



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119101741 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 10

(21) 申请号 202410984971.8

A61P 35/04 (2006.01)

(22) 申请日 2024.07.22

(71) 申请人 南方医科大学南方医院

地址 510515 广东省广州市白云区广州大道北1838号

(72) 发明人 王玮 林水苗 曾钦 褚帅

(74) 专利代理机构 北京惟专知识产权代理事务所(普通合伙) 16074

专利代理师 赵星

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页 附图6页

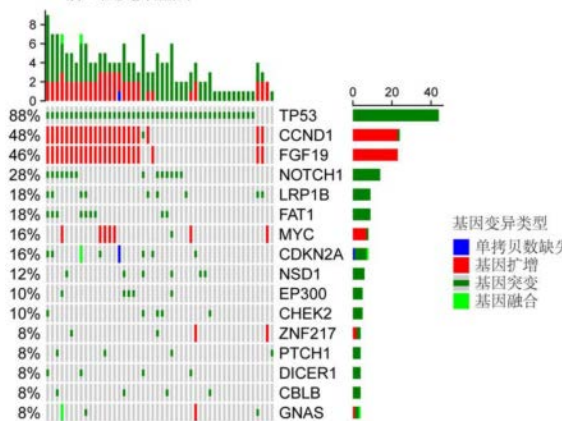
(54) 发明名称

FGF19扩增用于评价和/或预测食管癌患者对放疗的敏感性的用途

(57) 摘要

本发明涉及FGF19扩增作为生物标志物用于评价和/或预测食管癌细胞或食管癌患者对放疗的敏感性的用途。具体而言,本发明涉及检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂在制备用于评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性的试剂盒中的用途。本发明还涉及一种用于评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性的试剂盒。

前16位变异基因



1. 用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂在制备用于评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性的试剂盒中的用途,其中与对照相比,FGF19基因的表达水平升高和/或拷贝数扩增指示所述食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性降低。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂包括与FGF19基因编码的蛋白或蛋白片段结合的结合剂,或与FGF19基因或其mRNA杂交或扩增FGF19基因或其mRNA的物质。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述与FGF19基因编码的蛋白或蛋白片段结合的结合剂为抗FGF19的抗体。

4. 根据权利要求2所述的用途,其中所述与FGF19基因或其mRNA杂交或扩增FGF19基因或其mRNA的物质为探针或寡核苷酸引物。

5. 一种用于评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性的试剂盒,其中所述试剂盒包含用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其中所述用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂包括与FGF19基因编码的蛋白或蛋白片段结合的结合剂,或与FGF19基因或其mRNA杂交或扩增FGF19基因或其mRNA的物质。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中所述与FGF19基因编码的蛋白或蛋白片段结合的结合剂为抗FGF19的抗体。

8. 根据权利要求6所述的试剂盒,其中所述与FGF19基因或其mRNA杂交或扩增FGF19基因或其mRNA的物质为寡核苷酸引物或探针。

9. 安罗替尼在制备用于提高FGF19基因扩增的食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性的药物中的用途。

10. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途或根据权利要求5-8中任一项所述的试剂盒或根据权利要求9所述的用途,其中所述食管癌为食管鳞癌或食管腺癌。

11. 根据权利要求1-4中任一项所述的用途或根据权利要求5-8中任一项所述的试剂盒或根据权利要求9所述的用途,其中所述食管癌选自复发性食管癌、转移性食管癌、复发转移性食管癌和晚期转移性食管。

## FGF19扩增用于评价和/或预测食管癌患者对放疗的敏感性的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基于生物标志物来评价和/或预测食管癌细胞或食管癌患者对放疗的敏感性。具体而言,本发明涉及基于基因标志物或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂来评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性。

### 背景技术

[0002] 目前针对食管癌的临床干预措施主要包括手术、放疗、化疗和药物治疗。放疗在食管癌综合治疗中占据重要地位,可手术食管癌患者,目前新辅助放化疗后手术已经是被广泛认可的标准治疗方案;不可手术的食管癌患者,同步放化疗是唯一可能获得根治机会的治疗方案;术后的患者有辅助放疗指征的,在接受放射治疗后可提高患者的局部控制率和生存率;晚期转移性食管癌患者,放疗可以改善患者的局部症状、提高生活质量、改善生存。然而,在接受放射治疗的食管癌患者中,有40%-60%的患者会出现肿瘤残留或复发。

[0003] 因此,增强食管癌患者的放疗敏感性、改善放疗疗效,是临床迫切需要解决的问题。

### 发明内容

[0004] 为解决现有技术的不足,本申请发明人基于临床食管癌患者基因测序结果筛选食管癌治疗新靶点;通过食管癌基因测序数据筛选出合适的变异基因FGF19。然后,本申请发明人通过数据库分析食管癌中FGF19基因特征及对预后的影响,分析FGF19可能具有作为靶点的潜力。最后,本申请发明人通过体内外实验发现FGF19扩增导致食管癌细胞对放疗抵抗。基于此,本申请发明人发现,FGF19能够作为临床评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性降低的关键生物标志物,具有较大的临床医学转化价值。

[0005] 本发明总体上关于FGF19扩增作为生物标志物来评价和/或预测食管癌细胞或食管癌患者对放疗的敏感性的用途。

[0006] 在一方面,本发明涉及用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂在制备用于评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性的试剂盒中的用途,其中与对照相比,FGF19基因的表达水平升高和/或拷贝数扩增指示食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性降低。

[0007] 如下文定义部分所详细说明,本领域技术人员能够理解对照的含义以及了解如何设置对照。例如对照可以是FGF19基因无扩增的健康的食管细胞,或者与FGF19基因扩增无关的患病细胞,例如保持了对氟尿嘧啶化疗的敏感性不下降的患病前期的食管癌细胞或患有食管癌的患者。

[0008] 本文所称的FGF19扩增与FGF19基因扩增具有相同的含义,涵盖FGF19基因拷贝数扩增和表达水平升高等。本领域技术人员也了解如何判断“升高”和/或“扩增”,如下文定义部分所详细说明,所述升高和/或扩增是统计学显著的,例如至少约1.1、1.25、1.5、2、3、4、

5、6、7、8、9或10倍或更多倍的升高和/或扩增,例如拷贝数扩增。

[0009] 并且,根据FGF19基因序列(NM\_005117)或者相应的mRNA和蛋白质序列,设计或选择用于检测FGF19基因扩增的寡核苷酸探针、引物或抗体以及用于实施该检测的其他试剂和方法,在本领域技术人员的技术范围内。

[0010] 在一些实施方案中,所述用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂包括与FGF19基因编码的蛋白或蛋白片段结合的结合剂,或与FGF19基因或其mRNA杂交或扩增FGF19基因或其mRNA的物质。

[0011] 在一些实施方案中,所述与FGF19基因编码的蛋白或蛋白片段结合的结合剂为抗FGF19的抗体。

[0012] 在一些实施方案中,所述与FGF19基因或其mRNA杂交或扩增FGF19基因或其mRNA的物质包括或为探针或寡核苷酸引物。

[0013] 基于本发明的教导,本领域技术人员还可以选择其他任何能够实现检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的技术手段和试剂。

[0014] 在另一方面,本发明涉及一种用于评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性的试剂盒,其中所述试剂盒包含用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂。

[0015] 在一些实施方案中,所述用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂包括与FGF19基因编码的蛋白或蛋白片段结合的结合剂,或与FGF19基因或其mRNA杂交或扩增FGF19基因或其mRNA的物质。

[0016] 在一些实施方案中,所述与FGF19基因编码的蛋白或蛋白片段结合的结合剂为抗FGF19的抗体。本领域技术人员可以根据检测目的和实际情况,合理确定任何能够实现检测目的抗FGF19的抗体,例如单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体等或其抗体片段;所述抗体可以是鼠源性抗体、人源性抗体等。

[0017] 在一些实施方案中,所述与FGF19基因或其mRNA杂交或扩增FGF19基因或其mRNA的物质包括或为探针或寡核苷酸引物。

[0018] 在一些实施方案中,所述食管癌为食管鳞癌或食管腺癌。

[0019] 在一些实施方案中,所述食管癌为食管鳞癌。

[0020] 在一些实施方案中,所述食管癌选自复发性食管癌、转移性食管癌、复发转移性食管癌和晚期转移性食管。

[0021] 在又一方面,本发明涉及一种用于评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性的方法,其包括以下步骤:

[0022] (1) 获取受试者的生物样品;和

[0023] (2) 检测所述样品的FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的表达水平和/或拷贝数;

[0024] 其中与对照相比,FGF19基因的表达水平升高和/或拷贝数扩增指示食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性降低。

[0025] 在一个实施方案中,所述生物样品为ctDNA、肿瘤组织、肿瘤循环细胞或人体其它来源的组织。

[0026] 在本领域技术人员能够根据检测目的和实际情况,合理选择和确定适合的检测技

术。适用于不同的检测目标,检测技术可以包括但不限于基因测序、PCR、FISH、免疫组化、ELISA、Western或流式细胞技术。

[0027] 由下文实施例部分所表明,

[0028] 安罗替尼能够逆转FGF19基因的表达水平升高和/或拷贝数扩增导致的食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性降低。由此,在根据本发明的再一个方面中,本发明涉及一种安罗替尼制备用于提高(与对照相比)FGF19基因扩增(包括FGF19基因表达水平升高和/或拷贝数扩增)的食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性的药物的用途。

## 附图说明

[0029] 图1:对50例食管癌患者进行基因测序的结果,其显示排在前16位的基因变异及变异频数。其中显示FGF19基因在食管癌中的变异类型为基因扩增,排在第3位。

[0030] 图2:数据库分析FGF19相关特征。A. cBioPortal网站分析食管癌数据集FGF19基因扩增占比;B. GeneMANIA数据库分析与FGF19相关的20个基因;C. STRING数据库分析与FGF19相关的10个蛋白;D. 针对FGF19+20相关基因进行KEGG通路富集分析;E. 针对FGF19+10相关蛋白进行KEGG通路富集分析。

[0031] 图3:FGF19在食管癌组织和正常组织中差异表达。A. TCGA泛癌种分析显示FGF19在多种癌症组织中高表达;B. FGF19在食管癌组织中显著高表达;C. 使用TCGA数据库绘制的FGF19表达预测食管癌肿瘤组织ROC曲线图(AUC=0.788);D. 使用TCGA+GTEx数据库绘制的FGF19表达预测食管癌肿瘤组织ROC曲线图(AUC=0.914)。

[0032] 图4:成功构建包含FGF19基因扩增的食管癌细胞株。A. qPCR实验及蛋白免疫印迹实验验证FGF19扩增食管癌细胞构建成功(分别为KYSE-410FGF19AM和KYSE-510FGF19AM);B. FGF19扩增促进食管癌细胞增殖。其中对照组为对应的空载食管癌细胞株(KYSE-410CON和KYSE-510CON)。

[0033] 图5:FGF19扩增导致食管癌细胞放疗敏感性显著下降。

[0034] 图6:安罗替尼增强FGF19扩增食管癌细胞的放疗敏感性。

[0035] 图7:FGF19扩增降低食管癌细胞放疗敏感性的信号通路的探索。A. FGF19扩增食管癌细胞通过FGF19-FGFR4信号活化下游的ERK信号通路导致放疗敏感性下降;B. FGF19扩增食管癌细胞不是通过Wnt信号通路降低放疗敏感性,但抑制Wnt信号通路可以增强食管癌细胞的放疗敏感性(LGK974是一种Wnt通路抑制剂)。

[0036] 图8:显示放疗(4Gy)以及在安罗替尼(2 $\mu$ M)或FGF401(10 $\mu$ M)存在下放疗时, $\gamma$ -H2AX免疫荧光染色实验。放大倍数200倍。下部图中各图例从上到下表示的分组分别为:对照组/空白对照、对照组/放疗(4Gy)、FGF19扩增组/空白对照、FGF19扩增组/放疗(4Gy)、FGF19扩增组/放疗(4Gy)+安罗替尼(2 $\mu$ M)、FGF19扩增组/放疗(4Gy)+FGF401(10 $\mu$ M)。

[0037] 图9:FGF19扩增影响食管癌细胞皮下移植瘤对放疗的敏感性。A. 对照组食管癌细胞对放疗(4Gy $\times$ 3F)的疗效反应。B. FGF19扩增食管癌细胞对各处理的疗效反应,其中各图例从上到下表示的处理分别为:空白对照组、放疗组(4Gy $\times$ 3F)、安罗替尼组(0.3mg/Kg/d)、放疗组(4Gy $\times$ 3F)+安罗替尼组(0.3mg/Kg/d)。

[0038] 图10:皮下瘤免疫组化检测,针对Ki 67和CD31。柱形图中各图例从上到下分别表示:对照组/空白对照、对照组/放疗、FGF19扩增组/空白对照、FGF19扩增组/放疗、FGF19扩

增组/安罗替尼、FGF19扩增组/放疗+安罗替尼。

[0039] 图11:质粒pcDNA3.1-FGF19的图谱。

### 具体实施方式

[0040] 本发明涉及新发现的生物标志物(即FGF19)的表达和/或拷贝数与食管癌、尤其是食管鳞癌对放疗的敏感性之间的关系。本文所述生物标志物提供用于评价和/或预测放疗对治疗食管癌的效果的用途和方法。因此,本发明的一个实施方案代表生物标志物的改进,所述生物标志物适用于评价和/或预测放疗对治疗食管癌的效果。在又一个实施方案中,本发明新发现的生物标志物(即FGF19)可与本领域已知的一种或多种其它癌症标志物(例如CEA、CA 19-9、CA 125、CA 72-4、SCC、CF21-1、TSGF、P53-Ab、VEGFR2、VEGFA、CD24)联用,例如用于评价和/或预测放疗对治疗食管癌的效果或用于制备用于此目的的试剂盒。

[0041] 本发明发现并证实了FGF19扩增(例如基因拷贝数增加)是预测食管鳞中放疗敏感性的关键生物标志物,这提示FGF19有潜力成为临床评价和/或预测食管癌细胞或患有食管癌的患者对放疗的敏感性降低的关键生物标志物,具有巨大的发掘潜力和应用前景。

[0042] 发明人期望在此澄清一些概念。例如,在癌症细胞中检测到的变异基因,甚至是作为检测用生物标志物的变异基因,不一定与癌症或肿瘤对放疗的敏感性有关。这二者之间没有必然的联系。如本申请实施例1中所描述,我们基于对50例食管癌患者的基因测序结果进行的频数统计分析,发现了排在前16位的变异基因,其中FGF19变异基因仅排在第3位,分别排在第1位和第2位的是TP53和CCND1变异基因。本发明中发现的FGF19基因扩增降低食管癌细胞对放疗敏感性这一现象,是出乎意料的。

[0043] 定义

[0044] 术语“样品”意指已知或疑似表达或含有生物标志物(即FGF19)或结合剂的材料,结合剂为例如对生物标志物(即FGF19)有特异性的抗体。样品可来源于生物来源(“生物样品”),例如组织(例如活组织检查样品)、提取物或包括细胞(例如肿瘤细胞)、细胞裂解物在内的细胞培养物和生物或生理流体,例如全血、血浆、血清、唾液、脑髓液、汗、尿液、乳汁、腹膜液等。获自来源的样品或在预处理以改进样品特征(例如从血液制备血浆、稀释黏液等)后的样品可直接使用。在本发明的某些方面,样品是人生理流体,例如人血清。在本发明的某些方面,样品是活组织检查样品例如经组织检查获得的肿瘤组织或细胞。在本发明的某些方面,样品是恶性或正常组织样品例如癌旁正常组织样品。

[0045] 本文使用的术语“标志物”指要用作分析患者实验样品的靶标的分子。这样的分子靶标的实例是基因、蛋白或多肽。在本发明中用作标志物的基因、蛋白或多肽预期包括所述基因或蛋白的天然存在的变体以及所述基因或蛋白或所述变体的片段,特别是免疫学上可检测的片段。免疫学上可检测的片段优选地包含所述标志物多肽的至少6、7、8、10、12、15或20个连续氨基酸。本领域的技术人员可认识到,由细胞释放的蛋白或存在于胞外基质中的蛋白可能受到损害(例如在炎症过程中),且可被降解或切割成这样的片段。某些标志物以无活性形式合成,其可以随后通过蛋白酶解来激活。如熟练的技术人员将明白的,蛋白或其片段也可以作为复合物的部分而存在。这样的复合物也可以用作本发明意义上的标志物。标志物多肽的变体可由相同的基因编码,但可能在其等电点(=PI)或分子量(=MW)或以上二者上有差异,例如作为可选的mRNA或mRNA前体加工的结果。变体的氨基酸序列与对应的

标志物序列具有95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性。另外,或在替代方案中,标志物多肽或其变体可以携带翻译后修饰。翻译后修饰的非限制性实例是糖基化、酰化和/或磷酸化。

[0046] 标志物的表达也可通过检测标志物的翻译(即,样品中标志物蛋白的检测)来鉴定。适合于检测标志物蛋白的方法包括用于检测和/或测量得自细胞或细胞提取物的蛋白的任何合适方法。这样的方法包括,但不限于免疫印迹(如蛋白质印迹)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫沉淀、免疫组织化学和免疫荧光。用于检测蛋白的特别优选的方法包括任何基于细胞的测定,包括免疫组织化学和免疫荧光测定。这样的方法是本领域熟知的。

[0047] 术语“受试者”、“患者”和“个体”在本文可互换使用,是指温血动物,例如哺乳动物。该术语包括但不限于家畜、啮齿动物(例如大鼠和小鼠)、灵长类动物和人。优选该术语是指人。

[0048] 成纤维细胞生长因子19(Fibroblast growth factor,FGF19)在人脑中首次被发现,其编码基因位于染色体11q13,由216个氨基酸组成,在回肠和胆囊上皮细胞中高表达,但在正常肝脏中检测不到。成年小鼠的回肠、空肠和十二指肠中高度表达FGF15,是FGF19的小鼠同源物,由218个氨基酸组成,与人FGF19具有51%的相似性。本文中所讨论的FGF19基因指的是序列示于NCBI号NM\_005117的人FGF19基因。

[0049] 术语“对照”应根据本领域技术人员的一般理解来理解,并且表示用于比较基因拷贝数、蛋白质或mRNA水平的任何有用的参考。对照可以是用于比较目的的任何样品、标准品、标准曲线或水平。对照可以是正常参考样品或参考标准或水平。对照可以是患者自身的血液对照样本;食管癌如食管鳞癌肿瘤细胞本身的内参基因(如FGF19)的表达;预先确定的对放疗相对不敏感的细胞(例如对放疗相对不敏感的食管鳞癌原代细胞),如“正常对照”或取自同一受试者的先前样品;来自正常健康受试者的样品,如正常细胞或正常组织;来自从未患疾病的受试者的样品(例如,细胞或组织);或已知正常浓度下的纯化蛋白或RNA的样品。“参考标准或水平”是指源自参考样品的值或数字。“正常对照值”是指非疾病状态的预先确定的值,例如,在健康对照受试者中预期的值。通常,正常对照值被表示为范围(“介于X与Y之间”)、高阈值(“不高于X”)或低阈值(“不低于X”)。对于特定生物标志物,具有在正常对照值内的测量值的受试者通常被称为对于所述生物标志物“在正常限值内”。正常参考标准或水平可以是从未患疾病或病症(例如,癌症)的正常受试者。本文实施例中所构建的空载食管癌细胞株(KYSE-410CON和KYSE-510CON),即是所构建的FGF19扩增稳转食管癌细胞株(KYSE-410FGF19AM/KYSE-510FGF19AM)的对照组。

[0050] 与对照或标准(例如来自健康食管细胞的正常水平、不同病期的水平或患者其它样品的水平、保持了对放疗的敏感性不下降的之前病期的食管癌细胞或患有食管癌的患者水平)相比,患者样品中标志物表达水平“升高”或“降低”或者拷贝数“扩增”或“缺失”可表示高于或低于检测试验的标准误差的水平,优选水平或拷贝数分别为对照或标准的至少约1.1、1.25、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍或更多倍或者为对照或标准的至多约1/1.1、1/1.25、1/1.5、1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9或1/10或更少。拷贝数扩增或缺失可通过本领域周知的技术检测,例如实施例所述的高通量测序,或者本领域已知的全基因组测序、全转录组测序、其他二代测序检测方法、芯片检测、液滴数字聚合酶链反应(ddPCR)等。本文

所称的FGF19基因扩增是指与不包含扩增的上述对照或标准相比,FGF19基因的拷贝数增加或者表达水平提高,优选增加或提高至少约1.1、1.25、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍或更多倍。

[0051] 术语“多肽”和“蛋白”或“蛋白质”在本文可互换使用,表示通过共价和/或非共价键连接的氨基酸的至少一个分子链。该术语包括肽、寡肽和蛋白质及多肽的翻译后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化等。蛋白质片段、类似物、突变蛋白质或变体蛋白质、融合蛋白等也包括在该术语的含义中。

[0052] 在本发明中,蛋白片段是指与全长天然蛋白相比具有氨基末端缺失、羧基末端缺失和/或中间缺失的多肽。所述片段还可含有与天然蛋白相比经修饰的氨基酸。在某些实施方案中,片段长度为约5-215个氨基酸。例如,片段长度可为至少5、6、8、10、14、20、50、70、100、110、150或200个氨基酸。在一个实施方案中,所述片段是免疫学上可检测的片段,其优选地包含标志物多肽的至少6、7、8、10、12、15或20个连续氨基酸。蛋白表达水平的变化是指与对照或标准的表达水平相比,至少为对照或标准的表达水平的至少约1.1、1.25、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍或更多倍或者为对照或标准的表达水平的至多约1/1.1、1/1.25、1/1.5、1/2、1/3、1/4、1/5、1/6、1/7、1/8、1/9或1/10或更少。在本文中,归因于FGF19基因的扩增,其相应的RNA(例如mRNA)和蛋白质的表达或水平也可以相比对照组增加,例如增加至少约1.1、1.25、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9或10倍或更多倍。在某些实施方案中,如本文所用的测定“蛋白表达水平”、“基因表达”或“基因表达水平”包括但不限于测定相应的RNA、蛋白或者肽水平(或其组合)。本发明不限于测定蛋白、肽或RNA水平的具体方法和试剂,所有这些方法和试剂是本领域熟知的。

[0053] 用于测定样品中蛋白质的量或浓度的方法为技术人员所知。所述方法包括放射性免疫测定、竞争性结合测定、蛋白质印迹分析和ELISA测定。对于使用抗体的方法,单克隆和多克隆抗体都适用。所述抗体对于蛋白质、蛋白表位或蛋白片段可为免疫学上特异的。

[0054] 术语“寡核苷酸”是指任何长度的核苷酸的多聚体形式,为核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。该术语包括双链和单链DNA和RNA,例如多核苷酸的甲基化或帽化等修饰形式和未修饰形式。术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”在本文可互换使用。寡核苷酸可包括但非必需包括其它编码或非编码序列,或者它可以但不一定与其它分子和/或载体或支持材料连接。用于本发明方法或试剂盒的寡核苷酸可具有适于具体方法的任何长度。在某些应用中,该术语是指反义核酸分子(例如处于与编码本发明癌症标志物(例如FGF19)的有义多核苷酸相反方向的mRNA或DNA链)。

[0055] 用于本发明的寡核苷酸包括互补核酸序列和与这些序列基本相同的核酸,并且还包括因遗传密码简并而不同于核酸序列的序列。可用于本发明的寡核苷酸还包括在严格条件下、优选高严格性条件下与寡核苷酸癌症标志物核酸序列杂交的核酸。

[0056] 核苷酸杂交测定是本领域熟知的。杂交测定程序和条件将根据应用而变化并依据已知的通用结合方法选择,参见例如J. 萨姆布鲁克等,分子克隆:实验指南(第三版,科学出版社,2002);以及Young和Davis,P.N.A.S.,80:1194(1983)。进行重复和受控杂交反应的方法和设备已经描述于美国专利号5,871,928、5,874,219、6,045,996、6,386,749和6,391,623中,其各自通过引用结合到本文中。

[0057] 在某些情况下,可能需要扩增样品。基因组样品可通过各种机制扩增,其中一些机

制可采用PCR。样品可在阵列上扩增。参见,例如美国专利号6,300,070和美国专利申请系列号09/513,300。

[0058] 其它合适的扩增方法包括连接酶链反应(LCR)(如Wu和Wallace, *Genomics* 4,560 (1989)、Landegren等 *Science* 241,1077 (1988) 和Barringer等 *Gene* 89:117 (1990))、转录扩增(Kwoh等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86,1173 (1989) 和W088/10315)、自维持序列复制(Guatelli等, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 1874 (1990) 和W090/06995)、目标多核苷酸序列的选择性扩增(美国专利号6,410,276)、共有序列引发的聚合酶链反应(CP-PCR)(美国专利号4,437,975)、任意引发的聚合酶链反应(AP-PCR)(美国专利号5,413,909、5,861,245)和基于核酸的序列扩增(NABSA)(参见美国专利号5,409,818、5,554,517和6,063,603,其各自通过引用结合到本文中)。

[0059] 可用于检测FGF19表达水平和/或拷贝数的试剂是本领域众所周知的。适用于本发明的这种试剂可市购获得或通过本领域技术人员熟知的方法常规地制得。

[0060] 术语“结合剂”是指例如与本发明生物标志物(FGF19)特异性结合的多肽、抗体、核糖体或适体等物质。如果物质以可检测的水平与本发明生物标志物起反应,而不与含有无关序列或不同多肽的序列的肽可检测地起反应,则它与本发明生物标志物“特异性结合”。可采用本领域技术人员可容易进行的方法例如ELISA来评价结合性质。

[0061] 结合剂可以是含或不含肽组分的核糖体、RNA或DNA分子或多肽。结合剂可以是包含多肽生物标志物序列、其肽变体或这类序列的非肽模拟物的多肽。

[0062] 适体包括与核酸和蛋白质结合的DNA或RNA分子。与本发明标志物结合的适体可在无需过多实验的情况下利用常规技术产生。[例如参见下列描述适体体外选择的出版物:Klug等, *Mol. Biol. Reports* 20:97-107 (1994); Wallis等, *Chem. Biol.* 2:543-552 (1995); Ellington, *Curr. Biol.* 4:427-429 (1994); Lato等, *Chem. Biol.* 2:291-303 (1995); Conrad等, *Mol. Div.* 1:69-78 (1995); 以及Uphoff等, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6:281-287 (1996)]。

[0063] 用于本发明的抗体包括但不限于合成抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>)、dAb(结构域抗体;参见Ward等, 1989, *Nature*, 341:544-546)、抗体重链、胞内抗体、人源化抗体、人抗体、抗体轻链、单链Fv(scFv)(例如包括单特异性、双特异性等)、抗独特型(ant-Id)抗体、包含抗体部分的蛋白质、嵌合抗体(例如含有鼠抗体的结合特异性但其中其余部分是人来源的抗体)、衍生物例如酶缀合物或标记的衍生物、双链抗体、线性抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、上述任一种的表位结合片段和包含所需特异性的抗原识别部位的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型。抗体包括任何类型(例如IgA、IgD、IgE、IgG、IgM和IgY)、任何类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或任何亚类(例如IgG2a和IgG2b)的抗体,抗体不必是任何特定的类型、类别或亚类。在本发明的某些实施方案中,抗体是IgG抗体或其类别或亚类。抗体可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物(例如人、鼠、驴、绵羊、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡)。

[0064] 例如,用于本发明的抗体可市购自例如BioVision(例如货号5542R-100)、Abcam(例如货号ab172545)等。或者,所述抗体可通过本领域周知的重组方法制备。在一些实施方案中,所述抗体是单克隆抗体。对于单克隆抗体的制备参见例如Kohler等(1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor等(1985) *J. Immunol Methods* 81:31-42; Cote等(1983) *Proc*

Natl Acad Sci 80:2026-2030和Cole等(1984)Mol Cell Biol 62:109-120。

[0065] 根据本公开的试剂盒可以通过本领域常规方法制备。试剂盒可包含实施本发明方法或用途所需要的材料或试剂(包括用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂)。试剂盒可以包括储存反应试剂(例如在合适容器中的引物、dNTP、酶等)和/或支持材料(例如缓冲液、实施检测的说明书等)的容器。例如,试剂盒可以包括一个或多个含有相应反应试剂和/或支持材料的容器(例如盒子)。这样的内容物可一起或分开施用至待检测的样品。作为一个实例,试剂盒可含有用于检测FGF19基因或其mRNA或其编码的蛋白或蛋白片段的试剂、缓冲液以及使用说明书。试剂盒还可含有聚合酶和dNTP等。试剂盒还可含有用于质控的内标、阳性和阴性对照等。试剂盒还可包含用于从样品制备核酸例如DNA的试剂。以上实例仅用于更清楚地说明本发明,而在任何方便都不构成对适用于本发明的试剂盒及其内容物的限制。

[0066] 实施例

[0067] 为了更清楚的解释本发明的内容,以下将结合附图和实施例详细说明。

[0068] 实施例1基于临床食管癌患者基因测序结果筛选食管癌治疗新靶点

[0069] 在临床工作中,我们收集进行基因测序的食管癌患者的临床资料。对收集到的本南方医院动物实验中心50例食管癌患者的全基因组测序结果进行统计分析,从中筛选出治疗新靶点。

[0070] 对50例食管癌患者的基因测序结果进行频数统计分析,发现排在前16位的变异基因依次为:TP53、CCND1、FGF19、NOTCH1、LRP1B、FAT1、MYC、CDKN2A、NSD1、EP300、CHEK2、ZNF217、PTCH1、DICER1、CBLB、GNAS,基因变异类型包括:基因突变、基因扩增、单拷贝数缺失、基因融合,其中排前三位的基因变异及占比分别为:TP53基因突变占比88%,CCND1基因变异占比48%(其中,扩增占比46%,突变占比2%),FGF19基因扩增占比46%,如图1所示。

[0071] 我们筛选出FGF19作为研究的新靶点。

[0072] 实施例2数据库分析食管癌中FGF19基因特征及对预后的影响

[0073] 虽然基于实施例1的研究结果发现FGF19扩增有作为食管癌精准治疗新靶点的潜质,但需要进一步明确新靶点是否在肿瘤组织中显著高表达,是否对食管癌患者预后产生影响。因此,本实施例通过在线数据库大样本量测序结果进一步分析FGF19在食管癌患者中的特征以及对食管癌患者预后的影响。

[0074] 利用cBioPortal网站食管癌数据集(TCGA,FirehoseLegacy)分析FGF19扩增在食管癌中的占比。通过GeneMANIA和STRING网站进行FGF19相关基因-基因和蛋白-蛋白互作网络分析,KEGG分别进行FGF19基因相关基因和蛋白的通路富集分析。利用TCGA数据库食管癌数据集进行FGF19在食管癌肿瘤组织和正常组织中的差异表达分析。通过LinkedOmics数据库筛选食管癌中与FGF19表达正相关、负相关基因及进行FGF19的生物学功能富集分析。使用R语言对TCGA数据库食管癌数据集进行临床特征、预后分析及可视化。

[0075] 采用R软件进行分析。采用独立样本t检验,分析TCGA数据库中食管癌组织与正常组织之间FGF19 mRNA的差异表达水平。采用皮尔逊卡方检验分析FGF19表达与临床病理特征的相关性。采用Kaplan-Meier图进行疾病特异生存期(DSS)分析,并采用log-rank检验比较差异。采用Cox比例风险回归模型进行单因素和多变量分析。双尾 $P < 0.05$ 时被认为有统计学意义。

[0076] 首先,我们通过数据库对FGF19基因在食管癌中的变异情况进行分析,了解其在食管癌中的特征。通过cBioPortal网站对TCGA数据库食管癌数据集(TCGA,Firehose Legacy)进行分析,发现FGF19在食管癌中扩增占比35%(图2A)。通过GeneMANIA网站和STRING网站进行基因-基因和蛋白-蛋白的互作网络分析,发现与FGF19基因相互作用的20个潜在靶基因(FGFR4/KLB/KL/SDC2/FGFR1/FGF20/FGF5/FGF17/FGF22/FGF16/FGF23/FGF8/FGF18/FGF6/FGF9/FGF3/FGF7/FGF4/FGF10/FGF1) (图2B) 以及10个潜在靶蛋白(KLB/FGFR1/FGFR3/FGFR2/FGF23/FGF10/FGF7/FGF2/PLCG1/FGFR4) (图2C)。将FGF19与20个相关基因(图2D)及与10个相关蛋白编码基因(图2E) 分别进行KEGG通路富集分析,发现从基因和蛋白水平与FGF19相关的主要富集信号通路为PI3K-Akt信号通路以及MAPK信号通路等。

[0077] 我们在TCGA数据库分析FGF19在泛癌中的表达,发现FGF19在多种肿瘤组织与正常组织中存在差异表达(图3A),在食管癌组织中FGF19表达显著高于正常组织(图3B)。并且在肿瘤发生发展过程中,FGF19高表达能对肿瘤组织进行预测(AUC=0.788)(图3C),TCGA+GTEX数据库显示FGF19高表达对肿瘤组织的预测具有较高的准确性(AUC=0.914)(图3D)。以上结果提示FGF19在食管癌肿瘤组织中显著高表达,有可能作为食管癌治疗的新靶点。

[0078] 实施例3 FGF19扩增对食管癌细胞放疗敏感性的影响

[0079] 使用购自上海美轩生物科技有限公司的人源食管癌细胞株KYSE-410细胞和KYSE-510细胞,我们成功构建了包含FGF19扩增的稳定转染的食管癌细胞株(KYSE-410FGF19<sup>AM</sup>/KYSE-510FGF19<sup>AM</sup>),以及空载食管癌细胞株(KYSE-410CON/KYSE-510CON)。使用了名称为pcDNA3.1-FGF19的质粒(图11)进行了构建,所述质粒包含插入在CMV启动子下游的FGF19基因,并带有嘌呤霉素抗性基因作为选择标记。FGF19基因的序列为NCBI号:NM\_005117所示的基因序列,基因片段由吉凯生物技术有限公司合成。空载质粒为pcDNA3.1-empty,其含有CMV启动子和嘌呤霉素抗性基因,但没有FGF19基因的插入。当细胞培养至30-50%汇合度时,使用50ul病毒液和8μg/ml polybrene进行转染,培养24-48小时后更换新鲜培养基,转染48-96小时后将KYSE-410细胞和KYSE-510细胞分别置于含250μg/ml及450μg/ml G418的完全培养基中培养5-7天,获得带G418抗性的细胞,再筛选培养单克隆稳转细胞株。

[0080] 通过实时定量PCR(qPCR)和蛋白免疫印迹(Westernblot)实验分别进行mRNA水平和蛋白质水平的验证。如图4A所示,包含FGF19扩增的稳定转染的食管癌细胞株相对对照组,具有显著更高的FGF19表达量。

[0081] 还通过克隆形成实验发现FGF19扩增促进了食管癌细胞的增殖。将稳定转染的细胞以低密度(500个细胞/孔)接种到6孔板培养皿中,培养两周,期间每3天更换一次培养基。随后用4%多聚甲醛固定细胞,并用0.1%的结晶紫染色。每个培养皿中形成的克隆数目进行计数和比较。结果如图4B所示。实验比较结果基于t检验进行显著性统计,所有P均为双侧检验,P<0.05被视为具有统计学意义。\*代表P<0.05;\*\*代表P<0.01;\*\*\*代表P<0.001;\*\*\*\*代表P<0.0001。

[0082] 3.1克隆形成实验证实FGF19扩增降低食管癌细胞对辐射的敏感性

[0083] 用胰酶消化待接种的、根据上文制备得到的对照组食管癌肿瘤细胞株(KYSE-410CON、KYSE-510CON)与单基因稳转细胞株(KYSE-410FGF19<sup>AM</sup>、KYSE-510FGF19<sup>AM</sup>)并制成单细胞悬液,1000rpm离心3分钟,PBS缓冲液洗涤细胞1次,除去胰酶,使用细胞计数仪进行细胞计数后调整细胞浓度,6孔板接种细胞数及对应放疗剂量为:0Gy-200个细胞、2Gy-400个

细胞、4Gy-1000个细胞、6Gy-2000个细胞、8Gy-4000个细胞,3个复孔。接种后恒温培养使细胞贴壁,接种24小时内进行射线照射处理,照射时将6孔板用胶布密封,照射完成后除去密封胶布。照射后恒温箱中静置培养,不定时观察细胞,若细胞漂浮物太多,则予以换液处理,过程轻柔。培养10-14天,当0Gy剂量的培养皿中出现肉眼可见的克隆数,细胞数大约为50个时,终止培养并予以染色计算克隆数。过程为:弃去培养基、PBS洗3次、甲醇固定15分钟,PBS洗2次、结晶紫染色30分钟,用流水小心从边缘开始冲洗染料,培养皿风干后拍照计数,计算克隆数、克隆形成率。绘制克隆形成曲线,如图5所示。实验比较结果基于t检验进行显著性统计,所有P均为双侧检验, $P < 0.05$ 被视为具有统计学意义。

[0084] 结果表明FGF19扩增食管癌细胞(KYES-410FGF19<sup>AM</sup>/KYES-510FGF19<sup>AM</sup>)的辐射敏感性较对照组食管癌细胞(KYES-410CON/KYES-510CON)显著下降,如图5所示。

[0085] 3.2安罗替尼增强FGF19扩增食管癌细胞的放疗敏感性

[0086] 通过上面的克隆形成实验,证实了FGF19扩增降低了食管癌细胞对放疗的敏感性。接下来,进一步探究安罗替尼是否能增强FGF19扩增食管癌细胞的放疗敏感性。分别以500、2000和2000个细胞/孔的接种量设置各三组对照组和FGF19扩增组,接种后恒温培养使细胞贴壁,接种24小时内进行4Gy射线照射处理。我们发现FGF19扩增食管癌细胞的放疗敏感性相比于对照组显著降低,联合使用安罗替尼能显著增强FGF19扩增食管癌细胞的放疗敏感性,而对照组没有显著改变,如图6所示,实验比较结果基于t检验进行显著性统计,所有P均为双侧检验, $P < 0.05$ 被视为具有统计学意义。

[0087] 这部分结果表明:安罗替尼增强FGF19扩增食管癌细胞的放疗敏感性,而对对照组食管癌细胞株的放疗敏感性无显著影响。

[0088] 3.3FGF19扩增通过FGF19-FGFR4-ERK信号通路影响食管癌细胞对放疗的敏感性

[0089] 通过前面的实验,已经证实了FGF19扩增降低了食管癌细胞的放疗敏感性,且安罗替尼能增强FGF19扩增食管癌细胞的放疗敏感性。接下来,进一步探究了FGF19通过什么信号途径影响了食管癌细胞的放疗敏感性。

[0090] 首先,通过蛋白免疫印迹(Westernblot)实验探索FGF19扩增影响食管癌细胞放疗敏感性的相关蛋白表达及活化情况。蛋白免疫印迹所使用抗体包括p-AKT(Cell Signaling Technology,#4060,1:1000稀释)、AKT(Cell Signaling Technology,#9272,1:1000稀释)、p-ERK1/2(Cell Signaling Technology,#4370,1:1000稀释)、ERK1/2(Cell Signaling Technology,#9102,1:1000稀释)、p-FGFR4(phospho Y642)(Abcam,ab192589,1:1000稀释)、FGFR4(Abcam,ab178296,1:1000稀释),以及 $\beta$ -actin(Cell Signaling Technology,#4970,1:5000稀释)作为内参抗体。如图7A图所示,放疗(4Gy)后,FGF19扩增食管癌细胞的ERK1/2信号相比于对照组显著活化了,p-ERK1/2蛋白表达量显著增高,当加用FGFR4特异抑制剂FGF401(10 $\mu$ M)时,磷酸化的ERK1/2被显著抑制。同时我们还使用Wnt通路抑制剂LGK974(3 $\mu$ M)探索在放疗中,FGF19扩增是否影响Wnt信号通路。通过CCK8实验我们发现,放疗联合LGK-974显著增强了食管癌细胞的放疗敏感性,但与FGF19扩增与否无关,如图7B图所示。CCK8实验的主要参数如下:接种细胞的数量为每孔2000个,使用的实验材料包括CCK8试剂,培养条件为37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>,实验时间为72小时。实验比较结果基于均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,组间比较使用t检验或单因素方差分析(ANOVA),显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

[0091] 以上结果表明:放疗导致了FGF19扩增食管癌细胞内ERK1/2信号的活化,但放疗联

合FGF401阻断FGF19-FGFR4信号通路后能抑制ERK1/2信号的活化,ERK1/2可能是FGF19-FGFR4信号通路的下游分子。同时,抑制Wnt信号通路,可以增强食管癌细胞的放疗敏感性,但Wnt信号不是FGF19-FGFR4导致辐射抵抗的下游参与信号。

[0092] 3.4 FGF19扩增导致放疗后DNA断裂减少

[0093] 我们通过  $\gamma$ -H2AX免疫荧光实验检测放疗后食管癌细胞内双链DNA损伤情况。我们选取指数生长期食管癌细胞(KYSE-410CON/KYSE-410FGF19<sup>AM</sup>、KYSE-510CON/KYSE-510FGF19<sup>AM</sup>)进行实验,首先将细胞悬液浓度调整至3000个/孔,混匀后按每孔100 $\mu$ l接种于96孔板中,室温静置15分钟后放入37 $^{\circ}$ C二氧化碳孵箱中培养,次日进行分组处理:对照组、放疗(4Gy)组、放疗+安罗替尼(2 $\mu$ M)组、放疗+FGF401(10 $\mu$ M)组,每组3个复孔。放疗前3-6小时加药,分别于放疗后2小时、6小时、24小时检测。采用DNA损伤检测试剂盒( $\gamma$ -H2AX免疫荧光法)(碧云天,C2035S)进行检测。

[0094] 结果显示:对照组食管癌细胞(KYSE-410CON/KYSE-510CON)放疗后核内 $\gamma$ -H2AX免疫荧光染色显著高于FGF19扩增组食管癌细胞(KYSE-410FGF19<sup>AM</sup>/KYSE-510FGF19<sup>AM</sup>),但FGF19扩增组食管癌细胞应用安罗替尼联合放疗处理后,细胞核内 $\gamma$ -H2AX免疫荧光染色显著增强(图8)。实验比较结果基于t检验进行显著性统计,所有P均为双侧检验,P<0.05被视为具有统计学意义。

[0095] 以上结果表明:相比于对照组食管癌细胞,FGF19扩增食管癌细胞放疗后DNA双链断裂显著减少;但是安罗替尼能显著增加FGF19扩增食管癌细胞放疗后核内DNA双链断裂。

[0096] 3.5 体内实验验证FGF19扩增对食管癌细胞放疗敏感性的影响

[0097] 进一步通过体内动物实验验证FGF19扩增对食管癌细胞放疗敏感性的影响。选择3-4周龄的雌性BALB/c裸鼠(购自广东省广州市南方医科大学动物实验中心,并饲养于南方医院动物实验中心SPF级环境中),共60只,将KYSE-410CON和KYSE-410FGF19AM细胞分别接种于裸鼠背部皮下,每只裸鼠接种 $5 \times 10^5$ 个细胞。自注射后开始,每2-5天观察裸鼠皮下瘤形成情况并监测皮下移植瘤增长情况,并监测体重。待皮下瘤体积平均达150-250mm<sup>3</sup>左右时,将裸鼠随机分组(每组10只)。KYSE-410CON分为:空白对照组、放疗组(4Gy $\times$ 3F);KYSE-410FGF19<sup>AM</sup>分为:空白对照组、放疗组(4Gy $\times$ 3F)、安罗替尼组(0.3mg/Kg/d $\times$ 12d,灌胃)、放疗组(4Gy $\times$ 3F)+安罗替尼组(0.3mg/Kg/d $\times$ 12d,灌胃),每2-3天测量肿瘤体积,绘制肿瘤体积变化图。

[0098] 结果显示:对照组放疗1周后肿瘤增速减慢,第12天放疗后体积显著小于空白对照( $p=0.0062$ )。FGF19扩增组,放疗后肿瘤较空白对照无显著缩小( $p=0.18$ ),安罗替尼治疗组较空白对照也无显著缩小( $p=0.25$ ),但放疗联合使用安罗替尼治疗后,肿瘤较空白对照显著缩小( $p=0.0099$ ),并要显著优于放疗组( $p=0.0149$ )和安罗替尼处理组( $p=0.01$ ),如图9所示。

[0099] 进一步对皮下瘤进行了免疫组化染色,免疫组化所使用抗体包括Ki67抗体(Cell Signaling Technology,#9027,1:200稀释)、CD31抗体(Abcam,ab28364,1:100稀释)。结果如图10所示,FGF19扩增组的Ki67染色阳性率显著高于对照组( $p=0.0386$ ),对照组放疗(R)后Ki67染色阳性率显著下降,扩增组放疗(R)后Ki67染色阳性率无显著变化,给予安罗替尼(A)处理后,Ki67染色阳性率也无显著变化,但是放疗联合应用安罗替尼(R+A)处理后,Ki67染色阳性率显著下降,这说明:FGF19扩增显著抑制食管癌细胞对放疗的敏感性,放疗联合

应用安罗替尼显著抑制肿瘤增长,并且放疗与安罗替尼具有协同效应。对照组和扩增组及各处理组CD31染色未见显著差异。实验比较结果基于t检验进行显著性统计,所有P均为双侧检验, $P<0.05$ 被视为具有统计学意义。\*代表 $P<0.05$ ;\*\*代表 $P<0.01$ ;\*\*\*代表 $P<0.001$ ;ns代表无统计学意义。

#### [0100] 3.6结论

[0101] 通过上述研究,我们确定了FGF19基因扩增降低了食管癌细胞对放疗的敏感性,并且,安罗替尼能逆转FGF19扩增食管癌细胞对放疗的抵抗性。

[0102] 安罗替尼对对照组的放疗敏感性没有显著影响(图6),也进一步说明了安罗替尼是通过抑制了FGF19-FGFR4信号通路,而不是安罗替尼的其他靶点,来逆转放疗抗性,同时发现FGF19-FGFR4下游的ERK1/2信号通路也参与了该过程,Wnt信号通路没有参与到FGF19-FGFR4信号通路的下游通路。临床工作中,对于FGF19扩增的食管癌放疗患者,可以考虑联合应用安罗替尼增强放疗敏感性,改善放疗疗效。

[0103] 根据本公开内容,可以在不进行过多实验的情况下制备和实施本文公开和要求保护的所有用途、产品和方法。本领域技术人员可以根据实践需求,对本发明所公开的技术方案和内容进行修改和变化,但这些修改和变化不背离本公开内容的概念、精神和范围。所有这样的修改和变化对本领域技术人员来说是显而易见的,在本申请权利要求所限定的保护范围内。

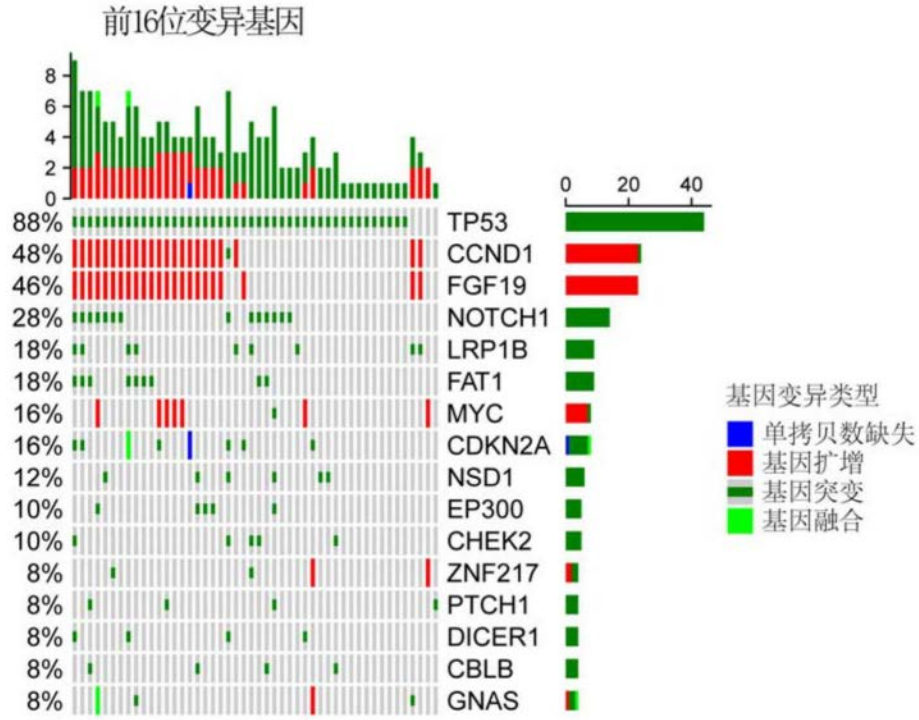


图1

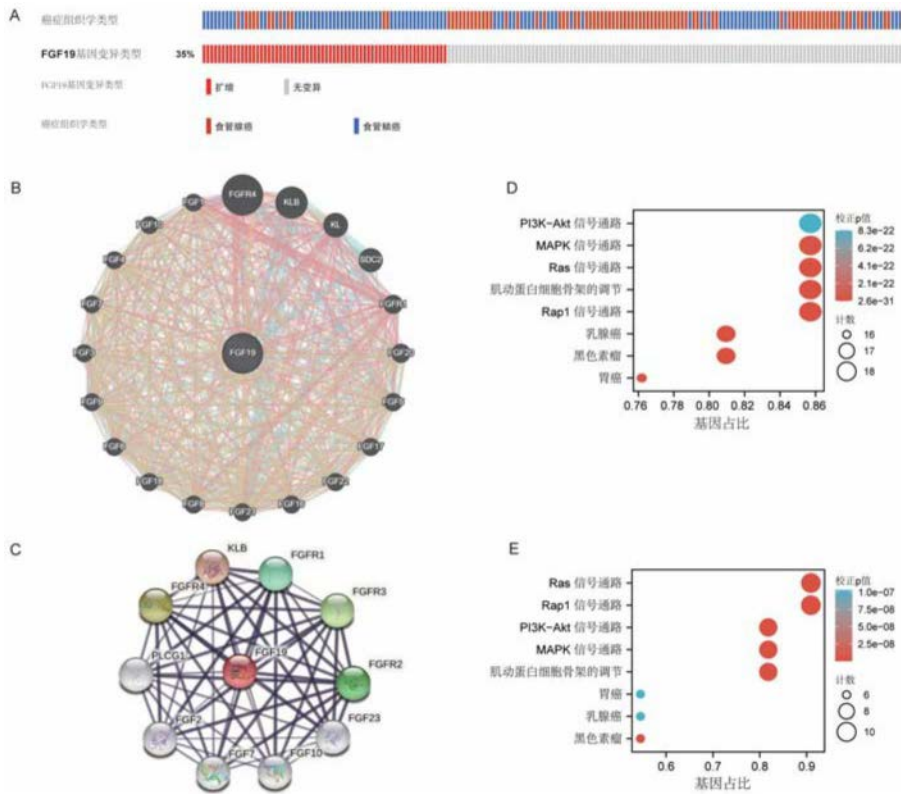


图2



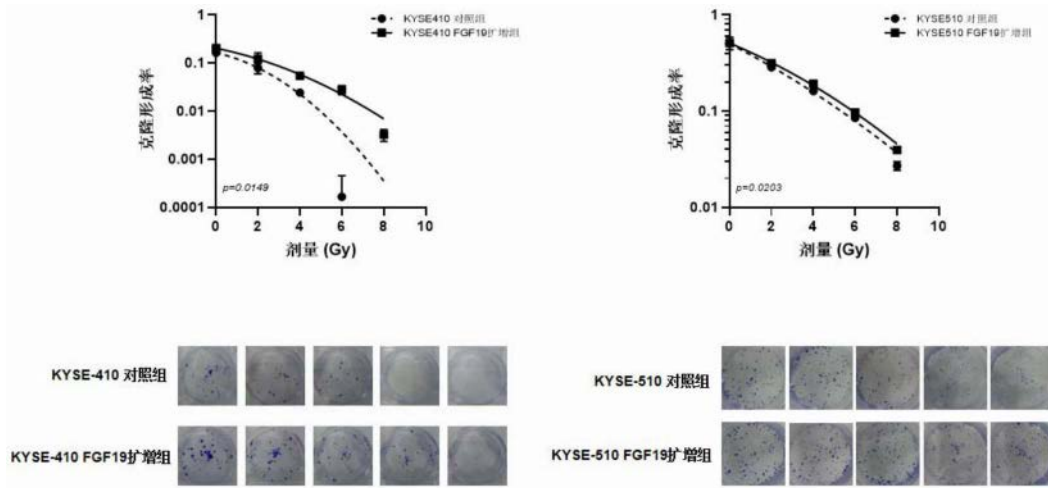


图5

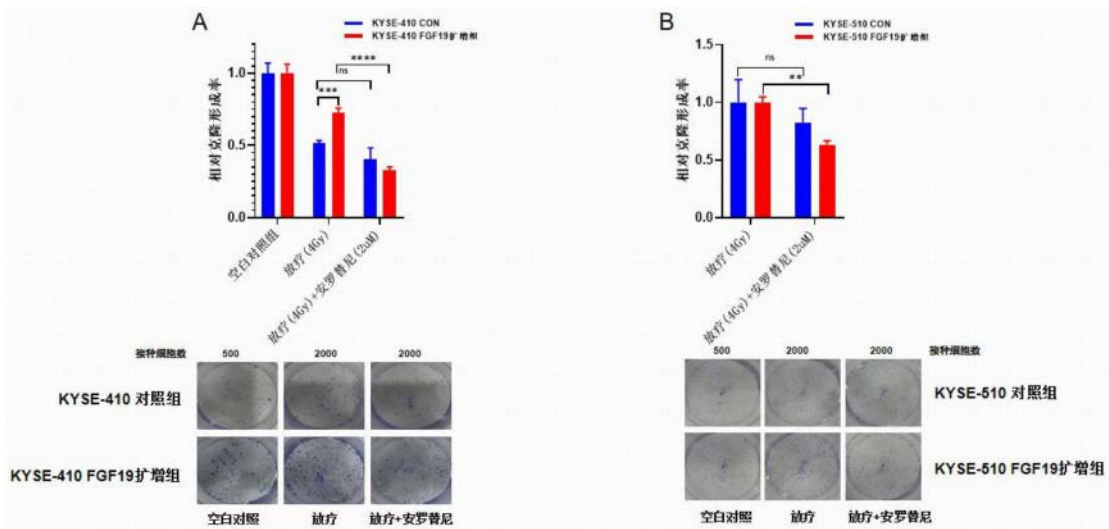


图6

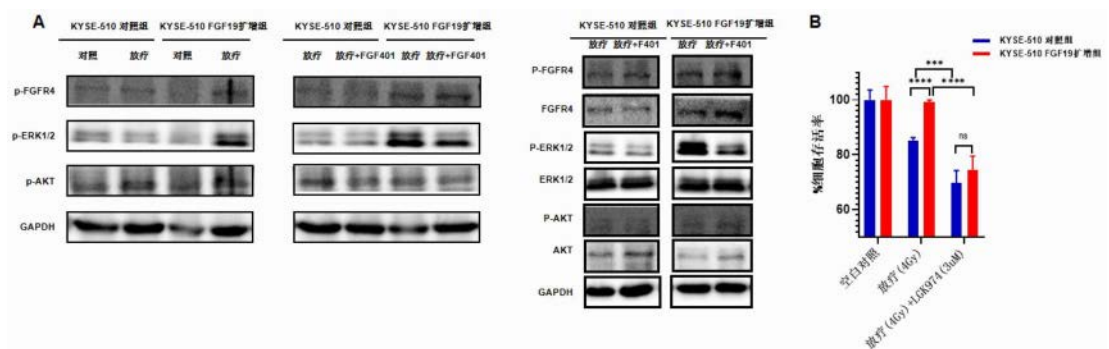


图7

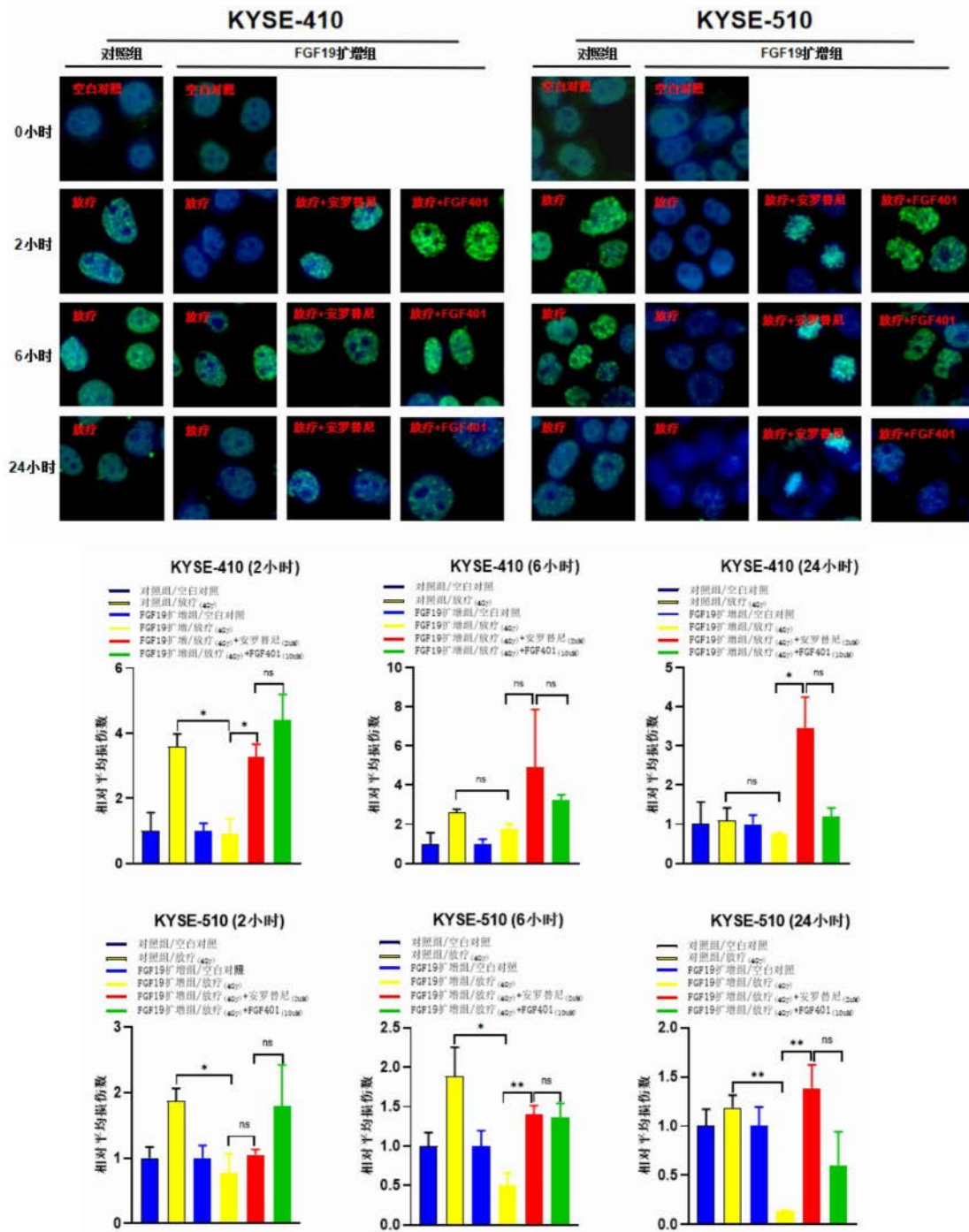


图8

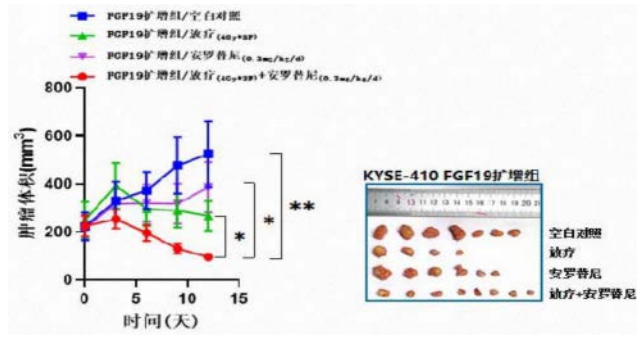


图9

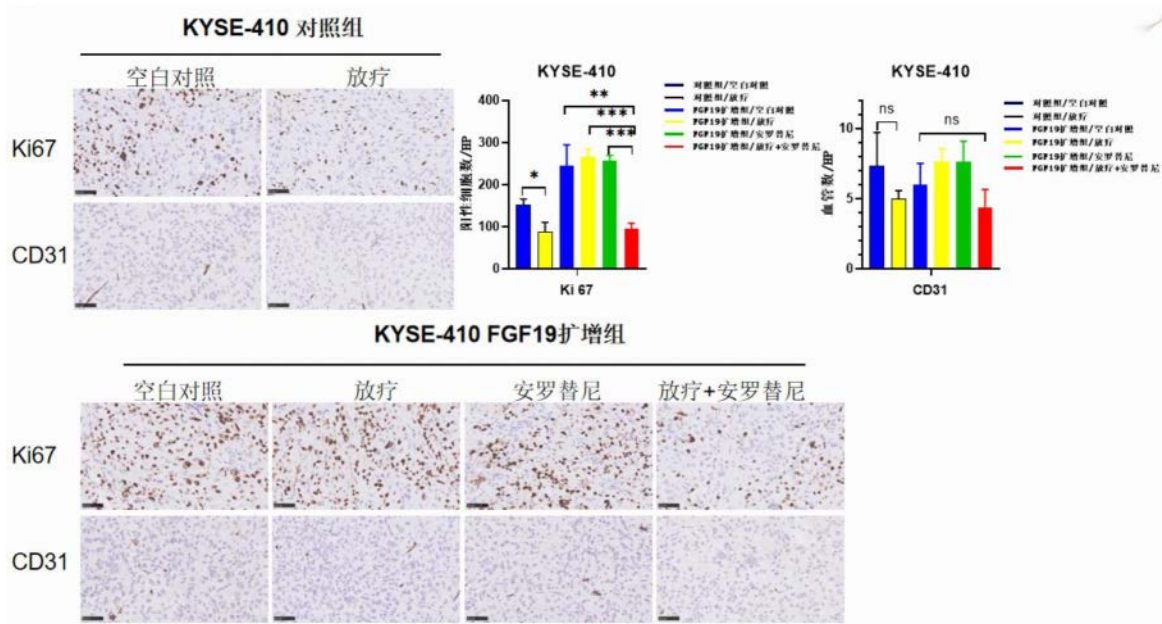


图10

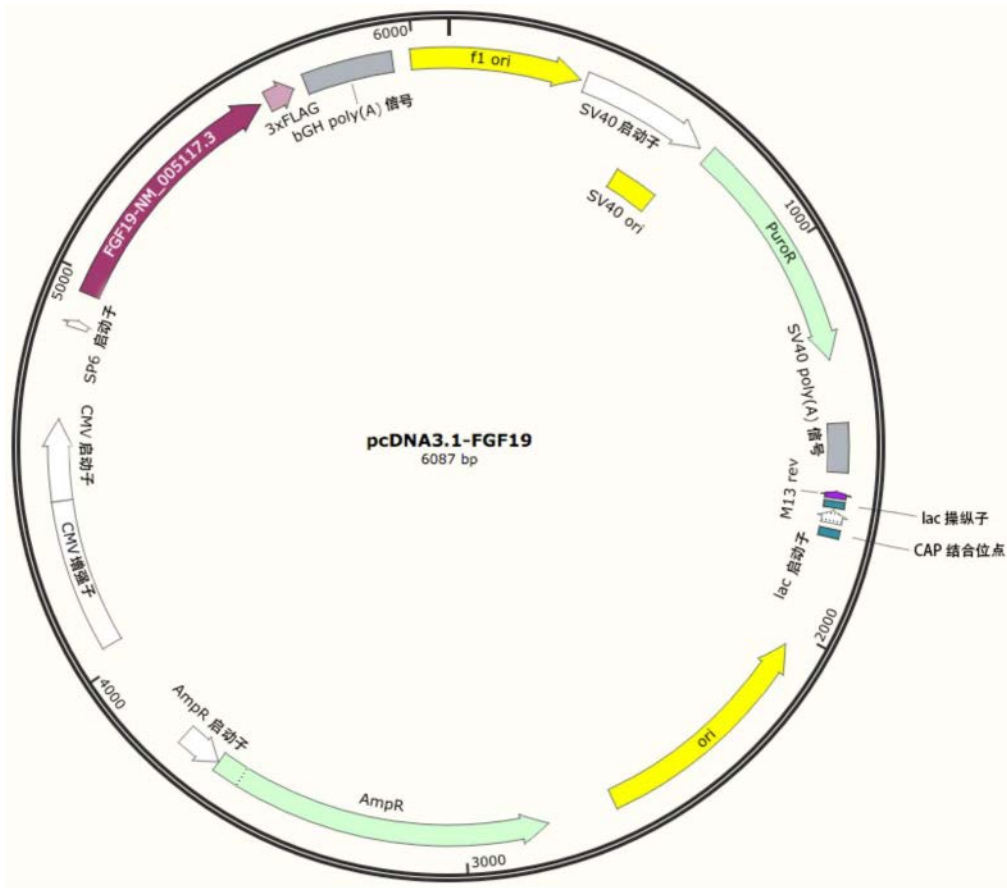


图11