

说明书

肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物、诊断试剂及试剂盒

技术领域

本发明涉及分子诊断技术领域，特别涉及一种肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物、诊断试剂及试剂盒。

背景技术

肾细胞癌（renal cell carcinoma, RCC，简称肾癌）是起源于肾小管上皮的恶性肿瘤，占肾脏恶性肿瘤的 80~90%。肾癌发病率仅次于前列腺癌及膀胱癌，占泌尿系统肿瘤第三位。肾癌的组织病理类型最常见的为透明细胞癌，占有 RCC 的 75~80%，每年全球约 90000 死亡病例。在过去的几十年里，RCC 的发病率逐渐增加。尽管 RCC 的死亡率在高水平维持，但是在没有发生转移之前，它是一种可补救的疾病。临床上，已经表明 RCC 通常对化疗和放射治疗具有抗性，并且肿瘤切除仍然是唯一明确的治疗方法。在治愈性肾切除术后，近 55% 的 RCC 患者存活。然而，由于缺乏早期症状，通过成像或穿刺活检，患早期症状和良性和恶性肿块之间的不能正确区别，检测早期阶段的癌细胞很具有挑战性，因此，需要开发针对早期 RCC 检测的创新的非侵入性方法。

最近，许多分子标记如碳酸酐酶 IX（carbonic anhydrase IX, CAIX），血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor, VEGF），缺氧诱导因子（hypoxia-inducible factor, HIF），KI67, P53, P21, PTEN（phosphatase and tensin homolog, 磷酸酶和疏素同源物），E-Cadherin, 骨桥蛋白和 CD44, CXCR4 和其他细胞周期和增殖标记物。这些潜在的 RCC 生物标志物都没有明显提高当前预后系统的预测准确性，多数没有经过大规模的验证，并且在常规临床实践中没有建议使用上述的标志物。到目前为止，没有鉴定出高效的针对 RCC 的早期诊断生物标志物，导致疾病的晚期检测和治疗效果差。因此，鉴定可改善 RCC 患者早期诊断和预后的 RCC 生物标志物是癌症治疗的重要焦点。

miRNA 是长度为 18-25 个核苷酸的短非编码 RNA，可以通过特定目标 mRNA 的分解或通过抑制其翻译来阻止蛋白质表达，参与调控个体发育、细胞凋亡、增殖及分化等生命活动，在肿瘤的发生和发展过程中发挥着类似于致癌基因或抑癌基因的功能。miRNA 的表达谱具有明显的组织特异性，在不同肿瘤中具有特定的表达模式。这些特点都使得 miRNA 有可能成为肿瘤诊断新的生物学标记和治疗靶标。

虽然许多研究已经评估了 RCC 患者组织和血清中的 miRNA 表达，但是能用于肾癌筛查的尿液 miRNA 生物标志物以及生物标志物组合标志物还未见定论，例如：

专利 US10457994B2 公开了一种可预测透明细胞肾细胞癌转移和预后的 miRNA 标志物组合，为 miR-10b、miR-139-5p、miR-130b 和 miR-199b-5p；其中 miR-199b-5p 和 miR-130b 在转移性肾癌中过表达，miR-10b 和 miR-139-5p 在转移性肾癌中下调。

文献 microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma（Hirofumi Yoshino, et. Oncotarget, 2017,8(13):20881-20894.）公开了在透明细胞肾细胞癌中起上调作用的 5 种 miRNA 标志物，为：miR-885-5p、miR-1274、miR-210-3p、miR-224 和 miR-1290。

综上所述，鉴于现有技术尚未有明确的定论选择何种单一的 miRNA 标志物或 miRNA 标

说明书

志物组合来准确、有效的预测或诊断肾细胞癌，且 miRNA 标志物的样品收集途径来源于尿液，还是血浆，抑或是组织，方法不一，也无定论；故本领域技术人员急需开发出适合于肾癌诊断用、且具有较高的人群特异性的尿液 miRNA 标志物组合。

发明内容

本发明的要解决的技术问题在于提供一种肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物、诊断试剂及试剂盒，相对国际上报道的其它 miRNA 标志物，具备有更高的人群特异性；所公开的 miRNA 诊断标志物及其组合为首次提出，相较于其他 miRNA 分子标志物更可靠，为肾癌诊断提供了一种全新的可选途径。

为解决上述技术问题，本发明提供的技术方案具体如下：

本发明提供了一种肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物，选自如下 8 个 miRNA 中的任意一个或多个：hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p。

在一些实施方案中，所述的尿液 miRNA 标志物可以选自如下 7 个 miRNA 中的任意一个或多个：hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p。

在一些实施方案中，所述的尿液 miRNA 标志物可以选自如下 7 个 miRNA 中的任意一个或多个：hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306。

在一些实施方案中，所述的尿液 miRNA 标志物可以选自如下 6 个 miRNA 中的任意一个或多个：hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。

本发明中，上述选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p 这 6 个 miRNA 中的至少 2 个，所构成的尿液 miRNA 标志物，其 AUC 值高于单个 miRNA（如 hsa-miR-518e-5p 或 hsa-miR-1-3p）的，包括但不限于如下组合，均可作为优选的实施方案：

1) 优选的，尿液 miRNA 标志物可以选自如下 5 个 miRNA 中的至少 2 个：

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。

2) 优选的，尿液 miRNA 标志物可以选自如下 4 个 miRNA 中的至少 2 个：

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p。

说明书

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。

3) 优选的, 尿液 miRNA 标志物可以选自如下 3 个 miRNA 中的至少 2 个:

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-153-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。

4) 优选的, 尿液 miRNA 标志物可以选自如下 2 个 miRNA:

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-21-3p。
hsa-miR-671-3p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-331-5p。
hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-885-5p。
hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p。

说明书

hsa-miR-153-3p、hsa-miR-331-5p。

hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。

hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p。

5) 优选的, 尿液 miRNA 标志物可以选自如下 1 个 miRNA:

hsa-miR-1-3p (AUC=0.567);

hsa-miR-518e-5p (AUC=0.572)。

在一些优选的实施方案中, 本发明还提供了含有特定 miRNA 的尿液 miRNA 标志物, 其特点在于:

当尿液 miRNA 标志物可以选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 这 8 个 miRNA 中的至少 2 个时, 或

当尿液 miRNA 标志物可以选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306 这 7 个 miRNA 中的至少 2 个时, 或

当尿液 miRNA 标志物可以选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p 这 7 个 miRNA 中的至少 2 个时, 或

当尿液 miRNA 标志物可以选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p 这 6 个 miRNA 中的至少 2 个时,

其中有 1 个 miRNA 必须是 hsa-miR-518e-5p。

在一些优选的实施方案中, 本发明还提供了含有特定 miRNA 的尿液 miRNA 标志物, 其特点在于:

当尿液 miRNA 标志物可以选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 这 8 个 miRNA 中的至少 2 个时, 或

当尿液 miRNA 标志物可以选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p 这 7 个 miRNA 中的至少 2 个时, 或

其中有 1 个 miRNA 必须是 hsa-miR-1-3p。

本发明中, 上述选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 这 8 个 miRNA 中的至少 2 个, 且含有特定 miRNA (如 hsa-miR-518e-5p 或 hsa-miR-1-3p), 所构成的尿液 miRNA 标志物, 其 AUC 值不低于 0.681 的, 包括但不限于如下的组合, 均可作为优选的实施方案:

1) 优选的, 尿液 miRNA 标志物可以选自如下 8 个 miRNA 中的至少 2 个:

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p。

2) 优选的, 尿液 miRNA 标志物可以选自如下 7 个 miRNA 中的至少 2 个:

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306;

说明书

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p;

3) 优选的, 尿液 miRNA 标志物可以选自如下 6 个 miRNA 中的至少 2 个:

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306;

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p;

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306;

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p;

4) 优选的, 尿液 miRNA 标志物可以选自如下 5 个 miRNA 中的至少 2 个:

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p;

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p;

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306;

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p;

说明书

5) 优选的, 尿液 miRNA 标志物可以选自如下 4 个 miRNA 中的至少 2 个:

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p;

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p;

6) 优选的, 尿液 miRNA 标志物可以选自如下 3 个 miRNA 中的至少 2 个:

hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p;

以下几种由 3~8 个 miRNA 组成、AUC 值 ≥ 0.681 的尿液 miRNA 标志物, 其共性特点在于, 均至少包括 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p:

在一些优选的实施方案中, 所述的尿液 miRNA 标志物可以由如下 8 个 miRNA 组成:

hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p。

在一些优选的实施方案中, 所述的尿液 miRNA 标志物可以由如下 7 个 miRNA 组成: hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306。

在一些优选的实施方案中, 所述的尿液 miRNA 标志物可以由如下 7 个 miRNA 组成: hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p。

在一些优选的实施方案中, 所述的尿液 miRNA 标志物可以由如下 6 个 miRNA 组成: hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。

在一些更优选的实施方案中, 所述的尿液 miRNA 标志物可以由如下 6 个 miRNA 组成: hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。

在一些更优选的实施方案中, 所述的尿液 miRNA 标志物可以由如下 4 个 miRNA 组成: hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p。

在一些更优选的实施方案中, 所述的尿液 miRNA 标志物可以由如下 4 个 miRNA 组成: hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。

在一些更优选的实施方案中, 所述的尿液 miRNA 标志物可以由如下 3 个 miRNA 组成: hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p。

此外, 本发明还提供了一种肾癌诊断试剂, 包括特异性检测如前所述的一个或多个尿液 miRNA 标志物的试剂。

此外, 本发明还提供了一种肾癌诊断用试剂盒, 包括以如前所述的一个或多个尿液 miRNA 标志物作为标准品, 以及检测如前所述的各种尿液 miRNA 标志物的相应引物。

此外, 本发明还提供了一种如前所述的各种尿液 miRNA 标志物的应用, 主要用于制备早期诊断和/或复发监测的产品。

所述产品包括但不限于装置 (如寡核苷酸探针或其集成、芯片基片或检测基板上的高通量 miRNA 检测芯片、以及微流控检测芯片)、试剂盒和设备。

说明书

在一些优选的实施方案中，所制备的用于早期诊断和/或复发监测的产品，包括如下一种或几种的功能：

- 1) 鉴定或辅助鉴定肾癌；
- 2) 诊断或辅助诊断初发肾癌；
- 3) 诊断或辅助诊断复发肾癌。

此外，本发明还提供了一种采用如前所述的一个或多个尿液 miRNA 标志物来早期诊断和/或复发监测肾癌的方法，包括如下步骤：

步骤 1，检测从受试者获得的尿液样品中 miRNA 的存在；

步骤 2，测量尿液样品中 miRNA 标志物中的至少 1 种 miRNA 的表达水平；

步骤 3，使用基于先前所测量的 miRNA 表达水平的分数与参照比较，通过比较受试者样本与参照样本是否存在显著性差异，来早期诊断和/或复发监测受试者患有肾癌的可能性。

本文还提供了一种确定受试者是否患有肾癌或确定受试者患肾癌的风险的方法，所述方法包括检测从所述受试者获得的尿液样品中的至少一种 miRNA 的表达水平，

其中至少一种 miRNA 选自 hsa-miR-671-3p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-153-3p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-4306, hsa-miR-1-3p; 和其中与对照相比，miRNA 的差异表达水平指示受试者患有肾癌或有患肾癌的风险。

在一些实施方案中，如所述的方法，所述的至少一种 miRNA 包括如前所述的尿液 miRNA 标志物的组合。

在一些实施方案中，其中与对照相比，miRNA 的表达水平在患有肾癌或有患肾癌风险的受试者中上调或下调。在一些实施方案中，所述的对照选自无癌症受试者、无肾癌受试者、未患肾癌或没有患肾癌风险的受试者。

在一些实施方案中，本文提供的方法还包括执行临床程序和/或测量生物样品（即尿液、组织血、血浆、血清样品）中的额外生物标志物。其他生物标志物可包括但不限于碳酸酐酶 IX (carbonic anhydrase IX, CAIX)，血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)，缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF)，KI67, P53, P21, PTEN (phosphatase and tensin homolog, 磷酸酶和硫素同源物)，E-Cadherin, 骨桥蛋白和 CD44, CXCR4 和其他细胞周期和增殖标记物。临床程序可能包括活检、细针穿刺和诊断成像测试，包括但不限于超声、计算机断层扫描 (CT)、磁共振成像 (MRI) 或正电子发射断层扫描 (PET) 成像。

在一些实施方案中，本公开提供了使用本文公开的方法治疗被确定患有肾癌的受试者的方法。被确定患有肾癌的受试者将被转介给执业医师，并且在确定合适的情况下，用合适的抗癌化合物、手术、靶向疗法、免疫疗法或放射疗法或这些疗法的组合进行治疗。

与现有技术相比，本发明的有益效果如下：

1、本发明首次发现了多个可检测肾癌的 miRNA，如 hsa-miR-518e-5p 或 hsa-miR-1-3p，现有文献或专利均未报道过可用于检测肾癌。

2、本发明从癌症和健康对照受试者的尿液样本中，初步找到可用于检测肾癌的 16 个 miRNA 标志物，经进一步研究后创造性的发现：当尿液 miRNA 标志物选自如下 8 个 miRNA 中的一个或多个时，可显著性差异的检测肾癌 ($p < 0.05$)：hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p。

3、本发明还意外发现：只要选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、

说明书

hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p 这 6 个 miRNA 中的至少 2 个，所构成的尿液 miRNA 标志物，其 AUC 值就会高于单个 miRNA（如 hsa-miR-518e-5p 等）的 AUC 值；但是，当尿液 miRNA 标志物由 hsa-miR-518e-5p 和 hsa-miR-153-3p 组成，其 AUC 值为 0.561，反而低于单个 hsa-miR-518e-5p 的 AUC 值。

4、在由 8 个 miRNA（hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306 和 hsa-miR-1-3p）组成的尿液 miRNA 标志物 AUC=0.681 的研究基础上，本发明通过优化、筛选，意外找到了 AUC $\geq$ 0.681 的尿液 miRNA 标志物，其共性特点在于：所述尿液 miRNA 标志物选自 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 这 8 个 miRNA 中的至少 2 个，且必须含有 1 个特定 miRNA（hsa-miR-518e-5p 或 hsa-miR-1-3p），尤其是 hsa-miR-518e-5p 起到上调的作用。

因此，本发明尝试将 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p 作为新的肾癌标志物组合，并以此进行临床样本的收集与验证考察，结果表明该标志物组合在肾癌的早期检测和诊断中有着重要的价值。

总之，本发明提供了多种组合的尿液 miRNA 标志物，其检测操作简便，可行性强，灵敏度和特异性高，具有临床诊断和指导意义；而且，本发明可通过尿液检测 miRNA 表达量，从而达到无创的目的。

附图说明

图1为8个（ $P<0.05$ ）有差异表达的肾癌miRNA诊断标志物的表达水平热图。miRNA的表达水平（拷贝数/毫升）是以log2标度呈现的并且相对于零平均值标准化。点的颜色表示浓度。基于欧几里德距离针对两个维度（miRNA和样品）进行分层聚类。对于水平维度，使用颜色表示病例-对照的受试者。

图2为肾癌miRNA诊断标志物组合在各队列的AUC图；其中，图2-A为8个肾癌miRNA诊断标志物组合在各队列的AUC图，图2-B为6个肾癌miRNA诊断标志物组合在各队列的AUC图。

图3为6个肾癌miRNA诊断标志物组合在对照和癌症预测值的线箱图。

具体实施方式

下面通过具体实施例，对本发明的技术方案作进一步的具体说明。

本发明中，若非特指，所采用的原料和设备等均可从市场购得或是本领域常用的。下述实施例中的方法，如无特别说明，均为本领域的常规方法。

术语定义

术语“miRNA”指的是微小RNA，即小的非编码RNA分子，它们在一些实施例中含有约22个核苷酸，并且存在于植物、动物以及一些病毒中。已知miRNA在RNA沉默和基因表达的转录后调节中具有功能。这些高度保守的RNA通过与特异性mRNA的3'-非翻译区（3'-UTR）结合来调节基因的表达。举例来说，每一种miRNA被认为调节多种基因，并且由于数百种miRNA基因被预测存在于高等真核生物中。miRNA倾向于从基因组中的几个不同的基因座转录。这些基因编码具有发夹结构的长RNA，这些长RNA在由一系列RNA酶

说明书

III 酶（包括 Drosha 和 Dicer）加工时形成在 3'末端上具有 2 个核苷酸突出端的通常约 22 核苷酸长的 miRNA 双链体。

术语“调节”指的是细胞响应于外部变量增加或减少细胞组分如 RNA 或蛋白质的量的过程。细胞组分的增加被称作上调，而细胞组分的减少被称作下调。本发明使用的术语“失调”或“错调”意指上调或下调。下调的实例是细胞中诸如激素或神经递质的分子的受体数目减少，这会降低细胞对所述分子的敏感性。这种现象是局部作用的负反馈机制的实例。上调的实例是当施用诸如二氧杂环己烯的异型生物分子时肝细胞中细胞色素 P450 酶的数量增加，从而引起这些分子的更大降解。上调和下调也可以作为对毒素或激素的响应而发生。妊娠中上调的实例是引起子宫中的细胞变得对催产素更敏感的激素。

术语“差异表达”指的是测量细胞组分以与对照或另一个样品相比较，从而确定所述细胞组分的例如浓度、存在或强度的差异。这样的比较的结果可以绝对值给出，即组分存在于样品中而不存在于对照中；或以相对值给出，即组分的表达或浓度与对照相比增加或减少。在这种情况下，术语“增加”与术语“上调”的意思相同可互换，术语“减少”与术语“下调”的意思相同可互换。

术语“miRNA组合”涉及本发明的miRNA的组合。miRNA的量可以通过本领域公知的技术在对象的样品中确定。根据样品的性质，所述量可以通过用于量化多核苷酸量的基于PCR的技术或者通过其他方法（如质谱或测序等）来确定。

术语“探针”是指通常用于检测与探针的序列互补的靶RNA和/或RNA序列的单链寡核苷酸。探针与核苷酸序列由于探针与靶序列之间的互补性而允许核苷酸配对的单链核酸

（DNA或RNA）杂交。探针的长度取决于预期用途以及所需的探针特异性。通常，探针的长度为20至500个（即50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500个）核苷酸，优选20至100个，更优选20至50个核苷酸。对于微RNA的检测，探针为12至30个核苷酸。探针用于多种实验设置，例如但不限于Southern和Northern印迹、实时PCR和原位杂交（In Situ Hybridization, ISH）以及微阵列实验。探针可以是未经标记的、经直接标记的或经间接标记的，例如用链霉抗生物素蛋白复合物随后可结合的生物素标记的。所述标记可以是可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、化学或其他物理手段检测的分子。例如，合适的标记包括³²P、荧光染料、电子致密试剂、酶（例如，通常用于ELISA）、生物素、地高辛配基（digoxigenin）、或半抗原以及其他可检测或可以变成可检测的实体。标记可以引入核酸中的任何位置，例如3'端、5'端或内部。术语“探针”还涵盖其骨架组成不同的核酸，例如但不限于肽核酸（PNA）、锁核酸（LNA）、二醇核酸（GNA）和苏糖核酸（TNA）。

术语“指标”和“标志”在本发明中可互换使用，并且是指病症的体征或信号或者用于监测病症。这样的“病症”是指细胞、组织或器官的生物状态，或者是指个体的健康和/或疾病状态。指标可以是包括但不限于肽、蛋白质和核酸的分子的存在或不存在，或者可以是细胞、或组织、器官或个体中这样的分子的表达水平或模式变化。指标可以是个体中疾病的发生、发展或存在或者这样的疾病的进一步进展的体征。指标也可以是在个体中发生疾病的风险的体征。

术语“分数”指的是整数或数字，它可以是以数学方式，例如通过使用本领域已知的计算模型（可以包括但不限于SMV作为一个实例）来确定的，并且是使用本领域已知的许多数

说明书

学方程式和/或算法中的任一种来计算的以实现统计分类的目的。这样的分数用于列举可能结果的范围上的一个结果。这样的分数的相关性和统计显著性取决于用于建立结果范围的基础数据集的大小和质量。举例来说，可以将盲样输入到算法中，进而基于通过分析所述盲样所提供的信息来计算分数。这使得所述盲样的分数产生。基于该分数，可以作出决定，例如产生该盲样的患者患有癌症或没有癌症的可能性如何。范围的端值可以基于所提供的数据在逻辑上限或根据实验人员的要求任意限定。在这两种情况下，所述范围需要在测试盲样之前被限定。

术语“表达水平”是指在特定的时间点体内或样品中存在的基因产物的量。表达水平可以例如通过由基因表达的蛋白质或mRNA来测量/量化/检测。可以例如如下量化表达水平：用相同样品或参考样品（例如，在相同时间从同一个体得到的样品或相同样品的相同尺寸（重量、体积）的部分）中相同类型基因产物的总量（总蛋白质或mRNA）归一化样品中存在的目的基因产物的量，或者确定目的基因产物的量/限定的样品尺寸（重量、体积等）。可以通过本领域已知的任何方法来测量或检测表达水平，所述方法例如用于目的基因产物的直接检测和量化的方法（例如质谱），或者通常通过目的基因产物与对目的基因产物具有特异性的一种或更多种不同分子或检测装置（例如，引物、探针、抗体、蛋白质支架）结合而工作的用于间接检测和测量目的基因产物的方法。技术人员还已知的是确定基因拷贝的水平，其还包括确定一个或更多个片段的不存在或存在（例如，通过核酸探针或引物，例如定量PCR、多重连接依赖性探针扩增PCR）。

针对肾癌检测方法包括以下步骤：

a) 测定人类来源的被检测样本和参考样本中hsa-miR-671-3p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-153-3p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-885-5p;

b) 比较被检测样本中与参考样本中hsa-miR-671-3p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-153-3p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-885-5p的表达水平；其中，被检测样本中上述miRNA的任一种的表达水平与参考样本中相应miRNA的表达水平相比出现显著变化，表明该个体可能患有肾癌。

具体来讲，被检测肾癌中任意一种miRNA的表达水平比参考样本中miRNA的表达水平发生显著变化时，样本提供者可能患有肾癌。

在较佳的实施方案中，被检测尿液样本中任意8种miRNA的表达水平比参考样本中miRNA的表达水平发生显著变化时，样本提供者可能患有肾癌。

在更佳的实施方案中，被检测尿液样本中6种miRNA的表达水平比参考样本中miRNA的表达水平发生显著变化时，样本提供者可能患有肾癌。

本发明中，参考样本来自健康人源尿液样本。

另一方面，本发明还提供了一种检测肾癌microRNA的方法。具体地说，该方法包括逆转录和实时荧光定量聚合酶链式反应（RT-qPCR）。更具体地，在实时荧光定量聚合酶链式反应中，使用的引物组合为hsa-miR-671-3p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-153-3p, hsa-miR-21-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-885-5p检测的逆转录引物和PCR引物组合。

可以根据相关miRNA的序列，对本发明的引物序列做出适当调整和修改，这些经过修改的引物序列仍可以用于检测所述miRNA标志物。本发明也包括这些等同的技术方案。

本发明使用RT-qPCR方法，相较于基于数百个分子的芯片，具备更可靠的临床可行性和

说明书

实用性，而且成本低，更易于推广。另外，对于上述miRNA的检测方法，不限于本发明提供的RT-qPCR法，其他方法例如测序法，微阵列，RNA印迹，生物发光和探针法等也可用于检测所述的miRNA标志物。

申请人在研究中发现任意1种可以用于诊断肾癌的miRNA标志物组合，任意2种-5种可以用于诊断肾癌的miRNA标志物组合，利用上述标志物，肾癌可以被可靠地鉴定。

本发明从16个可检测肾癌的miRNA标志物中，经进一步研究发现了其中的8个miRNA标志物可显著性差异的检测肾癌 ($p<0.05$): hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p; 并且，经进一步优化、筛选，得到了AUC值高于前述8个miRNA标志物的组合，即包括hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p组合在内的肾癌标志物组合，hsa-miR-671-3p， hsa-miR-518e-5p， hsa-miR-153-3p， hsa-miR-21-3p， hsa-miR-331-5p， hsa-miR-885-5p有多重核酸分子组成，每种核酸分子编码至少一个miRNA序列。具体序列信息如下表1所示。

本发明公开的所有miRNA序列均已经储存在miRBase数据库中(<http://www.mirbase.org/>)。

表1. 8个miRNA的序列表

miRNA	登录号	序列 (5'→3')
hsa-miR-518e-5p	MIMAT0005450	cucuagaggaagcgcuuucug (SEQ ID No.1)
hsa-miR-4306	MIMAT0016858	uggagagaaagcgagcua (SEQ ID No.2)
hsa-miR-21-3p	MIMAT0004494	caacaccagucgaugggcugu (SEQ ID No.3)
hsa-miR-1-3p	MIMAT0000416	uggaauguaaagaagauau (SEQ ID No.4)
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	uccgguucucagggcuccacc (SEQ ID No.5)
hsa-miR-153-3p	MIMAT0000439	uugcauagucacaaagugauc (SEQ ID No.6)
hsa-miR-331-5p	MIMAT0004700	cuagguaugguccagggaucc (SEQ ID No.7)
hsa-miR-885-5p	MIMAT0004947	uccauuacacuaccugccucu (SEQ ID No.8)

本发明公开了一种肾癌诊断标志物组合，包含编码hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p的多个核酸分子。编码hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p中的任何一个或任何两个或任何三个或任何四个或任何五个或任何六个核酸分子在诊断为肾癌患者的尿液中的表达比对照中的表达相比发生显著变化。肾癌诊断最优的实施方案中，上述的多个核酸分子包括hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p的6个核酸分子组合。

本文所公开的miRNA和方法用于对肾癌作出诊断。因此，作为基于本文所提供的方法的确定的结果，已经使用本文所述的方法被诊断为患有肾癌的受试者可以 由于所述诊断而接受必要的和相关的药物（例如化学治疗剂）的治疗或被安排必要的治疗方案，例如放射治疗，手术切除，靶向疗法，免疫疗法等。因此，本发明所公开的方法使得用本领域已知有效治疗肾癌的化合物和组合物来治疗被诊断为患有肾癌的受试者。因此，在一个实施例中，如本文所公开的方法使得受试者被诊断为患有肾癌，其中然后向所述受试者施用如本领域已知的用于肾癌的治疗。如本文所公开的方法因此可以使得对肾癌进行治疗。

本文说明性描述的发明可以在不存在本文没有具体公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制条件的情况下被适当地实施。因此，举例来说，术语“包含”、“包括”、“含有”等

说明书

应当被宽泛地并且不加限制地解读。此外，本文所用的术语和措辞已经被用作描述性术语而非限制性术语，并且并不意图在使用这些术语和措辞时排除所示的以及所述的特征或其部分的任何等同方案，但应当认识到的是，各种改动方案在要求保护的本发明的范围内是可能的。因此，应当了解的是，尽管已经通过优选的实施方案和任选的特征明确地公开了本发明，但是本文所公开的其中所体现的发明的改动方案 and 变化方案可以由本领域技术人员所采取，并且这些改动方案 and 变化方案被认为落入本发明的范围内。

实施例 1：验证队列验证用于肾癌诊断的 8 个 miRNA 组合

一、肾癌诊断标志物组合研发队列尿液样本要求，采集和抽提

肾癌诊断标志物研究中使用了 2 组样本，分别为病例组合对照组，病例组包含 69 例肾癌样本，对照组为 88 例健康人尿液样本，发现和验证了用于检测早期肾癌的生物标记物和生物标记物组合。研发队列中的肾癌病例和健康样本均来自浙江大学医学院附属第二医院。

二、逆转录-实时荧光PCR操作过程及结果

按照 Zymo 血清血浆 cfDNA 快速抽提试剂盒操作步骤进行抽提，抽提完成后，利用 MIRXE 反转录试剂盒操作步骤进行反转录，反转录完成后 qPCR 扩增进行质检。

质检完成后进行样本 qPCR 扩增，检测 312 个 miRNA 的表达量，癌症和健康对照中全部 312 个 miRNA 的表达没有存在明显的分级，初步找到可用于检测肾癌的 16 个 miRNA 标志物，进一步研究发现了具有显著性差异的检测肾癌的 8 个 miRNA 生物标记物，校正之后发现 8 个 miRNA 的 p 值小于 0.05；其中在肾癌受试者中上调了 3 个，下调了 5 个。

上调的 miRNA 包括：hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p 153 和 hsa-miR-21-3p；

下调的 miRNA 包括：hsa-miR-671-3p、hsa-miR-4306、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p 和 hsa-miR-885-5p。

在研发队列中提取这 8 个 miRNA 绘制 Heatmap 热图，观察到癌症和对照受试者之间存在 miRNA 表达量的显著差异，如图 1 所示。

三、验证队列验证上述 8 个 miRNA

病例-对照队列采用交叉验证（Leave-one-out Cross-validation）的方法检测这 8 种尿液 miRNA 生物标志物。验证队列样本为 157 个样本，诊断效能 AUC=0.681，如图 2-A 所示。

实施例 2：验证队列验证用于肾癌诊断的最优 6 个 miRNA 组合

研发队列尿液样本要求，采集和抽提，逆转录-实时荧光PCR操作过程及结果和实施例 1 中描述相同，基于前面筛选出的 8 个 miRNA，分别使用 Lasso、Stepwise 以及穷举法等算法进行 miRNA 组合的优化，最终确定了优选的 6 个 miRNA 组合，又使用交叉验证（Leave-one-out Cross-validation）方法验证 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p 在内的 6 种尿液生物标志物组合。验证队列样本为 157 个样本，6 个 miRNA 组合在验证队列中的诊断效能 AUC=0.703，如图 2-B 所示。

模型判读的结果如图 3 所示，可以看到癌症患者的模型输出概率显著高于对照受试者，说明模型可以较好地对癌症患者和对照受试者进行预测分类。

基于上述对比确认 6 个 miRNA 组合为诊断肾癌的优选组合之一。

说明书

实施例3：miRNA组合的优化

本实施例中，均采用交叉验证（Leave-one-out Cross-validation）的方法检测多变量miRNA组合的AUC值，方法同实施例1和2。

1、计算验证队列中多miRNA面板的AUC值

针对临床试验使用的8个miRNA（hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p），任选1个miRNA为非变量，再以该非变量的miRNA为基准，检测1-，2-，3-，4-，5-，6-，7-或8-miRNA的多变量组合的平均AUC值，分析AUC值的差异变化，结果见表2。

从包含2至8个miRNA的交叉验证实验的结果针对每个miRNA计算来自训练和测试的平均AUC（表2）。当单独使用我们所鉴定到的8个miRNA时，能够鉴定患有或处于发展肾癌风险中的受试者。结合两个或多个这些miRNA进一步增加了AUC值。从表2可以看出，当三个或更多个miRNA组合时，大多数多变量miRNA组合的AUC值可以达到较高水平。

表2. 单独的mirna或最多8个mirna的组合的平均AUC值

	平均AUC							
	面板中组合的 miRNA 数量							
	1	2	3	4	5	6	7	8
hsa-miR-21-3p	0.586	0.616	0.633	0.645	0.655	0.664	0.672	0.681
hsa-miR-518e-5p	0.572	0.617	0.645	0.658	0.667	0.673	0.678	0.681
hsa-miR-671-3p	0.568	0.590	0.603	0.621	0.639	0.653	0.668	0.681
hsa-miR-1-3p	0.567	0.583	0.592	0.616	0.636	0.651	0.666	0.681
hsa-miR-885-5p	0.563	0.567	0.595	0.620	0.637	0.653	0.668	0.681
hsa-miR-331-5p	0.557	0.561	0.594	0.623	0.642	0.657	0.669	0.681
hsa-miR-153-3p	0.543	0.589	0.613	0.629	0.642	0.655	0.668	0.681
hsa-miR-4306	0.468	0.560	0.595	0.613	0.633	0.651	0.666	0.681

2、包含用于诊断肾癌miRNA组合

为了进一步验证肾癌诊断miRNA组合的效用，分析包含上述表2所列miRNA示例性组合。验证队列的平均AUC、平均敏感性、平均特异性、平均阳性预测值（PPV）和平均阴性预测值（NPV）分别如表3所示。包含1-8个miRNA特征的示例组合可用于预测分类癌症患者和对照受试者，其平均AUC为0.553至0.681。

表3. 1至8个特征组合的平均AUC、敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值

特征数量	平均 AUC	平均敏感性	平均特异性	平均阳性预测值	平均阴性预测值
1 个特征	0.553	0.446	0.703	0.571	0.593
2 个特征	0.585	0.460	0.729	0.604	0.632
3 个特征	0.609	0.470	0.745	0.624	0.643
4 个特征	0.628	0.488	0.752	0.644	0.659
5 个特征	0.644	0.503	0.759	0.648	0.668
6 个特征	0.657	0.526	0.752	0.642	0.675
7 个特征	0.670	0.558	0.732	0.642	0.685
8 个特征	0.681	0.594	0.693	0.603	0.685

3、从研究队列中选择性能最优的miRNA，然后添加其他miRNA以改善组合的AUC

说明书

作为示例，这些miRNA在测试队列和验证队列中均表现出良好的性能。接着选择这些miRNA中的一个或多个，并与其他miRNA进行组合。其中以hsa-miR-518e-5p为固定miRNA的示例组合在进一步添加miRNA的个数（表2中列出的其他miRNA）后明显增加了AUC（表4）。但是，添加超过6个miRNA后，AUC开始小幅度下降。具有hsa-miR-1-3p和hsa-miR-671-3p的示例组合分别如表5和6所示。随着不断增加组合的miRNA数量，AUC逐渐增加，但超过6个时AUC开始下降。

以hsa-miR-518e-5p为例，比较单个hsa-miR-518e-5p，以及从剩余7个miRNA中的任意选择添加一个、二个、三个、四个、五个或六个后与hsa-miR-518e-5p所构成的多变量miRNA组合，检测平均AUC值，分析AUC值的差异变化，结果见表4。

表4. hsa-miR-518e-5p与选自上述miRNA特征组合的相关参数差异分析
平均AUC、敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值

特征	平均 AUC	平均敏感性	平均特异性	平均阳性预测值	平均阴性预测值
hsa-miR-518e-5p only	0.572	0.739	0.443	0.510	0.684
+ 1 个特征	0.617	0.499	0.739	0.615	0.653
+ 2 个特征	0.645	0.492	0.778	0.641	0.663
+ 3 个特征	0.658	0.576	0.706	0.620	0.684
+ 4 个特征	0.667	0.588	0.701	0.621	0.689
+ 5 个特征	0.673	0.578	0.715	0.626	0.687
+ 6 个特征	0.678	0.592	0.703	0.621	0.692
+ 7 个特征	0.681	0.594	0.693	0.603	0.685

以hsa-miR-1-3p为例，比较单个hsa-miR-1-3p，以及从剩余7个miRNA中的任意选择添加一个、二个、三个、四个、五个或六个后与hsa-miR-1-3p所构成的多变量miRNA组合，检测平均AUC值，分析AUC值的差异变化，结果见表5。

表5. hsa-miR-1-3p与选自上述miRNA特征组合的的相关参数差异分析
平均AUC、敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值

特征	平均 AUC	平均敏感性	平均特异性	平均阳性预测值	平均阴性预测值
hsa-miR-1-3p only	0.567	0.377	0.761	0.553	0.609
+ 1 个特征	0.583	0.497	0.683	0.592	0.648
+ 2 个特征	0.592	0.480	0.710	0.595	0.634
+ 3 个特征	0.616	0.467	0.757	0.641	0.652
+ 4 个特征	0.636	0.482	0.770	0.649	0.660
+ 5 个特征	0.651	0.507	0.766	0.648	0.669
+ 6 个特征	0.666	0.553	0.735	0.646	0.684
+ 7 个特征	0.681	0.594	0.693	0.603	0.685

以hsa-miR-671-3p为例，比较单个hsa-miR-671-3p，以及从剩余7个miRNA中的任意选择

说明书

添加一个、二个、三个、四个、五个或六个后与hsa-miR-671-3p所构成的多变量miRNA组合，检测平均AUC值，分析AUC值的差异变化，结果见表6。

表6. hsa-miR-671-3p与选自上述miRNA特征组合的的相关参数差异分析
平均AUC、敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值

特征	平均 AUC	平均敏感性	平均特异性	平均阳性预测值	平均阴性预测值
hsa-miR-671-3p only	0.568	0.507	0.670	0.547	0.634
+ 1 个特征	0.590	0.520	0.674	0.574	0.648
+ 2 个特征	0.603	0.509	0.695	0.592	0.646
+ 3 个特征	0.621	0.503	0.722	0.621	0.658
+ 4 个特征	0.639	0.523	0.732	0.634	0.670
+ 5 个特征	0.653	0.538	0.736	0.633	0.677
+ 6 个特征	0.668	0.559	0.731	0.644	0.686
+ 7 个特征	0.681	0.594	0.693	0.603	0.685

为更好的阐述本发明提供的多种miRNA组合都具有不错的AUC，本发明列举了如表7所示的几种AUC≥0.681的miRNA组合情形，共性特点是No.1至No.32所示的miRNA组合中均有hsa-miR-518e-5p，但并不意味着本发明要保护的miRNA组合范围仅局限于表7。

表7. 示例性miRNA组合及其各自的AUC

No.	特征	AUC
1	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p	0.705
2	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p	0.702
3	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p	0.705
4	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p	0.682
5	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306	0.695
6	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p	0.703
7	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p	0.694
8	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p	0.704
9	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p	0.681
10	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306	0.688
11	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p	0.700
12	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p	0.698
13	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306	0.695
14	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p	0.696
15	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p	0.701
16	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p	0.692
17	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306	0.688
18	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p	0.691
19	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306	0.691
20	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、	0.694

说明书

	hsa-miR-1-3p	
21	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p	0.703
22	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p	0.683
23	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306	0.686
24	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p	0.693
25	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p	0.688
26	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306	0.691
27	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p	0.692
28	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p	0.686
29	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306	0.691
30	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p	0.693
31	hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p	0.682
32	hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p	0.681

本发明建立了一个完整的工作流程，用于发现和验证尿液miRNA生物标志物组合，及成功确定了用于检测肾癌的生物标志物及生物标志物组合。

需要说明的是，本发明提供的尿液miRNA标志物组合，都是基于人源尿液样本的临床试验数据进行统计、筛选、分析而得，故适用于高人群特异性检测、有AUC显著差异表达的miRNA组合；但并不意味着这样的miRNA组合可以通用于人源的血浆或组织样本的检测。

以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案，并非对本发明作任何形式上的限制，在不超出权利要求所记载的技术方案的前提下还有其它的变体及改型。

说明书

SEQUENCE LISTING

<110> 觅瑞（杭州）生物科技有限公司；觅瑞实验室私人有限公司

<120> 肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物、诊断试剂及试剂盒

<130> 2021.12

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列（Artificial sequence）

<400> 1

cucuagaggg aagcgcuuc ug 22

<210> 2

<211> 17

<212> RNA

<213> 人工序列（Artificial sequence）

<400> 2

uggagagaaa ggcagua 17

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列（Artificial sequence）

<400> 3

caacaccagu cgauggcug u 21

<210> 4

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列（Artificial sequence）

<400> 4

uggaauguaa agaaguaugu au 22

<210> 5

说明书

<211> 21

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 5

uccgguucuc agggcuccac c 21

<210> 6

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 6

uugcauaguc aaaaaguga uc 22

<210> 7

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 7

cuagguaugg ucccaggau cc 22

<210> 8

<211> 22

<212> RNA

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<400> 8

uccauuacac uaccugccu cu 22

权 利 要 求 书

1. 一种肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物,其特征在于,选自如下 miRNA 中的一个或多个: hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p。

2. 根据权利要求 1 所述的肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物,其特征在于,所述 miRNA 标志物选自如下 miRNA 中的一个或多个: hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p。

3. 根据权利要求 1 所述的肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物,其特征在于,所述 miRNA 标志物选自如下 miRNA 中的一个或多个: hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306。

4. 根据权利要求 1 所述的肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物,其特征在于,所述 miRNA 标志物选自如下 miRNA 中的一个或多个: hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-671-3p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p。

5. 根据权利要求 1~4 中任一项所述的肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物,其特征在于,所述 miRNA 标志物至少为 2 个时,其中之一的 miRNA 必须是 hsa-miR-518e-5p。

6. 根据权利要求 1~4 中任一项所述的肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物,其特征在于,所述 miRNA 标志物至少为 2 个时,其中之一的 miRNA 必须是 hsa-miR-1-3p。

7. 根据权利要求 1 所述的肾癌诊断用尿液 miRNA 标志物,其特征在于,所述 miRNA 标志物包括如下任意一种或多种的组合:

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 组成;或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306 组成;或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p 组成;或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 组成;或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306 组成;或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p 组成;或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、

权 利 要 求 书

hsa-miR-885-5p 组成；或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306 组成；或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p 组成；或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p 组成；或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306 组成；或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-4306 组成；或

权 利 要 求 书

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-671-3p、hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-153-3p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-885-5p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-4306 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-1-3p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p、hsa-miR-885-5p 组成；或

由 hsa-miR-518e-5p、hsa-miR-21-3p、hsa-miR-331-5p 组成。

8. 一种肾癌诊断试剂，其特征在于，包括特异性检测权利要求 1~7 中任一项所述的尿液 miRNA 标志物的试剂。

9. 一种肾癌诊断用试剂盒，其特征在于，包括以权利要求 1~7 中任一项所述的尿液 miRNA 标志物作为标准品，以及检测权利要求 1~7 中任一项所述的尿液 miRNA 标志物的相应引物。

10. 一种如权利要求 1~7 中任一项所述的尿液 miRNA 标志物的应用，其特征在于，用于制备早期诊断和/或复发监测的产品；优选的，包括如下一种或几种的功能：

1) 鉴定或辅助鉴定肾癌；

2) 诊断或辅助诊断初发肾癌；

3) 诊断或辅助诊断复发肾癌。

11. 一种采用如权利要求 1~7 中任一项所述的尿液 miRNA 标志物来早期诊断和/或复发监测肾癌的方法，其特征在于，包括如下步骤：

步骤 1，检测从受试者获得的尿液样品中 miRNA 的存在；

步骤 2，测量尿液样品中 miRNA 标志物中的至少 1 种 miRNA 的表达水平；

步骤 3，使用基于先前所测量的 miRNA 的表达水平的分数，来早期诊断和/或复发监测受试者患有肾癌的可能性。