



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 109890979 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 16

(21) 申请号 201780067302.2

(22) 申请日 2017.11.02

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109890979 A

(43) 申请公布日 2019.06.14

(30) 优先权数据
16196813.6 2016.11.02 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.04.29

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/078079 2017.11.02

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/083186 EN 2018.05.11

(73) 专利权人 米尔德泰克特有限责任公司
地址 德国不来梅

(72) 发明人 迈克·施皮克曼 尼纳·温特
加赞费尔·贝尔格 阿洛·拉特克

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 郑斌 蔡胜有

(51) Int.Cl.
C12Q 1/6851 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104844566 A, 2015.08.19

CN 104080911 A, 2014.10.01

CN 104039983 A, 2014.09.10

M. Spiekermann等. MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker.《Andrology》. 2014, 第3卷78-84.

M. Spiekermann等. MicroRNA miR-371a-3p in serum of patients with germ cell tumours: evaluations for establishing a serum biomarker.《Andrology》. 2014, 第3卷78-84.

Matthew J Murray等. A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of relapse in paediatric malignant germ-cell tumours.《British Journal of Cancer》. 2015, 第114卷151-162.

Vlasta Korenková等. Pre-amplification in the context of high-throughput qPCR gene expression experiment.《BMC Molecular Biology》. 2015, 第16卷5.

审查员 夏向东

权利要求书1页 说明书14页
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

睾丸生殖细胞肿瘤的初期阶段的早期检测

(57) 摘要

本发明涉及检测对象中睾丸生殖细胞肿瘤(更特别地是睾丸上皮内瘤变(TIN))的初期阶段的方法, 并且涉及miR-371a-3p作为用于检测TIN的生物标志物的用途。其还涉及miR-371a-3p特异性引物和/或miR-371a-3p特异性探针以及相应试剂盒用于检测TIN的用途。

1. 检测miR-371a-3p的试剂在制备用于检测对象中睾丸上皮内瘤变(TIN)的试剂中的用途,所述检测包括确定来自所述对象的生物样品中miR-371a-3p的表达水平,其中所述miR-371a-3p的表达水平指示所述对象中TIN的存在或不存在,其中所述检测包括以下步骤:

(i) 提供包含从所述生物样品分离/获得的cDNA的批次A,其中步骤(i)包括以下步骤:

(ia) 从所述生物样品分离RNA;以及

(ib) 将在步骤(ia)中分离的RNA转化成cDNA,从而提供包含所述cDNA的批次A;

(ii) 提供在步骤(i)中提供的批次A的三个或更多个等分试样,并用所述三个或更多个等分试样中的每一个进行独立的聚合酶链式反应(PCR)以扩增miR-371a-3p,从而提供包含经扩增的miR-371a-3p的三个或更多个批次B;以及

(iii) (a) 将等量的所述三个或更多个批次B混合,从而提供批次C,并通过基于PCR的方法确定批次C中miR-371a-3p的水平,或

(b) 通过基于PCR的方法确定所述三个或更多个批次B中的每一个中的miR-371a-3p的水平,并计算通过所述基于PCR的方法确定的三个或更多个miR-371a-3p的水平的平均值,

其中在步骤(iii)中确定的水平对应于所述生物样品中miR-371a-3p的表达水平,并且所述生物样品选自血清、血浆和全血。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中与对照相比miR-371a-3p的表达水平提高,则指示所述对象中TIN的存在。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的用途,其中miR-371a-3p的表达水平高于预定义的截止值,则指示所述对象中TIN的存在,其中所述截止值为5。

4. 根据权利要求1至2中任一项所述的用途,其中在步骤(ii)中提供批次A的三个等分试样。

5. 根据权利要求1至2中任一项所述的用途,其中所述基于PCR的方法是定量实时PCR(qRT-PCR)或数字PCR(dPCR)。

6. 根据权利要求1至2中任一项所述的用途,其中miR-371a-3p是用于检测睾丸上皮内瘤变(TIN)的生物标志物。

7. 根据权利要求6所述的用途,其中miR-371a-3p是基于血清的生物标志物。

8. 根据权利要求1至2中任一项所述的用途,其中所述试剂包含至少一种miR-371a-3p特异性引物和/或miR-371a-3p特异性探针。

9. 根据权利要求1至2中任一项所述的用途,其中所述试剂包含在试剂盒中。

睾丸生殖细胞肿瘤的初期阶段的早期检测

技术领域

[0001] 本发明涉及检测对象中睾丸生殖细胞肿瘤(更特别地是睾丸上皮内瘤变(testicular intraepithelial neoplasia, TIN))的初期阶段的方法,并且涉及miR-371a-3p作为用于检测TIN的生物标志物的用途。其还涉及miR-371a-3p特异性引物和/或miR-371a-3p特异性探针以及相应试剂盒用于检测TIN的用途。

背景技术

[0002] 睾丸生殖细胞癌是20岁至45岁的青年男性中最常发生的癌症。通过早期检测、适当治疗和密切监测,从睾丸癌恢复的机会非常好,但是治疗和监测的长期作用是巨大的,并且根据肿瘤类型和阶段,重新发生睾丸癌或遭受复发的风险可高至31%。已知的发生睾丸癌的风险因素包括家族史和睾丸未降(undescended testicle)(隐睾),这会使发生睾丸癌的风险提高四倍。

[0003] 睾丸生殖细胞癌起源于前期病变“生殖细胞原位瘤(germ cell neoplasia in situ, GCNIS)”,也称为“原位癌(carcinoma in situ, CIS)”、“未分类小管内生殖细胞瘤(intratubular germ cell neoplasia, unclassified, IGCNU)”和“睾丸上皮内瘤变”(Berney D.M.等,2016, Histopathology 69(1):7-10; Moch H.等,2016, Eur Urol 70(1):93-105)。TIN是睾丸生殖细胞肿瘤的一致前体,并且它可能在睾丸生殖细胞癌变为侵入性之前的数年中存在于睾丸中(Dieckmann K.P.和Skakkebaek N.E.,1999, Int J Cancer 83(6):815-22)。具有前体的睾丸中有50%将在5年内进展成侵入性癌症,并且70%将在7年内进展成侵入性癌症。实际上,几乎所有具有TIN的睾丸最终都会发生癌症(Skakkebaek N.E.等,1987, Int J Androl 10(1):19-28)。

[0004] 因此,早期检测TIN和适当的后续治疗可以保护患者免受侵入性睾丸生殖细胞癌的发生。

[0005] 到目前为止,外科手术是检测患者睾丸组织中TIN的唯一可能。由于在没有严重怀疑的情况下不会进行外科手术,因此TIN的检测是相当随机的。因此,需要用于检测TIN的非侵入性(例如,基于血清的)方法。

[0006] 在生殖细胞肿瘤(germ cell tumor, GCT)组织中最初检测到miR-371-3聚类的miRNA(Palmer R.D.等,2010, Cancer Res 70(7):2911-23),并且独立研究确定血清水平升高(Dieckmann K.P.等,2012, Br J Cancer 107(10):1754-60; Gillis A.J.等,2013, Mol Oncol 7(6):1083-92)。然而,先前尝试建立miR-371-3簇的miRNA的(血清)表达水平与TIN之间的联系已经失败(Spiekermann M.等,2014, Andrology 3(1):78-84; van Agthoven T.和Looijenga L.H.,2016, Oncotarget DOI:10.18632/oncotarget.10867)。

[0007] 通过使用特定的检测方法(首次描述于PCT/EP2016/059604中),本发明人现在首次表明,特异性miRNA miR-371a-3p的体液表达水平可以作为TIN存在的生物标志物,将TIN患者与健康个体区分开来。

发明内容

[0008] 在一方面,本发明涉及检测对象中睾丸上皮内瘤变(TIN)的方法,所述方法包括确定来自对象的生物样品中miR-371a-3p的表达水平,其中miR-371a-3p的表达水平指示对象中TIN的存在或不存在。

[0009] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:

[0010] (i) 提供包含从所述生物样品分离/获得的cDNA的批次A,其中步骤(i)包括以下步骤:

[0011] (ia) 从所述样品分离RNA;以及

[0012] (ib) 将在步骤(ia)中分离的RNA转化成cDNA,从而提供包含所述cDNA的批次A;

[0013] (ii) 提供在步骤(i)中提供的批次A的三个或更多个等分试样,并用所述三个或更多个等分试样中的每一个进行独立的聚合酶链式反应(PCR)以扩增miR-371a-3p,从而提供包含经扩增的miR-371a-3p的三个或更多个批次B;以及

[0014] (iii) 将等量的所述三个或更多个批次B混合,从而提供批次C,并通过基于PCR的方法确定批次C中miR-371a-3p的水平,

[0015] 其中在步骤(iii)中确定的水平对应于所述生物样品中miR-371a-3p的表达水平。

[0016] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:

[0017] (i) 提供包含从所述生物样品分离/获得的cDNA的批次A,其中步骤(i)包括以下步骤:

[0018] (ia) 从所述生物样品分离RNA;以及

[0019] (ib) 将在步骤(ia)中分离的RNA转化成cDNA,从而提供包含所述cDNA的批次A;

[0020] (ii) 提供在步骤(i)中提供的批次A的三个或更多个等分试样,并用所述三个或更多个等分试样中的每一个进行独立的聚合酶链式反应(PCR)以扩增miR-371a-3p,从而提供包含经扩增的miR-371a-3p的三个或更多个批次B;以及

[0021] (iii) 通过基于PCR的方法确定所述三个或更多个批次B中的每一个中的miR-371a-3p的水平,并计算通过所述基于PCR的方法确定的三个或更多个miR-371a-3p的水平的平均值,

[0022] 其中在步骤(iii)中计算的平均值对应于所述生物样品中miR-371a-3p的表达水平。

[0023] 在一个实施方案中,与对照相比miR-371a-3p的表达水平提高,则指示对象中TIN的存在。

[0024] 在一个实施方案中,miR-371a-3p的表达水平高于预定义的截止值,则指示对象中TIN的存在。

[0025] 在一个实施方案中,所述生物样品选自体液、组织、细胞、细胞裂解物和细胞培养物上清液。

[0026] 在一个实施方案中,所述体液选自血清、血浆、精浆、鞘膜积液、精囊肿液、全血、尿、羊水、渗出物、痰、唾液和脑脊液。

[0027] 在一个实施方案中,所述体液是血清。

[0028] 在一个实施方案中,所述组织选自天然组织、速冻组织以及福尔马林固定和石蜡包埋(formalin-fixed and paraffin-embedded,FFPE)的组织。

[0029] 在一个实施方案中,在步骤(ii)中提供批次A的三个等分试样。

[0030] 在一个实施方案中,基于PCR的方法是定量实时PCR(quantitative real-time PCR,qRT-PCR)或数字PCR(digital PCR,dPCR)。

[0031] 在另一个方面,本发明涉及miR-371a-3p作为用于检测睾丸上皮内瘤变(TIN)的生物标志物的用途。

[0032] 在一个实施方案中,miR-371a-3p被用作基于体液的生物标志物,其中优选地,所述体液如上限定。

[0033] 在一个实施方案中,miR-371a-3p被用作基于血液的生物标志物,特别是基于血清的生物标志物。

[0034] 在另一方面,本发明涉及至少一种miR-371a-3p特异性引物和/或miR-371a-3p特异性探针用于检测睾丸上皮内瘤变(TIN)的用途。

[0035] 在另一方面,本发明涉及用于检测睾丸上皮内瘤变(TIN)的方法的至少一种miR-371a-3p特异性引物和/或miR-371a-3p特异性探针,其中优选地,所述方法如上限定。

[0036] 在另一方面,本发明涉及包含至少一种miR-371a-3p特异性引物和/或miR-371a-3p特异性探针的试剂盒用于检测睾丸上皮内瘤变(TIN)的用途。

[0037] 在一个实施方案中,所述试剂盒还包含用于从生物样品分离RNA的工具和/或用于将从生物样品分离的RNA转化成cDNA的工具。

[0038] 在一个实施方案中,所述生物样品是如上限定的体液。在一个实施方案中,所述体液是血清。

[0039] 在另一方面,本发明涉及如上限定的用于检测睾丸上皮内瘤变(TIN)的方法的试剂盒,其中优选地,所述方法如上限定。

[0040] 在另一方面,本发明涉及治疗对象中睾丸上皮内瘤变(TIN)或预防对象中睾丸癌(更特别地是睾丸生殖细胞癌)的方法,该方法包括(i)通过如上限定的方法检测对象中TIN;以及(ii)向所述对象提供治疗,其中优选地,所述治疗是放射治疗、睾丸切除术和/或化学治疗。

附图说明

[0041] 图1示出了根据本发明的方法的一个示意图(实施例1)。在三次qRT-PCR之后,计算算术平均值用于数据的评估。

[0042] 图2示出了根据本发明的方法的一个示意图(实施例2)。用来自三个独立预扩增反应的等量的混合物仅进行一次qRT-PCR,以获得测量平均值用于数据的评估。

[0043] 图3示出了18例TIN患者和20例对照中的相对miR-371a-3p表达。误差棒代表标准差;y轴以对数标度表示。

具体实施方式

[0044] 虽然在上下文中对本发明进行了详细描述,但应当理解,本发明不限于本文所述的具体方法、方案和试剂,因为这些可以变化。还应当理解,本文使用的术语仅出于描述一些特定实施方案的目的,并不旨在限制本发明的范围,本发明的范围将仅由所附权利要求书限定。除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本领域普通技术

人员通常所理解相同的含义。

[0045] 在下文中,将描述本发明的某些要素。这些要素可以与一些具体实施方案一起列出,然而,应当理解,其可以以任何方式和任意数量组合以产生另外的实施方案。多种所描述的实例和优选实施方案不应该被解释为将本发明限于仅是明确描述的实施方案。应理解本说明书支持并包括将明确描述的实施方案与任何数量的所公开和/或优选的要素进行组合的实施方案。此外,除非上下文另有说明,否则本申请中所有描述的要素的任何排列和组合都应被视为被本申请的说明书公开。

[0046] 优选地,本文使用的术语如“A multilingual glossary of biotechnological terms (IUPAC Recommendations)”,H.GW.Leuenberger,B.Nagel,和H. Kölbl,编,Helvetica Chimica Acta,CH-4010Basel,Switzerland,(1995)中所述而定义。

[0047] 除非另外说明,否则本发明的实践将采用化学、生物化学、细胞生物学、免疫学和重组DNA技术的常规方法,这些方法在本领域的文献中进行解释(参见例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,J.Sambrook等编,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor 2000)。

[0048] 在本说明书及所附权利要求通篇中,除非上下文另外需要,否则应理解词语“包含”和变化形式如“包括”和“含有”表明包括所述成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,但不排除任何其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,虽然在一些实施方案中可以排除这样的其他成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组,即主题包括所述成员、整数或步骤或者成员、整数或步骤的组。除非在本文中另外说明或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中所使用的无数量词修饰的名词表示一个/种或更多个/种。本文中的值的范围记载仅用于作为单独地参考落在范围内的每个单独值的速记方法。除非本文另外说明,否则每个单独值被并入说明书中,如同在本文中单独地记载一样。除非本文另外说明或以其他方式明确地与上下文相矛盾,否则本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序进行。本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“例如”)的使用仅旨在更好地说明本发明,并且不对另外要求保护的本发明的范围构成限制。说明书中的语言不应被解释为表示对本发明的实践至关重要的任何非要求保护的要素。

[0049] 睾丸上皮内瘤变(TIN)是睾丸生殖细胞肿瘤的前期病变,并且也称为“生殖细胞原位瘤(GCNIS)”、“原位癌(CIS)”或“未分类小管内生殖细胞瘤(IGCNU)”。这些术语在本发明的上下文中可互换使用。如本文中可互换使用的术语“睾丸生殖细胞肿瘤”和“睾丸生殖细胞癌”是指起源于睾丸中的生殖细胞的睾丸肿瘤/癌(约占所有睾丸癌的95%)。

[0050] microRNA(miRNA)是短的、高度保守的非编码RNA,其在基因调控的复杂网络中发挥着重要作用。它们通过调控mRNA的稳定性和翻译与信使RNA(mRNA)特异性结合并控制基因表达。通常,miRNA由21至23个核苷酸组成。在一个实施方案中,如本文中提及的miR-371a-3p是人miR-371a-3p(智人(Homo sapiens),hsa)。在一个实施方案中,hsa-miR-371a-3p具有(5'-3')序列^{AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU}(SEQ ID NO:1)。

[0051] 本文中使用的术语“表达水平”可以指miR-371a-3p的相对表达水平,即miR-371a-3p相对于一个或更多个参照核酸分子之表达水平的表达水平(例如另一个miRNA,例如miR-93-5p),或者指miR-371a-3p的绝对表达水平,即实际量。根据本发明,“确定生物样品中miR-371a-3p的表达水平”可为“确定生物样品中miR-371a-3p的存在或不存在”。根据本发

明,生物样品中miR-371a-3p的表达水平(或者存在或不存在)指示从其中获得生物样品的对象中的TIN的存在、不存在和/或程度/进展。在一个实施方案中,与对照(例如,在没有TIN的对象中miR-371a-3p的表达水平)相比miR-371a-3p的表达水平提高,则指示对象中TIN的存在。在一个实施方案中,miR-371a-3p的表达水平高于预定义的截止值,则指示对象中TIN的存在。在一个实施方案中,确定miR-371a-3p的相对数量(relative quantity,RQ),其中优选地,截止值为5。

[0052] 本文中使用的术语“核酸分子”可以是DNA或RNA。

[0053] 在本发明的上下文中,术语“DNA”涉及包含脱氧核糖核苷酸残基并且优选完全或基本上由脱氧核糖核苷酸残基构成的分子。“脱氧核糖核苷酸”涉及在 β -D-呋喃核糖基的2'-位处缺少羟基的核苷酸。本文中使用的术语“互补DNA(cDNA)”是指在酶逆转录酶催化的反应中由RNA模板合成的双链DNA。

[0054] 在本发明的上下文中,术语“RNA”涉及包含核糖核苷酸残基并且优选完全或基本上由核糖核苷酸残基构成的分子。“核糖核苷酸”涉及在 β -D-呋喃核糖基的2'-位处具有羟基的核苷酸。

[0055] 本文中所述的并根据本发明使用的方法(另见PCT/EP2016/059604)允许在较低检测限下检测特定核酸分子(例如miR-371a-3p)。在一个实施方案中,术语“较低检测限”是指通过基于PCR的方法,例如定量实时PCR(qRT-PCR)或数字PCR(dPCR)提供的较低检测限。

[0056] 在一个实施方案中,术语“较低检测限”意指生物样品中特定核酸分子(例如miR-371a-3p)的浓度为 $\leq 1 \times 10^{-11}$ M、或 $\leq 1 \times 10^{-12}$ M、或 $\leq 1 \times 10^{-13}$ M、或 $\leq 1 \times 10^{-14}$ M、或 $\leq 1 \times 10^{-15}$ M、或 $\leq 1 \times 10^{-16}$ M。在一个实施方案中,术语“较低检测限”意指生物样品中特定核酸分子(例如miR-371a-3p)的浓度为 1×10^{-11} M至 1×10^{-17} M、或 1×10^{-12} M至 1×10^{-17} M、或 1×10^{-13} M至 1×10^{-17} M、或 1×10^{-14} M至 1×10^{-17} M、或 1×10^{-15} M至 1×10^{-17} M、或 1×10^{-16} M至 1×10^{-17} M。

[0057] 在一个实施方案中,术语“较低检测限”意指生物样品中特定核酸分子(例如miR-371a-3p分子)的数目为 ≤ 10000 、或 ≤ 5000 、或 ≤ 2500 、或 ≤ 1000 、或 ≤ 500 、或 ≤ 250 。在一个实施方案中,术语“较低检测限”意指生物样品中特定核酸分子的数目为20至10000、或20至5000、或20至2500、或20至1000、或20至500、或20至250。在一个实施方案中,术语“较低检测限”意指生物样品中特定核酸分子的数目为50至10000、或50至5000、或50至2500、或50至1000、或50至500、或50至250。在一个实施方案中,术语“较低检测限”意指生物样品中特定核酸分子的数目为100至10000、或100至5000、或100至2500、或100至1000、或100至500、或100至250。

[0058] 在一个实施方案中,本文中所述的特定核酸分子的浓度或数目是指在包含从生物样品(其中特定RNA分子被转化成相应的cDNA分子)分离/获得的cDNA的批次A中的特定核酸分子的浓度或数目。在一个实施方案中,本文中所述的特定核酸分子的浓度或数目是指从生物样品分离/提取的RNA中特定核酸分子的浓度或数目。

[0059] 在一个实施方案中,用根据本发明方法的步骤(ii)中的三个或更多个等分试样中的每一个进行的独立PCR是预扩增PCR反应。

[0060] 根据本发明的优选的生物样品选自体液、组织、细胞、细胞裂解物和细胞培养物上清液。

[0061] 优选的体液选自血清、血浆、精浆、鞘膜积液、精囊肿液、全血、尿、羊水、渗出物、

痰、唾液和脑脊液。在一个实施方案中,体液是血清。

[0062] 组织优选地选自天然组织、速冻组织以及福尔马林固定和石蜡包埋 (FFPE) 的组织。

[0063] 用于从生物样品分离 (或提取) RNA (例如总RNA或miRNA) 的方式和方法是本领域技术人员已知的,并且包括市售的试剂盒,例如RNeasy Mini试剂盒和miRNeasy Mini试剂盒 (两者均来自Qiagen)。

[0064] 将RNA转化成cDNA的步骤优选通过使用酶逆转录酶的逆转录 (reverse transcription, RT) 进行。用于逆转录和合成cDNA的方式和方法是技术人员已知的,并且包括市售试剂盒,例如 **TaqMan[®]** microRNA RT试剂盒 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific)。

[0065] 根据本发明的优选的基于PCR的方法是定量实时PCR (qRT-PCR) 和数字PCR (dPCR)。

[0066] 在一个实施方案中,qRT-PCR是包括使用荧光标记的探针之基于荧光的qRT-PCR。在一个实施方案中,荧光标记的探针由用荧光报道染料和淬灭染料两者标记的寡核苷酸组成 (= 双标记探针)。合适的荧光报道和淬灭染料/部分是本领域技术人员已知的,并且包括但不限于报道染料/部分 6-FAM[™]、JOE[™]、**Cy5[®]** 和 **Cy3[®]** 以及淬灭染料/部分 dabcy1、TAMRA[™] 和 BHQ[™]-1、BHQ[™]-2 或 BHQ[™]-3。探针特异性产物的扩增导致探针的切割 (= 扩增介导的探针置换),从而产生报道物荧光的增加。用于基于荧光的qRT-PCR的其他合适荧光染料包括 **EvaGreen[®]** 和 **SYBR[®]** Green。通常,反应中荧光的增加 (实时测量) 与靶标扩增的增加成正比。

[0067] dPCR是用于核酸分子的绝对定量和检测的常规qRT-PCR的替代方法。dPCR通过将DNA或cDNA的样品分成许多单独的平行PCR反应来工作;这些反应中的一些包含靶核酸分子 (阳性),而另一些没有 (阴性)。单个分子可以被扩增百万倍或更多。在扩增期间,染料标记的探针用于检测序列特异性靶标。当不存在靶序列时,没有信号累积。在PCR分析之后,使用阴性反应的分分数 (fraction) 来产生样品中靶分子数的绝对计数,而不需要标准物或内源对照。

[0068] 本文中使用的表述“至少一种miR-371a-3p特异性引物”可以例如是指用于将RNA转化成cDNA的单个miR-371a-3p特异性引物,例如具有特定发夹结构的miR-371a-3p特异性引物 (例如,茎环引物),和/或是指用于qRT-PCR的一对miR-371a-3p特异性引物。

[0069] 用于设计和制备miR-371a-3p特异性引物和探针的合适方法是本领域技术人员已知的。miR-371a-3p特异性引物和探针也可商购获得,例如来自Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) 和Applied Biosystems (Darmstadt, Germany)。

[0070] 本文中使用的术语“试剂盒” (或“套件”) 是指包含一个或更多个容器和任选地,数据载体的制品。所述一个或更多个容器可填充有一种或更多种上述工具或试剂。试剂盒中可以包含含有例如稀释剂、缓冲剂和另外的试剂 (例如dNTP) 的另外的容器。所述数据载体可以是非电子数据载体,例如图形数据载体 (例如信息活页 (information leaflet)、信息表、条形码或访问码 (access code)); 或者电子数据载体,例如软盘、光盘 (CD)、数字通用光盘 (DVD)、微芯片或另外的基于半导体的电子数据载体。访问码可允许进入数据库,例如因

特网数据库、集中式数据库或分散式数据库。所述数据载体可以包含在本发明的方法中的试剂盒的使用说明。数据载体可包含miR-371a-3p表达水平的截止值或参考水平。在数据载体包含允许访问数据库的访问码的情况下,所述阈值或参考水平存放在该数据库中。另外,所述数据载体可以包含关于如何实施本发明的方法的信息或指示。

[0071] 本文中使用的术语“对象”涉及任何生物体,例如脊椎动物,特别是任何哺乳动物,包括人和另一种哺乳动物(例如动物如啮齿动物、兔或非人灵长类(例如猴))二者。啮齿动物可以是小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠或栗鼠。优选地,对象是男性对象。优选地,对象是人。在一个实施方案中,对象是患有或疑似患有疾病或病症,特别是本文中限定的疾病或病症的对象,其在本文中也称为“患者”。在一个实施方案中,所述对象有睾丸癌家族史和/或患有或曾经患有睾丸未降(隐睾)。

[0072] 本发明还提供了治疗对象中TIN或预防对象中睾丸癌(更特别地是睾丸生殖细胞癌)的方法,该方法包括(i)通过本文中限定的方法检测对象中的TIN以及(ii)向对象提供治疗。根据本发明,治疗优选地包括放射治疗(特别是局部放射治疗)、睾丸切除术和/或化学治疗。例如,局部放射治疗可涉及以2Gy为级分的16至20Gy。例如,放射治疗可以在单独的睾丸的情况下进行。例如,如果对侧睾丸是健康的,则可以进行睾丸切除术。根据本发明,治疗之前可以例如通过常规的睾丸超声对对象进行监测。

[0073] 通过以下实施例进一步举例说明本发明,这些实施例不被解释为限制本发明的范围。

[0074] 实施例

[0075] 比较例1

[0076] a) RNA分离

[0077] 从血清样品中,使用QIAGEN miRNeasy Mini试剂盒根据制造商的说明书(进行微小修改)对血清样品分离总RNA:对于200μl血清,使用1ml的QIAzol和200μl氯仿。

[0078] b) cDNA合成

[0079] 为了定量血清样品中的miR-371a-3p,使用TaqMan[®] microRNA RT试剂盒(Life Technologies/Thermo Fisher Scientific)以及由miR-371a-3p和miR-93-5p(用于归一化)的1μl每种茎环引物组成的引物库(Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, 测定ID:002124(miR-371a-3p)和000432(miR-93-5p))逆转录6μl的总RNA。

[0080] c) 预扩增

[0081] 因为血清中的低浓度RNA/miRNA,所以在qRT-PCR之前进行了预扩增步骤。预扩增反应由4μl的逆转录(RT)产物、miR-371a-3p和miR-93-5p各1.12μl测定剂(assay)(1:100稀释)、4μl 5x Real Time ready cDNA Pre-Amp Master(Roche,Mannheim,Germany)和加至总反应体积为20μl的无核酸酶的水组成。预扩增在95℃下进行1分钟,随后在95℃下15秒并且在60℃下4分钟进行14个循环。然后将预扩增产物在无核酸酶的水中以1:2稀释,并将5μl稀释的预扩增产物用于qRT-PCR。

[0082] d) 使用TaqMan[®]探针通过定量实时PCR(qRT-PCR)检测miRNA

[0083] qRT-PCR反应由10μl的FASTstart Universal Probe Master(Roche,Mannheim, Germany)、1μl的特异性测定剂和20μl总反应体积中的无核酸酶的水组成。qRT-PCR在7500

Fast Real-Time PCR系统(Life Technologies/Thermo Fisher Scientific)上以以下循环条件进行:在95℃下10分钟,然后在95℃下15秒并且在60℃下1分钟进行40个循环。使用 $\Delta \Delta Ct$ 方法计算相对数量(RQ)。

[0084] 在预扩增步骤期间,如果确定过程发生在qRT-PCR方法的较低检测限下,则常常会出现问题。将miRNA分子吸移到cDNA合成中,并以1:1转录成cDNA分子。这意味着如果最初只有少量的miRNA分子,这也只能产生相同少量的cDNA。如果在另一个实验期间重现该结果,那么统计学上不可能将相同准确量的cDNA/miRNA分子吸移到反应管中用于再次预扩增。对此的解释是,例如,在完整的反应管中存在10个miRNA或cDNA分子。如果将某一等分试样从该管吸移出到用于预扩增的下一个反应管中,那么由于统计概率,每次都不可能取出相同量的cDNA/miRNA分子。由此可能的是,在一个吸移步骤期间,5个cDNA/miRNA分子、8个分子、3个分子或甚至没有一个分子被转移到下一个预扩增反应中。我们的实验已经示出,这就是为什么在较低检测限下的可重现结果是非常困难或者甚至不可能的原因。

[0085] 在表1中,示出了一个样品的miRNA分析结果,其通过单独的cDNA合成、预扩增和qRT-PCR分别在RNA分离两次(A和B)之后进行处理。这里可以清楚地看出在“A”运行中的样品的miRNA-371a-3p的Ct值与“B”运行中获得的那些明显不同。相比之下,同样样品的miRNA-93的Ct值在每次运行中几乎相同。这导致同样样品的靶miRNA-371a-3p的运行“A”和“B”之完全不同的表达水平。这种现象是由于极少量的miRNA分子的统计学分布:如果与用于cDNA合成的1005个分子相比,例如存在1002个miRNA分子,则预扩增和qRT-PCR之后的Ct值差异几乎不可见。但是,如果与吸移到预扩增反应中的5个分子相比只存在2个分子,则差异在预扩增过程的循环(例如,14个循环)期间呈指数增长,并且表达水平差异巨大(各自的Ct值在qRT-PCR之后检测)。假设在每个循环期间100%效率的复制,则在预扩增的14个循环之后,2个分子变成16,384个分子并且5个分子变成6,103,515,625个分子。

[0086] 表1:测试qRT-PCR中测量的重现性的实验总结(A和B是同样样品的不同运行);靶标名称=测量的miRNA;Ct=阈值循环;Ct平均值=qRT-PCR一式三份的平均值)。

[0087]

样品名称	靶标名称	Ct	Ct平均值
8594A	miR-371a-3p	43.377	43.458
8594A	miR-371a-3p	43.520	43.458
8594A	miR-371a-3p	43.476	43.458
8594B	miR-371a-3p	29.493	29.460
8594B	miR-371a-3p	29.479	29.460
8594B	miR-371a-3p	29.408	29.460
8594A	miR-93-5p	12.780	12.791
8594A	miR-93-5p	12.814	12.791
8594A	miR-93-5p	12.779	12.791
8594B	miR-93-5p	12.580	12.631
8594B	miR-93-5p	12.644	12.631
8594B	miR-93-5p	12.670	12.631

[0088] 这些差异也可以在表2中看出,其中将通常表达非常高水平的miRNA-371a-3p的细胞系(HT 27)稀释直到达到较低检测限,以使得发生Ct值的变化。

[0089] 表2:miRNA的稀释系列;靶标名称=测量的miRNA;Ct=阈值循环;Ct平均值=qRT-PCR一式两份的平均值;检测不到=qRT-PCR期间无可检测的信号)。

[0090]

样品名称	靶标名称	Ct	Ct 平均值	稀释
1) HT 27 (1)	miR-371a-3p	11.931	11.883	1:250
1) HT 27 (1)	miR-371a-3p	11.836	11.883	
1) HT 27 (2)	miR-371a-3p	12.101	11.998	
1) HT 27 (2)	miR-371a-3p	11.896	11.998	
1) HT 27 (3)	miR-371a-3p	11.985	11.975	
1) HT 27 (3)	miR-371a-3p	11.964	11.975	
2) HT 27 (1)	miR-371a-3p	15.277	15.310	1:2500
2) HT 27 (1)	miR-371a-3p	15.342	15.310	
2) HT 27 (2)	miR-371a-3p	15.394	15.386	
2) HT 27 (2)	miR-371a-3p	15.378	15.386	
2) HT 27 (3)	miR-371a-3p	15.426	15.419	
2) HT 27 (3)	miR-371a-3p	15.412	15.419	
3) HT 27 (1)	miR-371a-3p	18.596	18.582	1:25000
3) HT 27 (1)	miR-371a-3p	18.569	18.582	
3) HT 27 (2)	miR-371a-3p	18.552	18.548	
3) HT 27 (2)	miR-371a-3p	18.544	18.548	
3) HT 27 (3)	miR-371a-3p	18.797	18.758	
3) HT 27 (3)	miR-371a-3p	18.720	18.758	
4) HT 27 (1)	miR-371a-3p	22.241	22.258	1:250000
4) HT 27 (1)	miR-371a-3p	22.274	22.258	
4) HT 27 (2)	miR-371a-3p	21.958	21.924	
4) HT 27 (2)	miR-371a-3p	21.889	21.924	
4) HT 27 (3)	miR-371a-3p	21.961	21.958	
4) HT 27 (3)	miR-371a-3p	21.955	21.958	
5) HT 27 (1)	miR-371a-3p	25.487	25.516	1:2500000
5) HT 27 (1)	miR-371a-3p	25.546	25.516	
5) HT 27 (2)	miR-371a-3p	25.355	25.328	
5) HT 27 (2)	miR-371a-3p	25.301	25.328	
5) HT 27 (3)	miR-371a-3p	25.064	25.038	
5) HT 27 (3)	miR-371a-3p	25.013	25.038	
6) HT 27 (1)	miR-371a-3p	26.831	26.826	1:25000000
6) HT 27 (1)	miR-371a-3p	26.820	26.826	
6) HT 27 (2)	miR-371a-3p	34.186	34.218	
6) HT 27 (2)	miR-371a-3p	34.251	34.218	
6) HT 27 (3)	miR-371a-3p	29.800	29.785	
6) HT 27 (3)	miR-371a-3p	29.769	29.785	
7) HT 27 (1)	miR-371a-3p	检测不到	检测不到	1:250000000
7) HT 27 (2)	miR-371a-3p	检测不到	检测不到	
7) HT 27 (2)	miR-371a-3p	检测不到	检测不到	
7) HT 27 (3)	miR-371a-3p	检测不到	检测不到	
7) HT 27 (3)	miR-371a-3p	检测不到	检测不到	

[0091] 在另一个实验中,限定量的人造miRNA(所谓的cel-miRNA-39)示例性地用于cDNA合成。结果示于表3中。再次,可以看到在约100个miRNA分子(大约0.0000000002皮摩尔)下出现关于Ct值的主要差异。

[0092] 表3:分子水平的miRNA cel-miRNA-39稀释;靶标名称=测量的miRNA;Ct=阈值循环;Ct平均值=qRT-PCR一式两份的平均值;Ct MV=相同样品三个预扩增运行的平均值;理论Ct=基于最高浓度的值,以数学方式确定的Ct值;ud=检测不到,qRT-PCR期间无可检测的信号)。

[0093]

样品名称	分子的数目	分子的数目 [皮摩尔, pmol]	浓度 [M]	靶标名称	Ct	Ct 平均值	Ct MV	理论 Ct
1. (1)				cel-miR-39-3p	4.067	4.154		
1. (1)				cel-miR-39-3p	4.241	4.154		
1. (2)				cel-miR-39-3p	4.171	4.214		
1. (2)				cel-miR-39-3p	4.257	4.214		
1. (3)				cel-miR-39-3p	4.334	4.308		
1. (3)	$1 \times 10^8 = 100000000$	0,00016605388	$4,15 \times 10^{-11}$	cel-miR-39-3p	4.283	4.308	4.23	4.20
5. (1)				cel-miR-39-3p	18.928	18.961		
5. (1)				cel-miR-39-3p	18.994	18.961		
5. (2)				cel-miR-39-3p	19.145	19.145		
5. (2)				cel-miR-39-3p	19.145	19.145		
5. (3)				cel-miR-39-3p	19.318	19.335		
5. (3)	$1 \times 10^4 = 10000$	0,00000001661	$4,15 \times 10^{-15}$	cel-miR-39-3p	19.351	19.335	19.15	17.40
6. (1)				cel-miR-39-3p	22.598	22.578		

[0094]

6. (1)				cel-miR-39-3p	22.557	22.578		
6. (3)				cel-miR-39-3p	23.052	23.029		
6. (3)				cel-miR-39-3p	23.005	23.029		
6. (2)				cel-miR-39-3p	23.127	23.122		
6. (2)	$1 \times 10^3 = 1000$	0,000000000166	$4,15 \times 10^{-16}$	cel-miR-39-3p	23.116	23.122	22.91	20.70
7. (1)				cel-miR-39-3p	24.781	24.822		
7. (1)				cel-miR-39-3p	24.863	24.822		
7. (2)				cel-miR-39-3p	27.048	27.042		
7. (2)				cel-miR-39-3p	27.037	27.042		
7. (3)				cel-miR-39-3p	26.229	26.234		
7. (3)	$1 \times 10^2 = 100$	0,000000000017	$4,15 \times 10^{-17}$	cel-miR-39-3p	26.240	26.234	26.03	24.00
8. (1)				cel-miR-39-3p	ud			
8. (1)				cel-miR-39-3p	ud			
8. (2)				cel-miR-39-3p	ud			
8. (2)				cel-miR-39-3p	ud			
8. (3)				cel-miR-39-3p	ud			
8. (3)	10	0,000000000002	$4,15 \times 10^{-18}$	cel-miR-39-3p	ud		ud	27.30
9. (1)				cel-miR-39-3p	ud			
9. (1)				cel-miR-39-3p	ud			
9. (2)				cel-miR-39-3p	ud			
9. (2)				cel-miR-39-3p	ud			
9. (3)				cel-miR-39-3p	ud			
9. (3)	0	0	0	cel-miR-39-3p	ud		ud	ud

[0095] e) 总结

[0096] 上述数据表明,在较低检测限下产生可靠结果的问题与预扩增步骤相关。如果对样品进行预扩增,并使用qRT-PCR测量该预扩增产物,则这导致每次一致的结果(参见表1、表2和表3中一式三份/一式两份的qRT-PCR测定)。然而,如果在一个cDNA反应管中进行几个预扩增,并且根据统计学,这些预扩增包括不同量的cDNA分子,则这导致后续qRT-PCR中Ct值的显著差异。尽管以最佳混合过程,也不可能将来自cDNA合成的少量cDNA分子等份地分配到预扩增的反应管中。此后,出现错误,并且存在变化很大的Ct值。这由14个循环每一个的分子数加倍来解释。

[0097] 实施例1

[0098] 对于预扩增过程,在cDNA合成之后将样品分到三个反应管中。然后,分别用这三个反应管的每一个进行qRT-PCR(参见表4和图1)。为了考虑Ct值的偏差和所获得的不同表达

水平(此处示例性地用于miR-371a-3p),以数学方式确定三个RQ值的平均值(算术平均值)(RQ=相对数量=表达)。

[0099] 表4:qRT-PCR的结果;RQ=相对数量;数学RQ-MV $C_t = RQ$ 的数学平均值;平均值=qRT-PCR一式三份的平均值;检测不到=qRT-PCR期间无可检测的信号。

[0100]

样品	RQ	数学RQ-MV	371a-3p的 C_t 平均值	93的 C_t 平均值
90 (1)	0.000		检测不到	11.179
90 (2)	9.389	3.130	30.289	11.442
90 (3)	0.000		检测不到	11.548
71 (1)	14.986		31.809	13.637
71 (2)	22.193	12.393	31.249	13.644
71 (3)	0.000		检测不到	13.651

[0101] 实施例2

[0102] 如实施例1在cDNA合成之后将样品分到三个用于预扩增的反应管中。之后,从三个预扩增反应管的每一个中取出相同的体积,并将其一起吸移到一个反应管中,并充分混合用于单个后续qRT-PCR(参见图2)。

[0103] 进行了一式三份的预扩增以分别补偿 C_t 值和确定的表达水平中的差异。这些差异可以通过计算RQ值的平均值(实施例1=计算的平均值/算术平均值)或者如实施例2中通过混合三种预扩增反应并在后续qRT-PCR分析中使用混合物来补偿,从而产生用于解释结果的方法平均值/测量平均值。该研究的结果列于表5中。

[0104] 表5:qRT-PCR的结果;RQ=相对数量;数学RQ-MV $C_t = RQ$ 的数学平均值; C_t 平均值=qRT-PCR一式三份的平均值;检测不到=qRT-PCR期间无可检测的信号;Zus=根据实施例2的方案处理样品(方法平均值)。

[0105]

样品	RQ	数学 RQ MV (1),(2),(3)	371a-3p的Ct平均值	93 的Ct平均值
80 (1)	1060.735		24.605	12.578
80 (2)	1853.232		23.906	12.684
80 (3)	1365.875		24.292	12.630
80 Zus (1,2,3)	1582.389	1426.614	24.033	12.583
129 (1)	154.021		27.944	13.133
129 (2)	244.851		27.287	13.146
129 (3)	420.644		26.453	13.092
129 Zus (1,2,3)	278.655	273.172	27.084	13.129
112 (1)	0.000			13.204
112 (2)	0.000			13.336
112 (3)	0.000			13.264
112 Zus (1,2,3)	0.000	0.000		13.373
90 (1)	0.000			11.179
90 (2)	9.389		30.289	11.442
90 (3)	0.000			11.548
90 Zus (1,2,3)	2.708	3.130	32.007	11.367
119 (1)	79.004		30.596	14.822
119 (2)	5.524		34.343	14.731
119 (3)	0.000			14.874
119 Zus (1,2,3)	31.989	28.176	31.995	14.917

[0106] 综上所述,实施例1和2中举例证明的方法提供了甚至在约0.0000000002皮摩尔的较低检测限下以准确和可靠的方式分析特定核酸分子的可能性。

[0107] 实施例3

[0108] 使用以上实施例2中所述的方法(另见PCT/EP2016/059604),在18例患有TIN但没有睾丸生殖细胞癌的患者(平均年龄:33.4±6.5)和20例对照(平均年龄:37.5±10.8)的血清中对miR-371a-3p的相对表达进行量化。

[0109] A. 方法

[0110] a) RNA分离

[0111] 从血清样品中,使用QIAGEN miRNeasy Mini试剂盒根据制造商的说明书(进行微小修改)对血清样品分离总RNA:对于200μl血清,使用1ml的QIAzol和200μl氯仿。

[0112] b) cDNA合成

[0113] 为了定量血清样品中的miR-371a-3p,使用TaqMan[®] microRNA RT试剂盒(Life Technologies/Thermo Fisher Scientific)以及由miR-371a-3p和miR-93-5p(用于归一化)的1μl每种茎环引物组成的引物库(Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, 测定ID:002124(miR-371a-3p)和000432(miR-93-5p))逆转录6μl的总RNA。

[0114] c) 预扩增

[0115] 因为血清中的低浓度RNA/miRNA,所以在qRT-PCR之前进行了预扩增步骤。首先,在cDNA合成之后将样品分到三个用于预扩增的反应管中。预扩增反应由4μl的逆转录(RT)产物,miR-371a-3p和miR-93-5p各1.12μl测定剂(assay)(1:100稀释),4μl 5x Real Time ready cDNA Pre-Amp Master(Roche,Mannheim,Germany)和加至总反应体积为20μl的无核酸酶的水组成。预扩增在95℃下进行1分钟,随后在95℃下15秒并且在60℃下4分钟进行14

个循环。

[0116] 之后,从三个预扩增反应管的每一个中取出相同的体积,并将其一起吸移到一个反应管中,并充分混合用于单个后续qRT-PCR。然后将预扩增产物在无核酸酶的水中以1:2稀释,并将5 μ l稀释的预扩增产物用于qRT-PCR。

[0117] d) 使用 **TaqMan[®]** 探针通过定量实时PCR (qRT-PCR) 检测miRNA

[0118] qRT-PCR反应由10 μ l的FASTstart Universal Probe Master (Roche, Mannheim, Germany)、1 μ l的特异性测定剂和20 μ l总反应体积中的无核酸酶的水组成。qRT-PCR在7500 Fast Real-Time PCR系统 (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) 上用以下循环条件进行:在95 $^{\circ}$ C下10分钟,然后在95 $^{\circ}$ C下15秒并且在60 $^{\circ}$ C下1分钟进行40个循环。使用 $\Delta\Delta C_t$ 方法计算相对数量 (RQ)。

[0119] B. 结果

[0120] 结果示于图3中。TIN患者中平均miR-371a-3p表达为30.75RQ (相对数量), 标准差为58.74。在对照中,miRNA的平均表达为0.77RQ,标准差为1.73。双侧Mann Whitney U检验证明这种差异是显著的, $p=0.007$ 。

[0121] 对于睾丸生殖细胞肿瘤,miR-371a-3p可以用作基于血清的生物标志物。在先前的研究中,选择RQ=5的截止值以在肿瘤和对照之间进行区分 (Dieckmann K.P.等,2016,Eur Urol doi:10.1016/j.eururo.2016.07.029)。

[0122] 使用这个截止值,18例TIN患者中有8例 (44.4%) 出现miR-371a-3p血清水平升高,而20例对照中只有1例 (5%) 呈阳性。为了测试这种比例差异是否显著,采用双侧fisher精确检验,显示分布具有显著性差异, $p=0.007$ 。因此,与对照相比,使用该检验可以检测到显著更多的TIN患者。

[0123] 在临床常规中,将经典的生物标志物甲胎蛋白 (α -fetoprotein, AFP)、人绒毛膜促性腺激素的 β 亚基 (β -subunit of human chorionic gonadotropin, hCG) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 用于诊断睾丸生殖细胞肿瘤。这些通常不适合检测TIN。与根据本发明的miR-371a-3p测试可检测到18例TIN患者中的8例 (44.4%) 相比,即使将所有三种经典标志物组合成一个组同时假设一个提高的经典标志物构成总体阳性评分,也只可检测到10例TIN患者中的1例 (10%)。

[0124] 检测TIN患者和健康供体之间差异的可能性为筛选和/或监测例如睾丸癌的风险群体开辟了新的机会。TIN的早期检测 (其将在所有病例中发展成睾丸生殖细胞肿瘤) 可以保护患者免受侵入性癌症疾病,并因此保证更好的生活质量和医疗保健系统的成本节约。本发明提供了用精确且可靠的技术早期检测体液中具有生殖细胞肿瘤 (TIN) 初期阶段的患者的可能性。

[0001] 序列表

[0002] <110> miRdetect GmbH

[0003] <120> 睾丸生殖细胞肿瘤的初期阶段的早期检测

[0004] <130> 962-4 PCT

[0005] <150> EP 16 196 813.6

[0006] <151> 2016-11-2

[0007] <160> 1

[0008] <170> PatentIn version 3.5

[0009] <210> 1

[0010] <211> 23

[0011] <212> RNA

[0012] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0013] <400> 1

[0014] aagugccgcc aucuuuugag ugu

23

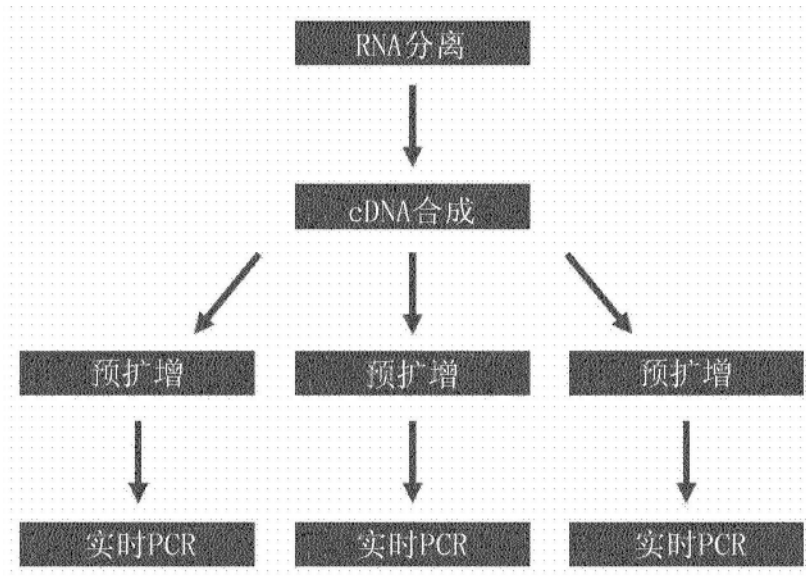


图1

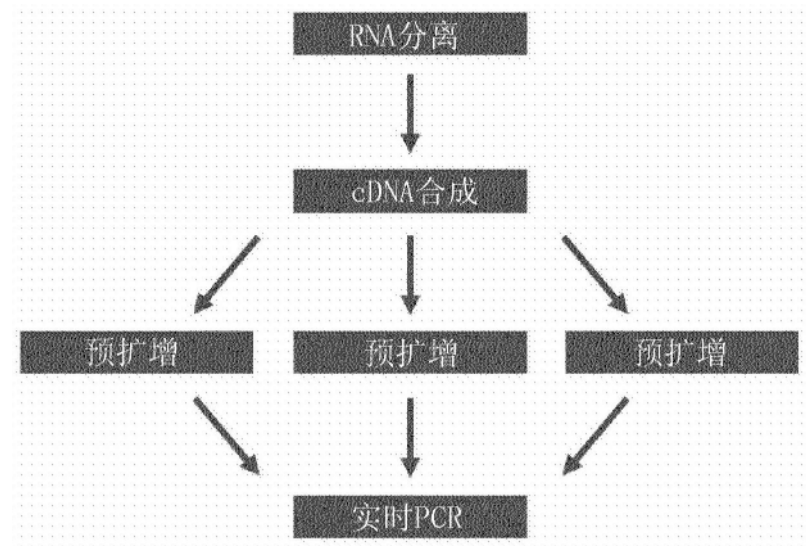


图2

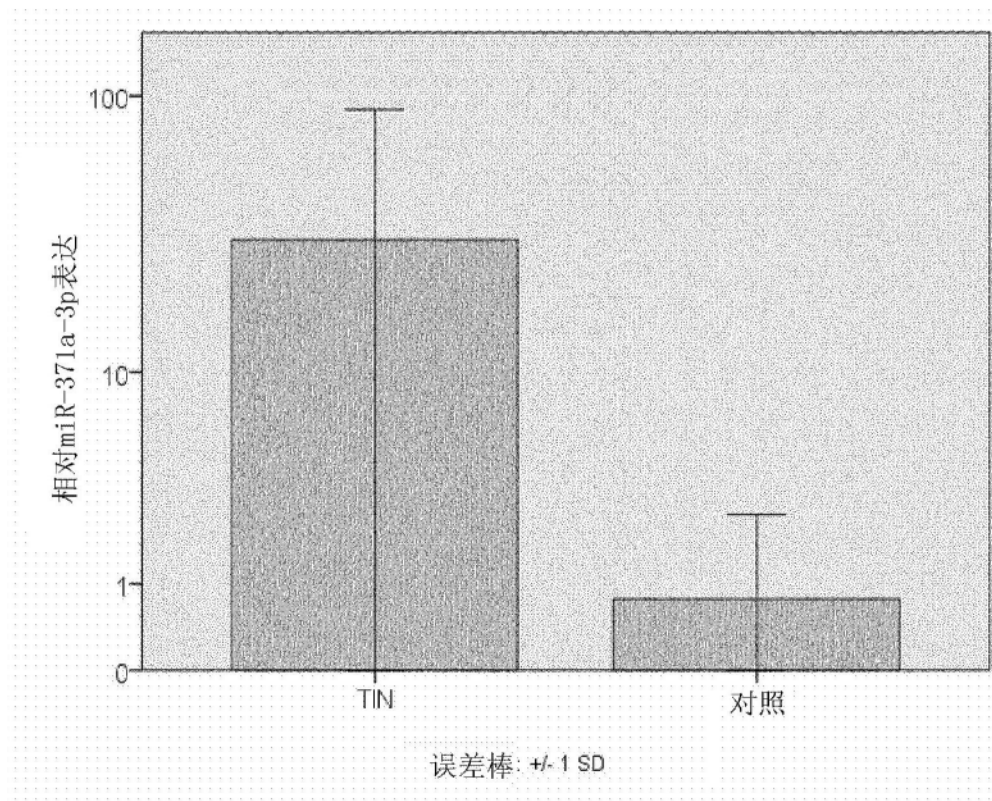


图3