



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107075583 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201580051832.9

(22)申请日 2015.09.25

(30)优先权数据

14306490.5 2014.09.26 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.03.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/072095 2015.09.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/046365 EN 2016.03.31

(71)申请人 英特盖根公司

地址 法国埃夫里市

(72)发明人 R·蒂埃博

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 韩文华

(51)Int.Cl.

G12Q 1/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书18页
序列表22页 附图1页

(54)发明名称

一种用于预测对采用EGFR抑制剂治疗的响应性的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于预测患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂的方法,该方法包括确定所述患者样本中的hsa-miR-31-5p(SEQ ID NO:2)miRNA的表达水平。本发明还涉及用于测量hsa-miR-31-5p的表达以及至少一种与EGFR抑制剂的响应正相关或负相关的其它参数的试剂盒。本发明也涉及EGFR抑制剂在经预测对所述EGFR抑制剂有响应的患者中的治疗用途。

1. 一种用于预测患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂的体外方法, 该方法包括确定所述患者的样本中 hsa-miR-31-5p (SEQ ID NO: 2) miRNA 的表达水平。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述患者患有KRAS野生型癌症。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述患者患有选自以下的癌症: 结肠直肠癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、头颈癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌和脑癌。

4. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述癌症是结肠直肠癌, 尤其是转移性结肠直肠癌。

5. 根据权利要求1至4任一项所述的方法, 其中所述的EGFR抑制剂是抗EGFR抗体, 尤其是西妥昔单抗或者帕尼单抗。

6. 根据权利要求1至5任一项所述的方法, 其中所述样本是肿瘤组织活检样本或者完整或部分的肿瘤外科切除样本。

7. 根据权利要求1至6任一项所述的方法, 其中通过定量RT-PCR确定miRNA的表达水平。

8. 根据权利要求1至7任一项所述的方法, 其中miRNA的表达水平越低, 患者越有可能响应EGFR抑制剂治疗。

9. 根据权利要求1至8任一项所述的方法, 其还包括基于miRNA的表达水平确定预后分数, 其中所述预后分数表明患者是否可能响应EGFR抑制剂。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述预后分数如下式:

预后分数 = $a * x + b$,

其中:

- x 是患者样本中测量的 hsa-miR-31-5p 表达水平的对数,
- a 和 b 是基于参考样本池所预定的参数, 以及
- 如果患者的预后分数小于或等于阈值 c , 则预测他/她响应EGFR抑制剂, 如果其预后分数大于阈值 c , 则预测他/她不响应EGFR抑制剂, 其中 c 的值已经基于相同的参考样本池被确定。

11. 根据权利要求10所述的方法, 其中 a 、 b 和 c 优选在以下范围内:

- a : $[0.096]$, 优选 $[0.001; 0.12]$;
- b : $[0.144]$, 优选 $[0.01; 0.3]$; 和
- c : $[-0.1; 0.1]$, 优选 $[-0.055; 0.055]$ 。

12. 根据权利要求1至9任一项所述的方法, 还包括确定至少一种与响应EGFR抑制剂正相关或负相关的其它参数, 并考虑所述 hsa-miR-31-5p 的表达水平和所述其它参数计算出组合分数, 其中所述组合分数表明患者是否可能响应EGFR抑制剂。

13. 根据权利要求1至8任一项所述的方法, 其中基于患者样本中 hsa-miR-31-5p 表达水平与一个或多个阈值的比较, 预测患者可能或不可能响应EGFR抑制剂。

14. 一种用于确定患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂的试剂盒, 其包含或由以下组成:

a) 用于确定所述患者样本中 hsa-miR-31-5p (SEQ ID NO: 2) miRNA 的表达水平的试剂, 以及

b) 用于确定至少一种与响应EGFR抑制剂正相关或负相关的其它参数的试剂。

15. 一种EGFR抑制剂,其用于治疗患有癌症的患者,其中所述患者根据权利要求1至13任一项所述的方法被分类为可能响应。

一种用于预测对采用EGFR抑制剂治疗的响应性的方法

技术领域

[0001] 本发明提供癌症治疗的个体化化疗的方法,尤其是在使用一种或者多种表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂进行治疗之前,评价患者对这种药剂响应性的方法,所述方法基于确定hsa-miR-31-5p的表达水平。

背景技术

[0002] 表皮生长因子受体(EGFR)通路在人类上皮细胞癌的发生和发展中起到关键作用。在具有功能性EGFR依赖的自分泌生长通路的不同人类癌症细胞中,同EGFR抑制剂的联合治疗具有协同的生长抑制和促凋亡活性,从而更加高效和持续的抑制Akt。

[0003] EGFR抑制剂已经在多种癌症治疗中被批准或者测试,包括非小细胞肺癌(NSCLC)、头颈癌、结肠直肠癌和Her2-阳性的乳癌,同时也更多的被引入到标准的治疗中。EGFR抑制剂可以靶向胞内酪氨酸激酶结构域或者EGFR靶标的胞外结构域,EGFR抑制剂的普遍困扰是人群响应率低,导致在许多病例中无效或者非最佳的化疗,以及不必要的药物毒性和费用。比如,据报道,西妥昔单抗(一种靶向EGFR胞外结构域的嵌合型单克隆抗体)在治疗结肠直肠癌时的临床响应率约为11%(Cunningham等人,N Engl Med 2004;351:337-45),埃罗替尼对于NSCLC的临床响应率约为8.9%(Shepherd F A等人,N Engl J Med 2005;353:123-132)。

[0004] 尤其在KRAS突变的情况下,已经观察到了抗性。

[0005] 在结肠直肠癌中,由于KRAS突变与抗EGFR抗体的抗性有明显的相关性(Lievre等人,Cancer Res.2006 66(8):3992-5),主要的挑战之一是在不带有KRAS突变的患者中鉴定能够预测对这种治疗缺乏响应的其它标记物。在其中,上述致癌基因的扩增或者激活突变、以及肿瘤抑制基因的失活突变作为相关候选,比如通过测量EGFR下游磷酸化蛋白的表达评价EGFR下游信号传导通路的激活水平。

[0006] 在肺癌中有三类患者:一类患者带有EGFR突变的肿瘤,对于这类患者使用EGFR酪氨酸激酶抑制剂(EGFR TKI)被证明是可以改善结果,第二类患者带有KRAS突变的肿瘤,对于这类患者抗EGFR的治疗很可能不是好的选择,以及第三类患者既没有EGFR突变也没有KRAS突变的肿瘤,对于这类患者无法预测响应。在没有突变肿瘤的患者中,至今没有药物响应相关的标记物被证明是有价值的。

[0007] 因此,为了更好的对患者进行个性化治疗,在使用EGFR抑制剂治疗之前,需要预测患者对这种药剂的响应性。

[0008] 在现有技术中,有很多文献涉及微小RNA(micro RNA)(miRNA)参与多种抗癌症治疗的敏感性或者抗性。然而,在大多数情况下,研究是部分的、不完整的,并且实际上也不允许真正预测对治疗的临床响应或不响应。事实上,在很多情况下,研究只局限在体外、在对具体治疗敏感或有抗性的细胞系中、或者在分离自患者肿瘤的肿瘤细胞中分析miRNA的表达。此外,许多研究中虽然显示出两种细胞群或患者群之间表达水平上的差异,但并没有给出以允许真正在新的患者中预测响应或不响应的阈值或者分数。这与许多研究缺乏获自临

床环境(setting)的数据的第一缺点部分相关。此外,即使存在一些获自临床环境的数据时,这些数据大多时候仅仅是回顾性的,而通常缺少在新队列中进行预测方法验证的数据。

[0009] 作为实例,W02010/121238描述了对EGFR酪氨酸激酶抑制剂敏感或有抗性的肺癌细胞系在体外培养物中进行的miRNA表达的分析。没有显示在临床环境中的数据。

[0010] W02009/080437广泛地要求了用于预测对抗癌治疗的响应或无响应的方法。然而,W02009/080437中显示的数据限于各种常规化疗治疗,并且没有提供关于EGFR抑制剂(既没有抗EGFR单克隆抗体,也没有EGFR酪氨酸激酶抑制剂)的数据。此外,提供的针对其它化疗分子的数据是基于miRNA在分离自体外培养的患者肿瘤的肿瘤细胞中的表达获得的。没有提供在临床环境中获得的数据。

[0011] 类似地,尽管W02011/135459广泛地要求了用于预测对抗癌治疗的响应或无响应的方法,但是在文件中显示的数据限于在体外预测癌细胞系对各种抗癌剂的敏感性或抗性。在此,也没有提供在临床环境中获得的数据,因此没有证明miRNA表达水平与患者的临床响应或存活之间相关性。

[0012] Ragusa等人2010(Ragusa M.等人Mol Cancer Ther.2010Dec;9(12):3396-409)分析了在结肠直肠癌细胞系中用西妥昔单抗治疗之后miRNA的表达水平,已知所述细胞系对西妥昔单抗治疗是敏感或有抗性的。在KRAS野生型和KRAS突变的患者中显示有两个miRNA的表达是有差异的。然而,KRAS野生型和KRAS突变的患者中的差异表达不允许在KRAS野生型患者中预测对EGFR抑制剂的响应。此外,跟许多其它研究一样,并没有提供获自临床环境的数据以表明这些miRNA的表达水平在患者中独立预测对EGFR抑制剂响应的能力。

[0013] WO 2013/076282描述了用于预测患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂的体外方法,其包括确定在所述患者的样本中hsa-miR-31-3p(以前称为hsa-miR-31*,UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU,在<http://www.mirbase.org>中登录号MIMAT0004504,在本说明书中的SEQ ID NO:1)miRNA的表达水平。更具体地,hsa-miR-31-3p的表达越低,患者更可能响应EGFR抑制剂治疗。虽然在这个申请中公开的方法是用于预测患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂的真正方法,仍有需要真正的和经验证的用于在患者中预测响应EGFR抑制剂的方法,其中针对所述患者的这种治疗只是多种选择之一。本发明针对这种需求给出了回应。

[0014] 微小RNA(或miRNA)是长度约21-24个核苷酸,优选21-23个核苷酸的单链分子,由从DNA转录但不翻译成蛋白的基因编码(非编码RNA);反而,它们从称为pri-miRNA的初级转录物加工成称为pre-miRNA的短茎环结构,最后成为功能性miRNA。在成熟期间,每个pre-miRNA产生具有高互补性的两个不同片段,一个起源于编码pri-miRNA的基因的5'臂,另一个起源于3'臂。将从编码pri-miRNA的基因的5'或3'臂获得的两个成熟miRNA分别称为“5p”或“3p”miRNA。在很多时候,两个片段之一(5p或3p)被降解,并且以比另一个片段(3p或5p)更少的量被发现(Liu N等人Cell Res.2008Oct;18(10):985-96;Okamura K等人.Nat Struct Mol Biol.2008Apr;15(4):354-63)。然后,最丰富的片段也可以称为miR-X(X是分配给特定物种中的miRNA序列的唯一的任意数字),而较不丰富的片段可以称为miR-X*。

[0015] 在WO 2013/076282中,用于预测患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂的miRNA是hsa-miR-31-3p,也称为hsa-miR-31*(SEQ ID NO:1)。从共同的pre-miRNA pre-miR-31产生的具有高互补性的另一个片段是hsa-miR-31-5p,也称为hsa-

miR-31 (AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU, <http://www.mirbase.org>上登录号MIMAT0000089, SEQ ID NO:2)。

[0016] 已知hsa-miR-31-5p表达水平的变化与各种癌症的诊断/预后相关, 尽管已经获得了矛盾的数据(Wang S等人Tumor Biol.2014Aug 20;Laurila EM等人Genes Chromosomes Cancer.2013Dec;52(12):1103-13)。

[0017] hsa-miR-31-5p的表达水平也已显示与对5-氟尿嘧啶-5-FU)、放射治疗、紫杉醇、多西他赛和顺铂的抗性有关(Laurila EM等人.Genes Chromosomes Cancer.2013Dec;52(12):1103-13;Bhatnagar N等人.Cell Death Dis.2010Dec 9;1:e105)。然而, 这些出版物没有分析hsa-miR-31-5p表达水平与EGFR抑制剂治疗的抗性或响应之间的可能相关性的存在。

[0018] hsa-miR-31-5p是从共同的pre-miRNA pre-miR-31产生的最丰富的片段, 较不丰富的片段是hsa-miR-31-3p, 其已经在W0 2013/076282中显示对于预测患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂是有用的。

[0019] 然而, 如上所述, 对于特定的pre-miRNA, 虽然从共同的pre-miRNA产生相似量的两个片段, 但是成熟miRNA/miRNA*比在稳态下是不对称的, 有时差异大于10000:1(Liu N等人Cell Res.2008Oct;18(10):985-96;Okamura K等人Nat Struct Mol Biol.2008Apr;15(4):354-63)。

[0020] 此外, 本领域已知特定miRNA的表达水平和miRNA/miRNA*比可以在空间和时间上改变(Liu N等人Cell Res.2008Oct;18(10):985-96;Okamura K等人Nat Struct Mol Biol.2008Apr;15(4):354-63;Guo L等人PLoS One.2010Jun 30;5(6):e11387)。因此, 从共同的pre-miRNA产生的一个miRNA片段的表达水平与对特定治疗的响应/抗性相关这个事实, 并不意味着从相同的共同pre-miRNA产生的具有高互补性的另一个片段也与相同治疗的响应/抗性相关。

[0021] 例如, 基于使用Affymetrix miRNA 1.0阵列分析, W02011/135459在表1-129中公开了miRNA, 其中过表达(表1-65)或低表达(表65-129)与在各种药物存在下的肿瘤细胞系的生长相关, 包括从相同前体pre-miRNA获得的许多对miRNA。对于他莫昔芬(tamoxifen)治疗, 发现与对他莫昔芬的响应相关的过表达的miRNA列于表53中, 而发现与他莫昔芬的响应相关的低表达的miRNA列于表118中。表53和表118的分析显示:

[0022] • 10个miRNA对(从相同的pre-miRNA前体获得的5p和3p片段)与对他莫昔芬的响应具有相似的正或负相关性:

[0023] ○过表达的相关性:miR106b/miR106b*、miR17/miR17*、miR18a/miR18a*、et miR-93/miR-93*;

[0024] ○低表达的相关性:miR151-3p/miR151-5p、miR193b/miR193b*、miR22/miR22*、miR28-3p/miR28-5p、miR30a/miR30a*、miR99b/miR99b*);

[0025] • 对于17个miRNA对, 已经发现只有两个片段之一的过表达或低表达与对他莫昔芬的响应相关, 从相同pre-miRNA获得的另一片段的表达水平与对他莫昔芬的响应不相关:

[0026] ○发现一个片段过表达相关, 另一个片段表达不相关:miR106a、miR1228、miR195*、miR25*、miR34b、miR629*、miR671-5p、miR769-5p;

[0027] ○发现一个片段低表达相关, 另一个片段表达不相关:miR10a、miR125a-5p、

miR21、miR221、miR23a、miR23b、miR30e、miR34c-5p、miR424*。

[0028] • 对于一种miRNA,miR149*过表达与他莫昔芬响应相关,而miR149低表达与他莫昔芬响应相关;即从相同pre-miRNA获得的两个片段的表达水平与他莫昔芬反应呈相反地相关。

[0029] 上述实施例清楚地说明,在一些情况下(这里是10/28例),从相同的miRNA前体获得的两个片段的表达水平类似地,与药物响应相关,在大多数情况下(这里是18/28例),只有一个片段与药物响应相关,或者甚至两个片段与药物响应呈相反地相关。因此,从共同的pre-miRNA产生的一个miRNA片段的表达水平与对特定治疗的响应/抗性相关的事实,显然不意味着从相同的共同pre-miRNA产生的具有高互补性的另一个片段也与相同治疗的响应/抗性相关。此外,在hsa-miR-31-5p(也称为hsa-miR-31)和hsa-miR-31-3p(也称为hsa-miR-31*)的具体情况下,W02011/135459显示,根据所测试的药物,可能仅它们中的一个、另一个或两者与药物响应相关。尤其是表89显示hsa-miR-31(即hsa-miR-31-5p)和hsa-miR-31*(即hsa-miR-31-3p)的低表达与对美法仑(melphalan)的响应相关。然而,对环磷酰胺(cytoxan)(参见表28和93)和氟维司群(fulverstrant)(参见表61和126)响应,仅hsa-miR-31(即hsa-miR-31-5p)的低表达与响应相关。相反,对洛莫司汀(lomustine)(参见表47和112)的响应,只有hsa-miR-31*(即hsa-miR-31-3p)的低表达与响应相关。这清楚地说明,可能只有hsa-miR-31-5p和hsa-miR-31-3p中的一个与药物响应相关,两个miRNA甚至可以与相同的药物响应相反地相关。

[0030] 此外,已知由hsa-miR-31-5p和hsa-miR-31-3p靶向的基因是不同的,这更表明两种miRNA参与不同的通路,使得本领域技术人员不会考虑hsa-miR-31-5p表达水平可能与对表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂响应的可能性相关。尤其是对于每种miRNA,基于几个标准,包括实验验证、序列信息,将该miRNA的靶基因列在各种数据库中并从最可能的靶基因到较不可能的靶基因排序。在2014年9月22日的miRNA.org数据库中搜索hsa-miR-31-5p和hsa-miR-31-3p靶基因,显示hsa-miR-31-5p和hsa-miR-31-3p的12个最可能的靶基因如下:

[0031]

排名	hsa-miR-31-5p靶标基因	hsa-miR-31-3p靶标基因
1	ACAD8	SCL30A5
2	ZNF512	MASP1
3	HSD17B6	GABBR2
4	WSB2	LRP1B
5	SH2D1A	BACH1
6	RGAG1	HAUS4
7	SYNC	THBS2
8	SFRS11	EHBP1
9	FNDC3A	TCEB1
10	BEST3	VPS13A
11	SMUG1	POLR2K
12	CUL5	ZMYM5

[0032] 从以上清楚地看出,在hsa-miR-31-5p和hsa-miR-31-3p的12个最可能的靶基因中

没有共同的靶基因,说明两个miRNA主要具有不同的靶标。

[0033] 此外,Mosakhani N等人Cancer Genet.2012Nov;205(11):545-51使用Agilent's miRNA微阵列系统V2(723种人类和76种人类病毒miRNA,Sanger数据库v10.1,在<http://microrna.sanger.ac.uk>),分析了转移性结肠直肠癌患者中响应抗EGFR抗体治疗的可能性,其包括hsa-miR-31-5p和hsa-miR-31-3p。然而,发现只有hsa-miR-31-3p(在该文中称为miR-31*)而不是hsa-miR-31-5p与患者对抗EGFR治疗的响应相关,因此表明hsa-miR-31-5p与结肠直肠癌患者中对抗EGFR治疗响应的可能性不相关。

发明内容

[0034] 然而,基于通过抗EGFR疗法治疗的结肠直肠癌患者的肿瘤样品的定量PCR分析,本发明人意外地发现,hsa-miR-31-5p表达水平事实上也与表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂响应的可能性相关,并且可以用于预测患有癌症的患者是否可能响应表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂。

[0035] 基于本发明人获得的结果(参见实施例1),本发明提供了一种用于预测患有癌症的患者是否可能对表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂响应的体外方法,该方法包括确定所述患者样本中hsa-miR-31-5p(SEQ ID NO:2)miRNA的表达水平。

[0036] 优选患者患有KRAS野生型的癌症。

[0037] 癌症优选是结肠直肠癌,优选转移性结肠直肠癌。

[0038] 在最优选的实施方案中,本发明提供了一种用于预测患有转移性结肠直肠癌的患者是否可能对表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂响应的体外方法,尤其是抗EGFR抗体,比如西妥昔单抗或者帕尼单抗,该方法包括确定所述患者的肿瘤样本中hsa-miR-31-5p(SEQ ID NO:2)miRNA的表达水平。

[0039] 本发明还提供了一种用于确定患有癌症的患者是否可能对表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂响应的试剂盒,其包含或由以下组成:用于确定所述患者样本中hsa-miR-31-5p(SEQ ID NO:2)miRNA的表达水平的试剂,以及用于确定至少一种与EGFR抑制剂响应正相关或负相关的其它参数的试剂。

[0040] 本发明还涉及一种EGFR抑制剂,其用于治疗患有癌症的患者,其中所述患者根据本发明的方法被分类为可能有响应。

[0041] 本发明还涉及EGFR抑制剂用于制备旨在用于在患者中治疗癌症的药物的用途,其中根据本发明的方法所述患者被分类为“响应者”。

[0042] 本发明还涉及一种治疗患有癌症的患者的方法,该方法包括(i)通过本发明的方法,确定患者是否可能对EGFR抑制剂响应,以及(ii)如果确定所述患者可能对EGFR抑制剂响应,则向所述患者施用EGFR抑制剂。

附图说明

[0043] 图1:依据hsa-miR-31-5p表达水平的患者生存曲线(Kaplan-Meier)。生存(表示为活的患者与感兴趣的组的所有患者的比率)以时间(周)的函数呈现。每组(低/高hsa-miR-31-5p)中的总患者数在括号中提及。

具体实施方式

[0044] 定义

[0045] “患者”可以为任意哺乳动物,优选为人类,年龄或性别不限。患者患有癌症。患者可以是已经接受任意化疗剂的治疗,或者是尚未接受治疗的。

[0046] 癌症优选为其中涉及EGFR信号传导通路的癌症。尤其,它可以是例如结肠直肠癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、头颈癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌或脑癌(Ciardello F等人.N Engl J Med.2008年3月13日;358(11):1160-74;Wheeler DL等人.Nat RevClinOncol.2010年9月;7(9):493-507;Zeineldin R等人.J Oncol.2010;2010:414676;Albitar L等人.Mol Cancer 2010;9:166;Leslie KK等人.GynecolOncol.2012年11月;127(2):345-50;Mimeault M等人.PLoS One.2012;7(2):e31919;Liebner DA等人.Ther AdvEndocrinolMetab.2011年10月;2(5):173-95;Leboulleux S等人.Lancet Oncol.2012年9月;13(9):897-905;Pan J等人.Head Neck.2012年9月13日;Chan SL等人.Expert OpinTher Targets.2012年3月;16增刊1:S63-8;Chu H等人.Mutagenesis.2012年10月15日;Li Y等人.Oncol Rep.2010年10月;24(4):1019-28;Thomasson M等人.Br J Cancer 2003,89:1285-1289;Thomasson M等人.BMC Res Notes.2012年5月3日;5:216)。在一些实施方案中,肿瘤本质上为实体组织肿瘤和/或是上皮性的。例如,患者可以为结肠直肠癌患者、Her2阳性或Her2阴性的乳癌患者(尤其是三阴性,即Her2阴性、雌激素受体阴性及孕激素受体阴性)、非小细胞肺癌(NSCLC)患者、头颈癌患者(尤其是头颈部鳞状细胞癌患者)、胰腺癌患者、或子宫内膜癌患者。更尤其是,患者可以为结肠直肠癌患者、Her2阳性或者Her2阴性(尤其是三阴性)的乳癌患者、肺癌患者(尤其是NSCLC)、头颈癌患者(尤其是头颈部鳞状细胞癌患者)、或胰腺癌患者。

[0047] 在优选的实施方案中,癌症是结肠直肠癌,进一步癌症优选是转移性结肠直肠癌。实际上,实施例1中显示的数据明确地表明hsa-miR-31-5p的表达水平可以在结肠直肠癌治疗中用作对EGFR抑制剂(和尤其是抗EGFR单克隆抗体,例如西妥昔单抗和帕尼单抗)响应的预测物。

[0048] 在已知涉及EGFR信号传导通路的癌症中获得的这些结果明确表明,hsa-miR-31-5p的表达水平可以在已知涉及EGFR信号传导通路的任何其它癌症中(例如肺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、甲状腺癌、鼻咽癌、前列腺癌、头颈癌、肾癌、胰腺癌、膀胱癌或脑癌)用作对EGFR抑制剂(和尤其是抗EGFR单克隆抗体,例如西妥昔单抗和帕尼单抗)响应的预测物。

[0049] 因此,在另一优选的实施方案中,癌症是Her2阳性或者Her2阴性(尤其是三阴性)的乳癌、优选Her2阴性(尤其是三阴性)的乳癌。

[0050] 在另一优选的实施方案中,癌症是肺癌,尤其是非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0051] 在另一优选的实施方案中,癌症是胰腺癌。

[0052] 由于该预测与EGFR抑制剂的治疗相关,因此患者的肿瘤优选为EGFR阳性。

[0053] 优选地,患者患有KRAS野生型肿瘤,即患者肿瘤中的KRAS基因在密码子第12位、13位(第一外显子)、或者第61位(第三外显子)上没有出现突变。换句话说,KRAS基因在第12位、13位和第61位密码子上是野生型的。

[0054] 野生型,即非突变的,密码子第12位、13位(第一外显子)和第61位(第三外显子)分

别对应甘氨酸 (Gly, 第12位密码子)、甘氨酸 (Gly, 第13位密码子) 和谷氨酰胺 (Gln, 第61位密码子)。野生型参考KRAS氨基酸序列可见于Genbank登陆号NP_004976.2 (SEQ ID NO:3)。

[0055] 尤其是, 患者肿瘤中的KRAS基因未呈现出以下任一突变 (Bos.Cancer Res 1989; 49:4682-4689;Edkins等人.Cancer BiolTher.2006年8月;5 (8):928-932;Demiralay等人.Surgical Science,2012,3,111-115):

[0056] Gly12Ser (GGT>AGT)

[0057] Gly12Arg (GGT>CGT)

[0058] Gly12Cys (GGT>TGT)

[0059] Gly12Asp (GGT>GAT)

[0060] Gly12Ala (GGT>GCT)

[0061] Gly12Val (GGT>GTT)

[0062] Gly13Arg (GGC>CGC)

[0063] Gly13Cys (GGC>TGC)

[0064] Gly13Asp (GGC>GAC)

[0065] Gly13Ala (GGC>GCC)

[0066] Gly13Val (GGC>TC)

[0067] 优选地, 患者肿瘤中的KRAS基因也未呈现出以下任一突变 (Demiralay等人.Surgical Science,2012,3,111-115):

[0068] Gly12Phe (GGT>TTT)

[0069] Gly13Ser (GGC>AGC)

[0070] 优选地, 患者肿瘤中的KRAS基因也未呈现出以下任一突变 (Bos.Cancer Res 1989;49:4682-4689;Tam等人.Clin Cancer Res 2006;12:1647-1653;Edkins等人.CancerBiolTher.2006年8月;5 (8):928-932;Demiralay等人.Surgical Science,2012,3,111-115):

[0071] Gln61His (CAA>CAC)

[0072] Gln61His (CAA>CAT)

[0073] Gln61Arg (CAA>CGA)

[0074] Gln61Leu (CAA>CTA)

[0075] Gln61Glu (CAA>GAA)

[0076] Gln61Lys (CAA>AAA)

[0077] Gln61Pro (CAA>CCA)

[0078] 本领域内已知的任何方法均可被用来获知患者的KRAS状态。

[0079] 例如, 肿瘤组织被显微切割, 并从石蜡包埋的组织块中提取DNA。用聚合酶链式反应 (PCR) 对KRAS基因中覆盖第12、13和61位密码子的区域进行扩增。突变状态可以通过用PCR探针进行的等位基因分型 (Laurent-Puig P, 等人, J ClinOncol.2009,27 (35):5924-30) 或通过任何其它方法, 如焦磷酸测序 (Ogino S, 等人, J MolDiagn 2008;7:413-21) 来确定。

[0080] “样本”可以为源自患者的任何生物样本, 其中包含核酸。这种样本的实例包含液体 (包含血液、血浆、唾液、尿液、精液)、组织、细胞样本、器官、活检样本等。优选地, 样本为

肿瘤样本,优选为肿瘤组织活检样本或者完整或部分肿瘤外科切除样本。样本可以根据常规的技术进行收集,并直接用于诊断或贮存。肿瘤样本可以是新鲜的、冷冻的或者石蜡包埋的。通常地,可用的肿瘤样本是冷冻的或者石蜡包埋的,大多数时候是石蜡包埋的。

[0081] “参考样本”是指已知对EGFR抑制剂治疗阳性或者阴性响应患者的肿瘤样本(尤其是肿瘤活检样本或者完整或部分的肿瘤外科切除样本)。优选地,参考样本池包含至少一名(优选地为数名,更优选地为至少5名,更优选地至少6名,至少7名,至少8名,至少9名,至少10名)响应的患者和至少一名(优选地为数名,更优选地至少6名,至少7名,至少8名,至少9名,至少10名)无响应的患者。响应者(也被称为“阳性”)和无响应者(也被称为“阴性”)参考样本的数目越多,则根据本发明的预测方法的可靠性就越好。

[0082] 在本发明的上下文中,患者是“可能响应的”或是“响应者”指的是患者对EGFR抑制剂的治疗有响应,即他的至少一种症状得到缓解,或者是疾病的发展被终止或减慢。依据RECIST标准(Eisenhauer等人,European Journal of Cancer,2009,45:228-247),完全响应者、部分响应者、或者稳定患者在本发明的上下文中均被认为是“可能响应的”或是“响应者”。

[0083] 在实体肿瘤中,RECIST标准是基于出现至少一种可测量病变的国际标准。“完全响应”是指所有靶标病变都消失;“部分响应”是指靶标病变最长直径总和减少30%,”进展性疾病”是指靶标病变最长直径总和增加20%,”稳定的疾病”是指不符合上述标准的变化。

[0084] 术语“预测”或者“预后”是指患者对EGFR抑制剂治疗响应的概率或可能性。

[0085] 根据本发明,肿瘤细胞生长对EGFR抑制剂抑制的灵敏度是通过该肿瘤细胞是否表达和表达何种水平的hsa-miR-31-5p来预测的。

[0086] 术语“治疗(treating)”或者“治疗(treatment)”是指稳定、缓解、治愈或者减轻癌症的进展。

[0087] “miRNA”或者“微小RNA(microRNA)”是约21-24个核苷酸的单链分子,优选地长度为21-23个,它们由转录自DNA的基因所编码,但不被翻译成蛋白(非编码RNA);而其是由被称为pri-miRNA的初级转录本加工成被称为pre-miRNA的短的茎环结构,并最终加工成功功能性miRNA。在成熟的过程中,每一种pre-miRNA都产生两个高度互补的不同片段,一个源自编码pri-miRNA的基因的5'臂,另一个源自3'臂。成熟的miRNA分子部分地与一种或者多种信使RNA(mRNA)分子互补,它们的主要功能是下调基因的表达。

[0088] 有一种miRNA的国际命名方式(见Ambros V等人,RNA 20039(3):277-279;Griffiths-Jones S.NAR 200432(数据库发布):D109-D111;Griffiths-Jones S等人.NAR 200634(数据库发布):D140-D144;Griffiths-Jones S等人.NAR 200836(数据库发布):D154-D158;以及Kozomara A等人.NAR 201139(数据库发布):D152-D157),可以在<http://www.mirbase.org/>的mirBase中获取。每一个miRNA都被以预定格式分派一个唯一名称,如下:

[0089] 对于成熟miRNA:sss-miR-X-Y,其中

[0090] • sss是用来表明miRNA物种的三字母编码,“hsa”表示人类,

[0091] • miR中的大写“R”表示它是成熟miRNA。然而一些作者在文献中也滥用“mir”来表示成熟miRNA。在这种情况下,也可以通过“-Y”的存在来识别它是成熟miRNA,

[0092] • X是分派给特定物种中miRNA序列的任意的唯一数字,如果已知有多个高度同源

的miRNA,那么后面可以再加一个字母。如,“20a”和“20b”表示高度同源的miRNA。

[0093] • Y表示切割pre-miRNA得到的成熟miRNA是对应于编码pri-mRNA的基因的5' 臂(那么Y为“5p”)或3' 臂(那么Y为“3p”)。在前述的miRNA国际命名中,没有出现“-Y”。那么通过n后面“*”符号的存在或缺失来区分获自编码pri-mRNA的基因的5' 臂或3' 臂的两个成熟miRNA。带有“*”符号表明该序列对应着较少检测到的miRNA。由于这种分类方式已经发生改变,因此采用“3p”和“5p”编码的新命名已经得以实施。

[0094] 对于pri-miRNA:sss-mir-X,其中

[0095] • sss是用来表明miRNA物种的三字母编码,“hsa”表示人类,

[0096] • mir中的小写“r”表示它是pri-miRNA而不是成熟的miRNA,这可以通过不存在“-Y”来确认,

[0097] • n是分派给特定物种中miRNA序列的任意唯一数字,如果已知有数个高度同源的miRNA,后面可以加上一个字母。

[0098] 对每种miRNA的序列也分派一个登陆号。

[0099] 本发明中所检测的miRNA为hsa-miR-31-5p(曾被命名为hsa-miR-31)。在该命名中,“hsa”表示其涉及人miRNA,“miR”表示成熟的miRNA,“31”是指该具体的miRNA所分派的任意编号,以及“5p”表示该成熟miRNA获自编码pri-miRNA的基因的5' 臂。

[0100] hsa-miR-31-5p为AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU (SEQ ID NO:2)

[0101] (<http://www.mirbase.org>中登陆号为MIMAT0000089)。

[0102] 在样本中测量hsa-miR-31-5p表达水平的方法

[0103] miRNA的表达水平可以通过本领域技术人员已知的任何方法确定,例如miRNA可以被定量。

[0104] 从患者样本(尤其是肿瘤样本)开始在体外进行这样的测量,必要地涉及样本的改造(transformation)。实际上,没有一些类型的样本改造,就无法测量具体基因表达水平。

[0105] 大多数技术依赖特异性结合于感兴趣的miRNA的试剂的使用,因此,导致改性样本中还包括检测试剂。此外,大多数技术还涉及一些在结合特定试剂之前,从患者的样本中初始提取RNA。因此,所要求保护的方法可能还包含从患者的样本中提取RNA的初始步骤。

[0106] 通过质谱检测不一定涉及初始的结合特定试剂。而多数时候对提取的RNA进行。即使当没有初始提取步骤、直接对样本进行时,其涉及通过激光束从样本中提取一些分子,提取的分子随后通过光谱仪分析。

[0107] 在任何情况中,无论是用何种技术,miRNA表达水平测量之后的样本的状态与取自患者的初始样本相比已经改变。

[0108] miRNA的量可以通过本领域技术人员已知的任何技术测量,包括miRNA微阵列,定量PCR、新一代测序以及与标记探针的杂交,包括nanosttring技术(参见Geiss GK等人Nat Biotechnol.2008Mar;26(3):317-25)。

[0109] 尤其是,可以用实时定量RT-PCR(qRT-PCR)。在一些实施方案中,qRT-PCR可以被用来对RNA靶标进行检测和定量(Bustin等人,2005,Clin.Sci.,109:365-379)。通过qRT-PCR得到的定量结果往往比定性的数据具有更大的信息量,并能简化标准分析和质量管理。因此,在一些实施方案中,基于qRT-PCR的分析可以被用来在基于细胞的分析中测量hsa-miR-31-5p表达水平。qRT-PCR方法也可以被用来监测患者的治疗。qRT-PCR是本领域技术人员熟

知的且容易获得的技术,且不需要详细的说明。基于qRT-PCR方法的实例可以在如U.S.Pat.No.7,101,663中找到。例如可以使用商品化可获得的基于qRT-PCR的方法(如Taqman[®]阵列),基于在以上公开的hsa-miR-31-5p的序列,很容易设计引物和/或探针。

[0110] 还可以使用miRNA分析或阵列,评估样本中miRNA的表达水平。

[0111] 在一些实施方案中,可以制备或购买n miRNA寡核苷酸阵列。阵列典型地含有固相支持物和至少一种与支持物接触的寡核苷酸,其中寡核苷酸对应于miRNA的至少一部分。

[0112] 任何合适的分析平台能被用于确定样本中miRNA的存在。例如,分析的形式可以是膜、芯片、皿、测试条、滤器、微球、多孔板等。分析系统可以具有固相支持物,在固相支持物上附着有对应于miRNA的寡核苷酸。固相支持物可以包含例如塑料、硅片、金属、树脂或者玻璃。可以制备分析组成,并包装到一起构成用来检测miRNA的试剂盒。为了确定靶标核酸样本的表达谱,所述样本被标记,在杂交条件中与微阵列接触,导致与附着于微阵列表面的探针序列互补的靶标核酸间形成复合物。随后检测标记的杂交复合物的存在。本领域技术人员可获得许多微阵列杂交技术的变化。

[0113] 在另一个实施方案中,miRNA定量可以使用nanosttring技术进行,如Geiss GK等人Nat Biotechnol.2008年3月;26(3):317-25中所描述的。

[0114] 在另一个实施方案中,miRNA定量可以由测序进行。

[0115] 患者分类

[0116] 基于hsa-miR-31-5p的表达水平分类 •

[0117] hsa-miR-31-5p的表达越低,对于患者来说就越好。因此,hsa-miR-31-5p的表达水平越低,患者对EGFR抑制剂治疗响应的可能性就越大。在一个优选的实施方案中,因此,基于在患者的样本中(尤其是如上所述的肿瘤样本)的hsa-miR-31-5p表达水平与一个或多个阈值的比较,可以预测患者可能或不可能响应EGFR抑制剂(尤其是抗EGFR抗体,比如西妥昔单抗或帕尼单抗)。

[0118] 在一个特定的实施方案中,当hsa-miR-31-5p表达水平低于阈值时,患者就被认为是“响应者”,或可能对EGFR抑制剂的治疗有响应。如上所定义的,这种阈值可以基于参考样本池来确定。在该实施方案中,基于hsa-miR-31-5p表达水平、依据该表达水平是低于还是高于所述阈值将患者分为两组。具有小于阈值的hsa-miR-31-5p表达水平的患者被认为可能响应,即作为响应者。相反,具有大于或等于阈值的hsa-miR-31-5p表达水平的患者被认为不太可能响应,即作为不响应者。

[0119] 在其它特定实施方案中,可以用几个阈值来进行该方法。在这种情况下,基于hsa-miR-31-5p表达水平将患者分类为与不同的响应可能性相关的至少三个组。

[0120] 在三组的情况下,使用两个阈值,并且根据患者的hsa-miR-31-5p表达水平低(即小于第一阈值)、中间(即大于或等于第一阈值并且小于第二阈值)或高(即大于或等于第二阈值)将患者分类为三组。然后,在优选的实施方案中,低表达组中的患者然后可以被认为可能响应,即作为响应者(高响应可能),高表达组中的患者可能不响应,即作为不响应者(低响应可能),以及中间表达组中的患者被认为具有中等响应可能性。或者,可以将响应高可能性的低、中等组给临床医生,然后由他们决定是否施用EGFR抑制剂治疗。

[0121] 在另一个实施方案中,所述方法还包括基于hsa-miR-31-5p的表达水平来确定预后分数或指数,其中预后分数表明患者是否可能对EGFR抑制剂响应。尤其是,所述预后分数

可表明患者是否可能对EGFR抑制剂响应取决于是否预后分数高于或低于预定的阈值(二分的结果)。在另一个实施方案中,可以从预后分数得到对EGFR抑制剂响应或者不响应的离散概率。

[0122] 如果对患者施用EGFR抑制剂治疗,所述患者对EGFR抑制剂治疗响应的概率与患者的生存概率相关,伴随或不伴随有疾病进展。

[0123] 因此,预后分数可以基于分析如上所定义的参考样本池的hsa-miR-31-5p的表达水平与无进展生存(PFS)或总体生存(OS)的相关性来确定。于是,可以将PFS和/或OS分数作为预后分数来预测对EGFR抑制剂的响应,PFS和/或OS分数是关联PFS或OS与hsa-miR-31-5p表达水平的函数。因为无病进展是对EGFR抑制剂治疗响应的明确指示,所以优选地采用PFS分数。

[0124] 从本发明人获得的实验数据显示,患者对EGFR抑制剂治疗响应的概率与hsa-miR-31-5p的表达水平的对数呈现线性负相关(参见图1)。在一个优选的实施方案中,所述预后分数于是可以采用下式表示:

[0125] 预后分数= $a \times x + b$,其中 x 是患者样本中所测量的hsa-miR-31-5p表达水平的对数(优选以2为底的对数,称为“ $\log_2$ ”), a 和 b 是按照上述定义的预先基于参考样本池所确定的参数。

[0126] 根据 a 是正的/负的,如果患者的预后分数大于或等于/小于或等于阈值 c ,那么他/她就可以被预测为对EGFR抑制剂响应,如果患者的预后分数小于/大于阈值 c ,则对EGFR抑制剂不响应,其中 c 值也基于相同的参考样本池所确定:

[0127] 如果 a 是正的,如果患者的预后分数大于或等于阈值 c ,那么他/她就可以被预测为对EGFR抑制剂响应,如果他/她的预后分数小于阈值 c ,则对EGFR抑制剂不响应。

[0128] 或者,如果 a 是负的,则如果患者的预后分数小于或等于阈值 c ,那么他/她就可以被预测为对EGFR抑制剂响应,如果他/她的预后分数大于阈值 c ,则对EGFR抑制剂不响应。

[0129] 基于本发明人进行的实验,已经确定 a 、 b 和 c 优选在以下范围内:

[0130] • a : [0.096], 优选 [0.001; 0.12];

[0131] • b : [0.144], 优选 [0.01; 0.3]; 和

[0132] • c : [-0.1; 0.1], 优选 [-0.055; 0.055]。

[0133] 在另一实施方案中,对EGFR抑制剂响应或不响应的离散概率可以源自上面的预后分数 $a \times x + b$ 。预后分数与对EGFR抑制剂治疗的响应概率之间的精确相关性可以基于相同的参考样本组所确定。根据 a 是正的/负的,预后分数越高/越低表明对EGFR抑制剂治疗的响应概率越高:

[0134] 如果 a 是正的,预后分数越高,对EGFR抑制剂治疗响应的概率越高(即在PFS分数的情况中疾病进展的概率越低)。

[0135] 或者,如果 a 是负的,预后分数越低,对EGFR抑制剂治疗响应的概率越高(即在PFS分数的情况中疾病进展的概率越低)。

[0136] 患有癌症的患者是否可能对EGFR抑制剂响应,还可以通过使用列线图做出预测。在列线图中对感兴趣的分数的每种变量建立点数(point)等级。对于指定的患者,通过从每种变量的点数等级中选取相应的点数将点数分配给每种变量。对于离散的变量(例如基因的表达水平),归属于变量的点数目与变量的值线性相关。对于二分的变量(只有两种可能

的值),将两个不同的值归属于两个可能的值中的每一个或变量。之后将分配给每种变量的点数相加计算感兴趣的分数(总点数)。基于分数值,依据组合分数低于或高于阈值(二分的分数)、或者对治疗的响应或不响应的概率,患者可被指定为良好或不良响应的预后。

[0137] 很明显,当在组合分数中结合多个不同的变量时,列线图是很有用的(参见以下使用组合分数的可能性:所述组合分数组合hsa-miR-31-5p表达水平和DBNDD2和/或EPB41L4B表达水平;hsa-miR-31-5p表达水平和hsa-miR-31-3p表达水平;或者hsa-miR-31-5p表达水平和BRAF状态)。然而,列线图也可以被用于代表仅基于一种变量的预后分数,比如hsa-miR-31-5p表达水平。在这种情况下,总点数对应于分配给单变量的点数。

[0138] 因此,根据本发明,在用于预测患有癌症的患者是否可能响应EGFR抑制剂的方法的实施方案中,所述方法还包含基于列线图确定不响应的风险,所述列线图基于参考样本池校准。列线图可以根据OS或PFS数据较准。如果基于OS数据较准,不响应的风险对应于死亡的风险。如果基于PFS数据较准,不响应的风险对应于疾病进展的风险。

[0139] 基于hsa-miR-31-5p的表达水平以及与EGFR抑制剂的响应正相关或负相关的其它参数分类

[0140] 虽然仅基于hsa-miR-31-5p的表达水平能够预测EGFR抑制剂的响应(参见实施例1),根据本发明的方法还可以包含确定至少一种与EGFR抑制剂响应正相关或负相关的其它参数。

[0141] 在这种情况下,组合hsa-miR-31-5p表达水平以及其它参数的组合分数,尤其可以基于参考样本池而产生。

[0142] 在列线图中,针对组合分数的每种变量建立点数等级,该列线图也可以被用于组合hsa-miR-31-5p的表达水平和其它参数,并且获得组合分数,之后该组合分数可以与不响应的风险相关(即PFS分数的疾病进展的风险)。对于指定的患者,通过从每种变量的点数等级中选取相应的点数将点数分配给每种变量。对于离散的变量(比如hsa-miR-31-5p的表达水平或者年龄),归属于变量的点数目与变量的值线性相关。对于二分的变量(只有两种可能的值,例如BRAF突变状态或者性别),将两个不同的值归属于两个可能的值中的每一个或变量。

[0143] 然后,通过将每种变量所分配的点数相加来计算组合分数(总点数)。在组合分数值的基础上,根据组合分数是否小于或大于阈值(二分的分数)、或对治疗响应或者不响应的概率,然后对患者作出良好或者不良的响应预后。

[0144] 可以基于相同的参考样本池确定每种变量的点数等级,以及阈值或者组合分数与响应或不响应概率之间的相关性,其中在所述阈值之上/之下响应预后是良好或不良。

[0145] 这种与EGFR抑制剂响应正相关或者负相关的其它参数尤其可以选自:

[0146] • 年龄;

[0147] • 性别;

[0148] • hsa-miR-31-3p的表达水平,其可以通过以上公开的用于测量hsa-miR-31-5p的表达水平的任何方法测量;和/或

[0149] • 至少一种与EGFR抑制剂的响应正相关或负相关的突变的存在或不存在。

[0150] 这种突变可以通过本领域技术人员已知的任何方法检测,并且尤其包括以下表1中提及的那些:

[0151]

基因符号	Unigene 号	染色体	Genbank 参考野生型 蛋白序列	突变*
Kras	Hs.505033	12	NP_004976.2 (SEQ ID NO :3)	G12
				G13
				Q61
				K117N
				A146
BRAF	Hs.550061	7	NP_004324.2 (SEQ ID NO:4)	V600
NRAS	Hs.486502	1	NP_002515.1 (SEQ ID NO:5)	G12
				G13
				Q61
				K117
				A146T
PIK3CA	Hs.553498	3	NP_006209.2 (SEQ ID NO:6)	E545
				H1047
EGFR	Hs.488293	7	NP_005219.2 (SEQ ID NO:7); NP_958441.1 (SEQ ID NO:8); NP_958439.1 (SEQ ID NO:9);	S492R
AKT1	Hs.525622	14	NP_001014431.1 (SEQ ID NO:10); NP_001014432.1 (SEQ ID NO:11); NP_005154.2 (SEQ ID NO:12)	E17K

[0152] *突变被蛋白质中提及的密码子编号限定,该编号前面的字母代表为野生型氨基酸,并且任选地在其后面的为取代氨基酸。当未提及取代氨基酸时,取代氨基酸可以是不同于野生型氨基酸的任何氨基酸。

[0153] EGFR抑制剂

[0154] 本发明使得能够在用一种或者多种表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂进行治疗之前预测患者对这种药剂的响应性。

[0155] EGFR抑制剂可以是EGFR酪氨酸激酶的抑制剂,或者可以靶向EGFR靶标的胞外结构域。在一些实施方案中,EGFR抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂,如厄洛替尼、吉非替尼、或拉帕替尼,或者是靶向EGFR胞外结构域分子,如西妥昔单抗或帕尼单抗。

[0156] 优选的,该EGFR抑制剂是抗EGFR的抗体,优选为单克隆抗体,尤其是西妥昔单抗或帕尼单抗。

[0157] 靶向EGFR胞外结构域分子包括主要被用来治疗结肠直肠癌或乳腺癌治疗的抗EGFR单克隆抗体,如西妥昔单抗或帕尼单抗。因此,如果患者的癌症是结肠直肠癌(尤其是转移性结肠直肠癌)或者乳腺癌,那么根据本发明的方法优选用于预测对分子的响应,其中所述分子靶向EGFR胞外结构域,尤其是抗EGFR单克隆抗体,如西妥昔单抗或帕尼单抗。

[0158] 相反地,酪氨酸激酶EGFR抑制剂主要被用来治疗肺癌(尤其是非小细胞肺癌,

NSCLC), 因此如果患者的癌症是肺癌 (尤其是非小细胞肺癌, NSCLC), 那么根据本发明的方法优选用于预测对酪氨酸激酶EGFR抑制剂 (如厄洛替尼、吉非替尼、或拉帕替尼) 的响应。

[0159] 在胰腺癌或者头颈癌 (尤其是头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)) 中, 酪氨酸激酶EGFR抑制剂和抗EGFR单克隆抗体都被作为治疗进行了测试, 因此, 如果患者的癌症是胰腺癌或者头颈癌 (尤其是头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)), 那么根据本发明的方法可用于预测对酪氨酸激酶EGFR抑制剂 (如厄洛替尼、吉非替尼、或拉帕替尼) 或者抗EGFR单克隆抗体 (如西妥昔单抗或帕尼单抗) 的响应。

[0160] 西妥昔单抗和帕尼单抗是目前临床上应用最多的抗EGFR单克隆抗体。然而, 更多的抗EGFR单克隆抗体也在开发中, 如Nimotuzumab (TheraCIM-h-R3)、Matuzumab (EMD 72000)、Zalutumumab (HuMax-EGFr)、Nimotuzumab和Sym 004。根据本发明的方法也可以用来预测对这些抗EGFR单克隆抗体或者对任何其它可能被进一步开发出来的抗EGFR单克隆抗体 (包括其片段) 的响应, 尤其是如果患者患有结肠直肠癌 (尤其是转移性的结肠直肠癌)、乳癌、胰腺癌或者头颈癌 (尤其是头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN))。

[0161] 类似的, 厄洛替尼、吉非替尼、拉帕替尼和瑞戈非尼 (Regorafenib) 是目前临床上应用最多的酪氨酸激酶EGFR抑制剂。然而, 更多的酪氨酸激酶EGFR抑制剂也在开发中, 如卡奈替尼 (CI-1033)、来那替尼 (HKI-272)、阿法替尼 (BIBW2992)、Dacomitinib (PF299804, PF-00299804)、TAK-285、AST-1306、ARRY334543、AG-1478 (Tyrphostin AG-1478)、AV-412、OSI-420 (脱甲基厄洛替尼)、AZD8931、AEE788 (NVP-AEE788)、培利替尼 (EKB-569)、CUDC-101、AG 490、PD153035 HCl、XL647、鲁索替尼 (Ruxolitinib) 和BMS-599626 (AC480)。根据本发明的方法也可以用来预测对这些酪氨酸激酶EGFR抑制剂, 或者任何其它可能被进一步开发出来的酪氨酸激酶EGFR抑制剂的响应, 尤其是如果患者患有肺癌 (尤其是非小细胞肺癌, NSCLC)、胰腺癌、或头颈癌 (尤其是头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN))。

[0162] 试剂盒

[0163] 本发明还涉及一种用于确定患有癌症的患者是否可能对表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂响应的试剂盒, 其包含或由如下组成:

[0164] a) 用于确定所述患者样本 (优选肿瘤样本, 例如肿瘤活检样本, 或者完整或部分肿瘤外科切除样本) 中hsa-miR-31-5p (SEQ ID NO:2) miRNA的表达水平的试剂, 以及

[0165] b) 用于确定至少一种与EGFR抑制剂的响应正相关或负相关的其它参数的试剂。

[0166] 这种试剂可能尤其包括用于以下的试剂:

[0167] i) 确定所述患者的样本中 (优选肿瘤样本, 比如肿瘤活检样本或者完整或部分的肿瘤外科切除样本) hsa-miR-31-3p (SEQ ID NO:1) miRNA的表达水平, 和/或,

[0168] ii) 检测至少一种与EGFR抑制剂的响应正相关或负相关的突变, 例如在上表1中提及的那些。

[0169] 用于确定所述患者的样本中hsa-miR-31-5p或hsa-miR-31-3p的表达水平的试剂, 尤其可以包含以下或由以下组成: 特异于hsa-miR-31-5p和/或has-miR-3p的引物对 (正向引物和反向引物) 和/或探针 (尤其是标记的探针, 其包含特异于靶序列的核酸和与其连接的标记, 尤其是荧光标记)、或包含特异于hsa-miR-31-5p和/或has-miR-3p的序列的微阵列。基于以上公开的hsa-miR-31-5p和/或has-miR-31-3p的序列, 本领域技术人员很容易设计引物和/或探针。

[0170] 用于检测至少一种与EGFR抑制剂的响应正相关或负相关的突变的试剂可以包括用来在测序之前扩增全部或者部分感兴趣的基因的至少一对引物对,或者用于等位基因分型(allelic discrimination)分析的在其5'端标记有报告染料的一组特异性探针,例如ABI 7900HT Sequence Detection System(Applied Biosystems,福斯特城,CA)(参见Laurent-Puig P,等人,J Clin Oncol.2009,27(35):5924-30以及Lièvre等人.J Clin Oncol.2008年1月20日;26(3):374-9用于BRAF突变的检测V600)。

[0171] 本发明的试剂盒进一步包含说明书,其基于hsa-miR-31-5p的表达水平和其它受试参数用于确定患者是否可能会对EGFR抑制剂有响应。尤其是包括组合分数中所含全部变量的点数等级的列线图、以及组合分数(点数的总数)与预测(响应/不响应、或者响应或不响应的概率)之间的相关性可以包括在内。

[0172] 药物、治疗用途以及治疗方法

[0173] 本发明的方法与临床所报道的对EGFR抑制剂的响应比例相匹配的比例预测患者对EGFR抑制剂响应性。

[0174] 因此,进一步提供了一种用于治疗患有癌症的患者的方法,该方法包括向患者施用至少一种EGFR抑制剂,其中患者依据上述方法被分类为“响应者”或“可能响应的”。

[0175] 尤其地,本发明涉及到一种用于治疗患有癌症的患者的方法,该方法包括(i)根据本发明的方法确定患者是否可能对EGFR抑制剂响应,以及(ii)如果患者被确定为可能对EGFR抑制剂有响应,则对所述患者施用EGFR抑制剂。

[0176] 如果患者被确定为不可能对EGFR抑制剂响应,那么方法进一步包括步骤(iii)对患者施用替代性抗癌治疗。这种替代性抗癌治疗依赖于具体的癌症和之前测试的治疗,然而可以尤其选自放射疗法、其它化疗分子、或者其它生物制剂,如针对其它抗原的单克隆抗体(抗Her2、抗VEGF、抗EPCAM、抗CTLA4等)。

[0177] 尤其是在结肠直肠癌中,如果患者被确定为不可能对EGFR抑制剂有响应,那么步骤(iii)中的替代性抗癌治疗可以选自:

[0178] • VEGF抑制剂,尤其是抗VEGF单克隆抗体(如贝伐单抗),有利地与基于奥沙利铂的化疗比如FOLFOX(甲酰四氢叶酸(叶醛酸)、5-氟尿嘧啶(5-FU)和奥沙利铂的组合)或基于依立替康的化疗比如FOLFIRI(甲酰四氢叶酸(叶醛酸)、5-氟尿嘧啶(5-FU)和依立替康的组合)联用。

[0179] • 或者,如果患者对任选地与基于奥沙利铂或者依立替康的化疗组合的VEGF抑制剂的治疗不成功,可施用5-FU,任选地与丝裂霉素B组合。可进一步对患者施用最好的支持性护理,其定义为在不采用具体的抗肿瘤方案(即没有抗癌治疗)的前提下,意图最大可能提高生活质量所施用的治疗。

[0180] 本发明另一主题涉及一种EGFR抑制剂,其用于治疗患有癌症的患者,其中按上述方法患者分类为可能有响应。本发明还涉及EGFR抑制剂。其用于治疗患有癌症的患者,其中所述治疗包含按上述方法预测所述患者是否可能对EGFR抑制剂响应的初始步骤,并且按上述方法所述EGFR抑制剂仅被施用于已经被预测可能对EGFR抑制剂响应的患者。所述患者可能患有结肠直肠癌,更尤其是转移性结肠直肠癌。或者,所述患者可能患有乳癌,尤其是三阴性乳癌。或者,所述患者可能患有肺癌,尤其是非小细胞肺癌(NSCLC)。或者,所述患者可能患有头颈癌,尤其是头颈部鳞状细胞癌。或者,所述患者可能患有胰腺癌。本发明也涉及

EGFR抑制剂用于制备药物的用途,所述药物用于在通过本发明上述方法中被分类为“响应者”的患者中治疗癌症。

[0181] 在优选的实施方案中,EGFR抑制剂为抗EGFR抗体,优选为西妥昔单抗或帕尼单抗。或者,EGFR抑制剂可以是酪氨酸激酶EGFR抑制剂,尤其是厄洛替尼、吉非替尼或拉帕替尼。

[0182] 在优选的实施方案中:

[0183] • 患者患有结肠直肠癌,尤其是转移性结肠直肠癌,并且EGFR抑制剂是抗EGFR抗体,优选为西妥昔单抗或帕尼单抗;

[0184] • 患者患有乳癌,尤其是三阴性乳癌,并且EGFR抑制剂是抗EGFR抗体,优选为西妥昔单抗或帕尼单抗;

[0185] • 患者患有肺癌,尤其是非小细胞肺癌(NSCLC),并且EGFR抑制剂是酪氨酸激酶EGFR抑制剂,尤其是厄洛替尼、吉非替尼或拉帕替尼;

[0186] • 患者患有头颈癌,尤其是头颈部鳞状细胞癌、或者胰腺癌,并且EGFR抑制剂是抗EGFR抗体(优选为西妥昔单抗或帕尼单抗)或者是酪氨酸激酶EGFR抑制剂(尤其是厄洛替尼、吉非替尼或拉帕替尼)。

[0187] 实施例和附图用以说明本发明而不限其范围。

[0188] 实施例

[0189] 实施例1:在KRAS野生型结肠直肠癌中hsa-miR-31-5p的水平决定了用抗EGFR治疗的患者的生存差异

[0190] 患者与方法

[0191] 患者组

[0192] 该组患者由23名进展期(advanced)结直肠癌患者组成,所有患者在至少基于1线化疗的治疗后用抗EGFR抗体治疗。8名患者接受帕尼单抗,14名接受西妥昔单抗。一名患者接受西妥昔单抗和帕尼单抗。对于每个患者,可获得福尔马林固定、石蜡包埋(FFPE)的原发性肿瘤。所有患者为KRAS的野生型(WT)。

[0193] hsa-miR-31-5p表达分析:

[0194] 对于每个肿瘤样本,在肿瘤区域中划出5 μ m FFPE片,根据制造商的说明书,使用FFPE miRNeasy提取试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)提取总RNA。

[0195] 使用对逆转录RNA的特异性TaqMan预设计的测定和ABI7900HT实时PCR系统进行miRNA hsa-miR-31-5p的表达水平的特异性定量。通过 $\Delta\Delta$ Ct方法将表达水平针对参照归一化。

[0196] 生存模型预测

[0197] 通过组合Cox比例风险模型(Cox,D.R.(1972)Remression models and life-tables.Journal of the Royal Statistical Society, Series B 34(2),187-220)和监督主成分方法(E Bair&R Tibshirani,Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data,PLOS Biology 2:511-522,2004),计算生存风险组的基于微小RNA表达的预测值。

[0198] 计算患者的组合预后分数,所述患者的表达谱通过对数表达水平x的向量组合x的成分与每个主成分值的加权平均值。预后分数的高值对应于死亡危险的高值,因此相对较差的预测存活。为了评估预测值,使用留一法交叉验证。在良好和不良预后之间产生最佳分

离的分数阈值用于Kaplan-Meier分析。

[0199] 结果

[0200] 使用特异性TaqMan预设计的测定对23个样本进行实时miRNA定量PCR分析,以定量miRNA hsa-miR-31-5p的表达水平。使用来自数据组的主成分的拟合Cox比例风险模型的系数对于PFS(无进展生存)估计为2.6。如果样本的预后分数大于/小于或等于0(PFS),则预测其处于高/低风险。具有高水平的hsa-miR-31-5p的患者具有比具有低水平的hsa-miR-31-5p的患者显著更短的PFS,低风险患者的中值PFS为56.9周,高风险患者的中值PFS为12.1周($p=0.06$) (图1)。

[0201] 然后可以通过以下公式计算预后分数:

[0202] $PFS\text{分数} = 0.096 * x + 0.144$,其中x是hsa-miR-31-5p的表达的以2为底的对数($\log_2$)。

[0203] 在他们的研究中,Mosakhani等人(Mosakhani N等人Cancer Genet.2012Nov;205(11):545-51)没有鉴定hsa-miR-31-5p作为对抗EGFR抗体响应的预测标记物。在本研究中,hsa-miR-31-5p作为预测标记物的鉴定考虑整体人群,并以无进展生存作为终点。在Mosakhani等人中,人群的分层是不同的。他们首先将人群分为两组,一个疾病对照组,其中包括响应者患者和稳定疾病患者,以及进展组(progressive group)。然后他们进行分析比较这两个组。

[0204] 参考文献

[0205] Albitar L等人.Mol Cancer 2010;9:166;

[0206] Ambros V等人,RNA 2003 9(3):277-279;

[0207] Bair E&R Tibshirani,Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data,PLoS Biology 2:511-522,2004;

[0208] Bhatnagar N等人.Cell Death Dis.2010Dec 9;1:e105;

[0209] Bos.Cancer Res 1989;49:4682-4689;

[0210] Bustin等人.,2005,Clin.Sci.,109:365-379;

[0211] Chan SL等人.Expert OpinTher Targets.2012Mar;16Suppl 1:S63-8;

[0212] Chu H等人.Mutagenesis.2012Oct 15;

[0213] Ciardello F等人.N Engl J Med.2008Mar 13;358(11):1160-74;

[0214] Cox,D.R.(1972).Regression models and life-tables.Journal of the Royal Statistical Society, Series B 34(2),187-220;

[0215] Cunningham等人,N Engl Med 2004;351:337-45;

[0216] Demiralay等人.Surgical Science,2012,3,111-115;

[0217] Edkins等人.Cancer BiolTher.2006年8月;5(8):928-932;

[0218] Geiss GK等人.Nat Biotechnol.2008Mar;26(3):317-25;

[0219] Eisenhauer等人,European Journal of Cancer,2009,45:228-247;

[0220] Griffiths-Jones S等人.NAR 2006 34(数据库发布):D140-D144;

[0221] Griffiths-Jones S等人.NAR 2008 36(数据库发布):D154-D158;

[0222] Griffiths-Jones S.NAR 2004 32(数据库发布):D109-D111;

[0223] Guo L等人.PLoS One.2010Jun 30;5(6):e11387;

- [0224] Kozomara A等人.NAR 2011 39 (数据库发布):D152-D157;
- [0225] Laurent-Puig P,等人,J ClinOncol.2009,27 (35):5924-30;
- [0226] Laurila EM等人.Genes Chromosomes Cancer.2013Dec;52 (12):1103-13;
- [0227] Leboulleux S等人.Lancet Oncol.2012Sep;13 (9):897-905;
- [0228] Leslie KK等人.GynecolOncol.2012Nov;127 (2):345-50;
- [0229] Li Y等人.Oncol Rep.2010Oct;24 (4):1019-28;
- [0230] Liebner DA等人.TherAdvEndocrinolMetab.2011Oct;2 (5):173-95;
- [0231] Lievre等人,Cancer Res.2006 66 (8):3992-5;
- [0232] Lièvre等人.J ClinOncol.2008Jan 20;26 (3):374-9;
- [0233] Liu N等人.Cell Res.2008Oct;18 (10):985-96;
- [0234] Mimeault M等人.PLoS One.2012;7 (2):e31919;
- [0235] Mosakhani N等人.Cancer Genet.2012Nov;205 (11):545-51;
- [0236] Ogino S,等人.J MolDiagn 2008;7:413-21;
- [0237] Okamura K等人.Nat Struct Mol Biol.2008Apr;15 (4):354-63;
- [0238] Pan J等人.Head Neck.2012Sep 13;
- [0239] Ragusa M.等人.Mol Cancer Ther.2010Dec;9 (12):3396-409;
- [0240] Shepherd F A,等人,N Engl J Med 2005;353:123-132;
- [0241] Tam等人.Clin Cancer Res2006;12:1647-1653;
- [0242] Thomasson M等人.BMC Res Notes.2012May 3;5:216;
- [0243] Thomasson M等人.Br J Cancer 2003,89:1285-1289;
- [0244] U.S.Pat.No.7,101,663;
- [0245] Wang S等人.Tumour Biol.2014Aug 20;
- [0246] Wheeler DL等人.Nat RevClinOncol.2010年9月;7 (9):493-507;
- [0247] W02009/080437;
- [0248] W02010/121238;
- [0249] W02011/135459;
- [0250] W02013/076282;
- [0251] Zeineldin R等人.J Oncol.2010;2010:414676.

序列表

<110> 英特盖根公司

<120> 一种用于预测对采用EGFR抑制剂治疗的响应性的方法

<130> B368372D34198

<150> EP14306490.5

<151> 2014-09-26

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> 人类

<400> 1

ugcuauGCCa acauaauGCC au 22

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> 人类

<400> 2

aggcaagaug cuggcauagc u 21

<210> 3

<211> 188

<212> PRT

<213> 人类

<400> 3

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr

20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly

35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr

50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys

65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr

85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val

100	105	110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp	Leu Pro Ser Arg Thr Val	Asp Thr Lys
115	120	125
Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg	Ser Tyr Gly Ile Pro Phe	Ile Glu Thr
130	135	140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly	Val Asp Asp Ala Phe Tyr	Thr Leu Val
145	150	155
Arg Glu Ile Arg Lys His Lys	Glu Lys Met Ser Lys Asp	Gly Lys Lys
165	170	175
Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr	Lys Cys Val Ile Met	
180	185	
<210> 4		
<211> 766		
<212> PRT		
<213> 人类		
<400> 4		
Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly	Gly Gly Gly Ala Glu Pro	Gly Gln
1	5	10
Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met	Glu Pro Glu Ala Gly Ala	Gly Ala Gly
20	25	30
Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala	Asp Pro Ala Ile Pro Glu	Glu Val Trp
35	40	45
Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys	Leu Thr Gln Glu His Ile	Glu Ala Leu
50	55	60
Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu	His Asn Pro Pro Ser Ile	Tyr Leu Glu
65	70	75
Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser	Lys Leu Asp Ala Leu Gln	Gln Arg Glu
85	90	95
Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu	Gly Asn Gly Thr Asp Phe	Ser Val Ser
100	105	110
Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr	Val Thr Ser Ser Ser Ser	Ser Ser Leu
115	120	125
Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu	Ser Val Phe Gln Asn Pro	Thr Asp Val
130	135	140
Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser	Pro Gln Lys Pro Ile Val	Arg Val Phe
145	150	155
Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr	Val Val Pro Ala Arg Cys	Gly Val Thr
165	170	175
Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys	Ala Leu Met Met Arg Gly	Leu Ile Pro

180	185	190
Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile		
195	200	205
Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val		
210	215	220
Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys		
225	230	235
Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe		
245	250	255
Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys		
260	265	270
Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu		
275	280	285
Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu		
290	295	300
Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala		
305	310	315
Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro		
325	330	335
Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp		
340	345	350
His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn		
355	360	365
Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg		
370	375	380
Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala		
385	390	395
Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu		
405	410	415
Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser		
420	425	430
Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp		
435	440	445
Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly		
450	455	460
Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val		
465	470	475
Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln		
485	490	495

Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn		
500	505	510
Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val		
515	520	525
Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile		
530	535	540
Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr		
545	550	555
Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp		
565	570	575
Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile		
580	585	590
Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His		
595	600	605
Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val		
610	615	620
Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr		
625	630	635
Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr		
645	650	655
Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly		
660	665	670
Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala		
675	680	685
Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg		
690	695	700
Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser		
705	710	715
Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala		
725	730	735
Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys		
740	745	750
Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His		
755	760	765

<210> 5

<211> 189

<212> PRT

<213> 人类

<400> 5

Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Lys
1				5					10					15	
Ser	Ala	Leu	Thr	Ile	Gln	Leu	Ile	Gln	Asn	His	Phe	Val	Asp	Glu	Tyr
				20				25					30		
Asp	Pro	Thr	Ile	Glu	Asp	Ser	Tyr	Arg	Lys	Gln	Val	Val	Ile	Asp	Gly
				35				40					45		
Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Glu	Tyr
				50				55				60			
Ser	Ala	Met	Arg	Asp	Gln	Tyr	Met	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Phe	Leu	Cys
65					70					75					80
Val	Phe	Ala	Ile	Asn	Asn	Ser	Lys	Ser	Phe	Ala	Asp	Ile	Asn	Leu	Tyr
				85					90					95	
Arg	Glu	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Asp	Asp	Val	Pro	Met	Val
				100				105					110		
Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Cys	Asp	Leu	Pro	Thr	Arg	Thr	Val	Asp	Thr	Lys
				115				120				125			
Gln	Ala	His	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Tyr	Gly	Ile	Pro	Phe	Ile	Glu	Thr
				130				135				140			
Ser	Ala	Lys	Thr	Arg	Gln	Gly	Val	Glu	Asp	Ala	Phe	Tyr	Thr	Leu	Val
145					150					155					160
Arg	Glu	Ile	Arg	Gln	Tyr	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp	Asp
				165					170					175	
Gly	Thr	Gln	Gly	Cys	Met	Gly	Leu	Pro	Cys	Val	Val	Met			
				180				185							

<210> 6

<211> 1068

<212> PRT

<213> 人类

<400> 6

Met	Pro	Pro	Arg	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu	Leu	Trp	Gly	Ile	His	Leu	Met
1				5					10					15	
Pro	Pro	Arg	Ile	Leu	Val	Glu	Cys	Leu	Leu	Pro	Asn	Gly	Met	Ile	Val
				20				25					30		
Thr	Leu	Glu	Cys	Leu	Arg	Glu	Ala	Thr	Leu	Ile	Thr	Ile	Lys	His	Glu
				35				40				45			
Leu	Phe	Lys	Glu	Ala	Arg	Lys	Tyr	Pro	Leu	His	Gln	Leu	Leu	Gln	Asp
				50				55			60				
Glu	Ser	Ser	Tyr	Ile	Phe	Val	Ser	Val	Thr	Gln	Glu	Ala	Glu	Arg	Glu
65					70					75					80

Glu Phe Phe Asp Glu Thr Arg Arg Leu Cys Asp Leu Arg Leu Phe Gln		
85	90	95
Pro Phe Leu Lys Val Ile Glu Pro Val Gly Asn Arg Glu Glu Lys Ile		
100	105	110
Leu Asn Arg Glu Ile Gly Phe Ala Ile Gly Met Pro Val Cys Glu Phe		
115	120	125
Asp Met Val Lys Asp Pro Glu Val Gln Asp Phe Arg Arg Asn Ile Leu		
130	135	140
Asn Val Cys Lys Glu Ala Val Asp Leu Arg Asp Leu Asn Ser Pro His		
145	150	155
Ser Arg Ala Met Tyr Val Tyr Pro Pro Asn Val Glu Ser Ser Pro Glu		
165	170	175
Leu Pro Lys His Ile Tyr Asn Lys Leu Asp Lys Gly Gln Ile Ile Val		
180	185	190
Val Ile Trp Val Ile Val Ser Pro Asn Asn Asp Lys Gln Lys Tyr Thr		
195	200	205
Leu Lys Ile Asn His Asp Cys Val Pro Glu Gln Val Ile Ala Glu Ala		
210	215	220
Ile Arg Lys Lys Thr Arg Ser Met Leu Leu Ser Ser Glu Gln Leu Lys		
225	230	235
Leu Cys Val Leu Glu Tyr Gln Gly Lys Tyr Ile Leu Lys Val Cys Gly		
245	250	255
Cys Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Lys Tyr Pro Leu Ser Gln Tyr Lys Tyr		
260	265	270
Ile Arg Ser Cys Ile Met Leu Gly Arg Met Pro Asn Leu Met Leu Met		
275	280	285
Ala Lys Glu Ser Leu Tyr Ser Gln Leu Pro Met Asp Cys Phe Thr Met		
290	295	300
Pro Ser Tyr Ser Arg Arg Ile Ser Thr Ala Thr Pro Tyr Met Asn Gly		
305	310	315
Glu Thr Ser Thr Lys Ser Leu Trp Val Ile Asn Ser Ala Leu Arg Ile		
325	330	335
Lys Ile Leu Cys Ala Thr Tyr Val Asn Val Asn Ile Arg Asp Ile Asp		
340	345	350
Lys Ile Tyr Val Arg Thr Gly Ile Tyr His Gly Gly Glu Pro Leu Cys		
355	360	365
Asp Asn Val Asn Thr Gln Arg Val Pro Cys Ser Asn Pro Arg Trp Asn		
370	375	380
Glu Trp Leu Asn Tyr Asp Ile Tyr Ile Pro Asp Leu Pro Arg Ala Ala		

385	390	395	400
Arg Leu Cys Leu Ser Ile Cys Ser Val Lys Gly Arg Lys Gly Ala Lys			
	405	410	415
Glu Glu His Cys Pro Leu Ala Trp Gly Asn Ile Asn Leu Phe Asp Tyr			
	420	425	430
Thr Asp Thr Leu Val Ser Gly Lys Met Ala Leu Asn Leu Trp Pro Val			
	435	440	445
Pro His Gly Leu Glu Asp Leu Leu Asn Pro Ile Gly Val Thr Gly Ser			
	450	455	460
Asn Pro Asn Lys Glu Thr Pro Cys Leu Glu Leu Glu Phe Asp Trp Phe			
465	470	475	480
Ser Ser Val Val Lys Phe Pro Asp Met Ser Val Ile Glu Glu His Ala			
	485	490	495
Asn Trp Ser Val Ser Arg Glu Ala Gly Phe Ser Tyr Ser His Ala Gly			
	500	505	510
Leu Ser Asn Arg Leu Ala Arg Asp Asn Glu Leu Arg Glu Asn Asp Lys			
	515	520	525
Glu Gln Leu Lys Ala Ile Ser Thr Arg Asp Pro Leu Ser Glu Ile Thr			
	530	535	540
Glu Gln Glu Lys Asp Phe Leu Trp Ser His Arg His Tyr Cys Val Thr			
545	550	555	560
Ile Pro Glu Ile Leu Pro Lys Leu Leu Leu Ser Val Lys Trp Asn Ser			
	565	570	575
Arg Asp Glu Val Ala Gln Met Tyr Cys Leu Val Lys Asp Trp Pro Pro			
	580	585	590
Ile Lys Pro Glu Gln Ala Met Glu Leu Leu Asp Cys Asn Tyr Pro Asp			
	595	600	605
Pro Met Val Arg Gly Phe Ala Val Arg Cys Leu Glu Lys Tyr Leu Thr			
	610	615	620
Asp Asp Lys Leu Ser Gln Tyr Leu Ile Gln Leu Val Gln Val Leu Lys			
625	630	635	640
Tyr Glu Gln Tyr Leu Asp Asn Leu Leu Val Arg Phe Leu Leu Lys Lys			
	645	650	655
Ala Leu Thr Asn Gln Arg Ile Gly His Phe Phe Phe Trp His Leu Lys			
	660	665	670
Ser Glu Met His Asn Lys Thr Val Ser Gln Arg Phe Gly Leu Leu Leu			
	675	680	685
Glu Ser Tyr Cys Arg Ala Cys Gly Met Tyr Leu Lys His Leu Asn Arg			
	690	695	700

Gln Val Glu Ala Met Glu Lys Leu Ile Asn Leu Thr Asp Ile Leu Lys			
705	710	715	720
Gln Glu Lys Lys Asp Glu Thr Gln Lys Val Gln Met Lys Phe Leu Val			
	725	730	735
Glu Gln Met Arg Arg Pro Asp Phe Met Asp Ala Leu Gln Gly Phe Leu			
	740	745	750
Ser Pro Leu Asn Pro Ala His Gln Leu Gly Asn Leu Arg Leu Glu Glu			
	755	760	765
Cys Arg Ile Met Ser Ser Ala Lys Arg Pro Leu Trp Leu Asn Trp Glu			
	770	775	780
Asn Pro Asp Ile Met Ser Glu Leu Leu Phe Gln Asn Asn Glu Ile Ile			
785	790	795	800
Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Ile			
	805	810	815
Ile Arg Ile Met Glu Asn Ile Trp Gln Asn Gln Gly Leu Asp Leu Arg			
	820	825	830
Met Leu Pro Tyr Gly Cys Leu Ser Ile Gly Asp Cys Val Gly Leu Ile			
	835	840	845
Glu Val Val Arg Asn Ser His Thr Ile Met Gln Ile Gln Cys Lys Gly			
	850	855	860
Gly Leu Lys Gly Ala Leu Gln Phe Asn Ser His Thr Leu His Gln Trp			
865	870	875	880
Leu Lys Asp Lys Asn Lys Gly Glu Ile Tyr Asp Ala Ala Ile Asp Leu			
	885	890	895
Phe Thr Arg Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Phe Ile Leu Gly			
	900	905	910
Ile Gly Asp Arg His Asn Ser Asn Ile Met Val Lys Asp Asp Gly Gln			
	915	920	925
Leu Phe His Ile Asp Phe Gly His Phe Leu Asp His Lys Lys Lys Lys			
	930	935	940
Phe Gly Tyr Lys Arg Glu Arg Val Pro Phe Val Leu Thr Gln Asp Phe			
945	950	955	960
Leu Ile Val Ile Ser Lys Gly Ala Gln Glu Cys Thr Lys Thr Arg Glu			
	965	970	975
Phe Glu Arg Phe Gln Glu Met Cys Tyr Lys Ala Tyr Leu Ala Ile Arg			
	980	985	990
Gln His Ala Asn Leu Phe Ile Asn Leu Phe Ser Met Met Leu Gly Ser			
	995	1000	1005
Gly Met Pro Glu Leu Gln Ser Phe Asp Asp Ile Ala Tyr Ile Arg			

1010	1015	1020
Lys Thr Leu Ala Leu Asp	Lys Thr Glu Gln Glu	Ala Leu Glu Tyr
1025	1030	1035
Phe Met Lys Gln Met Asn	Asp Ala His His Gly	Gly Trp Thr Thr
1040	1045	1050
Lys Met Asp Trp Ile Phe	His Thr Ile Lys Gln	His Ala Leu Asn
1055	1060	1065
<210> 7		
<211> 1210		
<212> PRT		
<213> 人类		
<400> 7		
Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala		
1	5	10
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln		
20	25	30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe		
35	40	45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn		
50	55	60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys		
65	70	75
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val		
85	90	95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr		
100	105	110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn		
115	120	125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu		
130	135	140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu		
145	150	155
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met		
165	170	175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro		
180	185	190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln		
195	200	205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg		

210	215	220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys		
225	230	235
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp		240
	245	250
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro		255
	260	265
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly		270
	275	280
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His		285
290	295	300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu		
305	310	315
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val		320
	325	330
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		335
	340	345
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		350
355	360	365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr		
370	375	380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu		
385	390	395
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp		
	405	410
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln		415
	420	425
His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu		430
	435	440
Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser		445
450	455	460
Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu		
465	470	475
Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu		480
	485	490
Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro		495
	500	505
Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn		510
515	520	525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly		
530	535	540
Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro		
545	550	555 560
Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro		
565	570	575
Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val		
580	585	590
Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp		
595	600	605
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys		
610	615	620
Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly		
625	630	635 640
Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu		
645	650	655
Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met Arg Arg Arg His		
660	665	670
Ile Val Arg Lys Arg Thr Leu Arg Arg Leu Leu Gln Glu Arg Glu Leu		
675	680	685
Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Glu Ala Pro Asn Gln Ala Leu Leu		
690	695	700
Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Phe Lys Lys Ile Lys Val Leu Gly Ser		
705	710	715 720
Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Leu Trp Ile Pro Glu Gly Glu		
725	730	735
Lys Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys Glu Leu Arg Glu Ala Thr Ser		
740	745	750
Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala Ser		
755	760	765
Val Asp Asn Pro His Val Cys Arg Leu Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser		
770	775	780
Thr Val Gln Leu Ile Thr Gln Leu Met Pro Phe Gly Cys Leu Leu Asp		
785	790	795 800
Tyr Val Arg Glu His Lys Asp Asn Ile Gly Ser Gln Tyr Leu Leu Asn		
805	810	815
Trp Cys Val Gln Ile Ala Lys Gly Met Asn Tyr Leu Glu Asp Arg Arg		
820	825	830
Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Lys Thr Pro		

835	840	845
Gln His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Ala Lys Leu Leu Gly Ala		
850	855	860
Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp		
865	870	875
Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp		880
885	890	895
Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser		
900	905	910
Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu		
915	920	925
Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr		
930	935	940
Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys		
945	950	955
Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln		
965	970	975
Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro		
980	985	990
Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp		
995	1000	1005
Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe		
1010	1015	1020
Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu		
1025	1030	1035
Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn		
1040	1045	1050
Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg		
1055	1060	1065
Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp		
1070	1075	1080
Asp Thr Phe Leu Pro Val Pro Glu Tyr Ile Asn Gln Ser Val Pro		
1085	1090	1095
Lys Arg Pro Ala Gly Ser Val Gln Asn Pro Val Tyr His Asn Gln		
1100	1105	1110
Pro Leu Asn Pro Ala Pro Ser Arg Asp Pro His Tyr Gln Asp Pro		
1115	1120	1125
His Ser Thr Ala Val Gly Asn Pro Glu Tyr Leu Asn Thr Val Gln		
1130	1135	1140

Pro Thr Cys Val Asn Ser Thr Phe Asp Ser Pro Ala His Trp Ala		
1145	1150	1155
Gln Lys Gly Ser His Gln Ile Ser Leu Asp Asn Pro Asp Tyr Gln		
1160	1165	1170
Gln Asp Phe Phe Pro Lys Glu Ala Lys Pro Asn Gly Ile Phe Lys		
1175	1180	1185
Gly Ser Thr Ala Glu Asn Ala Glu Tyr Leu Arg Val Ala Pro Gln		
1190	1195	1200
Ser Ser Glu Phe Ile Gly Ala		
1205	1210	
<210> 8		
<211> 705		
<212> PRT		
<213> 人类		
<400> 8		
Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala		
1	5	10
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln		
20	25	30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe		
35	40	45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn		
50	55	60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys		
65	70	75
Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val		
85	90	95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr		
100	105	110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn		
115	120	125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu		
130	135	140
His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu		
145	150	155
Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met		
165	170	175
Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro		
180	185	190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln		
195	200	205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg		
210	215	220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp Cys Cys His Asn Gln Cys Ala Ala Gly Cys		
225	230	235 240
Thr Gly Pro Arg Glu Ser Asp Cys Leu Val Cys Arg Lys Phe Arg Asp		
	245	250 255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp Thr Cys Pro Pro Leu Met Leu Tyr Asn Pro		
	260	265 270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp Val Asn Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Phe Gly		
	275	280 285
Ala Thr Cys Val Lys Lys Cys Pro Arg Asn Tyr Val Val Thr Asp His		
	290	295 300
Gly Ser Cys Val Arg Ala Cys Gly Ala Asp Ser Tyr Glu Met Glu Glu		
305	310	315 320
Asp Gly Val Arg Lys Cys Lys Lys Cys Glu Gly Pro Cys Arg Lys Val		
	325	330 335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn		
	340	345 350
Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp		
	355	360 365
Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr		
	370	375 380
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu		
385	390	395 400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp		
	405	410 415
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln		
	420	425 430
His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu		
	435	440 445
Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser		
	450	455 460
Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu		
465	470	475 480
Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu		
	485	490 495
Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro		

500	505	510
Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn		
515	520	525
Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly		
530	535	540
Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro		
545	550	555
Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro		
565	570	575
Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val		
580	585	590
Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp		
595	600	605
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys		
610	615	620
Thr Tyr Gly Pro Gly Asn Glu Ser Leu Lys Ala Met Leu Phe Cys Leu		
625	630	635
Phe Lys Leu Ser Ser Cys Asn Gln Ser Asn Asp Gly Ser Val Ser His		
645	650	655
Gln Ser Gly Ser Pro Ala Ala Gln Glu Ser Cys Leu Gly Trp Ile Pro		
660	665	670
Ser Leu Leu Pro Ser Glu Phe Gln Leu Gly Trp Gly Gly Cys Ser His		
675	680	685
Leu His Ala Trp Pro Ser Ala Ser Val Ile Ile Thr Ala Ser Ser Cys		
690	695	700
His		
705		
<210> 9		
<211> 628		
<212> PRT		
<213> 人类		
<400> 9		
Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala		
1	5	10
Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln		
20	25	30
Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe		
35	40	45
Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn		

50	55	60
Leu Glu Ile Thr Tyr Val	Gln Arg Asn Tyr Asp	Leu Ser Phe Leu Lys
65	70	75
Thr Ile Gln Glu Val Ala	Gly Tyr Val Leu Ile	Ala Leu Asn Thr Val
85	90	95
Glu Arg Ile Pro Leu Glu	Asn Leu Gln Ile Ile	Arg Gly Asn Met Tyr
100	105	110
Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala	Leu Ala Val Leu Ser	Asn Tyr Asp Ala Asn
115	120	125
Lys Thr Gly Leu Lys Glu	Leu Pro Met Arg Asn	Leu Gln Glu Ile Leu
130	135	140
His Gly Ala Val Arg Phe	Ser Asn Asn Pro Ala	Leu Cys Asn Val Glu
145	150	155
Ser Ile Gln Trp Arg Asp	Ile Val Ser Ser Asp	Phe Leu Ser Asn Met
165	170	175
Ser Met Asp Phe Gln Asn	His Leu Gly Ser Cys	Gln Lys Cys Asp Pro
180	185	190
Ser Cys Pro Asn Gly Ser	Cys Trp Gly Ala Gly	Glu Glu Asn Cys Gln
195	200	205
Lys Leu Thr Lys Ile Ile	Cys Ala Gln Gln Cys	Ser Gly Arg Cys Arg
210	215	220
Gly Lys Ser Pro Ser Asp	Cys Cys His Asn Gln	Cys Ala Ala Gly Cys
225	230	235
Thr Gly Pro Arg Glu Ser	Asp Cys Leu Val Cys	Arg Lys Phe Arg Asp
245	250	255
Glu Ala Thr Cys Lys Asp	Thr Cys Pro Pro Leu	Met Leu Tyr Asn Pro
260	265	270
Thr Thr Tyr Gln Met Asp	Val Asn Pro Glu Gly	Lys Tyr Ser Phe Gly
275	280	285
Ala Thr Cys Val Lys Lys	Cys Pro Arg Asn Tyr	Val Val Thr Asp His
290	295	300
Gly Ser Cys Val Arg Ala	Cys Gly Ala Asp Ser	Tyr Glu Met Glu Glu
305	310	315
Asp Gly Val Arg Lys Cys	Lys Lys Cys Glu Gly	Pro Cys Arg Lys Val
325	330	335
Cys Asn Gly Ile Gly Ile	Gly Glu Phe Lys Asp	Ser Leu Ser Ile Asn
340	345	350
Ala Thr Asn Ile Lys His	Phe Lys Asn Cys Thr	Ser Ile Ser Gly Asp
355	360	365

Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr			
370	375	380	
Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu			
385	390	395	400
Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp			
	405	410	415
Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln			
	420	425	430
His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu			
	435	440	445
Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser			
	450	455	460
Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu			
465	470	475	480
Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu			
	485	490	495
Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro			
	500	505	510
Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn			
	515	520	525
Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly			
	530	535	540
Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro			
545	550	555	560
Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro			
	565	570	575
Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val			
	580	585	590
Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp			
	595	600	605
Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys			
	610	615	620
Thr Tyr Gly Ser			
625			
<210> 10			
<211> 480			
<212> PRT			
<213> 人类			
<400> 10			

Met	Ser	Asp	Val	Ala	Ile	Val	Lys	Glu	Gly	Trp	Leu	His	Lys	Arg	Gly
1			5					10					15		
Glu	Tyr	Ile	Lys	Thr	Trp	Arg	Pro	Arg	Tyr	Phe	Leu	Leu	Lys	Asn	Asp
		20					25						30		
Gly	Thr	Phe	Ile	Gly	Tyr	Lys	Glu	Arg	Pro	Gln	Asp	Val	Asp	Gln	Arg
		35					40						45		
Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Asn	Phe	Ser	Val	Ala	Gln	Cys	Gln	Leu	Met	Lys
		50					55				60				
Thr	Glu	Arg	Pro	Arg	Pro	Asn	Thr	Phe	Ile	Ile	Arg	Cys	Leu	Gln	Trp
65					70					75					80
Thr	Thr	Val	Ile	Glu	Arg	Thr	Phe	His	Val	Glu	Thr	Pro	Glu	Glu	Arg
				85					90						95
Glu	Glu	Trp	Thr	Thr	Ala	Ile	Gln	Thr	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Lys	Lys
			100					105					110		
Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Met	Asp	Phe	Arg	Ser	Gly	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn
			115					120					125		
Ser	Gly	Ala	Glu	Glu	Met	Glu	Val	Ser	Leu	Ala	Lys	Pro	Lys	His	Arg
		130					135					140			
Val	Thr	Met	Asn	Glu	Phe	Glu	Tyr	Leu	Lys	Leu	Leu	Gly	Lys	Gly	Thr
145					150					155					160
Phe	Gly	Lys	Val	Ile	Leu	Val	Lys	Glu	Lys	Ala	Thr	Gly	Arg	Tyr	Tyr
			165						170						175
Ala	Met	Lys	Ile	Leu	Lys	Lys	Glu	Val	Ile	Val	Ala	Lys	Asp	Glu	Val
			180					185					190		
Ala	His	Thr	Leu	Thr	Glu	Asn	Arg	Val	Leu	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro
		195						200					205		
Phe	Leu	Thr	Ala	Leu	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gln	Thr	His	Asp	Arg	Leu	Cys
		210						215				220			
Phe	Val	Met	Glu	Tyr	Ala	Asn	Gly	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	His	Leu	Ser
225					230					235					240
Arg	Glu	Arg	Val	Phe	Ser	Glu	Asp	Arg	Ala	Arg	Phe	Tyr	Gly	Ala	Glu
			245						250						255
Ile	Val	Ser	Ala	Leu	Asp	Tyr	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Asn	Val	Val	Tyr
			260					265					270		
Arg	Asp	Leu	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Gly	His	Ile
		275						280					285		
Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Cys	Lys	Glu	Gly	Ile	Lys	Asp	Gly	Ala
		290						295					300		
Thr	Met	Lys	Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Val

305	310	315	320
Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly			
	325	330	335
Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln			
	340	345	350
Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe			
	355	360	365
Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu			
	370	375	380
Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys			
385	390	395	400
Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val			
	405	410	415
Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu			
	420	425	430
Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr			
	435	440	445
Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu			
	450	455	460
Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala			
465	470	475	480
<210> 11			
<211> 480			
<212> PRT			
<213> 人类			
<400> 11			
Met Ser Asp Val Ala Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly			
1	5	10	15
Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp			
	20	25	30
Gly Thr Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg			
	35	40	45
Glu Ala Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys			
	50	55	60
Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp			
65	70	75	80
Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg			
	85	90	95
Glu Glu Trp Thr Thr Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp Gly Leu Lys Lys			

100	105	110
Gln Glu Glu Glu Glu Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser Pro Ser Asp Asn		
115	120	125
Ser Gly Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg		
130	135	140
Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr		
145	150	155
Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr		
165	170	175
Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val		
180	185	190
Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro		
195	200	205
Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys		
210	215	220
Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser		
225	230	235
Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu		
245	250	255
Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr		
260	265	270
Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile		
275	280	285
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala		
290	295	300
Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val		
305	310	315
Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly		
325	330	335
Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln		
340	345	350
Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe		
355	360	365
Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu		
370	375	380
Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys		
385	390	395
Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val		
405	410	415

Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu
 420 425 430
 Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr
 435 440 445
 Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu
 450 455 460
 Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala
 465 470 475 480
 <210> 12
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> 人类
 <400> 12
 Met Ser Asp Val Ala Ile Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly
 1 5 10 15
 Glu Tyr Ile Lys Thr Trp Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp
 20 25 30
 Gly Thr Phe Ile Gly Tyr Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg
 35 40 45
 Glu Ala Pro Leu Asn Asn Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys
 50 55 60
 Thr Glu Arg Pro Arg Pro Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp
 65 70 75 80
 Thr Thr Val Ile Glu Arg Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg
 85 90 95
 Glu Glu Trp Thr Thr Ala Ile Gln Thr Val Ala Asp Gly Leu Lys Lys
 100 105 110
 Gln Glu Glu Glu Glu Met Asp Phe Arg Ser Gly Ser Pro Ser Asp Asn
 115 120 125
 Ser Gly Ala Glu Glu Met Glu Val Ser Leu Ala Lys Pro Lys His Arg
 130 135 140
 Val Thr Met Asn Glu Phe Glu Tyr Leu Lys Leu Leu Gly Lys Gly Thr
 145 150 155 160
 Phe Gly Lys Val Ile Leu Val Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Tyr Tyr
 165 170 175
 Ala Met Lys Ile Leu Lys Lys Glu Val Ile Val Ala Lys Asp Glu Val
 180 185 190
 Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro
 195 200 205

Phe	Leu	Thr	Ala	Leu	Lys	Tyr	Ser	Phe	Gln	Thr	His	Asp	Arg	Leu	Cys	
210				215				220								
Phe	Val	Met	Glu	Tyr	Ala	Asn	Gly	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	His	Leu	Ser	
225				230				235				240				
Arg	Glu	Arg	Val	Phe	Ser	Glu	Asp	Arg	Ala	Arg	Phe	Tyr	Gly	Ala	Glu	
				245				250				255				
Ile	Val	Ser	Ala	Leu	Asp	Tyr	Leu	His	Ser	Glu	Lys	Asn	Val	Val	Tyr	
				260				265				270				
Arg	Asp	Leu	Lys	Leu	Glu	Asn	Leu	Met	Leu	Asp	Lys	Asp	Gly	His	Ile	
				275				280				285				
Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Leu	Cys	Lys	Glu	Gly	Ile	Lys	Asp	Gly	Ala	
290				295				300								
Thr	Met	Lys	Thr	Phe	Cys	Gly	Thr	Pro	Glu	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Val	
305				310				315				320				
Leu	Glu	Asp	Asn	Asp	Tyr	Gly	Arg	Ala	Val	Asp	Trp	Trp	Gly	Leu	Gly	
				325				330				335				
Val	Val	Met	Tyr	Glu	Met	Met	Cys	Gly	Arg	Leu	Pro	Phe	Tyr	Asn	Gln	
				340				345				350				
Asp	His	Glu	Lys	Leu	Phe	Glu	Leu	Ile	Leu	Met	Glu	Glu	Ile	Arg	Phe	
				355				360				365				
Pro	Arg	Thr	Leu	Gly	Pro	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu	Leu	Ser	Gly	Leu	Leu	
370				375				380								
Lys	Lys	Asp	Pro	Lys	Gln	Arg	Leu	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Asp	Ala	Lys	
385				390				395				400				
Glu	Ile	Met	Gln	His	Arg	Phe	Phe	Ala	Gly	Ile	Val	Trp	Gln	His	Val	
				405				410				415				
Tyr	Glu	Lys	Lys	Leu	Ser	Pro	Pro	Phe	Lys	Pro	Gln	Val	Thr	Ser	Glu	
				420				425				430				
Thr	Asp	Thr	Arg	Tyr	Phe	Asp	Glu	Glu	Phe	Thr	Ala	Gln	Met	Ile	Thr	
				435				440				445				
Ile	Thr	Pro	Pro	Asp	Gln	Asp	Asp	Ser	Met	Glu	Cys	Val	Asp	Ser	Glu	
450				455				460								
Arg	Arg	Pro	His	Phe	Pro	Gln	Phe	Ser	Tyr	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Ala	
465				470				475				480				

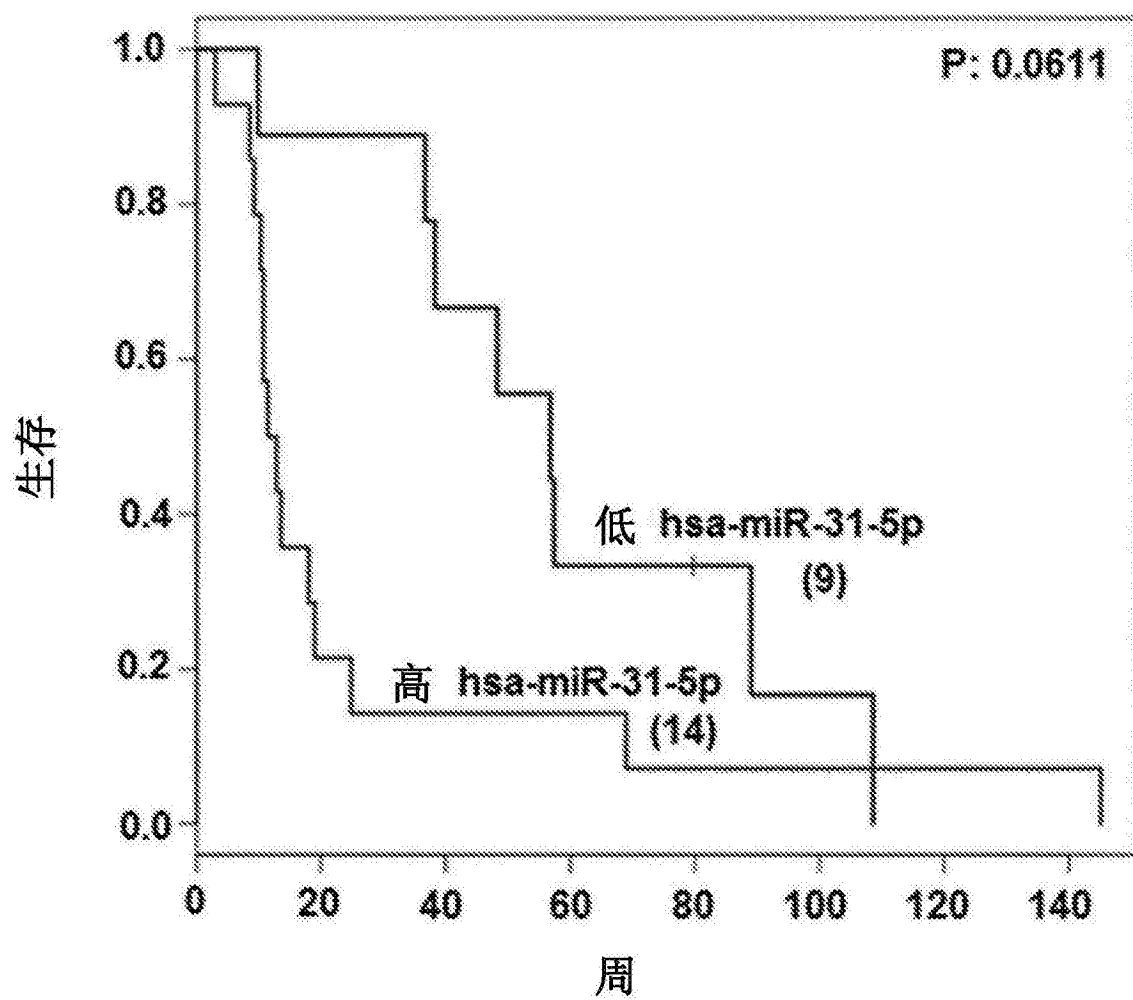


图1