(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116113712 A
(43)申请公布日 2023.05.12

(21)申请号 202180062982.5
(22)申请日 2021.07.16
(30)优先权数据
20186398.2 2020.07.17 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.03.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/069952 2021.07.16
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/013420 EN 2022.01.20
(71)申请人 欧洲分子生物学实验室
地址 德国海德堡
申请人 伯尔尼大学
(72)发明人 巴斯蒂安·林德
拉尔斯·斯坦梅茨
塞巴斯蒂安·莱德尔
(74)专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理事务所(普通合伙) 44348
专利代理师 何锦标 张玉颖
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6886(2006.01)

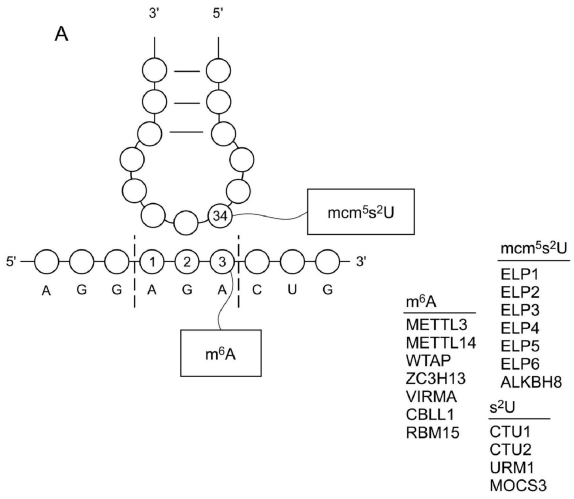
权利要求书3页 说明书28页
序列表4页 附图24页

(54)发明名称

用于癌症的预后生物标志物

(57)摘要

本发明涉及一种用于对象中的紊乱的疗法的预后、诊断、分层和/或监测的新方法。所述方法基于至少一种第一生物标志物的水平的测定，所述第一生物标志物对调节N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性，以及作为组合生物标志物的至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性的测定，所述第二生物标志物对调节5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性。本发明的新生物标志物能够对患者的紊乱进行诊断甚至分层，预估患者(特别是癌症患者(例如乳腺癌患者))的预后并监测患者的疗法成功。还提供了用于对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测的试剂盒。本发明还涉及用于治疗疾病、病症或紊乱的化合物，其中所述化合物特异性地降低或增强调节细胞中m6A mRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质和/或调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质的水平、突变状态和/或活性。



CN 116113712 A

1.一种用于对象中的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测的方法,包含以下步骤

(a)提供所述对象的生物样品,

(b)测定所述生物样品中至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第一生物标志物对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,

(c)测定所述生物样品中至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第二生物标志物对调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)

-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,以及

(d)将步骤(b)和(c)中测定的所述第一生物标志物和所述第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性与参照样品或参照值进行比较,

其中来自所述对象的生物样品中的所述第一生物标志物和/或第二生物标志物与所述参照样品或参照值相比的差异水平、突变状态和/或活性指示患有疾病、病症或紊乱的患者的无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的减少,或者其中来自所述对象的生物样品中的所述第一生物标志物和/或第二生物标志物与所述参照样品或参照值相比的差异水平、突变状态和/或活性指示所述对象中所述疾病、病症或紊乱的存在。

2.根据权利要求1所述的方法,其中(i)所述至少一种第一生物标志物选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白的基因、mRNA或蛋白质,并且优选地为METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5的基因、mRNA或蛋白质;和/或(ii)其中所述至少一种第二生物标志物选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述疾病、病症或紊乱是癌症、和/或显示调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的疾病、和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的疾病,优选地,其中所述癌症选自乳腺癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤、肾癌、肝癌、头颈癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、甲状腺癌、食道癌、脑癌、结肠直肠癌、胃部癌、宫颈癌、卵巢癌、尿路癌、肾脏癌、癌和显示调节细胞中m6A-mRNA修饰和/或调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的肿瘤,更优选其中所述癌症是乳腺癌。

4.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述生物样品是包含组织样品或体液样品的对象中的样品,例如来自肿瘤的一组细胞、肿瘤组织、RNA样品、DNA样品、血液样品、血清样品、血浆样品、尿样、淋巴液样品、胸膜液样品或脑液样品的样品,优选来自肿瘤的一组细胞或肿瘤组织的样品。

5.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种第一生物标志物和所述至少一种第二生物标志物的所述水平、突变状态和/或所述活性通过检测方法来测定,所述检测方法包含mRNA分析、DNA分析、蛋白质分析和/或用于测定靶核酸序列中的单核苷酸多态性(SNP)的方法,优选地,其中所述方法选自用于测定靶核酸序列中的单核苷酸多态性(SNP)的方法,例如包含一组单核苷酸多态性(SNP)的多态性阵列,例如,Affymetrix GeneChip、聚合酶链式反应(PCR)、实时定量PCR(qPCR)、nanoString nCounter、酶联免疫吸

附测定(ELISA)、质谱、质谱免疫测定(MSIA)、基于抗体的蛋白质芯片、二维凝胶电泳、抗肽抗体稳定同位素标准捕获(SISCAPA)、高效液相色谱(HPLC)、基因测试、蛋白质印迹、流式细胞术微球阵列法(CBA)、放射免疫测定和免疫组织化学染色法,优选地其中所述检测方法是用于测定靶核酸序列中的单核苷酸多态性(SNP)的多态性阵列和/或实时定量PCR(qPCR)。

6.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中来自所述对象的生物样品中的所述至少一种第一生物标志物和/或所述至少一种第二生物标志物与所述参照样品或参照值相比的差异水平、突变状态和/或活性指示患有所述疾病、病症或紊乱的患者的无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的减少,并且其中所述参照样品或参照值是群组固有的参照样品或参照值,其中所述参照样品或参照值中的所述至少一种第一生物标志物和/或所述至少一种第二生物标志物与来自所述对象的生物样品相比的水平、突变状态和/或活性指示无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的增加。

7.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中如果所测定的来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物的差异水平、突变状态和/或活性(i)使得结果指示较低水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA,则与未显示这种结果的对象相比,无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)的时间减少,和/或(ii)使得结果指示较高水平的m6A修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U修饰的tRNA,则与未显示这种结果的对象相比,无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)的时间增加。

8.一种对患者进行分层以用于治疗的方法,所述方法包含作为第一步骤的识别来自所述患者的生物样品中的至少一种第一生物标志物和/或至少一种第二生物标志物与参照样品或参照值相比的差异水平、突变状态和/或活性,以及作为第二步骤的基于所述差异水平、突变状态和/或活性决定支持或反对所述治疗,其中所述差异水平、突变状态和/或活性通过使用包括以下步骤的方法来识别:

(a)提供所述患者的生物样品,

(b)测定所述生物样品中至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第一生物标志物对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,

(c)测定所述生物样品中至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第二生物标志物对调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)

-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,以及

(d)将步骤(b)和(c)中测定的所述第一生物标志物和第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性与参照样品或参照值进行比较。

9.根据权利要求8所述的方法,其中(i)所述至少一种第一生物标志物选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白的基因、mRNA或蛋白质,并且优选地为METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5s的基因、mRNA或蛋白质;和/或(ii)其中所述至少一种第二生物标志物选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

10.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种第二生物标志物(ii)包含CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的组,和/或其中所述至少一种第二生物标志物(ii)由CTU1、

CTU2、MOCS3和URM1的组组成。

11.根据权利要求8或9所述的方法，其中基于步骤(d)中来自所述对象的生物样品中的所述第一生物标志物和/或第二生物标志物与所述参照样品或值相比的差异水平、突变状态和/或活性，决定支持增强或抑制调节N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的水平、突变状态和/或活性，和/或增强或抑制调节5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的水平、突变状态和/或活性。

12.根据权利要求8-10中任一项所述的方法，其中所述治疗是靶向细胞中的m6A-mRNA修饰和/或细胞中的mcm5s2U-tRNA修饰的治疗，优选其中所述治疗抑制或激活m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白、m6A擦除蛋白和/或延伸因子复合物。

13.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述方法是非侵入性方法，优选地是离体方法或体外方法。

14.一种用于对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测的试剂盒，所述试剂盒包含用于量化至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性的装置，所述第一生物标志物对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性，和/或用于量化至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性的装置，所述第二生物标志物对调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性。

15.根据权利要求13所述的试剂盒，其中(i)所述至少一种第一生物标志物选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白的基因、mRNA或蛋白质，优选地为METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5s的基因、mRNA或蛋白质；和/或(ii)其中所述至少一种第二生物标志物选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

16.一种用于治疗疾病、病症或紊乱的化合物，其中所述化合物特异性地降低或增强调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质和/或调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质的水平、突变状态和/或活性，优选其中所述疾病、病症或紊乱的特征在于调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性，和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性，更优选其中所述疾病、病症或紊乱是癌症，例如乳腺癌。

用于癌症的预后生物标志物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于对象中的紊乱的疗法的预后、诊断、分层和/或监测的新方法。该方法基于至少一种第一生物标志物的水平的测定，所述第一生物标志物对调节N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性，以及作为组合生物标志物的至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性的测定，所述第二生物标志物对调节5-甲氧基羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性。本发明的新生物标志物能够预估患者(特别是癌症患者(例如乳腺癌患者))的预后并监测患者的治疗成功。本发明的生物标志物还能够对患者的紊乱(特别是癌症(例如乳腺癌))进行诊断甚至分层。进一步提供了用于对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测的试剂盒，所述试剂盒包含用于量化单独的m6A/mcm5s2U基因对的装置。最后，本发明还涉及用于治疗疾病、病症或紊乱的化合物，其中所述化合物特异性地降低或增强细胞中调节m6A mRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质和/或细胞中调节mcm5s2U-tRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质的水平、突变状态和/或活性，从而能够扰乱或恢复m6A/mcm5s2U平衡。

发明内容

[0002] 乳腺癌是女性中最常见的癌症，也是女性中癌症相关死亡人数最多的原因。约12％的美国女性会在她的一生中患上浸润性乳腺癌。目前，乳腺癌每年影响约210万女性。在2018年，估计有627,000名女性死于乳腺癌，约占所有女性癌症死亡人数的15％。乳腺癌通常可分为几个主要阶段：早期、局部晚期、局部复发和转移。早期乳腺癌的5年生存预后通常在60％以上，晚期乳腺癌的该项数字下降到40-60％之间。

[0003] 目前用于治疗乳腺癌的治疗选择包括手术(例如切除、自体骨髓移植)、放射治疗、化疗(例如蒽环类药物(例如多柔比星)；烷化剂(例如环磷酰胺和丝裂霉素C)；紫杉烷类药物(例如紫杉醇和多西他赛)；抗代谢药(例如卡培他滨)；微管抑制剂(例如长春花生物碱诺维本(navelbine))；内分泌治疗(例如抗雌激素(例如他莫昔芬)；孕激素(例如醋酸甲羟孕酮和醋酸甲地孕酮)；或芳香酶抑制剂(例如氨鲁米特(aminoglutethamide)和来曲唑(letrozole))和生物制剂(例如细胞因子、免疫治疗剂(例如单克隆抗体))。

[0004] 乳腺癌的诊断选择包括从患者乳房受影响区域获得的患者样品的显微镜分析或活检。两种最常用的诊断方法是由医生对乳房进行理学检查和乳房x光检查(mammography)。当这些检查无法得出结论时，通常会将肿块中液体的患者样品送去进行显微镜分析以帮助确定诊断。用于活检的其他选择包括计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、超声波检查和核心活检或真空辅助乳腺活检、或切除活检，其中所述切除活检切除整个乳腺肿块。为了改善癌症预后和存活率，癌症(例如乳腺癌)的早期检测至关重要。

[0005] 在过去的几十年中，许多因素已被证实对癌症患者的预后具有预测价值。例如，在乳腺癌患者的情况中，与患有ER/PR阴性和/或HER2阳性疾病的女性相比，激素受体(雌激素/孕酮受体，ER/PR)阳性和人表皮生长因子受体2(HER2)阴性表型被充分证明与有利的预

后结果相关。

[0006] WO2006036726A1公开了一种用于评估乳腺癌患者预后的方法,其中所述方法包含检测至少五种生物标志物(SLPI、src、PSMB9、p21ras和E2F1)。

[0007] US20110097732A1公开了一种用于确定患有乳腺癌的个体的生存预测的方法,其通过测量来自乳腺组织的样品中的细胞核中Wrap53的量和/或测量来自乳腺组织的样品中的细胞质中Wrap53的量,其中Wrap53的细胞核水平、细胞质水平和/或细胞核与细胞质水平之间的比率可以单独或组合以用于乳腺癌预后。然而,这种方法的缺点是需要从开放式手术中获得组织,或者在手术前从细针活检或空心针活检中获得组织。

[0008] 到目前为止,还没有开发出用于疾病(例如癌症疾病)的预后和/或监测的微创但特异且敏感的测试系统的方法,该方法涉及分析基因调控的表观转录层。

[0009] 尽管广泛存在,但基因调控的“表观转录”层的功能尚未被完全了解。mRNA的主要功能是在核糖体上的翻译过程中模板化蛋白质合成。在这个过程中,tRNA通过其反密码子环和mRNA密码子的碱基配对来解码遗传信息。已经在包括mRNA、tRNA、rRNA和ncRNA在内的多种RNA种类中鉴定了超过200种不同的化学修饰核苷酸。这种“表观转录组”改变了修饰的RNA的表达和/或功能,因此代表了基因调控中的一层。例如,tRNA的反密码子环是RNA修饰的“热点”,这些与应激期间的基因表达控制有关。

[0010] 修饰的mRNA核苷酸N6甲基腺苷(m6A)是mRNA中最丰富的修饰,其修饰率高达所有腺苷的0.5%。m6A在RNA聚合酶II通过m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)转录新生RNA的过程中共转录沉积在新生RNA上,该复合物由METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15 ZC3H13组成。因此,m6A用tRNA读取的剪接信息印迹mRNA。

[0011] 所述m6A共有序列被称为“DRACH基序”(D=A、G或U;R=G或A;H=A、C或U)。DRACH基序在mRNA中每～57个核苷酸出现一次,其转录产生潜在的甲基化位点(DRACH)。用m6A修饰导致mRNA半衰期缩短,即细胞中修饰的mRNA转换(turnover)增加。m6A“阅读”蛋白YTHDF2和YTHDF3参与了这一过程,但降解是如何触发的尚不清楚。然而,m6A介导的衰减被证明在细胞转变(例如分化或应激适应)期间重塑细胞转录组是重要的。因此,m6A与细胞稳态被扰乱的多种健康状况(例如癌症、病毒感染或心力衰竭)有关。

[0012] m6A介导的mRNA衰减的主要功能是去除多能性基因以促进干细胞的分化[1、2]。m6A还被证明与各种癌症有关,包括胶质母细胞瘤、急性髓性白血病、膀胱癌和肝细胞癌。因此,通过靶向m6A来对表观转录组进行成药是治疗疾病(例如癌症)的一种有前途的疗法。针对m6A生物发生因子的药物目前正在开发中并且存在第一先导分子,但尚不清楚哪些患者将从这些药物中受益最多。此外,一些最初的研究报告了关于m6A是否作为癌基因或肿瘤抑制因子的矛盾结果,强调了需要建立预测治疗结果并能够将患者分层为受益于激活m6A的化合物和/或受益于抑制m6A的化合物的患者的方法。

[0013] 与疾病(例如癌症)相关的研究的许多方面中的主要步骤是鉴定适合于开发有效和改进的预后、诊断和治疗模式的特异性和敏感性生物标志物。鉴于上述背景技术,本发明的目的是提供用于对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测以及用于开发新疗法的新标志物。由于对快速但敏感且特异的癌症预后和诊断标志物的持续需求,本发明寻求提供一种简单且微创但特异且敏感的测试系统的新方法,用于对象中的疾病、病症或紊乱(例如癌症)的预后、诊断和/或监测。此外,本发明寻求提供能够直接监测临床中的治疗(例如

癌症治疗)的正在进行的治疗成功并评估接受治疗的癌症患者的预后的诊断策略。

[0014] 通过提供用于对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测以及用于开发新疗法的新标志物解决了上述问题,其基于分析m6A系统和tRNA反密码子修饰(即5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U))的相互依赖性。

[0015] 发明简述

通常通过简要描述的方式,本发明的主要方面可以描述如下:

在第一方面,本发明涉及综合分析m6A和mcm5s2U作为对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测的标志物的用途。

[0016] 在第二方面,本发明涉及单独的m6A/mcm5s2U基因对作为对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测的标志物的用途。

[0017] 在第三方面,本发明涉及综合分析m6A和mcm5s2U作为将患者分层为需要抑制或激活m6A通路的患者和/或需要抑制或激活mcm5s2U通路的患者的方法的用途。

[0018] 在第四方面,本发明涉及单独的m6A/mcm5s2U基因对作为将患者分层为需要抑制或激活m6A通路的患者和/或需要抑制或激活mcm5s2U通路的患者的方法的用途。

[0019] 在第五方面,本发明涉及一种用于对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测的试剂盒,所述试剂盒包含用于定量单独的m6A/mcm5s2U基因对的装置。

[0020] 在第六方面,本发明涉及用于治疗疾病、病症或紊乱的化合物,其中所述化合物特异性地降低或增强调节细胞中m6A mRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质和/或调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质的水平、突变状态和/或活性,从而能够扰乱或恢复m6A/mcm5s2U平衡。

[0021] 发明详述

在下文中,将描述本发明的元素。这些元素与特定的实施方案一同列举,然而,应当理解的是,它们可以以任何方式和任何数量组合以创建另外的实施方案。不同描述的实施方案和优选的实施方案不应被解释为将本发明仅限于明确描述的实施方案。该描述应理解为支持并涵盖将两个或更多个明确描述的实施方案组合的实施方案,或者将一个或多个明确描述的实施方案与任意数量的公开和/或优选的元素组合的实施方案。此外,除非上下文另有指示,否则本申请中所有描述的元素的任何排列和组合都应该被视为是由本申请的描述公开的。

[0022] 在第一方面,通过一种用于对象中的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测的方法来解决上述问题,所述方法包含以下步骤

(a)提供所述对象的生物样品,

(b)测定所述生物样品中至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第一生物标志物对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,

(c)测定所述生物样品中至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第二生物标志物对调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,以及

(d)将步骤(b)和(c)中测定的所述第一和所述第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性与参照样品或参照值进行比较,

其中来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物与所述参照样品或参照值相比的差异水平、突变状态和/或活性指示患有疾病、病症或紊乱的患者的无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的减少，或者其中来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物与所述参照样品或参照值相比的差异水平、突变状态和/或活性指示所述对象中所述疾病、病症或紊乱的存在。

[0023] 术语“预后”是指根据病例的性质和症状对疾病的可能结果以及从疾病中康复的前景进行的预测。因此，阴性或不良预后的定义为较低的治疗后生存期或存活率。相反地，积极或良好的预后的定义为提高的治疗后生存期或存活率。通常以无进展生存(PFS)或总生存(OS)的时间提供预后。

[0024] 在本发明的上下文中使用的无进展生存(PFS)应被定义为在疾病(例如癌症)的治疗期间和之后，患者与疾病共存但疾病没有恶化(即无疾病进展的生存)的时间长度。PFS应进一步定义为从随机分配(例如在临床试验中)到疾病进展或任何原因导致死亡的时间。在临床试验中，测量PFS是观察新疗法效果的一种方法。在本发明的上下文中使用的术语“总生存”(OS)应被定义为从特定疾病的诊断或开始治疗之日起患者仍然存活的持续时间。因此，在临床试验中，总生存的测量将比较死亡和未死亡的患者数量。

[0025] 在本发明的上下文中，“诊断”或术语“诊断的”是指识别病理状况的存在或性质。诊断方法的灵敏度和特异性各不相同。诊断试验的“灵敏度”是检测呈阳性的患病个体的百分比(“真阳性”的百分比)。检测未发现的患病个体为“假阴性”。未患病且检测结果为阴性的对象称为“真阴性”。诊断试验的“特异性”是1减去假阳性率，其中“假阳性”率被定义为检测呈阳性的无疾病者的比例。虽然特定的诊断方法可能不能提供疾病的明确诊断，但如果该方法提供有助于诊断的阳性指示也已足够。

[0026] 为了本发明的目的，术语“疾病、病症或紊乱的监测”是指在接受治疗的患者中观察疾病进展。换句话说，在治疗期间定期监测患者所应用的疗法的效果，这使得医生在治疗期间的早期阶段预估该疗法是否有效，并因此相应地调整治疗方案。

[0027] 根据本发明，使用本发明的方法可以预测、诊断和/或监测任何疾病、病症或紊乱。在优选的实施方案中，待预测、诊断和/或监测的所述疾病、病症或紊乱是癌症、病毒性疾病、心脏疾病、神经退行性疾病、与氧化应激相关的疾病和/或显示调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的其他疾病。

[0028] 在另一个优选实施方案中，待预测、诊断和/或监测的所述癌症选自乳腺癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤、肾癌(kidney cancer)、肝癌、头颈癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌(stomach cancer)、结肠癌、甲状腺癌、食道癌、脑癌、结肠直肠癌、胃部癌(gastric cancer)、宫颈癌、卵巢癌、尿路癌、肾脏癌(renal cancer)、癌(carcinoma)和显示调节细胞中m6A-mRNA修饰和/或调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的肿瘤，优选地其中所述癌症是乳腺癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤或显示调节细胞中m6A-mRNA修饰和/或调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的肿瘤。最优选地，所述癌症是乳腺癌。

[0029] 术语“癌症”和“癌细胞”是指在多细胞生物的组织或器官中表现出不受控制的生长的任何细胞。术语“乳腺癌”被理解为指与乳腺组织或乳腺组织细胞相关的任何癌症或癌性病变，并且可以包括乳腺癌的前体(例如，非典型导管增生或非-非典型增生)。癌症可以理解为其中存在原发性肿瘤或多个单独的原发性肿瘤(例如在乳腺癌的情况下存在于乳房中)的疾病。术语“肿瘤”是指非炎性且不具有生理功能的异常良性或恶性组织块。

[0030] 如本文所用，术语“对象”或“患者”是指任何动物(例如哺乳动物)，包括但不限于人类、非人灵长类动物、啮齿动物等。通常地，术语“对象”和“患者”在本文中可互换地用于指代人类对象。如本文所用，术语“怀疑患有癌症的对象”是指呈现指示癌症的一种或多种症状(例如，明显的隆起或肿块)的对象。怀疑患有癌症的对象也可能有一个或多个风险因素。怀疑患有癌症的对象通常没有进行癌症检测。然而，“怀疑患有癌症的对象”涵盖已经接受初步诊断(例如，CT扫描显示肿块)但其癌症亚型或阶段未知的个体。该术语还包括曾经患有癌症的人(例如，处于缓解期的个体)，以及患有癌症并怀疑具有原发肿瘤转移扩散的人。

[0031] 在本发明所描述的优选实施方案中，所述对象是哺乳动物，优选地是人，更优选地是诊断为患有癌症的人类患者或诊断为患有转移性乳腺癌的人类患者。本发明进一步地不仅能够诊断乳腺癌，而且能够诊断转移性乳腺癌甚至循环肿瘤细胞(CTC)阳性乳腺癌。因此，本发明的患者/对象可以根据诊断、预后、分层或测试的是疾病的上述阶段中的哪一个而变化。本领域技术人员理解，例如，已经被诊断患有例如转移性乳腺癌的患者将不会被检测例如乳腺癌这样的普遍存在。然而，当然这不应当被解释为对本发明范围的限制，因为已经建立的诊断也可以用本文描述的本发明方法中的任何一种来验证。

[0032] 在特别优选的实施方案中，所述对象是哺乳动物，例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、猫、狗、猴或人，优选地是人，例如人类患者，更优选地是患有疾病、病症或紊乱并需要治疗的人类患者。

[0033] 本文中使用的术语“生物样品”是指所获得的并且可以用本发明公开的任何一种生物标志物或其基因表达进行分析的样品。生物样品可以包括生物流体(例如，血液、脑脊液、尿液、血浆、血清)、组织活检等。在一些实施方案中，样品是组织样品(例如肿瘤组织)并且可以是新鲜的、冷冻的或储存的石蜡包埋的组织。用于本发明目的的优选的样品是体液，特别地是血浆样品。

[0034] 在优选实施方案中，生物样品是包含组织样品或体液样品的对象的样品，例如来自肿瘤的一组细胞、肿瘤组织、RNA样品、DNA样品、血液样品、血清样品、血浆样品、尿液样品、淋巴液样品、胸膜液样品或脑液样品的样品，优选来自肿瘤的一组细胞或肿瘤组织的样品。

[0035] 如本文所述，术语“测定...的水平”所测的如本文所描述的样品、对照或参照中的至少一种第一标志物和至少一种第二标志物的水平应指定量测试的样品中的所述至少一种第一生物标志物和所述至少一种第二生物标志物的存在。例如，所述样品中第一和第二生物标志物的浓度可以通过测量测试样品中存在的蛋白质/多肽/多糖的量来直接定量。此外，还可以通过(例如通过质谱)评估修饰的RNA核苷酸来直接定量第一和第二生物标志物的量。然而，也可以通过评估第一和第二生物标志物的编码基因的基因表达来间接定量第一和第二生物标志物的量，例如通过定量编码相应生物标志物的表达mRNA。如何测定特定

生物标志物的水平是本领域技术人员所熟知的。本发明不应局限于用于测定给定生物标志物水平的任何特定方法，而是应涵盖能够直接或间接定量或估计所述第一和第二生物标志物水平的所有方法。因此，在本发明的上下文中，“水平”是描述给定样品中生物标志物的绝对量的参数，例如作为绝对重量、体积或摩尔量；或者“水平”与测试样品中所述生物标志物的相对量有关，优选与测试样品中所述生物标志物的浓度有关，例如以mol/l、g/l、g/mol等为单位。在优选的实施方案中，“水平”是指以g/l为单位的测试生物标志物的浓度。

[0036] 如本文所述，术语“测定...的突变状态”中所测定的样品、对照或参照中至少一种第一和至少一种第二生物标志物的突变状态应指分析突变(例如种系突变和/或体细胞突变(例如在调节N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的途径的基因中或在调节5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的基因中))的存在或不存在。如何测定特定生物标志物的突变状态是本领域技术人员所熟知的。本发明不应局限于用于测定给定生物标志物的突变状态的任何特定方法，而是应涵盖能够直接或间接地测定所述生物标志物的突变状态的所有方法。突变的存在或不存在可以例如通过分离从细胞获得的核酸、扩增核酸并确定扩增的核酸中突变的存在或不存在来确定。在一些实施方案中，通过等位基因特异性聚合酶链式反应(AS-PCR)来测定突变的存在或不存在。基因组DNA的相应部分，特别是碱基序列的对应性质适合于作为标准值，其不具有突变，以下也称为野生型、野生型状态或参照DNA。例如，来自同一个体的正常组织，特别是健康组织的基因组DNA适合作为野生型。这可以是，例如，关于体细胞突变的测定的优选的野生型。作为野生型，也可以使用参照基因组。合适的参照基因组包括截至2015年7月16日的Genome Reference Consortium Genome Reference Consortium Human Build 38patch release 2(GRCh38.p2)的人类基因组版本。例如，参照基因组可以是用于确定种系突变和/或体细胞突变的优选野生型。

[0037] 本发明的至少一种第一和至少一种第二生物标志物的“测定突变状态”的方法可以包含以下步骤：扩增所获得的(例如从患者处获得的)的DNA样品或将从患者处获得的RNA样品逆转录成DNA，扩增DNA并分析扩增的DNA以测定与参与调节N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路和/或参与调节5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的基因相关的至少一种序列异常。突变状态的测定可以例如通过Sanger测序来完成。本发明的方法可以涉及测定单核苷酸多态性(SNP)和/或分析单核苷酸突变(即核苷酸取代、插入、缺失)。

[0038] 如本文所述，术语“测定...的活性”中所测定的样品、对照或参照中至少一种生物标志物的活性应指例如分析本发明的至少一种生物标志物的酶活性，例如通过对参与调节m6A-mRNA修饰的通路和/或参与调节mcm5s2U-tRNA修饰的通路的酶或蛋白质进行酶活性测定。根据本发明的术语“测定...的活性”中所测定的至少一种生物标志物的活性应指进一步包括分析参与调节m6A-mRNA修饰的通路和/或参与调节mcm5s2U-tRNA修饰的通路的酶或蛋白质的磷酸化状态，其中所述酶或蛋白质的活性依赖于特定酶或蛋白质的氨基酸的至少一种磷酸化状态。如何测定特定生物标志物的活性和/或酶和/或蛋白质的磷酸化是本领域技术人员公知的，并且可以在一个特定实施方案中涉及蛋白质印迹或ELISA。然而，本发明不应局限于测定给定的生物标志物活性的任何特定方法，而应涵盖能够直接或间接地测定所述生物标志物活性的所有方法。

[0039] 根据本发明的术语“至少一个/至少一种”应包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

13、14、15、16、17、18、19、20或任何其他数字。例如，术语测定“至少一种”根据本发明的第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性应包括测定1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或任何其他数量的可能的第一生物标志物，即对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的生物标志物。此外，术语测定“至少一种”根据本发明的第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性应包括测定1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或任何其他数量的可能的第二生物标志物，即对调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的生物标志物。此外，术语测定根据本发明的特定酶或蛋白质的氨基酸的磷酸化状态的“至少一种”应包括测定特定酶或蛋白质的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或任何其他数量的可能的磷酸化的氨基酸。

[0040] 在本发明的上下文中，“生物标志物”或“标志物”是指有机生物分子(特别是多肽或多糖)，其是，例如与取自没有所述疾病的对象(例如，阴性诊断、正常或健康对象)的可比样品相比不同地存在于取自具有某种疾病的患者的样品中的有机生物分子。例如，标志物可以是多肽或多糖(具有特定的表观分子量)，与阴性诊断的患者或非转移性乳腺癌患者的样品相比，其在转移性乳腺癌患者的样品中以升高或降低的水平存在。在优选的实施方案中，与对照相比，样品中生物标志物水平的“增加”应指本发明优选方面的统计学上显著的增加。在本发明的替代实施方案中，在对象出现特定疾病、病症或紊乱的情况下，本文公开的某些生物标志物也可以显著降低。

[0041] 优选的是，本发明的预后和/或诊断方法的步骤(b)中的标志物和/或步骤(c)中的标志物的分析的特征在于，至少一种测试的标志物在95％置信区间(CI)下具有至少60％、优选至少65％或更优选至少70％的曲线下表观面积(AUC)。本领域技术人员已知如何确定AUC。任选地或另外地，本发明的生物标志物的特征可以是至少75％、优选至少80％的灵敏度、和至少40％、优选至少50％、更优选至少60％的特异性。

[0042] 本发明基于mcm5s2U修饰的tRNA在摆动(wobble)位置增强m6A修饰的mRNA的解码从而调节基因表达和细胞分化的发现。因此，发明人发现了m6A将核mRNA加工与tRNA解码联系起来的机制，这代表了一种用于对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测以及用于疾病治疗干预的新方法，其中基因表达通过m6A/mcm5s2U轴失调。发明人发现可以通过tRNA反密码子修饰mcm5s2U来促进m6A修饰的mRNA的解码，从而揭示了mRNA和tRNA表观转录组之间意想不到的联系。此系统以翻译依赖性方式控制mRNA的半衰期，从而将mRNA的外显子-内含子结构与它们的转换联系起来。

[0043] 发明人进一步发现细胞平衡m6A和mcm5s2U生物发生机制的表达，并且不这样做与疾病(例如癌症)相关，这表明m6A/mcm5s2U轴已经进化为调节基因表达和控制细胞分化的表观转录机制。在健康的人体组织中，m6A和mcm5s2U的生物发生因子的表达高度相关。最重要的是，CRISPR基因依赖性数据显示，依赖m6A生物发生因子的癌细胞也需要mcm5s2U生物发生因子，反之亦然。这些结果表明m6A-和mcm5s2U-表观转录组是复杂平衡的，因此，用mcm5s2U修饰tRNA反密码子抵消了m6A的不平衡，反之亦然。

[0044] 为了测定涉及m6A的生物发生因子的基因、mRNA或蛋白质，优选分析m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读(reader)蛋白和/或m6A擦除(eraser)蛋白的基因、mRNA或蛋

白质。m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)包含多种蛋白质成分，例如METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA和RBM15 ZC3H13。此外，可以分析m6A阅读蛋白YTHDF1(YTH1)、YTHDF2(YTH2)和YTHDF3(YTH3)以测定对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性。此外，可以分析m6A去甲基化酶FTO和ALKBH5以测定至少一种对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性。

[0045] 优选地，可以分析m6A-MTC的蛋白质、m6A阅读蛋白和m6A去甲基化酶中的任一种以测定对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性。在另一优选实施方案中，分析METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5以测定对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性。

[0046] mcm5s2U生物发生因子是多能性基因表达和干细胞维持所必需的[3、4]，并且该通路的缺陷与神经变性、病毒感染和癌症有关。mcm5s2U的生物发生是一个多步骤的过程，涉及延伸因子复合物(由ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5和ELP6组成)、甲基转移酶ALKBH8、MOCS3、URM1和CTU1-CTU2硫解酶复合物。因此，可以分析延伸因子复合物的蛋白质和甲基转移酶ALKBH8以测定参与mcm5s2U-tRNA因子生物发生的基因、mRNA或蛋白质。此外，可以分析CTU1-CTU2硫解酶复合物(即CTU1和/或CTU2)以测定对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性。此外，还可以分析mcm5sU生物发生通路中CTU1和2上游的MOCS3和URM1以测定对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性。

[0047] 为了测定参与5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA的生物发生因子的基因、mRNA或蛋白质，分析调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的基因、mRNA或蛋白质，优选例如ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

[0048] 在特别优选的实施方案中，对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的所述至少一种第一生物标志物选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白，优选是METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5的基因、mRNA或蛋白质。

[0049] 对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的所述至少一种第一生物标志物可以进一步是包含至少两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种、十三种或十四种所述第一生物标志物的特征组，所述第一生物标志物选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白，例如选自METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RT BM15和ALKBH5的基因、mRNA或蛋白质。

[0050] 在另一个特别优选的实施方案中，对调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的所述至少一种第二生物标志物选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

[0051] 对调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的所述至少一种第二生物标志物可以进一步是包含至少两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或十一种所述第二生物标志物的特征组，所述第二生物标志物选自调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路，例如选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

[0052] 又一个特别优选的实施方案涉及对调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的所述至少一种第二生物标志物，其中所述第二生物标志物选自CTU1、CTU2、MOCS3和URM1或其组合的基因、mRNA或蛋白质。

[0053] 对调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的所述至少一种第二生物标志物可以进一步是包含选自CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的基因、mRNA或蛋白质的至少两种、或三种或全部四种所述第二生物标志物的特征组。优选地，包含至少两种、或三种或全部四种所述第二生物标志物的所述组选自生物标志物CTU1和CTU2;CTU1和MOCS3;CTU1和URM1;CTU2和MOCS3;CTU2和URM1;MOCS3和URM1;CTU1、CTU2和MOCS3;CTU1、CTU2和URM1;CTU1、MOCS3和URM1;CTU2、MOCS3和URM1;以及CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的组合。特别优选的实施方案涉及包含选自CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的基因、mRNA或蛋白质中的所有四种第二生物标志物的组。因此，优选的示例由CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的组来组成。

[0054] 本领域技术人员将理解，可以使用多种方法来选择特定的标志物或多个标志物的阈值或参照值。在诊断方面，可以通过对从患有例如某种类型癌症的患者群体和未患有癌症的对象的第二群体获得的样品执行测定方法来获得阈值。替代地，可以通过对从具有例如与无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的减少相关的侵袭性类型癌症的患者群体和具有与无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的增加相关的偏向温和形式癌症的对象的第二群体获得的样品执行测定方法来获得阈值。

[0055] 在上述方法的上下文中，所述第一和/或第二生物标志物的差异水平、突变状态和/或活性的增加或减少可以指示无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的减少。如果生物标志物水平的降低与不良预后相关，那么所述样品中所述生物标志物的降低也可能指示无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的缩短。

[0056] 对于预后或治疗监测应用，可以在感兴趣的时间段内(例如，分别在诊断或治疗后六个月)跟踪所有患有例如乳腺癌的患者群体，然后将该群体分成多个组，例如两个组：进展到终点(例如，疾病复发和/或死亡)的第一组对象；以及没有进展到终点(例如，没有疾病复发和/或没有死亡)的第二组对象。这些分别用于确定所测量的标志物的“低风险”和“高风险”人群值。其他合适的终点包括但不限于5年死亡率或进展成转移性疾病。

[0057] 一旦建立了这些组，就可以选择一个或多个阈值来提供预测预后风险、诊断、治疗成功等的可接受能力。在实践中，接收者工作特征曲线或“ROC”曲线通常通过绘制变量的值与其在两个人群中的相对频率(例如，任意的称为“疾病”和“正常”或“低风险”和“高风险”)

来计算。对于任何特定的标志物，患有和未患有疾病的对象的标志物水平分布可能重叠。在这种情况下，测试不能以100％的准确率绝对区分“疾病”和“正常”，重叠区域表明测试不能区分“疾病”和“正常”。选择一个阈值，高于该阈值(或低于该阈值，取决于标志物如何随疾病变化)的测试被认为是“阳性”，低于该阈值的测试被认为是“阴性”。ROC曲线下面积(AUC)是感知测量值可能可以正确识别病情的概率的度量。

[0058] 此外，可以通过获得来自同一患者的早期标志物结果来建立阈值，可以将后来的结果与之比较。在某些方面，个体充当他们自己的“对照组”。在随着疾病严重程度或预后风险增加的标志物中，同一患者随时间增加可指示疾病恶化或治疗方案失败，而随时间减少可指示疾病缓解或治疗方案成功。

[0059] 在一些实施方案中，可以确定多个阈值或参照值。这可以是所谓的“三分位”、“四分位”或“五分位”分析的情况。在这些方法中，“疾病”和“正常”组(或“低风险”和“高风险”)组可以被一起视为单个群体，并被分成3、4或5(或更多)具有相等数量个体的“箱(bin)”。这些“箱”中的两个之间的边界可以被认为是“阈值”。可以基于测试对象落入哪个“箱”来给风险(例如特定预后或诊断的风险)赋值。

[0060] 无论是否明确地指示，本文中所有数值都假设为以术语“约”修饰。术语“约”通常指本领域技术人员认为等效于所列举的值(即，具有相同的功能或结果)的数字范围。在许多情况下，术语“约”可以包括四舍五入到最接近有效数字的数字。在本发明的特别优选的实施方案中，术语“约”可以指相应数值的偏差最大为数值的20％，但更优选为15％、10％、5％，甚至更优选为4％、3％、2％以及最优选为1％。

[0061] 在特别优选的实施方案中，待预测、诊断和/或监测的所述疾病、病症或紊乱是癌症、病毒性疾病、心脏病、神经退行性疾病、与氧化应激相关的疾病和/或显示调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的其他疾病。

[0062] 进一步优选的是，所述癌症选自乳腺癌、黑色素瘤、胶质母细胞瘤、子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤、肾癌、肝癌、头颈癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、甲状腺癌、食道癌、脑癌、结肠直肠癌、胃部癌、宫颈癌、卵巢癌、尿路癌、肾脏癌、癌和显示调节细胞中m6A-mRNA修饰和/或调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的肿瘤。

[0063] 如本文所用，术语“结肠直肠癌”包括公认的医学定义，其将结肠直肠癌定义为以小肠以下的肠道(即大肠(结肠)，包括盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠和直肠)的细胞的癌症为特征的医学病症。此外，如本文所用，术语“结肠直肠癌”还包括以十二指肠和小肠(空肠和回肠)的细胞的癌症为特征的医学病症。

[0064] 如本文所用，术语“胃癌(gastric cancer)”或“胃部癌(stomach cancer)”是指胃部的癌症。最常见的胃癌类型是影响胃上皮细胞的癌，例如但不限于腺癌。胃癌还可以包括例如影响胃结缔组织的肉瘤和影响胃原始组织的母细胞瘤。

[0065] 根据本发明的术语“胰腺癌”应涵盖良性或恶性形式的胰腺癌，以及由胰腺细胞引起的任何特定类型的癌症(例如，导管细胞癌、腺泡细胞癌、乳头状癌、腺鳞癌、未分化癌、粘液癌、巨细胞癌、混合型胰腺癌、小细胞癌、囊腺癌、未分类胰腺癌、胰母细胞瘤和乳头状-囊

性肿瘤等)。

[0066] 本发明的优选实施方案中,所述癌症优选为起源于上皮的癌。上皮癌是例如卵巢、结肠、肺、直肠、乳腺、前列腺、胰腺、食道、膀胱、肝脏、子宫或脑的上皮癌。

[0067] 在本发明的另一优选实施方案中,在方法的步骤(d)中,将步骤(b)和(c)中测定的所述第一和所述第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性与参照样品或参照值进行比较。优选地,参照样品或参照值是"群组固有(cohort-intrinsic)"的参照值。在特定的实施方案中,将肿瘤样品的特征分类为n分位(ntiles)(例如,分类为四分位)。然后,比较不同n分位(例如四分位)的存活率。本发明的另一个实施方案涉及本发明的方法,其中本方法步骤(d)中的参照样品或参照值对应于从健康个体中获得的样品或从患有肿瘤疾病的对象的肿瘤邻近组织获得的样品。

[0068] 本发明的一个特别优选的实施方案例涉及一种用于癌症患者(例如乳腺癌患者)的预后的方法,包括以下步骤:

(a)提供所述对象的生物样品,

(b)测定所述生物样品中至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第一生物标志物对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,

(c)测定所述生物样品中至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第二生物标志物对调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,以及

(d)将步骤(b)和(c)中测定的所述第一和所述第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性与参照样品或参照值进行比较,

其中与所述参照样品或参照值相比,来自所述对象的所述生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物的差异水平、突变状态和/或活性指示患有疾病、病症或紊乱的患者的无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的减少。

[0069] 可以与本发明的任何其他优选实施方案组合的一个优选实施方案涉及任何上述方法,其中所述至少一种第一生物标志物和所述至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性通过检测方法来测定,所述检测方法包含mRNA分析、DNA分析、蛋白质分析和/或用于测定靶核酸序列中的单核苷酸多态性(SNP)的方法。

[0070] 在本发明的所有方面和实施方案中,优选通过核酸检测方法或免疫学检测方法来测定所述样品中所述至少一种生物标志物的水平。然而,核酸检测方法仅适用于表达的蛋白质是生物标志物的情况。通常,本发明应包含允许对这些蛋白质的表达、突变状态和/或活性进行定量的所有方法。因此,在本文描述的发明还包含启动子分析和评估编码本发明的蛋白质生物标志物的基因位点的表观遗传状态的程序。或者,可以评估调节蛋白质代谢的酶的存在或表达,其指示所述蛋白质的存在或水平。

[0071] 在本文描述的本发明的上下文中优选的用于测定所述样品中的所述至少一种第一生物标志物和所述至少一种第二生物标志物的水平、突变状态、和/或活性的检测方法应包括选自质谱、质谱免疫测定(MSIA)、基于抗体的蛋白质芯片、二维凝胶电泳、抗肽抗体稳定同位素标准捕获(SISCAPA)、高效液相色谱(HPLC)、蛋白质印迹、流式细胞术微球阵列法(CBA)、蛋白质免疫沉淀、放射免疫测定、配体结合测定和酶联免疫吸附测定(ELISA)的检测

方法,优选地其中所述蛋白质检测方法是ELISA。用于测定本发明生物标志物的合适的替代性检测方法是本领域技术人员已知的。

[0072] 在特别优选实施方案中,用于测定所述样品中所述至少一种第一生物标志物和所述至少第二第一生物标志物的水平、突变状态、和/或活性的检测方法选自包含mRNA分析、DNA分析、蛋白质分析、和/或用于测定靶核酸序列中的单核苷酸多态性(SNP)的方法的检测方法,例如包含一组单核苷酸多态性(SNP)的多态性阵列,例如,Affymetrix GeneChip、聚合酶链式反应(PCR)、实时定量PCR(qPCR)、nanoString nCounter、酶联免疫吸附测定(ELISA)、质谱、质谱免疫测定(MSIA)、基于抗体的蛋白质芯片、二维凝胶电泳、抗肽抗体稳定同位素标准捕获(SISCAPA)、高效液相色谱(HPLC)、基因测试、蛋白质印迹、流式细胞术微球阵列法(CBA)、放射免疫测定和免疫组织化学染色,优选其中所述检测方法是用于测定目标核酸序列中的单核苷酸多态性(SNP)的多态性阵列和/或实时定量PCR(qPCR)。

[0073] 本发明的又一优选实施方案涉及一种方法,其中来自所述对象的生物样品中的所述至少一种第一生物标志物和/或所述至少一种第二生物标志物与所述参照样品或参照值相比的差异水平、突变状态和/或活性指示患有所述疾病、病症或紊乱的患者的无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的减少,并且其中所述参照样品或参照值是群组固有的参照样品或参照值,其中所述参照样品或参照值中的所述至少一种第一生物标志物和/或所述至少一种第二生物标志物与来自所述对象的生物样品相比的水平、突变状态和/或活性指示无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)时间的增加。

[0074] 本发明的另一优选实施方案涉及一种方法,其中与所述参照样品或参照值相比,来自所述对象的生物样品中的所述至少一种第一生物标志物和/或所述至少一种第二生物标志物的差异水平、突变状态和/或活性指示所述对象中存在癌症,优选其中所述癌症是黑色素瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌和/或子宫内膜癌。

[0075] 本发明的另外的优选实施方案涉及一种方法,其中(i)调节m6A-mRNA修饰的至少一种基因、mRNA或蛋白质的水平与(ii)调节mcm5s2U-tRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质的水平相比的差异比率指示疾病、病症或紊乱。

[0076] 在本发明的特别优选的实施方案中,对调节细胞中m6A mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性与对调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性的相对水平通过包含以下步骤的方法测定:

(a)测量i)至少一种第一生物标志物,其选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白,优选为METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5s的基因、mRNA或蛋白质;和ii)至少一种第二生物标志物,其选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质,以及

(b)测定所述相对水平。

[0077] 在特别优选的实施方案中,如(a)中测量的所述至少一种第二生物标志物(ii)包含CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的组,和/或所述至少一种第二生物标志物(ii)由CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的组组成。

[0078] 本发明的进一步优选实施方案涉及本发明的方法，其中与所述参照样品或参照值相比，来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物的差异水平、突变状态和/或活性指示以下任一项：

(a)与健康对照相比，与较高水平的m6A-修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(b)与健康对照相比，与较高水平的m6A-修饰的mRNA和不变/正常水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(c)与健康对照相比，与较高水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(d)与健康对照相比，与较低水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(e)与健康对照相比，与较低水平的m6A-修饰的mRNA和不变/正常水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(f)与健康对照相比，与较低水平的m6A-修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(g)与健康对照相比，与不变/正常水平的m6A-修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，或

(h)与健康对照相比，与不变/正常水平的m6A修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱。

[0079] 在本发明另外的优选的实施方案中，健康对照是健康对象中的可比较的样品或者是从其衍生的参照值，其中已知健康对象没有患有与m6A-修饰的mRNA和/或mcm5s2U-修饰的tRNA的差异水平相关的疾病、病症或紊乱。

[0080] 在本发明的另一个优选实施方案中，健康对照来自“群组固有”参照值。在特定的实施方案中，将肿瘤样品的特征分类为n分位(例如，分类为四分位)。然后，比较不同的n分位(例如四分位)。本发明的另一个实施方案涉及本发明的任何一种方法，其中健康对照被定义为显示最少疾病症状和/或显示最佳存活率的队列的n分位。

[0081] 在本发明另外优选实施方案中，如果所测定的来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物中的差异水平、突变状态、和/或活性(i)使得结果指示较低水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA，则与未显示这种结果的对象相比，无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)的时间减少，和/或(ii)使得结果指示较高水平的m6A修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U修饰的tRNA，则与未显示这种结果的对象相比，无进展生存(PFS)和/或总生存(OS)的时间延长。

[0082] 本发明的另一优选实施方案涉及本发明的方法，其中如果所测定的来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物的差异水平、突变状态、和/或活性使得结果指示与较低水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(参见上述方法中的(d))，与较低水平的m6A-修饰的mRNA和不变/正常水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(参见上述方法中的(e))，或者与不变/正常水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(参见上述方法中的(h))，则所述疾病病症或紊乱是选自膀胱癌、乳腺癌、食道癌、肺癌和甲状腺

癌的癌症疾病。

[0083] 本发明的另外的优选实施方案的特征在于,如果所测定的来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物的差异水平、突变状态、和/或活性使得结果指示与较高水平的m6A-修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(参见上述方法中的(a)),与较高水平的m6A-修饰的mRNA和不变/正常水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(参见上述方法中的(b)),或者与不变/正常水平的m6A-修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(参见上述方法中的(g)),则所述疾病病症或紊乱是选自肾癌、肝癌和胃癌的癌症疾病。

[0084] 本发明的又一方面涉及一种对患者的疾病、病症或紊乱进行分层的方法,所述方法包含:作为第一步骤的识别来自所述患者的生物样品中的至少一种第一和/或至少一种第二生物标志物与参照样品或参照值相比的差异水平、突变状态和/或活性,以及作为第二步骤的基于所述差异水平、突变状态和/或活性决定支持或反对所述治疗,其中所述差异水平、突变状态和/或活性通过使用包含以下步骤的方法来识别:

(a)提供所述患者的生物样品,

(b)测定所述生物样品中至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第一生物标志物对调节细胞中的N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,

(c)测定所述生物样品中至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性,所述第二生物标志物对调节细胞中的5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性,以及

(d)将步骤(b)和(c)中测定的所述第一和第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性与参照样品或参照值进行比较。

[0085] 用于本发明的目的的术语“分层”应指根据本发明的方法使得对患者的治疗和疗法的决策成为可能的优点,无论是患者的住院治疗、一种或多种药物的使用、效果和/或剂量、治疗措施或对疾病病程和治疗病程的监测或疾病的病因学或分类(例如分为新的或现有的亚型)或疾病及其患者的分化。特别是关于乳腺癌,“分层”在本文中是指关于转移状态或循环肿瘤细胞的存在或不存在对个体患者的乳腺癌疾病的分类。此外,术语“分层”特别地覆盖与负面健康事件结果预后相关的风险分层。在特别优选的实施方案中,通过mcm5s2U通路的状态对病症、紊乱或疾病(例如癌症)进行分层以预测对m6A靶向化合物引起的m6A生物发生扰动的敏感性。另外地优选的是一种方法,其中通过分析mcm5s2U通路的表达和/或突变状态来对病症、紊乱或疾病(例如癌症)进行分层以预测对m6A靶向化合物引起的m6A生物发生扰动的敏感性。

[0086] 又一优选实施方案涉及一种将癌症患者分层为对m6A靶向化合物的治疗有应答者和无应答者的方法。特别优选地待分层的癌症是AML和胶质母细胞瘤,因为先前的结果显示AML和胶质母细胞瘤对m6A通路的扰动表现出不同的反应。因此,mcm5s2U通路可用于预测m6A靶向化合物治疗的结果。

[0087] 重要的是,本发明可用于预测患者对治疗的反应。发明人观察到,高m^6A/mcm^5s^2U特征与对EGFR靶向酪氨酸激酶抑制剂(TKI)(包括拉帕替尼和吉非替尼)的敏感性增加相关(图7)。因此,组合的m6A/mcm5s2U特征可作为对EGFR抑制的敏感性的生物标志物。此外,组

合的m6A/mcm5s2U特征可用作预测癌症患者治疗成功的生物标志物。在一个实施方案中，用EGFR靶向酪氨酸激酶抑制剂(TKI)治疗癌症患者。然而，本发明不限于预测EGFR靶向TKI的治疗成功。相反，组合的m6A/mcm5s2U特征可用作生物标志物来预测任何类型治疗的患者的治疗成功。在一个实施方案中，应预测成功的治疗靶向表观转录组。

[0088] 本发明的另外地优选的实施方案涉及上述对患者进行治疗分层的方法，其中(i)所述至少一种第一生物标志物选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白，优选为METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5s的基因、mRNA或蛋白质；和/或(ii)其中所述至少一种第二生物标志物选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

[0089] 特别优选的是上述方法，其中所述至少一种第二生物标志物(ii)包含CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的组，和/或其中所述至少一种第二生物标志物(ii)由CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的组组成。

[0090] 本发明的另一优选实施方案涉及上述对患者进行治疗分层的方法，其中基于(d)中来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物与所述参照样品或值相比的差异水平、突变状态和/或活性，决定支持增强或抑制调节N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的水平、突变状态和/或活性，和/或增强或抑制调节5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的水平、突变状态和/或活性。

[0091] 本发明的一个优选实施方案涉及上述对患者进行分层来治疗的方法，其中所述治疗是靶向细胞中m6A-mRNA修饰和/或细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的治疗，优选其中所述治疗抑制或激活m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白、m6A擦除蛋白和/或延伸因子复合物。

[0092] 在本发明的另外的优选实施方案中，如果(d)中来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物与所述参照样品或值相比的差异水平、突变状态和/或活性与所述参照样品或参照值相比高或低至少1％、优选至少5％、更优选至少10％、甚至更优选至少15％、最优选至少20％，则决定支持所述治疗。

[0093] 然而，绝对浓度水平很大程度上取决于所用的样品处理和定量方法。上述水平适用于与示例上下文中使用的方法相对应的样品处理。因此，本领域技术人员认识到，在不面对过度实验的情况下，必须根据样品处理方案的改变来确定新的参照值。

[0094] 本发明的目的还通过一种用于评估接受治疗的患者的治疗成功的方法来解决，该方法包含以下步骤：

(a)提供接受治疗的所述患者的生物样品，

(b)测定所述生物样品中的至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性，所述第一生物标志物对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性，

(c)测定所述生物样品中的至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性，所述第二生物标志物对调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性，以及

(d)将步骤(b)和(c)中测定的所述第一和第二生物标志物的水平、突变状态和/或

活性与参照样品或参照值进行比较，其中与所述参照样品或参照值相比，来自所述对象的所述生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物的差异水平、突变状态和/或活性的降低或增加指示患者对所述治疗的反应。

[0095] 在又一优选的实施方案中，优选一种用于评估接受治疗的患者的治疗成功的方法，其中与所述参照样品或参照值相比，来自所述对象的生物样品中的所述第一和/或第二生物标志物的所述水平、突变状态和/或活性降低或增加至少10％、优选至少20％、更优选25％、甚至更优选30％、最优选35％至45％指示患者对所述治疗的反应。

[0096] 本发明的另一优选实施方案涉及本发明的方法，其中(i)所述至少一种第一生物标志物选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白，优选为METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5s的基因、mRNA或蛋白质；和/或(ii)其中所述至少一种第二生物标志物选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

[0097] 在本发明的本文中描述的方面的上下文中的“参照”优选对应于在接受所述治疗之前从所述患者中获得的所提供的生物样品中的所述至少一种生物标志物的水平。因此，参照对应于未处理的对照。在另外优选的实施方案中，所述参照对应于在接受所述治疗之前从所述患者获得的所提供的生物样品中所述第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性与所述第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性的比率。

[0098] 本发明的另一优选实施方案涉及本发明的方法，其中所述治疗是靶向细胞中的m6A-mRNA修饰和/或细胞中的mcm5s2U-tRNA修饰的治疗，优选其中所述治疗抑制或激活m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白、m6A擦除蛋白和/或延伸蛋白复合物。

[0099] 在本发明的另外优选的实施方案中，所述疾病、病症或紊乱优选地通过调节mcm5s2U与m6A的水平，即mcm5s2U与m6A的比率来治疗，其特征在于mcm5s2U修饰的tRNA增强m6A修饰的mRNA的解码从而调节基因表达和细胞分化。

[0100] 本发明的一个优选实施方案涉及上述方法，其中该方法是非侵入性方法，优选地为离体(ex vivo)方法或体外(in vitro)方法。本文描述的本发明的所有方法优选是体外方法，更优选不包括在人或动物体内进行的任何方法步骤的体外方法。

[0101] 本发明的另一优选实施方案涉及本发明的方法，其中所述疾病、病症或紊乱选自癌症、病毒性疾病、心脏病、神经退行性疾病、与氧化应激相关的疾病和显示出调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性和/或显示出调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的其他疾病。

[0102] 在本发明另外优选实施方案中，所述癌症选自黑色素瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、急性髓性白血病、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤、肾癌、肝癌、头颈癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、甲状腺癌、食道癌、脑癌、结肠直肠癌、胃部癌、宫颈癌、卵巢癌、尿路癌、肾脏癌、癌和显示调节细胞中m6A-mRNA修饰和/或调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的肿瘤，优选其中所述癌症是黑色素瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤、显示调节细胞中m6A-mRNA修饰和/或调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的差异水平、突

变状态和/或活性的肿瘤。

[0103] 在本发明的又一方面中，其可与本发明的其它方面和/或实施方案中的任一个相结合，本发明提供了用于帮助对象的疾病、病症或紊乱的预后、诊断和/或监测的试剂盒，该试剂盒包含用于量化至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性的装置，所述第一生物标志物对调节细胞中m6A-mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性，以及用于量化至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性的装置，所述第二生物标志物对调节细胞中mcm5s2U-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性。

[0104] 本发明的另一优选实施方案涉及本发明的试剂盒，其中(i)所述至少一种第一生物标志物选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白，优选是METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5s的基因、mRNA或蛋白质；和/或(ii)其中所述至少一种第二生物标志物选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

[0105] 特别优选的是上述试剂盒，其中所述至少一种第二生物标志物(ii)包含CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的组，和/或其中所述至少一种第二生物标志物(ii)由CTU1、CTU2、MOCS3和URM1的组组成。

[0106] 本发明的一个优选实施方案涉及上述试剂盒，其包含一种或多种抗体、衍生物或其抗原片段，用于检测(i)m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)的蛋白质、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白中的至少一种，优选为METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5s；和/或包含一种或多种抗体、衍生物或其抗原片段，用于检测(ii)ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8中的至少一种。

[0107] 本发明的试剂盒可以有许多应用。例如，试剂盒可用于区分对象是否患有某种疾病、病症或紊乱(例如癌症(特别是乳腺癌(例如转移性乳腺癌或CTC阳性乳腺癌)))或具有阴性诊断，从而有助于某种诊断。在另一个实施方案中，试剂盒可用于鉴定在体外疾病细胞模型中和/或体内动物模型中(例如在例如乳腺癌细胞中)或体内动物模型(例如乳腺癌)中调节生物标志物表达的化合物。

[0108] 任选地，该试剂盒还可以包括标签或单独插页形式的合适操作参数的说明。例如，试剂盒可以具有标准说明，告知消费者在血浆样品接触到探针后如何清洗探针。

[0109] 在另一个实施方案中，试剂盒包含(a)特异性结合标志物的抗体；和(b)检测试剂。这种试剂盒可以由上述材料制备，并且前面关于材料(例如抗体、检测试剂、固定化支持物等)的讨论完全适用于本节，无需重复。

[0110] 在任一实施方案中，试剂盒可以任选地进一步包含标准或对照信息以使得测试样品可以与对照信息标准进行比较以测定在样品中检测到的标志物的测试量是否是与疾病、病症或紊乱(例如癌症(优选乳腺癌))的诊断一致的诊断量。这种抗体在本领域中是已知的，并且可以市售购得。

[0111] 优选地，本发明的试剂盒是用于执行根据本发明的方法的试剂盒，其包含用于定量生物样品中对调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示

性和/或选择性的至少一种第一生物标志物的水平、突变状态和/或活性的装置，并且包含用于定量生物样品中对调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的状态和/或活性具有指示性和/或选择性的至少一种第二生物标志物的水平、突变状态和/或活性的装置。

[0112] 本发明的目的在另一方面通过使用针对选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白、m6A擦除蛋白和硫代化因子，优选为METTL3、METTL14、WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15、ALKBH5s、ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的任何一种蛋白质生物标志物的抗体、衍生物或其抗原片段来解决。

[0113] 本发明的另一个方面涉及一种用于筛选生物细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2UtRNA修饰的水平的调节剂的体外或体内方法，该方法包含以下步骤：

(a)提供生物测试细胞，

(b)提供候选化合物，

(c)使所述生物测试细胞与所述候选化合物接触，以及

(d)测定(i)未与候选化合物接触和(ii)与候选化合物接触的生物测试细胞中m6AmRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的水平，其中与(i)相比，(ii)中测定的生物测试细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰水平的变化表明候选化合物是生物细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的水平的调节剂。

[0114] 在一个方面，本发明的筛选可以在细胞培养或动物模型(例如小鼠或大鼠乳腺癌模型)中进行。在所述筛选方法中，优选包括使用患有某种疾病(例如乳腺癌)的动物。基于本发明的生物标志物的所述模型中的疾病(例如乳腺癌)的进展可以响应于将所述模型与候选乳腺癌治疗或治疗方案接触来监测。因此，优选的用途是，其中在所述筛选方法中，测试化合物导致所述至少一种生物标志物的量减少，所述测试化合物是用作疾病(例如乳腺癌)的治疗分子的候选物。

[0115] 上述方法可进一步用于测试对其他疾病和/或其他癌症类型有效的治疗剂。因此，该替代性实施方案包含的疾病和癌症不是乳腺癌，而是其它疾病和其它癌症，优选其它上皮癌。优选如上所述的上皮癌。

[0116] 本发明的另一个优选实施方案涉及上述用于筛选生物细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的水平的调节剂的方法，其中步骤(d)包含测定生物测试细胞中m6AmRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的水平。

[0117] 本发明的一个优选实施方案涉及上述用于筛选生物细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的水平的调节剂的方法，其中生物测试细胞具有(i)调节m6A-mRNA修饰的至少一种基因、mRNA或蛋白质的水平与(ii)调节mcm5s2U-tRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质的水平相比的差异比率。

[0118] 进一步优选的是一种方法，其中生物测试细胞具有N6-甲基腺苷(m6A)修饰的mRNA与5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)修饰的tRNA水平相比的不同比率。

[0119] 本发明的一个另外优选的实施方案涉及上述用于筛选生物细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的水平的调节剂的方法，其中(i)所述至少一种第一生物标志物选自m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白和m6A擦除蛋白，优选为METTL3、METTL14、

WTAP、VIRMA、RBM15、ZC3H13、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、FTO、KIAA1429、CBLL1、RBM15和/或ALKBH5s的基因、mRNA或蛋白质;和/或(ii)其中所述至少一种第二生物标志物选自ELP1/IKBKAP、ELP2、ELP3、ELP4、ELP5、ELP6、CTU1、CTU2、MOCS3、URM1和/或ALKBH8的基因、mRNA或蛋白质。

[0120] 本发明的另一个优选实施方案涉及上述用于筛选生物细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的水平的调节剂的方法,其中已鉴定的所述候选化合物靶向m6A甲基转移酶复合物(m6A-MTC)、m6A阅读蛋白、m6A擦除蛋白、硫代化因子、延伸因子复合物的基因、mRNA或蛋白质或与mcm5s2U相关的其他基因、mRNA或蛋白质的表达和/或活性。

[0121] 进一步优选的是一种方法,其中使用用于测定γ-毒素核酸内切酶活性或翻译不忠诱导蛋白(infidelity-induced protein)的试验来测定tRNA中的mcm5s2U修饰。

[0122] 本发明的一个优选实施方案涉及用于筛选生物细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2UtRNA修饰的水平的调节剂的上述方法,其中所述鉴定的候选化合物选自小分子化合物,多肽、肽、糖蛋白、肽模拟物、抗原结合构建体(例如抗体、抗体样分子或其他抗原结合衍生物,或其抗原结合片段)、核酸(例如DNA或RNA(例如反义或抑制性DNA或RNA))、核酶、RNA或DNA适体、RNAi、siRNA、shRNA等,包括其变体或衍生物,例如肽核酸(PNA)、用于靶向基因编辑的遗传构建体(例如CRISPR/Cas9构建体)和/或指导核酸(gRNA或gDNA)和/或tracrRNA。

[0123] 本发明的一个优选实施方案涉及用于筛选生物细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2UtRNA修饰的水平的调节剂的上述方法,其中所述鉴定的候选化合物能够治疗疾病、病症或紊乱,其中所述疾病选自癌症、病毒性疾病、心脏病、神经退行性疾病、与氧化应激相关的疾病和显示调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的其他疾病。

[0124] 进一步优选的是上述方法,其中所述癌选自黑色素瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、急性髓性白血病、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤、肾癌、肝癌、头颈癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、甲状腺癌、食道癌、脑癌、结肠直肠癌、胃部癌、宫颈癌、卵巢癌、尿路癌、肾脏癌和癌,优选其中所述癌症是黑色素瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤、显示调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的肿瘤、和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的肿瘤。

[0125] 本发明的另一个方面可以与本发明的任何其他方面和/或具体实施方案相结合,涉及根据本发明的化合物或试剂盒在预防、治疗和/或诊断疾病、病症或紊乱(例如癌症),特别是用于预防、治疗和/或诊断所述疾病、病症或紊乱(例如癌症复发)的复发中的用途。

[0126] 本发明的又一个方面可以与本发明的任何其他方面或特定实施方案相结合,涉及治疗患者的疾病、病症或紊乱的方法,所述方法包含根据本发明且治疗和/或预防所述患者的疾病、病症或紊乱或所述疾病、病症或紊乱的复发的方法。

[0127] 本发明的一个优选实施方案涉及上述治疗方法,其中通过增加或减少m6A修饰的mRNA的水平、突变状态和/或活性来治疗所述疾病、病症或紊乱,和/或其中通过增加或减少

mcm5s2U修饰的tRNA的水平、突变状态和/或活性来治疗所述疾病、病症或紊乱。

[0128] 进一步优选的是一种方法，包含向对象施用治疗有效量的化合物，该化合物特异性地降低或增强mcm5s2U和/或m6A的水平、突变状态和/或活性。

[0129] 本发明的一个另外优选的实施方案涉及上述方法，其中所述治疗包括向所述对象施用根据如上所述的本发明的生物细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的水平的调节剂的筛选方法筛选的化合物。

[0130] 本发明的一个优选实施例涉及上述方法，其中所述疾病、病症或紊乱是癌症、病毒性疾病、心脏病、神经退行性疾病、与氧化应激相关的疾病、和/或显示调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的其他疾病，其中所述癌症选自黑色素瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤、肾癌、肝癌、头颈癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌、甲状腺癌、食道癌、脑癌、结肠直肠癌、胃部癌、宫颈癌、卵巢癌、尿路癌、肾脏癌和癌，优选其中所述癌症是黑色素瘤、胶质母细胞瘤、乳腺癌、子宫内膜癌、急性髓性白血病(AML)、肺癌、膀胱癌、肝细胞癌、髓母细胞瘤、显示调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的肿瘤、和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性的肿瘤。

[0131] 本发明的又一个方面可以与本发明的任何其他方面或特定实施方案相结合，其涉及用于治疗疾病、病症或紊乱的化合物，其中所述疾病、病症或紊乱的特征在于调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性，和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性。

[0132] 本发明另一方面，其可与本发明的任何其它方面或特定实施方案组合，涉及一种用于治疗疾病、病症或紊乱的化合物，其中所述化合物特异性地降低或增强调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质和/或调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的基因、mRNA或蛋白质的水平、突变状态和/或活性，优选其中所述疾病、病症或紊乱的特征在于调节细胞中N6-甲基腺苷(m6A)mRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性，和/或显示调节细胞中5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)-tRNA修饰的通路的差异水平、突变状态和/或活性。

[0133] 重要的是，m6A与各种癌症有关，所述癌症包括胶质母细胞瘤、急性髓性白血病、膀胱癌和肝细胞癌。此外，mcm5s2U与多种癌症有关，所述癌症包括乳腺癌、髓母细胞瘤和黑色素瘤。然而，目前还没有特异性靶向mcm5s2U生物发生的小分子。此外，延伸因子复合物是有价值的药物靶点，不仅在mcm5s2U依赖性癌症中。因此，直接靶向延伸因子复合物的小分子可以为mcm5s2U依赖性癌症(例如乳腺癌、髓母细胞瘤和黑色素瘤)提供根据本发明的药物先导物，并且它们还具有能够精确操纵m6A/mcm5s2U平衡的联合治疗的潜力。此外，延伸因子复合物不仅在mcm5s2U依赖性癌症中，而且在与m6A相关的癌症中都是有价值的药物靶点。因此，直接靶向延伸因子复合物的小分子为mcm5s2U依赖性病症和疾病提供了有希望的药物先导物。根据本发明，调节mcm5s2U或m6A的化合物或用于调节mcm5s2U和m6A两者的组合疗法可允许精确操纵m6A和mcm5s2U之间的平衡从而治疗各种病症、疾病和紊乱。

[0134] 本发明的另一个方面可以与本发明的任何其他方面或特定实施方案相结合，其涉及根据本发明的化合物在制造用于治疗疾病、病症或紊乱的药物中的用途。

[0135] 本发明的又一方面，其可与本发明的任何其他方面或具体实施方案结合，涉及一种用于治疗患有与与疾病、病症或紊乱相关的细胞中m6A mRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的异常水平相关的疾病、病症或紊乱的对象的方法，优选与m6A mRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的异常比例相关，该方法包含向需要治疗的对象施用治疗有效量的m6AmRNA修饰和/或mcm5s2U tRNA修饰的调节剂的步骤。

[0136] 本文中使用的术语“[本]发明的”、“根据本发明”、“根据本发明的”等旨在指代本文中描述和/或要求保护的本发明的所有方面和实施方案。

[0137] 如本文所使用的，术语“包含/包含/含有”应被解释为包括“包括”和“由...组成”两者，这两者的含义都是特别指代，因此是根据本发明的单独公开的实施方案。在本文中使用的地方，“和/或”将被视为具有或不具有另一个的两个指定特征或组分中的每一个的具体公开。例如，“A和/或B”将被视为(i)A、(ii)B和(iii)A和B中每一项的具体公开，如同每一项在本文单独列出。在本发明的上下文中，术语“约”和“近似”表示精度区间，本领域技术人员将理解该术语以确保所讨论的特征的技术效果。该术语通常表示偏离所指示的数值±20％、±15％、±10％和例如±5％。如本领域技术人员将理解的，对于给定技术效果的数值的具体的这种偏差将取决于技术效果的性质。例如，自然或生物技术效应通常比人为或工程技术效应具有更大的偏差。如本领域技术人员将理解的，对于给定技术效果的数值的具体的这种偏差将取决于技术效果的性质。例如，自然或生物技术效应通常比人为或工程技术效应具有更大的偏差。除非另有特别说明，否则在提到单数名词时使用不定冠词或定冠词，例如“一”、“一个/项”或“所述/该”，这包括该名词的复数。

[0138] 应当理解，将根据本发明包含的教导应用于特定问题或环境以及包括本发明的变体或其附加特征(例如进一步的方面和实施方案)，将在本领域普通技术人员根据本文包含的教导的能力范围内。

[0139] 除非上下文另有指示，否则上述特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施方案，并且同等地应用于所描述的所有方面和实施方案。

[0140] 本文引用的所有参考文献、专利和出版物都通过引用整体并入本文。

[0141] 附图和序列表的简要描述

附图显示：

图1显示了mcm5s2U调节m6A修饰的密码子的解码。A.密码子和tRNA反密码子环中修饰的核苷酸的示意图。球体是mRNA(下部)和tRNA(上部)的核苷酸。指示了tRNA位置34和37的修饰。指示了密码子位置3的m6A，以及由线条突出显示了DRACH基序(AGACU)。B.在野生型HEK293细胞(圆形)或其中CTU2(三角形)或ELP1/IKBKAP(叉号)被敲除的细胞中通过核糖体谱测定的密码子A位点占有率。由mcm5s2U修饰的tRNA解码的密码子用方框表示。可甲基化腺苷用球体表示。

[0142] 图2显示了A.m6A和mcm5s2U生物发生因子中体细胞突变的共现。成对功能丧失(LoF)突变模式的热图(Heatmap)表明24种癌症类型的共现和互斥突变，其中至少一种生物发生通路成分发生突变。显著对用点标记(p值<0.01；费希尔精确检验(Fisher's exact test))。m6A的生物发生因子用数字(1)突出显示，羧甲基化的生物发生因子(mcm5U)用数字

(2)突出显示,硫醇化的生物发生因子(mcm5s2U)用数字(3)突出显示。m6A和mcm5s2U生物发生之间的跨通路共现区域由虚线框表示。B-D:m6A生物发生比mcm5s2U生物发生对种系突变的耐受性差。B.m6A和mcm5s2U生物发生因子的种系功能丧失(LoF)变体的观察与预期比率(95%置信区间)(数据来自gnomAD)。C.通过种系LoF耐受性对基因排序来分离m6A和mcm5s2U生物发生因子。D.m6A生物发生通路的种系LoF耐受性显著低于基因组平均值,而mcm5和s2U通路没有显著差异。(Wilcoxon检验;**:p≤0.01)。

[0143] 图3显示了m6A和mcm5s2U生物发生特征在正常组织和肿瘤中的差异。A.参与用于计算表达特征的m6A和mcm5s2U生物发生的基因。B.m6A/mcm5s2U特征表达平衡在组织和肿瘤之间不同。使用标准化的、批量校正的表达数据。"GTEx":来自GTEx的正常组织;"正常":TCGA癌旁正常组织;"肿瘤":TCGA的肿瘤组织。

[0144] 图4显示m6A和mcm5s2U表达特征预测黑色素瘤存活。A.TCGA黑色素瘤队列(SKCM)中m6A和mcm5s2U表达特征的散点图。数字(1)、(2)、(3)和(4)指示通过特征表达的分层,数字(2)和(3)是具有平衡的m6A/mcm5s2U的肿瘤。B.TCGA黑色素瘤队列的Kaplan-Meier生存分析。肿瘤如A中地被分层。高mcm5s2U与高m6A的风险比率(Hazard ratio)为1.44(95%CI:0.98-2.13)。

[0145] 图5显示了向mcm5s2U转移的表达平衡与大多数单个mcm5s2U和m6A生物发生因子对的风险比率增加相关。A.上图:m6A修饰的mRNA密码子和mcm5s2U修饰的tRNA反密码子示意图。下图:m6A和mcm5s2U羧甲基化(mcm5U)和硫醇化(mcm5s2U)的生物发生因子列表。B.mcm5s2U("s^2U")和m6A生物发生因子基因对表达比率的单变量Cox比例风险。对于每一对,计算表达比率并用于预测METABRIC和SCANB乳腺癌队列的总生存率(风险比±95%置信区间)。C.在两个队列中,mcm5s2U("s^2U")/m6A基因对的风险比率显著高于1000个随机选择的基因对。(****:p≤0.0001;Wilcoxon检验)

图6显示了Kaplan-Meier存活曲线,证实了基因对平衡向mcm5s2U生物发生因子转移的患者的总存活率较低。A.METABRIC队列中所有重要基因对的Kaplan-Meier曲线。mcm5s2U("s^2U")/m6A生物发生因子基因对的表达比率被分类为高(更多mcm5s2U;用数字(1)指代)和低(更多m6A;用数字(2)指代)。显示了对数格兰克检验(logrank-test)的95%置信区间和p值。B.与(A)中相同,但适用于SCANB队列。

[0146] 图7显示了组合的m^6A和mcm^5s^2U特征预测特定的癌症药物脆弱性(vulnerability)。A.EGFR信号基因与m^6A/mcm^5s^2U特征全基因组依赖性相关性的基因组富集分析。B.M6A/mcm^5s^2U特征和CRISPR基因依赖性之间的相关性。EGFR通路成分被标记。C.m6A/mcm^5s^2U特征和药物脆弱性之间的相关性(标记了EGFR抑制剂)。D和E.在EGFR表达阴性或阳性的细胞系中绘制了M6A/mcm^5s^2U相对于吉非替尼(D)和拉帕替尼(E)的药物脆弱性的绘图。

[0147] 图8显示了m6A和mcm^5s^2U生物发生通路中的肿瘤体细胞突变与显著不同的总生存率无关。对于m6A/mcm5s2U("s^2U")生物发生通路成分中功能丧失(LoF)突变的每个组合,分析TCGA癌症队列中的总生存率。

[0148] SEQ ID No:1至18的序列显示了各种可能的DRACH-基序:

SEQ ID No.1:AGACU

SEQ ID No.2:GGACU

SEQ ID No.3:UGACU

SEQ ID No.4:AAACU

SEQ ID No.5:GAACU

SEQ ID No.6:UAACU

SEQ ID No.7:AGACA

SEQ ID No.8:GGACA

SEQ ID No.9:UGACA

SEQ ID No.10:AAACA

SEQ ID No.11:GAACA

SEQ ID No.12:UAACA

SEQ ID No.13:AGACC

SEQ ID No.14:GGACC

SEQ ID No.15:UGACC

SEQ ID No.16AAACC

SEQ ID No.17:GAACC

SEQ ID No.18:UAACCSEQ ID No.19:AGGAGACUG。

实施例

[0149] 现在将通过实施例的方式并参考说明书、本文中列出附图和表格来说明本发明的某些方面和实施方案。本发明的方法、用途和其他方面的这些实施例仅是代表性的，并且不应将本发明的范围限制为仅这些代表性的实施例。

[0150] 实施例显示：

实施例1：tRNA反密码子修饰解码m6A-修饰的密码子

为了理解m6A表观转录组基因调控的功能，发明人使用转录关闭数据集，并通过对数转化表达数据随时间的线性回归来计算衰减率。在可用的情况下，发明人使用预处理的表达值(表1)。否则，使用原始测序数据通过比对和读数计数或者从GEO获得微阵列数据来测定表达(见表1)。如果预处理数据包含每个基因中的一个以上的测量值(即不同的探针亚型)，则使用基因平均值。因为只分析了相对衰减率，所以省略了加标(spike-in)归一化。对于SLAM-Seq数据分析，公布的转化率(见表1)是每个基因和衰减率的平均值。METTL3 KO或吐根碱(emetine)治疗的稳定性分别通过从KO衰减率中减去WT或从吐根碱衰减率中减去对照来测定。

[0151] 表1：本研究中使用的数据集和登录号的链接。

数据集	登录号	文件链接
LAIC		https://media.nature.com/original/nature-assets/nmeth/journal/v13/n8/extref/nmeth.3898-S2.xlsx
DRUID		ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/geo/series/GSE99nnn/GSE99517/suppl/GSE99517%5FHEK%2E4SU%2EHL%2EDRUID%2Eone%2Ecsv%2Egz
Ke METTL3 KO mESC 衰减		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/download/?acc=GSE86336&format=file
Schwartz m6A-IP HEK293	IP = SRR1182595，输入= SRR1182596	
Geula m6A-IP	IP = SRR1596085，输入= SRR1596086	
Geula METTL3 KO mESC 衰减		ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/geo/series/GSE61nnn/GSE61994/suppl/GSE61994%5FDGE%5Fnormalized%5Flevels%5FRefSeq%2Etxt%2Egz
Herzog METTL3 KO mESC 衰减		https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/download/?acc=GSE99974&format=file
Riboseq	SRR2433794	
Riboseq	SRR2075925	
亚砷酸盐多核糖体梯度		ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/geo/series/GSE44nnn/GSE44379/suppl/GSE44379%5Fars%5Fnoars%5Fpolysome%5Fprofiles%2Etxt%2Egz
亚砷酸盐核糖体图谱		ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/geo/series/GSE55nnn/GSE55195/suppl/GSE55195%5FSupplementalTable1%2Exlsx%2Egz

[0152] 发明人集中于分析密码子的第三位置，因为第三密码子位置的m6A位点在小鼠和

人之间更保守。这个位置也有最高的DRACH甲基化率，核糖体停顿最强。密码子的第三个位置更特殊，因为它容忍与tRNA反密码子非Watson/Crick(“摆动(wobble)”)碱基配对从而使遗传密码简并。有趣的是，tRNA反密码子中修饰的核苷酸经常调节摆动解码并能影响tRNA选择。

[0153] 在摆动位置并列腺苷的tRNA反密码子核苷酸修饰是mcm5s2U。被mcm5s2U修饰的tRNA解码酵母和人类中的密码子AAA、CAA和GAA。最近，研究表明在人类中AGA也被mcm5s2U修饰的tRNA解码。发明人假设mcm5s2U可能参与解码m6A修饰的AAA、GAA和AGA密码子。为了测试mcm5s2U是否参与解码m6A，发明人生产了HEK293细胞系，其中使用CRISPR敲除IKBKAP或CTU2以有效地耗尽mcm5s2U。

[0154] 然后，发明人使用核糖体图谱来测定A位点占有率，将DRACH密码子分类为m6A修饰的和未修饰的密码子。使用flexbar为适当的适配器修剪原始测序数据，并用STAR对齐。使用长度为28、29或30nt的读数。通过分析起始和终止密码子的RPF 5’末端覆盖来确定RPF 5’末端到A位点密码子的偏移，并且发现所有分析的数据集为15nt。计算转录组中所有核苷酸的标准化A位点覆盖率。为此，在感兴趣位置周围-60nt至+60nt的窗口中对原始计数进行z分数标准化。对于密码子，使用1位的标准化A位点覆盖(即在框内翻译它的核糖体的)。对于窗口覆盖图，绘制每个位置的平均z分数。

[0155] 合并原始测序数据，将完整数据集用STAR对齐并使用UMI工具进行重复数据删除。在端到端模式下进行比对以评估C到T转换的读数内分布，但前两个位置被排除在m6A位点调用之外。通过Rsamtools pileup测定转换，并通过要求至少2次转换和4％至40％之间的转换率来调用m6A-位点。对于每个m6A修饰的密码子，发明人在相同的CDS中选择相同类型的最接近的未甲基化密码子。这是分别对未甲基化密码子进行的，这些密码子在DRACH基序中或不在DRACH基序中。发明人没有排除在相同CDS中找不到匹配密码子的m6A位点，但是这些位点的比例很小。

[0156] 在分析ELP1/IKBKAP和CTU2敲除细胞时，发明人发现IKBKAP和CTU2敲除细胞中的大多数密码子的A位点占有率没有改变(图1B)。然而，最引人注目的观察结果是在IKBKAP和CTU2敲除细胞中，密码子AGA和GAA的m6A修饰版本的A位点占有率异常高(图1B)。这表明当这些甲基化密码子位于它们的A位点并且mcm5s2U修饰的同源tRNA不可用时，核糖体停顿。因此，发明人推断mcm5s2U的功能是促进m6A修饰的密码子的解码。

[0157] 因此，本发明人发现了m6A将核mRNA加工与tRNA解码连接起来的机制。发明人发现，沉积在mRNA的蛋白质编码序列(CDS)中的m6A的量与该区域中外显子的长度相关，并且CDS m6A导致体内修饰密码子亚群的缓慢解码。然而，当m6A处于摆动位置时，tRNA反密码子修饰5-甲氧羰基甲基-2-硫代尿苷(mcm5s2U)可以促进解码，从而揭示mRNA和tRNA表观转录组之间意想不到的联系。m6A-mCM5S2U系统以翻译依赖性方式控制mRNA的半衰期并因此将mRNA的外显子-内含子结构与它们的转换联系起来。

[0158] 实施例2:m6A和mcm5s2U生物发生因子中体细胞突变的共现发明人分析了在m6A生物发生通路、羧甲基化(mcm5U)生物发生通路和硫醇化(mcm5s2U)生物发生通路的至少一种生物发生通路成分中具有突变的24种癌症类型(图2)。发明人进一步分析了癌症类型特异性图中m6A和mcm5s2U生物发生因子之间突变的跨通路共现，并发现m6A和mcm5s2U通路成分之间共现的突变显著富集(图2)，即在m6A通路中具有突变的肿瘤往往也在mcm5s2U通路中

具有突变，反之亦然。这表明m6A和mcm5s2U在癌症中起关键作用。发明人进一步比较了m6A生物发生通路、羧甲基化(mcm5U)生物发生通路和硫醇化(mcm5s2U)生物发生通路的成分中的体细胞突变和种系变异(图2)，发现mcm5s2U比m6A对种系功能缺失突变更耐受。这可能对癌症易感性有影响。

[0159] 实施例3：在正常组织和肿瘤中m6A和mcm5s2U生物发生特征不同发明人使用参与m6A和mcm5s2U的生物发生的基因来计算m6A和mcm5s2U的表达特征(图3A)。然后使用m6A/mcm5s2U的比率来分析m6A/mcm5s2U特征基因表达是否平衡。有趣的是，m6A/mcm5s2U特征表达平衡在正常组织和肿瘤之间是不同的(图3B)。

[0160] 本发明人发现，m6A/mcm5s2U特征基因表达比率可用于将疾病、病症或紊乱分为以下组：

(a)与对照相比，与较高水平的m6A-修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(b)与对照相比，与较高水平的m6A-修饰的mRNA和不变/正常水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(c)与对照相比，与较高水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(d)与对照相比，与较低水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(e)与对照相比，与较低水平的m6A-修饰的mRNA和不变/正常水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(f)与对照相比，与较低水平的m6A-修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，

(g)与对照相比，与不变/正常水平的m6A-修饰的mRNA的和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱，以及

(h)与对照相比，与不变/正常水平的m6A修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱。

[0161] 对照优选为群组固有的参照样品。发明人发现，如果m6A/mcm5s2U特征基因表达比率使得结果指示：

-与较低水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(见上文(d))，

-与较低水平的m6A修饰的mRNA和不变/正常水平的mcm5s2U修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(见上文(e))，或

-与不变/正常水平m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(见上文(h))，则疾病病症或紊乱是优选地选自膀胱癌、乳腺癌、食道癌、肺癌和甲状腺癌的癌症疾病。

[0162] 因此，本发明的特别优选的实施方案涉及mcm5S2U抑制剂在治疗和/或预防膀胱癌、乳腺癌、食道癌、肺癌和甲状腺癌中的应用。最优选地，所述待治疗的癌症是乳腺癌。

[0163] 本发明人进一步发现，如果m6A/mcm5s2U特征基因表达比率使得结果指示

-与较高水平的m6A-修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、

病症或紊乱(见上文(a)),

-与较高水平的m6A-修饰的mRNA和不变/正常水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(见上文(b)),或

-与不变/正常水平的m6A-修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U-修饰的tRNA相关的疾病、病症或紊乱(见上文(g)),

则疾病状况或病症是优选地选自肾癌、肝癌和胃癌的癌症疾病。

[0164] 因此,本发明人发现细胞平衡m6A和mcm5s2U生物发生机制的表达,并且不这样做与特定疾病(例如癌症)相关,这表明m6A/mcm5s2U轴已经进化为调节基因表达和控制细胞分化的表观转录机制。在健康的人体组织中,m6A和mcm5s2U的生物发生因子的表达高度相关。最重要的是,CRISPR基因依赖性数据显示,依赖m6A生物发生因子的癌细胞也需要mcm5s2U生物发生因子,反之亦然。这些结果表明m6A-和mcm5s2U-表观转录组是复杂平衡的;因此,用mcm5s2U修饰tRNA反密码子抵消了m6A的不平衡,反之亦然。

[0165] 实施例4:m6A和mcm5s2U表达特征预测黑色素瘤和乳腺癌队列中的存活率TCGA黑色素瘤队列(SKCM)中m6A和mcm5s2U表达特征的散点图显示,m6A和mcm5s2U表达特征预测黑色素瘤存活(图4)。发明人发现,如果m6A/mcm5s2U特征基因表达比率使得结果指示较低水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA,则所述对象的预后低于患有相同疾病、病症或紊乱且未显示较低水平的m6A-修饰的mRNA和较高水平的mcm5s2U-修饰的tRNA的对象。此外,本发明人发现,如果m6A/mcm5s2U特征基因表达比率使得结果指示较高水平的m6A修饰的mRNA和较低水平的mcm5s2U修饰的tRNA,则所述对象的预后高于患有相同疾病、病症或紊乱且未显示出这种结果的对象。

[0166] 发明人进一步使用不同的mcm5s2U(“s2U”)/m6A生物发生因子基因对表达比率来预测METABRIC和SCANB乳腺癌队列中的总生存率(图5)。在两个队列中,mcm5s2U(“s^2U”)/m6A基因对的风险比显著高于1000个随机选择的基因对的风险比(图5C)。然后,发明人使用Kaplan-Meier生存曲线来证实在METABRIC队列(图6A)和SCANB队列(图6B)中基因对平衡向mcm5s2U生物发生因子转移的患者的不良总生存期。mcm5s2U(“s^2U”)/m6A生物发生因子基因对的表达比率分为高(更多mcm5s2U)和低(更多m6A)。

[0167] 实施例5:m^6A和mcm^5s^2U联合特征预测特定癌细胞系脆弱性发明人使用组合的m^6A/mcm^5s^2U特征来探测癌细胞系脆弱性。对全基因组CRISPRi基因依赖性的分析揭示了在具有高m^6A/mcm^5sU特征的细胞系中EGFR信号通路组分的富集(图7A)。与此一致,EGFR是与高m^6A/mcm^5s^2U特征相关的顶级基因依赖性之一(图7B)。EGFR/ErbB家族的受体酪氨酸激酶经常在肿瘤中过表达,并被几种FDA批准的酪氨酸激酶抑制剂(TKI)(包括拉帕替尼和吉非替尼)靶向。发明人观察到对这些EGFR靶向TKI的敏感性与m6A/mcm5s2U特征相关(图7C)。对这些药物脆弱性的详细分析显示,高m^6A/mcm^5s^2U特征与EGFR阳性细胞对拉帕替尼和吉非替尼的敏感性增加相关。最低特征的四分位数的细胞系与EGFR阴性细胞一样对EGFR抑制剂不敏感。因此,结合的m6A/mcm5s2U特征可作为癌细胞对EGFR抑制敏感性的生物标志物。

[0168] 实施例6:m6A和mcm5s2U生物发生通路中的肿瘤体细胞突变与显著不同的总生存率无关发明人分析了m6A和mcm5s2U生物发生通路中的肿瘤体细胞突变是否与TCGA癌症队列中不同的总生存率相关。然而,结果显示m6A和mcm5s2U生物发生通路中的肿瘤体细胞突变通常与显著不同的总生存率无关(图8)。虽然对于一些癌症,检测出存活率存在显著差异

(例如乳腺癌[BRCA]),但这是基于非常少的突变病例。因此,进一步证实了mcm5s2U与m6A比率的不平衡是TCGA癌症队列中不同总生存率的主要触发因素。

[0169] 参考文献

参考文献为:

1.Geula,S.,Moshitch-Moshkovitz,S.,Dominissini,D.,Mansour,A.A.,Kol,N.,Salmon-Divon,M.,Hershkovitz,V.,Peer,E.,Mor,N.,Manor,Y.S.,et al.(2015).m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation.Science 347,1002-1006.

2.Aguilo,F.,Zhang,F.,Sancho,A.,Fidalgo,M.,Di Cecilia,S.,Vashisht,A.,Lee,D.-F.,Chen,C.-H.,Rengasamy,M.,Andino,B.,et al.Coordination of m6A mRNA Methylation and Gene Transcription by ZFP217 Regulates Pluripotency and Reprogramming.Cell Stem Cell 0.Availableat:http://www.cell.com/article/S1934590915004129/abstract[Accessed November 6,2015].

3.Yoo,H.,Son,D.,Jang,Y.-J.,and Hong,K.(2016).Indispensable role for mouse ELP3 in embryonic stem cell maintenance and early development.Biochemical and Biophysical ResearchCommunications 478,631-636.

4.Qi,L.,Zhang,X.,Zhai,H.,Liu,J.,Wu,F.,Li,C.,and Chen,Q.(2019).Elongator Is Requiredfor Root Stem Cell Maintenance by Regulating SHORTROOT Transcription.Plant Physiology 179,220-232.

5.Delaunay,S.,and Frye,M.(2019).RNA modifications regulating cell fate in cancer.NatureCell Biology 21,552-559.

6.Delaunay,S.,Rapino,F.,Tharun,L.,Zhou,Z.,Heukamp,L.,Termathe,M.,Shostak,K.,Klevernic,I.,Florin,A.,Desmecht,H.,et al.(2016).Elp3 links tRNA modification to IRES-dependent translation of LEF1 to sustain metastasis in breast cancer.Journal of ExperimentalMedicine 213,2503-2523.

7.Fry,N.J.,Law,B.A.,Ilkayeva,O.R.,Carraway,K.R.,Holley,C.L.,and Mansfield,K.D.(2018).N6-methyladenosine contributes to cellular phenotype in a genetically-defined model ofbreast cancer progression.Oncotarget 9,31231-31243.

8.Goodarzi,H.,Nguyen,H.C.B.,Zhang,S.,Dill,B.D.,Molina,H.,and Tavazoie,S.F.(2016).Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and Cancer Progression.Cell 165,1416-1427。

序列表

<110> 欧洲分子生物学实验室
伯尔尼大学
<120> 用于癌症的预后生物标志物
<130> 196120-23F-CNP
<150> EP20186398.2
<151> 2020-07-17
<160> 19
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 1
agacu 5
<210> 2
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 2
ggacu 5
<210> 3
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 3
ugacu 5
<210> 4
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 4
aaacu 5
<210> 5
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 5

gaacu 5

<210> 6

<211> 5

<212> RNA

<213> 智人

<400> 6

uaacu 5

<210> 7

<211> 5

<212> RNA

<213> 智人

<400> 7

agaca 5

<210> 8

<211> 5

<212> RNA

<213> 智人

<400> 8

ggaca 5

<210> 9

<211> 5

<212> RNA

<213> 智人

<400> 9

ugaca 5

<210> 10

<211> 5

<212> RNA

<213> 智人

<400> 10

aaaca 5

<210> 11

<211> 5

<212> RNA

<213> 智人

<400> 11

gaaca 5

<210> 12

<211> 5

<212> RNA
<213> 智人
<400> 12
uaaca 5
<210> 13
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 13
agacc 5
<210> 14
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 14
ggacc 5
<210> 15
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 15
ugacc 5
<210> 16
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 16
aaacc 5
<210> 17
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 17
gaacc 5
<210> 18
<211> 5
<212> RNA
<213> 智人
<400> 18

uaacc 5

<210> 19

<211> 9

<212> RNA

<213> 智人

<400> 19

aggagacug 9

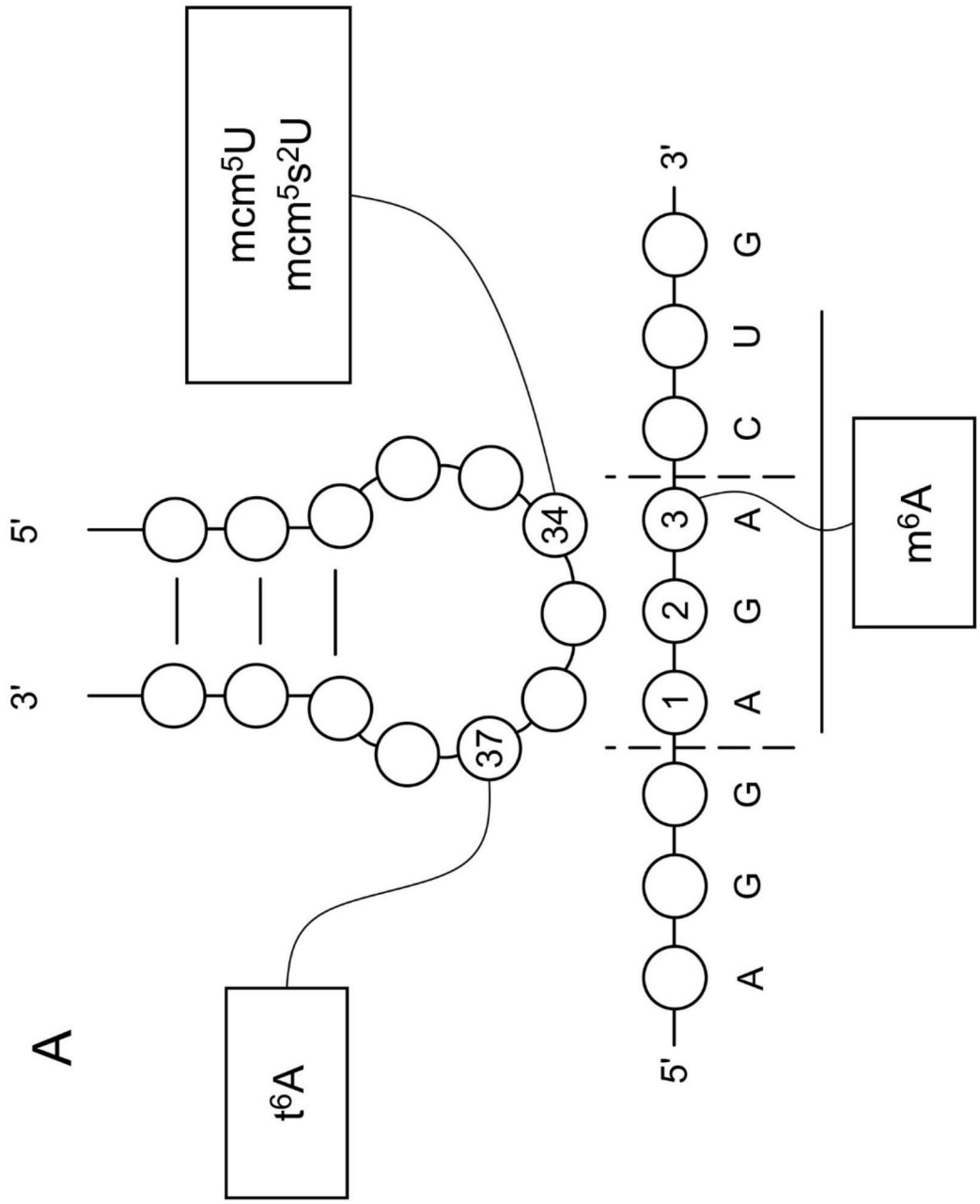


图1

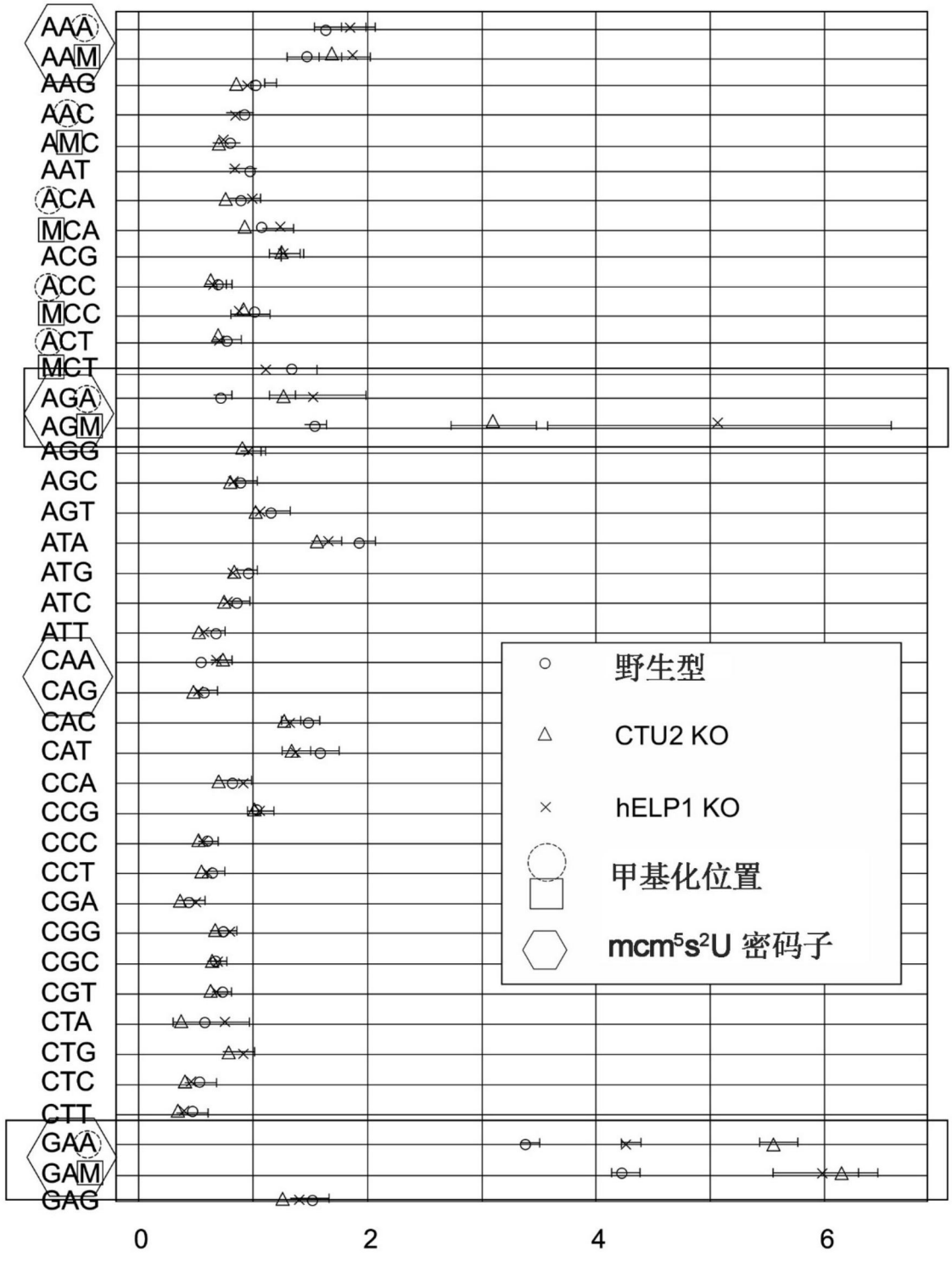
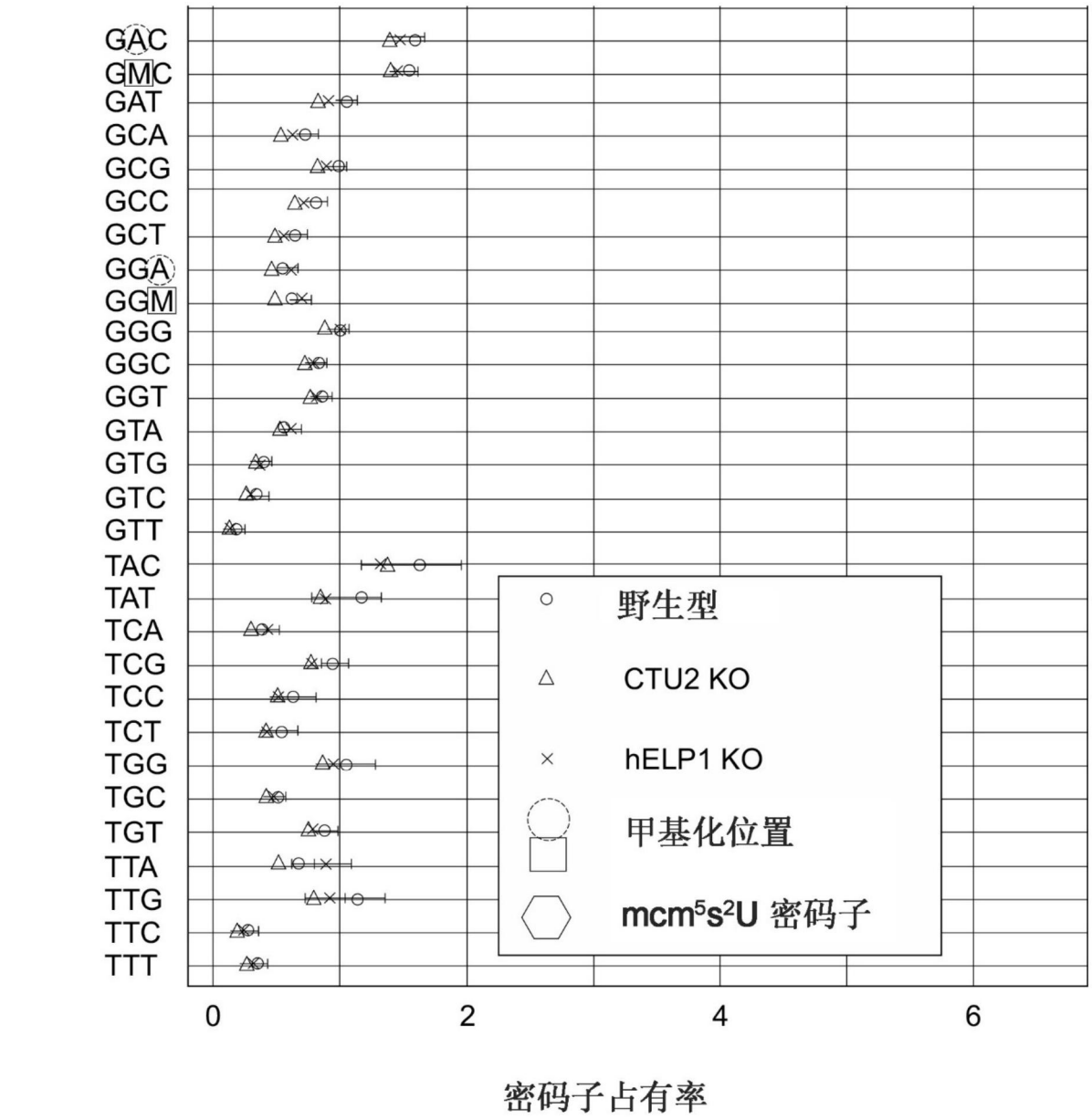

AAA
AAM
AAG
AAC
AMC
AAT
ACA
MCA
ACG
ACC
MCC
ACT
MCT
AGA
AGM
AGG
AGC
AGT
ATA
ATG
ATC
ATT
CAA
CAG
CAC
CAT
CCA
CCG
CCC
CCT
CGA
CGG
CGC
CGT
CTA
CTG
CTC
CTT
GAA
GAM
GAG
0
2
4
6
野生型
CTU2 KO
hELP1 KO
甲基化位置
mcm5s2U 密码子
密码子占有率
B

图1(续)


GAC
GMC
GAT
GCA
GCG
GCC
GCT
GGA
GGM
GGG
GGC
GGT
GTA
GTG
GTC
GTT
TAC
TAT
TCA
TCG
TCC
TCT
TGG
TGC
TGT
TTA
TTG
TTC
TTT
0
2
4
6
野生型
CTU2 KO
hELP1 KO
甲基化位置
mcm5s2U 密码子
密码子占有率

B

图1(续)

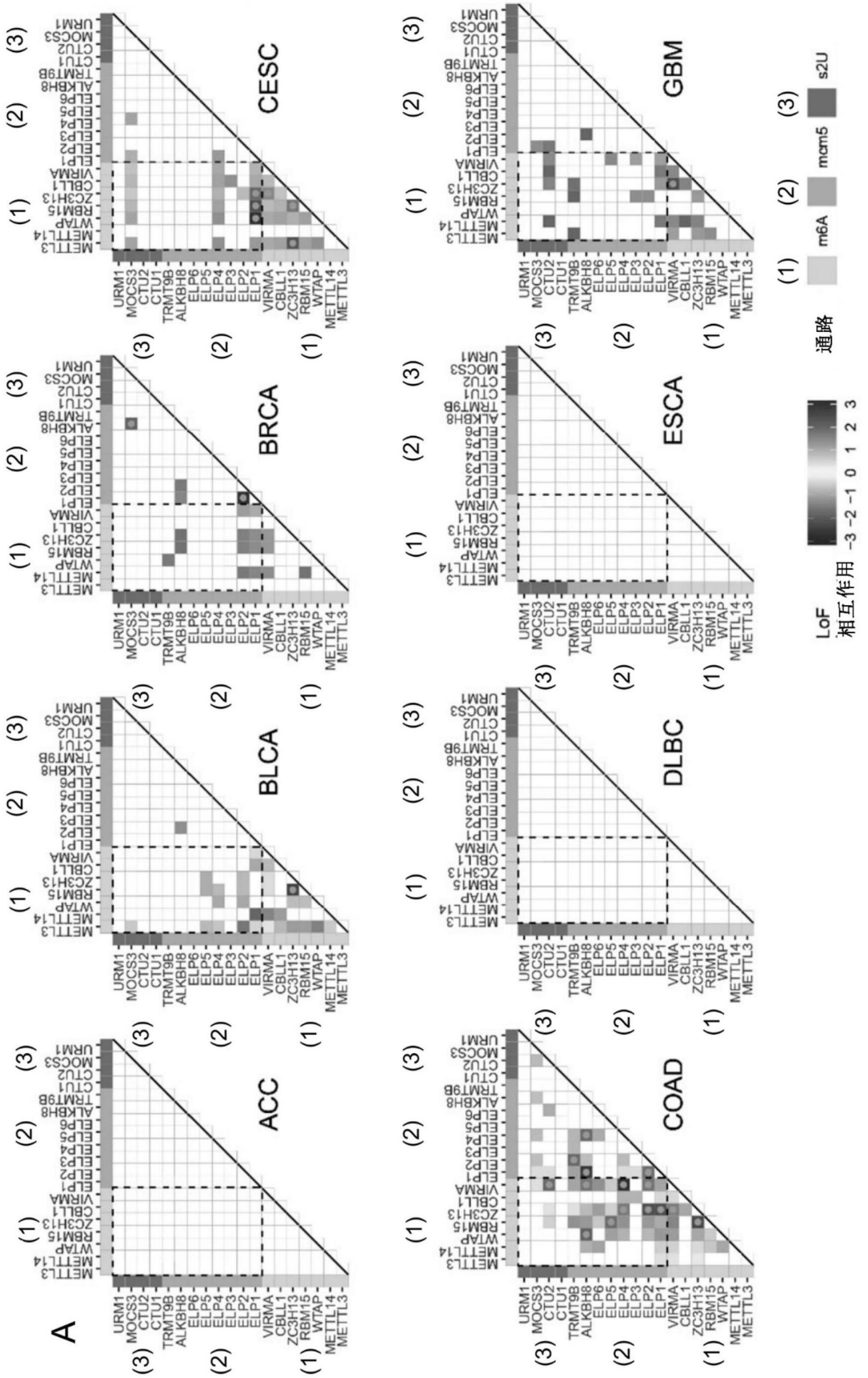

A
ACC
BLCA
BRCA
CESC
COAD
DLBC
ESCA
GBM
m6A
mcm5
s2U
通路
LoF
相互作用 -3 -2 -1 0 1 2 3

图2

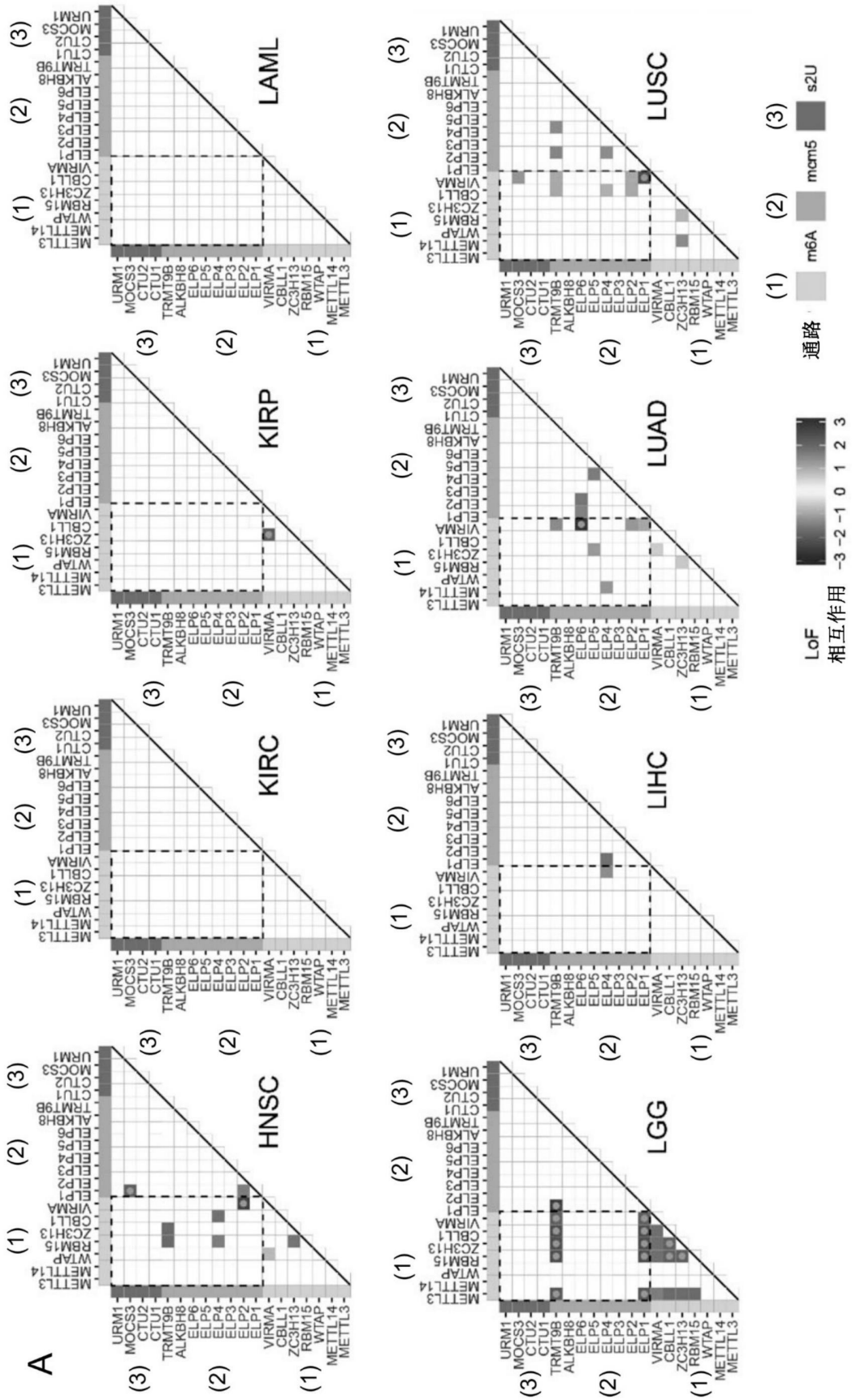

A
HNSC
KIRC
KIRP
LAML
LGG
LIHC
LUAD
LUSC
URM1
MOCS3
CTU2
CTU1
TRMT9B
ALKBH8
ELP6
ELP5
ELP4
ELP3
ELP2
ELP1
VIRMA
CBLL1
ZC3H13
RBM15
WTAP
METTL14
METTL3
(1)
(2)
(3)
LoF
相互作用 -3 -2 -1 0 1 2 3
通路
m6A
mcm5
s2U

图2(续)

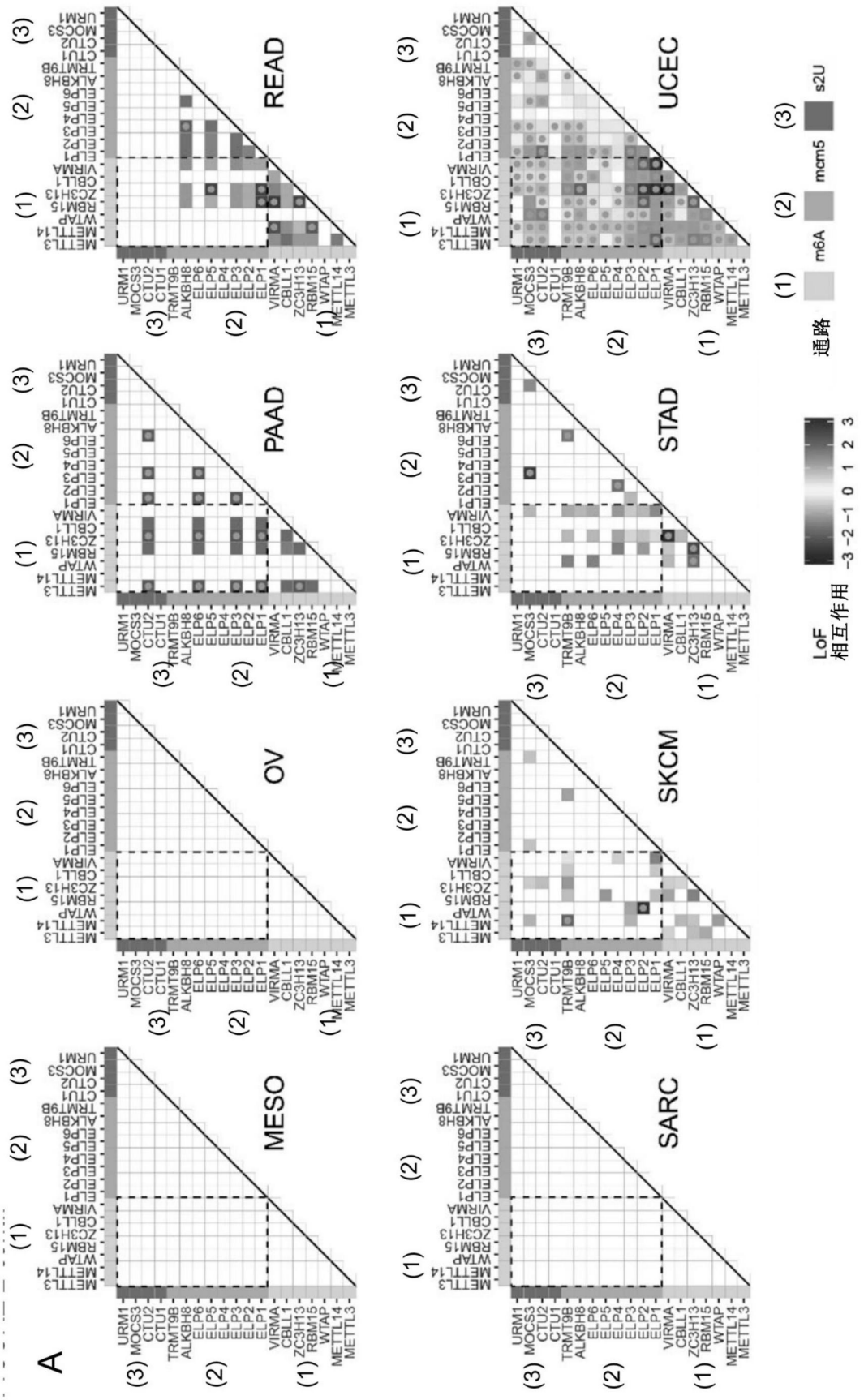

A
MESO
OV
PAAD
READ
SARC
SKCM
STAD
UCEC
LoF
相互作用
-3 -2 -1 0 1 2 3
通路
m6A
mcm5
s2U

图2(续)

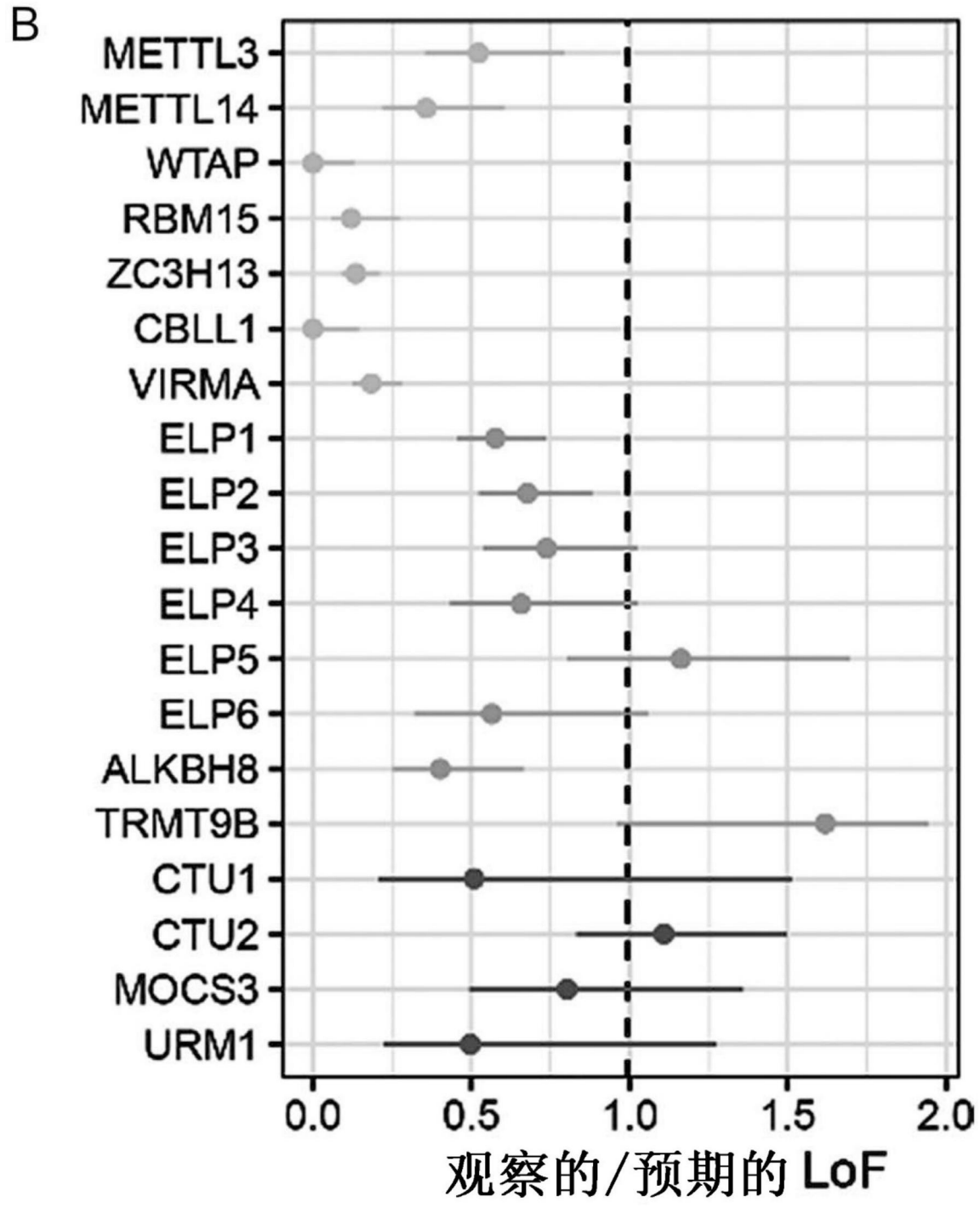

B
METTL3
METTL14
WTAP
RBM15
ZC3H13
CBLL1
VIRMA
ELP1
ELP2
ELP3
ELP4
ELP5
ELP6
ALKBH8
TRMT9B
CTU1
CTU2
MOCS3
URM1
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
观察的/预期的 LoF

图2(续)

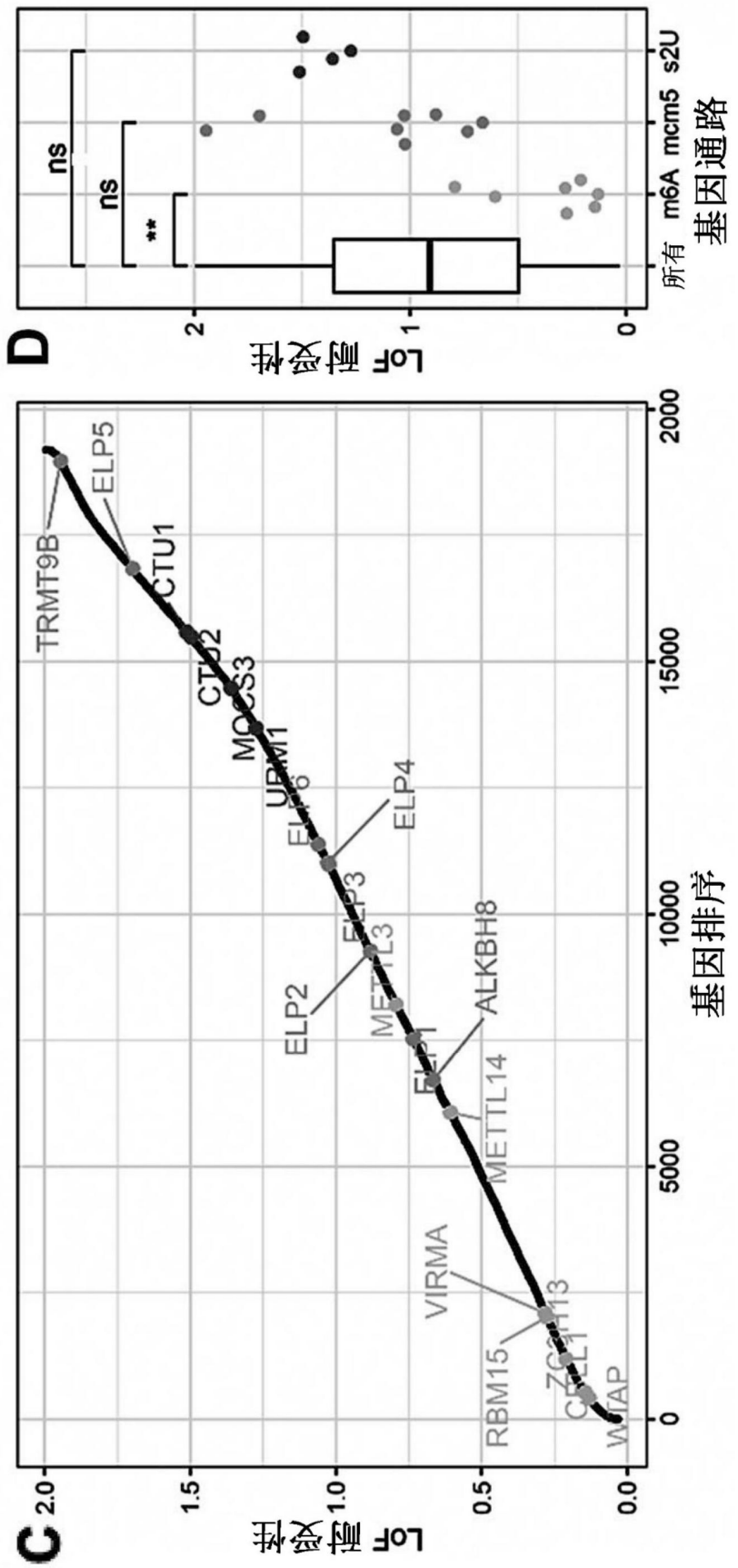

D
LoF 耐受性
2
1
0
ns
ns
**
所有
m6A
mcm5
s2U
基因通路
C
LoF 耐受性
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
5000
10000
15000
2000
基因排序
TRMT9B
ELP5
CTU1
CTU2
MOCS3
URM1
ELP6
ELP4
ELP3
METTL3
ELP2
ELP1
ALKBH8
METTL14
VIRMA
RBM15
CBLL1
WTAP

图2(续)

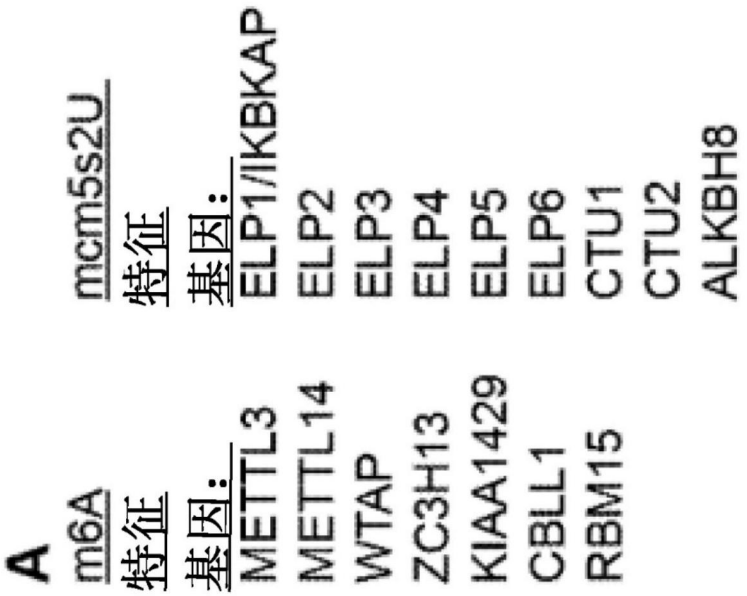

A
m6A
特征
基因:
METTL3
METTL14
WTAP
ZC3H13
KIAA1429
CBLL1
RBM15
mcm5s2U
特征
基因:
ELP1/IKBKAP
ELP2
ELP3
ELP4
ELP5
ELP6
CTU1
CTU2
ALKBH8

图3

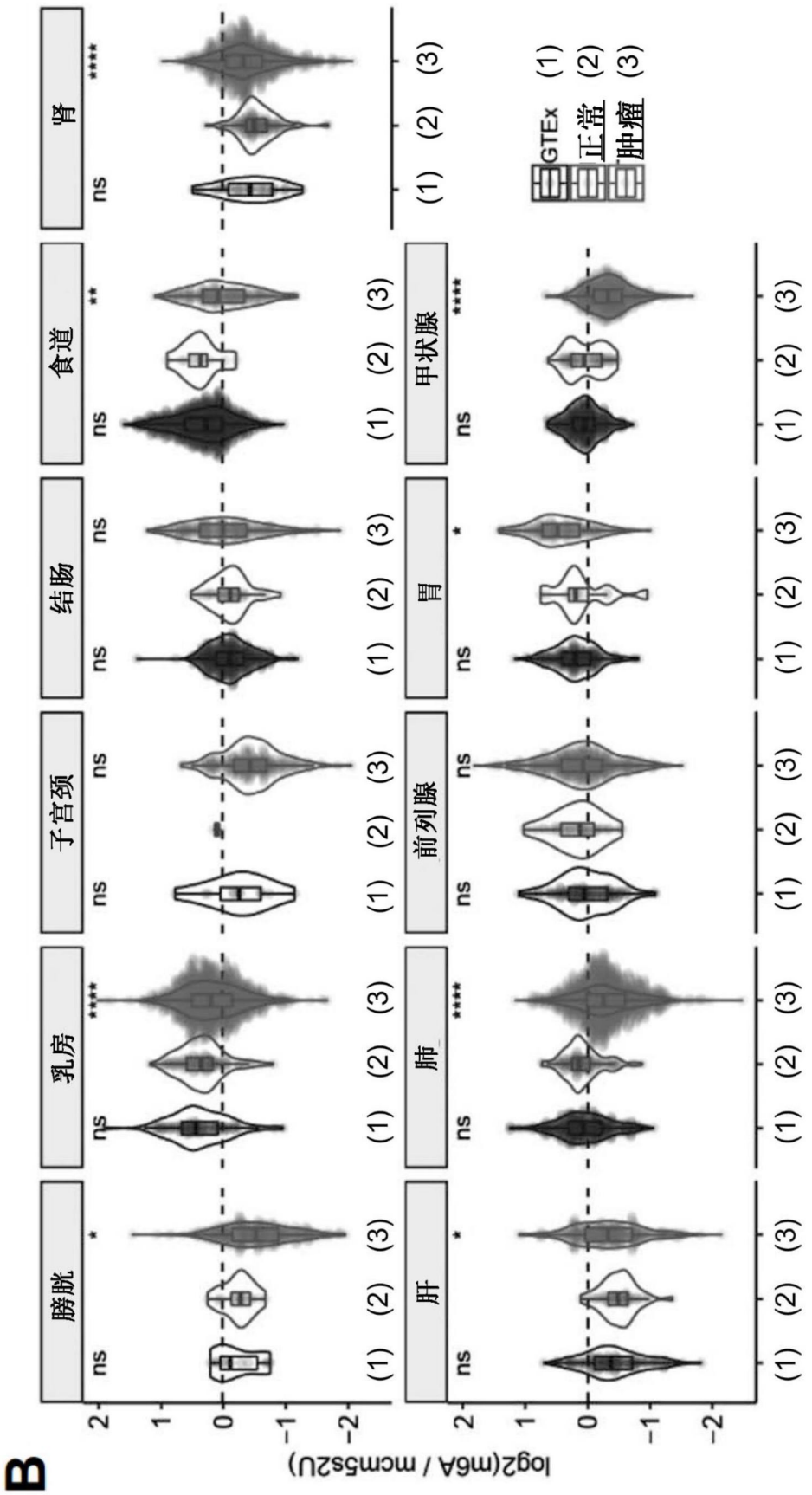


图3(续)

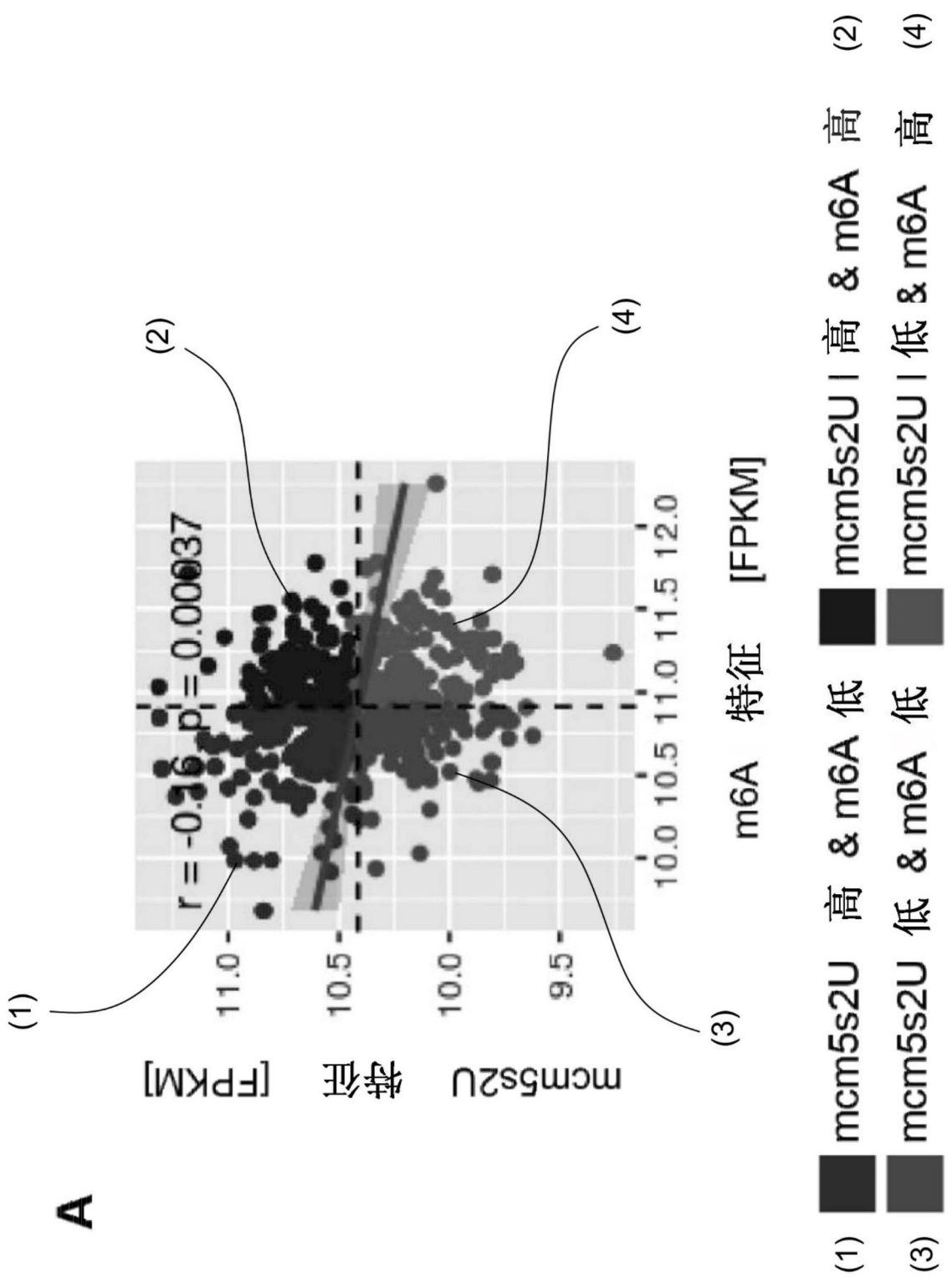

A
mcm5s2U 特征 [FPKM]
r = -0.16 p = 0.00037
11.0
10.5
10.0
9.5
10.0 10.5 11.0 11.5 12.0
m6A 特征 [FPKM]
(1)
(2)
(3)
(4)
(1) mcm5s2U 高 & m6A 低
(2) mcm5s2U | 高 & m6A 高
(3) mcm5s2U 低 & m6A 低
(4) mcm5s2U | 低 & m6A 高

图4

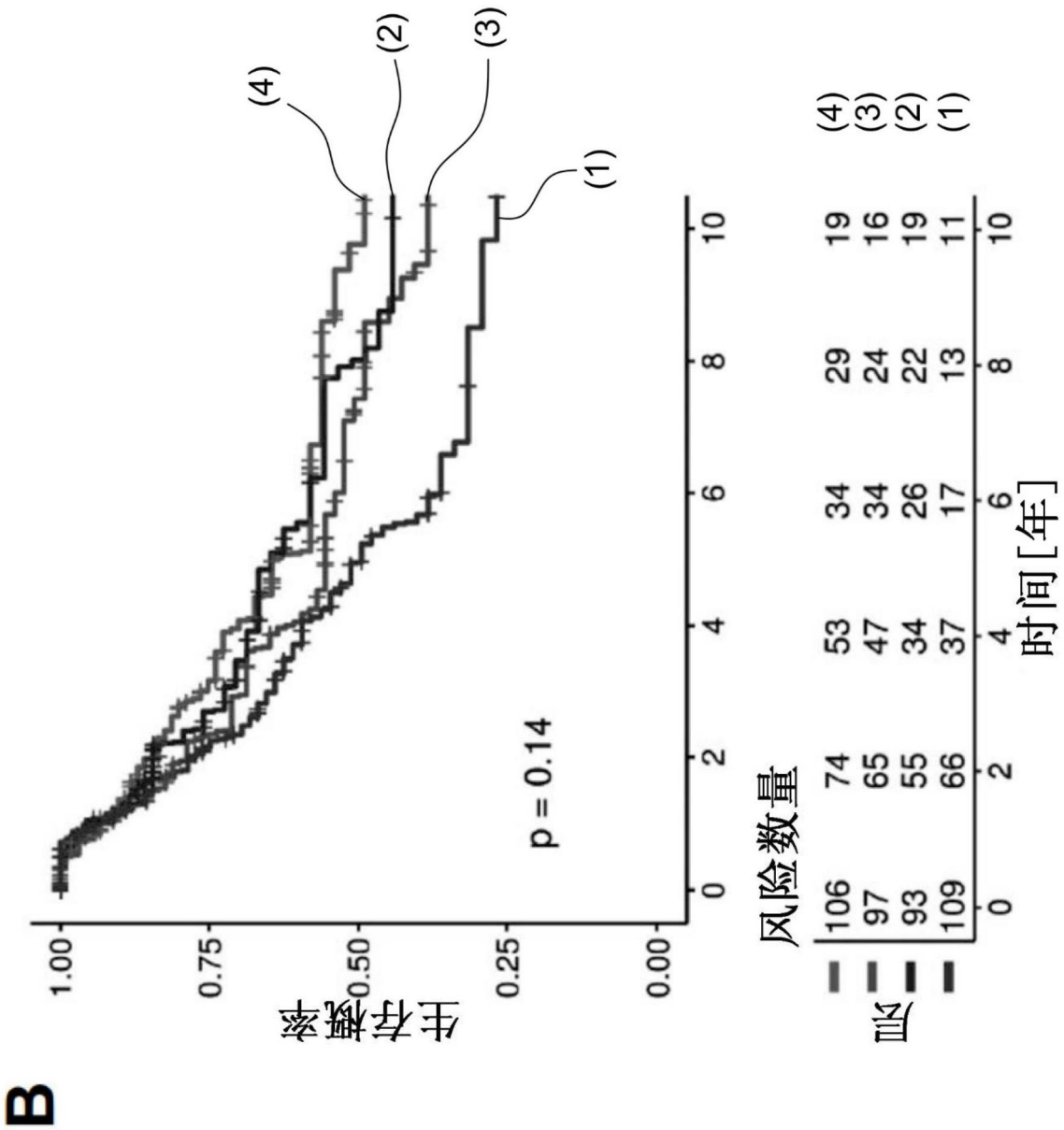

B
生存概率
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
p = 0.14
(1)
(2)
(3)
(4)
0
2
4
6
8
10
时间[年]
风险数量
风险
(4)
(3)
(2)
(1)
106 74 53 34 29 19
97 65 47 34 24 16
93 55 34 26 22 19
109 66 37 17 13 11

图4(续)

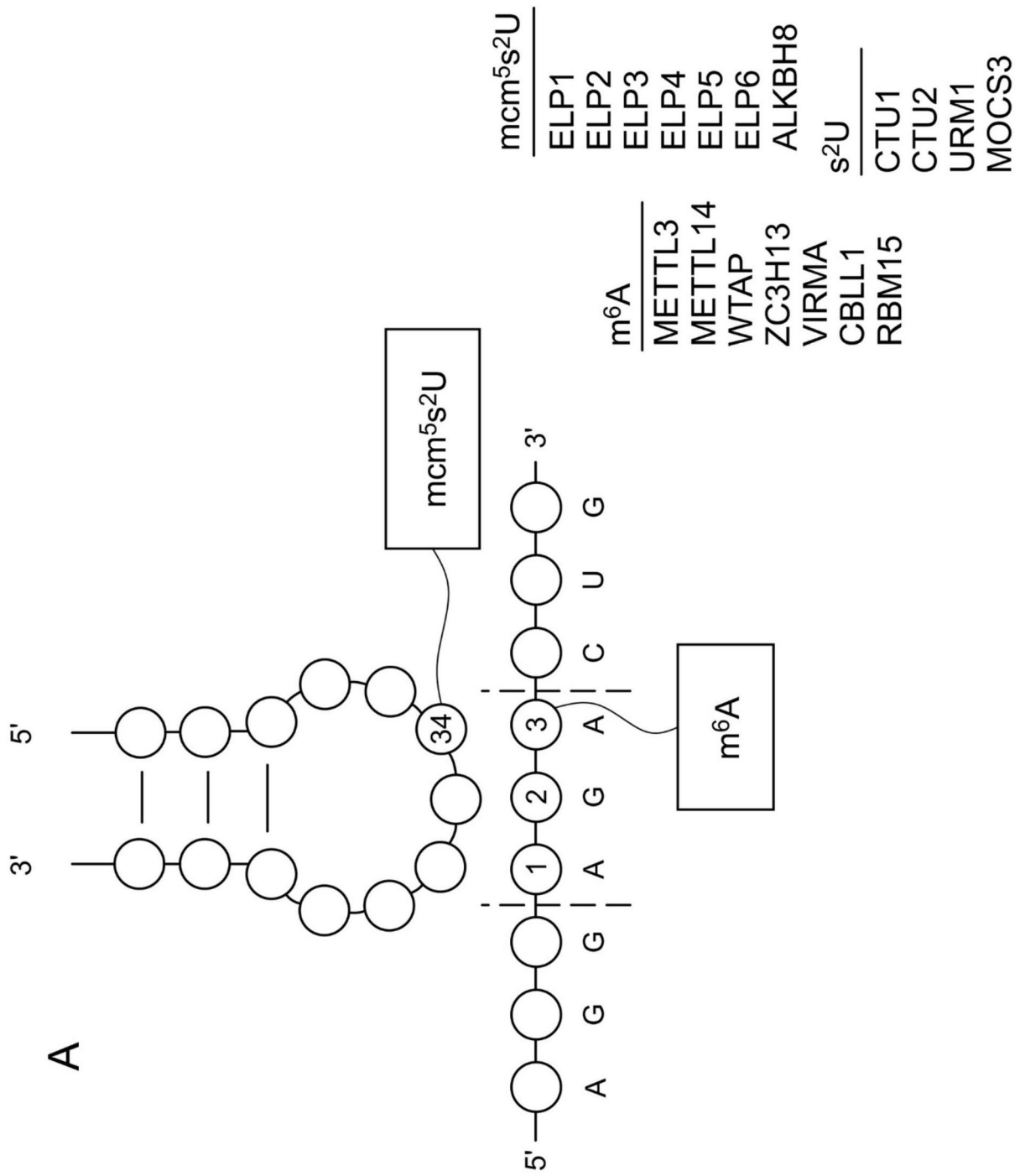

A
5'
3'
34
mcm5s2U
m6A
1
2
3
A
G
A
G
G
A
C
U
G
3'
5'
m6A
METTL3
METTL14
WTAP
ZC3H13
VIRMA
CBLL1
RBM15
mcm5s2U
ELP1
ELP2
ELP3
ELP4
ELP5
ELP6
ALKBH8
s2U
CTU1
CTU2
URM1
MOCS3

图5

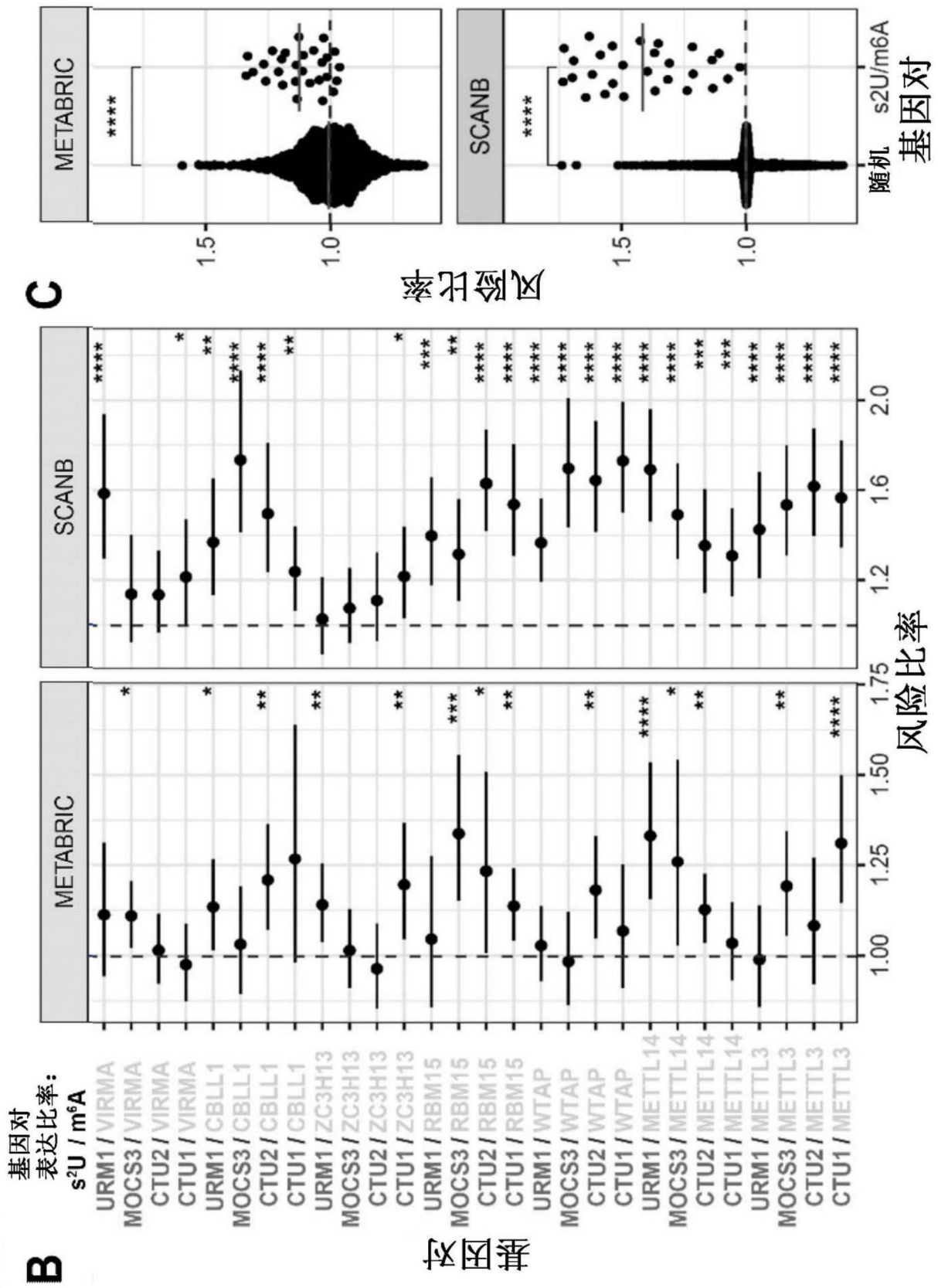

B
基因对
表达比率：
s²U / m⁶A
URM1 / VIRMA
MOCS3 / VIRMA
CTU2 / VIRMA
CTU1 / VIRMA
URM1 / CBLL1
MOCS3 / CBLL1
CTU2 / CBLL1
CTU1 / CBLL1
URM1 / ZC3H13
MOCS3 / ZC3H13
CTU2 / ZC3H13
CTU1 / ZC3H13
URM1 / RBM15
MOCS3 / RBM15
CTU2 / RBM15
CTU1 / RBM15
URM1 / WTAP
MOCS3 / WTAP
CTU2 / WTAP
CTU1 / WTAP
URM1 / METTL14
MOCS3 / METTL14
CTU2 / METTL14
CTU1 / METTL14
URM1 / METTL3
MOCS3 / METTL3
CTU2 / METTL3
CTU1 / METTL3
METABRIC
SCANB
1.00
1.25
1.50
1.75
1.2
1.6
2.0
风险比率
基因对
C
METABRIC
SCANB
****
1.5
1.0
风险比率
随机
s2U/m6A
基因对

图5(续)

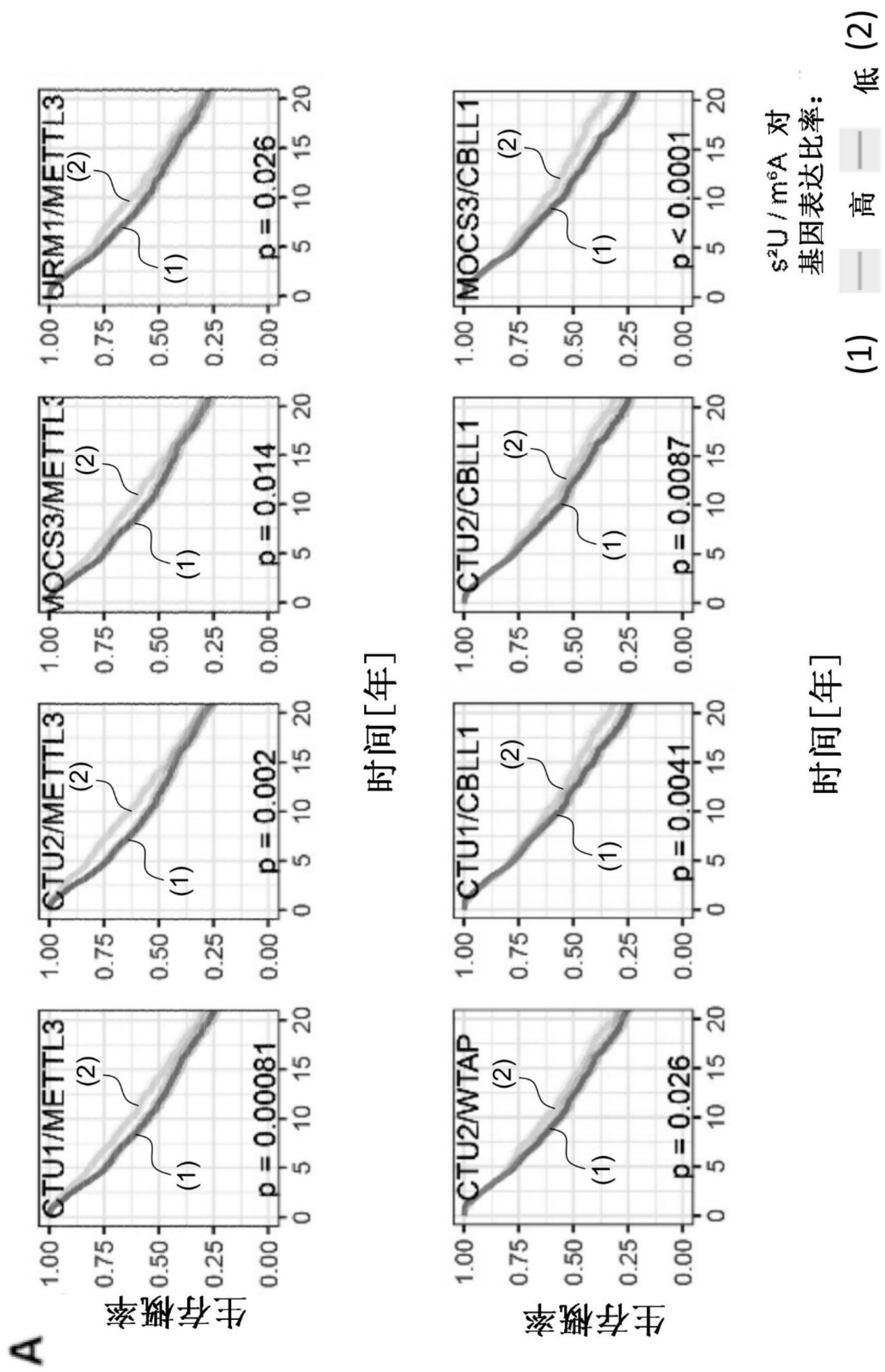

A
生存概率
时间[年]
CTU1/METTL3
p = 0.00081
CTU2/METTL3
p = 0.002
MOCS3/METTL3
p = 0.014
URM1/METTL3
p = 0.026
CTU2/WTAP
p = 0.026
CTU1/CBLL1
p = 0.0041
CTU2/CBLL1
p = 0.0087
MOCS3/CBLL1
p < 0.0001
(1)
(2)
s²U / m⁶A 对
基因表达比率:
高
低

图6

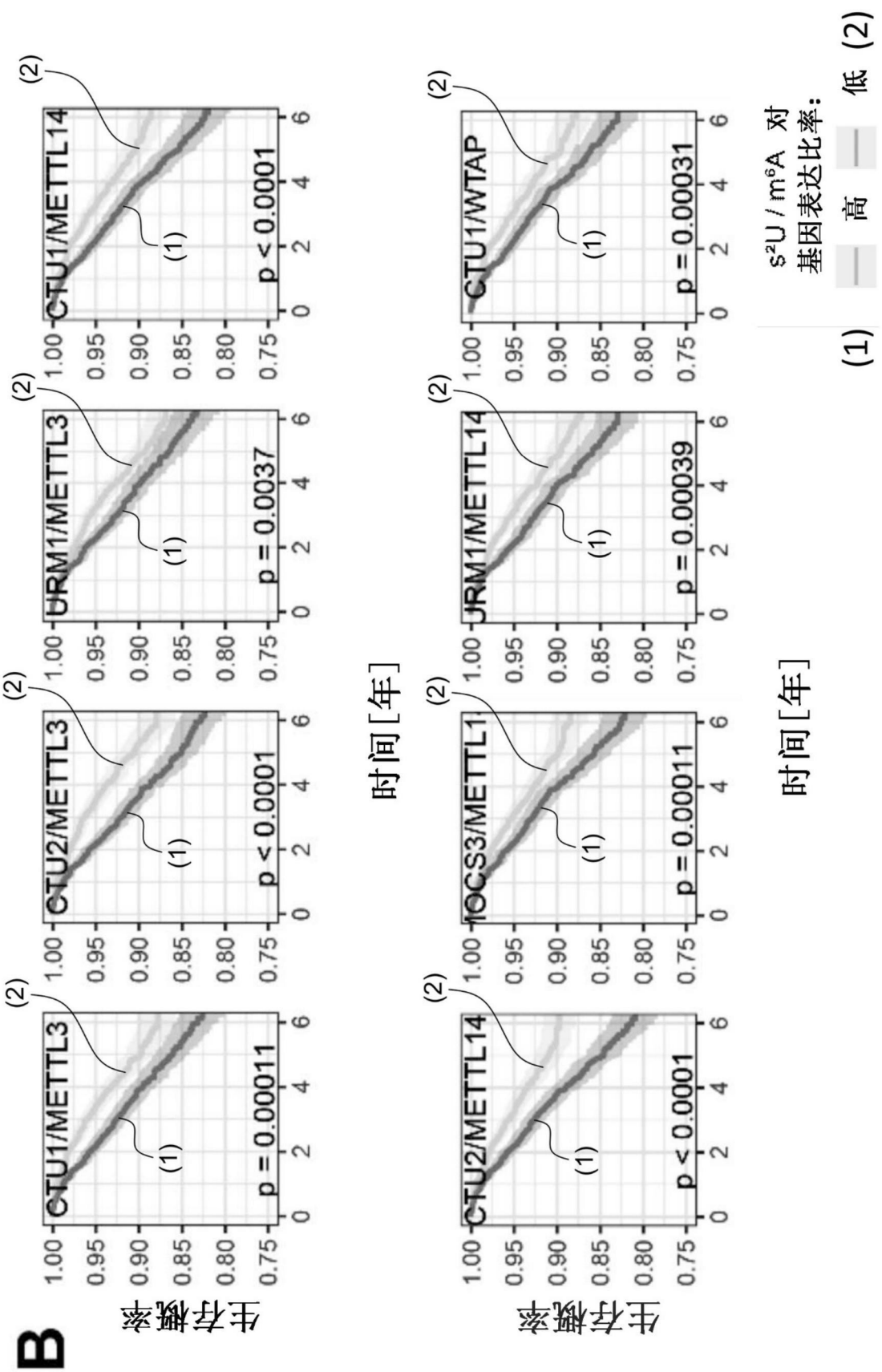

B
生存概率
时间[年]
CTU1/METTL3
p = 0.00011
CTU2/METTL3
p < 0.0001
URM1/METTL3
p = 0.0037
CTU1/METTL14
p < 0.0001
CTU2/METTL14
p < 0.0001
IOCS3/METTL1
p = 0.00011
JRM1/METTL14
p = 0.00039
CTU1/WTAP
p = 0.00031
(1)
(2)
s²U / m⁶A 对
基因表达比率:
高
低

图6(续)

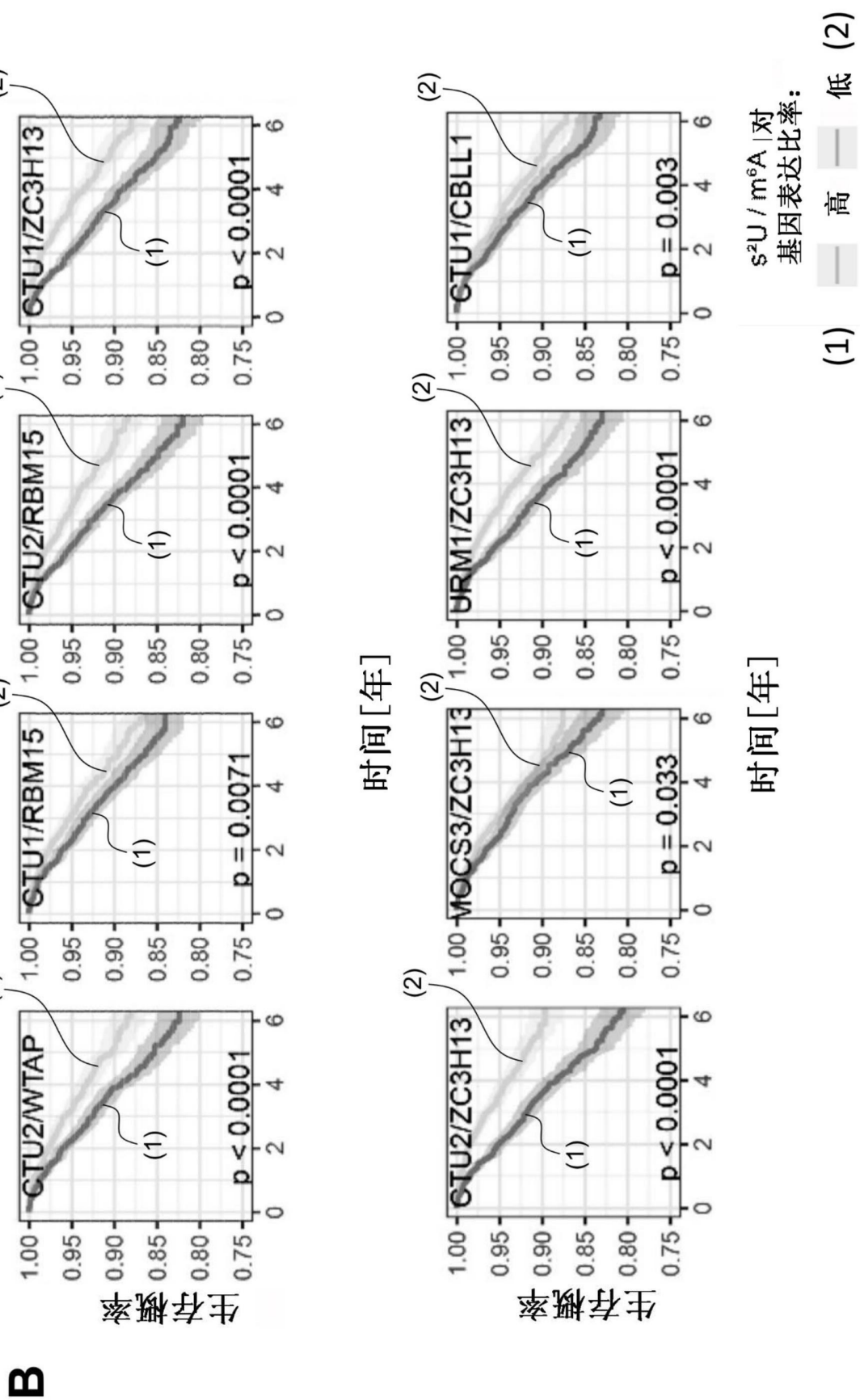

B
生存概率
时间[年]
CTU2/WTAP
p < 0.0001
CTU1/RBM15
p = 0.0071
CTU2/RBM15
p < 0.0001
CTU1/ZC3H13
p < 0.0001
CTU2/ZC3H13
p < 0.0001
MOCS3/ZC3H13
p = 0.033
URM1/ZC3H13
p < 0.0001
CTU1/CBLL1
p = 0.003
(1)
(2)
s²U / m⁶A 对
基因表达比率:
高
低

图6(续)

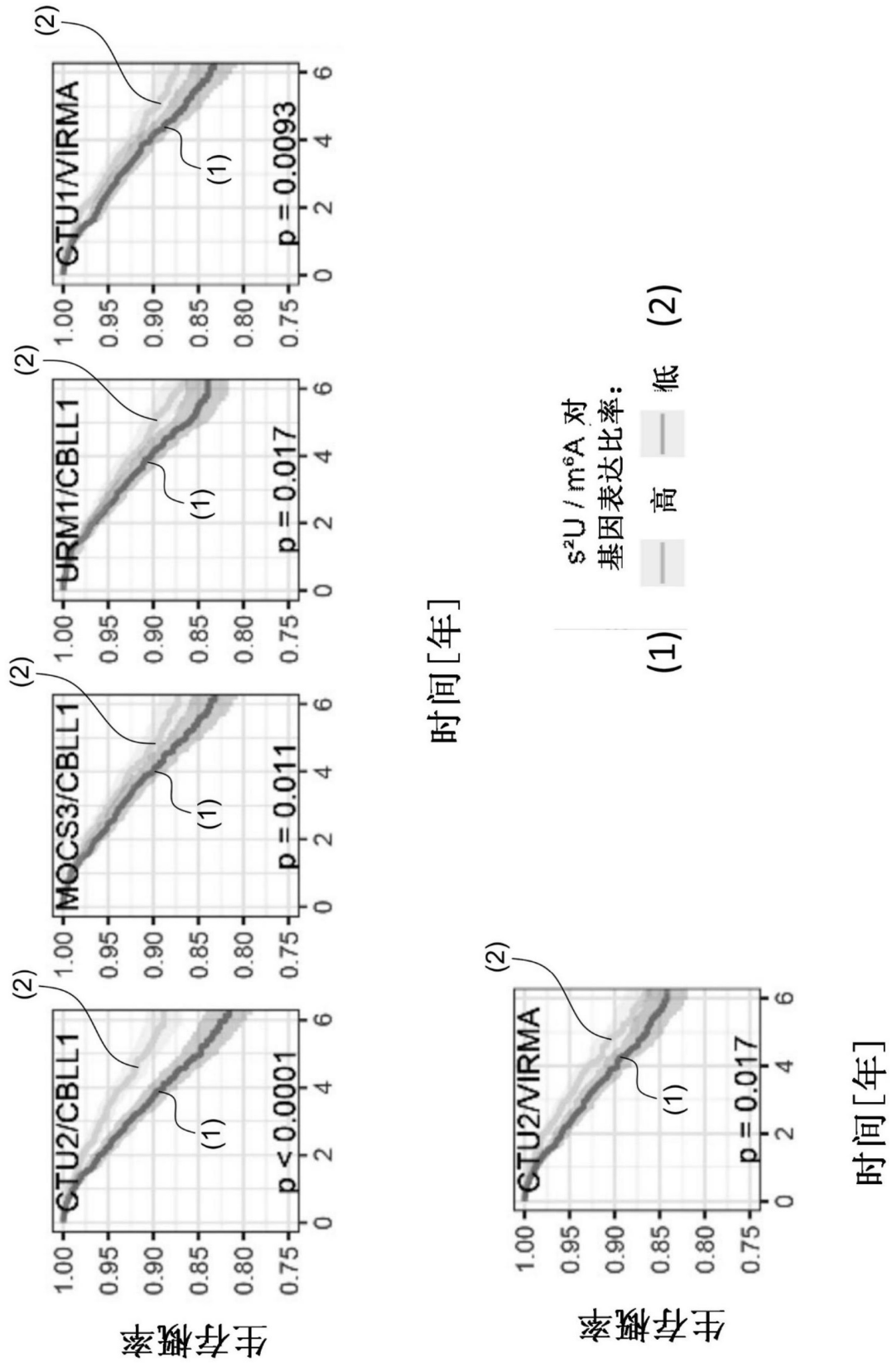

B
生存概率
CTU2/CBLL1
p < 0.0001
MOCS3/CBLL1
p = 0.011
URM1/CBLL1
p = 0.017
CTU1/VIRMA
p = 0.0093
CTU2/VIRMA
p = 0.017
(1)
(2)
时间[年]
s²U / m⁶A 对
基因表达比率:
高
低

图6(续)

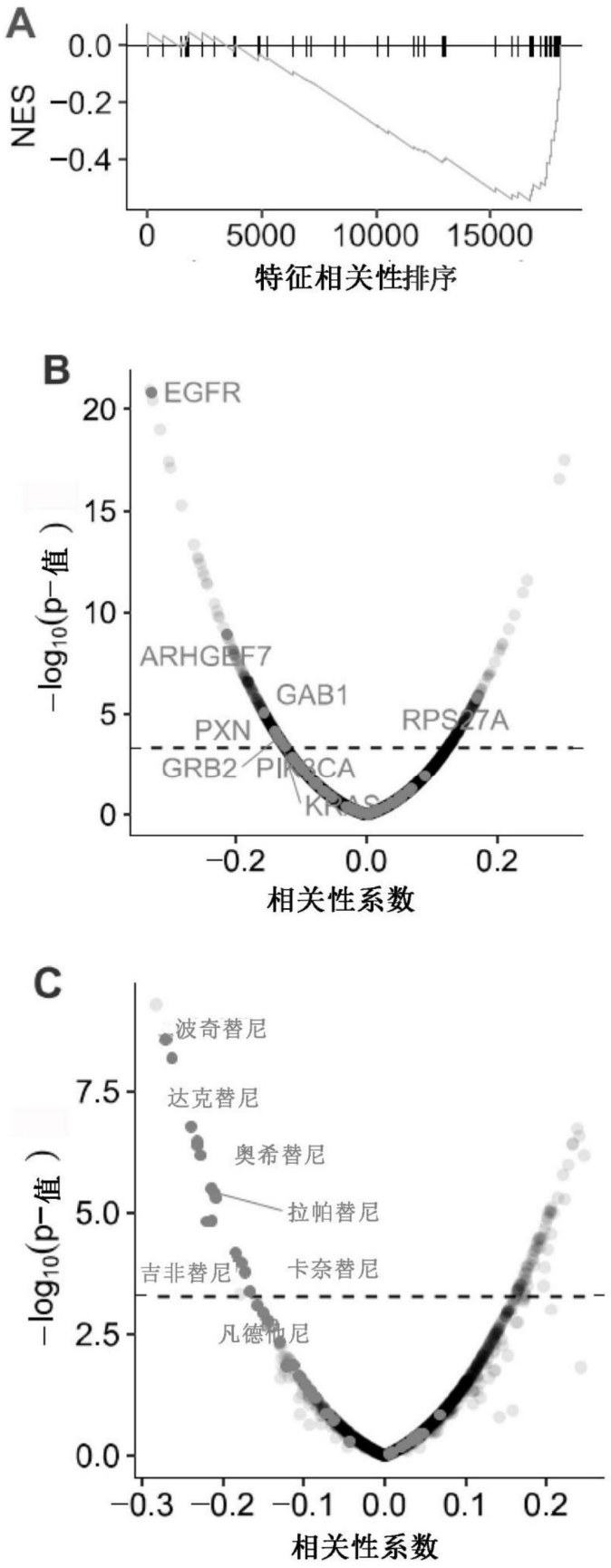

A
NES
0.0
−0.2
−0.4
0
5000
10000
15000
特征相关性排序
B
EGFR
20
15
10
5
0
$-\log_{10}$(p-值)
ARHGEF7
GAB1
PXN
RPS27A
GRB2
PIK3CA
KRAS
−0.2
0.0
0.2
相关性系数
C
波奇替尼
达克替尼
奥希替尼
拉帕替尼
吉非替尼
卡奈替尼
凡德他尼
7.5
5.0
2.5
0.0
$-\log_{10}$(p-值)
−0.3
−0.2
−0.1
0.0
0.1
0.2
相关性系数

图7

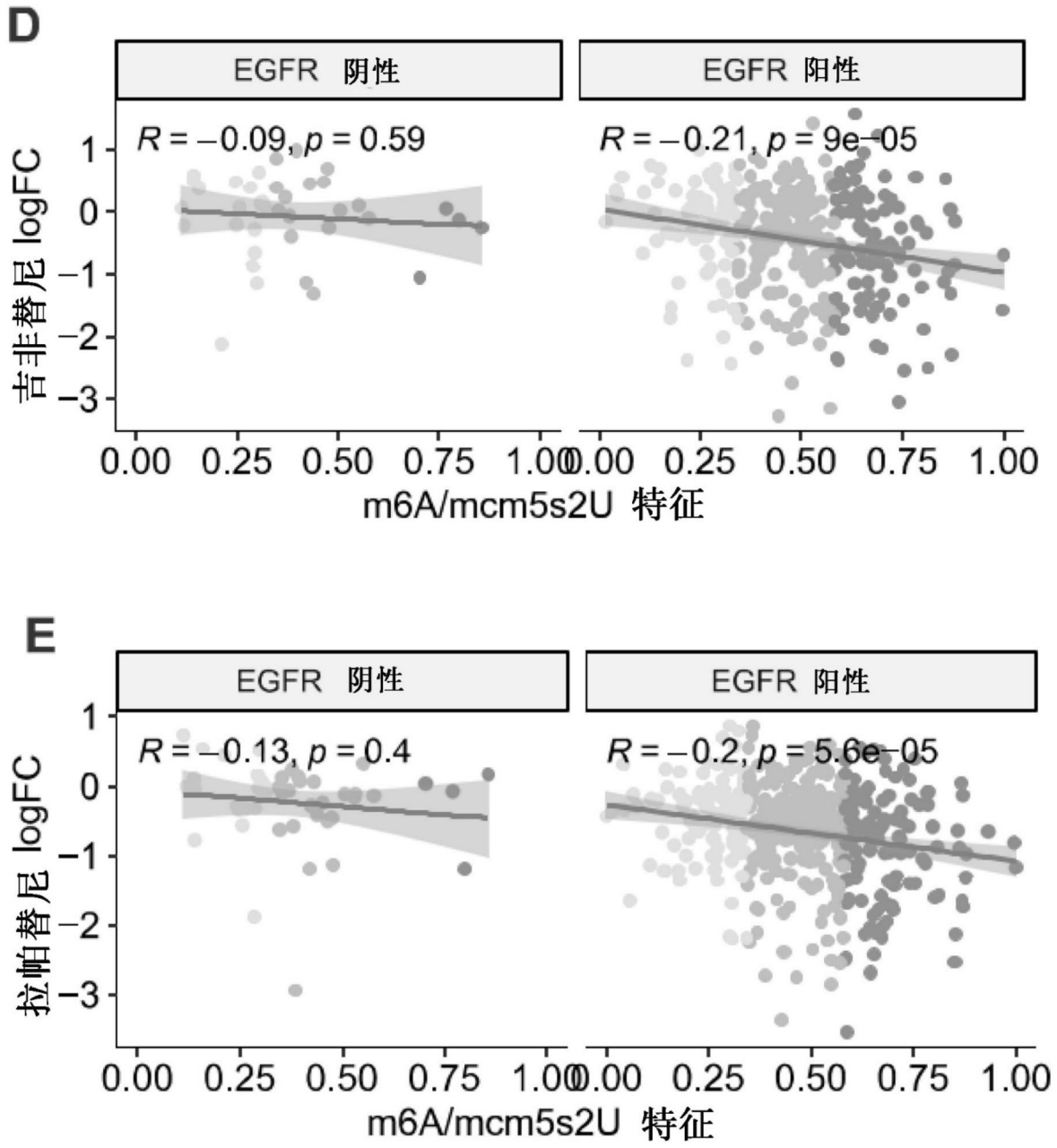

D
EGFR 阴性
EGFR 阳性
R = −0.09, p = 0.59
R = −0.21, p = 9e−05
吉非替尼 logFC
m6A/mcm5s2U 特征
E
EGFR 阴性
EGFR 阳性
R = −0.13, p = 0.4
R = −0.2, p = 5.6e−05
拉帕替尼 logFC
m6A/mcm5s2U 特征

图7(续)

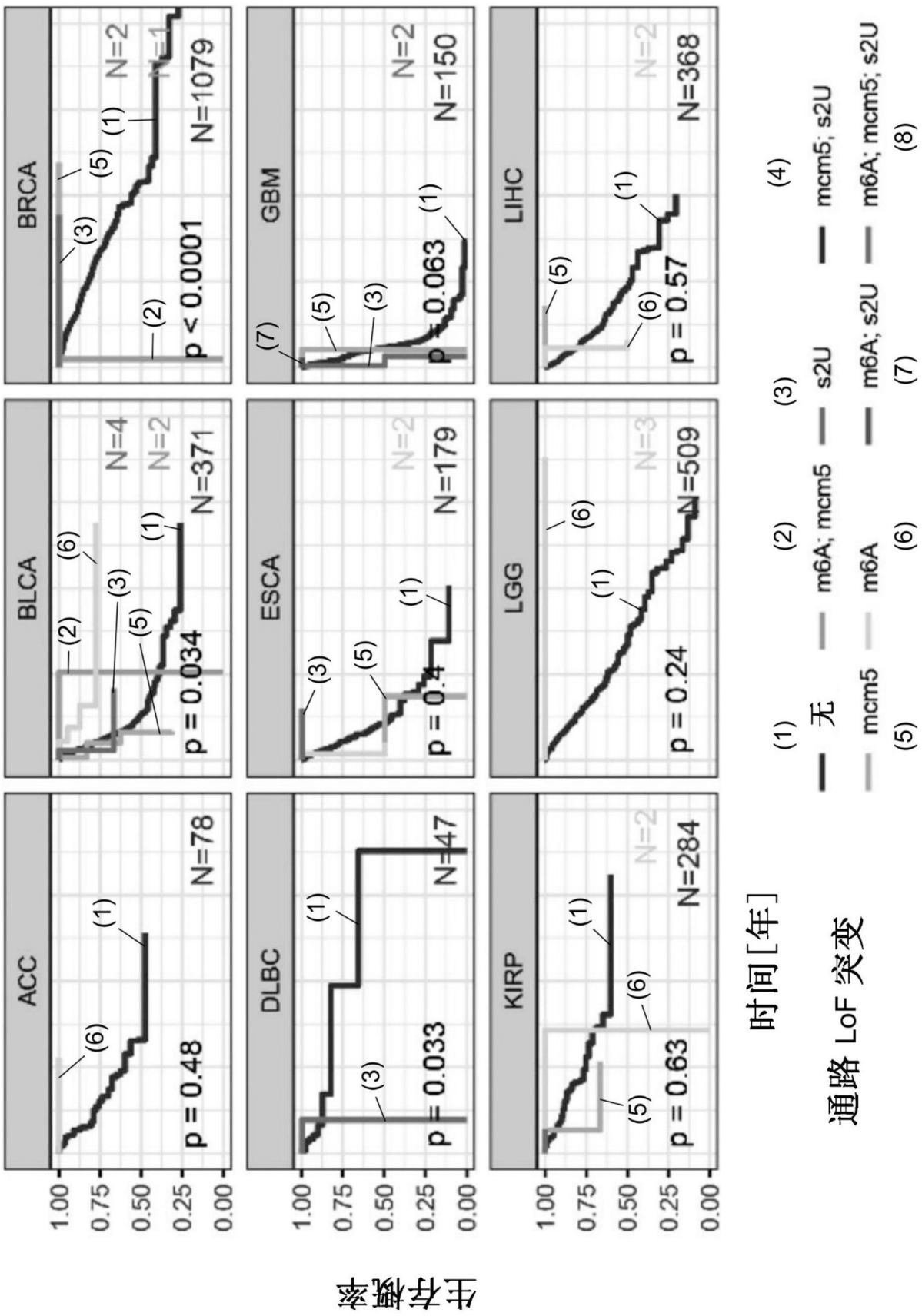

ACC
BLCA
BRCA
DLBC
ESCA
GBM
KIRP
LGG
LIHC
p = 0.48
p = 0.034
p < 0.0001
p = 0.033
p = 0.4
p = 0.063
p = 0.63
p = 0.24
p = 0.57
N=78
N=371
N=1079
N=47
N=179
N=150
N=284
N=509
N=368
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
生存概率
时间[年]
通路 LoF 突变
(1) 无
(2) m6A; mcm5
(3) s2U
(4) mcm5; s2U
(5) mcm5
(6) m6A
(7) m6A; s2U
(8) m6A; mcm5; s2U

图8

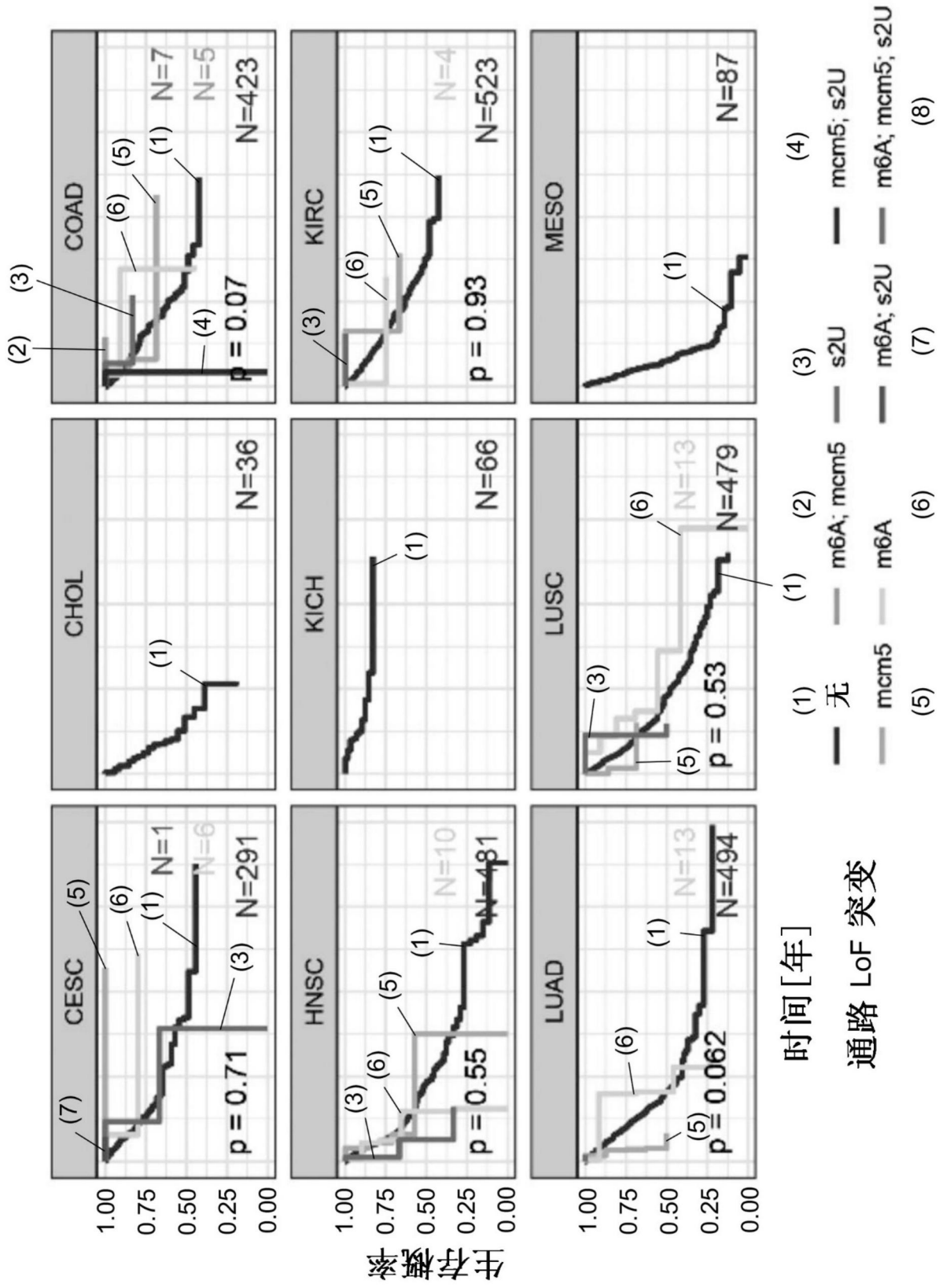

COAD
CHOL
CESC
KIRC
KICH
HNSC
MESO
LUSC
LUAD
N=423
N=36
N=291
N=523
N=66
N=481
N=87
N=479
N=494
p = 0.07
p = 0.93
p = 0.71
p = 0.55
p = 0.53
p = 0.062
生存概率
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
时间[年]
通路 LoF 突变
(1) 无
(2) m6A; mcm5
(3) s2U
(4) mcm5; s2U
(5) mcm5
(6) m6A
(7) m6A; s2U
(8) m6A; mcm5; s2U

图8(续)

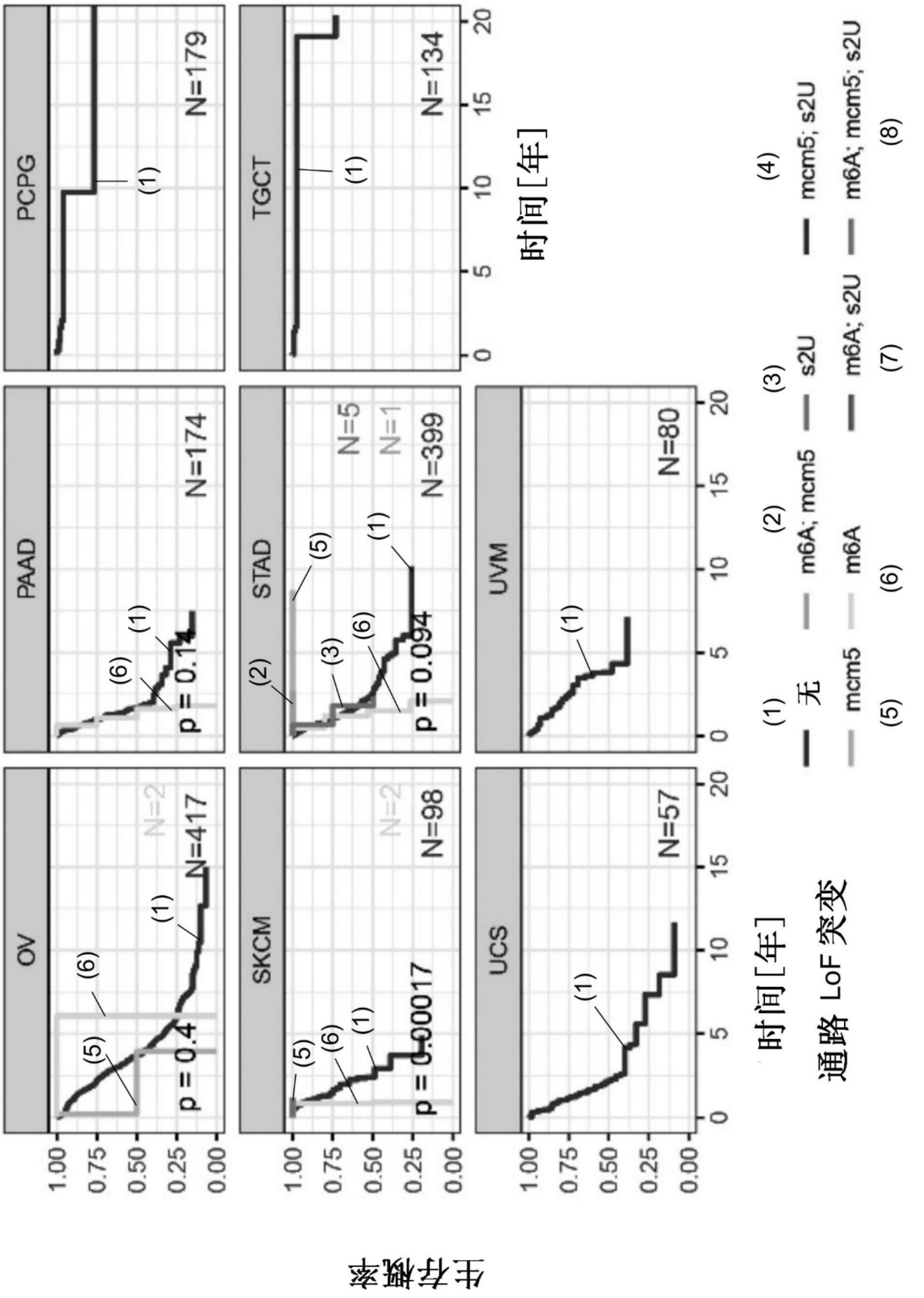

OV
PAAD
PCPG
SKCM
STAD
TGCT
UCS
UVM
p = 0.4
p = 0.14
p = 0.00017
p = 0.094
N=417
N=174
N=179
N=98
N=399
N=134
N=57
N=80
N=2
N=5
N=1
生存概率
时间[年]
通路 LoF 突变
(1) 无
(2) m6A; mcm5
(3) s2U
(4) mcm5; s2U
(5) mcm5
(6) m6A
(7) m6A; s2U
(8) m6A; mcm5; s2U

图8(续)

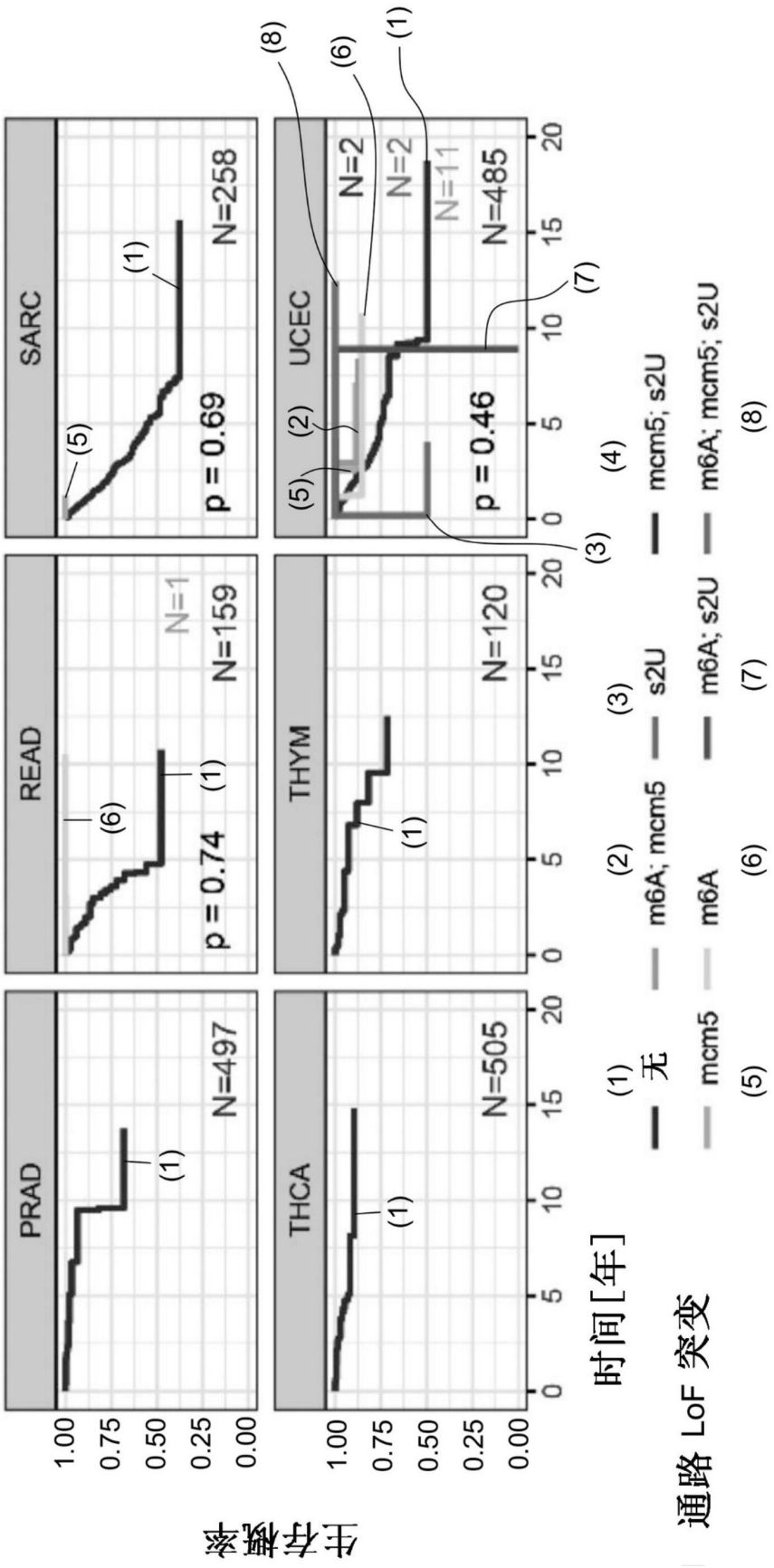

PRAD
READ
SARC
THCA
THYM
UCEC
N=497
N=159
N=258
N=505
N=120
N=485
N=1
N=2
N=2
N=11
p = 0.74
p = 0.69
p = 0.46
生存概率
时间[年]
通路 LoF 突变
(1) 无
(2) m6A; mcm5
(3) s2U
(4) mcm5; s2U
(5) mcm5
(6) m6A
(7) m6A; s2U
(8) m6A; mcm5; s2U

图8(续)