



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102301006 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 15

(21) 申请号 200980155785. 7

页.

(22) 申请日 2009. 12. 21

(30) 优先权数据

0823445. 2 2008. 12. 23 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 08. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2009/002926 2009. 12. 21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/073001 EN 2010. 07. 01

(73) 专利权人 萨里大学

地址 英国萨里

(72) 发明人 R. 摩根 H. S. 潘达

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008075056 A1, 2008. 06. 26, 实施例 5.

US 2005042650 A1, 2005. 02. 24, 说明书第 1

Tibor Rauch. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. 《PNAS》. 2007, 第 104 卷 (第 13 期), 5527 - 5532.

Nicole L Martin. EN2 is a candidate oncogene in human breast cancer. 《Oncogene》. 2005, 第 24 卷 6890 - 6901.

审查员 刘超

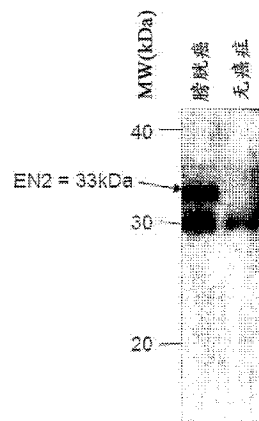
权利要求书 2 页 说明书 12 页
序列表 4 页 附图 5 页

(54) 发明名称

生物标志

(57) 摘要

描述了膀胱癌特异性生物标志和肺癌特异性生物标志, 其包含 Engrailed-2 (EN2) 基因的核酸序列或编码的 EN2 蛋白的氨基酸序列。还描述了所述生物标志在膀胱癌和肺癌的治疗、诊断、监测和成像中的用途。



1. 生物标志或特异性结合该生物标志的抗体或抗体片段在制备 1) 用于诊断患者中的膀胱癌, 或 2) 用于鉴定有风险形成膀胱癌的患者, 或 3) 用于治疗膀胱癌的药剂中的用途, 所述生物标志是:

- (i) 由 SEQ ID NO:1 的核酸序列组成的核酸分子; 或
- (ii) 由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成的氨基酸分子。

2. 能够结合或特异性识别生物标志的配体在制备试剂盒中的用途, 所述试剂盒用于一种用于诊断患者中的膀胱癌或用于鉴定有风险形成膀胱癌的患者, 该方法包括:

- (a) 测定自患者获得的样品中的所述生物标志的量;
- (b) 比较来自所述患者的样品中测定的生物标志的量与正常对照中的所述生物标志的量;

其中与所述正常对照中的所述生物标志的量相比, 来自所述患者的样品中的所述生物标志的量的差异与膀胱癌的存在有关或者与形成膀胱癌的风险有关, 所述生物标志是:

- (i) 由 SEQ ID NO:1 的核酸序列组成的核酸分子; 或
- (ii) 由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成的氨基酸分子。

3. 依照权利要求 2 的用途, 其中所述试剂盒用于检测早期阶段癌症, 其中所述对照与自所述患者获得的样品之间的增加指明早期阶段癌症。

4. 依照权利要求 2 的用途, 其中所述试剂盒用于检测晚期阶段癌症, 其中所述对照与自所述患者获得的样品之间的增加指明晚期阶段癌症。

5. 能够结合或特异性识别生物标志的配体在制备试剂盒中的用途, 所述试剂盒用于一种用于监测患者中的膀胱癌进展的方法, 该方法包括:

- (a) 测定自患者获得的样品中的所述生物标志的量;
- (b) 比较来自所述患者的样品中测定的生物标志的量与正常对照中的所述生物标志的量; 并

- (c) 在两个或更多个时间间隔重复步骤 (a) 和 (b),

其中来自所述患者的所述生物标志的量随时间增加与膀胱癌的进展升高有关, 且来自所述患者的所述生物标志的量随时间减少与膀胱癌的进展降低有关, 所述生物标志是:

- (i) 由 SEQ ID NO:1 的核酸序列组成的核酸分子; 或
- (ii) 由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成的氨基酸分子。

6. 依照权利要求 5 的用途, 其中所述试剂盒用于监测癌症阶段的变化, 其中相对于较早阶段样品或对照, 增加指明所述癌症自疾病的较早阶段进展至较晚阶段。

7. 能够结合或特异性识别生物标志的配体在制备试剂盒中的用途, 所述试剂盒用于一种用于监测治疗对膀胱癌的功效的方法, 包括检测和 / 或量化自患者获得的样品中的所述生物标志的存在, 所述生物标志是:

- (i) 由 SEQ ID NO:1 的核酸序列组成的核酸分子; 或
- (ii) 由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成的氨基酸分子。

8. 依照权利要求 2 至 7 中任一项的用途, 其中所述样品包括自所述患者获得的生物学流体或组织。

9. 依照权利要求 1 至 8 中任一项的用途, 其中所述生物标志或结合所述生物标志的抗体或抗体片段处于组合物的形式。

10. 依照权利要求 1 的用途, 其中所述治疗包括对患者施用治疗有效量的 (i) 所述生物标志, 或 (ii) 所述抗体或抗体片段。

11. 依照权利要求 10 的用途, 其中所述抗体与细胞毒剂缀合。

12. 能够结合或特异性识别生物标志的抗体或抗体片段在制备试剂盒中的用途, 所述试剂盒用于一种用于对患者中的膀胱癌成像的方法, 该方法包括对患者施用特异性结合所述生物标志的抗体或抗体片段, 其中所述生物标志是:

(i) 由 SEQ ID NO:1 的核酸序列组成的核酸分子; 或

(ii) 由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成的氨基酸分子。

13. 依照权利要求 10 至 12 中任一项的用途, 其中所述抗体与可检测标志物缀合。

生物标志

[0001] 本申请涉及生物标志,具体而言,涉及膀胱癌和肺癌的生物标志。

[0002] 膀胱癌是男性中的第四位最常见癌症和女性中的第十位最常见癌症;每年在英国 有 10,000 例新病例,而在美国有 63,000 例。目前,通过检查尿液中已经自膀胱壁解附的细胞(细胞学),或者通过自膀胱取出组织进行活组织检查来做出诊断。细胞学是非常特异性的但是具有低灵敏度,而且这两种技术是昂贵且费时的。针对膀胱癌的可靠的生物化学标志物对于患者会具有极大的益处。

[0003] 关于膀胱癌的类型,病例的 90%是移行细胞癌(TCC),其源自膀胱的内部衬里,即尿路上皮。膀胱癌剩余的 10%是鳞状细胞癌、腺癌、肉瘤或小细胞癌。

[0004] 肺癌是全世界最常见的癌症,每年有 135 万新病例,其中 38,000 例在英国。没有可靠的用于诊断肺癌的生物化学方法可用;目前通过 X 射线,接着为支气管镜检查法和/或计算机化断层摄影术(CT)扫描进行诊断。基于血清或痰中的单一标志物的可靠的生物化学测试对于患者会有极大的益处,因为它会加速诊断。另外,此类测试有可能远比现有方法便宜。

[0005] 肺癌有多种类型。将非小细胞肺癌(NSCLC)分组在一起,因为其预后和管理相似。它们由鳞状细胞肺癌、腺癌和大细胞肺癌组成。NSCLC 是肺癌的最普遍形式,构成病例的 80.4%。小细胞肺癌(SCLC)构成病例的 16.8%。SCLC 经常具有作为该疾病的重要组成的内分泌功能。类癌和肉瘤癌症分别构成病例的 0.8%和 0.1%,其中病例的 1.9%是未规定的类型。

[0006] 发明概述

[0007] 依照本发明的一方面,提供了膀胱癌特异性生物标志或肺癌特异性生物标志,所述生物标志包含:

[0008] (i) 包含 SEQ ID NO:1 或其片段或变体的核酸序列,或包含所述核酸序列的核酸分子;或

[0009] (ii) 包含 SEQ ID NO:2 或其片段或变体的氨基酸序列,或包含所述氨基酸序列的氨基酸分子。

[0010] 在此方面,SEQ ID NO:1 对应于 Engrailed-2(EN2) 基因的核酸序列(GenBank 参考号 NM_001427),而 SEQ ID NO:2 对应于由其编码的 EN2 蛋白(NCBI 登录号 P19622, gi21903415)。

[0011] 令人惊讶地,已经发现了 EN2 基因在膀胱癌和肺癌中显著上调。

[0012] EN2 基因编码含有同源域的转录因子,其在早期发育中具有许多重要功能,包括轴突导向和边界形成(综述见 Morgan R, (2006). Engrailed: Complexity and economy of a multi-functional transcription factor. FEBS letters 580, 2531-2533, 通过提及而将其完整收入本文)。其 NCBI/GenBank 参考号是 NM_001427。先前报告了其在乳腺癌中起癌基因的作用,尽管尚未将诊断意义归于它(Martin, N. L., Saba-El-Leil, M. K., Sadekova, S., Meloche, S. 及 Sauvageau, G. (2005) EN-2 is a candidate oncogene in human breast cancer. Oncogene 24, 6890-6901, 通过提及而将其完整收入本文)。EN2 基因产物是 33kDa

蛋白 (EN2)。

[0013] 优选地,所述其片段或变体包含:

[0014] (i) 与 SEQ ID NO:1 具有至少约 50%、或至少约 60%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 96%、或至少约 97%、或至少约 98%、或至少约 99% 核酸序列同一性的核酸序列,在严格条件下与其可杂交的核酸序列,和 / 或与其互补的核酸序列;

[0015] (ii) 与 SEQ ID NO:2 具有至少约 50%、或至少约 60%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 96%、或至少约 97%、或至少约 98%、或至少约 99% 氨基酸序列同一性的氨基酸序列;或

[0016] (iii) 由 (i) 的核酸序列编码的氨基酸序列。

[0017] 换言之,依照上文的部分 (iii),优选的是,所述其片段或变体包含:

[0018] (A) 由核酸序列编码的氨基酸序列,其中所述核酸序列与 SEQ ID NO:1 具有至少约 50%、或至少约 60%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 96%、或至少约 97%、或至少约 98%、或至少约 99% 核酸序列同一性;

[0019] (B) 由核酸序列编码的氨基酸序列,其中所述核酸序列在严格条件下同与 SEQ ID NO:1 具有至少约 50%、或至少约 60%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 96%、或至少约 97%、或至少约 98%、或至少约 99% 核酸序列同一性的核酸序列可杂交;或

[0020] (C) 由核酸序列编码的氨基酸序列,其中所述核酸序列同与 SEQ ID NO:1 具有至少约 50%、或至少约 60%、或至少约 70%、或至少约 75%、或至少约 80%、或至少约 85%、或至少约 90%、或至少约 95%、或至少约 96%、或至少约 97%、或至少约 98%、或至少约 99% 核酸序列同一性的核酸序列互补。

[0021] 优选地,所述其片段包含 (i) 来自 SEQ ID NO:2 的至少 4 个、优选地至少 5 个、优选地至少 6 个、优选地至少 7 个、优选地至少 8 个连续的氨基酸或 (ii) 核酸序列 SEQ ID NO:1 中编码来自 SEQ ID NO:2 的至少 4 个、优选地至少 5 个、优选地至少 6 个、优选地至少 7 个、优选地至少 8 个连续的氨基酸的片段。更长的片段也是优选的,例如 SEQ ID NO:2 的至少约 10、15、20、25、30、50、75、100、150、200、225 和多至至少约 250 个氨基酸或 SEQ ID NO:1 的相应的编码片段。片段还可以包括自 N 端和 / 或 C 端删除 x 个氨基酸的截短的肽。在此类截短物中, x 可以是 SEQ ID NO:2 的 1 个或多个 (即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100 或更多个),但是优选地小于 150 个氨基酸或 SEQ ID NO:1 的相应的编码片段。

[0022] 优选地,所述其片段或变体是其功能性片段或变体。

[0023] 依照本发明的另一方面,提供了一种用于诊断患者中的膀胱癌或肺癌或者用于鉴定有风险形成膀胱癌或肺癌的患者的方法,该方法包括:

[0024] (a) 测定自患者获得的样品中的癌症特异性生物标志的量;

[0025] (b) 比较来自所述患者的样品中测定的癌症特异性生物标志的量与正常对照中的所述癌症特异性生物标志的量;

[0026] 其中与所述正常对照中的所述癌症特异性生物标志的量相比,来自所述患者的样

品中的所述癌症特异性生物标志的量的差异与膀胱癌或肺癌的存在有关或者与形成膀胱癌或肺癌的风险有关。

[0027] 依照本发明的另一方面,提供了一种用于监测患者中的膀胱癌或肺癌进展的方法,该方法包括:

[0028] (a) 测定自患者获得的样品中的癌症特异性生物标志的量;

[0029] (b) 比较来自所述患者的样品中测定的癌症特异性生物标志的量与正常对照中的所述癌症特异性生物标志的量;并

[0030] (c) 在两个或更多个时间间隔重复步骤 (a) 和 (b),

[0031] 其中来自所述患者的所述癌症特异性生物标志的量随时间增加与膀胱癌或肺癌的进展升高有关,且来自所述患者的所述癌症特异性生物标志的量随时间减少与膀胱癌或肺癌的进展降低有关。

[0032] 因而,可以使用本发明的方法来检测膀胱癌或肺癌的发作、进展、稳定、改善 (amelioration) 和 / 或减退 (remission)。

[0033] 优选地,对照可以来自与先前样品相同的患者,以如此监测发作或进展。然而,还优选的是,可以相对于群体,特别是没有膀胱癌或肺癌的健康或正常群体使对照标准化。换言之,对照可以由在来自正常受试者的正常对照样品中找到的生物标志水平组成。

[0034] 因而,在本发明的一个例子中,提供了一种诊断或监测膀胱癌或肺癌进展的方法,包括检测和 / 或量化自患者获得的生物学流体中的癌症特异性生物标志。

[0035] 如上文所讨论的,优选的是,提供了在时间上间隔分开的至少两个检测和 / 或量化步骤。

[0036] 优选地,所述步骤间隔分开几天、几周、几年或几个月,以测定癌症特异性生物标志的水平是否已经改变,如此指明癌症的进展是否已经有变化,使得能够在两个或更多个时机采集的样品中的生物标志水平间进行比较,因为生物标志水平随时间的升高指明癌症的发作或进展,而生物标志水平的降低可以指明癌症的改善和 / 或减退。

[0037] 优选地,生物标志水平的差异是统计学显著的,这通过使用“t 检验”确定,所述“t 检验”提供优选地至少约 80%、优选地至少约 85%、优选地至少约 90%、优选地至少约 95%、优选地至少约 99%、优选地至少约 99.5%、优选地至少约 99.95%、优选地至少约 99.99% 的置信区间。

[0038] 本发明的生物标志和方法特别可用于检测早期阶段癌症,而且比用于检测早期阶段膀胱癌和肺癌的已知方法更灵敏。如此,本发明的生物标志和方法特别可用于在已经使用常规方法测得患者在癌症方面呈阴性时确认癌症。

[0039] 预后和治疗的选择取决于癌症的阶段和患者的一般健康状态。

[0040] 关于膀胱癌,阶段以癌症是否仅存在于膀胱的衬里中或者是否已经扩散至其它区域来定义。为了计划治疗,期望知道疾病的阶段。如此,一旦已经诊断出膀胱癌,一般便实施其它测试来测定癌症的阶段。

[0041] 0 期是极早期癌症。在此阶段中,仅在膀胱的内部衬里上找到癌症。在除去癌症后,在内部检查过程中不会观察到肿胀或肿块。在 I 期中,癌细胞已经略深地扩散入膀胱的内部衬里中,但是尚未扩散至膀胱的肌肉壁。在 II 期中,癌细胞已经扩散至给膀胱做衬里的肌肉的内部衬里。在 III 期中,癌细胞已经扩散遍及膀胱的肌肉壁,至膀胱周围的组织层

和 / 或至附近的生殖器官。在此阶段中,即使在已经手术除去癌性组织后仍可以观察到肿胀或肿块。在 IV 期中,癌细胞已经扩散至骨盆或腹壁或至附近的淋巴结。淋巴结是遍及身体找到的小的豆形结构;它们生成并贮存抗感染细胞。癌症也可以已经扩散至远离膀胱的淋巴结和身体的其它部分。

[0042] 关于肺癌,分期对于非小细胞对小细胞肺癌是不同的。

[0043] 非小细胞癌分成四个阶段。I 期是非常局限性的癌症,淋巴结中没有癌症。在 II 期中,癌症已经扩散至受累及肺顶部的淋巴结。在 III 期中,癌症已经在癌症开始的地方附近扩散。这可以是至胸壁、肺的覆盖物(胸膜)、胸腔中间(纵隔)或其它淋巴结。IV 期癌症已经扩散至身体的另一部分。

[0044] 小细胞肺癌分成两组。这是因为小细胞肺癌经常相当早期扩散。即使癌症扩散在扫描时不可见,但有可能的是,一些癌细胞会已经脱离,而且经由血流或淋巴系统传播。因而,经常优选的是,无论是否看到任何继发性癌症,就像它们已经扩散了一样治疗小细胞肺癌。小细胞肺癌的两个阶段是受限性疾病(其是仅可以在一个肺中和在附近的淋巴结中看到的癌症)和广泛性疾病(其是已经在肺外部扩散至胸腔或身体的其它部分的癌症)。

[0045] 应当领会,如本文中所使用的,术语“早期阶段”可以被说成指膀胱癌的 0 期、I 期和 / 或 II 期或非小细胞肺癌的 I 期和 / 或 II 期,或小细胞肺癌的受限性疾病阶段,如上文所讨论的。

[0046] 如本文中所使用的,关于术语“晚期阶段”,应当领会,此术语可以被说成指膀胱癌或非小细胞肺癌的 III 期和 / 或 IV 期,或小细胞肺癌的广泛性疾病阶段,如上文所讨论的。

[0047] 应当领会,癌症疾病状态的“早期阶段”和“晚期阶段”本质是内科医师能确定的。还涵盖的是,它们可以分别与非转移和转移状态有关。

[0048] 在一方面,提供了依照本发明的方法,其用于检测早期阶段癌症,其中对照与自患者获得的样品间的升高指明早期阶段癌症。优选地,升高是至少约 100%、优选地至少约 125%、优选地至少约 150%、优选地至少约 200%、优选地至少约 250%、优选地至少约 300%、优选地至少约 500%。

[0049] 还提供了依照本发明的方法,其用于检测晚期阶段癌症,其中对照与自患者获得的样品间的升高指明晚期阶段癌症。优选地,升高是至少约 100%、优选地至少约 125%、优选地至少约 150%、优选地至少约 200%、优选地至少约 250%、优选地至少约 300%、优选地至少约 500%、优选地至少约 750%、优选地至少约 1000%、优选地至少约 1500%。

[0050] 进一步提供了依照本发明的方法,其用于监测癌症阶段的变化,其中相对于较早阶段的样品或对照,升高指明癌症从疾病的较早阶段进展至较晚阶段,例如自 0 期至 I 期、自 I 期至 II 期、自 II 期至 III 期、自 III 期至 IV 期、自早期阶段至晚期阶段、或自受限性疾病阶段至广泛性疾病阶段。优选地,升高是至少约 100%、优选地至少约 125%、优选地至少约 150%、优选地至少约 200%、优选地至少约 250%、优选地至少约 300%、优选地至少约 500%、优选地至少约 750%、优选地至少约 1000%、优选地至少约 1500%。

[0051] 在涉及膀胱癌的方法中,优选的是,在以正常对照水平的至少约 2 倍、优选地至少约 5 倍、优选地至少约 10 倍、优选地至少约 20 倍、优选地至少约 50 倍、优选地至少约 100 倍、优选地至少约 200 倍、优选地至少约 500 倍、优选地至少约 750 倍、优选地至少约 1000 倍的水平存在时,膀胱癌特异性生物标志指明膀胱癌的存在或形成膀胱癌的风险。

[0052] 在涉及肺癌的方法中,优选的是,在以正常对照水平的至少约 2 倍、优选地至少约 5 倍、优选地至少约 10 倍、优选地至少约 15 倍、优选地至少约 20 倍、优选地至少约 25 倍、优选地至少约 30 倍的水平存在时,肺癌特异性生物标志指明肺癌的存在或形成肺癌的风险。

[0053] 本发明还提供了一种用于监测治疗对膀胱癌或肺癌的功效的方法,包括检测和 / 或量化自患者获得的生物学样品中的癌症特异性生物标志的存在。

[0054] 优选地,在本发明的方法中,膀胱癌和肺癌 (melanoma) 特异性生物标志的检测和 / 或量化通过下列一项或多项进行: MALDI-TOF、SELDI、经由与一种或多种配体的相互作用、基于 1-D 或 2-D 凝胶的分析系统、液相层析、组合的液相层析和质谱术技术 (包括 ICAT(R) 或 iTRAQ(R))、薄层层析、NMR 光谱学、三明治式免疫测定法、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、放射性免疫测定法 (RAI)、酶免疫测定法 (EIA)、侧流 / 免疫层析条测试、Western 印迹、免疫沉淀、基于颗粒的免疫测定法 (包括使用金、银、或乳胶颗粒)、磁性颗粒或 Q 点、和组织切片上的免疫组织化学。

[0055] 优选地,在微量滴定板、条形式、阵列或芯片上实施癌症特异性生物标志的检测和 / 或量化。

[0056] 优选地,癌症特异性生物标志的检测和 / 或量化通过包含对癌症特异性生物标志特异性的抗体,优选地与报告物连接的抗体的 ELISA 进行。

[0057] 优选地,癌症特异性生物标志的检测和 / 或量化通过生物传感器进行。

[0058] 优选地,样品包括自患者获得的生物学流体或组织。优选地,生物学流体或组织包括细胞液、脑脊液 (CSF)、精液、尿液、血液、痰或唾液。在涉及膀胱癌的优选的实施方案中,样品是自患者获得的尿液。在涉及肺癌的优选的实施方案中,样品是自患者获得的痰。

[0059] 优选地,生物标志在细胞表面上可检出。

[0060] 还优选的是,生物学流体基本上或完全没有全 / 完整细胞。优选地,生物学流体没有血小板和细胞碎片 (诸如在细胞裂解时生成的)。优选地,生物学流体没有原核和真核细胞两者。

[0061] 此类样品可以通过本领域中已知的许多手段 (诸如对于技术人员会显而易见的) 任一来获得。例如,尿液和痰样品容易地可得到,而血液或血清样品可以例如通过使用针头和注射器在胃肠外获得。可以通过将样品进行本领域技术人员已知的多种技术,包括但不限于离心和过滤来获得没有细胞或基本上没有细胞的样品。

[0062] 虽然一般优选的是,不使用侵入技术来获得样品,但获得诸如组织匀浆物、组织切片和活组织检查标本等样品仍可以是优选的。

[0063] 本发明的另一方面涉及一种用于治疗膀胱癌或肺癌患者的方法,该方法包括对患者施用治疗有效量的 (i) 本发明的生物标志,或 (ii) 特异性结合本发明的生物标志的抗体或其片段。

[0064] 本发明的另一方面涉及一种用于对患者中的膀胱癌或肺癌成像的方法,该方法包括对患者施用特异性结合本发明的生物标志的抗体或其片段。

[0065] 优选地,所述抗体与可检测标志物,例如荧光标志物或标签缀合。优选地,抗体是单克隆抗体。优选地,所述抗体与生长抑制剂缀合。优选地,所述抗体与细胞毒剂,例如毒素、抗生素、分解酶或放射性同位素缀合。

[0066] 本发明的另一方面涉及一种组合物,其包含本发明的生物标志或结合本发明的生

物标志的抗体或其片段。

[0067] 优选地,所述组合物是药物组合物。

[0068] 本发明还提供了一种疫苗,其包含本发明的生物标志或结合本发明的生物标志的抗体或其片段。

[0069] 本发明的另一方面涉及在体液中可检出的癌症特异性生物标志作为膀胱癌或肺癌生物标志的用途。

[0070] 优选地,所述用途是在选自下组的方法中:临床筛选,预后评估的方法,监测疗法的结果,用于鉴定最有可能响应特定治疗性处理的患者的方法,和药物筛选和开发。

[0071] 本发明的另一方面涉及 (i) 本发明的生物标志,或 (ii) 特异性结合本发明的生物标志的抗体或其片段在制造用于治疗膀胱癌或肺癌的药物中的用途。

[0072] 还提供了一种组合物,其包含 (i) 本发明的生物标志,或 (ii) 特异性结合本发明的生物标志的抗体或其片段,其中所述组合物供膀胱癌或肺癌的治疗中使用。

[0073] 本发明的另一方面涉及特异性结合本发明的生物标志的抗体或其片段,其供对患者中的膀胱癌或肺癌成像的方法中使用。

[0074] 在优选的实施方案中,本发明的方法和组合物用于治疗或诊断早期阶段(例如在疾病症状出现前)的疾病。

[0075] 在一些实施方案中,本发明的方法和组合物用于治疗或诊断临床阶段的疾病。

[0076] 依照本发明的另一方面,提供了供上文所描述的方法或用途中使用的试剂盒,其中所述试剂盒包含能够结合或特异性识别在体液中可检出的癌症特异性生物标志的配体和报告手段。

[0077] 优选地,试剂盒是阵列或芯片。

[0078] 优选地,试剂盒包含微量滴定板、测试条、阵列或芯片。

[0079] 附图简述

[0080] 本发明的例示性实施方案现在会参照附图进行描述。

[0081] 图 1 显示了对来自患者的尿液中的 EN2 蛋白的分析,所述患者因疑似膀胱癌而进行膀胱镜检查 (cytoscopic examination);

[0082] 图 2 显示了肺癌中的 EN2 表达;

[0083] 图 3 显示了 EN2 存在于膀胱癌细胞的表面上;

[0084] 图 4 显示了 EN2 的核酸序列 (SEQ ID NO :1);和

[0085] 图 5 显示了 EN2 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :2)。

[0086] 发明详述

[0087] 本发明涉及膀胱癌特异性生物标志和肺癌特异性生物标志。

[0088] 在本说明书内,术语“包含”解释为指“包括,等等”。这些术语并不意图解释为“仅由...组成”。

[0089] 在本说明书内,术语“约”指加或减 20%,更优选地加或减 10%,甚至更优选地加或减 5%,最优选地加或减 2%。

[0090] 如本文中所使用的,术语“治疗有效量”指减轻源自所讨论疾病的至少一种状况或症状的严重性和/或改善源自所讨论疾病的至少一种状况或症状所需要的组合物的量。

[0091] 在本说明书内,已经以如下的方式描述了实施方案,所述方式使得能够写出清楚

且简明的说明书,但是意图并应当领会,实施方案可以在不背离本发明的前提下进行各种组合或者分拆。

[0092] 对于临床使用,将依照本发明的化合物或其前药形式配制成药物组合物,其配制为与其意图的施用路径,例如口服、直肠、胃肠外或其它施用模式相容。通常,通过混合活性物质与常规的药学可接受稀释剂或载体来制备药物配制剂。如本文中所使用的,语言“药学可接受载体”意图包括与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂、等等。药学可接受稀释剂或载体的例子有水、明胶、阿拉伯树胶、乳糖、微晶纤维素、淀粉、羟基乙酸淀粉钠、磷酸氢钙、硬脂酸镁、滑石、胶体二氧化硅、等等。此类介质和药剂对药学活性物质的用途是本领域中公知的。除非任何常规的介质或药剂与活性化合物不相容,涵盖其在组合物中的用途。

[0093] 此类配制剂也可以含有其它药学活性剂和常规的添加剂,诸如稳定剂、润湿剂、乳化剂、增香剂、缓冲剂、等等。

[0094] 可以通过已知的方法,诸如粒化、压缩、微囊化、喷雾涂层、等等来进一步制备配制剂。可以通过常规的方法以片剂、胶囊剂、颗粒剂、粉剂、糖浆剂、悬浮液、栓剂或注射剂的剂量形式制备配制剂。可以通过将活性物质在水或其它合适的媒介物中溶解或悬浮来制备液体配制剂。可以以常规的方式给片剂和颗粒剂加涂层。

[0095] 用于胃肠外、皮内、或皮下应用的溶液或悬浮液可以包括下列成分:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗细菌剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;及供调节张力用的药剂诸如氯化钠或右旋糖。pH 可以用酸或碱来调节,诸如盐酸或氢氧化钠。胃肠外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量管形瓶中。

[0096] 适合于可注射使用的药物组合物包括无菌水溶液(在水溶性的情况中)或分散体和供即时制备无菌可注射溶液或分散体用的无菌粉剂。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(BASF, Parsippany, NJ) 或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况中,组合物必须是无菌的,而且应当是流体的,其程度使得存在容易的可注射性。它在制造和贮存条件下必须是稳定的,而且必须针对微生物诸如细菌和真菌的污染作用提供防护。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、和液态聚乙二醇、等等)、及其合适的混合物。可以例如通过使用涂层诸如卵磷脂、在分散体的情况中通过维持所要求的粒度、及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟苯甲酸酯、氯丁醇、酚、抗坏血酸、硫柳汞、等等)可以实现阻止微生物的作用。在许多情况中,组合物中包含等张剂(例如糖,多元醇诸如甘露醇、山梨醇、氯化钠)会是优选的。可以通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来引起可注射组合物的吸收延长。

[0097] 可以如下制备无菌可注射溶液,即根据需要在具有上文所列举的一种组分或组分组合的合适溶剂中掺入需要量的活性化合物(例如依照本发明的实施方案的化合物),接着过滤灭菌。一般而言,通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物含有基础分散介质及来自那些上文所列举的组分的其它所需组分。在供制备无菌可注射溶液用的无菌粉剂的情况中,制备的优选方法是自其先前无菌过滤的溶液产生活性成分和

任何其它想要组分的粉末的真空干燥和冷冻干燥。

[0098] 一般而言,口服组合物包含惰性稀释剂或可食用载体。可以将它们封装入明胶胶囊中或者压缩成片剂。出于口服治疗性施用的目的,可以与赋形剂一起掺入活性化合物,并以片剂、锭剂、或胶囊剂形式使用。也可以使用流体载体来制备口服组合物而作为漱口液使用,其中口腔应用流体载体中的化合物,嗖嗖漱口,并吐出或吞下。可以包含药学相容的结合剂和/或辅助材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可以含有任何下列组分或具有相似性质的化合物:粘合剂诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂诸如淀粉或乳糖;崩解剂诸如褐藻酸、Primogel、或玉米淀粉;滑润剂诸如硬脂酸镁或 Sterotes;助流剂诸如胶体二氧化硅;甜味剂诸如蔗糖或糖精;或增香剂诸如薄荷、水杨酸甲酯、或桔味剂。

[0099] 对于通过吸入进行的施用,从含有合适推进剂(例如气体诸如二氧化碳)的加压容器或分配器,或喷雾器以气溶胶喷射形式投递化合物。

[0100] 系统施用也可以是通过经粘膜或经皮手段。对于经粘膜或经皮施用,在配制剂中使用适合于要渗透的屏障的渗透剂。一般而言,此类渗透剂是本领域中已知的,并且包括例如用于经粘膜施用的去污剂、胆汁盐、和梭链孢酸衍生物。可以经由使用鼻喷雾或栓剂来实现经粘膜施用。对于经皮施用,将活性化合物配制成软膏剂、油膏剂、凝胶剂、或乳膏,如本领域中普遍知道的。

[0101] 也可以以用于直肠投递的栓剂(例如用常规栓剂基质,诸如可可脂和其它甘油酯)或保留灌肠剂形式制备化合物。

[0102] 在一个实施方案中,活性化合物与会保护该化合物免于从身体内快速消除的载体一起制备,诸如受控释放配制剂,包括植入物和微囊化投递系统。可以使用生物可降解的、生物相容的聚合物,诸如乙烯-乙酸乙烯、聚(酸)酐、聚乙醇酸、胶原、多正酯(polyorthoester)、和聚乳酸。用于制备此类配制剂的方法对于本领域技术人员会是显而易见的。材料也可以购自 Alza Corporation 和 Nova Pharmaceuticals, Inc。脂质体悬浮液(包括用针对病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体)也可以用作药学可接受载体。这些可以依照本领域技术人员已知的方法来制备。

[0103] 为了容易施用和剂量的一致性以剂量单位形式配制口服或胃肠外组合物是特别有利的。如本文中所使用的,剂量单位形式指物理上离散的单元,其适合作为要治疗的受试者的单一剂量;每个单元含有与所需要的药学载体联合的,预先确定数量的活性化合物,其根据计算,产生想要的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规格由下述各项规定,并直接依赖于下述各项:所述活性化合物的独特性质和要实现的特定治疗效果,和本领域中配合此类活性化合物以治疗个体所固有限制。

[0104] 可以通过在细胞培养物或实验动物中的标准药学规程,例如用于测定 LD50(群体 50%致死的剂量)和 ED50(群体 50%的治疗有效剂量)的,从而测定此类化合物的毒性和治疗功效。毒性与治疗效果之间的剂量比率是治疗系数,并且它可以以比率 LD50/ED50 表示。优选展现出较大治疗系数的化合物。虽然可以使用展现出毒性副作用的化合物,但是应当注意设计如下的投递系统,其将此类化合物靶向受累及组织部位以使对未感染细胞的潜在损害最小化,并且由此降低副作用。

[0105] 可以在配制人用剂量范围中使用自细胞培养测定法和动物研究获得的数据。优选

地,此类化合物的剂量位于循环浓度范围内,其包括具有少许毒性或没有毒性的ED50。剂量可以在此范围内变化,这取决于所采用的剂量形式和所利用的施用路径。对于在本发明的方法中所使用的任何化合物,最初可以自细胞培养测定法评估治疗有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以实现循环血浆浓度范围,其包括 IC50(即实现对症状的半最大抑制的测试化合物浓度),如在细胞培养物中所测定的。可以使用此类信息来更准确地确定人中有用的剂量。可以例如通过高效液相层析来测量血浆中的水平。

[0106] 药物组合物可以与施用指令一起包含在容器、包装、或分配器中。

[0107] 在本说明书内,如本领域已知的,“同一性”是两种或更多种多肽序列或两种或更多种多核苷酸序列之间的关系,如通过比较所述序列所确定的。在本领域中,“同一性”还指多肽或多核苷酸序列(视情况而定)之间的序列关联性程度,如通过此类序列的串之间的匹配所确定的。可以通过已知的方法来容易地计算百分比同一性,包括但不限于那些记载于 Computational Molecular Biology, Lesk, A. M. 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W. 编, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, I 部分, Griffin, A. M. 和 Griffin, H. G. 编, Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 及 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. 和 Devereux, J. 编, M Stockton Press, New York, 1991; 及 Carillo, H. 和 Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073(1988) 的,通过提及而将它们都完整收入本文。用于测定同一性的优选的方法设计为给出所测试序列间的最大匹配。在公众可获得的计算机程序中编码了用于测定同一性的方法。用于测定两种序列间的百分比同一性的优选的计算机程序方法包括但不限于 GCG 程序包 (Devereux, J. 等, Nucleic Acids Research 12(1):387(1984),通过提及而将其完整收入本文)、BLASTP、BLASTN、和 FASTA (Atschul, S. F. 等, J. Molec. Biol. 215:403-410(1990),通过提及而将其完整收入本文)。BLAST X 程序公众自 NCBI 和其它来源可获得 (BLAST Manual, Altschul, S. 等, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S. 等, J. Mol. Biol. 215:403-410(1990),通过提及而将其完整收入本文)。作为例示,通过具有与参照核苷酸序列“SEQ ID NO:A”具有至少例如 95% “同一性”的核苷酸序列的多核苷酸,意图该多核苷酸的核苷酸序列与参照序列相同,只是该多核苷酸序列可以包含参照核苷酸序列“SEQ ID NO:A”的每 100 个核苷酸的多至 5 处点突变。换言之,为了获得具有与参照核苷酸序列至少 95% 相同的核苷酸序列的多核苷酸,可以将参照序列中的多至 5% 的核苷酸删除或者用另一种核苷酸替代,或者可以将参照序列中的总核苷酸的多至 5% 的许多核苷酸插入参照序列中。参照序列的这些突变可以在参照核苷酸序列的 5' 或 3' 端位置或那些末端位置间的任何地方发生,其个别地点缀于参照序列中的核苷酸间或者以一个或多个连续组点缀在参照序列内。类似地,通过具有与参照氨基酸序列“SEQ ID NO:B”具有至少例如 95% 同一性的氨基酸序列的多肽,意图该多肽的氨基酸序列与参照序列相同,只是该多肽序列可以包含参照氨基酸序列“SEQ ID NO:B”的每 100 个氨基酸的多至 5 处氨基酸变化。换言之,为了获得具有与参照氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列的多肽,可以将参照序列中的多至 5% 的氨基酸残基删除或者用另一种氨基酸替代,或者可以将参照序列中的总氨基酸残基的多至 5% 的许多氨基酸插入参照序列中。参照序列的这些变化可以在参照氨基酸序列的氨基或羧基端位置或那些末端位置间

的任何地方发生,其个别地点缀于参照序列中的残基间或者以一个或多个连续组点缀在参照序列内。

[0108] 如本文中所使用的,术语“在严格条件下杂交”意图描述彼此至少 50%同源的编码受体的核苷酸序列通常仍彼此杂交的杂交和清洗条件。该条件可以使得彼此至少约 65%、至少约 70%、或至少约 75%或更多同源的序列通常仍彼此杂交。此类严格条件是本领域技术人员已知的,而且可以参见 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6. 3. 1-6. 3. 6, 通过提及而将其完整收入本文。严格杂交条件的一个例子是在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中于约 45°C 杂交,接着在 0. 2X SSC, 0. 1% SDS 中于 50-65°C 进行一次或多次清洗。在一个实施方案中,在严格条件下与序列 SEQ ID NO:1 杂交的分离的受体核酸分子对应于天然存在的核酸分子。如本文中所使用的,“天然存在的”核酸分子指具有自然界中存在的核苷酸序列(例如编码天然蛋白质)的 RNA 或 DNA 分子。

[0109] 在本说明书内,“抗体或抗体片段”指无论自天然生成抗体的任何物种衍生,还是通过重组 DNA 技术创建;无论自血清、B 细胞、杂交瘤、转染瘤、酵母或细菌分离的抗体(例如 IgG、IgM、IgA、IgD 或 IgE) 或片段(诸如 Fab、F(ab')₂、Fv、二硫化物连接的 Fv、scFv、闭合构象多特异性抗体、二硫化物连接的 scFv、双抗体)。

[0110] 在本说明书内,术语“治疗 / 处理”指对现有疾病的治疗 / 处理和 / 或为了预防疾病发生的预防性处理。因此,可以使用本发明的方法来进行疾病的治疗、预防、进展抑制或发作延迟。

[0111] 术语“生物标志”遍及本领域使用,并且指过程、事件或状况的独特的生物学或生物学衍生的指示物。换言之,生物标志指明某种生物学状态,诸如癌性组织的存在。在一些情况中,不同形式的生物标志可以指明某些疾病状态,但是不限于理论,认为仅仅本发明的生物标志在体液诸如痰或尿液中的水平升高的存在分别指明肺癌或膀胱癌。虽然目前没有设想分泌例如 EN2 肽的不同糖形,然而,这些被本发明所涵盖。例如,还可以对 EN2 测定不同糖形,诸如改变的糖形结构或糖含量,但是这些被涵盖,而且甚至还可以指明膀胱癌或肺癌的进展。还涵盖 EN2 肽或其片段的截短、突变、或删除、或连接。

[0112] 如上文所讨论的,已经令人惊讶地发现了与正常组织相比,膀胱和肺肿瘤中的 EN2 基因的表达显著升高。此外,在膀胱癌患者的尿液中找到 EN2。认为 EN-2 可以被分泌或者可以由于自受损伤的或死亡的细胞泄漏而在体液中可检出。此类升高的水平指明早期阶段和晚期阶段膀胱癌和肺癌。虽然对照或正常水平与早期阶段膀胱癌和肺癌之间有显著升高,但早期与晚期阶段膀胱癌和肺癌之间也有非常显著的升高。广泛地,本发明的优点是可检出该物质和还有癌症的状态。这帮助预后和合适疗法的供应。

[0113] 本发明的另一个优点是能在不诉诸于令人不快的且潜在有害的侵入规程(其还可能是不准确的)的情况下提供准确的诊断。此外,本发明是特别灵敏的。优选地,本发明的方法可以在任何其它检测方法前和癌症的明显症状发作前检测癌症的发作。如此,癌症可以在早期阶段即在其更易受此类治疗影响且不太可能已经进入转移阶段时治疗。

[0114] 可以在诊断方法(例如临床筛选)中及在预后评估、监测疗法的结果、鉴定最有可能响应特定治疗性处理的患者、和药物筛选和开发的方法中使用本发明的生物标志。此外,本发明的生物标志及其用途对于鉴定新的药物治疗及对于发现药物治疗的新靶物是有价值的。

[0115] 术语“诊断”涵盖鉴定、确认、和 / 或表征膀胱癌或肺癌的存在或缺失,及其发展阶段,诸如早期阶段或晚期阶段,或者良性或转移性癌症。

实施例

[0116] 膀胱癌中的 EN2

[0117] 我们已经研究了膀胱癌中的 EN2 表达。使用半定量 PCR 来比较三种不同 TCC 肿瘤中的 EN2mRNA 转录物的数目与肿瘤邻近的正常组织 (“NAT”) 中的数目。这揭示 EN2 在肿瘤中比在 NAT 中以大 1457 倍的水平表达。

[0118] 实施进一步的研究以建立基因表达的此差异是否在膀胱癌患者的尿液中存在的 EN2 蛋白的实际量中得到反映。为此,自因疑似膀胱癌而进行膀胱镜检查的患者收集尿液。使用 20 μ l 尿液来测定 EN2 蛋白,其使用下文所描述的方法经由 Western 印迹来进行。检查总共 62 名患者,其中仅三名随后诊断为患有膀胱癌。所有这三名个体在其尿液中都具有 EN2 蛋白,而被发现没有该疾病的 59 名个体没有可检出量的 EN2 蛋白。图 1 中显示了结果。

[0119] 肺癌中的 EN2

[0120] 我们已经研究了肺癌中的 EN2 表达。使用半定量 PCR 来比较三种不同 NSCLC 肿瘤中的 EN2mRNA 转录物的数目与肿瘤邻近的正常组织 (“NAT”) 和 A549 (即一种自 NSCLC 肿瘤衍生的细胞系) 中的数目。这揭示相对于 NAT, EN2 在肿瘤中和在 A549 细胞中分别以高 28.9 倍和 14.6 倍的水平表达。图 2 中显示了结果。

[0121] 所使用的方法

[0122] 1. 来自尿液样品的 EN2 蛋白的检测 (膀胱癌)

[0123] 通过 Western 印迹进行的 EN2 蛋白检测:以 10,000g 将 1.5ml 尿液离心 5 分钟以除去细胞和细胞碎片。然后,将 20 μ l 上清液与 5 μ l LDL 凝胶运行缓冲液 (Invitrogen) 和 2 μ l 还原剂 (Invitrogen) 直接混合,并加热至 70°C 达 10 分钟。通过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳来解析蛋白质,并将其转移至聚偏二氟乙烯膜。以 0.5 μ g/ml 的浓度使用抗 EN2 抗体 (Abcam, UK)。

[0124] 2. 来自组织样品的 EN2RNA 的检测 (膀胱和肺癌)

[0125] 定量 PCR:首先通过加热至 65°C 达 5 分钟来使 RNA 变性。将 1-5 μ g RNA 在 50 μ l 体积中于 37°C 与终浓度 10mM DTT、1mM dNTP 混合物、及 100ng/ml polyT 引物、200 个单位的逆转录酶 (Invitrogen, USA) 和 40 个单位的 RNaseOUT (Invitrogen, USA) 一起温育 1 小时。通过将管于 80°C 放置 5 分钟来终止 cDNA 合成反应。使用 Stratagene MX4000 实时 PCR 仪来实施 RT-PCR,通过 SYBR 绿色荧光在反应的指数期期间测量 PCR 产物积累。相对于 β -肌动蛋白基因 (其表达在许多细胞类型中是相对恒定的) 的表达计算 EN2 的表达。

[0126] 3. 膀胱癌细胞表面上的 EN2 的检测

[0127] 将 4 种自膀胱癌衍生的细胞系与抗 EN2 抗体一起,接着与具有荧光标签的二抗一起温育。然后,通过 FACS 分选细胞。图 3 中显示了结果。黑线显示了仅用二抗处理的细胞,而灰线显示了用这两者处理的细胞。灰色曲线向右移动指明 EN2 蛋白在细胞表面上可用于一抗结合。这些结果显示细胞系 “TCC”、“EJ” 和 “BHK” 而非 “T24” 在细胞表面上具有 EN2 蛋白。

[0128] 组织取得:膀胱和肺肿瘤 RNA 及来自正常邻近组织的 RNA 购自 Ambion Inc, USA。

[0129] QPCR 引物序列：

[0130] β -肌动蛋白（人）：

[0131] HsBeta-ActinF :5' ATGTACCCTGGCATTGCCGAC 3' (SEQ ID NO :3)

[0132] HsBeta-ActinR :5' GACTCGTCATACTCCTGCTTG 3' (SEQ ID NO :4)

[0133] EN2（人）：

[0134] HsEN2F :5' GAACCCGAACAAAGAGGACA 3' (SEQ ID NO :5)

[0135] HsEN2R :5' CGCTTGTTCTGGAACCAAAT 3' (SEQ ID NO :6)

[0136] 应当理解，本文中所描述的目前优选的实施方案的各种变化和修改对于本领域技术人员会是显而易见的。可以在不背离本发明的精神和范围的前提下及在不减少其附随优点的情况下进行此类变化和修改。因此，意图所附权利要求书覆盖此类变化和修改。

[0001]

序列表

<110> 萨里大学(The University of Surrey)

<120> 生物标志

<130> P60187G-W0

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3405

<212> DNA

<213> 人

<400> 1
tctctcatcg tctgggcgag cggggcggct cgtggtgttt ctaaccagtc tctggattc 60
aaaggtggct cgcgcgcgag cgcggccggc gacttgtagg acctcagccc tggccgcggc 120
cgcccgccac gccctcggaa gactcggcgg ggtggggcgc cgggggtctc cgtgtgcgcc 180
gcgggagggc cgaaggtga tttggaaggg cgtcccgga gaaccagtgt gggatttact 240
gigaacagca tggaggagaa tgacccaag cctggcgaag cagcggcggc ggtggaggga 300
cagcggcagc cgggaatccag ccccgccggc ggctcggcgc gcggcggcgg tagcagccc 360
ggcgaagcgg acaccggcgg cggcgggcgt ctgatgtgc ccgcgggtcct gcaggcgccc 420
ggcaaccacc agcaccgcga ccgcatacc aacttcttca tcgacaacat cctgcggccc 480
gagttcggcc ggcgaaagga cgcggggacc tgctgtgcgg gcgcgggagg aggaaggggc 540
ggcggagccg gcggcgagg cggcgcgagc ggtgcggagg gaggcggcgg cgcgggcggc 600
tcggagcagc tcttgggtc gggctccga gagcccgcc agaaccgcc atgtgcgcc 660
ggcgcggcgg ggccgtccc agccgcggc agcgacttc cgggtgacgg ggaaggcggc 720
tccaagacgc tctcgtgca cgttgccgc aagaaaggcg gcgaccccg cgccccctg 780
gacgggtcgc tcaaggcccg cggcttggc ggccgcgacc tgtcggtag ctccgactcg 840
gacagctcgc aagccgcgc caacctggc gcgcagccca tgctctgcc ggcttgggtc 900
tactgtacgc gctactcgga ccggccttct tcaggtecca ggtctcgaaa accaaagaag 960
aagaaccgga acaaagagga caagcggcgg cgcacggcct ttaccgcccga gcagctgcag 1020
aggctcaagg ccgagttcca gaccaacagg taccigacgg agcagcggcg ccagagcctg 1080
gcgcaggagc tgagcctcaa cgagtcacag atcaagattt ggttcagaa caagcgcgcc 1140
aagatcaaga aggccacggg caacaagaac acgctggcgg tgcacctcat ggacagggc 1200
ttgtacaacc atccaccac agccaaggag ggcaagtcgg acagcagta gggcgggggg 1260
catggaggcc aggtctcagt ccgcgctaaa caatgcaata atttaaatc ataaagggcc 1320
agtgtataaa gattatacca gcattaatag tgaaaatatt gtgtattagc taaggttctg 1380
aaatatctta tgtatatac atttacaggi ggtataaaat ccaaaatata tgactataaa 1440
atatTTTTT gagTTTTTg tgtttatgag attatgctaa ttttatgggt tttttcttt 1500
tttgcaagg gggctgttta gggtttcacc ttttttaat cccctaagct ccattatatg 1560
acattggaca cttttttatt attccaaaag aagaaaaaat taaaacaact tgcigaagtc 1620

[0002]

```

caaagatttt ttattgctgc atttcacaca actgtgaacc gaataaatag ctccattttg 1680
gtctatgact tctgccactt tgtttgtgtt ggcttgggtg ggacagcagg agggggccac 1740
acctcaagcc tggaccagcc acctcaaggc ctgggggagc ttaggggacc tgggtggaga 1800
gaggggactt ccagggtcct tggggcagtt ctgggatttg gccctgggaa gcagcccagc 1860
gtaccccagg cctgctcttg gaagtcggct ccatgctcac cagcagccgc ccaggcccgc 1920
agcctacccc ggctccctct cctcacctc ctgcacctaa ctccctctc ctctctcttt 1980
ttctctctct tctctcttc tcttctctc tgetctctct ttctctctct ttttctctc 2040
ctctctctc tctctctc ctctctctc tcttctctc tctctctc caaggccca 2100
accgtgtgca tacatcgtct gcgtctgttg tctgtgtcgc tgtccccagt cccaccgcag 2160
tcttgcgcga gccctaacc tctgcccctg ggccactgct ccatgcagaa gcgtctcgag 2220
gttctggggc taaaggcctg ggggtgtgtg cctaaagccc aagagcggtg gggcgaccct 2280
ccttttggt tggcccagg aatttctgt gactccacca gccatcatgg gtgccagcca 2340
gggtcccaga aatgaggcca tggctcactg tttctggcg ggcaagaagg tctgtagagg 2400
gagatggcat catctatctt ccttctctt ttctttctt cctatcttt ttctttttt 2460
cctttatctt ttctttctt tggagtggct gcttctgcta tagagaacat tcttccaaga 2520
taaatatgtg tgtttacaca tatgtctgca tgcattgtga cacacacaca cacacacaca 2580
caccaggcgt gttttagtcc acagtctga aacattgtgc taccttctct ttcaaaagaa 2640
ctcagaatcc tccaggatct agaagaagga agaaagtgtg taaataatca ttcttatca 2700
tcactttttg tcttttctt ttttttaaaa tatacatttt atttttgaag gtgtgttaca 2760
gtgtlaatta aatataattca atataattcc caccaagtac ctatatagt atataaaca 2820
acacattatc tatatataac gccacactgt cttctgttta gtgtatgggg aaagaccaat 2880
ccaactgtcc atctgtggct gggacagccc aggggggtgtg cccacggctg acccaggggt 2940
gtgcacacgg ctgagctggg agtcccgctg gtctccctga ggactgaggg tgaacttgc 3000
tctttgcctt aaacctcttt atttcattgc agtaatagtt ttacgtttga cataatagtg 3060
taaacctttt taaaaaggaa agtataaaaa caaaagtgtt aattttaaag tctgaataac 3120
cactctctgc ttaggaaact caatgaaatg acatgccctt ttacgaggaa gcaaagttgg 3180
ttctgtttt ttgttttctt tgtgtttta gtttataaaa catgtgcatt ttacagttcc 3240
agtatcaaat atttataatc ttatgagaaa tgaatgaatg ttctatttta caactgtgct 3300
tatcaaaatt gtgaacaccc ccacccccgc atttttgtgt gttgaaatc ttgaaggtta 3360
cattaaataa aacaaaatct ctattattata aaataaaaaa aaaaa 3405

```

<210> 2
 <211> 333
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Glu Glu Asn Asp Pro Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ala Val Glu
 1 5 10 15

[0003]

Gly	Gln	Arg	Gln	Pro	Glu	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	20	25	30
Gly	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Glu	Ala	Asp	Thr	Gly	Arg	Arg	Arg	Ala	Leu	35	40	45
Met	Leu	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Pro	Gly	Asn	His	Gln	His	Pro	His	50	55	60
Arg	Ile	Thr	Asn	Phe	Phe	Ile	Asp	Asn	Ile	Leu	Arg	Pro	Glu	Phe	Gly	65	70	75
Arg	Arg	Lys	Asp	Ala	Gly	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Arg	85	90	95
Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Glu	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Ala	Glu	Gly	Gly	100	105	110
Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ser	Glu	Gln	Leu	Leu	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Glu	115	120	125
Pro	Arg	Gln	Asn	Pro	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly	Ala	Gly	Gly	Pro	Leu	Pro	130	135	140
Ala	Ala	Gly	Ser	Asp	Ser	Pro	Gly	Asp	Gly	Glu	Gly	Gly	Ser	Lys	Thr	145	150	155
Leu	Ser	Leu	His	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Gly	Gly	Asp	Pro	Gly	Gly	Pro	165	170	175
Leu	Asp	Gly	Ser	Leu	Lys	Ala	Arg	Gly	Leu	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Ser	180	185	190
Val	Ser	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Ser	Gln	Ala	Gly	Ala	Asn	Leu	Gly	Ala	195	200	205
Gln	Pro	Met	Leu	Trp	Pro	Ala	Trp	Val	Tyr	Cys	Thr	Arg	Tyr	Ser	Asp	210	215	220
Arg	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Arg	Ser	Arg	Lys	Pro	Lys	Lys	Lys	Asn	Pro	225	230	235
Asn	Lys	Glu	Asp	Lys	Arg	Pro	Arg	Thr	Ala	Phe	Thr	Ala	Glu	Gln	Leu	245	250	255
Gln	Arg	Leu	Lys	Ala	Glu	Phe	Gln	Thr	Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Glu	Gln	260	265	270
Arg	Arg	Gln	Ser	Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Ser	Gln	Ile	275	280	285
Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Lys	Arg	Ala	Lys	Ile	Lys	Lys	Ala	Thr	Gly	290	295	300

[0004]

Asn Lys Asn Thr Leu Ala Val His Leu Met Ala Gln Gly Leu Tyr Asn
305 310 315 320

His Ser Thr Thr Ala Lys Glu Gly Lys Ser Asp Ser Glu
325 330

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> QPCR 引物序列

<400> 3
atgtaccctg gcattgccga c 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> QPCR 引物序列

<400> 4
gactcgtcat actcctgctt g 21

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> QPCR 引物序列

<400> 5
gaaccggaac aaagaggaca 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> QPCR 引物序列

<400> 6
cgcttgttct ggaaccaaatt 20

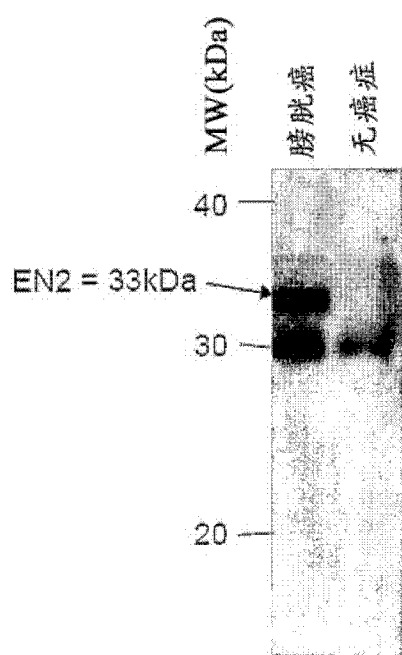


图 1

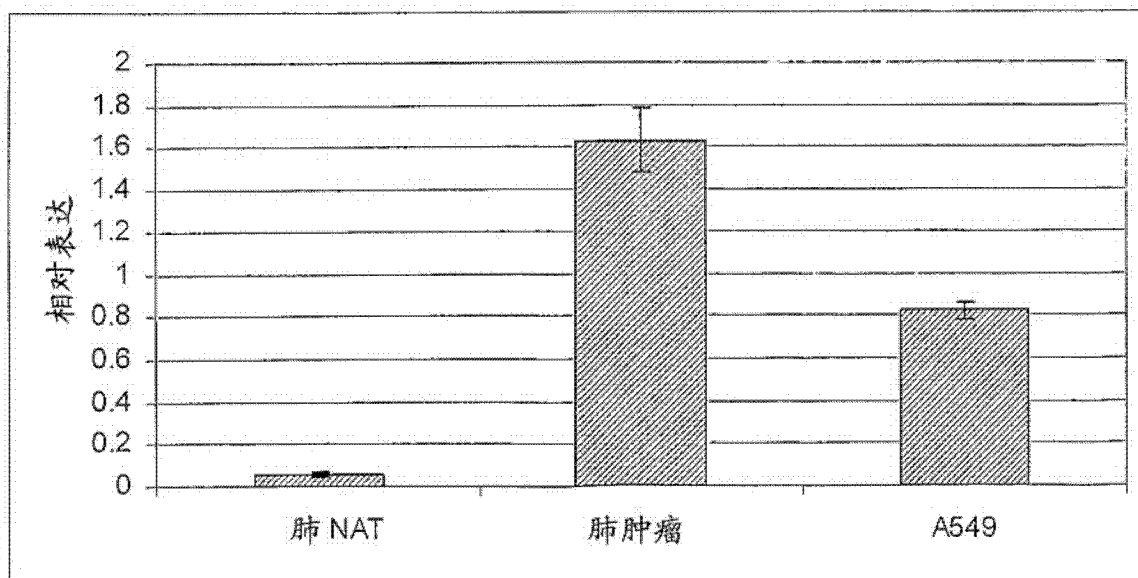


图 2

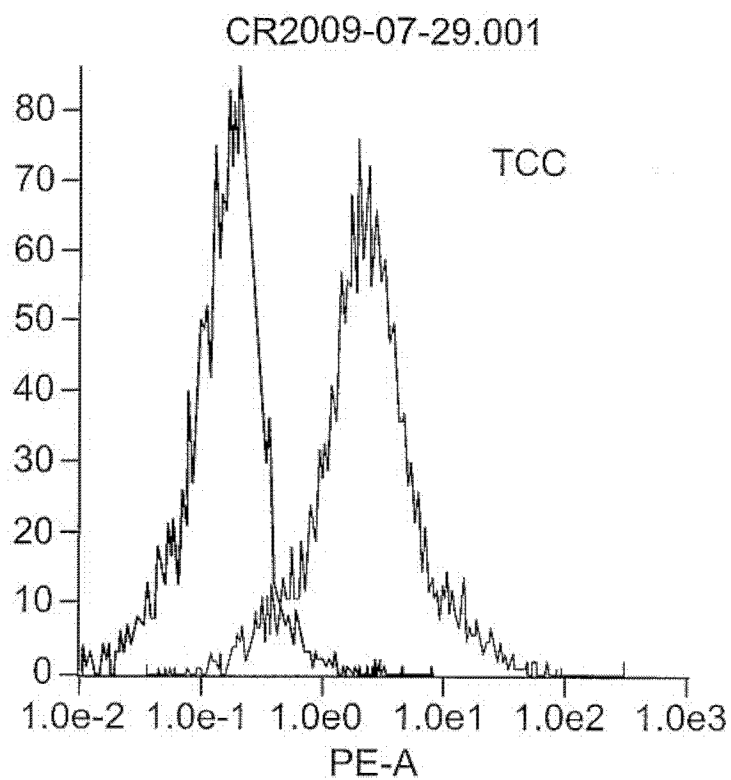


图 3a

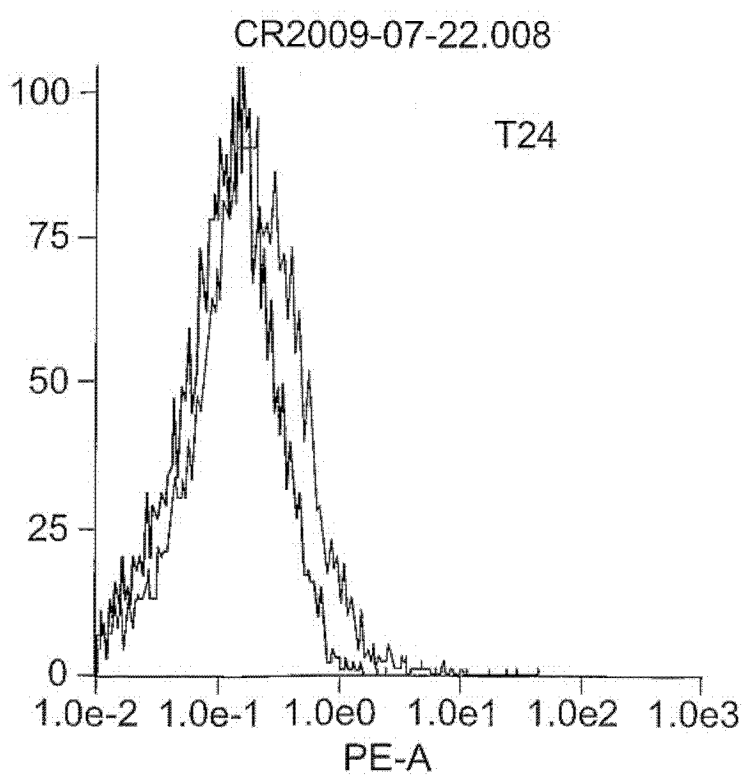


图 3b

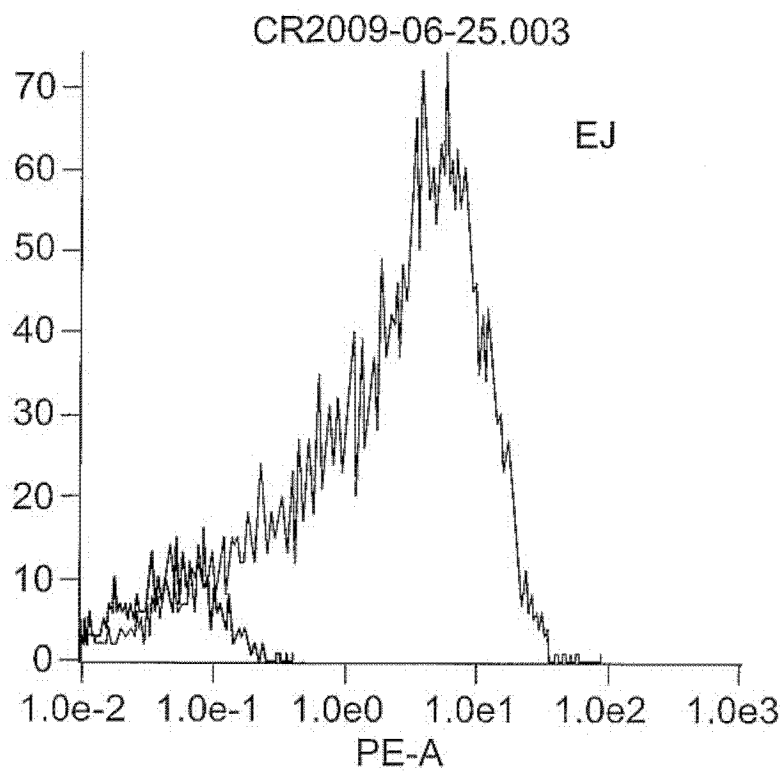


图 3c

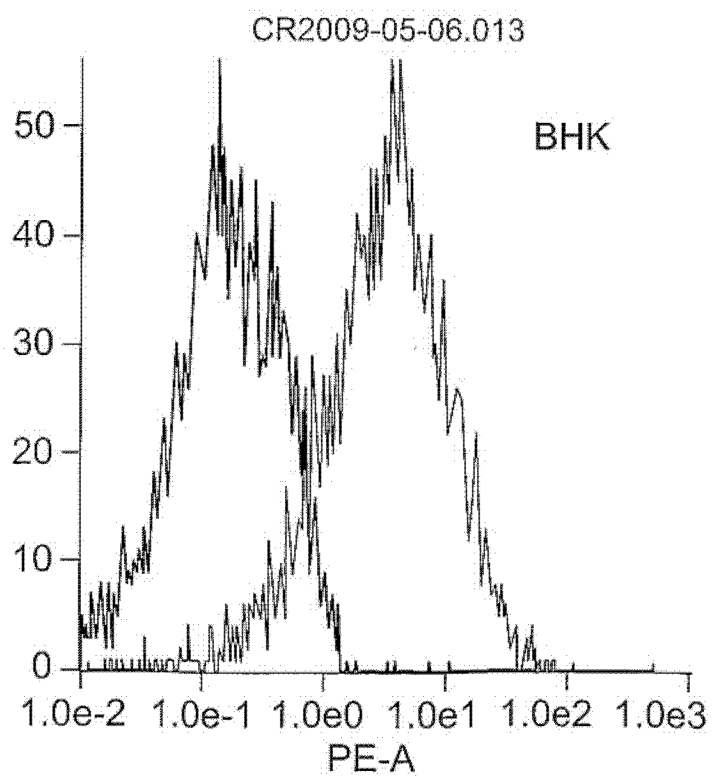


图 3d

```

1  tctotcattcg tctgggagag cggggcggt cgtggtgttt ctaaccaggt tctgtgattc
61  aaaggtggct ccgcccagag cgcggccggc gacttgtagg aactcagccc tggccgcggc
121  cgccgcgcac gccctcggaa gactcggcgg ggtgggggag cgggggtctc cgtgtgcgcc
181  gcgggagggc cgaaggctga tttggaaggg cgtccccgga gaaccagtgt gggatttact
241  gtgaacagca tggaggagaa tgaccccaag cctggogaag cagcggcggc ggtggaggga
301  cagcggcagc cggaatccag ccccggcggc ggcctggggc ggcggcggcg tagcagcccg
361  ggccaagcgg acaccggggc cgcgggggct ctgatgctgc ccgcggtcct gcaggcgccc
421  ggcaaccacc agcaccgcga ccgcattacc aacttcttca tcgacaacat cctgogggcc
481  gagttcggcc ggcgaaagga cgcggggacc tgcctgtgag ggcggggagg aggaaggggc
541  ggcgagagcg ggcgcgaagg cggcgcgagc ggtgoggagg gaggcggcgg cgcgggcggc
601  tcggagcagc tcttgggctc gggtcccgga gagccccggc agaaccggcc atgtgcgcc
661  ggcgcgggcg ggccgctccc agccgcgggc agcgactctc cgggtgacgg ggaaggcggc
721  tccaagacgc tctcgctgca cgggtggcgcc aagaaaggcg gcgacccggc cggccccctg
781  gacgggtcgc tcaaggcccg cggcttgggc ggcgcgacc tgcgggtgag ctgggactcg
841  gcagactcgc aagccggcgc caacctgggc gcgcagccca tgcctgagcc ggcgtgggtc
901  tactgtacgc gctactcgga ccggccttct tcaggtcoca ggtctcgaaa accaaagaag
961  aagaaccgga acaaagagga caagcggcgc cgcacggcct ttaccggcga gcagctgcag
1021  aggtcaagg ccgagttcca gaccaacagg tacctgacgg agcagcggcg ccagagcctg
1081  gcgcaggagc tgagcctcaa cgagtcacag atcaagattt ggttcagaaa caagcgcgcc
1141  aagatcaaga aggccacggg caacaagaac acgctggcgc tgcacctcat ggcacagggc
1201  ttgtacaacc actccaccac agccaaggag ggcaagtcgg acagcgagta gggcgggggg
1261  catggaggcc aggtctcagt ccgcgctaaa caatgcaata atttaaaatc ataaagggcc
1321  agtgtataaa gattatacca gcattaatag tgaaaatatt gtgtattagc taaggttctg
1381  aaatattcta tgtatatatc atttacaggc ggtataaaat ccaaaatata tgactataaa
1441  atattttttt gagttttttg tgtttatgag attatgctaa ttttatgggt tttttctttt
1501  tttgcgaagg gggctgctta gggtttcacc tttttttaat cccctaagct ccatttatatg
1561  acattggaca cttttttatt attccaaaag aagaaaaaat taaaacaact tgcgaagtc
1621  caaagatttt ttattgctgc atttcacaca actgtgaacc gaataaatag ctccattttg
1681  gtctatgact tctgccactt tgtttgtgtt ggcttgggtg ggacagcagg aggggcccac
1741  acctcaagcc tggaccagcc acctcaaggc cttggggagc ttgggggacc tgggtgggag
1801  gaggggactt ccagggtcct tgggocaggt ctgggatttg gccctgggaa gcagcccagc
1861  gtaccccagg cctgctctgg gaagtccgct ccagtctcac cagcgcgcgc caggcccgcc
1921  agccctcacc ggctccctct cctcacctct ctgcacctaa ctccctctct cttctctttt
1981  ttctctctct tctctcttcc tcttctctcc tgcctctctt tcttctctct ttttctctct
2041  ctctctctcc tctctctctc ctctctcttc tcttctctcc tctctctcac caagggccca
2101  accgtgtgca tacatcgtct gcgtctgtgg tctgtgtcgc tgtcccaggt cccaccgcag
2161  tctgcccga ggcctaacc tctgcccgtg ggcactgctt ccatgcagaa gcgcttcgag
2221  gttctggggc taaaggcctg ggggtgtgtg cctaaagccc aagagcgggt gggcgaccct
2281  ccttttggct tggccccagg aatttctctg gactccacca gccatcatgg gtgccagcca
2341  gggccccaga aatgaggcca tggctcactg tttctgggag ggcagaaggc totgtagagg
2401  gagatggcat catctatctt ctttctcttt tcttttctt ccctattttt ttcttttttt
2461  cttttatttt tttctttttt tggagtggct gcttctgcta tagagaacat tcttccaaga
2521  taaatatgtg tgtttacaca tatgtctgca tgcattgtga cacacacaca cacacacaca
2581  caccaggcgt gtttgagtcc acagttctga aacatgtggc taccttgtct ttcaaaagaa
2641  ctcagaatcc tccaggatct agaagaagga agaaagtgtg taaataatca tttottatca
2701  tcactttttg tctttttctg ttttttaaaa tatacatttt atttttgaag gtgtggtaca
2761  gtgtaaatta aatatattca atatatattc caccaagtac ctatatatgt atataacaa
2821  acacattatc tatatataac gccacactgt cttctgttta gtgtatgggt aaagaccaat
2881  ccaactgtcc atctgtggct gggacagccc aggggggtgt cccacggctg cccaggggt
2941  gtgcacacgg ctgagctggg agtcccgctg gtctccctga ggactgaggg tgaacttcgc
3001  tctttgcctt aaacctcttt atttcattgc agtaatagtt ttacgttgta cataatagtg
3061  taaacctttt taaaaaggaa agtataaaaa caaaagtgtt aattttaaag tctgaataac
3121  catctgctgc ttaggaaact caatgaaatg acatgccttt ttagcaggaa gcaaagtgtg
3181  tttctgtttt ttgttttctt tgtgttttta gtttataaaa catgtgcatt ttacagttcc
3241  agtatcaaat atttataatc ttatgagaaa tgaatgaatg tttctattta caactgtgct
3301  tatcaaaatt gtgaacaccc ccaccccgcc atttttgtgt gttgaaattc ttgaagggtt
3361  cattaaataa aacaaaatct ctttattata aaataaaaaa aaaaa

```

图 4

```
      10      20      30      40      50      60
MEENDPKPGE AAAAVEGQRQ PESSPGGGSG GGGGSSPGEA DTGRRRALML PAVLQAPGNH

      70      80      90     100     110     120
QHPHRITNEF IDNILRPEFG RRKDAGTCCA GAGGGRGGGA GGEGGASGAE GGGGAGGSEQ

      130     140     150     160     170     180
LLGSGSREPR QNPPCAPGAG GPLPAAGSDS PGDGEGGSKT LSLHGGAKKG GDPGGPLDGS

      190     200     210     220     230     240
LKARGLGGGD LSVSSDS DSS QAGANLGAQP MLWPAWVYCT RYSDRPSSGP RSRKPKKKNP

      250     260     270     280     290     300
NKEDKRPRTA FTAEQLQRLK AEFQTNRYLT EQRQSLAQE LSLNESQIKI WFQNKRAKIK

      310     320     330
KATGNKNTLA VHLMAQGLYN HSTTAKEGKS DSE
```

图 5