



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101395478 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 28

(21) 申请号 200780004023. 8

(22) 申请日 2007. 01. 30

(30) 优先权数据

0600851 2006. 01. 31 FR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 07. 31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/FR2007/050708 2007. 01. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02007/088305 FR 2007. 08. 09

(73) 专利权人 生物梅里埃公司

地址 法国马西埃托勒

专利权人 里尔科技大学

(72) 发明人 G·肖凯-凯斯狄拉维斯基 Y·德蒙

H·亨德尔马克

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 康健 林晓红

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1420785 A, 2003. 05. 28,

W0 2005076695 A2, 2005. 08. 25,

W0 2004040312 A2, 2004. 05. 13,

W0 2004056385 A2, 2004. 07. 08,

Descamps 等. Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 1998, 第 273 卷 (第 27 期), 16659-16662.

审查员 寇飞

权利要求书1页 说明书20页

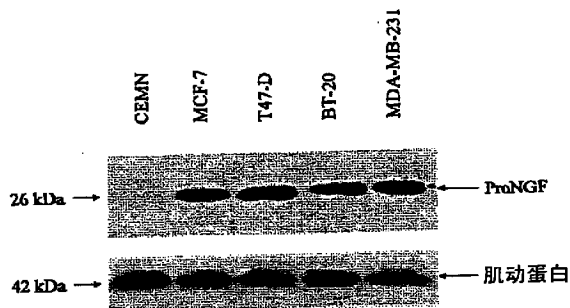
序列表3页 附图5页

(54) 发明名称

用于体外诊断癌症具体是乳腺癌、甲状腺癌或肺癌的 ProNGF 测定的方法以及 ProNGF 的治疗用途

(57) 摘要

本发明涉及一种体外诊断癌症、特别是乳腺癌、甲状腺癌或肺癌的方法, 其包括确定来自可疑患有癌症特别是乳腺癌、甲状腺癌或肺癌的患者的生物学样品中 ProNGF 的存在。所述方法可用于癌症特别是乳腺癌、甲状腺癌或肺癌的早期诊断、筛查、治疗随诊、预后和复发诊断。本发明还涉及 ProNGF 抑制剂的制药用途, 所述药物特别用于阻断患有癌症、特别是乳腺癌、甲状腺癌或肺癌的患者中的远处播散和细胞侵袭。本发明可用于诊断和治疗领域。



1. 特异性 ProNGF 结合配偶体在制备用于诊断癌症的组合物中的用途,其特征在于所述癌症是乳腺癌、甲状腺癌或肺癌。
2. 权利要求 1 的用途,其特征在于所述癌症是乳腺癌。
3. 权利要求 1 的用途,其特征在于所述癌症是肺癌。
4. 权利要求 1 的用途,其特征在于所述癌症是甲状腺癌。
5. 特异性 ProNGF 结合配偶体在制备用于癌症的筛查、治疗随诊和复发诊断的组合物中的用途,所述癌症是乳腺癌、甲状腺癌或肺癌。

用于体外诊断癌症具体是乳腺癌、甲状腺癌或肺癌的 ProNGF 测定的方法以及 ProNGF 的治疗用途

[0001] 本发明涉及癌学领域。更具体地,本发明涉及在人类患者中通过体外确定来自这一患者的生物学样品中或患者体内肿瘤中神经生长因子前体 (ProNGF) 的存在而诊断癌症、更具体地乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌的方法,所述方法可用于癌症的早期诊断、筛查、治疗随诊和预后,也可用于诊断癌症复发。另外,由于癌细胞更具体地乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌细胞产生 ProNGF 的能力,本发明也涉及治疗。

[0002] 在女性中,在工业化国家中乳腺癌是最常见的因癌死亡因素。据估计,乳房 X 线照相术可检测的最小肿瘤大小是几个毫米 (mm)。乳腺癌发展缓慢。但是,在这一小肿瘤被诊断时,其已经演化平均 8 年了。乳腺癌的病因学尚未完全了解。家族倾向已被证实。年龄是最重要的风险因子。因此,在西方国家中风险随着年龄每年增加 0.5%。已知其它风险因素,如妊娠数和首次妊娠年龄、乳房喂养、青春期和绝经期年龄、绝经期后雌激素治疗、应激和营养。

[0003] 用于乳腺癌大量筛查的测试是成像技术:乳房 X 线照相术。通过这一技术,乳腺癌致死率大大降低(死亡率降低 30%),这表明了肿瘤筛查在公共健康方面的重要性。但是,筛查技术有一些缺陷。乳房 X 线照相术需要高效设备和合格人员,这在大规模筛查方面是昂贵的。

[0004] 甲状腺癌是少见的癌症。在法国一般人群癌症中约占 1%。它的年发生率低,每 10 万个体约 2.5 个 (Cancers:évaluation, traitement et surveillance [Cancers: assessment, treatment and monitoring]. JM Andrieu & P Colonna Ed. ESTEM, Paris 1997)。在 2006 年美国甲状腺癌新病例数估计为 30000,死亡为 1500 (American Cancer Society. :Cancer Facts and Figures 2006. Atlanta, Ga :American Cancer Society, 2006)。

[0005] 甲状腺癌通常以甲状腺内结节形式发生,它可以是正常大小或放大的(甲状腺肿)。它是一种少见的癌症,在年轻个体中更常见,当癌症在其乳头状形式时其预后良好,因为在 90% 病例中发生痊愈。

[0006] 根据筛查手段,甲状腺结节的流行性是可变的。其在女性、老年个体和在碘缺乏区域生活的个体或在婴儿期进行过颈部辐射的个体中更常见,但这些结节在超过 90% 病例中是良性的。年轻个体更多地暴露于癌症发生,因为甲状腺对辐射更高的敏感性。

[0007] 根据国际组织学分类,可以区分 4 种主要组织学类型的甲状腺癌:

[0008] - 乳头状上皮瘤,

[0009] - 滤泡上皮瘤 (follicular epitheliomas),

[0010] - 髓样上皮瘤 (medullary epitheliomas),

[0011] - 间变性(或未分化)上皮瘤。

[0012] 这些肿瘤可以是实体的 (solitary) 或多灶性的 (multifocal)。

[0013] 乳头状癌更常见。它们在年轻个体中占优势并且代表了约 80% 的甲状腺癌。

[0014] 滤泡癌代表约 10% 甲状腺癌并在约 40 岁附近特别常见。

[0015] 乳头状和滤泡癌代表了放射敏感性分化甲状腺癌组,它们分泌甲状腺球蛋白。

[0016] 髓样癌代表了 5% 甲状腺癌并相应于衍生自神经嵴的 C 细胞或滤泡旁细胞的肿瘤。C 细胞分泌降钙素。

[0017] 间变性或未分化癌是少见的(小于 5% 病例)并且是特别严重的。

[0018] 在存在恶性甲状腺结节时,基本治疗是手术。

[0019] 如果残余功能组织保留,在总甲状腺切除术后 4-6 周在隔离室中给予碘 131 剂以完全清除之。

[0020] 约 40% 甲状腺癌转移 (metastasis) 固定碘并因此可被这一方法治疗。

[0021] 在总甲状腺切除术和用碘 131 清除后,给予抑制 TSH 分泌的激素甲状腺素。这一激素疗法也使得能保证满意的甲状腺功能平衡。

[0022] 新的诊断和预后标记和靶向治疗剂的发现能够完善这一癌症的治疗和诊断工具库。

[0023] 肺癌在法国每年新增病例 25000 例,可被认为是主要公共健康问题。其是男性中最常见的癌症并事实上是男性中因癌死亡的最常见因素,是女性中第三常见因素。在 2006 年美国肺癌新病例数(非小细胞和小细胞肺癌合并)估计是 174470 例,死亡 162460 例 (American Cancer Society. :Cancer Facts and Figures 2006. Atlanta, Ga :American Cancer Society, 2006)。

[0024] 在原发癌中,癌细胞的检查(解剖病理学检查)使得可以区分:

[0025] - 表皮样癌 (35-40%);

[0026] - 腺癌 (25-35%);

[0027] - 大细胞癌 (10-15%);

[0028] - 小细胞癌 (20-25%)。

[0029] 这四类代表了接近 95% 的肺癌,前三类归在一起为“非小细胞肺癌”(NSCLC)。

[0030] 小细胞癌进展快得多并更易于扩散到其它器官。

[0031] 类癌瘤和粘膜表皮样瘤 (mucoepidermoid tumor) 更少见,代表了其余的 1-2%。

[0032] 这些分类可被概括为“小细胞肺癌”(13%) 或“非小细胞肺癌”(87%),其具有不同的治疗含意。

[0033] 已经表明使用目前工具(肺 X 光、痰分析和纤维镜不改善存活率)对于早期检测的努力不是有效的。螺旋扫描或痰分子学分析使得可能进行更早的检测,使得癌症可以更容易切除。但是,尚未发现筛查工具,特别是由于与肺活检和手术相关的风险所致,特别是在吸烟的患者中。

[0034] 不经治疗,小细胞肺癌是最具侵略性的肺肿瘤,中位 (median) 存活仅 2-4 个月。与其它类型的肺癌相比,小细胞肺癌倾向于在诊断前扩散,但是其对于化疗和放疗更敏感。

[0035] 非小细胞肺癌 (NSCLC) 包括各种组织学。最常见的组织学是表皮样癌或鳞癌、腺癌和大细胞癌。这些组织学通常分类在一起,因为诊断方法、分级、预后建立和治疗是类似的。显示可切除癌的患者可通过手术或手术辅助化疗而治愈。在大量具有不可切除癌症的患者中,疾病的局部控制可以用放疗进行。显示局部晚期和不可切除疾病的患者使用放疗合并化疗可具有长期存活。显示晚期转移疾病的患者用化疗可有症状改善和存活改善。

[0036] 在诊断中,患有 NSCLC 的患者可被分为 3 组类似治疗。第一组患者包括手术可切

除肿瘤（通常 I 期、II 期和一些 III 期患者）。这一组具有最佳预后。显示可切除癌症并有手术医学禁忌症的患者是治疗性放疗的候选者。

[0037] 第二组包括具有局部 (T3-T4) 和 / 或区域 (N2-N3) 晚期肺癌的患者。

[0038] 第三组包括具有在诊断时发现的远处转移 (M1) 的患者。这一组可用缓解性放疗或化疗治疗。

[0039] 已经尝试了多项研究以鉴别决定性预后因子 (Albain KS, Crowley JJ, LeBlanc M, et al. :Survival determinants in extensive-stage non-small-cell lung cancer : the Southwest Oncology Group experience. J Clin Oncol 9(9) :1618-26, 1991 ; Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, et al. :Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 106(1) :80-9, 1993 ; Ichinose Y, Yano T, Asoh H, et al. : Prognostic factors obtained by a pathologic examination in completely resected non-small-cell lung cancer. An analysis in each pathologic stage. J Thorac Cardiovasc Surg 110(3) :601-5, 1995 ; Martini N, Bains MS, Burt ME, et al. :Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 109(1) :120-9, 1995 ; Fontanini G, Bigini D, Vignati S, et al. : Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer. J Pathol 177(1) :57-63, 1995). 与不利的预后相关的因子包括 :

[0040] - 存在肺部症状

[0041] - 大尺寸肿瘤 (> 3 厘米) .

[0042] - 非表皮样组织学 .

[0043] - 淋巴结中的结转移, 由 TNM 确定

[0044] - 血管侵袭

[0045] 类似地, 有关在肺癌中一些蛋白质的异常表达的预后重要性的互相矛盾的结果已经被报道。对于患有不可手术的癌症的患者, 预后由差的一般状况和体重减轻 > 10% 而连累。

[0046] 由于治疗对于几乎所有患有 NSCLC 的患者都不是令人满意的, 有必要发现新的治疗靶和用于早期诊断的新的工具。

[0047] 前列腺癌是 50 岁以上男性中最常见的癌症并在发达国家中是次于肺癌的第二最常见因癌死亡因素。

[0048] 其发生随着年龄而增加。在法国, 1990 年的总体发生率是每 100000 人中 71.4 (在 35-49 岁年龄范围是 2.6 ; 在 50-69 岁年龄范围是 133.8 ; 在 70 岁年龄范围是 726.9)。前列腺癌的平均年龄是 70 岁左右, 但是一些男性在更早年龄发病。

[0049] 在过去 20 年中与前列腺癌相关的死亡率增加 23%, 反映了期望寿命的增加和更加认识到前列腺癌是主要死亡因素。在法国, 总体因癌死亡率在 1990 年是每 100000 人 33.4, 即每年死亡超过 9000 人。前列腺癌占全部死亡中的 3.4%, 因癌死亡的 10.7%。

[0050] 前列腺癌通过进展非常缓慢, 并在开始时保持局部化。当癌症进展时, 其可以通过直接侵袭位于前列腺附近的组织和器官而扩散出前列腺, 并且其可以扩散到远离前列腺的其它器官。

[0051] 前列腺特异性抗原 (PSA) 是用于检测前列腺癌的肿瘤标记。血中 PSA 水平以每毫升纳克 (ng/ml) 表示并且如果水平低于 4ng/ml 被认为是正常的。在前列腺癌情况中 PSA 水平越高,癌症远处扩散的风险越高,其通常意味着恢复或长期存活的机会降低。但是,PSA 不是一种理想的标记:这是因为由升高的 PSA 水平检测的某些癌症可能具有非常缓慢的进程,无需治疗。因此,有必要发现新的诊断工具(用于在组织水平诊断或在生物学液体水平诊断),以精确检测具有迅速蔓延性 (aggressive potential) 的癌症,以与具有非常缓慢进程的癌症重新区分。

[0052] 为了明确诊断,使用前列腺的直肠内回波描记术,其可以非常精确地支配针在前列腺的给定位点取样。只有活检能证实癌症,因为癌细胞在显微镜下是可见的。活检因此对于确定疾病的预后是非常重要的。

[0053] 参考治疗是根治性前列腺切除术 (radical prostatectomy)。这一手术除去完整前列腺和精囊。其仅是在癌症未超出前列腺界限时进行。约 10% 的患者在局部前列腺癌的根本性前列腺切除术后 5 年内会局部复发。

[0054] 放疗用于治疗位于前列腺内的癌症,或者已经到达邻近组织的癌症。其可用于降低肿瘤大小或防止局部并发症。

[0055] 激素治疗的目的是对抗刺激前列腺的雄性激素(雄激素)的作用。因此,降低主要雄性激素睾酮的水平阻断癌细胞增殖并降低前列腺的体积。激素治疗仅具有短暂效应,其阻断癌增殖而非治愈它。

[0056] 当前列腺癌已进展到扩散出前列腺并且不再响应激素治疗时使用化疗。化疗降低肿瘤生长并且可以降低与癌相关的疼痛。

[0057] 上述治疗可能有一些副作用,包括尿失禁、阳痿、肠道问题(腹泻、大肠炎),以及主要在治疗过程中发生的泌尿问题(尿频、尿流变小、排尿急迫、排尿时灼热感、尿中有血)。长期激素治疗可导致骨质疏松、骨易碎。

[0058] 新的靶向治疗剂使得可以防止一些副作用,改善前列腺癌治疗的效果。新的诊断和预后工作可使得区分缓慢进展的癌症和具有转移趋势的迅速蔓延的癌症。

[0059] 在临床实践中,在肿瘤被发现后,在规定的实验室中通过组织学方法鉴定肿瘤恶性程度。使用一系列参数如肿瘤大小、其组织病理学级别、相关炎症和淋巴结侵袭来决定治疗法和评估疾病预后。

[0060] 对于许多癌症,包括乳腺癌、甲状腺癌、肺癌和前列腺癌,可以区分肿瘤细胞和正常细胞的标记已经被寻找和研究了很多年。它们使得可以早期诊断疾病、确定所述级别的预后和对治疗的敏感性、以及监控所述疾病的进程。直至目前,已被鉴别和研究的候选标记是癌基因、组织标记和与血管发生相关的标记或与肿瘤的转移能力相关的标记。目前,鉴别的乳腺癌标记主要被用于治疗随访。对于乳腺癌的早期诊断或筛查没有验证的生物学测试,许多其它癌症也没有(对于结肠直肠癌的大规模筛查,检测粪便中的血红蛋白)。在前列腺癌情况中,PSA 可被用于辅助诊断并指示前列腺活检的需要。血浆中降钙素的免疫测定是髓样甲状腺癌的优异标记。在一些国家中,其可被用于筛查前列腺癌,但是其尚未基于人群验证这一指示。仅在乳腺肿瘤组织上检测雌激素受体使得可以确定乳腺肿瘤是或不是激素敏感的。检测乳腺癌中的 HER-2/neu 受体使得可以确定肿瘤对 Herceptin 是否敏感。

[0061] 在癌性乳腺细胞中已经鉴别了有限数目的抗原标记,特别是 CA 15-3 (Basuyau,

J. P. , M. P. Blanc-Vincent, J. M. Bidart, A. Daver, L. Deneux, N. Eche, G. Gory-Delabaere, M. F. Pichon, and J. M. Riedinger. 2000. [Standards, Options and Recommendations (SOR) for tumor markers in breast cancer. SOR Working Group]. *Bull Cancer*. 87 :723-37)。这一标记的通常实践是用于患者跟踪,特别是检测复发,但是因为其敏感性低,不建议其用于筛查测试或诊断测试。

[0062] 若干年来,与乳腺癌相关的抗原的有关研究已被开发,不是为了寻找标记,而是寻找免疫治疗靶。这些研究从抗 T/Tn 抗原的体液免疫的证实 (Springer, G. F. 1997. Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy. *J Mol Med*. 75 :594-602), 到最近发现的针对 p53 (Gnjatic, S. , Z. Cai, M. Viguier, S. Chouaib, J. G. Guillet, and J. Choppin. 1998. Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope presented by breast carcinomas and melanomas. *J Immunol*. 160 :328-33) 和 HER-2/neu (Disis, M. L. , and M. A. Cheever. 1997. HER-2/neu protein :a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. *Adv Cancer Res*. 71 :343-71) 的抗体和 T 细胞应答。

[0063] 最近,已通过 SEREX (血清学表达克隆) 途径基于构建肿瘤细胞 cDNA 文库并用自体血清筛选而揭示了一系列新的潜在抗原。血清学乳腺癌文库筛选因此已使得可以揭示 ING1 抗原 (Jager, D. , E. Stockert, M. J. Scanlan, A. O. Gure, E. Jager, A. Knuth, L. J. Old, and Y. T. Chen. 1999. Cancer-testis antigens and ING1 tumor suppressor gene product are breast cancer antigens :characterization of tissue-specific ING1 transcripts and a homologue gene. *Cancer Res*. 59 :6197-204.), 和新的分化抗原 NY-BR-1, 根据作者,其在 80% 乳腺癌中表达并在患者中诱导产生 IgG 抗体 (Jager, D. , E. Stockert, A. O. Gure, M. J. Scanlan, J. Karbach, E. Jager, A. Knuth, L. J. Old, and Y. T. Chen. 2001. Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Res*. 61 : 2055-61)。这一类型的途径主要被用于寻找可潜在被用于开发疫苗的靶,推理不排除存在于正常组织中的抗原 (这是 NY-BR-1 的情况),也不排除由有限数目的患者血清识别的抗原 (2/14, 对于 ING1) ;它们因此不能被开发用于筛查或早期诊断策略。通过相同途径,已经揭示了诱导患者中的体液免疫应答的其它抗原,如 NY-BR-62, NY-BR-85 和 D52 蛋白。这些抗原据认为分别在 60%、90% 和 60% 的乳腺癌中过表达 (Scanlan, M. J. , and D. Jager. 2001. Challenges to the development of antigen-specific breast cancer vaccines. *Breast Cancer Res*. 3 :95-8.)。

[0064] 导致癌症、更具体地乳腺癌的发生的分子学现象包括结构修饰和癌基因 (如 ras) 表达的修饰以及肿瘤抑制基因如 p53 的突变。大部分乳腺癌中肿瘤生长依赖于雌激素 (雌二醇和孕酮) 以及依赖于控制增殖、迁移和凋亡的生长因子。前列腺癌的生长是雄激素依赖性的。一些甲状腺癌的生长是甲状腺刺激激素 (TSH) 依赖性的。这些生长因子协同作用刺激或抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和分化,以促进癌症的生长和转移。例如,胰岛素型生长因子、转化生长因子 α (TGF- α) 和成纤维细胞生长因子 (FGF) 全都可以刺激乳腺癌细胞增殖,而乳腺衍生生长因子抑制剂 (MDGI) 和转化生长因子 β (TGF- β) 抑制它们的生长。

[0065] 在专利申请 W02004/040312 中, 申请人描述了使用 NGF 作为肿瘤标记和作为治疗靶。因此, NGF 由乳腺癌细胞产生, 而相应的正常乳房表皮细胞不产生之。另外, NGF 刺激癌性乳房表皮细胞的存活和增殖, 而其对正常乳房表皮细胞无作用。

[0066] NGF 基因编码一蛋白前体称作 ProNGF (26kDa), 其通过酶裂解产生 NGF (13.6kDa) (Seidah et al., 1996, Biochem J., 314:951-960)。哺乳动物中 NGF 的主要来源是颌下腺, 其仅含 NGF 和非常少的 ProNGF。很长时间, 已知 ProNGF 的唯一作用是具有非常短暂寿命的代谢前体的作用。

[0067] 最近, 在各种组织中已经示出 ProNGF 以大于 NGF 的量被发现 (Bierlet et al., 2005, Neurosci Lett, 380:133-137)。Hasan et al. 描述了 ProNGF 可以被分泌, 其意味着其可以潜在地以自分泌、旁分泌或甚至内分泌方式起作用 (2003, J Neurobiol, 57:38-53)。最后, 最近证实 ProNGF 在神经元细胞表面有高亲和性结合位点, 通过该位点其具有特异性作用, 不同于 NGF。因此, ProNGF 能结合 sortilin, 一种 100kDa 糖蛋白 (Mazella et al., 1998, J Biol Chem, 273:26273-26276), 诱导神经元细胞体外凋亡 (Nykjaer et al., 2004, Nature, 427:843-848)。专利申请 W0 2004/056385 和 W0 2005/076695 显示 neurotrophin (NGF 或 ProNGF) 之间的相互作用可以用特异化合物修饰, 如使得可以治疗与一些泌尿生殖系统疾病相关的疼痛或神经系统被损伤的患者的调节。体内促凋亡活性也已经被赋予 ProNGF (Pedraza et al., 2005, Am J Pathol, 166:533-543)。清楚的是在 NGF 和 ProNGF 的表达和生物学作用方面有分离, 其似乎是不同的。

[0068] 更一般地, 原肽长期被认为仅是代谢前体; 一些最近的例子, 特别是在神经肽领域, 表明在某些情况下, 原肽具有它们自己的生物学活性, 与它们所能产生的成熟肽不同。ProNGF 就是这样的例子, 其可以被细胞分泌, 有其自己的受体并表明有与 NGF 不同的对神经元的生物学作用。ProNGF 因此组成了与 NGF 不同的特异性分子和生物学实体。承认的是, NGF 的序列包含在 ProNGF 中, 但是它们等电点和分子量不同, 它们的生物学活性也不同。

[0069] 申请人现已令人惊奇地证实上皮癌细胞特别是上皮乳腺癌、甲状腺癌、肺癌和前列腺癌细胞本身以显著的量产生和分泌 ProNGF, 而相同器官的正常上皮细胞不产生之, 因而 ProNGF 可以被用作肿瘤标记或用作治疗靶。申请人还明确了在癌细胞中过表达的 ProNGF 对于这些细胞有促转移活性, 而 NGF 具有抗凋亡和促有丝分裂活性。

[0070] 因此, 本发明的一个主题是体外诊断癌症特别是乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌的方法, 其通过确定来自怀疑患有癌症特别是乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌患者的生物学样品中 ProNGF 的存在而进行。

[0071] 本发明的方法因此使得可以通过简单测试诊断癌症特别是乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌, 所述简单测试包括检测取自患者的生物学样品或在患者体内肿瘤中 ProNGF 的存在。申请人已令人意外地表明癌细胞产生 ProNGF, 而相应的非癌细胞不能这样做, 以下将详细证明。因此, 确定样品中 ProNGF 的存在使得可以得出结论所检测的病理学是存在的, ProNGF 不存在说明病理学不存在。ProNGF 在肿瘤中的存在也可以体内、在肿瘤原位显示。

[0072] 为了显示体内肿瘤中 ProNGF 的存在, 可以使用本领域技术人员已知的任何成像方法。为此, 可以将特异性 ProNGF 结合配偶体与成像示踪剂偶联。所述特异性 ProNGF 结合配偶体是任何能结合 ProNGF 的配偶体。例如, 抗体、抗体部分、受体和其它能结合 ProNGF

的分子。

[0073] 结合配偶体抗体是例如多克隆抗体或单克隆抗体。

[0074] “将结合配偶体与成像示踪剂偶联”是指可以被本领域技术人员已知的任何成像方法检测的和能直接或间接产生可检测信号的示踪剂的附着。因此,示踪剂可以是放射性示踪剂如镓-99。在这种情况下,被原发癌或转移侵袭的器官将结合 ProNGF 及其示踪剂。由该器官发出的辐射可以由特殊的相机例如相机照相。该装置收集由放射性物质产生的光闪烁并因此显现该器官。

[0075] 在本发明的另一种方法中,示踪剂包括发出正电子的放射性物质(氟 18)。图像然后被正电子发射层析成像系统捕捉。

[0076] 在本发明的另一种优选的方法中,ProNGF 配偶体可以与纳米颗粒偶联。例如,它们可以是超磁性纳米颗粒(supramagneticnanoparticles);例如阴离子磁性纳米颗粒,其用于直接细胞标记和通过核磁共振成像进行的体内检测。它们也可以是金纳米颗粒。

[0077] 通过本发明的可以体内检测 ProNGF 的方法,可以显现下述身体区域,即具有 ProNGF 结合配偶体的结合、产生 ProNGF 的癌症特别是乳腺癌、前列腺癌、甲状腺癌和肺癌、以及它们的远处转移的位置和淋巴结牵涉。

[0078] 体外确定 ProNGF 的存在可以直接检测 ProNGF,通过培养对 ProNGF 敏感的细胞,或者通过本领域技术人员已知的任何其它确定样品中蛋白质的存在的方法进行。

[0079] 通过 ProNGF 的直接检测而确定 ProNGF 的存在是本发明的具体实施方案。

[0080] 术语“ProNGF 的直接检测”是指证实生物学样品中的 ProNGF 本身。

[0081] 生物学样品中的 ProNGF 的直接检测可以通过本领域技术人员已知的任何手段进行,例如免疫测定、质谱,其是本发明的一个具体实施方案。

[0082] 免疫测定可以是本领域技术人员广泛知道的涉及免疫反应即 ProNGF 和特异的 ProNGF 结合配偶体之间的反应的任何测定。

[0083] 特异的 ProNGF 结合配偶体是能结合 ProNGF 的任何配偶体。例如,可提及的有抗体、抗体部分和能结合 ProNGF 的任何其它分子。

[0084] 结合配偶体抗体是例如多克隆抗体或单克隆抗体。

[0085] 多克隆抗体可以如下获得,用 ProNGF 免疫接种动物,然后通过取所述动物的血清样品并从其它血清组分中分离所述抗体而回收纯化形式的希望抗体,所述分离具体是通过在柱上亲和层析而进行,所述的柱附着由所述抗体特异识别的抗原,具体是 ProNGF。单克隆抗体可以通过杂交瘤技术获得,其一般原则总结如下。

[0086] 最初,动物、通常是小鼠(或者在体外免疫接种情况中,培养细胞)用 ProNGF 免疫,所述动物的 B 淋巴细胞然后能产生抗此抗原的抗体。这些产生抗体的淋巴细胞随后与“永生化”骨髓瘤细胞(在例子中是小鼠的)融合以产生杂交瘤。从如此获得的异种细胞混合物中,选择能产生特定抗体并能无限繁殖的细胞。每个杂交瘤以克隆形式繁殖,每个产生单克隆抗体,可以通过例如 ELISA、用一维或二维免疫印迹、用免疫荧光、或用生物传感器测试其识别 ProNGF 的性质。如此选择的单克隆抗体随后被纯化,特别是根据上述亲和层析技术纯化。

[0087] 单克隆抗体也可以是通过基因工程、本领域技术人员熟知的技术获得的重组抗体。

[0088] 抗 ProNGF 抗体的例子是已知的并且可特别得自 Chemicon 目录。

[0089] 当结合配偶体被用作检测试剂时,特异的 ProNGF 结合配偶体可以被标记以显现 ProNGF/ 结合配偶体的结合,并因此用于生物学样品中的 ProNGF 的直接检测。

[0090] 术语“结合配偶体的标记”是指能直接或间接产生可检测信号的标记的附着。这些标记的非限制性列表包括:

[0091] • 产生可通过例如比色法、荧光或发光检测的信号酶的,如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 α -半乳糖苷酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,

[0092] • 发色团如荧光、发光或染料化合物,

[0093] • 放射性分子如 ^{32}P , ^{35}S 或 ^{125}I , 及

[0094] • 荧光分子如 Alexas 或藻蓝蛋白。

[0095] 也可以使用间接系统,如能与抗配体反应的配体。配体/抗配体对是本领域技术人员熟知的,例如其是如下配对:生物素/链霉抗生物素蛋白、半抗原/抗体、抗原/抗体、肽/抗体、糖/凝集素、多核苷酸/与多核苷酸互补的序列。在本申请中,配体携带结合配偶体。抗配体可以通过前述段落描述的标记而直接检测或者可以本身通过配体/抗配体检测。

[0096] 在一些条件下,这些间接检测系统可以放大信号。这一信号放大技术是本领域技术人员熟知的,可参见申请人之一的先前的专利申请 FR98/10084 或 WO-A-95/08000,或文章 J. Histochem. Cytochem. 45:481-491, 1997。

[0097] 根据所用标记类型,本领域技术人员能添加用于显现标记的试剂。

[0098] 上述免疫测定的例子可以提及的是“夹心”法如 ELISA, IRMA 和 RIA,“竞争”法和直接免疫检测法如免疫组织化学、免疫细胞化学、Western 印迹和斑点印迹。

[0099] 在“竞争”方法中,ProNGF 如以上对结合配偶体描述的那样进行标记。

[0100] 质谱也可以用于直接检测生物学样品中的 ProNGF。谱分析原则是本领域技术人员广泛知道的并且在例如 Patterson, S., 2000, Massspectrometry and proteomics. Physiological Genomics 2, 59-65 中描述。

[0101] 为此,可使经预处理或未经预处理的生物学样品通过质谱仪,并将获得的谱图与 ProNGF 的进行比较。样品预处理的一个例子包括使其通过免疫捕获载体,该免疫捕获载体包含一种 ProNGF 结合配偶体,例如抗 ProNGF 的抗体。样品预处理的另一个例子可以是生物学样品的预分级分离,以分离样品中的各个蛋白质。在本领域技术人员熟知的技术中,样品中的主要蛋白质可以例如首先被耗竭。

[0102] 用于 ProNGF 的直接检测的生物学样品可能含有 ProNGF 等,其可以包括生物学液体或源自被考虑的患者肿瘤或转移的活检的组织。

[0103] 可以提及的生物学液体是全血及其衍生物如血清或血浆、骨髓、乳汁、脑脊液、尿液和渗出物。血液或其衍生物是优选的。

[0104] 为检测 ProNGF,组成本发明一个具体实施方案的生物学液体可能需要特殊处理。这是因为生物学液体可能含有 ProNGF 等,或者可能含有循环型肿瘤细胞(recycling tumor cell),所述细胞含有 ProNGF,和/或能分泌 ProNGF 的循环型肿瘤细胞。

[0105] 因此,根据本发明的一个实施方案,生物学液体被预处理以分离所述液体所含的循环型肿瘤细胞。

[0106] 术语“分离循环型肿瘤细胞”是指获得循环型肿瘤细胞中富含的细胞级分。

[0107] 处理液体以分离循环型肿瘤细胞可以通过在流式细胞仪中的细胞淘选、通过在 Ficoll 上富集、通过用包被有特异抗体的磁珠富集或通过本领域技术人员已知的其它特异富集方法进行。

[0108] 在血液或骨髓作为生物学液体的情况中,循环型肿瘤细胞可以通过在 Ficoll 上进行细胞分离并结合用偶联至磁珠的抗 CD45 抗体耗竭血细胞的技术进行分离 (Dyna1 Biotech ASA, Norway)。

[0109] ProNGF 的直接检测可以然后直接在分离自生物学液体的循环型肿瘤细胞上进行,例如在将循环型肿瘤细胞经 cytospin 沉积在玻片上之后用抗 ProNGF 抗体对这些细胞进行免疫细胞化学标记。ProNGF 的直接检测也可以直接用流式细胞术在循环型肿瘤细胞中进行,所述流式细胞术如 Métézeau P, Ronot X, Le Noan-Merdrignac G, Ratinaud MH, Lacytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique [Flowcytometry for studying normal or pathological cells] (Tome I), published by Medsi-MacGrawhill 所述

[0110] 在这些条件下,所述循环细胞可以在使得 ProNGF 被阻断在所述细胞内部的条件下处理。这种处理在例如 Intracellular Flow Cytometry, Applied reagents and Techniques, pp 1-21, BD Pharmingen 中描述。

[0111] 在使细胞膜透化以使得特异的 ProNGF 结合配偶体进入后,进行 ProNGF 的检测。

[0112] 使用循环细胞的 ProNGF 的直接检测也可以通过申请人之一的专利申请 WO 03/076942 中描述的方法进行。

[0113] 肿瘤细胞中的 ProNGF 的直接检测也可以在使细胞分泌 ProNGF 的条件下培养细胞后在所述细胞的培养基中进行。

[0114] 这些培养条件是常规条件,如 37°C、潮湿环境和 5% CO₂。

[0115] 当被测试的生物学样品是源自患者的肿瘤或转移的活检组织时,其是本发明的一个具体实施方案,ProNGF 的直接检测在获得的切片上直接进行,无需预处理所述组织。

[0116] 另一种检测 ProNGF 的存在的方法包括在生物学样品存在下培养 ProNGF 敏感性细胞,其组成了本发明的一具体实施方案。

[0117] 在这种情况下,检测生物学样品中 ProNGF 的存在由 ProNGF 敏感性细胞的反应而证实。

[0118] 术语“ProNGF 敏感性细胞”是指在 ProNGF 存在下被刺激(生长、凋亡等)的任何细胞。

[0119] 可提及的 ProNGF 敏感性细胞包括神经元来源的细胞如 P12 细胞 (Pedraza et al. Am. J. Pathol. 2005, 166, 533-543)。

[0120] 可被用于通过培养 ProNGF 敏感性细胞而检测 ProNGF 存在的生物学样品可以是上述任何样品。

[0121] 因此,生物学样品可以包括生物学液体,其被合适预处理以分离循环型肿瘤细胞,这些细胞本身可随后在使得其分泌 ProNGF 的条件下被培养,如上所述。

[0122] 本发明的方法可以用于癌症特别是乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌的早期诊断和筛查、治疗性跟踪、预后和复发诊断,因为只有癌细胞产生 ProNGF,并且这一产生依赖

于癌症级别。

[0123] 因此,本发明的另一个主题是本发明的方法在癌症特别是乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌的早期诊断、筛查、治疗性跟踪、预后和复发诊断中的用途。

[0124] 除了肿瘤标记作用之外,ProNGF 还可以具有作为治疗靶的作用。事实上,由于癌细胞特别是乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌细胞产生 ProNGF 的能力,而正常细胞不产生 ProNGF,乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌细胞的远处播散以及细胞的侵袭可以被能阻断 ProNGF 活性的 ProNGF 抑制剂阻断。

[0125] 另外,ProNGF 单独或与其它分子组合可以用作靶向治疗工具的治疗靶。在此情况中治疗工具可以是可活化的纳米颗粒、细胞毒性剂或可以摧毁癌细胞的任何其它分子。

[0126] ProNGF 抑制剂因此可以被用作药物。

[0127] 因此,本发明的一个主题还包括 ProNGF 抑制剂在制备特别是用于治疗癌症、更具体地乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌的药物中的用途。

[0128] 根据本发明的一个具体实施方案,所述药物可被用于阻断患有癌症、更具体地乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌的患者中的细胞迁移或肿瘤细胞侵袭。

[0129] 术语“细胞迁移”是指患有癌症、更具体地乳腺癌、甲状腺癌、肺癌或前列腺癌(转移)的患者中的远处播散,术语“侵袭”是指癌细胞的局部穿透。

[0130] 本发明还包括药物组合物,其包含作为活性成分的至少一种 ProNGF 抑制剂,任选地与药理学可接受的赋形剂组合。

[0131] 可被用于抗癌的药物组合物包含作为活性成分的至少一种能阻断细胞迁移或侵袭的 ProNGF 抑制剂。

[0132] 术语“ProNGF 抑制剂”是指 ProNGF 的直接抑制剂,即阻断蛋白质的生物学活性的抑制剂,如 ProNGF 结合配偶体,还指 ProNGF 受体的抑制剂或 ProNGF 信号途径的任何抑制剂,以及能特异地结合 ProNGF 而无论是否阻断生物学活性的任何分子。

[0133] 在肿瘤性和正常的乳腺上皮细胞中表达的 ProNGF 受体的一个例子是 Sortilin。

[0134] 适合作为活性成分的特异的 ProNGF 结合配偶体特别如上述在免疫测定中定义的那些并可以是本领域技术人员已知的能阻断细胞迁移或侵袭的任何其它配偶体。根据一个具体实施方案,能阻断乳腺癌细胞的迁移或侵袭的特异的配偶体是抗 ProNGF 抗体。

[0135] ProNGF 的直接抑制剂的另一个例子是可溶形式的 ProNGF 受体的类似物,如可溶形式的 Sortilin 类似物,其也组成了本发明的一个实施方案。

[0136] 术语“由肿瘤和正常乳腺上皮细胞表达的 ProNGF 受体的抑制剂”是指例如通过所述受体或通过阻断其产生而阻断 ProNGF 的活性的任何分子。通过所述受体阻断 ProNGF 活性可以通过阻止 ProNGF 与所述受体的结合而进行,例如使用能结合所述受体并因而占据 ProNGF 的位置的物质。这种抑制剂的一个例子包括保留了结合所述受体的性质的 ProNGF 衍生的肽或抗所述受体的抗体。ProNGF 的活性也可以通过用所述受体的 mRNA 的抑制剂或编码所述受体的基因的抑制剂阻断所述受体的产生而被阻断。作为受体 mRNA 的抑制剂,可以使用这 mRNA 的合成片段。事实上,干扰 RNA 技术(小干扰 RNA 或 siRNA)是基于使用相应于待被抑制的细胞 mRNA 的短序列的双链 RNA 寡核苷酸。这一双螺旋形式的寡核苷酸(可能被导入质粒中)在进入细胞后,被 Dicer/Risc 酶系统处理,导致相应的细胞 mRNA 的降解(Dykxhoorn D et al., 2003, NatureReviews, vol. 4, p457-467)。编码受体的基因的

抑制剂可以提及的是所述受体的反义寡核苷酸。这一寡核苷酸可以容易地由本领域技术人员制备 (Lefrancois S et al. Biol. Proced. online. 2005, 7 (1) :17-25)。

[0137] 根据本发明的一个具体实施方案, ProNGF 抑制剂是 ProNGF 受体的 siRNA。

[0138] 术语“ProNGF 信号途径抑制剂”是指阻断 ProNGF 的生物学活性如其对细胞迁移和侵袭的活性的任何分子。

[0139] 为了靶向各种抑制剂的治疗作用, 后者可以被置于使其特异地穿透进感兴趣细胞如肿瘤细胞的条件下, 这组成了本发明的另一个实施方案。

[0140] 为此, 它们可以例如被附着于允许这种穿透的配偶体, 例如载体分子, 聚合物如基因治疗中使用的聚合物, 或也用于基因治疗中的病毒载体如腺病毒和痘病毒。

[0141] 例如, 在乳腺癌的情况中, 载体分子可以是抗 MUC1 抗体或抗上皮细胞抗体, 或者抗 HER/2/neu 抗体。在甲状腺癌的情况中, 载体分子可以是抗甲状腺球蛋白抗体或抗上皮细胞抗体。在前列腺癌中, 载体分子可以是抗 PSA 抗体或抗上皮细胞抗体。在肺癌情况中, 载体分子可以是抗上皮细胞抗体。

[0142] ProNGF 信号途径抑制剂还可以附着于抗癌剂。术语“抗癌剂”是指对于癌细胞是毒性的化合物。例如, ProNGF 配偶体可以与治疗性纳米颗粒结合, 当它们被活化时可以靶向破坏肿瘤。在本发明的另一种方法中, ProNGF 配偶体可以与细胞毒性剂偶联或与用于阻断癌发生过程的分子偶联。

[0143] 优选地, 当药物组合物包含作为活性成分的 ProNGF 抑制剂如直接抑制剂或 ProNGF 信号途径抑制剂时, 它们被置于使其特异地穿透进入感兴趣的肿瘤细胞的条件下, ProNGF mRNA 抑制剂和编码 NGF 的基因的抑制剂具有天然穿透进入所述细胞的能力。

[0144] 赋形剂的量和性质可以容易地由本领域技术人员确定。它们根据药物形式和希望的给药方法选择。

[0145] 本发明的药物组合物适于口服、舌下、皮下、肌肉内、肿瘤内、静脉内、局部 (topical)、局部 (local)、气管内、鼻内、真皮内、直肠、眼内或耳内给药, 所述活性成分可以以单位给药形式给药。

[0146] 单位给药形式可例如是片剂、凝胶胶囊、颗粒、粉末、可注射口服溶液或悬液、贴剂、舌下、颊内、气管内、眼内、鼻内或耳内给药形式, 通过吸入给药的形式, 局部、真皮内、皮下、肌肉内、肿瘤内或静脉内形式, 直肠给药形式或移植物。对于局部给药, 可以包括乳膏、凝胶、软膏剂、洗剂或洗眼液。

[0147] 这些盖伦 (galenical) 制剂形式根据本领域常用方法制备。

[0148] 所述单位形式含有的剂量使得根据盖伦制剂形式日给药 0.001-10mg 活性成分 / 千克体重。

[0149] 可以有特殊的情形, 其中更高或更低的剂量是合适的, 这种剂量不偏离本发明范围。根据通常实践, 每个患者合适的剂量根据给药方法和患者体重和应答而由医生确定。

[0150] 根据另一个实施方案, 本发明还涉及治疗乳腺癌的方法, 其包括给予患者有效剂量的 ProNGF 结合配偶体或 ProNGF 抑制剂。

[0151] 本发明根据以下非限制性实施例和表 1 和表 2 以及附图 1-10 会变得更清楚, 其中:

[0152] - 图 1 是 Western 印迹照片, 显示了癌性乳腺上皮细胞 (MCF-7, T47-D, BT-20 和

MDA-MB-231) 产生 ProNGF, 而正常细胞 (NMEC 细胞) 不产生, 肌动蛋白被用作阳性对照。

[0153] - 图 2 是 Western 印迹照片, 显示了在癌性乳腺活检样本 (ST-1 至 ST-4) 中存在 ProNGF, 但在正常活检样本 (SS-1 至 SS-4) 中不存在 ProNGF, 肌动蛋白被用作归一化对照。

[0154] - 图 3 是 Western 印迹照片, 显示了:

[0155] • 图 3A : MCF-7 癌细胞分泌 ProNGF (浓缩的条件培养基泳道), 右边两个泳道是对照泳道,

[0156] • 图 3B : 用于图 3A 的浓缩 / 脱盐装置能保留 NGF。

[0157] - 图 4 是 Western 印迹照片, 显示了在用癌细胞注射的小鼠血清中存在 ProNGF 而在正常小鼠血清中不存在。

[0158] - 图 5 是用质谱检测在用 MCF-7 细胞条件化的培养基中的 ProNGF (图 5A, 5C 和 5E) 或用质谱检测重组 ProNGF (图 5B 和 5D) 的图, 给出作为质量的函数的相对丰度。

[0159] - 图 6 是 Western 印迹照片, 显示了在癌性乳腺上皮细胞 (MCF-7, T47-D, BT-20 和 MDA-MB-231) 和正常细胞 (NMEC 细胞) 中 Sortilin 的存在, 肌动蛋白被用作阳性对照。

[0160] - 图 7 是给出培养 24、48 和 96 小时后在 EMEM 培养基中生长的 MDA 细胞数的图, 所述细胞已经用如下物质转染: 仅培养基 (模拟), 阴性对照干扰 RNA (siGFP, 由部分互补序列 SEQ ID NO. 1 和 SEQ ID NO. 2 组成的双链 RNA 分子, 其中核苷酸 N 代表胸腺嘧啶 T), 或降低 Sortilin 的表达的干扰 RNA (siSORT, 由部分互补序列 SEQ ID NO. 3 和 SEQ ID NO. 4 组成的双链 RNA 分子, 其中核苷酸 N 代表胸腺嘧啶 T),

[0161] 序列 siGFP: SEQ ID No. 1 5' -GCUGACCCUGAAGUUCAUCNN-3'

[0162] SEQ ID No. 2 5' -GAUGAACUUCAGGGUCAGCNN-3'

[0163] 序列 siSORT: SEQ ID No. 3 5' -GGUGGUGUUAACAGCAGAGNN-3'

[0164] SEQ ID No. 4 5' -CUCUGCUGUUAACACCACCNN-3'

[0165] - 图 8 给出使用 MCF-7 细胞的细胞迁移百分比, 所述 MCF-7 细胞浸在如下培养基中: 仅饥饿培养基 (starving medium), 补加 200ng/mL ProNGF 的饥饿培养基, 补加 200ng/mL ProNGF 和 20 μ M galardin 的饥饿培养基, 或补加 20 μ M galardin 的饥饿培养基, 或补加 200ng/mL NGF 的饥饿培养基。

[0166] - 图 9 给出使用 MCF-7 细胞的侵袭指数, 所述 MCF-7 细胞浸在如下培养基中: 仅饥饿培养基, 补加 200ng/mL ProNGF 的饥饿培养基, 补加 200ng/mL ProNGF 和 20 μ M galardin 的饥饿培养基, 或补加 20 μ M galardin 的饥饿培养基, 或补加 200ng/mL NGF 的饥饿培养基。

[0167] - 图 10 是从 Western 印迹照片绘图而来, 其显示了培养 24 或 48 小时后在转染 ProNGF 干扰 RNA (siProNGF) 后 MCF-7 细胞中 ProNGF 表达的降低。肌动蛋白被用作阳性对照, 用于验证等上样量。MCF-7 细胞用如下物质转染: 针对 GFP 的干扰 RNA (siRNA) (siGFP, 由部分互补序列 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 组成), 针对 ProNGF 的干扰 RNA (siProNGF, 由部分互补序列 SEQ ID No. 5 和 SEQ ID No. 6 组成的双链 RNA 分子, 其中碱基 N 蛋白胸腺嘧啶 T)。由印迹分析检测的 ProNGF 的相对量用 QuantityOne 软件 (Bio-Rad) 评价, 与等上样量相关联并以柱状图形式提供, 其中 100% 是 siGFP 对照条件,

[0168] 序列 siGFP: SEQ ID No. 1 5' -GCUGACCCUGAAGUUCAUCNN-3'

[0169] SEQ ID No. 2 5' -GAUGAACUUCAGGGUCAGCNN-3'

[0170] 序列 siProNGF: SEQ ID No. 5 5' -CAGUGUAUCAAACAGUAUNN-3'

[0171] SEQ ID No. 6 5' -GUACUGUUUGAAUACACUGNN-3'

[0172] 实施例 1: 细胞培养

[0173] 1.1. 材料

[0174] 所用细胞是得自 ATCC (美国典型培养物保藏中心) 的已建立的乳腺癌细胞系 (BT-20, MCF-7, MDA-MB-231, T-47D) 和得自在 Centre Oscar Lambret in Lille 进行乳房成形术的患者的 NMEC (正常乳腺上皮细胞) 的原代培养物。MCF-7, MDA-MB-231 和 T-47D 是上皮细胞, 它们源自患有腺癌的患者胸腔积液; BT-20 部分源自原位癌。MCF-7 和 T-47D 被称作“激素敏感的”是因为它们表达雌二醇受体, 而 BT-20 和 MDA-MB-231 被称作“激素不敏感的”是因为它们不表达这些受体。

[0175] 活检样本源自进行了非恶性组织乳房成形术 (Professeur Pellerin CHRU, Lille) 或癌组织切除术 (Docteur Laurent, Croisé Laroche, Marcq en Baroeul) 的患者。

[0176] 含有肿瘤和正常乳腺组织斑点的免疫组织化学玻片 (组织阵列) 源自 Biochain Inc. (Cat. No. T8235731)。含有衍生自各种器官的组织 (癌组织和相应的正常组织) 的其它免疫组织化学玻片源自 Superbio Chips (Cat. No. MA (癌组织), MAN (需要的正常组织) 和 AA (各种正常器官))。雌性 6 周龄 SCID (Female six-week-old SCID (重症联合免疫缺陷) 小鼠得自 Iffa Credo (France) 并驯化至少 2 周。这些小鼠在 20-22°C 饲养, 同时保持交替 12 小时昼/夜 (光照从 6am 至 6pm), 并随意喂养, 遵照 Institutional Animal Care 设立的规定。

[0177] 所用 ProNGF 是人重组 NGF, 由 SCIL proteins (Germany) 销售。重组 EGF、HGF 和 NGF 得自 R&D systems (France)。皮质醇、胰岛素、DMSO (二甲基亚砷)、霍乱毒素、转铁蛋白、C2 神经酰胺类似物 (N-乙酰-D-鞘氨醇) 和 Hoechst 33258 (双苯甲亚胺) 得自 Sigma (France)。EMEM (Eagle's 极限必需培养基)、DMEM/F12 (Dulbecco's 改良的 Eagle's 培养基)、胰蛋白酶-EDTA (乙二胺四乙酸)、HEPES (N-2-羟乙基哌嗪-N'-2'-乙磺酸), L-谷氨酰胺、非必需氨基酸、青霉素/链霉素和庆大霉素由 Cambrex (France) 销售。FCS (胎牛血清) 由 Gibco Invitrogen Corporation (France) 销售。所用的各种塑料制品: 1mL 冻干管、15mL 和 50mL 离心管、100mm 直径皮氏皿、75cm² 培养皿、175cm² 培养皿和 6 孔板 (35mm 直径的孔) 由 Starstedt (Germany) 出售。transwell[®] 得自 Costar (France)。纤连蛋白得自 Becton Dickinson (France)。glycergel 由 Dako (France) 出售。Galardin 得自 Tebu-Bio (France)。胶原 I 型由 Upstate (United States of America) 出售。

[0178] 1.2. 细胞解冻和维持

[0179] 从液氮中取出细胞冻干管并在 37°C 解冻 2 分钟。然后回收悬浮液并转移至含有 19mL MEM (极限必需培养基) 的 50mL 离心管中。在 200g 离心 (15 分钟) 以除去痕量 DMSO (二甲基亚砷)。回收细胞沉淀, 然后用 10mL 完全培养基 (组成如下) 悬浮并转移进 75cm² 培养皿中。24 小时后更换培养基, 在 24 小时后传代细胞。细胞然后在进行实验之前维持 2 周。

[0180] 癌细胞系维持在 75cm² 培养皿中, 它们粘附在培养皿上并在完全培养基中生长为单层, 完全培养基为: EMEM 补加 10% FCS, 20mM HEPES, 2g/L 碳酸氢钠, 2mM L-谷氨酰胺, 1% 非必需氨基酸, 40 μg/mL 青霉素/链霉素和 50 μg/mL 庆大霉素。NMEC 维持在 75cm² 培养皿中, 它们粘附在培养皿上并在完全培养基中生长为单层, 完全培养基为: DMEM/F12 补加 5%

FCS, 10 μ g/mL 胰岛素, 5 μ M 皮质醇, 2ng/mL EGF, 0.01ng/mL 霍乱毒素, 100 μ g/mL 青霉素和 45 μ g/mL 庆大霉素。

[0181] 在潮湿环境中于 37°C 和 5% CO₂ 下培养细胞。维持培养基每 2 天更换并在铺满时传代细胞。

[0182] 实施例 2: ProNGF 的检测

[0183] 2.1. 方法学

[0184] 裂解乳腺细胞和活检样本: 蛋白质提取

[0185] 细胞接种在 3 个直径为 100mm 的皮氏皿中, 然后在 95% 铺满时, 在冰上用 PBS (磷酸缓冲盐水) 洗细胞 2 次: 107mM KCl, 59mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 56mM Na₂HPO₄, 用 100 μ L/皿裂解缓冲液裂解细胞, 所述裂解缓冲液含有: 50mM tris-HCl, pH7.5, 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% SDS (十二烷基硫酸钠), 和蛋白酶活性抑制剂: 1mM 苯基甲基亚砷氟化物, 1mM 正砷酸盐, 1mM Na₄P₂O₇, 10 μ g/mL 亮抑蛋白酶肽和 10 μ g/mL 抑肽酶。将培养皿冷冻 12 小时, 然后刮擦并合并裂解物, 在 100°C 加热 5 分钟, 在 10000g 离心 (10 分钟, 4°C), 回收上清。

[0186] 将活检样本称重并与 10 倍体积的裂解缓冲液 (上述) 一起置于一轮子 (wheel) 上 (1 小时, 4°C)。然后在冰上用杜恩斯匀浆器研磨它们, 冷冻 (20 分钟, -80°C), 在冰上解冻。最后在 13000g 离心 (10 分钟, 4°C), 去除脂质层并回收上清。

[0187] 用双金鸡宁酸方法测定上清, 与一系列牛血清白蛋白比较, 然后分成 50 μ L 等份冷冻。

[0188] 获得条件培养基和血清

[0189] 将 MCF-7 细胞在完全培养基中接种到 175cm² 培养皿中。在 90% 铺满时, 在饥饿培养基中洗培养皿 2 次, 然后用 14mL 饥饿培养基饥饿细胞 24 小时。之后, 回收由细胞条件化的培养基并在 1000g 离心 (15 分钟, 4°C)。上清随后直接使用或在 -20°C 冷冻。截留阈值为 10kDa 的浓缩/脱盐装置 (Centricon Plus 20, Millipore, France) 各加载 14mL MCF-7 条件培养基然后在 4000g 离心 (15 分钟, 4°C)。这些相同装置进一步用 14mL 条件培养基再加载 3 次 (产生起始培养基的 4 倍浓缩)。这些装置然后用 mQ 质量的水 (18.2osm) 脱盐, 其是通过加载 14mL 并在 4000g 离心 (15 分钟, 4°C) 而进行, 这一步骤根据厂商推荐进行 2 次。最后, 倒转装置回收浓缩液, 在 1000g 离心 (4 分钟, 4°C); 回收 250 μ L。浓缩的条件培养基然后分成 50 μ L 等份并在 -20°C 冷冻。然后实现 4x14000/250 的浓缩倍数, 即 224 倍。

[0190] MDA-MB-231 细胞 (3×10^6) 被重悬于 PBS 中, 然后皮下注射进 8 周龄 SCID 小鼠的肋腹。两周后, 每 2 天测量肿瘤体积。7 周后, 小鼠用乙醚麻醉, 通过心内取样采血, 之后处死动物。血液在 4°C 过夜以使得凝集, 离心后回收血清, 测定并在 -20°C 冷冻。

[0191] SDS-PAGE

[0192] 在使用前解冻等份 (50 μ L), 加入 12.5 μ L 5x Laemmli 缓冲液: 5% SDS, 5% β -巯基乙醇, 50% 甘油, 50mM Tris, pH6.8, 0.3% 溴酚蓝。蛋白质上样到 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶的孔中。迁移后 (30mA, 5 小时) 转移到硝基纤维素膜上 (200mA, 1 小时), 转移质量用 Ponceau 红染色评价。

[0193] 免疫检测

[0194] 膜用在含有 0.1% Tween 20 的 TBS (Tris 缓冲盐水) 溶液 (17.54g NaCl, 2.42g

Tris, 2mL tween 20, QSP 2L, pH 调节至 7.4) 中的 4% 牛血清白蛋白在室温饱和 2 小时。饱和后, 膜与各种一抗在 4℃ 在饱和溶液中保温过夜: 1 : 2000 的抗 ProNGF (AB9040, 来自 Chemicon), 1 : 2000 在饱和溶液中的抗 NGF (SC-548, 来自 Sigma) 或 1 : 5000 的抗肌动蛋白 (A-2066, 来自 Sigma)。用 TBS 0.1% Tween 20 洗涤后, 膜与 1 : 20000 在饱和溶液中的偶联有辣根过氧化物酶的抗兔二抗 (A-1949, 来自 Sigma, France) 在室温保温 1 小时。洗涤后, 用 ECL 系统 (Pierce Interchim, France) 根据推荐使用的数据进行显影。

[0195] 免疫组织化学

[0196] 在第一步中, 将组织阵列玻片脱蜡。为此, 将它们依次在下列浴中保温 10 分钟: 甲基环己烷 (2 次)、100% 乙醇、95% 乙醇、70% 乙醇和水。玻片然后用 TBS 0.1% Tween 20 (TBS-T) 振荡洗 10 分钟。通过加热至 90℃ 40 分钟, 然后冷却至室温 30 分钟而在 10mM 柠檬酸盐缓冲液, pH6 中再活化抗原。通过在含有 3% H₂O₂ 的 TBS-T 中保温 5 分钟抑制内源过氧化物酶。玻片然后在湿室中用含 3% BSA 的 TBS-T 在 37℃ 饱和 1 小时。玻片然后与在含 3% BSA 的 TBS-T 中稀释至 1/200 的抗 ProNGF 一抗 (AB9040, 来自 Chemicon) 保温 2 小时 (在湿室中于 37℃ 保温)。用 TBS-T 洗 10 分钟共 3 次后, 玻片在湿室中与在饱和溶液中稀释至 1/400 的偶联有辣根过氧化物酶的抗兔二抗 (Cat. No. 711-035-152 Jackson ImmunoResearch) 于 37℃ 保温 2 小时。玻片用 TBS-T 洗 3 次各 10 分钟, 再用 PBS 洗 3 次各 10 分钟。用 Sigma Fast 底物 (Cat. No. D-4168, Sigma-Aldrich) 显影 5 分钟。在 PBS 中洗涤而终止染色。用 Harris 苏木精 (Cat. No. MHS16, Sigma-Aldrich) 复染 30 秒。用水和用 PBS 洗涤后, 玻片在显微镜下观察。

[0197] 质谱 (MS)

[0198] 将 MCF-7 条件培养基注射到 C4LC (Liquid Chromatography) 纳米柱 (Dionex, France) 中, 其使得可以根据增加的疏水性梯度分离全部蛋白质。因此, 最疏水的蛋白质最后洗脱。分离后, 全部蛋白质用 nanoESI (ElectroSpray Ionization) 离子化, 然后在离子阱 (LCQ Deca XPTM station from Thermo Electron) 中根据它们的质量 (m) 和它们的电荷 (z) 而分析它们。我们使用 SIM (Selected Ion Monitoring) 扫描技术, 使得可以仅扫描感兴趣的某些离子。这些多电荷离子是重组 ProNGF 的特征, 它们事先用 nanoLC-nanoESI/MS 确定。用 SIM 在条件培养基中检测到 ProNGF 后, 分辨相应的多电荷质谱以发现产生这一质谱的蛋白质的质量。

[0199] 2.2. 结果

[0200] 使用上皮细胞的检测

[0201] 将 50 μg 乳腺上皮细胞的总蛋白提取物上样到凝胶中进行 SDS-PAGE。转移到硝基纤维素膜上之后, 用 AB9040 抗体和 A-2066 抗体 (等上样对照) 进行免疫检测。NMEC: 正常乳腺上皮细胞, BT-20, MCF-7, MDA-MB-231 和 T-47D 是癌性乳腺上皮细胞系。

[0202] 结果见图 1, 其代表 Western 印迹照片, 显示出癌性乳腺上皮细胞 (MCF-7, T47-D, BT-20 和 MDA-MB-231) 产生 ProNGF, 但正常细胞 (NMEC 细胞) 不产生, 肌动蛋白被用作阳性对照。

[0203] 用乳腺活检样本经 Western 印迹进行的检测

[0204] 50 μg 活检样本的蛋白质提取物上样到凝胶中进行 SDS-PAGE。转移到硝基纤维素膜上之后, 用 AB9040 抗体和 A-2066 抗体 (等上样对照) 进行免疫检测。SS-x: 正常乳腺活

检样本编号 x, ST-x :肿瘤乳腺活检样本编号 x。

[0205] 结果见图 2, 其代表 Western 印迹照片, 显示出癌性乳腺活检样本 (ST-1 至 ST-4) 中存在 ProNGF, 但在正常活检样本 (SS-1 至 SS-4) 中不存在, 肌动蛋白被用作阳性对照。

[0206] 用乳腺活检样本经免疫组织化学进行的检测

[0207] 使用组织阵列玻片筛选大量样品。这些是点样到玻片上的乳腺活检样本。所用组织阵列含有 60 个活检样本点, 相应于 1 个对照, 4 个正常供体和 25 个患有乳腺癌的患者, 一式两份。患者的特征和用抗 ProNGF 抗体进行的免疫标记的强度见表 1。在来自正常供体的乳腺活检样本中存在弱标记 (在全部 4 个患者中强度为 +), 而在癌性乳腺组织中信号强得多 (在 20/25 个患者中强度为 ++/+++)。另外, 标记谱在两种类型组织中是不同的: 在癌组织中, 标记基本上是上皮的, 而在正常活检样本中不是。

[0208] 表 1. 乳腺癌组织阵列上存在的乳腺活检样本特征以及用抗

[0209] ProNGF 抗体进行的免疫组织化学标记的强度

[0210]

标识符	诊断	分化标记	TNM 分类	阶段	标记强度
HT00031	对照				0
HT00500	正常乳腺				+
HT00501	正常乳腺				+(无上皮)
HT00502	正常乳腺				+(无上皮)
HT00503	正常乳腺				+(无上皮)
HT00509	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	0
HT00510	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	++
HT00511	浸润性小叶癌	高	T2N11M0	IIIB	++
HT00512	浸润性小叶癌	高	T2N17M1	IV	+++
HT00513	浸润性小叶癌	中	T2N1M0	IIB	+
HT00520	浸润性导管癌	中	T2N1M0	IIB	0
HT00521	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	++
HT00522	浸润性导管癌	中	T2N1M1	IV	+++
HT00523	浸润性导管癌	中	T2N3M1	IV	++
HT00524	浸润性导管癌	中	T2N4M1	IV	+
HT00531	纤维腺瘤	未知	T2N0M0	IIB	0
HT00532	浸润性导管癌	中	T2N2M0	IIIA	++
HT00533	浸润性导管癌	低	T2N0M0	IIB	+++
HT00534	浸润性导管癌	低	T2N1M0	IIB	++
HT00535	浸润性导管癌	中-低	T2N1M0	IIB	+++
HT00542	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	0
HT00543	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	+++
HT00544	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	+++
HT00545	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	+++
HT00546	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	+++
HT00553	浸润性导管癌	中	T2N3M0	IIIB	0
HT00554	浸润性导管癌	低	T2N1M0	IIB	+++
HT00555	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	+++
HT00556	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	+++
HT00557	浸润性导管癌	中	T2N0M0	IIB	+++

[0211] 用肺和甲状腺活检样本经免疫组织化学进行的检测

[0212] 使用其它组织阵列玻片分析 ProNGF 在乳腺癌之外的癌症类型中的表达。每种癌症我们筛选了 9 个患者并平行分析了肿瘤组织和取自相同患者的肿瘤附近的正常组织。因此,我们能够证实在肺癌和甲状腺癌中 ProNGF 的过表达。患者的特征以及用抗 ProNGF 抗体免疫标记的强度见表 2。肺癌和甲状腺癌一样,在 9 个患者中的 7 个中肿瘤组织的标记要比正常组织中强得多。对于其它患者(每种癌症的 2/9),信号在肿瘤和正常组织中保持相同强度。应注意的是我们的分析技术仅是半定量的,其不能揭示表达中的小差异。

[0213] 表 2. 组织阵列上存在的肺和甲状腺活检样本的特征和用抗 ProNGF 抗体免疫组织化学标记的强度

[0214]

标识符	诊断	分化水平	TNM 分类	阶段	标记强度	
					癌组织	正常组织
肺癌						
P1	腺癌	高	T2N0M0	IB	+++	++
P2	大细胞癌		T2N0M0	IB	+++	++
P3	表皮样癌	中	T2N0M0	IB	+ / ++	++
P4	表皮样癌	中	T2N1M0	IIB	++	++
P5	表皮样癌	中	T4N0M0	IIIB	++	+
P6	腺癌	高	T2N0M0	IB	++	+
P7	表皮样癌	中	T2N1M0	IIB	+++	+
P8	表皮样癌	中	T3N2M0	IIIA	+++	+
P9	表皮样癌	高	T2N1M0	IIB	+++	+
甲状腺癌						
T1	乳头状癌		T2N0M0	I	++	+
T2	乳头状癌		T2N0M0	I	++	++
T3	乳头状癌		T2N0M0	I	+++	+++
T4	乳头状癌		T2N0M0	II	+++	+ / ++
T5	乳头状癌		T2N0M0	II	++ / +++	+
T6	乳头状癌		T3N1aM0	III	+++	+
T7	乳头状癌		T1N0M0	I	+++	+
T8	乳头状癌		T2N1bM0	IVA	++ / +++	+
T9	乳头状癌		T3N0M0	III	++ / +++	+

[0215] ProNGF 的分泌

[0216] 为了确定 ProNGF 是否分泌,我们浓缩了 MCF-7 条件培养基。为此,在电泳和转移后,100 μ L 浓缩 224 倍的条件培养基被用于进行用 SC-548 抗体进行的免疫检测。重组 NGF 和重组 ProNGF 被用作对照进行分析。

[0217] 结果见图 3A,其是 Western 印迹照片,显示了 MCF-7 癌细胞分泌 ProNGF,不分泌 NGF(浓缩条件培养基泳道),右边 2 条泳道是对照泳道。可以注意的是在此未观察到 NGF 分泌,因为实验终止得太早未能观察到 NGF,原因是 ProNGF 丰富。当继续实验时,也观察到 NGF 条带。这证实不仅 ProNGF 是肿瘤标记,而且也大量分泌。

[0218] 为验证所用的截留阈值为 10kDa 的浓缩 / 脱盐装置能够保留 NGF(13.6kDa),我们在相同实验条件下浓缩了重组 ProNGF 和重组 NGF 的混合物:20ng ProNGF 和 20ng NGF 被加入到未条件化的培养基中,然后置于与条件培养基相同的条件下。

[0219] 结果(图 3B)证明浓缩\脱盐装置能保留 NGF 和 ProNGF。

[0220] 血清中的检测

[0221] 100 μ g 小鼠血清的蛋白质提取物被上样到凝胶上进行 SDS-PAGE。转移到硝基纤维素膜上之后,进行用 AB9040 抗体的免疫检测。在等上样对照中,在用 Ponceau 红染色后显示出在膜上可见 24kDa 的条带。癌:来自用 MDA-MB-231 细胞注射的小鼠的 6 份血清,正常:来自用 PBS 注射的小鼠的 2 份血清。

[0222] 结果见图 4,其显示出在来自用癌细胞注射的小鼠的 6 个血清中的 5 个中 ProNGF 免疫反应的条带在 26kDa(ProNGF 的重量)出现;在来自对照动物的血清中未检测到条带。

[0223] 质谱检测

[0224] 我们进行了如上所述的程序。结果见图 5,其是质谱检测 MCF-7 条件培养基中的 ProNGF(图 5A、5C 和 5E)或重组 ProNGF(图 5B 和 5D)的图,给出了作为质量函数的相对丰度。图 5A 和 B 相应于来自 nanoLC 的蛋白质级分,所述 nanoLC 相应于 ProNGF 的 3 种特征离子中的至少一种的 SIM。图 5C 相应于在 A 中于 29.43 分钟洗脱的蛋白质的质谱。图 5D 相应于重组 ProNGF 的质谱,其 3 种特征离子为红色。最后,图 5E 显示在 A 中于 29.43 分钟洗脱的蛋白质的质谱的去卷积。

[0225] 这些结果表明相应于与重组 ProNGF(31.17 分钟,图 5B)在相同时间洗脱的 ProNGF(29.43 分钟,图 5A)的 SIM(选择离子监控)的蛋白质在 MCF-7 条件培养基中出现。这一蛋白质在离子化后产生与重组 ProNGF(996.2,1037.5,1082.6,图 5.D)相同的多电荷离子(998.2,1039.9,1083.4,图 5.C)。另外,该蛋白质的质量的去卷积计算得到值 25971Da(图 5.E)。因此,这些结果表明首先我们确实鉴别了 MCF-7 条件培养基中的 ProNGF,其次由质谱检测 ProNGF 是可能的。

[0226] 实施例 3:ProNGF 治疗靶

[0227] 3.1. 方法学

[0228] ProNGF 受体 Sortilin 的表达

[0229] 蛋白质提取方法与针对 ProNGF 所述的相同(见上述 2.1)。

[0230] 为进行 Western 印迹,膜在室温用在 TBS(Tris 缓冲盐水)0.1% Tween 20(17.54g NaCl,2.42g Tris,2mL tween 20, QS 2L, pH 调整至 7.4)溶液中的 4%牛血清白蛋白饱和 2 小时。饱和后,膜在 4℃与各种一抗保温过夜:在饱和溶液中 1:2000 稀释的抗-Sortilin(BD612101,来自 BDBiosciences),1:5000 稀释的抗肌动蛋白(A-2066,来自 Sigma)。用 TBS0.1% Tween 20 洗涤后,膜在室温与在饱和溶液中 1:20000 稀释的偶联有辣根过氧化物酶的抗兔二抗(A-1949,来自 Sigma,France)保温 1 小时。洗涤后,用 ECL 系统(Pierce Interchim,France)根据推荐使用数据显影。

[0231] 干扰 RNA(siRNA) 的转染

[0232] 干扰 RNA(siRNA)转染实验用来自 Amaxa 的 Cell Line Nucleofector 试剂盒和相应的电穿孔装置进行。这一系统使得可以获得高效核基因转移(核染)。

[0233] MDA-MB-231 细胞在转染前传代 2 天,以在实验时达到 80%铺满。待被转染的细胞被胰蛋白酶化,然后计数。细胞沉淀(1 百万个细胞)溶于 100 μ l Nucleofector Kit V 溶液并加入 3 μ g siRNA。这一细胞悬液被转移进电穿孔小池,置于 Amaxa 装置中,根据 X-13 程序进行电穿孔。细胞随后在 6 孔板的孔中进行培养 24-72 小时。随时间跟踪细胞增值并

定期计数细胞。根据前述段落“Sortilin 的表达”中描述的方案在各种时间回收的裂解物上进行抗 Sortilin Western 印迹。

[0234] MCF-7 在转染前传代 3-4 天,以在实验时达到 50% 铺满。2 百万个细胞溶于 100 μ l Nucleofector Kit V 溶液中并加入 3 μ g siRNA。用于 Nucleofector 的转染程序是 E-14。根据 2.1 中描述的方案在 24 小时或 48 小时后回收的裂解物上进行抗 ProNGF Western 印迹。由印迹检测的 ProNGF 的相对量用 QuantityOne 软件 (Bio-Rad) 相对于等上样 (肌动蛋白) 评价,并以柱状图形式表示,其中 100% 是 siGFP 对照条件。

[0235] ProNGF 生物学活性测量

[0236] 使用“饥饿”培养基,“饥饿”是指无血清并补加 2 μ g/mL 纤连蛋白和 30 μ g/mL 转铁蛋白的完全培养基。对于各种生物学活性测量,将各种测试分子 (ProNGF, NGF and galardin) 加入到这一饥饿培养基中。在处理中,培养基每 24 小时更新一次。

[0237] 迁移和侵袭

[0238] 根据先前 Bracke et al. (1999, J Natl Cancer Inst, 91:354-359) 所述进行迁移和侵袭测试。使用 Boyden 室和用于胶原凝胶侵袭的方案见下述。

[0239] Boyden 室 (transwell®)

[0240] 含有孔径为 12 μ m 的 transwells® 的 12 孔板用饥饿培养基平衡并置于 37°C、5% CO₂ 下 2 小时。然后吸掉培养基并在下室中用含有各种测试分子的饥饿培养基更换,而在上室内将 40000 个细胞接种在单独的饥饿培养基中。24 小时后,transwells® 用 PBS 洗涤,刮擦上表面,然后进行 Hoechst 标记 (如存活测试所述),以显现跨过膜的细胞。通过一滴加热到 55°C 的 glycerol 将 transwells® 固定在载玻片和盖玻片之间,然后在黑暗中将玻片在 4°C 保存直至计数。每种条件进行双份;每种条件计数至少 40 块视野。数据代表这 40 块视野计数的平均值,用标准差加权。它们以迁移百分比表示,其中 100% 迁移为 50ng/mL 的 HGF 对照。

[0241] 胶原凝胶侵袭测试

[0242] 胶原 I 型凝胶以如下方式制备:2.1mL 胶原 I 型,0.8mL EMEM(10x),4.6mL PBS,0.8mL 的 0.25M NaHCO₃ 和 0.15mL 1M NaOH。将 1.25mL 沉积在 6 孔板的孔中。凝胶固化后,将 100000 个细胞用饥饿培养基和各种测试分子接种 24 小时。随后计数细胞并确定侵袭指数 (深部细胞数相对于表面细胞数)。每种条件进行三份,每种条件最少计数 45 块视野。

[0243] 3.2. 结果

[0244] ProNGF 受体 Sortilin 的表达

[0245] 50 μ g 乳腺上皮细胞的总蛋白质提取物被上样至凝胶进行 SDS-PAGE。转移到硝基纤维素膜上后,用 BD612101 抗体和 A-2066 抗体 (等上样对照) 进行免疫检测。NMEC:正常乳腺上皮细胞,BT-20,MCF-7,MDA-MB-231 和 T-47D 是癌性乳腺上皮细胞系。

[0246] 结果见图 6,其为 Western 印迹照片,显示出 Sortilin 在癌性乳腺上皮细胞 (MCF-7,T47-D,BT-20 和 MDA-MB-231) 和对照细胞 (NMEC 细胞) 中的存在,肌动蛋白被用作阳性对照。因此,Sortilin 在所有这些细胞中出现。另一方面,这一条带似乎在癌性细胞中比在正常细胞中强度更大,而上样对照肌动蛋白无变化。人们因此可能会认为在正常乳腺上皮细胞中的 Sortilin 比在癌细胞中少。

[0247] 由干扰 RNA 导致的 Sortilin 表达的降低 (Sortilin 敲低)

[0248] 在 EMEM 培养基中维持的 MDA-MB-231 细胞用培养基 (模拟) 或用针对 GFP 蛋白的干扰 RNA (siGFP) 或用针对 Sortilin 的干扰 RNA (siSORT) 转染。

[0249] 表 7 结果显示, 在所选的培养条件下, 培养的 MDA-MB-231 细胞数在 siSORT 存在下不随时间增加。在模拟或 siGFP 对照组, 细胞数在 24 和 48 小时培养物之间加倍。因此, MDA-MB-231 癌性乳腺细胞系通过针对 Sortilin 的干扰 RNA 的转染而慢下来。我们通过 Western 印迹验证了 siSORT 转染确实降低了 Sortilin 蛋白的表达水平。因此, 这一实验使得我们表明可以通过用干扰 RNA 靶向 PrNGF 受体 Sortilin 而控制乳腺癌细胞的异常增殖。

[0250] 迁移

[0251] ProNGF 对乳腺上皮细胞迁移的作用通过在 Boyden 室 (transwell®) 中的测试而了解。每种条件进行一式两份并计数最少 40 块视野。MCF-7 细胞接种在 transwell® 上表面的饥饿培养基中, 而下表面浸在仅饥饿培养基或含有如下成分的饥饿培养基中: 200ng/mL ProNGF, 或者含有或不含 200ng/mL ProNGF 的 20 μ M galardin, 或者 200ng/mL NGF。然后计数跨过 transwell® 的细胞。* $p < 0.05$, 与饥饿培养基条件相比。

[0252] 结果见图 8, 其是用浸入各种培养基中的 MCF-7 细胞获得的细胞迁移百分比的图。这些结果证实用 ProNGF 处理 MCF-7 癌细胞使得可以增强它们迁移的能力, 在等剂量与 NGF 类似。向培养基中添加能抑制从 ProNGF 合成 NGF 的 galardin 证实迁移活性的促进是由于 ProNGF 所致而非其能产生的 NGF 所致。

[0253] 侵袭

[0254] ProNGF 刺激的 MCF-7 细胞的侵袭能力在胶原 I 型凝胶中测试。每种条件进行 3 份并且每种条件计数最少 45 块视野。MCF-7 细胞在仅饥饿培养基或含有如下成分的饥饿培养基中接种到胶原 I 型凝胶上, 所述成分为: 200ng/mL ProNGF, 或者含有或不含 200ng/mL ProNGF 的 20 μ M galardin, 或者 200ng/mL NGF。* $p < 0.05$, 与饥饿培养基条件相比。

[0255] 结果见图 9, 其是显示使用浸入各种培养基中的 MCF-7 细胞获得的侵袭指数的图。这些测试表明 ProNGF 刺激 MCF-7 侵袭。

[0256] 干扰 RNA 降低 ProNGF 的表达

[0257] MCF-7 细胞用 3 μ g 针对 GFP (siGFP) 或 ProNGF (siProNGF) 的干扰 RNA (siRNA) 转染。24-48 小时培养后, 裂解细胞并进行 ProNGF Western 印迹。由印迹检测的 ProNGF 的相对量用 QuantityOne 软件 (Bio-Rad) 相对于肌动蛋白等上样评价, 并以柱状图形式表示, 其中 100% 是 siGFP 对照条件 (图 10)。在印迹照片上, 我们已经能够观察到 siProNGF 的转染降低了 MCF-7 细胞中 ProNGF 蛋白的表达。通过光密度评价在转染 24 小时后降低 59%。

[0258] 这一实验使得我们显示能够用干扰 RNA 策略降低乳腺癌细胞中 ProNGF 的表达水平。

序列表

<110> 生物梅里埃公司

<120> 用于体外诊断癌症具体是乳腺癌、甲状腺癌或肺癌的 ProNGF 测定的方法以及 ProNGF 的治疗用途

<130>ProNGF

<150>FR0600851

<151>2006-01-31

<160>6

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>siGFP :in the sequence n represents t(thymine)

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (21)

<223>n is a, c, g, or u

<400>1

gcugaccug aagucaucn n

21

<210>2

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>siGFP :in the sequence n represents t(thymine)

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (21)

<223>n is a, c, g, or u

<400>2

gaugaacuuc agggucagcn n

21

<210>3

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>siSORT :in the sequence n represents t(thymine)

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (21)

<223>n is a, c, g, or u

<400>3

ggugguguua acagcagagn n

21

<210>4

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>siSORT :in the sequence n represents t(thymine)

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (21)

<223>n is a, c, g, or u

<400>4

cucugcuguu aacaccacn n

21

<210>5

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>siProNGF :in the sequence n represents t(thymine)

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (21)

<223>n is a, c, g, or u

<400>5

caguguauuc aaacaguaun n

21

<210>6

<211>21

<212>RNA

<213>Artificial

<220>

<223>siProNGF :in the sequence n represents t -thymine)

<220>

<221>misc_feature

<222>(20).. (21)

<223>n is a, c, g, or u

<400>6

guacuguuug aauacacugn n

21

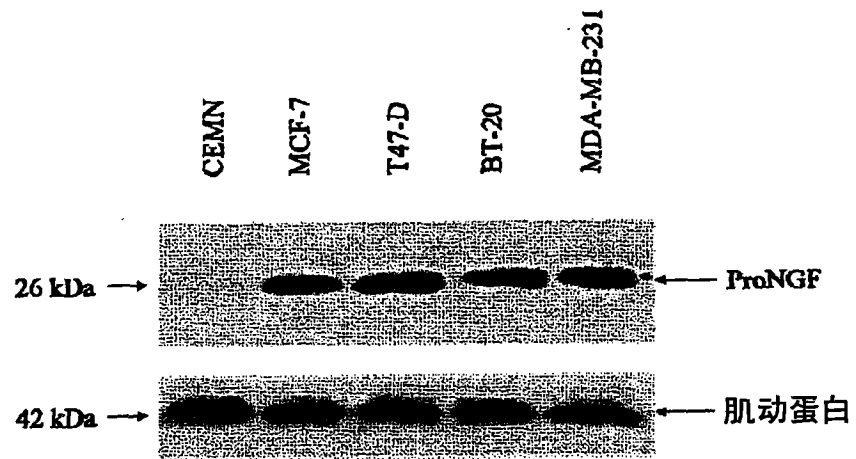


图 1

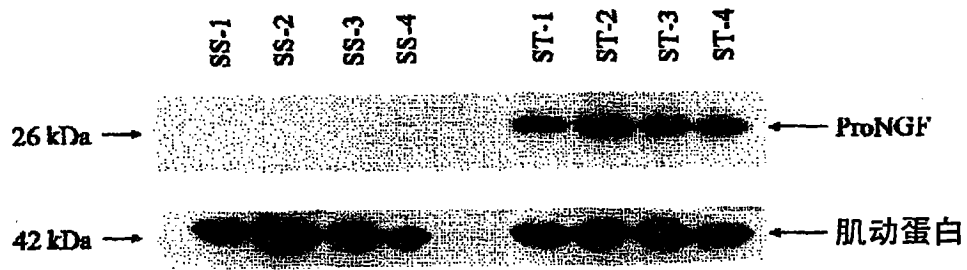


图 2

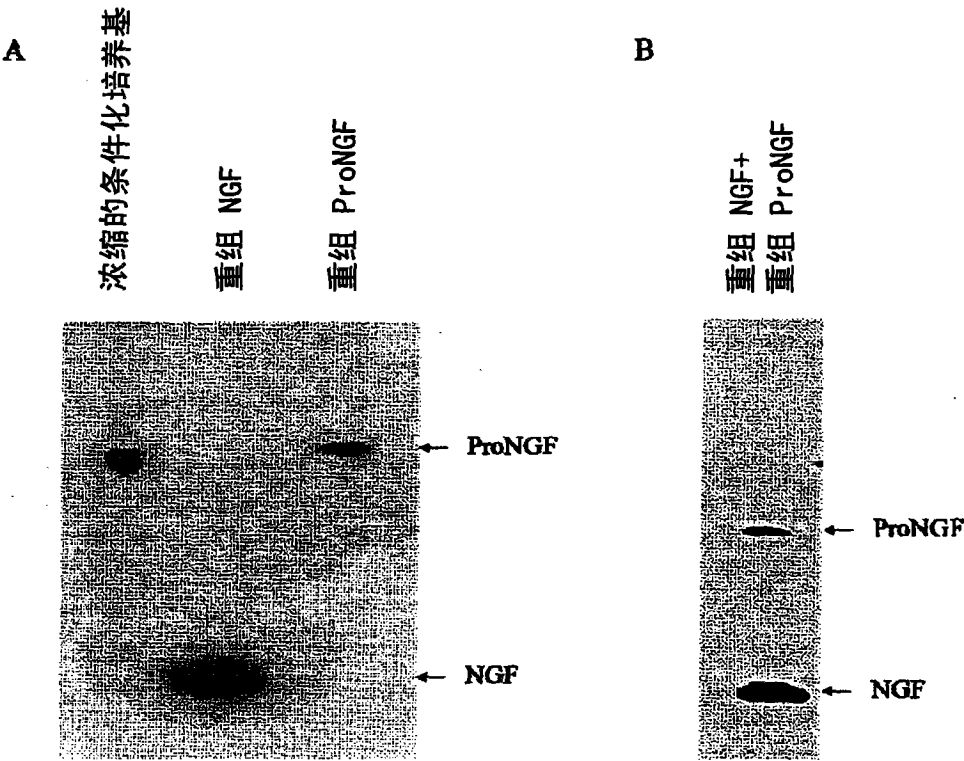


图 3

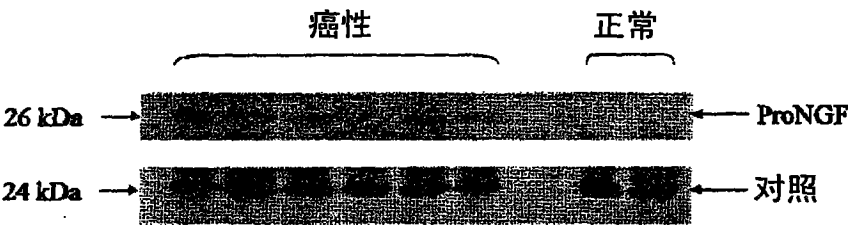


图 4

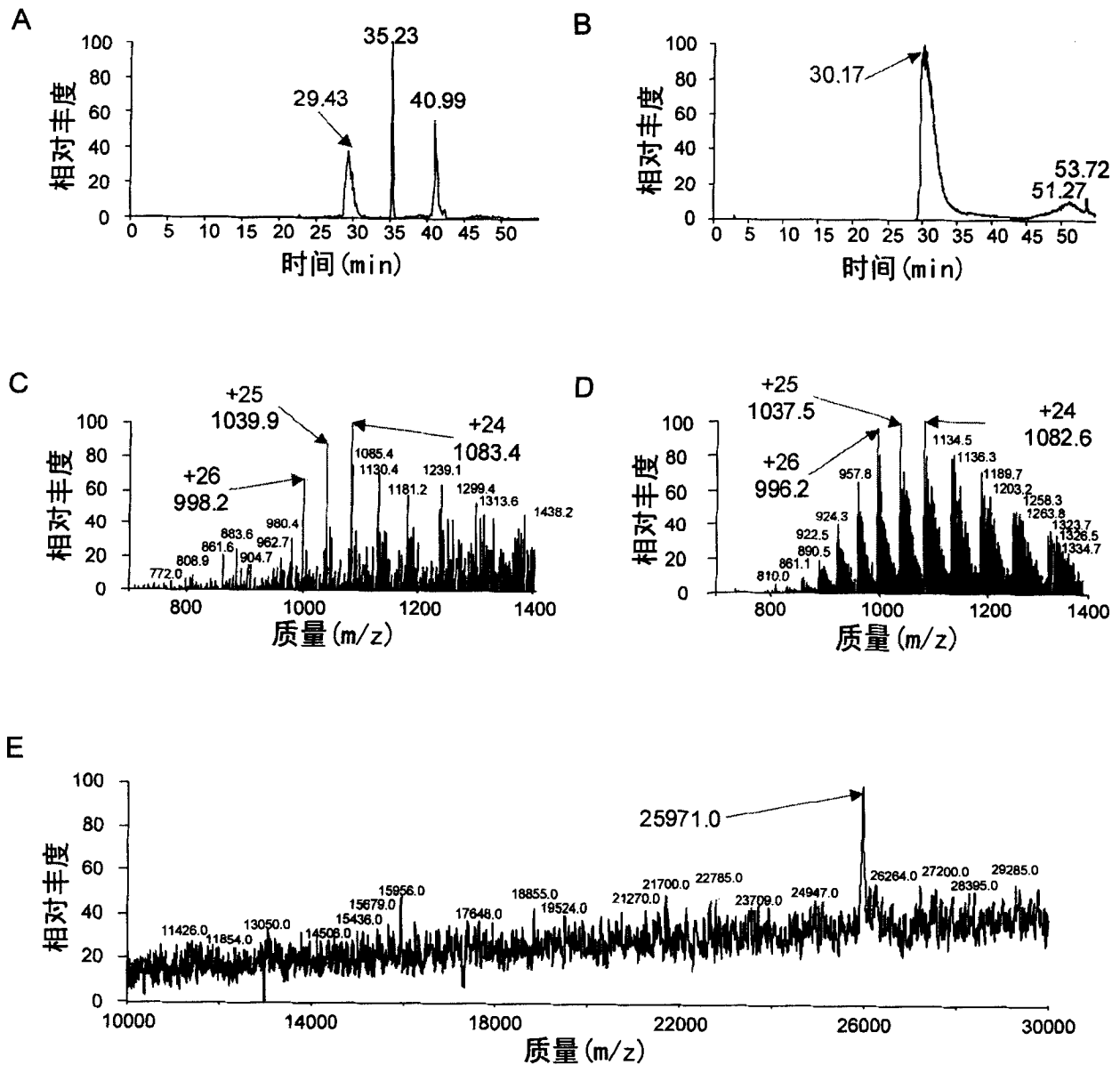


图 5

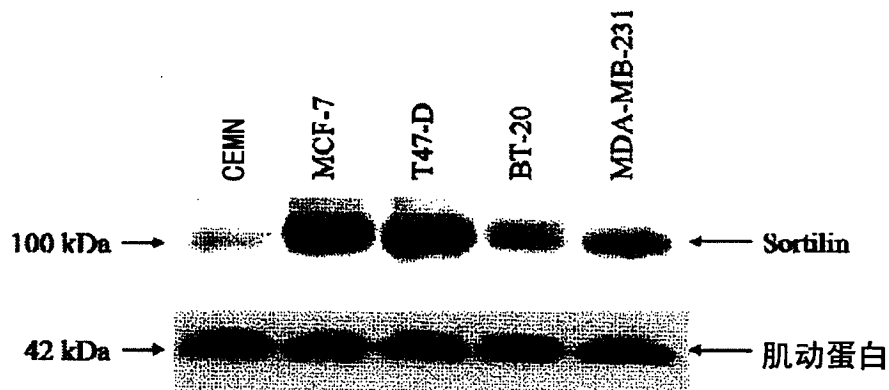


图 6

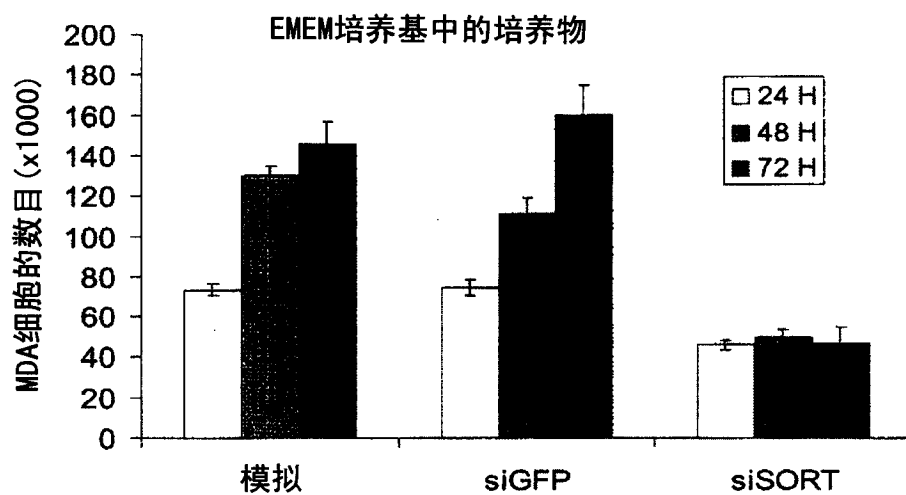


图 7

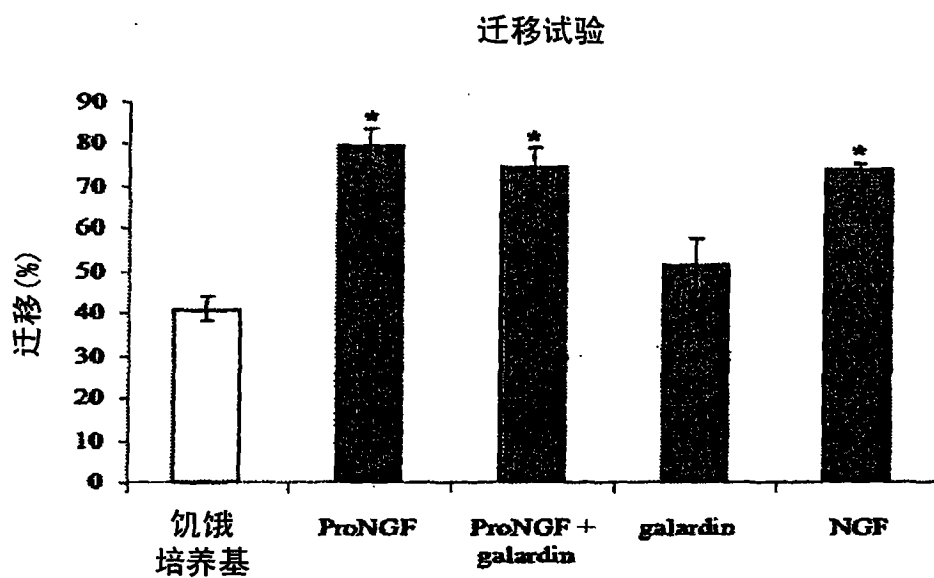


图 8

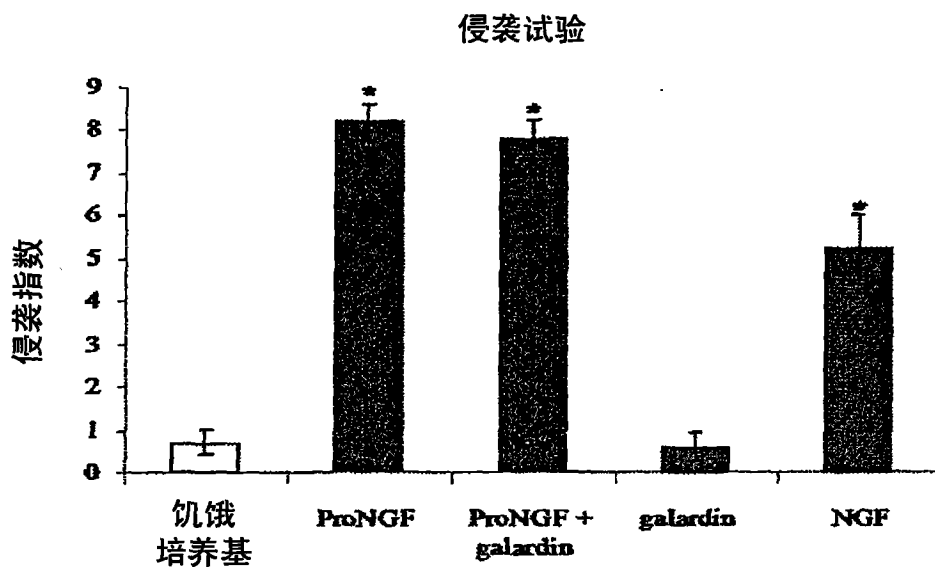


图 9

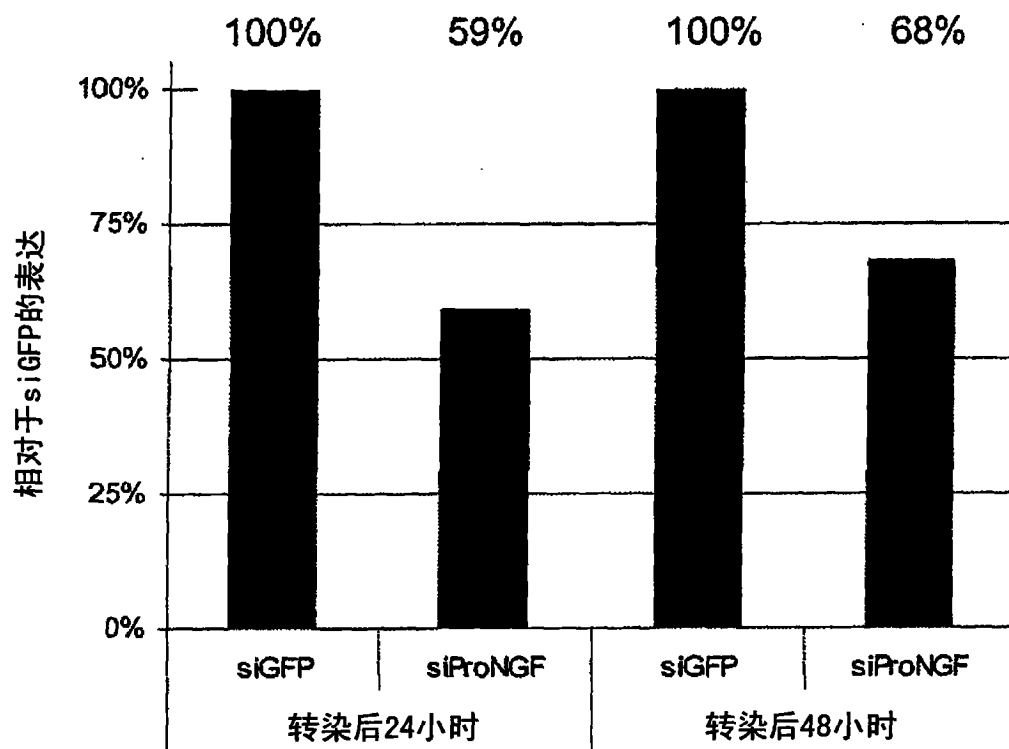


图 10