



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105940117 A

(43)申请公布日 2016.09.14

(21)申请号 201480074318.2

(22)申请日 2014.12.12

(30)优先权数据

1322034.8 2013.12.12 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.07.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2014/053694 2014.12.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/087088 EN 2015.06.18

(71)申请人 阿尔玛克诊断有限公司

地址 英国北爱尔兰

(72)发明人 S·沃克尔 A·麦卡维干

T·达维森 R·肯尼迪 P·哈金

L·希尔

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 韩威威

(51)Int.Cl.

G12Q 1/68(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书6页 说明书73页

序列表21页 附图7页

(54)发明名称

前列腺癌分类

(57)摘要

提供了用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的方法,其包括测定来自所述受试者的样品中的CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的表达水平。所述方法可用于预测转移的可能性。还公开了用于诊断和选择用于前列腺癌的治疗方法,连同相应的治疗方法。还提供了用于执行所述方法的系统、试剂盒和计算机程序。

1. 用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的方法,其包括:测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

其中测定的表达水平用于提供所述前列腺癌的特征和/或预后。

2. 权利要求1的方法,其包括测定以下中的至少一种的表达水平:

SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、F3、CENPF、MYBPC1、SELE、CEBPD和XBP1。

3. 权利要求1或2的方法,其中所述前列腺癌的特征和/或预后包括预测复发的增加可能性和/或预测转移的增加可能性,基本上由其组成,或由其组成。

4. 权利要求1或2的方法,其中所述前列腺癌的特征和/或预后包括确定所述前列腺癌是否具有不良预后,基本上由其组成,或由其组成。

5. 任一前述权利要求的方法,其包括将所述表达水平与参考值或一个或多个对照样品中的表达水平进行比较。

6. 任一前述权利要求的方法,其中将所述表达水平与一个或多个对照样品中的相同基因的表达水平进行比较。

7. 任一前述权利要求的方法,其中将样品中的前列腺癌细胞中的SRSF5、PDK4、PDRG1、TRPM3、PDE4D和F12中的至少一种的表达水平与相同样品中的正常细胞中的相同基因的表达水平进行比较。

8. 任一前述权利要求的方法,其进一步包括测定参考基因的表达水平。

9. 任一前述权利要求的方法,其中将以下中的至少一种的表达水平与参考基因的表达水平进行比较:

CREM、ERRFI1、HJURP、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36。

10. 权利要求8或权利要求9的方法,其中所述参考基因是TPT1、RPS14或RPL37A。

11. 任一前述权利要求的方法,其中HJURP、PDRG1、TRPM3、F12、CENPF、RNFT2和SSTR1中的至少一种的增加了的表达水平表明复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性,和/或CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、PDE4D、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的降低的表达水平表明复发和/或转移和/或不良预后的降低可能性。

12. 任一前述权利要求的方法,其中在蛋白质、RNA或表观遗传修饰的水平测定所述表达水平。

13. 权利要求12的方法,其中所述表观遗传修饰是DNA甲基化。

14. 任一前述权利要求的方法,其中通过免疫组织化学测定所述表达水平。

15. 任一前述权利要求的方法,其中使用与标记缀合的抗体测定所述表达水平。

16.任一前述权利要求的方法,其中通过微阵列、northern印迹、RNA-seq(RNA测序)、原位RNA检测或核酸扩增测定所述表达水平。

17.任一前述权利要求的方法,其进一步包括从所述样品提取总RNA。

18.任一前述权利要求的方法,其进一步包括从所述受试者获得样品。

19.任一前述权利要求的方法,其中所述样品包含前列腺组织,基本上由其组成,或由其组成。

20.任一前述权利要求的方法,其中所述样品包含福尔马林固定的石蜡包埋的活检样品,基本上由其组成,或由其组成。

21.任一前述权利要求的方法,其包括测定HJURP、PDRG1、TRPM3、F12、CENPF、RNFT2、和SSTR1和CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、PDE4D、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的表达水平。

22.用于选择受试者中的前列腺癌的治疗方法,其包括:

(a)测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

其中测定的表达水平用于提供所述前列腺癌的特征和/或预后,和

(b)选择对于所述前列腺癌的特征和/或预后适当的治疗。

23.用于选择受试者中的前列腺癌的治疗方法,其包括:

(a)测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

其中测定的表达水平用于提供所述前列腺癌的特征和/或预后

(b)选择对于所述前列腺癌的特征和/或预后适当的治疗,和

(c)用选择的治疗来治疗所述受试者。

24.权利要求22或23的方法,其中如果所述前列腺癌的特征和/或预后结果是复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性,则选择的治疗是以下中的一种或多种:

a)抗激素治疗剂,优选比卡鲁胺和/或阿比特龙

b)细胞毒性剂

c)生物制品,优选抗体和/或疫苗,更优选Sipuleucel-T

d)放射疗法,任选扩大的放射疗法,优选扩野放射疗法

e)靶向疗法

f)手术。

25.治疗前列腺癌的方法,其包括向受试者施用化疗剂或放射疗法,任选扩大的放射疗

法,优选扩野放射疗法,或者对受试者实施手术,其中基于如权利要求22至24中任一项中请求保护的方法选择所述受试者用于治疗。

26. 用于治疗受试者中的前列腺癌的化疗剂,

其中基于如权利要求22至24中任一项中请求保护的方法选择所述受试者用于治疗。

27. 治疗前列腺癌的方法,其包括:

向受试者施用化疗剂或放射疗法,任选扩大的放射疗法,优选扩野放射疗法,或者对受试者实施手术,其中所述受试者具有HJURP、PDRG1、TRPM3、F12、CENPF、RNFT2和SSTR1中的至少一种的增加的表达水平和/或CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、PDE4D、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的降低的表达水平。

28. 用于治疗受试者中的前列腺癌的化疗剂,

其中所述受试者具有HJURP、PDRG1、TRPM3、F12、CENPF、RNFT2和SSTR1中的至少一种的增加的表达水平和/或CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、PDE4D、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的降低的表达水平。

29. 权利要求25或27的方法,或权利要求26或28的用于治疗受试者中的前列腺癌的化疗剂,

其中所述化疗剂包含以下,基本上由以下组成,或由以下组成:

- a) 抗激素治疗剂,优选比卡鲁胺和/或阿比特龙
- b) 细胞毒性剂
- c) 生物制品,优选抗体和/或疫苗,更优选Sipuleucel-T和/或
- d) 靶向的治疗剂。

30. 权利要求24或29的方法,其中所述细胞毒性剂是基于铂的药剂和/或紫杉烷。

31. 权利要求30的方法,其中所述基于铂的药剂选自顺铂、卡铂和奥沙利铂。

32. 权利要求30的方法,其中所述紫杉烷是紫杉醇或多西他赛。

33. 抗体,其特异性结合至以下中的至少一种的蛋白质产物:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36。

34. 权利要求33的抗体,其与标记缀合。

35. 权利要求33或34的抗体用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的用途。

36. 用于诊断受试者中的具有增加的转移潜能的前列腺癌的方法,其包括:

测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、

SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

其中测定的表达水平用于鉴定受试者是否患有具有增加的转移潜能的前列腺癌。

37. 用于诊断受试者中的具有增加的转移潜能的前列腺癌的方法,其包括:

测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

SRSF5、PDK4、TRPM3、PDRG1、PDE4D和F12

其中测定的表达水平用于鉴定受试者是否患有具有增加的转移潜能的前列腺癌。

38. 用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的方法,其包括:测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36或

以鉴定特征在于复发和/或转移的增加可能性的细胞的存在或不存在,其中测定的所述细胞的存在或不存在用于提供所述前列腺癌的特征/或预后。

39. 用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的方法,其包括:

a) 从所述受试者获得样品

b) 将对于以下中的至少一种的蛋白质产物特异性的抗体应用于来自所述受试者的样品:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

c) 应用检测抗体-蛋白质复合物的检测试剂

d) 使用所述检测试剂以测定所述蛋白质的水平

d) 其中测定的蛋白质的水平用于提供所述前列腺癌的特征和/或预后。

40. 用于执行任一前述权利要求的方法的系统或装置。

41. 用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的系统或测试试剂盒,其包含:

a) 一种或多种测试装置,其用于测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

b) 处理器;和

c) 包含计算机应用的存储介质,当由所述处理器执行时,所述计算机应用被配置为:

(i) 在一种或多种测试装置上访问和/或计算所述样品中以下中的至少一种的测定的表达水平:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、

LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

(ii)计算所述样品中以下中的至少一种的水平是增加还是降低:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36;和

(iii)从所述处理器输出所述前列腺癌的特征和/或预后。

42. 权利要求41的系统或测试试剂盒,其进一步包含用于从所述处理器输出的显示器。

43. 计算机应用或包含如权利要求41或42中定义的计算机应用的存储介质。

44. 用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的方法,其包括:

测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的甲基化状态:

ADAMTS9、EMP1、F3、LDLR、LGALS3、MALAT1、MTUS1、NR4A3、PTGS2、RIN2、SLC15A2、SOCS3和TSC22D1

其中测定的甲基化状态用于提供所述前列腺癌的特征和/或预后。

45. 权利要求44的方法,其中如果ADAMTS9、EMP1、F3、LDLR、LGALS3、MALAT1、MTUS1、NR4A3、PTGS2、RIN2、SLC15A2、SOCS3和TSC22D1中的至少一种被过度甲基化,则复发和/或转移的可能性增加。

46. 用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的试剂盒,其包含一种或多种权利要求33或34的抗体。

47. 权利要求46的试剂盒,其进一步包含权利要求43的计算机应用或存储介质。

48. 用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的计算机程序产品,其包含具有在其上实施的计算机可读程序指令的非临时性计算机可读存储装置,所述计算机可读程序指令引起所述计算机:

(i)在一种或多种测试装置上访问和/或计算样品中以下中的至少一种的测定的表达水平:CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36;

(ii)计算所述样品中以下中的至少一种的水平是增加还是降低:CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36;和

(iii)提供关于所述前列腺癌的特征和/或预后的输出。

49. 用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的试剂盒,其包含一种或多种对于以下中的至少一种的RNA产物特异性的寡核苷酸探针:

CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、HJURP、PDRG1、TRPM3、PDE4D、F12、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、

LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

且进一步包含以下组分中的一种或多种：

- a) 阻断探针
- b) 预扩增分子
- c) 扩增分子和/或
- d) 标记分子。

前列腺癌分类

发明领域

[0001] 本发明涉及前列腺癌。提供了依赖于生物标志物的用于表征和预后前列腺癌的方法。还描述了可用于所述方法中的抗体、试剂盒和系统。

[0002] 发明背景

[0003] 前列腺癌是具有15.3%的终生发病率的男性中最常见的恶性肿瘤(Howlader 2012)。基于1999-2006的数据,约80%的前列腺癌患者呈现临床上限于前列腺的早期疾病(Altekruse 等人2010),其中约65%通过手术切除或放射疗法治愈(Kattan等人1999,Pound等人1999)。35%将发展PSA复发,其中约35%将发展局部或转移性复发,这是不可治愈的。目前,不清楚哪些具有早期前列腺癌的患者可能发展复发,并且可能得益于更强烈的疗法。目前的预后因素诸如通过Gleason评分测量的肿瘤分期具有预后价值,但显著数目的被认为是较低分期(7或更小)的那些仍然复发,并且一定比例的更高分期肿瘤则没有。此外,在Gleason 7肿瘤的预后中存在显著异质性(Makarov等人2002,Rasiah等人,2003)。此外,已经变得明显的是,Gleason评分的分期已经改变,导致Gleason评分的分布随着时间变化(Albertsen等人2005,Smith等人,2002)。

[0004] 现在清楚的是,源自同一解剖部位的大多数实体瘤代表许多在分子水平不同的实体(Perou等人2000)。DNA微阵列平台允许从存档的石蜡包埋组织同时分析数以万计的转录物,并且理想地适合于鉴定分子亚组。这种方法已经鉴定了实体瘤诸如乳腺癌(van't Veer 等人2002)和结肠癌(Bertucci等人2004)中的具有转移潜能的原发性癌症。

[0005] 发明描述

[0006] 本发明基于前列腺癌生物标志物的鉴定和验证。

[0007] 本发明人已经鉴定了在分子水平类似于转移性疾病的一组原发性前列腺癌。这些肿瘤通过几个基因和限定途径的表达损失来定义;此外,该组通过导致参与有丝分裂的基因表达增加的原癌基因FOXM1的活化来定义。已经定义了该亚组内可以鉴定肿瘤的一系列生物标志物,其具有多变量预后能力,并且可以用于前瞻性评价肿瘤是否处于增加的复发和/或转移发展的可能性中。

[0008] 因此,在第一个方面,本发明提供用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的方法,其包括:

[0009] 测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

[0010] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

[0011] 其中测定的表达水平用于提供所述前列腺癌的表征和/或预后。

[0012] 根据本发明的所有方面,所述前列腺癌可以是原发性前列腺癌。

[0013] 根据本发明的一个进一步方面,提供了用于诊断受试者中的具有增加的转移潜能的前列腺癌的方法,其包括:

[0014] 测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

[0015] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、

CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

[0016] 其中测定的表达水平用于鉴定受试者是否患有具有增加的转移潜能的前列腺癌。

[0017] 在又一个进一步方面,本发明涉及用于诊断受试者中的具有增加的转移潜能的前列腺癌的方法,其包括:

[0018] 测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

[0019] TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12和PDK4

[0020] 其中测定的表达水平用于鉴定受试者是否患有具有增加的转移潜能的前列腺癌。

[0021] 本发明还涉及用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的方法,其包括:

[0022] 测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

[0023] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

[0024] 以鉴定特征在于复发和/或转移的增加可能性的细胞的存在或不存在,其中测定的所述细胞的存在或不存在用于提供所述前列腺癌的特征/或预后。

[0025] 在一个进一步方面,本发明涉及用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的方法,其包括:

[0026] a)从所述受试者获得样品

[0027] b)将对于以下中的至少一种的蛋白产物特异性的抗体应用于来自所述受试者的样品:

[0028] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

[0029] c)应用检测抗体-蛋白复合物的检测试剂

[0030] d)使用所述检测试剂以测定所述蛋白的水平

[0031] d)其中测定的蛋白的水平用于提供所述前列腺癌的特征和/或预后。

[0032] 前列腺癌的特征、预后或诊断也可用于指导治疗。

[0033] 因此,在一个进一步方面,本发明涉及用于选择受试者中的前列腺癌的治疗方法,其包括:

[0034] (a)测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平:

[0035] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

[0036] 其中测定的表达水平用于提供所述前列腺癌的特征和/或预后,和

[0037] (b)选择对于所述前列腺癌的特征和/或预后适当的治疗。

[0038] 在又一个进一步方面,本发明涉及用于选择受试者中的前列腺癌的治疗方法,

其包括：

[0039] (a)测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的表达水平：

[0040] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

[0041] 其中测定的表达水平用于提供所述前列腺癌的特征和/或预后

[0042] (b)选择对于所述前列腺癌的特征和/或预后适当的治疗，和

[0043] (c)用选择的治疗治疗所述受试者。

[0044] 本发明还涉及治疗前列腺癌的方法，其包括向受试者施用化疗剂或放射疗法，任选扩大的放射疗法，优选扩野放射疗法(extended-field radiotherapy)，或者对受试者实施手术，其中基于本文所述的方法选择所述受试者用于治疗。

[0045] 在一个进一步方面，本发明涉及用于治疗受试者中的前列腺癌的化疗剂，其中基于本文所述的方法选择所述受试者用于治疗。

[0046] 在又一个进一步方面，本发明涉及治疗前列腺癌的方法，其包括向受试者施用化疗剂或放射疗法，任选扩大的放射疗法，优选扩野放射疗法(extended-field radiotherapy)，或者对受试者实施手术，其中所述受试者具有HJURP、PDRG1、TRPM3、F12、CENPF、RNFT2和SSTR1中的至少一种的增加的表达水平和/或CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、PDE4D、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的降低的表达水平。

[0047] 本发明还涉及用于治疗受试者中的前列腺癌的化疗剂，其中所述受试者具有HJURP、PDRG1、TRPM3、F12、CENPF、RNFT2和SSTR1中的至少一种的增加的表达水平和/或CREM、ERRFI1、SRSF5、PDK4、PDE4D、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、DKK1、EMP1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的降低的表达水平。

[0048] 在某些实施方案中，所述化疗剂包含以下，基本上由以下组成或由以下组成：

[0049] a)抗激素治疗剂，优选比卡鲁胺和/或阿比特龙

[0050] b)细胞毒性剂

[0051] c)生物制品，优选抗体和/或疫苗，更优选Sipuleucel-T和/或

[0052] d)靶向的治疗剂。

[0053] 本文进一步详细地讨论合适的疗法和治疗剂。

[0054] 下表A进一步详细地描述和定义基因FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36以及它们的蛋白产物。所述基因也可以被互换地称为生物标志物。

[0055] 表A

基因	先前名称和符号和同义词(HGNC 数据库)	Uniprot 编号	蛋白质
[0056] FOXM1	FKHL16、HFH-11、HNF-3、INS-1、"M-期磷酸化蛋白 2"、	Q08050	叉头盒 M1
	MPHOSPH2、MPP2、TGT3、三叉的 (trident)		
TRPM3	GON-2、KIAA1616、LTRPC3、"melastatin 2"	Q9HCF6	瞬时受体电位阳离子通道亚家族 M 成员 3
PDRG1	C20orf126、"染色体 20 开放阅读框 126"、dJ310O13.3	Q9NUG6	p53 和 DNA 损伤调节蛋白 1
[0057] SRSF5	SFRS5、"剪接因子, 富含精氨酸/丝氨酸 5"、HRS、"SR 剪接因子 5"、SRP40	Q13243	富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子 5
PDE4D	DPDE3、"磷酸二酯酶 4D, cAMP-特异性的(dunce (果蝇)-同系物磷酸二酯酶 E3)"	Q08499	cAMP-特异性的 3',5'-环磷酸二酯酶 4D
F12	N/A	P00748	凝血因子 XII
PDK4	"丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 4"	Q16654	丙酮酸脱氢酶[硫辛酰胺]]激酶同工酶 4, 线粒体
ADAMTS1	"具有血小板反应蛋白 1 型基序 1 的解联蛋白样和金属蛋白酶 (reprolysin 型)"、C3-C5、KIAA1346、METH1	Q9UH18	具有血小板反应蛋白基序 1 的解联蛋白和金属蛋白酶

[0058]

ADAMTS9	KIAA1312	Q9P2N4	具有血小板反应蛋白基序 9 的解联蛋白和金属蛋白酶
B3GNT5	B3GN-T5、beta3Gn-T5、"乳糖基神经酰胺 1,3-N-乙酰基-β-D-葡糖胺基转移酶"	Q9BYG0	乳糖基神经酰胺 1,3-N-乙酰基-β-D-葡糖胺基转移酶
CD38	"CD38 抗原(p45)"、"ADP-核糖基环化酶 1"、"NAD(+)核苷酶"	P28907	ADP-核糖基环化酶 1
CEBPD	C/EBP-delta、CELF、CRP3、NF-IL6-beta	P49716	CCAAT/增强子-结合蛋白 δ
CENPF	"着丝粒蛋白 F、350/400kDa (核分裂激素)"、hcp-1、"核分裂激素"	P49454	着丝粒蛋白 F
CREM	hCREM-2	Q03060	cAMP-反应元件调节剂
DKK1	"dickkopf (非洲爪蟾)同系物 1"、"dickkopf 1 同系物 (非洲爪蟾)"、DKK-1、SK	O94907	Dickkopf-相关蛋白 1
EMP1	CL-20、TMP	P54849	上皮膜蛋白 1
ERRFI1	GENE-33、MIG-6、RALT	Q9UJM3	ERBB 受体反馈抑制剂 1

F3	CD142	P13726	组织因子
HJURP	DKFZp762E1312、 FAKTS、hFLEG1、 URLC9	Q8NCD3	Holliday 连结体识别蛋白
IL1R1	IL1R、IL1RA、 CD121A、D2S1473	P14778	白介素-1 受体 1 型
IL8	3-10C、"肺泡巨噬细胞趋化因子 I"、 AMCF-I、b-ENAP、 "β 内皮细胞衍生的嗜中性粒细胞活化肽" "、"趋化因子(CXC 基序)配体 8"、 CXCL8、GCP-1、 GCP1、"粒细胞趋化蛋白 1"、IL-8、 K60、LECT、 LUCT、"肺巨细胞癌衍生的趋化蛋白"、 "淋巴细胞衍生的嗜中性粒细胞活化肽"、 LYNAP、MDNCF、 MONAP、"单核细胞衍生的嗜中性粒细胞趋化因子"、 "单核细胞衍生的嗜中性粒细胞活化肽"、NAF、 NAP-1、NAP1、"嗜中性粒细胞活化肽"	P10145	白介素-8

[0059]

[0060]

	1"、SCYB8、TSG-1、"肿瘤坏死因子诱导的基因 1"		
JUNB	N/A	P17275	转录因子 jun-B
KLF10	"TGFB 诱导型早期生长反应"、TIEG、EGRA、TIEG1	Q13118	Krueppel-样因子 10
KLF4	EZF、GKLF	O43474	Krueppel-样因子 4
LDLR	"家族性高胆固醇血症"、LDLCQ2	P01130	低密度脂蛋白受体
LGALS3	LGALS2、"半乳糖凝集素 3"、GALIG、MAC-2	P17931	半乳糖凝集素-3
LPAR1	EDG2、"内皮分化，溶血磷脂酸 G 蛋白偶联受体，2"、edg-2、Gpcr26、GPR26、LPA1、Mrec1.3、rec.1.3、vzg-1	Q92633	溶血磷脂酸受体 1
MALAT1	HCN、"hepcarcin"、LINC00047、"长基因间非蛋白编码 RNA 47"、MALAT-1、"转移相关的肺腺癌转录物 1"、NCRNA00047、NEAT2、"非蛋白编码 RNA 47"、"核富	Q9UHZ2	转移相关的肺腺癌转录物 1

[0061]

	集的丰富转录物 2"、 "核旁斑组装转录物 2(非蛋白编码)"、 PRO1073		
MTUS1	"线粒体肿瘤抑制蛋 白 1"、"AT2 受体-相 互作用蛋白"、 "AT2R 结合蛋白"、 ATBP、ATIP1、 DKFZp586D1519、 FLJ14295、ICIS、 KIAA1288、"线粒体 肿瘤抑制基因 1"、 MP44、MTSG1	Q9ULD2	微管相关的肿瘤抑 制蛋白 1
MYBPC1	"肌球蛋白结合蛋白 C, 慢型"	Q00872	肌球蛋白结合蛋白 C, 慢型
NFIL3	IL3BP1、E4BP4、 NF-IL3A、NFIL3A	Q16649	核因子白介素-3-调 节的蛋白
NR4A3	CHN、CSMF、 MINOR、NOR1	Q92570	核受体亚家族 4 组 A 成员 3
OAT	"回旋形萎缩"、 HOGA、"鸟氨酸转 氨酶"、"鸟氨酸转氨 酶前体"	P04181	鸟氨酸转氨酶, 线 粒体
PI15	"蛋白酶抑制剂 15"、 P25TI	O43692	肽酶抑制剂 15
PTGS2	COX2	P35354	前列腺素 G/H 合酶 2

RHOBTB3	KIAA0878	O94955	含有 Rho 相关的 BTB 结构域的蛋白 3
RIN2	RASSF4	Q8WYP3	Ras 和 Rab 相互作用蛋白 2
RNFT2	TMEM118、"跨膜蛋白 118"、FLJ14627	Q96EX2	含有 RING 指和跨膜结构域的蛋白 2
SELE	ELAM、ELAM1、"内皮粘附分子 1"、CD62E、ESEL	P16581	E-选择素
SLC15A2	"溶质载体家族 15 (H ⁺ /肽转运体), 成员 2"、PEPT2	Q16348	溶质载体家族 15 成员 2
SOCS2	CIS2、Cish2、SOCS-2、SSI-2、SSI2、"STAT-诱导的 STAT 抑制剂-2"、STAT12	O14508	细胞因子信号传导的抑制蛋白 2
SOCS3	CIS3、Cish3、SOCS-3、SSI-3	O14543	细胞因子信号传导的抑制蛋白 3
SSTR1	N/A	P30872	生长抑素受体 1 型
ST6GAL1	"唾液酸转移酶 1 (β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶)"、SIAT1、"ST6Gal I"	P15907	β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶 1
TSC22D1	TGFB114、"转化生长因子 β 1 诱导的转录物 4"、MGC17597、	Q15714	TSC22 结构域家族蛋白 1

[0062]

	TSC22		
XBP1	XBP2	P17861	X-盒-结合蛋白 1
[0063] ZFP36	" 锌指蛋白 36, C3H 型, 同系物(小鼠) "、 G0S24、NUP475、RNF162A、TIS11、tristetraprolin、TTP	P26651	Tristetraprolin

[0064] 在某些实施方案中,测定以下中的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45或46种的表达水平:

[0065] TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36。在一些实施方案中,可以将FOXMI添加至实验对象组。

[0066] 或者,测定以下中的2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45或46种的组群中的至少一种的表达水平:

[0067] TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36。在一些实施方案中,该组群中可以包括FOXMI。

[0068] 在某些实施方案中,测定以下中的至少一种的表达水平:

[0069] TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、PDK4、F12、F3、HJURP、CENPF、MYBPC1、SELE、CEBPD和XBP1。

[0070] 在某些实施方案中,测定以下中的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13种的表达水平:

[0071] TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、PDK4、F12、F3、HJURP、CENPF、MYBPC1、SELE、CEBPD和XBP1。

[0072] 表征意指前列腺癌的分类和/或评估。预后是指预测受试者的前列腺癌的可能后果。诊断意指鉴定前列腺癌的存在。

[0073] 根据本发明的所有方面,前列腺癌的表征和/或预后可以包括预测复发的增加可能性,基本上由其组成,或由其组成。前列腺癌的表征和/或预后可以包括预测减少的复发时间,基本上由其组成,或由其组成。复发可以是临床复发或生物化学复发。生物化学复发意指在治疗前列腺癌之后受试者中PSA的水平上升。生物化学复发可以表明前列腺癌没有得到有效治疗或已经复发。

[0074] 前列腺癌的特征和/或预后可以包括预测转移的增加可能性,基本上由其组成,或由其组成。

[0075] 转移或转移性疾病,是癌症从一个器官或部分扩散到另一个不相邻的器官或部分。因此生成的疾病的新的发生被称为转移。

[0076] 前列腺癌的特征和/或预后也可以包括确定前列腺癌是否具有不良预后,基本上由其组成,或由其组成。不良预后可以是原因特异性(即癌症特异性)或长期存活的降低可能性。原因或癌症特异性存活是代表在没有其它死亡原因的情况下的癌症存活的净存活量度。癌症存活可以持续6、7、8、9、10、11、12个月或1、2、3、4、5等年。长期存活可以是诊断后存活1年、5年、10年或20年。具有不良预后的前列腺癌可以是侵袭性的,快速生长的,和/或显示对治疗的耐受性。

[0077] 在某些实施方案中,TRPM3、PDRG1、F12、CENPF、HJURP、RNFT2和SSTR1中的至少一种或FOXM1的增加的表达水平表明复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性。在进一步实施方案中,SRSF5、PDE4D、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的降低的表达水平表明复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性。

[0078] 在某些实施方案中,本文描述的方法可以包括测定TRPM3、PDRG1、F12、CENPF、HJURP、RNFT2和SSTR1中的至少一种或FOXM1和SRSF5、PDE4D、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的表达水平。因此,所述方法可以依赖于上调的标志物和下调的标志物的组合。

[0079] 在某些实施方案中,本文描述的方法包括将所述表达水平与参考值或与一种或多种对照样品中的表达水平或相同样品中的一种或多种对照细胞中的表达水平进行比较。对照细胞可以是正常细胞(即,通过独立方法表征为非癌性的细胞)。一种或多种对照样品可以由非癌细胞组成,或者可以包括前列腺癌细胞和非癌细胞的混合物。可以将所述表达水平与一种或多种对照样品或对照细胞中的相同基因的表达水平进行比较。

[0080] 参考值可以通过测定来自有和没有前列腺癌的受试者的一定范围的样品中的水平而设置的至少一种基因的表达的阈值水平。前列腺癌可以是有或没有复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性的前列腺癌。用于设置阈值的合适方法是本领域技术人员众所周知的。所述阈值可以从患者数据的训练集数学推导。评分阈值因此根据特定条件的存在或不存在分离测试样品。可以在开发或训练阶段从具有已知后果的患者集合推导出该量(即,截止阈值)的解释。因此可以在通过本领域技术人员已知的方法从训练数据进行请求保护的方法之前固定所述阈值。

[0081] 参考值也可以是通过测定在第一时间点来自受试者的样品中的至少一种基因的表达水平而设置的至少一种基因的表达的阈值水平。然后将测定的相同受试者在随后时间点的表达水平与阈值水平进行比较。因此,可以使用本发明的方法以监测受试者中的疾病的进展,即提供受试者中的疾病的持续表征和/或预后。例如,可以使用所述方法以鉴定已

经发展为侵袭性更强或潜在的转移性形式的前列腺癌。这可以用于指导治疗决定,如本文进一步详细讨论。

[0082] 对于表达水平在正常细胞和来自不具有复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性的前列腺癌细胞之间没有差异的基因,相同样品中的正常细胞中的相同基因的表达水平可以用作对照。

[0083] 因此,在具体实施方案中,将样品中的前列腺癌细胞中的TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12和PDK4中的至少一种的表达水平与相同样品中的正常细胞中的相同基因的表达水平进行比较。

[0084] 在具体实施方案中,如果测定的样品中的前列腺癌细胞中的TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12和PDK4中的至少一种的表达水平与相同样品中的正常细胞相比没有不同,则所述前列腺癌不具有复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性。

[0085] 不同可以是统计学显著性不同的。统计学显著意指不可能仅仅偶然发生。合适的统计学评价可以根据任何合适的方法进行。

[0086] 在具体实施方案中,如果所述基因是TRPM3、PDRG1或F12且表达水平在样品中的前列腺癌细胞中相对于相同样品中的正常细胞增加,则所述前列腺癌具有复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性。

[0087] 在具体实施方案中,如果所述基因是SRSF5、PDE4D或PDK4且表达水平在样品中的前列腺癌细胞中相对于样品中的正常细胞降低,则所述前列腺癌具有复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性。

[0088] 本文描述的方法可以进一步包括测定参考基因的表达水平。如果目标基因表达水平在正常细胞和来自不具有复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性的前列腺癌细胞之间不同,则可以需要参考基因。

[0089] 在某些实施方案中,将ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的表达水平与参考基因的表达水平进行比较。

[0090] 所述参考基因可以是在所有前列腺癌样品中具有最小表达方差的任何基因。因此,所述参考基因可以表达水平不会随着复发和/或转移和/或不良预后的可能性变化的任何基因。技术人员能够很好地基于这些标准鉴定合适的参考基因。具体而言,所述参考基因可以是TPT1、RPS14或RPL37A。可以在与以下中的至少一种的表达水平相同的样品中测定所述参考基因的表达水平:

[0091] ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36。

[0092] 可以在不同的样品中测定所述参考基因的表达水平。不同的样品可以是如上所述的对照样品。可以在样品中的正常和/或前列腺癌细胞中测定所述参考基因的表达水平。

[0093] 可以使用统计学模型分析来自受试者的样品中的至少一种基因的表达水平。在其

中测量至少2种基因的表达水平的具体实施方案中,所述基因可以被加权。如本文所使用,术语“权重”是指统计学计算中项目的相对重要性。每种基因的权重可以使用本领域中已知的分析方法在患者样品的数据集上来确定。可以计算总评分并将其用于提供前列腺癌的特征和/或预后。

[0094] 本文更详细描述用于测定标志物的表达水平的方法。典型地,所述方法可以涉及使获得自受试者的样品与检测试剂诸如对于标志物特异性的引物/探针/抗体(如本文详细讨论)接触并检测表达产物。针对对照样品中测定的表达水平进行比较以提供前列腺癌的特征和/或预后。

[0095] 根据本发明的所有方面,可以通过任何合适的方法测量一种或多种基因的表达水平。在某些实施方案中,在蛋白、RNA或表观遗传修饰的水平测定表达水平。表观遗传修饰可以是DNA甲基化。

[0096] 可以通过免疫组织化学测定表达水平。免疫组织化学意指通过使用特异性结合至蛋白的结合剂诸如抗体或适配子而检测组织样品的细胞中的蛋白。因此,如通过免疫组织化学测定的表达水平是蛋白水平。所述样品可以是前列腺组织样品,并且可以包含前列腺癌(肿瘤)细胞,前列腺上皮内肿瘤(PIN)细胞,正常前列腺上皮,基质和任选的浸润性免疫细胞。在一些实施方案中,将样品中的前列腺癌(肿瘤)细胞中的至少一种基因的表达水平与同一样品中的正常细胞中的相同基因(和/或参考基因)的表达水平进行比较。在一些实施方案中,将样品中的前列腺癌(肿瘤)细胞中的至少一种基因的表达水平与对照样品中的正常细胞中的相同基因(和/或参考基因)的表达水平进行比较。正常细胞可以包含正常(非癌)前列腺上皮细胞,基本上由其组成,或由其组成。在某些实施方案中,正常细胞不包含PIN细胞和/或基质细胞。在某些实施方案中,前列腺癌(肿瘤)细胞不包含PIN细胞和/或基质细胞。在进一步实施方案中,将样品中的前列腺癌(肿瘤)细胞中的至少一种基因的表达水平(额外地)与对照样品中的相同细胞或前列腺癌细胞中的参考基因的表达水平进行比较。所述参考基因可以是TPT1、RPS14或RPL37A。在又进一步实施方案中,使用基于前列腺癌(肿瘤)细胞(不与正常细胞相比)中的表达的强度、比例和/或定位的方法对样品中的前列腺癌(肿瘤)细胞中的至少一种基因的表达水平进行评分。可以在开发或训练阶段从具有已知后果的患者集合推导出评分方法。

[0097] 因此,在一个进一步方面,本发明涉及特异性结合至以下中的至少一种的蛋白产物的抗体或适配子:

[0098] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PKD4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36。

[0099] 所述抗体可以是单克隆或多克隆来源的。也可以利用片段和衍生物抗体,包括但不限于Fab片段、ScFv、单结构域抗体、纳米抗体、重链抗体,适配子等,其保留肽特异性结合功能,并且这些都包括在“抗体”的定义中。这样的抗体可用于本发明的方法中。它们可以用于测量特定蛋白、或在一些情况下蛋白的一种或多种特定同种型的水平。技术人员完全能够鉴定允许将特定同种型与彼此区分的表位。

[0100] 用于生成特异性抗体的方法是本领域技术人员已知的。抗体可以是人或非人来源

的(例如啮齿动物,诸如大鼠或小鼠),并且可以根据已知技术进行人源化等(Jones等人, Nature(1986)May 29-Jun.4;321(6069):522-5;Roguska等人,Protein Engineering, 1996,9(10):895-904;和Studnicka等人,Humanizing Mouse Antibody Frameworks While Preserving 3-D Structure.Protein Engineering,1994,Vol.7,pg 805)。

[0101] 在某些实施方案中,使用与标记缀合的抗体或适配子测定表达水平。标记意指允许直接或间接检测的组分。例如,所述标记可以是酶,任选过氧化物酶,或荧光团。

[0102] 标记是检测试剂的实例。检测试剂意指可以用于协助检测抗体-蛋白复合物的试剂。当抗体与酶缀合时,检测试剂可以包含化学组成,使得所述酶催化化学反应以产生可检测的产物。由适当的酶催化的反应的产物可以是,但不限于,荧光产物、发光产物或放射活性产物,或者它们可吸收可见光或紫外线。适用于检测这样的可检测的标记的检测仪的实例包括,但不限于,x-射线膜、放射性计数器、闪烁计数器、分光光度计、比色计、荧光光度计、光度计和光密度计。在某些实施方案中,所述检测试剂可以包含二抗。然后使用未标记的结合至目标蛋白的一抗和与标记缀合的二抗测定表达水平,其中所述第二抗体结合至所述一抗。

[0103] 本发明还涉及如上所述的抗体用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的用途。

[0104] 用于在蛋白水平测定表达水平的额外技术包括,例如,Western印迹、免疫沉淀、免疫细胞化学法、质谱、ELISA和其它(参见ImmunoAssay:A Practical Guide,由Brian Law编辑,由Taylor&Francis,Ltd.出版,2005版)。为了改进基于免疫反应性的测定方法的特异性和灵敏度,单克隆抗体因为其特异性表位识别而经常得到使用。多克隆抗体因为它们与单克隆抗体相比对于目标的增加亲和力而也已成功地用于许多免疫测定中。

[0105] 本发明的方法中可以使用或本发明的试剂盒中可以包括的合适的抗体列于下表B中:

[0106] 表B-结合至本发明的标志物的抗体的实例

基因 ID	抗体供应商	抗体参考
[0107] ADAMTS1	Source Bioscience	LS-A1643
	Source Bioscience	LS-A1642

[0108]

	Source Bioscience	LS-A1649
ADAMTS9	Novus	NBP1-82915
	Novus	NBP1-82916
	Sigma	HPA028577
B3GNT5	Novus	NBP1-88954
CD38	Source Bioscience	LS-A9696
	Source Bioscience	LS-A9697
	Leica Novocastra	CD38-290-L-CE
CEBPD	无合适的抗体	
CENPF	Source Bioscience	LS-B2992
	Source Bioscience	LS-B3157
	Novus	NB500-101
CREM	Sigma	HPA001818
DKK1	Source Bioscience	LS-A2867
	Source Bioscience	LS-A2865
	Source Bioscience	LS-A2868
	Novus	NBP1-95560
EMP1	Sigma	HPA056250
ERRFI1	Novus	NBP1-81835
	Sigma	HPA027206
F12	Source Bioscience	LS-B2649
	Source Bioscience	LS-B3044
	Sigma	HPA003825
F3	Novus	NBP2-15139
FOXM1	Source Bioscience	LS-B3073
	Sigma	HPA029974
	Novus	NBP1-84671

[0109]

HJURP	Sigma	HPA008436
IL1R1	Source Bioscience	LS-B2859
	Novus	NBP1-30929
IL8	Source Bioscience	LS-B6427
JUNB	Source Bioscience	LS-C176087
	Novus	NBP1-89544
KLF10	Source Bioscience	LS-C119009
KLF4	Source Bioscience	LS-B5641
	Novus	NBP2-24749
LDLR	Source Bioscience	LS-B1598
	Source Bioscience	LS-B8088
	Sigma	HPA009647
LGALS3	Source Bioscience	LS-B5661
	Source Bioscience	LS-B1671
	Sigma	HPA003162
LPAR1	Source Bioscience	LS-A212
	Source Bioscience	LS-A211
MALAT1	NA	NA
MTUS1	Novus	NBP1-82197
MYBPC1	Novus	NBP1-86427
NR4A3	Source Bioscience	LS-A2341
	Source Bioscience	LS-A2328
	Novus	NBP1-92198
OAT	Source Bioscience	LS-B4188
	Novus	NBP1-83239
PDE4D	Source Bioscience	LS-C185640
	Source Bioscience	LS-B8230
	Novus	NBP1-31131

PDK4	Source Bioscience	LS-B3459
PDRG1	Source Bioscience	LS-C163501
	Novus	NBP2-01854
PI15	Source Bioscience	LS-C163698
PTGS2	Source Bioscience	LS-B3296
	Source Bioscience	LS-B2145
	Novus	NB110-1948
RHOBTB3	Source Bioscience	LS-C120337
	Source Bioscience	NBP1-82954
RIN2	Sigma	HPA034641
SELE	Source Bioscience	LS-B2323
SOCS2	Source Bioscience	LS-B1257
[0110] SOCS3	Source Bioscience	LS-B3373
	Source Bioscience	NBP2-00850
SRSF5	Source Bioscience	LS-B3091
	Novus	NBP1-92381
SSTR1	Source Bioscience	LS-A994
ST6GAL1	Source Bioscience	LS-B6041
	Novus	NBP1-68447
TRPM3	Novus	NBP1-46344
TSC22D1	Source Bioscience	LS-B8419
XBP1	Source Bioscience	LS-B3178
	Source Bioscience	LS-B188
	Novus	NBP1-95395
ZFP36	Source Bioscience	LS-B5606

[0111] 测量生物样品中的mRNA可用作检测生物样品中的相应蛋白水平的替代方案。因此,本文描述的任何基因的表达水平还可通过检测适当的RNA来检测。

[0112] 因此,在具体实施方案中,通过微阵列、northern印迹、RNA-seq(RNA测序)、原位RNA检测或核酸扩增测定表达水平。核酸扩增包括PCR及其所有变体诸如实时和终点方法和qPCR。其它核酸扩增技术是本领域中众所周知的,并且包括方法诸如NASBA、3SR和转录介导的扩增(TMA)。其它合适的扩增方法包括连接酶链式反应(LCR)、目标多核苷酸序列的选择性扩增(美国专利号6,410,276)、共有序列引发的聚合酶链式反应(美国专利号4,437,975)、任意引发的聚合酶链式反应(WO 90/06995)、侵入者技术、链置换技术和缺口置换扩增(WO 2004/067726)。该列表并不意欲是穷尽的;可以使用任何核酸扩增技术,条件是特异

性扩增适当的核酸产物。合适的引物和/或探针的设计在本领域技术人员的能力之内。可以免费得到各种引物设计工具以协助该过程,诸如NCBI Primer-BLAST工具。引物和/或探针可以是至少15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个(或更多个)核苷酸的长度。可以通过逆转录定量聚合酶链式反应(RT-PCR,随后qPCR)测量mRNA的表达水平。RT-PCR用于从mRNA生成cDNA。cDNA可用于qPCR测定中以便随着DNA扩增过程进行而产生荧光。通过与标准曲线比较,qPCR可以产生绝对测量值,诸如每个细胞的mRNA的拷贝数。Northern印迹、微阵列、侵入测定和与毛细管电泳组合的RT-PCR均已用于测量样品中的mRNA的表达水平。参见Gene Expression Profiling:Methods and Protocols,Richard A.Shimkets,编辑,Humana Press,2004。

[0113] RNA-seq使用下一代测序以测量基因表达的改变。RNA可以转化为cDNA或直接测序。下一代测序技术包括焦磷酸测序、SOLiD测序、IonTorrent半导体测序、Illumina测序染料、单分子实时测序或DNA纳米球测序。

[0114] 原位RNA检测涉及在不从组织和细胞提取的情况下检测RNA。原位RNA检测包括原位杂交(ISH),其使用标记的(例如,放射标记的,抗原标记的或荧光标记的)探针(互补DNA或RNA链),以便将特定RNA序列定位于组织的部分或区域中,或者整个组织(整个包封的ISH)中,或细胞中。可以分别使用放射自显影、荧光显微镜或免疫组织化学在组织中定位和定量用放射、荧光或抗原标记的基质(例如,地高辛)标记的探针。ISH也可以使用两种或更多种探针同时检测两种或更多种转录物。分支DNA测定也可用于具有单分子灵敏度的RNA原位杂交测定。该方法包括ViewRNA测定。将样品(细胞,组织)是固定,然后处理,以允许RNA目标可及(RNA未掩蔽)。目标特异性探针杂交至各目标RNA。随后的信号扩增基于相邻探针(即在RNA目标上并排结合的个体寡核苷酸)的特异性杂交。典型的目标特异性探针将含有40个寡核苷酸。经由一系列相继杂交步骤实现信号扩增。预扩增分子杂交至目标特异性RNA上的各寡核苷酸对,然后多个扩增分子杂交至各预扩增分子。接下来,多个标记探针寡核苷酸(缀合至酶诸如碱性磷酸酶或直接缀合至荧光团)杂交至各扩增分子。分开但相容的信号扩增系统能够进行多重测定。可以通过测量根据所用的检测系统发射的荧光或光显现信号。在一些实施方案中,检测可以涉及使用高含量成像系统,或荧光或明场显微镜。

[0115] 因此,在一个进一步方面,本发明涉及用于(原位)表征和/或预后受试者中的前列腺癌的试剂盒,其包含对于以下中的至少一种的RNA产物特异性的一种或多种寡核苷酸探针:FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36。

[0116] 所述试剂盒可以进一步包含以下组分中的一种或多种:

[0117] a)阻断探针

[0118] b)预扩增分子

[0119] c)扩增分子和/或

[0120] d)标记分子

[0121] 所述试剂盒的组分可以适合于进行viewRNA测定(<https://www.panomics.com/products/rna-in-situ-analysis/view-rna-overview>)。

[0122] 所述试剂盒的组分可以是基于核酸的分子,任选DNA(或RNA)。阻断探针是起作用以通过结合至目标上不被目标特异性探针(对于本发明的至少一种基因的RNA产物特异性的探针)结合的位点而减少背景信号的分子。预扩增分子是当目标结合时能够结合至(一对)目标特异性探针的分子。扩增分子是能够结合至预扩增分子的分子。或者,预扩增分子当目标结合时能够直接结合至(一对)目标特异性探针。扩增分子具有用于多个标记分子的结合位点(其可以是标记探针)。

[0123] 本发明还涉及所述试剂盒用于表征和/或预后前列腺癌的使用。

[0124] 可以通过RNA与一组探针的杂交测定RNA表达。该探针可以排列于阵列中。微阵列平台包括由公司诸如Affymetrix、Illumina和Agilent制造的平台。由Affymetrix制造的微阵列平台的实例包括U133Plus2阵列、Almac专有Xcel™阵列和Almac专有癌症**DSAs®**,包括前列腺癌**DSA®**。

[0125] 在具体实施方案中,可以使用选自下表C中的探针的一种或多种探针来测定至少一种基因的表达:

[0126] 表C-用于测量阵列上的基因的表达水平的探针列表。

基因	探针组 ID	SEQ ID No
ADAMTS1	PC3P.3828.C1_s_at	30
	PCHP.1595_s_at	75
ADAMTS9	PC3P.17014.C1_s_at	24
	PC3SNGnh.5879_at	53
	PCADA.974_s_at	62

B3GNT5	PCRS2.398_s_at	81
CD38	3Snip.8317-94a_s_at	6
	PC3P.16779.C1_s_at	23
CEBPD	>PCHP.407_s_at_1160	89
	>PC3P.4961.C1_s_at_156	90
CENPF	PC3P.14957.C1_s_at	19
	PCADA.11788_at	55
CREM	PC3P.8627.C1_at	48
	PC3P.8627.C1_s_at	49
DKK1	3Snip.431-44a_s_at	4
EMP1	PC3P.10147.C1_at	9
ERRFI1	PC3P.3363.C1-522a_s_at	29
	PCADA.5865_at	58
	PCADA.5865_x_at	59
	PCRS2.6810_s_at	83
F12	PCADNP.16711_at	63
F3	3Snip.8552-9072a_s_at	7
	PC3P.8519.C1_s_at	46
	PC3P.8519.C2_s_at	47
	PCHP.1022_s_at	70
FOXM1	PCHP.1211_s_at	87
HJURP	PCADA.12835_s_at	56
IL1R1	PCADA.9303_s_at	61
IL8	PCHP.274_s_at	76
KLF10	PCRS2.574_s_at	82
KLF4	PC3P.14562.C1_s_at	18
LDLR	PCHP.101_s_at	69
LGALS3	3Snip.6331-2a_s_at	5

[0128]

[0129]

LPAR1	PC3P.4497.C1_at	34
	PCADA.11416_s_at	54
	PCADA.5036_s_at	57
	PCRS2.2781_s_at	80
MALAT1	3Snip.3677-484a_s_at	3
	PC3P.2436.C1_s_at	25
MTUS1	PCRS2.6884_s_at	84
MYBPC1	PC3P.13654.C1_at	16
	PC3P.13654.C1_x_at	17
	PC3P.3003.C1_s_at	27
	PC3P.7685.C1_at	40
	PC3P.7685.C1_x_at	41
	PC3P.7685.C1-693a_s_at	42
NFIL3	>PC3P.9419.C1-398a_s_at 365	88
NR4A3	PC3P.11087.C1_x_at	11
	PC3P.13257.C1_at	15
OAT	PC3P.2802.C1_s_at	26
PDE4D	PC3P.11285.C1_at	12
	PCADNP.1679_s_at	64
PDK4	PC3P.16300.C1_at	20
	PC3P.16300.C1_x_at	21
	PC3P.8159.C1_s_at	43
	PC3P.8159.C1-773a_s_at	44
	PC3SNGnh.4912_at	50
	PC3SNGnh.4912_x_at	51
	PC3SNGnh.5369_x_at	52
	PCADNP.18913_s_at	66
	PCEM.2221_at	68

[0130]

	PCPD.29484.C1_at	78
PDRG1	>PC3P.15830.C1_s_at_353	93
PI15	3Snip.2873-1277a_at	2
	PC3P.7245.C1_at	38
	PC3P.7245.C1_x_at	39
	PC3P.8311.C1-482a_s_at	45
	PCADNP.17332_s_at	65
PTGS2	3Snip.950-71a_x_at	8
	PC3P.16654.C1_s_at	22
RHOBTB3	PC3P.12138.C1_at	13
	PC3P.12138.C1_x_at	14
	PC3P.5195.C1_s_at	35
RIN2	PC3P.7127.C1_s_at	37
RNFT2	PCADNP.401_s_at	67
SELE	PCHP.1458_s_at	74
SLC15A2	3Snip.1826-385a_s_at	1
	PC3P.10260.C1_at	10
	PC3P.3316.C1_at	28
	PCRS2.7997_s_at	86
SOCS2	PC3P.5499.C1_at	36
	PCHP.128_s_at	73
SOCS3	PCHP.491_s_at	77
SRSF5	PC3P.394.CB1_s_at	32
SSTR1	>PCHP.841_s_at_4070	91
	>PC3P.12563.C1_s_at_327	92
ST6GAL1	PCRS2.699_s_at	85
TRPM3	PCADA.7751_s_at	60
TSC22D1	PC3P.41.CB2_s_at	33

	PCHP.112_s_at	71
[0131]	XBP1	31
	PCPD.59444.C1_at	79
	ZFP36	72

[0132] 这些探针还可以并入本发明的试剂盒。还可以使用探针序列,以便设计用于例如通过RT-PCR检测表达的引物。这样的引物也可包括于本发明的试剂盒中。

[0133] 已经显示启动子处或附近的DNA甲基化的增加率与降低的基因表达水平相关。DNA甲基化是人中的主要表观遗传修饰。它是由被称为甲基转移酶的酶进行的DNA的化学修饰,其中将甲基(m)添加至DNA中的特定胞嘧啶(C)残基。在哺乳动物中,甲基化仅在邻近于鸟苷残基的胞嘧啶残基处,即,在序列CG处或在CpG二核苷酸处,发生。

[0134] 因此,在又一个进一步方面,本发明涉及用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的方法,其包括:

[0135] 测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种的甲基化状态:

[0136] ADAMTS9、EMP1、F3、LDLR、LGALS3、MALAT1、MTUS1、NR4A3、PTGS2、RIN2、SLC15A2、SOCS3和TSC22D1

[0137] 其中测定的甲基化状态用于提供所述前列腺癌的特征和/或预后。

[0138] 在某些实施方案中,如果ADAMTS9、EMP1、F3、LDLR、LGALS3、MALAT1、MTUS1、NR4A3、PTGS2、RIN2、SLC15A2、SOCS3和TSC22D1中的至少一种被(过度)甲基化,则复发和/或转移的可能性增加。

[0139] 可以通过任何合适的方式来实现甲基化状态的测定。合适的实例包括亚硫酸氢盐基因组测序和/或通过甲基化特异性PCR。用于评价甲基化状态的各种技术是本领域中已知的,并且可以与本发明结合使用:测序,甲基化特异性PCR(MS-PCR),熔解曲线甲基化特异性PCR(McMS-PCR),有或没有亚硫酸氢盐处理的MLPA,QAMA(Zeschnigk等人,2004),MSRE-PCR(Melnikov等人,2005),MethyLight(Eads等人,2000),ConLight-MSP(Rand等人,2002),亚硫酸氢盐转化特异性的甲基化特异性PCR(BS-MSP)(Sasaki等人,2003),COBRA(依赖于使用限制性酶以揭示亚硫酸氢钠-处理的DNA的PCR产物的甲基化依赖性序列差异),甲基化敏感的单核苷酸引物延伸验证(MS-SNuPE),甲基化敏感的单链验证分析(MS-SSCA),熔解曲线组合的亚硫酸氢盐限制性分析(McCOBRA)(Akey等人,2002),PyroMethA,HeavyMethyl(Cottrell等人2004),MALDI-TOF,MassARRAY,甲基化的等位基因的定量分析(QAMA),酶促区域甲基化检测(ERMA),QBSUPT,MethylQuant,定量PCR测序和基于寡核苷酸的微阵列系统,焦磷酸测序,Meth-DOP-PCR。一些可用于DNA甲基化分析的技术的综述提供于Nucleic acids research,1998,Vol.26,No.10,2255-2264,Nature Reviews,2003,Vol.3,253-266; Oral Oncology,2006,Vol.42,5-13。

[0140] 用于评价甲基化状态的技术基于不同的方法。一些包括使用核酸内切酶。这样的内切核酸酶可以相对于未甲基化的识别位点优先切割甲基化的识别位点,或者相对于甲基化的识别位点优先切割未甲基化的识别位点。前者的一些实例是Acc III、Ban I、BstN I、Msp I和Xma I。后者的实例是Acc II、Ava I、BssH II、BstU I、Hpa II和Not I。切割模式的

差异表明甲基化的CpG二核苷酸的存在或不存在。切割模式可以直接检测,或者在生成可容易区分的产物的进一步反应之后进行检测。检测改变的大小和/或电荷的方式可以用于检测修饰的产物,包括但不限于电泳、色谱和质谱。

[0141] 或者,甲基化的CpG二核苷酸的鉴定可以利用MeCP2蛋白的甲基结合结构域(MBD)选择性结合至甲基化DNA序列的能力(Cross等人,1994;Shiraishi等人,1999)。MBD还可以从MBP、MBP2、MBP4、聚-MBD(Jorgensen等人,2006)或试剂诸如结合至甲基化核酸的抗体获得。可以将MBD固定至固相基质,且用于制备型柱层析来分离高度甲基化的DNA序列。变体形式诸如表达的His标记的甲基化-CpG结合结构域可以用来选择性结合至甲基化的DNA序列。最终,使限制性内切核酸酶消化的基因组DNA与表达的His标记的甲基-CpG结合结构域接触。其它方法是本领域中众所周知的,且尤其包括甲基化的CpG岛回收测定(MIRA)。另一种方法,MB-PCR,使用固定化于PCR容器的壁上以捕获甲基化的DNA的重组的二价甲基-CpG-结合多肽和随后通过PCR检测结合的甲基化DNA。

[0142] 用于检测甲基化的CpG二核苷酸基序的进一步方法使用选择性修饰CpG二核苷酸基序的甲基化或未甲基化的形式的化学试剂。合适的化学试剂包括胍和亚硫酸氢根离子。在某些实施方案中,本发明的方法可以使用亚硫酸氢根离子。亚硫酸氢盐转化依赖于用亚硫酸氢钠处理DNA样品,其将未甲基化的胞嘧啶转化为尿嘧啶,而甲基化的胞嘧啶得到保持(Furuichi等人,1970)。该转化最终导致初始DNA的序列的变化。众所周知,所得尿嘧啶具有胸腺嘧啶的碱基配对行为,这不同于胞嘧啶碱基配对行为。这使得甲基化和未甲基化的胞嘧啶之间的区分变得可能。用于评价序列差异的分子生物学和核酸化学的有用常规技术是本领域中众所周知的并在文献中解释。参见,例如,Sambrook, J., 等人, *Molecular cloning: A laboratory Manual*, (2001)第3版, Cold Spring Harbor, NY; Gait, M. J. (编辑), *Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach*, IRL Press(1984); Hames B. D., 和Higgins, S. J. (编辑), *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press(1985); 和系列, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc.

[0143] 一些技术使用用于评价在CpG二核苷酸的甲基化状态的引物。两种引物设计的方法是可能的。首先,可以设计本身不覆盖DNA甲基化的任何潜在位点的引物。在差异甲基化位点处的序列变异位于两个引物之间,并且序列变异的显现需要进一步的测定步骤。这样的引物用于亚硫酸氢盐基因组测序、COBRA、Ms-SnuPE和几种其他技术中。其次,可以设计与初始处理的序列的甲基化或未甲基化版本特异性杂交的引物。杂交之后,可进行扩增反应,使用本领域已知的任何检测系统测定扩增产物。扩增产物的存在表明所述样品与引物杂交。所述引物的特异性表明DNA是否已经修饰或未经修饰,其进而表明DNA是否已被甲基化。如果与目标具有足够的互补区域,例如12、15、18或20个核苷酸,则所述引物还可含有不干扰杂交但可用于其它操作的额外核苷酸残基。这样的其它残基的实例可以是限制性内切核酸酶切割位点,配体结合位点或者因子结合或接头或重复。寡核苷酸引物可以使得或者可以不使得它们对于修饰的甲基化残基是特异性的。

[0144] 区分修饰和未修饰的核酸的进一步方式是使用寡核苷酸探针。这样的探针可以直接杂交至修饰的核酸或修饰的核酸的进一步产物,诸如通过扩增获得的产物。基于探针的测定利用寡核苷酸与特异性序列的杂交以及随后对该杂交物的检测。也可以在检测扩增产物之前存在进一步的纯化步骤,例如沉淀步骤。可以使用任何本领域中已知的检测系统标

记寡核苷酸探针。这些包括但不限于：荧光部分、放射性同位素标记部分、生物发光部分、发光部分、化学发光部分、酶、底物、受体或配体。

[0145] 在MSP方法中,可以使用引物对扩增DNA,所述引物对经设计通过利用由于亚硫酸氢根处理导致的序列差异来区分甲基化DNA与未甲基化DNA(WO 97/46705)。例如,亚硫酸氢根离子修饰未甲基化的胞嘧啶碱基,将它们变为尿嘧啶碱基。在杂交条件下,尿嘧啶碱基与腺嘌呤碱基杂交。因此,包含替代鸟嘌呤碱基的腺嘌呤碱基的寡核苷酸引物会与亚硫酸氢根修饰的DNA杂交,而含有鸟嘌呤碱基的寡核苷酸引物会与DNA中未修饰的(甲基化的)胞嘧啶残基杂交。使用DNA聚合酶和第二引物的扩增得到扩增产物,所述扩增产物可以容易观察到,这进而表明DNA是否已经被甲基化。尽管PCR是优选的扩增方法,本发明的范围内也包括该基本技术的变体,诸如巢式PCR和多重PCR。

[0146] 如前所提及,用于评价相关基因的甲基化状态的一个实施方案需要扩增以产生扩增产物。扩增产物的存在可以使用本领域中众所周知的方法直接评价。它们可以简单地在合适的凝胶诸如琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶上显现。检测可以涉及,例如,特定染料(诸如插入双链DNA的溴化乙锭)的结合和在UV照射器下DNA条带的显现。用于检测扩增产物的另一种方式包含与寡核苷酸探针杂交。或者,可以测量荧光或能量转移以测定甲基化DNA的存在。

[0147] MSP技术的一个特定实例被称为实时定量MSP(QMSP),并且允许实时或在端点可靠定量甲基化的DNA。实时方法一般是基于连续光学监测扩增程序,并且利用荧光标记的试剂,所述试剂在产物中的掺入可以进行定量,并且其定量表明模板中该序列的拷贝数。一种这样的试剂是荧光染料,被称为SYBR Green I,其优先结合双链DNA,且双链DNA的结合大大增强了其荧光。或者,标记的引物和/或标记的探针可用于定量。它们代表了众所周知的市售实时扩增技术的具体应用,诸如**TAQMAN®**、**MOLECULAR BEACONS®**、**AMPLIFLUOR®**和**SCORPION®**、**DzyNA®**、Plexor™等。在实时PCR系统中,可以在指数期过程中监测PCR反应,在所述指数期过程中,PCR产物的量的首先显著增加与目标模板的初始量相关。

[0148] 实时PCR检测反应过程中扩增子的积累。然而,不需要利用实时方法。许多应用不需要定量,且实时PCR技术仅用作获得便利的结果呈现和储存且同时避免PCR后处理的工具。因此,可以仅进行分析以证实目标DNA是否存在于样品中。在扩增反应已经完成之后进行这样的终点验证。

[0149] 根据本发明的所有方面,测定以下中的至少一种的表达水平

[0150] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

[0151] 可以涉及测定从所述基因产生的转录物和/或蛋白同种型的所有或选择物的水平。对于各基因可以检测的转录物和相应的蛋白同种型的实例显示于下表D:

[0152] 表D-本发明中可以检测的代表性转录物和相应的蛋白同种型

[0153]

基因 ID	通过 Almac 探针组检测的 Ensembl 转录物 ID	Ensembl 蛋白 ID
TRPM3	ENST00000377111	ENSP00000366315
	ENST00000423814	ENSP00000389542
	ENST00000357533	ENSP00000350140
	ENST00000354500	非蛋白编码
	ENST00000377110	ENSP00000366314
PDRG1	ENST00000202017	ENSP00000202017
SRSF5	ENST00000553635	ENSP00000451391
	ENST00000554465	非蛋白编码
	ENST00000556184	非蛋白编码
	ENST00000557154	ENSP00000451088
	ENST00000394366	ENSP00000377892
	ENST00000557460	非蛋白编码
	ENST00000556587	非蛋白编码
	ENST00000555547	非蛋白编码
	ENST00000556330	非蛋白编码
	ENST00000554929	非蛋白编码
	ENST00000553521	ENSP00000452123
PDE4D	ENST00000507116	ENSP00000424852
	ENST00000502575	ENSP00000425917
	ENST00000502484	ENSP00000423094
	ENST00000340635	ENSP00000345502
	ENST00000546160	ENSP00000442734
	ENST00000505453	ENSP00000421013
	ENST00000360047	ENSP00000353152

[0154]

	ENST00000405053	非蛋白编码
	ENST00000405755	ENSP00000384806
	ENST00000309641	非蛋白编码
	ENST00000514231	非蛋白编码
PDK4	ENST00000473796	非蛋白编码
	ENST00000005178	ENSP00000005178
ADAMTS1	ENST00000284984	ENSP00000284984
	ENST00000464589	非蛋白编码
ADAMTS9	ENST00000482490	非蛋白编码
	ENST00000295903	ENSP00000295903
	ENST00000481060	ENSP00000417521
	ENST00000498707	ENSP00000418735
B3GNT5	ENST00000460419	ENSP00000420778
	ENST00000326505	ENSP00000316173
CEBPD	ENST00000408965	ENSP00000386165
CENPF	ENST00000366955	ENSP00000355922
CREM	ENST00000464475	ENSP00000418450
	ENST00000488328	ENSP00000417460
	ENST00000490460	非蛋白编码
	ENST00000479070	ENSP00000420511
	ENST00000463314	ENSP00000418336
	ENST00000374734	ENSP00000363866
	ENST00000484283	ENSP00000417165
	ENST00000463960	ENSP00000419684
	ENST00000460270	ENSP00000420437
	ENST00000473940	ENSP00000420681
	ENST00000469517	非蛋白编码
	ENST00000342105	ENSP00000341875

[0155]

	ENST00000461968	非蛋白编码
	ENST00000374728	ENSP00000363860
	ENST00000395887	ENSP00000379225
	ENST00000495960	非蛋白编码
	ENST00000429130	ENSP00000393538
	ENST00000348787	ENSP00000345384
	ENST00000337656	ENSP00000337138
	ENST00000333809	ENSP00000333055
	ENST00000487132	ENSP00000418798
	ENST00000374721	ENSP00000363853
	ENST00000439705	ENSP00000409220
	ENST00000344351	ENSP00000344365
	ENST00000345491	ENSP00000265372
	ENST00000474362	ENSP00000419018
	ENST00000361599	ENSP00000354593
	ENST00000395895	ENSP00000379232
	ENST00000354759	ENSP00000346804
	ENST00000487763	ENSP00000417807
	ENST00000356917	ENSP00000349387
DKK1	ENST00000476752	非蛋白编码
	ENST00000373970	ENSP00000363081
EMP1	ENST00000256951	ENSP00000256951
	ENST00000537612	ENSP00000445319
ERRFI1	ENST00000487559	ENSP00000467030
	ENST00000474874	ENSP00000466958
	ENST00000377482	ENSP00000366702
	ENST00000467067	ENSP00000465100
	ENST00000469499	ENSP00000466454

[0156]

HJURP	ENST00000441687	ENSP00000401944
	ENST00000411486	ENSP00000414109
	ENST00000432087	ENSP00000407208
	ENST00000433484	非蛋白编码
IL1R1	ENST00000422532	非蛋白编码
	ENST00000409929	ENSP00000386776
	ENST00000233946	ENSP00000233946
	ENST00000409288	ENSP00000386478
	ENST00000413623	非蛋白编码
	ENST00000409589	ENSP00000386555
	ENST00000424272	ENSP00000415366
	ENST00000409329	ENSP00000387131
	ENST00000428279	ENSP00000410461
	ENST00000410023	ENSP00000386380
JUNB	ENST00000302754	ENSP00000303315
KLF10	ENST00000285407	ENSP00000285407
	ENST00000395884	ENSP00000379222
KLF4	ENST00000497048	非蛋白编码
	ENST00000493306	非蛋白编码
	ENST00000374672	ENSP00000363804
LDLR	ENST00000252444	ENSP00000252444
	ENST00000560628	非蛋白编码
LGALS3	ENST00000254301	ENSP00000254301
	ENST00000556438	非蛋白编码
LPAR1	ENST00000358883	ENSP00000351755
	ENST00000541779	ENSP00000445697
	ENST00000374430	ENSP00000363552
	ENST00000374431	ENSP00000363553

[0157]

MALAT1	ENST00000534336	非蛋白编码
MTUS1	ENST00000517413	非蛋白编码
	ENST00000381861	ENSP00000371285
	ENST00000520196	非蛋白编码
	ENST00000381869	ENSP00000371293
	ENST00000262102	ENSP00000262102
	ENST00000400046	ENSP00000382921
	ENST00000544260	ENSP00000445738
	ENST00000297488	ENSP00000297488
	MYBPC1	ENST00000541119
ENST00000551300		ENSP00000447116
ENST00000361466		ENSP00000354849
ENST00000547509		ENSP00000447362
ENST00000552198		非蛋白编码
ENST00000547405		ENSP00000448175
ENST00000441232		ENSP00000388989
ENST00000452455		ENSP00000400908
ENST00000550270		ENSP00000449702
ENST00000392934		ENSP00000376665
ENST00000545503		ENSP00000440034
ENST00000550514		ENSP00000447404
ENST00000550501		非蛋白编码
ENST00000553190		ENSP00000447900
ENST00000360610		ENSP00000353822
ENST00000361685		ENSP00000354845
ENST00000549145		ENSP00000447660
ENST00000536007	ENSP00000446128	
NFIL3	ENST00000534336	ENSP00000297689

[0158]

NR4A3	ENST00000395097	ENSP00000378531
	ENST00000330847	ENSP00000333122
PI15	ENST00000260113	ENSP00000260113
	ENST00000523773	ENSP00000428567
PTGS2	ENST00000490885	非蛋白编码
	ENST00000559627	非蛋白编码
	ENST00000367468	ENSP00000356438
	ENST00000466691	非蛋白编码
RHOBTB3	ENST00000510313	ENSP00000424844
	ENST00000379982	ENSP00000369318
	ENST00000504179	ENSP00000422360
RIN2	ENST00000484638	非蛋白编码
	ENST00000255006	ENSP00000255006
RNFT2	ENST00000319176	ENSP00000321405
	ENST00000547718	非蛋白编码
	ENST00000551251	非蛋白编码
	ENST00000407967	ENSP00000385669
	ENST00000392549	ENSP00000376332
	ENST00000257575	ENSP00000257575
SELE	ENST00000367777	ENSP00000356751
	ENST00000367775	ENSP00000356749
	ENST00000367781	ENSP00000356755
	ENST00000333360	ENSP00000331736
	ENST00000367776	ENSP00000356750
	ENST00000367779	ENSP00000356753
	ENST00000367780	ENSP00000356754
	ENST00000367782	ENSP00000356756
SLC15A2	ENST00000469422	非蛋白编码

[0159]

	ENST00000295605	ENSP00000295605
	ENST00000489711	ENSP00000417085
SOCS2	ENST00000549206	ENSP00000448815
	ENST00000549122	ENSP00000447161
	ENST00000548537	ENSP00000448709
	ENST00000551883	ENSP00000474805
	ENST00000340600	ENSP00000339428
SOCS3	ENST00000330871	ENSP00000330341
SSTR1	ENST00000267377	ENSP00000267377
ST6GAL1	ENST00000470633	非蛋白编码
	ENST00000457772	ENSP00000412221
	ENST00000169298	ENSP00000169298
	ENST00000448044	ENSP00000389337
TSC22D1	ENST00000261489	ENSP00000261489
	ENST00000458659	ENSP00000397435
	ENST00000501704	ENSP00000437414
XBP1	ENST00000216037	ENSP00000216037
	ENST00000405219	ENSP00000384295
	ENST00000344347	ENSP00000343155
	ENST00000403532	ENSP00000385162
	ENST00000482720	非蛋白编码
ZFP36	ENST00000594442	ENSP00000471239
	ENST00000248673	ENSP00000248673
	ENST00000597629	ENSP00000469647
F12	ENST00000510358	非蛋白编码
	ENST00000514943	非蛋白编码
	ENST00000502854	非蛋白编码
	ENST00000504406	非蛋白编码

[0160]	CD38	ENST00000253496	ENSP00000253496
		ENST00000226279	ENST00000226279
		ENST00000502843	非蛋白编码
	F3	ENST00000370207	ENSP00000359226
		ENST00000334047	ENSP00000334145
		ENST00000480356	非蛋白编码
	IL8	ENST00000307407	ENSP00000306512
	OAT	ENST00000471127	非蛋白编码
		ENST00000368845	ENSP00000357838
		ENST00000539214	ENSP00000439042
	FOXMI	ENST00000342628	ENSP00000342307
		ENST00000536066	非蛋白编码
		ENST00000361953	ENSP00000354492
		ENST00000359843	ENSP00000352901

[0161] 本文所述的方法可以进一步包括从样品提取总核酸或RNA。合适的方法是本领域中已知的,并且包括使用商业可得的试剂盒诸如Rneasy和GeneJET RNA纯化试剂盒。

[0162] 在某些实施方案中,所述方法可以进一步包括从受试者获得样品。典型地,所述方法是在分离的样品上进行的体外方法。

[0163] 根据本发明的所有方面,样品可以是任何合适的形式。所述样品可以包含前列腺细胞,基本上由其组成,或由其组成,且经常是前列腺组织样品。前列腺细胞或组织可以包含前列腺癌细胞。在具体实施方案中,所述样品包含福尔马林固定的石蜡包埋的活检样品,基本上由其组成,或由其组成。组织样品可以通过任何合适的技术获得。实例包括活检程序,任选细针抽吸活检程序。也可以利用体液样品。合适的样品类型包括血液,以涵盖全血、血清和血浆样品、尿液和精液。

[0164] 本发明的方法可以包括选择受试者中的前列腺癌的治疗和任选进行所述治疗。在某些实施方案中,如果前列腺癌的特征和/或预后结果是复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性,则选择的治疗是以下中的一种或多种:

[0165] a) 抗激素治疗

[0166] b) 细胞毒性剂

[0167] c) 生物制品

[0168] d) 放射疗法

[0169] e) 靶向疗法

[0170] f) 手术

[0171] 抗激素治疗(或激素疗法)意指降低选择的激素(特别是睾酮)的水平和/或活性的

治疗形式。所述激素可以促进肿瘤生长和/或转移。抗激素治疗可以包含促黄体激素阻断剂,诸如戈舍瑞林(也称为Zoladex)、布舍瑞林、亮丙瑞林(也称为Prostap)、组氨瑞林(Vantas)和曲普瑞林(也称为Decapeptyl)。所述抗激素治疗可以包含促性腺激素释放激素(GnRH)阻滞剂,诸如地加瑞克(Firmagon),或抗雄激素诸如氟他胺(也称为Drogenil)和比卡鲁胺(也称为Casodex)。在具体实施方案中,所述抗激素治疗可以是比卡鲁胺和/或阿比特龙。

[0172] 所述细胞毒性剂可以是基于铂的药剂和/或紫杉烷。在具体实施方案中,所述基于铂的药剂选自顺铂、卡铂和奥沙利铂。所述紫杉烷可以是紫杉醇、卡巴他赛或多西他赛。所述细胞毒性剂也可以是长春花生物碱,诸如长春瑞滨或长春花碱。所述细胞毒性剂可以是拓扑异构酶抑制剂,诸如依托泊苷或葱环霉素(抗生素),诸如阿霉素。所述细胞毒性剂可以是烷基化剂,诸如雌莫司汀。

[0173] 生物制品意指由生物过程生成的医药产品。生物制品可以是,例如,疫苗、血液或血液组分、细胞、基因疗法、组织或重组治疗性蛋白。任选地,所述生物制品是抗体和/或疫苗。所述生物制品可以是Sipuleucel-T。

[0174] 在某些实施方案中,所述放射疗法是扩大的放射疗法,优选扩野放射疗法(extended-field radiotherapy)。

[0175] 手术可以包括根治性前列腺切除术。根治性前列腺切除术意指去除整个前列腺、精囊和输精管。在进一步实施方案中,手术包括肿瘤切除,即去除所有或部分肿瘤。

[0176] 靶向疗法意指使用针对特定药物目标的靶向治疗剂用于治疗前列腺癌的治疗。在具体实施方案中,这可意指针对目标诸如PARP、AKT、MET、VEGFR等的抑制剂。PARP抑制剂是酶聚ADP核糖聚合酶(PARP)的一组药理学抑制剂。几种形式的癌症比普通细胞更依赖于PARP,使得PARP成为癌症疗法的有吸引力的目标。(临床试验中的)实例包括iniparib、奥拉帕尼、rucaparib、veliparib、CEP 9722、MK 4827、BMN-673和3-氨基苯甲酰胺。AKT,也称为蛋白激酶B(PKB),是丝氨酸/苏氨酸特异性蛋白激酶,其在多种细胞过程诸如葡萄糖代谢、凋亡、细胞增殖、转录和细胞迁移中发挥关键作用。AKT与肿瘤细胞存活、增殖和侵袭相关。AKT抑制剂的实例包括VQD-002、哌立福辛、米替福新和AZD5363。MET是原癌基因,其编码肝细胞生长因子受体(HGFR)。所述肝细胞生长因子受体蛋白具有酪氨酸-激酶活性。用于抑制MET的激酶抑制剂的实例包括K252a、SU11274、PHA-66752、ARQ197、Foretinib、SGX523和MP470。也可以通过抑制与HGF的相互作用来阻断MET活性。许多合适的拮抗剂,包括截短的HGF,抗HGF抗体和不可切割的HGF,是已知的。VEGF受体是血管内皮生长因子(VEGF)的受体。各种抑制剂是已知的,诸如lenvatinib、莫替沙尼、帕唑帕尼和瑞格非尼。

[0177] 本发明的方法可以指导疗法选择,以及新颖治疗剂的临床试验评估过程中选择患者群体用于富集策略。例如,当评估推定的抗癌剂或治疗方案时,本文公开的方法可用于选择个体用于临床试验,其具有被表征为具有复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性的前列腺癌。

[0178] 本发明还涉及用于执行如本文所述的方法的系统或装置。

[0179] 在一个进一步方面,本发明涉及用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的系统或测试试剂盒,其包含:

[0180] a)一种或多种测试装置,其用于测定来自所述受试者的样品中以下中的至少一种

的表达水平:

[0181] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

[0182] b)处理器;和

[0183] c)包含计算机应用的存储介质,当由所述处理器执行时,所述计算机应用被配置为:

[0184] (i)在一种或多种测试装置上访问和/或计算所述样品中以下中的至少一种的测定的表达水平:

[0185] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36

[0186] (ii)计算所述样品中以下中的至少一种的水平是增加还是降低:

[0187] FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36;和

[0188] (iii)从所述处理器输出前列腺癌的特征和/或预后。

[0189] 测试装置意指允许测定基因的表达水平的组分(件)的组合。所述组分(件)可以包括上面关于在蛋白、RNA或表观遗传修饰的水平测定表达水平的方法描述的任何组件。例如,所述组分可以是抗体、引物、检测剂等等。组分(件)还可以包括以下中的一种或多种:显微镜、显微镜载片、x-光片、放射性计数器、闪烁计数器、分光光度计、色度计、荧光计、光度计和密度计。

[0190] 在某些实施方案中,所述系统或测试试剂盒进一步包含用于从所述处理器输出的显示器。

[0191] 本发明还涉及计算机应用或包含如上定义的计算机应用的存储介质。

[0192] 在某些示例性实施方案中,提供了用于根据本文描述的方法表征和/或预后受试者中的前列腺癌的计算机执行的方法、系统和计算机程序产品。例如,所述计算机程序产品可以包含具有在其上实施的计算机可读程序指令的非临时性计算机可读存储装置,当由计算机执行时,其引起所述计算机如本文所述表征和/或预后受试者中的前列腺癌。例如,计算机可执行指令可以引起所述计算机:

[0193] (i)在一种或多种测试装置上访问和/或计算所述样品中以下中的至少一种的测定的表达水平:FOXM1、TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36;

[0194] (ii)计算所述样品中以下中的至少一种的水平是增加还是降低:FOXM1、TRPM3、

PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36；和，

[0195] (iii)提供关于所述前列腺癌的特征和/或预后的输出。

[0196] 在某些示例性实施方案中，所述计算机执行的方法、系统和计算机程序产品可以在计算机应用中实施，所述计算机应用，例如，在计算机器和模块上操作和执行。当执行时，所述应用可以根据本文所述的示例性实施方案特征和/或预后受试者中的前列腺癌。

[0197] 如本文所使用，计算机器可以对应于任何计算机、服务器、嵌入式系统或计算系统。模块可以包含一个或多个硬件或软件元件，其被配置为便于计算机器执行本文呈现的各种方法和处理功能。计算机器可以包括各种内部或所附组件，诸如处理器、系统总线、系统存储器、存储介质、输入/输出接口和用于与例如网络通信的网络接口。

[0198] 计算机器可以被实现为常规计算机系统、嵌入式控制器、膝上型计算机、服务器、定制机器、任何其它硬件平台、诸如例如实验室计算机或装置或其任何组合。计算机器可以是被配置成使用例如经由数据网络或总线系统互连的多个计算机器工作的分布式系统。

[0199] 处理器可以被配置成执行代码或指令以执行本文所述的操作和功能，管理请求流和地址映射，和执行计算和生成命令。处理器可以被配置成监视和控制计算机器中的组件的操作。处理器可以是通用处理器、处理器核心、多处理器、可再配置处理器、微控制器、数字信号处理器(“DSP”)、专用集成电路(“ASIC”)、图形处理单元(“GPU”)、现场可编程门阵列(“FPGA”)、可编程逻辑器件(“PLD”)、控制器、状态机、门控逻辑、离散硬件组件、任何其它处理单元、或者其任何组合或多样性。处理器可以是单个处理单元、多个处理单元、单个处理核心、多个处理核心、专用处理核心、协同处理器、或者其任何组合。根据特定实例实施方案，处理器连同计算机器的其它组件可以是在一个或多个计算机器内执行的虚拟化的计算机器。

[0200] 系统存储器可以包括非易失性存储器，诸如只读存储器(“ROM”)、可编程只读存储器(“PROM”)、可擦除可编程只读存储器(“EPROM”)、闪存、或能够在有或没有施加的电力的情况下存储程序指令或数据的任何其它设备。系统存储器还可以包括易失性存储器，诸如随机存取存储器(“RAM”)、静态随机存取存储器(“SRAM”)、动态随机存取存储器(“DRAM”)和同步动态随机存取存储器(“SDRAM”)。其它类型的RAM还可以用于实现系统存储器。系统存储器可以使用单个存储器模块或多个存储器模块来实现。尽管系统存储器可以是计算机器的一部分，但本领域技术人员将认识到，系统存储器可以与计算机器分离而不偏离主题技术的范围。还应该认识到，系统存储器可以包括非易失性存储设备诸如存储介质，或者与其结合操作。

[0201] 存储介质可以包括硬盘、软盘、压缩盘只读存储器(“CD-ROM”)、数字通用盘(“DVD”)、蓝光盘、磁带、闪存、其它非易失性存储设备、固态驱动器(“SSD”)、任何磁存储设备、任何光存储设备、任何电存储设备、任何半导体存储设备、任何基于实体的存储设备、任何其它数据存储设备、或者其任何组合或多样性。存储介质可以存储一个或多个操作系统、应用程序和程序模块诸如模块、数据或任何其它信息。存储介质可以是计算机器的一部分或连接到计算机器。存储介质还可以是与计算机器诸如服务器、数据库服务器、云存储、连

接网络的存储器等等通信的一个或多个其它计算机器的一部分。

[0202] 模块可以包含一个或多个硬件或软件元件,其被配置成便于计算机器来执行本文呈现的各种方法和处理功能。模块可以包括与系统存储器、存储介质或两者相关的存储为软件或固件的一个或多个指令序列。存储介质可以因此代表机器或计算机可读介质的实例,在其上可以存储指令或代码用于由处理器执行。机器或计算机可读介质可以通常是指用于提供指令给处理器的任何一种或多种介质。这样的与模块相关的机器或计算机可读介质可以包含计算机软件产品。应该认识到,包含模块的计算机软件产品还可以与经由网络、任何信号承载介质、或任何其它通信或递送技术来递送模块给计算机器的一个或多个处理或方法相关。模块还可以包含硬件电路或用于配置硬件电路的信息,诸如微代码或用于FPGA或其它PLD的配置信息。

[0203] 输入/输出(“I/O”)接口可以被配置为耦合至一个或多个外部设备,以从一个或多个外部设备接收数据,以及发送数据到一个或多个外部设备。这样的外部设备连同各种内部设备一起还被称为外围设备。I/O接口可以包括电和物理连接,用于可操作地将各种外围设备耦合至计算机器或处理器。I/O接口可以被配置成在外围设备、计算机器或处理器之间传送数据、地址和控制信号。I/O接口可以被配置成实现任何标准接口,诸如小型计算机系统接口(“SCSI”)、串行附连的SCSI(“SAS”)、光纤通道、外围组件互连(“PCI”)、PCI express(PCIe)、串行总线、并行总线、先进技术连接(“ATA”)、串行ATA(“SATA”)、通用串行总线(“USB”)、Thunderbolt、FireWire、各种视频总线等。I/O接口可以被配置成仅实现一个接口或总线技术。

[0204] 或者,I/O接口可以被配置成实现多个接口或总线技术。I/O接口可以被配置成系统总线的一部分、全部,或与其结合操作。I/O接口可以包括一个或多个缓冲器,用于缓冲一个或多个外部设备、内部设备、计算机器或处理器之间的传输。

[0205] I/O接口可以将计算机器2000耦合到各种输入设备,包括鼠标、触摸屏、扫描仪、电子数字转换器、传感器、接收机、触摸板、轨迹球、相机、麦克风、键盘、任何其它指示设备、或者其任何组合。I/O接口可以将计算机器耦合至各种输出设备,包括视频显示器、扬声器、打印机、投影仪、触觉反馈设备、自动控制、机器人组件、致动器、电机、风扇、螺线管、阀门、泵、发射器、信号发射器、光源等等。

[0206] 计算机器可以使用通过网络接口到跨越网络的一个或多个其它系统或计算机器的逻辑连接而在联网环境中操作。网络可以包括广域网(WAN)、局域网(LAN)、内联网、互联网、无线接入网络、有线网络、移动网络、电话网络、光学网络、或其组合。网络可以是任何拓扑的分组交换、电路交换、并且可以使用任何通信协议。网络内的通信链路可以包括各种数字或模拟通信介质,诸如光纤电缆、自由空间光学、波导、电导体、无线链接、天线、射频通信等等。

[0207] 处理器可以通过系统总线连接到计算机器的其它元件或本文讨论的各种外围设备。应该认识到,系统总线可以在处理器内部,在处理器外部,或两者都有。根据一些实施方案,处理器、计算机器的其它元件或本文讨论的各种外围中的任一个可以被集成到单个设备诸如芯片上系统(“SOC”)、封装上系统(“SOP”)或者ASIC设备中。

[0208] 实施方案可以包括计算机程序,其实现本文描述和说明的功能,其中计算机程序在包含存储在机器可读媒介的指令和执行指令的计算机系统中实现。然而,应该

显然的是,可以存在许多不同的在计算机编程中实现实施方案的方式,且所述实施方案不应该理解为限定为任何一组计算机程序指令。进一步,本领域编程人员将能够写出这样的计算机程序来实现所公开的本文所述的实施方案。因此,不考虑充分理解如何做出和使用实施方案所必需的特定程序代码指令集合的公开。进一步,本领域技术人员将理解,本文描述的实施方案的一个或多个方面可以由硬件、软件或其组合来执行,如可以在一个或多个计算系统中实现的那样。而且,对由计算机执行的动作的任何引用不应该被理解为由单个计算机执行,因为多于一个计算机可以执行该动作。

[0209] 本文描述的实例实施方案可以通过执行先前所述的方法和处理功能的计算机硬件和软件来使用。本文所述的系统、方法和程序可以在可编程计算机、计算机可执行软件、或数字电路中实现。软件可以存储在计算机可读介质上。例如,计算机可读介质可以包括软盘、RAM、ROM、硬盘、可移动介质、闪存、记忆棒、光介质、磁光介质、CD-ROM等等。数字电路可以包括集成电路、门阵列、构造模块逻辑、现场可编程门阵列(FPGA)等等。

[0210] 试剂盒中可以提供用于执行本文所述的方法的试剂、工具和/或指令。这样的试剂盒可以包括用于从患者(诸如通过活检)收集组织样品的试剂,和用于处理该组织的试剂。该试剂盒还可包括用于进行表达水平分析的一种或多种试剂,例如用于进行核酸扩增,包括RT-PCR和qPCR、NGS、northern印迹、蛋白质组分析或免疫组织化学以测定患者的样品中的生物标志物的表达水平的试剂。例如,这样的试剂盒中可包括用于进行RT-PCR的引物,用于进行northern印迹分析的探针,和/或如本文讨论用于进行蛋白质组分析诸如Western印迹、免疫组织化学和ELISA分析的抗体或适配子。还可包括用于测定的适当的缓冲液。还可包括这些测定中的任一种所需的检测试剂。所述试剂盒可以是例如基于阵列或PCR的试剂盒,并且可以包括例如额外的试剂,诸如聚合酶和/或dNTP。本文特征的试剂盒还可以包括描述如何执行用于测量表达水平的测定的说明单。

[0211] 所述试剂盒可以包括与以下中的至少一种互补的一种或多种引物对:

[0212] TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36。

[0213] 所述试剂盒还可以包括与参考基因互补的一种或多种引物对,例如与TPT1、RPS14或RPL37A中的至少一种互补的引物。

[0214] 这样的试剂盒还可以包括与以下中的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45或46互补的引物对:

[0215] TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、F12、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CENPF、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、HJURP、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、RNFT2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、SSTR1、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36。

[0216] 所述试剂盒可以包括与TRPM3、PDRG1、F12、CENPF、HJURP、RNFT2和SSTR1中的至少一种互补的一种或多种引物对和与SRSF5、PDE4D、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、

MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种互补的一种或多种引物对。

[0217] 用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的试剂盒可以允许测定ADAMTS9、EMP1、F3、LDLR、LGALS3、MALAT1、MTUS1、NR4A3、PTGS2、RIN2、SLC15A2、SOCS3和TSC22D1中的至少一种的甲基化状态。测定的甲基化状态,其可以是过度甲基化,用于提供所述前列腺癌的表征和/或预后。这样的试剂盒可以包括用于直接测定一种或多种基因的甲基化状态的引物和/或探针。因此,它们可以包含通过杂交区分DNA的甲基化和未甲基化形式的甲基化特异性引物和/或探针。这样的试剂盒通常还含有选择性修饰CpG二核苷酸基序的甲基化或未甲基化形式的试剂。合适的化学试剂包含胍和亚硫酸氢根离子。实例是亚硫酸氢钠。然而,所述试剂盒可以含有如上文所讨论测定甲基化状态的其它试剂,诸如限制性内切酶。

[0218] 因此,本发明还涉及用于表征和/或预后受试者中的前列腺癌的试剂盒,其包含如上所述的一种或多种抗体或适配子。

[0219] 如上所讨论,在某些实施方案中,TRPM3、PDRG1、F12、CENPF、HJURP、RNFT2和SSTR1中的至少一种或FOXM1的增加的表达水平表明复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性。在进一步实施方案中,SRSF5、PDE4D、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的降低的表达水平表明复发和/或转移和/或不良预后的增加可能性。

[0220] 因此,本文所述的试剂盒可以包含用于测定TRPM3、PDRG1、F12、CENPF、HJURP、RNFT2、和SSTR1中的至少一种或FOXM1和SRSF5、PDE4D、PDK4、ADAMTS1、ADAMTS9、B3GNT5、CD38、CEBPD、CREM、DKK1、EMP1、ERRFI1、F3、IL1R1、IL8、JUNB、KLF10、KLF4、LDLR、LGALS3、LPAR1、MALAT1、MTUS1、MYBPC1、NFIL3、NR4A3、OAT、PI15、PTGS2、RHOBTB3、RIN2、SELE、SLC15A2、SOCS2、SOCS3、ST6GAL1、TSC22D1、XBP1和ZFP36中的至少一种的表达水平的引物、探针或抗体/适配子。因此,所述试剂盒可以并入测定上调的标志物和下调的标志物的组合的表达水平的试剂。合适的抗体和/或引物/探针可以源自本文的表B、C和D。

[0221] 试剂盒中包括的信息材料可以是涉及本文描述的方法和/或用于本文描述的方法的试剂的用途的描述性的、指导性的、销售的或其它的材料。例如,试剂盒的信息材料可含有联系信息,例如,物理地址、电子邮件地址、网站或电话号码,其中试剂盒的用户可获得关于进行基因表达分析和解析结果的大量信息。

[0222] 所述试剂盒可以进一步包含如上所述的计算机应用或存储介质。

[0223] 先前呈现的实施方案中所述的实例系统、方法和动作是说明性的,并且,在替代实施方案中,某些动作可以以不同次序、相互并行、整体忽略和/或在不同实例实施方案之间组合来执行,和/或可以执行某些额外动作,而不偏离各个实施方案的范围和精神。因此,这样的替代实施方案包括于本文所述的实例中。

[0224] 尽管上面已经详细描述了特定实施方案,但该描述仅仅用于说明目的。因此,应该理解,上述许多方面不意欲作为必需或重要元素,除非另有明确陈述。

[0225] 实例实施方案的公开方面的修改或与之对应的等效组分或动作,除了上述那些之外,可以由受益于本公开内容的本领域普通技术人员做出,而不偏离以下权利要求中限定

的实施方案的精神和范围,其范围应符合最宽泛的解释,从而涵盖这样的修改和等效结构。

[0226] 附图描述

[0227] 图1

[0228] 包含70个原发性前列腺癌、20个具有伴随转移性疾病的原发性癌症、11个转移性疾病和25个正常前列腺样品FFPE的FFPE前列腺癌样品集合的无监督的分层聚类分析。

[0229] A.使用数据集间变化最大的基因鉴定了与转移性疾病应用聚类的原发性肿瘤的子集(卡方 2.77×10^{-10})。

[0230] B.使用从Taylor和同事公开的数据集的内部数据集的鉴定的1083个差异表达的基因的半监督的分层聚类分析鉴定了与转移性疾病应用聚类的原发性肿瘤类似亚簇(卡方 2.78×10^{-6})。

[0231] C.如果患者是或不是转移性生物学组的一部分,他们在手术之后保持无病的概率的Kaplan-Meier分析,风险比通过对数秩检验进行测定。

[0232] 图2

[0233] A.83个过表达的基因与来自出版物的FOXMI1CHIP-Seq命中重叠,重叠p-值 9.269×10^{-5} 的超几何检验。

[0234] B.与FOXMI1CHIP-seq命中重叠且仍然是过表达目标的39个过表达目标的Pearson相关性评分的盒形图。T-检验(p-值 < 0.0001)。

[0235] 图3

[0236] A.GREAT(<http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/>)功能分析,其中甲基化探针位于的基因组区域的分子功能。

[0237] B.表明低表达基因与EZH2和H3K27me3的CHIP-SEQ鉴定的目标重叠的维恩图,重叠的超几何检验。

[0238] C.表明低表达基因与过度甲基化的且H3K27me3修饰重叠的维恩图。

[0239] 图4

[0240] 显示在排序靠前的10,000个探针组之间的重叠,包括至少在转移性生物学亚组和非转移性生物学亚组之间相关的重叠(“列表1和2”)和在非转移性生物学亚组和良性组之间高度相关的重叠(“表3”),的维恩图。

[0241] 图5

[0242] 内部数据集中鉴定的样品簇的GAP分析。

[0243] 图6

[0244] 使用Toppfun(<http://toppgene.cchmc.org/>)差异表达的1182个独特基因的功能分析。

[0245] A.低表达的基因的重要分子过程

[0246] B.过表达的基因的重要分子过程。

[0247] 图7

[0248] 筛选潜在IHC抗体的研究概述

实施例

[0249] 通过引用以下实验实施例将进一步理解本发明。

[0250] 结果

[0251] 无监督分层聚类分析鉴定通过转移性生物学定义的前列腺癌中的不同分子亚型

[0252] 我们假设,具有转移潜能的原发性前列腺癌与转移性疾病和具有已知伴随转移的原发性疾病在转录上是类似的。为了鉴定该转移性亚组,我们采取无监督分层聚类分析方法,其使用70个切割的临床上限于前列腺的原发性前列腺癌、20个具有已知伴随转移性疾病的原发性前列腺癌、11个具有转移性疾病的淋巴结和25个正常前列腺样品。使用整个数据集的最可变的探针组进行聚类分析。GAP统计学检验(Tibshirani等人,2001)鉴定了2个具有统计学意义的主要样品簇(图1A,图5)。

[0253] 这些分子亚组之一对于转移性疾病和具有已知伴随转移的原发性肿瘤具有显著富集(卡方 $p=2.77\times 10^{-10}$)。重要的是,在该组中还发现29个原发性前列腺样品,其没有呈现转移性疾病,但共享类似的转录生物学。该组肿瘤在此被称为“转移性生物学亚组”,且第二亚组被称为“非转移性亚组”。

[0254] 接下来,我们在转移性和非转移性亚组中的原发性肿瘤之间进行基因表达分析,并且鉴定了1182个差异表达的转录物。这些转录物中的大多数在转移性亚组中低表达(1099个低表达相比于83个过表达)。

[0255] 为了鉴定1182个差异表达的基因在第二数据集中是否是预后的,我们使用所述基因以聚类分析由Taylor和同事(Taylor等人,2010)公开的前列腺癌数据集,该数据集表示PSA随访可用的由手术管理的前列腺癌。与我们的内部培训集合一致,我们发现2个稳健的样品簇,其中一个表明对于转移性样品的富集(卡方 $p=2.78\times 10^{-6}$ (图1B)。重要的是,该组还含有63个在呈现时无已知转移性疾病的原发性肿瘤样品。Kaplan Meier分析表明,转移性生物学组内的原发肿瘤在手术后具有较短的疾病复发时间(图1C)(风险比(HR)2.377和p值0.0351)。样品簇的临床和病理特征详述于表1中。重要的是,在其它预后临床因素诸如治疗前的分期、分级或PSA水平中没有差异。

[0256] 作为转移性生物学组基础的分子途径

[0257] 为了确定哪些分子途径导致转移性表型和不良预后,我们使用1182个在转移性和非转移性亚组之间差异表达的基因进行途径分析。这在转移性亚组中鉴定了10个显著过表达的途径和20个低表达的途径(表2i和2ii)。有趣的是,转移性亚组中过表达的大多数途径与有丝分裂进程相关(表2i),而低表达的分子途径参与细胞粘附、形态学、ATF2和p53转录。

[0258] 为了确定这些分子途径中的哪些负责不良预后,我们使用代表每个途径的基因来聚类分析Taylor数据集以及Sun和同事(Sun等人,2009)公开的第二数据集。该后面的数据集代表具有PSA随访的由手术管理的前列腺癌。复发时间的Kaplan Meier分析用于每个观察簇(表2i和2ii)。

[0259] 在过表达的分子途径中,只有FOXM1转录因子网络在Taylor数据集中是显著预后的(HR 2.755 $p=0.0134$)。此外,FOXM1本身在我们的内部训练数据集中的转移性生物亚组中是过表达的(FC 2.13)。为了确定增加的FOXM1是否负责有丝分裂基因在转移生物学组中的过表达,我们研究了Sander和同事以及Chen和同事(Chen等人2013,Sander等人2013)公开的2个公共FoxM1 CHIP-Seq数据。我们重叠了鉴定的FOXM1 CHIP-Seq目标与转移生物学组中过表达的基因。明显地,转移性亚组中的83个过表达的基因中的39个被任一数据集中的FOXM1结合,其中20个是两者共同的。该重叠是高度显著的(9.269×10^{-5})。此外,我们进行

了内部数据集中所有过表达转录物针对FOXMI水平的相关性分析(补充表3)。通过CHIP-Seq数据的分析鉴定的39个FOXMI与非CHIP目标的相关性的比较表明,与CHIP-Seq目标的FOXMI不结合的那些相比,对于FOXMI目标的相关性评分高度显著增加(t 检验 p -值 <0.0001)(图2B)。总之,该数据强烈地表明,FoxMI过表达负责转移性亚组中被检测为过表达的83个基因的大子集的转录活化。

[0260] 在Taylor和Sun两者的数据集中显著预后的低表达分子途径是肌肉收缩、脂肪形成和ATF2转录目标。地尔硫卓途径在Taylor数据集中是显著预后的,而整联蛋白信号传导和p53的转录目标(尽管在Taylor数据集中损失)仅在Sun数据集中达到预后意义。

[0261] 基因表达的表观遗传沉默发生于转移性生物学亚组中

[0262] 转移性生物学亚组中的大多数差异表达的基因下调。接下来,我们询问哪些潜在机制可以负责转移性生物学组中的基因表达的该显著损失。分子过程的分析鉴定了参与染色质结合的基因过表达(图6),重要的是,我们注意到,已知参与表观遗传基因调控的几个基因上调,包括AR、EZH2、HELLS和UHRF1)(表3)。

[0263] UHRF1在转移性生物学亚组中过表达(2.375倍)。该蛋白近来已显示促进并维持前列腺癌中的表观遗传沉默(Babbio等人2012)。UHRF1可以结合至半甲基化的CpG,并且可以招募DNMT1以维持DNA甲基化模式(Bostick等人2007,Sharif等人2007)。启动子处或附近的DNA甲基化的增加率已经显示与降低的基因表达相关,这最可能与转录因子对基因启动子的可及性相关。

[0264] 因此,我们使用高含量DNA甲基化阵列(样品详见补充表3中)测量来自我们的临时训练集(每个亚组11个)的22个肿瘤的子集中的DNA甲基化水平。转移性亚组中的1098个低表达基因的整体分析表明,418个具有增加率的DNA甲基化(重叠的 p 值 1.546×10^{-34})(表4)。此外,过表达的基因集的分析显示没有显著的超或低甲基化状态,由此表明改变的甲基化状态在过表达基因集中是不重要的。

[0265] 超甲基化的基因组区域的GREAT(<http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/>)分析表明许多富集分子过程(图3A),特别是DNA结合和转录因子功能。这表明甲基化不仅直接沉默转移性生物学组中的基因,而且可负责参与转录的基因的损失,引起基因表达的进一步损失。

[0266] 参与表观遗传沉默的另一种基因EZH2在转移性生物学组中超过2倍过表达(表3)。EZH2是PRC2(多梳抑制复合物2)(两类多梳家族蛋白或(PcG)之一)的组分。该复合物具有组蛋白甲基转移酶活性,且EZH2是催化亚基。事实上,EZH2表达是组蛋白甲基转移酶活性的关键决定因素。PRC2复合物在赖氨酸27上使组蛋白H3三甲基化(即H3K27me3),该位点是转录沉默染色质的标志。为了确定EZH2功能是否可以负责转移性亚组中的基因表达的至少部分损失,我们使用了公共CHIP-Seq(Wu等人2012)前列腺癌细胞系数据集。具体地,我们将已知结合EZH2和H3K27me3的基因与转移性生物学亚组中被抑制的基因进行比较(图3B)。显著数目的低表达基因被EZH2、H3K27me3或两者结合(p -值 2.597×10^{-12}),由此强烈暗示经由EZH2介导的组蛋白修饰的染色质沉默为转移性亚组内的基因子集沉默的关键机制。

[0267] 有趣的是,只有一定比例的表观遗传沉默的目标(123/602)具有增加率的超甲基化(图3C),并且被预测具有H3K27me3相关的组蛋白修饰,由此表明两种机制可能在很大程度上独立地工作以沉默基因表达。

[0268] 用于检测转移性生物学亚组的方法

[0269] 分层聚类分析是来自许多样品的基因表达数据的有用分析方法,然而它不能用于前瞻性分类个别肿瘤。此外,在先前研究中,我们已经表明,前列腺癌中的肿瘤异质性引起肿瘤活检样品和从同一患者切割的肿瘤的概况之间显著不一致。因此,我们决定开发适合于免疫组织化学(IHC)的标志物,其将前瞻性分类肿瘤与转移性生物学亚组是否是类似的。

[0270] 为了实现这一点,我们采用2种方法,首先我们鉴定在转移性生物学亚组和非转移性生物学亚组之间差异表达、但在非转移性生物学亚组和正常之间几乎没有表达差异的转录物。该方法使用2-样品t检验法鉴定了393个探针组,这些探针组中的~75%在非转移性生物学亚组中与转移性生物学亚组中相比过表达。我们将该方法称为靶向性的,因为测试例内的正常前列腺可以用作参考。

[0271] 对于第二种方法,我们评价了1182个在转移性生物学亚组和非转移性亚组之间差异表达的基因,在该情况下,因为非转移性生物学组和良性/正常之间可能存在表达差异,要求参考目标,为了鉴定合适的参考,我们鉴定了无论亚组而在所有前列腺癌样品中具有最小表达方差的基因(最好的3个基因概述于表7中)。

[0272] IHC目标的预后效用

[0273] 对于第一种方法,将393个探针组映射至基因水平,以协助外部数据集(Taylor等人2010)的独立评估。在该数据集中,检测总共349个基因。我们使用生物化学复发时间以针对年龄、分级和分期校正的Cox比例风险在Taylor中进行这些349个基因的多变量分析,这导致产生7个具有显著多变量预测功能(p -值 <0.05 .)的基因,这些是TRPM3、PDRG1、SRSF5、PDE4D、CNPY4、F12和PDK4。(表5)还进行单变量存活分析,其中52个基因是显著的, p -值 <0.05 。在这些排序靠前的探针组中存在3个基因的重叠;这些是SRSF5、PDE4D和PDK4。还使用anova检验评价393个探针组,以确定它们与临床因素、即病理学Gleason评分(和Gleason评分1和2)是否是显著相关的。

[0274] 对于第二种方法,在相同的多变量分析中测试1182个差异表达的基因,这鉴定了56个具有显著多变量预后功能(p -值 <0.05 .)的基因,(表6)。还进行单变量存活分析,其中304个独特基因是显著的, p -值 <0.05 。在这些排序靠前的探针组中存在41个基因的重叠。具有显著多变量预后功能的目标的数目在验证的范围之外,因此,我们通过交叉参考预后途径(表2i和2ii)、FOXM1CHIP-Seq命中和选择的文献综述而进一步改善列表。来自聚焦、途径和文献比较的最佳14个基因概述于表7中。FOXM1本身和表明显著多变量预后能力的差异表达的FOXM1CHIP-Seq目标概述于表9中。

[0275] 讨论

[0276] 由于大多数发展早期前列腺癌的男性不会死于该疾病,所以明确要求更好地理解作为转移扩散的基础的生物学。这可允许适当选择高风险患者用于侵袭性更强的主要疗法,且使低风险患者免去不必要的副作用。

[0277] 在本研究中,我们已经鉴定了在分子水平类似于转移性疾病的一组原发性前列腺癌。这些肿瘤通过几个基因和限定途径的表达损失来定义;此外,该组通过导致参与有丝分裂的基因表达增加的原癌基因FOXM1的活化来定义。

[0278] 我们已经定义了一系列具有多变量预后能力且高度适合于IHC开发的标志物,以前瞻性评价肿瘤是否具有复发和转移发展的增加可能性。

[0279] 表1

	转移性生物学组	其它	p-值
平均 Gleason 评分	6.952	6.714	0.0730
平均分期	2.429	2.381	0.648
平均 PSA	9.677	7.788	0.1984
患者年龄	57.9	57.7	0.8633
复发时间	40.29	56.95	0.0014**

[0281] Taylor数据集中的转移性生物学肿瘤和非转移性生物学组的临床和病理标准。

[0282] 表2i

途径	途径 p-值	Taylor HR	Taylor p-值	Sun HR	Sun p-值
参与细胞周期(有丝分裂)的基因	1.78E-10	2.118	0.0614	2.061	0.0602
PLK1 信号传导事件	4.42E-07	1.843	0.1306	1.54	0.2774
参与有丝分裂 M-M/G1 期	1.10E-06	1.988	0.0997	0.841	0.6823

[0283]

		2.062280			
	参与有丝分裂前中期的基因	3.92E-06	883	0.0779	0.9289
	Aurora B 信号传导	8.51E-06	1.823	0.1352	1.031
	FOXO1 转录因子网络	4.19E-04	2.755	0.0134	1.737
[0284]	参与 G2/M 转变期间的细胞周期蛋白 A1 相关事件的基因	1.21E-02	1.871	0.1274	0.7773
	参与 APC/C 的磷酸化的基因	1.79E-02	1.995	0.0922	0.9521
	细胞周期	3.35E-02	1.837	0.1397	0.8063
	参与 G1/S 的 E2F 转录目标的基因	3.98E-02	0.462	0.0699	0.4214

[0285] 如使用Toppfun检测的显著过表达的途径,指明途径p-值,Kaplan meier存活分析结果使用途径来聚类分析和定义类别标记iTaylor和Sun数据集。

[0286] 表2ii

	途径	Taylor	Taylor	Sun	Sun
	p-值	HR	p-值	HR	p-值
[0287]	参与肌肉收缩的基因	2.26E-10	2.495	0.0339	2.361
	参与平滑肌收缩的基因	1.61E-07	2.155	0.0648	2.808
	脂肪形成	4.05E-07	2.378	0.0391	2.336

	局灶粘附	4.79E-07	1.726	0.1814	1.01	0.9807
	横纹肌收缩	4.08E-06	2.6001	0.0189	2.24	0.0163
	参与止血的基因	1.14E-04	1.1	0.8235	1.322	0.4404
	地尔硫卓途径	5.21E-04	2.289	0.0431	1.568	0.1993
	质膜雌激素受体信号传导	6.24E-04	2.179	0.0914	1.384	0.3411
	参与血小板栓的形成的基因	7.81E-04	1.872	0.1226	1.19	0.6283
	参与血小板脱颗粒的基因	9.60E-04	1.129	0.769	1.502	0.2263
	肌层舒张和收缩途径	1.04E-03	2.611	0.0188	2.06	0.0342
	血管生成中的整联蛋白	1.74E-03	1.639	0.2234	0.8937	0.7829
[0288]	ATF-2 转录因子网络	1.74E-03	4.006	0.0037	4.026	0.0004
	参与血小板活化的基因	1.75E-03	2.047	0.0788	1.347	0.422
	粘蛋白聚糖-4介导的信号 传导事件	2.61E-03	3.686	0.0105	1.667	0.1268
	LPA 受体介导的事件	5.01E-03	2.158	0.149	1.332	0.3791
	整联蛋白信号传导途径	1.41E-02	1.893	0.1202	2.069	0.0306
	参与整联蛋白细胞表面相互 作用的基因	2.44E-02	1.584	0.2567	1.549	0.1905
	直接 p53 效应物	2.53E-02	2.151	0.0676	3.836	0.0003
	整联蛋白介导的细胞粘附	3.78E-02	1.941	0.1084	0.765	0.4997

[0289] 如使用Toppfun检测的显著低表达的途径,指明途径p-值,Kaplan meier存活分析结果使用途径来聚类分析和定义类别标记i Taylor和Sun数据集。

[0290] 表3

	倍数变化	FDR 校正的 p-值	转录抑制中的作用
AR	2.41796	4.86E-10	是
CENPA	2.87805	3.23E-09	否
CENPF	3.00853	4.19E-09	否
DLX1	3.22068	8.49E-08	否
[0291] EZH2	2.7026	2.45E-12	是
HELLS	2.10418	6.92E-05	是
TOP2A	2.90041	3.84E-09	否
UBE2T	2.36638	3.65E-07	否
UHRF1	2.37542	2.32E-09	是
ZIC2	2.08528	6.52E-05	是

[0292] 注释为染色质结合的基因,转移性生物学组相比于未校正和FDR校正的p-值的倍数变化表达。注明公开的转录抑制中的作用。

[0293] 表4

基因集名称	过度甲基化的基因	超几何检验 p-值
[0294] 低表达的基因	418/1098	1.546×10^{-34}
过表达的基因	13/83	0.947

[0295] 转移性生物学组中具有增加的过度甲基化的过表达或低表达的基因,检验重叠的显著性的超几何检验。

[0296] 表5

基因	多变量		单变量		独立性(pvals)			表达
	HR	pval	HR	pval	Path GGS	PathG G1	PathG G2	
TRPM3	6.64	0.01	5.763	0.055	0.02	0.437	0.677	过表达的
PDRG1	4.8835	0.027	2.416	0.256	0.046	0.035	0.351	过表达的
SRSF5	0.378	0.029	0.398	0.031	0.11	0.382	0.165	低表达的
PDE4D	0.425	0.035	0.268	0	0	0.004	0	低表达的
F12	5.523	0.042	2.789	0.263	0.895	0.845	0.844	过表达的
PDK4	0.641	0.048	0.52	0.001	0.009	0.069	0.018	低表达的

[0297]

[0298]

基于Taylor数据集中的多变量存活分析的排序靠前的预后标志物。

[0299]

表6

	多变量		单变量		转移性生物学 组中的表达
	HR	pval	HR	pval	
ADAMTS1	0.553383	0.0348589	0.54021	0.0194342	低表达的
ADAMTS9	0.4585803	0.0288481	0.371399	0.00848	低表达的
B3GNT5	0.5137102	0.0299695	0.3956727	0.0017219	低表达的
CD38	0.6091854	0.0138355	0.5143886	0.0004166	低表达的
CEBPD	0.3271493	0.0097009	0.1813086	8.15E-06	低表达的
CENPF	3.5933385	0.0416512	9.1943228	0.0001128	过表达的
CREM	0.2330916	0.0448842	0.1947922	0.01595	低表达的
DKK1	0.2871025	0.0482413	0.3428314	0.0473753	低表达的
EMPI	0.4347836	0.0071015	0.3768645	0.0006745	低表达的
ERRFI1	0.5542049	0.0300146	0.5263541	0.0078253	低表达的
F3	0.579862	0.0170842	0.6133141	0.0418215	低表达的

[0300]

[0301]

HJURP	13.578677	0.0428399	46.05557	0.002649	过表达的
IL1R1	0.4800943	0.0108723	0.3570689	0.0002425	低表达的
IL8	0.3158031	0.0348507	0.47006	0.0724264	低表达的
JUNB	0.5484282	0.0347493	0.4460346	0.0008361	低表达的
KLF10	0.5017168	0.030925	0.4394025	0.0066195	低表达的
KLF4	0.3979693	0.0274113	0.2711992	0.000817	低表达的
LDLR	0.4540006	0.0299326	0.2845191	0.0001791	低表达的
LGALS3	0.2425137	0.0163003	0.1363453	0.0005586	低表达的
LPAR1	0.4085325	0.0398731	0.2924915	0.0043957	低表达的
MALAT1	0.1444922	0.0264399	0.2732161	0.1174596	低表达的
MTUS1	0.4461261	0.0438701	0.293677	0.0001736	低表达的
MYBPC1	0.5829982	0.002379	0.5657745	0.0003248	低表达的
NFIL3	0.494893	0.0271456	0.3853505	0.0006228	低表达的
NR4A3	0.3498147	0.0058837	0.3287529	0.0013712	低表达的
OAT	0.6455529	0.0451212	0.6272926	0.0531972	低表达的
PDE4D	0.4404056	0.0389414	0.2744262	0.0004312	低表达的
PDK4	0.6173687	0.0302305	0.5004434	0.0008031	低表达的
PII5	0.609224	0.0068663	0.4940706	7.96E-06	低表达的
PTGS2	0.5919948	0.0206793	0.5621402	0.0077942	低表达的
RHOBTB3	0.5457431	0.0455287	0.4498483	0.0117462	低表达的
RIN2	0.4232609	0.0422486	0.3777279	0.0290502	低表达的
RNFT2	38.724825	0.0168421	52.633909	0.0070457	过表达的
SELE	0.4784527	0.0139667	0.4724994	0.0036146	低表达的
SLC15A2	0.5968128	0.03609	0.4424453	0.0005391	低表达的
SOCS2	0.2955096	0.003396	0.2391982	0.0005038	低表达的
SOCS3	0.4423332	0.042005	0.3155164	0.0014183	低表达的
SSTR1	9.0410923	0.0182887	15.147803	0.0033901	过表达的
ST6GAL1	0.6042365	0.0088117	0.5305465	0.0016829	低表达的
TSC22D1	0.452536	0.0301503	0.3209002	0.0011309	低表达的
XBPI	0.2271852	0.0008373	0.2747813	0.0006004	低表达的
ZFP36	0.517509	0.0108194	0.4385203	0.0001823	低表达的

[0302]

[0303] 基于在转移性生物学亚组和非转移性生物学亚组之间差异表达的基因的Taylor数据集中的多变量存活分析的排序靠前的预后标志物。

[0304] 表7

基因	多变量 HR	pval	单变量 HR	pval	来源	转移性生物学组 中的表达
TRPM3	6.6406	0.0105	5.7636	0.0551	靶向的	过表达的
PDRG1	4.8835	0.0272	2.416	0.2566	靶向的	过表达的
SRSF5	0.3787	0.0294	0.3986	0.031	靶向的	低表达的
PDE4D	0.4255	0.035	0.2685	0.0005	靶向的	低表达的
PDK4	0.6415	0.0484	0.52	0.0019	靶向的	低表达的
F12	5.5235	0.0428	2.7897	0.2638	靶向的	过表达的
[0305] F3	0.591462629	0.026150109	0.641392413	0.070885567	途径	低表达的
HJURP	17.72622995	0.028647576	58.21478537	0.001862129	途径	过表达的
CENPF	4.009668447	0.028698111	9.892737548	8.66E-05	途径	过表达的
MYBPC1	0.616919233	0.009107673	0.596731068	0.001740583	途径	低表达的
SELE	0.506452771	0.023940071	0.494071466	0.006723235	途径	低表达的
CEBPD	0.33366283	0.012163084	0.188671187	1.76E-05	途径	低表达的
XBPI	0.227185248	0.000837328	0.274781347	0.000600431	文献	低表达的
TPT1	NA	NA	NA	NA	参考	NA
RPS14	NA	NA	NA	NA	参考	NA
RPL37A	NA	NA	NA	NA	参考	NA

[0306] 概述的IHC目标与参考基因。

[0307] 表8

	转移性生物学组 中的表达	过度甲基化的
ADAMT S9	低表达的	过度甲基化的
EMP1	低表达的	过度甲基化的
F3	低表达的	过度甲基化的
LDLR	低表达的	过度甲基化的
LGALS 3	低表达的	过度甲基化的
[0308] MALAT 1	低表达的	过度甲基化的
MTUS1	低表达的	过度甲基化的
NR4A3	低表达的	过度甲基化的
PTGS2	低表达的	过度甲基化的
RIN2	低表达的	过度甲基化的
SLC15 A2	低表达的	过度甲基化的
SOCS3	低表达的	过度甲基化的
TSC22 D1	低表达的	过度甲基化的

[0309] 具有增加的过度甲基化水平的最佳低表达标志物。

[0310] 表9

基因	多变量		单变量		转移性生物学组中的表达
	HR	pval	HR	pval	
FOXM1	3.6353510	0.1583446	9.4463205	0.0116584	过表达的

[0311]

	21	19	85	25	
CENPF	3.5933384	0.0416511	9.1943227	0.0001127	过表达的
	84	66	68	62	
HJURP	13.578676	0.0428399	46.055570	0.0026490	过表达的
	93	01	07	46	
RNFT2	38.724825	0.0168420	52.633908	0.0070456	过表达的
	02	83	75	87	
XBP1	0.2271852	0.0008373	0.2747813	0.0006004	低表达的
	48	28	47	31	
SOCS2	0.2955096	0.0033959	0.2391981	0.0005037	低表达的
	06	53	63	79	
NR4A3	0.3498146	0.0058836	0.3287529	0.0013712	低表达的
	83	74	43	06	
EMP1	0.4347835	0.0071014	0.3768645	0.0006744	低表达的
[0312]	57	7	3	58	
ZFP36	0.5175090	0.0108193	0.4385202	0.0001823	低表达的
	16	86	53	13	
IL1R1	0.4800943	0.0108722	0.3570688	0.0002424	低表达的
	31	79	77	95	
SELE	0.4784527	0.0139667	0.4724993	0.0036146	低表达的
	26	48	6	1	
LGALS3	0.2425137	0.0163002	0.1363453	0.0005586	低表达的
	44	57	09	37	
MALAT1	0.1444922	0.0264399	0.2732160	0.1174596	低表达的
	02	02	94	35	
NFIL3	0.4948930	0.0271455	0.3853504	0.0006228	低表达的
	03	95	74	18	
LDLR	0.4540006	0.0299326	0.2845191	0.0001791	低表达的
	47	34	4	38	

	ERRFI1	0.5542048	0.0300145	0.5263541	0.0078252	低表达的
		51	85	1	97	
	KLF10	0.5017168	0.0309250	0.4394024	0.0066194	低表达的
		31	35	87	67	
	JUNB	0.5484281	0.0347492	0.4460345	0.0008361	低表达的
		87	58	58	12	
[0313]	MTUS1	0.4461260	0.0438700	0.2936770	0.0001736	低表达的
		88	83	25	24	
	CREM	0.2330915	0.0448841	0.1947922	0.01595	低表达的
		94	66	47		
	RHOBTB	0.5457430	0.0455287	0.4498483	0.0117462	低表达的
	3	73	1	27	42	
	DKK1	0.2871025	0.0482412	0.3428313	0.0473752	低表达的
		03	65	7	65	

[0314] 在转移性生物学组中差异表达的FOXM1和FOXM1CHIP-Seq目标。

[0315] 方法

[0316] 患者样品

[0317] Addenbrookes医院和Karolinska研究所遵循当地伦理批准提供126个样品(70个切割的临床上限于前列腺的原发性前列腺癌、20个具有已知伴随转移性疾病的原发性前列腺癌、11个具有转移性疾病的淋巴结和25个正常前列腺)。

[0318] 在Taylor等人公开的含有179个样品(131个原发性肿瘤、29个正常和19个转移性疾病)的数据集中验证和测试亚组和预后意义。手术后的生物化学复发时间和复发状态用于测试预后意义,5个样品因为(手术类型PCA0056,和新辅助治疗,PCA0050、PCA0103、PCA119和PCA0176)而从分析中排除。

[0319] Sun等人(79个肿瘤样品),样品为手术后,79例,其中39例被分类为具有疾病复发。

[0320] 基因表达谱分析

[0321] 使用如前所述(Kennedy RD, Bylesjo M, Kerr P等人. Development and independent validation of a prognostic assay for stage II colon cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. J Clin Oncol 2011;29:4620-4626)的Roche高纯RNA石蜡试剂盒(Roche Diagnostics Ltd.)从肉眼切割的FFPE肿瘤样品提取总RNA。如前所述,使用NuGEN WT-Ovation™FFPE系统(NuGEN)扩增总RNA,并且使其与Almac前列腺癌DSA™(Affymetrix)杂交。

[0322] 统计学分析方法

[0323] 单因素ANOVA分析使用 $\text{abs}(\text{FC}) > 2$ 的倍数变化(FC)阈值和针对错误发现率(FDR)调整的显著性p-值阈值(p-值 $\text{FDR} < 0.05$)鉴定29个原发性转移性生物学组肿瘤和41个原发性非转移性生物学肿瘤组对照之间差异表达的探针组。独特基因被确定为与比对的至少6探

针处于有义方向的基因。

[0324] 将组合的背景和方差过滤器应用于数据矩阵,以便使用内部开发的特征选择程序鉴定最可变的基因。首先,应用背景过滤器以去除表达值太低而无法与背景噪声区分的基因。高阈值用于去除大量探针,并确保这些探针高表达(阈值: $\leq 10^{-16}$)。其次,将强度依赖性方差过滤器应用于数据矩阵,以去除在所有样品间具有低方差的探针组(阈值: $\leq 5.10^{-16}$)。特征选择导致产生1651个变化最大的探针。

[0325] 将分层聚类分析(Pearson相关距离和Ward氏联系)分别应用于来自每个数据集的探针和样品。使用缺口统计学确定子簇的数目。

[0326] IHC目标鉴定

[0327] 感兴趣的IHC目标是至少在转移性和非转移性组之间相关的那些(列表1和2)和在非转移性和良性组之间高度相关的那些(表3)。

[0328] 根据这些标准将三个列表各自中的探针组的相关性p-值进行排序。每个列表中排序靠前的10,000个探针组中观察到的p-值的范围,对于列表1为 $[0-6.62e-05]$,对于列表2为 $[1.03e-19-6.17e-04]$,且对于列表3为 $[0.99-0.82]$ 。

[0329] 三个列表中的排序靠前的10,000个探针组的交叉点揭示512个共同探针(图4)。去除反义探针组和少于6个探针与探针组比对的那些,留下393个。**Partek®**基因组Suite™6.6版用于生成倍数变化值。

[0330] 甲基化

[0331] 对于22个患者,11个转移性生物学亚组和11个非转移性生物学亚组,使用Recoverall(Life technologies)提取DNA。使用Zymo EZ DNA甲基化试剂盒™(Zymo Research, Orange, CA, USA),根据制造商的程序,用当使用Illumina Infinium甲基化测定时推荐的替代孵育条件,用亚硫酸氢钠处理基因组DNA(800ng)。根据Infinium HD甲基化测定方案以50ng/ μ l对4 μ l亚硫酸氢盐转化的基因组DNA进行甲基化测定。根据制造商的程序将样品处理至Illumina 450k阵列上。用相同软件提取未校正的b-值。使用微阵列的显著性分析(SAM)(Tusher等人2001)评价具有统计学显著的双值(bivalues)变化的探针组。使用0.05的错误发现率(FDR),在阵列上的235,526个探针组中,32,286个被低甲基化(相当于7,222个独特的基因)且9,184个探针组(4003个独特的基因)。

[0332] 参考文献

[0333] Albertsen PC, Hanley JA, Barrows GH, Penson DF, Kowalczyk PD, Sanders MM等人(2005). Prostate cancer and the Will Rogers phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 97:1248-1253.

[0334] Altekruse SF, Huang L, Cucinelli JE, McNeel TS, Wells KM, Oliver MN(2010). Spatial patterns of localized-stage prostate cancer incidence among white and black men in the southeastern United States, 1999-2001. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19:1460-1467.

[0335] Babbio F, Pistore C, Curti L, Castiglioni I, Kunderfranco P, Brino L等人(2012). The SRA protein UHRF1 promotes epigenetic crosstalks and is involved in prostate cancer progression. *Oncogene*.

[0336] Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C,

Charafe-Jauffret E, Loriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene*. 2004 Feb 19; 23(7):1377-91. PubMed PMID:14973550.

[0337] Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007). UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* 317: 1760-1764.

[0338] Chen X, Muller GA, Quaas M, Fischer M, Han N, Stutchbury B 等人 (2013). The forkhead transcription factor FOXM1 controls cell cycle-dependent gene expression through an atypical chromatin binding mechanism. *Mol Cell Biol* 33: 227-236.

[0339] Howlader A (2012). SEER Cancer Statistics Review, 1978-2009.

[0340] Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT (1999). Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol* 17:1499-1507.

[0341] Makarov DV, Sanderson H, Partin AW, Epstein JI (2002). Gleason score 7 prostate cancer on needle biopsy: is the prognostic difference in Gleason scores 4+3 and 3+4 independent of the number of involved cores? *J Urol* 167:2440-2442.

[0342] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA 等人 (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747-752.

[0343] Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC (1999). Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 281:1591-1597.

[0344] Rasiah KK, Stricker PD, Haynes AM, Delprado W, Turner JJ, Golovsky D 等人 (2003). Prognostic significance of Gleason pattern in patients with Gleason score 7 prostate carcinoma. *Cancer* 98:2560-2565.

[0345] Sanders DA, Ross-Innes CS, Beraldi D, Carroll JS, Balasubramanian S (2013). Genome-wide mapping of FOXM1 binding reveals co-binding with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Genome Biol* 14:R6.

[0346] Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA 等人 (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 450:908-912.

[0347] Smith EB, Frierson HF, Jr., Mills SE, Boyd JC, Theodorescu D (2002). Gleason scores of prostate biopsy and radical prostatectomy specimens over the past 10 years: is there evidence for systematic upgrading? *Cancer* 94:2282-2287.

[0348] Sun Y, Goodison S. Optimizing molecular signatures for predicting prostate cancer recurrence. *Prostate*. 2009 Jul 1; 69(10):1119-27. doi:10.1002/

pros.20961.

[0349] Tibshirani R,Walther G,Hastie T(2001).Estimating the number of clusters in a data set via the gap statistic.Journal of the Royal Statistical Society:Series B(Statistical Methodology)63:411-423.

[0350] Tusher VG,Tibshirani R,Chu G(2001).Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response.Proc Natl Acad Sci U S A 98:5116-5121.

[0351] Taylor BS,Schultz N,Hieronymus H,Gopalan A,Xiao Y,Carver BS,Arora VK,Kaushik P,Cerami E,Reva B,Antipin Y,Mitsiades N,Landers T,Dolgalev I,Major JE,Wilson M,Socci ND,Lash AE,Heguy A,Eastham JA,Scher HI,Reuter VE,Scardino PT,Sander C,Sawyers CL,Gerald WL.Integrative genomic profiling of human prostate cancer.Cancer Cell.2010Jul 13;18(1):11-22.doi:10.1016/j.ccr.2010.05.026.Epub 2010 Jun 24.

[0352] Unoki M,Kelly JD,Neal DE,Ponder BA,Nakamura Y,Hamamoto R(2009).UHRF1 is a novel molecular marker for diagnosis and the prognosis of bladder cancer.Br J Cancer 101:98-105.

[0353] van't Veer LJ,Dai H,van de Vijver MJ,He YD,Hart AA,Mao M等人(2002).Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.Nature 415:530-536.

[0354] Xu K,Wu ZJ,Groner AC,He HH,Cai C,Lis RT,Wu X,Stack EC,Loda M,Liu T,Xu H,Cato L,Thornton JE,Gregory RI,Morrissey C,Vessella RL,Montironi R,Magi-Galluzzi C,Kantoff PW,Balk SP,Liu XS,Brown M.EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent.Science.2012 Dec 14;338(6113):1465-9.doi:10.1126/science.1227604.PubMed PMID:23239736;PubMed Central PMCID:PMC3625962.

[0355] 补充表1

特征	数目	%
类型		
原发性肿瘤	70	100
具有转移的 原发性肿瘤	21	100
转移性疾病	10	100
良性	25	100
总计	126	100
Gleason 评分		
<7	10	7.936507937
7	24	19.04761905
>7	56	44.44444444
NA	36	28.57142857
	126	100
中心		
Cambridge	73	57.93650794
Karolinska	53	42.06349206
总计	126	100

[0356]

[0357] 内部样品集的患者特征。

[0358] 补充表2FOXMI相关性

[0359]

基因符号	r	p-值 (相关性)	CI 下限	CI 上限	N	CHIP 重叠
CENPA	0.7729 42	2.91E-26	0.69152	0.83496	126	是
NUSAP1	0.7702 2	5.55E-26	0.68799	0.83292	126	是
KIF11	0.7628 21	3.08E-25	0.67843	0.82734	126	是
BUB1	0.7607 37	4.94E-25	0.67574	0.82577	126	是
TOP2A	0.7548 79	1.81E-24	0.66819	0.82134	126	是
CDCA3	0.7534 81	2.46E-24	0.66639	0.82028	126	是
KIF11	0.7494 25	5.90E-24	0.66118	0.81721	126	是
ANLN	0.7491 2	6.29E-24	0.66079	0.81698	126	是
FAM111B	0.7460 59	1.20E-23	0.65686	0.81466	126	是
KIFC1	0.7436 11	2.00E-23	0.65372	0.81280	126	是

[0360]

ASPM	0.7418	2.91E-23	0.65142	0.81143	126	是
	14		7	9		
CENPA	0.7366	8.26E-23	0.64485	0.80753	126	是
	76		7	4		
RRM2	0.7317	2.18E-22	0.63862	0.80381	126	是
	95		8	8		
CENPF	0.7296	3.33E-22	0.63587	0.80217	126	是
	36		7	3		
UBE2C	0.7253	7.65E-22	0.63039	0.79888	126	是
	26		2	5		
ASPM	0.7202	2.01E-21	0.62390	0.79498	126	是
	23		9	5		
ZWINT	0.7160	4.34E-21	0.61863	0.79180	126	是
	62		3	1		
NUSAPI	0.7159	4.45E-21	0.61846	0.79169	126	是
	26		1	8		
EZH2	0.7152	5.03E-21	0.61761	0.79118	126	是
	54		1	3		
PKMYT1	0.7146	5.65E-21	0.61679	0.79069	126	是
	12		7	1		
KIFC1	0.7136	6.79E-21	0.61552	0.78992	126	是
	07		5	2		
IQGAP3	0.7134	6.98E-21	0.61532	0.78980	126	是
	52		8	2		

[0361]

SPAG5 /// ---	0.7057	2.75E-20	0.60562	0.78391	126	是
/// --- ///	74		6	2		
ALDOC						
PTTG1	0.7007	6.62E-20	0.59926	0.78003	126	是
	28		7	4		
IQGAP3	0.7007	6.65E-20	0.59923	0.78001	126	是
	02		4	4		
MLF1IP	0.6956	1.57E-19	0.59287	0.77612	126	是
	49		9	4		
CDC48	0.6951	1.72E-19	0.59221	0.77571	126	是
	22		6	8		
CDC48	0.6908	3.53E-19	0.58679	0.77238	126	是
	06		8	9		
AURKA	0.6901	3.94E-19	0.58595	0.77186	126	是
	33		4	9		
PTTG1	0.6890	4.73E-19	0.58456	0.77101	126	是
	26		7	6		
HJURP	0.6886	4.99E-19	0.58414	0.77075	126	是
	93		9	8		
KIF14	0.6863	7.34E-19	0.58119	0.76893	126	是
	36		6	7		
RRM2	0.6851	8.92E-19	0.57968	0.76800	126	是
	29		7	5		
CDK1	0.6765	3.51E-18	0.56891	0.76133	126	是

[0362]

	07			5		
CENPF	0.6736	5.44E-18	0.56538	0.75913	126	是
	72			2	2	
UHRF1	0.6733	5.75E-18	0.56493	0.75885	126	是
	13			5	4	
KIF20A	0.6661	1.72E-17	0.55599	0.75327	126	是
	26			7	1	
CDK1	0.6637	2.43E-17	0.55310	0.75145	126	是
	94			2	7	
HIST1H2AJ	0.6322	2.03E-15	0.51415	0.72675	126	是
	12			7	7	
PLK1	0.6242	5.72E-15	0.50442	0.72049	126	是
	58			6	8	
RNFT2	0.6169	1.44E-14	0.49552	0.71474	126	是
	6			4	1	
CBX2	0.6042	6.80E-14	0.48012	0.70471	126	是
	89			7	4	
UBE2T	0.6028	8.12E-14	0.47832	0.70353	126	是
	02			4	4	
SGOL1	0.5922	2.79E-13	0.46556	0.69514	126	是
	43				4	
CDT1	0.5730	2.36E-12	0.44245	0.67979	126	是
	18			4	5	
RHPN1	0.5365	9.40E-11	0.39913	0.65044	126	是

[0363]

	86		6	9		
AMH	0.4972	3.16E-09	0.35307	0.61839	126	是
	71		1	5		
ZNF251	0.4870	7.33E-09	0.34120	0.60999	126	是
	51		8	5		
AR	0.4869	7.42E-09	0.34104	0.60987	126	是
	09		4	8		
ZNF467	0.4847	8.82E-09	0.33856	0.60811	126	是
	64			2		
PRAME	0.4793	1.36E-08	0.33226	0.60362	126	是
	2		6	3		
MEX3A	0.4614	5.38E-08	0.31171	0.58884	126	是
	66		6	7		
ZNF467	0.4499	1.25E-07	0.29852	0.57926	126	是
	44		8	6		
APLN	0.4483	1.40E-07	0.29674	0.57796	126	是
	82		5	4		
GPC2	0.4455	1.72E-07	0.29348	0.57558	126	是
	27		8	4		
PRAME	0.4395	2.61E-07	0.28672	0.57062	126	是
	91		7	6		
SAC3D1	0.4355	3.44E-07	0.28218	0.56728	126	是
	99		9	7		
RPL11	0.4099	1.87E-06	0.25317	0.54571	126	是

[0364]

	32		5	3		
HOXC6	0.4081	2.10E-06	0.25114	0.54419	126	否
	28		6	1		
IDUA	0.4070	2.25E-06	0.24991	0.54326	126	否
	34		7	7		
LINC00662	0.4026	2.95E-06	0.24500	0.53956	126	否
	6		6	9		
APLN	0.4013	3.21E-06	0.24348	0.53842	126	否
	04		5	1		
DLX1	0.3973	4.08E-06	0.23908	0.53509	126	否
	75		2	3		
APLN	0.3973	4.10E-06	0.23901	0.53503	126	否
	11			9		
KIFC2	0.3866	7.74E-06	0.22712	0.52600	126	否
	74		5	9		
AR	0.3836	9.22E-06	0.22377	0.52345	126	是
	67		4			
AR	0.3754	1.48E-05	0.21466	0.51646	126	是
	76		4	8		
--- /// ---	0.3738	1.62E-05	0.21282	0.51505	126	否
	21		7	5		
COMTD1	0.3589	3.67E-05	0.19633	0.50229	126	是
	2		6	7		
PTPRT	0.3571	4.04E-05	0.19435	0.50075	126	否

[0365]

	22		2	3		
ECE2	0.3555	4.39E-05	0.19264	0.49942	126	否
	7		1			
CANX	0.3553	4.45E-05	0.19234	0.49919	126	是
	06		9	3		
MIA3	0.3409	9.36E-05	0.17655	0.48681	126	否
	39		7	8		
CPNE4	0.3388	0.000103723	0.17432	0.48505	126	否
	97			5		
ODAM	0.3287	0.000170991	0.16322	0.47627	126	是
	47		3	1		
AR	0.3217	0.000239105	0.15558	0.47018	126	是
	36		1	6		
CPNE4	0.3132	0.000355568	0.14631	0.46276	126	否
	11		7	9		
RPS2 ///	0.3111	0.000390829	0.14407	0.46096	126	否
SNORA64 ///	42		3	6		
SNORA10						
AR	0.3108	0.000395174	0.14381	0.46075	126	是
	99			4		
HOXC4	0.3105	0.000401081	0.14345	0.46046	126	否
	73		6	9		
PTPRT	0.3099	0.000412213	0.14280	0.45994	126	否
	7		2	3		

CPNE4	0.3068	0.0004738	0.13945	0.45724	126	否
	83		8	9		
DSCAM-AS1	0.3059	0.000493863	0.13845	0.45644	126	否
	57		6			
PPFIA2	0.3004	0.000629772	0.13252	0.45164	126	否
	66		1	1		
IRAK1	0.2990	0.000669126	0.13102	0.45042	126	否
	81		5	8		
---	0.2933	0.000856865	0.12485	0.44541	126	否
	55		1			
HOXC4	0.2921	0.000901978	0.12355	0.44435	126	否
	52		5	5		
FOLH1 ///	0.2890	0.00102741	0.12024	0.44165	126	否
FOLH1B	76		6	5		
---	0.2822	0.00136596	0.11288	0.43563	126	否
	26		8	1		
NCAM2	0.2790	0.00155454	0.10949	0.43284	126	否
	58		2	1		
---	0.2660	0.00259802	0.09564	0.42139	126	否
	99		08	6		
---	0.2654	0.00266239	0.09496	0.42083	126	否
	66		55	6		
MT-TG ///	0.2628	0.00294821	0.09213	0.41848	126	否
MT-CO3 ///	11		58	4		

[0366]

[0367]

MT-TR ///						
MT-ND4L ///						
MT-ND3						
NTNG2	0.2596	0.00332155	0.08879	0.41570	126	否
	71		44	1		
SLC25A16	0.2565	0.00373266	0.08548	0.41294	126	否
	63		92	2		
---	0.2359	0.0078127	0.06369	0.39459	126	否
	72		1	6		
EIF3K	0.2299	0.00959972	0.05731	0.38918	126	否
	2		53			
SSTR1	0.2289	0.00992512	0.05627	0.38828	126	否
	27		02	9		
CST1	0.2214	0.0127055	0.04840	0.38157	126	否
	41		62	2		
NIPAL1	0.2115	0.0174161	0.03803	0.37265	126	否
	37		39	8		
SSTR1	0.2048	0.0213703	0.03108	0.36665	126	否
	85		9	5		
---	0.1844	0.0387046	0.00983	0.34810	126	否
	26		315	7		
OXRI	0.1818	0.0415884	0.00713	0.34573	126	是
	21		827	6		
OPRK1	0.1615	0.0706621	-	0.32724	126	否

[0368]

	88		0.01370	9	
			96		
MT-TA ///	0.1399	0.118182	- 0.30729	126	否
MT-TY ///	03		0.03588	3	
MT-TC ///			52		
MT-TN					
LRRN1	0.1371	0.125644	- 0.30475	126	否
	59		0.03867	8	
			93		
MT-TC ///	0.1294	0.148398	- 0.29766	126	否
MT-TN ///	98		0.04646	6	
MT-TY ///			47		
MT-TA					
LRRN1	0.1258	0.16021	- 0.29429	126	否
	67		0.05014	8	
			69		
MT-ND2 ///	0.1187	0.185204	- 0.28772	126	否
MTND2P28 ///	97		0.05730	9	
MT-TW			36		
MT-TH ///	0.0828	0.356482	- 0.25406	126	否
MT-TS2 ///	304		0.09343		
MT-ND4 ///			33		
MT-ND5 ///					
MT-TL2					
MT-TQ	0.0693	0.440025	- 0.24137	126	否
	974		0.10680	8	

				9		
WNT5A	0.0551	0.539432	-	0.22788	126	否
	785		0.12089	9		
				8		
SNORA61 ///	0.0508	0.571383	-	0.22381	126	否
SNHG12 ///	993		0.12512	7		
SNORA44				5		
MT-TC ///	-	0.923724	-	0.16654	126	否
MT-TN ///	0.0086		0.18324	6		
MT-TA ///	152		9			
MT-TY						
MT-CO1 ///	-	0.909852	-	0.16501	126	否
MT-TW ///	0.0101		0.18476	6		
MT-ND2	882		9			

[0370] 整个内部数据集中的过表达的目标与FOXMI水平的Pearson相关性。

[0371] 补充表3

[0372] 用于甲基化分析的样品

[0373]

mRNA 类型 标记	样品 类型	中心	样品 年龄	手术 类型	Gleason 评分	分期
转移性 生物学	原发性 肿瘤	Karolinska	1	根治性	6	T2C
转移性 生物学	原发性 肿瘤	Karolinska	2	根治性	8	T3A
转移性 生物学	转移性前 列腺样品	Cambridge	7	根治性	9	NA
转移性 生物学	转移性前 列腺样品	Cambridge	4	TURPS	9	NA
转移性 生物学	原发性 肿瘤	Karolinska	8	根治性	8	T3C
转移性 生物学	原发性 肿瘤	Karolinska	1	根治性	8	T3A
转移性 生物学	原发性 肿瘤	Karolinska	1	TURPS	9	T3A
转移性 生物学	原发性 肿瘤	Karolinska	1	根治性	8	T2A
转移性 生物学	原发性 肿瘤	Karolinska	6	根治性	7	T3B
转移性 生物学	原发性 肿瘤	Karolinska	1	根治性	8	T3A
转移性 生物学	原发性 肿瘤	Karolinska	1	根治性	9	T2C
非转移性	原发性	Karolinska	2	根治性	7	T3A

	生物学	肿瘤					
	非转移性生物学	原发性肿瘤	Karolinska	2	根治性	6	T3A
	非转移性生物学	原发性肿瘤	Karolinska	2	根治性	8	T3A
	非转移性生物学	原发性肿瘤	Cambridge	2	根治性	7	T3B
	非转移性生物学	原发性肿瘤	Cambridge	1	根治性	9	T3B
[0374]	非转移性生物学	原发性肿瘤	Cambridge	1	根治性	7	T3A
	非转移性生物学	原发性肿瘤	Karolinska	5	根治性	8	T2C
	非转移性生物学	原发性肿瘤	Karolinska	2	根治性	9	T3A
	非转移性生物学	原发性肿瘤	Karolinska	1	根治性	9	T3A
	非转移性生物学	原发性肿瘤	Karolinska	7	根治性	8	T2C
	非转移性生物学	原发性肿瘤	Karolinska	1	根治性	8	T3B

[0375] 前列腺IHC开发

[0376] 方法

[0377] 为了鉴定合适的抗体,我们针对来自生物标志物阳性(通过微阵列概况分析证实)前列腺癌样品的4uM全断面切片对于选择的目标进行每个目标3种抗体的分析。使用3种抗原修复方法使用3种稀释度测试每种抗体(图7)。

[0378] 每个全断面切片含有肿瘤、前列腺上皮内瘤(PIN)、正常前列腺上皮、基质和在一些切片中浸润性免疫细胞的区域。

[0379] 该方法允许鉴定检测感兴趣的目标的抗体、抗原修复方案和稀释度。

[0380] 方法

[0381] 使用前列腺肿瘤的全断面FFPE切片(4μm)。

[0382] 测试样品:

[0383] 前列腺肿瘤(DI 20052):年龄58:男性。病理-前列腺的腺癌。肿瘤分期:3+4=7。

[0384] 前列腺肿瘤(DI 20054):年龄70:男性:病理-前列腺的腺癌。肿瘤分期:3+4=7。

[0385] 方案

[0386] 除非另有说明,所有孵育都在室温实施。

[0387] 1.目标修复(FFPE):

[0388] 抗原修复1-Dako PT Link和3-in-1pH6.1目标修复(TR)溶液。

[0389] • _在自动加热和冷却下,97°C 20min。

[0390] 抗原修复2-Dako PT Link和3-in-1pH9目标修复(TR)溶液。

[0391] • _在自动加热和冷却下,97°C 20min。

[0392] 抗原修复3-Microwave Vector柠檬酸盐pH6.1热诱导的抗原修复(HIER)。

[0393] • 将载片脱石蜡和水化,然后用设置为全功率的微波煮沸(3×5min)。

[0394] 所有载片用PBS清洗-10min

[0395] 2.测定步骤(DAKO Envision Flex plus)

[0396] • _EnVision过氧化物酶封闭-5min

[0397] • _清洗

[0398] • _Dako CSAII无血清蛋白封闭-10min

[0399] • _空气去除

[0400] • _一抗-30min

[0401] • _清洗x2

[0402] • _EnVision Flex/HRP-20min

[0403] • _清洗x2

[0404] • _DAB-10min

[0405] 3.复染和盖片

[0406] Mayer的苏木精复染

[0407] 在递呈系列的乙醇中脱水

[0408] • 在二甲苯中澄清(x3)

[0409] • 在DePeX下的盖片

[0410] 试剂-一抗

[0411] CREM-抗cAMP响应性元件调节剂

[0412] 1)Abcam目录号:AB64832,以4、2和1μg/ml测试

[0413] 2)Novus biomedical目录号:NBP1-81760,以4、2和1μg/ml测试

[0414] 3)Sigma Aldrich目录号:HPA001818-100UL,以0.8、0.4和0.2μg/ml测试(推荐浓度0.16μg/ml)

[0415] • R-IgG-兔多克隆IgG(兔同种型对照)Alere目录号:X0936

[0416] ERRFI1-抗-ERBB受体反馈抑制剂1

[0417] 1)Abcam目录号:ab50272,以4、2和1μg/ml测试

[0418] 2)Insight biotechnology目录号:SC-137154,以4、2和1μg/ml测试(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)

[0419] 3)Sigma Aldrich目录号:HPA027206-100UL,以4、2和1μg/ml测试

[0420] • M-IgG1-小鼠单克隆IgG1(小鼠同种型对照)Alere目录号:X0931

[0421] • R-IgG1-兔多克隆IgG(兔同种型对照)Alere目录号:X0936

- [0422] HJURP抗-Holliday连结体识别蛋白
- [0423] 1)Abcam目录号:AB100800,以4、2和1 μ g/ml测试,兔多克隆
- [0424] 2)Abcam目录号:AB175577,以4、2和1 μ g/ml测试,小鼠单克隆
- [0425] 3)Biorbyt目录号:ORB140157,以4、2和1 μ g/ml测试兔多克隆
- [0426] • 兔同种型对照Alere目录号:X0936
- [0427] • 小鼠IgG1对照Alere目录号:X0931
- [0428] PDK4-抗丙酮酸脱氢酶激酶,同工酶4
- [0429] 1)Sigma Aldrich目录号:HPA056731-100UL,以4、2和1 μ g/ml测试
- [0430] 2)LifeSpan BioSciences目录号:LS-B3459,以4、2和1 μ g/ml测试
- [0431] 3)Thermo scientific目录号:PA5-13778,以4、2和1 μ g/ml测试
- [0432] • R-IgG-兔多克隆IgG(兔同种型对照)Alere目录号:X0936
- [0433] • SRSF5-抗-富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子5
- [0434] 1)Novus Biomedical目录号:H00006430-B01P,以4、2和1 μ g/ml测试
- [0435] 2)Sigma Aldrich目录号:HPA043484-100UL,以4、2和1 μ g/ml测试
- [0436] 3)LifeSpan BioSciences目录号:LS-B3091,以4、2和1 μ g/ml测试
- [0437] • R-IgG1-兔多克隆IgG(兔同种型对照)Alere目录号:X0936
- [0438] • Sigma Aldrich目录号:F3520-1ML
- [0439] • 多小鼠IgG(M-IgG1、2a、2b)
- [0440] • M-IgG1-Alere目录号:X0931
- [0441] • M-IgG2a-Alere目录号:X0943
- [0442] • M-IgG2b-Alere目录号:X0944
- [0443] PDRG1-抗-p53和DNA损伤-调节的蛋白1
- [0444] 1)Abcam目录号:AB175965,以4、2和1 μ g/ml测试
- [0445] 2)Biorbyt目录号:ORB162334,以4、2和1 μ g/ml测试
- [0446] 3)Novus Biomedical目录号:NBP2-01854,以4、2和1 μ g/ml测试
- [0447] • M-IgG1-小鼠单克隆IgG1(小鼠同种型对照)Alere目录号:X0931
- [0448] • R-IgG1-兔多克隆IgG(兔同种型对照)Alere目录号:X0936
- [0449] 结果
- [0450] 在概览所有数据之后,以下目标已经表明特异性且灵敏的IHC测定法,并且可用于前列腺癌分类或预后。

目标	实例 合适的抗体	实例 修复条件	实例 浓度
CREM	Sigma Aldrich HPA001818	pH9 PT 连接 (Link)	0.8 µg/ml
		pH6 微波	0.8 µg/ml
	Novus Biomedical NBP1-81760	pH6 PT 连接	4 µg/ml
ERRFI1	ABCAM AB50272	pH9 PT 连接	4 µg/ml
	Sigma Aldrich HPA027206	pH9 PT 连接	4 µg/ml
HJURP	Biorbyt ORB140157	pH6 PT 连接	4 µg/ml
PDK4	Thermo Scientific PAS- 13778	pH6 PT 连接	4 µg/ml
		pH9 PT 连接	4 µg/ml
SRSF5	Sigma Aldrich HPA056731	pH9 PT 连接	4 µg/ml
	Sigma Aldrich HPA043484	pH6 PT 连接	4 µg/ml
	ABCAM AB175965	pH9 PT 连接	4µg/ml

[0453] 本发明的范围不限于本文描述的具体实施方案。事实上,除了本文描述的那些以外,本发明的各种改变对于本领域技术人员而言,从前面的描述和附图将是显而易见的。这样的改变意欲落入所附权利要求的范围之内。此外,本文描述的所有实施方案都被认为是广泛适用的且适当时可以与任何和所有其它一致实施方案组合。

[0454] 本文引用各种出版物,其公开内容以其整体通过引用并入。

序列表

<110> 阿尔玛克诊断有限公司
 <120> 前列腺癌分类
 <130> MPS/NRS1/PI29999W000
 <160> 93
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 ctccaccttt ctccaatgac agaagccacc ttctccaat gacagaagtt acctttctcc 60
 aatgacagaa gtccaggcc ccagagactc tatgtctgcc cagagactct atgtctgcc 120
 gtccaagaga ctctatgtct gccctccat gactctatgt ctgccctgcc atcagactgg 180
 attagacaag agagatagca tggattagac aagagagata gcagcgatta gacaagagag 240
 atagcagcat attagacaag agagatagca gcata 275

<210> 2
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

[0001]

<400> 2
 ggcaatgtcc aaagtcaaat atcactgcaa ataccaccta aactggttag actggttaga 60
 ttacttctac agctaattgc aggcactggc gccctctggt cggcctctgg tggttatgaa 120
 gacaaaatgg ctacttgacc tacagcaaaa ttgacctaca gcaaaagcca ttctaaagcc 180
 atttctgtac cataaaaatt atcatatgtt tectacatct gacaggttcc ctacatctga 240
 cagcacctaa atctgacagc acctaaaatg ttgta 275

<210> 3
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 gtctttgctt tgactactaa tctgttgact actaatctgt ctteaggact taatctgtct 60
 tcaggactct ttctggggag gtaacagcac aatatctttg ctttgaacta tatacatctc 120
 tgatgacatc ctgatgtat aatttgcag gatgtataat ttgtcaggag cttgagtcag 180
 gagcttgact tgattgtata atcataattt acacgagaac etaataatat aactgccttg 240
 tccttttcag ttgtcttttt caggtaatag cctgc 275

<210> 4
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 acacattgat tgfatcttg actgagattg ttatcttgac tgacaaatat cccittacc 60
 catttaattc tagagttacc ccatttaatt cttagctcta tctagagtct agaacgcaag 120
 gatctgagtc tagaacgcaa ggatctcttg caaggatctc ttggaatgac aatggaaatg 180
 acaaatgata ggtacctaaa taggtacctc aaatgtaaca tgaattata ttcccttta 240

	ggctgtgata tttcccttta ggctfgaia gtttt	275
	<210> 5	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
	atacaagtac tggfagaace tgacccaagt actggttgaa cctgaccact gfactggttg	60
	aacctgacca cttcaggttg aacctgacca cttcaaggtt gaacctgacc acttcaaggt	120
	tgcagaacct gaccacttca aggttgcagt aatgatgctc actfittgca gtacagatgc	180
	tcactfittg cagfacaate atgctcactt gttgcagfac aateatgcag tacaatcacc	240
	gggttaaaaa gcagtacaat catcgggtta aaaaa	275
	<210> 6	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
	ataatttacc gtaagtccta catttattta ccgtaagtc tacatttagt agtccctacat	60
	ttagtatcaa gctagtacat ttagtataca gctagagact aagctagaga ctgaatttga	120
	actatcccaa aatlcattg cttttctctt aaaaticatg tctttttcc ttctaggcct	180
	ttcataccaa actaatagta atagtattt atattctctt ccacgtagt ttatattctc	240
	ttccaacaaa tatattctct tccaacaaat gcata	275
[0002]	<210> 7	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
	agttttacta cttaccaggg tactgggtac tgtataaatc cttgtgctaa taatccttg	60
	tgctaaattt tgctagctat agagtatgtg gtcctctctg aatactgtat ctctatgita	120
	cataggttac atagaaagcc ctaggagact ctccctgtat ctgaacaact atttgaaca	180
	actatttctg gtactgataa ggaacagca tagtctcatt cacttaacac attttggta	240
	ttcgggaaca aacaaaatac cctctctact tttat	275
	<210> 8	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 8	
	aactcaggag aatcttcttt acaattatta acattgatct gctgacaaaa acattgatct	60
	gctgacaaaa cctgggtgatc tgcagacaaa acctgggaat acctgggaat ttgggttctg	120
	taigcttggg ttgtgtatgc gaatgttcca gtgtatgcca atgtttcagt gcctcgaatg	180
	tttcagtgcc tcagacaaat gtttcagtgc ctgagacaaa tgtgtcagtg cctcagacaa	240
	atgtgtattt tgcctcagac aaatgtgtat ttaac	275
	<210> 9	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	

	<400> 9	
	acatttcaga catatccaaa gggaaaagaa gtggaactat gactggagta ggagtaaacc	60
	atgtattccc ttatcgtaaa ccatgtattc ccttatcttt gtaatttga tfactctggt	120
	ggattgcatt actctgggtg attgttctag ctgggtgatt gttctagtac tgtatgattg	180
	ttctagtact gtattgggct tgttctagta ctgtattggg cttctgtatt gggettcttc	240
	gttaatagat gggettcttc gttaatagat tattt	275
	<210> 10	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 10	
	ctggtctatg cccttcagtg aacagatgcc cttcagtgaa cagtgtataaaccttctct	60
	tgtcaacctt gctgatcttg tcaaccttgc tgatccagct tcttattatt acaccttctc	120
	ttgctaacaa caatgtttct ataagtcctaa gtttctataa gtccaacttc cttacaact	180
	tcctttatta atgtttccat aatgtttcca tttagcctca aaaatcctga tttacttttc	240
	ccataagttt atttctgctt tgaagcctag aaatt	275
	<210> 11	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
[0003]	<400> 11	
	tatggttcat ttgcagtgac ttttagactt ttaaggcagt actgttttagc ggcagtactg	60
	tttagcactt tgatagtttt gctaaattcg aataatgttt tatatactct gtatcaagtc	120
	aaaataatat ctttggccat ttgctaaga ctttggccat ttgctaaga aacaaatgic	180
	aaactgatgt cacagtagtt gtcacagtag tttttgtag ctttatgita gctttaaact	240
	atllllgctt aaaactatgc tglttatatt gtcac	275
	<210> 12	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 12	
	tattcatctt agttctgaaa acatggagtt aatcatgita ctgaatctaa tttgcaatat	60
	tagcctgctt gtatttatta gcctgcctgt attttcatg tcatgtaaac cttttgtaca	120
	ttgaaaagaa cgtttgtttt caggctcaga aacgtttggt ttcaggctca gacctggctc	180
	agaccitaa aactgatggt accttaagaa ctgatggtct tttcttacac aaaagictaa	240
	gcagttctga aacctacag tgacattggg teatt	275
	<210> 13	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 13	
	ggaattttgg gttattctct aaatgttttg gttattctc taaatgacta gtgtgcttta	60
	gaagtttaac tgtgattaac tgtgagaagg aaggcataat gaaggcataa ttctgtgtcg	120
	caggactggt cgcaggagga aacttaaaat attggtagta agattaatca tctaaatca	180

tctaaactt gggaatccac taaacttggg aatccaccac tgaaggggaa tccaccactg	240
aagcataaat ttgccttgta ataaacttgt gaaat	275
<210> 14	
<211> 275	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 14	
ttttgggta ttctctaaat gactagtgtg ctttagaagt ttaactgtga gaaggcataa	60
ttcttggtcg caggactggg cgcaggagga aacttaaaat ttgttacatt gctgtgtctc	120
ctacatgtgt ctctacagt ccctagaact tcctagaac tgtgacttgc ctttaaatca	180
tctaaactt gggaatccac taaacttggg aatccaccac tgaaggggaa tccaccactg	240
aagcataaat ttgccttgta ataaacttgt gaaat	275
<210> 15	
<211> 275	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 15	
tacagagtgg atgaccacac tagcaggatg accacactag cacagaagag gtgattctct	60
cccttggcgg gagaggcggg agagctctct cagtgtgaac gagctctctc agtgtgaaca	120
tgctcggaa atcaggaage caacagetgt atggagagtg ccttgccttt atttctcaga	180
cagcagagtt tccaaaagt ttctgtctcc tctaacagca ttgtctcagca ttgtctctta	240
gtgtgtgta ttagtgtgtg ttaacctgig gtttg	275
[0004]	
<210> 16	
<211> 275	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 16	
tctaccattt actaattatg tgactcaaat atttgacccc tctgagactt atatttgacc	60
ctctgagac ttggattgac cctctgaga cttggatttc cccctctgag acttggattt	120
cacatctct gagacttga ttccacatct ttaagtgtaa aaagcttggc tcacaagtgt	180
aaaaagcttg gttcacagta aaatatgtac ttccttiaag gaaatgatac agtagattat	240
taagcacctt acagtagatt attaagcacc ttgct	275
<210> 17	
<211> 275	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 17	
tctaccattt actaattatg tgactgtcaa atatttgacc cctctgagac atatttgacc	60
ctctgagac ttggacccct ctgagacttg gatttcacat agtgtaaaaa gcttggttca	120
cagtaaaage ttggttcaca gtaggtggca ataaatatgt acttccctta aggaaatatt	180
cataaggaga caacacacaa gatacagtag attattaage accttacagt agattattaa	240
gcaccttgc ttaagcacctt gcttfgattt aaaag	275
<210> 18	
<211> 275	
<212> DNA	

	<213> Homo sapiens	
	<400> 18	
	aagtcaggta atatacctgg ttacagtea ggtaataac ctggtttact aataatttgt	60
	acaatggttt atccataat ttgtacaatg gtttattccc gtttattccc aagtatgect	120
	taagcittatt cccaagtatg ccttaagcag tccaagtat gccttaagca gaacacccaa	180
	glatgectta agcagaacaa tgtattttgc atactcaagg tgagagtatt ttgcatactc	240
	aaggtagaaa attttgcata ctcaaggta gaatt	275
	<210> 19	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 19	
	gaagcactga tcacctgfta gcattaagca ctgatcacct gttagcattg gcactgaica	60
	ccigttagca ttgcactga tcacctgfta gcattgceat tgatcacctg itagcattgc	120
	cattcatata aagctttttg gtaatatgtt attaaaaa caagcactat atcactgagg	180
	agaaaaaat tccttagaag gaggagaaa caattcctta gaagttccca tggtaggta	240
	ttgaaaaagt ccatgtgtag gtattgaaaa agttt	275
	<210> 20	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
[0005]	<400> 20	
	ataaacctgt accttagtga atattaaacc tgtaccttag tgaatatttt tttagattag	60
	ggtaatacac aactgatta gggtaataca gacactgaag ctgaagatta ttgagaact	120
	gtactagatt attttagaac tgtacttggc actgtacttg gcataaacctc atttctact	180
	tggcataaac tcatttcatt ggcataaac catttcattg ttatataatt taacctatgg	240
	aaaattctgt aaattctgtg ttctcctaat attat	275
	<210> 21	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 21	
	ataaacctgt accttagtga atattaaacc tgtaccttag tgaatatttt gattaggta	60
	atcacagcac tgaagagatt attttagaac tgtacttggc ttgagaactg tacttggcat	120
	aaactgtact tggcataaac tcatttcatt ggcataaac catttcattg ttataacttc	180
	tattccagat gcctttgagt aacctatgga aaattctgtg ttctcaaatt ctgtgttctc	240
	ctaataattat ctgtgttctc ctaataattat tgcct	275
	<210> 22	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 22	
	tttttacact gtcgatgttt ccaattttac actgtcgatg ttccaatgc taactgtcg	60
	atgtttccaa tgcatttcca atgcattctc catgatgat tattttaaatt agacattacc	120
	agtaaaaatt agacattacc agtaatttca aaatttetaa attcataggg tagaacatag	180

	ggtagaatca cctgtaaaag agggtagaat cacctgtaaa agcctaccctg taaaagccttg	240
	tttgatttct ctgfaaaage ttgtttgatt tctta	275
	<210> 23	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 23	
	taaggccaat gccagagacg gaagcaggtc aatgccagag acggaagcct tcaatgccag	60
	agacggaage cttttcaatg ccagagacgg aagccttttt aatgccagag acggaagcct	120
	ttttcaata actafatata tcagcatabc atcaccaga facctttatt gtagcatca	180
	gcataccttt atgtgatct cagcaccct ttatttgat ctatgcata cctttattgt	240
	gatctatcaa cacccttta ttgtgateta tcaat	275
	<210> 24	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 24	
	cttccctcat ctectattat atattgaaat tccctctaa gctcattgtg aattccctct	60
	taagctcatt ggtttcatt ggtttcac ccagtcact attgttttt caccagttc	120
	actagacca gttcactaga ccaacagcaa ttactagac caacagcaat accagcaat	180
	accagtacca gagttatgtt ttgaaaagtc tactagctgt ccacaagtct actagctgc	240
	cacaaagtcg gctgtccaca aagtcctagt ccaat	275
[0006]		
	<210> 25	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 25	
	gaggtggag gtaacagcac aatatgggag gtaacagcac aatatctttg ctttgaacta	60
	tatacatcct tgatgacatc cttgatgat aattgtcag gatgtataat ttgtcaggag	120
	cttgagtcag gagcttgact tgattgtata atccatattt acagagaaac ctaattttac	180
	acagaaacct aatataactg cctaataata ctgctttgtc ttttaatat aactgccttg	240
	tccttttcag ttgtcttttt caggtaatag cctgc	275
	<210> 26	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 26	
	aacttcatat tggccaacac cagggacttc atattggcca acaccagggt ctccatattg	60
	gccaacacca gggttttcat attggccaac accagggttg tcatattggc caacaccagg	120
	gttgatattt ggccaacacc aggtttgtat tattggccaa caccagggtt gtattttggt	180
	caacaccagg gttgtattct tggccaacac cagggttgta ttctagccca acaccagggt	240
	tgtattctat gccaacacca gggttgtatt ctatg	275
	<210> 27	
	<211> 275	

	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 27	
	gcagactcct cttgcaagc gtaccagact cctcttgcaa ggcgtacct ctcttgcaag	60
	gggtacctcc aaacattgca aggegtacct ccaaacataa aaggegtacc tccaaacata	120
	attgaggcgt acctccaac ataattgatt cactcaagca atcctgagga atactactca	180
	agcaatctctg aggaatactg tcaagcaatc ctgaggaata ctgaggagga atactgaggg	240
	agggcctggc ggaatactga gggagggect ggcta	275
	<210> 28	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 28	
	ttcagaata taagageggc agccaagagc ggcagccaga ccaaccagtt agcggcagcc	60
	agaccaacca gtittttctg aigtgaacct gacctactc tgaacctgac cctactcctt	120
	tagaactgac cctactcctt tagaagacag taaatagctt taaccctaac tgttccaaga	180
	gacattaaca cagttctgta gggaaatgtg gcatactgta tctctgagat atcttcagct	240
	aaagacacaa gcagtaaaga cacaagatac cttgt	275
	<210> 29	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
[0007]	<400> 29	
	cttggcaacc atattgicac ctgtaacct attgtcaect gtacctgtca cctgtacctg	60
	tcacacatct tgaaggtacc tgtcacacat cttgaaaaat gactaatttt ccttiacagt	120
	tectgtitcc ctfacagttc ctgcttggtc tgccttggtc caccactga agtagaagta	180
	gctcactgta gtgcgggccg gctcactgta gtgcgggccg tattagggtg cgtagactc	240
	agatggaaaa attagctatg tgaatgagag ttatt	275
	<210> 30	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 30	
	giatcctggt gaatgtctgt tcagctatcc tggfgaatgt ctgttcagct acatgtactt	60
	tataagtatt ggttcatgt actttataag tattggtttg tacittataa gtattggttt	120
	gggtgacttt ataagtattg gtttgggtgt tttataagta ttggtttggg tgttcttata	180
	agtattggtt tgggtgttcc tataagtatt gttttgggtg ttcttataag tattggtttg	240
	gggttccctt taagtattgg tttgggtgtt ccttc	275
	<210> 31	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 31	
	cggatgatgc aatataggag agaattgatg atgcaatata ggagagaata gatgatgcaa	60
	tataggagag aataagatgc aatataggag agaataaagc agcaggtctt cgagctagat	120

	tgacagcagg tcttcgagct agattgacag caggtcttcg agctagattg acagaaggte	180
	tctcgactag attgacagaa gaggggagga gcctgaagtg tatttagggg aggagcctga	240
	agtgatattt caccagctgg taaagtcttc aaata	275
	<210> 32	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 32	
	attcagaatt agttaaagtc cttaatcag aattagttaa atgcctaat ttagggicaa	60
	gggtgtcctc cactctaggc tcaagggtgt cctccactct ggtcaaggg tgcctccac	120
	tcttttcaag ggtgtcctc actctttaa acgtgctgga cagacacatt agagcctgc	180
	tggacagaca cattagagca cacattagag cagctgcttg ttattattag agcagctgtt	240
	tgttattgat ttagagcagc tgtttgatat tgata	275
	<210> 33	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 33	
	tgcctgaatac gctgaagtaa atcctaatac gcigaagtaa atccttgctc gctgaagtaa	60
	atccttgctc acgatgaag taaatccttg ttcactgaag tgaagtcttt caattgagct	120
	ggttgggaag ctctcaattg agctggttga ttgaaaaatg ctcagttcta actaaaacta	180
	atgaaatgga ttcccagta taatgaaatg gatttcccag taggggcata tcacctgtat	240
[0008]	agtagttata tcacctgtat agtagttata tgcac	275
	<210> 34	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 34	
	aaagaagtcc gggagatgaa tgcttgatg tcagtgcacg gtagtgctt agtgcacggt	60
	tagtgcttga gcagacagag ggcagacttg taaagtacct aagtacctgt agtgaaaaga	120
	atgtgggacc cgattagcag aaagggtgtt gtgtttgcac atactttata cnaaagaat	180
	gaacgiggac ttttacacat gaacgtggac ttttacacat gtgcataatt ttcctggagge	240
	tatatggatt aaatcatttt caatcagcgt ttggt	275
	<210> 35	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 35	
	catattaagt agtaacagaa gctcgaacag aagtctgaac aattggataa gctcgaacaa	60
	tggataaat ttgacgataa attgacttc caagacagct attgacttc caagacagct	120
	aaactaaact aactacact gttatagtta tacactacac tgttatagtt aatctgttat	180
	agttaatctg acaaaaatgt gttaatctga caaaaatgct cteaaaaag catctgttta	240
	attcaacctt aaagcatctg ttaatticac ccttt	275
	<210> 36	

<211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 tttttgctat gttagtctgc ataactaaaa ttttctgca tagctacaat attttcctgc 60
 atagctacaa tccigtctgca tagctacaat ccigtgggtg gctacaatcc tgggtgtgt 120
 caccagtgtc accataaagg tggacctgt aagggtgacc ctgtgtgaat gagaagtgga 180
 cctgtgtga atgagaaaat acatggccag tcttttaciaa gttgagcttt ttacaagttg 240
 agtaggcata acaaagtttt gtggccactt attt 275

<210> 37
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 aaataaaaacc agtttgcagg tgcacataaa accagtttgc aggtgcacaa gcaggtgcac 60
 aaactatgag ggtcttgcac aaactatgag ggtcttctat tcttctatcc acgtaacaca 120
 ggtagtgtga tccacgtaac acaggtagtt gtactgtgta aagatgcata gtcactatag 180
 tcatctcatt tggttggctt tctcatttgg ttggctttgt accttctttt tttagccttg 240
 gcctttgttg tagccttggc tttgtttgaa ctaga 275

<210> 38
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 [0009] <400> 38
 aatatctaaa tatgtctcac atattattac ctaattctgt ggcaaaaatg aattctgtgg 60
 caaaaatggt gccctctgtg gcaaaaatgg tgcctctgat tglgcaaaa atggtgcctc 120
 tgatggatgt tfgatataag tattgtcagt gttgtgatat agtattgtca gtgtggfgat 180
 atagtattgt cagtgtgtac tagtattgtc agtgtgtaca tatactttat gaaccataac 240
 aatgtagct atgaaccata acaaatgtag ctttt 275

<210> 39
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 39
 taatcctcaa atatactgta ccattggaga agttttatc attacctaat attacctaat 60
 tctgtggcaa aaatgctgtg gcaaaaatgg tgcctctgat aaatgggtgc tctgatgtt 120
 tgatagcctc tgatgtttgt atatagtatt gtgatatagt attgtcagtg tgtacaaaac 180
 cigtgtaac ctctgtcctt gtaaacctct gtcttataga accatatgaa ccataacaaa 240
 ttagctttt gcctttttaa gtccattgta ttgtt 275

<210> 40
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 actcttcact aggattccct atatacttca ctaggattcc ctatatatat tctagatatt 60
 tactatagtg cagaagatat ttactatagt gcagaagcaa tatttactat agtgcagaag 120

	caacagatta tgtttatct agcaaattg tatgtttat ctagcaaatt tgtaagtct	180
	ttctatggtt attaaaagac tgctttctat gggtattaaa agactgctat actcttcaact	240
	aggattccct ctatactctt cactaggatt ccta	275
	<210> 41	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 41	
	cttcactagg attccctata tatatatatg cctgttatag atatctagat gatatttact	60
	atagtgcaga agcaagatta tgtttatct agcaaattg ttctattaa ctttccaggc	120
	ttttaaatta cttttagtgc ttctatggt gtctttctc tggttattaa aagaccatt	180
	ttataagatt tctctccata gatttctctc cataatatt tctattataa ctgctatct	240
	cttcactagg ctatactctt cactaggatt ccta	275
	<210> 42	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 42	
	cicctgaaac gtagglgaga acaaagaaac gtagglgaga acaaaglat acglaggta	60
	gaacaaagt atggaatgat gagtgagaca ttgtggctg agtgagacat tgggctgg	120
	aagtctgag acattgtgac ctggaagtct acaactgat actaatctt taaagactgc	180
[0010]	atactaactc tttaaagcct ctgcatacta atctttttaa gccittttaa gccitttaaca	240
	gittctttaa taaagcctt aacagttget tttaa	275
	<210> 43	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 43	
	gaaatgttag tatctcaatt acaccgttag tatctcaatt acaccaactg agtatctcaa	60
	ttacaccaac tglgcaalc aallaeacea acigtgcaaa tagtagalgg atactgaata	120
	ctcagaigga tactgaatac tcaggcccaac atactcaggc ccacttaaat tattatactc	180
	aggcccactt aaattattaa gttttgtct ttatgctatg tacaggtctt tatgctatgt	240
	acagagaaat gctatgtaca gagaaatgtg ataat	275
	<210> 44	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 44	
	ataatttgaa ggttgcaga ccagtaattt gaaggttggc agaccagttg ttgaagttg	60
	gcagaccagt tgcgcaaggt tggcagacca gttgcctga ttggcagacc agttgcctg	120
	attacggcag accagttgct ctgattactc agaccagttg cgctgattac tcttaccagt	180
	tgcctgatt actcttagag gttgcctga ttactcttag agaaggcctt gattactctt	240
	agagaagaag cgctgattac tcttagagaa gaaga	275

<210> 45
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 45
 aatatggtaa gttccagagt gcaaatftaa aattccatac acgtttgcag catttgata 60
 ctttgaaga tgacattgtt aatgaatgac tagcccaatt gaatgactag cccaattatc 120
 cttattgact agcccaatta tctttataaa gctttgatat catactacte tgcctttgat 180
 atcatactac tetgctttg atatcatact actctgectt tgtgggtggg cacatatgta 240
 gacactacta gggcacatat gtagacacta ctaaa 275

<210> 46
 <211> 200
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 46
 tgactgggaa ttgttactgt tgaactactg ggaattgita ctgttgtact actgggaatt 60
 gttactgttg tacttctggg aattgttact gttgtactta tgggaattgt tactgttgta 120
 cttatgggaa ttgttactgt tgtacttatt ggaattgita ctgttgtact tattcgtaca 180
 atttgggtgtt tglattagct 200

<210> 47
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 [0011] <400> 47
 tgcactttaa ctgacttaag tggcacttta actgacttaa gtggcattaa taactgactt 60
 aagtggcatt aaacataagt ggcaftaaac atttgagagc acatttgaga gctaactata 120
 ttttttataa gaactactata caaactacag taagactact atacaaacta cagaggacta 180
 ctatcaaac tacagagttt aactacagag ttatgatllt aaggicagag ttatgatllt 240
 aaggtactta tactttaaat aaaggtgact gggaa 275

<210> 48
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 48
 aaataatgca tccagcagta caataataat gcatccagca gtacaataaa atgcatccag 60
 cagtacaata aaagtggcat ccagcagtac aataaaagta attfaatgac atgacctatf 120
 gagaatttaa tgacatgctt atatgagaag atgaatatat ggcatttga gattllgaat 180
 atatggcatt tgcagatttt gcagattttt atattagttg ctttgcagat ttttatatta 240
 gttgctttgt agatttttat attagttgct ttgtt 275

<210> 49
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 49
 atgcaatatt tgaaggctt gttccatatt tgaaggctt gttccaatgc aaggcttgtt 60
 ccaatgceac alacttgttc caatgceaca tacttgcagc aatgceacat acttgcagct 120

	cccattgcag ctcccattct atgtgtcacc agctcccatt ctatgtgtca tcaattatgt	180
	gcatcaata gtgtcctatg gtgtcatcaa tagtgtecta tgcaacatca atagtgtcct	240
	atgcaataaa attatttga ggicttataa teatt	275
	<210> 50	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 50	
	gcttggatgt aaaacgtaat agaaaaaaag ggagagctag gaaatggact gaacttgaca	60
	gctagcagaa ttggtgcaga attggtttcc attagacatt ggtttccatt agacattact	120
	cccagttcca ttagacatta ctcccaggag tactcccagg agctatatta catagtccca	180
	ggagctatat tacatagtaa aataggaact ttgaattacc ctctggaact ttgaattacc	240
	ctctgtgcta aattaccctc tgtgtactt ttatt	275
	<210> 51	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 51	
	tagtctttgg tgcttggatg taaaaaaaag ggagagctag gaaatggact gaacttgaca	60
	gctagcagaa ttggtgcaga attggtttcc attagacatt ggtttccatt agacattact	120
	cccagtaact ccaggagcta tattacatag ttatacatcc tacatgacct attcaacaaa	180
	gctgttttac taciaactta aataggaact ttgaattacc ctctggaact ttgaattacc	240
[0012]	ctctgtgcta aattaccctc tgtgtactt ttatt	275
	<210> 52	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 52	
	gtccaactg ttggacaaaa taaaggatt gtccagacc ttgtgtttt tgtccagac	60
	cttgtgtttt ttgatgtgtt tttgattcg aactttgcca tttgattcg aactttgcca	120
	aggccttgcc aaggcctgga acgctgaaga gccctggaacg ctgaagaata atactcttt	180
	ccaaaaagca ttaagaggtt tgtttgictg tttcctttat cctctctgtt tcttttatcc	240
	tcttggtaaa aagatttaat gtttgggta taaa	275
	<210> 53	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 53	
	agtgtttatc agcagactgt aaaggagact gtaaaggcaa gtaggctctg tttgtaaatt	60
	ccctccaacc tftacgtaaa ttccctccaa cctgtacaac ccctccctca aatttgagta	120
	gccaaactcaa atttgagtag ccaagtatct ttgagtacc aagtatctag ctttgatcta	180
	gctttgtgta attagacagc gctttgtgta attagacagc tteaaaatta gacagcttca	240
	agtatgtatt ttgatttga aatgatgctt agatt	275
	<210> 54	

<211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 54
 gttcctggac cccacaagac ttgattagct tatgtgacaa cctcatctt atccccatcc 60
 ctctcgaang taggagttgg agctcttgca atggaattca gaacagactc tggagtgtcc 120
 atttatctgg agtgtccatt tagactacac tagactacac taactagaact ftaagigtg 180
 gtttgggtca agtcagaata aaattcggc tagttgaatc cacaattcat ttatatacag 240
 gcttcccttt aataaacacg tttatgecta tcagc 275

<210> 55
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 55
 caggcttccct agagggtgtc tatacagggt tgcataacca tgcgtctgtc ataccatgcg 60
 tctgtcgttg tcttiacagt tctttgtaa gcattgtcgt gtaageatt gtcgtatctg 120
 gtgatcattg tcttatctgg tgatggatta tgatggatta acatatagcc tttgttctaa 180
 taaaatagtc gccctcgttt taaaatagtc gccctcgttt tctgtatctt tctcttaciaa 240
 tctgttttag gacatctttg cttatgaaac ctgta 275

[0013]

<210> 56
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 56
 agaggagaga acacgtctta caggaagaga acacgtctta caggatggaa aagtgtgtag 60
 ctaggltatt tccgagtagc taggttattt cggagtgtta ggttatttcc gagtgttatt 120
 tctctgtttt tgattcttga gactgtgagg ctgggtgac ttctctgccc ttaaagttga 180
 ctctctgccc cttaaagtaa tagtgaattt gggtccatca gagatgttcc atcagagata 240
 acctcgattt catcagagat aacctcgagt tcttg 275

<210> 57
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 57
 attagatggt gatttgacgt ctgggtaat ttactgtagg actagtggca taggaactagt 60
 ggcagtgagt cteatgtggc agtgagctc atattgtctg agtgagctc atattgtctg 120
 catatagtag cctaaagacc acgctttgag cacgctttga gaaactegta aagtgaaac 180
 tctgaaaggt ttgtcataga taattttaag ctttagttgc ctactaagta ggatgcagta 240
 caagtttgc gatgcagtac aagtttgcct ttac 275

<210> 58
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 58
 aaaaaacctt gtgccttaca caatgaaacc ctgtgcttta cacaatgtgt cctgtgctt 60
 tacacaatgt gtatacacia tgtgtatatt gattgatac aaaagtgat tgagacacag 120

	cctctaaagg tgattgagac acagcctctg ctcgtcctg agcttagtct agtagctgag	180
	cttagtctag taggaggatga cttagtctag taggaggatga cagatctagt aggaggatgac	240
	agatttgtaa aataatagat ttgaagttgc tgagc	275
	<210> 59	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 59	
	aaaaaacct gtgccttaca caatgaaacc ctgtgcctta cacaatgtgt ggtattatac	60
	aatcattcat tcagcagcaa acattcactt actgagcacc actgagcacc tactaatgtt	120
	ccaggcctac taatgttcca ggtactgatt aaaggatgatt gagacacagc ctcgtacaca	180
	gcctctgtcc tgagcttagt ctcgtcctg agcttagtct agtagctagt aggaggatgac	240
	agatttgtaa aataatagat ttgaagttgc tgagc	275
	<210> 60	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 60	
	atactgactt gtttgcattg ggcctgcata tatactaact ttgcgagcag tactactctt	60
	gagcagcagg ggcctgcagc aggaggcctg aaatctccta agcctggcaa caagggaat	120
	ccgaaaaac ccgagattgt aggcaagagg gatgctttca aaaagcctgg agggaagtgg	180
[0014]	agatgattat gtttaacgca atgtttaac ctttctctt ttggtgagct gctagcatag	240
	tatgatttaa aatagccaga ctatactgac ttgtt	275
	<210> 61	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 61	
	gggaataccg agtgcctaat ttattttta tagtttctca tagtttcttc tctcatagtt	60
	tcttcatggc cacagtagtt tcttcatggc cacagataaa cacagataaa cccctgaaac	120
	caatcataac cctgtagttc tcaactattg cctgttagtt ctcaactattg ggtcacacta	180
	ttgggctcatt aacacagtca acagtcatta aatgcaagca ggtctatgca agcaggctca	240
	gtattgacta gtctagtatt gactagccct tctgg	275
	<210> 62	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 62	
	gaggagtctt gagattgact actaagacta ctaatgtctg ccatggaagt ggagcagtta	60
	tggtacgagt gtcattgagt teatatTTTT gccagttctg atttttgcca gttctgactg	120
	aaggcaaagc ccaggatctt cttagcctct gatctttcta gcctctacc agtgtcagtg	180
	tcactgactt tetagctcat tagctcattg ccttagtgaa attggtacaa tgccaaatcc	240
	tatcaaaggg atcaaagggt attggtctgc ttag	275

<210> 63
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 63
 atcgggetgt ggtgaccgca acaagtcggg ctgtggtgac egcaacaage gggagcaaac 60
 cgtttcctga ttgctagcac accgtttcct gattgctcag ccttctcttg tgattccgca 120
 gtgagtcctt ggtgattccg cagtggagaga aaggcaagat tgtgtcccat tccccgcaag 180
 attgtgtccc attccccag agctccgcgc caggatggcg aggnaaggat ggcgaggaac 240
 tcaataaagt tggcgaggaa ctcaataaag tgctt 275

<210> 64
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 64
 acttttgcca agcaccatac tiaaggccaa gcaccatact taagactcaa tacittaagac 60
 tcaacttttt tgcaatatca gacaaagcac tgtctttaag cactagatcc ctctctctga 120
 aaatcgatcc ctctctctga aatcactgt atattttttt agcattcact gcatgagtia 180
 agtctgcttt cctatccctt taagtctgct ttectatecc ttatactgct ttectatccc 240
 ttatacagaa atcccctata cagaagctat ccatt 275

[0015]

<210> 65
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 65
 ctgtctctcc aagttatggg ggaictcttg tacigacaat ctgtgttttc gtacigacaa 60
 tctgtgtttt ccaggetgtg tttccagga gttacgtcaa gttttccagg agttacgtca 120
 aactaaggag ttacgtcaaa ctacctgtac gttacgtcaa actacctgta ctgggtgcaa 180
 actacctgta ctggtttaaa atacatattt tgtgctaacc ttgttagtgt ttgtctagca 240
 tgtttgttta gtctagcatg ttgtttaat ctttt 275

<210> 66
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 66
 ttcttcaaaa acaaacgaca gcaacaaacg acagcaacga aaactcctta gacagcaacg 60
 aaaactcctt atcagaaaa ctcttaate agaacactga tcagaacact gatecaatga 120
 ggaatcagga gaacttagtg caagactaca gagaacttag tgcaagacta caggaagact 180
 acaggagtta acagatggcc tacaggagtt aacagatggc cagctgagtt tatatcaaat 240
 cctgaagaaa atatcaaatc ctgaagaaat aagcc 275

<210> 67
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 67
 ggcacaagaa attggagctg gagaagctgg agaagattga tgaagtgca gtgcaggtgt 60

	gtaaggaat agaacaata gaacagtctg ctgggagica atctecaggg tgacggaacc	120
	cagtggtagc ggaacccagt gtattacctg gtgtattacc tgctggaacc aaggagtagg	180
	ttactagtga ataccceaat gttactagtg aataccceaa tggttgaata ccccaatggt	240
	ttctccaatt ccaatggttt ctccaattat gecca	275
	<210> 68	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 68	
	atggtgaaac aagggaigtc tgattaacaa gggatgtctg attggaagta gatatttatt	60
	taggttctag gacatctagg acattagiat cagtgaggac tcagtgagga cagtaatttc	120
	ctctgtaat ttctgcttg ttgtatttc gtatttcagt gatcacatac acttctgtat	180
	cacatacact tcttacctg acacttcttt acctgataac gtctctacct gataacgtct	240
	cttctctca ctacttaag giateccttg aatte	275
	<210> 69	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 69	
	tttgcaaacc ctggttctg tatttaaac ctggttctg tatttgttca ctggttctg	60
	tatttgttca gtgacagatt attgcacga actggactgt gaactggact ggtgcaacg	120
	cttttttgg gagaatgatg tccccttgt aatgatgicc ccgttgtatg fatgatcccc	180
	gttgtatgta tgagtggctt ccactgtata gaaggtttt gtagectage ctgaatgtct	240
	tacttgatc cctgaatgic ttactgtgat caatt	275
	<210> 70	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 70	
	tgaggagac attggtatc tgggcgcagg agacattggt attctgggca tgcactttaa	60
	ctgacttaag tggcacttta actgacttaa gtggcattaa taactgactt aagtggcatt	120
	aaacataagt ggcattaaac attgagagc acattgaga gctaacata tttttaaga	180
	ctactataca aactacagag gactactata caaactacag agtttaacta cagagtttat	240
	gatttaaggt cagagtttat gatttaaggt actta	275
	<210> 71	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 71	
	aagaatttgg cacagttact cacttgaatt tggcacagtt actcactttg tctgaatac	60
	gctgaagtaa atcctaatac gctgaagtaa atccttctc gctgaagtaa atccttctc	120
	actgatgaag tcttcaatt gagctggtg gaagtcttc aattgagctg gttgattgaa	180
	aaatgctcag tcttaactaa taatgaaatg gatttcccag tagggcata tcacctgtat	240
	agtagttata tcacctgtat agtagttata tgcac	275

[0016]

<210> 72
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 72
 tccaaaaagca agtagccaaa gccgtaagca agtagccaaa gccgttgcca caagtagcca 60
 aagccgttgc caaactagcc aaagccgttg ccaaacecca atgggcccct tatttatgac 120
 gacttggecc tttatttatg acgaatttat atttatgacg accttattta ttctatata 180
 atattgggtc gctcgttccc atatataatg ggtegtctgc ttccctatfg ggtegtctgc 240
 ttcccttgta ttttgtaata ttgaaaaga cgata 275

<210> 73
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 73
 atacaggtgc aactcaatcc ccgttfgtgc actcaatccc cgtaataaa tntaggtata 60
 ggcattctac cctttgata ggcattctac cctttgaaat tacccttga aatagctgtg 120
 tcccactttg aatagctgtg gteccaactc agaaatatcc aagttgtect tgaatgttgt 180
 ccttgaattg tctaaccatg gtctaaccat ggacataaac agttgatgga cataaacagt 240
 tgtctccctt tactgtgtag aatactttga cttaa 275

[0017]

<210> 74
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 74
 aagagagaac aactactgtg atcagagaac aactactgtg atcaggctat actactgtga 60
 tcaggctatg taiggaigta tggaaatagc tgttatttcc aattagctgt gfgaaatacc 120
 agtgtagctg gtgfgaaata ccagtgtggt atttatttaa gcttatgtca gacctattt 180
 aagcttatgt cagacctatt aagcttatgt cagacctatt tgacacagac ctatttgaca 240
 taacactata gacataaac tataaaggtt gacaa 275

<210> 75
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 75
 acatgtactt tataagtatt ggtttcatgt actttataag tattggtttg atgtaettta 60
 taagtattgg ttgggtgac tttataagta ttggttggg tactttataa gtattggtt 120
 gggtagcitt ataagtattg gtttgggtgt tttataagta ttggttggg tcttctata 180
 agtattggtt tgggtgtccc tataagtatt ggtttgggtg ttccataag tattggtttg 240
 ggtgttctt taagtattgg ttgggtgtt ccttc 275

<210> 76
 <211> 225
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 76
 acagccaaaa ctccacagtc aatatcagcc aaaactccac agtcaatatt agccaaaact 60

	ccacagtcac tattageccaa aactccacag tcaatattag ccaaaactcc acagtcaata	120
	ttagtgatgt ttttatgtgc tctccaaatt atgtttttat gtgctctcca aattttgttt	180
	ttatgtgctc tccaaatfff ttaactgttcc tgattgtaig gaaat	225
	<210> 77	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 77	
	tctgtctttt ataaagattc caccftaaag attccacctc cagtcctctc aaagattcca	60
	cctccagtc cctctcttac tcaggccctt gaggctatta tactcaggcc cttagagcta	120
	ttaggtcagg cccttgaggc tattaggaga ggccttgag gctattagga gatgccctt	180
	gaggctatta ggagatgctt agaactcaac aaaatcccaa tccaagaact caacaaaatc	240
	ccaatccaag caacaaaatc ccaatccaag tcaaa	275
	<210> 78	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 78	
	gaaatcctat gcctagaaac caattacatg actgctattt agggaaggcc gggaaggcct	60
	aatcttttga acttaciaaag tgattgacag agtggctctc gccctctgca ctcttagttg	120
	tggaattcta gttgtggaat ccttgccaag tggcaagtgt cttaaactct ttatgaactc	180
[0018]	ttatgccatt gagttattat attattccca tctgttatta aagaggatta aagtatatgc	240
	cicagaggga gccctcagagg gatgittgag tgtaa	275
	<210> 79	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 79	
	atctacatta aagccacaag teaccaagcc acaagtcacc etttgctgaa ccacaagtca	60
	ccctttgctg aagtcgaagc agtattagta gttggaagca agcagtgtgt tattcttgac	120
	cccatgigge acttattaag tagcttgctt aagtagcttg cttttccata attatttcca	180
	taattatgge ctagettttt agctttttta aacctactat gaacaacacc acaagcatag	240
	agttttccaa aggaaaccaa ttatactgaa tcagg	275
	<210> 80	
	<211> 275	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 80	
	ttttaataca acaagatcaa ctagattaat acaacaagat caactagaag gatcaactag	60
	aagaattcaa ctgttcaact agaagaatc aactgtctca actagaagaa ttcaactgct	120
	tcaagtcagg gtacccaat atatctcgca aaggtacccc aatatatctc gcaatggtac	180
	cccataatct ctctgcaatc tacccaata tatctcgcaa ttccacccaa tatatctcgc	240
	aattccaac aatatatctc gcaattccaa acttt	275

<210> 81
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 81
 aaaaacttt ttgtgetcc agtgtaaac tttttggtc tccagtgtag accttttggc 60
 gcfccagtgt agggcaata aactatcagc ttggatggtc aataaactat cagcttggat 120
 ggtcagettg gaiggtcact tgaatagaag tggatggta ctigaataga agatgtgaat 180
 agaagatggt tafacacagt tttgctcttg tatggcaaaa taattgctct tgfatggcaa 240
 aataattagt gtatggcaaa ataattagtg agttt 275

<210> 82
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 82
 cattcacttt tgtaacagt aittctcact ttgttaaca gtatttctct tatagtggat 60
 gatatacaca gtggcagtgg atgatataca cagtggcaaa acacagtggc aaaacaaaag 120
 tacataaaaa tgcactata tcttcccatt gicactatat ctcccattt aacatatac 180
 tteccattta acattgtttt tgtafattgg gtgtagattt ctgacattgg gtgtagattt 240
 ctgacatcaa tgggtgtaga tttctgacat caaaa 275

[0019]

<210> 83
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 83
 gaaggctctc actaacagag gtacaggctc tcactaacag aggtacatta ctaacagagg 60
 tacattactg caatgtaaca gaggfacatt actgcaatg taacagttaa acaagctgtt 120
 tacagcagtt aaacaagctg tttacagttt gagetatita aagcttatta tattttgcat 180
 tafgtgtaca gtattggaca gcattatgtg tacagtatg gacaagtgtc cagtattgga 240
 caaaggattt tacagtattg gacaaaggat tttat 275

<210> 84
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 84
 gctgtcctcc gtattacgtg aceggtcctg tattacgtga ccggcaata tacgtgaccg 60
 gcaataaaat ctcatgtaga atgcaaaatg ttggcacgtc gaatcaaaa tgitggcacg 120
 tcaaagtgtg cactgcaaaa atatgaatgt fgaatgtgta gacaactgta gttgtgacaa 180
 ctgtagtgtg gtcagtttg gggaagtgtg ttttactctg atcaaggaag tgtattttac 240
 tctgatcaaa taatgctgga atactcaaga attgc 275

<210> 85
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 85
 gatattggacg ttatcatitgg tctggatgga cgttatcatt ggtctggtga tggcttggig 60

agatgtttca tatttattat gagttaatgc tgccctgtgc agttaatgct geectgtgtct	120
atggggctca tggggttctg tcttctttga tgccttcttt gatageccatc tattegatag	180
ccatctatcc atctggatca ctattcatct ggatcatggg acccttgggt tggagttgag	240
aatcagtet gttgagatat cagctcrogga aactt	275
<210> 86 <211> 275 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 86	
tcacaggggc ctcaagaatt ggtatacagg ggccctcaaga attggtatgt ctcaagaatt	60
ggtatgatg atgigtgatg tgatctggtc cagccagggc atgigtatctg gtccagccag	120
ggccttgatc tggtecagcc agggectggc cagctctcta ggtttgatg gacttgcctc	180
ctaggtttga tatgacttta ctctctaggt ttgatatgac tttagtttgt caatatagat	240
ggtaggaagc gtcaatfatag atggtaggaa gcaga	275
<210> 87 <211> 275 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 87	
gatggatgca actgaagcag agtgtggtgc ccagatgtgc gctatttagat gtgcgctatt	60
agatgtttct ctgattttct ctgataatgt ccccaatcat gataatgtcc ccaatcatac	120
caggggtccc caacataacc agggagactc caggngact ggcattgacg agaacttgac	180
[0020] gagaactcag gtggaggctt tcagctttgc aaagagccac cctagcagct gaccgeatgg	240
gtgtgagcca ctactcaata aaagcgaagg tggac	275
<210> 88 <211> 275 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 88	
aagatgtcat ttgcaataga gcagtgicat ttgcaataga gcagtcatt gaattttcac	60
tggacctgtg atgtcaattt teactggacc tigtatgtca ctttttgtgc acagattatg	120
atgaattatc actctgectg tgtatagtca cactctgcct gtgtatagtc agatagtata	180
gtcagatagt ccatgcgaag cagatagtec atgcgaagge tgtattccat gcgaaggctg	240
tatatattga ttataaagtg tgtaagttac cagtt	275
<210> 89 <211> 225 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 89	
aaaagactga gcaigtctac tttttaaacc ctttgtattg tagataagag aaagactgag	60
catgctcact tttttaaacc tttgtattgt agataagagg aagactgagc atgctcactt	120
ttttaaacaa ccctttgtat tgtagataag agacaaacce tttgtattgt agatacaaac	180
ccctttgatt gtagataaga gacaaacctt tttgtattgta gataa	225
<210> 90	

<211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 90
 acttaccacc actaaactgc gagagagcag actgceggta acgcgcggcc cegcigcagt 60
 ttcttgggac atagctaaa ctgcgagaga agctaaactg gagegcaaaag aagctacagc 120
 ctggaggaca gcagactgcc ggtaacgcgc ggaactacca ccactaaact gcgagggaga 180
 gactcagcaa cgaccatac ggcgggagag actcagcaac gacccttttc ttgggacata 240
 ggagcgcaaa tgcccctgc agtttcttgg gacat 275

<210> 91
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 91
 aaagtttāga tctgtccctt aataaaaaatc ttaatcatta tecttctaag aggatacaaa 60
 tttagtctc ttaacatcaa aatcttaatc attatccttc atcagaaagt ttagatctgt 120
 cccttatcat tatccttcta agaggataca ctaagaggat acaaatttag tgetccttaa 180
 tcattatcct tctaagagga gaaagtttag atctgtccct taatatacaa atttagtgct 240
 ctttaactgt ttgcttaaac taatgaacaa atag 275

[0021]

<210> 92
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 92
 aaatcttaat cattatectt ctaagaggat acaaatttag tgetcttaac atcagaaagt 60
 ttagatctgt ccttccaag agttaagata tccctaagt cctgaaagca gtaaccaaga 120
 gttaacitaa tcattatcet tctaagagga gaaagittag atctgtccct taatagttaa 180
 gatatcccta atgttttgct taaccaagag ttaagatac cctaataaga tatecctaat 240
 gttttgctta tacaattta gtgctcttaa cttgt 275

<210> 93
 <211> 275
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 93
 actcttiact caggagggcc ttgcaagagt aggtgctgcc tagcagccct agcagccctt 60
 cgtggccact cttaagggtg ctgectagca gcccttcgtg atgacacgtg teaagatgcc 120
 cttccatgtg ttcattaagg gctcaataaa ccagtatgaa ctgccgtgaa gtcaagaggt 180
 cccagtatga actgccgtga tctttactca ggaggcctt gcagattacc atagacacg 240
 tgcaagatg ttatgtgttc attaagggct caata 275

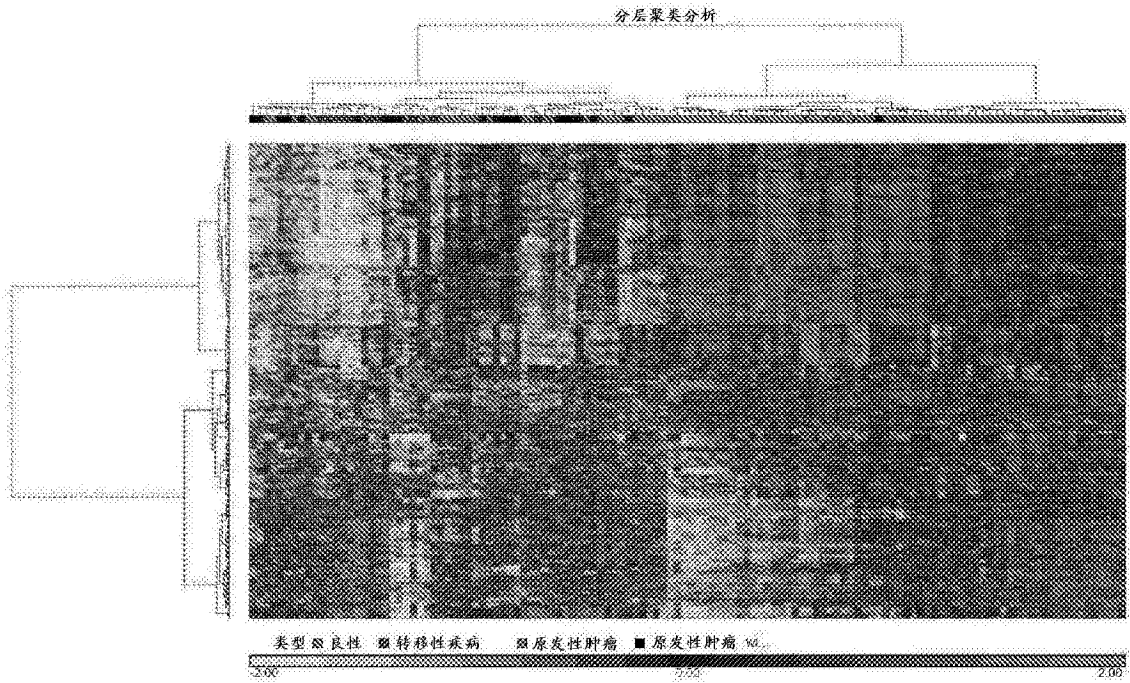


图1A

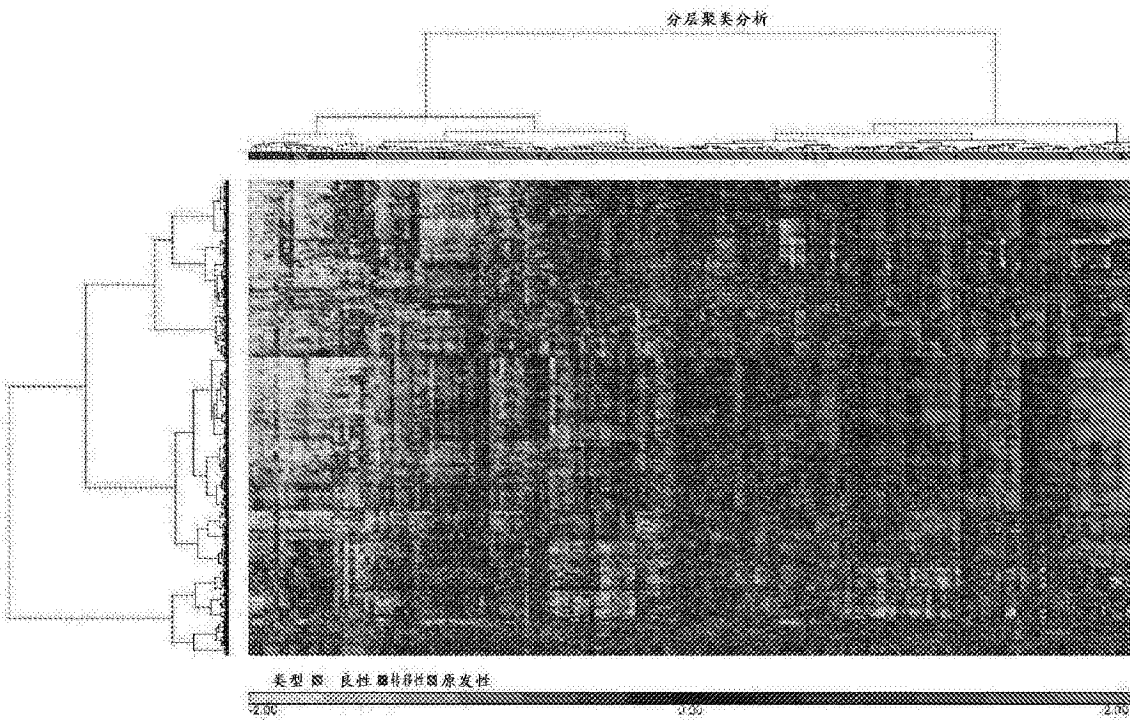


图1B

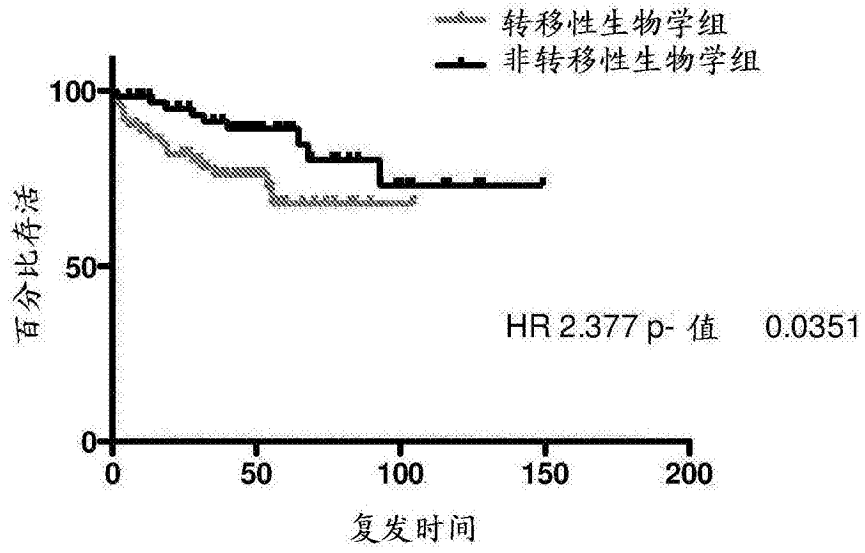


图1C

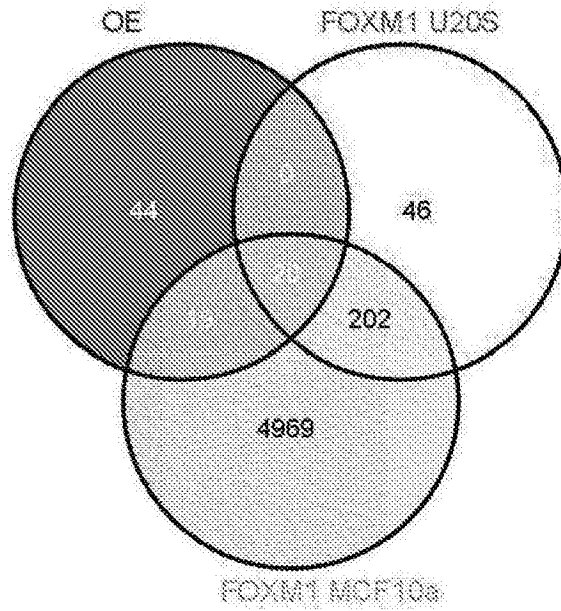


图2A

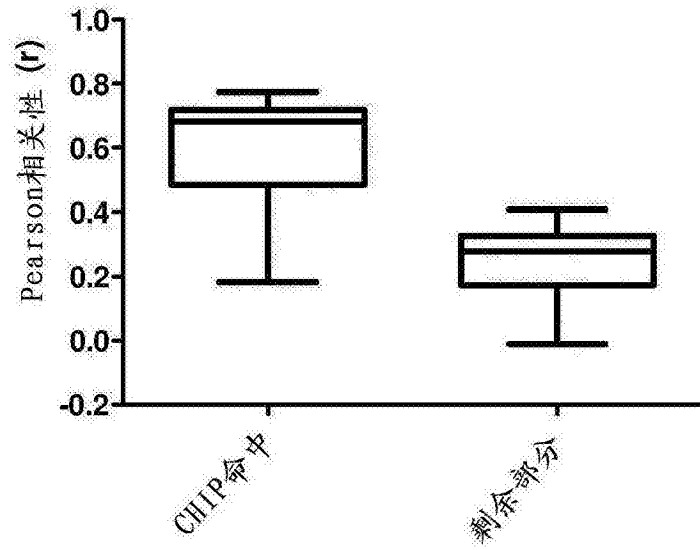


图2B

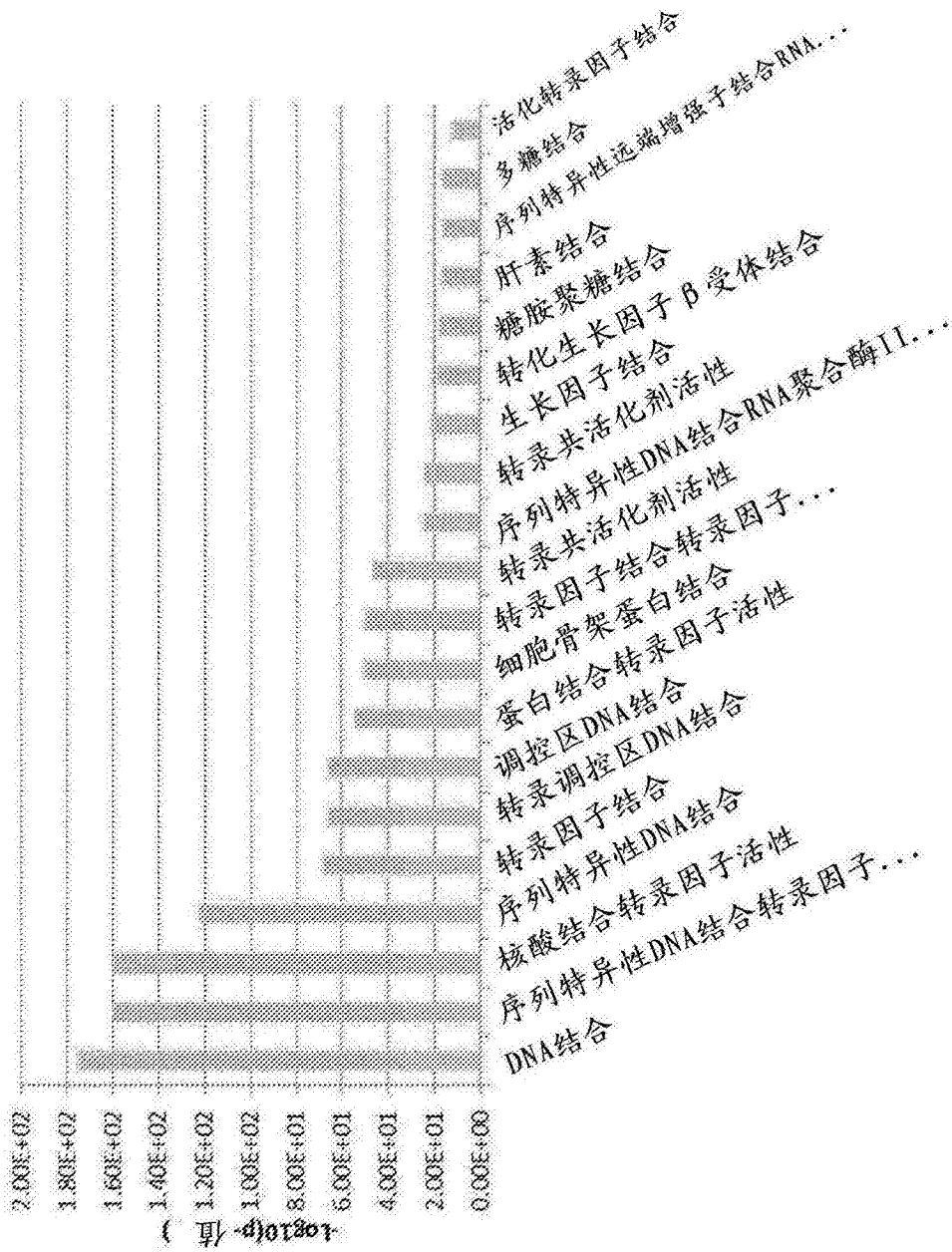


图3A

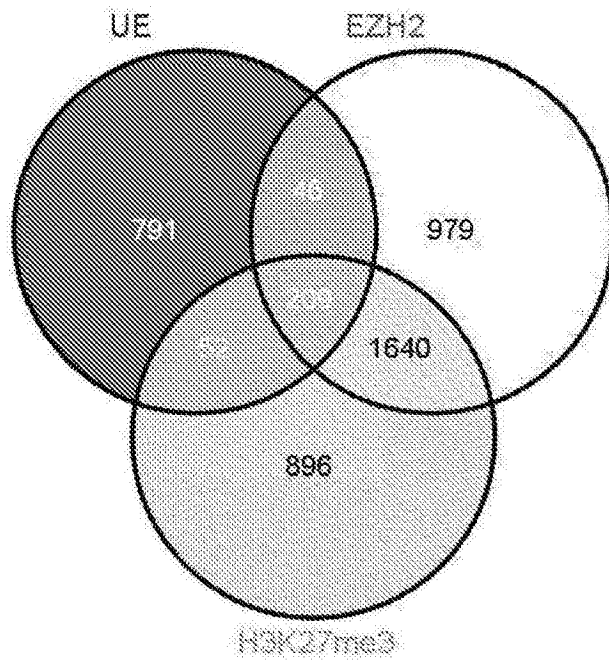


图3B

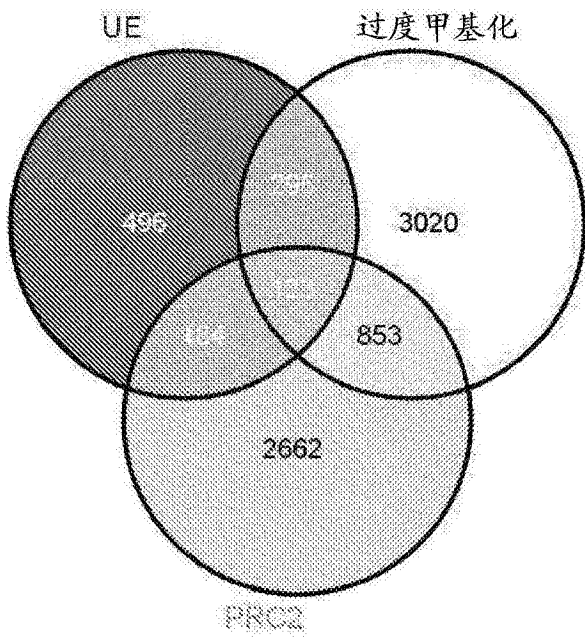


图3C

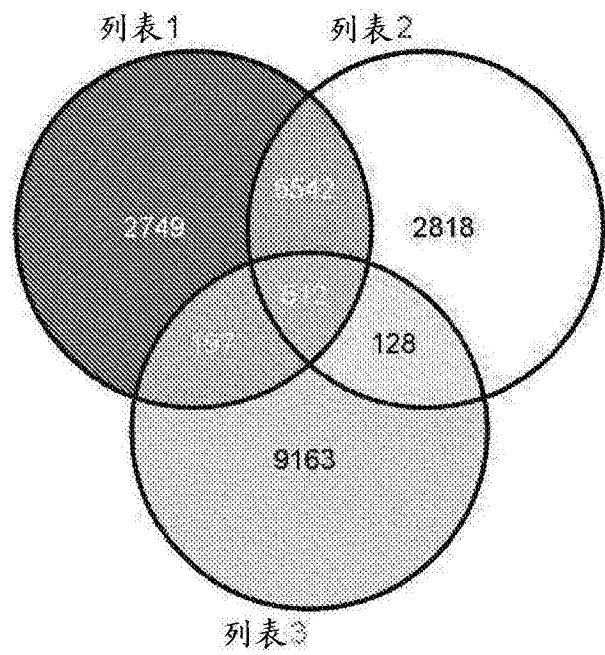


图4

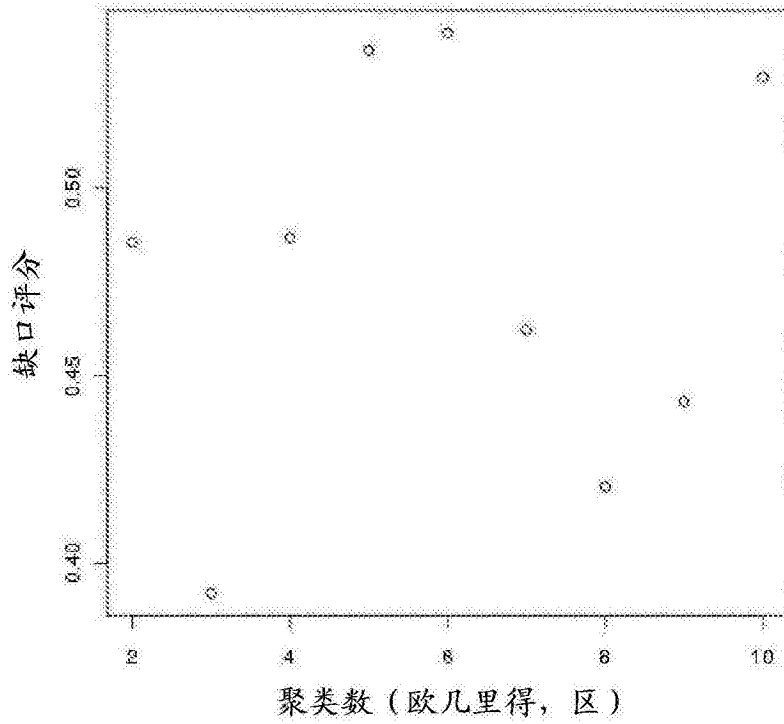


图5

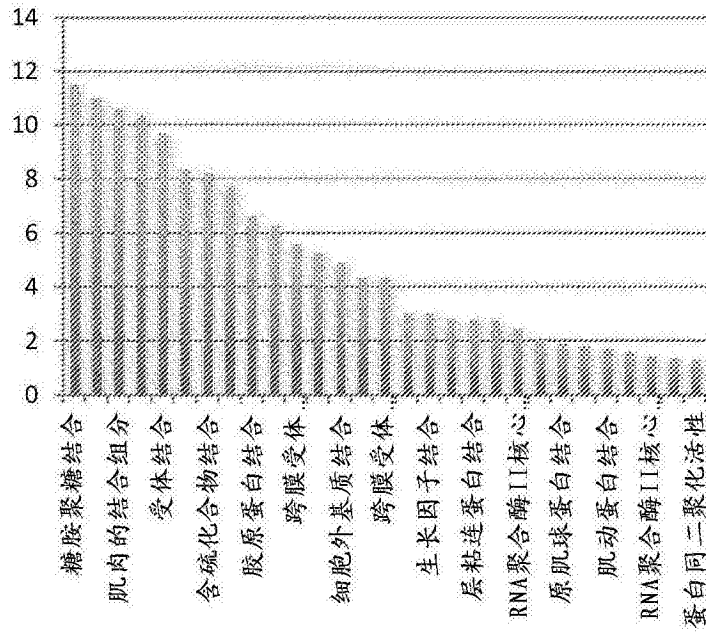


图6A

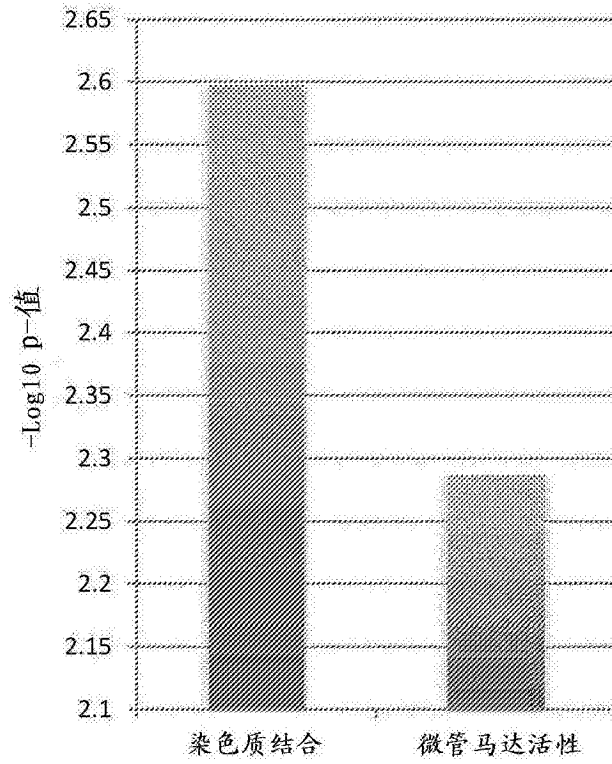


图6B

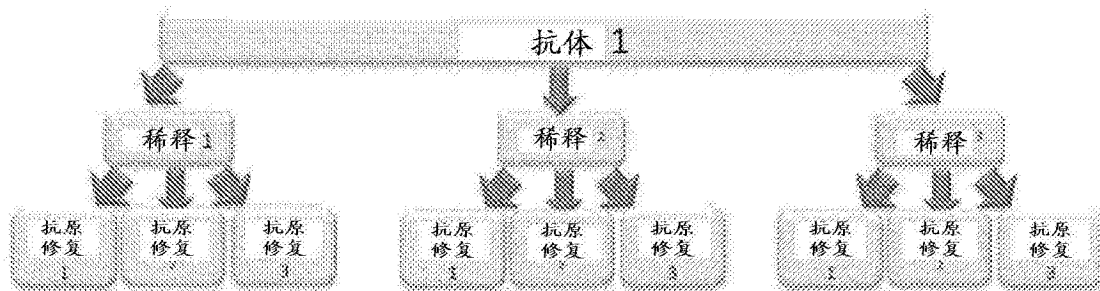


图7