



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105229169 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201480011550. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 01. 31

C12Q 1/68(2006. 01)

(30) 优先权数据

13382030. 8 2013. 01. 31 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/051939 2014. 01. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/118334 EN 2014. 08. 07

(71) 申请人 飞纳生物技术单人有限责任公司

地址 西班牙马德里

(72) 发明人 安东尼奥·阿尔卡拉斯阿森西奥

洛德斯·门瓜尔布里希斯

玛丽亚·何塞·里巴尔卡帕罗斯

胡安·何塞·洛萨诺萨尔瓦特利亚

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

权利要求书6页 说明书44页 附图2页

(54) 发明名称

用于诊断膀胱癌的非侵入性诊断方法

(57) 摘要

本发明涉及基于确定一个或多个标志物的表达水平来诊断膀胱癌的非侵入性诊断方法,其中所述标志物之一是来自待研究对象的样品中的 IGF2 基因。其他合适的标志物包括 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 以及可能的 FOXM1、KIF20A、MELK、CDK1。

1. 一种用于诊断对象是否患有膀胱癌的体外方法,其包括:

a) 确定来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平和第二基因的表达水平,其中所述第二基因选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因;以及

b) 将所述样品中所述基因的表达水平与其参考值进行比较;

其中来自所述对象之所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的所述参考值;并且

其中当与该基因的所述参考值相比时,来自所述对象之所述样品中的所述第二基因的表达水平改变,其中所述表达水平改变是:

-MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 或 MMP12 基因的表达水平提高,或者

-KLF9、AHNAK2、EBF1 或 CFH 基因的表达水平降低,指示所述对象患有膀胱癌。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述第二基因选自 CRH、KLF9、SLC1A6、MAGEA3、ANXA10 和 KRT20 基因。

3. 一种用于诊断对象是否患有膀胱癌的体外方法,其包括:

a) 确定来自所述对象之样品中的基因组合中存在的每个基因的表达水平,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因,前提是所述基因组合不是下列任一组合:

-ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10;

-ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT;

-ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT;

-ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10;或

-ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT;以及

b) 将所述样品中所述基因的水平与其参考值进行比较;

其中

-来自所述对象之所述样品中 IGF2、MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平高于所述基因各自的参考值,并且

-来自所述对象之所述样品中的 KLF9、AHNAK2、EBF1 和 CFH 基因的表达水平低于所述基因各自的参考值,

指示所述对象患有膀胱癌。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其还包括确定选自 FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因及其任意组合的一个或更多个基因的表达水平。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 2 个基因的表达水平。

6. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自

MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 3 个基因的表达水平。

7. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 4 个基因的表达水平。

8. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 5 个基因的表达水平。

9. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 6 个基因的表达水平。

10. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 7 个基因的表达水平,前提是所述 7 个基因的组合不是 ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT 的组合或者 ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT 的组合。

11. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 8 个基因的表达水平,前提是所述 8 个基因的组合不是 ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10 的组合。

12. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 9 个基因的表达水平。

13. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 10 个基因的表达水平。

14. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 11 个基因的表达水平,前提是所述 11 个基因的组合不是 ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT 的组合。

15. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 12 个基因的表达水平。

16. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 13 个基因的表达水平,前提是所述 13 个基因的组合不是 ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10 的组合。

17. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自

MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 14 个基因的表达水平。

18. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 15 个基因的表达水平。

19. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法,其包括确定所述 IGF2 基因的表达水平以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 16 个基因的表达水平。

20. 根据权利要求 3 所述的方法,其包括确定 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因的表达水平。

21. 根据权利要求 3 所述的方法,其包括确定选自以下的基因组合的表达水平:

-IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因;

-IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因;

-IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因;

-IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因;

-IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因;

-IGF2、CRH 和 KLF9 基因;

-IGF2、CRH 和 KRT20;

-IGF2、CRH 和 ANXA10 基因;

-IGF2、ANXA10 和 KRT20 基因;

-IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因;以及

-IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因。

22. 一种用于诊断对象是否患有膀胱癌的方法,其包括:

a) 确定来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平;

b) 将所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平与其参考值进行比较;其中来自所述对象之所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的所述参考值指示所述对象患有膀胱癌;以及

c) 如果根据所述基因的表达水平所述对象患有膀胱癌,则对所述对象进行内窥镜操作。

23. 一种用于诊断患有膀胱癌的对象的方法,其包括:

a) 确定来自所述对象之尿样中 IGF2 基因的表达水平和第二基因的表达水平,其中所述第二基因选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因;

b) 将所述样品中所述基因的表达水平与其参考值进行比较;

其中来自所述对象之所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的所述参考值;并且

其中当与该基因的所述参考值相比时,来自所述对象之所述样品中所述第二基因的表达水平改变,其中所述表达水平改变是:

-MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 或 MMP12 基因的表达水平提高,或者

-KLF9、AHNAK2、EBF1 或 CFH 基因的表达水平降低,指示所述对象患有膀胱癌;以及

c) 如果根据所述基因的表达水平所述对象患有膀胱癌,则对所述对象进行内窥镜操作。

24. 一种用于诊断患有膀胱癌的对象的方法,其包括:

a) 确定来自所述对象之样品中的基因组合中存在的每个基因的表达水平,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因;

b) 将所述样品中所述基因的所述水平与其参考值进行比较;

其中

- 来自所述对象之所述样品中 IGF2、MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平高于所述基因各自的参考值,并且

- 来自所述对象之所述样品中 KLF9、AHNAK2、EBF1 和 CFH 基因的表达水平低于所述基因各自的参考值,

指示所述对象患有膀胱癌;以及

c) 如果根据所述基因的表达水平所述对象患有膀胱癌,则对所述对象进行内窥镜操作。

25. 一种用于治疗患有膀胱癌的对象的方法,其包括:

a) 确定来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平;

b) 将所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平与其参考值进行比较;

其中来自所述对象之所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的所述参考值指示所述对象患有膀胱癌;以及

c) 如果所述对象被诊断为患有膀胱癌并且所述对象将受益于经尿道切除术 (TUR) 的施用,则向所述对象施用所述经尿道切除术。

26. 一种用于治疗患有膀胱癌的对象的方法,其包括:

a) 确定来自所述对象之尿样中 IGF2 基因的表达水平和第二基因的表达水平,其中所述第二基因选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因;

b) 将所述样品中所述基因的表达水平与其参考值进行比较;

其中来自所述对象之所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的所述参考值;并且

其中当与该基因的所述参考值相比时,来自所述对象之所述样品中所述第二基因的表达水平改变,其中所述表达水平改变是:

-MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 或 MMP12 基因的表达水平提高,或者

-KLF9、AHNAK2、EBF1 或 CFH 基因的表达水平降低,指示所述对象患有膀胱癌;以及

c) 如果所述对象被诊断为患有膀胱癌并且所述对象将受益于经尿道切除术 (TUR) 的施用,则向所述对象施用所述经尿道切除术。

27. 一种用于治疗患有膀胱癌的对象的方法,其包括:

a) 确定来自所述对象之样品中的基因组合中存在的每个基因的表达水平,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因;

b) 将所述样品中所述基因的所述水平与其参考值进行比较;

其中

- 来自所述对象之所述样品中 IGF2、MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平高于所述基因各自的参考值,并且

- 来自所述对象之所述样品中 KLF9、AHNAK2、EBF1 和 CFH 基因的表达水平低于所述基因各自的参考值,

指示所述对象患有膀胱癌;以及

c) 如果所述对象被诊断为患有膀胱癌并且所述对象将受益于经尿道切除术 (TUR) 的施用,则向所述对象施用所述经尿道切除术。

28. 下列基因组合作为膀胱癌诊断的标志物或用于膀胱癌监测的标志物的用途:

1) 包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的第二基因的基因组合;或

2) 包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因的基因组合,前提是所述组合不是下列任一组合:

-ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10;

-ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT;

-ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT;

-ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10;或

-ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT。

29. 根据权利要求 28 所述的用途,其中所述第二基因选自 CRH、KLF9、SLC1A6、MAGEA3、ANXA10 和 KRT20 基因。

30. 一种试剂盒,其选自:

a) 包含用于检测和 / 或量化基因组合之表达水平的试剂的试剂盒,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因的第二基因;以及

b) 包含用于检测和 / 或量化基因组合之表达水平的试剂的试剂盒,所述基因组合包含 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因,前提是所述组合不是下列任一组合:

-ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10;

- ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT；
- ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT；
- ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10；或
- ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT。

31. 根据权利要求 30 所述的试剂盒, 其还包含用于检测和 / 或量化选自 FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因及其任意组合的一个或更多个基因的表达水平的试剂。

32. 根据权利要求 30 或 31 所述的试剂盒, 其包含: 用于检测和 / 或量化所述 IGF2 基因之 mRNA 的试剂和用于检测和 / 或量化第二基因之 mRNA 的试剂, 所述第二基因选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因; 或者用于检测和 / 或量化由所述 IGF2 基因编码之蛋白质的试剂和用于检测和 / 或量化由所述第二基因编码之蛋白质的试剂, 所述第二基因选自所述 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因。

33. 根据权利要求 32 所述的试剂盒, 其包含: 与 IGF2 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2 之所述 mRNA 或与 IGF2 之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对; 以及与所述第二基因之 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述第二基因之所述 mRNA 或与所述第二基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对; 或者识别 IGF2 的抗体和识别由所述第二基因编码的蛋白质的抗体。

34. 根据权利要求 30 或 31 所述的试剂盒, 其包含: 与 IGF2 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2 之所述 mRNA 或与 IGF2 之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对; 以及与 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其组合中两个或更多个之 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述基因之所述 mRNA 或与所述基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对; 或者识别由所述 IGF2 基因编码的蛋白质的抗体以及识别由 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其组合编码的蛋白质的抗体。

35. 根据权利要求 30 至 34 中任一项所述的试剂盒用于膀胱癌诊断或用于膀胱癌监测的用途。

用于诊断膀胱癌的非侵入性诊断方法

技术领域

[0001] 本发明的应用领域是在医疗卫生行业中,主要是在“肿瘤泌尿外科”和“分子生物学”领域中。特别地,本发明涉及用于诊断膀胱癌的非侵入性诊断方法。

[0002] 发明背景

[0003] 膀胱的尿路上皮癌 (UC) 是世界范围内男性第七常见的恶性肿瘤,每年诊断出约 350,000 例新病例。UC 是由于赘生物而引起死亡的第四大原因并且是泌尿系统中继前列腺癌后的第二常见肿瘤,同时,由于 UC 的高复发率,其是泌尿肿瘤受到关注的主要原因 (Boyle P., Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Ann Oncol 2005 ;16 :481-8)。

[0004] 90% 以上的膀胱 UC 病例是移行细胞癌,但是它们还可以以腺癌和鳞状细胞癌的形式存在。移行细胞上皮位于尿路上皮粘膜内层并且通过固有层 (lamina propria) 与肌肉层隔开。约 75% 至 80% 的 UC 病例是浅表性肿瘤,即它们没有侵入肌肉层,因此将其称为非肌肉侵入性膀胱癌 (NMIBC)。它们中的 70% 至 80% 仅局限于尿路上皮粘膜 (Ta 和 CIS 阶段),而 20% 至 30% 达到固有层 (T1 阶段) 但未侵入膀胱壁的肌肉层 (Cheng L, Weaver AL, Neumann RM, Scherer BG, Bostwick DG. Substaging of T1 bladder carcinoma based on the depth of invasion as measured by micrometer: A new proposal. Cancer 1999 ;86 :1035-43)。NMIBC 的特征在于其多发性、其易于复发以及其好的预后。NMIBC 患者的存活率是 5 年 90% 和 10 年 80% (Pansadoro V, Emilliozzi P, Defidio L, 等 Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of stage T1 grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder: long-term results. J Urol 1995 ;154 :2054-8)。尽管这些患者复发的风险是约 70%,但是仅 10% 至 15% 进展为肌肉侵入性膀胱癌 (MIBC)。已观察到肿瘤分级与肿瘤进展风险之间存在紧密相关性 (Jordan AM, Weingarten J, Murphy WM. Transitional cell neoplasms of the urinary bladder. Can biologic potential be predicted from histologic grading? Cancer 1987 ;60 :2766-74)。大部分的 Ta 肿瘤是低级肿瘤。这些肿瘤频繁复发,但不到 5% 进一步发展。另一方面,很多 T1 肿瘤是高级肿瘤并且 30% 至 50% 进展成肌肉层浸润性肿瘤。相比之下,在诊断时约 20% 的 UC 病例以 MIBC 存在。这些是侵袭性肿瘤,如果不对其进行治疗,其将在 2 年内导致死亡。不管是否接受根治性外科手术治疗,50% 的 MIBC 患者由于远端转移或局部复发而在 2 年后死亡。MIBC 的基本问题在于其侵入前步骤短暂,这使得当达到临床阶段时,27% 至 60% 的病例已感染至深肌肉层,25% 达到膀胱前脂肪并且 14% 已具有临床上可检测的远端转移。

[0005] 当前的诊断系统基于尿细胞学检查 (根据尿液中的脱落细胞) 与借助膀胱镜检查术来直接观察膀胱的组合。实际上,膀胱镜检查术是主要的肿瘤诊断和追踪技术。膀胱镜检查术通过经尿道途径来进行,因此对患者而言其是侵入性并且是相当令人讨厌的技术。认为这种技术具有相当高的灵敏度和特异性,但是对技术本身的改进 (荧光膀胱镜检查术) 表明可能情况并非如此,并且在浅表性肿瘤中观察到的部分复发可能是由于未对其看不见的部分进行全切除 (Jones JS. DNA-based molecular cytology for bladder cancer

surveillance. *Urology* 2006 ;67 :35-45)。此外,对细胞学检查的解读高度依赖于观察者,因此可存在观察者间差异,尤其是在低级肿瘤中。

[0006] 与导致UC进展的分子事件相关的知识进步已刺激了基因表达图谱的研究,其借助DNA微阵列,使用从不同分类的UC(包括非肌肉和肌肉侵入性肿瘤)(Bastacky S, Ibrahim S, Wilczynski SP, Murphy WM. The accuracy of urinary cytology in daily practice. *Cancer* 1999 ;87 :118-28 ;aboe M, Marcussen N, Jensen KM, Thykjaer T, Dyrskjot L, Orntoft TF. Gene expression profiling of noninvasive primary urothelial tumours using microarrays. *Br J Cancer* 2005 ;93 :1182-90 ;Thykjaer T, Workman C, Kruhoffer M, 等 Identification of gene expression patterns in superficial and invasive human bladder cancer. *Cancer Res* 2001 ;61 :2492-9)、不同UC进展阶段(Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Charytonowicz E, 等 Molecular profiling of bladder cancer using cDNA microarrays: defining histogenesis and biological phenotypes. *Cancer Res* 2002 ;62 :6973-80)和具有不同临床进展的患者中(Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano J, Saint F, Cordon-Cardo C. Defining molecular profiles of poor outcome in patients with invasive bladder cancer using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol* 2006 ;24 :778-89)获得的RNA来进行。相同的方法已经被用于鉴定14个预测基因的组,其根据不同的治疗剂将UC响应患者与非UC响应患者分开(Takata R, Katagiri T, Kanehira M, 等 Predicting response to methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin neoadjuvant chemotherapy for bladder cancers through genome-wide gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 2005 ;11 :2625-36)。

[0007] 尽管尿路上皮组织直接分析是最舒适的替选,但是非侵入性常规诊断方法的开发将具有重大意义,因为侵入性策略降低患者的生命质量并表现出大得多的经济卫生负担。血液,特别是与整个膀胱上皮接触并因此具有肿瘤块的尿液是合适的用于检测肿瘤标志物的生物材料源,考虑到它们是易于以非侵入方式获得的待分析样品。

[0008] 大量的论文已关注于对尿液中的肿瘤标志物进行研究,以寻找用于诊断膀胱UC的非侵入性诊断方法。实际上,出于该目的,已将不同的测试投放市场(NMP22、UroVysion、ImmunoCyt、Accu-Dx等),但是即使它们中的大多数比尿细胞学检查更灵敏,后者仍具有最高的特异性。

[0009] 膀胱癌标记基因的鉴定由于所述肿瘤的异质性而变得复杂。最近,已开发了包括检测尿液中的标记蛋白的诊断方法(WO 2008/119858A1),但是其仅可用于诊断移行细胞癌。国际专利申请WO 2008/113870描述了其中基于膀胱流体样品中ANXA10、C14orf78(AHNAK2)、CTSE、CRH、IGF2、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM和MCM10基因的表达模式来进行膀胱癌的诊断和/或预后的体外非侵入性方法;尽管该方法具有高灵敏度和特异性,但是其使用需要对14个标志物进行分析,这增加了分析的成本,并且从方法学观点考虑其非常复杂。

[0010] 尽管存在一些用于诊断膀胱癌的非侵入性诊断方法,但是它们均不能被常规地用于临床实践中,因此仍需开发用于非侵入性诊断膀胱癌的替代方法,其允许以高灵敏度和特异性诊断膀胱癌并且需要对更少数量的标志物进行分析。

[0011] 发明简述

[0012] 在一方面,本发明涉及用于诊断对象是否患有膀胱癌的体外方法,其中所述方法在本文中被标识为本发明的第一方法、本发明的第二方法或本发明的第三方法。

[0013] 在另一方面,本发明涉及用于诊断对象是否患有膀胱癌的方法,其中所述方法在本文中被标识为本发明的第四方法、本发明的第五方法或本发明的第六方法。

[0014] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有膀胱癌的对象的方法,其中所述方法在本文中被标识为本发明的第七方法、本发明的第八方法或本发明的第九方法。

[0015] 在另一方面,本发明涉及 IGF2 基因作为膀胱癌诊断中的标志物或用于膀胱癌监测的标志物的用途。

[0016] 在另一方面,本发明涉及这样的基因组组合作为膀胱癌诊断中的标志物或用于膀胱癌监测的标志物的用途,所述基因组组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的第二基因,或者由其组成。

[0017] 在另一方面,本发明涉及这样的基因组组合作为膀胱癌诊断中的标志物或用于膀胱癌监测的标志物的用途,所述基因组组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因,前提是所述组合不是下列任一组合:

[0018] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10;

[0019] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT;

[0020] -ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT;

[0021] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10;或

[0022] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT。

[0023] 在另一方面,本发明涉及试剂盒,其中所述试剂盒在本文中被标识为本发明的第一试剂盒、本发明的第二试剂盒或本发明的第三试剂盒。

[0024] 在另一方面,本发明涉及本发明所提供的所述试剂盒用于膀胱癌诊断或用于膀胱癌监测的用途。

[0025] 附图简述

[0026] 图 1:12-基因模型的诊断性能 (A) 训练组 (n = 211) 和验证组 (n = 207) 中 12-基因模型的 ROC 曲线。截断值:0.525。(B) 验证组样品中不同风险组的 12-基因模型灵敏度 (Ta Gx 和 Tx LG 样品被排除在该分析之外)。

[0027] 图 2:显示所研究的每个基因在 UC 诊断中之影响的柱形图。超过参考线的柱对应于统计学上显著的相关性 ($p < 0.05$)。深色柱代表负相关 (EBF1、AHNAK2、MAGEA9、MAGEA9B、KLF9、CRH 和 KRT14) 而浅色柱代表正相关。来自 UC 诊断之遗传标签基因选择大多与具有代表较高影响之柱的基因一致。

[0028] 发明详述

[0029] 本发明的作者已开发了用于膀胱癌诊断的体外非侵入性方法,其以确定用作遗传标志物的一个或更多个基因的表达水平为基础。

[0030] 本发明的方法

[0031] 本发明的作者已观察到 IGF2 基因是用于膀胱癌诊断的良好标志物。这一发现允许借助非侵入性方法来确定对象中的膀胱癌诊断,所述非侵入性方法基于将来自所研究对象之样品中的所述基因(和任选的具有膀胱癌诊断价值的另一些基因)的表达水平与其参考值进行比较。

[0032] 因此,在一个方面,本发明涉及用于诊断患者是否患有膀胱癌的这样的体外方法(下文中为“本发明的第一方法”),其包括:

[0033] a) 确定来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平;以及

[0034] b) 将所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平与其参考值进行比较;

[0035] 其中来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的所述参考值指示所述对象患有膀胱癌。

[0036] 本文中使用的术语“膀胱癌”指在膀胱组织中开始的癌症类型并且包括在根据 TNM 系统的任意阶段内分类的任何癌症 [Sobin LH & Wittekind CH. TNM Classification of Malignant Tumours. International Union Against Cancer., 第 6 版, New York: John Wiley & Sons; 2002], 例如,如移行细胞癌(也成为尿路上皮癌或 UC)、鳞状细胞癌、腺癌或小细胞癌。预后与阶段的分类结果密切相关:

[0037] TM:原发性肿瘤

[0038] -Ta:非侵入性乳头状癌或局限于粘膜的乳头状癌。

[0039] -Tis:原位癌。未侵入固有层的扁平浅表性肿瘤。

[0040] -T1:侵入上皮下结缔组织或侵入固有层的肿瘤。Tis 和 T1 进而被分类为高级,即它们具有恶性肿瘤和侵入的巨大潜力。

[0041] -T2:侵入膀胱肌肉层的肿瘤,其进而分为:

[0042] -T2a:侵入浅表肌肉层或内部一半的肿瘤;和

[0043] -T2b:侵入深肌肉层或外部一半的肿瘤。

[0044] -T3:侵入超过肌肉层或侵入膀胱前脂肪的肿瘤;其进而分为:

[0045] -T3a:微观侵入;和

[0046] -T3b:宏观侵入。

[0047] -T4:侵入邻近膀胱之结构的肿瘤。其分为两个亚型:

[0048] -T4a:侵入前列腺、子宫或阴道;和

[0049] -T4b:侵入骨盆壁或腹壁。

[0050] NX:淋巴结受累(involverment)。基于所累及的淋巴结的数目及其尺寸进行分类:N0(无淋巴结受累),N1(小于 2cm 的单淋巴结受累),N2(小于或等于 5cm 的一个或更多个淋巴结受累)和 N3(大于 5cm 的淋巴结受累)。

[0051] MX:存在转移。M0:无远端转移。M1:远端转移。

[0052] 还可基于如世界卫生组织(World Health Organization,WHO)所建立的癌症级别特征来对膀胱癌进行分类。凭借该分类,如果肿瘤的特征在于其具有侵入其他组织的高侵入能力和高恶性程度则认为其是高级或 HG 肿瘤,或者当肿瘤的特征在于其具有低恶性程度或侵入性潜力时,认为其是低级或 LG 肿瘤。

[0053] 本文中使用的术语“诊断”及其变化形式指根据其来评价对象患有特定病理(在此情况下为膀胱癌)的可能性。本领域技术人员将理解,这样的评价不是对 100% 的所诊断

对象都是正确的,但是其优选对 100% 的所诊断对象都是正确的。然而,该术语要求能够鉴定统计学上显著部分的对象,例如对象患有所述病理(在此情况下为膀胱癌)。本领域技术人员可利用多种公知的统计学评价工具来确定某部分是否是统计学上显著的,例如借助确定置信区间、确定 p 值、Student's t 检验、Mann-Whitney 检验等。关于所述工具的信息和细节可见于 Dowdy 和 Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley&Sons, New York 1983 中。优选的置信区间为至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90% 或至少 95%。p 值优选为 0.2、0.1、0.05、0.025、0.001 或更小。

[0054] 本文中使用的术语“对象”指分类为哺乳动物的任何动物,并且包括但不限于驯养动物和农场动物、灵长目动物和人类,例如人、非人灵长目动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿目动物。所述对象优选是任意年龄或种族的雄性或雌性人。

[0055] 本文中使用的术语“标志物”或“标记基因”指这样的基因,其在显示出不同表型的群体中有差异地表达并且其单独或与其他基因组合的有差异表达与特定表型以大于随机期望的程度相关。

[0056] 本文中使用的术语“样品”指从对象分离的生物材料并且因此包括生物样品。所述样品可包含适用于检测期望标志物的任何生物材料并且可包含来自对象的细胞和/或非细胞材料。一般来说,可从任何合适的生物组织或流体分离样品;然而,所述样品优选是用于实施本发明之包含来自所研究对象的膀胱流体的样品。所述膀胱流体样品可以是尿样,例如排尿尿样、膀胱洗液样品等,并且可借助任何常规方法获得。

[0057] 在第一步中,本发明的第一方法包括确定来自所研究对象之样品中的 IGF2 基因的表达水平,或者由所述步骤组成。本文中使用的术语“表达水平”指测量特定基因之表达程度的参数值。所述值可通过测量目的基因的 mRNA 水平或者通过测量由所述目的基因编码之蛋白质的量来确定。

[0058] 本文中使用的术语“IGF2”指胰岛素样生长因子 2,也称为 C11orf43、IGF-II、FLJ22066、FLJ44734、INSIGF 或 PP9974。人 IGF2 基因位于 11 号染色体上并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NG_008849.1(2013 年 1 月 16 日的版本)。

[0059] 实际上,用于检测和量化基因表达水平的任何常规方法均可用在本发明的框架中以用于检测和量化特定基因的表达水平。作为非限制性示例,可借助量化基因的 mRNA 水平或借助量化由基因编码之蛋白质的水平来确定所述基因的表达水平。

[0060] 在一个具体实施方案中,通过测量来自所研究对象之样品中 IGF2 基因之转录产物(mRNA)的表达水平来确定所述基因的表达水平。出于该目的,可对样品进行处理从而以物理方式或机械方式破坏组织或细胞的结构,借此将细胞内成分释放到水性或有机溶液中以制备用于进行另外分析的核酸。优选地,要加以小心以防止在提取过程中发生 RNA 降解。

[0061] 在一个优选实施方案中,使用从来自所研究对象之膀胱流体样品(例如尿液)中包含的细胞获得的 RNA 来确定表达水平。作为非限制性示例,可将膀胱流体样品(例如尿液)收集在适于所述目的的容器中,优选收集在经 RNA 稳定剂(例如,1/25 体积的 0.5M EDTA, pH 8)处理的容器中。可在收集样品时对其进行处理或者,如果期望的话,可将其储藏在防止样品降解的适合条件下以供后续(例如在随后的 24 小时内)处理。为了使膀胱流体样品(例如尿液)中的细胞沉淀,可进行适当的离心,例如在 4℃ 下以 1,000xg 离心 10 分钟。可立即对细胞沉淀物进行处理或者可将其在例如 -80℃ 下冷冻,直至提取 RNA。

如果期望的话,在离心之后,可将细胞沉淀物重悬于适合分离 RNA 的试剂中,例如重悬于 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中。向细胞沉淀物添加的 Trizol 的体积可根据样品的初始体积而改变。如果期望的话,在将样品离心并获得细胞沉淀物后,可添加适当体积的 Trizol,例如每 50ml 或 100ml 膀胱流体(例如尿液)1ml,并将样品储存在 -80°C 下直至期望进行处理。借助分光光度计测量 260nm 下的吸光度(例如 NanoDrop)来量化从样品获得的 RNA 的总量。

[0062] 用于确定 mRNA 的量的方法在本领域状态下是公知的。例如,根据常规方法,例如借助使用裂解酶、化学溶液或固定树脂来提取来自所研究对象之样品(例如膀胱流体样品)中包含的核酸。可通过杂交(例如在将 mRNA 转化成经标记的 cDNA 后借助 Northern 印迹分析或者 DNA 或 RNA 阵列(微阵列))和/或借助酶促链式反应的扩增来检测所提取的 mRNA。一般来说,优选定量或半定量酶促扩增方法。特别有利的是聚合酶链式反应(PCR)或者定量实时 RT-PCR 或半定量 RT-PCR 技术。优选地,引物对被设计用于重叠(superimpose)内含子的目的以使 cDNA 扩增物与来自基因组 DNA(gDNA)的污染物区别开来。任选地,设计优选经标记的(例如经荧光标记的)、在位于两个外显子之间的区域中特异性杂交的另外引物或探针,目的是使 cDNA 扩增物与来自 gDNA 的污染物区别开。如果期望的话,可将所述引物设计成使得大概从所述引物 5' 端至引物总长一半的核苷酸与一个目的外显子杂交,而大概从所述引物 3' 端至所述引物总长一半的核苷酸与另一个目的外显子杂交。合适的引物可容易地由本领域技术人员设计。另一些扩增方法包括连接酶链式反应(LCR)、转录介导的扩增(TMA)、链置换扩增(SDA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)。优选地,定量地或半定量地测量 mRNA 的量。关于用于量化基因表达水平的常规方法的相关信息可见于例如 Sambrook 等,2001[Sambrook, J., 等, "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., 第1-3 卷]中。

[0063] 在一个具体实施方案中,借助实时逆转录-聚合酶链式反应(RT-qPCR)来确定 IGF2 基因的表达水平。

[0064] 为了使不同样品中的一个基因的表达值标准化,可将来自所研究受试对象之样品中的目的基因的 mRNA 水平与对照 RNA 水平进行比较。本文中使用的“对照 RNA”是其表达水平不会因他们是肿瘤细胞还是非肿瘤细胞而不同的基因的 RNA,例如在肿瘤细胞和非肿瘤细胞两者中都组成型表达的基因的 RNA;优选地,对照 RNA 是来源于编码被组成型表达并执行必需细胞功能之蛋白质的管家基因的 mRNA。用于本发明中的管家基因的示例性非限制性实例包括 GUSB(β -葡萄糖醛酸酶)、PPIA(肽基脯氨酰异构酶 A)、 β -2-微球蛋白、GAPDH、PSMB4(蛋白酶体 β 亚基 4 型)、泛素、运铁蛋白受体、18-S 核糖体 RNA、亲环蛋白、微管蛋白、 β -肌动蛋白、3-单加氧酶/色氨酸 5-单加氧酶酪氨酸激活蛋白(YWHAZ)等。在一个具体实施方案中,对照 RNA 是 GUSB 和/或 PPIA mRNA。

[0065] 另一方面,还可借助确定由目的基因编码之蛋白质的表达水平来确定所述基因的表达水平,因为基因表达的增加通常伴随着对应蛋白质的量的增加。可采用用于蛋白质检测和量化的任何常规方法(例如借助免疫测定等)来确定对应于特定基因之表达的蛋白质量。作为非限制性示例,可使用能够与待确定蛋白质(或其具有抗原决定簇的片段)特异性结合的抗体并随后量化抗原-抗体复合衍生物来进行所述确定。所述抗体可以是例如多克隆血清、杂交瘤上清液或单克隆抗体、抗体片段、Fv、Fab、Fab' 和 F(ab')²、scFv、二抗

体、三抗体、四抗体、人源化抗体等。所述抗体可以是（或可以不是）经标志物标记的。可用于本发明中的标志物的示例性非限制性实例包括放射性同位素、酶、荧光团、化学发光试剂、酶辅因子、酶底物、酶抑制剂等。多种公知的测定均可用于本发明中，例如基于以下的测定：Western 印迹或免疫印迹技术、ELISA（酶联免疫吸附测定）、RIA（放射性免疫测定）、EIA（酶免疫测定）、DAS-ELISA（双抗体夹心 ELISA）、免疫细胞化学或免疫组织化学技术等。检测和量化蛋白质的其他方式包括亲和色谱、配体结合测定技术等。

[0066] 在第二步中，本发明的第一方法包括将来自所研究对象之样品中的 IGF2 基因的表达水平与其参考值进行比较。术语“参考值”指用作由从对象获得之样品获得的数值或数据的参考的实验室数值。参考值（或参考水平）可以是绝对值、相对值、具有上限和 / 或下限的值、一系列值、平均值、中位数、均值或通过参考对照值或参考值所表示的数值。参考值可基于由单独样品获得的值，例如，如获自所研究受试对象之样品但在先前的时间点获得的值。参考值可基于大量样品，例如在与所研究受试对象一致之实龄组的对象群中获得的值，或者基于待分析样品的包括或排除样品组。参考值可基于从来自无疾病状态或特定表型之健康对象的样品获得的待比较标志物的表达值。例如，参考值可基于从来自没有患膀胱癌或没有膀胱癌病史之对象的膀胱流体样品（例如尿液）获得的待分析标志物的表达水平。另一方面，参考值可基于从来自已经进行肿瘤外科手术切除术但尚未经历复发之对象获得的待分析基因的表达水平。在一个优选实施方案中，参考值获自来自健康对象或无膀胱癌前病史对象的样品或样品组。在另一个优选实施方案中，参考值获自来自这样的对象的样品或样品组，所述对象已经进行膀胱中肿瘤外科手术切除术但尚未经历复发，优选不存在辅助性化学治疗。本领域技术人员将理解，样品的类型可根据所进行的特定方法而改变。

[0067] 一旦已建立参考值，就可将来自所研究对象之样品中 IGF2 基因的表达水平与参考值进行比较。作为该比较的结果，来自对象之样品中目的基因（例如，本发明第一方法中的 IGF2）的表达水平可“高于”或“提高”、“低于”或“降低”，或“等于”所述基因的所述参考值。在本发明的上下文中，认为当在与所述基因的参考值比较时来自对象之样品中的所述基因的表达水平提高例如 5%、10%、25%、50%、100% 或甚至更多时，或者当在与所述基因的参考值比较时其提高例如至少 1.1 倍、1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍或甚至更多时，来自对象之样品中的目的基因表达水平“高于”所述基因的参考值或者“相对于所述基因的参考值提高”。在本发明的上下文中，还认为当在与所述基因的参考值比较时来自对象之样品中的所述基因的表达水平降低例如 5%、10%、25%、50%、75% 或甚至 100% 时，来自对象之样品中的目的基因表达水平“低于”所述基因的参考值或者“相对于所述基因的参考值降低”。

[0068] 在本发明的上下文中，还认为当该基因的表达水平相对于参考值基本不变时，来自对象之样品中的目的基因的表达水平“等于”所述基因的参考值；例如，认为当所述水平相差不超过 0.1%、不超过 0.2%、不超过 0.3%、不超过 0.4%、不超过 0.5%、不超过 0.6%、不超过 0.7%、不超过 0.8%、不超过 0.9%、不超过 1%、不超过 2%、不超过 3%、不超过 4%、不超过 5% 或不超过与测定中所使用实验方法相关误差相同的百分数值时，来自所研究对象之样品中基因的表达水平“等于”参考值。

[0069] 一旦在来自对象之样品中 IGF2 基因的表达水平与所述基因的参考值之间进行比

较,本发明的第一方法允许基于来自所研究对象之样品中 IGF2 基因的表达水平是否高于所述参考值来诊断该对象是否患有膀胱癌。

[0070] 实施例 3 中获得的结果清楚地显示使用 IGF2 基因的表达水平允许在多中心验证组中以 76.85% 的灵敏度和 91.26% 的特异性 ($AUC = 0.907$) 诊断膀胱癌 (表 6)。

[0071] 此外,本发明的作者已观察到,IGF2 基因与用于诊断膀胱癌之第二基因的组合可用于进行膀胱癌诊断。这一发现允许借助非侵入性方法来建立对象中的膀胱癌诊断,所述非侵入性方法基于将来自所研究对象之样品中的所述 IGF2 基因和用于诊断膀胱癌之第二基因的表达水平与其参考值进行比较。

[0072] 因此,在另一方面,本发明涉及用于诊断对象是否患有膀胱癌的体外方法(下文为“本发明的第二方法”),其包括:

[0073] a) 确定来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平和第二基因的表达水平,其中所述第二基因选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因;以及

[0074] b) 将所述样品中所述基因的表达水平与其参考值进行比较;

[0075] 其中来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的参考值;并且

[0076] 其中当与该基因的参考值相比时,来自所述对象之样品中的所述第二基因的表达水平改变,其中所述表达水平改变是:

[0077] -MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 或 MMP12 基因的表达水平提高,或者

[0078] -KLF9、AHNAK2、EBF1 或 CFH 基因的表达水平降低,

[0079] 指示所述对象患有膀胱癌。

[0080] 在第一步中,本发明的第二方法包括确定来自所研究对象之样品中的 (i) IGF2 基因的表达水平和 (ii) 选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之第二基因的表达水平,或者由其组成。

[0081] 术语“诊断”、“对象”、“膀胱癌”、“样品”、“表达水平”和“IGF2”此前已针对本发明的第一方法进行了定义并通过引用并入文本。

[0082] 本文中使用的术语“MAGEA3”指胰岛素样黑素瘤相关抗原 3,也称为 CT1.3、HIP8、HYPD 或 MAGE3。人 MAGEA3 基因位于 X 染色体上并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NC_000023.10 (2012 年 10 月 30 日的版本)。

[0083] 本文中使用的术语“ANXA10”指膜联蛋白 10,也称为 ANX14。人 ANXA10 基因位于 4 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_007193.4 (2012 年 6 月 28 日的版本)。

[0084] 本文中使用的术语“AHNAK2”指成神经细胞分化相关蛋白 AHKAK,也称为 C14orf78 或 KIAA2019。人 AHNAK2 基因位于 14 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_001620.1 (2012 年 12 月 5 日的版本)。

[0085] 本文中使用的术语“CTSE”指组织蛋白酶 E,也称为 CATE4。人 CTSE 基因位于 1 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_001910.3 (2013 年 1 月 12 日的版本)。

[0086] 本文中使用的术语“CRH”指促肾上腺皮质素释放激素,也称为 CRF。人 CRH 基因位

于 8 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_00756.2(2012 年 12 月 23 日的版本)。

[0087] 本文中使用的术语“KLF9”指 Kruppel 样因子 9。人 KLF9 基因位于 9 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_001206.2(2013 年 1 月 7 日的版本)。

[0088] 本文中使用的术语“KRT20”指角蛋白 20,也称为 K20、CK20、KRT21、MGC35423。人 KRT20 基因位于 17 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NC_000017.10(2012 年 10 月 30 日的版本)。

[0089] 本文中使用的术语“POSTN”指骨膜蛋白,成骨细胞特异性因子。人 POSTN 基因位于 13 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_001135934.1(2013 年 1 月 28 日的版本)。

[0090] 本文中使用的术语“PPP1R14D”指蛋白磷酸酶 1,调节(抑制剂)亚基 14D,也称为 GBPI-1、FLJ20251、MGC119014、MGC119016、CPI17 样。人 PPP1R14D 基因位于 15 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NC_000015.9(2012 年 10 月 30 日的版本)。

[0091] 本文中使用的术语“SLC1A6”指溶质载体蛋白家族 1(高亲和力天冬氨酸/谷氨酸成员 6),也称为 EAA T 4、MGC33092 和 MGC43671。人 SLC1A6 基因位于 19 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NC_000019.9(2012 年 10 月 30 日的版本)。

[0092] 本文中使用的术语“TERT”指端粒酶逆转录酶,也称为 TP2、TRT、EST2、TCS1 和 hEST2。人 TERT 基因位于 5 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_001193376.1(2013 年 1 月 28 日的版本)。

[0093] 本文中使用的术语“ASAM”指脂肪细胞特异性粘附分子,也称为 ACAM、CLMP 和 FLJ22415。人 ASAM 基因位于 11 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NC_000011.9(2012 年 10 月 30 日的版本)。

[0094] 本文中使用的术语“MCM10”指微染色体维持缺陷蛋白 10(酿酒酵母(*S. cerevisiae*)),也称为 CNA43、PR02249 和 MGC126776。人 MCM10 基因位于 10 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_182751.2(2013 年 1 月 24 日的版本)。

[0095] 本文中使用的术语“EBF1”指早期 B 细胞因子 1,也称为 COE1、EBF 和 OLF1。人 EBF1 基因位于 5 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_024007.3(2013 年 1 月 6 日的版本)。

[0096] 本文中使用的术语“CFH”指补体因子 H,也称为 HF、ARMS1 和 FHL1。人 CFH 基因位于 1 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_001014975.2(2013 年 1 月 28 日的版本)。

[0097] 本文中使用的术语“MMP12”指基质(细胞外)金属蛋白酶 2,也称为巨噬细胞金属弹性蛋白酶(macrophage metalloestelase)、巨噬细胞弹性蛋白酶(macrophage estelase)、HME、MME 和 MMP-12。人 MMP12 基因位于 1 号染色体上,并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_002426.4(2013 年 1 月 13 日的版本)。

[0098] 可如针对本发明第一方法所述的那样来确定本发明第二方法之该第一步中所选择的基因的表达水平,即,通过测量目的基因(即,IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的基因)的 mRNA 水平或者通过测量由所述目的基因编码的蛋白质的量。用于确

定目的基因之 mRNA 水平或者用于测量由所述目的基因编码之蛋白质的量的方法和技术此前已针对本发明的第一方法进行了限定,并通过引用并入文本。

[0099] 在一个具体实施方案中,确定以下:

[0100] -IGF2 基因的表达水平,和

[0101] -第二基因的表达水平,其中所述第二基因是 MAGEA3 基因,或 ANXA10 基因,或 AHNAK2 基因,或 CTSE 基因,或 CRH 基因,或 KLF9 基因,或 KRT20 基因,或 POSTN 基因,或 PPP1R14D 基因,或 SLC1A6 基因,或 TERT 基因,或 ASAM 基因,或 MCM10 基因,或 EBF1 基因,或 CFH 基因,或 MMP12 基因。

[0102] 在一个更具体的实施方案中,确定以下:

[0103] -IGF2 基因的表达水平,和

[0104] -第二基因的表达水平,其中所述选择的第二基因选自 CRH、KLF9、SLC1A6、MAGEA3、ANXA10 和 KRT20 基因。

[0105] 在一个具体且优选的实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 MAGEA3 基因的表达水平。

[0106] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 CRH 基因的表达水平。

[0107] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 KLF9 基因的表达水平。

[0108] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 SLC1A6 基因的表达水平。

[0109] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 ANXA10 基因的表达水平。

[0110] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 AHNAK2 基因的表达水平。

[0111] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 CTSE 基因的表达水平。

[0112] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 KRT20 基因的表达水平。

[0113] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 POSTN 基因的表达水平。

[0114] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 PPP1R14D 基因的表达水平。

[0115] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 TERT 基因的表达水平。

[0116] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 ASAM 基因的表达水平。

[0117] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 MCM10 基因的表达水平。

[0118] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 EBF1 基因的表达水平。

[0119] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 CFH 基因的表达水平。

[0120] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 MMP12 基因的表达水平。

[0121] 在第二步中,本发明的第二方法包括将在来自所研究对象之样品中获得的 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之第二基因的表达水平与所述基因的参考值进行比较,或者由上述步骤组成。用于建立特定基因参考水平的术语“参考值”及其获得方式此前已针对本发明的第一方法进行了定义并通过引用并入文本,应用于来自所研究对象之样品中的目的基因的表达水平与其参考值之间的比较的术语“高于”、“低于”或“等于”也同样如此。

[0122] 一旦已在来自对象之样品中的 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之

第二基因的表达水平与所述基因的参考值之间做出比较,本发明的第二方法就允许诊断对象是否患有膀胱癌,如果:

[0123] - 来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的参考值;并且如果

[0124] - 当与该基因的参考值相比时所述第二基因的表达水平改变,其中所述表达水平改变是:

[0125] -MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 或 MMP12 基因的表达水平提高,或者

[0126] -KLF9、AHNAK2、EBF1 或 CFH 基因的表达水平降低。

[0127] 本文中使用的术语“提高”应用于表达水平时指与参考值相比,表达水平高于至少 1.1 倍、1.5 倍、5 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、100 倍的参考值或甚至更多。另一方面,认为与参考值相比,表达水平的降低低于至少 5%、10%、25%、50%、75%或甚至 100%的参考值,或者作为替代地表示表达水平降低低于至少 0.9 倍、0.75 倍、0.2 倍、0.1 倍、0.05 倍、0.025 倍、0.02 倍、0.01 倍、0.005 倍的参考值或甚至更低为“降低的”表达水平。

[0128] 实施例 3 中获得的结果清楚地显示使用 IGF2 基因之表达水平与 MAGEA3 基因之表达水平的组合允许在验证组中以 81.48%的灵敏度和 91.26%的特异性 (AUC = 0.918) 诊断膀胱癌(表 6)。

[0129] 实施例 3 中获得的结果清楚地显示使用 IGF2 基因之表达水平与 CRH 基因之表达水平的组合允许在多中心验证组中以 75.46%的灵敏度和 90.94%的特异性 (AUC = 0.893) 诊断膀胱癌(表 6)。

[0130] 实施例 3 中获得的结果清楚地显示使用 IGF2 基因之表达水平与 ANXA10 基因之表达水平的组合允许在多中心验证组中以 75.46%的灵敏度和 90.94%的特异性 (AUC = 0.902) 诊断膀胱癌(表 6)。

[0131] 实施例 3 中获得的结果清楚地显示使用 IGF2 基因之表达水平与 KRT20 基因之表达水平的组合允许在多中心验证组中以 76.39%的灵敏度和 92.23%的特异性 (AUC = 0.907) 诊断膀胱癌(表 6)。

[0132] 发明人进行的分析清楚地显示使用 IGF2 基因之表达水平与 KLF9 基因之表达水平的组合允许以 76.39%的灵敏度和 91.59%的特异性 (AUC = 0.904) 诊断膀胱癌。

[0133] 发明人进行的分析清楚地显示使用 IGF2 基因之表达水平与 SLC1A6 基因之表达水平的组合允许以 75.54%的灵敏度和 91.26%的特异性 (AUC = 0.907) 诊断膀胱癌。

[0134] 因此,在一个具体实施方案中,用于诊断对象是否患有膀胱癌之本发明的第二方法由以下组成:

[0135] a) 确定来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平和第二基因的表达水平,其中所述第二基因选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因;以及

[0136] b) 将所述样品中的所述基因的表达水平与其参考值进行比较;

[0137] 其中

[0138] - 来自所述对象之样品中 IGF2、MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平高于所述基因各自的参考

值,并且

[0139] - 来自所述对象之样品中的 KLF9、AHNAK2、EBF1 和 CFH 基因的表达水平低于所述基因各自的参考值,

[0140] 指示所述对象患有膀胱癌。

[0141] 在一个具体且优选的实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 MAGEA3 基因的表达水平。

[0142] 在另一个具体且优选的实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 CRH 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 KLF9 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 SLC1A6 基因的表达水平。在另一个具体且优选的实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 ANXA10 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 AHNAK2 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 CTSE 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 KRT20 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 POSTN 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 PPP1R14D 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 TERT 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 ASAM 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 MCM10 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 EBF1 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 CFH 基因的表达水平。在另一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和 MMP12 基因的表达水平。

[0143] 另外,本发明的作者已观察到,IGF2 基因与用于诊断膀胱癌之两个或更多个基因的组合可用于进行膀胱癌诊断。这一发现允许借助非侵入性方法来建立对象中的膀胱癌诊断,所述非侵入性方法基于将来自所研究对象之样品中的所述 IGF2 基因与用于诊断膀胱癌之所述基因中两个或更多个基因的组合的表达水平与其参考值进行比较。

[0144] 因此,在另一方面,本发明涉及用于诊断对象是否患有膀胱癌的体外方法(下文称为“本发明的第三方法”),其包括:

[0145] - 确定来自所述对象之样品中的基因组合中存在的每个基因的表达水平,所述基因组合包含 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因;

[0146] a) 将所述样品中的所述基因的水平与其参考值进行比较;

[0147] 其中

[0148] - 来自所述对象之样品中 IGF2、MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平高于所述基因各自的参考值,并且

[0149] - 来自所述对象之样品中的 KLF9、AHNAK2、EBF1 和 CFH 基因的表达水平低于所述基因各自的参考值,

[0150] 指示所述对象患有膀胱癌。

[0151] 在第一步中,本发明的第三方法包括确定来自所研究对象之样品中的 (i) IGF2

基因的表达水平和 (ii) 选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的两个或更多个基因的表达水平。

[0152] 术语“诊断”、“对象”、“膀胱癌”、“样品”、“表达水平”、“IGF2”、“MAGEA3”、“ANXA10”、“AHNAK2”、“CTSE”、“CRH”、“KLF9”、“KRT20”、“POSTN”、“PPP1R14D”、“SLC1A6”、“TERT”、“ASAM”、“MCM10”、“EBF1”、“CFH”和“MMP12”此前已针对本发明的第二方法进行了定义并通过引用并入本文。

[0153] 可如针对本发明第一方法所述的那样来确定本发明第三方法之该第一步中所选择的基因的表达水平,即,通过测量目的基因(即, IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因)的 mRNA 水平或者通过测量由所述目的基因编码的蛋白质的量。用于确定目的基因之 mRNA 水平或者用于测量由所述目的基因编码之蛋白质的量的方法和技术此前已针对本发明的第一方法进行了定义,并通过引用并入本文。

[0154] 在一个具体实施方案中,本发明的第三方法包括确定来自所述对象之样品中的基因组合中存在的每个基因的表达水平,所述基因组合包含 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因,前提是所述基因组合不是下列任一组合:

[0155] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10;

[0156] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT;

[0157] -ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT;

[0158] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10;或

[0159] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT。

[0160] 因此,根据本发明第三方法的这一具体实施方案,本发明提供了用于诊断对象是否患有膀胱癌的体外方法,其包括:

[0161] a) 确定来自所述对象之样品中的基因组合中存在的每个基因的表达水平,所述基因组合包含 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因,前提是所述基因组合不是下列任一组合:

[0162] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10;

[0163] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT;

[0164] -ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT;

[0165] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10;或

[0166] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT;以及

[0167] b) 将所述样品中的所述基因的所述水平与其参考值进行比较;

[0168] 其中

[0169] - 来自所述对象之样品中 IGF2、MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平高于所述基因各自的参考值,并且

[0170] - 来自所述对象之样品中的 KLF9、AHNAK2、EBF1 和 CFH 基因的表达水平低于所述基因各自的参考值,

[0171] 指示所述对象患有膀胱癌。

[0172] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 2 个基因的表达水平。

[0173] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 3 个基因的表达水平。

[0174] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 4 个基因的表达水平。

[0175] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 5 个基因的表达水平。

[0176] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 6 个基因的表达水平。

[0177] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 7 个基因的表达水平,前提是所述 7 个基因的组合不是 ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT 的组合或 ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT 的组合。

[0178] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 8 个基因的表达水平,前提是所述 8 个基因的组合不是 ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10 的组合。

[0179] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 9 个基因的表达水平。

[0180] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 10 个基因的表达水平。

[0181] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 11 个基因的表达水平,前提是所述 11 个基因的组合不是

ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT 的组合。

[0182] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 12 个基因的表达水平。

[0183] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 13 个基因的表达水平,前提是所述 13 个基因的组合不是 ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10 的组合。

[0184] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 14 个基因的表达水平。

[0185] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 15 个基因的表达水平。

[0186] 在本发明第三方法的一个具体实施方案中,确定 IGF2 基因的表达水平和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 16 个基因的表达水平。

[0187] 在一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因的表达水平。

[0188] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因的表达水平。

[0189] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因的表达水平。

[0190] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因的表达水平。

[0191] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因的表达水平。

[0192] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、CRH 和 KLF9 基因的表达水平。

[0193] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、CRH 和 KRT20 基因的表达水平。

[0194] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、CRH 和 ANXA10 基因的表达水平。

[0195] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、ANXA10 和 KRT20 基因的表达水平。

[0196] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因的表达水平。

[0197] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 基因的表达水平。

[0198] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 基因的表达水平。

[0199] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因的表达水平。

[0200] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、KLF9、AHNAK2、EBF1 和 MMP12 基因的表达水平。

[0201] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 基因的表达水平。

[0202] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 基因的表达水平。

[0203] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基

因的表达水平。

[0204] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 基因的表达水平。

[0205] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因的表达水平。

[0206] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的表达水平。

[0207] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的表达水平。

[0208] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的表达水平。

[0209] 在另一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平。

[0210] 任选地,如果期望的话,在一个具体实施方案中,本发明的第三方法包括还确定选自 FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因及其任意组合的一个或更多个基因的表达水平。

[0211] 本文中使用的术语“FOXM1”指 FOXM1 (叉头框蛋白 M1) 原癌基因,也称为 FKHL16、FOXM1B、HFH-11、HFN-3、INS-1、MPHOSPH2 和 MPP-2。人 FOXM1 基因位于 12 号染色体上并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_001243088.1 (2013 年 1 月 28 日的版本)。

[0212] 本文中使用的术语“KIF20A”指驱动蛋白样蛋白,也称为 MKLP2 和 RAB6KIFL。人 KIF20 基因位于 5 号染色体上并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_005733.2 (2013 年 1 月 27 日的版本)。

[0213] 本文中使用的术语“MELK”指母体胚胎亮氨酸拉链激酶蛋白,也称为 HPK38。人 MELK 基因位于 9 号染色体上并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_001256685.1 (2013 年 1 月 13 日的版本)。

[0214] 本文中使用的术语“CDK1”指细胞周期蛋白依赖性激酶 1,也称为 CDC2、CDC28A 和 P34CDC2。人 CDK1 基因位于 10 号染色体上并且在 GenBank 数据库中具有登录号 NM_001130829.1 (2009 年 11 月 1 日的版本)。

[0215] 在一个具体实施方案中,确定 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因的表达水平。

[0216] 发明人进行的分析清楚地显示使用 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因的表达水平允许以 77.78% 的灵敏度和 93.2% 的特异性 ($AUC = 0.904$) 诊断膀胱癌。

[0217] 发明人进行的分析清楚地显示使用 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因的表达水平允许以 77.31% 的灵敏度和 89.32% 的特异性 ($AUC = 0.903$) 诊断膀胱癌。

[0218] 发明人进行的分析清楚地显示使用 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因的表达水平允许以 75% 的灵敏度和 91.26% 的特异性 ($AUC = 0.897$) 诊断膀胱癌。

[0219] 发明人进行的分析清楚地显示使用 IGF2、CRH 和 KLF9 基因的表达水平允许以 77.78% 的灵敏度和 91.59% 的特异性 ($AUC = 0.897$) 诊断膀胱癌。

[0220] 实施例 3 中获得的结果清楚地显示使用 IGF2、CRH 和 KRT20 基因的表达水平允许在多中心验证组中以 75.93% 的灵敏度和 90.94% 的特异性 ($AUC = 0.895$) 诊断膀胱癌 (表

6)。

[0221] 发明人进行的分析清楚地显示使用 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因的表达水平允许以 76.17% 的灵敏度和 91.59% 的特异性 ($AUC = 0.902$) 诊断膀胱癌。

[0222] 实施例 3 中获得的结果清楚地显示使用 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因的表达水平允许在多中心验证组中以 79.17% 的灵敏度和 91.59% 的特异性 ($AUC = 0.903$) 诊断膀胱癌 (表 6)。

[0223] 实施例 3 中获得的结果清楚地显示使用 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平允许在多中心验证组中以 79.63% 的灵敏度和 93.53% 的特异性 ($AUC = 0.908$) 诊断膀胱癌 (表 6)。

[0224] 发明人进行的分析清楚地显示使用 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXO1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因的表达水平允许以 79.63% 的灵敏度和 89.97% 的特异性 ($AUC = 0.909$) 诊断膀胱癌。

[0225] 在另一方面,本发明涉及用于诊断对象是否患有膀胱癌的方法(下文中为“本发明的第四方法”),其包括:

[0226] a) 确定来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平;

[0227] b) 将所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平与其参考值进行比较;

[0228] 其中来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的所述参考值指示所述对象患有膀胱癌;以及

[0229] c) 如果根据所述基因的表达水平所述对象患有膀胱癌,则对所述对象进行内窥镜操作。

[0230] 在另一方面,本发明涉及用于诊断患有膀胱癌之对象的方法(下文中称为“本发明的第五方法”),其包括:

[0231] a) 确定来自所述对象之尿样中 IGF2 基因的表达水平和第二基因的表达水平,其中所述第二基因选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因;

[0232] b) 将所述样品中所述基因的表达水平与其参考值进行比较;

[0233] 其中来自所述对象之样品中所述 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的参考值;并且

[0234] 其中当与该基因的参考值相比时,来自所述对象之样品中所述第二基因的表达水平改变,其中所述表达水平改变是:

[0235] -MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 或 MMP12 基因的表达水平提高,或者

[0236] -KLF9、AHNAK2、EBF1 或 CFH 基因的表达水平降低,指示所述对象患有膀胱癌;以及

[0237] c) 如果根据所述基因的表达水平所述对象患有膀胱癌,则对所述对象进行内窥镜操作。

[0238] 在另一方面,本发明涉及用于诊断患有膀胱癌之对象的方法(下文中称为“本发明的第六方法”),其包括:

[0239] a) 确定来自所述对象之样品中的基因组合中存在的每个基因的表达水平,所述基因组合包含 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、

PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因；

[0240] b) 将所述样品中的所述基因的所述水平与其参考值进行比较；

[0241] 其中

[0242] - 来自所述对象之样品中 IGF2、MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平高于所述基因各自的参考值,并且

[0243] - 来自所述对象之样品中 KLF9、AHNAK2、EBF1 和 CFH 基因的表达水平低于所述基因各自的参考值,

[0244] 指示所述对象患有膀胱癌;以及

[0245] c) 如果根据所述基因的表达水平所述对象患有膀胱癌,则对所述对象进行内窥镜操作。

[0246] 本发明第四、第五和第六方法的步骤 a) 和 b) 的细节此前已结合本发明的第一、第二和第三方法分别进行了描述并通过引用并入文本。所述步骤在体外进行。

[0247] 换言之,本发明第四、第五和第六方法的步骤 c) 包括:如果诊断是膀胱癌阳性的,则开处方或者进行内窥镜操作。因此,简言之,如果对象被诊断为患有膀胱癌,那么对该对象进行内窥镜操作,例如膀胱镜检查术。膀胱镜检查术是经由尿道的膀胱内窥镜检查术。其用膀胱镜来进行,所述膀胱镜即具有让医生聚焦于膀胱粘膜的透镜的装置。一些膀胱镜使用将图像从器械的顶端运送至另一端的观察件的光纤(柔性玻璃纤维)。很多膀胱镜具有额外的导管以引导用于治疗泌尿问题之外科手术操作的其他器械。存在两种主要类型的膀胱镜检查术,即柔性和硬性,其不同之处在于膀胱镜的柔性。柔性膀胱镜检查术通常在局部麻醉下进行。由于探头引起的疼痛,硬性膀胱镜检查术一般在全身麻醉下进行。

[0248] 如果,依照根据本发明之用于诊断膀胱癌的任一种方法[即,本发明的第一、第二或第三方法],对象被诊断为未患膀胱癌,则将不对该对象进行内窥镜操作。

[0249] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有膀胱癌之对象的方法(下文中称为“本发明的第七方法”),其包括:

[0250] a) 确定来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平;

[0251] b) 将所述样品中所述 IGF2 基因的表达水平与其参考值进行比较;

[0252] 其中来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的所述参考值指示所述对象患有膀胱癌;以及

[0253] c) 如果所述对象被诊断为患有膀胱癌并且所述对象将受益于经尿道切除术(transurethral resection, TUR)的施用,则向所述对象施用所述经尿道切除术。

[0254] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有膀胱癌之对象的方法(下文中称为“本发明的第八方法”),其包括:

[0255] a) 确定来自所述对象之尿样中 IGF2 基因的表达水平和第二基因的表达水平,其中所述第二基因选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因;

[0256] b) 将所述样品中所述基因的表达水平与其参考值进行比较;

[0257] 其中来自所述对象之样品中 IGF2 基因的表达水平高于所述基因的参考值;并且

[0258] 其中当与该基因的参考值相比时,来自所述对象之样品中的所述第二基因的表达水平改变,其中所述表达水平改变是:

[0259] -MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 或 MMP12 基因的表达水平提高,或者

[0260] -KLF9、AHNAK2、EBF1 或 CFH 基因的表达水平降低,指示所述对象患有膀胱癌;以及

[0261] c) 如果所述对象被诊断为患有膀胱癌并且所述对象将受益于经尿道切除术 (TUR) 的施用,则向所述对象施用所述经尿道切除术。

[0262] 在另一方面,本发明涉及用于治疗患有膀胱癌之对象的方法(下文中称为“本发明的第九方法”),其包括:

[0263] a) 确定来自所述对象之样品中的基因组合中存在的每个基因的表达水平,所述基因组合包含 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因;

[0264] b) 将所述样品中所述基因的水平与其参考值进行比较;

[0265] 其中

[0266] -来自所述对象之样品中 IGF2、MAGEA3、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平高于所述基因各自的参考值,并且

[0267] -来自所述对象之样品中 KLF9、AHNAK2、EBF1 和 CFH 基因的表达水平低于所述基因各自的参考值,

[0268] 指示所述对象患有膀胱癌;以及

[0269] c) 如果所述对象被诊断为患有膀胱癌并且所述对象将受益于经尿道切除术 (TUR) 的施用,则向所述对象施用所述经尿道切除术。

[0270] 本发明第七、第八和第九方法的步骤 a) 和 b) 的细节此前已结合本发明的第一、第二或第三方法分别进行了描述并通过引用并入文本。所述步骤在体外进行。

[0271] 根据本发明第七、第八和第九方法的步骤 c),如果通过本发明第一、第二和第三方法中的任一种方法对象被诊断为患有膀胱癌,那么向将受益于治疗的施用的所述对象施用所述治疗。

[0272] 众所周知,膀胱癌的治疗取决于肿瘤侵入膀胱壁的深度。所有的患者都进行 TUR 作为第一步。非肌肉侵入性膀胱癌 (NMIBC) (未进入肌肉层的那些) 可利用膀胱镜附带的电烙器装置(在此情况下,称为前列腺切除器)去除。该操作称为 TUR 并且主要用于病理学分期。在非肌肉侵入性膀胱癌的情况下,TUR 本身就是治疗,但在肌肉侵入性膀胱癌 (MIBC) 的情况下,该操作对最终治疗来说是不够的。

[0273] 还采用通过囊内 (intravesicular) 递送卡介苗 (Bacillus Calmette-Guérin, BCG) 的免疫治疗来治疗和预防 NMIBC 的复发。BCG 是一种针对结核病的疫苗,BCG 由在人中已丧失其毒力之经减毒的(弱化的)活牛结核杆菌(牛型结核菌 (Mycobacterium bovis)) 制备而成。BCG 免疫治疗在处于该阶段之多达 2/3 的病例中是有效的,并且随机试验中已显示其优于标准的化学治疗。

[0274] 膀胱内化学治疗的滴剂(例如 mytomicine 及其他物质)是治疗和预防复发的有

效选择。装置辅助性化学治疗是用于治疗 NMIBC 的一个这样的新技术组合。这些技术利用不同的机制来促进所滴注的化学治疗药物被直接吸收到膀胱中并发挥作用。另一种技术利用电流来增强药物吸收。另一种技术（热治疗）利用射频能量来直接加热膀胱壁，其与化学治疗一起表现出协同作用，互相增强杀伤肿瘤细胞的能力。

[0275] 其肿瘤在 BCG 治疗后复发的患者更加难以治疗。很多医生建议这些患者进行膀胱切除术。这一建议依照欧洲泌尿科医师协会 (European Association of Urologists, EAU) 和美国泌尿外科协会 (American Urological Association, AUA) 的官方指导方针。然而，患者可能优选先尝试保守的治疗选择，之后才选择这种最后根治性选择治疗。

[0276] 未经治疗的浅表性肿瘤可进展并浸润膀胱的肌肉壁。浸润膀胱的肌肉层的肿瘤需要更为根治性的外科手术，其中通常全部膀胱都被去除（称为膀胱切除术的操作）并且尿流被转移到分离的肠回路中（称为回肠膀胱术或尿道造口术）。在一些情况下，熟练的外科医生可由肠组织的一段产生替代膀胱（新膀胱），但这在很大程度上取决于患者的偏好、患者的年龄、肾功能和患病部位。

[0277] 还可使用辐射和化学治疗的组合来治疗侵入性疾病。仍尚未确定如何将这种治疗形式的功效与根治性切除外科手术的功​​效进行比较。

[0278] 对于肌肉侵入性尿路上皮膀胱癌，具有多个治疗选择。黄金标准是如所提及的根治性膀胱切除术。在男性中，这通常还包括去除前列腺，而在女性中包括去除卵巢、子宫和部分阴道。为了解决本身对长期存活有影响的微转移疾病的问题，需要新的治疗选择。微转移播散通常不可仅用大的外科手术来治疗并且已发展出新辅助化学治疗的概念。在世界范围内随机化前瞻性实验的众多 Meta 分析中，结果已显示这种治疗在随后的 5 年时间内具有 5% 至 8% 的存活益处。因此，患者首先在 3 或 4 个周期内接受化学治疗，并在此之后首次进行大的外科手术。

[0279] 如果，依照根据本发明之用于诊断膀胱癌的任一种方法 [即，本发明的第一、第二或第三方法]，对象被诊断为未患膀胱癌，则将不对该对象进行任何治疗。

[0280] 根据本发明所提供的结果，医生可通过选择合适的方法（例如，膀胱镜检查术）来优化膀胱癌的诊断以应用于对象。因此，本发明所提供的方法和手段可帮助医生选择最适合可能患有膀胱癌的对象诊断选择。此外，可避免对对象造成应用非必需的侵入性诊断方法相关的不适，并避免在此情况下所涉及的不必要花费。

[0281] 本发明的用途

[0282] 在另一方面，本发明涉及 IGF2 基因作为膀胱癌诊断中的标志物或用于膀胱癌监测的标志物的用途。

[0283] 在另一方面，本发明涉及这样的基因组组合作为膀胱癌诊断中的标志物或用于膀胱癌监测的标志物的用途，所述基因组组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的第二基因，或者由其组成。

[0284] 在一个具体实施方案中，所述第二基因是 MAGEA3。

[0285] 在另一个具体实施方案中，所述第二基因是 CRH。

[0286] 在另一个具体实施方案中，所述第二基因是 KLF9。

[0287] 在另一个具体实施方案中，所述第二基因是 SLC1A6。

- [0288] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 ANXA10。
- [0289] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 AHNAK2。
- [0290] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 CTSE。
- [0291] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 KRT20。
- [0292] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 POSTN。
- [0293] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 PPP1R14D。
- [0294] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 TERT。
- [0295] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 ASAM。
- [0296] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 MCM10。
- [0297] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 EBF1。
- [0298] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 CFH。
- [0299] 在另一个具体实施方案中,所述第二基因是 MMP12。
- [0300] 在另一方面,本发明涉及这样的基因组合作为膀胱癌诊断中的标志物或用于膀胱癌监测的标志物的用途,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因,前提是所述组合不是下列任一组合:
- [0301] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10;
- [0302] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT;
- [0303] -ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT;
- [0304] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10;或
- [0305] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT。
- [0306] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 2 个基因。
- [0307] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 3 个基因。
- [0308] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 4 个基因。
- [0309] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 5 个基因。
- [0310] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 6 个基因。
- [0311] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、

AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 7 个基因,前提是所述 7 个基因的组合不是 ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT 的组合或 ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT 的组合。

[0312] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 8 个基因,前提是所述 8 个基因的组合不是 ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10 的组合。

[0313] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 9 个基因。

[0314] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 10 个基因。

[0315] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 11 个基因,前提是所述 11 个基因的组合不是 ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT 的组合。

[0316] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 12 个基因。

[0317] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 13 个基因,前提是所述 13 个基因的组合不是 ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10 的组合。

[0318] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 14 个基因。

[0319] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 15 个基因。

[0320] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2 基因以及选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 16 个基因。

[0321] 在一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因,或者由其组成。

[0322] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因,或者由其组成。

[0323] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因,或者由其组成。

[0324] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因,或者由其组成。

[0325] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因,或者由其组成。

[0326] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、CRH 和 KLF9 基因,或者由其组成。

[0327] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、CRH 和 KRT20 基因,或者由其组成。

[0328] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、CRH 和 ANXA10 基因,或者由其组成。

[0329] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、ANXA10 和 KRT20 基因,或者由其组成。

[0330] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因,或者由其组成。

[0331] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 基因,或者由其组成。

[0332] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 基因,或者由其组成。

[0333] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因,或者由其组成。

[0334] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、KLF9、ANHAK2、BFE1 和 MMP12 基因,或者由其组成。

[0335] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 基因,或者由其组成。

[0336] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 基因,或者由其组成。

[0337] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因,或者由其组成。

[0338] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 基因,或者由其组成。

[0339] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因,或者由其组成。

[0340] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因,或者由其组成。

[0341] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因,或者由其组成。

[0342] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因,或者由其组成。

[0343] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、

POSTN、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因,或者由其组成。

[0344] 在另一个具体实施方案中,所述基因组合包含 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXO1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因,或者由其组成。

[0345] 本领域技术人员可以理解,本发明的教导还可应用于监测或跟踪患者中随时间的周期性或重复诊断,所述患者此前患过膀胱癌并已被治疗但由于这种癌症具有复发的高风险而仍处于警觉之中。通常来说,在不同的时间间隔监测患者,所述时间间隔通常为距离上一次治疗 3 个月至 1 年。

[0346] 因此,在另一方面,本发明涉及本发明所提供的任意基因或其组合用于膀胱癌监测的用途。本发明所提供的所述基因以及基因组合的细节此前已进行了描述并通过引用包括在本文中。

[0347] 本发明的试剂盒

[0348] 在另一方面,本发明涉及这样的试剂盒(下文中为“本发明的第一试剂盒”),其包含用于检测和/或量化 IGF2 基因的表达水平的试剂。

[0349] 在一个具体实施方案中,所述试剂是用于检测和/或量化 IGF2 基因的 mRNA 的试剂。在另一个具体实施方案中,所述试剂是用于检测和/或量化由 IGF2 基因编码的蛋白质的试剂。

[0350] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和/或量化 IGF2 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2 之所述 mRNA 杂交或与 IGF2 之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。

[0351] 在另一个具体实施方案中,所述用于检测和/或量化由 IGF2 基因编码的蛋白质的试剂是识别 IGF2 的抗体。

[0352] 在另一方面,本发明涉及这样的试剂盒(下文中为“本发明的第二试剂盒”),其包含用于检测和/或量化基因组合的表达水平的试剂,所述基因组合包含 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的第二基因,或者由其组成。

[0353] 在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和/或量化 IGF2 基因之 mRNA 的试剂和用于检测和/或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之第二基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和/或量化 IGF2 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2 之所述 mRNA 杂交或与 IGF2 之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在一个具体实施方案中,所述用于检测和/或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TFRT、ASAM、MCM10、ERF1、CFH 和 MMP12 基因之第二基因的 mRNA 的试剂包含与第二基因之 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与第二基因之所述 mRNA 杂交或与第二基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在一个特定的具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和/或量化 IGF2 基因之 mRNA 的试剂和用于检测和/或量化选自 MAGEA3 基因之第二基因的 mRNA 的试剂,其中所述用于检测和/或量化 IGF2 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2 之所述 mRNA 杂交或与 IGF2 之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对,并且其中所述用于检测和/或量化 MAGEA3 基因之 mRNA 的试剂包

含与 MAGEA3 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 MAGEA3 之所述 mRNA 杂交或与 MAGEA3 之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一些具体实施方案中,待检测和 / 或量化的第二基因是 CRH、KRT20、SLC1A6、ANXA10 或 KLF9。

[0354] 在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由 IGF2 基因编码的蛋白质的试剂是识别 IGF2 的抗体。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之所述第二基因编码的蛋白质的试剂是识别由所述第二基因编码之蛋白质的抗体。

[0355] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 MAGEA3 的抗体。

[0356] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 CRH 的抗体。

[0357] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 KLF9 的抗体。

[0358] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 SLC1A6 的抗体。

[0359] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 ANXA10 的抗体。

[0360] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 AHNAK2 的抗体。

[0361] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 CTSE 的抗体。

[0362] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 KRT20 的抗体。

[0363] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 POSTN 的抗体。

[0364] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 PPP1R14D 的抗体。

[0365] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 TERT 的抗体。

[0366] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 ASAM 的抗体。

[0367] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 MCM10 的抗体。

[0368] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 EBF1 的抗体。

[0369] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质的试剂是识别 CFH 的抗体。

[0370] 在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由第二标记基因编码的蛋白质

的试剂是识别 MMP12 的抗体。

[0371] 在另一方面,本发明涉及这样的试剂盒(下文中为“本发明的第三试剂盒”),其包含用于检测和 / 或量化基因组合的表达水平的试剂,所述基因组合包含 IGF2 基因和选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其任意组合的至少两个基因,前提是所述组合不是下列任一组合:

[0372] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10;

[0373] -ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT;

[0374] -ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT;

[0375] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10;或

[0376] -ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT。

[0377] 在一个具体实施方案中,本发明的所述第三试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之 mRNA 的试剂和两种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其组合之基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2 之所述 mRNA 杂交或与 IGF2 之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其组合之 mRNA 的试剂包含与所述基因之 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述基因之所述 mRNA 杂交或与所述基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化由 IGF2 基因和由 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH、MMP12 基因及其组合编码的蛋白质的试剂是识别由所述基因编码的蛋白质的抗体。

[0378] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 2 个基因的表达水平的试剂。

[0379] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 3 个基因的表达水平的试剂。

[0380] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 4 个基因的表达水平的试剂。

[0381] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 /

或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 5 个基因的表达水平的试剂。

[0382] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 6 个基因的表达水平的试剂。

[0383] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 7 个基因的表达水平的试剂,前提是所述试剂盒不是由用于检测和 / 或量化下列基因组合的表达水平的试剂组成:IGF2、ANXA10、CRH、KRT20、MAGEA3、POSTN、SLC1A6 和 TERT;以及 IGF2、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6 和 TERT。

[0384] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 8 个基因的表达水平的试剂,前提是所述试剂盒不是由用于检测和 / 或量化下列基因组合的表达水平的试剂组成:IGF2、ANXA10、CTSE、CRH、KRT20、MAGEA3、SLC1A6、TERT 和 MCM10。

[0385] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 9 个基因的表达水平的试剂。

[0386] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 10 个基因的表达水平的试剂。

[0387] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 11 个基因的表达水平的试剂,前提是所述试剂盒不是由用于检测和 / 或量化下列基因组合的表达水平的试剂组成:IGF2、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT。

[0388] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 12 个基因的表达水平的试剂。

[0389] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、

ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 13 个基因的表达水平的试剂,前提是所述试剂盒不是由用于检测和 / 或量化下列基因组合的表达水平的试剂组成:IGF2、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM 和 MCM10。

[0390] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 14 个基因的表达水平的试剂。

[0391] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 15 个基因的表达水平的试剂。

[0392] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2 基因之表达水平的试剂和一种或更多种用于检测和 / 或量化选自 MAGEA3、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 16 个基因的表达水平的试剂。

[0393] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 KRT20 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 KRT20 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 KRT20 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、CRH 和 KRT20 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、CRH 和 KRT20 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、CRH 和 KRT20 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 KRT20 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、CRH 和 KRT20 基因编码的蛋白质的抗体。

[0394] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 ANXA10 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 ANXA10 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 ANXA10 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、CRH 和 ANXA10 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、CRH 和 ANXA10 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、CRH 和 ANXA10 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 ANXA10 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、CRH 和 ANXA10 基因编码的蛋白质的抗体。

[0395] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、ANXA10 和 KRT20 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、ANXA10 和 KRT20 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、ANXA10 和 KRT20 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、ANXA10 和 KRT20 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、ANXA10 和 KRT20 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、ANXA10 和 KRT20 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、ANXA10 和 KRT20

基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、ANXA10 和 KRT20 基因编码的蛋白质的抗体。

[0396] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3 和 KLF9 基因编码的蛋白质的抗体。

[0397] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3 和 SLC1A6 基因编码的蛋白质的抗体。

[0398] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3 和 CRH 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因之所述 mRNA 杂交或与 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3 和 CRH 基因编码的蛋白质的抗体。

[0399] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 杂交或与 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、KLF9 和 SLC1A6 基因编码的蛋白质的抗体。

[0400] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、CRH 和 SLC1A6 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 杂交或与 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一

个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、CRH 和 SLC1A6 基因编码的蛋白质的抗体。

[0401] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 KLF9 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 KLF9 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 KLF9 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、CRH 和 KLF9 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、CRH 和 KLF9 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、CRH 和 KLF9 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH 和 KLF9 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、CRH 和 KLF9 基因编码的蛋白质的抗体。

[0402] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因编码的蛋白质的抗体。

[0403] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、KLF9 和 CRH 基因编码的蛋白质的抗体。

[0404] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、CTSE 和 MMP12 基因编码的蛋白质的抗体。

[0405] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,

所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9 和 SLC1A6 基因编码的蛋白质的抗体。

[0406] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、ANHAK2、BFE1 和 MMP12 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、ANHAK2、BFE1 和 MMP12 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、ANHAK2、BFE1 和 MMP12 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、KLF9、ANHAK2、BFE1 和 MMP12 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、KLF9、ANHAK2、BFE1 和 MMP12 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、KLF9、ANHAK2、BFE1 和 MMP12 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、ANHAK2、BFE1 和 MMP12 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、KLF9、ANHAK2、BFE1 和 MMP12 基因编码的蛋白质的抗体。

[0407] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 ASAM 基因编码的蛋白质的抗体。

[0408] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 MCM10 基因编码

的蛋白质的抗体。

[0409] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因编码的蛋白质的抗体。

[0410] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6 和 EBF1 基因编码的蛋白质的抗体。

[0411] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1 和 CFH 基因编码的蛋白质的抗体。

[0412] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 mRNA 的试剂包含

与 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、CRH、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因编码的蛋白质的抗体。

[0413] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、PPP1R14D、SLC1A6、EBF1、CFH 和 MMP12 基因编码的蛋白质的抗体。

[0414] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、POSTN、TERT、ASAM、MCM10、EBF1、CFH 和 MMP12 基因编码的蛋白质的抗体。

[0415] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、

SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12 基因编码的蛋白质的抗体。

[0416] 在一个具体实施方案中,本发明的所述第三试剂盒还包含用于检测和 / 或量化选自 FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因及其任意组合之一个或更多个基因的表达水平的试剂。因此,所述试剂盒将根据需对其表达水平进行量化的一个或更多个基因来并入所需的试剂,例如,如用于检测和 / 或量化 FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因中一个或更多个的 mRNA 的试剂,例如,如与 FOXM1、KIF20A、MELK 和 / 或 CDK1 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 FOXM1、KIF20A、MELK 和 / 或 CDK1 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 FOXM1、KIF20A、MELK 和 / 或 CDK1 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 FOXM1、KIF20A、MELK 和 / 或 CDK1 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 FOXM1、KIF20A、MELK 和 / 或 CDK1 基因编码的蛋白质的抗体。

[0417] 在一个具体实施方案中,本发明的第三试剂盒包含一种或更多种用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因的表达水平的试剂。在一个具体实施方案中,所述试剂盒包含用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因的 mRNA 的试剂。在一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因之 mRNA 的试剂包含与 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 之所述 mRNA 的 cDNA 杂交的探针或者与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因之所述 mRNA 杂交或与所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK12 基因之所述 mRNA 的所述 cDNA 杂交的寡核苷酸引物对。在另一个具体实施方案中,所述用于检测和 / 或量化 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因之表达水平的试剂包含识别由所述 IGF2、MAGEA3、CRH、KLF9、SLC1A6、POSTN、EBF1、CFH、MCM10、MMP12、TERT、FOXM1、KIF20A、MELK 和 CDK1 基因编码的蛋白质的抗体。

[0418] 在另一方面,本发明涉及本发明的任意试剂盒用于膀胱癌诊断的用途。

[0419] 此外,本领域技术人员可以理解,本发明的教导还可应用于监测或跟踪患者中随时间的周期性或重复诊断,所述患者此前患过膀胱癌并已被治疗,但由于这种癌症具有复发的高风险而仍处于警觉之中。通常来说,在不同的时间间隔监测患者,所述时间间隔通常为距离上一次治疗 3 个月至 1 年。

[0420] 因此,在另一方面,本发明涉及本发明的任意试剂盒用于膀胱癌监测的用途。本发明试剂盒的细节此前已进行了描述并通过引用包括在本文中。

[0421] 以下实施例用于举例说明本发明而不应认为是对本发明的范围进行限制。为了进行所述实施例,使用本文中所述的材料和方法。

[0422] 实施例 1

[0423] 12 个基因之组合所形成的模型用于膀胱癌诊断的临床验证

[0424] 进行该实施例以验证所开发的 12- 基因模型 [IGF2、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT] 在独立患者和对照组中的精确度。

[0425] 材料和方法

[0426] 样品和患者

[0427] 在巴塞罗那医院门诊 (Hospital Clínic of Barcelona) 于 2009 年 2 月至 2010 年 1 月期间预期地收集本实施例中所使用的来自 239 名连续膀胱癌患者的尿样和对照样品。本研究中包括的所有个体此前均被告知了本研究的目的并签署了知情同意表格。该验证研究来自经医院伦理委员会 (Hospital Ethics Committee) 先前批准的全球计划。

[0428] 考虑到获得不到 10ng 的 RNA, 将所收集的 239 份尿样中的 14 份从研究中排出。另一方面, 排除不符合 RNA 质量标准的那些样品 ($n = 18$, 参见下文涉及“数据分析”的部分)。最终, 在本验证研究中对 207 份尿样进行分析: 96 份样品来自由于患有原发性或复发性膀胱瘤和组织学上确认的肿瘤而已进行外科经尿道切除术 (TUR) 的患者 (72 名男性, 24 名女性, 平均年龄 71.8 岁), 并且 111 份尿样来自患有非赘生性泌尿疾病的对照患者和健康对照 (47 名男性, 64 名女性, 平均年龄 58.3 岁) (表 1)。根据世界卫生组织 (WHO) 分类法 [Lopez-Beltran A 等 Tumours of the Urinary System. In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, 编辑. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press, 2004. 第 89-157 页] 和 TNM 分类法 [Sobin LH & Wittekind CH. TNM Classification of Malignant Tumours. International Union Against Cancer., 第 6 版. New York: John Wiley & Sons; 2002] 来确定肿瘤的级别和阶段。

[0429] 根据肿瘤的风险将其分类为 3 种类型:

[0430] - 低风险非肌肉侵入性膀胱癌 (NMIBC, Ta 和 T1 低级, 无相关 CIS);

[0431] - 高风险 NMIBC (低级 Ta 或 T1, 具有相关 CIS; 高级 Ta 或 T1 和 Tis); 和

[0432] - 肌肉侵入性膀胱癌 (MIBC, T2、T3、T4 和 LG HG, 有或无相关 CIS)。

[0433] 本研究中所包括的患者和对照的临床 - 病理学特征示于表 1 中。

[0434] 表 1

[0435] 本研究中所包括的患者和对照的临床 - 病理学特征

[0436]

		训练组 (N=211)	验证组 (N=207)
肿瘤样品 (尿液)			
Tis		2	4
Ta LG	-CIS	39	25
	+CIS	-	1
Ta HG	-CIS	9	5
	+CIS	1	3
Ta Gx	-CIS	-	1
T1 LG	-CIS	5	5
	+CIS	-	1
T1 HG	-CIS	11	24
	+CIS	4	5
T2, T3, T4 LG	-CIS	-	1
T2, T3, T4 HG	-CIS	22	18
	+CIS	4	2
Tx LG	-CIS	-	1
总肿瘤		97	96
对照样品 (尿液)			
良性前列腺增生		29	14
尿石病		22	33
尿失禁		9	14
尿道狭窄		13	4
尿路感染		7	1
健康		25	33
其他		9	12
总对照		114	111
总计		211	207

[0437] CIS :原位癌

[0438] GX :级别未确定

[0439] HG :高级

[0440] LG :低级

[0441] Ta :非侵入性乳头状癌或局限于粘膜的乳头状癌

[0442] Tis :原位癌。未侵入固有层的扁平浅表性肿瘤。

[0443] Tx :原发肿瘤

[0444] T1 :侵入上皮下结缔组织或侵入固有层的肿瘤。

[0445] T2 :侵入膀胱肌肉层的肿瘤 ;

[0446] T3 :侵入肌肉层之外或侵入膀胱前脂肪的肿瘤 ;

[0447] T4 :侵入邻近膀胱的结构肿瘤

[0448] 处理尿样

[0449] 在研究组的情况下,在对患者进行 TUR 之前收集尿样,而在对照的情况下在泌尿科服务中心 (Urology Service) 于其研究期间收集尿样。将 50ml 至 100ml 的尿液收集在经 RNA 稳定剂 (1/25 体积的 0.5M 乙二胺四乙酸 (EDTA), pH 8.0) 制备的容器中,将尿液在 4℃ 下贮存并在随后的 24 小时后进行处理。将样品在 4℃ 下以 1000xg 离心 10 分钟。接下来,弃去上清液,将细胞沉淀物重悬于 1ml TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中并在 -80℃ 下冷冻,直至进行后续的总 RNA 提取。

[0450] 依照供应商的说明 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 从在 TRIzol 试剂中均化过的尿样提取总 RNA。然后,借助分光光度计 (NanoDrop ND-1000) 量化所获得的 RNA。

[0451] TaqMan 阵列中的定量 PCR

[0452] 根据可用性,使用 10ng 至 500ng 从尿样获得的总 RNA 借助 TaqMan RNA 逆转录试剂盒® (Applied Biosystems) 按照供应商的说明 (除反应的终体积是 25 μ l 之外) 来获得互补 DNA (cDNA)。使用 **TaqMan®** PreAmp Master Mix 试剂盒 (Applied Biosystems) 按照供应商的建议 (除最终反应体积为 25 μ l 之外) 借助含有 45 个靶基因加 2 个内源对照 (表 2) 的多重反应来对总共 6.25 μ l 的每种 cDNA 进行预扩增。最后,将 5 μ l 经预扩增并稀释的 cDNA 与 50 μ l 的 2X TaqMan Universal PCR Mastermix (AB) 混合,终体积为 100 μ l,并借助 TaqMan 阵列采用生产商的建议在单重反应中扩增 (Applied Biosystems)。

[0453] 表 2

[0454] 本研究中所分析的 45 个靶基因和 2 个内源对照的列表

[0455]

基因符号	测定ID(Applied Biosystems)	基因名称
<i>TMBIM6</i>	Hs00162661_m1	含跨膜BAX抑制剂基序6
<i>PPIA</i>	Hs99999904_m1	肽基脯氨酰异构酶A(亲环蛋白A)
<i>GUSB</i>	Hs99999908_m1	β 葡萄糖醛酸酶
<i>ANLN</i>	Hs00218803_m1	anillin, 肌动蛋白结合蛋白
<i>ANXA10</i>	Hs00200464_m1	膜联蛋白A10
<i>ASAM</i>	Hs00293345_m1	脂肪细胞特异性粘附分子
<i>ASPM</i>	Hs00411505_m1	asp(异常纺锤体)同源物, 头小畸形关联的(果蝇(<i>Drosophila</i>))
<i>BIRC5</i>	Hs00153353_m1	含杆状病毒IAP重复序列5
<i>AHNAK2</i>	Hs00746838_s1	AHNAK核蛋白 2
<i>CCNA2</i>	Hs00153138_m1	细胞周期蛋白A2
<i>CDK1</i>	Hs00364293_m1	细胞周期蛋白依赖性激酶1
<i>CDC20</i>	Hs00415851_g1	细胞分裂周期20同源物(酿酒酵母)
<i>NUF2</i>	Hs00230097_m1	NUF2, NDC80动粒复合体成分同源物(酿酒酵母)
<i>CDH1</i>	Hs00170423_m1	钙粘着蛋白1, 1型, E-钙粘着蛋白(上皮)
<i>CENPF</i>	Hs00193201_m1	着丝粒蛋白F, 350/400ka(分裂激酶)
<i>CFH</i>	Hs00164830_m1	补体因子H
<i>CRH</i>	Hs00174941_m1	促肾上腺皮质激素释放激素
<i>CTSE</i>	Hs00157213_m1	组织蛋白酶E
<i>DLGAP5</i>	Hs00207323_m1	盘大(果蝇)同源物关联蛋白 5
<i>EBF1</i>	Hs00395513_m1	早期B细胞因子1
<i>FGFR3</i>	Hs00179829_m1	成纤维细胞生长因子受体3
<i>FOXO1</i>	Hs00153543_m1	叉头盒M1
<i>IGF2</i>	Hs00171254_m1	胰岛素样生长因子(生长调节素A)
<i>IQGAP3</i>	Hs00603642_m1	含IQ基序的GTP 酶激活蛋白3
<i>KIF20A</i>	Hs00194882_m1	驱动蛋白家族成员20A
<i>KIF2C</i>	Hs00199232_m1	驱动蛋白家族成员2C
<i>KIF4A</i>	Hs00602211_g1	驱动蛋白家族成员4A
<i>KLF9</i>	Hs00230918_m1	Kruppel样因子9
<i>KRT14</i>	Hs00265033_m1	角蛋白14
<i>KRT20</i>	Hs00300643_m1	角蛋白20
<i>MAGEA3</i>	Hs00366532_m1	黑素瘤抗原家族A, 3
<i>MAGEA2;MAGEA9B</i>	Hs00245619_s1	黑素瘤抗原家族A, 9;黑素瘤抗原家族A, 9B
<i>MCM10</i>	Hs00218560_m1	微染色体维持复合体成分10
<i>MDK</i>	Hs00171064_m1	中期因子(神经突生长促进因子2)
<i>MELK</i>	Hs00207681_m1	母体胚胎亮氨酸拉链激酶
<i>MKI67</i>	Hs00606991_m1	通过单克隆抗体Ki-67鉴定的抗原
<i>MMP12</i>	Hs00159178_m1	基质金属蛋白酶12(巨噬细胞弹性蛋白酶)
<i>NEK2</i>	Hs00601227_mH	NIMA(从未存在于有丝分裂基因a中)相关激酶2
<i>POLQ</i>	Hs00198196_m1	聚合酶(DNA定向的), θ
<i>POSTN</i>	Hs00170815_m1	骨膜蛋白, 成骨细胞特异性因子
<i>PPP1R14D</i>	Hs00214613_m1	蛋白磷酸酶1, 调节(抑制剂)亚基14D
<i>SLC1A6</i>	Hs00192604_m1	溶质载体蛋白家族1(高亲和力和力冬氨酸/谷氨酸转运蛋白), 成员6
<i>TERF</i>	Hs00162669_m1	端粒酶逆转录酶
<i>TOP2A</i>	Hs00172214_m1	拓扑异构酶 (DNA) II α 170kDa
<i>TPX2</i>	Hs00201616_m1	TPX2, 微管关联同源物(非洲爪蟾(<i>Xenopus laevis</i>))
<i>TRIP13</i>	Hs00188500_m1	甲状腺激素受体交互子13
<i>VEGFA</i>	Hs00900054_m1	血管内皮生长因子A

[0456] 在验证研究的所有样品中对由相同发明人在先前研究中所分析的 45 个靶基因(包括所研究模型的 12 个基因的组合)和 2 个内源对照进行分析 [Mengual L 等 Gene expression signature in urine for diagnosing and assessing aggressiveness of bladder urothelial carcinoma. Clin Cancer Res 2010 ;16 :2624-33], 目的是评价通过添加或去除基因来改善模型的可能性。

[0457] 数据分析

[0458] 用 SDS 2.4 和 Enterprise 程序 (Applied Biosystems) 处理定量 PCR 数据。自动建立每个基因的阈值和基线。为了能够将所提取的先前数据与人工阈值进行比较, 自动地对之前所分析样品的阈值进行再分析。

[0459] 用 2 个参考基因 (GUSB 和 PPIA) 的循环阈值或 CT 的几何平均值标准化数据。为了确保结果的可靠性, 认为具有较高 GUSB CT 值 ± 3 倍患者和对照之整个组的 GUSB CT 的平均 SD(标准偏差)的样品具有低 RNA 质量并将其从分析中排除 (n = 18 份样品, 12 份对

照和 6 份肿瘤 ;GUSB CT = 24.62 ;GUSB CT 范围 = 22.4-30.27)。

[0460] 将样品中靶基因的相对表达水平以 Δ CT 表示 :

[0461] Δ CT = CT_{参考基因平均值} - CT_{靶基因}

[0462] 认为 CT 值大于 35 的基因表达较差,并且其 Δ CT 归于该基因的最小 Δ CT 值。采用逻辑回归来评价 12 个基因之组合在独立样品验证组中的性能。构建多维尺度图以根据 12 个基因的表达来察看对照和肿瘤组之间的相异性。利用 R 软件来进行所有的计算并构建热图和散点图。利用 ROC 曲线来计算模型的灵敏度和特异性。用 DiagnosisMed([http://CRAN.R-project.org/package = DiagnosisMed](http://CRAN.R-project.org/package=DiagnosisMed)) 和 Proc 包制作 ROC 曲线。使用 R 软件进行所有的计算。

[0463] 结果

[0464] 使用 207 份尿样来验证由 12 个基因 [IGF2、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6 和 TERT] 之组合组成的组用于上述非侵入性膀胱癌诊断。验证组的标签灵敏度 (SN) 和特异性 (SP) 分别为 80% 和 86% (AUC :0.914) (图 1A)。如在训练组中,SN 随肿瘤风险的增加而增加,在低风险 NMIBC (包含 19 份经不正确分类肿瘤样品中的 15 份) 中较低,而在 MIBC 中达到 100% (图 1B)。关于 SP,在验证组中,通过 12 个基因的遗传标签,111 份对照样品中的 15 份不正确分类。独立验证组中的总诊断精确度是 84%。

[0465] 实施例 2

[0466] 鉴定用于膀胱癌诊断的第二代遗传标签

[0467] 为了在可能程度上减轻由于使用数量减少的样品而引起之模型的过度训练,将有所分析尿样 [用于训练模型的样品加用于验证的样品 (实施例 1) 分组在一起以获得较大的训练样品组。将具有较高 GUSB CT 值 ± 2 倍前述验证组中患者和对照之整个组的 GUSB CT 的平均 SD 的样品从分析中排除 (n = 14 份样品,11 份对照样品和 3 份肿瘤样品)。因此,新扩大的样品组最终包含 404 份样品 (211+193)。使用该扩大的样品组来对前述 12-基因模型进行再评价并生成已产生本发明所提供之用于膀胱癌诊断的一些遗传标签的具有较高精确度和较小基因数目的新基因组合。

[0468] 为此,利用前向逐步逻辑回归来确定是否存在用于非侵入性 UC 诊断之具有较大精确度和较小基因数目的其他基因组合 [Hastie TJ&Pregibon D.Generalized linear models. In :Chambers JM,Hastie TJ,编辑.Statistical Models in S.Wadsworth&Brooks/Cole,1992]。

[0469] 用 DiagnosisMed([http://CRAN.R-project.org/package = Diagnosis Med](http://CRAN.R-project.org/package=DiagnosisMed)) 和 Proc 包 [Robin X 等 pROC :an open-source package for R and S+to analyze and compare ROC curves.BMC Bio informatics 2011;12:77] 制作 ROC 曲线。使用 R 软件进行所有的计算。使用 Bioconductor 软件包中的“全局检验算法”[Goeman JJ 等 A global test for groups of genes:testing association with a clinical outcome.Bioinformatics 2004;20:93-9] 来分析所研究基因与诊断预测和积极性 (aggressiveness) 的关联性。

[0470] 在区分对照尿液和 UC 患者尿液方面,对在扩大的训练组尿样中经再评价之 12-基因诊断模型 (鉴定为表 4 中的“GS_D12”) 的评价达到 88% 的精确度 (AUC 0.944) (表 3)。

[0471] 表 3

[0472] 扩大的训练群中所鉴定的遗传标签的诊断性能 (N = 404)

[0473]

遗传标签	SN (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)	RE (%)	AUC	截断值
GS_D12	85.86	90.14	88.65	87.67	11.88	0.944	0.4392224
GS_D10	86.39	90.14	88.71	88.07	11.63	0.949	0.4358558
GS_D5	84.29	90.61	88.95	86.55	12.38	0.941	0.4227185
GS_D3(1)	77.49	90.14	87.57	81.7	15.84	0.921	0.5409575
GS_D3(2)	78.53	90.14	87.72	82.40	15.35	0.920	0.5380129
GS_D3(3)	68.59	90.14	86.18	76.19	20.05	0.901	0.9047405
GS_D2(1)	78.53	90.14	87.72	82.4	15.35	0.913	0.4920999
GS_D2(2)	78.53	90.14	87.72	82.4	15.35	0.920	0.5340469
GS_D2(3)	68.59	90.14	86.18	76.19	20.05	0.890	0.5826062
GS_D2(4)	69.11	90.14	86.27	76.49	19.8	0.900	0.6207051
DS_D1	68.59	90.61	86.75	76.28	19.8	0.883	0.5908347

[0474] SN :灵敏度 ;SP :特异性 ;PPV :阳性预测值 ;NPV :阴性预测值 ;RE :相对误差 ;AUC :曲线下面积

[0475] 发现对 UC 诊断极其精确的多种基因组合。在所有的这些组合中,选择包含 5 和 10 个基因的 2 种基因组合 (分别被鉴定为“GS_D5”和“GS_D10”,表 4)。应指出,有 3 种鉴定的遗传组合 (GS_D12、GS_D5 和 GS_D10) 共有 5 个标志物 (IGF2、CRH、KLF9、MAGEA3 和 SLC1A6)。

[0476] 表 4

[0477] 组成各种遗传标签的基因

[0478]

基因符号	GS_D12	GS_D10	GS_D5	GS_D3(1)	GS_D3(2)	GS_D3(3)	GS_D2(1)	GS_D2(2)	GS_D2(3)	GS_D2(4)	GS_D1
IGF2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MAGEA3	X	X	X				X				
CRH	X	X	X	X	X			X			
KLF9	X	X	X								
SLC1A6	X	X	X								
POSTN	X	X									
TERT	X										
AHNAK2	X										
ANXA10	X				X	X			X		
CTSE	X										
KRT20	X			X		X				X	
PPP1R14D	X										
EBF1		X									
CFH		X									
MCM10		X									
MMP12		X									

[0479] 接下来,对 3 种基因标签所共有的 5 个基因进行更详细地评价以发现标签中每个基因的重要性,确定:

[0480] -2 个基因的组合 (GS_D2(1)) [IGF2 和 MAGEA3] 对膀胱癌诊断极其精确 (表 3),并彼此互补;和

[0481] -IGF2 基因本身能够区分肿瘤和对照样品;尽管如此,加入 MAGEA3 极大地提高了对高风险肿瘤的灵敏度。

[0482] 最后,考虑到 IGF2 是本身就可提供最多诊断性信息的基因,在独立的患者和对照组中,连同其他基因标签 [GS_D10、GS_D5、GS_D3 和 4 种 GS_D2 标签:GS_D2(1)、GS_D2(2)、GS_D2(3) 和 GS_D2(4)] 的诊断性能对其诊断性能 (GS_D1) 进行评价 (实施例 3)。

[0483] 实施例 3

[0484] 在独立的组中临床验证 GS_D12、GS_D10、GS_D5、GS_D2 和 GS_D1 标签的组

[0485] 材料和方法

[0486] 样品和患者

[0487] 在独立的患者和对照组中验证 GS_D12、GS_D10、GS_D5、GS_D3(1)、GS_D3(2)、GS_D3(3)、GS_D2(1)、GS_D2(2)、GS_D2(3)、GS_D2(4) 和 GS_D1 遗传标签 (表 4)。在 5 个欧洲中心 [医院门诊 (Barcelona, Spain)、**Fundació** Puigvert (Barcelona, Spain)、Hospital Virgen del Rocío (Seville, Spain)、奈梅亨大学医学中心 (The Radboud University Nijmegen Medical Centre) (Nijmegen, Netherlands) 和维也纳医科大学 (Medical University of Vienna) (Vienna, Austria)] 于 2009 年 2 月至 2010 年 7 月期间预期地收集 790 份尿样。

[0488] 这些样品对应于 370 名膀胱癌患者和 420 名对照。在本研究中所包括的 790 名受试者中,由于 147 名 (17%) 被认为筛选失败而将其排除并因为技术问题 (在收集样品之时

或者在其分析期间)还排除 118 份样品(14%)。最终,本研究中包括 525 个个体(216 名膀胱癌患者和 309 名对照)。本研究中所包括的患者的临床和组织病理学变量包括在表 5 中。分别根据 WHO 和 TNM 标准来确定肿瘤级别和阶段。

[0489] 表 5

[0490] 多中心验证研究中所包括的受试者的临床-病理学特征

[0491]

	HOSPITAL CLINIC	FUNDACIO PUIGVERT	VIRGEN DEL ROCÍO	UNIVERSITY OF VIENNA	RADBOUD UNIVERSITY NIJMEGEN
N	59	115	22	14	6
平均年龄 (范围)	72 (51-88)	74 (38-90)	65 (45-83)	72 (59-84)	65 (30-83)
阶段					
Ta	20	71	8	7	4
T1	26	19	11	4	2
≥T2	10	23	2	3	0
级别					
LG	21	44	14	8	2
HG	37	70	7	6	4

[0492] HG :高级

[0493] LG :低级

[0494] Ta :非侵入性乳头状癌或局限于粘膜的乳头状癌

[0495] T1 :侵入上皮下结缔组织或侵入固有层的肿瘤。

[0496] T2 :侵入膀胱肌肉层的肿瘤。

[0497] 临床验证

[0498] 以与训练组(实施例 1)中完全相同的方式进行样品收集和处理以及样品分析。

[0499] 在不同的中心收集样品并进行处理直至加入 Trizol 试剂,之后送至用于进行 RNA 提取和分析的参考中心。

[0500] 采用逻辑回归来评价不同标签在验证组中的性能。使用来自训练组的数据计算每份样品是对照或肿瘤样品的可能性。在调整年龄和性别后,与扩大的训练组(n = 404)相比,使用 ROC 曲线来确定 12 个模型在验证组中的灵敏度(SN)和特异性(SP)。用 DiagnosisMed(<http://CRAN.R-project.org/package=DiagnosisMed>)和 Proc 包 [Robin X 等 pROC :an open-source package for R and S+to analyze and compare ROC curves. BMC Bio informatics 2011;12:77] 制作 ROC 曲线。利用 R 软件进行所有的计算。

[0501] 各个诊断标签的 AUC 在扩大的训练组和验证组之间略有不同(表 6)。

[0502] 表 6

[0503] 遗传标签在验证群中的诊断性能 (n = 525)

[0504]

遗传标签	SN (%)	SP (%)	PPV (%)	NPV (%)	RE (%)	AUC	截断值
GS_D12	78.7	93.2	89.01	86.23	12.76	0.905	0.4392224
GS_D10	79.63	93.53	89.58	86.79	12.19	0.908	0.4358558
GS_D5	79.17	91.59	86.8	86.28	13.52	0.903	0.4227185
GS_D3(1)	75.93	90.94	85.42	83.38	15.24	0.895	0.5409575
GS_D3(2)	75.00	91.26	85.71	83.93	15.43	0.893	0.5380129
GS_D3(3)	75.93	91.91	86.77	84.52	14.67	0.905	0.9047405
GS_D2(1)	81.48	91.26	86.7	87.58	12.76	0.918	0.4920999
GS_D2(2)	75.46	90.94	85.34	84.13	15.43	0.894	0.5340469
GS_D2(3)	75.46	90.94	85.34	84.13	15.43	0.902	0.5826062
GS_D2(4)	76.39	92.23	87.30	84.82	14.29	0.907	0.6207051
DS_D1	76.85	91.26	86.01	84.94	14.67	0.907	0.5908347

[0505] SN :灵敏度 ;SP :特异性 ;PPV :阳性预测值 ;NPV :阴性预测值 ;RE :相对误差 ;AUC :曲线下面积

[0506] 所获得结果清楚地显示提供最高诊断性能的遗传标签是 GS_D10 (AUC 0.908 ; 87.81% 精确度)。更甚者, GS_D2(1) 遗传标签达到非常高的精确度值 (AUC 0.918 ; 87.24% 精确度)。最后, 基于仅一个基因 GS_DS1 的非侵入性 UC 诊断达到 85.33% 的精确度, 其中 AUC 为 0.907。

[0507] 实施例 4

[0508] 具有显著差异的靶基因的差别表达

[0509] 借助定量实时 RT-PCR 来确证基于在微阵列中所获得的表达结果被认为在对照和肿瘤样品之间具有更显著差异的那些靶基因的表达水平变化, 具体地, 所述基因是 IGF2、ANXA10、AHNAK2、CTSE、CRH、KLF9、KRT20、MAGEA3、POSTN、PPP1R14D、SLC1A6、TERT、EBF1、CFH、MCM10 和 MMP12。

[0510] 如材料和方法部分中所示, 借助 Taqman RNA 逆转录试剂盒® (Applied Biosystems) 来进行由 RNA 样品的 cDNA 合成以及后续的 cDNA 扩增。如下进行逆转录: 25°C 10 分钟, 1 个循环; 接着 37°C 2 小时, 1 个循环; 和 85°C 5 秒, 1 个循环。在以下条件下进行 cDNA 预扩增: 95°C 10 分钟, 1 个循环; 接着 95°C 15 秒, 14 个循环; 和 60°C 4 分钟。定量 PCR 条件如下: 50°C 2 分钟, 1 个循环; 95°C 10 分钟, 1 个循环; 以及 95°C 15 秒, 40 个循环; 和 60°C 1 分钟。

[0511] 所获得的结果示于表 7 中。

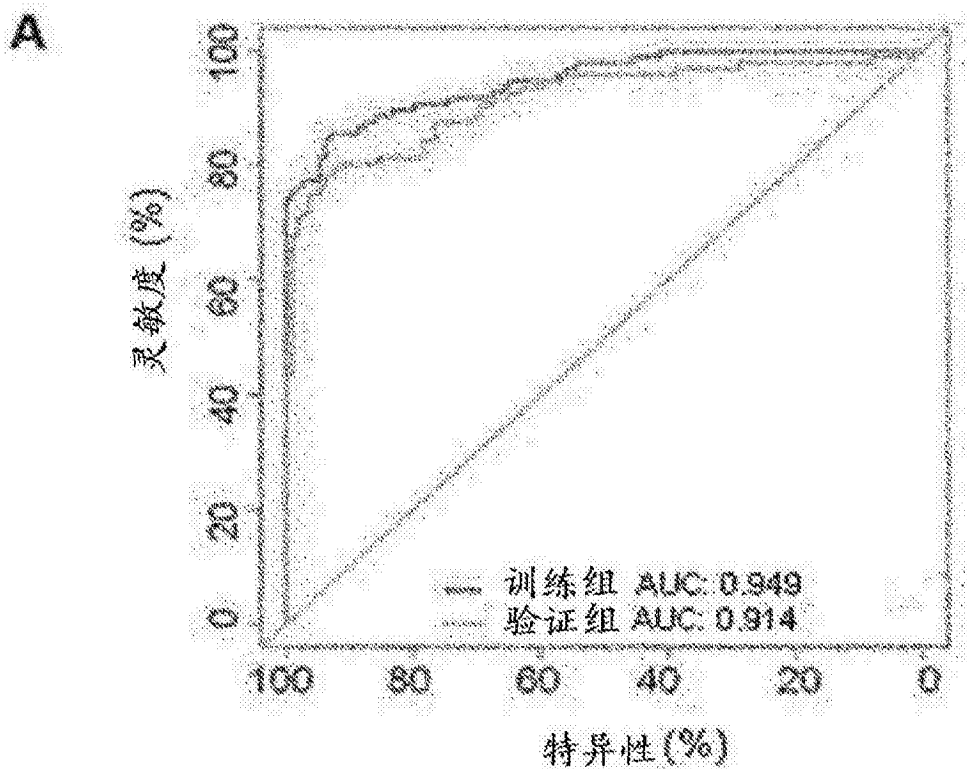
[0512] 表 7

[0513] 变化 / 差别表达的程度

[0514]

基因符号	倍数(诊断)
IGF2	30.0311
MAGEA3	13.4155
CRH	114.9314
KLF9	-1.4277
SLC1A6	37.1548
POSTN	1.3794
TERT	4.7496
AHNAK2	-1.3208
ANXA10	10.9467
CTSE	6.7450
KRT20	12.5117
PPP1R14D	4.6107
EBF1	-2.2139
CFH	-1.1621
MCM10	1.5803
MMP12	1.6804

[0515] “-”符号表示该基因在肿瘤样品中的表达低于该基因在非肿瘤样品中的表达。



	N/T/C	SN	SP	PPV	NPV
训练组	97/114	86	93	91	88
验证组	96/111	80	86	84	83

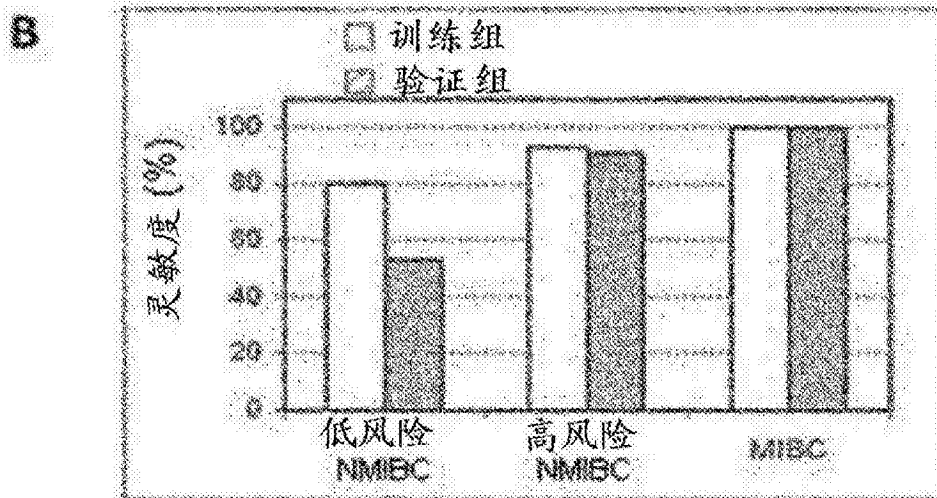


图 1

