

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 39/00

C07K 16/18 A61K 38/17

A61K 47/48 A61K 51/10

A61K 31/00 G01N 33/50



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815471.9

[43] 公开日 2003 年 11 月 12 日

[11] 公开号 CN 1455680A

[22] 申请日 2001.9.11 [21] 申请号 01815471.9

[30] 优先权

[32] 2000.9.11 [33] US [31] 60/231841

[86] 国际申请 PCT/US01/28548 2001.9.11

[87] 国际公布 WO02/22685 英 2002.3.21

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.11

[71] 申请人 达纳-法伯癌症协会有限公司

地址 美国麻萨诸塞州

共同申请人 埃列克斯肿瘤学公司

[72] 发明人 唐纳德·W·库弗 大野恒哉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

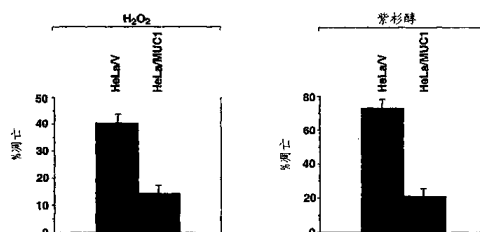
代理人 温宏艳 徐雁漪

权利要求书 5 页 说明书 30 页 序列表 17 页  
附图 4 页

[54] 发明名称 MUC1 胞外域和癌症治疗组合物及方法

[57] 摘要

本发明提供用配体与 MUC1 的胞外域结合的拮抗剂抑制癌细胞增殖和治疗肿瘤的组合物和方法, 所述配体与 MUC1 的胞外域的结合与 MUC1 的致癌功能有关。



1. MUC1 胞外域拮抗剂用于制备抑制 MUC1-表达癌细胞增殖的药物的用途。
2. 权利要求 1 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述 MUC1 胞外  
5 域拮抗剂下调 MUC1 胞外域的表达。
3. 权利要求 1 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述 MUC1 胞外  
域拮抗剂是 MUC1 胞外域结合抑制剂。
4. 权利要求 3 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述 MUC1 胞外  
域结合抑制剂是 SEQ ID NO: 1 的多肽，或者包括 SEQ ID NO: 1 的至  
10 少四个连续氨基酸的片段，或者其保守变体。
5. 权利要求 3 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述 MUC1 胞外  
域结合抑制剂是 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 的多肽，或者其保守  
变体。
6. 权利要求 3 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述 MUC1 胞外  
15 域结合抑制剂是与选自 SEQ ID NO: 1，SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3  
的肽的序列中的表位结合的抗体或者其片段。
7. 权利要求 3 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述 MUC1 胞外  
域结合抑制剂是与 SEQ ID NO: 1 的序列中的表位结合的抗体或者其片  
段。
- 20 8. 权利要求 6 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述抗体是单  
克隆抗体。
9. 权利要求 8 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述单克隆抗  
体是人源化的。
10. 权利要求 8 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述单克隆抗  
25 体是人抗体。
11. 权利要求 6 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述抗体是双  
特异性抗体。
12. 权利要求 6 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述片段包括  
抗原结合区。
- 30 13. 权利要求 6 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途，其中所述抗体或其  
片段与化学治疗药物，放射性同位素，毒素，或者诱导细胞溶解或细  
胞毒性免疫应答的效应物偶联。

14. 权利要求 13 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述抗体或其片段与细胞因子, 抗代谢物, anthracycline, 长春花生物碱, 抗生素, 烷化剂, 天然来源的毒素, 或者 IgG1 免疫球蛋白的 Fc 区偶联。

5 15. 权利要求 1 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中以含有所述 MUC1 胞外域拮抗剂和药学可接受载体的组合物形式施用所述有效量的 MUC1 胞外域拮抗剂。

16. 权利要求 1 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 进一步包括施用化学治疗药物或放射疗法。

10 17. MUC1 胞外域拮抗剂用于制备与化学治疗药物或放射疗法联合治疗癌症的药物的用途。

18. 权利要求 17 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述 MUC1 胞外域拮抗剂下调 MUC1 胞外域的表达。

19. 权利要求 17 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述 MUC1 胞外域拮抗剂是 MUC1 胞外域结合抑制剂。

15 20. 权利要求 19 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述 MUC1 胞外域结合抑制剂是 SEQ ID NO: 1 的多肽, 或者包括 SEQ ID NO: 1 的至少四个连续氨基酸的片段, 或者其保守变体。

20 21. 权利要求 19 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述 MUC1 胞外域结合拮抗剂是 SEQ ID NO: 4 或 SEQ ID NO: 5 的多肽, 或者其保守变体。

22. 权利要求 19 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述 MUC1 胞外域结合抑制剂是与选自 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 的肽的序列中的表位结合的抗体或者其片段。

25 23. 权利要求 19 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述 MUC1 胞外域结合抑制剂是与 SEQ ID NO: 1 的序列中的表位结合的抗体或者其片段。

24. 权利要求 22 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述抗体是单克隆抗体。

30 25. 权利要求 24 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述单克隆抗体是人源化的。

26. 权利要求 24 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述单克隆抗体是人抗体。

27. 权利要求 22 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述抗体是双特异性抗体。

28. 权利要求 22 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述片段包括抗原结合区。

5 29. 权利要求 22 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述抗体或其片段与化学治疗药物, 放射性同位素, 毒素, 或者诱导细胞溶解或细胞毒性免疫应答的效应物偶联。

30. 权利要求 29 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述抗体或其片段与细胞因子, 抗代谢物, anthracycline, 长春花生物碱, 抗生素, 烷化剂, 天然来源的毒素, 或者 IgG1 免疫球蛋白的 Fc 区偶联。

31. 权利要求 17 的 MUC1 胞外域拮抗剂的用途, 其中所述化学治疗药物选自烷化剂, 拓扑异构酶抑制剂, 抗代谢物, 微管蛋白相互作用试剂, 抗激素试剂, 鸟氨酸脱羧酶抑制剂和酪氨酸激酶抑制剂。

15 32. 一种含有 SEQ ID NO: 1 的多肽, 或者包括 SEQ ID NO: 1 的至少四个连续氨基酸的片段, 或者其保守变体, 和药学可接受载体的药物组合物。

33. 权利要求 32 的组合物, 其中所述多肽是 SEQ ID NO: 5 的多肽, 或者其保守变体。

20 34. 一种含有 SEQ ID NO: 4 的多肽, 或者其保守变体, 和药学可接受载体的药物组合物。

35. 一种含有与选自 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 的肽的序列中的表位结合的抗体或者其片段和药学可接受载体的药物组合物。

25 36. 权利要求 35 的组合物, 其中所述抗体或其片段与 SEQ ID NO: 1 的序列中的表位结合。

37. 权利要求 36 的组合物, 其中所述抗体是单克隆抗体。

38. 权利要求 37 的组合物, 其中所述单克隆抗体是人源化的

39. 权利要求 37 的组合物, 其中所述单克隆抗体是人抗体。

40. 权利要求 35 的组合物, 其中所述抗体是双特异性抗体。

30 41. 权利要求 35 的组合物, 其中所述片段包括抗原结合区。

42. 权利要求 35 的组合物, 其中所述抗体或其片段与化学治疗药物, 放射性同位素, 毒素, 或者诱导细胞溶解或细胞毒性免疫应答的

效应物偶联。

43. 权利要求 42 的组合物, 其中所述抗体或其片段与细胞因子, 抗代谢物, anthracycline, 长春花生物碱, 抗生素, 烷化剂, 天然来源的毒素, 或者 IgG1 免疫球蛋白的 Fc 区偶联。

5 44. 一种抑制配体与 MUC1 的胞外域结合的化合物的鉴定方法, 该方法包括:

(a) 提供一种多肽, 包括 SEQ ID. NO: 1 的多肽或 SEQ ID NO: 5 的多肽;

10 (b) 使所述多肽接触试验化合物和与 SEQ ID NO: 4 中的表位结合的抗体;

(c) 测定与 SEQ ID NO: 4 中的表位的抗体结合的所述抗体与 SEQ ID. NO: 1 的多肽或 SEQ ID NO: 5 的多肽的结合相对于合适的对照是否有所降低。

15 45. 一种含有通过权利要求 44 的方法鉴定的化合物和药学可接受载体的药物组合物。

46. 一种抑制 MUC1 表达癌细胞的增殖的化合物的鉴定方法, 该方法包括:

(a) 提供一种 MUC1 表达癌细胞群;

20 (b) 使所述 MUC1 阳性癌细胞群接触一种试验化合物和与 SEQ ID NO: 5 中的表位结合的抗体;

(c) 测定所述 MUC1 表达癌细胞群的增殖与合适的对照相比较是否有所降低。

47. 一种含有通过权利要求 46 的方法鉴定的化合物和药学可接受载体的药物组合物。

25 48. 一种下调 MUC1 的胞外域表达的化合物的鉴定方法, 该方法包括:

(a) 提供一种 MUC1 表达癌细胞群;

(b) 使所述 MUC1 表达癌细胞群接触一种试验化合物;

30 (c) 使用抗-MUC1/ECD 抗体来鉴定 MUC1/ECD 表达癌细胞中包含 MUC1/ECD 的多肽; 和

(d) 测定包括 MUC1/ECD 的多肽的表达与排除该试验化合物的对照相比较是否有所降低。

49. NM-3 用于制备下调 MUC1/ECD 的胞外域在癌中的表达的药物的用途。

## MUC1 胞外域和癌症治疗组合物及方法

5 本申请要求 2000 年 9 月 11 日提交的临时申请顺序号 No. 60/231841 的优先权。依据健康和人员行政部，国家健康研究所，国家癌症研究中心 (National Cancer Institute, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services) 授权号 R21-CA87421，美国政府对本发明拥有权力。

### 10 发明领域

本发明一般涉及癌症治疗领域，更具体地涉及与作为癌症治疗介入点的 MUC1 相互作用的调制剂或试剂的用途。

### 发明背景

15 在大多数腺上皮的腔表面上的分泌上皮细胞的顶端边缘上表达人 MUC1 粘蛋白糖蛋白。在癌中，贯穿整个细胞膜和细胞质 MUC1 高度过量表达 (Kufe 等, 1984; Perey 等, 1992)。因为这样，癌细胞中 MUC1 表达的异常模式可能为 MUC1 带来一般在顶端膜至整个细胞膜发现的一种功能。MUC1 粘蛋白的标志是包括在各分子中串连重复 25 - 100 次的糖基化的 20 个氨基酸的胞外序列的胞外结构域 (Sreouss&Decker, 20 1992)。与导管上皮组织的正常细胞相比，粘蛋白糖基化水平显示在癌细胞中较低 (Kufe, 美国专利 No. 5506343)。这种低糖基化作用导致在完全糖基化的粘蛋白中隐藏的肿瘤特异性表位的暴露。

25 超过 90% 的乳腺癌表现出 MUC1 的增量表达 (MUC1 也已知为粘蛋白，上皮膜抗原，多态性上皮粘蛋白，人乳脂小体膜抗原，Episialin, DF-3 等，参见 Barry&Sharkey, 1985)。几次临床研究提出肿瘤细胞的细胞表面上表达的粘蛋白肿瘤抗原与各种癌症类型的不良预后有关 (Itzkowitz 等, 1990)。

30 MUC1 以跨膜形式和分泌形式两者被表达 (Finn 等, 1995)。MUC1 的重复唾液酸表位 (胞外结构域) 释放到血清中 (Reddish 等, 1996)。MUC1 的 N-末端胞外结构域 (裂解的胞外域) 由接受 O-糖基化作用的不同数目的 20 个氨基酸的串连重复组成。这种粘蛋白伸出细胞表面以

上很远并且超出糖萼使得其容易与其它细胞相互作用。MUC1 的 C-末端区包括一个 37 个氨基酸的跨膜结构域和一个 72 个氨基酸的包含酪氨酸磷酸化位点的胞质尾部。胞外结构域裂解之后保留一个大约 45 个氨基酸的胞外域。没有人知道什么酶负责这时的胞外结构域的裂解。胞外结构域裂解之后保留的胞外域（或“MUC1/ECD”）一般包括氨基酸序列：

TINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPPFFSAQSGAG.

MUC1 的胞质结构域（“MUC1/CD”）包括多个亚结构域，它们在癌细胞中胞内信号传递中是重要的。 $\beta$ -连环蛋白在 SAGNGGSSL 基序与 MUC1/CD 直接结合（Yamamoto 等，1997）。 $\beta$ -连环蛋白，即一种哺乳动物上皮粘着连接的成分在质膜的胞内表面与连环蛋白结合，并且作为 wnt 信号传递途径的倒数第二个下游介质在胞质中起着信号传递作用（Takeichi, 1990; Novak&Dedhar, 1999）。wnt 途径的最终介质是刺激各种靶基因转录的  $\beta$ -连环蛋白和淋巴增强子因子/T 细胞因子（Lef/Tcf）的核复合体（参见例如，Molenaar 等，1996; Brunner 等，1997）。几种类型癌症的发展中涉及  $\beta$ -连环蛋白-Lef/Tcf 途经缺陷。

糖原合成酶激酶 3 $\beta$ （GSK3 $\beta$ ）也直接结合 MUC1/CD，并且使与  $\beta$ -连环蛋白结合基序邻接的 DRSPY 位点的丝氨酸磷酸化，从而减少 MUC1 和  $\beta$ -连环蛋白之间的缔合（Li 等，1998）。另外，c-Src 酪氨酸激酶也与 MUC1/CD SPYEKV 基序结合并且使其磷酸化，导致 MUC1/CD 和  $\beta$ -连环蛋白之间的相互作用加强并且 MUC1/CD 和 GSK3 $\beta$  之间的相互作用减弱（Li 等，2001）。

MUC1 还与细胞膜处的上皮生长因子受体（EGF-R，HER1）组成型缔合，并且激活的 EGF-R 诱导 MUC1/CD SPYEKV 基序的磷酸化作用（Li 等 2001（a））。EGF-R 介导的 MUC1/CD 的磷酸化作用表现出增强 MUC1 与 c-Src 和  $\beta$ -连环蛋白的相互作用，并且下调 MUC1 和 GSK3 $\beta$  之间的相互作用。这些结果支持这样一个模式，其中 MUC1 整合 c-Src， $\beta$ -连环蛋白和 GSK3 $\beta$  途经之间的信号传递，并且癌细胞中 MUC1 的异常过量表达对该整合的信号传递的调节异常可能促进转化的表型（Li 等 2001（a））。

犹猿蛋白 p120<sup>cas</sup> 还与 MUC1/CD 直接结合，导致 p120 的核定位

(Li&Kufe, 2001)。细胞转化中涉及 p120, 并且在癌中发现 p120 表达的  
改变模式(参见, 例如 Jawhari 等, 1999; Shimazui 等, 1996)。p120 是 v-Src 酪氨酸激酶底物, 与 E-钙粘着蛋白结合, 并且涉及作为  
转录辅激活物(Reynolds 等, 1989; Reynolds 等, 1994; Daniels 和  
5 Reynolds 等, 1999)。有关 p120 定位于细胞连接和细胞核的发现支持 p120 的作用, 象  $\beta$ -连环蛋白, 在细胞粘附和基因转录的调节中的作用。  
MUC1-表达肿瘤细胞的增加的转移可能性中可能涉及由于 MUC1 和 p120 的缔合导致的减弱的细胞粘着。

这样, 获得的证据证明, MUC1/CD 有将信号从胞外域转移给细胞  
10 核的功能, 并且利用粘附受体和生长因子信号传递和细胞转化中涉及的信号传递机理。期望鉴定与 MUC1-介导的信号传递和推导它的在细胞  
转化中的作用的调节相关的组合物和方法。

#### 发明概述

15 本发明包括涉及 MUC1 的胞外域为内源配体提供结合区并且这样的结合与 MUC1 的致癌功能和癌细胞的增殖有关这项发现的应用方法和药物组合物。

本发明广义上涉及包括或包含 MUC1/ECD 调节的细胞增殖的拮抗剂的癌症治疗组合物和应用这样的试剂和治疗方法的方法。优选的是  
20 包括与 MUC1/ECD 结合或者与激活 MUC1 的致癌功能的 MUC1/ECD 配体结合的物质的试剂和组合物。

因此, 本发明的一个方面提供一种抑制癌细胞增殖的方法, 包括施用有效量的 MUC1/ECD 拮抗剂。MUC1/ECD 拮抗剂是下调或减少细胞表面上存在的 MUC1/ECD 的量, 或者下调结合 MUC1/ECD 的野生型  
25 MUC1/ECD 配体的水平的试剂, 和/或 MUC1/ECD 结合抑制剂。“MUC1/ECD 结合抑制剂”指抑制适当地包括神经调节蛋白 2 同种型 5 (SEQ ID NO: 2), 神经调节蛋白 2 同种型 6 (SEQ ID NO: 3), 和它们的合适的片段的 MUC1 野生型配体与 MUC1/ECD 结合的化合物, 或者抑制与 SEQ ID NO: 4 中的表位结合的抗体与 MUC1/ECD 结合的化合物。神经调节蛋白 2  
30 同种型 5 (SEQ ID NO: 2), 神经调节蛋白 2 同种型 6 (SEQ ID NO: 3) 的合适的片段是那些与 MUC1/ECD 结合的片段。“MUC1/ECD-P1 结合抑制剂”指通过对 MUC1/ECD 与结合于 SEQ ID NO: 4 中的表位的抗体结

合的抑制作用鉴定的 MUC1/ECD 结合抑制剂。

在本发明的一个实施方案中，MUC1/ECD 抑制剂是 SEQ ID NO: 1 的多肽，或者包括 SEQ ID NO: 1 的至少四个连续氨基酸的片段，例如  
5 TINV, NVHD, VHDV, DVET, VETQ, ETQF, TQFN, QFNQ, FNQY, NQYK, QYKT, YKTE, KTEA, TEAA, EAAS, AASR, ASRY, SRYN, RYNL, YNLT, NLTI, LTIS, TISD, ISDV, SDVS, DSVS, VSVS, SVSD, VSDV, SDVP, DVPF, VPPF, PFPF, PFPS, PFSA, FSAQ, SAQS, AQSG, QSGA, 和 SGAG。在另外的实施方案中，MUC1/ECD 抑制剂是上述肽的保守变体。在另一个实施方案中，MUC1/ECD 结合抑制剂是 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:  
10 5 的多肽，或者其保守变体。

在本发明另一个实施方案中，MUC1/ECD 抑制剂是与 MUC1/ECD 序列 SEQ ID NO: 1 中的一个或多个表位结合的抗体。在本发明另外的实施方案中，MUC1/ECD 抑制剂是与 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 中的一个表位结合的抗体。所述抗体可以是多克隆或单克隆抗体。单克隆抗体可以是人源化的或人单克隆抗体。其也可以是双特异性抗体或者包括抗原结合区的片段。在一些实施方案中，抗体偶联于化学治疗药物，放射性同位素，毒素，或者诱导细胞溶解或细胞毒性免疫应答的效应物。这样的偶联物可以包括细胞因子，抗代谢物，anthracycline, 长春花生物碱，抗生素，烷化剂，天然产生的毒素，或者 IgG1 免疫球蛋白的 Fc 区。  
15 20

在另一个实施方案中，所述方法进一步包括与 MUC1/ECD 拮抗剂联合施用化学治疗药物或放射疗法。化学治疗药物一般包括烷化剂，拓扑异构酶抑制剂，抗代谢物，微管蛋白相互作用试剂，抗激素试剂，鸟氨酸脱羧酶抑制剂和酪氨酸激酶抑制剂。

在不同的实施方案中，癌细胞选自皮肤癌细胞，前列腺癌细胞，肺癌细胞，脑癌细胞，乳腺癌细胞，卵巢癌细胞，子宫颈癌细胞，肝癌细胞，胰腺癌细胞；结肠癌细胞，胃癌细胞和白血病细胞。  
25

本发明的另一方面是减少哺乳动物肿瘤生长的方法，包括施用治疗量的化学治疗药物或放射疗法和有效量的 MUC1/ECD 拮抗剂。在优选的实施方案中，哺乳动物是人。在一个实施方案中，所述方法用于治疗顽固性肿瘤，包括在用一种或多种化学治疗药物治疗之后，施用治疗量的化学治疗药物或放射疗法和有效量的 MUC1/ECD 拮抗剂。在不同  
30

的实施方案中,所述肿瘤是皮肤,前列腺,肺,脑,乳腺,卵巢,子宫,肝,胰腺,结肠,胃或血液系统的肿瘤。

本发明的其它方面涉及含有 MUC1/ECD 拮抗剂和药学可接受载体的药物组合物。其中所述拮抗剂是 MUC1/ECD 结合抑制剂,其可以是 SEQ ID NO: 1 的多肽或者包括至少四个连续的氨基酸的片段,或者其保守变体,和药学可接受载体。在一些实施方案中, MUC1/ECD 抑制剂可以是 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 的多肽,或者其保守变体。在其它实施方案中,药物组合物含有是 MUC1/ECD 结合抑制剂并且与选自 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 3 的肽序列中的表位结合的抗体和药学可接受载体。

本发明还涉及筛选 MUC1/ECD 结合抑制剂活性的方法。一个实施方案包括抑制配体与 MUC1/ECD 结合的化合物的鉴定方法,该方法包括:(a) 提供包括 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 5 的多肽;(b) 使所述多肽接触一种试验化合物和一种 MUC1 胞外域的配体,所述配体选自刺激 MUC1 介导的癌细胞增殖的 MUC1/ECD 的抗体和结合 MUC1/ECD 并且刺激癌细胞增殖的野生型配体;和(c) 测定所述抗体与 MUC1/ECD 或野生型配体的结合相对于合适的对照是否有所降低。合适的对照包括,但不限于排除试验化合物的测试。在一个实施方案中,刺激 MUC1 介导的癌细胞增殖的 MUC1/ECD 抗体是与 SEQ ID NO. 4 中的表位结合的抗体。在其它实施方案中,所述野生型配体可以合适地包括神经调节蛋白 2 同种型 5 (SEQ ID NO: 2) 和其合适的片段,和神经调节蛋白 2 同种型 6 (SEQ ID NO: 3), 和它们的合适的片段,其中合适的片段是与 SEQ ID NO: 1 结合并且具有合适的生长刺激活性的那些。

另一个实施方案是抑制 MUC1 表达癌细胞的增殖的化合物的鉴定方法,该方法包括:(a) 提供 MUC1 表达癌细胞群;(b) 使所述 MUC1 表达癌细胞群接触一种试验化合物和一种 MUC1 胞外域的配体,所述配体选自刺激 MUC1 介导的癌细胞增殖的 MUC1/ECD 的抗体和结合 MUC1/ECD 并且刺激癌细胞增殖的野生型配体;和(c) 测定所述 MUC1-表达癌细胞种群的增殖与合适的对照物相比较是否有所降低。合适的对照物包括但不限于其中排除试验化合物的增殖测试。在一个实施方案中,刺激 MUC1 介导的癌细胞增殖的 MUC1/ECD 抗体是与 SEQ ID NO. 4 中的表位结合的抗体。在其它实施方案中,所述野生型配体可以合适地包括神

经调节蛋白 2 同种型 5 (SEQ ID NO: 2) 和其合适的片段, 和神经调节蛋白 2 同种型 6 (SEQ ID NO: 3), 和其合适的片段, 其中合适的片段是与 SEQ ID NO: 1 结合并且具有合适的生长刺激活性的那些。

5 本发明还提供了鉴定下调 MUC1/ECD 表达的化合物的方法。该方法包括: (a) 提供 MUC1 表达癌细胞群; (b) 使所述 MUC1 表达癌细胞群接触一种试验化合物; (c) 使用抗-MUC1/ECD 抗体来鉴定 MUC1 表达癌细胞中包含 MUC1/ECD 的多肽; 和 (d) 测定包含 MUC1/ECD 的多肽的表达与排除该试验化合物的对照相比较是否有所降低。

10 本发明还包括含有上述方法鉴定的化合物和药学可接受载体的药物组合物。

### 附图说明

下面的附图构成本发明说明书的一部分, 包括这些附图是为了进一步证明本发明的一些方面。通过参考这些附图中的一幅或几幅并且  
15 结合这里给出的具体实施方案的详细描述, 可以更好地理解本发明。

图 1: 抗-MUC1-P1 抗体对 ZR-75-1 乳腺癌细胞增殖的作用。

图 2: 抗-MUC1-P1 抗体对稳定表达空载体 (SW480/V) 或 MUC1 (SW480/MUC1) 的 SW480 细胞增殖的作用。

20 图 3: ZR-75-1 条件培养基对稳定表达空载体 (SW480/V) 或 MUC1 (SW480/MUC1) 的 SW480 细胞增殖的作用。

图 4: MUC1 对稳定表达空载体 (HeLa/V) 或 MUC1 (HeLa/Muc1) 的 HeLa 细胞中  $H_2O_2$  和紫杉醇-诱导的细胞凋亡的作用。结果以三个独立实验的细胞凋亡百分数表示 (平均值  $\pm$  SE) 。

### 25 发明详述

#### I. 多肽

通过合成技术或者利用基因组或 cDNA 克隆方法的重组技术能够制备本发明的多肽。常规情况下应用固相或溶液相肽合成能够合成多肽。通过化学合成制备相对短的多肽, 例如 P0 (SEQ ID NO: 9), P1 (SEQ  
30 ID NO: 4), P2 (SEQ ID NO: 6) 和 P3 (SEQ ID NO: 7) 的方法是本领域公知的。例如, 利用商业上可购得的设备和试剂例如从 Milligen (Bedford, Mass.) 或 Applied Biosystems Perkin Elmer (Foster

City, CA)购得的那些,通过固相肽合成技术,可以制备这样的多肽。或者,通过固相合成可以制备这样的多肽的片段,并且利用例如 Dawson 等,(1994)描述的那些片段缩合方法连接在一起。这样的多肽的化学合成中,通过用不同的氨基酸单体置换要取代的残基就简单地实现了任何氨基酸的取代作用。

这里实施例 3 例示说明了鉴定野生型 MUC1/ECD 配体多肽。然后通过本领域公知的方法能够制备重组 MUC1/ECD 配体。

本发明的多肽包括多肽的变体。所谓"变体"多肽意指在序列的一个或多个位点缺失或添加一个或多个氨基酸或者在序列的一个或多个位点取代一个或多个氨基酸而修饰的多肽序列。本发明包括的变体多肽保留了它们所来源的多肽的期望的生物学活性。这样的变体与它们所来源的多肽的氨基酸序列具有至少 40%, 50%, 60%, 70%, 一般至少 75%, 80%, 85%, 优选大约 90%至 95%或更多,更优选大约 98%或更大序列同一性。通过应用使用 Smith 和 Waterman, (1981)算法的 Gap 程序 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wisconsin)比较两个序列,可以测定多肽的天然和变体序列之间的序列同一性百分比,也称为同源性。

本发明的多肽也包括带有一个或多个保守取代的变体多肽。为了将氨基酸取代分为保守型,将氨基酸如下分组: I 组(疏水性侧链): 正亮氨酸, 甲硫氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸; II 组(中性亲水性侧链): 半胱氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸; III 组(酸性侧链): 天冬氨酸, 谷氨酸; IV 组(碱性侧链): 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸; V 组(影响链取向的残基): 甘氨酸, 脯氨酸; 和 VI 组(芳香侧链): 色氨酸, 酪氨酸, 苯丙氨酸。保守型取代包括同组中的氨基酸之间的取代。

本发明还包括多肽的化学衍生物。"化学衍生物"指具有通过官能性侧基的反应化学衍生的一个或多个残基的多肽。这样的衍生化残基包括例如那些分子,其中游离氨基被衍生化生成胺的盐酸化物,对-甲苯磺酰基,苄酯基,叔丁氧羰基,氯代乙酰基或甲酰基。游离羧基可以被衍生化生成盐,甲酯和乙酯或其它类型的酯或酰胺。游离羟基可以被衍生化生成 O-酰基或 O-烷基衍生物。组氨酸的咪唑基可以被衍生

化生成 N-im 苄基组氨酸。

这里使用的术语"多肽"指氨基酸分子链而不是指该产物的特定长度。

## 5 II. 抗体

术语"抗体"是广义使用的,并且具体包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体),多克隆抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体),和抗体片段,只要它们表现出期望的生物学活性。

10 制备多克隆抗体的方法是本领域公知的。简要地说,通过用抗原组合物免疫动物并且从接受免疫的动物收集血清来制备多克隆抗体。很多动物物种被用于制备抗血清,包括兔,小鼠,大鼠,仓鼠,豚鼠和山羊。

本领域公知,给定的组合物其免疫原性可能不同。因此对宿主免疫系统的加强免疫经常是必需的,这可以通过使多肽免疫原与载体的偶联来实现。举例和优选的载体是匙孔血蓝蛋白(KLH)和牛血清白蛋白(BSA)。象卵清蛋白,小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白这样的其它白蛋白也可以用作载体。多肽与载体蛋白质偶联的方法是本领域公知的并且包括戊二醛,间-马来酰亚胺苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯,碳化二亚胺和双-biazotized 联苯胺。正如本领域也公知的,使用已知为佐剂  
15 20 的免疫应答的非特异性刺激剂能够增强特定免疫原组合物的免疫原性。举例和优选的佐剂包括弗氏完全佐剂(含有杀死的结核分枝杆菌的免疫应答的非特异性刺激剂),弗氏不完全佐剂和氢氧化铝佐剂。

接受免疫的动物的血清可以用于各种应用,或者通过公知的方法可以纯化期望的抗体级分,例如使用与固体基质结合的另一种抗体或  
25 肽的亲合色谱。

利用公知技术可以容易制备单克隆抗体(MAbs),例如美国专利4,196,265中举例的那些方法,该专利文献在此引作参考。一般地,该项技术包括用选择的免疫原成分例如纯化的或部分纯化的表达多肽免疫合适的动物。以有效刺激产生抗体的细胞的方式施用免疫成分。

30 制备单克隆抗体(MAbs)的方法一般与用于制备多克隆抗体的那些细胞系相同的细胞系开始。使用大鼠可以提供一些好处(Goding, 1986),但是小鼠是优选的,BALB/c小鼠是最常使用的,并且通常给出

更高百分比的稳定的融合。

免疫之后，筛选有可能产生抗体的体细胞，特别是B淋巴细胞(B细胞)，在制备Mab的方案中使用。这些细胞可以获自活检的脾，扁桃腺或淋巴结样品，或者获自外周血样品。脾细胞和外周血细胞是优选的。  
5 经常地，对一组动物进行免疫，并且取出具有最高抗体效价的动物的脾，并且从脾中获得淋巴细胞。

然后将从免疫动物获得的产生抗体的B淋巴细胞与永生化骨髓瘤细胞融合，一般情况下，相同物种中的一个作为接受免疫的动物。适合在产生杂交瘤的融合程序中使用的骨髓瘤细胞系优选是不产生抗体的，  
10 具有高融合效率，并且酶不足，使得它们不能在只支持期望的融合细胞(杂交瘤)生长的某些选择性培养基中生长。将选择的杂交瘤系列稀释并且克隆到各个产生抗体的细胞系，其然后可以无期限地繁殖，提供Mabs。

根据本发明，通过包括用酶例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化和/或通过化学还原裂解二硫键的方法，能够从如上所述制备的单克隆抗体  
15 获得本发明的单克隆抗体的片段。或者，使用自动合成仪，或者通过在大肠杆菌或其它重组微生物和细胞系中表达全长基因或基因片段，能够合成本发明包括的单克隆抗体的片段。

本发明还包括各种抗体偶联物。通过本领域公知的方法制备带有  
20 荧光素标记的偶联物，例如通过在偶联剂存在下的偶联作用或者通过与异硫代氰酸酯的反应。类似地制备带有金属螯合物的偶联物。抗体可以偶联的其它部分包括放射性核素，例如<sup>131</sup>I，<sup>90</sup>Y，<sup>105</sup>Rh，<sup>47</sup>Sc，<sup>67</sup>Cu，<sup>212</sup>Bi，<sup>211</sup>At，<sup>188</sup>Re，<sup>109</sup>Pd，<sup>47</sup>Sc，<sup>212</sup>Pb，和<sup>153</sup>Sm等，如Gansow，1991所述，该文献在这里引作参考。

本发明的单克隆抗体也可以偶联于常用的化学治疗药物，例如抗  
25 代谢物，anthracycline，长春花生物碱，抗生素或烷化剂。可以偶联目标抗体的药物包括下面的化合物，例如阿霉素(doxorubicin)，环磷酰胺，顺铂，阿霉素(adriamycin)，雌莫司汀，氟尿嘧啶，乙炔雌二醇，米托恩醌，甲氧喋呤，非那留胺，紫杉醇和甲地孕酮。可以直接通过共价键或者间接通过连接分子实施偶联方法，并且针对选择的  
30 特定的药物的偶联方法一般是本领域已知的，并且使用各种双功能蛋白质偶联剂进行。这样的试剂的例子是SPDP，IT，亚氨酸酯的双功能

衍生物, 例如二甲基己二酰亚胺酯 HC1 的双功能衍生物, 活性酯类, 例如二琥珀酰亚胺辛二酸酯, 醛类, 例如戊二醛, 二叠氮基化合物, 例如双(R-叠氮基苯甲酰基)己二胺, 双重氮鎓衍生物, 例如双-(R-重氮鎓苯甲酰基)乙二胺, 二异氰酸酯类, 例如甲代亚苯基 2, 6-二异氰酸酯, 5 和双活性氟化合物, 例如 1, 5-二氟-2, 4-二硝基苯(参见, 例如, Thorpe 等, 1982, 这里引作参考)。

本发明的抗体还可以偶联各种毒素分子或者效应物, 例如 IgG1 免疫球蛋白, 其诱导细胞溶解或细胞毒性免疫应答。因此, 通过各种公知的化学方法可以将两个成分化学键合在一起。例如, 利用杂双功能交联剂, 键可以是例如 SPDP, 碳化二亚胺, 戊二醛, 等。通过重组方法也可以使毒素分子与抗体或其结合区融合, 例如通过单链抗体的制备。通过本领域技术人员公知的任何克隆方法可以以 cDNA 或基因组形式克隆编码蛋白质链的基因(参见, 例如 Sambrook 等, 1989)。各种免疫毒素的重组制备是本领域公知的, 并且可以例如从 Thorpe 等, 1982 (a), 15 Waldmann, 1991, 和 Pastan 等, 1992 中得知, 这两篇文献在此引作参考。很多种毒素分子适合用作这里描述的抗体偶联物或融合蛋白中的细胞毒性结构域。可以使用已知用作免疫毒素的毒性成分的任何毒素, 优选可以重组表达的蛋白质毒素。特别可用作细胞毒性结构域的是细菌毒素, 例如假单胞菌外毒素 A (PE), 白喉毒素, 志贺菌毒素和志贺样毒素, 和来自植物和真菌的核糖体灭活毒素, 包括蓖麻毒,  $\alpha$ -次黄嘌呤, 局限曲菌素, mitogellin, tricanthosin, saporin-G, saporin-1, 木鳖子苷, gelonin, 美洲商陆抗病毒蛋白, 红豆毒素, modeccin 和在遗传工程毒素 (Genetically Engineered Toxins), A. Frankel 编著, Marcel Dekker, Inc., 1992 中描述的其他毒素, 该文献在此引作参考, 和那些蛋白质的任何重组衍生物(参见 Olsnes 1981; 25 美国专利 No. 4, 675, 382; 和美国专利 No. 4, 894, 443, 这里引作参考)。

所述抗体也可以是即识别 MUC1/ECD 又识别促进细胞因子释放的抗原的双特异性抗体, 所述细胞因子是例如 IL-1, TNF $\alpha$  和 CD16, CD2, 30 CD3 L. C. CD28, 其接着分别激活 IFN  $\gamma$  或 TNF $\alpha$  的释放。

本发明的 MAbs 包括嵌合 MAbs, 包括非人(例如鼠) MAbs 的"人源化"形式。人源化 MAbs 是嵌合抗体, 其包含从非人免疫球蛋白来源

的最小序列。对于大多部分来说，人源化抗体是具有期望的特异性，亲和性和能力的人免疫球蛋白(受体)，其中来自非人物种(供体抗体)例如小鼠，大鼠，兔或非人灵长类的高变区的残基取代受体高变区的残基。在某些情况下，相应的非人残基取代人免疫球蛋白的构架残基。

5 此外，人源化抗体可以包括受体抗体或供体抗体中没有的残基。进行这些修饰以进一步优化抗体性能。一般情况下，人源化抗体包括基本上全部的至少一个，一般两个可变区，其中全部或基本上全部的高变区相应于非人免疫球蛋白的那些，并且全部或基本上全部的构架区是人免疫球蛋白序列的那些。任选地，所述人源化抗体还包括免疫球蛋白

10 恒定区(Fc)，一般是人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。(参见 Jones 等，1986；Riechmann 等，1988；和 Presta，1992)。在本发明的治疗方法中全人 Mabs 是优选的。

本发明的"单链 Fv"或"sFv"抗体片段包括抗体的 VH 和 VL 结构域，其中这些结构域存在于单一多肽链中。一般情况下，Fv 多肽进一步包

15 括 VH 和 VL 结构域之间的多肽接头，其使得 sFv 形成抗原结合所期望的结构(参见 Pluckthun，1994)。

### III. 筛选和诊断分析

本发明提供抑制各种配体与 MUC1/ECD 结合的化合物的鉴定方

20 法。所述结合配体包括与 MUC1/ECD 结合的神经调节蛋白 2 同种型 5 (SEQ ID NO: 2)，神经调节蛋白 2 同种型 6 (SEQ ID NO: 3) 及任一种同种型的片段，在优选的实施方案中，包括结合 SEQ ID NO: 4 中的表位的抗体。

在一个实施方案中，所述筛选方法应用体外竞争结合测试，其中评

25 价一种试验化合物抑制上述配体与包括 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO: 5 的多肽的结合的能力。在这样的测试中，包括 MUC1/ECD 来源的序列 SEQ ID NO. 1 或 SEQ ID NO: 5 的多肽可以与另一种蛋白质偶联，或作为融合蛋白产生，例如，实施例 3 中举例的 GST-MUC1/ECD 融合蛋白。本领域技术人员应用本领域公知的方法可以制备其它合适的偶联

30 物和融合蛋白。所述多肽或 MUC1/ECD 配体可以标记有放射性同位素或荧光标记(例如，藻胆蛋白质，例如藻红蛋白和别藻蓝蛋白，荧光素和德克萨斯红)。或者可以使用一种酶，例如过氧化物酶，并且通过生物

素和抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白系统直接或间接偶联。导入试验化合物时结合减弱是竞争结合的指征。

抑制配体与 MUC1/ECD 结合的化合物可以是一种调制剂，它是由神经调节蛋白 2 同种型 5 或 6 结合 MUC1/ECD 所起始的生物活性的拮抗剂或激动剂。例如，预期抗多肽 P1 (SEQ ID. NO 4) 的抗体抑制野生型配体的结合，但是作为 MUC1/ECD 结合位点的激动剂起作用，即，它刺激癌细胞的增殖。相反，合适的化合物，例如 MUC1/ECD 多肽 SEQ ID NO. 1，会结合内源野生型配体，从而阻止结合 MUC1/ECD，并且接着作为拮抗剂起作用，即，阻止或减少癌细胞的增殖，这种增殖在 MUC1/ECD 配体结合时可以观察到。

另一种筛选测试能够区分 MUC1/ECD 结合抑制剂对 MUC1 表达癌细胞的增殖表现出的拮抗性和激动剂活性。该方法需要 MUC1 阳性癌细胞群，优选人癌细胞群。这是组成型表达 MUC1 的细胞群，但是所述细胞群优选是经基因工程处理表达 MUC1 的细胞群。对于提供用于合适的对照的细胞，例如用空载体经基因工程处理的细胞，或者对于构建表达 MUC1 突变体的细胞，后一种细胞群更灵活。基因工程处理的 MUC1 癌细胞的例子包括但不限于，这里的实施例 2 和 4 中例示的 SW480 和 HCT116 结肠癌细胞。MUC1/ECD 配体诱导的细胞增殖的抑制指示具有拮抗剂活性的试验化合物。对照可以包括空载体（即 MUC1 阴性）基因工程处理的癌细胞的温育或者没有试验化合物或 MUC1/ECD 配体的存在下 MUC1 阳性细胞的温育。后一种情况下的对照之一鉴定激动剂，即，在存在试验化合物和不存在 MUC1/ECD 配体的温育中发现癌细胞增殖的刺激作用。通过使用基因工程处理的 MUC1-阴性细胞确定激动剂活性的特异性。

还有另一种筛选测试监测 MUC1/ECD 配体诱导的 MUC1 胞内域的磷酸化作用。另一种筛选方法利用对 MUC1/ECD 诱导的 MUC1 与 EGF-R, s-Src,  $\beta$ -连环蛋白, GSK3 $\beta$  或 p120 的缔合配体的监测。监测这样的磷酸化作用和蛋白质缔合的方法描述于 Li 等, (1998), Li 等, (2001), Li 等, (2001 (a)) 和 Li & Kufe, (2001), 这些文献都在此引作参考。

本发明还提供了下调 MUC1/ECD 表达的化合物的鉴定方法。在本发明的一些实施方案中，通过流式细胞术或者通过免疫组织化学，应用本领域公知的方法，使用标记的 MUC1/ECD 的抗体观察 MUC/ECD 在合

适的细胞系中的表达。或者,通过免疫印迹或通过用标记的 DNA 探针探测总细胞 RNA,能判断 MUC1 的表达,例如,如这里的实施例 7 所述。

5 对 MUC1/ECD 表达的判断也可以用于诊断方法,其中 MUC1/ECD 的抗体可以被用来研究来自受试者的细胞上或细胞中的 MUC1/ECD 表达。这样的抗体也可以用于对受试者体内癌细胞的成像。通过例如用放射性标记物标记抗-MUC1/ECD 抗体,并且将该抗体注射给受试者,进行成像并且监测该抗体在所述受试者体内的位置。

#### IV. 与化学治疗药物联合

10 本发明涉及与化学治疗药物联合使用 MUC1/ECD 拮抗剂。不受任何特定理论的局限,MUC1 抑制某些化学治疗药物诱导的对基因毒物应激的细胞调亡反应,并且从而诱导对这样的药物的抗性。MUC1/ECD 拮抗剂可以被用来减轻这种 MUC1 介导的对化学治疗药物的反应,从而增强这样的药物的效力。就这方面来说,MUC1/ECD 拮抗剂用于治疗癌症  
15 细胞对化学治疗药物的耐药性,包括癌症化学治疗之后的剩下的或复发的残留癌。上述合理性方法还涉及 MUC1/ECD 拮抗剂和电离辐射的联合。

本发明方法中使用的化学治疗药物包括已知在杀灭和/或抑制癌细胞生长中有活性的所有的组合物和化合物。以作用机理分组,化学  
20 治疗药物包括 DNA-相互作用试剂,抗代谢物,微管蛋白相互作用试剂,抗激素药,抗病毒药,ODC 抑制剂和其它细胞毒性物质例如羟基脲。所有的这些试剂适合在本发明方法中使用。

25 DNA-相互作用物质包括烷化剂,例如,顺铂,环磷酰胺,六甲密胺;DNA 链断裂试剂,例如博莱霉素;嵌入性拓扑异构酶 II 抑制剂,例如,放线菌素 D 和阿霉素);非嵌入性拓扑异构酶 II 抑制剂,例如,依托泊苷和替尼泊苷;和 DNA 小沟结合剂 plicamycin。

30 烷化剂与细胞 DNA, RNA 和蛋白质分子和与较小的氨基酸,谷胱甘肽和类似的化合物形成共价化学加成物。一般情况下,这些烷化剂与细胞成分中的亲核原子反应,例如核酸,蛋白质,氨基酸或谷胱甘肽中的氨基,羧基,磷酸酯,巯基。这些烷化剂在癌症治疗中的机理和作用还没有被完全认清。典型的烷化剂包括:氮芥类,例如苯丁基氮芥,环磷酰胺,异环磷酰胺,双氯乙基甲胺,苯丙氨酸氮芥,尿嘧啶氮芥;

环乙亚胺例如塞替派；甲磺酸酯类，例如二甲磺酸丁酯；亚硝基脲类，例如双氯乙亚硝脲，环己亚硝脲，链脲霉素；铂络合物，例如顺铂，卡铂；生物还原性烷化剂，例如丝裂霉素和甲苒胍，达卡巴嗪和六甲密胺；DNA 链断裂试剂，包括博莱霉素。

5 拓扑异构酶是普遍存在的细胞酶，其在复制过程中起始瞬时 DNA 链断裂，使得链自由转动。这些酶的功能性对于 DNA 的复制过程是决定性的。没有它们，DNA 螺旋中的扭转张力阻止自由旋转，DNA 链不能适当分开，细胞最终没有分裂就死亡。Topo I 连接 DNA 单链断裂的 3' 末端，而 Topo II 连接双链 DNA 断裂的 5' 末端。DNA 拓扑异构酶 II 抑制剂包括下面的物质：嵌入剂，例如安吡啶，放线菌素 D，柔红霉素，阿霉素，去甲氧柔红霉素和米托恩醌；非嵌入剂，例如依托泊苷和替尼泊苷；camptothecins，包括 irinotecan (CPT-II) 和托泊替堪。代表性 DNA 小沟结合剂是 plicamycin。

15 抗代谢物一般通过两种主要机理中的一种或另一种干扰核酸的产生而表现出细胞毒性活性。一些药物抑制脱氧核糖核苷三磷酸酯的产生，后者是 DNA 合成的中间前体，这样抑制 DNA 复制。一些化合物足够类似于嘌呤或嘧啶，能在合成代谢的核苷酸途径中替代它们。然后这些类似物能够取代到 DNA 和 RNA 中代替它们正常的对应物。这里使用的抗代谢物包括：叶酸拮抗剂，例如甲氧喋呤和曲美沙特；嘧啶拮抗剂，例如氟尿嘧啶，氟脱氧尿苷，氮胞苷，阿糖胞苷，和氟尿苷；嘌呤拮抗剂，包括巯基嘌呤，6-硫代鸟嘌呤，氟达拉滨；糖修饰类似物，包括阿糖胞苷，氟达拉滨；核糖核苷酸还原酶抑制剂，包括羟基脲。

25 微管蛋白相互作用试剂通过结合微管蛋白上特定位点而干扰细胞分裂，微管蛋白是聚合生成细胞微管的蛋白质。微管是重要的细胞结构单位。当相互作用试剂在蛋白质上结合时，细胞不能正常形成微管。微管蛋白相互作用试剂包括长春新碱和长春花碱，生物碱和紫杉烷类（紫杉醇和 docetaxel）。

30 尽管它们的作用机理不同，紫杉烷类和长春花生物碱对细胞微管都表现出生物学作用。紫杉烷类促进微管蛋白的聚合作用，微管蛋白是纺锤体微管的蛋白质亚基。最终结果是微管的解聚作用的抑制，它引起稳定的和非功能性微管的形成。这破坏了微管系统的动态平衡，并

且在晚 G2 和 M 期使细胞周期停止, 这抑制细胞复制。

和紫杉烷类一样, 长春花生物碱还影响细胞中的微管系统。与紫杉烷类相反, 长春花生物碱结合微管蛋白并且抑制或阻止微管蛋白亚基聚合成微管。长春花生物碱还诱导微管的解聚作用, 这抑制微管装配并且介导细胞中期停止。长春花生物碱还影响核酸和蛋白质合成; 氨基酸, 环 AMP, 和谷胱甘肽合成; 细胞呼吸; 并且在更高浓度表现出免疫抑制活性。

抗激素试剂通过在终端受体器官阻断激素作用而表现出细胞毒性活性。几种不同类型的肿瘤要求激素刺激来延续细胞繁殖。抗激素试剂通过阻断激素作用对肿瘤细胞剥夺复制必需的刺激。细胞达到它们的生命周期终点时, 它们正常死亡, 没有分裂和产生另外的恶性细胞。抗激素试剂一般源于天然来源并且包括: 雌激素, 结合雌激素和乙炔基雌二醇和乙烯雌酚, 氯烯雌醚和 idenestrol; 孕激素, 例如己酸羟基孕甾酮, 甲羟孕酮, 和甲地孕酮; 雄激素, 例如 睾酮, 丙酸睾酮; 氟甲睾酮, 甲睾酮。

肾上腺皮质类固醇从天然肾上腺可的松或氢化可的松衍生。使用它们是因为它们的抗炎优点及其中一些抑制有丝分裂和停止 DNA 合成的能力。这些化合物包括强的松, 地塞米松, 甲基强的松龙和强的松龙。在前列腺癌的治疗中主要使用促黄体素释放激素试剂或促性腺释放激素拮抗剂。这些包括利普安和醋酸性瑞林。它们防止甾族化合物在睾丸中的生物合成。

抗激素试剂包括抗雌激素试剂, 例如他莫昔芬, 抗雄激素试剂, 例如氟他胺, 和抗肾上腺试剂, 例如米托坦和氨鲁米特。

ODC (或鸟氨酸脱羧酶) 抑制剂通过排除或者干扰 ODC 的活性而抑制癌和癌前细胞增殖, ODC 是对肿瘤细胞生长重要的聚胺生物合成的速度限制酶。特别地, 鸟氨酸被转化为聚胺, 腐胺 (腐胺随后转化为亚精胺) 和精胺的聚胺生物合成似乎是各种癌和癌细胞系中肿瘤生长增殖作用中关键的生物化学作用, 并且已经证明这样的肿瘤细胞中 ODC 活性的抑制作用或 ODC 的排除减少这样的细胞中聚胺的水平, 导致细胞生长停止; 更分化的细胞形态以及甚至细胞衰老和死亡。就这一点来说, ODC 或聚胺合成抑制剂被认为是比细胞毒性或细胞杀灭试剂更有细胞毒性的试剂, 其功能是防止癌症复发或者防止前癌细胞转

化为癌细胞。合适的 ODC 抑制剂是艾氟尿氨酸或  $\alpha$ -二氟甲基-鸟氨酸，即一种口服有效的不可逆的 ODC 抑制剂，以及各种聚胺类似物，它们处于临床前和临床研究的各个阶段。

5 其它细胞毒素包括干扰或阻断对于保持细胞功能或细胞有丝分裂是必需的各种细胞过程的试剂，以及促进细胞调亡的试剂。就这一点来说，羟基脲表现出通过核糖核苷酸还原酶的抑制剂而起作用，而天冬酰胺酶将天冬酰胺酶促转化为没有功能的天冬氨酸，从而阻断肿瘤中蛋白质的合成。

本发明的 MUC1/ECD 拮抗剂成分也可以与 HER-2 的抗体例如  
10 Trastuzumab (Herceptin (H)) 联合使用。另外，本发明还涉及与表皮生长因子受体-相互作用试剂例如酪氨酸激酶抑制剂联合使用 MUC1 结构域拮抗剂。酪氨酸激酶抑制剂适当地包括 imatinib (Novartis), OSI774 (OSI Pharmaceuticals), ZD-1839 (AstraZeneca), SU-101 (Sugen) 和 CP-701 (Cephalon)。

15 当在本发明的治疗方法中使用，注意选择化学治疗药物，使其方便在任何目前可购得的配方中以低于经批准的对于单一药物标明的剂量或者在该剂量之内的剂量使用。

## V. 电离辐射

20 在本发明中，术语“电离辐射”指包括粒子或光子的辐射，具有足够的能量或通过核相互作用能够产生足够的能量，来产生电离作用（得到或失去电子）。一种例示的并且优选的电离辐射是 x-射线。将 x-射线送递到靶组织或细胞的方法是本领域公知的。给定细胞中需要的电离辐射量一般取决于那种细胞的性质。测定射线有效量的方法是本领域  
25 公知的。这里使用的术语电离辐射的“有效剂量”指当与本发明的 MUC1/ECD 拮抗剂联合施用，任选地进一步与化学治疗药物联合时，产生细胞损伤或死亡的电离辐射的剂量。

x-射线的剂量范围是从对于延续时段（3-4 周）日剂量是 50-200 伦琴，至 2000-6000 伦琴的单一剂量。放射性同位素的剂量范围  
30 非常宽，并且取决于同位素的半衰期，发射的射线的强度和类型，以及肿瘤细胞的摄入。

除了外部手段之外，可以使用任何将射线送递给组织的合适的方法

法。例如,通过首先提供与肿瘤抗原免疫反应的放射性标记抗体,接着将有效量的放射性标记抗体送递给肿瘤,可以送递射线。另外,可以使用放射性同位素将电离射线送递给组织或细胞。

## 5 VI. MUC1/ECD 表达的下调

本发明还涉及下调 MUC1/ECD 表达的化合物。一种这样的化合物是异香豆素 NM-3 (2-(8-羟基-6-甲氧基-1-氧代-1H-2-苯并吡喃-3-基)丙酸)。适合下调 MUC1/ECD 表达的 NM-3 和其它异香豆素公开于美国专利 No. 6, 020, 363, 该专利文献在此全文引作参考。其它合适的化合物包括 2-取代的雌二醇化合物,例如 2-甲氧基雌二醇和 2-羟基雌二醇。这些和其它合适的雌二醇衍生物公开于美国专利 No. 6, 239, 123, 该专利文献在此全文引作参考。适合下调 MUC1/ECD 表达的其它化合物包括反义寡核苷酸,如下所述,它靶向编码 MUC1 的核酸分子。

## 15 VII. 反义寡核苷酸

本发明还应用反义化合物,特别是反义寡核苷酸,用于调控编码 MUC1 和 MUC1/ECD 野生型配体例如神经调节蛋白 2 同种型 5 和 6 的核酸分子的功能。MUC1 表达的抑制将减少可用于结合 MUC1/ECD 配体的 MUC1/ECD 的水平。MUC1/ECD 内源配体表达的抑制作用防止或减弱对与这样的配体与 MUC1/ECD 的结合相关的癌细胞的增殖作用。反义方法有这样的益处,即核酸趋向于与“互补序列”配对。所谓互补,指所述多核苷酸是能够根据标准 Watson-Crick 互补规则进行碱基配对的那些多核苷酸。本发明的寡核苷酸可以完全或部分定向于信息序列,即,编码蛋白质的那些,和其它相关的核糖核苷酸,如 5'-非翻译区, 25 3'-非翻译区, 5'-封端区和内含子/外显子接合处。因此,本发明提供寡核苷酸,其与编码 MUC1 和/或 MUC1/ECD 野生型配体例如神经调节蛋白 2 同种型 5 和 6 的核酸分子,优选 mRNA 特异性杂交。干扰 mRNA 的总效果是调控神经调节蛋白 2 同种型 5 和/或 6 的表达。可以用本领域常规的方法测定这样的调控作用。另外,可以评定对癌细胞增殖或 30 肿瘤生长的作用。

人们明白寡核苷酸不一定要与要特异性杂交的靶核酸序列 100% 互补。当寡核苷酸与靶物的结合干扰靶分子的正常功能引起功效损失

时，寡核苷酸是可特异性杂交的，并且有足够程度的互补性来避免在期望特异性结合的条件下，即在体内测试或治疗性处理情况下的生理条件下，寡核苷酸与非靶序列的非特异性结合。

5 根据本发明的反义化合物优选包括大约 4 至大约 50 个核碱基。特别优选的是包括大约 8 至大约 30 个连接的核碱基的反义寡核苷酸。根据本发明使用的寡核苷酸可以通过固相合成公知技术方便并且常规地制备。在本发明上下文中，术语“寡核苷酸”指核糖核酸或脱氧核糖核酸的寡聚物或多聚物。该术语包括由天然存在的核碱基，糖和（主链）糖间共价键和具有功能相似的非天然存在部分的寡核苷酸组成。

10 这样的修饰的或取代的寡核苷酸经常比天然形式优选，因为有期望的性质，例如增强的细胞摄入，增强的与靶物的结合和提高的在核酸酶存在下的稳定性。一些优选的修饰的寡核苷酸的例子包括含有硫代磷酸酯，磷酸三酯，甲基磷酸酯，短链烷基或环烷基糖间键或短链杂原子或杂环糖间键的那些。

15 本发明的寡核苷酸的另外的或其它的修饰作用包括使寡核苷酸化学连接一个或多个亲脂部分，其增强寡核苷酸的细胞摄入。这样的亲脂部分可以在寡核苷酸上几个不同的位置处与寡核苷酸连接。一些优选的位置包括 3' 末端核苷酸的糖的 3' 位置，5' 末端核苷酸的糖的 5' 位置，和任何核苷酸的糖的 2' 位置。本发明的反义化合物还包括生物等价化合物，包括药学可接受盐和前体药物。

20

术语“可特异性杂交”和“互补”被用来指足以导致反义寡核苷酸和靶核酸序列之间稳定的特异性结合的互补度。寡核苷酸不一定要与要特异性杂交的靶核酸序列 100% 互补。当寡核苷酸与靶物的结合干扰靶分子的正常功能引起功效损失并且减少产物蛋白质表达时，寡核苷酸是“可特异性杂交的”，并且有足够程度的互补度来避免寡核苷酸与非靶序列的非特异性结合。

25

神经调节蛋白 2 蛋白质家族包括大量可选择的剪接同种型 (Ring 等, 1999)。神经调节蛋白 2 同种型 5 和 6 的编码序列都具有编码各蛋白质的前 416 个氨基酸的神经调节蛋白 2 基因的从外显子 1 至 6 的相同的核苷酸序列，但是不同之处是编码同种型 5 的羧基末端 10 个氨基酸的序列和编码同种型 6 的羧基末端 6 个氨基酸的序列。外显子 1 至 6 的编码 DNA 序列分别掺入到 SEQ ID NO: 10 至 SEQ ID. NO: 15 中。

30

同种型 5 和 6 的前 416 个氨基酸的编码序列是 SEQ ID. NO 10 的核苷酸 31-1012, SEQ ID. NO 11 的核苷酸 51-222, SEQ ID. NO 12 的核苷酸 230-348, SEQ ID. NO 13 的核苷酸 100-220, SEQ ID. NO 14 的核苷酸 111-187 和 SEQ ID. NO 15 的核苷酸 123-181。同种型 5  
5 和 6 的羧基末端的编码序列分别是 SEQ ID. NO 16 的核苷酸 132-164 和 SEQ ID. NO 17 的核苷酸 30-50。

因为 SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17 明显不与其它神经调节蛋白基因产物共享有序列,在优选的实施方案中,反义寡核苷酸包括至少四个核苷酸的序列,其与 SEQ ID. NO 16 的核苷酸 132-164 或 SEQ ID.  
10 NO 17 的核苷酸 30-50 之间的区互补。在更优选的实施方案中,反义寡核苷酸包括至少八个核苷酸的序列,其与 SEQ ID. NO 16 的核苷酸 132-164 或 SEQ ID. NO 17 的核苷酸 30-50 之间的区互补。

在其它实施方案中,反义寡核苷酸包括至少四个核苷酸的序列,其与 SEQ ID. NO 10 的核苷酸 313-1012 之间的区,或 SEQ ID. NO 11  
15 的核苷酸 51-222 之间的区,或 SEQ ID NO: 12 的核苷酸 230-348 之间的区,或 SEQ ID NO: 13 的核苷酸 100-220 之间的区,或 SEQ ID NO: 14 的核苷酸 111-187 之间的区,或 SEQ ID NO: 15 的核苷酸 123-181 之间的区互补。在另一个实施方案中,反义寡核苷酸是至少八个核苷酸的序列,其与一个上述核苷酸序列的区互补。

20 在其它实施方案中,反义寡核苷酸包括至少四个核苷酸的序列,优选八个核苷酸的序列,其与 SEQ ID. NO 10-17 的非编码区互补。

在本发明其它实施方案中,定向于 MUC1 的反义寡核苷酸包括至少四个核苷酸的序列,其与 SEQ ID NO: 18 互补。在优选的实施方案中,反义寡核苷酸包括至少八个核苷酸的序列,其与 SEQ ID NO: 18 互补。

25 本发明还涉及包括直接产生上述反义寡核苷酸的转录物的表达控制系统的表达载体。另外,本发明提供杂交方法,包括提供一种上述反义寡核苷酸,并且使这样的寡核苷酸与包括靶序列的核酸在允许寡核苷酸与核酸杂交的条件下接触。还包括抑制 mRNA 翻译的方法,包括提供一种上述反义寡核苷酸,并且提供包括靶序列的 mRNA 的细胞,并且  
30 将所述寡核苷酸导入所述细胞,其中所述寡核苷酸抑制 mRNA 在该细胞中翻译。

本发明的另一方面提供含有本发明的反义寡核苷酸和药学可接受

载体的药物组合物。

### VIII. 疫苗

5 本发明还涉及 MUC1/ECD 肽，例如 SEQ ID NO: 1 或者其片段，其中所述片段包括 SEQ ID NO. 1 的四个或多个连续的氨基酸，在疫苗中的应用，其中宿主哺乳动物产生抗这种多肽的抗体，其还起作用抗宿主自身的 MUC1/ECD。根据 Duffy (1980) 所述，疫苗制备技术是本领域一般公知的，这里引述的所有的参考文献全部在此引入作为参考。

10 MUC1/ECD 可以与象蛋白质或 Ficoll 这样的载体分子偶联。载体蛋白质优选是具有至少大约 40,000 道尔顿并且更优选大约 60,000 道尔顿分子量的载体。疫苗制剂可以含有药学可接受载体并且还可以包括佐剂体系以增强制剂的免疫原性，例如水包油体系和其它本领域公知的体系。因为所述肽或偶联物可以在胃中分解，优选肠胃外施用疫苗(例如，皮下，肌内，静脉内或真皮内注射)。剂量取决于疫苗的比活性，并且通过常规实验容易确定。制剂可以存在于例如密封的安瓿和小瓶的单位剂量或多剂量容器中，并且可以保存在冻干条件下，在使用之前只需要加入无菌液体载体。

### IX. 制剂

20 可以将本发明的组合物和方法中使用的 MUC1/ECD 拮抗剂，包括结合抑制剂或寡核苷酸配制成多种常规药物制剂，并且通过常规使用的任何给药途径，包括口服，静脉内，动脉内，肠胃外或腹膜内对需要治疗的癌症患者给药。

25 对于口服给药，可以用例如惰性稀释剂或者用可吸收的食用载体配制本发明的组合物，或者包封在硬或软外壳明胶胶囊中，或者压制成片，或者直接掺入饮食食品中。对于口服治疗给药，活性化合物可以与赋形剂相混合并且用于可吸收片剂，颊片剂，糖剂，胶囊，酏剂，悬浮液，糖浆，薄片等形式。当然，这样的组合物和制剂可以不同，并且一般是大约 2%至单位重量的大约 60%。这样的治疗用组合物中活性化合物的量是获得合适剂量的量。

30 片剂，锭剂，丸剂，胶囊剂等可以含有下面的成分：可以加入粘合剂，黄芪胶，阿拉伯胶，玉米淀粉，或明胶；赋形剂，例如磷酸二钙；崩

解剂,例如玉米淀粉,马铃薯淀粉,海藻酸等;润滑剂,例如硬脂酸镁;和甜味剂,例如蔗糖,乳糖或糖精或者矫味剂,例如薄荷油,冬绿树油,或樱桃调味料。当剂量单位是胶囊时,其除了上述类型材料之外可以含有液体载体。可以存在各种各样的其它材料作为包衣或者另外修饰剂量单位的物理形式。例如,可以用虫胶,糖或者两者对片剂,丸剂或胶囊包衣。糖浆或酞剂可以含有作为甜味剂的活性化合物蔗糖,作为保鲜剂的甲基和丙基对羟基苯甲酸酯,颜料和矫味剂,例如樱桃或橙味矫味剂。当然,在制备剂量单位形式中使用的任何材料都应该是药学的并且使用的量基本上没有毒性。另外,持续释放制剂和配方中可以掺入其它化学治疗化合物。

关于含有寡核苷酸的制剂,可以使用胶体分散系统作为运输赋形剂来增强寡核苷酸体内稳定性和/或使寡核苷酸定位于特定器官,组织或细胞类型。胶体分散系统包括但不限于大分子复合物,纳米胶囊,微球体,小球和以脂质为基础的系统,包括水包油乳液,胶束,混合胶束,脂质体和没有鉴定结构的脂质:寡核苷酸复合物。

适合注射使用的本发明的组合物的药物制剂包括灭菌水溶液或分散液,和用于临时制备灭菌注射溶液或分散液的灭菌粉末剂。在所有的情况下,形式上必须是灭菌的并且流体流动程度一定要达到可用针头注射。其在制备和贮存条件下一定要稳定并且一定要保持不受到微生物例如细菌和真菌作用的污染。载体可以是含有溶剂或分散介质的,例如通过使用包衣,例如卵磷脂,通过在分散情况下保持要求的颗粒大小和通过使用表面活性剂。通过各种抗细菌和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯,氯丁醇,苯酚,山梨酸,乙汞硫代水杨酸钠等能够防止微生物的作用。在很多情况下,其优选包括等渗剂,例如,糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收剂例如一硬脂酸铝和明胶,能够实现可注射组合物的延时吸收。

通过以要求的量将本发明的组合物和上述各种其它成分掺入合适的溶剂,根据需要,接着无菌过滤,来制备无菌可注射溶液。一般情况下,通过将各种灭菌的活性成分掺入到含有基本分散介质和要求的选自上述的其它成分的无菌赋形剂中来制备分散剂。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末剂的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,从预先无菌过滤的溶液得到活性成分加所有附加的期望

的成分。

如这里使用的, "药学可接受载体" 包括任何和所有的溶剂, 分散介质, 包衣, 抗细菌和抗真菌剂, 等渗剂和延迟吸收剂等。对于药学活性物质所使用的这样的介质和试剂的应用是本领域公知的。除了迄今  
5 为止与该活性成分不相容的常规介质或试剂之外, 包括在治疗组合物中使用的所有的常规介质或试剂。也可以在组合物中掺入补充的活性成分。

#### X. 治疗方法

10 可以应用本发明的方法适当治疗的肿瘤包括但不限于, 脑(恶性胶质瘤, 成神经管细胞瘤, 星形细胞瘤, 少突神经胶质瘤, 室管膜瘤), 肺, 肝, 脾, 肾, 淋巴结, 小肠, 胰腺, 血细胞, 结肠, 胃, 乳腺, 子宫内膜, 前列腺, 睾丸, 卵巢, 皮肤, 头颈, 食道, 骨髓, 血液和其它组织的肿瘤。肿瘤可以分为转移性和非转移性。在恶性病变之前也可以适当地  
15 用本发明的方法治疗。

在放射治疗和/或化学治疗之前或之后可以用本发明的 MUC1/ECD 拮抗剂治疗, 间隔期可以是几秒钟或者数周和/或与这样的治疗同时给药。对细胞分开施用 MUC1/ECD 拮抗剂和放射治疗和/或化学治疗的实施方案中, 应该采取保证在各次送递药物之间没有间隔很长时间, 使得  
20 两次或三次治疗的结合仍然能够对细胞发挥有利的组合效果。在这样的情况下, 考虑在每次间隔 0.1 - 25 小时之内, 每次间隔大约 1 - 4 小时之内, 使细胞接触治疗药物或者实施给药方案, 只有大约 1 小时至大约 2 小时的延迟时间是最优选的。在某些情况下, 期望显著延长治疗时间, 各次给药之间间隔几天 (2, 3, 4, 5, 6 或 7) 或几周 (1, 2, 3, 4,  
25 5, 6, 7 或 8)。在任何情况下, 本发明考虑在电离照射和/或化学治疗物质之前, 之后或者甚至同时可以给与 MUC1/ECD 拮抗剂。

癌细胞和化学治疗药物接触之后 0.5 - 12 小时, 一些化学治疗药物瞬时诱导癌细胞上 MUC1 表达。因此, 在一些实施方案中, 施用 MUC1/ECD 结合抑制剂, 特别是任选地与毒素或放射性核苷酸偶联的  
30 MUC/ECD 序列 SEQ ID NO. 1 的抗体, 伴随有癌细胞上增强的 MUC1 表达, 在其它实施方案中, 在用 MUC1 结合抑制剂, 特别是任选地与毒素或放射性核苷酸偶联的 MUC/ECD 序列 SEQ ID NO. 1 的抗体治疗之

前,化学治疗药物之外的试剂也可以被用来提高 MUC1 表达。

在本发明的方法中,使用的 MUC1/ECD 拮抗剂的实际剂量取决于很多因素,包括要治疗的癌症类型和严重程度,和选择的 MUC1/ECD 拮抗剂和其它治疗方案的加和或协同治疗效果。

5

### 实施例

#### 实施例 1: 肽

SEQ ID NO: 1 提供了典型地在 MUC1 表达细胞中发现的 MUC1/ECD 多肽序列。通过标准技术合成了很多种多肽序列。这些包括肽 P1 (SEQ ID NO: 4), P2 (SEQ ID NO: 5) 和 P3 (SEQ ID NO: 6), 它们是 MUC1/ECD 的多肽片段。P1 (SEQ ID NO: 4) 代表在羧基末端加入一个半胱氨酸的 MUC1/ECD (SEQ ID NO: 1) 的氨基酸 5-20。P2 (SEQ ID NO: 5) 代表在羧基末端加入一个半胱氨酸的 MUC1/ECD (SEQ ID NO: 1) 的氨基酸 13-28。P3 (SEQ ID NO: 6) 代表在羧基末端加入一个半胱氨酸的 MUC1/ECD (SEQ ID NO: 1) 的氨基酸 27-44。另外,合成的多肽序列 SEQ ID NO: 7 掺入了在羧基末端加入一个半胱氨酸的 MUC1/ECD (SEQ ID NO: 1) 的氨基酸 6-24。合成的多肽 P0 (SEQ ID NO: 8) 插入仅在 MUC1/ECD 的氨基末端之前存在的 MUC1 蛋白质中存在的 19 氨基酸序列,并且代表潜在的裂解位点。在 MUC 1 序列中存在的序列羧基末端也加入一个半胱氨酸。

10  
15  
20

#### 实施例 2: 抗-MUC1-P1 抗体

##### A. 抗体的制备

多肽 P1 (SEQ. ID NO: 4), 含有 QYK 基序和与细胞因子受体的配体结合结构域同源的其它序列 (Zrihan-Licht, 等, 1994)。在兔体内产生抗与 KLH 偶联的多肽 P1 (SEQ ID NO. 4) 的多克隆抗体, 通过标准方法制备血清。

也制备了抗多肽 SEQ ID NO: 7 的多克隆抗体, 通过使多肽 SEQ ID NO: 7 与 KLH 偶联生成免疫原。从两只兔子获得抗体, 记为 3402-1 和 3402-2。通过标准方法制备血清和亲和纯化的抗体制剂。

25  
30

##### B. 抗-MUC1-P1-抗体对人癌细胞的刺激作用

在含有 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI 1640 培养基中人 ZR-75-1 癌

细胞生长至 80%汇合，然后以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种到 6 孔板上。在含有 0.1% FBS 的培养基中饥饿培养过夜之后，向每个孔加入抗 MUC1-P1 抗体，加入量如图 1 所示，并且温育 48 小时。在 0.1% FBS 存在下又温育 3 天之后定量测定细胞数目。如图 1 所示，抗-MUC1-P1 以剂量依赖方式刺激 ZR-75-1 细胞的生长。

为了评定抗-MUC1-P1 抗体刺激的特异性，稳定转染人 MUC1- 阴性 SW480 结肠癌细胞，表达空载体 (SW480/V) 或 MUC1 (SW480/MUC1)。利用 lipofectamide (Ligtenburger 等, 1992)，用 pCMV-IE-ak1-dhfr 载体或 pCMV-IE-ak1-dhfr-MUC1 转染 SW80 结肠癌细胞。细胞在 800 g/ml G418 (新霉素) 的存在下生长，并且系列稀释，得到单一细胞群。筛选表达 MUC1 (SW480/MUC1) 的单一细胞克隆。两者类型的 SW480 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 中生长至 80% 汇合，然后以每孔  $5 \times 10^4$  个细胞辅于 6 孔板。在含有 0.1% FBS 的培养基中饥饿培养过夜之后，加入指定浓度的抗 MUC1-P1 抗体，并且温育 48 小时。又温育一天之后 (共计三天) 定量测定细胞数。如图 2 所示，抗 MUC1-P1 刺激 SW480/MUC1 细胞的生长但是不刺激 SW48-0/V 细胞生长。这些发现证实抗-MUC1-P1 抗体通过与 MUC1 特异性相互作用而刺激人癌细胞的生长。

### 20 实施例 3: 内源 MUC1 ECD 配体 s

抗-MUC1-P1 刺激人癌细胞的生长的发现提示可能存在天然 MUC1 ECD 配体。为了研究这种可能性，筛选作为 MUC1 配体可能来源的 ZR-75-1 细胞。通过在含有 0.1% FBS 的 RPMI 1640 培养基中培养 ZR-75-1 细胞 72 小时后制备上清液来制备条件培养基。将这种条件培养基加给如前所述在含有 0.1% FBS 的 DME 中生长停滞的 SW480/V 和 SW480/MUC1 细胞。以图 3 指明的浓度加入条件培养基，并且在定量测定细胞数之前将细胞维持 3 天。如图 3 所示，ZR-75-1 细胞表达通过与 MUC1 结合而刺激癌细胞生长的可溶性配体。

为了鉴定可溶性 MUC1 配体，制备包括 MUC1/ECD (SEQ ID. No: 1) 和谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 的融合蛋白。使用如下一套引物通过 PCR 扩增 GST:

5'-ATTAGGCTAGCCTGGTTCGCGTGGTTCTATGTCCCCTATACTAGGTTA-

3', 和 5'-CAAGGGGATCCCTACGGAACCAGATCCGATTTTGG-3', 并且插入 pET-11d 的 NheI 和 BamHI 位点之间 ("pET-11d-GST 载体")。使用如下一套引物通过 PCR 扩增 MUC1/ECD:

5'-TCTGGCCATGGGAGAAGGTACCATCAAT-3', 和 5'-AGCGCGCTAGCCC  
5 AGCCTGGCACCCCAGC-3', 并且插入 pET11d-GST 载体的 NcoI 和 NheI 位点之间 ("pET11d-GST-MLTC1/ECD" 载体)。

通过在 25℃ 下将用 pET11d-GST-MUC1/ECD 或 pET11d-GST 转化的对数生长的大肠杆菌 BL21 (D3) pLysS 细胞与 0.1 mM 异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷温育 6 小时来制备 GST 融合蛋白。使细胞沉淀并且重新悬浮于含有 20 % 蔗糖, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 % NP-40 的 PBS 中,  
10 然后超声处理。4℃ 下以 10,000 x g 离心 30 分钟去除碎屑。将上清液施加到大量谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 上并且 4℃ 下温育 4 小时, 然后洗涤并且装到柱子中。用含 10 mM 谷胱甘肽的 50 mM Tris-HCl, pH 9.5 溶液洗脱融合蛋白。用 PBS 透析纯化的融合蛋白。

15 通过收集含有 40mM EDTA 的 PBS 中的 ZR75-1 细胞来制备培养的细胞的细胞溶解级分。用 PBS 洗涤之后, 用冰冷却的匀化缓冲液 (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM 二硫苏糖醇, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA 和蛋白酶抑制剂混合物 (Roche)) 重新悬浮细胞, 并且在冰上放置 15 分钟。用 Dounce 匀化器匀化悬浮液。4℃ 下  
20 以 1,000 x g 将匀浆离心。收集上清液作为胞质溶胶级分并且在 0℃ 下贮存。

GST-MUC1/ECD 融合蛋白 (1.8 mg) 固定在 400 微升谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B 上, 将其装到柱子中并且用缓冲液 A (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 和 1 mM 二硫苏糖醇) 平衡。通过使其通过谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B 柱首先将胞质溶胶级分预澄清, 然后  
25 加载到 GST-MUC1/ECD 亲和柱上, 然后用 2 x 10 ml 缓冲液 A 洗涤两次。通过加入 2 ml 缓冲液 B (含有 0.15 M NaCl 的缓冲液 A) 洗脱与柱子结合的蛋白质, 并且收集每份 0.4 ml 的级分。将第二和第三级分混合, 并且加载到十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)  
30 上。作为对照, GST 蛋白质 (1.5 mg) 固定到 400 微升谷胱甘肽-琼脂糖凝胶 4B 上, 并且如上所述进行实验。结果证明 MUC1/ECD 与 45 kDa 蛋白质结合。使用人 MCF-7 乳腺癌细胞的溶胞产物进行相似实验, 证

明 MUC1/ECD 与 45 kDa 蛋白质结合。

从凝胶上切下 45 kDa GST-MUC1/ECD 吸附物,用乙腈脱水,然后用 100 mM 碳酸氢铵重新脱水。然后将凝胶切片悬浮于 12.5 ng/微升胰蛋白酶/50 mM 碳酸氢铵中。在 37℃ 下进行消化 10-12 小时。使用 Voyager DE-PRO (Perceptive Biosystem Inc., Framingham, MA) 通过辅助基质的激光解吸/飞行质谱电离时间 (MALDI-TOF-MS) 分析胰蛋白酶消化肽的质量。通过质量指纹法鉴定两种相关的蛋白质,指定为 ML-1 和 ML-2。ML-1 (SEQ ID NO: 3) 和 ML-2 (SEQ ID NO: 4) 的序列和先前分别对于两种神经调节蛋白同种型, NRG2 剪接同种型 5 和 NRG2 剪接同种型 6 公开的那些一样。

#### 实施例 4: 作为致癌基因的 MUC1

##### A. MUC1 支持在软琼脂中生长

证明 MUC1 的表达就恶性表型的展现来说是功能显著的。制备稳定表达 MUC1 的细胞系。通过脂质转染试剂用 pIRES-puro2 载体或 pIRES-puro2-MUC1 转染 HCT116 结肠癌细胞,并且筛选嘌呤霉素抗性。使用稳定表达空载体 (VCT116/V) 或 MUC1 (HCT116/MUC1) 的单一克隆人 MUC1-阴性 HCT116 结肠癌细胞进行研究。对 HCT 116/V 和 HCT116/MIJC1 细胞测试在软琼脂中无贴壁依赖性生长。将细胞 ( $1 \times 10^5$ /60 mm 培养皿) 悬浮于含有补加有 10% FBS 的 DMEM 培养基的 0.33% 琼脂糖中,并且辅于琼脂糖栓上(加有 10% FBS 的 DMEM 中的 0.5% 琼脂糖)。将细胞温育 4 星期,期间每周向平板加入新鲜培养基。4 星期之后计数直径大于 70 微米的集落。与用 HCT/116/V 细胞获得的相比,野生型 MUC1 的表达与集落大小和数目显著增加有关。使用 SW480/V 和 SW480/MUC1 细胞进行的相似研究证实了这些发现,其中 MUC1 表达再次证明支持 SW480 细胞无贴壁依赖性生长。

##### B. MUC1 支持裸鼠中人肿瘤形成

为了评价 MUC1 对人体内肿瘤生长的作用,对 5-6 周龄无胸腺 Balbc/nu/nu 小鼠 (Taconic, Germantown, NY) 右肋腹皮下注射  $1 \times 10^6$  HCT116/V 或 HCT 116/MUC1 细胞。一星期对肿瘤测量两次 (4 只小鼠/组)。通过下面的式子计算肿瘤体积:  $1/2$  (长  $\times$  宽<sup>2</sup>)。当肿瘤体

积超过 2 cm<sup>3</sup> 时终止实验。随时间对肿瘤体积的测量证明很少的 HCT116/V 细胞生长。通过比较, HCT116/MUC1 肿瘤生长显著加大。

#### 实施例 5: 氧化和基因毒性应激诱导 MUC1 表达

5 为了确定 MUC1 是否反应氧化应激被诱导, 用过氧化氢处理 MCF-7 细胞。使用抗-DF3/MUC1 抗体通过免疫印迹分析细胞溶胞产物。通过将 MCF-7 细胞悬浮于冰上的溶胞缓冲液(50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 3 mM NaF, 1 mM 钒酸钠, 1mM DTT 加蛋白酶抑制剂和 1% NP-40 或 1% Brij-96) 中 30 分钟来制备溶胞产物。通过离心  
10 澄清溶胞产物, 并且通过 SDS-PAGE 分析等量的蛋白质。然后将蛋白质转移到硝基纤维素滤纸上, 通过在含有 0.05 % Tween-20 的 5 % 脱脂奶粉 PBS 溶液中温育而封闭, 并且用抗-MUC1 抗体 (Pandey 等, 1995) 探测。使用抗肌动蛋白作为对照。结果证明反应于氧化应激, MUC1 快速而瞬时被诱导, 而同时过氧化氢对肌动蛋白表达水平没有影响。

15 使用基因毒性剂进行相似研究。结果证明用柔红霉素处理 MCF-7 细胞与 MUC1 快速而瞬时诱导有关, 但是与肌动蛋白, 表达无关。有效证据证实不同的细胞毒性剂包括紫杉醇, 顺铂和电离辐射诱导 MUC1。

#### 实施例 6: MUC1 抑制对氧化和基因毒性应激的细胞调亡反应

20 为了确定 MUC1 是否抑制对氧化应激的细胞调亡反应, 用 1mM 过氧化氢处理稳定表达空载体或 MUC1 的 HeLa 细胞 1 小时。通过用碘化丙锭对乙醇固定的细胞染色并且通过 FACScan (Beckton Dickerson) 监测来评定 DNA 含量。用 MODFIT LT 程序 (VeritySoftware House, Topsham, ME) (Yuan 等, 1997) 确定细胞数和 sub-G1 DNA 含量。通过  
25 流式细胞仪对细胞分析 sub-G1 DNA 的诱导作为细胞调亡的标记。如图 4 所示, 结果证明 MUC1 抑制对氧化应激的细胞调亡反应。

通过测定表达空载体或 MUC1 的 HeLa 细胞的 sub-G1 DNA 含量评定用 0.01 mM 紫杉醇处理 20 小时的细胞中细胞调亡的诱导。如图 4 所示, 具有氧化应激时, MUC1 表达抑制紫杉醇诱导的细胞调亡。

30

#### 实施例 7: NM-3 对 MUC1 表达的影响

用 100-400 微克/毫升的 NM-3 (2- (8-羟基-6-甲氧基-1-氧代-

1H-2-苯并吡喃-3-基)丙酸)将MCF-7细胞处理48小时。使用DF3 MAb (Kufe, 美国专利 5,506,343, 这里引作参考)通过免疫印迹分析显现DF3抗原水平。

观察到相对于没有处理的细胞来说, NM-3处理过的细胞的DF3抗原的胞内水平降低。对于ZR-75-1和BT-20细胞系发现相似结果。证明NM-3介导的胞内DF3抗原减少既是剂量依赖性的又是时间依赖性的。为了确定NM-3是否破坏MUC1 DF3抗原的胞外定位, 研究了细胞培养基上清液中抗原水平和NM-3处理之后的MCF-7细胞上的抗原水平。两个位置DF3抗原水平都减少。这些发现提示NM-3抑制MUC1蛋白质表达。

进行杂交研究来确定NM-3对MUC1-表达的影响在转录水平上是否是可测的。在NM-3处理MCF-7细胞48小时之后, <sup>32</sup>P-标记的DF3 DNA探针与总细胞RNA中4.5和7.0 kb两个转录物杂交。与不存在NM-3下温育的MCF-7细胞对照物相比, mRNA水平都降低。使用ZR-75-1和BT-20细胞系观察到相同的结果。这些发现提示对那些细胞系进行NM-3处理之后, DF3表达在转录水平上被调节。

为了确定NM-3是否也抑制细胞表面蛋白质的表达, 对MCF-7, ZR-75-1和BT-20细胞系试验NM-3处理之后表皮生长因子(EGF-R)表达的水平。与不存在NM-3下温育的细胞对照物相比, NM-3处理之后EGF-R表达没有可检测的变化。这些结果表明NM-3对MUC1表达的选择性作用, 它不抑制表面分子表达。

说明书和实施例证实了本发明。实施例只是为了举例说明而不是限制本发明的范围。本领域技术人员能想象出在要求的发明的范围和精神之内的后面的权利要求书中描述的本发明方法的等价物。

25

### 参考文献

下面的参考文献, 其程度相当于它们提供的例示方法或者对提出的那些的补充的其它详细描述, 具体在这里引作参考。

30 Barry & Sharkey, 人类病理学 (Hum. Pathol. ), 16: 225-7, 1985.

Brunner 等, 自然 (Nature), 385: 829-833, 1997.

- Daniels & Reynolds, 分子细胞生物 (Mol. Cell. Biol. ), 19: 3614-23, 1999.
- Dawson 等, 科学 (Science) 266: 776, 1994.
- Duffy, 疫苗制备技术 (Vaccine Preparation Techniques ),  
5 Noyes Data Corporation of Park Ridge, N. J., 1980.
- Finn 等, 免疫学研究 ( Immunol. Rev. ) 145: 61-89, 1995.
- Gansow, Int. J. Rad Appl. Instrum. [B], Nucl. Med. Biol. 18: 369-381, 1991.
- Goding, 于: 单克隆抗体: 原理与实践 (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice), 第二版, Orlando, Fla., 科学出版社,  
10 pp. 60-61, 1986.
- Itzkowitz 等, 癌症 (Cancer), 66: 1960-6, 1990.
- Jawhari 等, 病理学杂志 (J. Pathol. ), 189: 180-85, 1999.
- Jones 等, 自然 (Nature) 321: 522-525, 1986.
- 15 Kufe 等, 杂交瘤 ( Hybridoma ), 3: 223-232, 1984.
- Li 等, 分子细胞生物学 (Mol Cell Biol. ), 18: 7216-24, 1998.
- Li 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem. ), 276: 6061-64, 2001.
- Li 等, 生物化学杂志 (J. Biol. Chem. ), 电子-公开版本 C100359200, 2001年8月1日 (a).
- 20 Li & Kufe, 生物化学生物物理研究通讯 (Biochem Biophys. Res. Commun. ), 281, 440-43, 2001.
- Ligtenburger 等, 癌症研究 (Cancer Res. ), 15: 2318-2324, 1992.
- Molenaar 等, 细胞 (Cell), 86: 391-399, 1996.
- 25 Novak & Dedhar, 细胞分子生命科学 (Cell Mol. Life Sci. ), 523-37, 1999.
- Olsnes & Pihl, 制药原理 (Pharmac. Ther. ) 25: 355-381, 1981.
- Pandey 等, 癌症研究 (Cancer Res. ), 55: 4000-4003, 1995.
- 30 Pastan 等, 生物化学研究年鉴 (Ann. Rev. Biochem. ) 61: 331-354, 1992.
- Perey 等, 癌症研究 (Cancer Res. ), 52: 2563-68, 1992.

- Pluckthun , 单克隆抗体药理学 ( The Pharmacology of Monoclonal Antibodies ), vol. 113: 269-315, Rosenberg 和 Moore 编著, Springer-Verlag, New York, 1994.
- Presta, Curr. Op. Struct Biol. 2: 593-596, 1992.
- 5 Reddish 等, 癌症免疫. 免疫治疗 ( Cancer Immunol. Immunother. ), 42: 303-9, 1996.
- Reynolds 等, 分子细胞生物学 ( Mol. Cell. Biol. ) 9: 629-38, 1989.
- Reynolds 等, 分子细胞生物学 ( Mol. Cell. Biol. ) 14:  
10 8333-41, 1994.
- Riechmann 等, 自然 ( Nature ) 332: 323-329, 1988.
- Ring 等, 人类遗传学 ( Human Genet. ), 104: 326-32, 1999.
- Sambrook 等, 分子克隆: 实验手册 ( Molecular Cloning: A Laboratory Manual ), 冷泉港实验出版社, 冷泉港, N. Y. 1989.
- 15 Shimazui 等, 癌症研究 ( Cancer Res. ), 56: 4154-58, 1996.
- Smith & Waterman, Adv. Appl. Math., 2: 482-489, 1981.
- Strouss & Decker, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 27: 57-92, 1992.
- Takeichi, 生物化学研究年鉴 ( Annu. Rev. Biochem. ), 59:  
20 237-52, 1990.
- Thorpe 等, 免疫学研究 ( Immunological Rev. ) 62: 119-158, 1982.
- Thorpe 等, 临床药物中的单克隆抗体 ( Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine ), pp. 168-190, 科学出版社, NY 1982 (a).
- 25 Waldmann, 科学 ( Science ), 252: 1657, 1991.
- Yamamoto 等, 生物化学杂志 ( J. Biol. Chem. ) 272: 12492-94, 1997.
- Yuan 等, PNAS, 94: 1437-1440, 1997.
- Zrihan-Licht, 等, FEBS Let., 356: 130-36, 1994.
- 30 美国专利 No. 4,675,382,  
美国专利 No. 4,894,443,  
美国专利 No. 5,506,343.

## 序列表

<110> 唐纳德 W. 库弗.

大野

<120> MUC1 胞外域和癌症治疗组合物及方法

<130> ILEX:061JP

<150> 60/231,841

<151> 2000-09-11

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 45

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr
1           5           10           15
Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser
                20           25           30
Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly
          35           40           45

```

<210> 2

<211> 426

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

```

Met Arg Gln Val Cys Cys Ser Ala Leu Pro Pro Pro Pro Leu Glu Lys
1           5           10           15
Gly Arg Cys Ser Ser Tyr Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Arg
                20           25           30
Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ser Gly Ser Ser Ser Arg
          35           40           45

```

---

Ser Ser Ser Asn Asn Ser Ser Ile Ser Arg Pro Ala Ala Pro Pro Glu  
 50 55 60

Pro Arg Pro Gln Gln Gln Pro Gln Pro Arg Ser Pro Ala Ala Arg Arg  
 65 70 75 80

Ala Ala Ala Arg Ser Arg Ala Ala Ala Ala Gly Gly Met Arg Arg Asp  
 85 90 95

Pro Ala Pro Gly Phe Ser Met Leu Leu Phe Gly Val Ser Leu Ala Cys  
 100 105 110

Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Gln Asp Gln Ala Tyr Lys Ala Pro  
 115 120 125

Val Val Val Glu Gly Lys Val Gln Gly Leu Val Pro Ala Gly Gly Ser  
 130 135 140

Ser Ser Asn Ser Thr Arg Glu Pro Pro Ala Ser Gly Arg Val Ala Leu  
 145 150 155 160

Val Lys Val Leu Asp Lys Trp Pro Leu Arg Ser Gly Gly Leu Gln Arg  
 165 170 175

Glu Gln Val Ile Ser Val Gly Ser Cys Val Pro Leu Glu Arg Asn Gln  
 180 185 190

Arg Tyr Ile Phe Phe Leu Glu Pro Thr Glu Gln Pro Leu Val Phe Lys  
 195 200 205

Thr Ala Phe Ala Pro Leu Asp Thr Asn Gly Lys Asn Leu Lys Lys Glu  
 210 215 220

Val Gly Lys Ile Leu Cys Thr Asp Cys Ala Thr Arg Pro Lys Leu Lys  
 225 230 235 240

Lys Met Lys Ser Gln Thr Gly Gln Val Gly Glu Lys Gln Ser Leu Lys  
 245 250 255

Cys Glu Ala Ala Ala Gly Asn Pro Gln Pro Ser Tyr Arg Trp Phe Lys  
 260 265 270

Asp Gly Lys Glu Leu Asn Arg Ser Arg Asp Ile Arg Ile Lys Tyr Gly  
 275 280 285

Asn Gly Arg Lys Asn Ser Arg Leu Gln Phe Asn Lys Val Lys Val Glu  
 290 295 300

Asp Ala Gly Glu Tyr Val Cys Glu Ala Glu Asn Ile Leu Gly Lys Asp  
 305 310 315 320

Thr Val Arg Gly Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Ser Thr Thr Leu Ser  
 325 330 335

---

Val Val Val Glu Gly Lys Val Gln Gly Leu Val Pro Ala Gly Gly Ser  
 130 135 140

Ser Ser Asn Ser Thr Arg Glu Pro Pro Ala Ser Gly Arg Val Ala Leu  
 145 150 155 160

Val Lys Val Leu Asp Lys Trp Pro Leu Arg Ser Gly Gly Leu Gln Arg  
 165 170 175

Glu Gln Val Ile Ser Val Gly Ser Cys Val Pro Leu Glu Arg Asn Gln  
 180 185 190

Arg Tyr Ile Phe Phe Leu Glu Pro Thr Glu Gln Pro Leu Val Phe Lys  
 195 200 205

Thr Ala Phe Ala Pro Leu Asp Thr Asn Gly Lys Asn Leu Lys Lys Glu  
 210 215 220

Val Gly Lys Ile Leu Cys Thr Asp Cys Ala Thr Arg Pro Lys Leu Lys  
 225 230 235 240

Lys Met Lys Ser Gln Thr Gly Gln Val Gly Glu Lys Gln Ser Leu Lys  
 245 250 255

Cys Glu Ala Ala Ala Gly Asn Pro Gln Pro Ser Tyr Arg Trp Phe Lys  
 260 265 270

Asp Gly Lys Glu Leu Asn Arg Ser Arg Asp Ile Arg Ile Lys Tyr Gly  
 275 280 285

Asn Gly Arg Lys Asn Ser Arg Leu Gln Phe Asn Lys Val Lys Val Glu  
 290 295 300

Asp Ala Gly Glu Tyr Val Cys Glu Ala Glu Asn Ile Leu Gly Lys Asp  
 305 310 315 320

Thr Val Arg Gly Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Ser Thr Thr Leu Ser  
 325 330 335

Ser Trp Ser Gly His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr Ala Lys Ser Tyr

Ser Trp Ser Gly His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr Ala Lys Ser Tyr  
340 345 350

Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly Ile Asn Gln Leu  
355 360 365

Ser Cys Lys Cys Pro Asn Gly Phe Phe Gly Gln Arg Cys Leu Glu Lys  
370 375 380

Leu Pro Leu Arg Leu Tyr Met Pro Asp Pro Lys Gln Ser Val Leu Trp  
385 390 395 400

Asp Thr Pro Gly Thr Gly Val Ser Ser Ser Gln Trp Ser Thr Ser Pro  
405 410 415

Lys Pro Arg Ser Cys Thr Arg Arg Gly Ser  
420 425

<210> 3

<211> 422

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 3

Met Arg Gln Val Cys Cys Ser Ala Leu Pro Pro Pro Pro Leu Glu Lys  
1 5 10 15

Gly Arg Cys Ser Ser Tyr Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Arg  
20 25 30

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ser Gly Ser Ser Ser Arg  
35 40 45

Ser Ser Ser Asn Asn Ser Ser Ile Ser Arg Pro Ala Ala Pro Pro Glu  
50 55 60

Pro Arg Pro Gln Gln Gln Pro Gln Pro Arg Ser Pro Ala Ala Arg Arg  
65 70 75 80

Ala Ala Ala Arg Ser Arg Ala Ala Ala Ala Gly Gly Met Arg Arg Asp  
85 90 95

Pro Ala Pro Gly Phe Ser Met Leu Leu Phe Gly Val Ser Leu Ala Cys  
100 105 110

Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Gln Asp Gln Ala Tyr Lys Ala Pro  
115 120 125



<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 5

His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser  
1 5 10 15

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 6

Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp  
1 5 10 15

Cys

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 7

Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser  
 1 5 10 15

Gly Ala Cys

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 8

Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg  
 1 5 10 15

Tyr Asn Leu

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 9

Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala  
 1 5 10 15

Phe Arg Glu Cys  
20

<210> 10

<211> 1054

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 10

```

ccctgcagaa gccgcgctcc ctactcggtc cgggggcaga gggggcgcga gagagcaagt      60
gggcgggcgt cccatectcc gcatecctct ccaggctctg gcgcacaggg tgggagcgct      120
gcgctgcgcc gcgctgcgca tcgcggcccc cttgccgctt gccccctgcc ctagctgggc      180
cacctccccg ggctgccggt ggagggctaa gaggcgctaa cgttacgctg tttccggttt      240
tccagcgggc tctgtttccc ctccaaggc ggcggcggct gagcggcgga gcccccaaa      300
tggcctggcc agatgcggca ggtttgctgc tcagcgtgc cgccgccgcc actggagaag      360
ggtcggtgca gcagctacag cgacagcagc agcagcagca gcgagaggag cagcagcagc      420
agcagcagca gcagcgagag cggcagcagc agcaggagca gcagcaacia cagcagcatc      480
tctcgtcccc ctgcgcccc agagccgagg ccgcagcaac agccgcagcc ccgcagcccc      540
gcagcccgga gagccgccc ccgttcgca gccgcagccg ccggcgccat gaggcgcgac      600
ccggcccccg gcttctccat gctgctcttc ggtgtgtgc tcgcctgcta ctgcccagc      660
ctcaagtcag tgcaggacca ggcgtacaag gcacccgtgg tggtagagg caaggtacag      720
gggctgtcc cagccggcgg ctccagctcc aacagcacc gagagccgcc cgcctcgggt      780
cgggtggcgt tggtaaagg gctggacaag tggccgctcc ggagcgggg gctgcagcgc      840
gagcaggtga tcagcgtggg ctctgtgtg ccgctcgaaa ggaaccagcg ctacatcttt      900
ttcctggagc ccacggaaca gcccttagtc ttaagacgg cctttgcccc cctcgatacc      960
aacggcaaaa atctcaagaa agaggtgggc aagatcctgt gcaactgactg cggtagtgc      1020
ccccctccct ttgctggaga aaggggggag gggc      1054

```

<210> 11

<211> 419

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 11

```
gcactgcccc taccaccacc gtgctcacct acctgccttg taaccacag ccaccggcc      60
caagttgaag aagatgaaga gccagacggg acaggtgggt gagaagcaat cgctgaagtg    120
tgaggcagca gccggtaatc cccagccttc ctaccgttgg ttcaaggatg gcaaggagct    180
caaccgcagc cgagacattc gcatcaaata tggcaacggc aggtaagcaa tatccagcct    240
gtcctccatc caagcagctg ccctccctcc tctcgagaag gagtggcctg aactgggcag    300
aggccagggc tgtgccccca gactcaccca tggaaaccagt cccagcccct ctccatactc    360
cccttccttg ccaactcccag cctttcttct gcagctcggg gaccctctgg tcatggtgg    419
```

<210> 12

<211> 493

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapien)

<400> 12

```
gccactagtc ctgccctgtg ttgtcctaag ggcccaaggc tccctgcagc tgcagggact      60
ccgtgccccca cctggactcc agaaattgct ggggggaggg aatctccttc ccatctaagc    120
tgcagggcca ctgtggctct gtggagagag gcaaccgctg ggtgactgct ggggagccac    180
agccggccct ggctcacgcc tctccccctt ttatcccctc cctaaccaga aagaactcac    240
gactacagtt caacaaggtg aaggtggagg acgctgggga gtatgtctgc gaggccgaga    300
acatcctggg gaaggacacc gtccggggcc ggctttacgt caacagcggg aggtgggccc    360
agacagaggg aagggccta gaggggtttg gcagggcggg ccagtggccc cccagccctt    420
ggggcctgca tgtgatccat ctgcactca actcccctcc ctctgctgc tgccatatca    480
agccctagat ctc                                          493
```

<210> 13

<211> 350

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 13

```

ggtcaccttc cagttttgac gtggggcatg aaggagatga ttcttggggc ctagggatag      60
tctcagtgcg tcaactggcac atgtctctca taccctcagt gagcaccacc ctgtcatcct      120
ggtcggggga cgcocggaag tgcaacgaga cagccaagtc ctattgcgtc aatggaggcg      180
tctgctacta catcgagggc atcaaccagc tctcctgcaa gtaagtgacc agtaggggtg      240
ggcatgggag caagaacagg gtaggagatg ctgggtcaga agtggagggc tctaggaaaa      300
gagggttcca agccactgac aagagggtccc caaggggtgt agacaggaag      350

```

<210> 14

<211> 326

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 14

```

aagtgcctga cttgggtttt ctcatccttc actgtgcact ttgatttcta accttagcct      60
cgcggatgat gccagtttgt tctgtgattt ttcccctttt cttctccag atgtccaaat      120
ggattcttcg gacagagatg tttggagaaa ctgcctttgc gattgtacat gccagatcct      180
aagcaaagta tgtttgaaga tacaacaca agtccctgct ccttagaaag cttctgggtg      240
cagtcccccc aatgtagggc atagggccag ggggtgttggg tgttttgatc tttggctggt      300
ttgttttggt tctcttttct tttttg      326

```

<210> 15

<211> 310

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 15

aatacaaatg gtaacggtgg caaggaaccc agctggcatt ggcaggagcc cgtgccgggg 60  
 tgttgcaatg cctgtgtctt gctatcctgg ctctctcttt ctggttttct ttcttttggt 120  
 aggtgtcctg tgggatacac cggggacagg tgtcagcagt tcgcaatggt caacttctcc 180  
 agtatgtctc tttcttctat ttcttctctt ccctggtgac tgacagtctc cccctgggga 240  
 gggatggggc cttgcttagc aagactaggg ggagatgtag aggggtgtcct gcgctcctta 300  
 gaggagacgg 310

<210> 16

<211> 259

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 16

ggatggaaag gagctgggca ggacctgagc tggggagagc ctatggcttt gggggcaaag 60  
 gggctctctgc accactatcc ctatggggtt tgctctctgc cccaccctc acatctaccc 120  
 tacctctgca gaagccgagg agctgtacca gaagagggtc ctgaccatca cgggcatctg 180  
 cgtggctctg ctggtcgtgg gcatcgtctg tgtggtggcc tactgcaaga ccaagtgagt 240  
 gtcactcact caagctggg 259

<210> 17

<211> 258

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 17

ttgtgaccct cgctcttctg cactgccaga gcaccttggga tttgaattaa agggtatgaa 60  
 acctctgtgt gtcactcagc accatctgcg tggcccctct ccacagcctc cgatgccatg 120

---

```

tgtgctgaat gtttggtttc ctttccaaaa aatggaaaag ggatgattcc aaaaatctct    180
cctggcccca tcgagatgtc ctatcataaa ctacgttgat ttagcaggag acgaaagaag    240
ctcatgaaca gaagggca                                                    258

```

<210> 18

<211> 8181

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<220>

<221> misc\_特征

<222> (6890)..(7960)

<223> 此时还没有此序列中的"n"的定义

<220>

<221> misc\_特征

<222> (6890)..(7960)

<223> 未知核苷酸

```

<400> 18
gaattcagaa ttttagacc tttggccttg ggtccatcc tggagaccct gaggtctaag    60
ctacagcccc tcagccaacc acagaccctt ctctggctcc caaaaggagt tcagtcccag    120
agggtggtca cccacccttc agggatgaga agttttcaag gggattact caggcactaa    180
ccccaggaaa gatgacagca cattgccata aagttttggt tgttttctaa gccagtgcaa    240
ctgcttattt tagggatttt ccgggatagg gtggggaagt ggaaggaatc ggcgagtaga    300
agagaaagcc tgggaggggtg gaagttaggg atctagggga agtttggtctg atttggggat    360
gcgggtgggg gaggtgctgg atggagttaa gtgaaggata ggggtgcctga gggaggatgc    420

```

---

|             |             |            |            |            |             |      |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| ccgaagtccct | cccagaccca  | cttactcacg | gtggcagcgg | cgacactcca | gtctatcaaa  | 480  |
| gatccgccgg  | gatggagagc  | caggaggcgg | gggctgcccc | tgaggtagcg | gggaggccgg  | 540  |
| ggggccgggg  | ggcggacggg  | acgagtgcaa | tattggcggg | ggaaaaaca  | acactgcacc  | 600  |
| gcgtcccgtc  | cctcccggcc  | gcccggggcc | ggatcccgct | ccccaccgcc | tgaagccggc  | 660  |
| ccgaccoggga | accggggccg  | ctggggagtt | gggttcacct | tggaggccag | agagacttgg  | 720  |
| cgccccgaag  | caaagggaaat | ggcaaggggg | aggggggagg | gagaacggga | gtttgcggag  | 780  |
| tccagaaggc  | cgctttccga  | cgcccggggc | ttgcgcgcgc | ttgctcttta | agtactcaga  | 840  |
| ctgcgcggcg  | cgagccgtcc  | gcatggtgac | gcgtgtccca | gcaaccgaac | tgaatggctg  | 900  |
| ttgcttggca  | atgccgggag  | ttgaggtttg | gggccgcca  | cctagctact | cgtgttttct  | 960  |
| ccggcctgcg  | agttgggggg  | ctcccgcctc | cccggcccgc | tcttggggcg | gctgacgtca  | 1020 |
| gatgtcccca  | ccccgcccag  | cgcttgcctc | aagggtctcg | ccgcacacaa | agctcggcct  | 1080 |
| cgggcgccgg  | cgcgcgggcg  | agagcgggtg | tctctcgcct | gctgatctga | tgcgctccaa  | 1140 |
| tcccgtgcct  | cgccgaagtg  | tttttaaagt | gttctttcca | acctgtgtct | ttggggctga  | 1200 |
| gaactgtttt  | ctgaatacag  | gcggaactgc | ttccgtcggc | ctagaggcac | gctgcgactg  | 1260 |
| cgggacccaa  | gttccacgtg  | ctgccgcggc | ctgggatagc | ttcctcccct | cgtgcactgc  | 1320 |
| tgccgcacac  | acctcttggc  | tgtcgcgcac | tacgcacctc | acgtgtgctt | ttgccccccg  | 1380 |
| ctacgtgcct  | acctgtcccc  | aataccactc | tgctcccaaa | aggatagttc | tgtgtccgta  | 1440 |
| aatcccattc  | tgtaacccca  | cctactctct | gcccccccct | tttttgtttt | gagacggagc  | 1500 |
| tttgctctgt  | cgcccaggct  | ggagtgcaat | ggcgcgatct | cggctcactg | caacctccgc  | 1560 |
| ctcccggggt  | caagcgattc  | tcttgcctca | gcctcctgag | tagctggggg | tacagcggcc  | 1620 |
| gccaccacgc  | tcggctaatt  | tttgtagttt | ttagtagaga | cgaggtttca | ccatcttggc  | 1680 |
| caggctggtc  | ttgaaccctt  | gaccttgtga | tccactcgcc | tcggccttcc | aaagtgttgg  | 1740 |
| gattacgggc  | gtgacgaccg  | tgccacgcat | ctgcctctta | agtacataac | ggccccacaca | 1800 |
| gaacgtgtcc  | aactcccccg  | cccacgttcc | aacgtcctct | cccacatacc | tcggtgcccc  | 1860 |
| ttccacatac  | ctcaggaccc  | caccgcctta | gctccatttc | ctccagacgc | caccaccacg  | 1920 |
| cgccccggag  | tgccccctcc  | taaagctccc | agccgtccac | catgctgtgc | gttcctccct  | 1980 |
| ccctggccac  | ggcagtgacc  | cttctctccc | gggccctgct | tcctctcgc  | gggctctgct  | 2040 |

---

|             |            |             |            |             |            |      |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|------|
| gcctcactta  | ggcagcgctg | cccttactcc  | tctccgcccg | gtccgagcgg  | cccctcagct | 2100 |
| tcggcgccca  | gccccgcaag | gctcccgggtg | accactagag | ggcgggagga  | gctcctggcc | 2160 |
| agtgggtggag | agtggcaagg | aaggacccta  | gggttcatcg | gagcccaggt  | ttactccctt | 2220 |
| aagtggaaat  | ttcttcccc  | actcctcctt  | ggctttctcc | aaggagggaa  | cccaggctgc | 2280 |
| tggaaagtcc  | ggctgggggg | gggactgtgg  | gttcagggga | gaacgggggtg | tggaacggga | 2340 |
| cagggagcgg  | ttagaaggg  | ggggctattc  | cgggaagtgg | tggggggagg  | gagcccaaaa | 2400 |
| ctagcaccta  | gtccactcat | tatccagccc  | tcttatttct | cggccgctct  | gcttcagtgg | 2460 |
| acccggggag  | ggcggggaag | tggagtggga  | gacctagggg | tgggcttccc  | gaccttgctg | 2520 |
| tacaggacct  | cgacctagct | ggctttgttc  | cccatcccca | cgttagtgtg  | tgccctgagg | 2580 |
| ctaaaactag  | agcccagggg | ccccaggttc  | cagactgccc | ctccccctc   | ccccggagcc | 2640 |
| agggagtgg   | tggtgaaagg | gggaggccag  | ctggagaaca | aacgggtagt  | cagggggttg | 2700 |
| agcgattaga  | gcccttgtac | cctaccaggg  | aatggttggg | gaggaggagg  | aagaggtagg | 2760 |
| aggtagggga  | gggggcgggg | ttttgtcacc  | tgtcacctgc | tcgctgtgcc  | tagggcgggc | 2820 |
| gggcggggag  | tggggggacc | ggtataaagc  | ggtaggcgcc | tgtgcccgt   | ccacctctca | 2880 |
| agcagccagc  | gcctgcctga | atctgttctg  | ccccctcccc | accatttca   | ccaccacat  | 2940 |
| gacaccgggc  | accagtctc  | ctttcttct   | gctgctgctc | ctcacagtgc  | ttacaggtga | 3000 |
| ggggcacgag  | gtggggagtg | ggctgccctg  | cttaggtgg  | cttcgtggtc  | tttctgtggg | 3060 |
| ttttgctccc  | tggcagatgg | caccatgaag  | ttaaggtaag | aattgcagac  | agaggctgcc | 3120 |
| ctgtctgtgc  | cagaaggagg | gagaggctaa  | ggacaggctg | agaagagttg  | cccccaacc  | 3180 |
| tgagagtggg  | taccaggggc | aagcaaagt   | cctgtagaga | agtctagggg  | gaagagagta | 3240 |
| gggagagggga | aggcttaaga | ggggaagaaa  | tgcaggggcc | atgagccaag  | gcctatgggc | 3300 |
| agagagaagg  | aggctgctgc | agggaggag   | gcttccaacc | caggggttac  | tgaggctgcc | 3360 |
| cactccccag  | tctcctgg   | attatctctc  | tggtgccag  | agcttatatt  | ttcttcttgc | 3420 |
| tcttattttt  | ccttcataaa | gacccaacc   | tatgacttta | acttcttaca  | gctaccacag | 3480 |
| cccctaaacc  | cgcaacagtt | gttacaggtt  | ctggtcatgc | aagctctacc  | ccaggtggag | 3540 |
| aaaaggagac  | ttcggctacc | cagagaagtt  | cagtgccag  | ctctactgag  | aagaatgctg | 3600 |
| tgagtatgac  | cagcagcgta | ctctccagcc  | acagccccgg | ttcaggctcc  | tccaccactc | 3660 |

---

|            |            |            |             |            |             |      |
|------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|------|
| agggacagga | tgtcactctg | gccccggcca | cggaaccagc  | ttcaggttca | gctgccacct  | 3720 |
| ggggacagga | tgtcacctcg | gtcccagtca | ccaggccagc  | cctgggctcc | accaccccgc  | 3780 |
| cagcccacga | tgtcacctca | gccccggaca | acaagccagc  | cccgggctcc | accgcccccc  | 3840 |
| cagcccacgg | tgtcacctcg | gccccggaca | ccaggccggc  | cccgggctcc | accgcccccc  | 3900 |
| cagcccacgg | tgtcacctcg | gccccggaca | acaggcccgc  | cttgggctcc | accgcccctc  | 3960 |
| cagtccacaa | tgtcacctcg | gcctcaggct | ctgcatcagg  | ctcagcttct | actctgggtg  | 4020 |
| acaacggcac | ctctgccagg | gctaccacaa | cccagccag   | caagagcact | ccatttctaa  | 4080 |
| ttcccagcca | ccactctgat | actcctacca | cccttgccag  | ccatagcacc | aagactgatg  | 4140 |
| ccagtagcac | tcacatagc  | acggtagctc | ctctcacctc  | ctccaatcac | agcacttctc  | 4200 |
| cccagttgtc | tactggggtc | tctttctttt | tctgtcttt   | tcacatttca | aacctccagt  | 4260 |
| ttaattcctc | tctggaagat | cccagcaccg | actactacca  | agagctgcag | agagacattt  | 4320 |
| ctgaaaatgg | gagtatcggc | ctttccttcc | ccatgctccc  | ctgaagcagc | catcagaact  | 4380 |
| gtccacaccc | tttgcaccaa | gcccagatcc | tttccctctc  | accccagttt | ttgcagattt  | 4440 |
| ataaacaagg | gggttttctg | ggcctctcca | atattaagtt  | caggtacagt | tctgggtgtg  | 4500 |
| gaccagtggt | ggtggttggg | gggttgggtg | gtggtcatga  | ccgtaggagg | gactggtgca  | 4560 |
| cttaaggttg | ggggaagagt | gctgagccag | agctgggacc  | cgtggctgaa | gtgccattt   | 4620 |
| ccctgtgacc | aggccaggat | ctgtggtggt | acaattgact  | ctggccttcc | gagaaggtag  | 4680 |
| catcaatgtc | cacgacgtgg | agacacagtt | caatcagtat  | aaaacggaag | cagcctctcg  | 4740 |
| atataacctg | acgatctcag | acgtcagcgg | tgaggctact  | tccctggctg | cagccagcac  | 4800 |
| catgccgggg | cccctctcct | tccagtgtct | gggtccccgc  | tctttcctta | gtgctggcag  | 4860 |
| cgggaggggc | gcctcctctg | ggagactgcc | ctgaccactg  | cttttccttt | tagtgagtga  | 4920 |
| tgtgccattt | cctttctctg | cccagtctgg | ggctgggggtg | ccaggctggg | gcatcgcgct  | 4980 |
| gctggtgctg | gtctgtgttc | tggttgcgct | ggccattgtc  | tatctcattg | ccttgggtgag | 5040 |
| tgcagtcctt | ggccctgatc | agagcccccc | ggtagaaggc  | actccatggc | ctgccataac  | 5100 |
| ctcctatctc | cccaggctgt | ctgtcagtgc | cgccgaaaga  | actacgggca | gctggacatc  | 5160 |
| ttccagccc  | gggataccta | ccatcctatg | agcgagtacc  | ccacctacca | cacccatggg  | 5220 |
| cgctatgtgc | cccctagcag | taccgatcgt | agcccctatg  | agaaggtag  | attgggcccc  | 5280 |

---

|            |             |            |            |            |             |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|------|
| acaggccagg | ggaagcagag  | ggtttggctg | ggcaaggatt | ctgaagggg  | tacttggaaa  | 5340 |
| acccaaagag | cttgggaagag | gtgagaagtg | gcgtgaagtg | agcaggggag | ggcctggcaa  | 5400 |
| ggatgagggg | cagaggtcag  | aggagttttg | ggggacaggc | ctgggaggag | actatggaag  | 5460 |
| aaaggggccc | tcaagaggga  | gtggccccac | tgccagaatt | cctaaaagat | cattggccgt  | 5520 |
| ccacattcat | gctggctggc  | gctggctgaa | ctggtgccac | cgtaggcagt | ttgttttgtt  | 5580 |
| ttgctttttt | gcacccagag  | gcaaaatggg | tggagcacta | tgcccagggg | agcccttccc  | 5640 |
| gaggagtccc | aggggtgagc  | ctctgtgccc | ctaatcatct | cctaggaatg | gagggtagac  | 5700 |
| cgagaaaggc | tggcataggg  | ggaggtttcc | caggtagaag | caagaagaag | tgtcagcaga  | 5760 |
| ccaggtgagc | gtgggtgcca  | gtggggttct | tgggagcttc | aaggaagcaa | ggaacgctcc  | 5820 |
| ctccttcctc | tctgtgtctt  | tctctatggg | acctagtaaa | taattactgc | agccacctga  | 5880 |
| ggctggaaaa | ccactccag   | tgggggagga | gagagttag  | tttcttgct  | cctatthttcc | 5940 |
| tcctcctgga | gacctccctc  | tctcggcttt | acaaagacac | agatacacc  | cgcccccaa   | 6000 |
| aacacacaca | cacacacaca  | cacacacacc | tccttaggct | ggaacagcag | agaatggagg  | 6060 |
| gacaaggggg | ctgattagag  | ccaagaagag | ggagtgaagg | agagcagagg | gaggagggca  | 6120 |
| gccctgttta | cagtcacctg  | gctggtgggg | tggcaggtgc | tctctctgaa | ttaacccttt  | 6180 |
| gagagctggc | caggactctg  | gactgattac | cccagcctgg | ggtggcatcc | aggggctcta  | 6240 |
| ggaggtacct | tttgctcctc  | accctggatc | tcttttcctt | ccaccaggt  | ttctgcaggt  | 6300 |
| aatggtggca | gcagcctctc  | ttacacaaac | ccagcagtg  | cagccacttc | tgccaacttg  | 6360 |
| taggggcacg | tgcgccgctg  | agctgagtgg | ccagccagtg | ccattccact | ccactcaggt  | 6420 |
| tcttcagggc | cagagcccct  | gcaccctggt | tgggctggtg | agctgggagt | tcaggtgggc  | 6480 |
| tgctcacacg | tccttcagag  | gccccaccaa | tttctcggac | acttctcagt | gtgtggaagc  | 6540 |
| tcatgtgggc | ccctgaggct  | catgcctggg | aagtgttg   | gtgggggctc | ccaggaggac  | 6600 |
| tggcccagag | agccctgaga  | tagcggggat | cctgaactgg | actgaataaa | acgtggtctc  | 6660 |
| ccactggcgc | caacttctga  | tctttcatct | gtgaccctg  | ggcagcagg  | cgtcagaatg  | 6720 |
| tgtgtgaggg | ggctggggga  | ggagacagg  | aggccaggag | gcagtaagga | gagagtttgt  | 6780 |
| ttgagaagca | ggagatgtga  | ggaggaggtg | acattgggg  | gtaggggtg  | cctgaggagc  | 6840 |
| cacctctggc | taaccctggc  | agcacaagag | gaaggaggaa | acgaaacca  | ggcnggcttt  | 6900 |

---

|             |            |            |            |             |            |      |
|-------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------|
| ggagggctag  | cgtgactggg | ctccgtgact | gagctctgtg | tgccagtggc  | tctcccctct | 6960 |
| cctcgcctgg  | cccacgccct | ccttgcccct | ggcatggtgc | cccccaggtg  | gctctattct | 7020 |
| tagctgtccg  | ggtgtgaagt | aaatccttgg | gcagtgataa | cagcccagag  | tcaacaggg  | 7080 |
| tgagataaagc | agaggctggg | tcagatccgg | gcgctggcac | caggcccagc  | cccctccctg | 7140 |
| accccggtc   | cccaccagc  | ctgctgcccc | tggggtggnc | tccacaacac  | cctgggaatg | 7200 |
| gggaagtgg   | tctggttccc | tgaccccttt | ggcccaggca | cgttgcctgt  | ccctcgaccg | 7260 |
| cattccccca  | ggcctgtgc  | tgacggcctg | gaagccctga | ttggggcctg  | ccaccagcag | 7320 |
| ccagagagct  | atgttccctg | gcagctgtga | tgcgctcagg | ccggggccagg | acacgtgtgg | 7380 |
| caggaggctt  | agagcacctg | cctggggcct | tcctctctca | ggcaccagat  | ccattggttg | 7440 |
| ctcctgccta  | gaaccacagc | ctagcacccc | tgctccctcc | cgcctaccac  | accagcaca  | 7500 |
| gaaactcaca  | ggaatgattg | cgctcaggga | aggcagagat | gtgcctggca  | tcacagttta | 7560 |
| ttgtttataa  | accatgacaa | taacagctgt | tgctcagcac | aggcctagca  | gagcccactg | 7620 |
| cagggggacg  | gcagcgggca | ccagaggcct | tgcttgccc  | aacccaatgg  | gaacaccag  | 7680 |
| actcagctgg  | gtccccaagg | gagacttggc | acattggcat | gggtgtggga  | caggtaaagc | 7740 |
| atgcaagagg  | gagaagagg  | acataaggg  | catgcggctg | cggggtgttg  | ggacccaat  | 7800 |
| aaataaagca  | ggatgacagg | gtccccttcc | cctcaccagg | aatgcctgac  | agcgtccagc | 7860 |
| cccaaagcct  | gcctgtccca | aggctgtagt | tcagcatcaa | cagggcaggg  | agcttggcag | 7920 |
| ggcaagggca  | gagctggaga | tcatgcccag | tnttcagggt | gccctccctc  | ccaatcagcc | 7980 |
| tggggggcac  | aggacaggg  | tgagaaagg  | gctctctcca | tggttgggt   | aacatgcca  | 8040 |
| aggcaggtca  | tagggcagac | tcagtgggg  | tggggcctg  | gctaacaagc  | aatggagaga | 8100 |
| acgggggcca  | tccagagagg | ttggcagaag | agagcccctg | ggtcaagaga  | aaactttggg | 8160 |
| gaagacaaga  | cacgggagaa | g          |            |             |            | 8181 |

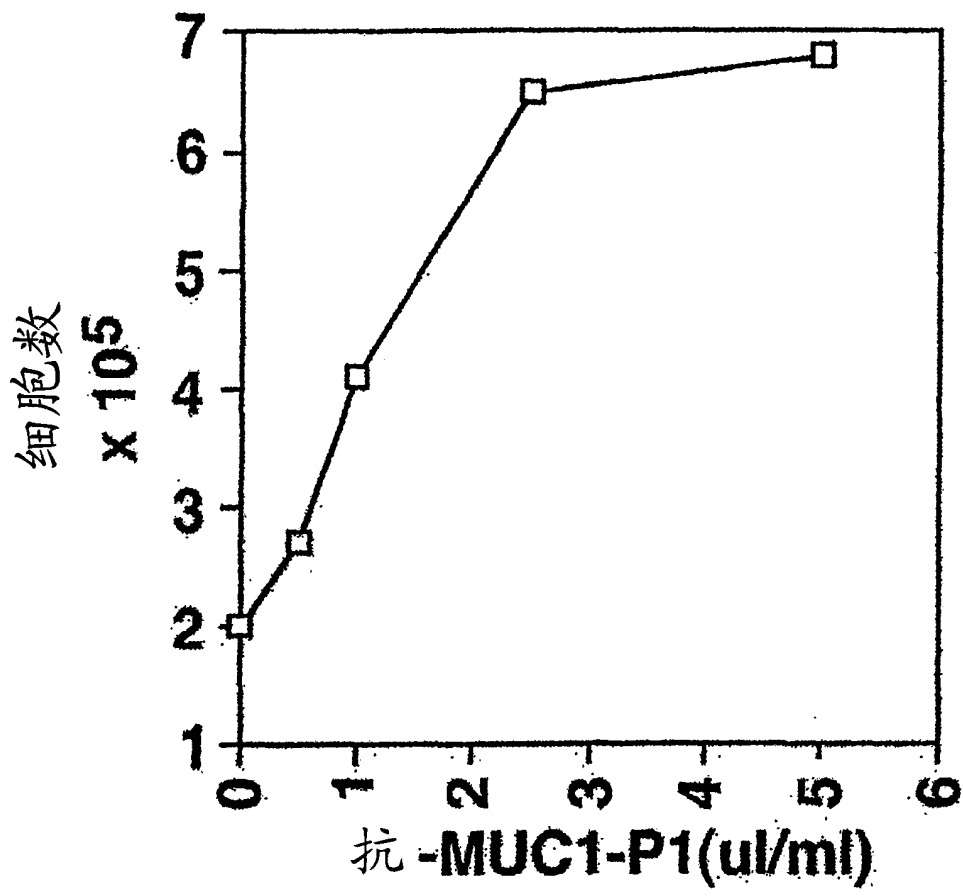


图 1

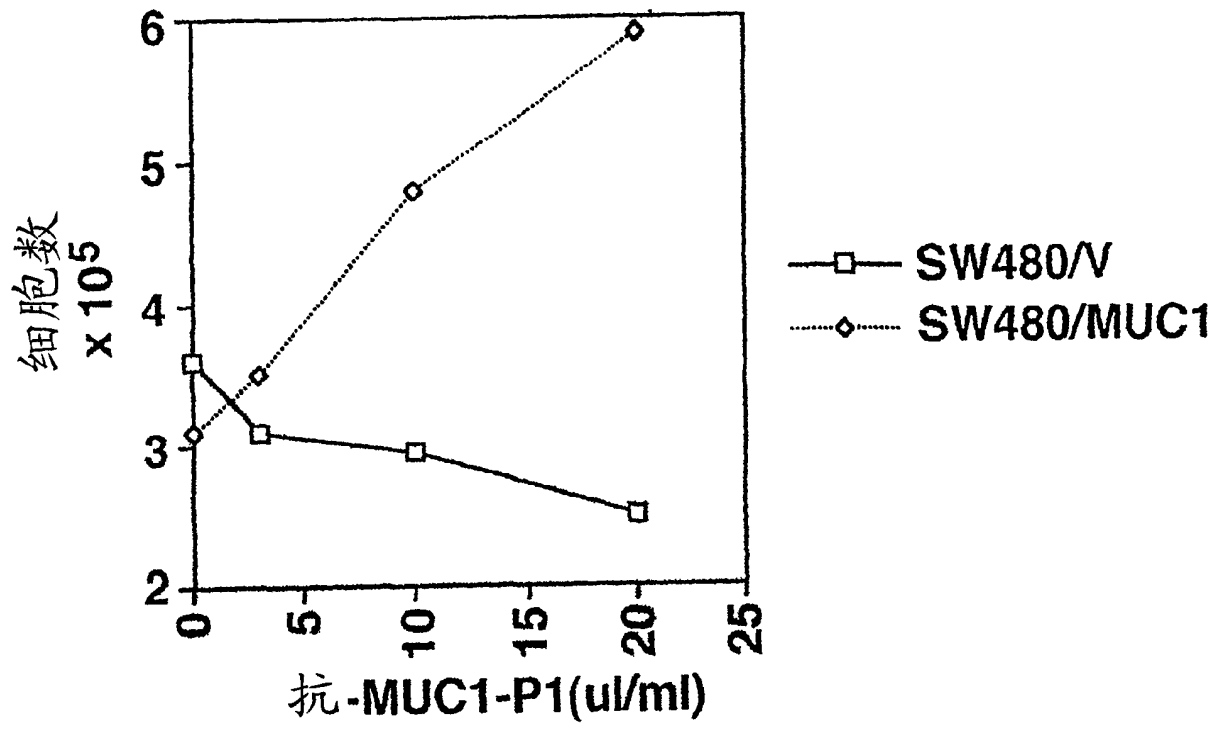


图 2

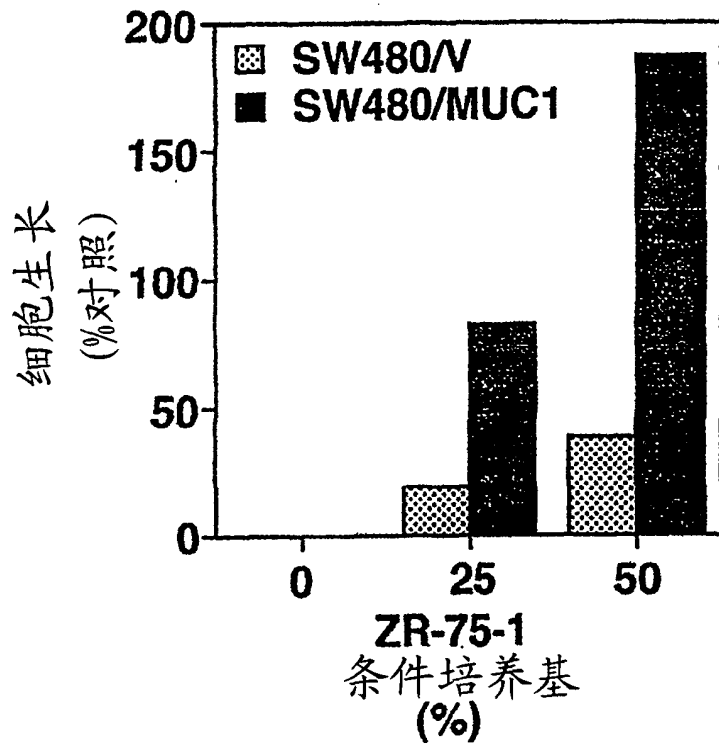


图 3

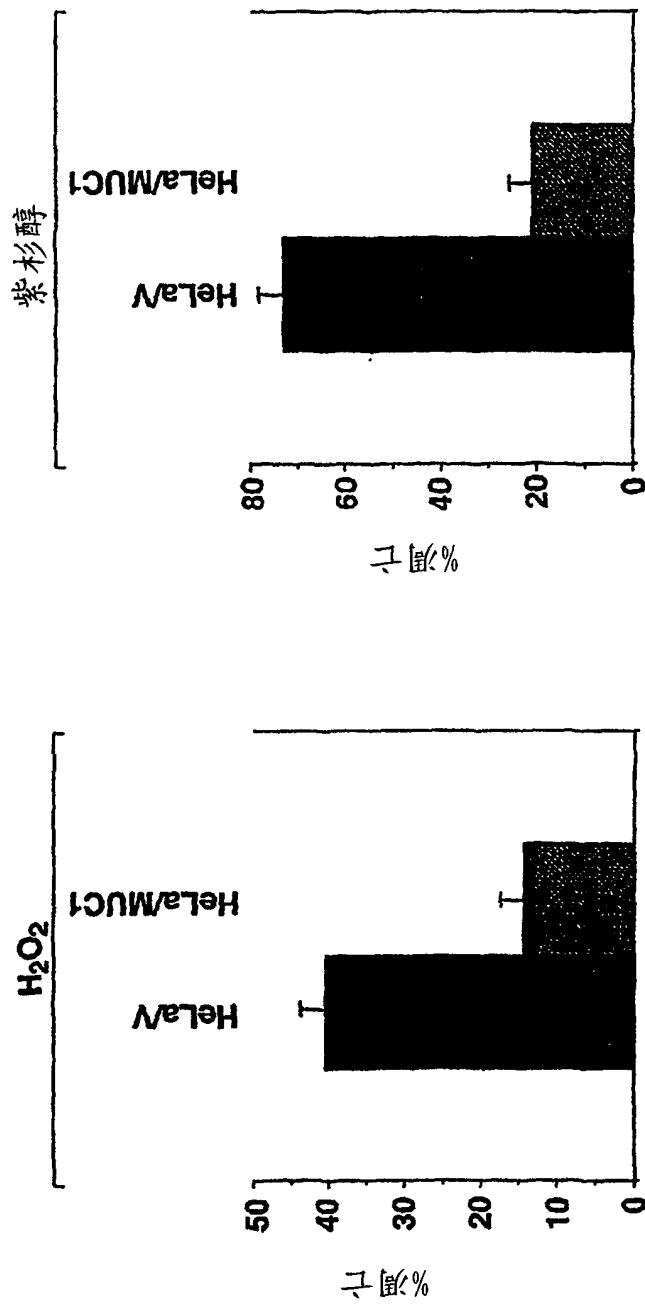


图 4