

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2013 年 1 月 31 日 (31.01.2013)



(10) 国际公布号
WO 2013/013368 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/077495
- (22) 国际申请日: 2011 年 7 月 22 日 (22.07.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **深圳华大基因科技有限公司 (BGI SHENZHEN CO., LIMITED)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。 **深圳市第二人民医院 (SHENZHEN SECOND PEOPLE'S HOSPITAL)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区笋岗西路 3002 号, Guangdong 518035 (CN)。 **北京大学深圳医院 (PEKING UNIVERSITY SHENZHEN HOSPITAL)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): **郭广武 (GUO, Guangwu)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **胡学达 (HU, Xueda)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **桂耀庭 (GUI, Yaoting)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。 **蔡志明 (CAI, Zhiming)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区笋岗西路 3002 号, Guangdong 518035 (CN)。 **唐爱发 (TANG, Aifa)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区笋岗西路 3002 号, Guangdong 518035 (CN)。 **李泽松 (LI, Zesong)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区笋岗西路 3002 号, Guangdong 518035 (CN)。 **高升杰 (GAO, Shengjie)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **黄毅 (HUANG, Yi)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。 **贾文龙 (JIA, Wenlong)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(CN)。 **李贤新 (LI, Xianxin)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。 **陈超 (CHEN, Chao)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **周亮 (ZHOU, Liang)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。 **万胜青 (WAN, Shengqing)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **叶睿 (YE, Rui)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **宋鹏飞 (SONG, Pengfei)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **黄培德 (HUANG, Peide)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **樊帆 (FAN, Fan)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **赵鑫 (ZHAO, Xin)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **朱家楼 (ZHU, Jialou)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **陈家浩 (CHEN, Jiahao)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **鲍莉 (BAO, Li)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **刘智盛 (LIU, Zhisheng)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **阳作权 (YANG, Zuoquan)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **周峰 (ZHOU, Feng)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **周权 (ZHOU, Quan)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **于源 (YU, Yuan)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 **李彦丽 (LI, Yanli)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号

[见续页]

(54) Title: SEQUENCE FOR BLADDER CANCER DIAGNOSIS AND APPLICATION METHOD AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 用于膀胱癌诊断的序列及其使用方法和应用

(57) Abstract: Disclosed is a sequence for bladder cancer diagnosis and evaluation and the application method and use thereof. In particular, the invention provides probe sets, primer sets, compositions and microarrays for detecting at least one mutation in gene selected from UTX, CREBBP, EP300, ARID1A, CHD6, MLL, NCOR1 and MLL3. The invention also provides a method for bladder cancer diagnosis by detecting changes in the abovementioned genes, and the application of the probe sets and primer sets in preparing a kit and microarray for detecting bladder cancer.

(57) 摘要: 本发明公开了用于膀胱癌诊断评估的序列、使用方法及其应用。具体地, 本发明提供了检测选自 UTX、CREBBP、EP300、ARID1A、CHD6、MLL、NCOR1 和 MLL3 至少一种基因的突变的探针组、引物组、组合物和微阵列。本发明还提供了通过检测上述基因变化诊断膀胱癌的方法, 和上述探针组和引物组在制备检测膀胱癌的试剂盒和微阵列中的用途。



WO 2013/013368 A1



北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。王勇 (WANG, Yong) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。孙亮 (SUN, Liang) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。江智茂 (JIANG, Zhimao) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。陈静 (CHEN, Jing) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。吴松 (WU, Song) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。张仲富 (ZHANG, Zhongfu) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。杨锐林 (YANG, Ruilin) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。赵军 (ZHAO, Jun) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。徐丛杰 (XU, Congjie) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。尹卫华 (YIN, Weihua) [CN/CN]; 中国广东省深圳市福田区莲花路 1120 号, Guangdong 518036 (CN)。王俊 (WANG, Jun) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区北山路 146 号北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

- (74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OF-

FICE); 中国北京市西城区阜成门外大街 2 号万通新世界广场 8 层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

用于膀胱癌诊断的序列及其使用方法和应用

技术领域

本发明涉及病理学、遗传学、基因组学等领域。具体地，本发明涉及用于膀胱癌诊断评估的序列、使用方法及其应用。

背景技术

膀胱癌是当今全球第九大癌症 [Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55, 74-108 (2005).]，临床上一般分为两种：早期和中晚期。70%的病人表现为早期（NMI-TCCs, stage Ta 或 T1），一般没有生命危险，但容易复发。30%的病人表现为晚期（MI-TCCs, stage T2-4），表现为转移性，会危及生命 [Wu, X.R. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. Nat Rev Cancer 5, 713-25 (2005)]。以前基于基因组研究发现，两种亚型的膀胱癌在基因上就有很大差异：早期癌症在 FGFR3 基因和 Ras 基因家族中突变特别多；中晚期癌症的 TP53 和 RB1 基因缺失严重 [Wu, X.R. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. Nat Rev Cancer 5, 713-25 (2005)]。这些发现对以后的临床诊断和治疗具有深远的意义和影响。但是仅仅是上述这几种基因远远不能满足分期和检测的准确性要求，为此很有必要对其他和膀胱癌发生相关的重要基因进行同步检测，以此提高检测的精确度，或者寻找更为准确检测靶点。

发明内容

为此发明人进行了多方面的研究，跟踪现有技术，发现通过

外显子捕获技术找到膀胱癌组织中特有的 Somatic Mutations, 可以找到高频突变基因, 通过分析进而找到膀胱癌发生的重要原因。我们可以根据这些基因提供针对膀胱癌检测的序列, 为膀胱癌的发生机制和临床诊断及靶点药物的开发提供丰富可靠的信息。更为具体地, 本发明为膀胱癌易感性的检测、膀胱癌分期的检测、膀胱癌的个体化医疗提供了广泛具体的支持依据。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 但是本领域技术人员将理解, 下列实施例仅用于说明本发明, 而不是对本发明的范围的限定。根据优选实施方案的下列详细描述, 本发明的各种目的和有利方面对于本领域技术人员来说将变得显然。

除非特别指明, 否则本发明中所使用的分子生物学实验方法基本上按照本领域公知的常规方法进行或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者, 均为可以通过市购获得的常规产品。本领域技术人员知晓, 实施例以举例方式描述本发明, 且不意欲限制本发明所要求保护的范围。

实施例 1: 样品的测序

在本实施例中, 发明人使用 nimblegen 芯片 (Roche 公司, NimbleGen Sequence Capture Human Exome 2.1M Array) 以及 Hiseq 高通量测序系统 (Illumina 公司, Hiseq 2000), 对获自北京大学深圳医院的 97 例膀胱癌病患的样品 (癌组织和对应血液) 进行了外显子组测序。

97 例膀胱癌病患的样品的详细信息示于表 1 中。

表 1: 97 例膀胱癌病患的样品的详细信息。

编号	病例号	性别	年龄 (岁)	肿瘤部位	肿瘤 大小	组织分型	分化 程度	TNM 分期
B10	761683	男	52	左后壁	4.1 × 2.3	移行细胞癌	II 级	T2N0M0
B100	540152	男	25	后侧壁	1.8 × 2.3	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B101	207107	女	69	三角区	1.9 × 3	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B102	206856	男	45	三角区、顶壁	2.0 × 2.5	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B103	206811	男	54	后侧壁	2.2 × 2.5	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B104	201379	男	52	左侧壁	1 × 1.5	移行细胞癌	I-II 级	T2N0M0
B104-0	423055	男	72	膀胱颈	1.6 × 2.7	移行细胞癌	0-I 级	T1N0M0
B105	603856	男	62	右侧壁	4 × 2	移行细胞癌	I-II 级	T2NxMx
B105-0	815061	男	60	三角区	4 × 3	移行细胞癌	0-I 级	T2NxMx
B105-1	814514	男	64	后侧壁、顶壁	2 × 2	移行细胞癌	I-II 级	T2NxMx
B106	814050	男	56	三角区	2 × 1	移行细胞癌	0-I 级	T2NxMx
B107	812222	男	68	前侧壁、三角区	6 × 5	移行细胞癌	II-III 级	T2NxMx
B109	169333	男	46	后侧壁	1.8 × 2.7	移行细胞癌	0-I 级	T1N0M0
B110	207316	男	54	后侧壁	2.3 × 2.5	移行细胞癌	0-I 级	T1N0M0
B111	1505017	男	45	右侧壁	6.5 × 5.3	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B112	1534712	男	62	三角区、顶壁、膀胱颈	1.5 × 2	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B114	203243	男	73	左侧后壁	2.4 × 3.6	移行细胞癌	0-I 级	T1N0M0
B13	5761	男	64	膀胱三角区	2.0 × 2.6	移行细胞癌	II-III 级	T2N0M0
B14	323775	男	57	左侧壁	2 × 3	移行细胞癌	II 级	T2N0M0
B15	764030	男	40	三角区、顶壁	4 × 3	移行细胞癌	II 级	T4aN0M0
B16	764823	男	72	左侧壁	4 × 3	移行细胞癌	III 级	T1N0M0
B17	618300	男	61	左侧壁	1.1 × 2	移行细胞癌	I-II 级	T2N0M0

B18	618300	男	66	左后壁	3 × 2.5	移行细胞癌	II 级	T1N0M0
B2	N	男	55	N (?)	N	N	III 级	T2N0M0
B20	177583	男	66	前壁	2 × 3.5	移行细胞癌	II-III 级	T4N0M0
B21	324697	男	61	膀胱壁、后尿道	2.3 × 2.5	移行细胞癌	I 级	T4N0M0
B22	765492	男	79	左侧壁	4 × 3	移行细胞癌	II 级	T4N0M0
B23	767225	男	85	右侧壁	2 × 2	移行细胞癌	II-III 级	T1N0M0
B24	767192	男	53	顶壁、左右侧壁	8 × 5	移行细胞癌	I 级	T4N0M0
B25	489549	男	65	三角区	5.3 × 2.7	移行细胞癌	III 级	T4aN0M0
B34	2009068198	男	66	顶壁	1.5 × 2	移行细胞癌	II-III 级	T3aN0M0
B35	253609	男	80	侧壁、三角区	1.5 × 1.8	移行细胞癌	I-II 级	T1N0M0
B36	255434	男	65	右后壁	2.3 × 2	移行细胞癌	I-II 级	T2N0M0
B37	20957	男	71	侧壁、三角区	3.2 × 2.8	移行细胞癌	IV 级	T4N0M0
B41	782077	男	69	左后壁	3 × 2.5	移行细胞癌	II 级	T3bN0M0
B43	782385	男	43	右前壁	6.4 × 6	移行细胞癌	III 级	T3aN1M0
B45	2026597	男	82	右后壁	7 × 4	移行细胞癌	I 级	T1bN0M0
B47	765702	男	84	右侧壁、右后壁	5 × 4	移行细胞癌	III 级	T3aN0M0
B5	174092	男	53	膀胱颈、三角区	3.0 × 2.8	移行细胞癌	II-III 级	T4N0M0
B50	784429	男	73	顶壁、三角区	3 × 3	移行细胞癌	II 级	T2bNXMX
B52	2009078120	男	57	左侧壁	2.5 × 2.8	移行细胞癌	0-I 级	T3N0M0
B54	2010005379	男	49	三角区	2.5 × 1.5	移行细胞癌	II-III 级	T4N0M0
B55	2028479	男	41	右侧壁	3 × 3	移行细胞癌	I-II 级	T3N0M0
B56	786904	男	41	右侧壁	6 × 5	移行细胞癌	II 级	T1NxMx
B57	787299	女	72	右后壁	4 × 3.2	移行细胞癌	I 级	T2aNxMx
B59	787659	女	67	后壁	6 × 5	移行细胞癌	II-III 级	T3aNxMx
B59-0	788365	男	50	三角区	6 × 5	移行细胞癌	I-II 级	T2aNxMx
B59-1	189752	男	43	左侧壁	2 × 2	移行细胞癌	I 级	T1N0M0

B59-3	793669	男	65	膀胱颈、三角区	3 × 2	移行细胞癌	I-II 级	T2N0M0
B60	791009	女	80	右侧壁	4 × 3	移行细胞癌	II-III 级	T4N0M0
B61	788532	女	53	后侧壁	4 × 3	移行细胞癌	II-III 级	T3N0M0
B62-0	791962	男	58	左侧壁	2.5 × 2	移行细胞癌	I 级	T1NoMo
B63	792491	男	70	前后壁	2 × 2.5	移行细胞癌	II-III 级	T2aN0M0
B64	797951	男	66	后壁、左侧壁、膀胱颈	2 × 2	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B65	426354	男	87	后壁、顶壁、三角区	2 × 2	移行细胞癌	II 级	T3aN0M0
B66	796927	男	54	左侧壁	3 × 3	移行细胞癌	II-III 级	T2N0M0
B66-0	797940	女	50	左后壁	4 × 5	移行细胞癌	II-III 级	TaN0M0
B68	766774	男	85	侧壁	3 × 2.5	移行细胞癌	II 级	T2N0M0
B69	2010015266	男	87	右侧壁	3 × 2.5	移行细胞癌	I 级	T4N0M0
B70	2037243	男	65	左侧壁	1.3 × 2.0	移行细胞癌	II 级	T2N0M0
B71	2010012896	男	65	前后壁	5 × 5	移行细胞癌	II-III 级	T2N0M0
B73	2035564	男	44	前侧壁	3 × 2.5	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B74	2034578	男	60	左侧壁、三角区	2.5 × 2.5	移行细胞癌	II-III 级	T3aN0M0
B77	2010023787	男	75	左后壁	3.5 × 1.5	移行细胞癌	II 级	T1N0M0
B78	2010011281	男	80	左前壁	4 × 3	移行细胞癌	II 级	TaN0M0
B79	799385	男	63	膀胱颈、三角区	6.0 × 3.0	移行细胞癌	II-III 级	T3aN0M0
B8	759153	男	55	侧壁、三角区	2.8 × 3.5	移行细胞癌	II-III 级	T3aN0M0
B80	800364	男	76	右侧壁	2 × 2.4	移行细胞癌	III 级	T4aN0M0
B80-0	800389	男	82	左侧壁	2.5 × 4	移行细胞癌	II 级	T1N0M0
B80-11	798621	男	28	膀胱颈	1.5 × 2.0	移行细胞癌	I-II 级	T1N0M0
B80-13	802775	男	63	左、右侧壁	2.4 × 1.7	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B80-3	799961	男	51	右侧壁、膀胱颈	0.7 × 0.5	移行细胞癌	II 级	T4N0M0

B80-4	799634	男	54	膀胱颈	2.5 × 2.1	移行细胞癌	I-II 级	T1N0M0
B80-7	N	男	58	N	N	N	II 级	T3N0M0
B80-8	N	女	63	N	N	N	III 级	T2N0M0
B81	802224	男	63	右后壁	5.6 × 4.1	移行细胞癌	III 级	T2N0M0
B81-1	804976	男	62	右后侧壁	1.6 × 2.4	移行细胞癌	I 级	T2N0M0
B82	184794	男	56	侧壁、三角区	4 × 2.5	移行细胞癌	II-III 级	T3aN0M0
B83	2041040	女	84	左、右侧壁	2.0 × 2.5	移行细胞癌	I-II 级	T3N0M0
B84	185596	男	64	后壁	1 × 1.5	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B85-0	584807	男	76	左、右侧壁	3.3 × 3.5	移行细胞癌	I 级	TaN0M0
B85-2	583637	男	74	三角区右侧	2.5 × 2	移行细胞癌	I 级	TaN0M0
B86	806578	男	48	膀胱颈	8.1 × 5.9	移行细胞癌	I 级	T2N0M0
B87	805057	男	57	左后壁	4.3 × 4.9	移行细胞癌	I-II 级	T1N0M0
B88	804594	男	56	左侧壁、后壁	7.0 × 4.6	移行细胞癌	I-II 级	T3N0M0
B89-1	805342	男	65	左侧壁、顶壁	2.0 × 2.5	移行细胞癌	I-II 级	T2N0M0
B89-10	2043702	男	65	顶壁	2.3 × 3	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B89-12	189515	女	72	三角区	3.9 × 2.4	移行细胞癌	III 级	T2N0M0
B89-16	269798	男	68	左侧壁	2.2 × 1.5	移行细胞癌	I-II 级	T1N0M0
B89-3	806608	男	65	侧壁	2.2 × 2	移行细胞癌	I 级	T3N0M0
B89-4	2014113	男	71	右侧壁	1 × 2	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B89-5	2010041410	男	50	左侧壁	2 × 2	移行细胞癌	I 级	T1N0M0
B9	760698	男	81	膀胱颈、三角区	5.2 × 3.4	移行细胞癌	II-III 级	T3N0M0
B90	272438	男	84	右侧壁	2.0 × 2.5	移行细胞癌	I-II 级	T1N0M0
B96	2045318	男	69	三角区、侧壁	5 × 4	移行细胞癌	II-III 级	T3N0M0
B98	200155	男	63	右侧壁	5.2 × 4.5	移行细胞癌	II-III 级	T3N0M0
B99	2047222	女	37	顶壁	1.0 × 1.5	移行细胞癌	I 级	T1N0M0

(表 1 中 N 表示无详细信息)

1、基因组 DNA 的片段化

从各个病患的样品中使用试剂盒 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, 51306) 提取基因组 DNA, 并使用超声法 (Covaris, S-2) 将获得的基因组 DNA 片段化为大小约 200bp 的片段。

2、DNA 片段的末端修复以及 3' 连接“A”碱基

根据制造商的说明书, 使用 T4 DNA Polymerase(Enzymatics, P708L)、Klenow Fragment(Enzymatics, P706L) 和 T4 Polynucleotide Kinase (Enzymatics, Y904L), 对步骤 1 获得的片段化的 DNA 进行末端修复, 从而形成平末端的 DNA 片段。然后使用 Klenow (3'-5' exo-)酶 (Enzymatics, P701-LC-L), 在具有平末端的 DNA 片段的 3' 末端连接“A”碱基。

3、标签接头(Index Adapter)的连接及 DNA 片段的捕获

使用 T4 DNA Ligase (Enzymatics, L603-HC-L), 将步骤 2 获得的 3' 末端连接有“A”碱基的 DNA 片段分别连接至不同的标签接头(Index Adapter) (序列自行设计, 由 Invitrogen 公司合成)。然后根据制造商的说明书, 使用 nimblegen 芯片 (Roche, NimbleGen Sequence Capture Human Exome 2.1M Array), 捕获连接有标签接头(Index Adapter)的 DNA 片段。使用 NimbleGen Sequence Capture Wash and Elution Kit (NimbleGen, 05340730001) 洗涤芯片和洗脱捕获的样品。然后使用 Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix(NEB, F-531L) 扩增与 MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, 28006) 纯化洗脱的样品, 从而获得各个样品的测序文库。

4、测序

根据制造商的说明书，使用 Illumina HiSeq 2000 测序平台（Illumina, HiSeq 2000）对各个样品的测序文库进行测序，其中，测序的读取长度为 100bp，并且每个样本的平均测序深度至少为 60x（本例中即测序量为外显子组的 60 倍），从而获得每个样品的外显子组测序数据。

实施例 2：样品的外显子组测序数据的处理与分析

如下处理和分析实施例 1 得到的各个样品的外显子组测序数据，以鉴定膀胱癌样品中发生高频突变的与染色质修饰相关的基因，以及这些基因中发生突变的位点

1、如实施例 1 所述，获取各个样品的外显子组测序数据；

2、针对各个样品的外显子组测序数据，将实施例 1 的步骤 4 中的含有接头序列(adapter connector)的测序片段(reads)去除；对每个 lane 的下机数据进行测序片段去重复处理，该步骤是为了去掉测序引起的一些数据冗余。

具体执行步骤：

首先根据每个 lane 下机数据的报告得到其特异的接头序列，遍历下机数据的每条测序片段将含有接头序列的测序片段去除（通常有两种方法，一种是只去除接头序列保留截取接头序列后的测序片段，另一种是直接将含有接头序列的测序片段扔掉，由于含有接头序列的测序片段量较少不足以影响我们后续分析，因此我们为了序列的整齐利于后续分析而采取直接将含有接头序列的测序片段扔掉的方法）。

其次，每个 lane 的下机数据中由于实施例 1 中的扩增作用产生的完全一致的测序片段为重复序列，数据量越大，duplication

比例越高，完全重复的测序片段是冗余的，根据测序片段的个性去除数据冗余。

3、使用序列比对软件 bwa (<http://bio-bwa.sourceforge.net/> 软件: Burrows-Wheeler Aligner)，将步骤 2 处理得到的测序数据与来自数据库 NCBI 的人类基因组参考序列 hg18 (8 个突变基因是癌症样本序列与正常组织样本序列分别与参考序列比对后进一步分析得到的突变位点对应的基因, 既 8 个基因是 hg18 序列上对应的基因) 进行比对, 得到比对结果。

4、通过对每个样品的比对结果应用如下处理以统计得到各个样品的测序数据的质量, 测序深度, 以及外显子靶区域覆盖度。

具体执行步骤:

首先读取比对结果, 得到总测序片段数, 进一步得到比对到外显子靶区域的测序片段数, 非冗余的比对到外显子测序片段区域的测序片段数, 外显子测序片段区域位点数等, 通过数学关系式得到各自的统计结果。

5、依然以人类基因组 hg18 为参考序列, 使用比对软件 VarScan (<http://varscan.sourceforge.net/>) 和 GATK (http://www.broadinstitute.org/gsa/wiki/index.php/The_Genome_Analysis_Toolkit) 来鉴定各样品的测序数据中具有单核苷酸多态性的位点 (即, 与参考序列 hg18 相比, 发生了突变的位点);

6、使用 NCBI (The National Center for Biotechnology Information) 数据库 Dbsnp, 例如多态性位点数据库 dbsnp130 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) 和人类基因组国际单体型 hapmap (www.hapmap.org), 对步骤 5 所鉴定的位点进行可信度数据优化, 从测序片段支持数等相关方面进行过滤并根据该网站 (<http://genome.ucsc.edu/>) 上得到的人类相关

基因信息进行注释;

7、获得发生了突变的位点的详细信息, 做 PCR 实验进行 Sanger 测序法验证;

通过上述步骤, 发明人在 9 例膀胱癌组织的深度测序下进行突变分析时发现阶段中鉴定到的高频突变基因与染色体修饰相关, 并在用于验证的其他 88 例膀胱癌中发现了相关的 8 个发生高频突变的基因。

所述的基因分别为: UTX (示于 SEQ ID NO: 1)、CREBBP (示于 SEQ ID NO: 2)、EP300 (示于 SEQ ID NO: 3)、ARID1A (示于 SEQ ID NO: 4)、CHD6 (示于 SEQ ID NO: 5)、MLL (示于 SEQ ID NO: 6)、NCOR1 (示于 SEQ ID NO: 7) 和 MLL3 (示于 SEQ ID NO: 8)。

综合各个样品的外显子组测序数据及其分析结果, 发明人鉴定并验证了 8 个发生高频突变的基因, 并鉴定到了 96 个与这些基因相关的突变。8 个发生高频突变的基因的详细信息列于表 2 中, 并且所鉴定到的 96 个非同义突变的详细信息列于表 3 中。

表 2: 8 个发生高频突变的基因的详细信息。

基因 名称	非沉默体细胞突变 (N)		沉默突变 (S)	总的突变 个数	N: S 的 比值	具有非沉默 突变的患者	P 值
	错义突变	无义突变/剪 接位点突变/ 插入或缺失					
<i>UTX</i>	5	17	1	23	22.0	20 (21%)	<0.001
<i>CREBBP</i>	4	11	2	17	7.5	13 (13%)	<0.001
<i>EP300</i>	6	7	0	13	-	13 (13%)	<0.001
<i>ARID1A</i>	4	14	0	18	-	13 (13%)	<0.001

<i>CHD6</i>	6	1	2	9	3.5	7 (7%)	<0.001
<i>MLL</i>	5	3	1	9	8.0	7 (7%)	<0.001
<i>NCOR1</i>	5	2	0	7	-	6 (6%)	<0.001
<i>MLL3</i>	2	4	1	7	6.0	5 (5%)	<0.001

表 3: 96 个突变的详细信息

基因名称	患者	核苷酸 (基因组) #	核苷酸 (cDNA) \$	密码子 变化	氨基酸 变化	氨基酸 (蛋白) *	杂合/ 纯合	突变 类型
ARID1A	B13	g. chr1: 2697 8951C>G	c. 5975C>G	TCA=> TGA	Ser=> 终 止	p. S1992*	杂合	无义
ARID1A	B13	g. chr1: 2697 9357C>G	c. 6381C>G	ATC=> ATG	Ile=>Met	p. I2127M	杂合	错义
ARID1A	B13	g. chr1: 2697 9782C>T	c. 6806C>T	TCA=> TTA	Ser=>Leu	p. S2269L	杂合	错义
ARID1A	B13	g. chr1: 2696 6872-269668 72delC	c. 2993: 299 3delC	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
ARID1A	B24	g. chr1: 2696 2263C>T	c. 2632C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q878*	杂合	无义
ARID1A	B35	g. chr1: 2697 1984C>T	c. 3634C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q1212*	杂合	无义
ARID1A	B37	g. chr1: 2697 8314G>T	c. 5338G>T	GAA=> TAA	Glu=> 终 止	p. E1780*	杂合	无义
ARID1A	B37	g. chr1: 2697 8674G>A	c. 5698G>A	GAT=> AAT	Asp=>Asn	p. D1900N	杂合	错义
ARID1A	B47	g. chr1: 2697 8197C>T	c. 5221C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q1741*	杂合	无义

ARID1A	B5	g. chr1: 2697 1940C>G	c. 3590C>G	TCC=> TGC	Ser=>Cys	p. S1197C	杂合	错义
ARID1A	B5	g. chr1: 2697 2451C>A	c. 3743C>A	TCA=> TAA	Ser=> 终 止	p. S1248*	杂合	无义
ARID1A	B52	g. chr1: 2697 8192_269782 25delcaggac agagaacgcta ctggatcctgg gaggtt	c. 5216: 524 9delcaggac agagaacgct actggatcct gggaggtt	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
ARID1A	B60	g. chr1: 2697 4055C>T	c. 4750C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q1584*	杂合	无义
ARID1A	B71	g. chr1: 2693 1800C>G	c. 1850C>G	TCA=> TGA	Ser=> 终 止	p. S617*	杂合	无义
ARID1A	B79	g. chr1: 2697 4670G>A	c. 5009G>A	TGG=> TAG	Trp=> 终 止	p. W1670*	杂合	无义
ARID1A	B85- 0	g. chr1: 2697 8582_269785 82delg	c. 5607: 560 7delg	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
ARID1A	B85- 2	g. chr1: 2697 3782C>T	c. 4477C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q1493*	杂合	无义
ARID1A	B90	g. chr1: 2693 1847C>T	c. 1897C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q633*	杂合	无义
CHD6	B35	g. chr20: 394 88150C>A	c. 4126G>T	GCA=> TCA	Ala=>Ser	p. A1376S	杂合	错义
CHD6	B36	g. chr20: 395 50622C>T	c. 1717G>A	GTC=> ATC	Val=>Ile	p. V573I	杂合	错义
CHD6	B55	g. chr20: 394 78647G>T	c. 6481C>A	CAC=> AAC	His=>Asn	p. H2161N	杂合	错义

CHD6	B59-3	g. chr20: 394 74294C>G	c. 7155G>C	CAG=> CAC	Gln=>His	p. Q2385H	杂合	错义
CHD6	B65	g. chr20: 395 49856T>A	c. 1864A>T	AAA=> TAA	Lys=> 终止	p. K622*	杂合	无义
CHD6	B69	g. chr20: 395 13999C>T	c. 3404G>A	CGT=> CAT	Arg=>His	p. R1135H	杂合	错义
CHD6	B89-4	g. chr20: 395 95593G>A	c. 64C>T	CCA=> TCA	Pro=>Ser	p. P22S	杂合	错义
CREBBP	B105	g. chr16: 374 7903G>A	c. 3517C>T	CGA=> TGA	Arg=> 终止	p. R1173*	杂合	无义
CREBBP	B109	g. chr16: 372 8619G>C	c. 4336C>G	CGC=> GGC	Arg=>Gly	p. R1446G	杂合	错义
CREBBP	B110	g. chr16: 384 0811G>A	c. 286C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终止	p. Q96*	杂合	无义
CREBBP	B13	g. chr16: 373 5319G>A	c. 3874C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终止	p. Q1292*	杂合	无义
CREBBP	B37	g. chr16: 384 0787G>A	c. 310C>T	CAA=> TAA	Gln=> 终止	p. Q104*	杂合	无义
CREBBP	B5	g. chr16: 378 3541G>A	c. 1063C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终止	p. Q355*	杂合	无义
CREBBP	B59	g. chr16: 375 7755G>A	c. 3217C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终止	p. Q1073*	杂合	无义
CREBBP	B62-0	g. chr16: 374 8902G>T	c. 3323C>A	TCA=> TAA	Ser=> 终止	p. S1108*	杂合	无义
CREBBP	B63	g. chr16: 372 6706C>A	c. 4506G>T	TGG=> TGT	Trp=>Cys	p. W1502C	杂合	错义
CREBBP	B66	g. chr16: 371 8066G>A	c. 6983C>T	TCG=> TTG	Ser=>Leu	p. S2328L	杂合	错义

CREBBP	B66	g. chr16: 374 7299T>C	c. 3689A>G	TAT=> TGT	Tyr=>Cys	p. Y1230C	杂合	错义
CREBBP	B80- 13	g. chr16: 376 0937G>A	c. 2515C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q839*	杂合	无义
CREBBP	B89- 1	g. chr16: 376 8750-376875 3delggct	c. 1890: 189 3delagcc	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
CREBBP	B89- 4	g. chr16: 374 1727C>A	-	-	-	-	杂合	剪接位 点突变
CREBBP	B89- 4	g. chr16: 378 2055T>A	c. 1258A>T	AAG=> TAG	Lys=> 终 止	p. K420*	杂合	无义
EP300	B10	g. chr22: 398 75951C>T	c. 2620C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q874*	杂合	无义
EP300	B106	g. chr22: 398 98450A>T	c. 4454A>T	GAT=> GTT	Asp=>Val	p. D1485V	杂合	错义
EP300	B66	g. chr22: 398 96441-39896 446delcccaa g	c. 4372: 437 7delcccaag	-	-	-	-	插入/缺 失
EP300	B78	g. chr22: 398 75801C>T	c. 2470C>T	CAA=> TAA	Gln=> 终 止	p. Q824*	杂合	无义
EP300	B80- 13	g. chr22: 398 99617G>C	c. 4662G>C	AAG=> AAC	Lys=>Asn	p. K1554N	杂合	错义
EP300	B80- 4	g. chr22: 399 04544C>A	c. 6883C>A	CAA=> AAA	Gln=>Lys	p. Q2295K	杂合	错义
EP300	B80- 8	g. chr22: 398 43235C>T	c. 193C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q65*	杂合	无义
EP300	B86	g. chr22: 399 02296C>T	c. 4879C>T	CGG=> TGG	Arg=>Trp	p. R1627W	杂合	错义

EP300	B87	g. chr22: 398 95519insT	c. 4240: 424 0insT	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
EP300	B89- 10	g. chr22: 398 96446-39896 457delgccca agcgact	c. 4377: 438 8delgcccaa gcgact	-	-	-	-	p. AQAT9 57-960d el
EP300	B89- 4	g. chr22: 398 96421A>T	c. 4352A>T	CAT=> CTT	His=>Leu	p. H1451L	杂合	错义
EP300	B90	g. chr22: 398 98557G>C	c. 4561G>C	GAA=> CAA	Glu=>Gln	p. E1521Q	杂合	错义
EP300	B96	g. chr22: 398 43686-39843 696delctggc aactta	c. 644: 654d elctggcaac tta	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
MLL	B103	g. chr11: 117 864574C>A	c. 4368C>A	CAC=> CAA	His=>Gln	p. H1456Q	杂合	错义
MLL	B112	g. chr11: 117 864643C>G	c. 4437C>G	TGC=> TGG	Cys=>Trp	p. C1479W	纯合	错义
MLL	B35	g. chr11: 117 895917C>G	c. 11348C>G	TCT=> TGT	Ser=>Cys	p. S3783C	杂合	错义
MLL	B66	g. chr11: 117 875247-1178 75266delttg aagttttcaga agagtg	c. 5972: 599 1delttgaag ttttcagaag agtg	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
MLL	B69	g. chr11: 117 852746C>G	c. 3173C>G	TCA=> TGA	Ser=> 终 止	p. S1058*	杂合	无义
MLL	B69	g. chr11: 117 864633-1178	c. 4427: 442 9delgtc	-	-	-	-	插入/缺 失

		64635delgtc						
MLL	B71	g. chr11: 117 880473C>G	c. 8647C>G	CTT=> GTT	Leu=>Val	p. L2883V	杂合	错义
MLL	B73	g. chr11: 117 879382C>T	c. 7556C>T	ACA=> ATA	Thr=>Ile	p. T2519I	杂合	错义
MLL3	B5	g. chr7: 1515 10591G>A	c. 5287C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q1763*	杂合	无义
MLL3	B5	g. chr7: 1515 31025-15153 1025delC	c. 4019: 401 9delG	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
MLL3	B60	g. chr7: 1516 39897G>A	c. 658C>T	CAA=> TAA	Gln=> 终 止	p. Q220*	纯合	无义
MLL3	B70	g. chr7: 1515 04437G>A	c. 9034C>T	CAA=> TAA	Gln=> 终 止	p. Q3012*	杂合	无义
MLL3	B89- 12	g. chr7: 1514 76545T>A	c. 13400A>T	AAG=> ATG	Lys=>Met	p. K4467M	杂合	错义
MLL3	B89- 4	g. chr7: 1514 82083C>A	c. 12221G>T	GGT=> GTT	Gly=>Val	p. G4074V	杂合	错义
NCOR1	B107	g. chr17: 159 14252G>C	c. 4465C>G	CAA=> GAA	Gln=>Glu	p. Q1489E	杂合	错义
NCOR1	B45	g. chr17: 159 35901C>A	-	-	-	-	杂合	剪接位 点突变
NCOR1	B66	g. chr17: 159 81413C>G	c. 1446G>C	AAG=> AAC	Lys=>Asn	p. K482N	杂合	错义
NCOR1	B69	g. chr17: 159 24760G>A	c. 3184C>T	CCA=> TCA	Pro=>Ser	p. P1062S	杂合	错义
NCOR1	B69	g. chr17: 159 97435C>G	-	-	-	-	杂合	剪接位 点突变

NCOR1	B74	g. chr17: 160 30638C>T	c. 197G>A	CGA=> CAA	Arg=>Gln	p. R66Q	杂合	错义
NCOR1	B96	g. chr17: 159 14368G>A	c. 4349C>T	TCA=> TTA	Ser=>Leu	p. S1450L	纯合	错义
UTX	B101	g. chrX: 4480 7883-448078 92delAAGTGG AAGT	c. 1800: 180 9delAAGTGG AAGT	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
UTX	B101	g. chrX: 4481 3956-448139 65delTACCTC AGGT	c. 2112: 212 1delTACCTC AGGT	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
UTX	B104 -0	g. chrX: 4476 4915T>G	c. 560T>G	TTA=> TGA	Leu=> 终 止	p. L187*	杂合	无义
UTX	B105	g. chrX: 4480 3468A>G	c. 1007A>G	GAT=> GGT	Asp=>Gly	p. D336G	杂合	错义
UTX	B111	g. chrX: 4483 0137T>A	c. 3517T>A	TAC=> AAC	Tyr=>Asn	p. Y1173N	纯合	错义
UTX	B114	g. chrX: 4483 4051G>A	c. 3668G>A	GGC=> GAC	Gly=>Asp	p. G1223D	纯合	错义
UTX	B57	g. chrX: 4482 3355A>T	c. 2959A>T	AAA=> TAA	Lys=> 终 止	p. K987*	杂合	无义
UTX	B57	g. chrX: 4482 7761C>T	c. 3397C>T	CAA=> TAA	Gln=> 终 止	p. Q1133*	杂合	无义
UTX	B66	g. chrX: 4482 7705C>T	c. 3341C>T	TCA=> TTA	Ser=>Leu	p. S1114L	纯合	错义
UTX	B69	g. chrX: 4482 7715-448277 17delTCT	c. 3351: 335 3delTCT	-	-	-	-	p. S286- 286del

UTX	B77	g. chrX: 4480 7610G>C	-	-	-	-	杂合	剪接位 点突变
UTX	B79	g. chrX: 4485 4391C>T	c. 4129C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q1377*	杂合	无义
UTX	B82	g. chrX: 4481 3948insA	c. 2105insA	-	-	-	-	移框-插 入/缺失
UTX	B83	g. chrX: 4482 2653C>G	c. 2897C>G	CCT=> CGT	Pro=>Arg	p. P966R	杂合	错义
UTX	B85- 0	g. chrX: 4481 4168C>G	c. 2324C>G	TCA=> TGA	Ser=> 终 止	p. S775*	纯合	无义
UTX	B85- 2	g. chrX: 4483 3965G>A	c. 3582G>A	TGG=> TGA	Trp=> 终 止	p. W1194*	纯合	无义
UTX	B89- 16	g. chrX: 4471 8869C>T	c. 349C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q117*	杂合	无义
UTX	B89- 4	g. chrX: 4482 3391G>T	c. 2995G>T	GAA=> TAA	Glu=> 终 止	p. E999*	杂合	无义
UTX	B89- 5	g. chrX: 4471 8898C>G	c. 378C>G	TAC=> TAG	Tyr=> 终 止	p. Y126*	杂合	无义
UTX	B90	g. chrX: 4480 3566C>T	c. 1105C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q369*	纯合	无义
UTX	B96	g. chrX: 4480 7746C>T	c. 1663C>T	CAG=> TAG	Gln=> 终 止	p. Q555*	纯合	无义

注：表中 ins 表示插入；del 表示缺失。

上述结果表明，所鉴定到的发生高频突变的 8 个基因以及在这 8 个基因中所鉴定到的 96 个突变位点与膀胱癌密切相关，并且所述 8 个基因和 96 个突变位点可用于对膀胱癌进行诊断、分期和药物敏感性评估。

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公开的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。

权 利 要 求

1. 探针组，其由特异性检测选自：UTX（示于 SEQ ID NO: 1）、CREBBP（示于 SEQ ID NO: 2）、EP300（示于 SEQ ID NO: 3）、ARID1A（示于 SEQ ID NO: 4）、CHD6（示于 SEQ ID NO: 5）、MLL（示于 SEQ ID NO: 6）、NCOR1（示于 SEQ ID NO: 7）和 MLL3（示于 SEQ ID NO: 8）中的至少一个基因的变化的探针构成，所述变化包括移框、插入、缺失、无义、错义突变中的至少一种。
2. 引物组，其由特异性扩增 SEQ ID NO: 1-8 中的至少一个基因的特定序列引物组构成。
3. 组合物，其中含有权利要求 1 的探针组或权利要求 2 的引物组。
4. 微阵列，其上固定有权利要求 1 的探针组或者引物组。
5. 权利要求 1 的探针组或权利要求 2 的引物组，其包含特异性检测或者扩增表 3 所示的任何一种基因变化的探针或者引物。
6. 诊断受试者是否患有膀胱癌或处于发展该疾病的风险中的方法，该方法包括测量来自所述受试者的受试样品中 SEQ ID NO: 1-8 的至少一种基因的变化，其中与 SEQ ID NO: 1-8 相应的基因相比，受试样品中基因的改变表示受试者患有膀胱癌或处于发展膀胱癌的风险中。
7. 权利要求 6 的方法，其包括使用权利要求 1 的探针组或权利要求 2 的引物组对取自人体的待测膀胱组织进行检测，当检测结果表明所述组织中的对应于 SEQ ID NO: 1-8 的基因中存在表 3 所述的基因变化达到 2 种以上，所述样品为膀胱癌的阳性率为 90% 以上。
8. 权利要求 1 的探针组或权利要求 2 的引物组在制备用于膀胱癌检测的微阵列、试剂盒、个体化治疗中的用途。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/077495**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12Q 1/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN; CNABS; NCBI; CNKI; ISI-WEB OF KNOWLEDGE; GOOGLE SCHOLAR: bladder carcinoma, gent, mutation, UTX, CREBBP, EP300, ARID1A, CHD6, MLL, NCOR1, MLL3, bladder, cancer, carcinoma, tumor, urothelial, primer, probe, micro-array, diagnosis, diagnostic

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KOMPIER, L.C. et al., FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. PLOS ONE. November 2010, vol. 5, no. 11, pages 1-13, see pages 3-4 and 10	1-8
A	SJODAHL, G et al., A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; Inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1. PLOS ONE, April 2011, vol. 6, no. 4, pages 1-6, see abstract, and pages 2 and 4	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 18 April 2012 (18.04.2012)	Date of mailing of the international search report 03 May 2012 (03.05.2012)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer TIAN, Yuan Telephone No.: (86-10) 62411047

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/077495

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-8 of the present invention comprise at least 8 inventions:

1. Simultaneously detect the mutational probe set, primer group, composition and micro-array of 8 genes, wherein the genes are selected from UTX, CREBBP, EP300, ARID1A, CHD6, MLL, NCOR1 and MLL3; a method for the diagnosis of bladder cancer by detecting changes of the above 8 genes, and usage of said probe set or primer group in preparation of the micro-array, kit and individual treatment for the detection of bladder cancer;

(see the extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claims 1-8 (partial): simultaneously detect the mutational probe set, primer group, composition and micro-array of 8 genes, wherein the genes are selected from UTX, CREBBP, EP300, ARID1A, CHD6, MLL, NCOR1 and MLL3; a method for the diagnosis of bladder cancer by detecting changes of the above 8 genes, and usage of said probe set or primer group in preparation of the micro-array, kit and individual treatment for the detection of bladder cancer.

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/077495

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAAFTEN, G.V. et al., Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. NATURE GENETICS. May 2009, vol. 41, no. 5, pages 521-523, see the whole document	1-8
A	BOORJIAN, S.A. et al., Expression and significance of androgen receptor coactivators in urothelial carcinoma of the bladder. ENDOCR RELAT CANCER. March 2009, vol. 16, no. 1, pages 123-137, see the whole document	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/077495

CONTINUATION BOX NO. III

2. Simultaneously detect the mutational probe set, primer group, composition and micro-array of 7 genes, wherein the genes are selected from UTX, CREBBP, EP300, ARID1A, CHD6, MLL, NCOR1 and MLL3; a method for the diagnosis of bladder cancer by detecting changes of the above 7 genes, and a usage of said probe set or primer group in preparation of the micro-array, kit and individual treatment for the detection of bladder cancer;

3. Simultaneously detect the mutational probe set, primer group, composition and micro-array of 6 genes, wherein the genes are selected from UTX, CREBBP, EP300, ARID1A, CHD6, MLL, NCOR1 and MLL3; a method for the diagnosis of bladder cancer by detecting changes of the above 6 genes, and a usage of said probe set or primer group in preparation of the micro-array, kit and individual treatment for the detection of bladder cancer;

.

.

.

8. Simultaneously detect the mutational probe set, primer group, composition and micro-array of 1 gene, wherein the gene is selected from UTX, CREBBP, EP300, ARID1A, CHD6, MLL, NCOR1 and MLL3; a method for the diagnosis of bladder cancer by detecting change of the above 1 gene, and a usage of said probe set or primer group in preparation of the micro-array, kit and individual treatment for detection of bladder cancer;

The probe set, primer group, composition and micro-array of each invention described above realize the diagnosis of bladder cancer by detecting a variety of mutations of different gene combinations. The same technical features shared among the inventions are several of the 8 genes, however, all of the above 8 genes are common knowledge in the art, and the technical features thereof do not make a contribution over the prior art. Therefore, the above inventions do not share a same or corresponding special technical feature and do not belong to a single general inventive concept, thus they do not have unity.

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2011/077495

A. 主题的分类

C12Q 1/68 (2006.01) i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C12Q

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

VEN;CNABS;NCBI;CNKI;ISI-WEB OF KNOWLEDGE;GOOGLE SCHOLAR: 膀胱癌, 基因, 突变, UTX, CREBBP, EP300, ARID1A, CHD6, MLL, NCOR1, MLL3, 引物, 探针, 微阵列, 诊断, bladder, cancer, carcinoma, tumor, urothelial, primer, probe, micro-array, diagnosis, diagnostic

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Lucie C Kompier等. FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. PLoS ONE.11月2010, 第5卷, 第11期, 第1-13页 参见第3-4页和第10页	1-8
A	Gottfrid Sjodahl 等.A systematic study of gene mutations in urothelial carcinoma; Inactivating mutations in TSC2 and PIK3R1.PLoS ONE.4月2011, 第6卷, 第4期, 第1-6页 参见摘要, 第2页, 第4页	1-8

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

18.4月2012(18.04.2012)

国际检索报告邮寄日期

03.5月2012(03.05.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

田园

电话号码: (86-10) **62411047**

C(续). 相关文件

类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	Gijs van Haaften 等. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. Nature Genetics. 5 月 2009, 第 41 卷, 第 5 期, 第 521-523 页 参见全文	1-8
A	Stephen A Boorjian 等. Expression and significance of androgen receptor coactivators in urothelial carcinoma of the bladder. Endocr Relat Cancer. 3 月 2009, 第 16 卷, 第 1 期, 第 123-137 页 参见全文	1-8

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☐ 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

本发明的权利要求1-8包括至少8项发明：

1. 同时检测 UTXUTX、CREBBP、EP300、ARID1A、CHD6、MLL、NCOR1 和 MLL3 8 种基因突变的探针组、引物组、组合物和微阵列，通过检测上述 8 种基因变化诊断膀胱癌的方法，所述探针组或引物组制备检测膀胱癌的微阵列、试剂盒和个体治疗中的用途；
(参见附加页)

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

权利要求1-8(部分)：同时检测 UTX、CREBBP、EP300、ARID1A、CHD6、MLL、NCOR1 和 MLL3 8 种基因突变的探针组、引物组、组合物和微阵列，通过检测上述 8 种基因变化诊断膀胱癌的方法，所述探针组或引物组制备检测膀胱癌的微阵列、试剂盒和个体治疗中的用途。

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

续第 III 栏

2. 同时检测选自 UTXUTX、CREBBP、EP300、ARID1A、CHD6、MLL、NCOR1 和 MLL3 的 7 种基因的突变的探针组、引物组、组合物和微阵列，通过检测上述 7 种基因变化诊断膀胱癌的方法，所述探针组或引物组制备检测膀胱癌的微阵列、试剂盒和个体治疗中的用途；

3. 同时检测选自 UTXUTX、CREBBP、EP300、ARID1A、CHD6、MLL、NCOR1 和 MLL3 的 6 种基因的突变的探针组、引物组、组合物和微阵列，通过检测上述 6 种基因变化诊断膀胱癌的方法，所述探针组或引物组制备检测膀胱癌的微阵列、试剂盒和个体治疗中的用途；

.
. .
.

8. 检测选自 UTXUTX、CREBBP、EP300、ARID1A、CHD6、MLL、NCOR1 和 MLL3 的 1 种基因的突变的探针组、引物组、组合物和微阵列，通过检测上述 1 种基因变化诊断膀胱癌的方法，所述探针组或引物组制备检测膀胱癌的微阵列、试剂盒和个体治疗中的用途；

上述各项发明的探针组、引物组、组合物和微阵列通过检测不同种基因组合的多种突变实现膀胱癌的诊断。各项发明之间存在的共同技术特征只是 8 个基因中的几个基因，而上述 8 种基因都是本领域已知的，不是对现有技术作出贡献的技术特征。因此，上述各项发明之间没有相同或相应的特定技术特征，不属于一个总的发明构思，不具备单一性。