



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101675341 B

(45)授权公告日 2017.08.08

(21)申请号 200780051417.9

(22)申请日 2007.12.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 101675341 A

(43)申请公布日 2010.03.17

(30)优先权数据

0625321.5 2006.12.19 GB

0719792.4 2007.10.10 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2009.08.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2007/004902 2007.12.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02008/075056 EN 2008.06.26

(73)专利权人 萨里大学

地址 英国萨里

(72)发明人 哈德夫·潘达

理查德·G·L·莫根

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/96(2006.01)

(56)对比文件

WO 2006/071466 A2,2006.07.06,全文.

Kosaki,K.等.HOXC4 [Homo sapiens].<

NCBI GenBank: AAG42145.1>.2000,全文.

Gary J. Miller等.Aberrant HOXC

Expression Accompanies the Malignant

Phenotype in Human Prostate.<CANCER

RESEARCH>.2003,第63卷5879-5888.

Gary J. Miller等.Aberrant HOXC

Expression Accompanies the Malignant

Phenotype in Human Prostate.<CANCER

RESEARCH>.2003,第63卷5879-5888.

审查员 张颖

权利要求书2页 说明书16页

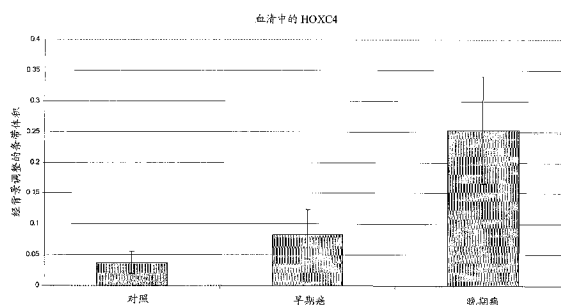
序列表16页 附图7页

(54)发明名称

癌症的生物标志物

(57)摘要

本发明提供了用于检测雄性受试者中的癌症(特别是前列腺癌)的生物标志物,该生物标志物包含至少一种含有转录因子的同源异型域(诸如HOX肽或EN-2肽)或其片段。提供了所述生物标志物在检测和/或治疗前列腺癌中的用途,及其方法和试剂盒。



1. 含有SEQ ID NO:4的EN-2肽在制备用于诊断或监测前列腺癌进展的试剂盒中的用途,其中所述诊断或监测包括比较尿液测试样品中所述EN-2肽的量与来自正常无癌症受试者的正常对照尿液样品中存在的量。

2. 依照权利要求1的用途,其中所述诊断或监测是检测前列腺癌的发作、进展、稳定、改善和/或缓和。

3. 依照权利要求2的用途,其中提供至少两个在时间上间隔开的检测和/或定量步骤。

4. 依照权利要求1或2的用途,其中所述诊断或监测包括比较尿液测试样品中的EN-2肽水平与一种或多种正常对照尿液样品中的水平。

5. 含有SEQ ID NO:4的EN-2肽在制备用于诊断前列腺癌的试剂盒中用途,其中所述诊断包括定量或检测尿液测试样品中的所述EN-2肽的量并比较所述尿液测试样品中所述EN-2肽的量与来自正常无癌症受试者的正常对照尿液样品中存在的量,其中尿液测试样品中找到的EN-2肽水平的升高指示疾病或是正在进展或是已经启动。

6. 依照权利要求5的用途,其中所述升高是统计学显著的,通过使用“t检验”来测定,前提是置信区间是至少80%。

7. 依照权利要求6的用途,其中所述置信区间是至少85%。

8. 依照权利要求6的用途,其中所述置信区间是至少90%。

9. 依照权利要求6的用途,其中所述置信区间是至少95%。

10. 依照权利要求6的用途,其中所述置信区间是至少99%。

11. 依照权利要求6的用途,其中所述置信区间是至少99.5%。

12. 依照权利要求6的用途,其中所述置信区间是至少99.95%。

13. 依照权利要求6的用途,其中所述置信区间是至少99.99%。

14. 依照权利要求5-13中任一项的用途,其中对照和尿液测试样品之间、指示早期阶段前列腺癌的升高为110-200%。

15. 依照权利要求14的用途,其中对照和尿液测试样品之间、指示早期阶段前列腺癌的升高为125%。

16. 依照权利要求5-13中任一项的用途,其中对照和尿液测试样品之间、指示晚期阶段前列腺癌的升高为550-620%。

17. 依照权利要求16的用途,其中对照和尿液测试样品之间、指示晚期阶段前列腺癌的升高为560-600%。

18. 依照权利要求16的用途,其中对照和尿液测试样品之间、指示晚期阶段前列腺癌的升高为570-590%。

19. 依照权利要求16的用途,其中对照和尿液测试样品之间、指示晚期阶段前列腺癌的升高为580%。

20. 依照权利要求5-13中任一项的用途,其中比早期阶段尿液测试样品或对照升高100-300%时,指示癌症自早期进展至晚期疾病阶段。

21. 依照权利要求20的用途,其中比早期阶段尿液测试样品或对照升高200%时,指示癌症自早期进展至晚期疾病阶段。

22. 含有SEQ ID NO:4的EN-2肽在制备用于监测对前列腺癌的治疗功效的试剂盒中的用途,其中所述监测包括定量或检测治疗开始后采集的尿液测试样品中的所述EN-2肽的量

并比较所述尿液测试样品中所述EN-2肽的量与治疗开始前采集的对照尿液测试样品中存在的量。

23. 依照权利要求1,5或22中任一项的用途,其中尿液测试样品中EN-2肽的检测和/或定量是通过选自下组的一项或多项进行的: MALDI-TOF、SELDI、经与一种或多种配体的相互作用、基于1-D或2-D凝胶的分析系统、包括ICAT®或iTRAQ®的液相层析联合液相层析和质谱技术、薄层层析、和NMR光谱术。

24. 依照权利要求1,5或22中任一项的用途,其中所述EN-2肽的检测和/或定量是通过选自下组的一项或多项进行的: 三明治式免疫测定法、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、放射免疫测定法(RAI)、酶免疫测定法(EIA)、Western印迹、免疫沉淀、和基于颗粒的免疫测定法。

25. 依照权利要求24的用途,其中所述基于颗粒的免疫测定法包括使用金、银、或乳胶颗粒、磁性颗粒或Q-点。

26. 依照权利要求24的用途,其中所述EN-2肽的检测和/或定量是在微量滴定板上、条带形式、阵列或在芯片上实施的。

27. 依照权利要求26的用途,其中所述EN-2肽的检测和/或定量是通过ELISA进行的,该ELISA包含对所述EN-2肽或其片段特异性的抗体。

28. 依照权利要求27的用途,其中所述抗体是与报道物相连接的。

29. 依照权利要求1,5或22中任一项的用途,其中所述EN-2肽的检测和/或定量是通过生物传感器进行的。

30. 依照权利要求1的用途,其中所述试剂盒用于选自下组的方法中: 临床筛选、评估预后的方法、监测治疗结果、鉴定最有可能响应特定治疗性处理的患者的方法、及药物筛选和开发。

31. 依照权利要求1-2中任一项的用途,其中所述尿液测试样品基本上不含细胞。

32. 依照权利要求30的用途,其中所述患者先前已经使用检测PSA的测定法诊断为癌症阴性。

33. 依照权利要求1-2中任一项的用途,其中尿液测试样品中所述EN-2肽是通过一种或多种配体间接检测的,其中配体是适体或寡核苷酸。

癌症的生物标志物

[0001] 本发明涉及至少一种含有转录因子的同源异型域(诸如HOX肽或EN-2肽)作为前列腺癌生物标志物的用途。

[0002] 前列腺癌目前是男性中癌症相关死亡的第一原因,仅在英国每年就杀死10,000人。然而,当前可用于非侵入性前列腺癌检测的生物标志物基本上限于前列腺特异性抗原(PSA)。PSA的血清水平在前列腺癌患者中显著升高,而且当前使用PSA测试来跟踪疾病的进展及其对治疗的响应。

[0003] 不幸的是,PSA测试有多种重大缺点。由于PSA水平在前列腺的其它非癌性疾病(诸如前列腺炎和良性肥大)中也显著升高,因此并非总是能够确定检测到PSA水平升高指示患者中的前列腺癌。另外,PSA水平不是必然与疾病的体积或与结节或骨转移的形成有关。

[0004] 由于假阳性水平非常高,导致大量不必要的侵入性活检,最近使用诸如游离PSA对总PSA的比率和“PSA速度”的标记的尝试被证明非常不成功。

[0005] 事实上,PSA水平被认为在前列腺癌中只是非常缓慢地升高,因此在测量PSA水平时得到阳性结果前疾病常常已是高度晚期。另外,PSA水平必须进行标准化,因为它们能随年龄和前列腺尺寸而变化。

[0006] 前列腺癌还有多种别地潜在化学标志物,包括激肽释放酶和最近的e-钙粘蛋白80kDa片段(Kuefer等,2005)。同样,这些生物标志物趋于显示上文关于PSA所讨论的多种重大缺点。

[0007] 如此,本领域需要可靠的前列腺癌生物标志物。

[0008] 意外的是,我们发现同源异型转录因子HOXC4自前列腺肿瘤分泌且其血清浓度在前列腺癌患者中显著升高。如此,HOXC4在体液(诸如血清)中的存在是早期和晚期前列腺癌的有效指示物。

[0009] 我们还发现第二种HOX蛋白即HOXB6和第三种蛋白即HOXB5也显示类似结果。认为HOXA3和HOXD9作为生物标志物也是有用的。

[0010] 我们进一步鉴定了含同源异型域的转录因子Engrailed 2(EN-2),其在前列腺癌衍生细胞系LNCaP和PC3中有RNA和蛋白质水平表达,在原代前列腺癌细胞中也表达。另外,EN-2蛋白能被分泌到细胞周围的培养基中。

[0011] 意外的是,所有这些癌标志物水平的升高均能在前列腺癌患者中检测到,即使PSA水平正常时也如此。这进一步例证了本发明的标志物在前列腺癌的诊断中与其它标志物(诸如PSA)相比是更加可靠的。

[0012] 如此,在第一个方面,本发明提供了至少一种含同源异型域的转录因子或其片段作为前列腺癌的生物标志物的用途。含同源异型域的转录因子的例子包括HOX和EN-2肽。本发明还涉及用于诊断前列腺癌疾病的方法,包括在来自患者的样品中检测至少一种含同源异型域的转录因子。

[0013] 特别优选地,至少一种HOX或EN-2肽或其片段在体液中是可检测到的。

[0014] 优选地,生物标志物是单独的HOXC4。还优选地,生物标志物是单独的HOXB5或更优选单独的HOXB6。还优选地,生物标志物是单独的EN 2。还优选地,生物标志物是单独的

HOXA3。还优选地,生物标志物是单独的HOXD9。然而,组合也是优选的。此类组合包括HOXC4和HOXB5;HOXC4和HOXB6;HOXB5和HOXB6;HOXC4、HOXB5和HOXB6;EN-2和HOXC4;EN-2和HOXB5;EN-2和HOXB6;EN-2、HOXC4和HOXB5;EN-2、HOXC4和HOXB6;EN-2、HOXB5和HOXB6;EN-2、HOXC4、HOXB5和HOXB6。此类组合还可进一步包含HOXA3和/或HOXD9中的一种或两种。其它组合包括HOXA3和HOXD9;HOXA3和HOXC4;HOXA3和HOXB5;HOXA3和HOXB6;HOXA3和EN-2;HOXD9和HOXC4;HOXD9和HOXB5;HOXD9和HOXB6;HOXD9和EN-2。一种特别优选的标志物组合包含HOXC4、HOXB5、HOXB6和EN-2中的两种或多种、优选所有。

[0015] 优选地,体液是血清或尿液。下文讨论了其它优选的体液。

[0016] HOX基因是一族含同源异型域的转录因子,其决定早期发育过程中细胞和组织的身分(综述见Morgan,2006)。最近的出版物(包括Miller等,2003)有效鉴定了每一种在前列腺癌肿瘤细胞中表达并保留在胞内的蛋白质。当然,这意味着鉴定了总共10,000-12,000种左右的蛋白质,包括HOX肽。

[0017] 然而,我们意外发现,在这数以千计的前列腺癌细胞表达的蛋白质中,例如HOXC4蛋白为胞外的蛋白,且是非常好的前列腺癌生物标志物。

[0018] 这是意外的,因为:首先,HOXC4是转录因子,因此想不到能在血清中发现它。其次,尽管已知前列腺癌有其它生物标志物,但仍未找到可靠的生物标志物,见例如上文所述PSA的问题。事实上,HOXC4是早期、尤其晚期阶段的生物标志物,如图1所示。

[0019] 如此,尽管已知此蛋白质与数千种其它蛋白质一样,都在前列腺癌细胞中表达,而且其中大多不能被描述为前列腺癌的生物标志物,但此前未将HOXC4鉴定为前列腺癌的生物标志物。其它HOX肽,包括HOXB5和HOXB6的情形也是如此。

[0020] 像HOX肽一样,Engrailed (En) 蛋白也是含同源异型域的转录因子,在发育过程中显示非常高程度的功能保守性(综述见Morgan,2006)。En基因最初在果蝇中发现,其En突变体未能在前翅与后翅之间形成边界(Garcia-Bellido和Santamaria,1972)。En的脊椎动物同系物同样在发育过程(包括肢发育及神经系统的早期特化和后续轴突迁移)中有调节作用(Morgan 2006)。

[0021] 除转录调节之外,EN蛋白具有多种其它表面上无关的但功能上重要的特性。其中第一种是自细胞分泌并被其它细胞内在化的能力(Cosgaya等,1998;Joliot等,1998;综述见Morgan,2006)。这种现象的确切机制基础未知,尽管它显然依赖于位于同源异型域中的保守核输出序列(Maizel等,1999;Chatelin等,1996;Derossi等,1996;Joliot等,1997)。

[0022] 除发育作用外,最近发现EN-2是乳腺癌中的潜在癌基因(Martin等,2005)。非致瘤性鼠乳房细胞系被迫表达EN-2后表现出多种恶性特征,包括缩短细胞周期、以及损失细胞间接触。另外,EN-2的RNAi沉默指示它是人乳腺癌细胞系中转化表型的维持所要求的。

[0023] 我们发现EN-2在前列腺癌衍生细胞系LNCaP中和在来自前列腺腺癌的人组织样品中过表达且分泌。另外,EN-2自导管细胞和腺癌肿瘤分泌且存在于前列腺癌患者的尿液中。这是第一次提示EN-2作为前列腺癌的标志物。

[0024] 优选地,检测至少一种含同源异型域的转录因子(诸如HOX肽或EN-2肽)或其片段的存在或不存在。

[0025] 优选地,至少一种HOX肽选自任何下文所列HOX肽,前提是HOX肽或其片段在体液(诸如血清或尿液)中是可检测到的。

[0026] 优选地,至少一种HOX肽或其片段来自HOXA、HOXB、HOXC或HOXD亚家族。如果使用超过一种HOX肽,那么这些可以来自同一家族或来自家族组合。还涵盖片段组合,或是同一蛋白质的片段或是不同蛋白质的片段。不同肽的组合能提供更精确的诊断。优选地,HOX肽不是HOXA4、HOXA1、HOXA7、HOXB3、或HOXB9。

[0027] 特别优选地,HOX肽是HOXC4肽和/或HOXB6肽和/或HOXB5肽和/或HOXA3肽和/或HOXD9肽或其片段。

[0028] 优选地,HOXC4肽是SEQ ID NO.1 (NCBI编号P09017,gi:123279)所提供的或其片段。优选地,HOXB6肽是SEQ ID NO.2 (NCBI编号P17509,gi:116242515)所提供的或其片段。优选地,HOXB5肽是SEQ ID NO.3 (NCBI编号P09067,gi:400000)所提供的或其片段。优选地,EN-2肽是SEQ ID NO.4 (NCBI编号P19622,gi:21903415)所提供的或其片段。优选地,HOXA3肽是SEQ ID NO.5 (mRNA NCBI编号NM_030661,gi:84043946)所提供的或其片段。优选地,HOXD9肽是SEQ ID NO.6 (mRNA NCBI编号NM_014213,gi:23397673)所提供的或其片段。

[0029] 在提到HOXC4、HOXC4肽或其片段时,应当理解,这些术语可互换使用,除非另外明确。这同样适用于其它HOX肽和EN-2。

[0030] 另外,除非特别指明,本文提到HOXC4、HOXB6、HOXB5、HOXA3或HOXD9之处也适用于其它HOX肽或其组合。

[0031] 同样,除非特别指明,本文提到特定序列(诸如参比序列或SEQ ID NO)之处也适用所有SEQ ID NO.和任何下文所提供的HOX序列。

[0032] 优选地,片段包含与参比序列(例如HOXC4、HOXB6、HOXB5、HOXA3、HOXD9或EN-2)的至少80%序列同源性、更优选85%、更优选90%、更优选95%、更优选97%、更优选99%和最优选与参比序列的99.9%序列同源性,或恰当的与其接近。适合于确定序列同源性的方法包括BLAST程序。

[0033] 优选地,片段包含与参比序列(HOXC4、HOXB6、HOXB5、HOXA3、HOXD9或EN-2)的至少80%序列同一性、更优选85%、更优选90%、更优选95%、更优选97%、更优选99%和最优选与参比序列的99.9%序列同一性,或恰当的与其接近。适合于确定序列同一性的方法包括BLAST程序。

[0034] 在术语“同源”用于本文中时,若一种多肽的序列具有足够高程度的与另一种多肽的序列的同一性或相似性,则说这两种多肽是“同源”的。“同一性”指示在所比对序列中任何特定位置处,各序列间的氨基酸残基是同样的。“相似性”指示在所比对序列中任何特定位置处,各序列间的氨基酸残基是相似类型的。同一性和相似性的程度可容易地计算(ComputationalMolecular Biology,Lesk,A.M.编,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing.Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.编,AcademicPress,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part 1,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis inMolecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press,1987;及Sequence AnalysisPrimer,Gribskov,M.和Devereux,J.编,M Stockton Press,New York,1991)。百分比同一性在本文中提到时是使用2.1.3版BLAST测定的,其中使用NCBI(National Center for Biotechnology Information;<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)规定的缺省参数[Blosum 62矩阵;缺口打开罚分=11;和缺口延伸罚分=1]。

[0035] 优选地,片段包含至少四个来自参比序列的连续氨基酸、更优选至少5个、更优选至少6个、更优选至少7个、更优选至少8个来自参比序列诸如SEQID NO.1,2,3,4,5或6的连续氨基酸,尽管至少10个、15个、20个、25个、30个、50个、75个、100个、150个、200个、225个和多至至少250个氨基酸的更长片段也是优选的。片段还包括自N-末端和/或C-末端删除了x个氨基酸的截短型肽。在此类截短中,x可以是1或更多(即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多),但优选少于150。

[0036] 不限于理论,认为HOXC4是经非经典路径分泌的,不需要信号序列。因此认为SEQ ID NO.1所示序列与血清中找到的蛋白质相同。这得到了如下观察结果的确证,即所检测到的条带具有与基于基因序列预测的大小对应的大小(Mw)。HOX蛋白也可经其它机制(例如细胞溶解)离开细胞。

[0037] 术语“生物标志物”在本领域到处使用,指某过程、时间或状况(疾患)的区别性生物学或生物学衍生指示物。换言之,生物标志物指示某种生物学状态,诸如癌性组织的存在。在有些情况中,生物标志物的不同形式能指示某些疾病状态,但是不限于理论,认为仅仅HOXC4肽或其片段在体液(诸如血清)中升高水平的存在指示前列腺癌。本发明涵盖例如HOXC4肽的不同糖型(glycoform)。例如,可测定HOXC4的不同糖型,诸如改变的糖型结构或糖含量,但是这些是前列腺癌所涵盖的而且甚至可指示前列腺癌的进展。还涵盖HOXC4肽或其片段的截短、突变或删除,或与其的连接。

[0038] 然而,支撑本发明的主要发现在于在体液(诸如血清)中有可检测到的HOXC4水平的显著升高。认为HOXC4得到分泌,但是这可能是由于HOXC4蛋白泄漏出死亡中的细胞。同样,EN-2可由于来自受损或死亡细胞的泄漏而得到分泌或在体液中可检测到。此类升高的水平指示早期阶段和晚期阶段二者前列腺癌。不但对照或正常水平和早期阶段前列腺癌之间有显著升高,而且早期阶段和晚期阶段前列腺癌之间也有非常显著的升高。广泛的说,本发明的一个优点在于所述物质及前列腺癌的状态是能检测的。这有助于合适疗法的预后和供应。

[0039] 本发明的另一个优点在于它能够区分诸如良性前列腺增生BTH(BPH)的状况。使用已为测定前列腺癌存在建立的技术,诸如数字化直肠检验(DRE),此类导致前列腺腺体变大的状况能误释为前列腺癌。本发明的另一个优点在于能提供精确的诊断而无需求助讨厌、潜在有害且还可能不精确的侵入性方法。另外,本发明是特别灵敏的。优选地,本发明的方法可以在任何其它检测方法之前且在前列腺癌的明显症状出现之前检测到前列腺癌的发生。如此,可以在癌症对治疗更为易感且不太可能已进入转移阶段的早期阶段用此类治疗处理癌症。

[0040] 已知不同类型的前列腺癌。最常见者始于前列腺腺体细胞,称作前列腺腺癌。然而,存在其它形式的前列腺癌,诸如肉瘤、小细胞癌、和移行细胞癌。本发明的方法可用于检测任何这些类癌症的发作,但优选检测腺癌。

[0041] 癌症的进展通过分期(staging)方法来监测。这指示癌症的发展情况如何及它是否已经蔓延。得分从1到4,各阶段的预后逐渐恶化。

[0042] 第1期:恶性细胞局限于前列腺;未蔓延至淋巴结或其它器官;Gleason得分为2-4,且前列腺不到5%的部分由肿瘤生长构成。

[0043] 第2期:Gleason得分为5以上,或腺体超过5%有异常生长;癌症仍然局限于前列

腺。

[0044] 第3期:恶性细胞已蔓延至精囊,但未蔓延至淋巴结或其它器官。

[0045] 第4期:淋巴结、骨盆组织或更远的器官受到侵袭。

[0046] 优选地,本发明方法在第1期或第2期(更优选第1期)之前或期间检测前列腺癌的发作。

[0047] 本发明的肽生物标志物可用于诊断方法(例如临床筛选)以及预后评估、监测治疗结果、鉴定最有可能对特定治疗性处理有响应的患者、药物筛选和开发的方法。另外,本发明的生物标志物及其用途对于新药物治疗和对于新药物治疗靶的开发是有价值的。

[0048] 如此,在又一个方面,本发明提供了诊断或监测前列腺癌的进展的方法,包括检测和/或定量至少一种含同源异型域的转录因子(诸如HOX肽或EN-2肽)或其片段。优选地,肽包含依照SEQ ID NO 1,2,3,4,5或6的氨基酸序列或由其组成。优选地,至少一种HOX肽、EN-2肽或其片段存在于来自测试受试者的生物学样品中。合适点生物学样品优选是体液样品。

[0049] 体液可以是任何的人体液,包括细胞液、脑脊液(CSF)、精液、尿液、血液、淋巴或体液。然而,特别优选地,体液是全血(特别是血清)或尿液。还优选体液基本上或完全不含全细胞/完整(intact)细胞。优选地,体液不含血小板和细胞碎片(诸如细胞溶解所致)。优选地,体液不含原核和真核细胞。

[0050] 此类体液可通过本领域知道的多种手段之任一来获得,是熟练技术人员显而易见的。例如,易于获得尿液样品,而且可使用例如针头和注射器胃肠外获得血液或血清样品。可通过将体液进行本领域技术人员知道的多种技术来获得不含细胞的或基本上不含细胞的样品,包括但不限于离心和过滤。

[0051] 尽管一般优选不使用侵入 生技术来获得样品,但是仍然优选获得诸如组织匀浆、组织切片和活检标本的样品。

[0052] 本发明的监测方法可用于检测前列腺癌的发作、进展、稳定、改善和/或缓和。如此,可使用至少一种HOX肽、EN-2肽或其片段的检测来测定疾病的进展,以指导内科医师进行特定的治疗。

[0053] 优选地,提供至少两个检测和/或定量步骤,优选时间上间隔例如数天、数周、数年、或更长,优选数月,以确定至少一种HOX或EN-2肽或其片段的水平是否有变化,如此指示癌症的进展是否有变化。这能够在两个或更多个时机所采集的样品中的生物标志物水平之间进行比较,肽的水平随时间升高指示癌症的发作或进展,而肽的水平降低可指示癌症的改善和/或缓和。

[0054] 优选地,依照本发明的诊断或监测方法包括比较测试样品中存在的肽水平与一种或多种对照中的水平。优选地,对照可以来自与先前样品相同的患者,以如此监测发作或进展。然而,还优选的是对照可以对群体(特别是没有前列腺癌的健康或正常的群体)进行标准化。换言之,对照可以由在来自正常受试者的正常对照样品中找到的生物标志物水平组成。

[0055] 如此,提供了诊断前列腺癌的方法,包括定量或检测至少一种HOX肽、EN-2肽或其片段的量,并比较所述测试样品中所述肽的量与来自正常受试者的或来自疾病发生之前的同一受试者的正常对照生物学样品中存在的量。如果在测试样品中发现至少一种HOX肽、EN-2肽或其片段水平的显著升高,那么它指示疾病正在进展或已经启动。

[0056] 如上所述,这种检测至少一种HOX肽、EN-2肽或其片段的方法在检测检测早期阶段前列腺癌中特别有用而且比检测PSA水平的传统测试更加灵敏。如此,本发明的方法对于在使用常规方法(诸如PSA检测)测试患者为癌症阴性时确认癌症特别有用。

[0057] 一般而言,至少一种HOX肽或EN-2肽分泌入体液中的水平在下文所述范围中。

[0058] 应当理解,术语“肽”和“蛋白(质)”在本文中使用时可互换使用,除非另外明确。

[0059] 例如表1和图1显示了HOXC4血清蛋白质浓度的非常大的升高。表2和图2小时了HOXB6的类似结果。我们还显示了HOXB6是晚期阶段前列腺癌的生物标志物(数据未显示)。HOXB5也是生物标志物,但是不如HOXB6或HOXC4优选(表3和图7)。其它备选生物标志物包括HOXA3和HOXD9(见图8)。

[0060] 优选地,升高是统计学显著的,这通过使用标准方法来测定,诸如“t检验”,其提供优选至少80%、更优选至少85%、更优选至少90%、更优选至少95%、更优选至少97%、更优选至少99%、更优选至少99.5%、更优选至少99.95%、和最优选至少99.99%的置信区间。

[0061] 优选地,指示早期前列腺癌的、在对照与样品之间的升高为110-200%左右、更优选120-180%左右、更优选130-160%左右、更优选140-150%左右、更优选110-140%左右、更优选115-130%左右、更优选120-130%左右、更优选120-140%左右、最优选125%左右。还涵盖上述终点的其它组合。

[0062] 确定晚期癌症时,指示晚期前列腺癌的、在对照与样品间的升高为400-800%左右、更优选450-750%左右、更优选500-700%左右、更优选520-680%左右、更优选540-640%左右、更优选550-620%左右、更优选560-600%左右、更优选570-590%左右、最优选580%左右。升高也可以在550-800%或400-600%。还涵盖上述终点的其它组成。

[0063] 可以相对于正常(即没有癌症)对照或相对于早期阶段样品或同一患者中的对照来测量早期与晚期阶段癌症之间的升高。相对于早期阶段样品,优选100-300%左右、更优选150-250%左右、更优选175-225%左右、更优选185-215%左右、更优选100-220%左右、更优选170-300%左右、最优选200%左右的升高。

[0064] 如上所述,若在本文中提到的至少一种含同源异型域的肽,则这适用于HOX肽(诸如HOXC4、HOXB6、HOXB5、HOXA3和HOXD9)和EN-2肽,除非另外明确。

[0065] 若在本文中提到的至少一种HOX肽或HOX肽,则这适用于HOXC4、HOXB6、HOXB5、HOXA3和HOXD9,特别是同样适用于下文所列其它HOX肽,除非另外明确。

[0066] 每毫升体液(优选血清)中至少一种HOX或EN-2蛋白的绝对量,在对照样品的情形中优选为0.5-1.5ng/ml左右、更优选0.75-1.25ng/ml左右、最优选1.0ng/ml左右。对于早期阶段癌症样品,优选的范围为2.0-5.0ng/ml左右、更优选2.5-4.5ng/ml左右、更优选2.5-4.0ng/ml左右、更优选2.75-3.5ng/ml左右、更优选2.75-3.0ng/ml左右、更优选2.0-3.5ng/ml左右、更优选2.0-3.0ng/ml左右、和最优选3.0ng/ml左右。

[0067] 对于晚期阶段癌症样品,优选的范围为6.0-20ng/ml左右、更优选8.0-15ng/ml左右、更优选8.5-13ng/ml左右、更优选9.0-12ng/ml左右、更优选9.5-11ng/ml左右、更优选7-13ng/ml左右、更优选8.5-16ng/ml左右、最优选10ng/ml左右。

[0068] 术语“诊断”涵盖鉴定、确认、和/或表征前列腺癌的存在或不存在以及其发育阶段(诸如早期阶段或晚期阶段)或者良性或转移性前列腺癌。

[0069] 应理解,癌症疾病状态的“早期阶段”和“晚期阶段”本质是内科医师能确定的。在

本发明范围内,这两个术语可以分别指非转移癌和转移癌。

[0070] 本发明还提供了监测对前列腺癌的治疗功效的方法,包括检测和/或定量来自受试者的生物学样品中存在的至少一种HOX肽、EN-2肽或其片段。如上,可优选获得两个在时间上间隔的样品,例如间隔数月,以确定治疗是否有进展,换言之,至少一种HOX肽、EN-2肽或其片段的水平是否升高或降低。所述至少一种HOX肽或EN-2肽水平的降低指示疾病缓和,如此治疗方案是成功的。这样监测疾病会快速显示患者是对治疗有响应还是对治疗不应。如果是后者,那么可提供备选治疗。此类方法因此提供了治疗方法是否有效的快速指示,并容许内科医师改变所述方案直至在患者中观察到效果。

[0071] 在本发明的方法中,优选将测试样品中肽或其片段的量与在一种或多种对照和/或一种或多种在更早的时间自所述同一测试受试者采集的先前测试样品中存在的量进行比较。较早与较晚样品之间的时间长度可以只是数天,但是可以长达数月或甚至数年,而且会由内科医师根据疾病的进展和患者医学史来决定。或者,对照可以是来自无病患者的测试样品。

[0072] 通过确认所述生物标志物的存在来检测肽或其片段。样品中所存在的生物标志物的量的定量优选包括测定肽生物标志物在样品中的浓度。检测和/或定量步骤可直接地对样品实施,或者间接地对其提取物或其稀释物实施。

[0073] 本发明涉及生物标志物,而且应当领会,这些必须是在体液中可检测到的。有些HOX家族成员在体液中可能是检测不到的,因此不是依照本发明的生物标志物。

[0074] 其它地方讨论了至少一种HOX肽、EN-2肽或其片段的可检测到的水平,但是应当领会,可能有多种原因使得检测不到HOX肽、EN-2肽或其片段。不限于理论,一个原因可能是肽在体液中被降解,即不是“稳定”的。

[0075] 如此,优选至少一种HOX肽、EN-2肽或其片段在能更易于采样的身体周围(即靠近皮肤表面的静脉)(优选臂部)基本上是不被降解的和/或仍可检测到的(即以可检测到的浓度存在)。

[0076] 肽可以被释放入体液中,或是通过细胞破碎或泄漏,或是通过分泌。

[0077] 至少一种HOX肽或EN-2肽或其片段的检测和/或定量可以通过任何适合于检测生物学样品中特定蛋白质或肽的存在和/或量的方法。这可以通过生物标志物的直接检测,例如通过MALDI-TOF或SELDI。

[0078] 然而,还优选的是至少一种HOX肽或EN-2肽或其片段是直接地或间接地经由与一种或多种配体的相互作用而检测的。此类配体可包括抗HOX或抗EN-2抗体或其结合片段、适体、或寡核苷酸。应当领会,这些配体必须能够特异性结合HOX肽或EN-2肽或其片段。它可以进行合适地标记且包含亲和标签。合适点标记物可以是荧光的、放射性的或发光的。标记物可以直接地或经由接头地附着至抗体。

[0079] 例如,检测和/或定量可通过选自下组的一种或多种方法来实施: MALDI-TOF、SELDI、基于1-D或2-D凝胶的分析系统、液相层析联合液相层析和质谱技术。这些中的后者可包括优选的ICAT®或iTRAQ® (Applied Biosystems, USA)。

[0080] 液相层析技术可包括HPLC(高压液相层析)或甚至低压液相层析(LPLC)。另外,还优选诸如薄层层析、NMR光谱术和任何本文所述其它方法的方法。

[0081] 可以使用免疫学方法检测和/或定量肽或其片段,诸如三明治式免疫测定法,例如

酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、放射免疫测定法 (RAI)、酶免疫测定法 (EIA)、Western印迹、免疫沉淀。还优选基于颗粒的免疫测定法,其可以包括例如使用金、银、或乳胶颗粒、磁性颗粒或Q-点 (Q-dot)。此类方法可以例如以微量滴定板或条带形式或在“芯片”上实施。

[0082] 特别优选的是包含对至少一种HOX或EN-2肽特异性的抗体的ELISA。抗HOX或抗EN-2抗体优选直接地或经由接头地连接至报道分子 (诸如放射性同位素、荧光分子、发光分子或酶) 的。优选的酶的一个例子是碱性磷酸酶 (Invitrogen, UK), 尽管本领域知道别的报道物。

[0083] 抗人HOXC4抗体的一个例子可得自Abcam, UK, 产品目录号ab24338。这是家兔抗人HOXC4抗体, 因此可能优选使用连接至报道物 (诸如碱性磷酸酶) 的抗家兔IgG二抗来检测HOXC4抗体复合物。抗HOXB6抗体的一个例子可得自Abcam, 产品目录号ab26077。抗HOXB5抗体的一个例子来自Abcam, 产品目录号ab26079。抗HOXA3抗体的一个例子来自Abcam, 产品目录号ab28771。抗HOXD9抗体的一个例子来自Abcam, 产品目录号ab60708。本领域知道其它抗HOX抗体的例子。抗EN-2抗体的一个例子例子Abcam, 产品目录号ab45867。

[0084] Western印迹方法也是优选的, 特别是因为这些能提供密度计量数据。

[0085] 上文讨论了足以区分对照、早期阶段和晚期阶段癌症的至少一种HOX或EN-2肽的存在合适的比较性水平, 或其组成。

[0086] 若使用抗体, 则这些可以是多克隆的、单克隆的、双特异性的、人源化的或嵌合的抗体。抗体可以由单链组成, 但是会优选至少由轻链或重链组成, 但是应当领会, 为了结合HOX表位或EN-2表位需要至少一个互补绝对区 (CDR)。

[0087] 当然, 还应当领会, 必须有一种或多种表位可供配体 (诸如抗体) 结合或识别。抗HOX和抗EN-2抗体是早就知道的, 但是如果需要具有不同特异性的别的抗体或结合配体, 那么这些也是可以得到的。制备抗体的方法是本领域已知的。例如, 如果需要多克隆抗体, 那么可以用选定抗原 (诸如人HOX或EN-2) 免疫选定哺乳动物 (诸如小鼠、家兔、山羊或马)。然后自经免疫动物收集血清并处理 (例如通过免疫亲和层析) 以获得抗体。可以将例如人HOX或EN-2注射入家兔, 触发家兔免疫应答, 产生抗HOX或抗EN-2抗体, 其由此可以使用标准方法来分离。

[0088] 当然, 单克隆抗体可以通过本领域已知方法来生成, 而且一般是优选的。使用杂交瘤技术制备单克隆抗体的一般方法学是公知的 (参见例如Kohler, G. 和Milstein, C., Nature 256:495-497 (1975); Kozbor等, Immunology Today 4:72 (1983); Cole等, 77-96于 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985))。

[0089] 因此, 在本文中提到时, 抗体必须由表位结合区 (诸如CDR) 组成。在用于本文时, 术语“抗体”指完整分子及其能够结合表位的片段, 诸如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv。优选地, 抗体还包含效应部分, 诸如Fc区。

[0090] 抗体可以是任何合适类别的, 包括IgE、IgM、IgD、IgA和特别是IgG。还涵盖各种亚类的这些抗体。

[0091] 如此, 还优选使用生物传感器来检测至少一种肽生物标志物或其片段。生物传感器可掺入免疫学方法 (如上文关于例如检测生物标志物的检测所描述的) 或者电的、热的、磁的、光学的 (例如全息图) 或声学的手段或技术。在使用此类生物传感器时, 涵盖对生物标志物进行检测和/或定量。如此, 在又一个方面, 本发明提供了生物传感器用于检测和/或定

量肽或其片段的用途。

[0092] 优选地,可使用基于“智能”全息图或高频声学系统(特别是因为此类系统能适应阵列构造)的使用的生物传感器来检测至少一种HOX或EN-2生物标志物。例如,凭借智能全息图传感器(可得自Smart Holograms Limited,Cambridge UK),全息图像被保存在被敏化以与生物标志物特异性起反应的聚合物薄膜中。在暴露时,生物标志物与聚合物起作用,导致全息图所展示的图像的改变。测试结果读出能看到光学亮度、图像、颜色和/或图像位置的变化。这甚至能用肉眼读出。

[0093] 应当领会,优选的是能够检测和/或定量至少一种HOX或EN-2生物标志物的生物传感器将生物分子识别与适宜手段组合,以将样品中所述生物标志物的存在检测或定量转变成可检测信号。例如,在用于至少一种HOX或EN-2生物标志物的检测和/或定量的本发明生物传感器中可优选采用印刻识别元件、薄膜晶体管技术、磁声共鸣装置和其它新型声电系统。优选地,依照本发明的生物传感器会检测HOXC4、HOXB5、HOXB6、HOXA3、HOXD9和EN-2中的一种或多种、优选两种、三种、四种、五种或所有六种。进一步优选的生物传感器还可进一步检测其它HOX生物标志物,如上文所提及的。

[0094] 优选地,生物传感器包括配体和/或抗体,如上文所讨论的。上文传感器可以在合适的阵列或“芯片”上提供,使得生物传感器能够特异性结合至少一种HOX肽或EN-2肽或其片段。还提供了检测手段。上文讨论了合适的检测手段,但是可以包括报道系统,诸如碱性磷酸酶,或智能全息图,其能够给用户提供可检测信号以指示对至少一种HOX或EN-2肽或其片段的结合已经实现和优选的是关于所述阵列或芯片上已经发生的特异性结合事件的数目或HOX或EN-2的浓度的指示。

[0095] 本发明进一步提供了用于所述检测和/或定量的试剂盒。此类试剂盒在前列腺癌的診断和/或监测中是有用的。如此,此类试剂盒会优选包含能够特异性结合至少一种肽或其片段的生物传感器(诸如配体,优选抗体)和用于为用户指示所述特异性结合的手段(例如使用本文所述报道系统)。特别提到的试剂盒包括阵列或芯片。

[0096] 在又一个方面,本发明提供了能够特异性结合和识别至少一种HOX或EN-2肽或其片段的生物传感器(优选配体,最优选抗体)用于鉴定能够遏制至少一种HOX或EN-2肽或其片段生成的物质的用途。优选地,此物质能够遏制前列腺癌生成生物标志物。换言之,该配体可用于测定假定的或确定的抗前列腺癌治疗的功效或其它方面。

[0097] 如此,用于检测假定抗癌治疗的功效的方法可包括以下步骤:

[0098] (a) 温育表达HOX肽或EN-2肽的全细胞并检测所释放的HOX肽或EN-2肽的量;

[0099] (b) 用假定的抗癌治疗处理细胞;

[0100] (c) 检测处理后所释放的HOX肽或EN-2肽的量;并

[0101] (d) 比较处理之前与之后所释放的HOX肽或EN-2肽的量,看假定的抗癌治疗是否对所释放的肽的量有影响。

[0102] 或者,该方法可包括以下步骤:

[0103] (a) 将带标记物的配体与在细胞表面上表达HOX肽或EN-2肽的全细胞或者与含有HOX肽或EN-2肽的细胞膜一起温育;

[0104] (b) 测量结合至全细胞或细胞膜的带标记物的配体的量;

[0105] (c) 将假定的抗癌剂加至步骤(a)的带标记物的配体与全细胞或细胞膜的混合物

并让混合物达到平衡;

[0106] (d) 测量步骤(c)之后结合至全细胞或细胞膜的带标记物的配体的量;并

[0107] (e) 比较步骤(b)与(d)中带标记物的配体的差异,将引起步骤(d)中的结合降低的化合物视为HOX或EN-2表达的抑制剂,因此是抗癌剂。

[0108] 例如,诸如前列腺癌细胞系LNCaP的细胞系可用于此类测定法。可以在存在或不存在假定的或确定的抗癌剂的情况下培养LNCaP细胞,并比较EN-2的相对表达。较低的EN-2表达水平会指示较好的抗癌活性。可通过检测所生成的蛋白质(及最终产物)或通过检测所生成的RNA(即中间产物)来检测表达水平。上文讨论了检测蛋白质产物的方法或。可使用例如定量PCR或寡核苷酸阵列来检测RNA。

[0109] 上述还涉及本发明的方法和试剂盒。

[0110] 依照本发明使用的其它方法或试剂盒对于熟练技术人员会是显而易见的。这些可包括例如US-2006-014301;US-2004-063216;WO 01/92879;和WO 02/054936中所披露的生物标志物检测系统。

[0111] 如此,本发明可用于鉴定新的抗前列腺癌治疗,其中在存在或不存在假定抗癌剂的情况下检测和/或定量至少一种HOX或EN-2肽或其片段的水平,以测定其功效。本发明还可用于高通量筛选技术的方法,例如成形的阵列格式,诸如在芯片上或在多孔阵列中。

[0112] 由于前列腺癌是男性相关疾病,因此应当领会受试者或患者是男性。

附图说明

[0113] 图1:Western印迹寻找血清中HOXC4蛋白的一个例子。结果还通过密度计量术进行分析,并显示为来自每个组的所有六个样品的均值。误差条显示均值的标准误差。这些信息表明,HOXC4是潜在的、早期和晚期前列腺癌的特异性且精确的诊断标志物。

[0114] 图2:在六名早期前列腺癌患者(其肿瘤体积小且局限于前列腺)和六名同龄对照中进行的HOXB6检测。

[0115] 图3:(a) LNCaP和原代肿瘤细胞中EN-2表达的RT-QPCR分析(转录水平为相对于 β -肌动蛋白的比例)。(b,c) 用抗En2抗体染色的前列腺腺癌核心活检(core biopsy)。肿瘤细胞的胞质中存在En2阳性染色(褐色),在腔缘(1)处有最强染色。可看到附着至腔缘(2)的或在腔(3)中游离的En2阳性泡。核被染色成蓝色。放大倍数:(a) x100, (b) x60。

[0116] 图4:通过对(a) 正常前列腺组织、(b) 良性前列腺肥大、及(c和d) 恶性前列腺肿瘤进行TMA核心活检得到的切片。基质细胞(白色实心箭头)中和腺体中存在EN-2染色(褐色),在腔缘(实心箭头)处明显有最强染色。核被染色成蓝色。放大倍数:(a-c) x60, (d) x100。

[0117] 图5:培养液中EN-2蛋白的Western印迹检测。

[0118] 图6:尿液中的EN-2蛋白。从正在检查前列腺癌症状的个体收集尿液,筛选EN-2蛋白的存在。通过活检检验癌症的存在或不存在。EN-2的预测MW为30kDa,但是在阳性对照(小鼠小脑提取物)中还检测到33kDa的第二条带。30kDa的条带仅见于50%患者的尿液,这些患者经活检发现有前列腺癌细胞(C Pa),该30kDa条带未见于活检阴性、或有良性前列腺肥大(BHP)或高级别(high grade)前列腺上皮内瘤形成(HGPIN)的患者。

[0119] 图7:对三名肿瘤体积小且局限于前列腺的早期前列腺癌患者、三名晚期前列腺癌患者和三名同龄对照进行的HOXB5检测。

[0120] 图8:多种HOXA和HOXD基因在肿瘤组织中相比于相邻正常组织中的表达水平。DU145和PC3是衍生自前列腺肿瘤的细胞系。

[0121] 实施例1

[0122] HOXC4

[0123] 自六名激素不应性晚期前列腺癌患者、六名肿瘤体积小且局限于前列腺的早期前列腺癌患者、和六名同龄对照获取血清。将其脱盐,在12.5%PAGE/SDS凝胶上进行分级分离。人HOXC4蛋白(UniProtKB/Swiss-Prot编目流水号P09017)用兔抗人HOXC4抗体(Abcam, UK,产品目录号ab24338)和连接有碱性磷酸酶的抗兔IgG二抗(Invitrogen,UK)通过Western印迹来检测。使用这种方法,我们在所有前列腺癌患者的血清中检测到高水平的HOXC4蛋白,但是在同龄对照血清中只检测到非常低的水平(图1)。

[0124] 结果显示于下文表1。

[0125] 通过使用ELISA等标准测定法,HOXC4可用作前列腺癌诊断和/或预后测试的基础。这涉及使用连接有报道物(诸如碱性磷酸酶)的抗HOXC4抗体,以定量患者血清样品中HOXC4蛋白的量。也可以使用其它方法学,包括Western印迹。HOXC4蛋白的量将指示疾病是否存在和已经达到什么阶段。

[0126] 表1

[0127]

凝胶名称: HoxC4印迹131006 (原始1-D图像)						
索引	名称	患者	诊断	体积 OD*mm2	调整体积 OD*mm2	%调整体积
1	U1	HR29	癌症	6.844796	0.272431	24.320686
2	U2	HR28	癌症	6.460027	0.092836	8.2877258
3	U3	HR27	癌症	9.731784	0.393355	35.115964
4	U4	SR5	早期癌症	6.108735	0.086538	7.7255409
5	U5	SR2	早期癌症	6.26387	0.01121	1.0007083
6	U6	SR1	早期癌症	8.427193	0.15222	13.589161
7	U7	VR30	健康	6.459172	0.045458	4.0581642
8	U8	VR23	健康	9.760506	0.062926	5.6175665
9	U9	VR21	健康	6.740683	0.003187	0.2844833

[0128] NB.用第一抗体探查膜仅1小时

[0129] 均值 %增量

[0130] sd sem

[0131] 对照 0.037190112 0.030716 0.0177548 0

[0132] 早期癌症 0.08332277 0.07056 0.0407864 124.0455

[0133] 晚期癌症 0.252873795 0.151211 0.0874053 579.949

[0134] SEQ ID NO.1:HOXC4 NCBI编号P09017

[0135] 1 MIMSSYLMS NYIDPKFPPC EEYSQNSYIP EHSPEYYGRT RESGFQHHHQ ELYPPPPPRP

[0136] 61 SYPERQYSCT SLQPGNSRG HGPAQAGHHH PEKSQSLCEP APLSGASASP SPAPPACSQP

[0137] 121 APDHPSSAAS KQPIVYPWMK KIHVSTVNPN YNGGEPKRSR AAYTRQQVLE LEKEFHYNRY
 [0138] 181 LTRRRRIEIA HSLCLSERQI KIWFQNRMMK WKKDHRLPNT KVRSAAPPAGA APSTLSAATP
 [0139] 241 GTSEDHSQSA TPPEQQRAED ITRL

[0140] 实施例2

[0141] HOXB6

[0142] 在这些样品中检测HOXB6,操作完全同HOXC4,唯一不同的是,一抗是兔抗人HOXB6 (Abcam,产品目录号ab26077)。通过X射线胶片的密度计量术评估HOXB6蛋白的相对值(使用位于其预测分子量处的条带)。这些数值是条带相对于局部背景的光密度。因此应理解,比较出的密度计量数值可能是负值,见同龄对照(AMC)值,但不应将其解读为,HOXB6蛋白含量为负值。

[0143] 这些数据示于图2。

[0144] 表2

[0145]

血清中的HOXB6

数值是条带的相对光密度

			均值	sd	sem
AMC1	-0.02671	AMC	-0.09016	0.064043	0.036977
AMC2	-0.08899	早期癌症	0.261033	0.076253	0.044026
AMC3	-0.15478				
Early1	0.182775				
Early2	0.33511				
Early3	0.265214				

[0146] SEQ ID NO.2:HOXB6 NCBI编号P17509

[0147] 1 MSSYFVNSTF PVTLASGQES FLGQLPLYSS GYADPLRHYP APYGPQPGQD KGFATSSYYYP

[0148] 61 PAGGGYGRAA PCDYGPAPAF YREKESACAL SGADEQPPFH PEPRKSDCAQ DKS VFGETEE

[0149] 121 QKCSTPVYPW MQRMNCSNSS SFGPSGRRGR QTYTRYQTLE LEKEFHYNRY LTRRRRIEIA

[0150] 181 HALCLTERQI KIWFQNRMMK WKKE SKLLSA SQLSAEEEEEE KQAE

[0151] 实施例3

[0152] EN-2

[0153] 使用定量PCR(QPCR),测试了人前列腺癌瘤细胞系LNCaP(Horoszewicz等,1983)中的EN-2表达水平。这是一种衍生自人前列腺腺癌的转移病灶的细胞系,而且广泛用作这种癌症的体外模型。另外,测试了自前列腺肿瘤活检获得的组织中的EN-2表达。两种样品都表达EN-2。原代肿瘤细胞也表达蛋白质形式的EN-2。这能在前列腺腺癌的切片中检测到(图3a)。这些切片中的EN-2染色存在于胞质区和核区中,但是在腔缘处和在进入腔的次级泡中最强(图3b,c)。

[0154] 为进一步检验EN-2在来自正常前列腺、良性肥大和恶性肿瘤的组织中的存在区域(extent),我们用抗EN-2抗体对组织微阵列(TMA)进行染色,该TMA上有来自每一种组织的

代表性切片。结果证实,EN-2在恶性腺体尤其是腔缘中中强表达(图4),但在正常腺体和肥大组织的腺体中也有一些染色。所有组织还都显示基质细胞中的EN-2染色(图4)。为了定量腺体中的染色,给每种组织打分0-3,其中0代表无染色,3代表最强染色。在此基础上,正常组织的腺体(图4a)得分均值为0.5($n=10$, $sd=0.52$),良性肥大的腺体(图4b)得分均值为0.67($n=6$, $sd=0.51$),恶性肿瘤的腺体(图4c和4d)得分均值为2.3($n=6$, $sd=0.52$)。

[0155] 这些数据清楚表明,EN-2在这些前列腺癌细胞中表达。

[0156] 实施例4

[0157] 检验LNCaP和原代前列腺肿瘤细胞周围的培养基,以确定EN-2是否能自这些细胞分泌。将用于培养这两种细胞类型达2小时的培养基脱盐并浓缩。然后在丙烯酰胺凝胶上分辨此浓缩液中所含有的蛋白质。Western印迹揭示,这两种类型的细胞周围的培养基中有EN-2特异性条带(图5),使用标准量的体外转录EN-2蛋白进行的定量指示,用于培养LNCaP细胞的培养基中EN-2的量为3ng/ml,而原代肿瘤细胞在48小时中生成1.75ng/ml。

[0158] 实施例5

[0159] 自17名最近有前列腺活检和按摩的个体收集尿样。在这些人中,10人在活检后发现有癌症。在其他人中,2人具有高级别前列腺上皮内瘤形成(HGPIN),3人显示良性肥大表现,2人的活检切片无癌性细胞。5名诊断出癌症的患者在他们的尿液中有大量的EN-2,而未诊断出癌症的个体的尿样无一含有显著量的EN-2蛋白(图6)。

[0160] 实施例6

[0161] HOXB5

[0162] 完全像HOXC4和HOXB6那样进行这些样品中HOXB5的检测,只是第一抗体是兔抗人HOXB5(Abcam,产品目录号ab26079)。通过X射线胶片的密度计量术评估HOXB5蛋白的相对值(使用位于其预测分子量处的条带)。这些数值是条带相对于局部背景的光密度。

[0163] 表3

					%增量
均值		sd	sem		
[0166] AMC	0.006 597	0.005948	0.003438		0
[0167] 早期ca	0.244012	0.055004	0.031794		3598.808
[0168] 晚期ca	0.471597	0.154221	0.089145		7048.621

[0169] 这些数据示于图7。

[0170] 实施例7

[0171] 自17名怀疑有前列腺癌且随后诊断有该疾病的个体获取尿样。如上所述评估尿样中EN2的蛋白质水平。这些个体中8人(47%)的尿液显示EN2水平升高。相反,15名怀疑有前列腺癌但随后证实没有癌症的患者的尿样中,无一(0%)具有升高水平的EN2。值得注意的是,有3名诊断有前列腺癌、且尿样中发现EN2水平升高的患者,PSA水平未升高。这说明,本发明的方法对于检测常规检测方法已经失败的癌症方面是有效的。

[0172] 实施例8

[0173] 检测正常组织和肿瘤组织中的HOX基因表达

[0174] RNA提取:肿瘤组织和相邻正常组织的RNA购自Ambion,USA。使用RNeasy迷你试剂盒(Qiagen,UK)自细胞培养物提取RNA。

[0175] cDNA合成:RNA先加热至65℃达5分钟来变性。将1-5mg RNA在50ml体积中37℃温育1小时,该体积中有以下终浓度的物质:10mM DTT、1mM dNTP混合物、及100mg/ml polyT引物、200单位逆转录酶 (Invitrogen, USA) 和40单位RNaseout (Invitrogen, USA)。将管于65℃放置5分钟,以终止cDNA合成反应。

[0176] 实时PCR:半定量RT-PCR用Stratagene MX4000实时PCR仪进行。Stratagene MX4000测量反应的指数式阶段期间的PCR产物积累,这是在扩增变得易受有限的试剂和循环的变化的影响之前。随着PCR产物量增加,荧光增强。测定每一样品中每种转录物的相对量,表示为与 β -肌动蛋白量的比率。

[0177] 所使用的引物列于下文表4。

[0178]

基因	正向引物	反向引物
HOXA1	CTGGCCCTGGCTACGTATAA (SEQ ID NO:7)	TCCAACCTTCCCTGTTTTGG (SEQ ID NO:8)
HOXA2	TTCAGCAAAATGCCCTCTCT (SEQ ID NO:9)	TAGGCCAGCTCCACAGTTCT (SEQ ID NO:10)
HOXA3	ACCTGTGATAGTGGGCTTGG (SEQ ID NO:11)	ATACAGCCATTCCAGCAACC (SEQ ID NO:12)
HOXA4	CCCTGGATGAAGAAGATCCA (SEQ ID NO:13)	AATTGGAGGATCGCATCTTG (SEQ ID NO:14)
HOXA5	CCGAGAATGAAGTGGAAAA (SEQ ID NO:15)	ACGAGAACAGGGCTTCTTCA (SEQ ID NO:16)
HOXA6	AAAGCACTCCATGACGAAGG (SEQ ID NO:17)	TCCTTCTCCAGCTCCAGTGT (SEQ ID NO:18)
HOXA7	TGGTGTAATCTGGGGGTGT (SEQ ID NO:19)	TCTGATAAAGGGGGCTGTTG (SEQ ID NO:20)
HOXA9	AATAACCCAGCAGCCAACTG (SEQ ID NO:21)	ATTTTCATCCTGCGGTTCTG (SEQ ID NO:22)
HOXA10	AACTGGAGCTGGAGAAGGA (SEQ ID NO:23)	GATCCGGTTTTCTCGATTCA (SEQ ID NO:24)
HOXA11	CGCTGCCCTATACCAAGTA (SEQ ID NO:25)	GTCAAGGGCAAAATCTGCAT (SEQ ID NO:26)
HOXA13	GGATATCAGCCACGACGAAT (SEQ ID NO:27)	ATTATCTGGGCAAAGCAACG (SEQ ID NO:28)
HOXD1	TTCAGACCAAGCAACTGAC (SEQ ID NO:29)	TAGTGGGGTGTTCAGAG (SEQ ID NO:30)
HOXD3	CAGCCTCCTGGTCTGAATC (SEQ ID NO:31)	ATCCAGGGGAAGATCTGCTT (SEQ ID NO:32)
HOXD4	TCAAATGTGCCATAGCAAGC (SEQ ID NO:33)	TCCATAGGGCCCTCCTACTT (SEQ ID NO:34)
HOXD8	TCAAATGTTTCCGTGGATGA (SEQ ID NO:35)	GCTCTTGGGCTTCCTTTTTC (SEQ ID NO:36)
HOXD9	TCCCCATGTTTCTGAAAAG (SEQ ID NO:37)	GGGCTCCTCTAAGCCTCACT (SEQ ID NO:38)
HOXD10	GCTCCTTACCACCAACATT (SEQ ID NO:39)	AAATATCCAGGGACGGGAAC (SEQ ID NO:40)
HOXD11	GGGGCTACGCTCCCTACTAC (SEQ ID NO:41)	GCTGCCTCGTAGAACTGGTC (SEQ ID NO:42)
HOXD12	CGCTTCCCCTATCTCCTAC (SEQ ID NO:43)	CTTCGGGCGCATAGAACTTA (SEQ ID NO:44)
HOXD13	GGGGATGTGGCTCTAAATCA (SEQ ID NO:45)	AACCTGGACCACATCAGGAG (SEQ ID NO:46)

[0179] 结果示于图8。HOXA3和HOXD9用该方法鉴定为前列腺癌的潜在生物标志物,因为这些基因在肿瘤组织样品中明显过表达。

[0180] SEQ ID NO.5:HOXA3多肽

[0181] MQKATYYDSSAIYGGYPYQAANGFAYNANQQPYPASAAALGADGE

[0182] YHRPACSLQSPSSAGGHPKAHELSEACLRTLAPPSQPPSLGEPPLHPPPPQAAPPAP

[0183] QPPQPAPQPPAPTPAAPPPSSASPPQNASNNPTPANAAKSPLLNSPTVAKQIFPWMK

[0184] ESRQNTKQKTSSSSSGESCAGDKSPPGQASSKRARTAYTSAQLVELEKEFHFNRYLCR

[0185] PRRVEMANLLNLTERQIKIWFQNRMMKYKKDQKKGMLTSSGGQSPSRSPVPPGAGGY

[0186] LNSMHSLVNSVPYEPQSPPPFSKPPQGTYGLPPASYPASLPSCAPPPPPQKRYTAAGA

- [0187] GAGGTPDYDPHAHGLQGNGSYGTPHIQGSPVFGGSYVEPMSNSGPALFGLTHLPHAA
- [0188] SGAMDYGGAGPLGSGHHHGPGPGEPHTYTDLTGHHPSQGRIQEAPKLTHL
- [0189] SEQ ID NO.6:HOXD9多肽
- [0190] MSSSGTLSNYYVDSLIGHEGDEVFAARFGPPGPGAQGRPAGVAD
- [0191] GPAATAAEFASCSFAPRSVFSASWSAVPSQPPAAAAAMSGLYHPYVPPPPLAASASEP
- [0192] GRYVRSWMEPLPGFPGGAGGGGGGGGGGPGRGPSPGSPGANGRHYGIKPETRAAPAP
- [0193] ATAASTTSSSSTLSSSSKRTECSVARESQQSSGPEFSCNSFLQEAAAAATGGTGPGA
- [0194] GIGAATGTGGSSEPSACSDHIPGCSLKEEEKQHSQPQQQLDPNNPAANWIHARSTR
- [0195] KKRCPTYKYQTLELEKEFLFNMYLTRDRRYEVARILNLTERQVKIWFQNRMRMKMKMS
- [0196] KEKCPKGD
- [0197] 参考文献
- [0198] Chatelin, L.,Volovitch,M.,Joliot,A.H.,Perez,F.and Prochiantz,A. (1996) Transcription factor *hoxa-5* istaken up by cells in culture and conveyed to their nuclei.Mech.Dev.55,111-117.
- [0199] Cosgaya,J.M.,Aranda,A.,Cruces,J.and Martin-Blanco,E. (1998) Neuronal differentiation of PC12 cellsinduced by engrailed homeodomain is DNA-binding specific and independent of MAP kinases.J.CellSci.111 (Pt 16),2377-2384.
- [0200] Derossi,D.,Calvet,S.,Trembleau,A.,Brunissen,A.,Chassaing,G.and Prochiantz,A. (1996) Cellinternalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent.J.Biol.Chem.271,18188-18193.
- [0201] Garcia-Bellido,A.and Santamaria,P. (1972) Developmental analysis of the wing disc in the mutantEngrailed of *Drosophila melanogaster*.Genetics 72,87-104.
- [0202] Joliot,A.,Maizel,A.,Rosenberg,D.,Trembleau,A.,Dupas,S.,Volovitch,M.and Prochiantz,A. (1998) Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailedhomeoprotein.Curr.Biol.8,856-863.
- [0203] Kuefer R,Hofer MD,Zorn CS,Engel O,Volkmer BG,Juarez-Brito MA,Eggel M, Gschwend JE,RubinMA,Day ML.Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value forprostate cancer.Br J Cancer.2005 Jun 6;92 (11):2018-23.
- [0204] Maizel,A.,Bensaude,O.,Prochiantz,A.and Joliot,A. (1999) A short region of its homeodomain isnecessary for engrailed nuclear export and secretion.Development 126,3183-3190.
- [0205] Martin,N.L.,Saba-El-Leil,M.K.,Sadekova,S.,Meloche,S.and Sauvageau,G. (2005) EN-2 is a candidateoncogene in human breast cancer.Oncogene 24,6890-6901.
- [0206] Miller GJ,Miller HL,van Bokhoven A,Lambert JR,Werahera PN,Schirripa O,Lucia MS,Nordeen SK.Aberrant HOXC expression accompanies the malignant phenotype in human prostate.Cancer Res.2003Sep 15;63 (18):5879-88.

[0207] Morgan R.Hox genes:a continuation of embryonic patterning?Trends Genet.2006 Feb;22 (2) :67-9.

[0208] Morgan R.Engrailed:complexity and economy of a multi-functional transcription factor.FEBS Lett.2006May 15;580 (11) :2531-3.

[0209] Petricoin EF,Ardekani AM,Hitt BA,Levine PJ,Fusaro VA,Steinberg SM, Mills GB,Simone C,FishmanDA,Kohn EC,Liotta LA.Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer.Lancet.2002Feb 16;359 (9306) :572-7.

[0001] <110>萨里大学(The University of Surrey)
 [0002] <120>癌症的生物标记物
 [0003] <130>P048286W0
 [0004] <140>PCT/GB2007/004902
 [0005] <141>2007-12-19
 [0006] <150>GB0625321.5
 [0007] <151>2006-12-19
 [0008] <150>GB0719792.4
 [0009] <151>2007-10-10
 [0010] <160>46
 [0011] <170>SeqWin99,version 1.02
 [0012] <210>1
 [0013] <211>264
 [0014] <212>PRT
 [0015] <213>人类(Homo sapiens)
 [0016] <400>1
 [0017] Met Ile Met Ser Ser Tyr Leu Met Asp Ser Asn Tyr Ile Asp Pro Lys
 [0018] 1 5 10 15
 [0019] Phe Pro Pro Cys Glu Glu Tyr Ser Gln Asn Ser Tyr Ile Pro Glu His
 [0020] 20 25 30
 [0021] Ser Pro Glu Tyr Tyr Gly Arg Thr Arg Glu Ser Gly Phe Gln His His
 [0022] 35 40 45
 [0023] His Gln Glu Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Pro Arg Pro Ser Tyr Pro Glu
 [0024] 50 55 60
 [0025] Arg Gln Tyr Ser Cys Thr Ser Leu Gln Gly Pro Gly Asn Ser Arg Gly
 [0026] 65 70 75 80
 [0027] His Gly Pro Ala Gln Ala Gly His His His Pro Glu Lys Ser Gln Ser
 [0028] 85 90 95
 [0029] Leu Cys Glu Pro Ala Pro Leu Ser Gly Ala Ser Ala Ser Pro Ser Pro
 [0030] 100 105 110
 [0031] Ala Pro Pro Ala Cys Ser Gln Pro Ala Pro Asp His Pro Ser Ser Ala
 [0032] 115 120 125
 [0033] Ala Ser Lys Gln Pro Ile Val Tyr Pro Trp Met Lys Lys Ile His Val
 [0034] 130 135 140
 [0035] Ser Thr Val Asn Pro Asn Tyr Asn Gly Gly Glu Pro Lys Arg Ser Arg
 [0036] 145 150 155 160
 [0037] Ala Ala Tyr Thr Arg Gln Gln Val Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His
 [0038] 165 170 175

[0039]	Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg Ile Glu Ile Ala His Ser
[0040]	180 185 190
[0041]	Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg
[0042]	195 200 205
[0043]	Met Lys Trp Lys Lys Asp His Arg Leu Pro Asn Thr Lys Val Arg Ser
[0044]	210 215 220
[0045]	Ala Pro Pro Ala Gly Ala Ala Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ala Thr Pro
[0046]	225 230 235 240
[0047]	Gly Thr Ser Glu Asp His Ser Gln Ser Ala Thr Pro Pro Glu Gln Gln
[0048]	245 250 255
[0049]	Arg Ala Glu Asp Ile Thr Arg Leu
[0050]	260
[0051]	<210>2
[0052]	<211>224
[0053]	<212>PRT
[0054]	<213>人类
[0055]	<400>2
[0056]	Met Ser Ser Tyr Phe Val Asn Ser Thr Phe Pro Val Thr Leu Ala Ser
[0057]	1 5 10 15
[0058]	Gly Gln Glu Ser Phe Leu Gly Gln Leu Pro Leu Tyr Ser Ser Gly Tyr
[0059]	20 25 30
[0060]	Ala Asp Pro Leu Arg His Tyr Pro Ala Pro Tyr Gly Pro Gly Pro Gly
[0061]	35 40 45
[0062]	Gln Asp Lys Gly Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Tyr Pro Pro Ala Gly Gly
[0063]	50 55 60
[0064]	Gly Tyr Gly Arg Ala Ala Pro Cys Asp Tyr Gly Pro Ala Pro Ala Phe
[0065]	65 70 75 80
[0066]	Tyr Arg Glu Lys Glu Ser Ala Cys Ala Leu Ser Gly Ala Asp Glu Gln
[0067]	85 90 95
[0068]	Pro Pro Phe His Pro Glu Pro Arg Lys Ser Asp Cys Ala Gln Asp Lys
[0069]	100 105 110
[0070]	Ser Val Phe Gly Glu Thr Glu Glu Gln Lys Cys Ser Thr Pro Val Tyr
[0071]	115 120 125
[0072]	Pro Trp Met Gln Arg Met Asn Ser Cys Asn Ser Ser Ser Phe Gly Pro
[0073]	130 135 140
[0074]	Ser Gly Arg Arg Gly Arg Gln Thr Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr Leu Glu
[0075]	145 150 155 160
[0076]	Leu Glu Lys Glu Phe His Tyr Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg
[0077]	165 170 175

[0078]	Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Thr Glu Arg Gln Ile Lys Ile
[0079]	180 185 190
[0080]	Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Ser Lys Leu Leu
[0081]	195 200 205
[0082]	Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Glu Glu Glu Glu Glu Lys Gln Ala Glu
[0083]	210 215 220
[0084]	<210>3
[0085]	<211>269
[0086]	<212>PRT
[0087]	<213>人类
[0088]	<400>3
[0089]	Met Ser Ser Tyr Phe Val Asn Ser Phe Ser Gly Arg Tyr Pro Asn Gly
[0090]	1 5 10 15
[0091]	Pro Asp Tyr Gln Leu Leu Asn Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Leu Ser Gly
[0092]	20 25 30
[0093]	Ser Tyr Arg Asp Pro Ala Ala Met His Thr Gly Ser Tyr Gly Tyr Asn
[0094]	35 40 45
[0095]	Tyr Asn Gly Met Asp Leu Ser Val Asn Arg Ser Ser Ala Ser Ser Ser
[0096]	50 55 60
[0097]	His Phe Gly Ala Val Gly Glu Ser Ser Arg Ala Phe Pro Ala Pro Ala
[0098]	65 70 75 80
[0099]	Gln Glu Pro Arg Phe Arg Gln Ala Ala Ser Ser Cys Ser Leu Ser Ser
[0100]	85 90 95
[0101]	Pro Glu Ser Leu Pro Cys Thr Asn Gly Asp Ser His Gly Ala Lys Pro
[0102]	100 105 110
[0103]	Ser Ala Ser Ser Pro Ser Asp Gln Ala Thr Ser Ala Ser Ser Ser Ala
[0104]	115 120 125
[0105]	Asn Phe Thr Glu Ile Asp Glu Ala Ser Ala Ser Ser Glu Pro Glu Glu
[0106]	130 135 140
[0107]	Ala Ala Ser Gln Leu Ser Ser Pro Ser Leu Ala Arg Ala Gln Pro Glu
[0108]	145 150 155 160
[0109]	Pro Met Ala Thr Ser Thr Ala Ala Pro Glu Gly Gln Thr Pro Gln Ile
[0110]	165 170 175
[0111]	Phe Pro Trp Met Arg Lys Leu His Ile Ser His Asp Met Thr Gly Pro
[0112]	180 185 190
[0113]	Asp Gly Lys Arg Ala Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Thr Leu Glu
[0114]	195 200 205
[0115]	Leu Glu Lys Glu Phe His Phe Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg
[0116]	210 215 220

[0117]	Ile Glu Ile Ala His Ala Leu Cys Leu Ser Glu Arg Gln Ile Lys Ile
[0118]	225 230 235 240
[0119]	Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Asp Asn Lys Leu Lys
[0120]	245 250 255
[0121]	Ser Met Ser Leu Ala Thr Ala Gly Ser Ala Phe Gln Pro
[0122]	260 265
[0123]	<210>4
[0124]	<211>333
[0125]	<212>PRT
[0126]	<213>人类
[0127]	<400>4
[0128]	Met Glu Glu Asn Asp Pro Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ala Ala Val Glu
[0129]	1 5 10 15
[0130]	Gly Gln Arg Gln Pro Glu Ser Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0131]	20 25 30
[0132]	Gly Gly Ser Ser Pro Gly Glu Ala Asp Thr Gly Arg Arg Arg Ala Leu
[0133]	35 40 45
[0134]	Met Leu Pro Ala Val Leu Gln Ala Pro Gly Asn His Gln His Pro His
[0135]	50 55 60
[0136]	Arg Ile Thr Asn Phe Phe Ile Asp Asn Ile Leu Arg Pro Glu Phe Gly
[0137]	65 70 75 80
[0138]	Arg Arg Lys Asp Ala Gly Thr Cys Cys Ala Gly Ala Gly Gly Gly Arg
[0139]	85 90 95
[0140]	Gly Gly Gly Ala Gly Gly Glu Gly Gly Ala Ser Gly Ala Glu Gly Gly
[0141]	100 105 110
[0142]	Gly Gly Ala Gly Gly Ser Glu Gln Leu Leu Gly Ser Gly Ser Arg Glu
[0143]	115 120 125
[0144]	Pro Arg Gln Asn Pro Pro Cys Ala Pro Gly Ala Gly Gly Pro Leu Pro
[0145]	130 135 140
[0146]	Ala Ala Gly Ser Asp Ser Pro Gly Asp Gly Glu Gly Gly Ser Lys Thr
[0147]	145 150 155 160
[0148]	Leu Ser Leu His Gly Gly Ala Lys Lys Gly Gly Asp Pro Gly Gly Pro
[0149]	165 170 175
[0150]	Leu Asp Gly Ser Leu Lys Ala Arg Gly Leu Gly Gly Gly Asp Leu Ser
[0151]	180 185 190
[0152]	Val Ser Ser Asp Ser Asp Ser Ser Gln Ala Gly Ala Asn Leu Gly Ala
[0153]	195 200 205
[0154]	Gln Pro Met Leu Trp Pro Ala Trp Val Tyr Cys Thr Arg Tyr Ser Asp
[0155]	210 215 220

[0156]	Arg	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Arg	Ser	Arg	Lys	Pro	Lys	Lys	Lys	Asn	Pro
[0157]	225					230					235					240
[0158]	Asn	Lys	Glu	Asp	Lys	Arg	Pro	Arg	Thr	Ala	Phe	Thr	Ala	Glu	Gln	Leu
[0159]					245					250					255	
[0160]	Gln	Arg	Leu	Lys	Ala	Glu	Phe	Gln	Thr	Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Glu	Gln
[0161]				260					265					270		
[0162]	Arg	Arg	Gln	Ser	Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ile
[0163]			275					280					285			
[0164]	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Lys	Arg	Ala	Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	Thr	Gly
[0165]		290					295					300				
[0166]	Asn	Lys	Asn	Thr	Leu	Ala	Val	His	Leu	Met	Ala	Gln	Gly	Leu	Tyr	Asn
[0167]	305					310					315					320
[0168]	His	Ser	Thr	Thr	Ala	Lys	Glu	Gly	Lys	Ser	Asp	Ser	Glu			
[0169]					325					330						
[0170]	<210>5															
[0171]	<211>443															
[0172]	<212>PRT															
[0173]	<213>人类															
[0174]	<400>5															
[0175]	Met	Gln	Lys	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Ser	Ser	Ala	Ile	Tyr	Gly	Gly	Tyr
[0176]	1				5					10					15	
[0177]	Pro	Tyr	Gln	Ala	Ala	Asn	Gly	Phe	Ala	Tyr	Asn	Ala	Asn	Gln	Gln	Pro
[0178]				20					25					30		
[0179]	Tyr	Pro	Ala	Ser	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Glu	Tyr	His	Arg	Pro
[0180]			35					40					45			
[0181]	Ala	Cys	Ser	Leu	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Gly	Gly	His	Pro	Lys	Ala
[0182]		50					55					60				
[0183]	His	Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Cys	Leu	Arg	Thr	Leu	Ser	Ala	Pro	Pro	Ser
[0184]	65					70					75					80
[0185]	Gln	Pro	Pro	Ser	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro	Leu	His	Pro	Pro	Pro	Pro	Gln
[0186]					85					90					95	
[0187]	Ala	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro	Gln	Pro	Ala	Pro	Gln	Pro	Pro
[0188]				100					105					110		
[0189]	Ala	Pro	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Ala	Ser	Pro	Pro
[0190]			115					120					125			
[0191]	Gln	Asn	Ala	Ser	Asn	Asn	Pro	Thr	Pro	Ala	Asn	Ala	Ala	Lys	Ser	Pro
[0192]		130					135					140				
[0193]	Leu	Leu	Asn	Ser	Pro	Thr	Val	Ala	Lys	Gln	Ile	Phe	Pro	Trp	Met	Lys
[0194]	145					150					155					160

[0195]	Glu Ser Arg Gln Asn Thr Lys Gln Lys Thr Ser Ser Ser Ser Ser Gly		
[0196]		165	170
[0197]	Glu Ser Cys Ala Gly Asp Lys Ser Pro Pro Gly Gln Ala Ser Ser Lys		175
[0198]		180	185
[0199]	Arg Ala Arg Thr Ala Tyr Thr Ser Ala Gln Leu Val Glu Leu Glu Lys		190
[0200]		195	200
[0201]	Glu Phe His Phe Asn Arg Tyr Leu Cys Arg Pro Arg Arg Val Glu Met		205
[0202]		210	215
[0203]	Ala Asn Leu Leu Asn Leu Thr Glu Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln		220
[0204]	225	230	235
[0205]	Asn Arg Arg Met Lys Tyr Lys Lys Asp Gln Lys Gly Lys Gly Met Leu		240
[0206]		245	250
[0207]	Thr Ser Ser Gly Gly Gln Ser Pro Ser Arg Ser Pro Val Pro Pro Gly		255
[0208]		260	265
[0209]	Ala Gly Gly Tyr Leu Asn Ser Met His Ser Leu Val Asn Ser Val Pro		270
[0210]		275	280
[0211]	Tyr Glu Pro Gln Ser Pro Pro Pro Phe Ser Lys Pro Pro Gln Gly Thr		285
[0212]		290	295
[0213]	Tyr Gly Leu Pro Pro Ala Ser Tyr Pro Ala Ser Leu Pro Ser Cys Ala		300
[0214]	305	310	315
[0215]	Pro Pro Pro Pro Pro Gln Lys Arg Tyr Thr Ala Ala Gly Ala Gly Ala		320
[0216]		325	330
[0217]	Gly Gly Thr Pro Asp Tyr Asp Pro His Ala His Gly Leu Gln Gly Asn		335
[0218]		340	345
[0219]	Gly Ser Tyr Gly Thr Pro His Ile Gln Gly Ser Pro Val Phe Val Gly		350
[0220]		355	360
[0221]	Gly Ser Tyr Val Glu Pro Met Ser Asn Ser Gly Pro Ala Leu Phe Gly		365
[0222]		370	375
[0223]	Leu Thr His Leu Pro His Ala Ala Ser Gly Ala Met Asp Tyr Gly Gly		380
[0224]	385	390	395
[0225]	Ala Gly Pro Leu Gly Ser Gly His His His Gly Pro Gly Pro Gly Glu		400
[0226]		405	410
[0227]	Pro His Pro Thr Tyr Thr Asp Leu Thr Gly His His Pro Ser Gln Gly		415
[0228]		420	425
[0229]	Arg Ile Gln Glu Ala Pro Lys Leu Thr His Leu		430
[0230]		435	440
[0231]	<210>6		
[0232]	<211>342		
[0233]	<212>PRT		

[0234]	<213>人类															
[0235]	<400>6															
[0236]	Met	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Ser	Asn	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Leu	Ile
[0237]	1				5					10					15	
[0238]	Gly	His	Glu	Gly	Asp	Glu	Val	Phe	Ala	Ala	Arg	Phe	Gly	Pro	Pro	Gly
[0239]					20					25					30	
[0240]	Pro	Gly	Ala	Gln	Gly	Arg	Pro	Ala	Gly	Val	Ala	Asp	Gly	Pro	Ala	Ala
[0241]					35					40					45	
[0242]	Thr	Ala	Ala	Glu	Phe	Ala	Ser	Cys	Ser	Phe	Ala	Pro	Arg	Ser	Ala	Val
[0243]					50					55					60	
[0244]	Phe	Ser	Ala	Ser	Trp	Ser	Ala	Val	Pro	Ser	Gln	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala
[0245]	65					70					75				80	
[0246]	Ala	Met	Ser	Gly	Leu	Tyr	His	Pro	Tyr	Val	Pro	Pro	Pro	Pro	Leu	Ala
[0247]					85					90					95	
[0248]	Ala	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Gly	Arg	Tyr	Val	Arg	Ser	Trp	Met	Glu	Pro
[0249]					100					105					110	
[0250]	Leu	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
[0251]					115					120					125	
[0252]	Gly	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Pro	Ala	Asn
[0253]					130					135					140	
[0254]	Gly	Arg	His	Tyr	Gly	Ile	Lys	Pro	Glu	Thr	Arg	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro
[0255]	145					150					155				160	
[0256]	Ala	Thr	Ala	Ala	Ser	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Leu	Ser	Ser
[0257]					165					170					175	
[0258]	Ser	Ser	Lys	Arg	Thr	Glu	Cys	Ser	Val	Ala	Arg	Glu	Ser	Gln	Gly	Ser
[0259]					180					185					190	
[0260]	Ser	Gly	Pro	Glu	Phe	Ser	Cys	Asn	Ser	Phe	Leu	Gln	Glu	Lys	Ala	Ala
[0261]					195					200					205	
[0262]	Ala	Ala	Thr	Gly	Gly	Thr	Gly	Pro	Gly	Ala	Gly	Ile	Gly	Ala	Ala	Thr
[0263]					210					215					220	
[0264]	Gly	Thr	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Pro	Ser	Ala	Cys	Ser	Asp	His	Pro	Ile
[0265]	225					230					235				240	
[0266]	Pro	Gly	Cys	Ser	Leu	Lys	Glu	Glu	Glu	Lys	Gln	His	Ser	Gln	Pro	Gln
[0267]					245					250					255	
[0268]	Gln	Gln	Gln	Leu	Asp	Pro	Asn	Asn	Pro	Ala	Ala	Asn	Trp	Ile	His	Ala
[0269]					260					265					270	
[0270]	Arg	Ser	Thr	Arg	Lys	Lys	Arg	Cys	Pro	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Gln	Thr	Leu
[0271]					275					280					285	
[0272]	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe	Leu	Phe	Asn	Met	Tyr	Leu	Thr	Arg	Asp	Arg

[0273]	290	295	300
[0274]	Arg Tyr Glu Val Ala Arg Ile Leu Asn Leu Thr Glu Arg Gln Val Lys		
[0275]	305	310	315 320
[0276]	Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Met Lys Lys Met Ser Lys Glu		
[0277]	325	330	335
[0278]	Lys Cys Pro Lys Gly Asp		
[0279]	340		
[0280]	<210>7		
[0281]	<211>20		
[0282]	<212>DNA		
[0283]	<213>人工序列		
[0284]	<220>		
[0285]	<223>引物HOXA1正向		
[0286]	<400>7		
[0287]	ctggccctgg ctacgtataa	20	
[0288]	<210>8		
[0289]	<211>20		
[0290]	<212>DNA		
[0291]	<213>人工序列		
[0292]	<220>		
[0293]	<223>引物HOXA1反向		
[0294]	<400>8		
[0295]	tccaactttc cctgttttgg	20	
[0296]	<210>9		
[0297]	<211>20		
[0298]	<212>DNA		
[0299]	<213>人工序列		
[0300]	<220>		
[0301]	<223>引物HOXA2正向		
[0302]	<400>9		
[0303]	ttcagcaaaa tgccctctct	20	
[0304]	<210>10		
[0305]	<211>20		
[0306]	<212>DNA		
[0307]	<213>人工序列		
[0308]	<220>		
[0309]	<223>引物HOXA2反向		
[0310]	<400>10		
[0311]	taggccagct ccacagttct	20	

[0312]	<210>11	
[0313]	<211>20	
[0314]	<212>DNA	
[0315]	<213>人工序列	
[0316]	<220>	
[0317]	<223>引物HOXA3正向	
[0318]	<400>11	
[0319]	acctgtgata gtgggcttgg	20
[0320]	<210>12	
[0321]	<211>20	
[0322]	<212>DNA	
[0323]	<213>人工序列	
[0324]	<220>	
[0325]	<223>引物HOXA3反向	
[0326]	<400>12	
[0327]	atacagccat tccagcaacc	20
[0328]	<210>13	
[0329]	<211>20	
[0330]	<212>DNA	
[0331]	<213>人工序列	
[0332]	<220>	
[0333]	<223>引物HOXA4正向	
[0334]	<400>13	
[0335]	ccctggatga agaagatcca	20
[0336]	<210>14	
[0337]	<211>20	
[0338]	<212>DNA	
[0339]	<213>人工序列	
[0340]	<220>	
[0341]	<223>引物HOXA4反向	
[0342]	<400>14	
[0343]	aattggagga tcgcatcttg	20
[0344]	<210>15	
[0345]	<211>20	
[0346]	<212>DNA	
[0347]	<213>人工序列	
[0348]	<220>	
[0349]	<223>引物HOXA5正向	
[0350]	<400>15	

[0351]	ccggagaatg aagtggaaaa	20
[0352]	<210>16	
[0353]	<211>20	
[0354]	<212>DNA	
[0355]	<213>人工序列	
[0356]	<220>	
[0357]	<223>引物HOXA5反向	
[0358]	<400>16	
[0359]	acgagaacag ggctttcttca	20
[0360]	<210>17	
[0361]	<211>20	
[0362]	<212>DNA	
[0363]	<213>人工序列	
[0364]	<220>	
[0365]	<223>引物HOXA6正向	
[0366]	<400>17	
[0367]	aaagcactcc atgacgaagg	20
[0368]	<210>18	
[0369]	<211>20	
[0370]	<212>DNA	
[0371]	<213>人工序列	
[0372]	<220>	
[0373]	<223>引物HOXA6反向	
[0374]	<400>18	
[0375]	tcctttctcca gctccagtgt	20
[0376]	<210>19	
[0377]	<211>20	
[0378]	<212>DNA	
[0379]	<213>人工序列	
[0380]	<220>	
[0381]	<223>引物HOXA7正向	
[0382]	<400>19	
[0383]	tggtgtaaat ctgggggtgt	20
[0384]	<210>20	
[0385]	<211>20	
[0386]	<212>DNA	
[0387]	<213>人工序列	
[0388]	<220>	
[0389]	<223>引物HOXA7反向	

[0390]	<400>20	
[0391]	tctgataaag ggggctgttg	20
[0392]	<210>21	
[0393]	<211>20	
[0394]	<212>DNA	
[0395]	<213>人工序列	
[0396]	<220>	
[0397]	<223>引物HOXA9正向	
[0398]	<400>21	
[0399]	aataaccag cagccaactg	20
[0400]	<210>22	
[0401]	<211>20	
[0402]	<212>DNA	
[0403]	<213>人工序列	
[0404]	<220>	
[0405]	<223>引物HOXA9反向	
[0406]	<400>22	
[0407]	attttcatcc tgcggttctg	20
[0408]	<210>23	
[0409]	<211>20	
[0410]	<212>DNA	
[0411]	<213>人工序列	
[0412]	<220>	
[0413]	<223>引物HOXA10正向	
[0414]	<400>23	
[0415]	acactggagc tggagaagga	20
[0416]	<210>24	
[0417]	<211>20	
[0418]	<212>DNA	
[0419]	<213>人工序列	
[0420]	<220>	
[0421]	<223>引物HOXA10反向	
[0422]	<400>24	
[0423]	gatccggttt tctcgattca	20
[0424]	<210>25	
[0425]	<211>20	
[0426]	<212>DNA	
[0427]	<213>人工序列	
[0428]	<220>	

[0429]	<223>引物HOXA11正向	
[0430]	<400>25	
[0431]	cgctgcccct ataccaagta	20
[0432]	<210>26	
[0433]	<211>20	
[0434]	<212>DNA	
[0435]	<213>人工序列	
[0436]	<220>	
[0437]	<223>引物HOXA11反向	
[0438]	<400>26	
[0439]	gtcaagggca aaatctgcat	20
[0440]	<210>27	
[0441]	<211>20	
[0442]	<212>DNA	
[0443]	<213>人工序列	
[0444]	<220>	
[0445]	<223>引物HOXA13正向	
[0446]	<400>27	
[0447]	ggatatcagc cagcacgaat	20
[0448]	<210>28	
[0449]	<211>20	
[0450]	<212>DNA	
[0451]	<213>人工序列	
[0452]	<220>	
[0453]	<223>引物HOXA13反向	
[0454]	<400>28	
[0455]	attatctggg caaagcaacg	20
[0456]	<210>29	
[0457]	<211>20	
[0458]	<212>DNA	
[0459]	<213>人工序列	
[0460]	<220>	
[0461]	<223>引物HOXD1正向	
[0462]	<400>29	
[0463]	ttcagcacca agcaactgac	20
[0464]	<210>30	
[0465]	<211>20	
[0466]	<212>DNA	
[0467]	<213>人工序列	

[0468]	<220>	
[0469]	<223>引物HOXD1反向	
[0470]	<400>30	
[0471]	tagtgggggt tgttccagag	20
[0472]	<210>31	
[0473]	<211>20	
[0474]	<212>DNA	
[0475]	<213>人工序列	
[0476]	<220>	
[0477]	<223>引物HOXD3正向	
[0478]	<400>31	
[0479]	cagcctcctg gtctgaactc	20
[0480]	<210>32	
[0481]	<211>20	
[0482]	<212>DNA	
[0483]	<213>人工序列	
[0484]	<220>	
[0485]	<223>引物HOXD3反向	
[0486]	<400>32	
[0487]	atccagggga agatctgctt	20
[0488]	<210>33	
[0489]	<211>20	
[0490]	<212>DNA	
[0491]	<213>人工序列	
[0492]	<220>	
[0493]	<223>引物HOXD4正向	
[0494]	<400>33	
[0495]	tcaaattgtgc catagcaagc	20
[0496]	<210>34	
[0497]	<211>20	
[0498]	<212>DNA	
[0499]	<213>人工序列	
[0500]	<220>	
[0501]	<223>引物HOXD4反向	
[0502]	<400>34	
[0503]	tccatagggc cctcctact t	20
[0504]	<210>35	
[0505]	<211>20	
[0506]	<212>DNA	

[0507]	<213>人工序列	
[0508]	<220>	
[0509]	<223>引物HOXD8正向	
[0510]	<400>35	
[0511]	tcaaattgttt ccgtggatga	20
[0512]	<210>36	
[0513]	<211>20	
[0514]	<212>DNA	
[0515]	<213>人工序列	
[0516]	<220>	
[0517]	<223>引物HOXD8反向	
[0518]	<400>36	
[0519]	gctcttgggc ttcctttttc	20
[0520]	<210>37	
[0521]	<211>20	
[0522]	<212>DNA	
[0523]	<213>人工序列	
[0524]	<220>	
[0525]	<223>引物HOXD9正向	
[0526]	<400>37	
[0527]	tcccccatgt ttctgaaaag	20
[0528]	<210>38	
[0529]	<211>20	
[0530]	<212>DNA	
[0531]	<213>人工序列	
[0532]	<220>	
[0533]	<223>引物HOXD9反向	
[0534]	<400>38	
[0535]	gggctcctct aagcctcact	20
[0536]	<210>39	
[0537]	<211>20	
[0538]	<212>DNA	
[0539]	<213>人工序列	
[0540]	<220>	
[0541]	<223>引物HOXD10正向	
[0542]	<400>39	
[0543]	gctccttcac caccaacat t	20
[0544]	<210>40	
[0545]	<211>20	

[0546]	<212>DNA	
[0547]	<213>人工序列	
[0548]	<220>	
[0549]	<223>引物HOXD10反向	
[0550]	<400>40	
[0551]	aaatatccag ggacgggaac	20
[0552]	<210>41	
[0553]	<211>20	
[0554]	<212>DNA	
[0555]	<213>人工序列	
[0556]	<220>	
[0557]	<223>引物HOXD11正向	
[0558]	<400>41	
[0559]	ggggctacgc tccctactac	20
[0560]	<210>42	
[0561]	<211>20	
[0562]	<212>DNA	
[0563]	<213>人工序列	
[0564]	<220>	
[0565]	<223>引物HOXD11反向	
[0566]	<400>42	
[0567]	gctgcctcgt agaactggtc	20
[0568]	<210>43	
[0569]	<211>20	
[0570]	<212>DNA	
[0571]	<213>人工序列	
[0572]	<220>	
[0573]	<223>引物HOXD12正向	
[0574]	<400>43	
[0575]	cgttcccccc tatctcctac	20
[0576]	<210>44	
[0577]	<211>20	
[0578]	<212>DNA	
[0579]	<213>人工序列	
[0580]	<220>	
[0581]	<223>引物HOXD12反向	
[0582]	<400>44	
[0583]	cttcgggcgc atagaactta	20
[0584]	<210>45	

[0585]	<211>20	
[0586]	<212>DNA	
[0587]	<213>人工序列	
[0588]	<220>	
[0589]	<223>引物HOXD13正向	
[0590]	<400>45	
[0591]	ggggatgtgg ctctaaatca	20
[0592]	<210>46	
[0593]	<211>20	
[0594]	<212>DNA	
[0595]	<213>人工序列	
[0596]	<220>	
[0597]	<223>引物HOXD13反向	
[0598]	<400>46	
[0599]	aacctggacc acatcaggag	20

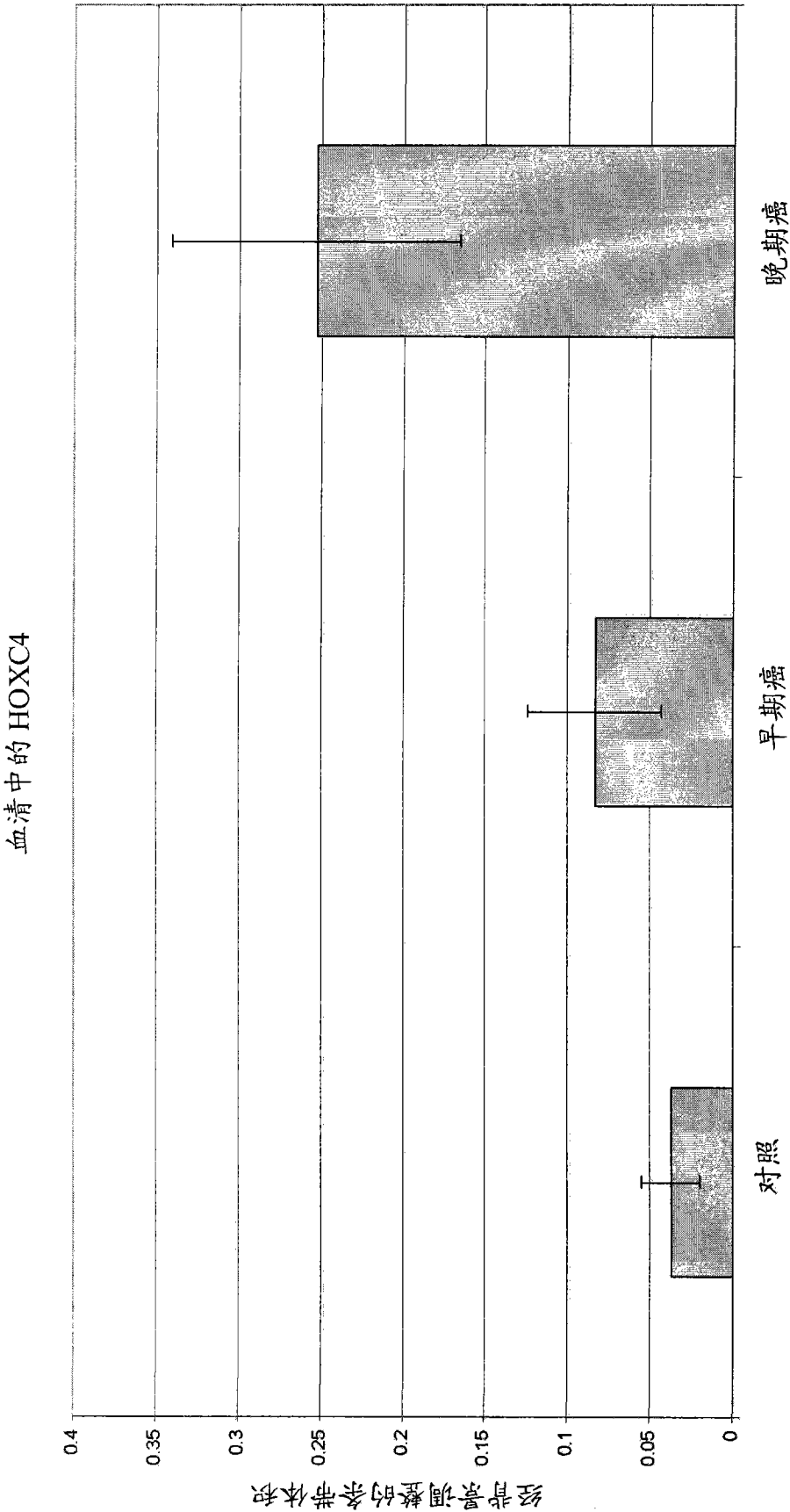


图1

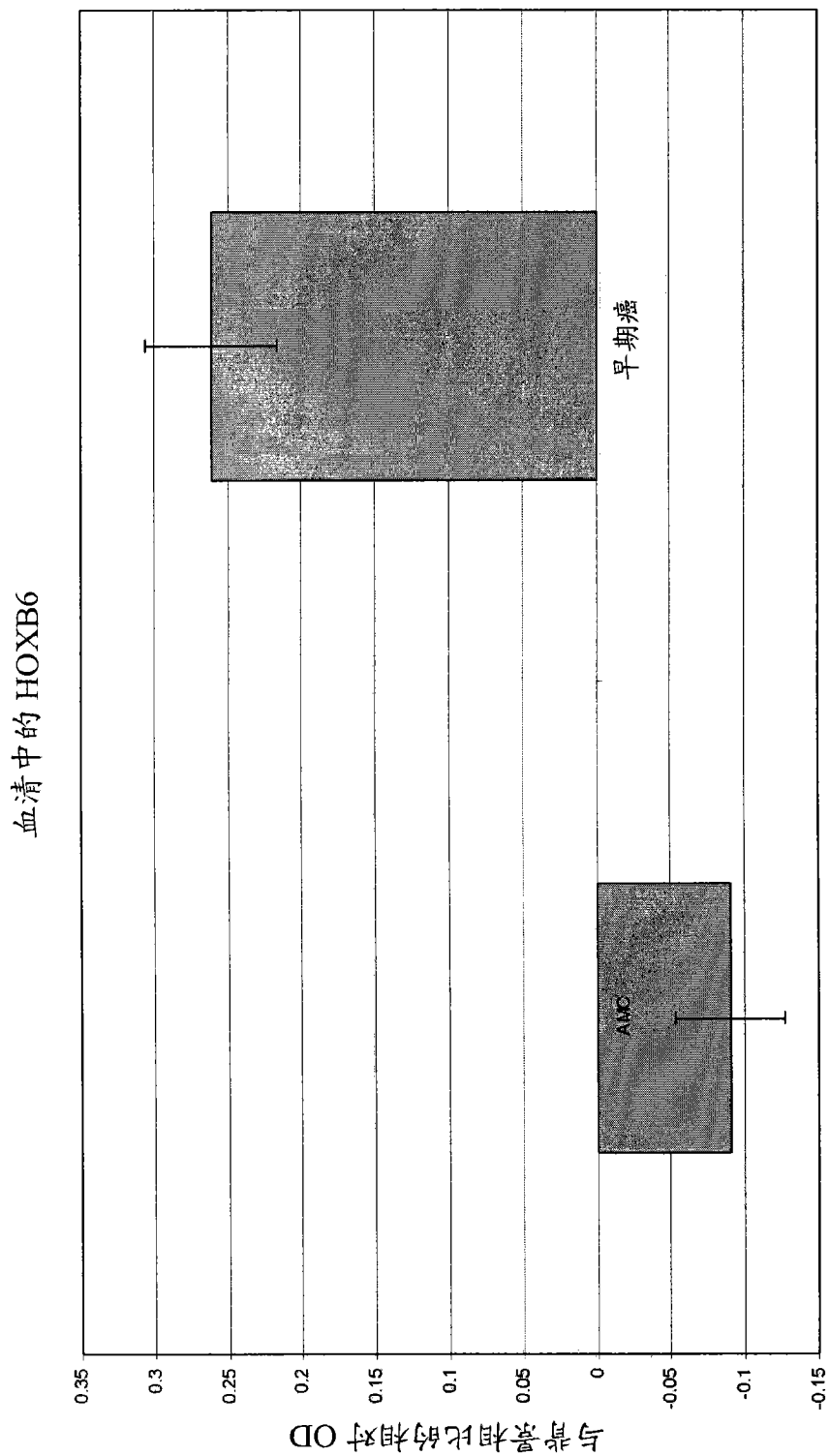


图2

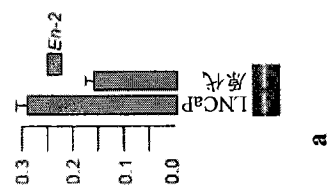
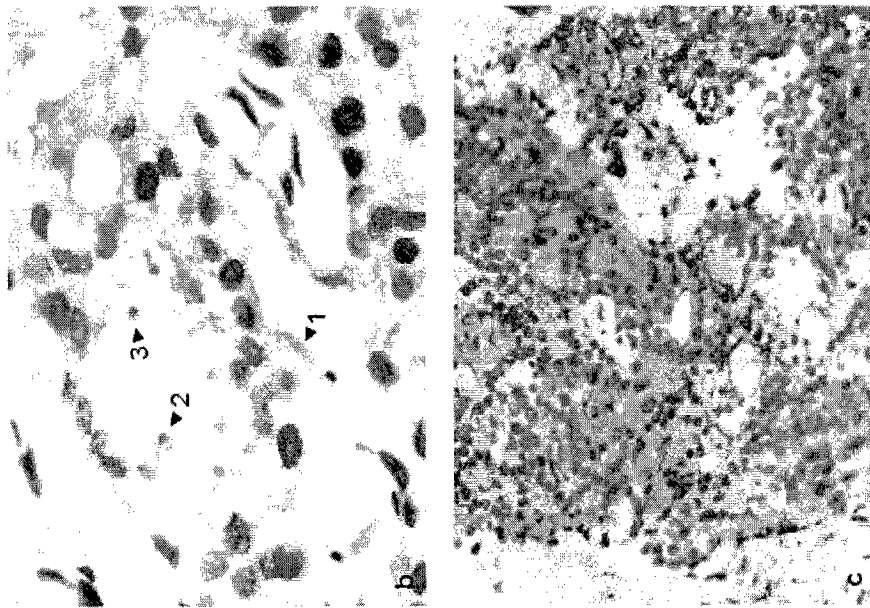


图3

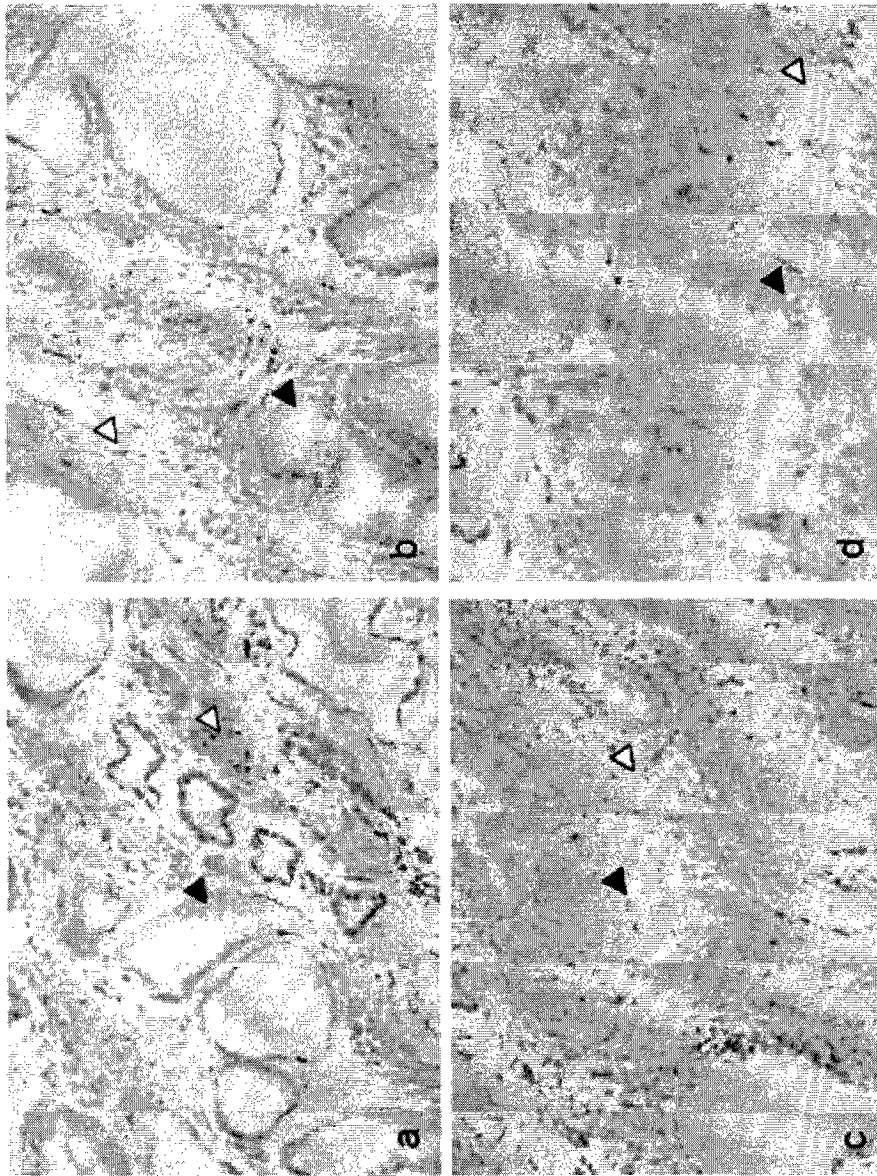


图4

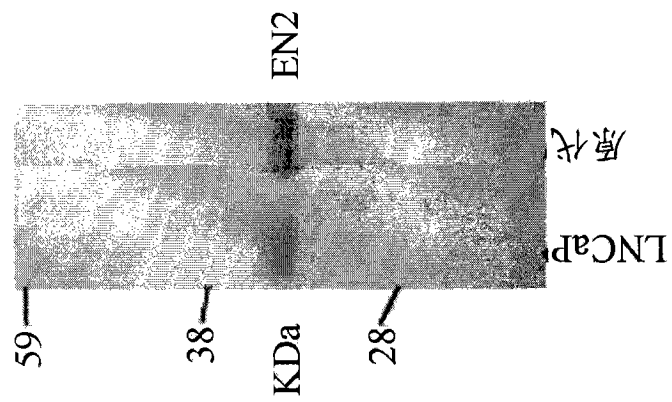


图5

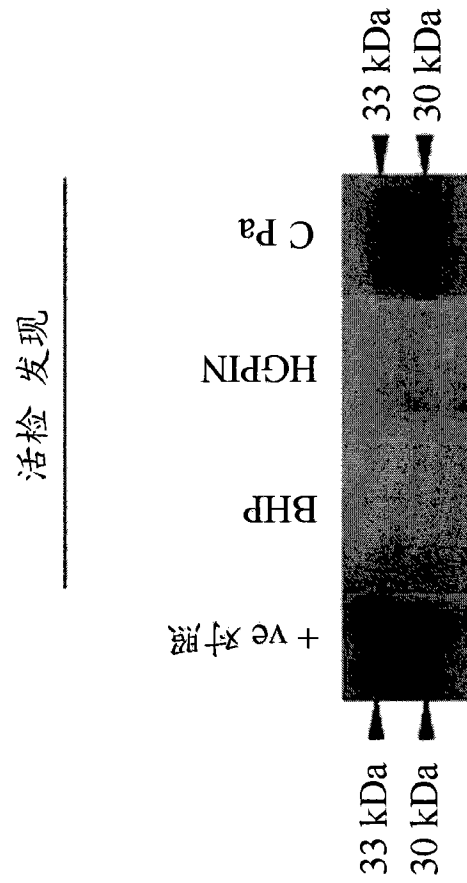


图6

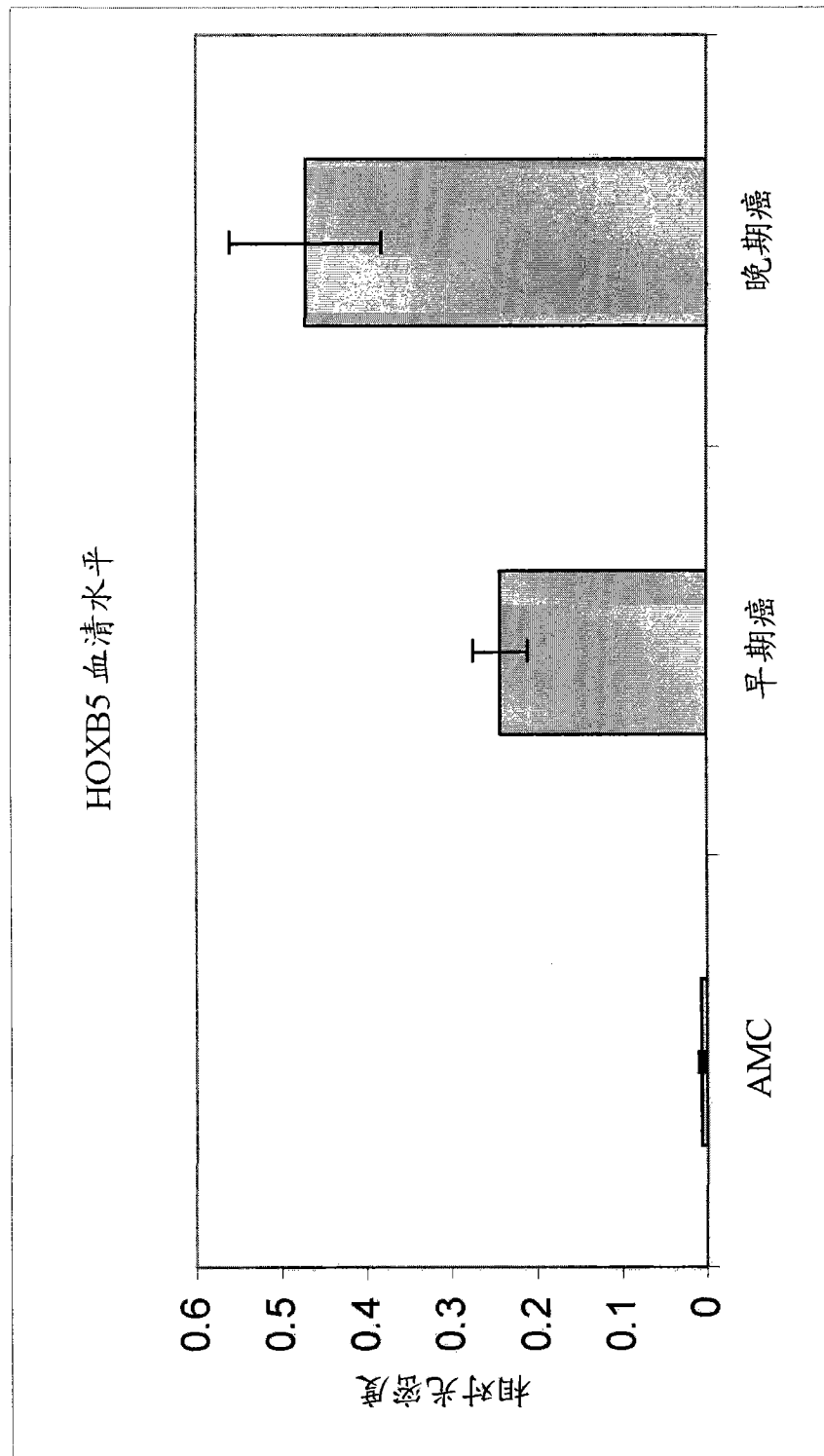


图7

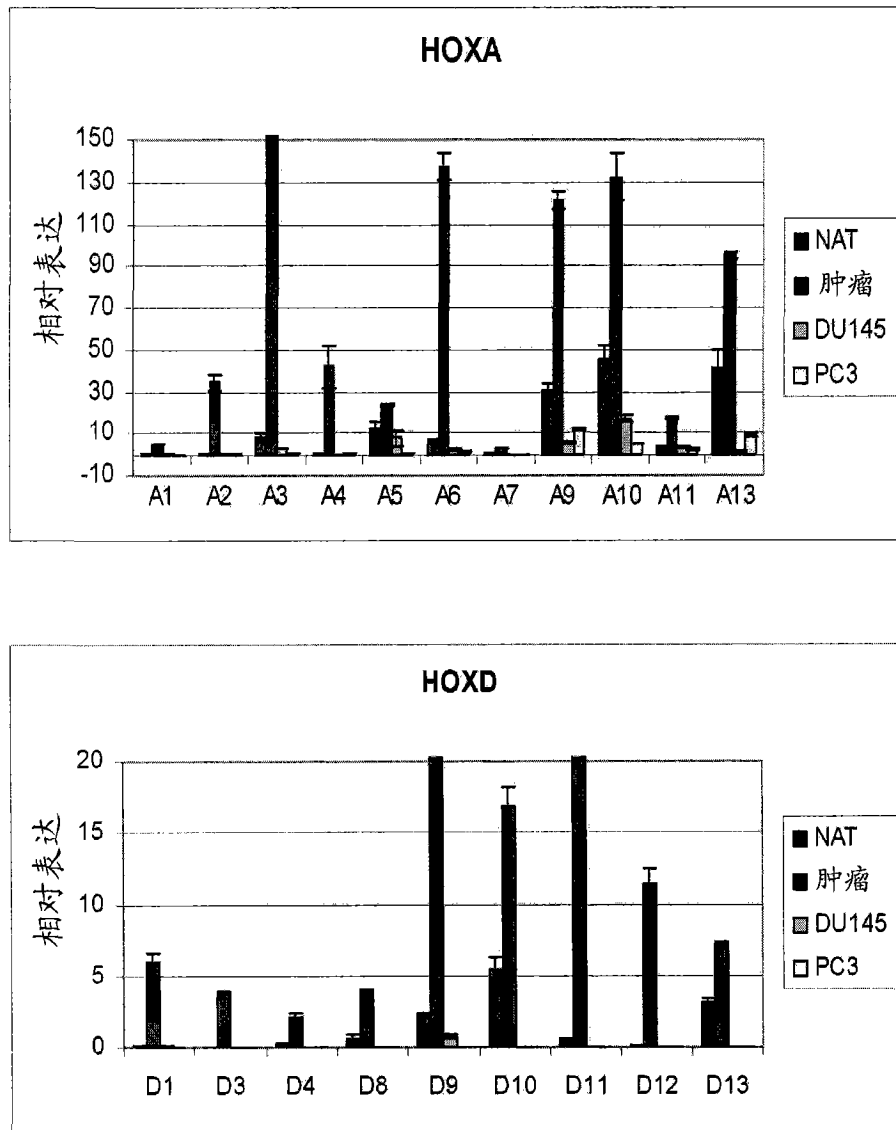


图8