



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102334032 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201080007960. 0

A61K 31/282 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 02. 16

A61K 33/24 (2006. 01)

(30) 优先权数据

PCT/SE2009/000091 2009. 02. 16 SE

09158084. 5 2009. 04. 16 EP

61/169, 963 2009. 04. 16 US

09167847. 4 2009. 08. 13 EP

61/233, 769 2009. 08. 13 US

PCT/EP2009/067419 2009. 12. 17 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 08. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2010/051941 2010. 02. 16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/092190 EN 2010. 08. 19

(73) 专利权人 阿特拉斯抗体有限公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

(72) 发明人 K·杰斯特罗姆 J·埃伯哈德

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2009/102261 A1, 2009. 08. 20,

WO 2007/084485 A2, 2007. 07. 26,

WO 2009/102261 A1, 2009. 08. 20,

Shozo Danno et al. Decreased Expression of Mouse Rbm3, a Cold-Shock Protein, in Sertoli Cells of Cryptorchid Testis.

《American Journal of Pathology》. 2000, 第156卷 (第5期),

Yu Zeng et al. Down-Regulating Cold Shock Protein Genes Impairs Cancer Cell Survival and Enhances Chemosensitivity.

《Journal of Cellular Biochemistry》. 2009, 第107卷 (第1期),

Yu Zeng et al. Down-Regulating Cold Shock Protein Genes Impairs Cancer Cell Survival and Enhances Chemosensitivity.

《Journal of Cellular Biochemistry》. 2009, 第107卷 (第1期),

审查员 舒霏霏

权利要求书4页 说明书41页

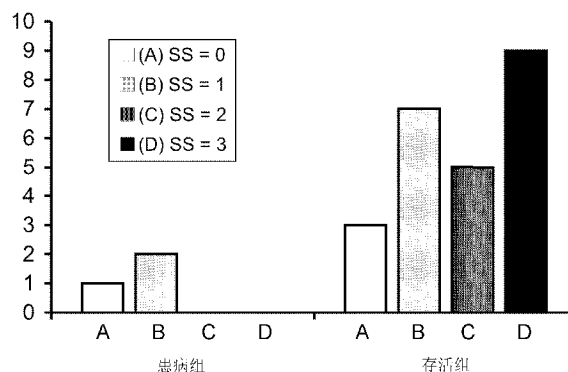
序列表6页 附图22页

(54) 发明名称

预测对基于铂的治疗的反应性

(57) 摘要

确定患有癌症的哺乳动物受试者属于第一组还是第二组的方法, 其中第一组受试者对基于铂的治疗的反应性很可能比第二组受试者更强, 包括步骤: 评估之前从所述受试者获得的样品的至少一部分中存在的RBM3蛋白或RBM3mRNA的量, 并确定所述量对应的样品值; 将所述样品值与参照值比较; 并且, 如果所述样品值高于所述参照值, 那么得出结论所述受试者属于第一组; 并且, 如果所述样品值低于或等于所述参照值, 那么得出结论所述受试者属于第二组。还提供用于建立治疗预测的工具。



1. 用于评估 RBM3 蛋白的量的亲和配体或用于评估 RBM3mRNA 的量的探针或引物用于制备用于在确定患有癌症的哺乳动物受试者属于第一组还是第二组的方法中使用的试剂的用途,其中第一组受试者对基于铂的治疗的反应性比第二组受试者更强,包括步骤:

a) 评估之前从所述受试者获得的样品的至少一部分中存在的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量,并确定所述量对应的样品值;

b) 将在步骤 a) 中获得的样品值与参照值比较;并且,
如果所述样品值高于所述参照值,

c1) 那么得出结论所述受试者属于所述第一组;并且,
如果所述样品值低于或等于所述参照值,

c2) 那么得出结论所述受试者属于所述第二组。

2. 用于评估 RBM3 蛋白的量的亲和配体或用于评估 RBM3mRNA 的量的探针或引物用于制备用于在确定患有癌症的哺乳动物受试者的基于铂的治疗的强度水平的方法中使用的试剂的用途,包括步骤:

a) 评估之前从所述受试者获得的样品的至少一部分中存在的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量,并确定所述量对应的样品值;

b) 将在步骤 a) 中获得的样品值与参照值比较;并且,
如果所述样品值高于所述参照值,

c1) 那么得出结论所述受试者应被给予第一强度的基于铂的治疗;并且
如果所述样品值低于或等于所述参照值,

c1) 那么得出结论所述受试者应被给予第二强度的基于铂的治疗,
其中所述第二强度高于所述第一强度。

3. 权利要求 1-2 任一项的用途,其中所述癌症选自睾丸癌、卵巢癌、肺癌、膀胱癌、结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌和头颈癌。

4. 权利要求 3 的用途,其中所述癌症选自睾丸癌和卵巢癌。

5. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述基于铂的治疗选自卡铂、铂尔定、奥沙利铂、沙铂、吡铂和顺铂治疗。

6. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述样品是体液样品。

7. 权利要求 6 的用途,其中所述体液选自血液、血浆、血清、精液、精液 (semen)、脑脊液、尿液和渗出液。

8. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述样品是细胞学样品。

9. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述样品是粪便样品。

10. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述样品包含来自所述受试者的细胞。

11. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述样品包含来自所述受试者的肿瘤细胞。

12. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述样品是组织样品。

13. 权利要求 12 的用途,其中所述组织样品是肿瘤组织样品。

14. 权利要求 1 或 2 的用途,其中步骤 a) 的评估限于所述样品的细胞的细胞核和 / 或细胞质。

15. 权利要求 14 的用途,其中步骤 a) 的评估限于所述样品的肿瘤细胞的细胞核和 / 或细胞质。

16. 权利要求 1 或 2 的用途,其中步骤 a) 的样品值被确定为 1,对应于所述样品中有可检出 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA ;或被确定为 0,对应于所述样品中无可检出的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA。

17. 权利要求 1 或 2 的用途,其中步骤 b) 的参照值对应于无可检出的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的参照样品。

18. 权利要求 1 或 2 的用途,其中步骤 b) 的参照值是 0。

19. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述参照值为细胞核比例、细胞核强度、细胞核比例与细胞核强度的函数、细胞质比例、细胞质强度或者细胞质比例与细胞质强度的函数。

20. 权利要求 1 或 2 的用途,其中 RBM3 蛋白的氨基酸序列包含 SEQ ID NO:1。

21. 权利要求 1 或 2 的用途,其中 RBM3 蛋白的氨基酸序列包含 SEQ ID NO:2 或由 SEQ ID NO:2 组成。

22. 权利要求 1 或 2 的用途,其中步骤 a) 包括:

aI) 对所述样品施用能够选择性与 RBM3 蛋白相互作用的可定量的亲和配体以进行评估,所述施用使所述亲和配体与样品中存在的 RBM3 蛋白能够结合的条件下进行;并且

aII) 定量与所述样品结合的亲和配体以评估所述量。

23. 权利要求 1 或 2 的用途,其中步骤 a) 包括:

a1) 对所述样品施用能够选择性与 RBM3 蛋白相互作用的可定量的亲和配体以进行定量,所述施用使所述亲和配体与所述样品中存在的 RBM3 蛋白能够结合的条件下进行;

a2) 除去未结合的亲和配体;并且

a3) 定量与所述样品保持结合的亲和配体以评估所述量。

24. 权利要求 22 的用途,其中所述可定量的亲和配体选自抗体、其片段和其衍生物。

25. 权利要求 24 的用途,其中所述可定量的亲和配体可通过包括以下步骤的方法获得:用氨基酸序列由选自 SEQ ID NO:4 和 5 的序列组成的肽免疫动物。

26. 权利要求 22 的用途,其中所述可定量的亲和配体可通过包含以下步骤的方法获得:用由 20 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO:6-19 的序列的 RBM3 片段免疫动物。

27. 权利要求 22 的用途,其中所述可定量的亲和配体可通过包含以下步骤的方法获得:用由 15 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO:6-19 的序列的 RBM3 片段免疫动物。

28. 权利要求 26 的用途,其中所述可定量的亲和配体可通过包括以下步骤的方法获得:用由 20 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的序列的 RBM3 片段免疫动物。

29. 权利要求 26 的用途,其中所述可定量的亲和配体可通过包括以下步骤的方法获得:用由 15 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的序列的 RBM3 片段免疫动物。

30. 权利要求 22 的用途,其中所述可定量的亲和配体是寡核苷酸分子。

31. 权利要求 22 的用途,其中所述可定量的亲和配体是来源于支架的蛋白配体,所述支架选自葡萄球菌 A 蛋白及其结构域、脂质运载蛋白、锚蛋白重复结构域、纤维素结合结构域、 γ 晶体、绿色荧光蛋白、人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4、蛋白酶抑制剂、PDZ 结构域、

肽适体、葡萄球菌核酸酶、淀粉酶抑肽、纤维连接蛋白 III 型结构域和锌指结构。

32. 权利要求 22 的用途,其中所述可定量的亲和配体能够与氨基酸序列由序列 SEQ ID NO:1 组成的肽选择性相互作用。

33. 权利要求 22 的用途,其中所述可定量的亲和配体能够与由选自 SEQ ID NO:4 和 5 的氨基酸序列组成的肽选择性相互作用。

34. 权利要求 22 的用途,其中所述可定量的亲和配体能够与 RBM3 片段选择性相互作用,所述 RBM3 片段由 20 个或更少的氨基酸组成,并包含选自 SEQ ID NO:6-19 的氨基酸序列。

35. 权利要求 22 的用途,其中所述可定量的亲和配体能够与 RBM3 片段选择性相互作用,所述 RBM3 片段由 15 个或更少的氨基酸组成,并包含选自 SEQ ID NO:6-19 的氨基酸序列。

36. 权利要求 34 的用途,其中所述可定量的亲和配体能够与 RBM3 片段选择性相互作用,所述 RBM3 片段由 20 个或更少的氨基酸组成,并包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的序列。

37. 权利要求 34 的用途,其中所述可定量的亲和配体能够与 RBM3 片段选择性相互作用,所述 RBM3 片段由 15 个或更少的氨基酸组成,并包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的序列。

38. 权利要求 1 或 2 的用途,其中步骤 a) 包括通过微阵列、PCR 扩增、RNA 杂交、凝胶电泳或其结合来评估 RBM3mRNA 的量,以得到所述量。

39. 权利要求 38 的用途,其中所述 PCR 扩增为 RT 定量 PCR。

40. 可实施前述权利要求任一项中所限定的用途的试剂盒,其包含:

a) 能够与氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 组成的肽或由 20 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的氨基酸序列的 RBM3 片段选择性相互作用的可定量的亲和配体;和

b) 对所述可定量的亲和配体的量进行定量所需的试剂。

41. 可实施前述权利要求任一项中所限定的用途的试剂盒,其包含:

a) 能够与氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 组成的肽或由 15 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的氨基酸序列的 RBM3 片段选择性相互作用的可定量的亲和配体;和

b) 对所述可定量的亲和配体的量进行定量所需的试剂。

42. 权利要求 40 或 41 的试剂盒,其中所述可定量的亲和配体选自抗体、其片段和其衍生物。

43. 权利要求 40 或 41 的试剂盒,其中所述可定量的亲和配体是来源于支架的蛋白配体,所述支架选自葡萄球菌 A 蛋白及其结构域、脂质运载蛋白、锚蛋白重复结构域、纤维素结合结构域、 γ 晶体、绿色荧光蛋白、人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4、蛋白酶抑制剂、PDZ 结构域、肽适体、葡萄球菌核酸酶、淀粉酶抑肽、纤维连接蛋白 III 型结构域和锌指结构。

44. 权利要求 40 或 41 的试剂盒,其中所述可定量的亲和配体是寡核苷酸分子。

45. 权利要求 40 或 41 的试剂盒,其中对所述可定量的亲和配体的所述量进行定量所需的试剂包括能够识别所述可定量的亲和配体的二级亲和配体。

46. 权利要求 45 的试剂盒,其中所述二级亲和配体含有标签,所述标签选自荧光染料或金属、发色团染料、化学发光化合物和生物发光蛋白、酶、放射性同位素、颗粒和量子点。

47. 权利要求 40 或 41 的试剂盒,包含:

第一参照样品,其包含的 RBM3 蛋白的量对应于高于参照值的值;和

第二参照样品,其包含的 RBM3 蛋白的量对应于低于或等于所述参照值的值。

48. 权利要求 47 的试剂盒,其中所述参照样品包含细胞系。

49. RBM3 蛋白片段,由 20 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的氨基酸序列。

50. 权利要求 49 的 RBM3 蛋白片段,由 15 个或更少的氨基酸组成。

51. 抗体,其可通过包括以下步骤的方法获得:用氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 组成的肽或 RBM3 蛋白片段免疫动物,所述 RBM3 蛋白片段由 20 个或更少的氨基酸组成,并且包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的序列。

52. 抗体,其可通过包括以下步骤的方法获得:用氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 组成的肽或 RBM3 蛋白片段免疫动物,所述 RBM3 蛋白片段由 15 个或更少的氨基酸组成,并且包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的序列。

53. 亲和配体,其能够与氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 组成的肽或者 RBM3 蛋白片段选择性相互作用,所述 RBM3 蛋白片段由 20 个或更少的氨基酸组成,并且包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的氨基酸序列。

54. 亲和配体,其能够与氨基酸序列由 SEQ ID NO:5 组成的肽或者 RBM3 蛋白片段选择性相互作用,所述 RBM3 蛋白片段由 15 个或更少的氨基酸组成,并且包含选自 SEQ ID NO:8、16 和 17 的氨基酸序列。

55. 权利要求 51 的抗体或者权利要求 53 的亲和配体,其是单克隆抗体或多克隆抗体。

56. 能够与 RBM3 蛋白选择性相互作用的亲和配体在制备患有癌症的哺乳动物受试者的基于铂的治疗的治疗预测剂中的用途,其中所述癌症选自睾丸癌、卵巢癌、肺癌、膀胱癌、结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌和头颈癌。

57. 权利要求 56 的用途,其中所述亲和配体是权利要求 53-55 任一项的亲和配体。

58. 权利要求 56 的用途,其中所述癌症选自睾丸癌和卵巢癌。

59. 权利要求 56 的用途,其中所述基于铂的治疗选自卡铂、铂尔定、奥沙利铂、沙铂、吡铂和顺铂治疗。

60. 基于铂的治疗剂在制造用于治疗患有癌症的哺乳动物受试者的药物中的用途,其中所述患者具有高 RBM3 蛋白或高 RBM3mRNA。

61. 权利要求 60 的用途,其中所述癌症选自睾丸癌、卵巢癌、肺癌、膀胱癌、结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌和头颈癌。

62. 权利要求 61 的用途,其中所述癌症选自睾丸癌和卵巢癌。

63. 权利要求 60-62 任一项的用途,其中所述基于铂的治疗选自卡铂、铂尔定、奥沙利铂、沙铂、吡铂和顺铂治疗。

预测对基于铂的治疗的反应性

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症领域,特别是癌症治疗。此外,本发明还涉及可用于建立癌症受试者对癌症治疗的反应性的治疗预测的工具和方法。

背景技术

[0002] 癌症

[0003] 癌症是最常见的疾病之一,并且是西方世界的主要死亡诱因。通常,大多数癌症类型的发病率会随年龄增加。随着人类寿命不断增长,由于一般健康状态的提高,癌症可影响越来越多的个体。大多数常见癌症类型的诱因仍基本未知,但日益增多的知识提供了环境因素(饮食、吸烟、紫外线等)及遗传因素(“癌症基因”如 p53、APC、BRCA1、XP 等的种系突变)与癌症发生风险之间的联系。

[0004] 尽管癌症本质上是一种细胞疾病并被定义为具有净细胞生长和有害群体行为的转化细胞群,但从细胞生物学角度来看,对癌症的定义都不能完全令人满意。恶性转化代表基于不可逆转遗传改变的向恶性表型的转变。尽管还未正式证明,但恶性转化被认为在一个细胞内发生,随后形成的肿瘤从该细胞起源(“癌症克隆性”学说)。癌发生是癌症通过其产生的过程,并通常被认为包括最终导致恶性肿瘤生长的多个事件。这个多步骤过程包括数个限速步骤,如引入突变、还有可能的外遗传(epigenetic)事件,导致癌变前增殖阶段后的癌症形成。逐步改变包括决定细胞分裂、自我行为和细胞死亡的至关重要调控通路中的错误(突变)的累积。这些改变每一种均可能提供相对于周围细胞的达尔文选择生长优势,导致肿瘤细胞群的净生长。恶性肿瘤不一定仅由转化肿瘤细胞自身组成,而是还可以包括作为支持性间质的周围正常细胞。这种补充的癌症间质包括结缔组织、血管和多种其他正常细胞,如炎性细胞,它们共同起到向转化的肿瘤细胞提供肿瘤继续生长所必需的信号的作用。

[0005] 最常见癌症类型发生于体细胞,主要来源于上皮,例如前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、尿路上皮癌和皮肤癌,随后是起源自造血谱系的癌症,例如白血病和淋巴瘤;起源于神经外胚层的癌症,例如恶性胶质瘤以及软组织瘤,例如肉瘤。

[0006] 癌症诊断和预后

[0007] 疑似肿瘤的活检材料的显微镜评估仍然是癌症诊断的黄金标准。为了获得可靠的诊断结果,将肿瘤组织在福尔马林中固定,进行组织处理和石蜡包埋。从所得的石蜡块获得组织切片并用组织化学方法即苏木素-伊红染色和免疫组织化学(IHC)方法进行染色。然后,用病理学技术评估外科样本,所述病理学技术包括总体分析(gross analysis)和显微镜分析。这种分析经常形成评定对具体肿瘤的诊断——即对肿瘤类型分类并对恶性程度定级——的基础。

[0008] 可根据专门针对每种癌症类型的分类表将恶性肿瘤分成数个时期。最常见的实体瘤分类系统是肿瘤-淋巴结-转移(TNM)分期系统。T期描述原发性肿瘤的局部程度,即所述肿瘤侵入并进入周围组织生长的程度,而N期和M期描述肿瘤形成转移的程度,其中N期

描述肿瘤扩散至淋巴结, M 期描述肿瘤在其他远端器官中生长。早期包括: T0-1、N0、M0, 代表淋巴结阴性的局部化肿瘤。较晚期包括: T2-4、N0、M0, 生长更广泛的局部化肿瘤; T1-4、N1-3、M0, 已转移至淋巴结的肿瘤; 以及 T1-4、N1-3、M1, 在远端器官中检出转移的肿瘤。肿瘤分期经常基于多种形式的检查, 包括外科分析、放射学分析和组织病理学分析。除了分期以外, 对于大多数肿瘤类型还存在对恶性程度分级的分类系统。所述分级系统倚赖对肿瘤组织样品的形态学评定并基于给定肿瘤中的显微特征。这些分级系统可基于所述肿瘤细胞的分化程度、增殖程度和非典型外观 (atypical appearance)。通常采用的分级系统的实例包括用于前列腺癌的 Gleason 分级和用于乳腺癌的 Nottingham 组织学级别 (NHG) 分级。

[0009] 准确的分期和分级对于正确诊断很重要并可提供预测预后的手段。对具体肿瘤的诊断和预后信息随后可确定对所给癌症患者的合适治疗策略。除了组织切片的组织化学染色以外, 获得关于肿瘤的更多信息的常用方法是免疫组织化学染色。IHC 使得可使用特异性抗体来检测组织和细胞中的蛋白表达模式。除了从组织化学染色的肿瘤组织切片评定的关于组织结构和细胞形态学的信息以外, 在临床诊断中使用 IHC 还使得可检测不同细胞群体中的免疫反应性。IHC 可用于支持原发性肿瘤的准确诊断, 包括分期和分级, 以及用于未知来源的转移的诊断。如今在临床实践中最常用的抗体包括针对细胞类型“特异”蛋白例如 PSA (前列腺)、MelanA (黑素细胞) 和甲状腺球蛋白 (甲状腺) 的抗体; 识别 (上皮细胞的、间质细胞的、神经胶质的) 中间丝、分化群 (cluster of differentiation, CD) 抗原 (淋巴细胞的造血亚类) 以及恶性潜能标记物, 例如 Ki67 (增殖)、p53 (通常突变的肿瘤抑制基因) 和 HER-2 (生长因子受体) 的抗体。

[0010] 除了 IHC, 使用原位杂交来检测基因扩增和使用基因测序进行突变分析是癌症诊断学中正在发展的技术。此外, 对转录物、蛋白或代谢物的整体分析增加了相关信息。然而, 大多数这些分析仍然代表基础研究, 并且尚未对其在临床医疗中的应用进行评估和标准化。

[0011] 基于铂的治疗

[0012] 基于铂的化学疗法用于治疗癌症例如睾丸癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、膀胱癌、结肠直肠癌和头颈癌。目前, 有三种 FDA 批准的基于铂的化合物 (顺铂 (cisplatin)、卡铂 (carboplatin) 和奥沙利铂 (oxaliplatin)), 但是还有正在开发或者正在进行临床试验的新衍生物 (例如沙铂 (satraplatin) 和吡铂 (picoplatin))。开发新的基于铂的化合物的一个目的是使毒性最小化, 目前使用的化合物的毒性较大。常见副作用包括肾毒性、神经毒性和听力丧失。

[0013] 铂抗性

[0014] 基于铂的化疗剂结合 DNA, 从而产生 DNA 加合物, 导致破坏 DNA 结构的交联。通常, 这些破坏最终导致凋亡。然而, 存在药物抗性的问题。一部分肿瘤对常规治疗无反应, 这种抗性可以是固有的, 也可以是获得性的。

[0015] 铂抗性背后的机制尚未被完全阐明, 但已经提出了两种主要途径: 铂化合物不能到达靶 DNA, 或者铂化合物在 DNA 加合物形成后不能诱导凋亡。

[0016] 铂化合物不能到达肿瘤 DNA 可能是由于某些与多药物抗性相关的蛋白的效应。也可涉及其他外排蛋白, 例如介导铜转运的那些蛋白。

[0017] 铂化合物不能诱导凋亡很可能是由于 DNA 修复系统的差异。DNA 修复涉及多种机

制,并且具体而言这些机制中的两种——核苷酸切除修复 (NER) 和错配修复 (MMR)——与铂抗性有关。

[0018] 以睾丸癌作为模型系统 (这些肿瘤对基于铂的化学疗法极为敏感),已经证明某些睾丸癌细胞系具有 NER 缺陷,具体而言是低水平的切除修复交叉互补组 1 (ERCC1) 蛋白。在卵巢癌细胞系中,已经证明形成顺铂抗性的细胞系的 ERCC1 表达增加。

[0019] 有迹象表明 MMR 途径必需起作用,目的是使得顺铂和卡铂形成的损伤被细胞检测到。这些化合物干扰 MMR 活性,因此阻止损伤修复,最终导致凋亡。如果 MMR 缺陷,那么细胞可在 DNA 损伤仍然存在的情况下继续增殖,并从而具有抗性。然而,在不同化合物之间,MMR 介导的抗性似乎存在差异:奥沙利铂可在对顺铂和卡铂有抗性的细胞中有效应。

[0020] 终点 (endpoint) 分析

[0021] 对癌症的辅助治疗试验的终点分析可得到患者对某种治疗如何反应的重要信息。总存活率 (overall survival, OS) 长期以来一直被认为是标准的主要终点。OS 考虑到至死亡的时间,而不管诱因,例如死亡是否是由于癌症导致。检查失访,并且忽略区域性复发、远端转移、第二原发性卵巢癌和第二其他原发性癌症。

[0022] 如今,对许多癌症类型数量日益增加的有效治疗已经导致对可更好地评估辅助治疗效果的替代终点的需要。部分由于对证明辅助治疗改善 OS 所需的长随访期,该终点经常以更早表明所述治疗成功程度的其他临床终点为补充。

[0023] 在本公开中,发明人证明具体蛋白 (所提议的生物标记物) 的表达水平与预后显著相关。对于此观察结果,使用两种替代终点,即卵巢癌特异性存活率 (OCSS) 和无复发存活率 (RFS)。OCSS 分析包括至由源肿瘤引起的卵巢癌造成的死亡的时间。RFS 包括至与相同癌症相关的任何事件的时间,即,相同癌症的全部癌症复发和死亡都是事件。考虑了远端、局部和区域转移以及卵巢癌特异性死亡。在另一方面,忽略了第二原发性相同癌症和其他原发性癌症。其他癌症导致的死亡、与癌症无关的死亡、治疗有关的死亡和失访均是被检查的观察结果。

发明内容

[0024] 本公开某些方面的一个目的是预测对基于铂的治疗的反应性水平。

[0025] 因此,提供了一种确定患有癌症的哺乳动物受试者属于第一组还是第二组的方法,其中第一组受试者对基于铂的治疗的反应性比第二组受试者更强。此外,提供了一种确定对患有癌症的哺乳动物受试者的基于铂的治疗的强度水平的方法。所述方法基于对存在于受试者样品的至少一部分中的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量的评估。

[0026] 此外,提供了一种实施所述方法的试剂盒,其包含能够与 RBM3 蛋白选择性相互作用的可定量亲和配体,以及对所述可定量亲和配体的量进行定量必需的试剂。

[0027] 此外,提供了一种 RBM3 蛋白片段及其用途,一种能够与 RBM3 蛋白选择性相互作用的亲和配体及其用途,以及一种用于治疗患有癌症的高 RBM3 哺乳动物受试者的基于铂的治疗剂。

附图说明

[0028] 图 1 示出了被诊断为卵巢上皮癌 (EOC) 的全部患者即 154 名受试者的存活分析的

结果。图 1A 示出了总存活率 (OS)。此群体中的全部患者的预估 5 年存活率为约 38%。图 1B 示出了卵巢癌特异性存活率 (OCSS)。此群体中的全部患者的预估 5 年存活率为约 39%。

[0029] 图 2 示出了在基于细胞核比例 (NF) 染色将全部 154 名受试者分组的情况下, RBM3 水平对 OS 的影响。在图 2A 中, 基于 NF 状态将全部受试者分为四组, 即 $< 2\%$ (0)、 $2-25\%$ (1)、 $> 25-75\%$ (2) 或者 $> 75\%$ (3)。在图 2B 中, 实线代表 RBM3 的高 NF 水平 ($NF > 75\%$), 虚线代表 RBM3 的低 NF 水平 ($NF \leq 75\%$)。

[0030] 图 3 示出了在基于细胞核比例 (NF) 染色将全部 154 名受试者分组的情况下, RBM3 水平对 OCSS 的影响。在图 3A 中, 基于 NF 状态将全部受试者分为四组, 即 $< 2\%$ (0)、 $2-25\%$ (1)、 $> 25-75\%$ (2) 或者 $> 75\%$ (3)。在图 3B 中, 实线代表 RBM3 的高 NF 水平 ($NF > 75\%$), 虚线代表 RBM3 的低 NF 水平 ($NF \leq 75\%$)。

[0031] 图 4 示出了在治疗后的前五年时间内在全部 154 名患者中 RBM3 的 NF 水平对 OS 的影响。对于此群体中的高 RBM3 ($NF > 75\%$) 患者 (实线), 预估的 5 年存活率为约 44%; 对于低 RBM3 ($NF \leq 75\%$) 患者 (虚线), 预估的 5 年存活率为约 25%。

[0032] 图 5 示出了基于 RBM3 的细胞核强度 (NI) 或胞质强度 (CI) 水平的诊断为 EOC 的全部 154 名患者的 OS。使用高组和低组二分 RBM3 表达。在图 5A 中, 实线代表 RBM3 的高 NI 水平 ($NI = 3$), 虚线代表 RBM3 的低 NI 水平 ($NI < 3$)。在图 5B 中, 实线代表 RBM3 的高 CI 水平 ($CI = 2$), 虚线代表 RBM3 的低 CI 水平 ($CI < 2$)。

[0033] 图 6 示出了基于 RBM3 的细胞核强度 (NI) 或胞质强度 (CI) 水平的诊断为 EOC 的全部 154 名患者的 OCSS。使用高组和低组二分 RBM3 表达。在图 6A 中, 实线代表 RBM3 的高 NI 水平 ($NI = 3$), 虚线代表 RBM3 的低 NI 水平 ($NI < 3$)。在图 6B 中, 实线代表 RBM3 的高 CI 水平 ($CI = 2$), 虚线代表 RBM3 的低 CI 水平 ($CI < 2$)。

[0034] 图 7 示出了基于 RBM3 的 NF 水平对诊断为 2 级 EOC 的 39 名患者的存活分析的结果。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表高 RBM3 水平 ($NF > 75\%$), 虚线代表低 RBM3 水平 ($NF \leq 75\%$)。图 7A 示出了 OS。图 7B 示出了 OCSS。

[0035] 图 8 示出了基于 RBM3 的 NF 水平对诊断为 1 级或 2 级 EOC 的 47 名患者的存活分析的结果。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表高 RBM3 水平 ($NF > 75\%$), 虚线代表低 RBM3 水平 ($NF \leq 75\%$)。图 8A 示出了 OS。图 8B 示出了 OCSS。

[0036] 图 9 示出了基于 RBM3 的 NF 水平对诊断为 1 期或 2 期 EOC 的 42 名患者的存活分析的结果。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表高 RBM3 水平 ($NF > 75\%$), 虚线代表低 RBM3 水平 ($NF \leq 75\%$)。图 9A 示出了 OS。图 9B 示出了 OCSS。

[0037] 图 10 示出了基于 RBM3 的 NF 水平对诊断为内膜样癌的 35 名患者的存活分析的结果。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表高 RBM3 水平 ($NF > 75\%$), 虚线代表低 RBM3 水平 ($NF \leq 75\%$)。图 10A 示出了 OS。图 10B 示出了 OCSS。

[0038] 图 11 示出了基于 RBM3 的 NF 水平对诊断为 1 期或 2 期卵巢内膜样癌的 17 名患者的存活分析的结果。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表高 RBM3 水平 ($NF > 75\%$), 虚线代表低 RBM3 水平 ($NF \leq 75\%$)。图 11A 示出了 OS。图 11B 示出了 OCSS。

[0039] 图 12 示出了基于 RBM3 的 NI 水平对诊断为浆液性癌的 90 名患者的存活分析的结果。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表高 RBM3 水平 ($NI = 3$), 虚线代表低 RBM3 水平 ($NI < 3$)。图 12A 示出了 OS。图 12B 示出了 OCSS。

[0040] 图 13 示出了基于 RBM3 的 CI 水平对诊断为浆液性癌的 90 名患者的存活分析的结果。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表高 RBM3 水平 ($CI = 2$), 虚线代表低 RBM3 水平 ($CI < 2$)。图 13A 示出了 OS。图 13B 示出了 OCSS。

[0041] 图 14 示出了基于 RBM3 的 NI 水平对诊断为 1 级或 2 级浆液性癌的 23 名患者的 OS 分析的结果。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表高 RBM3 水平 ($NI = 3$), 虚线代表低 RBM3 水平 ($NI < 3$)。图 14A 示出了 OS。图 14B 示出了 OCSS。

[0042] 图 15 示出了 RBM3 水平对诊断为卵巢上皮癌 (EOC) 的患者的 OS 的影响。将全部 149 名受试者用 1B5 单克隆抗体染色。在图 15A 中, 基于染色分值 (SS) 状态将全部受试者分为 3 组。在图 15B 中, RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表 RBM3 表达的高 SS ($SS > 0$), 虚线代表 RBM3 表达的低 SS ($SS = 0$)。

[0043] 图 16 示出了 RBM3 水平对诊断为卵巢上皮癌 (EOC) 的患者的 OCSS 的影响。将全部 149 名受试者用 1B5 单克隆抗体染色。在图 16A 中, 基于 SS 将全部受试者分为 3 组。在图 16B 中, RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表 RBM3 表达的高 SS ($SS > 0$), 虚线代表 RBM3 表达的低 SS ($SS = 0$)。

[0044] 图 17 示出了 RBM3 水平对诊断为 1 级或 2 级 EOC 的患者的 OS 的影响。将全部 44 名受试者用 1B5 单克隆抗体染色。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表 RBM2 表达的高 SS ($SS > 0$), 虚线代表 RBM3 表达的低 SS ($SS = 0$)。

[0045] 图 18 示出了 RBM3 水平对诊断为内膜样 EOC 的患者的 OS 的影响。将全部 35 名受试者用 1B5 单克隆抗体染色。RBM3 表达被二分为高组和低组。实线代表 RBM2 表达的高 SS ($SS > 2$), 虚线代表 RBM3 表达的低 SS ($SS = 2$)。

[0046] 图 19 示出了具有高 RBM3mRNA 水平的卵巢癌患者 (实线) 和具有低 RBM3mRNA 水平的卵巢癌患者 (虚线) 的无复发存活率。

[0047] 图 20 示出了睾丸癌患者中的 RBM3 蛋白表达。患者被分为 4 个不同的预后组: 不良预后、中等预后、良好预后和精原细胞瘤。

[0048] 图 21 示出了睾丸癌患者中的 RBM3 蛋白表达。患者被分为 2 个不同的预后组: 患病组或存活组。

[0049] 图 22 示出了顺铂敏感细胞系 (A2780) 和顺铂抗性细胞系 (A2780-cp70) 中 RBM3 表达的蛋白质印迹。

[0050] 图 23 示出了顺铂敏感细胞系 (A2780) 和顺铂抗性细胞系 (A2780-cp70) 中顺铂处理后的生存力百分数。将细胞用顺铂处理 48 小时, 然后分析生存力。

[0051] 图 24 示出了以 3 种不同抗 RBM3 的 siRNA 处理的细胞 (虚线) 以及未暴露于 siRNA 处理的对照细胞 (实线) 中顺铂处理后的生存力百分数。

具体实施方式

[0052] 本公开的第一方面提供了一种确定患有癌症的哺乳动物受试者属于第一组还是第二组的方法, 其中第一组受试者对基于铂的治疗的反应性比第二组受试者更强, 所述方法包括步骤:

[0053] a) 评估之前从所述受试者获得的样品的至少一部分中存在的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量, 并确定所述量对应的样品值;

[0054] b) 将在步骤 a) 中获得的样品值与参照值比较 ; 并且,

[0055] 如果所述样品值高于所述参照值,

[0056] c1) 那么得出结论所述受试者属于所述第一组 ; 并且

[0057] 如果所述样品值低于或等于所述参照值,

[0058] c2) 那么得出结论所述受试者属于所述第二组。

[0059] 第一组与第二组的差别在于第一组受试者通常对基于铂的治疗的反应性比第二组受试者更强。这意味着如果给予基于铂的治疗方案, 那么第一组受试者通常比给予相同治疗方案的第二组受试者存活几率更高, 或者第一组受试者通常比第二组受试者需要更低的剂量来达到给定的存活几率。此处, 存活可以以总存活率、无复发存活率或癌症类型特异性存活率来度量。

[0060] 从而确定癌症受试者属于第一组还是第二组, 其中第一组受试者通常对基于铂的治疗的反应性比第二组受试者更强。通过比较患有给定癌症的受试者的样品值与参照值, 确定将所述受试者划分为所述两组。因此, 所述参照值是各组大小的决定因素 ; 所述参照值越高, 第一组中的受试者就越少, 被测受试者属于第一组的可能性也越小。

[0061] 为避免疑问, 第一组和第二组由患有相同类型癌症的受试者作为被测受试者组成。因此, 卵巢癌受试者不与患有睾丸癌的受试者进行比较或编组。此外, 第一组和第二组可由癌症时期和 / 或亚型相同或相似的受试者作为被测受试者组成。此外, 这两组可由年龄、种族、性别、更年期状态、遗传特性和 / 或健康状态或病史相同或相似的受试者作为被测受试者组成。

[0062] 本公开基于发明人的以下观点 : 从患有癌症的受试者获得的样品中的 RBM3 表达可用作所述受试者对基于铂的治疗的反应性的指示物。发明人已经确定了 RBM3 值与对基于铂的治疗的反应性之间的关系。通常, 本文显示高 RBM3 值与对基于铂的治疗的相对高反应性相关。

[0063] 基于铂的治疗已被证明在多种癌症类型中有效。然而, 所述治疗经常伴随副作用, 有时伴有严重的副作用。因此, 发明人已经得出结论 : 使所述治疗的剂量 (即所述治疗的强度) 适合癌症受试者的反应性从而避免不必要的过度治疗是有利的。即, 高反应受试者可能需要比低反应受试者低的剂量。此外, 鉴定不大可能对所述治疗有反应的受试者是有利的。这些受试者应该使用其他方案进行治疗。

[0064] 总之, 在决定是否施用基于铂的治疗以及决定所述治疗的强度 (在发现基于铂的治疗合适的情况下) 时, 上述方法可帮助负责治疗癌症受试者的医师。

[0065] 如果上述方法的癌症受试者被发现属于第一组, 那么医师的决定可因此为以较低的剂量施用基于铂的治疗。然而, 如果所述癌症受试者被发现属于第二组, 那么医师的决定可为以较高的剂量下施用基于铂的治疗, 或者放弃基于铂的治疗, 可能选用另一种治疗。

[0066] 因此, 本公开的第二方面还提供了一种确定患有癌症的哺乳动物受试者的基于铂的治疗的强度水平的方法, 包括步骤 :

[0067] a) 评估之前从所述受试者获得的样品的至少一部分中存在的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量, 并确定所述量对应的样品值 ;

[0068] b) 将在步骤 a) 中获得的样品值与参照值比较 ; 并且,

[0069] 如果所述样品值高于所述参照值,

- [0070] c1) 那么得出结论所述受试者应接受第一强度的基于铂的治疗 ; 并且
- [0071] 如果所述样品值低于或等于所述参照值,
- [0072] c1) 那么得出结论所述受试者应接受第二强度的基于铂的治疗,
- [0073] 其中所述第二强度高于所述第一强度。
- [0074] 上述第二方面方法可与患有卵巢癌或睾丸癌的受试者特别相关, 目前在世界上的许多地方这些受试者几乎都是以基于铂的治疗进行治疗。
- [0075] 强度水平可例如以给予所述受试者的基于铂的治疗剂的平均每日或每周剂量来度量。第二强度的治疗可因此比第一强度的治疗更频繁地施用或者以更高单独剂量施用。所述第二强度的治疗还可包含施用比第一强度的治疗更有力的基于铂的治疗剂。另一种可能性是第二强度的治疗比第一强度的治疗的施用时间更长。
- [0076] 在第二方面的一个实施方案中, c1) 可因此得出结论所述受试者应在第一段时间内接受基于铂的治疗, c2) 可得出结论所述受试者应在第二段时间内接受基于铂的治疗, 其中所述第二段时间比所述第一段时间长。
- [0077] 作为第二方面的替代形式, 提供了一种确定患有癌症的哺乳动物受试者是否放弃基于铂的治疗的方法, 包括步骤:
- [0078] a) 评估之前从所述受试者获得的样品的至少一部分中存在的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量, 并确定所述量对应的样品值;
- [0079] b) 将在步骤 a) 中获得的样品值与参照值比较 ; 并且,
- [0080] 如果所述样品值低于或等于所述参照值,
- [0081] c) 放弃以基于铂的治疗来治疗所述受试者。
- [0082] 第二方面的该替代实施方案与患有以下癌症的受试者特别相关 : 对于这些癌症, 不认为基于铂的治疗是标准治疗, 所述癌症例如除卵巢癌和睾丸癌之外的所有癌症。
- [0083] 根据本公开的教导, 在任何情况下, 高 RBM3 癌症受试者均有可能从基于铂的治疗中获益。因此, 本公开的第三方面还提供了一种治疗患有癌症的哺乳动物受试者的方法, 包括步骤:
- [0084] a) 评估从所述受试者获得的样品的至少一部分中存在的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量, 并确定所述量对应的样品值;
- [0085] b) 将在步骤 a) 中获得的样品值与参照值比较 ; 并且,
- [0086] 如果所述样品值高于所述参照值,
- [0087] c) 对所述受试者施用基于铂的治疗。
- [0088] 该治疗方法可限于决策制定和治疗。因此, 作为所述第三方面的一种形式, 提供了一种治疗患有癌症的受试者的方法, 包括:
- [0089] α) 将与所述受试者的样品中的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 水平对应的样品值与参照值进行比较 ; 并且,
- [0090] 如果所述样品值高于所述参照值,
- [0091] β) 对所述受试者施用基于铂的治疗。
- [0092] 本公开描述了获得与受试者的样品中的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 水平对应的样品值的多种方法, 本公开还提供了 (临床) 相关参照值的多个实例。
- [0093] 关于本公开方法的步骤 a), RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量增加通常可导致所述样品

值增大,而不是所述样品值增大可导致 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量增加。然而,在某些实施方案中,所述评估量可对应于预定数量的离散样品值的任一个。在这些实施方案中,第一个量和增大的第二个量可对应于相同的样品值。在本公开上下文中,在任何情况下,RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量增加都不会导致样品值的减小。

[0094] 然而,一种不方便但等价的形式是,如果步骤 b) 与 c) 之间的限定条件反转,那么所述评估量可与样品值反向相关。例如,如果短语“如果所述样品值高于所述参照值”替换为“如果所述样品值低于所述参照值”,那么步骤 b) 与 c) 之间的限定条件就反转。

[0095] 负责治疗癌症受试者的医师在为所述受试者决定合适治疗方案时可考虑数个参数,例如免疫组织化学评估结果、患者年龄、激素受体状态、患者全身状况、病史(如癌症史)和遗传特性(如所述受试者家族中是否存在癌症史)。为了在所述决定中得到指导,医师可根据上述方法的任一种进行 RBM3 测试,或要求进行 RBM3 测试。此外,医师还可指派其他人例如实验室工作人员进行步骤 a) 并任选地进行步骤 b),而亲自进行步骤 c) 并任选地进行步骤 b)。

[0096] 作为上述方法的变化形式,提供了一种预测患有癌症的哺乳动物受试者对基于铂的治疗的反应性的方法,包括步骤:

[0097] a) 评估从所述受试者获得的样品的至少一部分中存在的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量,并确定所述评估量对应的样品值;

[0098] b) 使步骤 a) 的样品值与预测的对所述治疗的反应性关联。

[0099] 在一个实施方案中,所述样品可为之前获得的样品。

[0100] 步骤 b) 的关联是指使存活数据与所获得样品值关联以建立所述治疗预测的任何方式。根据本公开的教导,技术人员无需过度负担即可判断预测的反应性。

[0101] 在本公开的方法的上下文中,“之前获得的”是指在实行该方法之前获得的。因此,如果将之前从受试者获得的样品用于某一方法,那么所述方法不包括从所述受试者获得样品,即所述样品是之前在独立于所述方法的步骤中从所述受试者获得的。

[0102] 本公开的所有方法和用途,除治疗方法以外,均可完全在体外进行。

[0103] 此外,在本公开上下文中,“患有癌症的哺乳动物受试者”是指患有原发性或继发性肿瘤的哺乳动物受试者或者已将所述肿瘤除去的哺乳动物受试者,其中除去所述肿瘤是指通过任何类型的外科手术或治疗杀死或除去所述肿瘤。在后一种情况下,所述肿瘤可例如被除去不到一年。例如,肿瘤已通过外科手术除去并准备进行辅助治疗的受试者在本公开上下文中被认为“患有癌症”。在本公开的方法和用途方面中,“患有癌症的哺乳动物受试者”还包括以下情况,即其中所述哺乳动物受试者在实行所述用途或方法之时疑似患有癌症并且该癌症诊断后来被确认。

[0104] 此外,在本公开上下文中,所述“参照值”是指对作出与治疗或治疗预测有关的决策或得出相关结论的预定值。在本公开教导的指导下,本领域技术人员无需过度负担即可选择相关的参照值。

[0105] 上述方面的方法的步骤 a) 包括评估所述样品的至少一部分中存在的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量,并确定所述量对应的样品值。“样品的至少一部分”是指用于建立与合适治疗相关的反应性水平或得出相关结论的所述样品的一个或多个相关部分。本领域技术人员理解在实行所述方法时的条件下哪个或哪些部分是相关的。例如,如果评估包含细胞的样

品,那么技术人员可仅考虑所述样品的肿瘤细胞,或仅考虑所述样品的肿瘤细胞的细胞核或细胞质。

[0106] 此外,在步骤 a) 中,对量进行评估并确定该量对应的样品值。因此,对于获得所述样品值,不需要精确测量 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量。例如,RBM3 蛋白的量可通过肉眼检查制备和染色的组织样品进行评估,然后可基于所述评估量将所述样品值分为例如高组或低组。

[0107] 步骤 a) 的评估和确定需要对样品进行某种处理或操作。不可能仅通过观察来确定所述样品值。用于所述评估和确定的多种技术(下文列出了其中的一些)为技术人员所公知。因此,本公开的方法不限于任何用于实行步骤 a) 的具体技术。

[0108] 在下面的实施例中,显示 RBM3 蛋白或 mRNA 表达的水平与以基于铂的治疗剂治疗的卵巢癌和睾丸癌受试者的存活关联。因此,RBM3 蛋白或 mRNA 的差别表达及其治疗预测相关性的发现构成了本公开的基础。除了卵巢癌和睾丸癌以外,RBM3 蛋白还在多种癌症类型中差别表达,如表 2 所示(实施例,第 7b 节)。因此,本发明人得出结论,在卵巢癌和睾丸癌中的发现可能可扩展至其他癌症类型。具体而言,可注意到 RBM3 蛋白被显示在睾丸癌、卵巢癌、肺癌、尿路上皮癌、结直肠癌、宫颈癌、乳腺癌和头颈癌中差别表达,这些是目前被认为适合基于铂的治疗的所有癌症类型。

[0109] 因此,在本公开的实施方案中,所述癌症选自睾丸癌、卵巢癌、肺癌、膀胱癌、结直肠癌、宫颈癌和头颈癌(尿路上皮癌是一种类型的膀胱癌)。

[0110] 在某些实施方案中,所述癌症选自卵巢癌和睾丸癌。在世界上许多地方,患有卵巢癌或睾丸癌的受试者几乎总被给予基于铂的治疗,因此本公开的发现与这些癌症类型特别相关。

[0111] 如果本公开的癌症是卵巢癌,那么根据一个实施方案,所述卵巢癌可为中度分化或高度分化的卵巢癌(参见图 7、8、14 和 17),根据另一个替代的或补充的实施方案,所述卵巢癌可处于根据国际妇产科协会(FIGO)分类的 1 期或 2 期(参见图 9 和 11),根据又一个替代的或补充的实施方案,所述卵巢癌为浆液性卵巢癌(参见图 12、13 和 14)或子宫内膜样卵巢癌(参见图 10、11 和 17)。

[0112] 如果本公开的癌症是睾丸癌,那么根据一个实施方案,所述睾丸癌可为睾丸生殖细胞癌,根据一个替代的或补充的实施方案,所述睾丸癌可为非精原细胞型睾丸癌。

[0113] 如果本公开的癌症是结直肠癌,那么根据一个实施方案,所述结直肠癌可为较晚期的结直肠癌,例如 Dukes C 期或 D 期的癌症。然而,Dukes B 期的癌症也可以是相关的,因为在该期的癌症中有复发的风险。因此,高 RBM3 的 Dukes B 期受试者可被给予基于铂的治疗以防止复发。

[0114] 如果本公开的癌症是肺癌,那么根据一个实施方案,所述肺癌可为小细胞肺癌或非小细胞肺癌。

[0115] 如果本公开的癌症是乳腺癌,那么根据一个实施方案,所述乳腺癌可为三阴乳腺癌,即雌激素受体、孕酮受体和 HER2 受体均为阴性的乳腺癌。目前三阴乳腺癌受试者被认为特别难以治疗,并且正在进行临床试验,其中所述受试者用基于铂的药剂顺铂进行治疗。

[0116] 基于铂的治疗包括施用基于铂的治疗剂。卡铂(包括铂尔定(paraplatin))、奥沙利铂、沙铂、吡铂和顺铂是目前临床上使用的一些基于铂的治疗剂。顺铂——其在下文的实

施例中使用——广泛用于临床,例如用于治疗卵巢癌、小细胞肺癌和睾丸癌。奥利沙铂在临床上用于治疗结直肠癌,经常与氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸结合使用。卡铂也用于临床,例如用于治疗卵巢癌、肺癌和头颈癌。在肺癌中,其经常与吉西他滨 (gemcitabine) 结合使用。

[0117] 在本公开的实施方案中,基于铂的治疗因此可为施用选自卡铂、奥利沙铂、沙铂、吡铂和顺铂的药剂。在所述癌症为卵巢癌或肺癌的实施方案中,所述药剂可为例如顺铂和卡铂。在所述癌症为结直肠癌的实施方案中,所述药剂可为例如奥利沙铂。在所述癌症为睾丸癌的实施方案中,所述药剂可为例如顺铂。

[0118] 在上述方面的方法的实施方案中,所述样品可为体液样品。例如,所述体液样品可选自血液、血浆、血清、脑脊液、尿液、淋巴液、精液和渗出液。或者,所述样品可为细胞学样品或粪便样品。

[0119] RBM3 蛋白的水平可优选在细胞内或者在源于细胞的材料中测量。因此,所述体液、细胞或粪便样品例如可包含细胞如肿瘤细胞。

[0120] 在上述方面的方法的其他实施方案中,所述样品可为组织样品例如肿瘤样品,例如来自之前进行手术从所述受试者除去肿瘤的肿瘤样品。

[0121] 此外,发明人已经注意到,RBM3 蛋白的细胞核和 / 或细胞质表达与确定对基于铂的治疗的反应性的水平或者选择治疗相关。例如,RBM3 蛋白的细胞核与细胞质表达都被发现与直结肠癌、卵巢癌和睾丸癌有关。因此,步骤 a) 的评估可限于所述样品的细胞 (例如肿瘤细胞) 的细胞核与细胞质。因此,当检查组织样品时,可以只考虑肿瘤细胞的细胞核或细胞质。所述检查可辅以例如免疫组织化学染色。

[0122] 当实行上述方面的方法时,可以方便地使用零作为参照值,因为在这种情况下,在步骤 a) 中只需要确定样品中是否存在 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA。图 15b 和 17 表明,零 (即无可检出的 RBM3 蛋白) 是确定不同存活率的两个亚组的有效截取值。

[0123] 因此,在上述方面的方法的实施方案中,步骤 a) 的样品值可为 1 (对应于样品中有可检出 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA) 或 0 (对应于样品中无可检出的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA)。因此,在所述实施方案中,所述样品的评估是数字式的:RBm3 蛋白或 RBM3mRNA 被认为要么存在,要么不存在。在本公开上下文中,“无可检出的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA”是指 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量太少以至于在正常操作条件下通过进行步骤 a) 的人或设备无法检出。所述“正常操作条件”是指本领域技术人员认为适合用于实行本公开方法的实验室方法和技术。

[0124] 因此,在本公开方法的实施方案中,步骤 b) 的参照值可为 0。因而,在本公开方法的其他实施方案中,步骤 b) 的参照值可对应于无可检出的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的参照样品 (见下文)。

[0125] 高于所述参照值的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的样品值,或者从中获得该样品值的受试者,在本文中有时称为“高 RBM3”。此外,低于或等于所述参照值的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的样品值,或者从中获得该样品值的受试者,在本文中有时称为“低 RBM3。”

[0126] 在本公开上下文中,术语“样品值”和“参照值”被广义地解释。对 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 定量以获得这些数值可经自动方式、经基于肉眼检查或显微镜检查样品的评分系统或者经这些方式的结合进行。然而,对于技术人员例如组织病理学领域的技术人员,还可能通过检查例如已被制备并就 RBM3 蛋白表达染色的组织切片来确定所述样品值和参照

值。因此,确定所述样品值高于所述参照值可对应于——通过肉眼检查或显微镜检查——确定样品组织切片染色更强并且 / 或者呈现比参照组织切片更大比例的染色细胞。所述样品值还可与参考文献给出的参照值比较,例如以文字或通过参考图片描述的参照值。因此,所述样品值和 / 或参照值在某些情况下可为技术人员根据检查和比较确定的心理值 (mental value)。

[0127] 本公开方法的一个或多个步骤可在设备中实现。例如,步骤 a) 并且任选还有步骤 b) 可在自动分析设备中进行,这种设备可基于适合用于免疫组织化学分析的平台。作为一个实例,可手工制备来自目标受试者的一个或多个肿瘤组织样品用于免疫组织化学分析,然后装载到所述自动分析设备中,所述自动样品设备给出步骤 a) 的样品值,并且任选还进行与步骤 b) 的参照值的比较。然后,进行所述分析的操作员、要求所述分析的医师或所述设备本身可得出步骤 c) 的结论。因此,适合得出步骤 c) 的结论的软件可在所述设备上执行。

[0128] 可以以多种方式提供被发现与对癌症受试者建立治疗预测或制定治疗决策相关的参照值,用于与来自所述受试者的样品值比较。根据本公开的教导,技术人员无需过度负担即可提供实行本公开的方法的相关参照值。

[0129] 例如,进行上述方面的方法的人员可例如将所述参照值改为所需的信息。例如,可改变所述参照值以产生关于存活的最有意义的信息,例如高 RBM3 存活曲线与低 RBM3 存活曲线之间的最大分离 (参见附图),所述分离对应于第一方面的第一组与第二组之间的最大存活差异。或者,可选择所述参照值,使得反应性特别高或反应性特别低的一组受试者被挑出。

[0130] 在上述方面的方法的实施方案中,所述参照值可对应于在包含肿瘤细胞的参照样品例如肿瘤组织的参照样品中测得的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量。所述参照样品的蛋白表达量优选可在之前确定。因此,所述参照值可由在参照样品中测得的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量提供,所述参照样品包含表达预定量的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的细胞。

[0131] 此外,所述参照值可例如由在参照样品中测得的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的量提供,所述参照样品包含表达预定量或受控量的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的细胞系例如癌细胞系。本领域技术人员理解如何提供所述细胞系,例如由 Rhodes et al. (2006) *The biomedical scientist*, p 515-520 的公开指导。

[0132] 然而,如下面进一步讨论的,所述参照样品中 RBM3 蛋白的量不必直接对应于所述参照值。所述参照样品还可提供帮助实行本发明的人员评定多个参照值的 RBM3 蛋白量。例如,所述参照值可通过提供“阳性”参照值和 / 或“阴性”参照值而帮助建立所述参照值的心理映像 (mental image)。

[0133] 用于定量样品 (例如之前从所述受试者获得的样品或所述参照样品) 中 RBM3 蛋白表达的一个替代方案是确定所述样品中呈现 RBM3 蛋白表达超过某一水平的细胞比例。所述比例例如可为:“细胞比例”,其中考虑整个细胞的 RBM3 蛋白表达;“细胞质比例”,其中只考虑细胞的细胞质的 RBM3 蛋白表达;或者“细胞核比例”,其中只考虑细胞的细胞核的 RBM3 蛋白表达。所述细胞核比例例如可分为占相关细胞群体 < 2%、2-25%、> 25-75% 或 > 75% 的免疫反应性细胞。所述“细胞核比例”对应于在细胞核中呈现阳性染色的样品中相关细胞的百分数,其中所述细胞核中的中度免疫反应性或者明显和强免疫反应性被认为

是阳性,而细胞核中无免疫反应性或弱免疫反应性被认为是阴性。所述“细胞质比例”对应于在细胞质中呈现阳性染色的样品中相关细胞的百分数,其中所述细胞质中的中度免疫反应性或者明显和强免疫反应性被认为是阳性,而所述细胞质中无免疫反应性或弱免疫反应性被认为是阴性。病理学领域的技术人员理解,哪些细胞在实行所述方法时的条件下是相关的,并且可基于其常识和本公开的教导确定细胞核比例或细胞质比例。所述相关细胞例如可为肿瘤细胞。此外,技术人员理解如何利用所述“细胞比例”进行相应测量。

[0134] 用于定量样品(例如之前从所述受试者获得的样品或所述参照样品)中 RBM3 蛋白表达的另一个替代方案是确定所述样品的总染色强度。所述强度例如可为:“细胞强度”,其中考虑整个细胞的 RBM3 蛋白表达;“细胞质强度”,其中只考虑细胞的细胞质的 RBM3 蛋白表达;或者“细胞核强度”,其中只考虑细胞的细胞核的 RBM3 蛋白表达。细胞核强度根据临床组织病理学诊断使用的标准进行主观评估。细胞核强度测定的结果可分为:无=所述样品的相关细胞的细胞核中无总免疫反应性,弱=所述样品的相关细胞的细胞核中有微弱的总免疫反应性,中度=所述样品的相关细胞的细胞核中有中度总免疫反应性,或者强=所述样品的相关细胞的细胞核中有明显和强总免疫反应性。细胞强度测定的结果可分为:无=所述样品的相关细胞的细胞质中无总免疫反应性,弱=所述样品的相关细胞的细胞质中有微弱的总免疫反应性,中度=所述样品的相关细胞的细胞质中有中度总免疫反应性,或者强=所述样品的相关细胞的细胞质中有明显和强总免疫反应性。在某些实施方案中,所述弱值和中度值可合并为弱/中度值。本领域技术人员理解,哪些细胞在实行所述方法时的条件下是相关的,并且可基于其常识和本公开的教导确定细胞核强度或细胞质强度。所述相关细胞例如可为肿瘤细胞。此外,技术人员理解如何利用所述“细胞强度”进行相应测量。

[0135] 因此,在上述方面的方法的实施方案中,所述参照值可为细胞核比例、细胞核强度、细胞核比例与细胞核强度的结合、细胞质比例、细胞质强度或者细胞核比例与细胞核强度的结合。

[0136] 如附图所示,多于一个基于 RBM3 蛋白表达的参照值可用作确定反应性水平的相关参照值。

[0137] 因此,在上述方面的方法的实施方案中,步骤 b) 的参照值是 95%或更低的细胞核比例或细胞质比例,例如 90%或更低、例如 85%或更低、例如 80%或更低、例如 75%或更低、例如 70%或更低、例如 65%或更低、例如 60%或更低、例如 55%或更低、例如 50%或更低、例如 45%或更低、例如 40%或更低、例如 35%或更低、例如 30%或更低、例如 25%或更低、例如 20%或更低、例如 15%或更低、例如 10%或更低、例如 5%或更低、例如 2%或更低、例如 1%或更低、例如 0%。

[0138] 此外,在上述方面的方法的实施方案中,步骤 b) 的参照值可为中度或更低的细胞核强度或细胞质强度,例如弱或更低的细胞核强度或细胞质强度,例如无细胞核强度或细胞质强度。

[0139] 同时,在上述方面的方法的实施方案中,所述参照值可为比例值与强度值的结合或函数。所述参照值因此可涉及两个甚至更多个标准。这种结合的参照值的实例见下表 1。在上述方面的方法的实施方案中,所述参照值因此可为 2 或更低的“染色分值”(SS),例如 1 或更低,例如 0。

[0140] 通常,选择强度值和 / 或比例值作为所述参照值可依赖于染色方法,例如依赖于所用抗体的类型和量 / 浓度并依赖于染色试剂的类型和浓度。

[0141] 由本公开指导,本领域技术人员例如病理学家理解如何进行检测,得出比例(例如细胞比例、细胞质比例或细胞核比例)或者强度(例如细胞强度、细胞质强度或细胞核强度)。例如,技术人员可使用包含预定量的 RBM3 蛋白的参照样品,用于建立某些比例或强度的表观值(appearance)。

[0142] 然而,参照样品不仅可用于提供实际参照值,而且可用于提供 RBM3 蛋白的量高于所述参照值对应的量的样品实例。作为实例,在组织化学染色中,例如在免疫组织化学染色中,技术人员可使用参照样品来建立具有高 RBM3 蛋白量的染色样品的表观值(例如阳性参照)。随后,技术人员可评定具有较低 RBM3 蛋白量的样品的表观值,例如 RBM3 蛋白量对应于所述参照值的样品的表观值。换言之,技术人员可使用参照样品来生成参照值的心理映像,所述参照值对应于低于所述参照样品的 RBM3 蛋白量的 RBM3 蛋白量。或者,或作为补充,在所述评定中,技术人员可使用具有低 RBM3 蛋白量或无可检出的 RBM3 蛋白的另一参照样品来建立这些样品的表观值,例如作为“阴性参照”。

[0143] 例如,如果使用中度细胞核强度作为所述参照值,那么可使用两个参照样品:无可检出的 RBM3 蛋白并因此对应于无细胞核强度的第一参照样品,所述细胞核强度低于所述参照值;和具有对应于强细胞核强度的 RBM3 蛋白量的第二参照样品,所述细胞核强度高于所述参照值。

[0144] 因此,在所述评估中,技术人员可使用参照样品来建立具有高 RBM3 蛋白量的样品的表观值。所述参照样品可为包含表达高 RBM3 蛋白量的组织的样品,例如包含具有预先建立的 RBM3 蛋白高表达的肿瘤组织的样品。

[0145] 因此,所述参照样品可提供强细胞核强度(NI)的实例。根据具有强 NI 的样品的表观值,技术人员随后可将样品分成无、弱、中度和强 NI 组中。无可检出的 RBM3 蛋白的参照样品(阴性参照),即提供无细胞核强度的参照样品,可进一步帮助这种划分。同时,所述参照样品可提供细胞核比例(NF)高于 75%的样品的实例。根据阳性细胞多于 75%的样品的表观值,技术人员随后可评估例如阳性细胞百分数较小的其他样品的 NF。基本无 RBM3 蛋白的参照样品(阴性参照),即提供低 NF(例如< 5%,如< 2%)或 NF 为 0 的参照样品,可进一步帮助这种划分。这同样适用于细胞质强度和细胞质比例。

[0146] 如上所述,可使用表达受控量的 RBM3 蛋白的细胞系作为所述参照,特别是作为阳性参照。

[0147] 可提供一张或多张图像作为所述“参照样品”。例如,这类图像可显示在某些条件下以某种抗体染色并呈现某种细胞核或细胞质强度和 / 或比例的肿瘤组织切片的实例。上述关于所述“参照样品”的讨论作必要的修正后适用于图像。

[0148] 所述细胞系或图像还可构成本公开的试剂盒的一部分(见下文)。

[0149] 此外,技术人员应认识到上述方面的方法的应用不限于定量目标受试者中存在的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 任何具体变体,只要蛋白或 mRNA 由相关基因编码并呈现相关的表达模式即可。

[0150] 作为一个非限制性的实例,RBM3 蛋白可包含选自以下的序列:

[0151] i) SEQ ID NO:1;和

[0152] ii) 与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同的序列。

[0153] 在某些实施方案中, 上面的序列 ii) 与 SEQ ID NO:1 至少 90% 相同, 至少 91% 相同, 至少 92% 相同, 至少 93% 相同, 至少 94% 相同, 至少 95% 相同, 至少 96% 相同, 至少 97% 相同, 至少 98% 相同或至少 99% 相同。

[0154] 作为另一个非限制性的实例, RBM3 蛋白可包含选自以下的序列或由选自以下的序列组成:

[0155] i) SEQ ID NO:2; 和

[0156] ii) 与 SEQ ID NO:2 至少 85% 相同的序列。

[0157] 在某些实施方案中, 上面的序列 ii) 与 SEQ ID NO:2 至少 90% 相同, 至少 91% 相同, 至少 92% 相同, 至少 93% 相同, 至少 94% 相同, 至少 95% 相同, 至少 96% 相同, 至少 97% 相同, 至少 98% 相同或至少 99% 相同。

[0158] 作为另一个非限制性的实例, 本公开的 RBM3mRNA 可包含以下序列或由以下序列组成:

[0159] i) 对应于 SEQ ID NO:3 的序列, 或

[0160] ii) 与上述序列至少 85% 相同的序列。

[0161] 在某些实施方案中, 上面的序列 ii) 与序列 i) 至少 90% 相同, 至少 91% 相同, 至少 92% 相同, 至少 93% 相同, 至少 94% 相同, 至少 95% 相同, 至少 96% 相同, 至少 97% 相同, 至少 98% 相同或至少 99% 相同。

[0162] 本公开上下文中所用的术语“% 相同”计算如下。使用 CLUSTAL W 算法 (Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J., Nucleic Acids Research, 22:4673-4680 (1994)) 对所述查询序列与靶序列进行比对。比较每个位置的氨基酸残基, 所述查询序列在所述靶序列中具有相同对应性的位置百分数被报告为 % 相同。同时, 所述靶序列确定进行比较的位置的数目。因此, 在本公开上下文中, 短于所述靶序列的查询序列不可能与所述靶序列 100% 相同。例如, 85 个氨基酸的查询序列与 100 个氨基酸的靶序列可最多 85% 相同。此在作必要修正后对应于核酸序列。

[0163] 在某些实施方案中, 上述方面的方法的步骤 a) 可包含:

[0164] 从所述受试者获取生物材料, 切除或选择所述生物材料的相关部分以获得所述样品, 并任选将所述样品置于固相上以有利于步骤 a) 的评估。因此, 步骤 a) 例如可包含从所述受试者获取肿瘤组织材料, 任选将所述组织材料固定在石蜡或福尔马林中, 组织学处理所述组织材料以获得构成所述样品的切片, 并任选将所述切片封固在透明载物片 (例如玻片) 上用于显微镜检查。

[0165] 在上述方面的方法的实施方案中, RBM3 蛋白可通过对所述样品施用可检测和 / 或可定量的亲和配体进行检测和 / 或定量, 所述亲和配体能够选择性与 RBM3 蛋白相互作用。所述亲和配体的施用为使所述亲和配体与所述样品中 RBM3 蛋白能够结合的条件下进行。

[0166] 具体地, 在上述方面的方法的实施方案中, 步骤 a) 可包括:

[0167] a1) 对所述样品施用能够选择性与 RBM3 蛋白相互作用的可定量的亲和配体以进行评估, 所述施用为使所述亲和配体与所述样品中存在的 RBM3 蛋白能够结合的条件下进行;

[0168] a2) 除去未结合的亲和配体; 并且

[0169] a3) 定量与所述样品保持结合的亲和配体以评估所述量。

[0170] “与所述样品保持结合的亲和配体”是指在步骤 a2) 中未被除去的亲和配体,例如与所述样品结合的亲和配体。这里,所述结合例如可为抗体与抗原之间的相互作用。

[0171] 然而,在某些实施方案中,a2) 的除去未结合的亲和抗体,例如洗涤,并不总是必需的。因此,在上述方面的方法的某些实施方案中,步骤 a) 可包括:

[0172] a1) 对所述样品施用能够选择性与 RBM3 蛋白相互作用的可定量的亲和配体以进行评估,所述施用在使所述亲和配体与所述样品中存在的 RBM3 蛋白能够结合的条件下进行;

[0173] a11) 定量与所述样品结合的亲和配体以评估所述量。

[0174] 在本公开上下文中,例如亲和配体与其靶标或抗原的“特异性”或“选择性”相互作用是指这种相互作用使得特异性相互作用与非特异性相互作用之间、选择性相互作用与非选择性相互作用之间的区别有意义。两种蛋白之间的相互作用有时通过解离常数度量。解离常数描述了两种分子之间结合(或亲和)的强度。通常,抗体及其抗原之间的解离常数为 10^{-7} 到 10^{-11} M。然而,高特异性/选择性不必然要求高亲和性。对其配对物具有低亲和性(在摩尔范围内)的分子已经被证明与具有高得多的亲和性的分子的选择性/特异性一样。对于本公开,特异性或选择性相互作用是指以下程度,即达到所述程度时可使用具体方法在生物来源的样品(例如制备的组织样品或者天然或处理过的生物液体的液体样品)中存在其他蛋白的情况下在给定条件下确定某种蛋白即靶蛋白的存在和/或量。换言之,特异性或选择性是区分相关蛋白的能力。在本说明书中,特异性和选择性有时互换使用。例如,抗体的特异性或选择性可如下面的实施例第2节中所述来确定,其中分别使用蛋白阵列设置、悬浮微珠阵列和多重竞争阵列进行分析。Nilsson P et al. (2005) *Proteomics* 5: 4327-4337 中也描述了特异性和选择性确定。

[0175] 选择或制造合适的亲和配体以及选择用于检测和/或定量的合适形式和条件,被认为在本领域普通技术人员的能力范围之内。尽管如此,在下面仍给出被证明可用的亲和配体的实例,以及用于检测和/或定量的形式和条件的实例,目的是进行说明。

[0176] 因此,在本公开的实施方案中,所述亲和配体可选自抗体、其片段和其衍生物,即基于免疫球蛋白支架的亲和配体。所述抗体及其片段或衍生物可以是分离的。抗体包含任何来源的单克隆和多克隆抗体,包括鼠抗体、兔抗体、人抗体和其他抗体,以及含有来自不同物种的序列的嵌合抗体,例如部分人源化的抗体如部分人源化的小鼠抗体。多克隆抗体通过用所选抗原免疫动物而产生。所述多克隆抗体可为单特异性的。具有明确特异性的单克隆抗体可使用 **Köhler** 和 Milstein 开发的杂交瘤技术来产生 (**Köhler** G and Milstein C (1976) *Eur. J. Immunol.* 6:511-519)。本公开的抗体片段和衍生物能够同所述抗体(所述片段和衍生物是它的片段和衍生物)一样与相同抗原(例如 RBM3 蛋白)选择性相互作用。抗体片段及衍生物包括 Fab 片段(它由完整免疫球蛋白的重链第一恒定区(CH1)、轻链恒定区(CL)、重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)组成)、Fv 片段(它由抗体的两个可变区 VH 和 VL 组成 (Skerra A and Plückthun A (1988) *Science* 240: 1038-1041))、单链 Fv 片段(scFv)(它由通过柔性肽接头连接在一起的 VH 和 VL 两个区组成 (Bird RE and Walker BW (1991) *Trends Biotechnol.* 9:132-137))、Bence Jones 二聚体 (Stevens FJ et al (1991) *Biochemistry* 30:6803-6805)、骆驼 (camelid) 重链二聚

体 (Hamers-Casterman C et al. (1993) *Nature* 363 :446-448) 和单链可变区 (Cai X and Garen A (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 :6280-6285 ;Masat L et al (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 :893-896), 以及单结构域链支架如铰口鲨的新抗原受体 (NAR) (Dooley H et al (2003) *Mol. Immunol.* 40 :25-33) 和基于重链可变区的微抗体 (minibody) (Skerra A and Plückthun A (1988) *Science* 240 :1038-1041)。

[0177] 在某些实施方案中, 本公开的亲和配体能够与由氨基酸序列 SEQ ID NO :1 组成的肽选择性相互作用。如下面的实施例 1b 节所述, RBM3 片段 (SEQ ID NO :1) 被设计为缺少跨膜区以确保在大肠杆菌 (*E. coli*) 中有效表达, 并且被设计为不含任何信号肽, 因为信号肽在成熟蛋白中被切除。因此, SEQ ID NO :1 被设计用于免疫。此外, 所述蛋白片段被设计为由与其他人类蛋白低同源性的独特序列组成, 以使所生成亲和剂的交叉反应最小化; 并且被设计为具有合适的大小, 以使构象表位可以形成并且仍可在细菌系统中有效克隆和表达。因此, 在所述亲和配体是抗体或其片段或衍生物的情况下, 所述亲和配体可通过包括以下步骤的方法获得, 即用氨基酸序列由序列 SEQ ID NO :1 组成的肽免疫动物。例如, 所述免疫方法可包括用完全弗氏佐剂中的蛋白进行的初次免疫。此外, 所述免疫方法还可包括用完全弗氏佐剂中的蛋白以 2-6 周的间隔强化至少两次。生产针对给定靶的抗体或其片段或衍生物的方法为本领域所知。

[0178] 此外, 如下面的实施例第 4 节所述, 已经在 SEQ ID NO :1 中鉴定了两个表位区 (SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5)。因此, 所述亲和配体可通过包括以下步骤的方法获得, 即用氨基酸序列由序列 SEQ ID NO :4 或 SEQ ID NO :5 组成的肽免疫动物。此外, 所述抗体或其片段可通过包括以下步骤的方法获得, 即用由 20 个或更少的氨基酸例如 15 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO :6-19 的序列的 RBM3 片段免疫动物。

[0179] 关于 SEQ ID NO :4-19 的进一步讨论见下文。

[0180] 在本公开上下文中, “单特异性抗体” 是一个或者一群多克隆抗体已就其自己的抗原被亲和纯化, 从而所述单特异性抗体与其他抗血清蛋白和非特异性抗体分离。这种亲和纯化产生与其抗原选择性结合的抗体。在本公开的情况下, 所述多克隆抗血清用基于免疫亲和性的两步方案进行纯化, 以获得对所述靶蛋白有选择性的单特异性抗体。使用固定化的标签蛋白作为捕获剂, 在第一耗尽步骤中除去针对抗原片段的通用亲和和标签的抗体。在所述第一耗尽步骤后, 将血清加载到以所述抗原为捕获剂的第二亲和柱, 以富集对所述抗原特异性的抗体 (也参见 Nilsson P et al. (2005) *Proteomics* 5 :4327-4337)。

[0181] 多克隆抗体和单克隆抗体以及它们的片段和衍生物, 在需要选择性生物分子识别的应用中, 例如在上述方法方面的对 RBM3 蛋白的检测和 / 或定量中, 代表亲和配体的常规选择。然而, 本领域技术人员已知, 由于对高通量生产选择性结合配体和低成本生产系统的需求增加, 新的生物分子多样化技术在过去十年中已经发展起来。这使得能够形成免疫球蛋白源及非免疫球蛋白源的新型亲和配体, 所述非免疫球蛋白源的新型亲和配体被证明在生物分子识别应用中同样可用作结合配体, 并且可代替免疫球蛋白或与其一起使用。

[0182] 选择亲和配体所需的生物分子多样性可通过对多种可能支架分子之一进行组合工程来产生, 然后使用合适的筛选平台选择特异性 / 选择性的亲和配体。所述支架分子可以是免疫球蛋白源 (Bradbury AR and Marks JD (2004) *J. Immunol. Meths.* 290 :29-49)、非免疫球蛋白源 (Nygren PÅ and Skerra A (2004) *J. Immunol. Meths.* 290 :3-28) 或寡核苷酸

源 (Gold L et al (1995) Annu. Rev. Biochem. 64 :763-797)。

[0183] 大量非免疫球蛋白的蛋白支架已经在开发新结合蛋白中用作支持结构。可用于生产针对本公开中使用的 RBM3 蛋白的亲合配体的这类结构的非限制性实例有葡萄球菌 A 蛋白及其结构域和这些结构域的衍生物, 如蛋白 Z (Nord K et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15 :772-777); 脂质运载蛋白 (lipocalin) (Beste G et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 :1898-1903); 锚蛋白重复结构域 (Binz HK et al. (2003) J. Mol. Biol. 332 :489-503); 纤维素结合结构域 (CBD) (Smith GP et al. (1998) J. Mol. Biol. 277 :317-332; **Lehtiö** J et al. (2000) Proteins 41 :316-322); γ 晶体 (Fiedler U and Rudolph R, W001/04144); 绿色荧光蛋白 (GFP) (Peelle B et al. (2001) Chem. Biol. 8 :521-534); 人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) (Hufton SE et al. (2000) FEBS Lett. 475 :225-231; Irving RA et al. (2001) J. Immunol. Meth. 248 :31-45); 蛋白酶抑制剂, 如 Knottin 蛋白 (Wentzel A et al. (2001) J. Bacteriol. 183 :7273-7284; Baggio R et al. (2002) J. Mol. Recognit. 15 :126-134) 和库尼兹 (Kunitz) 结构域 (Roberts BL et al. (1992) Gene 121 :9-15; Dennis MS and Lazarus RA (1994) J. Biol. Chem. 269 :22137-22144); PDZ 结构域 (Schneider S et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17 :170-175); 肽适体, 如硫氧还蛋白 (Lu Z et al. (1995) Biotechnology 13 :366-372; Klevenz B et al. (2002) Cell. Mol. Life Sci. 59 :1993-1998); 葡萄球菌核酸酶 (Norman TC et al. (1999) Science 285 :591-595); 淀粉酶抑肽 (McConnell SJ and Hoess RH (1995) J. Mol. Biol. 250 :460-479; Li R et al. (2003) Protein Eng. 16 :65-72); 基于纤维连接蛋白 III 型结构域的 trinectin (Koide A et al. (1998) J. Mol. Biol. 284 :1141-1151; Xu L et al. (2002) Chem. Biol. 9 :933-942); 以及锌指结构 (Bianchi E et al. (1995) J. Mol. Biol. 247 :154-160; Klug A (1999) J. Mol. Biol. 293 :215-218; Segal DJ et al. (2003) Biochemistry 42 :2137-2148)。

[0184] 上面提到的非免疫球蛋白的蛋白支架的实例包括: 呈现出单个随机选择环的支架蛋白, 该环用于生成新的结合特异性; 具有刚性二级结构的蛋白支架, 随机选择该结构中从蛋白表面突出的侧链, 以生成新的结合特异性; 和呈现出不连续的高变的环区的支架, 该环区用于生成新结合特异性。

[0185] 除了非免疫球蛋白的蛋白, 寡核苷酸也可被用作亲和配体。单链核酸 (称为适体或诱饵 (decoy)) 折叠成非常清楚的三维结构并以高亲和性和特异性与它们的靶标结合。(Ellington AD and Szostak JW (1990) Nature 346 :818-822; Brody EN and Gold L (2000) J. Biotechnol. 74 :5-13; Mayer G and Jenne A (2004) BioDrugs 18 :351-359)。寡核苷酸配体可以是 RNA 或 DNA, 并可与很多类别的靶分子结合。

[0186] 为了从上面提到的任何支架结构的变体库中选择想要的亲和配体, 有许多筛选平台可用于分离针对选定靶蛋白的特异性新型配体。筛选平台包括但不限于: 噬菌体展示 (Smith GP (1985) Science 228 :1315-1317)、核糖体展示 (Hanes J and Plückthun A (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 :4937-4942)、酵母双杂交系统 (Fields S and Song O (1989) Nature 340 :245-246)、酵母展示 (Gai SA and Wittrup KD (2007) Curr Opin Struct Biol 17 :467-473)、mRNA 展示 (Roberts RW and Szostak JW (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 :12297-12302)、细菌展示 (Daugherty PS (2007) Curr Opin Struct

Biol 17 :474-480, Kronqvist N et al. (2008) Protein Eng Des Sel 1-9, Harvey BR et al. (2004) PNAS 101(25) :913-9198)、微珠展示 (Nord O et al. (2003) J Biotechnol 106 : 1-13, W001/05808)、SELEX(指数富集式配体系统进化)(Tuerk C and Gold L(1990) Science 249 :505-510) 和蛋白片段互补测定法 (PCA) (Remy I and Michnick SW(1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 :5394-5399)。

[0187] 因此,在本公开的实施方案中,所述亲和配体可为来自上述任一蛋白支架的非免疫球蛋白亲和配体,或者是寡核苷酸分子。

[0188] 如上所述,RBM3 蛋白片段 SEQ ID NO :1 被设计为由与其他人蛋白低同源性的独特序列组成,并被设计为使生成的亲和剂的交叉反应性最小。因此,在本公开的实施方案中,所述亲和配体能够与由氨基酸序列 SEQ ID NO :1 组成的多肽选择性相互作用。

[0189] 如下文的实施例第 4 节所述,已经在 SEQ ID NO :1 中鉴定了表位区 SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5。因此,在某些实施方案中,本公开的亲和配体能够与由选自 SEQ ID NO :4 和 5 的氨基酸序列组成的肽选择性相互作用。

[0190] 此外,如下文的实施例第 5 节所述,已经鉴定了另外 4 个表位区 (SEQ ID NO :6-9)。此外,在某些实施方案中,本公开的亲和配体能够与由 20 个或更少的氨基酸例如 15 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO :6-9 的序列的 RBM3 片段选择性相互作用。

[0191] 此外,如下文的实施例第 6 节所述,已经鉴定了另外 10 个表位区 (SEQ ID NO :10-19)。此外,在某些实施方案中,本公开的亲和配体能够与由 20 个或更少的氨基酸例如 15 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO :10-19 的序列的 RBM3 片段选择性相互作用。

[0192] 与针对更长的肽序列(例如 PrEST 或全长蛋白)生成的抗体相比,对单个表位区有选择性的抗体(例如单克隆抗体)可在检测分析中增加再现性。对单个表位区有选择性的抗体还可在免疫组织化学分析中提供明显且强染色。当根据本公开进行治疗预测或制定关于治疗的决策时,这些有利之处——独立地或结合地——可能是有价值的。在图 22 中,图释了本公开的单克隆抗体与多克隆抗体相比的有利之处(选择性增加)。

[0193] 单克隆抗体 6F11 和 1B5 被认为是特别有利的。在图 22 中,6F11 和 1B5 均显示比多克隆 anti-RBM3 抗体选择性更大。此外,1B5 显示比 6F11 选择性更大。1B5 还用于下文实施例第 7、8 和 10 节中。

[0194] SEQ ID NO :17——在实施例第 6 节中 1B5 显示可与其结合——位于 SEQ ID NO :5 内。在本公开的优选实施方案中,所述亲和配体因此能够与由 SEQ ID NO :5 组成的 RBM3 片段选择性相互作用;在本公开的特别优选的实施方案中,所述亲和配体能够与由 20 个或更少的氨基酸例如 15 个或更少的氨基酸组成并包含序列 SEQ ID NO :17 的 RBM3 片段选择性相互作用。

[0195] 6F11 显示可与 SEQ ID NO :8 和 SEQ ID NO :16 结合。在本公开的其他优选实施方案中,所述亲和配体因此能够与由 20 个或更少的氨基酸例如 15 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO :8 和 16 的序列的 RBM3 片段选择性相互作用。应注意,SEQ ID NO :8 和 16 部分重叠并且这一片段可同时包含 SEQ ID NO :8 和 16 的序列。

[0196] 对能够与 RBM3 蛋白选择性相互作用的亲和配体的检测和/或定量可以通过技术人员知道的任何在基于生物相互作用的测定中对结合试剂进行检测和/或定量的方法完

成。因此,上述任何亲和配体均可用于定量地和/或定性地检测 RBM3 蛋白的存在情况。这些“一级”亲和配体自身可被各种标记物标记,或者转通过标记的二级亲和配体检测,以进行检测、可视化和/或定量。这可以使用多种标签的任一种或多种并使用技术人员已知的许多技术中的任一种或多种来完成,并不需要任何过度的实验,所述标签可与能够与 RBM3 蛋白相互作用的亲和配体或者与任何二级亲和配体缀合。

[0197] 可与一级和/或二级亲和配体缀合的标签的非限制性实例包括荧光染料或金属(如荧光素、罗丹明、藻红蛋白、荧光胺)、发色团染料(如视紫红质)、化学发光化合物(如鲁米那(luminal)、咪唑)和生物发光蛋白(如萤光素、萤光素酶)、半抗原(如生物素)。多种其他有用的荧光剂和发色团在 Stryer L(1968)Science 162:526-533 和 Brand L 和 Gohlke JR(1972)Annu. Rev. Biochem. 41:843-868 中有描述。亲和配体也可被酶(如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶和 β -内酰胺酶)、放射性同位素(如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I)和颗粒(如金)标记。在本公开上下文中,“颗粒”是指适合用于标记分子的颗粒,例如金属颗粒。此外,所述亲和配体还可使用荧光半导体纳米晶体(量子点(quantum dot))标记。量子点具有较高的量子产率,并且与有机荧光团相比更光稳定,因此更易于检测(Chan et al. (2002) Curr Opin Biotech. 13:40-46)。不同类型的标签可通过不同的化学法与亲和配体缀合,所述化学法如胺反应或巯基反应。然而,也可使用胺和巯基以外的其他反应基团,如醛、羧酸和谷氨酰胺。

[0198] 上述方法方面可以以数种已知的形式和设置的任一种使用,其中的一个非限制性选择将在下文讨论。

[0199] 在基于组织学的设置中,对与其 RBM3 蛋白靶标结合的标记亲和配体的检测、定位和/或定量可涉及可视化技术如光学显微术或免疫荧光显微术。其他方法可能涉及通过流式细胞术或发光法进行检测。

[0200] 来自所述受试者的生物材料,例如通过手术移除的肿瘤组织,可用于获得用于检测和/或定量 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 的样品。所述样品因此可为之前获得的样品。在一种方法中如果使用之前获得的样品,那么该方法没有在人或动物身体上实施的步骤。

[0201] 可将所述亲和配体施用于所述样品,以检测和/或定量 RBM3 蛋白。这种方法不仅可检测 RBM3 蛋白,另外还可显示其表达分布和相对水平。

[0202] 对亲和配体上的标签可视化的方法包括但不限于:荧光技术、发光技术和/或酶学技术。荧光的检测和/或定量通过将荧光标签暴露在特定波长的光下、然后对特定波长范围内的发射光进行检测和/或定量而实现。发光标记的亲和配体的存在情况可通过化学反应中形成的发光进行检测和/或定量。对酶促反应的检测是基于化学反应过程中产生的样品颜色偏移。本领域的技术人员应认识到,为了适当地检测和/或定量,可对多种不同方案进行修改。

[0203] 在上述方面的方法的实施方案中,所述样品可被固定于固相支持物或载体上,如硝化纤维素或能够固定施加于固体支持基质本身的生物样品中存在的 RBM3 蛋白的任何其他固体支持基质。某些可用于本发明的公知固态支持材料包括玻璃、碳水化合物(如琼脂糖凝胶(Sephacrose))、尼龙、塑料、毛、聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、葡聚糖、淀粉酶、膜、树脂、纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖、氧化铝、辉长岩和磁铁矿。在固定所述生物样品后,例如如本公开的实施例第 8 节所述,可施用对 RBM3 蛋白有选择性的一级亲和配体。如果一级亲和配

体本身没有被标记,可用本领域已知的一种或多种合适的缓冲液洗涤所述支持基质,然后使其暴露于标记的二级亲和配体,然后再用缓冲液洗涤一次以除去未结合的亲和配体。此后,可用常规方法检测和 / 或定量选择性亲和配体。亲和配体的结合性质可随不同固态支持物而变化,但是本领域技术人员应能够通过常规实验为每个测定确定可使用的和最佳的测定条件。

[0204] 因此,在上述方面的方法的实施方案中,a1) 或 aI) 的可定量亲和配体可用能够识别所述可定量亲和配体的二级亲和配体检测。a3) 或 aII) 的定量因此可借助对所述可定量亲和配体具有亲和性的二级亲和配体进行。作为实例,所述二级亲和配体可为抗体或其片段或衍生物。

[0205] 作为实例,一种可用于检测和 / 或定量 RBM3 的方法是通过将亲和配体连接至随后可以在酶免疫测定 (如 EIA 或 ELISA) 中检测和 / 或定量的酶上。这类技术已经相当成熟,而且实现它们对于技术人员而言不存在任何过度的困难。在这类方法中,使生物样品与固体材料或与 RBM3 蛋白的亲和配体缀合的固体材料相接触,然后它可通过酶标记的二级亲和配体进行检测和 / 或定量。随后,使合适的底物在合适的缓冲液中与酶标签反应产生化学部分,所述化学部分例如用分光光度计、荧光计、发光计或通过肉眼方式检测和 / 或定量。

[0206] 如上所述,一级和任何二级亲和配体可用放射性同位素标记,从而能够进行检测和 / 或定量。本公开中合适放射性标签的非限制性实例有 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I 。标记亲和配体的比放射性依赖于放射性标签的半衰期、同位素纯度和标签掺入亲和配体中的方式。对亲和配体的标记优选使用公知的技术 (Wensel TG and Meares CF(1983)in: Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy (Burchiel SW and Rhodes BA eds.) Elsevier, New York, pp 185-196)。可通过在体内或体外检测放射活性,将这种经放射性标记的亲和配体用于可视化 RBM3 蛋白。放射性核扫描 (如用 γ 相机)、磁共振波谱或发射断层术可用于体外或体内检测,而 γ/β 计数器、闪烁计数器和射线照相术也可在体外使用。

[0207] 用于在 mRNA 水平上检测和定量生物标志物的方法为本领域所公知。

[0208] 根据一种这样的方法,通过在核酸提取缓冲液的存在下匀浆,然后离心,从细胞中纯化总细胞 RNA。然后,将核酸沉淀,以通过用 DNase 处理并沉淀除去 DNA。然后,通过根据标准技术的琼脂糖凝胶上的凝胶电泳来分离 RNA 分子,并通过例如所谓的“Northern”印迹技术将其转移至硝酸纤维素滤膜。然后,通过加热将 RNA 固定在所述滤膜上。使用与目标 RNA 互补的合适标记 DNA 或 RNA 探针实现对具体 RNA 的检测和定量。参见例如, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook J. et al., (1989) 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook J. et al., (1989) 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press) 中描述了制备标记 DNA 和 RNA 探针的方法,以及将所述探针与靶核酸序列杂交的条件。例如,可将所述核酸分子探针以例如以下物质标记:放射性核素,例如 ^3H 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{14}C 或 ^{35}S ;重金属;或者能够作为标记配体 (例如生物素、抗生物素蛋白或抗体)、荧光分子、化学发光分子、酶等的特异性结合配对成员发挥功能的配体。

[0209] 可通过切口平移法 (Rigby et al., (1977) J. Mol Biol, 113:237-251) 或者通过随机引物法 (Fienberg, (1983) Anal. Biochem., 132:6-13) 将探针标记为高比放射性。后

者可为从 RNA 模板合成高比放射性的 ^{32}P - 标记探针的方法。例如,通过根据所述切口平移法用高放射性的核苷酸替换预先存在的核苷酸,可制备具有远超 10cpm/ 微克的比放射性的 ^{32}P - 标记的核酸探针。然后,可通过将杂交的滤膜暴露于胶片进行杂交的放射自显影检测。对由所述杂交滤膜暴露的感光胶片的光密度扫描提供了生物标志物水平的精确测量。使用另一种方法,可通过计算机化成像系统例如 Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ., USA) 定量生物标志物水平。

[0210] 当 DNA 或 RNA 探针的放射性核素标记不可行时,可使用随机引物法将类似物例如 dTTP 类似物 5-(N-(N-生物素- ϵ -氨基己酰)-3-氨基烯丙基)脱氧尿苷三磷酸

[0211] (5-(N-(N-biotinyl-epsilon-aminocaproyl)-3-aminoallyl)deoxyuridine triphosphate) 掺入到所述探针分子中。所述生物素化的探针寡核苷酸可通过与偶合于荧光染料或产生颜色反应的酶的生物素结合蛋白例如抗生物素蛋白、链霉亲和素和抗体(例如抗生物素的抗体)的反应进行检测。

[0212] 除了 Northern 和其他 RNA 印迹杂交技术以外,确定 RNA 转录物的水平还可使用原位杂交技术实现。此技术需要比 Northern 印迹技术更少的细胞,并涉及将完整细胞沉积在显微镜盖片上并用含有放射活性或其他方式标记的核酸(例如 cDNA 或 RNA) 探针的溶液来探测所述细胞的核酸含量。此技术特别适合用于分析来自受试者的活检组织样品。

[0213] 细胞中 RNA 转录物的相对数目还可通过将 RNA 转录物反转录,然后通过聚合酶链式反应扩增所述反转录的转录物(RT-PCR) 进行确定。RNA 转录物的水平可通过与内部标准(例如同一样品中存在的标准基因的 mRNA 的水平) 比较进行定量。本领域技术人员能够选择合适的基因用作内部标准。用于定量 RT-PCR 的方法及其变化方法在本领域技术人员能力范围内。

[0214] 任何合适的引物均可用于定量 RT-PCR。优选地,所述引物对 RBM3 是特异的。生成对 RBM3 特异的引物(例如以 SEQ ID NO :3 为原料) 在本领域技术人员能力范围内。引物可为任何合适的长度,但优选为 19-23(例如 19、20、21、22 或 23) 个核苷酸。理想地,为获得最佳 PCR 效率,扩增子长度应为 50-150 个碱基(最多 250 个碱基可能是必需的,但那就必须优化热循环方案和反应组分)。设计生成非常长的扩增子的引物可导致扩增效率低。例如可在 www.ambion.com 找到关于引物设计和最佳扩增子大小的信息。

[0215] 在某些实例中,可能需要使用微芯片技术来检测生物标志物表达。所述微芯片可用本领域已知的技术制造。例如,对合适长度例如 40 个核苷酸的探针寡核苷酸在 C6 位进行 5'-胺修饰并使用市售的微阵列系统例如 GENEMACHINE OmniGhd 100Microarrayer 和 Amersham CODELINK 活化的玻片进行印制(print)。与靶 RNA 对应的标记 cDNA 寡聚体通过用标记引物反转录靶 RNA 来制备。在第一链合成后,将 RNA/DNA 杂交体变性以降解 RNA 模板。然后将如此制备的标记靶 cDNA 在杂交条件下例如在 6 倍 SSPE/30% 甲酰胺中,于 25°C 下与微阵列芯片杂交 18 小时,然后在 0.75 倍 TNT 中于 37°C 下洗涤 40 分钟。在阵列的位置上,如果固定的探针 DNA 识别样品中的互补靶 cDNA,则发生杂交。所述标记靶 cDNA 标志所述阵列上发生结合的确切位置,从而使得可进行自动检测和定量。输出包括杂交事件列表,这些杂交事件可指示受试者样品中具体 cDNA 序列的相对丰度,从而指示受试者样品中对应互补生物标志物的相对丰度。根据一个实施方案,所述标记 cDNA 寡聚体是从生物素标记引物制备的生物素标记 cDNA。然后,将所述微阵列通过使用例如链霉亲和素-Alexa647

缀合物直接检测所述含生物素的转录物进行处理,并利用常规扫描方法进行扫描。所述阵列上每个点的图像强度与受试者样品中对应生物标志物的丰度成比例。

[0216] 使用所述阵列对于 mRNA 表达检测具有一个或多个优点。首先,一次可在单个样品中鉴定数个到数千个基因的全局表达。第二,通过仔细设计所述寡核苷酸探针,成熟分子和前体分子的表达均可被鉴定。第三,与 Northern 印迹分析相比,芯片仅需少量 RNA。

[0217] 本公开的第四方面提供了一种用于进行上述方面的方法的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0218] a) 能够与 RBM3 蛋白选择性相互作用的可定量亲和配体;和

[0219] b) 对所述可定量亲和配体进行定量所需的试剂。

[0220] 本发明第四方面的试剂盒的各种组分可如上关于本公开的方法方面所述进行选择 and 确定。

[0221] 因此,本公开的试剂盒包含针对 RBM3 蛋白的亲配体,以及在特异性和/或选择性亲和配体与 RBM3 蛋白特异性和/或选择性结合后帮助对所述亲和配体进行定量的其他工具。例如,所述试剂盒可包含二级亲和配体,用于检测和/或定量由 RBM3 蛋白与能够与 RBM3 蛋白选择性相互作用的亲和配体形成的复合物。所述试剂盒还可包含除亲和配体之外的多种辅助物质,以使该试剂盒可容易且有效地使用。所述辅助物质的实例包括用于溶解或复原所述试剂盒的冻干蛋白组分的溶剂、洗涤缓冲液、在将酶用作标签的情况下用于测量酶活性的底物、在使用石蜡或福尔马林固定的组织样品的情况下增强抗原可及性的靶修复(target retrieval)液,以及免疫测定试剂盒中常用的物质,例如反应终止剂,如降低背景染色的内源性酶封闭溶液和/或增加染色反差的衬染(counterstaining)溶液。

[0222] 在所述试剂盒方面的实施方案中,所述亲和配体可为上文有关所述方法方面所述的亲和配体的任一种。

[0223] 此外,根据上文有关所述方法方面所述的内容,在所述试剂盒方面的实施方案中,所述可检测亲和配体可包含选自以下的标签:荧光染料和金属、发色团染料、化学发光化合物和生物发光蛋白、酶、放射性同位素、颗粒和量子点。或者,对亲和配体的量进行定量所需的试剂包括能够识别所述可定量亲和配体的二级亲和配体。作为实例,所述能够识别可定量亲和配体的二级亲和配体包含选自如下的标签:荧光染料或金属、发色团染料、化学发光化合物和生物发光蛋白、酶、放射性同位素、颗粒和量子点。

[0224] 所述试剂盒方面的试剂盒还可有利地包含用于提供或产生用于与样品值比较的参照值的参照样品。例如,所述参照样品可包含预定量的 RBM3 蛋白。这类参照样品例如可由包含预定量 RBM3 蛋白的组织样品构成。然后,通过手工(例如目测)或自动比较所述参照组织样品和受试者样品中的表达水平,本领域技术人员可将所述参照组织样品用于确定 RBM3 在研究样品中的表达状态。作为另一个实例,所述参照样品可包含表达预定量或受控量的 RBM3 蛋白的细胞系,例如癌细胞系。本领域技术人员理解如何提供这类细胞系,例如由 Rhodes et al. (2006) *The biomedical scientist*, p 515-520 的公开指导。作为实例,所述细胞系可被福尔马林固定。此外,所述福尔马林固定的细胞系可被石蜡包埋。

[0225] 表述“用于提供所述参照值的参照样品”在本公开上下文中被广义地解释。所述参照样品可包含实际上对应于所述参照值的 RBM3 蛋白量,但其也可包含对应于高于所述参照值的值的 RBM3 蛋白量。在后一种情况中,实行本方法的人可使用“高”值作为上参照

(阳性参照)用于评定例如低于所述“高”值的参照值的表观值。免疫组织化学领域的技术人员理解如何进行所述评定。此外,作为替代实例或补充实例,技术人员可使用包含低 RBM3 蛋白量的另一参照样品,用于提供这类评定中的“低”值,例如作为阴性参照。这在上文有关所述方法方面进行了进一步讨论。

[0226] 因此,在所述试剂盒方面的实施方案中,所述参照样品可包含与所述参照值对应的 RBM3 蛋白量。作为实例,所述参照样品可包含与 95%或更低的细胞核比例或细胞质比例对应的 RBM3 蛋白量,例如 90%或更低、例如 85%或更低、例如 80%或更低、例如 75%或更低、例如 70%或更低、例如 65%或更低、例如 60%或更低、例如 55%或更低、例如 50%或更低、例如 45%或更低、例如 40%或更低、例如 35%或更低、例如 30%或更低、例如 25%或更低、例如 20%或更低、例如 15%或更低、例如 10%或更低、例如 5%或更低、例如 2%或更低、例如 1%或更低、例如 0%。

[0227] 替代地,或者作为补充,所述参照样品包含的 RBM3 蛋白量可对应于中度或更低细胞核强度或细胞质强度,例如弱或更低细胞核强度或细胞质强度,例如无细胞核强度或细胞质强度。

[0228] 比例值和强度值的提供在上文有关所述方法方面所述进行了讨论。

[0229] 此外,在所述试剂盒方面的替代或补充实施方案中,所述试剂盒包含的参照样品包含的 RBM3 蛋白量可对应于高于所述参照值的值。在这些实施方案中,所述参照样品包含的 RBM3 蛋白量例如可对应于 75%或更高的细胞核比例或细胞质比例和 / 或强细胞核强度或细胞质强度。

[0230] 在所述试剂盒方面的其他替代或补充实施方案中,所述试剂盒包含的参照样品包含的 RBM3 蛋白量可对应于低于或等于所述参照值的值,例如无细胞核强度或细胞质强度和 / 或 < 2%如 0%的细胞核比例或细胞质比例。

[0231] 所述试剂盒因此可包含:包含的 RBM3 蛋白量对应于预定参照值的参照样品;包含的 RBM3 蛋白量对应于高于预定参照值的参照样品;和 / 或包含的 RBM3 蛋白量对应于低于或等于预定参照值的参照样品。

[0232] 因此,所述试剂盒的实施方案可包含:包含的 RBM3 蛋白的量高于预定参照值的第一参照样品;和包含的 RBM3 蛋白量低于或等于预定参照值的第二参照样品。

[0233] 在试剂盒方面的实施方案中,所述参照样品可为组织样品,例如适于目测评估或显微镜评估的组织样品。作为实例,可将所述参照组织样品固定在石蜡或经缓冲的福尔马林中并且 / 或者经组织学加工成封固在显微镜载玻片上的切片(例如 μm 级薄切片)。还可将所述参照组织样品调整为适合用针对 RBM3 蛋白的亲配体例如抗体进行染色。

[0234] 因此,在所述试剂盒方面的实施方案中,可将所述参照样品调整为适于直接或间接提供任何相关参照值,例如上文讨论的任一种参照值。

[0235] 所述试剂盒方面的参照样品的其他实施方案在上文有关所述方法方面的参照值和参照样品处进行了讨论。

[0236] 根据上文给出的发现,发明人认识到 RBM3 蛋白及其片段的数种用途。

[0237] 因此,本公开第五方面提供了由 50 个或更少的氨基酸组成并包含选自 SEQ ID NO: 4-19 的序列的 RBM3 蛋白片段。

[0238] 在第五方面的实施方案中,所述片段由 29 个或更少的氨基酸组成。

[0239] 在第五方面的其他实施方案中,所述片段由 20 个或更少的氨基酸例如 15 个或更少的氨基酸组成,并包含选自 SEQ ID NO :6-19 的序列。

[0240] 这类片段的可能用途在下面进行描述。

[0241] 本公开第六方面的第一种形式提供了 RBM3 蛋白、其片段或 RBM3mRNA 分子作为用于患有癌症的哺乳动物受试者的基于铂的治疗的治疗预测标志物的用途。

[0242] 第一种形式的用途可完全是体外的,例如用在之前获得的样品上。

[0243] 在本公开上下文中,“治疗预测标志物”是指其存在指示对治疗的反应性水平的某种物质。所述标志物因此可为生物标志物,例如人蛋白。应理解,所述治疗预测标志物的存在,或其相对高水平,可指示对所述治疗的相对高反应性,而不存在所述治疗预测标志物,或其相对低水平,可指示对所述治疗的相对低反应性。这里,所述“相对高反应性”高于所述“相对低反应性”。

[0244] 本公开第六方面的第二种形式提供了 RBM3 蛋白或其抗原活性片段用于产生、选择或纯化用于患有癌症的哺乳动物受试者的基于铂的治疗的治疗预测剂的用途。

[0245] 所述选择和纯化可在体外,而所述产生可在体内。

[0246] “抗原活性片段”是指大小足以生成能够与所述片段选择性相互作用的亲和配体的片段。

[0247] 在本公开上下文中,“治疗预测剂”是指具有至少一种对建立治疗预测有价值的性质的试剂。例如,所述治疗预测剂能够与所述治疗预测标志物选择性相互作用。

[0248] 所述治疗预测剂可为能够与 RBM3 蛋白或其抗原活性片段选择性相互作用的亲和配体。这类亲和配体的实例在上文有关所述方法方面处进行了讨论。

[0249] 由本公开的教导指导,本领域技术人员理解如何将 RBM3 蛋白或其片段用于产生、选择或纯化所述治疗预测剂。例如,所述用途可包括在固体支持物上进行的亲和纯化,RBM3 蛋白或其片段已被固定化在所述固体支持物上。所述固体支持物可被置于柱中。此外,所述用途可包括使用 RBM3 蛋白或其片段已经被固定在其上的固体支持物选择对 RBM3 蛋白或其片段具有特异性的亲和配体。这类固体支持物可为孔板(例如 96 孔板)、磁珠、琼脂糖珠或琼脂糖凝胶珠。此外,所述用途可包括分析可溶基质上的亲和配体,例如使用葡聚糖基质,或者用于表面等离子共振仪器,例如 Biacore™ 仪器,其中所述分析例如可包括监测多个可能亲和配体对固定的 RBM3 蛋白或其片段的亲和性。

[0250] 同时,为产生所述治疗预测剂,可使用 RBM3 蛋白或其抗原活性片段免疫动物,例如兔或小鼠。

[0251] 这类用途可包含在包括以下步骤的方法中:

[0252] i) 使用 RBM3 蛋白或其抗原活性片段作为抗原免疫动物;

[0253] ii) 从所述免疫动物中获得包含所述治疗预测剂的血清;并且,任选地,

[0254] iii) 从所述血清中分离所述治疗预测剂。

[0255] 或者,第一步之后的步骤可为:

[0256] ii') 从所述免疫动物中获得细胞,所述细胞包含编码所述治疗预测剂的 DNA,

[0257] iii') 将所述细胞与骨髓瘤细胞融合以获得至少一个克隆,

[0258] 并且

[0259] iv') 获得由所述克隆表达的治疗预测剂。

[0260] 在第六方面的实施方案中, RBM3 蛋白的氨基酸序列可包含选自以下的序列:

[0261] i) SEQ ID NO:1;和

[0262] ii) 与 SEQ ID NO:1 至少 85% 相同的序列。

[0263] 在某些实施方案中, 序列 ii) 与 SEQ ID NO:1 至少 90% 相同, 至少 91% 相同, 至少 92% 相同, 至少 93% 相同, 至少 94% 相同, 至少 95% 相同, 至少 96% 相同, 至少 97% 相同, 至少 98% 相同或至少 99% 相同。

[0264] 此外, 在第六方面的实施方案中, RBM3 蛋白的氨基酸序列可包含选自以下的序列或由选自以下的序列组成:

[0265] i) SEQ ID NO:2;和

[0266] ii) 与 SEQ ID NO:2 至少 85% 相同的序列。

[0267] 在某些实施方案中, 序列 ii) 与 SEQ ID NO:2 至少 90% 相同, 至少 91% 相同, 至少 92% 相同, 至少 93% 相同, 至少 94% 相同, 至少 95% 相同, 至少 96% 相同, 至少 97% 相同, 至少 98% 相同或至少 99% 相同。

[0268] 第六方面的抗原活性片段例如可为第五方面的片段的任一种。

[0269] 本公开第七方面提供了能够与 RBM3 蛋白选择性相互作用的亲和配体。

[0270] 这类亲和配体的不同实施方案在上文有关所述方法方面处进行了讨论。

[0271] 本公开第八方面提供了第七方面的亲和配体作为用于患有癌症的哺乳动物受试者的基于铂的治疗的治疗预测剂的用途。

[0272] 类似地, 提供了能够与 RBM3 蛋白选择性相互作用的亲和配体用于指示患有癌症的哺乳动物受试者是否应给予基于铂的治疗的用途。

[0273] 在本文中, “应给予基于铂的治疗” 是指这样的情形, 即所述治疗的有利之处可弥补所述治疗的不利之处。所述治疗的有利之处是指进行所述治疗比不进行所述治疗存活或恢复的几率更高。所述治疗的不利之处是指缺点, 例如副作用、疼痛或者其他不便和费用。

[0274] 这类用途例如可在体外进行, 例如涉及确定之前从受试者获得的样品的至少一部分中的 RBM3 量。

[0275] 以等同的方式, 提供了能够与 RBM3 蛋白选择性相互作用的亲和配体用于制造用于患有癌症的哺乳动物受试者的基于铂的治疗的治疗预测剂的用途。

[0276] 在本公开中, 基于铂的治疗显示特别有利于那些高 RBM3 蛋白或高 RBM3mRNA 的受试者。在基于铂的治疗的背景下, 高 RBM3 蛋白或高 RBM3mRNA 的癌症受试者是之前未被识别的亚组。

[0277] 因此, 本公开第九方面提供了用于治疗患有癌症的哺乳动物受试者的基于铂的治疗剂, 其中所述受试者具有高 RBM3 蛋白或高 RBM3mRNA。

[0278] 本公开第十方面提供了基于铂的治疗剂在制造用于治疗患有癌症的哺乳动物受试者的药物中的用途, 其中所述受试者具有高 RBM3 蛋白或高 RBM3mRNA。

[0279] 如果来源于所述受试者的任何 RBM3 蛋白或 mRNA 参数指示相对高的对基于铂的治疗的反应性, 那么所述受试者具有“高 RBM3 蛋白”或“高 RBM3mRNA”。例如, 如果来源于所述受试者的相关生物样品被发现含有对应于高于相关参照值的样品值的 RBM3 蛋白或 RBM3mRNA 量, 那么所述受试者可被认为具有高 RBM3 或高 RBM3mRNA。相关样品值和参照值在上文有关所述方法方面处进行了讨论。因此, 如果相关样品例如来源于肿瘤的组织样品

在所述样品的相关部分例如在肿瘤细胞中显示可检测的 RBM3 蛋白表达,那么所述癌症受试者例如可被认为是 RBM3 蛋白阳性。此外,如果这类样品含有对应于比无细胞质比例或细胞核比例高或者比高于 1% 的细胞质比例或细胞核比例高的细胞质强度或细胞核强度的 RBM3 蛋白量,那么所述癌症受试者例如可被认为具有高 RBM3 蛋白。根据本公开,本领域技术人员例如病理学家知晓如何确定所述受试者是否具有高 RBM3 蛋白以及所述受试者是否具有高 RBM3mRNA。

[0280] 第九和第十方面的多个实施方案,特别是与癌症类型和基于铂的治疗剂的类型有关的实施方案,在上文有关所述方法方面处进行了讨论。

[0281] 通常而言,发明人相信,在本公开上下文中,RBM3 蛋白表达比 RBM3mRNA 表达更相关。

[0282] 实施例

[0283] 单特异性多克隆抗体

[0284] 1. 抗原的生成

[0285] a) 材料和方法

[0286] 以人基因组序列为模板,用生物信息学工具选择由 EnsemblGene ID ENSG00000102317 编码的靶蛋白的合适片段 (Lindskog M et al (2005) Biotechniques 38 : 723-727, Ensembl, www.ensembl.org)。用所述片段作为模板以产生对应于 RBM3 蛋白 (SEQ ID NO :2 ;Ensembl 登录号为 ENSP00000365946) 第 18-151 位氨基酸 (SEQ ID NO :1) 的 134 个氨基酸长的片段。

[0287] 以人总 RNA 库组 (Human Total RNA Panel IV, BD Biosciences Clontech) 为模板,用含有 **Platinum®** Taq 的 Superscript™ One-StepRT-PCR 扩增试剂盒 (Invitrogen) 分离含有 Ensembl 登录号 00000376755 (SEQ ID NO :3) 的第 281-682 位核苷酸的 RBM3 基因转录物片段。通过 PCR 扩增引物将侧翼限制酶切位点 NotI 和 AscI 引入到该片段中,使其在阅读框内 (in frame) 克隆到表达载体中 (正向引物 :GACGAGCAGGCACTGGAAG (SEQ ID NO :20), 反向引物 :GTAATTCCTCCTGAGTAGC (SEQ ID NO :21))。然后,将下游引物生物素化以使得可以如前所述进行固相克隆,并将所产生的生物素化 PCR 产物固定在 Dynabeads M280Streptavidin (Dynal Biotech) 上 (Larsson M et al (2000) J. Biotechnol. 80 : 143-157)。通过 NotI-AscI (New England Biolabs) 消化将该片段从固体支持物上释放出来,将该片段在阅读框内连入至具有双亲和标签的 pAff8c 载体中 (Larsson M et al, 见上文),所述双亲和标签由用于固定化金属离子色谱 (IMAC) 纯化的六组氨酰标签和来自链球菌蛋白 G 的免疫增强白蛋白结合蛋白 (ABP) 组成 (**Sjölander** A et al (1997) J. Immunol. Methods 201 :115-123 ;**Stahl** S et al (1999) Encyclopedia of Bioprocess Technology :Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation (Fleckinger MC and Drew SW, eds) John Wiley and Sons Inc., New York, pp 49-63),并转化到大肠杆菌 (E. coli) BL21 (DE3) 细胞 (Novagen) 中。依照厂商建议,通过使用 TempliPhiDNA 测序扩增试剂盒 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) 扩增的质粒 DNA 的染料终止循环测序 (dye-terminator cycle sequencing) 确认所述克隆的序列。

[0288] 通过将 1ml 过夜培养物加入到 100ml 添加 5g/l 酵母提取物 (Merck KGaA) 和 50mg/l 卡那霉素 (Sigma-Aldrich) 的 30g/l 胰蛋白酶大豆肉汤 (Merck KGaA) 中,将含有所述

表达载体的 BL21 (DE3) 细胞接种至所述培养基。将所述细胞培养物在 1 升摇瓶中于 37℃、150rpm 条件下孵育,直到 600nm 下的光密度达到 0.5-1.5。然后通过加入异丙基-β-D 硫乳吡喃糖苷 (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (Apollo Scientific) 至终浓度为 1mM 诱导蛋白表达,并在 25℃和 150rpm 下继续孵育过夜。通过以 2400g 离心收集细胞,用 5ml 裂解缓冲液 (7M 盐酸胍,47mM Na₂HPO₄,2.65mM NaH₂PO₄,10mM Tris-HCl,100mM NaCl,20mM β-巯基乙醇;pH=8.0) 重新悬浮沉淀物,然后在 37℃、150rpm 下孵育 2 小时。在以 35300g 离心之后,收集含有变性和溶解的蛋白的上清液。

[0289] 在 ASPEC XL4™ 上 (Gilson) 使用自动蛋白纯化程序 (Steen J et al (2006) Protein Expr. Purif. 46 :173-178),通过含 1ml **Talon®** 金属 (Co²⁺) 亲和树脂 (BD Biosciences Clontech) 的柱上的固定化金属离子亲和色谱 (IMAC) 纯化有 His₆ 标签的融合蛋白。用 20ml 变性洗涤缓冲液 (6M 盐酸胍,46.6mM Na₂HPO₄,3.4mM NaH₂PO₄,300mM NaCl, pH 8.0-8.2) 平衡所述树脂。然后将澄清的细胞裂解物加入所述柱中。然后,用最小量 31.5ml 的洗涤缓冲液洗涤所述树脂,再用 2.5ml 洗脱缓冲液 (6M 尿素,50mM NaH₂PO₄,100mM NaCl,30mM 乙酸,70mM 乙酸钠,pH5.0) 洗脱。将所洗脱的物质分为 500、700 和 1300 μl 三个收集物。将含有抗原的 700 μl 级分以及所收集的 500 和 1300 μl 级分都储存备用。

[0290] 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS ;1.9mM NaH₂PO₄,8.1mM Na₂HPO₄,154mM NaCl) 将所述抗原级分稀释成 1M 尿素的终浓度,然后是用截留分子量为 7500Da 的 Vivapore 10/20ml 浓缩器 (Vivascience AG) 增加蛋白浓度的浓缩步骤。依照厂商的建议,使用以牛血清白蛋白为标准品的二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 微测定方案 (Pierce) 测定蛋白浓度。用 Protein 50 或 200 测定 (Agilent Technologies) 在 Bioanalyzer 仪器上分析所述蛋白的质量。

[0291] b) 结果

[0292] 使用特异性引物,通过 RT-PCR 从人 RNA 库成功分离了与 RBM3 的全长转录物 (SEQ ID NO :3) 第 281-682 位核苷酸对应的基因片段。所述片段编码靶蛋白 RBM3 (SEQ ID NO :2) 的第 18-151 位氨基酸。靶蛋白 (SEQ ID NO :2) 的所述 134 个氨基酸的片段 (SEQ ID NO :1) 被设计为不含跨膜区以确保在大肠杆菌中有效表达,并且被设计为不含任何信号肽,因为信号肽在成熟蛋白中被切除。此外,所述蛋白片段被设计为由与其他人蛋白低同源性的独特序列组成,以尽可能减少所生成亲和试剂的交叉反应,并且被设计为具有合适的大小,以使构象表位可形成并且仍使得可有效在细菌系统中克隆和表达。

[0293] 鉴定了编码所述正确氨基酸序列的克隆,并且在大肠杆菌中表达后产生了大小正确的单种蛋白,随后用固定化金属离子色谱进行纯化。在将洗脱的样品稀释到 1M 尿素的终浓度并将样品浓缩到 1ml 后,所述蛋白片段的浓度被确定为 10.4mg/ml,根据纯度分析为 96.0% 的纯度。

[0294] 2. 抗体的生成

[0295] a) 材料和方法

[0296] 按照国家标准 (Swedish permit no. A 84-02),使用如上得到的纯化 RBM3 片段作为抗原免疫兔。用含 200 μg 抗原的弗氏完全佐剂对兔进行肌肉免疫作为初次免疫,然后用含 100 μg 抗原的弗氏不完全佐剂以 4 周的间隔加强免疫三次。

[0297] 通过基于免疫亲和的三步法纯化来自该免疫动物的抗血清 (Agaton C et

al (2004) J. Chromatogr. A 1043:33-40; Nilsson P et al (2005) Proteomics 5: 4327-4337)。在第一步中,用 10×PBS 将 7ml 总抗血清缓冲至 1×PBS 的终浓度 (1.9mM NaH_2PO_4 , 8.1mM Na_2HPO_4 , 154mM NaCl), 用 0.45 μm 孔径的滤器 (**Acrodisc®**, Life Science) 过滤, 并将其加入到亲和柱中, 该柱中含有 5ml 偶合有双亲和标签蛋白 His₆-ABP (六组氨酸标签和白蛋白结合蛋白标签) 的 N-羟基琥珀酰亚胺活化的 Sepharose™ 4Fast Flow (GE Healthcare), 所述标签蛋白 His₆-ABP 以与上述抗原蛋白片段相同的方式表达自 pAff8c 载体并被纯化。在第二步中, 将去除抗双亲和标签 His₆-ABP 的抗体的流过物以 0.5ml/ 分钟的流速加入 1ml Hi-Trap NHS 活化的 HP 柱 (GE Healthcare) 中, 该柱偶合有用作免疫抗原的 RBM3 蛋白片段 (SEQ ID NO:1)。如厂商的建议将所述 His₆-ABP 蛋白和所述蛋白片段抗原偶合到 NHS 活化的基质上。用 1×PBST (1×PBS, 0.1% 吐温 20, pH 7.25) 洗掉未结合的材料, 并且用低 pH 的甘氨酸缓冲液 (0.2M 甘氨酸, 1mM EGTA, pH 2.5) 洗脱捕获的抗体。将洗脱的抗体级分自动收集, 并加入到两个串联的 5ml HiTrap™ 脱盐柱 (GE Healthcare) 中, 用于在第三步有效进行缓冲液置换。第二和第三纯化步骤在 **ÄKTAexpress™** 平台 (GE Healthcare) 上进行。用添加有终浓度分别为 40% 和 0.02% 的甘油和 NaN_3 的 PBS 缓冲液洗脱该抗原选择性 (单特异性) 抗体 (msAb), 在 -20℃ 长期储存 (Nilsson P et al (2005) Proteomics 5:4327-4337)。

[0298] 通过对蛋白质阵列设置中的抗原自身及其他 94 种人蛋白片段的结合分析, 分析了所述亲和纯化的抗体级分的特异性和选择性 (Nilsson Pet al (2005) Proteomics 5: 4327-4337)。将这些蛋白片段在含 0.1M 尿素的 1×PBS (pH 7.4) 中稀释至 40 $\mu\text{g/ml}$, 并且各取 50 μl 转移到 96 孔点样板的孔中。使用针环阵列点样仪 (pin-and-ring arrayer) (Affymetrix 427) 将这些蛋白片段重复两份点样并固定在环氧树脂载片 (SuperEpoxy, TeleChem) 上。用 1×PBS 洗涤该载片 (5 分钟) 并且封闭其表面 (**SuperBlock®**, Pierce) 30 分钟。将粘性 16 孔硅酮掩罩 (Schleicher & Schuell) 加在玻璃上, 然后加入该单特异性抗体 (在 1×PBST 中 1:2000 稀释至大约 50ng/ml) 并在摇床上孵育 60 分钟。使亲和和标签特异的 IgY 抗体与所述单特异性抗体共同孵育, 以定量每个点中的蛋白量。用 1×PBST 和 1×PBS 洗涤该载片两次, 每次 10 分钟。将二抗 (缀合有 Alexa647 的山羊抗兔抗体和缀合有 Alexa 555 的山羊抗鸡抗体, Molecular Probes) 在 1×PBST 中 1:60000 稀释至 30ng/ml, 并孵育 60 分钟。在进行与初次孵育相同的洗涤步骤后, 将该载片甩干并扫描 (G2565BA 阵列扫描仪, Agilent), 之后用图像分析软件 (GenePix 5.1, Axon Instruments) 对图像进行定量。

[0299] 此外, 通过蛋白质印迹法分析了所述亲和纯化的抗体的特异性和选择性。通过以下方式进行蛋白质印迹: 依照厂商的建议, 在还原条件下在预制 10-20% SDS-PAGE 梯度胶 (Bio-Rad Laboratories) 上从所选人细胞系分离总蛋白提取物, 然后电转移至 PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories) 上。将所述膜室温封闭 (5% 奶粉, 1×TBST; 0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, 0.1% 吐温 20) 1 小时, 与亲和纯化的第一抗体 (在封闭缓冲液 1:500 稀释) 孵育, 再用 TBST 洗涤。将缀合 HRP 的二抗 (猪抗兔免疫球蛋白/HRP, DakoCytomation) 在封闭缓冲液中 1:3000 稀释, 并依照厂商的方案使用 Chemidoc™ CCD 相机 (Bio-Rad Laboratories) 和 **SuperSignal®** West Dura Extended Duration 底物 (Pierce) 进行化学发光检测。

[0300] b) 结果

[0301] 已证明所述多克隆抗体制剂的质量依赖于所述抗体纯化的严格程度,并且先前已证明,耗尽针对非源自靶蛋白的表位的抗体对于避免与其他蛋白的交叉反应和背景结合而言是必需的 (Agaton C et al (2004) J. Chromatogr. A 1043 :33-40)。因此,进行蛋白微阵列分析,以确保已通过耗尽针对所述 His₆ 标签的抗体和针对所述 ABP 标签的抗体生成了具有高特异性的单特异性多克隆抗体。

[0302] 为了定量蛋白阵列的每个点中的蛋白量,使用了结合一抗和二抗的双色染料标记系统。用 Alexa 555 荧光染料标记的山羊抗鸡二抗来检测在鸡体内生成的标签特异的 IgY 抗体。用 Alexa 647 荧光标记的山羊抗兔抗体检测兔 msAb 所述阵列上的其抗原的特异性结合。每种蛋白片段都重复点样两份。蛋白阵列分析显示,所述亲和纯化的抗 RBM3 的单特异性抗体对正确的蛋白片段具有高度选择性,并对该阵列上分析的所有其他蛋白片段都具有非常低的背景。

[0303] 所述蛋白质印迹分析的结果显示,所述抗体在两种乳腺癌细胞系 T47D 和 MCF-7 中可特异性检测约 16kDa 的单条带。RBM3 的理论分子量为 16kDa (从 RBM3 氨基酸序列 SEQ ID NO :2 计算),与所获得的结果符合很好。

[0304] 单克隆抗体

[0305] 3. 单克隆抗体的生成

[0306] a) 材料和方法

[0307] 使用从第 1 节获得的纯化片段 (SEQ ID NO :1) 作为抗原用于产生单克隆抗体。将抗原送到 AbSea Biotechnology Ltd (Beijing, China), 简单地说,将所述抗原以三个星期的间隔皮下注射到 BALB/c 小鼠中 (4-6 周龄,雌性)。将所述抗原与弗式完全佐剂混合用于第一次注射,与弗式不完全佐剂混合用于后续注射。融合前 3 天,以静脉内注射的方式用抗原最后一次激发小鼠。通过融合小鼠脾细胞和 Sp2/0 骨髓瘤细胞系产生杂交瘤细胞。通过使用 ELISA 筛选数个细胞系,鉴定分泌对所述抗原 (SEQ ID NO :1) 特异的抗体的细胞,并将其送至 Atlas Antibodies AB 进行进一步表征。选择在 ELISA、蛋白质印迹 (WB) 和免疫组织化学 (IHC) 中显示阳性结果的细胞系进行亚克隆,由 AbSea Biotechnology Ltd. 进行。

[0308] 此外,将所述单克隆抗体的免疫组织化学染色模式与在第 2 节中产生的多克隆 anti-RBM3 抗体的免疫组织化学染色模式进行比较。这种多克隆抗体在本文中有时称为“anti-RBM3”。

[0309] b) 结果

[0310] 通过 ELISA (在 AbSea) 筛选细胞系以鉴定产生识别所述抗原 (SEQ ID NO :1)、但不识别亲和标签 His-ABP 的单克隆抗体 (mAb) 的细胞系。8 种细胞系在 ELISA 中显示出对抗原 SEQ ID NO :1 的特异性结合,并被选择用于进一步试验。对于所选的 8 种克隆的每一种,收集 150-300 μ l 的上清液,加入叠氮化物,然后将所述上清液在湿冰 (wet ice) 上送至 Atlas Antibodies AB。根据 AbSea 的说明,所述上清液在到达后保存在 4°C。对所述细胞系的进一步试验导致了在蛋白质印迹和 IHC 分析中均产生阳性结果的 3 种令人感兴趣的细胞系克隆 1B5、6F11 和 7G3 的鉴定。将这些克隆选出进行亚克隆和扩增,由 AbSea Biotechnology Ltd 进行。

[0311] 表位作图

[0312] 4. 使用细菌展示的表位作图 I

[0313] 使用载体 pAff8c 作为模板,通过 PCR 扩增对应于 SEQ ID NO:1 的 RBM3DNA (即 ENSP00000365946 的 aa 18-151 或 ENST00000376755 的 bp 261-682)。通过超声处理使所述扩增的 DNA 成不同长度 (约 50-150bp) 的片段,然后将其连接至葡萄球菌展示载体 (pSCEM2) 中并转化到肉糖葡萄球菌 (*S. carnosus*) 中,得到约 100,000 个转化体。阅读框内 DNA 片段在葡萄球菌表面上展示为肽。在与抗体 (对 SEQ ID NO:1 有选择性,如上文第 2 节中获得) 和荧光标记的第二试剂孵育后,使用流式细胞术分别分选出阳性和阴性细胞,目的是分离表位递呈细胞和非表位递呈细胞。通过焦磷酸测序法 (pyrosequencing) 对分离的细胞进行测序,最后将序列与 RBM3 抗原进行比对以鉴定表位。

[0314] 使用实时监测表面表达水平的双标记法 (Löfblom, J et al (2005) FEMS Microbiol Lett 248,189-198)。该方法可用表达水平标准化结合信号,提供小的细胞间差异,并使得可辨别不同的表位群。此外,该方法还使得可进行平行测定,以确定表面上展示的非结合肽。

[0315] 鉴定了 SEQ ID NO:1 中的两个表位区:SEQ ID NO:4 (RGFGFITFTNPEHASVAMRAMNGESLDGR) 和 SEQ ID NO:5 (RSYSRGGGDQGYGSGRYYSRPGG)。

[0316] 5. 使用 Luminex 的表位作图

[0317] a) 合成肽制备

[0318] 由 Sigma-Genosys (Sigma-Aldrich) 合成由 25 种对应于 RBM3 上的 PrEST HPRR232631 (SEQ ID NO:1) 的生物素化的肽组成的 PEP 筛选库。所述肽长 15 个氨基酸,其中 10 个氨基酸重叠,这些肽一起覆盖所述整个 PrEST 序列。将所述肽溶解在 80% DMSO 中至终浓度 10mg/ml。

[0319] b) 小珠偶合

[0320] 依照厂商的方案,将 Neutravidin (Pierce, Rockford, IL) 固定在羧化小珠 (COOH Microspheres, Luminex-Corp., Austin, TX) 上。如前人所述 (Larsson et al (2009) J Immunol Methods 15;34(1-2):20-32, Schwenk et al (2007) Mol Cell Proteomics 6(1):125-32), 使用底部有滤膜的微量滴定板 (MultiScreen-HTS, Millipore, Billerica, MA) 进行 10^6 个小珠的偶合。使用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide) 和 N-羟基丁二酰亚胺 (N-Hydroxysuccinimide) 活化不同色码 ID 的 25 个不同组的小珠。将 Neutravidin (在 MES 中, $100 \mu\text{g/ml}$) 加入所述小珠中并在摇床上孵育 120 分钟。最后将所述小珠洗涤、重悬浮并转移至微离心管中,以在添加 NaN_3 的含蛋白缓冲液中 (BRE——ELISA 封闭试剂, Roche, Basel, Switzerland) 于 4°C 保存。将所有偶合的小珠群在超声清洗器 (Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT) 中以超声处理 5 分钟。将所述生物素化的肽在 BRE 中稀释至 $20 \mu\text{M}$ 的浓度,每种肽取 $100 \mu\text{l}$ 用于所述偶合反应,所述偶合反应于室温伴随晃动进行 60 分钟。最后,用 $3 \times 100 \mu\text{l}$ BRE 缓冲液洗涤小珠并将小珠保存在 4°C 下备用。

[0321] c) 结合特异性的测定

[0322] 制备了含有全部 25 种小珠 ID 的小珠混合物,将 $45 \mu\text{l}$ 在 PBS 中稀释至 50ng/ml 的每种抗体与 $5 \mu\text{l}$ 所述小珠混合物混合并室温孵育 60 分钟。将底部有滤膜的微量滴定板 (Millipore) 用于洗涤,在每次孵育后用 $3 \times 100 \mu\text{l}$ PBST 洗涤所有孔。加入 $50 \mu\text{l}$ 的 R-藻红蛋白标记的抗兔 IgG 的抗体 ($0.5 \mu\text{g/ml}$, Jackson ImmunoResearch) 或 $50 \mu\text{l}$ 的 Alexa

Fluor 555 山羊抗小鼠 IgG(0.4ug/ml),最后室温孵育 60 分钟。

[0323] 使用带有 Luminex xPONENT 软件的 Luminex LX200 仪器进行测量。对于每次实验,每种小珠 ID 计 50 个事件,使用中值荧光强度 (MFI) 作为抗体与各个小珠群结合的度量。

[0324] d) 结果

[0325] 在使用偶合有合成生物素化肽的小珠的测定中测试了所述单特异性多克隆抗体 (anti-RBM3) 和单克隆抗体 6F11 的特异性。anti-RBM3 显示出与这其中的 8 种肽 (即 6、7、8、14、15、16、24 和 25) 的强结合,这些肽对应于所述 PrEST 序列上的 3 个独特区域,共有序列 SEQ ID NO :6、7、8 和 9。特别地,对应于 SEQ ID NO :9 的肽 24 和 25 产生了强信号。单克隆抗体 6F11 与两种肽 15 和 16 反应,这两种肽对应于所述 PrEST 序列上的 1 个独特区域,共有序列 SEQ ID NO :8。由于 anti-RBM3 和 6F11 都与肽 15 和 16 结合,这指示这些抗体共有此区域内的一个或多个表位。值得注意的是,SEQ ID NO :6 在 SEQ ID NO :4 内,而 SEQ ID NO :8 与 SEQ ID NO :5 有某种程度的重叠。

[0326] 6. 使用细菌展示的表位作图 II

[0327] 使用载体 pAff8c 作为模板,通过 PCR 扩增对应于 SEQ ID NO :1 的 RBM3DNA (即 ENSP00000365946 的 aa 18-151 或 ENST00000376755 的 bp 261-682)。通过超声处理使所述扩增的 DNA 成不同长度 (约 50-150bp) 的片段,然后将其连接至葡萄球菌展示载体 (pSCEM2) 中并转化到肉糖葡萄球菌 (*S. carnosus*) 中,得到约 100000 个转化体。阅读框内 DNA 片段在葡萄球菌表面上展示为肽。在与抗体 (在第 2 节中获得的 anti-RBM3 和在第 3 节中获得的单克隆抗体) 和荧光标记的第二试剂孵育后,使用流式细胞术分别分选出阳性和阴性细胞,目的是分离表位递呈细胞和非表位递呈细胞。通过 Sanger 测序法对分离细胞的质粒 DNA 进行测序,并将序列与所述 RBM3 抗原比对以鉴定表位。使用实时监测表面表达水平的双标记法 (Löfblom, J et al (2005) FEMS Microbiol Lett 248, 189-198)。该方法可用表达水平标准化结合信号,提供小的细胞间差异,并使得可能辨别不同的表位群。此外,该方法还使得可进行平行测定,以确定表面上展示的非结合肽。

[0328] 对于所述多克隆抗体,鉴定了 SEQ ID NO :1 中的区域 SEQ ID NO :10-15。特别地,对区域 SEQ ID NO :11 和 SEQ ID NO :12 感兴趣,因为发现它们在之前鉴定的区域 SEQ ID NO :4 内。此外,区域 SEQ ID NO :13 和 SEQ ID NO :14 特别令人感兴趣,因为它们分别与之前鉴定的 SEQ ID NO :6 和 7 有很大程度的重叠。

[0329] 对于单克隆抗体 6F11,鉴定了 SEQ ID NO :1 中的区域 SEQ ID NO :16,此区域 (SEQ ID NO :16) 在之前确定的区域 SEQ ID NO :5 内。在这里的第 6 节中鉴定的 6F11 的表位区与在第 5 节中鉴定的 6F11 的表位区有 1 个氨基酸的重叠。然而,第 5 节和第 6 节的结果不矛盾;在第 5 节中发现结合 6F11 的一个肽 (肽 16) 包含 SEQ ID NO :16 (和 SEQ ID NO :19)。第 5 节和第 6 节的结果可因此被认为是互补的。

[0330] 对于单克隆抗体 1B5,鉴定了 SEQ ID NO :1 内的区域 SEQ ID NO :17,此区域 (SEQ ID NO :17) 也被发现在之前鉴定的区域 SEQ ID NO :5 内。对于单克隆抗体 7G3,鉴定了 SEQ ID NO :1 内的区域 SEQ ID NO :18。此区域 (SEQ ID NO :18) 也被发现在之前鉴定的区域 SEQ ID NO :5 中。此区域 (SEQ ID NO :18) 与所述 6F11 抗体的表位 (SEQ ID NO :16) 部分重叠。对于单克隆抗体 9B11,鉴定了 SEQ ID NO :1 内的区域 SEQ ID NO :19。

[0331] 阵列分析

[0332] 7. 发现 TMA

[0333] a) 材料和方法

[0334] 使用在实施例第 3 节得到的单克隆抗体 1B5 分析含有来自 20 种不同癌症类型的肿瘤组织的石蜡核心。作为供体块 (donor block) 用于制作组织微阵列 (TMA) 的所有组织都选自乌普萨拉大学医院病理科的档案, 并征得当地伦理委员会的批准。检查用于 TMA 分析的组织切片以确定诊断和分类。所有组织用福尔马林固定、石蜡包埋并切片, 用于诊断目的。

[0335] TMA 的制作基本上如前人所述 (Kononen J et al (1998) Nature Med. 4 :844-847 ; Kallioniemi OP et al (2001) Hum. Mol. Genet. 10 :657-662) 进行。简言之, 在受体 TMA 块上打一个洞, 获取来源于供体块的圆柱形核心组织样品, 并将该样品置于所述受体 TMA 块中。在 Beecher Instrument (ATA-27, Beecher Instruments, Sun Prairie, CA, USA) 的自动组织阵列点样仪中重复进行此步骤, 直到产生完整的 TMA 设计。TMA 受体块在 42℃ 温育 2 小时, 然后切片。

[0336] TMA :s 设计的重点在于包括代表性癌组织。这在以前被详细记载于 Kampf C et al (2004) Clin. Proteomics 1 :285-300。简言之, 选择来自 20 种人类最常见癌症类型的样品。每个 TMA 块均包含 72 个 1mm 直径的组织核心。对于 20 种癌症类型中的 17 种, 采集了个体不同的 12 个肿瘤, 并且对于剩下的 3 种癌症类型, 采集了个体不同的 4 个肿瘤, 所有样品对于同一肿瘤均设两个重复。用悬瀑切片机 (waterfall microtome) (Leica) 将所述 TMA 块以 4 μm 的厚度切片, 并置于 **SuperFrost®** (Roche Applied Science) 玻片上用于 IHC 分析。

[0337] 自动 IHC 如前人所述进行 (Kampf C et al (2004) Clin. Proteomics 1 :285-300)。简言之, 将玻片在 60℃ 孵育 45 分钟, 在二甲苯中脱蜡 (2×15min), 然后在梯度乙醇中水化。为修复抗原, 将玻片浸于 TRS (靶修复溶液, pH 6.0, DakoCytomation) 中, 并在 Decloaking **chamber®** (Biocare Medical) 中于 125℃ 煮沸 4 分钟。将玻片置于 **Autostainer®** (DakoCytomation) 中, 并用 H₂O₂ (DakoCytomation) 初步封闭内源过氧化物酶。将所述玻片用如实施例第 3 节所述得到的一抗室温孵育 30 分钟, 然后用山羊抗小鼠过氧化物酶缀合的 **Envision®** 室温孵育 30 分钟。所有步骤之间, 都用洗涤缓冲液 (DakoCytomation) 洗涤玻片。最后, 用二氨基联苯胺 (DakoCytomation) 作为发色团, 并用哈里斯 (Harris) 苏木精 (Sigma-Aldrich) 进行衬染。用 **Pertex®** (Histolab) 封固玻片。

[0338] 用 ScanScope T2 自动切片扫描系统 (Aperio Technologies) 扫描所有来自不同 TMA :s 的免疫组织化学染色切片。为了表示 TMA :s 的总含量, 生成了数字图像。扫描在 20 倍放大下进行。数字图像被分离并提取成独立标记的图像文件格式 (TIFF) 文件, 以储存原始数据。为了能够在基于网络的注释系统中处理所述图像, 将各图像由 TIFF 格式压缩为 JPEG 格式。免疫组织化学染色的组织的所有图像均在显微镜下被人工评估, 并有资质的病理学家注释或被专业人员注释并随后由病理专家确认。

[0339] 用对 IHC 结果分类的简化方案对每个不同的癌组织进行注释。检查每个组织的代表性和免疫反应性。对每种癌症, 注释出肿瘤细胞和间质。基本注释参数包括评估 : i) 亚细胞定位 (细胞核和 / 或细胞质 / 细胞膜), ii) 染色强度 (SI) 和 iii) 染色细胞比例 (FSC)。按照在临床组织病理学诊断中使用的标准主观地评估染色强度, 结果作如下分类 : 无 = 没

有免疫反应性,弱=微弱免疫反应性,中度=中等免疫反应性,或者,强=明显和强免疫反应性。染色细胞的比例被评估并分为免疫反应活性细胞占相关细胞群的< 2%、2-25%、> 25-75%或> 75%。基于免疫反应活性细胞的强度和比例,对每个组织样品给出“染色分值”:0 =阴性,1 =弱,2 =中度以及3 =强。N. R. 是指无代表性组织存在。详细的说,根据以下标准给出染色分值:如果SI =无并且FSC = 0-100%或者如果SI =弱并且FSC ≤ 25%,则给出0;如果SI =弱并且FSC > 25%或者如果SI =中度并且FSC ≤ 25%则给出1;如果SI =中度并且FSC > 25%或者如果SI =强并且FSC ≤ 25%,则给出2;如果SI =强并且FSC > 25%则给出3,见表1。技术人员会认识到此方法类似于Allred分值的计算,参见Allred et al(1998)Mod Pathol 11(2),155。

[0340]

表 1: 染色分值		
染色分值	染色强度	染色细胞的比例
0	无	<2%
0	无	2-25%
0	无	>25-75%
0	无	>75%
0	弱	<2%
0	弱	2-25%
1	弱	>25-75%
1	弱	>75%
1	中度	<2%
1	中度	2-25%
2	中度	>25-75%
2	中度	>75%
2	强	<2%
2	强	2-25%
3	强	>25-75%
3	强	>75%

[0341] b) 结果

[0342] 表 2 示出了来源于多种癌症类型的组织样品中的 RBM3 蛋白表达的水平。RBM3 蛋白表达见于除甲状腺癌以外的所有被测试的癌症类型中。然而,只有来源于三个不同受试者的样品可检测甲状腺癌。例如,经证明,染色分值在乳腺癌受试者中为 0-2,在宫颈癌受试者中为 0-2,在结直肠癌受试者中为 0-3,在头颈癌受试者中为 0-2,在肺癌受试者中为 0-2,在卵巢癌受试者中为 0-2,在睾丸癌受试者中为 0-2,在尿路上皮癌受试者中为 0-2。因此可得出结论,RBM3 蛋白在癌组织中通常差异表达,这支持其在多种类型的癌症中作为治疗预

测标志物的功能。

[0343]

表 2: RBM3 在 20 种癌症类型中的表达模式												
癌症类型	患者数目											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
乳腺癌	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	0	0
宫颈癌	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
结直肠癌	3	3	2	2	2	2	2	0	0	0	0	N.R.
子宫内膜癌	3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
头颈癌	2	2	0	0								
肾癌	3	3	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
肝癌	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
肺癌	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0	N.R.	N.R.
恶性类癌瘤	1	0	0	0								
恶性胶质瘤	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	N.R.	N.R.
恶性淋巴瘤	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0
恶性黑素瘤	3	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0
卵巢癌	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
胰腺癌	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	N.R.
前列腺癌	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	N.R.
皮肤癌	3	3	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
胃癌	2	1	1	1	1	1	0	0	0	N.R.	N.R.	N.R.
睾丸癌	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N.R.
甲状腺癌	0	0	0	N.R.								
尿路上皮癌	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	N.R.

[0344] 8. 卵巢癌 TMA, 潜在的群体

[0345] a) 材料和方法

[0346] 来源于对原发性侵袭性卵巢上皮癌进行手术治疗的 154 名患者的福尔马林固定石蜡包埋的存档组织, 是从瑞典马尔默大学医院病理科收集的。患者在 1982 到 2007 年被诊断。伦理许可从 Lund 地方伦理委员会获得。

[0347] 患者年龄的中值为 63 (47-83) 岁。对于所有样品, 均记录了时期 (根据 FIGO 分级): 26 个肿瘤处于 I 期, 18 个肿瘤处于 II 期, 75 个处于 III 期以及 22 个处于 IV 期。还

记录了级别:8个肿瘤高度分化(1级),39个中度分化(2级),107个低度分化(3级)。所述群体包括90个浆液性癌病例,35个子宫内膜样癌病例,12个粘液癌病例,9个透明细胞癌病例,1个布伦纳(Brenner)瘤病例以及7个组织类型不确定的病例。随访时间中值为2.67年。73名患者的治疗数据可用。标准治疗为基于铂的化疗,从20世纪90年代起结合紫杉醇。

[0348] 所有154个病例都在用苏木精和曙红染色的玻片上进行组织病理学重新评估。然后,对每个病例从卵巢上皮癌的代表部位取 $2 \times 1.0\text{mm}$ 的核心样品来构建TMA:s。

[0349] 使用根据上文第2节产生的多克隆抗体(anti-RBM3)和根据上文第3节产生的单克隆抗体1B5,按照以下方法分析所述材料。自动免疫组织化学如前人所述进行(Kampf C et al(2004)Clin. Proteomics1:285-300)。简言之,将玻片在 60°C 孵育45分钟,在二甲苯中脱蜡($2 \times 15\text{min}$),然后在梯度乙醇中水化。为修复抗原,将玻片浸于TRS(靶修复溶液,pH 6.0,Dako,Copenhagen,Denmark)中,并在Decloaking chamber®(Biocare Medical)中于 125°C 煮沸4分钟。将玻片置于Autostainer®(Dako)中,并用 H_2O_2 (Dako)初步封闭内源过氧化物酶。将所述玻片用RBM3一抗(anti-RBM3或1B5)室温孵育30分钟。然后用山羊抗过氧化物酶二抗(抗兔或抗小鼠)缀合的Envision®室温孵育30分钟。所有步骤之间,都用洗涤缓冲液(Dako)洗涤玻片。最后,用二氨基联苯胺(Dak)作为发色团,并用哈里斯(Harris)苏木精(Sigma-Aldrich)进行衬染。用Pertex®(Histolab)封固玻片。

[0350] 将经免疫组织化学染色的组织的所有样品在显微镜下人工评估,并由有资质的病理学家注释。用对IHC结果分类的简化方案对每个样品进行注释。检查每个组织样品的代表性和免疫反应性。

[0351] 基本注释参数包括评估:i)亚细胞定位(细胞核和/或细胞质/细胞膜),ii)染色强度(SI)和iii)染色细胞比例(FSC)。按照在临床组织病理学诊断中使用的标准主观地评估染色强度,结果作如下分类:无=没有免疫反应性,弱-中度=微弱到中等免疫反应性,或者,强=明显和强免疫反应性。也按照在临床组织病理学诊断中使用的标准主观地评估染色细胞的比例,结果作如下分类:免疫反应性细胞占相关细胞群 $< 2\%$ 、 $2-25\%$ 、 $> 25-75\%$ 或 $> 75\%$ 。技术人员会认识到此注释方法类似于Allred分值的计算,参见Allred et al(1998)Mod Pathol 11(2),155。因此,组织注释基本如上文实施例第7节所述进行。

[0352] 对于使用多克隆抗体时的统计分析,不将染色细胞的染色强度和比例结合起来得到“染色分值”,而是分别评估细胞核比例(NF),细胞核强度(NI)水平和细胞质强度(CI)水平。基于各个层级的存活趋势,建立二分变量用于进一步统计分析。将高细胞核比例定义为 $> 75\%$ (NF=3)染色细胞比例,将低细胞核比例定义为染色细胞的比例为 $0-75\%$ (NF < 3)染色细胞比例。此外,将高蛋白表达水平定义为强细胞核强度(NI=3),将低蛋白表达水平定义为无-弱以及中度细胞核强度(NI < 3)。同时,将高蛋白表达水平定义为强细胞质强度(CI=2),将低蛋白表达水平定义为无和弱/中度细胞质强度(CI < 2)。上述样品分类被用于根据Kaplan-Meier法进行总存活率(OS)和卵巢癌特异性存活率(OCSS)分析,并且使用时序检验(log-rank test)来比较不同层级的存活。所有统计检验都是双侧检验,且p值 $< 0.05\%$ 被认为具有显著性。所有计算都用统计软件包SPSS 17.0(SPSS Inc. Illinois, USA)进行。

[0353] 对于使用单克隆抗体1B5时的统计分析,将细胞核和细胞质染色结合起来获得

0-2 的染色分值 (SS)。只考虑了强度,但大多数阳性肿瘤的比例水平 $> 50\%$ 。SS = 0 被定义为无表达,SS = 1 被定义为弱或中度表达,SS = 2 被定义为强表达。

[0354] 基于各个层级的存活趋势,建立二分变量用于进一步统计分析。高染色分值被定义为 SS > 0 或 SS = 2。低染色分值被定义为 SS = 0 或 SS < 2 。将上述样品分类用于根据 Kaplan-Meier 法的总存活率 (OS) 分析,并且使用时序检验来比较不同层级的存活。所有统计检验都是双侧检验,且 p 值 $< 0.05\%$ 时被认为具有显著性。所有计算都用统计软件包 SPSS17.0 (SPSS Inc. Illinois, USA) 进行。

[0355] b) 结果

[0356] 对所述群体的初始分析揭示,全部患者的 OS 为约 38% 而 OCSS 为约 39%, 分别如图 1A 和 1B 所示。

[0357] 对全部 154 个肿瘤样品均可用 anti-RBM3 进行 RBM3 表达的免疫组织化学分析。在 154 个组织核心的 147 个中 (95%) 观察到了阳性细胞核比例 (NF > 0)。在 154 名受试者的 147 名中 (95%) 观察到了细胞核染色 (NI > 0) 的肿瘤细胞,在 154 名受试者的 84 名中 (55%) 观察到了细胞质染色 (CI > 0) 的肿瘤细胞。

[0358] 可对所述 154 个肿瘤样品中的 149 个用 1B5 进行 RBM3 表达的免疫组织化学分析。在 149 个组织核心的 55 个中 (37%) 观察到了阳性染色分值 (SS > 0)。

[0359] 对整个群体的存活分析揭示, anti-RBM3 阳染的肿瘤细胞的比例与 OS (图 2A 和 2B) 和 OCSS (图 3A 和 3B) 显著相关,即高 RBM3 蛋白水平对应更好的存活。对于比例值 NF $> 75\%$ 的患者,5 年 OS 为约 44%, 而 RBM3 比例值 NF $\leq 75\%$ 的患者的 OS 为约 25% (图 4)。细胞核强度水平和细胞质强度水平也显示出与 OS (图 5A 和 5B) 和 OCSS (图 6A 和 6B) 的关联。

[0360] 令人意外的是,当单独分析患有 2 级 (中度分化的) 肿瘤 (图 7A 和 7B) 或者 1 或 2 级 (高度或中度分化的) 肿瘤 (图 8A 和 8B) 的患者组时, RBM3 蛋白水平与存活 (OS 和 OCSS) 之间的关联特别显著。因此,诊断患有高度或中度分化的 EOC 的患者可能特别适合 RBM3 蛋白水平的分析。

[0361] 有趣的是,在被诊断患有 I 期或 II 期 EOC 的患者中, RBM3 蛋白水平也与 OS 和 OCSS 显著相关 (图 9A 和 9B)。因此,被诊断患有 I 期或 II 期 EOC 的患者可特别适合 RBM3 蛋白水平的分析。

[0362] 此外,在患有子宫内膜样肿瘤的患者亚组中, RBM3 蛋白水平也与 OS 和 OCSS 显著相关 (图 10A 和 10B)。如果只分析患有 I 期或 II 期子宫内膜样 EOC 的患者,对存活的影响甚至更严重 (图 11A 和 12B)。因此,被诊断患有子宫内膜样 EOC 的患者可特别适合 RBM3 蛋白水平的分析。

[0363] 当分析患有浆液性肿瘤的患者亚组时,也发现了 RBM3 蛋白强度水平与 OS 和 OCSS 之间的显著关联 (图 12 和 13)。如果只分析患有 1 级或 2 级 (高度或中度分化的) 浆液性 EOC 的患者, RBM3 对存活的影响甚至更严重 (图 14A 和 14B)。因此,诊断患有浆液性 EOC 的患者可特别适合 RBM3 蛋白水平的分析。

[0364] 用 1B5 进行的染色揭示了与用 anti-RBM3 获得的结果相似, RBM3 阳染的肿瘤细胞比例与 OS (图 15A 和 15B) 和 OCSS (图 16A 和 16B) 显著相关,即高 RBM3 蛋白水平对应更好的存活。

[0365] 当单独分析患有 1 或 2 级（高度或中度分化的）肿瘤的患者组时，RBM3 蛋白水平与 OS 之间的关联特别显著（图 17）。因此，诊断患有高度或中度分化的 EOC 的患者可特别适合 RBM3 蛋白水平的分析。

[0366] 此外，在患有子宫内膜样肿瘤的患者亚组中，RBM3 蛋白水平也与 OS 显著相关（图 18）。

[0367] 总之，用基于铂的试剂治疗的 EOC 受试者在高 RBM3 的情况下具有比在低 RBM3 的情况下更好的存活。

[0368] 9. 卵巢癌的基因表达分析

[0369] a) 材料和方法

[0370] 基于从 1992 到 2006 年被诊断患有卵巢上皮样癌的 285 名患者的患者群，从之前进行的微阵列研究中收集数据。对于全部患者均获得了患者同意的伦理审查委员会的批准。

[0371] 患者的年龄中值为 59 (18-79) 岁。发明人决定排除来自接受新辅助疗法的 18 名患者的数据，因为发明人认识到这种治疗可能影响 RBM3mRNA 水平，并因此可能导致结果偏倚。此外，将来自未接受基于铂的治疗的 40 名患者的数据从所述数据集中去掉。在这 227 个样品中，210 个来自患有浆液性癌症的患者，16 个来自患有子宫内膜癌的患者，1 个来自患有腺癌的患者。对于统计分析，只考虑浆液性样品。对于全部患者均有病理学评估数据，并且对于高 RBM3mRNA 含量以及低 RBM3mRNA 含量均评估了无复发存活率。

[0372] b) 结果

[0373] 对 285 个肿瘤样品的 210 个进行 RBM3 表达的阵列分析。构建二分变量用于统计分析。如图 19 所示，具有高 RBM3 表达水平的经顺铂治疗的肿瘤患者具有比具有低 RBM3 表达水平的肿瘤患者显著更好的无复发存活率。

[0374] 10. 睾丸 TMA

[0375] a) 材料和方法

[0376] 从 1995 到 2008 年在 UMAS 病理学系从被诊断患有睾丸生殖细胞肿瘤 (TGCT) 的 30 个患者中收集肿瘤材料。所述样品中的 5 个是纯精原细胞瘤，25 个是非精原细胞瘤性 TGCT。非精原细胞瘤性 TGCT 根据国际生殖细胞癌症合作组 (IGCCC) 进行分类。所述 25 个样品中的 4 个是分类为 IGCCC 中度预后的病例，5 个样品是分类为 IGCCC 不良预后的病例。剩余的 16 个非精原细胞瘤性 TGCT 病例被分类为 IGCCC 良好预后。此研究的许可从 Lund 大学伦理委员会获得；参考号为 447-07 和 493-09。5 名患者死于他们的疾病，其中 4 名是 IGCCC 不良预后，1 名是 IGCCC 中度预后。全部患者均接受了顺铂治疗。

[0377] 在 TMA 构建之前，将来自每个病例的全部可用苏木素和伊红染色的切片进行组织病理学重新评估。组织学亚型的总数被表示出，并且代表每种亚型的区域被描绘，包括难以分类的区域。然后，对完全覆盖切片 (full-face section) (涵盖每个病例中全部不同部分所需的数量) 的 SOX-2 和 CD30 染色，以一步确定和修正所述分类。在一个病例中，只有尸检材料可用于分析。按比例从每个侵袭性肿瘤取得标准设置为 $4 \times 1\text{mm}$ 的核心，涵盖最多 3 个不同的部分。使用了半自动阵列装置 (TMArrayer; Pathology Devices, Inc, Westminster, MD, USA)。此外，从 15 个病例患 ITGCN 的区域并从 22 个病例的正常睾丸中取得 $2 \times 1\text{mm}$ 的核心。从进行 RPLND 的 15 个病例中，从有残余肿瘤的 8 个病例的 6 个中取得 $2-4 \times 1\text{mm}$ 的

组织核心。

[0378] 自动免疫组织化学如前人所述进行 (Kampf C et al (2004) Clin. Proteomics 1: 285-300)。简言之, 将玻片在 60℃ 孵育 45 分钟, 在二甲苯中脱蜡 (2×15min), 然后在梯度乙醇中水化。对于抗原修复, 将玻片浸于 TRS (靶修复溶液, pH 6.0, Dako, Copenhagen, Denmark) 中, 并在 Decloaking **chamber**® (Biocare Medical) 中于 125℃ 煮沸 4 分钟。将玻片置于 **Autostainer**® (Dako) 中, 并用 H₂O₂ (Dako) 初步封闭内源过氧化物酶。将所述玻片与如实施例第 3 节所得到的 RBM3 单克隆一抗 1B5 室温孵育 30 分钟, 然后与山羊抗小鼠过氧化物酶缀合的 **Envision**® 室温孵育 30 分钟。所有步骤之间, 都用洗涤缓冲液 (Dako) 洗涤玻片。最后, 用二氨基联苯胺 (Dako) 作为发色团, 并用哈里斯 (Harris) 苏木精 (Sigma-Aldrich) 进行衬染。用 **Pertex**® (Histolab) 封固玻片。

[0379] 对于 RBM3 的免疫组织化学分析, 使用 PT-link 系统 (DAKO, Copenhagen, Denmark) 自动预处理 4 μm TMA- 切片, 然后用 1 : 10000 稀释的 RBM3 克隆 1B5 抗体在 Techmate 500 (DAKO, Copenhagen, Denmark) 中染色。

[0380] 将经免疫组织化学染色的组织的所有样品在显微镜下人工评估, 并由有资质的病理学家注释。用对 IHC 结果分类的简化方案对每个样品进行注释。检查了每个组织样品的代表性和免疫反应性。

[0381] 基本注释参数包括评估: i) 亚细胞定位 (细胞核和 / 或细胞质 / 细胞膜), ii) 染色强度 (SI) 和 iii) 染色细胞比例 (FSC)。按照在临床组织病理学诊断中使用的标准主观地评估染色强度, 结果作如下分类: 无 = 没有免疫反应性, 弱 - 中度 = 微弱到中等免疫反应性, 或者, 强 = 明显和强免疫反应性。也按照在临床组织病理学诊断中使用的标准主观地评估染色细胞的比例, 结果作如下分类: 免疫反应性细胞占相关细胞群 < 2%、2-25%、> 25-75% 或 > 75%。技术人员会认识到此注释方法类似于 Allred 分值的计算, 参见 Allred et al (1998) Mod Pathol 11(2), 155。

[0382] 对于统计分析, 将细胞核和细胞质染色的图示结合起来获得 0-3 的染色分值 (SS)。只考虑强度, 但大多数阳性肿瘤的比例水平 > 50%。SS = 0 被定义为无表达, SS = 1 被定义为弱度表达, SS = 2 被定义为中度表达, SS = 3 被定义为强表达。

[0383] b) 结果

[0384] RBM3 表达被注释为 0、1、2 或 3, 3 表示最高的染色分值 (SS)。如图 20 所示, RBM3 表达强度与建立的预后类别很好地相关。死于其疾病的患者均显示出相对低水平的 RBM3 表达。这对于大部分属于不良预后类别的患者也是成立的, 而在良好的预后类别中是具有很强 RBM3 表达 (SS = 3) 的全部患者和具有强 RBM3 表达 (SS = 2) 的几乎全部患者。患有精原细胞瘤的所有患者——公知其具有良好预后——均具有很强的 RBM3 表达 (SS = 3)。

[0385] 如图 21 所示, 在 RBM3 蛋白表达与存活之间存在明显的相关。在死于其疾病的患者中没有具有高 RBM3 蛋白表达的患者。具有高 RBM3 蛋白表达的全部患者在观察期结束时都存活。

[0386] 细胞培养实验

[0387] 11. 顺铂敏感细胞系和顺铂抗性细胞系中的 RBM3 表达

[0388] a) 材料和方法

[0389] 通过蛋白质印迹分析了顺铂敏感细胞系 (A2780) 和顺铂抗性细胞系

(A2780-cp70) 中 RBM3 蛋白的表达。通过以下方式进行蛋白质印迹：依照厂商的建议，通过在还原条件下在 17% SDS-PAGE 凝胶上从选择的人类细胞系分离总蛋白提取物，然后电转导至 PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories) 上。将所述膜室温封闭（在含有 0.1% 吐温 20 的 1×PBS 中的 5% BSA）1 小时，与亲和纯化的第一抗体（在封闭缓冲液 1 : 1000 稀释）孵育，再在 TBST 中洗涤。将缀合 HRP 的二抗（山羊抗小鼠免疫球蛋白 /HRP, GE）在封闭缓冲液中 1 : 10000 稀释，并依照厂商的方案使用 Chemidoc™ CCD 相机 (Bio-Rad Laboratories) 和蛋白质印迹鲁米诺试剂 (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Biotechnologies, Inc) 进行化学发光检测。

[0390] b) 结果

[0391] 蛋白质印迹分析的结果示于图 22。RBM3 蛋白的表达在顺铂抗性细胞系 (A2780-cp70) 中低于在顺铂敏感细胞系 (A2780) 中。所用的全部抗体 (anti-RBM3、6F11、1B5) 显示了相似的结果。

[0392] 此外，单克隆抗体 6F11 和 1B5 显示出比多克隆抗体 anti-RBM3 更高的对 RBM3 蛋白的选择性。1B5 还显示出比 6F11 更高的选择性。

[0393] 12. 对顺铂治疗的差别反应性的确认

[0394] a) 材料和方法

[0395] 依照厂商建议，通过 WST-1 测定 (Roche Applied Science) 确定了顺铂对细胞生存力的效应。在加入顺铂前一天，将 A2780 和 A2780-Cp70 细胞以 2500 个细胞 / 孔的密度接种到 96 孔板中的 100 μ l 的合适培养基中。将所述细胞用顺铂 (0-100 μ M) 处理 48 小时。样品重复三份。每孔加入 10 微升 WST-1 溶液并将细胞在 37°C 孵育 4 小时。使用扫描多孔分光光度计、ELISA 酶标仪在 450nm 的波长和 690nm 的参照波长下测量每孔的吸光度。

[0396] b) 结果

[0397] 当分析 A2780 和 A2780-cp7 细胞在顺铂处理后的生存力时，清楚显示了顺铂抗性的 A2780-cp70 细胞在与亲本 A2780 细胞相比有生存力增加（图 23）。

[0398] 13. RBM3 敲除对顺铂抗性的效应

[0399] a) 材料和方法

[0400] 将人卵巢癌细胞系 A2780 及其顺铂抗性变种 A2780Cp70 在 37°C 和 5% CO₂ 的湿润培养箱中维持在添加有谷氨酰胺、10% 胎牛血清和 1% 青霉素 / 链霉素的 RPMI-1640 中。将顺铂 (Sigma) 溶解在 0.9% NaCl 中，制成 1mg/ml 的储液，然后加入细胞培养物中至终浓度 (1-100 μ M)。

[0401] 用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 以针对 RBM3 的 siRNA (Applied Biosystems, Carlsbad, Ca) 或对照 siRNA (Applied Biosystems) 进行转染，终浓度为 50nM siRNA。

[0402] 如实施例第 12 节所述通过 WST-1 测定确定顺铂对细胞生存力的效应。

[0403] b) 结果

[0404] 低 RBM3 蛋白表达导致顺铂敏感细胞在顺铂治疗后生存力增加，如图 24 所示。暴露于不同 RBM3 siRNA 的细胞与未暴露的细胞相比生存力有显著不同。这些结果显示，低 RBM3 蛋白表达指示顺铂抗性，高 RBM3 蛋白表达指示顺铂敏感性。

[0405] 治疗预测的建立

[0406] 14. 非限制性实例

[0407] 在确定患者中的癌症后,从该患者中获得肿瘤组织样品。所述肿瘤组织样品可从之前手术切除肿瘤时获得的样品中或者从肿瘤活检中获得。此外,为提供“阴性参照”,从包含低 RBM3 蛋白表达或基本无 RBM3 蛋白表达的组织的存档材料中取样。这类存档组织例如可为来自与测试受试者之一癌症类型相同的具有预先确定的低 RBM3 蛋白表达水平的组织。此外,为提供“阳性参照”,从也来自与测试受试者之一癌症类型相同的包含高 RBM3 蛋白表达的组织的存档材料中取样,所述组织例如具有预先确定的高 RBM3 蛋白表达水平的恶性黑素瘤组织。

[0408] 将所述样品材料固定在经缓冲的福尔马林中并进行组织学处理,目的是获得所述样品材料的薄切片(4 μ m)。

[0409] 根据实施例第 8 节中所述的内容进行免疫组织化学分析。将来源于每个样品的一个或多个样品切片封固在玻片上,在 60℃ 孵育 45 分钟,在二甲苯中脱蜡(2×15min)(如果目的样品被石蜡包埋的话),然后在梯度乙醇中水化。对于抗原修复,将玻片浸于 TRS(靶修复溶液, pH6.0, DakoCytomation)中,并在 Decloaking **chamber**® (Biocare Medical) 中于 125℃ 煮沸 4 分钟。将玻片置于 **Autostainer**® (DakoCytomation) 中,并用 H₂O₂ (DakoCytomation) 初步封闭内源过氧化物酶。封固多个样品切片的原因是增加结果的准确性。

[0410] 将 RBM3 蛋白特异性一抗(例如如实施例第 3 节所得到的单克隆抗体)加至所述玻片并室温孵育 30 分钟,然后用标记的二抗例如山羊抗小鼠过氧化物酶缀合的 **Envision**® 室温孵育 30 分钟。为检测所述二抗,用二氨基联苯胺(DakoCytomation)作为发色团,并用哈里斯(Harris)苏木精(Sigma-Aldrich)衬染作为对比。所有步骤之间,都用洗涤缓冲液(DakoCytomation)漂洗玻片。然后用 **Pertex**® (Histolab) 封固介质封固玻片。

[0411] 任选地,可使用两个对照细胞系作为验证所述染色过程的工具;例如一个玻片载有表达 RBM3 蛋白的细胞(阳性细胞系),一个玻片载有不明显的微弱的 RBM3 蛋白表达或不表达 RBM3 蛋白的细胞(阴性细胞系)。技术人员理解如何提供这类细胞系,例如由 Rhodes et al. (2006) The biomedical scientist, p 515-520 的公开指导。所述对照细胞系玻片可以与其他玻片相同的方法同时染色,即与相同的一抗和二抗孵育。

[0412] 例如,可以将来源于所述受试者的肿瘤组织玻片、染色参照玻片以及任选的载有对照细胞系的玻片在使用 ScanScope T2 自动玻片扫描系统(Aperio Technologies)的光学显微镜下以×20 的放大率扫描。然而,此扫描步骤不是必须的,但在例如以下情况下可使得所述方法更容易:如果所述玻片的制备和染色以及对所染色玻片的评估(见下)是在不同的位点或由不同人进行的。

[0413] 如果使用对照细胞系,那么对这些细胞系进行检查以验证所述染色过程。如果所述细胞系呈现可接受标准之外的染色结果,例如被技术人员识别为人为染色,那么所述组织样品的染色被认为无效,用新玻片重复整个染色过程。如果所述阳性和阴性细胞系分别呈现强染色强度以及不明显的微弱染色强度或无染色强度,那么所述染色被认为是有效的。

[0414] 根据临床组织病理学诊断中使用的标准通过目测人工评估来源于所述肿瘤组织的染色样品玻片,并根据上文实施例第 8 节将结直肠癌玻片的免疫反应性分级。

[0415] 即,确定细胞核强度、细胞核比例、细胞质强度和 / 或细胞质比例,以获得一个或多个样品值。进行所述评估和确定的人借助于目测所述染色的阳性和阴性参照玻片。

[0416] 然后,将从所述患者获得的肿瘤组织样品的样品值与参照值进行比较。如果评估了多于一个样品玻片并从而获得多于一个样品值,那么与所述参照值进行比较的样品值可为所获得样品值的平均值或中值。

[0417] 如果使用单克隆抗体 1B5,那么所述参照值可为无细胞核强度和 / 或无细胞质强度。

[0418] 如果所述样品值高于所述参照值,那么负责所述患者治疗的医师就得出结论,所述患者对基于铂的治疗的反应性相对高,并且,任选地,所述患者应被给予基于铂的治疗。

[0419] 然而,如果所述样品值低于或等于所述参照值,那么医师就得出结论,所述患者对基于铂的治疗的反应性相对低,并且,任选地,如果所述患者患有睾丸癌或卵巢癌,那么所述患者因此应被给予更高强度(例如更高剂量)的基于铂的治疗,如果所述患者患有任何其他类型的癌症,那么应放弃基于铂的治疗。

[0001]

序列表

<110> 阿特拉斯抗体有限公司
<120> 预测对基于铂的治疗的反应性
<130> 21045891
<150> PCT/SE2009/000091
<151> 2009-02-16
<150> PCT/EP2009/067419
<151> 2009-12-17
<150> EP09158084.5
<151> 2009-04-16
<150> US 61/169,963
<151> 2009-04-16
<150> EP09167847.4
<151> 2009-08-13
<150> US 61/233,769
<151> 2009-08-13
<160> 21
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 134
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)
<400> 1
Asp Glu Gln Ala Leu Glu Asp His Phe Ser Ser Phe Gly Pro Ile Ser
1 5 10 15
Glu Val Val Val Val Lys Asp Arg Glu Thr Gln Arg Ser Arg Gly Phe
20 25 30
Gly Phe Ile Thr Phe Thr Asn Pro Glu His Ala Ser Val Ala Met Arg
35 40 45
Ala Met Asn Gly Glu Ser Leu Asp Gly Arg Gln Ile Arg Val Asp His
50 55 60
Ala Gly Lys Ser Ala Arg Gly Thr Arg Gly Gly Gly Phe Gly Ala His
65 70 75 80
Gly Arg Gly Arg Ser Tyr Ser Arg Gly Gly Gly Asp Gln Gly Tyr Gly
85 90 95
Ser Gly Arg Tyr Tyr Asp Ser Arg Pro Gly Gly Tyr Gly Tyr Gly Tyr
100 105 110
Gly Arg Ser Arg Asp Tyr Asn Gly Arg Asn Gln Gly Gly Tyr Asp Arg
115 120 125
Tyr Ser Gly Gly Asn Tyr
130

[0002]

<210> 2
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 2

Met Ser Ser Glu Glu Gly Lys Leu Phe Val Gly Gly Leu Asn Phe Asn
 1 5 10 15

Thr Asp Glu Gln Ala Leu Glu Asp His Phe Ser Ser Phe Gly Pro Ile
 20 25 30

Ser Glu Val Val Val Val Lys Asp Arg Glu Thr Gln Arg Ser Arg Gly
 35 40 45

Phe Gly Phe Ile Thr Phe Thr Asn Pro Glu His Ala Ser Val Ala Met
 50 55 60

Arg Ala Met Asn Gly Glu Ser Leu Asp Gly Arg Gln Ile Arg Val Asp
 65 70 75 80

His Ala Gly Lys Ser Ala Arg Gly Thr Arg Gly Gly Gly Phe Gly Ala
 85 90 95

His Gly Arg Gly Arg Ser Tyr Ser Arg Gly Gly Gly Asp Gln Gly Tyr
 100 105 110

Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asp Ser Arg Pro Gly Gly Tyr Gly Tyr Gly
 115 120 125

Tyr Gly Arg Ser Arg Asp Tyr Asn Gly Arg Asn Gln Gly Gly Tyr Asp
 130 135 140

Arg Tyr Ser Gly Gly Asn Tyr Arg Asp Asn Tyr Asp Asn
 145 150 155

<210> 3
 <211> 1130
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

atgcgcaatg tggeccccta atggtggctg cgetgagcca gctctcaga ttaccacett 60
 attggccgcc ttctcagct ttctgtagt taccatatt ttgttctct ttcttgtcta 120
 tttctgtgc ttttctctg ctttccgtct cgtattttc tcacatctc attttcttc 180
 tccttctgc caccattctt catgttctt ccacaggact tgaactgcca tgtctctga 240
 agaaggaaag ctcttcgtgg gagggctcaa cttaacacc gacgagcagg cactggaaga 300
 ccacttcagc agtttcggac ctatctctga ggtggctggt gtcaaggacc gggagactca 360
 gcggctcagg ggttttggtt tcatcactt caccaacca gacatgctt cagttgcat 420
 gagagccatg aacggagagt ctctggatgg tcgtcagatc cgtgtggatc atgcaggcaa 480
 gtctgctcgg ggaaccagag gagtggtt tggggcccat gggcgtggtc gcagctactc 540

[0003]

```

tagaggtaggt ggggaccagg gctatgggag tggcaggtat tatgacagtc gacctggagg      600
gtatggatat ggatatggac gttccagaga ctataatggc agaaaccagg gtggttatga      660
ccgctactca ggaggaaatt acagagacaa ttatgacaac tgaaatgaga catgcacata      720
atatagatac acaaggaata atttctgate caggatcgte cttccaaatg gctgtattta      780
taaaggtttt tggagctgca ccgaagcate ttattttata gtatatcaac cttttgtttt      840
taaattgacc tgccaaggta gctgaagacc ttttagacag ttccatcttt ttttttaaatt      900
tttttctgcc tatttaaaga caaattatgg gacgtttgta gaacctgagt atttttcttt      960
ttaccagttt tttagtttga gctcttaggt ttattggagc tagcaataat tggttctggc     1020
aagtttgccc agactgactt caaaaaatta atgtgtatcc agggacattt taaaaacctg     1080
tacacagtgt ttattgtggt taggaagcaa tttcccaatg tacctataag                    1130

```

<210> 4
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 4

```

Arg Gly Phe Gly Phe Ile Thr Phe Thr Asn Pro Glu His Ala Ser Val
1              5              10              15

```

```

Ala Met Arg Ala Met Asn Gly Glu Ser Leu Asp Gly Arg
                20              25

```

<210> 5
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

```

Arg Ser Tyr Ser Arg Gly Gly Gly Asp Gln Gly Tyr Gly Ser Gly Arg
1              5              10              15

```

```

Tyr Tyr Asp Ser Arg Pro Gly Gly
                20

```

<210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 6

```

Thr Phe Thr Asn Pro
1              5

```

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 7

```

Gly Thr Arg Gly Gly Gly Phe Gly Ala His
1              5              10

```

[0004]

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 8

Gly Phe Gly Ala His Gly Arg Gly Arg Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 9

Tyr Asp Arg Tyr Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 10

Asp Glu Gln Ala Leu Glu Asp His Phe
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 11

Thr Asn Pro Glu His Ala Ser
1 5

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 12

Glu His Ala Ser Val Ala Met Arg Ala Met
1 5 10

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 13

Arg Gly Gly Gly Phe Gly Ala His Gly Arg
1 5 10

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

[0005]

<400> 14

Gly Phe Gly Ala His Gly Arg Gly
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 15

Asp Tyr Asn Gly Arg Asn Gln Gly Gly
1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 16

Ser Tyr Ser Arg Gly
1 5

<210> 17

<211> 11

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 17

Asp Gln Gly Tyr Gly Ser Gly Arg Tyr Tyr Asp
1 5 10

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 18

Ser Tyr Ser Arg Gly Gly
1 5

<210> 19

<211> 3

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 19

Asp Glu Gln
1

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 20

gacgagcagg cactggaag

19

<210> 21

<211> 20

[0006]

<212>	DNA	
<213>	人 (Homo sapiens)	
<400>	21	
	gtaatttcct cctgagtagc	20

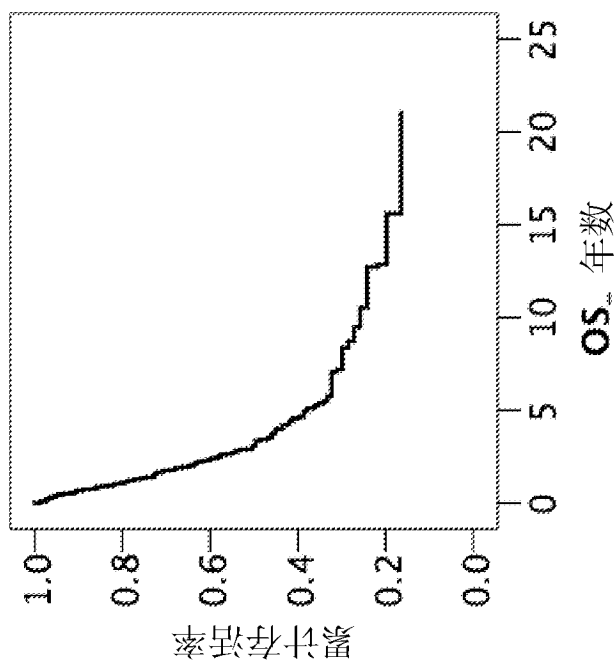


图 1A

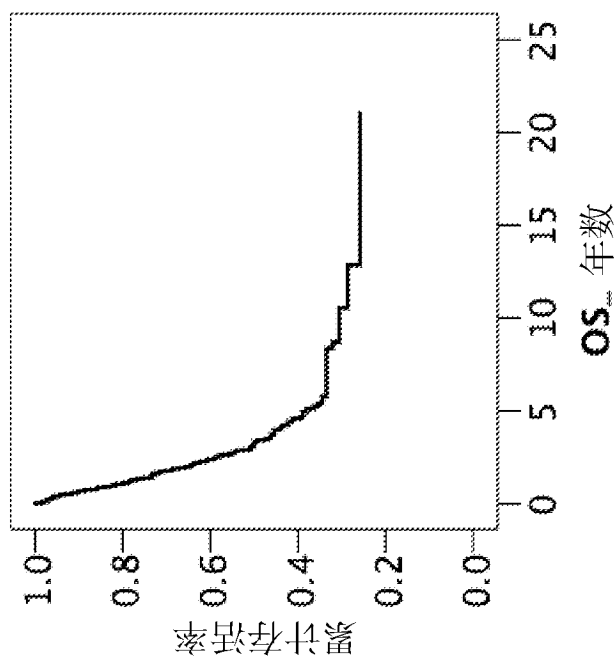


图 1B

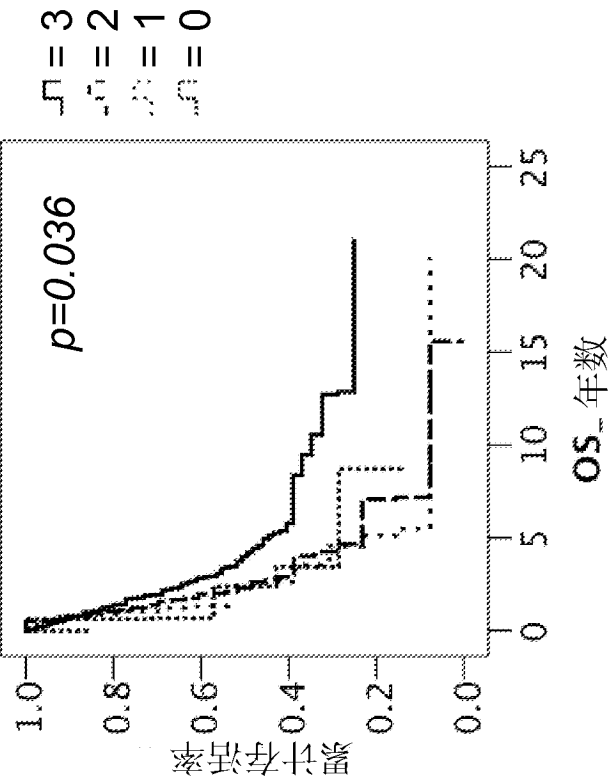


图 2A

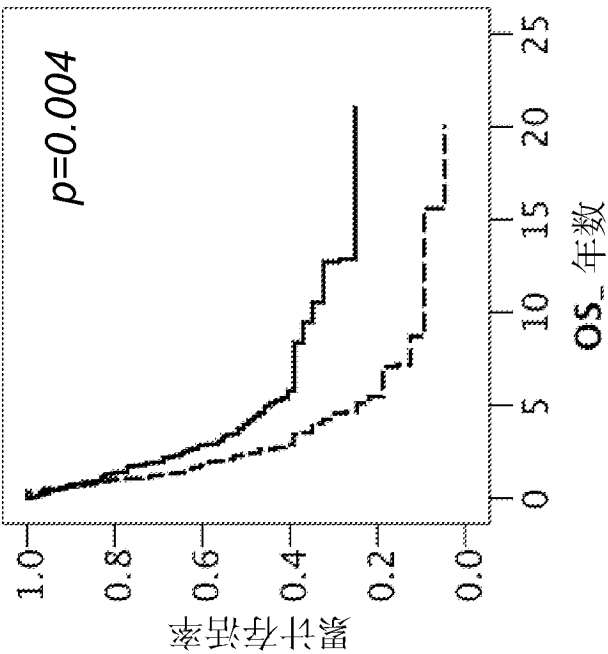


图 2B

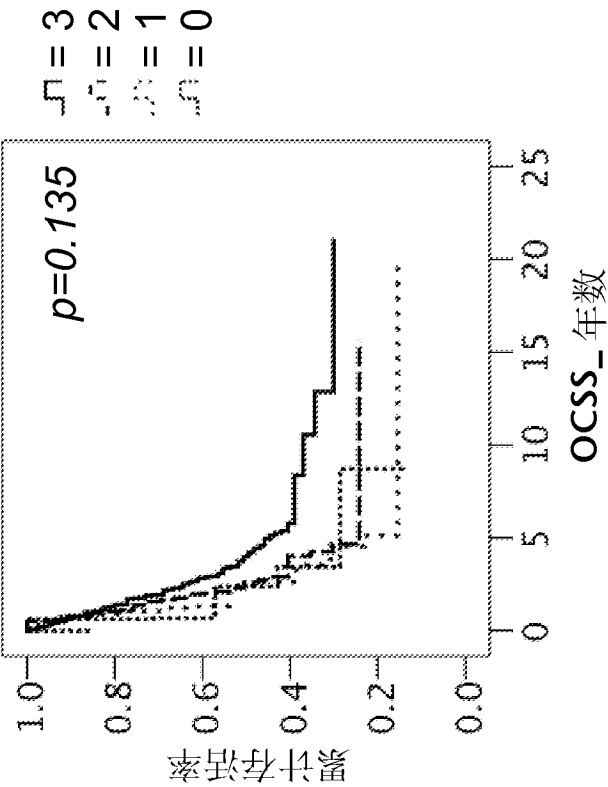


图 3A

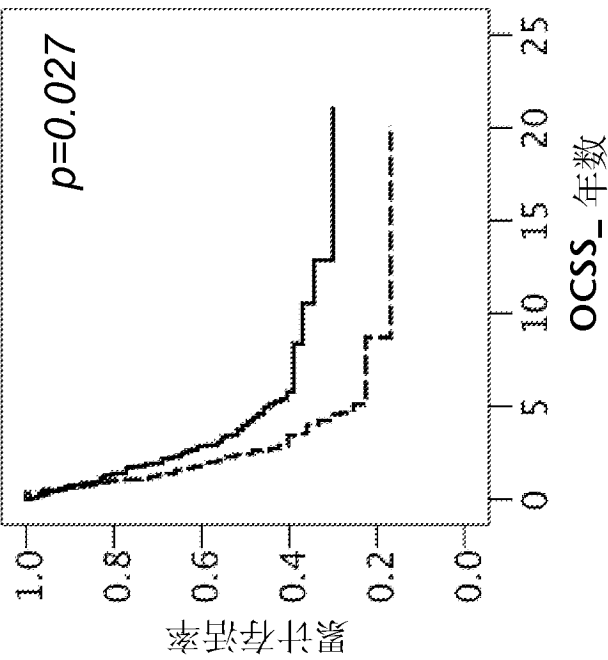


图 3B

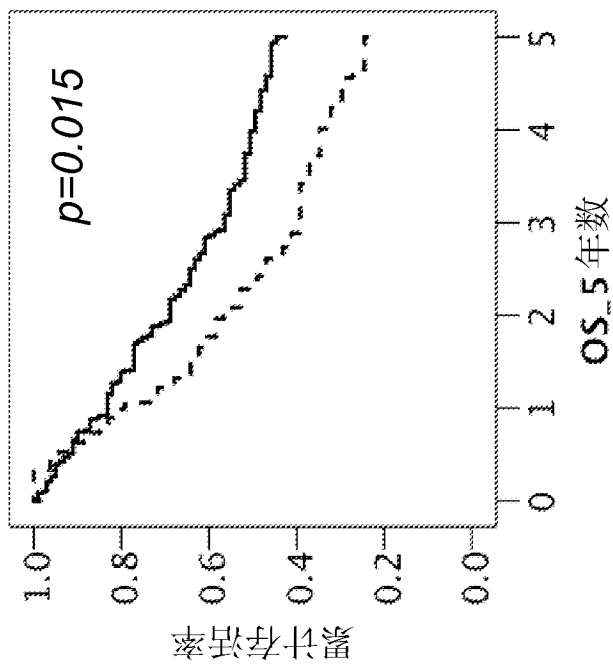


图 4

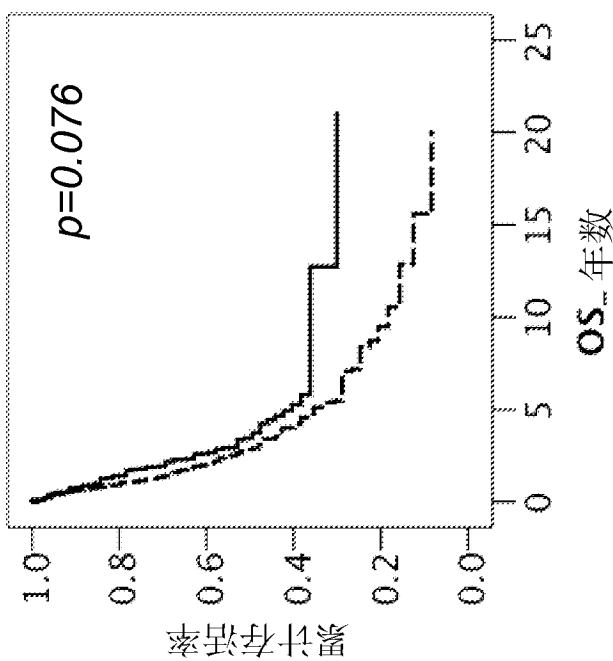


图 5A

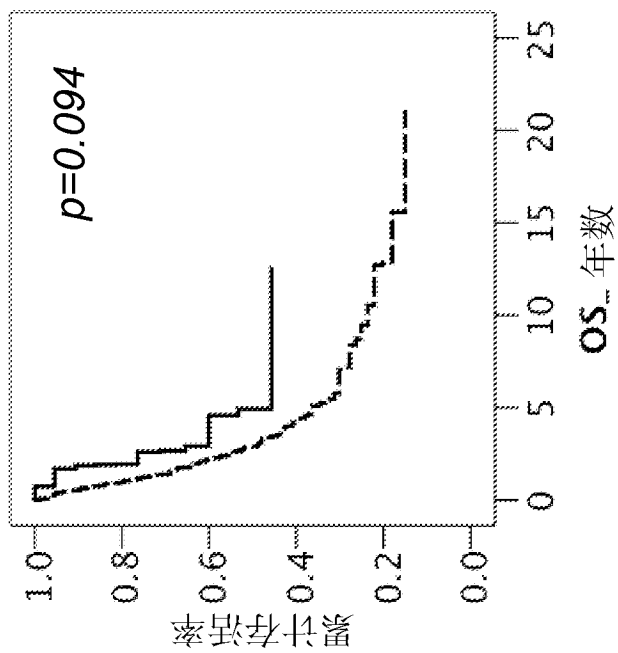


图 5B

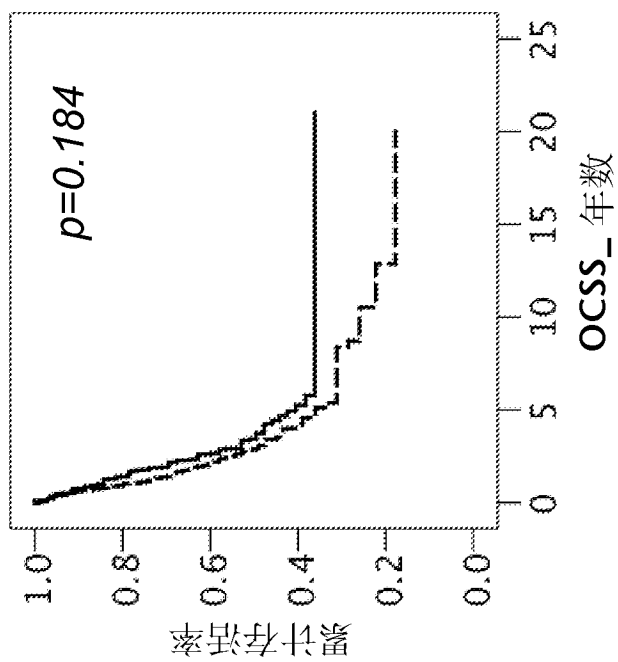


图 6A

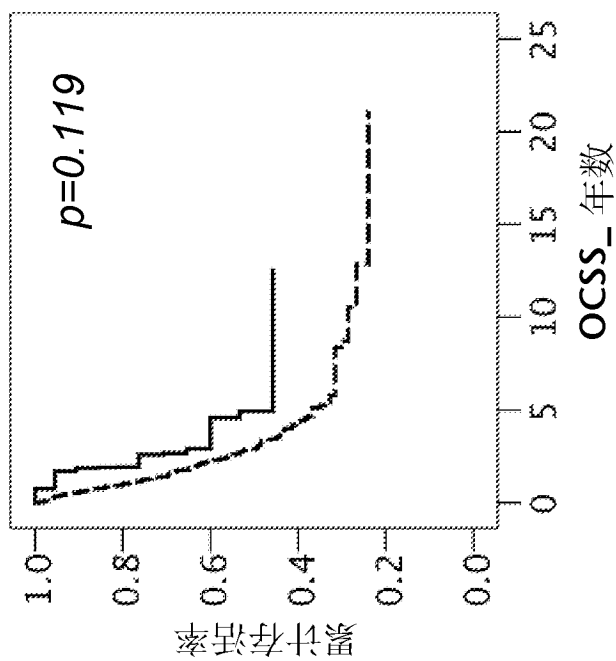


图 6B

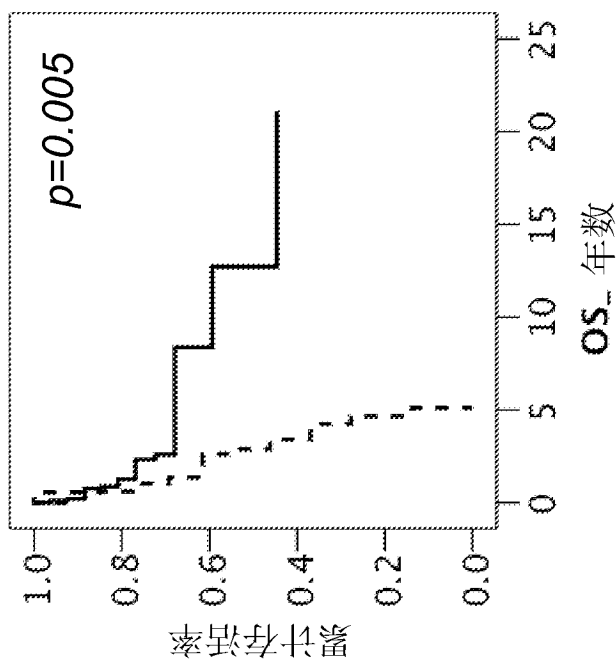


图 7A

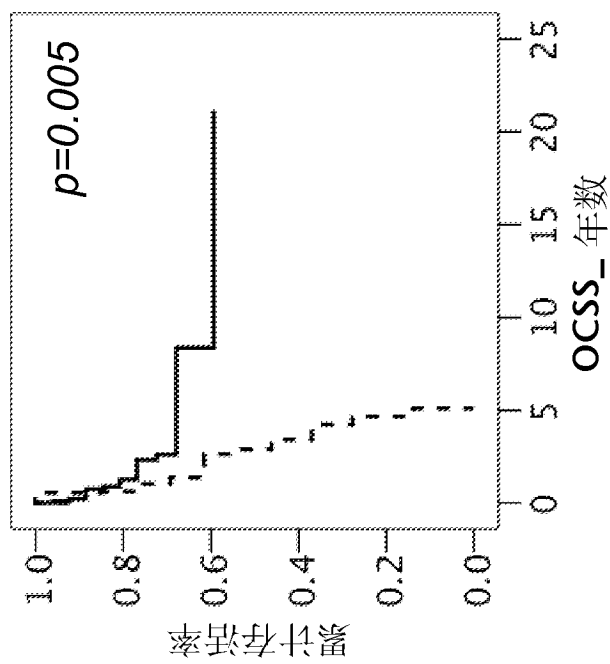


图 7B

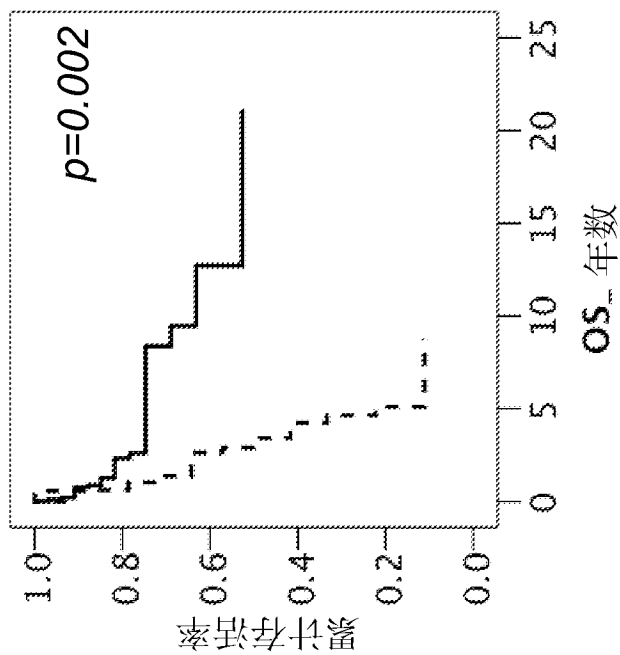


图 8A

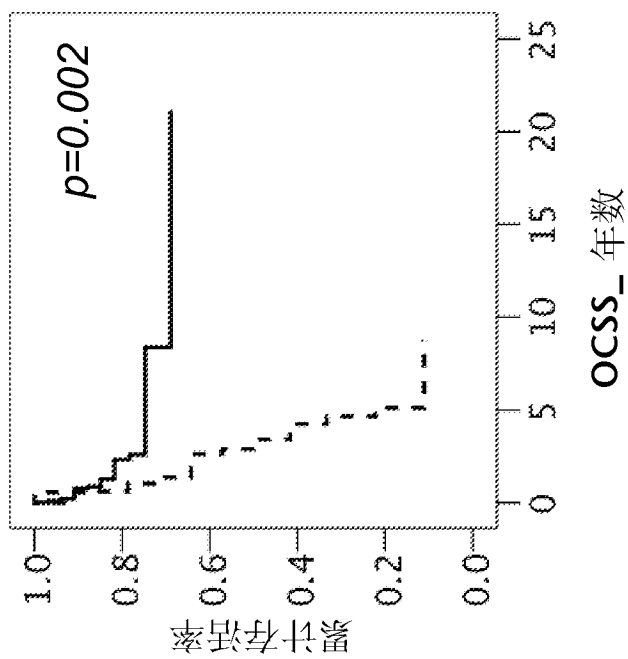


图 8B

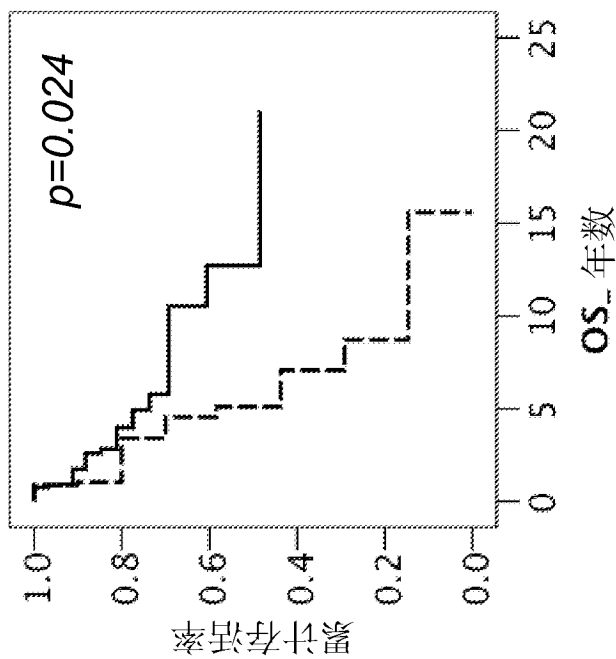


图 9A

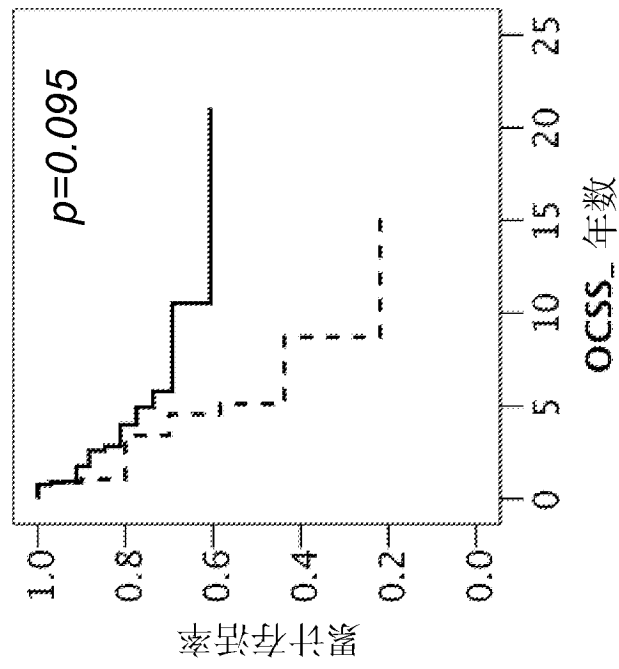


图 9B

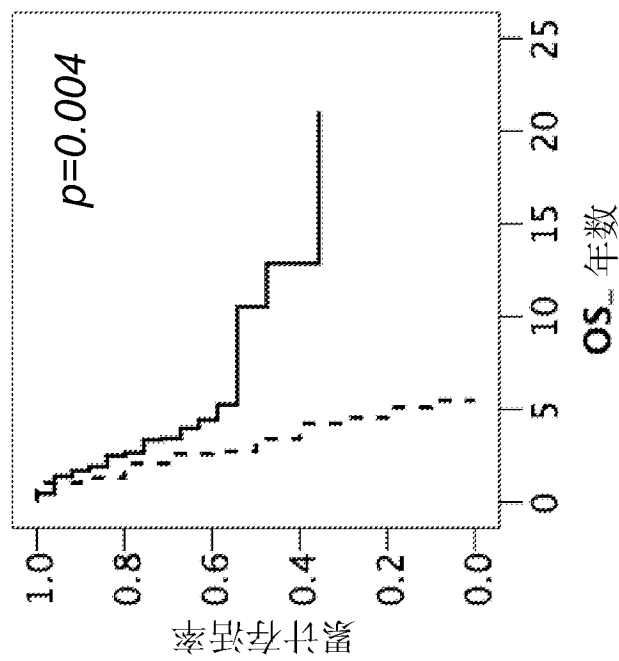


图 10A

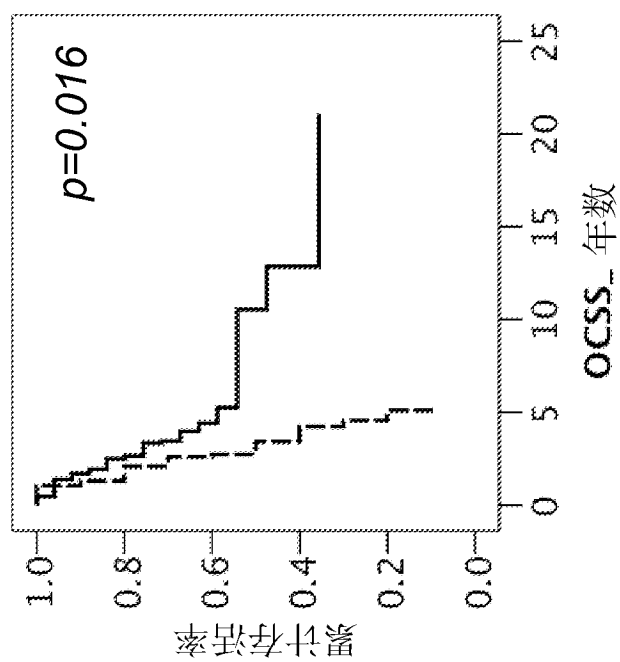


图 10B

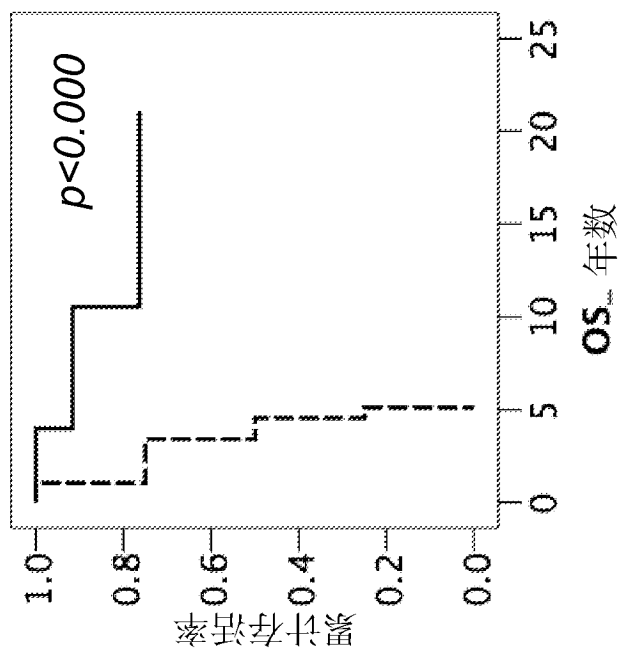


图 11A

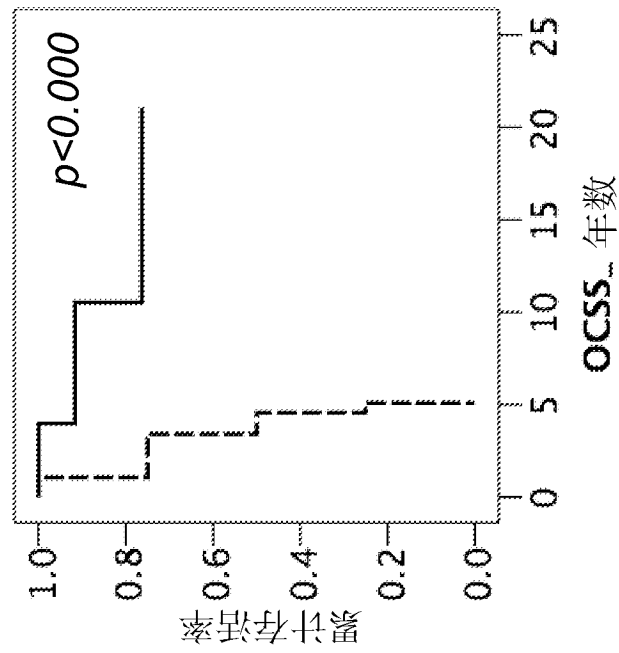


图 11B

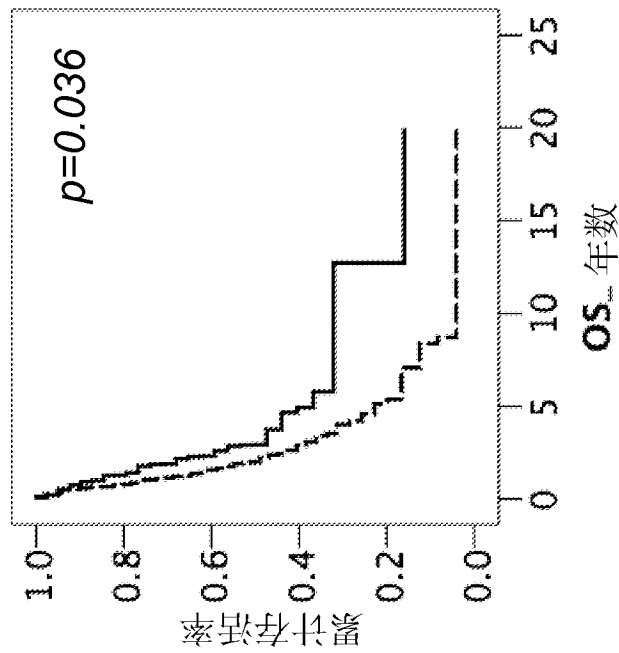


图 12A

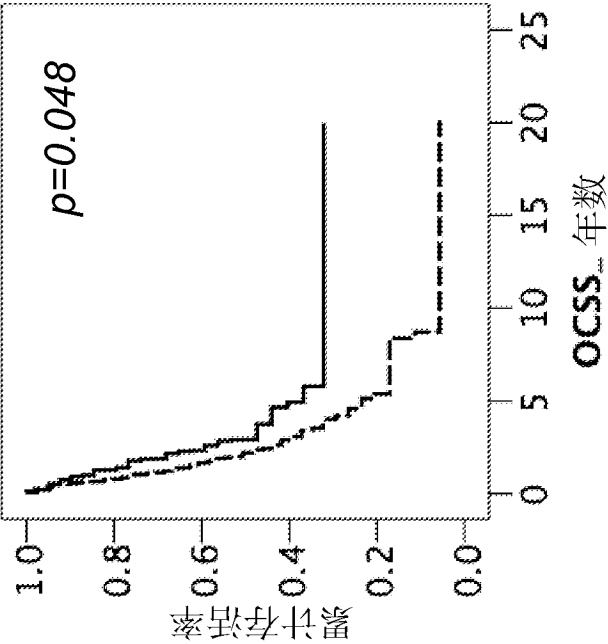


图 12B

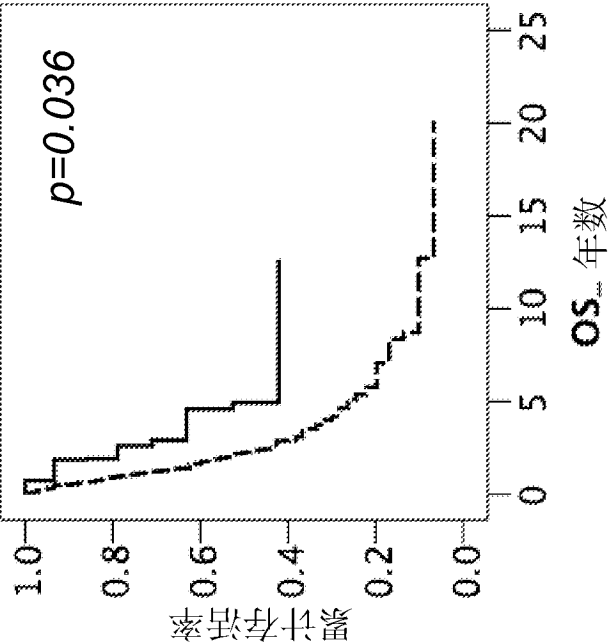


图 13A

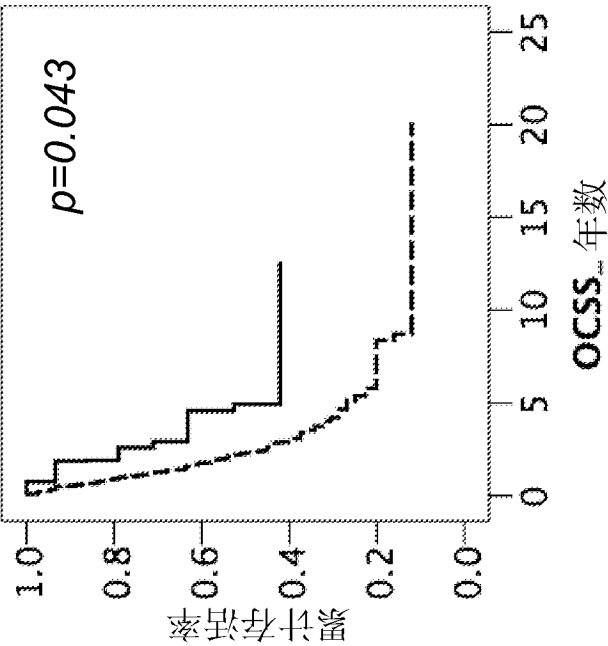


图 13B

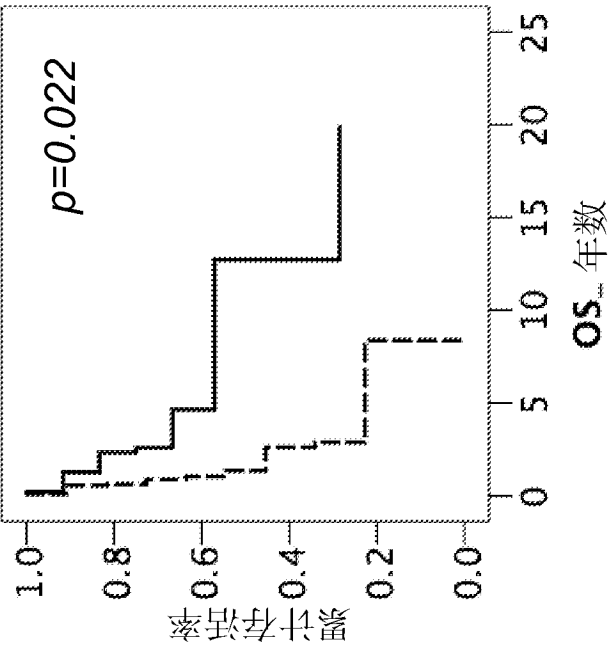


图 14A

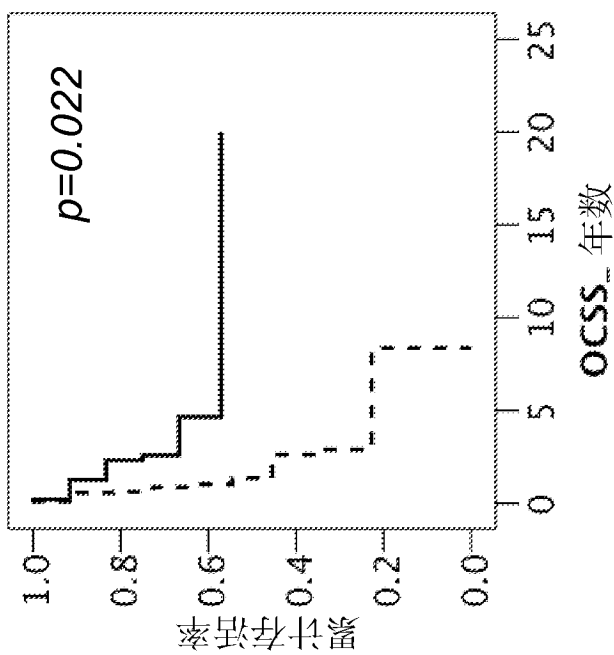


图 14B

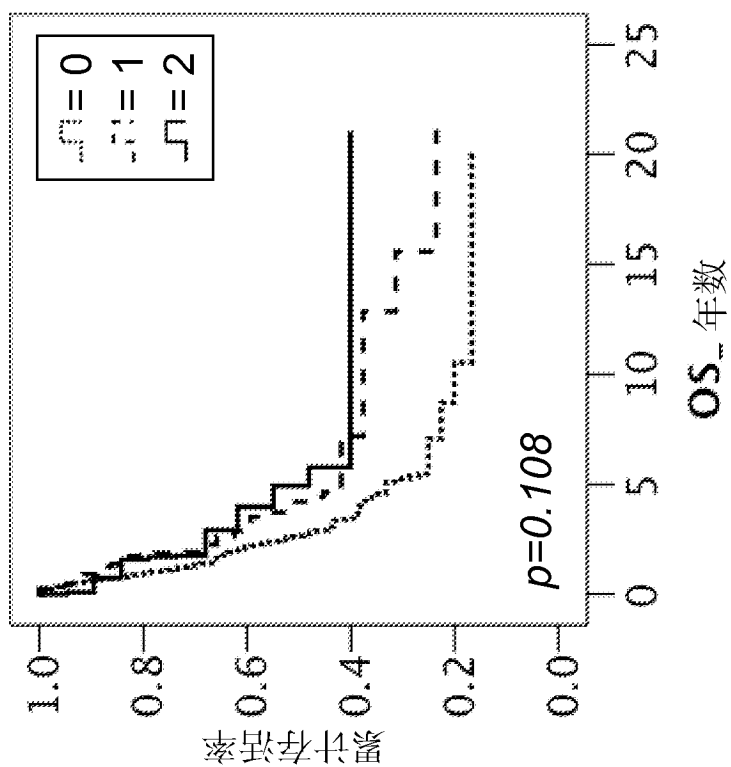


图 15A

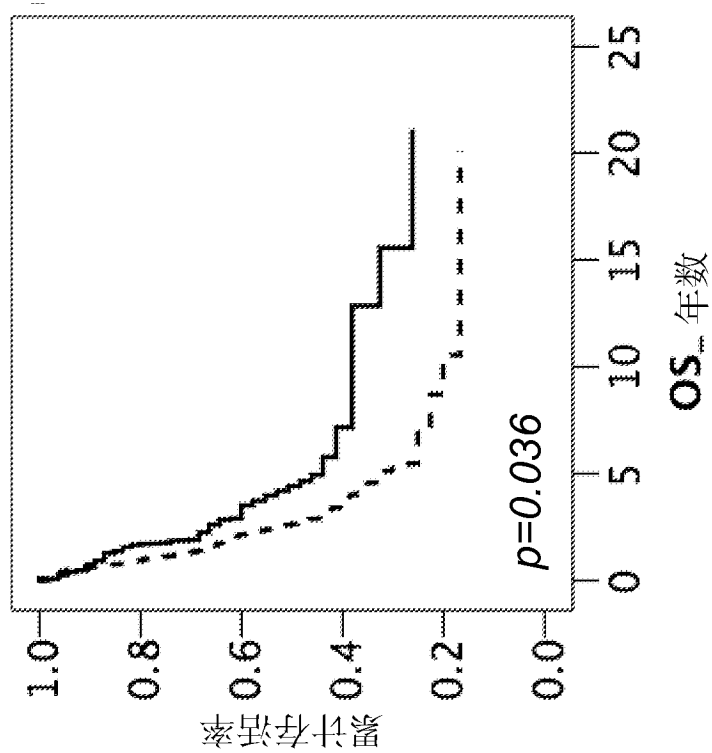


图 15B

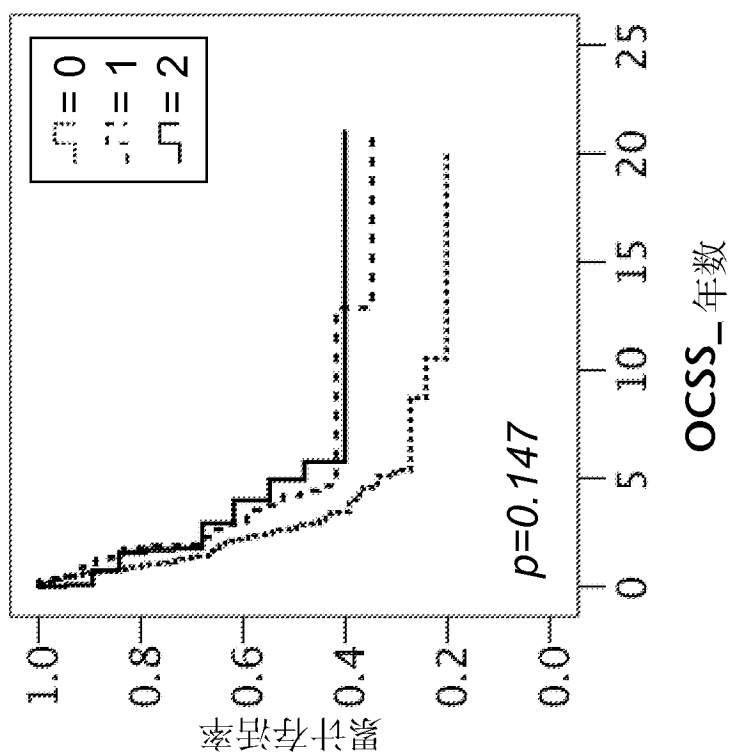


图 16A

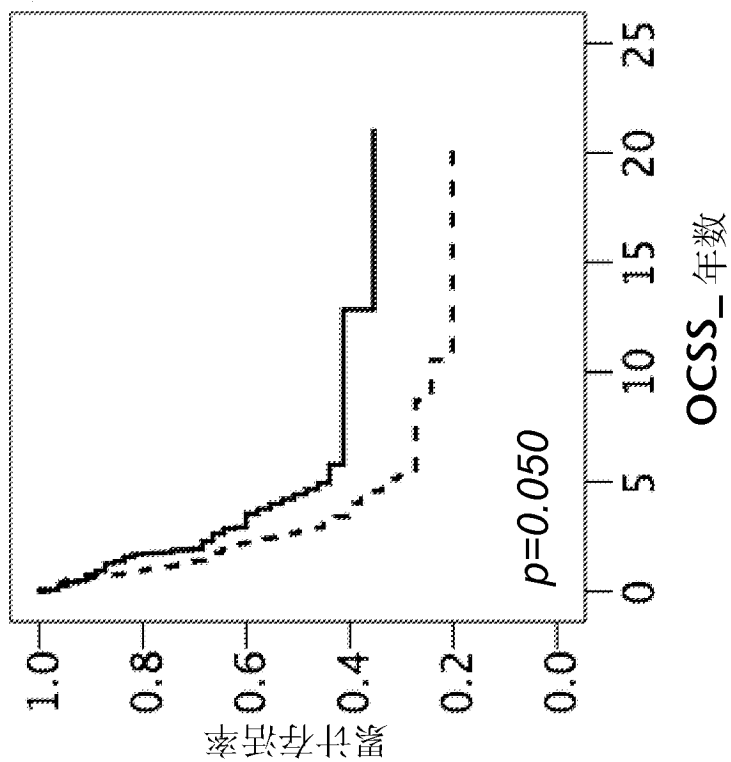


图 16B

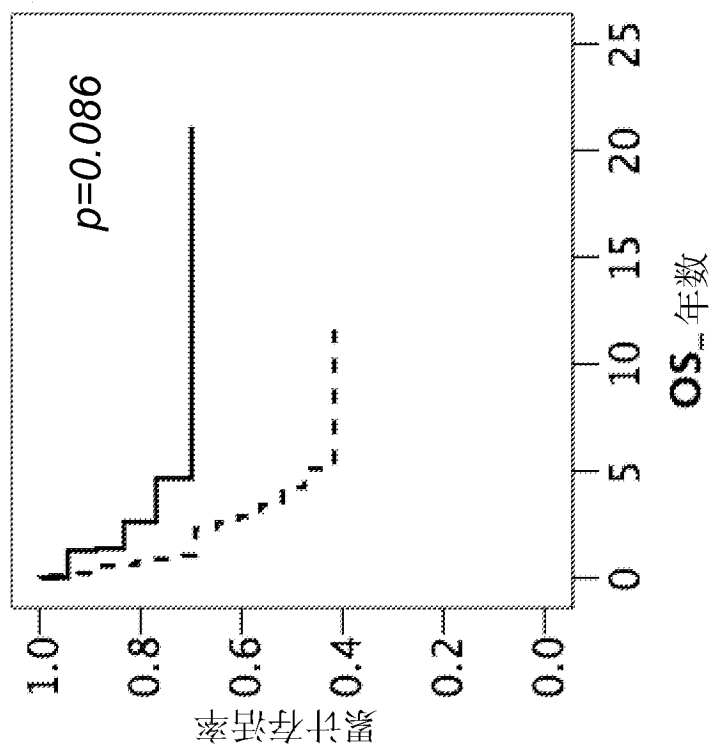


图 17

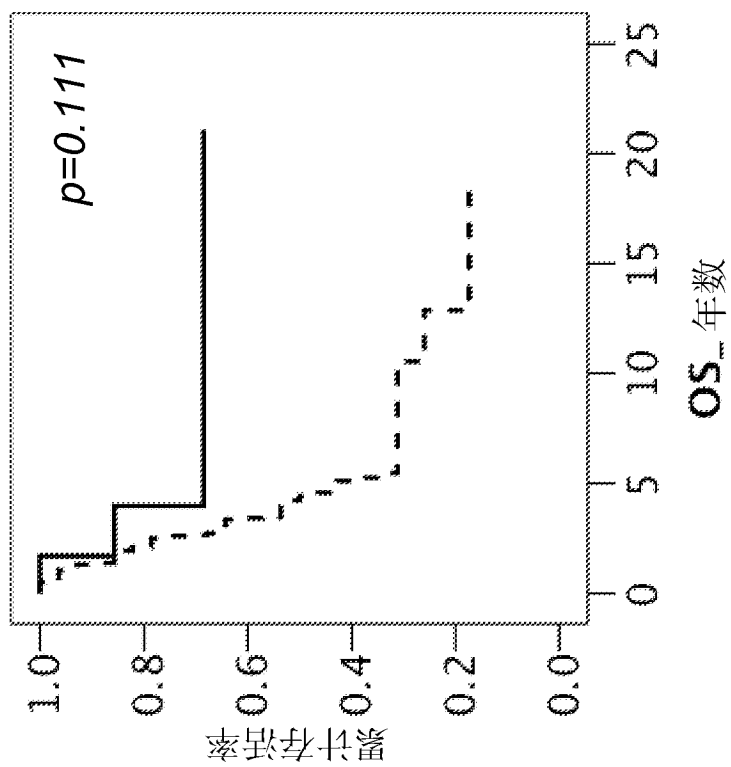


图 18

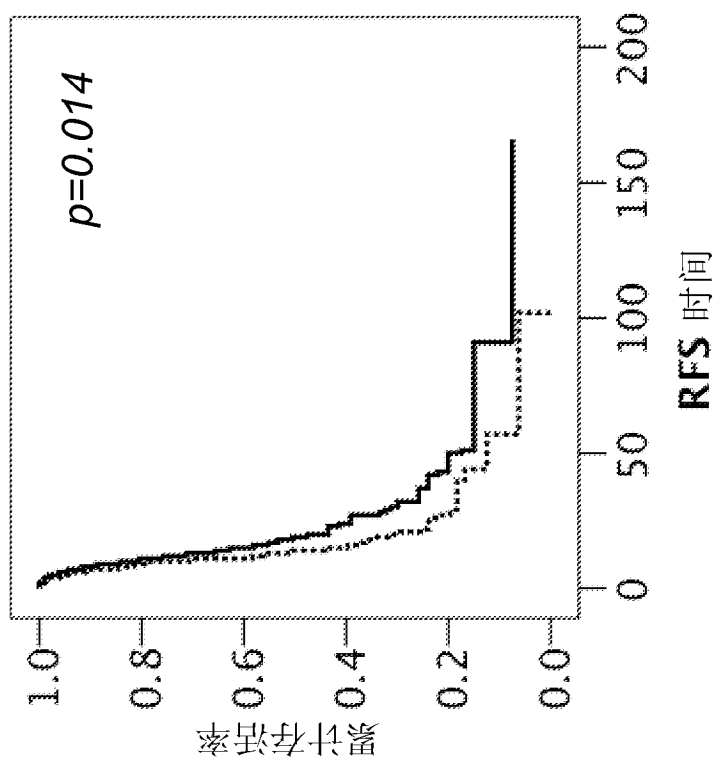


图 19

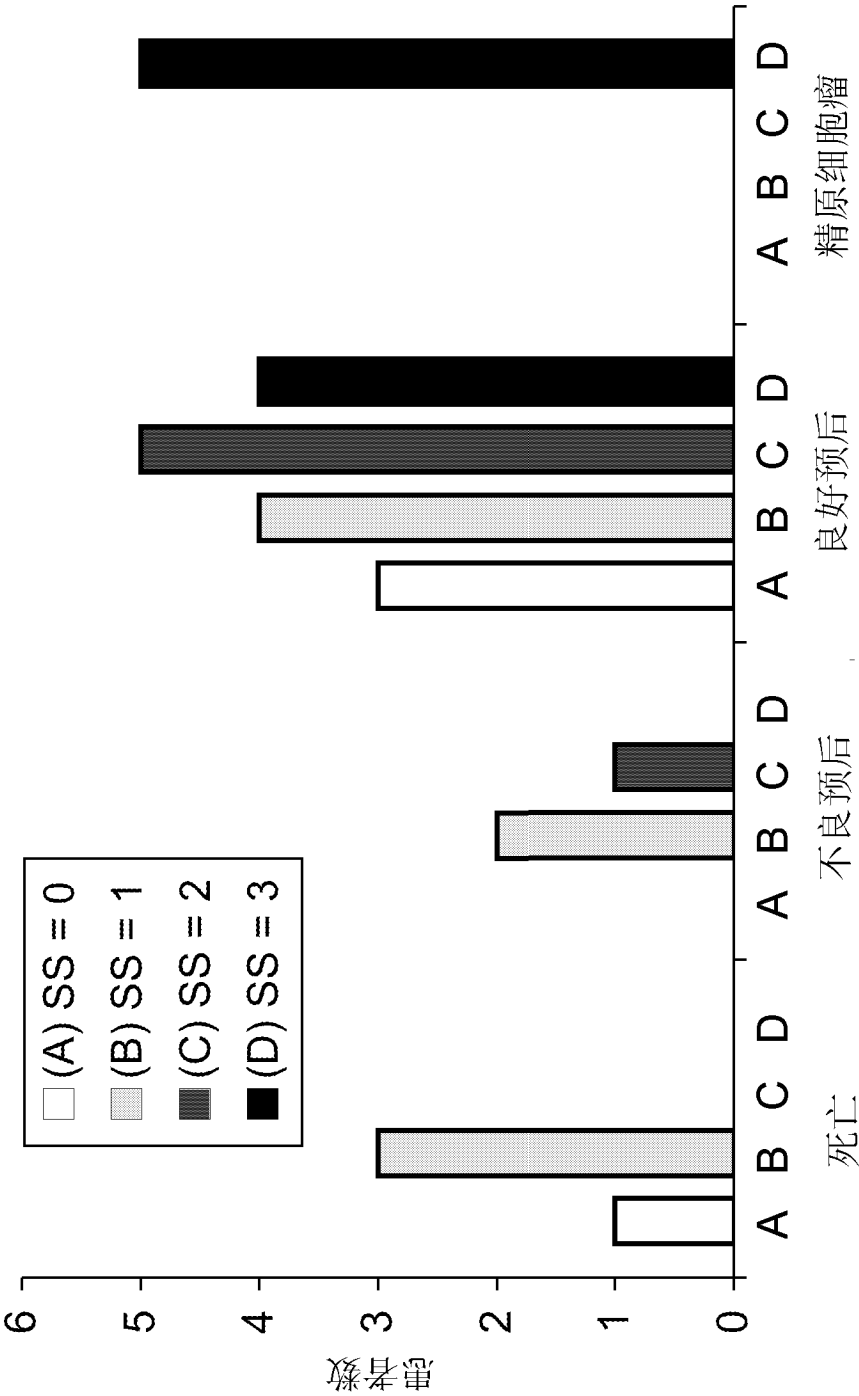


图 20

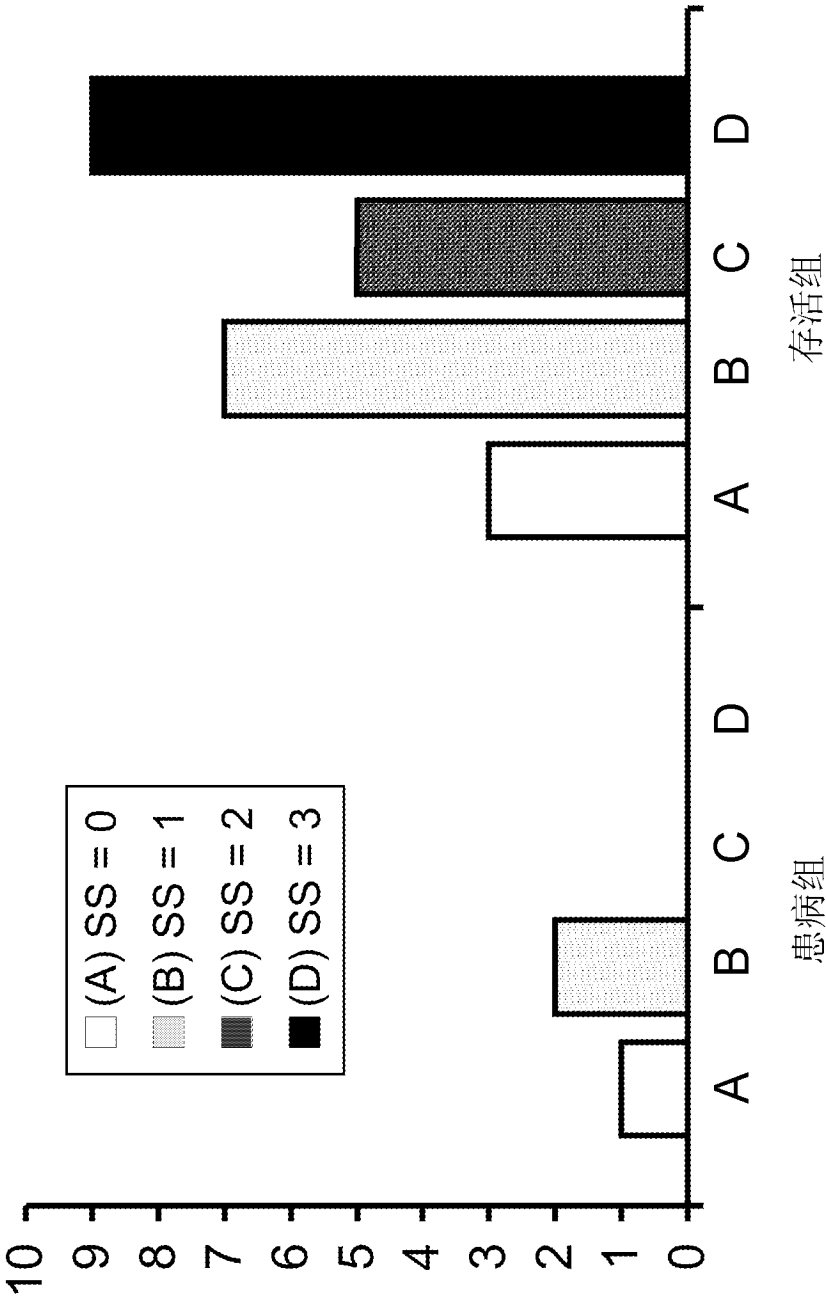


图 21

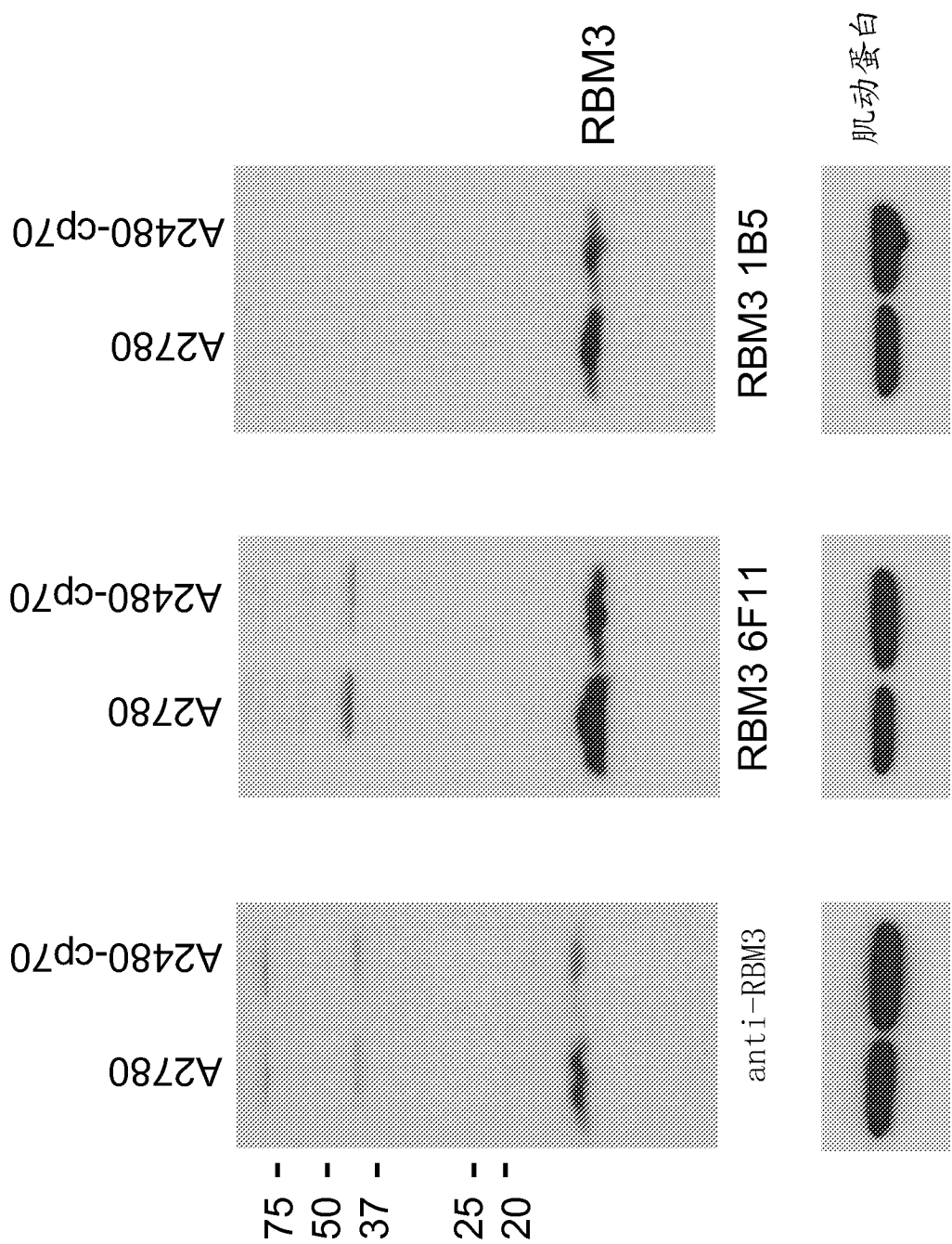


图 22

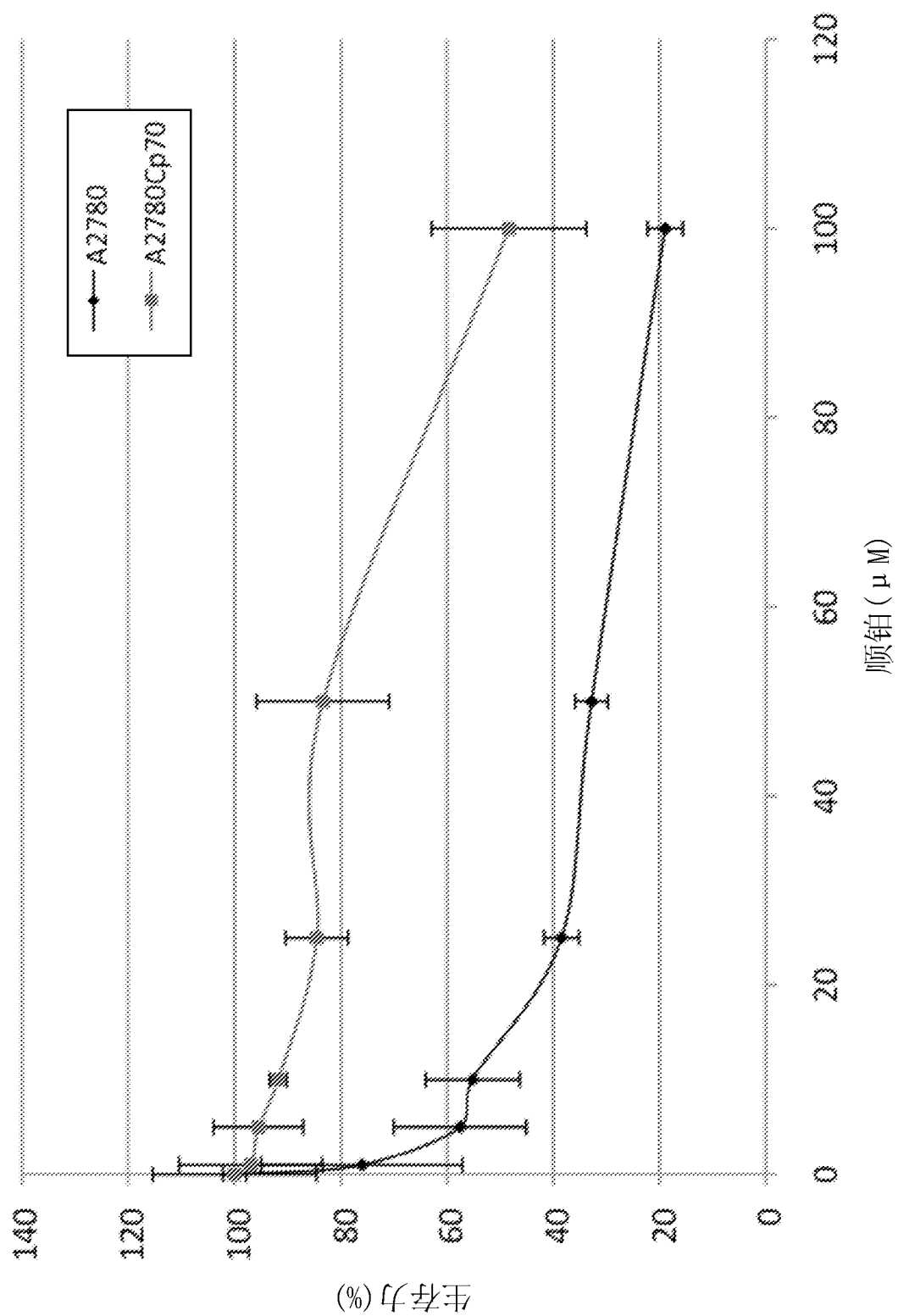


图 23

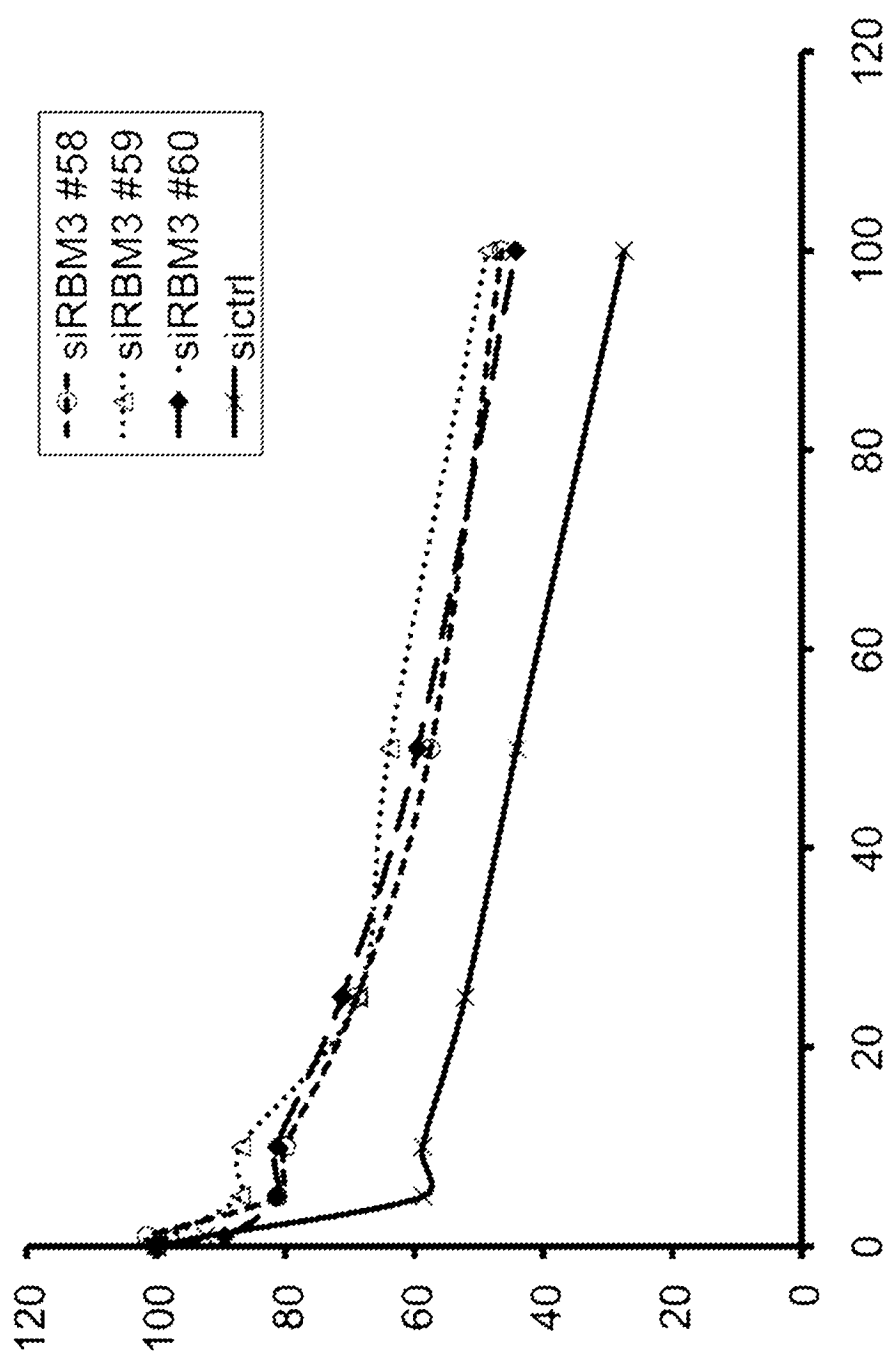


图 24