

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102636648 A

(43) 申请公布日 2012. 08. 15

(21) 申请号 201110228346. 3

(22) 申请日 2011. 08. 10

(30) 优先权数据

61/442192 2011. 02. 12 US

(71) 申请人 贝勒研究院

地址 美国德克萨斯

(72) 发明人 A·古勒 C·R·伯兰德 儿井稔

高桥雅信

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理

有限公司 11280

代理人 刘丹妮

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

权利要求书 4 页 说明书 19 页 附图 6 页

(54) 发明名称

MSH3 的表达状态决定癌细胞对使用 PARP 抑制剂和铂药物的化学疗法治疗的响应性

(57) 摘要

本文公开了治疗具有患结肠直肠癌的风险或者诊断患有结肠直肠癌的患者的方法。本发明的方法确定了来自患者的怀疑为结肠直肠癌细胞的细胞中的 MSH3 的总体表达水平,并预测使用有基因毒性的抗肿瘤剂治疗患者的疗效,其中与正常的结肠直肠癌细胞中 MSH3 的表达相比,在患者的细胞中 MSH3 的总体表达水平的下降表明对基因毒性抗肿瘤剂治疗的响应性的倾向性,其中该治疗包括将有效量的基因毒性抗肿瘤剂治疗给予患者。

1. 一种用于预测具有患一种或多种腺癌的风险,或者诊断患有的一种或多种腺癌的治疗方案的方法,所述方法包括:

测定得自患者的怀疑为腺癌细胞的细胞中的 MSH3 的总体表达;并且

根据在患者细胞中 MSH3 的总体表达的测定,预测使用用于治疗患者的抗肿瘤剂的治疗方案的效果,其中与正常细胞中 MSH3 的表达相比,在患者的细胞中 MSH3 的总体表达的减少表明对抗肿瘤剂治疗的响应性的倾向,其中所述的治疗包括将有效量的抗肿瘤剂给予患者。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述的腺癌包括实体瘤,所述的实体瘤选自结肠直肠癌(CRC)、肺癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、肝癌、睾丸癌、膀胱癌、阴道癌、乳腺癌、食道癌、胰腺癌和胃癌。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述的腺癌是 CRC。

4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述的测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑为腺癌细胞的细胞的 MSH3 蛋白表达,MSH3 核酸表达或者 MSH3 蛋白表达和 MSH3 核酸表达两者都分析。

5. 权利要求 1 所述的方法,其中所述的测定得自个体的 MSH3 核酸或者一部分的 MSH3 核酸中的 MSH3 的总体表达水平的步骤包括进行质谱分析,滚环扩增,免疫组织化学分析,使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交,或者其任意的组合或者修改。

6. 权利要求 1 所述的方法,其中所述的抗肿瘤剂选自 1,3-二(2-氯乙基)-1-亚硝基脲、白消安、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、达卡巴嗪、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、依托泊苷、去甲氧柔红霉素、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、马法兰、丝裂霉素 C、米托蒽醌、替莫唑胺、托泊替康、和电离辐射。

7. 权利要求 1 所述的方法,其中所述的抗肿瘤剂是链间交联剂,所述链间交联剂选自顺铂、卡铂、奥沙利铂、呋喃香豆素或补骨脂素。

8. 权利要求 1 所述的方法,其中所述的抗肿瘤剂是聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂,所述的聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂选自奥拉帕尼、异吲哚酮的衍生物、veliparib、iniparib 和 4-甲氧基-咪唑的衍生物。

9. 一种用于治疗具有患结肠直肠癌的风险或者诊断患有结肠直肠癌的方法,所述的方法包括:

测定得自患者的怀疑为结肠直肠癌细胞的细胞中的 MSH3 的总体表达;并且

根据在患者细胞中 MSH3 的总体表达的测定,预测使用用于治疗患者的抗肿瘤剂的治疗方案的效果,其中与正常结肠直肠癌细胞中的 MSH3 的表达相比,在患者的细胞中 MSH3 的总体表达的减少表明对抗肿瘤剂治疗的响应性的倾向,其中所述的治疗包括将有效量的抗肿瘤剂治疗给予患者。

10. 权利要求 9 所述的方法,其中所述的测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑为腺癌细胞的细胞的 MSH3 蛋白表达,MSH3 核酸表达或者 MSH3 蛋白表达和 MSH3 核酸表达两者都分析。

11. 权利要求 9 所述的方法,其中所述的从得自个体的 MSH3 核酸或者一部分的 MSH3 核酸测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括进行质谱分析,滚环扩增,免疫组织化学分析,

使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交,或者其任意的组合或者修改。

12. 权利要求 9 所述的方法,其中所述的抗肿瘤剂选自 1,3-二(2-氯乙基)-1-亚硝基脲、白消安、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、达卡巴嗪、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、依托泊苷、去甲氧柔红霉素、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、马法兰、丝裂霉素 C、米托蒽醌、替莫唑胺、托泊替康、和电离辐射。

13. 权利要求 9 所述的方法,其中所述的抗肿瘤剂是链间交联剂,所述链间交联剂选自顺铂、卡铂、奥沙利铂、呋喃香豆素或补骨脂素。

14. 权利要求 9 所述的方法,其中所述的抗肿瘤剂是聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂,所述的聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂选自奥拉帕尼、异吲哚酮的衍生物、veliparib、iniparib 和 4-甲氧基-咪唑的衍生物。

15. 一种为具有患结肠直肠癌风险或者诊断患有结肠直肠癌的患者选择癌症治疗的方法,所述的方法包括:

测定患者的 MSH3 的总体表达水平,并且预测使用用于治疗患者的抗肿瘤剂治疗的疗效,其中 MSH3 的总体表达的减少表明 DNA 交联剂对于患者而言是适合的治疗。

16. 权利要求 15 所述的方法,其中所述的测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑是腺癌细胞的细胞的 MSH3 蛋白表达、MSH3 核酸表达或者 MSH3 蛋白表达和 MSH3 核酸表达两者都分析。

17. 权利要求 15 所述的方法,其中所述的从得自个体的 MSH3 核酸或者一部分的 MSH3 核酸测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括进行质谱分析,滚环扩增,免疫组织化学分析,使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交,或者其任意的组合或者修改。

18. 权利要求 15 所述的方法,其中所述的抗肿瘤剂选自 1,3-二(2-氯乙基)-1-亚硝基脲、白消安、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、达卡巴嗪、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、依托泊苷、去甲氧柔红霉素、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、马法兰、丝裂霉素 C、米托蒽醌、替莫唑胺、托泊替康和电离辐射。

19. 权利要求 15 所述的方法,其中所述的抗肿瘤剂是链间交联剂,所述链间交联剂选自顺铂、卡铂、奥沙利铂、呋喃香豆素或补骨脂素。

20. 权利要求 15 所述的方法,其中所述的抗肿瘤剂是聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂,所述的聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂选自奥拉帕尼、异吲哚酮的衍生物、veliparib、iniparib 和 4-甲氧基-咪唑的衍生物。

21. 一种用于将患者分类到癌症治疗的临床试验的亚组中的方法,所述的方法包括步骤:

测定得自患者的怀疑为癌细胞的细胞中的 MSH3 的总体表达;并且

预测使用用于治疗患者的候选药物治疗的疗效,其中与正常细胞中的 MSH3 的表达相比,患者细胞中的 MSH3 的总体表达的减少表明对使用该候选药物治疗响应性的倾向,其中所述的治疗包括将有效量的候选药物给予患者,并且 MSH3 的表达水平使得患者能分类到临床试验的亚组中。

22. 权利要求 21 所述的方法,其中所述的癌细胞是位于实体瘤内的,并且选自结肠直

肠癌 (CRC)、肺癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、肝癌、睾丸癌、膀胱癌、阴道癌、乳腺癌、食道癌、胰腺癌和胃癌。

23. 权利要求 21 所述的方法,其中所述的癌细胞是结肠直肠癌细胞。

24. 权利要求 21 所述的方法,其中所述的测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑是腺癌细胞的细胞的 MSH3 蛋白表达、MSH3 核酸表达或者 MSH3 蛋白表达和 MSH3 核酸表达两者都分析。

25. 权利要求 21 所述的方法,其中所述的测定得自个体的 MSH3 核酸或者一部分的 MSH3 核酸中的 MSH3 的总体表达水平的步骤包括进行质谱分析,滚环扩增,免疫组织化学分析,使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交,或者其任意的组合或者修改。

26. 权利要求 21 所述的方法,其中所述的候选药物是基因毒性剂。

27. 权利要求 21 所述的方法,其中所述的候选药物是聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 抑制剂。

28. 一种用于将患者分类到结肠直肠癌的亚组中的方法,所述的方法包括步骤:

测定得自患者的怀疑为结肠直肠癌细胞的细胞中的 MSH3 的总体表达;并且

预测结肠直肠癌的阶段,其基于与正常的结肠直肠癌细胞中的 MSH3 的表达相比,在患者的细胞中的 MSH3 的总体表达的变化。

29. 一种用于治疗具有患结肠直肠癌的风险或者诊断患有结肠直肠癌的患者的方法,所述的方法包括:

测定得自患者的怀疑为结肠直肠癌细胞的细胞中 MSH3 的总体表达,其中 MSH3 的总体表达的变化表明了对于采用一种或者多种 DNA 交联剂治疗的响应性的倾向;

给予治疗上有效量的 DNA 交联剂,所述的 DNA 交联剂的量足以减少结肠直肠癌细胞中的 MSH3 表达;并且

测定在患者中 MSH3 的总体表达的持续降低。

30. 一种用于进行临床试验从而评估候选药物的方法,所述的候选药物据相信在治疗与 MSH3 基因表达有关的疾病状态中 useful,该方法包括:

a) 测定来自一组患者的怀疑具有结肠直肠癌的组织中的 MSH3 表达的水平;

b) 将候选药物给予第一亚组的患者,并将安慰剂给予第二亚组的患者;

c) 在给予候选药物或者安慰剂之后,重复步骤 a);并且

d) 测定所述的候选药物是否减少了结肠直肠癌的细胞的数目,所述的细胞具有降低的 MSH3 表达,该降低与第二个亚组的患者中所发生的任何降低相比具有统计学上的显著性,其中统计学上的显著性降低表明所述的候选药物在治疗所述的疾病状态中是有用的。

31. 一种用于确定哺乳动物的结肠直肠癌对于 DNA 损伤剂是否很可能具有抗性或者是有响应的方法,所述的 DNA 损伤剂用于结肠直肠癌的治疗,该方法包括以下步骤:

检测来自所述癌症的生物样品中 MSH3 的总体表达的下降;并且

将所述的结肠癌鉴定为对该 DNA 损伤剂有反应或者具有增强的敏感性,其中在生物样品中降低的 MSH3 的表达或者活性是对 DNA 损伤剂的指示或者响应。

32. 一种用于结肠直肠癌疾病进展的生物标记物,其中所述的生物标记物是 MSH3,并且与正常的结肠直肠癌细胞,或者在更早的时间点上得自同一患者的结肠直肠癌细胞中的

MSH3 表达相比,从患者中得到的结肠直肠癌细胞中 MSH3 的总体表达的减少意味着结肠直肠癌疾病的进展。

33. 权利要求 32 所述的生物标记物,其中测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑为腺癌细胞的细胞的 MSH3 蛋白表达、MSH3 核酸表达或者 MSH3 蛋白表达和 MSH3 核酸表达两者都分析。

34. 权利要求 32 所述的生物标记物,其中测定得自个体的 MSH3 核酸或者一部分的 MSH3 核酸中的 MSH3 的总体表达水平的步骤包括进行质谱分析,滚环扩增,免疫组织化学分析,使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交,或者其任意的组合或者修改。

35. 一种用于诊断结肠直肠癌的试剂盒,所述的试剂盒包括用于测定 MSH3 的差异表达水平的生物标记物检测剂和针对其在诊断结肠直肠癌风险中的应用的说明。

36. 权利要求 35 所述的试剂盒,其中在来自具有患结肠直肠癌风险的患者的样品中,MSH3mRNA 和蛋白质表达水平与正常受试者相比均显著地降低。

37. 一种用于诊断或者检测人类受试者的结肠直肠癌进展的方法,该方法包括以下步骤:

鉴定怀疑患有结肠直肠癌的人类受试者;

从该受试者得到一个或多个的生物样品,其中所述的生物样品选自组织样品、粪便样品、细胞匀浆物和所包含的一种或更多种生物流体;

测定来自受试者的生物样品中的一个或者多个细胞中的 MSH3 的总体表达特征;并且

将来自怀疑患有结肠直肠癌的受试者的生物样品中的 MSH3 的总体表达特征与来自正常的受试者的生物样品的 MSH3 的总体表达特征进行比较,其中所述正常的受试者是未患有结肠直肠癌的健康受试者,其中在受试者的生物样品中,MSH3 的总体表达特征的下降意味着存在结肠直肠癌、具有发生结肠直肠癌的风险或者存在结肠直肠癌和具有发生结肠直肠癌的风险。

38. 权利要求 37 所述的方法,其中所述的测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑为腺癌细胞的细胞的 MSH3 蛋白表达、MSH3mRNA 核酸表达或者 MSH3 蛋白表达和 MSH3mRNA 核酸表达两者都分析。

39. 权利要求 37 所述的方法,其中 MSH3mRNA、MSH3 蛋白质或者 MSH3mRNA 和 MSH3 蛋白质两者的表达水平的显著降低说明存在侵袭性结肠直肠癌、具有发生侵袭性结肠直肠癌的风险或者存在侵袭性结肠直肠癌和具有发生侵袭性结肠直肠癌的风险。

40. 权利要求 37 所述的方法,其中所述的测定得自个体的 MSH3 核酸或者一部分的 MSH3 核酸中的 MSH3 的总体表达水平的步骤包括进行质谱分析,滚环扩增,免疫组织化学分析,使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交,或者其任意的组合或者修改。

41. 权利要求 37 所述的方法,其中所述的方法用于治疗存在患结肠直肠癌的风险或者患有结肠直肠癌的患者,用于选择用于存在患结肠直肠癌的风险或者患有结肠直肠癌的患者的 DNA 交联剂治疗,用于将患者分类到结肠直肠癌的亚组中或者用于结肠直肠癌治疗临床试验,用于确定针对结肠直肠癌治疗方案的抗性或者响应性,用于开发用于诊断结肠直肠癌的试剂盒,或者其任意的组合。

MSH3 的表达状态决定癌细胞对使用 PARP 抑制剂和铂药物的化学疗法治疗的响应性

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及癌症的检测、诊断和治疗领域,并且更具体地涉及结肠直肠癌细胞对于 DNA 损伤剂的敏感性。

背景技术

[0002] 在不限制本发明的范围的前提下,其背景结合用于结肠和胃肠癌症检测的生物标记物进行描述。

[0003] 授权给 Pant 等人的第 7,252,955 号美国专利公开了用于结肠癌筛查的免疫检测和试剂盒。从保持了免疫原性的单个样品中提取了粪便糖蛋白。将经纯化的粪便糖蛋白与结肠和卵巢肿瘤抗原 (COTA) 的抗体进行反应。黏液素抗原 COTA 特异性地存在于结肠直肠的癌组织中,而不存在于正常的结肠中。测定粪便样品中的 COTA 的含量,并且该含量用于指示结肠癌的存在与否。

[0004] 授权给 Liu 等人的第 7,575,928 号美国专利公开了用于诊断结肠直肠癌的基因。简单地说,本发明通过以下的步骤搜索基因序列,提供了用于诊断结肠直肠癌的基因:(1) 从正常的肠、肠息肉和结肠直肠的癌组织中得到上皮细胞;(2) 通过高度差异基因表达收集基因并且建立文库,所述的高度差异基因表达通过抑制消减杂交 (SSH) 进行;(3) 从癌组织中得到具有相对高的信号强度的群落;(4) 通过 RNA 印迹杂交 (Northern Hybridization) 收集更多的癌组织,通过实时聚合酶链式反应 (PCT) 结合生物信息学的分析确认差异基因表达之间的变化;并且 (5) 从所述的文库中选择最适用的基因,并且将所述的基因序列用作试剂提供早期诊断,专一性、高度敏感性及安全性的效果。

[0005] 授权给 Robbins 等人的第 7,022,472 号美国专利公开了在诊断结肠直肠癌中 useful 的人类 MLH1 和人类 MSH2 基因的突变。也提供了简单地说,发现人类 MLH1 和 MSH2 基因的变体可以用于诊断遗传性非息肉病性结肠直肠癌 (HNPCC) 和/或测定患者对于发生 HNPCC 的易感性。还提供了用于鉴定 MSH2 基因的新变体 MLH1 的方法和组合物。除此之外,提供了包含这些变体基因的遗传性非息肉病性结肠直肠癌的试验模型。

[0006] 最终,由 Baker 等人递交的第 20090305277 号美国专利公开描述了基于确定至少一个基因的表达水平,预测被诊断患有癌症的人类患者的可能性的方法,所述的基因选自 AURKB、Axin 2、B1K、BRAF、BRCA2、BUB1、C20 orf1、C20ORF126、CASP9、CCNE2 变体 1、CDC2、CDC4、CENPA、CENPF、CLIC1、CYR61、Cdx2、Chk1、DLC1、DUSP1、E2F1、EGR3、E124、ESPL1、FBX05、FGF2、FOS、FUT6、GSK3B、Grb10、HES6、HLA-G、HNRPA、HOXB13、HSPE1、KIF22、KIF1C、KLRK1、Ki-67、LAT、LMYC、MAD2L1、MSH2、MSH3、NR4A1、PDGFA、PRDX2、RAB32、RAD54L、RANBP2、RCC1、ROCK2、RhoB、S100P、SAT、SOD1、SOS1、STK15、TCF-1、TOP2A、TP53BP1、UBE2C、VCP 和 cMYC,或者其相应的表达,其中一个或者多个上述基因的表达增加与对化学治疗的阳性响应的可能性增加呈正相关。

发明内容

[0007] 关于 MSH3 的表达水平在评价预后和 / 或预测结肠直肠癌的癌细胞对化疗的响应性方面, 本发明人在此证明了与之前的发现具有显著的和新的区别。

[0008] 在一个实施方案中, 本发明提供了治疗存在患一种或多种腺癌的风险, 或者诊断患有患一种或多种腺癌的患者, 所述的方法包括: 在得自患者的怀疑为腺癌细胞的细胞内测定 MSH3 的总体表达, 并且预测使用用于治疗患者的抗肿瘤剂治疗的疗效, 其中与正常细胞中的 MSH3 的表达相比, 在患者的细胞中 MSH3 的总体表达的减少表明对抗肿瘤剂治疗的响应性的倾向, 其中所述的治疗包括将有效量的抗肿瘤剂给予患者。在上文中所描述的腺癌选自结直肠癌 (CRC)、肺癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、肝癌、睾丸癌、膀胱癌、阴道癌、乳腺癌、食道癌、胰腺癌和胃癌。在更具体的方面, 所述的腺癌是 CRC 并且所述的腺癌包括实体瘤。

[0009] 在另一个方面, 测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑是腺癌细胞的细胞的 MSH3 蛋白表达、MSH3 核酸表达或者 MSH3 蛋白表达和 MSH3 核酸表达两者都分析。在另一个方面, 测定 MSH3 总体表达水平的步骤包括将得自个体的 MSH3 核酸进行质谱分析。在再一个方面, 测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括将从个体得到的 MSH3 核酸的一部分进行滚环扩增。在另一个方面, 测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括将使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交。在另一个方面, 测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括免疫组织化学。

[0010] 在相关的方面, 所述的抗肿瘤剂选自 1,3-二(2-氯乙基)-1-亚硝基脒、白消安、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、达卡巴嗪、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、依托泊苷、去甲氧柔红霉素、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、马法兰、丝裂霉素 C、米托蒽醌、替莫唑胺、托泊替康、和电离辐射。在一个方面, 所述的抗肿瘤剂是链间交联剂。在另一个方面, 所述的抗肿瘤剂是选自顺铂、卡铂、奥沙利铂、呋喃香豆素或补骨脂素的链间交联剂。在再一个方面, 所述的抗肿瘤剂是聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 抑制剂, 该抑制剂选自奥拉帕尼 (olaparib)、异吡啶酮的衍生物、veliparib、iniparib 和 4-甲氧基-咪唑的衍生物。

[0011] 本发明的另一个实施方案提供了治疗具有腺癌的风险或者诊断患有腺癌的患者, 所述的方法包括: (1) 在得自患者的怀疑为腺癌细胞的细胞中, 测定 MSH3 的总体表达; 并且 (2) 预测使用用于治疗患者的抗肿瘤剂治疗的疗效, 其中与正常细胞中的 MSH3 的表达相比, 在患者的细胞中 MSH3 的总体表达的减少表明对抗肿瘤剂治疗的响应性的倾向, 其中所述的治疗包括将有效量的抗肿瘤剂给予患者。在一个方面, 所述的腺癌选自结直肠癌 (CRC)、肺癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、肝癌、睾丸癌、膀胱癌、阴道癌、乳腺癌、食道癌、胰腺癌和胃癌。在另一个方面, 所述的腺癌是 CRC。在再一个方面, 所述的腺癌包括实体瘤。

[0012] 如前文所述的测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑为腺癌细胞的细胞的 MSH3 蛋白表达, MSH3 核酸表达或者 MSH3 蛋白表达和 MSH3 核酸表达两者都分析。在一个方面, 所述测定 MSH3 总体表达水平的步骤包括将得自个体的 MSH3 核酸进行质谱分析。在另一个方面, 测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括将从个体得到的 MSH3 核酸的一部分进行滚环扩增。在再一个方面, 测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括使用等位基因特异性探

针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交。在另一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括免疫组织化学。

[0013] 在一个方面,所述的抗肿瘤剂选自 1,3-二(2-氯乙基)-1-亚硝基脒、白消安、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、达卡巴嗪、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、依托泊苷、去甲氧柔红霉素、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、马法兰、丝裂霉素 C、米托蒽醌、替莫唑胺、托泊替康、和电离辐射。在另一个方面,所述的抗肿瘤剂是链间交联剂。在另一个方面,所述的抗肿瘤剂是选自顺铂、卡铂、奥沙利铂、呋喃香豆素或补骨脂素的链间交联剂。在再一个方面,所述的抗肿瘤剂是聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂,该抑制剂选自奥拉帕尼、异吡啶酮的衍生物、veliparib、iniparib 和 4-甲氧基-咪唑的衍生物。

[0014] 在再一个实施方案中,本发明公开了治疗具有结肠直肠癌的风险或者诊断患有结肠直肠癌的方法,所述的方法包括:在得自患者的怀疑为结肠直肠癌细胞的细胞内测定 MSH3 的总体表达,并且预测使用用于治疗患者的抗肿瘤剂治疗的疗效,其中与正常结肠直肠癌细胞中的 MSH3 的表达相比,在患者的细胞中 MSH3 的总体表达的减少表明对抗肿瘤剂治疗的响应性的倾向,其中所述的治疗包括将有效量的抗肿瘤剂治疗给予患者。

[0015] 在一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑是结肠直肠癌的组织样品的 MSH3 蛋白表达。在另一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑是结肠直肠癌的组织样品的 MSH3 核酸表达。在再一个方面,测定 MSH3 总体表达水平的步骤包括将得自个体的 MSH3 核酸进行质谱分析。在再一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括将从个体得到的 MSH3 核酸的一部分进行滚环扩增。在另一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交。在另一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括免疫组织化学。

[0016] 在一个方面,所述的抗肿瘤剂选自 1,3-二(2-氯乙基)-1-亚硝基脒、白消安、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、达卡巴嗪、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、依托泊苷、去甲氧柔红霉素、异环磷酰胺、伊立替康、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、马法兰、丝裂霉素 C、米托蒽醌、替莫唑胺、托泊替康、和电离辐射。在具体方面,所述的抗肿瘤剂是链间交联剂。在另一个方面,所述的抗肿瘤剂是选自顺铂、卡铂、奥沙利铂、呋喃香豆素或补骨脂素的链间交联剂。在再一个方面,所述的抗肿瘤剂是聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂,该抑制剂选自奥拉帕尼、异吡啶酮的衍生物、veliparib、iniparib 和 4-甲氧基-咪唑的衍生物。

[0017] 本发明进一步提供了为具有结肠直肠癌风险或者诊断患有结肠直肠癌的患者选择癌症治疗的方法,所述的方法包括测定患者的 MSH3 的总体表达水平,并且预测使用用于治疗患者的抗肿瘤剂治疗的疗效,其中 MSH3 的总体表达水平的降低表明 DNA 交联剂对于患者而言是适合的治疗。在一个方面中,测定 MSH3 总体表达水平的步骤包括分析怀疑是结肠直肠癌的组织样品的 MSH3 蛋白表达。在另一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑是结肠直肠癌的组织样品的 MSH3 核酸表达。在再一个方面,测定 MSH3 总体表达水平的步骤包括将得自个体的 MSH3 核酸进行质谱分析。在以上所描述的方法的又一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括将从个体得到的 MSH3 核酸的一部分进行滚环扩增。在所述方法的相关的方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交,或者免疫组织

化学法。在所述方法的一个具体的方面,所述的抗肿瘤剂是链间交联剂。在另一个方面,所述的抗肿瘤剂选自顺铂、卡铂、奥沙利铂、呋喃香豆素或补骨脂素的链间交联剂。在另一个方面,所述的抗肿瘤剂是聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂,该抑制剂选自奥拉帕尼、异吲哚酮的衍生物、veliparib、iniparib 和 4-甲氧基-咪唑的衍生物。

[0018] 本文公开的另一个实施方案涉及将患者分类到癌症治疗的临床试验的亚组中的方法,所述的方法包括:在得自患者的怀疑为癌细胞的细胞内测定 MSH3 的总体表达,并且预测使用用于治疗患者的候选药物治疗的疗效,其中与正常细胞中的 MSH3 的表达相比,在患者的细胞中 MSH3 的总体表达的减少表明对候选药物治疗的响应性的倾向,其中所述的治疗包括将有效量的候选药物给予患者,并且 MSH3 的表达水平使得能将患者分类到临床试验的亚组中。在一个方面,癌细胞选自结直肠癌(CRC)、肺癌、宫颈癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌、肝癌、睾丸癌、膀胱癌、阴道癌、乳腺癌、食道癌、胰腺癌和胃癌。在具体方面,所述的癌细胞是结直肠癌细胞并且所述的癌细胞位于实体瘤内。

[0019] 在所述方法的一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括分析怀疑是结肠直肠癌的组织样品的 MSH3 蛋白表达、MSH3 核酸表达或者 MSH3 蛋白表达和 MSH3 核酸表达都分析。在另一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括将得自个体的 MSH3 核酸进行质谱分析。在再一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括将从个体得到的 MSH3 核酸的一部分进行滚环扩增。在又一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括使用等位基因特异性探针或者抗体探针进行杂交。在另一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括免疫组织化学。在一个相关的方面,候选剂是基因毒性剂或者聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)抑制剂。

[0020] 在再一个实施方案中,本发明描述了通过包括以下步骤的方法将患者分类到结肠直肠癌的亚组中的步骤,所述的方法包括步骤:在得自患者的怀疑为结肠直肠癌细胞的细胞内测定 MSH3 的总体表达,并且预测结肠直肠癌的阶段,其中与正常的结肠直肠癌细胞中的 MSH3 的表达相比,在患者的细胞中 MSH3 的总体表达的减少表明疾病的进展。在前文所公开的分组方法的一个方面,疾病进展和 MSH3 表达的减少表明结肠直肠癌对抗肿瘤剂治疗的倾向。

[0021] 本发明还公开了治疗具有结肠直肠癌的风险或者诊断患有结肠直肠癌的患者的方法,所述的方法包括以下步骤:(i) 在得自患者的怀疑为结肠直肠癌细胞的细胞中测定 MSH3 的总体表达,其表明了对于采用一种或者多种 DNA 交联剂治疗的响应性的倾向;并且(ii) 测定患者中 MSH3 总体表达的持续的降低,并且(iii) 给予治疗上有效量的 DNA 交联剂,所述的 DNA 交联剂的量足以消除 MSH3 表达降低的结肠直肠癌细胞。

[0022] 在一个实施方案中,本发明涉及进行临床试验从而评价候选药物的方法,所述的候选药物据信在治疗与 MSH3 基因表达相关的疾病状态中是有用的,所述的方法包括:a) 从来自一组患者中怀疑具有结肠直肠癌的组织中测定 MSH3 的表达水平;b) 将候选的药物给予第一亚组的患者,并将安慰剂给予第二亚组的患者,c) 在给予所述的候选的药物或者安慰剂的给予之后,重复步骤 a),并且 d) 测定所述的候选药物是否减少了结肠直肠癌的细胞的数量,所述的细胞具有降低的 MSH3 表达,该降低与第二个亚组的患者中所发生的任何降低相比具有统计学上的显著性,其中统计学上的显著性降低表明所述的候选药物在治疗所述的疾病状态中是有用的。

[0023] 在另一个实施方案中,本发明提供了检测哺乳动物的结肠直肠癌对于 DNA 损伤剂是否很可能具有抗性或者是有响应的方法,所述的 DNA 损伤剂用于结肠直肠癌的治疗,该方法包括以下步骤(或多个步骤):在来自该癌症的生物样品中检测 MSH3 的总体表达的下降,并将该结肠直肠癌鉴定为对该 DNA 损伤剂具有增强的感受性,其中在对该 DNA 损伤剂有响应的癌症中,相对于同样的生物标记物的表达或者活性水平,MSH3 的表达或者活性降低。

[0024] 在再一个实施方案中,本发明公开了用于结肠直肠癌疾病进展的生物标记物,其中所述的生物标记物是 MSH3,并且与正常的结肠直肠癌细胞,或者在更早的时间点得自同一患者的结肠直肠癌细胞相比,从患者中得到的结肠直肠癌细胞内 MSH3 的总体表达的减少意味着结肠直肠癌疾病的进展。在一个方面,所述 MSH3 的总体表达水平包括分析怀疑为结肠直肠癌的组织样品的 MSH3 蛋白的表达。在另一个方面,MSH3 的总体表达水平包括分析怀疑为结肠直肠癌的组织样品的 MSH3 核酸的表达。在另一个方面,MSH3 的总体表达水平包括将得自个体的 MSH3 核酸进行质谱分析。在再一个方面,MSH3 的总体表达水平包括将从个体得到的 MSH3 核酸的一部分进行滚环扩增。在另一个方面,MSH3 的总体表达水平包括使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交。

[0025] 本发明还描述了用于诊断结肠直肠癌的试剂盒,所述的试剂盒包括用于测定 MSH3 的差异表达水平的生物标记物检测试剂和针对其在诊断结肠直肠癌风险中的应用的说明。在一个方面,与正常的受试者相比,在来自存在结肠直肠癌风险的患者的样品中,MSH3mRNA 和蛋白质表达水平均显著降低。在另一个方面,与正常的受试者相比,在具有结肠直肠癌风险的患者中,MSH3mRNA 表达水平降低。在再一个方面,与正常的受试者相比,在具有结肠直肠癌风险的患者中,MSH3 蛋白质表达水平降低。

[0026] 最后,本发明提供了用于在人类受试者中,诊断或者检测结肠直肠癌进展的方法,该方法包括步骤:(i) 鉴定怀疑患有结肠直肠癌的人类受试者,(ii) 从该受试者得到一个或多个的生物样品,其中所述的生物样品选自组织样品、粪便样品、细胞匀浆和包含一种或更多种生物流体,(iii) 在来自受试者的生物样品的一个或者多个细胞中,测量 MSH3 的总体表达特征,并且(iv) 将来自怀疑患有结肠直肠癌的受试者的生物样品中的 MSH3 总体表达特征与来自正常的受试者的生物样品的 MSH3 的总体表达特征进行比较,其中所述正常的受试者是未患有结肠直肠癌的健康受试者,其中在受试者的生物样品中,MSH3 的总体表达特征的下降意味着存在结肠直肠癌、具有发生结肠直肠癌的风险或者同时存在结肠直肠癌和具有发生结肠直肠癌的风险。

[0027] 在前文所公开的诊断方法的一个方面,MSH3mRNA、MSH3 蛋白质或者 MSH3mRNA 和 MSH3 蛋白质两者表达水平的显著下降预示着存在侵袭性结肠直肠癌、具有发生侵袭性结肠直肠癌的风险或者同时存在侵袭性结肠直肠癌和具有发生侵袭性结肠直肠癌的风险。在另一个方面,测定 MSH3 的总体水平的步骤包括分析来自生物样品中的一个或多个细胞的 MSH3 核酸表达。在另一个方面,测定 MSH3 总体表达水平的步骤包括将得自受试者的 MSH3 核酸进行质谱分析。在再一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括将从受试者得到的 MSH3 核酸的一部分进行滚环扩增。在一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括使用等位基因特异性探针、抗体探针或者使用等位基因特异性探针和抗体探针两者进行杂交。在另一个方面,测定 MSH3 的总体表达水平的步骤包括免疫组织化学。在再一个方面,

该方法用于治疗有结肠直肠癌的风险或者患有结肠直肠癌的患者,用于选择具有结肠直肠癌的风险或者患有结肠直肠癌的患者的 DNA 交联剂治疗,用于将患者分类为结肠直肠癌的亚组中或者用于结肠直肠癌治疗临床试验,用于确定对结肠直肠癌治疗具有抗性或者响应性,用于开发用于诊断结肠直肠癌的试剂盒,或者它们的任何组合。

附图说明

[0028] 为了更完全地理解本发明的特征和优点,现参考本发明的详述以及所附的图,其中:

[0029] 图 1 显示了在由 MSH3shRNA 稳定地感染的得自 HCT116+3+5 的克隆中,MSH3 的表达受到 tet-off 系统的控制:(1A) 在 HCT116、HCT116+3、HCT116+3+5 以及三个得自 HCT116+3+5 的克隆、G1、G2 和 G5 细胞中 MSH3, MLH1 和 β -肌动蛋白的蛋白质印迹分析;(1B) 在 HCT116+3+5、G1、G2 和 G5 细胞中,MSH3 以及 β -肌动蛋白的蛋白质印迹分析,其中所述的细胞在具有和不具有 $1\mu\text{g/ml}$ 的强力霉素的培养基中培养。按照密度计量学计算相关的 MSH3 表达,并且结果得自三次或更多次的独立研究。

[0030] 图 2 显示了与富含 MSH3 的细胞 (MSH3-proficient cell) 相比,缺乏 MSH3 的细胞对于顺铂和奥沙利铂更为敏感:(2A) 使用顺铂处理的 HCT116、HCT116+3、HCT116+3+5 和 G5 细胞的无性系存活部分,(2B) 使用含有或者不含 $1\mu\text{g/ml}$ 的强力霉素的培养基培养的 G5 细胞的无性系存活部分,该细胞使用顺铂处理,(2C) 使用奥沙利铂处理的 HCT116、HCT116+3、HCT116+3+5 和 G5 细胞的无性系存活部分,(2D) 使用含有或者不含 $1\mu\text{g/ml}$ 的强力霉素的培养基培养的 G1、G2 和 G5 细胞的无性系存活部分,该细胞也使用奥沙利铂进行处理,(2E) S 期的群体的减少,以及 (2F) HCT116+3+5 和 G1 细胞的 sub-G1 群体的增加,(2G) 与未经处理的对照相比,相对的 BrdU 掺入的减少,以及 (2H) 在 HCT116+3+5 和 G5 细胞的免疫荧光中显示出的抗-活性半胱天冬酶 3 阳性细胞的增加。将数据表示为来自三个或者更多个独立的研究的平均值 \pm 平均值的标准误 (SE)。统计上的差异按照双侧 Student t 检测确定 (two-sided Student's t test)。星号 *、** 和 *** 分别代表 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 。NS 代表 $p = 0.05$ 或者 $p > 0.05$ 。在此图中显示了来自三个缺乏 MSH3 的克隆之一的代表性数据。

[0031] 图 3 显示了 siRNA 导致的 MSH3 的短暂耗尽也使得 HCT116+3+5 细胞对顺铂和奥沙利铂敏感:(3A) 通过短暂的 siRNA 转染得到的 MSH3 耗尽的 HCT116+3+5 细胞中 MSH3 和 β -肌动蛋白的蛋白质印迹分析。在使用非靶向 (对照) siRNA 和使用 MSH siRNA 转染之后,使用顺铂 (3B) 以及奥沙利铂 (3C) 处理的 HCT116+3+5 细胞系的无性系存活部分的比较。在 siRNA 转染 72 小时之后提取细胞。在使用对照 siRNA 和 MSH3siRNA 进行转染之后,使用顺铂 (3E) 和奥沙利铂 (3F) 处理 HT29 细胞的无性系存活部分的比较。数据表示为来自五次独立的试验中的平均值 \pm SE。统计上的差异按照双侧 Student t 检测确定。星号 * 和 ** 分别代表 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$; NS 表示 $p \geq 0.05$ 。

[0032] 图 4 显示了使用 siRNA 短暂地耗尽 MLH1 不影响富含及缺少 MSH3 的细胞对于顺铂和奥沙利铂的抗性:(4A) 短暂的 siRNA 转染之后,在 MLH1 耗尽的 HCT116+3+5 和 G5 细胞中 MLH1 和 β -肌动蛋白的蛋白质印迹分析;(4B) 在使用对照的 siRNA 或者 MLH1siRNA 转染之后,使用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍处理的 HCT116+3+5 和 G5 细胞的无性系存

活部分。在使用顺铂 (4C) 和奥沙利铂 (4D) 处理的 MLH1 耗尽的 HCT116+3+5 和 G5 细胞之间,无性系存活部分的比较。数据表示为来自四次或更多次独立试验的平均值 \pm SE。统计差异按照双侧 Student t 检测确定。星号 * 和 ** 分别代表 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$; NS 表示 $p \geq 0.05$ 。

[0033] 图 5 证明了缺少 MSH3 的细胞显示出 DNA 双链断裂修复效力的下降:(5A) 在使用强力霉素的 HCT116+3+5、G5 和不使用强力霉素的 G5 细胞中针对 γ -H2AX 核灶形成的荧光染色。所述的细胞使用 $5 \mu\text{M}$ 的奥沙利铂处理 6 小时,并在所指示的小时数后通过免疫荧光进行分析。上方的图 ;DAPI,下方的图 ; γ -H2AX;(5B) 在缺少 MSH3 的细胞中, γ -H2AX 阳性细胞的低效率地减少,(5C) 在使用强力霉素的 G5 以及无强力霉素的 G5 细胞中,针对 53BP1 核灶形成的免疫荧光染色。所述的细胞使用 $5 \mu\text{M}$ 的奥沙利铂处理 6 小时,并在 48 小时后通过免疫荧光进行分析 (5D)。在各个载玻片上至少数出 100 个细胞。数据表示为来自三次或四次独立的试验的平均值 \pm SE。在缺少 MSH3 的 G5 和富含 MSH3 的 G5 之间的统计差异按照双侧 Student t 检测确定。星号 * 和 ** 分别代表 $p < 0.05$ 和 $p < 0.01$; NS 表示 $p \geq 0.05$ 。

[0034] 图 6 显示了缺少 MSH3 细胞对于奥拉帕尼,一种 PARP 抑制剂,以及其与奥沙利铂的组合是敏感的:(6A)HCT116+3+5、不含强力霉素的 G5 和含有强力霉素的 G5 细胞的无性系存活率,该细胞使用 $2 \mu\text{M}$ 的奥沙利铂, $2 \mu\text{M}$ 的奥拉帕尼及这两种药物的组合处理,以及 (6B) 是 HT29 细胞的无性系存活率,该细胞使用 $1 \mu\text{M}$ 的奥沙利铂, $2 \mu\text{M}$ 的奥拉帕尼及这两种药物的组合处理。数据表示为来自三次或更多次独立的试验的平均值 \pm SE。统计差异按照双侧 Student t 检测确定。星号 *、** 和 *** 分别代表 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 和 $p < 0.001$ 。

[0035] 发明描述

[0036] 尽管在下文中详细讨论了制备和应用本发明的不同的实施方案,应该认识到本发明提供了多个可实施的发明构思,所述的发明构思可以在具体上下文的大范围内实施。在此讨论的具体实施方案仅仅说明了制备和使用本发明的特定方式,而不限制本发明的范围。

[0037] 为了便于理解本发明,在下文中定义了多个术语。在此定义的术语与本发明相关领域具有普通技术人员所一般地理解的意义。术语如“一个”、“一种”以及“该”无意于仅指单个的实体,而包括可以用作说明的具体例子的大类。该术语在此用于描述本发明的特定实施方案,但是其使用不限制本发明,除非在权利要求中概述。

[0038] 在此使用的缩写包括:MMR,错配的修复;MSI,微卫星不稳定性;CRC,结肠直肠癌;MeG, O6-甲基鸟嘌呤;ICL,链间交联;NER,核苷酸剪切补修复;HR,同源重组;PARP,聚(ADP-核糖)聚合酶;EMAST,在四核苷酸重复处的上升的微卫星改变;DSB,双链断裂;BrdU,溴脱氧尿苷; γ -H2AX,磷酸化的 H2AX。

[0039] 如本文使用的,术语“结肠直肠癌”包括广泛接受的医学定义,该定义规定结肠直肠癌是医学疾病,特征在于小肠下方(即大肠(结肠),包括盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、S形结肠以及直肠)的肠道细胞的癌变。除此之外,如本文所使用的,术语“结肠直肠癌”还进一步地包括这样的医学疾病,其特征不在于十二指肠和小肠(空肠和回肠)内细胞的癌变。

[0040] 术语“组织样品”(术语“组织”与术语“组织样品”可交换地使用)应该理解为包括由一个或者多个细胞所组成的任意材料,其是单独的或者与任意的基质复合,或者与任意的化学物质结合。该定义应包括任意的生物或有机材料,以及任意的细胞的亚部分,其产

物或者副产物。“组织样品”的定义应该理解为包括但不限于精子、卵子、胚胎和血液的组分。为了本发明的目的,术语“组织”还包括的是特定的非细胞结构如皮肤的真皮层,该真皮层来自于细胞但是不再具有细胞的特征。如本文所使用的术语“大便”是临床术语,指人类排出的粪便。

[0041] 在本文使用的术语“基因”指编码功能蛋白质、多肽或者肽的单元。如本领域的技术人员所理解的,这一功能性的术语包括两个基因组序列、cDNA 序列或者其片段或组合,以及基因的产物,包括可以经人工改变的那些。经纯化的基因、核酸、蛋白质等等用于指从至少一种通常与其相关的污染核酸或者蛋白质中鉴定并分离出来的这些实体。术语“等位基因”或者“等位基因形式”指编码同样的功能性蛋白的基因的可选择的形式,但是含有与同一基因的其他形式相关的核苷酸序列上的差异。

[0042] 如本文所使用的,“核酸”或者“核酸分子”指多核苷酸,如脱氧核糖核酸 (DNA) 或者核糖核酸 (RNA)、寡核苷酸、由聚合酶链式反应 (PCR) 所产生的片段以及通过任意的连接、剪切、核酸内切酶和核酸外切酶活动产生的片段。核酸分子可以由天然产生的核苷酸的单体组成 (例如 DNA 和 RNA),或者由天然产生的核苷酸的类似物组成 (例如天然产生的核苷酸的 α -对映体形式),或者两者的组合组成。经修饰的核苷酸可以在糖部分和 / 或在嘧啶或者嘌呤碱基部分上有改变。糖的修饰包括,例如将一个或者多个羟基以卤素、烷基、胺和叠氮基团替代,或者可以将糖功能化成为醚或者酯。除此之外,整个的糖部分可以用空间上和电子学上类似的结构替换,如阿扎糖以及碳环的糖类似物。在碱基部分上修饰的实例包括烷基化的嘌呤和嘧啶、酰化的嘌呤和嘧啶或者其他公知的杂环替代物。核酸单体可以通过磷酸二酯键或者该连接的类似物进行连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯 (phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯 (phosphorodiselenoate)、phosphoroanilothioate、phosphoranilidate、氨基磷酸酯等等。术语“核酸分子”还包括所谓的“肽核酸”,其包括连接到聚酰胺骨架上的天然产生的或者经修饰的核酸碱基。核酸可以是单链的或者双链的。

[0043] 如本文所使用的,术语“杂交”指两个单链的多核苷酸非共价结合,形成稳定的双链多核苷酸的过程;三链的杂交在理论上也是可能的。所产生的 (通常是) 双链的多核苷酸是“杂交物”。形成稳定的杂交物的多核苷酸的群体的比例在本文中称作“杂交度”。杂交通常在严格的条件下进行,例如在盐浓度不多于 1M 并且温度为至少 25°C 下进行。例如,5×SSPE 的条件 (750mM NaCl, 50mM 磷酸钠, 5mM EDTA, pH 7.4) 以及 25-30°C 的温度对于等位基因特异性的探针杂交而言是合适的。对于严格的条件,参见例如 Sambrook, Fritsche and Maniatis. “Molecular Cloning A laboratory Manual”第二版. Cold Spring Harbor Press (1989), 其由于前述的所有目的,以全文的方式并入作为参考。

[0044] 如本文所使用的,术语“滚环扩增 (RCA)”描述了 DNA 的复制和扩增的方法,该方法导致包括序列的一个或者多个拷贝的与原始环状 DNA 的序列互补的核酸链。该扩增过程 (产生互补的拷贝) 包括将寡核苷酸引物杂交到环状的靶 DNA 上,随后进行等温循环 (例如,在连接酶和 DNA 聚合酶的存在下)。使用 RCA 的单轮扩增导致在环靶中产生大量序列的扩增,从而得到高浓度的所期待的位于核酸的单链上的寡核苷酸。由于所期待的核酸序列成为混合物中主要的序列 (在浓度的意义上),这称作“RCA 扩增的”。通过 RCA,可能将一个拷贝的特定的核酸序列扩增到可以通过几种不同的方法检测的程度 (如与经标记的探

针杂交；在抗生物素蛋白-酶缀合物检测之后加入生物素化的引物；在扩增的片段中加入³²P 标记的脱氧三磷酸核苷，如 dCTP 或者 dATP)。

[0045] 如本文所使用的，术语“抗体探针”指对于任意靶抗原而言特异性并且与之结合的抗体。该靶抗原可以是抗体能够特异性地结合的肽、蛋白质、碳水化合物或者任意的其他生物聚合物。

[0046] 如本文不同的实施方案中所使用的，术语“生物标记物”指体内的特定生物化学物质，其具有特别的分子结构，从而使其在诊断疾病、测量疾病的进展或者治疗的效果中有用。例如，在人的呼吸中所发现的普通代谢物和生物标记物，以及提供该代谢物的人的相应的诊断状况，所提供的该代谢物包括但不限于乙醛（来源：乙醇、X- 苏氨酸；诊断：中毒），丙酮（来源：乙酰乙酸盐；诊断：饮食 / 糖尿病），氨（来源：氨基酸的脱氨基作用；诊断：尿毒症及肝脏疾病），CO（一氧化碳）（来源：CH₂Cl₂，升高的 % COHb；诊断：室内空气污染），氯仿（来源：卤化物），二氯苯（来源：卤化物）；二乙胺（来源：胆碱；诊断：肠道细菌过度生长），H（氢）（来源：肠；诊断：乳糖不耐受性），异戊二烯（来源：脂肪酸；诊断：代谢压力），甲硫醇（来源：甲硫氨酸；诊断：肠道细菌过度生长），2- 丁酮（来源：脂肪酸；诊断：室内空气污染 / 饮食），邻- 甲苯胺（来源：癌代谢物；诊断：支气管癌），戊烷硫化物和硫化物（来源：脂质过氧化；诊断：心肌梗死），H₂S（来源：代谢；诊断：牙周病 / 排卵），MeS（来源：代谢；诊断：肝硬化）以及 Me₂S（来源：感染；诊断：坏死性溃疡性龈炎）。

[0047] 如本文所使用的，术语“免疫组织化学 (IHC)”当用于细胞时，也称作“免疫细胞化学 (ICC)”，其指诊断病理学中的工具，其中可以在未分化的肿瘤的差异诊断中使用多组的单克隆抗体（例如，用于区分淋巴瘤、癌症和肉瘤），从而显示对特定的肿瘤类型和其他疾病特异性的标记物，从而实现恶性淋巴瘤的诊断和分类，并且证明病毒性抗原、癌基因蛋白、荷尔蒙受体和增殖相关的核蛋白的存在。

[0048] 如本文所使用的，术语“临床试验”包括设计用于收集特定的治疗带来的临床数据的任意研究，并且包括但不限于一期、二期及三期临床试验。为了限定患者群体并入选受试者，使用了标准的方法。

[0049] 术语在研究组之间的“统计学上的显著性”差异指在使用合适的统计分析（例如卡方检验，t- 检验）时，各组是一样的概率小于 5% 的情形，例如 $p < 0.05$ 。换言之，在完全随机的情况下，在 100 次尝试中得到相同结果的概率少于 5 次。

[0050] 如本文所使用的，术语“候选的药物”指任意来源的任意化合物，根据本发明的方法，其适用于筛选其在使 MSH3 表达降低的结肠直肠细胞数量减少上的活性。

[0051] 如本文所使用的，术语“基因毒性剂”定义为能够引起人类的 DNA 或者基因损伤的化学试剂及物理试剂。致癌剂和诱变剂是化学的基因毒性剂的常见实例，而 UV 照射， γ 及 X 射线等等当其产生氧化的 DNA 产物时，是物理的基因毒性剂的常见实例。

[0052] 如本文所使用的，术语“抗肿瘤剂”指具有抑制哺乳动物，如人的肿瘤的发生或者进展的功能特性的药剂，并且也指对转移或者转移可能性的抑制。

[0053] 术语“试剂盒”或者“试验试剂盒”指分析所需的试剂和佐剂的组合。尽管试验试剂盒在大多数的情况下由数个单元组成，也可以使用单件的分析单元，这类似地被认为是试验试剂盒。

[0054] MSH3 基因（保藏编号 P20585）是 DNA 错配修复 (MMR) 基因之一，其在缺少 MMR 的

癌症中频繁地经历体细胞突变。MSH3 与 MSH2 一起形成 MutS β 异源双链核酸分子,其与药物诱导的链间交联 (ICL) 相互作用,所述的药物如顺铂和补骨脂素。但是,MSH3 在介导 ICL 诱导剂的细胞毒性作用中的确切作用仍然知之甚少。本发明人在此证明了缺少 MSH3 对于由顺铂和补骨脂素,其他的 ICL 诱导铂药物引起的细胞毒性的作用。

[0055] 使用得自 HCT116 的克隆发现了 MSH3 缺乏使得细胞对临床相关剂量的顺铂和奥沙利铂敏感化,所述的得自 HCT116 的克隆中 MSH3 的表达受到 tet-off 系统中的 shRNA 控制。有趣的是, siRNA 所诱导的 MLH1 蛋白下调不影响这些药物的 MSH3- 依赖性毒性,这说明了该方法不需要正确的 MMR 途径的参与。

[0056] 除此之外,与富含 MSH3 的细胞相比,缺少 MSH3 的细胞在奥沙利铂处理之后,保持了更高水平的磷酸化的 H2AX 和 53BP1,这说明了 MSH3 在修复 DNA 双链断裂 (DSB) 中起到了重要的作用。MSH3 的这一作用进一步地受到在此的发现支持,在此发现中缺少 MSH3 的细胞对于奥拉帕尼,一种聚 (ADP- 核糖) 聚合酶抑制剂具有敏感性。除此之外,奥沙利铂和奥拉帕尼的组合与它们中任一种单独地处理相比,呈现出协同作用。这些结果共同地证明了,通过不充分的 DSB 修复,MSH3 的缺少增强了铂药物的细胞毒性。这些数据使得能够对具有 MSH3 缺少的癌症进行有效的预测和治疗。

[0057] 关于基因 (包括 MSH3) 和基因的系列在评价预后和 / 或预测癌症对化学治疗的响应中的有用性,本发明的发现与此前的发现相比显示出了显著的及新颖的变化。由 Baker 等人递交的第 20090305277 号美国专利申请描述了基于测定至少一个基因的表达水平,预测被诊断为癌症的人类患者的可能性的方法,该方法与本发明相反,也就是说包括 MSH3 的特定基因表达的上升与对化学治疗的阳性响应上升的可能性呈正相关。然而该申请不包括细胞或者组织数据,却使用了一般性的基因挖掘方法得到了他们的结论。

[0058] DNA 错配修复 (MMR) 系统由几个蛋白组成,所述的蛋白如 MLH1、MSH2、MSH6、MSH3 和 PMS2,消除了复制的错误并保持基因组的稳定性。MutS α , 一种 MSH2/MSH6 的异质二聚体,识别单个的碱基错配,然而 MutS β , 一种 MSH2/MSH3 异质二聚体主要地识别 2-4 个 bp 的插入 - 缺失环 (1,2)。MutL 复合物,主要地为 MutL α , 一种 MLH1/PMS2 异质二聚体,与一种 MutS 异质二聚体形成四聚体复合物,该四聚体复合物在复制期间结合于 DNA 的错配,并且导致募集其他蛋白质,从而完成 DNA MMR 的过程。在 MMR 基因中的种系突变导致林奇综合征 (Lynch syndrome),该病的特征在于遗传地易患微卫星不稳定 (MSI) 的癌症,所述的癌症位于结肠、子宫内膜、卵巢及尿道 (3,4)。与此相反,MLH 启动子的甲基化所导致的 MMR 缺少导致偶发的 MSI 肿瘤,其包括结肠直肠癌 (CRC) (~ 15%), 子宫内膜癌 (20 ~ 25%) 和卵巢癌 (~ 12%) (4-6)。

[0059] MMR 系统也参与 DNA 损伤剂所产生的特定 DNA 加和物的修复,所述的 DNA 损伤剂如烷基化剂和 6- 硫鸟嘌呤。烷基化剂所产生的主要的细胞毒性损伤是 O⁶- 甲基鸟嘌呤 (^{Me}G), 其导致 ^{Me}G-C 或者 ^{Me}G-T 的错配 (7)。MutS α 识别这些错配,并募集用于随后的修复反应的 MutL α (8,9)。MutS α 或者 MutL α 的丢失导致细胞对这些药物的细胞毒性作用具有耐受性,这说明了这两种复合物也与导致细胞生长抑制或者细胞死亡的信号转导途径有联系 (10,11)。

[0060] 另一方面, MutS β 识别由 DNA 交联剂所产生的链间交联 (ICL), 所述的 DNA 交联剂如补骨脂素和顺铂。哺乳动物提取物中,补骨脂素所诱导的 ICL 的识别和分开涉及

MutS β (12)。最近已经显示 MutS β 与 XPA-RPA 或者 XPC-RAD23B 相互作用,这两者均涉及核酸切除修复 (NER),补骨脂素 ICL 的识别,并且促进 NER 过程 (13,14)。修复 ICL 的同源重组 (HR) 的水平也取决于 MutS β ,而非 MutS α 或者 MLH1。这些结果说明, MutS β 可以与 NER、HR 和 Fanconi 贫血症蛋白协同作用,修复由补骨脂素诱导的 ICL (15)。除此之外, MutS β 还与 PARP-1、DNA 连接酶 III、XRCC-1、Ku80 和 Ku70 一起结合于顺铂诱导的 ICL,这说明 MutS β 也可以与其他的修复路径协同作用,从而识别并修复铂药物所诱导的 ICL。(16)

[0061] 奥沙利铂,第三代的铂药物,是当前用于治疗 CRC 患者的主要药物之一。与顺铂类似,奥沙利铂也形成链内交联及 ICL (17)。然而,奥沙利铂所诱导的加成物,尤其地 ICL 的修复和细胞毒性作用中所涉及的详细分子机制仍然未得到广泛探索。

[0062] 考虑到 MutS β 复合物在 ICL 的修复中起作用,本发明人认识到 MSH3 的缺乏可以使铂药物所诱导的 ICL 的修复停止,这导致这些药物在癌症患者中的细胞毒性增强。除此之外,由于 MSH3 的缺乏导致抑制的 HR (15),并且缺少 HR 的细胞对于聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 抑制剂具有高度敏感性 (18,19),本发明人进一步地认识到 MSH3 的缺乏还可以导致细胞对 PARP 抑制剂的敏化。在 MSI CRC 中,在 MSH3 的外显子中单核苷酸 [A]_n 重复之内的频繁的移码突变 (20-50%) 导致 MSH3 的丢失或者减少 (20-22)。最近,本发明人发现了 MSH3 阴性的癌症细胞群体在偶发的 CRC 组织中存在,所述的细胞群体显示出低的 MSI 水平和 / 或在四核苷酸重复位置升高的微卫星改变 (EMAST) (23)。如果 MSH3 的缺少在临床的环境下支配了铂药物和 PARP 抑制剂的毒性,可以将 MSH3 的状态在缺少 MSH3 的患者中用作化学治疗的预测性标记物。为了证明可以将 MSH3 的状态在具有缺少的 MSH3 的癌症患者中用作化学治疗的预测性标记物,本发明人使用同基因的细胞系,其中 MSH3 蛋白质的表达可以通过 tet-off 系统中的 shRNA 的表达进行调节,并且研究了 MSH3 缺少对于细胞对两种铂药物及一种公知的 PARP 抑制剂的敏感性的影响。这些研究揭示了新的分子证据,在 CRC 细胞系中,MSH3 的缺少对铂药物的细胞毒性,尤其是作为损伤性的双链断裂 (DSB) 修复的结果的细胞毒性有贡献。

[0063] 试剂—顺铂,奥沙利铂,N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG) 及碘化丙啶购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。奥拉帕尼,一种 PARP 抑制剂,购自 Selleck Chemicals (Houston, TX)。

[0064] 细胞系和细胞培养物—人类结肠癌细胞系 HCT116、HCT116+ch. 3 (HCT116+3)、HCT116+ch. 3+ch. 5 (HCT116+3+5) 均已在前面描述 (10,23)。HCT116+3+5 细胞由四环素调节的反转录病毒载体稳定地转染,所述载体为 TMP (Open Biosystems, Huntsville, AL),其编码针对 MSH3 的 shRNA。分离了稳定的缺少 MSH3 的克隆 G1、G2 和 G5 (参见结果和 (23))。在具有 10% 胎牛血清的 IMDM (Invitrogen, Rockville, MD) 中生长 HCT116、HCT116+3 和 HCT116+3+5 细胞。在含有 10% 胎牛血清和 0.6 μ g/ml 的嘌呤霉素的 IMDM 中生长 G1、G2 和 G5 细胞。为了关闭 MSH3shRNA 的表达,在培养基中加入 1 μ g/ml 的强力霉素。

[0065] 蛋白质印迹分析—如前所述地,由细胞裂解液制备蛋白质,将该蛋白质分离在 SDS-PAGE 上,并转移到 PVDF 膜上 (31)。使用抗-hMSH3 鼠单克隆抗体 (稀释;1 : 250, Clone 52, BD Pharmingen, San Jose, CA),抗-hMLH1 鼠单克隆抗体 (1 : 200, G168-728, BD Pharmingen) 和抗- β -肌动蛋白抗体 (1 : 10000, Clone AC-15, Sigma-Aldrich) 作为特异性蛋白检测的一抗。使用山羊抗鼠抗体 (1 : 3000, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology,

Santa Cruz, CA) 作为二抗。信号放大和检测通过将膜暴露于 ECL 试剂 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), 随后在 Storm 成像系统 (Storm imaging system) (Amersham, Piscataway, NJ) 上可视化来完成。

[0066] 无性系存活率分析—将 200 个细胞种在六孔板的各个孔中。为了测量顺铂或者奥沙利铂所引起的细胞毒性, 一旦细胞附着于板, 便使用所述的药物处理细胞 24 小时。为了测量奥拉帕尼所引起的细胞毒性, 在试验中将细胞继续使用该药物进行处理。在 8-10 天之后, 计数群落的数量 (大于 50 个细胞的群落), 并且测定药物处理的与未处理的细胞中无性系存活率的相对变化。

[0067] 细胞周期分析—将一百万个细胞种于 10cm 的盘中。一旦附着, 将所述的细胞系使用奥沙利铂处理 24 小时。在此后的 48 小时后, 将细胞使用冷的 PBS 洗涤两次, 在冷的 70% 乙醇中 -20°C 下固定过夜或者持续几天。随后, 将经乙醇固定的细胞 (2×10^6) 使用 PBS 洗涤两次并且使用 $300 \mu\text{l}$ 的 PBS 和 0.15% RNase A 在 37°C 下温育 15 分钟。将该细胞使用 $75 \mu\text{g/ml}$ 的碘化丙啶处理 30 分钟, 并随后使用 FACSCantoII 流式细胞仪 (FACSCantoII flow cytometer) (BD Biosciences, San Jose, CA) 分析其 DNA 含量。细胞周期数据使用 Flowjo 软件 (Tree Star, Ashland, OR) 进行分析。

[0068] 增殖分析—增殖指数通过溴脱氧尿嘧啶在 HCT116+3+5 和 G5 中的掺入来测定, 该测定在最初使用顺铂或者奥沙利铂 (Cell Proliferation ELISA, BrdU, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) 处理 24 小时之后 48 小时进行。试验进行三次, 并且数据从三次或者四次的独立试验中得到。

[0069] siRNA 处理—MLH1 siRNA、MSH3siRNA 和非靶向的 siRNA 购自 Dharmacon (Lafayette, CO)。将二十万个细胞种在 24 孔板中。经过夜温育之后, 使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 按照生产商的说明书, 将该细胞使用 83nM 的靶向 siRNA 或者非靶向 siRNA, 进行转染。转染后两天, 收获细胞并再次将细胞铺板用于无性系存活率分析。

[0070] 免疫荧光染色—在 12 孔板中, 将一万个细胞在玻璃盖玻片上生长。将细胞使用 4% 的多聚甲醛 (pH 7.5) 在 PBS 中固定 15 分钟, 使用 0.3% Triton X-100 渗透五分钟, 并随后使用 10% 的山羊血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 封闭 1 小时。随后, 将该细胞与抗活性的半胱天冬酶 -3 抗体 (1 : 500, G748, Promega, Madison, WI), 一种抗磷酸化的 H2AX (pH2AX) 抗体 (1 : 5000, JBW301, Millipore Corporation, Billerica, MA) 或者一种抗 53BP1 抗体 (1 : 600, ab21083, Abcam, Cambridge, MA) 一起温育 1 小时, 随后与二抗 (1 : 800, Alexa Fluor 555 山羊抗小鼠或者抗兔抗体, Invitrogen) 一起温育 40 分钟。在封固培养基时使用了 Prolong Gold with DAPI (Invitrogen)。这些图像使用配备有 AxioVision 软件的 AxioSkop2 多通道落射荧光显微镜 (AxioSkop2 multichannel epifluorescence microscope equipped with the AxioVision software) (Carl Zeiss, Thornwood, NY) 得到。

[0071] 在缺少 MSH3 的克隆中, MSH3 的表达受到强力霉素的控制。本发明人首次确定了在 HCT116 CRC 细胞的 G1、G2 和 G5 细胞克隆中, MSH3 的表达是否受到强力霉素的控制。将 HCT116 和 HCT116+3 细胞用作 MSH3 表达的阴性对照, 以及将 HCT116+3+5 用作 MSH3 表达的阳性对照。HCT116 和 HCT116+3 未显示出可检测的 MSH3 蛋白质表达 (图 1A), 这与在 MSH3

外显子 7 的单核苷酸重复中存在纯合子移码突变的 HCT116 细胞一致 (23)。通过 5 号染色体的拷贝的转移由缺少 MSH3 的 HCT116+3 产生的 HCT116+3+5 显示出表达 MSH3。尽管在没有强力霉素的 G1、G2 和 G5 克隆中未检测到 MSH3, 在这些克隆中, 强力霉素的加入将 MSH3 的表达恢复到亲代 HCT116+3+5 水平的约 40-60% (图 1A 和 1B)。尽管期待在这些细胞系中甚至在强力霉素的存在下完全阻碍 MSH3shRNA 的产生具有技术挑战性, 但在本研究中, 在这些结果中的蛋白质水平足以用来分析 MSH3 对药物敏感性的效果, 由于即使考虑到体外的 EMAST 表型, 在 G5 细胞中的 MSH3 的水平足以恢复 MSH3 的功能 (23)。

[0072] 与富含 MSH3 的细胞相比, 缺少 MSH3 的细胞对于顺铂和奥沙利铂更为敏感。为了测定 MSH3 的状态是否影响对两种铂药物的细胞敏感性, 检查了 HCT116 和得自 HCT116 的细胞系在顺铂处理的细胞中的无性系存活率情况。在缺少 MLH1 以及 MSH3 的 HCT116 与仅缺少 MLH1 的 HCT116+3 细胞系之间没有观察到顺铂敏感性上的显著性差异, 然而在富含 MSH3 的 HCT116+3+5 细胞系中观察到了更高的耐受性 (图 2A)。在不同的细胞系中, 缺少 MSH3 的 G5 克隆比其亲代的 HCT116+3+5 更为敏感 (图 2A)。为了进一步确认 MSH3 的存在影响顺铂所诱导的细胞毒性, 比较了在强力霉素存在及不存在下, G5 细胞的无性系存活率。发现了 MSH3 表达的恢复使细胞对顺铂的不敏感 ($5 \mu\text{M}$; 图 2B)。这些结果表明, MSH3 的耗尽导致细胞对顺铂的敏感。同时还分析了其他克隆, G1 和 G2 的无性系存活率, 并且发现这些克隆与 G5 表现类似 (数据未显示)。这进一步地增强了 MSH3 在顺铂导致的细胞毒性中的可能作用。随后, 测定了 MSH3 的缺少是否也影响到对奥沙利铂的细胞敏感性。出人意料地, 缺少 MSH3 的 HCT116、HCT116+3 和 G5 显著比亲代的 HCT116+3+5 对奥沙利铂更为敏感, 就像顺铂的情况一样 (图 2C)。此外, 观察到了在缺少 MSH3 的细胞中, MSH3 的恢复导致奥沙利铂不敏感性的恢复 (图 2D)。随后, 在缺少 MSH3 的细胞与经奥沙利铂处理的缺少 MSH3 细胞之间比较了生长速率的抑制及凋亡水平。通过使用流式细胞仪, 本发明人发现在缺少 MSH3 的细胞中, 细胞生长抑制 (图 2E) 的程度和凋亡水平 (图 2F) 显著地比在富含 MSH3 的细胞中更高。还分别通过 BrdU 分析和免疫荧光法, 确认了在经奥沙利铂处理的缺少 MSH3 的细胞中细胞增殖降低并且凋亡的部分增加。图 2G 显示了与未经处理的对照相比, 相对的 BrdU 掺入的减少, 并且图 2H 显示了在 HCT116+3+5 和 G5 细胞的免疫荧光中, 抗-活性的半胱天冬酶阳性细胞的增加。这些结果与在本文中显示的通过无性系分析所得到的生长抑制结果一致。

[0073] 通过 siRNA 转染的 MSH3 的缺少也使细胞对顺铂及奥沙利铂敏感。为了进一步确认与 MSH3 相关的对顺铂和奥沙利铂的敏感性的作用, 测定了短暂地转染了 MSH3siRNA 和非靶向的 siRNA 的细胞的无性系存活率频率。在这些研究中, 已知在 HCT116+3+5 细胞中, MSH3 蛋白质表达在 siRNA 转染之后 72 小时显著地减少 (与未处理的细胞相比 98% 的 MSH3 表达抑制) (图 3A)。将 HCT116+3+5 细胞用 MSH3siRNA 进行转染, 并且在转染之后 48 小时, 将所述的细胞暴露于顺铂 ($5 \mu\text{M}$ 和 $10 \mu\text{M}$) 或者奥沙利铂 ($2 \mu\text{M}$ 和 $5 \mu\text{M}$)。如图 3B 和 3C 中所示, MSH3siRNA 的转染使得 HCT116+3+5 细胞与经非靶向的 siRNA 转染的细胞系相比, 变得对顺铂和奥沙利铂更为敏感。为了进一步确认在缺少 MSH3 的细胞中这种对铂药物的敏感性的增加, 将另一个结肠癌细胞系, HT29, 使用 MSH3siRNA 或者非靶向的 siRNA 进行转染。证实了在 HT29 细胞中, MSH3 基本上被完全抑制 (图 3D), 并且使用 MSH3siRNA 处理的 HT29 细胞变得对顺铂和奥沙利铂两者都更为敏感 (图 3E 和 3F)。这些结果进一步加强了 MSH3

的缺少使得细胞对顺铂和奥沙利铂敏感的这一发现。

[0074] 在富含 MSH3 和缺少 MSH3 的细胞中顺铂或者奥沙利铂的敏感性是与结肠癌细胞中的 MLH1 状态独立地发生的。从临床观点来看,确定 MSH3 状态是否影响 MLH1 也缺少的癌症患者是否对于顺铂和奥沙利铂的敏感性是重要的。为了解决这一问题,通过诱导 siRNA 介导的 MLH1 表达的下调,比较了缺少 MSH3 的 G5 细胞和富含 MSH3 的细胞对于顺铂和奥沙利铂的敏感性(图 4A)。当 MLH1 在由 MLH1siRNA 转染的 HCT116+3+5 和 G5 细胞中均下调时,两种细胞系与未经处理的对照细胞系相比,均变得对 MNNG 更具抗性(图 4B),从而在这些情况下确认了 MLH1 的功能抑制(10, 11)。有趣的是,在这一情况下,观察到 G5 细胞与 HCT116+3+5 相比,对于顺铂和奥沙利铂更为敏感(图 4C 和 4D)。这些结果证明了 MSH3 依赖的对顺铂和奥沙利铂的敏感性与 MLH1 状态是独立发生的。

[0075] 缺少 MSH3 的细胞证实了在奥沙利铂处理后,持续的 pH2AX 和 53BP1 水平。铂药物诱导 DNA 的链内交联以及 ICL,并且一些损伤最终导致继发的 DNA 双链断裂(DSB),据推测是解体的复制叉所导致的(24)。为了确定 MSH3 是否包含在 DSB 的修复中,使用免疫荧光染色分析了核 pH2AX,一种 DNA DSB 的替代标记物的水平随时间的变化(25)。发现富含和缺少 MSH3 细胞系在奥沙利铂处理之前和之后, pH2AX 核灶阳性的细胞数目没有变化。相反,观察到在缺少 MSH3 的 G5 细胞中,与 MSH3 恢复的 G5 细胞以及 HCT116+3+5 细胞系相比,在奥沙利铂处理的 48 小时和 72 小时期间, pH2AX 核灶阳性的细胞数目减少的速度更低(图 5A 和 5B),表明 DSB 修复仅在缺少 MSH3 的细胞系中受到损害。为了进一步地确认这种 DSB 修复的效率低下,使用抗-53BP1 抗体,另一种检测 DNA DSB 的标记物进行了免疫荧光测试。证实了在奥沙利铂处理之后,在缺少 MSH3 的 G5 细胞中持续的 53BP1 水平(图 5C 和 5D)。这些结果显示了缺少 MSH3 的细胞对于奥沙利铂具有的更高的敏感性可能部分由于降低的 DNA DSB 修复效率,而不是由于处理所诱导的 DNA 损伤负担的数量上的差异。

[0076] 缺少 MSH3 的细胞对奥拉帕尼, PARP 抑制剂也是敏感的。PARP 抑制剂增加单链断裂的数目,其最终导致由 HR 系统修复的 DNA DSB。缺少 HR 的细胞对 PARP 抑制剂是高度敏感的,由于它们不能修复这些 DSB(18, 19)。MSH3 在 DSB 修复中可能的功能从结果(图 5A-5D)中得到证明,这促使进一步地调查缺少 MSH3 的细胞是否也对 PARP 抑制剂敏感。如图 6A 中所显示的,缺少 MSH3 的细胞与恢复了 MSH3 的 G5 细胞系相比,对奥拉帕尼更为敏感。这些数据清楚地支持在 CRC 细胞中, MSH3 在 DSB 修复中的作用。除此之外,在缺少 MSH3 的 G5 细胞中,与亲代的 HCT116+3+5 相比,奥沙利铂和奥拉帕尼的组合在细胞毒性中显示协同效应。该效应在使用 MSH3siRNA 的短暂压制系统(knockdown system)中,通过两种其他的结肠癌细胞系 HT29(图 6B) 和 SW480(数据未显示)得到证实。这些结果证实了铂药物和 PARP 抑制剂对缺少 MSH3 的癌症的联合治疗。

[0077] 本研究阐明了 MSH3 的损失影响由铂药物引起的细胞敏感性。该观察可以用于建立诊断和治疗策略,其中在缺少 MSH3 的肿瘤患者中 MSH3 的状态可以用作化学治疗结果的预测性标记物。总的来说,通过使用 MSH3 表达受到 tet-off 系统调节的同基因结肠癌细胞系,证实了在结肠癌细胞中,MSH3 表达的缺失使得所述的癌细胞不仅对顺铂,而且对奥沙利铂及 PARP 抑制剂敏感化。尽管 MSH3 牵涉到 DNA DSB 修复中的确切机理仍待进一步探索,这些数据说明,这些效果可以由缺少 MSH3 的细胞的降低的修复 DSB 的能力来很好地解释,所述的 DSB 是在使用这些药物处理之后引起的。这是首次证实了 MSH3 的选择性抑制增加

了针对铂药物和 PARP 抑制剂增强的细胞敏感性。此外,这些结果证实了这种 MSH3 依赖的针对顺铂和奥沙利铂的敏感性增加不受 MLH1 下调的影响,并且很可能对于标准的 MMR 系统是独立的。

[0078] MutS 和 MutL 同源物在 ICL 修复中的作用已经通过补骨脂素 ICL 进行了彻底研究 (12-15, 26)。这些数据说明与其他蛋白如 NER 和 HR 蛋白结合, MutS β 牵涉到特定类型的 ICL 的识别及处理中,并且说明了 MutS β 与其在 MMR 中的主要功能独立地也在 ICL 修复中起作用。此处的这些发现显示,缺少 MSH3 的细胞对于顺铂和奥沙利铂是敏感的,并且这一事实与 MLH 功能独立,以上的结果与使用补骨脂素 ICL 的发现是一致的。

[0079] 这些结果显示了 MutS β 牵涉到 ICL 加成物所导致的有毒性的 DSB 的修复中。首先,有证据显示 MSH3 与 DSB 损伤呈现出共定位,所述的 DSB 损伤由激光 (27) 以及由致癌物如六价铬 (28) 诱导产生。其次,本发明人意识到在奥沙利铂处理之后,与富含 MSH3 的细胞相比,在缺少 MSH3 的细胞中与 DSB 共同定位的 p-H2AX 和 53BP1 具有持续的水平。第三,缺少 MSH3 的细胞对于 PARP 抑制剂是敏感的,所述的 PARP 抑制剂诱导 DSB。因此,这些数据显示,由于 MSH3 缺少导致的未修复的 DSB 是细胞死亡的直接原因。然而,近期的研究显示,与具有 MSH2G674D 突变的小鼠中的肿瘤相比,在无 MSH2 的小鼠中产生的肿瘤对于顺铂,以及对于 5-FU 和奥沙利铂的组合更具抗性 (29)。有趣的是,尽管该错义突变导致 MMR 活性的损失,其仍然对于 DNA 损伤是敏感的。这些结果显示 MSH2 在 MMR 活性以及化学敏感性中具有区别的功能 (29)。已经证明了在顺铂处理之后,细胞凋亡途径中涉及的不同蛋白如 JNK 和 c-Ab1 的活化中需要 MSH2 和 MLH1 (30),然而, MutS α 或者 MutS β , 或者 MutS α 和 MutS β 两者是否牵涉到顺铂或者奥沙利铂的信号转导途径中还不清楚。然而,由于该结果表明,MSH3 的损失增加了对顺铂及奥沙利铂的敏感性, MutS β 很可能主要参与 DNA 损伤的修复中,以及 MutS α 参与到修复及导致细胞死亡的信号转导途径中。进一步的研究可以解释 MutS α 或者 MutS β 在 DNA 损伤修复以及这些药物导致的损伤信号转导中的具体作用。

[0080] 缺少 MSH3 的细胞对顺铂和奥沙利铂的敏感性这一结果和此前 Vaisman 等人的报道 (31) 不一致。Vaisman 等人的研究报道了针对这些药物的敏感性在缺少 MSH3 的 HHUA 细胞和与 5 号染色体互补的富含 MSH3 的 HHUA 细胞之间并无不同 (31)。在他们的研究中,5 号染色体的数百个其他基因的影响未加以排除;因此在本文中所获得的数据更为有力,由于使用了 HCT116 结肠癌细胞的同基因的克隆,其中 MSH3 的表达按照需要选择性地进行了调节。

[0081] 从临床的角度来看,本文中所给出的结果证实了相当大群体的 MSI CRC 患者可以从基于奥沙利铂的处理方案、PARP 抑制剂或者尤其地,两者结合的治疗方法中获益。在 CRC 中,许多近期的研究显示,三期 MSI 癌症的患者从 5-FU 佐剂化学治疗中不获益 (32-34)。除此之外,Bertagnolli 等人报道了三期 MSI 癌症的患者从含有 5-FU 和伊立替康的佐剂化学治疗中获益 (35),然而另一个研究报道了这些患者并不从这一佐剂治疗中获益 (36)。这些不一致的结果提高了具有患者的亚组的可能性,在各亚组之间在 MSI-CRC 中具有不同的化学敏感性。例如,这些结果显示至少有两个亚群体的缺少 MLH1 的 CRC,富含 MSH3 的和缺少 MSH3 的 CRC,并且这些可能依据 MSH3 状态对奥沙利铂、PARP 抑制剂及其组合的响应不同。

[0082] 除了 MSH3 外,在 MSI 癌症中使其他几个 DNA 修复基因发生突变。MRE11A 和 RAD50 是在 MSI 癌症中最经常突变的基因 (22),其产物在 DSB 修复复合物 MRE11A-hRAD50-NBS1 中

产生。已经证明了在 MRE11A 和 RAD50 中的突变增加了对伊立替康的敏感性,所述的伊立替康在培养的细胞中诱导继发的 DSB(37,38)。这些结果显示,MSH3 的缺少使细胞对 SN-38 敏感,所述的 SN-38 是伊立替康的活性代谢物(数据未显示)。除此之外,磷酸酶和强力蛋白同系物的损失,另一种在 MSI 中经常发生突变的基因显示出通过 HR 修复的无效,使得细胞对 PARP 抑制剂敏感(39,40)。因此,分析这些 DSB 修复中涉及的基因或者蛋白质对于预测 MSI 癌症患者的治疗结果是有帮助的。用于验证作为 MSI 癌症的药物治疗的预测标记物的临床研究得到保证。

[0083] 此前,本发明人证实了 MSH3 表达的损失导致 EMAST 和 MSI 低的表型,并且在偶发的 CRC 组织中,MSH3 表达的实质减少与 EMAST 有关(23)。除此之外,多数 MSI 低的 CRC 和相当比例 of MSS 肿瘤显示出 EMAST,这表明这些组织可能经历过 MSH3 的缺少(23)。MSH3 缺少可能与缺少 MLH1 的 CRC(20) 的疾病进展,以及 MSI 低的 CRC 具有差的预后(41,42) 有关,这提高了 MSH3 的损失可以与 CRC 的转移和重现的促进相关这一可能性。在这种环境下,含有 MSH3 阴性的癌症细胞种群的偶发性 CRC 使用铂药物或者 PARP 抑制剂,或者两者处理,可以抑制疾病的进展。

[0084] 总而言之,本文证明了缺少 MSH3 的细胞对于顺铂、奥沙利铂和 PARP 抑制剂是敏感的,这可能是由 DNA DSB 减少的修复造成的。这些发现有助于更好地理解 MSH3 在 DNA 修复和药物敏感性中的功能,以及有助于预测及改进具有缺少 MSH3 的癌症的患者的治疗结果。

[0085] 预期的是,本说明书中所讨论的任何实施方案可以通过关于本发明的任何方法、试剂盒、试剂或组合物来实施,反之亦然。此外,本发明的组合物可以用于实现本发明的方法。

[0086] 要理解的是,本文所述的具体实施方案是通过举例说明而不是限制本发明的方法来展示的。本发明的主要特征可以在不脱离本发明范围的情况下用于各种实施方案中。本领域技术人员将认识到,或者仅仅利用例行的实验能够确定,本文所述具体步骤的许多等同物。这样的等同物被认为是在本发明的范围内,且被权利要求所涵盖。

[0087] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请指示了本发明所涉及领域的技术人员的水平。所有的出版物和专利申请均引入本文作为参考,其引入的程度如同各个独立的出版物或专利申请具体并独立地被指明引入作为参考。

[0088] 词语“一个”或“一种”当与权利要求和/或说明书中的术语“包含”结合使用时,可以指“一种”,但其也与“一种或多种”、“至少一种”和“一种或多种”的意思相一致。在权利要求中所使用的术语“或者”是指“和/或”,除非明确指明仅仅是指供选择物,或供选择物为相互排斥的,尽管公开内容支持仅仅指供选择物及“和/或”的定义。在整个本申请中,术语“大约”用来说明这样的值,其包括装置和用来测定所述值的方法的误差的固有变化,或者研究受试者之间存在的变化。

[0089] 如在本说明书和权利要求书中所使用的,词语“包含”(以及任何形式的“包含”),“具有”(以及任何形式的“具有”),“包括”(以及任何形式的“包括”)或“含有”(以及任何形式的“含有”)是包括的或开放式的,且不排除额外的,未述及的元素或方法步骤。如本文所使用的,短语“大体上由...组成”将权利要求的范围限定至指定的物质或步骤和未在实质上影响要求保护的发明的基本和新颖的特征。如本文所使用的,短语“由...组成”不包括在权利要求中指定的任何元素、步骤或者成分,除了例如通常与元素或限制有关的杂质。

[0090] 本文所使用的术语“或其组合”是指在该术语之前所列举项目的全部排列和组合。例如，“A、B、C 或其组合”意在包括 A、B、C、AB、AC、BC 或 ABC 中的至少一种，并且如果在特定的上下文中顺序是重要的，那么还包括 BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC 或 CAB。继续这个例子，明显包括的是包含一种或多种项目或术语的重复的组合，如 BB、AAA、AB、BBC、AAABCCCC、CBBAAB、CABABB 等等。本领域技术人员将理解的是，通常对任何组合中的项目或术语的数目没有限制，除非从上下文中另外是明显的。

[0091] 如本文所使用的，表示近似的词语如但不限于“约”、“基本的”或者“基本上”指这样的情况，当这样修饰时理解为并非必须是绝对的或者精确的，而应认为是足够地接近本领域技术人员认为与当前的情况一样可以使用的情況。说明书可以变化的程度取决于进行多大的变化之后，仍然使得本领域技术人员认为经改变的特征仍然具有所需的性质和未经改变的特征所具有的能力。总地来说，与前面的讨论一致地，使用表示近似的词语如“约”修饰的数值可以从所宣称的数值变化至少 ± 1 、2、3、4、5、6、7、10、12 或者 15%。

[0092] 根据本发明的公开内容，在没有不适当的实验下可以制备和实施本文所公开和要求保护的全部组合物和 / 或方法。尽管已就优选的实施方 案描述了本发明的组合物和方法，但是对于本领域技术人员来说明显的是，在不脱离本发明的构思、精神和范围的情况下，可以改变本文所述的组合物和 / 或方法以及方法的步骤或方法的步骤的顺序。所有这样相似的对本领域技术人员而言明显的取代和修饰被认为是在所附的权利要求所限定的本发明的精神、范围和构思内。

[0093] 参考文献

[0094] 第 7, 252, 955 号美国专利 :Method of Detecting Colon Cancer.

[0095] 第 7, 575, 928 号美国专利 :Genes for Diagnosing Colorectal Cancer.

[0096] 第 7, 022, 472 号美国专利 :Mutations in Human MLH1 and Human MSH2 Genes useful in Diagnosing Colorectal Cancer.

[0097] 第 20090305277 号美国专利申请 :Gene Expression Markers for Prediction of Patient Response to Chemotherapy.

[0098] 1. Kunkel, T. A., and Erie, D. A. (2005) *Annu. Rev. Biochem.* 74, 681-710

[0099] 2. Jiricny, J. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 335-346

[0100] 3. Hendriks, Y. M., de Jong, A. E., Morreau, H., Tops, C. M., Vasen, H. F., Wijnen, J. T., Breuning, M. H., and Brocker-Vriends, A. H. (2006) *CA Cancer J. Clin.* 56, 213-225

[0101] 4. Boland, C. R., and Goel, A. (2010) *Gastroenterology* 138, 2073-2087 e2073

[0102] 5. Black, D., Soslow, R. A., Levine, D. A., Tomos, C., Chen, S. C., Hummer, A. J., Bogomolny, F., Olvera, N., Barakat, R. R., and Boyd, J. (2006) *J. Clin. Oncol.* 24, 1745-1753

[0103] 6. Pal, T., Permut-Wey, J., Kumar, A., and Sellers, T. A. (2008) *Clin. Cancer Res.* 14, 6847-6854

[0104] 7. Duckett, D. R., Drummond, J. T., Murchie, A. I., Reardon, J. T., Sancar, A., Lilley, D. M., and Modrich, P. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6443-6447

[0105] 8. de Wind, N., Dekker, M., Claij, N., Jansen, L., van Klink, Y., Radman, M., Riggins, G., van der Valk, M., van 't Wout, K., and te Riele, H. (1999) *Nat. Genet.* 23,

359-362

- [0106] 9. Abuin, A. , Zhang, H. , and Bradley, A. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20, 149-157
- [0107] 10. Koi, M. , Umar, A. , Chauhan, D. P. , Cherian, S. P. , Carethers, J. M. , Kunkel, T. A. , and Boland, C. R. (1994) *Cancer Res.* 54, 4308-4312
- [0108] 11. Hawn, M. T. , Umar, A. , Carethers, J. M. , Marra, G. , Kunkel, T. A. , Boland, C. R. , and Koi, M. (1995) *Cancer Res.* 55, 3721-3725
- [0109] 12. Zhang, N. , Lu, X. , Zhang, X. , Peterson, C. A. , and Legerski, R. J. (2002) *Mol. Cell. Biol.* 22, 2388-2397
- [0110] 13. Zhao, J. , Jain, A. , Iyer, R. R. , Modrich, P. L. , and Vasquez, K. M. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37, 4420-4429
- [0111] 14. Vasquez, K. M. (2010) *Environ. Mol. Mutagen* 51, 527-539
- [0112] 15. Zhang, N. , Liu, X. , Li, L. , and Legerski, R. (2007) *DNA Repair (Amst)* 6, 1670-1678
- [0113] 16. Zhu, G. , and Lippard, S. J. (2009) *Biochemistry* 48, 4916-4925
- [0114] 17. Chaney, S. G. , Campbell, S. L. , Bassett, E. , and Wu, Y. (2005) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 53, 3-11
- [0115] 18. Bryant, H. E. , Schultz, N. , Thomas, H. D. , Parker, K. M. , Flower, D. , Lopez, E. , Kyle, S. , Meuth, M. , Curtin, N. J. , and Helleday, T. (2005) *Nature* 434, 913-917
- [0116] 19. Farmer, H. , McCabe, N. , Lord, C. J. , Tutt, A. N. , Johnson, D. A. , Richardson, T. B. , Santarosa, M. , Dillon, K. J. , Hickson, I. , Knights, C. , Martin, N. M. , Jackson, S. P. , Smith, G. C. , and Ashworth, A. (2005) *Nature* 434, 917-921
- [0117] 20. Plaschke, J. , Kruger, S. , Jeske, B. , Theissig, F. , Kreuz, F. R. , Pistorius, S. , Saeger, H. D. , Iaccarino, I. , Marra, G. , and Schackert, H. K. (2004) *Cancer Res.* 64, 864-870
- [0118] 21. Miquel, C. , Jacob, S. , Grandjouan, S. , Aime, A. , Viguier, J. , Sabourin, J. C. , Sarasin, A. , Duval, A. , and Praz, F. (2007) *Oncogene* 26, 5919-5926
- [0119] 22. Hewish, M. , Lord, C. J. , Martin, S. A. , Cunningham, D. , and Ashworth, A. (2010) *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 197-208
- [0120] 23. Haugen, A. C. , Goel, A. , Yamada, K. , Marra, G. , Nguyen, T. P. , Nagasaka, T. , Kanazawa, S. , Koike, J. , Kikuchi, Y. , Zhong, X. , Arita, M. , Shibuya, K. , Oshimura, M. , Hemmi, H. , Boland, C. R. , and Koi, M. (2008) *Cancer Res.* 68, 8465-8472
- [0121] 24. Hinz, J. M. (2010) *Environ. Mol. Mutagen* 51, 582-603
- [0122] 25. Bonner, W. M. , Redon, C. E. , Dickey, J. S. , Nakamura, A. J. , Sedelnikova, O. A. , Solier, S. , and Pommier, Y. (2008) *Nat. Rev. Cancer* 8, 957-967
- [0123] 26. Wu, Q. , and Vasquez, K. M. (2008) *PLoS Genet.* 4, e1000189
- [0124] 27. Hong, Z. , Jiang, J. , Hashiguchi, K. , Hoshi, M. , Lan, L. , and Yasui, A. (2008) *J. Cell Sci.* 121, 3146-3154
- [0125] 28. Reynolds, M. F. , Peterson-Roth, E. C. , Bespalov, I. A. , Johnston, T. , Gurel, V. M. , Menard, H. L. , and Zhitkovich, A. (2009) *Cancer Res.* 69, 1071-1079

- [0126] 29. Kucherlapati, M. H. , Lee, K. , Nguyen, A. A. , Clark, A. B. , Hou, H. , Jr. , Rosulek, A. , Li, H. , Yang, K. , Fan, K. , Lipkin, M. , Bronson, R. T. , Jelicks, L. , Kunkel, T. A. , Kucherlapati, R. , and Edelman, W. (2010) *Gastroenterology* 138,993-1002e1001
- [0127] 30. Nehme, A. , Baskaran, R. , Nebel, S. , Fink, D. , Howell, S. B. , Wang, J. Y. , and Christen, R. D. (1999) *Br. J. Cancer* 79,1104-1110
- [0128] 31. Vaisman, A. , Varchenko, M. , Umar, A. , Kunkel, T. A. , Risinger, J. I. , Barrett, J. C. , Hamilton, T. C. , and Chaney, S. G. (1998) *Cancer Res.* 58,3579-3585
- [0129] 32. Ribic, C. M. , Sargent, D. J. , Moore, M. J. , Thibodeau, S. N. , French, A. J. , Goldberg, R. M. , Hamilton, S. R. , Laurent-Puig, P. , Gryfe, R. , Shepherd, L. E. , Tu, D. , Redston, M. , and Gallinger, S. (2003) *N. Engl. J. Med.* 349,247-257
- [0130] 33. Papat, S. , Hubner, R. , and Houlston, R. S. (2005) *J. Clin. Oncol.* 23,609-618
- [0131] 34. Sargent, D. J. , Marsoni, S. , Monges, G. , Thibodeau, S. N. , Labianca, R. , Hamilton, S. R. , French, A. J. , Kabat, B. , Foster, N. R. , Torri, V. , Ribic, C. , Grothey, A. , Moore, M. , Zaniboni, A. , Seitz, J. F. , Sinicrope, F. , and Gallinger, S. (2010) *J. Clin. Oncol.* 28,3219-3226
- [0132] 35. Bertagnolli, M. M. , Niedzwiecki, D. , Compton, C. C. , Hahn, H. P. , Hall, M. , Damas, B. , Jewell, S. D. , Mayer, R. J. , Goldberg, R. M. , Saltz, L. B. , Warren, R. S. , and Redston, M. (2009) *J. Clin. Oncol.* 27,1814-1821
- [0133] 36. Tejpar, S. , Bosman, F. , Delorenzi, M. , Fiocca, R. , Yan, P. , Klingbiel, D. , Dietrich, D. , Van Cutsem, E. , Labianca, R. , and Roth, A. (2009) *J. Clin. Oncol.* 27,4001
- [0134] 37. Vilar, E. , Scaltriti, M. , Balmana, J. , Saura, C. , Guzman, M. , Arribas, J. , Baselga, J. , and Tabernero, J. (2008) *Br. J. Cancer* 99,1607-1612
- [0135] 38. Rodriguez, R. , Hansen, L. T. , Phear, G. , Scorah, J. , Spang-Thomsen, M. , CoX, A. , Helleday, T. , and Meuth, M. (2008) *Clin. Cancer Res.* 14,5476-5483
- [0136] 39. Mendes-Pereira, A. M. , Martin, S. A. , Brough, R. , McCarthy, A. , Taylor, J. R. , Kim, J. S. , Waldman, T. , Lord, C. J. , and Ashworth, A. (2009) *EMBO Mol. Med.* 1,315-322
- [0137] 40. McEllin, B. , Camacho, C. V. , Mukherjee, B. , Hahn, B. , Tomimatsu, N. , Bachoo, R. M. , and Burma, S. (2010) *Cancer Res.* 70,5457-5464
- [0138] 41. Kohonen-Corish, M. R. , Daniel, J. J. , Chan, C. , Lin, B. P. , Kwun, S. Y. , Dent, O. F. , Dhillon, V. S. , Trent, R. J. , Chapuis, P. H. , and Bokey, E. L. (2005) *J. Clin. Oncol.* 23,2318-2324
- [0139] 42. Wright, C. M. , Dent, O. F. , Newland, R. C. , Barker, M. , Chapuis, P. H. , Bokey, E. L. , Young, J. P. , Leggett, B. A. , Jass, J. R. , and Macdonald, G. A. (2005) *Gut* 54, 103-108.

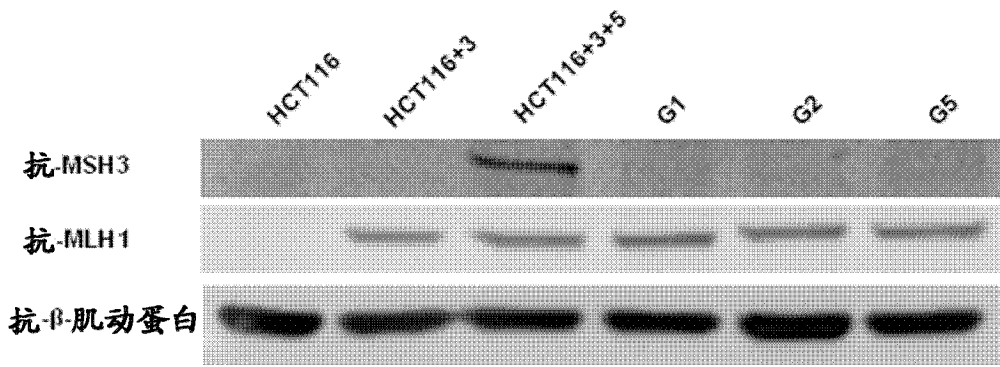


图 1A

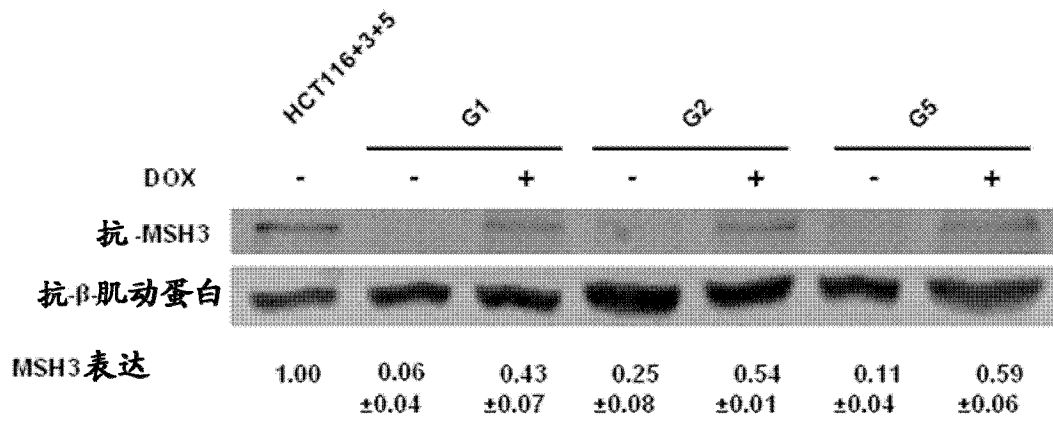


图 1B

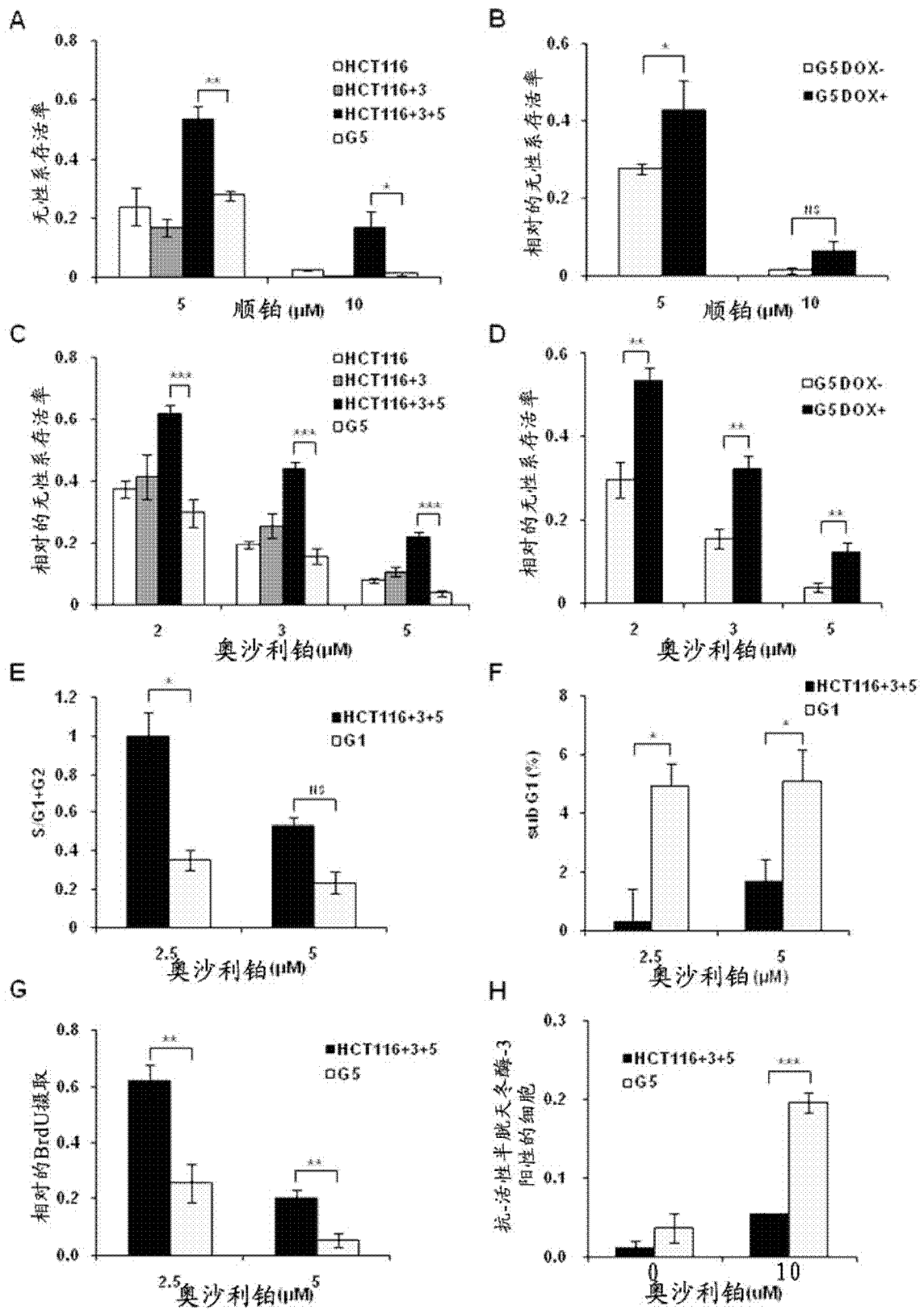


图 2

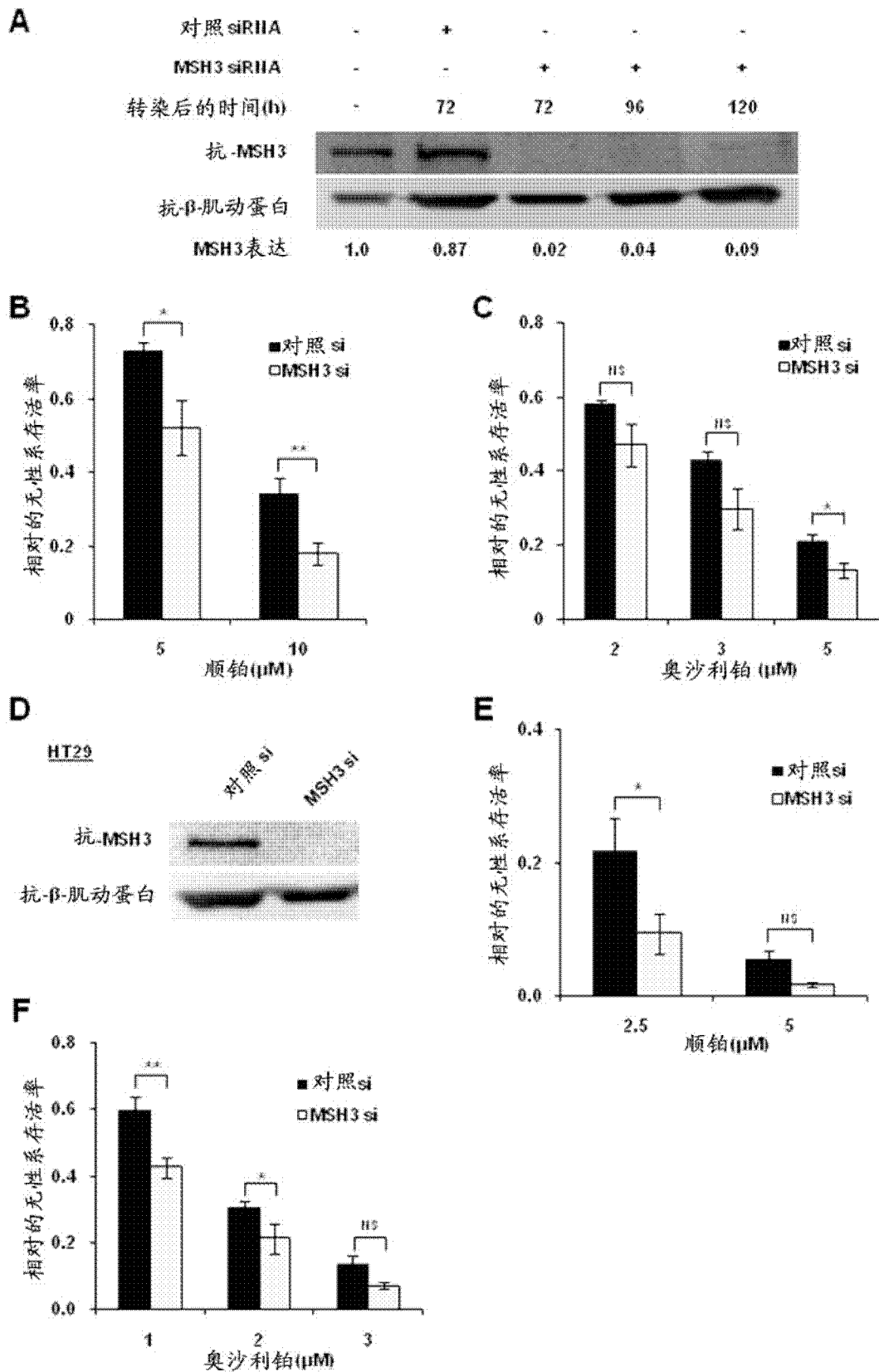


图 3

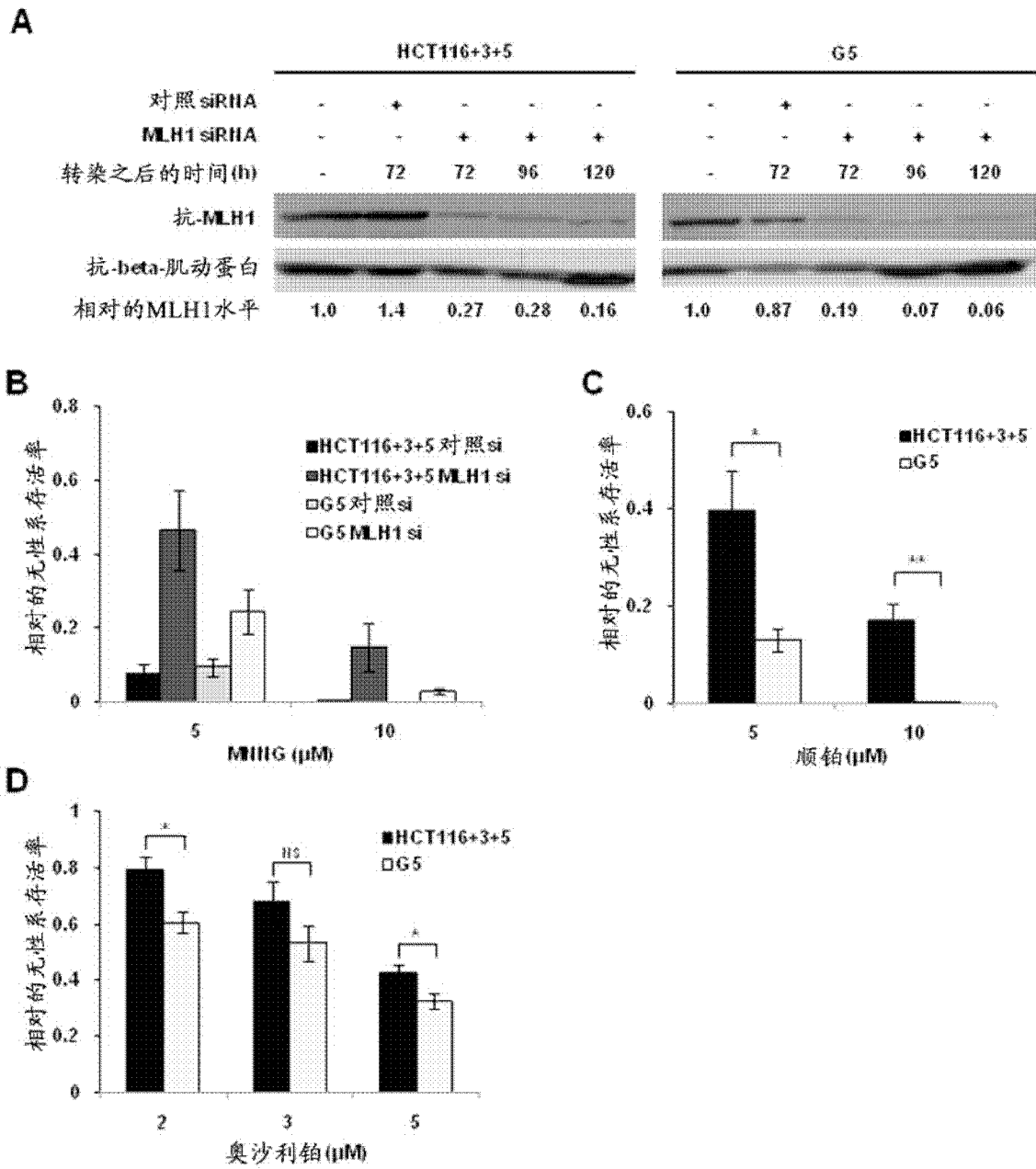


图 4

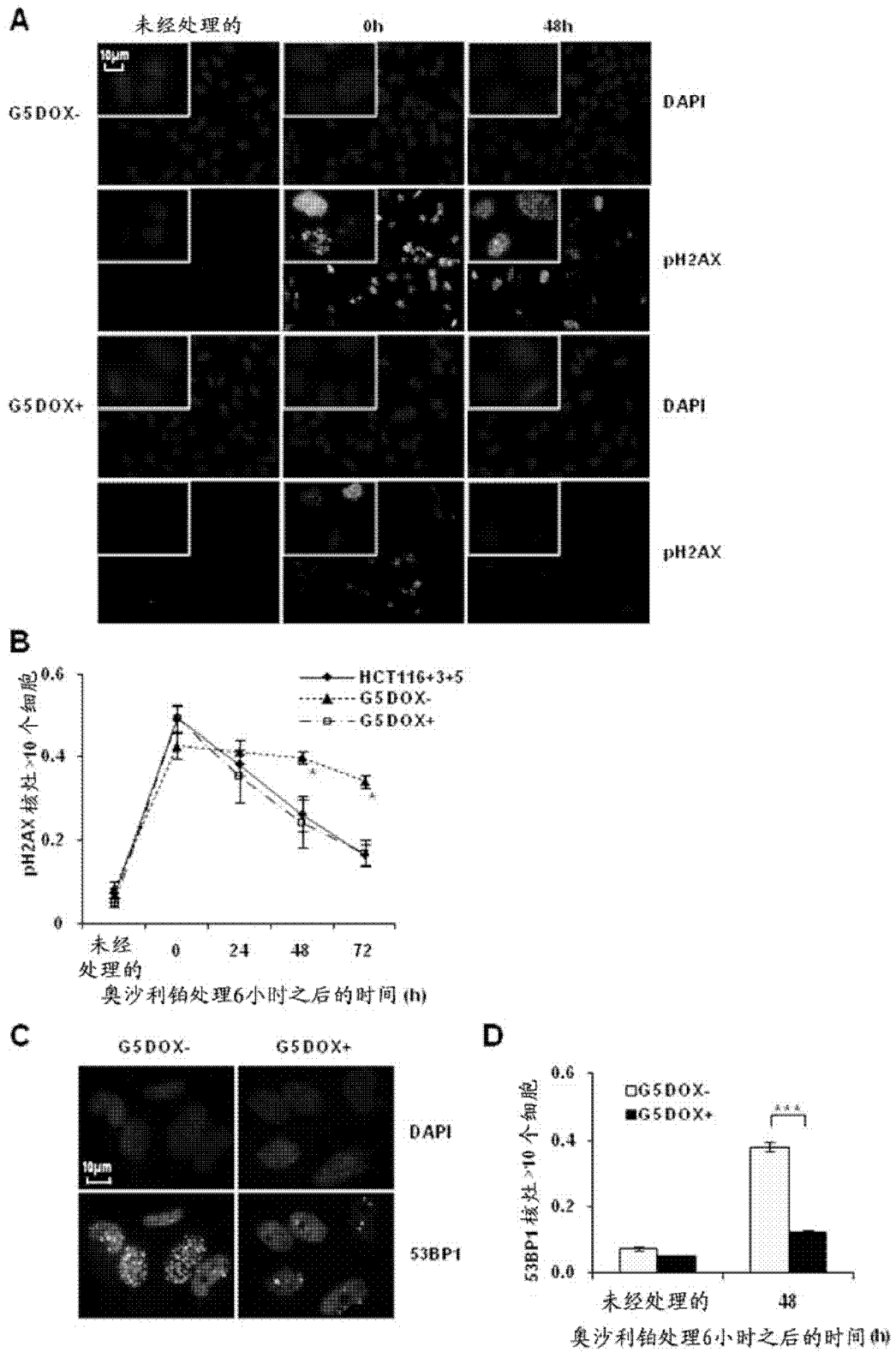


图 5

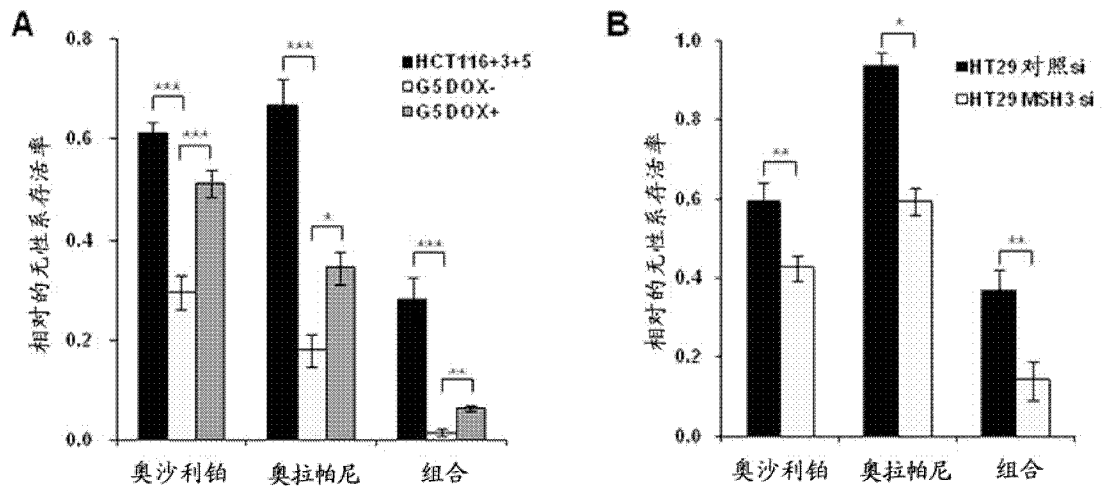


图 6

