



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102186994 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 14

(21) 申请号 200980141243. 4

(22) 申请日 2009. 09. 01

(30) 优先权数据

0815846. 1 2008. 09. 01 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2009/002098 2009. 09. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02010/023458 EN 2010. 03. 04

(71) 申请人 伊缪诺维亚公司

地址 瑞典隆德

(72) 发明人 C·A·K·博雷贝克 S·C·A·埃克

D·J·布伦南

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/574 (2006. 01)

权利要求书 5 页 说明书 17 页 附图 15 页

(54) 发明名称

诊断或预后上皮性卵巢癌的方法

(57) 摘要

本发明提供了选择性结合至用于成像、诊断或预后上皮性卵巢癌 (EOC) 的 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的结合部分。任选地,所述部分是抗体或其抗原结合片段。有利地,所述部分包含另外的容易检测的部分。本发明还提供了使 EOC 细胞成像的方法以及诊断或预后个体中 EOC 的方法。本发明的另外方面提供了鉴定与 EOC 相关的细胞的方法,所述方法包括分析待测试细胞样品中基因表达的模式以及将其与已知淋巴瘤细胞样品中的基因表达模式相比较。优选地,如果 Sox11 的表达相对于正常 B 细胞为上调,待测试细胞被鉴定为 EOC 细胞。优选地,如果 Sox11 的表达相对于非癌的上皮性卵巢细胞为上调,EOC 细胞被鉴定为与增加的无复发存活相关。优选地,如果与非癌的上皮性卵巢细胞相比,Sox11 的表达是相似的或下调,EOC 细胞被鉴定为与降低的无复发存活相关。

1. 一种选择性结合至 Sox11 蛋白,或结合至编码所述蛋白的核酸分子的结合部分,其用于诊断和 / 或预后上皮性卵巢癌 (EOC)。
2. 一种选择性结合至 Sox11 蛋白,或结合至编码所述蛋白的核酸分子的结合部分,其用于检测上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞。
3. 根据权利要求 1 所述的结合部分,其用于诊断上皮性卵巢癌 (EOC)。
4. 根据权利要求 1 所述的结合部分,其用于预后上皮性卵巢癌 (EOC)。
5. 根据前述权利要求任一项所述的结合部分,其中 EOC 属于选自浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞或未分化或无分类的组织学亚型。
6. 根据权利要求 5 所述的结合部分,其中 EOC 是浆液型 EOC。
7. 根据权利要求 5 所述的结合部分,其中 EOC 是粘蛋白型 EOC。
8. 根据权利要求 5 所述的结合部分,其中 EOC 是子宫内膜型 EOC。
9. 根据权利要求 5 所述的结合部分,其中 EOC 是透明细胞 EOC。
10. 根据权利要求 5 所述的结合部分,其中 EOC 是未分化的或无分类的 EOC。
11. 根据前述权利要求任一项所述的结合部分,其体内使用。
12. 根据前述权利要求任一项所述的结合部分,其体外使用。
13. 根据前述权利要求任一项所述的结合部分,其用于检测作为诊断或预后上皮性卵巢癌 (EOC) 的唯一生物标记的 Sox11 表达。
14. 根据前述权利要求任一项所述的结合部分,其用于与一种或多种另外的结合部分联合使用,所述另外的结合部分用于检测一种或多种另外的诊断或预后上皮性卵巢癌 (EOC) 的生物标记。
15. 根据权利要求 14 所述的结合部分,其用于与少于 20 种另外的结合部分,例如少于 15、10、8、6、5、4、3、2 或 1 种另外的结合部分联合使用。
16. 根据前述权利要求任一项所述的结合部分,其用于检测 Sox11 的核和 / 或细胞质的表达。
17. 根据前述权利要求任一项所述的结合部分,其中所述结合部分选择性结合至 Sox11 蛋白。
18. 根据权利要求 17 所述的结合部分,其中所述结合部分选择性结合至包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的多肽和 / 或其天然变体。
19. 根据前述权利要求任一项所述的结合部分,其中所述结合部分包含多肽或由多肽组成。
20. 根据权利要求 19 所述的结合部分,其中所述结合部分包含抗体或其抗原结合片段或变体,或由抗体或其抗原结合片段或变体组成。
21. 根据权利要求 20 所述的结合部分,其中抗体是单克隆抗体。
22. 根据权利要求 20 或 21 所述的结合部分,其中抗体或其抗原结合片段或变体选自 Fv 片段、Fab 样片段、单可变结构域或结构域抗体。
23. 根据权利要求 20 至 22 任一项所述的结合部分,其中抗体或其抗原结合片段或变体是人源化的。
24. 根据权利要求 1 至 16 任一项所述的结合部分,其中所述结合部分选择性结合至编码 Sox11 蛋白的核酸分子。

25. 根据权利要求 24 所述的结合部分,其中所述结合部分选择性结合至编码多肽的核酸分子,所述多肽包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列和 / 或其天然变体。

26. 根据权利要求 24 或 25 所述的结合部分,其中所述结合部分包含核酸分子或由核酸分子组成。

27. 根据权利要求 24 所述的结合部分,其中所述结合部分包含 DNA 分子或由 DNA 分子组成。

28. 根据权利要求 24 至 27 所述的结合部分,其中所述结合部分包含 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列片段或其互补序列或其变体,或由 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列片段或其互补序列或其变体组成。

29. 根据权利要求 26 至 28 任一项所述的结合部分,其中核酸分子的长度为 5 至 100 个核苷酸。

30. 根据权利要求 29 所述的结合部分,其中核酸分子的长度为 15 至 35 个核苷酸。

31. 根据前述权利要求任一项所述的结合部分,其中所述结合部分包含可检测的部分。

32. 根据权利要求 31 所述的结合部分,其中可检测部分包含放射性原子或由放射性原子组成。

33. 根据权利要求 32 所述的结合部分,其中放射性原子选自镅 -99m、碘 -123、碘 -125、碘 -131、钷 -111、氟 -19、碳 -13、氮 -15、氧 -17、磷 -32、硫 -35、氘、氟、铯 -137、铯 -138 或钷 -147。

34. 诊断个体中上皮性卵巢癌 (EOC) 的方法,所述方法包括:

(a) 提供来自个体的上皮性卵巢细胞样品;和

(b) 确定细胞样品中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的量,

其中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的水平是患有上皮性卵巢癌 (EOC) 的个体的指征。

35. 根据权利要求 34 所述的方法,其中高水平的 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 是患有上皮性卵巢癌 (EOC) 的个体的指征。

36. 根据权利要求 34 或 35 所述的方法,其中 EOC 属于选自浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞或未分化或无分类的组织学亚型。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中 EOC 是浆液型 EOC。

38. 根据权利要求 36 所述的方法,其中 EOC 是粘蛋白型 EOC。

39. 根据权利要求 36 所述的方法,其中 EOC 是子宫内膜型 EOC。

40. 根据权利要求 36 所述的方法,其中 EOC 是透明细胞 EOC。

41. 根据权利要求 36 所述的方法,其中 EOC 是未分化的或无分类的 EOC。

42. 一种预后个体中上皮性卵巢癌 (EOC) 的方法,所述方法包括:

(a) 提供来自个体的上皮性卵巢癌细胞的样品;和

(b) 确定细胞样品中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的量,

其中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的水平是具有增加的无复发存活 (RFS) 个体的指征。

43. 根据权利要求 42 所述的方法,其中 EOC 属于选自浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞或未分化或无分类的组织学亚型。

44. 根据权利要求 43 所述的方法,其中 EOC 是浆液型 EOC。

45. 根据权利要求 43 所述的方法,其中 EOC 是粘蛋白型 EOC。

46. 根据权利要求 43 所述的方法,其中 EOC 是子宫内膜型 EOC。
47. 根据权利要求 43 所述的方法,其中 EOC 是透明细胞 EOC。
48. 根据权利要求 43 所述的方法,其中 EOC 是未分化的或无分类的 EOC。
49. 根据权利要求 42 至 48 任一项所述的方法,其中高水平的 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 是具有增加的无复发存活 (RFS) 个体的指征。
50. 根据权利要求 42 至 48 任一项所述的方法,其中低水平的 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 是具有降低的无复发存活 (RFS) 个体的指征。
51. 一种检测个体中上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞的方法,所述方法包括:
 - (a) 提供来自个体的上皮性卵巢细胞的样品 ;和
 - (b) 确定细胞样品中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的量,其中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的水平是具有上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞的个体的指征。
52. 根据权利要求 51 所述的方法,其中高水平的 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 是细胞为上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞的指征。
53. 根据权利要求 51 至 52 所述的方法,其中 EOC 属于选自浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞或未分化或无分类的组织学亚型。
54. 根据权利要求 53 所述的方法,其中 EOC 是浆液型 EOC。
55. 根据权利要求 53 所述的方法,其中 EOC 是粘蛋白型 EOC。
56. 根据权利要求 53 所述的方法,其中 EOC 是子宫内膜型 EOC。
57. 根据权利要求 53 所述的方法,其中 EOC 是透明细胞 EOC。
58. 根据权利要求 53 所述的方法,其中 EOC 是未分化的或无分类的 EOC。
59. 根据权利要求 34 至 58 任一项所述的方法,其中所述方法在体内进行。
60. 根据权利要求 34 至 58 任一项所述的方法,其中所述方法在体外进行。
61. 根据权利要求 34 至 60 任一项所述的方法,其中将 Sox11 用作唯一的生物标记。
62. 根据权利要求 34 至 61 任一项所述的方法,其中 Sox11 与一种或多种另外的诊断或预后 EOC 的生物标记联合使用。
63. 根据权利要求 62 所述的方法,其中少于 20 种另外的生物标记,例如少于 15、10、8、6、5、4、3、2 或 1 种另外的生物标记用于本方法中。
64. 根据权利要求 34 至 63 任一项所述的方法,其中所述方法包括检测 Sox11 的核和 / 或细胞质的表达。
65. 根据权利要求 34、32 至 64 任一项所述的方法,其中待测试的细胞样品是组织样品的形式。
66. 根据权利要求 34 至 65 任一项所述的方法,其中使用根据权利要求 1 至 31 任一项所述的结合部分测定样品中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的量。
67. 根据权利要求 34 至 66 任一项所述的方法,其进一步包括将待测试细胞样品中的 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的量与对照样品中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的量进行比较。
68. 根据权利要求 67 所述的方法,其中对照样品是包含非癌的上皮性卵巢细胞或由非癌的上皮性卵巢细胞组成的阴性对照样品。
69. 根据权利要求 67 所述的方法,其中对照样品是包含上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞或由上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞组成的阳性对照样品。

70. 根据权利要求 67 所述的方法,其中上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞是高无复发存活 (RFS) 相关的 EOC 细胞。

71. 根据权利要求 67 所述的方法,其中上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞是低无复发存活 (RFS) 相关的 EOC 细胞。

72. 根据权利要求 34 至 71 任一项所述的方法,其中步骤 (b) 使用选自宏阵列筛选、微阵列筛选、纳米阵列筛选、逆转录 PCR、实时 PCR 或原位 PCR 的方法进行。

73. 一种在个体体内使上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞成像的方法,所述方法包括给予个体有效量的如权利要求 1 至 33 任一项定义的结合部分。

74. 根据权利要求 73 所述的方法,其进一步包括在个体中检测结合部分位置的步骤。

75. 一种根据权利要求 1 至 33 任一项定义的结合部分在制备用于诊断上皮性卵巢癌 (EOC) 的药物中的用途。

76. 一种根据权利要求 1 至 33 任一项定义的结合部分在制备用于预后上皮性卵巢癌 (EOC) 的药物中的用途。

77. 一种 Sox11 蛋白和 / 或编码所述蛋白的 mRNA 作为生物标记用于诊断上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞的用途。

78. 一种 Sox11 蛋白和 / 或编码所述蛋白的 mRNA 作为生物标记用于预后上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞的用途。

79. 根据权利要求 75 至 78 任一项所述的用途,其中 EOC 属于选自浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞或未分化的或无分类的组织学亚型。

80. 根据权利要求 79 所述的用途,其中 EOC 是浆液型 EOC。

81. 根据权利要求 79 所述的用途,其中 EOC 是粘蛋白型 EOC。

82. 根据权利要求 79 所述的用途,其中 EOC 是子宫内膜型 EOC。

83. 根据权利要求 79 所述的用途,其中 EOC 是透明细胞 EOC。

84. 根据权利要求 79 所述的用途,其中 EOC 是未分化的或无分类的 EOC。

85. 根据权利要求 77 至 84 任一项所述的用途,其中 Sox11 用作唯一的生物标记。

86. 根据权利要求 77 至 84 任一项所述的用途,其中 Sox11 与一种或多种另外的生物标记联合使用。

87. 根据权利要求 86 所述的用途,其中少于 20 种另外的生物标记,例如少于 15、10、8、6、5、4、3、2 或 1 种另外的生物标记用于本方法中。

88. 一种筛选在诊断和 / 或预后上皮性卵巢癌 (EOC) 中有效力的分子的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 将待测试的分子与 Sox11 蛋白和 / 或编码所述蛋白的 mRNA (或与所述蛋白或 mRNA 的片段) 接触;和

(b) 检测含有该蛋白质和 / 或 mRNA (或其片段) 和待测试分子的复合物的存在。

89. 根据权利要求 88 所述的方法,其中 EOC 属于选自浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞或未分化的或无分类的组织学组。

90. 根据权利要求 89 所述的方法,其中 EOC 是浆液型 EOC。

91. 根据权利要求 89 所述的方法,其中 EOC 是粘蛋白型 EOC。

92. 根据权利要求 89 所述的方法,其中 EOC 是子宫内膜型 EOC。

93. 根据权利要求 89 所述的方法, 其中 EOC 是透明细胞 EOC。
94. 根据权利要求 89 所述的方法, 其中 EOC 是未分化的或无分类的 EOC。
95. 一种参考说明书并基本上如本文所述的诊断或预后上皮性卵巢癌 (EOC) 的结合部分。
96. 一种参考说明书并基本上如本文所述的检测样品中上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞的结合部分。
97. 一种参考说明书并基本上如本文所述的诊断或预后个体中上皮性卵巢癌 (EOC) 的方法。
98. 一种参考说明书并基本上如本文所述的使个体体内上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞成像的方法。
99. 一种参考说明书并基本上如本文所述的结合部分在制备用于诊断或预后上皮性卵巢癌 (EOC) 的药物中的用途。
100. 一种参考说明书并基本上如本文所述的作为上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞标记的 Sox11 蛋白和 / 或编码所述蛋白的 mRNA 的用途。
101. 一种参考说明书并基本上如本文所述的筛选在诊断、预后和 / 或治疗上皮性卵巢癌 (EOC) 中具有效力的分子的方法。

诊断或预后上皮性卵巢癌的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于上皮性卵巢癌 (EOC) 的诊断、预后和成像的新试剂和其用途。

背景技术

[0002] 引言

[0003] 上皮性卵巢癌 (EOC) 是妇科恶性肿瘤引起的死亡的首要原因以及女性中第五个最常见的癌症相关死亡的原因。在 2008 年, 据估计 21650 个新的卵巢癌病例将在美国得到诊断, 15520 个将死于此疾病 (Jemal A, Siegel R, Ward E 等人 Cancer statistics, 2008. CA : a cancer journal for clinicians 2008 ; 58 : 71-96)。EOC 的存活率与发病率的不良比例与高比例的晚期才得以诊断的病例以及缺少对晚期难治性疾病的有效治疗相关。尽管有手术技术的改进和更定向治疗法如贝伐单抗 (bevacizumab) 的到来, 患有 EOC 的患者的存活率停留在 5 年为 45% (Jemal A, Siegel R, Ward E 等人 Cancer statistics, 2008. CA : a cancer journal for clinicians 2008 ; 58 : 71-96)。这样不良的预后统计学表明急需改善我们对 EOC 的分子机理的理解, 以便开发更好的预后性分析法和预测性分析法以及鉴定新的治疗靶标。

[0004] 上皮性卵巢癌包括三种主要的组织学亚型: 浆液型、粘蛋白型和子宫内膜型。浆液型 EOC 包括浆液性囊瘤、浆液性良性囊腺瘤、带有上皮细胞增殖活性和核异常而没有浸润的破坏性生长 (低潜力或临界恶性) 的浆液性囊腺瘤, 以及浆液性囊腺癌 (cystadenocarcinomas)。粘蛋白型 EOC 包括粘蛋白性囊瘤、粘蛋白性良性囊腺瘤、带有上皮细胞增殖活性和核异常而没有浸润的破坏性生长 (低潜力或临界恶性) 的粘蛋白性囊腺瘤, 以及粘蛋白性囊腺癌。子宫内膜型 EOC 包括子宫内膜性肿瘤 (与子宫内膜中的腺癌相似)、子宫内膜良性囊肿、带有上皮细胞增殖活性和核异常而没有浸润的破坏性生长 (低潜力或临界恶性) 的子宫内膜肿瘤, 以及子宫内膜腺癌。

[0005] 还存在两种另外的较不普遍的组织学亚型: 透明细胞和未分化的细胞。

[0006] 另外, EOC 可以通过“阶段”分类, 这取决于它们在卵巢外扩散有多远。因此, 阶段 I 被定义为限制在一个或两个卵巢中的卵巢癌。阶段 II 被定义为已经扩散至盆腔器官 (例如子宫、输卵管), 但没有扩散至腹部器官的卵巢癌。阶段 III 被定义为已经扩散至腹部器官或淋巴系统 (例如盆腔或腹部淋巴结, 在肝脏上, 在肠上) 的卵巢癌。最后, 阶段 IV 被定义为已经扩散至远端位点 (例如肺, 在肝脏内部, 脑, 颈部淋巴结) 的卵巢癌。

[0007] EOC 还可以根据癌细胞的外观分级。低级 (或 1 级) 意思是癌细胞看起来非常像卵巢的正常细胞; 它们通常生长缓慢且不太可能扩散。中级 (或 2 级) 意思是细胞比低级细胞看起来更异常。高级 (或 3 级) 意思是细胞看起来非常异常。它们可能生长更快且更可能扩散。

[0008] 因此, EOC 大多数其他癌一样是复杂的异质性疾病, 受多种遗传改变和表观遗传改变的影响和控制, 引起增加的攻击性表型 (Martin L 和 Schilder R. Novel approaches in advancing the treatment of epithelial ovarian cancer: the role of angiogenesis

inhibition. *Journal of clinical oncology* 2007 ;25 :2894-901;Naora H 和 Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nature reviews* 2005 ;5 :355-66)。现在公认单个肿瘤的特性和其生命过程由多种随时间而获得的体细胞突变（例如 TP53、PTEN、RAS）和主体对环境因素（例如暴露于雌激素或烟草）反应的持续演变引起（West M, Ginsburg G, Huang A 和 Nevins J. Embracing the complexity of genomic data for personalized medicine. *Genome Res* 2006 ;16 :559-66)。在某些情况下, 这些体细胞突变位于内在种系的变异之上（例如 BRCA1/2) (West M, Ginsburg G, Huang A 和 Nevins J. Embracing the complexity of genomic data for personalized medicine. *Genome Res* 2006 ;16 :559-66 ;Prat J, Ribe A 和 Gallardo A. Hereditary ovarian cancer. *Human pathology* 2005 ;36 :861-70)。从治疗的观点来看, EOC 最好地被认为是复杂相关疾病的集合, 其在肿瘤表型、疾病结果和治疗反应中被极大的天然异质性所代表。主要的挑战是必然地鉴定和完全地验证可以准确描述归于 EOC 的异质性的诊断和预后性生物标记。另外, 需要准确的预测性生物标记从而指导现行的治疗规程, 并指导新定向治疗的开发和应用。

[0009] 技术（如 DNA 微阵列、基于质谱的蛋白质组学和代谢组学）在过去的十年中促进了翻译研究, 帮助我们增加对肿瘤生成的分子和遗传基础的理解以及提供向临床肿瘤学实践增加新方法的机会。“omic 技术”的基本前提是对基因组 (DNA)、转录组 (mRNA)、蛋白质组 (蛋白质) 或代谢组 (代谢产物) 改变的全面检查可以通过向现有技术提供优异的诊断测试和治疗效率而提供对疾病的生理学和机制的深刻了解 (Brennan DJ, Kelly C, Rexhepaj E 等人 Contribution of DNA and Tissue Microarray Technology to the Identification and Validation of Biomarkers and Personalised Medicine in Breast Cancer. *Cancer Genomics and Proteomics* 2007 ;4 :3-16)。特别是将 DNA 微阵列技术应用于癌生物学已经引起对肿瘤内基础病理生理学通路和相互作用的复杂性的不断增长的理解 (Duffy MJ, Kelly ZD, Culhane AC, O'Brien S 和 Gallagher WM. DNA microarray-based gene expression profiling in cancer: aiding cancer diagnosis, assessing prognosis and predicting response to therapy. *Current Pharmacogenomics* 2005 ;3 :289-304; Brennan DJ, O'Brien SL, Fagan A 等人 Application of DNA microarray technology in determining breast cancer prognosis and therapeutic response. *Expert Opin Biol Ther* 2005 ;5 :1069-83)。转录组学筛选加速了对基因型 - 表型相互关系的研究, 其共同的目的是阐明正常组织和疾病状态（如癌）中基因的功能性分类学 (Brennan D, O'Brien S, Fagan A 等人 Application of DNA microarray technology in determining breast cancer prognosis and therapeutic response. *Expert Opin Biol Ther* 2005 ;5 :1069-83)。

[0010] 但是, 仍然有对用于诊断和预后 EOC 的改进试剂和方法的需求。

发明内容

[0011] 发明简述

[0012] 本发明的第一个方面提供了能够选择性结合至 Sox11 蛋白的结合部分, 或能够选择性结合至编码所述蛋白质的核酸分子的结合部分, 其用于诊断或预后上皮性卵巢癌

(EOC)。

[0013] 应该理解的是本发明还提供能够选择性结合至 Sox11 蛋白或编码所述蛋白质的核酸分子的结合部分在制备用于上皮性卵巢癌 (EOC) 的诊断或预后性试剂中的用途。

[0014] 我们定义“Sox11 蛋白”包括人 Sox11 蛋白的氨基酸序列,如本文图 4 中所示,以及其天然存在的同源物。

[0015] 因此,我们还包括通过数据库登录号 BAA88122、AAH25789、AAB08518、AAH25789 和 P35716 鉴定的 Sox11 蛋白。

[0016] 本发明人使用免疫组织化学分析惊讶地将 Sox11 鉴定为用于 EOC 的新诊断 / 预后性抗原。这不仅是显示 Sox11 在 EOC 细胞中过表达的首次报道,还是 Sox11 在高风险 EOC 群中相对于低风险 EOC 群中的差异性表达的首次报道。因此,Sox11 提供了用于诊断 EOC 患者以及帮助准确诊断和 / 或预后这一攻击性恶性肿瘤的有价值的标记。

[0017] 我们定义“诊断”包括鉴定个体可能患有的癌的存在和 / 或类型的行为或方法。因此,在一个具体实施方案中,诊断包括将特定的癌类型即 EOC 与一种或多种其他的癌区分开。在另外的具体实施方案中,本发明的结合部分用于基于总的存活率和 / 或癌特异性存活率将 EOC 患者分成临床上相关的组。

[0018] 我们定义“预后”包括预测癌的可能病程和结果的行为或方法,例如确定存活可能性和 / 或无复发存活 (RFS) 可能性。

[0019] “结合部分”意思是能够结合至 Sox11 蛋白或编码所述蛋白质的 mRNA 的分子或实体。

[0020] 本领域技术人员将理解,本发明的结合部分可以用于诊断或预后任何组织学亚型的 EOC (例如浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞、未分化的或无分类的)。

[0021] 在一个具体实施方案中,结合部分用于诊断或预后属于特定组织学亚型的 EOC。因此,EOC 可以属于选自浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞和未分化或无分类的组织学亚型。

[0022] 同样,结合部分可以用于诊断或预后与特异性级别 (例如高级) 的细胞相关的 EOC。

[0023] 还应理解的是本发明的结合部分可以用于体内或体外。

[0024] 在一个具体实施方案中,本发明的结合部分用于作为上皮性卵巢癌 (EOC) 唯一生物标记的 Sox11 表达的检测。例如,Sox11 表达可以作为用于将 EOC 与一种或多种其他癌区分开的唯一生物标记。

[0025] 或者,本发明的结合部分可以与一种或多种另外的结合部分联合使用,所述另外的结合部分用于检测一种或多种另外的用于上皮性卵巢癌 (EOC) 的生物标记。因此,结合部分可以与少于 20 个另外的结合部分,例如少于 15、10、8、6、5、4、3、2 或 1 个另外的结合部分联合使用。

[0026] 在一个特定的具体实施方案中,本发明的结合部分用于检测 Sox11 的核表达和 / 或细胞质表达。

[0027] 我们定义“选择性结合”包括相对于另外的多肽或核酸更强地结合至 Sox11 的结合部分;优选所述结合为强至少 10 倍,优选强至少 50 倍和甚至更优选强至少 100 倍。优选结合部分只结合至 Sox11 多肽或核酸。

[0028] 本文使用的术语“多肽”意思是多种氨基酸通过肽键连接在一起。术语“肽”可以与术语“多肽”交换使用,但是肽可以由两种或两种以上的多肽组成。

[0029] 本文使用的术语“氨基酸”包括标准的 20 个遗传编码的氨基酸和其相应的“D”形式立体异构体(与天然“L”形式相比)、 ω -氨基酸,其它天然存在的氨基酸、非常规氨基酸(例如 α , α -二取代的氨基酸、N-烷基氨基酸等)和化学衍生的氨基酸。

[0030] 当一个氨基酸被特异性列举时,如“丙氨酸”或“Ala”或“A”,该术语是指 L-丙氨酸或 D-丙氨酸,除非另外明确地说明。其他非常规氨基酸也可以是本发明多肽的适合成分,只要所需功能性质被多肽保留。对于所显示的肽,每个编码的氨基酸残基在适当的情况下由单个字母的命名所代表,对应于常规氨基酸的俗名。

[0031] 本发明的基于核酸的结合部分优选是 DNA,但还可以是 RNA 或人工核酸如 PNA。

[0032] 本发明的第二个方面提供了能够选择性结合至 Sox11 蛋白或编码所述蛋白质的核酸分子的结合部分,其用于检测样品中的上皮性卵巢癌(EOC)细胞。

[0033] 在一个具体实施方案中,结合部分用于检测属于特定组织学亚型(例如浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞和未分化或无分类的)的 EOC。

[0034] 同样,结合部分可以用于检测与特定级别(例如高级)的细胞相关的 EOC。

[0035] 本发明的一个具体实施方案提供了根据第一方面或第二方面的结合部分,其能够选择性结合至 Sox11 蛋白。优选地,Sox11 蛋白是人蛋白质。

[0036] 通常,结合部分能够选择性结合至含有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列(见图 4)的多肽和/或其天然变体。

[0037] 我们定义“天然变体”包括天然发现的 Sox11 蛋白,例如等位基因变体。

[0038] 多肽的变体包括含有与已知氨基酸序列具有至少 60%同一性的序列,优选与所述序列具有至少 70%或 80%或 85%或 90%的同一性,且更优选与所述 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 95%、96%、97%、98%或 99%的同一性。

[0039] 百分比同一性可以通过例如 Expasy 工具站点(http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)上的 LALIGN 程序(Huang 和 Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357),使用总体比对选择,得分矩阵 BLOSUM62,开口空隙罚分 -14,延伸空隙罚分 -4 作为参数而确定。或者,两种多肽之间的百分比序列同一性可以使用合适的计算机程序,例如威斯康星大学的遗传计算组的 GAP 程序确定,且应理解的是百分比同一性的计算是关于序列被优化比对的多肽。

[0040] 优选结合部分包含多肽或由多肽组成。

[0041] 多肽结合部分可以通过筛选鉴定。用于鉴定肽或其他选择性结合靶蛋白质或多肽的分子的合适的方法或筛选可以包括将靶蛋白质或多肽与测试肽或其他分子在结合可以发生的条件下接触,然后测定测试分子或肽是否结合靶蛋白质或肽。检测两个部分之间结合的方法在生物化学领域中是熟知的。优选地,已知的噬菌体展示技术被用于鉴定适于用作结合部分的肽或其他配体分子。另外的方法包括酵母双杂交系统。

[0042] 更优选地,结合部分包含抗体或抗原结合片段或其变体或由抗体或抗原结合片段或其变体组成。

[0043] 我们定义“抗体”包括基本上完整的抗体分子以及嵌合抗体、人源化抗体、人抗体(其中至少一个氨基酸相对于天然存在的人抗体是突变的)、单链抗体、双特异性抗体、抗

体重链、抗体轻链、抗体重链和 / 或轻链的同二聚体和异二聚体, 以及其抗原结合片段和衍生物。

[0044] “抗原结合片段”意思是能够结合至 Sox11 蛋白的抗体的功能性片段。

[0045] 优选地, 抗原结合片段选自 Fv 片段 (例如单链 Fv 和二硫键合的 Fv)、Fab 样片段 (例如 Fab 片段、Fab' 片段和 F(ab)₂ 片段)、单可变结构域 (例如 V_H 和 V_L 结构域) 和结构域抗体 (dAb, 包括单和双的格式 [即 dAb- 连接子 -dAb])。

[0046] 使用抗体片段而不是整个抗体有多个优点。片段的较小尺寸可以引起改善的药理学性质, 如对固体组织更好的穿透性。另外, 抗原结合片段如 Fab、Fv、ScFv 和 dAb 抗体片段可以在大肠杆菌 (E. coli) 中表达并从大肠杆菌中分泌, 因此允许促进大量所述片段的产生。

[0047] 还包括在本发明范围内的是抗体和其抗原结合片段的修饰版本, 例如通过共价连接聚乙二醇或其它适当的聚合物进行修饰。

[0048] 产生抗体和抗体片段的方法是本领域中熟知的。例如, 抗体可以通过以下几种方法中的任一种产生: 所述方法应用了抗体分子体内产生的诱导、免疫球蛋白库的筛选 (Orlandi. 等人 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :3833-3837 ;Winter 等人, 1991, Nature 349 :293-299) 或通过培养物中细胞系产生单克隆抗体分子。这些包括但不限于杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术和 EB 病毒 (EBV) 杂交瘤技术 (Kohler 等人 1975. Nature 256 :4950497 ;Kozbor 等人 1985. J. Immunol. Methods 81 :31-42 ;Cote 等人 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 :2026-2030 ;Cole 等人 1984. Mol. Cell. Biol. 62 :109-120)。

[0049] 所选抗原的合适的单克隆抗体可以通过已知的技术制备, 例如那些在 “Monoclonal Antibodies :A manual of techniques”, H Zola (CRC Press, 1988) 和 “Monoclonal Hybridoma Antibodies :Techniques and Applications”, J G R Hurrell (CRC Press, 1982) 中公开的技术。

[0050] 抗体片段可以使用本领域熟知的方法获得 (见例如 Harlow & Lane, 1988, “Antibodies :A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。例如, 根据本发明的抗体片段可以通过蛋白水解抗体或通过在大肠杆菌或哺乳动物细胞 (例如中国仓鼠卵巢细胞培养物或其它蛋白质表达系统) 中表达编码片段的 DNA 而制备。或者, 抗体片段可以通过常规方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化整个抗体而获得。

[0051] 本领域技术人员将理解对于人的治疗或诊断而言, 人源化抗体是优选使用的。非人的 (例如鼠类) 抗体的人源化形式是遗传工程化的嵌合抗体或优选具有源自非人抗体的最小部分的抗体片段。人源化抗体包括这样的抗体: 其中人抗体 (受体抗体) 的互补决定区被来自非人物种 (供体抗体) 如小鼠、大鼠、兔的具有所需功能性的互补决定区的残基所替代。在一些情况下, 人抗体的 Fv 骨架残基被相应的非人残基所替代。人源化抗体还可以包含在受体抗体中或在引进的互补决定区或骨架序列中都找不到的残基。通常, 人源化抗体包含基本上所有的至少一个和通常两个可变结构域, 其中所有的或基本上所有的互补决定区对应于非人抗体的那些互补决定区, 以及所有的或基本上所有的骨架区对应于相关人共有序列的那些骨架区。人源化抗体还最佳地包括至少一部分抗体恒定区, 如 Fc 区, 其通常源自人抗体 (见例如 Jones 等人 1986. Nature 321 :522-525 ;Riechmann 等人 1988, Nature 332 :323-329 ;Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2 :593-596)。

[0052] 人源化非人抗体的方法是本领域中熟知的。通常,人源化抗体具有一个或几个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人的氨基酸残基(通常被称为引入的残基)通常取自引入的可变结构域。人源化可以通过用相应的啮齿动物互补决定区置换人互补决定区而基本上如所述见例如(Jones 等人 1986, Nature 321:522-525;Reichmann 等人 1988, Nature 332:323-327;Verhoeyen 等人,1988, Science239:1534-15361;US 4,816,567)进行。因此,这样的人源化抗体是嵌合抗体,其中大幅小于完整人可变结构域的结构域被来自非人物种的相应序列置换。实际上,人源化抗体可以是典型的人抗体,其中一些互补决定区残基和可能地一些骨架残基被来自啮齿动物抗体中相似位点的残基置换。

[0053] 人源化抗体还可以使用本领域中各种已知的技术得以鉴定,包括噬菌体展示文库(见例如 Hoogenboom 和 Winter,1991, J. Mol. Biol. 227:381;Marks 等人 1991, J. Mol. Biol. 222:581;Cole 等人 1985, In:Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77;Boerner 等人 1991, J. Immunol. 147:86-95)。

[0054] 一旦获得合适的抗体,可以对其测试活性,例如通过 ELISA 测试。

[0055] 本发明的另一个具体实施方案提供了能够选择性结合至编码 Sox11 蛋白的核酸分子的结合部分。

[0056] 优选地,结合部分能够选择性结合至编码多肽的核酸分子,所述多肽包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列和/或其天然变体。

[0057] 更优选地,结合部分包含核酸分子或由核酸分子组成。甚至更优选地,结合部分包含 DNA 分子或由 DNA 分子组成。有利地,结合部分包含 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的片段(见图 5)或其片段或变体的互补序列,或由 SEQ ID NO:2 的核苷酸序列的片段(见图 5)或其片段或变体的互补序列组成。方便地,所述核酸分子的长度为 5 至 100 个核苷酸。更方便地,所述核酸分子的长度为 15 至 35 个核苷酸。

[0058] 优选地,结合部分包含可检测部分。

[0059] 我们定义“可检测部分”的意思是这样的部分:将本发明的化合物给予至患者后,当其定位于靶位点时,可以通常非侵入性地在身体和定位的靶位点的外部被检测到。因此,本发明该具体实施方案的化合物可用于成像和诊断。

[0060] 通常,可检测部分是用于成像的放射性原子或包含用于成像的放射性原子。合适的放射性原子包括用于闪烁法研究的 ^{99m}Tc 和 ^{123}I 。其它容易检测的部分包括例如用于磁共振成像(MRI)的自旋标记如 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{19}F 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{17}O 、钆、锰或铁。显然,本发明的化合物必须具有足够的适当原子同位素,以便分子容易地得以检测。

[0061] 放射性或其它的标记可以以已知的方式整合进入本发明的化合物中。例如,如果结合部分是多肽,其可以生物合成或可以使用合适的包括例如用氟 19 代替氢的氨基酸前体通过化学氨基酸合成进行合成。标记如 ^{99m}Tc 、 ^{123}I 、 ^{186}Rh 、 ^{188}Rh 和 ^{111}In 可以例如通过结合部分中的半胱氨酸残基连接。钇-90 可以通过赖氨酸残基连接。IODOGEN 方法(Fraker 等人 1978, Biochem. Biophys. Res. Comm. 80:49-57)可以用于整合 ^{123}I 。参考文献(“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”, J-F Chatal, CRC Press, 1989)详细描述了其它方法。

[0062] 因此,在本发明的另一个具体实施方案中,放射性原子选自钇-99m、碘-123、碘-125、碘-131、钬-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、磷-32、硫-35、氘、氚、铯-137、

铈 -188 或钇 -90。

[0063] 本发明的第三方面提供了诊断个体中上皮性卵巢癌 (EOC) 的方法,所述方法包括:

[0064] (a) 提供来自个体的上皮性卵巢细胞样品 ;和

[0065] (b) 确定细胞样品中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的量。

[0066] 其中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的水平是具有上皮性卵巢癌 (EOC) 个体的指征。

[0067] 特别地,高水平的 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 是具有上皮性卵巢癌 (EOC) 个体的指征。

[0068] 在一个具体实施方案中,所述方法用于诊断属于特异性组织学亚型 (例如浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞和未分化的或无分类的) 的 EOC。

[0069] 同样,所述方法可以用于诊断与特定级别 (例如高级) 细胞相关的 EOC。

[0070] 在一个具体实施方案中,所述方法进一步包括在上皮性卵巢癌细胞上对 EOC 进行一个或多个另外的诊断测试,从而证实所述诊断。

[0071] 本发明的第四个方面提供了在个体中预后上皮性卵巢癌 (EOC) 的方法,所述方法包括:

[0072] (a) 提供来自个体上皮性卵巢癌细胞的样品 ;和

[0073] (b) 确定细胞样品中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的量。

[0074] 其中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的水平是个体无复发存活机会的指征。

[0075] 在一个具体实施方案中,所述方法用于预后属于特定组织学亚型 (例如浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞和未分化的或无分类的) 的 EOC。

[0076] 同样,所述方法可以用于预后与特定级别 (例如高级) 细胞相关的 EOC。

[0077] “无复发存活机会”的意思是个体存活一段给定时间如 1 年、2 年、3 年、5 年、10 年或更长的概率。

[0078] 在一个具体实施方案中,高水平的 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 是具有增加的无复发存活 (RFS) 个体的指征。

[0079] “增加的无复发存活”的意思是当与上皮性卵巢癌 (EOC) 患者的平均人群相比时,无复发存活的概率较高,例如所述概率可以增加至少 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 或 0.5 或更多。

[0080] 在另外的具体实施方案中,低水平的 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 是具有降低的无复发存活 (RFS) 个体的指征。

[0081] “降低的无复发存活”的意思是当与上皮性卵巢癌 (EOC) 患者的平均人群相比时,无复发存活的概率较低,例如所述概率可以降低至少 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4 或 0.5 或更多。

[0082] 本发明的第五方面提供了检测个体中上皮性卵巢癌 (EOC) 的方法,所述方法包括:

[0083] (a) 提供来自个体的细胞样品 ;和

[0084] (b) 确定细胞样品中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的量。

[0085] 其中 Sox11 蛋白和 / 或 mRNA 的水平是具有上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞的个体的指征。

[0086] 在一个具体实施方案中,所述方法用于检测属于特定组织学亚型 (例如浆液型、

粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞和未分化的或无分类的)的 EOC 的细胞。

[0087] 同样,所述方法可以用于检测与特定级别(例如高级)细胞相关的 EOC 的细胞。

[0088] 特别地,高水平的 Sox11 蛋白和/或 mRNA 是具有上皮性卵巢癌(EOC)个体的指征。

[0089] “高水平的 Sox11 蛋白和/或 mRNA”的意思是与非癌的(例如健康的)上皮性卵巢细胞相比,Sox11 蛋白和/或 mRNA 的量高至少 10%,例如高 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、1500%、2000%、3000%、4000%、5000%、10000%或更多。

[0090] “低水平的 Sox11 蛋白和/或 mRNA”的意思是 Sox11 蛋白和/或 mRNA 的量与非癌的上皮性卵巢细胞中的量无统计学上的不同。

[0091] 技术人员将理解,本发明的方法可以在体内或体外进行。

[0092] 在一个具体实施方案中,所述方法包括检测作为诊断或预后上皮性卵巢癌(EOC)的唯一生物标记的 Sox11 的表达(如上所述)。

[0093] 或者,本发明的结合部分可以与一种或多种另外的结合部分联合使用,所述另外的结合部分用于检测一种或多种另外的用于诊断或预后 EOC 的生物标记。因此,所述结合部分可以与少于 20 种另外的结合部分,例如少于 15、10、8、6、5、4、3、2 或 1 种另外的结合部分联合使用。

[0094] 在一个具体实施方案中,所述方法包括检测 Sox11 的核和/或细胞质的表达。

[0095] 优选地,待测试的细胞样品是组织样品的形式。

[0096] 方便地,样品中 Sox11 蛋白和/或 mRNA 的量用根据本发明第一方面或第二方面的结合部分确定。

[0097] 本发明方法的另外的具体实施方案包括用对照样品中的 Sox11 蛋白和/或 mRNA 的量比较待测试细胞样品中 Sox11 蛋白和/或 mRNA 的量。

[0098] 有利地,对照样品是包含非癌的上皮性卵巢细胞的阴性对照样品或由非癌的上皮性卵巢细胞组成的阴性对照样品。

[0099] 有利地,或另外,对照样品是包含上皮性卵巢癌细胞的阳性对照样品或由上皮性卵巢癌细胞组成的阳性对照样品。所述卵巢上皮细胞可以是与高无复发存活(RFS)相关的 EOC 细胞或与低无复发存活(RFS)相关的 EOC 细胞。

[0100] 通常,本发明的方法的步骤(b)使用选自宏阵列、微阵列(包括组织微阵列)、纳米阵列、逆转录 PCR、实时 PCR 或原位 PCR 的方法进行。

[0101] 本发明的第三或第四方面的另外具体实施方案包括确定待测试细胞样品中另外的 EOC 生物标记蛋白质和/或 mRNA 的水平,例如 p53、雌激素受体和/或孕酮受体。

[0102] 本发明的第六方面提供了使个体体内上皮性卵巢癌(EOC)细胞成像的方法,所述方法包括给予个体有效量的根据本发明第一或第二方面的结合部分。

[0103] 在一个具体实施方案中,所述方法用于使属于特定组织学亚型(例如浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞和未分化的或无分类的)EOC 细胞成像。

[0104] 同样,所述方法可以用于使与特定级别(例如高级)细胞相关的 EOC 细胞成像。

[0105] 本文使用的术语“有效量”是指为给定的给药方案提供足够可检测信号的量。这是经计算与需要的添加剂和稀释剂(即载体或给药载体)联合而产生所需信号强度的活性物质的预定量。如本领域技术人员理解的,化合物的量可以根据其特异活性变化。合适的

剂量可以含有经计算与所需稀释剂联合而产生所需信号强度的活性组合物的预定量。在制备本发明组合物的方法和用途中,提供了活性成分的有效量。一般技术的医疗或兽医技术人员可以根据患者的特征,如年龄、体重、性别、状况、合并症、其它本领域熟知的疾病等确定有效量。

[0106] 通常,本发明的第六方面包括检测个体中结合部分位置的步骤。优选地,Sox11 蛋白和 / 或编码其的 mRNA 用作上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞的标记。

[0107] 本发明的第七方面提供了上述定义的结合部分在制备用于诊断或预后上皮性卵巢癌 (EOC) 的药物中的用途。

[0108] 作为第八方面,本发明另外提供作为上皮性卵巢癌 (EOC) 细胞生物标记的 Sox11 蛋白和 / 或编码其的 mRNA 的用途。

[0109] 在一个具体实施方案中,Sox11 蛋白和 / 或编码其的 mRNA 用作属于特定组织学亚型 (例如浆液型、粘蛋白型、子宫内膜型、透明细胞和未分化的或无分类的) EOC 的生物标记。

[0110] 同样,Sox11 蛋白和 / 或编码其的 mRNA 可以用作属于特定级别 (例如高级) 的 EOC 的生物标记。

[0111] 应理解 Sox11 可以用作上皮性卵巢癌 (EOC) 的唯一生物标记。

[0112] 或者,Sox11 可以与一种或多种另外的生物标记联合使用。但是优选地,Sox11 与少于 20 种另外的用于方法中的生物标记,例如少于 15、10、8、6、5、4、3、2 或 1 种另外的生物标记联合使用。

[0113] 本发明第九方面提供了筛选在诊断和 / 或预后上皮性卵巢癌 (EOC) 中有效力的分子的方法,所述方法包括以下步骤:

[0114] (a) 将待测试的分子与 Sox11 蛋白和 / 或编码其的 mRNA (或与所述蛋白质或 mRNA 的片段) 接触;和

[0115] (b) 检测含有蛋白质和 / 或 mRNA (或其片段) 和待测试的分子的复合物的存在。

[0116] 在一个具体实施方案中,方法用于筛选在诊断和 / 或预后属于特定组织学亚型 (例如浆液型、粘蛋白性、子宫内膜型) 的 EOC 中有效力的分子。

[0117] 同样,所述方法可以用于筛选在诊断和 / 或预后与特定级别 (例如高级) 细胞相关的 EOC 中有效力的分子。

[0118] 检测和 / 或测定蛋白质和 / 或核酸的浓度的方法对本领域技术人员是熟知的,见例如 Sambrook 和 Russell (上述)。

[0119] 用于检测和 / 或测定蛋白质的优选方法包括 Western 印迹、North-Western 印迹、免疫吸附测定法 (ELISA)、抗体微阵列、组织微阵列 (TMA)、免疫沉淀、原位杂交和其他免疫组织化学技术、放射免疫测定法 (RIA)、免疫放射测定法 (IRMA) 和免疫酶测定法 (IEMA),包括使用单克隆和 / 或多克隆抗体的三明治测定法。举例性的三明治测定法由美国专利号 4,376,110 和 4,486,530 中 David 等人所述,据此通过参考并入。载玻片上的细胞抗体染色可以用于细胞学实验室诊断测试中熟知的方法中,如本领域技术人员熟知的。

[0120] 通常,ELISA 包括使用产生有色反应产物的酶 (通常在固相测定法中)。酶如辣根过氧化物酶和磷酸酶已经被广泛应用。放大磷酸酶反应的方法是使用作为底物的 NADP 从而产生现在作为第二酶系统的辅酶的 NAD。来自大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的焦磷酸酶

提供良好的偶联,因为所述酶不在组织中存在,是稳定的,且产生好的反应颜色。也可以使用基于酶的化学发光系统,如荧光素酶。

[0121] 经常使用与维生素生物素的偶联,因为其可以容易地通过其与酶连接的卵白素或抗生物素蛋白链菌素(其以高特异性和亲和力结合卵白素或抗生物素蛋白链菌素)的反应得以检测。

[0122] 检测和/或测定核酸(例如 mRNA)的优选方法包括 southern 印迹、northern 印迹、聚合酶链式反应(PCR)、逆转录酶 PCR(RT-PCR)、定量实时 PCR(qRT-PCR)、纳米阵列、宏阵列、放射自显影和原位杂交。

[0123] 在典型的具体实施方案中,上皮性卵巢癌(EOC)细胞的存在通过检测细胞核和/或细胞质中 Sox11 蛋白和/或核酸得到检测。优选地,如上述,通过例如原位杂交分析中的核亮染,淋巴瘤细胞的核/细胞质以相对高的量表达 Sox11 蛋白和/或核酸。

附图说明

[0124] 优选地,现在将参考下列附图描述具体表现本发明某些方面的非限制性例子:

[0125] 图 1: Sox11 蛋白在卵巢癌中的表达。

[0126] Sox11 的免疫组织化学染色显示,只有细胞质表达(A)和细胞质和核的表达(B)。去卷积算法的相应批注图像显示蓝色的基质、黄色和橙色的细胞质染色和红色的核表达。

[0127] 图 2. Sox11 蛋白在卵巢癌中的表达和存活。

[0128] 基于条形图, Sox11 的表达被分类为低、中和高(A)。基于三个 Sox11 组 RFS 的 Kaplan Meier 评估(B)。基于高和中等水平的 Sox11 与低水平 Sox11 的较 RFS 的 Kaplan Meier 评估(C)。

[0129] 图 3. 人类 Sox11 蛋白的氨基酸序列。

[0130] 图 4. 人类 SOX11 mRNA 的核酸序列。

[0131] 图 5. 子宫内膜型卵巢癌中的总存活率(25 年)

[0132] 比较了带有多于或少于 10% Sox11 阳性肿瘤细胞的患者的 25 年总存活率。当患者被检查过后(由于死亡以外的其他原因从研究中被除去),在线上用打钩符号指示。

[0133] 图 6. 子宫内膜型卵巢癌中的总存活率(5 年)

[0134] 比较了带有多于或少于 10% Sox11 阳性肿瘤细胞的患者的 5 年总存活率。当患者被检查过后(由于死亡以外的其他原因从研究中被除去),在线上用打钩符号指示。

[0135] 图 7. 子宫内膜型卵巢癌中癌特异性存活率(5 年)

[0136] 比较了带有多于或少于 10% Sox11 阳性肿瘤细胞的患者的 5 年癌特异性存活率。当患者被检查过后(由于死亡以外的其他原因从研究中被除去),在线上用打钩符号指示。

[0137] 图 8. 高级 EOC 的总存活率(25 年)

[0138] 比较了带有多于或少于 10% Sox11 阳性肿瘤细胞的高级患者的 25 年总存活率。当患者被检查过后(由于死亡以外的其他原因从研究中被除去),在线上用打钩符号指示。

[0139] 图 9. 高级 EOC 的癌特异性(25 年)存活率

[0140] 比较了带有多于或少于 10% Sox11 阳性肿瘤细胞的高级患者的 25 年癌特异性存活率。当患者被检查过后(由于死亡以外的其他原因从研究中被除去),在线上用打钩符号指示。

具体实施方式

[0141] 实施例 A

[0142] 引言

[0143] 转录因子 Sox11 是 Sox 基因家族的成员, 已经被定位在染色体 2p25.3 上 (Azuma T, Ao S, Saito Y 等人 Human SOX11, an upregulated gene during the neural differentiation, has a long 3' untranslated region. DNA research 1999 ;6 : 357-60)。Sox 蛋白被鉴定为含有 DNA 结合高迁移率组 (HMG) 结构域的蛋白质, 所述结构域具有与雄性性别决定基因 Sry 的 HMG 结构域的强氨基酸同源性 (通常 > 50 %) (Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. Nucleic acids research 1999 ;27 :1409-20)。20 个以上的直系同源 Sox 基因已经在人和小鼠基因组中得到鉴定, 根据 HMG 结构域内和外的同源性程度将家族成员分为 8 个亚群 (Schepers GE, Teasdale RD 和 Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. Developmental cell 2002 ;3 :167-70)。Sox 蛋白通过结合至 DNA 的小沟并诱导 DNA 的急剧弯曲使得它们在转录增强子复合物的组装中起到关键的建筑作用而作为转录因子发挥作用 (Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H 等人 The three SoxC proteins Sox4, Sox11 and Sox12 exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. Nucleic acids research 2008 ;36 :3101-17; van de Wetering M 和 Clevers H. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. The EMBO journal 1992 ;11 :3039-44)。除了蛋白质-DNA 的相互作用, Sox 蛋白还与各种其他的转录因子相互作用从而增加其效力和作用的特异性 (Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H 等人 The three SoxC proteins Sox4, Sox11 and Sox12 exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. Nucleic acids research 2008 ;36 :3101-17)。

[0144] Sox11 与 Sox4 和 Sox12 一起属于 C 亚群 (Schepers GE, Teasdale RD 和 Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. Developmental cell 2002 ;3 :167-70), 所有三种蛋白质在 C 末端转录激活结构域和 HMG 结构域中都显示高程度的同源性 (Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H 等人 The three SoxC proteins Sox4, Sox11 and Sox12 exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. Nucleic acids research 2008 ;36 :3101-17; Jay P, Goze C, Marsollier C 等人 The human SOX11 gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression. Genomics 1995 ;29 :541-5)。Sox11 和 Sox4 在心脏、神经和其它主要胚胎过程中起主要作用, 同时对 Sox12 知道得很少 (Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H 等人 The three SoxC proteins Sox4, Sox11 and Sox12 exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. Nucleic acids research 2008 ;36 :3101-17)。

[0145] 近来, 我们证明核 Sox11 在外套细胞淋巴瘤 (MCL) 中被特异性上调, 且将 MCL 与其他 B 细胞淋巴瘤区分开 (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K 和 Borrebaeck

CA. Nuclear expression of the non B cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008 ;111 :800-5)。Sox4 是 B 细胞谱系和 T 细胞谱系的淋巴细胞中重要的转录因子 (Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. Nucleic acids research 1999 ;27 :1409-20 ;van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K 和 Clevers H. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. The EMBO journal 1993 ;12 :3847-54) 且对 B 淋巴细胞生成是决定性的 (Smith E 和 Sigvardsson M. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. Journal of leukocyte biology 2004 ;75 :973-81), 同时 Sox11 没有已知的淋巴细胞生成功能且不在 B 细胞中表达 (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K 和 Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008 ;111 :800-5)。Sox4 和 Sox11 都在成神经管细胞瘤中表达 (Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI 和 Scotting PJ. Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. Journal of neuro-oncology 2002 ;57 :201-14), Sox11 还在恶性神经胶质瘤中过表达 (Weigle B, Ebner R, Temme A 等人 Highly specific overexpression of the transcription factor SOX11 in human malignant gliomas. Oncology reports 2005 ;13 :139-44)。另外, Sox4 在膀胱癌中表达, 具有与改善患者结果相关的增加水平的表达 (Aaboe M, Birkenkamp-Demtroder K, Wiuf C 等人 SOX4 expression in bladder carcinoma: clinical aspects and in vitro functional characterization. Cancer research 2006 ;66 :3434-42)。

[0146] 这一研究概括了大量正常组织和肿瘤中的 Sox11 mRNA 的表达, 显示 Sox11 mRNA 在大量的恶性组织中过表达。另外, 我们特异地检查了 EOC 中 Sox11 蛋白的表达, 并证明增加水平的 Sox11 蛋白 (如通过图像分析确定的) 与增加的无复发存活 (RFS) 相关。

[0147] 材料和方法

[0148] 转录图谱

[0149] 大量人组织中 SOX11 基因 mRNA 的表达水平从硅转录组学 (silico transcriptomics, IST) 数据库中取得, 所述数据库含有来自使用 Affymetrix 基因表达微阵列分析的 14095 个样品的元分析的数据。

[0150] 患者和肿瘤样品

[0151] 本研究中使用的 TMA 从连续的一群 76 个患者中构建, 所述患者在都柏林的国家妇产医院被诊断患有原发侵入性上皮性卵巢癌, 中间的随访时间为 4.3 年。患者群在表 1 中有总结。标准的手术方法为经腹全子宫切除术、两侧输卵管 - 卵巢切除术和具有腹膜液或洗出物的细胞学评估的网膜切除术。在可能的地方将残余病患切除至 2cm 以下。在所有的病例中记录残余病患的阶段和体积 (无残余病患, 残余病患大于 2cm 或 2cm 以下)。辅助化学疗法在 1992 年以前由顺铂或碳铂组成, 从 1992 年至 2002 年与紫杉醇联合。没有患者接受新辅助化学疗法。从研究中排除良性或临界卵巢癌、非上皮性卵巢癌和具有典型次级卵巢癌的组织学特征的病例。诊断样本都在爱尔兰都柏林的国家妇产医院的病理学系用甲醛固定并用石蜡包埋。所有的组织块在构建 TMA 之前都在此系中储存。全部伦理认可从都柏林的国家妇产医院的伦理学会获得。

[0152] 组织微阵列和免疫组织化学

[0153] 76 个石蜡包埋的肿瘤样本用于组织微阵列 (TMA) 的构建。侵入性癌的代表区域在苏木精和伊红染色的载玻片上被标记, 并使用手动组织阵列器 (MTA-1, Beecher Inc, WI) 构建 TMA。所述阵列由每个患者 4 个核心组成。从每个供体块中提取两个 1.0mm 的核心, 并在受体块上组装。受体块被限制至每个为约 100 个核心。通常, 核心从病例肿瘤的周围部分取出, 在病例中肿瘤具有清楚的边界。在更扩散生长的肿瘤中, 首先靶向具有最高肿瘤细胞密度的区域。避免坏死的组织。

[0154] 将 TMA 切片 (4 μ m) 干燥、脱石蜡、再水化并放入浓度递减的乙醇中。在 pH 9.0 的 BORGdecloaker (Biocare, Concord, CA, 美国) 中进行热介导的抗原修复, 然后将切片于室温用兔抗人 Sox11 一抗 (1 : 100) 染色 25 分钟。如上所述, 产生这一特异性抗体 (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K 和 Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008 ;111 :800-5) 并靶向下列蛋白质序列: FMVWSKIERRKIMEQSPDMHNAEISKRLGKRWKMLKDSEKIPFIREAERLRLKHMADYPDYKYRPRKKPKMDPSAKPSASQSPEKSAAGGGGSAGGGAGGAKTSKGSSKK [SEQ ID NO :3]

[0155] 根据制造商的规程, 使用含有生物素化的山羊抗兔 / 小鼠二抗、抗生物素蛋白链菌素 / 辣根过氧化物酶复合物和 3,3' - 二氨基联苯的 Dako REAL Detection 系统检测信号。载玻片用 Mayers 苏木精 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 复染。

[0156] 图像获取、管理和自动分析

[0157] 使用 Aperio ScanScope XT Slide Scanner (Aperio Technologies, Vista, CA) 系统以 20X 物镜获得全载玻片数字图像。使用 TMA Lab (Aperio) 将载玻片去阵列从而观察单个核心。使用彩色去卷积算法 (Aperio) 开发了 Sox11 表达的定量得分模型。

[0158] 统计学分析

[0159] 使用 Spearman 氏 Rho 相关性评估来自个体肿瘤核心之间的关系, 使用 χ^2 测试评估临床数据分布和肿瘤特征在具有高和 low Sox11 表达 (如下述) 的样品之间的差异。使用 Kaplan-Meier 分析和时序检验 (log rank test) 说明 RFS 之间的差异。使用 Cox 比例风险回归模型 (regression proportional hazards models) 评估 RFS 和 Sox11, 阶段和等级的关系。使用 SPSS 版本 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) 进行所有的计算。P 值 < 0.05 被认为统计学上显著。

[0160] 结果

[0161] Sox11 mRNA 在正常和肿瘤组织中的表达

[0162] 使用 Affymetrix 基因表达微阵列在 14095 个分析的样品中进行 Sox11 mRNA 表达水平的元分析 (metanalysis)。

[0163] 增加水平的 Sox11 mRNA 表达在上皮性卵巢癌样品中是明显的 (数据未显示)。

[0164] Sox11 蛋白在卵巢癌中的表达

[0165] 已经将 Sox11 鉴定为上皮性卵巢癌细胞中过表达的基因, 使用 EOC 中的 IHC 检查 Sox11 蛋白的表达, 如图 1 所示。Sox11 的表达专一地在肿瘤上皮中可见, IHC 信号在核和细胞质中都明显。只有当伴随细胞质信号时 Sox11 的核表达才存在, 而部分 (49%) 肿瘤确实显示了无核信号时的细胞质表达 (图 1)。

[0166] 通过图像分析确定的 Sox11 表达的定量确定

[0167] 然后使用图像分析方法,特别是通过使用商业彩色去卷积算法(Aperio)确定了 Sox11 表达的定量确定。作为算法的结果,产生了拟彩色“标记”(mark-up)图像,因此允许证实所述算法准确地鉴定了上皮和基质像素(图 1)。近期出版了对所述算法的全部描述(Brennan DJ, Rexhepaj E, O' Brien SL 等人 Altered Cytoplasmic-to-Nuclear Ratio of Survivin Is a Prognostic Indicator in Breast Cancer. Clinical cancer research 2008 ;14 :2681-9)。

[0168] 使用所述算法对每个核心计算了 Sox11 的总强度(TI)。在来自个体肿瘤的一式四份的核心之间对 TI 有强相关性(Spearman 氏 $\rho = 0.858, p < 0.001$),这表明 Sox11 在卵巢癌中有同源模式的表达,且适于基于 TMA 的分析。由于肿瘤以一式四份进行排列,每个肿瘤的中间值用于进一步的分析。所述算法准确地地区分所有核心中的核和细胞质的染色,如通过组织病理学证实的。

[0169] 整个群的 Sox11 图像分析数据的直方图显示在图 2a 中。使用该直方图,将肿瘤置入三个分类中:高、中和低水平的 Sox11 表达,如通过图像分析确定的。基于图像分析分类,20% ($n = 17$) 的肿瘤被归类为具有高水平 43% ($n = 35$)、中等水平和 29% ($n = 24$) 低/阴性水平的 Sox11 表达,如通过图像分析确定的。在高表达组中的肿瘤都显示了核和细胞质 Sox11 的表达,同时那些在中等组中的通常只显示细胞质 Sox11。在 Sox11 表达和年龄、疾病的级别或阶段之间没有找到联系。

[0170] 通过自动图像分析确定的 Sox11 表达和存活之间的联系

[0171] 基于 Sox11 表达的 RFS 的 Kaplan Meier 分析显示在高、中和低组之间 RFS 的逐步降低 ($p = 0.033$) (图 2b)。进一步子集的分析显示,具有低水平 Sox11 表达的患者与高和中等 Sox11 表达者(如通过图像分析确定的)相比,RFS 显著降低 ($p = 0.02$) (图 2c)。我们继续进行 RFS 的多变量 Cox 回归分析,其显示当与阶段和级别相比时,Sox11 表达是 RFS 的独立预测物 ($HR = 0.56, 95\% CI = 0.319-0.997, p = 0.049$)。

[0172] 讨论

[0173] 在这一研究中,我们结合了转录数据的元分析、TMA 和自动图像分析来鉴定并证实 Sox11 是上皮性卵巢癌(EOC)中的预后生物标记。这一研究首次公开了 Sox11 表达和 EOC 预后之间的关系。之前将 Sox11 鉴定为 MCL 中的新诊断标记(EkS, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K 和 Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008 ;111 :800-5),我们继续使用含有来自 14095 个分析的样品的元分析数据的 IST 数据库,使用 Affymetrix 基因表达微阵列来描绘 Sox11 mRNA 在 EOC 细胞中的表达。

[0174] 然后,我们继续使用 TMA 和 IHC 的定量自动分析来评估与无复发存活相关的 Sox11 蛋白在 EOC 中的表达。这显示了核和细胞质隔室中上皮特异性 Sox11 的表达。增加的 Sox11 水平,特别是核 Sox11 与增加的 RFS 相关,且当控制级别和阶段时,Cox 回归多变量分析显示 Sox11 是 RFS 的独立预测物(见表 2)。

[0175] Sox11 在胚胎发生和组织重塑中发挥重要作用,因此在整个胚胎的原肠胚形成和早期后原肠胚形成的发育中存在(Hargrave M, Wright E, Kun J 等人 Expression of the Sox11 gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and

epithelio-mesenchymal induction. *Developmental dynamics* 1997 ;210 :79-86 ;Sock E, Rettig SD, Enderich J 等人 Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling. *Molecular and cellular biology* 2004 ;24 :6635-44)。后来,在发育过程中, Sox11 显著表达在发育中的神经系统中以及整个胚胎中上皮-间充质相互作用发生的许多位点上 (Hargrave M, Wright E, Kun J 等人 Expression of the Sox11 gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and epithelio-mesenchymal induction. *Developmental dynamics* 1997 ;210 :79-86)。在这样的上皮-间充质相互作用的位点上, Sox11 可以在间充质或上皮的隔室中找到,且已经假定其参与诱导重塑 (Hargrave M 等人, 1997 上述)。Sox11 在多数组织中的表达是瞬时的,并且作为结果,与其在胚胎发生过程中的广泛表达相反,在终极分化的成人组织中几乎找不到 Sox11 表达 (Sock E, Rettig SD, Enderich J 等人 Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling. *Molecular and cellular biology* 2004 ;24 :6635-44)。我们的发现补足了为何 Sox11 的表达在正常组织中缺失的这些数据。

[0176] Sox11 在肿瘤发生中发挥的作用仍然需要全面阐明。如前面提及的, Sox11 mRNA 的显著上调在 EOC 细胞中是明显的。Sox11 在成人组织中的确切功能作用未完全得到理解,虽然 Sox 蛋白似乎起到双重的作用 (i) DNA 结合和 (ii) 转录伴侣选择,其可以允许选择性地单个 Sox 蛋白募集至特定的基因 (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K 和 Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008 ;111 :800-5)。同时,许多研究已经描述了 Sox11 在神经胶质瘤 (Weigle B, Ebner R, Temme A 等人 Highly specific overexpression of the transcription factor SOX11 in human malignant gliomas. *Oncology reports* 2005 ;13 :139-44)、成神经细胞瘤 (Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI 和 Scotting PJ. Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. *Journal of neuro-oncology* 2002 ;57 :201-14) 和 MCL (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K 和 Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood* 2008 ;111 :800-5) 中的表达,其在这些肿瘤中的功能作用没有得到完全理解。

[0177] 总之,这是首次对 Sox11 在 EOC 中差别表达的描述。我们的发现证实 Sox11 是 EOC 中增加的 RFS 的独立预测物。

[0178] 表 1. 患者和肿瘤的特征

	年龄	
[0179]	中间 (范围)	52 (31-77)
	组织学	

[0180]	浆液型	50
	粘蛋白型	4
	子宫内膜型	17
	透明细胞	1
	其它	4
	级别	
	良好分化的	12
	中度分化的	29
	不良分化的	35
	阶段	
	1	0
	2	21
	3	54
	4	1

[0181] 表 2. RFS 的多变量 *Cox 回归分析

	HR	95.0% CI	P 值
Sox11 (高/中相对于低)	0.56	0.319 - 0.997	0.049
阶段 (连续的)	1.92	0.971 - 3.800	0.061
级别 (良好和中度分化的相对于不良分化的)	1.08	0.740 - 1.562	0.702

[0183] * 对表中所有其它的变量进行调整

[0184] 缩写 :HR = 风险率, 95% CI = 95% 置信区间

[0185] 实施例 B

[0186] 引言

[0187] 上皮性卵巢癌 (EOC) 包含三种主要组织学亚型 (浆液型、粘蛋白型和子宫内膜型), 还可以基于阶段和级别分成亚群。子宫内膜型肿瘤构成所有卵巢肿瘤的约 2% 至 4%, 其大多数 (约 80%) 是恶性的, 代表所有卵巢癌的 10% 至 20%。

[0188] 材料和方法

[0189] 将高级 EOC 和子宫内膜型 EOC 的切片进行 Sox11 的染色, 并如前述进行分析 (Brennan 等人 2009, European Journal of Cancer, 45 (8) :1510-1517)。

[0190] 结果和讨论

[0191] 如图 5、6 和 7 中显示的, 使用子宫内膜型 EOC 的 Sox11 可以预测总的和癌特异性的存活。还有, 如图 8 和 9 中显示的, 使用高级 EOC 的 Sox11 可以预测总的和癌特异性的存活。

[0192] 当计算癌特异性存活概率时, 与当计算总的存活相比, 只使用癌相关死亡的数据。

[0193] 这些数据显示 Sox11 可以用于高级 EOC 和子宫内膜型卵巢癌中从而基于总的和癌特异性的存活将患者分成临床相关的组。

[0194] 总之，Sox11 不仅是作为组的 EOC 的有用生物标记，还可以用于具有不同临床和 / 或组织学特征的患者的亚群。

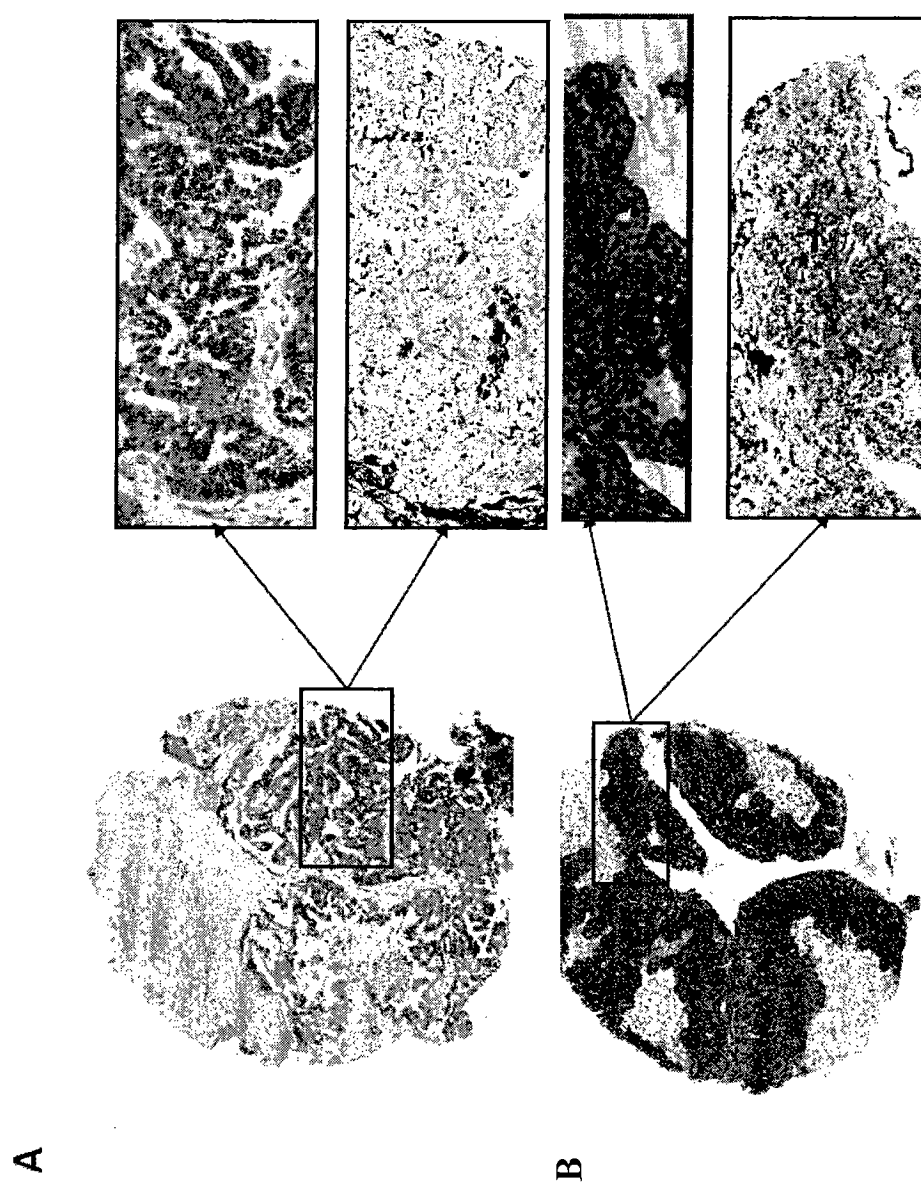


图 1

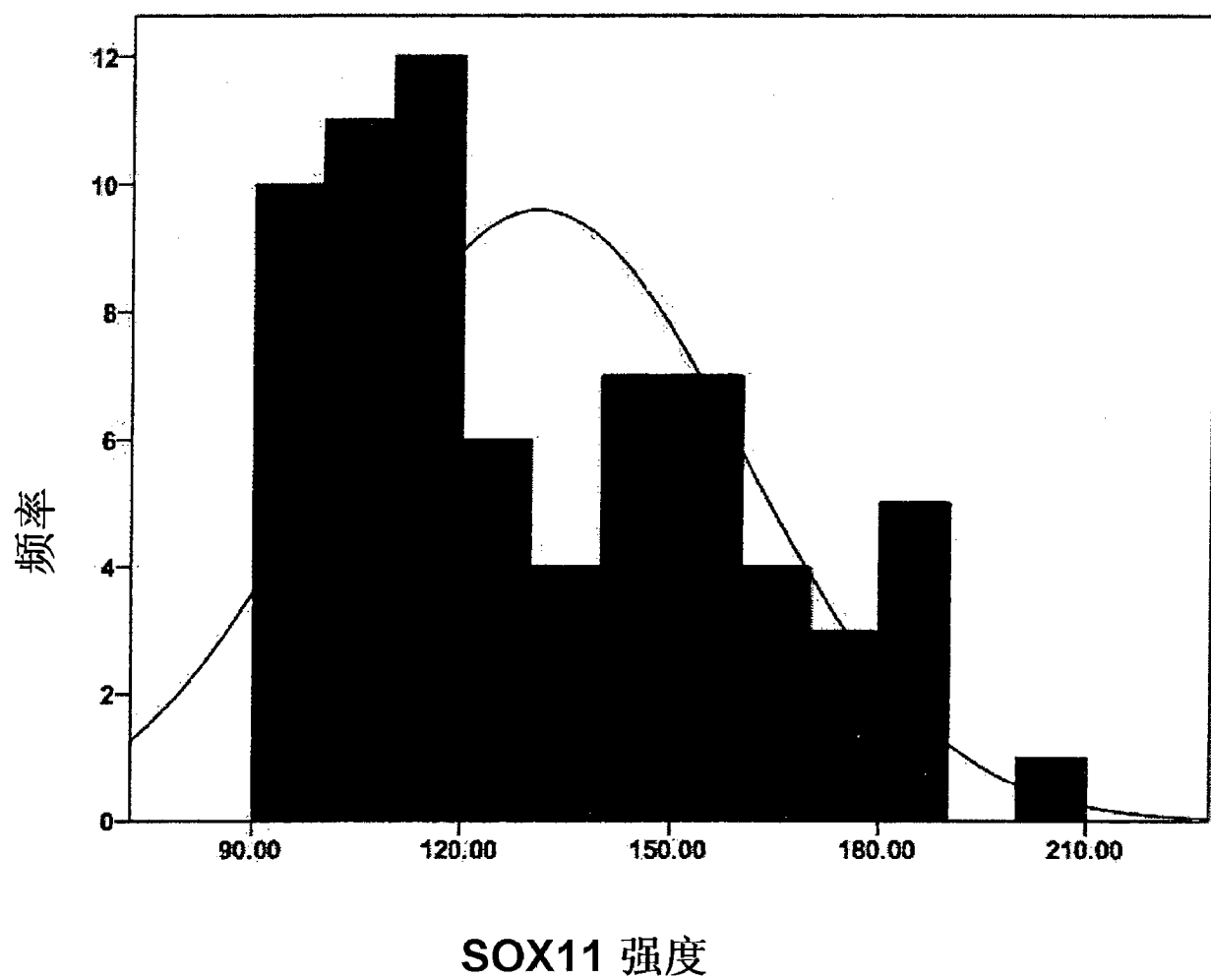


图 2A

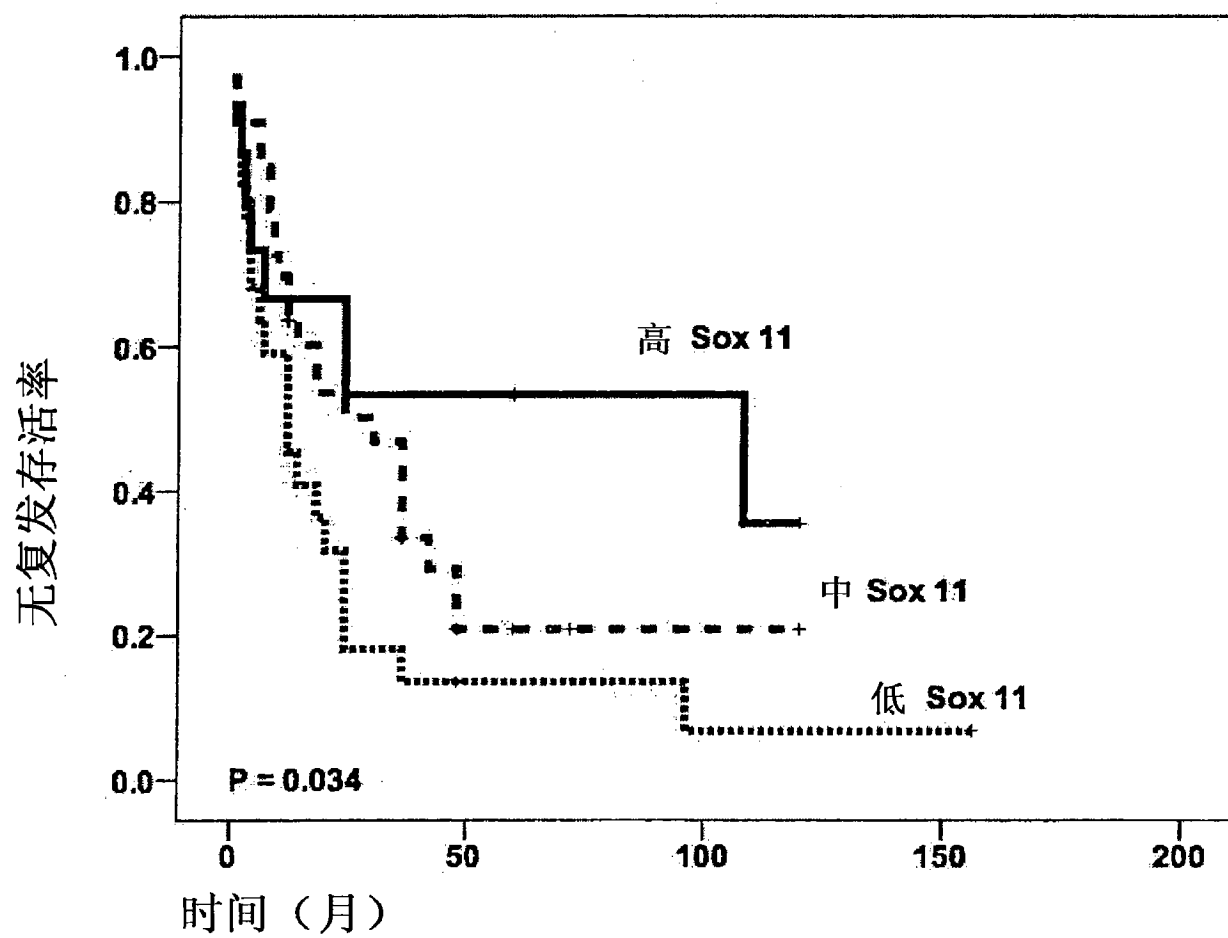


图 2B

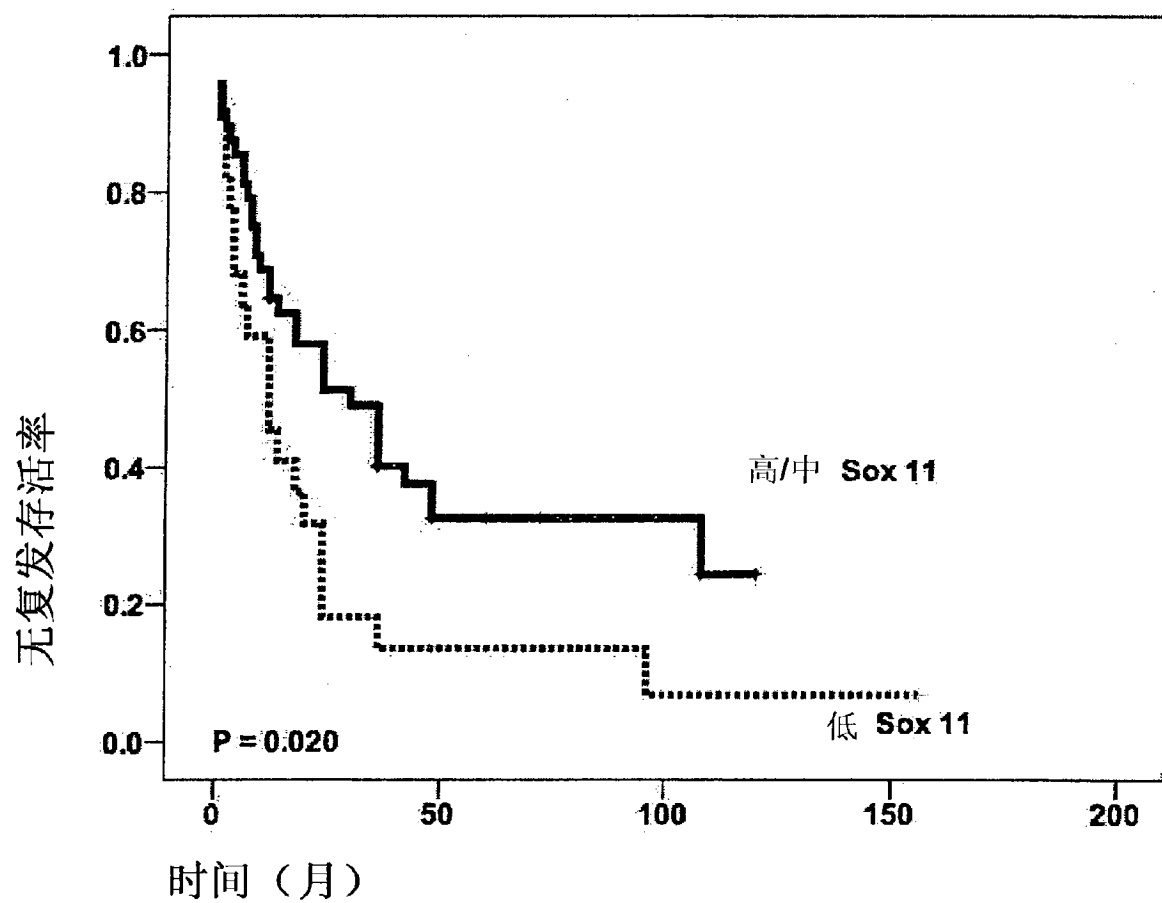


图 2C

MVQQAESLEAESNLPREALDTEEGEFMACSPVALDESDPDWCKTASGHIKRPM
NAFMVWSKIERRKIMEQSPDMHNAEISKRLGKRWKMLKDSEKIPFIREAERLRL
KHMADYPDYKYRPRKKPKMDPSAKPSASQSPEKSAAGGGGGSAGGGAGGAK
TSKGSSKKCGKLGAPAAAGAKAGAGKAAQSGDYGGAGDDYVLGSLRVSGSGG
GGAGKTVKCVFLDEDDDDDDDDDELQLQIKQEPDEEDEEPPHQQLLQPPGQQ
PSQLLRRYNVAKVPASPTLSSSAESPEGASLYDEVRA GATSGAGGGSRLYYSF
KNITKQHPPPLAQPALSPASSRSVSTSSSSSSGSSSGSSGEDADDLMFDLSLNF
SQSAHSASEQQLGGGAAAGNLSLSLVDKDLDSEGLGSHFEFPDYCTPELS
EMIAGDWLEANFSDLVFTY

SEQ ID NO:1

图 3

acctccgcacgagacccagcggcccggttgagcgtccagccctgcagcggatcatggt
gcagcaggcggagagcttggaagcggagagcaacctgccccgggaggcgctggacacgga
ggagggcgaattcatggcttgagcccggtggccctggacgagagcgacccagactggtg
caagacggcgctcgggccacatcaagcggccgatgaacgcgttcatggtatggtccaagat
cgaacgcaggaagatcatggagcagtctccggacatgcacaacgccgagatctccaagag
gctgggcaagcgctggaaaatgctgaaggacagcgagaagatcccgttcatccgggaggc
ggagcggctgcggctcaagcacatggccgactaccccgactacaagtaccggccccggaa
aaagcccaaaatggacccctcgggccaagcccagcgccagccagagcccagagaagagcgc
ggccggcgggcgggcggggagcgcgggcggaggcgcgggcggtgccaaagacctccaagg
ctccagcaagaaatgcggcaagctcaaggcccccgcgggccgcgggcgccaaggcgggcgc
gggcaaggcgggcccagtcgggggactacgggggcgcgggcgacgactacgtgctgggcag
cctgcgcgtgagcggctcgggcgggcgggcgcggggcaagacggtcaagtgcgtgtttct
ggatgaggacgacgacgacgacgacgacgacgacgagctgcagctgcagatcaaacagga
gccggacgaggaggacgaggaaccaccgcaccagcagctcctgcagccgccccgggcagca
gccgtcgcagctgctgagacgctacaacgtcgccaaagtgcccgccagccctacgtgag
cagctcggcggagtcccccgagggagcgagcctctacgacgaggtgcgggccccgcgcgac
ctcgggcgccccggggcgggcagccgcctctactacagcttcaagaacatcaccaagcagca
ccccgccgctcgcgcgagcccgcgctgtcgccccgctcctcgcgctcggtgtccacctc
ctcgtccagcagcagcggcagcagcagcggcagcagcggcgaggacgccgacgacctgat
gttcgacctgagcttgaatttctctcaaagcgcgcacagcgccagcgagcagcagctggg
ggcgggcgcgggcgggcggaacctgtccctgtcgctggtggataaggatttgattcggt
cagcgagggcagcctgggctcccacttcgagttccccgactactgcacgccggagctgag
cgagatgatcgcgggggactggctggaggcgaacttctccgacctggtgttcacatatg
aaaggcgccccgctgctcgctctttctctcggaggggtgcagagctgggttccttgggagga
agttgtagtggtgatgatgatgataatgatgatgatggtggtggtgatggtggc
ggtggtaggggtggaggggagagaagaagatgctgatgatattgataagatgtcgtgacgc
aaagaaattggaaaacatgatgaaaattttgggtggagttaaagtgaaatgagtagttttt
aacatttttccctgtccttttttgtccccctcccttctttatcgtgtctcaaggtag
ttgcatacctagctctggagttgtgattattttcccaaaaaatgtgtttttgtaattacta

图 4

图 4(续)

ccgtttccagatttgaattttttctgttctttatttttaacgctgcatcttcgcgtgtgc
tcagaggtggttgttggcggagaaacgcgcgcgcagtggttgacctctagcgggtgaagggg
gaaggggaagaggaaaggagagaagtggtcggtgtctgtttccttctgtcccccggggccc
gtggagctgtcggagggaaggaggacgggtgcggggccgcagggggcgcggggcgcgggcg
gaccaggtctacgagcgggagggaggcgggagtcgggggaagacgcgggcaggccggccga
gggcacccccgaggaacatggcatggcctctgtgcgatccgagtcgcgggtctccggggtgc
ctgggagggccgaaccactggtgagggcgtggggagcagggggtggcagagggcaccggg
gcggtagtccgggacgcgcaaggcagagccctgacgctccgggtccccgtgcttggtct
tcttgctcgcaccgcgtgctcctgggcgcgccccgcgcggggcccttgaggcgcgcg
agacaccagcgtggttccccgggccccgcgggccccggggaggggaagcctcggggctgcggg
gtgagaggaagaaagcaaaccggggagcaggcggctgccgcaccgcgcacccccggggcc
ctcaccacgcctccccgcgcgcgggtcaggggctgccccggaatcagctccccggggc
cgccgcaacgaaggtggatccgcacattgattgttctccgggagcctcctgggggctccg
gcggcggcgcggggcgcgacccatcccgtggcgctccccgctcgtgaacccccgtttgcc
tgtccacacccccctcgtccccaccatttttctgaccggcctgtgtccccgagccctcg
cggcaggccccgagcaggcgatcgcggcggggcacgcgcgccccgggctcccgccccctt
ccgagcatccgcgcctcttttctgctgggtctgggaggaggaggctgggaggccgctc
ggggcccagcgtgccagccccggagttcagcctcccgagctgcggcgccccgcagcggagg
aggttttcagtggtgattgaaactcactgcaaaatcaccacgactctttcacctactga
gatgattgaccgaggtttggccttccatttttactgagatttggcgagaccgaatggaag
cgtccgcacagtaactgcagctgctaggccagaggggccccggcgcccttcccgcctccc
ctcccgcttgcttttgcttactcgatcttaccaccacccctccccggcccccccgactg
agaactcgggcctctcaccgcccccccagcctcccgtctgggcgagcctcctccccagc
ccccacccctgggatgccaagccagcaagcttttgctgcagatggacagggtttcttttct
gtggctttttcctttcgataaaccatcagatttcagtagtacatttgggaaaagaagggg
ctgatggcggttaaccagggttctcaatatagaactggatttctggagttgtttaccttacc
ccacacccccctcaacatgtagactaatgcagccattgggtggtacatttatttttagccacg
gataattgaaccagcgggtttacaattgacacgtgctccgtgctggtgattttatgtggca
gccctctgctgcagttccgaaacttgttggcaacgtaaacccattgatagggtgatctat

图4(续)

gtat t t t t t g a a a g c c t g a a a a c t t g g c a t g t c t t t t c t g t t t t a a t c a t a g a t g a a t c t t g
g a c a t t t t c t g t g g t g a g g t g g a a c t t t a a g t a a a t t a g t a a a g t a a t a a t t t g g c t t c
a g a a t g g g a a g a g a t a g t c a a g a t t t t t t t t t t t t a a a g c c a t g t g g c c t a a c t t g a t a c
a a a a t a a a a g t a a t t g t t t g g c a a t c t a a a t t t a a a a c c t g t t a g a a c t c a g g a c a g g c
g c t t c a a t g c g c t t t t t a a c a a t a t t t a a g g c t g t t t t g a t g a g t g c g t t g t g a g a a t c a
t c t t a a t g a a t t c t t t a t t g a g t g t c t a a a a c a t a g t a t a a t a c a c a t g g t a t t c t t g c c
a c t g g a t a g t c t t c a a t a a a a g t t t a a t t g a t t t t t t t t g t t g g t c t c t t a a g t a a g t c
t t a t t t t t a a c t a a g c a t t g a c a g a a t a t c t t a a a a t g g t a a c c t g g g g g t g g c g g g t g g
g t g c t g t g t g c a c g g c a g c c t a g c c a g t g g g g a t c c t g c t g t t t a t t a t a a g t a g t t c a c
a g a c t c t g a t g g c a t t t t g g t a a g c t t t c c a t c t t t a a g a a a t t g a a c c a g c a t t c t c t t
a t t a a t t c t t t a a a c t g t g g a a g t a a t t t c c a g t t c t t a c a c t c t g a t a c g c a t c c c t t t
t a t t t a a a a a a a a a a a a t g c t a a t a a a a g g c a g t g t a c t t a a a c t g t g c t t t g c a a a t
a t t g t g t a t g t t a t g a a t g a c t a c a g a c a c t g g g c a a a t t a t t t g t a g a a t g a t t a t c c t
t t a g c t a g a g a a a g a a a t c a t t a c a a c t c t t t t g g g c a g a g a t g t t t c t t t t t a a t g t t a
a t c a a g g g g a a g t g a t t t a a a t a t g c a t a a a t g t a g c a g t c a g g g t g a t t t a g t t g c t t t
t t t c a t g a a a g a a a a g a c t c a a a a g a c a a g a c t t a t t t t t c t c t t c t g g g a c t t g a a a t
c a t a a t c a t c t g a t a t t a g t a c a g t a c a a g a a a t t t a c a t t t g t t t t t t a c t t c a g a a t t
t a a g t g a c t t t t g c c c a a g g a a t t t g a g a a a t a a g g c a a a t a a g t t g c t c t a t t t t a a a g
t a g t c a t t c a a t a t a a a t a t a t t a t a t c a a t c t t a a c t t t t t t a t t c t c t g a t a t g a t t a
a t a a t a t g t a t a t t c t t a c t t t t c t t c t a a t g g g c a t a t g t a t c c t t g t g g a c a c t t t g a
g a g a g g t t t t c t t g g a c t c t c c c a t t t a t a g a a t c t t t a t a c t c t t t a c t g t g t g g t t c
c c t g c t t t t a a c a g a t t t c t g a g g c a a a t a t a t t t g t g c t t t t t t c t t a t g t a g g a a g a c
c a g c g a a a a t a g t t t a c t g a g t t g t c a a t t t t a t c a g t a g a t a a g a a c t t t c t t t a t t a
c a g t t t c a g g g a a g a t t t t t t c a g g a t a t t t c t c a g t t a t t c t a a g g g c c a a a t t t t g t a
a a a t t t c c a t t a g g a a t g t c a g t t t c a a a t a c c c t t t g t a t a g c c t a a g c c t g t g a g g a t
a a c a a g a a t g a g c c t t a c c t a t c c t a a c a c a g g g a t t t a c a a g t t c c c a a a g t a a c c g t c
t c c a t g t a a c t c t t g a c a t a c t t t t c t g a g a t t t g g c t t a t t t t t a t t a t t g g t t a t t t c
t c a c t g t t c a t t c t a t t t g a t t t a t t c t a c a a c a t c c c c t t t t a t t t a a t g a t c t g g a a a
a t t c t g c t c t t t g a t a a c a a c t c a g g a t t t t t t g t t c a g t t t t g g t t t t t g c c c c t t c c

图4(续)

tgtggagcctacatttttcaaccacaataaagatgaaacaaaatttatgaaactgagctct
cttccatttttacttactgctggctttttttttttttttttttttccttgattcctaccatacc
ttcgttttttttcattgtacttttttaacactacctatatccattagctgcctaatttagtt
ttatctgttccatgtggatgcagtgagttttataagagaatttcacaaacaagtagttttt
tagtgaacttaaaataaacagaatttttaaggagacctatttttataactcaataaaagca
caaaagtgcagaaagtataaaacggcttacaaagggagacacaagctcataatggttccat
gtataaaagtaataactttattgggtagagatatctttacaagatctagcacctctgcc
gtgcacagataggactgttttaaatgatttggaacttttggttgccctgcagttgtgaac
agagaacttctctacagagaaacaaaccactaaaagcaatatgaccgagttgagatgtgg
tttccaatgagcaattgggtgaatttaagcaacctggatgtgcatatgtggaggctcccgt
ctcactgtttgatcaaacttcttttatgtagtacgtagacttgattttttctgctgtga
aatgaaaaaataaagcaatatgacaaaaagtttaaaaatgcataaaaaataggatttcc
tctaggctcctcgaagagattttttttaatatgatgcttgtcttactttcttagacacggt
acatttccccttccaaaaaaaaaaaaaaaaaggacaactggaagtaatttatcatataaagaa
ttttgatcaaatagatattgacaaagggccctctgtcacattttttcttcatccagctttt
gttcaaaaacagtatgcctcctcccttgaatcacataggagaaacggttatactccattc
tcattaatttcccattttgtctacttttactcttgtacatatgttgtgggtttaagagtc
ttttgcattttgttctgtgacacctttttttgaattgactgttttaaaacggaggccatt
ttttccgggtttgggactcctagtgggttatggcatcccataatgcttcgtgacggccacca
ggacagaaccacctgatgttttagagcagttttcagcatgacactgttaacaagtgtgta
ttttccaaggccacatgaaacttactttcttagccactccagggtttgggagcagaaaaagc
tgaaaaacccttttgtgtagaagtctgagtggtttgtgggggggaccttttttagagttt
gcatgccagcgcacggcctattgctgtgaaacagagagaaggtaagctacctgaggcag
tgcgctggaggatgaagtgtttgatagcactaggggggaaagaaaaatgcatggcaaagtt
tcgtcttctcgtagactatctagcatgcagagtgtagtggttgaaacggtgtatgacat
tgctgtatcaaagttgtaaaattaagcattatttattgaaaactatgtattttttgtaa
aacctgatcacatagagaatatcagtggcttgtgcttgtgcttcgatctaaccagcttc
ttgacccaccccccttgggtatgcagtggttaatgctcagggttgaaaatagtacactcca
atgtctcttttgcaagagtttttcacagaggattacatttgttcaaaagactctaataaa

图4(续)

attgtgtgatcaatcttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

SEQ ID NO:2

图4(续)

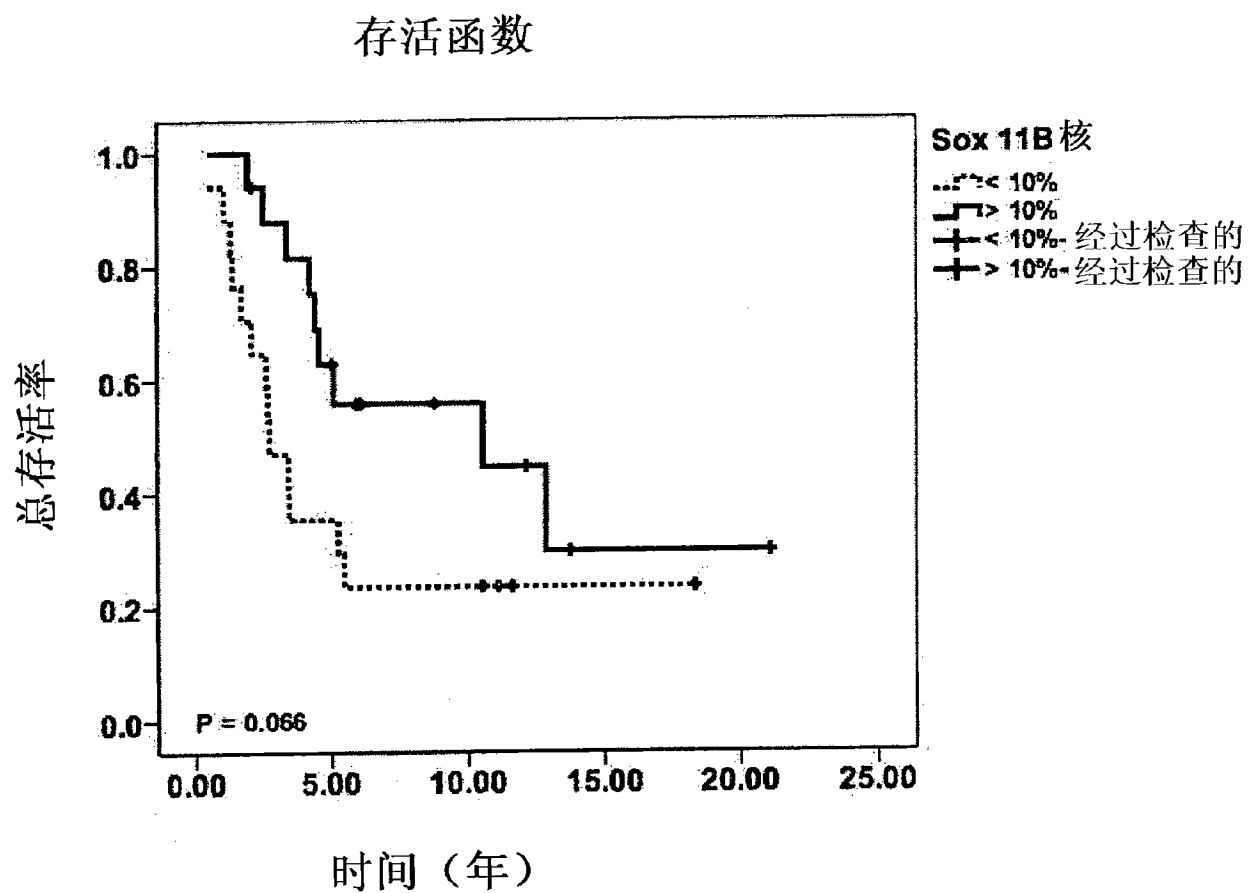


图5

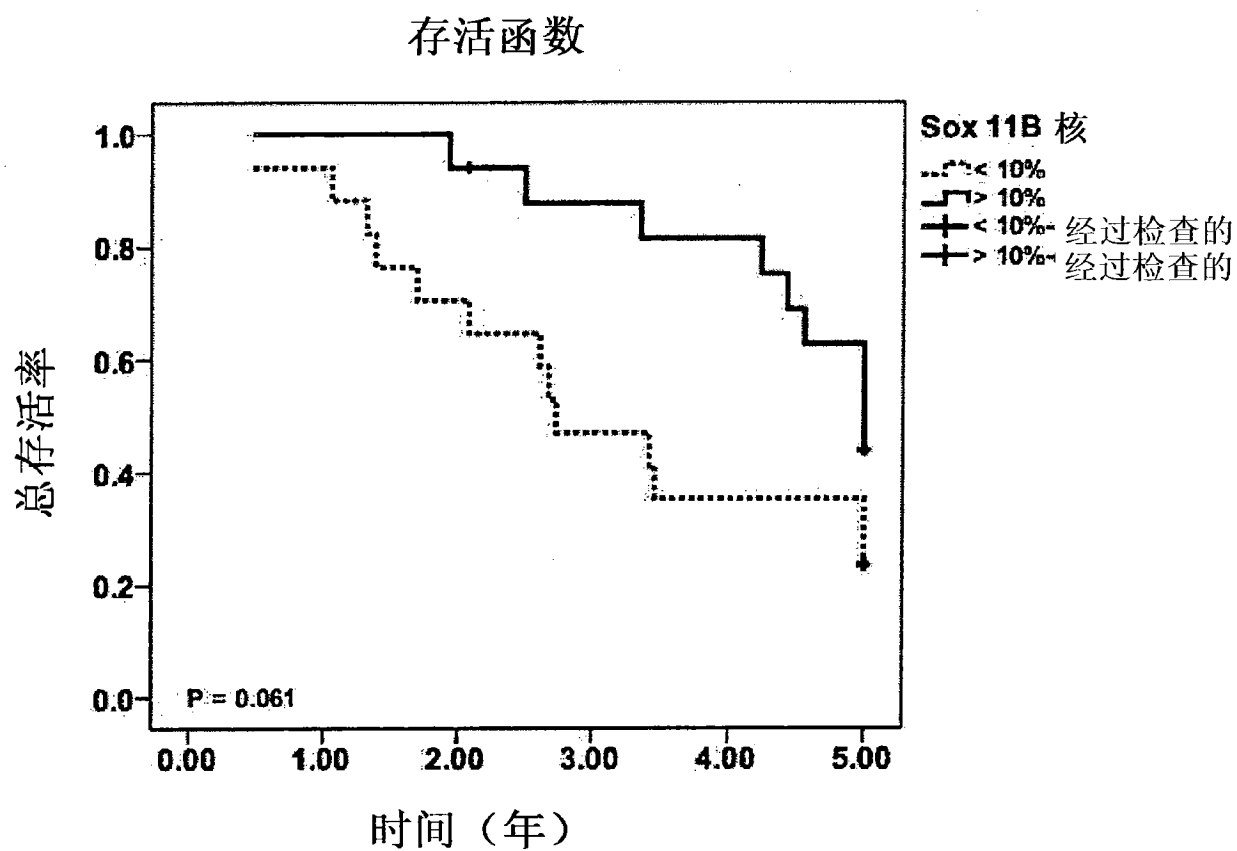


图 6

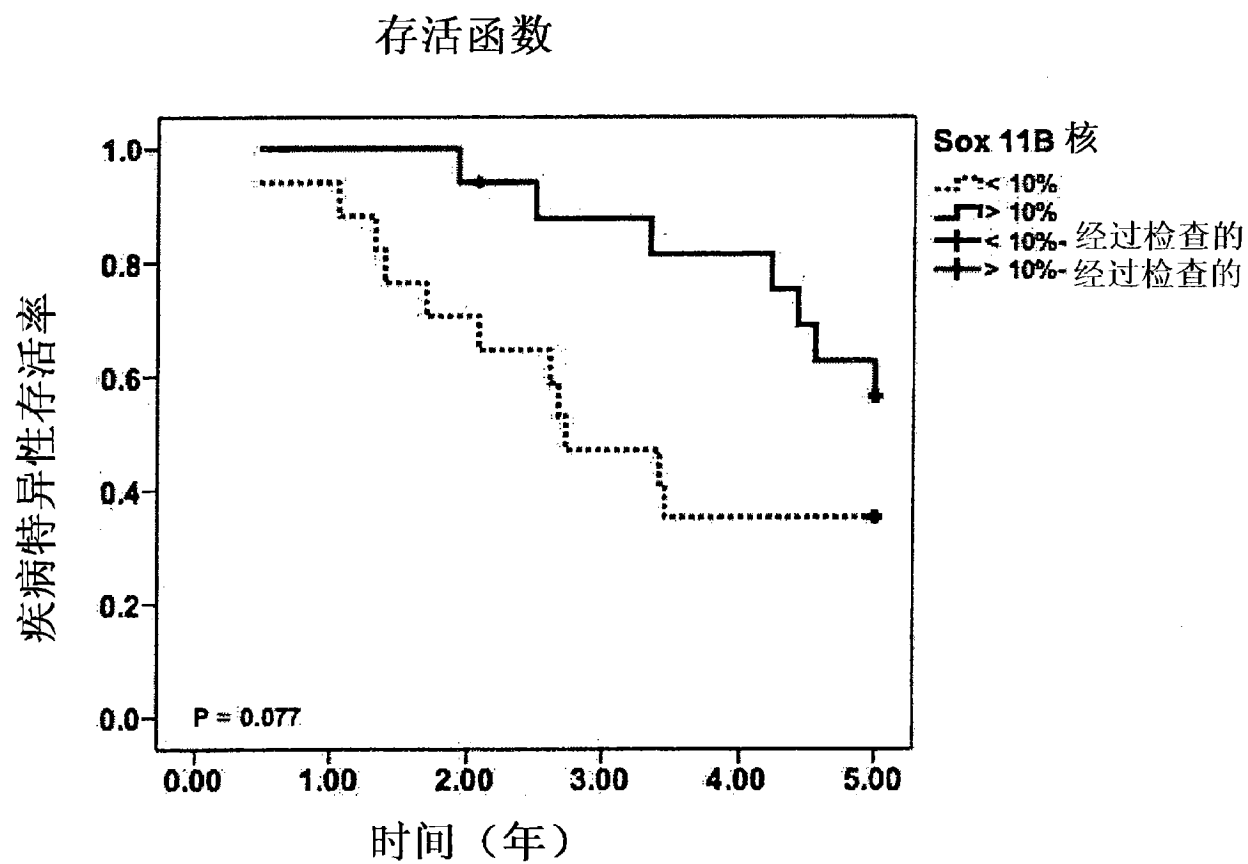


图 7

存活函数

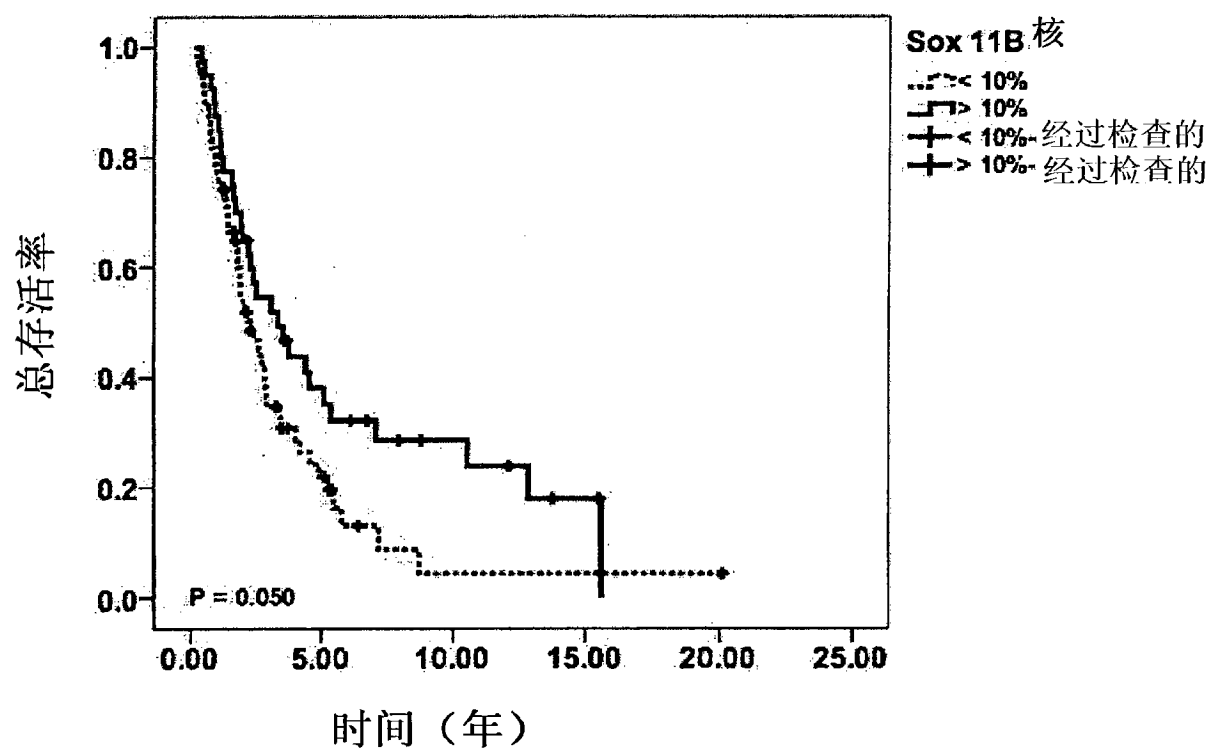


图 8

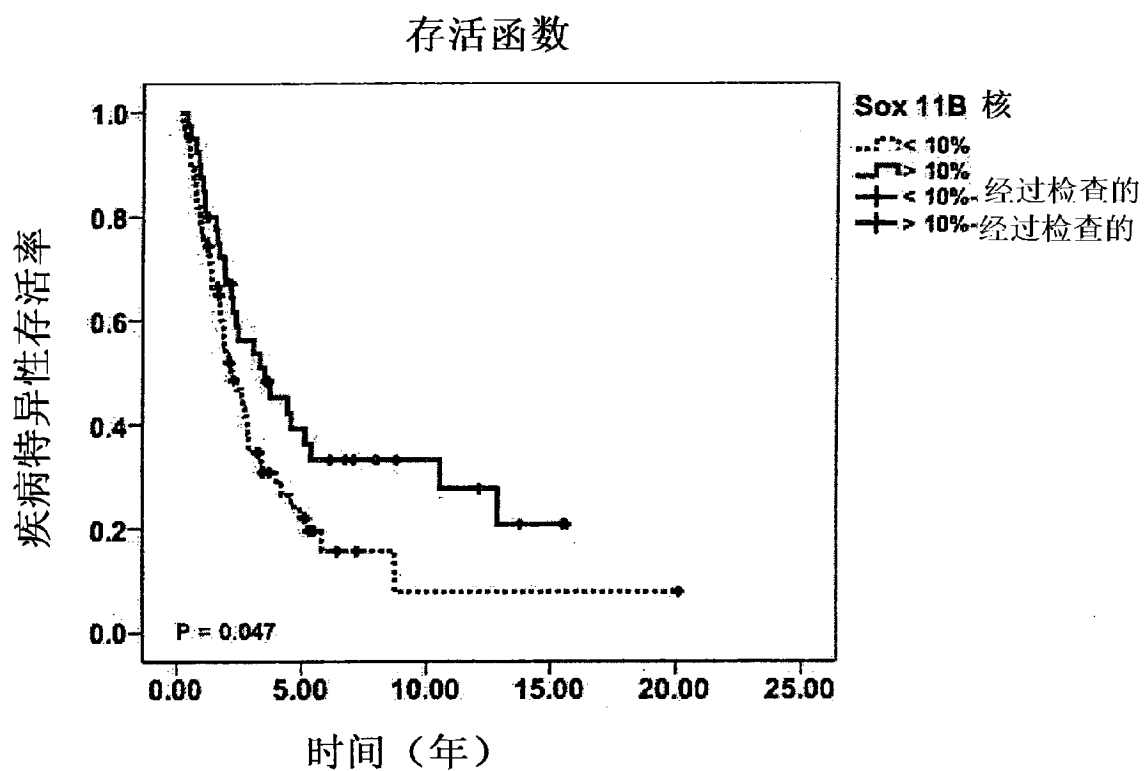


图 9