



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106574307 A

(43)申请公布日 2017.04.19

(21)申请号 201580046512.4

(22)申请日 2015.07.01

(30)优先权数据

62/020990 2014.07.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.02.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/038761 2015.07.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/004165 EN 2016.01.07

(71)申请人 雅培分子公司

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 Y.张 E.佩斯托瓦 J.杜 P.刘

T.科尔皮茨

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 周齐宏

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书6页 说明书46页 附图7页

(54)发明名称

用于评估前列腺癌的进展的材料和方法

(57)摘要

区分和鉴定具有侵袭性/惰性前列腺腺癌的患者方法,其包括在杂交条件下使来自患者的样品与可检测标记的探针组接触,并确定样品中染色体异常的存在;用于这样的方法的探针组;和包含探针组和用于将患者区分或鉴定为具有侵袭性/惰性前列腺腺癌的说明书的试剂盒。

1. 区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者和具有惰性前列腺腺癌的方法,所述方法包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,

(v) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,

(vi) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(vii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,

(viii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和染色体8的染色体计数探针(CEP8),

(ix) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(x) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(xi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,

(xiii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,

(xiv) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xv) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xvi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(xvii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,或

(xviii) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

其中组(i)-(vi)、(viii)、(xi)、(xiv)、(xv)和(xvii)中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%损失,

其中组(vii)、(ix)和作为FGFR1的%损失的替代方案的(xiv)中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%增加,

其中组(ix)-(xiv)、(xvi)和(xviii)中的CEP8用于确定CEP8的%损失,

其中组(iii)和(viii)中的PTEN的基因座特异性探针用于确定PTEN的%纯合损失,

其中组(xvi)中的PTEN的基因座特异性探针用于确定PTEN的%损失,且

其中组(viii)和作为FGFR1的%增加的替代方案的(ix)中的FGFR1和CEP8的基因座特异性探针用于确定FGFR1/CEP8比率的%损失,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于30,

其中FGFR1 %损失(%损失是FGFR拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于15至小于或等于40,

其中FGFR1 %增加(%增加是FGFR拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于46,

其中CEP8 %损失(%损失是CEP8拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于21至小于或等于36,

其中CEP8 %增加(%增加是CEP8拷贝数>2的细胞的%)大于或等于15至小于或等于40,

其中FGFR1/CEP8 %损失大于或等于13至小于或等于72,

其中PTEN %纯合损失(%纯合损失是PTEN拷贝数为零的细胞的%)大于或等于2且小于或等于40,

其中PTEN %损失(%损失是PTEN拷贝数小于2的细胞的%)大于或等于10至小于或等于50,

其中ERG 2+Ede1大于或等于1至小于或等于30,

其中MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于30,

其中MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于20,

其中NKX3.1 %损失(%损失是NKX3.1拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于10至小于或等于50,

其中ETV1 %易位/缺失大于或等于1至小于或等于20,

其中P27 %损失(%损失是P27拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于10至小于或等于50,或

其中AURKA %增加(%增加是AURKA拷贝数>2的细胞的%)大于或等于1至小于或等于20表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,

而上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌,

由此区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者与具有惰性前列腺腺癌的患者。

2. 权利要求1的方法,其中如果患者已经进行了前列腺切除术,则所述样品中的染色体异常的存在的确定表明所述患者具有复发或转移的高风险。

3. 权利要求2的方法,其进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗以抑制或预防复发或转移。

4. 权利要求1的方法,其中如果患者被最初诊断为具有前列腺癌且所述患者具有发展

侵袭性前列腺腺癌的高风险,所述方法进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗。

5. 权利要求1的方法,其中如果所述患者被最初诊断为具有前列腺腺癌且所述患者具有惰性前列腺腺癌,则所述方法进一步包括推荐主动监测或观察等待。

6. 鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者,所述方法包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,或

(v) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中对于(i) 大于或等于26的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%) 和/或大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%),

其中对于(ii) 大于或等于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%) 和/或大于或等于10的ERG % $2 + \text{Ede1}$,

其中对于(iii) 大于或等于8的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于10的ERG % $2 + \text{Ede1}$ 和/或大于或等于20的PTEN % 纯合损失,

其中对于(iv) 大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于10的ERG % $2 + \text{Ede1}$ 和/或大于或等于20的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数 > 2 的细胞的%),或

其中对于(v) 大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于10的ERG % $2 + \text{Ede1}$ 和/或大于或等于10的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数 > 2 的细胞的%)

表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,由此鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者。

7. 权利要求6的方法,其中(i) 进一步由以下组成,或(ii)-(v) 中任意项进一步包含以下:染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针和/或ETV1的分离探针。

8. 权利要求6或7的方法,其进一步包括获得选自以下的临床参数:Gleason评分、肿瘤分期、前列腺特异性抗原(PSA) 水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄,其中任一种可以与确定染色体异常的存在组合用于预后。

9. 权利要求6-8中任一项的方法,其包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与可检测标记的探针组接触,所述探针组包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中大于或等于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%) 和大于或等于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。

10. 鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者方法,所述方法包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,或

(v) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中对于(i) 大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%) 和/或大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%),

其中对于(ii) 大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%) 和/或大于或等于2的ERG % 2+Ede1,

其中对于(iii) 大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的PTEN %纯合损失,

其中对于(iv) 大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于18的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数 > 2 的细胞的%),或

其中对于(v) 大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于3的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数 > 2 的细胞的%)

表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌,

由此鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者。

11. 权利要求10的方法,其中(i) 进一步由以下组成,或(ii)-(v) 中任一种进一步包含以下:染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探

针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针和/或ETV1的分离探针。

12. 权利要求10或11的方法,其进一步包括获得选自以下的临床参数:Gleason评分、肿瘤分期、PSA水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄,其中任一种可以与确定染色体异常的存在组合用于预后。

13. 权利要求10-12中任一项的方法,其包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与可检测标记的探针组接触,所述探针组包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和ERG的分离探针,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于20的PTEN %纯合损失和大于或等于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。

14. 可检测标记的探针组,其中所述探针组为:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和染色体8的染色体计数探针,

(v) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(vi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(vii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(viii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,

(ix) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,

(x) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xi) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(xiii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针、FGFR1

的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,或

(xiv) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针和ERG的分离探针。

15. 权利要求14的探针组,其进一步包含可检测标记的染色体8的染色体计数探针、可检测标记的染色体10的染色体计数探针、可检测标记的AURKA的基因座特异性探针、可检测标记的NKX3.1的基因座特异性探针、可检测标记的P27的基因座特异性探针和/或可检测标记的ETV1的分离探针。

16. 探针组,其包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针和可检测标记的ERG的分离探针。

17. 权利要求16的探针组,其进一步包含可检测标记的PTEN的基因座特异性探针。

18. 权利要求16的探针组,其进一步包含可检测标记的MYCN的基因座特异性探针。

19. 权利要求16的探针组,其进一步包含可检测标记的MDM2的基因座特异性探针。

20. 权利要求16-19中任一项的探针组,其进一步包含可检测标记的染色体8的染色体计数探针、可检测标记的染色体10的染色体计数探针、可检测标记的AURKA的基因座特异性探针、可检测标记的NKX3.1的基因座特异性探针、可检测标记的P27的基因座特异性探针和/或可检测标记的ETV1的分离探针。

21. 试剂盒,其包含用于进行权利要求1-5中任一项的方法的探针组和说明书。

22. 试剂盒,其包含用于进行权利要求6-8中任一项的方法的探针组和说明书。

23. 权利要求22的试剂盒,其包含:

(a) 能够鉴定具有侵袭性前列腺腺癌的患者探针组,其中所述探针组包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针和可检测标记的ERG的分离探针,和

(b) 用于鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者的说明书,其中所述说明书包括确定从患者获得的样品中的染色体异常的存在,

其中大于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%) 和大于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。

24. 试剂盒,其包含用于进行权利要求10-12中任一项的方法的探针组和说明书。

25. 权利要求24的试剂盒,其包含:

(a) 能够鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者探针组,其中所述探针组包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针、可检测标记ERG的分离探针和可检测标记的PTEN的基因座特异性探针,和

(b) 用于鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者说明书,其中所述说明书包括确定从患者获得的样品中的染色体异常的存在,

其中大于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于20的PTEN % 纯合损失和大于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。

用于评估前列腺癌的进展的材料和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求于2014年7月3日提交的美国临时申请号62/020,990的优先权,所述申请全文通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于评估前列腺癌的进展的方法以及可用于这样的方法的探针组和试剂盒。

[0003] 背景

前列腺癌是男性中最常见的恶性肿瘤,并且是男性中在肺癌后的第二大死亡原因。在2012年估计有241,740个新病例,导致28,170人死亡(www.cancer.gov)。大多数肿瘤限于前列腺,且大多数患者发展临床上不显著的前列腺癌,而其它患者发展快速致命的弥散性疾病。

[0004] 目前,约30%的前列腺癌在根治性前列腺切除术(RP)后复发。鉴定具有高复发风险的患者是一个挑战。前列腺癌的自然病史是极端可变的,并且通过现有方法(例如,Gleason评分)是相当不可预测的。需要手术后肿瘤复发的有效预测物,以确定是否应当立即用辅助疗法来治疗患者。具有非生物恶性肿瘤的患者不会受益于这样的医学干预。前述情况,加上与明显局部疾病的RP相关的显著发病率以及RP的高成本,强调了发现可靠的分子标志物以预测个体癌的行为的重要性。

[0005] 已经公开了各种标志物和方法。例如,已经公开了通过荧光原位杂交(FISH)测量HER-2/neu基因的扩增水平是一种确定前列腺癌的严重程度的方法(国际专利申请公开号WO 1998/045479;''479申请)。根据'479申请的方法,侵袭性治疗具有5个或更多个Her-2/neu拷贝的患者。已经公开了确定扩增的8q24.1-24.2染色体带区段的存在是一种诊断前列腺癌进展的方法(美国专利号5,658,730)。已经公开了确定8p21-22基因座的损失、染色体8的增加和c-myc的拷贝数相对于着丝粒拷贝数的额外增加是一种预测前列腺癌的方法(美国专利号6,613,510)。也已经公开了8q24 (c-myc)的增加和8p21-22的杂合性损失(LOH)(Bova等人,Cancer Res.53:3869-3873 (1993);和Kagan等人,Oncogene 11:2121-2126 (1995);关于8p12-21的等位基因损失,还参见Emmert-Buck等人,Cancer Res.55:2959-2962 (1995))和10q23(PTEN)(Yoshimoto等人,Br. J. Cancer 97(5):678-685 (2007年9月3日;2007年8月14日电子出版)。已经公开了测试染色体1-22中的一个或多个上的一个或多个基因座处杂合性的损失作为一种检测具有肿瘤或癌前表型的细胞的方法(美国专利申请公开号2003/0165895;''895申请)。公开了'895申请的方法适用于检测与各种癌症的进展相关的遗传变化。已经公开了诸如在鉴定肿瘤的证据的方法中的20P1F12/TMPRSS2的分析可用于评估前列腺癌(美国专利号7,037,667)。已经公开了检测TMPRSS2的5'部分和ERG、ETV1、ETV4或FLI1的3'部分之间的融合体以及PCA3核酸分子的存在作为另一种鉴定或表征前列腺癌的方法(美国专利号8,580,509;还参见美国专利号8,211,645和7,718,369以及美国专利申请公开号2012/0295809)。一种包括检测选自FOXO1A、SOX9、CLNS1A、PTGDS、

XP01、LETMD1、RAD23B、ABCC3、APC、CHES1、EDNRA、FRZB、HSPG2和TMPRSS:ETV1的三种或更多种生物标志物的预测前列腺癌的复发、进展和转移潜能的方法公开于美国专利申请公开号2011/0230361和国际专利申请公开号WO 2010/056993中。筛选具有ERG-活化或ERG-易位的前列腺癌患者以评价对抗ERG疗法的反应性公开于国际专利申请公开号WO 2008/023087。已经报道了检测TMPRSS2:ERG融合体、其重复和5'间质缺失至ERG连同Gleason评分和PSA水平,使得能够将患有前列腺癌的患者分层(Attard等人,Oncogene 27(3):253-263(2008年1月);2007年7月16日电子出版)。已经公开了检测ERG的过表达以及ERG的3'部分与雄激素调节基因(诸如TMPRSS2、NDRG1、SLC45A3或PSA)的5'部分的融合体,用于早期诊断前列腺癌(美国专利申请公开号2012/0220672;还参见美国专利申请公开号2012/0039889, re ERG:NDRG1融合体中)。HERPUD1:ERG和AX747630:ETV1融合体在鉴定患者中的前列腺癌中的用途已经公开于美国专利申请公开号2012/0015839(对于其它ERG和ETV1基因融合体的用途,还参见美国专利申请公开号2009/0239221和2009/0208937)。MIPOL1:ETV1检测前列腺癌的用途公开于美国专利申请公开号2011/0028336中,而ACSL3:ETS、诸如ACSL3:ETV1将患者诊断为具有前列腺癌、具有侵袭性前列腺癌或可能发展前列腺癌和评估患者中的前列腺肿瘤是否适合于抗雄激素疗法的用途公开于国际专利申请公开号WO 2009/0144460(“'460申请”)中。在'460申请中还公开了ETV1融合体来评估前列腺癌的Gleason评分和/或临床分期和确定前列腺癌的预后的用途。已经公开了检测ARG-ETS基因融合体诸如ARG:ERG和ARG:ETV1作为一种筛选前列腺肿瘤的方法(加拿大专利申请号2814598)。美国专利申请公开号2012/0214684公开了选自OCT3/4、Nanog、Sox2、c-Myc、Klf4、角蛋白8和uPAR的标志物在检测肿瘤诸如前列腺癌、表征前列腺癌的侵袭性、监测疗法的有效性和选择治疗中的用途。除了其它方法,通过检查选自包括ETV1的组的基因的表达产物的水平来评估癌症的进展和诊断癌、黑色素瘤、结肠癌和前列腺癌的方法公开于美国专利申请公开号2007/0237770中。测量单独或与PTEN进一步组合的至少两种细胞周期基因(诸如AURKA)已经公开于美国专利申请公开号2012/0041274中的癌症诸如前列腺癌的分类中。单独或与PTEN RNA进一步组合的MYC RNA用于评估存活性的用途已经公开于美国专利申请公开号2012/0009581中。通过定量至少两种蛋白诸如PTEN来确定疾病诸如癌症(例如,前列腺癌)的存活(例如,诊断、预后、反应预测和/或相对存活率)公开于美国专利申请公开号2011/0306514中。PCA3和至少一种选自包括TMPRSS2:ERG的组的其它标志物用于检测前列腺癌的用途公开于国际专利申请公开号WO 2009/0140741中。一种包括确定扩增的8q24染色体带区段的存在的诊断前列腺癌进展或前列腺癌复发的方法公开于国际专利申请公开号1996/020288中。包含探针、除DMSO以外的极性非质子溶剂、小于10%的甲酰胺和杂交溶液的杂交组合物用于检测病况诸如癌症(例如,前列腺癌)的用途公开于美国专利申请公开号2011/0281263中。杂交组合物中的探针尤其可以检测例如c-MYC、MYCN、PTEN、MDM2、FGFR1、AURKA、CEP8或CEP10。一种通过确定选自ABP280 (FLNA)、AMACR、AR、BM28、BUB3、CaMKK、CASPASE3、CDK7、DYNAMIN、E2F1、E-CADHERIN、EXPORTIN、EZH2、FAS、GAS7、GS28、ICBP90、ITGA5、JAGGED1、JAM1、KANADAPTIN、KLF6、KRIP1、LAP2、MCAM、MIB1 (MK167)、MTA1、MUC1、MYSOIN-VI、P27、P63、PAXILLIN、PLCLN、PSA (KLK3)、BAP27、RBBP、RIN1、SAPK α 、TPD52、XIAP和ZAG的基因集合的表达水平来表征前列腺组织的方法公开于美国专利申请公开号2006/0234259中;所述方法据报道可以包括预后,诸如预测前列腺疾病进展。在评估癌症复发或转移发展的风险的方法中测量选自372个

决定簇的列表的两个或更多个决定簇的水平公开于美国专利申请公开号2011/0265197中；所述方法可以据报道包括测量前列腺癌的标准参数诸如Gleason评分。在前列腺癌的诊断或预后中测量单独或与AMACR表达水平进一步组合的ERG表达水平也已经公开于美国专利申请公开号2013/029860中（对于其它ERG相关基因在筛选前列腺癌等中的用途，还参见美国专利申请公开号2010/0215638）。已经公开了检测选自CSPG2、WNT10B、E2F3、CDKN2A、TYMS、TGFB3、ALOX12、CD44、LAF4、CTNNA1、XPO1、PTGDAS、SOX9、RELA、EPB49、SIM2、EDNRA、RAD23B、FBP1、TNFRSF1A、CCNG2、LETMD1、NOTCH3、ETV1、BID、SIM2、ANXA1、BCL2、FOXO1A、CLNS1A、PTGDS、XPO1、LETMD1、RAD23B、ABCC3、APC、CHES1、EDNRA、FRZB、HSPG2、TMPRSS2、ETV1、CSPG2、CDKN2A和其它的一种或多种生物标志物（例如RNA或蛋白质）用于预测癌症的复发、进展和转移潜能（参见美国专利申请公开号2013/0005837）。已经报道了FGFR1、PMP22和CDKN1A的组合准确地预测低Gleason评分肿瘤的结果（Irshad等人，Sci. Transl. Med. 5(202):202（2013年9月11日））。一种包括检测选自包括FGFR1的73种基因的组的基因的差异表达的诊断癌症诸如前列腺癌的方法公开于加拿大专利申请号2604844（还参见欧洲专利申请号2083088）。也已经公开了PCA3和前列腺特异性标志物（例如，NKX3.1）诸如其比率预测、评估肿瘤体积、监测、确定进展风险和分期前列腺癌的用途（美国专利号8,257,924）。选自PSA/KLK3、PMEPA1、NKX3.1、ODC1、AMD1和ERG的两种或更多种基因预测前列腺癌或评估雄激素受体信号传导（诸如通过检测或测量表达）的用途公开于加拿大专利申请号2719172中。选自her2/neu、p16、p53、Ki67、MN、mdm-2、bcl-2和EGFR的至少两种分子标志物在用于鉴定细胞/组织样品、诸如从前列腺获得的样品中的癌细胞及其前体细胞的自动化方法中的用途公开于美国专利号7,452,727中。一种包括确定由8p21-22、染色体8和C-MYC的探针组成的染色体探针组的杂交模式预测前列腺癌的方法公开于美国专利号6,613,510中。已经公开了ERG、TFF3和高分子量细胞角蛋白的抗体检测前列腺癌的用途，包括通过IHC的ERG表达和通过FISH的ERG基因状态（即，重排）之间的完全一致性，尽管没有观察到ERG/TFF3表达和参数诸如年龄、PSA、Gleason评分、肿瘤分期和生化复发之间的关联（国际专利申请公开号WO 2013/0173463）。c-Myc、Ha-Ras、NeuT和/或c-Src的表达水平在诊断前列腺癌、将前列腺癌/肿瘤分类为不同的前列腺癌亚类和（与ErbB2进一步组合）分层具有肿瘤（诸如，前列腺肿瘤）的患者用于临床试验中的用途公开于美国专利申请公开号2014/0109245中。选自TARDBP、TLN1、PARK7、ISPI1、CALD1、p73、PTEN、PXN、PEX10、KL3、DBN1、NFAT1、B-微管蛋白、SOS1、HSF4、TOP1、HSPA1A、ACID2、STAT2、p53、CHD3、CASP8、STX6、AR、GAPDHS、细胞周期蛋白D1和CCNA2的两种或更多种标志物诊断评估受试者的前列腺癌的用途公开于美国专利申请公开号2014/0066325中。一种包括单独或与ERG重排进一步组合确定AURKA和/或MYCN的过表达/扩增的亚型分析前列腺癌（例如，发展致死性神经内分泌前列腺癌（NEPC）的风险）的方法公开于美国专利申请公开号2014/037647中。选自HOXA7、AURKA、NEK2、FOXM1B、CCNB1、CEP55、CENPA、DNMT3B、DNMT1、HELLS、MAPK8、BMI1、ITGB1、IVL和CTNNB1的五种或更多种标志物诊断或监测癌症诸如前列腺癌的进展的用途公开于国际专利申请公开号2012/013931中。已经公开了使用FISH检测 SMRT基因座处人染色体12q24的序列中的断裂作为一种确定前列腺癌转移的可能性的方法（美国专利号7,425,414）。已经公开了测定组分诸如PTEN RNA的水平以评价前列腺癌、评估/监测前列腺癌患者中对治疗的反应以及监测前列腺癌的进展（国际专利申请公开号WO 2008/121132）。诸如通过检测mRNA、蛋白或基因组序列变化

(例如,扩增、缺失或融合)来检测ERG的表达增加和PTEN的表达降低,以确定前列腺癌的侵袭性或前列腺癌已经渗透或可能渗透前列腺囊公开于美国专利申请公开号2013/0196866中,其为检测PTEN的表达降低以确定前列腺癌的复发。(i) MYC、PTEN、CEP8和CEP7,(ii) MYC、LPL、PTEN和CEP8或(iii) MYC和CEP8在检测前列腺癌中的用途公开于美国专利申请公开号2013/0171638中。已经公开了PITX2的过表达的检测作为一种用于诊断前列腺癌的存在或风险的方法,并且与至少一种其它因子诸如PSA或Gleason等级组合,作为一种用于预后前列腺癌的方法(国际专利申请公开号W0 2010/099577)。已经公开了鉴定选自OCT3/4、Nanog、Sox2、c-myc、Klf4、角蛋白8和uPAR的核酸或多肽的增加水平作为一种鉴定前列腺癌的方法,一种表征前列腺癌的侵袭性的方法、一种鉴定发展转移性前列腺癌的倾向的方法以及其它方法(国际专利申请公开号2011/037643)。一种包括测定p27或其表达产物的表达水平的预测患者中治疗后癌症复发的可能性的方法公开于美国专利申请公开号2003/0225528中,而一种包括检测p27蛋白的确定前列腺癌的侵袭性的方法公开于国际专利申请公开号W0 2000/077258中,其还公开了一种包括检测MDM2表达的测定前列腺癌增殖速率的方法(还参见加拿大专利申请号2,375,228)。一种包括测试样品在一个或多个染色体上的一个或多个基因座处的杂合性损失(LOH)、诸如与从肿瘤前期至侵袭性癌的进展相关的那些的检测具有肿瘤或癌前表型的细胞的方法公开于美国专利申请公开号2003/0165895中。一种包括在可重复条件下定量测量至少一种RNA(例如,MYC)、使得所述测量以至少75%准确度区分前列腺癌与黑色素瘤、肺癌和结肠癌的评价前列腺癌的方法公开于美国专利申请公开号2011/097717(还参见美国专利申请公开号2010/0233691)中。一组由DUSP6、SPRY2和选自包括ETV1的约33种基因的组的一种或多种生物标志物组成的分离的癌症生物标志物公开于美国专利申请公开号2008/013188中。

[0006] 鉴于上述情况,仍然需要前列腺癌的控制的更可靠且信息量大的预后方法。本发明寻求提供用于评估前列腺癌的进展的标志物组以及使用方法和包括标志物组的试剂盒。本文和其它目的和优点以及发明特征从本文提供的详细描述将变得显而易见。

[0007] 概述

提供了区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者和具有惰性前列腺腺癌的方法。所述方法包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针(break-apart probe),

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,或

(v) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,

(vi) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探

针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针，

(vii) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针，

(viii) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和染色体8的染色体计数探针 (CEP8)，

(ix) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针，

(x) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针，

(xi) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针，

(xii) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针，

(xiii) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针，

(xiv) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针，

(xv) 可检测标记的探针组，其包含AURKA的基因座特异性探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针，

(xvi) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针，

(xvii) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针，或

(xviii) 可检测标记的探针组，其包含AURKA的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针和ERG的分离探针，

其中组 (i) - (vi)、(viii)、(xi)、(xiv)、(xv) 和 (xvii) 中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%损失，

其中组 (vii)、(ix) 和作为FGFR1的%损失的替代方案的 (xiv) 中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%增加，

其中组 (ix) - (xiv)、(xvi) 和 (xviii) 中的CEP8用于确定CEP8的%损失，

其中组 (iii) 和 (viii) 中的PTEN的基因座特异性探针用于确定PTEN的%纯合损失，

其中组 (xvi) 中的PTEN的基因座特异性探针用于确定PTEN的%损失，且

其中组 (viii) 和作为FGFR1的%增加的替代方案的 (ix) 中的FGFR1和CEP8的基因座特异性探针用于确定FGFR1/CEP8比率的%损失，和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在，

其中MYC %增加 (%增加是MYC拷贝数 > 2的细胞的%) 大于或等于2至小于或等于30，

其中FGFR1 %损失 (%损失是FGFR拷贝数 < 2的细胞的%) 大于或等于15至小于或等于40，

其中FGFR1 %增加 (%增加是FGFR拷贝数 > 2的细胞的%) 大于或等于2至小于或等于46，

其中CEP8 %损失(%损失是CEP8拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于21至小于或等于36,

其中CEP8 %增加(%增加是CEP8拷贝数>2的细胞的%)大于或等于15至小于或等于40, 其中FGFR1/CEP8 %损失大于或等于13至小于或等于72,

其中PTEN %纯合损失(%纯合损失是PTEN拷贝数为零的细胞的%)大于或等于2至小于或等于40,

其中PTEN %损失(%损失是PTEN拷贝数小于2的细胞的%)大于或等于10至小于或等于50,

其中ERG 2+Ede1大于或等于1至小于或等于30,

其中MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于30,

其中MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于20,

其中NKX3.1 %损失(%损失是NKX3.1拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于10至小于或等于50,

其中ETV1%易位/缺失大于或等于1至小于或等于20,

其中P27 %损失(%损失是P27拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于10至小于或等于50, 或

其中AURKA %增加(%增加是AURKA拷贝数>2的细胞的%)大于或等于1至小于或等于20

表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,而上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。如果患者已经进行了前列腺切除术,则所述样品中的染色体异常的存在确定表明所述患者具有复发或转移的高风险,在所述情况下,所述方法可以进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗以抑制或预防复发或转移。如果所述患者被最初诊断为具有前列腺癌且所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,则所述方法可以进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗。如果所述患者被最初诊断为具有前列腺癌且所述患者具有惰性前列腺腺癌,则所述方法可以进一步包括推荐主动监测或观察等待。

[0008] 提供了鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者的方法。所述方法包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,或

(v) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在。对于(i) 大于或等于26的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%) 和/或大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数< 2的细胞的%),而对于(ii) 大于或等于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞

的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)和/或大于或等于10的ERG % 2+Ede1,对于(iii)大于或等于8的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的PTEN %纯合损失,对于(iv)大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%),或对于(v)大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于10的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%)表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。(i)的探针组可以进一步由以下组成,或(ii)-(v)的探针组中任一种可以进一步包含以下:染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针和/或ETV1的分离探针。所述方法可以进一步包括获得临床参数,诸如选自Gleason评分、肿瘤分期、前列腺特异性抗原(PSA)水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄的临床参数,其中任一种可以与确定染色体异常的存在组合用于预后。因此,在一个实施方案中,所述方法包括(a)在杂交条件下使来自所述患者的样品与可检测标记的探针组接触,所述探针组包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,和(b)确定所述样品中的染色体异常的存在,其中大于或等于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)和大于或等于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。

[0009] 还提供了鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者方法。所述方法包括:

(a)在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触:

(i)可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

(iii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(iv)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,或

(v)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,和

(b)确定所述样品中的染色体异常的存在。对于(i)大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%) 和/或大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%),而对于(ii)大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%) 和/或大于或等于2的ERG % 2+Ede1,对于(iii)大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG

% 2+Ede1和/或大于或等于20的PTEN %纯合损失,对于(iv)大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于18的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%),或对于(v)大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于3的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%)表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。(i)的探针组可以进一步由以下组成,或(ii)-(v)的探针组中任一种可以进一步包含以下:染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针和/或ETV1的分离探针。所述方法可以进一步包括获得临床参数,诸如选自Gleason评分、肿瘤分期、PSA水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄的临床参数,其中任一种可以与确定染色体异常的存在组合用于预后。因此,在一个实施方案中,所述方法包括(a)在杂交条件下使来自所述患者的样品与可检测标记的探针组接触,所述探针组包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和ERG的分离探针,和(b)确定所述样品中的染色体异常的存在,其中大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于20的PTEN %纯合损失和大于或等于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。

[0010] 还提供了探针组。在一个实施方案中,所述探针组是:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和染色体8的染色体计数探针,

(v) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(vi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(vii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(viii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,

(ix) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,

(x) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探

针、ETV1的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xi) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(xiii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,或

(xiv) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针和ERG的分离探针。所述探针组可以进一步包含可检测标记的染色体8的染色体计数探针、可检测标记的染色体10的染色体计数探针、可检测标记的AURKA的基因座特异性探针、可检测标记的NKX3.1的基因座特异性探针、可检测标记的P27的基因座特异性探针、和/或可检测标记的ETV1的分离探针。

[0011] 在另一个实施方案中,所述探针组包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针和可检测标记的ERG的分离探针。所述探针组可以进一步包含可检测标记的PTEN的基因座特异性探针、可检测标记的MYCN的基因座特异性探针、可检测标记的MDM2的基因座特异性探针、可检测标记的染色体8的染色体计数探针、可检测标记的染色体10的染色体计数探针、可检测标记的AURKA的基因座特异性探针、可检测标记的NKX3.1的基因座特异性探针、可检测标记的P27的基因座特异性探针和/或可检测标记的ETV1的分离探针。

[0012] 还提供了试剂盒。所述试剂盒包含能够区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者和具有惰性前列腺腺癌的患者患者的探针组,诸如如上所述的探针组,以及用于进行上述方法的说明书。可选地,所述试剂盒包含能够鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者或鉴定具有惰性腺癌的患者患者的探针组,诸如如上所述的探针组,以及用于进行上述方法的说明书。

[0013] 在一个实施方案中,所述试剂盒包含(a)能够鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者患者的探针组,其中所述探针组包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针和可检测标记的ERG的分离探针,和(b)用于鉴定具有侵袭性前列腺腺癌的患者患者的说明书,其中所述说明书包括在从患者获得的样品中确定染色体异常的存在。大于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%) and 大于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。

[0014] 在另一个实施方案中,所述试剂盒包含(a)能够鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者患者的探针组,其中所述探针组包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针、可检测标记的ERG的分离探针和可检测标记的PTEN的基因座特异性探针,和(b)用于鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者患者的说明书,其中所述说明书包括在从患者获得的样品中确定染色体异常的存在。大于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于20的PTEN % 纯合损失和大于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。

[0015] 附图简述

图1是FGFR1增加的KM曲线(PFS(无进展存活期);年) vs. 存活概率),其中截止值为6且对数秩p-值为0.0062。

[0016] 图2是FGFR1损失的KM曲线(PFS(年) vs. 存活概率),其中截止值为40且对数秩p-值为0.0009。

[0017] 图3是CMYC增加、ERG 2+Ede1和FGFR1损失的KM曲线(PFS(年) vs. 存活概率),其中对数秩p-值为0.0001。

[0018] 图4是CMYC增加、ERG 2+Ede1、FGFR1损失和PTEN的纯合损失的KM曲线(PFS(年) vs. 存活概率),其中对数秩p-值为0.0048。

[0019] 图5A是ROC曲线,其为1-特异性(假阳性) vs. 灵敏度(真阳性)的图,其显示具有单独Gleason评分的AUC。

[0020] 图5B是ROC曲线,其为1-特异性(假阳性) vs. 灵敏度(真阳性)的图,其显示具有异常FISH参数CMYC增加、ERG 2+Ede1、FGFR1损失和PTEN纯合损失的组合的AUC。

[0021] 图5C是ROC曲线,其为1-特异性(假阳性) vs. 灵敏度(真阳性)的图,其显示具有Gleason评分和异常FISH参数CMYC增加、ERG 2+Ede1、FGFR1损失和PTEN纯合损失的组合的AUC。

[0022] 详述

本发明提供了探针组,包含探针组和用于实施方法的说明书的试剂盒,使用探针组的方法或包含探针组的试剂盒,以区分或鉴定患有侵袭性前列腺腺癌或惰性前列腺腺癌的患者。所述方法可用于评估疾病进展(包括复发和死于疾病(DOD))的风险,诸如在例如通过根治性前列腺切除术治疗前列腺腺癌(或前列腺癌)之后评估疾病进展的风险。该方法还可用于随时间监测患者,诸如已经被鉴定为具有惰性、前列腺腺癌的患者,以及已经被鉴定为具有侵袭性、前列腺腺癌并且正在或将诸如用辅助治疗(例如,雄激素剥夺)治疗的患者。所述方法还可用于确认组织学风险预测的结果和新型基于尿液或血液的检测/筛选方法的结果。因此,所述方法可用于鉴定患者用于主动监测或观察等待,潜在地减少活组织检查的频率,并且潜在地减少不必要的根治性前列腺切除术,由此改善患者的生活质量。以下术语与本发明相关:

“2 + Ede1”在本文中可用于指ERG基因融合体、例如TMPRSS2:ERG基因融合体的重复,以及ERG基因5'序列的中间缺失。

[0023] “约”是指与所述值约 $\pm 10\%$ 的变化。应当理解,这样的变化总是包括在本文提供的任何给定值内,无论是否具体提及它们。

[0024] “腺癌”、“前列腺腺癌”、“前列腺的癌”和“前列腺腺癌”在本文中可用于指在前列腺中的恶性生长(即,癌症)。

[0025] “AURKA”在本文中可用于指极光激酶A基因。Entrez Gene和HGNC细胞遗传学带是20q13,而Ensembl细胞遗传学带是20q13.2。AURKA的别名包括ARK1、BTAK、STK15、STK6、ALK、PPP1R47、STK7、丝氨酸/苏氨酸激酶6、极光2、极光相关激酶1、极光/IPL1相关激酶1、乳腺癌肿瘤扩增激酶、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶15、丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶6、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶极光-A、ARK-1、AURA、hARK1、AURORA2、AurA、丝氨酸/苏氨酸激酶15、极光/IPL1样激酶、乳腺癌肿瘤扩增激酶、IPL1相关激酶、蛋白磷酸酶1调节亚基47、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶15、AIRK1、AYK1、EC2.7.11.1和IAK1。“AURKA”在本文中也用于指用于确定涉及AURKA的染色体

异常诸如拷贝数增加的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及AURKA的参数,诸如AURKA的拷贝数、涉及AURKA的拷贝数比或AURKA的百分比增加的探针,优选杂交至包含AURKA基因的染色体20的q13区域(20q13)。DNA参考序列包括但不限于NC_000020.10和NT_011362.10。

[0026] 如美国国立卫生研究院定义的“生物标志物”是“被客观测量和评估为正常生物过程、致病过程或治疗干预的药理反应的指标的特征”。

[0027] “分离探针”在本文中可用于指两种不同的可检测标记的探针的组合,所述探针能够检测易位。例如,一个探针可以杂交在给定基因的5'端或附近并且在一种波长处发荧光,而另一个探针可以杂交在给定基因的3'端或附近并且在不同波长处发荧光。当染色体在其天然状态时,颜色组合为单一颜色,例如黄色。当染色体经历易位时,颜色分离,例如红色和绿色。

[0028] “染色体计数探针(CEP)”或“着丝粒探针”在本文中可用于指使得在细胞中的特定染色体的数目能够被计数的任何探针。染色体计数探针通常识别并结合特定染色体的着丝粒附近的区域(称为“周缘着丝粒”)或着丝粒处的区域,通常为重复DNA序列(例如, α 卫星DNA)。染色体的着丝粒通常被认为代表该染色体,因为着丝粒是细胞分裂过程中忠实分离所需的。特定染色体区域的缺失或扩增可以分化于其通常所在的整个染色体的损失或增加(染色体异数(aneusomy)),通过比较对应于特定基因座的信号数目(拷贝数)与对应着丝粒的信号数目。用于进行这种比较的一种方法是将代表基因座信号的数目除以代表着丝粒的信号数目。小于1的比率指示基因座的相对损失或缺失并且大于1的比率指示基因座的相对增加或扩增。类似地,可以在同一染色体上的两个不同的基因座上进行比较,例如染色体的两个不同的臂上,以指示染色体不平衡的增加或损失。代替用于染色体的着丝粒探针,本领域技术人员将认识到染色体臂探针可以替代地用于近似全染色体损失或增加。然而,这样的探针在计数染色体中不够精确,因为对于这种探针的信号的损失可能并不总是指示整个染色体的损失。染色体计数探针的实例包括:购自Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL (原来Vysis, Inc., Downers Grove, IL)的CEP[®]探针。染色体计数探针或着丝粒探针的具体实例包括用于下列的探针:染色体1、染色体2、染色体3、染色体4、染色体5、染色体6、染色体7、染色体8、染色体9、染色体10、染色体11、染色体12、染色体13、染色体14、染色体15、染色体16、染色体17、染色体18、染色体19、染色体20、染色体21、染色体X和染色体Y。CEP[®]探针的具体实例包括CEP1、CEP2、CEP3、CEP4、CEP5、CEP6、CEP7、CEP8、CEP9、CEP10、CEP11、CEP12、CEP13、CEP14、CEP15、CEP16、CEP17、CEP18、CEP19、CEP20、CEP21、CEPX和CEPY。

[0029] “C-MYC”和“MYC”可在本文中可互换使用,是指c-myc癌基因。Entrez Gene和Ensembl细胞遗传学带是8q24.21,而HGNC细胞遗传学带是8q24。别名包括vHLHe39、c-Myc、v-myc禽髓细胞瘤病毒癌基因同源物、E类碱性螺旋-环-螺旋蛋白39、原癌基因c-Myc、转录因子p64、MRTL、禽髓细胞瘤病毒癌基因同源物、myc原癌基因蛋白、myc相关翻译/定位调节因子和BHLHE39。MYC在本文中也可用于指可用于确定涉及MYC的染色体异常、诸如MYC拷贝数增加的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及MYC的参数(诸如MYC的拷贝数,涉及MYC的拷贝数比率,或MYC的百分比增加)的探针,优选杂交至包含MYC基因的染色体8的q24区域(8q24)。DNA参考序列包括但不限于NC_000008.10和NT_

008046.16。

[0030] “拷贝数”在本文中可用于指对于无论是单个基因座、1个或多个基因座或整个基因组的DNA的测量。2 的“拷贝数”在人中是“野生型”(因为二倍体,除了性染色体)。2以外的“拷贝数”在人中(除了对于性染色体)偏离野生型。这样的偏离包括扩增(即拷贝数增加),和缺失(即,拷贝数减少,和甚至无拷贝数)。

[0031] “ERG”在本文中可用于指V-Ets禽成红细胞增多症病毒E26癌基因同源基因。Entrez Gene和HGNC细胞遗传学带是21q22.3,而Ensembl细胞遗传学带是21q22.2。别名包括V-Ets禽成红细胞增多症病毒E26癌基因相关、转录调节子ERG(转化蛋白ERG)、V-Ets成红细胞增多症病毒E26癌基因样、TMPRSS2-ERG前列腺癌特异性、erg-3、ets相关、p55、TMPRSS2/ERG融合体、转录调节子ERG,V-Ets成红细胞增多症病毒E26癌基因同源基因和转化蛋白ERG。“ERG”在本文中也可用于指用于确定涉及ERG的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及ERG的参数的探针优选杂交至包含ERG基因的染色体21的q22区域(21q22)。参考DNA序列包括NC_000021.8、NC_018932.2和NT_011512.11。

[0032] “ETV1”在本文中可以用于指Ets变体1基因。Entrez Gene细胞遗传学带是7p21.3,而Ensembl细胞遗传学带是7p21.2,且HGNC细胞遗传学带是7p22。别名包括Ets变体基因1、Ets相关蛋白81、ER81和ETS易位变体1。“ETV1”在本文中也可用于指用于确定涉及ETV1的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及ETV1的参数的探针优选杂交至包含ETV1基因的染色体7的p21-22区域(7p21-22)。参考DNA序列包括NC_000007.13、NT_007819.17、NC_018918.2和NT_079592.2。

[0033] “FGFR1”在本文中可用于指成纤维细胞生长因子受体1基因。Entrez Gene和HGNC细胞遗传学带是8p12,而Ensembl细胞遗传学带是8p11.22。别名包括FLT2、KAL2、Fms相关酪氨酸激酶2、碱性成纤维细胞生长因子受体1、Fms样酪氨酸激酶2、原癌基因C-Fgr、BFGFR、CEK、FGFBR、FGFR-1、FLG、FLT-2、HBGFR和bFGF-R-1、EC 2.7.10、EC2.7.10.1、OGD、法伊弗综合征(Pfeiffer syndrome)、CD331、CD331抗原、HH2、N-SAM、FGFR1/PLAG1融合体、肝素结合生长因子受体、羟基芳基蛋白激酶、N-SAM、N-sam、FGFR1/PLAG1融合体、肝素结合生长因子受体和羟基芳基蛋白激酶。“FGFR1”在本文中也可用于指用于确定涉及FGFR1的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及FGFR1的参数的探针优选杂交至包含FGFR1基因的染色体8的p11-12区域(8p11-12)。参考DNA序列包括NC_000008.10、NT_167187.1和NC_018919.2。

[0034] “纯合损失”、“杂合性的损失”和“LOH”在本文中可互换使用,指整个基因和周围染色体区域的两个拷贝的损失或失活。

[0035] “标记的”、“用可检测标记标记”和“可检测标记的”可在本文可互换使用,表示可以检测到一个实体(例如,探针)。“标记”和“可检测标记”在本文中可用于指连接至实体以使得实体可检测的部分,诸如连接至探针以使得所述探针在结合到靶序列后可检测的部分。所述部分本身可能无法检测到,但可以在与另一部分反应后变得可检测。使用术语“可检测标记”意在包括这样的标记。可以选择可检测标记,使得标记产生信号,所述信号可以被测量并且其强度与结合的实体的量成比例。多种用于标记和/或检测分子诸如核酸的系统,例如探针,是公知的。可以通过掺入或缀合标记来制备标记的核酸,所述标记通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电学、光学、化学或其它方式可以直接或间接被检测。合适

的可检测标记包括放射性同位素、荧光团、发色团、化学发光剂、微粒、酶、磁性粒子、电子致密颗粒、质量标记物、自旋标记物、半抗原等。本文优选荧光团和化学发光剂。

[0036] “基因座特异性探针”和“基因座特异性标识符(LSI)”可在本文中可互换使用,指这样的探针,所述探针在染色体上的区域内选择性结合特定基因座,例如,已被确定经历转移的增加/损失的基因座。探针可以靶向编码或非编码区,或者两者,包括外显子、内含子和/或调节序列,诸如启动子序列等。

[0037] “MDM2”在本文中可以用于指MDM2癌基因E3泛素蛋白连接酶基因。Entrez Gene细胞遗传学带是12q14.3-q15,而Ensembl细胞遗传学带是12q15,且HGNC细胞遗传学带是12q13-q14。别名包括癌蛋白MDM2、MDM2 P53结合蛋白同源物(小鼠)、MDM2 P53 E3泛素蛋白连接酶同源物(小鼠)、MDM2转化的3T3细胞双微小体2 p53结合蛋白(小鼠)、小鼠双微小体2 P53结合蛋白的人同源物、ACTFS、HDMX、双微小体2 P53结合蛋白的人同源物、E3泛素-蛋白连接酶MDM2、hdm2、MDM2 P53 E3泛素蛋白连接酶同源物、MDM2转化的3T3细胞双微小体2 p53结合蛋白、EC6.3.2、Hdm2、双微小体2蛋白和P53结合蛋白MDM2。“MDM2”在本文中也可用于指用于确定涉及MDM2的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及MDM2的参数的探针优选杂交至包含FGFR1基因的染色体12的q13-15区域(12q13-15)。参考DNA序列包括NC_000012.11、NT_029419.12和NC_018923.2。

[0038] “MYCN”在本文中可用于指V-Myc禽髓细胞瘤病毒癌基因神经母细胞瘤衍生的同源基因。Entrez Gene、Ensembl和HGNC细胞遗传学带是2p24.3。别名包括NMYC、E类碱性螺旋-环-螺旋蛋白37、bHLHe37、MODED、ODED、MYCN0T、N-myc、N-Myc原癌基因蛋白、神经母细胞瘤MYC癌基因、神经母细胞瘤来源的V-Myc禽髓细胞瘤病毒相关癌基因、癌基因NMYC、pp65/67、V-Myc禽髓细胞瘤病毒相关癌基因神经母细胞瘤来源的、V-Myc髓细胞瘤相关癌基因神经母细胞瘤来源的和BHLHE37。“MYCN”在本文中也可用于指用于确定涉及MDM2的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及MDM2的参数的探针优选杂交至包含MYCN基因的染色体2的p24区域(2p24)。参考DNA序列包括NC_000002.11、NC_018913.2和NT_005334.16。

[0039] “NKX3.1”在本文中可以用于指NK3同源盒1基因。Entrez Gene、Ensembl和HGNC细胞遗传学带是8p21.2。别名包括NKX3-1、NKX3A、同源盒蛋白NK-3同源物A、BAPX2、NK同源盒(果蝇)家族3A、NK3转录因子相关基因座1(果蝇)、NKX3、同源盒蛋白Nkx-3.1、NK同源盒家族3A、NK3转录因子同源物A和NK3转录因子相关基因座1。“NKX3.1”在本文中也可用于指用于确定涉及NKX3.1的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及MDM2的参数的探针优选杂交至包含NKX3.1基因的染色体8的p21区域(8p21)。参考DNA序列包括NC_000008.10、NC_018919.2和NT_167187.1。

[0040] “核酸样品”在本文中可用于指包含以适用于与探针杂交的形式的核酸的样品,诸如包含细胞核或从这种细胞核分离或纯化的核酸的样品。核酸样品可以包含全部或部分的(例如,特定染色体)基因组DNA、全部或部分的mRNA(例如,特定的染色体或基因),或选择的序列。凝聚染色体(诸如存在于间期或中期)适合在原位杂交诸如FISH中用作靶标。

[0041] “P27”在本文中可以用于指细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1B基因。Entrez Gene和HGNC细胞遗传学带是12p13.1-p12,而Ensembl细胞遗传学带是12p13.1。别名包括Kip1、KIP1、CDKN4、MEN4、MEN1B、P27KIP1、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂和p27Kip1。“P27”在本

文中也可用于指用于确定涉及P27的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及P27的参数的探针优选杂交至包含P27基因的染色体12的p13-12区域(12p13-12)。参考DNA序列包括NC_000012.11、NC_018923.2和NT_009714.17。

[0042] “预定截止值”和“预定水平”在本文中可用于指用于通过针对预定截止值/水平比较测定结果来评估诊断/预后/治疗效力结果的截止值,其中所述预定截止值/水平已经与各种临床参数(例如,疾病的严重程度,进展/无进展/改善等)联系或关联。

[0043] “探针”在本文中可用于指可以在允许或促进选择性杂交的条件下选择性杂交至靶序列的至少一部分的寡核苷酸或多核苷酸。通常,探针可以与DNA的编码链或正义(+)链互补或与DNA的非编码链或反义(-)链互补(有时被称为“反向互补”)。探针长度可以显著变化。约10至约100个核苷酸,诸如约15至约75个核苷酸,例如约15至约50个核苷酸的长度在一些应用中可以是优选的,而约50- 1×10^5 核苷酸的长度可以优选用于染色体探针并且约25,000至约800,000个核苷酸的长度可以优选用于基因座特异性探针。一般来说,诸如根据本文描述和本领域已知的方法,探针被可检测标记。

[0044] “预后”在本文中可用于指疾病的可能过程和/或结果的预测,诸如恢复的可能性。因此,预后包括疾病状态的改善,疾病状态的恶化,以及疾病状态无改变。

[0045] “进展”在本文中可以用于指复发和/或死于疾病(DOD)。

[0046] “前列腺癌”在本文中可以用于指所有类型的前列腺癌,诸如腺癌、小细胞癌、鳞状细胞癌、肉瘤和移行细胞癌。大多数前列腺癌(95%左右)是腺癌。前列腺癌与前列腺上皮内瘤形成(PIN,其进一步区分为低级或高级)区分开,后者是前列腺癌的前体。小细胞癌和鳞状细胞癌在自然界中倾向于非常具侵袭性,并且不导致前列腺特异性抗原(PSA)的增加。移行细胞癌很少在前列腺中发展,但源自膀胱和/或尿道中的原发性肿瘤。

[0047] “前列腺切除术”在本文中可以用于指去除部分或全部前列腺,其单独或与其它结构进一步组合。“简单”或“开放”前列腺切除术可以由增生性前列腺腺瘤的摘除组成。“根治性”前列腺切除术可以指整个前列腺、精囊和输精管的整体去除。这样的术语可在本文中可互换使用,并且一种的使用不意在排除另一种。

[0048] “PTEN”在本文中可用于指磷酸酶和张力蛋白同源基因。Entrez Gene细胞遗传学带是10q23.3,而Ensembl细胞遗传学带是10q23.31且HGNC细胞遗传学带是10q23。别名包括磷酸酶和张力蛋白样蛋白、磷脂酰肌醇3,4,5-三磷酸3-磷酸酶和双特异性蛋白磷酸酶、PTEN1、多种晚期癌症中突变1(mutated in multiple advanced cancers 1)、MMAC1、染色体10上缺失的MMAC1磷酸酶和张力蛋白同源物、BZS、MHAM、TEP1、GLM2、10q23del、CWS1、DEC、EC3.1.3.16、EC3.1.3.48和EC3.1.3.67。“PTEN”在本文中也可用于指用于确定涉及PTEN的染色体异常的探针或探针组。用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及PTEN的参数的探针优选杂交至包含PTEN基因的染色体10的q23区域(10q23)。参考DNA序列包括NC_000010.10、NC_018921.2和NT_030059.13。

[0049] “进展的风险”在本文中可以用于指疾病状态恶化、复发(诸如缓解后)和死于疾病(DOD)的风险。

[0050] 组织样品的“切片”是组织样品的单一部分或小块,例如从组织样品切下的组织或细胞薄片。可以取组织样品的两个或更多个切片并分析。如果需要,可以在多个水平、例如形态和分子水平(例如核酸和蛋白)分析单一切片。

[0051] “选择性杂交至”（以及，“选择性杂交”、“特异性杂交至”和“特异性杂交”）在本文中可用于指在严格条件下核酸分子与特定核苷酸序列的优先结合、成双链体或杂交。术语“严格条件”在本文中可用于指这样的条件，在该条件下，探针将优先杂交至其靶序列并且以较低程度或根本不杂交至其它非靶序列。在核酸杂交（例如，如在阵列、Southern杂交、Northern杂交或FISH中时）的情况下，“严格杂交”和“严格杂交洗涤条件”是序列依赖性的并且在不同条件下不同。对于核酸杂交的详细的指南见于，例如Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Part I, Ch. 2, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” Elsevier, NY (1993) (“Tijssen”)。通常，选择高度严格杂交和洗涤条件在确定的离子强度和pH下比特定序列的热解链点(T_m)低约5℃。 T_m 是这样的温度（在确定的离子强度和pH下），在这样的温度下，50%的靶序列杂交至完全匹配的探针。选择非常严格的条件为等于特定探针的 T_m 。在阵列上或在Southern或Northern印迹中滤膜上，互补核酸（具有超过100个互补残基）的杂交的严格杂交条件的一个实例是42℃使用标准杂交溶液（参见，例如Sambrook和Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY (2001)）。

[0052] “靶序列”、“靶区域”和“核酸靶”在本文中可用于指是位于其损失和/或增加例如被确定的特定染色体位置的核苷酸序列。

[0053] 本文所用的术语学目的仅在于描述特定实施方案，并且不以其它方式意图是限制性的。

[0054] 区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者和具有惰性前列腺腺癌的患者、鉴定具有侵袭性前列腺腺癌的患者和鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者的方法

提供了区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者和具有惰性前列腺腺癌的患者的方法。所述方法包括：

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触：

(i) 可检测标记的探针组，其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成，

(ii) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针，

(iii) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针，

(iv) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针，或

(v) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针，

(vi) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针，

(vii) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针，

(viii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和染色体8的染色体计数探针(CEP8),

(ix) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(x) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(xi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,

(xiii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,

(xiv) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xv) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xvi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(xvii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,或

(xviii) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

其中组(i)-(vi)、(viii)、(xi)、(xiv)、(xv)和(xvii)中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%损失,

其中组(vii)、(ix)和作为FGFR1的%损失的替代方案的(xiv)中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%增加,

其中组(ix)-(xiv)、(xvi)和(xviii)中的CEP8用于确定CEP8的%损失,

其中组(iii)和(viii)中的PTEN的基因座特异性探针用于确定PTEN的%纯合损失,

其中组(xvi)中的PTEN的基因座特异性探针用于确定PTEN的%损失,且

其中组(viii)和作为FGFR1的%增加的替代方案的(ix)中的FGFR1和CEP8的基因座特异性探针用于确定FGFR1/CEP8比率的%损失,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于30,

其中FGFR1 %损失(%损失是FGFR拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于15至小于或等于40,

其中FGFR1 %增加(%增加是FGFR拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于46,

其中CEP8 %损失(%损失是CEP8拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于21至小于或等于36,

其中CEP8 %增加(%增加是CEP8拷贝数>2的细胞的%)大于或等于15至小于或等于40,

其中FGFR1/CEP8 %损失大于或等于13至小于或等于72,

其中PTEN %纯合损失(%纯合损失是PTEN拷贝数为零的细胞的%)大于或等于2至小于或等于40,

其中PTEN %损失(%损失是PTEN拷贝数小于2的细胞的%)大于或等于10至小于或等于50,

其中ERG 2+Ede1大于或等于1至小于或等于30,

其中MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于30,

其中MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%)大于或等于2至小于或等于20,

其中NKX3.1 %损失(%损失是NKX3.1拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于10至小于或等于50,

其中ETV1%易位/缺失大于或等于1至小于或等于20,

其中P27 %损失(%损失是P27拷贝数< 2的细胞的%)大于或等于10至小于或等于50, 或

其中AURKA %增加(%增加是AURKA拷贝数>2的细胞的%)大于或等于1至小于或等于20

表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,而上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。

[0055] 提供了区分患者或患者群体中的侵袭性前列腺腺癌与惰性前列腺腺癌的另一种方法。所述患者可以是个体患者或患者群体的成员,诸如被分成以下组的患者群体,诸如包含具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者的组和包含具有惰性前列腺腺癌的患者组。所述方法包括(或由以下组成): (a) 使来自患者的样品与可检测标记的探针组接触,和(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在。可检测标记的探针组可以包含选自以下的两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个探针:MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、PTEN的基因座特异性探针、ERG的分离探针(或端粒(ERG Te1)和着丝粒(ERG Cen)探针)、NKX3.1的基因座特异性探针、MYCN的基因座特异性探针、MDM2的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、AURKA的基因座特异性探针,以及参与与前述基因中任一种相同的途径的一个或多个基因的一个或多个探针。如果需要,使用染色体计数探针连同存在于相同染色体上的基因的基因座特异性探针使得能够评估比率,诸如基因/染色体比率(例如,PTEN/CEP10和/或FGFR1/CEP8)。

[0056] MYC探针可用于确定确定MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%),诸如大于或等于2至小于或等于30的MYC %增加。FGFR1探针可用于确定确定FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数< 2的细胞的%),诸如大于或等于15至小于或等于40的FGFR1 %损失。另外或可替代地,FGFR1探针可用于确定FGFR1 %增加(%增加是FGFR1拷贝数> 2的细胞的%),诸如大于或等于2至小于或等于46的FGFR1 %增加。CEP8探针可用于确定CEP8 %损失(%损失是CEP8拷贝数< 2的细胞的%),诸如大于或等于21至小于或等于36的CEP8 %损失。另外或可替代地,CEP8探针可用于确定CEP8 %增加(%增加是CEP8拷贝数> 2的细胞的%),诸如大于或等于15至小于或等于40的CEP8 %增加。在这方面,FGFR1探针和CEP8探针可以组合使用以确定例如FGFR1/CEP8,诸如大于或等于13至小于或等于72的FGFR1/CEP8 %损失。PTEN探针可用于确定PTEN %纯合损失(%纯合损失是PTEN拷贝数为零的细胞的%),诸如大于或等于2

至小于或等于40的PTEN %纯合损失;可选地,PTEN探针可用于确定PTEN %损失(%损失是PTEN拷贝数小于2的细胞的%),诸如大于或等于10至小于或等于50的PTEN %损失。CEP10探针可用于确定CEP10 %损失(%损失是CEP10拷贝数< 2的细胞的%),诸如大于或等于10至小于或等于50的CEP10 %损失。另外或可选地,CEP10探针可用于确定CEP10 %增加(%增加是CEP10拷贝数> 2的细胞的%),诸如大于或等于15至小于或等于40的CEP10 %增加。在这方面,PTEN探针和CEP10探针可以组合使用以确定例如PTEN/CEP10,诸如大于或等于10至小于或等于50的PTEN/CEP10 %损失。ERG探针可用于确定大于或等于1至小于或等于30的% 2 E+de1。MYCN探针可用于确定MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%),诸如大于或等于2且小于或等于30的MYCN %增加。MDM2探针可用于确定MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%),诸如大于或等于2且小于或等于20的MDM2 %增加。NKX3.1探针可用于确定NKX3.1 %损失(%损失是NKX3.1拷贝数< 2的细胞的%),诸如大于或等于10至小于或等于50的NKX3.1 %损失。ETV1分离探针可用于确定ETV1 %单一红色(%单一红色是具有ETV1易位或缺失的细胞的%),诸如大于或等于1至小于或等于20的ETV1 %单一红色。P27探针可用于确定P27 %损失(%损失是P27拷贝数< 2的细胞的%),诸如大于或等于10至小于或等于50的P27 %损失。AURKA探针可用于确定AURKA %增加(%增加是AURKA拷贝数> 2的细胞的%),诸如大于或等于1至小于或等于20的AURKA %增加。

[0057] 如果患者已经进行了前列腺切除术,则所述样品中的染色体异常的存在确定表明所述患者具有复发或转移的高风险,在所述情况下,上述方法可以进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗以抑制或预防复发或转移。如果患者被最初诊断为具有前列腺癌且所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,则上述方法可以进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗。如果患者被最初诊断为具有前列腺癌且所述患者具有惰性前列腺腺癌,则上述方法可以进一步包括推荐主动监测(例如,约每六个月至一年的活组织检查)或观察等待(即,没有主动干预)。

[0058] 所述方法可以进一步包括获得临床参数,诸如选自Gleason评分、肿瘤分期、前列腺特异性抗原(PSA)水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄的临床参数,其中任一种可以与确定染色体异常的存在组合用于预后。上述方法可以进一步包括在治疗期间通过在治疗过程中重复(a)和(b)来监测被鉴定为具有侵袭性前列腺腺癌的患者。如果所述患者已经经历根治性前列腺切除术,则治疗可以是辅助治疗。可选地,上述方法可以进一步包括通过周期性重复(a)和(b)来监测被鉴定为具有惰性前列腺腺癌的患者。关于上述方法,所述患者可能已经通过另一种方法鉴定为具有侵袭性或惰性前列腺腺癌,所述方法诸如选自以下的方法:前列腺细胞样品的组织学检查,检测/筛选尿液样品中的侵袭性或惰性前列腺腺癌的标志物的方法,以及检测/筛选血液样品中的侵袭性或惰性前列腺腺癌标志物的方法。

[0059] 鉴于上述内容,还提供了鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者的方法。所述方法包括(或由以下组成):(a)在杂交条件下使来自患者的样品与可检测标记的探针组接触,所述探针组包含选自MYC、FGFR1、ERG、PTEN、MYCN和MDM2的两个、三个、四个、五个或六个探针和(b)确定样品中的染色体异常的存在。探针组合的实例包括但不限于(i) MYC和FGFR1,(ii) MYC、FGFR1和ERG,(iii) MYC、FGFR1、ERG和PTEN,(iv) MYC、FGFR1、ERG和MYCN,和(v) MYC、FGFR1、ERG和MDM2。当使用由MYC和FGFR1组成的探针组合时,大于或等于26的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%) 和/或大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是

FGFR1拷贝数<2的细胞的%)表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。当使用包含MYC、FGFR1和ERG(或由其组成)的探针组合时,大于或等于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)和/或大于或等于10的ERG % 2+Ede1表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。当使用包含MYC、FGFR1、ERG和PTEN(或由其组成)的探针组合时,大于或等于8的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的PTEN %纯合损失表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。当使用包含MYC、FGFR1、ERG和MYCN(或由其组成)的探针组合时,大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%)表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。当使用包含MYC、FGFR1、ERG和MDM2(或由其组成)的探针组合时,大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于10的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%)表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。(i)的探针组可以进一步由以下组成,或(ii)-(v)的探针组中任一种可以进一步包含以下:染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针、ETV1的分离探针中的一种或多种,以及参与与前述基因中任一种相同的途径的一个或多个基因的一个或多个探针。如果需要,使用染色体计数探针连同存在于相同染色体上的基因的基因座特异性探针使得能够评估比率,诸如基因/染色体比率(例如,PTEN/CEP10和/或FGFR1/CEP8)。

[0060] 所述方法可以进一步包括获得临床参数,诸如选自Gleason评分、肿瘤分期、PSA水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄的临床参数,其中任一种可以与确定染色体异常的存在组合用于预后。上述方法可以进一步包括在治疗期间通过治疗过程中重复(a)和(b)来监测被鉴定为具有侵袭性前列腺腺癌的患者。如果所述患者已经经历根治性前列腺切除术,则治疗可以是辅助治疗。关于上述方法,所述患者可能已经通过另一种方法鉴定为具有侵袭性前列腺腺癌,所述方法诸如选自以下的方法:前列腺细胞样品的组织学检查,检测/筛选尿液样品中的侵袭性前列腺腺癌的标志物的方法,以及检测/筛选血液样品中的侵袭性前列腺腺癌标志物的方法。

[0061] 还提供了鉴定具有惰性前列腺腺癌的方法。所述方法包括(或以下组成):(a)在杂交条件下使来自患者的样品与可检测标记的探针组接触,所述探针组包含选自MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针、PTEN的基因座特异性探针、MYCN的基因座特异性探针和MDM2的基因座特异性探针中的两个、三个、四个、五个或六个探针和(b)确定样品中的染色体异常的存在。探针组合的实例包括但不限于(i) MYC和FGFR1,(ii) MYC、FGFR1和ERG,(iii) MYC、FGFR1、ERG和PTEN,(iv) MYC、FGFR1、ERG和MYCN,和(v) MYC、FGFR1、ERG和MDM2。当使用由MYC和FGFR1组成的探针组合时,大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%) 和/或大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。当使

用包含MYC、FGFR1和ERG (或由其组成) 的探针组合时, 大于或等于2的MYC %增加 (%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失 (%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%) 和/或大于或等于2的ERG % 2+Ede1表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。当使用包含MYC、FGFR1、ERG和PTEN (或由其组成) 的探针组合时, 大于或等于2的MYC %增加 (%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失 (%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的PTEN %纯合损失表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。当使用包含MYC、FGFR1、ERG和MYCN (或由其组成) 的探针组合时, 大于或等于2的MYC %增加 (%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于18的FGFR1 %损失 (%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的MYCN %增加 (%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%) 表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。当使用包含MYC、FGFR1、ERG和MDM2 (或由其组成) 的探针组合时, 大于或等于30的MYC %增加 (%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失 (%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于3的MDM2 %增加 (%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%) 表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。(i) 的探针组可以进一步由以下组成, 或(ii)-(v) 的探针组中任一种可以进一步包含以下: 染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针、MDM2的基因座特异性探针、MYCN的基因座特异性探针、ETV1的分离探针, 和/或参与与前述基因中任一种相同的途径的一个或多个基因的一个或多个探针。如果需要, 使用染色体计数探针连同存在于相同染色体上的基因的基因座特异性探针使得能够评估比率, 诸如基因/染色体比率 (例如, PTEN/CEP10和/或FGFR1/CEP8)。

[0062] 所述方法可以进一步包括获得临床参数, 诸如选自Gleason评分、肿瘤分期、PSA水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄的临床参数, 其中任一种可以与用于染色体异常的存在组合用于预后。上述方法可以进一步包括在治疗期间通过治疗过程中重复(a) 和(b) 来监测被鉴定为具有侵袭性前列腺腺癌的患者。可选地, 上述方法可以进一步包括通过周期性重复(a) 和(b) 来监测被鉴定为具有惰性前列腺腺癌的患者。关于上述方法, 所述患者可能已经通过另一种方法鉴定为具有侵袭性或惰性前列腺腺癌, 所述方法诸如选自以下的方法: 前列腺细胞样品的组织学检查, 检测/筛选尿液样品中的侵袭性或惰性前列腺腺癌的标志物的方法, 以及检测/筛选血液样品中的侵袭性或惰性前列腺腺癌标志物的方法。

[0063] 样品可以是任何合适的样品。合适的样品的实例包括但不限于组织学样本, 其切片可以安装在载玻片上。样本可以来自根治性前列腺切除术, 活组织检查 (例如, 针活组织检查), 前列腺经尿道切除术 (TURP) 等。可以将切片福尔马林固定并石蜡包埋 (FFPE), 并放置在显微镜载玻片上。可选地, 可以使用通过其它方式诸如冷冻储存的部分, 或者可以使用细胞学样本, 诸如血液样品或尿液样品。

[0064] 如果患者刚刚进行根治性前列腺切除术, 除了使用去除的前列腺作为前列腺细胞样品的来源 (其可以新鲜使用或包埋在石蜡中并用福尔马林固定), 则可以使用另一种样品诸如血液或尿液。如果根据本文所述的方法分析样品显示至少一种指示侵袭性前列腺腺癌 (例如复发、转移和甚至可能由于疾病死亡) 的高风险的染色体异常的存在, 则患者接受诸

如通过辅助治疗的立即治疗以预防或抑制疾病的进展可以是有益的。

[0065] 如果患者正在接受或已经接受前列腺癌的初步诊断,则可以使用样品,诸如从前列腺、血液或尿液的活组织检查获得的样品。如果根据本文所述的方法分析样品显示至少一种指示侵袭性前列腺腺癌的高风险的染色体异常的存在,则患者立即接受单独或与一种或多种其它治疗进一步组合的根治性前列腺切除术可以是有益的。或者,如果根据本文所述的方法分析样品显示没有染色体异常,监测患者或患者经历主动监测可以是有益的。

[0066] 关于所有上述方法,探针的性质/大小将至少部分取决于用于确定特定参数(例如目标基因的拷贝数、拷贝数比率或百分比增加)的方法。当通过原位杂交诸如FISH进行上述诊断/预后方法时,例如探针可以相对较大。当通过另一种方法进行上述诊断/预后方法时,探针可以比用于原位杂交(诸如FISH)的探针更小,甚至显著更小,在这种情况下,探针优选杂交至目标基因内的序列。

[0067] 鉴于上述情况,用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及MYC的参数(例如,诸如MYC的拷贝数(例如,增加),涉及MYC的拷贝数比率(比如,MYC/CEP8自增加),或MYC的百分比增加)的探针,优选杂交至包含MYC基因的染色体8的q24区域(8q24)。探针也可以杂交至位于8q24的着丝粒侧上的邻近区域,位于8q24的端粒侧的邻近区域,或两者。优选的探针覆盖8q24的约820 kb,诸如821 kb,并且以MYC基因为中心。用于通过另一种方法检测涉及MYC的参数的探针可以比用于原位杂交诸如FISH的探针更小,甚至明显更小,在该情况下,探针优选杂交至MYC基因内的序列(序列信息可在线获得自来源诸如GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 和GeneCards® (www.genecards.org))。“MYC”在本文中用来指可用于确定涉及MYC的参数的任何和所有探针,无论拷贝数、拷贝数比率、百分比增加等,不论用于确定参数的具体方法。

[0068] 用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及FGFR1的参数(例如,诸如FGFR1的拷贝数(例如,损失或增加),涉及FGFR1的拷贝数比率(例如,FGFR1/CEP8损失或FGFR1/CEP8增加),或FGFR1的百分比损失或增加)的探针优选与包含FGFR1基因的染色体8的p11-12区域(8p11-12)杂交。所述探针也可以与位于8p11-12的着丝粒侧上的邻近区域、位于8p11-12的端粒侧的邻近区域或两者杂交。优选的探针覆盖8p12的约530 kb,诸如531 kb,并且以FGFR1基因为中心。用于通过另一种方法检测涉及FGFR1的参数的探针可以比用于原位杂交诸如FISH的探针更小,甚至明显更小,在所述情况下,所述探针优选与FGFR1基因内的序列杂交(序列信息可在线得自来源诸如GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 和GeneCards® (www.genecards.org))。“FGFR1”在本文中可用于指可用于确定涉及FGFR1的参数的任何和所有探针,无论拷贝数、拷贝数比率、百分比增加等,不论用于确定参数的具体方法。

[0069] 用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及PTEN的参数(例如,诸如PTEN的拷贝数(例如,PTEN损失或PTEN纯合损失),涉及PTEN的拷贝数比率(例如,PTEN/CEP10损失),或PTEN的百分比损失)的探针优选与包含PTEN基因的部分和位于10q23的端粒侧的邻近区域的染色体10的q23区域(10q23.31)杂交。优选的PTEN探针覆盖10q23.31的约340-350 kb,诸如344 kb。PTEN基因探针的邻近区域包括着丝粒侧上的STS标记物D10S215和端粒侧上的SHGC-77962。用于通过另一种方法检测涉及PTEN的参数的探针可以比用于原位杂交诸如FISH的探针更小,甚至明显更小,在所述情况下,所述探针优选与PTEN基因内的序列或PTEN基因内的邻近序列杂交(序列信息可在线得自来源诸如GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/

genbank) 和 GeneCards® (www.genecards.org)。 “PTEN” 在本文中可用于指可用于确定涉及 PTEN 的参数 的任何和所有探针, 无论拷贝数、拷贝数比率、百分比纯合性等, 不论用于确定参数的具体方法。

[0070] 用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 ERG 的参数 (例如, 诸如重排, 单独或与 ERG 基因的 5' 间隙染色体缺失 (例如, 百分比 2+Ede1) 进一步组合) 的探针, 优选杂交至包含 ERG 基因的染色体 21 的 q22 区域 (21q22)。 优选的 ERG 探针是分离探针, 即一对探针, 其中一个 ERG 基因的端粒侧的, 其中另一个是 ERG 基因的着丝粒侧的, 并且检测涉及 ERG 基因和相邻染色体缺失的重排。 用于通过另一种方法检测涉及 ERG 的参数 的探针可以比用于原位杂交诸如 FISH 的探针更小, 甚至明显更小, 在该情况下, 探针优选杂交至 ERG 基因内的序列 (序列信息可在线获得自来源诸如 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 和 GeneCards® (www.genecards.org))。 “ERG” 在本文中可用于指可用于确定涉及 ERG 的参数 的任何和所有探针, 无论重排, 例如, 2+Ede1 等, 不论用于确定参数的具体方法。

[0071] 用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及染色体 8 的参数 (诸如染色体 8 的拷贝数 (例如, 增加或损失) 或涉及基因 (即, 染色体 8 上的基因) 和染色体 8 (例如, FGFR1/CEP8 增加或 FGFR1/CEP8 损失) 的拷贝数比率) 的染色体计数探针 优选杂交至染色体 8 的着丝粒处的 8p11.1-q11.1 的区域中的 α 卫星 DNA。 可选地, 染色体计数探针可以杂交至染色体 8 的臂, 只要该探针精确地代表染色体 8 关于拷贝数增加或拷贝数损失的状态。

[0072] 用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及染色体 10 的参数 (诸如染色体 10 的拷贝数 (例如, 损失) 或涉及基因 (即, 染色体 10 上的基因) 和染色体 10 (例如, PTEN/CEP10 损失) 的拷贝数比率) 的染色体计数探针 优选杂交至染色体 10 的着丝粒处的 10p11.1-q11.1 的区域中的 α 卫星 DNA。 可选地, 染色体计数探针可以杂交至染色体 10 的臂, 只要该探针精确地代表染色体 10 关于拷贝数增加或拷贝数损失的状态。

[0073] 用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 AURKA 的参数 (诸如 AURKA 的拷贝数 (例如, AURKA 增加), 涉及 AURKA 的拷贝数比率, 或 AURKA 的百分比增加) 的探针, 优选杂交至包含 AURKA 基因的染色体 20 的 q13 区域 (20q13)。 探针也可以杂交至位于 20q13 的着丝粒侧上的邻近区域, 位于 20q13 的端粒侧的邻近区域, 或两者。 优选的探针覆盖 20q13 的约 638-858 kb, 诸如 648 kb, 并且集中在 AURKA 基因上。 用于通过另一种方法检测涉及 AURKA 的参数 的探针可以比用于原位杂交诸如 FISH 的探针更小, 甚至明显更小, 在所述情况下, 所述探针优选与 AURKA 基因内的序列杂交 (序列信息可在线得自来源诸如 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 和 GeneCards® (www.genecards.org))。 “AURKA” 在本文中用来指可用于确定涉及 AURKA 的参数 的任何和所有探针, 无论拷贝数、拷贝数比率、百分比增加等, 不论用于确定参数的具体方法。

[0074] 用于通过原位杂交诸如 FISH 检测涉及 NKX3.1 的参数 (诸如 NKX3.1 的拷贝数 (例如, NKX3.1 损失), 涉及 NKX3.1 的拷贝数比率, 或 NKX3.1 的百分比损失) 的探针, 优选杂交至包含 NKX3.1 基因的染色体 8 的 p21 区域 (8p21)。 探针也可以杂交至位于 8p21 的着丝粒侧上的邻近区域, 位于 8p21 的端粒侧的邻近区域, 或两者。 优选的探针覆盖 8p21 的约 518-538 kb, 诸如 528 kb, 并且以 NKX3.1 基因为中心。 用于通过另一种方法检测涉及 NKX3.1 的参数 的探针可以比用于原位杂交诸如 FISH 的探针更小, 甚至明显更小, 在所述情况下, 所述探针优选与 NKX3.1 基因内的序列杂交 (序列信息可在线得自来源诸如 GenBank

(www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 和 GeneCards® (www.genecards.org)。 “NKX3.1” 在本文中用来指可用于确定涉及NKX3.1的参数(任何和所有探针,无论拷贝数、拷贝数比率、百分比增加等,不论用于确定参数的具体方法)。

[0075] 用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及P27的参数(诸如P27的拷贝数(例如,P27损失),涉及P27的拷贝数比率,或P27的百分比损失)的探针,优选杂交至包含P27基因的染色体12的p13-12区域(12p13-12)。所述探针也可以与位于12p13-12的着丝粒侧上的邻近区域、位于12p13-12的端粒侧的邻近区域或两者杂交。优选的探针覆盖12p13-12的约382-412 kb,诸如392 kb,并且以P27基因为中心。用于通过另一种方法检测涉及P27的参数的探针可以比用于原位杂交诸如FISH的探针更小,甚至明显更小,在该情况下,探针优选杂交至P27基因内的序列(序列信息可在线获得自来源诸如GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 和 GeneCards® (www.genecards.org))。 “P27” 在本文中用来指可用于确定涉及P27的参数(任何和所有探针,无论拷贝数、拷贝数比率、百分比增加等,不论用于确定参数的具体方法)。

[0076] 用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及MDM2的参数(诸如MDM2的拷贝数(例如,MDM2增加),涉及MDM2的拷贝数比率,或MDM2的百分比增加)的探针,优选杂交至包含MDM2基因的染色体12的q15区域(12q15)。探针也可以杂交至位于12q15的着丝粒侧上的邻近区域,位于12q15的端粒侧的邻近区域,或两者。优选的探针覆盖12q15的约210 kb,诸如209 kb,并且以MDM2基因为中心。用于通过另一种方法检测涉及MDM2的参数的探针可以比用于原位杂交诸如FISH的探针更小,甚至明显更小,在该情况下,探针优选杂交至MDM2基因内的序列(序列信息可在线获得自来源诸如GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 和 GeneCards® (www.genecards.org))。 “MDM2” 在本文中用来指可用于确定涉及MDM2的参数(任何和所有探针,无论拷贝数、拷贝数比率、百分比增加等,不论用于确定参数的具体方法)。

[0077] 用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及MYCN的参数(诸如MYCN的拷贝数(例如,MYCN增加),涉及MYCN的拷贝数比率,或MYCN的百分比增加)的探针,优选杂交至包含MYCN基因的染色体2的p24区域(2p24)。探针也可以杂交至位于2p24的着丝粒侧上的邻近区域,位于2p24的端粒侧的邻近区域,或两者。优选的探针覆盖2p24的约195-205 kb,诸如200 kb,并且以MYCN基因为中心。用于通过另一种方法检测涉及MYCN的参数的探针可以比用于原位杂交诸如FISH的探针更小,甚至明显更小,在该情况下,探针优选杂交至MYCN基因内的序列(序列信息可在线获得自来源诸如GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 和 GeneCards® (www.genecards.org))。 “MYCN” 在本文中用来指可用于确定涉及MYCN的参数(任何和所有探针,无论拷贝数、拷贝数比率、百分比增加等,不论用于确定参数的具体方法)。

[0078] 用于通过原位杂交诸如FISH检测涉及ETV1的参数(例如,诸如重排)的探针优选杂交至包含ETV1基因的染色体7的p21区域(7p21)。优选的ETV1探针是分离探针,即一对探针,其中一个为ETV1基因的端粒侧的,其中另一个为ETV1基因的着丝粒侧的,并且检测涉及ETV1基因和相邻染色体缺失的重排。用于通过另一种方法检测涉及ETV1的参数的探针可以比用于原位杂交诸如FISH的探针更小,甚至明显更小,在该情况下,探针优选杂交至ETV1基因内的序列(序列信息可在线获得自来源诸如GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) 和 GeneCards® (www.genecards.org))。 “ETV1” 在本文中可用于指可用于确定涉及ETV1的

参数的任何和所有探针,无论重排等,不论用于确定参数的具体方法。

[0079] 如上面所解释的探针的用法适用于本文讨论的方法、探针和试剂盒。如“详述”开头中所述的探针的描述也适用于本文讨论的方法、探针和试剂盒。

[0080] 上述方法可以使用本领域已知的任何合适的检测方法进行。优选地,上述方法使用原位杂交诸如荧光原位杂交(FISH)进行。优选地,每个探针用不同的标记、诸如不同的荧光团可检测标记。可选地,可以使用如本文所述的放射性标记的核苷酸检测(原位杂交(ISH)、染色体杂交检测等)。

[0081] 当上述方法通过原位杂交进行时,其中每个探针诸如通过FISH用不同的标记可检测标记,其中每个探针用不同的荧光团标记,所述方法可以在前列腺细胞的样品上进行,所述样品是新鲜的,诸如来自前列腺活组织检查的新鲜细胞(可以将新鲜细胞培养1-3天,并且可以向培养物中添加阻断剂诸如秋水仙酰胺以将细胞阻断于中期,在此期间染色体高度凝聚并可以可视化),冷冻或固定的(例如,固定在福尔马林中并包埋在石蜡中),处理的(例如用RNase和胃蛋白酶)以增加靶核酸(例如,DNA)的可及性并减少非特异性结合,然后进行与一种或多种探针杂交,洗涤以除去任何未结合的探针,和检测杂交的探针。例如,细胞悬浮液可以作为单层施加至载玻片上,并且细胞密度可以通过光或相差显微镜测量。细胞也可以获得自其它来源,诸如体液,例如尿液或精液,保存在固定剂诸如甲醇-乙酸(Carnoy's试剂)中,并施加到载玻片或类似的支持物用于显微镜检查和分析。

[0082] FFPE组织学样本载玻片(切片)可以在约56-60℃下烘烤约2-24小时,然后在室温下在Hemo-De(Scientific Safety Solvents)或Xyline中预处理两次至三次,每次约5-10分钟,在室温下在100%乙醇中清洗两次,每次约1分钟。然后可将载玻片在预处理溶液(1xSSC,pH 7.0)中在约75-85℃下孵育约35-50分钟,在去离子水中清洗约3分钟,在约37℃下在0.1N HCl溶液中的0.15%胃蛋白酶中孵育约17-27分钟,并在去离子水中再次清洗约3分钟。可将载玻片在70%、85%和100%乙醇中各脱水1分钟,然后在空气中干燥。可将10微升探针杂交混合物(LSI®缓冲液、封闭DNA、标记的探针)添加至单独的载玻片,并且可以施加盖玻片并用橡胶胶水密封。可将载玻片在约71-75℃下共变性约5分钟,并在ThermoBrite(Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL)上在约37℃下杂交约4-24小时。杂交后,可以剥离橡胶胶水,并且可以通过在1xSSC,pH7.0中浸泡约3-5分钟来移除盖玻片。然后可将载玻片置于在约73℃下预热约2-5分钟的2xSSC/0.3% NP-40的洗涤溶液中。然后可将载玻片置于1xSSC,pH 7.0中约1分钟作为最终清洗。然后可以将携带样品的支持物用核DNA结合染料,诸如4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)在溶液中或在黑暗中在干燥样品之后进行复染。在后者情况下,将样品用约10 μL DAPI复染,并且将新的盖玻片放置在样品上。然后可以,例如,在约-20℃下,观察或储存样品。

[0083] 检测前,任选地可以基于明显的细胞学异常预先选择细胞样品。预选择鉴定疑似细胞,由此允许筛选集中于那些细胞。预选择允许更快筛选并增加阳性结果不会被遗漏的可能性。

[0084] 证明一些水平的发育异常或疑似病变的区域可以使用低倍DAPI滤光片定位,并且彻底检查携带异常拷贝数的任何探针的细胞核的存在。在正常细胞中,将检测到两个拷贝的给定探针。在异常细胞中,将检测到更多或更少拷贝的给定探针。优选选择具有最显著拷贝数变化的区域用于计数。只要有可能,就选择约3-10个区域,并且在每个异常区域中,在

高倍(64 x或100 x物镜)下分析10个随机的细胞核。优选地,细胞核是非重叠的并且包含足够亮的信号。

[0085] 可选地,可以独立于细胞学或组织学特征选择用于检测的细胞。例如,可以评价在给定的区域或在显微镜载玻片上的区域中所有非重叠的细胞的染色体损失和/或增加。作为进一步的实例,可以选择在载玻片上的细胞,例如显示改变形态的细胞,以至少约50的量级,并且更优选地至少约100的量级,以在显微镜载玻片上以连续量级出现的数目,用于评价染色体损失和/或增加。

[0086] 因此,这样的方法包括使获得自患者的样品,例如前列腺细胞、血尿或核酸的样品在杂交条件下与如上所述的可检测标记的探针组接触。杂交条件允许(或促进)探针与其靶核酸序列选择性结合并形成稳定的杂交复合物。这样的方法进一步包括检测杂交复合物的形成和计数杂交复合物的数目。鉴于杂交复合物的数目,该方法还包括确定一个或多个染色体异常的拷贝数。染色体异常的拷贝数可以与预定的截止值、诸如本文提供的范围内的截止值或本文提供的特定截止值比较,其中大于预定截止值的拷贝数(即,对于增加)或小于预定截止值的拷贝数(即,对于损失),适当时,指示患者具有或不具有如本文所述的侵袭性/惰性前列腺癌。

[0087] 尽管脱石蜡、预处理、染色和常规载玻片洗涤也可以根据本领域已知的方法进行,但是使用自动化系统,诸如VP2000 Process(Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL)降低了制备用于评价的载玻片所需的时间量。当使用标准科普林氏缸进行杂交后洗涤时,可以大批量(如,50个载玻片),而不是小批量(例如,4个载玻片)制备载玻片。此外,载玻片的评分可利用自动成像完全自动化,从而降低了样本分析所需的实际操作时间的量。完全自动化也使得能够更频繁和一致地使用捕获更多异常细胞的成像算法进行信号计数和随后的数据分析。

[0088] 本领域已知的或目前处于开发中的其它方法可以需要或优选使用前列腺细胞的样品,其不是在福尔马林中固定和在石蜡中包埋的细胞,例如新鲜或冷冻的细胞、均化细胞、裂解的细胞、或来自前列腺细胞的分离或纯化的核酸(例如“核酸样品”例如DNA)(如本文使用的“前列腺细胞样品”意欲包括所有形式的前列腺细胞样品,其能够确定拷贝数和增加/丧失)。细胞核还可以从石蜡包埋的样本的厚切片中提取,以降低截断伪影(truncation artifact)并且消除外来包埋材料。通常,一旦获得,使用本领域已知的标准方法在杂交前收获和处理生物样品。这样的处理通常包括在醛溶液诸如甲醛中的蛋白酶处理和额外的固定。

[0089] 在本文中可以使用的方法的实例包括但不限于定量聚合酶链反应(Q-PCR)、实时Q-PCR(Applied Biosystems,Foster City,CA)、PCR产物的光密度扫描、数字PCR,任选伴随对于其待确定拷贝数的基因和/或染色体区域的预扩增(参见例如Vogelstein等人,PNAS USA 96: 9236-9241(1999);美国专利申请公开号2005/0252773;和美国专利申请公开号2009/0069194)、比较基因组杂交(CGH;参见例如Kallioniemi等人,Science 258: 818-821(1992);国际专利申请公开号W0 93/18186)、微卫星或Southern等位基因型分析、斑点印迹、阵列、微阵列(Carter,Nature Genetics Supplement 39: S16-S21(July 2007))、多重可扩增探针杂交(MAPH)、多重连接依赖性探针扩增(MLPA;参见例如Schouten等人,Nucleic Acids Res. 30: e 57(2002))、变性高效液相层析(dHPLC;Kumar等人,J. Biochem.

Biophys. Methods 64(3): 226-234(2005))、动态等位基因特异性杂交(DASH)、测量在梳理(combed)基因组DNA上的荧光探针长度(Herrick等人,PNAS 97(1): 222-227(2000))、参考查询焦磷酸测序(RQPS;Liu等人,Cold Spring Harb. Protoc. doi: 10.1101/pdb.prot5491(2010))、F黏粒末端映射到参考序列上(基于毛细管的技术)、微电泳和纳米孔测序(参见例如Service,Science 311: 1544-1546(2006);和Shendure等人,Nat. Rev. Genet. 5: 335-344(2004))等。

[0090] 用于通过原位杂交和类似方法进行分析的核酸靶标的变性通常以保存细胞形态的方式完成。例如,染色体DNA可以被高pH、热(例如温度从约70-95 °C)、有机溶剂(例如甲酰胺)和其组合变性。另一方面,探针可以通过加热在几分钟内变性。

[0091] 变性后,进行杂交。用于使探针特异性杂交至它们的核酸靶标的条件通常包括在给定杂交程序中可采用以产生特异杂交物的条件的组合,所述条件可以由本领域普通技术人员容易地确定。这些条件通常包括受控的温度,液相,以及探针和靶标之间的接触。杂交条件取决于很多因素变化,包括探针浓度、靶标长度、靶标和探针G-C含量、溶剂组成、温度和孵育持续时间。至少一个变性步骤可以在探针与靶标接触之前。可选地,所述探针和靶标彼此接触时可以一起经历变性条件,或随后探针与生物样品接触。可以如下实现杂交,例如后续在2-4 x SSC和甲酰胺的约50:50体积比混合物的液相中孵育探针/样品,在约25至约55°C范围内的温度,持续说明性地约0.5至96小时范围的时间,或者更优选地,在约32至约40°C的温度,持续约2至约16小时范围内的时间。为了增加特异性,可以使用封闭剂,诸如未标记的封闭核酸,如描述于美国专利号5,756,696(其内容通过引用全文并入本文,并且特别是使用封闭核酸的描述)。可以容易地采用其它条件用于使探针特异性杂交至样品中存在的它们的核酸靶标,如本领域技术人员将容易显而易见。杂交方案描述于,例如Pinket等人,PNAS USA 85: 9138-9142 (1988);In situ Hybridization Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 33, Choo, 编, Humana Press, Totowa, NJ (1994);和Kallioniemi等人,PNAS USA 89: 5321-5325 (1992)。

[0092] 合适的孵育期完成后,可以通过一系列洗涤去除染色体探针与样品DNA的非特异性结合。适当地选择温度和盐浓度用于所需严格性。所需严格性的水平取决于特定探针序列相对于基因组序列的复杂度,并且可以通过系统地将探针杂交至已知遗传组成的样品来确定。通常,高严格洗涤可以在约65至约80°C的范围的温度下,约0.2x至约2xSSC和约0.1%至约1%非离子去污剂诸如Nonidet P-40 (NP40)下进行。如果需要更低严格性的洗涤,可以在更低的温度用增加的盐浓度进行洗涤。

[0093] 当使用荧光标记的探针或探针组合物时,所述检测方法可以涉及荧光显微镜、流式细胞仪或其它用于确定探针杂交的工具。任何合适的显微镜成像方法都可以与本文所述方法结合使用用于观察多个荧光团。在采用荧光显微镜的情况下,可以在适用于激发每种荧光团的光下并使用适当的一种或多种滤光器查看杂交样品。或者,可以使用自动数字成像系统诸如MetaSystems、BioView或Applied成像系统,连同信号计数和数据获得算法。

[0094] 取决于所采用的方法,可以使用数字图像分析系统帮助显示结果和改善检测荧光强度中小的差异的灵敏性。一种示例性系统是具有图像分析软件的BioView自动载玻片扫描仪。另一种示例性系统是QUIPS(定量图像处理系统的缩写),其是基于标准荧光显微镜的自动图像分析系统,所述显微镜配备有自动载物台、聚焦控制和滤光轮(Ludl Electronic

Products, Ltd., Hawthorne, NY)。滤光轮固定在显微镜的荧光激发路径中用于选择激发波长。分色镜中专门的滤光器(Chroma Technology, Brattleboro, VT)允许多种染料的激发而无图像配准移位。所述显微镜具有两个相机端口,其中一个具有增强型CCD相机(Quantex Corp., Sunnyvale, CA)用于灵敏的高速视频图像显示,其用于发现载玻片上令人感兴趣的区域,以及用于聚焦。另一个相机端口具有制冷CCD相机(Photometrics Ltd., Tucson, AZ的200型),其用于高分辨率和灵敏性的实际图像获得。制冷CCD相机通过VME总线对接SUN 4/330工作站(SUN Microsystems, Inc., Mountain View, CA)。多色图像的整体获得使用图像处理软件包SCIL-Image (Delft Centre for Image Processing, Delft, Netherlands)控制。

[0095] 在阵列CGH(aCGH)中,将探针固定到基底上的不同位置处,并且是未标记的(参见例如国际专利申请公开号WO 96/17958)。相反,包含靶核酸的样品核酸是标记的。样品核酸在杂交前进行标记,或杂交复合物是可检测标记的。在双色或多色aCGH中,探针阵列与不同标记的靶核酸的两个或更多个集合同时或依次杂交。

[0096] 上述方法可以用于将患者分层成需要侵袭性治疗(例如,手术,激素治疗,放射,或者如果手术后(例如,简单或根治性前列腺切除术),辅助治疗(例如,雄激素剥夺))的那些,和不需要侵袭性治疗的那些,诸如应当经历积极监视或观察等待的那些。所述方法还可用于监测前列腺癌的进展或复发,确定用于治疗的患者候选者,以及监测前列腺癌的预防性或治疗性治疗(例如,激素或放射治疗)的效力。用基于尿液或血液的检测方法获得的结果可以用上述方法确认。

[0097] 另外,本文提供了监测受试者中的前列腺癌的进展的方法。最佳地,所述方法包括以下步骤:

- (a) 确定来自受试者的样品中的染色体异常;
- (b) 确定来自受试者的随后样品中的染色体异常水平;和
- (c) 将如步骤(b)中确定的染色体异常水平与如步骤(a)中确定的染色体异常水平进行比较,其中如果步骤(b)中的水平相比于步骤(a)中确定的水平是不变或不利的,则前列腺癌被确定为在受试者中继续、进展或恶化。通过比较,如果如步骤(b)中确定的水平相比于如步骤(a)中确定的水平是有利的,则前列腺癌被确定为在受试者中已经停止、消退或改善。

[0098] 任选地,所述方法进一步包括将如步骤(b)中确定的染色体异常水平例如与预定水平进行比较。此外,任选地,如果比较显示如步骤(b)中确定的水平例如相对于预定水平不利地改变,则所述方法包括例如用一种或多种药物组合物、辐射和/或激素疗法治疗受试者一段时间。

[0099] 因此,所述方法可以进一步包括预后或评估由其获得测试样品的患者的治疗性/预防性治疗的效力。如果所述方法进一步包括评估从中获得测试样品的患者的治疗性/预防性治疗的效力,则所述方法任选地进一步包括根据需要修改患者的治疗性/预防性治疗以改善效力。可以将所述方法调整以用于自动化系统或半自动化系统中使用。

[0100] 通常,可以使用预定水平作为基准,针对所述基准以评估在测定前列腺细胞样品的染色体异常时获得的结果。通常,在进行这样的比较时,通过在适当条件下运行特定测定足够次数来获得预定水平,使得可以进行特定染色体异常(存在或水平)与疾病、病症或病

况(例如先兆子痫或心血管疾病)的特定阶段或终点或与特定标记的联系或关联。通常,用参考受试者(或受试者群体)的测定获得预定水平。

[0101] 具体而言,相对于用于监测疾病进展和/或治疗的预定水平,染色体异常(存在或水平)可以是“不变的”、“有利的”(或“有利地改变的”)或“不利的”或“不利地改变的”)。“升高的”或“增加的”是指前列腺细胞样品中染色体异常的水平比典型或正常水平或范围(例如,预定水平)更高,或比另一个参考水平或范围(例如,较早或基线样品)更高。“下降的”或“降低的”是指前列腺细胞样品中染色体异常的水平比典型或正常水平或范围(例如,预定水平)更低,或比另一个参考水平或范围(例如,较早或基线样品)更低。术语“改变的”是指前列腺细胞样品中染色体异常的水平相对于典型或正常水平或范围(例如,预定水平)或相对于另一个参考水平或范围(例如,较早或基线样品)改变(增加或降低)。根据标准实践定义给定染色体异常的典型或正常水平或范围。

[0102] 此外,本发明还涉及确定易患或患有前列腺癌的受试者是否将受益于治疗的方法。具体而言,本发明涉及伴随诊断方法和产品。因此,所述方法可以进一步包括选择或鉴定候选者用于治疗。

[0103] 因此,在一个具体实施方案中,本发明还提供了确定具有前列腺癌或处于具有前列腺癌的风险中的受试者是否是疗法的候选的方法。通常,受试者是经历疾病的一些症状或实际已诊断为患有这样的疾病或具有这样的疾病的风险,和/或展示不利的染色体异常水平的受试者,如本文所述。

[0104] 所述方法任选地包括如本文所述的测定法,其中在受试者治疗之前或之后评价染色体异常的水平。治疗之后不利的染色体异常水平的观察结果确认受试者将不会受益于接受进一步或继续的治疗,而治疗之后有利的染色体异常水平的观察结果确认受试者将会受益于接受进一步或继续的治疗。此确认有助于临床研究的管理和提供改善的患者护理。

[0105] 探针

提供了可检测标记的探针组。所述探针组为:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和染色体8的染色体计数探针,

(v) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(vi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(vii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(viii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性

探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针，

(ix) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针，

(x) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针，

(xi) 可检测标记的探针组，其包含AURKA的基因座特异性探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针，

(xii) 可检测标记的探针组，其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针，

(xiii) 可检测标记的探针组，其包含MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针，或

(xiv) 可检测标记的探针组，其包含AURKA的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针和ERG的分离探针。

[0106] 在另一个实施方案中，所述探针组包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针和可检测标记的ERG的分离探针(或由其组成)。所述探针组可以进一步包含可检测标记的PTEN的基因座特异性探针、可检测标记的MYCN的基因座特异性探针、可检测标记的MDM2的基因座特异性探针、可检测标记的染色体8的染色体计数探针、可检测标记的染色体10的染色体计数探针、可检测标记的AURKA的基因座特异性探针、可检测标记的NKX3.1的基因座特异性探针、可检测标记的P27的基因座特异性探针、可检测标记的ETV1的分离探针，以及参与与前述基因中任一种相同的途径的一个或多个基因的一个或多个探针。如果需要，使用染色体计数探针连同存在于相同染色体上的基因的基因座特异性探针使得能够评估比率，诸如基因/染色体比率(例如，PTEN/CEP10和/或FGFR1/CEP8)。

[0107] MYC探针的一个实例是LSI MYC SpectrumAqua探针，其长度为约821kb，且可得自Abbott Molecular, Inc.。较小的MYC探针，其长度约120kb，也可作为LSI C-MYC SpectrumOrange探针得自Abbott Molecular, Inc.。

[0108] FGFR1探针的一个实例是LSI FGFR1 SpectrumRed探针，其长度为约531kb，且可得自Abbott Molecular, Inc.。

[0109] ERG探针的一个实例是ERG Cen探针，其长度为209kb。ERG探针的另一个实例是ERG Tel探针，其长度为561kb。两种探针均可得自Abbott Molecular, Inc.。

[0110] PTEN探针的一个实例是LSI PTEN SpectrumOrange探针，其长度为约344kb，且可得自Abbott Molecular, Inc.。PTEN探针的另一个实例是LSI PTEN SpectrumGold探针，其长度为约344kb，且可得自Abbott Molecular, Inc.。

[0111] 长度为200kb的MYCN探针可得自Abbott Molecular, Inc.。

[0112] MDM2探针的一个实例是LSI MDM2 SpectrumOrange探针，其长度为约209kb，且可得自Abbott Molecular, Inc.。

[0113] 染色体8的染色体计数探针的一个实例是可得自Abbott Molecular, Inc.的CEP8[®] SpectrumAqua。CEP8[®] 在染色体8的着丝粒处的8p11.1-q11.1的区域中与 α -卫星DNA杂交。

[0114] 染色体10的染色体计数探针的一个实例是可得自Abbott Molecular, Inc的CEP10® SpectrumGreen。CEP10® 在染色体10的着丝粒处的10p11.1-q11.1的区域中与 α -卫星DNA杂交。

[0115] 长度为648kb的AURKA探针可得自Abbott Molecular, Inc。

[0116] 长度为528kb的NKX3.1探针可得自Abbott Molecular, Inc。

[0117] 长度为392kb的P27探针可得自Abbott Molecular, Inc。

[0118] ETV1探针的实例包括长度为约605kb且与ETV1基因5'杂交的LSI ETV1 (Cen) SpectrumGreen探针和长度为约560kb且与ETV1基因3'杂交的LSI ETV1 (Tel) SpectrumRed探针。两种探针均可得自Abbott Molecular, Inc。

[0119] 靶向染色体区域或亚区域的染色体计数探针(CEP)和基因座特异性探针可以商购获得或由本领域技术人员容易地制备。这些探针可以购自Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL)、Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR)或Cytocell (Oxfordshire, UK)。例如染色体探针可以从下列制备:蛋白核酸(PNA),克隆的人DNA诸如含有人DNA序列的插入物的质粒、细菌人工染色体(BAC)和P1人工染色体(PAC)。目标区域可以经由PCR扩增或克隆获得。在另一个实施方案中,所述染色体探针可以是寡聚探针。可选地,染色体探针可以根据本领域已知方法合成制备。

[0120] 当期望靶向特定基因座时,可以优选沿靶向基因的全长杂交的探针,尽管不需要。可以设计基因座特异性探针以杂交至癌基因或肿瘤抑制基因,所述基因的遗传异常与转移相关,例如MYC。

[0121] 可以通过本领域中已知的任何方法制备探针。可以合成或重组产生探针。这些探针长度范围可以从约25,000碱基对至约800,000碱基对。

[0122] 优选地,探针是可检测标记的,并且每种探针被不同地标记。优选地,所述探针用荧光团可检测标记,并且每种探针被不同地标记。优选的荧光团的实例包括,但不限于,7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸(AMCA)、5-羧基-X-罗丹明、6-羧基-X-罗丹明、丽丝胺罗丹明B、5-羧基荧光素、6-羧基荧光素、荧光素-5-异硫氰酸酯(FITC)、7-二乙基氨基香豆素-3-羧酸、四甲基罗丹明-5-异硫氰酸酯、四甲基罗丹明-6-异硫氰酸酯、5-羧基四甲基罗丹明、6-羧基四甲基罗丹明、7-羟基香豆素-3-羧酸、N-4,4-二氟-5,7-二甲基-4-硼杂-3a,4a-二氮杂-3-苯并二茚丙酸、伊红-5-异硫氰酸酯、赤藓红-5-异硫氰酸酯、SpectrumRed (Abbott Molecular, Inc.)、SpectrumGold (Abbott Molecular, Inc.)、SpectrumGreen (Abbott Molecular, Inc.)、SpectrumAqua (Abbott Molecular, Inc.)、TEXAS RED (Molecular Probes, Inc.)、萤光黄和CASCADE蓝乙酰叠氮化物(Molecular Probes, Inc.)。所使用的具体标记不是关键的;然而期望具体标记不干扰探针的原位杂交和在任何其它探针上标记的检测。希望标记在尽可能低的拷贝数内是可检测的,以最大化测定的灵敏度并且在高于任何背景信号是可检测的。还期望的是,所述标记提供高度局部性的信号,由此提供高度空间分辨率。

[0123] 将荧光团连接至核酸探针是本领域公知的,并且可以通过任何可得手段完成。例如荧光团可以共价连接至特定核苷酸,并且使用标准技术将标记的核苷酸并入探针,所述标准技术诸如切口平移、随机引发(Rigby 等人, J. Mol. Biol. 113: 237 (1997))、PCR标记、末端标记、通过特定残基的化学修饰直接标记等,所述残基诸如胞嘧啶残基(美国专

利号5,491,224)。或者,所述荧光团可以用活化的接头臂共价连接至已并入探针的核苷酸,例如经由接头连接至探针的已经转氨基化的脱氧胞苷核苷酸。用于标记探针的方法描述于美国专利号5,491,224,和Morrison 等人, *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*, 第2章, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets," 第21-40页, Fan, Ed., Humana Press (2002), 两者均关于它们的标记探针的描述通过引用并入本文。

[0124] 本领域技术人员将认识到可以使用其它试剂或染料代替荧光团作为含标记部分。发光试剂包括,例如,辐射发光、化学发光、生物发光和含磷光标记部分。可以用可见光检测的试剂包括花菁染料。可选地,可以使用通过间接手段可视化的检测部分。例如,探针可以用生物素或地高辛使用本领域已知的常规方法标记,然后进一步处理用于检测。含生物素探针的可视化可以经由后续缀合至可检测标记物的抗生物素蛋白的结合来实现。所述可检测标记物可以是荧光团,在这种情况下可以如下所述实现探针的可视化和区分。

[0125] 杂交至靶区域的染色体探针可选地可以通过标记部分与用于产生不溶性颜色产物的合适底物的酶反应来可视化。通过选择不同标记部分,每种探针可以与组内其它探针进行区分。组内含生物素的探针可以经由后续与缀合至碱性磷酸酶(AP)或辣根过氧化物酶(HRP)和适当底物的抗生物素蛋白一起孵育而检测。5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸和硝基蓝四唑(NBT)充当碱性磷酸酶的底物,而二氨基苯甲酸盐充当HRP的底物。

[0126] 试剂盒

还提供了试剂盒。所述试剂盒包含能够区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者和具有惰性前列腺腺癌的患者的一组探针,诸如如上所述的探针组,以及用于进行上述方法的说明书。可选地,所述试剂盒包含能够鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者或鉴定具有惰性腺癌的患者的一组探针,诸如如上所述的探针组,以及用于进行上述方法的说明书。

[0127] 因此,在一个实施方案中,所述试剂盒包含(a)探针组,其中所述探针组是(i)可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,(ii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,(iii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,(iv)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,(v)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,(vi)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,(vii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,(viii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和染色体8的染色体计数探针(CEP8),(ix)可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,(x)可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,(xi)可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,(xii)可检测标记的探针

组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,(xiii)可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,(xiv)可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,(xv)可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,(xvi)可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,(xvii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,或(xviii)可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针和ERG的分离探针。组(i)-(vi)、(viii)、(xi)、(xiv)、(xv)和(xvii)中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%损失,组(vii)、(ix)和作为FGFR1的%损失的替代方案的(xiv)中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%增加,组(ix)-(xiv)、(xvi)和(xviii)中的CEP8用于确定CEP8的%损失,组(iii)和(viii)中的PTEN的基因座特异性探针用于确定PTEN的%纯合损失,组(xvi)中的PTEN的基因座特异性探针用于确定PTEN的%损失,且组(viii)和作为FGFR1的%增加的替代方案的(ix)中的FGFR1和CEP8的基因座特异性探针用于确定FGFR1/CEP8比率的%损失。所述试剂盒进一步包含(b)用于区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者和具有惰性前列腺腺癌患者的说明书。所述说明书包括确定从患者获得的样品中的染色体异常的存在。所述方法可以包括在杂交条件下使样品与探针组接触,计数杂交复合物,并将数目与如本文所述的截止值范围内的截止值或特定截止值进行比较。例如,大于或等于2至小于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%),大于或等于15至小于或等于40的FGFR1 %损失(%损失是FGFR拷贝数< 2的细胞的%),大于或等于2至小于或等于46的FGFR1 %增加(%增加是FGFR拷贝数> 2的细胞的%),大于或等于21至小于或等于36的CEP8 %损失(%损失是CEP8拷贝数< 2的细胞的%),大于或等于15至小于或等于40的CEP8 %增加(%增加是CEP8拷贝数>2的细胞的%),大于或等于13至小于或等于72的FGFR1/CEP8 %损失,大于或等于2且小于或等于40的PTEN %纯合损失(%纯合损失是PTEN拷贝数为零的细胞的%),大于或等于10至小于或等于50的PTEN %损失(%损失是PTEN拷贝数小于2的细胞的%),大于或等于1至小于或等于30的ERG 2+Ede1,大于或等于2至小于或等于30的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%),大于或等于2至小于或等于20的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%),大于或等于10至小于或等于50的NKX3.1 %损失(%损失是NKX3.1拷贝数< 2的细胞的%),大于或等于1至小于或等于20的ETV1%易位/缺失,大于或等于10至小于或等于50的P27 %损失(%损失是P27拷贝数< 2的细胞的%),或大于或等于1至小于或等于20的AURKA %增加(%增加是AURKA拷贝数>2的细胞的%)表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,而上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。如果所述患者已经进行了前列腺切除术,则所述样品中的染色体异常的存在确定表明所述患者具有复发或转移的高风险,在所述情况下,所述说明书可以进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗以抑制或预防复发或转移。如果所述患者被最初诊断为具有前列腺癌且所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,则所述说明书可以进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗。如果所述患者被最初诊断为

具有前列腺癌且所述患者具有惰性前列腺腺癌,则所述说明书可以进一步包括推荐主动监测或观察等待。

[0128] 在另一个实施方案中,所述试剂盒包含(a)探针组,其中所述探针组是(i)可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,(ii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,(iii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,(iv)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,或(v)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针。组(i)可以进一步由以下组成,或(ii)-(v)中任一种的组可以进一步包含染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和/或参与与前述基因中任一种相同的途径的一个或多个基因的一个或多个探针。如果需要,使用染色体计数探针连同存在于相同染色体上的基因的基因座特异性探针使得能够评估比率,诸如基因/染色体比率(例如,PTEN/CEP10和/或FGFR1/CEP8)。所述试剂盒进一步包含(b)用于鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者的说明书。所述说明书包括确定从患者获得的样品中的染色体异常的存在。所述方法可以包括在杂交条件下使样品与探针组接触,计数杂交复合物,并将数目与如本文所述的截止值范围内的截止值或特定截止值进行比较。例如,对于(i)大于或等于26的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)和/或大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%),对于(ii)大于或等于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)和/或大于或等于10的ERG % 2+Ede1,对于(iii)大于或等于8的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的PTEN % 纯合损失,对于(iv)大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%),或对于(v)大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于10的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%)表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。所述说明书可以进一步包含用于获得临床参数的说明书,所述临床参数诸如选自Gleason评分、肿瘤分期、前列腺特异性抗原(PSA)水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄的临床参数,其中任一种可以与确定染色体异常的存在组合用于预后。

[0129] 在另一个实施方案中,所述试剂盒包含(a)探针组,其中所述探针组是(i)可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,(ii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,(iii)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,(iv)可检测标记的探针组,其包含MYC的

基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,或(v)可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针。组(i)可以进一步由以下组成,或(ii)-(v)中任一种的组可以进一步包含染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和/或,参与与前述基因中任一种相同的途径的一个或多个基因的一个或多个探针。如果需要,使用染色体计数探针连同存在于相同染色体上的基因的基因座特异性探针使得能够评估比率,诸如基因/染色体比率(例如,PTEN/CEP10和/或FGFR1/CEP8)。所述试剂盒进一步包含(b)用于鉴定具有惰性前列腺腺癌患者的说明书。所述说明书包括确定从患者获得的样品中的染色体异常的存在。所述方法可以包括在杂交条件下使样品与探针组接触,计数杂交复合物,并将数目与如本文所述的截止值范围内的截止值或特定截止值进行比较。例如,对于(i)大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数>2的细胞的%)和/或大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%),对于(ii)大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数>2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)和/或大于或等于2的ERG % 2+Ede1,对于(iii)大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数>2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的PTEN %纯合损失,对于(iv)大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数>2的细胞的%)、大于或等于18的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数>2的细胞的%),或对于(v)大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数>2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于3的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数>2的细胞的%)表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。所述说明书可以进一步包含用于获得临床参数的说明书,所述临床参数诸如选自Gleason评分、肿瘤分期、前列腺特异性抗原(PSA)水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄的临床参数,其中任一种可以与用于确定染色体异常的存在组合用于预后。

[0130] 上述试剂盒可以进一步包含一种或多种试剂,诸如DAPI 1复染剂,预处理SSC缓冲液(例如,1xSSC,pH 7.0),蛋白酶缓冲液(例如,0.1N HCl),蛋白酶IV(例如,胃蛋白酶,诸如粉末形式(75mg/管)),杂交后洗涤缓冲液(例如,2xSSC,0.3% NP-40)等。

实施例

[0131] 下列实施例用于举例说明本发明。这些实施例并非意在以任何方式限制所要求保护的发明的范围。

[0132] 实施例1

本实施例描述了使用多色荧光原位杂交(FISH)评估前列腺癌样品中各种探针及其组合的评价。

[0133] 在RUSH Medical Center, Chicago, IL收集来自具有前列腺腺癌患者的总共52个福尔马林固定的、石蜡包埋的(FFPE)根治性前列腺切除术样本。在52个样本中,32个获

得自在15年内进展的患者。在那些32个样本中,7个获得自无病的患者,4个获得自死于前列腺癌的患者。剩余的20个样本获得自在8.2-15.0年的随访期间没有进展的患者。

[0134] 所有样品都用14个探针评价。探针是PTEN、NKX3.1、P27 (CDKN1B)、CEP10、CMYC、AURKA、ERG Cen (着丝粒探针)、ERG Tel (端粒探针)、ETV1 Tel (端粒探针)、ETV1 Cen (着丝粒探针)、MDM2、MYCN、FGFR1和CEP8。在如表1中所示的组中测试探针。所有探针在Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, IL) 制造,并且可以从制造商获得。

[0135] 表1

探针组	探针	基因座	颜色
探针组 1	PTEN	10q23	金色
	CEP10		浅绿色
	ERG Cen	21q22.2	红色
	ERG Tel	21q22.2	绿色
探针组 2	NKX3.1	8p21	金色
	CMYC	8q24	浅绿色
	ETV1 Tel	7p21.2	红色
	ETV1 Cen	7p21.2	绿色
探针组 3	P27 (CDKN1B)	12p13.1	金色
	AURKA	20q13.2	浅绿色
	MDM2	12q14-15	红色
	MYCN	2p24	绿色
探针组 4	FGFR1	8p12	红色
	CEP8		浅绿色

[0136] 在相应的苏木精和伊红染色的 (H&E染色的) 载玻片的10个连续切片内选择FFPE样本载玻片,用于用FISH评价探针。该选择确保通过组织病理学评价的区域和通过FISH评价的区域之间的最小分离。由病理学家检查H&E染色的切片。标记,即包围,最大可能的肿瘤区域。样本载玻片上选择用于用FISH评价探针的相应区域用玻璃划线标记。

[0137] 将FFPE样本载玻片在60℃下烘烤2-24小时,然后在室温下每次5分钟用Hemo-De® (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) 处理三次,并在室温下用100%乙醇清洗两次,每次1分钟。将载玻片在80℃下在预处理溶液 (1xSSC (盐水 - 柠檬酸钠), pH7.0) 中孵育35分钟,在去离子水中清洗3分钟,在37℃下在0.1N HCl溶液中的0.15%胃蛋白酶中孵育20-22分钟,并再次在去离子水中清洗三分钟。然后将载玻片在70%、85%和100%乙醇中脱水,每次1分钟,并风干。

[0138] 将10微升含有探针组 (如表1中所示)、封闭DNA和LSI/WCP杂交缓冲液 (Abbott Molecular, Inc.) 的杂交混合物添加至样本载玻片,并施加盖玻片并用橡胶胶水密封。将载玻片和探针在73℃下共变性5分钟,并在37℃下在ThermoBrite® 杂交平台 (Abbott Molecular, Inc.) 上杂交16-24小时。杂交后,通过将盖玻片在1xSSC溶液 (pH7.0) 中浸泡2-5分钟,并立即在72℃下在2xSSC/0.3% NP-40中洗涤3分钟,并在室温下在1xSSC溶液 (pH7.0) 中洗涤一分钟,来除去盖玻片。然后使载玻片在黑暗中干燥。将10微升4',6-二脒基-2-苯基吲哚复染/抗褪色溶液 (DAPI 1; Abbott Molecular, Inc.) 添加至样本,并用盖玻片覆盖样品用于显微镜检查。

[0139] 在与表1中所列的每个探针组分别杂交的载玻片上评价划线的肿瘤区域内的几个视野。对于给定组中的每个探针,计数细胞(50-100)的荧光信号数目。捕获和记录ERG和ETV1分离探针的所有可能的重排模式和拷贝数变化。

[0140] 计算以下FISH异常参数:

ERG分离探针(BAP) (no. 单一红色信号数 ≥ 1),
ERG 2+Ede1 (no. 单一红色信号数 - no. 单一绿色信号数 ≥ 2),
PTEN损失(%每个样本信号 ≤ 1 的细胞),
PTEN/CEP10损失(%每个样本比率 < 1 的细胞),
ETV1 BAP (no. 单一红色信号数 ≥ 1),
NKX3.1损失(%每个样本信号 ≤ 1 的细胞),
CMYC增加(%每个样本信号 > 2 的细胞),
AURKA增加(%每个样本信号 > 2 的细胞),
MYCN增加(%每个样本信号 > 2 的细胞),
P27损失(%每个样本信号 ≤ 1 的细胞),
MDM2增加(%每个样本信号 > 2 的细胞),
FGFR1增加(%每个样本信号 > 2 的细胞),
FGFR1损失(%每个样本信号 ≤ 1 的细胞),
CEP8增加(%每个样本信号 > 2 的细胞),
CEP8损失(%每个样本信号 ≤ 1 的细胞),
FGFR1/CEP8增加(%每个样本比率 > 1 的细胞),和
FGFR1/CEP8损失(%每个样本比率 < 1 的细胞)。

[0141] 使用接收器操作特性(Receiver Operating Characteristic) (ROC) 分析和存活分析(Cox比例风险模型) 系统地分析FISH异常参数,以选择候选探针及其组合,并对其进行优先性排序。随访患者15年。治疗发生进展超过15年的患者,如在15年时审查。疾病结果是“进展”,其包括疾病复发和死于疾病(DOD) 作为结果。ROC分析区分在15年内进展的那些患者(灵敏度)和在15年内没有进展的对照患者(特异性),以最大化灵敏度和特异性(曲线下面积(AUC))。使用存活分析,确定“FISH阳性患者/ FISH阴性患者中疾病进展的可能性”的风险比(HR)。对于每个FISH异常参数,基于选择的截止值优化最高特异性以选择患者用于侵袭性/辅助治疗(在本研究中,选择患者的最高特异性以获得最佳“阳性预测值”)。基于选择的截止值优化具有至少50%的特异性的最高灵敏度,以选择具有惰性肿瘤的患者用于观察(在本研究中,选择患者的最高灵敏度以实现最佳“阴性预测值”)。

[0142] 使用ROC分析和存活分析,将表2中的异常FISH参数鉴定为具有辅助以 $p < 0.05$ 区分具有低疾病进展风险的患者与具有高疾病进展风险的那些患者的潜力。截止值基于含有基因组异常的细胞的百分比。基于截止值确定FISH阳性和阴性。FISH阳性被定义为含有基因组异常 $\geq$ 截止值的细胞的百分比,而FISH阴性被定义为含有基因组异常 $<$ 截止值的细胞的百分比。通过模拟来自Cox模型的所有可能的截止值(1-100%) 来确定每个截止值,并且在次要ROC分析中仅包括具有显著 p -值的那些截止值以计算AUC。通过最佳风险比(HR) 选择截止值。当HR大于或等于1时,选择最大的HR;当HR小于1时,选择最小的HR。

[0143] 表2

异常FISH参数	截止值*	风险比 (尽可能最好)	P-值 (COX)	AUC
FGFR1 损失	40	4.163	0.0030	0.7039
CEP8 损失	26	3.858	0.0006	0.6977
FGFR1 增加	6	0.303	0.0122	0.6914
FGFR1/CEP8 损失	72	8.504	0.0475	0.6664
CEP8 增加	15	0.372	0.0136	0.6555
CMYC 增加	26	2.695	0.0442	0.6422
ERG 单一红色	17	0.264	0.0387	0.5648
AURKA 增加	1	0.118	0.0475	0.5031

(*) 对于FGFR1损失, p-值在15-40的截止值内仍然是显著的, 对于CEP8 %损失, p-值在21-36的截止值内仍然是显著的, 对于FGFR1增加, p-值在26-46的截止值内仍然是显著的, 对于FGFR1/CEP8损失, p-值在13-72的截止值内仍然是显著的, 对于CEP8增加, p-值在15-40的截止值内仍然是显著的, 对于MYC增加, p-值在2-30的截止值内仍然是显著的, 且对于ERG单一红色, p-值在14-17的截止值内仍然是显著的。

[0144] 实施例2

本实施例描述了进一步评价具有6的截止值的FGFR1增加和具有40的截止值的FGFR1损失。

[0145] 如图1中所示进一步评价具有6的截止值的FGFR1增加。图1是FGFR1增加的KM曲线(PFS(年) vs. 存活概率), 其中对数秩p-值为0.0062。数据表明具有FGFR1增加或扩增的患者将更慢进展(复发或死亡)。换言之, FGFR1增加阳性的那些患者比FGFR1增加阴性的那些患者具有更低的进展机会(0.303的风险比)。

[0146] 如图2中所示进一步评价具有40的截止值的FGFR1损失。图2是FGFR1损失的KM曲线(PFS(年) vs. 存活概率), 其中对数秩p-值为0.0009。数据表明具有FGFR1损失的患者将更快进展(复发或死亡)。换言之, FGFR1损失阳性的那些患者比FGFR1损失阴性的那些患者具有更高的进展机会(4.163的风险比)。

[0147] 实施例3

本实施例描述了两个、三个和四个异常FISH参数的组合的进一步评价。

[0148] 使用ROC分析评价两个、三个和四个异常FISH参数的组合。组合的AUC排序显示于表3中。通过AUC的异常FISH参数的组合和单一异常FISH参数之间的分析的比较表明通过分组互补生物标志物来实现最大性能。

[0149] 表3

组合	AUC
CMYC增加, ERG 2+Ede1, FGFR1 损失, PTEN 纯合损失	0.8563
CMYC增加, ERG 2+Ede1, FGFR1 损失, NKX3.1 损失	0.8531
CMYC增加, ERG 2+Ede1, FGFR1 损失, MYCN 增加	0.8445
CMYC增加, ERG 2+Ede1, FGFR1 损失, MDM2 增加	0.8438
CMYC增加, ERG 2+Ede1, FGFR1 损失	0.843
CMYC增加, ETV1 单一红色, FGFR 1 增加, P27 损失	0.8391
CMYC增加, FGFR1 损失, PTEN 纯合损失, FGFR1/CEP8 损失	0.8391

CEP8损失,CMYC增加,ERG 2+Ede1,FGFR1增加	0.8438
CEP8损失,CMYC增加,ERG 2+Ede1,NKX3.1损失	0.843
CEP8损失,CMYC增加,ERG 2+Ede1,FGFR1损失	0.8398
CEP8损失,CMYC增加,ERG 2+Ede1,MYCN增加	0.8398
CEP8损失,CMYC增加,ERG 2+Ede1,MDM2增加	0.8359
CEP8损失,CMYC增加,ETV1单一红色,FGFR1增加	0.8375
CEP8损失,CMYC增加,ERG 2+Ede1,FGFR1/CEP8损失	0.8438
CEP8损失,CMYC增加,ETV1单一红色,FGFR1损失	0.8359
AURKA增加,CMYC增加,ERG 2+Ede1,FGFR1损失	0.8383
CEP8损失,CMYC增加,ERG 2+Ede1,PTEN损失	0.8359
CMYC增加,ERG 2+Ede1,FGFR1损失,P27损失	0.8359
AURKA增加,CEP8损失,CMYC增加,ERG 2+Ede1	0.8336
CMYC增加,FGFR1损失	0.8055

[0150] 实施例4

本实施例描述了在选择具有更侵袭性的疾病的患者用于侵袭性和/或辅助治疗中进一步评价异常FISH参数的组合。

[0151] 使用COX和ROC分析评价异常FISH参数的各种组合,用于选择具有更侵袭性的疾病的患者用于侵袭性和/或辅助治疗。选择具有最高特异性和可接受灵敏度的异常FISH参数的组合,以便靶向最高阳性预测值。六个组合的COX和ROC分析的结果描述于表4中。通过首先模拟所有可能的截止值组合(对于组合中的每个参数)来确定每个截止值。截止值基于含有基因组异常的细胞的百分比。基于截止值确定FISH阳性和阴性。FISH阳性被定义为组合中的阳性的任何参数,而FISH阴性被定义为组合中的阴性的所有FISH参数。将Cox模型应用于每个截止值组合。在第二ROC分析中仅包括具有显著p-值的那些截止值组合。然后从ROC确定截止值。

[0152] 表 4

异常FISH参数的组合	截止值1	截止值2	截止值3	截止值4	灵敏度	特异性	风险比	P-值(Cox)	AUC
CMYC增加,FGFR1损失	26	26	NA	NA	44%	100%	3.874	0.0003	0.8055
CMYC增加,ERG 2+Ede1,FGFR1损失	14	10	26	NA	53%	95%	3.915	0.0002	0.8430
CMYC增加,ERG 2+Ede1, FGFR1损失,PTEN纯合损失	8	10	26	20	59%	80%	2.807	0.0047	0.8563
CMYC增加,ERG 2+Ede1, FGFR1损失,MYCN增加	30	10	20	20	81%	75%	5.328	0.0003	0.8445
CMYC增加,ERG 2+Ede1, FGFR1损失,MDM2增加	30	10	20	10	78%	65%	3.447	0.0041	0.8438
CMYC增加,FGFR1损失,PTEN纯合损失,FGFR1/CEP8损失	26	26	20	34	50%	85%	2.360	0.0166	0.8391

[0153] 如图3中所示进一步评价CMYC增加、ERG 2+Ede1和FGFR1损失的组合。图3是CMYC增加、ERG 2+Ede1和FGFR1损失的KM曲线(PFS(年) vs. 存活概率),其中对数秩p-值为0.0001。

[0154] 通过高/低风险(即FISH阳性/ FISH阴性)分析预后的数据显示于表5中。以高特异性(95.00%)、可接受的灵敏度(53.13%)和3.92的风险比,CMYC增加、ERG 2+Ede1和FGFR1损失的组合表明,FISH阳性的患者具有更大的进展机会,并且比FISH阴性的患者更快进展。这种异常FISH参数的组合可以将高风险(复发或DOD)组与低风险(惰性)组分离,并且可以帮助患者和临床医师决定寻求立即治疗。

[0155] 表5

异常 FISH 参数的组合	高/低风险	N (进展的数目/DOD)	中值存活 (95% CI)	风险比 (95% CI)	P-值 (Cox)	灵敏度	特异性
CMYC 增加, ERG 2+Edel, FGFR1 损失	高风险	18(17)	1 (0.1,2.3)	3.92 (1.9,8.05)	0.0002	53.13%	95.00%
	低风险	34(15)	NA (1.6,NA)				

[0156] 实施例5

本实施例描述了在鉴定具有较低侵袭性(惰性)肿瘤的患者用于观察中进一步评价异常FISH参数的组合。

[0157] 使用COX和ROC分析评价异常FISH参数的各种组合,用于选择具有较低侵袭性(惰性)肿瘤的患者用于观察。选择具有最高灵敏度和至少50%特异性的异常FISH参数的组合,以便靶向最高阴性预测值。六个组合的COX和ROC分析的结果描述于表6中。通过首先模拟所有可能的截止值组合(对于组合中的每个参数)来确定每个截止值。截止值基于含有基因组异常的细胞的百分比。基于截止值确定FISH阳性和阴性。FISH阳性被定义为组合中的阳性的任何参数,而FISH阴性被定义为组合中的阴性的所有FISH参数。将Cox模型应用于每个截止值组合。在第二ROC分析中仅包括具有显著p-值的那些截止值组合。然后从ROC确定截止值。

[0158] 表6

异常FISH参数的组合	截止值1	截止值2	截止值3	截止值4	灵敏度	特异性	风险比	P-值(Cox)	AUC
CMYC增加,FGFR1损失	2	10	NA	NA	88%	50%	3.571	0.0177	0.8055
CMYC增加,ERG 2+Edel,FGFR1损失	2	2	10	NA	91%	50%	4.648	0.0116	0.8430
CMYC增加,ERG 2+Edel,FGFR1损失,PTEN纯合损失	2	10	10	20	91%	50%	4.648	0.0116	0.8563
CMYC增加,ERG 2+Edel, FGFR1损失, MYCN gain	2	2	18	20	97%	50%	14.200	0.0092	0.8445
CMYC增加,ERG 2+Edel,FGFR1损失, MDM2增加	30	2	20	3	94%	55%	8.665	0.0032	0.8438
CMYC增加,FGFR1损失,PTEN纯合损失,FGFR/CEP8损失	2	10	20	35	91%	50%	4.648	0.0116	0.8391

[0159] 如图4中所示进一步评价CMYC增加、ERG 2+Edel、FGFR1损失和PTEN的纯合性的组合。图4是CMYC增加、ERG 2+Edel、FGFR1损失和PTEN的纯合性损失的KM曲线(PFS(年) vs. 存活概率),其中对数秩p-值为0.0048。

[0160] 通过高/低风险(即FISH阳性/ FISH阴性)分析预后的数据显示于表7中。以高灵敏度(90.60%)、可接受的灵敏度(50.00%)和4.65的风险比,CMYC增加、ERG 2+Edel、FGFR1损失和PTEN的纯合损失的组合表明,FISH阳性的患者具有更大的进展机会,并且比FISH阴性的患者更快进展。更重要的是,这种异常FISH参数的组合也具有预测FISH阴性的那些患者(10/13患者在15个随访年份中是无进展的,显示在图4中的KM曲线(顶线)上)具有较长的无进展时间的潜能。该探针组合可以将低风险(惰性)与高风险(复发或DOD)组分开,并且如果FISH数据为阴性,可以帮助患者和临床医师安心选择主动监测(AS)。

[0161] 表7

异常 FISH 参数的组合	高/低风险	N(进展的数目/DOD)	中值存活(95% CI)	风险比(95% CI)	P-值(Cox)	灵敏度	特异性
CMYC 增加, ERG 2+Edel, FGFR1 损失, PTEN 纯合损失	高风险	39(29)	2 (1.2,2.8)	4.65 (1.41,15.33)	0.0116	90.63%	50.00%
	低风险	13(3)	NA (1.6,NA)				

[0162] 实施例6

本实施例描述了如何将其它临床参数(诸如Gleason评分)添加到异常FISH参数的组合的分析中可以改善疾病进展的预测。

[0163] 可以将异常FISH参数的组合(诸如表3或更具体地表4或表6中所列的组合之一)的分析与一种或多种其它临床参数(诸如Gleason评分、肿瘤分期、前列腺特异性抗原(PSA)、患者年龄等组合,以预测疾病进展。如图5A-5C(其为ROC曲线,1-特异性(假阳性) vs. 灵敏度(真阳性)的图)中所示,四个异常FISH参数的某些组合为Gleason评分提供增量值。图5A显示具有单独Gleason评分的AUC,而图5B显示具有异常FISH参数CMYC增加、ERG 2+Edel、FGFR1损失和PTEN纯合损失的组合的AUC,且图5C显示具有Gleason评分和异常FISH参数CMYC增加、ERG 2+Edel、FGFR1损失和PTEN纯合损失的组合的AUC。

[0164] 说明书中提及的所有专利、专利申请公开物、杂志论文、教科书和其它公开物均指示所述公开内容涉及的本领域技术人员的水平。所有这些公开物通过引用并入本文,达到如同每个个别公开物具体和个别地被指示通过引用并入的相同程度。

[0165] 本文说明性描述的本发明可以适当地在不存在本文没有具体公开的任何元件或限制的情况下实施。因此,例如,本文任何术语“包含”、“基本上由...组成”和“由...组成”的每个实例都可以用其它两个术语替换。类似地,单数形式“一个/种”和“所述”包括复数方面,除非上下文清楚地另外指示。因此,例如提及“所述方法”包括本文所述的和/或在本领域技术人员阅读本发明后将变得显而易见的一种或多种方法和/或类型的步骤。

[0166] 已经采用的术语和表述用作说明的术语并且不是限制的术语。在这方面,当某些术语在“定义”下定义并在“详述”中以其它方式定义、描述或讨论时,所有这些定义、描述和讨论都意在归于这些术语。在使用这些术语和表达中也没有意向排除所显示和描述的特征或其部分的任何等效形式。此外,当在“详述”中使用副标题,如“定义”时,这样的使用完全是为了便于参考,并无意将在一节中作出的公开内容限制仅限制在该节内;相反,在一个副标题下作出的任何公开内容都意在构成各个和每个其它副标题下的公开内容。

[0167] 应认识到,在所要求保护的发明的范围之内,各种修改是可能的。因此,应当理解,尽管在优选实施方案和任选特征的情况下,本发明已具体公开,但是本领域技术人员可以将本文公开的概念诉诸修改和变化。这些修改和变化被认为在本文要求保护的本发明的范围之内。

[0168] 出于完整性的原因,在以下编号项中描述本发明的各个方面:

项1. 区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者和具有惰性前列腺腺癌的方法,所述方法包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针

组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,

(v) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,

(vi) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(vii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,

(viii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和染色体8的染色体计数探针(CEP8),

(ix) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(x) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(xi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,

(xiii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,

(xiv) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xv) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xvi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(xvii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,或

(xviii) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

其中组(i)-(vi)、(viii)、(xi)、(xiv)、(xv)和(xvii)中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%损失,

其中组(vii)、(ix)和作为FGFR1的%损失的替代方案的(xiv)中的FGFR1的基因座特异性探针用于确定FGFR1的%增加,

其中组 (ix) - (xiv)、(xvi) 和 (xviii) 中的 CEP8 用于确定 CEP8 的 % 损失，
其中组 (iii) 和 (viii) 中的 PTEN 的基因座特异性探针用于确定 PTEN 的 % 纯合损失，
其中组 (xvi) 中的 PTEN 的基因座特异性探针用于确定 PTEN 的 % 损失，且
其中组 (viii) 和作为 FGFR1 的 % 增加的替代方案的 (ix) 中的 FGFR1 和 CEP8 的基因座特异性探针用于确定 FGFR1/CEP8 比率的 % 损失，和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在，
其中 MYC % 增加 (% 增加是 MYC 拷贝数 > 2 的细胞的 %) 大于或等于 2 至小于或等于 30，
其中 FGFR1 % 损失 (% 损失是 FGFR 拷贝数 < 2 的细胞的 %) 大于或等于 15 至小于或等于 40，

其中 FGFR1 % 增加 (% 增加是 FGFR 拷贝数 > 2 的细胞的 %) 大于或等于 2 至小于或等于 46，
其中 CEP8 % 损失 (% 损失是 CEP8 拷贝数 < 2 的细胞的 %) 大于或等于 21 至小于或等于 36，

其中 CEP8 % 增加 (% 增加是 CEP8 拷贝数 > 2 的细胞的 %) 大于或等于 15 至小于或等于 40，
其中 FGFR1/CEP8 % 损失大于或等于 13 至小于或等于 72，
其中 PTEN % 纯合损失 (% 纯合损失是 PTEN 拷贝数为零的细胞的 %) 大于或等于 2 且小于或等于 40，

其中 PTEN % 损失 (% 损失是 PTEN 拷贝数 < 2 的细胞的 %) 大于或等于 10 至小于或等于 50，

其中 ERG 2+Ede1 大于或等于 1 至小于或等于 30，
其中 MYCN % 增加 (% 增加是 MYCN 拷贝数 > 2 的细胞的 %) 大于或等于 2 至小于或等于 30，
其中 MDM2 % 增加 (% 增加是 MDM2 拷贝数 > 2 的细胞的 %) 大于或等于 2 至小于或等于 20，
其中 NKX3.1 % 损失 (% 损失是 NKX3.1 拷贝数 < 2 的细胞的 %) 大于或等于 10 至小于或等于 50，

其中 ETV1 % 易位/缺失大于或等于 1 至小于或等于 20，
其中 P27 % 损失 (% 损失是 P27 拷贝数 < 2 的细胞的 %) 大于或等于 10 至小于或等于 50，
或

其中 AURKA % 增加 (% 增加是 AURKA 拷贝数 > 2 的细胞的 %) 大于或等于 1 至小于或等于 20
表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险，

而上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌，

由此区分具有侵袭性前列腺腺癌的患者与具有惰性前列腺腺癌的患者。

[0169] 项2. 项1的方法，其中如果患者已经进行了前列腺切除术，则所述样品中的染色体异常的存在确定表明所述患者具有复发或转移的高风险。

[0170] 项3. 项2的方法，其进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗以抑制或预防复发或转移。

[0171] 项4. 项1的方法，其中如果患者被最初诊断为具有前列腺癌且所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险，所述方法进一步包括推荐所述患者咨询其医师进行立即治疗。

[0172] 项5. 项1的方法，其中如果所述患者被最初诊断为具有前列腺癌且所述患者具有惰性前列腺腺癌，则所述方法进一步包括推荐主动监测或观察等待。

[0173] 项6. 鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者方法,所述方法包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,或

(v) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中对于 (i) 大于或等于26的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%) 和/或大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%),

其中对于 (ii) 大于或等于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%) 和/或大于或等于10的ERG % $2 + \text{Ede1}$,

其中对于 (iii) 大于或等于8的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于10的ERG % $2 + \text{Ede1}$ 和/或大于或等于20的PTEN % 纯合损失,

其中对于 (iv) 大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于10的ERG % $2 + \text{Ede1}$ 和/或大于或等于20的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数 > 2 的细胞的%),或

其中对于 (v) 大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于10的ERG % $2 + \text{Ede1}$ 和/或大于或等于10的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数 > 2 的细胞的%)

表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,由此鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者。

[0174] 项7. 项6的方法,其中 (i) 进一步由以下组成,或 (ii) - (v) 中任一种进一步包含以下:染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针和/或ETV1的分离探针。

[0175] 项8. 项6或7的方法,其进一步包括获得选自以下的临床参数:Gleason评分、肿瘤分期、前列腺特异性抗原 (PSA) 水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄,其中任一种可以与确定染色体异常的存在组合用于预后。

[0176] 项9. 项6-8中任一项的方法,其包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与可检测标记的探针组接触,所述探针组包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中大于或等于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)和大于或等于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。

[0177] 项10. 鉴定具有惰性前列腺腺癌的方法,所述方法包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与以下接触:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针和ERG的分离探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,或

(v) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中对于 (i) 大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%) 和/或大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%),

其中对于 (ii) 大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%) 和/或大于或等于2的ERG % 2+Ede1,

其中对于 (iii) 大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于10的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的PTEN %纯合损失,

其中对于 (iv) 大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于18的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于20的MYCN %增加(%增加是MYCN拷贝数> 2的细胞的%),或

其中对于 (v) 大于或等于30的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于或等于20的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于或等于2的ERG % 2+Ede1和/或大于或等于3的MDM2 %增加(%增加是MDM2拷贝数> 2的细胞的%)

表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌,

由此鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者。

[0178] 项11. 项10的方法,其中 (i) 进一步由以下组成,或 (i i) - (v) 中任一种进一步包含以下:染色体8的染色体计数探针、染色体10的染色体计数探针、AURKA的基因座特异性探针、NKX3.1的基因座特异性探针、P27的基因座特异性探针和/或ETV1的分离探针。

[0179] 项12. 项10或11的方法,其进一步包括获得选自以下的临床参数:Gleason评分、肿瘤分期、PSA水平、诺模图、甲基化状态、突变和患者年龄,其中任一种可以与确定染色体异常的存在组合用于预后。

[0180] 项13. 项10-12中任一项的方法,其包括:

(a) 在杂交条件下使来自所述患者的样品与可检测标记的探针组接触,所述探针组包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和ERG的分离探针,和

(b) 确定所述样品中的染色体异常的存在,

其中大于或等于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数 > 2 的细胞的%)、大于或等于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数 < 2 的细胞的%)、大于或等于20的PTEN %纯合损失和大于或等于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。

[0181] 项14. 可检测标记的探针组,其中所述探针组为:

(i) 可检测标记的探针组,其由MYC的基因座特异性探针和FGFR1的基因座特异性探针组成,

(ii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(iii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,

(iv) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、FGFR1的基因座特异性探针、PTEN的基因座特异性探针和染色体8的染色体计数探针,

(v) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(vi) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和NKX3.1的基因座特异性探针,

(vii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(viii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MYCN的基因座特异性探针,

(ix) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和MDM2的基因座特异性探针,

(x) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ETV1的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xi) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和FGFR1的基因座特异性探针,

(xii) 可检测标记的探针组,其包含染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针和PTEN的基因座特异性探针,

(xiii) 可检测标记的探针组,其包含MYC的基因座特异性探针、ERG的分离探针、FGFR1的基因座特异性探针和P27的基因座特异性探针,或

(xiv) 可检测标记的探针组,其包含AURKA的基因座特异性探针、染色体8的染色体计数探针、MYC的基因座特异性探针和ERG的分离探针。

[0182] 项15. 项14的探针组,其进一步包含可检测标记的染色体8的染色体计数探针、可

检测标记的染色体10的染色体计数探针、可检测标记的AURKA的基因座特异性探针、可检测标记的NKX3.1的基因座特异性探针、可检测标记的P27的基因座特异性探针和/或可检测标记的ETV1的分离探针。

[0183] 项16. 探针组,其包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针和可检测标记的ERG的分离探针。

[0184] 项17. 项16的探针组,其进一步包含可检测标记的PTEN的基因座特异性探针。

[0185] 项18. 项16的探针组,其进一步包含可检测标记的MYCN的基因座特异性探针。

[0186] 项19. 项16的探针组,其进一步包含可检测标记的MDM2的基因座特异性探针。

[0187] 项20. 项16-19中任一项的探针组,其进一步包含可检测标记的染色体8的染色体计数探针、可检测标记的染色体10的染色体计数探针、可检测标记的AURKA的基因座特异性探针、可检测标记的NKX3.1的基因座特异性探针、可检测标记的P27的基因座特异性探针和/或可检测标记的ETV1的分离探针。

[0188] 项21. 试剂盒,其包含用于进行项1-5中任一项的方法的探针组和说明书。

[0189] 项22. 试剂盒,其包含用于进行项6-8中任一项的方法的探针组和说明书。

[0190] 项23. 项22的试剂盒,其包含:

(a) 能够鉴定具有侵袭性前列腺腺癌的患者探针组,其中所述探针组包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针和可检测标记的ERG的分离探针,和

(b) 用于鉴定具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险的患者的说明书,

其中所述说明书包括确定从患者获得的样品中的染色体异常的存在,

其中大于14的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于26的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)和大于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险。

[0191] 项24. 试剂盒,其包含用于进行项10-12中任一项的方法的探针组和说明书。

[0192] 项25. 项24的试剂盒,其包含:

(a) 能够鉴定具有惰性前列腺腺癌的患者探针组,其中所述探针组包含可检测标记的MYC的基因座特异性探针、可检测标记的FGFR1的基因座特异性探针、可检测标记的ERG的分离探针和可检测标记的PTEN的基因座特异性探针,和

(b) 用于鉴定具有惰性前列腺腺癌患者的说明书,其中所述说明书包括确定从患者获得的样品中的染色体异常的存在,

其中大于2的MYC %增加(%增加是MYC拷贝数> 2的细胞的%)、大于10的FGFR1 %损失(%损失是FGFR1拷贝数<2的细胞的%)、大于20的PTEN %纯合损失和大于10的ERG % 2+Ede1中的一种或多种表明所述患者具有发展侵袭性前列腺腺癌的高风险,且上述无一表明所述患者具有惰性前列腺腺癌。

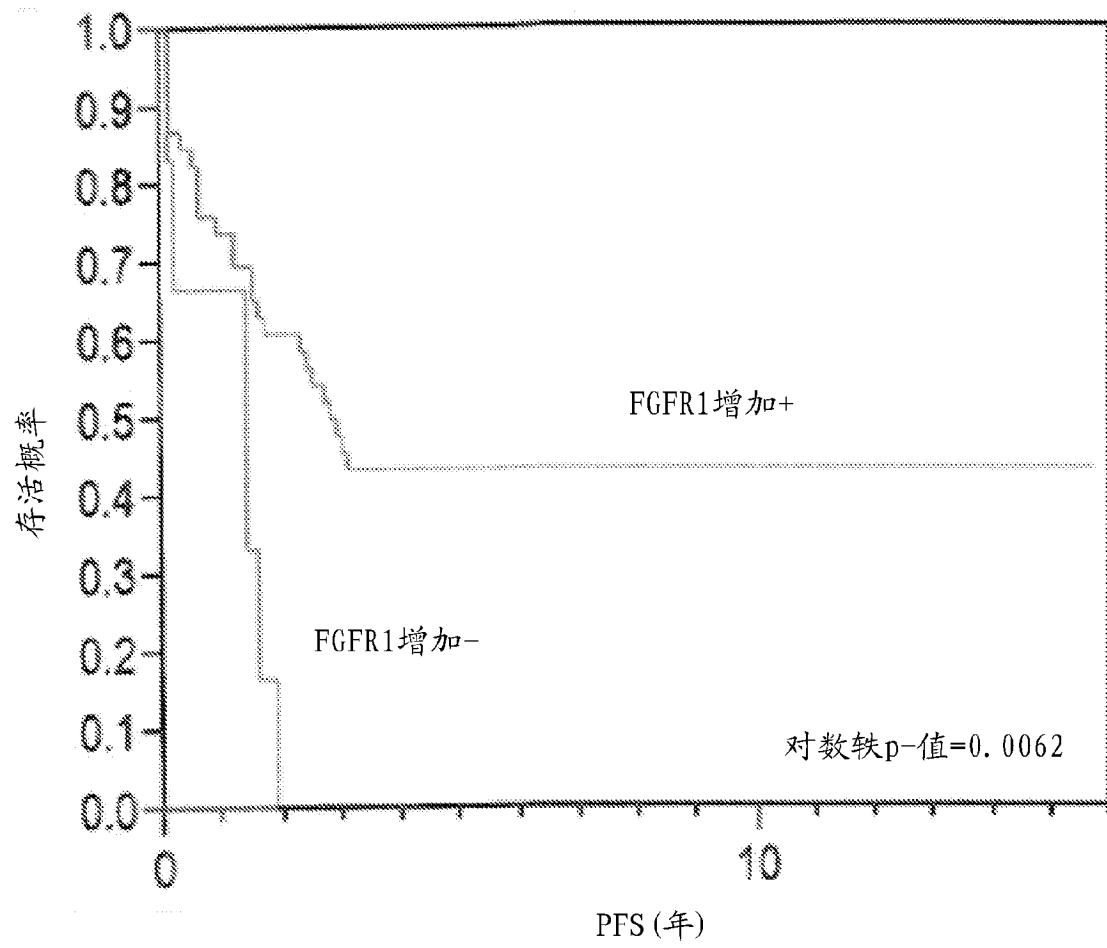


图 1

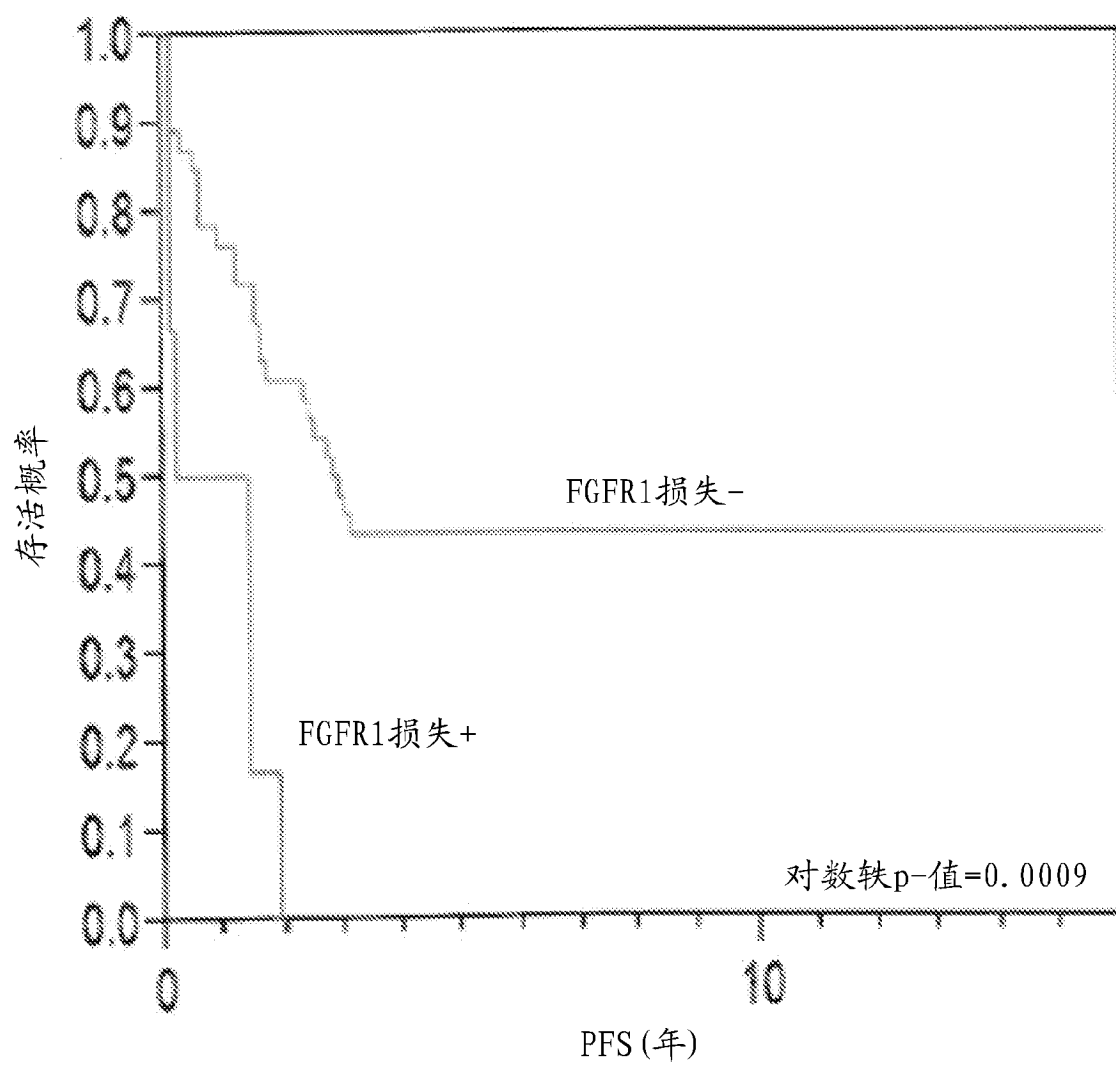


图 2

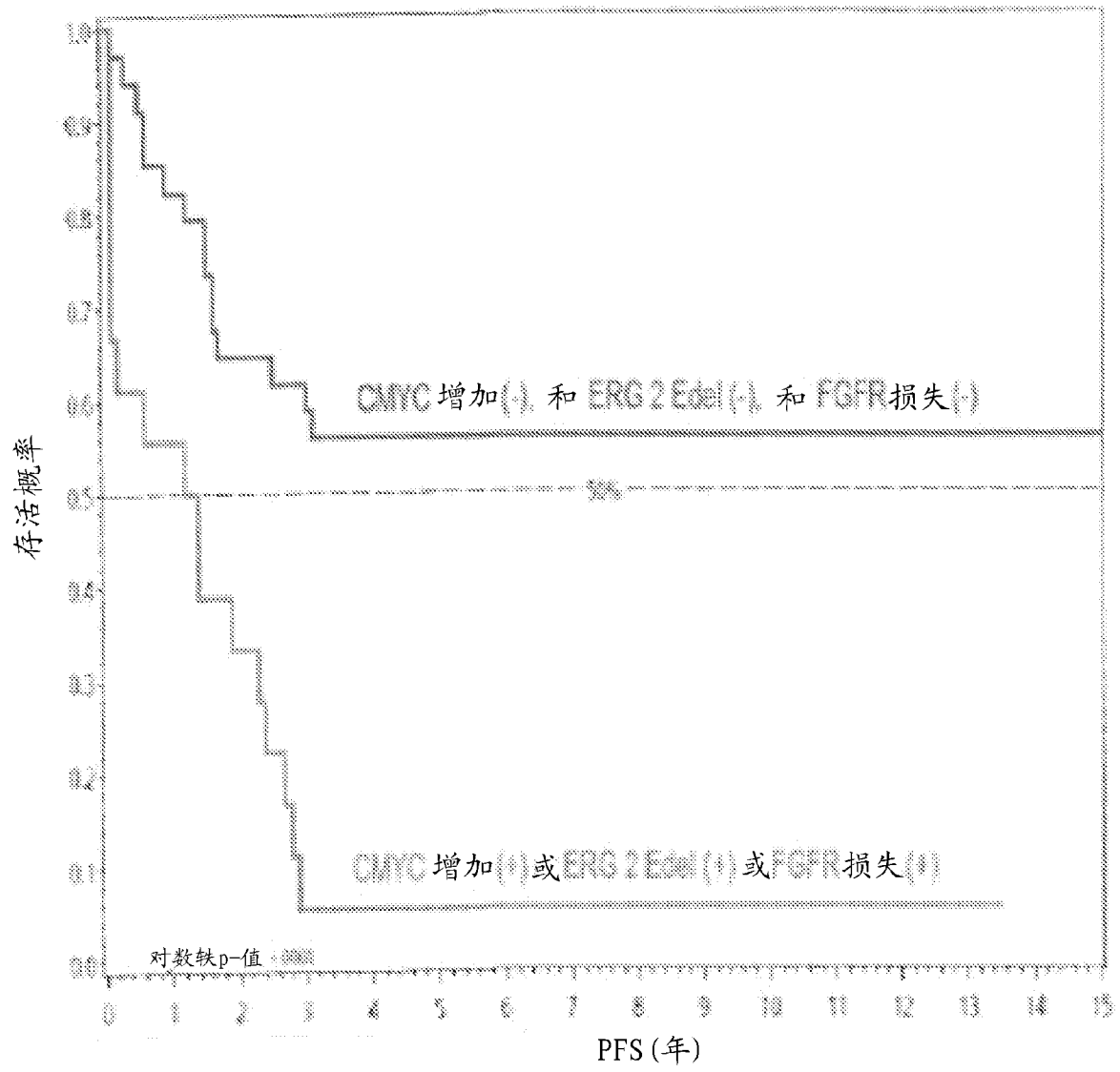


图 3

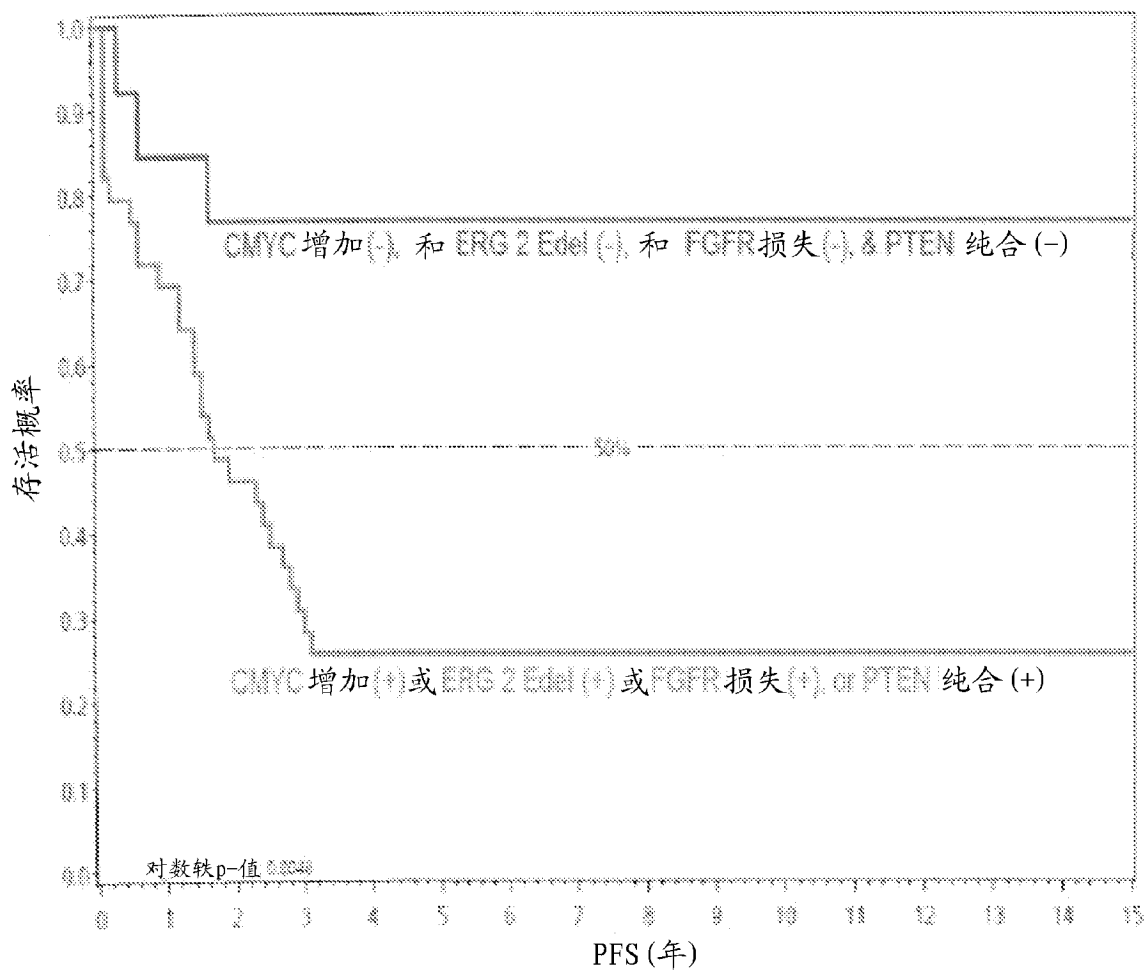


图 4

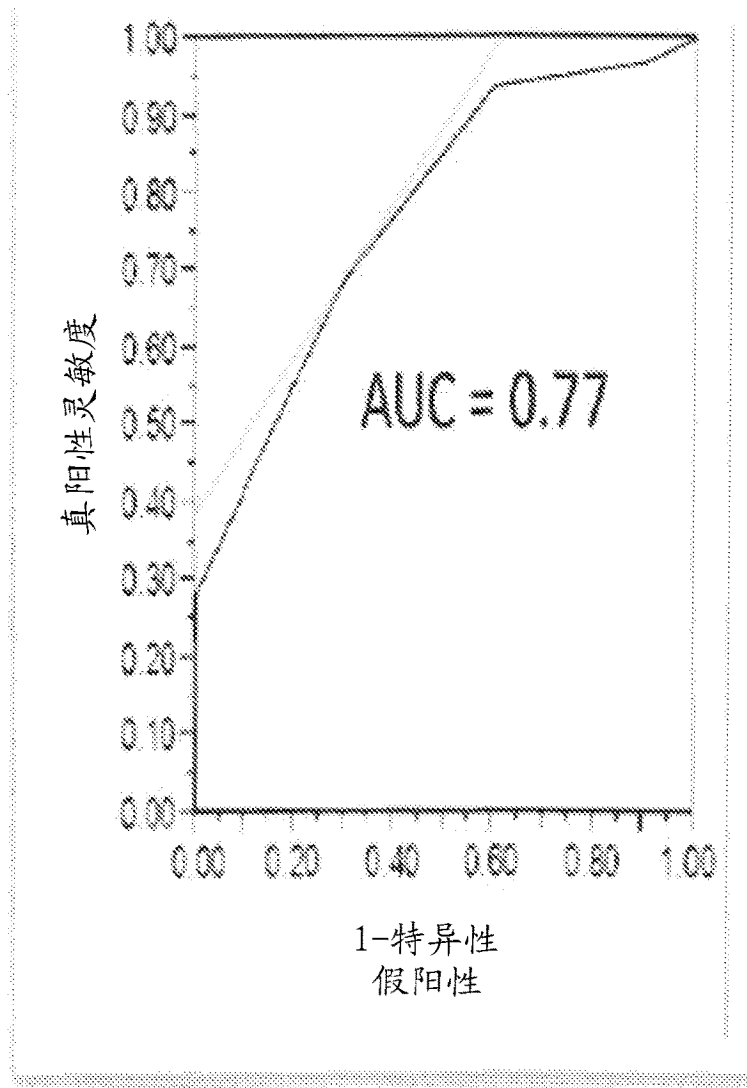


图 5A

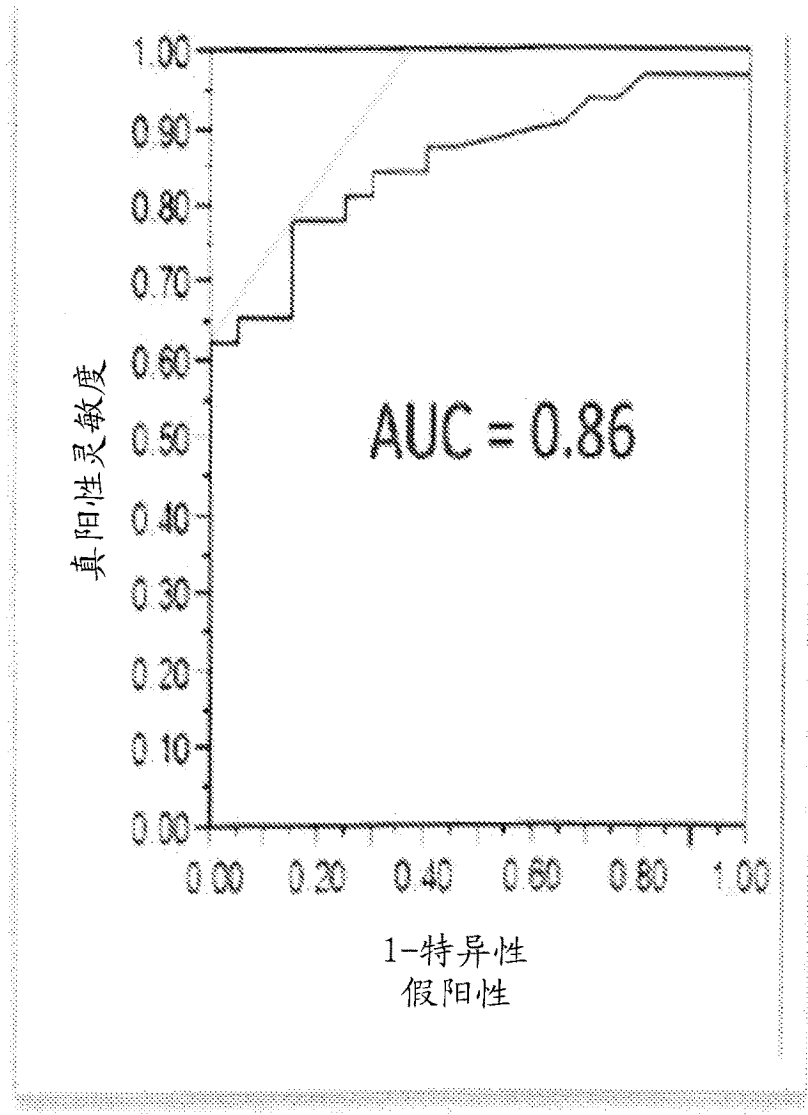


图 5B

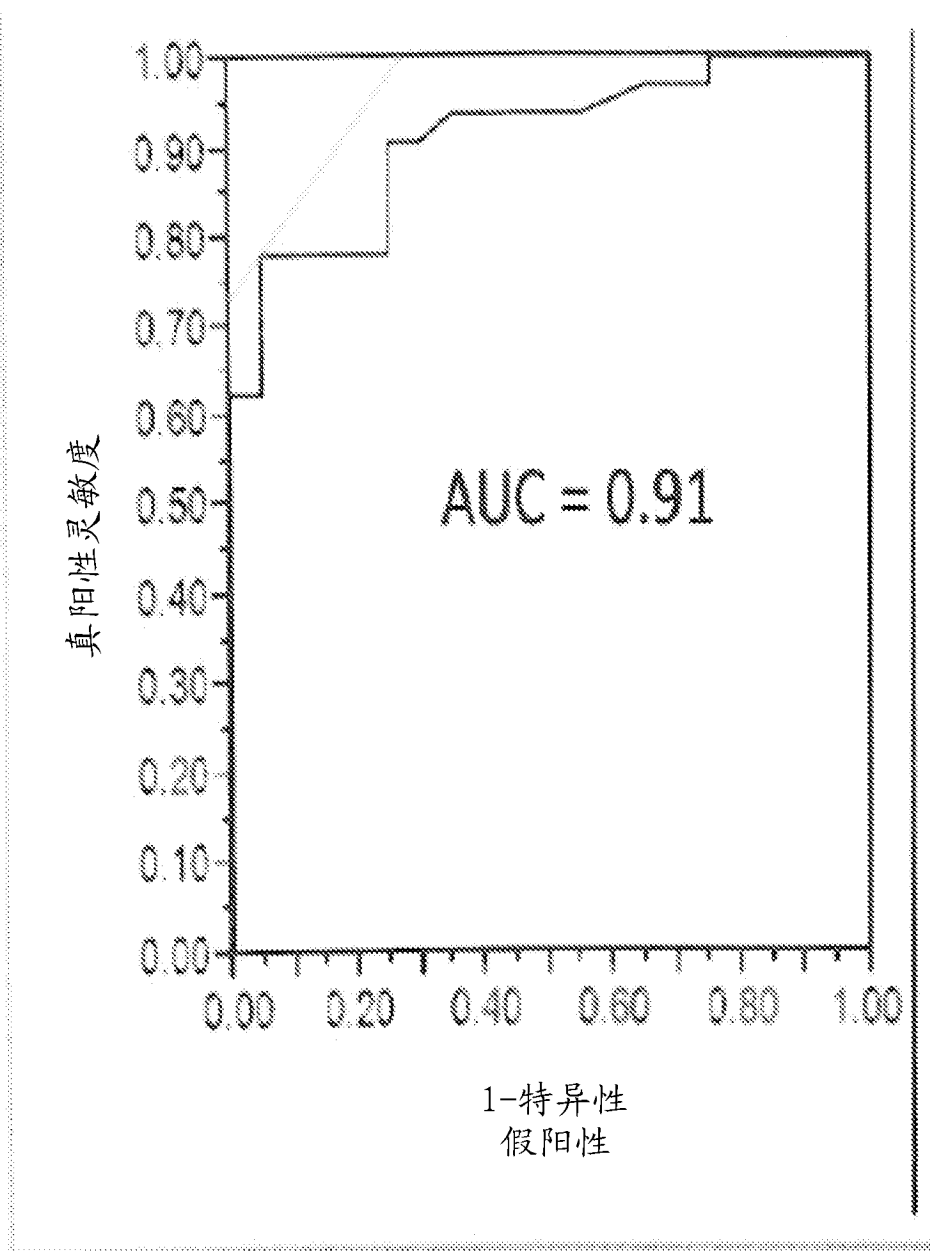


图 5C