

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012 年 12 月 27 日 (27.12.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/174970 A1

(51) 国际专利分类号:

G01N 33/574 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2012/076031

(22) 国际申请日: 2012 年 5 月 25 日 (25.05.2012)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201110174036.8 2011 年 6 月 24 日 (24.06.2011) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 中国科学院上海药物研究所 (SHANGHAI INSTITUTE OF MATERIA MEDICA, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市浦东张江祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 耿美玉 (GENG, Meiyu) [CN/CN]; 中国上海市浦东张江祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。 丁健 (DING, Jian) [CN/CN]; 中国上海市浦东张江祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。 艾菁 (AI, Jing) [CN/CN]; 中国上海

市浦东张江祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。 樊嘉 (FAN, Jia) [CN/CN]; 中国上海市浦东张江祖冲之路 555 号, Shanghai 201203 (CN)。

(74) 代理人: 北京金信立方知识产权代理有限公司 (KINGSOUND & PARTNERS); 中国北京市海淀区紫竹院路 116 号嘉豪国际中心 B 座 11 层, Beijing 100097 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,

[见续页]

(54) Title: USE OF pIgR AS MOLECULAR MARKER IN EARLY RECURRENCE AND/OR METASTASIS OF TUMOURS AND INTERVENTION TARGET FOR ANTI-METASTATIC DRUGS

(54) 发明名称: pIgR 作为肿瘤早期复发和/或转移的分子标志物和抗肿瘤转移的药物干预靶点的用途

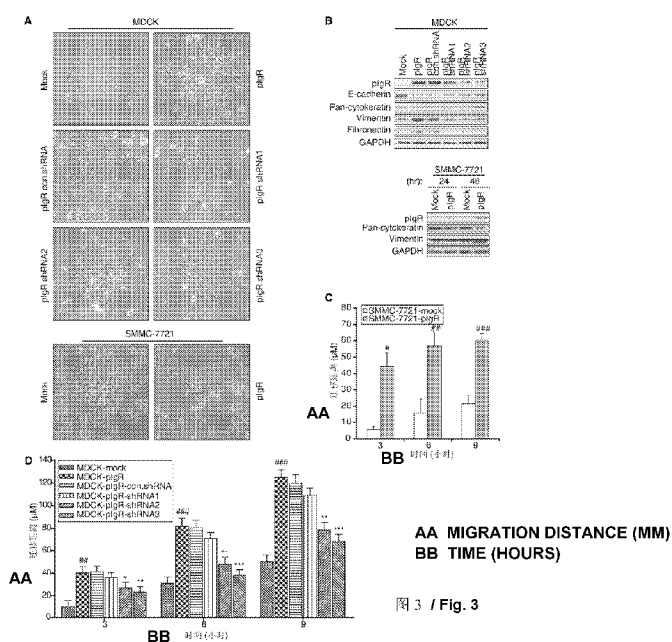


图 3 / Fig. 3

(57) Abstract: Disclosed is a use of pIgR as a molecular marker in diagnosing or predicting the early recurrence and/or metastasis of tumours and an intervention target for anti-metastatic drugs. In particular, the present invention provides for the use of an antibody against pIgR protein in the preparation of diagnostic agents for diagnosing or predicting the early recurrence and/or metastasis of tumours. In addition, the present invention also provides for the use of a substance reducing pIgR protein expression in the preparation of drugs for preventing or treating the recurrence and/or metastasis of tumours. In addition, the present invention also provides for an antisense oligonucleotide or an RNA interference fragment or an expression vector steadily producing an RNA interference fragment.

(57) 摘要: 本发明公开了 pIgR 作为诊断或预测肿瘤早期复发和/或转移的分子标志物和抗肿瘤转移的药物干预靶点的用途。具体而言, 本发明提供了针对 pIgR 蛋白的抗体在制备用于诊断或预测肿瘤早期复发和/或转移的诊断剂中的用途。此外, 本发明还提供了使 pIgR 蛋白表达下调的物质在制备用于预防和治疗肿瘤的复发和/或转移的药物中的用途。此外, 本发明还提供了一种反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体。



RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, — 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

pIgR 作为肿瘤早期复发和/或转移的分子标志物和抗肿瘤转移 的药物干预靶点的用途

技术领域

本发明涉及生物医药领域，具体而言，涉及针对 pIgR 蛋白的抗体在制备用于诊断或预测肿瘤的复发和/或转移的诊断剂中的用途；以及使 pIgR 蛋白或者其 662-735 段或 680-735 段蛋白表达下调的物质在制备用于预防和/或治疗肿瘤的复发和/或转移的治疗药物中的用途；以及一种反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体。

背景技术

恶性肿瘤是严重威胁人类生命的主要疾病之一，肿瘤的转移则是造成癌症患者死亡的主要原因。有资料表明 90% 的恶性肿瘤患者死于肿瘤的转移和复发。目前有关肿瘤转移复发进展的研究，特别是肿瘤复发转移分子标志物的研究一直是肿瘤复发转移研究的热点。因此，找到用于早期诊断、预测转移的新的生物标志物和用于干预治疗的新的靶分子，是提高肿瘤患者治愈率与生存率的行之有效的手段，对于肿瘤的诊断和治疗具有重要的意义，已成为当今生命科学和医药研究中极富挑战性且意义重大的领域。

在肿瘤转移的研究中，上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）近来受到越来越多的关注。EMT 是指具有极性的上皮特征的细胞转换成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的具有间质特征细胞的过程。上皮细胞表型转化过程是由精细的细胞内信号转导机制调控，与多种慢性疾病（特别是肿瘤的发生、浸润和转移）密切相关，因此成为肿瘤研究中前沿的热点。EMT 的发生不仅取决于细胞本身特性，同时受到细胞微环境（microenvironment）的调节。越来越多的研究表明，炎性微环境（尤其是慢性炎症微环境），作为机体免疫系统对感染或刺激响应的重要生理事件，在 EMT 的发生发展过程中具有重要的促进作用，已成为器官纤维化、肿瘤等重

大病理过程转化的共有病理特征。

多聚免疫球蛋白受体 (pIgR) 属于 I 型跨膜糖蛋白, 分为胞内区 (即 C 末端 662-764 氨基酸)、胞外区 (即 N 末端 19-638 氨基酸) 和跨膜区 (639-661 氨基酸) 三个部分 (P01833, UniProtKB/Swiss-Prot 数据库)。pIgR 通过介导细胞内多聚免疫球蛋白 dIgA/pIgM 的极性转运, 在先天与后天免疫中均发挥了重要的作用。pIgR 位于腺上皮细胞和肝细胞 (某些物种) 的基侧膜上, 通常感受炎性环境上调, 抵御病毒或病原体感染。事实上, 早在几十年前就有 pIgR 在肿瘤中表达的研究, 但表达水平高低不一, 特别重要的是, 这种表达的差异与肿瘤病人的临床预后尚未见报道。

发明内容

针对现有技术中存在的问题, 本发明人进行了广泛和深入的研究, 最终完成本发明。

本发明的一个目的是提供了多聚免疫球蛋白受体 (pIgR) 作为诊断或预测肿瘤早期复发和/或转移的分子标志物和/或抗肿瘤转移的药物干预靶点的用途。

为了实现上述目的, 本发明提供了通过检测 pIgR 蛋白的表达来诊断或预测肿瘤的复发和/或转移的方法; 以及本发明提供了通过利用使 pIgR 蛋白或者其 662-735 段或 680-735 段蛋白表达下调的物质来预防和/或治疗肿瘤的复发和/或转移的方法。

根据本发明的一个方面, 本发明提供了针对 pIgR 蛋白的抗体在制备用于诊断或预测肿瘤的复发和/或转移的诊断剂中的用途。

本发明中所用的术语“诊断剂”既可用于诊断肿瘤早期复发和/或转移, 又可用于预测肿瘤复发和/或转移的风险。

本发明中, 优选地, 所述针对 pIgR 蛋白的抗体选自针对 pIgR 全长蛋白的抗体、针对 pIgR 胞内区的抗体和针对 pIgR 胞外区的抗体中, 但不限于此。

更优选地，所述针对 pIgR 蛋白的抗体可为针对 pIgR 胞内区的抗体。最优选地，所述针对 pIgR 蛋白的抗体为针对 pIgR 上 662-735 段或 680-735 段蛋白的抗体。

本发明中，通过检测 pIgR 蛋白的表达来诊断或预测肿瘤的复发和/或转移的方法包括以下步骤：取肿瘤组织，利用 pIgR 的抗体，采用实施例中所描述的免疫组化方法或者免疫印记方法检测 pIgR 蛋白的表达。

同时，本发明提供了一种用于诊断或预测肿瘤的复发和/或转移的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括针对 pIgR 蛋白的抗体。

根据本发明的另一个方面，本发明提供了使 pIgR 蛋白表达下调的物质在制备用于预防和治疗肿瘤的复发和/或转移的治疗药物中的用途。

根据本发明的还一个方面，本发明提供了使 pIgR 蛋白的 662-735 段或 680-735 段蛋白表达下调的物质在制备用于预防 and/或治疗肿瘤的复发和/或转移的药物中的用途。

本发明中，优选地，所述使 pIgR 蛋白者其 662-735 段或 680-735 段蛋白表达下调的物质为反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体是针对 pIgR 上 662-735 段或 680-735 段蛋白设计的单链或者双链的具有靶向该段序列表达的核苷酸片段，或能够稳定产生具有上述特性的核苷酸片段的表达载体。更优选地，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体包含靶向于 5'-AGAGCCCGGCACAGGAAGAACGUCGACCGAGUUUCAUCAGAAGC UACAGGACAGACAUUAGCAUGUCAGACUUCGAGAACUCCAGGGAAU UUGGAGCCAAUGACAACAUGGGAGCCUCUUCGAUCACUCAGGAGAC AUCCCUCGGAGGAAAAGAAGAGUUUGUUGCCACCACUGAGAGCACC ACAGAGACCAAAGAACCCAAGAAGGCAAAAAGGUCAUCC-3' 中连续

13~24 个核苷酸序列的序列。

本发明中，优选地，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体，靶向针对的模板序列如下：

模板序列 1， 5'-AGAACGUCGACCGAGUUUCAAU-3'；

模板序列 2， 5'-ACGUCGACCGAGUUUCAAUCAG-3'；或

模板序列 3， 5'-AGAAGAGUUUGUUGCCACCACU-3'。

本发明中，优选地，所述肿瘤选自肝癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、卵巢癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、头颈部癌症、胆管癌、鼻咽癌和甲状腺癌中。更优选地，所述肿瘤为肝癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌或肺癌。

本发明中，利用使 pIgR 蛋白者其 662-735 段或 680-735 段蛋白表达下调的物质来预防和/或治疗肿瘤的复发和/或转移的方法包括以下步骤：以药物运输系统，输送反义寡聚核苷酸(如小 RNA)干扰片段至靶器官。

根据本发明的又一个方面，本发明提供了一种反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体是针对 pIgR 上 662-735 段或 680-735 段蛋白设计的单链或者双链的具有靶向该段序列表达的核苷酸片段，或能够稳定产生具有上述特性的核苷酸片段的表达载体，优选地，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体包含靶向于 5'-AGAGCCCGGCACAGGAAGAACGUCGACCGAGUUUCAAUCAGAAGC UACAGGACAGACAUUAGCAUGUCAGACUUCGAGAACUCCAGGGAAU UUGGAGCCAAUGACAACAUGGGAGCCUCUUCGAUCACUCAGGAGAC AUCCCUCGGAGGAAAAGAAGAGUUUGUUGCCACCACUGAGAGCACC

ACAGAGACCAAAGAACCCAAGAAGGCAAAAAGGUCAUCC-3' 中连续 13~24 个核苷酸序列的序列。

本发明中，优选地，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体，靶向针对的模板序列如下：

模板序列 1， 5'-AGAACGUCGACCGAGUUUCAAU-3'；

模板序列 2， 5'-ACGUCGACCGAGUUUCAUCAG-3'；或

模板序列 3， 5'-AGAAGAGUUUGUUGCCACCACU-3'。

附图说明

图 1 为说明 pIgR 蛋白的表达与肝癌患者术后两年内复发相关性的图。

图 2 为说明 pIgR 蛋白的高表达对肝癌患者术后两年复发转移率的指征在肝癌发生的早期尤其具有显著意义的图；其中，图 2A 为显示 pIgR 蛋白的高表达对肝癌患者术后两年复发转移率的指征在无癌栓的肝癌患者中尤其具有显著意义的图；图 2B 为显示 pIgR 蛋白的高表达对肝癌患者术后两年复发转移率的指征在肿瘤单发的肝癌患者中尤其具有显著意义的图；图 2C 为显示 pIgR 蛋白的高表达对肝癌患者术后两年复发转移率的指征在肿瘤瘤径小于 5cm 的肝癌患者中尤其具有显著意义的图；图 2D 为显示 pIgR 蛋白的高表达对肝癌患者术后两年复发转移率的指征在 TNM 为 I 期的肝癌患者中尤其具有显著意义的图。

图 3 为说明 pIgR 的高表达能够明显促进 EMT 恶性转化(细胞形态、EMT 标志蛋白、运动能力)的图；其中，图 3A 为显示 pIgR 的表达水平对细胞形态的影响的图；图 3B 为显示 pIgR 的表达水平对 EMT 相关标志蛋白的影响的图；图 3C 和图 3D 为显示 pIgR 的表达水平对细胞运动能力的影响的图。

图 4 和图 5 均为说明 pIgR 高表达能够明显促进 SCID 小鼠实验性肺转移的图。

图 6A 和 6B 为说明 pIgR 的 662-735 段和 680-735 段蛋白域是 pIgR 诱导

EMT 恶性转化的两个重要功能区域的图。

图 7 为说明在不同种属、不同组织来源的原代细胞和细胞株中高表达 pIgR 均能促进 EMT 恶性转化的图；其中，图 7A 为显示在肝癌细胞 BEL-7402、肝细胞 LO2 中高表达 pIgR 能促进 EMT 恶性转化的图；图 7B 为显示在肺癌细胞 H1650 中高表达 pIgR 能促进 EMT 恶性转化的图；图 7C 为显示在人脐静脉内皮细胞 HUVEC 中高表达 pIgR 能促进 EMT 恶性转化的图；图 7D 为显示在小鼠胚胎成纤维细胞 MEF 中高表达 pIgR 能促进 EMT 恶性转化的图。

具体实施方式

本发明人利用免疫组化技术，检测了 254 例肝癌石蜡切片中 pIgR 蛋白的表达情况，研究结果表明，pIgR 高表达与肝癌术后 2 年复发转移率密切相关，且 pIgR 高表达是肝癌患者 2 年复发转移的独立危险因素。继而发明人分析了 pIgR 表达水平与肝癌不同临床病理特征之间的关系，结果显示，pIgR 高表达对肝癌患者 2 年复发转移率的指征在肝癌发生的早期尤其具有显著的意义。深入研究显示，在细胞中高表达 pIgR 均能够显著诱导 EMT 的发生，利用 shRNA 干扰 pIgR 的表达，EMT 发生明显逆转；体内试验显示，pIgR 高表达细胞株接种到重度联合免疫缺陷（SCID）小鼠中，能够明显促进肺转移。深入研究发现，pIgR 的 662-735 段及 680-735 段蛋白域均是 pIgR 诱导 EMT 恶性转化的两个重要功能区域。此外，发明人在不同种属、不同组织来源的原代细胞和细胞株中高表达 pIgR 均能导致 EMT 的发生，表明 pIgR 诱导 EMT 转化是个共性现象。发明人的研究首次揭示了一个全新的 EMT 诱导因子 pIgR，发现 pIgR 是肿瘤转移以及肿瘤早期复发的重要生物标志物和干预靶标，上述研究为肿瘤早期诊断与早期治疗提供了重要的实验依据，同时为抗肿瘤转移药物研究开发提供了一个新靶标。

下列实施例举例说明了发明人的标准实验室实践，用于示范本发明的模式，而不应将本发明理解为限定于这些实施例的范围。

实施例 1: pIgR 与肿瘤临床特征之间的关系以及 pIgR 与肿瘤恶性转化标志分子之间的相关性

1、实验方法

组织标本

本发明中所使用的肝癌组织标本来源于在复旦大学肝癌研究所中山医院经外科手术切除及病理学检查证实的肝细胞肝癌患者。收集标本时，取手术中切除的新鲜组织标本，标本切下后立即取材，迅速置于液氮中，然后置-70℃冰箱保存备用。每例病人均取肝癌原发瘤及其相邻无瘤肝组织，其中，相邻无瘤肝组织取距离主瘤尽可能远（2cm 以外）的组织。

本发明中所使用的肝癌组织标本的供体均具有以下特点：（1）病理证实是肝细胞肝癌；（2）手术为根治性切除，标准为：完全切除肿瘤，组织学检查切缘阴性；（3）病人临床病例资料及随访资料完整可靠。所有病人标本的获取都经中山医院伦理委员会同意，取得病人的同意并签署知情同意书。

临床病理资料及随访资料

所有病例均有完整的术后随访资料，随访截止时间到 2010 年 4 月 20 日，随访内容除了患者的一般资料，包括年龄、性别、肝炎情况等，还有肿瘤的特征包括甲胎蛋白（alpha-fetoprotein, AFP）、谷丙转氨酶（ALT, alanine aminotransferase）、肝硬化程度、肿瘤大小、有无包膜、数目、Edmondson 分级、生存、复发情况等，部分病例进行了 CT、MRI 和动脉造影检查和治疗过程等；在本研究中各个病例的组织标本经高年资病理医生诊断及复诊，将 Edmondson I-II 级归为分化好，III-IV 级归为分化差；肝癌复发标准：根据影像学、血清学及组织学检查结果，如出现 AFP 增高、肝脏占位以及远处转移等典型复发征象，结合临床表现及治疗、随访情况确定是否为复发。

在无瘤生存（disease-free survival）分析中，我们对肿瘤早期复发事件进行分析统计。肿瘤复发分为早期复发（early recurrence）和晚期复发（late

recurrence), 以术后两年为界, 两年内复发为早期复发, 两年后复发为晚期复发。

组织芯片的制备及免疫组化染色

组织芯片构建:

1) 标本选择: 根据所选定病例的手术切除标本病理号将其相应的石蜡包埋标本取出, 包括肝脏肿瘤组织和对应的癌旁组织;

2) HE 染色切片病理诊断, 并标记病变组织的范围。每个病例均经过高年资病理科医生核对;

3) 按照实验目的设计组织芯片阵列的组织类型和排列方式;

4) 用组织包埋机制备合适的空白受体蜡块;

5) 用组织阵列仪按照阵列设计抽提病理蜡块组织芯并有规律的排列在空白受体蜡块上;

6) 组织阵列块在 52℃ 恒温烤箱中加热融合, 使组织芯与受体蜡块紧密相连;

7) 用全自动组织切片机以 20 微米/转的进刀速度对组织阵列块进行修整蜡块, 直至 80% 的组织芯完全曝露;

8) 用全自动组织切片机以 4 微米/转的进刀速度对组织阵列块进行切片, 切片裱附在防脱片处理的进口载玻片上;

9) 阵列切片置于 60℃ 恒温烤箱中烤片 16h;

10) 组织芯片按编号每隔 10 张抽取一张作 HE 染色;

11) 病理医生对抽检组织芯片中每一个组织样本进行复诊质检, 结果由信息部输入组织芯片数据库;

12) 组织芯片实验白片保存在切片盒中, 置于冰箱 4℃ 冷藏室保存。

免疫组化方法, 实验步骤如下:

1) 组织芯片 92℃ 烘箱烘 30 min; 湿盒预温;

- 2) 依次置入两缸 100%二甲苯脱蜡（预温），37℃各 20 min；
- 3) 于 100%、95%、80%、70%酒精中漂洗各 10 min，PBS 漂洗 5 min；
- 4) 于现配 3% H_2O_2 —甲醇溶液中室温孵育 10 min，PBS 漂洗 5 min×3 次；
- 5) 加热/微波抗原修复 5 min×2 次：将芯片置入沸腾的抗原修复液（0.01M 柠檬酸钠缓冲液，pH=6.0）中，再放入微波炉中加热，保持抗原修复液为 90℃左右，不能沸腾；自然冷却至室温，蒸馏水洗，PBS 漂洗 5min；
- 6) 吸去芯片周围液体，滴加封闭液（10%绵羊血清—PBS）封闭，置于 37℃湿盒孵育 25 min；吸去封闭液，勿洗；
- 7) 加入 pIgR 抗体（Santa Cruz）4℃孵育过夜（1: 300）；PBS 漂洗 3 min×3 次；
- 8) 加入辣根过氧化物酶标记的二抗（即用型），37℃湿盒孵育 1h，PBS 漂洗 3 min×3 次；
- 9) 加入 DAB 常温显色（棕色）1-3 min，镜下控制显色时间，蒸馏水漂洗，PBS 漂洗 5min；
- 10) 苏木素复染 2 min，镜下控制染色时间；蒸馏水洗，PBS 漂洗 5 min，风干，中性树胶封片，显微镜下观察；

所有芯片染色均在相同条件下进行，每批染色均设阳性对照、空白对照；阳性对照用已知染色阳性的肝癌组织进行，结果为阳性；空白对照用相当于一抗浓度的血清代替一抗孵育组织切片，结果为阴性。

结果观察：由 2 名不知患者临床情况的病理科医生观察 HE 染色及免疫组化染色之组织芯片，采用双盲法分别对同一芯片判读。按照胞浆染色强度和面积进行评分。

数据分析：

应用 SPSS16.0 软件分析所得数据，单因素方差分析比较组间差异；阳性率的差别比较使用卡方检验或 Fisher 精确概率法，生存率采用 Kaplan-Meier

法计算,生存期差别的比较用 Log-rank 检验。用 Cox 比例风险模型评估影响术后预后的各变量。 $p < 0.05$, 差异有显著性。

2、实验结果

本发明人前期利用免疫组化技术,检测了 254 例肝癌石蜡切片中 pIgR 蛋白的表达情况,结果显示,pIgR 高表达组术后 2 年复发转移率显著高于 pIgR 低表达组(图 1),且 pIgR 高表达是肝癌患者 2 年复发转移的独立危险因素(见下表 1)。继而我们分析了 pIgR 表达水平与 HCC 不同临床病理特征之间的关系,结果表明, pIgR 高表达对肝癌患者 2 年复发转移率的指征在肝癌发生的早期(无癌栓、肿瘤单发、肿瘤瘤径小于 5cm 或 TNM=I 时)尤其具有显著的意义(图 2)。

表 1. pIgR 高表达是肝癌患者 2 年复发转移的独立危险因素

变量	无早期复发生存率	
	HR (95% CI)	P 值
肿瘤数目(多发 vs. 单发)	1.76 (1.07-2.92)	0.028
癌栓(有 vs. 无)	2.28 (1.50-3.48)	< 0.001
pIgR (高 vs. 低)	1.62 (1.07-2.45)	0.024

实施例 2: pIgR 表达对上皮间充质转化的影响

1、实验方法

各种 pIgR 表达细胞株的构建:

将 pcDNA3.1 空载体质粒(Invitrogen)与 pcDNA3.1-pIgR 质粒(Finn-Eirik Johansen 博士馈赠)分别转染狗肾上皮细胞 MDCK 细胞(ATCC),转染 48 小时后,加新霉素 G418 筛选,获得具有抗性的阳性细胞株——MDCK-mock 和 MDCK-pIgR。

发明人根据干扰片段设计原则和 pIgR 的序列,设计并通过 Blast 软件排除与基因组其他基因具有同源性的序列,获得三个理想的干扰片段模板靶序

列:

模板序列 1, 5'-AGAACGUCGACCGAGUUUCAAU-3';

模板序列 2, 5'-ACGUCGACCGAGUUUCAUCAG-3';

模板序列 3, 5'-AGAAGAGUUUGUUGCCACCACU-3'。

针对上述模板靶序列, 按照 Ambion 的说明书, 生成具有发夹结构的 shRNA 干扰片段, 并克隆入 pSilencer2.1-U6 载体中。

将 MDCK-pIgR 细胞分别转染三个干扰质粒及阴性对照质粒, 命名为 shRNA1、shRNA2、shRNA3 和 con.shRNA。转染 48 小时后加嘌呤霉素 puro 进行筛选, 获得具有抗性的阳性细胞株——MDCK-pIgR, MDCK-pIgR-shRNA1, MDCK-pIgR-shRNA2, MDCK-pIgR-shRNA3, MDCK-pIgR-con.shRNA。

将 pBABE-puro 空载体质粒 (Addgene) 与 pBABE-puro-pIgR 质粒(分子生物学常规方法克隆构建获得)分别转染肝癌细胞 SMMC-7721 细胞(生化细胞所细胞库), 转染 48 小时后, 加嘌呤霉素 puro 筛选, 获得具有抗性的阳性细胞株——SMMC-7721 和 SMMC-7721-pIgR。

(1) pIgR 对细胞形态的影响

上述狗肾上皮细胞 MDCK 及肝癌细胞 SMMC-7721 系列工程构建 pIgR 表达细胞株【MDCK 系列: 空载体对照组 (MDCK-mock)、pIgR 高表达组 (MDCK-pIgR)、干扰对照组 (MDCK-pIgR-con.shRNA)、pIgR 干扰组 (MDCK-pIgR-shRNA1、MDCK-pIgR-shRNA2、MDCK-pIgR-shRNA3); SMMC-7721 系列: 空载体对照组 (SMMC-7721-mock)、pIgR 高表达组 (SMMC-7721-pIgR)】, 接种于十二孔板, 过夜, 细胞贴壁伸展后, 光学显微镜观察细胞形态。

(2) pIgR 对上皮细胞间充质标志分子的影响(免疫印记法, western blot)

上述狗肾上皮细胞 MDCK 及肝癌细胞 SMMC-7721 系列工程构建 pIgR

表达细胞株【MDCK 系列：空载体对照组（MDCK-mock）、pIgR 高表达组（MDCK-pIgR）、干扰对照组（MDCK-pIgR-con.shRNA）、pIgR 干扰组（MDCK-pIgR-shRNA1、MDCK-pIgR-shRNA2、MDCK-pIgR-shRNA3）；SMMC-7721 系列：空载体对照组（SMMC-7721-mock）、pIgR 高表达组（SMMC-7721-pIgR）】，接种于十二孔板，融合度达到 80%后，收集细胞，用冷的 PBS(含 1 mM 钒酸钠)洗一次，加入 1×SDS 凝胶上样缓冲液 (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% SDS, 10%甘油, 1 mM 钒酸钠, 0.1% 溴酚蓝)裂解细胞。细胞裂解物在沸水浴中加热 10 分钟后，于 4°C 12000 rpm 离心 10 分钟。

取上清液进行 SDS-PAGE 电泳，电泳结束后，用半干电转移系统将蛋白转移至硝酸纤维素膜(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA)，将硝酸纤维素膜置于封闭液(5%脱脂奶粉稀释于含 1mM 钒酸钠的 TBS/T)中室温封闭 1 小时，然后将膜置于抗 pIgR 抗体(Santa Cruz, 货号: sc-51694、sc-20487、sc-20485 或 sc-20656)或者抗 E-cadherin 抗体(BD)或者抗 Pan-cytokeratin 抗体(Sigma)或者抗 Vimentin 抗体(Abcam)或者抗 Fibronectin 抗体(Abcam)或者抗 GAPDH 抗体(kangchen)中 4°C 封闭过夜。用含 1mM 钒酸钠的 TBS/T 洗涤三次，每次 15 分钟。将膜置于二抗(1:2000)溶液中室温反应 1-2 小时。同上洗膜三次后，用 ECL 试剂发色，压片，显影。

(3) pIgR 对细胞运动能力的影响

上述狗肾上皮细胞 MDCK 及肝癌细胞 SMMC-7721 系列工程构建 pIgR 表达细胞株【MDCK 系列：空载体对照组（MDCK-mock）、pIgR 高表达组（MDCK-pIgR）、干扰对照组（MDCK-pIgR con.shRNA）、pIgR 干扰组（MDCK-pIgR shRNA1、MDCK-pIgR shRNA2、MDCK-pIgR shRNA3）；SMMC-7721 系列：空载体对照组（SMMC-7721-mock）、pIgR 高表达组（SMMC-7721-pIgR）】，接种于二十四孔板。待细胞生长至一层致密的单细

胞层时，取一 200 μ L 枪头，于每孔中划出一道划痕，并将培养液换成新鲜无血清 RPMI-1640 培养液（Invitrogen）。分别于 0、3、6、9 小时拍照，进行比较。使用 Zeiss LSM Image Browser 软件统计，每张图取 3 个最近距离，求平均值，并计算迁移距离。做柱状图并做 t 检验计算统计学差异。## $p<0.01$ ，### $p<0.001$ ，mock 组 vs. pIgR 组； * $p<0.05$ ，** $p<0.01$ ，*** $p<0.001$ ，干扰组 vs. NC 组。

2、实验结果

实验结果如图 3 所示，在狗肾上皮细胞 MDCK 及肝癌细胞 SMMC-7721 中高表达 pIgR 能够促进细胞由上皮形态向间充质形态的转变，细胞散在生长，同时伴随相应的 EMT 标志性分子的改变，即上皮标志分子 E-cadherin、Pan-cytokeratin 表达下调，而间充质标志分子 Vimentin 和 Fibronectin 表达上调，此外，高表达 pIgR 后细胞的运动能力显著增强。尤其值得注意的是，在 MDCK-pIgR 细胞中以 shRNA 稳定干扰 pIgR 的表达后，细胞形态发生较为明显的变化，恢复为规则的铺路石样上皮形态，细胞成片生长；同时伴随相应的 EMT 标志性分子的逆转以及运动能力的减弱。上述结果表明，pIgR 的表达与 EMT 恶性转化密切相关，pIgR 高表达通过诱导 EMT 转化促进细胞运动能力增强。

实施例 3：pIgR 表达对实验性肺转移的影响

1、实验方法

SPF 级重度联合免疫缺陷（SCID）小鼠，4~6 周龄，体重 16~20 克，由中国科学院上海实验动物中心提供。裸小鼠饲养于无特殊病原菌条件下，光照每 12 小时更替一次，饲料和水经消毒后方能使用。所有实验均严格遵守动物饲养和使用伦理标准。

MDCK 系列 pIgR 表达细胞株实验性肺转移能力比较：将动物随机分为 4 个组，空载体对照组（MDCK-mock）、pIgR 高表达组（MDCK-pIgR）、干扰

对照组 (MDCK-pIgR con.shRNA)、pIgR 干扰组 (MDCK-pIgR shRNA3) 每组各 5 只。分别将按照实施例 2 中的方法制备的细胞 (MDCK-mock、MDCK-pIgR、MDCK-pIgR con.shRNA、MDCK-pIgR shRNA3) 消化后, 用 PBS 稀释成浓度 2.5×10^6 个/200 μ L, 取 200 μ L 细胞悬液通过尾静脉注射入各组 SCID 小鼠体内。10 周后处死小鼠, 取肺, 将肺组织固定于 4%多聚甲醛中 24 小时以上, 在解剖显微镜下观测记录每个肺 5 个肺叶上的总转移结节数, 做柱状图并做 t 检验计算统计学差异。# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, mock 组 vs. pIgR 组; * $p < 0.05$, 干扰组 vs. 干扰对照组。

SMMC-7721 系列 pIgR 表达细胞株实验性肺转移能力比较: 将动物随机分为 2 个组, 空载体对照组 (SMMC-7721-mock)、pIgR 高表达组 (SMMC-7721-pIgR) 每组各 5 只。将按照实施例 2 中的方法制备的细胞 (SMMC-7721-mock、SMMC-7721-pIgR) 消化后, 用 PBS 稀释成浓度 1×10^6 个/200 μ L, 取 200 μ L 细胞悬液通过尾静脉注射入各组 SCID 小鼠体内。10 周后处死小鼠, 取肺, 将肺组织固定于 4%多聚甲醛中 24 小时以上, 在解剖显微镜下观测记录每个肺 5 个肺叶上的总转移结节数, 做柱状图并做 t 检验计算统计学差异。# $p < 0.05$, mock 组 vs. pIgR 组。

2、实验结果

pIgR 高表达 SMMC-7721 细胞和 MDCK 细胞接种到重度联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠中, 能够引起高转细胞的明显肺转移, 而 pIgR 干扰组小鼠肺转移灶数显著下降 (图 4, 图 5), 表明在体内 pIgR 促进了肿瘤细胞的转移。

实施例 4: pIgR 诱导 EMT 恶性转化功能段确定

1、实验方法

发明人以 pcDNA3.1-pIgR 质粒 (Finn-Eirik Johansen 博士馈赠) 为模板, 按照分子生物学常规方法, 构建了 pIgR (662-735) 表达质粒及 pIgR (680-735) 表达质粒 【pcDNA3.1-pIgR (662-735) 及 pcDNA3.1-pIgR (680-735)】。

将 MDCK 或 SMMC-7721 细胞接种于十二孔板, 融合度达到 80% 时, 采用脂质体法, 分别转染 pcDNA3.1 空载体质粒、pcDNA3.1-pIgR 表达质粒、pcDNA3.1-pIgR (662-735) 表达质粒及 pcDNA3.1-pIgR (680-735) 表达质粒, 48 小时后, 收集细胞, 用冷的 PBS (含 1 mM 钒酸钠) 洗一次, 加入 1×SDS 凝胶上样缓冲液 (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% SDS, 10% 甘油, 1 mM 钒酸钠, 0.1% 溴酚蓝) 裂解细胞。细胞裂解物在沸水浴中加热 10 分钟后, 于 4°C 12000 rpm 离心 10 分钟。

取上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后, 用半干电转移系统将蛋白转移至硝酸纤维素膜 (Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA), 将硝酸纤维素膜置于封闭液 (5% 脱脂奶粉稀释于含 1mM 钒酸钠的 TBS/T) 中室温封闭 1 小时, 然后将膜置于抗 E-cadherin 抗体 (BD) 或者抗 Pan-cytokeratin 抗体 (Sigma) 或者抗 Vimentin 抗体 (Abcam) 或者抗 Fibronectin 抗体 (Abcam) 或者抗 GAPDH 抗体 (kangchen) 中 4°C 封闭过夜。用含 1mM 钒酸钠的 TBS/T 洗涤三次, 每次 15 分钟。将膜置于二抗 (1:2000) 溶液中室温反应 1-2 小时。同上洗膜三次后, 用 ECL 试剂发色, 压片, 显影。

2、实验结果

结果如图 6 所示, pIgR 上 662-735 段或 680-735 段蛋白序列的表达就能够促进上皮标志分子 E-cadherin、Pan-cytokeratin 下调, 而间充质标志分子 Vimentin 和 Fibronectin 表达上调, 与全长 pIgR 表达效应相似, 表明 pIgR 上 662-735 段或 680-735 段蛋白域在 pIgR 诱导的 EMT 恶性转化中发挥重要作用。

实施例 5: 在不同种属、不同组织来源的原代细胞和细胞株中高表达 pIgR 对 EMT 恶性转化的影响

1、实验方法

肝癌细胞 BEL-7402 (生化细胞所细胞库)、肝细胞 LO2 (生化细胞所细

胞库)、肺癌细胞 H1650 (ATCC)、人脐静脉内皮细胞 HUVEC (ATCC) 及小鼠胚胎成纤维细胞 MEF (ATCC) 分别接种于十二孔板, 融合度达到 80% 时, 采用脂质体法, 分别转染 pcDNA3.1 空载体质粒 (Invitrogen)、pcDNA3.1-pIgR 表达质粒(Finn-Eirik Johansen 博士馈赠), 48 小时后, 收集细胞, 用冷的 PBS (含 1 mM 钒酸钠) 洗一次, 加入 1×SDS 凝胶上样缓冲液(50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% SDS, 10%甘油, 1 mM 钒酸钠, 0.1%溴酚蓝)裂解细胞。细胞裂解物在沸水浴中加热 10 分钟后, 于 4°C 12000 rpm 离心 10 分钟。

取上清液进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后, 用半干电转移系统将蛋白转移至硝酸纤维素膜(Amersham Life Sciences, Arlington Heights, IL, USA), 将硝酸纤维素膜置于封闭液(5%脱脂奶粉稀释于含 1mM 钒酸钠的 TBS/T)中室温封闭 1 小时, 然后将膜置于抗 pIgR 抗体(Santa Cruz, 货号: sc-51694、sc-20487、sc-20485 或 sc-20656)或者抗 E-cadherin 抗体(BD)或者抗 Pan-cytokeratin 抗体(Sigma)或者抗 Vimentin 抗体(Abcam)或者抗 GAPDH 抗体(kangchen)中 4°C 封闭过夜。用含 1mM 钒酸钠的 TBS/T 洗涤三次, 每次 15 分钟。将膜置于二抗 (1:2000)溶液中室温反应 1-2 小时。同上洗膜三次后, 用 ECL 试剂发色, 压片, 显影。

2、实验结果

结果如图 7 所示, 在肝癌细胞 BEL-7402、肝细胞 LO2、肺癌细胞 H1650、人脐静脉内皮细胞 HUVEC 及小鼠胚胎成纤维细胞 MEF 中高表达 pIgR 均能导致 EMT 的发生, 表明 pIgR 诱导 EMT 转化是个共性现象。

权 利 要 求

1、针对多聚免疫球蛋白受体（pIgR）蛋白的抗体在制备用于诊断或预测肿瘤的复发和/或转移的诊断剂中的用途。

2、根据权利要求 1 所述的用途，其中，所述针对 pIgR 蛋白的抗体选自针对 pIgR 全长蛋白的抗体、针对 pIgR 胞内区的抗体和针对 pIgR 胞外区的抗体中。

3、根据权利要求 2 所述的用途，其中，所述针对 pIgR 蛋白的抗体为针对 pIgR 胞内区的抗体。

4、根据权利要求 2 所述的用途，其中，所述针对 pIgR 蛋白的抗体为针对 pIgR 上 662-735 段或 680-735 段蛋白的抗体。

5、根据权利要求 1 所述的用途，其中，所述肿瘤选自肝癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、卵巢癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、头颈部癌症、胆管癌、鼻咽癌和甲状腺癌中，优选地，所述肿瘤为肝癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌或肺癌。

6、使多聚免疫球蛋白受体（pIgR）蛋白表达下调的物质在制备用于预防和/或治疗肿瘤的复发和/或转移的药物中的用途。

7、使多聚免疫球蛋白受体（pIgR）蛋白的 662-735 段或 680-735 段蛋白表达下调的物质在制备用于预防和/或治疗肿瘤的复发和/或转移的药物中的用途。

8、根据权利要求 6 或 7 所述的用途，其中，所述使 pIgR 蛋白或者其 662-735 段或 680-735 段蛋白表达下调的物质为反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体是针对 pIgR 上 662-735 段或 680-735 段蛋白设计的单链或者双链的具有靶向该段序列表达的核苷酸片段，或能够稳定产生具有上述特性的核苷酸片段的表达载体，优选地，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰

片段的表达载体包含靶向于 5'-AGAGCCCGGCACAGGAAGAACGUCGACCGAGUUUCAUUCAGAGAGC UACAGGACAGACAUUAGCAUGUCAGACUUCGAGAACUCCAGGGAAU UUGGAGCCAAUGACAACAUGGGAGCCUCUUCGAUCACUCAGGAGAC AUCCCUCGGAGGAAAAGAAGAGUUUGUUGCCACCACUGAGAGCACC ACAGAGACCAAAGAACCCAAGAAGGCAAAAAGGUCAUCC-3' 中连续 13~24 个核苷酸序列的序列。

9、根据权利要求 8 所述的用途，其中，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体，靶向针对的模板序列如下：

模板序列 1， 5'-AGAACGUCGACCGAGUUUCAAU-3'；

模板序列 2， 5'-ACGUCGACCGAGUUUCAUUCAG-3'；或

模板序列 3， 5'-AGAAGAGUUUGUUGCCACCACU-3'。

10、根据权利要求 6 或 7 所述的用途，其中，所述肿瘤选自肝癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌、宫颈癌、肾癌、膀胱癌、卵巢癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、头颈部癌症、胆管癌、鼻咽癌、甲状腺癌中，优选地，所述肿瘤为肝癌、结直肠癌、前列腺癌、胃癌或肺癌。

11、多聚免疫球蛋白受体 (pIgR) 作为诊断或预测肿瘤早期复发和/或转移的分子标志物和/或抗肿瘤转移的药物干预靶点的用途。

12、一种反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体是针对 pIgR 上 662-735 段或 680-735 段蛋白设计的单链或者双链的具有靶向该段序列表达的核苷酸片段，或能够稳定产生具有上述特性的核苷酸片段的表达载体，优选地，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体包含靶向于

5'-AGAGCCCGGCACAGGAAGAACGUCGACCGAGUUUCAAUCAGAAGC
UACAGGACAGACAUAUAGCAUGUCAGACUUCGAGAACUCCAGGGAAU
UUGGAGCCAAUGACAACAUGGGAGCCUCUUCGAUCACUCAGGAGAC
AUCCCUCGGAGGAAAAGAAGAGUUUGUUGCCACCACUGAGAGCACC
ACAGAGACCAAAGAACCCAAGAAGGCAAAAAGGUCAUCC-3' 中 连 续
13~24 个核苷酸序列的序列。

13、根据权利要求 12 所述的反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体，其中，所述反义寡聚核苷酸或者 RNA 干扰片段或者稳定产生 RNA 干扰片段的表达载体，靶向针对的模板序列如下：

模板序列 1， 5'-AGAACGUCGACCGAGUUUCAAU-3'；

模板序列 2， 5'-ACGUCGACCGAGUUUCAAUCAG-3'； 或

模板序列 3， 5'-AGAAGAGUUUGUUGCCACCACU-3'。

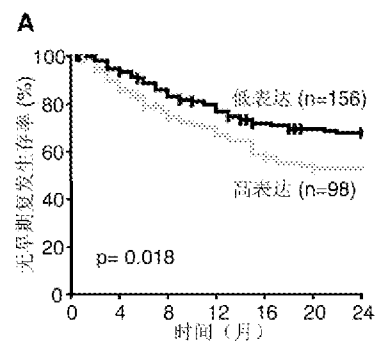


图 1

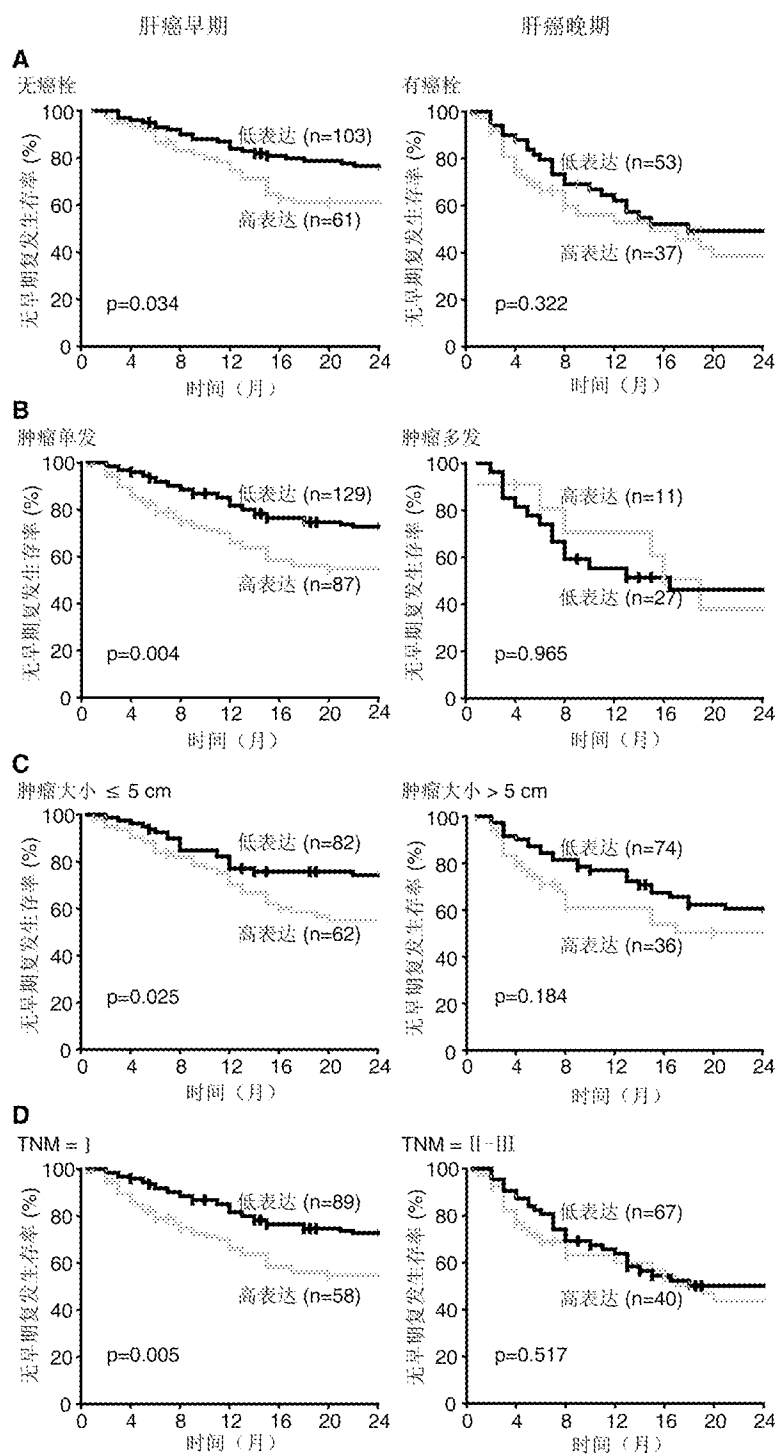


图 2

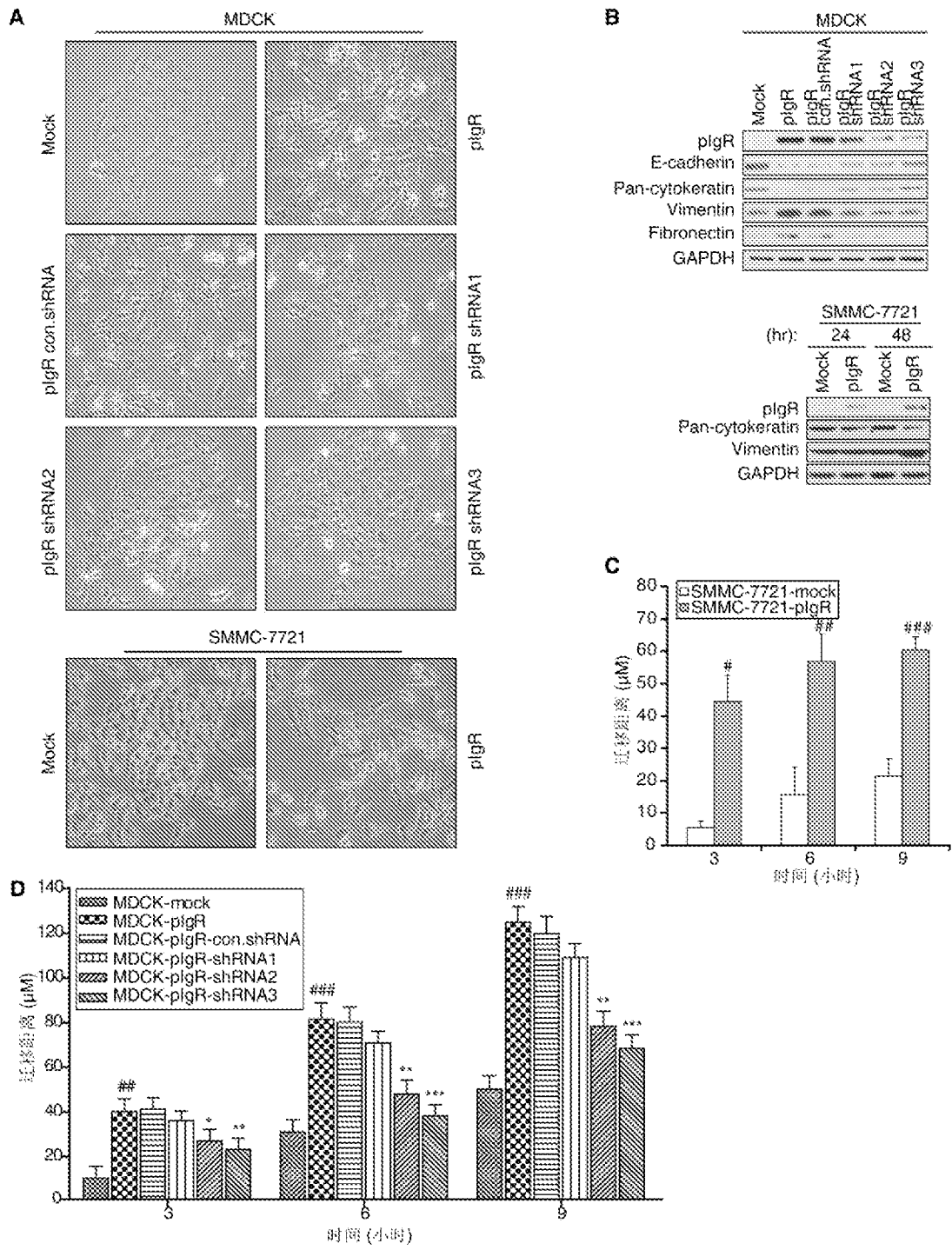


图 3

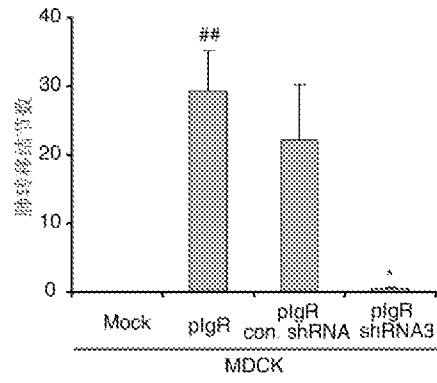


图 4

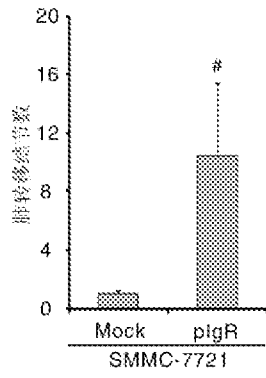


图 5

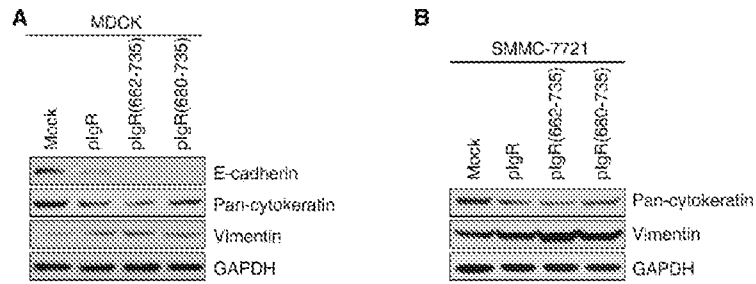


图 6

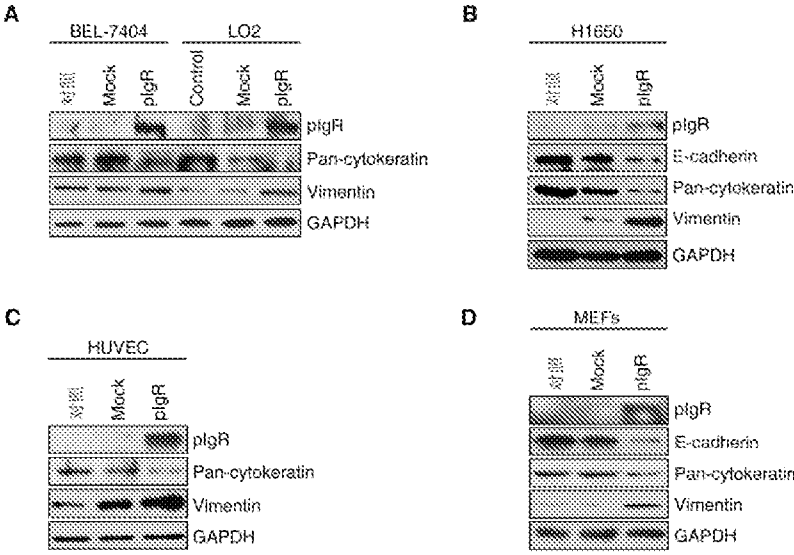


图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076031

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: G01N, C12N, A61K, A61P

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

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

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, ISI Web of knowledge, NCBI:
pIgR, cancer, tumor, RNAi, antisense oligonucleotide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XIAO Ting et al., Expression of Polymeric Immunoglobulin Receptor (pIgR/SC) in Lung Cancer Tissues, Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 08 May 2008, vol. 20, no. 3 pages 182-192, See page 183, right column, line 4 to page 184, left column, line 5.	1, 2, 5, 11
A		3, 4, 7-9, 13
X	TANG Qingjuan, The Research on Two New Functions of Glycoprotein pIgR pIgR Mediate Paneth Cells Participate in Acquired Immunity and Mediate MDCK Cells Transform into Malignant Cells, China Doctoral Dissertations Full-text Database, Medicine and Health Science, 15 Feb. 2009, no. 2 2009, Pages E059-70, See abstract.	6, 10, 11
A		3, 4, 7-9, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
31 July 2012 (31.07.2012)

Date of mailing of the international search report
30 Aug. 2012 (30.08.2012)

Name and mailing address of the ISA
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer
ZHANG, Qi
Telephone No. (86-10)62411036

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076031

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GE Changrong, Studies on the Effects of N-glycans in the Course of Malignant Transformation of MDCK Cell Line with Overexpression of hpIgR, China Maseter's Theses Full-text Database, Medicine and Health Science,	6, 10, 11
A	15 Feb. 2009, no. 2 2009, Pages E059-18, See abstract.	3, 4, 7-9, 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076031

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 12
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 12 relates to antisense oligonucleotides or RNAi fragments which aim at ot target to pIgR 662-735 or 680-735. As too many experiments are needed to find all of these antisense oligonucleotides or RNAi fragments, claim 12 doesn't meet the requirement of PCT Aticle 6, and no meaningful international search can be carried out.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/076031

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/574(2006.01) i

C12N 15/113(2010.01) i

C12N 15/63 (2006.01) i

A61K 48/00 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A61P 35/04 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2012/076031

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: G01N, C12N, A61K, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI,EPODOC,CNPAT, CNKI, ISI Web of knowledge, NCBI:

多聚免疫球蛋白受体, 癌, 肿瘤, 干扰 RNA, 反义寡核苷酸, pIgR, cancer, tumor, RNAi, antisense oligonucleotide

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X A	肖汀 等, 多聚免疫球蛋白受体 (pIgR/SC) 在肺癌组织的表达及其临床意义, 癌变.畸变.突变, 08.5 月 2008, 第 20 卷第 3 期, 第 182-192 页, 见第 183 页右栏第 4 行-第 184 页左栏第 5 行	1, 2, 5, 11 3, 4, 7-9,13
X A	唐庆娟, 糖蛋白 pIgR 两种新功能的发现研究 pIgR 介导潘氏细胞参与获得性免疫与 pIgR 介导 MDCK 细胞恶性转化, 中国博士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑, 15.2 月.2009, 2009 年第 2 期, E059-70 页, 见摘要	6, 10, 11 3, 4, 7-9,13
X A	葛长荣, N-糖链在 hpIgR 高表达致 MDCK 细胞恶性转化过程中作用的研究, 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑, 15.2 月.2009, 2009 年第 2 期, E059-18 页, 见摘要	6, 10, 11 3, 4, 7-9,13

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

31.7 月 2012 (31.7.2012)

国际检索报告邮寄日期

30.8 月 2012 (30.08.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

张起

电话号码: (86-10) **62411036**

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☒ 权利要求：12

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，

具体地说：

权利要求12涉及针对或靶向pIgR662-735段或680-735段上大量片段的反义寡聚核苷酸或RNA干扰片段，要找出所有符合条件的反义寡聚核苷酸和RNA干扰片段对于本领域技术人员来说需要过度实验，因此权利要求12不符合专利合作条约A6的规定，无法对其做出有意义的检索。

3. ☐ 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

主题的分类

G01N 33/574(2006.01) i

C12N 15/113(2010.01) i

C12N 15/63 (2006.01) i

A61K 48/00 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A61P 35/04 (2006.01) i