

1. 检测样本中TDGF3多核苷酸或其部分的存在的方法，所述方法包含如下步骤：

a) 使所述样本接触与转录的TDGF3多核苷酸选择性杂交的核酸分子，其中所述转录的TDGF3多核苷酸包含TDGF3基因的编码区；和

b) 测定所述核酸分子是否结合样本中的所述多核苷酸，从而检测样本中 TDGF3 多核苷酸或其部分的存在。

2. 权利要求1所述的方法，其中所述转录的 TDGF3 多核苷酸是 mRNA。

3. 权利要求1所述的方法，其中所述转录的 TDGF3 多核苷酸是 cDNA。

4. 权利要求1所述的方法，其还包含用所述核酸分子扩增所述转录的 TDGF3 多核苷酸的步骤。

5. 权利要求4所述的方法，其中所述扩增步骤包含聚合酶链式反应。

6. 权利要求4所述的方法，其中所述核酸分子与转录的 TDGF3 多核苷酸的结合是通过检测扩增的 TDGF3 多核苷酸来测定。

7. 权利要求4所述的方法，其中所述转录的多核苷酸用至少一种与所述转录的 TDGF3 多核苷酸选择性杂交的核酸分子扩增。

8. 权利要求7所述的方法，其中所述至少一种核酸分子不扩增 TDGF1 多核苷酸。

9. 权利要求7所述的方法，其中所述至少一种核酸分子与转录的 TDGF3 多核苷酸的部分杂交，所述部分包含 TDGF3 编码区内编码选自下组的氨基酸的核苷酸：V7, L68, E92 和 A178。

10. 权利要求9所述的方法，其中所述至少一种核酸分子包含选自表2和表3所列的序列。

11. 检测样本中 TDGF3 多肽或其部分的存在的方法，所述方法包含如下步骤：

a) 使所述样本接触选择性结合TDGF3多肽的试剂；和

b) 测定所述试剂是否结合样本中的所述多肽，从而检测该样本中 TDGF3 多肽或其部分的存在。

12. 权利要求11所述的方法，其中所述试剂选自抗体、抗体衍生物和抗体片段。

13. 权利要求 12 所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合 TDGF3 多肽并且不结合 TDGF1 多肽。

14. 权利要求 12 所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与 TDGF3 多肽的胞外部分中包含的表位结合。

15. 权利要求 12 所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合包含选自下组的氨基酸的表位: V7, L68, E92 和 A178。

16. 权利要求 1 或权利要求 11 所述的方法, 其中所述患者的样本包含肿瘤组织样本。

17. 权利要求 16 所述的方法, 其中所述肿瘤是选自乳腺肿瘤、结肠肿瘤和肺肿瘤组成的组的肿瘤。

18. 权利要求 1 或权利要求 11 所述的方法, 其中所述患者样本是体液。

19. 权利要求 18 所述的方法, 其中所述体液选自血液、淋巴、腹水、妇科液体、囊液和尿液组成的组。

20. 检测样本中 TDGF3 多核苷酸或其部分的存在的方法, 所述方法包含如下步骤:

a) 使所述样本接触与转录的 TDGF3 多核苷酸的部分选择性杂交的核酸分子, 所述部分包含 TDGF3 编码区内编码选自下组的氨基酸的核苷酸: V7, L68, E92 和 A178;

b) 通过聚合酶链式反应用所述核酸分子扩增所述转录的 TDGF3 多核苷酸或其部分; 和

b) 检测扩增的 TDGF3 多核苷酸, 从而检测样本中所述 TDGF3 多核苷酸或其部分的存在。

21. 检测样本中 TDGF3 多核苷酸或其部分的存在试剂盒, 所述试剂盒包含与 TDGF3 的转录多核苷酸选择性杂交的核酸分子。

22. 检测样本中 TDGF3 多肽或其部分的存在试剂盒, 所述试剂盒包含抗体、抗体衍生物或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性结合 TDGF3 多肽或其部分。

23. 评估细胞是否转化的方法, 其包含比较:

a) 被测细胞中 TDGF3 基因的表达水平, 和

b) 对照未转化细胞中 TDGF3 基因的表达水平,

其中 TDGF3 基因在被测细胞中的表达水平比在对照未转化细胞中的水平高表明所述被测细胞已转化。

24. 权利要求 23 所述的方法, 其中 TDGF3 基因在被测细胞和对照细胞中的表达水平是通过检测转录的多核苷酸或其部分在被测细胞和对照细胞中的存在来评估, 其中所述转录的多核苷酸包含 TDGF3 基因的编码区。

25. 权利要求 24 所述的方法, 其中所述转录的多核苷酸是 mRNA。

26. 权利要求 24 所述的方法, 所述转录的多核苷酸是 cDNA。

27. 权利要求 24 所述的方法, 其中所述检测步骤还包含在检测所述转录的多核苷酸之前扩增该转录的多核苷酸。

28. 权利要求 27 所述的方法, 其中所述扩增步骤包含聚合酶链式反应。

29. 权利要求 27 所述的方法, 其中所述转录的多核苷酸用至少一种与所述 TDGF3 编码区选择性杂交的核酸分子扩增。

30. 权利要求 29 所述的方法, 所述至少一种核酸分子不扩增 TDGF1 多核苷酸。

31. 权利要求 29 所述的方法, 其中所述至少一种核酸分子与对应于 TDGF3 编码区的转录多核苷酸的部分杂交, 所述部分跨越编码选自下组的氨基酸的核苷酸: V7, L68, E92 和 A178。

32. 权利要求 31 所述的方法, 其中所述至少一种核酸分子包含选自表 2 和表 3 所列的序列。

33. 权利要求 23 所述的方法, 其中 TDGF3 基因在被测细胞和对照细胞中的表达水平是通过用特异性结合所述 TDGF3 基因编码的蛋白的试剂, 检测所述 TDGF3 基因编码的蛋白在被测细胞和对照细胞中的存在来评估。

34. 权利要求 33 所述的方法, 其中所述试剂选自抗体、抗体衍生物和抗体片段组成的组。

35. 权利要求 34 所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合 TDGF3 多肽并且不结合 TDGF1 多肽。

36. 权利要求 34 所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与 TDGF3 多肽的胞外部分中包含的表位结合。

37. 权利要求 34 所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与包含选自下组的一或多个氨基酸的表位结合: V7, L68, E92 和 A178。

38. 评估样本中转化细胞的存在的试剂盒, 所述试剂盒包含抗体、抗体衍生物或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性结合 TDGF3 蛋白。

39. 评估样本中转化细胞的存在的试剂盒, 所述试剂盒包含与 TDGF3 的转录多核苷酸选择性杂交的核酸分子。

40. 评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的方法, 所述方法包含比较:

a) 患者样本中的TDGF3基因的表达水平, 和

b) 对照非-癌样本中的TDGF3基因的表达水平,

其中 TDGF3 基因在患者样本中的表达水平比在对照非-癌样本中高, 表明所述患者是抗-Cripto 抗体疗法的合适候选者。

41. 权利要求 40 所述的方法, 其中样本中所述 TDGF3 基因的表达水平是通过检测样本中转录的多核苷酸或其部分的存在来评估, 其中所述转录的多核苷酸包含 TDGF3 基因的编码区。

42. 权利要求 41 所述的方法, 其中所述转录的多核苷酸是 mRNA。

43. 权利要求 41 所述的方法, 其中所述转录的多核苷酸是 cDNA。

44. 权利要求 41 所述的方法, 其中所述检测步骤还包含在检测所述转录的多核苷酸之前扩增该转录的多核苷酸。

45. 权利要求 44 所述的方法, 其中所述扩增步骤包含聚合酶链式反应。

46. 权利要求 44 所述的方法, 其中所述转录的多核苷酸用至少一种与所述 TDGF3 编码区选择性杂交的核酸分子扩增。

47. 权利要求 46 所述的方法, 其中所述至少一种核酸分子不扩增 TDGF1 多核苷酸。

48. 权利要求 46 所述的方法, 其中所述至少一种核酸分子与对应于 TDGF3 编码区的转录的多核苷酸的部分杂交, 所述部分跨越编码选自下组的氨基酸的核苷酸: V7, L68, E92 和 A178。

49. 权利要求 48 所述的方法, 其中所述至少一种核酸分子包含选自表 2 和表 3 所列的序列。

50. 权利要求 40 所述的方法, 其中样本中所述 TDGF3 基因的表达水平是通过用核酸探针检测样本中转录的多核苷酸的存在来评估, 所述核酸探针在严谨杂交条件与转录的 TDGF3 多核苷酸的核苷酸序列选择性杂交或与转录的 TDGF3 多核苷酸的部分杂交。

51. 权利要求 40 所述的方法, 其中样本中所述 TDGF3 基因的表达水平是通过用特异性结合所述 TDGF3 基因编码的蛋白的试剂, 检测样本中所述 TDGF3 基因编码的蛋白的存在来评估。

52. 权利要求 51 所述的方法, 其中所述试剂选自抗体、抗体衍生物和抗体片段组成的组。

53. 权利要求 52 所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合 TDGF3 多肽并且不结合 TDGF1 多肽。

54. 权利要求 52 所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与 TDGF3 多肽的胞外部分中包含的表位结合。

55. 权利要求 52 所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与包含选自下组的一或多个氨基酸的表位结合: V7, L68, E92 和 A178。

56. 权利要求 40 所述的方法, 其中所述患者样本包含肿瘤组织样本。

57. 权利要求 56 所述的方法, 其中所述肿瘤选自乳腺肿瘤、结肠肿瘤和肺肿瘤组成的组。

58. 权利要求 40 所述的方法, 其中所述患者样本是体液。

59. 权利要求 58 所述的方法, 其中所述体液选自血液、淋巴、腹水、妇科液体、囊液和尿液组成的组。

60. 权利要求 40 所述的方法, 其中患者样本中的 TDGF3 基因的表达水平与对照非-癌样本中的 TDGF3 基因的表达水平相差至少约 2 倍。

61. 权利要求 40 所述的方法, 其中患者样本中的 TDGF3 基因的表达水平与对照非-癌样本中的 TDGF3 基因的表达水平相差至少约 5 倍。

62. 权利要求 40 所述的方法, 其中所述 TDGF3 基因在对照非-癌样本中不表达。

63. 评估患者是否是抗-Cripto 抗体疗法的合适候选者的试剂盒, 所述试剂盒包含抗体、抗体衍生物或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性结合 TDGF3 蛋白。

64. 评估患者是否是抗-Cripto 抗体疗法的合适候选者的试剂盒, 所述试剂盒包含与 TDGF3 的转录多核苷酸选择性杂交的核酸分子。

65. 选出抑制细胞内的细胞转化的组合物的方法, 所述方法包含:

a) 获得含有细胞的样本, 和

b) 将等份的样本分别维持在多种被测组合物存在的条件下;

c) 比较每个所述等份中的TDGF3基因表达;

d) 选出一种被测组合物, 在含有该被测组合物的等份中诱导的TDGF3基因表达水平, 比其他被测组合物诱导的水平低。

66. 评估被测化合物的致癌潜力的方法, 所述方法包含:

a) 在所述被测化合物存在和不存在时分别维持多个哺乳动物细胞等份;
和

c) 比较每个所述等份中的TDGF3基因表达;

d) 其中TDGF3基因的表达水平在该被测化合物存在时维持的等份中比在该被测化合物不存在时维持的等份中高, 表明所述被测化合物具有致癌潜力。

67. 制备分离的单克隆抗体的方法, 所述单克隆抗体用于特异性检测样本中TDGF3多肽或其部分的存在, 所述方法包含:

分离TDGF3多肽或其部分;

用所分离的多肽免疫哺乳动物;

从被免疫的哺乳动物分离脾细胞;

将此分离的脾细胞与无限繁殖细胞系融合来制备杂交瘤; 和

筛选用于产生特异性结合所述TDGF3多肽的抗体的单个的杂交瘤; 和

分离所述杂交瘤产生的抗体, 从而分离用于特异性检测样本中TDGF3多肽或其部分的存在单克隆抗体。

68. 用权利要求67所述的方法制备的单克隆抗体。

69. 检测样本中TDGF1多核苷酸或其部分的存在的方法, 所述方法包含如下步骤:

a) 使所述样本接触与转录的TDGF1多核苷酸选择性杂交的核酸分子, 其中所述转录的TDGF1多核苷酸包含TDGF1基因的编码区; 和

b) 测定所述核酸分子是否结合样本中的所述多核苷酸, 从而检测样本中TDGF1多核苷酸或其部分的存在。

70. 权利要求69所述的方法, 其中所述转录的TDGF1多核苷酸是mRNA。

71. 权利要求69所述的方法, 其中所述转录的TDGF1多核苷酸是cDNA。

72. 权利要求69所述的方法, 其还包含用所述核酸分子扩增转录的TDGF1多核苷酸的步骤。

73. 权利要求72所述的方法, 其中所述扩增步骤包含聚合酶链式反应。

74. 权利要求72所述的方法, 其中所述核酸分子与所述转录的TDGF1多核苷酸的结合是通过检测扩增的TDGF1多核苷酸来确定的。

75. 权利要求72所述的方法, 所述转录的多核苷酸用至少一种与所述转录的TDGF1多核苷酸选择性杂交的核酸分子扩增。

76. 权利要求75所述的方法, 其中所述至少一种核酸分子不扩增TDGF3多核苷酸。

77. 权利要求75所述的方法, 其中所述至少一种核酸分子与转录的TDGF1多核苷酸的部分杂交, 所述部分包含TDGF3编码区内编码选自下组的氨基酸的核苷酸: A7, P68, G92, V178, V22和Y43。

78. 权利要求77所述的方法, 其中所述至少一种核酸分子包含选自表2和表3所列的序列。

79. 检测样本中TDGF1多肽或其部分的存在的方法, 所述方法包含如下步骤:

a) 使所述样本接触选择性结合TDGF1多肽的试剂; 和

b) 测定所述试剂是否结合样本中的所述多肽, 从而检测样本中TDGF3多肽或其部分的存在。

80. 权利要求79所述的方法, 其中所述试剂选自抗体、抗体衍生物和抗体片段。

81. 权利要求80所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合TDGF1多肽并且不结合TDGF3多肽。

82. 权利要求80所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与TDGF1多肽的胞外部分中包含的表位结合。

83. 权利要求80所述的方法, 其中所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与包含选自下组的氨基酸的表位结合: V7, L68, E92和A178。

84. 权利要求69或权利要求79所述的方法, 其中所述患者样本包含肿瘤组织样本。

85. 权利要求84所述的方法, 其中所述肿瘤选自乳腺肿瘤、结肠肿瘤和肺肿瘤组成的组。

86. 权利要求69或权利要求79所述的方法, 其中所述患者样本是体液。

87. 权利要求86所述的方法, 其中所述体液选自血液、淋巴、腹水、妇科液体、囊液和尿液组成的组。

88. 检测样本中TDGF1多核苷酸或其部分的存在的的方法, 所述方法包含如下步骤:

a) 使所述样本接触与转录的TDGF1多核苷酸的部分选择性杂交的核酸分子, 所述部分包含TDGF1编码区内编码选自下组的氨基酸的核苷酸: A7, P68, G92, V178, V22和Y43;

b) 通过聚合酶链式反应用所述核酸分子扩增所述转录的TDGF1多核苷酸或其部分; 和

b) 检测扩增的TDGF1多核苷酸, 从而检测样本中所述TDGF1多核苷酸或其部分的存在。

89. 检测样本中TDGF1多核苷酸或其部分的存在的试剂盒, 所述试剂盒包含与TDGF1的转录多核苷酸选择性杂交的核酸分子。

90. 检测样本中TDGF1多肽或其部分的存在的试剂盒, 所述试剂盒包含抗体、抗体衍生物或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性结合TDGF1多肽或其部分。

91. 特异性检测TDGF1多核苷酸的分离的核酸分子, 其中所述核酸分子选自表2和表3所列的序列。

92. 特异性检测TDGF3多核苷酸的分离的核酸分子, 其中所述核酸分子选自表2和表3所列的序列。

用于检测 CRIPTO-3 的组合物及方法

相关申请

该申请要求 2006 年 4 月 28 日提交的标题为“用于检测 CRIPTO-3 的组合物及方法”的美国临时专利申请 60/795,807 的权益。上述临时专利申请的完整内容在此引入作为参考。

背景技术

Cripto-1(由 TDGF1 编码)是与细胞表面结合的(cell surface-associated)蛋白,其包含一个与转化生长因子 α 和表皮生长因子有相似性的结构域。EGF-CFC 家族蛋白在早期发育和癌形成中起重要作用(参见综述: Gritsman *et al.* 1999; Minchiotti *et al.* 2001; Saloman *et al.* 2000; Strizzi *et al.* 2005)). Cripto 功能突变的损失与人的前脑无裂畸形(holoprosencephaly),包括前脑缺陷和发育推迟有关(de la Cruz *et al.* 2002)。Cripto 蛋白在正常成人组织中的表达低,而且不清楚正常成人组织中此蛋白是否有功能。乳腺是个例外,据猜测在那里 Cripto 表达对于导管上皮细胞的分化起作用(Saloman *et al.* 2000)。然而, Cripto 蛋白在人的多种实体瘤中过表达(Adkins *et al.* 2003; Ciardiello *et al.* 1991b; Shen 2003)。例如,用抗-Cripto 抗体作免疫组化显示, Cripto 在多达 80% 的人乳腺癌以及很大比例的结肠癌和肺癌中过表达。Cripto 的过表达还是致癌的(oncogenic) (Sun Y 2005)。也有报道显示, Cripto 的表达导致正常小鼠乳腺上皮细胞系的转化(transformation)(Ciardiello *et al.* 1991a)。几份最近的出版物显示,通过单克隆抗体或反义寡核苷酸抑制 Cripto 会抑制体内癌细胞生长(Adkins *et al.* 2003; Normanno *et al.* 2004b; Xing *et al.* 2004)。

虽然清楚 Cripto 在很多癌细胞系和肿瘤中上调,而且 Cripto 的过表达还是致癌的,但仍不太清楚在正常和癌组织中如何调控 Cripto 的表达。而且,不清楚有多少基因实际编码 Cripto 蛋白。人基因组中至少有七个 CRIPTO 基因和假基因(pseudogene),称为 TDGF1 到 TDGF7。TDGF1 位于第 3 条染色体 p23-21 区域,普遍认为它是 Cripto 蛋白的唯一结构基因(表 1)。在 6 个假基因中, X 染色体(Xq28)上的 TDGF3 有编码可预测蛋白(Cripto-3)的完整开放阅读框架,所

述可预测蛋白与公开的Cripto-1蛋白参照序列(Scognamiglio B 1999)有6个氨基酸不同(图1A; SEQ ID NO:1)。此基因没有内含子,看来其来自于在进化中插入到人基因组中的TDGF1 cDNA,在本发明之前,据推测它是不表达的。因此,本领域需要检测假基因TDGF3的潜在表达,并且进一步需要检测可能存在于TDGF3表达和发作或患有增生疾病(proliferative disease)如癌症之间的任何相关性。

发明概述

本发明是基于,至少部分基于如下发现:推测的假基因 TDGF3是在人类细胞中表达的有功能的无内含子的基因,另外,TDGF3过表达与细胞的转化有关,如TDGF3在癌细胞系和来自肿瘤组织的细胞中过表达。因此,本发明涉及用于特异性检测样本中标记物如TDGF3和/或TDGF1、多核苷酸或多肽的存在的组合物、试剂盒和方法。这些组合物、试剂盒和方法可用于确定肿瘤的表型,如该肿瘤是否是表达TDGF1或TDGF3的肿瘤。这些组合物、试剂盒和方法还可用于评估细胞是否转化,例如用于诊断癌症,以及用于评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者。因此,本发明还涉及用于确定肿瘤的表达Cripto的表型的组合物、试剂盒和方法。本发明还涉及用于评估细胞是否转化的组合物、试剂盒和方法。本发明还涉及用于评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的组合物、试剂盒和方法。

因此,本发明一方面涉及检测样本中TDGF3多核苷酸或其部分的存在的方法,所述方法包含如下步骤:

- a) 使所述样本接触与转录的TDGF3多核苷酸选择性杂交的核酸分子,其中所述转录的TDGF3多核苷酸包含TDGF3基因的编码区; 和
- b) 确定所述核酸分子是否结合样本中的多核苷酸,从而检测样本中TDGF3多核苷酸或其部分的存在。

一个实施方案中,所述转录的TDGF3多核苷酸是mRNA。

一个实施方案中,所述转录的TDGF3多核苷酸是cDNA。

一个实施方案中,所述方法还包含用所述核酸分子扩增所述转录的TDGF3多核苷酸的步骤。

一个实施方案中,所述扩增步骤包含聚合酶链式反应。

一个实施方案中,所述核酸分子与转录的TDGF3多核苷酸的结合通过检

测扩增的TDGF3多核苷酸来确定。

一个实施方案中，所述转录的多核苷酸用至少一种与所述转录的TDGF3多核苷酸选择性杂交的核酸分子扩增。

一个实施方案中，所述至少一种核酸分子不扩增TDGF1多核苷酸。

一个实施方案中，所述至少一种核酸分子与转录的TDGF3多核苷酸的部分杂交，所述部分包含TDGF3编码区内编码选自下组的氨基酸的核苷酸：V7, L68, E92和A178。

一个实施方案中，所述至少一种核酸分子包含选自表2和表3所列的序列。

本发明一方面涉及检测样本中TDGF3多肽或其部分的存在的方法，所述方法包含如下步骤：

a) 使所述样本接触选择性结合TDGF3多肽的试剂；和

b) 确定所述试剂是否结合样本中的所述多肽，从而检测该样本中TDGF3多肽或其部分的存在。

一个实施方案中，所述试剂选自抗体、抗体衍生物和抗体片段。

一个实施方案中，所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合TDGF3多肽并且不结合TDGF1多肽。

一个实施方案中，所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与TDGF3多肽的胞外部分中包含的表位结合。

一个实施方案中，所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合包含选自下组的氨基酸的表位：V7, L68, E92和A178。

一个实施方案中，所述患者的样本包含肿瘤组织样本。

一个实施方案中，所述肿瘤选自由乳腺肿瘤、结肠肿瘤和肺肿瘤组成的组。

一个实施方案中，所述患者样本是体液。

一个实施方案中，所述体液选自由血液、淋巴(lymph)、腹水(ascetic fluid)、妇科液体(gynecological fluid)、囊液(cystic fluid)和尿液组成的组。

本发明另一方面涉及检测样本中TDGF3多核苷酸或其部分的存在的方法，所述方法包含如下步骤：

a) 使所述样本接触与转录的TDGF3多核苷酸的部分选择性杂交的核酸分子，所述部分包含TDGF3编码区内编码选自下组的氨基酸的核苷酸：V7,

L68, E92和A178;

b) 通过聚合酶链式反应用所述核酸分子扩增所述转录的TDGF3多核苷酸或其部分; 和

b) 检测扩增的TDGF3多核苷酸, 从而检测样本中所述TDGF3多核苷酸或其部分的存在。

本发明另一方面涉及检测样本中TDGF3多核苷酸或其部分的存在试剂盒, 所述试剂盒包含与TDGF3的转录多核苷酸选择性杂交的核酸分子。

本发明另一方面涉及检测样本中TDGF3多肽或其部分的存在试剂盒, 所述试剂盒包含抗体、抗体衍生物或其片段, 其中所述抗体或其片段特异性结合TDGF3多肽或其部分。

本发明另一方面涉及评估细胞是否转化的方法, 其包含比较:

a) 被测细胞中TDGF3基因的表达水平, 和

b) 对照未转化的细胞中TDGF3基因的表达水平,

其中TDGF3基因在被测细胞中的表达水平比在对照未转化的细胞中的水平高表明所述被测细胞转化了。

一个实施方案中, TDGF3基因在被测细胞和对照细胞中的表达水平是通过检测转录的多核苷酸或其部分在被测细胞和对照细胞中的存在来评估的, 其中所述转录的多核苷酸包含TDGF3基因的编码区。

一个实施方案中, 所述转录的多核苷酸是mRNA。

一个实施方案中, 所述转录的多核苷酸是cDNA。

一个实施方案中, 所述检测步骤还包含在检测所述转录的多核苷酸之前扩增该转录的多核苷酸。

一个实施方案中, 所述扩增步骤包含聚合酶链式反应。

一个实施方案中, 所述转录的多核苷酸用至少一种与所述TDGF3编码区选择性杂交的核酸分子扩增。

一个实施方案中, 所述至少一种核酸分子不扩增TDGF1多核苷酸。

一个实施方案中, 所述至少一种核酸分子与对应于TDGF3编码区的转录多核苷酸的部分杂交, 所述部分跨越(span)编码选自下组的氨基酸的核苷酸: V7, L68, E92和A178。

一个实施方案中, 所述至少一种核酸分子包含选自表2和表3所列的序列。

一个实施方案中，评估TDGF3基因在被测细胞和对照细胞中的表达水平是通过用特异性结合所述TDGF3基因编码的蛋白的试剂，检测所述TDGF3基因编码的蛋白在被测细胞和对照细胞中的存在。

一个实施方案中，所述试剂选自抗体、抗体衍生物和抗体片段。

一个实施方案中，所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合TDGF3多肽并且不结合TDGF1多肽。

一个实施方案中，所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与TDGF3多肽的胞外部分中包含的表位结合。

一个实施方案中，所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与包含选自下组的一或多个氨基酸的表位结合：V7, L68, E92和A178。

本发明另一方面涉及评估样本中的转化细胞的存在试剂盒，所述试剂盒包含抗体、抗体衍生物或其片段，其中所述抗体或其片段特异性结合TDGF3蛋白。

本发明另一方面涉及评估样本中转化细胞的存在试剂盒，所述试剂盒包含与TDGF3的转录多核苷酸选择性杂交的核酸分子。

本发明另一方面涉及评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的方法，所述方法包含比较：

a) 患者样本中的TDGF3基因的表达水平，和

b) 对照非-癌样本中的TDGF3基因的表达水平，

其中TDGF3基因在患者样本中的表达水平比在对照非-癌样本中高，表明所述患者是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者。

另一方面，样本中所述TDGF3基因的表达水平是通过检测样本中转录的多核苷酸或其部分的存在来评估的，其中所述转录的多核苷酸包含TDGF3基因的编码区。

一个实施方案中，所述转录的多核苷酸是mRNA。

一个实施方案中，所述转录的多核苷酸是cDNA。

一个实施方案中，所述检测步骤还包含在检测所述转录的多核苷酸之前扩增该转录的多核苷酸。

一个实施方案中，所述扩增步骤包含聚合酶链式反应。

一个实施方案中，所述转录的多核苷酸用至少一种与所述TDGF3编码区选择性杂交的核酸分子扩增。

一个实施方案中,所述至少一种核酸分子不扩增TDGF1多核苷酸。

一个实施方案中,所述至少一种核酸分子与对应于TDGF3编码区的转录的多核苷酸的部分杂交,所述部分跨越编码选自下组的氨基酸的核苷酸: V7, L68, E92和A178。

一个实施方案中,所述至少一种核酸分子包含选自表2和表3所列的序列。

一个实施方案中,评估样本中TDGF3基因的表达水平是通过用核酸探针检测样本中转录的多核苷酸的存在,所述核酸探针在严谨杂交条件与转录的TDGF3多核苷酸的核苷酸序列选择性杂交或与转录的TDGF3多核苷酸的部分杂交。

一个实施方案中,评估样本中TDGF3基因的表达水平是通过用特异性结合所述TDGF3基因编码的蛋白的试剂,检测样本中所述TDGF3基因编码的蛋白的存在。

一个实施方案中,所述试剂选自抗体、抗体衍生物和抗体片段。

一个实施方案中,所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合TDGF3多肽并且不结合TDGF1多肽。

一个实施方案中,所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与TDGF3多肽的胞外部分中包含的表位结合。

一个实施方案中,所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与包含选自下组的一或多个氨基酸的表位结合: V7, L68, E92和A178。

一个实施方案中,所述患者样本包含肿瘤组织样本。

一个实施方案中,所述肿瘤选自由乳腺肿瘤、结肠肿瘤和肺肿瘤组成的组。

一个实施方案中,所述患者样本是体液。

一个实施方案中,所述体液选自由血液、淋巴、腹水、妇科液体、囊液和尿液组成的组。

一个实施方案中,患者样本中的TDGF3基因的表达水平与对照非-癌样本中的TDGF3基因的表达水平相差至少约2倍的系数(factor)。

一个实施方案中,患者样本中的TDGF3基因的表达水平与对照非-癌样本中的TDGF3基因的表达水平相差至少约5倍的系数。

一个实施方案中,所述TDGF3基因在对照非-癌样本中不表达。

本发明另一方面涉及评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的试剂盒，所述试剂盒包含抗体、抗体衍生物或其片段，其中所述抗体或其片段特异性结合TDGF3蛋白。

本发明另一方面涉及评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的试剂盒，所述试剂盒包含与TDGF3的转录多核苷酸选择性杂交的核酸分子。

本发明另一方面涉及选出抑制细胞内的细胞转化的组合物的方法，所述方法包含：

- a) 获得含有细胞的样本，和
- b) 分别在多种被测组合物存在时保持等份的所述样本；
- c) 比较每个等份中的TDGF3基因表达；
- d) 选出一种被测组合物，在含有该被测组合物的等份中诱导的TDGF3基因表达水平比其他被测组合物诱导的水平低。

本发明另一方面涉及评估被测化合物的致癌潜力的方法，所述方法包含：

- a) 在所述被测化合物存在和不存在时分别维持多个哺乳动物细胞等份；和
- c) 比较每个等份中的TDGF3基因表达；
- d) 其中在有该被测化合物存在时维持的等份中TDGF3基因的表达水平比在该被测化合物不存在时维持的等份中高，表明所述被测化合物具有致癌潜力。

本发明另一方面涉及制备分离的单克隆抗体的方法，所述单克隆抗体用于特异性检测样本中TDGF3多肽或其部分的存在，所述方法包含：

- 分离TDGF3多肽或其部分；
- 用所分离的多肽免疫哺乳动物；
- 从被免疫的哺乳动物分离脾细胞；
- 将此分离的脾细胞与无限繁殖细胞系(immortalized cell line)融合来制备杂交瘤；和
- 筛选用于产生特异性结合所述TDGF3多肽的抗体的单个杂交瘤；和
- 分离所述杂交瘤产生的抗体，从而分离用于特异性检测样本中TDGF3多肽或其部分的存在单克隆抗体。

本发明另一方面涉及用本发明方法制备的单克隆抗体。

本发明一方面涉及检测样本中TDGF1多核苷酸或其部分的存在的方法，所述方法包含如下步骤：

a) 使所述样本接触与转录的TDGF1多核苷酸选择性杂交的核酸分子，其中所述转录的TDGF1多核苷酸包含TDGF1基因的编码区；和

b) 测定所述核酸分子是否结合样本中的多核苷酸，从而检测样本中TDGF1多核苷酸或其部分的存在。

一个实施方案中，所述转录的TDGF1多核苷酸是mRNA。

一个实施方案中，所述转录的TDGF1多核苷酸是cDNA。

一个实施方案中，所述方法包含用所述核酸分子扩增转录的TDGF1多核苷酸的步骤。

一个实施方案中，所述扩增步骤包含聚合酶链式反应。

一个实施方案中，所述核酸分子与所述转录的TDGF1多核苷酸的结合是通过检测扩增的TDGF1多核苷酸来测定的。

一个实施方案中，所述转录的多核苷酸用至少一种与所述转录的TDGF1多核苷酸选择性杂交的核酸分子扩增。

一个实施方案中，所述至少一种核酸分子不扩增TDGF1多核苷酸。

一个实施方案中，所述至少一种核酸分子与转录的TDGF1多核苷酸的部分杂交，所述部分包含TDGF1编码区内编码选自下组氨基酸的核苷酸：A7, P68, G92, V178, V22和Y43。

一个实施方案中，所述至少一种核酸分子包含选自表2和表3所列的序列。

本发明一方面涉及检测样本中TDGF1多肽或其部分的存在的方法，所述方法包含如下步骤：

a) 使所述样本接触选择性结合TDGF1多肽的试剂；和

b) 确定所述试剂是否结合样本中的多肽，从而检测样本中TDGF1多肽或其部分的存在。

一个实施方案中，所述试剂选自抗体、抗体衍生物和抗体片段。

一个实施方案中，所述抗体、抗体衍生物或抗体片段结合TDGF1多肽并且不结合TDGF1多肽。

一个实施方案中，所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与TDGF1多肽的胞

外部分中包含的表位结合。

一个实施方案中，所述抗体、抗体衍生物或抗体片段与包含选自下组的氨基酸的表位结合：V7, L68, E92和A178。

一个实施方案中，所述患者样本包含肿瘤组织样本。

一个实施方案中，所述肿瘤选自由乳腺肿瘤、结肠肿瘤和肺肿瘤组成的组。

一个实施方案中，所述患者样本是体液。

一个实施方案中，所述体液选自由血液、淋巴、腹水、妇科液体、囊液和尿液组成的组。

本发明一方面涉及检测样本中TDGF1多核苷酸或其部分的存在的方法，所述方法包含如下步骤：

a) 使所述样本接触与转录的TDGF1多核苷酸的部分选择性杂交的核酸分子，所述部分包含TDGF1编码区内编码选自下组氨基酸的核苷酸：A7, P68, G92, V178, V22和Y43；

b) 通过聚合酶链式反应用所述核酸分子扩增所述转录的TDGF1多核苷酸或其部分；和

b) 检测扩增的TDGF1多核苷酸，从而检测样本中所述TDGF1多核苷酸或其部分的存在。

本发明一方面涉及检测样本中TDGF1多核苷酸或其部分的存在试剂盒，所述试剂盒包含与TDGF1的转录多核苷酸选择性杂交的核酸分子。

本发明一方面涉及检测样本中TDGF1多肽或其部分的存在试剂盒，所述试剂盒包含抗体、抗体衍生物或其片段，其中所述抗体或其片段特异性结合TDGF1多肽或其部分。

本发明另一方面涉及特异性检测TDGF1多核苷酸的分离的核酸分子，其中所述核酸分子选自表2和表3所列的序列。

本发明另一方面涉及特异性检测TDGF3多核苷酸的分离的核酸分子，其中所述核酸分子选自表2和表3所列的序列。

附图简述

图1A-C描述了编码Cripto-1和Cripto-3的核苷酸序列和多肽序列。(A) TDGF1和TDGF3编码的蛋白质的肽序列比对。最上面一行是Cripto 1序列

(SEQ ID NO:1), 最底下一行是Cripto 3序列(SEQ ID NO:2)。共有的序列在中间。两种蛋白的氨基酸残基不同处用点注明。Cripto1中由于TDGF1中SNP所致的可变氨基酸位点用星号注明, 并且两种蛋白间固定的氨基酸差异用方框括出。信号肽是黑体。潜在的岩藻糖基化位点用下划线标记。(B) 编码Cripto-1的核酸序列(SEQ ID NO:3)。 (C)编码Cripto-3的核酸序列(SEQ ID NO:4)。

图2A-2B描述了TDGF的cDNA片段的PCR扩增结果。(A)cDNA纯度试验。显示了寡聚体(oligo)相对于TDGF1基因的位置, 以及用cDNA和基因组DNA进行PCR所预期的结果。1-4道: 来自4个乳腺肿瘤的cDNA; 5-8道: 来自4个结肠肿瘤的cDNA; 9-12道: 来自4个肺肿瘤的cDNA; 13道: 100 bp DNA标记物; 14-25道: 来自与1-12道相同的组织样本组的基因组DNA。(B)外显子间(Inter-exon) PCR。显示了寡核苷酸相对于TDGF基因和转录物的位置, 以及用cDNA和基因组DNA进行PCR所预期的结果。1374 bp DNA片段来自TDGF1基因, 从基因组DNA扩增的286 bp DNA片段来自TDGF3基因, 而从cDNA扩增的286 bp DNA片段来自TDGF1和/或TDGF3 cDNA, 因为这些cDNA模板没有受到基因组DNA的污染。

图3A-3B描述了转录物-特异性PCR的结果。(A)用TDGF1转录物-特异性寡聚体对进行PCR的结果。(B)用TDGF3特异性寡核苷酸对进行PCR的结果。1道: 正常乳腺#1; 2道: 正常乳腺#3; 3道: 正常乳腺#4; 4道: 正常肺#; 5道: 正常肺#4; 6-12道: 乳腺癌; 13道: 正常结肠; 14-15道: 结肠癌; 16-18道: 正常肺; 19道: 匹配的正常肺; 20-21道: 肺癌; 22道: 基因组DNA(gDNA)对照; 23道: 100 bp DNA标记物。

图4A-4B描述了细胞表面Cripto 1和Cripto 3的FACS分析结果。(A) 用抗Cripto抗体对TDGF1和TDGF3阳性细胞系进行的FACS分析。(a)NCCIT细胞(TDGF1阳性); (b)BT474细胞(TDGF3阳性); (c)和(d)用抗-小鼠IgG获得的阴性对照。结果显示Cripto 1和Cripto 3蛋白都存在于细胞表面并且可用抗-Cripto抗体检测。(B)用TDGF1或TDGF3转染的细胞的FACS分析。(a)用TDGF1基因转染的T47D细胞; (b)用TDGF3基因转染的T47D细胞; (c)和(d)用抗-小鼠IgG获得的阴性对照。结果显示转染的基因TDGF1和TDGF3所编码的Cripto 1和Cripto 3表达在细胞表面上并且被抗-Cripto抗体识别。

图5描述了显示Cripto-1和Cripto-3在F9细胞中能够通过Nodal传递信号的结果。用表达(n2)₇-萤光素酶(luciferase)的质粒、表达FAST的质粒 及无任何

添加物(第1列)的质粒,或添加了人Cripto-1(第2列)或人Cripto-3(第3列)的质粒转染F9 cripto-/-细胞。

发明内容

人基因组中至少有七个CRIPTO基因和假基因,称为TDGF1到TDGF7。TDGF1位于第3条染色体p23-21区域,且在本发明之前,普遍认为它是Cripto蛋白的唯一结构基因(表1)。

表1: TDGF基因列表

TDGF 基因	分类	基因组定位	ORF	表达
TDGF1	结构基因	Chr 3p23-p21	完整	是
TDGF2	假基因	Chr 2q37	破损	
TDGF3	假基因	Chr Xq21-q22	完整	未知
TDGF4	假基因	Chr 6p25	破损	
TDGF5	假基因	Chr 8	破损	
TDGF6	假基因	Chr 3q22	破损	
TDGF7	假基因	Chr 19q13	破损	

在6个假基因中,X染色体(Xq28)上的TDGF3有可编码预计蛋白(Cripto-3)的完整开放阅读框架,所述预计蛋白与公开的Cripto-1蛋白参照序列(Scognamiglio B 1999)(图1A; SEQ ID NO:1)有6个不同的氨基酸。此基因没有内含子,似乎其来自于在进化中插入到人基因组中的TDGF1 cDNA。

本发明是基于,至少部分基于如下惊人发现:来自多种癌组织和细胞系的大量Cripto cDNA分离物源自TDGF3(Cripto-3)基因而不是TDGF1(Cripto-1)基因。TDGF1和TDGF3基因在多种正常和癌性人组织中被转录并翻译。当检查表达Cripto的组织样本时,仅在少量情况下两种基因以类似水平表达,而在大多数情况下TDGF1或TDGF3优势表达。特别是,本发明是基于如下发现:虽然TDGF1会在一些正常组织中表达,但TDGF3而不是TDGF1却在大多数表达Cripto的肿瘤中过表达。

因此,本文提供了用于检测样本中本发明的标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的存在的组合物、试剂盒和方法,其通过例如特异性检测样本中标记物,如Cripto-3和/或Cripto-1、多核苷酸或多肽的表达来达到目的。这些

组合物、试剂盒和方法可用于确定肿瘤的表型,如该肿瘤是否是表达 Cripto-1 或 Cripto-3 的肿瘤。本文也提供了评估细胞是否转化的方法。这些方法涉及比较在细胞中的 TDGF3 基因表达水平和在对照的未转化细胞中的 TDGF3 基因表达水平。本文还提供了评估患者是否是抗-Cripto 抗体疗法的合适候选者的方法。这些方法涉及比较在患者样本中的 TDGF3 基因表达水平和在对照的非-癌样本中的 TDGF3 基因表达水平。

本发明的多个方面将在后文予以更详尽的描述:

I. 定义

本文所用的每个如下术语都具有与本部分有关的含义。

本文所用的冠词“一个”和“一种”指冠词的一个或一个以上(即至少一个)语法客体。举个例子,“一个元件”指一个或一个以上的元件。

本文所用的术语“标记物”包括据认为参与细胞转化或增生疾病如癌症的发病(包括维持(maintenance)、进展、血管生成和/或转移)的 Cripto-3(TDGF3)和/或Cripto-1 (TDGF1)等标记物。“标记物”包括可用于评估细胞是否转化的Cripto-3和/或Cripto-1等标记物。“标记物”也包括可用于评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的Cripto-3和/或Cripto-1。术语“TDGF3”和“Cripto-3”在本文是互换使用的。术语“TDGF1”和“Cripto-1”在本文是互换使用的。

本发明的标记物也可用于增生疾病(如癌症)的诊断,如在开展疗法之前、之中或之后增生疾病的过强活性(over-activity)或过低活性(under-activity)、出现、表现、生长、缓解(remission)、复发(recurrence)或耐受。本发明的标记物也可用于诊断肿瘤级别,肿瘤预后以及肿瘤的治疗反应。所述标记物的预测功能可以通过如下来确认,例如(1)在人类增生疾病如癌症(如在超过约2%, 3%, 5%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 20%, 25%, 50%或更多的人类增生疾病如癌症)中的过表达或低表达(underexpression)(如通过ISH、Northern Blot或qPCR测定)、蛋白水平升高或降低(如通过IHC测定)、或活性升高或降低(如通过所述标记物所参与的路径的调控来确定);(2)其在生物样本中的存在或缺无,所述样本如包含来自患有增生疾病如癌症的受试者(如人类受试者)的组织、细胞或生物液体的样本;或(3)其在患有增生疾病如癌症的不同临床分组的患者(如对特定疗法有反应的那些或产生耐

受的那些)中的存在或缺无。

“标记物核酸”是本发明标记物如Cripto-3和/或Cripto-1编码或对应的核酸(如DNA, mRNA, cDNA)。例如,此种标记物核酸分子包括含所述Cripto-3基因的核酸序列的完整或部分序列、或此序列的互补物或杂交片段的DNA(如基因组DNA或cDNA)。所述标记物核酸分子也包括含所述Cripto-3基因的核酸序列的完整或部分序列、或此序列的互补物的RNA,如mRNA,其中所有胸苷残基被尿苷残基替代。

“标记物蛋白”或“标记物多肽”是本发明标记物如Cripto-3和/或Cripto-1编码或对应的蛋白。标记物蛋白包含所述Cripto-3基因的多核苷酸序列所编码的蛋白的完整氨基酸序列。术语“蛋白”和“多肽”在本文是互换使用的。

术语标记物的“改变的(altered)量”或“受调控的(modulated)量”(在本文互换使用)或术语标记物的“改变的水平”或“受调控的水平”(在本文互换使用)指,与标记物在对照样本(如来自正常的非癌组织如邻近的正常组织的样本,或来自不患有增生疾病如癌症的健康受试者的样本)中的表达水平相比,所述标记物基因在样本中(如来自患有增生疾病(如癌症)的受试者的样本)的表达水平受调控如升高或下降。术语标记物的“改变的量”或“受调控的量”也包括与标记物在正常的对照样本中的蛋白水平相比,所述标记物在样本(如来自患有增生疾病(如癌症)的受试者的样本)中受调控如升高或下降的蛋白水平。

术语标记物的“改变的表达水平”和“受调控的表达水平”(在本文互换使用)指,与标记物在对照样本(如来自正常的非癌组织如邻近的正常组织的样本,或来自不患有增生疾病如癌症的健康受试者的样本)中的表达水平相比,所述标记物在样本(如源自患增生疾病(如癌症)的患者的样本)中的表达水平受调控,如高或低统计学显著的量,如超过评估表达所用试验的标准差的量。优选,与所述标记物在对照样本中的表达水平,优选与所述标记物在若干对照样本中的平均表达水平相比,所述标记物在被测样本中的表达水平受调控,如高或低至少两倍,更优选三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。

标记物的“过表达”或“较高表达水平”或“更高表达水平”指,在样本中的表达水平比该标记物在对照样本(如来自正常的非癌组织如邻近的正常组织的样本,或来自不患有增生疾病如癌症的健康受试者的样本)中的表达水平高统计学显著的量,如超过评估表达所用试验的标准差的量,并且优选是所

述标记物在对照样本中的表达水平(优选所述标记物在若干对照样本中的平均表达水平)的至少两倍,更优选三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。

标记物的“表达低下”或“较低表达水平”指,在样本中的表达水平比该标记物在对照样本(如来自正常的非癌组织如邻近的正常组织的样本,或来自不患有增生疾病如癌症的健康受试者的样本)中的表达水平低统计学显著的量,如超过评估表达所用试验的标准差的量,并且优选比所述标记物在对照样本中的表达水平,优选比所述标记物在若干对照样本中的平均表达水平低至少两倍,更优选三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。

标记物在样本中的量,如标记物的表达或标记物的蛋白水平,“显著地”高于或低于标记物在对照样本(如来自正常的非癌组织如邻近的正常组织的样本,或来自不患有增生疾病如癌症的健康受试者的样本)中的量,条件是所述标记物的量分别以超过用于评估“量”的试验的标准差的量高于或低于在对照样本中的水平,并且优选是所述量的至少两倍,更优选三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。可选地,标记物在样本中的量可以被认为“显著地”高于或低于在对照样本中的量,条件是所述量分别比所述标记物在对照样本中的量高或低至少约两倍,并优选至少约三倍、四倍、或五倍。

术语标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的“改变的活性”和“受调控的活性”(在本文互换使用)指,与标记物在正常的对照样本中的活性相比,标记物在疾病状态如增殖性疾病(如癌症)时受调控如升高或降低的活性。标记物的改变的或受调控的活性可能由于,例如标记物的表达改变或受调控、标记物的蛋白水平改变或受调控、标记物的结构改变或受调控、或例如与所述标记物参与的途径相同或不同的途径中的其它蛋白同所述标记物的相互作用改变或受调控、或与转录激活物或抑制物的相互作用改变或受调控、或甲基化状态改变。

术语标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的“改变的结构”和“受调控的结构”(在本文互换使用),指与正常的或野生型基因或蛋白相比,在标记物基因或标记物蛋白内存在突变或等位变体,如影响标记物的表达或活性的突变。例如,突变包括但不限于替代、缺失或添加型突变。突变可以存在于标记物的编码或非编码区。

“转录的多核苷酸”是与成熟RNA的全部或部分互补或者同源的多核苷酸(如RNA、cDNA、或RNA或cDNA任一者的类似物),其产生是通过转录本

发明标记物如Cripto-3,必要时对转录物进行正常转录后加工(如剪接),以及对转录物进行逆转录而产生的。

“互补”指两条核酸链的区域之间或同一条核酸链的两个区域之间的序列互补的广义概念。已知第一个核酸区域的腺嘌呤残基能够与反向平行于该第一个区域的第二个核酸区域的残基(如果该残基是胸腺嘧啶或尿嘧啶)形成独特的氢键(“碱基配对”)。类似地,已知第一条核酸链的胞嘧啶残基能与反向平行于第一条链的第二条核酸链的残基(如果该残基是鸟嘌呤)碱基配对。一个核酸分子的第一个区域与同一个或不同核酸分子的第二个区域互补,前提是这两个区域以反向平行方式排列,第一个区域的至少一个核苷酸残基能与第二个区域的一个残基进行碱基配对。优选,所述第一个区域包含第一个部分,所述第二个区域包含第二个部分,其中当所述第一个和第二个部分以反向平行方式排列时,第一个部分的至少约50%,并优选至少约75%,至少约90%或至少约95%的核苷酸残基能与第二个部分的核苷酸残基进行碱基配对。更优选,第一个部分的所有核苷酸残基能与第二个部分的核苷酸残基进行碱基配对。

术语“同源性”或“同一性(identity)”(在本文互换使用)指两条多核苷酸序列或两条多肽序列之间的序列相似性,而同一性指更严格的比较。术语“百分比同一性或同源性”和“%同一性或同源性”指在比较两条或多条多核苷酸序列或者两条或多条多肽序列时发现的序列相似性百分比。“序列相似性”指在两条或多条多核苷酸序列之间碱基对序列的百分比相似性(用任何合适方法测定)。两条或多条序列可以是0-100%相似或在之间的任何整数百分比。可以通过比较每条序列中为比较的目的而比对的位置,来测定同一性或同源性。当被比较的序列中的位置被相同核苷酸或氨基酸占据时,所述分子在该位置就是等同的。多核苷酸序列之间的相似性或同一性的程度是在多核苷酸序列共有的位置上的同一的或匹配的核苷酸数目的函数。多肽序列的同一性程度是在多肽序列共有位置上的等同氨基酸数目的函数。多肽序列的同源性或相似性的程度是在多肽序列共有位置上的氨基酸数目的函数。本文所用的术语“基本(substantial)同源性”指至少50%,更优选60%,70%,80%,90%,95%或更高的同源性。

术语“探针”指能与特定靶分子,例如本发明的标记物如Cripto-3和/或Cripto-1,选择性结合的任何分子。探针可以由本领域技术人员合成,也可

以源自合适的生物制备物。如本文所述,为了检测靶分子的目的,探针可以具体设计成被标记的。可以用作探针的分子的例子包括但不限于RNA、DNA、蛋白、抗体和单体有机物。

“核酸探针”或“引物”指任何能与本发明的标记物多核苷酸,如Cripto-3多核苷酸和/或Cripto-1多核苷酸,选择性杂交的核酸分子。“核酸探针”或“引物”包括任何能与Cripto-3多核苷酸如Cripto-3转录的多核苷酸选择性杂交,从而可以选择性检测Cripto-3多核苷酸的核酸分子,例如,其在检出Cripto-1多核苷酸如Cripto-1转录的多核苷酸方面不太有效或不能检出。“核酸探针”或“引物”也包括任何能与Cripto-1多核苷酸如Cripto-1转录的多核苷酸选择性杂交的核酸分子,从而可以选择性检测Cripto-1多核苷酸,例如,从而在检出Cripto-3多核苷酸如Cripto-3转录的多核苷酸方面不太有效或不能检出。

如果标记物或探针(如核酸探针或引物)共价或非共价结合于底物,则它“固定于”所述底物,使得可以用液体(如标准柠檬酸盐溶液, pH 7.4)漂洗该底物,但所述标记物的基本级分(substantial fraction)不会从所述底物上解离下来。

本文所用的“天然的(naturally-occurring)”核酸分子指有天然出现的核苷酸序列(如编码天然蛋白)的RNA或DNA分子。

本文所用的“增生疾病”指任何与不良细胞增生有关的疾病,如癌症。本文所述的增生疾病的非限制性例子包括乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌、睾丸癌、卵巢癌、肾癌、子宫癌、宫颈癌、前列腺癌、膀胱癌、胰腺癌、胃癌、中枢神经系统癌、黑色素瘤(melanoma)、淋巴瘤和白血病。

增生疾病如癌症“受调控”(如“受抑制”)是指所述增生疾病的至少一种症状被缓和(alleviated)、终止(terminated)、减慢、或被阻止(prevented)。本文所述增生疾病(如癌症)“受抑制”是指,所述增生疾病(如肿瘤)的再发(relapse),复发(recurrence)或转移被降低、减慢、推迟或被阻止。

本文所用的“受试者”指脊椎动物,特别是哺乳动物物种的成员,并且包括但不限于家养动物、竞技动物和灵长类动物,包括人。

本文所用的术语“启动子”、“调控(regulatory)序列”或“启动子元件”指表达与所述启动子/调控序列可操作连接的基因产物所需的核酸序列。有时此序列可以是核心启动子序列,而其它时候此序列也可包含表达所述基因产物所需的增强子序列及其它调控元件。例如,所述启动子/调控序列可以空间或时

间限制的方式表达所述基因产物。

“组成型”启动子是在与编码或指定(specifies)基因产物的多核苷酸可操作连接时,在细胞的大多数或所有生理条件下在该细胞中产生所述基因产物的核苷酸序列。

“诱导型”启动子是在与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作连接时,基本只在与所述启动子对应的诱导物存在于细胞中时,才在该细胞中产生所述基因产物的核苷酸序列。

“组织-特异性启动子”、“空间限制型启动子或调控序列”、或“空间限制型启动子元件”是在与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作连接时,基本只在细胞是与所述启动子对应的组织类型的细胞时,才在该细胞中产生所述基因产物的核苷酸序列。

“时间限制型启动子或调控序列”或“时间限制型启动子元件”是在与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作连接时,基本只在细胞是处于特别发育阶段或接触到诱导所述启动子表达的物质如四环素或他莫西芬(tamoxifen)时,才在该活体人细胞产生所述基因产物的核苷酸序列。

试剂盒是包含至少一种用于特异性检测本发明标记物的试剂如探针的任何制品(如包裹或容器),该制品可作为一个整体单元来被推销(promote)、配送(distribute)或销售,以实施本发明的方法。

II. 本发明的用途

本发明是基于(至少部分基于)鉴定与细胞转化有关的标记物(如Cripto-3和/或Cripto-1),如在患有(afflicted with)增生疾病如癌症的细胞中比在对照(即未受累的(non-afflicted)或正常的)细胞中优先表达的标记物。本发明的标记物可以是在正常和受累(afflicted)细胞的一者或两者中能检出的DNA、cDNA、RNA或多肽分子。

样本中标记物的量、结构和/或活性,如存在、缺无、表达水平、蛋白水平、蛋白活性、有无突变例如影响所述标记物活性的突变(如替代、缺失或添加型突变)、和/或甲基化状态,在本文中细胞的转化状态有关,所述样本例如是含组织或细胞如肿瘤组织或细胞的样本,或者是含生物液体的样本,如全血、血清、血浆、口腔刮片(buccal scrape)、唾液、脊髓液、脑脊液、尿、粪便。

因此本发明提供了检测样本中标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的存在的组合物、试剂盒和方法。这些组合物、试剂盒和方法可用于确定肿瘤的表型，如表达Cripto的表型，如该肿瘤是否表达Cripto-1或Cripto-3。这些组合物、试剂盒和方法还可用于评估细胞的转化状态以及评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者。

本发明的组合物、试剂盒和方法具有多种用途，例如：

- 1) 检测样本中的标记物，如Cripto-1和/或Cripto-3，如Cripto-3多核苷酸或多肽；
- 2) 评估细胞是否转化或有风险会转化；
- 3) 评估样本中转化或恶性细胞的存在；
- 4) 评估受试者的肿瘤的良性或恶性性质；
- 5) 评估肿瘤的表型，如该肿瘤是否是表达Cripto-1或Cripto-3的肿瘤；
- 6) 评估受试者是否患有增生疾病、病症(disorder)或状况(condition)；
- 7) 评估患有肿瘤的受试者是否是基于-抗-Cripto抗体的治疗的合适候选者；
- 8) 预测患有肿瘤的受试者对治疗，如基于-抗-Cripto抗体的治疗的反应性；
- 9) 制备抗体、抗体片段或抗体衍生物，其用于检测Cripto-3多肽，评估细胞是否转化，评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者，治疗增生疾病、病症或状况，和/或评估受试者是否患有增生疾病、病症或状况；
- 10) 评估一或多种被测化合物抑制细胞转化的有效性；
- 11) 评估被测化合物的致癌潜力。

因此，本发明包括用于检测样本中标记物多核苷酸如Cripto-3多核苷酸或Cripto-1多核苷酸的存在的组合物、试剂盒和方法。一个实施方案中，所述方法包括使所述样本接触与转录的Cripto-3多核苷酸选择性杂交的核酸分子，其中所述转录的Cripto-3多核苷酸包含Cripto-3基因的编码区，并测定所述核酸分子是否结合样本中的多核苷酸。另一个实施方案中，所述方法包括使所述样本接触与转录的Cripto-1多核苷酸选择性杂交的核酸分子，其中所述转录的Cripto-1多核苷酸包含Cripto-1基因的编码区，并测定所述核酸分子是否结合样本中的多核苷酸。

本发明还包括用于检测样本中标记物多肽如Cripto-3多肽或Cripto-1多肽

的存在的组合物、试剂盒和方法。一个实施方案中，所述方法包括使所述样本接触选择性结合Cripto-3多肽的试剂，并测定所述试剂是否结合样本中的所述多肽。另一个实施方案中，所述方法包括使所述样本接触选择性结合Cripto-1多肽的试剂，并测定所述试剂是否结合样本中的所述多肽。

这些用于检测本发明标记物在样本中的存在的组合物、试剂盒和方法可用于确定肿瘤的表型，如肿瘤是否是表达Cripto-3或Cripto-1的肿瘤。这些方法还可用于评估细胞是否转化，如用于诊断癌症。这些组合物、试剂盒和方法还可用于评估患者是否是基于-抗-Cripto抗体疗法的合适候选者。

因此，本发明提供了评估细胞是否转化的方法。此方法包含将标记物如Cripto-3在被测细胞中的量、结构或活性，如存在、缺无、表达水平、蛋白水平、蛋白活性、有无突变例如影响所述标记物活性的突变(如替代、缺失或添加型突变)、和/或甲基化状态，与在正常的未转化细胞中的水平相比较。在被测细胞中与在正常的未转化细胞中相比，标记物的量、结构或活性的显著差异如增加表明该细胞转化了。

本发明还提供了测定肿瘤的表达Cripto的表型的方法。此方法包含将Cripto-3在肿瘤样本中的量、结构或活性与Cripto-1在肿瘤样本中的量、结构或活性比较。在肿瘤样本中，Cripto-3的量、结构或活性与Cripto-1相比的显著差异如增加表明该肿瘤是表达Cripto-3的肿瘤。在肿瘤样本中，Cripto-1的量、结构或活性与Cripto-3相比的显著差异如增加表明该肿瘤是表达Cripto-1的肿瘤。

本发明还提供了评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的方法。此方法包含将标记物如Cripto-3在患者样本中的量、结构和/或活性，如存在、缺无、拷贝数、表达水平、蛋白水平、蛋白活性、有无突变例如影响所述标记物活性的突变(如替代、缺失或添加型突变)、和/或甲基化状态，与在正常的非癌样本中的水平相比较。与在正常的非癌样本中的水平相比较，标记物如Cripto-3在患者样本中的量、结构或活性的显著差异如增加表明该患者是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者。

另外，当评估更多受试样本中的标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的改变的量、结构和/或活性时，并且与获得所述样本的个体受试者的后果(outcome)作相关，也将确认该标记物的改变的量、结构和/或活性与特定种类的癌或肿瘤很相关，或与对疗法如抗-Cripto抗体疗法有特定应答的癌或肿瘤很相关，

所述应答如对抗-Cripto抗体疗法的阳性或阴性应答。本发明的组合物、试剂盒和方法因而用于表征受试者的例如癌或肿瘤的一或多个阶段、级别、组织学类型、良性/恶变前(premalignant)/恶性性质, 以及对于抗-Cripto抗体疗法的预计应答或后果。

现在认识到, 本发明的组合物、试剂盒和方法会对患上增生疾病、病症或状况的风险增强的受试者, 以及他们的医疗顾问有特别的用途。认定为患上增生疾病、病症或状况的风险增强的受试者包括, 例如有增生疾病、病症或状况的家族史的受试者, 鉴定出有突变的癌基因(即至少一个等位基因)的受试者, 和年老的受试者。

可以以多种方式评估在正常的(未受累的)人组织中, 对例如标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的量、结构和/或活性的调控, 如改变。一个实施方案中, 评估表达的正常水平是通过评估所述标记物在一部分看来未受累的细胞中的表达水平, 并比较此正常的表达水平和在疑似患病(diseased)或受累的部分细胞中的表达水平。可选地, 特别当常规操作本文所述方法得到更多信息时, 可以使用本发明标记物的“正常的”量、结构和/或活性的群体均值(population-average value)。在其它实施方案中, 测定标记物的“正常的”量、结构和/或活性可以通过评估该标记物在得自未受增生疾病、病症或状况累及的受试者的受试样本, 在受试者疑似出现(suspected onset)增生疾病、病症或状况之前得自受试者的受试样本, 在归档的(archived)受试样本, 等等中的量、结构和/或活性。

本发明包括检测样本(如归档的组织样本或得自受试者的样本)中本发明的标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的存在的组合物、试剂盒和方法。本发明还包括用于测定肿瘤的表达Cripto的表型(如该肿瘤是表达Cripto-1还是Cripto-3的肿瘤)的组合物、试剂盒和方法。本发明还包括用于评估细胞是否转化的组合物、试剂盒和方法。本发明还包括用于评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的组合物、试剂盒和方法。必要时, 所述组合物、试剂盒和方法适用于某些类型的样本。例如, 当所述样本是石蜡封片的归档的人组织样本时, 可能必需调整本发明组合物中、本发明试剂盒中、或所用的方法中的化合物的比例。这些方法是本领域和本领域技术人员公知的。

因此, 本发明包括用于检测或评估在样本(如来自受试者的组织样本)中本发明标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的量如表达的试剂盒。本发明还包括用

于评估转化细胞(在样本如受试样本中)的存在的试剂盒。本发明还包括用于评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的试剂盒。所述试剂盒可包含一或多种试剂,所述试剂能够鉴定本发明标记物,如特异性结合对应于本发明标记物的核酸或多肽。结合对应于本发明标记物的多肽的合适试剂包括抗体、抗体衍生物、抗体片段等等。结合核酸(如基因组DNA、mRNA、剪接的mRNA、cDNA等等)的合适试剂包括互补核酸。例如,所述核酸试剂可包括固定于底物的寡核苷酸(标记的或非标记的),不结合底物的标记的寡核苷酸,PCR引物对,分子信标(beacon)探针等等。

本发明的试剂盒可任选包含其它用于进行本发明方法的组分。例如,所述试剂盒可包含使互补核酸退火或使抗体结合其特异性结合蛋白的合适液体(如SSC缓冲液)、一或多个样本隔间(compartment)、描述本发明方法的操作的指导材料,正常细胞的样本,神经胶质细胞的样本等等。

本发明的试剂盒可包含用于测定标记物的蛋白水平或蛋白活性的试剂。

本发明也包括制备用于本发明的方法和试剂盒的分离的单克隆抗体的方法。单克隆抗体可用本领域技术人员已知的方法制备。例如,可以分离对应于本发明标记物的蛋白或其免疫原性部分,如Cripto-3(如用已知方法通过从表达它的细胞纯化,或通过蛋白的编码核酸的体内或体外转录和翻译),并用所述分离的蛋白免疫脊椎动物优选哺乳动物如小鼠、大鼠、兔或绵羊。可选地(并优选),可以用所述分离的蛋白免疫所述脊椎动物至少另外一次,从而使该脊椎动物对所述蛋白产生强烈的免疫应答。用本领域公知的多种方法中的任一种,从所述免疫的脊椎动物分离脾细胞,与无限繁殖细胞系融合以形成杂交瘤。然后用标准的方法筛选以这种方式形成的杂交瘤,以鉴定一或多个产生特异性结合所述蛋白的抗体的杂交瘤。本发明也包括用此种方法制备的杂交瘤和用这些杂交瘤制备的抗体。制备抗体的其他方法是本领域已知的并已在上文进行了更详细的描述。

本发明也包括评估被测化合物调控如抑制细胞转化的有效性的方法。如上述,本发明标记物的量的差异或本发明表达水平的差异与细胞的转化状态相关。本发明标记物的量如表达的水平改变,可源于细胞的转化状态,或者可能诱导、保持、和促进转化状态。因此,调控如抑制受试者的增生疾病、病症或状况的化合物,可造成改变,如使本发明标记物的表达改变到更接近此种标记物的正常水平(如在未受累细胞中该标记物的量如表达)的水平。

因此,此方法包含比较标记物在第一种细胞样本中的量如表达和该标记物在第二种细胞样本中的量如表达,所述第一种细胞样本在被测化合物存在时保持,所述第二种细胞样本在被测化合物缺无时保持。对标记物的量如表达的显著调控如降低表明该被测化合物调控细胞的转化。所述细胞样本可以是,例如,得自受试者的正常细胞的单个样本的等份试样,得自受试者的正常细胞的汇总(pooled)样本,正常细胞系的细胞,得自受试者的受累细胞的单个样本的等份试样,得自受试者的受累细胞的汇总样本,来自增生疾病、病症或状况的动物模型的细胞等等。

如上所述,细胞的转化状态与本发明标记物如Cripto-3的量的改变相关。因此,诱导所述标记物的表达或活性增加的化合物能够诱导细胞癌变或增生疾病、病症或状况。本发明也包括评估被测化合物对人细胞的致癌潜力的方法。此方法包含在所述被测化合物存在和不存在时分别维持多个人类细胞等份。比较在每个等份中标记物如Cripto-3的表达。在所述被测化合物存在时维持的等份中,标记物的量的显著调控如显著增加(相对于在所述被测化合物不存在时维持的等份)表明,所述被测化合物具有诱导人细胞的致癌潜力或诱导增生疾病、病症或状况的能力。可以通过比较所述标记物量的增加程度来评估多种被测化合物的相对致病潜力。

III. 分离的核酸分子

本发明一方面涉及对应于本发明标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的核酸分子,包括编码标记物多肽或此多肽的一部分的核酸。本发明的核酸分子也包括足以用作杂交探针来鉴定对应于标记物基因如Cripto-3和/或Cripto-1的核酸分子的核酸分子,包括编码标记物多肽的核酸分子以及这些核酸分子的片段,如适合用作PCR引物来扩增或突变核酸分子的那些。本文所用的术语“核酸分子”应包括DNA分子(如cDNA)和RNA分子(如mRNA)以及用核苷酸类似物产生的DNA或RNA的类似物。所述核酸分子可以是单链或双链。

一个实施方案中,本发明的核酸分子是分离的核酸分子。“分离的”核酸分子是与其它存在于所述核酸分子的天然来源中的核酸分子分开的核酸分子。优选,“分离的”核酸分子不含有产生所述核酸的机体的基因组DNA中在所述核酸侧翼的序列(优选编码蛋白的序列)(即位于所述核酸5'和3'末端的序列)。例如,在多项实施方案中,分离的核酸分子可包含不足约5 kB, 4 kB,

3 kB, 2 kB, 1 kB, 0.5 kB或0.1 kB的, 在产生所述核酸的细胞的基因组DNA中天然位于所述核酸分子侧翼的核苷酸序列。另外, “分离的”核酸分子, 如cDNA分子, 在通过重组技术制备时可以基本无其它细胞物质或培养基, 或在化学合成时基本无化学前体或其它化学物质。

本发明的核酸分子, 如编码Cripto-3蛋白或其片段或Cripto-1蛋白或其片段的核酸分子, 可用标准分子生物技术以及本文所述的数据库记录中的序列信息分离。用所有的或部分的这些核酸序列, 本发明的核酸分子可用标准杂交和克隆技术(如Sambrook *et al.*, ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989所述)分离。

本发明的核酸分子可用cDNA、mRNA或基因组DNA作为模板以及合适的寡核苷酸引物, 根据标准PCR扩增技术来扩增。所扩增的核酸分子可以克隆到合适的载体中并通过DNA序列分析表征。另外, 对应于所有或部分的本发明的核酸分子的寡核苷酸可以通过标准合成技术如用自动DNA分析仪制备。

一个实施方案中, 本发明的核酸分子包含具有下述核苷酸序列的核酸分子, 所述核苷酸序列与对应于Cripto-3基因的核酸的核苷酸序列或编码Cripto-3蛋白的核酸的核苷酸序列互补。另一个实施方案中, 本发明的核酸分子包含具有下述核苷酸序列的核酸分子, 所述核苷酸序列与对应于Cripto-1基因的核酸的核苷酸序列或编码Cripto-1蛋白的核酸的核苷酸序列互补。优选的Cripto-3多核苷酸具有图1C所示的核苷酸序列(SEQ ID NO:4)。优选的Cripto-1多核苷酸具有图1B所示的核苷酸序列(SEQ ID NO:3)。与指定的(given)核苷酸序列互补的核酸分子是与指定核苷酸序列充分互补的核酸分子, 从而能与指定核苷酸序列杂交以形成稳定双链。

一个实施方案中, 本发明的核酸分子仅包含部分的核酸序列, 其中全长的核酸序列包含Cripto-3基因或编码 Cripto-3多肽。另一个实施方案中, 本发明的核酸分子仅包含部分的核酸序列, 其中全长的核酸序列包含Cripto-1基因或编码 Cripto-1多肽。这些核酸分子可用作例如, 探针或引物。所述探针或引物通常是基本纯化的寡核苷酸的形式。所述寡核苷酸通常包含核苷酸序列的区域, 所述区域与本发明核酸的至少约7个, 优选约15个, 更优选约25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 或400或更多个连续核苷酸在严

谨条件杂交。一个实施方案中,所述寡核苷酸包含核苷酸序列的区域,所述区域与Cripto-3多核苷酸,如转录的多核苷酸的约10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29或30或更多个连续核苷酸在严谨条件杂交。

基于Cripto-3核酸分子序列的核酸探针可用于检测Cripto-3 转录的多核苷酸,如mRNA或cDNA。基于Cripto-1核酸分子序列的核酸探针可用于检测Cripto-1 转录的多核苷酸,如mRNA或cDNA。所述探针可包含与其连接的标记基团,如放射性同位素、荧光化合物、酶、或酶辅助因子。这些探针可用于特异性检测Cripto-3或Cripto-1 转录的多核苷酸在样本中的存在。也可用这些探针,如作为试剂盒的部分(part),来鉴定过表达标记物基因的细胞或组织,如转化的细胞或肿瘤组织,如通过测定在来自受试者的细胞样本中的Cripto-3 转录的多核苷酸水平,如检测mRNA水平。

一个实施方案中,本发明的核酸分子为至少7, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 550, 650, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000, 3500, 4000, 4500或更多个核苷酸长,并与对应于Cripto-3基因的核酸分子或编码Cripto-3蛋白的核酸分子在严谨条件杂交。另一个实施方案中,本发明的核酸分子为至少7, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 550, 650, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200, 2400, 2600, 2800, 3000, 3500, 4000, 4500或更多个核苷酸长,并与对应于Cripto-1基因的核酸分子或编码Cripto-1蛋白的核酸分子在严谨条件杂交。

本文所用术语“在严谨条件杂交”应描述用于杂交和洗涤的条件,在所述条件下至少 60%, 65%, 70%, 优选 75%, 80%, 85%, 90%, 95%或 98%彼此同一的核苷酸序列通常保持彼此杂交。此种严谨条件对那些本领域技术人员是已知的并可见 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989)的 6.3.1-6.3.6 部分。严谨杂交条件的非限制性例子包括在 6X 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中于约 45°C 杂交,之后在 0.2X SSC, 0.1% SDS 于 50-65°C 洗涤一或多次。优选的杂交条件允许在 Cripto-1 核酸存在时特异性检测 Cripto-3 核酸。

杂交条件的一个非限制性例子可具体用于本发明特异性检测样本中的

Cripto-3多核苷酸,其包含:(i)在预杂交溶液(6X SSC, 5X Denhardt溶液, 0.05% 焦磷酸钠, 100ug/ml tRNA, 0.5% SDS)中于42°C预杂交 1小时; (ii)在杂交溶液(6X SSC, 5X Denhardt溶液, 0.05% 焦磷酸钠, 0.5% SDS)中与核酸探针(如经过修饰而可被检测的, 如放射性标记的, 如用³²P标记在5'-末端的核酸探针)于42°C杂交过夜(如与10⁶-10⁷ CPM/ml的放射性标记的核酸探针杂交过夜); 和(iii)在洗涤溶液(含0.1%SDS的6X SSC)中于42°C洗涤20分钟, 如三次。本领域技术人员会认识到对于特异性检测Cripto-3多核苷酸或Cripto-1多核苷酸, 最适的杂交条件依赖于所用的特定核酸探针。对特定核酸探针最适的杂交条件可以由本领域技术人员仅用本领域已知的常规方法就可以确定。

本发明的实施方案中, 核酸分子(如探针或引物)与转录的Cripto-3多核苷酸的部分杂交, 该部分包含编码Cripto-3而不是Cripto-1所特有的一或多个氨基酸的核苷酸序列, 从而在转录的Cripto-1多核苷酸存在时选择性地检测(如特异性地检测)所述转录的Cripto-3多核苷酸。优选, 所述核酸分子(如探针或引物)与转录的Cripto-1多核苷酸微弱杂交, 从而微弱检出转录的Cripto-1多核苷酸。更优选, 所述核酸分子(如探针或引物)不与转录的Cripto-1多核苷酸杂交, 从而不检出转录的Cripto-1多核苷酸。本发明另一个实施方案中, 核酸分子(如探针或引物)与转录的Cripto-1多核苷酸的部分杂交, 该部分包含编码Cripto-1而不是Cripto-3所特有的一或多个氨基酸的核苷酸序列, 从而在转录的Cripto-3多核苷酸存在时选择性地检测(如特异性地检测)所述转录的Cripto-1多核苷酸。优选, 所述核酸分子(如探针或引物)与转录的Cripto-3多核苷酸微弱杂交, 从而微弱检出转录的Cripto-3多核苷酸。更优选, 所述核酸分子(如探针或引物)不与转录的Cripto-3多核苷酸杂交, 从而不检出转录的Cripto-3多核苷酸。

一个实施方案中, 本发明核酸分子(如引物)为至少7, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50或更多个核苷酸长, 并与对应于标记物基因(如Cripto-3和/或Cripto-1)的核酸分子或编码标记物蛋白(如Cripto-3和/或Cripto-1)的核酸分子, 如转录的多核苷酸如mRNA或cDNA选择性杂交, 并用于标记物核酸分子的扩增, 如PCR扩增。在优选的实施方案中, 所述核酸分子(如引物)能够选择性扩增Cripto-3核酸分子, 如Cripto-3转录的多核苷酸, 如在Cripto-1核酸分子如Cripto-1转录的多核苷酸存在时。优选, 所述核酸分子(如引物)与转录的Cripto-1多核苷酸微弱杂交, 从而微弱扩增转录的Cripto-1多核苷酸。更优

选,所述核酸分子(如引物)不与转录的Cripto-1多核苷酸杂交,从而不扩增转录的Cripto-1多核苷酸。在另一个优选实施方案中,所述核酸分子(如引物)能够选择性扩增Cripto-1核酸分子,如Cripto-1转录的多核苷酸,如在Cripto-3核酸分子如Cripto-3 转录的多核苷酸存在时。优选,所述核酸分子(如引物)与转录的Cripto-3多核苷酸微弱杂交,从而微弱扩增转录的Cripto-3多核苷酸。更优选,所述核酸分子(如引物)不与转录的Cripto-3多核苷酸杂交,从而不扩增转录的Cripto-3多核苷酸。

一个实施方案中,本发明的核酸分子与转录的Cripto-3多核苷酸的部分杂交,该部分包含编码Cripto-3蛋白而不是Cripto-1蛋白所特有的一或多个氨基酸的核苷酸序列,如Cripto-3 多肽序列中选自V7, L68, E92和A178的一或多个氨基酸。另一个实施方案中,本发明的核酸分子与转录的Cripto-1多核苷酸的部分杂交,该部分包含编码Cripto-1蛋白而不是Cripto-3蛋白所特有的一或多个氨基酸的核苷酸序列。一个优选实施方案中, Cripto-1蛋白而不是Cripto-3蛋白所特有的一或多个氨基酸选自由A7, P68, G92, V178, V22和Y43组成的组。另一个优选实施方案中, Cripto-1蛋白而不是Cripto-3蛋白所特有的一或多个氨基酸选自由A7, P68, G92和V178组成的组。

在本发明用来选择性检测Cripto-3多核苷酸或Cripto-1多核苷酸的核酸分子的非限制性例子见表2所示。表2所示的核酸分子(探针)对应于Cripto DNA序列的反义或模板链。因此,表2所示的核酸分子与Cripto-3或Cripto-1 mRNA (mRNA对应于正义或编码链)互补,并用于与Cripto-3或Cripto-1 mRNA杂交,从而检测样本中的Cripto mRNA。本领域技术人员可以理解表2所示的核酸分子(探针)的互补物对应于Cripto-3或Cripto-1 DNA的正义或编码链,从而可用于与Cripto cDNA(cDNA对应于反义或模板链)杂交,从而检测样本中的Cripto cDNA。表2所示的核酸分子可用于本文所述的任一种方法用于特异性检测样本中的Cripto-3转录的多核苷酸或特异性检测样本中的Cripto-1转录的多核苷酸。表2所示的核酸分子可特别用于,如Northern和Southern印迹分析用于检测样本中的Cripto-3转录的多核苷酸或Cripto-1转录的多核苷酸。

表2: Cripto-3-特异性核酸探针和Cripto-1特异性核酸探针的例子

	序列	特异于:	SEQ ID NO:
1	GAGAAGCGGACCATCTTCCTGCAGTC	TDGF3	SEQ ID NO:5
2	AGAGAAGCGGACCATCTTCCTGCAG	TDGF3	SEQ ID NO:6

3	TAAGAGAAGCGGACCATCTTCCTGC	TDGF3	SEQ ID NO:7
4	GTATTCCCATGGGCAGCACACGCTG	TDGF3	SEQ ID NO:8
5	CTGTATTCCCATGGGCAGCACACGC	TDGF3	SEQ ID NO:9
6	GCTGTATTCCCATGGGCAGCACACG	TDGF3	SEQ ID NO:10
7	GGCACAAAAGGACTCCAGCATGCAG	TDGF3	SEQ ID NO:11
8	CAGGCACAAAAGGACTCCAGCATGC	TDGF3	SEQ ID NO:12
9	TATAGAAAGGCAGATGCCAGCTAGC	TDGF3	SEQ ID NO:13
10	CGGGTCATGAAATTTGCATAATATC	TDGF3	SEQ ID NO:14
11	TACGGGTCATGAAATTTGCATAATA	TDGF3	SEQ ID NO:15
12	GAGAAGCGGGCCATCTTCCTGCAGTC	TDGF1	SEQ ID NO:16
13	AGAGAAGCGGGCCATCTTCCTGCAG	TDGF1	SEQ ID NO:17
14	TAAGAGAAGCGGGCCATCTTCCTGC	TDGF1	SEQ ID NO:18
15	GTATCCCATGGGCGGCACACGCTG	TDGF1	SEQ ID NO:19
16	CTGTATCCCATGGGCGGCACACGCT	TDGF1	SEQ ID NO:20
17	GCTGTATCCCATGGGCGGCACACG	TDGF1	SEQ ID NO:21
18	GGCACAAAAGGACCCCAGCATGCAG	TDGF1	SEQ ID NO:22
19	CAGGCACAAAAGGACCCCAGCATGC	TDGF1	SEQ ID NO:23
20	TATAGAAAGGCAGATGCCAACTAGC	TDGF1	SEQ ID NO:24
21	CTGGTCATGAAATTTGCATGATATC	TDGF1	SEQ ID NO:25
22	TACTGGTCATGAAATTTGCATGATA	TDGF1	SEQ ID NO:26

用于选择性检测样本中的标记物如Cripto-3或Cripto-1多核苷酸的核酸分子的更多例子是，对标记物多核苷酸特异并适合扩增标记物多核苷酸的核酸分子(引物)。优选，这些核酸分子(引物)特别用作样本中的标记物如Cripto-3或Cripto-1的转录的多核苷酸的PCR 扩增引物。用于扩增转录的多核苷酸的核酸分子(引物)通常成对使用，如包含对应于Cripto-3 DNA序列(如图1C所示的编码Cripto-3的核苷酸序列)的反义或模板链的第一个核酸分子(引物)和对应于Cripto-3 DNA序列(如图1C所示的编码Cripto-3的核苷酸序列)的正义或编码链的第二个核酸分子(引物)的对，或“正向”和“反向”引物的对。因此，成对的核酸分子或引物，如表3所述，可用于对转录的多核苷酸中两侧为所述两个核酸引物的部分进行扩增，所述多核苷酸如Cripto-3 mRNA(其中

mRNA对应于所述正义或编码链)和/或Cripto-3 cDNA(其中cDNA对应于所述反义或模板链),从而特异性检测样本中的转录的多核苷酸,如mRNA或cDNA。这些核酸分子(引物)的非限制性例子如表3所述。但表3所述的核酸分子呈现为正向和反向引物的特定配对,本领域技术人员可以认识到正向和反向引物的其他组合,如表3所述的引物可用于特异性扩增Cripto-3或Cripto-1转录的多核苷酸。本领域技术人员还理解虽然表3所述的核酸分子可特别用于本发明的扩增方法,如PCR,如定量PCR,这些核酸分子也可用于本文所述的任一种其他检测方法,以便特异性检测样本中的Cripto-3转录的多核苷酸或特异性检测样本中的Cripto-1转录的多核苷酸。

表3: Cripto-3-特异性核酸引物和Cripto-1-特异性核酸引物的例子

特异于:	引物序列:	引物:	PCR 产物大小:	SEQ ID NO:
TDGF3	GCGTGTGCTGCCCATGGGA CGGGTCATGAAATTTGCATA	正向	431 bp	SEQ ID NO:27
		反向		SEQ ID NO:28
TDGF3	GACTGCAGGAAGATGGTCCGCTTC TTCCCATGGGCAGCACACGCT	正向	211 bp	SEQ ID NO:29
		反向		SEQ ID NO:30
TDGF3	GCGTGTGCTGCCCATGGGAATAC GCAGGCACAAAAGGACTCCAG	正向	97 bp	SEQ ID NO:31
		反向		SEQ ID NO:32
TDGF3	GCGTGTGCTGCCCATGGGAATAC GCAGATGCCAGCTAGCATAAAAG	正向	349 bp	SEQ ID NO:31
		反向		SEQ ID NO:33
TDGF3	GCTAGCTGGCATCTGCCTTTC ACGGGTCATGAAATTTGCATAA	正向	99 bp	SEQ ID NO:34
		反向		SEQ ID NO:35
TDGF1	GCTACGACCTTCTGGGGAAAACG CTGGTCATGAAATTTGCATG	正向	776 bp	SEQ ID NO:36
		反向		SEQ ID NO:37
TDGF1	GACTGCAGGAAGATGGCCCGCTTC TCCCATGGGCGGCACACGCT	正向	211 bp	SEQ ID NO:38
		反向		SEQ ID NO:39
TDGF1	GCGTGTGCCGCCCATGGGGATAC GCAGGCACAAAAGGACCCAG	正向	97 bp	SEQ ID NO:40
		反向		SEQ ID NO:41
TDGF1	GCGTGTGCCGCCCATGGGGATAC GCAGATGCCAACTAGCATAAAAG	正向	349 bp	SEQ ID NO:40
		反向		SEQ ID NO:42
TDGF1	GCTAGTTGGCATCTGCCTTTC CTGGTCATGAAATTTGCATGA	正向	99 bp	SEQ ID NO:43
		反向		SEQ ID NO:44

本发明还包括与本文所述的Cripto-3或Cripto-1核酸分子有至少一个区域互补的分子信标核酸分子,从而所述分子信标可用于定量样本中的Cripto-3或Cripto-1核酸分子的存在。“分子信标”核酸是包含一对互补区并有荧光团(fluorophore)和荧光猝灭剂(fluorescent quencher)与其相连的核酸分子。所述荧光团和猝灭剂与核酸的不同部分相连,它们的取向(orientation)使得当互补

区彼此退火时, 荧光团的荧光被猝灭剂猝灭。当核酸分子的互补区彼此不退火时, 荧光团的荧光被猝灭的程度较低。对分子信标核酸分子的描述例如见于美国专利5,876,930。

一个实施方案中, 核酸分子可包含产生所述核酸的机体的基因组DNA中天然位于所述核酸侧翼的序列(即位于所述核酸5'和3'末端的序列)。在多项实施方案中, 所述分离的核酸分子可包含约100 kB, 50 kB, 25 kB, 15 kB, 10 kB, 5 kB, 4 kB, 3 kB, 2 kB, 1 kB, 0.5 kB或0.1 kB的核苷酸序列, 该序列在产生所述核酸的细胞的基因组DNA中天然位于所述核酸分子侧翼。例如, 在多项实施方案中, 本发明的核酸分子包含时间和空间的调控元件(如将本发明标记物的表达限制于特定组织或特定发育阶段的元件), 所述元件邻接或位于起始信号(如起始ATG密码子)的5'。而且, 核酸分子在通过重组技术制备时可以基本无其他细胞物质或培养基, 或在化学合成时基本无化学前体或其它化学物质。

本领域技术人员将会理解, 本发明还包括与编码标记物蛋白如Cripto-3和/或Cripto-1的核酸分子的核苷酸序列由于遗传密码简并性而不同, 但编码相同蛋白的核酸分子。本领域技术人员还会意识到导致氨基酸序列改变的DNA序列多态性会存在于群体(如人群)内。此种遗传多态性由于天然的等位基因变异会存在于群体内的不同个体之间。等位基因是在指定遗传基因座择一(alternatively)出现的一组基因之一。另外, 本领域技术人员会意识到影响RNA表达水平的DNA多态性也可存在从而可以影响到那个基因的总体表达水平(如通过影响调解或降解)。

本文所用的术语“等位基因变体”指在指定基因座出现的核苷酸序列或该核苷酸序列所编码的多肽。

本文所用的术语“基因”和“重组基因”指包含编码Cripto-3多肽的开放阅读框架的核酸分子。这些天然的等位基因变异通常导致指定基因的核苷酸序列的1-5%差异。通过测序不同个体中的目的(of interest)基因, 可以鉴定可选的等位基因。通过使用杂交探针可以容易地鉴定多种个体中的相同遗传基因座。本发明范围内应包括由天然等位基因变异所导致且不改变功能活性的任何以及所有这些核苷酸变异以及所得的氨基酸多态性或变异。

熟练技术人员还会认识到可以通过突变将序列改变引入本发明的核酸分子, 从而改变所编码蛋白的氨基酸序列, 但不改变所编码蛋白的生物活性。

例如,可以通过做核苷酸替代来使“非必需”氨基酸残基发生氨基酸替代。“非必需”氨基酸残基是可以从野生型序列改变而不改变生物活性的残基,而“必需”氨基酸残基是生物活性所需的。例如,在多个物种的同系物中不保守或仅半保守的氨基酸残基可能是活性非必需的,因此会是改变的可能靶标。可选地,在多个物种(如鼠和人)的同系物中保守的氨基酸残基可能是活性必需的,因此不会是改变的可能靶标。

因此,本发明另一方面涉及编码标记物多肽的核酸分子,所述多肽如含有活性非必需的氨基酸残基改变的Cripto-3或Cripto-1多肽。这些多肽在对应于本发明标记物的氨基酸序列上与天然的蛋白不同,但仍保持生物活性。一个实施方案中,此种蛋白具有与对应于本发明标记物的蛋白之一的氨基酸序列至少约40%同一,50%,60%,70%,80%,90%,95%或98%同一的氨基酸序列。

可以通过向本发明核酸的核苷酸序列引入一或多个核苷酸替代、添加或缺失来制备编码变体蛋白的核酸分子,从而将一或多个氨基酸残基替代、添加或缺失引入所编码的蛋白。可以用标准技术如定点诱变和PCR-介导的诱变来引入突变。优选,在一或多个预测的非必需氨基酸残基做保守氨基酸替代。“保守氨基酸替代”指氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替代。本领域已经确定了具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链(如赖氨酸、精氨酸、组氨酸),酸性侧链(如天冬氨酸、谷氨酸),不带电荷的极性侧链(如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸),非极性侧链(如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸), β -分支的侧链(如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)以及芳香族侧链(如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。可选地,可以在编码序列的全部或部分随机引入突变,如通过饱和诱变,并可以筛选所得突变体的生物活性来鉴定保持活性的突变体。在诱变后,可以重组方式表达所编码的蛋白并测定所述蛋白的活性。

与标记物基因的时间和空间调控元件如时间和空间启动子对应的本发明核酸分子可用于构建重组表达载体。鉴定时间和空间调控元件可以通过制备含有下述核酸分子的重组表达载体,其中公认的时间和空间调控元件与可诱导的重组位点例如lox位点,如loxP位点可操作连接,并任选还与报道序列(reporter sequence)例如LacZ, GFP和EGFP可操作连接。此种重组表达载体可

的蛋白包括蛋白制备物,该制备物具有不足约30%,20%,10%,或5%(以干重计)的异源蛋白(本文也称为“杂质蛋白”)。在重组制备所述蛋白或其生物活性部分的情况中,也优选其基本无培养基,即所述培养基占蛋白制备物体积的不足约20%,10%,或5%。在通过化学合成来制备所述蛋白的情况中,优选其基本无化学前体或其它化学物质,即它与参与所述蛋白合成的化学前体或其它化学物质相分离。因此,此蛋白的制备物含有不足约30%,20%,10%,5%(以干重计)的除目的多肽之外的化学前体或化合物。

优选的Cripto-3多肽具有图1A所示的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。其它可用蛋白与此序列基本相同(如至少约40%,优选50%,60%,70%,80%,90%,95%,或99%相同),并保留该天然的Cripto-3蛋白的功能活性,只是由于诱变或天然等位基因变异而氨基酸序列不同。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸的百分比同一性,为最适比较目的将所述序列进行比对(如可以将缺口引入第一个氨基酸或核酸序列来与第二个氨基酸或核酸序列做最适比对)。然后比较在对应的氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当在第一个序列中的位置被与第二个序列中对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,那么所述分子在那个位置就是相同的。两个序列间的百分比同一性是所述序列共有的相同位置数的函数(即%同一性=相同位置数/总位置数(如重叠位置) $\times 100$)。在一个实施方案中,这两个序列长度相同。

确定两个序列之间的百分比同一性可以用数学算式来完成。用于比较两个序列的数学算式的优选非限制性例子是Karlin和Altschul算式(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268,修改为Karlin和Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877。此算式被引入Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410的NBLAST和XBLAST程序。BLAST核苷酸检索可以用NBLAST程序进行,计分(score)=100,字长=12以此获得与本发明核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白检索可以用XBLAST程序进行,计分=50,字长=3以此获得与本发明蛋白分子同源的氨基酸序列。为获得为了比较目的的缺口比对,可以如Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402所述利用缺口BLAST。可选地,可用检测分子间距离关系(distant relationship)的PSI-Blast来进行反复检索。在利用BLAST、缺口BLAST以及PSI-Blast程序时,可以使用各个程序的缺省参数(如XBLAST和NBLAST)。参见

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。用于比较序列的数学算式的另一个优选的非限制性例子是Myers和Miller算式(1988) *Comput Appl Biosci*, 4:11-7。此算式被引入作为GCG 序列比对软件包的一部分的ALIGN程序(version 2.0)。在利用ALIGN程序比较氨基酸序列时, 可使用PAM120权重残基表(weight residue table), 缺口长度罚分为12, 以及缺口罚分为4。然而另一个可用于鉴定局部序列的区域的相似性并比对的算式是如Pearson和Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448所述的FASTA算式。在使用FASTA算式比较核苷酸或氨基酸序列时, 可以使用PAM120权重残基表, 例如 k -元组(tuple)值为2。

可以用与上述的那些类似的技术, 在考虑或不考虑缺口时, 确定两个序列之间的百分比同一性。计算百分比同一性时, 仅计算精确匹配。

在本发明实施方案中, 可用分离的Cripto-3多肽或其片段作为免疫原, 使用制备多克隆和单克隆抗体的标准技术产生抗体。可用全长多肽或蛋白, 或可选地, 本发明提供抗原肽片段用作免疫原。Cripto-3蛋白的抗原肽包含Cripto-3氨基酸序列的至少8 (优选10, 15, 20, 25或30或更多)个氨基酸残基, 并包含所述蛋白的表位, 从而抗所述肽的抗体与Cripto-3蛋白形成特异性免疫复合物。优选, Cripto-3蛋白的抗原肽包含Cripto-3蛋白的表位, 从而抗所述肽的抗体与Cripto-3蛋白选择性形成免疫复合物, 并且不与Cripto-1蛋白形成免疫复合物。

所述抗原肽包含的优选表位是位于所述蛋白表面上的区域, 如亲水性区域。可用疏水性序列分析、亲水性序列分析、或类似分析来鉴定亲水性区域。所述抗原肽可对应于完整的结构域, 如胞外区、胞内区、EGF-样结构域、cys-富集区, 受体结合区等等。Cripto-3的胞外区跨越成熟Cripto-3蛋白的约第1位氨基酸残基到约第158位氨基酸残基。Cripto-3的EGF-样结构域跨越成熟Cripto-3蛋白的约第75位氨基酸残基到约第112位氨基酸残基。cys-富集区跨越成熟Cripto-3蛋白的约第114位氨基酸残基到约第150位氨基酸残基。Cripto-3中的表位可包含线性或非线性的氨基酸残基区段(span)。一个实施方案中, 所述表位是在构象天然的Cripto-3蛋白中而非变性的Cripto-3蛋白中形成的表位。

在本发明的一个实施方案中, Cripto-3蛋白的抗原肽包含胞外区中包含的Cripto-3蛋白的表位。优选, 所述抗原肽所包含的表位是Cripto-3蛋白的区

域, 其包含一或多个对Cripto-3而不是Cripto-1独特的氨基酸残基, 如在Cripto-3多肽的氨基酸序列中与Cripto-1多肽的对应氨基酸位置的氨基酸残基不同的氨基酸残基。在 Cripto-3多肽中与Cripto-1多肽的对应氨基酸残基不同的氨基酸残基包括Cripto-3的氨基酸 V7, L68, E92和A178。该抗原肽所包括的优选表位是Cripto-3的区域, 其包含至少一个选自V7, L68, E92和A178的氨基酸。在相关的实施方案中, Cripto-3蛋白的抗原肽包含Cripto-3蛋白的一部分, 其中该部分的二级结构或构象对Cripto-3而不是Cripto-1是独特的, 因为例如存在一或多个对Cripto-3而不是Cripto-1独特的氨基酸, 如V7, L68, E92和A178。

通常用免疫原通过免疫合适的(即有免疫能力的)受试者如兔、山羊、小鼠、或其它哺乳动物或脊椎动物制备抗体。合适的免疫原性制备物可以包含, 例如, 重组表达的或化学合成的多肽。制备物还可以包含佐剂, 如福氏完全或不完全佐剂, 或类似的免疫刺激剂(immunostimulatory agent)。

本发明还提供了对应于Cripto-3多肽的嵌合或融合蛋白。本文所用术语“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含所有或部分的Cripto-3多肽(优选生物活性部分)与异源多肽(即Cripto-3多肽之外的多肽)可操作连接。在融合蛋白内, 术语“可操作连接”应指Cripto-3多肽和异源多肽彼此框内融合。所述异源多肽可以与Cripto-3多肽的氨基末端或羧基末端融合。

一个有用的融合蛋白是GST融合蛋白, 其中Cripto-3多肽与GST 序列的羧基末端融合。此种融合蛋白可有利于重组Cripto-3多肽的纯化。

另一个实施方案中, 所述融合蛋白在其氨基末端包含异源信号序列。例如, Cripto-3多肽的天然信号序列可以被去除并被另一种蛋白的信号序列所替代。例如, 杆状病毒包膜蛋白的gp67分泌序列可用作异源信号序列(Ausubel *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1992)。其它真核异源信号序列的例子包括蜂毒肽(melittin)和人胎盘碱性磷酸酶的分泌序列(Stratagene; La Jolla, California)。其它例子中, 可用的原核异源信号序列包括phoA分泌信号(Sambrook *et al.*, 如上)以及蛋白A分泌信号(Pharmacia Biotech; Piscataway, New Jersey)。

在另一个实施方案中, 融合蛋白是免疫球蛋白的融合蛋白, 其中 Cripto-3多肽的全部或部分与源自免疫球蛋白家族的成员之一的序列融合。本发明的免疫球蛋白融合蛋白可以被掺入药物组合物中, 并给予受试者, 来抑制配体

(可溶的或膜结合的)和细胞表面上的蛋白(受体)之间的相互作用,从而抑制体内信号传导。所述免疫球蛋白融合蛋白可用于影响 Cripto-3 多肽的关联(cognate)配体的生物利用度。对配体/受体相互作用的抑制可以在治疗中应用,既可以用于治疗增生和分化病症也可以调控(如促进或抑制)细胞存活。而且,可用本发明的免疫球蛋白融合蛋白作为免疫原,在受试者中产生针对 Cripto-3 多肽的抗体,来纯化配体,并在筛选试验中鉴定抑制受体与配体的相互作用的分子。

本发明的嵌合和融合蛋白可以用标准的重组DNA技术来制备。另一个实施方案中,可以通过常用技术包括自动DNA合成仪来合成融合基因。可选地,进行基因片段的PCR扩增可用锚定引物,所述引物在两段连续的基因片段之间产生互补的突出端,随后可以使所述基因片段退火并重扩增来产生嵌合的基因序列(参见如Ausubel *et al.*, 如上述)。另外,很多已经编码融合部分(如GST多肽)的表达载体可以购买得到。编码Cripto-3多肽的核酸可以被克隆到这样的表达载体中,从而使融合部分与Cripto-3多肽框内连接。

可用信号序列来促进所分泌蛋白或其他目的蛋白的分泌和分离。信号序列通常表征为疏水氨基酸的核心,其通常在分泌时经一或多次剪切从成熟蛋白中剪切下来。此种信号肽在通过分泌通道时,包含允许从成熟蛋白中剪切信号序列的加工位点。因此,本发明涉及具有信号序列的所述多肽,以及已经通过蛋白水解剪切了信号序列的多肽(即所述剪切产物)。一个实施方案中,编码信号序列的核酸序列可以在表达载体中与目的蛋白(如通常不分泌或者难于分离的蛋白)可操作相连。此信号序列指导所述蛋白的分泌,如分泌到转化了所述表达载体的真核宿主,并且随后或同时剪切掉信号序列。然后容易地用本领域公知的方法从胞外培养基(medium)纯化所述蛋白。或者,可以用利于纯化的序列,如用GST结构域,将此信号序列与目的蛋白连接。

本发明也涉及Cripto-3多肽的变体。此种变体具有改变的氨基酸序列,其能用作激动剂(模拟物(mimetics))或拮抗剂。变体可以通过诱变产生,如不连续的点突变或截短。优选的变体保留一或多个使Cripto-3区别于Cripto-1的特定氨基酸,如在Cripto-3的氨基酸 V7, L68, E92和A178中一或多个未改变的变体。激动剂可基本保留与天然形式的所述蛋白相同的生物活性或该活性的一部分(subset)。蛋白的拮抗剂可抑制天然形式的所述蛋白的一或多种活性,其通过例如,竞争性结合细胞信号传导级联的下游或上游成员,包括目

的蛋白来实现。因此,通过用功能有限的变体处理,可以引发特定的生物效果。用具有天然形式的所述蛋白的部分生物活性的变体处理受试者,相比用天然形式的所述蛋白处理,对受试者的副作用会较小。

起激动剂(模拟物)或拮抗剂作用的本发明蛋白的变体可以通过筛选本发明蛋白突变体如截短突变体的组合文库的激动剂或拮抗剂活性鉴定。一个实施方案中,变体的多样化(variegated)文库通过在核酸水平作组合诱变来产生,并由多样化的基因文库编码。变体的多样化文库可以通过例如将合成的寡核苷酸混合物酶促连接到基因序列中产生,从而使潜在的蛋白序列的简并集(degenerate set)可被表达为单个多肽或者一组较大的融合蛋白(如用于噬菌体展示)。多种方法可用于从简并寡核苷酸序列产生本发明多肽的潜在变体的文库。合成简并寡核苷酸的方法是本领域已知的(参见如 Narang, 1983, *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al.*, 1984, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al.*, 1984, *Science* 198:1056; Ike *et al.*, 1983 *Nucleic Acid Res.* 11:477)。

另外,可用Cripto-3多肽编码序列的片段文库来制备多肽的多样化群用于筛选和随后选择变体。例如,编码序列片段的文库可以如下产生:在每个分子只出现一次切口(nicking)的条件下,用核酸酶处理目的编码序列的双链PCR片段,使双链DNA变性,再复性该DNA,来形成包括来自不同切口产物的正义/反义对的双链DNA,通过用S1核酸酶处理从再形成的双链体去除单链部分,并将所得的片段文库连接到表达载体中。通过此种方法,可以衍生出编码目的蛋白的不同大小的氨基末端和内部片段的表达文库。

本领域已知多种技术来筛选通过点突变或截短制备的组合文库的基因产物,以及筛选cDNA文库中具有所选性质的基因产物。适于高通量分析、可筛选大基因文库的最广泛应用的技术通常包括,将所述基因文库克隆到可复制的表达载体中,用所得的载体文库转化合适的细胞,在检出所需活性有利于将编码待测产物的基因的载体分离出来的条件下表达组合基因。递推模拟诱变(Recursive ensemble mutagenesis) (REM),一种提高功能性突变体在文库中的频率的技术,可与筛选试验联用来鉴定本发明蛋白的变体(Arkin and Yourvan, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815; Delgrave *et al.*, 1993, *Protein Engineering* 6(3):327- 331)。

本发明还涉及,本文所述的方法可以用于制备与Cripto-1形成特异性免疫复合物(如不与Cripto-3形成免疫复合物)的抗体。优选, Cripto-1蛋白的抗

原肽包含Cripto-1蛋白的表位,从而针对该肽的抗体与Cripto-1蛋白选择性形成免疫复合物但不与Cripto-3蛋白形成免疫复合物。优选,该抗原肽所包含的表位是Cripto-1蛋白的区域,其包含Cripto-1而不是Cripto-3特有的一或多个氨基酸残基,如在Cripto-1多肽序列中与Cripto-3多肽序列中对应氨基酸位置上的氨基酸残基不同的氨基酸残基。Cripto-1多肽中与Cripto-3多肽中的对应氨基酸不同的氨基酸残基包括Cripto-1的氨基酸A7, P68, G92, V178, V22和Y43。该抗原肽所包含的优选表位是Cripto-1的区域,其包含氨基酸A7, P68, G92和V178中的至少一个。在相关实施方案中, Cripto-1蛋白的抗原肽包含Cripto-1蛋白的部分,其中该部分的二级结构或构象对Cripto-1而不是Cripto-3是独特的,因为例如存在一或多个Cripto-1而不是Cripto-3特有的氨基酸,如A7, P68, G92和V178。

(ii). 抗体

本发明另一方面涉及针对Cripto-3多肽的抗体。术语“抗体”和“抗体物质”(在本文互换使用)指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有抗原结合位点的分子,所述位点特异性结合抗原如本发明的Cripto-3多肽。特异性结合Cripto-3多肽的分子是结合Cripto-3多肽但基本不结合样本中其他分子的分子,所述样本如生物样本天然包含所述多肽。优选,特异性结合Cripto-3多肽的分子基本不结合Cripto-1多肽。免疫球蛋白分子的免疫活性部分的例子包括F(ab)和F(ab')₂片段,其能通过用酶如胃蛋白酶处理抗体来产生。本发明提供了多克隆和单克隆抗体。本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组分”指抗体分子的群,其仅包含一种(species)能够与具体表位免疫反应的抗原结合位点。

可以通过将本发明多肽作为免疫原免疫合适的受试者来如上述制备多克隆抗体。可以用标准技术随时监测被免疫的受试者中的抗体滴度,如用使用固定多肽的酶联免疫吸附试验(ELISA)。如果需要,可以从所述受试者(如从该受试者的血或血清)收获或分离抗体分子,并进一步用公知技术纯化,如蛋白A色谱,来获得IgG级分。在免疫后的合适时间,如在特异性抗体滴度最高时,可以从所述受试者获得产生抗体的细胞,并用于通过用标准技术制备单克隆抗体,如最初由Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256:495-497所述的杂交瘤技术,人B细胞杂交瘤技术(参见Kozbor *et al.*, 1983, *Immunol. Today* 4:72), EBV-杂交瘤技术(参见*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan

R. Liss, Inc., 1985中Cole *et al.*, pp. 77-96)或三源杂交瘤(trioma)技术。制备杂交瘤的技术是公知(常见于*Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* ed., John Wiley & Sons, New York, 1994)。通过如使用标准ELISA试验,在杂交瘤培养物上清中筛选结合目的多肽的抗体,可检测产生本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞。

除了制备分泌单克隆抗体的杂交瘤之外,可以通过用目的多肽筛选重组组合免疫球蛋白文库(如抗体噬菌体展示文库)来鉴定并分离针对本发明Cripto-3多肽的单克隆抗体。制备并筛选噬菌体展示文库的试剂盒可商购(如the Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Catalog No. 27-9400-01;以及the Stratagene *SurfZAP Phage Display Kits*, Catalog No. 240612)。另外,特别适用于制备并筛选抗体展示文库的方法和试剂的例子可见于例如,美国专利 5,223,409; PCT 公开申请 WO 92/18619; PCT 公开申请 WO 91/17271; PCT 公开申请 WO 92/20791; PCT 公开申请 WO 92/15679; PCT 公开申请 WO 93/01288; PCT 公开申请 WO 92/01047; PCT 公开申请 WO 92/09690; PCT 公开申请 WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734。

另外,本发明范围内包括重组抗体,如嵌合和人源化的单克隆抗体,其包括人和非人部分,可用标准重组DNA技术制备。这些嵌合和人源化的单克隆抗体可以通过本领域已知的重组DNA技术制备,例如用PCT公开申请WO 87/02671; 欧洲专利申请184,187; 欧洲专利申请171,496; 欧洲专利申请173,494; PCT 公开申请 WO 86/01533; 美国专利 4,816,567; 欧洲专利申请125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; 和 Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *Bio/Techniques* 4:214; 美国专利 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; 和 Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060 所述的方法。

完全的人抗体对于治愈性治疗(therapeutic treatment)人类受试者特别理

想。这些抗体可以用转基因小鼠制备,所述小鼠不能表达内源性免疫球蛋白的重链和轻链基因,但能表达人的重链和轻链基因。以正常方式用选定的抗体,如对应于本发明标记物的所有或部分的多肽,免疫所述转基因小鼠。可用常用的杂交瘤技术获得针对所述抗原的单克隆抗体。转基因小鼠所携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化时重排,随后经过类别转换和体细胞突变。因此,用此技术,可以制备治疗上有用的IgG, IgA和IgE抗体。制备人抗体的此技术的综述见Lonberg and Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93)。对制备人抗体和人单克隆抗体的此技术的详细讨论以及制备此类抗体的方案见如美国专利5,625,126; 美国专利5,633,425; 美国专利5,569,825; 美国专利5,661,016; 和美国专利5,545,806。另外,用类似上述的技术, Abgenix, Inc. (Freemont, CA)等公司可承诺提供针对选定抗原的人抗体。

可用称为“定向选择(guided selection)”的技术制备识别选定表位的完全人抗体。在这种方法中,用选定的非人单克隆抗体(如鼠抗体)来定向选择识别相同表位的完全人抗体(Jespers *et al.*, 1994, *Bio/technology* 12:899-903)。

特异性结合在增生病症如癌症中受调控的Cripto-3多肽的抗体、抗体衍生物、或其片段可用于抑制Cripto-3的活性,从而可给予受试者用于治疗、抑制或预防该受试者的增生疾病如癌症。而且,也可用偶联(conjugated)抗体来治疗、抑制或预防受试者的癌症。偶联抗体,优选单克隆抗体,或其片段,是与药物、毒素或放射性原子连接并用作递送载体来将那些物质直接递送到癌细胞的抗体。所述抗体,如特异性结合Cripto-3多肽的抗体,被给予受试者并结合所述标记物,从而将毒性物质递送到受累细胞,将对机体其他部分的正常细胞的损害降到最小化。

偶联抗体也被称为“标识的(tagged)”, “标记的”或“装载的(loaded)”。连接了化疗剂的抗体常称为化学标记的。连接了放射性粒子的抗体被称为放射性标记的,并且此种疗法被称为放射免疫疗法(RIT)。除了用于治疗癌症之外,放射性标记的抗体也可用于检测机体内扩散的癌的区域。与毒素连接的抗体被称作免疫毒素。

免疫毒素是通过将毒素(如植物或细菌的有毒物质)与单克隆抗体连接来制备的。可以通过将单克隆抗体与细菌毒素如白喉毒素(DT)或假单胞菌外毒素(PE40)连接,或与植物毒素如蓖麻毒蛋白A或皂草素连接,来制备免疫毒素。

可用针对Cripto-3多肽的抗体(如单克隆抗体)通过标准技术分离所述多肽,如亲和层析或免疫沉淀。另外,可用此抗体检测所述多肽(如在细胞裂解物或细胞上清中),以评价该多肽的表达水平和类型。也用该抗体来诊断性监测组织或体液中(如在与卵巢相关的体液中)的蛋白水平作为临床实验方法的部分,如为了,例如,确定指定治疗方案的有效性(如抗-Cripto抗体疗法的有效性)。通过将抗体与可检测物质偶联可以便于检测。可检测物质的例子包括多种酶、辅基(prosthetic groups)、荧光物质、化学发光物质、生物发光物质、以及放射性物质。合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的例子包括链亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光物质的例子包括伞形酮(umbelliferone)、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基氨基荧光素(dichlorotriazinylamine fluorescein)、丹磺酰氯或藻红蛋白;化学发光物质的例子包括鲁米诺(luminol);生物发光物质的例子包括萤光素酶(luciferase)、萤光素(luciferin)和水母发光蛋白(aequorin),而合适的放射性物质的例子包括 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S 或 ^3H 。

还认为上述任一种方法可用于制备特异性结合Cripto-1多肽,如不结合Cripto-3多肽的分子,如抗体,如单克隆抗体。特异性结合Cripto-1多肽的分子是结合Cripto-1多肽但基本不结合样本中其它分子的分子,所述样本如生物样本天然包含所述多肽。优选,特异性结合Cripto-1多肽的分子基本不结合Cripto-3多肽。

IV. 检测和诊断试验

本发明涉及测定样本中对应于本发明标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的多肽或核酸的量、结构和/或活性的检测试验或诊断试验。此检测试验用于测定肿瘤的表型,如肿瘤是否是表达Cripto-3或Cripto-1的肿瘤。此试验也用于评估细胞(如来自患者样本的细胞)是否转化,如用于诊断癌症,以及用于评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者。在优选的实施方案中,可测试本发明标记物如Cripto-3的表达水平,作为评估细胞如来自患者样本的细胞是否转化的方法。还可测试本发明标记物如Cripto-3的表达水平,作为诊断增生疾病、病症或状况,如癌症,或患上增生疾病、病症或状况的风险的方法。另外,可测试本发明标记物如Cripto-3的表达水平,作为评估患者是

否适合抗-Cripto抗体疗法的方法。

1. 检测基因表达的方法

评估本发明标记物的表达可以用多种公知检测转录的多核苷酸或蛋白表达的方法中的任一种。此种方法的非限制性例子包括, 核酸杂交方法, 核酸逆转录方法, 和核酸扩增方法, 检测分泌的、细胞表面的、胞质的或胞核的蛋白的免疫方法, 蛋白纯化方法, 以及蛋白功能或活性的测定。

在优选的实施方案中, 特定标记物如Cripto-3和/或Cripto-1的表达, 表征为基因转录物(如mRNA或cDNA)的测量值(measure), 对所翻译蛋白量的测量值, 或者对基因产物活性的测量值。可用多种方法监测标记物的表达, 包括通过检测mRNA水平、蛋白水平或蛋白活性, 其中任何一种都可用标准技术来测定。检测可包括对基因表达水平(如cDNA、mRNA、蛋白或酶活性)的定量, 或者可以是对基因表达水平的定性评估, 尤其是与对照水平相比。被测水平的类型可由上下文清楚得知。

用核酸杂交技术检测和/或定量基因转录物(mRNA或由其得来的cDNA)的方法是本领域技术人员已知的(参见Sambrook et al. 如上述)。例如, 评价cDNA的存在、缺无或量的方法涉及Southern转移。简言之, 分离mRNA(如用酸胍(acid guanidinium)-苯酚-氯仿抽提方法, Sambrook et al. 如上述)并进行逆转录来制备cDNA。然后任选消化该cDNA, 并在缓冲液中进行凝胶电泳, 再转移到膜上。然后用对靶cDNA特异的核酸探针进行杂交。

这些检测试验或诊断性和预后性试验的一般原则, 涉及在适当条件以及足够长的时间制备包含标记物和探针(如核酸探针或引物)的样本或反应混合物, 所述条件和时间使所述标记物和探针相互作用并结合, 从而形成可从反应混合物中去除和/或检出的复合物。这些试验可以以多种方式进行。

例如, 进行此试验的一种方法会涉及将标记物或探针锚定在固相支持物也称为底物上, 然后在反应末检测锚定在固相上的靶标记物/探针复合物。在此方法的一个实施方案中, 待测定其中标记物的存在和/或浓度的来自受试者的样本, 可锚定在载体或固相支持物上。另一个实施方案中, 可能会是相反的情况, 此时探针可以锚定在固相上, 并可使来自受试者的样本作为该试验未锚定的组分发生反应。

有很多已有的将试验组分锚定在固相的方法。这些方法包括, 但不限于通过生物素和链亲和素的结合固定的标记物或探针分子。这些生物素化的试

验组分可以从生物素-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺)用本领域已知技术(如固相试剂盒, Pierce Chemicals, Rockford, IL)制备, 并固定在链亲和素-包被的96孔板(Pierce Chemical)的孔中。在某些实施方案中, 可以事先制备固定了试验组分的表面并储存。

其它用于此试验的合适载体或固相支持物包括能够结合该标记物或探针所属类别分子的任何材料。公知的支持物或载体包括但不限于玻璃、聚苯乙烯、尼龙、聚丙烯、尼龙、聚乙烯、葡聚糖(dextran)、淀粉酶、天然和经修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩(gabbro)以及磁铁矿(magnetite)。

为了进行具有上述步骤的试验, 将未固定的组分加入已锚定第二种组分的固相。在反应完成后, 可去除未复合的组分(如通过洗涤), 其条件使得任何形成的复合物仍旧固定在固相上。可用本文概述的若干方法检测锚定在固相上的标记物/探针复合物。

在优选的实施方案中, 探针(如核酸探针或引物)在作为未锚定的试验组分时, 可为试验的检测以及读出目的, 而用本文所述且本领域技术人员公知的可检测标记直接或间接地标记。

也可以直接检测标记物/探针复合物形成而不需再处理或标记任一种组分(标记物或探针), 例如通过利用荧光能量转移技术(参见例如, Lakowicz *et al.*, 美国专利5,631,169; Stavrianopoulos, *et al.*, 美国专利4,868,103)。选择在第一个‘供体’分子上的荧光团标记, 其经过适当波长的入射光的激发, 发射的荧光能量会被第二个‘接受体(acceptor)’分子上的荧光标记吸收, 后者由于吸收的能量接着就能发荧光。可选地, ‘供体’蛋白分子可简单地利用色氨酸残基的天然荧光能量。选择发射不同波长光的标记, 从而‘接受体’分子标记可以与‘供体’的标记相区分。因为标记间能量转移的效率与分子间距离有关, 所以可评估分子间的空间关系。在分子间出现结合的情况下, 试验中‘接受体’分子标记发射的荧光是最大的。通过本领域公知的标准荧光法检测手段(如用荧光计(fluorimeter)), 可以方便地测定FET结合事件。

另一个实施方案中, 通过利用技术如实时Biomolecular Interaction Analysis (BIA), 不用标记任一种组分(标记物或探针)就可以测定探针(如核酸探针或引物)识别标记物的能力(参见如 Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, *Anal. Chem.* 63:2338-2345和Szabo *et al.*, 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705)。本文所用的“BIA”或“表面等离子共振(surface plasmon

resonance)”是不用标记任一种相互作用物、实时研究生物特异性相互作用的一项技术(如BIAcore)。在结合表面的质量改变(表明结合事件)导致表面附近光线折射率的改变(表面等离子共振(SPR)的光学现象),得到了可检测的信号,该信号可用作生物分子间实时反应的指标。

可选地,在另一个实施方案中,可用标记物和探针作为液相溶质进行类似的诊断和预测试验。此试验中,复合的标记物和探针与未复合组分通过多种标准技术中的任一种分离,其包括但不限于:差异离心、层析、电泳和免疫沉淀。在差异离心中,可经一系列离心步骤将标记物/探针复合物与未复合试验组分分离,由于复合物的沉降平衡根据其不同大小和密度而不同(参见例如, Rivas, G., and Minton, A.P., 1993, *Trends Biochem Sci.* 18(8):284-7)。标准层析技术也可用于分离复合分子和未复合分子。例如,凝胶过滤层析根据大小,并且利用合适的凝胶过滤树脂以柱模式,来分离分子,例如,将相对较大的复合物与相对较小的未复合组分分离。类似地,标记物/探针复合物与未复合组分相比相对不同的电荷性质可用于区分复合物和未复合组分,例如通过利用离子交换层析树脂。这些树脂和层析技术对本领域技术人员是公知的(参见如Heegaard, N.H., 1998, *J. Mol. Recognit.* Winter 11(1-6):141-8; Hage, D.S., and Tweed, S.A. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997 Oct 10;699(1-2):499-525)。也可用凝胶电泳来将复合的试验组分与未结合的组分分离(参见如Ausubel *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999)。此技术中,例如基于大小或电荷,分离蛋白或核酸复合物。为了在电泳过程中保持结合相互作用,在还原剂缺失时,常优选非变性凝胶基质材料和条件。对具体试验及其组分的合适条件是本领域技术人员公知的。

在具体实施方案中,对应于标记物的转录的多核苷酸如mRNA的水平,可在生物样本中用本领域已知方法来以原位或体外模式测定。术语“生物样本”应包括分离自受试者的组织、细胞、生物液体以及其分离物,以及存在受试者内的组织、细胞和液体,如肿瘤细胞。

本发明的表达检测法可使用分离的RNA,如mRNA或cDNA。对于体外方法,可以用任何不违反mRNA分离而进行选择的RNA分离技术自细胞纯化RNA(参见如Ausubel *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 1987-1999)。另外,大量的组织样本可以容易地用本

领域技术人员公知技术加工，如例如，Chomczynski的一步RNA分离法(1989, 美国专利4,843,155)。对于原位方法，检测前mRNA不需从细胞分离。此方法中，用已知的组织学方法制备/加工细胞或组织样本。然后将此样本固定在支持物上，通常为载玻片，然后与能够与编码所述标记物的mRNA杂交的探针接触。

对应于本发明标记物的分离的转录的多核苷酸，如mRNA或cDNA，可用于杂交或扩增试验，包括但不限于Southern或Northern分析、聚合酶链式反应分析和探针阵列。

检测mRNA或cDNA水平的一种诊断方法涉及使分离的mRNA或cDNA与核酸分子(探针)接触，所述核酸分子能够与被检测的标记物所编码的mRNA或cDNA杂交。该核酸探针可以是例如，全长cDNA，或其部分，如至少7, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900或1000个核苷酸长或更长的寡核苷酸，且足以与转录的多核苷酸在严谨条件特异性杂交，所述转录的多核苷酸如mRNA或cDNA，编码本发明标记物如Cripto-3和/或Cripto-1。一个实施方案中，该核酸探针与转录的Cripto-3多核苷酸选择性杂交，从而该核酸探针不与转录的Cripto-1多核苷酸杂交。另一个实施方案中，该核酸探针与转录的Cripto-1多核苷酸选择性杂交，从而该核酸探针不与转录的Cripto-3多核苷酸杂交。其它适用于本发明方法的核酸探针或引物如本文所述。转录的多核苷酸如mRNA或cDNA与所述探针或引物的杂交表明，目标(in question)标记物已表达。

在一种模式中，将转录的多核苷酸如mRNA或cDNA固定在固相表面上并与探针接触，方法例如使分离的mRNA或cDNA在琼脂糖凝胶上泳动，并将该mRNA或cDNA从凝胶转移到膜如硝酸纤维素上。在另一种模式中，例如，在Affymetrix基因芯片阵列中，将探针固定在固相表面上，且使mRNA或cDNA与所述探针相接触。熟练技术人员可以容易地采用已知的mRNA和/或cDNA检测方法用于检测本发明标记物所编码的mRNA或cDNA的水平。

探针可以是编码蛋白的核酸序列的全长或不足全长。较短的探针经验上用于检测特异性。优选核酸探针是10, 15, 20个碱基长或更长。(参见如Sambrook et al.选择用于核酸杂交的核酸探针序列的方法)。肉眼观察(visualization)杂交部分允许定性测定mRNA 或cDNA的存在或缺无。

在本发明一个实施方案中，测定对应于本发明标记物如Cripto-3和/或

Cripto-1的转录的多核苷酸的水平, 涉及扩增所述转录的多核苷酸的方法, 随后用本领域技术人员公知的技术检测扩增的分子。核酸扩增的方法是本领域技术人员已知的, 并且包括但不限于, 如PCR, rtPCR(试验的实施方案如Mullis, 1987, 美国专利4,683,202所述), 连接酶链式反应(Barany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:189-193), 自动维持序列复制(Guatelli *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), 转录扩增体系(Kwoh *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta复制酶(Lizardi *et al.*, 1988, *Bio/Technology* 6:1197), 滚环复制(Lizardi *et al.*, 美国专利5,854,033)或任何其它的本领域技术人员已知的核酸扩增方法。荧光(Fluorogenic) rtPCR也可用于本发明的方法。在荧光rtPCR中, 基于荧光信号如TaqMan和sybr green的量作定量。这些检测方案特别可用于检测核酸分子, 如果这些分子以很低量存在。本发明的优选扩增方法涉及PCR, 如rtPCR。

通常, 可用作扩增引物的核酸分子的核苷酸长度从约10到50(如10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50或更多), 且位于约25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 10000, 20000或更多个核苷酸长度的区域侧翼。在合适条件并用合适试剂, 这些引物允许扩增包含以所述引物为侧翼的核苷酸序列的核酸分子。

一个实施方案中, 所述核酸分子(引物)与转录的Cripto-3多核苷酸选择性杂交, 从而该引物选择性扩增转录的Cripto-3多核苷酸且不扩增转录的Cripto-1多核苷酸。此种核酸分子(引物)的一个例子是与转录的Cripto-3多核苷酸的部分杂交的核酸分子(引物), 该部分包含编码Cripto-3而不是Cripto-1特有的氨基酸的核苷酸, 所述氨基酸如Cripto-3多核苷酸序列中与Cripto-1多核苷酸序列中的对应氨基酸不同的氨基酸残基, 如选自V7, L68, E92和A178的氨基酸。另一个实施方案中, 所述核酸分子(引物)与转录的Cripto-1多核苷酸选择性杂交, 从而该引物选择性扩增转录的Cripto-1多核苷酸且不扩增转录的Cripto-3多核苷酸。此种核酸分子(引物)的一个例子是与转录的Cripto-1多核苷酸的部分杂交的核酸分子(引物), 该部分包含Cripto-1而不是Cripto-3特有的一或多个氨基酸的编码核苷酸, 所述一或多个氨基酸如Cripto-1多核苷酸序列中与Cripto-3多核苷酸序列中的对应氨基酸不同的一或多个氨基酸残基, 如选自A7, P68, G92, V178, V22和Y43的一或多个氨基酸。在优选的实施方案中, 所述的一或多个Cripto-1蛋白而不是Cripto-3蛋白特有的氨基酸选

自A7, P68, G92和V178。

除了基于标记物的绝对表达水平作测定外,还可基于标记物的标准化(normalized)表达水平作测定。通过将标记物的绝对表达水平与非标记物基因的表达进行比较,来进行校正,可使标记物的绝对表达水平标准化,所述非标记物基因如组成性表达的管家基因。用于标准化的合适基因包括管家基因如肌动蛋白基因,或表皮细胞-特异性基因。此标准化允许比较一个样本如受试样本与另一个样本如正常的非癌样本、或来自不同来源的样本之间的表达水平。

可选地,表达水平可作为相对表达水平来提供。为测定标记物的相对表达水平,在测定目标样本的表达水平之前,测定该标记物在正常以及癌细胞分离物的1, 2, 3, 4, 5, 10或更多份样本中,优选 50或更多份样本中的表达水平。测定每个被试基因在较多量样本中的平均表达水平,并且将其用作该标记物的表达水平基线。然后将测定的被测样本的标记物表达水平(绝对的表达水平)除以获得的该标记物的表达均值。这提供了相对表达水平。

还考虑样本中Cripto-3的表达水平可作为与Cripto-1表达水平的相对表达水平来提供。一个实施方案中,本发明提供了评估患者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者的方法,该方法包含比较患者样本如肿瘤样本中的TDGF3基因的表达水平,以及TDGF1基因在患者样本中的表达水平,其中患者样本中TDGF3基因的表达水平比患者样本中TDGF1基因的表达水平高,这表明该患者是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者。优选,基线测定中所用的样本将会来自相同组织类型的癌细胞或正常细胞。选择细胞来源依赖于利用相对的表达水平。用在正常组织中发现的表达作为平均表达计分,有助于确认被测的标记物对该细胞的来源组织是特异的(与正常细胞相比)。除外,在积累了更多数据时,可以修改平均表达值,基于累积的数据提供改进的相对表达值。来自正常细胞的表达数据提供了给转化状态,如癌症状态的严重程度分级的手段。

因为本发明的组合物、试剂盒和方法依赖于检测本发明标记物表达水平的差异,优选该标记物的表达水平显著高于该方法用于评估在至少一种正常细胞和癌细胞中的表达时的最低检出限。

在另一种优选的实施方案中,评估标记物的表达是通过从受试样本的细胞中制备基因组DNA或mRNA/cDNA(即转录的多核苷酸),并通过将基因组

DNA或mRNA/cDNA与参照多核苷酸杂交来实现,所述参照多核苷酸是包含该标记物的多核苷酸的互补物及其片段。cDNA可以,在与参照多核苷酸杂交前,任选地,用任何多种聚合酶链式反应方法中的一种扩增。一或多种标记物的表达可以类似通过用定量PCR(QPCR)来检测,从而评估所述标记物的表达水平。可选地,可用多种检测本发明标记物突变或变异(如单个核苷酸多态性,缺失等)的已知方法中的任一种,来检测受试者中出现的突变的标记物。

另一个实施方案中,使用多种方法的组合来评估标记物表达。

2. 检测表达的蛋白的方法

本发明标记物蛋白如Cripto-3和/或Cripto-1的活性或水平,也可通过检测或定量所表达的多肽来检测和/或定量。所述多肽可用多种本领域技术人员公知手段的任何一种来检测和定量。这些可包括分析性生物化学方法,如电泳、毛细电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、超级扩散(hyperdiffusion)色谱等等,或多种免疫方法,如液体或凝胶沉淀素反应、免疫扩散(单向或双向)、免疫电泳、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附试验(ELISAs)、免疫荧光测定、western印迹等等。熟练技术人员可以容易地采用已知的蛋白/抗体检测方法用于确定细胞是否表达本发明标记物。

本发明多肽的优选检测剂是能够结合对应于本发明标记物的多肽的抗体,优选带有可检测标记的抗体。抗体可以是多克隆的或更优选单克隆的。可用完整抗体或其片段(如Fab或F(ab')₂)。术语“标记(labeled)”就探针或抗体而言,应该包含通过将可检测的物质与探针或抗体偶联(即物理连接)来直接标记探针或抗体,以及通过与另一种直接标记的试剂反应来间接标记探针或抗体。间接标记的例子包括用荧光标记的二级抗体来检测一级抗体,以及在末端用生物素标记DNA探针从而通过荧光标记的链亲和素来检测。

在优选的实施方案中,抗体是标记的,如放射性标记的,生色团标记的,荧光团标记的或酶标记的抗体)。另一个实施方案中,使用抗体衍生物(如与底物结合或与蛋白-配体对{如生物素-链亲和素}的蛋白或配体结合的抗体),或抗体片段(如单链抗体,分离的抗体超变区等等),所述抗体衍生物或抗体片段特异性结合对应于所述标记物的蛋白,所述蛋白如由对应于所述标记物的开放阅读框架编码的蛋白,或者已经历过全部或部分的正常翻译后修饰的

蛋白。

可以用本领域技术人员公知的技术分离来自细胞的蛋白。所用的蛋白分离方法可以，例如，如Harlow and Lane (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)所述。

在一个模式中，抗体或抗体片段可用于在诸如Western印迹或免疫荧光技术等方法中来检测表达的蛋白。在此用途中，通常优选将抗体或蛋白固定在固相支持物上。合适的固相支持物或载体包括任何能够结合抗原或抗体的支持物。公知的支持物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和经修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩以及磁铁矿。

本领域技术人员知道很多其它结合抗体或抗原的合适载体，而且能够采用这些支持物用于本发明。例如，从细胞分离的蛋白可在聚丙烯酰胺凝胶电泳上泳动并固定在固相支持物如硝酸纤维素上。之后可以用合适缓冲液洗涤所述支持物，随后用可检测标记的抗体处理。然后可以再用缓冲液洗涤该固相支持物第二次来去除未结合的抗体。然后用常用手段检测结合在该固相支持物上的标记物的量。用电泳技术检测蛋白的手段是本领域技术人员公知的(常参见R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher, (1990) *Method in Enzymology* Vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc., N.Y.)。

在另一个优选的实施方案中，Western印迹(免疫印迹)分析被用于检测并定量多肽在样本中的存在。此技术常包含通过凝胶电泳基于分子量分离样本蛋白，将所分离的蛋白转移到合适的固相支持物(如硝酸纤维素滤膜、尼龙滤膜或衍生而得的(derivatized)尼龙滤膜)，并将该样本与特异性结合多肽的抗体温育。所述抗-多肽抗体特异性结合固相支持物上的所述多肽。这些抗体可直接标记，或可选随后用与所述抗-多肽特异性结合的标记的抗体检测(如标记的绵羊抗-小鼠抗体)。

在更优选的实施方案中，所述多肽用免疫测定来检测。本文所用的免疫测定是利用抗体来特异性结合分析物的测定。因此，所述免疫测定表征为检测多肽与抗-抗体的特异性结合，而不是应用其它物理或化学性质来分离、靶向并定量分析物。

用多种公知的免疫学结合试验中的任一种检测和/或定量多肽(参见如美国专利4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; 和4,837,168)。对于常见免疫测定的综述也参见Asai (1993) *Method in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology 7th Edition*。

免疫学结合试验(或免疫试验)通常利用“捕捉剂(capture agent)”来特异性结合并通常将分析物固定(多肽或亚序列)。该捕捉剂是特异性结合分析物的部分。在优选的实施方案中,该捕捉剂是特异性结合多肽的抗体。所述抗体(抗-肽)可用本领域技术人员公知手段中的任一种来制备。

免疫试验也常应用标记物质来特异性结合并标记捕捉剂与分析物所形成的结合复合物。该标记物质自身可以是含所述抗体/分析物复合物的部分之一。因此,该标记物质可以是标记的多肽或标记的抗-抗体。可选地,标记剂(labeling agent)可以是第三种部分,如另一种抗体,其特异性结合所述抗体/多肽复合物。

在一个优选的实施方案中,标记剂是第二种携带标记的人抗体。或者,第二种抗体可能不带标记,但它可能之后被标记的第三种抗体结合,该第三种抗体是对所述第二种抗体的来源物种的抗体特异的抗体。该第二种抗体可用可检测部分如生物素修饰,第三种标记的分子如酶标链亲和素可以与该可检测部分特异性结合。

其它能特异性结合免疫球蛋白恒定区的蛋白,如蛋白A或蛋白G,也可用作标记剂。这些蛋白是链球菌细胞壁的正常组成成分。它们表现出了与多种物种的免疫球蛋白恒定区的强非免疫原性反应性(通常参见Kronval, et al. (1973) *J. Immunol.*, 111: 1401-1406, 和Akerstrom (1985) *J. Immunol.*, 135: 2589-2542)。

如上指出,用于检测和/或定量多肽的免疫试验可采取本领域技术人员公知的多种模式。

优选的检测多肽的免疫试验是竞争性或非竞争性的。非竞争性免疫试验是直接测定被捕捉的分析物的量的试验。在一个优选的“夹心”试验中,例如,捕捉剂(抗-肽的抗体)可直接结合到固定它们的固相底物上。之后这些固定的抗体捕捉被测样本中存在的多肽。然后这样固定的多肽与标记剂如携带标记的第二种人抗体结合。

在竞争性试验中,通过测定加入的(外源的)分析物(多肽)的量,间接测定样本中存在的分析物(多肽)的量,该加入的分析物被样本中存在的分析物从捕捉剂(抗肽的抗体)中置换掉(或竞争失败(competed away))。在竞争性试验中,此时将已知量的多肽加入样本,然后使所述样本与捕捉剂接触。与抗体结合的多肽的量与在样本中存在的多肽的浓度成反比。

在一个特别优选的实施方案中,所述抗体固定在固相底物上。测定与抗体结合的多肽量可以通过测量多肽/抗体复合物中存在的多肽的量,或者测量剩余未复合的多肽的量。多肽的量可通过提供标记多肽来检测。

本发明试验根据本领域技术人员公知的标准方法来计分(为阳性或阴性或多肽的量)。具体方法依赖于试验模式以及标记的选择。例如,Western印迹试验可通过肉眼观察酶标产生的有色产物来计分。在准确分子量处的清晰可见的有色带或点计分为阳性结果,而不存在清晰可见的点或带计分为阴性。带或点的强度可提供多肽的定量测量值(measure)。

用于本文所述多种免疫试验的抗体,可以如上述制备。

另一个实施方案中,测定水平(活性)是通过测量基因产物的酶活性。测试酶活性的方法是本领域技术人员公知的。

检测生物标记物蛋白的体内技术包括向受试者引入针对所述蛋白的标记抗体。例如,该抗体可用放射性标记物标记,其在受试者中的存在和位置可用标准成像技术检测。

可理解受试样本,如含组织或细胞如肿瘤组织或细胞的样本,如全血、血清、血浆、口腔刮片、唾液、脊髓液、脑脊液、尿、粪便,其中可含有细胞,尤其当细胞是癌性时,并且更特别在癌症转移时,因此可用于本发明方法。当然,在评估样本中标记物的表达水平之前,细胞样本会用多种公知的收集后制备以及储存技术(如核酸和/或蛋白抽提、固定、储存、冷冻、超滤、浓缩、蒸发、离心等等)处理。因此,本发明的组合物、试剂盒和方法可用于检测标记物的表达,该标记物对应于至少一部分展示在表达该标记物的细胞的表面上的蛋白。对于熟练技术人员而言,确定是否对应于任何特定标记物的蛋白包含细胞表面蛋白是个简单问题。例如,可用免疫方法来检测整个细胞上的此种蛋白,或可用公知的基于计算机的序列分析方法(如SIGNALP程序;Nielsen *et al.*, 1997, *Protein Engineering* 10:1-6)来预测至少一个胞外区的存在(即包括分泌的蛋白以及具有至少一个细胞表面结构域的蛋白)。检测

标记物的表达可以不必裂解表达该标记物的细胞,所述标记物对应于至少一部分展示在该细胞表面上的蛋白(如使用特异性结合该蛋白的细胞表面结构域的标记抗体)。

本发明也包含用于检测生物样本中与本发明标记物对应的多肽或核酸的存在的试剂盒,所述样本如含组织或细胞如肿瘤组织或细胞的样本,或生物液体,如全血、血清、血浆、口腔刮片、唾液、脊髓液、脑脊液、尿、粪便。此种试剂盒可用于确定细胞是否转化。此种试剂盒也可用于评估受试者是否是抗-Cripto抗体疗法的合适候选者。例如,所述试剂盒可包含标记的化合物或试剂,其能够检测生物样本中与本发明标记物对应的多肽或编码多肽的mRNA,以及用于测定在样本中所述多肽或mRNA的量的工具(如结合所述多肽的抗体或结合编码所述多肽的DNA或mRNA的核酸分子(探针或引物))。试剂盒也可包括解释用该试剂盒获得的结果的说明书。

对于基于抗体的试剂盒,所述试剂盒可包含例如:(1)结合与本发明标记物对应的多肽的第一种抗体(如与固相支持物连接);及可选的(2)结合所述多肽或者第一种抗体、并与可检测标记结合的第二种不同的抗体。

对于基于核酸分子的试剂盒,所述试剂盒可包含例如:(1)核酸分子(探针),如带有可检测标记的核酸分子,其与与本发明标记物对应的多肽的编码核酸序列杂交,或(2)一对核酸分子(引物),其用于扩增对应于本发明标记物的核酸分子。所述试剂盒也可包含,如缓冲剂、防腐剂或蛋白稳定剂。该试剂盒也可包含检测可检测标记的必要组分(如酶或底物)。所述试剂盒也可含有一种或一系列对照样本,其可以用来试验并与被测样本比较。该试剂盒的每个组分可包含在独立容器内,并且多个容器可以一起置于单个包装中,包装中还有解释用所述试剂盒进行试验所得的结果的说明书。

本发明将通过下述不应视为限制的实施例来做进一步阐述。所有本申请所引用的参考文献、图、表、附录、序列登录号、专利和公开专利申请的内容,都在此引入本文作为参考。

实施例

实施例1: TDGF3 (CRIPTO-3)基因表达分析

A. 材料和方法

人类基因组 DNA 和 RNA 样本. 健康的对照的人类基因组 DNA 购自

Sigma (HRC1 panel)和 Coriell 细胞库。人类癌症基因组 DNA 和 RNA 购自 Biochain Institute Inc. (Hayward, CA94545)或从人组织(Asterand, Detroit, MI 48202)和细胞培养物制备。除了得自 NCI-DCTD 肿瘤库的 KM20L2 之外,所有的人癌细胞系都得自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)。用 DNeasy 试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)制备 DNA。用 Trizol 随后用 RNeasy 试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)制备 RNA。为了去除在“无基因组 DNA”的 RNA 中的任何残留基因组 DNA 杂质,在 cDNA 合成前,在室温用 1 单位的 DNase I (Invitrogen)消化 1 μ g 的每种 RNA 样本 15 或 30 分钟。用 Cripto-1 内含子特异性寡核苷酸引物(CGCTTACAGGAATTGCCCTTGC (SEQ ID NO:45); 和 CAGACCCAAGCTATCGCAGC (SEQ ID NO:46))通过 PCR 检查 cDNA 是否有 gDNA 污染。

cDNA 制备和 TA 克隆。用 SMART cDNA 合成试剂盒(BD Clontech, CA)根据制造商的方案合成 cDNA。每一样本使用 0.3 μ g 无基因组 DNA 的总 RNA。将来自每个样本的 cDNA 用作模板,使用如下的寡核苷酸引物对,来扩增 TDGF 1 和 Cripto-3 cDNA 的全长或片段,所述引物对是这两种基因共有的: GGCTGAGTCTCCAGCTCAAGG (全长(FL), 正向) (SEQ ID NO:47) 和 GTATTTCTGGAAATAGGTCAATGTCG (FL, 反向) (SEQ ID NO:48); GGCTGAGTCTCCAGCTCAAGG (部分, 正向) (SEQ ID NO:47) 和 TGTGATTTGGATCATGGCCA (部分, 反向) (SEQ ID NO:49)。

所述 PCR 产物被克隆到 pCR2.1-TOPO 载体(Invitrogen)中,每一组织样本有多个分离物被测序。

用热测序仪(pyrosequencer)作基因分型。在含 0.4 μ l 钛 Taq DNA 聚合酶(BD Biosciences, Palo Alto, CA)的 20 μ l 反应体积中,从 20 ng 基因组 DNA 通过 PCR 扩增靶 DNA 片段。PCR 条件如下:最初在 95°C 变性 1 分钟,在 94°C 变性 45 秒,在 64°C 退火 45 秒,在 72°C 延伸 0.5 分钟,并重复 38 个循环。引物的序列如下:

CTCATGTTTGACTTCCTCTTC(正向) (SEQ ID NO:50);

CATCGAAGTCAGGCAGTTCTTAC (反向,在 5'末端生物素化) (SEQ ID NO:51);

GATCATGGCCATTTCTAAAG (V/A22 的测序引物) (SEQ ID NO:52);

GAATTTGCTCGTCCATCTCGGGGA (Y/D43 的测序引物) (SEQ ID

NO:53)。

在 PSQ96 HS 仪器(Biotage, Uppsala, Sweden)上根据制造商建议的方案给大约 3-8 μ l PCR 产物作基因分型。

Cripto-1 和 Cripto-3 特异性 PCR. PCR 条件如下:最初在 95°C 变性 1 分钟,在 94°C 变性 45 秒,在 64°C(Cripto-3 特异的)或 66°C(Cripto-1 特异的)退火 45 秒,在 72°C 延伸 1 分钟,并重复 35 个循环。引物的序列如下:

Cripto-1 的正向寡核苷酸: GCTACGACCTTCTGGGGAAAACG (SEQ ID NO:36);

Cripto-1 的反向寡核苷酸: CTGGTCATGAAATTTGCATG (SEQ ID NO:37);

Cripto-3 的正向寡核苷酸: GCGTGTGCTGCCCCATGGGA (SEQ ID NO:27);

Cripto-3 的反向寡核苷酸: CGGGTCATGAAATTTGCATA (SEQ ID NO:28)。

Cripto-1 片段的 PCR 产物的预期大小是 776 bp, Cripto-3 片段的是 431 bp。

FACS 检测 Cripto 蛋白. 将细胞与 10 μ g/ml 抗-Cripto 抗体温育,并用抗-小鼠 IgG PE 偶联第二抗体染色。将大约 10,000 个细胞用 FACS Calibur and FlowJo 软件经流式细胞仪进行分析。

B. 结果

Cripto-3 基因表达. 为研究 Cripto-3 基因是否在人肿瘤组织和肿瘤细胞系表达,用 Cripto-1 和 Cripto-3 的共有引物扩增来自人肿瘤组织样本和肿瘤细胞系的 Cripto cDNA (图 2B)。然后克隆 PCR 产物并测序来自每个样本的多个克隆。因为 Cripto-3 是无内含子的基因,其基因组编码序列与 cDNA 序列等同。因此,任何污染了基因组 DNA 的 RNA 制备物可被扩增并被误认为 Cripto-3 cDNA。为了去除基因组 DNA (gDNA)污染,在反向转录之前用 DNase I 充分处理 RNA 制备物,通过用对 Cripto-1 内含子特异的引物进行 PCR,确认 cDNA 无基因组 DNA 污染(图 2)。令人惊讶的是,所有来自癌症样本的 cDNA 克隆分离物都衍生自 Cripto-3 基因,而且在 8 个被测癌细胞系中的 5 个里发现 Cripto-3 cDNA (表 4)。

表 4: cDNA 片段克隆的汇总

组织	DNA Fr. 分离物数目	Cripto-1 分 离物数目	Cripto-3 分 离物数目
肺肿瘤 #1	10	0	10
肺肿瘤 #2	7	0	7
肺肿瘤 #3	8	0	8
肺肿瘤 #4	9	0	9
乳腺肿瘤 #1	9	0	9
乳腺肿瘤 #2	9	0	9
乳腺肿瘤 #3	9	0	9
乳腺肿瘤 #4	8	0	8
结肠肿瘤 #1	9	0	9
结肠肿瘤 #2	9	0	9
结肠肿瘤 #3	9	0	9
结肠肿瘤 #4	9	0	9
正常乳腺	8	0	8
正常肺	12	7	5
正常肺	12	0	12
Colo205	8	8	0
NCCIT	9	9	0
H727	8	8	0
GEO	10	9	1
BT474	10	0	10
MCF7	10	0	10
LS174T	10	9	1
H69	8	0	8

为控制 TA 克隆源自不具编码潜力的 mRNA 片段的 cDNA 片段的可能性,用 Cripto-1 和 Cripto-3 的共有引物从另外的癌组织样本中 PCR 扩增全长 TDGF cDNA。发现来自所有 TDGF 阳性癌样本的全长 cDNA 克隆分离物都源自 Cripto-3 基因(表 5)。还在一个正常乳腺、两个正常结肠和三个正常肺样本中发现 Cripto-3 cDNA(表 5)。只从健康组织,包括六个乳腺样本中的三

个和六个肺样本中的两个扩增出 Cripto-1 cDNA (表 5)。只从一个正常肺样本得到了衍生自 Cripto-1 和 Cripto-3 基因的 cDNA。(表 5 和表 4)。

表 5: 全长 Cripto 克隆的汇总

组织	样本总数	Cripto 全长 PCR 阳性数	测序的全长分离物数	Cripto-1 数	Cripto-3 数
正常乳腺	6	3	70	70	0
		1	5	0	5
正常结肠	6	2	30	0	30
正常肺	6	1	8	8	0
		2	43	0	43
		1	21	12	9
乳腺肿瘤	12	8	111	0	111
结肠肿瘤	12	3	35	0	35
肺肿瘤	12	5	55	0	55

转录物-特异性 PCR. 用 Cripto-1 和 Cripto-3 的共有引物作 PCR 有可能得到偏向于其中一个基因转录物而非另一个的数据。为了获得 TDGF 表达的独立试验数据, 大写标注(capitalized)两个基因之间固定的核苷酸差异, 来在上述同组 cDNA 上进行转录物-特异性 PCR。这两个蛋白有四处固定的氨基酸差异: Cripto-1 中为丙氨酸 7 (A7), 脯氨酸 68 (P68), 甘氨酸 92 (G92), 和缬氨酸 178 (V178), 与此相对, Cripto-3 中为缬氨酸 7 (V7), 亮氨酸 68 (L68), 谷氨酸 92 (E92)和丙氨酸 178 (A178)。对编码一或多个这些特有氨基酸的核苷酸序列特异的引物, 被用于特异性扩增 Cripto-1 或 Cripto-3 转录物。如图 3A 所示, 三份正常乳腺和两份正常肺样本表达 Cripto-1。与此相对, 所有在此试验中被测的癌样本要么对 Cripto-3 是阳性的(图 3B)要么 RT-PCR 结果是阴性的。

SAGE 数据库搜索. 接下来, 搜索公共 SAGE 数据库(网址见 www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SAGE)中 Cripto-3 表达的独立证据。检索中所用的 TDGF1-特异性标签是序列 TAATTCTACCAAGGTCT。检索中所用的 Cripto-3 特异性标签是序列 CTCCTTCAGAA。两组不重叠的 SAGE 文库对 Cripto-1 或者 Cripto-3 标签是阳性的 (。在十个 Cripto-1 标签阳性文库中, 九

个来自 ES 细胞而一个来自胎脑。在五个 Cripto-3 阳性文库中，四个来自癌症样本。这些数据进一步支持 Cripto-3 在癌组织中表达的结论。

Affymetrix 基因表达数据。 接下来，支持 Cripto-3 而非 Cripto-1 在肿瘤中表达的其他独立证据来自 Affymetrix 基因表达数据。人 U95Av2 Affymetrix 芯片上的探针组 40386_r_at 被注明为 Cripto-1-特异的。然而，此探针组中的 16 个探针中只有一个是只对 Cripto-1 特异的，所有其他探针都是 Cripto-1 和 Cripto-3 共有的。用此探针组，在 42 份人恶性结肠样本中的 28 份中检测到“Cripto-1”表达。在此组中的所有探针中，所述的 Cripto-1-特异的寡核苷酸探针一直具有最低的强度，信号几乎总是“缺无” ($p < 0.01$)。在这些试验中，缺乏所述的 Cripto-1-特异性探针的信号这一事实与 Cripto 信号源自 Cripto-3 而非 Cripto-1 通道的事实是一致的。

序列变异分析。 最后，为测试所观察的 cDNA 序列是否可能衍生自 Cripto-1 的多态性或突变，分析 96 个健康对照、72 个癌症样本和 32 个细胞系的 DNA 中的 Cripto-1 和 Cripto-3 的序列变异。对于 Cripto-1，两个之前报道的 SNPs, rs11130097 和 rs2293025，显示出与已报道的健康群体中 dbSNP 相类似的等位基因频率。在 Cripto-3 中是单态性的(monomorphic)两个位点上，Cripto-1 是多态性的。特别是，观察到 Cripto-1 在氨基酸残基 22 是多态性的，如 V/A 22 (在核苷酸位置 312 是 T/C)，而且在氨基酸残基 43 是多态性的，如 Y/D 43 (在核苷酸位置 374 是 T/G)。在这两个位置发现 Cripto-3 是单态性的，其中 Cripto-3 序列中的所述特定氨基酸与在 Cripto-1 序列的两个变体之一的相应位置上的氨基酸是相同的，如 A22 和 D43。因此氨基酸 V22 和 Y43 是 Cripto-1 特有的。对 V22 估计的等位基因频率在高加索人(Caucasian) (给 94 个个体作基因分型)是大约 47%，在非裔美国人(给 86 个个体作基因分型)是 57%。D43 的等位基因频率在高加索人(给 94 个个体作基因分型)是 4%，而在非裔美国人(给 96 个个体作基因分型)是 1%。除此以外，在 Cripto-1 与 Cripto-3 差异的位点没有发现 SNPs 或突变。对于 Cripto-3，在这 204 份样本中测序整个编码序列，并没有观察到核苷酸变异；所有序列都与在本文所述 Cripto-3 cDNA 克隆观察到的那些序列相同。

Cripto-3 蛋白表达。 下一个要解决的问题是 Cripto-3 mRNA 是否在细胞中被翻译以及所得的 Cripto-3 蛋白是否被转运到细胞表面。通过荧光素活化的细胞分选(FACS)用两种抗-Cripto 抗体 B3.F6 和 A6.C12 来测定 Cripto-3

蛋白。细胞系 BT474(其中只有 Cripto-3 cDNA 能成功 PCR 扩增)显示与细胞系 NCCIT(其中只有 Cripto-1 的 RT-PCR 是阳性的)同样的染色模式(图 4A)。从已经用表达 Cripto-1 或 Cripto-3 的质粒转染的细胞系 T47D(内源性 Cripto 表达是阴性的)获得类似结果(图 4B)。这些结果显示, Cripto-3 基因不仅被转录, 而且翻译出 Cripto-3 蛋白并转运到这些细胞的细胞表面。

调控 Cripto-3 表达。 本文所述的在一些癌症中观察到的 Cripto-3 表达引出问题: 此基因如何在这些细胞中失调(de-regulated)。Cripto-3 表达在癌症中可能会失调的可能机制包括但不限于: (i) Cripto-3 基因座的扩增; (ii) Cripto-3 的启动子/调控区突变; (iii) 调控 Cripto-3 表达的(一或多个)转录因子的上调或下调; 和(iv) Cripto-3 启动子甲基化状态的改变。绘制全基因组表达图谱披露了若干个表达模式与 TDGF 正向相关的基因, 包括 ASCL2, DHCR7, EPHB3, GPSM2, NOX1, C13orf23, 和 NUFIP1。特别是, ASCL2 编码了结合 E-框序列片段簇 (cluster)的转录因子。在 Cripto-3 转录起点上游 300 个核苷酸的区域内有 6 个 E-框, 而在 Cripto-1 转录起点上游 300 个核苷酸片段内只有一个 E-框。这些数据表明, ASCL2 转录因子和 Cripto-3 基因表达之间可能有联系。进一步的基因组分析会为 Cripto-3 基因表达在癌症中如何被调控提供启示, 为如何靶向 Cripto 或其相互作用的蛋白以进行癌症治疗将提供更多信息。

C. 讨论

Cripto-1 和 Cripto-3 参照序列有 6 处氨基酸差异, 其中 4 处是固定的差异而 2 处处于 Cripto-1 中的多态性位点。如图 1 所示, 固定的氨基酸差异是: A7V, P68L, G92E, V178A (Cripto1 序列在先)。虽然现在还不知道这些氨基酸差异的功能性含义, 但脯氨酸在位置 68 被非保守替代为亮氨酸是值得注意的。也值得注意的是, 在人基因组中的所有 TDGF 假基因中, Cripto-3 是唯一保持其开放阅读框架的假基因。而且, 在本文被测的样本中没发现突变或 SNP。在黑猩猩的 X 染色体存在无内含子的 TDGF 假基因(refseq contig NW122118.1), 这表明 Cripto-3 至少与人类物种一样历史悠久。因此, 看起来 Cripto-3 基因处于基因组中变异较少的部分和/或已经经过了纯化选择。对 Cripto-3 的深度纯化选择与 Cripto-3 具有除了该基因在癌症中起的任何作用之外的功能性作用是一致的。

在本发明之前, 所有针对 TDGF 表达已发表的文章均使用不区分

Cripto-1 和 Cripto-3 的方法。IHC、Northern 印迹分析和全基因组寡核苷酸芯片的结果已经简单地归因于 Cripto-1, 因为 Cripto-3 携带假基因的一些标志, 如缺乏内含子。然而, 无内含子的基因的表达并不罕见; 根据估计大约 5% 的人基因是无内含子的。¹⁵唯一公开可得的有足以区分 Cripto-1 和 Cripto-3 的序列特异性的数据是 SAGE, 但是表明 Cripto-3 在癌症中表达的数据已经被忽略了。

申请人是首个提供了证据, 证明假设的假基因 Cripto-3 是有功能的无内含子的基因, 并且证明 Cripto-3 是在很多 TDGF 阳性癌组织中以可检测水平表达的唯一 Cripto 基因。很明显 Cripto-1 在早期胚胎发育中起关键作用, 并且 Cripto-1 经改造的过表达是致癌的。Cripto-3 在癌组织中表达以及 Cripto-3 与 Cripto-1 有类似的编码序列的观察结果, 强烈提示 Cripto-3 表达也是致癌的。因此虽然 Cripto-1 看似经过进化而在胚胎发育和乳腺发育中起重要作用, 但可以预测到 Cripto-1 或 Cripto-3 在成熟组织中以高水平表达是致癌的。

实施例2: CRIPTO-NODAL信号传递实验中的TDGF3 (CRIPTO-3)功能

A. 材料和方法

用脂转染胺(Lipofectamine, Invitrogen)以及 50ng 的(n2) γ -萤光素酶报告子构建体(reporter construct), 100 ng 叉头活化蛋白信号传导物(forkhead activin signal transducer, FAST)转录因子, 和 100 ng 全长的人 Cripto-1 或人 Cripto-3 表达质粒, 转染缺无小鼠 Cripto 的小鼠畸胎瘤(teratocarcinoma)F9 Cripto-/-细胞(在 24 孔板中 2×10^5 细胞/孔)。转染后 48 小时, 用 LucLite (Perkin Elmer)裂解细胞, 并在发光仪(luminometer) (Perkin Elmer)中测定萤光素酶活性。

B. 结果

在 FAST 转录因子依赖性(n2) γ -萤光素酶报告子实验中, 测试人 Cripto-1 和人 Cripto-3 通过 Nodal 传递信号的能力。在被作为目标用于灭活小鼠 Cripto 基因座的由小鼠 F9 衍生的胚胎性癌(embryonal carcinoma)细胞系基因(F9 Cripto -/-)中评估活性。这些细胞包含内源性 Nodal 但缺无 Cripto, 因此 Cripto-依赖性信号传导是缺无的。与对照相比, Cripto-3 和 Cripto-1 转染的细胞有 4 到 6 倍的萤光素酶活性升高(图 5)。这些结果表明人 Cripto-1 和人 Cripto-3 都能通过 Nodal 传递信号。

参考文献:

- Adkins HB, Bianco C, Schiffer SG, Rayhorn P, Zafari M, Cheung AE, Orozco O, Olson D, De Luca A, Chen LL, Miatkowski K, Benjamin C, Normanno N, Williams KP, Jarpe M, LePage D, Salomon D, Sanicola M (2003) Antibody blockade of the Cripto CFC domain suppresses tumor cell growth in vivo. *J Clin Invest* 112: 575-87
- Brocke KS N-YG, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE (2002) The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Hum Mol Genet.* 11: 331-5
- Ciardiello F, Dono R, Kim N, Persico MG, Salomon DS (1991a) Expression of cripto, a novel gene of the epidermal growth factor gene family, leads to in vitro transformation of a normal mouse mammary epithelial cell line. *Cancer Res* 51: 1051-4
- Ciardiello F, Kim N, Saeki T, Dono R, Persico MG, Plowman GD, Garrigues J, Radke S, Todaro GJ, Salomon DS (1991b) Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7792-6
- de la Cruz JM, Bamford RN, Burdine RD, Roessler E, Barkovich AJ, Donnai D, Schier AF, Muenke M (2002) A loss-of-function mutation in the CFC domain of TDGF1 is associated with human forebrain defects. *Hum Genet* 110: 422-8
- Gritsman K, Zhang J, Cheng S, Heckscher E, Talbot WS, Schier AF (1999) The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97: 121-32
- Minchiotti G, Manco G, Parisi S, Lago CT, Rosa F, Persico MG (2001) Structure-function analysis of the EGF-CFC family member Cripto identifies residues essential for nodal signalling. *Development* 128: 4501-10
- Normanno N, De Luca A, Bianco C, Maiello MR, Carriero MV, Rehman A, Wechselberger C, Arra C, Strizzi L, Sanicola M, Salomon DS (2004a)

- Cripto-1 overexpression leads to enhanced invasiveness and resistance to anoikis in human MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Physiol* 198: 31-9
- Normanno N, De Luca A, Maiello MR, Bianco C, Mancino M, Strizzi L, Arra C, Ciardiello F, Agrawal S, Salomon DS (2004b) CRIPTO-1: a novel target for therapeutic intervention in human carcinoma. *Int J Oncol* 25: 1013-20
- Saloman DS, Bianco C, Ebert AD, Khan NI, De Santis M, Normanno N, Wechselberger C, Seno M, Williams K, Sanicola M, Foley S, Gullick WJ, Persico G (2000) The EGF-CFC family: novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer. *Endocr Relat Cancer* 7: 199-226
- Scognamiglio B BG, Cassano C, Tucci M, Montuori N, Dono R, Lembo G, Barra A, Lago CT, Viglietto G, Rocchi M, Persico MG. (1999) Assignment of human teratocarcinoma derived growth factor (TDGF) sequences to chromosomes 2q37, 3q22, 6p25 and 19q13.1. *Cytogenet Cell Genet.* 84: 220-4.
- Shen MM (2003) Decrypting the role of Cripto in tumorigenesis. *J Clin Invest* 112: 500-2
- Strizzi L, Bianco C, Normanno N, Salomon D (2005) Cripto-1: a multifunctional modulator during embryogenesis and oncogenesis. *Oncogene.* 2005 24: 5731-41.
- Sun Y SL, Raafat A, Hirota M, Bianco C, Feigenbaum L, Kenney N, Wechselberger C, Callahan R, Salomon DS. (2005) Overexpression of human Cripto-1 in transgenic mice delays mammary gland development and differentiation and induces mammary tumorigenesis. *Am J Pathol.* 167: 585-597
- Xing PX, Hu XF, Pietersz GA, Hosick HL, McKenzie IF (2004) Cripto: a novel target for antibody-based cancer immunotherapy. *Cancer Res* 64: 4018-23

等同方案(Equivalents)

本领域技术人员会认识到或仅通过常规试验就能够确认本文所述的发明的具体实施方案的很多等同方案。这些等同方案应该包括在下述权利要求中。

<110> 比奥根艾迪克 MA 公司 (Biogen Idec MA Inc.)

<120> 用于检测 CRIPTO-3 的组合物及方法

<130> BGN-A243PC

<140>

<141>

<150> 60/795,807

<151> 2006-04-28

<160> 55

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 188

<212> PRT

<213> 人 (Homo Sapiens)

<400> 1

```

Met Asp Cys Arg Lys Met Ala Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
 1          5          10          15
Met Ala Ile Ser Lys Val Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
          20          25          30
His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Tyr Leu Ala Phe Arg Asp
          35          40          45
Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
          50          55          60
Gln Arg Val Pro Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
65          70          75          80
Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Gly Ser Phe Cys Ala
          85          90          95
Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys
          100          105          110
Glu Asn Cys Gly Ser Val Pro His Asp Thr Trp Leu Pro Lys Lys Cys
          115          120          125
Ser Leu Cys Lys Cys Trp His Gly Gln Leu Arg Cys Phe Pro Gln Ala
          130          135          140
Phe Leu Pro Gly Cys Asp Gly Leu Val Met Asp Glu His Leu Val Ala
145          150          155          160
Ser Arg Thr Pro Glu Leu Pro Pro Ser Ala Arg Thr Thr Thr Phe Met
          165          170          175
Leu Val Gly Ile Cys Leu Ser Ile Gln Ser Tyr Tyr
          180          185

```

<210> 2

<211> 188

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

```

Met Asp Cys Arg Lys Met Val Arg Phe Ser Tyr Ser Val Ile Trp Ile
 1          5          10          15
Met Ala Ile Ser Lys Ala Phe Glu Leu Gly Leu Val Ala Gly Leu Gly
          20          25          30
His Gln Glu Phe Ala Arg Pro Ser Arg Gly Asp Leu Ala Phe Arg Asp
          35          40          45
Asp Ser Ile Trp Pro Gln Glu Glu Pro Ala Ile Arg Pro Arg Ser Ser
          50          55          60
Gln Arg Val Leu Pro Met Gly Ile Gln His Ser Lys Glu Leu Asn Arg
65          70          75          80
Thr Cys Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Met Leu Glu Ser Phe Cys Ala
          85          90          95
Cys Pro Pro Ser Phe Tyr Gly Arg Asn Cys Glu His Asp Val Arg Lys

```

<210> 7	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 7	
taagagaagc ggaccatctt cctgc	25
<210> 8	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 8	
gtattcccat gggcagcaca cgctg	25
<210> 9	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 9	
ctgtattccc atgggcagca cacgc	25
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 10	
gctgtattcc catgggcagc acacg	25
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 11	
ggcacaaaag gaticcagca tgcag	25
<210> 12	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 12	
caggcacaaa aggactccag catgc	25
<210> 13	
<211> 25	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 13	
tatagaaagg cagatgccag ctagc	25
<210> 14	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 14	
cgggtcatga aatttgcata atatc	25
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 15	
tacgggtcat gaaatttgca taata	25
<210> 16	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 16	
gagaagcggg ccattcttct gcagtc	26
<210> 17	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 17	
agagaagcgg gccattcttc tgcag	25
<210> 18	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 18	
taagagaagc gggccattctt cctgc	25
<210> 19	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	19	
	gtatcccat gggcggcaca cgctg	25
<210>	20	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	20	
	ctgtatccc atgggcggca cacgt	26
<210>	21	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	21	
	gctgtatccc catgggcggc acacg	25
<210>	22	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	22	
	ggcacaaaag gaccccagca tgcag	25
<210>	23	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	23	
	caggcacaaa aggacccag catgc	25
<210>	24	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	24	
	tatagaaagg cagatgccaa ctagc	25
<210>	25	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 寡核苷酸	
<400> 25	
ctggtcatga aatttgcag atatc	25
<210> 26	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 26	
tactggtcat gaaatttgca tgata	25
<210> 27	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 27	
gcgtgtgctg cccatggga	19
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 28	
cgggtcatga aatttgcata	20
<210> 29	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 29	
gactgcagga agatggtccg cttc	24
<210> 30	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 30	
ttcccatggg cagcacacgc t	21
<210> 31	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	

<400> 31 gcgtgtgctg cccatgggaa tac	23
<210> 32 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 寡核苷酸	
<400> 32 gcaggcacaa aaggactcca g	21
<210> 33 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 寡核苷酸	
<400> 33 gcagatgcca gctagcataa aag	23
<210> 34 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 寡核苷酸	
<400> 34 gctagctggc atctgccttt c	21
<210> 35 <211> 22 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 寡核苷酸	
<400> 35 acgggtcatg aaatttgcat aa	22
<210> 36 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 寡核苷酸	
<400> 36 gctacgacct tctggggaaa acg	23
<210> 37 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 寡核苷酸	
<400> 37 ctgggtcatga aatttgcatg	20

<210>	38	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	38	
	gactgcagga agatggcccg cttc	24
<210>	39	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	39	
	tcccatggg cggcacacgc t	21
<210>	40	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	40	
	gcgtgtgccg cccatgggga tac	23
<210>	41	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	41	
	gcaggcacia aaggaccca g	21
<210>	42	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	42	
	gcagatgcca actagcataa aag	23
<210>	43	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	43	
	gctagtggc atcigccttt c	21
<210>	44	

<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 44	
ctggtcatga aatttgcattg a	21
<210> 45	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 45	
cgcttacagg aattgccctt gc	22
<210> 46	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 46	
cagacccaag ctatcgagc	20
<210> 47	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 47	
ggctgagttt ccagctcaag g	21
<210> 48	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 48	
gtatttcttg aaataggtca atgtcg	26
<210> 49	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 49	
tgtgatttgg atcatggcca	20
<210> 50	
<211> 21	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 50	
ctcatgtttg acttcctctt c	21
<210> 51	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<220>	
<221> 修饰的碱基	
<222> 1	
<223> 5'-生物素-修饰的胞嘧啶核苷	
<400> 51	
catcgaagtc aggcagttct tac	23
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 52	
gatcatggcc atttctaaag	20
<210> 53	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 53	
gaatttgctc gtccatctcg ggga	24
<210> 54	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 54	
taattctacc aaggtct	17
<210> 55	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 寡核苷酸	
<400> 55	
ctcttcagaa	10

Cripto 1	MDCRKM	RFYSVIWIM	MAISKVFELGLVAGLGHQEFARPSRGYLAERDDSIWPQEEPAIR		
Cripto 3	MDCRKM	RFYSVIWIM	MAISK.FELGLVAGLGHQEFARPSRG.LAFRDDSIWPQEEPAIR		
Cripto 1	PRSSQRV	PMGIQHSKELN	RTCCLINGGTCML	GSFCACPPSFYGRNCEHDVRKENC	CGSVPH
Cripto 3	PRSSQRV	PMGIQHSKELN	RTCCLINGGTCML	SFCACPPSFYGRNCEHDVRKENC	CGSVPH
Cripto 1	DTWLPKKCSLCKCWHGQ	RCFPQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMI	VG		
Cripto 3	DTWLPKKCSLCKCWHGQ	RCFPQAFLPGCDGLVMDEHLVASRTPELPPSARTTTFMI	GI		
Cripto 1	CLSISQSY	(SEQ ID NO:1)			
Cripto 3	CLSISQSY	(SEQ ID NO:2)			

图 1A

编码 Cripto-1 的核酸序列

GGATCCTTCA	ATATGGACTG	CAGGAAGATG	GCCCGCTTCT	CTTACAGTGT	GATTGGATC	60
ATGGCCATTT	CTAAAGTCTT	TGAAGTGGGA	TTAGTTGCCG	GGCTGGGCCA	TCAGGAATTT	120
GCTCGTCCAT	CTCGGGGATA	CCTGGCCTTC	AGAGATGACA	GCATTGGCC	CCAGGAGGAG	180
CCTGCAATTC	GGCCTCGGTC	TTCCCAGCGT	GTGCCGCCCA	TGGGGATACA	GCACAGTAAG	240
GAGCTAAACA	GAACCTGCTG	CCTGAATGGG	GGAACCTGCA	TGCTGGGGTC	CTTTTGTGCC	300
TGCCCTCCCT	CCTTCTACGG	ACGGAAGTGT	GAGCACGATG	TCCGCAAAGA	GAACGTGTGG	360
TCTGTGCCCC	ATGACACCTG	GCTGCCCAAG	AAGTGTTCCC	TGTGTAATG	CTGGCACGGT	420
CAGCTCCGCT	GCTTCCCTCA	GGCATTCTTA	CCCGGCTGTG	ATGGCCTTGT	GATGGATGAG	480
CACCTCGTGG	CTTCCAGGAC	TCCAGAACTA	CCACCGTCTG	CACGTACTAC	CACTTTATG	540
CTAGTTGGCA	TCTGCCCTTC	TATACAAAGC	TACTATTAAAG	CGGCCGCCCTC	GAG	593 (SEQ ID NO:3)

图 1B

编码 Cripto-3 的核酸序列

ATGGACTGCA	GGAAGATGGT	CCGCTTCTCT	TACAGTGTGA	TTTGGATCAT	GGCCATTCTT	60
AAAGCCTTTG	AACTGGGATT	AGTTGCCGGG	CTGGGCCATC	AGGAATTGTC	TCGTCCATCT	120
CGGGGAGACC	TGGCCTTCAG	AGATGACAGC	ATTTGGCCCC	AGGAGGAGCC	TGCAATTTCGG	180
CCTCGGTCTT	CCCAGCGTGT	GCTGCCCCATG	GGAATACAGC	ACAGTAAGGA	GCTAAACAGA	240
ACCTGCTGCC	TGAATGGGGG	AACCTGGCATG	CTGGAGTCCT	TTTGTGCCCTG	CCCTCCCTCC	300
TTCTACGGAC	GGAACGTGTGA	GCACGATGTG	CGCAAAGAGA	ACTGTGGGTC	TGTGCCCCCAT	360
GACACCTGGC	TGCCCCAAGAA	GTGTTCCCTG	TGTAATGCT	GGCACGGTCA	GCTCCGCTGC	420
TTTCCTCAGG	CATTCTAC	CGGCTGTGAT	GGCCTTGTGA	TGGATGAGCA	CCTCGTGGCT	480
TCCAGGACTC	CAGAACTACC	ACCGTCTGCA	CGTACTACCA	CTTTTATGCT	AGCTGGCATC	540
TGCCTTTCTA	TACAAAGCTA	CTATTAA				567 (SEQ ID NO:4)

图 1C

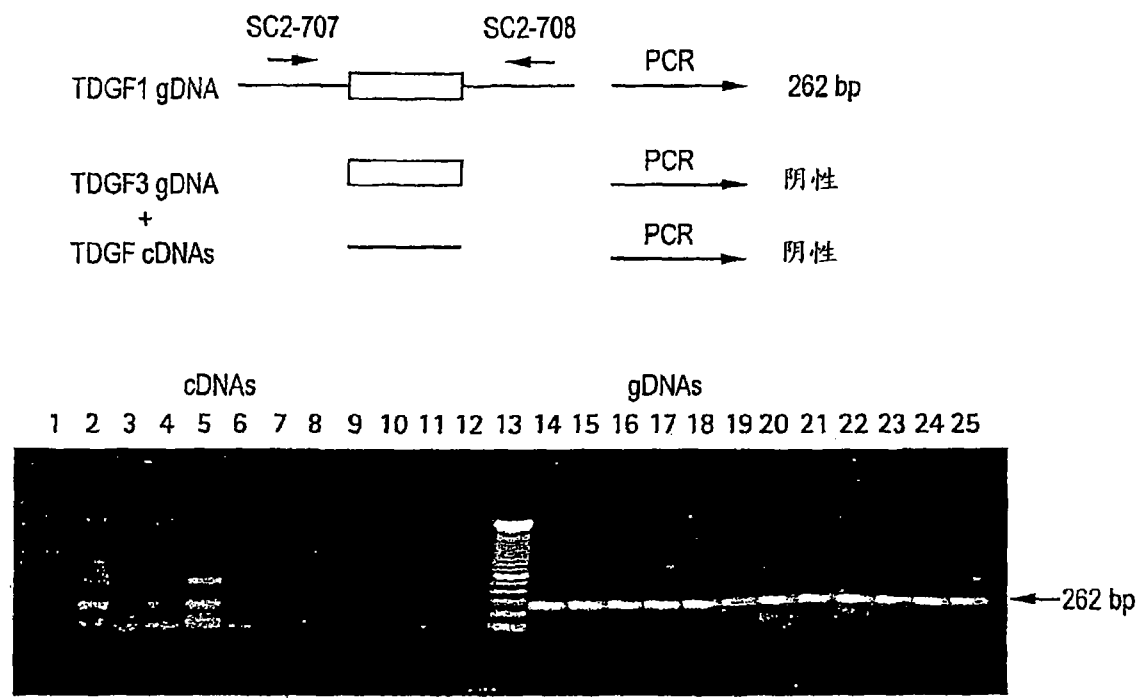


图 2A

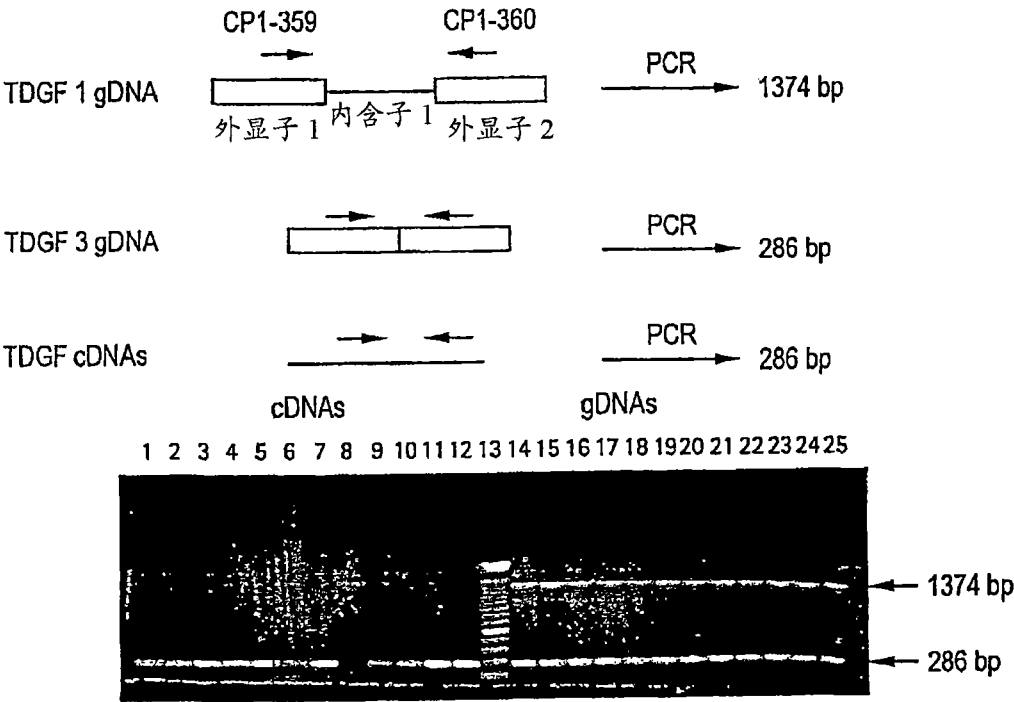


图 2B

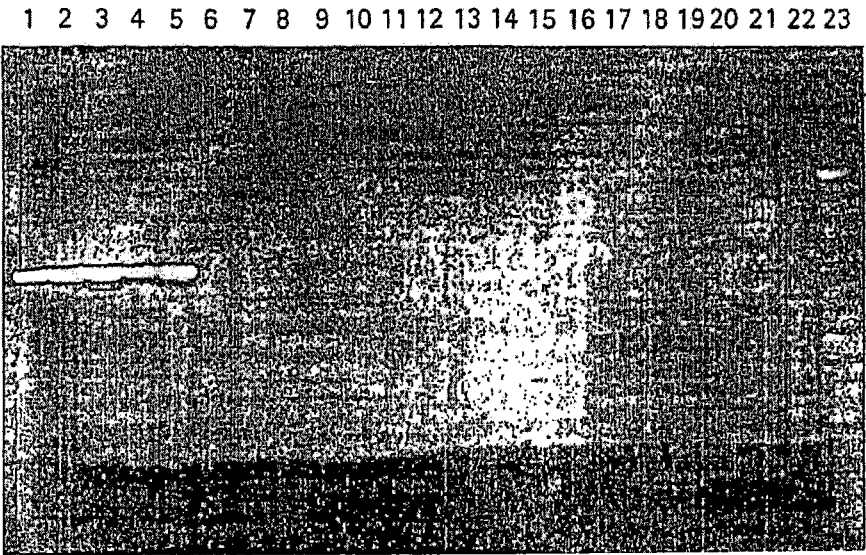


图 3A

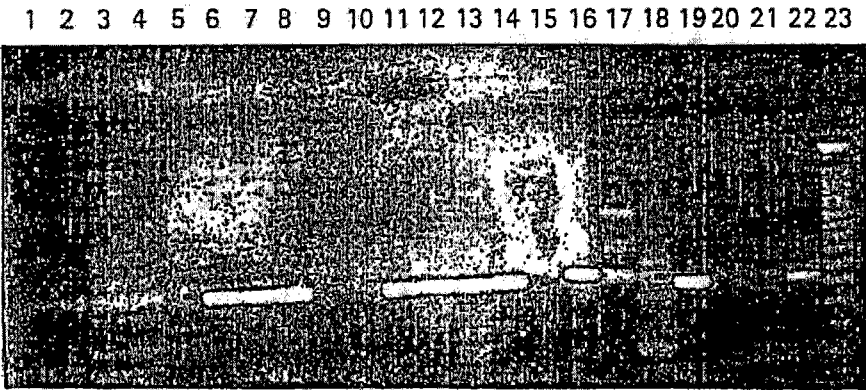


图 3B

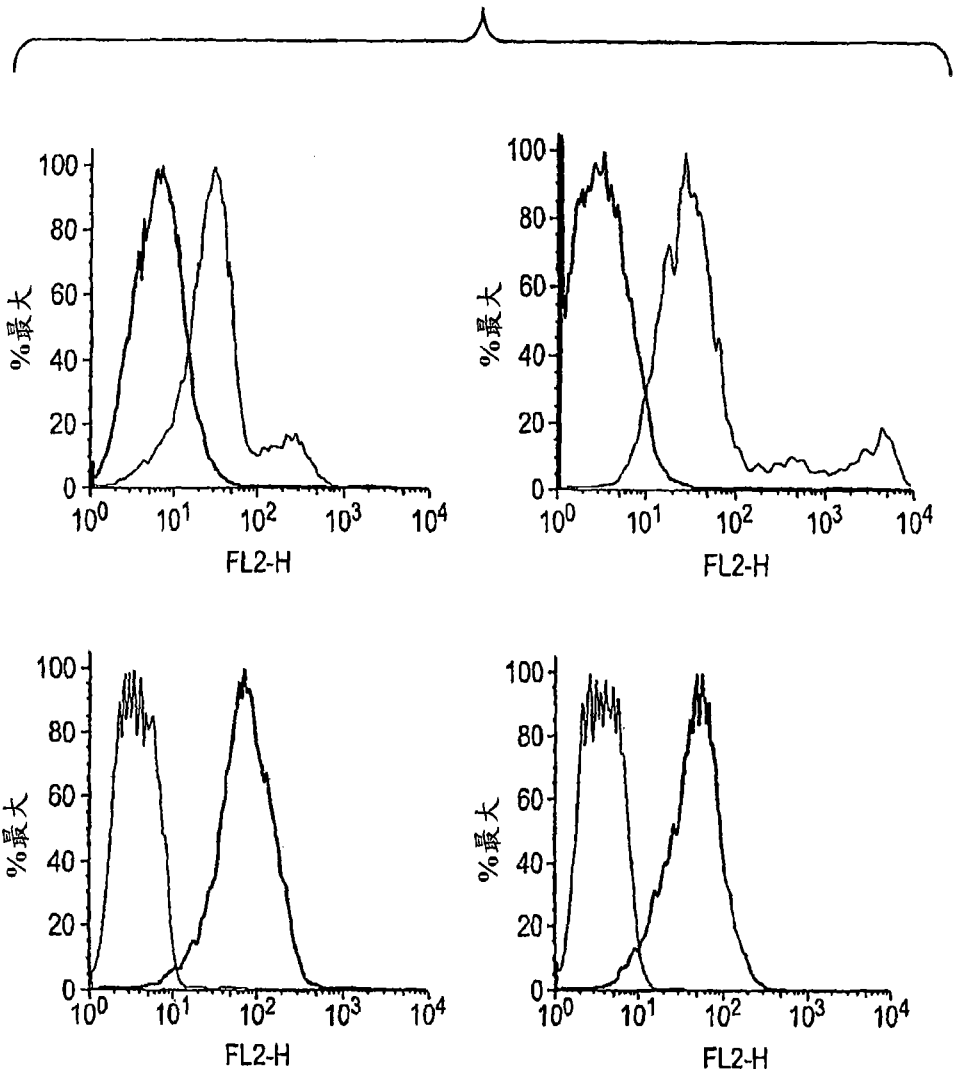


图 4

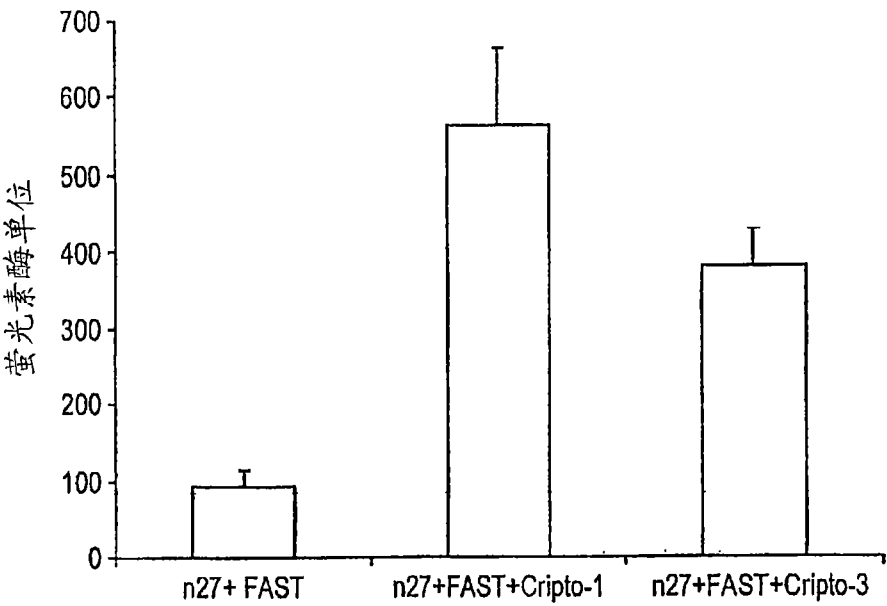


图 5