



1. 一种确定患者患癌症或者未患癌症的方法,包括在来自所述患者的体液的样品中确定癌蛋白存在或不存在,其中所述癌蛋白存在于所述样品中表明所述患者患有癌症。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌蛋白是细胞内蛋白,如PRL3、PRL1、VHZ、c-myc、H-ras、AKT-1、p53、Rac1、FAK、Runx1、雌激素受体(ER)、PTEN、b-肌动蛋白或GAPDH,优选PRL3。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中来自所述患者的体液的所述样品是尿液样品。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌蛋白是细胞外癌蛋白,如Her2、N-钙粘蛋白、PDGF受体( $\alpha$ )、FLT-3或p-EGFR。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,进一步包括定量所述样品中癌蛋白的水平。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是初期或早期癌症。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症选自膀胱癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、鼻咽癌或前列腺癌。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌蛋白是可溶性癌蛋白。
9. 一种确定患者患癌症或者未患癌症的方法,该方法包括在由来自患者的体液获得的包含外泌体的样品中,确定癌蛋白存在或不存在,所述样品对于外泌体进行富集、和/或基本仅包含外泌体,其中优选地,所述样品是尿液,或者源自尿液。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌蛋白存在于所述样品中的外泌体内。
11. 一种选择进行抗癌治疗的患者的方法,其中所述方法包括在来自所述患者的体液的样品中或来源于来自所述患者的体液的样品中检测癌蛋白的存在,以及基于所确定存在的所述癌蛋白选择治疗,其中所述体液优选为尿液。
12. 一种侧流装置,包含一种或多种抗癌蛋白抗体。
13. 一种用于在体液样品中检测癌蛋白的试剂盒,其中所述试剂盒可选地包括权利要求12所述的侧流装置。
14. 一种用于在患者中诊断膀胱癌的方法,所述方法包括从来自所述患者的尿液样品中分离外泌体,并且确定在所述外泌体中癌蛋白的存在,其中所述外泌体中癌蛋白的存在表明所述患者患有膀胱癌。
15. 一种抗癌治疗抗体,用于治疗患者中的癌症,其中通过包括在来自所述患者的体液的样品中确定癌蛋白的存在的方法选择所述患者进行治疗。
16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法、试剂盒或侧流装置,其中所述癌蛋白是PRL3。
17. 一种治疗方法,所述方法包括治疗通过根据权利要求1至10中任一项所述的方法选择的患者。
18. 根据权利要求17所述的治疗方法,包括向所述患者给予抗癌治疗。
19. 根据权利要求11、15或18中任一项所述的方法,其中所述抗癌治疗是抗体治疗。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述抗体治疗是抗PRL3抗体治疗。

## 癌症的诊断

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞生物学、分子生物学和生物化学领域。本发明还涉及医学领域。特别地,本发明涉及疾病的诊断,特别是癌症的诊断。

### 背景技术

[0002] 在过去的二十年里,癌症一直是大量研究的主题。然而,对造成癌症转移的潜在原因了解不多,而且大多数类型的癌症预防仍然有限。

[0003] 已经证明基于抗体的疗法对于癌症治疗是有效的;然而,这种方法传统上限于由癌细胞表达的细胞外蛋白质或分泌的蛋白质。因此,在文献中已经鉴定了许多潜在的癌症或肿瘤标志物和癌抗原,并且已经开发了针对其中一些的抗体治疗。

[0004] 例如,众所周知的癌症治疗赫赛汀(曲妥珠单抗)是可以杀死HER2阳性癌细胞的单克隆抗体。赫赛汀结合癌细胞上的HER2(人表皮生长因子受体2)抗原。同样地,贝伐单抗(Avastin™)是靶向血管内皮生长因子(VEGF)的单克隆抗体,血管内皮生长因子是涉及新血管形成的生长因子之一。通过抑制血管生成,贝伐单抗防止肿瘤细胞接收血液恒定供应而接收肿瘤存活所需的氧和营养物。

[0005] 然而,抗体治疗剂对不同癌症的适用性不是普遍的。妨碍抗体治疗剂的通常使用的限制之一是抗体分子的大尺寸及后续不能穿过血浆或细胞膜。在不存在修饰的情况下,抗体(包括单克隆抗体)通常仅适用于靶向位于宿主细胞表面或外部的癌抗原。在上述实例中,HER2受体位于细胞表面上,因此赫赛汀可与抗体结合。同样,VEGF被分泌到血流中,并且能够被贝伐单抗结合。

[0006] 大多数癌蛋白是细胞内蛋白(如细胞内磷酸酶、细胞内激酶、转录因子等),并且仍然处于通过抗体治疗方法的探索之中。长期以来认为,抗体太大而不能穿透细胞膜阻碍了用于靶向细胞内蛋白质的抗体治疗的技术。

[0007] 我们先前证明了,三种不同的抗体可以分别靶向三种细胞内蛋白质:PRL-3(再生肝3(regenerating liver 3)的磷酸酶),其是癌症相关的磷酸酶;EGFP(增强型绿色荧光蛋白),一般的报告分子(reporter);和mT(多瘤病毒中间T(middle T)),多瘤病毒中间T癌蛋白(WO2011/065923)。只有PRL-3细胞内磷酸酶(一种酶)与人类癌症转移相关(参见Saha et al.,Science 294;1343(2001)和Wang et al.,Cancer cell 18;52-63(2010)),另外两种细胞内蛋白质(EGFP和中间T)被用于阐明抗体可靶向细胞内蛋白质的一般现象。

### 发明内容

[0008] 发明人已经发现,与正常对照相比,在癌症患者的尿液样品(尿样,urine sample)或尿外泌体中优先存在几种癌蛋白。在本研究中,我们测试多种细胞内和细胞外蛋白:PRL-3、PRL-1、VHZ、myc、ras、肌动蛋白、GAPDH、p53、N-钙粘蛋白、Her2、EGFR、FLT、雌激素受体、PDGF、PDGF-a。用蛋白质印迹进行分析。已经检查了数百个癌症尿样,包括膀胱癌、肺癌、淋巴瘤、前列腺腺癌、乳腺癌、胃癌或胃癌、鼻咽癌(nasopharynx cancer)和鼻咽部恶性肿瘤

(nasopharyngeal carcinoma) (NPC), 并与正常尿样进行比较。尿中这些癌蛋白的水平与诸如膀胱癌的初期和晚期阶段的癌症阶段相关。通过使用各种免疫测试确定尿癌蛋白的存在, 这些发现提供了对癌症的简单测试。我们的数据显示, 细胞内癌蛋白可以非常规地通过外泌体分泌, 以在体液(血液、尿液、唾液等)内进行较长距离。本文公开了用于检测癌蛋白的存在的尿液测试, 以用于诊断、癌症分期、癌症治疗和监测抗癌治疗。

[0009] 本文提供的数据显示, 令人惊讶地, 在肿瘤或癌症的细胞内发现的生物标志物可以在患者的尿液中以足够的水平存在, 从而使得能够进行检测。此外, 发明人惊奇地发现, 在癌症发展的非常早期的阶段, 可以在尿中检测到某些癌蛋白。令人惊奇的是, 在这些初始阶段期间, 患者尿液中足够量的癌蛋白远离肿瘤而存在, 使检测和诊断成为可能。

[0010] 我们在62%的多种类型的人类癌症尿液中和在100%的来源于携带PRL3+ (但不是PRL3-) 肿瘤的小鼠的尿液中发现了分泌的PRL3癌蛋白。在用抗PRL3抗体进行有效治疗后, 尿PRL3水平显著降低。因此, 提出了尿PRL3作为一种新型诊断和替代生物标志物, 其用于癌症中抗PRL3抗体治疗的治疗反应监测。

[0011] 在癌症不可接近的情况下, 使用体液样品, 例如尿液可能是特别有利的。

[0012] 本发明提供了一种用于确定个体是否患有癌症的方法, 该方法包括确定来自个体的体液样品中癌蛋白存在或不存在。癌蛋白的存在可以表明个体患有癌症。在一些情况下, 量化了癌蛋白的量。存在于样品中的癌蛋白的量可以指示个体患有癌症。例如, 较高水平的癌蛋白可以指示癌症的存在。癌蛋白的量可以指示癌症的阶段, 例如早期、中期或晚期。该方法可以包括检测外泌体癌蛋白。也就是说, 检测体液内的外泌体中或附着于外泌体的癌蛋白。

[0013] 本文公开的方法可用于监测患者对治疗性治疗(therapeutic treatments)的反应。例如, 可以在施用治疗性治疗之前和之后测定尿中癌蛋白的存在或水平。治疗性治疗可以是化学疗法、放射疗法或其他治疗性治疗。癌蛋白水平的降低可以表明该疗法具有抗癌效果。

[0014] 本文公开的方法可用于选择利用抗癌疗法进行治疗的患者, 或用于确定患者适合于这种治疗。在一些情况下, 本文公开的方法涉及患者的治疗, 该患者被确定适合通过本文公开的方法进行治疗。还公开了用于这些方法的试剂。

[0015] 在本发明方法中有用的体液样品包括尿、唾液、血液或血浆或任何其他体液, 包括母乳。优选地, 体液是尿液。

[0016] 癌蛋白可以存在于样品的外泌体中或可以是可溶的。该方法可以涉及从样品中分离外泌体, 并且确定外泌体中癌蛋白的存在或不存在。相对于从个体分离的样品, 该方法可以包括浓缩外泌体的步骤。外泌体的样品可以被处理或可以不被处理以释放外泌体的内容物, 例如溶解或破裂外泌体。该方法可以在先前已从体液样品中分离的外泌体样品上进行。特别地, 样品的外泌体中癌蛋白的存在可以表明患者患有膀胱癌。在一些情况下, 癌蛋白是可溶的, 例如可溶性PRL3。可溶性癌蛋白可以与样品中的外泌体不相关或存在于外泌体中。

[0017] 癌蛋白的存在或不存在可以涉及免疫测定(immunoassay), 例如ELISA或基于蛋白质印迹的方法。该方法可以包括使用抗体或适体(aptamer)。抗体可以是能够特异性结合癌蛋白的任何抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的, 它们可以是人、兔或小鼠抗体, 或来自任何合适的哺乳动物, 或可以在细胞培养物中产生。抗体可以是人源化的或嵌合的。所述抗体

可以是如Li等人(Clin.Canc.Res.(2005)11:2195-204)中所述的抗体223或318。抗体可以结合至通常存在于细胞内(例如在质膜、细胞质或细胞核内)的癌蛋白的区域。在一些情况下,抗体不结合癌蛋白的细胞外部分,例如通常存在于细胞表面上的癌蛋白的部分。

[0018] 与非癌性组织相比,在本文公开的方法中有用的癌蛋白在癌症中是上调或过表达的。在一些情况下,癌蛋白与在非癌性组织中表达的蛋白相比携带有突变。如本文所讨论的癌蛋白可以是细胞内或细胞外的。也就是说,它们的表达基本上在细胞内,例如在细胞核、细胞质或细胞膜内侧,或基本上在细胞外侧,例如在细胞表面上。优选地,癌蛋白是细胞内癌蛋白。

[0019] 在本文所述的优选方法中,癌蛋白选自于PRL3、PRL1、VHZ、c-myc、H-ras、AKT-1、p53、Rac1、FAK、Runx1、雌激素受体(ER)、PTEN、b-肌动蛋白或GAPDH。p53可以是突变型p53。例如,p53蛋白可以在72位具有脯氨酸残基而不是精氨酸残基。优选地,癌蛋白是PRL3、PRL1或VHZ。在一些情况下,相对于在非癌性组织中发现的形式,癌蛋白是突变的GAPDH或b-肌动蛋白的形式。在一些情况下,确定多于一种癌蛋白的存在或不存在。癌蛋白可以是Her2、N-钙粘蛋白、PDGF受体( $\alpha$ )、FLT-3或p-EGFR。

[0020] 通过本文公开的方法可检测的癌症包括胃癌、膀胱癌、肺癌、乳腺癌、胃癌、鼻咽癌、前列腺癌(例如前列腺恶性肿瘤或前列腺增生,特别是前列腺增生)。癌症可以远离样品的来源。癌症可以是难以接近和/或侵入性地进入(例如取样或活组织检查)的那种。

[0021] 在一些癌症中,方法包括确定样品中癌蛋白的水平是高于还是低于从没有癌症的个体获得的样品中的水平。在一些情况下,相对于非癌性个体,更高水平的癌蛋白表明个体患有癌症。在一些情况下,表达水平表明癌症的阶段。高水平的表达可以表明个体患有晚期或晚期癌症。

[0022] 个体优选是人类个体,并且检测的癌蛋白优选是人癌蛋白。

[0023] 在一些情况下,癌蛋白不是Her2、N-钙粘蛋白、PDGF受体( $\alpha$ )、FLT-3或p-EGFR。在一些情况下,癌症不是膀胱癌。

[0024] 在一些情况下,本发明的方法包括确定个体中癌症的阶段。也就是说,样品中某些癌蛋白的存在或不存在可以表明癌症是早期、中期或晚期。某种癌蛋白的存在或不存在可以表明癌症是或将是转移性的。在一些情况下,癌蛋白的量指示癌症的阶段。

[0025] 方法可以包括比较步骤,其中将来自个体的样品中的生物标志物的水平与从非癌性个体获得的样品中的生物标志物的水平进行比较。该水平可以与来自非癌性个体的样品(例如对照样品)直接比较,或者可以与一个或多个参考值的数据库进行比较。

[0026] 体液样品可以通过本领域已知的任何合适的方法从个体获得。样品可以在开始本文公开的方法之前获得,或者可以作为方法的一部分而获得。体液可以是其中存在外泌体的流体。方法可以包括检测样品中的癌蛋白,例如可溶性癌蛋白。方法可以包括从样品中分离外泌体,或在样品中浓缩外泌体,以及检测外泌体中的癌蛋白。

[0027] 从样品中分离外泌体的方法在本领域中是已知的。例如,EXOQUICK-TC™方法是可商购的技术,其中将样品在沉淀溶液中培育过夜,然后离心以形成含有外泌体的固体沉淀。用于分离或浓缩外泌体的其他方法包括超离心(超构型,ultra-configuration)。

[0028] 外泌体是细胞来源的囊泡。它们可以具有30-100nm的直径。它们是膜结合的,并从质膜释放。外泌体含有各种分子成分,包括miRNA和蛋白质。对外泌体存在越来越多的临床

关注,特别是它们在诊断、预后和治疗中的应用。已在各种生物流体中鉴定出外泌体,该生物流体包括尿液、血液、血清、唾液和母乳。

[0029] 可以在癌蛋白的检测之前破裂通过本发明的方法分离的外泌体。本文公开的方法可以额外地包括检测外泌体标志物(例如,CD63)、或外泌体特征性的其它蛋白质或RNA序列。

[0030] 本文还公开了用于确定样品中癌蛋白存在或不存在的试剂盒。该试剂盒可以包含对癌蛋白特异的抗体。

[0031] 本文还提供在其上结合了抗癌蛋白抗体的固体支持物。因此,该固体支持物适合于结合样品中的癌蛋白,使得可以从样品中分离癌蛋白,并进行检测。

[0032] 本文还公开了用于检测样品中靶标存在或不存在的侧向流动测试(侧流测试, lateral flow test)或侧向流动免疫色谱测定(“侧向流动测试”)。该测试可适用于家庭测试、护理点测试或实验室使用。侧向流动测试可以含有一种或多种抗癌蛋白抗体。

[0033] 试剂盒可以包括一种或多种溶液,该溶液用于制备用于检测癌蛋白的生物流体,和/或用于洗涤结合到支持物上的癌蛋白和/或检测结合的癌蛋白。试剂盒可以包括侧向流动测试。

[0034] 任何适合于检测样品中蛋白质的方法均可用在本文所述的方法中。该方法可以包括检测癌蛋白的存在或不存在。该方法可以包含癌蛋白的表达水平的定量。

[0035] 在一些情况下,癌蛋白的水平表明癌症的阶段。因此,某种癌蛋白的高水平表达可以表明癌症处于更晚期的阶段,例如晚期癌症。在一些情况下,癌蛋白的存在可以表明晚期癌症。

[0036] 在本文中有用的方法包括蛋白质印迹或斑点印迹。此种方法包括通过将样品暴露于抗体或能够特异性结合癌蛋白的其它试剂,从而检测特定的癌蛋白。

[0037] 特别优选的方法包括酶联免疫吸附测定(ELISA),例如夹心ELISA。ELISA涉及使用捕获剂以将癌蛋白特异性结合到表面,并且应用检测剂来检测结合的癌蛋白。通常,捕获剂和检测剂是抗体。检测剂可以连接到报告分子,优选酶。然后将底物施加到表面,并在底物与检测剂的整个反应过程中检测结合的癌蛋白。

[0038] 在一些情况下,可以使用浸入生物流体中的固体支持物或者在从生物流体获得的外泌体的样品中进行ELISA。固体支持物可以是板、浸渍片(dipstick)或珠,或本领域已知的其他支持物。

[0039] 本文还包括用于在体液中检测或测量癌蛋白的试剂盒。该试剂盒可以包括侧流测试装置(侧向流动测试装置, lateral flow test device)。该试剂盒可以包括使用说明书。侧流测试可以包括反应区、测试区和任意的对照区。

[0040] 在用于基于ELISA的检测癌蛋白的方法中使用的合适的抗体包括本领域已知的任何抗癌蛋白抗体。为了检测PRL3,抗体可以是如在Li等中所公开的单克隆抗体223或318,或者来自兔#1992或#1993的多克隆抗体血清。抗体的任何组合可以用作捕获剂或检测剂。然而,优选地,捕获剂和检测剂是不同的。在PRL3的情况下,特别优选的组合是使用单克隆抗体223作为捕获抗体。兔抗血清#1992作为检测剂是优选的。检测剂可以连接到金颗粒以允许检测。

[0041] 根据本发明所述的方法可以包括以下步骤:

[0042] a) 提供从个体获得的生物样品；

[0043] b) 将所述生物样品暴露于其上固定有癌蛋白结合剂的固体支持物，使得生物样品中的癌蛋白固定在固体支持物上；

[0044] c) 从所述生物样品中分离癌蛋白；

[0045] d) 检测癌蛋白。

[0046] 癌蛋白的存在可以表明个体患有癌症。该方法可以包括对检测的癌蛋白的量进行定量。该方法可以包括一个或多个洗涤步骤，例如在固体支持物上固定癌蛋白之后。该方法可以包括比较步骤，其中将步骤(d)中获得的结果与从已知没有癌症的个体获得的结果进行比较。该比较可以涉及与数据库中的已知值的比较。

[0047] 在一些情况下，固体支持物是硝化纤维素膜，特别是硝化纤维素AE99。优选地，单克隆抗体结合到固体支持物作为捕获抗体(capture antibody)。优选地，抗体是抗体223。该测定可以包括将生物样品暴露于捕获抗体中10-20分钟，优选11-19分钟，优选14-16分钟，优选约15分钟。

[0048] 优选地，多克隆抗体被用作检测剂。优选地，兔抗PRL3#1992血清被用作检测剂。优选地，检测剂与金颗粒缀合以允许检测。

[0049] 在由于特定癌蛋白的存在或水平而诊断癌症后，可以对个体开药方或进行相关的治疗性治疗。例如，特定癌蛋白的检测可以表明，特定免疫治疗可能是有益的。例如，鉴定PRL3的存在可以表明患者会受益于PRL3免疫治疗，例如抗PRL3抗体治疗。

### 具体实施方式

[0050] 我们描述了各种免疫学测定，如蛋白质印迹、斑点印迹、ELISA。我们还描述了妊娠样测试，以检测尿液和血液样品(以及唾液)中的癌蛋白。

[0051] 我们调查了癌蛋白的水平是否与癌症的阶段相关。

[0052] 使用尿液和血液样品来筛选生物标志物比使用肿瘤样品更容易，因为可能难以达到肿瘤，例如在内部中心位置的脑肿瘤。

[0053] 我们有2个独立的PRL-3单克隆抗体(#318或#223)；我们还有与PRL-3及其相关的PRL-1和PRL-2反应的多克隆兔抗体。除了蛋白质印迹和Elisa测定之外，我们可以制备含有PRL-3克隆抗体#318或#223的试纸条，PRL-3克隆抗体#318或#223用于从尿或血清(可能是唾液)样品中捕获PRL-3抗原，其是与HRP或AP偶联的第二抗体，会清楚地显示条或板上的抗体-抗原酶反应的颜色，从而反映出存在PRL-3抗原。该技术类似于家庭妊娠测试(反应区、试验区、对照区)，其可以应用于在尿样中检测到的任何其他生物标志物。

[0054] 我们还使用类似的技术来测试简单尿样中其他分泌的癌靶标。

[0055] 细胞内蛋白质可以通过外泌体排泄到尿液，这在以前没有报告过。这是证明该观点的第一次研究，并提供了检测癌症和反映癌症阶段的简单方法。本文公开的是通过分析癌症尿样或自去年以来从数百个尿样中纯化的相应外泌体而获得的数据。

[0056] 如本文所用，术语“生物标志物”是指表明个体中的生物学状况或疾病(例如癌症)的蛋白质。本发明的生物标志物通常是蛋白质或癌蛋白。癌蛋白是具有引起癌症的潜力的蛋白质或与癌症相关的蛋白。特别地，本发明涉及生物标志物，其是细胞内癌蛋白。

[0057] 细胞内癌蛋白

[0058] 发明人已经确定,细胞内癌蛋白可以通过外泌体非常规地分泌出以在体内长距离移动。因此,本发明特别地涉及细胞内癌蛋白。

[0059] 细胞内癌蛋白和细胞内抗原在本领域是已知的,并且可包括下列中的任何一种或多种或其变体、衍生物、同源物或片段等。

[0060] 合适的细胞内癌蛋白是本领域技术人员可以理解的。在肿瘤形成过程中特异性上调但在宿主组织中表达较差或不表达的基因,特别有希望作为肿瘤特异性靶标。对于显示遗传联系的癌症,用与家族性癌症相关的抗原(基于表位的肽疫苗)免疫具有免疫能力的年轻的易感家族成员,可以促使免疫系统抵抗该癌蛋白。然后这些内源性刺激的抗体可以潜在地抗击表达该特定癌蛋白的癌细胞。本文描述的结果表明,基于抗体的治疗和针对癌症的疫苗接种,可以扩展至更广泛种类的作为治疗靶标的细胞内癌蛋白。整个类别的细胞内癌蛋白,以前认为不能由治疗性抗体或疫苗靶向,现在可以扩大定制的癌症疗法的范围以及引领癌症疫苗的新时代。我们预期,使用细胞内自体抗原的一个潜在优点是,它们与细胞外自体抗原相比可以具有更好的引发免疫应答的机会,因为靶向细胞外的自体抗原的免疫细胞通常在发育期间被消除。我们发现,与外源递送的抗体相比,抗原诱导的抗体治疗可以实现类似的抗肿瘤治疗功效。因为现有的常规临床抗体治疗昂贵,所以作为诱导高滴度的抗原诱导抗体的手段,疫苗接种可能更有用且经济。这种“癌症疫苗接种”的概念是有前景和挑战的。

[0061] 如本文所述的癌蛋白是蛋白质,其参与了与致瘤细胞生长相关的蛋白质的调节或合成。癌蛋白可以是癌多肽(oncogenic polypeptide),其参与将正常细胞转化为癌细胞。癌蛋白在肿瘤细胞中的表达可高于正常细胞。癌蛋白是细胞内的,这意味着它们位于细胞内部,例如在细胞核或细胞质中,或附着于细胞膜的细胞内表面。优选地,癌蛋白是自体抗原,这意味着它们是通常在动物中发现的蛋白质,并且形成从动物基因组表达的蛋白质群的一部分,并且对于该动物不是异源的,如病毒蛋白为异源的。

[0062] 或者,细胞内癌蛋白可以是具有胞内区的癌蛋白。例如,其可以是具有延伸到细胞质中的区域的膜锚定蛋白。

[0063] 癌蛋白可以是非自体抗原,例如由被感染的细胞表达的病毒蛋白。在一些情况下,细胞内癌蛋白不是来自微生物。例如,不是病毒癌蛋白,或不是细菌癌蛋白,或不是真菌癌蛋白。优选地,癌蛋白是自体抗原。使用细胞内自体抗原的潜在优点是,与细胞外自体抗原相比,它们可以具有更好的引发免疫应答的机会,因为靶向细胞外自体抗原的免疫细胞通常在发育期间被消除。

[0064] PRL-3

[0065] 以下文本改编自OMIM条目606449。

[0066] PRL-3也称为蛋白质-酪氨酸磷酸酶,类型4A,3;PTP4A3。PRL-3的染色体位置在基因图谱基因座8q24.3。

[0067] 在心脏中,蛋白激酶调节收缩、离子转运、代谢和基因表达。磷酸酶除了它们在去磷酸化中的作用之外,还涉及心脏肥大和功能障碍。

[0068] 通过数据库搜索和筛选心脏cDNA文库,Matter et al.2001, Biochem.Biophys.Res.Commun.283:1061-1068鉴定了编码PTP4A3的cDNA,它们将其称为PRL3。推导的PRL3蛋白与PRL1(PTP4A1;601585)具有76%的同一性,并且与小鼠Pr13具有

96%的同一性。Northern印迹分析显示,主要在心脏和骨骼肌中表达约2.3kb的PRL3转录物,在胰腺中具有较低的表达。该表达模式不同于PRL1和PRL2 (PTP4A2;601584)的较宽表达。原位杂交分析将PRL3表达局限于心肌细胞中。Tris甘氨酸凝胶分析显示,PRL3表达为22-kD蛋白。功能和突变分析表明,磷酸酯断裂(phosphate cleavage)依赖于PRL3的cys104。PRL3的过表达导致增加的细胞生长。蛋白质印迹分析示出了响应于血管紧张素II(106150)的p130cas (BCAR1;602941)的去磷酸化,表明PRL3在调节血管紧张素II诱导的细胞内钙瞬变中的作用。

[0069] 为了深入了解肿瘤转移的分子基础,Saha et al.2001,Science 294:1343-1346将转移性结直肠癌的总基因表达谱与原发性癌症、良性结直肠肿瘤和正常结直肠上皮的总基因表达谱进行比较。在18个研究的癌症转移的每一个中,PRL3均以高水平表达,但在非转移性肿瘤和正常结直肠上皮中以较低水平表达。在检查的12个转移中的3个中,在位于染色体8q24.3的小扩增子(small amplicon)内发现了PRL3基因的多个拷贝。Saha et al.(2001)的结论是,PRL3基因对结直肠癌转移是重要的。

[0070] 使用斯坦福G3辐射杂交板和数据库序列分析,Saha et al.(2001)将PRL3基因映射到周围标志物145.20。PRL3基因还与位于8q24.3的标志物SHGC-22154紧密连接,标志物离8q端粒约3Mb。

[0071] Li et al(2005),Clin Cancer Res;11:2195-204中详细地描述了小鼠和人类PRL-3蛋白。

[0072] PRL-3序列

[0073] 本文所述的方法和组合物使用PRL-3多肽,其在下文详细描述。如本文所使用的,术语“PRL-3”意指选自以下的序列。

[0074]

Unigene	版本	说明
AF041434.1	GI:3406429	智人潜在异戊烯化蛋白酪氨酸磷酸酶 hPRL-3 mRNA, 全编码序列 (complete cds)
BT007303.1	GI:30583444	智人蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA 型, 成员 3mRNA, 全编码序列
AK128380.1 NM_007079.2	GI:34535719 GI:14589853	智人 cDNA FLJ46523 fis, 克隆 THYMU3034099 智人蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA 型, 成员 3 (PTP4A3), 转录变体 2, mRNA
AY819648.1	GI:55977462	智人 HCV P7-反式调节蛋白 2 mRNA, 全编码序列
BC003105.1	GI:13111874	智人蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA 型, 成员 3, mRNA (cDNA 克隆 MGC: 1950 IMAGE:3357244), 全编码序列
NM_032611.1	GI:14589855	智人蛋白酪氨酸磷酸酶 IVA 型, 成员 3 (PTP4A3), 转录变体 1, mRNA
AK311257.1 U87168.1	GI:164696021 GI:1842085	智人 cDNA, FLJ 18299 智人蛋白酪氨酸磷酸酶同源物 hPRL-R mRNA, 部分编码序列
BC066043.1	GI:42406367	小家鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, mRNA (cDNA 克隆 MGC:90066 IMAGE:6415021), 全编码序列
AJ276554.1	GI:26985935	用于蛋白酪氨酸磷酸酶 hPRL-3 的智人 mRNA, 短形式
AK190358.1	GI:56014535	小家鼠 cDNA, 克隆: YIG0102103, 链: 加 (strand:plus), 参考: ENSEMBL: 小鼠-转录-ENST:ENSMUST00000053232, 基于 BLAT 检索
CT010215.1	GI:71059758	小家鼠全开放阅读框 cDNA 克隆 RZPDo836H0950D 基因 Ptp4a3, 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3; 全编码序列, 包括: 终止密码子
AK147489.1	GI:74184679	小家鼠成年雄性大脑未限定的细胞系 cDNA, RIKEN 全长富集的文库, 克隆: M5C1053F14 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全插入序列
AK172192.1	GI:74182510	小家鼠活化的脾 cDNA, RIKEN 全长富集的文库, 克隆: F830102P03 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全插入序列
AK 143702.1	GI:74150753	小家鼠 6 天新生鼠脾 cDNA, RIKEN 全长富集的文库, 克隆: F43001 1 C20 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全插入序列
AF035645.1	GI:2992631	小家鼠潜在异戊烯化的蛋白酪氨酸磷酸酶

[0075]

		mPRL-3 (Prl3) mRNA, 全编码序列
NM_008975.2	GI:31543526	小家鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3 (Ptp4a3), mRNA
AK014601.1	GI:12852557	小家鼠 0 天新生鼠皮肤 cDNA, RIKEN 全长富集的文库, 克隆: 4632430E19 产物蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全插入序列
AK004562.1	GI:12835815	小家鼠成年雄性肺 cDNA, RIKEN 全长富集的文库, 克隆: 1200003F10 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全插入序列
AK003954.1	GI:12834926	小家鼠 18 天胚全身 cDNA, RIKEN 全长富集的文库, 克隆: 1110029E17 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, 全插入序列
BC027445.1	GI:20071662	小家鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a3, mRNA (cDNA 克隆 MGC: 36146 IMAGE:4482106), 全编码序列

[0076] “PRL-3多肽”可以包含人类PRL-3多肽(例如具有独立基因库登录号AF041434.1的序列)或由其组成。

[0077] 还包括任意的、一些的或全部这些多肽的同源物变体及其衍生物。例如,PRL-3可以包括独立基因库登录号BC066043.1。

[0078] PRL1

[0079] 以下文本改编自OMIM条目604585。

[0080] PRL1也称为蛋白酪氨酸磷酸酶,4a1型;PTP4A1,磷酸酶或再生肝1(Regenerating Liver 1),PTP(CAAX1)。PRL1的染色体位置在基因图谱基因座6q12。

[0081] 涉及生长、分化和代谢的细胞过程通常部分由蛋白磷酸化和去磷酸化调节。水解酪氨酸残基的磷酸单酯的蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP),都具有共同的活性位点基序并被分为三组。

[0082] 这些包括受体样PTP、细胞内PTP和双特异性PTP,它们可以在丝氨酸和苏氨酸残基以及在酪氨酸处去磷酸。

[0083] Diamond et al 1994Cell.Bio.14:3752-3762描述了来自再生作为第四类成员的大鼠肝脏的PTP。该基因(称它们为PRL1)是许多直接早期基因之一,并且主要在细胞核中表达。PRL1在稳定转染的细胞中的过表达产生转化的表型,这表明其可能在肿瘤发生中发挥了一些作用。

[0084] 通过使用体外异戊烯化筛选,Cates et al.,1996,Cancer Lett.110:49-55分离了编码PRL1同源物的2种人cDNA,指定为PTP(CAAX1)和PTP(CAAX2)(PRL2;601584),它们在体外通过哺乳动物法呢基:蛋白转移酶而法尼基化。这些PTP在上皮细胞中的过表达,在培养的细胞中导致转化的表型和并且在裸鼠中导致肿瘤生长。作者得出结论是,PTP(CAAX1)和PTP(CAAX2)代表了一类新颖的异戊二烯化的癌性PTP。

[0085] Peng et al.1998,J.Biol.Chern.273:17286-17295报告了人PTP(CAAX1)基因或PRL1由6个外显子组成并含有2个启动子。预测的小鼠、大鼠和人PRL1蛋白是相同的。Zeng et al.1998,Biochem.Biophys.Res.Commun.244:421-427确定,人PRL1和PRL2蛋白共享有87%的氨基酸序列同一性。通过FISH,Peng et al.(1998)将PRL1基因映射到6q12。

[0086] 当使用术语“PRL-1”时,应理解为指任何PRL-1序列,包括PRL-1蛋白或PRL-1核酸

及其任何片段、变体同源物、衍生物、变体。

[0087] PRL-1的性质和活性在本文献中有描述,例如在参考文献中。

[0088] Zeng et al (1998), supra中详细描述了小鼠和人PRL-1蛋白。

[0089] PRL-1序列

[0090] 本文描述的方法和组合物使用PRL-1多肽,其在下文详细描述。如本文所使用的,术语“PRL-1”旨在是指下表D1中所示的序列。

[0091]

Unigene	说明
NM 003463.3	智人蛋白酪氨酸磷酸酶 IV A 型, 成员 1 (PTP4A1), mRNA
CR602427.1	智人(人)的归一化的 HeLa 细胞 Cot 25 的全长 cDNA 克隆 CSODK012YJ03
CR599216.1	智人(人)的神经母细胞瘤的全长 cDNA 克隆 CLOBB007ZF05
CR596545.1	智人(人)的 HeLa 细胞 Cot 25 归一化的的全长 cDNA 克隆 CSODK010YM06
CR749458.1	智人 mRNA; cDNA DKFZp779M0721 (来自克隆 DKFZp779M0721)

[0092]

- BC045571.1 智人蛋白酪氨酸磷酸酶 IV A 型,成员 1,mRNA(cDNA 克隆 MGC:57320 IMAGE:4826233), 全编码序列
- AJ420505.1 智人 mRNA 全长插入 cDNA 克隆 EUROIMAGE 2096405
- AK312526.1 智人 cDNA, FLJ92892
- BC023975.2 智人蛋白酪氨酸磷酸酶 IV A 型,成员 1,mRNA(cDNA 克隆 MGC:1659 IMAGE:2960001), 全编码序列
- U69701.1 智人蛋白酪氨酸磷酸酶 hPRL-1 mRNA, 部分编码序列
- U48296.1 智人蛋白酪氨酸磷酸酶 PTPCAAX 1 (hPTPCAAX1) mRNA, 全编码序列
- AK081491.1 小家鼠 16 天胚胎头 cDNA, RIKEN 全长富集的文库, 克隆: C130021 BO 1 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1, 全插入序列
- AK078120.1 小家鼠成年雄性延脑 cDNA, RIKEN 全长富集的文库, 克隆: 6330521 E 18 产物: 蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1, 全插入序列
- BC055039.1 小家鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1, mRNA (cDNA 克隆 MGC:62623 IMAGE:6396041), 全编码序列
- AK199907.1 小家鼠 cDNA, 克隆: Y1G0132L24, 链: 减,  
参考: ENSEMBL 小鼠-转录物 ENST: ENSMUST00000061959, 基于 BLAT 检索小家鼠 cDNA, 克隆: Y1 G0129D05,  
链: 正链, 参考: ENSEMBL:小鼠-转录物-
- AK198788.1 ENST:ENSMUST00000061959, 基于 BLAT 检索小家鼠 cDNA, 克隆:Y1G0109N22, 链: 正链, 参考: ENSEMBL: 小鼠-转录物-
- AK192767.1 ENST:ENSMUST00000055216, 基于 BLAT 检索小家鼠 cDNA, 克隆:YOG014001 1 , 链: 正链, 参考:ENSEMBL:小鼠-转录物-
- AK187266.1 ENST: ENSMUST00000061959, 基于 BLAT 检索小家鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1, mRNA (cDNA 克隆 BC086787.1 MGC: 102117 IMAGE: 30538771)
- BC094447.1 全编码序列小家鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1, mRNA (cDNA 克隆 MGC: 102501 IMAGE: 3990529), 全编码序列
- AK 150506.1 小家鼠骨髓巨噬细胞 cDNA, RIKEN 全长富集的文库, 克隆:

[0093]

- I830008L20 产物：蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1，全插入序列
- AK 148288.1 全小家鼠 B16 F10Y 细胞 cDNA，RIKEN 全长富集的文库，克隆：  
G3 70079M23 产物：蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1，插入序列
- AK151533.1 小家鼠骨髓巨噬细胞 cDNA，RIKEN 全长富集的文库，克隆：  
I830031 H07 产物：蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1，全插入序列
- U84411.1 小家鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 (PRL-1) mRNA，全编码序列
- NM 011200.2 小家鼠蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1 (Ptp4a1)，mRNA  
小家鼠，蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1，克隆
- BC031734.1 IMAGE:3590144，mRNA 小家鼠，蛋白酪氨酸磷酸酶 4a1，克隆
- BC003761.1 IMAGE:3157812，mRNA

[0094] “PRL-1 多肽”可以包含人 PRL-1 多肽或由其组成，例如具有 Unigene 登录号 NM\_003463.3 的序列。还包括任一、一些或全部的这些多肽的同源物变体及其衍生物。例如，PRL-1 可以包括 Unigene 登录号 U84411.1。

[0095] VHZ

[0096] 本文所述的方法和组合物使用 VHZ，其详细地描述于下文。

[0097] VHZ 也称为 DUSP23、MOSP、LDP-3、DUSP25、FLJ20442 和 RP11-190A12.1。

[0098] 如本文所使用的，术语“VHZ”可以指具有以下 GenBank 登录号的多肽序列：NP\_060293.2、NP\_081001.1、XP\_341 157.1、XP\_001 170819.1、XP\_001 170835.1、XP\_545747.2、NP\_001076078.1、NP\_00101 1371.1、NP\_783859.1、NP\_001034709.1、XP\_001480730.1、XP\_001 1 17253.1 或 XP\_001 1 17256.1。

[0099] “VHZ 多肽”可以包含人类 VHZ 多肽或由其组成，例如具有登录号 NP060293 的序列。

[0100] 关于核酸序列，术语“VHZ 多核苷酸”、“VHZ 核苷酸”和“VHZ 核酸”可以互换使用，并且应当理解为具体地同时包括 cDNA 和基因组 VHZ 序列。这些术语还意在包括能够编码 VHZ 多肽和/或其片段、衍生物、同源物或变体的核酸序列。

[0101] 当提及 VHZ 核酸时，其应被视为提及 VHZ 核酸家族的任何成员。特别令人感兴趣的是选自以下组成的组中的 VHZ 核酸：NM\_017823.3、NM\_026725.2、XM\_341 156.3、XM\_001 170819.1、XM\_170835.1、XM\_545747.2、NM\_001082609.1、NM\_00101 1371.1、N\_175732.1、NM\_001039620.1、XM\_001480680.1、XM\_001 1 17253.1 或 XM\_001 117256.1。

[0102] 还包括以下作为“其他 VHZ 核酸序列”列出的任何一种或多种核酸序列。

[0103] 例如，VHZ 核酸可以包含具有 GenBank 登录号 NM\_017823.3 的人 VHZ 序列。

[0104] Her2

[0105] Her2/neu (也称为 ErbB-2) 代表“人表皮生长因子受体 2”，并且是在乳腺癌中具有更高侵袭性的蛋白质。它是 ErbB 蛋白家族的成员，更常称为表皮生长因子受体家族。HER2/neu 也被指定为 CD340 (分化簇 340) 和 p185。HER2 是细胞膜表面结合的受体酪氨酸激酶，并且通常参与导致细胞生长和分化的信号转导途径。

[0106] 如本文所述,HER2可以指选自GenBank登录号NP\_004439.2、NP\_001005862.1、NP\_001003817.1、AAI67147.1的多肽序列。

[0107] 本文所述的“Her2多肽”可以包含人HER2多肽序列或由其组成,如登录号P04626.1的序列。

[0108] Her2多肽描述于US6333169和EP1418235中。

[0109] 在本发明中有用的其它癌蛋白包括EGFR (GenBank登录号CAA25240 (GI:119533)、ADZ75461.1 (GI326467049))、SHP1 (GenBank登录号NP002822.2 (GI:18104989)、NP536858.1 (GI:18104991)、NP536859.1 (GI:18104991))、Tiam (GenBank登录号NP003244.2 (GI:115583670)、AAA98443.1 (GI:897557)、Q13009.2 (GI:152031709))、Myc (GenBank登录号AAA59886.1 (GI:188975)、AAA59887.1 (GI:188977)、CAA25015.2 (GI:29839758)、NP002458.2 (GI:71774083))、Ras (GenBank登录号AAA34557.1 (GI:171374)) 和Runx-1 (GenBank登录号NP001079966.1 (GI:148232064))。

[0110] 雌激素受体

[0111] 在本发明中有用的癌蛋白是雌激素受体(ER)。癌蛋白可以是人类ER。它可以包含在P03372 (GI:544257) 中列出的蛋白质序列或由其组成。

[0112] 雌激素受体及其片段可用于治疗由雌激素受体(ER)过表达引起的或与之相关的乳腺癌。针对ER的抗体或使用ER癌蛋白或其片段的疫苗接种可以用于防止扩散。这对于靶向ER阳性乳腺癌患者特别有用,无论Her2或其他蛋白的表达如何。

[0113] 雌激素受体(ER)是配体激活的转录因子,其由多个对于激素结合、DNA结合和转录激活重要的结构域组成。选择性剪接产生多种ER mRNA转录物,其主要区别在于其5'-引物非翻译区。翻译的受体显示较小的变异性(参见OMIM参考文献133430)。

[0114] 乙型肝炎病毒(HBV)蛋白

[0115] 乙型肝炎蛋白可以适用于本发明。HBV存在8种基因型。

[0116] 例如,HBV X蛋白。HBV X蛋白定位于感染细胞的细胞核中。大多数肝细胞癌(HCC)与HBV感染相关。因此,HBV蛋白可用于治疗HCC,抗体靶向病毒蛋白以特异地破坏病毒感染细胞,同时使正常细胞无损伤。

[0117] HBV-X蛋白的蛋白序列已保藏在GenBank中并且适用于本发明。例如,术语“HBV-X蛋白”可用于指包含GenBank CBX46805.1 (GI:310923520) 或EMBL登录号FR714506.1列出的序列的蛋白或由该序列组成的蛋白、或由以下基因编码的蛋白质,该基因具有登录号AB670311.1 (GI:371919030) 中列出的序列。

[0118] 本文特别优选的其它癌蛋白是c-myc (CAA46984.1GI:396512)、H-ras (CAG38816.1GI:49168642)、AKT-1 (AAL55732.1GI:18027298)、p53 (BAC16799.1GI:23491729或其变体,如NP\_000537.3GI:120407068)、Rac1 (CAB53579.5GI:8574038)、FAK (NP\_722560.1GI:24476013或NP\_005598.3GI:27886593)、Runx1 (AAI36381.1GI:223459612)、PTEN (AAD13528.1GI:4240387)、b-肌动蛋白 (NP\_001092.1GI:4501885) 或GAPDH (NP\_001243728.1GI:378404908)、N-钙粘蛋白 (CAA40773.1GM335229)、PDGF受体( $\alpha$ ) (NP\_006197.1GI:5453870)、FLT-3 (NP\_004110.2GI:121114304) 或EGFR或p-EGFR (NP\_005219.2GI:29725609)。

[0119] 多肽

[0120] “多肽”是指包含通过肽键或修饰的肽键彼此连接的两个或多个氨基酸的任何肽或蛋白质,即肽等排体。“多肽”同时指短链(通常称为肽、寡肽或寡聚体)以及长链(通常称为蛋白质)。多肽可以含有除了20个基因编码的氨基酸之外的氨基酸。

[0121] “多肽”包括通过天然过程(例如,翻译后加工)或通过本领域熟知的化学修饰技术修饰的氨基酸序列。这样的修饰在基础教科书和更详细的专论中以及在大量研究文献中有详细描述。修饰可发生在多肽中的任何位置,包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。应当理解是,相同类型的修饰可以以相同或不同程度存在于给定多肽中的多个位点。此外,给定的多肽可以含有许多类型的修饰。

[0122] 多肽可以由于泛素化而支化,并且它们可以是环状的、有支链的或无支链的。环状、支链和支链环状多肽可以由翻译后天然过程产生,或者可以通过合成方法制备。修饰包括乙酰化、酰化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、脱甲基化、共价交联的形成、胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化、 $\gamma$ -羧化、糖基化、GPI锚形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、蛋白水解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化(selenoylation)、硫酸化、转运-RNA(t-RNA)介导的氨基酸添加到蛋白质,例如精氨酸酰化和泛素化。参见,例如Proteins-Structure and Molecular Properties,第2版,T.E.Creighton,W.H.Freeman and Company,New York,1993和Wold,F.,Posttranslational Protein Modifications:Perspectives and Prospects,Posttranslational Covalent Modification of Proteins第1-12页,B.C.Johnson,Ed.,Academic Press,New York,1983;Seifter et al.,“Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors”,Meth Enzymol(1990)182:626-646以及Rattan et al.,“Protein Synthesis:Posttranslational Modifications and Aging”,Ann NY AcadSci(1992)663:48-62。

[0123] 术语“多肽”包括本领域已知的各种合成肽变种,例如逆反D肽。所述肽可以是抗原决定簇和/或T细胞表位。所述肽可以在体内是免疫原性的。所述肽能够在体内诱导中和抗体。

[0124] 当应用于细胞内癌蛋白时,所得的氨基酸序列可以具有一种或多种活性,例如与细胞内癌蛋白多肽(例如人细胞内癌蛋白)共有的生物活性。例如,与正常乳腺细胞相比,细胞内癌蛋白同源物在癌细胞中可以具有增加的表达水平。特别地,术语“同源物”涵盖关于结构和/或功能的同一性,只要获得的氨基酸序列具有细胞内癌蛋白活性。关于序列同一性(即相似性),可以有至少70%,例如至少75%,例如至少85%,例如至少90%的序列同一性。可以具有至少95%,例如至少98%的序列同一性。这些术语还涵盖了从作为细胞内癌蛋白核酸序列的等位基因变异的氨基酸衍生的多肽。

[0125] 当提及多肽(例如细胞内癌蛋白)的“活性”或“生物活性”时,这些术语意指细胞内癌蛋白的代谢或生理功能,包括类似的活性或改善的活性或具有降低的不良副作用的这些活性。还包括的是细胞内癌蛋白的抗原性和免疫原性活性。此类活性的例子以及测定和定量这些活性的方法是本领域已知的,并且在本文的其它地方有详细描述。

[0126] 变体、衍生物和同源物

[0127] 本文所述的方法可以涉及PRL3多肽或此类肽的变体、同源物或衍生物的检测或定

量。本文所述的方法可以包括检测与本文公开的序列不同的癌蛋白,且其可以携带相对于已知序列的一个或多个突变。因此,此类序列不限于本文中阐述的特定序列,而且还包括同源序列,例如相关的细胞同源物、来自其他物种的同源物及其变体或衍生物。

[0128] 与本文献中描述的核苷酸序列相关的术语“变体”、“同源物”或“衍生物”包括由该序列取代、改变、修饰、置换、缺失或一个(或多个)核苷酸,或者向该序列添加一个(或多个)核苷酸。获得的序列能够可以编码具有细胞内癌蛋白结合活性的多肽,该活性如本文其它部分所述。

[0129] 如上所述,关于序列同一性,“同源物”与相关序列具有至少5%的同一性、至少10%的同一性、至少15%的同一性、至少20%的同一性、至少25%的同一性、至少30%的同一性、至少35%的同一性、至少40%的同一性、至少45%的同一性、至少50%的同一性、至少55%的同一性、至少60%的同一性、至少65%的同一性、至少70%的同一性、至少75%的同一性、至少80%的同一性、至少85%的同一性、至少90%的同一性或至少95%的同一性。

[0130] 可以具有至少95%的同一性,如至少96%的同一性,如至少97%的同一性,如至少98%的同一性,如至少99%的同一性。可以如上所述进行核苷酸同源性比较。序列比较程序,例如上述的GCG Wisconsin Bestfit程序可用于此目的。默认评分矩阵(default scoring matrix)对于每个相同的核苷酸具有10的匹配值,并且对于每个错配具有-9的匹配值。对于每个核苷酸,默认空位产生罚分为-50,并且默认空位延伸罚分为-3。

[0131] 患者

[0132] 待治疗的患者可以是任何动物或人。患者优选是非人类哺乳动物,更优选人类患者。患者可以是男性或女性。患者可能患有或可能怀疑患有癌症。在一些情况下,患者先前没有被诊断为患有癌症。在一些情况下,患者不表现出与癌症相关的症状。在一些情况下,已知患者具有癌症倾向,例如癌症的家族史或癌症的生活方式指标。在一些情况下,个体或患者先前已诊断为患有癌症。

[0133] 术语患者和受试者在本文中可互换使用。

[0134] 癌症

[0135] 本文公开的方法涉及癌症的诊断、预后、治疗或预防。癌症可以是表达PRL3的癌症。癌症可以是过表达PRL3的癌症(即,与非癌性组织相比以更高的水平表达PRL3或者与其他癌性组织相比以更高的水平表达PRL3的癌症)。

[0136] 特别地,本文公开的方法涉及胃部癌症(gastric cancer)或胃癌(stomach cancer)。该方法可以涉及鼻咽癌、膀胱癌、肺癌、乳腺癌或前列腺癌。一些方法涉及结肠癌或葡萄膜黑色素瘤。癌症可以是原发性癌症或转移性癌症。

[0137] 也如本文所提及的,“癌症”可以包括以下的任何一种或多种:急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、肾上腺皮质癌、肛门癌、膀胱癌、血癌、骨癌、脑肿瘤、乳腺癌、雌性生殖系统癌、雄性生殖系统癌、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、儿童横纹肌肉瘤、儿童肉瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、结直肠癌、结肠癌、子宫内膜癌、子宫内膜肉瘤、食管癌、眼癌、胆囊癌、胃部癌症,胃肠道癌、毛细胞白血病、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金病、下咽癌、卡波西肉瘤、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌、恶性纤维组织细胞瘤、恶性胸腺瘤、黑色素瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、骨髓瘤、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经系统癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、甲状旁

腺癌、阴茎癌、咽癌、垂体瘤、浆细胞瘤、原发性CNS淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、呼吸系统、视网膜母细胞瘤、唾液腺癌、皮肤癌、小肠癌、软组织肉瘤、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、泌尿系统癌、子宫肉瘤、阴道癌、血管系统、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和维尔姆斯氏瘤(Wilms' tumor)。

[0138] 癌症可以是特定类型。癌症类型的实例包括星形细胞瘤、癌(例如腺癌、肝细胞癌、髓样癌、乳头状癌、鳞状细胞癌)、神经胶质瘤、淋巴瘤、髓母细胞瘤、黑色素瘤、骨髓瘤、脑膜瘤、神经母细胞瘤、肉瘤(例如,血管肉瘤、软骨肉瘤、骨肉瘤)。

[0139] 样品

[0140] 本文所述的方法可以在已经从患者获得的样品上进行。因此,这样的方法可以离体进行。它们可以在体外进行。

[0141] 优选地,用于本文所述方法的样品是尿样。

[0142] 在一些布置中,样品取自体液,更优选通过身体循环的体液。因此,样品可以是血液样品或淋巴样品。适用于本发明方法的其他体液包括血清、尿、唾液和母乳。

[0143] 样品可以包含或者可以衍生自:一定量的血液;一定量的源自个体血液的血清,其可以包含除去纤维蛋白凝块和血细胞后获得的血液的流体部分;一定量的血浆;一定量的胰液;组织样品或活组织检查;或从个体分离的细胞。

[0144] 样品可以是血液样品或血液来源的样品。血液来源的样品可以是患者血液的选择的级分(馏分,fraction),例如所选择的含有细胞的级分或血浆或血清级分。

[0145] 样品可以是来自体液样品制备的外泌体样品,例如来自尿液、血浆或唾液的外泌体样品。样品可以是其中外泌体的比例相对于从患者提取的样品而言增加的样品(即外泌体已经被浓缩)。在一些情况下,样品基本仅含有外泌体。

[0146] 诊断

[0147] 诊断是指识别一种疾病,例如癌症。本文所述的方法可用于检测癌症。它们可以用于诊断特定癌症的亚型或亚类或阶段。

[0148] 根据本发明的方法检测样品中的癌蛋白可以用于诊断患者的癌性病征、诊断对癌性病征的倾向、或用于确定癌性病征的预后(预测)。诊断或预后可以涉及现有的(先前诊断的)癌性病征,该癌性病征可以是良性的或恶性的,或者可以涉及疑似的癌性病征,或可以涉及对患者的癌性病征的筛选(其可以是先前未诊断的)。

[0149] 其它诊断测试可以与本文所述的那些结合使用,以增强癌性病征的诊断或预后的准确性,或者用来确认通过使用本文所述的测试所获得的结果。

[0150] 诊断方法可以是对患者样品进行的体外方法,或者在患者样品的处理之后进行。一旦收集样品,要进行的体外诊断方法不需要患者存在,因此该方法可以是不在人体或动物物体上实施的方法。

[0151] 其它诊断测试可以与本文描述的那些结合使用,以增强诊断或预后的准确性或者用来确认通过使用此处描述的测试获得的结果。

[0152] 预后

[0153] 预后(Prognosis, prognosing, prognose)是指基于个体的临床和非临床特征估计该个体未来结果的风险。特别地,本文使用的确定预后的方法是指预测个体或患者癌症的结果或未来的进程。预后包括预测患者的生存。预后可以用于确定适合的治疗性治疗。预后

测试可以与先前未诊断的癌性病征的诊断一起(例如,同时)进行,或者可以与现有的(先前诊断的)病征相关。

[0154] 预后的方法可以是对患者样品进行的体外方法,或在患者样品的处理之后进行。一旦收集了样品,待进行的体外预后方法就不需要患者存在,因此该方法可以是不在人体或动物体上实施的方法。

[0155] 如本文所公开的,样品中癌蛋白的水平可以用于表明患者癌征的预后。如本文所述,升高的癌蛋白表达和活性可能与晚期或更晚期的癌征相关,并且可能表示更短的总生存期。因此,癌蛋白水平的增加可能表明预后不良,例如减少的存活时间。

[0156] 预后可以用于预测个体的无疾病存活时间、无进展生存时间、疾病特异性存活时间、存活率或存活时间。

[0157] 患者选择

[0158] 本文公开的方法包括选择或分类适合治疗的患者。例如,所述方法可用于选择或分类适合用抗PRL3抗体治疗进行治疗的患者。如本文所用的,被认为适合治疗的受试者是预期受益于或响应于所述治疗的那些受试者。受试者可能患有或怀疑患有癌征或处于患癌征的风险中。受试者可能已经接受了癌征的诊断。特别地,受试者可能患有或怀疑患有癌征或处于患癌征的风险中。在一些方面,基于样品中癌蛋白的存在或癌蛋白表达的量(例如来自患者的尿样中PRL3的存在或量)来选择患者。还公开了治疗通过这些方法所选择的患者

[0159] 在一些情况下,与来自非癌性患者的样品相比,生物标志物蛋白(例如PRL3)在样品中过表达的观察结果可以表明患者适合于治疗。在其它情况下,与来自非癌性患者的样品中不存在该生物标记物蛋白相比,生物标志物蛋白的存在可表明患者适合于治疗。

[0160] 检测和定量

[0161] 本文公开的方法涉及癌蛋白的检测和/或定量。如本文所使用的,检测是指在没有定量的情况下测量癌蛋白。用于检测和定量PRL3核苷酸和蛋白质的方法是本领域熟知的并且是本领域技术人员容易理解的。

[0162] 例如,可以通过免疫测定法检测或定量蛋白质。免疫测定方法是本领域熟知的,并且通常包括:(a)通过针对所述蛋白的抗体提供包含可结合的表位的多肽;(b)在允许形成抗体-抗原复合物的条件下,用该多肽孵育生物样品;和(c)确定是否形成包含该多肽的抗体-抗原复合物。免疫测定方法包括蛋白质印迹和ELISA。

[0163] 免疫测定包括,但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、侧流测试、乳胶凝集、其它形式的免疫色谱、蛋白质印迹和/或磁性免疫测定。

[0164] 蛋白质也可以使用质谱法检测或定量。例如,使用电喷雾电离(ESI)或基质辅助激光解吸(desorption)/电离(MALDI)的质谱法。

[0165] 蛋白质量化的其他方法包括基于光谱的方法。这样的方法可包括比色测定或分光光度测定。

[0166] 检测和定量核酸的方法是本领域公知的。方法包括基于聚合酶链反应(PCR)的方法和杂交方法。

[0167] 基于聚合酶链反应的方法包括PCR、逆转录PCR(RT-PCR和定量RT-PCR)。这样的方法利用特异性结合目的DNA序列的引物或短DNA片段。RNA可以在该方法之前或期间转录为

DNA。

[0168] 提高的表达或活性

[0169] 如本文所公开的,升高的癌蛋白表达可以表明癌症患者的不良预后。如本文所用的,升高的表达可以与增加的表达、高表达或高水平互换使用。蛋白质的升高的表达可能与尿中该蛋白质升高的水平相关联。

[0170] 升高的表达意味着癌蛋白的水平增加。表达可以局部或全局地升高,例如在特定组织或细胞类型内,例如在肿瘤内或在骨髓内,或者可以在患者的整个体内升高。升高的表达可以由该蛋白质或核酸的生产的增加而引起,或者由该蛋白质或核酸或两者的消除或破坏的降低而引起。

[0171] 升高的活性可以由蛋白或核酸的量的增加而引起,或由每个个体分子的活性的增加而引起。这可以通过基因或蛋白质序列中的突变(例如活化突变)而发生,或者可以由翻译后的改变(例如异常的蛋白磷酸化)而引起。

[0172] 在一些情况下,相对于在非癌性个体或非癌性组织中的表达,癌症蛋白的表达在患者或样品中被显著上调。

[0173] 相对于对照,癌蛋白的过表达或增加的活性可以表明不良预后和差的存活。癌蛋白的非常高的过表达或非常高的活性可以表明非常差的预后和非常差的存活。

[0174] 在一些情况下,表达或活性比对照中的表达或活性高出5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、750%或1000%或更高的百分比表明预后不良。

[0175] 在一些情况下,表达或活性为对照中的表达或活性的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、100倍或更多倍表明预后不良。

[0176] 对照

[0177] 在一些情况下,方法包括将来自患者的样品中的癌蛋白与一种或多种对照样品中的癌蛋白进行比较。

[0178] 该比较可以不要求将对照样品的分析与来自患者的样品的分析同时或顺序地进行。相反,可以与先前从对照样品获得的结果进行比较,例如存储在数据库中的结果。

[0179] 对照样品可以是在癌症发生之前,或者在观察到与癌症相关的症状之前,从患者获得的样品。

[0180] 对照样品可以是来自另一个体获得的样品,例如没有癌症的个体。个体可以根据一个或多个特征(例如性别、年龄、病史、种族、体重或特定标志物的表达)来与患者匹配。对照样品可以从身体位置获得,或者是与从患者获得的样品相同的组织或样品类型。

[0181] 对照样品可以是样品的集合,从而提供跨越多个不同个体或组织的代表性值。

[0182] 在一些情况下,对照可以是参考样品或参考数据集。参考可以由先前具有已知程度适用于特定治疗的受试者获得的样品。参考可以是分析参考样本获得的数据集。

[0183] 对照可以是其中已知靶分子存在或以高水平表达的阳性对照,或其中已知靶分子不存在或以低水平表达的阴性对照。

[0184] 对照可以是来自已知受益于治疗的受试者的组织的样品。所组织可以是与被测试的样品相同的类型。例如,可以将来自受试者的肿瘤组织的样品与来自已知适合于治疗的

受试者(例如已经对治疗有响应的受试者)的肿瘤组织的对照样品进行比较。

[0185] 在一些情况下,对照可以是与测试样品相同的受试者获得的样品,但是其是在已知受试者是健康的时间(例如已知受试者没有癌症的时间)获得的。因此,可以将来自受试者的癌性组织样品与非癌性组织样品进行比较。

[0186] 在一些情况下,对照是细胞培养物样品。

[0187] 在一些情况下,在使用抗体孵育之前分析测试样品,以确定该样品固有的背景染色的水平。

[0188] 在一些情况下,使用同型对照(isotype control)。同型对照使用与靶特异性抗体相同类别的抗体,但与样品不具有免疫反应性。这样的对照可用于区分靶特异性抗体的非特异性的相互作用。

[0189] 抗癌蛋白抗体

[0190] 可用于本文公开的方法的抗体可通过本领域已知的任何方法制备。本文所用的术语抗体包括完整抗体和抗体片段、人源化、嵌合和重组抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。

[0191] 结合PRL1和PRL3的抗体是已知的。例如,公开于Li et al.,2005中。

[0192] 抗原结合部分可以是抗体的一部分(例如Fab片段)或合成抗体片段(例如单链Fv片段[ScFv])。针对所选抗原的合适的单克隆抗体可以通过已知技术制备,例如在“*Monoclonal Antibodies:A manual of techniques*”,H Zola(CRC出版社,1988)中和在“*Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Applications*”,J G R Hurrell(CRC Press,1982)中公开的那些技术。Neuberger et al(1988,第8届国际生物技术研讨会第2部分,792-799)讨论了嵌合抗体。

[0193] 单克隆抗体(mAb)可用于本发明的方法中并且是特异性靶向抗原上单个表位的抗体的同源群体。合适的单克隆抗体可以使用本领域熟知的方法制备(例如,参见Köhler,G.; Milstein,C.(1975).“Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity”.*Nature* 256(5517):495;Siegel DL(2002).“Recombinant monoclonal antibody technology”.Schmitz U,Versmold A,Kaufmann P, Frank HG(2000);“Phage display:a molecular tool for the generation of antibodies—综述”.*Placenta*.21Suppl A:S106-12.Helen E.Chadd和Steven M.Chamow;“Therapeutic antibody expression technology”,*Current Opinion in Biotechnology* 12,第2期(2001年4月1日):188-194;McCafferty,J.;Griffiths,A.;Winter,G.;Chiswell,D.(1990).“Phage antibodies:filamentous phage displaying antibody variable domains”.*Nature* 348(6301):552-554;“*Monoclonal Antibodies:A manual of techniques*”,H Zola(CRC Press,1988)以及在“*Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Applications*”,J G R Hurrell(CRC Press,1982)中。Neuberger et al(1988,第8届国际生物技术研讨会第2部分,792-799)讨论了嵌合抗体)。

[0194] 多克隆抗体可用于本发明的方法中。优选单特异性多克隆抗体。合适的多克隆抗体可以使用本领域熟知的方法制备。

[0195] 抗体的片段(例如Fab和Fab2片段)也可以用作可以基因工程化的的抗体和抗体片段。抗体的可变重链(VH)和可变轻链(VL)结构域参与抗原识别,这是通过早期蛋白酶消化

实验首先认知的事实。通过啮齿动物抗体的“人源化”发现了进一步的证实。啮齿动物来源的可变结构域可以被融合到人源的恒定结构域,使得获得的抗体保留了啮齿动物亲本抗体的抗原特异性(Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855)。

[0196] 该抗原特异性由可变结构域赋予并且不依赖于恒定结构域,这是从参与抗体片段的细菌表达的实验中得知的,抗体片段都含有一个或多个可变结构域。这些分子包括Fab样分子(Better et al (1988) Science 240, 1041); Fv分子(Skerra et al (1988) Science 240, 1038); 单链Fv (ScFv) 分子,其中VH和VL配偶体结构域(partner domain)通过柔性寡肽连接(Bird et al (1988) Science 242, 423; Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879), 以及包含分离的V结构域的单结构域抗体(dAbs) (Ward et al (1989) Nature 341, 544)。涉及合成抗体片段(保留了其特异性结合位点)的技术的一般综述可以在Winter&Milstein (1991) Nature 349, 293-299中找到。

[0197] “ScFv分子”是指其中VH和VL配偶体结构域共价连接的分子,例如直接连接、通过肽或通过柔性寡肽连接。

[0198] Fab、Fv、ScFv和dAb抗体片段都可以在大肠杆菌中表达和分泌,因此允许容易地产生大量的片段。

[0199] 全抗体和F(ab')<sub>2</sub>片段是“二价的”。“二价”是指所述抗体和F(ab')<sub>2</sub>片段具有两个抗原结合位点。相比之下,Fab、Fv、ScFv和dAb片段是单价的,仅具有一个抗原结合位点。结合PRL3的合成抗体也可以使用本领域熟知的噬菌体展示技术制备(例如参见“Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies--综述”. Placenta. 21 Suppl A: S106-12. Helen E. Chadd和Steven M. Chamow; “Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains”. Nature 348 (6301): 552-554)。

[0200] 在一些优选的实施方式中,抗体被可检测地或至少能够检测地标记。例如,可以用放射性原子或有色分子或荧光分子或可以以任何其它方式容易检测的分子来标记抗体。合适的可检测的分子包括荧光蛋白、萤光素酶、酶底物和放射性标记。可以用可检测的标记物直接标记抗体或者可以间接标记抗体。例如,抗体可以是未标记的,并且可以通过本身被标记的另一抗体来检测。可替代地,第二抗体可以结合生物素,并且标记的链霉素与生物素的结合被用于间接地标记第一抗体。

[0201] 抗体可以是能够结合表位KAKFYN和/或HTHKTR的抗体。抗体可以是具有与来自(如Li et al 2005所报告的)杂交瘤克隆223或杂交瘤克隆318的小鼠抗PRL3抗体相同的序列的抗体。该抗体可以与来自在Li et al 2005中描述的杂交瘤克隆223或杂交瘤克隆318的抗体竞争靶标结合。抗体可以是人源化抗体、嵌合抗体或完全的人抗体。该抗体与本文所述的抗体同源。

[0202] 如上所述,关于序列同一性,“同源物”与相关序列具有,如至少5%的同一性、至少10%的同一性、至少15%的同一性、至少20%的同一性、至少25%的同一性、至少30%的同一性、至少35%的同一性、至少40%的同一性、至少45%的同一性、至少50%的同一性、至少55%的同一性、至少60%的同一性、至少65%的同一性、至少70%的同一性、至少75%的同一性、至少80%的同一性、至少82%的同一性、至少84%的同一性、至少86%的同一性、至少88%的同一性、至少90%的同一性、至少92%的同一性、至少94%的同一性、至少96%的同

一性或至少98%的同一性。相关序列可以是CDR序列,或可以跨重和/或轻可变链的序列。

#### [0203] 方法

[0204] 根据本发明的方法可以在体外或离体进行。术语“体外”旨在包括在实验室条件下或在培养物中使用材料、生物物质、细胞和/或组织进行的实验。“离体”是指存在于生物体外或在生物体外(例如在人或动物体外)发生的某物,其可以在从生物体获取的组织(例如整个器官)上或细胞上。

[0205] 本文公开的方法涉及蛋白表达的测定。可以通过定量细胞、组织或样品中的蛋白质的量,或通过观察蛋白质在细胞和组织中的定位来测量蛋白质表达。

[0206] 在一些情况下,使用免疫测定来检测来自受试者的样品中的靶标(例如,PRL3)。免疫测定使用对靶分子具有特异的亲和力的抗体以及可检测的分子。在一些情况下,抗体与可检测分子缀合。可检测的分子可以称为标记(label)。当抗体与靶分子结合时,可检测的分子产生可检测的信号。可检测的信号可以是可量化的信号。在一些情况下,使用适体代替抗体或与抗体一起使用。免疫测定包括免疫组织化学、ELISA、免疫印迹和流式细胞术。在本文所述的某些方面,测定是免疫组织化学测定。这样的测定通常使用抗体,但是可以使用其它靶特异性分子,例如适体或其他配体。

[0207] 该方法可以由管理机构批准使用。该方法可以是FDA批准的方法。

#### [0208] ELISA

[0209] 在一些情况下,可以通过ELISA(酶联免疫吸附测定)检测靶标。来自样品的靶分子附着于表面并使用特异性抗体来检测。靶可以非特异性地(通过吸附到表面)或特异性地(使用特异性捕获剂,例如抗体)附着到表面。ELISA可用于定量样品中的靶标。ELISA特别适合于分析液体样品,例如血清、尿液或唾液。

#### [0210] 免疫印迹

[0211] 在一些方面,通过免疫印迹或蛋白质印迹检测靶标。在这样的方法中,基于电荷或尺寸来分离样品中的蛋白质。它们可以通过基于电泳的方法来分离。将分离的蛋白转移至膜,在膜上用对靶标特异的抗体对它们进行染色。然后该抗体可通过与可检测的标记物缀合的该抗体直接检测,或通过加入标记的第二抗体来间接检测。

#### [0212] 治疗

[0213] 本文公开的诊断方法可以用于指导疗法的选择。方法可用于选择待治疗的患者,例如对于特定类型的治疗。方法可以用于监测特定疗法的进展或成功。方法可用于选择待治疗的患者。本文还公开了治疗方法,方法涉及治疗患者,该患者是基于一种或多种癌蛋白在来自该患者的尿样中的存在或水平而被选择用于治疗。

[0214] 治疗可以导致癌症症状的缓解,或者可以导致癌症的完全治疗。治疗可以减缓癌症的进展,或者可以防止癌症的症状的恶化。在特别优选的实施方式中,利用抗细胞内癌蛋白抗体(例如抗PRL3抗体),该方法可以被用于选择待治疗的患者或监测治疗的进展或成功。

[0215] 根据本发明的方面所述的药物和药物组合物可以被配制用于通过多种途径施用,途径包括,但不限于胃肠外、静脉内、动脉内、肌肉、肿瘤内、口服和鼻内。药物和组合物可以被配制成流体或固体形式。流体制剂可以配制用于通过注射施用到人或动物体的选择的区域。

[0216] 施用优选以“治疗有效量”的方式,这足以显示出对个体的益处。实际的施用量、施用的速率和时间过程将取决于所治疗的疾病的性质和严重性。治疗处方(例如,决定剂量等)是全科医生和其他医生的责任,并且通常考虑待治疗的病症、个体患者的状况、递送部位、施用方法和从业者已知的其它因素。上述技术和协议的示例可以在Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版,2000,pub.Lippincott,Williams&Wilkins中找到。

[0217] 治疗可以包括施用多于一种治疗剂。药剂可以单独施用或与其它治疗组合施用(根据待治疗的病症同时或依次施用)。例如,治疗可以涉及施用两种药剂的共同治疗,药剂的一种或多种旨在治疗癌症。因此,抗PRL3抗体可以与另一药物(例如,化疗剂、前体药物、抗体或激素治疗)一起施用。治疗可另外包括放射治疗。

[0218] 治疗和疗法的实例包括,但不限于化疗(施用活性剂,包括,例如药物,例如化学治疗剂);手术;和放射治疗。

[0219] 无论作用机制如何,“化疗剂”是用于治疗癌症的化合物。化疗剂的类别包括,但不限于:烷化剂、抗代谢物、纺锤体毒素植物生物碱、细胞毒性/抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、抗体、光敏剂和激酶抑制剂。化疗剂包括用于“靶向疗法”和常规化疗中的化合物。

[0220] 化疗剂的实例包括:来那度胺(REVLIMID®, Celgene)、伏立诺他(ZOLINZA®, Merck)、帕比司他(FARYDAK®, Novartis)、莫西他汀(Mocetinostat) (MGCD0103)、依维莫司(ZORTRESS®, CERTICAN®, Novartis)、苯达莫司汀(TREAKISYM®, RIBOMUSTIN®, LEVACT®, TREANDA®, Mundipharma International)、厄洛替尼(TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.)、多西他赛(TAXOTERE®, Sanofi-Aventis)、5-FU(氟尿嘧啶,5-氟尿嘧啶,CAS号51-21-8)、吉西他滨(GEMZAR®, Lilly)、PD-0325901(CAS号391210-10-9, Pfizer)、顺铂(顺式二胺,二氯铂(II),CAS号15663-27-1)、卡铂(CAS号41575-94-4)、紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN®, Genentech)、替莫唑胺(4-甲基-5-氧代-2,3,4,6,8-五氮杂双环[4.3.0]壬-2,7,9-三烯-9-甲酰胺,CAS号85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough)、他莫昔芬((Z)-2-[4-(1,2-二苯基丁-1-烯基)苯氧基]-N,N-二甲基乙胺, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®)和阿霉素(ADRIAMYCIN®)、Akti-1/2、HPPD以及雷帕霉素。

[0221] 化疗剂的更多实例包括:奥沙利铂(ELOXATIN®, Sanofi)、硼替佐米(VELCADE®, Millennium Pharm.)、索坦(SUNITINIB®, SU11248, Pfizer)、来曲唑(FEMARA®, Novartis)、甲磺酸伊马替尼(GLEEVEC®, Novartis)、XL-518(Mek抑制剂, Exelixis, WO 2007/044515)、ARRY-886(Mek抑制剂, AZD6244, Array BioPharma, AstraZeneca)、SF-1126(PI3K抑制剂, Semafore Pharmaceuticals)、BEZ-235(PI3K抑制剂, Novartis)、XL-147(PI3K抑制剂, Exelixis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、氟维司群(FASLODEX®, AstraZeneca)、甲酰四氢叶酸(亚叶酸)、雷帕霉素(西罗莫司, RAPAMUNE®, Wyeth)、拉帕替尼(TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline)、洛那法尼(SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough)、索拉非尼(NEXAVAR®, BAY43-9006,

Bayer Labs)、吉非替尼 (IRESSA® , AstraZeneca)、伊立替康 (CAMPTOSAR® , CPT-11, Pfizer)、替比法尼 (ZARNESTRA™ , Johnson&Johnson)、ABRAXANE™ (不含克列莫佛)、白蛋白改造的紫杉醇纳米颗粒制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL)、凡德他尼 (rINN, ZD6474, ZACTIMA® , AstraZeneca)、苯丁酸氮芥、AG1478、AG1571 (SU 5271; Sugen)、西罗莫司 (TORISEL® , Wyeth)、帕唑帕尼 (GlaxoSmithKline)、苄佛 (canfosfamide) (TELCYTA® , Telik)、噻替派和环磷酰胺 (CYTOXAN® , NEOSAR®); 烷基磺酸酯, 如白消安、右苯丙胺和哌泊硫; 氮丙啶, 如苯达多巴、卡波醌、美妥替哌和脲多巴 (uredopa); 乙烯亚胺和甲基蜜胺包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺 (triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺; 多聚乙酰 (acetogenin) (特别是膨润酸和苯菌酸); 喜树碱 (包括合成的类似物拓扑替康); 苔藓抑素; 海绵他汀; CC-1065 (包括阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物); 念珠藻素 (cryptophycins) (特别是念珠藻素 1 和念珠藻素 8); 多拉司他汀; 多卡霉素 (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1); 癌榴塞洛素 (eleutherobin); 泛曲霉素; 匍枝珊瑚醇 (sarcodictyin); 海绵抑制素; 氮芥, 如苯丁酸氮芥、萘氮芥、环磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲二乙胺、氮氧化胺盐酸盐、苯丙氨酸氮芥、新恩比兴、胆固醇苯乙酸氮芥、松龙苯芥、氯乙环磷酰胺、尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲, 如亚硝基脲氮芥、吡葡亚硝基脲、福莫司汀、环己亚硝基脲、嘧啶亚硝基脲和拉尼莫司汀; 抗生素诸如烯二炔类抗生素 (例如卡奇霉素、卡里奇霉素  $\gamma$  11, 加利车霉素  $\omega$  1 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); 迪尼米兴 (dynemicin)、迪尼米兴 A; 二膦酸盐, 如氯膦酸盐; 埃斯波霉素; 以及新制癌菌素发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素、放射菌素、葱霉素 (authramycin)、重氮丝氨酸、博莱霉素、更生霉素、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌素、染色霉素、放线菌素 D、道诺红菌素、多柔比星、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、吗啉代-多柔比星、氰基吗啉-多柔比星、2-吡咯啉-多柔比星和脱氧阿霉素)、表阿霉素、依索比星、表阿霉素、伊达比星、奈莫柔比星、马塞罗霉素、丝裂霉素, 如丝裂霉素 C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、波福霉素、嘌呤霉素、铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲霉素、杀结核菌素、乌苯美司、新制癌菌素 (zinostatin)、佐柔比星; 抗代谢物, 如氨甲喋呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 如二甲叶酸、氨甲喋呤、蝶酰三谷氨酸、三甲曲沙; 嘌呤类似物, 如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫柳宁、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 如环胞苷、阿扎胞苷、6-氮尿嘧啶、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷; 雄性激素, 如二甲睾酮、丙酸甲雄烷醇酮、环硫雄醇、环戊缩环硫雄烷、睾丸内脂; 抗肾上腺, 如氨鲁米特、米托坦、三氯斯坦; 叶酸补充剂, 如糠酸; 乙酰葡胺; 醛磷酰胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 恩尿嘧啶; 安吡啶; 贝塔布辛; 比生群; 依达曲沙 (edatraxate); 地佛法明 (defofamine); 脱羧秋水仙碱; 地吡醌; 依氟鸟氨酸 (elfornithine); 依利醋铵; 埃坡霉素; 乙环氧啶; 硝酸镓; 羟基脲; 蘑菇多糖; 氯尼达明; 美登木素生物碱, 如美登素和安莎霉素; 美托拉宗; 米托葱醌; 莫哌达醇; 硝氨丙吡啶; 喷司他丁; 苯来美特; 吡柔比星; 米托葱醌; 鬼臼树脂酸; 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼; **PSK®** 多糖复合物 (JHS 天然物, Eugene, OR); 丙亚胺; 根瘤菌素; 西佐咪喃; 螺旋锗; 丝裂酸; 三亚乙基亚胺苯醌; 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯 (特别是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verrucurin) A、杆孢菌素 A 和蛇形菌素); 乌拉坦; 长春地辛; 达卡巴嗪; 甘露霉素; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; 加西托新 (gacytosine); 阿拉伯糖苷 ("Ara-C"); 环磷酰胺; 噻替派; 6-巯基嘌呤; 硫基嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物, 如顺铂和卡铂; 长春花碱; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 米托葱

醌;长春新碱;长春瑞滨(NAVELBINE®);诺肖林;替尼泊昔;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;卡培他滨(XELODA®,Roche);伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMF0);类视黄醇,如视黄酸;以及前述中任一项的药学上可接受的盐、酸和衍生物。可以使用试剂的组合,如CHP(多柔比星、强的松、环磷酰胺)或CHOP(多柔比星、强的松、环磷酰胺、长春新碱)。

[0222] “化疗剂”的定义中还包括:(i)抗激素剂,其用于调节或抑制对肿瘤的激素作用,例如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬(包括NOLVADEX®;枸橼酸他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、克洛昔芬、LY117018、奥那司酮和FARESTON®(枸橼酸托瑞米芬);(ii)抑制芳香酶的芳香酶抑制剂,其调节肾上腺中的雌激素产生,例如4(5)-咪唑、氨鲁米特、MEGASE®(醋酸甲地孕酮)、AROMASIN®(依西美坦;Pfizer)、福美坦、法倔唑、RIVISOR®(伏罗唑)、FEMARA®(来曲唑;Novartis)和ARIMIDEX®(阿那曲唑;AstraZeneca);(iii)抗雄激素,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮脯利特和戈舍瑞林;以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);(iv)蛋白激酶抑制剂,如MEK抑制剂(WO 2007/044515);(v)脂质激酶抑制剂;(vi)反义寡核苷酸,特别是那些在异常细胞增殖中涉及的信号通路中抑制基因表达的寡核苷酸,PKC- $\alpha$ 、Raf和H-Ras,如奥利默森(GENASENSE®,Genta Inc.);(vii)核酶,如VEGF表达抑制剂(例如ANGIOZYME®)和HER2表达抑制剂;(viii)疫苗,如基因治疗疫苗,例如ALLOVECTIN®、LEUVECTIN®和VAXID®;PROLEUKIN®r1L-2;拓扑异构酶1抑制剂,如LURTOTECAN®;ABARELIX®rmRH;(ix)抗血管生成剂,如贝伐单抗(AVASTIN®,Genentech);和上述任一药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0223] “化疗剂”的定义中还包括治疗性抗体,如阿仑单抗(Campath)、贝伐单抗(AVASTIN®,Genentech);西妥昔单抗(ERBITUX®,Imclone);帕尼单抗(VECTIBIX®,Amgen)、利妥昔单抗(RITUXAN®,Genentech/Biogen Idee)、奥法木单抗(ARZERRA®,GSK)、帕妥珠单抗(PERJETATM,OMNITARG™,2C4,Genentech)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN®,Genentech)、托西莫单抗(Bexxar,Corixia)、MDX-060(Medarex)和抗体药物偶联物、吉妥珠单抗、奥佐米星(MYLOTARG®,Wyeth)。

[0224] 与本发明的缀合物组合使用的具有作为化学治疗剂的治疗潜力的人源化单克隆抗体包括:阿仑单抗、阿波珠单抗、阿塞珠单抗、阿替唑单抗、巴匹珠单抗、贝伐单抗、比伐单抗美坦新(bivatuzumab mertansine)、坎妥珠美坦新、西利珠单抗、妥珠单抗、西弗斯妥单抗(cidfusituzumab)、西地珠单抗(cidtuzumab)、达利珠单抗、依库丽单抗、依法珠单抗、依帕珠单抗、厄利珠单抗、非维珠单抗、芳妥珠单抗(fontolizumab)、吉妥单抗奥佐米星(gemtuzumab ozogamicin)、英妥珠单抗奥佐米星、伊匹单抗、拉贝珠单抗、林妥珠单抗、马妥珠单抗、美泊利单抗、莫他珠单抗(motavizumab)、莫妥珠单抗(motovizumab)、那他珠单抗、尼妥珠单抗、罗若珠单抗(nolovizumab)、奴马珠单抗(numavizumab)、奥瑞珠单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕考珠单抗、pecfusituzumab、帕妥珠单抗、普妥珠单抗、培克珠单抗、雷利珠单抗、雷尼珠单抗、热利维珠单抗、瑞利珠单抗(reslizumab)、热西维珠单抗(resyvizumab)、罗维珠单抗、鲁利单抗、西罗珠单抗、希普利珠单抗(siplizumab)、索土珠

单抗 (sontuzumab)、他珠单抗四氢西洋 (tacatuzumab tetraxetan)、托珠单抗、他利珠单抗 (talizumab)、替非珠单抗、塔西单抗、托珠单抗、曲妥珠单抗、图口妥珠单抗 (tucotuzumab) 西莫白介素 (celmoleukin)、图库斯珠单抗 (tucusituzumab)、乌吗维珠单抗 (umavizumab)、乌珠单抗和维西珠单抗。

[0225] 治疗监测

[0226] 本文还公开了监测治疗性 (therapeutic treatment) 成功的方法。这样的方法包括比较来自不同时间点的同一患者的两个或更多个样品。例如,可以在开始治疗之前或开始治疗时采集样品。这样的样品可以与开始治疗之后取得的样品进行比较,例如在开始治疗的1周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、14个月、16个月、18个月或2年后取得的样品。尿中生物标志物水平的降低可以表明治疗成功。尿中生物标志物水平的增加或生物标志物水平没有显著变化可以表明需要更强化的治疗,例如增加治疗剂的剂量,或者向治疗方案中添加另外的治疗剂。或者,这种增加或不显著的变化可以表明替代的治疗应该代替现有的治疗。

[0227] 样品之一可以在治疗停止后采集,例如用来监测疾病的复发或再发。例如,在停止治疗之后1个月、3个月、6个月、9个月、12个月、18个月、2年、2-5年、3年、5年或更长。例如,在最后一次剂量后,或在确定患者无癌症之后。

[0228] 本发明包括所描述的方面和优选特征的组合,除非这样的组合是明显不允许的或明确避免的。

[0229] 本文使用的章节标题仅用于组织目的,并且不应被解释为限制所描述的主题。

[0230] 本文中提及的所有文献均通过引用并入本文。

[0231] 以下描述中通过实施例阐述了本发明的一个或多个实施例的细节,包括发明人为实现本发明而设想的最佳模式的具体细节。对本领域技术人员显而易见的是,本发明可以在不限于这些具体细节的情况下实施。

## 附图说明

[0232] 图1:PRL-3可以用作癌症阶段的生物标志物。高的PRL-3表达于8/10的晚期阶段的患者中,而在1/10的早期阶段患者中。

[0233] 图2:在两种正常尿样和来自膀胱癌患者的六种尿样中的癌蛋白表达。癌蛋白通常在癌症尿样中可检测。

[0234] 图3:泳道1-2正常尿,3-8癌症尿。PRL-3可用作晚期癌症阶段的生物标志物。高PRL-3表达在8/10的晚期阶段患者中,但是表达在1/10的早期阶段患者中。外泌体相关的PRL3存在于膀胱癌患者的尿中。使用针对PRL3、CD63、外泌体标志物的抗体分析来自膀胱癌患者尿样的纯化的外泌体级分。

[0235] 图4:34例来自肺癌患者的尿样。

[0236] 图5:34例来自肺癌患者的尿样。

[0237] 图6:来自乳腺癌、胃癌和鼻咽癌患者的肺、尿样中的癌蛋白表达。

[0238] 图7:22例来自肺癌、膀胱炎、前列腺腺癌和良性前列腺增生患者的尿样。

[0239] 图8:与正常尿(泳道1)相比,我们在大B细胞淋巴瘤患者中检测到超强的PRL-3表达水平(泳道2),且在肺癌尿中检测到低水平(泳道3-4)。

[0240] 图9:通过蛋白质印迹(右图)再确认了斑点印迹(左图)上的PRL-3阴性样品(1、2、3、5)和阳性样品(8、9、12、14、16)。我们可以使用斑点印迹一次性测试大样品。

[0241] 图10:通过SDS PAGE测试抗体纯度。从左侧开始依次为Ab223、318、1992、1994、参考MoAb和参考兔抗体(4%-20%Tris-甘氨酸凝胶)。

[0242] 图11:PRL3原型装置的剂量响应曲线。

[0243] 图12:A用于评分测试线信号的QC比色图;B原型测试装置;C测试装置说明;D使用阴性、阳性和稀释阳性尿样的原型测试装置。

[0244] 图13:细胞内PRL-3癌蛋白可以被分泌到细胞培养基中并且存在于61%的癌症尿中,但不存在于正常的尿中。(a)在所示GC细胞系的匹配裂解物和条件培养基中的PRL-3的蛋白质印迹。CANX,钙联结蛋白。(b)在来自所研究的所有癌症患者和正常个体的尿样中的%PRL-3阳性率的总结。(c-f):在(c)正常个体和GC患者、(d)鼻咽癌患者和(e)膀胱癌患者的尿液中的PRL-3的蛋白质印迹检测。显示了代表性的印迹。Mr,相对分子质量(relative molecular mass)(kDa)。

[0245] 图14:有效的抗PRL3抗体治疗导致尿PRL-3的减少,并且机制上涉及免疫效应物的肿瘤内积累和募集。(a)来自未治疗的或抗PRL3抗体治疗的小鼠的匹配尿液和肿瘤样品中的PRL-3蛋白的蛋白质印迹,所述小鼠含有PRL-3+SNU484或PRL-3-MKN45原位胃肿瘤。上图,在第28天(SNU-484)或第56天(MKN45)切除的胃。(b)所提议的抗PRL3抗体对PRL-3+癌细胞的作用机制。描述了两种形式的分泌的PRL-3抗原—可溶性的游离形式或结合于外泌体。

[0246] 实施例

[0247] 实施例1

[0248] 我们检查了来自101个癌症尿(cancer urine)(26个膀胱癌、44个肺癌、10个乳腺癌、6个胃癌、15个NPC)和11个正常尿的细胞内癌蛋白:PRL-3、PRL-1、VHZ、c-myc、H-ras、AKT-1、p53、Rac1、FAK、Runx1、雌激素受体、PTEN、b-肌动蛋白、GAPDH。我们经常检测到癌症尿液中的这些细胞内癌蛋白。我们还检测到癌症(但不是正常)尿中的GAPDH和b-肌动蛋白的突变形式。结果示于图1-8中。

[0249] 我们检查了来自81个癌症尿(6个膀胱癌、44个肺癌、10个乳腺癌、6个胃癌、15个NPC)和11个正常尿的细胞内癌蛋白:Her2/N-钙粘蛋白、PDGF受体( $\alpha$ )、FLT-3、p-EGFR,我们使用蛋白印迹法只在6个膀胱癌尿液的3个中检测到低水平的FLT-3。

[0250] 我们在癌症尿液中检测到细胞内癌蛋白比细胞外癌蛋白更频繁出现,但在正常的尿中并未如此。不希望受理论的束缚,这表明细胞外癌蛋白可以与脂质双层更紧密相关,因此它们更难以从细胞膜解离并与外泌体一起进入尿液中。然而,细胞内癌蛋白可以更容易且自由地形成并通过外泌体分泌以进入体液(血液、尿、唾液)。我们的发现将有助于诊断用于癌症治疗的癌症生物标志物。

[0251] 实施例2:外泌体分离和试剂盒

[0252] 本实施例提供了用于从体液样品中的外泌体获得蛋白质的样品方案。该方案在图9中示出。

[0253] 方案:目录号EXOAB-KIT-1

[0254] 如果样品是冷冻的,在冰上解冻

[0255] 合并10ml样品+2ml ExoQuick-TC,即(如果是500 $\mu$ l样品,那么100 $\mu$ l ExoQuick-

TC)

[0256] 通过颠倒三次混合均匀

[0257] 在4℃下放置过夜

[0258] 在1500\*g下离心30分钟或(1.5rfc)

[0259] 去除上清液,保留外泌体团粒(颗粒, pellet)

[0260] 在1500\*g下离心5分钟以除去所有痕量流体

[0261] 向外泌体团粒中加入100μl RIPA(放射免疫沉淀测定)缓冲液或PBS(根据团粒)并简单地涡旋15秒。

[0262] 在室温下放置20分钟并且在595nm下记录蛋白读数。

[0263] 加入SDS染料并且在100℃下加热样品5分钟。

[0264] 进行蛋白质印迹。

[0265] 实施例3:原型快速测试装置的评价

[0266] I. 目的:

[0267] 1. 研究开发用于检测患者尿样中生物标志物PRL3的原型快速测试装置的可行性。

[0268] II. 背景

[0269] 1998年新加坡国立大学IMCB的Zeng Qi博士发现了生物标记PRL3。已经在数千名癌症患者中显示了其升高的水平。曾博士研发了两种单克隆抗体和两种兔抗体抗PRL3。本研究旨在评价这四种抗体,并研究使用这些抗体开发免疫色谱装置的可行性,该装置使用侧流技术以区分癌症与正常人之间的尿液。

[0270] 快速测试格式(侧流装置(lateral flow device))具有测定时间短(仅10-20分钟即可看到测试结果)的优点。测定也可以在感官或医生办公室进行,不需要特殊的设备。Zeng Qi博士有兴趣开发这种快速测试和签订为AD顾问(Phoenix, AZ),以通过使用这些抗体进行可行性研究。以下是本研究的结果。

[0271] III. 建议:

[0272] 根据第IV部分的结论,我们建议:

[0273] • 设置规范

[0274] 1. 灵敏度,待定

[0275] 2. 特异性,待定

[0276] 3. 检测限(LOD):待定

[0277] 4. 15分钟测定

[0278] 5. 样品类型:尿样

[0279] 6. 储存:室温

[0280] 7. 有效期:制造后24个月

[0281] 8. 干扰研究:待定

[0282] 9. 提交类型:待定

[0283] 10. 时间表:待定

[0284] • 使用MoAb 223作为捕获的抗体(用于包被),并使用兔抗PRL3(1992)作为检测物(缀合到金颗粒),以进行快速测试。

[0285] • 使用硝化纤维素膜AE99作为固相以结合抗体223。

- [0286] • 运行临床样品 (50个阳性和100个阴性) 以确定这种原型的特异性和灵敏度。
- [0287] • 如果需要,进一步的改进将包括通过使用亲和纯化的兔抗PRL3抗体实现增加的灵敏度和特异性。
- [0288] • 如需要,反馈进一步的修改。
- [0289] IV. 结论:
- [0290] 1. MoAb 223和多克隆抗体1992是用于开发PRL3快速测试的最佳配对。MoAb 223用作检测物,多克隆1992用作捕获物(参见V.2)
- [0291] 2. 10-20ng PRL3-GST/ml的可检测性可以在15分钟内实现(参见V.3.3)
- [0292] 3. V.3.1中显示了从12.5ng/ml至4,000ng/ml的响应曲线
- [0293] 4. V.3.2中显示了阴性尿和低水平样品的重复性
- [0294] 5. 该原型可以区分一个阳性尿液 (B) 与其他8个阴性尿样(参见3.4)
- [0295] 6. 抗体纯化在V.1中
- [0296] 7. 抗体目录在VI中
- [0297] V. 测试结果及讨论:
- [0298] 1. 抗体纯化
- [0299] 2014年5月28日收到杂交瘤223和318的腹水以及1992和1993的抗血清。使用蛋白质纯化所有四种抗体。结果汇总于下表中。
- [0300] 单克隆抗体和多克隆抗体的蛋白G纯化的汇总
- [0301]

抗血清/腹水	体积, ml	蛋白 G 纯化的抗体	来自抗血清或腹水的抗体产量	批号
MoAb 318, 腹水	5.1	3.42 mg/ml x 3ml = 10.26 mg	10.26mg/5.1ml=2.0 mg/ml	R- 1405001
MoAb 223, 腹水	2.3	5.96 mg/ml x 0.82 ml =4.88 mg 2.06 mg/ml x 0.35 ml=0.72 mg	5.6 mg / 2.3 ml =2.4 mg/ml	R- 1405002-1 R- 1405002-2
兔抗 PRL3 抗血清#1992	5.5 ml	4.45 mg/ml x 14.3 ml= 63.6 mg	63.6 mg /5.5 ml = 11.56 mg/ml	R- 1406002
兔抗 PRL3 抗血清#1993	6 ml	3.54 mg/ml x 17.8 ml=63 mg	63 mg /6 ml = 10.44 mg/ml	R- 1406003

- [0302] 通过SDS-PAGE测试抗体的纯度,参见图10
- [0303] 讨论:
- [0304] 1. 在PAGE中仅见到轻链 (25kDa) 和重链 (55kDa)。满足抗体的纯度。
- [0305] 2. 来自腹水的抗体回收产量为2.0-2.5mg/ml。这是在透析和浓缩后计算的,并且是基于少量腹水 (5.1ml和2.3ml)。
- [0306] 3. 来自两种兔抗血清的抗体回收量分别为10至11mg/ml。
- [0307] 2. 研究最佳匹配对
- [0308] 抗体配对的设计图

[0309]

		Au-Ab 偶联物			
		MoAb 223	MoAb 318	兔抗 PRL3#1992	兔抗 PRL3#1993
包被抗体	MoAb 223	1	2	3	4
	MoAb 318	5	6	7	8
	兔抗 PRL3#1992	9	10	11	12
	兔抗 PRL3#1993	13	14	15	16

[0310] 研究了16对,结果列于下面的两个表中。

[0311] 阴性样品检测结果

[0312]

抗体配对#	样品缓冲液 6190	尿 1	尿 2	dH <sub>2</sub> O	PBS
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0
9	3	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	3	0	0	0	2
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	3	0	0
16	0	0	3	0	0

[0313] 阳性对照测试结果

[0314]

抗体配对	PRL3 GST 100ng/ml
1	2
3	0
4	6
4	3
5	2
6	3
7	3
8	2
9	3
10	0

11	8
12	3
13	2
14	3
15	6
16	6

[0315] 结果与讨论:

[0316] 2.1从阳性对照测试结果可以看出,兔抗体1992显示出最高的亲和力(配对11)。

[0317] 2.2基于配对1-8、9、10、13和14的信息,推断MoAb223的亲和力高于318。

[0318] 2.3未经亲和纯化,多克隆抗体通常可能含有一些来自动物免疫期的感染的抗体。明显的实例是被假单胞菌感染。在常规纯化后,这种抗体会被引入到测试线并在测试装置中缀合,因此,如果患者样品含有假单胞菌,则导致假阳性。

[0319] 2.4由于2.3中的原因,本研究不会考虑在测试设备中使用多克隆抗体同时作为检测物和捕获物。

[0320] 2.5如果在原型试验后不能满足灵敏度和特异性,亲和纯化的兔抗PRL3可以是一种选择。

[0321] 3.原型PRL3快速测试的性能

[0322] 为了在剂量响应曲线和再现性上执行PRL3原型装置,本研究使用快速测试读取物以将测试线信号量化为数字信号。

[0323] 3.1PRL3响应曲线

[0324] 在本研究中,将PRL3抗原在样品缓冲液6129中稀释(室内, in house)。将140 $\mu$ l稀释的PRL3施用到测试盒(装置)的样品孔中。15分钟后,通过快速测试读取器读取测试装置。对于每个PRL3水平运行一式三次。计算每个水平的CV%。

[0325] 结果与讨论:

[0326]

浓度 ng/ml	运行			平均值	CV%
	1	2	3		
12.5	0.0087	0.0083	0.0086	0.00857	2.4
25	0.0132	0.0123	0.0127	0.012733	3.5
50	0.0181	0.0186	0.0232	0.019967	14.0
100	0.0425	0.0481	0.0497	0.046767	8.0
200	0.1002	0.1069	0.1054	0.104167	3.3
400	0.1820	0.1925	0.2200	0.198233	9.8
1000	0.4686	0.5232	0.4998	0.4972	5.5
2000	0.8349	0.7645	0.7000	0.766467	8.8
4000	1.2854	N/A	N/A	1.2854	N/A

[0327] 讨论:

[0328] 3.1.1在2000ng/ml后,曲线变得并不陡峭(灵敏度较低)。

[0329] 3.1.2低于4000ng/ml,未观察到钩状效应(hook affection)。曲线中的分析者是PRL3-GST。尚未得知游离PRL3将是如何进入钩状效应的。

[0330] 3.2再现性

[0331] 测定方案与3.1中描述的相同。对于IMCB定义和提供的阴性尿样重复操作20次。对于在样品缓冲液中制备的低阳性PRL3重复操作10次。计算每个的CV%。

[0332] 阴性尿#2的20个读数

读数 样品数=10					平均值	CV%
0.0023	0.0014	0.0033	0.0013	0.0022	0.0027	40
0.0024	0.0054	0.0024	0.0019	0.0014		
0.0030	0.0026	0.0025	0.0018	0.0041		
0.0035	0.0036	0.0021	0.0049	0.0020		

[0334] 一个弱阳性对照的10个读数

读数 样品数=10					平均值	CV%
0.0210	0.0196	0.0164	0.0171	0.0202	0.0170	14.1
0.0163	0.0160	0.0148	0.0128	0.0163		

[0336] 讨论:

[0337] 3.2.1阴性尿的CV为40%，但最高和最低读数为0.0054和0.0014。该读取器的阈值为0.010或更高作为阳性。所以这个数据是可以接受的。

[0338] 3.2.2低阳性CV为14.1%并且可接受。

[0339] 3.3检测限 (LOD)

[0340] 使用QC对照颜色表对测试线信号进行评分。分数3是边界线，将3以下视为负数。

[0341] 以表中所示的每个水平，在样品缓冲液中稀释PRL3-GST。

[0342] 将100 $\mu$ l稀释液施用到测试盒的样品孔中。在第15分钟时对信号进行评分。

[0343]

ng/ml	10,000	5,000	1,000	500	100	50	20	10
评分	10	9	8	7	6	5	4	3
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+

[0344] 讨论:

[0345] 3.3.1可检测性为10-20mg T3-GST/ml。

[0346] 3.3.2在高达10,000ng/ml下未看到勾状效应。

[0347] 3.4临床尿样研究

[0348] 从IMCB收到五个阴性尿样和两个阳性尿样。从我们的实验室收集了另外三个尿样。将阳性尿样之一 (L) 用于鉴定抗体。因此，在使用原型装置的最终测试中仅使用了一个阳性尿样 (尿液B)。

[0349] 3.4.1测定方案

[0350] 1). 使用尿样达到室温 (注意: PRL3在冷却时在膜上具有不同的迁移行为, 因此在运行测试之前使样品达到室温是非常重要的)。

[0351] 2). 将100 $\mu$ l尿样加入到测试装置上。

[0352] 3). 在第15分钟时读取结果。

[0353] 4). 测试结果解释。

[0354] 3.4.2测定结果

[0355] 样品#1至#5是来自IMCB的阴性尿, #6至#8来自我们的实验室, #9是阳性尿B。尿B为阳性, 且1:10稀释也见到弱阳性。

[0356]

#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9
-	-	-	-	-	-	-	-	+

[0357] VI. 抗体目录

抗体/批号	浓度, mg/ml	体积, ml	总量, Mg
MoAb 223/ R1405002-1 R1405002-2	5.96 mg/ml 2.06 mg/ml	0.39 ml 0.35 ml	2.3 mg +) 0.72 mg 3.0 mg
[0358] MoAb 318 R1405001	3.42 mg	2.8 ml	9.5 mg
兔抗 PRL3 1992 R1406002	4.45 mg/ml	14 ml	62.3 mg
兔抗 PRL3 19923 R1406003	3.54 mg/ml	17.4 ml	61.5 mg

[0359] 实施例4

[0360] 出乎意料的是,我们在61%的多种类型的人类癌症尿液中以及在所有源自PRL-3+ (但不是PRL-3-) 荷瘤小鼠的癌症尿液中发现了分泌的PRL-3癌蛋白。在用PRL3-抗体有效治疗后,尿PRL-3水平显著降低。我们提议尿PRL-3作为一种新型诊断和替代生物标志物,其用于治疗反应监测多种癌症类型中的PRL3抗体治疗。

[0361] 材料和方法

[0362] 蛋白质印迹在12%SDS-聚丙烯酰胺凝胶的单独孔中溶解200 $\mu$ g裂解物,并转移到硝化纤维素膜上,然后在4 $^{\circ}$ C下以指定的一级抗体在1:1,000稀释下过夜封闭并检测。用TBS-T缓冲液(20mM Tris pH 7.6,140mM NaCl,0.2%Tween-20)充分洗涤后,使用相应的辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的第二抗体以1:5,000稀释比例将膜温育1小时,用TBS-T洗涤,并且使用化学发光底物(Pierce)可视化。

[0363] 抗体B细胞标志物(CD45/CD220,克隆RA3-6B2)、NK细胞标志物(CD335/Nkp46,克隆29A1.4)和HSP70(cat#610607)抗体购自BD Pharmingen。钙联结蛋白(cat#2679)抗体购自Cell Signaling。CD63(cat#sc-15363)抗体购自Santa Cruz Biotechnology。GAPDH(克隆MAB374)抗体购自Millipore。

[0364] 尿液分析在分析之前,将在新加坡国立大学医院的患者同意下收集的晨尿样储存在-80 $^{\circ}$ C下。在4,000x g下在4 $^{\circ}$ C将样品离心20分钟以除去不溶性的碎片,然后进行分析。将等体积(30 $\mu$ L)的尿样加载到凝胶上以进行蛋白质印迹。

[0365] 外泌体分离用PBS将处在70-80%融合指数生长的细胞洗涤两次,然后用10ml无血清的RPMI-1640温育24小时。将条件培养基在300xg下离心10分钟,以去除死细胞和碎片。然后使用超离心3K滤器浓缩器(Milipore)将预清洁的条件培养基浓缩至约500 $\mu$ L,并且根据制造商的说明书使用总外泌体分离试剂(Total Exosome Isolation Reagent)(Invitrogen)从渗余物中提取外泌体。对于人类尿液外来体提取,将1mL预清洁的尿液直接用于所述的外泌体提取。

[0366] 结果

[0367] 细胞内PRL-3癌蛋白可以被分泌到细胞培养基中,并且存在于61%的癌症尿中,但

不存在于正常的尿中。在2008年,我们首先报告了针对细胞内癌蛋白的非传统免疫疗法,并且证明PRL-3抗体可以被肿瘤细胞S22吸收。然而,仍然不清楚细胞内抗原的抗体识别是如何发生的以及发生在何处。在本文中,我们发现了一种未被认识的自然现象,即在体外相应的PRL-3+ (而不是PRL-3-) 癌细胞系的浓缩培养基中可以检测到“细胞内”PRL-3蛋白(图13a,泳道5-8)。作为对照,定位在ER的蛋白质钙联结蛋白(calnexin)(CANX)仅在裂解物中发现,但在条件培养基中未发现(图13a),因此排除了来自死细胞或细胞碎片的非特异性污染。由于基于微阵列和组织学研究<sup>6</sup>,PRL-3具有有前景的癌生物标志物潜力,所以我们通过分析来自健康个体和癌症患者的尿样,继续研究了“分泌的”PRL-3作为生物标志物是否可能具有临床相关性。

[0368] 通过蛋白质印迹分析来自健康个体的总共15个尿样和来自癌症患者的总共195个尿样以检测PRL-3蛋白。出乎意料地,平均在61% (195个样品中的119个样品)的来自患有不同类型癌症的患者的尿样中容易检测到PRL-3(图13b),但在任何正常尿样中都不能检测到(图13c,泳道1-15)。具体地,在10/12(83%)的胃部癌症尿(图13c,泳道16-27)、12/17(70%)的鼻咽癌尿(图13d)、30/67(45%)的膀胱癌尿(图13e)、56/85(66%)的肺癌尿(图13f)、8/10(80%)的乳腺癌尿和3/4(75%)的前列腺癌尿(数据未显示)中检测到了尿PRL-3蛋白质。我们从这210个尿样获得的结果,鉴定了PRL-3为常见的癌症特异性尿蛋白。

[0369] 由于PRL-3蛋白不具有经由ER/高尔基途径的经典分泌的序列肽,因此我们认为其可能通过非经典的外泌体分泌来分泌。外泌体是存在于许多生物流体和细胞培养基<sup>33</sup>中的细胞膜和/或内体来源的50至150nm囊泡。为了确定分泌的PRL-3本质上是否可能是外泌体,我们对来自不同类型癌症的患者的尿样进行了外泌体分级,使用四跨膜蛋白CD63作为对照的外泌体蛋白<sup>34</sup>。令人惊讶的是,我们仅在膀胱癌尿液中检测到外泌体相关的PRL-3(图3),而在来自其他类型的癌症尿液中未检测到(数据未显示)。由于由上皮膀胱癌细胞分泌的外泌体绕过由肾小球滤过<sup>35</sup>施加的物理排除限制并且可以直接进入膀胱的尿池,所以我们的结果间接表明,PRL-3可以在体内以至少两种形式从肿瘤细胞分泌:1)作为约20kDa的可溶性可过滤的形式存在于多种类型的癌症尿液中。这种‘游离PRL-3’可能通过肿瘤坏死、凋亡或肿瘤细胞裂解而泄漏到体液中。由于‘游离PRL-3’足够小(约20kDa)以通过肾脏过滤系统,其具有的估计截止值为70kDa<sup>35</sup>,所以可容易地累积在癌症尿液中。2)作为仅在膀胱癌患者的尿中发现的外泌体相关的形式。由于来自其它癌组织(如胃、肝、肺)的循环外泌体不能通过肾小球过滤,只有无阻碍进入膀胱泌尿系统的膀胱癌细胞可以将这种含PRL-3的外泌体直接流入到尿中。总之,分泌的PRL-3是一种癌症特异性标志物,其包含至少两种形式—可溶的“游离”形式(在来自各种癌症患者的尿液中可检测到)和更大的外泌体相关的形式(仅在膀胱癌患者的尿液中可检测到)。

[0370] 尿PRL-3是一种新的替代生物标志物,其用于抗PRL3抗体治疗的治疗反应监测。由于PRL-3可以在来自癌症患者的尿样中频繁检测到,所以我们质疑尿PRL-3表达是否反映了体内真正的PRL-3+肿瘤的存在。由于难以获得临床匹配的肿瘤-尿样以验证这种关系,我们改用PRL-3+SNU-484和PRL-3-MKN45原位胃小鼠模型来比较匹配的肿瘤-尿对中的PRL-3的表达。此外,将每个原位模型细分为2组—接受PBS(未治疗的)或抗PRL3抗体治疗(经治疗的)的小鼠—以阐明抗PRL3抗体治疗和尿PRL-3表达之间的关系。

[0371] 在未治疗的PRL-3+SNU-484荷瘤小鼠中,PRL-3在尿中是高丰度的(图14a,奇数泳

道1-9)。然而,在抗PRL3抗体治疗后,在所有小鼠中不再检测到尿PRL-3,这与PRL-3的肿瘤内表达的降低一致(图14a,偶数泳道2-10)。重要的是,在每种情况下,尿PRL-3信号从抗PRL3抗体治疗的小鼠的减少对应于胃肿瘤缩小(图14a,上图),表明尿PRL-3可用作抗PRL3抗体治疗功效的替代生物标志物。作为对照,不论是否进行抗PRL3抗体治疗,我们没有检测到携带PRL-3-MKN45原位肿瘤的小鼠中的尿PRL-3(图14a,泳道11-12)。因此,在携带PRL-3+而非PRL-3-癌的小鼠中,特异性地检测到了尿PRL-3,并且在用抗PRL3抗体治疗后减少。

#### [0372] 讨论

[0373] 本研究确定了分泌的尿PRL-3用于诊断和治疗反应监测的生物标志物潜力。我们在平均61%的多个人类癌症患者中检测到尿PRL-3。

[0374] 虽然在来自多个癌症患者的尿中检测到可溶性PRL-3,但我们仅在膀胱癌患者的尿中检测到外泌体相关的PRL-3,而来自患有其它恶性肿瘤的患者并未检测到外泌体相关的PRL-3。这种尿的可能的解释是由肾小球过滤施加的物理约束,肾小球仅允许小于70kDa的蛋白从血浆通过进入用于尿排泄的鲍曼氏囊中<sup>35</sup>。因此,可溶性‘游离’PRL-3(约20kDa)而不是外泌体相关的PRL-3,仍然可以在来自这些其它癌症类型的尿液中检测到。尽管如此,外泌体相关的PRL-3的存在提出了一个有趣的可能性,其中来自PRL-3+肿瘤的萌芽外泌体可以作为肿瘤区域内的锚定点,以用于体内抗PRL3抗体识别和启动效应物免疫应答(图14b)。

[0375] 在小鼠模型中观察到的肿瘤和尿PRL-3表达之间的紧密相关性表明,尿PRL-3表达在各种人类恶性肿瘤中可用作PRL-3靶向癌症疗法(包括抗PRL3抗体)的前瞻性诊断生物标志物。此外,尿PRL-3也可以作为替代生物标志物,提供用于临床医生推断治疗功效的非侵入性、快速且简单的定性方法。

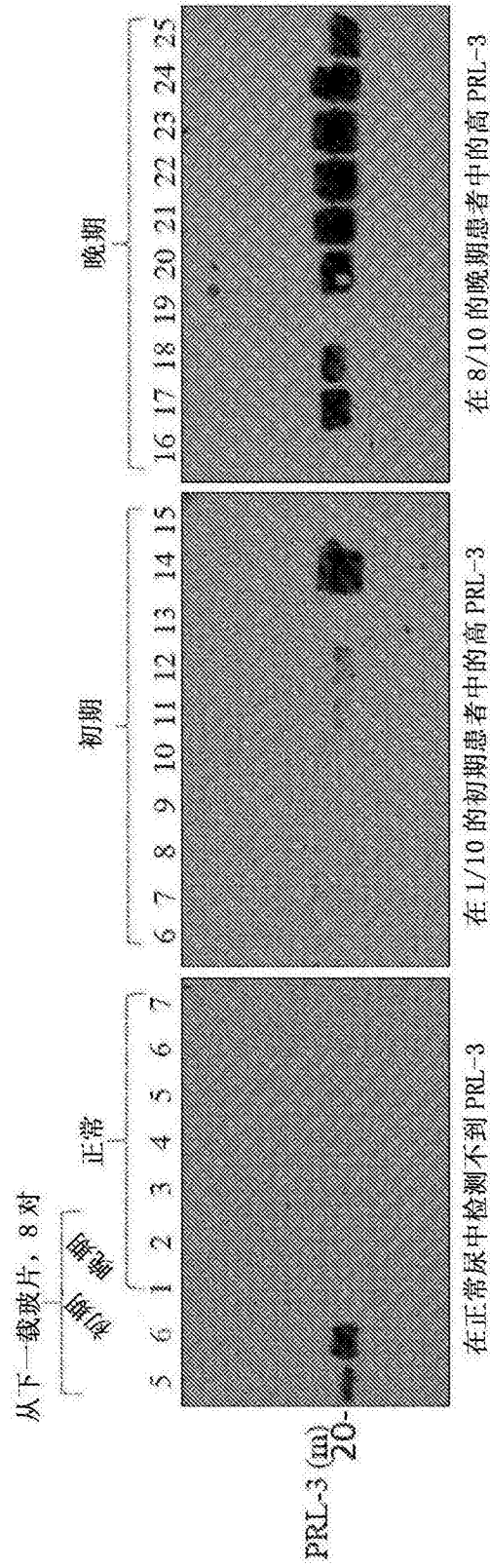


图1

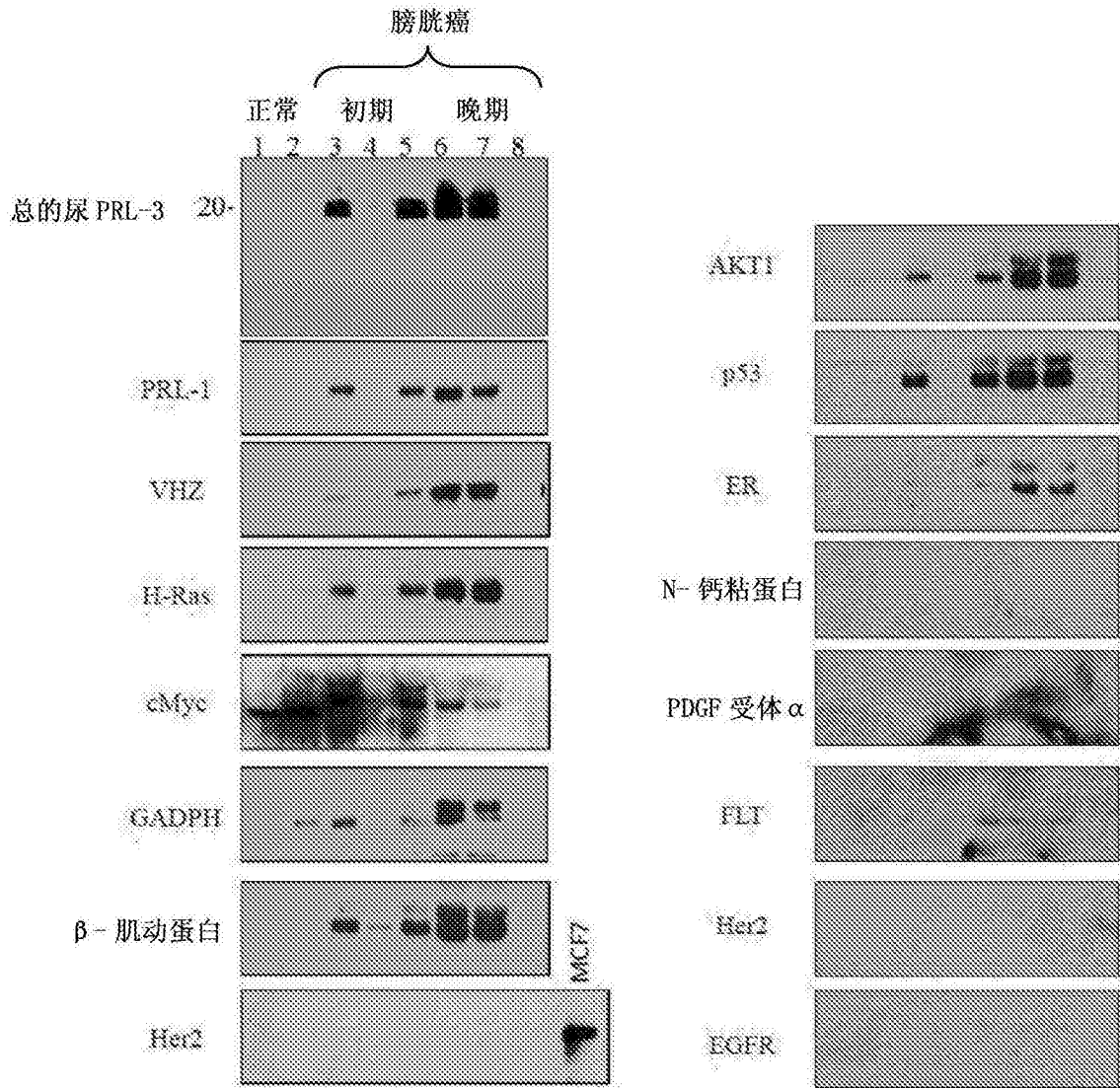


图2

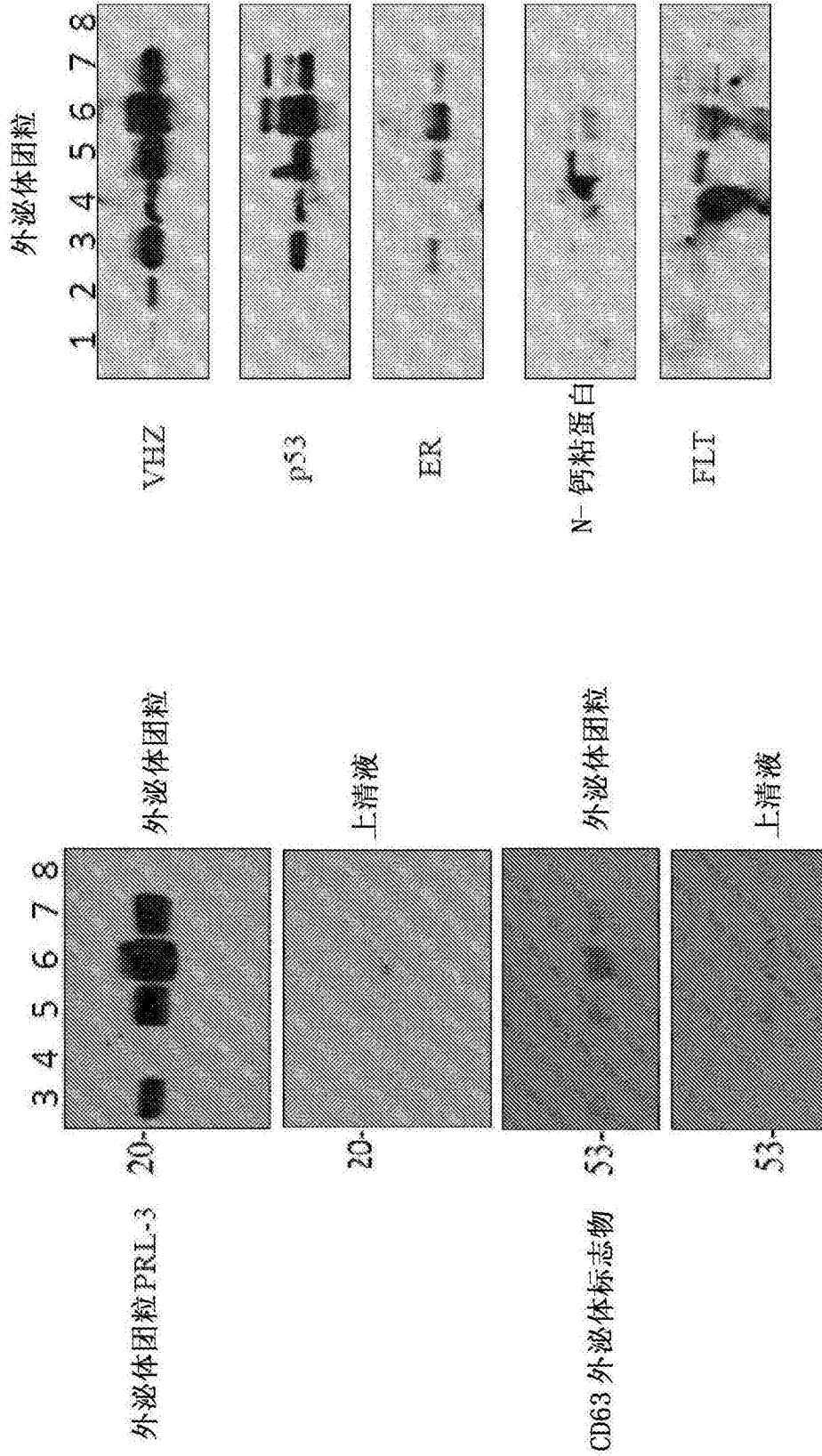


图3

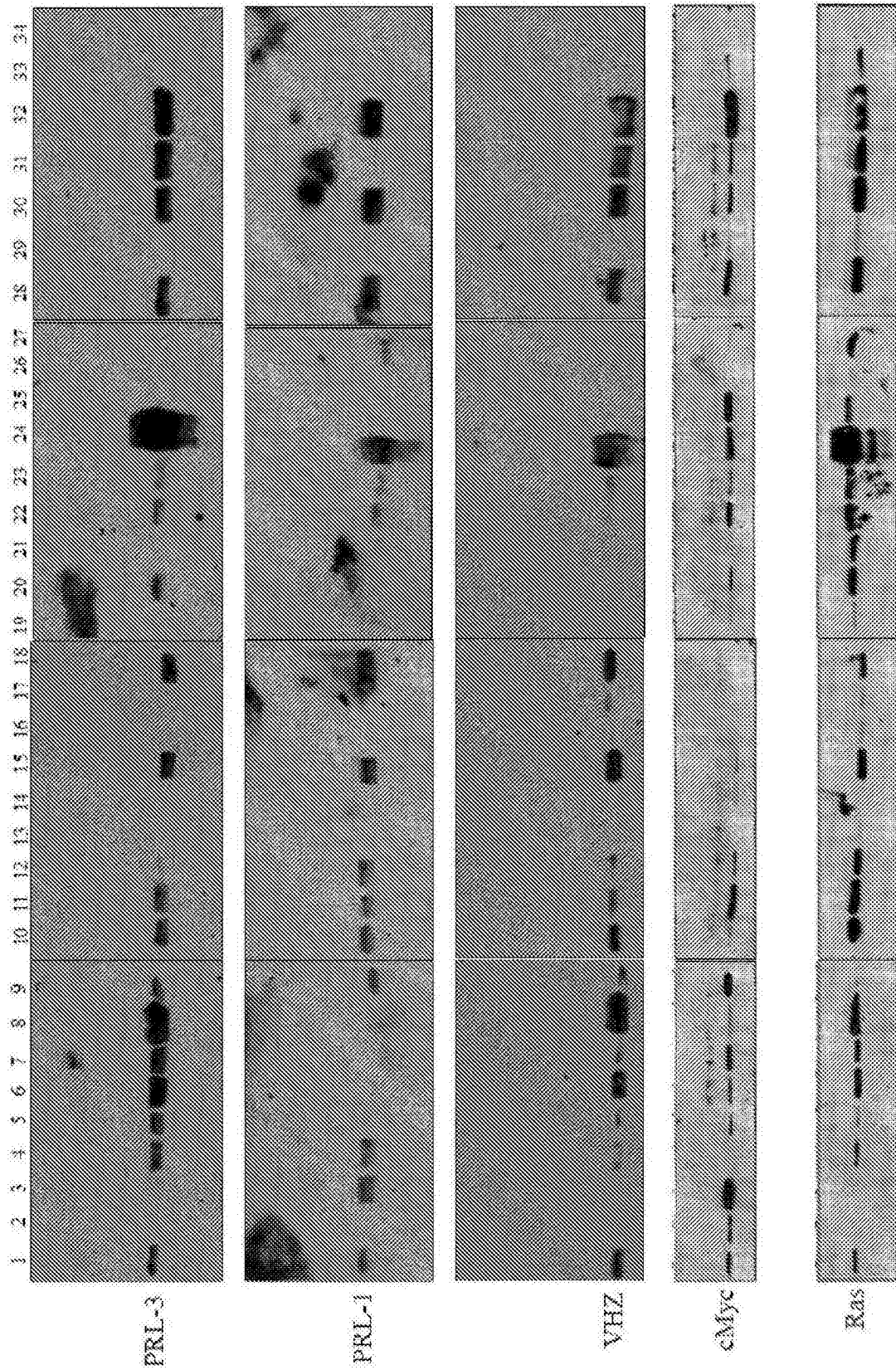


图4

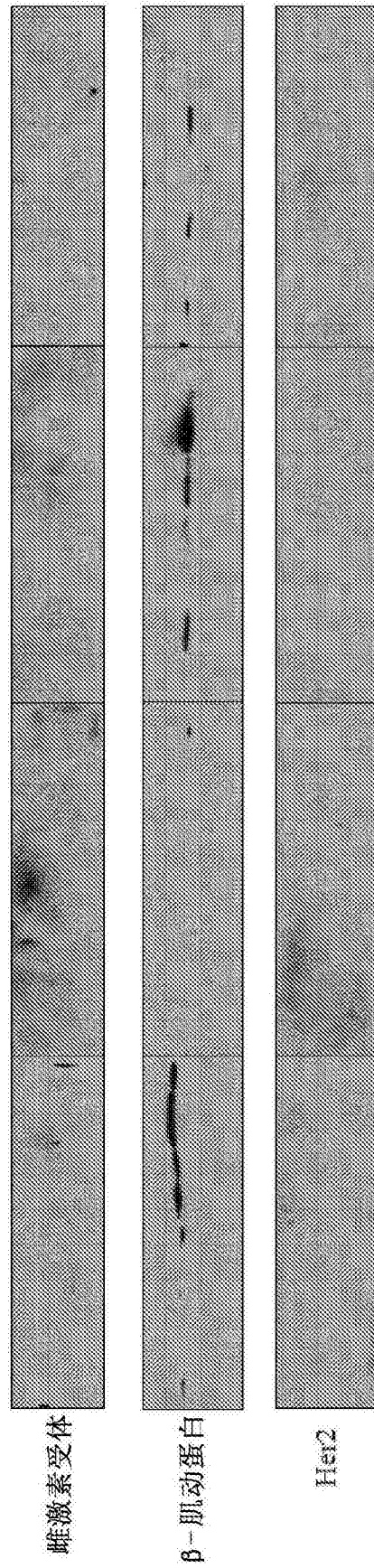


图5

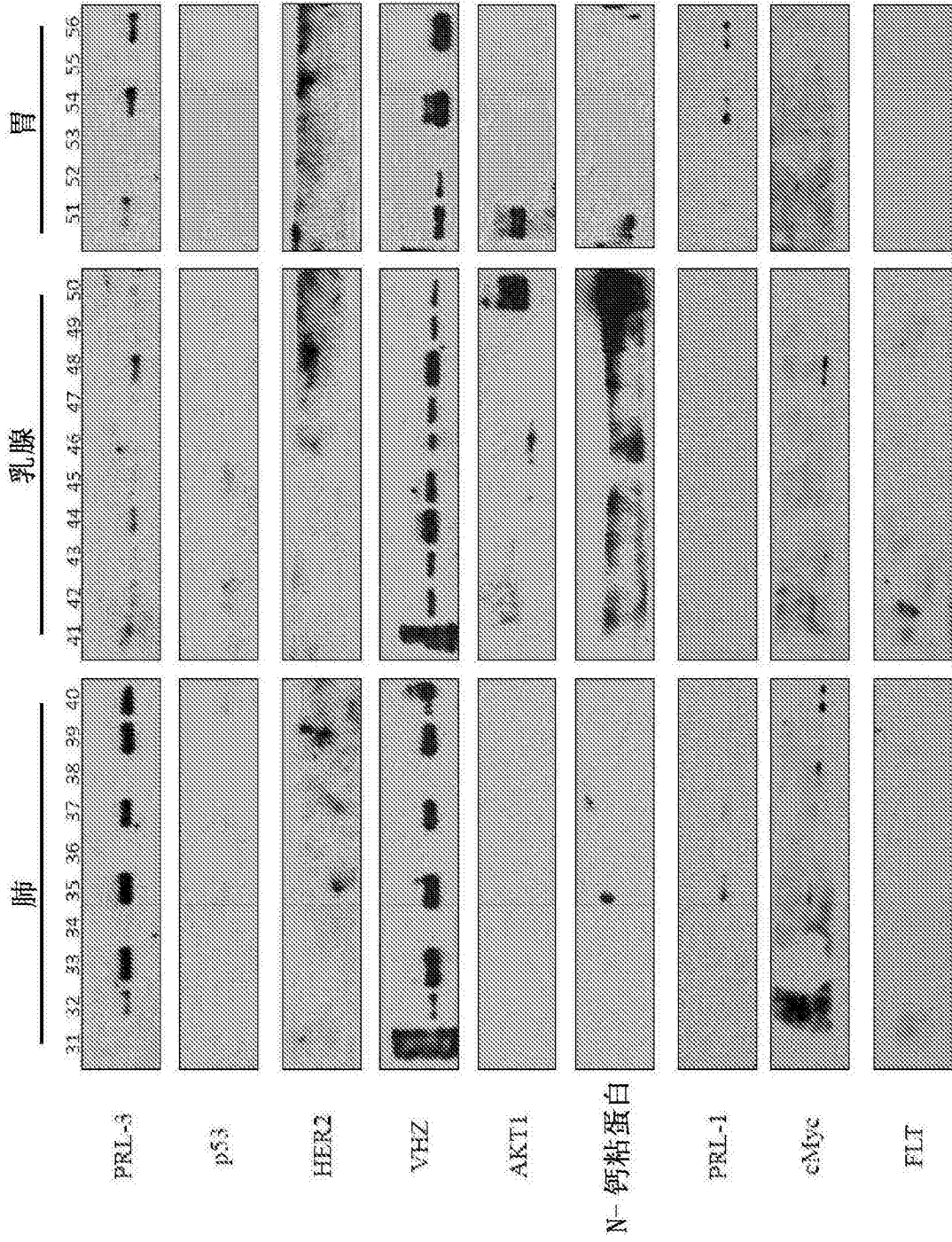


图6

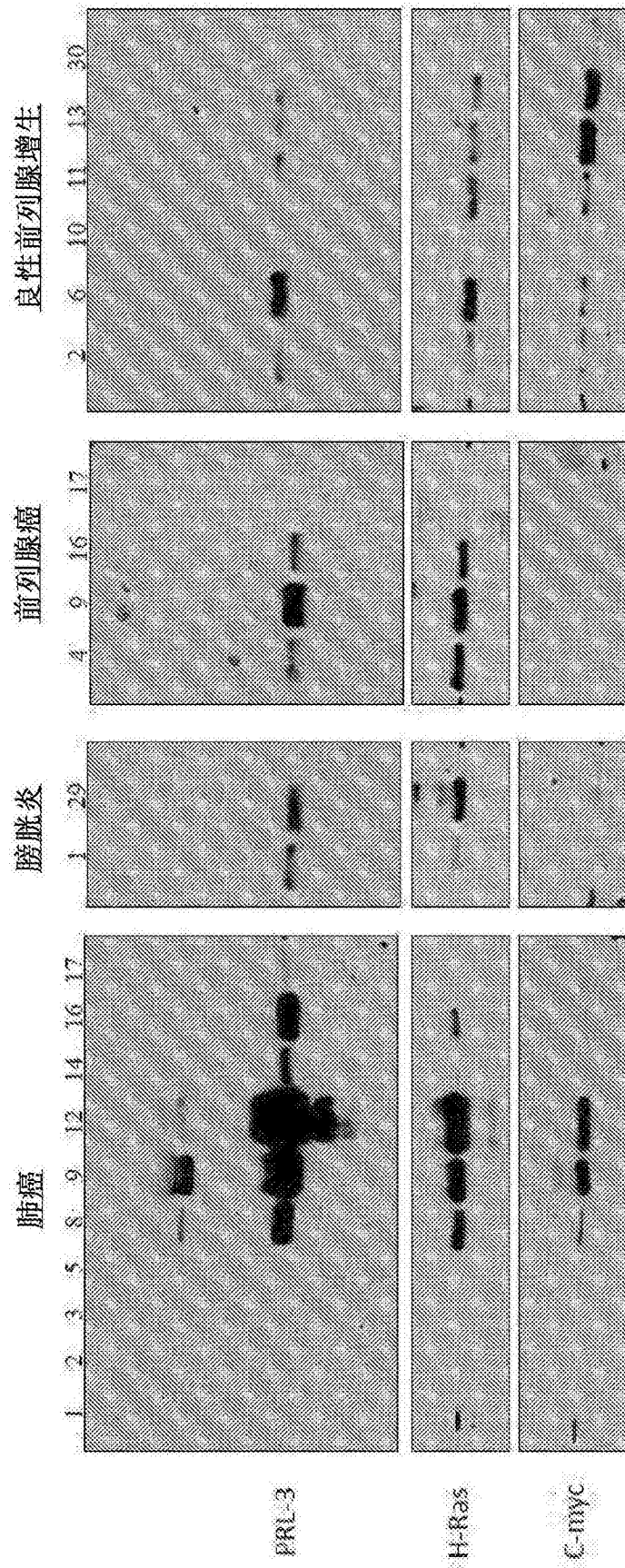


图7

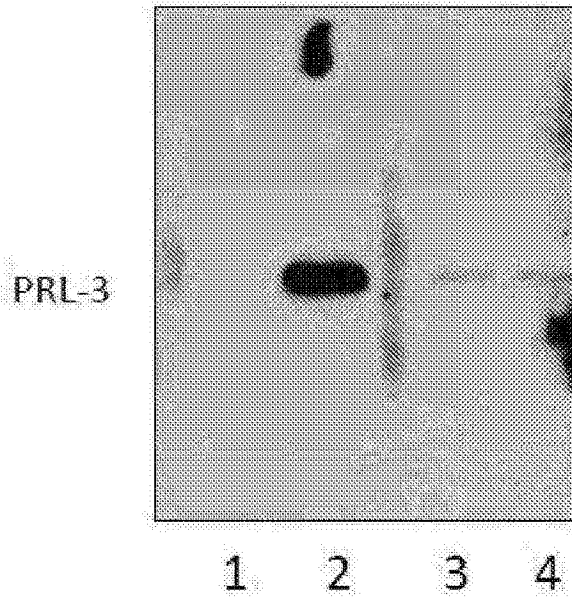


图8

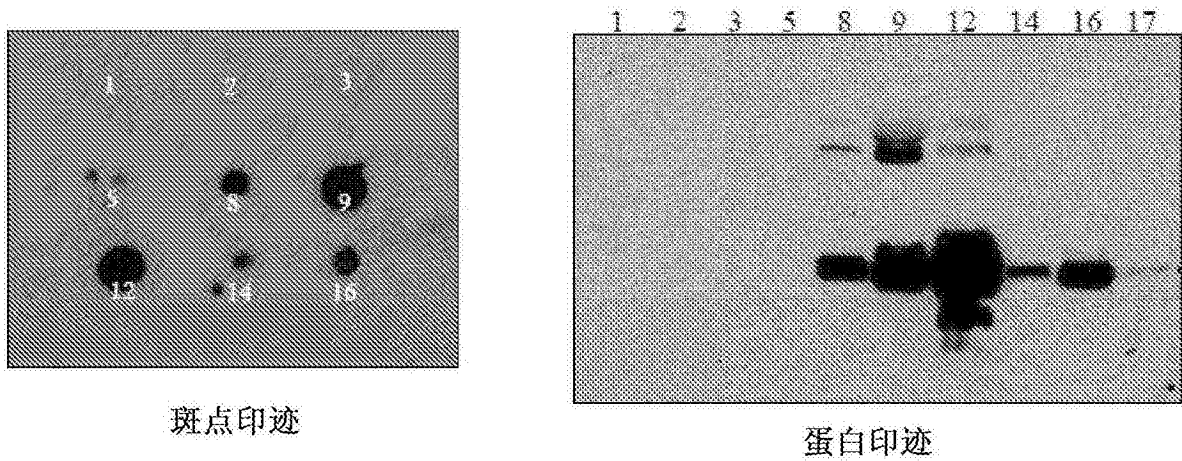


图9

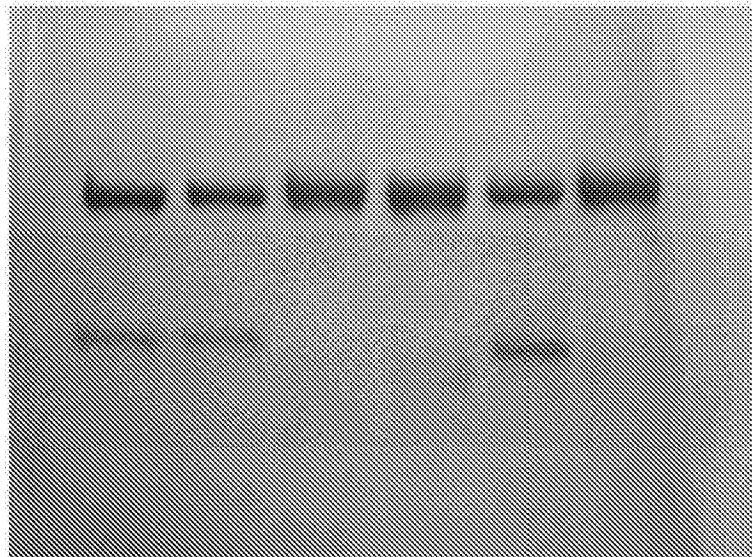


图10

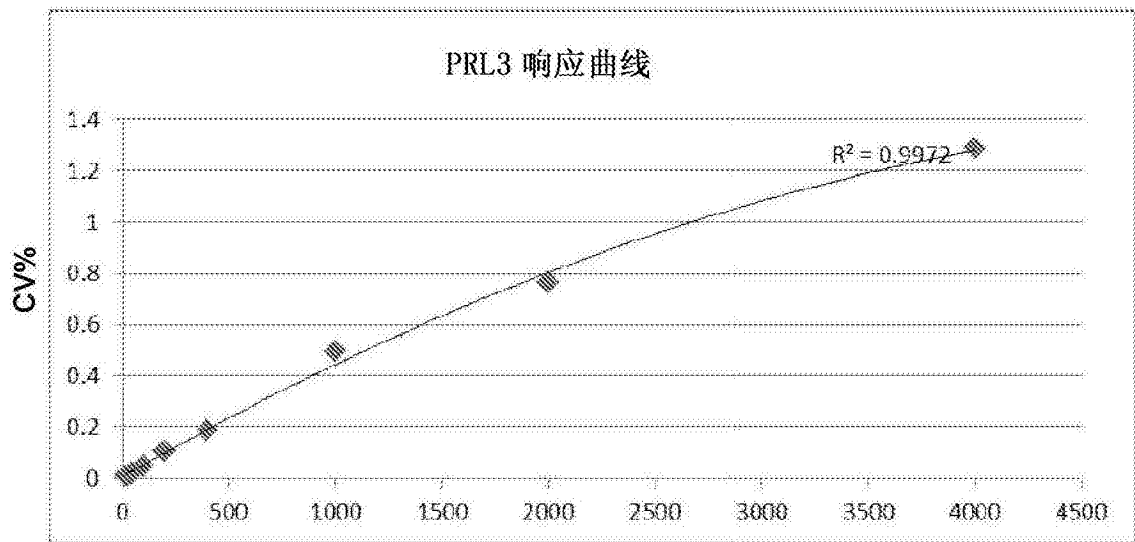


图11

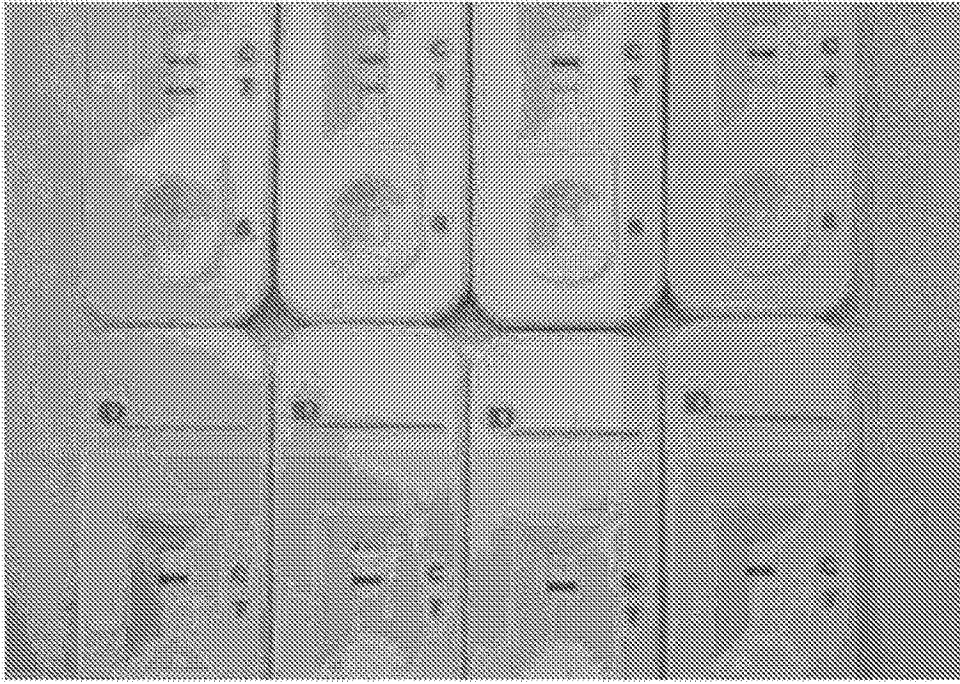


图12

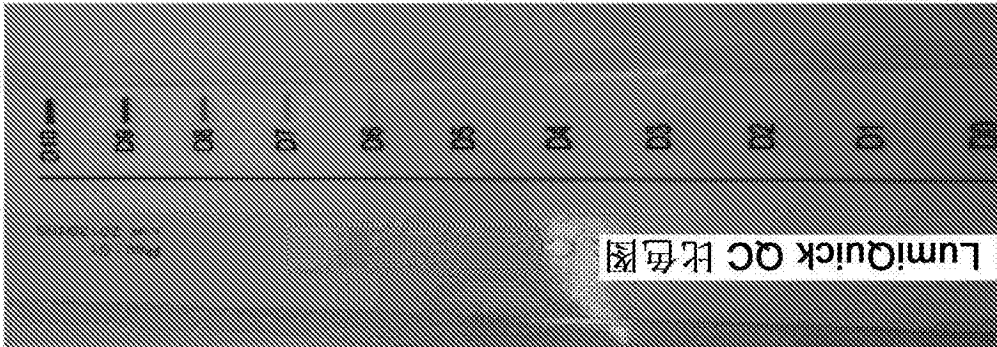


图12A

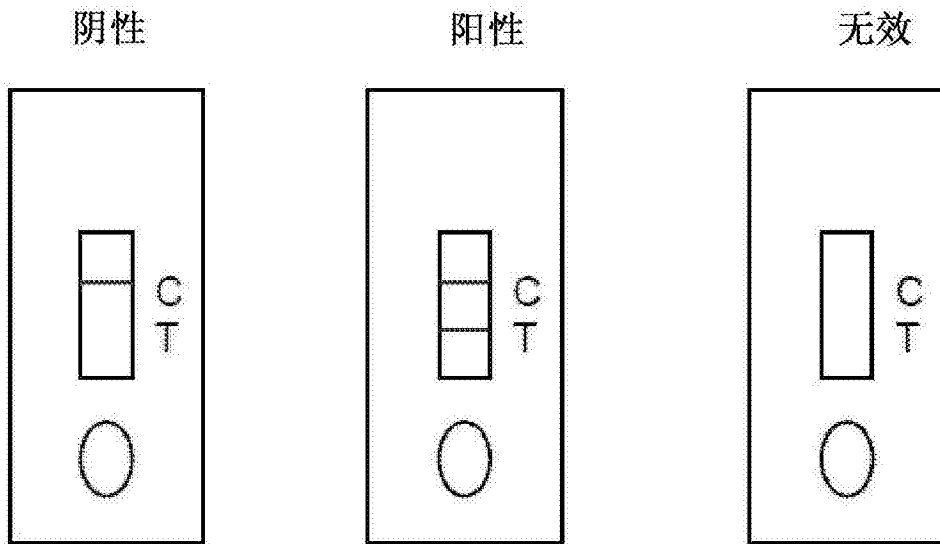


图12C

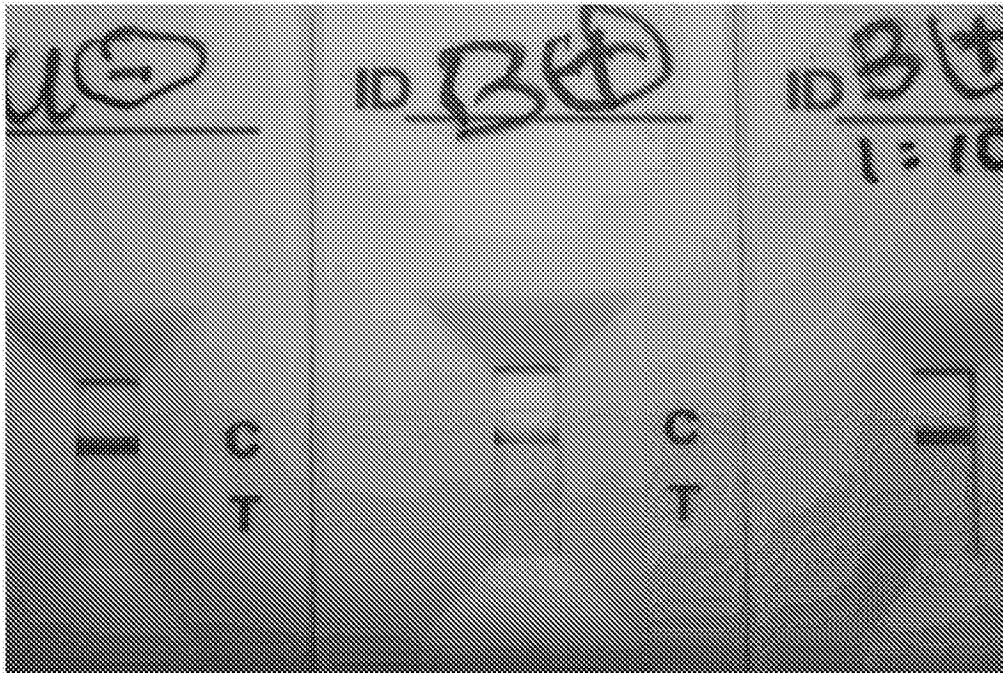


图12D

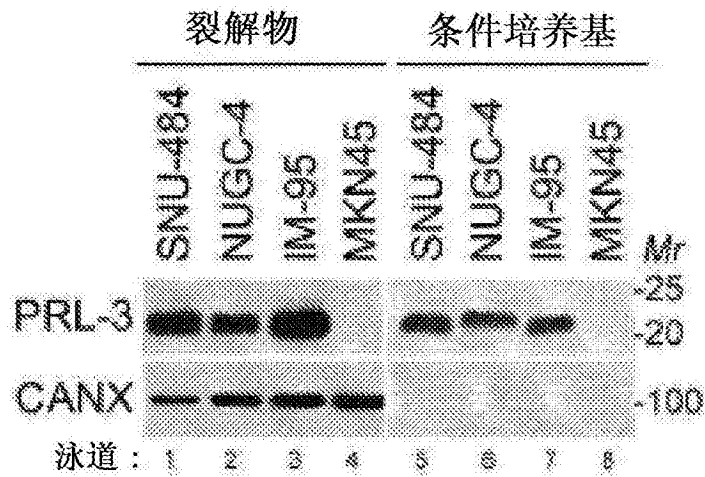


图13A

癌症类型	n	尿 PRL-3 表达	
		PRL-3 阳性数	% PRL-3 阳性
胃癌	12	10	83
鼻咽癌	17	12	71
膀胱癌	67	30	45
肺癌	85	56	66
乳腺癌	10	8	80
前列腺癌	4	3	75
总计	195	119	61.0 (平均值)
正常个体	15	0	0

图13B

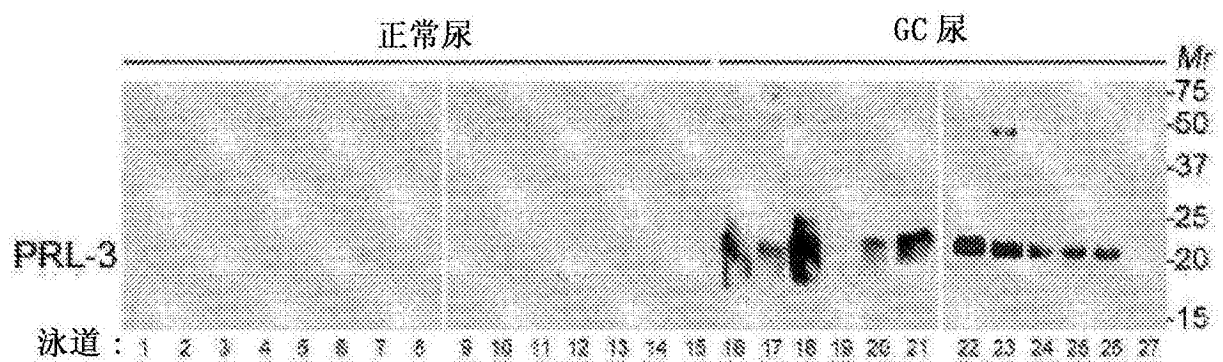


图13C

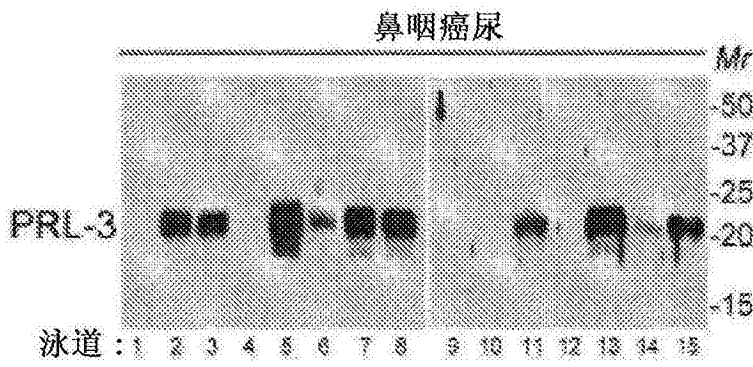


图13D

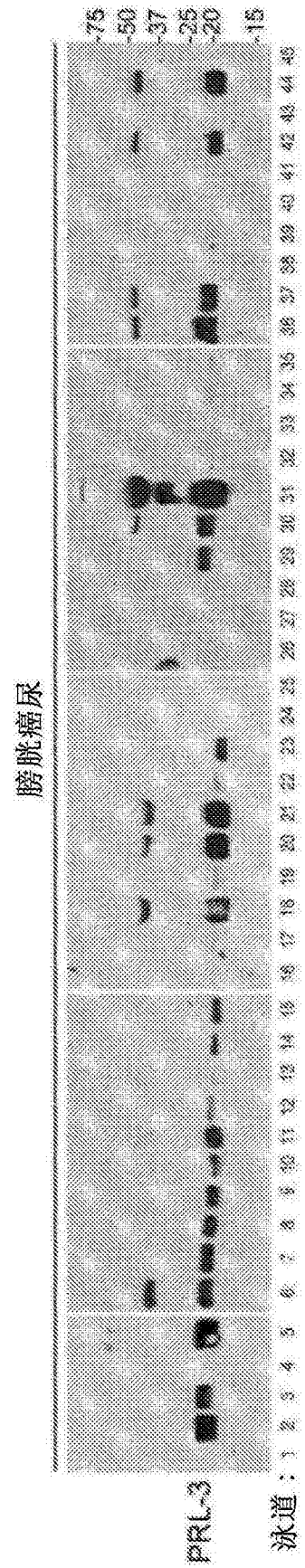


图13E

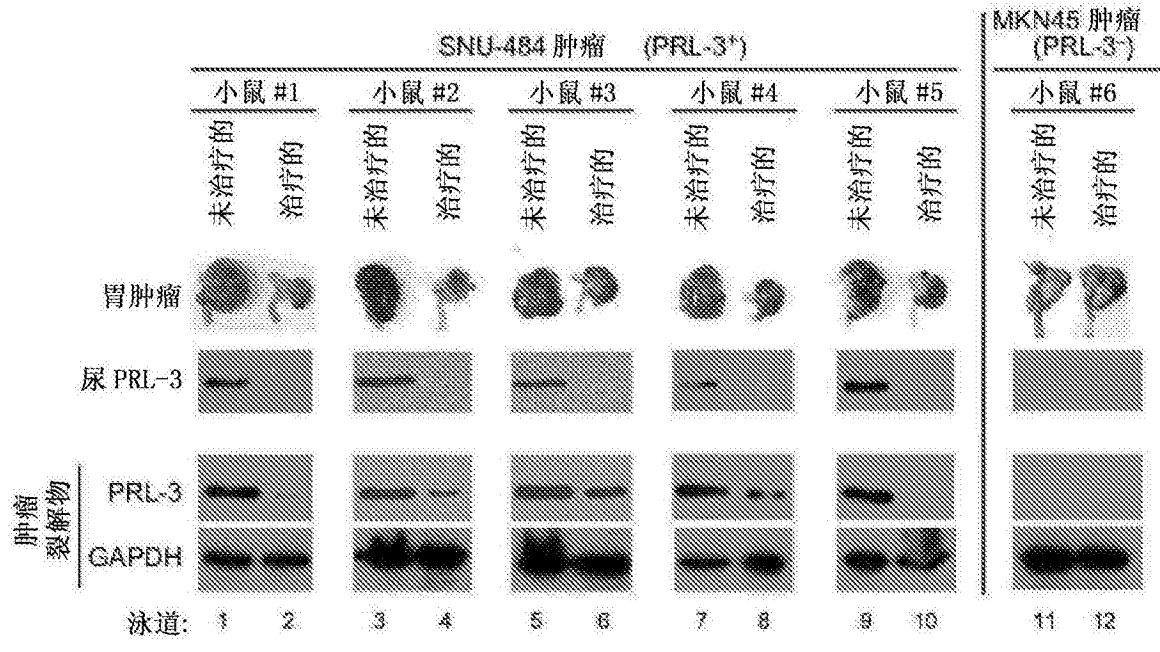


图14A

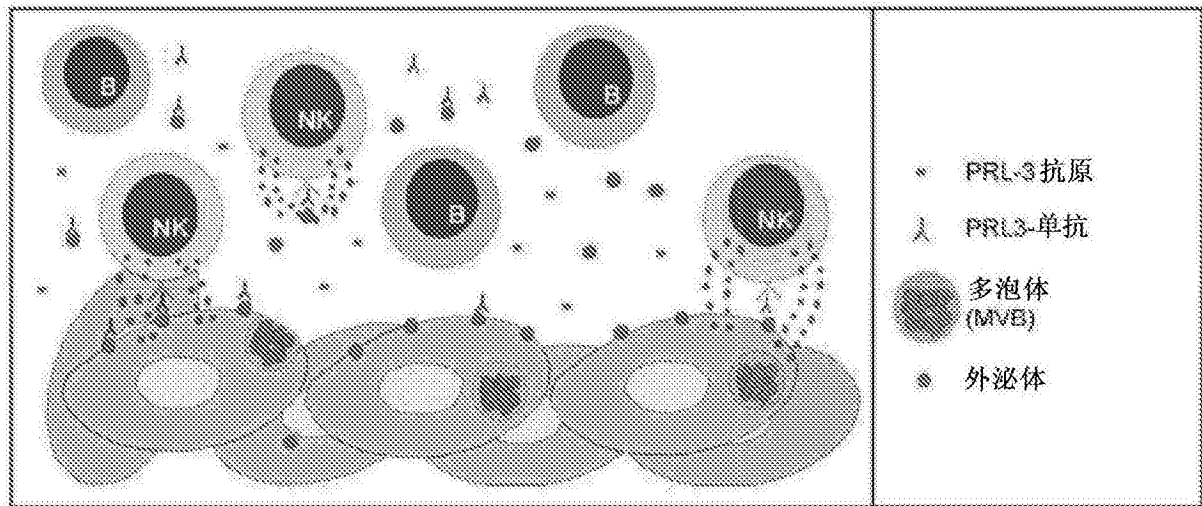


图14B