

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日  
2018年12月6日 (06.12.2018)

(10) 国际公布号  
WO 2018/219264 A1

- (51) 国际专利分类号:  
*C12N 15/11* (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)  
*C12Q 1/68* (2018.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/088809
- (22) 国际申请日: 2018年5月29日 (29.05.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201710403824.7 2017年6月1日 (01.06.2017) CN
- (71) 申请人: 上海长海医院 (SHANGHAI CHANGHAI HOSPITAL) [CN/CN]; 中国上海市杨浦区长海路168号, Shanghai 200433 (CN)。
- (72) 发明人: 孙颖浩 (SUN, Yinghao); 中国上海市杨浦区长海路168号, Shanghai 200433 (CN)。 任善成 (REN, Shancheng); 中国上海市杨浦区长海路168号, Shanghai 200433 (CN)。 施晓磊 (SHI, Xiaolei); 中国上海市杨浦区长海路168号, Shanghai 200433 (CN)。 刘飞 (LIU, Fei); 中国上海市杨浦区长海路168号, Shanghai 200433 (CN)。
- (74) 代理人: 上海麦其知识产权代理事务所 (普通合伙) (MSJ LAW OFFICE); 中国上海市普陀区中山北路3663号第358幢301B董红曼, Shanghai 200031 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

(54) Title: USE OF LONG-CHAIN NON-CODING RNA AS PROSTATIC CANCER MOLECULE MARKER

(54) 发明名称: 一种长链非编码RNA作为前列腺癌分子标志物的应用

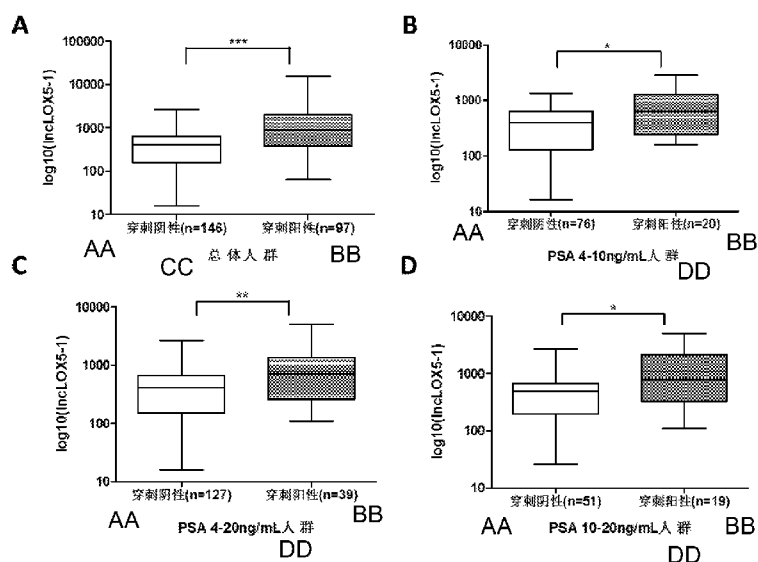


图 2

AA Negative in puncture  
BB Positive in puncture

CC Overall population  
DD Population

(57) Abstract: A long-chain non-coding RNA marker lncLOX5-1 for early diagnosis and prognosis of prostatic cancer and use thereof. Said lncLOX5-1 has the characteristics of high accuracy, high specificity, and high sensitivity, being able to be used for early diagnosis and prognosis of prostatic cancer.

(57) 摘要: 一种前列腺癌早期诊断和预后判断的标志物长链非编码RNA lncLOX5-1及其应用。该lncLOX5-1可用于前列腺癌的早期诊断和预后判断, 具有高准确度、高特异性和高灵敏度的特点。



WO 2018/219264 A1

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

**根据细则4.17的声明:**

- 关于发明人身份(细则4.17(i))
- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则4.17(iii))
- 发明人资格(细则4.17(iv))

**本国际公布:**

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

## 一种长链非编码 RNA 作为前列腺癌分子标志物的应用

### 技术领域

本发明属于癌症分子诊断领域，具体涉及长链非编码 RNA lncLOX5-1 作为前列腺癌早期诊断以及对前列腺癌进行预后判断的标志物中的应用，还涉及相应的 lncRNA 芯片和诊断试剂盒。

### 背景技术

前列腺癌(Prostatic Cancer, PCa) 是一种严重威胁男性健康的恶性肿瘤，是发达国家发病率最高的男性恶性肿瘤，占全球肿瘤发病率第二位、死亡率第六位。我国 PCa 的发病率近年来一直处于显著的上升趋势。在北京、上海、广州等医学、经济发达城市，PCa 发病率已位于当地十大常见肿瘤之列。流行病学数据显示，中国 PCa 发病率已从 1993 年的 1.71/10 万男性人口增加到 2005 年的 7.9/10 万男性人口，年增幅约 13%。依此推算，预计 2020 年，我国 PCa 发病率将超过 40/10 万男性人口，接近欧美国家水平，成为危害男性健康的主要肿瘤“杀手”。由此可见，随着我国普遍医疗水平的提高，以及中国正在步入老龄化社会，前列腺癌的防治、研究工作已经进入刻不容缓的阶段。由于 PCa 症状隐蔽，导致国内初诊时处于中晚期的患者居多，且超过 46.3% 的患者已发生局部进展或远处转移。前列腺癌患者一旦发生转移不仅预后差，而且严重影响其生活质量。SEER (Surveillance Epidemiology and End Results, SEER) 数据库 2004-2010 年的资料显示，局限性前列腺癌的 5 年生存率为 100%，而转移性前列腺癌仅为 28%。前列腺特异性抗原 (Prostate specific antigen, PSA) 是目前最广泛应用于前列腺癌分子诊断标记物，但其特异性较差，导致大量的不必要穿刺和医疗资源的浪费。因此亟需找到 PCa 高特异性的分子诊断标记物和相关检测技术。

### 发明内容

本发明提供了一种长链非编码 RNA lncRNA (lncLOX5-1)，其核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

本发明提供了一种所述 lncLOX5-1 在作为对前列腺癌进行早期诊断及预后判断的分子标志物的应用，通过 lncLOX5-1 的检测，提高对前列腺癌诊断的准确性和特异性。

本发明中，可通过 lncLOX5-1 的表达量变化，从而对前列腺癌进行早期诊断以及预后判断。

本发明还提供了一种分离的多核苷酸 (lncLOX5-1 所对应的 DNA)，所述多核苷酸能被细胞 (如，人细胞) 转录成如上所述的 lncLOX5-1，与所述多核苷酸的同源性为 80%、85%、

90%、95%及 99%的序列，也可作为前列腺癌的标志物。

本发明中，与所述 lncLOX5-1 如 SEQ ID NO.1 所示的核苷酸序列同源性的 80%、85%、90%、95%及 99%的序列，也可作为前列腺癌的标志物。

本发明还提供了一种分离的多核苷酸，所述多核苷酸能被人细胞转录成权利要求 1 所述的 lncLOX5-1。

本发明还提供了 lncLOX5-1 的检测试剂在制备对前列腺癌进行早期诊断的产品中的应用，所述 lncLOX5-1 的检测试剂可以但不限于是特异性检测 lncLOX5-1 的核酸探针。通过对所述基因 lncLOX5-1 的表达量进行定量，来对前列腺癌进行早期诊断。

本发明还提供了 lncLOX5-1 的检测试剂在制备对前列腺癌进行预后判断的产品中的应用，所述 lncLOX5-1 的检测试剂可以但不限于是特异性检测 lncLOX5-1 的核酸探针。通过对所述基因 lncLOX5-1 的表达量进行定量，对前列腺癌进行预后判断。

本发明中，所述 lncLOX5-1 的表达量可通过以下方法确定：微阵列技术、RNA 印迹和定量 PCR、组织原位杂交 (*In situ hybridization*, ISH) 等；所述定量 PCR 为实时定量 PCR 或多重 PCR 等。

本发明还提供了一种寡核苷酸引物，所述引物的序列为正向：

TCCTCCTAAGCCGTATCCCATCTG (SEQ ID NO.2)，反向：

CCAGGTGAGTTGAACAGTCCGATT (SEQ ID NO.3)，该引物能够用来扩增所述 lncLOX5-1。

本发明还提供了一种诊断前列腺癌的检测 lncLOX5-1 的反转录 PCR 系统，该检测 lncLOX5-1 的系统包括如上所述的引物。

本发明还提供了一种前列腺癌体外诊断产品，所述体外诊断产品包括特异性检测 lncLOX5-1 的试剂。所述前列腺癌体外诊断产品可用于对前列腺癌进行早期诊断以及对前列腺癌进行预后判断。所述特异性检测 lncLOX5-1 的试剂可以但不限于是核酸探针，所述核酸探针能特异性识别所述 lncLOX5-1。

其中，所述前列腺癌体外诊断产品包括试剂盒、基因芯片、固体支持体等；所述固体支持体包括阵列、微阵列等。

本发明还提供了 lncLOX5-1 的检测试剂在预测前列腺癌患者肿瘤恶性程度中的应用。lncLOX5-1 的表达与前列腺癌细胞恶性进展相关。

本发明还提供了 lncLOX5-1 的检测试剂在预测前列腺癌患者肿瘤是否进展转移中的应用。

本发明还提供了 lncLOX5-1 的检测试剂在预测拟行前列腺穿刺患者的阳性率中的应用。

本发明还提供了一种基于 lncLOX5-1 构建的 lncLOX5-1 临床诊断模型

(Model-lncLOX5-1) , 所述模型的构建过程为, 将年龄、PSA、%fPSA、前列腺体积、直肠指诊(DRE)、lncLOX5-1 表达量、PCA3 表达量进行单因素 logistic 回归分析, 确定能作为预测前列腺穿刺结果的独立危险因素; 根据单因素 logistic 回归分析确定的独立危险因素年龄、PSA、%fPSA、前列腺体积、lncLOX5-1 表达量、PCA3 表达量, 将其纳入多因素 logistic 回归分析中, 构建所述基于 lncLOX5-1 构建的 lncLOX5-1 临床诊断模型(Model-lncLOX5-1), 和基于 PCA3 构建的 PCA3 临床诊断模型(Model-PCA3); 其中, 所述 lncLOX5-1 临床诊断模型的 AUC 达到 0.909。

本发明还提供了所述 lncLOX5-1 临床诊断模型(Model-lncLOX5-1) 在预测前列腺穿刺的阳性率中的应用。

本发明还提供了一种前列腺癌进行早期诊断的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 检测 PSA 异常患者行前列腺按摩后尿渣中 lncLOX5-1 的表达量;

b) 通过 a) 中测定的 lncLOX5-1 的表达量, 采用受试者工作曲线(ROC) 分析 lncLOX5-1 表达量的曲线下面积(AUC), 选择敏感性和特异性最大的点作为临界点, 将患者分为高表达组和低表达组, 若 lncLOX5-1 表达量小于临界点, 提示其前列腺穿刺阳性概率较低; 若 lncLOX5-1 表达量大于等于临界点, 提示其前列腺穿刺阳性概率较高;

或, 通过 a) 中测定的 lncLOX5-1 的表达量, 采用受试者工作曲线(ROC) 分析 lncLOX5-1 表达量的曲线下面积(AUC), 选择敏感性和特异性最大的点作为临界点, 联合患者年龄、PSA、%fPSA 和前列腺体积具体数值, 应用基于 lncLOX5-1 临床诊断模型绘制的列线图计算患者单个风险因素的风险评分, 相加得到患者的累积风险评分, 对应得出患者的穿刺阳性概率。

在一个具体的实施方式中, 本发明提供的前列腺癌进行早期诊断的方法, 包括以下步骤:

a') 检测 PSA 异常患者行前列腺按摩后尿渣中 lncLOX5-1 的表达量;

b') 通过 a') 中测定的 lncLOX5-1 的表达量, 以 lncLOX5-1 表达量等于 68 为界, 将患者分为高表达组和低表达组, 若 lncLOX5-1 表达量小于 68, 提示其前列腺穿刺阳性概率较低; 若 lncLOX5-1 表达量大于等于 68, 提示其前列腺穿刺阳性概率较高;

或, 通过 a') 中测定的 lncLOX5-1 的表达量, 以 lncLOX5-1 表达量等于 68 为界, 联合患者年龄、PSA、%fPSA 和前列腺体积具体数值, 应用基于 lncLOX5-1 临床诊断模型绘制的列线图计算患者单个风险因素的风险评分, 相加得到患者的累积风险评分, 对应得出患者的穿刺阳性概率。

其中, 步骤 a') 中, lncLOX5-1 的表达量测定方法如下,

(1) 尿液RNA抽提:

尿液 RNA 采用 TRIzol 法进行抽提。每 1mL TRIzol 溶解的 EP 管中加入 200 $\mu$ L 三氯甲烷，颠倒混匀后置于冰盒中放置 5min，以 4 $^{\circ}$ C 14000rpm 离心 15min。可见上层透明水样层，中间为一层白色絮状蛋白，下面红色液体为苯酚-氯仿层。小心吸取上层水相约 500 $\mu$ L 转移至新的 EP 管中。每个 EP 管中加入 500 $\mu$ L 的异丙醇，冰盒中放置 10min 以沉淀 RNA，再以 4 $^{\circ}$ C 14000rpm 离心 10min，可见管底透明或白色胶冻样沉淀，小心弃去上清加入 1mL 75%乙醇冲洗一遍，再次以 4 $^{\circ}$ C 14000rpm 离心 5min，小心弃去上清，充分干燥后加入 10-20 $\mu$ L 无酶水溶解 RNA。抽提出来的 RNA 应用 Nanodrop 2000c 检测浓度和 260/280 吸光度评价质量，重复测量 2 次，260/280 吸光度比值应介于 1.80-2.00。

### (2) 反转录扩增：

反转录扩增采用 Sigma 公司的完整全转录组扩增试剂盒 (TransPlex<sup>®</sup> Complete Whole Transcriptome Amplification Kit)。冰盒上解冻 Library Synthesis Buffer, Library Synthesis Solution, Library Synthesis Enzyme, Amplification Mix, 10mM dNTP Mix, Amplification Enzyme 和无酶水。

#### PCR 仪设置程序：

WTA1: 70 $^{\circ}$ C, 5min $\rightarrow$ 18 $^{\circ}$ C

WTA2: 18 $^{\circ}$ C 10min $\rightarrow$ 25 $^{\circ}$ C 10min $\rightarrow$ 37 $^{\circ}$ C 30min $\rightarrow$ 42 $^{\circ}$ C 10min $\rightarrow$ 70 $^{\circ}$ C 20min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C

WTA3: 94 $^{\circ}$ C 2min $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C 30s $\rightarrow$ 70 $^{\circ}$ C 5min) $\times$ 17 个循环 $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C。

文库合成：100ng 全 RNA 中加入 0.5 $\mu$ L Library Synthesis Solution，加入无酶水补齐至 3.32 $\mu$ L。吹打混匀后使用 PCR 仪 WTA1 程序孵育。

向管中加入 0.5  $\mu$ L Library Synthesis Buffer, 0.4 $\mu$ L Library Synthesis Enzyme 和 0.78 $\mu$ L 无酶水。吹打混匀后，使用 PCR 仪 WTA2 程序进行孵育。

文库扩增：向管中加入 60.2 $\mu$ L 无酶水，7.5 $\mu$ L Amplification Mix, 1.5 $\mu$ L dNTP Mix 和 0.75 $\mu$ L Amplification Enzyme，使用 PCR 仪 WTA3 程序进行孵育。反应完成后，将 PCR 产物 cDNA 储存于 -20 $^{\circ}$ C 以备后续检测。

### (3) 实时定量 PCR (qRT-PCR)：

目的基因表达水平的检测采用 ABI StepOnePlus 实时定量荧光 PCR 仪器进行检测。应用 TOYOBO 公司 THUNDERBIRD SYBR real-time qPCR 试剂盒，每个孔 20 $\mu$ L 反应体系中含有 10 $\mu$ L SYBR Green Master Mix, 1 $\mu$ L 上游引物, 1 $\mu$ L 下游引物, 0.4 $\mu$ L 50 $\times$ Rox Dye, 2 $\mu$ L cDNA 和 5.6 $\mu$ L 无酶水。反应条件为，95 $^{\circ}$ C 10min, 95 $^{\circ}$ C 15s 和 60 $^{\circ}$ C 60s 连续 40 个循环。数据采用 StepOne Software version v2.1 (Applied BioSystems, USA) 软件进行统计分析和导出。IncLOX5-1 表达量计算公式为：IncLOX5-1 表达量 =  $2^{Ct(\text{PSA}) - Ct(\text{IncLOX5-1})}$ ，PCA3 表达量计算公

式为： $PCA3 \text{ 表达量} = 2^{Ct(PSA) - Ct(PCA3)}$ ，以 PSA 作为尿渣 RNA 的内参，对于 PSA 的 Ct 值大于 28 的样本提示其 RNA 含量不足，故剔除样本。

qRT-PCR反应体系		
试剂	体积	终浓度
THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix	10 $\mu$ L	1 $\times$
上游引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
下游引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
50 $\times$ Rox	0.4 $\mu$ L	1 $\times$
cDNA	2 $\mu$ L	
无酶水	5.6 $\mu$ L	
总体积	20 $\mu$ L	

qRT-PCR扩增反应条件			
	温度	时间	循环
预变性 Initial denaturation	95 $^{\circ}$ C	10min	
变性 Denaturation	95 $^{\circ}$ C	15s	40 个循环
延长 Extension	60 $^{\circ}$ C	60s	
熔解曲线 Melting Curve Analysis	95 $^{\circ}$ C	15s	
	60 $^{\circ}$ C	1min	
	95 $^{\circ}$ C	15s	

qRT-PCR引物序列		
PSA	Forward (5'-3')	GTCTGCGGCGGTGTTCTG
	Reverse(5'-3')	TGCCGACCCAGCAAGATC
PCA3	Forward (5'-3')	GAAGCTTGGCATCAGAAAAACAGAG
	Reverse(5'-3')	CTCAGATGGTAAAGTCAGCAGCCT
lncLOX5-1	Forward (5'-3')	TCCTCCTAAGCCGTATCCCATCTG
	Reverse(5'-3')	CCAGGTGAGTTGAACAGTCCGATT

本发明还提供了一种对前列腺癌进行预后判断的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 检测前列腺癌患者病理样本中 lncLOX5-1 的表达量；

b) 通过 a)中测定的表达量，将前列腺癌患者分为低表达组和高表达组，若病理样本中 lncLOX5-1 表达量高于前列腺癌患者人群 lncLOX5-1 的均值，则为高表达组，预示肿瘤恶性程度、侵袭性较高，生存预后水平较差；否则为低表达组。

所述 lncLOX5-1 高表达组，以组织原位杂交中 DAB 显色为例，将高倍镜下综合染色强度和阳性细胞所占比例进行半定量测定，染色强度评分标准：低表达-不着色或浅黄色，高表达-棕黄色或深黄褐色。

本发明还提供了一种 lncLOX5-1 的抑制剂在抑制前列腺癌中的应用，所述抑制剂用于抑制前列腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

本发明的有益效果在于，本发明提供的诊断和预测前列腺癌的新标志物，即长链非编码 RNA lncLOX5-1，该标志物能对前列腺癌进行早期诊断以及对前列腺癌进行预后判断，具有高准确度，高特异性和高灵敏度的特点；本发明提供的包含标志物 lncLOX5-1 的检测试剂的前列腺癌体外诊断产品，其使用方便，具有高准确度、高特异性和高灵敏度的特点。

#### 附图说明

图 1 为前列腺癌、良性前列腺增生、肾癌和膀胱癌患者以及健康人尿渣中 lncLOX5-1 的表达量；其中，前列腺癌患者尿渣中 lncLOX5-1 表达量显著高于其他人群。

图 2 为 243 例行前列腺穿刺患者人群尿渣 lncLOX5-1 的表达量，前列腺穿刺阳性患者尿渣中 lncLOX5-1 表达量显著高于前列腺穿刺阴性患者；其中，A 为总体人群，B 为 PSA 4-10ng/mL 人群，C 为 PSA 4-20ng/mL 人群，D 为 PSA 10-20ng/mL 人群。

图 3 为前列腺穿刺阳性患者人群中不同 lncLOX5-1 表达量的前列腺癌检出率；其中，lncLOX5-1 表达量高的人群中前列腺癌检出率增高。

图 4 为受试者工作曲线分析 PSA、lncLOX5-1、PCA3、fPSAratio 等指标的诊断效能；其中，A 为总体人群、B 为 PSA 4-10ng/mL 人群，C 为 PSA 4-20ng/mL 人群。

图 5 为受试者工作曲线分析完全基于临床诊断指标构建的基础模型（Base Model）、基于 lncLOX5-1 构建的 lncLOX5-1 临床诊断模型（Model-lncLOX5-1）、基于 PCA3 评分构建的 PCA3 临床诊断模型（Model-PCA3）等的诊断效能：总体人群（A）、PSA 4-10ng/mL 人群（B）和 PSA 4-20ng/mL 人群（C）。

图 6 为基于 lncLOX5-1 构建的 lncLOX5-1 临床诊断模型（Model-lncLOX5-1）绘制的列线图及内部验证（列线图的校正曲线检验）：A 应用年龄、PSA、%fPSA、前列腺体积、lncLOX5-1 构建的诊断模型绘制的列线图；B 列线图的校正曲线检验。

图 7 为前列腺癌患者尿渣 lncLOX5-1 表达量与肿瘤进展转移和恶性程度相关；其中，A 为局限性前列腺癌与局部进展/转移前列腺癌患者尿渣 lncLOX5-1 表达量；B 不同 Gleason 评分前列腺癌患者尿渣 lncLOX5-1 表达量。

图 8 为局限性和转移性前列腺癌患者肿瘤组织的 lncLOX5-1 表达量。

图 9 为 TCGA 数据库中 lncLOX5-1 高表达和低表达前列腺癌患者人群总体生存曲线。

图 10 为外源性改变 lncLOX5-1 表达量后肿瘤细胞增殖能力的变化：LNCaP（A）和 PC3（B）细胞中干扰 lncLOX5-1 表达量后，肿瘤细胞增殖能力减弱；LNCaP（C）和 PC3（D）细胞中过



表达 lncLOX5-1 表达量后, 肿瘤细胞增殖能力增强; 其中, 图 10A 和图 10B 的图例相同。

图 11 为外源性改变 lncLOX5-1 表达量后肿瘤细胞迁移和侵袭能力的变化: PC3 (A) 细胞中过表达 lncLOX5-1 水平肿瘤细胞迁移和侵袭能力增强; LNCaP (B) 细胞中干扰 lncLOX5-1 水平肿瘤细胞迁移和侵袭能力减弱。

图 12 为体内实验证实 lncLOX5-1 在前列腺癌中的作用; 其中, A-B 为干扰 lncLOX5-1 表达的前列腺癌细胞 PC3 皮下荷瘤裸鼠模型, 前列腺癌肿瘤体积与正常对照组相比明显降低; C 为干扰 lncLOX5-1 表达的前列腺癌 PC3 种植瘤中 lncLOX5-1 表达量较对照组显著降低; D 为免疫组化(IHC)显示, 在干扰 lncLOX5-1 的前列腺癌细胞 PC3 的肿瘤中, 细胞增殖标记物 Ki-67 和 PCNA 表达量明显降低。

(全文中星号含义相同, 即, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ )。

### 具体实施方式

结合以下具体实施例和附图, 对本发明作进一步的详细说明。实施本发明的过程、条件、实验方法等, 除以下专门提及的内容之外, 均为本领域的普遍知识和公知常识, 本发明没有特别限制内容。

实施例 1 前列腺癌、良性前列腺增生、肾癌和膀胱癌患者以及正常人尿液中 lncLOX5-1 的表达

以下实施例中, 检测 lncLOX5-1 表达量时可采用上文所述的前列腺癌体外诊断试剂, 如试剂盒、基因芯片等。

(1.1) 前列腺癌、良性前列腺增生、肾癌和膀胱癌患者以及正常人尿液中 lncLOX5-1 的表达量有显著差异

本发明发现前列腺癌患者的尿渣中, lncLOX5-1 表达量显著高于良性前列腺增生患者、肾癌患者、膀胱癌患者和健康人的尿渣中 lncLOX5-1 表达量 (图 1)。且前列腺癌患者及良性前列腺增生患者尿渣中 lncLOX5-1 表达量高于其他人群, lncLOX5-1 可作为前列腺特异性指标。

(1.2) 前列腺穿刺阳性患者尿渣中 lncLOX5-1 表达量显著高于前列腺穿刺阴性患者

如上所述, lncLOX5-1 在前列腺癌患者尿渣中表达量显著高于其他人群的尿渣中 lncLOX5-1 表达量。通过纳入 243 名行前列腺穿刺患者, 包括 146 名穿刺阴性患者和 97 名穿刺阳性患者, 检测患者前列腺按摩后尿渣中 lncLOX5-1 表达量。发现穿刺阳性患者尿渣中 lncLOX5-1 表达量显著高于穿刺阴性患者尿渣中 lncLOX5-1 的表达量 (图 2A)。在总体人群、PSA 4-10ng/mL 人群、PSA 4-20ng/mL 人群和 PSA 10-20ng/mL 人群中均发现 lncLOX5-1 表达量在穿刺阳性患者的尿渣中显著提高 (图 2)。

### (1.3) lncLOX5-1 表达量高的人群中前列腺癌检出率增高

本发明通过检测 97 名前列腺穿刺阳性的患者尿渣中 lncLOX5-1 表达量,发现 lncLOX5-1 表达量越高,其对应人群中前列腺癌检出率越高。将 lncLOX5-1 按照从小到大进行排序,0-25% 是 lncLOX5-1 表达量最低的 25%人群,75-100%是 lncLOX5-1 表达量最高的 25%人群,发现 lncLOX5-1 表达量最低的群体(0-25%)前列腺癌检出率要低于表达量较高的群体(75-100%);在总体人群、PSA <10ng/mL 人群、PSA 10-20ng/mL 人群和 PSA >20ng/mL 人群中均发现相同的趋势(图 3)。

### (1.4) 尿渣 lncLOX5-1 评分作为前列腺癌的辅助诊断指标

图 4 为受试者工作曲线分析各指标诊断效能。运用受试者工作曲线(ROC)分析尿渣 lncLOX5-1 的诊断效能,发现尿渣 lncLOX5-1 的曲线下面积(AUC)达到了 0.782,PSA 的 AUC 为 0.798,两者之间的差异无统计学意义( $P=0.696$ )(图 4 A)。而 PCA3 评分的 AUC 0.662,显著低于 lncLOX5-1 和 PSA ( $P_{\text{lncLOX5-1}} < 0.001$ ,  $P_{\text{PSA}} = 0.003$ )。在 PSA 4-10 ng/mL 诊断灰区的患者人群中,lncLOX5-1 评分的诊断效能要优于 PCA3 评分(0.709 vs 0.601,  $P=0.046$ )(图 4 B)。在 PSA 4-20 ng/mL 的患者人群中,lncLOX5-1 评分的诊断效能也显著优于 PCA3 评分(0.719 vs 0.600,  $P < 0.001$ )(图 4 C)。

### (1.5) 基于尿渣 lncLOX5-1 诊断模型建立

单因素 logistic 回归分析确定的独立危险因素,本发明将年龄、前列腺体积、PSA、%fPSA 纳入多因素 logistic 回归分析中,构建预测前列腺穿刺活检结果的诊断预测模型。首先单独应用临床诊断指标构建的基础诊断模型(Base Model)。基于 lncLOX5-1 构建的 lncLOX5-1 临床诊断模型(Model-lncLOX5-1)其 AUC 达到了 0.909,显著优于基于临床诊断指标构建的基础诊断模型( $P=0.009$ )。而基于 PCA3 评分构建的临床诊断模型(Model-PCA3)其 AUC 和 PA 与基础诊断模型相比,差异均无显著的统计学意义(图 5)。

### (1.6) 基于尿渣 lncLOX5-1 诊断预测模型绘制列线图

基于尿渣 lncLOX5-1 构建的 lncLOX5-1 临床诊断模型(Model-lncLOX5-1),本发明绘制了列线图(nomogram),将每个独立危险因素进行了赋值,每个临床指标以及 lncLOX5-1 评分的数值都给予了相应的分数,将各指标分数相加得到的总分可以迅速计算出模型预测前列腺穿刺阳性的概率(图 6 A)。接下来本发明对 nomogram 进行了校正曲线的检验,横坐标为本发明构建的预测模型的 nomogram 预测概率情况,纵坐标为真实发生概率,斜 45° 曲线代表理想曲线,表明 nomogram 预测概率与真实概率完全吻合;本发明的偏倚校正曲线与理想曲线贴合比较密切(图 6 B)。该列线图可简单、有效应用于临床,预测拟行前列腺穿刺患者的穿刺阳性概率。

### (1.7) lncLOX5-1 高表达与前列腺癌患者的肿瘤进展转移及恶性程度相关

本发明对于尿液 lncLOX5-1 表达量在不同级别的前列腺癌患者的表达量进行了比较, 发现基于尿渣检测的 lncLOX5-1 表达量在局限性前列腺癌和局部进展/转移前列腺癌患者人群表达存在显著差别, Gleason 评分(GS) <7 分和  $\geq 7$  分的前列腺癌人群中表达有显著差别(图 7)。随着肿瘤进展转移和病理恶性程度增加, lncLOX5-1 表达量增加, 提示 lncLOX5-1 评分可用于精准诊断高级别前列腺癌。

### (1.8) 局限性和转移性前列腺癌患者肿瘤组织的 lncLOX5-1 表达量

本发明对 41 例前列腺癌患者的肿瘤组织样本进行 lncLOX5-1 表达量的检测, 发现转移前列腺癌患者的 lncLOX5-1 表达量显著高于局限性前列腺癌患者肿瘤组织样本( $P < 0.01$ )(图 8)。

### (1.9) lncLOX5-1 高表达与前列腺癌患者的总体生存率相关

本发明通过生物信息学的方法, 分析公开数据库(TCGA)中前列腺癌患者肿瘤组织中 lncLOX5-1 的表达量, 发现 lncLOX5-1 的高表达组和低表达组患者的预后显著差异(图 9)。在 333 例随访时间达到 15 年的前列腺癌患者人群, 发现 lncLOX5-1 高表达是其预后较差的危险因素, 风险率(Hazard rate, HR)等于 3.736。提示 lncLOX5-1 高表达在前列腺癌预后判断方面具有重要价值。

## 实施例 2 lncLOX5-1 在前列腺癌恶性进展过程中的作用

### (2.1) lncLOX5-1 与前列腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭性的相关性

既往并无 lncLOX5-1 与前列腺癌恶性进展相关的研究报道。

在本发明的前述内容中, 发明人发现 lncLOX5-1 的表达量与肿瘤进展转移和恶性程度密切相关。而无限增殖以及侵袭迁移是肿瘤的重要特征, 本发明对 lncLOX5-1 与前列腺癌细胞的增殖、侵袭迁移的相关性进行了研究。

本发明通过外源性过表达质粒和 siRNA 转染的方式, 在前列腺癌细胞系 LNCaP 和 PC3 中过表达 lncLOX5-1, 通过 CCK8 实验检测了细胞增殖能力的变化(图 10), 通过 Transwell 实验检测了肿瘤细胞侵袭和迁移能力的变化(图 11), 发现在上调 lncLOX5-1 表达量后, 细胞的增殖能力出现上升, 细胞的侵袭和迁移能力也发生增强; 在下调 lncLOX5-1 表达量后, 细胞的增殖能力出现下降, 细胞的侵袭和迁移能力也发生减弱。

### (2.2) 裸鼠荷瘤实验

向裸鼠皮下注射前列腺癌细胞 PC3: 待 PC3 细胞生长至对数增长期, 即状态最佳时, 每只裸鼠注射  $1 \times 10^5$  数量的细胞, 将细胞悬液与基质胶(BD 公司)按照 1: 1 的体积比混合后注射至裸鼠大腿外侧皮下, 便于进行瘤内注射与测量肿瘤情况。半周后, 裸鼠皮下可触及质硬包块, 将裸鼠按照体重和包块大小随机分为两组; 每两天进行瘤内注射 lncLOX5-1 的 siRNA

和对照 siRNA-NC，每周一注射前测量肿瘤大小。6 周后，肿瘤生长较为明显。

结果表明，干扰 lncLOX5-1 表达的前列腺癌细胞 PC3-siRNA-lncLOX5-1 的裸鼠，前列腺癌肿瘤体积明显降低（图 12a-b），干扰后，qPCR 检测肿瘤中 lncLOX5-1 表达量显著下降（图 12c）。

免疫组化(IHC)分析显示，在干扰 lncLOX5-1 的前列腺癌细胞 PC3-siRNA-lncLOX5-1 的肿瘤中，细胞增殖标记物 Ki-67 和 PCNA 表达量明显降低（图 12d）。

以上研究均表明，lncLOX5-1 的过表达可以促进前列腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

综上所述，本发明提出的非编码 RNA lncLOX5-1 可有效作为前列腺癌早期诊断和预后判断的标志物；所述 lncLOX5-1 能够用于预测前列腺癌患者肿瘤的恶性程度，预测前列腺癌患者肿瘤是否进展转移，预测拟行前列腺穿刺的患者的阳性率等，具有高准确度、高特异性和高灵敏度的特点。

本发明的保护内容不局限于以上实施例。在不背离发明构思的精神和范围下，本领域技术人员能够想到的变化和优点都被包括在本发明中，并且以所附的权利要求书为保护范围。

<110> 上海长海医院  
 <120> 一种长链非编码 RNA 作为前列腺癌分子标志物的应用  
 <160> 3  
 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 558  
 <212> lncLOX5-1  
 <213> 智人 (Homo sapie)

<400> 1  
 1 aacctcctcc cacaggagct tgctacatgt gacggaaatc tggccactgg gccaaaggaat  
 61 gccgcagcc cgggattcct cctaagccgt atcccatctg tgtgggaccc cagtgaaaat  
 121 cggactgttc aactcaccig gcagccactc ccagagcccc tggaaactctg gcccaaggct  
 181 ctctgaccga ctccttccca gatcttctcg gcttagcggc tgaagactga cactgcccac  
 241 tcgctcggga agccccctag accatcacgc acgccgagct tcgggtaact ctcacagtgg  
 301 aagagatggc atcttcagca cgaacgctgg ctgtgaggac ttggatgga agaacagaag  
 361 aggagaatgc taggaattcc ctgtacaact ggaaagaaga gtgctcagca cagcatgggg  
 421 ctgaagccta agtacaacaa taatgagta gacttgggtc tcatggaacc aacaggccac  
 481 ttactccttt agctgcttgg ttaacttcac cacttgagag gccagcgaca tgcaggtctc  
 541 caccaccacc aggtacct

<210> 2  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<400> 2  
 1 tctcctaagccgtatcccatctg

<210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<400> 3

1 ccaggtgagttgaacagtccgatt

- 1.一种长链非编码 RNA lncLOX5-1, 其特征在于, 所述 lncLOX5-1 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。
- 2.一种分离的多核苷酸, 其特征在于, 所述多核苷酸能被细胞转录成如权利要求 1 所述的 lncLOX5-1。
- 3.一种寡核苷酸引物, 其特征在于, 所述引物的序列为正向:  
TCCTCCTAAGCCGTATCCCATCTG, 反向: CCAGGTGAGTTGAACAGTCCGATT, 该引物能够用来扩增如权利要求 1 所述的 lncLOX5-1。
- 4.一种诊断前列腺癌的检测 lncLOX5-1 的反转录 PCR 系统, 其特征在于, 该检测 lncLOX5-1 的系统包括如权利要求 3 所述的引物。
- 5.如权利要求 1 所述的长链非编码 RNA lncLOX5-1 的用途, 其特征在于, 所述 lncLOX5-1 的检测试剂用于制备前列腺癌早期诊断和预后判断的前列腺癌体外诊断产品。
- 6.如权利要求 5 所述的用途, 其特征在于, 所述前列腺癌体外诊断产品包括试剂盒、基因芯片、固体支持体。
- 7.一种 lncRNA 芯片, 其特征在于, 所述的 lncRNA 芯片包括:  
固相载体; 以及有序固定在所述固相载体上的寡核苷酸探针, 所述的寡核苷酸探针特异性地对应于如权利要求 1 所述的 lncLOX5-1 的部分或全部序列。
- 8.一种试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒中含有如权利要求 1 所述的 lncLOX5-1 的检测试剂。
- 9.如权利要求 1 所述的长链非编码 RNA lncLOX5-1 的检测试剂在预测前列腺癌患者肿瘤恶性程度中的应用。
- 10.如权利要求 1 所述的长链非编码 RNA lncLOX5-1 的检测试剂在预测前列腺癌患者肿瘤是否进展转移中的应用。
- 11.如权利要求 1 所述的长链非编码 RNA lncLOX5-1 的检测试剂在对拟行前列腺穿刺患者的阳性率预测中的应用。
- 12.一种基于 lncLOX5-1 构建的 lncLOX5-1 临床诊断模型 Model-lncLOX5-1, 其特征在于, 所述模型的构建过程为, 将年龄、PSA、%fPSA、前列腺体积、如权利要求 1 所述的 lncLOX5-1 表达量进行单因素 logistic 回归分析, 确定能作为预测前列腺穿刺结果的独立危险因素; 根据单因素 logistic 回归分析确定的独立危险因素, 将其纳入多因素 logistic 回归分析中, 构建所述基于 lncLOX5-1 构建的 lncLOX5-1 临床诊断模型 Model-lncLOX5-1。
- 13.一种如权利要求 12 所述的基于 lncLOX5-1 构建的 lncLOX5-1 临床诊断模型 Model-lncLOX5-1 的应用, 其特征在于, 所述 Model-lncLOX5-1 用于预测前列腺穿刺的阳性率。

14.一种对前列腺癌进行早期诊断的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

- a) 检测 PSA 异常患者行前列腺按摩后尿渣中 lncLOX5-1 的表达量；
- b) 通过 a) 中测定的 lncLOX5-1 的表达量，采用受试者工作曲线（ROC）分析 lncLOX5-1 表达量的曲线下面积（AUC），选择敏感性和特异性最大的点作为临界点，将患者分为高表达组和低表达组，若 lncLOX5-1 表达量小于临界点，提示其前列腺穿刺阳性概率较低；若 lncLOX5-1 表达量大于等于临界点，提示其前列腺穿刺阳性概率较高；

或，通过 a) 中测定的 lncLOX5-1 的表达量，采用受试者工作曲线（ROC）分析 lncLOX5-1 表达量的曲线下面积（AUC），选择敏感性和特异性最大的点作为临界点，联合患者年龄、PSA、%fPSA 和前列腺体积具体数值，应用基于 lncLOX5-1 临床诊断模型绘制的列线图计算患者单个风险因素的风险评分，相加得到患者的累积风险评分，对应得出患者的穿刺阳性概率。

15.一种对前列腺癌进行预后判断的方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：

- a) 检测前列腺癌患者病理样本中如权利要求 1 所述的 lncLOX5-1 的表达量；
- b) 通过 a) 中测定的表达量，将前列腺癌患者分为低表达组和高表达组，若病理样本中 lncLOX5-1 表达量高于前列腺癌患者人群 lncLOX5-1 的均值，则为高表达组，预示肿瘤恶化、侵袭性较高，易发生局部进展或转移，生存预后水平较差；否则为低表达组。

16.一种如权利要求 1 所述的 lncLOX5-1 的抑制剂在抑制前列腺癌中的应用，其特征在于，所述抑制剂用于抑制前列腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移。



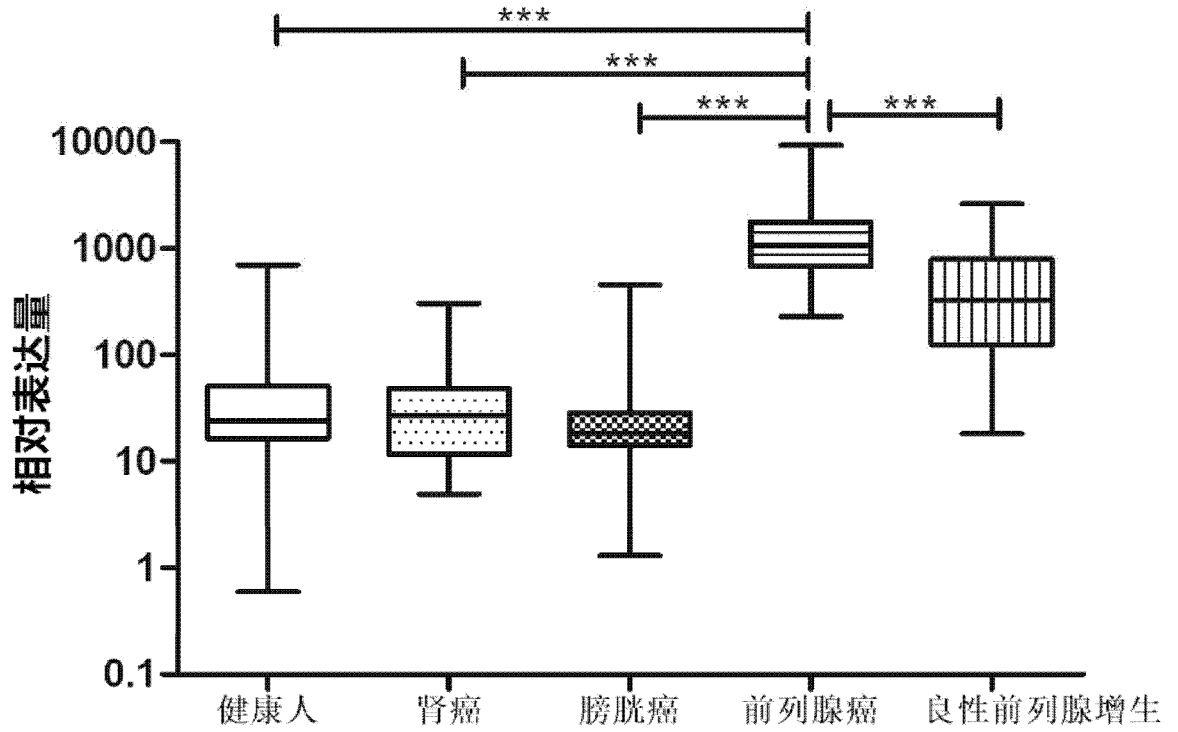


图 1

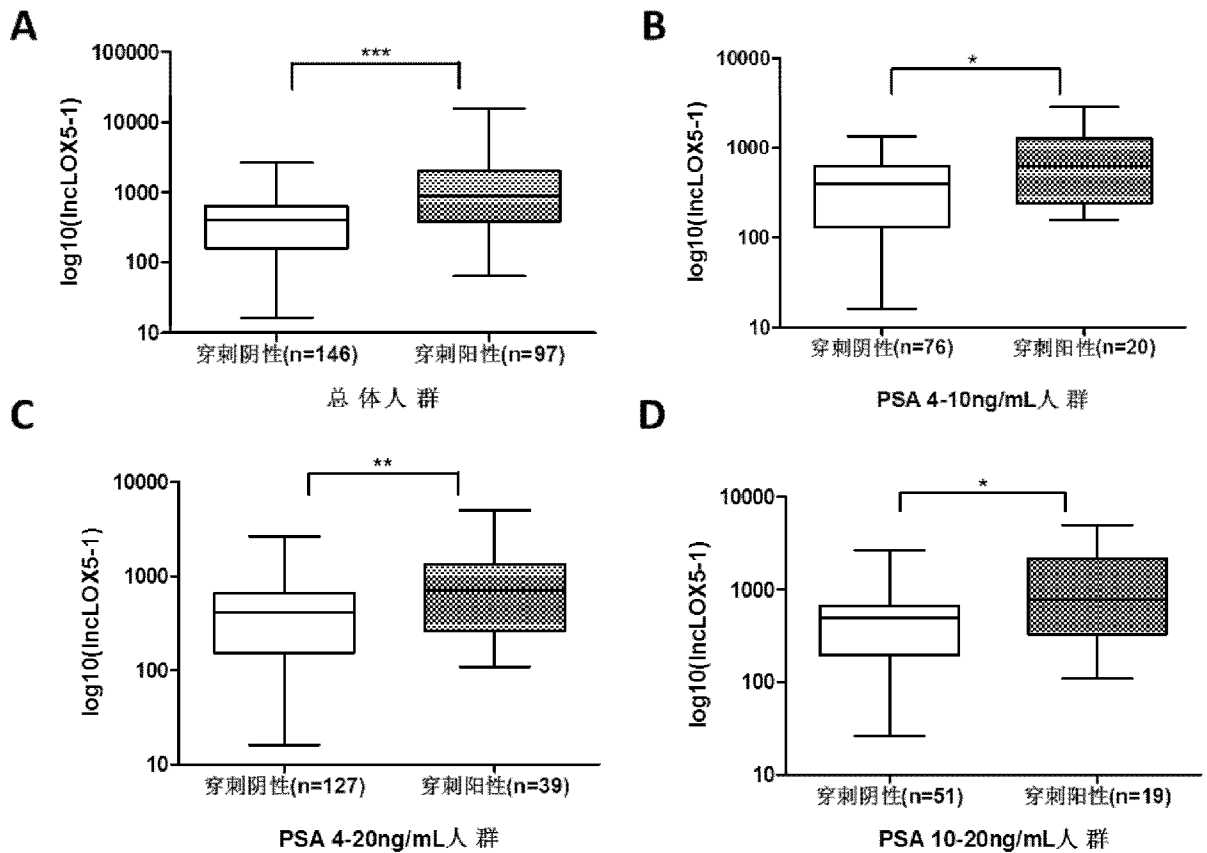


图 2

替换页 (细则第26条)

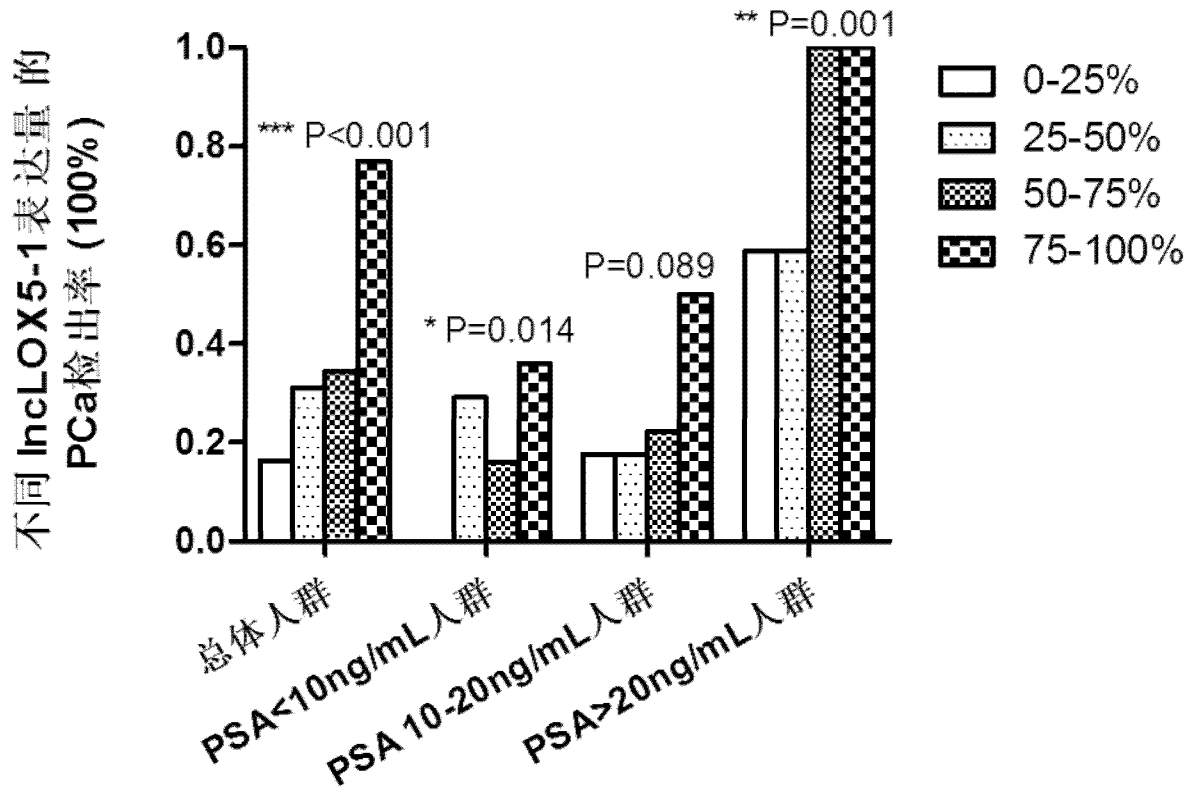
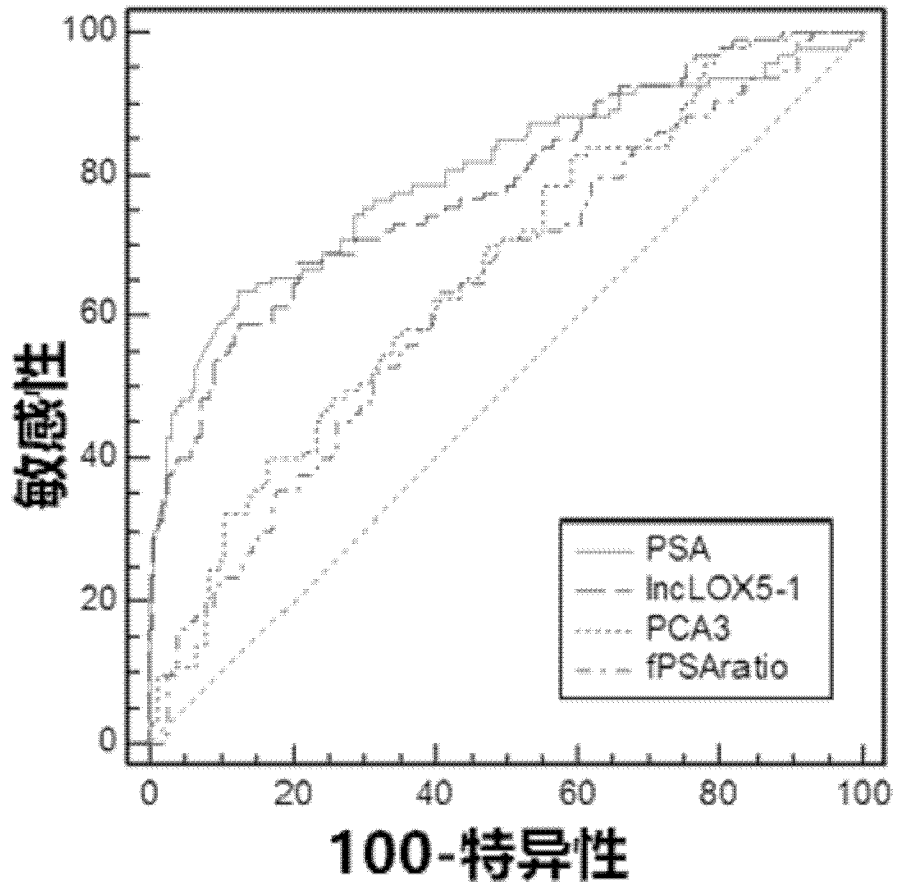
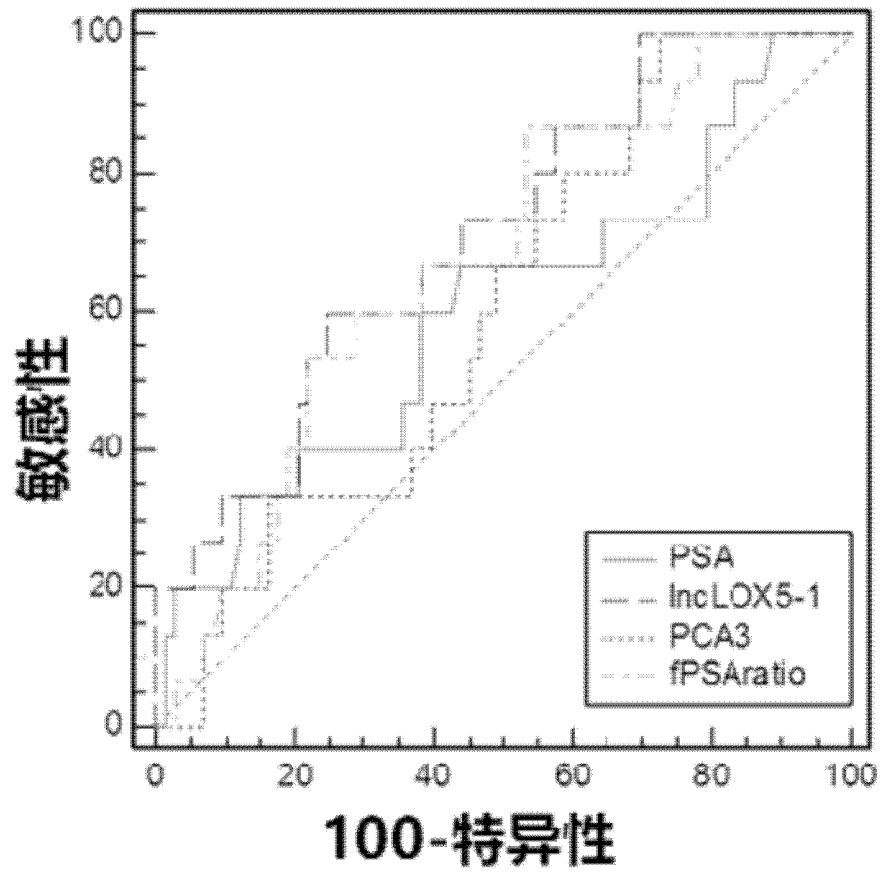


图 3

# A 总体人群



## B PSA 4-10 ng/mL人群



### C PSA 4-20 ng/mL人群

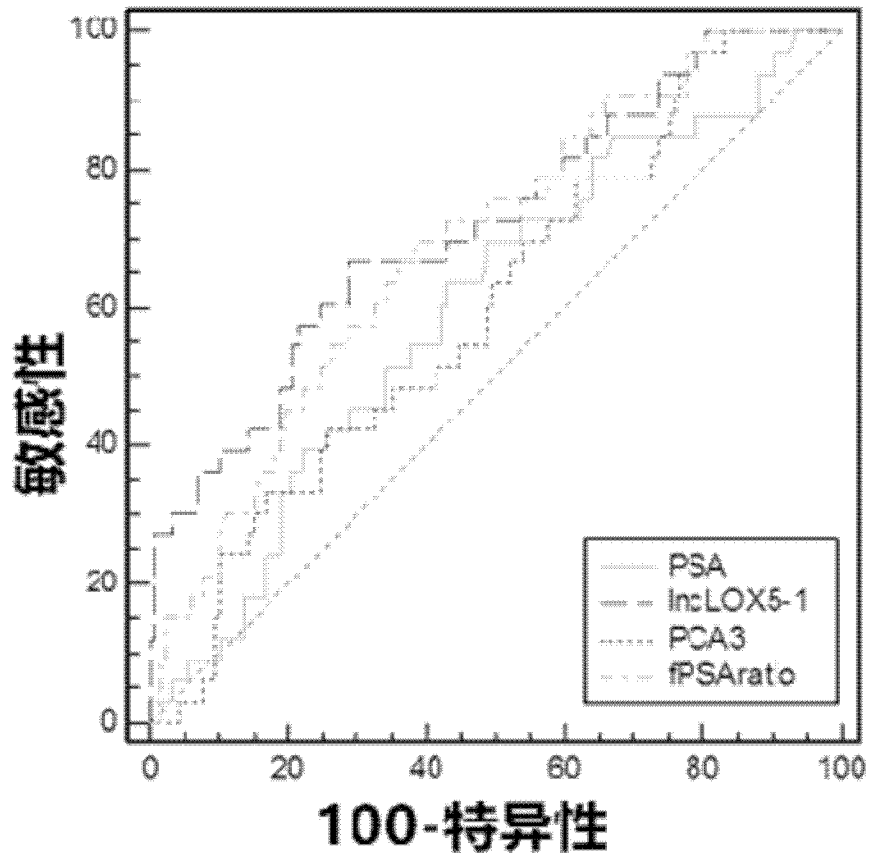
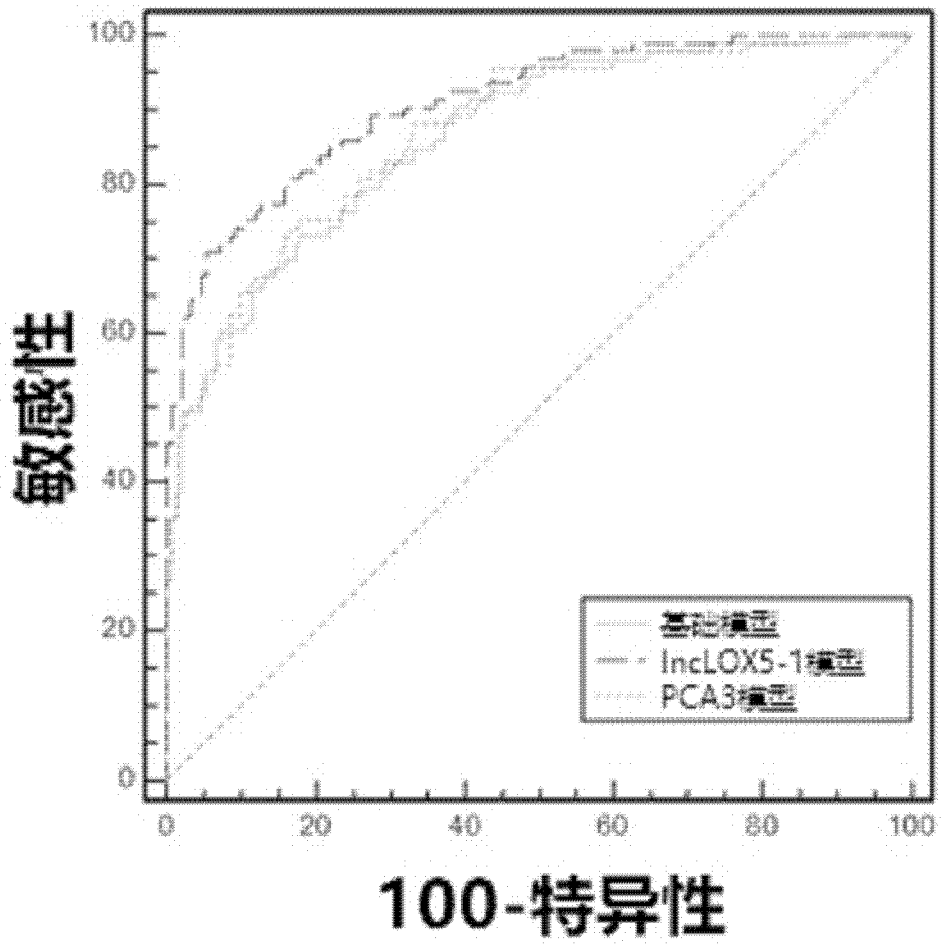
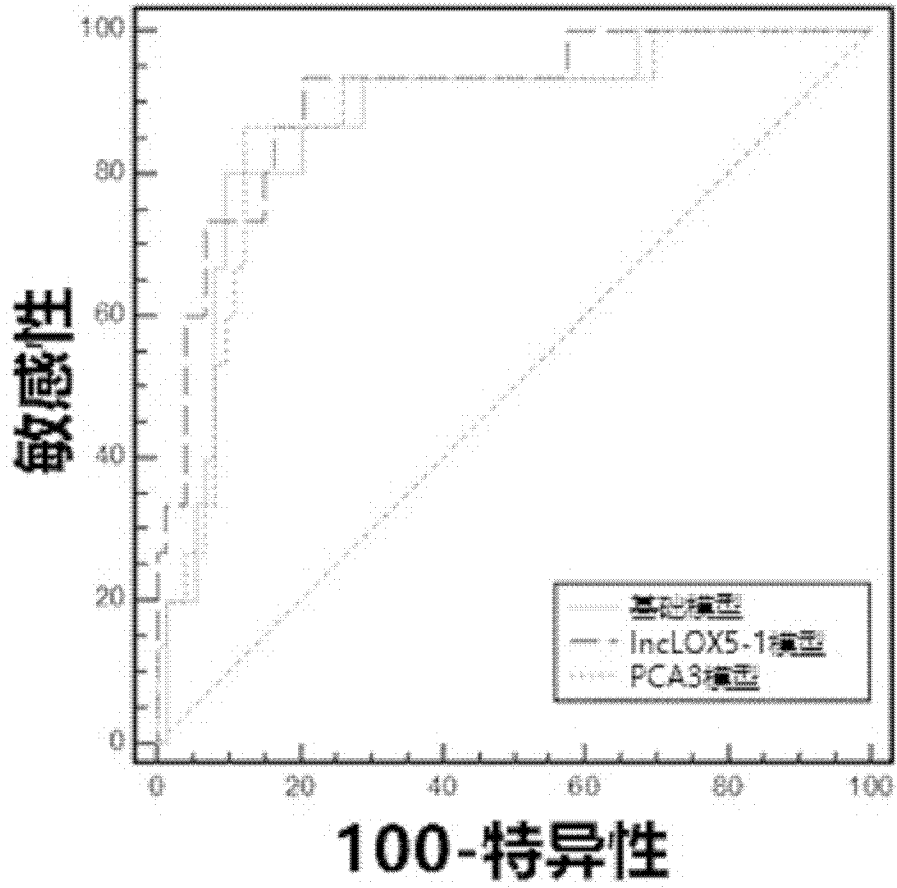


图 4

# A 总体人群



## B PSA 4-10 ng/mL人群



替换页 (细则第26条)

### C PSA 4-20 ng/mL人群

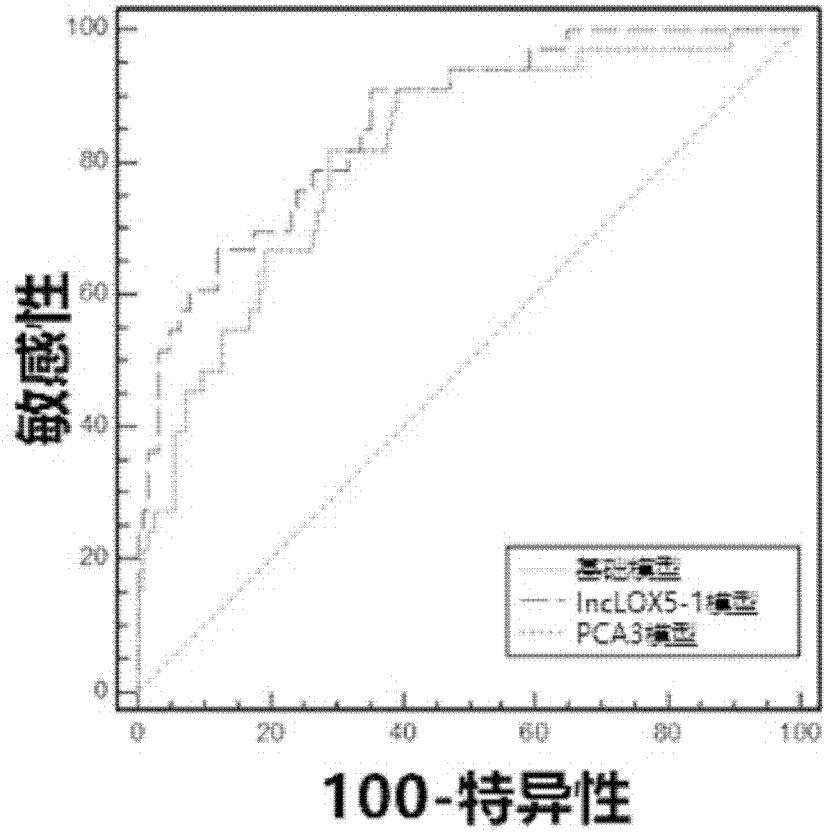


图 5



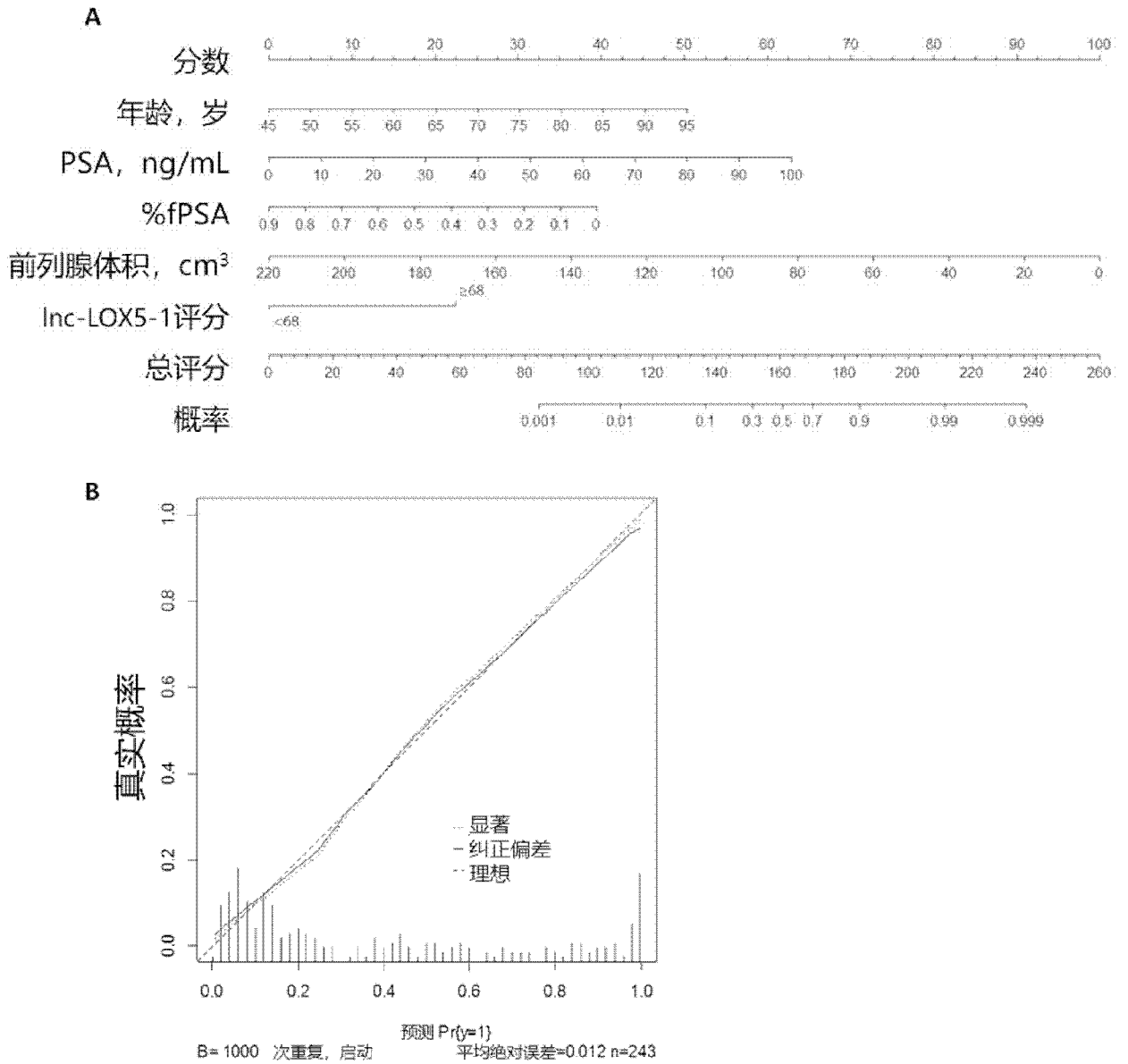


图 6

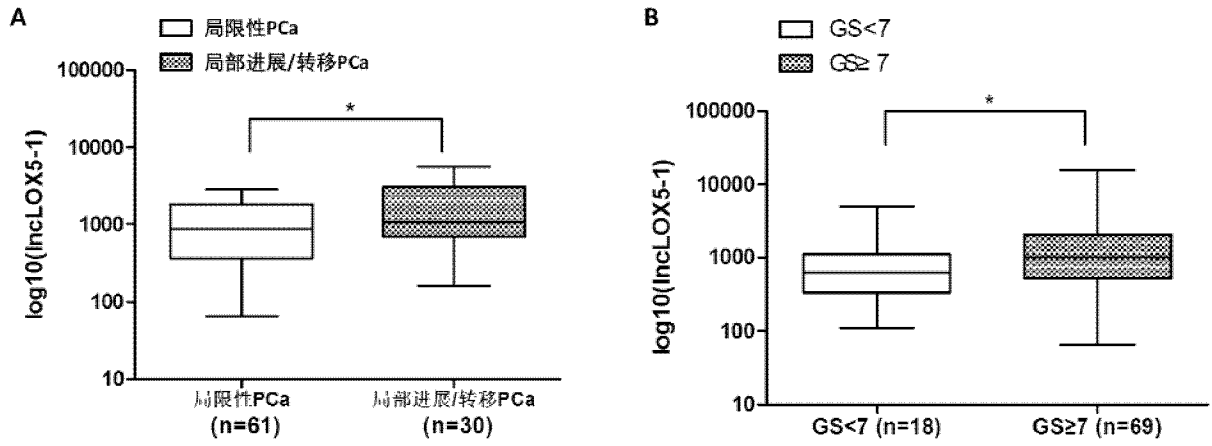


图 7

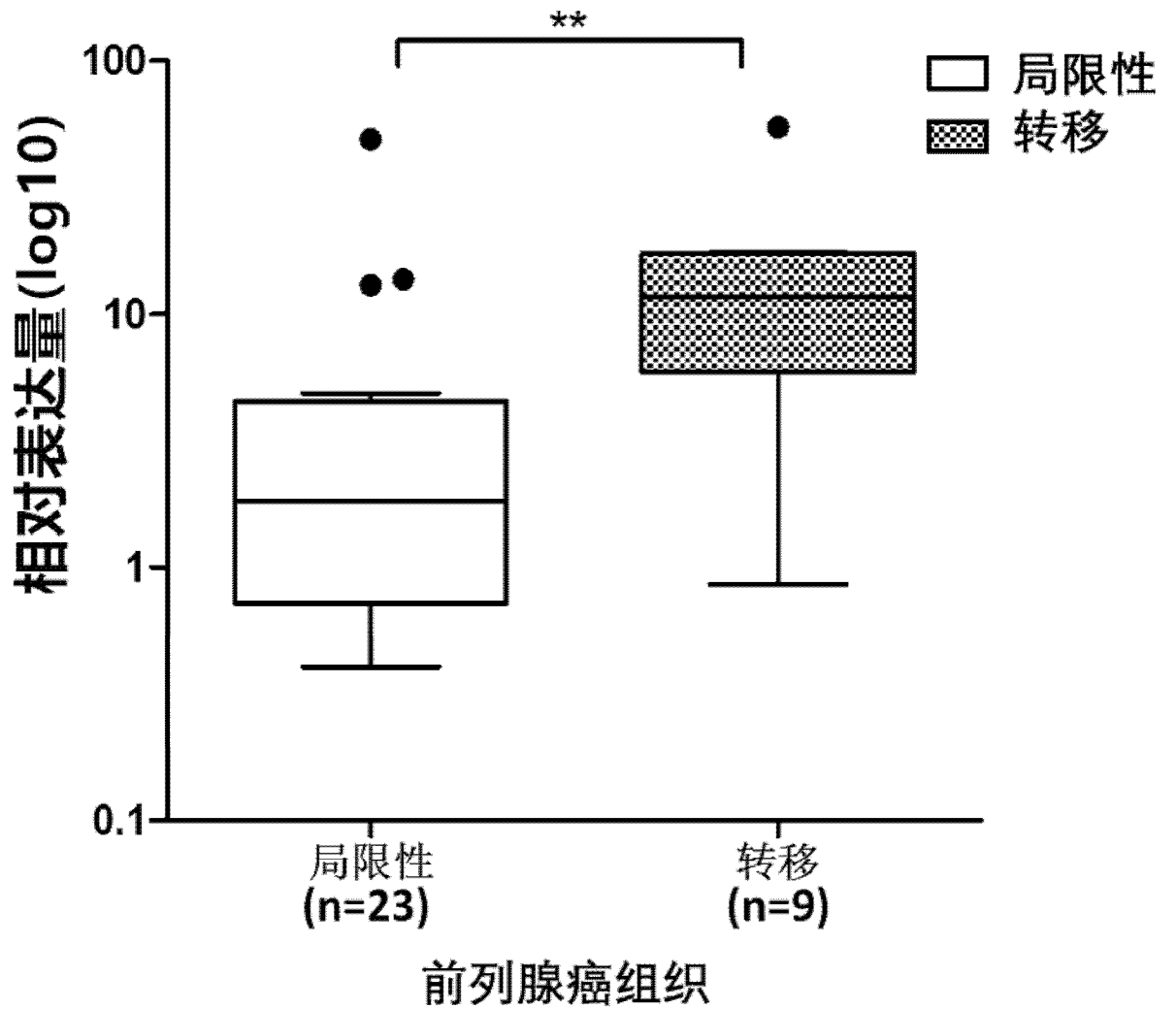


图 8

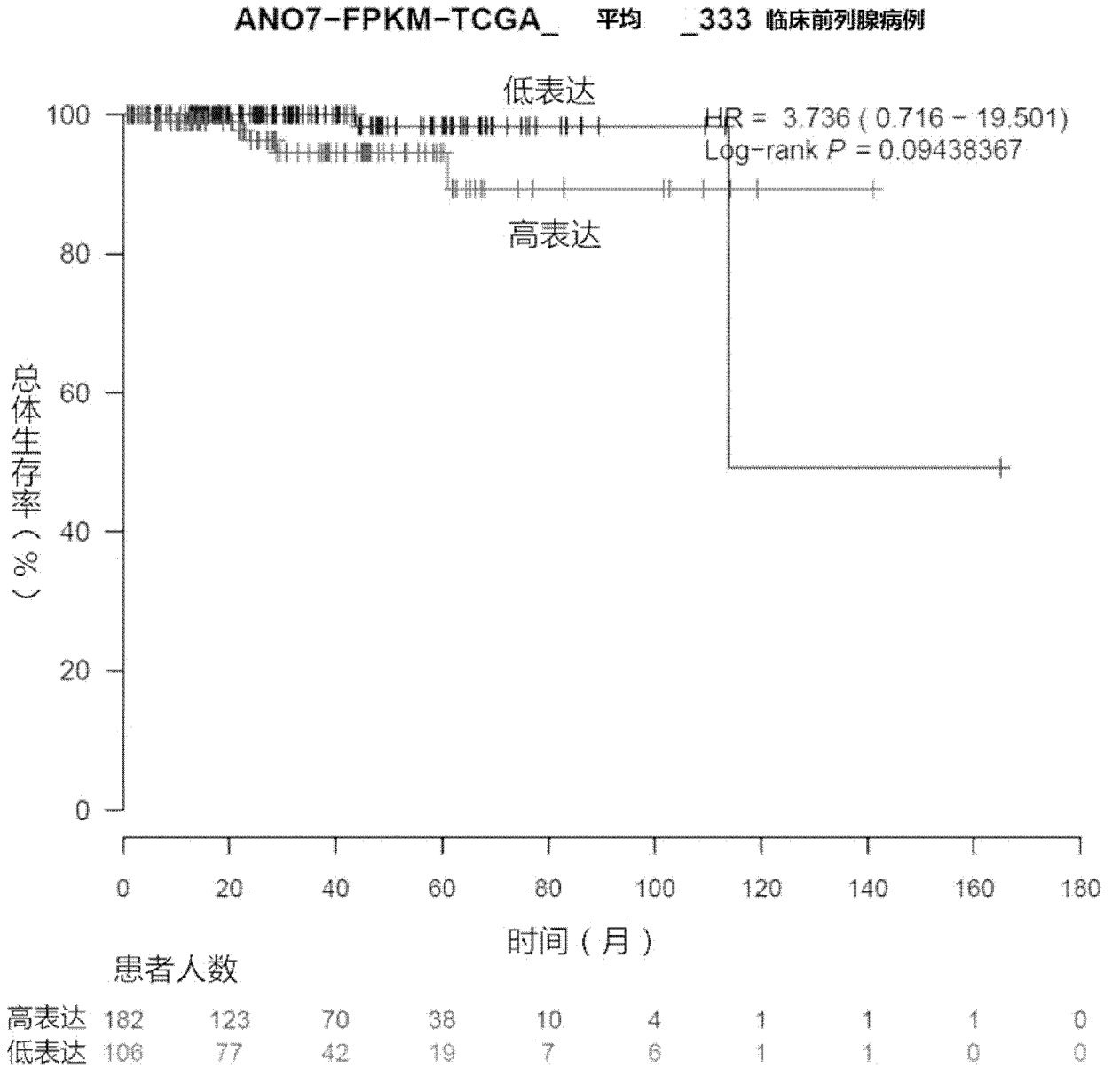


图 9

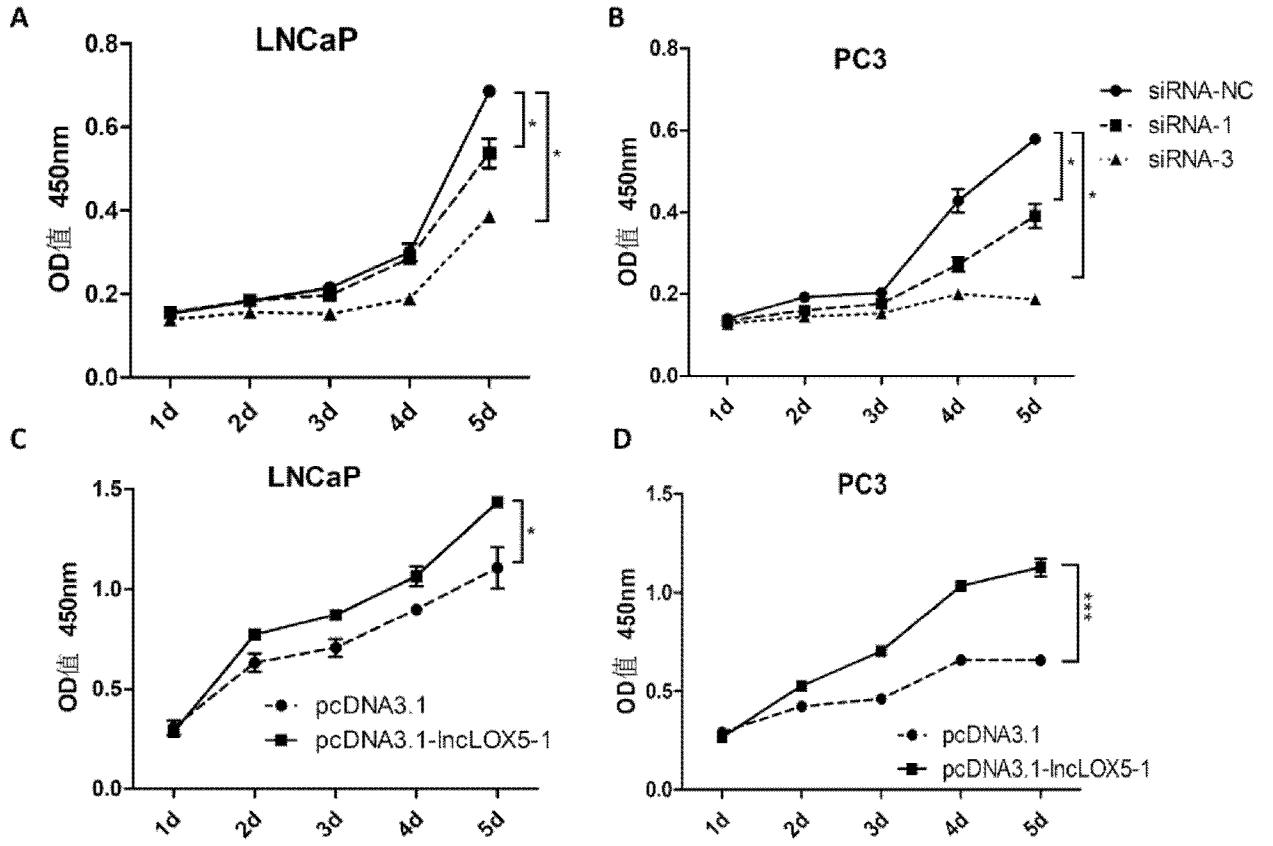


图 10

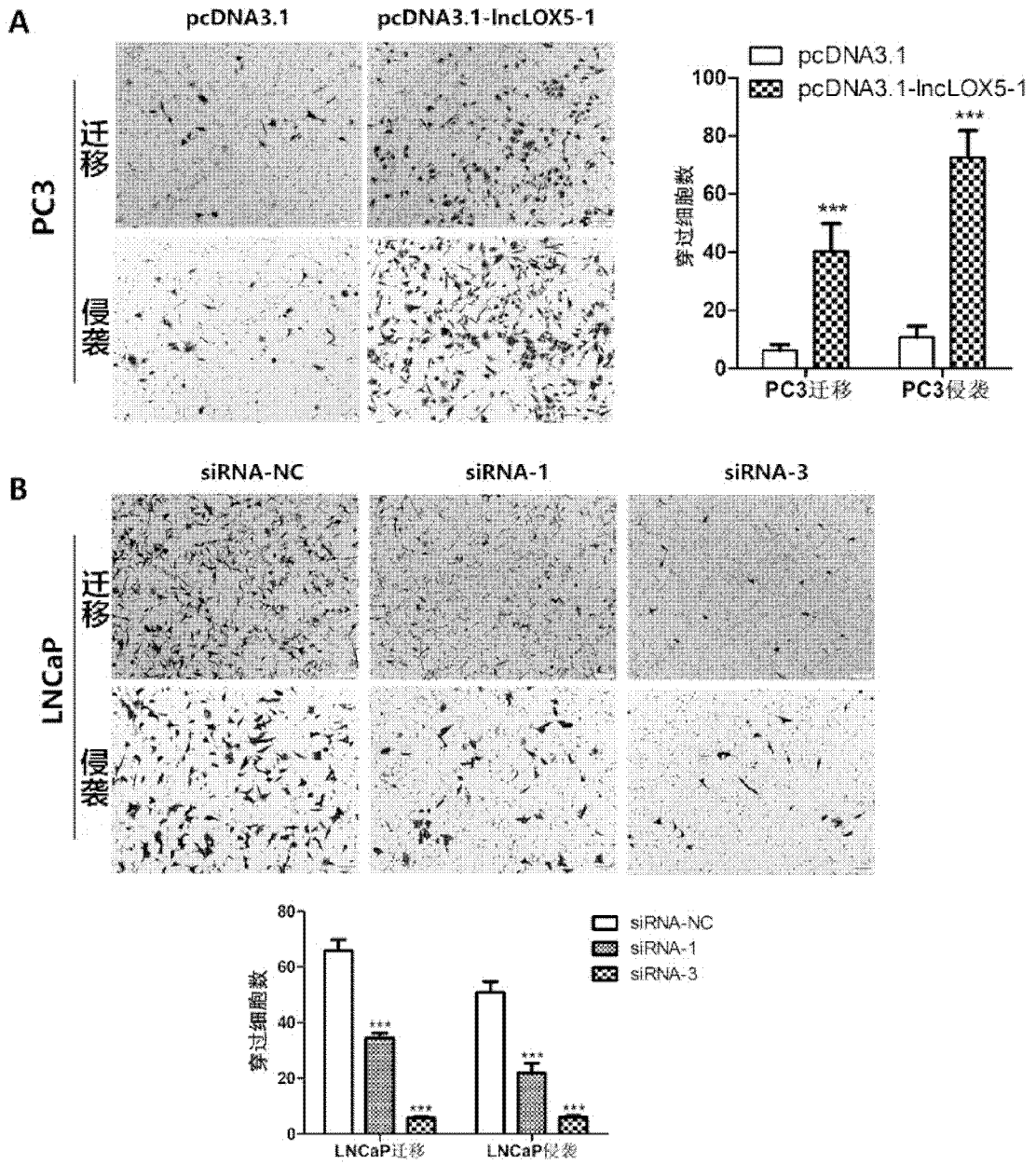


图 11

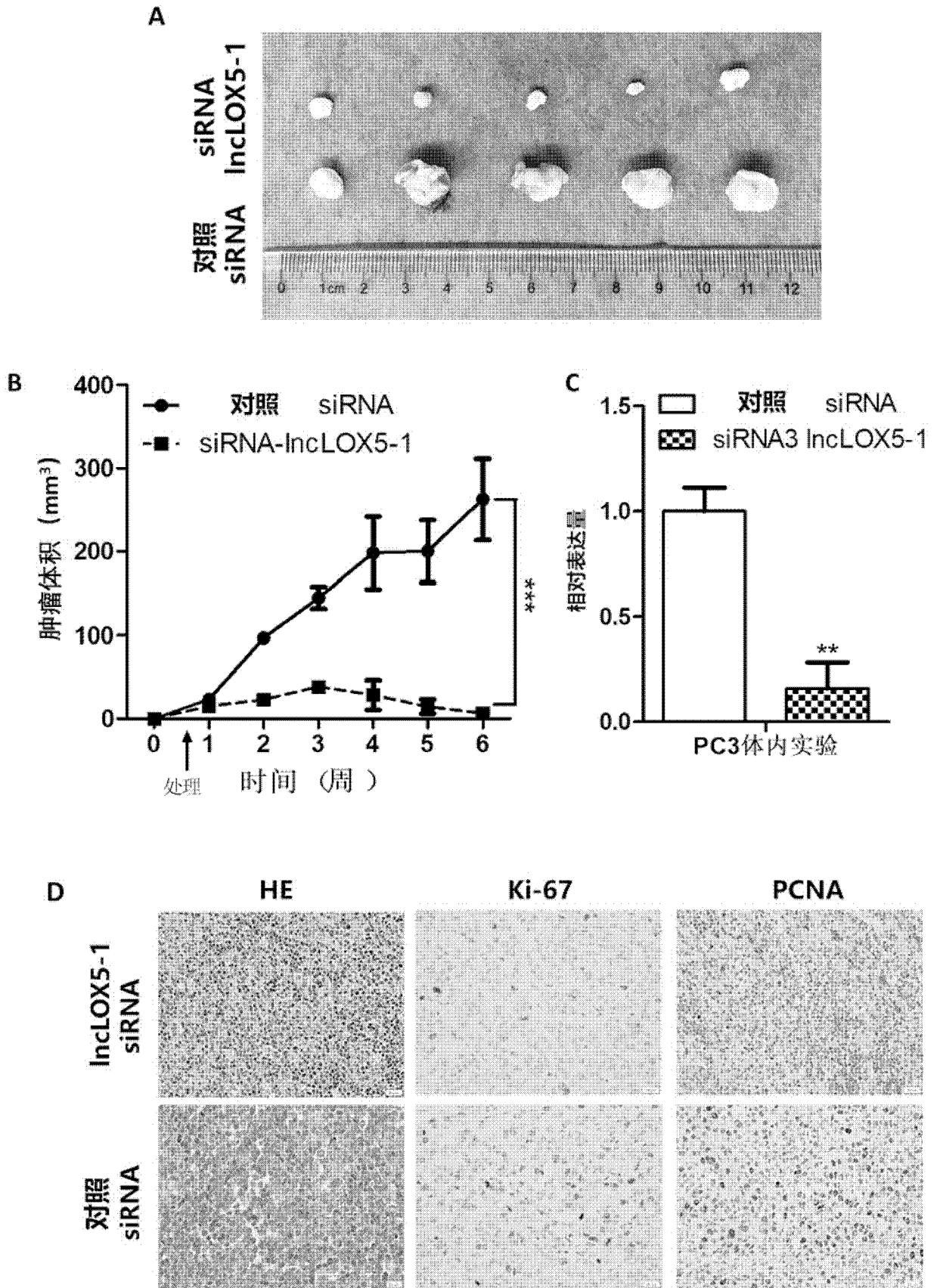


图 12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/088809

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; C12N 15/113(2010.01)i

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

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12Q

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

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

CNABS, TWABS, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE; 前列腺癌, 非编码 RNA, 标志物, lncLOX5-1, Prostate cancer, prostatic cancer, non-coding RNA, long non-coding RNA, lncRNA, marker; GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统, GENBANK+EMBL+NATIONAL BIOSEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT: search for the sequence of SEQ ID NO.1.

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106967719 A (CHANGHAI HOSPITAL) 21 July 2017 (2017-07-21) see claims 1-15	1-15
A	CN 104498495 A (CHANGHAI HOSPITAL) 08 April 2015 (2015-04-08) see entire document	1-15
A	CN 105154448 A (FUDAN UNIVERSITY ET AL.) 16 December 2015 (2015-12-16) see entire document	1-15
A	CN 106148561 A (BEIJING ZHICHENG BIOMEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 23 November 2016 (2016-11-23) see entire document	1-15
A	CN 105316341 A (ZHEJIANG SCI-TECH UNIVERSITY) 10 February 2016 (2016-02-10) see entire document	1-15
A	WO 2014077354 A1 (UNIV TOKYO ET AL.) 22 May 2014 (2014-05-22) see entire document	1-15
A	CN 103797120 A (CHANGHAI HOSPITAL ET AL.) 14 May 2014 (2014-05-14) see entire document	1-15

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

\* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 2018

Date of mailing of the international search report

03 September 2018

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
100088  
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2018/088809**

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 9410206 B2 (HOON, D.S.B. ET AL.) 09 August 2016 (2016-08-09) see entire document	1-15
<hr/>		



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/088809

**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/088809

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

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

1.  Claims Nos.: **16**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
[1] a method of treatment of the living human or animal body, which does not warrant a search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(vi).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2018/088809**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106967719	A	21 July 2017	None			
CN	104498495	A	08 April 2015	None			
CN	105154448	A	16 December 2015	None			
CN	106148561	A	23 November 2016	None			
CN	105316341	A	10 February 2016	CN	105316341	B	06 July 2018
WO	2014077354	A1	22 May 2014	JP	WO2014077354	A1	05 January 2017
				US	2015329858	A1	19 November 2015
CN	103797120	A	14 May 2014	WO	2013037118	A1	21 March 2013
				CN	103797120	B	12 April 2017
US	9410206	B2	09 August 2016	US	2013178428	A1	11 July 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/088809

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i; C12N 15/113(2010.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																										
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N, C12Q</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, TWABS, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE; 前列腺癌, 非编码RNA, 标志物, lncLOX5-1, Prostate cancer, prostatic cancer, non-coding RNA, long non-coding RNA, lncRNA, marker; GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统:对SEQ ID NO.1的序列检索。</p>																										
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 106967719 A (上海长海医院) 2017年 7月 21日 (2017 - 07 - 21) 参见权利要求1-15</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104498495 A (上海长海医院) 2015年 4月 8日 (2015 - 04 - 08) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105154448 A (复旦大学等) 2015年 12月 16日 (2015 - 12 - 16) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106148561 A (北京致成生物医学科技有限公司) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105316341 A (浙江理工大学) 2016年 2月 10日 (2016 - 02 - 10) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014077354 A1 (UNIV TOKYO等) 2014年 5月 22日 (2014 - 05 - 22) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103797120 A (上海长海医院等) 2014年 5月 14日 (2014 - 05 - 14) 参见全文</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。      <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:          “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件          “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利          “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)          “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件          “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件          “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件          “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性          “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性          “&amp;” 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 106967719 A (上海长海医院) 2017年 7月 21日 (2017 - 07 - 21) 参见权利要求1-15	1-15	A	CN 104498495 A (上海长海医院) 2015年 4月 8日 (2015 - 04 - 08) 参见全文	1-15	A	CN 105154448 A (复旦大学等) 2015年 12月 16日 (2015 - 12 - 16) 参见全文	1-15	A	CN 106148561 A (北京致成生物医学科技有限公司) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 参见全文	1-15	A	CN 105316341 A (浙江理工大学) 2016年 2月 10日 (2016 - 02 - 10) 参见全文	1-15	A	WO 2014077354 A1 (UNIV TOKYO等) 2014年 5月 22日 (2014 - 05 - 22) 参见全文	1-15	A	CN 103797120 A (上海长海医院等) 2014年 5月 14日 (2014 - 05 - 14) 参见全文	1-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																								
PX	CN 106967719 A (上海长海医院) 2017年 7月 21日 (2017 - 07 - 21) 参见权利要求1-15	1-15																								
A	CN 104498495 A (上海长海医院) 2015年 4月 8日 (2015 - 04 - 08) 参见全文	1-15																								
A	CN 105154448 A (复旦大学等) 2015年 12月 16日 (2015 - 12 - 16) 参见全文	1-15																								
A	CN 106148561 A (北京致成生物医学科技有限公司) 2016年 11月 23日 (2016 - 11 - 23) 参见全文	1-15																								
A	CN 105316341 A (浙江理工大学) 2016年 2月 10日 (2016 - 02 - 10) 参见全文	1-15																								
A	WO 2014077354 A1 (UNIV TOKYO等) 2014年 5月 22日 (2014 - 05 - 22) 参见全文	1-15																								
A	CN 103797120 A (上海长海医院等) 2014年 5月 14日 (2014 - 05 - 14) 参见全文	1-15																								
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																									
2018年 8月 14日	2018年 9月 3日																									
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																									
中华人民共和国国家知识产权局 (ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	邢云龙																									
传真号 (86-10)62019451	电话号码 62411094																									

C. 相关文件		
类型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	US 9410206 B2 (HOON DAVE S B等) 2016年 8月 9日 (2016 - 08 - 09) 参见全文	1-15

## 第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

- a.  作为国际申请的一部分提交的:  
 附件C/ST. 25文本文件形式  
 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:  
 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))  
 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 16  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 对有生命的人体或动物体的治疗方法，属于PCT实施细则第39.1(iv)规定的无须检索的情况。  
。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/088809

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106967719	A	2017年 7月 21日	无			
CN	104498495	A	2015年 4月 8日	无			
CN	105154448	A	2015年 12月 16日	无			
CN	106148561	A	2016年 11月 23日	无			
CN	105316341	A	2016年 2月 10日	CN	105316341	B	2018年 7月 6日
WO	2014077354	A1	2014年 5月 22日	JP	W02014077354	A1	2017年 1月 5日
				US	2015329858	A1	2015年 11月 19日
CN	103797120	A	2014年 5月 14日	WO	2013037118	A1	2013年 3月 21日
				CN	103797120	B	2017年 4月 12日
US	9410206	B2	2016年 8月 9日	US	2013178428	A1	2013年 7月 11日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)