



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111065403 B

(45) 授权公告日 2023.09.26

(21) 申请号 201880054701.X

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2018.08.23

A61K 38/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A01K 67/027 (2006.01)

申请公布号 CN 111065403 A

A61K 47/66 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.04.24

A61P 15/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006.01)

2017-161556 2017.08.24 JP

A61P 43/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 7/08 (2006.01)

2020.02.21

C07K 19/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/JP2018/031136 2018.08.23

US 2016145308 A1, 2016.05.26

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2012251453 A1, 2012.10.04

W02019/039540 JA 2019.02.28

WO 2015041019 A1, 2015.03.26

(73) 专利权人 学校法人藤田学园

CN 102905534 A, 2013.01.30

地址 日本爱知县

US 2012142606 A1, 2012.06.07

(72) 发明人 杉原一广 金山尚裕

US 2015353603 A1, 2015.12.10

小野寺雄一郎 柴田俊章

K. Sugihara, et al.. Development of pro-apoptotic peptides as potential therapy for peritoneal endometriosis.
《NATURE COMMUNICATIONS》.2014,1-9.

福田道子 野中元裕

审查员 李艳丽

(74) 专利代理机构 北京中博世达专利商标代理

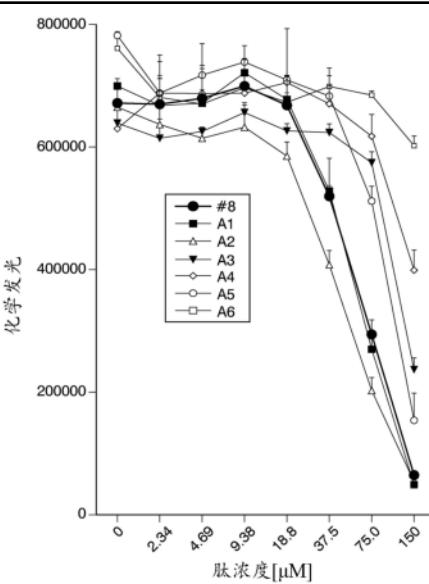
权利要求书1页 说明书53页

有限公司 11274

序列表(电子公布) 附图16页

专利代理人 申健

(54) 发明名称



细胞杀伤剂

(57) 摘要

本发明为具有由序列号1表示的氨基酸序列组成的肽、和选择性结合靶分子的位点的细胞杀伤剂；所述细胞杀伤剂中，由所述序列号1表示的氨基酸序列组成的肽为：全部由L-氨基酸组成的肽；序列号1表示的氨基酸序列中，第1～14位氨基酸由D-氨基酸组成、第15～19位氨基酸由L-氨基酸组成的肽；所述序列号1表示的氨基酸序列中，第1～14位氨基酸为止由L-氨基酸组成、第15～19位氨基酸由D-氨基酸组成的肽；或全部由D-氨基酸组成的肽。

CN 111065403 B

1. 一种细胞杀伤剂，所述细胞杀伤剂具有效应肽以及选择性结合靶分子的位点，所述效应肽是具有细胞凋亡诱导活性的肽和具有内涵体逃逸活性的肽串联组成的效果肽，在所述细胞杀伤剂中，所述效应肽与所述选择性结合靶分子的位点直接连接或通过接头间接连接，

其中，所述效应肽的特征在于由序列号1表示的氨基酸序列组成，

所述接头为由氨基酸序列RR组成的肽。

2. 根据权利要求1所述的细胞杀伤剂，其中，所述靶分子为存在于细胞或组织表面的分子。

3. 根据权利要求1或2所述的细胞杀伤剂，其中，由所述序列号1表示的氨基酸序列组成的肽是：

全部由L-氨基酸组成的肽；

所述序列号1表示的氨基酸序列中，第1～14位氨基酸由D-氨基酸组成、第15～19位氨基酸由L-氨基酸组成的肽；

所述序列号1表示的氨基酸序列中，第1～14位氨基酸由L-氨基酸组成、第15～19位氨基酸由D-氨基酸组成的肽；或

全部由D-氨基酸组成的肽。

4. 根据权利要求1或2所述的细胞杀伤剂，其中，所述选择性结合靶分子的位点为肽或蛋白质，由所述序列号1表示的氨基酸序列组成的肽、与所述选择性结合靶分子的位点直接或间接地连接。

5. 根据权利要求1或2所述的细胞杀伤剂，其中，所述靶分子为CNGB3 (cyclic nucleotide-gated channelbeta 3) 或膜联蛋白I。

6. 根据权利要求1所述的细胞杀伤剂，其中，所述选择性结合靶分子的位点是，由序列号2表示的氨基酸序列组成的肽，

在由所述序列号1表示的氨基酸序列组成的肽的下游、直接或间接地连接有所述选择性结合靶分子的位点。

7. 根据权利要求1所述的细胞杀伤剂，其中，所述选择性结合靶分子的位点是，由序列号7表示的氨基酸序列组成的肽，

在所述选择性结合所述靶分子的位点的下游，直接或间接地连接有由所述序列号1表示的氨基酸序列组成的肽。

8. 根据权利要求1或2所述的细胞杀伤剂，其为细胞异常增殖引起的疾病的治疗剂。

9. 根据权利要求8所述的细胞杀伤剂，其中，所述疾病为子宫内膜异位症或癌症。

细胞杀伤剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可以选择性诱导靶细胞凋亡的肽药剂。

[0002] 本申请请求基于2017年8月24日提交的日本国专利申请、特愿2017-161556号的优先权，并引用其公开的内容。

背景技术

[0003] 细胞凋亡为多细胞生物的细胞死亡中、作为增殖控制机制而被管理/调节的细胞死亡。在多细胞生物中，通过诱导这些细胞的凋亡，来排除在细胞生成和再生过程中产生的不必要的细胞和有害细胞。另外，通过在引起疾病的细胞中诱导细胞凋亡并进行排除，可以期待病情得到改善。因此，也将具有细胞凋亡诱导活性的物质也已经用于医药用途。例如，可以期待通过诱导癌细胞凋亡，来缓解或治愈癌症。

[0004] 当利用诱导细胞凋亡来治疗疾病时，对诱导细胞凋亡的靶细胞的选择性是非常重要的。当靶标选择性低、且在除靶细胞以外的细胞中诱导了凋亡时，则副作用会超过预期的治疗效果，从安全性方面来看不适合作为治疗药。如果能仅针对靶细胞特异性诱导凋亡，则其可以成为充分抑制副作用的有效治疗药。

[0005] 子宫内膜异位症是指子宫内膜细胞在子宫内腔以外的部位增殖的疾病。在许多情况下，子宫内膜细胞在骨盆的腹膜或卵巢中增殖。典型的症状为月经痛(痛经困难)和不孕症，在严重的情况下，会引起剧烈的疼痛，并使人晕厥。另外，也有以子宫内膜异位症为发生母体而引发癌症的情况。子宫内膜细胞在女性荷尔蒙(雌激素)的刺激下增殖。因此，作为子宫内膜异位症的治疗药，使用有抑制雌激素分泌的激素剂，例如低剂量丸剂(低用量ピル)、针对孕酮受体的选择性激动剂(针对卵巢功能及子宫内膜细胞增殖的抑制剂)、促性腺激素释放激素(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)激动剂(卵泡刺激素的分泌抑制剂)。但是，根治疗法只有摘除子宫和卵巢的手术，因此需要开发一种可期待根治子宫内膜异位症的治疗药。

[0006] 例如，专利文献1公开了一种肽组合物，其含有与CNGB3(环状核苷酸门控通道β3(cyclic nucleotide-gated channel beta 3))特异性结合的Z13肽与内涵体逃逸肽(endosomal escape peptide)的融合肽、以及Z13肽与细胞凋亡诱导肽的融合肽。CNGB3是在子宫内膜异位细胞(存在于除子宫内膜以外的子宫内膜细胞)的细胞表面上特异性高表达、而在腹膜表面不表达的分子。通过Z13肽部分将两种肽一起摄入子宫内膜异位症细胞，可选择性地诱导子宫内膜异位症细胞凋亡。实际上，当对患有子宫内膜异位症的狒狒，通过腹腔镜向腹膜施用含有Z13肽与内涵体逃逸肽的融合肽、以及Z13肽与细胞凋亡诱导肽的融合肽的肽组合物时，仅子宫内膜异位症病变的细胞被选择性地诱导凋亡，而相邻的其他细胞则没有被诱导凋亡(参见非专利文献1)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] [专利文献1]美国专利申请第2016/145308号公报说明书

[0010] 专利文献

[0011] [非专利文献1] Sugihara, et al., NATURE COMMUNICATIONS, 2014年, 第5卷, 第4478号

发明内容

[0012] 发明要解决的课题

[0013] 本发明的目的在于,提供一种能够选择性地诱导靶细胞凋亡的肽药物。

[0014] 解决手段

[0015] 本发明人为解决上述问题而进行了深入研究,结果发现:与含有Z13肽与内涵体逃逸肽的融合肽、以及Z13肽与细胞凋亡诱导肽的融合肽的肽组合物相比,由特定肽序列组成的内涵体逃逸肽和由特定的肽序列组成的细胞凋亡诱导肽和Z13肽的融合肽,能够以更高的选择性、高效率地诱导表达CNGB3的子宫内膜细胞凋亡。此外还发现CNGB3不仅在子宫内膜和视网膜中表达,其在几个癌细胞中也表达,从而完成了本发明。

[0016] 即,本发明提供以下的细胞杀伤剂以及子宫内膜异位症模型动物等。

[0017] [1]一种细胞杀伤剂,其具有由序列号1表示的氨基酸序列组成的肽、和选择性结合靶分子的位点。

[0018] [2]根据所述[1]的细胞杀伤剂,其中,所述靶分子为存在于细胞或组织表面的分子。

[0019] [3]根据所述[1]或[2]的细胞杀伤剂,其中,由所述序列号1表示的氨基酸序列组成的肽是:

[0020] 全部由L-氨基酸组成的肽;

[0021] 所述序列号1表示的氨基酸序列中,第1~14位氨基酸由D-氨基酸组成、第15~19位氨基酸由L-氨基酸组成的肽;

[0022] 所述序列号1表示的氨基酸序列中,第1~14位氨基酸由L-氨基酸组成、第15~19位氨基酸由D-氨基酸组成的肽;或

[0023] 全部由D-氨基酸组成的肽。

[0024] [4]根据所述[1]-[3]中任一项的细胞杀伤剂,其中,所述选择性结合靶分子的位点是肽或蛋白质,由所述序列号1表示的氨基酸序列组成的肽、与所述选择性结合靶分子的位点直接或间接地连接。

[0025] [5]根据所述[1]-[4]中任一项的细胞杀伤剂,其中,所述靶分子为CNGB3或膜联蛋白I。

[0026] [6]根据所述[1]的细胞杀伤剂,其中,所述选择性结合靶分子的位点为由序列号2表示的氨基酸序列组成的肽,

[0027] 在由所述序列号1表示的氨基酸序列组成的肽的下游、直接或间接地连接有所述选择性结合靶分子的位点。

[0028] [7]根据所述[1]的细胞杀伤剂,其中,所述选择性结合靶分子的位点为由序列号3表示的氨基酸序列组成的肽,

[0029] 在所述选择性结合靶分子的位点的下游,直接或间接地连接有由所述序列号1表示的氨基酸序列组成的肽。

- [0030] [8]根据所述[1]-[7]中任一项的细胞杀伤剂,其为细胞异常增殖引起的疾病的治疗剂。
- [0031] [9]根据所述[8]的细胞杀伤剂,其中,所述疾病为子宫内膜异位症或癌症。
- [0032] [10]一种子宫内膜异位症模型动物,其腹腔内中移植有导入了编码CNGB3基因的CNGB3过表达细胞。
- [0033] [11]一种致病细胞表达CNGB3的疾病的疾病发病可能性的评估方法,其包括:
- [0034] 测量从被检动物采集的外泌体中的CNGB3,
- [0035] 将得到的测量值与预设参考值进行比较,评估所述被检动物发生所述疾病的可能性。
- [0036] [12]根据所述[11]的疾病发病可能性的评估方法,其中,当所述测量值超过所述参考值时,所述被检动物发生所述疾病的可能性评价为高。
- [0037] [13]根据所述[11]或[12]的疾病发病可能性的评估方法,其中,所述外泌体是从所述被检动物采集的血液中分离出来的。
- [0038] [14]根据所述[11]-[13]中任一项的疾病发病可能性的评估方法,其中,使用由序列号2表示的氨基酸序列组成的肽、测量CNGB3。
- [0039] [15]根据所述[11]-[14]中任一项的疾病发病可能性的评估方法,其中,所述被检动物为人类。
- [0040] [16]根据所述[11]-[15]中任一项的疾病发病可能性的评估方法,其中,所述疾病为子宫内膜异位症或癌症。
- [0041] [17]一种生物标记物,其由外泌体中的CNGB3量构成,
- [0042] 用于评估有无子宫内膜异位症或癌症的发生。
- [0043] 发明效果
- [0044] 本发明提供的细胞杀伤剂,能够非常有效地诱导靶细胞凋亡。因此,该细胞杀伤剂,作为子宫内膜异位症或癌症等细胞异常增殖引起的疾病的治疗剂尤为有效。
- [0045] 并且,本发明提供的子宫内膜异位症模型动物,可用于针对子宫内膜异位症的治疗剂候选物质的药效试验等。
- [0046] 此外,通过本发明提供的疾病发病的评估方法及生物标志物,可以简便且有效地对子宫内膜异位症或癌症等CNGB3特异性表达的疾病的发病可能性进行评估。

附图说明

- [0047] 图1是参考例1中、用各种肽处理过的反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果的示意图。
- [0048] 图2是实施例1中、用各种肽处理过的反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果的示意图。
- [0049] 图3是实施例2中、用肽8和肽A1~A6中的各种肽处理过的反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果的示意图。
- [0050] 图4是实施例2中、用肽8和肽B1~B7中的各种肽处理过的反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果的示意图。
- [0051] 图5是实施例3中、用各种肽处理过的反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果的示

意图。

[0052] 图6是实施例4中、用肽A2处理过的A431-CNGB3-myc细胞的活细胞数测量结果的示意图。

[0053] 图7是对实施例4中、用肽A2处理过的A431-CNGB3-myc细胞进行Apop-Tag assay和核染色后的染色图像。

[0054] 图8是实施例5中向腹腔内施用一次肽A2后的、子宫内膜异位症模型小鼠的腹膜发光强度(RLU)测量结果的示意图。

[0055] 图9是实施例5中向腹腔内施用多次肽A2后的、子宫内膜异位症模型小鼠的腹膜发光强度(RLU)测量结果的示意图。

[0056] 图10是实施例6中、用各种肽处理过的A431-CNGB3-myc细胞的相对ATP量(%)的测量结果的示意图。

[0057] 图11是实施例6中、用各种肽处理过的ishikawa细胞的相对ATP量(%)的测量结果的示意图。

[0058] 图12是实施例6中、用各种肽处理过的SNG-II细胞的相对ATP量(%)的测量结果的示意图。

[0059] 图13是实施例6中、用各种肽处理过的Hec-1A细胞的相对ATP量(%)的测量结果的示意图。

[0060] 图14是实施例6中、用各种肽处理过的RL95-2细胞的相对ATP量(%)的测量结果的示意图。

[0061] 图15是实施例8中、经时测量施用IF7(RR)-(K+H)肽后的荷癌小鼠的光子(photon)数增加率(%)的结果示意图。

[0062] 图16示例是实施例8中、经时测量施用IF7(RR)-(K+H)肽后的荷癌小鼠的肿瘤体积增加率(%)的结果示意图。

具体实施方式

[0063] <细胞杀伤剂>

[0064] 本发明提供的细胞杀伤剂，具有由序列号1表示的氨基酸序列(KLAKLAKKLAKLAKHL AHL)组成的肽(以下有时称为“效应肽”)、和选择性结合靶分子的位点。效应肽是具有细胞凋亡诱导活性的肽与具有内涵体逃逸活性的肽串联组成的肽。本发明提供的细胞杀伤剂通过选择性结合靶分子的位点与靶分子结合，并通过胞吞过程(endocytosis)被摄入靶细胞内。接着，由于在具有内涵体逃逸活性的肽位点的作用下内涵体膜被破坏，其结果，摄入到靶细胞内的内涵体中内含的细胞杀伤剂，被释放到靶细胞的细胞质中。释放到细胞质中的细胞杀伤剂，通过具有细胞凋亡诱导活性的肽位点的作用，阻碍线粒体膜并诱导该靶细胞凋亡。

[0065] 本发明提供的细胞杀伤剂，在一个分子中含有具有细胞凋亡诱导活性的肽位点、具有内涵体逃逸活性的肽位点、以及选择性结合靶分子的位点的全部。因此，与分别独立含有使选择性结合靶分子的肽与具有细胞凋亡诱导活性的肽连接的肽、以及使选择性结合靶分子的肽与具有内涵体逃逸活性的肽连接的肽组合物相比，能够非常有效地诱导靶细胞凋亡。

[0066] 另外,在本发明和本说明书中,“靶细胞”是指,将要诱导细胞凋亡的目标细胞。“靶分子”是指,存在于将要诱导细胞凋亡的目标细胞的表面上、或存在于该细胞所在的组织表面上的分子,也是本发明提供的细胞杀伤剂选择性结合的分子。

[0067] 如专利文献1中公开的那样,由KLAK的4个氨基酸重复而成的氨基酸序列(以下有时称为“KLAK序列”)所组成的肽(以下有时称为“KLAK肽”),阻碍线粒体膜而具有诱导细胞凋亡的作用(细胞凋亡诱导活性)。并且,由HLAH的4个氨基酸重复而成的氨基酸序列(以下有时称为“HLAH序列”)所组成的肽(以下有时称为“HLAH肽”),具有破坏内涵体膜的作用(内涵体逃逸活性)。连接KLAK肽与HLAH肽的肽,具有内涵体逃逸活性和细胞凋亡诱导活性。但是,其活性强度会受到每种肽的氨基酸长度和连接顺序的影响。将HLAH肽连接到KLAK肽的下游(C末端)的肽、和将KLAK肽连接到HLAH肽的下游(C末端)的肽,都具有内涵体逃逸活性和细胞凋亡诱导活性,但是将HLAH肽连接到KLAK肽的下游(C末端)的肽,则具有更高的细胞凋亡诱导活性。

[0068] 由序列号1表示的氨基酸序列组成的效应肽,是由5个氨基酸组成的HLAH序列连接在由14个氨基酸组成的KLAK序列的下游而形成的肽。即,在序列号1的氨基酸序列中,第1~第14位氨基酸为止是具有细胞凋亡诱导活性的位点,第15~第19位氨基酸为止是具有内涵体逃逸活性的位点。该效应肽是,KLAK序列的长度、HLAH序列的长度以及KLAK序列与HLAH序列的连接顺序被最优化的肽,以使得其在通过胞吞过程被靶细胞摄入时,可获得最高的细胞凋亡诱导活性。由于具有该效应肽,因此本发明提供的细胞杀伤剂,具有非常高的细胞凋亡诱导活性。

[0069] 本发明提供的细胞杀伤剂所具有的效应肽没有特别限定,只要是由序列号1表示的氨基酸序列组成的肽即可,其可以是由L-氨基酸组成的肽,也可以是由D-氨基酸组成的肽,还可以是由L-氨基酸与D-氨基酸组成的肽。效应肽优选为至少部分地含有D-氨基酸的肽,更优选KLAK序列(序列号1表示的氨基酸序列中的第1~14位氨基酸)和HLAH序列(序列号1表示的氨基酸序列中的第15~19位氨基酸)中的至少一方为由D-氨基酸组成的肽,特别优选为全部由D-氨基酸组成的肽,因为这样的肽在内涵体中的稳定性高、且能够得到更高的细胞凋亡诱导活性。

[0070] 在本发明提供的细胞杀伤剂中,由选择性结合靶分子的位点与由序列号1表示的氨基酸序列组成的效应肽可以直接结合,也可以通过接头间接结合。作为该接头没有特别限定,例如,可列举出1~20个氨基酸左右的肽、糖链、聚乙二醇、聚烯烃等。从合成比较容易的角度出发,作为本发明提供的细胞杀伤剂,优选选择性结合靶分子的位点为肽或蛋白质,并与效应肽直接结合或经由1~20个氨基酸左右的肽而结合。此外,在本发明提供的细胞杀伤剂中,由选择性接合靶分子的位点,只要不阻碍与靶分子的结合性,可以与由序列号1表示的氨基酸序列组成的效应肽的N末端侧连接,也可以与C末端侧连接。

[0071] 本发明提供的细胞杀伤剂中的、与靶分子选择性结合的位点没有特别限定,可根据靶分子来决定。该位点可以是肽或蛋白质,也可以是寡核苷酸或核酸,也可以是糖链,也可以是脂质,还可以是低分子化合物。

[0072] 另外,作为本发明提供的细胞杀伤剂选择性结合的靶分子没有特别限定,只要是存在于诱导细胞凋亡的靶细胞或组织的表面上的分子即可,可以是蛋白质,也可以是糖链,还可以是脂质。

[0073] 本发明提供的细胞杀伤剂的选择性变高,作为各种疾病的治疗剂使用时,可以降低副作用。由此,作为本发明提供的细胞杀伤剂选择性结合的靶分子,优选在靶细胞的表面上或含有该靶细胞的组织的表面上的表达量、与其他许多细胞和组织上的表达量相比显著多的分子,更优选在靶细胞的表面上或含有该靶细胞的组织的表面上特异性表达的分子。

[0074] 例如,CNGB3是在正常组织中仅在子宫内膜和视网膜中高表达的膜蛋白。已知CNGB3在正常组织中的存在非常不平衡,在松果体中为中等程度的表达,而在骨髓、脉络丛、输卵管、眼、卵巢和睾丸中仅弱表达。因此,本发明提供的细胞杀伤剂中,靶分子为CNGB3的细胞杀伤剂,是能够特异性诱导子宫内膜或视网膜的细胞凋亡的细胞杀伤剂,作为针对子宫内膜或视网膜的疾病的治疗药是有用的。特别是,由于其在腹腔和骨盆的正常细胞中不诱导细胞凋亡、而能够选择性地诱导子宫内膜异位症细胞凋亡,因此非常适合作为子宫内膜异位症的治疗药。

[0075] 此外,CNGB3在各种癌细胞中也相对强烈地表达。因此,本发明提供的细胞杀伤剂中的靶分子为CNGB3的细胞杀伤剂,作为针对表达CNGB3的癌细胞的选择性高、且副作用被抑制的抗癌剂是有用的。作为表达CNGB3的癌症,例如,可列举出子宫癌、宫颈癌、骨盆腔癌、卵巢癌、乳腺癌、腹壁肿瘤、大网膜肿瘤、食道癌、胃癌、小肠癌、结肠癌、直肠癌、盲肠癌、胆囊癌、胰腺癌、肝癌、脾癌、肾癌、舌癌、咽癌、鼻癌、耳下腺癌、甲状腺癌、恶性淋巴瘤、骨肿瘤、皮肤癌、肺癌、纵隔癌、睾丸癌、前列腺癌、膀胱癌和脑肿瘤。即使是来自同种组织的癌细胞,也有CNGB3表达的癌细胞和CNGB3不表达的癌细胞。因此,当将本发明提供的细胞杀伤剂中的靶分子为CNGB3的细胞杀伤剂作为抗癌剂使用时,优选通过活检等,预先确认作为靶标的癌细胞为表达CNGB3的细胞。

[0076] 将CNGB3用作靶分子时,作为选择性结合靶分子的位点,例如,可列举出由序列号2(VRRAXNXPG,X表示任意天然存在的氨基酸)表示的氨基酸序列组成的肽、以及由改变序列号2表示的氨基酸序列的一部分而获得的氨基酸序列组成的肽(以下这些肽有时被称为“CNGB3结合肽”) (专利文献1)。作为由改变序列号2表示的氨基酸序列的一部分而获得的氨基酸序列组成的肽,可列举出:序列号2表示的氨基酸序列的一个、两个或三个氨基酸缺失、被取代或添加、且保持对CNGB3的结合能力的肽;与序列号2表示的氨基酸序列具有至少75%以上、优选85%以上、更优选90%以上的序列同一性、且保持对CNGB3的结合能力的肽。具体地,作为CNGB3结合肽,可列举出由序列号3(VRRADNRPG)表示的氨基酸序列组成的肽(以下有时称为“Z13肽”)、由序列号4(VRRAENRPG)表示的氨基酸序列组成的肽、由序列号5(VRRANNLPG)表示的氨基酸序列组成的肽、由序列号6(VRRANNRPG)表示的氨基酸序列组成的肽。

[0077] 由于对表达CNGB3的细胞具有更强的细胞凋亡诱导活性,因此作为靶分子为CNGB3的细胞杀伤剂,优选Z13肽与所述效应肽直接或通过接头间接连接的细胞杀伤剂,更优选Z13肽与所述效应肽直接连接或通过由1~20个氨基酸组成的肽而连接的肽,进一步优选Z13肽直接或通过由1~20个氨基酸组成的肽而连接至所述效应肽的C末端的肽,更进一步优选所述效应肽的C末端与Z13肽的N末端直接连接的肽(序列号26:KLAKLAKKLAKLAKHLAHLVRRADNRPG),特别优选全部由D-氨基酸组成的所述效应肽的C末端、与全部由L-氨基酸组成的Z13肽的N末端直接连接的肽。

[0078] 此外,膜联蛋白I是在正常血管内皮细胞的细胞质中表达、但在恶性肿瘤组织中新

生的血管(肿瘤新生血管)的血管内皮细胞的血流侧特异性表达的膜蛋白。与在生物体内施用的膜联蛋白I选择性结合的分子,在恶性肿瘤组织中,通过与在肿瘤新生血管的血流侧表达的膜联蛋白I结合,被摄入肿瘤新生血管的血管内皮细胞中。摄入血管内皮细胞的分子,通过囊泡转运从顶端(apical)侧向基段(basal)侧运送,并排出到间质。排出的分子在间质中扩散从而能够被摄入肿瘤细胞内。因此,本发明提供的细胞杀伤剂中、以膜联蛋白I作为靶分子的细胞杀伤剂,是能够诱导癌细胞凋亡的细胞杀伤剂,作为抗癌剂是有用的。以膜联蛋白I为靶分子的细胞杀伤剂,被肿瘤新生血管的血管内皮细胞特异性地摄入,并在血管内皮细胞内的囊泡转运过程中、或在摄入其肿瘤细胞内的囊泡转运过程中,通过HLAH肽部分的功能破坏内涵体膜,并被释放到细胞质中。之后通过KLAK肽部分的功能,杀死摄入该细胞杀伤剂的细胞。当使用以膜联蛋白I为靶分子的细胞杀伤剂作为抗癌剂时,作为治疗对象的癌症种类没有特别限定,可以用于与以上列举的那些相同的癌症。

[0079] 将膜联蛋白I用作靶分子时,作为选择性结合靶分子的位点,例如,可列举出由序列号7(IFLLWQR)表示的氨基酸序列组成的肽(以下有时称为“IF7”)、以及由改变序列号7表示的氨基酸序列的一部分而获得的氨基酸序列组成的肽(以下这些肽有时被称为“膜联蛋白I结合肽”)。作为由改变序列号7表示的氨基酸序列的一部分而获得的氨基酸序列组成的肽,可列举出:序列号7表示的氨基酸序列的一个、两个或三个氨基酸缺失、被取代或添加、且保持对膜联蛋白I的结合能力的肽;与序列号2表示的氨基酸序列具有至少70%以上、优选85%以上的序列同一性、且保持对膜联蛋白I的结合能力的肽。

[0080] 由于对癌细胞具有更强的细胞凋亡诱导活性,因此作为靶分子为膜联蛋白I的细胞杀伤剂,优选IF7肽与所述效应肽直接或通过接头间接连接的细胞杀伤剂;更优选IF7肽与所述效应肽直接或通过由1~20个氨基酸组成的肽而连接的肽;进一步优选所述效应肽直接或通过由1~20个氨基酸组成的肽而连接至IF7肽的C末端的肽;更进一步优选所述效应肽直接或通过由1~5个氨基酸组成的肽而连接至IF7肽的C末端的肽;特别优选全部由L-氨基酸组成的IF7肽的C末端、与全部由D-氨基酸组成的所述效应肽的N末端,通过由1~5个L-氨基酸组成的肽而连接的肽。作为IF7肽的C末端与所述效应肽的N末端、通过由1~5个氨基酸组成的肽而连接的肽,例如,可列举出由序列号40表示的氨基酸序列(IFLLWQRRRKLAKLAKKLAKHLAHL)组成的肽。

[0081] 当本发明提供的细胞杀伤剂用作医药时,给药途径没有特别限定,可以根据靶细胞和含有该靶细胞的组织相应决定。例如,作为本发明提供的细胞杀伤剂的给药途径,可列举出口服给药、静脉给药、腹腔内给药、直肠给药等。

[0082] 本发明提供的细胞杀伤剂可以通过通常的方法制成散剂、颗粒剂、胶囊剂、锭剂、咀嚼剂、缓释剂等口服固体制剂,溶液剂、糖浆剂等口服液体制剂,注射剂、灌肠剂、喷雾剂、贴剂、软膏剂等。

[0083] 本发明提供的细胞杀伤剂,根据制剂上的需要,可以配合赋形剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、流动剂、溶剂、助溶剂、缓冲剂、悬浮剂、乳化剂、等渗剂、稳定剂、防腐剂、抗氧化剂、矫味矫臭剂、着色剂等而进行制剂化。

[0084] 作为赋形剂,可列举出乳糖、葡萄糖、D-甘露醇等糖类,淀粉、结晶纤维素等纤维素类,赤藓糖醇、山梨糖醇、木糖醇等糖醇类,磷酸二钙、碳酸钙、高岭土等。作为粘合剂,可列举出 α -淀粉、明胶、阿拉伯胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、结晶纤维素、D-

甘露醇、海藻糖、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇等。作为润滑剂,可列举出硬脂酸、硬脂酸钙、滑石、蔗糖脂肪酸酯和聚乙二醇等。作为崩解剂,可列举出交联聚维酮(交联聚乙烯吡咯烷酮)、低取代度羟丙基纤维素、淀粉、海藻酸、海藻酸钠等。作为流动剂,可列举出硅酸、硅酸酐、硅酸铝、硅酸钙、硅酸铝镁化合物、氧化铝、氢氧化铝、氧化镁、氢氧化镁等。作为溶剂,可列举出净化水,生理盐水等。作为助溶剂,可列举出葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、苯甲酸钠、乙二胺、水杨酰胺、烟酰胺和聚氧乙烯氢化蓖麻油衍生物等。作为缓冲剂,例如可列举出柠檬酸钠水合物、乙酸钠水合物、碳酸氢钠、氨基丁三醇、硼酸、硼砂、磷酸氢钠水合物、磷酸二氢钠等。作为悬浮剂或乳化剂,可列举出十二烷基硫酸钠、阿拉伯胶、明胶、卵磷脂、单硬脂酸甘油酯、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧甲基纤维素钠等的纤维素类、聚山梨醇酯类、聚氧乙烯氢化蓖麻油等。作为等渗剂,可列举出乳糖、葡萄糖、D-甘露醇等的糖类、氯化钠、氯化钾、甘油、丙二醇、聚乙二醇、尿素等。作为稳定剂,可列举出聚乙二醇、葡聚糖硫酸钠、亚硫酸钠等。作为防腐剂,可列举出对羟基苯甲酸酯类、氯代丁醇、苄醇、苯乙醇、氯甲酚、脱氢乙酸和山梨酸等。作为抗氧化剂,可列举出亚硫酸盐、抗坏血酸等。作为矫味矫臭剂,可列举出通常在医药及食品领域中使用的甜味剂、香料等。作为着色剂,可列举出通常在医药及食品领域中使用的着色料等。

[0085] 本发明提供的细胞杀伤剂可以直接使用,也可以作为含有其他成分的医药用组合物使用。作为该医药用组合物中所含的其他成分,例如,可列举出上述的赋形剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、流动剂、溶剂、助溶剂、缓冲剂、悬浮剂、乳化剂、等渗剂、稳定剂、防腐剂、抗氧化剂、矫味矫臭剂、着色剂等。并且,该医药用组合物也可以含有除本发明提供的细胞杀伤剂以外的其他有效成分。

[0086] 本发明提供的细胞杀伤剂优选为对哺乳动物施用的细胞杀伤剂,更优选为对人类或小鼠、大鼠、兔、豚鼠、仓鼠、猴、绵羊、马、牛、猪、驴、狗、猫等的家畜或实验动物施用的细胞杀伤剂,进一步优选为对人类施用的细胞杀伤剂。

[0087] <子宫内膜异位症模型动物>

[0088] 子宫内膜异位症细胞表达CNGB3。并且,在许多子宫内膜异位症中,子宫内膜异位症细胞在腹腔内增殖。因此,腹腔内移植有使CNGB3过表达的细胞的动物可以作为子宫内膜异位症模型动物。

[0089] 作为过表达的CNGB3没有特别限定,只要是与在子宫内膜细胞中表达的野生型人CNGB3(NCBI的基因(Gene)ID:54714)起到相同功能的蛋白质即可。例如,其可以是人CNGB3,也可以是来自人类以外的动物的人CNGB3的同源蛋白质,还可以是人CNGB3或其同源物的变体、且保持与人CNGB3相同功能的蛋白质。

[0090] 作为所述变体,例如,可列举出由人CNGB3或其同源物的氨基酸序列中的1个或多个氨基酸缺失、被取代或添加而获得的氨基酸序列组成、且保持作为CNGB3的功能的蛋白质。发生缺失等情况的氨基酸的个数优选为1~50个,更优选为1~30个,进一步更优选为1~20个,再进一步优选为1~10个。作为添加到人CNGB3或其同源物的N末端或C末端的氨基酸,可列举出His标签、Myc标签、Flag标签等。此外,作为所述变体,例如,可列举出由与人CNGB3或其同源物的氨基酸序列的序列同一性为70%以上、优选为80%以上、更优选为85%以上、进一步优选为90%以上,更进一步优选为95%以上的氨基酸序列组成,并保持作为CNGB3的功能的蛋白质。

[0091] 另外,在本发明和本申请说明书中,“蛋白质中氨基酸缺失”是指构成蛋白质的氨基酸的一部分缺失(被去除)。

[0092] 在本发明和本申请说明书中,“蛋白质中氨基酸取代”是指构成蛋白质的氨基酸变为另一种氨基酸。

[0093] 在本发明和本申请说明书中,“蛋白质中氨基酸添加”是指蛋白质中被插入新的氨基酸。

[0094] 作为为了制备CNGB3过表达细胞而导入编码CNGB3的基因(CNGB3基因)的细胞(宿主细胞),没有特别限定,可以是子宫内皮细胞,也可以是从动物组织中采集的除子宫内皮细胞以外的细胞的原代培养细胞,还可以是培养细胞株。另外,导入CNGB3基因的宿主细胞可以是来自人的细胞,也可以是来自人以外的动物的细胞。

[0095] CNGB3过表达细胞可以通过将CNGB3基因以能够表达的状态导入宿主细胞而获得。具体地,将整合了由表达CNGB3所需的DNA的组合构成的表达盒的表达载体,导入宿主细胞。表达盒具备编码要表达的蛋白质的基因、和控制该基因表达的启动子。表达盒可以进一步包含终止子、5'-非翻译区和3'-非翻译区中的任何一个以上。优选的表达盒为包含编码蛋白质的基因序列、启动子、终止子、5'-非翻译区、3'-非翻译区的全部的表达盒。导入宿主细胞的CNGB3基因,只要是由对目标氨基酸序列组成的CNGB3进行编码的碱基序列组成的基因即可,可以根据宿主细胞的密码子频率进行改变。

[0096] 启动子和终止子只要是在宿主细胞内发挥功能的启动子和终止子即可。作为在宿主细胞内发挥功能的启动子和终止子,可以是宿主细胞本来具有的启动子和终止子,也可以是宿主细胞本来不具有的启动子和终止子。

[0097] 用于整合CNGB3基因的表达盒而制作表达载体的载体,可以使用通常用于导入宿主细胞的任意载体。该载体可以是环状的质粒载体,也可以是直链状的载体,还可以是腺病毒等病毒载体。也可以通过将CNGB3基因整合到市售的哺乳细胞表达用载体的克隆位点来制备表达载体。

[0098] CNGB3过表达细胞可以是CNGB3基因的表达盒在宿主细胞的细胞内作为染色体外基因而保留的转化体,也可以是整合到宿主细胞的染色体中的转化体。另外,将表达载体导入作为宿主的哺乳细胞的转化方法,可以从脂质体转染(lipofection)法、磷酸钙沉淀法、醋酸锂法、电穿孔(electroporation)法等公知的转化方法中适当选择来进行。所获得的CNGB3过表达细胞可以在与作为宿主的哺乳动物细胞相同的条件下培养。

[0099] 腹腔内移植CNGB3过表达细胞的非人类动物的生物种类没有特别限定。作为本发明提供的子宫内膜异位症模型动物,优选为例如小鼠、大鼠、兔、豚鼠、仓鼠、猴、绵羊、马、牛、猪、驴、狗、猫等家畜或实验动物。CNGB3过表达细胞向腹腔内的移植可以通过常规方法进行。

[0100] <生物标志物>

[0101] 外泌体中含有在释放该外泌体的原细胞的细胞膜中表达的生物分子。如上所述,CNGB3在子宫内膜异位症细胞的细胞膜中表达较多,并且从子宫内膜异位症细胞释放出的外泌体中含有CNGB3。同样地,CNGB3在各种癌细胞中也表达,并且从癌细胞释放出的外泌体中含有CNGB3。因此,外泌体中的CNGB3量作为子宫内膜异位症或癌症的生物标志物是有用的。

[0102] <疾病发病可能性的评估方法>

[0103] 本发明提供的疾病发病可能性的评估方法(以下有时称为“本发明提供的评估方法”),是一种将外泌体中的CNGB3作为生物标志物来评估表达CNGB3的疾病的发病可能性的方法。在发生致病细胞表达CNGB3的疾病(以下有时称为“CNGB3高表达疾病”)的动物体内,会从该疾病的病源细胞中,大量分泌出含有很多CNGB3的外泌体。另一方面,由于CNGB3在正常细胞中仅在有限组织中表达,因此在未发生CNGB3高表达疾病的动物体内,含有大量CNGB3的外泌体非常少。因此,可以基于外泌体中的CNGB3量,区分CNGB3高表达疾病的发病者组与非发病者组。在本发明提供的评估方法中,测定从被检动物采集的外泌体中的CNGB3,将得到的测定值与预先设定的参考值进行比较,以评估所述被检动物发生CNGB3高表达疾病的可能性。

[0104] 作为CNGB3高表达疾病,可列举出子宫内膜异位症和表达CNGB3的癌症。并且,作为通过本发明提供的评估方法进行评估的被检动物,可以是人类、也可以是非人类动物。作为非人类动物的生物种类没有特别限定,例如,可列举出小鼠、大鼠、兔、豚鼠、仓鼠、猴、绵羊、马、牛、猪、驴、狗、猫等家畜或实验动物。作为通过本发明提供的评估方法进行评估的被检动物,优选人类、家畜和实验动物,更优选人类。

[0105] 具体地,当外泌体中CNGB3的测量值超过预设参考值时,被采集了该外泌体的被检动物发生CNGB3高表达疾病的可能性评估为高。该参考值为用于区分CNGB3高表达疾病的发病者与未发病者的参考值。

[0106] 该参考值,例如可以通过测量CNGB3高表达疾病的患者组与非患者组的外泌体中的CNGB3量、而通过实验并作为能够区分两组的阈值来求得。本发明的外泌体中CNGB3量的参考值的确定方法没有特别限制,例如可通过常规的统计学方法来求得。

[0107] 作为求得参考值的方法的一个示例,例如可以采集通过其他方法如通常进行的病理检查被诊断为目标CNGB3高度表达疾病的患者的外泌体,并测量其CNGB3量。在对多个患者进行测量之后,根据其平均值或中位数等计算这些外泌体中的CNGB3量,可以将含有该量的数值用作参考值。

[0108] 此外,对于多个CNGB3高表达疾病患者和多个CNGB3高表达疾病的非患者,分别测量外泌体中的CNGB3量,通过平均值或中位数等分别计算出CNGB3高表达疾病患者组与CNGB3高表达疾病非患者组的外泌体中的CNGB3量与差异,之后在将差异因素考虑在内的基础上求出区分两种数值的阈值,并将其作为参考值。

[0109] 对于待评估的CNGB3高表达疾病,当CNGB3在病源细胞中特异性表达时,所述参考值可以是CNGB3的检测极限值。当从被检动物采集的外泌体中检测到CNGB3时,则评估该被检动物评估对该CNGB3高表达疾病的发病可能性为高,而当未检测到CNGB3时,则评估该被检动物评估对该CNGB3高表达疾病的发病可能性为高。

[0110] 从被检动物采集的外泌体中的CNGB3量的测量方法没有特别限制,可以用在定量或半定量地测量蛋白质表达时通常所使用的各种方法来进行测量。作为该方法,例如,可列举出ELISA法、免疫组织化学法和蛋白质印迹(Western blot)法等利用免疫反应的方法。并且,从被检动物采集的外泌体中的CNGB3量,还可以作为含有CNGB3的外泌体的量而求得。CNGB3主要存在于外泌体的脂质双层膜表面。因此,也可以通过采用各种测量具有特定表面分子的外泌体的方法、来测量外泌体中的CNGB3量。作为测量具有特定表面分子的外泌体的

装置,例如,可列举出“Exo Counter”(JVCKENWOOD公司制品)、“dNano”(Meiwafosis公司制品)、“Nano Sight”(日本Quantum Design公司制品)、“SP6800”索尼(株式会社)等外泌体测量系统。

[0111] 在利用免疫反应的测量方法中,可以使用任何抗CNGB3抗体。并且,可以使用与CNGB3结合的分子来代替抗CNGB3抗体。作为该分子,可以是肽、蛋白质、核酸,低分子等中的任何一种。此外,该分子还优选为标记化物(在与CNGB3结合的位点处,标记物质直接或间接地结合的物质)。该标记物质没有特别限制,例如,可以是生物素等低分子、也可以是荧光物质、也可以是酶、还可以是His标签、Myc标签或Flag标签等标签肽。

[0112] 例如,作为与CNGB3结合的肽,优选前述CNGB3结合肽或其标记化物,特别优选Z13肽或其标记化物。此外,还可以使用由序列号41(MQRTRATPG)表示的氨基酸序列组成的肽(以下有时称为“Z24肽”)、由序列号42(VRSSRSTPQ)表示的氨基酸序列组成的肽(以下有时称为“Z11肽”) (均参考非专利文献1)等能够与CNGB3结合的肽。作为与CNGB3结合的肽,可以使用肽部分全部由L-氨基酸组成的肽,也可以使用由D-氨基酸组成的肽。例如,可以使用一组生物素化Z13肽、和用酶或荧光标记的抗生物素蛋白或抗生蛋白链菌素(streptavidin)。

[0113] 用于测量CNGB3量的外泌体只要是从被检动物采集的外泌体即可,其可以是从被检动物采集的生物试样其本身,但优选是从该生物试样精制成的外泌体。从生物试样中分离外泌体,例如可以使用市售的外泌体分离用试剂盒进行。

[0114] 含有外泌体的生物试样不受特别限定,其可以是血液、血浆、血清、泪液、唾液、腹腔液、尿液等,还可以是诸如子宫粘膜或消化道粘膜的粘膜、或者是从肝脏、胃、小肠或大肠的组织采集的组织薄片。其中,血液、血浆和血清被广泛用作临床检体,并且能够比较低侵害地采集。因此,作为在本发明提供的评估方法中用于测量CNGB3量的外泌体,优选从被检动物采集的血液、特别是从血浆或血清中分离出的外泌体。由于在本发明提供的评估方法中,可以将从血清等中分离出的外泌体作为样品来实施,因此对于健康诊断之类的CNGB3高表达疾病的初筛也是有效的。

[0115] 本发明提供的评估方法可用于评估CNGB3高表达疾病治疗中的治疗效果。例如,在CNGB3高表达疾病的治疗开始前和结束后,对CNGB3高表达疾病患者实施本发明的评估方法。当通过该治疗、在患者体内CNGB3高表达疾病的病源细胞减少、或其生理活性降低时,在该患者体内,从CNGB3高表达疾病的病源细胞分泌出的外泌体的量减少。因此,当外泌体中的CNGB3量与治疗前相比在治疗后显著减少时,可以评估为通过该治疗获得了治疗效果。并且,外泌体中CNGB3量的减少比率越高,则可以评估为获得的治疗效果越高。除在CNGB3高表达疾病的治疗开始前和结束后以外,也可以在治疗期间通过经时地实施本发明提供的评估方法来监测治疗效果。

[0116] 此外,通过对患有至少一次CNGB3高表达疾病的动物、经时地实施本发明提供的评估方法,可以监测该患病动物有无CNGB3高表达疾病的发病。例如,当CNGB3高表达疾病是例如癌症或子宫内膜异位症那样、即使已经治愈也具有高复发风险的疾病时,通过对CNGB3高表达疾病患者经时地实施本发明提供的评估方法,可以监视有无复发。

[0117] 实施例

[0118] 接着、通过实施例对本发明进行的具体描述,但本发明不受以下实施例的限定。

[0119] <子宫内膜异位症模型细胞(A431-CNGB3-myc细胞)>

[0120] 将C末端融合有myc标签的编码人CNGB3的基因导入A431细胞(来源于人的上皮样细胞癌的细胞株)中而强制表达的转化细胞(A431-CNGB3-myc细胞),作为子宫内膜异位症模型细胞来制备。

[0121] A431-CNGB3-myc细胞的培养,以在细胞培养基高浓度葡萄糖(DMEM High Glucose)培养基(GIBCO公司制品)中含有10%灭活的FBS(胎牛血清,Corning公司制品)和1%的青霉素(penicillin-streptomycin)(Invitrogen公司制造)的培养基作为培养基,并在37℃、5体积%二氧化碳环境下进行。每2~3日进行一次传代。

[0122] <子宫内膜异位症模型小鼠>

[0123] 将A431-CNGB3-myc细胞移植到免疫缺陷小鼠(NOD/ShiJic-scid Jcl品系,由日本clea公司提供)的腹腔中,制作子宫内膜异位症模型小鼠。

[0124] 具体地,将冷冻保存的A431-CNGB3-myc细胞解冻后,使用10cm培养皿(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific)公司制品、Lot No.F3BAXQ103)、为使2次传代的细胞成为 1×10^7 细胞/0.5mL/只(1×10^7 cells/0.5mL/body),添加培养基制成细胞液,作为施用药液。通过将该施用药液、在制备后尽快向7周龄雌性免疫缺陷小鼠的腹腔内施用来移植A431-CNGB3-myc细胞。

[0125] 另外,小鼠在聚碳酸酯笼(W×D×H=270×440×187(mm))中以5~10只/笼,在19.8~27.1℃、湿度32~75%、12小时照明的环境下饲养。饲料(无菌CRF-1(固体)、东方(Oriental)酵母工业公司制品)和饮用水(无菌自来水)让小鼠自由摄取。

[0126] 模型制备的检查通过对腹膜肿瘤的观察和取样来进行。A431-CNGB3-myc细胞移植1~3周后,每周对2只小鼠进行剖检,通过视觉确认腹膜中是否观察到肿瘤(1mm左右的粒状),并进行拍照。之后,对腹膜取样,切下4个部位(腹部和背部的各左右部位),分别浸入并固定在10%中性缓冲福尔马林中,冷藏保存。使用抗c-myc抗体对福尔马林固定后的腹膜进行免疫组织化学染色,检查播种状态。

[0127] 通过视觉观察A431-CNGB3-myc细胞移植后的小鼠可知,在第1次实验中,移植1周后,通过视觉发现了肿瘤,并未观察到腹膜播种,而移植2周或3周后,通过视觉发现了肿瘤及腹膜播种。在第2次实验中,即便是移植1周后,也可通过视觉观察到腹膜播种。并且,移植后小鼠的腹膜组织薄片的c-myc染色的结果,表明移植1周后已发生腹膜播种。

[0128] [参考例1]

[0129] 对于连接KLAK肽、HLAH肽和CNGB3结合肽的肽,检查的是:CNGB3结合肽的氨基酸序列的种类和对子宫内膜异位症细胞的细胞毒性的强度的影响。

[0130] 具体来说,合成了由表2所示的氨基酸序列组成的两种肽,并比较了它们对A431-CNGB3-myc细胞的细胞毒性。这两种肽,其KLAK序列和HLAH序列部分是由D-氨基酸合成的,而CNGB3结合肽部分是由L-氨基酸合成的。

[0131] [表1]

	KLAK-HLAH	Seq.	Seq.No.
WT	14+14	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-VRRADNRPG	8
D5E	14+14	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-VRRAENRPG	9

[0133] <细胞杀伤活性的评估>

[0134] 各种肽的细胞杀伤活性的评估,通过使用CellTiter-Glo(注册商标)检测试剂盒

(由Promega公司制品)、测量用各种肽处理过的A431-CNGB3-myc细胞的ATP量来进行。

[0135] 具体说来,首先,将2次传代后的A431-CNGB3-myc细胞,调制成 1×10^4 细胞/孔(cells/well)的细胞浓度,并播种在96孔板(Corning/Costar公司制品, Lot No. 00515003)上。播种后培养2日,再将各种肽添加在各孔中,各种肽使得其最终浓度分别为35.5、75或150μM,并培养24小时。之后,从各孔中去除培养上清液,在剩余的细胞中添加CellTiter-Glo缓冲液(buffer)进行均质化后,通过离心回收上清液,将其作为裂解物(Lysate)。向该裂解物中添加两倍量的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)和与裂解物等量的2×CellTiterGlo反应物(Reagent)并搅拌,将其作为反应溶液,将该反应溶液在室温下静置10分钟。使用增效(Synergy)H1混合多模式微孔板读板仪(Hybrid multi-mode microplate reader)(BioTek公司制品)测量室温静置后的反应溶液的发光强度(Luminescence)(RLU: RELATIVE LIGHT UNITS(相对光单位))。反应溶液的发光强度为ATP量的指标。反应溶液的发光强度越低,ATP量越低,表示所施用的肽的细胞杀伤活性越强。所有试验均用一式三份(triplicate)进行测量,并将其平均值评估为在各种肽浓度下的细胞杀伤活性。

[0136] 在各种肽对A431-CNGB3-myc细胞的细胞杀伤活性的评估中,各反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果如图1所示。在图1中,“WT”示出了表1的肽WT的结果,“D5E”示出了表1的肽D5E的结果。两种肽都显示出浓度依赖性的细胞杀伤活性作用。CNGB3结合肽是Z13肽的肽WT,比CNGB3结合肽是序列号4的肽的肽D5E,显示出更强的细胞杀伤活性作用。

[0137] [实施例1]

[0138] 对于连接了KLAK肽、HLAH肽和Z13肽的肽, KLAK序列和HLAH序列的长度得到了最优化,从而使得对子宫内膜异位症细胞的细胞毒性的强度最大化。

[0139] 具体说来,合成由表2所示的氨基酸序列组成的16种肽,并比较了它们对A431-CNGB3-myc细胞的细胞毒性。这16种肽中, KLAK序列和HLAH序列部分是由D-氨基酸合成的,而Z13肽部分是由L-氨基酸合成的。

[0140] [表2]

[0141]	肽	KLAK-HLAH	Seq.	Seq.No.
1	14+14	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLAH-VRRADNRPG	8	
2	14+13	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHLA-VRRADNRPG	10	
3	14+12	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAHL-VRRADNRPG	11	
4	14+11	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLAH-VRRADNRPG	12	
5	14+10	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HLA-VRRADNRPG	13	
6	14+9	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-HL-VRRADNRPG	14	
7	14+8	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-H-VRRADNRPG	15	
8	14+7	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG	16	
	HLAH-KLAK			
9	14+14	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAKLAK-VRRADNRPG	17	
10	14+13	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAKLA-VRRADNRPG	18	
11	14+12	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAKL-VRRADNRPG	19	
12	14+11	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLAK-VRRADNRPG	20	
13	14+10	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KLA-VRRADNRPG	21	

14	14+9	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-KL-VRRADNRPG	22
15	14+8	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-K-VRRADNRPG	23
16	14+7	HLAHLAH-HLAHLAH-KLAKLAK-VRRADNRPG	24

[0142] 除了添加到播种在96孔板上的A431-CNGB3-myc细胞中的各种肽的最终浓度为2.34、4.69、9.38、18.8、37.5、75或150μM,且肽添加后的培养时间为20小时以外,按照与参考例1相同的方式,评估各种肽的细胞杀伤活性评估。在各种肽对A431-CNGB3-myc细胞的细胞杀伤活性的评估中,各反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果如图2所示。在图中,“1”~“16”分别示出了添加了表2中的肽1~16的反应溶液的结果。在添加肽后20小时,以浓度依赖性方式显示出细胞杀伤活性作用。在KLAK序列的肽的下游连接有HLAH序列的肽的肽1~8,比在HLAH序列的肽的下游连接有KLAK序列的肽的肽9~16,显示出更强的细胞杀伤活性作用。并且,在肽1~8中最短的肽8,比最长的肽1细胞杀伤活性更强;而在肽9~16中最短的肽16,比最长的肽9细胞杀伤活性更强。

[0143] [实施例2]

[0144] 在实施例1中示出最强细胞杀伤活性的肽8被进一步缩短,并且进行了最优化以使得其对子宫内膜异位症细胞的细胞毒性的强度最大化。

[0145] 具体说来,合成由表3所示的氨基酸序列组成的14种肽,并比较了它们对A431-CNGB3-myc细胞的细胞毒性。这14种肽中,KLAK序列和HLAH序列部分是由D-氨基酸合成的,而Z13肽部分是由L-氨基酸合成的。

[0146] [表3]

肽	KLAK-HLAH	Seq.	Seq.No.
8	14+7	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG	16
A1	14+6	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHLA-VRRADNRPG	25
A2	14+5	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHL-VRRADNRPG	26
A3	14+4	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAH-VRRADNRPG	27
A4	14+3	KLAKLAK-KLAKLAK-HLA-VRRADNRPG	28
A5	14+2	KLAKLAK-KLAKLAK-HL-VRRADNRPG	29
A6	14+1	KLAKLAK-KLAKLAK-H-VRRADNRPG	30
B1	13+7	KLAKLAK-KLAKLA-HLAHLAH-VRRADNRPG	31
B2	12+7	KLAKLAK-KLAKL-HLAHLAH-VRRADNRPG	32
B3	11+7	KLAKLAK-KLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG	33
B4	10+7	KLAKLAK-KLA-HLAHLAH-VRRADNRPG	34
B5	9+7	KLAKLAK-KL-HLAHLAH-VRRADNRPG	35
B6	8+7	KLAKLAK-K-HLAHLAH-VRRADNRPG	36
B7	7+7	KLAKLAK-HLAHLAH-VRRADNRPG	37

[0148] 以与实施例1相同的方式,评估各种肽的细胞杀伤活性评估。在各种肽对A431-CNGB3-myc细胞的细胞杀伤活性的评估中,用肽8和肽A1~A6处理的反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果如图3所示,用肽8和肽B1~B7处理的反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果如图4所示。图中,“#8”示出的是添加了表3中的肽8的反应液的结果,“A1”~“A6”以及“B1”~“B6”分别示出的是添加了表3中的肽A1~A6、B1~B6的反应溶液的结果。在KLAK序列

由14个氨基酸组成的肽A1-A6中,HLAH序列为4个氨基酸以下的肽A3~6,即使在最终肽浓度为75 μM 时也几乎不显示细胞杀伤活性(图3)。并且,在HLAH序列由7个氨基酸组成的肽B1~B7中,KLAK序列为11个氨基酸以下的肽B3~B7,即使在最终肽浓度为75 μM 时也几乎不显示出细胞杀伤活性(图4)。此外,仅肽A2显示出比肽8更强的细胞杀伤活性。这些结果可以表明,作为效应肽,连接KLAK序列由14个氨基酸组成的肽与HLAH序列由5个氨基酸组成的肽的肽,显示出的细胞杀伤活性最高。

[0149] [实施例3]

[0150] 在连接KLAK肽、HLAH肽和Z13肽的肽中,检测当组成氨基酸为D-氨基酸时和L-氨基酸时的细胞杀伤活性的强度。

[0151] 具体说来,以与实施例1相同的方式,检测以下各种肽的细胞杀伤活性的强度:表3所记载的肽A2(由14个氨基酸组成的KLAK序列和由5个氨基酸组成的HLAH序列两者均由D-氨基酸组成。也称为肽(14D+5D)) ;以及肽8的氨基酸中,14个氨基酸组成的KLAK序列由D-氨基酸组成、5个氨基酸组成的HLAH序列由L-氨基酸组成的肽(14D+5L);肽8的氨基酸中,14个氨基酸组成的KLAK序列由L-氨基酸组成、5个氨基酸组成的HLAH序列由D-氨基酸组成的肽(14L+5D);肽8的所有氨基酸均由L-氨基酸组成的肽(14L+5L)。另外,这些肽的Z13肽部分均仅由L-氨基酸组成。

[0152] 在各种肽对A431-CNGB3-myc细胞的细胞杀伤活性的评估中,用各种肽处理过的反应溶液的发光强度(RLU)的测量结果如图5所示。逃逸肽全部由L-氨基酸组成的肽(14L+5L)的细胞杀伤活性最小,逃逸肽全部由D-氨基酸组成的肽A2(肽(14D+5D))的细胞杀伤活性最大。推测这是因为由D-氨基酸组成的肽,比由L-氨基酸组成的肽在内涵体中或细胞质中更难被消化、更能充分发挥内涵体逃逸活性和细胞凋亡诱导活性。

[0153] [实施例4]

[0154] 对实施例2及3中细胞杀伤活性最高的肽A2的细胞杀伤活性进行检测。

[0155] <活细胞的定量分析>

[0156] 向接种在置于细胞培养用多孔培养皿(multidish)的盖玻片上的A431-CNGB3-myc细胞中添加肽A2,使其最终浓度为0(对照)、37.5、75或150 μM ,并进行培养。在肽添加后24、48或72小时,对粘附到盖玻片并转移(Spread)的细胞(活细胞)的数量进行计数。每一视野中的活细胞数(细胞/视野(Cells/view))的测量结果中图6所示。其结果,发现A431-CNGB3-myc细胞的活细胞数,取决于添加的肽A2的浓度且随时间推移减少。

[0157] <细胞凋亡诱导活性的分析>

[0158] 向接种在置于细胞培养用多孔培养皿的盖玻片上的A431-CNGB3-myc细胞中添加肽A2,使其最终浓度为0(对照)、37.5、75或150 μM ,并进行培养。在肽添加后24、48或72小时,使用ApopTag(注册商标)荧光素原位凋亡检测试剂盒(Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit)检测细胞凋亡。图7示出了对肽添加后经过48小时的细胞进行细胞凋亡标签试验(Apop-Tag assay)的结果。在图中,“赫斯特(Hoechst)”示出了用Hoechst 33342溶液(solution)进行核染色的结果。其结果,发现Apop-Tag染色的细胞数增加取决于所添加的肽A2的浓度,且证实肽A2诱导了细胞凋亡。

[0159] [实施例5]

[0160] 对子宫内膜异位症模型小鼠施用实施例2及3中细胞杀伤活性最高的肽A2,并检查

其对子宫内膜异位症的治疗效果。

[0161] <肽的腹腔内单次投药>

[0162] 对将A431-CNGB3-myc细胞移植到腹腔内7日后的子宫内膜异位症模型小鼠，在异氟烷麻醉下，于腹腔内加入0.5mL加温至37℃的生理盐水并按摩后，将溶解在生理盐水中的肽A2溶液进行腹腔内给药。肽A2以每单位体重小鼠0mg/10mL/kg(对照)、5mg/10mL/kg或10mg/10mL/kg(n=3)的剂量施用。

[0163] <肽的腹腔内多次投药>

[0164] 对将A431-CNGB3-myc细胞移植到腹腔内7日后的子宫内膜异位症模型小鼠，在异氟烷麻醉下，于腹腔内加入0.5mL加温至37℃的生理盐水并按摩后，将溶解在生理盐水中的肽A2溶液进行腹腔内给药(第一次给药)。之后，在腹腔内移植A431-CNGB3-myc细胞8日后和9日后，以相同的方式施用肽A2溶液。即，肽A2溶液1日1次，总共给药3次。肽A2经每单位体重小鼠0mg/10mL/kg(对照)、2.5mg/10mL/kg、5.0mg/10mL/kg或7.5mg/10mL/kg(n=3)的剂量施用。

[0165] <腹膜的采集(取样)>

[0166] 在最终投药24小时后或48小时后，在异氟烷麻醉下使施用肽A2的子宫内膜异位症模型小鼠放血死亡，并采集腹膜。ATP测量用腹膜在液氮中冷冻后，用深冻冰箱(deep freezer)保管直至测量。病理标本制备用腹膜在浸入并固定在10%中性缓冲福尔马林后，冷藏保管。

[0167] 另外，在放血死亡前测量每只小鼠的体重。无论肽A2的施用量和施用次数如何，每只小鼠的体重没有什么变化。

[0168] <ATP量测量>

[0169] ATP量测量，使用CellTiter-Glo(注册商标)检测试剂盒(由普洛麦格(Promega)公司制品)来进行。测量冷冻的腹膜的重量，加入冷冻组织的10倍量的CellTiter-Glo缓冲液进行均质化后，通过离心回收上清液，将其作为裂解物。向该裂解物中添加两倍量的PBS和与裂解物等量的2×CellTiterGlo反应物并搅拌，将其作为反应溶液，使该反应溶液在室温下静置10分钟。使用增效H1混合多模式微孔板读板仪(BioTek公司制品)测量室温静置后的反应溶液的发光强度(RLU)。反应溶液的发光强度为ATP量的指标，发光强度越低，ATP量越低，表示被施用的肽的细胞杀伤活性越强。所有试验均用一式三份(n=3)进行测量，并将其平均值评估为各种肽的细胞杀伤活性。

[0170] 单次施用肽A2的子宫内膜异位症模型小鼠的腹膜的发光强度(RLU)的测量结果如图8所示。并且，重复3次施用肽A2的子宫内膜异位症模型小鼠的腹膜的发光强度(RLU)的测量结果如图9所示。如图8和图9所示，在单次给药和多次给药的任一小鼠中，腹膜的发光强度(RLU)随着所施用的肽A2量而降低，这表明腹膜的ATP量在降低。腹膜的ATP量的降低意味着移植到腹膜中的A431-CNGB3-myc细胞的活细胞数的减少。这些结果可以说明，腹腔中的A431-CNGB3-myc细胞被肽A2杀伤，即，肽A2可以在生物体内环境中发挥细胞杀伤效果，特别是作为对子宫内膜异位症的治疗药是有用的。

[0171] < TUNEL染色>

[0172] 对用10%中性缓冲福尔马林固定的病理标本制备用腹膜，进行HE染色和TUNEL染色。其结果，在肽A2施用组中，为末端标记法(terminal-deoxynucleotidyl transferase

mediated nick end labeling, TUNEL) 法(末端脱氧核酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 介导的脱氧尿三磷酸 (deoxidized uridine triphosphate, dUTP) 缺口末端标记)为阳性(未图示), 这证实了肽A2诱导细胞凋亡、且显示出细胞杀伤效果。

[0173] [实施例6]

[0174] 检查肽A2(肽(14D+5D))对源自A431-CNGB3-myc细胞和各种子宫癌细胞的细胞株的细胞杀伤活性作用。

[0175] 作为源自癌细胞的细胞株, 使用源自人子宫内膜腺癌的石川(ishikawa)细胞, 源自人子宫内膜癌的SNG-II细胞、源自人子宫体癌的Hec-1A细胞和源自人子宫内膜癌的RL95-2细胞。以与A431-CNGB3-myc细胞相同的方式培养这些细胞。

[0176] 作为处理各细胞的肽, 使用由表4所示的氨基酸序列组成的三种肽。这3种肽中, KLAK序列和HLAH序列部分是由D-氨基酸合成的, 而Z13肽部分是由L-氨基酸合成的。

[0177] [表4]

[0178]

	KLAK-HLAH-Z13	Seq.	Seq.No.
A 2	14D+5D+Z13	KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHL-VRRADNRPG	26
A 2-1	14D+Z13	KLAKLAK-KLAKLAK-VRRADNRPG	38
A 2-2	5D+Z13	HLAHL-VRRADNRPG	39

[0179] 除了添加到播种在96孔板上的各细胞中的各种肽的最终浓度为0(不添加肽)、2.34、4.69、9.38、18.8、37.5、75.0、150.0或300.0μM以外, 以与实施例1相同的方式, 评估各种肽的细胞杀伤活性评估。当不添加肽的反应溶液的发光强度(RLU)为100%时, 将各反应溶液的相对发光强度(%)计算为相对ATP量(%)。计算结果如图10~14所示。在图中, “14D-Z13+5D-Z13”表示添加肽A2-1和肽A2-2两者后的反应溶液的相对ATP量, “14D-Z13”表示仅添加肽A2-1后的反应溶液的相对ATP量, “5D-Z13”表示仅添加肽A2-2后的反应溶液的相对ATP量, “14D-5D-Z13”表示仅添加肽A2后的反应溶液的相对ATP量(%)。如图10~14所示, 可知肽A2不仅对A431-CNGB3-myc细胞具有细胞杀伤活性作用, 而且对源自子宫癌细胞的各种细胞株也具有细胞杀伤活性作用。并且, 在用KLAK肽和Z13肽的连接肽以及HLAH肽和Z13肽的连接肽两者处理的细胞中, 与仅用KLAK肽和Z13肽的连接肽处理的细胞以及仅用HLAH肽和Z13肽的连接肽处理的细胞一样, 细胞杀伤活性作用几乎观察不到或非常微弱。

[0180] [实施例7]

[0181] 由于A431细胞为源自人上皮样细胞癌的细胞株, 因此腹腔中被移植了A431-CNGB3-myc细胞的子宫内膜异位症模型小鼠, 可称作荷瘤小鼠。因此, 在子宫内膜异位症模型小鼠的腹腔中, 施用连接由序列号1表示的氨基酸序列组成的效果肽与IF7肽的肽(IFLLWQR-RR-KLAKLAK-KLAKLAK-HLAHL、序列号40) (以下有时称为“IF7(RR)-(K+H)肽”), 检查其对癌细胞的细胞杀伤活性作用。IF7(RR)-(K+H)肽中, KLAK序列和HLAH序列部分是由D-氨基酸合成的, 其他的肽部分是由L-氨基酸合成的。

[0182] <肽的尾静脉给药>

[0183] 对将A431-CNGB3-myc细胞移植到腹腔内14日后的子宫内膜异位症模型小鼠, 1日1次, 连续6日, 从尾静脉施用50μL溶于生理盐水的IF7(RR)-(K+H)肽溶液。IF7(RR)-(K+H)肽以每单位体重小鼠0μg/只(body) (对照)、10μg/只或50μg/只的剂量施用。

[0184] 其结果,在未施用肽的对照组($n=8$)中,将A431-CNGB3-myc细胞移植到腹腔内24日后的死亡个体数为1,存活率为88.9%。与此相对,在以 $10\mu\text{g}/\text{只}/\text{天}$ 或 $50\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量施用IF7(RR)-(K+H)肽的组($n=6$)中,存活率则为100%。并且,在试验结束时检查所有小鼠腹腔中的癌细胞(A431-CNGB3-myc细胞)的扩散时,在对照组中癌细胞扩散至整个腹膜,而施用IF7(RR)-(K+H)肽的组中,在多数小鼠中癌细胞的扩散是比较局限的。另外,不管IF7(RR)-(K+H)肽的施用量或施用次数如何,每只小鼠的体重都没有特别变化。这些结果可以表明,经静脉施用的IF7(RR)-(K+H)肽具有对癌细胞的细胞杀伤活性作用、且作为抗癌剂是有用的。

[0185] [实施例8]

[0186] 对背部形成肿瘤的荷瘤小鼠,经静脉施用实施例7中使用的IF7(RR)-(K+H)肽,检查其对癌细胞的细胞杀伤活性作用。

[0187] <荧光素酶基因导入卵巢癌荷瘤皮下肿瘤小鼠(OVCAR3-Luc小鼠)>

[0188] 培养导入有荧光素酶基因的卵巢癌细胞株(卵巢癌3-荧光素酶(OVCAR3-Luc)细胞,来自其他机构的转让),将其作为要移植到小鼠中的肿瘤组织来使用。OVCAR3-Luc细胞的培养,以无血清冻存细胞培养基(RPMI medium)1640(11875-093,give by life technologies)作为培养基,在 37°C 、5体积%二氧化碳环境下进行。

[0189] 在8周龄雌性严重联合免疫缺陷(severe combined immune deficiency,SCID)小鼠(C.B-17/Icr-scid/scid Jcl品系,由日本clea公司提供)的背部上,移植约 1×10^6 个OVCAR3-Luc细胞,以制备OVCAR3-Luc小鼠。

[0190] <肽的尾静脉给药>

[0191] 与实施例7相同,对OVCAR3-Luc小鼠,1日1次,连续6日,从尾静脉施用 $50\mu\text{L}$ 溶于生理盐水的IF7(RR)-(K+H)肽的溶液。IF7(RR)-(K+H)肽以每单位体重小鼠 $0\mu\text{g}/\text{只}$ (对照)或 $10\mu\text{g}/\text{只}$ 的剂量施用。

[0192] <肿瘤组织大小的测量>

[0193] 对每只小鼠进行发光成像检查,并经时地测量背部肿瘤的光子数和肿瘤组织的大小。

[0194] (1)光子数的测量

[0195] 利用萤光素-萤光素酶发光机理,使用体内(in vivo)发光成像装置(精诺真(Xenogen)IVIS-200,卡尺公司(Caliper Corporation)制品)进行测量。首先,向OVCAR3-Luc小鼠腹腔内施用 $100\mu\text{L}$ 的 $30\text{mg}/\text{mL}$ 的D-荧光素钾盐(126-05116,和光纯药工业公司制品)溶液。施用15分钟后,用体内发光成像装置测量该小鼠,并测量光子数。

[0196] (2)肿瘤体积的测量

[0197] 各OVCAR3-Luc小鼠背部的估计肿瘤体积(mm^3),根据肿瘤的长径和短径,通过以下算式求得。在这里,肿瘤的长径(mm)和短径(mm)使用游标卡尺测量。

$$[\text{估计肿瘤体积}(\text{mm}^3)] = [\text{长径}(\text{mm})] \times [\text{短径}(\text{mm})] \times [\text{短径}(\text{mm})] \times 1/2$$

[0199] 图15示出了每只小鼠背部肿瘤的光子数的增加率(%)的经时变化,图16示出了每只小鼠背部肿瘤体积(mm^3)的增加率(%)的经时变化。光子数的增加率和肿瘤体积的增加率均以肽溶液施用开始日的前一天的值为基准(100%)。在图中,“治疗(treatment)”示出了对肽溶液静脉施用的处理期间。如图15所示,在施用了IF7(RR)-(K+H)肽的小鼠中,在肽

处理期间,光子数几乎不增加,并且,肽处理期间后的增加率也比对照组(生理盐水(Saline))小。此外,肿瘤体积在肽处理期间,对照组与IF7(RR)-(K+H)肽施用组没有差别,但该处理期间经过后的增加率,IF7(RR)-(K+H)肽施用组明显较小。这些结果表明:通过IF7(RR)-(K+H)肽的施用,可以杀伤生物体内的肿瘤组织、该肽作为抗癌剂是有用的。

[0200] [参考例2]

[0201] 用抗CNGB3抗体对各种器官的癌组织的石蜡包埋切片进行免疫染色,检查有无CNGB3的表达。

[0202] 组织切片使用市售的4种人卵巢癌组织阵列(Ovary cancer tissue array)(美国生物(US Biomax)公司制品)中的2种(OV20811及OV2088)、以及各种脏器的癌组织阵列(Multiple organ tumor tissue array)中的2种(FDA800a及MC964a)。并且,抗CNGB3抗体使用市售抗体中的、Biorbyt(目录(Catalog)No.orb156415BRT 100UG)(以下有时称为“抗体orb”)以及0senses(编码(code);OSC00253W)(以下有时称为“抗体253W”)这2种。

[0203] 组织切片的免疫染色如下进行。首先,使石蜡包埋组织切片在液状免疫实验用封闭(blocking)剂(免疫封闭(ImmunoBlock)、DS医药生物医学(Pharma Biomedical)公司制品)中反应30分钟,封闭非特异性反应后,进行2次利用洗涤缓冲液(TBST)(含有吐温20(Tween 20)的三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲生理盐水)的5分钟洗涤处理。接着,将该组织切片浸入在0.3%过氧化氢溶液中反应5分钟,在进行内源性过氧化物酶活性的封闭处理后,进行2次利用TBS的5分钟洗涤处理。接着,将该组织切片浸入用雷亚尔抗体稀释剂(REAL Antibody Diluent)(编码S2022,达科(Dako)公司制品)将抗CNGB3抗体稀释100倍的一次抗体溶液中,在室温下反应30分钟,之后进行2次利用TBS的5分钟洗涤处理。进一步地,将该组织切片与标记的二次抗体(EnVision+System-HRP标记聚合物(Polymer)抗兔抗体,Dako公司制品)在室温下反应30分钟后,进行2次利用TBS的5分钟洗涤处理。之后,将该组织切片用DAB显色试剂[二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)+液体(Liquid)(大号)、RUO(K3468)、Dako公司制备]处理5分钟以使其显色。DAB显色后的组织切片在水洗后,用迈尔氏苏木精(Mayers hematoxylin)处理2分钟将核染色,之后密封。

[0204] 人卵巢癌组织阵列中的OV20811的染色结果以表5~10示出,OV2088的染色结果以表11~16示出。各种脏器的癌组织阵列中的FDA800a的染色结果以表17、18示出,MC964a的染色结果以表19~21示出。在表中,各抗CNGB3抗体的栏中的“+”表示用该抗体免疫染色的结果,“-”表示未用该抗体免疫染色的结果。可知大部分的组织切片由抗CNGB3抗体免疫染色、且已表达CNGB3。

[0205] [表5]

OV20811		等级	阶段	orb	253W
1	浆液性腺癌 (Serous adenocarcinoma)	1	Ia	+	+
2	浆液性腺癌		I	-	-
3	腺癌 (adenocarcinoma) (稀疏 (sparse))	-	Ia	+	+
4	浆液性乳头状腺癌 (Serous papillary adenocarcinoma)	2	II	+	+
5	浆液性乳头状腺癌		Ia	-	+
6	粘液性乳头状腺癌 (Mucinous papillary adenocarcinoma)	1	Ic	-	+
7	粘液性乳头状腺癌 (纤维组织和血管)	-	Ia	+	-
8	粘液性乳头状腺癌	1		+	-

[0206]

[0207]	9	浆液性乳头状腺癌	2	-	-	
	10			+	+	
	11			IIa	+	+
	12			Ic	+	+
	13			Ib	+	-
	14			IIIc	+	+
	15				+	-
	16			IV	+	-
	17			3	Ic	+
	18			-	IIIa	+
[0208]	19	浆液性乳头状腺癌	3	Ic	+	+
	20			Ib	+	+
	21				-	+
	22		2	IIb	+	+
	23			Ia	+	+
	24			Ib	+	+
	25				+	+
	26				+	-
	27			Ia	+	+
	28			3	IIa	+
	29				Ib	+
[0208]	30	粘液性乳头状腺癌	2	Ia	+	+
	31			IIa	+	+
	32		-	Ib	+	+
	33		3	Ia	+	+
	34		2	IIIc	+	+
	35		2-3		II	+
	36		2	I	+	+
	37	粘液性乳头状腺癌(肿瘤坏死 (tumoral necrosis))	-	Ib	-	-

[0208] [表6]

[0209]

OV20811		等级	阶段	orb	253W
---------	--	----	----	-----	------

38	浆液性乳头状腺癌	3	IIa	+	+	
39			IV	+	+	
40			+	+		
41		2	Ib	+	+	
42			Ia	-	+	
43	浆液性乳头状腺癌(纤维组织和血管)	-	IIIc	+	+	
44	浆液性乳头状腺癌	3	IV	+	+	
45	粘液性乳头状腺癌		IIIc	+	+	
46	+		+			
47	浆液性乳头状腺癌	Ia	+	+		
48			+	+		
49		-	+	+		
50		1	IIIb	+	+	
51			Ia	+	+	
52	浆液性腺癌	2	II	+	+	
53	浆液性乳头状腺癌	3	+	+		
54			Ia	+	+	
55		2	IIa	+	+	
56	粘液性乳头状腺癌		Ia	+	+	
57	浆液性乳头状腺癌		II	+	+	
58	浆液性腺癌	2	IIIc	+	+	
59	浆液性乳头状腺癌	3	Ib	+	+	
60	浆液性乳头状腺癌		IIIc	+	+	
61	粘液性乳头状腺癌伴坏死 (Mucinous papillary adenocarcinoma with necrosis)		Ia	+	+	
62	浆液性乳头状腺癌		IIa	+	+	
63			Ia	+	+	
64	-	IIa	+	+		
65		浆液性腺癌	Ia	+	+	
66	浆液性乳头状腺癌	3	+	+		
67			+	+		
68		II	+	+		
			Ib	+	+	

[0211]

69			Ic	+	+
70		2		+	+
71	粘液性乳头状腺癌	3	Ia	+	+
72	粘液性乳头状腺癌(白体组织 (corpus albicans tissue))	-	Ib	+	+
73	浆液性乳头状腺癌(fibrous tissue)	-	Ia	+	+
74	浆液性乳头状腺癌	3	III	+	+

[0212] [表7]

OV20811		等级	阶段	orb	253W	
75	浆液性乳头状腺癌(卵巢组织)	-	Ic	-	+	
76				+	+	
77	浆液性乳头状腺癌		IIa	+		
78				+	+	
79	粘液性乳头状腺癌伴坏死	3	IIb	+	+	
80			II	+	+	
81	浆液性乳头状腺癌			+	+	
82	浆液性乳头状腺癌(卵巢组织)	-	II	+	+	
83	浆液性乳头状腺癌	3		+	+	
84	浆液性乳头状腺癌 (纤维组织和血管的慢性炎症)	-	Ia	+	+	
85			Ib	+	+	
86	浆液性乳头状腺癌	3	I	+	+	
87			Ia	+	+	
88	浆液性乳头状腺癌伴坏死			+	+	
89		2	I	+	+	
90	浆液性乳头状腺癌		II	+	+	
91		3	Ic	-	+	
92	粘液性乳头状腺癌伴坏死			Ib	+	+
93	腺癌(稀疏)	-	III	-	+	
94			I	+	+	
95	浆液性乳头状腺癌	3	Ia	+	+	
96	粘液性乳头状腺癌		Ib	+	+	
97	粘液性腺癌		IIa	-	+	

[0214]

89			Ib	+	+
99			Ia	+	+
100	腺癌		II	+	+
101		2	Ia	+	+
102	子宫内膜样腺癌 (Endometrioid adenocarcinoma)	1	Ib	+	+
103	子宫内膜样腺癌(肿瘤坏死)	-	II	-	-
104	子宫内膜样腺癌	1		+	+
105	子宫内膜样腺癌(肿瘤坏死)	-	Ic	-	-

[0215] [表8]

OV20811		等级	阶段	orb	253W
106	子宫内膜样腺癌	1	Ia	+	+
107	子宫内膜样腺癌(稀疏)		IIa	-	+
108			Ia	+	+
109				-	+
110				+	+
111			Ib	+	+
112			Ia	+	+
113			IIa	+	+
114			I	+	+
115			Ia	+	+
116			3	I	+
117	子宫内膜样腺癌		Ia	+	+
118			I	+	+
119		2	IIa	+	+
120			IV	+	+
121		2	Ic	+	+
122			IIc	+	+
123		3	Ia	+	+
124			Ic	+	+
125			Ib	+	+
126			IIa	+	+

[0217]	127	透明细胞癌 (Clear cell carcinoma)					I	-	-	
	128						+	+		
	129	透明细胞癌(稀疏)伴大量坏死 (with massive necrosis)					IIIc	-	+	
	130	透明细胞癌(稀疏)伴坏死						+	+	
	131	透明细胞癌					I	+	+	
	132							+	+	
	133	透明细胞癌(肿瘤坏死)					II	-	-	
	134	透明细胞癌					Ic	+	+	
	135							+	+	
	136	未分化癌 (Undifferentiated carcinoma)					I	+	+	
	137							+	+	
	138						Ia	+	+	
[0218]	139	由畸胎瘤恶性转化的鳞状细胞癌 (Squamous cell carcinoma from malignant transformation of teratoma)					1	I	+	+
	140						Ia	+	+	
	141						IIa	+	+	
	142						IIIc	+	+	
	143							+	+	
	144						2	Ia	+	+
							3		+	+

[0218] [表9]

[0219]

OV20811		等级	阶段	orb	253W	
145	鳞状细胞癌 (Squamous cell carcinoma)	-	Ib	+	+	
146	移行细胞癌 (Transitional cell carcinoma)		Ib	+	+	
147			IIIc	+	+	
148			Ia	-	+	
149			Ia	+	+	
150			Ia	-	+	
151			IV	-	+	
152			Ic	-	-	
153			Ic	-	+	
154			Ib	-	+	
155			I	-	+	

		-	+
	II	+	+
	Ib	-	+
	II	-	+
	Ib	-	+
	IV	-	-
[0220]	Ia	+	-
		+	-
	I	-	+
	Ic	-	+
	Ib	-	-
	I	-	+
	Ia	-	+
	Ib	-	-
	Ia	-	+
	IIb	+	-
	Ic	-	-
	I	-	+
[0221]	Ia	-	-
		-	-
		-	+
		+	+
		-	-

颗粒细胞瘤 (Granular cell tumor)

[0221] [表10]

OV20811		等级	阶段	orb	253W
179	颗粒细胞瘤	Ib	+	-	
180			-	-	
181		Ia	-	-	
182		II	-	+	
183		Ib	N.T.	+	
184	无性细胞瘤 (Dysgerminoma)	Ia	+	+	

		Ib	+	+
		Ia	+	+
			+	-
		IIb	+	-
		Ia	-	-
		I	-	+
		Ia	-	-
			+	+
			-	-
		Ic	-	-
[0223]	197	I	-	-
	198	Ia	-	-
	199		-	-
	200	Ib	-	+
	201	III	-	-
	202	Ia	-	+
	203	Ib	-	-
	204		-	-
	205	I	-	-
	206		-	-
	207		-	-
	208	Ia	-	-
			-	-
[0224]	[表11]			

[0225]

OV2088		等级	阶段	orb	253W
1	浆液性乳头状腺癌	1	Ia	+	+
2				+	+
3		2	Ib	+	+
4				-	-

[0226]

5			1	Ia	-	+	
6					-	+	
7			2	Ib	+	+	
8					+	+	
9			1	Ia	-	-	
10					-	-	
11					-	+	
12					-	+	
13					-	-	
14	浆液性乳头状腺癌(纤维组织和血管)				-	-	
15		16	1	Ic	-	-	
16	浆液性乳头状腺癌				-	-	
17		18	2	I	+	+	
18	浆液性腺癌				+	+	
19		1	1	Ia	+	+	
20					-	+	
21					-	+	
22					-	+	
23					+	-	
24		2	2	Ic	-	+	
25					+	+	
26				III	-	-	
27	浆液性乳头状腺癌				-	-	
28					-	-	
29		1	1	Ia	-	+	
30					-	+	
31					-	-	
32					-	-	
33					+	+	
34		Ib	Ib		+	+	
35	浆液性腺癌伴坏死				IIIa	-	

[0227]

36	浆液性腺癌（稀疏）		+	-
37	浆液性乳头状腺癌		+	+
38			+	+
39			+	+
40			+	-

[0228] [表12]

OV2088		等级	阶段	orb	253W
41	浆液性腺癌(稀疏)	2	Ib	-	-
42	浆液性腺癌(纤维组织和血管)	-		-	-
43	浆液性腺癌	3	Ia	-	-
44				-	-
45	浆液性腺癌(纤维组织和血管)	2	Ia	-	+
46				-	+
47	浆液性腺癌(纤维组织和血管)	-	Ib	-	-
48				-	-
49	纤维组织和血管	3	Ia	+	+
50				+	+
51	纤维组织和血管(卵巢组织)	-	Ib	+	+
52				-	+
53	浆液性乳头状腺癌	3	Ia	-	+
54				-	+
55	浆液性乳头状腺癌	2	II	+	+
56				+	+
57	浆液性乳头状腺癌	3	Ib	-	+
58				-	+
59	浆液性乳头状腺癌	2	III	+	+
60				+	-
61	浆液性乳头状腺癌	2	I	-	-
62				-	-
63	浆液性乳头状腺癌	1	I	+	+
64				-	+

[0229]

65	浆液性腺癌(坏死组织)	-		-	-
66				-	-
67	浆液性腺癌	3	Ib	-	+
68				+	+
69				+	+
70				+	+
71			Ic	-	+
72				-	+
73			III	-	+
74				-	-
75			II	+	+
76				+	+
77	浆液性腺癌	3	Ic	-	+
78				-	+
79			Ia	-	+
80				-	+

[0231] [表13]

[0232]

OV2088		等级	阶段	orb	253W
81	浆液性腺癌	3	IIc	+	+
82				+	+
83			Ia	+	+
84		2	-	-	+
85			Ib	+	+
86	浆液性腺癌(卵巢组织)	-		-	+
87	浆液性腺癌	3	II	+	+
88				+	+
89		I	-	-	+
90			-	-	+
91		II	-	-	+
92			-	-	+
93		IV	+	-	-

94					+	-
95					-	+
96					-	+
97					-	+
89					-	+
99					-	-
100					+	+
101	浆液性腺癌(纤维组织和血管的慢性炎症)	-		Ia	+	+
102	浆液性腺癌	3			+	+
103				Ic	+	+
104	浆液性腺癌 (纤维组织和血管)	-			-	+
105				Ic	+	+
106	浆液性腺癌				-	-
107				Ib	-	-
108	浆液性乳头状腺癌	3			-	-
109				Ia	-	-
110	浆液性腺癌				-	-
111				Ib	-	+
112	浆液性腺癌(卵巢组织)	-			-	+
113				Ia	+	-
114					+	-
115				I	-	-
116	浆液性腺癌	3			-	+
117					-	-
118					-	+
119					-	+
120					-	-

[0234] [表14]

OV2088		等级	阶段	orb	253W
[0235]	121	3	Ia	-	+
	122			-	-

123	粘液性乳头状腺癌	1	I	-	-		
124				-	-		
125		2	Ic	-	-		
126				-	+		
127	浆液性乳头状腺癌	1-2	II	-	-		
128				-	-		
129		1	I	+	+		
130				+	+		
131	粘液性乳头状腺癌			+	+		
132				+	+		
133	1-2	Ia	+	+			
134			+	+			
135	粘液性腺癌	2	I	-	-		
136				-	-		
137				-	-		
138				-	-		
[0236]	腺癌	3	Ia	-	-		
139				-	-		
140	由畸胎瘤恶性的腺癌 (Adenocarcinoma from malignant transformation of teratoma)			-	-		
141				-	-		
142				-	-		
143				-	-		
144	腺癌	Ib	IIIc	-	-		
145	子宫内膜样癌(稀疏)			+	+		
146				+	+		
147	从畸胎瘤恶性的鳞状细胞癌(成熟畸胎瘤稀疏)			N.T.	N.T.		
148				+	+		
149	由畸胎瘤恶性的鳞状细胞癌	3	Ib	+	-		
150				-	-		
151	鳞状细胞癌			-	+		
152				-	+		
153	由畸胎瘤恶性的鳞状细胞癌		Ia	+	-		
154				+	-		

[0237]

155	内胚窦癌	-	Ib	-	+
156				-	+
157				-	+
158				-	+
159				-	-
160				-	-

[0238]

[表15]

[0239]

OV2088		等级	阶段	orb	253W	
161	子宫内膜样癌	2	Ia	+	+	
162				+	+	
163		164		-	-	
164				-	+	
165				+	+	
166				+	+	
167				-	-	
168				+	+	
169	颗粒细胞瘤	170	Ib	-	-	
170				-	-	
171				-	-	
172				-	-	
173	滤泡膜细胞瘤	174	Ia	-	-	
174				-	-	
175				-	+	
176				-	+	
177				+	-	
178				+	-	
179	透明细胞癌	2	I	+	+	
180				+	+	
181		3		+	+	
182				+	+	
183	透明细胞癌伴坏死	2	IIIc	+	+	

				-	-	
184						
185	无性细胞瘤		I	-	+	
186				-	+	
187				+	+	
188				+	+	
189				-	-	
190			Ia	-	-	
191	未成熟畸胎瘤			-	+	
192				-	-	
193				-	+	
194			Ia	-	-	
195	甲状腺肿类癌(稀疏)			+	+	
196				+	+	
197	未分化癌伴内分泌特征 (neruoendocrine feature)		Ib	+	-	
198				+	-	
199	移行细胞癌			+	+	
200				+	N.T.	

[0241] [表16]

OV2088		等级	阶段	orb	253W
201	癌肉瘤 (Carcinosarcoma)	Ia	-	-	
202			-	-	
203	细胞性纤维瘤 (Cellular fibroma)		-	-	
204			-	-	
205	胚胎性癌 (Embryonal carcinoma)	Ia	-	-	
206			N.T.	N.T.	
207	弥漫性 B 细胞淋巴瘤 (Diffuse B-cell lymphoma)		-	-	
208			-	-	

[0243] [表17]

[0244]

FDA800a			orb	253W
1	皮肤	枕部皮肤的基底细胞癌 (Basal cell carcinoma of occipitalia skin)	+	-
		左胸壁鳞状细胞癌 (Squamous cell carcinoma of left chest wall)	+	-

[0245]

3	肺	小细胞癌 (Small cell carcinoma)	-	-
4		腺癌	+	-
5		鳞状细胞癌	-	+
6		大细胞癌 (Large cell carcinoma)	+	+
7		支气管肺泡癌 (Bronchoalveolar carcinoma)	-	-
8	睾丸	精原细胞癌 (Spermatocytoma)	+	-
9		精原细胞癌	-	-
10		胚胎性癌	+	+
11	前列腺	腺癌(格里森等级 (Gleason grade) :4; 格里森分数 (Gleason score) :4+5)	+	+
12		横纹肌肉瘤 (Rhabdomyosarcoma)	-	-
13	胆囊	腺癌	+	+
14		腺鳞癌 (Adenosquamous carcinoma)	+	-
15	小肠	腺癌	+	-
16		低度恶性间质瘤 (Low grade malignant interstitialoma)	-	+
17	胰腺	导管腺癌 (Duct Adenocarcinoma)	+	+
18		胰岛细胞癌 (Islet cell carcinoma)	-	+
19	结肠	腺癌	+	+
20		低度恶性间质瘤	+	+
21	直肠	腺癌	+	+
22		低度恶性间质瘤	-	-
23		恶性黑色素瘤 (Malignant melanoma)	+	+
24	食道	鳞状细胞癌	+	+
25		腺癌	+	-
26	盲肠	腺癌	+	+
27	舌	鳞状细胞癌	+	+
28	耳下腺	腺样囊性癌 (Adenoid cystic carcinoma)	+	+
29	胃	粘液性腺癌	+	+
30	肝脏	肝母细胞癌 (Hepatoblastoma)	+	-
31		肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma)	+	+
32	乳房	原位管癌 (Ductal carcinoma in situ)	+	+
33		浸润性导管癌 (Invasive ductal carcinoma)	+	+

[0246]	34		原位导管癌 (Ductal carcinoma in situ)	+	-
	35		髓样癌 (Medullary carcinoma)	N.T.	N.T.
	36	子宫	子宫内膜腺癌 (Adenocarcinoma endometrium)	+	+
	37		透明细胞癌板坏死 (稀疏)	+	+
	38		平滑肌瘤 (Leiomyoma)	-	-
	39		鳞状细胞癌	+	+
	40	宫颈	子宫腺癌类型 (Endocervical type adenocarcinoma)	+	+

[0247] [表18]

FDA800a			orb	253W
41	卵巢	粘液性腺癌	-	+
42		浆液性腺癌	+	+
43	纵隔	胸腺癌 (Thymoma) (B3 型)	+	+
44	甲状腺	髓样癌	-	-
45		乳头状癌 (Papillary carcinoma)	+	+
46	脑	脑膜癌 (Atypical meningioma)	-	+
47		右枕叶恶性室管膜瘤 (Malignant ependymoma of right occipital lobe)	-	-
48		变性钙化性少突神经胶质瘤 (Anaplastic oligodendroglioma with calcification) (稀疏)	-	-
49		右枕叶亚型胶质母细胞瘤 (Pantmorphic glioblastoma of right occipital lobe)	+	-
50		小脑的髓母细胞瘤 (Medulloblastoma of cerebellum)	+	-
51	膀胱	移行细胞癌	-	-
52		低度恶性平滑肉瘤	+	-
53	肾脏	移行细胞癌	-	+
54		乳头状肾细胞癌 (Papillary renal cell carcinoma)	-	-
55		透明细胞癌	+	+
56	淋巴结	弥漫性 B 细胞淋巴瘤	+	-
57		右大腿弥漫性 B-细胞淋巴瘤 (Diffuse B-cell lymphoma of right thigh)	-	-
58		下颌骨 (mandible) 弥散性 B-细胞淋巴瘤	-	-

59		脾脏弥漫性 B-细胞淋巴瘤 (Diffuse B-cell lymphoma of spleen)	-	-
		左锁骨霍奇金淋巴瘤 (Hodgkin's lymphoma of left clavicle)	-	-
61	软组织	胸壁平滑肌肉瘤 (Leiomyosarcoma of chest wall)	-	-
62		左腿胚胎横纹肌肉瘤 (Embryonal rhabdomyosarcoma of left leg)	-	-
63	后腹膜	横纹肌肉瘤	-	-
64		原始神经外胚层肿瘤 (Primitive neuroectodermal tumor)	-	-
[0249]	腹壁	透明细胞肉瘤	+	+
66	后腹膜	成神经细胞瘤 (Neuroblastoma)	-	-
67	腹腔	粘液性脂肪肉瘤 (Mucinous liposarcoma)	-	-
68	骨盆腔	脊索瘤 (Chordoma)	+	+
69	软组织	右下背部神经纤维瘤 (Neurofibroma of right low back)	N.T.	N.T.
70	骨盆腔	右胸壁滑膜肉瘤 (Synovial sarcoma of right chest wall)	-	-
71	骨	右股骨骨肉瘤 (Osteosarcoma of right femur)	-	-
72	腹膜	恶性间皮细胞瘤 (Malignant mesothelioma)	-	-

[0250] [表19]

[0251]

MC964a			orb	253W
1	大脑	星形细胞瘤 (Astrocytoma)	+	-
2		间变性少突胶质细胞瘤 (Anaplastic oligodendroglioma)	-	-
3		恶性室管膜瘤	+	-
4		星形细胞瘤	+	-
5		星形细胞瘤	+	-
6		恶性胶质瘤 (Glioblastoma)	+	+
7	食道	鳞状细胞癌(稀疏)	+	+
8		鳞状细胞癌(稀疏)	+	+
9		鳞状细胞癌	+	+
10	胃	腺癌	-	-
11		腺癌	+	+
12		间质瘤	+	+
13	肝脏	肝细胞癌	+	+
14		胆管瘤 (Cholangioma)	+	+
15		肝母细胞癌	+	+

16	小肠	腺癌	+	+
17		弥漫性 B 细胞淋巴瘤	-	-
18		间质瘤	+	+
19	结肠	腺癌	+	+
20		间质瘤	-	+
21		弥漫性 B 细胞淋巴瘤	-	-
22	直肠	腺癌	+	+
23		间质瘤	+	+
24		间质瘤	+	-
25	胰腺	胰岛细胞癌	+	+
26		腺癌	+	+
27		腺癌	+	+
28	大网膜	转移性腺癌 (Metastatic adenocarcinoma)	+	+
29		转移性无性细胞瘤 (Metastatic dysgerminoma)	-	+
30		间质瘤	-	-
31	肺	小细胞未分化癌 (Small cell undifferentiated carcinoma)	-	-
32		小细胞未分化癌	-	-
33		非典型类癌 (Atypical carcinoid)	+	-
34		鳞状细胞癌	+	+
35		腺癌	+	+
36		鳞状细胞癌	+	+

[0253] [表20]

MC964a			orb	253W
37	子宫颈部	鳞状细胞癌	+	+
38		鳞状细胞癌	+	+
39		鳞状细胞癌	+	+
40	子宫	子宫内膜样腺癌	+	+
41		子宫内膜样腺癌	+	+
42		透明细胞癌	-	+
43	乳房	浸润性小叶癌 (Invasive lobular carcinoma)	+	-
44		浸润性导管癌	-	+
45		叶状囊肉瘤 (Cystosarcoma phyllodes)	-	-
46	卵巢	浆液性腺癌	-	-
47		浆液性腺癌	-	+
48		浆液性腺癌	+	+
49	脾脏	弥漫性 B 细胞淋巴瘤	+	-
50		非滤泡性淋巴瘤 (Diffuse non-Hodgkin's lymphoma)	-	-
51		弥漫性 B 细胞淋巴瘤	+	+
52	前列腺	腺癌(格里森等级:3; 格里森分数:3+4)	+	+
53		腺癌(格里森等级:3; 格里森分数:3+3)	+	+
54		腺癌(格里森等级:3; 格里森分数:2+3)	-	+
55	睾丸	精原细胞瘤伴坏死	-	+
56		弥漫性 B 细胞淋巴瘤	-	-
57		胚胎性癌	+	+
58	肾脏	透明细胞癌	-	+
59		透明细胞癌	-	+
60		肉瘤样癌	-	-
61	膀胱	移行细胞癌	+	+
62		粘液性腺癌	+	+
63		平滑肌肉瘤	+	+

[0256] [表21]

MC964a			orb	253W
[0257]	64	淋巴结	霍奇金氏颈部淋巴瘤	+
	65		霍奇金氏颈部淋巴瘤	-
	66		左腹股沟弥漫性 B 细胞淋巴瘤(Diffuse B-cell lymphoma of left groin)	-
	67		轻度肘关节弥漫性 B 细胞淋巴瘤(Diffuse B-cell lymphoma of light elbow joint)	-
	68	纵隔	纵隔弥漫性 T 细胞淋巴瘤(Diffuse T-cell lymphoma of mediastinum)	-
	69	肠系膜	肠系膜弥漫性 B 细胞淋巴瘤(Diffuse B-cell lymphoma of mesentery)	+

70		左腿骨肉瘤(Osteosarcoma)	+	+
71		右股骨骨肉瘤	-	+
72		右股骨骨肉瘤	-	+
73	骨	帕氏酵母的去分化软骨肉瘤 (Dedifferentiation chondrosarcoma of pars sacralis)	-	-
74		右股骨软骨肉瘤高分化 (Well-differentiated chondrosarcoma of right femur)	+	+
75		帕氏囊的间质软骨肉瘤 (Mesenchymal chondrosarcoma of pars sacralis)	+	-
76	皮肤	面颊鳞状细胞癌	+	+
77	舌	唇部鳞状细胞癌	+	+
78	鼻	鼻鳞状细胞癌	+	+
79	舌	咽部鳞状细胞癌	+	+
80	喉头	喉鳞状细胞癌	+	+
81		喉鳞状细胞癌	+	+
82	咽喉	咽部弥漫性 B 细胞淋巴瘤	-	-
83	喉头	喉鳞状细胞癌	+	+
84	鼻	鼻咽鳞状细胞癌	-	-
85	舌	鳞状细胞癌	+	+
86		胚胎性横纹肌肉瘤	-	+
87		粘液表皮样癌	+	+
88	脂肪组织	左腿粘液性脂肪肉瘤 (Mucoid liposarcoma of left leg)	+	+
89	纤维组织	胸壁孤立性纤维瘤 (Isolated fibroma of chest wall)	-	-
90		左前臂纤维肉瘤 (Fibrosarcoma of left forearm)	+	+
91	甲状腺	髓样癌	+	+
92		乳头状癌	+	+
93		弥漫性 B 细胞淋巴瘤	-	-
94	皮肤	肛门边缘恶性黑色素瘤 (Malignant melanoma of anus margin)	+	+
95		头皮基底细胞癌 (Basal cell carcinoma of scalp)	-	-
96		左胸壁鳞状细胞癌 (Squamous cell carcinoma of left chest wall)	+	+

[0258]

[实施例9]

[0260] 测量从血液中分离出的外泌体中的CNGB3量，并检查CNGB3高表达疾病患者是否可

以与CNGB3高表达疾病的非发病者区分开。另外，随后的实验是在浜松医科大学制度审查委员会的批准下进行的。

[0261] <血清样品>

[0262] 离心分离从健康者(未患肿瘤，未发现罹患任何疾病，通常认为是健康的人)2名及浜松医科大学大学医院的患者(卵巢癌患者3名、子宫体癌患者3名、乳腺癌患者3名、宫颈癌患者1名、大肠癌患者2名、子宫内膜异位症患者3名以及子宫腺肌症患者1名)采集的血液，将得到的血清等分试样在-80℃下保存。子宫腺肌瘤患者为发病子宫内膜异位症和子宫肌瘤两者的患者。

[0263] <外泌体分离>

[0264] 外泌体使用Exosome Isolation Kit(富士胶片・和光纯药公司制品)，根据制造厂家的使用说明书从血清中单离。具体地，首先，将血清以 $1,000 \times g$ 、在4℃下离心分离20分钟，并回收上清液。回收的上清液以 $10,000 \times g$ 、在4℃下离心分离30分钟，并将上清液转移到新管中。接着，将1.0mL的该上清液与外泌体捕获珠在4℃下用旋转器混合180分钟。之后，将该捕获珠洗涤后，用100μL的洗脱缓冲液洗脱外泌体，在-20℃下保存。

[0265] <肽合成>

[0266] 作为使生物素结合到Z13肽(VRRADNRPG:序列号3)的生物素化Z13肽(由L-氨基酸组成的肽)，使用GenScript公司合成的生物素化Z13肽。

[0267] <抗生物素蛋白印迹(Avidin blotting)>

[0268] 将从800μL的血清中单离出的外泌体与浓缩Laemmli缓冲液混合，制备测量样品。通过SDS-PAGE分离该测量样品，接着转移到PVDF膜上。在室温下，将PVDF膜在含有5%牛血清蛋白(bull serum albumin, BSA)的TBST(0.1v/v% Tween-20)中封闭60分钟。封闭后的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜在洗涤后，于4℃下在含有1.0μg/mL生物素化Z13肽的TBST中孵育过夜。之后，将该膜用TBST洗涤，接着在含有0.1μg/mL HRP(辣根过氧化物酶)结合抗生物素蛋白(Thermo Fisher Scientific公司制品)的TBST中于室温下孵育60分钟。使用CCD相机系统(ATTO公司制品)和ECL prime(GE Healthcare公司制品)检测该膜上的CNGB3。使用图像分析软件“CS Analyzer 4”(ATTO公司制品)，进行光密度分析。

[0269] <统计分析>

[0270] 所有分析均使用医学统计软件“GraphPad Prism 6”(GraphPad Software公司制品)来进行。

[0271] 表22示出了通过各测量样品的抗生物素蛋白印迹的结果获得的CNGB3的条带的信号强度以及其相对值(以健康者1的信号强度为1的相对值)。但是，由于乳腺癌患者1和2仅能获得少量血清，因此使用从100μL的血清中单离出的外泌体，乳腺癌患者3使用从37.5μL的血清中单离出的外泌体。因此，乳腺癌患者样品的信号强度通过乘以血清使用量的倒数来进行校正。

[0272] [表22]

被检者样本	信号强度	相对信号强度
健康者1	1082305	1.00
健康者2	1188517	1.10
卵巢癌患者1	4377691	4.04

卵巢癌患者2	3907260	3.61
卵巢癌患者3	3620987	3.35
子宫体癌患者1	2681313	2.48
子宫体癌患者2	2939504	2.72
子宫体癌患者3	14049406	12.98
乳腺癌患者1	18864576	17.43
乳腺癌患者2	41851784	38.67
乳腺癌患者3	20114133	18.58
宫颈癌患者1	3480924	3.22
大肠癌患者1	6057912	5.60
大肠癌患者2	2285673	2.11
子宫内膜异位症患者1	13117100	12.75
子宫内膜异位症患者2	4358049	4.24
子宫内膜异位症患者3	3454806	3.36
子宫腺肌症患者1	5835780	5.67

[0274] 其结果,在所有样品中检测到CNGB3的条带,并且发现在这些外泌体中含有CNGB3。从癌症患者、子宫内膜异位症患者以及子宫腺肌症患者分离出的外泌体的CNGB3量,是从健康者分离出的外泌体的两倍以上。从这些结果可知,从肿瘤患者、子宫内膜异位症患者、以及子宫腺肌症患者这样的、病源细胞中CNGB3高表达的患者的血清中分离出的外泌体,比从健康者的血清中分离出的外泌体,明显含有更多的CNGB3,因此,通过设定适当的参考值(临界值),可以基于外泌体中的CNGB3量来评估CNGB3高表达疾病的发病可能性。

[0275] 此外,在健康者的外泌体中虽然非常少量,但也发现了CNGB3的存在。推测这是因为,通过使用CNGB3结合肽之类的与CNGB3的结合性高的分子,可以非常高灵敏度地检测血清中的外泌体的CNGB3。由于可以检测出含有从健康者体内的极微量的癌细胞中释放出来的CNGB3的外泌体,通过利用CNGB3结合肽,即使以血清中的外泌体作为检体,也能够期待不仅可以检测出晚期癌,而且还可以非常早期地检测出癌症。

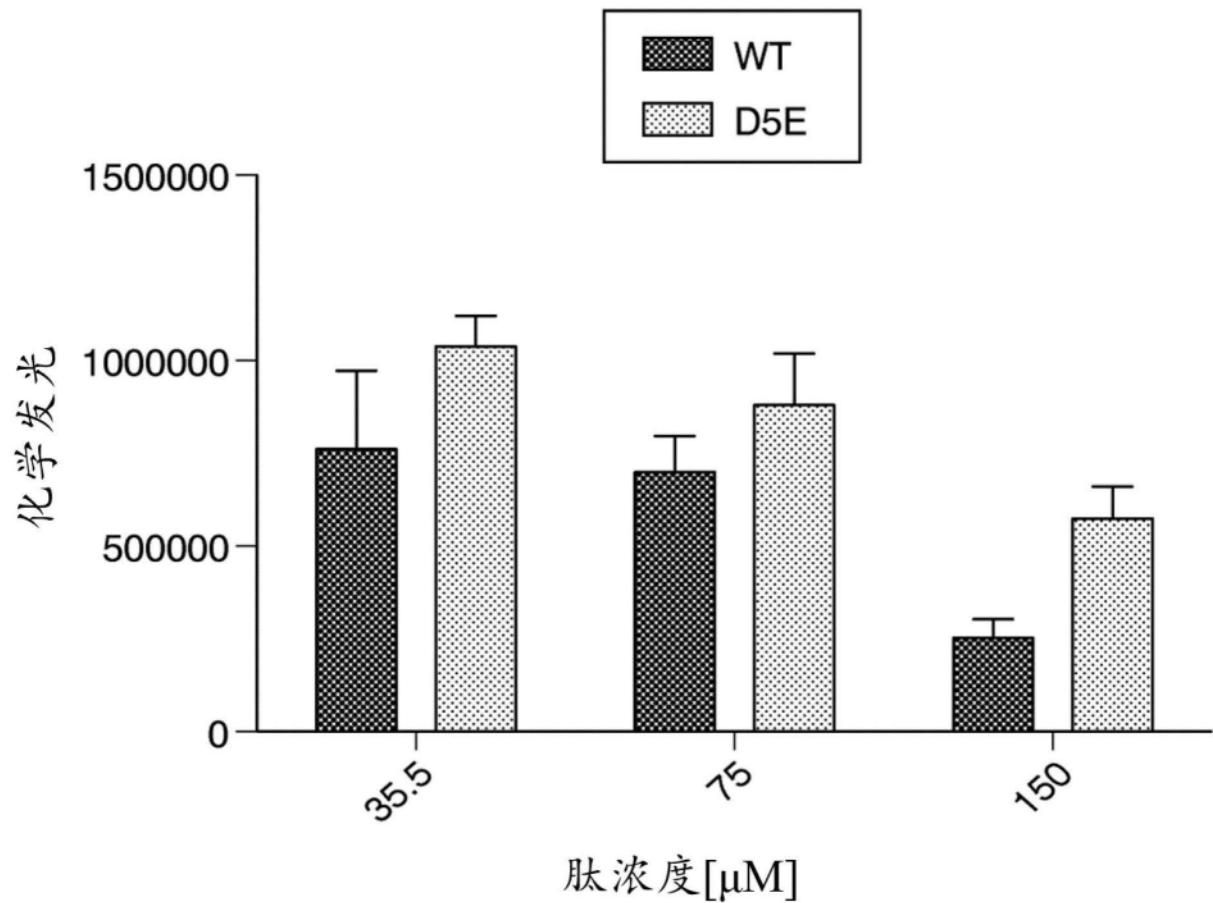


图1

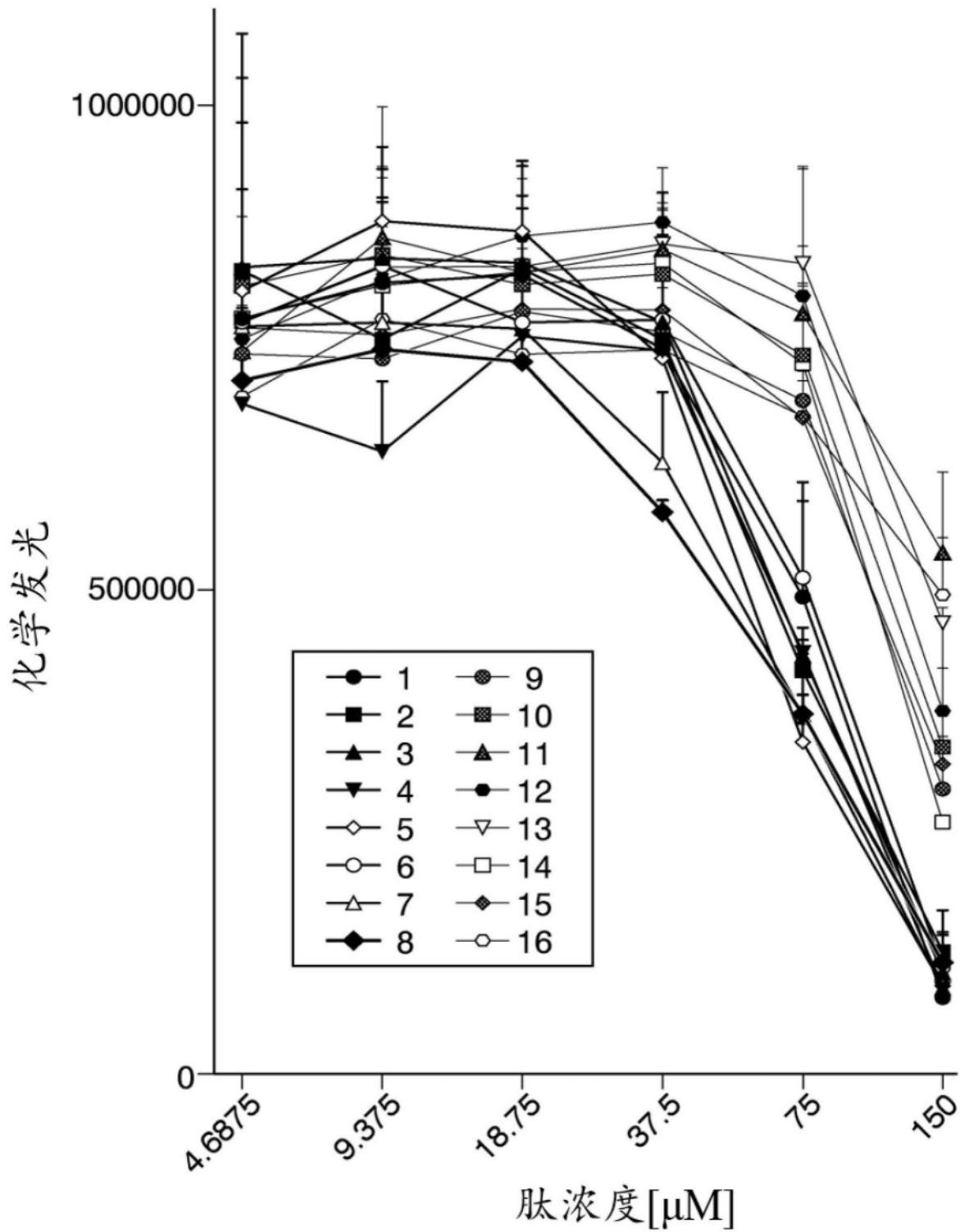


图2

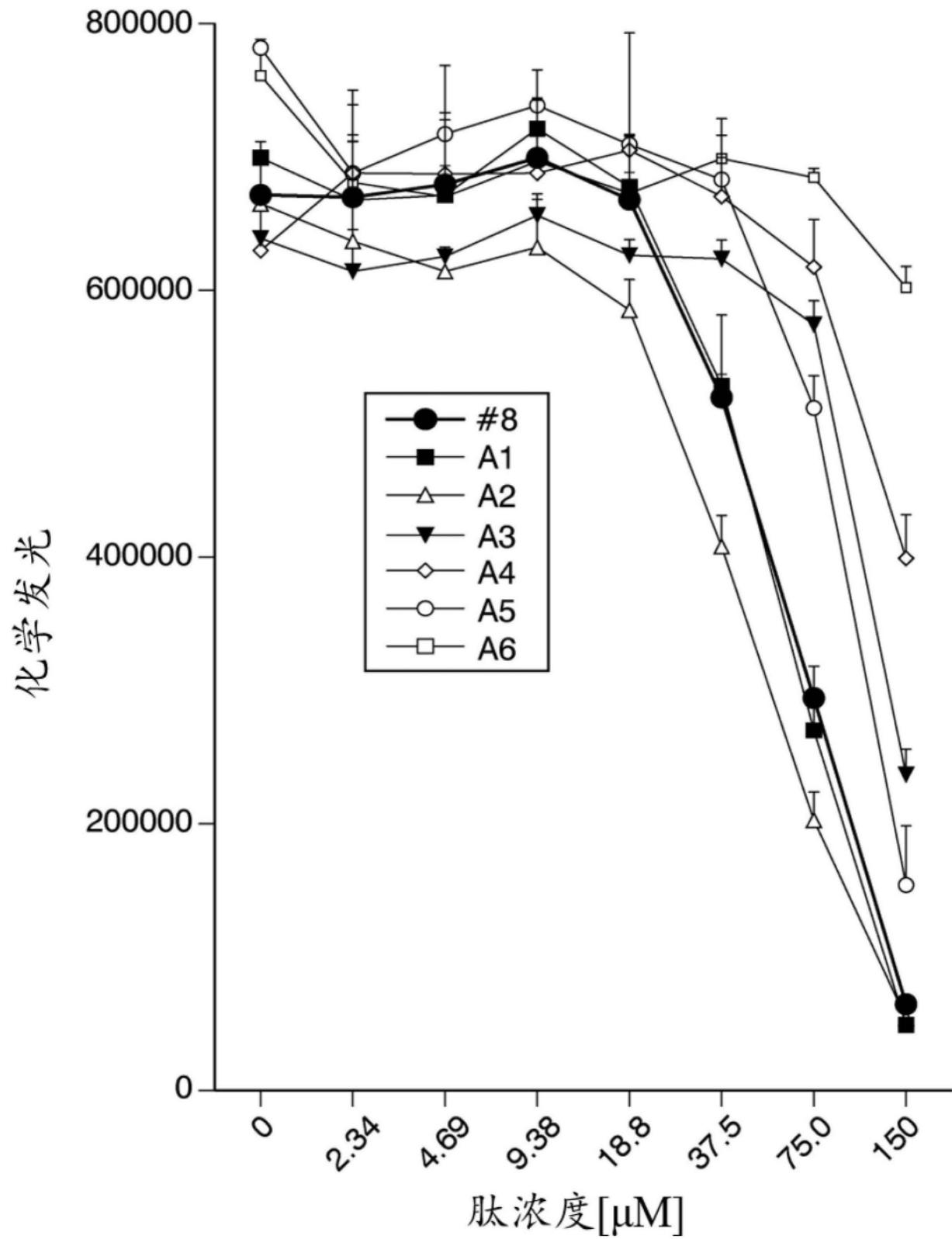


图3

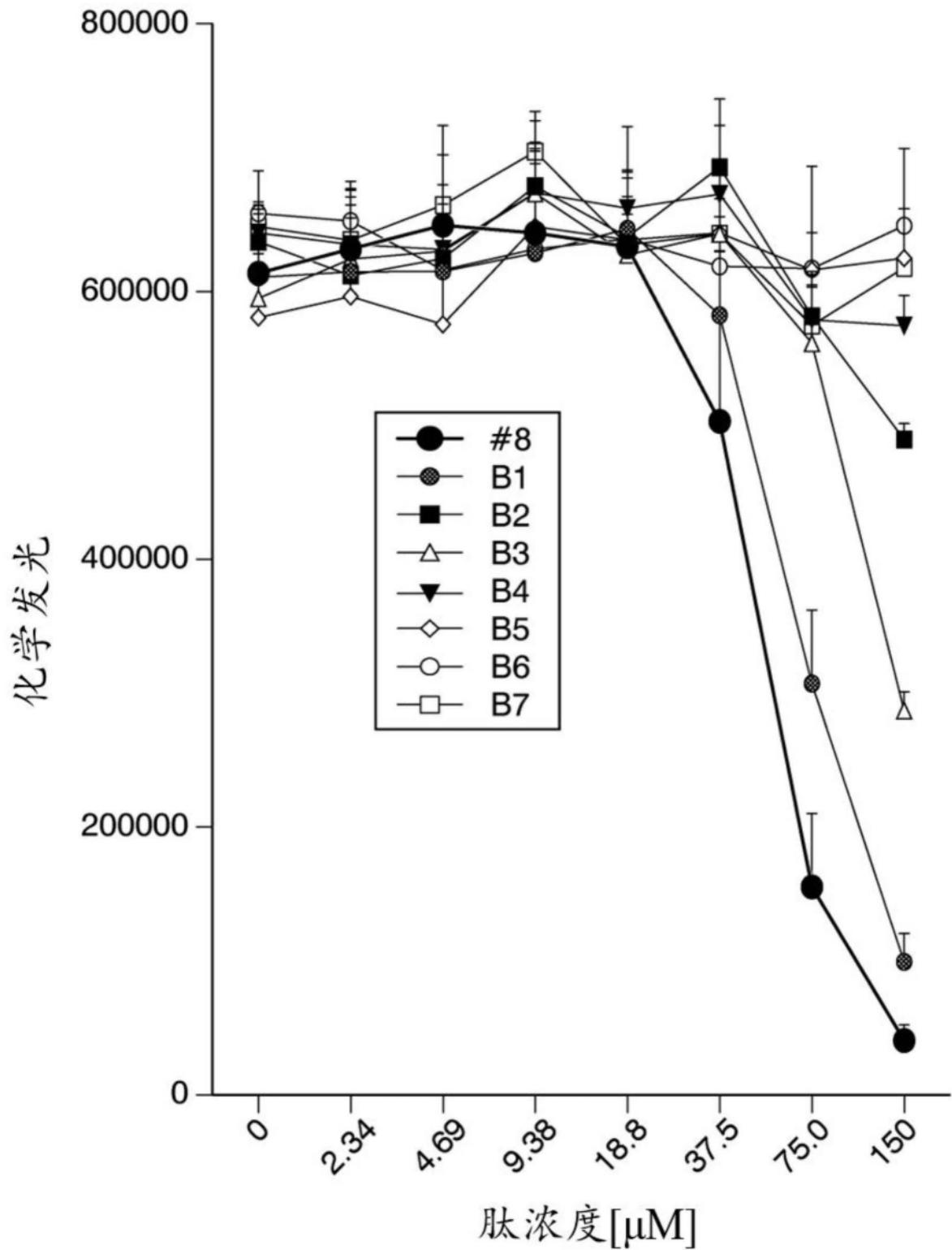


图4

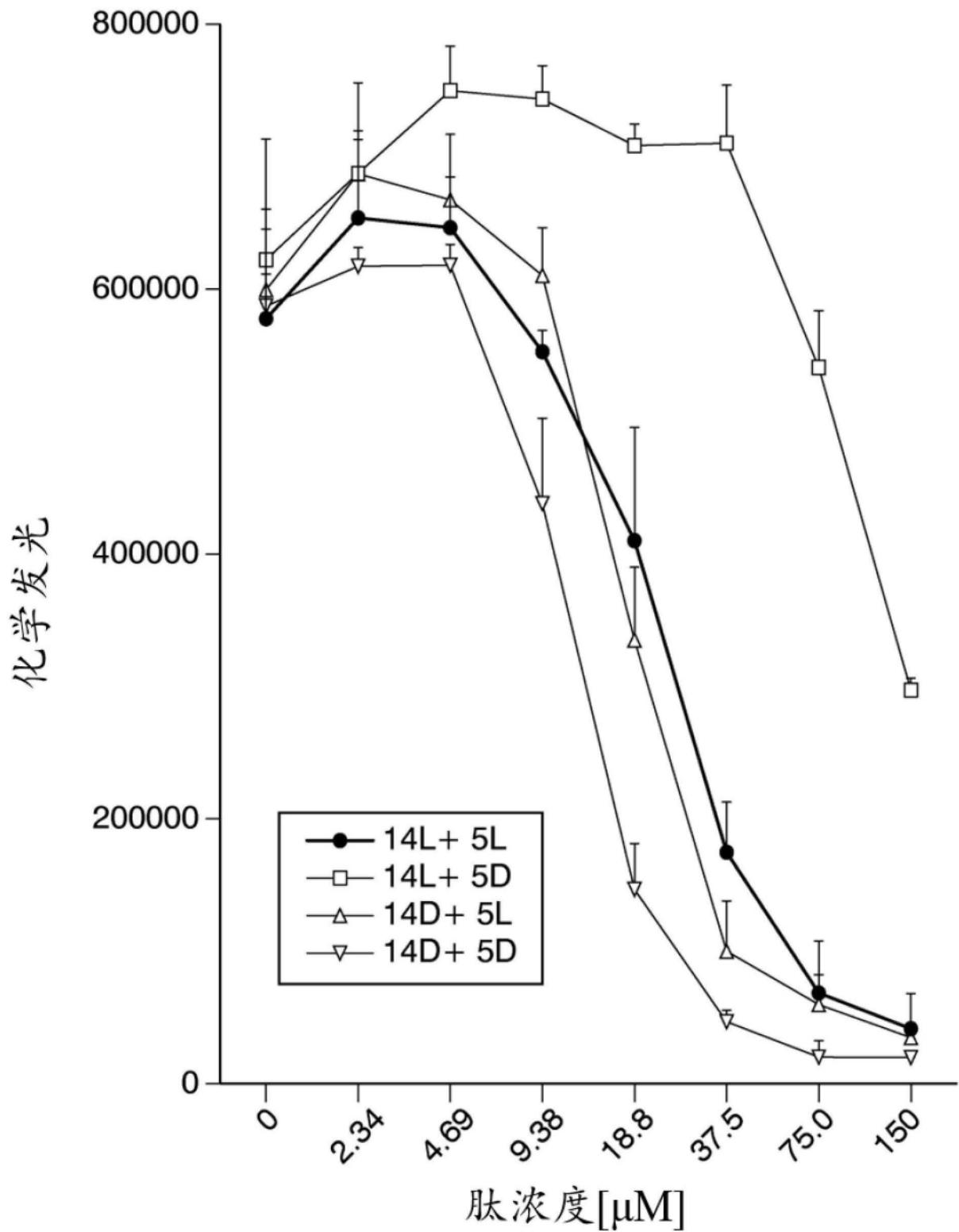


图5

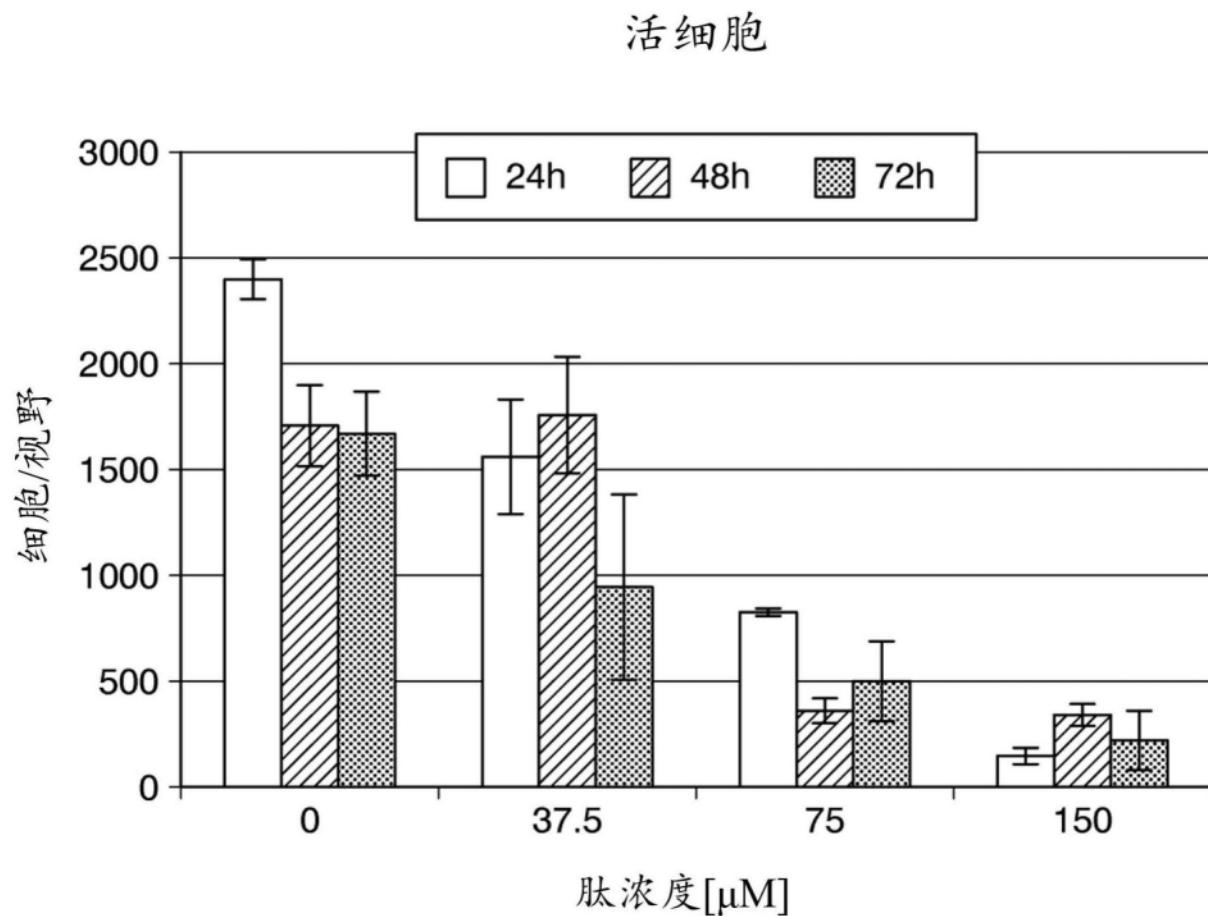


图6

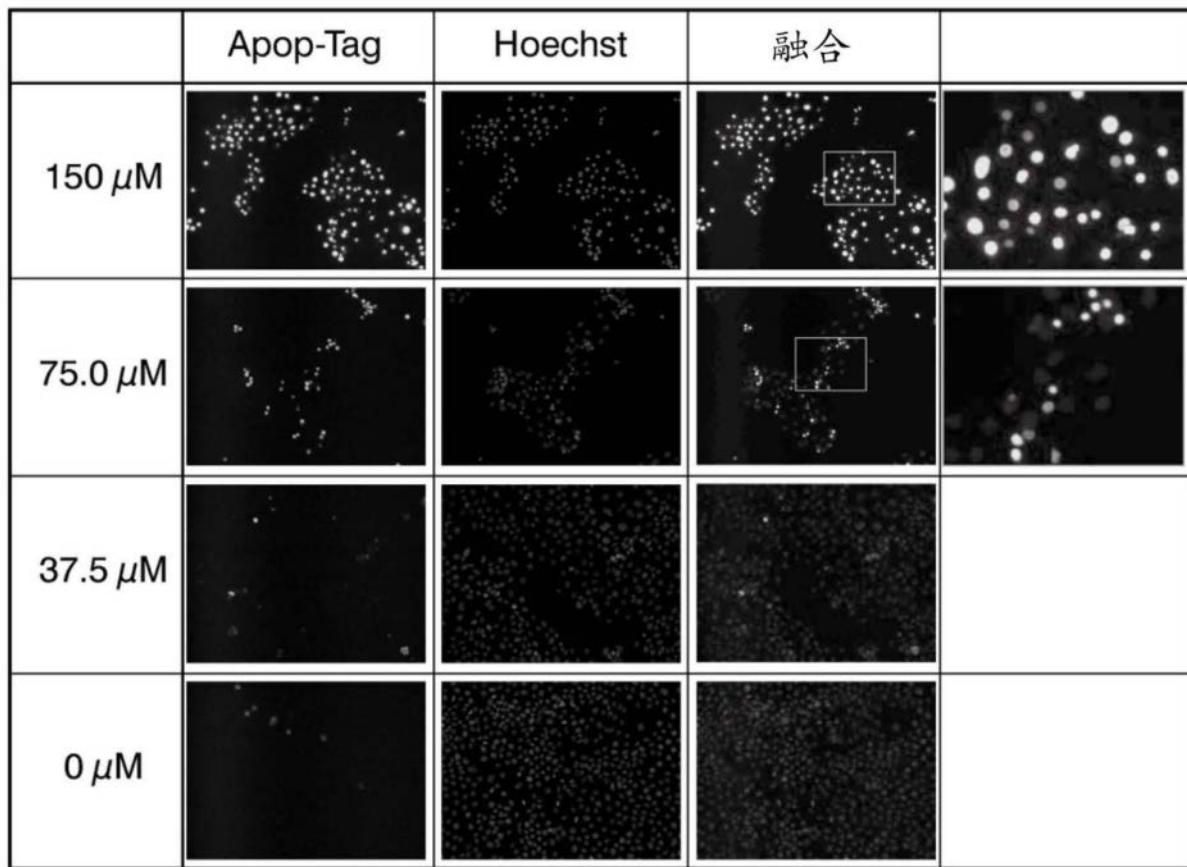


图7

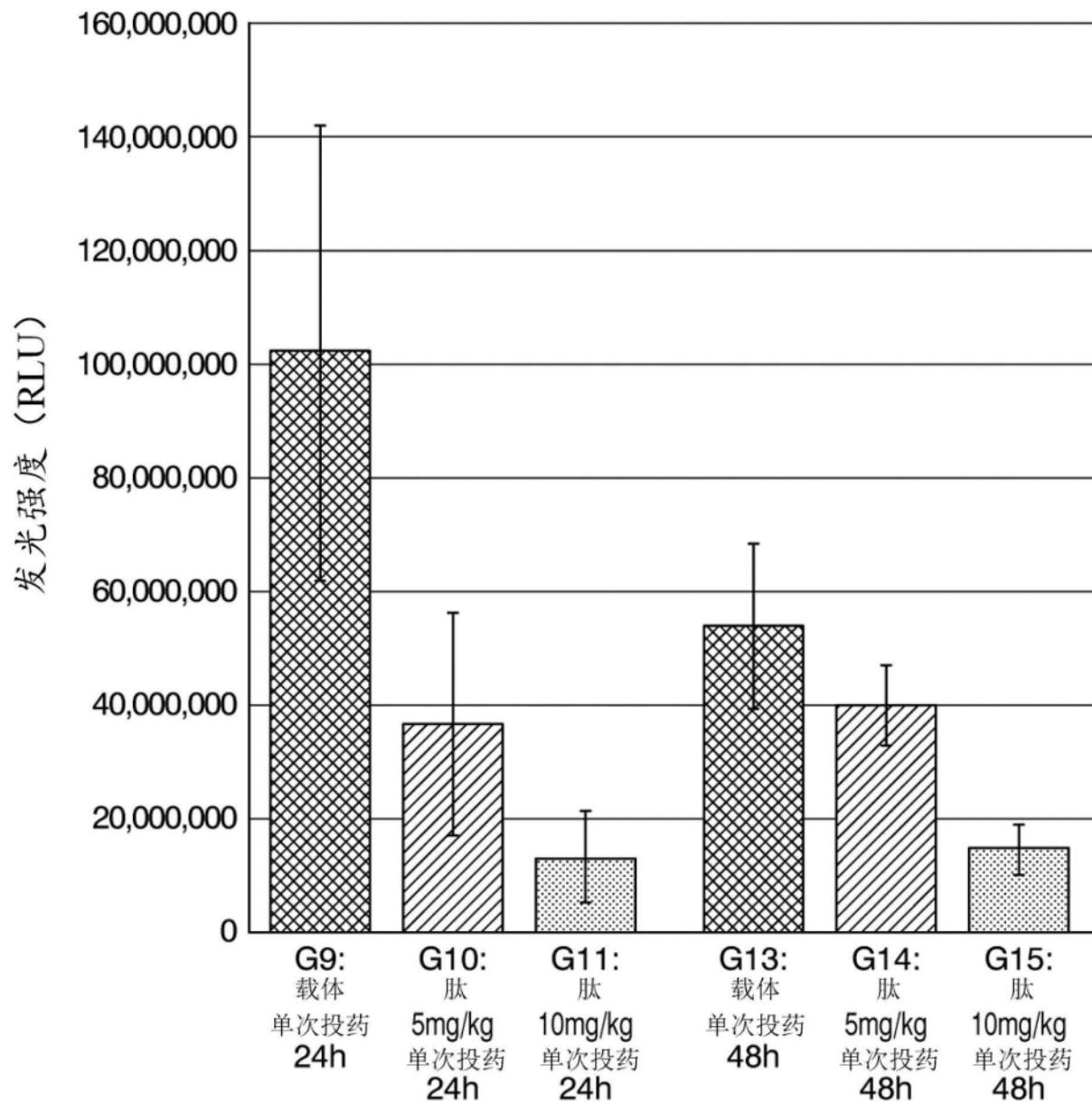


图8

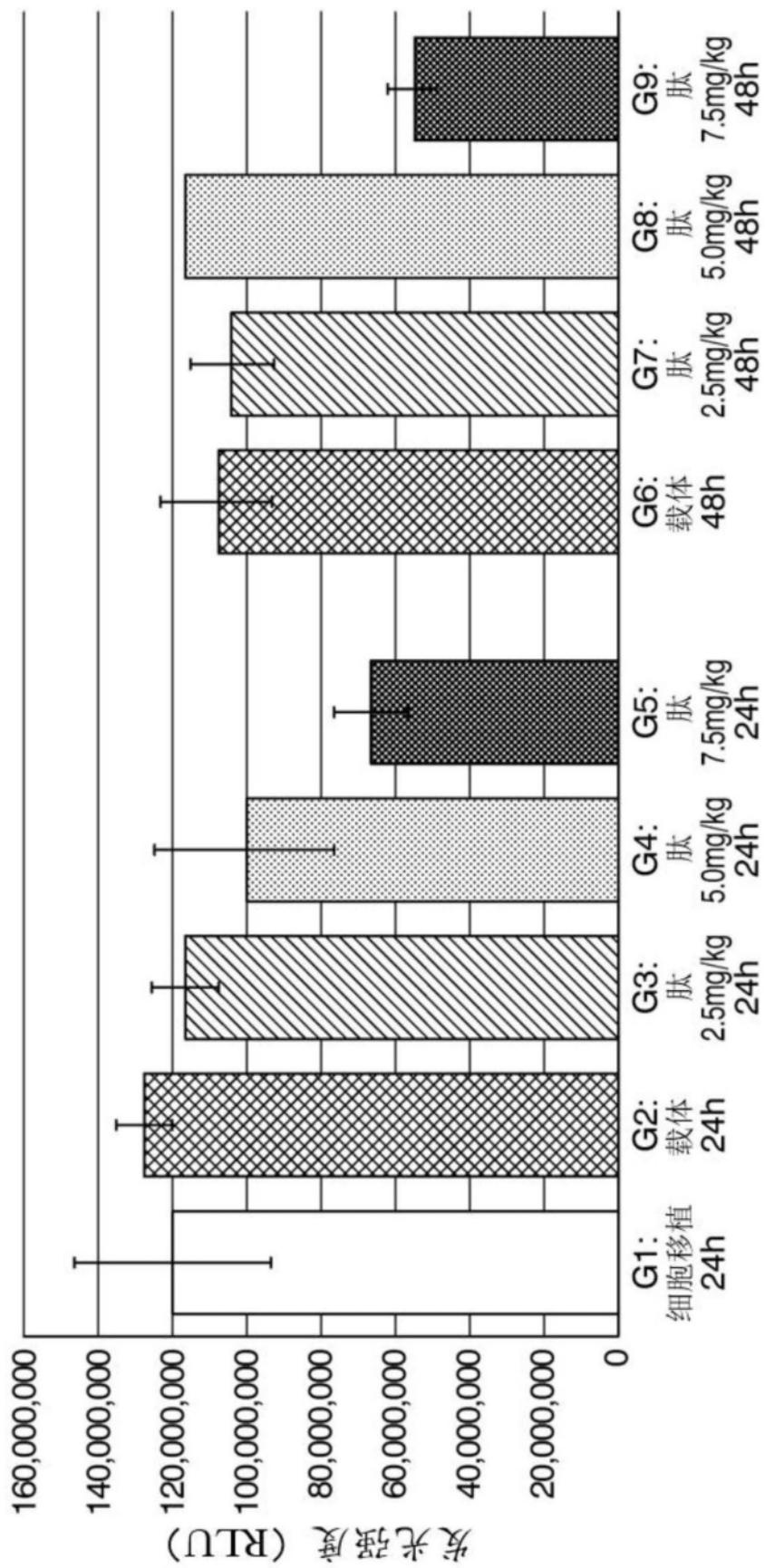


图9

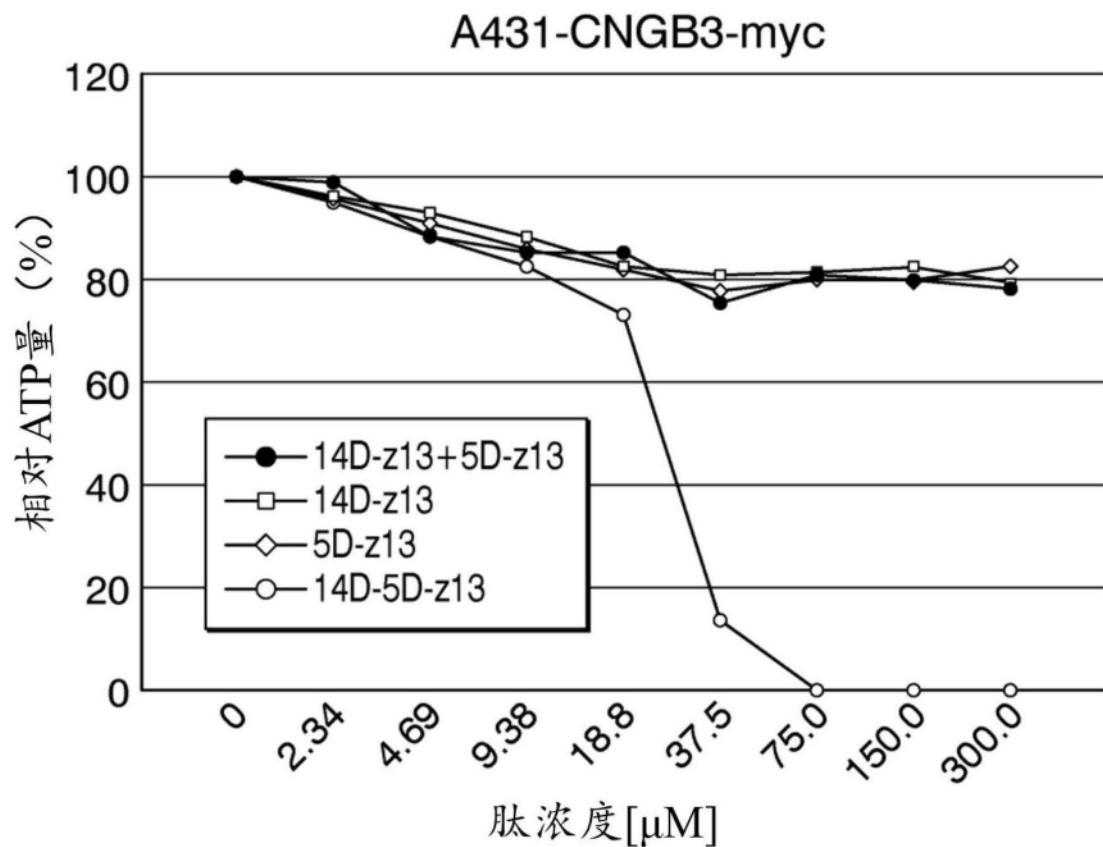


图10

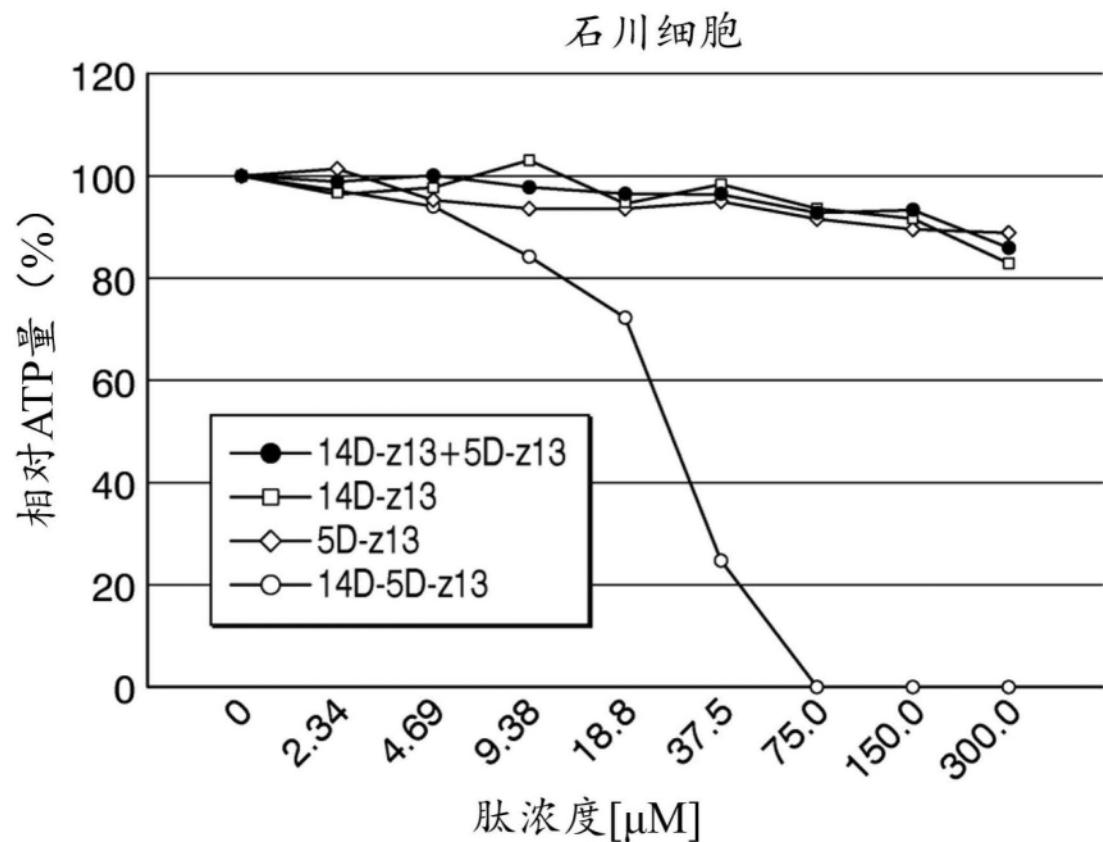


图11

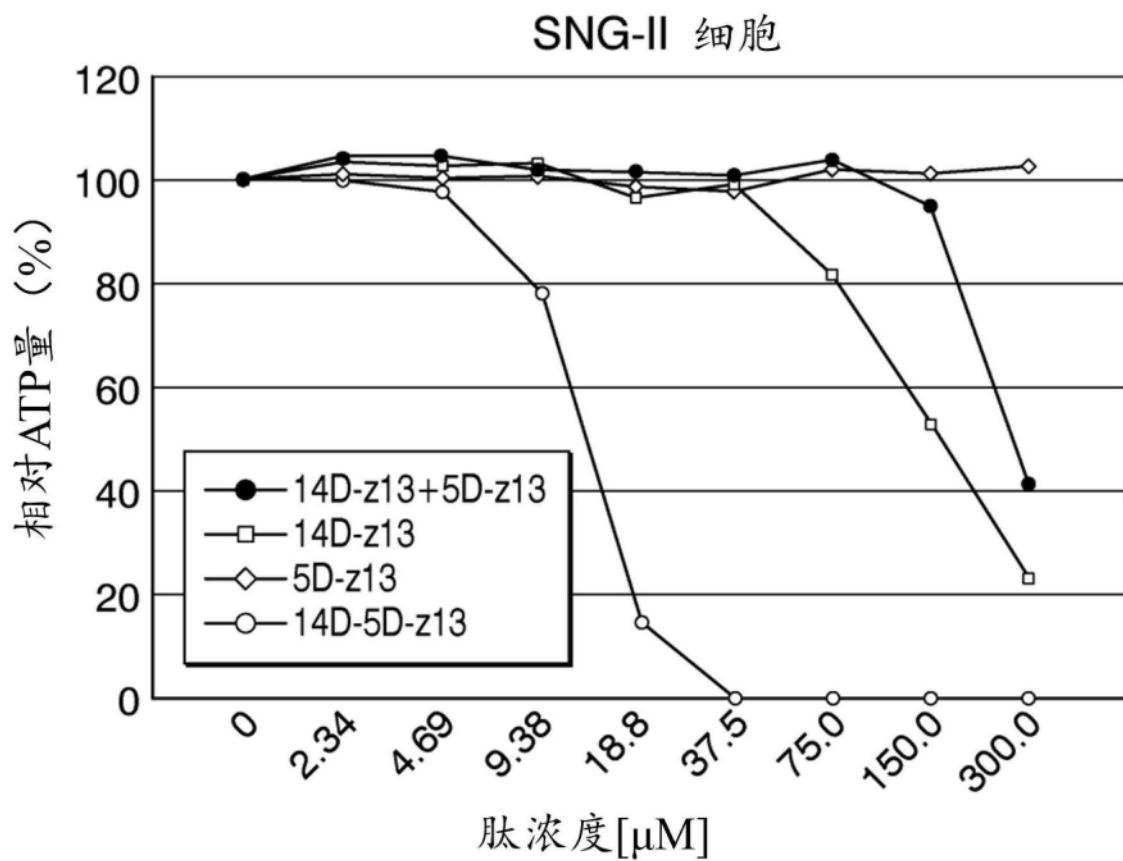


图12

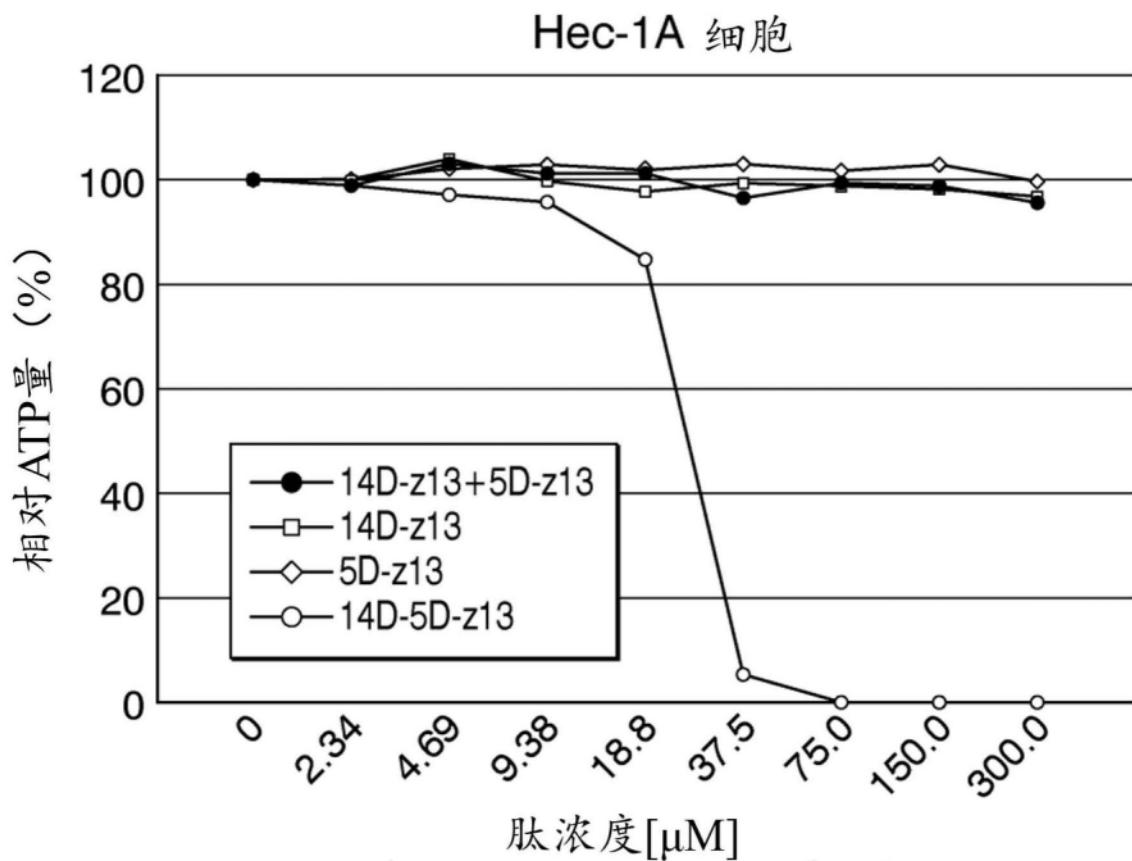


图13

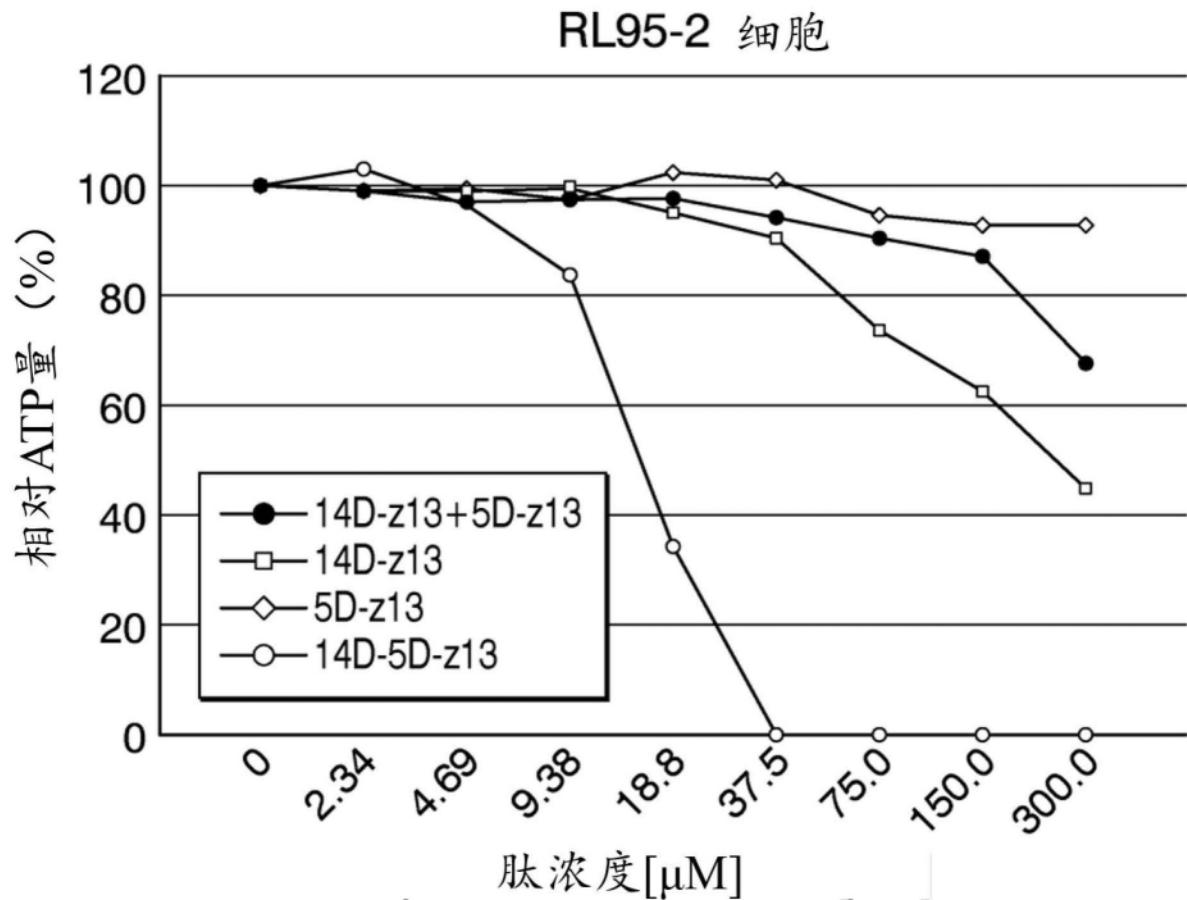


图14

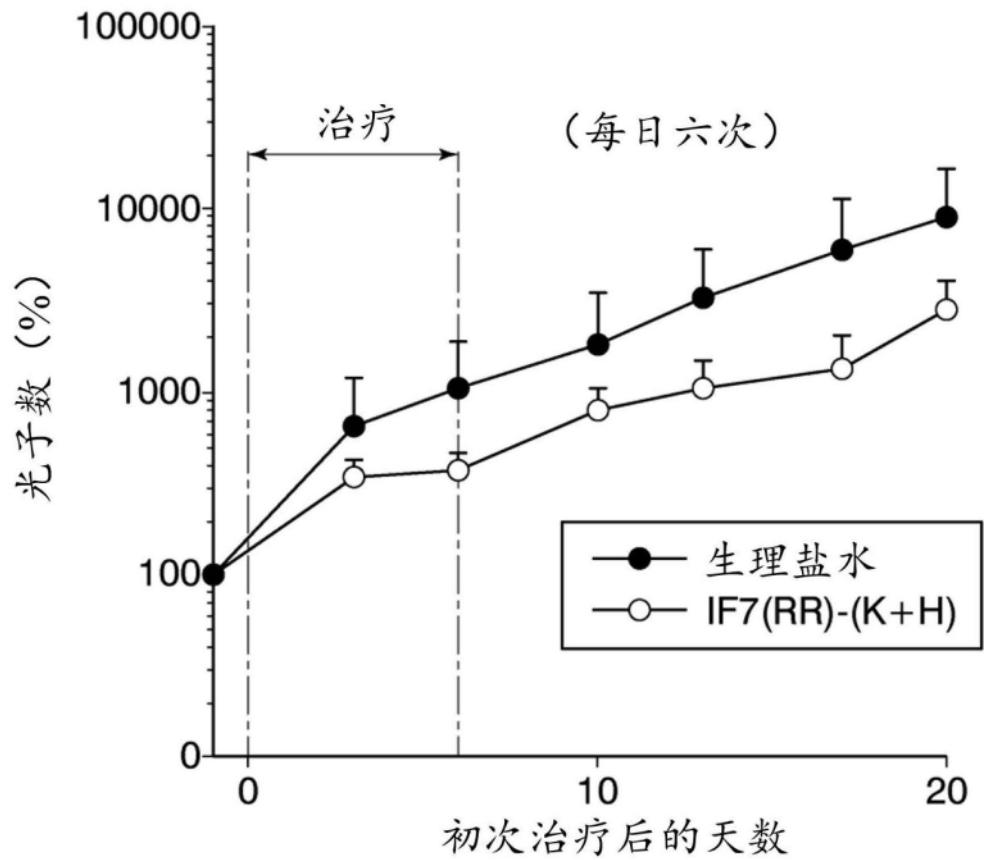


图15

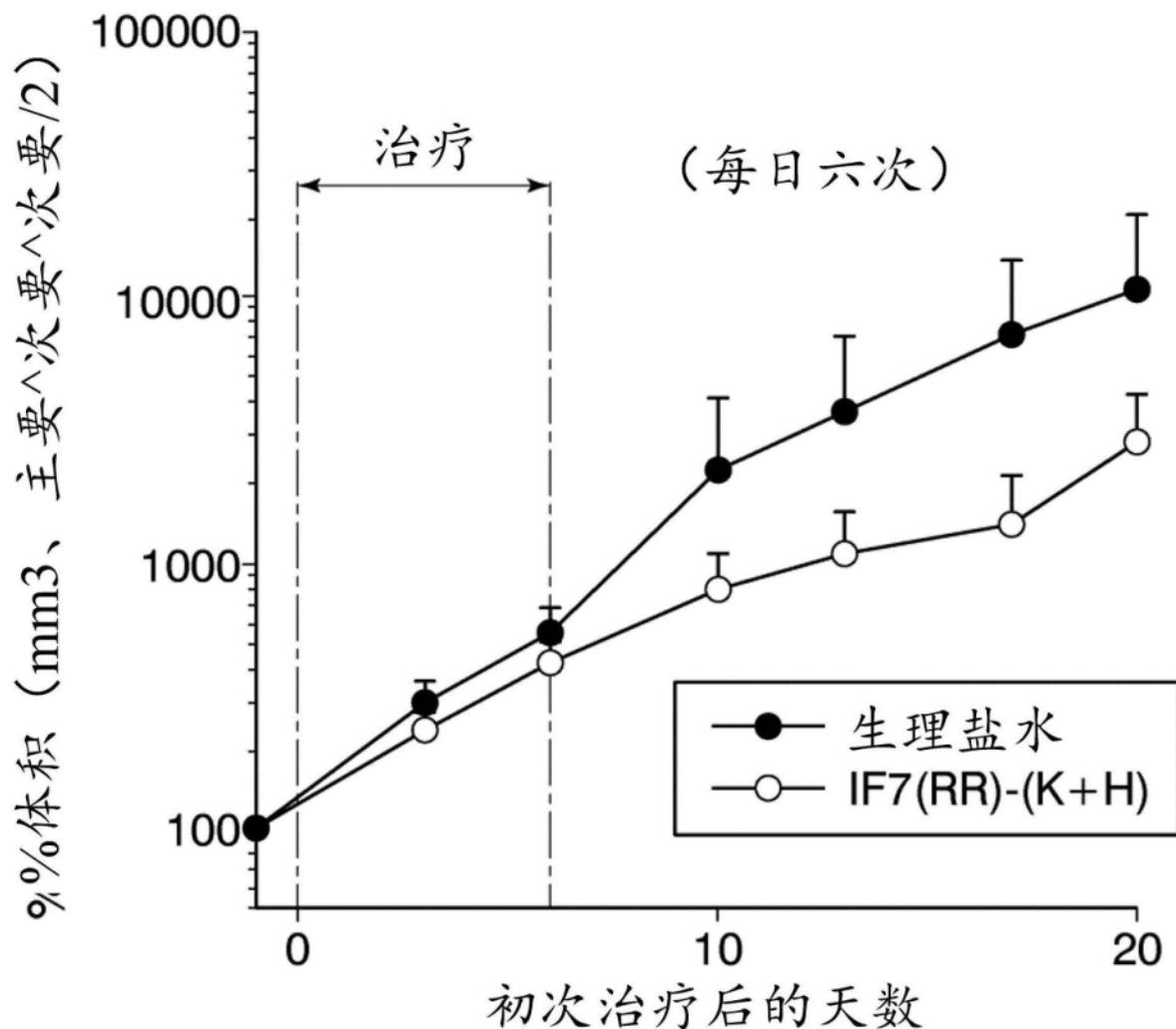


图16