



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109790585 B

(45) 授权公告日 2024. 09. 13

(21) 申请号 201780059325.9

(22) 申请日 2017.08.04

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109790585 A

(43) 申请公布日 2019.05.21

(30) 优先权数据
62/371028 2016.08.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.03.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2017/054800 2017.08.04

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/025242 EN 2018.02.08

(73) 专利权人 贝勒研究院
地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 A·古勒 J·米尧西

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理
有限公司 11280
专利代理师 郭广迅

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6886 (2018.01)

(56) 对比文件
CN 101861401 A, 2010.10.13

审查员 冷千里

权利要求书1页 说明书29页 附图25页

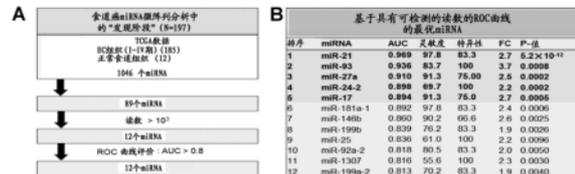
(54) 发明名称

用于诊断和治疗食道癌的方法

(57) 摘要

本发明的公开内容涉及基于生物标志物 miRNA 的表达水平的用于食道癌的治疗性处理和诊断方法。公开内容的方面涉及治疗患者的食道癌 (EC) 的方法,所述方法包括:当患者被确定为相对于对照样品中一种或多种 miRNA 的表达水平,在来自患者的样品中所述一种或多种 miRNA 的表达水平升高或降低时,诊断患者患有食道癌,所述一种或多种 miRNA 选自:mir-15b、miR-17、mir-18a、mir-21、mir-23a、mir-24-2、mir-25、mir-27a、mir-93、mir-103、mir-106b、mir-129-2、mir-139、mir-146b、mir-148a、mir-151、miR-155、mir-181a-1、mir-181a、mir-181b-1、mir-181b、mir-182、mir-183、mir-192、mir-194-1、mir-194-2、mir-196a-1、mir-196a-2、mir-196b、mir-205、mir-215、mir-223、mir-224、mir-335、mir-338、mir-375、mir-421、mir-484、mir-505、mir-769、mir-944、mir-1468、mir-3648 和 let-7i;和向被诊断的患者给予有效量的食道治

疗。



1. 检测miRNA的表达水平的试剂在制备用于诊断患有食道癌的患者试剂盒中的用途,其中所述miRNA为:mir-103、mir-106b、mir-151、miR-17、mir-181a、mir-21、mir-25和mir-93;其中所述食道癌是食道鳞状细胞癌。

2. 权利要求1所述的用途,其中当被检测的miRNA的表达水平与对照样品相比显著增加时,所述患者被诊断为患有食道鳞状细胞癌,其中所述对照样品是健康对照。

3. 权利要求2所述的用途,其中来自所述患者的样品和/或对照样品是组织样品。

4. 权利要求2所述的用途,其中来自所述患者的样品和/或对照样品是血清样品。

5. 权利要求1或2所述的用途,其中所述患者患有或被确定为患有I、IA、IB、II、IIA、IIB、III、IIIA、IIIB、IIIC或IV期食道癌。

6. 权利要求1或2所述的用途,其中来自所述患者的生物样品是来自原发性肿瘤样品。

7. 权利要求1或2所述的用途,其中所述食道癌包括T1、T2、T3或T4类食道癌。

8. 权利要求1或2所述的用途,其中所述食道癌包括N0、N1、N2或N3类食道癌。

9. 权利要求1或2所述的用途,其中所述食道癌包括M0或M1类食道癌。

10. 权利要求1或2所述的用途,其中所述食道癌包括淋巴结转移。

11. 权利要求1或2所述的用途,其中所述食道癌包括远处转移。

12. 权利要求11所述的用途,其中所述远处转移是肺、肝和/或骨转移。

13. 权利要求1或2所述的用途,其中升高的或降低的表达水平由临界值确定。

14. 权利要求13所述的用途,其中所述临界值通过ROC分析确定。

15. 权利要求1或2所述的用途,其中所述患者先前已经治疗过食道癌。

16. 一种试剂盒,其包含用于检测食道鳞状细胞癌-差异表达的miRNA的试剂,其中所述差异表达的miRNA由mir-103、mir-106b、mir-151、mir-17、mir-181a、mir-21、mir-25和mir-93组成。

17. 权利要求16所述的试剂盒,其还包含一种或多种用于检测对照的试剂。

18. 权利要求16或17所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包含用于从生物样品分离核酸的试剂。

19. 权利要求18所述的试剂盒,其中所述试剂用于从血清样品分离核酸。

用于诊断和治疗食道癌的方法

[0001] 描述

[0002] 本申请要求2016年8月4日提交的申请号为62/371,028的美国临时专利申请的优先权权益,该申请以其整体通过引用在此并入。

[0003] 政府支持的声明

[0004] 本发明是在国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的批准号为R01 CA184792的政府支持下完成的。政府拥有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 总的来说,本发明涉及分子生物学和肿瘤学领域。更具体地,它涉及与微小RNA(miRNA)分子和癌症预后、诊断和治疗有关的方法和组合物。

背景技术

[0006] 食道是从人的喉咙延伸到人的胃的管状结构,当癌细胞在食道中发展时发生食道癌。食物通过食道从口腔到达胃。癌症始于食道的内层,并且可以在食道的其它层到处扩散并扩散到身体的其它部位(转移)。

[0007] 食道癌有两种主要类型。一种类型是食道鳞状细胞癌。鳞状细胞排列在内部食道,并且由鳞状细胞发展的癌症可以沿着整个食道发生。另一种类型称为食道腺癌。这是从腺细胞发展而来的癌症。为了发展食道腺癌,通常排列在食道的鳞状细胞被腺细胞代替。这通常发生在靠近胃的食道下段中,并且被认为是主要与酸暴露于食道下段有关。

[0008] 食道癌(EC)是癌症相关死亡的第六大主要原因,也是全球第八最常见的癌症,其发病率因地理位置和种族而有很大变化。食道鳞状细胞癌(ESCC)占有EC病例的近80%,并且在东亚以及东非和南非尤其高。所有ESCC的平均5年生存率约为10-41%。其预后不良的主要原因之一是食道没有浆膜,并且具有广泛的淋巴管网络,降低了对癌症局部扩散的抵抗力并导致早期区域肿瘤的进展和早期转移。此外,ESCC的早期阶段通常没有症状,因此导致诊断延迟。虽然已经在ESCC患者的诊断中研究了各种基于血液的生化标志物,包括癌胚抗原(CEA)、鳞状细胞癌抗原(SCC-Ag)、细胞角蛋白-19片段(CYFRA21-1)和p53抗体,然而这些循环生物标志物对于ESCC的早期检测是不可靠的。因此,用于ESCC的早期检测的新的循环生物标志物的发现对于改善ESCC患者的总体结果具有极其重要的临床意义。

[0009] 因此,本领域中需要更有效的用于检测,特别是食道癌的早期检测的方法。此外,CRC阶段的更准确的诊断将得到用于治疗CRC的新的且更有效的治疗方法。

发明内容

[0010] 本发明的公开内容通过提供基于生物标志物miRNA的表达水平的用于食道癌的更有效的治疗性处理和诊断方法满足了本领域中的需求。公开内容的方面涉及治疗患者的食道癌(EC)的方法,所述方法包括:当患者被确定为相对于对照样品中一种或多种miRNA的表达水平,在来自于患者的样品中所述一种或多种miRNA的表达水平升高或降低时,诊断患者

患有食道癌,所述一种或多种miRNA选自:mir-15b、miR-17、mir-18a、mir-21、mir-23a、mir-24-2、mir-25、mir-27a、mir-93、mir-103、mir-106b、mir-129-2、mir-139、mir-146b、mir-148a、mir-151、miR-155、mir-181a-1、mir-181a、mir-181b-1、mir-181b、mir-182、mir-183、mir-192、mir-194-1、mir-194-2、mir-196a-1、mir-196a-2、mir-196b、mir-205、mir-215、mir-223、mir-224、mir-335、mir-338、mir-375、mir-421、mir-484、mir-505、mir-769、mir-944、mir-1468、mir-3648和let-7i;和给予被诊断的患者有效量的食道治疗。

[0011] 另外的方面涉及用于治疗被确定为患有食道癌的患者方法,包括:给予患者食道癌治疗,其中所述患者被确定为相对于对照样品中一种或多种miRNA的表达水平,在来自于患者的样品中所述一种或多种miRNA的表达水平升高或降低,所述一种或多种miRNA选自:mir-15b、miR-17、mir-18a、mir-21、mir-23a、mir-24-2、mir-25、mir-27a、mir-93、mir-103、mir-106b、mir-129-2、mir-139、mir-146b、mir-148a、mir-151、miR-155、mir-181a-1、mir-181a、mir-181b-1、mir-181b、mir-182、mir-183、mir-192、mir-194-1、mir-194-2、mir-196a-1、mir-196a-2、mir-196b、mir-205、mir-215、mir-223、mir-224、mir-335、mir-338、mir-375、mir-421、mir-484、mir-505、mir-769、mir-944、mir-1468、mir-3648和let-7i。

[0012] 另外的方面涉及检测患者的一种或多种miRNA的方法,所述方法包括:从人患者获得样品;通过使样品与miRNA检测试剂接触,检测所述一种或多种miRNA在样品中的表达是否升高或降低;其中所述一种或多种miRNA选自:mir-15b、miR-17、mir-18a、mir-21、mir-23a、mir-24-2、mir-25、mir-27a、mir-93、mir-103、mir-106b、mir-129-2、mir-139、mir-146b、mir-148a、mir-151、miR-155、mir-181a-1、mir-181a、mir-181b-1、mir-181b、mir-182、mir-183、mir-192、mir-194-1、mir-194-2、mir-196a-1、mir-196a-2、mir-196b、mir-205、mir-215、mir-223、mir-224、mir-335、mir-338、mir-375、mir-421、mir-484、mir-505、mir-769、mir-944、mir-1468、mir-3648和let-7i。在一些实施方案中,所述方法还包括当来自患者的样品中所述一种或多种miRNA升高时,治疗患者的食道癌。在一些实施方案中,所述方法还包括将来自患者的样品中miRNA的表达水平与对照样品中miRNA的表达水平进行比较。在一些实施方案中,样品包含血清样品。在一些实施方案中,对照样品包括来自没有食道癌(EC)的人患者的生物样品。在一些实施方案中,人患者疑似患有食道癌。

[0013] 公开内容的另外的方面涉及用于治疗被确定为患有食道癌的患者方法,包括:给予患者食道癌治疗,其中所述患者被确定为相对于对照样品中一种或多种miRNA的表达水平,在来自患者的样品中所述一种或多种miRNA的表达水平升高,所述一种或多种miRNA选自:miR-103、miR-106b、miR-151、miR-17、miR-181a、miR-21、miR-25和miR-93。在一些实施方案中,来自患者的样品包括血清样品。在一些实施方案中,食道癌是食道鳞状细胞癌(ESCC)。

[0014] 再另外的方面涉及用于诊断患有食道癌的患者方法,包括:确定在来自患者的样品中,选自以下的一种或多种miRNA的表达水平:mir-15b、miR-17、mir-18a、mir-21、mir-23a、mir-24-2、mir-25、mir-27a、mir-93、mir-103、mir-106b、mir-129-2、mir-139、mir-146b、mir-148a、mir-151、miR-155、mir-181a-1、mir-181a、mir-181b-1、mir-181b、mir-182、mir-183、mir-192、mir-194-1、mir-194-2、mir-196a-1、mir-196a-2、mir-196b、mir-205、mir-215、mir-223、mir-224、mir-335、mir-338、mir-375、mir-421、mir-484、mir-505、mir-769、mir-944、mir-1468、mir-3648和let-7i;并且基于所述一种或多种miRNA的表达水

平诊断食道癌。

[0015] 考虑本文所述的任何方法或试剂盒可涉及,可涉及至少或可涉及至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43或44(或其中可得出的任何范围)种以下miRNA:mir-15b、miR-17、mir-18a、mir-21、mir-23a、mir-24-2、mir-25、mir-27a、mir-93、mir-103、mir-106b、mir-129-2、mir-139、mir-146b、mir-148a、mir-151、miR-155、mir-181a-1、mir-181a、mir-181b-1、mir-181b、mir-182、mir-183、mir-192、mir-194-1、mir-194-2、mir-196a-1、mir-196a-2、mir-196b、mir-205、mir-215、mir-223、mir-224、mir-335、mir-338、mir-375、mir-421、mir-484、mir-505、mir-769、mir-944、mir-1468、mir-3648和let-7i。在一些实施方案中,可以检测、测量、比较、记录、分析、表征和/或鉴定这些miRNA分子中的一种或多种的表达。在一些实施方案中,当所述一种或多种被检测的miRNA的表达水平与对照样品相比显著不同时,患者被诊断为患有EC。

[0016] 在一些实施方案中,所述方法还包括从患者获得样品。在一些实施方案中,与对照相比,所述一种或多种miRNA的表达水平是升高的。在一些实施方案中,与对照相比,所述一种或多种miRNA的表达水平是降低的。

[0017] 实施方案涉及确定miRNA的表达水平。在一些实施方案中,将该水平与对照进行比较,以确定与非癌生物样品中的水平相比,所述miRNA的表达水平或活性是否升高。对照可以是非癌食道组织,或者其可以是癌性食道组织。如果对照是癌组织,则可以确定样品的miRNA水平升高,因为对照和患者样品中的水平相似,例如在彼此的至少或至多1、2、3或4个标准偏差(或其中可得出的任何范围)内。在一些实施方案中,对照是非EC患者样品中所述一种或多种miRNA的水平。在一些实施方案中,对照样品是非癌生物样品。在一些实施方案中,对照来自本文描述的特定群组。考虑一个或多个对照可以与测试样品同时测量,或者它可以是从多个对照样品收集的归一化值。

[0018] 在一些实施方案中,所述方法还包括确定来自患者的样品中所述一种或多种miRNA的表达水平。

[0019] 在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括mir-21、mir-93、mir-106b、mir-27a、mir-17和/或mir-181a中的一种或多种。在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括mir-93。在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括mir-93和mir-21。在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括mir-181a、mir-21和mir-17。在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括mir-181a、mir-17、mir-21和mir-27a。在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括mir-21、mir-93和mir-27a。

[0020] 在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括升高水平的mir-205。

[0021] 在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括与对照相比升高水平的miR-21、miR-93、miR-27a、miR-24-2和miR-17中的一种或多种。在一些实施方案中,当与对照如非EC或非癌对照中miRNA的表达水平相比,miR-21、miR-93、miR-27a、miR-24-2和miR-17中的一种或多种的表达水平升高时,治疗患者的EC或患者被诊断患有EC。

[0022] 在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括与对照相比升高水平的miR-103、miR-106b、miR-151、miR-17、miR-181a、miR-21、miR-25和miR-93中的一种或多种。在一些实施方案中,当与对照如非EC或非癌对照中miRNA的表达水平相比,miR-103、miR-106b、miR-

151、miR-17、miR-181a、miR-21、miR-25和miR-93中的一种或多种的表达水平升高时,治疗患者的EC或患者被诊断患有EC。

[0023] 在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括mir-103、mir-106b、mir-151、mir-17、miR-181a、mir-21、miR-25和mir-93中的至少两种。在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括mir-103、mir-106b、mir-151、mir-17、miR-181a、mir-21、miR-25和mir-93中的至少两种、三种、四种、五种、六种、七种或八种。在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包含mir-103、mir-106b、mir-17、miR-181a、mir-21、miR-25和mir-93中的至少两种。

[0024] 在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括let-7i、mir-103、mir-106b、mir-17、mir-151、mir-155、mir-181a、mir-181b、mir-182、mir-183、mir-18a、mir-21、mir-223、mir-23a、mir-25、mir-484、mir-505和mir-93。

[0025] 在一些实施方案中,食道癌是食道鳞状细胞癌(ESCC)。

[0026] 在一些实施方案中,所述一种或多种miRNA包括升高水平的mir-196a-1、mir-196b和/或mir-21。在一些实施方案中,食道癌是食道腺癌(EAC)。

[0027] 在一些实施方案中,患者样品和/或对照样品是组织样品。在一些实施方案中,患者样品和/或对照样品是血清样品。在一些实施方案中,患者样品和/或对照样品是如本文所述的生物样品。

[0028] 在一些实施方案中,食道癌治疗包括化学疗法、放射疗法、手术或其组合。在一些实施方案中,化学疗法包括卡铂、紫杉醇、顺铂、5-氟尿嘧啶、表柔比星、多西紫杉醇、卡培他滨(cepecitabine)、奥沙利铂及其组合。

[0029] 在一些实施方案中,所述方法还包括测量来自患者的生物样品中所述一种或多种miRNA的表达水平。在一些实施方案中,所述方法还包括将来自患者的生物样品中所述一种或多种miRNA的表达水平与对照生物样品中所述一种或多种miRNA的表达水平进行比较。

[0030] 在一些实施方案中,患者患有或被确定为患有I、IA、IB、II、IIA、IIB、III、IIIA、IIIB、IIIC或IV期食道癌。在一些实施方案中,患者患有或被确定为患有早期EC或I期EC,如ESCC,或所述方法用于诊断早期EC或I期EC,如ESCC。在一些实施方案中,来自患者的生物样品是来自原发性肿瘤样品。在一些实施方案中,食道癌包括T1、T2、T3或T4类食道癌。在一些实施方案中,食道癌包括N0、N1、N2或N3类食道癌。在一些实施方案中,食道癌包括M0或M1类食道癌。在一些实施方案中,食道癌包括淋巴结转移。在一些实施方案中,食道癌包含远处转移。在一些实施方案中,远处转移是肺、肝和/或骨转移。在一些实施方案中,食道癌包括本文所述的EC的一个或多个方面。在一些实施方案中,所述方法用于区分本文所述的EC的一个或多个分期或类型。

[0031] 在一些实施方案中,升高或降低的表达水平由临界值确定。在一些实施方案中,临界值通过ROC分析确定。

[0032] 在一些实施方案中,患者先前已经治疗过食道癌。

[0033] 在一些实施方案中,miRNA标志物用于区分EAC和ESCC或EAC和无EC或ESCC和无EC。在一些实施方案中,可以辨别EAC和ESCC或EAC和无EC的EAC特异性标志物包括mir-196a-1、mir-196b、mir-21、mir-181a-1、mir-196a-2、mir-335、mir-181b-1、mir-15b、mir-17和mir-106b中的一种或多种。在一些实施方案中,可以辨别ESCC和EAC或ESCC和无EC的ESCC特异性标志物包括mir-205、mir-944、mir-194-2、mir-192、mir-194-1、mir-23a、mir-215、mir-

27a、mir-338和/或mir-21中的一种或多种。

[0034] 公开内容的另外的方面涉及试剂盒,其包含用于检测选自以下的一种或多种miRNA的试剂:mir-15b、miR-17、mir-18a、mir-21、mir-23a、mir-24-2、mir-25、mir-27a、mir-93、mir-103、mir-106b、mir-129-2、mir-139、mir-146b、mir-148a、mir-151、miR-155、mir-181a-1、mir-181a、mir-181b-1、mir-181b、mir-182、mir-183、mir-192、mir-194-1、mir-194-2、mir-196a-1、mir-196a-2、mir-196b、mir-205、mir-215、mir-223、mir-224、mir-335、mir-338、mir-375、mir-421、mir-484、mir-505、mir-769、mir-944、mir-1468、mir-3648和let-7i。在一些实施方案中,所述试剂包括一种或多种用于从生物样品扩增miRNA的核酸探针。在一些实施方案中,所述试剂是被标记的。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含使用说明。

[0035] 在一些方面,公开内容涉及试剂盒,其包含用于检测EC差异表达的miRNA的试剂,其中所述差异表达的miRNA由mir-21、mir-93、mir-106b、mir-27a、miR-17和mir-181a组成。在一些方面,公开内容涉及试剂盒,其包含用于检测EC差异表达的miRNA的试剂,其中所述差异表达的miRNA由mir-205组成。在一些实施方案中,公开内容涉及试剂盒,其包含用于检测EC差异表达的miRNA的试剂,其中所述差异表达的miRNA由mir-196a-1组成。在一些实施方案中,公开内容涉及试剂盒,其包含用于检测EC差异表达的miRNA的试剂,其中所述差异表达的miRNA由mir-196b组成。在一些实施方案中,公开内容涉及试剂盒,其包含用于检测EC差异表达的miRNA的试剂,其中所述差异表达的miRNA由mir-21组成。在一些实施方案中,公开内容涉及试剂盒,其包含用于检测EC差异表达的miRNA的试剂,其中所述差异表达的miRNA由mir-103、mir-106b、mir-151、mir-17、mir-181a、mir-21、mir-25和mir-93组成。在一些实施方案中,公开内容涉及试剂盒,其包含用于检测EC差异表达的miRNA的试剂,其中所述差异表达的miRNA由let-7i、mir-103、mir-106b、mir-17、mir-151、mir-155、mir-181a、mir-181b、mir-182、mir-183、mir-18a、mir-21、mir-223、mir-23a、mir-25、mir-484、mir-505和mir-93组成。

[0036] 在一些实施方案中,所述试剂盒还包含一种或多种用于检测一种或多种对照的试剂。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含用于从生物样品分离核酸的试剂。在一些实施方案中,所述试剂用于从血清样品分离核酸。在一些实施方案中,所述试剂用于从本文所描述的样品分离核酸。

[0037] 术语受试者或患者可以指动物(例如哺乳动物),包括但不限于人、非人灵长动物、啮齿动物、狗或猪。本文提供的获得方法包括活组织检查的方法,如细针抽吸、核芯针活组织检查、真空辅助活组织检查、切口活组织检查、切除活组织检查、钻取活组织检查、刮取活组织检查或皮肤活组织检查。

[0038] 在某些实施方案中,样品获自食道、胃或其肌肉组织、粘膜或粘膜下层的活组织检查。在其它实施方案中,样品可以从本文提供的任何组织获得,包括但不限于胆囊、皮肤、心脏、肺、乳腺、胰腺、肝、肌肉、肾、平滑肌、膀胱、肠、脑、前列腺或甲状腺组织。

[0039] 供选择地,样品可包括但不限于血液、血清、汗液、毛囊、颊组织、眼泪、月经、尿液、粪便或唾液。在特定的实施方案中,样品可以是组织样品、全血样品、尿液样品、唾液样品、血清样品、血浆样品或粪便样品。

[0040] 在某些方面,样品获自囊液或来自肿瘤或赘生物的流体。在再其它的实施方案中,

囊肿、肿瘤或赘生物在消化系统中。在当前方法的某些方面,任何医学专业人员,如医生、护士或医疗技术人员可以获得用于测试的生物样品。在当前方法的另外方面,患者或受试者可以在没有医学专业人员的帮助下获得用于测试的生物样品,如获得全血样品、尿液样品、粪便样品、颊样品或唾液样品。

[0041] 在进一步的实施方案中,样品可以是新鲜的、冷冻的或保存的样品或细针抽吸物。在特定的实施方案中,样品是福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 样品。通过置于合适的培养基、赋形剂、溶液或容器中,可以将获得的样品置于短期或长期储存中。在某些情况下,储存可能需要将样品保持在冷藏或冷冻环境中。在储存于冷冻环境中之前可以快速冷冻样品。在某些情况下,冷冻样品可以与合适的冷冻保存介质或化合物接触。冷冻保存介质或化合物的实例包括但不限于:甘油、乙二醇、蔗糖或葡萄糖。

[0042] 一些实施方案还涉及从生物样品或在患者样品中分离核酸,如核糖核酸或RNA。其它步骤可以包括或不包括扩增样品中的核酸和/或将一种或多种探针与扩增的或非扩增的核酸杂交。该方法可以进一步包括分析样品中的核酸。在某些实施方案中,微阵列可用于测量或分析样品中miRNA的表达水平。该方法可以进一步包括将miRNA表达水平记录在有形介质中或将表达水平报告给患者、医疗保健付费者、医生、保险代理人或电子系统。

[0043] 加权系数或表达水平之间或之中或加权比较之间或之中的差异可以是至少或至多约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、14.0、14.5、15.0、15.5、16.0、16.5、17.0、17.5、18.0、18.5、19.0、19.5、20.0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、410、420、425、430、440、441、450、460、470、475、480、490、500、510、520、525、530、540、550、560、570、575、580、590、600、610、620、625、630、640、650、660、670、675、680、690、700、710、720、725、730、740、750、760、770、775、780、790、800、810、820、825、830、840、850、860、870、875、880、890、900、910、920、925、930、940、950、960、970、975、980、990、1000倍或倍数(或其中可得出的任何范围)。

[0044] 在一些实施方案中,通过基于生物标志物的表达值应用分类算法来进行诊断、预后或风险评分的计算确定,其差异表达p值为约或至多约0.005、0.006、0.007、0.008、0.009、0.01、0.011、0.012、0.013、0.014、0.015、0.016、0.017、0.018、0.019、0.020、0.021、0.022、0.023、0.024、0.025、0.026、0.027、0.028、0.029、0.03、0.031、0.032、0.033、0.034、0.035、0.036、0.037、0.038、0.039、0.040、0.041、0.042、0.043、0.044、0.045、0.046、0.047、0.048、0.049、0.050、0.051、0.052、0.053、0.054、0.055、0.056、0.057、0.058、0.059、0.060、0.061、0.062、0.063、0.064、0.065、0.066、0.067、0.068、0.069、0.070、0.071、0.072、0.073、0.074、0.075、0.076、0.077、0.078、0.079、0.080、0.081、0.082、

0.083、0.084、0.085、0.086、0.087、0.088、0.089、0.090、0.091、0.092、0.093、0.094、0.095、0.096、0.097、0.098、0.099、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9或更高,或约其间(或其中可得出的任何范围)。在某些实施方案中,使用一种或多种统计学上显著差异表达的生物标志物(单独或作为差异对)计算预后评分。

[0045] 本文描述的任何方法可以在包括计算机可读代码的有形计算机可读介质上实现,在由计算机执行时,该计算机可读代码使计算机执行一项或多项操作。在一些实施方案中,存在包含计算机可读代码的有形计算机可读介质,在由计算机执行时,所述计算机可读代码使计算机执行操作,所述操作包括:a)接收与来自患者的样品中编码miRNA的基因的表达水平相对应的信息;和b)使用对应于样品中表达水平的信息与基因的对照或参考表达水平相比较,确定表达水平的差异值。

[0046] 在其它方面,有形计算机可读介质还包括计算机可读代码,当由计算机执行时,该计算机可读代码使计算机进行一项或多项另外的操作,包括进行包含以下的推荐:其中步骤a)中的患者在首次食道癌治疗之中或之后,如果患者的表达水平没有增加,则给予与患者的首次治疗相同的治疗;如果患者的表达水平增加,则给予与患者的首次治疗不同的治疗。

[0047] 在一些实施方案中,接收信息包括从有形数据存储设备接收对应于来自有形存储设备的表达水平的信息。在另外的实施方案中,介质还包括计算机可读代码,当由计算机执行时,该计算机可读代码使计算机进行一项或多项另外的操作,包括:将对应于差值的信息发送到有形数据存储设备,计算患者的预后分数,如果患者没有表达水平,则用传统的食道治疗治疗患者,和/或如果患者的表达水平增加,则用供选择的食道治疗治疗患者。

[0048] 有形计算机可读介质还包括计算机可读代码,当由计算机执行时,该计算机可读代码使计算机进行一项或多项另外的操作,包括计算患者的预后分数。所述操作可以还包括进行推荐,所述推荐包括:向被确定为表达水平降低的患者给予治疗。

[0049] 如本说明书中所使用的,“一(a)”或“一(an)”可意指一个或多个。如本文在权利要求(多项权利要求)中所使用的,当与单词“包含(comprising)”结合使用时,词语“一(a)”或“一(an)”可意指一个或多个。

[0050] 权利要求中使用术语“或”用于意指“和/或”,除非明确指出仅指代供选择的方案或供选择的方案是相互排斥的,尽管公开内容支持仅指代替代方案和“和/或”的定义。如本文所使用的,“另一个”可以意指至少第二个或更多个。

[0051] 如在本说明书和权利要求(多项权利要求)中所使用的,词语“包含(comprising)”(和其任何形式,如“包含(comprise)”和“包含(comprises)”、“具有(having)”(和其任何形式,如“具有(have)”和“具有(has)”、“包括(including)”(和其任何形式,如“包括(includes)”和“包括(include)”或“含有(containing)”(和其任何形式,如“含有(contains)”和“含有(contain)”)是包括性或开放式的,并且不排除其它未列举的要素或方法步骤。以上描述为包含所述权利要求要素的方法和试剂盒还可包括其中所述方法由所述权利要求要素组成或基本上由所述权利要求要素组成的实施方案。

[0052] 如本文所使用的关于组合物的术语“基本上由.....组成”旨在意指组合物中的活性成分仅由权利要求中列出的活性成分组成。因此,例如,基本上由顺铂和5-氟尿嘧啶组成的组合物将排除任何其它活性成分,但可包括任何其它药物赋形剂或载体。

[0053] 在整个本申请中,术语“约”用于指示数值包括装置的误差、用于确定所述值的方法的固有变化,或存在于研究对象之间的变化。

[0054] 根据以下详细描述,本发明的其它目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应该理解的是,详细描述和具体实施例虽然表明了本发明的优选实施方案,但是其仅以说明的方式给出,因为根据该详细描述在本发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员将变得显而易见。

附图说明

[0055] 以下附图构成本说明书的部分并被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一幅或多幅,结合本文呈现的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解本发明。

[0056] 图1A-B:食道癌症miRNA微阵列分析。A中显示食道癌的发现阶段的流程图。选择了12种候选miRNA。B中显示候选miRNA以AUC(曲线下面积)次序的排序。

[0057] 图2:发现阶段-食道癌的最佳miRNA。显示排序前五位的miRNA的正常与癌症情况下的ROC曲线分析和表达水平。miR-21、miR-93、miR-27a、miR-24-2和miR-17在癌症中显著升高。

[0058] 图3A-B:通过逻辑回归模型得到的食道癌症(EC)miRNA组合。A中显示以AUC次序排序前五位miRNA的miRNA组合的排序。B中显示关于排序前四位的miRNA的组合的ROC曲线分析。

[0059] 图4:ESCC组织群组1.候选的前5位miRNA(mir-21、93、27a、24-2、17)的水平在癌症中显著升高。

[0060] 图5A-B:通过逻辑回归模型得到的ESCC组织群组1-miRNA组合。A中显示miRNA组合以AUC次序的排序。B中显示最佳组合miRNA的ROC曲线分析。5种组合miRNA展示出100%的灵敏度和100%的特异性。

[0061] 图6A-B:血清阶段-ESCC血清。A中显示的数据表明,在癌症中血清miR-21、93的水平显著升高。血清miR-21、93的AUC值分别为0.871和0.925。B中显示通过逻辑回归模型得到的血清miR-21+93组合的AUC值(0.927)。

[0062] 图7A-C:发现阶段-ESCC与EAC的对比。A中显示ESCC特异性标志物的排序。miR205是具有用于区分ESCC和EAC的最高灵敏度和特异性的标志物。miR-205的AUC值为0.998。B中显示EAC特异性标志物的排序。C中显示miR-205在ESCC与EAC中的表达水平和ROC曲线分析的对比。

[0063] 图8A-B:验证阶段-ESCC与EAC通过群组1组织miR-205的对比。A中显示的数据说明miR-205的水平在EACC中显著升高。B中显示的数据说明用于区分ESCC和EAC的miR-205的AUC值为0.974。

[0064] 图9:血清验证1:亚洲群组(名古屋)。图9显示在来自亚洲群组的样品的血清中所示miRNA标志物和组合的特异性和灵敏度。

[0065] 图10:血清验证2:西方群组(意大利)。图10显示来自西方群组的样品的血清中所示miRNA标志物和组合的特异性和灵敏度。

[0066] 图11:血清验证3:非洲群组(南非)。图11显示来自非洲群组的样品的血清中所示

miRNA标志物和组合的特异性和灵敏度。

[0067] 图12:血清:总计(西方+亚洲+非洲群组)。图12显示当汇集来自三个群组的数据时血清中所示miRNA标志物和组合的特异性和灵敏度。

[0068] 图13A-B:用于鉴定组织中ESCC相关的miRNA候选物的计算机发现。A) 通过使用三种miRNA表达数据集(TCGA、GSE55856、GSE43732)用于鉴定ESCC组织中上调的miRNA的计算机miRNA候选物选择。18个miRNA在三个数据集之间重叠。B) 用于三个miRNA表达数据集的18个候选miRNA的热图。对于三个数据集,18个miRNA的组合组使用重复的2倍交叉验证,重复100次,能够准确地将癌组织与正常组织区分(分别为AUC=0.98、0.99、0.98)。

[0069] 图14:血清测试群组中候选miRNA的选择。对于血清测试群组,8种候选miRNA在ESCC血清中显著上调。

[0070] 图15A-D:8-miRNA特征模型的建立、验证和诊断性能评价。A) 通过8-miRNA特征模型在训练群组中区分ESCC血清与健康对照的ROC曲线和瀑布图。B) 通过8-miRNA特征模型在验证群组1中区分ESCC血清与健康对照的ROC曲线和瀑布图。C) 通过8-miRNA特征模型在验证群组2中区分ESCC血清与健康对照的ROC曲线和瀑布图。D) 8-miRNA特征模型的诊断性能评价。它可以区分ESCC患者的所有分期(I-IV期, n=123)和健康对照(n=42),并且其优于SCC-Ag(分别为AUC=0.89、0.71),并且它可以区分I期ESCC患者(n=20)和健康对照(n=42),并且其优于SCC-Ag(分别为AUC=0.81、0.63)。

[0071] 图16:用于鉴定用于ESCC检测的循环miRNA组的研究设计。

[0072] 图17:初始miRNA候选物的组织验证。通过针对32个ESCC和32个匹配的相邻正常组织的qRT-PCR,与邻近正常组织相比,所有18个计算机miRNA候选物在ESCC组织样品中显著上调。

具体实施方式

[0073] 本发明的某些方面提供了能够帮助医师从几种供选择的治疗选项为患者选择最佳治疗的测试。癌症治疗中的主要临床挑战是鉴别在转移和辅助情况下将从治疗方案受益的患者的子集。在过去十年中,抗癌药物和多药物组合的数量已经大幅增加,然而,治疗仍然使用试错方法根据经验应用。在此提供方法和组合物以诊断患者来确定用于癌症患者的最佳治疗选项。

[0074] I. 定义

[0075] 术语“基本上相同或非显著地不同”是指表达水平相比与其进行对比的没有显著差异。供选择地或共同地,术语“基本上相同”是指表达水平相比与其进行对比的表达水平的差异小于2、1.5或1.25倍,或表达中的差异小于20、15、10或5%。

[0076] “受试者”或“患者”意指需要治疗的任何单个受试者,包括人、牛、狗、豚鼠、兔、鸡等。还要包括以下作为受试者:参与临床研究试验未显示任何疾病的临床症状的任何受试者,或参与流行病学研究的受试者,或用作对照的受试者。

[0077] 如本文所使用的,术语“引物”意在包括在模板依赖性过程中能够引发新生核酸合成的任何核酸。典型地,引物是长度为10至20和/或30个碱基对的寡核苷酸,但可以使用更长的序列。引物可以以双链和/或单链形式提供,但优选单链形式。

[0078] 如本文所使用的,“增加的表达”或“升高的表达”或“降低的表达”是指与代表相同

生物标志物或与不同生物标志物的参考水平相比,受试者的样品中生物标志物的表达水平。在某些方面,参考水平可以是来自相同受试者的非癌组织的参考表达水平。供选择地,参考水平可以是来自不同受试者或受试者组的参考表达水平。例如,参考表达水平可以是来自没患癌症的受试者或受试者组的样品(例如,组织、流体或细胞样品)获得的表达水平,或从患有癌症的受试者或受试者组的非癌组织获得的表达水平。参考水平可以是单个值或可以是值的范围。可以使用本领域普通技术人员已知的任何方法确定参考表达水平。在一些实施方案中,参考水平是由患有癌症或没患癌症的受试者群组确定的平均表达水平。参考水平也可以图形化地描绘为图上的区域。在某些实施方案中,参考水平是归一化水平,而在其它实施方案中,它可以是相对于被测试组织或生物样品不稳定的水平。

[0079] “约”和“近似”通常应意指给定测量的性质或精度下测量的量的可接受的误差程度。通常,误差的示例性程度在给定值或值范围的百分之(%)20内,优选在10%内,更优选在5%内。供选择地和特别地,在生物系统中,术语“约”和“近似”可以意指在给定值的数量级内,优选在5倍内,更优选在2倍内的值。在一些实施方案中,考虑本文讨论的数值可与术语“约”或“近似”一起使用。

[0080] II. MiRNA

[0081] 某些方面部分地基于食道癌的miRNA(多个miRNA)生物标志物的系统性发现和验证。在某些实施方案中,可以在方法和组合物中使用微小RNA(缩写为miRNA)用于确定预后、用于诊断受试者、用于确定特定患者对特定癌症治疗的反应以及用于治疗患有食道癌的个体。

[0082] miRNA可以是其生物活性形式的、天然存在的、小的非编码RNA,长度为约17至约25个核苷酸碱基(nt)。miRNA通过抑制靶mRNA翻译在转录后调节基因表达。认为miRNA起负调节剂的作用,即更大量的特异性miRNA将与较低水平的靶基因表达相关。

[0083] 体内可能存在三种形式的miRNA,初级miRNA(pri-miRNA),前体miRNA(pre-miRNA)和成熟miRNA。初级miRNA(pri-miRNA)表达为约数百碱基至超过1kb的茎-环结构转录物。pri-miRNA转录物在细胞核中被称为Drosha的RNase II核酸内切酶切割,该核酸内切酶切割茎环底部附近的茎的两条链。Drosha通过交错切割来切割RNA双链体,在3'端留下5'磷酸和2nt突出端。

[0084] 裂解产物,前体miRNA(pre-miRNA)可以为约60至约110nt长,具有以折回方式形成的发夹结构。通过Ran-GTP和Exportin-5将pre-miRNA从细胞核转运至细胞质。在细胞质中通过称为Dicer的另一种RNase II核酸内切酶进一步处理pre-miRNA。Dicer识别5'磷酸和3'突出端,并在茎-环连接处切掉环以形成miRNA双链体。miRNA双链体结合到RNA诱导的沉默复合物(RISC),其中反义链优先被降解,正义链成熟miRNA将RISC引导至其靶位点。成熟miRNA就是miRNA的生物活性形式,长度为约17至约25nt。

[0085] 微小RNA通过与其靶基因信息(mRNA)中的特定序列进行碱基配对(完美或不完美的)而起作用。miRNA降解或抑制mRNA的翻译,导致靶基因的表达在转录后被下调、抑制或沉默。在动物中,miRNA不必与其靶位点具有完美的同源性,并且部分同源性导致翻译抑制,而在植物中,miRNA倾向于显示与靶位点的完全同源性,信息(mRNA)的降解占优势。

[0086] 微小RNA广泛分布于基因组中,主导基因调控并积极参与许多生理和病理过程。例如,发现某些miRNA的调节模式控制细胞增殖、分化和凋亡;并且异常miRNA谱与肿瘤发生相

关。另外,表明病毒感染引起靶向以沉默“促细胞存活”基因的miRNA的增加,以及抑制与凋亡(程序性细胞死亡)相关的基因的miRNA的减少,从而使平衡倾向于获得凋亡信号传导。

[0087] 在本发明的其它实施方案中,存在作为miRNA抑制剂或拮抗剂的合成核酸。在一些实施方案中,miRNA抑制剂或拮抗剂是antagomir。miRNA抑制剂的长度为约17至25个核苷酸,并且包含与成熟miRNA的5'至3'序列至少90%互补的5'至3'序列。在某些实施方案中,miRNA抑制剂分子的长度为17、18、19、20、21、22、23、24或25个核苷酸,或其中可得出的任何范围。此外,miRNA抑制剂具有与成熟miRNA,特别是成熟的天然存在的miRNA序列的5'至3'序列90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9或100%互补或至少90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、99.1、99.2、99.3、99.4、99.5、99.6、99.7、99.8、99.9或100%(或其中可得出的任何范围)互补的序列(从5'到3')。本领域技术人员可以使用与成熟miRNA的序列互补的探针序列的部分作为miRNA抑制剂的序列。此外,可以改变探针序列的那部分,使其与成熟miRNA的序列仍然为90%互补。

[0088] 在某些实施方案中,合成miRNA具有一个或多个经修饰的核酸残基。在某些实施方案中,糖修饰是2' O-Me修饰、2' F修饰、2' H修饰、2' 氨基修饰、4' 核糖修饰或在连接到6位碳的羧基上的硫代磷酸酯修饰。在进一步的实施方案中,在互补区的最前或最后的2到4个残基或互补区的最前或最后的4到6个残基中有一个或多个糖修饰。

[0089] 此外,miRNA的核酸结构也可以被修饰成锁核酸(LNA),其具有在2'氧和4'碳之间的亚甲基桥,以将核酸锁定为核酸的A-型构象中的3'-内(北)构象中(Lennox等,2011;Bader,等2011)。该修饰显著增加了分子的靶特异性和杂交性质。

[0090] miRNA区域和互补区域可以在相同或不同的多核苷酸上。在其中它们被包含在相同的多核苷酸之上或之中的情况下,miRNA分子将被认为是单个多核苷酸。在其中不同区域在分开的多核苷酸上的实施方案中,合成的miRNA将被认为由两个多核苷酸组成。

[0091] 当RNA分子是单个多核苷酸时,在miRNA区域和互补区域之间存在接头区域。在一些实施方案中,由于miRNA区域和互补区域之间的结合,单个多核苷酸能够形成发夹环结构。接头构成发夹环。考虑在一些实施方案中,接头区域的长度为、为至少或为至多2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39或40个残基,或其中可得出的任何范围。在某些实施方案中,接头长度为3至30个残基(包括端值)。

[0092] 除了具有miRNA区域和互补区域之外,在该区域的5'或3'端也可能存在侧翼序列。在一些实施方案中,在这些区域的一侧或两侧的侧翼存在或者存在至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个核苷酸,或其中可得出的任何范围。

[0093] 负向操纵致癌miRNA的其它基于miRNA的疗法可包括、进一步包括miRNA海绵、miRNA掩模或锁核酸(LNA)。如本文所使用的,术语“miRNA海绵”是指含有针对感兴趣的miRNA的多个串联结合位点并且用于滴定感兴趣的内源性miRNA,从而抑制感兴趣的miRNA与其内源性靶点的结合的合成核酸(例如mRNA转录物)。

[0094] 在某些方面的方法包括减少、消除或抑制细胞中一种或多种miRNA的活性和/或表达,包括向细胞中引入miRNA抑制剂、拮抗剂或antagomir;或提供或增强细胞中一种或多种miRNA的活性。某些实施方案还涉及通过向细胞提供特定的核酸,如特定的合成miRNA分子或合成的miRNA抑制剂分子来诱导某些细胞特征。然而,在本发明的方法中,miRNA分子或

miRNA抑制剂不必须是合成的。它们可能具有与天然存在的miRNA相同的序列,或者它们可能没有任何设计修饰。在某些实施方案中,miRNA分子和/或miRNA抑制剂是合成的,如上所述。

[0095] III. 食道癌的分期和治疗

[0096] 可以提供用于治疗食道癌的方法和组合物,其具有miRNA表达水平的特定应用。基于miRNA表达水平谱,可以针对不同的癌症患者开具或推荐不同的治疗。

[0097] 食道癌,也称为食道癌症,始于排列在食道的细胞。具体地,食道的癌症始于食道壁的内层中并向外生长。如果它通过食道壁扩散,它可以扩散到淋巴结,以及胸部和其它附近器官中的血管,淋巴结是帮助对抗感染的微小豆形器官。食道癌还可以扩散到肺、肝、胃和身体的其它部位。

[0098] 食道癌有两种主要类型,食道鳞状细胞癌(ESCC),它始于排列在食道的鳞状细胞,并且通常在食道上部和中部发展,以及食道腺癌(EAC)。这种类型始于食道下部的腺体组织,食道和胃在此汇合。

[0099] A. 癌症分期

[0100] 本文描述的食道癌可以是以下任何分期的食道癌。

[0101] 1. TNM分期系统

[0102] 医生用来描述分期的一种工具是TNM系统。肿瘤(T):原发性肿瘤已经生长到食道壁和周围组织内有多深?节点(N):肿瘤是否已经扩散到淋巴结?如果是这样,在哪里和有多少?转移(M):癌症是否已经转移到身体的其它部位?如果是这样,在哪里和有多少?有5个期:0期(零)和I到IV(一到四)期。以下提供有关TNM分期系统的更多信息:

[0103] 使用TNM系统,“T”加上字母或数字(0到4)用于描述肿瘤,包括癌症是否已经生长进入食道壁或附近组织中,如果是这样,多深。一些分期也被分成更小的组,这有助于甚至更详细地描述肿瘤。具体的肿瘤分期信息如下所列。

[0104] **TX:** 原发性肿瘤无法评价。

T0: 食道中没有癌症。

Tis: 这称为原位癌(癌症)。原位癌是非常早期的癌症。癌细胞仅位于食道顶部内层的一个小区域内,没有任何扩散到内层中。

T1: 在被称为粘膜下层的食道的固有层和两个内层中有肿瘤。癌细胞已扩散到食道内层中。

[0105] **T2:** 肿瘤位于被称为固有肌层的食道的第三层。癌细胞已扩散到食道的肌肉壁中,但没有通过食道的肌肉壁。

T3: 肿瘤位于被称为外膜的食道外层,癌细胞已经扩散通过食道的整个肌肉壁进入到周围组织中。

T4: 肿瘤已扩散到食道外,进入其周围区域。癌细胞已扩散到食道周围的结构中,包括来自心脏的被称为主动脉的大血管、气管、膈肌和肺的胸膜内层。

[0106] TNM分期系统中的“N”代表淋巴结。在食道癌中,食道附近和胸部里的淋巴结被称

为区域淋巴结。身体其它部位中的淋巴结被称为远端淋巴结。

[0107]	NX:淋巴结无法评价。
	N0:在任何淋巴结中均未发现癌症。
	N1:癌症已经扩散到肿瘤附近胸部里的1或2个淋巴结。
	N2:癌症已经扩散到肿瘤附近胸部里的3到6个淋巴结。
	N3:癌症已经扩散到肿瘤附近胸部里的7个或更多个淋巴结。

[0108] TNM系统中的“M”表示癌症是否已扩散到身体的其它部位。

[0109]	MX:转移无法评价。
	M0:癌症尚未扩散到身体的其它部位。
	M1:癌症已经扩散到身体的另一部位。

[0110] 2. 等级 (G)

[0111] 食道癌也可以通过其等级 (G) 来描述,其描述了在显微镜下观察时癌细胞看起来像健康细胞的程度。医生将癌组织与健康组织比较。健康组织通常包含许多不同类型的聚集在一起的细胞。如果癌症看起来与健康组织相似并且包含不同的细胞分组,则称其为分化的或低等级肿瘤。如果癌组织看起来与健康组织非常不同,则称其为低分化的或高等级肿瘤。癌症的等级可以帮助医生预测癌症将扩散的速度。一般来说,肿瘤的等级越低,预后越好。

[0112]	G1: 组织看起来更像健康的细胞	称为良好分化的。
	G2: 细胞与健康细胞有些不同	称为有些分化的。
[0113]	G3: 肿瘤细胞看起来几乎不像健康的细胞	称为低分化的。
	G4: 癌细胞看起来几乎相似, 并且看起来不像健康的细胞	称为无分化的。

[0114] 3. 癌症分期分组

[0115] 医生通过组合T、N和M分类来指定癌症的分期。对于两种最常见类型的食道癌:鳞状细胞癌和腺癌,存在不同的分期系统。用于每个的分期系统如下所述。

[0116] a. 食道鳞状细胞癌的分期

[0117] 对于鳞状细胞癌,除了TNM分类之外,可以基于肿瘤是位于食管的上段,中段还是下段以及肿瘤细胞的等级 (G) 来细分分期。

	0 期	这与 Tis 癌症相同, 其中仅在食道的顶部内层中发现癌症 (Tis、N0、M0、G1)。
	IA 期	这与 T1 癌症相同, 其中癌症仅位于食道的 2 个内层中 (T1、N0、M0、G1)。
[0118]	IB 期	<p>这些情况中的任一种:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 癌症仅位于食道的 2 个内层中, 但肿瘤细胞为较低分化的 (T1、N0、M0、G2 或 G3)。 • 肿瘤位于食道下部, 并且癌症已经扩散到食道的 2 个外层中的任一个, 但没扩散到淋巴结或身体的其它部位 (T2 或 T3、N0、M0、G1)。
	IIA 期	<p>这些情况中的任一种:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 肿瘤位于食道的上部或中部, 并且癌症位于食道的 2 个外层中的任一个 (T2 或 T3、N0、M0、G1)。 • 肿瘤位于食道下部, 并且癌症位于食道的 2 个外层中的任一个。肿瘤细胞为较低分化的 (T2 或 T3、N0、M0、G2 或 G3)。
	IIB 期	<p>这些情况中的任一种:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 肿瘤位于食道的上部或中部, 并且癌症位于食道的 2 个外层中的任一个。肿瘤细胞为较低分化的 (T2 或 T3、N0、M0、G2 或 G3)。 • 癌症位于食道内层, 并已经扩散到肿瘤附近的 1 或 2 个淋巴结 (T1 或 T2、N1、M0、任何 G)。
	IIIA 期	<p>这些条件中的任一个:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 癌症位于食道内层, 并已经扩散到肿瘤附近的 3 或 6 个淋巴结 (T1 或 T2、N2、M0、任何 G)。 • 癌症位于食道外层, 并已经扩散到 1 或 2 个淋巴结 (T3、N1、M0、
		<p>任何 G)。</p> <ul style="list-style-type: none"> • 癌症已扩散到食道以外至附近组织, 但未扩散到淋巴结或身体的其它区域 (T4a、N0、M0、任何 G)。
	IIIB 期	癌症位于食道的外层和 3 至 6 个淋巴结中 (T3、N2、M0、任何 G)。
[0119]	IIIC 期	<p>这些条件中的任一个:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 癌症已经扩散到食道以外进入附近组织。癌症也存在于 6 个或更少的淋巴结中 (T4a、N1 或 N2、M0、任何 G)。 • 癌症已经扩散到食道以外进入附近组织, 并且不能通过手术去除 (T4b、任何 N、M0、任何 G)。 • 癌症已经扩散到 7 个或更多个淋巴结, 但未扩散到身体的远端部分 (任何 T、N3、M0、任何 G)。
	IV 期	癌症已经扩散到身体的另一部分 (任何 T、任何 N、M1、任何 G)。

[0120] b. 食道腺癌的分期对于腺癌, 医生使用 T、N 和 M 分类, 以及等级 (G)。

	<p>0 期 这与 Tis 癌症相同, 其中仅在食道的顶部内层中发现癌症 (Tis、N0、M0、G1)。</p>
	<p>IA 期 这与 T1 癌症相同, 其中癌症仅位于食道的 2 个内层中的任一个 (T1、N0、M0、G1 或 G2)。</p>
[0121]	<p>IB 期 这些情况中的任一种:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 癌症仅位于食道的 2 个内层中的任一个, 并且肿瘤细胞为低分化的 (T1、N0、M0、G3)。 • 癌症已经扩散到食道的外层, 但没扩散到淋巴结或身体的其它部分 (T2、N0、M0、G1 或 G2)。
	<p>IIA 期 癌症位于食道的外层, 并且肿瘤细胞为低分化的 (T2、N0、M0、G3)。</p>
	<p>IIB 期 这些情况的任一种:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 肿瘤位于食道的外层中, 但没有超出 (T3、N0、M0、任何 G)。 • 癌症位于食道的内层或固有肌层中, 并已经扩散到 1 或 2 个淋巴结 (T1 或 T2、N1、M0、任何 G)。
	<p>IIIA 期 这些条件中的任一种:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 癌症位于食道内层中, 并已经扩散到肿瘤附近的 3 或 6 个淋巴结 (T1 或 T2、N2、M0、任何 G)。 • 癌症位于食道外层中, 并已经扩散到 1 或 2 个淋巴结 (T3、N1、M0、任何 G)。
	<ul style="list-style-type: none"> • 癌症已扩散到食道以外至附近组织, 但未扩散到淋巴结或身体的其它区域 (T4a、N0、M0、任何 G)。
	<p>IIIB 期 癌症位于食道的外层和 3 至 6 个淋巴结中 (T3、N2、M0、任何 G)。</p>
[0122]	<p>IIIC 期 这些条件中的任一种:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 癌症已经扩散到食道以外进入附近组织。癌症也存在于 6 个或更少的淋巴结中 (T4a、N1 或 N2、M0、任何 G)。 • 癌症已经扩散到食道以外进入附近组织, 并且不能通过手术去除 (T4b、任何 N、M0、任何 G)。 • 癌症已经扩散到 7 个或更多淋巴结, 但未扩散到身体的远端部分 (任何 T、N3、M0、任何 G)。
	<p>IV 期 癌症已经扩散到身体的另一部分 (任何 T、任何 N、M1、任何 G)。</p>

[0123] 复发癌症是治疗后已经恢复的癌症。它可能回到食道中或身体的另一部分中。如果癌症确实恢复, 将会有另一轮测试来了解复发的程度。这些测试和扫描通常与原始诊断时进行的类似。

[0124] B. 治疗

[0125] 以下治疗步骤/活性成分用于本文所述的方法。还考虑在本文描述的实施方案中可以特意地排除以下治疗的步骤/治疗剂。对于患有尚未扩散到食道以外和淋巴结的肿瘤的人, 通常建议组合不同类型的治疗: 放射治疗、化学治疗和手术。治疗顺序有变化, 并且考

虑包括食道癌的类型在内的几种因素。

[0126] 特别是对于鳞状细胞癌,通常推荐使用被称为放化疗的化学治疗和放射治疗的组合作为首次治疗,随后根据放化疗作用的效果进行手术。最近的研究表明,手术前使用放化疗比单独手术更好。

[0127] 对于腺癌,在美国最常见的治疗是化学治疗和放射治疗,然后进行手术。除非存在增加手术风险的因素,如患者的年龄或整体健康状况,否则几乎总是建议在放化疗后进行手术。

[0128] 对于晚期食道癌,治疗通常涉及化学治疗和放射治疗。

[0129] 癌症及其治疗经常引起副作用。除了缓解、停止或消除癌症的治疗外,癌症护理的重要部分是缓解人的症状和副作用。这种方法被称为姑息治疗或支持治疗,并且它包括在其身体、情感和社会需求方面支持患者。

[0130] 姑息治疗是关注减轻症状、改善生活质量和支持患者及其家人的任何治疗。任何人,无论年龄或癌症的类型和阶段,都可以接受姑息治疗。在癌症治疗过程中根据需要尽早开始姑息治疗时,它最有效。人们经常同时接受癌症治疗和缓解副作用的治疗。事实上,接受这两者的患者通常症状较不严重,生活质量较好,并且报告说他们对治疗更满意。

[0131] 姑息治疗差异很大,通常包括药物治疗、营养改变、放松技巧、情感支持和其它治疗。姑息治疗还可包括与为了消除癌症的治疗相似的治疗,如化学治疗、手术或放射治疗。

[0132] 1. 手术

[0133] 手术是在操作过程中去除肿瘤和一些周围的健康组织。外科肿瘤医生是专门用手术治疗癌症的医生。手术已经是传统的最常见的食道癌治疗。然而,当前手术仅用作患有早期食道癌的患者的主要治疗。

[0134] 对于患有局部的晚期食道癌的患者,可在手术前使用化学治疗和放射治疗的组合(见下文)来缩小肿瘤。对于无法进行手术的人,最好的治疗选项通常是化学治疗和放射治疗的组合。

[0135] 治疗食道癌的最常见的手术称为食道切除术,其中医生除去食道受影响的部分,然后将食道剩余的健康部分连接到胃,以便患者可以正常吞咽。胃或肠的一部分有时可以用来进行连接。外科医生还去除了食道周围的淋巴结。

[0136] 除了手术治疗疾病外,手术还可用于帮助患者进食和缓解由癌症引起的症状。这被称为姑息性手术。为此,外科医生和胃肠科医生可以:

[0137] 1.) 进行经皮胃造口术或空肠造口术,也称为饲管,使得人可以直接将营养物接受到胃或肠道中。这可以在给予化学治疗和放射治疗之前进行,以确保患者在治疗期间可以吃足够的食物以维持他或她的体重和力量;或

[0138] 2.) 如果肿瘤阻塞食道但不能通过手术去除,则创建旁路或新的通路至胃;该步骤很少使用。

[0139] 在进食和饮水方面有困难的人可能需要在手术前后静脉注射(IV;进入静脉)营养和流体数天,以及抗生素,抗生素用于预防或治疗感染。患者学习特殊的咳嗽和呼吸练习,以保持其肺部清洁。

[0140] 2. 内窥镜治疗

[0141] 以下治疗使用内窥镜(见诊断)来治疗食道癌并控制由肿瘤引起的副作用。内窥镜

和扩张是扩张食管的过程。如果肿瘤生长,其可能不得不重复。采用支架放置的内窥镜方法是使用内窥镜将支架插入食道中的过程。食道支架是一种金属网状装置,其扩张以保持食道张开。

[0142] 光动力治疗是姑息治疗或支持治疗的选项,用于使吞咽更容易,特别是用于不能或不选择进行手术、放射治疗或化学治疗的人。在光动力治疗中,光敏物质被注入肿瘤中并且在癌细胞中比在健康细胞中停留更长时间。然后光对准肿瘤,破坏癌细胞。虽然光动力治疗可以在短时间内缓解吞咽问题,但它不治愈食道癌。

[0143] 电凝术是一类姑息治疗,其通过用电流加热癌细胞来帮助杀死它们。这有时用于通过消除由肿瘤引起的阻塞来帮助缓解症状。

[0144] 冷冻治疗是一类姑息治疗,其使用附带探针的内窥镜,可以冻结和移除肿瘤组织。它可用于减小肿瘤的大小,以帮助患者更好地吞咽。

[0145] 3. 放射治疗

[0146] 放射治疗是高能X射线或其它粒子破坏癌细胞的应用。放射治疗方案(计划)通常由在一段设定的时间内给予特定数量的治疗组成。最常见的放射治疗类型称为体外照射放射治疗,即由身体外的机器给予的放射治疗。当直接在体内给予放射治疗时,它被称为内部放射治疗或近距离放射治疗。对于食道癌,这涉及使用内窥镜将放射性线源暂时插入食道中。

[0147] 4. 化学治疗

[0148] 食道癌的化学治疗和放射治疗可以在术前、术后或独立于手术递送。当前用于治疗食道癌的大多数化学治疗包括烷化剂、抗代谢物、蒽环霉素和抗微管剂。鳞状细胞食道癌的化学治疗,通常与鳞状细胞癌一样,可以基于顺铂。

[0149] 在一些实施方案中,给予化学放射治疗,接着是手术。在一些实施方案中,使用新辅助治疗。在一些实施方案中,新辅助治疗包括放射治疗和采用铂化合物和DNA复制抑制剂的化学治疗的组合。在一些实施方案中,铂化合物选自顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、四硝酸三核铂(triplatin tetranitrate)、phenathriplatin、吡铂和沙铂。在一些实施方案中,铂化合物是顺铂。在一些实施方案中,DNA复制抑制剂是5-氟尿嘧啶。

[0150] 在一些实施方案中,化学治疗包括卡铂、紫杉醇、顺铂、5-氟尿嘧啶、表柔比星、多西紫杉醇、卡培他滨(cepecitabine)、奥沙利铂及其组合。在一些实施方案中,组合治疗包括卡铂和紫杉醇;顺铂和5-氟尿嘧啶;表柔比星、顺铂和5-氟尿嘧啶;多西紫杉醇、顺铂和5-氟尿嘧啶;顺铂和卡培他滨(cepacitabine);奥沙利铂和5-氟尿嘧啶以及奥沙利铂和卡培他滨。

[0151] 5. 靶向治疗

[0152] 靶向治疗是靶向癌症的特定基因、蛋白或有助于癌症生长和存活的组织环境的治疗。这种类型的治疗阻止癌细胞的生长和扩散,同时限制对健康细胞的损害。

[0153] 对于食道癌,靶向治疗曲妥珠单抗(赫赛汀)可与化学治疗一起用于患有转移性食道腺癌的患者。曲妥珠单抗靶向被称为人表皮生长受体2(HER2)的蛋白质。大约20%至30%的食道腺癌使得HER2过多。

[0154] 靶向治疗雷莫芦单抗(Cyramza)也是给予一线治疗,或者首次治疗不起效后的选项。它可以以本身给予或与紫杉醇(Taxol)一起给予,紫杉醇是一种化学治疗。

[0155] C. 监测

[0156] 在某些方面,如果确定患者处于复发的高风险或预后不良,则基于生物标记的方法可以以增加的频率与一种或多种其它的食道癌诊断或筛选测试组合。

[0157] 食道监测可以包含本领域已知的任何方法。特别地,监测包括获得样品并测试样品用于诊断。例如,监测可以包括食道的内窥镜检查 and/或活组织检查。其它监测测试包括成像测试、钡吞咽测试、CAT扫描(计算机断层扫描)、磁共振成像(MRI)扫描、正电子发射断层(PET)扫描、内窥镜检查如上消化道内窥镜检查、内窥镜超声检查、支气管镜检查、胸腔镜检查、腹腔镜检查或其组合。

[0158] 在另外的方面,监测诊断可以包括实验室测试如活组织检查样品的HER2测试、用于寻找贫血的全血细胞计数(CBC)血液测试、用于潜血的粪便样品检查和/或用于检查正常肾功能或肝功能的血液测试。

[0159] IV. ROC分析

[0160] 在统计学中,接收者操作特征(ROC)或ROC曲线是示出随着二元分类系统的辨别阈值变化的其性能的图形。通过在各种阈值设置下针对假阳性率绘制真阳性率来创建曲线。(在生物医学信息学中,真阳性率也称为灵敏度,或机器学习中的查全率。假阳性率也称为误警率,可以计算为1-特异性)。因此,ROC曲线是作为误警率的函数的灵敏度。通常,如果检测和虚警的概率分布是已知的,则可以通过相对x轴上的虚警概率的累积分布函数在y轴上绘制的检测概率的累积分布函数(从-无穷到+无穷的概率分布下的面积)来生成ROC曲线。

[0161] ROC分析提供了选择可能最优模型的工具,并独立于成本背景或类分布(并在指定成本背景或类分布之前)舍弃次优的模型。ROC分析以直接和自然的方式与制定诊断性决策的成本/效益分析相关。

[0162] ROC也被称为相对操作特征曲线,因为它是两个操作特征(TPR和FPR)随着标准的变化的比较。ROC分析曲线在本领域中是已知的,并且描述于Metz CE(1978) Basic principles of ROC analysis. Seminars in Nuclear Medicine 8:283-298; Youden WJ (1950) An index for rating diagnostic tests. Cancer 3:32-35; Zweig MH, Campbell G (1993) Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clinical Chemistry 39:561-577; 和 Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD (2000) Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Preventive Veterinary Medicine 45:23-41,它们的全部内容通过引用并入本文。

[0163] V. 样品制备

[0164] 在某些方面,方法涉及从受试者获得样品。本文提供的获得方法可以包括活组织检查的方法,如细针抽吸、核芯针活组织检查、真空辅助活组织检查、切口活组织检查、切除活组织检查、钻取活组织检测、刮取活组织检查或皮肤活组织检查。在某些实施方案中,通过前面提到的任何活组织检查方法从食道组织的活组织检查获得样品。在其它实施方案中,样品可以从本文提供的任何组织获得,包括但不限于非癌或癌组织和来自血清、胆囊、粘膜、皮肤、心脏、肺、乳腺、胰腺、血液、肝、肌肉、肾、平滑肌、膀胱、结肠、肠、脑、前列腺、食道或甲状腺组织的非癌或癌组织。供选择的,样品可以从任何其它来源获得,包括但不限于血液、汗液、毛囊、颊组织、泪液、月经、粪便或唾液。在当前方法的某些方面,任何医学专业

人员,如医生、护士或医疗技术人员可以获得用于测试的生物样品。此外,可以在没有医学专业人员的帮助下获得生物样品。

[0165] 样品可以包括但不限于组织、细胞或来自细胞或得自受试者细胞的生物材料。生物样品可以是细胞的异质群或同质群或组织。可以使用本领域已知的任何方法获得生物样品,其可以提供适合于本文所述分析方法的样品。样品可以通过非侵入性方法获得,包括但不限于:刮擦皮肤或子宫颈、擦拭面颊、唾液收集、尿液收集、粪便收集、月经收集、眼泪或精液。

[0166] 可以通过本领域已知的方法获得样品。在某些实施方案中,通过活组织检查获得样品。在其它实施方案中,通过擦拭、内窥镜检查、刮擦、静脉切开术或本领域已知的任何其它方法获得样品。在一些情况下,可以使用本方法的试剂盒的组件获得、储存或运输样品。在一些情况下,可以通过本文描述的方法获得多个样品,如多个食道样品用于诊断。在其它情况下,可以通过所述方法获得多个样品,如来自一种组织类型(例如食道)的一个或多个样品和来自另一种标本(例如血清)的一个或多个样品用于诊断。在一些情况下,可以相同或在不同的时间获得多个样品,例如来自一种组织类型(例如食道)的一个或多个样品和来自另一种标本(例如血清)的一个或多个样品。可以通过不同方法存储和/或分析在不同时间获得的样品。例如,可以通过常规染色方法或任何其它细胞学分析方法获得并分析样品。

[0167] 在一些实施方案中,生物样品可以由医师、护士或其它医学专业人员,如医疗技师、内分泌科医生、细胞学家、抽血者、放射科医生或肺科医生)获得。医学专业人员可以指定对样品进行的适当测试或分析。在某些方面,绘制分子谱的企业可以咨询何种分析或测试是最适宜指定的。在当前方法的其它方面,患者或受试者可以在没有医学专业人员的帮助下获得用于测试的生物样品,如获得全血样品、尿液样品、粪便样品、颊样品或唾液样品。

[0168] 在其它情况下,通过侵入性过程获得样品,包括但不限于:活组织检查、针抽吸、内窥镜检查或静脉切开术。针抽吸的方法还可包括细针抽吸、核芯针活组织检查、真空辅助活组织检查或大核芯活组织检查。在一些实施方案中,可以通过本文的方法获得多个样品以确保足够量的生物材料。

[0169] 用于获得生物样品的一般方法也是本领域已知的。如Ramzy, Ibrahim *Clinical Cytopathology and Aspiration Biopsy 2001*的出版物描述了活组织检查和细胞学方法的一般方法,该文献通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,样品是食道或疑似食道肿瘤或赘生物的细针抽吸物。在一些情况下,细针抽吸采样过程可以通过使用超声波、X射线或其它成像装置来引导。

[0170] 在本方法的一些实施方案中,绘制分子谱的企业可以直接从受试者、从医学专业人员,从第三方或从绘制分子谱的企业或第三方提供的试剂盒获得生物样品。在一些情况下,可以在受试者、医学专业人员或第三方获取并将生物样品发送至绘制分子谱的企业之后,通过绘制分子谱的企业获得生物样品。在一些情况下,绘制分子谱的企业可以提供合适的容器和赋形剂,用于将生物样品储存和运输到绘制分子谱的企业。

[0171] 在本文描述的方法的一些实施方案中,医学专业人员不需要参与最初的诊断或样品采集。供选择地,个体可以通过使用非处方(OTC)试剂盒获得样品。OTC试剂盒可包含用于如本文所述获得所述样品的机构、用于存储所述样品以用于检查的机构以及用于正确使用试剂盒的说明。在某些情况下,绘制分子谱的服务包含在购买该试剂盒的价格中。在其它情

况下,绘制分子谱的服务是分开计费的。适合绘制分子谱的企业使用的样品可以是含有待测个体的组织、细胞、核酸、基因、基因片段、表达产物、基因表达产物或基因表达产物片段的任何材料。提供了用于确定样品适合和/或充分的方法。

[0172] 在一些实施方案中,受试者可以委托给专科医生,如肿瘤科医生、外科医生或内分泌科医生。专家同样可以获得用于测试的生物样品或将个体委托到测试中心或实验室用以提交生物样品。在一些情况下,医学专业人员可以将受试者委托到测试中心或实验室用以提交生物样品。在其它情况下,受试者可以提供样品。在某些情况下,绘制分子谱的企业可以获得样品。

[0173] VI核酸分析

[0174] 所述方法的方面包括分析核酸以确定表达水平。可以使用阵列以检测两个样品之间的差异。具体考虑的应用包括鉴定来自正常样品的miRNA与来自非正常样品的miRNA之间、癌性病征和非癌病征之间或两种不同处理的样品之间的差异和/或对其定量。此外,可以在被认为易患特定疾病或病征的样品与被认为不易患该疾病或病征或对其有抗性的样品之间比较miRNA。不正常的样品是显示出疾病或病征的表型性状(多个表型性状)的样品或被认为是就该疾病或病征而言不正常的样品。可以将其与就该疾病或病征而言正常的细胞进行比较。表型性状包括疾病或病征的症状或对疾病或病征的易感性,其中的成分是或可能是或可能不是遗传的或由过度增殖或肿瘤细胞或多个过度增殖或肿瘤细胞引起的。

[0175] 阵列包含固体支持物,其中核酸探针附着于支持物。阵列通常包含多个不同的核酸探针,其在不同的已知位点偶联于基材的表面。这些阵列,也称为“微阵列”或俗称“芯片”,已在本领域中被普遍描述,例如,美国专利No.5,143,854、5,445,934、5,744,305、5,677,195、6,040,193、5,424,186和Fodor等1991),出于所有目的将其中每一篇通过引用整体并入。使用机械合成方法合成这些阵列的技术描述于,例如,美国专利No.5,384,261,其出于所有目的通过引用整体并入本文。尽管在某些方面使用平面阵列表面,但是阵列可以在几乎任何形状或甚至多种表面上制造。阵列可以是在珠、凝胶、聚合物表面、纤维如光纤、玻璃或任何其它合适的基材上的核酸,参见美国专利No.5,770,358、5,789,162、5,708,153、6,040,193和5,800,992,它们出于所有目的通过引用整体由此并入。

[0176] 除了使用阵列和微阵列之外,考虑可以采用许多不同的分析来分析miRNA、它们的活性和它们的作用。这样的分析包括但不限于核酸扩增、聚合酶链反应、定量PCR、RT-PCR、原位杂交、Northern杂交、杂交保护分析(HPA)(GenProbe)、分支DNA(bDNA)分析(Chiron)、滚环扩增(RCA)、单分子杂交检测(US Genomics)、Invader分析(ThirdWave Technologies)和/或桥连接分析(Bridge Litigation Assay)(Genaco)。

[0177] VII. 药物组合物

[0178] 在某些方面,用于所述方法的组合物或药剂,如化学治疗剂,适当地包含在药学上可接受的载体中。载体是无毒的、生物相容的并且经过选择以不对药剂的生物活性产生不利影响。在本发明的一些方面,药剂可以配制成固体、半固体、凝胶、液体或气体形式,如片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液、储库、吸入剂和注射剂的用于局部递送(即到身体的特定位置,如骨骼肌或其它组织)或全身递送的制剂,实现口服、肠胃外或手术给予。本发明的某些方面还考虑通过涂覆医疗装置等局部给予组合物。

[0179] 用于通过注射、灌输或冲洗的肠胃外递送和局部递送的合适载体包括蒸馏水、生

理磷酸盐缓冲盐水、正常或乳酸林格氏溶液、葡萄糖溶液、Hank溶液或丙二醇。此外,无菌的固定油可用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何生物相容性油,包括合成的单甘油酯或甘油二酯。此外,脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。载体和药剂可以混合成液体、悬浮液、可聚合或不可聚合的凝胶、糊剂或油膏。

[0180] 载体还可以包含递送载体以维持(即延长、延迟或调节)药剂(多种药剂)的递送或增强治疗剂(多种治疗剂)的递送、摄取、稳定性或药代动力学。作为非限制性实例,这样的递送载体可包括由蛋白质、脂质体、碳水化合物、合成有机化合物、无机化合物、聚合或共聚水凝胶和聚合物胶束组成的微粒、微球、纳米球或纳米颗粒。

[0181] 在某些方面,给予患者或受试者的组合物的实际剂量可以根据物理和生理因素,如体重、病症的严重程度、所治疗的疾病的类型、先前或同时的治疗性干预、患者的特发性疾病和给予途径确定。在任何情况下,负责给予的从业者将确定组合物中活性成分(多种活性成分)的浓度和用于个体受试者的适当剂量(多个适当剂量)。

[0182] 在某些实施方案中,药物组合物可以包含,例如,至少约0.1%的活性剂,如分离的外来体、相关的脂质纳米囊泡、或载有治疗剂或诊断剂的外来体或纳米囊泡。在其它的实施方案中,活性剂可包含单位重量的约2%至约75%,或约25%至约60%,和其中可得出的任何范围。在其它的非限制性实施例中,剂量还可以包含每次给予约1微克/kg/体重、约5微克/kg/体重、约10微克/kg/体重、约50微克/kg/体重、约100微克/kg/体重、约200微克/kg/体重、约350微克/kg/体重、约500微克/kg/体重、约1毫克/kg/体重、约5毫克/kg/体重、约10毫克/kg/体重、约50毫克/kg/体重、约100毫克/kg/体重、约200毫克/kg/体重、约350毫克/kg/体重、约500毫克/kg/体重至约1000mg/kg/体重或更多,以及其中可得出的任何范围。在由本文所列数字的得出范围的非限制性实例中,可以给予的范围为约5微克/kg/体重至约100mg/kg/体重,约5微克/kg/体重至约500毫克/kg/体重。

[0183] 药物组合物的溶液可以在与表面活性剂如羟丙基纤维素适当混合的水中制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇、其混合物和在油中制备。在通常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0184] 在某些方面,药物组合物以可注射组合物的形式作为液体溶液或悬浮液有利地给予;也可以制备适于液体中的溶液或悬浮液的注射前固体形式。这些制剂也可以乳化。用于此目的的典型组合物包含药学上可接受的载体。例如,该组合物可每毫升磷酸盐缓冲盐水含有10毫克或更少、25毫克、50毫克或至多约100毫克人血清白蛋白。其它药学上可接受的载体包括含有盐、防腐剂、缓冲剂等的水溶液、无毒赋形剂。

[0185] 非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射的有机酯,如油酸乙酯。水性载体包括水、醇/水溶液、盐溶液,胃肠外载体如氯化钠、林格氏葡萄糖等。静脉内载体包括液体和营养补充剂。防腐剂包括抗微生物剂、抗真菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体。根据众所周知的参数调节药物组合物的各种组分的pH和精确浓度。

[0186] 其它制剂适合口服给予。口服制剂包括这样的典型赋形剂,例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。该组合物采用溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末的形式。

[0187] 在另外的方面,药物组合物可包括经典药物制剂。根据某些方面的药物组合物的给予可以通过任何常规途径,只要目标组织可通过该途径达到。这可以包含口服、鼻腔、颊、

直肠、阴道或局部的。局部给予对于治疗皮肤癌、预防化学治疗诱导的脱发或其它皮肤过度增殖性障碍可能特别有利。供选择地,可以通过原位、皮内、皮下、肌肉内、腹膜内或静脉内注射给予。这样的组合物通常将作为药理学上可接受的组合物给予,所述组合物包括生理学上可接受的载体、缓冲剂或其它赋形剂。为了治疗肺部病症,可以使用气溶胶递送。气溶胶的体积在约0.01ml至0.5ml之间。

[0188] 基于预期目标确定有效量的药物组合物。术语“单位剂量”或“剂量”是指适合用于受试者的物理上离散的单位,每个单位含有预定量的药物组合物,经计算可产生上述与其给予,即适当的途径和治疗方案相关的所需反应。根据治疗次数和单位剂量,给予的量取决于所需的保护或效果。

[0189] 精确量的药物组合物还取决于从业者的判断,并且是每个个体特有的。影响剂量的因素包括患者的身体和临床状态、给予途径、治疗的预期目标(例如,缓解症状还是治愈)和特定的治疗性物质的效力、稳定性和毒性。

[0190] VIII. 试剂盒

[0191] 本发明的某些方面还涉及含有本发明的组合物或实施本发明的方法的组合物的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒可用于评价一种或多种miRNA分子。在某些实施方案中,试剂盒包含、包含至少或包含至多1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、100、500、1000种或更多种miRNA探针,合成miRNA分子或miRNA抑制剂,或其中可得出的任何值或范围和组合。在一些实施方案中,存在用于评价细胞中miRNA活性的试剂盒。

[0192] 试剂盒可以包含可以单独包装或放置在容器,如管、瓶、小瓶、注射器或其它合适的容器机构中的组分。

[0193] 单一组分也可以以浓缩量提供在试剂盒中;在一些实施方案中,单独提供组分,其浓度与其在含有其它组分的溶液中的浓度相同。组分的浓度可以以1x、2x、5x、10x或20x或更多提供。

[0194] 包括使用用于预后或诊断应用的本发明的miRNA探针、合成miRNA、非合成miRNA和/或miRNA抑制剂的试剂盒作为本发明的部分。具体考虑了对应于本文鉴定的任何miRNA的任何这样的分子。

[0195] 在某些方面,在一些试剂盒的实施方案中包括阴性和/或阳性对照合成miRNA和/或miRNA抑制剂。对照分子可用于验证转染效率和/或控制细胞中转染诱导的变化。

[0196] 考虑就本文所描述的任何其它方法或组合物而言,本文所描述的任何方法或组合物可以实施,并且可以组合不同的实施方案。特别考虑的是,就miRNA分子或miRNA而言,本文讨论的任何方法和组合物可以实施,就合成miRNA而言达到以下程度:将合成miRNA暴露于适当条件以允许其在生理环境下成为成熟miRNA。考虑最初提交的权利要求涵盖基于任何提交的权利要求或提交的权利要求的组合的多项从属权利要求。

[0197] 考虑涉及按名称的具体miRNA的本发明的任何实施方案也涵盖以下实施方案,该实施方案涉及其序列与具体miRNA的成熟序列至少80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%相同的miRNA。

[0198] 本发明的实施方案包括用于通过评估样品的miRNA谱来分析病理样品的试剂盒,

所述样品包含在合适的容器装置中的两种或更多种miRNA探针,其中所述miRNA探针检测本文鉴定的一种或多种miRNA。该试剂盒可以进一步包含用于标记样品中miRNA的试剂。试剂盒还可以包含标记试剂,所述标记试剂包含胺修饰的核苷酸、聚(A)聚合酶和聚(A)聚合酶缓冲液中的至少一种。标记试剂可包括胺活性染料。

[0199] IX. 实施例

[0200] 包括以下实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应理解,接下来的实施例中公开的技术代表了本发明人发现的在本发明的实施中很好地发挥作用的技术,因此可以被认为构成其实施的优选方式。然而,本领域技术人员根据本发明应理解,在不背离本发明的精神和范围的情况下,可以在所公开的具体实施方案中做出许多改变,并仍然获得相似的或类似的结果。

[0201] 实施例1

[0202] 在收集本申请的图中提供的的数据中实施以下方法。

[0203] A. 研究设计和临床标本

[0204] 该研究由三部分组成:候选miRNA组选择的发现阶段、验证阶段和翻译阶段。最后阶段目的在于评价食道癌患者的血清中miRNA组的潜力。在发现阶段,本发明人使用了来自癌症基因组图谱(TCGA)数据的186个I-IV期食道癌组织的群组,其包括98个食道鳞状细胞癌组织和88个食道腺癌组织以及12个正常粘膜组织。从癌症基因组图谱数据门户下载食道癌患者的miRNA的表达数据和相应的临床数据。有27例女性和157例男性患者,年龄分别为 66.1 ± 11.8 和 61.8 ± 11.7 岁。TCGA的原材料和数据的收集遵守用于保护人受试者的所有适用的法律、法规和政策进行,并获得了必要的IRB批准。数据总结为对数尺度上具有95%的置信区间的平均值,或者将这些值取幂以生成倍数变化。验证阶段包括224个0-IV期食道癌组织和224个匹配的相应的正常食道粘膜组织。翻译阶段包括136个0-IV期食道癌患者和112个健康对照,以检查miRNA的血清水平。本研究中使用了日本名古屋大学医院(Nagoya University Medical Hospital)的0-IV期总共224个食道癌组织和224个匹配的相应的正常食道粘膜组织和136个血清样品,和美国德克萨斯州贝勒大学医学中心(Baylor University Medical Center)的112名健康对照。从所有患者均获得了书面知情同意书,并且该研究经过所有参与机构的机构审查委员会的批准。

[0205] B. 从组织分离RNA和qRT-PCR

[0206] 使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)根据制造商的方案从组织分离包含小RNA的总RNA,并在30 μ L的无RNase的水中使用QIAcube设备(Qiagen, Valencia, CA)洗脱,并且使用NanoDrop分光光度计(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)定量。对于基于miRNA的RT-PCR分析,使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems, San Diego, CA)以10 μ L的总反应体积对来自组织样品的2 μ L富集的小RNA进行逆转录,条件如下:16 $^{\circ}$ C30分钟,42 $^{\circ}$ C30分钟,85 $^{\circ}$ C5分钟,并保持在4 $^{\circ}$ C。使用MicroRNA分析试剂盒和TaqMan Universal Master Mix II,无UNG(Applied Bio系统)进行实时PCR。使用QuantStudio 6Flex实时PCR系统(Applied Bio系统)进行用于定量miRNA的PCR反应,循环条件如下:95 $^{\circ}$ C10分钟,然后95 $^{\circ}$ C15秒40个循环,和60 $^{\circ}$ C1分钟。结果表示为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,并将结果以RNU6B归一化(Applied Bio系统)并以一式两份进行。

[0207] C. 从血清分离RNA和qRT-PCR

[0208] 使用Qiagen miRNAeasy血清/血浆试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 从所有血清样品富集小RNA。简言之,将250 μ L血清在冰上解冻并以10000rpm离心5分钟以除去细胞碎片。接下来,将200 μ L上清液在1000 μ L QiazoleLysis试剂中裂解。为了在RNA分离过程中使样品到样品的变化归一化,向每个变性样品加入25fmol合成的线虫miRNA (cel-miR-39)。提取包含小RNA的总RNA,并使用QIAcube设备 (Qiagen, Valencia, CA) 在30 μ L不含RNase的水中洗脱。对于基于miRNA的RT-PCR分析,使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒 (Applied Bio系统, San Diego, CA) 以10 μ L的总反应体积对来自血清样品的2 μ L富集的小RNA进行逆转录,条件如下: 16 $^{\circ}$ C 30分钟, 42 $^{\circ}$ C 30分钟, 85 $^{\circ}$ C 并保持4 $^{\circ}$ C。使用MicroRNA分析试剂盒和TaqMan Universal Master Mix II, 无UNG (Applied Bio系统) 进行实时PCR。使用QuantStudio 6Flex实时PCR系统 (Applied Bio系统) 进行用于定量miRNA的PCR反应,循环条件如下: 95 $^{\circ}$ C 10分钟, 然后95 $^{\circ}$ C 15秒40个循环, 和60 $^{\circ}$ C 1分钟。结果表示为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 并将结果以cel-miR-39归一化并以一式两份进行。

[0209] D. 统计分析

[0210] 为了评价样品的两个匹配对组之间或两个独立组之间的显著差异,分别使用配对t检验和Mann-Whitney U检验。所有P值均为双侧并且P值<0.05被认为是显著的。生成接受者操作特征 (ROC) 曲线并计算具有95%置信区间 (CI) 的ROC曲线下面积 (AUC) 以评估miRNA的区别性能。使用逻辑回归分析其中有一个或多个确定结果的独立变量的数据集。使用Medcalc统计软件v.12.7.7. (Medcalc Software bvba, 奥斯坦德, 比利时) 进行所有的统计学分析。

[0211] 下表显示用于EAC或ESCC特异性标志物的候选mRNA及其百分比。

通过使用随机 forrest 得到的 EAC 前 10	%	通过使用随机 forrest 得到的 ESCC 前 10	%
hsa-mir-196a-1	100	hsa-mir-205	100
hsa-mir-196b	100	hsa-mir-944	100
mir-21	100	hsa-mir-194-2	98
mir-181a-1	96	hsa-mir-192	92
hsa-mir-196a-2	96	hsa-mir-194-1	88
hsa-mir-335	92	hsa-mir-23a	80
hsa-mir-181b-1	70	mir-215	74
hsa-mir-15b	48	hsa-mir-27a	74
hsa-mir-17	44	hsa-mir-338	64
mir-106b	38	mir-21	62

[0213] 下表显示用于EAC或ESCC标志物的候选mRNA及其百分比。

[0214]	通过使用随机 forrest 得到的组合的 EAC/ESCC 前 15		通过使用 t 检验得到的组合的 EAC/ESCC 前 15	
	miRNA	%	miRNA	%
	mir-146b	100	mir-21	64
	mir-148a	100	mir-93	54
	mir-181a-1	100	hsa-mir-196a-1	52
	hsa-mir-196a-1	100	mir-106b	44
	hsa-mir-196b	100	hsa-mir-27a	42
	mir-21	100	hsa-mir-1468	38
	hsa-mir-196a-2	84	mir-139	32
	hsa-mir-181b-1	82	hsa-mir-196b	32
	hsa-mir-375	66	hsa-mir-17	30
	hsa-mir-3648	54	hsa-mir-196a-2	30
	hsa-mir-18a	48	mir-181a-1	28
	hsa-mir-27a	48	hsa-mir-421	28
	has-mir-129-2	46	hsa-mir-181b-1	26
	has-mir-769	40	hsa-mir-224	24
	has-mir-106b	36	hsa-mir-24-2	24

[0215] 实施例2:用于检测食道鳞状细胞癌的新的基于miRNA的非侵入性诊断组

[0216] 如该实施例中所描述的,使用全面的计算机分析来鉴定在ESCC中过表达的候选miRNA。随后,测试血清样品中的这些miRNA并细化至8-miRNA诊断组。该组的可靠性在两个大型独立群组中得到验证。此外,该组区分了早期ESCC患者与健康对照,并且显著优于当前使用的血清学ESCC标记物,SCC-Ag。

[0217] 尽管食道鳞状细胞癌(ESCC)占有食道癌的近80%,但当前尚无用于其早期诊断的确定的血清学分子标志物。本研究的目标是通过在多个独立的ESCC患者群组中系统且全面的miRNA表达分析,建立用于ESCC的基于循环miRNA的诊断组。使用三个组织RNA-Seq数据集来鉴定初始miRNA候选物,并且验证这些候选miRNA在临床组织样品中的表达。使用来自ESCC患者的与年龄、性别和种族匹配的血清样品与健康对照中的这样的血清样品相比较,本发明人以数学方法开发了循环miRNA-组。使用两个独立的患者群组评估miRNA组的诊断性能。最初在三个数据集中鉴定出18个始终过表达的miRNA。随后,在临床组织样品中验证这些miRNA的表达。评估这些组织候选物在血清标本中的表达,并且使用8-miRNA组(miR-103、106b、151、17、181a、21、25和93)得出多变量风险评分公式。miRNA特征的诊断性能在训练群组(AUC=0.83)和两个大的独立验证群组(AUC分别为0.80、0.89)中得到证实。此外,miRNA组将早期ESCC患者(I期)与健康对照(AUC=0.81)区分开来,其优于(p值=0.02)临床血清学标志物SCC-Ag(AUC=0.63)。在迄今分析的ESCC患者的潜在最大群组中使用集成的综合的生物标志物发现和验证方法,本发明人已经开发并验证了用于ESCC的早期检测的新型且可靠的基于miRNA的组。

[0218] A. 材料和方法

[0219] 1. 数据来源

[0220] 从癌症基因组图谱 (TCGA) 数据门户下载ESCC小RNA-Seq数据集和相应的临床数据。TCGA数据集包含98个I-IV期ESCC组织和13个正常食道粘膜。ESCC miRNA微阵列数据集源自Gene Expression Omnibus (GEO), 登录号为GSE55856 (108个I-IV期ESCC组织和108个相邻的正常食道组织) 和GSE43732 (119个I-IV期ESCC组织和119个相邻的正常食道组织)。Affymetrix Multispecies miRNA 2.0阵列平台 (Affymetrix, Santa Clara, California, USA) 用于GSE55856, Agilent-038166cbc人miRNA18.0微阵列平台 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 用于GSE43732。

[0221] 2. 临床标本

[0222] 在2001年至2016年间共收集了863个临床标本, 包括559个ESCC血清样品、240个健康血清样品、32个ESCC组织样品和32个相邻的正常食道粘膜。对于组织验证, 从没有任何术前治疗进行ESCC食道切除的患者收集32个I-III期ESCC组织和32个匹配的相应正常食道粘膜组织。首先, 对于血清细化群组, 在2009年至2011年间, 从日本熊本的熊本大学医院 (Kumamoto University Hospital) 收集50个I-III期ESCC血清样品和50个健康对照。接下来, 对于血清训练群组, 本发明人在2001年至2015年间, 从南非开普敦的Groote Schuur医院收集了280个I-IV期ESCC血清样品和128个健康受试者。最后, 本发明人收集了血清验证群组1和血清验证群组2, 血清验证群组1包括2012年至2016年间, 从熊本大学医院收集的106个I-III期ESCC血清样品和20个健康对照, 血清验证群组2包括2001年至2015年间, 从日本名古屋的名古屋大学医院收集的123个I-III期ESCC血清样品和42个健康对照。所有程序均经每个医院的机构审查委员会批准, 并从每个参与者获得书面知情同意书。在治疗前收集每个参与者的全血样品, 并在收集后12小时内以3000g进行10分钟。然后, 通过以10000g离心2分钟进一步分离无细胞血清, 以确保完全去除细胞碎片。将血清样品储存在-80°C下无RNase的eppendorf管中直至使用。

[0223] 3. 研究设计

[0224] 研究设计 (图16) 包括以下步骤: (1) 计算机发现阶段。使用三种基于组织的miRNA表达数据集 (TCGA、GSE55856、GSE43732) 来发现可靠的miRNA组。对于每个数据集, 首先从每个数据集鉴定出显著过表达的miRNA (标准: \log_2 倍数变化 >0.5 , FDR调整的p值 <0.05 , 在ESCC中上调的, $AUC > 0.7$, 并且平均miRNA表达水平必须 $>$ 所有差异表达的miRNA的中位数)。选择在三个数据集中普遍被识别的18种miRNA作为候选miRNA。(2) 组织验证阶段。通过qRT-PCR评价32个ESCC组织样品和32个匹配的相邻正常组织中18个候选miRNA的表达水平。所有候选miRNA被证实ESCC组织样品中显著上调 (p值 <0.05)。 (3) 血清细化阶段。为了开发诊断性miRNA组, 本发明人使用包括年龄、性别和种族匹配的50名ESCC患者和50名健康对照的血清细化群组来评估血清中18种候选miRNA的表达水平。发现在ESCC血清样品中八种miRNA显著上调 (p值 <0.05), 并且选择它们用于以下分析。(4) 血清训练和验证阶段。随后, 我们使用包括来自南非Groote Schuur医院的280名ESCC患者和128名健康对照的血清训练群组, 采用多变量逻辑回归建立用于ESCC诊断的风险评分公式。此外, 本发明人使用血清验证群组1 (来自熊本大学医院的106个ESCC患者和20个健康对照) 和血清验证群组2 (来自名古屋大学医院的123个ESCC患者和42个健康对照) 验证了8-miRNA组的诊断价值。使用miRNA特征模型, 本发明人通过灵敏度、特异性、曲线下面积 (AUC) 和相应的95%的置信区间评价了训

练群组、验证群组1和验证2群组的诊断性能。对于所有的血清群组,使用逻辑函数 $1/(1+\exp(-\text{线性预测因子}))$ 计算风险评分,并且临界值是训练群组的Youden指数:0.582。本发明人还通过在血清验证群组2中包含血清SCC-Ag来测试ESCC的预测性能。

[0225] 4. 从组织分离RNA

[0226] 使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)根据制造商的方案从组织分离包括小RNA的总RNA,并在30 μ L的无RNase的水中使用QIAcube半自动机器人设备(Qiagen, Valencia, CA)洗脱,并使用NanoDrop分光光度计(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)定量,并在-80 $^{\circ}$ C下储存以供进一步使用。

[0227] 5. 从血清分离RNA

[0228] 使用Qiagen miRNAeasy血清/血浆试剂盒(Qiagen)从所有血清样品富集小RNA。简言之,将血清样品在冰上解冻并以10000rpm离心5分钟以除去细胞碎片。接下来,将200 μ L上清液在1000 μ L QiazoleLysis试剂中裂解。为了在RNA分离过程中使样品到样品的变化归一化,向每个变性样品加入25fmol合成的线虫miRNA(ce1-miR-39, Qiagen)。使用QIAcube半自动机器人设备(Qiagen)提取包含小RNA的总RNA,并在30 μ L不含RNase的水中洗脱,并在-80 $^{\circ}$ C下储存以供进一步使用。

[0229] 6. 定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)

[0230] 对于基于miRNA的RT-PCR分析,使用TaqMan MicroRNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems)以6 μ L的总反应体积对来自组织/血清样品的1.2 μ L富集的小RNA进行逆转录,条件如下:16 $^{\circ}$ C30分钟,42 $^{\circ}$ C30分钟,85 $^{\circ}$ C并保持在4 $^{\circ}$ C。使用MicroRNA分析试剂盒和TaqMan Universal Master Mix II,无UNG(Applied Biosystems)进行实时PCR。使用QuantStudio 6Flex实时PCR系统(Applied Biosystems)进行用于定量miRNA的PCR反应,循环条件如下:95 $^{\circ}$ C10分钟,然后95 $^{\circ}$ C15秒40个循环,和60 $^{\circ}$ C1分钟。结果表示为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。在组织样本中,将结果以U6(Ambion, Austin, TX)归一化,并在血清样品中,将结果以内部内源性对照miR-16归一化。

[0231] 7. 统计分析

[0232] 为了量化样品的两个匹配的对组之间或两个独立的组之间的差异miRNA表达的统计学显著性,分别使用配对t检验和双侧学生t检验。所有p值均为双侧,并且p值<0.05被认为是显著的。生成接收者操作特征(ROC)曲线并计算具有95%置信区间(CI)的ROC曲线下面积(AUC)以评估miRNA的区别性能。对于ESCC诊断,训练多变量逻辑回归模型以基于8种特征性miRNA的表达水平预测癌症风险。使用Medcalc统计软件(v.12.7.7., Medcalc Software bvba, Ostend, Belgium), JMP软件(10.0.2., SAS Institute, Cary, NC, USA)和R(3.3.3, R Development Core Team, <https://cran.r-project.org/>)进行所有统计学分析。

[0233] B. 结果

[0234] 1. 受试者的特征

[0235] ESCC血清样品包括所有的预处理样品,在具有可切除肿瘤的患者(n=538)的手术之前和具有不可切除的肿瘤患者(n=21)化学治疗之前取得。此外,从健康对照处获得总共240份血清样品。在血清细化群组、血清训练群组和血清验证群组1中,ESCC患者和健康对照之间的年龄分布没有显著差异,没有显著的种族和性别差异,并且由于健康参与者的抽样限制,血清验证群组2中的ESCC患者与健康参与者之间存在显著的年龄差异(平均差异,

26.7岁[95%CI,26.4-28.9岁])。

[0236] 2. 鉴定ESCC相关的miRNA组候选物

[0237] 图16中的流程图示出了整体研究设计。在发现阶段,本发明人询问了三个基于组织的miRNA表达数据集(TCGA、GSE55856、GSE43732)以确定miRNA组候选物的优先级。对于每个数据集,如果miRNA:(1)在ESCC和正常样品之间差异表达(\log_2 倍数变化 >0.5 ,FDR调整的 p 值 <0.05);(2)在ESCC和正常样品之间有区别($AUC>0.7$);(3)在ESCC中上调并且具有相对高的表达以有利于临床中的检测(平均表达 $>$ 所有差异表达的miRNA的平均表达的中值),则它被认为是潜在候选物。因此,分别从TCGA、GSE55856和GSE43732数据集鉴定了79、431和136个miRNA,其中在三个数据集之间重叠的18个miRNA被优先作为miRNA组候选物(图13A)。为了评价18-miRNA组的诊断价值,采用了两种不同的策略。(1)在每个群组内,具有2倍交叉验证的多变量逻辑回归(重复100次)证明了可靠的诊断值(分别是平均 $AUC=0.98、0.99、0.98$) (图13B)。(2)基于GSE55856训练的多变量逻辑回归模型对于所有三个数据集也实现了高预测性能(分别为 $AUC=0.99、1.00、0.99$) (数据未显示)。此外,本发明人对32个ESCC和32个匹配的相邻正常组织进行了qRT-PCR,并证实了所有18个miRNA在ESCC临床组织样品中显著上调(p 值 <0.05) (图17)。

[0238] 3. 建立用于预测ESCC的循环miRNA组

[0239] 使用血清细化群组(50个ESCC,50个健康对照),本发明人接下来的目的在于细化18个组织来源的候选物,以开发循环miRNA组。在总共18个候选物中,排除了低于检测限(平均循环阈值 >35)的4种miRNA(miR-182、miR-183、miR-18a、miR-505)。在其它14种可检测的miRNA中,8种(miR-103、miR-106b、miR-151、miR-17、miR-181a、miR-21、miR-25、miR-93)在ESCC血清中显著上调(图14)。本发明人随后基于血清训练群组(208个ESCC,128个健康对照)对8种miRNA进行qRT-PCR,并训练多变量逻辑回归模型。风险评分公式来自如下的多变量模型: $\text{logit}(P)=0.209*\text{miR}21+0.968*\text{miR}93+0.454*\text{miR}106b+3.753*\text{miR}17-8.505*\text{miR}181a+4.149*\text{miR}25-1.375*\text{miR}103-3.278*\text{miR}151-0.998$ 。对于训练群组,8-miRNA模型达到0.83的AUC(95%CI,0.79-0.87),78%的灵敏度和75%的特异性(图15A)。

[0240] 4. 两个验证群组中的循环miRNA组的诊断性能

[0241] 为了验证8-miRNA组的诊断价值,本发明人对另外两个独立的血清群组进行了qRT-PCR:血清验证群组1(106个ESCC患者,20个健康对照)和血清验证群组2(123个ESCC患者,42个健康对照)。对于每个群组,本发明人使用8-miRNA模型计算风险评分,并使用源自血清训练群组的相应的临界值(0.582)确定高风险或低风险组。8-miRNA模型针对血清验证群组1(图15B,AUC:0.80、95%CI:0.69-0.91、灵敏度:89%、特异性:60%)和血清验证群组2(图15C,AUC:0.89、95%CI:0.83-0.94,灵敏度:87%,特异性:85%)实现了可靠的预测性能。重要的是,虽然鳞状细胞癌相关抗原的常规肿瘤标志物(SCC-Ag)对于血清验证群组2(123个I-IV期ESCC患者相对于42个健康对照)显示出对于ESCC诊断的一些价值($AUC:0.71$ 、95%CI:0.60-0.84,灵敏度:0.91,特异性:0.69),8-miRNA模型显示出显著更高的诊断性能(p 值=0.003,DeLong检验)。特别地,8-miRNA组可以区分I期ESCC患者($n=20$)和健康对照($n=42$) ($AUC:0.81$ 、95%CI:0.70-0.94,灵敏度:0.76,特异性:0.91),这是优于(p 值=0.025,DeLong检验) SCC-Ag ($AUC=0.63$ 、95%CI:0.50-0.78,灵敏度:0.75,特异性:0.69)的。这些验证结果证明使用8-miRNA模型有希望作为临床上ESCC的非侵入性早期检测的可

靠生物标志物的潜力。

[0242] C. 讨论

[0243] ESCC是最具侵袭性的癌症之一,其预后差,并且患者生存率低主要是由于诊断延迟。因此,ESCC的早期检测提供了实施有效治疗和及时干预以改善患者结果的机会。然而,当前没有临床上可行的用于ESCC诊断的分子标志物。在该研究中,本发明人利用生物信息学方法从三个计算机数据集鉴定候选miRNA。然后,本发明人评价了这些miRNA在血清中的表达,并建立了可靠的miRNA组作为用于ESCC的非侵入性诊断标志物,并在三个独立的群组中进行了验证。有趣的是,即使对于早期ESCC患者,本发明人也表明了miRNA组具有比SCC-Ag—ESCC最常用的血清诊断标志物显著更好的检测能力。总之,本发明人首次使用具有三个大型独立验证群组的综合性生物标志物发现过程,开发并成功验证了用于早期检测ESCC的新型且可靠的基于miRNA的组,其具有在未来转化对ESCC患者的非侵入性诊断的潜力。

[0244] 根据本发明的公开内容,可以在没有过度实验的情况下得出并实施本文公开和要求保护的所有方法。虽然已经就优选的实施方案描述了本发明的组合物和方法,但对于本领域技术人员将显而易见的是,在不背离发明的构思、精神和范围的情况下,可以对本文所述方法和在所述方法的步骤或步骤的顺序中作出变化。更具体地,显而易见的是在化学上和生理上都相关的某些试剂可以被替代为本文描述的试剂,而将实现相同或相似的结果。对本领域技术人员而言显而易见的是所有这些相似的替代和修改都被认为是在由所附权利要求限定的本发明的精神、范围和构思内。在整个公开内容中提及的所有参考文献和出版物都出于所有目的通过引用并入。

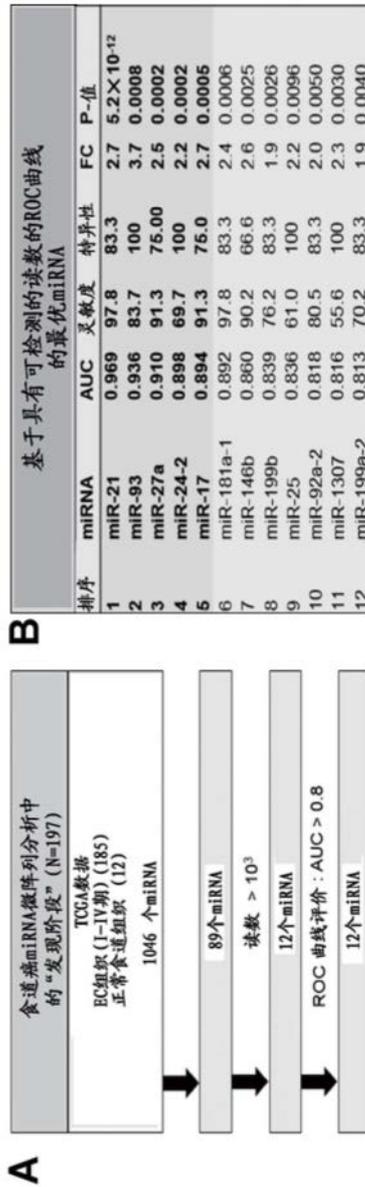


图1A-B

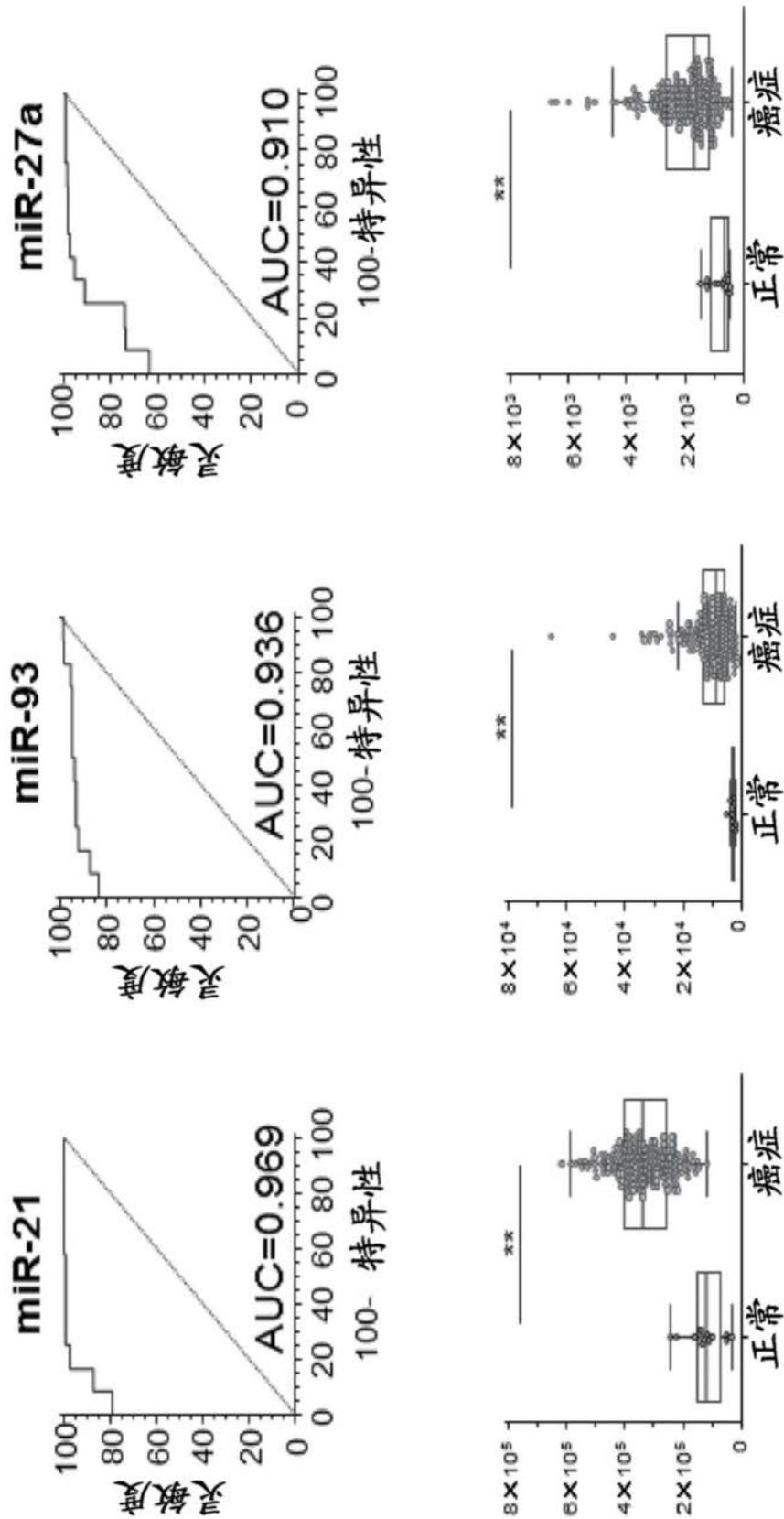


图2

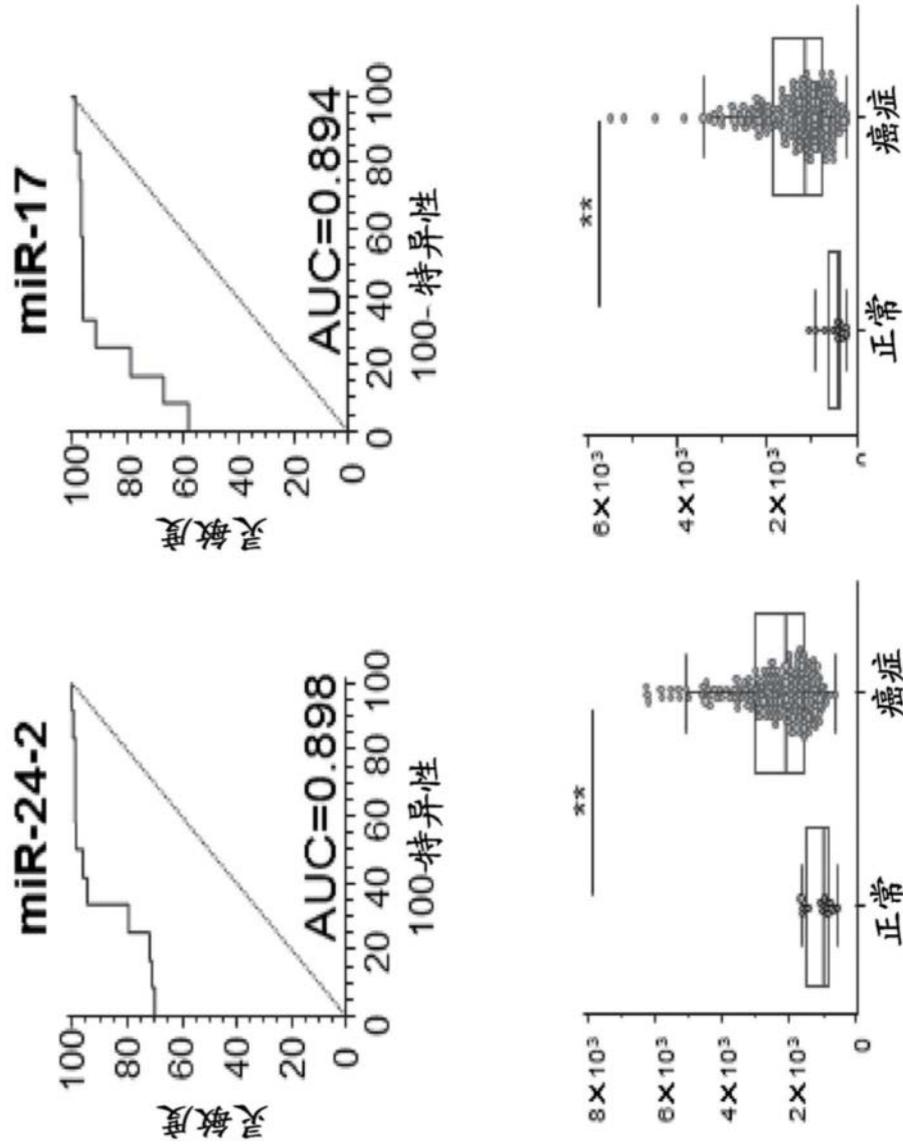


图2(续)

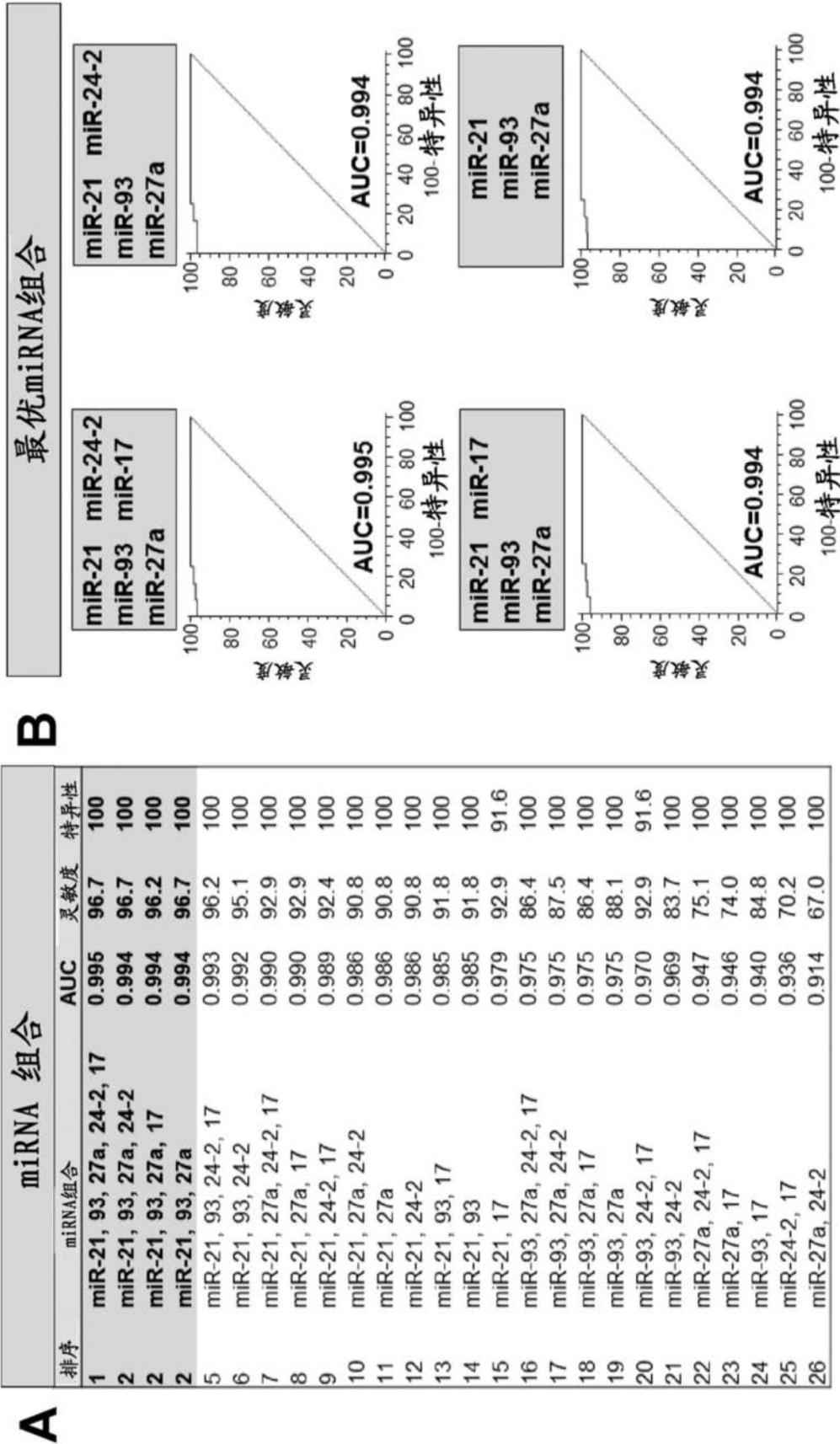


图3A-B

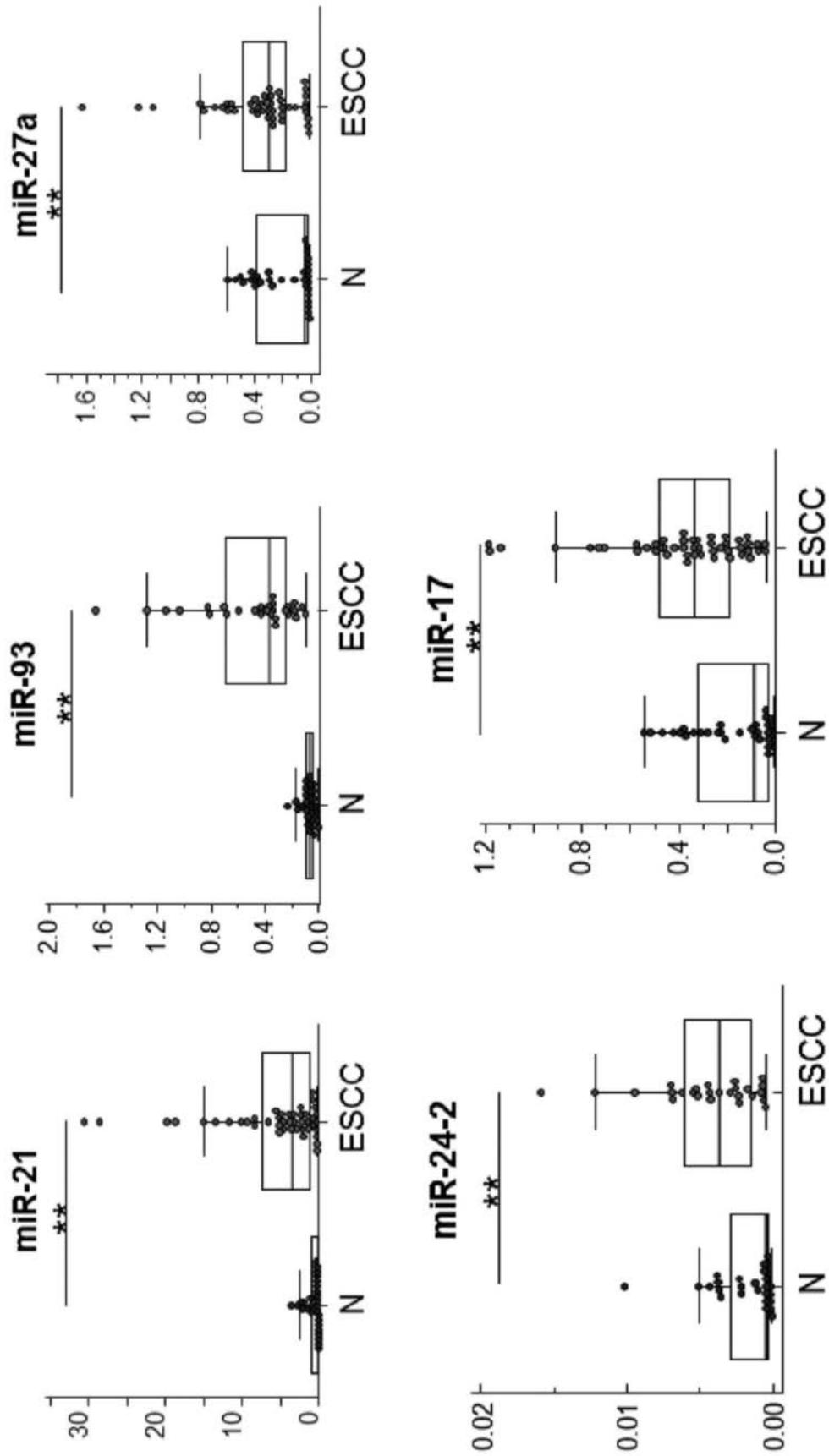


图4

A

排序	miRNA 组合	AUC	灵敏度	特异性
1	miR-21, 93, 27a, 24-2, 17	1.00	100	100
1	miR-21, 93, 27a, 24-2	1.00	100	100
1	miR-93, 27a, 24-2, 17	1.00	100	100
1	miR-21, 93, 27a, 17	1.00	100	100
1	miR-21, 93, 17	1.00	100	100
6	miR-93, 27a, 17	0.996	100	96.4
7	miR-93, 24-2	0.995	100	92.8
8	miR-93, 27a	0.994	100	92.8
9	miR-93, 17	0.994	100	92.8
10	miR-93, 21	0.989	88.8	100

图5A

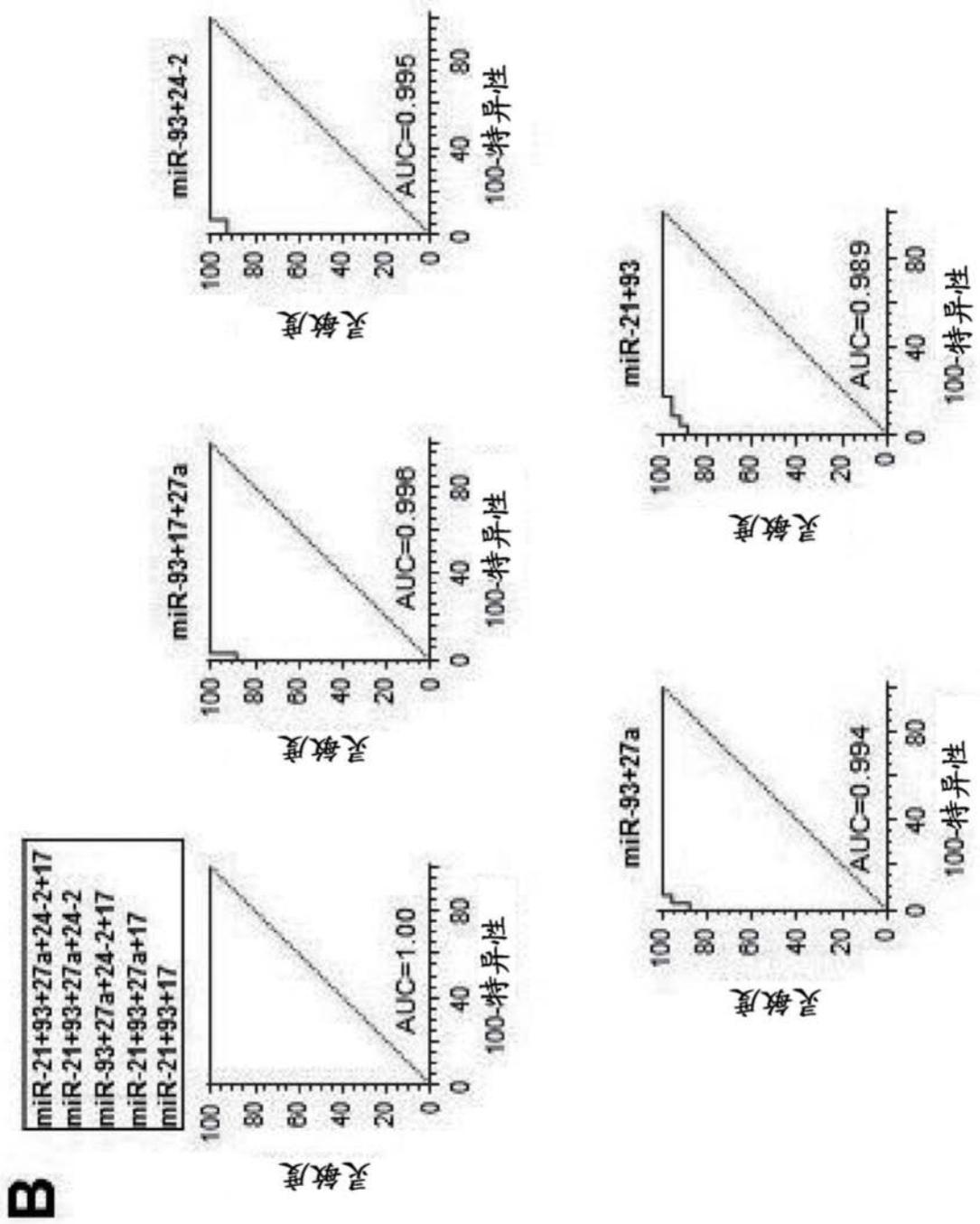


图5B

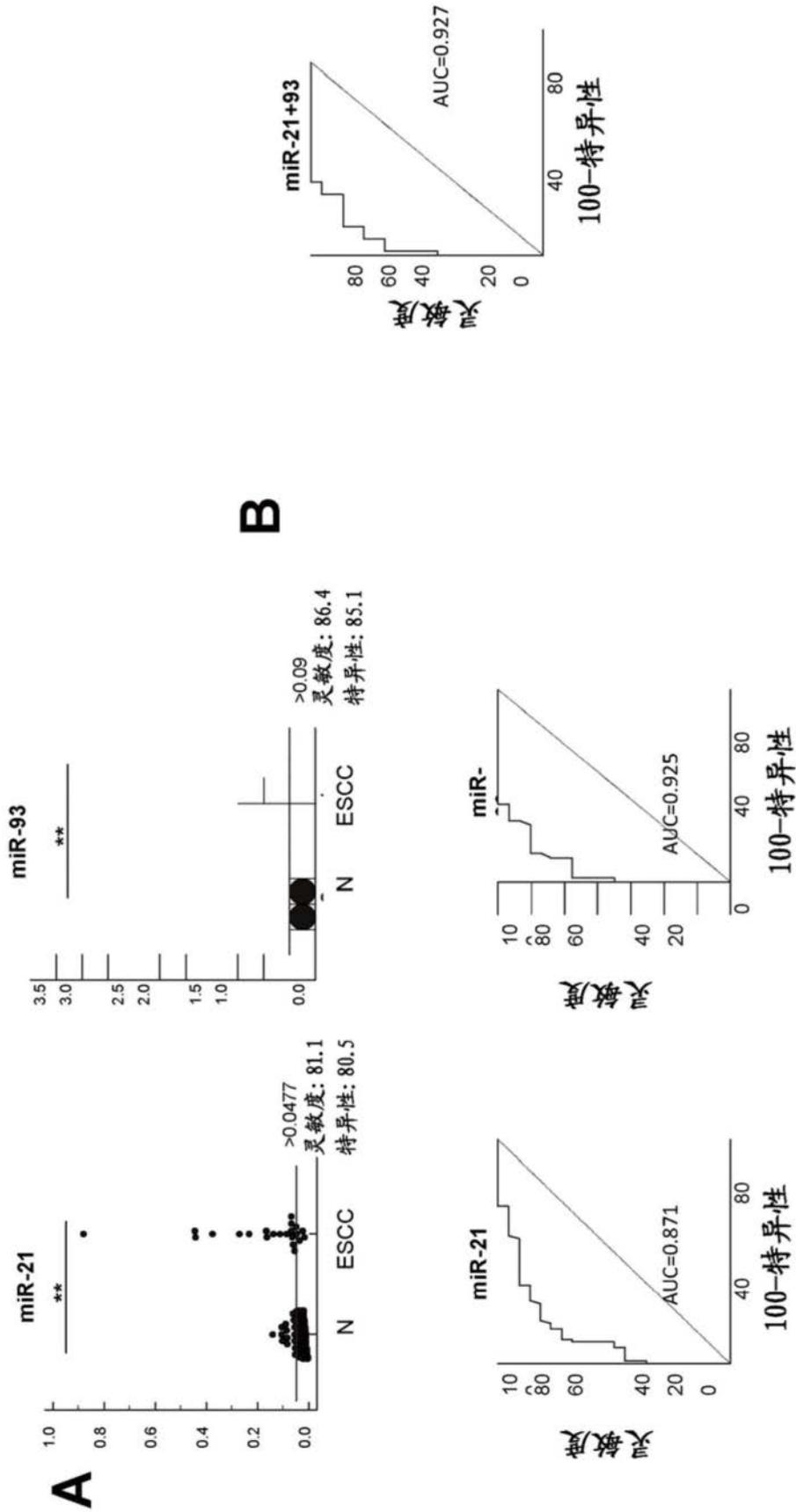


图6A-B

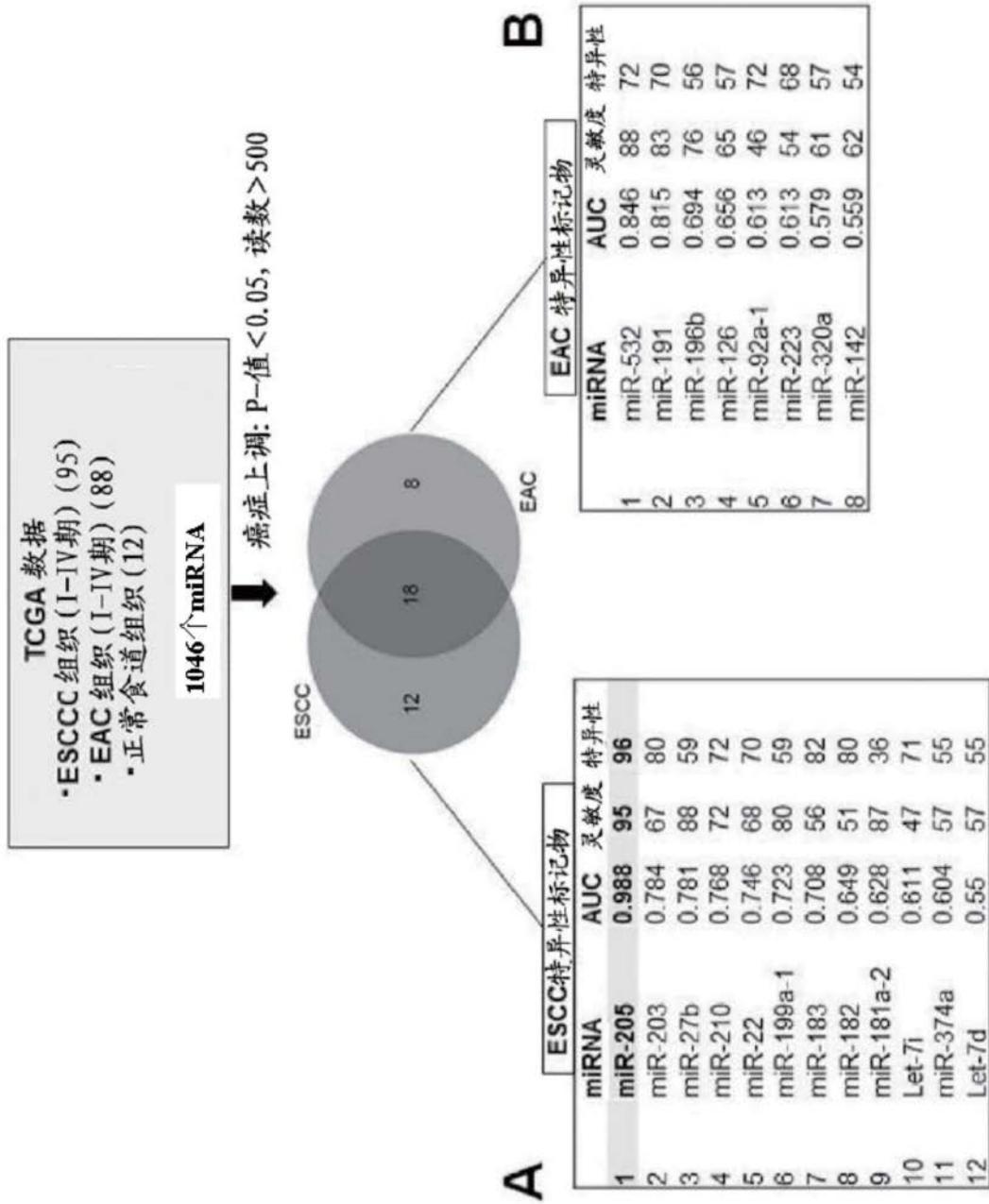


图7A-B

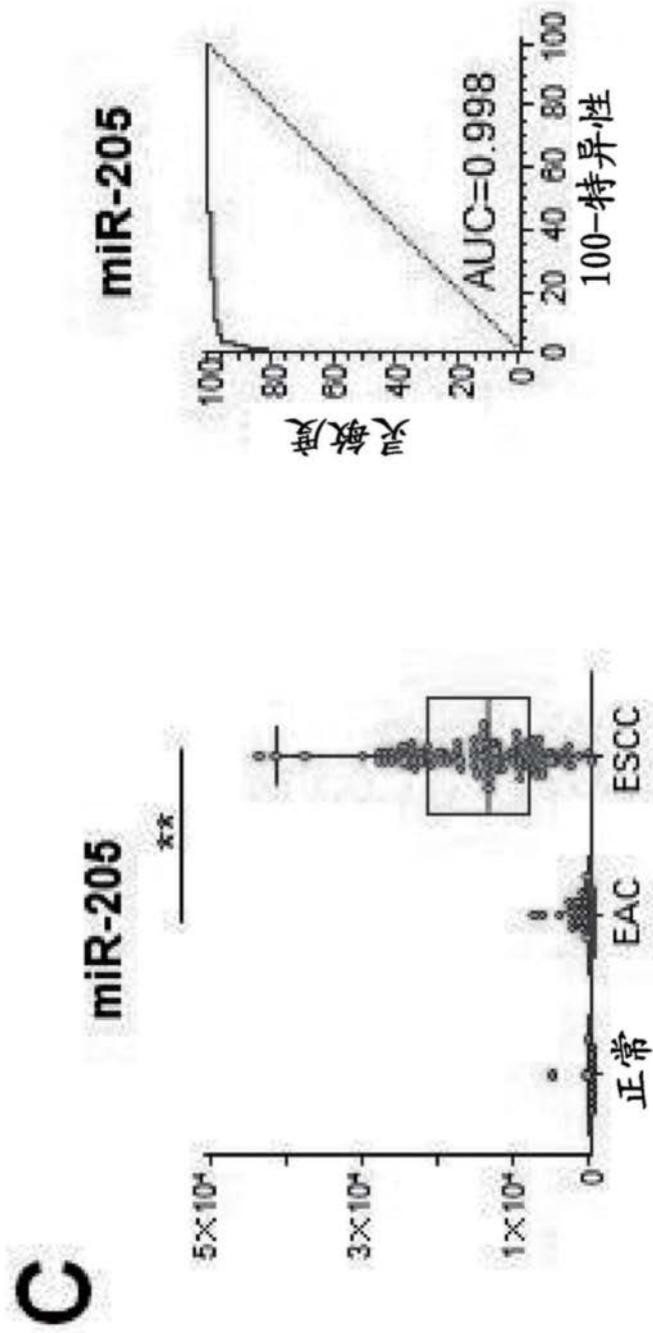


图7C

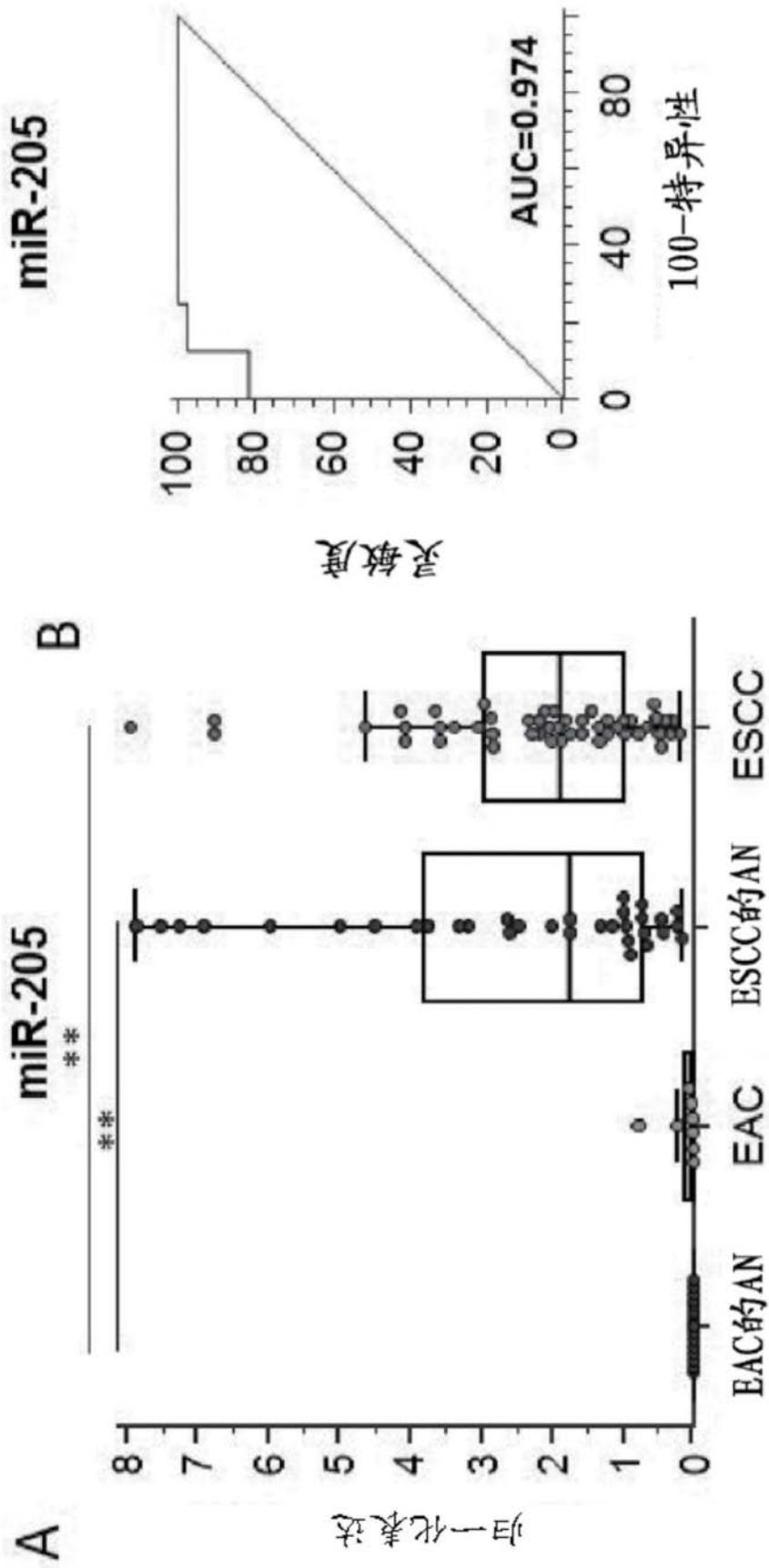


图8A-B

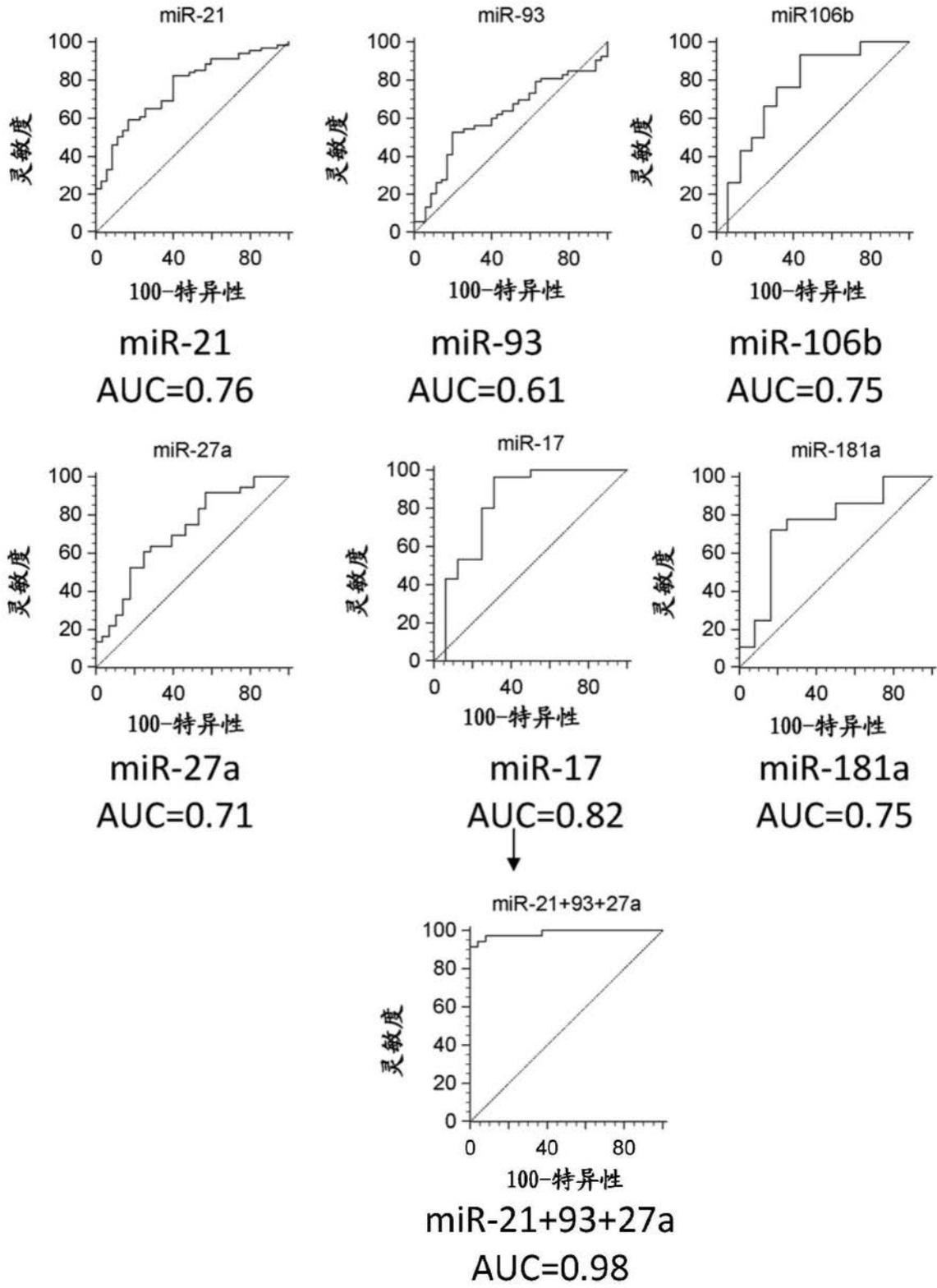


图9

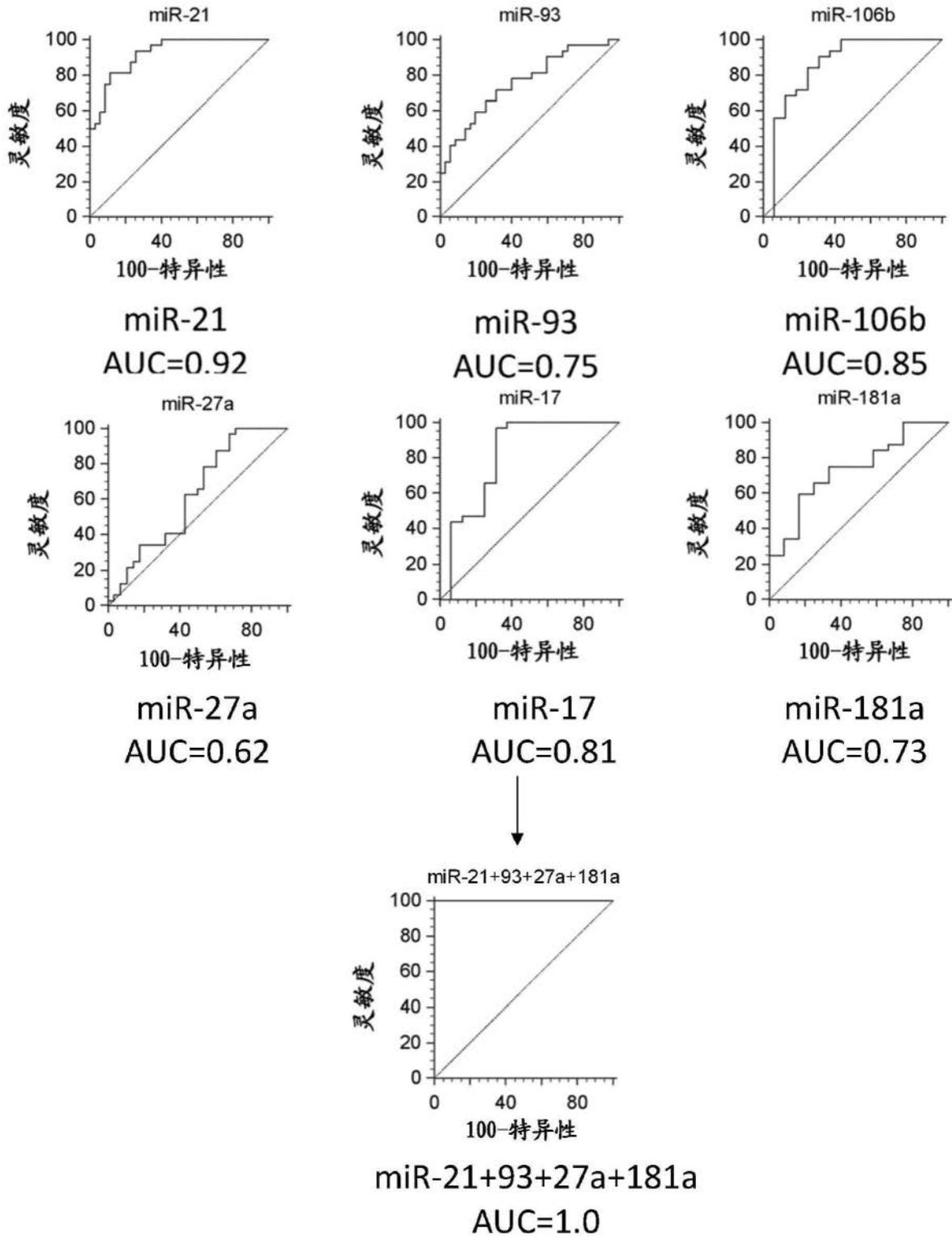


图10

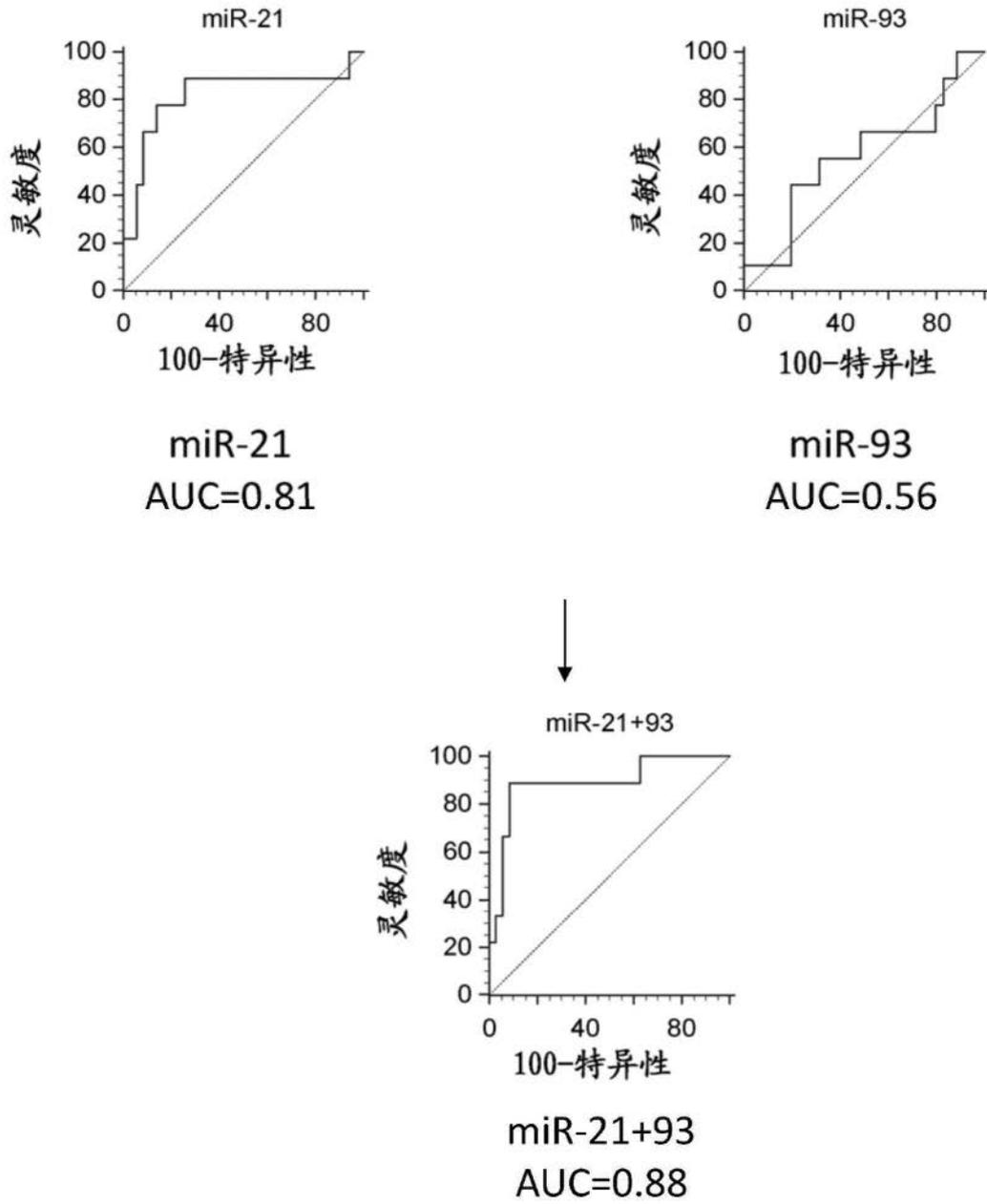


图11

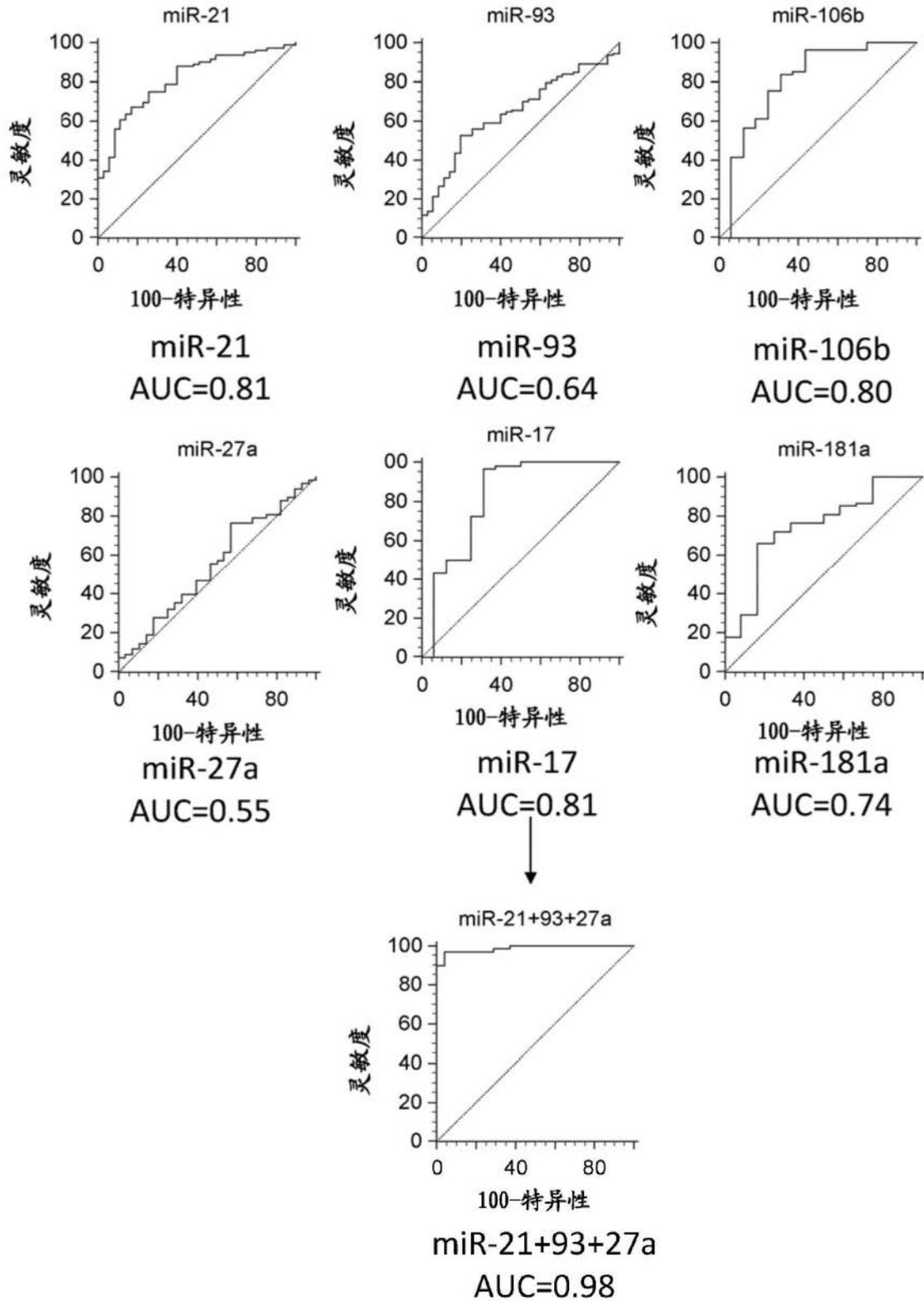


图12

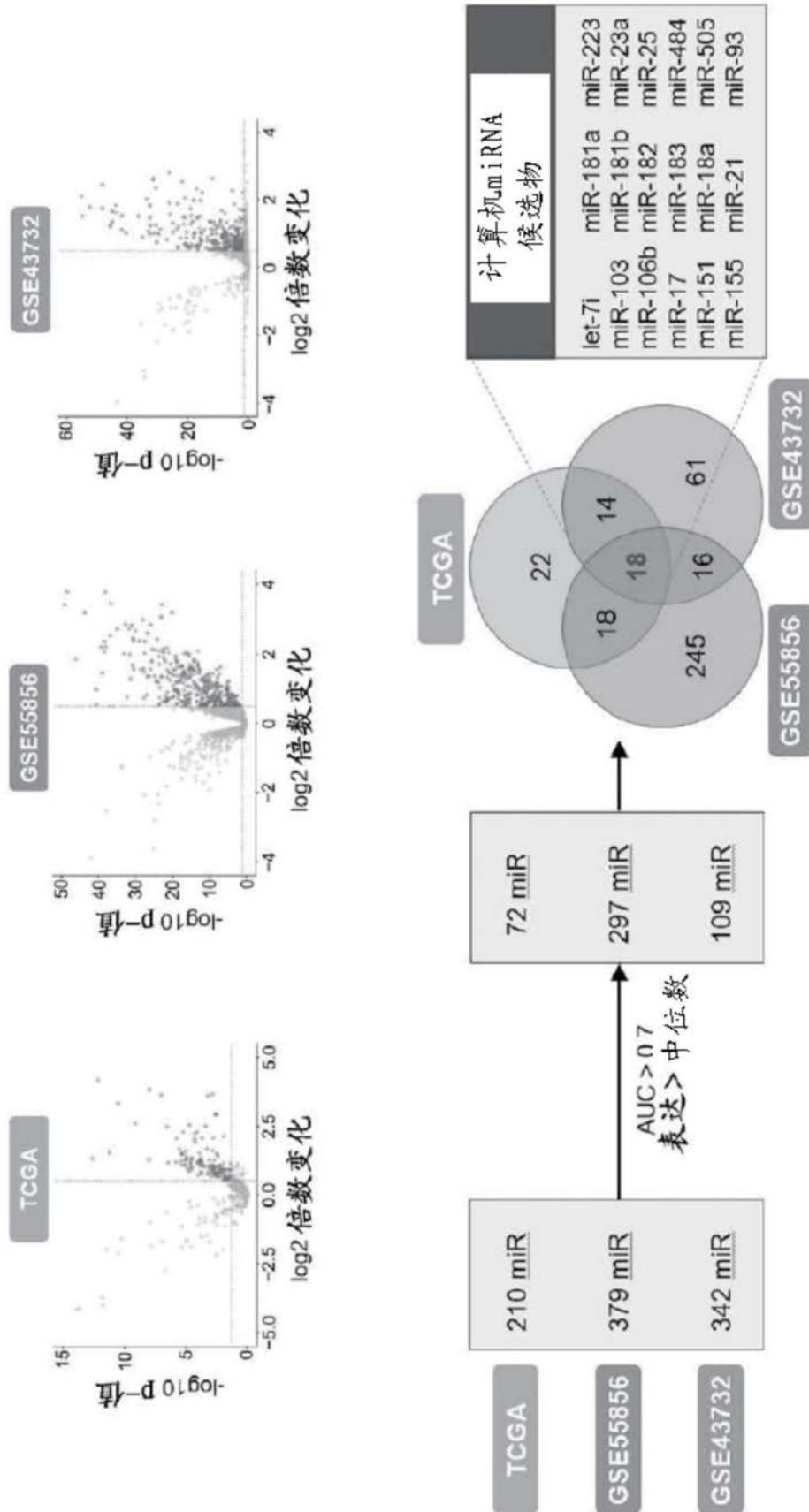


图13A

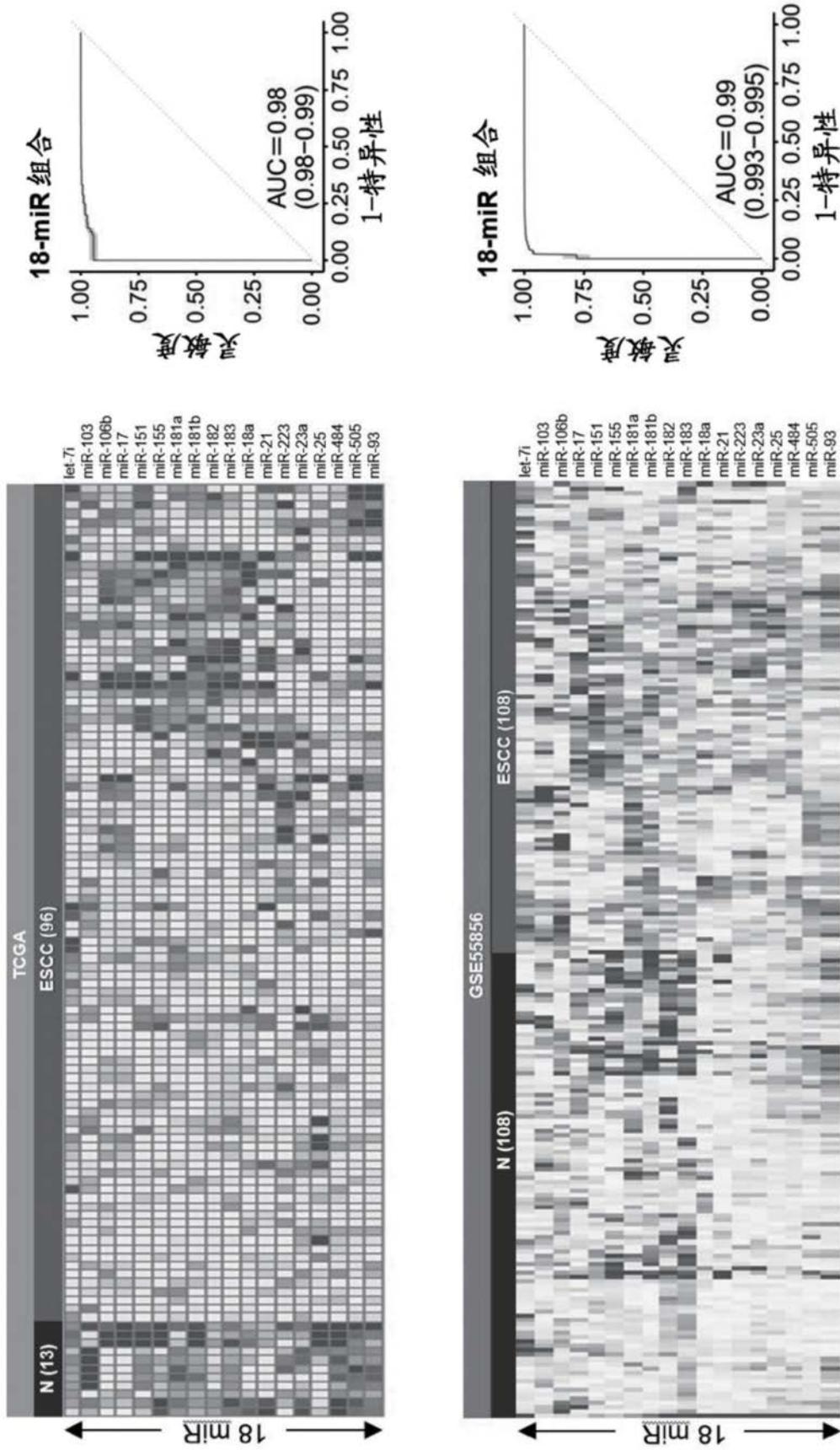


图13B



图13B(续)

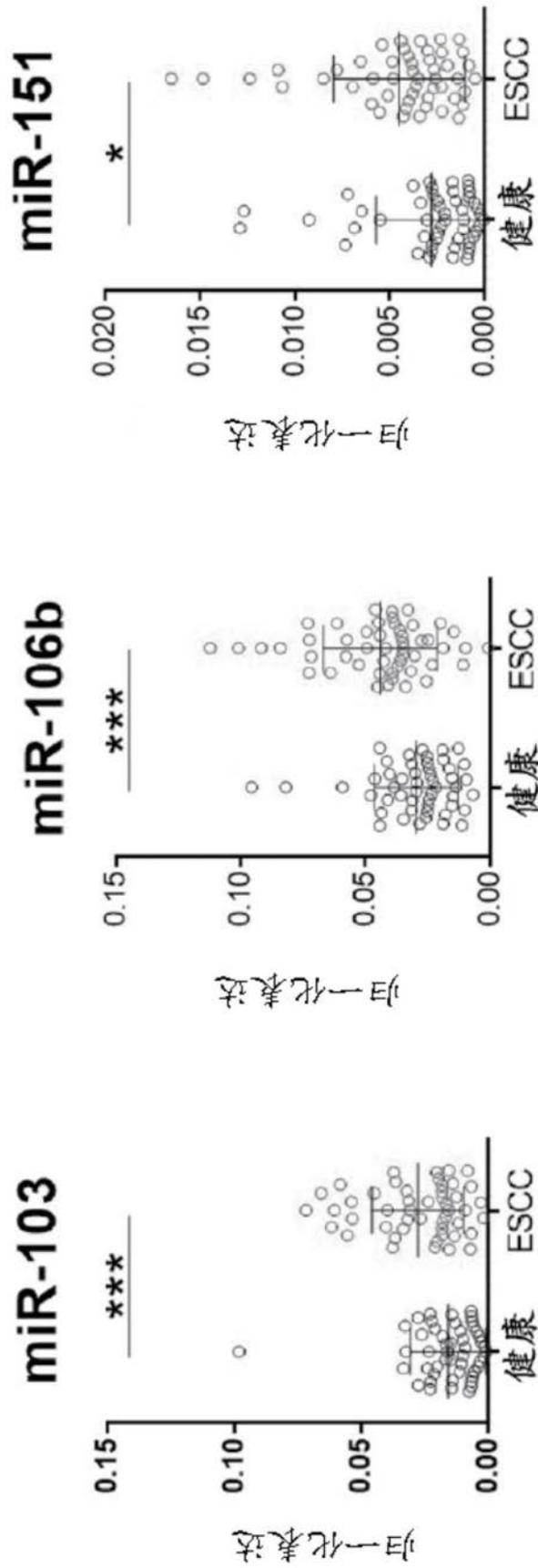


图14

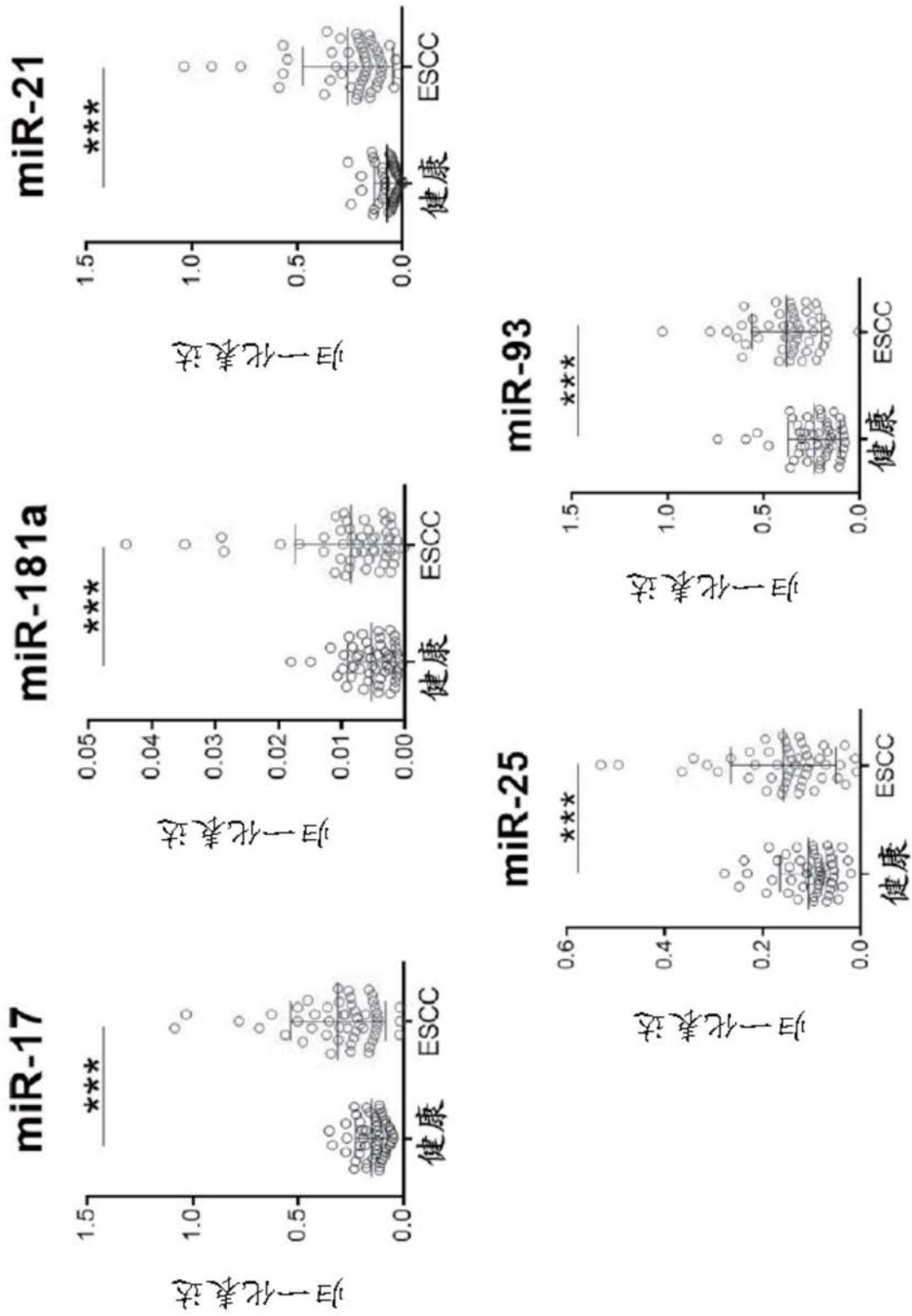
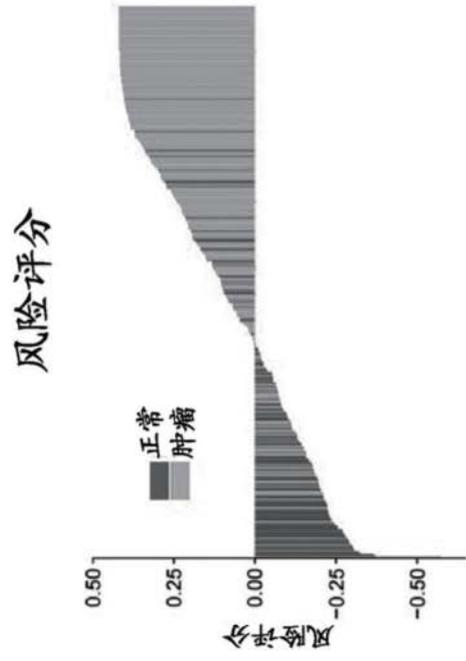
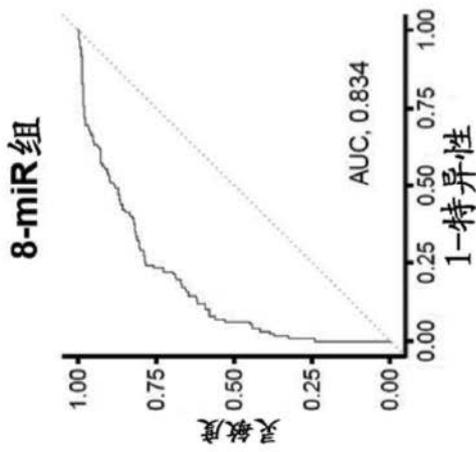


图14(续)

A 训练群组



B 验证群组1

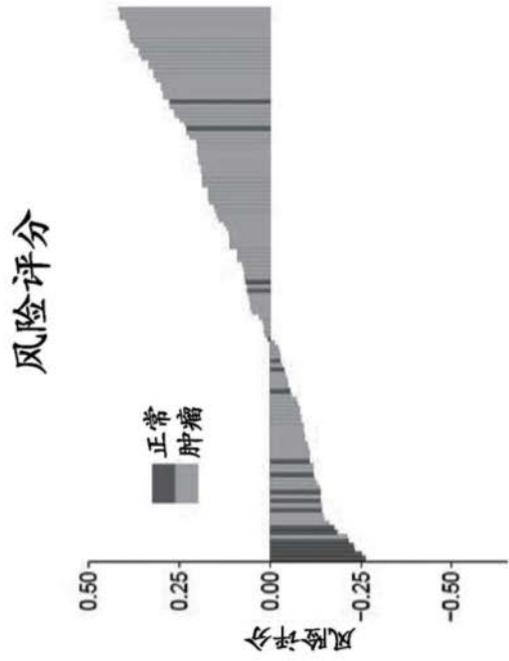
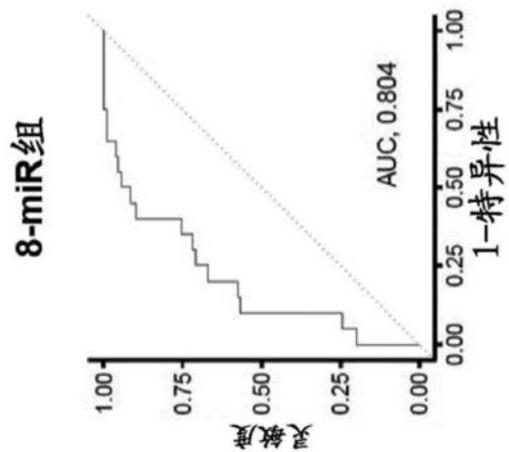


图15A-B

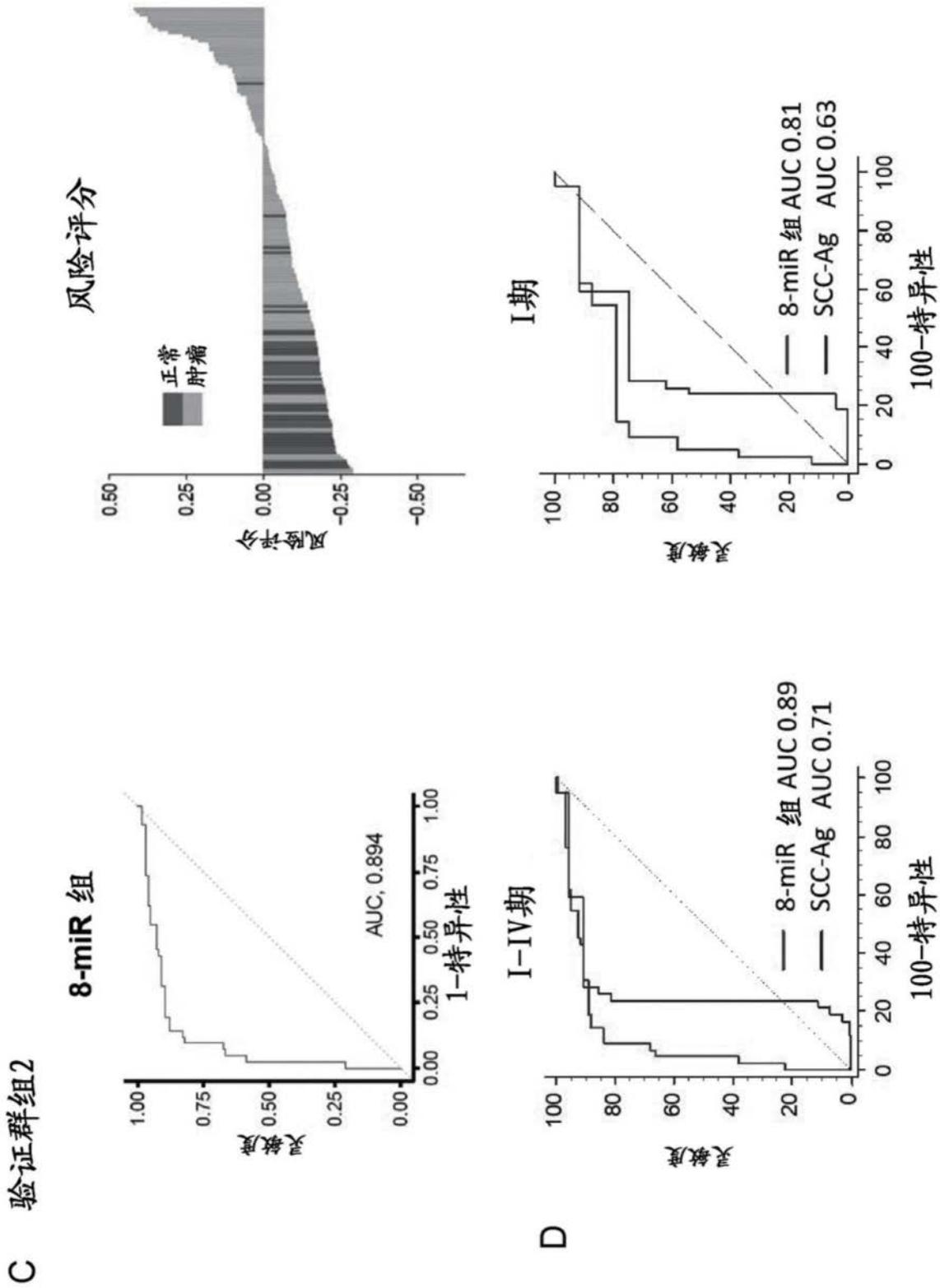


图15C-D

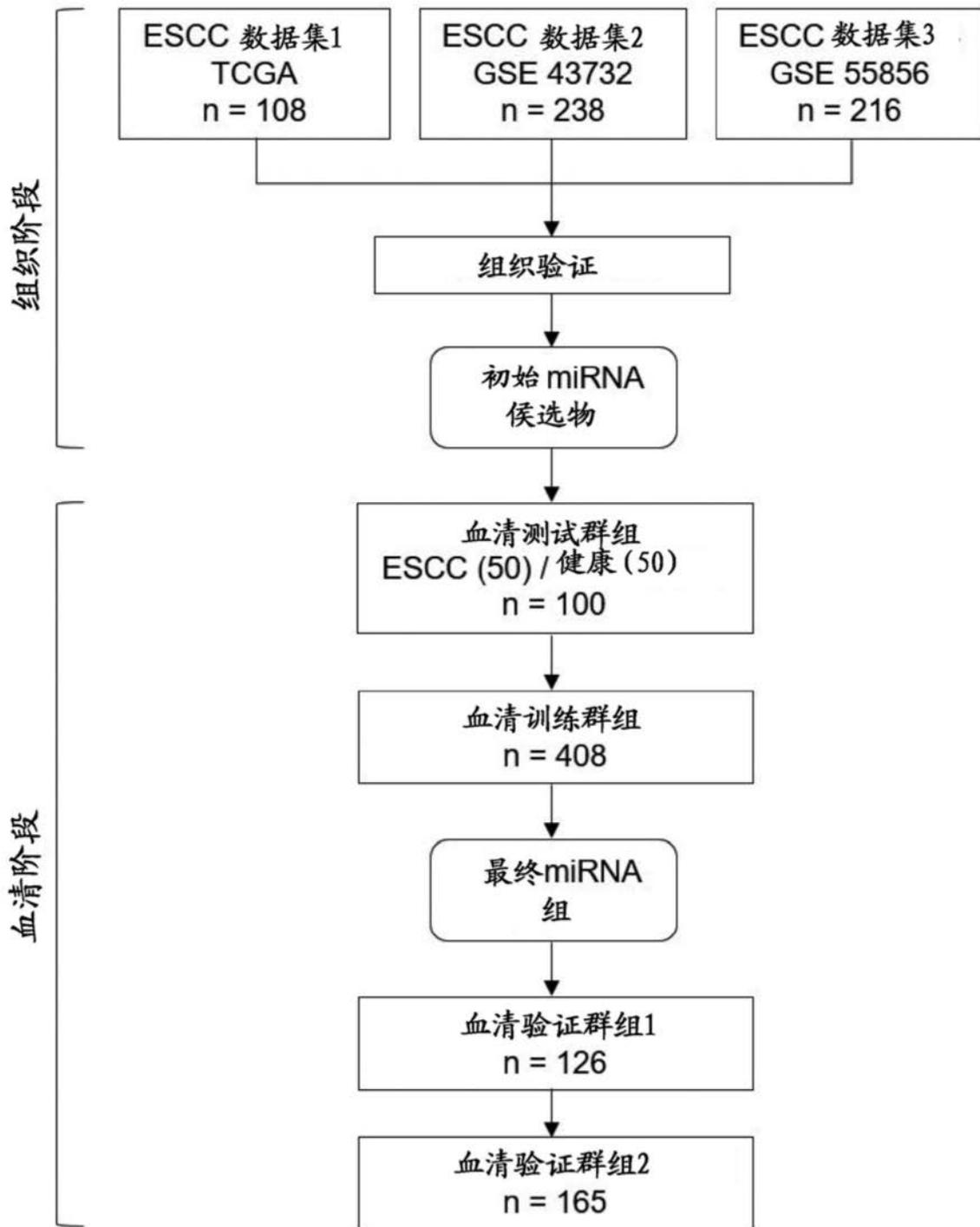


图16

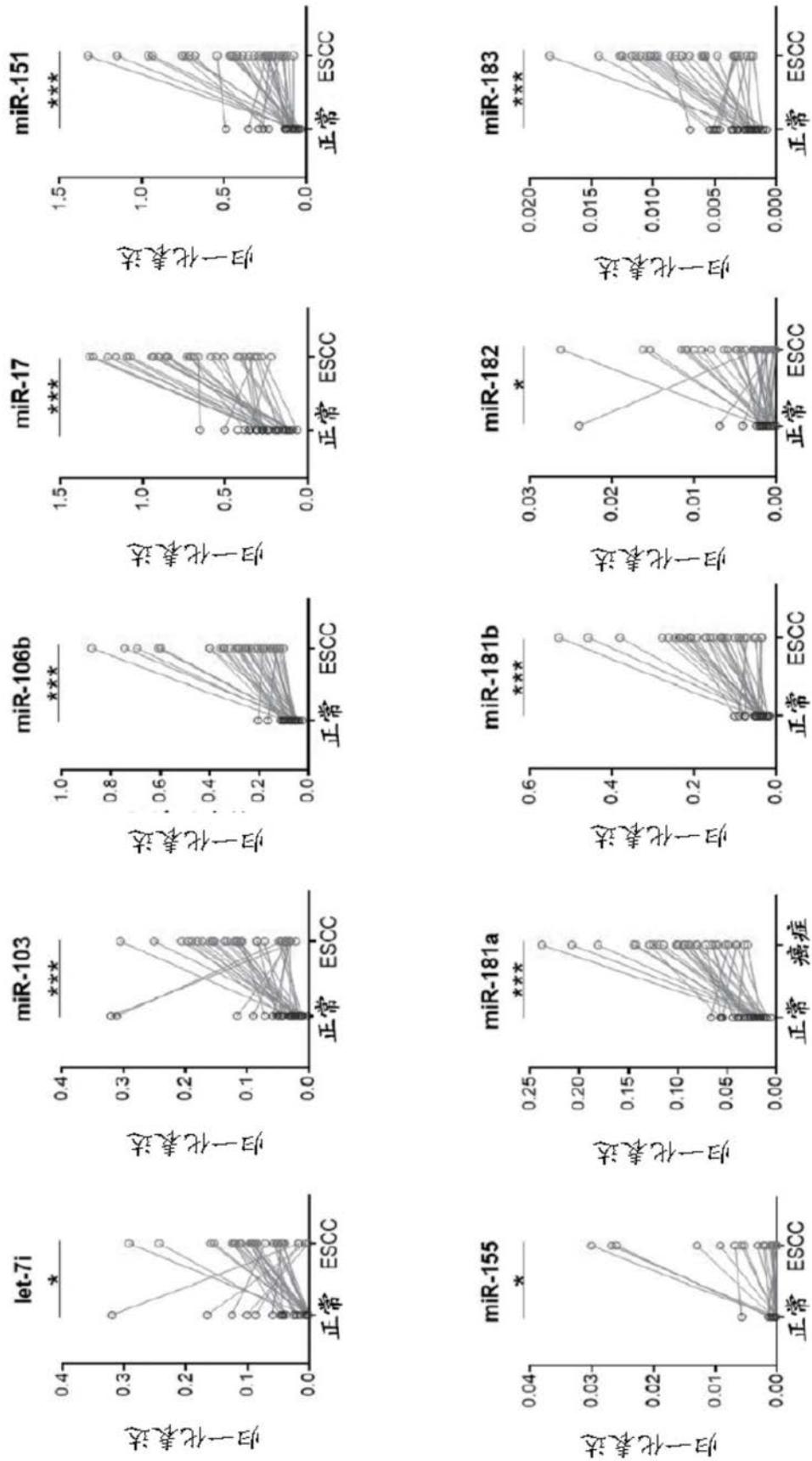


图17

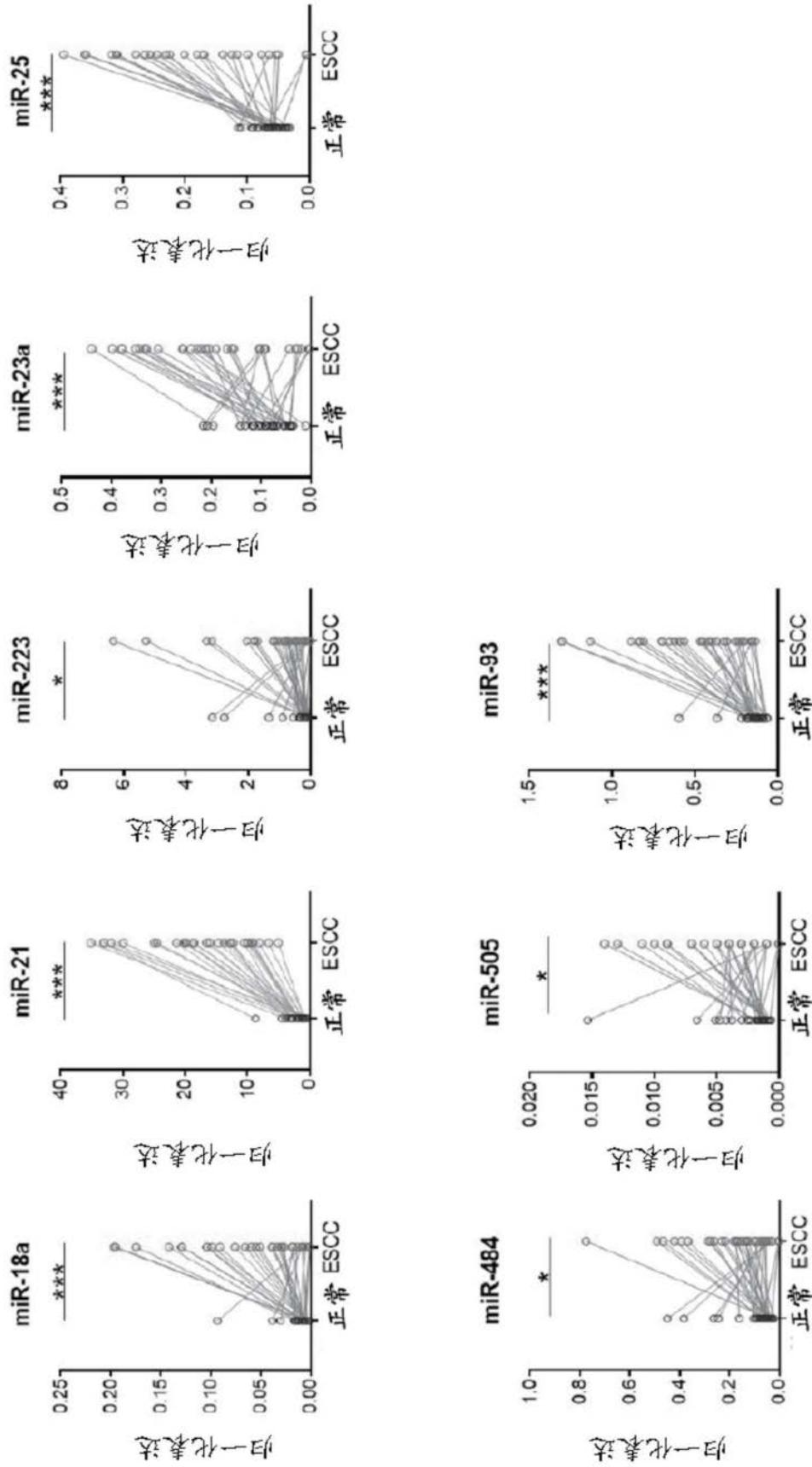


图17(续)