特异的一套探针寡核苷酸的微芯片形式的寡核苷酸文库。例如寡核苷酸文库可含有与来自人类基因组的所有已知的生物标志物相应的探针。微芯片寡核苷酸文库可被扩展至包括被发现的另外的 miRNA。

[0064] 从产生自己知 miRNA 的基因特异性寡核苷酸探针制备微芯片。例如,该阵列可包含每一种 miRNA 的两种不同的寡核苷酸探针,一种含有活性序列而另一种是对 miRNA 前体特异的。该阵列还可含有对照,诸如与人类直向同源物仅有少数碱基不同的一种或多种小鼠序列,其可作为杂交严格条件的对照。来自两种物种的 tRNA 也可被点样在微芯片上,为特异性杂交提供内部的、相对稳定的阳性对照。用于非特异性杂交的一种或多种适合的对照也可包括在微芯片上。为了这一目的,以缺少与任何已知 miRNA 的任何同源性为基础选择序列。

[0065] 可通过本领域已知的技术制作微芯片。例如,将适当长度诸如 20 个核苷酸的探针寡核苷酸在位置 C6 进行 5' 氨基修饰,并使用适合的可行的微阵列系统例如 GENEMACHINE OmniGrid 100 微阵列点样仪和 Amersham CODELINK 活化的载玻片点样。通过使用标记的引物反转录靶 RNA 来制备相应于靶 RNA 的标记的 cDNA 寡聚物。第一条链合成后,将 RNA/DNA 杂种变性以降解 RNA 模板。之后由此制备的标记的靶 cDNA 与微阵列芯片在例如 6 倍 SSPE/30% 甲酰胺 25℃ 下的杂交条件下杂交 18 小时,之后在 0.75 倍 TNT 中于 37℃ 清洗 40 分钟。在阵列上固定的探针 DNA 识别样品中互补的靶 cDNA 的位置,发生杂交。标记的靶

cDNA 标志出阵列上发生结合的准确位点,并允许自动化检测和定量。输出由一系列杂交事件组成,指示受治疗者的样品中特定 cDNA 序列的相对丰度,以及由此得出的相对应的互补生物标志物的相对丰度。在一个实例中,标记的 cDNA 寡聚物是生物素标记的 cDNA,由生物素标记的引物制备。然后使用例如 Streptavidin-Alexa647 缀合物通过包含生物素的转录物的直接检测处理微阵列,并且使用常规扫描方法将其扫描。阵列上每一个点的成像密度与受治疗者的样品中相应的生物标志物的丰度成比例。

[0066] 阵列的使用对于 miRNA 表达检测来说具有一个或多个优点。首先,可在相同的样品中在一个时间点鉴定几百种基因的整体表达。第二,通过仔细的设计寡核苷酸探针,成熟和前体分子的表达都可鉴定。第三,与 RNA 印迹分析相比,芯片要求少量的 RNA,并且用低至 2.5 μ g 的总 RNA 提供可重复的结果。相对有限数目的 miRNA (每个物种几百个) 允许构建对一些物种来说具有用于每一物种的不同寡核苷酸探针的通用的微阵列。这一工具将允许分析在不同的条件下每种已知的生物标志物的跨物种的表达。

[0067] 受治疗者可以是表现出 HCC 的症状人类或动物。优选地,受治疗者是人类。受治疗者还可以具有或没有乙型肝炎病毒或肝硬化(例如酒精导致的,原发性胆汁性肝硬化、遗传性血色病、自身免疫性肝炎、原发性硬化性胆管炎)。HCC 可为孤立性肿瘤、多结节性肿瘤和 / 或转移病灶。

[0068] 获自受治疗者的样品可是肝组织,其可是肿瘤组织或正常组织。可选择地,样品可来自受治疗者的血清或血浆、冷冻的活检组织、石蜡包埋的活检组织和其组合。

[0069] 本发明还提供用于通过确定受治疗者是否患有 HSC HCC、BDE-HCC、HP-HCC 或 MH-HCC 亚型来确定受治疗者预后的方法。本发明的预后的方法可代替现有的预后方法使用。可选择地,本发明的方法可与常规的预后方法协同使用。当使用组合的方法时,传统的预后方法可包括肝脏和胸腔的螺旋计算层析 X 射线照相术(CT)、对比增强的磁共振成像(MRI)或使用乙碘油注射的血管造影术和活检以及现有的分期系统。

[0070] 该方法还提供可以受治疗者中 HCC 亚型为基础的为受治疗者设计的治疗方案。就这一点而言,本发明方法允许更个人化的医学方法,以便可以使治疗的攻击性适合受治疗者中的 HCC 亚型。

[0071] 在一个实施方案中,本发明利用了生物标志物和 HCC 亚型之间的相关性。因此,本发明提供包括施用治疗有效量的组合物的治疗方法,所述组合物包括含有与 HSC-HCC、BDE-HCC、HP-HCC 或 MH-HCC 相关的生物标志物的至少一种互补的核酸的试剂。

[0072] 在另一个实施方案中,本发明利用 mir-181 生物标志物和 HCC 干细胞之间的相关性以便确定受治疗者中的 HCC 亚型,并且任选地将患者中的 HCC 亚型与预后相关联。mir-181 生物标志物与 EpCAM 和 AFP 阳性的肝干细胞样 (HSC)HCC 亚型相关。EpCAM 是含有三个细胞外结构域和一个细胞质结构域的跨膜蛋白。EpCAM 的功能和其表达的调节机制很大程度上还是未知的,但被认为包括细胞-细胞粘着(Winter, *Exp. Cell. Res.*, 285(1):50-58(2003))。EpCAM 和 AFP 不在成熟肝组织中表达。HSC HCC 亚型通常具有不良的预后和存活结果(Lee, *Hepatology*, 40(3):667-676(2004); Lee, *Nat. Med.*, 12(4):410-416(2006))。因此,本发明提供确定所检测的 HCC 是否是 HSC HCC 亚型的方法。特别地,因为 EPCAM+AFP+HCC 与 Wnt- β 联蛋白(Wnt- β -catenin) 信号传导相关,HCC 亚型的确定尤其用在确定受治疗者的适当的治疗中。Wnt- β 联蛋白信号是对于维持干细胞的功能

能来说是至关重要的,并且非正常的活化已经与许多人类癌包括 HCC 有关。mir-181 可能通过 Wnt- β 联蛋白通路的抑制剂 Dickkopf-1(即, DKK1) 和 nemo 样激酶(即, NLK) 可促进 Wnt- β 联蛋白信号传导活化。本发明利用 mir-181 和 HCC 干细胞之间的调节关系,并且提供预后的方法和以其为基础的治疗。

[0073] 治疗选择可包括传统治疗以及特异地靶向本文描述的 miRNA 的基因治疗方法。HCC 的传统治疗包括,例如,经皮乙醇注射(PEI)、射频消融、化疗栓塞和化疗。治疗是以受治疗者的状态为基础决定的并且指导方针是本领域内已知的。(参见例如 Ryder, Gut, 52:1-8(2003))。

[0074] 本发明还提供用于本发明的治疗方法的药物组合物。就这一点而言,本发明提供包括治疗有效量的试剂和药学上可接受的载体的组合物,所述试剂包括含有与选自 SEQ ID NO:1-39 标识的生物标志物的至少一种优选至少两种生物标志物互补的一种核酸或多种核酸。可选择地,试剂包括与生物标志物中的至少 5 种或更多种、10 种或更多种、15 种或更多种、20 种或更多种、25 种或更多种、30 种或更多种或者 35 种或更多种互补的核酸。该试剂可只包括核酸或者与递送试剂例如重组质粒、病毒载体、脂质体等组合的核酸。优选地,对于 HSC-HCC 的治疗来说,该组合物包括与由 SEQ ID NO:1-19 标识的生物标志物互补的核酸,甚至更优选地,该组合物包括与 mir-181a1、mir-181a2、mir-181b1、mir-181b2 和 mir-181c 互补的核酸和药学上可接受的载体。优选地,对于 BDE-HCC 的治疗来说,该组合物包括与由 SEQ ID NO:2、9-17 和 19-35 标识的至少一种优选至少 2 种生物标志物互补的核酸以及药学上可接受的载体。优选地,对于 HP-HCC 的治疗来说,该组合物包括与由 SEQ ID NO:1-8、11-13、17-18、23、28、29 和 33-39 标识的至少一种优选至少两种的生物标志物互补的核酸以及药学上可接受的载体。优选地,对于 MH-HCC 的治疗来说,该组合物包括与由 SEQ ID NO:1,8-12、14-17 和 19-39 标识的至少一种优选至少两种生物标志物互补的核酸以及药学上可接受的载体。该组合物可结合生物标志物和/或使生物标志物无效(即,抑制),或可选择地,改变编码生物标志物的基因的表达,由此改变所产生的生物标志物的量或水平,用于其的技术是本领域内公知的。

[0075] 在本治疗方法的实行中,抑制生物标志物中的至少一种的有效量的至少一种组合物也可被施用至受治疗者。如本文所用的,“抑制”意味着治疗后癌细胞中的生物标志物的水平和/或来自相应基因的生物标志物基因产物的产生少于治疗之前产生的量。在另一个实施方案中,增加生物标志物中的一种或多种的表达的组合物可被施用。本领域的技术人员使用例如前文讨论的用于确定生物标志物转录物的技术,可容易地确定在癌细胞中生物标志物水平或基因表达是已经被抑制还是被提高。

[0076] 如本文所用的,抑制生物标志物和生物标志物基因表达的组合物“有效量”是足以抑制患有 HCC 的受治疗者中癌细胞的增殖的量。本领域的技术人员通过考虑诸如受治疗者的身高和体重;疾病渗透的程度;受治疗者的年龄、健康和性别;施用途径以及施用是局部的还是全身性的因素,能够很容易地确定有待对给定的受治疗者施用的抑制组合物有效量。

[0077] 例如,改变表达的组合物有效量能以有待治疗的肿瘤块的大约的重量为基础。肿瘤块的大约的重量可通过计算该块的大约的体积来确定,其中一立方厘米的体积大致等于一克。因此,在一个实施方案中,可使用以肿瘤块的重量为基础的有效量。可选择地,组

合物的有效量能以有待治疗的受治疗者的大约的或估计的体重为基础。优选地,这样的有效的量是肠胃外或肠内施用的。

[0078] 本领域的技术人员也可很容易地确定用于对给定的受治疗者施用改变生物标志物水平或基因表达的组合物适当的给药方案。例如,该组合物可被一次(例如单一注射或放置)施用给受治疗者。可选择地,该组合物可被每天一次或两次施用给受治疗者从约三至约二十八天,更优选地从约七至约十天的时间段。可选择地,该组合物可一天被施用一次施用七天。当给药方案包括多次施用时,应当理解的是施用给受治疗者的组合物有效量可包括整个给药方案所施用的组合物的总量。

[0079] 用于抑制生物标志物基因表达的适当的组合物包括双链 RNA (例如短的或小的干扰 RNA 或“siRNA”)、反义核酸和酶促 RNA 分子例如核酶。这些组合物中的每一种可被靶向给定的生物标志物基因产物并且破坏靶生物标志物基因产物或诱导靶生物标志物基因产物的破坏。

[0080] 例如,可通过使用与生物标志物基因产物的至少一部分具有至少 90%,例如 95%、98%、99% 或 100% 的序列同源性的分离的双链 RNA (“dsRNA”) 分子诱导生物标志物基因的 RNA 干扰来抑制给定的生物标志物基因的表达。在优选的实施方案中, dsRNA 分子是“短的或小的干扰 RNA”或“siRNA”。

[0081] 用于本方法的 siRNA 包括在长度上约 17 个核苷酸至约 29 个核苷酸的,优选地在长度上约 19 个核苷酸至约 25 个核苷酸的短的双链 RNA。siRNA 包括一起通过标准的 Watson-Crick 碱基配对相互作用(下文中“碱基配对的”)退火的有义 RNA 链和互补反义 RNA 链。有义链包括与包含在靶生物标志物基因产物中的核酸序列大致上相同的核酸序列。

[0082] 如本文所用的, siRNA 是与包含在靶核酸序列中的靶序列“基本上相同的”,是与靶序列相同的核酸序列,或与靶序列相差一或两个核苷酸的核酸序列。siRNA 的有义和反义链可包括两种互补的单链 RNA 分子,或可包括其中两种互补部分是碱基配对的并且通过单链的“发夹”区共价相连的单一分子。

[0083] siRNA 也可是经由一个或多个核苷酸的添加、缺失、取代和 / 或改变而与天然存在的 RNA 不同的改变的 RNA。这种改变可包括将非核苷酸物质诸如向 siRNA 的末端或 siRNA 的一个或多个内部核苷酸的添加,或使得 siRNA 对核酸酶消化具有抗性的修饰,或脱氧核糖核苷酸对 siRNA 中的一个或多个核苷酸的取代。

[0084] siRNA 的一条或两条链还可包括 3' 突出端。如本文所用的“3' 突出端”是指从双链的 RNA 链的 3' 末端延伸出的至少一个未配对的核苷酸。因此,在一个实施方案中, siRNA 包括长度上 1 至约 6 个核苷酸(其包括核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的,优选地长度上 1 至约 5 个核苷酸的,更优选地长度上 1 至约 4 个核苷酸的,尤其优选地长度上约 2 至约 4 个核苷酸的至少一种 3' 突出端。在优选的实施方案中, 3' 突出端在 siRNA 的两条链上都存在,并且长度上为 2 个核苷酸。例如, siRNA 的每条链可包括双胸腺嘧啶核苷酸(“TT”)或双尿嘧啶核苷酸(“uu”)的 3' 突出端。

[0085] siRNA 可化学或生物地产生,或可从重组的质粒或病毒载体表达,用于分离的生物标志物基因产物。产生和检测 dsRNA 或 siRNA 分子的示例性方法描述于美国公开的专利申请第 2002/0173478 号和美国专利第 7, 148, 342 号,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0086] 给定生物标志物基因的表达还可被反义核酸抑制。如本文所用的,“反义核酸”是

指通过 RNA-RNA 或 RNA-DNA 或 RNA-肽核酸的相互作用的方式与靶 RNA 结合的核酸分子,其改变靶 RNA 的活性。适合在本方法中使用的反义核酸是通常包含与生物标志物基因产物中的连续的核酸序列互补的核酸序列的单链核酸(例如 RNA、DNA、RNA-DNA 嵌合体、PNA)。优选地,反义核酸包括与生物标志物基因产物中的连续的核酸序列 50-100% 互补的、更优选地 75-100% 互补的和最优选地 95-100% 互补的核酸序列。

[0087] 反义核酸还可包含对核酸主链的修饰或对糖和碱基部分(或它们的等同物)的修饰以增强靶特异性、核酸酶抗性、递送或与分子的功效有关的其他特性。这样的修饰包括胆固醇部分、双链插入剂诸如吡啶或一种或多种核酸酶抗性基团的包含物。

[0088] 反义核酸可化学或生物地产生,或可从重组的质粒或病毒载体表达,如前文所述用于分离的生物标志物基因产物。产生和检测的示例性方法属于本领域的技术范围内,参见例如,Stein, Science, 261:1004(1993) 和 Woolf 等人的美国专利第 5,849,902 号,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0089] 给定的生物标志物基因的表达还可被酶促核酸抑制,如本文所用的“酶促核酸”是指含有与生物标志物基因产物的连续的核酸序列互补的底物结合区的核酸,并且其能够特异性切割生物标志物基因产物。优选地,酶促核酸底物结合区是与生物标志物基因产物的连续的核酸序列 50-100% 互补的、更优选地 75-100% 互补的和最优选地 95-100% 互补的。酶促核酸还可包括碱基、糖和 / 或磷酸基团的修饰。用于在本方法中使用的示例性酶促核酸是核酶。

[0090] 酶促核酸可化学或生物地产生,或可从重组的质粒或病毒载体表达,如前文所述用于分离的生物标志物基因产物。产生和检测 dsRNA 或 siRNA 分子的示例性方法描述于 Werner, Nucl. Acids Res., 23:2092-96(1995)、Hammann, Antisense and Nucleic Acid Drug Dev., 9:25-31(1999) 和美国专利第 4,987,071 号中,其全部公开内容通过引用并入本文。

[0091] 用于抑制至少一种生物标志物或生物标志物基因的表达的至少一种组合物的施用将抑制患有 HCC 的受治疗者中癌细胞的增殖。如本文所用的“抑制癌细胞的增殖”意指杀死细胞或永久地或暂时地阻止或减缓细胞的生长。如果受治疗者中癌细胞的数目在施用本发明的组合物之后不变或减少,那么可推知这种细胞的增殖的抑制。如果癌细胞的绝对数目增加,但肿瘤生长的速度减小,那么也可推知这种细胞的增殖的抑制。

[0092] 受治疗者体内癌细胞的数目可通过直接测量或通过从原发或转移的肿瘤块的大小估计来确定。例如受治疗者中癌细胞的数目可通过免疫组织学的方法、流式细胞计或设计来检测癌细胞的表征的表面标志的其他技术来测量。

[0093] 肿瘤块的大小可通过直接的目视观察或通过诊断成像的方法例如 X-射线、磁共振成像、超声波和闪烁扫描法来确定。如本领域已知的,用来确定肿瘤块的大小的诊断成像方法可与或不与造影剂一起使用。肿瘤块的大小还可通过物理方法来确定,例如组织块的触诊或使用测量工具例如卡钳的组织块的测量。

[0094] 本发明的组合物通过适合于将这些组合物递送至受治疗者的癌细胞的任何方法施用给受治疗者。例如组合物可通过适合于用这些组合物转染受治疗者的细胞的方法施用。优选地,可用含有编码至少一种生物标志物基因产物或生物标志物基因表达的抑制组合物的序列的质粒或病毒载体转染细胞。

[0095] 用于真核细胞的转染方法是本领域中熟知的,并且包括例如将核酸直接注射至细胞的核或前核中、电穿孔、脂质体转移或由亲脂物质介导的转移、受体介导的核酸递送、基因枪或粒子加速、磷酸钙沉淀和由病毒载体介导的转染。

[0096] 例如,可用脂质体转移组合物例如 DOTAP (N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基-铵甲基硫酸酯,Boehringer-Mannheim) 或等同物诸如 LIPOFECTIN 转染细胞。核酸的量对于本发明的实行来说不是至关重要的;可使用 0.1-100 微克核酸/ 10^5 细胞获得可接受的结果。例如,可使用每 10^5 细胞 3 微克 DOTAP 中约 0.5 微克质粒载体的比率。

[0097] 该组合物还可通过任何适当的肠内或肠胃外的施用途径施用给受治疗者。适用于本方法的肠内的施用途径包括例如口服的、直肠的或鼻内的递送。适合的肠胃外的施用途径包括例如血管内施用(例如,静脉内推注、静脉内输注、动脉内推注、动脉内输注和进入脉管系统中的导管滴注);组织外围或组织内注射(例如,肿瘤外围或肿瘤内注射、视网膜内注射或视网膜下注射);皮下的注射或放置,包括皮下输注(例如,通过渗透泵);直接应用于感兴趣的组织例如通过导管或其他放置装置(例如,视网膜小丸或栓剂或含有有孔、无孔或胶状材料的植入物)以及吸入。优选的施用途径是注射、输注和直接向肿瘤注射。

[0098] 在本方法中,组合物作为与递送试剂组合的裸露的 RNA 或作为含有表达生物标志物基因产物或表达抑制组合物的核酸(例如重组质粒或病毒载体)施用给受治疗者。适合的递送试剂包括例如 Mirus Transit TKO 亲脂试剂、脂质转染剂、脂质转染胺试剂、细胞转染剂、聚阳离子(例如,聚赖氨酸)和脂质体。

[0099] 包含表达生物标志物或生物标志物基因表达抑制组合物的序列的重组质粒和病毒载体,和用于向癌细胞递送这种质粒和载体的技术是上文讨论的。

[0100] 在优选的实施方案中,脂质体被用来向受治疗者递送生物标志物或生物标志物基因表达抑制组合物(或包含编码它们的序列的核酸)。脂质体还可增加基因表达产物或核酸的血液半衰期。

[0101] 适用于在本发明中使用的脂质体可从标准的形成囊泡的脂质形成,其通常包括中性或带负电荷的磷脂和固醇例如胆固醇。脂质的选择通常受到对诸如所期望的脂质体的大小和血流中脂质体的半衰期的因素的考量的指导。用于制备脂质体的各种方法,例如,如 Szoka, Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 9:467 (1980) 和美国专利第 4,235,871、4,501,728、4,837,028 和 5,019,369 号中所描述的是已知的,其全部公开内容通过引用并入。

[0102] 用于在本方法中使用的脂质体可包含将脂质体靶向癌细胞的配体分子。优选与癌细胞中普遍存在的受体结合的配体,例如与癌细胞抗原结合的单克隆抗体。

[0103] 本发明的组合物可包括药学上可接受的载体。如本文所用的术语“药学上可接受的载体”意指适于在人类或兽医的患者中施用的一种或多种可接受的固体或液体填充剂、稀释剂、其他赋形剂或包封物质。术语“载体”意指天然的或合成的有机或无机成分,其与活性成分组合以帮助使用。药物组合物的组分还能够与本发明的分子以及彼此之间以大致上不损害所期望的药学功效的方式共混。“药学上可接受的”物质能够施用于患者而不产生不期望的生理作用例如恶心、头晕、皮疹或胃不适。例如,所期望的是当为了治疗目的包括药学上可接受的赋形剂的治疗性组合物被施用于人患者时,其为非免疫原性的。

[0104] 该药物组合物可包含适合的缓冲剂,包括乙酸盐、柠檬酸盐、硼酸盐和磷酸盐。该药物组合物还可任选地包含适合的防腐剂例如苯扎氯铵、三氯叔丁醇、对羟基苯甲酸酯和

乙基汞硫代水杨酸钠。

[0105] 该药物组合物可方便地以单位剂量形式存在,并且可通过制药领域中熟知的任何方法制备。所有方法包括将活性剂与组成一种或多种助剂的载体结合的步骤。通常,该组合物可通过将活性组合物与液体载体、精细分离的固体载体或两者都均一旦紧密的结合来制备,并且然后如果必要的话将产物成形。

[0106] 适用于肠胃外施用的组合物通常包括本发明组合物的无菌含水制剂,其优选地与接受者的血液等渗。这种含水制剂可根据已知的方法使用适合的分散或润湿剂和悬浮剂来配制。无菌的可注射的制剂还可是在无毒的可胃肠外接受的稀释剂或溶剂中的无菌的可注射的溶液或悬浮液,例如在 1,3-丁二醇中的溶液。可使用的可接受的载体或溶剂中有水、林格氏溶液和等渗的氯化钠溶液。此外,无菌的非挥发油通常被用作溶剂或悬浮介质。为了这一目的,可使用任何温和的非挥发油,包括合成的单-甘油酯或双-甘油酯。此外,脂肪酸例如油酸也可被用于可注射的制剂。适用于口服、皮下、静脉内、肌肉内等施用的载体制剂可在 Remington's Pharmaceutical Sciences, (雷明顿药物科学) Mack Publishing Co., Easton, PA 中找到,其通过引用全文并入本文。

[0107] 本发明的递送系统被设计以包括随时间释放的、延迟释放的或持续释放的递送系统以便使本发明的组合物的递送在足够的时间之前或伴随足够的时间发生,以导致有待治疗的部位的敏化。本发明的组合物可与其他治疗剂或治疗协同使用。这种系统可避免本发明组合物的重复施用,增加受治疗者和医生的方便性,并且尤其适用于本发明的某些组合物。

[0108] 许多类型的释放递送系统是可获得的本领域的那些普通技术人员已知的。它们包括聚合物基础的系统例如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯、聚己内酯、聚酰胺酯、聚原酸酯、聚羟基丁酸和聚酐。含有药物的前述的聚合物的微胶囊描述于例如美国专利第 5,075,109 号中。递送系统还包括非聚合物系统,其为:包括固醇例如胆固醇、胆固醇脂和脂肪酸或中性脂肪例如单-甘油酯、双-甘油酯和三-甘油酯的液体;水凝胶释放系统;硅橡胶 (sylastic) 系统;基于肽的系统、蜡包衣;使用传统结合剂和赋形剂的压缩的片剂;部分融合植入物以及类似系统。特定的实例包括但不限于 (a) 侵蚀系统,其中以在基质中的形式包含活性组合物,例如,美国专利第 4,452,775、4,667,014、4,748,034 和 5,239,660 号中描述的那些,以及 (b) 扩散系统,其中活性成分以可控制的速度从聚合物中渗出,如美国专利第 3,832,253 和 3,854,480 号中所描述的。此外,可使用基于泵的硬件递送系统,其中一些是适于植入的。

[0109] 本发明还提供通过在一疗程的治疗后确定是否有任何存留的 HCC 干细胞存留在受治疗者的肝中评估受治疗者中 HCC 的治疗功效的方法。就这一点而言,样品从受治疗者获得并被测定以检测 mir-181 生物标志物的存在或不存在。之后将 mir-181 生物标志物的存在或不存在分别与受治疗者中 EpCAM+AFP+HCC 的存在或不存在相关联。这一信息被用来确定受治疗者中 HCC 的治疗是否已经是或不是有效的。

[0110] 下列实施例进一步示例性说明本发明,但是,当然不应当被理解为以任何形式限制其范围。

实施例

[0111] 下列技术被用于下文叙述的实施例。

[0112] 临床样本。在知情同意的情况下从 2002 和 2003 年间在肝癌研究所和中山医院（中国上海复旦大学）经历根治切除的受治疗者获得肝组织。研究经肝癌研究所的机构审查委员会和国立卫生研究院批准。样品采纳标准包括具有 HBV 感染史或 HBV 相关的肝硬化、经由两个独立的病理学家诊断的 HCC，临床表现和生理学表征的详细信息以及至少三年的详细随访数据的那些，随访数据包括肝内的复发、肝内静脉转移、淋巴结受累、肝外转移、无病、整体存活和致死。对于用于分析 miRNA 的预测能力的经历切除并且因此被选定以分级为早期受治疗者（TNM I 和 II 期）的 HCC 受治疗者来说，最新的 TNM 分类优于其他分期系统，包括 CLIP 和 OKUDA。Varotti, *Eur J. Surg Oncol*, 31(7):760-767 (2005); Huang 等人, *J Gastroenterol Hepatol*, 20(5):765-771 (2005)。预期的研究显示 BCLC 系统优于 2002 年更新的新的 TNM 分类系统，因此还进行了以通过 BCLC 分类的早期受治疗者（0 和 A 期）为基础的 Cox 比例风险建模。在来自 244 个中国 HCC 受治疗者的原发 HCC 和相应的非癌肝组织中建立基因表达谱。其中，93% 具有潜在的肝硬化而 68% 具有 >20ng/mL 的血清 α 胎蛋白 (AFP) 水平。总共 134 个明确定义的病例被用作训练组。其中，30 名具有在门静脉 (n=25)、下腔静脉 (n=2) 或胆总管 (n=4；一名还具有下腔静脉中的肿瘤血栓) 的主要分支中发现的伴随有瘤栓的原发 HCC 损伤，而 104 名具有在随访 (3 年) 发现的无转移 / 复发的孤立性 HCC。在有效性分析中，使用了 110 名独立病例的测试组，其预后在切除时不能由一些 HCC 分期机制精确的确定。测试的病例包括 43 名多结节的 HCC 和 67 名孤立性 HCC。43 名多结节的 HCC 病例中，18 名发展肝内的复发并且一名除了肝内的复发外还发展了肝外的转移。67 名孤立性 HCC 病例中，4 名受治疗者患有具有出现集合小节的孤立性肿瘤，10 名发展肝内和 / 或肝外的转移，而 49 名发展了在随访 (3 年) 证实的肝内复发。此外，包括来自无病受治疗者的八种正常的肝组织 (描述于 Budhu, *Cancer Cell*, 10(2):99-111 (2006)) 作为正常对照。

[0113] RNA 分离和 miRNA 阵列。如 Ye, *Nat Med*, 9(4):416-423 (2003); Calin, *N Engl J. Med*, 353(17):1793-1802 (2005) 中描述的进行 RNA 分离和 miRNA 阵列的方法学。在 244 个 HCC 病例的分析中，以配对的形式从肿瘤或非肿瘤组织中分离 RNA 并且以随机顺序选择用于 miRNA 分析的样品以避免分组偏差。进行总共 488 个微阵列。微阵列台 (V2.0) 主要由 250 个非冗余的人类 miRNA 和 200 个小鼠 miRNA 组成。为了检测 miRNA 微阵列台的稳健性，分析 miRNA 以确定表达是否将 244 个组织与它们配对的周围的非癌肝组织区分开。使用具有单变量配对 t 检验和多变量检验的监督分类比较法，鉴定可显著地将 HCC 肿瘤组织 (T) 与它们配对的非肿瘤组织 (NT) 区分开的 209 个非冗余 miRNA，多变量检验具有 1000 种分类标记排列、具有设置为 ≤ 1 的假发现率并具有 99% 置信水平。通过系统聚类 (hierarchical clustering) 分析示例性说明，这些显著的 miRNA 清楚地将 T 和 NT 样品分离。具有 10% 交叉验证和 100 种随机排列的多变量分类预测算法分析显示这些 miRNA 可通过紧邻预测程序以大于 97% 的准确性提供 T 和 NT 样品的统计学上显著的预测 ($p < 0.01$)。这些初始分析表明 miRNA 阵列是稳健的并且能够鉴定肿瘤和非癌肝组织之间的显著差异。

[0114] 统计学分析。通过由 Alexander Sturn (IBMT-TUG, Graz, Austria) 开发的 GENESIS 软件版本 1.5 进行非监督系统聚类分析。BRB ArrayTools 软件版本 3.3 被用于如之前描述的监督分析 (Ye, *Nat Med*, 9(4):416-423 (2003); Budhu, *Cancer Cell*, 10(2):99-111 (2006))。使用基于 Excel 的 WinSTAT 软件，Kaplan-Meier 存活分析被用于

以预测结果为基础比较受治疗者的存活。统计的 p 值通过 Cox-Mantel 时序检验产生。使用 STATA9.2 (College Station, TX), Cox 比例风险回归被用来分析十六个临床变量对受治疗者存活或复发的作用, 统计学显著性被定义为 $p < 0.05$ 。TargetScan 分析是以由 Ben Lewis (Lewis, Cell, 120(1):15-20(2005)) 开发的网点工具为基础的。Cox 比例风险回归被用于分析临床变量对受治疗者整体和无复发存活的作用, 临床变量包括年龄、性别、HBV 活性状态、预切除的 AFP、肝硬化、丙氨酸转移酶 (ALT)、Child-Pugh 评分、肿瘤大小、肿瘤包裹作用、结节类型、微血管侵入状态、Edmondson 等级和几种 HCC 预后分期系统, 包括 BCLC 分期 (Llovet, Semin Liver Dis, 19(3):329-338(1999)), CLIP 分类 (“The Cancer of the Liver Italian Program (意大利肝癌计划)”, Hepatology, 28(3):751-755(1998)), Okuda 分期 (Okuda, Cancer, 56(4):918-928(1985)) 和 TNF 分类 (American Joint Committee on Cancer (AJCC)/International Union Against Cancer (UICC) ’s TNM Classification of Malignant Tumours (美国癌症联合委员会 (AJCC)/国际抗癌联合会 (UICC) 的恶性肿瘤 TNM 分类), 第 6 版, Hoboken, NJ, John Wiley & Sons 2002)。

[0115] qRT-PCR。使用 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) 提取总 RNA。使用 Applied Biosystems 7700 序列检测系统 (Foster City, CA) 一式三份测量 TACSTD1、BAMBI、DKK1、CCND1、CTNNB1 和 MYC 表达。所用的探针是 TACSTD1, Hs00158980_ml; CTNNB1, HS00170025_ml; BAMBI, HS00180818、DKK1, Hs00183740_ml、CCND1, Hs00277039_ml、CTNNB1, MYC, Hs00153408_ml; 18S, Hs999999901_sl (Applied Biosystems)。依照制造商的建议进行所有程序。

[0116] 免疫组织化学分析。使用 Envision+ 试剂盒 (DAKO USA, Carpinteria, CA) 依照制造商说明书进行免疫组织化学分析。如下第一抗体被使用: 抗- β -联蛋白单克隆抗体克隆 14 (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA) 和抗 EpCAM 单克隆抗体克隆 VU-1D9 (Oncogene Research Products, San Diego, CA)。

[0117] 免疫荧光。将细胞在腔室载玻片上培养并且用指定的化学药品处理 48 小时。之后将细胞用 4% 的多聚甲醛固定 10 分钟, 用甲醇固定 20 分钟并在磷酸盐缓冲的盐水中孵育。将样品用 10% 正常的驴血清于室温封闭 1 小时并用第一抗体于 37°C 染色 1 小时, 之后是结合 Alexa 568 Texas Red 的抗小鼠抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR)。

[0118] EMSA。将重组的 Tcf-4 在大肠杆菌 (*E. coli*) 中表达为 GST 融合蛋白并提取。使用 LightShift Chemiluminescent EMSA 试剂盒 (Pierce, Rockford, IL) 根据制造商的说明书进行 EMSA。含有 EpCAM 启动子的推定的 Tcf 结合位点和 10 个相邻的上游和下游核苷酸的双链的 DNA 寡核苷酸被构建并被用作探针。还使用了突变的 TBE1 和 TBE2 探针。

[0119] 细胞系, 反义和质粒。常规培养已知的 Hep3B B 型、MHCC97C 型、Smmc7721D 型、HUH1 和 HUH7HCC 细胞系。将细胞用 pMSCV-mir-181b-1 转染以用于功能分析。还用 2’-O-甲基 mir-181 反义, mir-181 的抑制剂, 处理 HUH7 细胞。

[0120] 实施例 1

[0121] 这一实施例证实 miRNA 表达可将 HCC 组织与非癌组织区分开并且可区分 HCC 的四种亚型。

[0122] 使用来自总共 230 个 HCC 患者的配对的 HCC 组织和周围非 HCC 组织样品, 发现总共 209 个非冗余 miRNA 在正确鉴定样品上提供 97% 的准确性 (多变量 $p < 0.01$)。该样品的异

质性是明显的并且该样品以四种 HCC 亚型 (HSC、BDE、HP 和 MH) 为基础被聚类。

[0123] 寻找四种 HCC 亚型中显著的 miRNA 表达。系统聚类显示来自以分类比较和具有建立预测准确性的 10 倍交叉验证 (10-fold cross validation) 的分类预测两者为基础的重叠基因的 39 种前体 miRNA 基因在四种 HCC 亚型中显示显著改变的表达 ($p < 0.002$, $FDR < 0.05$) (表 1)。39 种 miRNA 中, 在每种亚型中一些是上调的而其他是下调的 (图 10)。

[0124]

LYM 701608
DHHS E-215-10070

[0126]

HCC 组	SEQ ID No.	基因 符号	基因 定位	突变序列	参数 P值	FDR P值	排列 P值	强度的几何平均值						上升 / 下降			
								正常的			非-HCC						
								RDE	HSC	HPC	MH	HSC	HPC	MH			
		miR-															
	13	196a-2	12q13.13	aaaggagurucacugucagugagg	0.0036	0.0410	0.0045	2465	1585	1226	1533	1791	2477	2742	2470	2432	上升
		miR-															
	14	327	14q32.31	ucacgucucuaacacagucacuuu	0.0001	0.0084	0.0081	217	204	168	89	215	1080	1029	1023	1013	上升
	15	miR-93	7q32.1	aaacagucagurucagucagagag	0.0025	0.0343	0.0023	1973	1930	1589	1373	901	2103	2082	1983	1947	上升
	16	miR-17	13q31.3	caaacgucucuaacagucagucaguu	0.0001	0.0079	0.0081	1808	2937	1994	1650	1376	1972	2305	2050	2171	下降
		miR-															
	17	181c	19p13.12	aaacuaaacuaacagucagucaguu	0.0003	0.0311	0.0080	564	886	561	537	515	584	739	763	741	下降
		miR-															
	18	301	17q23.2	caagucuaaacagucagucagucaguc	0.0044	0.0473	0.0040	6047	11679	14523	13198	25310	13590	16251	15375	14177	下降
		miR-92-															
	19	1	Xq26.2	uaaacgucucuaacagucagucaguu	0.0003	0.0101	0.0002	10397	19133	14127	11409	18228	7590	13765	15979	15213	下降
		miR-															
	20	105a	Xq26.2	aaaacgucucuaacagucagucaguu	0.0002	0.0085	0.0001	1471	2316	1733	1318	1239	1848	1767	1727	1699	上升
		miR-															
	21	105b	7q22.1	uaaacgucucuaacagucagucaguu	0.0006	0.0135	0.0096	860	1078	960	712	520					上升
		miR-															
	9	129-1	7q32.1	caaacgucucuaacagucagucaguu	0.0004	0.0116	0.0003	374	265	215	170	178	191	194	203	192	上升
	16	miR-17	13q31.3	caaacgucucuaacagucagucaguu	0.0001	0.0079	0.0001	1608	2937	1994	1650	1376	1972	2303	2058	2171	上升

LPM 701608
DHHS E-215-2007/0

[0128]

HCC 组	SEQ. ID No.	基因 符号	基因 定位	突变序列	参数 P值	FDR P值	排列 P值	强度的几何平均值				上升 / 下降					
								BDE	HSC	HPC	MH		BDE	HSC	HPC	MH	
mir-	14	137	14q32.31	ucaggccctcaaaagaaagcccaaa	0.0001	0.0064	0.0001	217	204	168	89	215	147	180	119	138	上升
mir-52-	30	1	13q31.3	aaagcctcctcctcctcctcctcctc	0.0014	0.0218	0.0012	17617	25783	21298	17727	21489	24398	24872	24312	22036	上升
mir-92-	19	2	Xq26.2	aaagcctcctcctcctcctcctcctc	0.0003	0.0101	0.0002	10397	19133	14127	11409	18228	13990	16251	13375	14177	上升
mir-93	15	mir-93	7q22.1	aaagcctcctcctcctcctcctcctc	0.0025	0.0343	0.0023	1973	1950	1589	1373	901	2050	1419	1441	1363	上升
let-7a-	2	2	11q24.1	ggaggagcagccagcagcagcagc	0.0003	0.0101	0.0003	1592	1035	878	1136	1570	2301	2082	1863	1947	下降
mir-	31	122a	16q21.31	aaagcctcctcctcctcctcctcctc	0.0032	0.0391	0.0049	667	529	651	846	1338	1730	1409	1491	1625	下降
mir-	32	125b-1	11q24.1	aaagcctcctcctcctcctcctcctc	0.0007	0.0138	0.0003	1467	905	923	1510	3129	4016	3551	3319	3136	下降
mir-	33	125b-2	21q21.1	aaagcctcctcctcctcctcctcctc	0.0027	0.0145	0.0029	1696	1154	1202	1881	3245	3608	3620	3529	3471	下降
mir-	10	129-2	11p11.2	aaagcctcctcctcctcctcctcctc	0.0002	0.0085	0.0001	484	338	404	446	608	513	525	513	509	下降
mir-	34	29a	7q32.3	aaagcctcctcctcctcctcctcctc	0.0002	0.0055	0.0004	1477	1030	964	1635	1150	2289	2304	2036	2166	下降
mir-	35	29b-2	1q32.2	aaagcctcctcctcctcctcctcctc	0.0004	0.0116	0.0009	1076	984	926	1510	1234	1680	1329	2032	2034	下降

201910170000
DHHS E-215-300710

[0131]

HCC 组	SEQ ID No.	基因 符号	基因 定位	突变序列	参数		排列 P值	强度的几何平均值				MH / 下降					
					FDR P值	HCC		非-HCC									
						BDE		HSC	HPC	MH	BDE		HSC	HPC	MH		
MH	1	mir-	9q22.32	ugggguagguaggauaguu	0.0002	0.0089	0.0003	720	481	442	552	720	615	525	513	509	上升
	31	mir-	18q21.31	ugggagugugagauaggguguuugu	0.0032	0.0391	0.0049	687	529	651	348	1338	1191	1071	1811	904	上升
	32	mir-	11q24.1	uuccugagaccuuuuuuuuuuuuuu	0.0007	0.0138	0.0003	1467	903	923	1510	3329	1730	1609	1491	1625	上升
	33	mir-	21q21.1	uuccuagagaccuuuuuuuuuuuuuu	0.0037	0.0145	0.0069	1696	1154	1202	1801	5245	4016	3351	3319	3396	上升
	10	mir-	11p11.2	uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	0.0082	0.0085	0.0031	484	338	404	448	608	3638	3620	3539	3471	上升
	34	mir-	7q32.3	uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	0.0002	0.0085	0.0084	1477	1030	964	1630	1150	2289	2304	2036	3166	上升
	38	mir-	7q32.3	uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	0.0095	0.0186	0.0022	1194	904	749	1388	918	1866	2062	1751	1813	上升
	35	mir-	1q32.2	uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	0.0004	0.0116	0.0009	1076	984	926	1510	1234	1690	2329	2032	2034	上升
	39	mir-	1q32.2	uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	0.0015	0.0232	0.0028	1047	917	829	1368	1018	1619	2165	1895	1997	上升
	9	mir-	3p21.2	uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	0.0006	0.0138	0.0003	1043	766	658	801	962	1434	1431	1332	1294	下降
	20	mir-	Xq26.2	uuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	0.0002	0.0085	0.0001	1471	2316	1713	1318	1239	719	767	815	768	下降

[0135] 前体(A)和成熟 miRNA (B)两者的 mir-181 表达水平,相比于在其相应的非 HCC 组织中,在 HSC-HCC 和 BDE-HCC 中被显著提高,但在 HP-HCC 和 MH-HCC 中被显著降低。HSC-HCC 和 BDE-HCC 分别是指具有干细胞样特征和胆管上皮细胞样特征的 HCC。以 miRNA 前体的 miRNA 微阵列分析为基础,与来自 230 名患者的相应的非 HCC 组织相比的每种 HCC 亚型中 Mir-181 表达,示于分别是 mir-181a1、mir-181a2、mir-181b1、mir-181b2 和 mir-181c 的图 1A-E 中。基因表达比率以 \log_2 比率表示(平均值 \pm 95%CI)。图 1F-J 显示在 40 个 HCC 和非 HCC 样品对中所有成熟 mir-181 的 RT-PCR 分析。前体 mir-181 和成熟 mir-181 的散布图分析示于图 2,具有代表 Spearman 相关系数的 r 值。

[0136] 其次,在临床样品和培养的 HCC 细胞系两者中 mir-181 表达与 Wnt- β - 联蛋白信号传导活化正相关而与许多成熟的肝细胞基因负相关。进行了 5 种前体 mir-181、15 种肝细胞特异基因和 5 种 β - 联蛋白相关基因的系统聚类,从微阵列数据和 mRNA 阵列数据之间的相关分析得出其表达彼此显著相关($p < 0.001$)。在 3 种不同类型的 HCC 细胞系中, mir-181 的表达与 β - 联蛋白蛋白水平正相关(图 9)。

[0137] 用 ESC 培养基培养 HuH1 细胞后,所述 ESC 培养基为对于未分化的胚胎干(ES)细胞来说最好的基础培养基,如 qRT-PCR (图 3A-C) 以及使用抗 β - 联蛋白和肌动蛋白(作为对照)的抗体的免疫印迹所分析的, mir-181 和 β - 联蛋白调节的基因的表达增加而肝细胞特异基因的表达降低。撤回 ESC 培养基后,如 qRT-PCR (图 3D-F) 所分析的,上述基因的表达相反变化。一式三份测量基因表达并将其显示为平均值 \pm 标准偏差 (SD)。

[0138] 实施例 3

[0139] 这一实施例证实在 wnt- β - 联蛋白信号传导的活化中涉及 mir-181 表达。

[0140] 将 pMSCV-mir-181b-1 转染至 HuH1 细胞后,通过 RT-PCR 检测 mir-181b 并且将表达与 pMSCV-hTR 细胞的表达相比较。一式三份测量基因表达并将其于图 4 中显示为平均值 \pm SD。如所示的, mir-181 在 HuH1 细胞中是过量表达的。

[0141] 用 2'-O- 甲基 mir-181 反义处理 HuH7 细胞并且之后检测所有 mir-181 的表达。一式三份测量的基因表达上的显著降低(与对照寡聚物相比)在图 5 中显示为平均值 \pm SD。

[0142] mir-181 在 HuH1 细胞中过表达之后,通过 RT-PCR 检测 β - 联蛋白调节的基因(CCND1、TACSTD1 和 DKK1) 的表达并将其与 pMSCV-hTR 细胞的表达相比较(图 6A-C)。还通过使用抗 β - 联蛋白和肌动蛋白的抗体的免疫印迹分析细胞系的细胞溶解产物。

[0143] mir-181 在 HuH7 细胞中下调之后,通过 RT-PCR 检测 β - 联蛋白调节的基因(CCND1、TACSTD1 和 DKK1) 的表达并将其与 pMSCV-hTR 细胞的表达相比较(图 6D-F)。还通过使用抗 β - 联蛋白和肌动蛋白的抗体的免疫印迹分析细胞系的细胞溶解产物。

[0144] Mir-181 影响 wnt- β - 联蛋白表达。这通过功能的反馈联系而发生是可能的。DKK1 是 β - 联蛋白的抑制剂。 β - 联蛋白诱导 mir-181 以及随后抑制 β - 联蛋白的 DKK1。人们认为 mir-181 起作用以抑制 DKK1 的抑制活性。DKK13'-UTR 中预测的 mir-181 结合位点示于图 7A-B。使用了 BC001539,人类 dickkopf 类似物 1 的 cDNA。图 7A 显示在 DKK13'-UTR 的 611-632 位置中的结合位点。图 7B 显示在 DKK13'-UTR 的 771-799 位置中的预测的结合位点。

[0145] mir-181 的启动子中预测的转录因子 4 (TCF-4) 结合位点 ((A/T) (A/T) CAAAG) 或 (CTTTG(A/T) (A/T)) 示于图 8A-D。分析了位于转录起始位点上游的 6,060 碱基对。图 8A

显示染色体 1 中的 mir-181a1 和 mir-181b1 的启动子,为其使用了 NW_926128,人类染色体 1 基因组重叠群。图 8B 显示染色体 9 中的 mir-181a2 和 mir-181b2 的启动子,为其使用了 NT_008470,人类染色体 9 基因组重叠群。在 Sanger 数据库中,两种 EST 基因是在 mir-181c 和 mir-181d 定位的区域中预测的,其具有不同的转录起始位点(图 8C-D)。图 8C 中染色体 19 中的 mir-181c 和 mir-181d 的启动子是来自 ENSESTT00000290819 的启动子。图 8D 中染色体 19 中的 mir-181c 和 mir-181d 的启动子是来自 ENSESTT00000290818 的启动子。

[0146] 本文引用的所有文献,包括出版物、专利申请和专利通过引用并入本文,其引用程度就如同每一篇文献在此被个别并且特别地指出以通过引用并入并且全文展示于本文中。

[0147] 除非本文另有说明或以其他方式由上下文明确地否认,描述本发明的上下文中(尤其是在随后的权利要求的上下文中)的术语“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”以及相似的指示将被解释为涵盖单数和复数。除非另有注释,术语“包括(comprising)”、“具有”、“包括(including)”和“含有”被解释为开放式术语(即,意指“包括但不限于”)。除非本文以其他方式指出,本文的值的范围的描述仅仅意指作为个别地引用落入这一范围中的每一个单独的值的速记法,并且每个单独的值如同其在本文中被个别引用地并入说明书中。除非本文以其他方式指出或以其他方式由上下文明确地否认,本文描述的所有方法可以任何适当的顺序实行。除非以其他方式要求,任何和所有实施例的使用,或本文提供的示例性语言(例如,“诸如”)仅仅旨在更好的说明本发明而不是设定对本发明的范围的限制。说明书中的语言不应当被解释为说明任何未要求的元素为本发明的实行所必需的。

[0148] 本发明的优选的实施方案描述于本文,包括发明人已知的用于实现本发明的最好方式。当阅读前述说明时,那些优选的实施方案的变化形式对于本领域的普通技术人员来说是显而易见的。发明人期望技术人员适当使用这些变化形式,并且发明人希望本发明以除了如本文具体描述的其他方式被实施。因此,此发明包括在由可适用的法律允许的附加的权利要求中记述的主题的所有改变和同等物。而且,除非本文另有说明或以其他方式由上下文明确地否认,以本发明的所有可能的变化形式的上文描述的要素的任何组合都包括在本发明的范围内。

[0001]

序列表

<110> WANG, Xin Wei
JI, Junfang

<120> 确定肝细胞癌亚型和检测肝癌干细胞的方法

<130> 701608

<160> 39

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 21
<212> RNA
<213> 人

<400> 1
ugagguagua gguuguauag u 21

<210> 2
<211> 22
<212> RNA
<213> 人

<400> 2
ugagguagua gguuguauag uu 22

<210> 3
<211> 22
<212> RNA
<213> 人

<400> 3
ugagguagua gguuguauagg uu 22

<210> 4
<211> 22
<212> RNA
<213> 人

<400> 4
ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 5
<211> 22
<212> RNA
<213> 人

<400> 5
ugagguagua gguuguauagg uu 22

<210> 6
<211> 21
<212> RNA
<213> 人

<400> 6
agagguagua gguugcauag u 21

<210> 7
<211> 21
<212> RNA
<213> 人

<400> 7
ugagguagua gauuguauag u 21

[0002]

<210> 8		
<211> 21		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 8		
ugagguagua guuuguacag u		21
<210> 9		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 9		
uuuuuugcgg ucugggcuug cu		22
<210> 10		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 10		
uuuuuugcgg ucugggcuug cu		22
<210> 11		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 11		
aacauucauu gcugucggug gg		22
<210> 12		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 12		
aacauucauu gcugucggug gg		22
<210> 13		
<211> 21		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 13		
uagguaguuu cauguuguug g		21
<210> 14		
<211> 23		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 14		
uccagcuccu auaugaugcc uuu		23
<210> 15		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 15		
aaagucugu ucgucaggug ag		22
<210> 16		
<211> 24		
<212> RNA		
<213> 人		

[0003]

<400> 16 caaagugcuu acagucagg uagu	24
<210> 17 <211> 22 <212> RNA <213> 人	
<400> 17 aacauucaac cugucgguga gu	22
<210> 18 <211> 23 <212> RNA <213> 人	
<400> 18 cagugcaaua guauugucaa agc	23
<210> 19 <211> 21 <212> RNA <213> 人	
<400> 19 uauugcacuu gucccggccu g	21
<210> 20 <211> 24 <212> RNA <213> 人	
<400> 20 aaaagugcuu acagucagg uagc	24
<210> 21 <211> 21 <212> RNA <213> 人	
<400> 21 uaaagugcug acagucaga u	21
<210> 22 <211> 23 <212> RNA <213> 人	
<400> 22 aacauucaac gcugucggug agu	23
<210> 23 <211> 23 <212> RNA <213> 人	
<400> 23 aacauucaac gcugucggug agu	23
<210> 24 <211> 23 <212> RNA <213> 人	
<400> 24 uaaagugcuu auagucagg uag	23

[0004]

<210> 25		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 25		
agcuacauug ucugcugggu uu		22
<210> 26		
<211> 24		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 26		
agcuacauuc ggcuacuggg ucuc		24
<210> 27		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 27		
cauugcacuu gūcūcggūcū gā		22
<210> 28		
<211> 21		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 28		
uauugcacau uacuaaguug c		21
<210> 29		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 29		
gcacauuaca cgguegaccu cu		22
<210> 30		
<211> 21		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 30		
uaungcacuu gucccggccu g		21
<210> 31		
<211> 23		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 31		
uggaguguga caaugguguu ugu		23
<210> 32		
<211> 22		
<212> RNA		
<213> 人		
<400> 32		
ucccugagac ccuaacuugu ga		22
<210> 33		
<211> 22		
<212> RNA		

[0005]

<213> 人	
<400> 33	
uuccugagac ccuaacuugu ga	22
<210> 34	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 34	
uagcaccauc ugaaaucggu u	21
<210> 35	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 35	
uagcaccuu ugaaaucagu guu	23
<210> 36	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 36	
cgcauceccu agggcauugg ugu	23
<210> 37	
<211> 22	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 37	
cacccguaga accgaccuug cg	22
<210> 38	
<211> 23	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 38	
uagcaccuu ugaaaucagu guu	23
<210> 39	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> 人	
<400> 39	
uagcaccuu ugaaaucggu	20

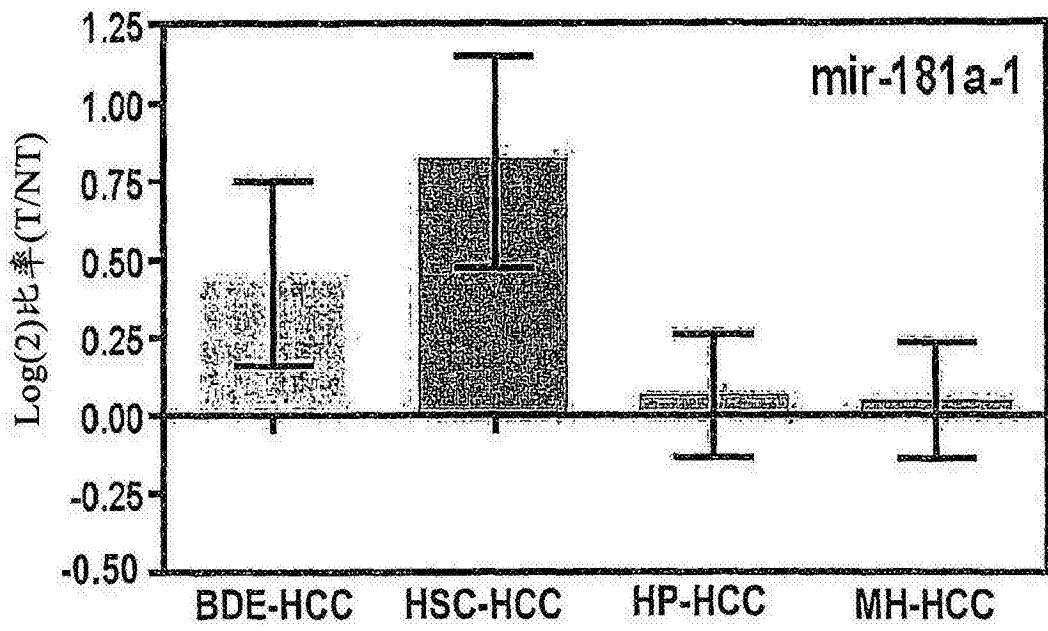


图 1A

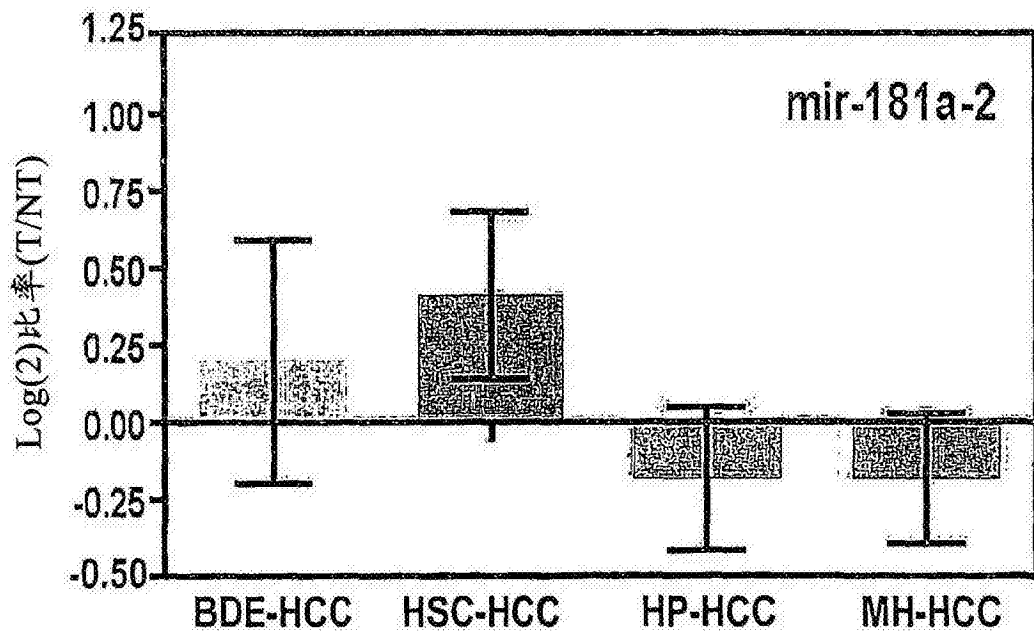


图 1B

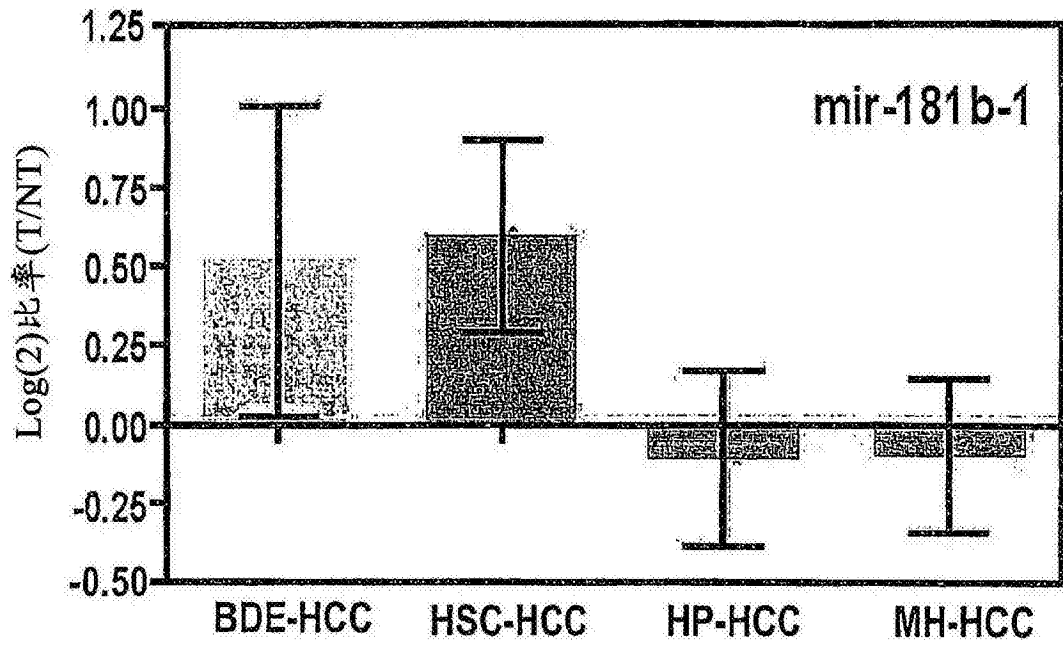


图 1C

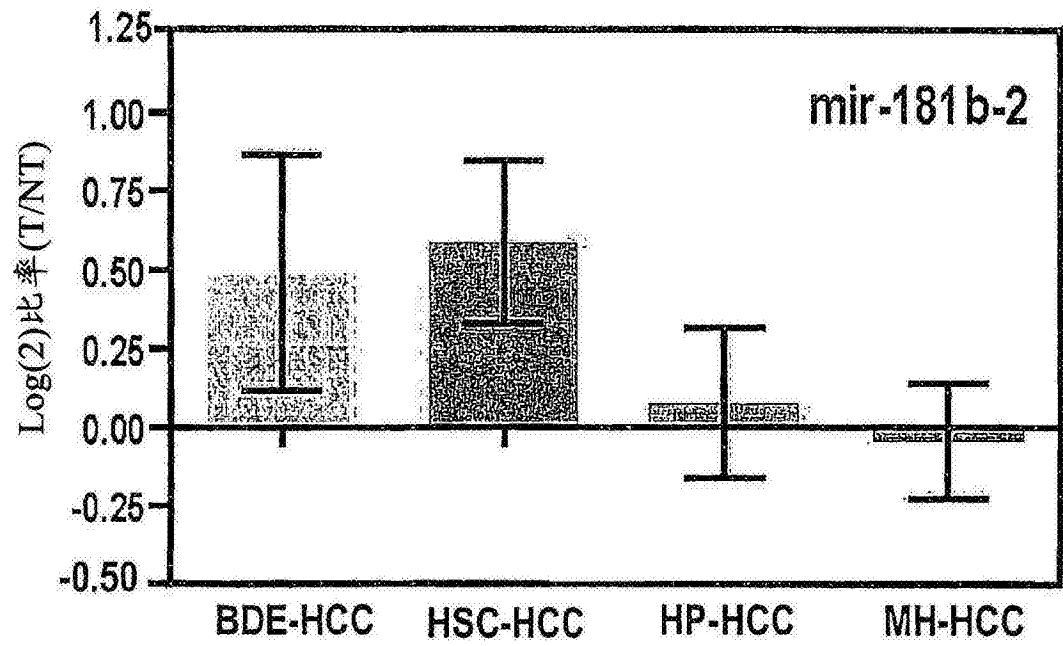


图 1D

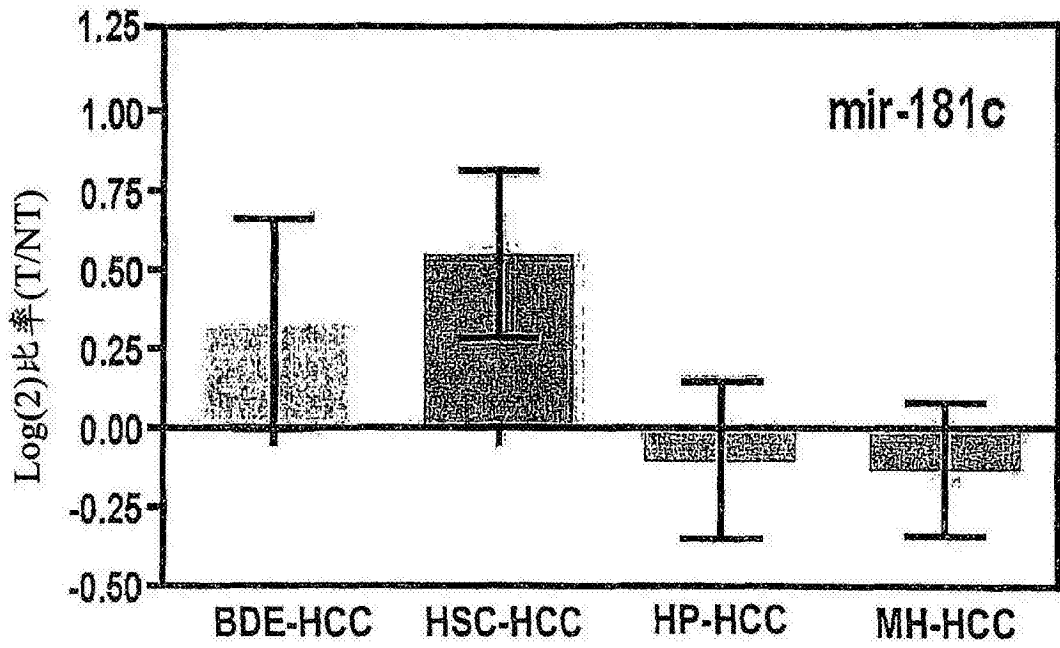


图 1E

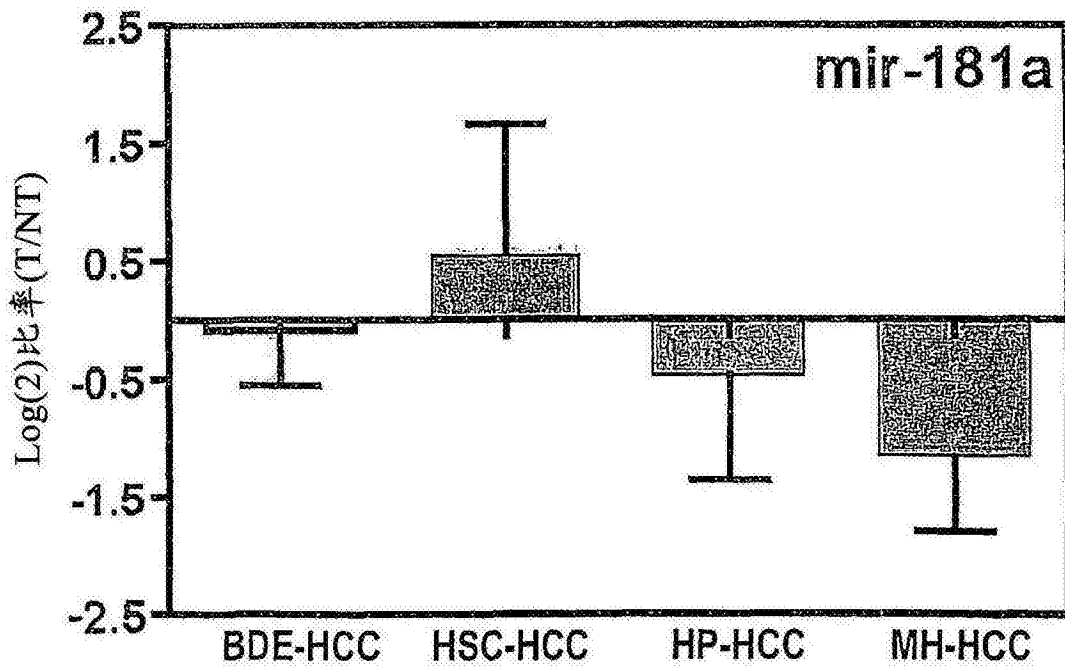


图 1F

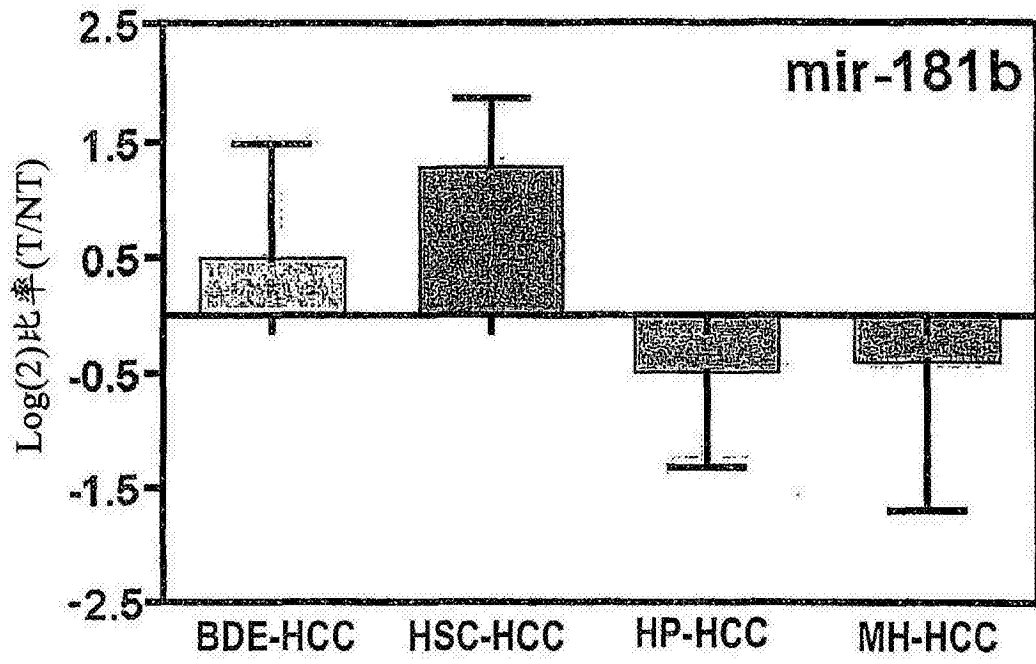


图 1G

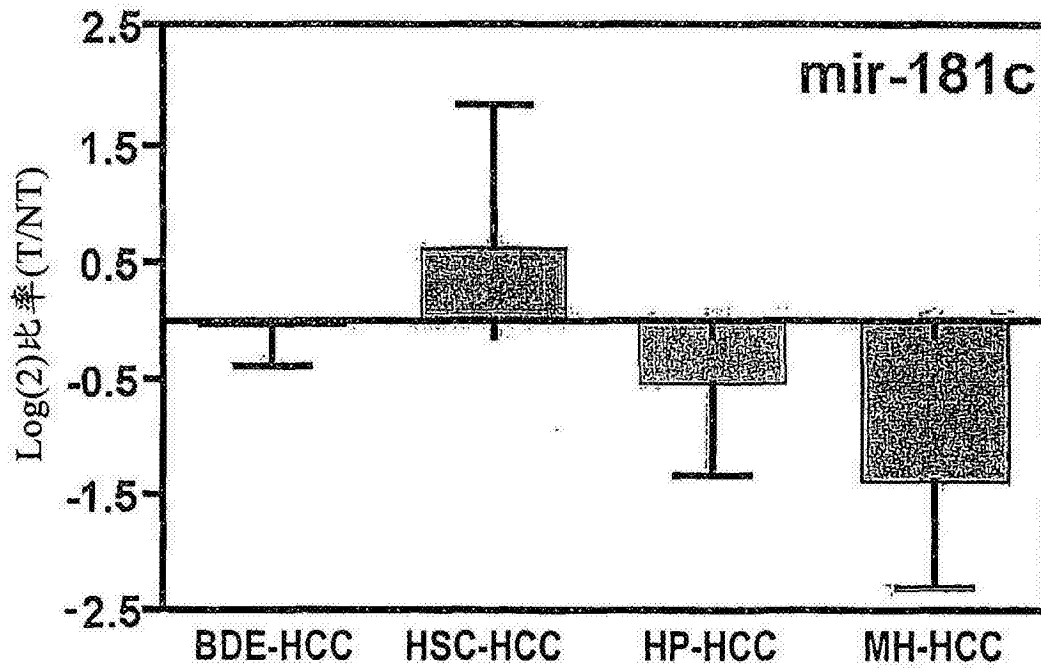


图 1H

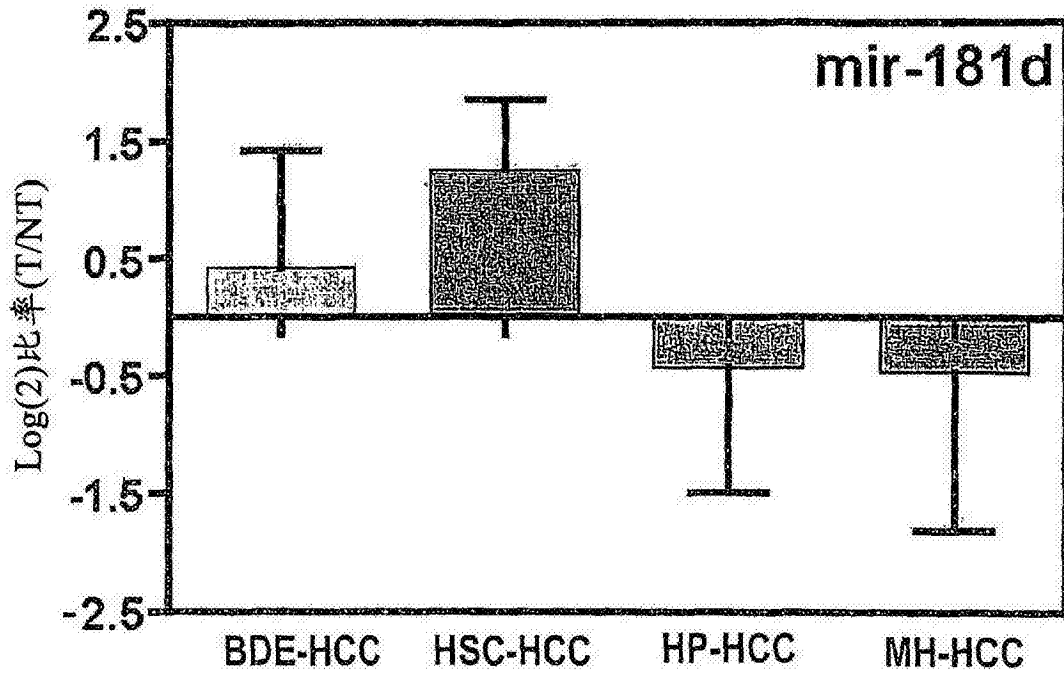


图 1I

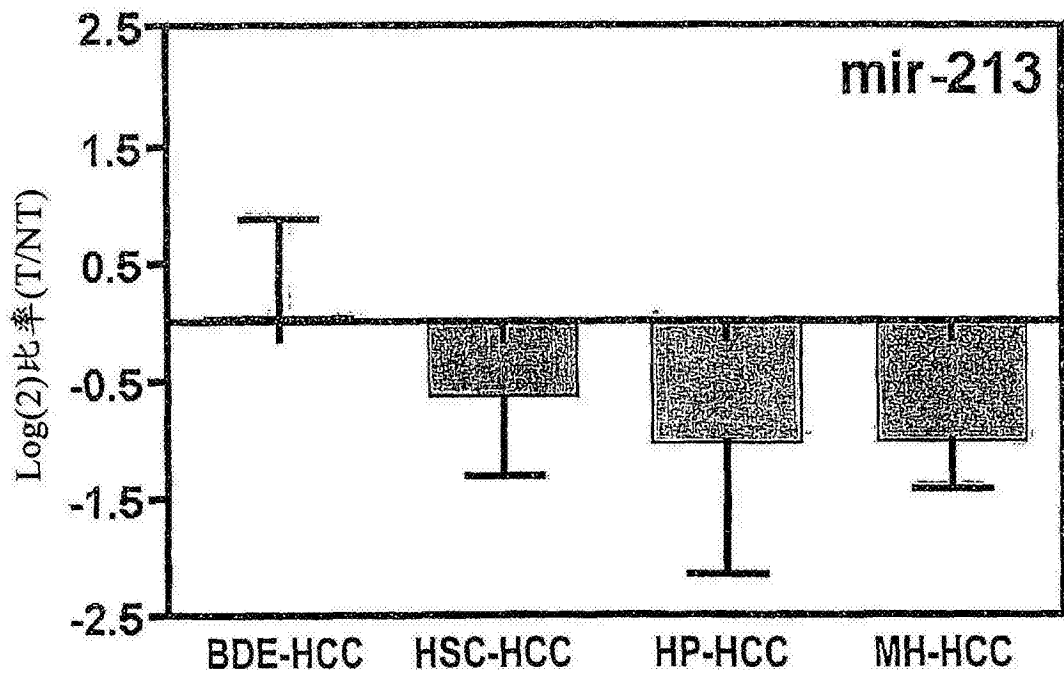


图 1J

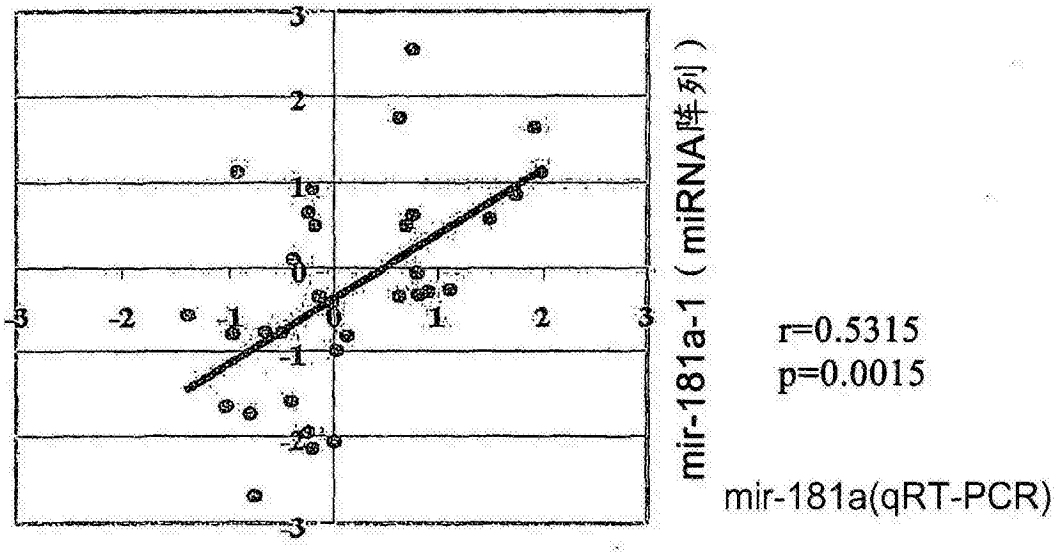


图 2A

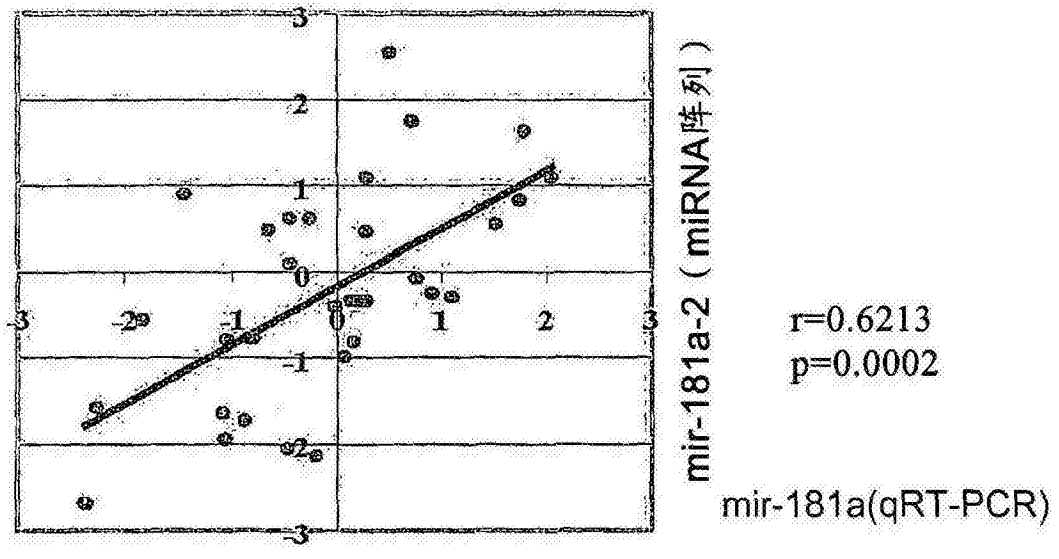


图 2B

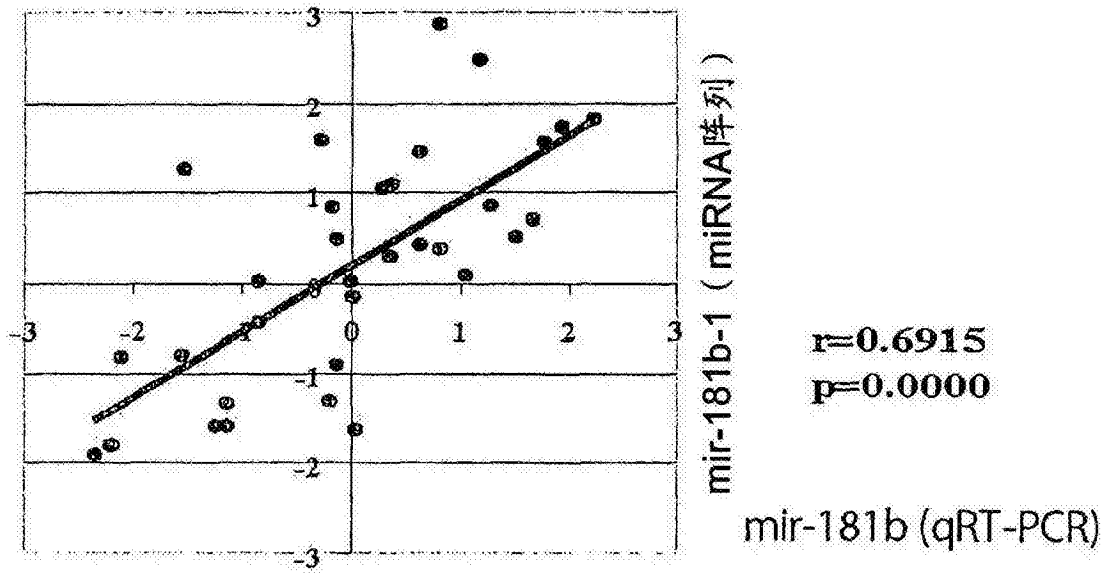


图 2C

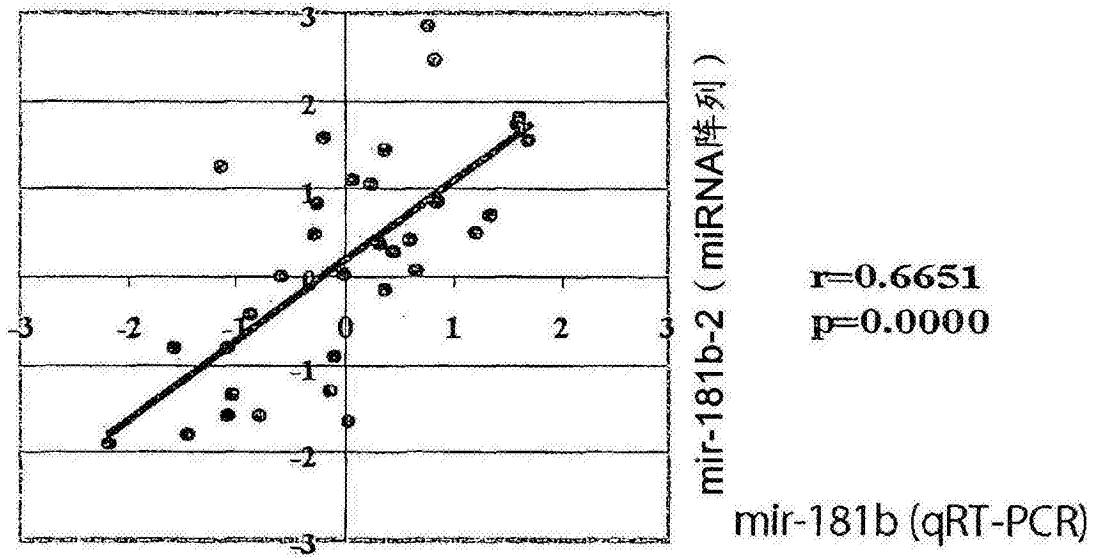


图 2D

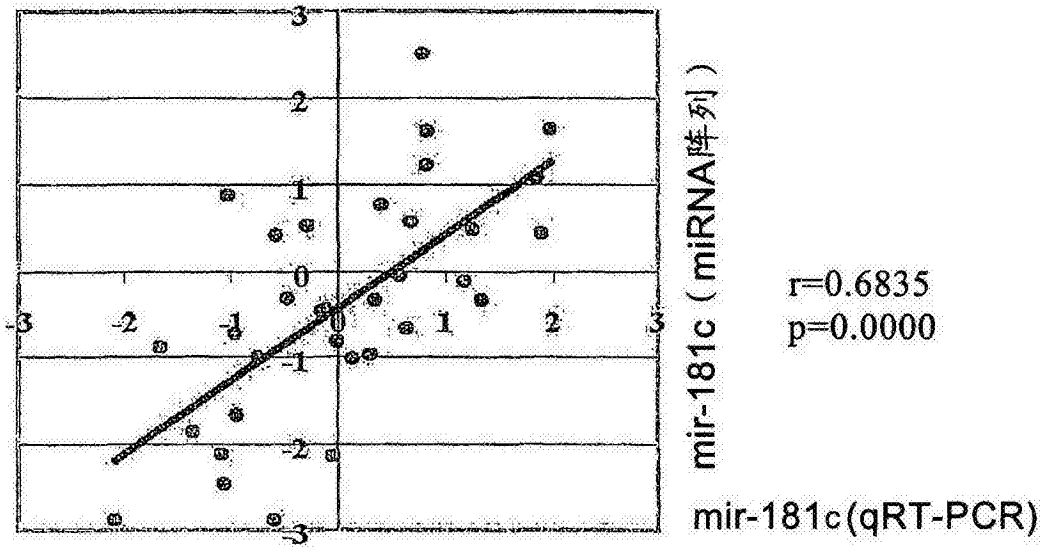


图 2E

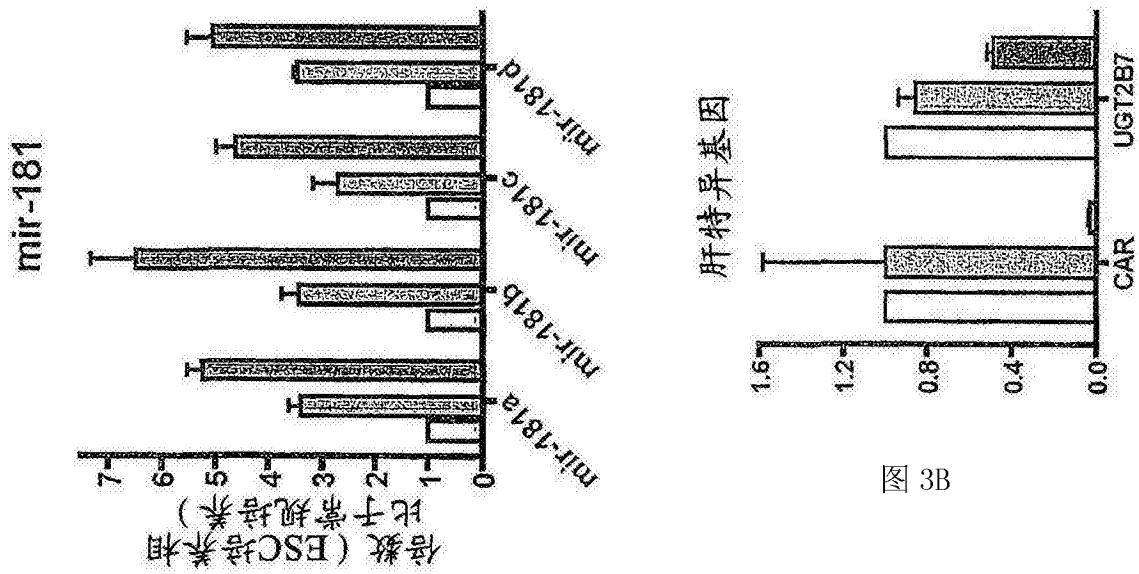


图 3A

图 3B

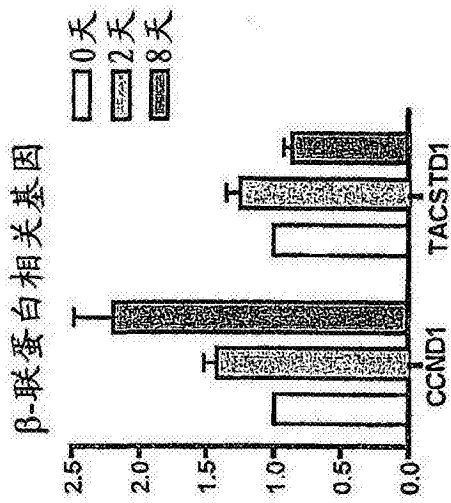


图 3C

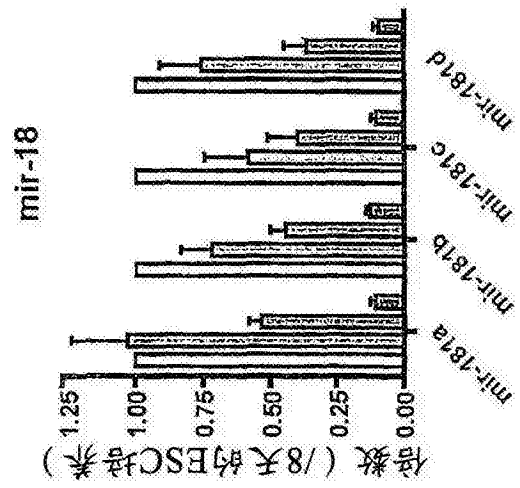


图 3D

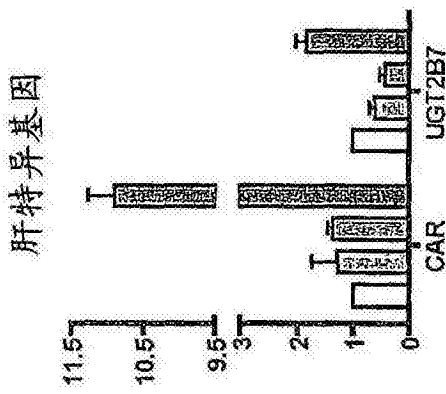


图 3E

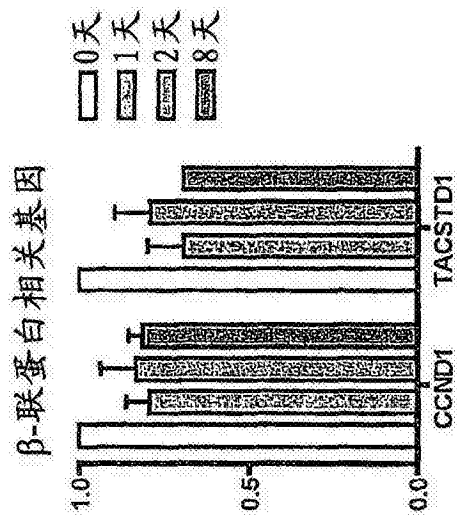


图 3F

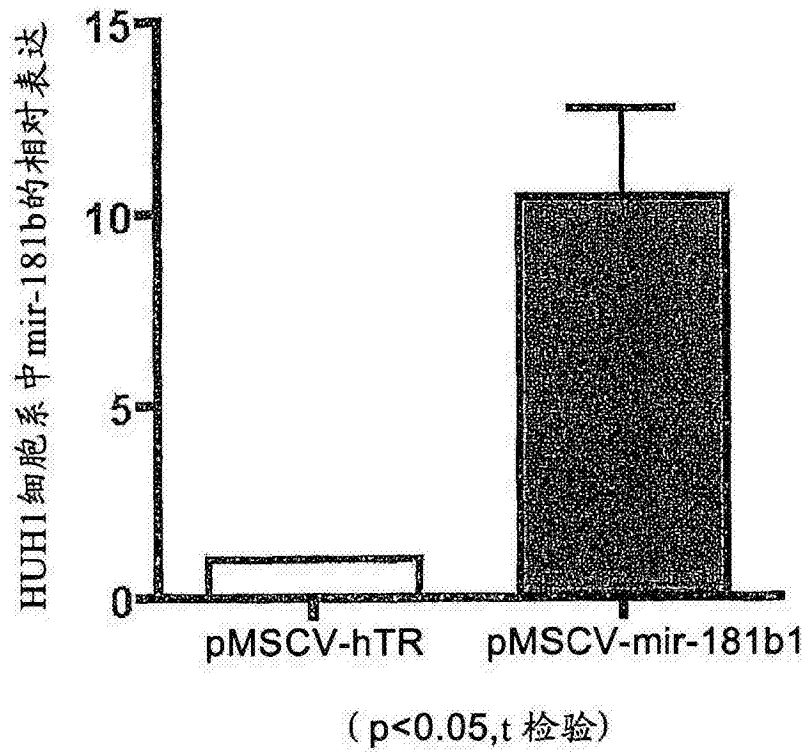


图 4

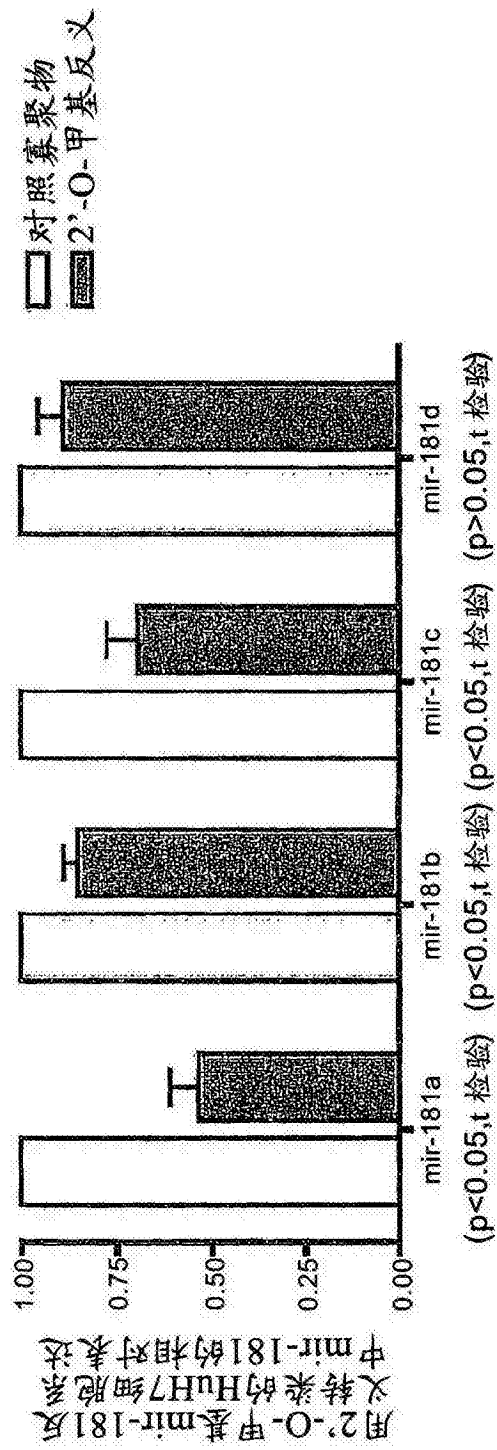


图 5

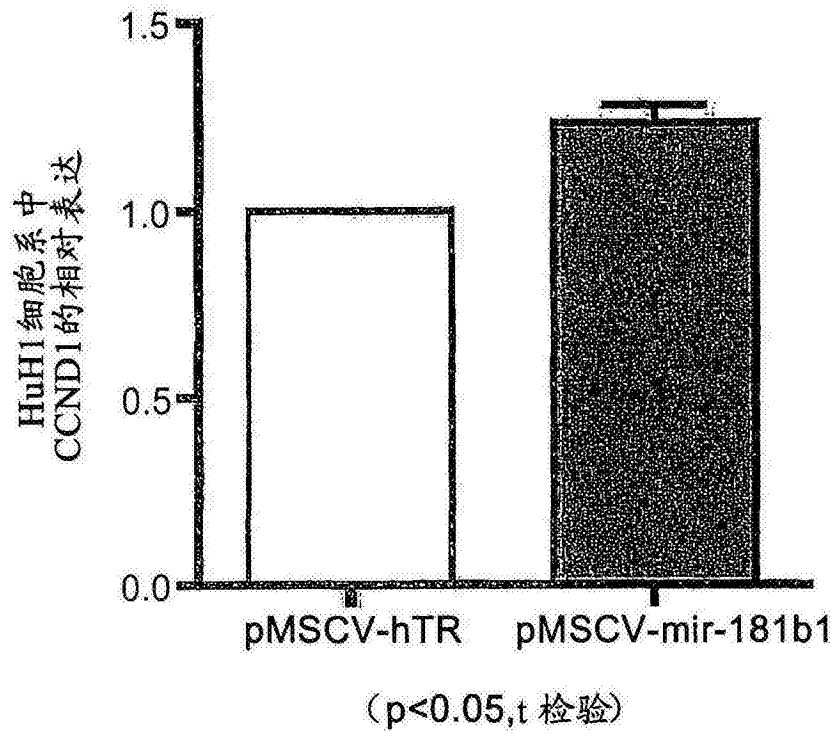


图 6A

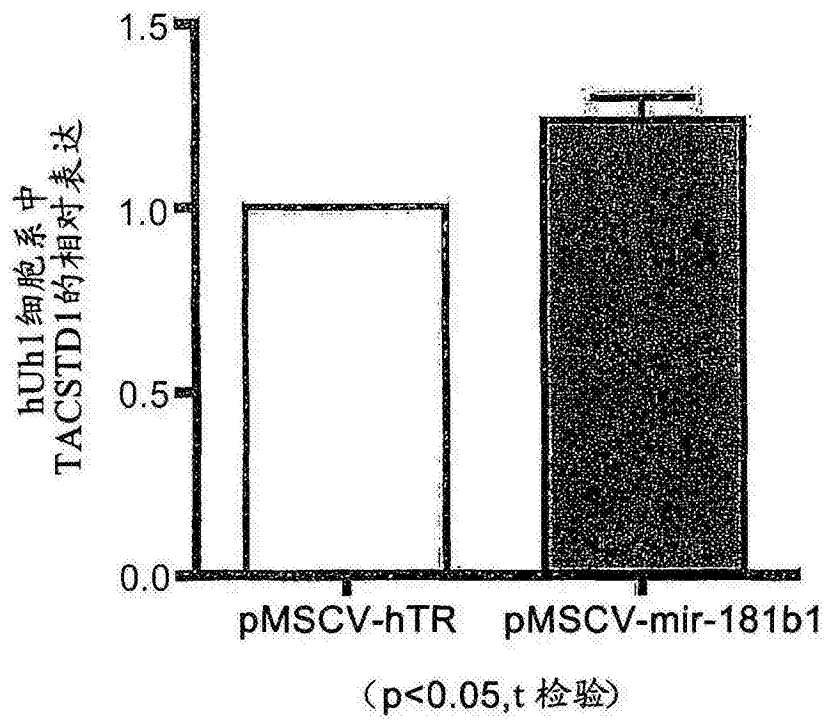


图 6B

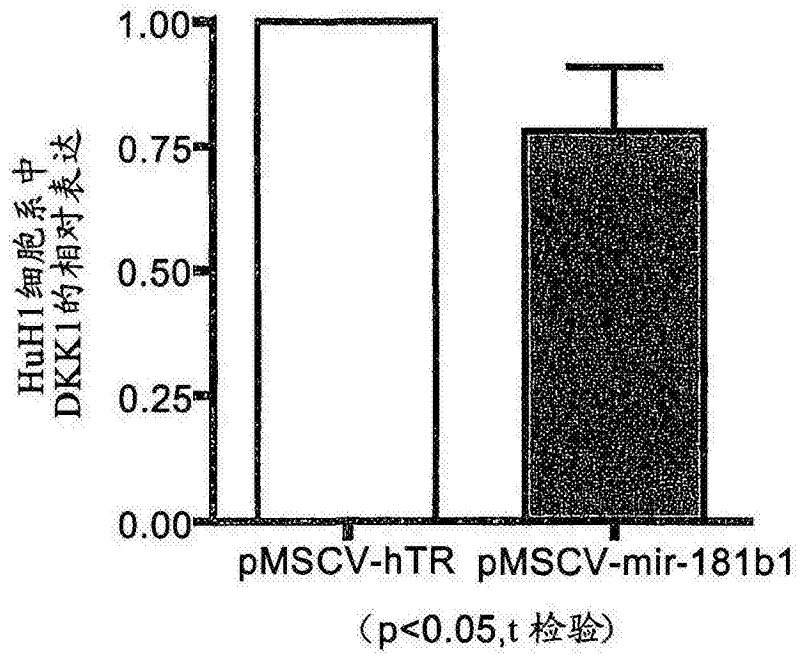


图 6C

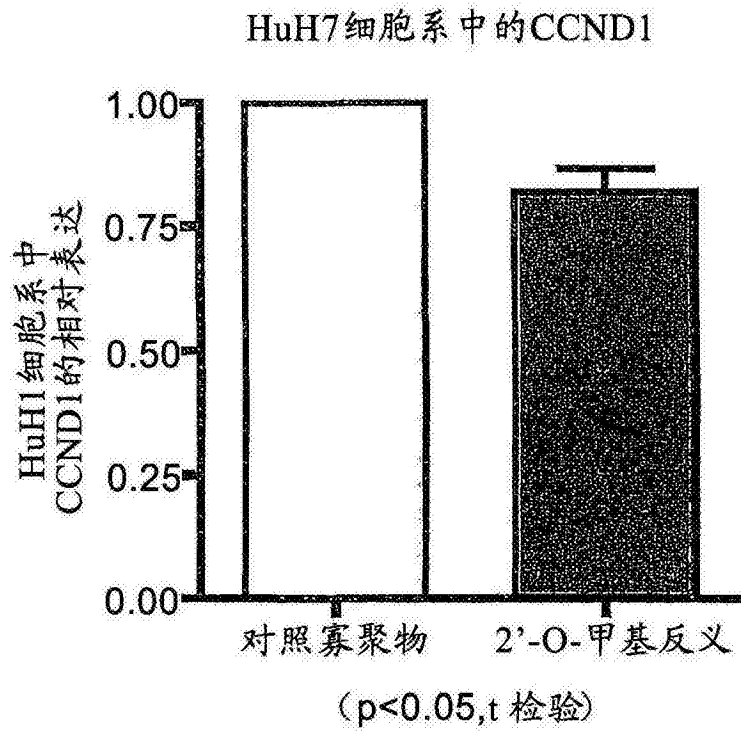


图 6D

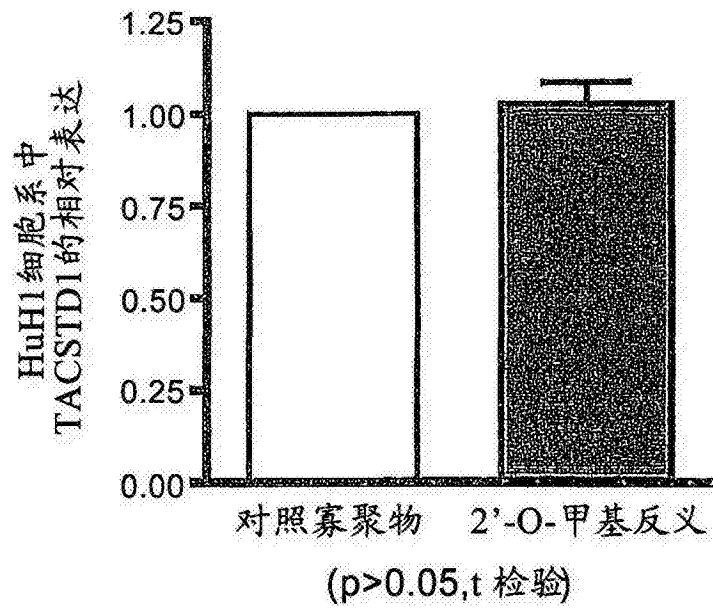


图 6E

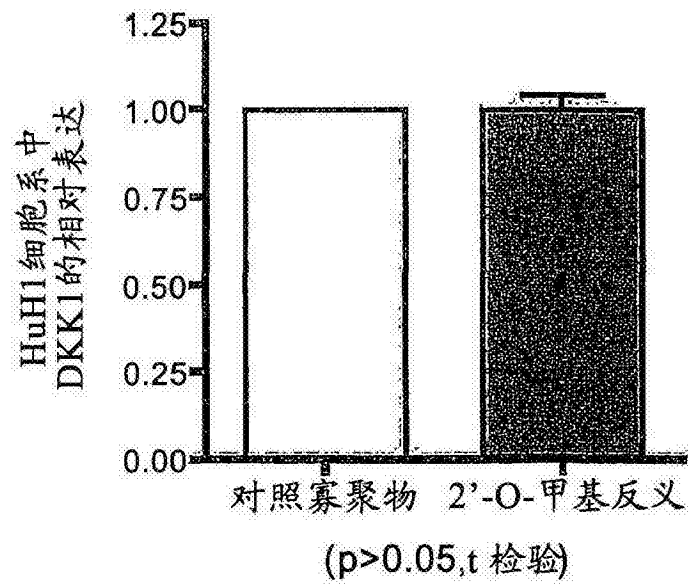


图 6F

DKK1 3'UTR的位置611-632

----AAUGAUCAU-AGCACC-UUGGAUG----	DKK1
. . . .	
UG--AGUGGCUGUCGCAACUUACAA	mir-181a
----AAUGAUCAUA-GCACC-UUGGAUG----	DKK1
. 	
G--GGUGGCUGUCGUUACUUACAA	mir-181b
----AAUGAUCA-UAGCACCUUGGAUG----	DKK1
. . . .	
UG--AGUGGCUGUCCAACUUACAA	mir-181c
----AAUGAUCAUA-GCACC-UUGGAUG----	DKK1
. 	
UUG--GGUGGCUGUUGUUACUUACAA	mir-181d

图 7A

DKK1 3'UTR的位置771-799

----AACCUGUCCUGAAAGAAGGUCAAGUGUGU----	DKK1
... .	
UGAGUGGC--UGUCG-CAAC-UUACA-A	mir-181a
----AACCUGUCCUGAAAGAAGGUCAAGUGUGU----	DKK1
... .. .	
GGGUGG--CUGUCG-UUAC-UUACA-A	mir-181b
----AACCUGUCCUGAAAGAAGGUCAAGUG GU----	DKK1
... .	
UGAGUGG--CUG---UCCAACUUACA-A	mir-181c
----AACCUGUCC-UGAAAGAAGGUCAAGUGUGU----	DKK1
... .. .	
UUGGGUGGCUGUUG--UU--A-CUUACA-A	mir-181d

图 7B

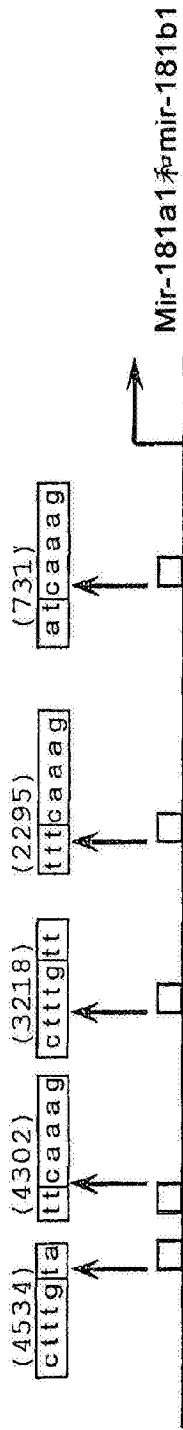


图 8A

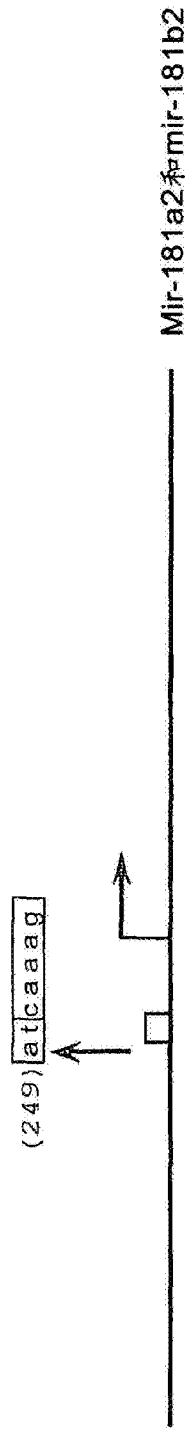


图 8B

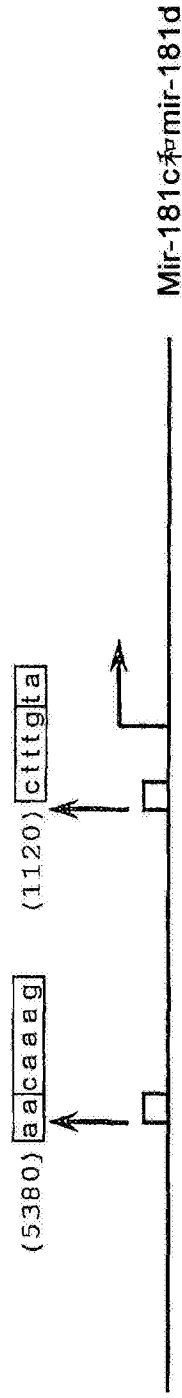


图 8C

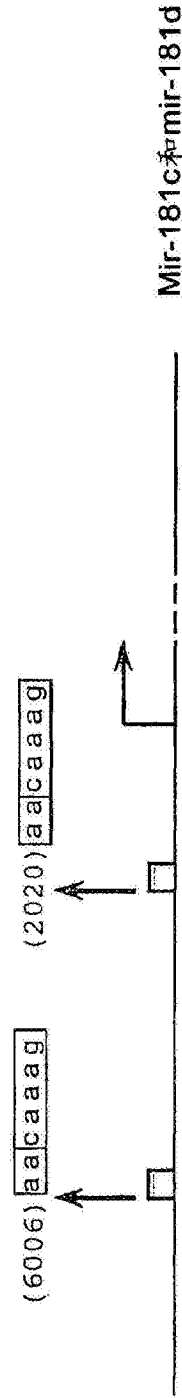


图 8D

B、C和D型细胞系中的mir-181

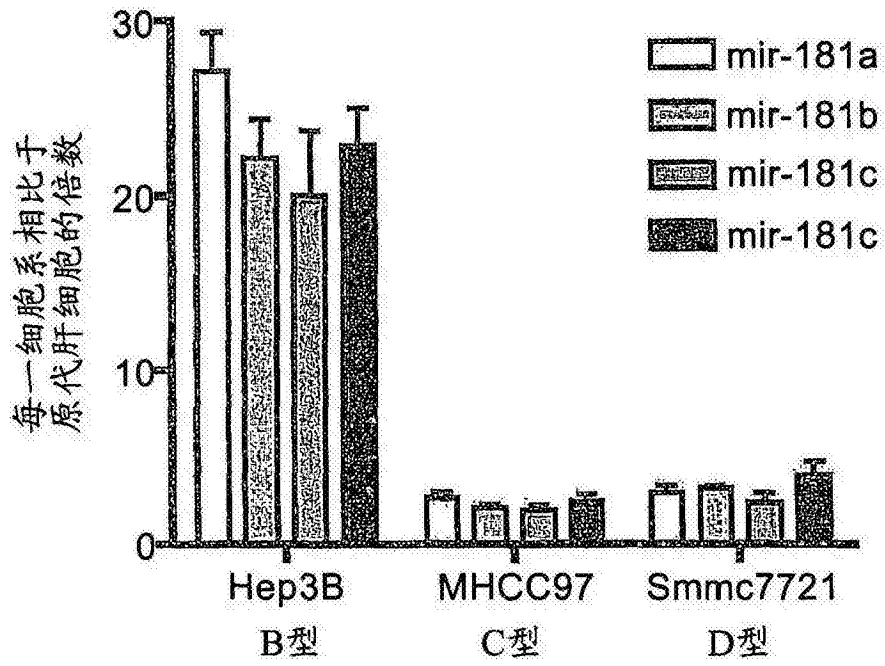


图 9

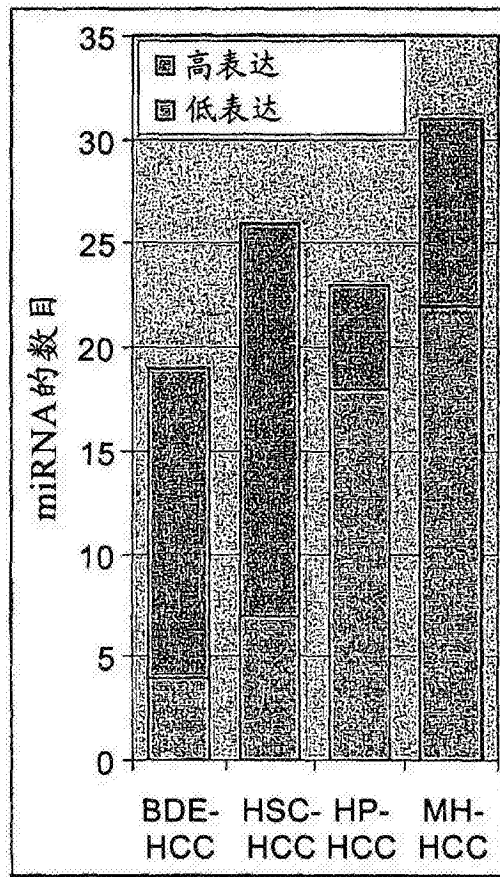


图 10

专利名称(译)	确定肝细胞癌亚型和检测肝癌干细胞的方法		
公开(公告)号	CN103602724B	公开(公告)日	2016-03-16
申请号	CN201310394618.6	申请日	2008-06-09
[标]申请(专利权)人(译)	俄亥俄州立大学研究基金会		
申请(专利权)人(译)	由卫生与公众服务部代表的美利坚合众国政府 俄亥俄州立大学研究基金会		
当前申请(专利权)人(译)	由卫生与公众服务部代表的美利坚合众国政府 俄亥俄州立大学研究基金会		
[标]发明人	XW王 J季 T亚玛史塔 CM克罗斯		
发明人	X·W·王 J·季 T·亚玛史塔 C·M·克罗斯		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/04 G01N33/53 G01N27/447 A61K48/00 A61K45/00 A61P35/00		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/158 C12Q2600/178 G01N33/6893		
代理人(译)	林远成		
审查员(译)	方晓云		
优先权	60/942833 2007-06-08 US		
其他公开文献	CN103602724A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了在受治疗者中确定HCC亚型的方法，其包括a)从所述受治疗者获得样品，b)测定样品以检测1种或多种生物标志物的表达，以及c)将所述生物标志物的表达与受治疗者中的HCC亚型相关联。本发明还提供了在样品中检测HCC干细胞的方法。此外，本发明提供了用于治疗患有HCC的受治疗者的方法和组合物，其利用了与HCC干细胞相关的生物标志物。

表 1

HCC 亚型 生物标志物 表达水平

HCC 亚型	生物标志物	表达水平	
		正常组织	HCC
HCC 1	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 2	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 3	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 4	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 5	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 6	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 7	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 8	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 9	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 10	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 11	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000
HCC 12	S100B	0.000	0.000
		0.000	0.000