



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101835894 A

(43) 申请公布日 2010.09.15

(21) 申请号 200880113403.X

代理人 罗天乐

(22) 申请日 2008.08.21

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

60/957,956 2007.08.24 US

60/977,360 2007.10.03 US

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.04.26

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2008/065352 2008.08.21

(87) PCT申请的公布数据

W02009/028580 EN 2009.03.05

(71) 申请人 肿瘤疗法科学股份有限公司

地址 日本神奈川县

(72) 发明人 中村佑辅 醍醐弥太郎 中鹤修一

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

权利要求书 5 页 说明书 111 页 序列表 63 页
附图 34 页

(54) 发明名称

EBI3、DLX5、NPTX1 和 CDKN3 用作肺癌治疗和诊断的靶基因

(57) 摘要

本发明涉及通过施用针对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因中一种或更多的双链分子,或包含上述双链分子的组合物、载体或细胞,来治疗或预防癌症的方法。本发明亦提供利用选自 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的一种或多种过表达的基因来诊断肺癌,特别是 NSCLC 或 SCLC 的方法。还公开了以化合物对肺癌中 EBI3、DLX5、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 中一种或多种的过表达,EBI3、DLX5、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 中一种或多种的细胞增殖功能,或 CDKN3 与 VRS、EF-1beta、EF-1gamma 和 / 或 EF-1delta 间相互作用的影响作为指标,鉴定用于治疗 and 预防肺癌的化合物的方法。

1. 一种分离的双链分子, 当它被导入细胞时, 抑制 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的体内表达以及细胞增殖, 所述分子包含有义链及与其互补的反义链, 所述链互相杂交以形成双链分子。

2. 权利要求 1 的双链分子, 其中所述有义链包含与选自 SEQ ID NO:18、20、49、51、84 和 85 中的靶序列对应的序列。

3. 权利要求 2 的双链分子, 其中所述双链分子是长度为大约 19 个到大约 25 个核苷酸之间的寡核苷酸。

4. 权利要求 1 的双链分子, 其由单一多核苷酸组成, 所述多核苷酸包含通过间插单链连接的所述有义链与反义链二者。

5. 权利要求 4 中的双链分子, 其具有通式 5'-[A]-[B]-[A']-3', 其中 [A] 是包含与选自 SEQ ID NO:18、20、49、51、84 和 85 中的靶序列对应的序列的有义链, [B] 是由 3 到 23 个核苷酸组成的间插单链, 且 [A'] 是包含 [A] 的互补序列的反义链。

6. 一种表达权利要求 1 到 5 所述双链分子的载体。

7. 一种治疗癌症的方法, 所述癌症表达至少一种选自 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因的基因, 其中所述方法包括施用至少一种权利要求 1 到 4 所述的分离的双链分子或权利要求 6 的载体的步骤。

8. 权利要求 7 的方法, 其中所治疗的癌症是肺癌。

9. 一种治疗癌症的组合物, 所述癌症表达至少一种选自 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因的基因, 其中所述组合物包含至少一种权利要求 1 到 4 所述的分离的双链分子或权利要求 6 的载体。

10. 权利要求 9 所述的组合物, 其中所治疗的癌症是肺癌。

11. 一种诊断肺癌的方法, 所述方法包括下列步骤:

(a) 通过选自下述组中的任一方法确定源自受试者的生物样品中所述基因的表达水平:

(i) 检测选自 EBI3、DLX5 和 CDKN3 的 mRNA ; ,

(ii) 检测选自 EBI3、DLX5 和 CDKN3 的蛋白质, 和

(iii) 检测选自 EBI3、DLX5 和 CDKN3 的蛋白质的生物学活性 ; 并

(b) 将步骤 (a) 中确定的表达水平相比于所述基因正常对照水平的提高与肺癌的存在相关联。

12. 权利要求 11 的方法, 其中步骤 (a) 中确定的表达水平至少比正常对照水平高 10%。

13. 权利要求 11 的方法, 其中步骤 (a) 中确定的表达水平是通过检测抗体针对选自 EBI3、DLX5 和 CDKN3 的蛋白的结合来确定的。

14. 权利要求 11 的方法, 其中所述源自受试者的生物样品包括活检物、痰、血液、胸腔积液或尿液。

15. 一种评估或确定肺癌患者的预后的方法, 所述方法包括下列步骤:

(a) 检测源自患者的生物样品中基因的表达水平 ;

(b) 将所述检测得到的表达水平与对照水平相比较 ; 和

(c) 基于 (b) 中的比较确定所述患者的预后,

且其中所述基因选自下组：EBI3、DLX5、CDKN3 或 EF-1delta。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述对照水平是良好预后对照水平，并且将相比于所述对照水平的表达水平增加确定为不良预后。

17. 权利要求 15 的方法，其中所述增加为至少高于对照水平 10%。

18. 权利要求 15 的方法，其中所述表达水平是通过选自下组的任一方法确定的：

- (a) 检测 EBI3、DLX5、CDKN3 或 EF-1delta 的 mRNA；
- (b) 检测 EBI3、DLX5、CDKN3 或 EF-1delta 蛋白；和
- (c) 检测 EBI3、DLX5、CDKN3 或 EF-1delta 蛋白的生物学活性。

19. 权利要求 15 的方法，其中所述源自患者的生物样品包括活检物、痰或血液、胸腔积液或尿液。

20. 一种用于诊断肺癌或评估或确定肺癌患者预后的试剂盒，其包括选自下组的试剂：

- (a) 用于检测基因 mRNA 的试剂；
- (b) 用于检测所述基因编码的蛋白的试剂；和
- (c) 用于检测所述蛋白的生物学活性的试剂

且其中所述基因选自下组：EBI3、DLX5、CDKN3 或 EF-1delta。

21. 权利要求 20 的试剂盒，其中所述试剂为针对所述基因的基因转录物的探针。

22. 权利要求 20 的试剂盒，其中所述试剂为针对所述基因编码的蛋白的抗体。

23. 一种诊断受试者中肺癌的方法，包括下列步骤：

- (a) 提供来自待诊断的受试者血液样品；
- (b) 确定该血液样品中 EBI3 蛋白的水平；
- (c) 将步骤 (b) 中确定的 EBI3 水平与正常对照相比较，其中所述血液样品中相比于正常对照的高 EBI3 水平表明所述受试者罹患肺癌。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述血液样品选自下组：全血、血清和血浆。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述 EBI3 蛋白是通过免疫测定检测的。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述免疫测定为 ELISA。

27. 权利要求 23 的方法，进一步包括下列步骤：

- (d) 确定所述血液样品中 CEA 的水平；
- (e) 将步骤 (d) 中确定的 CEA 水平与正常对照相比较，其中在所述血液样品中相比于正常对照的高 EBI3 水平和 / 或高 CEA 水平表明所述受试者罹患肺癌。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述肺癌是 NSCLC。

29. 权利要求 23 的方法，进一步包括下述步骤：

- (d) 确定所述血液样品中 CYFRA 的水平；
- (e) 将步骤 (e) 中确定的 CYFRA 水平与正常对照相比较，其中在所述血液样品中相比于正常对照的高 EBI3 水平和 / 或高 CYFRA 水平表明所述受试者罹患肺癌。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述肺癌是 SCC。

31. 权利要求 23 的方法，进一步包括下述步骤：

- (d) 确定所述血液样品中 pro-GRP 的水平；
- (e) 将步骤 (e) 中确定的 pro-GRP 水平与正常对照相比较，其中在所述血液样品中相比

于正常对照的高 EBI3 水平和 / 或高 pro-GRP 水平表明所述受试者罹患肺癌。

32. 权利要求 31 的方法, 其中所述肺癌是 SCLC。

33. 一种用于检测表达 EBI3 的癌症的试剂盒, 其中所述试剂盒包括:

- (i) 用于确定血液样品中 EBI3 水平的免疫测定试剂; 和
- (ii) EBI3 的阳性对照样品。

34. 权利要求 33 的试剂盒, 进一步包括:

- (iii) 用于确定血液样品中 CEA、CYFRA 和 / 或 pro-GRP 水平的免疫测定试剂; 和
- (iv) CEA、CYFRA 和 / 或 pro-GRP 的阳性对照样品。

35. 权利要求 34 的试剂盒, 其中所述阳性对照样品对 EBI3、CEA、CYFRA 和 / 或 pro-GRP 为阳性。

36. 一种诊断受试者中肺癌的方法, 包括下述步骤:

- (a) 从待诊断的受试者收集血液样品;
- (b) 确定该血液样品中 NPTX1 和 CYFRA 的水平;
- (c) 将 (b) 中确定的 NPTX1 水平与 CYFRA 水平与正常对照相比较; 和
- (d) 判断血液样品中相比于正常对照的高 NPTX1 水平和 / 或高 CYFRA 水平表明所述受试者罹患肺癌。

37. 权利要求 36 的方法, 其中所述肺癌为鳞状细胞癌 (SCC)。

38. 权利要求 36 的方法, 其中所述血液样品选自下组: 全血、血清与血浆。

39. 一种用于检测表达 NPTX1 与 CYFRA 蛋白的癌症的试剂盒, 其中所述试剂盒包括:

- (i) 确定血液样品中 NPTX1 与 CYFRA 蛋白水平的免疫测定试剂; 和
- (ii) NPTX1 和 CYFRA 蛋白的阳性对照样品。

40. 一种筛选用于治疗或预防肺癌或抑制肺癌细胞生长的候选化合物的方法, 所述方法包括下述步骤:

- (a) 使测试化合物与由 EBI3、DLX5 或 CDKN3 的多核苷酸编码的多肽接触;
- (b) 检测所述多肽与所述测试化合物之间的结合活性; 和
- (c) 选择与所述多肽结合的化合物。

41. 一种筛选用于治疗或预防肺癌或抑制肺癌细胞生长的候选化合物的方法, 所述方法包括下述步骤:

- (a) 使测试化合物与由 EBI3、DLX5 或 CDKN3 的多核苷酸编码的多肽接触;
- (b) 检测步骤 (a) 中所述多肽的生物学活性; 和
- (c) 选择与测试化合物不存在时由 EBI3、DLX5 或 CDKN3 的多核苷酸编码的多肽的生物学活性相比, 阻抑所述多肽的生物学活性的测试化合物。

42. 权利要求 41 的方法, 其中所述生物学活性选自下组: 促进细胞增殖、细胞侵袭、胞外分泌、磷酸酶活性与 Akt 磷酸化。

43. 权利要求 42 的方法, 其中所述磷酸酶活性是用 EF-1delta 检测的。

44. 一种筛选用于治疗或预防肺癌, 或抑制肺癌细胞生长的候选化合物的方法, 所述方法包括下述步骤:

- (a) 使候选化合物与表达 EBI3、DLX5 或 CDKN3 的细胞相接触; 和
- (b) 选择与所述测试化合物不存在时的 EBI3、DLX5 或 CDKN3 表达水平相比, 降低所述

表达水平的候选化合物。

45. 一种筛选用于治疗或预防肺癌或抑制肺癌细胞生长的候选化合物的方法,所述方法包括下述步骤:

(a) 使候选化合物与导入了包含 EBI3、DLX5 或 CDKN3 转录调控区域以及在所述转录调控区域控制下表达的报道基因的载体的细胞相接触;

(b) 测量所述报道基因的表达或活性;和

(c) 选择与对照相比降低所述报道基因的表达或活性水平的候选化合物。

46. 一种筛选用于治疗或预防肺癌或抑制肺癌细胞生长的候选化合物的方法,所述方法包括下述步骤:

(a) 在测试化合物的存在下,使 CDKN3 多肽或其功能等价物与选自下组的相互作用对象相接触:VRS 多肽、EF-1alpha 多肽、EF-1beta 多肽、EF-1gamma 多肽、EF-1delta 多肽及其功能等价物;

(b) 检测所述多肽之间的结合;和

(c) 选择抑制这些多肽之间结合的测试化合物。

47. 权利要求 46 的方法,其中所述 EF-1delta 多肽的功能等价物包括由 SEQ ID NO:48 组成的多肽。

48. 权利要求 46 的方法,其中所述 CDKN3 多肽的功能等价物包括 VRS 多肽、EF-1alpha 多肽、EF-1beta 多肽、EF-1gamma 多肽或 EF-1delta 结合域的氨基酸序列。

49. 一种筛选用于治疗或预防肺癌的化合物的方法,所述方法包括下述步骤:

(a) 使候选化合物与过表达 CDKN3 的细胞相接触;

(b) 测量 Akt Ser473 的磷酸化;和

(c) 选择与对照相比减少所述磷酸化的候选化合物。

50. 一种筛选用于治疗或预防肺癌的化合物的方法,其中所述方法包括下述步骤:

(a) 在测试化合物的存在下,使 NPTX1 多肽或其功能等价物与 NPTXR 多肽或其功能等价物相接触;

(b) 检测所述多肽之间的结合;和

(c) 选择抑制所述多肽之间的结合的测试化合物。

51. 权利要求 50 的方法,其中所述 NPTX1 多肽的功能等价物包括 NPTXR 结合域。

52. 权利要求 50 的方法,其中所述 NPTXR 多肽的功能等价物包括 NPTX1 结合域。

53. 与包含 SEQ ID NO:88 或 89 的多肽结合的抗体。

54. 权利要求 53 的抗体,其具有中和 NPTX1 的活性。

55. 一种用于治疗或预防肺癌的组合物,所述组合物包含药学有效量的抗 NPTX1 抗体或其片段。

56. 权利要求 55 的组合物,其中所述 NPTX1 抗体是权利要求 53 与 54 的抗体。

57. 一种在受试者中治疗或预防肺癌的方法,包括对所述受试者施用抗 NPTX1 抗体或其片段。

58. 权利要求 57 的方法,其中所述 NPTX1 抗体是权利要求 53 与 54 的抗体。

59. 一种多肽,其包含 ENQSLRGVVQELQQAISKL ID NO:61;或与该多肽功能上等价的肽的氨基酸序列,其中所述多肽缺乏由 SEQ ID NO:8 组成的肽的生物学功能。

60. 权利要求 59 的多肽,其中所述生物学功能为细胞增殖活性。
61. 权利要求 59 的多肽,其中所述多肽由 8 到 30 个残基组成。
62. 权利要求 59 的多肽,其中所述多肽被细胞膜渗透性物质所修饰。
63. 权利要求 59 的多肽,其具有下述通式:

[R]-[D];

其中 [R] 与 [D] 可通过接头如 GGG 直接或间接地相连,其中 [R] 代表所述细胞膜渗透性物质;而 [D] 代表包含 ENQSLRGVVQELQQAI SKL ID NO :61 的片段序列的氨基酸序列,或者与包含所述片段序列的多肽功能上等价的多肽的氨基酸序列,其中所述多肽缺乏由 SEQ ID NO :8 组成的肽的生物学功能。

64. 权利要求 63 所述的多肽,其中所述细胞膜渗透性物质是选自下组中的任一个:

聚精氨酸;

Tat/RKKRRQRRR/SEQ ID NO :63;

Penetratin/RQIKIWFQNRRMKWKK/SEQ ID NO :64;

Buforin II/TRS SRAGLQFPVGRVHRLLRK/SEQ ID NO :65;

Transportan/GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL/SEQ ID NO :66;

MAP(模式两亲性肽)/KLALKLALKALKAALKLA/SEQ ID NO :67;

K-FGF/AAVALLPAVLLALLAP/SEQ ID NO :68;

Ku70/VPMLK/SEQ ID NO :69

Ku70/PMLKE/SEQ ID NO :70;

朊病毒 /MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP/SEQ ID NO :71;

pVEC/LLIILRRRIRKQAHASK/SEQ ID NO :72;

Pep-1/KETWWETWWTEWSQPKKRKV/SEQ ID NO :73;

SynB 1/RGGRLSYSRRRFSTSTGR/SEQ ID NO :74;

Pep-7/SDLWEMMMVSLACQY/SEQ ID NO :75;和

HN-1/TSPLNIHNGQKL/SEQ ID NO :76.

65. 权利要求 64 的多肽,其中所述聚精氨酸是 Arg 11 (RRRRRRRRRRR/SEQ ID NO :77)。

66. 一种用于治疗 and / 或预防癌症的药剂,其包含权利要求 59 到 65 的多肽作为活性成分。

67. 权利要求 66 的药剂,其中所述癌症是肺癌。

68. 一种治疗或预防肺癌的方法,包括施用权利要求 59 到 65 的多肽的步骤。

69. 权利要求 68 的方法,其中所述癌症是肺癌。

EBI3、DLX5、NPTX1 和 CDKN3 用作肺癌治疗和诊断的靶基因

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 8 月 24 日提交的美国临时申请序列号 60/957956 与 2007 年 10 月 3 日提交的序列号 60/977360 的美国临时申请的权利,其内容在此提述的方式全部并入在本文中。

技术领域

[0003] 本方面涉及生物科学领域,更具体地说,涉及癌症研究,癌症诊断与癌症治疗领域。具体而言,本方面涉及检测与诊断肺癌的方法,以及治疗与预防肺癌的方法。另外,本发明涉及筛选用于治疗 and / 或预防癌症的药剂的方法。

现有技术

[0004] 肺癌是全球范围内一种最常见的致命性癌症,且非小细胞肺癌 (NSCLC) 占据了病例中的将近 80% (Greenlee, R. T., et al., CA. Cancer J. Clin. 51 :15-36 (2001))。由于大部分 NSCLC 到晚期才被诊断出来,一旦诊断多为绝症,近年来综合疗法虽有进步,但总的 10 年生存率仍仅有 10% 左右。即使是最创新的治疗方案对结局的影响亦很小,仅使 NSCLC 的 5 年总生存率增加 10-15%。虽已报导许多与肺癌发病和进展相关的遗传变异,但准确的分子机理尚未明了 (Sozzi, G. Eur. J. Cancer 37 :63-73 (2001))。因此,为开发有效的诊断方法和分子定位治疗,对肺癌分子致病机理的更透彻的理解是一个紧要问题。

[0005] 过去十年,出现了一批新开发的细胞毒药剂,诸如紫杉醇、多烯紫杉醇 (docetaxel)、吉西他滨 (Gemcitabine) 与长春瑞滨 (vinorelbine) 以为晚期 NSCLC 患者提供多种治疗选择;然而,与基于顺铂的治疗相比,这些新方案中每种都仅能对存活率提供有限的帮助 (Kelly, K., et al., J. Clin. Oncol. 19 :3210-3218 (2001))。近来,分子靶向药剂,包括抗 EGFR 或抗 VEGF 单克隆抗体,西妥昔单抗 (cetuximab) (艾比特恩 (Erbbitux)) 或贝伐单抗 (Bevacizumab) (阿瓦斯汀 (Avastin)), 以及 EGFR 酪氨酸激酶的小分子抑制剂,诸如吉非替尼 (gefitinib) (易瑞沙 (Iressa)) 和埃罗替尼 (erlotinib) (特罗凯 (Tarceva)), 已被检验和 / 或批准其临床使用 (Giaccone, G. J Clin Oncol. 23 :3235-3242 (2005); Sridhar, S. S., Lancet Oncol. 4 :397-406 (2003); Pal, S. K. and Pegram, M. Anticancer Drugs 16 :483-494 (2005))。虽然这些药剂针对复发 NSCLC 展示了一定程度活性,在存活率上获得好处的患者仍然为数有限。对于诊断,几种肺癌的癌症标志,包括 NSE、CEA、CYFRA21-1 与 ProGRP, 现已用于临床环境 (M. Seike, G. A. Chen, B. K. Shin); 然而,它们对于早期癌症检测与临床效果预测的有效性仍然非常局限,主要是因为其低灵敏度和 / 或特异性。因此,亟需发现可帮助医师诊断与监视所述疾病,具有高灵敏度与特异性的癌症生物标志。因此,新治疗策略,诸如开发更具选择性与效果的分子靶向药剂与标志,让人翘首以待。

[0006] 一些证据表明,在特定分化阶段,肿瘤细胞表达不同组织类型独特的细胞表面和 / 或分泌标志。由于细胞表面蛋白与分泌蛋白被认为对免疫机理与给药系统而言更易接近,对这些类型蛋白质的鉴别对新诊断和治疗策略的开发而言是重要的初始步骤。更进一

步,在 cDNA 微阵列上对上千种基因表达进行系统分析,对鉴别涉及癌症产生途径的未知分子而言是有效的方法,并因此可揭示新抗癌药与肿瘤生物标志开发的候选靶标 (Kikuchi, T., et al., *Oncogene* 22 :2192-2205(2003) ;Kikuchi, T., et al., *Int J Oncol.* 28 :799-805(2006) ;Kakiuchi, S., et al., *Mol Cancer Res.* 1 :485-499(2003) ;Kakiuchi, S., et al., *Hum Mol Genet.* 13 :3029-3043(2004) ;Taniwaki M., et al., *Int J Oncol.* 29 :567-575(2006) ;Yamabuki.T., et al., *Int J Oncol.* 28 :1375-1384(2006))。本发明人尝试了通过在包括 27648 基因的 cDNA 微阵列上分析不同肺癌细胞类型的基因组范围的表达概况 (使用以激光显微解剖自 101 个肺癌组织制备的纯肿瘤细胞群体),来分离用于诊断、治疗与预防肺癌的新分子靶标 (Kikuchi, T., et al., *Oncogene* 22 :2192-2205(2003) ;Kikuchi, T., et al., *Int J Oncol.* 28 :799-805(2006) ;Kakiuchi, S., et al., *Hum Mol Genet.* 13 :3029-3043(2004) ;Taniwaki M., et al., *Int J Oncol.* 29 :567-575(2006))。为验证相应基因产物的生物学与临床病理学意义,本发明人进行了对临床肺癌材料的肿瘤组织微阵列分析与 RNA 干扰 (RNAi) 技术的组合分析 (Ishikawa, N., et al., *Clin Cancer Res.* 10 :8363-8370(2004) ;Ishikawa, N., et al., *Cancer Res.* 65 :9176-9184(2005) ;Ishikawa, N., et al., *Cancer Sci.* 97 :737-745(2006) ;Kato, T., et al., *Cancer Res.* 65 :5638-5646(2005) ;Kato T, et al., *Clin. Cancer Res.* 13 :434-442. (2007) ;Furukawa, C., et al., *Cancer Res.* 65 :7102-7110(2005) ;Suzuki, C., *Cancer Res.* 63 :7038-7041(2003) ;Suzuki, C., *Cancer Res.* 65 :11314-11325(2005) ;Suzuki, C., et al., *Mol Cancer Ther.* 6 :542-551(2007) ;Takahashi K, et al., *Cancer Res.* 66 :9408-9419(2006) ; , Hayama, S., et al., *Cancer Res.* 66 :10339-10348(2006) ;Hayama S, et al., *Cancer Res.* 67 :)。

[0007] 使用上述系统方法,鉴定出了若干在特定癌症中过表达的基因,参见,例如,WO 2004/31413, WO 2004/31409, WO 2007/13665 与 WO/2007/13671,其内容以在此引用的方式包含在本文中。在此,为进一步调查,本发明人专注于四个基因;埃-巴二氏病毒诱导的基因 3 (EBI3) (SEQ ID NO 1 ;GenBank 登录号 :NM_005755) ;一种分泌型糖蛋白, distal-less 同源框 5 (DLX5) (SEQ ID NO 3 ;GenBank 登录号 :BC006226) ;细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂 3 (CDKN3 ;又名 KAP1) (SEQ ID NO 5 ;GenBank 登录号 :L27711) ;与神经正五聚蛋白 I (NPTX1) (SEQ ID NO 78 ;GenBank 登录号 :NM_002522. 2 或 GenBank 登录号 :NM_002522)。

[0008] EBI3 基因的表达首先在体外用 EBV 转化的 B 细胞系中被注意到 (Devergne O, et al., *J Virol* 70 :1143-1153(1996))。EBI3 是 IL-27 的组成部分,其通过与 p28, 一种 IL-12p53 相关亚单位,异源二聚化形成 IL-27 (Pflanz S, et al., *Immunity* 16 :779-90(2002))。IL-27 被认为在 Th1 免疫应答起始中起重要作用,而 Th1 免疫应答起始是 IFN-gamma 诱导的免疫应答所必需的。另一方面,最近由有报导表明在人类孕期中胎盘外滋养层细胞中发现 EBI3 表达 (Devergne O, et al., *Am J Pathol* 159 :1763-76(2001)), 且 EBI3 可能调节母体-胎盘免疫关系,诸如母体免疫耐受。虽然最近报导 EBI3 在人类血液恶性肿瘤中过表达 ((Larousserie, F., et al., *Am J Pathol.* 166 :1217-1228(2005), Niedobitek G, et al., *J Pathol* 198 :310-316(2002)), 尚未报导 EBI3 对这些癌症的机能作用,以及 EBI3 在人类实体肿瘤发生中的作用。

[0009] 在进化上不同的物种中,同源框是与发育联系具有根本重要性的转录因子。Dlx 基因们的冗余功能被推定为来源于其近乎相同的同源结构域,而其各自独特的功能则

被认为来自于它们的其它结构域中氨基酸序列的分歧 (Liu JK, et al., *Dev yn* 210 : 498-512(1997))。许多先天畸形与癌症发展都牵涉到同源框基因的失活 (Downing JR, et al., *Cancer Cell* 2 :437-45(2002))。DLX5 被认为是对涉及成骨细胞分化的级联作用的起始至关重要的主调控蛋白,并在哺乳动物四肢发育的调控中起关键作用,这一点被靶向破坏或去除 DLX5 和 DLX6 导致骨与内耳的发育异常以及颅面缺损所证实 (RobledoRF, et al., *Genes Dev* 16 :1089-101(2002))。然而,DLX5 激活在癌发生中的作用尚未得到阐明。

[0010] NPTX1 是“长正五聚蛋白 (long pentraxin)” (Goodman) 的一个新发现的亚家族的成员。NPTX1 基因编码一种 430 个氨基酸长的分泌蛋白,具有 N- 端信号肽与 C- 端正五聚蛋白域。NPTX1 被鉴定为一种大鼠蛋白,其可能调节突触物质及前突触蛇毒毒素——太攀蛇毒素 (taipoxin) 的摄取。所述“长正五聚蛋白”,一个新发现的蛋白亚家族,的几种结构与功能特征可能在促进兴奋性突触形成与突触重塑 (remodeling) 中起作用 (Schlimgen ;Kirtpatrick)。该亚家族的成员包括 NPTX1 与 NPTX2,两者均与神经正五聚蛋白受体 (NPTXR) 相互作用 (Schlimgen ;Kirtpatrick ;Goodman ;Dodds),且具有超加成性的突触发生活性。进一步,本发明人已发现 NPTX1 可用于肺癌的血清学标志或预后标志 (WO2008/23840)。然而,尚未阐明“长正五聚蛋白”在癌发生中的作用,及其在哺乳动物细胞中的功能。

[0011] CDKN3 起初被鉴别为具有 G1 与 S 期双重特异性的蛋白质磷酸酶,与 cdk2 和 / 或 cdc2 相关,且涉及细胞周期调控 (Gyuris, J., et al., *Cell* 75 :791-803(1993) ;Hannon, G. J., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 :1731-1735(1994))。cdk2 的完全激活需要 Thr160 磷酸化及 Thr14 与 Thr15 的去磷酸化。细胞周期蛋白 A 与 cdk2 的结合抑制 Thr160 的去磷酸化,但 CDKN3 仅在细胞周期蛋白 A 降解或离解时才能使 cdk2 去磷酸化 (Poon RY and Hunter T., *Science*270 :90-93(1995))。尽管先前有报导表明 CDKN3 在细胞周期调控中的功能性作用,尚未有其对细胞增殖的贡献的报导。虽然先前有在乳腺癌与前列腺癌中 CDKN3 过表达的报导 (Lee, S. W., et al., *Mol Cell Biol.* 20 :1723-1732(2000)),其过表达促进肺癌进展的机理仍未明了。

[0012] 另一方面,真核翻译延长因子 1delta(EF-1delta) (SEQ ID NO 7 ;GenBank 登录号 :BC009907) 是延长因子 -1 复合物的一部分,所述复合物包含一组核苷酸交换蛋白,所述蛋白能够与鸟嘌呤 -5' - 三磷酸 (GTP) 与氨酰 -tRNA 结合,导致氨酰 -tRNA 以密码子依赖的方式被安置在 80S 核糖体上,诱导蛋白质合成中肽链的延长 (Riis, B., et al., *Trends Biochem Sci.* 15 :420-424(1990) ;Proud, C. G. *Mol Biol Rep.* 19 :161-170(1994))。EF-1delta 亦被鉴定并表征为癌反应性原癌基因 (Joseph P., et al., *J Biol Chem.* 277 : 6131-6136(2002))。最近有报导显示 EF-1deltamRNA 在食道癌组织中过表达,并与淋巴结转移、晚期疾病状态与不良预后相关 (Ogawa, K., et al., *Br J Cancer* 91 : 282-286(2004))。相应地,更加全面地理解 EF-1 途径激活在癌症中的作用,可促成新型强效抑制剂的开发以治疗癌症。

[0013] 本发明发现了涉及癌发生途径的一些分子,它们可以作为或者可以揭示用于开发新颖抗癌药与肿瘤生物标志候选靶标,从而解决了本领域对改进的癌症诊断与治疗组合物与方法的需求。

发明内容

[0014] 如上所述,本发明涉及四个基因:EBI3、DLX5、CDKN3 与 NPTX1,以及它们在肺癌发生中所起的作用。因此,本发明涉及检测、诊断、治疗和 / 或预防肺癌的新颖组合物与方法,和筛选适用于上述目的的药剂的方法。

[0015] 具体而言,本发明缘自这样的发现:由特定序列(具体而言,SEQ ID NOs:18、20、49、51、84 与 85)构成的双链分子,能有效地抑制肺癌细胞的细胞增殖。具体而言,本发明提供以 EBI3、NPTXR,CDKN3 或 EF-1Delta 为靶标的小干扰 RNA(siRNA)。这些双链分子可在分离的状态下使用,或于载体中编码,并从载体表达。相应地,本发明的一个目的是提供这样的双链分子,以及表达它们的载体与宿主细胞。

[0016] 在一方面,本发明提供通过施用本发明的双链分子或受试者于需要的患者以抑制细胞增殖和治疗肺癌的方法。所述方法包括对受试者施与包含一种或多种双链分子或载体的组合物。

[0017] 在另一方面,本发明提供包含至少一种本发明的双链分子或载体的用于治疗癌症的组合物。

[0018] 在另一方面,本发明提供了通过确定 EBI3、DLX5 和 / 或 CDKN3 在源自患者的生物样品中的表达水平,来诊断肺癌或确定肺癌倾向性的方法。所述基因中一种或多种的表达水平相对于该基因正常对照水平的提高显示患者正罹患肺癌或有罹患肺癌的危险。

[0019] 另外,本发明涉及这样的发现,即 EBI3,DLX5,CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的高表达水平与低存活率相关。因此,本发明提供了评估或确定肺癌患者预后的方法,所述方法包括下列步骤:检测选自 EBI3、DLX5,CDKN3 和 EF-1delta 中的一种或多种基因的表达水平,将其与预先确定的参照表达水平相比,并根据其差异确定所述患者的预后。

[0020] 已经知道,在原肿瘤移除之后,EBI3 的表达水平降低。相应地,本发明提供了为被诊断为肺癌的患者监测治疗或评估疗效的方法,所述方法包括在治疗前后确定 EBI3 表达水平的步骤。治疗后 EBI3 表达水平的降低与有效的治疗相关。

[0021] 对本发明而言,肺癌患者血液内 EBI3 水平提高这一发现是新颖的。因此,本发明提供了在受试者中诊断肺癌的方法,所述方法包括下列步骤:确定来源于受试者的血液样品中 EBI3 的表达水平,并将其与在参照样品种中所见的水平相比较,所述参照样品种一般为正常对照。样品中高 EBI3 表达水平表明所述患者或者正罹患肺癌,或者有罹患肺癌的高风险。

[0022] 更进一步的方面,本发明提供了筛选用于治疗 and / 或预防肺癌的化合物的方法。所述化合物应能与 EBI3、DLX5 和 / 或 CDKN3 基因结合,或降低 EBI3、DLX5 和 / 或 CDKN3 基因的生物活性,或降低下列基因的表达:EBI3、DLX5 和 / 或 CDKN3 基因;或替代 EBI3、DLX5 和 / 或 CDKN3 基因的报告基因。另外,对于抑制 CDKN3 与 VRS、EF-1alpha、EF-1beta、EF-1gamma 或 EF-1delta 之间的结合,或抑制 NPTX1 与 NPTXR 之间结合的化合物,预期它们能缓解肺癌的症状。特别而言,可通过本发明的方法鉴定出抑制含有 EF-1gamma 氨基酸残基 72 至 160 的片段与 CDKN3 的结合的化合物。

[0023] 在更进一步的方面,本发明提供了通过对有需要的受试者施用具有显性失活(dominant negative)效应的 EF-1delta 突变体或编码此类突变体的多核苷酸,来治疗和 / 或预防受试者中的肺癌的方法。上述 EF-1delta 变异体优选包括这样的氨基酸序列,该

序列包括 CDKN3 结合区域,例如 EF-1delta 蛋白中包含全体或部分 EF-1delta 亮氨酸拉链的部分(见图 20A)。在优选实施方案中,所述 EF-1delta 突变体具有 SEQ ID NO:61 的氨基酸序列。或者,所述 EF-1delta 突变体可具有下述通式:[R]-[D],其中 [R] 是膜转导剂(membrane-transducing agent),而 [D] 是具有具有 SEQ ID NO:61 所示氨基酸序列的多肽。所述膜转导剂可选自:

- [0024] 多聚精氨酸;
- [0025] Tat/RKKRRQRRR/SEQ ID NO:63;
- [0026] Penetratin/RQIKIWFQNRRMKWKK/SEQ ID NO:64;
- [0027] Buforin II/TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK/SEQ ID NO:65;
- [0028] Transportan/GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL/SEQ ID NO:66;
- [0029] MAP(模式两亲性肽)/KLALKLALKALKAALKLA/SEQ ID NO:67;
- [0030] K-FGF/AAVALLPAVLLALLAP/SEQ ID NO:68;
- [0031] Ku70/VPMLK/SEQ ID NO:69;
- [0032] Ku70/PMLKE/SEQ ID NO:70;
- [0033] 肌蛋白/MANLGWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP/SEQ ID NO:71;
- [0034] pVEC/LLIILRRRIRKQAHASK/SEQ ID NO:72;
- [0035] Pep-1/KETWWETWWTEWSQPKKRKV/SEQ ID NO:73;
- [0036] SynB1/RGGRLSYSRRRFSTSTGR/SEQ ID NO:74;
- [0037] Pep-7/SDLWEMMVSLACQY/SEQ ID NO:75;以及
- [0038] HN-1/TSPLNIHNGQKL/SEQ ID NO:76.

[0039] 在更进一步的方面,本发明提供了与 NPTXR1 片段结合的抗体。该抗体具有中和活性。在一方面,本方面提供了通过施与该抗体治疗或预防肺癌的方法。

[0040] 本领域技术人员应理解本发明一个或更多方面可实现某些目的,而一个或更多其它方面可实现其它一些目的。每个目的未必同等地,在其所有方面,都适用于本发明的每个方面。因此,对于本发明的任何一个方面而言,上述诸目的可以择一审视。本发明的上述的及其它的目的与特征,在结合伴随的图表和实施例阅读下文的详细描述时,可以得到更充分的理解。然而,应理解无论是前述的发明内容,还是下文的详细描述,均系就优选实施方案而言,而对本发明,或本方面的备选实施方案没有限定。

[0041] 附图简述

[0042] 本领域技术人员在考虑了下文的附图简述和本发明的详细描述及其优选实施方案后,将更明了本发明的不同方面和应用:

[0043] 图 1:在肿瘤组织、细胞系与正常组织中 EBI3 表达的分析。A 部分,半定量 RT-PCR 分析检测,在 15 对临床肺癌与周围正常肺组织样品(上部小图)[肺腺癌(ADC)、肺鳞状细胞癌(SCC)与肺小细胞肺癌(SCLC);顶部]以及 23 个肺癌细胞系(下部小图)中 EBI3 的表达。B 部分:在癌细胞系与支气管上皮细胞中内源 EBI3 蛋白的表达与亚细胞定位。在 NCI-H1373 和 LC319 细胞系中,EBI3 在细胞的胞质呈颗粒状染色,而在 NCI-H2170 与源自支气管上皮的 BEAS-2B 细胞系中则没有染色。C 部分:通过 ELISA 检测从培养基中肺癌细胞系分泌的 EBI3。

[0044] 小图 D:对 16 种正常成人组织中 EBI3 转录物的 Northern 印迹分析结果。在胎盘

中检测到了强信号。小图 E :通过免疫组织化学比较正常组织与肿瘤组织中 EBI3 蛋白的表达。

[0045] 图 2 描述了 EBI3 过表达与 NSCLC 患者较差预后的关联。A 部分显示肺癌组织与正常组织中 EBI3 的强、弱与无表达的例子。原始放大率, x100 (上栏), x200 (下栏)。小图 B 描述了患者存活与 NSCLC ($P = 0.0011$, 根据时序检验) 的 Kaplan-Meier 分析的结果。

[0046] 图 3 :肺癌患者与正常对照或有 COPD 的非癌性肺病患者中通过 ELISA 确定的血清 EBI3 浓度。A 部分, 肺 ADC、肺 SCC 或 SCLC 患者的血清中 EBI3 的分布。空心线为平均血清水平。下述组之间差异是显著的 :在 ADC 患者与正常个体 /COPD 患者之间 (分别为 $P < 0.001$, Mann-Whitney U 检验), 在 SCC 患者与正常个体 /COPD 患者之间 ($P < 0.001$), 以及在 SCLC 患者与正常个体 /COPD 患者之间 ($P < 0.001$), 其中正常个体与 COPD 患者的差异并不显著 ($P = 0.160$)。B 部分, 肺 ADC、肺 SCC 或 SCLC 的不同临床阶段的患者血清中 EBI3 的分布, LD 表示局限性疾病 ;ED 表示广泛疾病。

[0047] 图 4 描述了肺癌患者与手术后患者血清中 EBI3 的浓度, EBI 的 ROC 曲线分析与 CEA (在 NSCLC 中) 或 pro-GRP (SCLC) 的相应分析的比较, 以及针对 EBI3 的 siRNA 对肺癌细胞生长的抑制。A 部分, 左边小图显示作为肺癌血清标志的 EBI3 的 ROC 曲线分析。X 轴, 1-特异性 ;Y 轴, 灵敏度。设定截止值以对 EBI3 提供最优的诊断准确率与似然比 (最少假阴性与假阳性的结果) [即, 11.8 单位 /mL]。A 部分, 右边小图显示原发性 NSCLC 切除之前与之后血清中 EBI3 的水平。手术后血清在手术两个月后获取。B 部分, 在相同 NSCLC 患者的原发肿瘤组织中 EBI3 的表达水平与血清 EBI3 水平 (U/mL)。C 部分, 上边小图 :对 EBI3 (蓝色) 与其它常规肿瘤标志 (CEA 为红色, CYFRA 为绿色, 而 ProGRP 为黄色) 作为每种肺癌组织学类型的血清标志的 ROC 曲线分析。X 轴, 1-特异性 ;Y 轴, 灵敏度。下面小图, EBI3 与其它肿瘤标志的组合分析。在灵敏度图与假阳性率图中最右边的柱表明在每种肺癌组织学类型中使用 EBI3 与其它三种肿瘤标志 (CEA, CYFRA 与 ProGRP) 中任一组合分析的灵敏度或假阳性率。

[0048] D 部分描述了针对 EBI3 的 siRNA 对肺癌细胞生长的抑制。上边小图, si-EBI3 (#1 与 #2) 与对照 siRNA (si-CNT/On-target, si-LUC/Luciferase) 的对在 A549 细胞与 LC319 细胞中 EBI3 表达的基因敲低 (gene knockdown) 效果, 通过半定量 RT-PCR 分析。下面小图, 转染了 si-EBI3 或对照 siRNA 的 A549 细胞与 LC319 细胞的集落形成与 MTT 分析。竖栏, 三次重复分析的相对吸光度 ;柱形, SD。E 部分, 两个独立的表达高水平 EBI3 的转染体 (COS-7-EBI3#1 与 #2, 上边小图) 与对照 (COS-7-M1 与 M2) 每个分三份重复培养, 120 小时后用 MTT 分析与集落形成分析测定细胞存活率 (下面小图)。

[0049] 图 5 :显示了肺肿瘤与正常组织中 DLX5 的表达。A 部分描述了通过半定量 RT-PCR 检查的 distal-less 同源框 5 (DLX5) 在 NSCLC (腺癌与鳞状细胞癌) 与正常肺组织临床样品中的表达。B 部分描述了半定量 RT-PCR 揭示的在肺癌细胞系中 DLX5 的表达。β-肌动蛋白 (ACTB) 的表达用作定量对照。C 部分描述了用共焦聚显微镜观察 DLX5 蛋白的亚细胞分布。D 部分描述了用 Northern 印迹检测的 DLX5 在正常人类组织中的表达。

[0050] 图 6 :显示了 DLX5 蛋白质表达的免疫组织化学评价, 以及其过表达与 NSCLC 患者的不良预后的联系, 以及针对 DLX5 的 siRNA 对 SBC-5 癌细胞生长的抑制。A 部分描述了在五种正常人类组织以及肺 SCC 中 DLX5 的表达, 检测使用抗 DLX5 兔多克隆抗体的免疫组织

化学染色,使用苏木精复染(x200)。在胎盘合体滋养层(箭头)以及肺癌细胞的细胞质和/或细胞核中出现阳性染色。B部分描述了肺癌(SCC, x100)、正常肺(x100)、以及SCC阳性病例的放大观察(x200)中DLX5表达的代表性例子。C部分显示依据DLX5表达水平对NSCLC患者中的肿瘤特异性生存率的Kaplan-Meier分析结果。D部分显示在SBC-5细胞中用半定量RT-PCR检测的DLX5表达水平。用对照siRNA(si-EGFP或si-Scramble/SCR)或si-DLX5治疗的效果示于上部小图。通过MTT分析检测的针对DLX5的siRNA对细胞存活率的效果示于下部小图。

[0051] 图7:显示肺肿瘤中NPTX1的表达。A部分,上部小图,描述了通过半定量RT-PCR检测的在15个肺癌临床样品(10例NSCLC与5例SCLC)中NPTX1的表达(T)与其相应正常肺组织(N)中的表达。从临床肺癌样品的mRNA中制备每个单链cDNA的合适稀释物,使用 β -肌动蛋白(ACTB)的表达水平作为定量对照。A部分,下部小图,描述了通过半定量RT-PCR分析检测的在23个肺癌细胞系中NPTX1的表达。B部分描述了通过Western印迹分析检测的在4个肺癌细胞系中NPTX1蛋白的表达。C部分描述了在4个肺癌细胞系中内源NPTX1蛋白的亚细胞定位。在NCI-H226、NCI-H520与SBC-5细胞中,NPTX1在细胞质中染色为颗粒状,但在NCI-H2170细胞中则不然。D部分:在来自表达NPTX1的NCI-H226、NCI-H520与SBC-5细胞以及不表达NPTX1的NCI-H2170细胞的条件化培养基中,用ELISA检测分泌的NPTX1。E部分:九个临床肺癌(下部小图)与23个肺癌细胞系(上部小图)中NPTX1与NPTXR的表达,通过半定量RT-PCR分析检测。

[0052] 图8:显示在正常组织中与肺癌组织中NPTX1的表达。A部分描述了通过Northern印迹分析检测的正常人类组织中NPTX1的表达。B部分显示了在代表性的肺腺癌(ADC)组织与五种正常组织:心、肝、肾、肾上腺中NPTX1蛋白的免疫组织化学评估结果。C部分显示了在代表性的肺腺癌ADC,肺鳞状细胞癌(SCC)与小细胞肺癌(SCLC)中,对组织微阵列(原始放大率x200)使用抗NPTX1抗体对NPTX1免疫组织化学染色的结果。D部分,上部小图,显示在肺ADC中NPTX1的强、弱与无表达的例子。D部分,下部小图,在NSCLC患者中,依据NPTX1表达($P < 0.0001$;时序检验)对肿瘤特异性存活率的Kaplan-Meier分析。

[0053] 图9:显示在肺癌患者与健康供体或有COPD的非肿瘤性肺病患者中通过ELISA确定的NPTX1血清浓度。A部分描述了在来自罹患肺ADC、肺SCC或SCLC的患者的血清中NPTX1的分布。下述各组之间有显著性差别:在ADC患者与健康/COPD个体之间($P < 0.001$, Mann-Whitney U检验),在SCC患者与健康/COPD个体之间($P = 0.005$)以及在SCLC患者与健康/COPD个体之间($P = 0.0051$)。健康个体与COPD之间的差异不显著。B部分描述了来自不同临床阶段的肺癌患者的血清中NPTX1的分布。LD表示局限性疾病;ED,广泛疾病。C部分,NSCLC患者手术前后(手术后在两个月后)NPTX1的血清浓度。D部分,同样的NSCLC患者的原发性肿瘤组织中NPTX1的表达水平与血清NPTX1水平(原始放大率x100)。

[0054] 图10:显示NPTX1的自分泌细胞生长效应。A部分描述了通过针对NPTX1的siRNA抑制肺癌细胞生长。A部分上部小图:通过RT-PCR分析,在A540与SBC-5细胞中NPTX1针对si-NPTX1(si-1,-2)或对照siRNA(LUC或SCR)反应的表达。A部分中间小图:用对NPTX1特异性的siRNA或对照质粒转染的A549与SBC-5细胞通过集落形成分析检测到的集落图像。A部分的下部小图显示了通过MTT分析的A549或SBC-5细胞针对si-NPTX1s、-LUC或-SCR反应的存活率。所有的分析都进行了三次,并且在三个重复孔中进行。B部分显示在

COS-7 细胞中 NPTX1 瞬时过表达的效果。上部小图,用 Western 印迹检测的 NPTX1 在 COS-7 细胞中的暂时表达。下部小图,通过 MTT(左边)和集落形成分析(右边)评价的 COS-7 细胞的存活率。C 部分,左边部分, NPTX1 对哺乳动物细胞生长的自分泌 / 旁分泌效应。通过 MTT 分析计算的细胞存活率(用终浓度为 0、0.1 或 1nM 的 NPTX1 处理 COS-7 细胞)(右栏表示 PBS)。通过 MTT 分析评价抗 NPTX1 单克隆抗体(mAb-75-1;50nM)与对照 IgG(正常小鼠;50nM)的对 NPTX1 蛋白(0、0.1 或 1nM)在 COS-7 细胞培养基中的竞争性中和效应(左边和中间栏表示抗 NPTX1 mAb 与 IgG)。右边部分,抗 NPTX1 单克隆抗体(25nM 或 50nM)剂量依赖地抑制过表达 NPTX1 的肺癌 A549 细胞的体外生长。每个实验一式三份进行。D 部分,用抗 NPTX1 抗体抑制不同肺癌细胞的体外生长。用 MTT 分析评价抗 NPTX1 单克隆抗体(mAb-75-1;50nM)对过表达 NPTX1 的肺癌细胞系 SBC-5($P = 0.012$, 都是配对 t-检验)以及不表达 NPTX1 肺癌细胞系, SBC-3 与 NCI-H2170 生长的效应。每个反应都一式三份进行。

[0055] 图 11:显示用 NPTX1 表达质粒转染的哺乳动物细胞增强的侵袭力。展示用人类 NPTX1 的表达质粒转染后的 NIH-3T3 在基质胶基质中的侵袭性的测定。左上部分,用 Western 印迹分析检测的在 NIH-3T3 细胞中 NPTX1 的瞬时表达。下部小图,吉姆萨染色(x200)与迁移透过包裹有基质胶的滤器细胞的数量。分析进行三次,每次用三个重复孔。

[0056] 图 12:抗 NPTX1 单克隆抗体对移植到裸小鼠的 A549 细胞的作用。上部小图,每周两次用抗 NPTX1 单克隆抗体(mAb-75-1;300 微克 / 只)或普通小鼠 IgG(对照-1;300 微克 / 只)处理的三只小鼠,以及处理治疗的小鼠的平均肿瘤体积作图。数值用肿瘤体积平均值 ± 标准误差表示。动物每周两次以腹内注射施与每种抗体,总共 30 日。下部小图,经抗 NPTX1 抗体处理的 HE 染色肿瘤(A549)的组织病理学检查。在用 NPTX1 抗体处理后第 30 天,与用对照 IgG 处理或未经处理的组织相比,在用抗 NPTX1 抗体处理的肿瘤组织中观察到纤维性变化,以及活癌细胞更加显著的减少。

[0057] 图 13:显示 NPTX1 与 NPTXR 在促进生长途径中的相互作用。A 部分对表达 NPTX1 或 NPTXR 的 COS-7 细胞进行共聚焦显微术。绿色:NPTX1(myc);红色:NPTXR。左边小图,用 Triton X-100 使 COS-7 细胞可透化并用检测 NPTX1 的抗 myc 抗体染色。右边小图,用针对 NPTX1(myc-标签)与 NPTXR 的抗体对 COS-7 细胞染色,以进行胞外表面染色。B、C 部分,使用表达 NPTX1 或 NPTXR 的 COS-7 细胞(B)和 SBC-5 细胞(C)进行共聚焦显微术。左边小图,用 NPTX1(myc)与 NPTXR 抗体对 COS-7 细胞与 SBC-5 细胞染色,以进行胞外细胞表面染色。右边部分,进行甘氨酸处理以移除细胞表面的 NPTX1。D 部分,针对 NPTXR 的 siRNA 抑制肺癌细胞的生长。上部小图,用 RT-PCR 分析在 A549 与 SBC-5 细胞中 NPTX1 应答于 si-NPTX1(si-1 与 si-2)或对照 siRNA(si-LUC 与 si-SCR)的表达。下部小图,通过集落形成分析考察用针对 NPTXR 的特定 siRNA 或对照 siRNA 转染的 A549 与 SBC-5 细胞所得的集落图像。中间小图,用 MTT 分析评价的 A549 或 SBC-5 细胞响应于 si-NPTXR、-LUC 或 -SCR 的存活率。

[0058] 图 14:显示 NPTX1 与 NPTXR 结合后的细胞内化作用。A 部分、B,将受体 COS-7 细胞(A)或 SBC-5 细胞(B)与分别来自 NPTX1 转染(+)的供体 COS-7 细胞或 SBC-5 细胞的条件下培养基一同温育。在用供体的条件下培养基处理受体细胞 3 小时后,检测带有 c-myc 标签的 NPTX1。绿色:NPTX1。用 DAPI 将细胞核可视化。(a)用抗 myc 抗体对细胞进行细胞外表面染色以检测 NPTX1。(b)用 Triton X-100 使细胞可透化,并对 NPTX1(myc)染色。(c)用 PBS 处理 3 小时。C 部分,受体 COS-7 细胞似乎以时间依赖的方式摄入来自供体 NPTX1 转

染(+)COS-7 细胞的条件化培养基中分泌的 NPTX1。在用来自供体 NPTX1 转染(+)COS-7 细胞处理受体 COS-7 细胞 1 或 3 小时后,用抗 myc 抗体通过 Western 印迹检测摄入的 NPTX1。

[0059] 图 15. A 部分在来自表达 NPTX1 的 COS-7 细胞的条件化培养基中用 Western 印迹检测分泌的外源 NPTX 蛋白。B 部分用免疫沉淀分析检测在表达外源 NPTX1 的 COS-7 细胞中 NPTX1 与 NPTXR 蛋白的结合。

[0060] 图 16 :显示在肺癌与脑转移中 CDKN3 的表达。A 部分描述了通过半定量 RT-PCR 检测的在 NSCLC(T) 临床样品与相应的正常肺组织(N)中 CDKN3 的表达。B 部分描述了通过半定量 RT-PCR 检测的在早期原发性 NSCLC(I-IIIa 期)、晚期原发性 NSCLC(IIIb-V 期)以及来自 ADC 转移的脑肿瘤(T)与正常肺组织(N)样品中 CDKN3 的表达(上边小图)。PCR 产物的光密度强度通过图像分析软件量化(下边小图)。C 部分描述了通过 Northern 印迹分析检测的在正常人类组织中 CDKN3 的表达。

[0061] 图 17 :显示了肺癌中 CDKN3 的表达及其与 NSCLC 患者较差的临床结果之间的联系。A 部分描述了通过使用小鼠单克隆抗 CDKN3 抗体进行免疫组织化学染色检测在六个正常人类组织以及一个 NSCLC 病例中 CDKN3 的表达,用苏木精复染(x200)。B 部分描述了用抗 CDKN3 抗体对组织微阵列(x100)进行的对代表性的手术切除 NSCLC(肺-SCC)与正常肺的免疫组织化学染色结果。C 部分,在 NSCLC 患者中参照 CDKN3 表达的肿瘤特异性存活率 Kaplan-Meier 分析(通过时序检验 $P < 0.0001$)。

[0062] 图 18 :显示鉴定 EF-1beta、gamma、delta/Va1RS 作为与 CDKN3 相互作用的新分子。A 部分描述了对与 CDKN3 相互作用的蛋白的筛选。用银染显色,来自用抗 CDKN3 单克隆抗体免疫沉淀的 LC319 细胞裂解液中可见 140-、50-、31- 与 25-kDa 条带,但不见于用正常小鼠 IgG 沉淀的相应细胞,提取上述条带。根据通过 MALDI-TOF 质谱测序所得的肽序列,鉴定各个条带分别为 VARS、EF-1gamma、EF-1delta、EF-1beta。CDKN3 蛋白条带用星号标志。分子量(以 kDa 计)标志的位置在左侧表示。B 部分描述了用半定量 RT-PCR 分析检测的 CDKN3、Va1RS、EF-1gamma、EF-1delta、EF-1beta 与其相关的分子 CDK1 在 NSCLC 细胞系中的表达。

[0063] 图 19 :显示在肺癌中 EF-1delta 的表达及其与 NSCLC 患者较差的临床结果之间的联系。A 部分描述了在肺癌细胞系中用 Western 印迹分析检测的 CDKN3 与 EF-1delta 蛋白的表达。B 部分描述了使用抗 EF-1delta 抗体在组织微阵列(x100)上进行对包括 NSCLC(肺-SCC)以及正常肺的代表性的手术切除样品的免疫组织化学染色结果。C 部分描述了 EF-1delta 表达与 NSCLC 患者较差的临床结果之间的联系。显示了 NSCLC 患者中肿瘤特异性存活率的 Kaplan-Meier 分析,依据 EF-1delta 表达(时序检验, $P = 0.0006$)

[0064] 图 20 :显示 CDKN3 使 EF-1delta 去磷酸化。A 部分描述了肺癌细胞中 CDKN3 与 EF-1delta 的结合,由 LC319 细胞提取物中内源 CDKN3 与 EF-1delta 的免疫沉淀反应证实。IP:免疫沉淀,IB:免疫印迹。B 部分描述了内源 CDKN3(绿色)与内源 EF-1delta(红色)在 LC319 细胞中在不同细胞周期阶段的共定位。C 部分描述了外源与内源 EF-1delta 的磷酸化。来自过表达外源 EF-1delta 的 COS-7 细胞的细胞提取物(左边小图)与来自 LC319 的细胞提取物(右边小图)用 lambda 蛋白质磷酸酶(lambda-PPase)处理。在 lambda-PPase 处理过的细胞提取物中检测出了移位的条带。空心与实心的箭头分别表示磷酸化的 EF-1delta 和去磷酸化的 EF-1delta。D 部分描述了在 LC319 细胞中,过表达的外源 CDKN3 使内源 EF-1delta 去磷酸化。用 CDKN3 表达载体转染 LC319 细胞。

[0065] 图 21:在 EF-1delta 中鉴定 CDKN3 结合区域。A 部分描述了在瞬时过表达 CDKN3 的 COS-7 细胞中外源 EF-1delta 的去磷酸化。针对弱表达 CDKN3 和 EF-1delta 的 COS-7 细胞,用带 Flag-HA 标签的 CDKN3 表达载体、或带 Flag-HA 标签的 EF-1delta 表达载体或两者一同加以转染。从这些细胞获得全细胞提取物,用抗 HA 抗体进行 Western 印迹分析(左边小图)。斜线、空心与实心箭头分别表示 CDKN3、磷酸化 EF-1delta 与脱磷酸 EF-1delta。经抗 Flag 抗体免疫沉淀的细胞提取物用抗磷酸丝氨酸抗体进行免疫印迹(右边小图)。空心箭头表示磷酸化 EF-1delta。IP:免疫沉淀;IB:免疫印迹。B 部分描述了 EF-1delta 的序列简图。显示了一个全长与四个缺失的 EF-1delta 构建体。C 部分描述了用免疫沉淀实验鉴定 EF-1delta 中结合 CDKN3 的区域。EF-1delta161-281 构建体,其缺乏 EF-1delta 中 N 端 160 个氨基酸,没有保留任何与 LC319 细胞中内源 CDKN3 相互作用的能力,表明 EF-1delta 中含有亮氨酸拉链基序的 89 个氨基酸多肽(密码子 72-160)在与 CDKN3 的相互作用中应起重要作用。IP:免疫沉淀;IB:免疫印迹。

[0066] 图 22:描述了 CDKN3 或 EF-1delta 对肺癌细胞生长的作用。A 左上小图,通过半定量 RT-PCR 分析的 CDKN3 在 LC319 细胞中应答于 si-CDKN3(si-A 与 si-B)或对照 siRNA(EGFP、荧光素(LUC)或乱序序列(SCR))的表达。A 部分,右上小图,描述通过 MTT 分析评价的 LC319 细胞应答于 si-CDKN3s、-EGFR、-LUC 或 -SCR 的存活率。A 部分下边小图,经特定 siRNA 或对照质粒转染的 LC319 的集落形成分析。B 部分左上小图,描述了通过半定量 RT-PCR 分析的 EF-1delta 在 LC319 细胞中应答于 si-EF-1delta(si-1 与 si-2)或对照 siRNA(EGFP、荧光素(LUC)或乱序序列(SCR))的表达。B 部分右上小图,描述通过 MTT 分析评价的 LC319 细胞应答于 si-EF-1delta 或对照 siRNA 的存活率。B 部分下边小图,描述了经 si-EF-1delta 或对照质粒转染的 LC319 的集落形成分析的结果。

[0067] 图 23:说明了 CDKN3 增加细胞侵袭活性与激活 Akt 的能力。A 部分显示基质胶侵袭测定的结果,说明经模拟载体或 CDKN3 表达载体转染的 NIH-3T3 侵袭性增加。显示了通过包裹有基质胶的滤器的侵袭细胞数。B 部分描述了通过半定量 RT-PCR 分析检测的在 NSCLC 细胞系中 EF-1alpha1 与 EF-1alpha2 的表达。C 部分描述了在肺癌细胞中 CDKN3 与 EF-1alpha 的结合,经使用 LC319 细胞的免疫沉淀反应证实。IP:免疫沉淀;IB:免疫印迹(左边小图)。D 部分描述了经 CDKN3 表达载体转染的 LC319 细胞中的 Akt 磷酸化。用抗 Akt、抗磷酸 Akt(Ser473)、抗 Flag 抗体或抗 c-myc 抗体进行 Western 印迹分析检测来自 CDKN3 表达细胞的总蛋白质提取物。用来自经模拟载体转染的细胞的蛋白质提取物用作对照,并使用 β 肌动蛋白作为上样对照。E 部分经模拟载体或 CDKN3 表达载体转染的 NIH-3T3 细胞与 LY294002 或 DMSO(载体)预培育,并用于基质胶侵袭分析以证实其侵袭性增加。显示了穿过包裹基质胶的滤器的侵袭细胞数。

[0068] 图 24:鉴定了 EF-1delta 中的 CDKN3 结合区域。A 部分显示 5 个细胞渗透性肽的概图,所述肽的 NH_2 末端共价连接有一包含 11 个聚精氨酸的穿膜序列。显示 EF-1delta 中以及 5 个源自 EF-1delta 的细胞渗透性肽中的亮氨酸拉链基序的序列。B 部分显示通过 MTT 分析评价的 LC319 细胞应答于 5 个细胞渗透性肽的存活率(上边小图)。在经 11R-EF-1delta₉₀₋₁₀₈ 处理的 LC319 细胞中,内源 CDKN3 与 EF-1delta 之间的免疫沉淀反应检测到复合体形成减少(下边小图)。

[0069] 本发明的公开

[0070] 尽管与本文描述相似或等价的方法和材料可用于实践或测试本发明实施方式,在此仍描述了优选方法与材料。然而应理解本发明并不限于本文描述的特定分子、组合物、方法或方案,因其可根据常规实验与优化而有变化。亦应理解本描述所用的命名法仅以描述特定版本或实施例为目的,并非意欲限定本发明的范围,所述范围仅由权利要求所限定。

[0071] 除非另行定义,本文所用全部技术或科学术语均与本发明所处技术领域一般技术人员理解含义相同。然而,当存在冲突时,应以本说明书所述为准,包括定义在内。相应的,在本方面的语境下,适用下列定义:

[0072] 定义

[0073] 本文所用“一个”与“所述”意为“至少一个”,除非专门另行说明。

[0074] 如本文使用的,术语“生物样品”是指整个生物体或由其组织、细胞或组成部分(例如体液,包括但不限于,血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊液、唾液、羊水、羊膜脐带血、阴道分泌物和精液)构成的子集。“生物样品”还指从整个生物体,或从由其细胞、组织或组成部分、或级分或部分构成的子集,所制备的匀浆、裂解物、提取物、细胞培养物或组织培养物。最后,“生物样品”指这样的介质,例如其中已有生物体繁殖的营养液或凝胶:其含有细胞成分,例如蛋白质或多核苷酸。

[0075] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”、“核苷酸”、“核酸”与“核酸分子”在本文中可互换使用,指核酸残基的多聚物,并且,除非专门另行定义,用其通常为人接受的单字母密码进行指代。所述术语适用于其中一个或更多核酸通过酯键连接的核酸(核苷酸)多聚体。所述核酸多聚体可包括 DNA、RNA 或其组合,并涵盖天然出现与非天然出现的核酸多聚体。

[0076] 术语“多肽”、“肽”与“蛋白质”可在本文中互换使用,指氨基酸残基的多聚体。所述术语适用于其中一个或更多氨基酸残基是修饰残基,或非天然出现的残基,诸如其对应天然出现残基的人工化学类似物的氨基酸多聚体,以及天然出现的氨基酸多聚体。

[0077] 基因或蛋白

[0078] 本发明中核酸与多肽序列示于下列数字,但不仅限于此:

[0079] EBI3 :SEQ ID NO :1 与 2 ;

[0080] DLX5 :SEQ ID NO :3 与 4 ;

[0081] CDKN3 :SEQ ID NO :5 与 6 ;

[0082] EF-1delta :SEQ ID NO :7 与 8 ;

[0083] ValRS :SEQ ID NO :26 或 28, 以及 27 或 29 ;

[0084] EF-1beta :SEQ IDNO :30 与 31 ;

[0085] EF-1gamma :SEQ ID NO :32 与 33 ;

[0086] EF-1alfa :SEQ ID NO :57 或 90 以及 58 或 91 ;

[0087] Akt :SEQ ID NO :59 与 60 ;

[0088] NPTX1 :SEQ ID NO :78 与 79 ;

[0089] NPTXR :SEQ ID NO :86 与 87.

[0090] 进一步,下列序列的数据亦可通过下述登录号获取:

[0091] EBI3 :NM_005755 ;

[0092] DLX5 :BC006226 ;

[0093] CDKN3 :L27711 ;

- [0094] EF-1delta :BC009907 ;
[0095] ValRS :NM_006295 或 BC012808 ;
[0096] EF-1beta :NM_001959 ;
[0097] EF-1gamma :BC009865 ;
[0098] EF-1alpha :NM_001402 或 NM_001958 ;
[0099] NPTX1 :SEQ ID NO :NM_002522 或 NM_002522. 2 ;
[0100] NPTXR :SEQ ID NO :NM_014293

[0101] 根据本发明的一方面,功能上的等价物亦认为是上述“多肽”。本文中,蛋白质的“功能等价物”是与所述蛋白质具有等价的生物学活性的多肽。意即,任何保有所述生物学活性的多肽可在本发明中用作上述功能等价物。上述功能等价物包括其中在所述蛋白质的天然序列上一个或更多个氨基酸经替换、缺失、添加或插入的那些。另外,所述多肽可包含与相应的蛋白质序列有至少 80% 同源性(亦称为序列同一性),较优选至少大约 90% 到 95% 同源性的氨基酸序列。在其它实施方案中,所述多肽可以由在严格条件下与所述基因的天然核苷酸序列相杂交的多核苷酸编码。

[0102] 本发明的多肽可在其氨基酸序列、分子量、等电点、糖链的有无或形式等方面有变化,取决于用于产生该多肽的细胞或宿主,或使用的纯化方法。无论如何,只要其具有于本发明所述人类蛋白等价的功能,即处于本发明的范围内。

[0103] 短语“严格(杂交)条件”指这样的条件,在该条件下,核酸分子将与其靶序列杂交(通常在核酸复杂混合物中),而没有与其它序列的可检测的杂交。严格条件取决于序列,且在不同情况下有所不同。较长的序列在更高温度下特异性杂交。对于核酸杂交详尽指导可见于 Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays”(1993)。一般地说,严格条件被选择为在限定的离子强度 pH 下,比特定序列的熔点 (T_m) 低大约 5–10°C。 T_m 是如下的温度(在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下),其中 50% 的与靶分子互补的探针在平衡状态下与靶序列杂交(因为靶序列过量存在,所以在 T_m 下,在平衡时 50% 的探针被占据)。严格条件还可以通过添加去稳定剂(例如甲酰胺)来实现。为了选择性或特异性的杂交,阳性信号优选地至少是背景的两倍,更优选地是背景杂交的 10 倍。示例性的严格杂交条件包括如下:50% 甲酰胺、5x SSC、和 1% SDS,在 42°C 温育,或 5x SSC、1% SDS、在 65°C 温育,用 0.2x SSC 和 0.1% SDS 在 50°C 下清洗。

[0104] 在本发明的语境下,为分离编码与上述人类蛋白功能等价的多肽的 DNA 的杂交条件可由本领域技术人员用常规方法选择。举例而言,可用下述步骤进行杂交:在 68 摄氏度用“Rapid-hyb buffer”(Amersham LIFESCIENCE) 进行 30 分钟或更长的预杂交,添加标记探针,并在 68 摄氏度下温育一小时或更长。后续漂洗步骤可于例如低严格度条件下进行。低严格度条件的例子可包括 42°C、2xSSC 与 0.1% SDS,优选 50°C、2xSSC 与 0.1% SDS。经常优选使用高严格度条件。高严格度条件的例子可包括在室温下用 2xSSC 与 0.1% SDS 漂洗三次各 20 分钟,然后在 1xSSC 与 0.1% SDS 在 37 摄氏度下漂洗 3 次各 20 分钟,并用 1xSSC 与 0.1% SDS 在 50 摄氏度下漂洗两次各 20 分钟。然而,数种因素,例如温度与盐浓度,可影响杂交的严格度,且本领域技术人员可选择合适的因素以达到所需的严格度。

[0105] 一般地说,已知蛋白质中一个或多个氨基酸的修饰不会影响蛋白的功能。实际上,

突变的或经过修饰的蛋白,具有通过在特定氨基酸序列中替换、删除、插入和 / 或添加一个或多个氨基酸残基进行修饰的氨基酸序列的蛋白,已知可以保留原始的生物活性 (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 81 :5662-6(1984) ;Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 10 :6487-500(1982) ;Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 79 :6409-13(1982))。由此,本领域的技术人员将会理解,对氨基酸序列进行个别添加、删除、插入或替换以改变单个氨基酸或少数氨基酸,或者被认为是“保守修饰”的那些修饰——其中蛋白质的改变的结果是产生具有相似功能的蛋白,这些都是本发明的语境下可接受的。

[0106] 只要保持所述蛋白质的活性,并不特别限定氨基酸突变的数目。然而,一般优选改变氨基酸序列的 5% 或更少。相应的,在优选实施方案中,在上述突变体中突变的氨基酸数一般为 30 个氨基酸或更少,优选 20 个氨基酸或更少,较优选 10 个氨基酸或更少,更优选 6 个氨基酸或更少,尤其更优选 3 个氨基酸或更少。

[0107] 需突变的氨基酸残基优选突变为氨基酸侧链特性保持的另一种氨基酸 (称为保守性氨基酸替换的过程)。氨基酸侧链特性的例子包括疏水性氨基酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、亲水性氨基酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、以及具有下列官能团或共同特征的侧链:脂肪族侧链 (G, A, V, L, I, P);含有羟基基团的侧链 (S, T, Y);含有硫原子的侧链 (C, M);含有羧酸与酰胺的侧链 (D, N, E, Q);含有碱的侧链 (R, K, H) 以及含有芳香族的侧链 (H, F, Y, W)。提供功能上相似氨基酸的保守性替换表在本领域是众所周知的。例如,下列 8 个组分分别包含彼此构成保守性替换的氨基酸:

[0108] 1) 丙氨酸 (A)、甘氨酸 (G);

[0109] 2) 天冬氨酸 (D)、谷氨酸 (E);

[0110] 3) 天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q);

[0111] 4) 精氨酸 (R)、赖氨酸 (K);

[0112] 5) 异亮氨酸 (I)、亮氨酸 (L)、甲硫氨酸 (M)、缬氨酸 (V);

[0113] 6) 苯丙氨酸 (F)、酪氨酸 (Y)、色氨酸 (W);

[0114] 7) 丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T);

[0115] 8) 半胱氨酸 (C)、甲硫氨酸 (M) (参见,例如 Creighton, Proteins 1984)。

[0116] 上述保守性修饰多肽包括在本发明的蛋白质中。然而,本发明并不仅限于此,所述蛋白质包括非保守性修饰,只要至少所述蛋白的一种生物学活性得以保留即可。进一步,所述修饰蛋白并不排除多态变体、种间同源物以及由这些蛋白的等位基因编码的蛋白。

[0117] 另外,本发明的基因涵盖编码所述蛋白的上述功能等价物的多核苷酸。除杂交外,可以使用基因扩增方法分离编码与所述蛋白质功能等价的多肽的多核苷酸,诸如多聚酶链式反应 (PCR) 方法,通过使用基于上述信息的序列合成的引物。分别构成人类基因和蛋白质的功能等价物的多核苷酸与多肽,通常与其原始核苷酸或氨基酸序列具有高同源性。“高同源性”通常指 40% 或更高的同源性,优选 60% 或更高,较优选 80% 或更高,更优选 90% 到 95% 或更高。特定多核苷酸或多肽的同源性可遵循“Wilbur and Lipman, Proc Natl Acad Sci USA 80 :726-30(1983)”中的算法确定。

[0118] 抗体

[0119] 如本文所使用的,术语“抗体”意图包括可以和指定蛋白或其肽特异反应的免疫球蛋白或其片段。抗体可以包括人抗体、灵长源化 (primatized) 抗体、嵌合抗体、双特异性抗

体、人源化抗体、与其它蛋白或放射性标记融合的抗体和抗体片段。而且,本文中,抗体使用其最广泛的意义,具体地涵盖完整单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示期望的生物学活性即可。“抗体”指示所有类型(例如 IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM)。

[0120] 本主题发明使用针对 EF-1delta 的 CDKN3 结合区域(位于 72-160aa)的抗体以阻断 CDKN3 与 EF-1delta 之间的结合或相互作用。因为这两个基因均在肺癌中被上调(图 16、17、18B 与 19)且其相互作用在肺癌细胞中被确定(图 18 与 20)。更进一步,针对 NPTX1 的抗体对中和分泌的 NPTX1 蛋白和抑制癌细胞增殖是有用的(图 10B 与 C)。因此本发明的抗体可用于治疗肺癌。这些抗体将通过已知方法提供。描述了产生根据本发明所述抗体的技术的例子。

[0121] (i) 多克隆抗体

[0122] 多克隆抗体优选地通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂在动物体内产生。在本发明中,所述抗原包括,但不仅限于:包含 SEQ ID NO:88 或 89 或 EF-1delta 的 CDKN3 结合区域,例如 SEQ ID NO:61 的多肽。可以使用双功能或衍生试剂将相关抗原与在待免疫物种体内具有免疫原性的蛋白相偶联,所述具有免疫原性的蛋白例如钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂,双功能或衍生试剂例如马来酰亚胺苯甲酸硫代丁二酰亚胺酯(maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester)(通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOC12 或 $R' - N = C = NR$,其中 R 和 R' 是不同的烷基。

[0123] 用该抗原、免疫原性偶联物或衍生物免疫动物是通过,例如,组合 100 μ g 或 5 μ g 蛋白或偶联物(分别用于家兔或小鼠)与 3 倍体积的弗氏完全佐剂,并在皮内多点注射该溶液。一个月后,用 1/5-1/10 原始量的肽或偶联物与弗氏完全佐剂多点皮下注射来对动物加强免疫。7-14 天后,对动物进行采血,并测定血清的抗体滴度。加强免疫动物,直至滴度达到高平台。优选地是,用于对动物进行加强免疫的是相同抗原的偶联物,但与不同的蛋白偶联和/或通过不同的交联剂偶联。

[0124] 结合物亦可在重组细胞培养以蛋白融合体的形式制备。聚集剂,例如明矾亦适用于增强免疫应答。

[0125] (ii) 单克隆抗体

[0126] 单克隆抗体从基本上均质的抗体构成的群体获得,即构成该群体的单个抗体是相同的,只是可能存在少量的天然发生的突变。因此,修饰语“单克隆”是指抗体不是离散(discrete)抗体的混合物这一特征。

[0127] 例如,单克隆抗体可以用杂交瘤方法制备,该方法首先在 Kohler et al., Nature, 256:495 (1975) 中被记载,或者可以通过重组 DNA 方法制备(美国中专利 4,816,567)。

[0128] 在杂交瘤方法中,小鼠或其它合适的动物,例如仓鼠,用本文上述方法产生免疫以激发淋巴细胞,所述淋巴细胞产生或有能力产生可特异性与用来产生免疫的蛋白结合的抗体。另外,可在体外使淋巴细胞产生免疫。然后将淋巴细胞与骨髓瘤细胞通过合适的融合剂,例如聚乙二醇融合,以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。

[0129] 将制备得的杂交瘤细胞在适合的培养基中接种并生长,所述培养基优选包含一种

或多种可抑制未融合亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。举例而言,如果所述骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT),所述杂交瘤的培养基通常包含次黄嘌呤、氨甲蝶呤与胸腺嘧啶(HAT 培养基),这些物质可阻止 HGPRT 缺陷细胞的生长。

[0130] 优选的骨髓瘤细胞具有如下特征:融合效率高,支持所选抗体产生细胞稳定高水平产生抗体,并且对某种培养基例如 HAT 培养基敏感。其中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,例如从可以从 Salk 研究所细胞配送中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego), California USA 获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤和可以从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection), Manassas, Virginia, USA 获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞衍生的细胞系。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也有报道用于产生人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol., 133:300-1(1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0131] 分析杂交瘤细胞在其中生长的培养基以获得针对所述抗原的单克隆抗体产量。优选地,通过免疫沉淀或体外结合分析,诸如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸收分析(ELISA),来测定杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性。

[0132] 例如,所述单克隆抗体的结合亲和性可通过 30 Scatchard analysis of Munson PJ & Rodbard D. Anal Biochem. 1980 Sep 1; 107(1):220-39 的方法来加以确定。

[0133] 当鉴定出产生具有所期望特异性、亲和性和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可将该克隆通过有限稀释过程进行亚克隆并用常规方法进行培育(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。适用于该目的的培养基包括,例如 D-MEM 或 RPML-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物体内以腹水瘤的形式生长。

[0134] 用合适的手段将所述亚克隆分泌的单克隆抗体自培养基、腹水或血清以常规免疫球蛋白纯化过程分离,所述过程的例子包括:蛋白 A-Sepharose、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和层析。

[0135] 编码单克隆抗体的 DNA 可以用传统方法(例如通过使用能够特异结合编码鼠源抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地加以分离和测序。杂交瘤细胞是这类 DNA 的优选来源。一旦分离了 DNA,即可将 DNA 置于表达载体内,然后将其转染进入宿主细胞,例如大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中华仓鼠卵巢(CHO)细胞,或骨髓瘤细胞,这些细胞本身不会产生免疫球蛋白,从而在重组宿主细胞内合成单克隆抗体。关于在细菌体内重组表达编码抗体的 DNA 的综述文献包括 Skerra A. Curr Opin Immunol. 1993 Apr; 5(2):256-62 和 Plückthun A. Immunol Rev. 1992 Dec; 130:151-88。

[0136] 另一种产生针对 EF-1delta 的 CDKN3 结合区域(位于 72-160aa)有特异性反应的抗体或抗体片段的方法,是用 EF-1delta 的 CDKN3 结合区域(位于 72-160aa)筛选细菌中表达的、编码免疫球蛋白或其片段的表达文库。可以用噬菌体表达文库,在细菌内表达完整的 Fab 片段、VH 区和 Fv 区。参见,例如,ard ES, et al., Nature. 1989 Oct 12; 341(6242):544-6; Huse WD, et al., Science. 1989 Dec 8; 246(4935):1275-81; 与 McCafferty J, et al., Nature. 1990 Dec 6; 348(6301):552-4。利用 EF-1delta 的 CDKN3 结合区域(位于 72-160aa)筛选上述文库,可鉴定出与 EF-1delta 的 CDKN3 结合区域有反应性的免疫球蛋白

片段。另外, SCID-hu-mouse (可从 Genpharm 获得) 可用来产生抗体或其片段。

[0137] 在进一步的实施方案中, 抗体或抗体片段可从通过 McCafferty J, et al., Nature. 1990Dec 6 ;348(6301) :552-4;Clarkson T, et al., Nature. 1991Aug15 ;352(6336) :624-8 描述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离出来;而 MarksJD, et al., J Mol Biol, 222 :581-597(1991) J Mol Biol. 1991Dec5 ;222(3) :581-97 分别描述了使用噬菌体文库分离小鼠与人类抗体。后继文章描述了用链改组产生高亲和性 (nM 范围) 人类抗体 (Marks JD, et al., Biotechnology (N Y). 1992Jul ;10(7) :779-83), 以及组合感染 (combinatorialinfection) 与体内重组作为组建超大噬菌体文库的技术 (Waterhouse P, et al., Nucleic Acids Res. 1993May 11 ;21(9) :2265-6)。因此, 这些技术对传统的用单克隆抗体杂交瘤技术分离单克隆抗体是可行的替代方法。

[0138] 亦可通过用人类重链和轻链恒定域替换同源小鼠序列的方法 (美国专利 4, 816, 567;Morrison SL, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1984Nov ;81(21) :6851-5), 或通过非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列与免疫球蛋白编码序列共价接合的方法修饰所述 DNA。

[0139] 通常, 这样的非免疫球蛋白多肽被用来替换抗体的恒定域, 或被用于替换抗体的一个抗原结合位点的可变域, 以组建包含一个对某种抗原特异性的抗原结合位点和另一个对另一个抗原特异性的抗原结合位点的嵌合二价抗体。

[0140] (iii) 人源化抗体

[0141] 用于将非人抗体人源化的方法在本领域中已有记载。优选地, 人源化抗体中导入了一个或多个来自非人来源的氨基酸残基。这些非人源氨基酸残基经常称作“输入 (import)”残基, 通常取自某个“输入”可变域。人源化可以基本上按照 Winter 及其合作者的方法 (Jones PT, et al., Nature. 1986May 29-Jun 4 ;321(6069) :522-5;Riechmann L, et al., Nature. 1988Mar24 ;332(6162) :323-7;Verhoeyen M, et al., Science. 1988Mar25 ;239(4847) :1534-6) 来进行, 用高变区序列替换人抗体的相应序列。因此, 这些“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利 No. 4, 816, 567), 其中完整人可变区的一小部分 (substantially less than intact) 被来自非人物种的相应序列替代。在实践中, 人源化抗体典型的是人抗体中一些高变区残基 (可能还有一些 FR 残基) 被来自啮齿动物抗体中类似位置上的残基替代而得到的抗体。

[0142] 用于制造人源化抗体的人可变区, 包括轻链和重链, 的选择对于减少抗原性是非常重要的。根据所谓的“最佳匹配 (best-fit)”方法, 用啮齿动物抗体的可变区的序列来筛选整个已知人可变区序列文库。然后, 接受与啮齿动物序列最接近的人序列作为用于人源化抗体的人框架区 (FR) (Sims MJ, et al., J Immunol. 1993Aug 15 ;151(4) :2296-308;Chothia C & Lesk AM. J MolBiol. 1987Aug 20 ;196(4) :901-17)。另一种方法使用来源于轻链或重链特定亚群中的所有抗体之共有序列的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体 (Carter P, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1992May15 ;89(10) :4285-9;Presta LG, et al., J Immunol. 1993Sep 1 ;151(5) :2623-32)。

[0143] 此外, 重要的是, 抗体的人源化保留对抗原的高亲和性和其它有利的生物学性质。为了实现这一目标, 根据优选的方法, 人源化抗体的制备借助下述过程: 使用亲本和人源化序列的三维模型来分析亲本序列和各种理论上的人源化产物。三维免疫球蛋白模型是常

用的,而且本领域技术人员很熟悉它们。有可用的计算机程序来图解和显示选定的候选免疫球蛋白序列的可能三维构型结构。通过检查这些显示结果,人们可以分析残基在候选免疫球蛋白序列功能中的可能作用,即分析残基是否影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力。这样,就可以选择 FR 残基,并与受体序列和输入序列组合,从而获得期望的抗体特性,例如增加对靶抗原的亲合性。一般地说,高变区残基直接而且最实质性地参与影响抗原的结合。

[0144] (iv) 人抗体:

[0145] 作为人源化的替代方式,可生成成人抗体。例如,现在有可能生产这样的转基因动物(例如小鼠),它能够在被免疫时产生完全的人抗体谱(repertoire),而没有内源免疫球蛋白产生。例如,已有记载,在嵌合和种系突变小鼠内纯合删除抗体重链连接区(JH),可导致内源抗体的产生完全被抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到这种种系的突变小鼠体内,可导致在抗原刺激时人抗体的产生。例如,参见 Jakobovits A, et al., Proc Natl AcadSci U S A. 1993Mar 15 ;90(6) :2551-5 ;Nature. 1993Mar 18 ;362(6417) :255-8 ; Brüggemann M, et al., Year Immunol. 1993 ;7 :33-40 ;与美国专利 5,591,669 ;5,589,369 与 5,545,807。

[0146] 另外,可使用噬菌体展示技术(McCafferty J, et al., Nature. 1990Dec6 ;348(6301) :552-4) 在体外从来自未被免疫的供体的免疫球蛋白可变(V)域基因谱(repertoire)产生人抗体和抗体片段。根据这种技术,将抗体V区基因符合读框地(in-frame)克隆到丝状噬菌体(例如M13或fd)的大或小衣壳蛋白基因内,作为有功能的抗体片段在噬菌体颗粒的表面上展示。因为丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,所以根据抗体的功能性质进行选择也会导致编码显示这些性质的抗体的基因被选出。因此,噬菌体可模拟B细胞的一部分性质。噬菌体展示可以用多种形式进行,关于它们的综述,见例如Johnson KS & Chiswell DJ. Curr Opin Struct Biol. 1993 ;3 :564-71。有数种来源的V基因片段可用于噬菌体展示。

[0147] Clackson T, et al., Nature. 1991Aug 15 ;352(6336) :624-8 从经免疫小鼠的脾脏来源的小型随机组合V基因文库分离了多种系列的抗噁唑酮抗体。可以从未被免疫的人供体构建V基因谱,并基本上按照下列文献中记载的技术分离针对多种系列抗原(包括自身抗原)的抗体: Marks JD, et al., J Mol Biol. 1991Dec 5 ;222(3) :581-97, 或 Griffiths AD, et al., EMBO J. 1993Feb ;12(2) :725-34。另见美国专利 5,565,332 和 5,573,905。

[0148] 人抗体也可以由体外活化的B细胞来产生(见美国专利 205,567,610 和 5,229,275)。在共有的共同未决申请中记载了用SCID小鼠产生人抗体的一个优选手段。

[0149] (v) 抗体片段:

[0150] 已经开发了各种技术用于产生抗体片段。传统上,这些片段是通过蛋白水解消化完整的抗体产生的(参见,例如Morimoto K & Inouye K. JBiochem Biophys Methods. 1992Mar ;24(1-2) :107-17 ;Brennan M, et al., Science. 1985Jul 5 ;229(4708) :81-3)。然而,现在这些片段也可以由重组宿主细胞直接产生。例如,可以从上面讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。或者,可以直接从大肠杆菌回收Fab' -SH片段,并加以化学偶联形成F(ab')₂片段(Carter P, et al., Biotechnology(N Y). 1992Feb ;10(2) :163-7)。根据另一种方法,F(ab')₂片段可以直接从重组宿主细胞分离。其它用于产生抗体片段的

技术是技术人员容易想到的。在其它实施方案中,首选的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见 WO 93/16185 ;美国专利 5, 571, 894 与 5, 587, 458。所述抗体片段亦可为“线性抗体”,例如,在美国专利 5, 641, 870 中描述的。上述线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0151] (vi) 非抗体结合蛋白:

[0152] 术语“非抗体结合蛋白”或“非抗体配体”或“抗原结合蛋白”可互换使用,指使用非免疫球蛋白骨架的抗体模拟物,包括 adnectins、avimers、单链多肽结合分子和类抗体结合肽模拟物,在下文中将更详细地进行讨论。

[0153] 已经开发出了其它按照与抗体相似的方式靶定和结合靶标的化合物。某些这样的“抗体模拟物”使用非免疫球蛋白骨架作为抗体可变区的可替代蛋白框架。

[0154] 举例而言,Ladner et al. (美国专利 5, 260, 203) 记载了单多肽链结合分子,其具有与抗体的轻链和重链可变区——它们聚集在一起但在分子水平上相互分离——相似的结合特异性。单链结合分子同时含有抗体重链和轻链可变区的抗体结合位点,它们通过一段肽接头连接,并会折叠成与双肽抗体相似的结构。单链结合分子与传统的抗体相比显示有多种优势,包括尺寸更小、稳定性更高和更容易被修饰。

[0155] Ku 等 (Proc Natl Acad Sci USA 92(14) :6552-6556 (1995)) 描述了一种基于细胞色素 b562 的抗体替代物。Ku 等 (1995) 制成了一个文库,其中细胞色素 b562 的两个环被随机化,并从中选择针对牛血清白蛋白的结合性。发现突变体们以与抗 BSA 抗体相似的方式选择性结合 BSA。

[0156] Lipovsek 等 (美国专利 6, 818, 418 与 7, 115, 396) 描述了一种抗体模拟物,其特征是具有一个纤连蛋白或纤连蛋白样骨架和至少一个可变环。这些基于纤连蛋白的抗体模拟物称作 Adnectins,它们显示出许多与天然或工程化抗体相同的特征,包括对任何靶配体的高亲和性和特异性。任何用于发展新的或改良的结合蛋白的技术均可用于这些抗体模拟物。

[0157] 这些基于纤连蛋白的抗体模拟物的结构与 IgG 重链可变区的结构相似。因此,这些模拟物的抗原结合性质在性质上与亲和性上与天然抗体相似。而且,这些基于纤连蛋白的抗体模拟物与抗体和抗体片段相比还表现出某些优点。例如,这些抗体模拟物的天然折叠稳定性不依赖于二硫键,因此这些抗体模拟物在通常会破坏抗体的条件下仍然保持稳定。此外,因为这些基于纤连蛋白的抗体模拟物的结构与 IgG 重链的结构相似,所以可以在体外进行环随机化和重排处理,类似于抗体的体内亲和力成熟过程。

[0158] Beste 等 (Proc Natl Acad Sci USA 96(5) :1898-1903 (1999)) 描述了一种基于脂笼蛋白骨架的抗体模拟物(**Anticalin®**)。脂笼蛋白包括蛋白末端由 4 个超变环构成的 β -桶。Beste (1999) 将这些环进行随机突变,并以例如对荧光素的结合为条件进行选择。这些变异体显示对荧光素的特异性结合,其中一个变异体显示与抗-荧光素抗体相似的结合。进一步的分析显示,所有随机化位置均是可变的,表明**Anticalin®**可能适合于用作抗体的替代物。

[0159] **Anticalin®**是小型单链肽,通常在 160 到 180 个残基之间,这提供了相比于抗体的若干优势,包括降低生成成本,增加储藏稳定性以及降低免疫应答。

[0160] Hamilton 等 (美国专利 5, 770, 380) 描述了一种合成抗体模拟物,其使用杯芳烃 (calixarene) 刚性非肽有机骨架,骨架上搭接有多个可变肽环作为结合位点。肽环相对于

彼此均从杯芳烃的几何学上的同一侧突出。由于这种几何学构型,所有的环均可供结合,从而增加了与配体的结合亲和性。然而,与其它抗体模拟物相比,基于杯芳烃的抗体模拟物不是纯粹由肽构成的,因此对蛋白酶攻击的敏感性降低。骨架也不是仅由肽、DNA 或 RNA 构成,这意味着该抗体在极端环境条件下相对稳定,寿命较长。而且,因为基于杯芳烃的抗体模拟物相对较小,其产生免疫原性应答的可能性降低。

[0161] Murali 等 (Cell Mol Biol. 49(2) :209-216(2003)) 描述了一种用于将抗体减小为更小的模拟肽的方法,他们称之为“类抗体结合模拟肽 (antibody likebinding peptidomemetics)” (ABiP),也可以作用抗体的替代物。

[0162] Silverman 等 (Nat Biotechnol. (2005), 23 :1556-1561) 记载了一些融合蛋白,它们是包含多个域的单链多肽,称作“avimers”。avimers 是通过体外外显子重排和噬菌体展示从人细胞外受体域发展而来的,是一类在亲和性和对各种靶分子的特异性方面与抗体相似的结合蛋白。所得的多结构域蛋白可以包括多个独立的结合域,它们与单表位结合蛋白相比显示更高的亲和性(在某些情况下是亚纳摩尔级)和特异性。关于 avimers 构建和使用的更多细节参见例如美国专利申请公开 Nos. 20040175756, 20050048512, 20050053973, 20050089932 和 20050221384。

[0163] 除了非免疫球蛋白蛋白框架之外,包含 RNA 分子和非天然寡聚体(例如蛋白酶抑制剂、苯并二氮卓、嘌呤衍生物和 β -转角模拟物)的化合物也可以模拟抗体。

[0164] (vii) 中和 NPTX1 活性的抗体

[0165] 涉及本发明的抗 NPTX1 抗体的术语“中和”或短语“中和 NPTX1 活性的抗体”意指其与 NPTX1 结合或接触导致抑制 NPTX1 细胞增殖活性的抗体。因为 NPTX1 分泌到胞外且作为肺癌细胞增殖的必需因子起作用,有些抗 NPTX1 抗体可中和该活性。

[0166] (viii) 选择抗体或抗体片段:

[0167] 前述方法制备的抗体或抗体片段可通过检测与 EF-1delta 的 CDKN3 结合区域(位于 72-160aa)表达细胞(如癌细胞)的亲和性来加以选择。对这些细胞的非特异性结合通过用含有 3% BSA 的 PBS 在室温下处理 30 分钟来封闭。将细胞在室温下与候选抗体或抗体片段温育 60 分钟。在用 PBS 漂洗之后,用 FITC 偶联的二抗在室温下将细胞染色 60 分钟,并使用荧光计检测。另外,可以使用表面等离子共振现象的生物感受器作为手段检测或定量本发明中的抗体或抗体片段。可检测细胞表面 EF-1delta 的 CDKN3 结合区域(位于 72-160aa)的抗体或抗体片段可选用于本发明。

[0168] 通过用 GST 融合的人类 NPTX1 蛋白(密码子 20-145:SEQ ID NO:88 与 297-430:SEQ ID NO:89)免疫兔以产生针对 NPTX1(BB017)的兔多克隆抗体(pAb),并用标准方案纯化。此外,用编码人 NPTX1 蛋白的质粒 DNA 基因枪皮内免疫 BALB/c 小鼠(Chowdhury)来产生对人 NPTX1(mAb-17-1)特异性的小鼠单克隆抗体(mAb)。用亲和层析从细胞培养上清中纯化出 NPTX1 mAb。通过使用内源表达 NPTX1 或否的肺癌细胞系的裂解液进行 Western 印迹分析证实 NPTX1 mAb 对人类 NPTX1 具有特异性。

[0169] (ix) 药用配制剂:

[0170] 可通过将具有期望纯度的抗体与任选的药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂(《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第 16 版,Osol, A. 编,1980)混合,以冻干剂型或水溶液的形式,制备抗体的治疗用配制剂供贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂

在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵;苯索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反荷离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0171] W097/04801中记载了适于皮下施用的冻干配制剂。此类冻干配制剂可用合适的稀释剂重建至高蛋白质浓度且重建的配制剂可皮下施用于本文中待治疗的哺乳动物。

[0172] 根据需治疗的特定病症需要,本文所述配制剂亦可包含多于一种活性化合物,优选那些具有互补活性且不会互相有负面影响的。举例而言,可期望进一步提供化疗剂、细胞因子或免疫抑制剂。上述其它药剂的有效量依赖于配制剂中存在的抗体量,病症或疾病或治疗的类型,以及其它上述讨论的因素。这些药剂通常使用与前述所用相同的剂量和给药途径,或前述所用的剂量的大约1到99%。

[0173] 活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊)、在胶状药物投递系统中(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液(macroemulsions)中。此类技术公开于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第16版,Osol, A. 编,1980。

[0174] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有药剂的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质是成型产品的形式,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利第3,773,919号)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ 乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯共聚物、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0175] (x) 用抗体的治疗

[0176] 包含本抗体的组合物可以符合良好医疗实践的形式配制、确定剂量与施与。本抗体优选为人类、嵌合或人源化抗体scFv,或抗体片段。在此背景下需考虑的因素包括正在治疗的特定肺癌、所需治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床情况、病症或疾病的原因、药剂需投递的位置、施用方法、施用时程以及其它医疗从业者所知的因素。治疗上有效的施用抗体量将由这些考虑所决定。

[0177] 作为一般性的建议,非消化道施用的抗体治疗上有效的量应在每剂大约每日0.1到20mg/kg患者体重的范围内,且典型的抗体起始用量范围为大约2到10mg/kg。

[0178] 然而,如上所述,这些建议的抗体量在很大程度上受治疗学上考量的左右。在合适剂量与时程的选择中最重要的因素,如上所述,是所得的结果。

[0179] 例如,对治疗正在进行的以及急性的疾病,可能需要相对较高的初始剂量。为获取

最有效的结果,根据疾病或病症的不同,所述抗体可能应尽可能在接近疾病或病症的初兆、诊断、出现或发生时施用,或在疾病或病症复发时施用。

[0180] 所述抗体可用任何合适的方法施用,包括非消化道、皮下、腹膜内、肺内以及鼻内施用,并且如果期望局部免疫抑制治疗,在病变内施用。非消化道输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内与皮下施用。

[0181] 另外,用脉冲输注(pulse infusion)的方法施与所述抗体可能为合适的,例如,用递减剂量的抗体。所述给药优选通过注射,最优选通过静脉内或皮下注射,部分取决于所述施用是短期的还是长期的。

[0182] 另外,还可以与本文所述抗体一起施用其它化合物,例如细胞毒剂、化疗剂、免疫抑制剂和/或细胞因子。组合施用包括使用不同配制剂或单一药用配制剂同时施用,以及任何顺序的相继施用,其中优选存在这样的一段时间,其中两种(或所有)活性药剂同时发挥其生物学活性。

[0183] 除施用所述抗体于患者外,本发明还构思了用基因疗法施用所述抗体。上述施用编码抗体的核酸的方法涵盖于“施用治疗有效量的抗体”这一表述中。例如,关于使用基因疗法产生胞内抗体,参见公布于1996年3月14日的W096/07321。

[0184] 有两种主要方法使核酸(任选包含在载体中)进入患者的细胞,即体内和回体(ex vivo)。对于体内投递,通常在需要抗体的部位将核酸直接注射到患者体内。对于回体治疗,采集患者的细胞,将核酸导入这些分离的细胞,并将经过修饰的细胞或是直接施用于患者,或是例如装入多孔膜内并植入患者体内(参见例如美国专利第4,892,538号和第5,283,187号)。有多种技术可用于将核酸导入活细胞。这些技术根据是将核酸转移至体外培养细胞还是目的宿主的体内细胞而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖苷、磷酸钙沉淀法等。常用于回体投递基因的载体是逆转录病毒。

[0185] 目前优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体(诸如腺病毒、I型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒)和基于脂质的系统(可用于脂质介导的基因转移的脂质有例如DOTMA、DOPE和DC-Chol)进行的转染。在有些情况中,希望与靶向靶细胞的试剂一起提供核酸源,诸如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异的抗体、靶细胞上受体的配体等。在采用脂质体时,与胞吞作用相关细胞表面膜蛋白结合的蛋白质可用于靶向和/或促进摄入,例如对特定细胞类型具有向性的衣壳蛋白或其片段、在循环中进行内在化的蛋白质的抗体、和靶向细胞内定位和增加细胞内半衰期的蛋白质。例如Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432(1987)和Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414(1990)中记载了受体介导的胞吞技术。关于目前已知的基因标记和基因治疗方案的综述参见Anderson et al., Science 256:808-813(1992)。还可参见W093/25673及其引用的参考文献。

[0186] 双链分子

[0187] 本文中使用的术语“分离双链分子”指抑制靶基因表达的核酸分子,包括,例如,小干扰RNA(siRNA,例如双链核糖核酸(dsRNA)或小发夹RNA(shRNA))与小干扰DNA/RNA(siD/R-NA,例如DNA与RNA的双链嵌合体(dsD/R-NA)或DNA与RNA的小发夹嵌合体(shD/R-NA))。

[0188] 本文中使用的术语“siRNA”指阻止靶mRNA翻译的双链RNA分子。使用将siRNA导

入细胞的标准技术,包括其中以 DNA 为模板转录 RNA 的那些。所述 siRNA 包括 EBI3、CDKN3 或 EF-1delta 有义核酸序列(亦用“有义链”指代)、EBI3、CDKN3 或 EF-1delta 反义核酸序列(亦用“反义链”指代)或两者。所述 siRNA 可如此构建使得单个转录物具有靶基因的有义核酸序列与其互补的反义核酸序列,例如,发夹结构。所述 siRNA 可为 dsRNA 或 shRNA。

[0189] 本文中使用的术语“dsRNA”指包含相互互补序列的两个 RNA 分子的构建体,所述两个 RNA 分子通过所述互补序列退火以形成双链 RNA 分子。所述两条链的核苷酸序列可不仅包含选自靶基因序列中蛋白质编码序列的“有义”或“反义”RNA,亦可包括具有选自所述靶基因非编码区域的核苷酸序列的 RNA 分子。

[0190] 在本说明书中使用的术语“shRNA”是指:具有茎-环结构的 siRNA,其包含彼此互补的第一区和第二区(即有义链和反义链)。两个区的互补程度和方向足以使两个区之间发生碱基配对,所述第一区和第二区通过环区连接在一起,而所述环是因为环区内的核苷酸(或核苷酸类似物)之间缺乏碱基配对而形成的。shRNA 的环区是介于有义链和反义链之间的单链区,也可以称作“间插单链(intervening single-strand)”

[0191] 在本说明书中使用的术语“siD/R-NA”是指:由 RNA 和 DNA 二者组成的双链多核苷酸分子,包括 RNA 和 DNA 的杂合体和嵌合体,其阻止靶 mRNA 的翻译。在本说明书中,杂合体表示这样的分子,其中由 DNA 组成的多核苷酸和由 RNA 组成的多核苷酸相互杂交形成双链分子;而嵌合体表示组成所述双链分子的链中的一条或两条可以同时含有 RNA 和 DNA。使用将 siD/R-NA 导入细胞的常规技术。所述 siD/R-NA 包括 EBI3、CDKN3 或 EF-1delta 有义核酸序列(亦用“有义链”指代)、EBI3、CDKN3 或 EF-1delta 反义核酸序列(亦用“反义链”指代)或两者。siD/R-NA 可以这样构建,使单个转录物同时具有来自靶基因的有义核酸序列和互补反义核酸序列,例如发夹。siD/R-NA 可以是 dsD/R-NA 或 shD/R-NA。

[0192] 在本文中使用的术语“dsD/R-NA”是指这样两个分子的构建体,所述两个分子包含彼此互补的序列并且已经藉由所述互补序列退火在一起而形成双链多核苷酸分子。两条链的核苷酸序列可以不仅仅包含选自靶基因序列的蛋白编码序列的“有义”或“反义”多核苷酸序列,还可以包含具有选自靶基因非编码区的核苷酸序列的多核苷酸。组成 dsD/R-NA 的两个分子中的一个或两个由 RNA 和 DNA 二者组成(嵌合体分子),或者一个分子由 RNA 组成而另一个由 DNA 组成(杂合双链)。

[0193] 在本文中使用的术语“shD/R-NA”是指:具有茎-环结构的 siD/R-NA,其包含彼此互补的第一区和第二区,即有义链和反义链。所述区的互补程度和方向足以使它们之间发生碱基配对,第一区和第二区通过环区连接,所述环是因为在环区内的核苷酸(或核苷酸类似物)之间缺乏碱基配对而形成的。shD/R-NA 的环区是介于有义链和反义链之间的单链区,也可以称作“间插单链”。

[0194] 本说明书中使用的“分离的核酸”是指:从本来的环境(例如自然出现时的自然环境)中被取出,与其自然状态相比发生了合成性的改变的核酸。在本发明中,分离的核酸包括 DNA、RNA 和它们的衍生物。

[0195] 针对 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的双链分子与靶 mRNA 杂交,通过与正常单链 mRNA 基因转录物结合,干扰其翻译,抑制蛋白质表达,来降低或抑制由 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因编码的 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 蛋白的产生。

[0196] 如本文中证明的,在肺癌细胞系中 EBI3 的表达被 dsRNA 抑制(图 4D);在肺癌细

胞系中 CDKN3 的表达被 dsRNA 抑制 (图 22A) 在肺癌细胞系中 NPTXR 的表达被 dsRNA 抑制 (图 13D) 在肺癌细胞系中 EF-1delta 的表达被 dsRNA 抑制 (图 22B)

[0197] 因此本发明提供了有能力在导入表达 EBI3、CDKN3 或 EF-1delta 基因的细胞后抑制所述基因表达的分离双链分子。所述双链分子的靶序列可通过 siRNA 设计算法来设计, 例如下述的:

[0198] EBI3 靶序列包括, 例如, 核苷酸

[0199] SEQ ID NO :18 (位于 SEQ ID NO :1 的 679-697nt)

[0200] SEQ ID NO :20 (位于 SEQ ID NO :1 的 280-298nt)

[0201] CDKN3 靶序列包括, 例如, 核苷酸

[0202] SEQ ID NO :49 (位于 SEQ ID NO :5 的 310-328nt)

[0203] EF-1delta 靶序列包括, 例如, 核苷酸

[0204] SEQ ID NO :51 (位于 SEQ ID NO :7 的 225-243nt)

[0205] NPTXR 靶序列包括, 例如, 核苷酸

[0206] SEQ ID NO :84 (位于 SEQ ID NO :86 的 1280-1298nt)

[0207] SEQ ID NO :85 (位于 SEQ ID NO :86 的 1393-1411nt)

[0208] 具体而言, 本发明提供了下列 [1] 到 [20] 的双链分子:

[0209] [1] 一种分离的双链分子, 它当被导入细胞后, 体内抑制 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的表达, 以及细胞增殖, 所述分子包含有义链以及与之互补的反义链, 二者彼此杂交形成所述双链分子;

[0210] [2] [1] 中所述的双链分子, 其中所述双链分子对 mRNA 作用, 所述 mRNA 与选自下组的靶序列匹配: SEQ ID NO :18 (位于 SEQ ID NO :1 的 679-697nt), SEQ ID NO :20 (位于 SEQ ID NO :1 的 280-298nt), SEQ ID NO :49 (位于 SEQ ID NO :5 的 310-328nt), SEQ ID NO :51 (位于 SEQ ID NO :7 的 225-243nt), SEQ ID NO :84 (位于 SEQ ID NO :86 的 1280-1298nt) 以及 SEQ ID NO :85 (位于 SEQ ID NO :86 的 1393-1411nt);

[0211] [3] [2] 中所述的双链分子, 其中所述有义链包括对应于选自下组的靶序列的序列: SEQ ID NOs :18, 20, 49, 51 84 与 85;

[0212] [4] [3] 中所述的双链分子, 具有少于约 100 个核苷酸的长度;

[0213] [5] [4] 中所述的双链分子, 具有少于约 75 个核苷酸的长度;

[0214] [6] [5] 中所述的双链分子, 具有少于约 50 个核苷酸的长度;

[0215] [7] [6] 中所述的双链分子, 具有少于约 25 个核苷酸的长度;

[0216] [8] [7] 中所述的双链分子, 具有约 19 到约 25 个核苷酸的长度;

[0217] [9] [3] 中所述的双链分子, 其由单一多核苷酸构成, 所述多核苷酸包含通过间插单链连接在一起的有义链和反义链;

[0218] [10] [9] 中所述的双链分子, 其具有通式 5' -[A]-[B]-[A'] -3', 其中, [A] 为包含与选自 SEQ ID NOs :18, 20, 49, 51, 84 与 85 中的靶序列对应的序列的有义链, [B] 为由 3 个~ 23 个核苷酸构成的间插单链, [A'] 为包含 [A] 的互补序列的反义链;

[0219] [11] [1] 中所述的双链分子, 其由 RNA 构成;

[0220] [12] [1] 中所述的双链分子, 其由 DNA 和 RNA 构成;

[0221] [13] [12] 中所述的双链分子, 其中所述分子是 DNA 多核苷酸与 RNA 多核苷酸的杂

合体；

[0222] [14][13] 中所述的双链分子,其中所述有义链与反义链分别由 DNA 与 RNA 构成；

[0223] [15][12] 中所述的双链分子,其中所述分子为 DNA 与 RNA 的嵌合体；

[0224] [16][15] 中所述的双链分子,其中反义链 3' 端侧翼的区域为 RNA,或者有义链 5' 端侧翼的区域与反义链 3' 端侧翼的区域均为 RNA；

[0225] [17][16] 中所述的双链分子,其中所述侧翼区域由 9 到 13 个核苷酸组成；

[0226] [18][2] 中所述的双链分子,其中所述分子包含 3' 突出端；

[0227] [19] 表达 [2] 中所述的双链分子的载体；

[0228] [20][19] 中所述的载体,其中所述双链分子具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3' , 其中, [A] 为包含与选自 SEQ ID NOs :18,20,49,5184 与 85 中的靶序列对应的序列的有义链, [B] 为由 3 个~ 23 个核苷酸构成的间插单链, [A'] 为包含 [A] 的互补序列的反义链。

[0229] 本发明所述的双链分子将在下面更详细描述；

[0230] 设计具有抑制细胞内靶基因表达能力的双链核酸分子的方法是已知的(见例如,美国专利 No. 6, 506, 559, 本文引用其全部内容作为参考)。例如,可以从 Ambion 网站 (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) 获得用于设计 siRNA 的计算机程序。

[0231] 该计算机程序可以根据如下的方案选择双链核酸分子的靶核苷酸序列。

[0232] 靶点的选择

[0233] 1. 从转录物的 AUG 起始密码子开始向下游扫描搜寻 AA 双核苷酸序列。记录每个 AA 的出现及其 3' 侧相邻的 19 个核苷酸作为潜在 siRNA 靶点。Tuschl 等建议避免针对 5' 和 3' 非翻译区 (UTR) 以及邻近起始密码子的区域 (75 个碱基之内) 设计 siRNA, 因为这些区域可能更富含调节蛋白质的结合位点, 而 UTR 结合蛋白和 / 或翻译起始复合物可能干扰 siRNA 核酸内切酶复合物的结合。

[0234] 2. 将潜在靶点与合适的基因组数据库 (人、小鼠、大鼠等) 进行比较, 将任何与其他编码序列显著同源的靶序列排除在考虑之外。主要使用 BLAST (Altschul SF 等, Nucleic Acids Res 1997 Sep 1, 25 (17) :3389-402), 其可见于 NCBI 服务器 :www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/。

[0235] 3. 选择合格的靶序列用于合成。通常沿着待评估的基因的长度选择几个靶序列。

[0236] 使用上述实验方案, 设计本发明中分离双链分子的靶序列为下述

[0237] 对 EBI3 基因, SEQ ID NO :18 与 20,

[0238] 对 CDKN3 基因, SEQ ID NO :49 与 50,

[0239] 对 EF-1delta 基因, SEQ ID NO :51 与 52

[0240] 对 NPTXR 基因, SEQ ID NO :84 与 85。

[0241] 分别对以上述靶序列为目标的的双链分子检查其阻抑表达靶基因细胞生长的能力。因此, 本发明提供以选自下组的任何序列为靶标的双链分子：

[0242] 对于 EBI3 基因, SEQ ID NO :18 (位于 SEQ ID NO :1 的 679-697nt) 或 20 (位于 SEQ ID NO :1 的 280-298nt),

[0243] 对于 CDKN3 基因, SEQ ID NO :49 (位于 SEQ ID NO :5 的 310-328nt),

[0244] 对于 EF-1delta 基因, SEQ ID NO :51 (位于 SEQ ID NO :7 的 225-243nt),

[0245] 以及 SEQ ID NO :84(位于 SEQ ID NO :86 的 1280-1298nt) 或 SEQ ID NO :85(位于 SEQ ID NO :86 的 1393-1411nt)。

[0246] 本发明的双链分子可以靶向单个 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因序列, 或可以靶向多个 EBI3、CDKN3、EF-1delta 和 / 或 NPTXR 基因。

[0247] 以上述靶序列 EBI3、CDKN3、EF-1delta 和 / 或 NPTXR 基因为靶标的本发明的双链分子包括含有靶序列和 / 或靶序列之互补序列的任何核酸序列的分离多核苷酸。以 EBI3 基因为靶的多核苷酸例子包括那些含有序列 SEQ IDNO :18 或 20 和 / 或这些核苷酸的互补序列的多核苷酸 ; 以 CDKN3 基因为靶的多核苷酸包括那些含有序列 SEQ ID NO :49 和 / 或这些核苷酸的互补序列的多核苷酸 ; 以 EF-1delta 基因为靶的多核苷酸包括那些含有序列 SEQ IDNO :51 和 / 或这些核苷酸的互补序列的多核苷酸 ; 以 NPTXR 基因为靶的多核苷酸包括那些含有序列 84 或 85 和 / 或这些核苷酸的互补序列的多核苷酸。然而, 本发明并不仅限于这些例子, 且上述核酸序列中次要修饰是可以接受的, 只要所述经修饰分子保留阻抑 EBI3、CDKN3、EF-1delta 与 NPTXR 基因表达的能力。本文中, 短语“次要修饰”当用于和核酸序列相关时表示对所述序列替换、缺失、添加或插入一个、两个或数个核酸。

[0248] 在本发明的语境下, 术语“数个”当用于核酸替换、缺失、添加和 / 或插入时可意指 3-7 个, 优选 3-5 个, 较优选 3-4 个, 最优选是 3 个核苷酸残基。

[0249] 根据本发明, 本发明的双链分子可用实施例中使用的方法检测其能力。在本文中下述的实施例中, 在体外对包含 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因的 mRNA 不同部分的有义链或其互补的反义链的双链分子测验其在肺癌细胞系中 (例如对 EBI3 使用 A549, 对 CDKN3 或 EF-1delta 使用 LC319) 降低 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因产物产生的能力。进一步, 例如, 较之在缺乏候选分子情况下培养的细胞, 在与候选双链分子接触的细胞中 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因产物的减少可由, 例如, 使用在实施例 1、11 和 18 “半定量 RT-PCR” 项中针对 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR mRNA 的引物的 RT-PCR 来加以检测。可然后对在体外基于细胞的分析中减少 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因产物的序列检测其针对细胞生长的抑制作用。可然后对在体外基于细胞的分析中抑制细胞生长的序列使用患癌动物检测其体内的相应能力, 以证实 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因产物的产生降低与癌细胞生长降低, 所述动物的例子包括裸鼠异种移植模型。

[0250] 当所述分离多核苷酸是 RNA 及其衍生物时, 核苷酸序列中的“u”应替换为“t”。本文中使用的术语“互补”指多核苷酸中核苷酸单元的 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基配对, 且术语结合意指两个多核苷酸间物理的或化学的相互作用。当所述多核苷酸包含修饰的核苷酸和 / 或非磷酸二酯酶连结时, 这些多核苷酸亦可以同样地发生相互结合。一般而言, 互补多核苷酸序列在合适条件下杂交以形成包含很少或没有错配的稳定双链体。进一步, 本发明中所述分离多核苷酸的有义链与反义链可通过杂交形成双链分子或发夹环结构。在优选实施方案中, 上述双链体在每 10 个匹配中包含不超过一个错配。在特别优选的实施方案中, 其双链体的链完全互补, 该双链体不包含错配。

[0251] 对 EBI3 所述多核苷酸长度优选少于 1149 个核苷酸, 对 CDKN3 所述多核苷酸长度优选少于 844 个核苷酸, 对 EF-1delta 所述多核苷酸长度优选少于 1031 个核苷酸, 而对 NPTXR 所述多核苷酸长度优选少于 5815 个核苷酸。举例而言, 对所述的所有基因, 多核苷酸长度小于 500、200、100、75、50 或 25 个核苷酸。本发明中所述分离多核苷酸对形成针对

EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因的双链分子,或制备编码双链分子的模板 DNA 是有用的。的所述多核苷酸用于形成双链分子时,所述核苷酸可长于 19 个核苷酸,优选长于 21 个核苷酸,且更加优选长度在约 19 与 25 个核苷酸之间。

[0252] 本发明中所述双链分子可包含一个或更多修饰核苷酸和 / 或非磷酸二酯连接。本领域众所周知的化学修饰具有增加所述双链分子稳定性、可用性和 / 或细胞摄入的能力。一般技术人员明白本发明分子可包含的其它类型的活性修饰 (W003/070744; W02005/045037)。在一个实施方案中,可使用修饰以提供改善的抗降解性或改善的摄入。上述修饰的例子包括但不限于,硫代磷酸酯连接、2'-O- 甲基核糖核苷酸 (特别在双链分子的有义链上)、2'-脱氧-氟代核糖核苷酸、2'-脱氧核糖核苷酸、“通用碱基”核苷酸、5'-C- 碱基核苷酸以及掺入倒转脱氧碱基残基 (US20060122137)。

[0253] 另一个实施方案中,可以使用修饰来增强双链核酸分子的稳定性或增加寻靶效率。修饰包括双链核酸分子两条互补链之间的化学交联、双链核酸分子一条链的 3' 或 5' 末端的化学修饰、糖修饰、核碱基修饰和 / 或骨架修饰、2- 氟代修饰的核糖核苷酸和 2'-脱氧核糖核苷酸 (W02004/029212)。在另一个实施方案中,修饰可以用于增加或减少针对靶 mRNA 中和 / 或互补双链核酸分子链中互补核苷酸的亲和力 (W02005/044976)。例如,未修饰的嘧啶核苷酸可以用 2- 硫、5- 炔基 (5-alkynyl)、5- 甲基或 5- 丙炔基 (5-propynyl) 嘧啶取代。另外,未修饰的嘌呤可以用 7- 脱氮 (7-deza)、7- 烷基或 7- 烯基嘌呤取代。在另一个实施方案中,当双链核酸分子是具有 3' 突出端的双链核酸分子时,可以把 3'- 末端核苷酸的突出核苷酸替换成脱氧核糖核苷酸 (Elbashir SM 等, Genes Dev 2001 Jan 15, 15(2) : 188-200)。关于进一步的细节,可以利用公开文献如 US20060234970。本发明不限于这些实例,可以将任何已知化学修饰应用于本发明的双链核酸分子,只要所得分子保留抑制靶基因表达的能力。

[0254] 此外,本发明的双链核酸分子可以包含 DNA 和 RNA 二者,例如 dsD/R-NA 或 shD/R-NA。具体而言,由 DNA 链与 RNA 链形成的杂合多核苷酸或 DNA-RNA 嵌合体多核苷酸表现出提高的稳定性。可以形成 DNA 和 RNA 的混合,即由 DNA 链 (多核苷酸) 和 RNA 链 (多核苷酸) 组成的杂合型双链核酸分子、或在任一单链 (多核苷酸) 或两条单链 (多核苷酸) 上同时包含 DNA 和 RNA 的嵌合型双链核酸分子,诸如此类,来增强所述双链核酸分子的稳定性。

[0255] DNA 链和 RNA 链的杂合体可以是这样的杂合体,其中有义链是 DNA 而反义链是 RNA,或者相反,只要它在导入表达靶基因的细胞中后具有抑制靶基因表达的活性。优选地,有义链多核苷酸是 DNA 而反义链多核苷酸是 RNA。同样,嵌合型双链核酸分子可以是其中的有义链和反义链均由 DNA 和 RNA 组成,或者有义链或反义链中的任一条由 DNA 和 RNA 组成,只要在导入表达靶基因的细胞中时,所述双链核酸分子具有抑制该基因表达的活性即可。为了提高双链核酸分子的稳定性,分子中优选包含尽可能多的 DNA;而为了诱导靶基因的表达抑制,要求分子在一定范围内是 RNA,以充分地诱导表达抑制。

[0256] 作为嵌合体双链核酸分子的一个优选实例,双链核酸分子的上游部分区域 (即位于有义链或反义链内的靶序列或其互补序列之侧翼的区域) 为 RNA。优选地,所述上游部分区表示有义链的 5' 侧 (5' 端) 和反义链的 3' 侧 (3' 端)。就是说,在某些实施方案中,反义链 3' 末端侧翼的区域由 RNA 组成,或者有义链 5' 末端侧翼的区域和反义链 3' 末端侧翼

的区域均由 RNA 组成。例如,本发明的嵌合型或杂合型双链核酸分子包含以下组合。

[0257] 有义链:5' -[DNA]-3'

[0258] 3' -(RNA)-[DNA]-5':反义链,

[0259] 有义链:5' -(RNA)-[DNA]-3'

[0260] 3' -(RNA)-[DNA]-5':反义链,

[0261] 有义链:5' -(RNA)-[DNA]-3'

[0262] 3' -(RNA)-5':反义链。

[0263] 上游部分区优选是由 9-13 个核苷酸组成的域,从双链核酸分子的有义链或反义链内的靶序列或其互补序列的末端算起。此外,这种嵌合型双链核酸分子的优选实例包括这样的实例:链长为 19-21 个核苷酸,其中多核苷酸的至少上游的半区(对于有义链为 5' 侧区域而对于反义链为 3' 侧区域)是 RNA,而另一半是 DNA。在这样的嵌合型双链核酸分子中,抑制靶基因表达的效果比反义链整体为 RNA 时强得多(US20050004064)。

[0264] 在本发明中,双链核酸分子可以形成发夹结构,例如短发夹 RNA(shRNA)以及由 DNA 与 RNA 组成的短发夹(shD/R-NA)。shRNA 或 shD/R-NA 是 RNA 序列或 RNA 和 DNA 的混合序列,其形成紧密的发夹转弯,可以用来通过 RNA 干扰来沉默基因表达。shRNA 或 shD/R-NA 在单一链上包含有义靶标序列和反义靶标序列,其中所述序列被环序列隔开。通常,发夹结构被细胞机制切割成 dsRNA 或 dsD/R-NA,所述 dsRNA 或 dsD/R-NA 进一步与 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)结合。这种复合物结合并切割与所述 dsRNA 或 dsD/R-NA 的靶标序列匹配的 mRNA。

[0265] 为了形成发夹环结构,可以在有义序列与反义序列之间设置由任意核苷酸序列构成的环序列。因此,本发明还提供具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3' 的双链核酸分子。式中,[A] 为有义链,包含与靶序列对应的序列;[B] 为间插单链;[A'] 为反义链,包含 [A] 的互补序列。靶序列例如可以选自以下的组:对 EBI3 基因,SEQ ID NO:18 与 20;对 CDKN3 基因,SEQ ID NO:49;对 EF-1delta 基因,SEQ ID NO:51;对 NPTXR 基因,SEQ ID NO:84 与 85。

[0266] 本发明不限于这些实例,在双链核酸分子保持抑制作为靶标的 CX 基因的表达的能力的前提下,[A] 中的靶序列可以是在这些实例的序列的基础上修饰而得到的序列。区域 [A] 与 [A'] 杂交而形成由区域 [B] 构成的环。间插单链部分 [B]、即环序列,长度优选可以为 3~23 个核苷酸。例如,环序列可以选自由以下的序列组成的组(http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html)。此外,由 23 个核苷酸组成的环序列也提供活性 siRNA(Jacque JM et al., Nature 2002Jul 25,418(6896):435-8, Epub 2002Jun 26):

[0267] CCC、CCACC 或 CCACACC:Jacque JM et al., Nature 2002Jul 25,418(6896):435-8, Epub 2002Jun 26;

[0268] UUCG:Lee NS et al., Nat Biotechnol 2002May,20(5):500-5;Fruscoloni Pet al., Proc Natl Acad Sci USA 2003Feb 18,100(4):1639-44, Epub 2003Feb10;

[0269] UUCAAGAGA:Dykhhoorn DM et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2003Jun,4(6):457-67。

[0270] 优选的具有本发明的发夹环结构的双链核酸分子实例如下所示。在下面的结构中,环序列可以选自由 AUG、CCC、UUCG、CCACC、CTCGAG、AAGCUU、CCACACC 和 UUCAAGAGA 组成的组;但本发明不限于此:

- [0271] CAAUGAGCCUGGGCAAGUA-[B]-UACUUGCCCAGGCUCAUUG (对靶序列 SEQ ID NO :18) ;
[0272] UCACGGAUGUCCAGCUGUU-[B]-AACAGCUGGACAUCGUGA (对靶序列 SEQ ID NO :20) ;
[0273] UAUAGAGUCCCAAACCUUC-[B]-GAAGGUUUGGGACUCUAUA (对靶序列 SEQ ID NO :49) ;
[0274] GUGGAGAACCAGAGUCUGC-[B]-GCAGACUCUGGUUCUCCAC (对靶序列 SEQ ID NO :51) ;
[0275] GACAAUGGCUGGCACCACA-[B]-UGUGGUGCCAGCCAUUGUC (对靶序列 SEQ ID NO :84) ;
[0276] CAUCAAGCCUCAUGGGAUC-[B]-GAUCCCAUGAGGCUUGAUG (对靶序列 SEQ ID NO :85)

[0277] 此外,为了增强双链核酸分子的抑制活性,可以将核苷酸“u”添加到靶序列的反义链的 3' 末端,作为 3' 突出端。添加的“u”的数目为至少 2 个,通常为 2-10 个,优选为 2-5 个。添加的“u”在双链核酸分子的反义链的 3' 末端形成单链。

[0278] 对于双链核酸分子的制备方法没有特殊限制,但优选采用本技术领域公知的化学合成方法。根据化学合成方法,分别合成有义和反义单链多核苷酸,然后采用适当的方法使它们相互退火,来获得双链核酸分子。退火的具体例子包括:将合成的单链多核苷酸以至少约 3 : 7、更优选约 4 : 6、最优选基本上等摩尔量(即约 5 : 5 的摩尔比)的摩尔比混合。然后,将混合物加热到双链核酸分子解离的温度,再缓慢冷却。经退火的双链多核苷酸可以采用本技术领域公知的常用方法来纯化。纯化方法的例子包括:利用琼脂糖凝胶电泳的方法,或者任选地除去剩余的单链多核苷酸(例如利用适当的酶进行降解)的方法。

[0279] 所述侧翼于 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 序列的调控序列可为相同或不同的,以使得它们的表达能够独立地,或者以时间性或空间性方式被调控。所述双链分子可通过将 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因模板克隆入载体(例如含有来自小核 RNA (U6) 的 RNA 多聚酶 III 转录单元或人类 H1 RNA 启动子的载体)以在胞内进行转录。

[0280] 含有本发明双链分子的载体

[0281] 本发明还包括含有一种或多种本文所述的双链核酸分子的载体、以及包含该载体的细胞。本发明的载体优选以可表达的形式编码本发明的双链核酸分子。在本说明书中,术语“以可表达的形式”,是指该载体当被导入细胞中时,将表达该分子。在优选的实施方案中,载体包含双链核酸分子表达所必需的调节元件。本发明的这种载体可以用于产生本发明的双链核酸分子,也可以直接用作癌症治疗的活性成分。

[0282] 本发明的载体可通过下述方法生成:例如,将 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 序列克隆入表达载体中,使调控序列可操作性地连接于 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 序列,以允许两条链的表达(通过 DNA 分子的转录)(Lee NS et al., Nat Biotechnol 2002May, 20(5):500-5)。例如,与 mRNA 反义的 RNA 分子由第一启动子(例如位于克隆 DNA 的 3' 末端侧翼的启动子序列)转录,对 mRNA 而言为有义链 RNA 分子由第二启动子(例如位于克隆 DNA 的 5' 末端侧翼的启动子序列)转录。有义和反义链在体内杂交,产生用于沉默该基因的双链核酸分子构建体。或者,使用分别编码双链核酸分子之有义链和反义链的两个载体构建体来分别表达有义链和反义链,随后形成双链核酸分子构建体。而且,克隆的序列可编码具有二级结构(例如发夹)的构建体,即,载体的单一转录物同时包含靶基因的有义序列和互补反义序列二者。

[0283] 也可以配置本发明的载体使得其实现靶细胞的基因组中的稳定插入(关于同源重组盒载体的说明,参见 Thomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51:503-12)。可以参考例如:Wolff 等, Science 1990, 247:1465-8;美国专利第 5,580,859 号、第 5,589,466 号、

第 5,804,566 号、第 5,739,118 号、第 5,736,524 号、第 5,679,647 号和 WO 98/04720。基于 DNA 的输送技术的例子包括：“裸 DNA”、辅助（布比卡因 (bupivacaine)、聚合物、肽介导型）输送、阳离子脂质复合体、和粒子介导型投递（“基因枪”）或压力介导型输送（例如参照美国专利第 5,922,687 号）。

[0284] 本发明的载体包括，例如，病毒性载体或细菌性载体。表达载体的例子包括牛痘或鸡痘等减毒病毒宿主（参照美国专利第 4,722,848 号）。该策略包含例如使用牛痘病毒作为载体来表达编码双链核酸分子的核苷酸序列。重组牛痘病毒在被导入表达靶基因的细胞时即表达该分子并由此抑制细胞的增殖。可使用的载体的其它例子包括卡介苗 (BCG)。BCG 载体在 Stover 等, *Nature* 1991, 351:456-60 中有记载。其它多种多样的载体可用于双链核酸分子的治疗性施用与生产，例子包括腺病毒载体和腺随伴病毒载体、逆转录病毒载体、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 载体、脱毒的炭疽毒素载体等。可以参照例如 Shata 等, *Mol Med Today* 2000, 6:66-71; Shedlock 等, *J Leukoc Biol* 2000, 68:793-806; 以及 Hipp 等, *In Vivo* 2000, 14:571-85。

[0285] 使用本发明双链分子抑制或降低癌细胞生长的方法：

[0286] 某些 siRNA 抑制 NSCLC 的能力之前已描述于 WO2005/89735，以引用的方式将其包含于本文中。在本发明中，测试了针对 EBI3 的两种不同的 dsRNA、针对 CDKN3 的两种不同的 dsRNA，以及针对 EF-1delta 的两种不同的 dsRNA 抑制细胞生长的能力。所述两种针对 EBI3 的 dsRNA (图 4D)、一种针对 CDKN3 的 dsRNA (图 22A)、一种针对 EF-1delta 的 dsRNA (图 22B) 或两种针对 NPTXR 的 dsRNA (图 13D) 有效地敲低 (knock down) 了肺癌细胞系中基因的表达，同时亦发生了细胞增殖的阻抑。

[0287] 因此，本发明提供了抑制细胞生长，意即肺癌细胞生长的方法，所述方法通过抑制 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的表达引起 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因功能障碍。EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因表达可通过任何前述本发明的双链分子或可表达本发明的任何所述双链分子中的载体抑制，所述双链分子特异性地靶定 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因。

[0288] 上述本发明双链分子及载体抑制癌细胞生长的能力提示其可用于治疗癌症的方法。因此，本发明提供通过施用针对 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因的双链分子或表达所述分子的载体无副作用的治疗罹患肺癌患者的方法，因为上述基因在正常器官中几乎无法检出 (图 1、7E、16、17、18B 与 19)。

[0289] 具体而言，本发明通过下列 [1] 到 [25] 的方法：

[0290] [1] 一种抑制癌细胞生长和治疗癌症的方法，其中所述癌细胞或癌症表达选自 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因中的至少一种基因，该方法包括施用至少一种在过表达 EBI3、CDKN3、EF-1delta 和 / 或 NPTXR 的细胞中抑制该基因表达且抑制细胞增殖的分离的双链分子，其中所述分子包括有义链与与其互补的反义链，二者相互杂交以形成双链分子；

[0291] [2] [1] 的方法，其中所述双链分子对 mRNA 作用，所述 mRNA 与选自下组的靶序列匹配：SEQ ID NO:18 (位于 SEQ ID NO:1 的 679-697nt)，SEQ ID NO:20 (位于 SEQ ID NO:1 的 280-298nt)，SEQ ID NO:49 (位于 SEQ ID NO:5 的 310-328nt)，SEQ ID NO:51 (位于 SEQ ID NO:7 的 225-243nt) SEQ ID NO:84 (位于 SEQ ID NO:861280-1298nt) 和 SEQ ID NO:85 (位

于 SEQ ID NO :86 的 1393-1411nt) ;

[0292] [3][2] 的双链分子,其中有义链包含与选自 SEQ ID NOs :18,20,49,51,84 与 85 的靶序列对应的序列;

[0293] [4][1] 的方法,其中治疗的癌症是肺癌;

[0294] [5][1] 的方法,其中所述肺癌是 NSCLC 或 SCLC ;

[0295] [6][1] 的方法,其中施用多种所述双链分子;

[0296] [7][6] 的方法,其中所述多种双链分子靶向同一基因;

[0297] [8][3] 的方法,其中所述双链分子长度小于大约 100 个核苷酸;

[0298] [9][8] 的方法,其中所述双链分子长度小于大约 75 个核苷酸;

[0299] [10][9] 的方法,其中所述双链分子长度小于大约 50 个核苷酸;

[0300] [11][10] 的方法,其中所述双链分子长度小于大约 25 个核苷酸;

[0301] [12][11] 的方法,其中所述双链分子长度在大约 19 个与大约 25 个核苷酸之间;

[0302] [13][1] 的方法,其中所述双链分子由单一多核苷酸构成,所述多核苷酸包含通过间插单链连接在一起的有义链和反义链;

[0303] [14][13] 的方法,其中所述双链分子具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3' ,其中,[A] 为包含与选自 SEQ ID NOs :18,20,49,51,84 与 85 中的靶序列对应的序列的有义链,[B] 为由 3 个~ 23 个核苷酸构成的间插单链,[A'] 为包含 [A] 的互补序列的反义链;

[0304] [15][1] 的方法,其中所述双链分子是 RNA ;

[0305] [16][1] 的方法,其中所述双链分子包含 DNA 和 RNA ; ;

[0306] [17][16] 的方法,其中所述双链分子是 DNA 多核苷酸与 RNA 多核苷酸的杂合体;

[0307] [18][17] 的方法,其中所述有义与反义链多核苷酸分别由 DNA 与 RNA 构成;

[0308] [19][16] 的方法,其中所述双链分子是 DNA 与 RNA 的嵌合体;

[0309] [20][19] 的方法,其中反义链 3' 端侧翼的区域为 RNA,或者有义链 5' 端侧翼的区域与反义链 3' 端侧翼的区域均为 RNA ;

[0310] [21][20] 的方法,其中所述侧翼区域由 9 到 13 个核苷酸组成;

[0311] [22][1] 的方法,其中所述双链分子包含 3' 突出端;

[0312] [23][1] 的方法,其中所述双链分子由载体编码;

[0313] [24][23] 的方法,其中所述载体编码的双链分子具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3' ,其中,[A] 为包含与选自 SEQ ID NOs :18,20,49,51,84 与 85 中的靶序列对应的序列的有义链,[B] 为由 3 个~ 23 个核苷酸构成的间插单链,[A'] 为包含 [A] 的互补序列的反义链;

[0314] [25][1] 的方法,其中所述双链分子包含于组合物中,所述组合物除所述分子外还包括转染增强剂和药学上可接受的载体。

[0315] 本发明方法将在下面更加详细的加以描述。

[0316] 可通过将细胞与针对 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因的双链分子、表达该分子的载体或包含同样分子的组合物接触来抑制表达 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因的细胞的生长。可进一步将所述细胞与转染剂接触。合适的转染剂在本领域是已知的。短语“抑制细胞生长”表示所述细胞较之未暴露于所述分子的细胞,以较低速率增殖或具有降低的存活率。细胞生长可通过本领域已知技术测定,例如,使用 MTT 细胞增殖分析。

[0317] 任何细胞的生长均可根据本方法进行阻抑,只要所述细胞表达或过表达本发明所述双链分子的靶基因。可作为例子的细胞包括肺癌细胞,既包括 NSCLC 和 SCLC。

[0318] 因此,对于正罹患或有危险罹患与 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 相关疾病的患者,可通过施用至少一种本发明双链分子、表达至少一种所述分子的载体或包含至少一种所述分子的组合物进行治疗。举例而言,肺癌患者可根据这些方法进行治疗。癌症类型可通过根据所诊断的特定类型肿瘤的病症方法进行鉴定。肺癌可通过,例如,癌胚抗原 (CEA)、CYFRA、pro-GRP 等等作为肺癌标志,或通过胸部 X 光和 / 或痰细胞学进行诊断。更优选地,用本发明所述方法治疗的患者是用这样的方法选出的:在来自患者的活检物中通过 RT-PCR 或免疫测定法检测 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的表达。优选地,在本发明的治疗之前,对于来自患者的所述活检样通过本领域所知的方法,例如,免疫组织化学分析或 RT-PCR,证实 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因过表达。

[0319] 根据本发明的方法,为抑制细胞生长并治疗癌症,当施用多种所述双链分子(或表达同样分子的载体或含有同样分子的组合物)时,每个所述分子可具有不同结构,但作用于与 EBI3、CDKN3、EF-1delta 和 / 或 NPTXR 的相同靶序列匹配的 mRNA。或者,多种双链分子可作用于与相同基因的不同靶序列匹配的 mRNA,或作用于与不同基因的不同靶序列匹配的 mRNA。举例而言,所述方法可使用针对 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的双链分子。另外,例如,本方法可利用针对选自 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 中的一个,两个或更多靶序列的双链分子。

[0320] 为抑制细胞生长,本发明的双链分子可直接以可实现该分子与对应 mRNA 转录物结合的形式导入细胞。另外,如上所述,编码双链分子的 DNA 可作为载体导入细胞。为将双链分子和载体导入细胞,可使用转染增强剂,例如 FuGENE (Roche diagnostics)、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)、Oligofectamine (Invitrogen) 与 Nucleofector (Wako pure Chemical)。

[0321] 当治疗导致临床效益,诸如受试者中 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 基因表达的减少、癌症的尺寸、患病率 (prevalence)、转移潜力的降低等,可以判定该治疗是“有效”的。当预防性地适用治疗时,“有效”是指其延迟或防止癌症形成,或者预防或缓解癌症的临床症状。有效性可以结合特定肿瘤类型的任何公知的诊断或治疗方法来加以确定。

[0322] 应理解,本发明的所述双链分子降解亚化学计量的靶 mRNA (EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR)。虽不愿拘于任何理论,认为本发明的所述双链分子以催化方式造成靶 mRNA 的降解。因此,与常规的癌症疗法相比,为实施治疗效应而需要输送到癌症的位置或其附近的双链分子要少得多。

[0323] 本领域技术人员在考虑了受试者的体重、年龄、性别、疾病类型、症状及其它条件、施用途径、以及是局部施用还是全身施用等因素的基础上,能够容易地确定本发明的双链核酸分子的有效量。一般而言,本发明双链分子的有效量是在癌症部位或其附近胞内浓度为大约 1 纳摩尔 (nM) 到约 100nM,优选大约 2nM 到大约 50nM,更优选大约 2.5nM 到大约 10nM。慎重考虑可使用更多或更少量的双链分子。本领域一般技术人员可方便地及常规地确定特定情况下所需的确切剂量。

[0324] 本发明的方法可用于抑制表达 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 中至少之一的癌症,例如肺癌,尤其是 NSCLC 或 SCLC,的生长或转移。具体而言,含有 EBI3 (即 SEQ ID NOs :

18 或 20)、CDKN3(即 SEQ ID NO :49)、EF-1delta(即 SEQ ID NO :51) 或 NPTXR(即 SEQ ID NOs :84 或 85) 靶序列的双链分子特别优选用来治疗癌症。

[0325] 为了治疗癌症,还可以将本发明的双链核酸分子与不同于所述双链核酸分子的药剂组合来施用于受试者。或者,本发明的双链核酸分子还可以与其它旨在用于癌症治疗的治疗方法组合来施用于患者。举例而言,本发明所述双链分子可与现在用于治疗癌症或预防癌症转移的治疗方法(例如,放射疗法,外科手术,以及使用化疗剂,如顺铂、卡铂、环磷酰胺、5-氟尿嘧啶、阿霉素、柔红霉素(daunorubicin) 或他莫昔芬(tamoxifen) 等的治疗)组合施用。

[0326] 在本发明的方法中,双链核酸分子可以以与投递试剂相组合的裸双链核酸分子的形式,或者以表达双链核酸分子的重组质粒或者病毒载体的形式施用于受试者。

[0327] 用于与本发明的双链核酸分子组合施用的合适的投递试剂包括 MirusTransit TKO 脂溶性试剂、Lipofectin、Lipofectamine、Cellfectin、或聚阳离子(例如聚赖氨酸)、或脂质体。一种优选的投递试剂是脂质体。

[0328] 脂质体能够帮助将双链核酸分子投递至特定的组织如视网膜或肿瘤组织中,还能够增加双链核酸分子的血中半衰期。适合在本发明中使用的脂质体是由常规的囊泡形成性脂质(vesicle-forming lipids)形成的,囊泡形成性脂质通常包括中性或带负电荷的磷脂,以及甾醇,诸如胆固醇。对一些因素的考虑通常可以为脂质的选择提供指导,如脂质体大小以及在血流中的脂质体的半衰期等。有多种制备脂质体的方法是公知的,例如 Szoka 等,Ann Rev Biophys Bioeng 1980,9 :467 ;美国专利第 4,235,871 号 ;第 4,501,728 号 ;第 4,837,028 号 ;第 5,019,369 号 ;它们全部援引并入本说明书。

[0329] 优选地,包被本发明的双链核酸分子的脂质体包含能够将脂质体输送至癌症部位的配体分子。优选的配体是与肿瘤或血管内皮细胞中常见的受体结合的配体,例如与肿瘤抗原或内皮细胞表面抗原结合的单克隆抗体

[0330] 特别优选的是,包被本发明的双链核酸分子的脂质体经过了修饰以免被单核巨噬细胞和网状内皮系统清除,例如,其结构的表面结合有调理作用抑制部分(opsonization inhibition moities)。在一个实施方案中,本发明的脂质体可以同时包括调理作用抑制部分和配体。

[0331] 用于制备本发明的脂质体的调理作用抑制部分通常是与脂质体膜结合的大型亲水性聚合物。如在本说明书中所使用的,例如,当调理作用抑制部分化学地或物理地搭接在膜上时,例如通过脂溶性锚(anchor)插入膜本身,或者通过与膜脂质的活性基团直接结合,则调理作用抑制部分与脂质体膜“结合”。这些调理作用抑制性亲水性聚合物形成保护性表层,显著地减少单核巨噬细胞系统(“MMS”)和网状内皮系统(“RES”)对脂质体的摄入;在例如美国专利第 4,920,016 号中对此有记载,后者的全部公开内容援引并入本说明书。因此,与未修饰的脂质体相比,被调理作用抑制部分修饰过的脂质体能够保留在血液循环中的时间显著更长。出于以上理由,上述脂质体有时也被称为“隐形”(stealth)脂质体。

[0332] 已知隐形脂质体蓄积在依靠多孔性或“渗漏性”微血管系统供给的组织中。因此,在以这样的微血管系统缺损为特征的靶组织,例如实体瘤中,这些脂质体会高效率地蓄积。参见 Gabizon 等,Proc Natl Acad Sci USA 1988,18 :6949-53。此外,由于 RES 的摄入的减少,防止隐形脂质体在肝脏和脾脏中的显著蓄积,从而降低隐形脂质体的毒性。因此,用调

理作用抑制部分修饰的本发明的脂质体能够将本发明的双链核酸分子输送至肿瘤细胞。

[0333] 适用于修饰脂质体的调理作用抑制部分优选为分子量约 500 ~ 约 40,000 道尔顿、更优选约 2,000 ~ 约 20,000 道尔顿的水溶性聚合物。这样的聚合物中包括聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇 (PPG) 衍生物;例如,甲氧基 PEG 或 PPG、和 PEG 或 PPG 硬脂酸酯;合成聚合物如聚丙烯酰胺或聚 N- 乙烯基吡咯烷酮;直链状、分枝状或者树状聚酰胺胺 (polyamidoamine);聚丙烯酸;聚醇 (polyol), 诸如化学结合有羧基或氨基的聚乙烯醇和聚木糖醇,以及神经节苷脂,诸如神经节苷脂 GM₁。PEG、甲氧基 PEG、或甲氧基 PPG 或其衍生物的共聚体也是适合的。此外,抑制调理作用的聚合物可以是 PEG 与聚氨基酸、多糖、聚酰胺胺、聚亚乙基胺或者多核苷酸中的任何一种的嵌段共聚物。抑制调理作用的聚合物也可以是含有氨基酸或羧酸的天然多糖,例如半乳糖醛酸、葡糖醛酸、甘露糖醛酸、透明质酸、果胶酸、神经氨酸、海藻酸、角叉胶;氨基化多糖类或寡糖(直链状或者分枝状);或者羧基化的多糖或寡糖,例如,通过与碳酸的衍生物反应而生成了羧基结合的羧基化多糖类或寡糖。

[0334] 优选地,调理作用抑制部分为 PEG、PPG 或其衍生物。用 PEG 或 PEG 衍生物修饰的脂质体有时称为“PEG 化脂质体”。

[0335] 调理作用抑制部分可以通过许多公知技术中的任何一种结合到脂质体膜上。例如,PEG 的 N- 羟基琥珀酰亚胺酯能够与磷脂酰乙醇胺脂溶性锚 (lipid-soluble anchor) 结合,然后再结合到膜上。相似地,可以通过还原性氨基化,用硬脂酰胺脂溶性锚来将右旋糖酐聚合物衍生化,所述还原性氨基化中使用 Na (CN) BH₃ 和混合溶剂,如 60°C 的四氢呋喃与水的 30 : 12 比例混合物。

[0336] 上文讨论了表达本发明的双链核酸分子的载体。这样的表达至少一种本发明的双链核酸分子的载体也可以直接施用或者与合适的投递试剂组合施用,所述合适的投递试剂包括 Mirus Transit LT1 亲脂性试剂、Lipofectin、Lipofectamine、Cellfectin、聚阳离子(例如聚赖氨酸)或脂质体。将表达本发明的双链核酸分子的重组病毒载体输送到患者的癌症区域的方法在本技术领域的技术范围内。

[0337] 本发明的双链核酸分子可以通过适于将双链核酸分子递送到癌症区域的任何手段来施用给受试者。例如,双链核酸分子可以通过基因枪、电穿孔、或者其它合适的非消化道或肠内施途径来施用。

[0338] 合适的肠内施途径包括口腔、直肠与鼻内递送。

[0339] 合适的非消化道施途径包括静脉内施用(例如静脉内推注、静脉内输注、动脉内推注、动脉内输注和针对血管网络的导管滴注),组织周围和组织内注射(例如肿瘤周围和肿瘤内注射、视网膜内注射或视网膜下注射),皮下注射或沉积,包括皮下输注(例如利用浸透压泵),直接施加到癌症区域或其附近,例如借助导管或其它放置装置(例如,包含多孔性、非多孔性或明胶状材料的视网膜片剂 (retinal pellet) 或栓剂或植入物),和吸入。优选通过注射或输注将双链核酸分子或载体施用到癌症部位或其附近。

[0340] 本发明的双链分子可以以单一剂量或分多个剂量来施用。当本发明的双链核酸分子的施用为输注方式时,输注可以是单个持续剂量,或者通过多次输注来施用。优选的是将药剂直接注射到癌症部位或其附近的组织中。特别优选的是将药剂多次注射到癌症部位或其附近的组织中。

[0341] 为了给受试者施用本发明的双链核酸分子,本领域技术人员可以容易地确定合适

的剂量方案。例如，双链核酸分子可以一次性施用给受试者，例如以单次注射或者沉积的形式施用到癌症部位或其附近。或者，双链核酸分子可以在约 3 ~ 约 28 日、更优选约 7 ~ 约 10 日的期间内每日一次或二次地施用给受试者。在优选的剂量方案中，双链核酸分子可以在 7 日期间内一日一次地注射到癌症部位或其附近。当剂量方案包括多次施用时，应该理解的是，给受试者施用的双链核酸分子的有效量，可以包含在整个剂量方案中施用的该双链核酸分子的总量。

[0342] 包含本发明双链分子的组合物：

[0343] 除上述外，本发明亦提供了包含至少一种本发明的双链分子或编码该分子载体的药物组合物。具体而言，本发明提供下述 [1] 到 [25] 的组合物：

[0344] [1] 一种用于抑制癌细胞生长并治疗癌症的组合物，其中所述癌细胞与癌症表达至少一种选自 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的基因，所述组合物包括至少一种分离的抑制 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 表达以及细胞增殖的双链分子，该分子包括有义链和与其互补的反义链，二者相互杂交以形成双链分子；

[0345] [2] [1] 中的组合物，其中所述双链分子作用于 mRNA，所述 mRNA 与选自下组的靶序列匹配：SEQ ID NO :18 (位于 SEQ ID NO :1 的 679-697nt)，SEQ ID NO :20 (位于 SEQ ID NO :1 的 280-298nt)，SEQ ID NO :49 (位于 SEQ ID NO :5 的 310-328nt)，SEQ ID NO :51 (位于 SEQ ID NO :7 的 225-243nt) SEQ ID NO :84 (位于 SEQ ID NO :861280-1298nt) 和 SEQ ID NO :85 (位于 SEQ ID NO :86 的 1393-1411nt)；

[0346] [3] [2] 的组合物，其中所述双链分子，其有义链包含与选自下组的靶序列相应的序列：SEQ ID NOs :18, 20, 49, 51, 84 和 85；

[0347] [4] [1] 的方法，其中需治疗的癌症是肺癌；

[0348] [5] [4] 的方法，其中所述肺癌是 NSCLC 或 SCLC；

[0349] [6] [1] 的组合物，其中施用多种所述双链分子；

[0350] [7] [6] 的组合物，其中所述多种双链分子靶向同一基因；

[0351] [8] [3] 的组合物，其中所述双链分子长度小于大约 100 个核苷酸；

[0352] [9] [8] 的组合物，其中所述双链分子长度小于大约 75 个核苷酸；

[0353] [10] [9] 的组合物，其中所述双链分子长度小于大约 50 个核苷酸；

[0354] [11] [10] 的组合物，其中所述双链分子长度小于大约 25 个核苷酸；

[0355] [12] [11] 的组合物，其中所述双链分子长度在大约 19 个与大约 25 个核苷酸之间；

[0356] [13] [1] 的组合物，其中所述双链分子由单一多核苷酸构成，所述多核苷酸包含通过间插单链连接在一起的有义链和反义链；

[0357] [14] [13] 的组合物，其中所述双链分子具有通式 5' -[A]-[B]-[A'] -3'，其中，[A] 为包含与选自 SEQ ID NOs :18, 20, 49, 51, 84 与 85 中的靶序列对应的序列的有义链，[B] 为由 3 个 ~ 23 个核苷酸构成的间插单链，[A'] 为包含 [A] 的互补序列的反义链；

[0358] [15] [1] 的组合物，其中所述双链分子是 RNA；

[0359] [16] [1] 的组合物，其中所述双链分子是 DNA 和 / 或 RNA；

[0360] [17] [16] 的组合物，其中所述双链分子是 DNA 多核苷酸与 RNA 多核苷酸的杂合体；

[0361] [18][17] 的组合物,其中所述有义链多核苷酸与反义链多核苷酸分别由 DNA 与 RNA 组成;

[0362] [19][16] 的组合物,其中所述双链分子是 DNA 与 RNA 的嵌合体;

[0363] [20][19] 的组合物,其中反义链 3' 端侧翼的区域为 RNA,或者有义链 5' 端侧翼的区域与反义链 3' 端侧翼的区域均为 RNA;

[0364] [21][20] 的组合物,其中所述侧翼区域由 9 到 13 个核苷酸组成;

[0365] [22][1] 的组合物,其中所述双链分子包含 3' 突出端;

[0366] [23][1] 的组合物,其中所述双链分子由载体编码并包含于组合物中;

[0367] [24][23] 的组合物,其中所述双链分子具有通式 5' -[A]-[B]-[A']-3', 其中, [A] 为包含与选自 SEQ ID NOs :18, 20, 49, 51, 84 与 85 中的靶序列对应的序列的有义链, [B] 为由 3 个~ 23 个核苷酸构成的间插单链, [A'] 为包含 [A] 的互补序列的反义链;

[0368] [25][1] 的方法,其中所述组合物包括转染增强剂和药学上可接受的载体。

[0369] 本发明合适的组合物将在下面更加详述地加以描述。

[0370] 本发明的所述双链分子优选在施用于患者之前根据本领域众所周知的技术配制为药物组合物。本发明的药物组合物特征为至少是无菌且不含热原的。本文中所使用的“药物配制剂”包括适用于人类与动物的配制剂。制备本发明药物配制剂的方法属于本领域一般技术,例如,描述于 Remington's Pharmaceutical Science, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985), 其全部公开内容通过引用包含于本文中。

[0371] 本发明的药物配制剂包含至少一种本发明的双链分子及其编码载体(例如,重量为 0.1% 到 90%), 或所述分子的生理学上可接受的盐, 与生理上可接受的载体介质混合。生理学上可接受的载体介质优选水、缓冲水、生理盐水、0.4% 盐水、0.3% 甘氨酸、透明质酸或类似物。

[0372] 根据本发明,所述组合物可包含多种双链分子,其中每一个均可针对 EBI3、CDKN3、EF-1delta 和 / 或 NPTXR 的相同或不同的靶序列。举例而言,所述组合物可包含针对 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的双链分子。另外,例如,所述组合物可包含针对选自 EBI3、CDKN3、EF-1delta 和 NPTXR 一种、两种或更多种靶序列的双链分子。

[0373] 而且,本组合物可以包含编码 1 个或多个双链核酸分子的载体。例如,所述载体可以编码 1 种、2 种或数种本双链核酸分子。或者,本组合物可以包含多种载体,而各载体编码不同的双链核酸分子。

[0374] 而且,本双链核酸分子可以作为脂质体的形式包含在本组合物中。脂质体的具体情况可以参照“癌症治疗方法”项。

[0375] 此外,本发明的药物组合物中还可以包含传统的药用赋形剂和 / 或添加剂。合适的药用赋形剂包括稳定化剂、抗氧化剂、浸透压调节剂、缓冲剂、和 pH 调节剂。合适的添加剂包括:生理学生物相容性的缓冲液(例如氨基丁三醇盐酸盐)、补加螯合剂(例如 DTPA 或 DTPA- 双酰胺等),或钙螯合剂复合物(例如、钙 DTPA、CaNaDTPA- 双酰胺),或者,任选的,补加钙或钠盐(例如氯化钙、抗坏血酸酸钙、葡糖酸钙或乳酸钙)。本发明的药物组合物可以进行包装以便作为液体使用,或者也可以加以冷冻干燥。

[0376] 对于固体组合物,可以使用常规的无毒固态载体。例如,药物级的甘露醇、乳酸、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、碳酸镁等。

[0377] 例如,用于口服施用的固体药物组合物中可以包含上述列举的任意载体和赋形剂,以及 10-95%,优选 25-75%的本发明的一种或多种双链核酸分子。用于气雾剂(吸入)施用的药物组合物可以包含 0.01-20 重量%、优选 1-10 重量%的包被于上述脂质体中的一种或多种本发明的双链核酸分子,以及推进剂。还可以根据需要包含载体,例如用于鼻内投递的卵磷脂等。

[0378] 除上述之外,本组合物中还可以包含其它药学活性成分,只要它们不抑制本双链核酸分子的体内功能。例如,上述组合物中可以包含常规用于癌症治疗的化疗药物。

[0379] 在其它实施方案中,本发明还提供本发明的双链核酸分子在制备用于治疗以表达 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 为特征的肺癌的药物组合物中的用途。例如,本发明涉及下述双链核酸分子在制备用于治疗表达 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的肺癌的药物组合物中的用途:该分子在细胞内抑制选自 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的基因的表达,且该分子包含有义链和与之互补的反义链,二者彼此杂交而形成该双链核酸分子,且该分子以选自 SEQ ID NOs :18, 20, 49, 51, 84 和 85 的序列为靶标。

[0380] 此外,本发明还提供生产用于治疗以表达 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 为特征的肺癌的药物组合物的方法或工艺。该方法或工艺包括将药学或者生理学可接受的载体与作为活性成分的下述双链核酸分子一起制剂化的步骤,其中所述双链核酸分子抑制细胞内 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的表达,且该分子包含有义链和与之互补的反义链,二者彼此杂交而形成该双链核酸分子,且该分子以选自 SEQ ID NOs :18, 20, 49, 51, 84 和 85 的序列为靶标。

[0381] 在另一个实施方案中,本发明还提供生产用于治疗以表达 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 为特征的肺癌的药物组合物的方法或工艺,其中所述方法或工艺包括将活性成分与药学上或生理学上可接受的载体混合的步骤,其中所述活性成分是这样的双链核酸分子,其在过表达 EBI3、CDKN3、EF-1delta 或 NPTXR 的细胞中抑制所述基因的表达,该分子包含有义链与与其互补的反义链,二者相互杂交以形成双链核酸分子,并以选自 SEQ ID NOs : 18, 20, 49, 51, 84 和 85 的序列为靶标。

[0382] 诊断肺癌的方法:

[0383] 发现 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的表达在肺癌细胞中特异性的提高(图 1、5、7、8 与 16)。因此,本文鉴定出的基因及其转录与翻译产物可以作为肺癌标志用于诊断,且通过测量细胞样品中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的表达可诊断肺癌。具体而言,本发明提供了通过确定受试者中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 表达水平诊断肺癌的方法。可用本方法诊断的肺癌包括 NSCLC 与 SCLC。进一步地,NSCLC,包括肺腺癌与肺鳞状细胞癌(SCC),亦可通过本发明诊断或检测出来。

[0384] 根据本发明,可提供用于检查受试者状况的中间结果。所述中间结果可与其它信息结合起来以协助医生、护士或其它从业人员诊断患者罹患所述疾病。另外,本发明亦可用于来源于患者的组织中检测出癌性细胞,并为医生提供对诊断罹患所述疾病的患者为有用的信息。

[0385] 具体而言,本发明提供了下述 [1] 到 [10] 的方法:

[0386] [1] 一种诊断癌症的方法,所述方法包括下述步骤:

[0387] (a) 检测生物样品中编码 EBI3、CDKN3 或 EF-1delta 氨基酸序列的基因的表达水

平；

[0388] (b) 将检测出的表达水平较之基因通常正照水平的提高与疾病存在相关联；

[0389] [2][1] 的方法,其中所述表达水平比正常对照水平高至少 10%；

[0390] [3][1] 的方法,其中所述表达水平通过选自下组的方法检测；

[0391] (a) 检测包含 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 序列的 mRNA；

[0392] (b) 检测包含 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的氨基酸序列的蛋白质；

[0393] (c) 检测包含 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 氨基酸序列蛋白质的活性；

[0394] [4][1] 的方法,其中所述肺癌为 NSCLC 或 SCLC。

[0395] [5][3] 的方法,其中所述表达水平是通过检测探针与基因的基因转录物杂交的方法确定的；

[0396] [6][3] 的方法,其中确定所述表达水平是通过检测抗体与基因编码的蛋白的结合作为所述基因的表达水平；

[0397] [7][1] 的方法,其中所述生物样品包括活检物、痰或血液。

[0398] [8][1] 的方法,其中所述源自患者的生物样品包含上皮细胞。

[0399] [9][1] 的方法,其中所述源自患者的生物样品包含癌细胞。

[0400] [10][1] 的方法,其中所述源自患者的生物样品包含癌性上皮细胞。

[0401] 针对肺癌的方法将在下面更加详细的加以叙述。

[0402] 需用本方法诊断的患者优选为哺乳动物。哺乳动物的例子包括但不限于,例如,人类,非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马以及牛。

[0403] 为实施诊断,优选从要诊断的受试者采集生物样品。任何生物学材料均可作为生物样品用于测定,只要其包括目标的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 转录或翻译产物。所述生物样品包括,但不限于,身体组织与体液,例如血液,痰与尿液。生物样品优选含有这样的细胞群体,该群体包括上皮细胞,较优选癌性上皮细胞或源自怀疑为肿瘤的组织的上皮细胞。进一步,如果必要,可从所得的身体组织与体液中纯化所述细胞,并将其用为生物样品。

[0404] 根据本发明,测定在所述源自患者的生物样品中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的表达水平。表达水平可在转录产物(核酸)水平确定,使用本领域熟知的方法。举例而言,EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的 mRNA 可通过杂交方法(例如,Northern 杂交)使用探针定量。可在芯片或阵列上实施所述检测。对检测多个基因(例如,多种癌症特异性基因),包括 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta,的表达水平而言,优选使用阵列。本领域技术人员可利用 EBI3(SEQ ID NO 1;GenBank 登录号:NM_005755)或 DLX5(SEQ ID NO 3;GenBank 登录号:BC006226)或 NPTX1(SEQ ID NO ;78;GenBank 登录号:NM_002522)或 CDKN3(SEQ ID NO 5;GenBank 登录号:L27711)或 EF-1delta(SEQ ID NO 7;GenBank 登录号:BC009907)的序列信息制备上述探针。举例而言,EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的 cDNA 可用作探针。如需要,所述探针可用合适的标志物来标志,例如染料、荧光或同位素,且所述基因的表达水平可以所述杂交标签的强度检测。

[0405] 进一步,EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的转录产物可通过基于扩增的检测技术(例如,RT-PCR)使用引物定量。上述引物亦可基于所述基因已知的序列信息制备。举例而言,用于实施例的引物(SEQ ID N09 与 10,21 与 22,34 与 35,或 36,37,80 与 81)可

用于通过 RT-PCR 或 Northern 印迹的检测,但本发明并不仅限于此。

[0406] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、温和条件与低严格条件下与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的 mRNA 杂交。如本文中所使用的,短语“严格(杂交)条件”是指这样的条件,在该条件下,探针或引物将与其靶序列杂交,但不与其它序列杂交。严格条件是依赖于序列的,在不同的环境下会不同。较长序列的特异杂交与较短序列相比在较高温度下发生。一般地,严格条件的温度应选择比特定序列在限定的离子强度和 pH 下的熔点 (T_m) 低大约 5°C 。 T_m 是(在限定的离子强度、pH 和核酸浓度下)平衡状态下有 50% 的与靶序列互补的探针与靶序列杂交的温度。因为靶序列一般过量存在,因此在 T_m 下,平衡时 50% 的探针被占据。典型地,严格条件是这样的:其中盐浓度小于大约 1.0M 钠离子,典型地大约 0.01-1.0M 钠离子(或其它盐),pH 7.0-8.3,温度对于较短的探针或引物(例如 10-50 个核苷酸)是至少大约 30°C ,用于较长的探针或引物是至少大约 60°C 。严格条件也可以通过添加去稳定剂,例如甲酰胺,来实现。

[0407] 或者,可以检测翻译产物以进行本发明的诊断。例如,可以确定 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 蛋白的量。测定作为翻译产物的蛋白量的方法包括免疫测定法,此类方法使用特异识别所述蛋白的抗体。抗体可以是单克隆或多克隆的。而且,抗体的任何片段或修饰(例如嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等)均可用于检测,只要该片段保留对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 蛋白的结合能力即可。制备这些类型的用于检测蛋白的抗体的方法是本领域众所周知的,并且在本发明中可以使用任何方法制备这些抗体和它们的等价物。

[0408] 作为另一种基于 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的翻译产物检测其基因的方法,可利用针对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 蛋白的抗体通过免疫组织化学分析观察其染色的强度。意即,观察到强染色表明所述蛋白质存在量增加,且同时表明 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 的高表达水平。

[0409] 另外,除 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因的表达水平外,其它癌相关基因的表达水平,例如,亦可确定已知在肺癌中有差异表达的基因以提高所述诊断的可靠性。

[0410] 包括 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因的癌标志基因,其于生物样品中的表达水平可认为是增加的,如果其较之相应的癌标志基因的对照水平增加了,例如 10%, 25% 或 50% 的话,或增加到超过 1.1 倍,超过 1.5 倍,超过 2.0 倍,超过 5.0 倍,超过 10 倍或者更多。

[0411] 对照水平可以与测试生物样品同时确定,使用先前从疾病状态(患癌或未患癌)已知的患者收集和保存的样品。或者,对照水平可以借助统计方法,根据通过分析先前测定的来自疾病状态已知的受试者的样品的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因表达水平获得的结果加以确定。进一步,对照水平可以是来自先前测试过的细胞的表达模式数据库。而且,根据本发明的一个方面,可以将生物样品中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因的表达水平与从多个参考样品确定的多个对照水平比较。优选地使用来自与患者来源样品组织类型相似的组织类型的参考样品确定的对照水平。而且,优选地,使用具有已知的疾病状态的群体中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因表达水平的标准值。标准值可以通过本领域已知的任何方法获得。例如,平均值 $\pm 2\text{S. D.}$ 或平均值 $\pm 3\text{S. D.}$ 的范围可以用作标准值。

[0412] 在本发明的语境下,从已知非癌性的生物样品确定的对照水平称作“正常对照水平”。另一方面,如果对照水平从癌性生物样品确定,则称作“癌对照水平”。

[0413] 当 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因的表达水平相比正常表达水平有所提高或与癌性对照水平相似,则受试者可诊断为正罹患或有危险罹患癌症。进一步,当比较多种癌相关基因的表达水平时,样品与癌性参照之间基因表达模式的相似性表明受试者正罹患或有危险罹患癌症。

[0414] 测试生物样品的表达水平与对照水平间的差异,可以相对已知表达水平不会随着细胞的癌或非癌状态改变的对照核酸,例如管家基因,的表达水平加以标准化。示例对照基因包括,但不限于, β -肌动蛋白、甘油醛-3 磷酸脱氢酶和核糖体蛋白 P1。

[0415] 评价癌症预后的方法:

[0416] 本发明涉及下列新发现,即 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 表达与患者较差预后显著相关。因此,本发明提供确定或评价罹患癌症,尤其是肺癌患者预后的方法,所述方法在患者生物样品中检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因表达水平;将测得的表达水平与对照水平比较;并确定相比对照水平增加的表达水平为不良预后(不良的存活率)的指示。

[0417] 在此,术语“预后”指根据病理性质与症状表明的关于所述疾病的可能结果以及从疾病中恢复的前景。相应的,不利的、负面的、不良的预后定义为较低的治疗后存活期间与存活率。相反,正面的、有利的、或良好的预后定义为治疗后存活期间或存活率提高。

[0418] 术语“评价预后”指预测、预告或将给定检测或测量与患者癌症的将来结果(例如,恶性化,治愈癌症的可能性、存活率及类似的)相联系。举例而言,确定 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 经时的表达水平使预测患者结果(例如,增加或减少恶性化,增加或减少癌症的等级,治愈癌症的可能性、存活率及类似的)成为可能。

[0419] 在本发明的语境下,短语“评价(或确定)预后”意欲涵盖癌症的预测与可能性分析、进展、特别是癌症复发、转移扩散与疾病复发。目前评价预后的方法意欲用于临床以对关于治疗方法作出决定,包括治疗介入、诊断标准例如疾病的分期,以及针对肿瘤疾病的转移与复发的疾病监视和监测。

[0420] 本方法所用源自患者的生物样品可为任何源自患者的样品,只要 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 可在样品中检测出来。所述生物样品优选肺细胞(从肺获得的细胞)。进一步,所述生物样品可包括体液例如痰、血液、血清或血浆。另外,所述样品可为从组织纯化的细胞。生物样品可在不同的时点自患者获取,包括治疗前,治疗中和 / 或治疗后。

[0421] 根据本发明,显示在源自患者的生物样品中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因的表达水平越高,治疗后病情缓和、恢复和 / 或存活就越为不良,且不良临床后果的可能性就越高。因此,根据本方法,用作比较的“对照水平”可为,例如,在个体或个体组成的群体中任何 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因的表达水平,且所述个体或群体在治疗后显示良好或积极的癌症预后,在此称之为“良好预后对照水平”。此外,所述“对照水平”可为,例如,在个体或个体组成的群体中任何 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因的表达水平,且所述个体或群体在治疗后显示不良或消极的癌症预后,在此称之为“不良预后对照水平”。所述“对照水平”是源自单独参照群体的单独表达模式,

或多种表达模式。因此,所述对照水平可基于在其疾病状态(良好或不良预后)已知的癌症患者中,或癌症患者的群体中,在进行任何种类治疗之前的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因的表达水平。癌症优选为肺癌。在具有已知疾病状态的患者集合中优先使用 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因的表达水平的标准值。所述标准值可通过任何本领域已知的方法获得。举例而言,平均值 ± 2 倍标准偏差或平均值 ± 3 倍标准偏差的范围可用作标准值。

[0422] 所述对照水平可与所试生物样品通过使用之前从已知其疾病状态(癌或非癌)的患者在接受任何种类的治疗之前采集并储藏的样品同时确定。

[0423] 此外,所述对照水平可通过统计学方法基于通过分析之前确定的来自对照组样品中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达水平来确定。进一步,所述对照水平可为源自之前测试细胞的表达模式数据库。

[0424] 另外,根据本发明的一个方面,在生物样品中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因的表达水平可与多种对照水平比较,所述对照水平通过多种参照样品的确定。优选使用从与源自患者生物样品类似组织类型所得的参照样品的确定的对照水平。

[0425] 根据本发明,EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因的表达水平与良好预后对照水平相似性显示所述患者较理想的预后,而相对良好预后对照水平表达水平增加显示较不理想的、较不良的治疗后病情缓和、恢复、存活和 / 或临床后果的预后。另一方面,相比于不良预后对照水平 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因表达水平减少显示患者较理想的预后,而与不良预后对照水平相似的基因表达水平显示较不理想的、较不良的治疗后病情缓和、恢复、存活和 / 或临床后果的预后。

[0426] 当相对对照水平表达水平变化超过 1.0、1.5、2.0、5.0、10.0 或更多倍时,在生物样品中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因表达水平可认为是改变了。

[0427] 所试生物样品与对照水平间表达水平的差异可相对于对照,例如持家基因,加以标准化。举例而言,已知其表达水平在癌性与非癌性细胞中不变的多核苷酸,包括那些编码 β -肌动蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶与核糖体蛋白 P1 的基因,可用于标准化 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因表达水平。

[0428] 所述表达水平可通过在源自患者的生物样品中利用本领域众所周知的技术检测基因转录物的方法来确定。所述通过本方法检测的基因转录物既包括转录产物也包括翻译产物,例如 mRNA 与蛋白质。

[0429] 举例而言,EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的转录产物可通过杂交,例如使用 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因探针的 Northern 印迹杂交分析来检测。所述检测可在芯片或阵列上进行。对检测多种基因包括 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的表达水平,优选使用阵列。作为另一个示例,基于扩增的检测方法,例如使用对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因有特异性的引物基于逆转录的多聚酶链式反应可用于检测(参见实施例)。EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因特异性探针或引物可使用常规技术参照 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因的全序列(分别为 SEQ ID NO:1,3,5 与 7)设计和制备。举例而言,在实施例中使用的引物(SEQ ID NOs:9 与 10(EBI3),21 与 22(DLX5),82 与 83(NPTX1),34 与 35(CDKN3),36 与 37(EF-1delta))可用于通过 RT-PCR 检测,但本方面并不仅限于此。

[0430] 具体而言,本方法所用的探针或引物在严格条件、温和条件与低严格条件下与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的 mRNA 杂交。如本文中所使用的,短语“严格(杂交)条件”指探针或载体会与其靶序列,但非其它序列杂交的条件。严格条件依赖于序列,且在不同情况下不同。观察到长序列较之较短序列在更高温度下特异性杂交。一般而言,严格条件的温度选为大约比特定序列在给定离子强度与 pH 值下热熔解温度(T_m)低大约 5 摄氏度。所述 T_m 是 50% 互补于靶序列的探针与靶序列在平衡条件下杂交的温度(在给定离子强度、pH 与核酸浓度下)。因为所述靶序列通常过量存在,在 T_m 时 50% 的探针在平衡时被占据。通常,严格条件是在该条件下盐浓度低于大约 1.0M 钠离子,通常为 0.01 到 1.0M 钠离子(或其它盐)在 pH7.0 到 8.3 处,且温度对短探针或引物(例如,10 到 50 核苷酸)为至少 30 摄氏度,而对较长探针与引物为至少大约 60 摄氏度。严格条件亦可通过添加去稳定剂,例如甲酰胺,来达成。

[0431] 另外,本发明的评价亦可通过检测翻译产物来进行。举例而言,可确定 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的量。确定作为翻译产物的蛋白质量的方法包括使用特异性识别 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的抗体的免疫测定方法。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。进一步,任何所述抗体的片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等等)可用于检测,只要所述片段保留与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白的结合能力。为检测蛋白制备此类抗体的方法在本领域是众所周知的,可在本发明中使用任何方法制备上述抗体及其等价物。

[0432] 作为另一种基于 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 翻译产物来检测其基因的方法,可通过免疫组织化学分析利用针对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 蛋白质的抗体观察其染色的强度。意即,观察到强染色表明 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 存在量增加,且同时表明 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的高表达水平。

[0433] 进一步,已知 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白具有细胞增殖活性。因此,EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因的表达水平可使用上述细胞增殖活性作为指标确定。举例而言,在生物样品存在下制备并培养表达 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的细胞,随后通过检测增殖速度或评价细胞周期或集落形成能力,可确定所述生物样品的细胞增殖活性。

[0434] 另外,除 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 基因的表达水平外,亦可确定其它癌相关基因,例如已知在肺癌中有差异表达的基因,的表达水平,以提高所述诊断的准确性。上述其它的肺细胞相关基因包括那些于 W02004/031413 和 W02005/090603 中描述的基因。其内容以引用方式纳入于本文中。

[0435] 此外,根据本发明,除其它测试结果外,还可提供用于评价患者预后的中间结果。所述中间结果可协助医生、护士或其它从业人员评价、确定或估计患者的预后。可与本发明所得中间结果结合考虑的其它信息包括患者的临床症状和身体状况。

[0436] 需根据本方法评价癌症预后的患者优选为哺乳动物,包括人、非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马和牛。

[0437] 诊断癌症或评价癌症预后的试剂盒:

[0438] 本发明提供了诊断癌症或评价癌症预后的试剂盒。所述癌症优选肺癌。具体而言,

所述试剂盒包含至少一种在源自患者的生物样品中检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因表达的试剂,所述试剂可选自下组:

[0439] (a) 检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因的 mRNA 的试剂;

[0440] (b) 检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的蛋白质的试剂;

[0441] (c) 检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的蛋白质的生物活性的试剂。

[0442] 适于检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因 mRNA 的试剂包括特异性结合或识别 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta mRNA 的核酸,例如具有与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta mRNA 的一部分互补的序列的寡核苷酸。这类寡核苷酸的例子有对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta mRNA 为特异性的引物与探针。可基于本领域众所周知的方法制备这类寡核苷酸。如果需要,检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta mRNA 的试剂可固定化在固体基质上。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta mRNA 的试剂。

[0443] 另一方面,适于检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白质的试剂包括针对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白质的抗体。所述抗体可为单克隆的或多克隆的。进一步,任何所述抗体的片段或修饰(例如,嵌合抗体、scFv、Fab、F(ab')₂、Fv 等等)均可用于检测,只要所述片段保留与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白的结合能力。为检测蛋白制备此类抗体的方法在本领域是众所周知的,且可在本发明中使用任何方法制备上述抗体及其等价物。进一步,所述抗体可用能产生信号的分子通过直接连接或非直接标记技术进行标记。标记物与标记抗体以及抗体与其靶结合的检测在本领域是众所周知的,且本发明可使用任何标记物与方法。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白质的试剂。

[0444] 进一步,所述生物活性可通过,例如,测量所述生物样品中由于 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白质表达而导致的细胞增殖活性来确定。举例而言,可在源自患者的生物样品的存在下培养所述细胞,然后通过检测增殖的速度,或测量细胞周期或集落形成活性,可确定所述生物样品的生物活性。如需要,检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta mRNA 的试剂可固定化在固体基质上。另外,在所述试剂盒中可包括多于一种检测 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白质生物活性的试剂。

[0445] 所述试剂盒可包含多于一种前述的试剂。进一步,所述试剂盒可包括固体基质以及用于将探针与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因结合的试剂或针对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白质的抗体,用于培养细胞的培养基与容器,阳性与阴性对照试剂,以及用于检测针对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白质的抗体的第二抗体。举例而言,从具有良好预后或不良预后的患者获取的组织样品可用作有用的对照试剂。本发明的试剂盒可进一步包括其它从商业或用户角度而言期望的材料,包括缓冲液、稀释液、滤纸、针头、注射器和带有使用说明书的装箱单(例如,书面的、磁带、CD-ROM 等等)。这些试剂之类的可标上标签包含在容器中。合适的容器包括瓶、管状瓶(vials)和试管。所述容器可从多种材料制得,例如玻璃或塑料。

[0446] 作为本发明的一个实施方案,当所述试剂是针对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta mRNA 的探针时,所述试剂可固定化于固体基质上,例如多孔条,以形成至少一个

检测位置。所述多孔条的测量或检测区域可包含多个位置，每个都包含核酸（探针）。测试条亦可包含阴性和 / 或阳性对照的位置。此外，对照位置可位于与测试条不同的条上。任选地，不同的检测位置可包含不同量的固定化核酸，即，在第一个检测位置上量较大而在接下来的位置上量较小。在加入样品之后，显示可检测信号位置的数量提供了在样品中存在的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta mRNA 量的定量指征。所述检测位置可具有任何合适可检测的形状，并通常是横跨测试条宽度的条状或点状。

[0447] 本发明所述试剂盒可进一步包括阳性对照或 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 标准样品。本发明的所述阳性对照样品可通过收集 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 阳性血液样品，随后分析其 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 水平来制备。此外，可将纯化的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白或多核苷酸添加到不含 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的血清中以形成所述阳性样品，或 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 标准品。在本发明中，纯化的 KDD1 可为重组蛋白。所述阳性对照样品中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的水平，例如，是高于截止值的。

[0448] 肺癌的血清学诊断：

[0449] 通过测量源自患者的血液样品中 EBI3 的水平，可确定在患者中表达 EBI3 的癌症的发生或其发病倾向。所述癌症可为肺癌，例如，NSCLC 与 SCLC。另外，SCLC 包括肺腺癌与肺鳞状细胞癌 (SCC)。相应地，本发明涉及在血液样品中确定（例如，测量）EBI3 水平。在本发明中，诊断肺癌的方法亦包括测试或检测肺癌的方法。此外，在本发明中，诊断肺癌亦指在患者中显示肺癌的怀疑、风险与可能性。

[0450] 或者，通过在源自患者血液样品中测量 NPTX1 的水平，可确定在患者中表达 NPTX1 的 SCC 的发生或其发病倾向。相应地，本发明涉及在血液样品中确定（例如，测量）NPTX1 水平。在本发明中，诊断 SCC 的方法亦包括测试或检测 SCC 的方法。此外，在本发明中，诊断 SCC 亦指在患者中显示 SCC 的怀疑、风险与可能性。

[0451] 可使用任何血液样品确定 EBI3 或 NPTX1 的水平，只需在所述血液样品中可检测或者 EBI3 或 NPTX1 的基因，或者其蛋白质。所述血液样品优选包括全血、血清和血浆。

[0452] 在本发明中，“血液样品中 EBI3 或 NPTX1 的水平”指在全血中校正了红细胞容积后在所述血中 EBI3 或 NPTX1 的浓度。技术人员明白在不同个体之间，血液中红细胞容积占的百分比有很大变动。举例而言，全血中红细胞所占百分比在男性和女性之间非常不同。进一步，个体之间差异不能忽略。因此在含有红细胞成分的全血中，物质的表观浓度取决于红细胞容积的百分比有很大变动。举例而言，即使血清中浓度相同，在具有大量红细胞容积的样品中测出的值较之具有少量红细胞容积的样品也为低。因此，为比较血中组分的测量值，通常使用已校正红细胞容积的值。

[0453] 举例而言，使用例如通过从全血中分离血细胞所得的血清或血浆，通过测量血液中组分，可获得去除了红细胞容积作用的测量值。因此，本发明中 EBI3 或 NPTX1 的水平通常以血清或血浆中的浓度形式确定。此外，可首先测量全血中的浓度，然后可校正红细胞容积的作用。在全血中测量红细胞容积的方法是已知的。

[0454] 根据本发明方法诊断罹患肺癌或 SCC 的受试者优选为哺乳动物，且包括人类、非人灵长类、小鼠、大鼠、犬、猫、马和牛。本发明的受试者优选为人类。

[0455] 在本发明中,受试者可以是被怀疑正罹患肺癌的患者或健康个体。所述患者可通过本发明诊断出来以便利临床决策。在另一个实施方案中,本发明亦可应用于健康个体筛选肺癌或 SCC。

[0456] 进一步,可提供检查受试者状况的中间结果。所述中间结果可与附加信息组合以协助医生、护士或其它从业人员诊断受试者罹患所述疾病。另外,本发明亦可用于在取自受试者的组织中检测出癌细胞,并提供医生对诊断受试者罹患所述疾病有用的信息。

[0457] 在本发明的一个实施方案中,EBI3 的水平通过在血液样品中测量 EBI3 蛋白的量或浓度来确定。确定血液样品中 EBI3 蛋白量的方法包括免疫测定方法。

[0458] 在本发明的诊断方法中,除 EBI3 的血浓度外,可确定 CEA 或 pro-GRP 的血浓度以检测肺癌。因此,本发明提供了诊断肺癌的方法,其中当 EBI3 血浓度或 CEA 或 pro-GRP 的血浓度较之健康个体为高,或两者皆较之健康个体为高时,肺癌被检测出来。

[0459] 癌胚抗原 (CEA) 是在包括肺癌的癌症中常被研究的肿瘤标志。

[0460] 胃泌素释放肽前体 (pro-GRP) 是在小细胞肺癌中有用的标志。如上所述,CEA 或 pro-GRP 已被用作诊断或检测肺癌的血清学标志。然而,CEA 或 pro-GRP 作为肺癌标志的灵敏度对全面检测肺癌有些不足。相应的,需要改善其诊断肺癌的灵敏度。

[0461] 在本发明中,提供了新颖的肺癌血清学标志 EBI3。本发明可达成肺癌诊断或检测方法灵敏度的改善。即,本发明提供在受试者中诊断肺癌的方法,包括下述步骤:

[0462] (a) 从需诊断的受试者中收集血液样品;

[0463] (b) 确定血液样品中 EBI3 的水平;

[0464] (c) 将步骤 (b) 中确定的 EBI3 水平与正常对照的水平相比,其中在所述血液样品中,与正常对照相比的高 EBI3 水平表示所述患者罹患癌症。此外,本发明提供了在患者中诊断 SCC 的方法,包括下述步骤:

[0465] (a) 确定从需诊断的受试者收集的血液样品中 EBI3 的水平;

[0466] (b) 将步骤 (a) 中确定的 EBI3 水平与正常对照的相比,其中在所述血液样品中,与正常对照相比的高 EBI3 水平,表示所述受试者罹患癌症。

[0467] 在优选实施方案中,对于 NSCLC,本发明所述诊断或检测方法可进一步包括下述步骤:

[0468] (d) 确定血液样品中 CEA 水平;

[0469] (e) 将步骤 (d) 中确定的 CEA 水平与正常对照的水平相比;

[0470] (f) 判断与正常对照的相比,EBI3 和 / 或 CEA 的高水平显示所述患者罹患肺癌,尤其是 NSCLC。

[0471] 通过 EBI3 与 CEA 的组合,肺癌,尤其是 NSCLC 检测的灵敏度可显著改善。举例而言,在下述讨论的实际实施例中分析的组中,肺癌中 CEA 的阳性率为大约 40.0%。与之相比,CEA 与 EBI3 的组合则上升到 64.9% (图 4C 左边小图)。在本发明中,“CEA 与 EBI3 的组合”指 CEA 和 / 或 EBI3 的水平用作标志。在优选实施方案中,或者 CEA 或者 EBI3 阳性的患者可判断为具有高肺癌风险。使用 EBI3 与 CEA 组合作为肺癌血清学标志是新颖的。

[0472] 对罹患 SCC 患者的 ROC 分析确定 CYFRA 的截断值为 2.0ng/ml,其灵敏度为 48.6% (37 例中 18 例),特异性为 2.3% (130 例中 3 例;图 4C,中上小图)。血清 EBI3 与 CYFRA 的相关系数并不显著 (Spearman 秩相关系数: $\rho = -0.117$; $P = 0.4817$),显示在血

清中测量两个标志可将 SCC 检测的灵敏度改善到 78.5%；对诊断 SCC, 单独 CYFRA 的灵敏度是 48.6% (37 例中 18 例), 而 EBI3 为 54.1% (37 例中 20 例)。在正常志愿者 (对照组) 中两个肿瘤标志任一的假阳性率为 4.6% (130 例中 6 例), 虽然在同一对照组中 CYFRA 与 EBI3 各自的假阳性率为 2.3% (130 例中 3 例) 与 2.3% (130 中 3; 图 4C, 中下小图)。

[0473] 对于 SCC, 本发明的诊断或检测方法可进一步包括下列步骤:

[0474] (d) 确定血液样品中 CYFRA 水平;

[0475] (e) 将步骤 (d) 中确定的 CYFRA 水平与正常对照相比;

[0476] (f) 判断较之正常对照, EBI3 和 / 或 CYFRA 的高水平显示所述患者罹患肺癌, 尤其是 SCC。

[0477] 此外, 对于 SCLC, 本发明的诊断或检测方法可进一步包括下列步骤:

[0478] (d) 确定血液样品中 pro-GRP 水平;

[0479] (e) 将步骤 (d) 中确定的 pro-GRP 水平与正常对照相比;

[0480] (f) 判断较之正常对照, EBI3 和 / 或 pro-GRP 的高水平显示所述患者罹患肺癌, 尤其是 SCLC。

[0481] 通过 EBI3 与 pro-GRP 的组合, 肺癌, 尤其是 NSCLC 检测的灵敏度可显著改善。举例而言, 在下述讨论的实际实施例分析的组中, 肺癌中 pro-GRP 的阳性率为大约 67.5%。与之相比, pro-GRP 与 EBI3 的组合则上升到 76.3% (图 4C 右边小图)。在本发明中, “pro-GRP 与 EBI3 的组合”指 pro-GRP 和 / 或 EBI3 的水平用作标志。在优选实施方案中, pro-GRP 和 / 或 EBI3 阳性的患者可判断为具有高肺癌风险。使用 pro-GRP 与 CEA 组合作为肺癌血清学标志是新发现。

[0482] 因此, 较之基于单独 CEA 或 pro-GRP 的测量结果来决定, 本发明可极大的改善检测肺癌患者的灵敏度。在该改善背后的事实是 CEA 或 pro-GRP 阳性组患者与 EBI3 阳性组患者并不完全匹配。

[0483] 举例而言, 在作为 CEA 或 pro-GRP 测量结果确定具有较之标准值为低 (意即, 不罹患肺癌) 的值的患者中, 事实上有一部分患者罹患肺癌。上述患者称为 CEA 或 pro-GRP 假阴性患者。通过组合基于 EBI3 的确定与基于 CEA 或 pro-GRP 的确定, 可从 CEA 或 pro-GRP 假阴性患者中找出 EBI3 值高于标准值的患者。也就是说, 本发明提供了在因为 CEA 或 pro-GRP 低血浓度而被错误的确定为 “阴性” 的患者中鉴定出实际上罹患肺癌的患者的手段。一般而言, 单纯将使用多种标志确定的结果组合可增加检测的灵敏度, 但与此同时也往往导致特异性降低。然而, 通过确定灵敏度与特异性之间的最佳平衡, 本发明确定了可增加检测灵敏度而无损于特异性的特征性组合。

[0484] 在本发明中, 为同时考虑 CEA 或 pro-GRP 的测量结果, 例如, 可测量 CEA 或 pro-GRP 的血浓度并将其与标准值比较, 正如前述比较 EBI3 测量值与标准值的方法同样。举例而言, 如何测量 CEA 或 pro-GRP 的血浓度并将其与标准值相比是已知的。另外, CEA 或 pro-GRP 的 ELISA 试剂盒为可市购的。描述于已知报道中的这些方法可用于本发明所述方法以诊断或检测肺癌。

[0485] 类似的, 在本发明进一步的实施方案中, 通过测量血液样品中 NPTX1 蛋白质的量来确定 NPTX1 水平。确定血液样品中 NPTX1 量的方法包括免疫测定方法。

[0486] 在本发明的诊断方法中, 除 NPTX 的血浓度外, 还可确定 CYFRA 的血浓度以检测

SCC。因此,本发明提供了诊断 SCC 的方法,其中当 NPTX1 血浓度或 CYFRA 的血浓度较之健康个体为高,或两者皆较之健康个体为高时,SCC 被检测出来。

[0487] 类似癌胚抗原 (CEA),细胞角蛋白 19 片段 (CYFRA,或 CYFRA21-1) 是癌症中常被研究的肿瘤标志。对非小细胞肺癌,CYFRA 是有用的标志。然而,CYFRA 作为 SCC 标志的灵敏度对全面检测 SCC 有些不足,对于早期检测尤其如此。相应的,需要改善其诊断 SCC 的灵敏度。

[0488] 在本发明中,提供了新颖的 SCC 血清学标志 NPTX。本发明可达成肺癌诊断或检测方法灵敏度的改善。即,本发明提供在患者中诊断 SCC 的方法,包括下述步骤:

[0489] (a) 从需诊断的受试者中收集血液样品;

[0490] (b) 确定血液样品中 NPTX1 的水平;

[0491] (c) 将步骤 (b) 中确定的 NPTX1 水平与正常对照相比,其中在所述血液样品中,与正常对照相比的高 NPTX1 水平,表示所述受试者罹患肺癌。此外,本发明提供了在受试者中诊断 SCC 的方法,包括下述步骤:

[0492] (a) 确定从需诊断的受试者收集的血液样品中 NPTX1 的水平;

[0493] (b) 将步骤 (a) 中确定的 NPTX1 水平与正常对照的相比,其中在所述血液样品中,与正常对照相比的高 NPTX1 水平,表示所述受试者罹患肺癌。

[0494] 在优选实施方案中,对于 SCC,本发明所述诊断或检测方法可进一步包括下述步骤:

[0495] (d) 确定血液样品中 CYFRA 水平;

[0496] (e) 将步骤 (d) 中确定的 CYFRA 水平与正常对照相比;

[0497] (f) 判断较之正常对照,NPTX1 和 / 或 CYFRA 的高水平显示所述受试者罹患 SCC。

[0498] 通过 NPTX1 与 CYFRA 的组合,SCC 检测的灵敏度可显著改善。举例而言,在下述讨论的实际实施例分析的组中,SCC 中 CYFRA 的阳性率为大约 29.4%。与之相比,CYFRA 与 NPTX1 的组合则上升到 62.3%。在本发明中,“CYFRA 与 NPTX 的组合”指 CYFRA 和 / 或 NPTX1 的水平用作标志。在优选实施方案中,CYFRA 或者 NPTX1 阳性的受试者可判断为具有高 SCC 风险。使用 NPTX1 与 CYFRA 组合作为肺癌血清学标志是新颖的。

[0499] 因此,较之基于单独测量 CYFRA 结果的确定,本发明可极大的改善检测 SCC 患者的灵敏度。在该改善背后的事实是 CYFRA 阳性组患者与 NPTX 阳性组患者并不完全匹配。

[0500] 举例而言,经过 CYFRA 测量确定为具有较之标准值为低 (意即,未患 SCC) 的值的患者中,事实上有一部分患者罹患 SCC。上述患者称为 CYFRA 假阴性患者。通过组合基于 CYFRA 的确定与基于 NPTX 的确定,可从 CYFRA 假阴性患者中找出 NPTX1 值高于标准值的患者。本发明提供了在因为低的 CYFRA 血浓度而被错误地确定为“阴性”的患者中鉴定出实际上罹患 SCC 的患者的方法。一般而言,单纯将使用多种标志确定的结果组合可增加检测的灵敏度,但与此同时也往往导致特异性降低。然而,通过确定灵敏度与特异性之间的最佳平衡,本发明确定了可增加检测灵敏度而不牺牲特异性的特征性组合。

[0501] 在本发明中,为同时考虑 CYFRA 的测量结果,例如,可测量 CYFRA 的血浓度并将其与标准值比较,如前述比较 NPTX 测量值与标准值的方法同样。举例而言,如何测量 CYFRA 的血浓度并将其与标准值相比是已知的。另外,CYFRA 的 ELISA 试剂盒可以市购。描述于已知报道中的这些方法可用于本发明所述的方法中以诊断或检测 SCC。

[0502] 在本发明中,EBI3 和 / 或 NPTX1 的血浓度标准值可用统计学方法加以确定。举例而言,可测量健康个体中 EBI3 和 / 或 NPTX1 的血浓度以通过统计学方法确定 EBI3 和 / 或 NPTX1 的标准血浓度。当积聚了统计学上足量的群体后,通常用在距平均值两到三倍标准偏差 (S. D.) 范围内的值作为标准值。因此,对应于平均值 $+2xS. D.$ 或平均值 $+3xS. D.$ 的值可用作标准值。如上描述设定的标准值理论上分别包括 90% 和 99.7% 的健康个体。

[0503] 此外,标准值亦可分别基于肺癌或 SCC 患者中 EBI3 和 / 或 NPTX1 的实际血浓度设定。一般而言,用此方法设定的标准值使假阳性的百分比降到最低,且标准值从满足能使检测灵敏度最大化的条件的值的范围中选择。在此,假阳性的百分比,是指其 EBI3 和 / 或 NPTX1 血浓度被判断高于标准值的患者在健康个体中所占的百分比。相反,其 EBI3 和 / 或 NPTX1 血浓度被判断低于标准值的患者在健康个体中所占的百分比表示特异性。意即,假阳性百分比与特异性之和总是为 1。检测灵敏度,是指在确定有肺癌存在的群体中所有肺癌患者中,其 EBI3 和 / 或 NPTX1 血浓度被判断高于标准值的患者所占的百分比。

[0504] 进一步,在本发明中,在其 EBI3 和 / 或 NPTX1 浓度被判断高于标准值的患者中肺癌或 SCC 患者所占的百分比代表阳性预测价值。另一方面,在其 EBI3 和 / 或 NPTX1 血浓度被判断为低于标准值的患者中健康个体所占的百分比代表阴性预测价值。这些值的相互关系总结于表 1。如下所示关系显示,灵敏度、特异性、阳性预测价值和阴性预测价值都是评价肺癌或 SCC 诊断准确度的指标,且其值中每一个都根据用来判断 EBI3 和 / 或 NPTX1 血浓度水平的标准值而变化。

[0505] 表 1

[0506]

EBI3 血浓度	肺癌患者	健康个体	
高	a : 真阳性	b : 假阳性	阳性预测价值 $a / (a+b)$
低	c : 假阴性	d : 真阴性	阴性预测价值 $d / (c+d)$
	灵敏度 $a / (a+c)$	特异性 $d / (b+d)$	

[0507]

[0508] 如前所述,通常设定标准值使假阳性比例低而灵敏度高。然而,由上所示的关系亦明显显示,在假阳性比例与灵敏度之间存在权衡。意即,如果标准值降低,检验灵敏度增加。然而,因为假阳性比例亦增加,难以满足具有“低假阳性比例”的条件。考虑上述情况,例如,在本发明中给予下列预测结果的值可选为优选标准值。

[0509] 使假阳性比例为 50% 或更低的标准值 (意即,特异性不少于 50% 的标准值)。

[0510] 使灵敏度不低于 20% 的标准值。

[0511] 在本发明中,所述标准值可用接受者操作特性(ROC)曲线设定。ROC曲线是在竖轴显示检测灵敏度而在竖轴显示假阳性比例(意即,“1-灵敏度”)的图表。在本发明中,可通过绘制灵敏度和假阳性比例的变化来获取ROC曲线,所述变化可以在连续改变用于确定EBI3和/或NPTX1血浓度高/低程度的标准值之后获得。

[0512] 为获取ROC曲线的“标准值”是临时用于统计分析的值。为获取ROC曲线的“标准值”一般可在一定范围内连续变动,所述范围允许覆盖所有可选的标准值。举例而言,所述标准值可在受分析的群体中从测量出的EBI和/或NPTX1最小值到最大值的范围内变动。

[0513] 基于所得的ROC曲线,本发明所用的优选标准值可从满足上述条件的范围内选出。此外,可以通过使标准值在包括大多数EBI3和/或NPTX1测定值的范围内变化,根据所产生的ROC曲线来选择标准值。

[0514] 血中的EBI3和/或NPTX1可用任何可定量蛋白的方法测量。举例而言,免疫测定、液相色谱、表面等离子共振(SPR)、质谱或类似物可用于本发明。在质谱中,可使用合适的内标物来定量蛋白。举例而言,同位素标志的EBI3和/或NPTX1可用作内标物。血中EBI3和/或NPTX1的浓度可依据血中EBI3和/或NPTX1的峰强度以及内标物的峰强度来确定。一般而言,基质辅助激光解吸离子化(MALDI)方法用于蛋白质的质谱。依靠使用质谱或液相色谱的分析方法,亦可将EBI3与其它肿瘤标志(例如CEA或pro-GRP)同时分析。或者,依靠使用质谱或液相色谱的分析方法,亦可将NPTX1与其它肿瘤标志(例如CYFRA)同时分析。

[0515] 在本发明中测量EBI3和/或NPTX1的优选方法为免疫测定。已知EBI3的氨基酸序列(GenBank登录号NM_005755)。EBI3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:2,而编码其的cDNA的核苷酸序列示于SEQ ID NO:1。类似的,已知NPTX1的氨基酸序列(GenBank登录号NP_002513)。NPTX1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:79,而编码其的cDNA的核苷酸序列示于SEQ ID NO:78(GenBank登录号NM_002522)。因此,本领域的一般技术人员可基于EBI3或NPTX1的氨基酸序列通过合成所需的免疫原来制备抗体。所述用作免疫原的肽可方便的利用肽合成仪合成。所述合成肽可通过将其与载体蛋白连接用作免疫原。

[0516] 钥孔血蓝蛋白、肌球蛋白、白蛋白及类似物可用作载体蛋白。载体蛋白优选是KLH、牛血清白蛋白等。一般用马来酰亚胺苯甲酰基-N-氢化琥珀酰亚胺酯法(下面缩写为MBS法)等方法将合成肽连接到载体蛋白。

[0517] 具体而言,将半胱氨酸导入所述合成肽,且将该肽通过MBS使用该半胱氨酸的SH基团与KLH交联。可将所述半胱氨酸残基导入所述合成肽的N端或C端。

[0518] 此外,EBI3和NPTX1可分别使用EBI3(GenBank登录号NM_005755)和NPTX1(GenBank登录号NM_002522)的核苷酸序列,或其一部分来制备。可用从表达EBI3或NPTX1的组织制备的mRNA克隆包含所需核苷酸序列的DNA。此外,亦可使用市购的cDNA文库作为克隆来源。所得的EBI3和/或NPTX1遗传重组体,或其片段,亦可用作免疫原。用此方法表达的EBI3和/或NPTX1重组体对作为免疫原以获取本发明所用抗体而言是优选的。

[0519] 将用此方法获得的免疫原与合适的佐剂混合,并用其免疫动物。已知的佐剂包括弗氏完全佐剂(FCA)和不完全佐剂。以适当的间隔重复免疫过程直至证实抗体效价增加。在本发明中对用来免疫的动物没有特别限制。具体而言,可使用通常用于免疫的动物,如小

鼠、大鼠或兔。

[0520] 当获取的抗体为单克隆抗体时,可使用对其生产有利的动物。举例而言,在小鼠中,已知多数用于细胞融合的骨髓瘤细胞系,且构建具有高可能性的杂交瘤的方法是众所周知的。因此,为获取单克隆抗体的目的小鼠是理想的免疫用动物。

[0521] 进一步,所述免疫处理并非限于体外处理。亦可使用在体外免疫学致敏培养的免疫活性细胞的方法。对于用这些方法获取的抗体产生细胞,加以转化并克隆。转化抗体产生细胞以获取单克隆抗体的方法并不限于细胞融合。举例而言,通过病毒感染获取可克隆转化体的方法是已知的。

[0522] 对于产生本发明中所用的单克隆抗体的杂交瘤,可以基于其针对 EBI3 和 / 或 NPTX1 的反应性来加以筛选。具体而言,首先通过使用针对用作免疫原的 EBI3 和 / 或 NPTX1 或其结构域肽的结合能力作为指标选择抗体产生细胞。用此筛选方法选出的阳性克隆根据需要进行亚克隆。

[0523] 在本发明中需使用的单克隆抗体可通过将构建出的杂交瘤在合适的条件下培养并收集产生的抗体的方法获取。当所述杂交瘤为同源杂交瘤时,可用将其接种在同基因动物腹膜内的方法来进行体内培养。在此情况下,以腹水的方式收集单克隆抗体。当使用异源杂交瘤时,使用裸鼠作为宿主对其进行体内培养。

[0524] 除体内培养外,通常还可将杂交瘤在体外合适的培养环境下培养。举例而言,基础培养基,例如 RPMI 1640 和 DMEM,通常用作杂交瘤的培养基。添加剂,例如动物血清可添加至这些培养基内以保持高水平的所述抗体产生能力。当在体外培养杂交瘤时,所述单克隆抗体可以培养上清的形式收集,或在培养的同时通过使用空心纤维的培养装置连续收集。

[0525] 用于本发明的单克隆抗体是从作为腹水或培养上清液的单克隆抗体,通过以饱和硫酸铵沉淀并进一步用凝胶过滤、离子交换层析之类纯化的方法分离免疫球蛋白级分来收集的。此外,如果所述单克隆抗体为 IgG,基于与蛋白 A 或蛋白 G 的亲合层析的纯化方法是有效的。

[0526] 当针对 EBI3 和 / 或 NPTX1 的抗体与 EBI3 和 / 或 NPTX1 接触时,所述抗体与抗体识别的抗原决定簇(表位)通过抗原-抗体反应结合。所述抗体与抗原的结合可通过多种免疫测定原理加以检测。免疫测定可大致归类为异源分析方法与同源分析方法。为保持免疫测定的高灵敏度和特异性,希望使用单克隆抗体。本发明通过多种免疫测定形式用于测量 EBI3 和 / 或 NPTX1 的方法在此更加详细的加以说明。

[0527] 首先,描述了使用异源免疫测定的方法测量物质 (EBI3 和 / 或 NPTX1) 的方法。在异源免疫测定中,需要一套机制在将与所述物质结合的抗体从那些不与所述物质结合的抗体分离后检测该抗体。

[0528] 为便于分离,通常使用固定化剂。举例而言,首先制备在其上固定化了识别该物质的抗体的固相(固定化抗体)。使所述物质与其结合,且进一步使第二抗体与之反应。

[0529] 当所述固相从液相分离并如需要进一步漂洗后,第二抗体与所述物质的浓度成比例地残留在固相上。通过标记所述第二抗体,可通过测量源自标记物的信号来定量所述物质。

[0530] 可使用任何方法将所述抗体与所述固相结合。举例而言,可将抗体物理性地吸附于疏水材料,例如聚苯乙烯。此外,可将抗体化学性地与多种在其表面具有功能基团的材料

结合。进一步,可通过用其配体的结合伴侣将其捕获的方法将该配体标记的抗体结合到固相上。结合配体与其结合伴侣的组合包括抗生物素蛋白-生物素等。所述固相与抗体可于第一抗体与所述物质反应同时或之前结合。

[0531] 类似的,所述第二抗体无需被直接标记。意即,可使用针对所述抗体的抗体或诸如抗生物素蛋白-生物素之间结合反应将其间接标记。

[0532] 在样品中所述物质的浓度,基于使用含有已知浓度所述物质的标准样品获得的信号强度来确定。

[0533] 对于上述异源免疫测定,可使用任何抗体作为固定化抗体与第二抗体,只需其是识别所述物质的抗体或具有抗原结合位点的抗体片段。因此,其可为单克隆抗体、多克隆抗体或两者的混合或组合。举例而言,单克隆抗体和多克隆抗体的组合在本发明中是优选的组合。此外,当两个抗体均为单克隆抗体时,优选组合识别不同表位的单克隆抗体。

[0534] 因为需测量的抗原被抗体包夹,上述异源免疫测定称为夹心法。由于夹心法的测量灵敏度和重复性极佳,它们是本发明中优选的测量原理。

[0535] 竞争性抑制反应原理也可以适用于异源免疫测定。具体而言,它们是基于在样品中,所述物质竞争性的抑制已知浓度的物质与抗体的结合这一现象的免疫测定。样品中所述物质的浓度可通过用已知浓度的物质标记并测量与所述抗体反应(或未反应)的物质的量来加以确定。

[0536] 当具有已知浓度的抗原与在样品中的抗原同时与抗体反应时,竞争性反应体系成立。进一步,当抗体与样品中的抗原反应,随后用已知浓度的抗原反应时,使用抑制性反应体系的分析为可能。在两种反应体系中,均可通过设定使用的已知浓度抗原中任一个作为试剂组分或所述抗原作为标记组分,而另一个为固定化试剂。

[0537] 放射性同位素、荧光物质、发光物质、具有酶活性的物质、肉眼可见的物质、可用磁性观察的物质等用于这些异源免疫测定。这些标记物质的具体例子如下所示:

[0538] 具有酶活性的物质:

[0539] 过氧化物酶

[0540] 碱性磷酸酶

[0541] 尿素酶,过氧化氢酶,

[0542] 葡萄糖氧化酶

[0543] 乳酸脱氢酶,或

[0544] 淀粉酶等等

[0545] 荧光物质:

[0546] 异氰酸荧光素

[0547] 四甲基若丹明异硫氰酸盐

[0548] 取代的若丹明异硫氰酸盐

[0549] 异氰酸二氯三嗪(dichlorotriazine isothiocyanate)等

[0550] 放射性同位素:

[0551] 氚

[0552] ¹²⁵碘,或

[0553] ¹³¹碘

[0554] 其中,非放射性标记物,例如酶,在安全、可操作性、灵敏度等的方面是有优势的。可用已知方法,例如高碘酸法或马来酰亚胺法将酶性标记物与抗体或 EBI3 连接。

[0555] 作为固相,使用珠子、容器内壁、微细颗粒、多孔载体、磁性颗粒等。可使用通过下列材料形成的固相:聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚乙烯基甲苯、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、乳胶、明胶、琼脂糖、玻璃、金属、陶瓷等。亦已知表面导入化学性结合抗体等的功能团的固体材料。已知的结合方法,包括化学结合,例如聚-L-赖氨酸或戊二醛处理以及物理吸附,可施用于固相与抗体(或抗原)。

[0556] 尽管在本文中例示的所有异源免疫测定中均需从液相中分离固相的步骤以及漂洗步骤,通过免疫色谱方法可方便的实施这些步骤,免疫色谱方法为所述夹心法的一种变形。

[0557] 具体而言,将需固定化的抗体固定化到可通过毛细现象输送样品溶液的多孔载体上,接着利用此毛细现象将含有物质(EBI3和/或NPTX1)的样品与标记抗体的混合物配置到其中。在配置过程中,物质与标记抗体反应,且当其进一步与固定化抗体接触时,就会在那个位置被捕获。不与所述物质反应的标记抗体不被固定化抗体所捕获而流过。

[0558] 结果,所述物质的存在可通过,保留在固定化抗体位置标记抗体的信号作为指标来检测。如所述标记抗体预先保持在所述多孔载体上游,则仅通过注入样品溶液就可以起始与完成所有反应,从而可构建非常简单的反应体系。在免疫色谱方法中,可以把肉眼可分辨的标记组分,如着色颗粒,组合起来,以构建甚至无需专用读数器的分析装置。

[0559] 进一步,在所述免疫色谱方法中,可调节所述物质的检测灵敏度。举例而言,通过在截止值(如下所述)附近调节检测灵敏度,上述标记组分可在超过截止值时被检测出来。使用这样的装置,可非常简单地判断受试者是阳性还是阴性。通过采用允许肉眼分辨标签的构造,可通过简单地将血液样品施加到免疫色谱装置中来获取必要的检查结果。

[0560] 多种调节所述免疫色谱方法的检测灵敏度的方法在本领域是已知的。举例而言,可将另一种用于调节检测灵敏度的固定化抗体置于上样处与固定化抗体之间(日本专利申请公布(JP-A)H06-341989(未审查、已发表的日本专利申请))。样品中的物质在从上样处转移到为检测标签的第一固定化抗体处时,被所述第二固定化抗体所捕获。在第二固定化抗体饱和后,所述物质可到达下游的第一固定化抗体处。其结果是,当包含于样品中的物质浓度超过预定的浓度时,与所述标记抗体结合的物质在第一固定化抗体处被检测出来。

[0561] 下一步,描述同源免疫测定法。与上述需要分离反应溶液的异源免疫测定方法相对照的是,物质(EBI3和/或NPTX1)亦可使用同源分析方法测量。同源分析方法允许在无需将其从反应溶液中分离的情况下检测抗原-抗体反应产物。

[0562] 一种代表性的同源分析方法是免疫沉淀反应,其中通过检测抗原-抗体反应后产生的沉淀来定量分析抗原成分。多克隆抗体通常用于免疫沉淀反应。当应用单克隆抗体时,优选使用能与物质的不同表位结合的多种类型的单克隆抗体。免疫学反应后的沉淀反应的产物可由肉眼观测,或可通过光学测量转换成数值数据。

[0563] 免疫学粒子凝集反应是一种通用的同源分析方法,利用抗体致敏的细颗粒在抗原作用下的凝集作为指标。与上述免疫沉淀反应中一样,多克隆抗体或多种类型单克隆抗体的组合也可用在这种方法中。细颗粒的抗体致敏可以用抗体混合物致敏,或者可以通过混合分别用每种抗体致敏的粒子来制备这样的细颗粒。用这种方式获得的细颗粒一旦与上述

物质接触就产生基质样反应产物。反应产物可以作为粒子聚集来检测。粒子聚集可由肉眼观测或通过光学测定转换成数值数据。

[0564] 基于能量转移和酶引导作用 (enzyme channeling) 的免疫测定方法是已知的同源免疫测定法。在使用能量转移的方法中, 将具有供体 / 受体关系的不同的光学标记分别接到能够识别抗原上靠近的表位的多种抗体上。当发生免疫反应时, 两个部分相互接近, 发生能量转移现象, 其结果是产生荧光淬灭或者荧光波长的改变等信号。另一方面, 酶引导作用为能够结合邻近的表位的多种抗体使用标记, 其中所述标记是具有这样的关系的酶的组合, 即一种酶的反应产物是另一种酶的底物。当两个部分由于免疫反应彼此靠近时, 促进酶反应, 从而它们的结合可以作为酶反应速率的变化被检测到。

[0565] 在本发明中, 可以从抽取自患者的血液制备用于测量 EBI3 和 / 或 NPTX1 的血液。优选的血液样品是血清或血浆。测量前可将血清或血浆样品稀释。或者, 可以将全血作为样品测量, 然后可校正得到的测定值以确定血清浓度。例如, 全血中的浓度可通过测定同一血液样品中血细胞体积的比例来校正至血清浓度。

[0566] 在一个优选的实施方案中, 免疫测定包括 ELISA。本发明人创建了夹心 ELISA 以检测罹患肺癌患者血清中的 EBI3 和 / 或 NPTX1。

[0567] 然后将血液样品中 EBI3 水平和 / 或 NPTX1 水平与和标准样品 (例如正常对照样品) 有关的 EBI3 水平和 / 或 NPTX1 水平相比较。短语“正常对照水平”指在未患有肺癌或 SCC 的群体的血液样品中通常发现的 EBI3 和 / 或 NPTX1 水平。优选具有与试验样品相似性质的标准样品。例如, 如果试验样品包含患者血清, 标准样品也应是血清。来自于对照和试验受试者的血液样品中 EBI3 和 / 或 NPTX1 水平可以同时测定, 或者, 作为选择, 可以根据分析先前从对照组收集的样品中现的 EBI3 和 / 或 NPT 水平得到的结果, 用统计学方法测定正常对照水平。

[0568] EBI3 水平和 / 或 NPTX1 水平还可以用于监测肺癌或 SCC 的疗程。在该方法中, 由接受肺癌或 SCC 治疗的受试者提供试验血液样品。优选地, 在治疗前、治疗期间或治疗后的不同时间点从受试者获得多个试验血液样品。然后将治疗前样品中 EBI3 和 / 或 NPTX1 水平与治疗前样品中 EBI3 和 / 或 NPTX1 水平相比较, 或者, 作为选择, 与标准样品 (例如正常对照水平) 相比较。例如, 如果治疗后 EBI3 和 / 或 NPTX1 水平比治疗前 EBI3 和 / 或 NPTX1 水平低, 则可以做出治疗有效的结论。同样地, 如果治疗后 EBI3 和 / 或 NPTX1 水平与正常对照 EBI3 和 / 或 NPTX1 水平相似, 则也可以做出治疗有效的结论。

[0569] “有效的”治疗是导致受试者中 EBI3 和 / 或 NPTX1 水平降低, 或肺癌的大小、普遍程度或转移潜能降低的治疗。当预防性地应用治疗时, “有效的”意味着治疗延缓或阻止肺癌的发生, 或减轻肺癌的临床症状。可以利用标准临床规程评估肺癌。此外, 可以结合任何已知诊断和治疗肺癌的方法来确定治疗的有效性。例如, 以组织病理学方法或通过鉴别症状异常来常规诊断肺癌。

[0570] 肺癌血清学诊断试剂盒:

[0571] 可以预先将根据本发明用于进行肺癌诊断的成分组合, 作为检测试剂盒提供。据此, 本发明提供一种用于检测肺癌的试剂盒, 包括:

[0572] (i) 确定血液样品中 EBI3 水平的免疫测定试剂; 和

[0573] (ii) EBI3 的阳性对照样品。

[0574] 在优选实施方案中,本发明的试剂盒可进一步包括:

[0575] (iii) 确定血液样品中 CEA 或 pro-GRP 水平的免疫测定试剂;和

[0576] (iv) CEA 和 / 或 pro-GRP 的阳性对照样品。

[0577] 或者,根据本发明用于实施 SCC 诊断的组分可以实现组合并以测试试剂盒的形式供应。相应地,本发明提供了检测肺癌的试剂盒,包括:

[0578] (i) 确定血液样品中 NPTX1 水平的免疫测定试剂;和

[0579] (ii) NPTX1 的阳性对照样品。

[0580] 在优选实施方案中,本发明的试剂盒可进一步包括:

[0581] (iii) 确定血液样品中 CYFRA 水平的免疫测定试剂;和

[0582] (iv) CYFRA 的阳性对照样品。

[0583] 组成本发明试剂盒的免疫测定用试剂可以包括如上所述各种免疫测定所必需的试剂。具体地,免疫测定用试剂包括能识别待测量物质的抗体。可以根据免疫测定的测定形式修饰所述抗体。ELISA 可用作本发明优选的测定形式。在 ELISA 中,例如,通常应用固定到固相上的第一抗体和带有标记的第二抗体。

[0584] 因此,用于 ELISA 的免疫测定试剂可以包括固定在固相载体上的第一抗体。细颗粒或反应容器内壁可以用作固相载体。磁性粒子可以用作细颗粒。或者,多孔板(例如 96 孔微量培养板)常常用作反应容器。用于处理大量样品的容器也是众所周知的,其带有高密度的、比 96 孔微量培养板体积小的孔。在本发明中,这些反应容器的内壁可以用作固相载体。

[0585] 用于 ELISA 的免疫测定试剂可进一步包括带有标记的第二抗体。用于 ELISA 的第二抗体可以是直接或间接地与酶连接的抗体。将酶化学连接到抗体的方法是已知的。例如,可以酶切免疫球蛋白以获得包括可变区的片段。通过使所述片段中包含的 -SS- 键还原成 -SH 基,可以衔接上双功能接头。通过预先将酶与双功能接头连接,可以使酶与抗体片段连接。

[0586] 或者,为了间接地连接酶,例如,可以使用抗生物素蛋白-生物素结合。即,可以通过使生物素化的抗体与衔接有抗生物素蛋白的酶接触,使酶间接地与抗体连接。另外,利用第三抗体(一种识别第二抗体的酶标抗体)可以使酶间接地与第二抗体连接。例如,如上述例示的那些酶可用作标记抗体的酶。

[0587] 本发明的试剂盒包括 EBI3 的阳性对照。EBI3 的阳性对照包括预先确定了浓度的 EBI3。优选浓度为,例如,在本发明的试验方法中设定为标准值的浓度。或者,也可以组合具有更高浓度的阳性对照。本发明中 EBI3 的阳性对照还可包括预先测定了浓度的 CEA 和 / 或 pro-GRP。优选包括 EBI3、CEA 和 / 或 pro-GRP 的阳性对照作为本发明的阳性对照。

[0588] 因此,本发明提供一种用于检测肺癌的阳性对照,其包括浓度超过正常值的 EBI3 以及 CEA 和 / 或 pro-GRP。或者,本发明涉及包含浓度超过正常值的 EBI3 以及 CEA 和 / 或 pro-GRP 的血液样品在用于检测肺癌的阳性对照的生产中的用途。已知 CEA 和 / 或 pro-GRP 可以用作肺癌的指标;然而,EBI3 可以用作肺癌的指标是本发明获得的新发现。因此,除 CEA 和 / 或 pro-GRP 外还包含 EBI3 的阳性对照是新颖的。本发明的阳性对照可以通过将浓度超过标准值的 CEA 和 / 或 pro-GRP 添加到血液样品中来制备。例如,包含浓度超过标准值的 CEA 和 / 或 pro-GRP 的血清作为本发明的阳性对照是优选的。

[0589] 此外,本发明的试剂盒可包含 NPTX1 的阳性对照。NPTX1 的阳性对照包含事先其浓度已确定的 NPTX1。例如,优选其浓度是在本发明的测试方法中设定为标准值的浓度。此外,具有更高浓度的阳性对照亦可包含在内。本发明中 NPTX1 的阳性对照可额外的包括浓度已预先确定的 CYFRA。优选包括 NPTX1 和 / 或 CYFRA 的阳性对照作为本发明检测 SCC 的阳性对照。

[0590] 因此,本发明提供一种用于检测 SCC 的阳性对照,其包括浓度超过正常值的 NPTX1 和 CYFRA。或者,本发明涉及包含浓度超过正常值的 NPTX1 和 CYFRA 的血液样品在用于检测 SCC 的阳性对照的生产中的用途。已知 CYFRA 可以用作 NSCLC 的指标;然而,NPTX1 可以用作 SCC 的指标是本发明获得的新发现。因此,除包含 CYFRA 外还包含 NPTX1 的阳性对照是新颖的。本发明的阳性对照可以通过将浓度超过标准值的 NPTX1 和 CYFRA 添加到血液样品中来制备。例如,包含浓度超过标准值的 CYFRA 和 NPTX1 的血清作为本发明的阳性对照是优选的。

[0591] 本发明中的阳性对照优选是液体形式的。在本发明中,使用血液样品作为样品。因此,用作对照的样品也需要是液体形式。或者,使用时以预先定量的液体溶解干燥的阳性对照,可以制备提供试验浓度的对照。将干燥的阳性对照与溶解它所必需的一定量液体一起包装,使用者可仅通过将它们混合而获得必需的阳性对照。用作阳性对照的 EBI3 或 NPTX1 可以是天然来源的蛋白质,或者其可以是重组蛋白。不仅是阳性对照,阴性对照也可以组合在本发明的试剂盒中。用阳性对照或阴性对照来证实免疫测定显示的结果是正确的。

[0592] 抗肺癌化合物的筛选:

[0593] 在本发明的语境中,待通过本筛选方法鉴定的治疗剂可以是任何化合物或包含数种化合物的组合物。而且,根据本发明筛选方法暴露于细胞或蛋白的测试剂可以是单个化合物或多个化合物的组合。当在方法中使用化合物组合时,化合物可以顺次或同时加以接触。

[0594] 任何测试剂,例如,细胞提取物、细胞培养上清、发酵微生物产物、海洋生物提取物、植物提取物、纯化或粗蛋白质、肽、非肽化合物、合成微分子化合物(包括核酸构建体,例如反义 RNA、siRNA、核酶以及适体等等)以及天然化合物,均可用于本发明的筛选方法中。也可使用本领域熟知的很多组合文库方法中的任何途径来获得本发明的测试剂,包括(1)生物文库,(2)空间可寻址平行固相或液相文库(spatially addressable parallelsolid phase or solution phase libraries),(3)需要解卷积(deconvolution)的合成文库法,(4)“一珠一化合物”(“one-bead one-compound”)文库法,以及(5)使用亲和色谱选择的合成文库法。使用亲和色谱选择的生物文库法限于肽文库,而其它四种途径适用于肽、非肽寡聚物或化合物小分子文库(Lam(1997)Anticancer Drug Des. 12:145-67)。合成分子文库方法的例子可在本领域找到(DeWitt et al., Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90:6909-13; Erb et al., Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91:11422-6; Zuckermann et al., J Med Chem 37:2678-85, 1994; Cho et al., Science 1993, 261:1303-5; Carell et al., Angew Chem Int Ed Engl 1994, 33:2059; Carell et al., Angew Chem Int Ed Engl 1994, 33:2061; Gallop et al., J Med Chem 1994, 37:1233-51)。化合物文库可提供于溶液中(参见 Houghten, Bio/Techniques 1992, 13:412-21)或珠子上(Lam, Nature 1991, 354:82-4)、芯片(Fodor, Nature 1993, 364:555-6)、细菌上(美国专利 5, 223, 409)、孢子(美

国专利 5,571,698 ;5,403,484 与 5,223,409)、质粒上 (Cull et al., Proc Natl Acad Sci USA 1992,89 :1865-9) 或噬菌体上 (Scott and Smith, Science 1990,249 :386-90 ;Devlin, Science 1990,249 :404-6 ;Cwirla et al., Proc Natl Acad Sci USA 1990,87 :6378-82 ; Felici, J Mol Biol 1991,222 :301-10 ;美国专利申请 2002103360)。

[0595] 通过本发明任何筛选方法筛选到的化合物的一部分结构通过添加、删除、和 / 或置换方式被转换而得到的化合物,包括在通过本发明筛选方法鉴定的作用剂之内。

[0596] 此外,当所筛选的测试剂是蛋白质时,为了获得编码该蛋白的 DNA,可以确定蛋白的全部氨基酸序列,以此推定编码蛋白的核酸序列,或者可以分析所得蛋白的部分氨基酸序列,根据该序列制备寡 DNA 作为探针,并用该探针筛选 cDNA 文库,以获得编码该蛋白的 DNA。对所得的 DNA 进行确认,以其在制备治疗或预防癌症的候选物测试剂中的有用性为准。

[0597] 对本文描述筛选为有用的测试样品亦可为特异性结合 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 蛋白或其缺乏原蛋白的体内生物活性的部分肽的抗体。

[0598] 尽管测试剂文库的构建是本领域众所周知的,在下文中还是进一步提供了鉴定测试剂和构建用于本筛选方法的这些治疗剂文库的指导。

[0599] (i) 分子建模:

[0600] 对具有目标性质的化合物的分子结构和 / 或对待抑制靶分子即 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 EF-1delta 的分子结构的知识为人们构建测试剂文库提供了便利。预筛选适于进一步评估的受试作用剂的方法之一,是对受试作用剂与其靶标的相互作用进行计算机建模。

[0601] 计算机建模技术为针对选定分子的三维原子结构的可视化以及会与该分子相互作用的新化合物的合理设计提供了可能。三维构建典型地依赖于从选定分子的 x-射线晶体分析或 NMR 成像而来的数据。分子动力学需要力场数据。计算机图形系统为预测新化合物如何连接靶分子,以及实验操作化合物和靶分子的结构以优化结合特异性提供了可能。为了预测当分子和化合物之一或二者发生细小改变时分子-化合物相互作用是什么样的,需要分子力学软件和计算密集型计算机,它们通常耦联着分子设计程序和用户之间的用户友好的、菜单驱动的用户界面。

[0602] 上文一般性描述的分子建模系统的一个实例包括 CHARMM 和 QUANTA 程序, Polygen Corporation, Waltham, Mass. CHARMM 执行能量最小化和分子动力学功能。QUANTA 执行构建、图形建模和分子结构分析。利用 QUANTA 可进行分子相互行为的互动性构建、修饰、和可视化分析。

[0603] 有多篇文献综述了与特异蛋白相互作用的药物的计算机建模,例如 Rotivinen et al. Acta Pharmaceutica Fennica 1988,97 :159-66 ;Ripka, NewScientist 1988,54-8 ; McKinlay & Rossmann, Annu Rev Pharmacol Toxicol 1989,29 :111-22 ;Perry & Davies, Prog Clin Biol Res 1989,291 :189-93 ;Lewis & Dean, Proc R Soc Lond 1989,236 :125-40,141-62 ;以及综述关于核酸组分模型受体的 Askew et al., J Am Chem Soc 1989,111 :1082-90。

[0604] 其它可筛选并图形描述化学物质的计算机程序可以从例如 Mississauga, Ontario, Canada 的 BioDesign, Inc., Pasadena, Calif., Allelix, Inc 公司、Cambridge,

Ontario的Hypercube, Inc. 等公司获取。见例如DesJarlais et al., JMed Chem 1988, 31 : 722-9 ;Meng et al., J Computer Chem 1992, 13 :505-24 ;Meng et al., Proteins 1993, 17 :266-78 ;Shoichet et al., Science 1993, 259 :1445-50。

[0605] 一旦鉴定出推定的抑制剂,可使用组合化学技术基于鉴定出的推定抑制剂的化学结果构建任何数量的变体,如下所述。所得的推定抑制剂,或“测试剂”文库,可使用本发明的方法筛选,以鉴定治疗或预防肺癌的测试剂。

[0606] (ii) 组合化学合成:

[0607] 测试剂的组合文库可以作为合理药物设计程序——其涉及有关已知化合物中存在的核心结构的知识——的一部分来制备。这种策略使得文库可以保持合理的规模,或者,可通过简单地合成构成文库的分子家族的所有排列,构建简单的、特别短的、聚合的分子文库。后一种方法的一个实例是全部由长度为6个氨基酸组成的肽文库。这种肽文库包含所有6氨基酸序列组合。这种类型的文库称作线性组合化学文库。

[0608] 组合化学文库的制备是本领域技术人员所熟知的,可以通过化学或生物合成来产生。组合化学文库包括,但不仅限于,肽文库(见例如美国专利5,010,175 ;Furka, Int J Pept Prot Res 1991, 37 :487-93 ;Houghten et al., Nature 1991, 354 :84-6)。也可以使用其它用于产生化学多样性文库的化学。这些化学包括,但不仅限于,肽(例如PCT公布WO 91/19735),被编码的肽(例如WO 93/20242),随机生物寡聚体(例如WO 92/00091),苯并二氮卓(benzodiazepines)(例如美国专利5,288,514), diversomer 如乙内酰脲、苯并二氮卓和二肽(DeWitt et al., Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90 :6909-13),插烯化(vinylogous)多肽(Hagihara et al., J Amer Chem Soc 1992, 114 :6568),具有葡萄糖骨架(scaffolding)的非肽类肽模拟物(Hirschmann et al., J Amer Chem Soc 1992, 114 :9217-8),小化合物文库的模拟物有机合成(analogous organicsynthesis)(Chen et al., J. Amer Chem Soc 1994, 116 :2661),寡聚氨基甲酸盐(Cho et al., Science 1993, 261 :1303),和/或肽酰磷酸酯(peptidylphosphonates)(Campbell et al., J Org Chem 1994, 59 :658),核酸文库(见Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology 1995 supplement ;Sambrook et al., Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA),肽核酸文库(见例如美国专利5,539,083),抗体文库(见例如Vaughan et al., Nature Biotechnology 1996, 14(3) :309-14 和 PCT/US96/10287),碳水化合物文库(见例如Liang et al., Science 1996, 274 :1520-22 ;美国专利5,593,853),和有机小分子文库(见例如苯并二氮卓, Gordon EM. Curr Opin Biotechnol. 1995 Dec 1 ;6(6) :624-31 ;类异戊二烯(isoprenoids),美国专利5,569,588 ;噻唑烷酮(thiazolidinones)和偏硫杂氮杂环己烷(metathiazanone),美国专利5,549,974 ;吡咯烷(pyrrolidines),美国专利5,525,735 和 5,519,134 ;吗啉代化合物,美国专利5,506,337 ;苯并二氮卓,5,288,514 ;等)。

[0609] (iii) 噬菌体展示:

[0610] 另一种手段是使用重组噬菌体来产生文库。使用“噬菌体方法”(Scott & Smith, Science 1990, 249 :386-90 ;Cwirla et al., Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87 :6378-82 ;Devlin et al., Science 1990, 249 :404-6),可以构建非常大的文库(例如106-108个化学实体)。再一种手段主要使用化学方法,其实例包括Geysen方法(Geysen et al., Molecular

Immunology 1986,23 :709-15 ;Geysenet al. , J Immunologic Method 1987,102 :259-74) 和 Fodor 等的方法 (Science1991,251 :767-73)。Furka 等 (14th International Congress of Biochemistry 1988,Volume#5,Abstract FR :013 ;Furka,Int J Peptide Protein Res 1991,37 :487-93), Houghten(美国专利 4,631,211) 和 Rutter 等 (美国专利 5,010,175) 记载了产生肽混合物的方法,可以将这些肽作为激动剂或拮抗剂加以测试。

[0611] 用于制备组合文库的设备是可商购的 (见例如 357MPS,390MPS,Advanced Chem Tech,Louisville KY,Symphony,Rainin,Woburn,MA,433AApplied Biosystems,Foster City,CA,9050Plus,Millipore,Bedford,MA)。此外,有多种组合文库本身也是商业可得的 (见例如 ComGenex,Princeton,N.J.,Tripos,Inc.,St.Louis,MO,3D Pharmaceuticals,Exton,PA,Martek Biosciences,Columbia,MD,等等)。

[0612] EBI3,DLX5,NPTX1,CDKN3 和 / 或 EF-1delta 结合化合物的筛选 :

[0613] 在本发明中,在肺癌中检测出 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 EF-1delta 的过表达,虽然它们在正常器官中无表达 (图 1、5、7、16 与 19)。因此,使用 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因,基因编码的蛋白,本发明通过了筛选结合 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 化合物的方法。由于肺癌中 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 EF-1delta 的表达,与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 结合的化合物期待可阻抑肺癌细胞的增殖,并因此对治疗或预防肺癌是有用的。因此,本发明亦提供了筛选阻抑肺癌细胞增殖的化合物的方法,以及使用 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽筛选治疗或预防肺癌的化合物的方法。具体而言,该筛选方法的一个实施方案包括以下步骤 :

[0614] (a) 将测试化合物与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的多核苷酸所编码的多肽接触 ;

[0615] (b) 检测所述多肽与所述测试化合物之间的结合活性 ;和

[0616] (c) 选择结合所述多肽的测试化合物。

[0617] 本发明所述方法将在下面更加详细的加以描述。

[0618] 需用于筛选的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽可为重组多肽,或者是来自自然界的蛋白质,或其部分肽。与测试化合物接触的多肽可以是,例如,纯化的多肽、可溶蛋白质、与载体结合的形式、或者与其它多肽融合的融合蛋白。

[0619] 作为使用 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽来筛选蛋白质,例如与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽结合的蛋白质的方法,可使用本领域技术人员众所周知的方法。上述筛选可通过,例如,免疫沉淀方法,尤其是如下述的方式进行。在宿主 (例如,动物) 细胞等中通过将下述基因插入外源基因表达载体,例如 pSV2neo、pcDNA1、pcDNA3.1、pCAGGS 与 pCD8 来表达编码 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽的基因。

[0620] 为此表达所用的启动子可为任何通常使用的启动子,包括,例如,SV40 早期启动子 (Rigby in Williamson(ed.), Genetic Engineering, vol. 3. Academic Press, London, 83-141(1982))、EF-alpha 启动子 (Kim et al., Gene 91 :217-23(1990))、CAG 启动子 (Niwa et al., Gene 108 :193(1991))、RSV LTR 启动子 (Cullen, Methods in Enzymology 152 : 684-704(1987))、SR alpha 启动子 (Takebe et al., Mol Cell Biol 8 :466(1988))、CMV 立即早期启动子 (Seed and Aruffo, Proc Natl Acad Sci USA 84 :3365-9(1987))、SV40 晚

期启动子 (Gheysen and Fiers, *J Mol Appl Genet* 1:385-94(1982))、腺病毒晚期启动子 (Kaufman et al., *Mol Cell Biol* 9:946(1989))、HSV TK 启动子等等。

[0621] 将所述导入宿主细胞以表达外源基因可根据任何方法实施,例如电穿孔方法 ((Chu et al., *Nucleic Acids Res* 15:1311-26(1987))、磷酸钙方法 (Chen and Okayama, *Mol Cell Biol* 7:2745-52(1987))、DEAE 葡聚糖方法 (Lopata et al., *Nucleic Acids Res* 12:5707-17(1984); Sussman and Milman, *Mol Cell Biol* 4:1641-3(1984))、Lipofectin 方法 (Derijard B., *Cell* 76:1025-37(1994); Lamb et al., *Nature Genetics* 5:22-30(1993); Rabindran et al., *Science* 259:230-4(1993)) 等等。

[0622] 对于由 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因编码的多肽,可以把特异性已知的单克隆抗体的识别位点 (表位) 导入该多肽的 N 或 C 端,从而将该多肽表达为包含该表位的融合蛋白。可以使用商品化的表位 - 抗体系统 (*Experimental Medicine* 13:85-90(1995))。可商购的载体能够利用其多克隆位点表达与例如 β -半乳糖苷酶、麦芽糖结合蛋白、谷胱甘肽 S 转移酶和绿色荧光蛋白 (GFP) 形成的融合蛋白。另外,也可以使用如下的融合蛋白,其通过导入仅由数个到十余个 (a dozen) 氨基酸构成的小型表位加以制备,使融合不会改变 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽的性质。可以使用例如多组氨酸 (His- 标签)、流感凝集素 HA、人 c-myc、FLAG、水泡性口炎病毒糖蛋白 (VSV-GP)、T7 基因 10 蛋白 (T7- 标签)、人单纯疱疹病毒糖蛋白 (HSV- 标签)、E- 标签 (多克隆噬菌体上的表位) 等表位,和识别它们的单克隆抗体作为筛选与 PKIB 或 NAALADL2 多肽结合的蛋白质的表位 - 抗体系统 (*Experimental Medicine* 13:85-90(1995))

[0623] 在免疫沉淀中,将这些抗体添加到用合适去垢剂制备的细胞裂解物内形成免疫复合物。免疫复合物由 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽、具有与该多肽结合能力的多肽、和抗体组成。除了使用针对上述表位的抗体之外,还可以使用针对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽的抗体进行免疫沉淀,这样的抗体的制备如下文所述。免疫复合物可以被沉淀,例如当抗体是小鼠 IgG 抗体时,可以通过蛋白 A sepharose 或蛋白 G sepharose 将其沉淀。如果将由 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因编码的多肽制备成与表位 (例如 GST) 的融合蛋白,则可以使用特异结合这些表位的底物,例如谷胱甘肽 -sepharose 4B,按照与使用针对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的抗体的相同的方式来形成免疫复合物。

[0624] 可遵循或根据,例如,文献中的方法来实施免疫沉淀 (Harlow and Lane, *Antibodies*, 511-52, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York(1988))。

[0625] 普遍使用 SDS-PAGE 分析经免疫沉淀的蛋白,使用合适浓度的凝胶,可以利用结合蛋白的分子量来分析该蛋白。由于与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽结合的蛋白难以通过考马斯兰染色或银染色等普通染色方法检测到,可以通过如下的方法提高蛋白的检测灵敏度:在含有放射性同位素 ^{35}S - 甲硫氨酸或 ^{35}S - 半胱氨酸的培养基中培养细胞,标记细胞中的蛋白,并检测该蛋白。当蛋白的分子量已知时,可以直接从 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上纯化出靶蛋白并测定其序列。

[0626] 作为利用 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽来筛选结合这些多肽的蛋白的方法,可以使用例如 West-Western 印迹分析法 (Skolnik et al., *Cell* 65:83-90(1991))。具体地,与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽结合的蛋白可

以通过如下方法获得,从预期表达 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽的培养细胞 (例如 LC176、LC319、A549、NCI-H23、NCI-H226、NCI-H522、PC3、PC9、PC14、SK-LU-1、EBC-1、RERF-LC-AI、SK-MES-1、SW900 与 SW1573) 利用噬菌体载体 (例如 ZAP) 制备 cDNA 文库,在 LB 琼脂糖上表达蛋白,将表达出的蛋白固定在膜上,使纯化并且标记的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽与上述膜反应,并依照标记来检测表达与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽结合的蛋白的噬菌斑。本发明的多肽可以利用生物素与抗生物素蛋白间的结合,或者利用特异结合 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽或与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽融合的肽或多肽 (例如 GST) 的抗体,来进行标记。也可以使用利用放射性同位素或荧光等的方法。

[0627] 或者,在本发明筛选方法的另一个实施方案中,可以使用利用细胞的双杂交系统 (“MATCHMAKER Two-Hybrid system”, “Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit”, “MATCHMAKER one-Hybrid system” (Clontech); “HybriZAP Two-Hybrid Vector System” (Stratagene); 参考文献见 “Dalton and Treisman, Cell 68 :597-612(1992)”, “Fields and Sternglanz, Trends Genet 10 :286-92(1994)”)。

[0628] 在双杂交系统中,例如,使本发明的多肽与 SRF 结合区或 GAL4 结合区融合,并在酵母细胞中表达。从预期表达与本发明多肽结合的蛋白的细胞制备 cDNA 文库,从而使该文库在被表达时与 VP16 或 GAL4 转录激活区融合。然后,将 cDNA 文库导入到上述酵母细胞中,并从检测到的阳性克隆 (当酵母细胞表达可与本发明多肽结合的蛋白时,两者的结合可激活报告基因,使阳性克隆可检测) 分离源自该文库的 cDNA。通过将上面分离的 cDNA 导入到大肠杆菌中并表达该蛋白,可制备由该 cDNA 编码的蛋白。作为报告基因,除了 HIS3 基因之外,还可以使用例如 Ade2 基因、lacZ 基因、CAT 基因、萤光素酶基因等。

[0629] 也可以用亲和色谱来筛选与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因编码的多肽结合的化合物。例如,可以把本发明多肽固定在亲和柱的载体上,而将含有能够结合本发明多肽的蛋白的测试化合物施加到该柱上。这里的测试化合物可以是例如细胞提取物、细胞裂解物等。在加载测试化合物之后,冲洗柱子,从而可以制备得到结合于本发明多肽的化合物。当测试化合物是蛋白质时,对所得蛋白质的氨基酸序列进行分析,根据该序列合成寡 DNA,并用该寡 DNA 作为探针筛选 cDNA 文库,从而获得编码该蛋白的 DNA。

[0630] 利用表面等离子体共振现象的生物传感器可以在本发明中用作检测或定量结合化合物的装置。当使用这种生物传感器时,可以仅使用微量并且没有标记的多肽 (例如 BIAcore, Pharmacia),以表面等离子体共振信号的形式对本发明多肽与测试化合物间的相互作用进行实时的观察。因此,使用生物传感器,例如 BIAcore,人们就有可能对本发明多肽与测试化合物间的结合进行评估。

[0631] 用于筛选当固定的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽暴露于合成化合物或天然底物文库或随机噬菌体多肽展示文库时发生结合的分子的方法,以及使用基于高通量的组合化学技术 (Wrighton et al., Science 273 :458-64(1996); Verdine, Nature 384 :11-13(1996); Hogan, Nature 384 :17-9(1996)), 不仅分离与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白结合的蛋白质,而且分离与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白结合化合物 (包括激动剂和拮抗剂) 的方法,是本领域技术人员众所周知的。

[0632] 阻抑 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 生物活性的化合物的筛选：

[0633] 在本发明中，EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 EF-1delta 蛋白具有促进肺癌细胞的细胞增殖（图 4D、6D、10A、10B、22A 与 22B）、细胞侵袭活性（图 23A）、胞外分泌（图 1C 与 1D）、磷酸酶活性（图 21A）与 Akt 磷酸化（图 23D）的活性。使用这些生物活性，本发明提供了筛选可阻抑癌细胞增殖的化合物的方法，以及筛选用于治疗或预防肺癌的化合物的方法。因此，本发明提供了使用由 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因编码的多肽来筛选治疗或预防肺癌的化合物的方法，其包括下列步骤：

[0634] (a) 将测试化合物与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的多核苷酸编码的多肽接触；

[0635] (b) 检测 (a) 所述多肽的生物活性；

[0636] (c) 选择较之测试化合物不存在时，阻抑由 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因编码的多肽的生物活性的测试化合物。

[0637] 本发明所述方法将在下面更加详细的加以描述。

[0638] 任何多肽均可用于筛选，只要它们具有 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白的生物活性即可。例如，可以使用 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白，这样的生物活性包括 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白的细胞增殖活性。举例而言，可使用 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白，亦可使用与这些蛋白功能上等价的多肽。上述多肽可由细胞内源或外源地表达。

[0639] 通过本筛选分离的化合物是 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 基因编码多肽的拮抗剂的候选物。术语“拮抗剂”是指可以通过结合多肽而抑制多肽功能的分子。所述术语还指可降低或抑制编码 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的基因的表达的分子。而且，通过本筛选分离的化合物是如下化合物的候选物，所述化合物抑制 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽与分子（包括 DNA 和蛋白）的体内相互作用。

[0640] 当本方法中要检测的生物活性是细胞增殖时，可以通过例如如下方法进行检测：制备表达 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽的细胞，在测试化合物的存在下培养细胞，确定细胞增殖速度，测量细胞周期等，以及通过测量集落形成活性，例如图 4D、6D、10A、10B、22A 与 22B 所示。选择这样的化合物作为治疗或预防肺癌的候选化合物：较之未受所述化合物处理的细胞，其降低表达 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 多肽的细胞的增殖速度的，而较之表达很少或没有上述多肽表达的细胞，其保持该增殖速度。

[0641] 当本发明所述方法所需检测的生物活性是细胞侵袭活性时，其可通过下述方法来检测，例如，制备表达 CDKN3 多肽的细胞，通过基质胶（matrigel）侵袭分析，确定侵袭性细胞的数量，例如，示于图 23A。选择这样的化合物作为治疗或预防肺癌的候选化合物：较之未受所述化合物处理的细胞，其减少表达 CDKN3 多肽的侵袭性细胞量，而较之表达很少或没有 CDKN3 多肽表达的细胞，其保持该量。

[0642] 当本发明所述方法所需检测的生物活性是胞外分泌时，其可通过下述方法来检测，例如，制备表达 EBI3 或 NPTX1 多肽的细胞，将其在测试化合物存在下培养，用 ELISA 测量确定那些多肽在培养基中分泌蛋白的量，例如，示于图 1C 与 7D。选择这样的化合物作为治疗或预防肺癌的候选化合物：较之未受所述化合物处理的细胞，其减少表达 EBI3 或 NPTX1 多肽的细胞分泌蛋白量，而较之表达很少或没有 EBI3 或 NPTX1 多肽表达的细胞，其保

持该量。

[0643] 当本发明所述方法所需检测的生物活性是磷酸酶活性时,其可通过下述方法来检测,例如,在测试化合物存在下将 CDKN3 多肽或其功能性等价物与 EF-1delta 多肽或其功能性等价物接触,并确定 EF-1delta 多肽的磷酸化,例如,示于图 21A。选择这样的化合物作为治疗或预防肺癌的候选化合物:较之未受所述化合物处理的细胞,其减少 EF-1delta 多肽的磷酸化水平。在优选的方法中,检测 EF-1delta 多肽的磷酸化水平通过磷酸丝氨酸测量。

[0644] 当本发明方法所需检测的生物活性是 Akt 磷酸化时,其可通过下述方法来检测,例如,制备表达 CDKN3 多肽的细胞,用 Western 印迹测量确定 Akt 的磷酸化水平,例如,示于图 23D。选择这样的化合物作为治疗或预防肺癌的候选化合物:较之未受所述化合物处理的细胞,其在表达 CDKN3 多肽细胞中减少 Akt 的磷酸化水平,而较之表达很少或没有 CDKN3 多肽表达的细胞,其保持该量。

[0645] 举例而言,证实了在肺癌细胞中 EF-1delta 与 CDKN3 共表达,且在体内其很可能为 CDKN3 磷酸酶的生理学底物,提示 CDKN3 可能在肺肿瘤中通过 EF-1delta 的去磷酸化而起促进生长的功能(图 20-21)。相应地,若化合物能通过抑制 CDKN3 功能而抑制 EF-1delta 去磷酸化,则其可望能阻抑肺癌细胞的增殖,并因此对肺癌,包括 NSCLC 或 SCLC 的治疗或预防有用。因此,本发明亦提供了筛选能阻抑肺癌细胞增殖的化合物的方法,以及筛选治疗或预防肺癌,包括 NSCLC 和 / 或 SCLC 的方法。

[0646] 更具体地,本方法包括下列步骤:

[0647] (a) 将候选化合物与过表达 CDKN3 的细胞接触;

[0648] (b) 测量 EF-1delta 的磷酸化水平;和

[0649] (c) 选择与对照相比降低去磷酸化的候选化合物。

[0650] 优选地,EF-1delta 的磷酸化和去磷酸化可以通过确定 EF-1delta 的分子量来检测。确定蛋白分子量的方法是众所周知的。举例而言,可用在下面实施例部分中描述的 Western 印迹分析,将磷酸化和去磷酸化分别作为分子量的增加和减少加以检测。此外,EF-1delta 的磷酸化水平亦可通过使用识别磷酸化 EF-1delta 抗体的免疫技术来评估。举例而言,识别 EF-1delta 上磷酸化丝氨酸的抗体,或泛磷酸特异性抗体可用于上述目的。在优选实施方案中,供比较的对照水平可为在候选化合物不存在时在与测试条件(有候选化合物存在)相同的条件下检测到的 EF-1delta 磷酸化水平。

[0651] 或者,在本发明中,揭示了 Akt 磷酸化(Ser473)受 CDKN3 过表达增强(图 23)。相应地,若化合物能通过抑制 CDKN3 功能减少 Akt 磷酸化,则其可望会阻抑肺癌细胞增殖,并因此对治疗或预防肺癌,包括 NSCLC 和 / 或 SCLC 是有用。因此,本发明亦提供了筛选可阻抑肺癌细胞增殖的化合物的方法,以及筛选用于治疗或预防肺癌,包括 NSCLC 和 / 或 SCLC,的化合物的方法。

[0652] 更具体地,本方法包括下列步骤:

[0653] (a) 将候选化合物与过表达 CDKN3 的细胞接触;

[0654] (b) 测量 Akt Ser473 的磷酸化;和

[0655] (c) 选择与对照相比,降低了该磷酸化的候选化合物。

[0656] 在优选实施方案中,通过本发明所述方法选出的测试化合物可作为候选物进行进一步的筛选,以评估其治疗效果。

[0657] 优选的是检测 Akt 在 SEQ ID NO :59 (NP_001014431) 核苷酸序列所编码的 SEQ ID NO :60 氨基酸序列的 473 丝氨酸残基处的磷酸化水平。可使用本领域技术人员众所周知的 Akt 磷酸化检测方法。举例而言,可使用在下面实施例部分描述的 Western 印迹分析。

[0658] 在本发明的语境下,适于 CDKN3 对 Akt 磷酸化的条件可通过将 Akt 与 CDKN3 在磷酸供体,例如 ATP 存在下一同温育来提供。适于 CDKN3 对 Akt 磷酸化的条件亦包括培养表达 CDKN3 与 Akt 的细胞。举例而言,所述细胞可以是携带包含编码所述多肽的多核苷酸的表达载体的细胞。在温育后,可用识别磷酸化 Akt 的抗体检测 Akt 的磷酸化水平。在优选实施方案中,供比较的对照水平可为在候选化合物不存在时,在与测试条件(候选化合物存在)相同的条件下检测到的 Akt 磷酸化水平。

[0659] 在检测到磷酸化 Akt 之前,可将 Akt 与其它要素,或表达 Akt 细胞的细胞裂解液分离。举例而言,可使用凝胶电泳来将 Akt 从其余组分中分离。此外,可通过将 Akt 与具有抗 Akt 抗体的载体接触的方法捕获 Akt。当使用标记的磷酸供体时,Akt 的磷酸化水平可通过跟踪该标记物来检测。举例而言,当使用放射性标记 ATP(如 ^{32}p -ATP) 作为磷酸供体时,分离的 Akt 的放射性与该 Akt 的磷酸化水平相关。或者,可利用能从未磷酸化的 Akt 中特异性识别磷酸化 Akt 的抗体来检测磷酸化 Akt。优选地,所述抗体识别磷酸化 Akt 的 Ser-473 残基。

[0660] 制备与给定蛋白功能上等价的多肽的方法对本领域技术人员是众所周知的,且包括将突变导入所述蛋白质的已知方法。一般而言,已知在蛋白质中修饰一个或更多氨基酸并不影响该蛋白的功能 (Mark DF et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81 :5662-6 ; Zoller MJ & Smith M, Nucleic Acids Res 1982, 10 :6487-500 ; Wang A et al., Science 1984, 224 :1431-3 ; Dalbadie-McFarland G et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79 : 6409-13)。事实上,已知变异或修饰的蛋白,具有氨基酸序列经对一定氨基酸序列替换、缺失、插入和 / 或添加一个或更多氨基酸残基修饰的蛋白,仍保持原来的生物活性 (Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 81 :5662-6 (1984) ; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 10 :6487-500 (1982) ; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 79 : 6409-13 (1982))。相应的,本领域的技术人员会认识到,对氨基酸序列的个别添加、缺失、插入或替换,只改变单一氨基酸或一小部分氨基酸的,或那些被认为是“保守修饰”,其中对蛋白的改变导致产生具有类似功能的蛋白质的,是本发明语境下所考虑的内容。

[0661] 举例而言,本领域的技术人员可通过下述方法制备与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 和 / 或 Akt 功能上等价的多肽:在上述任一蛋白的氨基酸序列中,使用,例如定点诱变 (Hashimoto-Gotoh et al., Gene 152 :271-5 (1995) ; Zoller and Smith, Methods Enzymol 100 :468-500 (1983) ; Kramer et al., Nucleic Acids Res. 12 :9441-56 (1984) ; Kramer and Fritz, Methods Enzymol 154 :350-67 (1987) ; Kunkel, Proc Natl Acad Sci USA 82 :488-92 (1985) ; Kunkel TA, et al., Methods Enzymol. 1991 ; 204 :125-39.) 导入合适的突变。本发明的所述多肽包括那些具有 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 和 / 或 Akt 氨基酸序列中突变一个或更多氨基酸而成的氨基酸的多肽,只要所得的突变多肽分别与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 和 / 或 Akt 在功能上是等价的。只要保持所述蛋白的生物活性,并不特别限定氨基酸突变数。然而,一般优选改变氨基酸序列的 5% 或更少。相应地,在优选实施方案中,在上述突变体中需突变的氨基酸数一般为 30 个氨基酸或

更少,通常为 20 个氨基酸或更少,更通常为 10 个氨基酸或更少,优选 5-6 个氨基酸或更少,且更优选 1-3 个氨基酸。

[0662] 需突变的氨基酸残基优选变异为保留其氨基酸侧链性质的不同氨基酸(该过程称为保守氨基酸替换)。氨基酸侧链性质的例子包括疏水氨基酸(A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、亲水氨基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)及其具有下列官能团或共通特征的侧链:脂族侧链(G, A, V, L, I, P);含有羟基基团的侧链(S, T, Y);含有硫原子的侧链(C, M);含有羧基和酰胺基的侧链(D, N, E, Q);含有碱性基团的侧链(R, K, H);以及含有芳香族的侧链(H, F, Y, W)。注意,括号中的字母表示氨基酸的单字母编码。进一步,提供功能上相似氨基酸的保守性替换表在本领域是众所周知的。举例而言,下述 8 组均包含彼此为保守性替换的氨基酸:

[0663] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0664] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0665] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0666] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0667] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0668] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0669] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);

[0670] 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见,例如 Creighton, Proteins 1984)。

[0671] 上述保守性修饰多肽包含于当前的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 蛋白中。然而,本发明并不仅限于此,所述 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 蛋白包括非保守性修饰,只要保留原蛋白的结合活性即可。进一步,修饰的蛋白并不排除多态性变体、种间同源物以及这些蛋白等位基因编码的蛋白。

[0672] 一个或更多氨基酸残基添加到 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 氨基酸序列上的多肽的例子是分别含有 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 的融合蛋白。相应的,融合蛋白,意即 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 以及其它肽或蛋白的融合,包含于本发明中。融合蛋白可通过本领域技术人员众所周知的方法制成,例如通过将编码 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 的 DNA 与编码其它肽或蛋白的 DNA 连接,使阅读框匹配,将融合 DNA 插入表达载体并将其在宿主中表达。对与本发明所述蛋白融合的肽或蛋白并未限制。

[0673] 可用于与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 融合的多肽的已知肽包括,例如,FLAG(Hopp TP et al., Biotechnology 1988 6:1204-10)、含六个 His(组氨酸)残基的 6xHis、10xHis、流感凝集素(A)、人类 c-myc 片段、VSP-GP 片段、p18HIV 片段、T7- 标签、HSV- 标签、E- 标签、SV40T 抗原片段、lck 标签、alpha- 微管蛋白片段、B- 标签、蛋白 C 片段及类似物。

[0674] 融合蛋白可通过将可市购的编码上述融合肽或蛋白质的 DNA 与编码 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 蛋白的 DNA 融合,并表达制备的融合 DNA 的方法来制备。

[0675] 另外可选的分离功能上等价的多肽本领域方法涉及,例如,杂交技术(Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9. 47-9. 58, Cold Spring Harbor Lab. Press(1989))。本领域技术人员可方便的分离与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 具有高同源性

的 DNA,并自分离出的 DNA 分离出与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 功能上等价的肽。本发明的所述蛋白包括那些由与编码 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 的 DNA 序列的全部或部分杂交的 DNA 编码,并与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 功能上等价的蛋白。这些多肽包括对应于源自人类的哺乳动物同源物(例如,由猴、大鼠、兔和牛基因编码的多肽)。从动物中分离与编码 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 的 DNA 高度同源的 cDNA 时,特别优选使用前列腺癌组织。

[0676] 本领域的技术人员可选择为分离编码人类 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 功能等价物的 DNA 的杂交手段。短语“严格(杂交)条件”指这样的条件,在该条件下,核酸分子将与其靶序列杂交(通常在核酸复杂混合物中),而没有与其它序列的可检测的杂交。严格条件取决于序列,且在不同情况下有所不同。较长的序列在更高温度下特异性杂交。对于核酸杂交一般性的指导可见于 Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993)。在本发明的语境中,合适的杂交条件可由本领域的技术人员常规性的选择。

[0677] 一般而言,严格条件选择在比特定序列在给定离子强度与 pH 下的热解链温度 (T_m) 大约低 5-10 摄氏度处。所述 T_m 是这样的温度(在给定的离子强度、pH 与核酸浓度下),在该温度下达到平衡时与靶互补的探针中的 50% 与靶序列杂交(因所述靶序列是过量的,在 T_m , 50% 的探针在平衡时被占据)。严格条件亦可通过添加诸如甲酰胺等的去稳定剂获得。对选择的或特定的杂交,阳性信号需至少为背景的两倍,优选背景杂交的 10 倍。

[0678] 严格杂交条件的例子包括下列: 50% 甲酰胺、5xSSC 与 1% SDS, 在 42°C 下温育; 或 5xSSC、1% SDS, 在 65°C 下温育,并用 0.2xSSC 与 0.1% SDS 在 50°C 下温育。合适的杂交添加亦可包括在 68 摄氏度用“Rapid-hyb buffer”(Amersham LIFE SCIENCE) 进行 30 分钟或更长的预杂交,添加标记探针,并在 68 摄氏度下温育一小时或更长。

[0679] 例如,漂洗步骤可于低严格度条件下进行。因此,低严格度条件的例子可包括 42°C、2xSSC 与 0.1% SDS, 或者优选 50°C、2xSSC 与 0.1% SDS。或者,高严格度条件的例子可包括在室温下用 2xSSC 与 0.1% SDS 漂洗三次各 20 分钟,然后在 1xSSC 与 0.1% SDS 在 37 摄氏度下漂洗 3 次各 20 分钟,并用 1xSSC 与 0.1% SDS 在 50 摄氏度下漂洗两次各 20 分钟。然而,数种因素,例如温度与盐浓度,可影响杂交的严格度,且本领域技术人员可选择合适的因素以达到所需的严格度。

[0680] 所述功能等价物多肽优选具有和本文公开的天然 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 序列至少 80% 同源性(也称序列同一性)的氨基酸序列,更优选至少大约 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 特异性。多肽的同源性可通过遵循“Wilbur and Lipman, *Proc Natl Acad Sci USA* 80:726-30(1983)”中的算法确定。在其它实施方案中,所述功能等价物多肽可由与编码该功能上等价的肽的多核苷酸在严格条件(如下文定义)下杂交的多核苷酸所编码。

[0681] 作为杂交的替代手段,可利用基因扩增技术,例如,多聚酶链式反应(PCR)方法,使用基于 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 序列信息合成的引物来分离编码功能上与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 等价的多肽。

[0682] 在本发明语境中有用的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 功能等价物可

具有不同的氨基酸序列、分子量、等电点、糖链的存在与否或其形式，取决于用于产生它的细胞或宿主或使用的纯化方法。无论如何，只要其为 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3、EF-1delta 或 Akt 多肽中任一种的功能等价物，即处于本发明的范围内。

[0683] “阻抑生物活性”在此定义为较之不存在所述化合物时，对 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 生物活性优选至少 10% 的阻抑，较优选至少 25%、50% 或 75% 的阻抑，且最优选 90% 的阻抑。

[0684] 改变 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达的化合物的筛选：

[0685] 在本发明中，通过 siRNA 减少 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达导致癌细胞增殖的抑制（图 4D、6D、10A、10B、22A 与 22B）。因此，本发明提供了筛选抑制 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达的化合物的方法。抑制 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达的化合物可望能够阻抑肺癌细胞增殖，并因此对治疗或预防肺癌有用。因此，本发明亦提供了筛选阻抑肺癌细胞增殖的化合物的方法，以及筛选治疗或预防肺癌的化合物的方法。在本发明的语境下，上述筛选可包括，例如，下列步骤：

[0686] (a) 将候选化合物与表达 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的细胞接触；

[0687] (b) 选择与对照相比减少 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达水平的候选化合物。

[0688] 本发明的方法将在下面更加详细的加以描述。

[0689] 表达 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的细胞包括，例如，自肺癌建立的细胞系；这样的细胞可用于上述本发明的筛选（例如，A427, LC176, LC319, A549, NCI-H23, NCI-H1317, NCI-H1666, NCI-H1781, NCI-H226, NCI-H522, PC3, PC9, PC14, EBC01, LU61, NCI-H520, NCI-H1703, NCI-H2170, NCI-H647, LX1, DMS114, DMS273, SBC-3, SBC-5, SK-LU-1, EBC-1, RERF-LC-AI, SK-MES-1, SW900 与 SW1573）。可用本领域技术人员众所周知的方法，例如，RT-PCR、Northern 印迹分析、Western 印迹分析、免疫染色与流式细胞分析来估计表达水平。在此定义的“降低表达水平”优选为较之在所述化合物不存在时，至少使 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达降低 10%，较优选降低至少 25%、50% 或 75%，最优选降低 95% 的水平。在此使用的化合物包括化学化合物、双链核苷酸等等。在前面描述了双链核苷酸的制备。在筛选方法中，降低 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达水平的化合物可选择用来治疗或预防癌症的候选化合物。

[0690] 或者，本发明的所述筛选方法可包括下列步骤：

[0691] (a) 将候选化合物与导入了包含 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 转录调控区域与在该转录调控区域控制下表达的报道基因的载体的细胞接触；

[0692] (b) 测量所述报道基因的表达或活性；

[0693] (c) 选择降低所述报道基因表达或活性的候选化合物。

[0694] 合适的报道基因和宿主细胞在本领域是众所周知的。举例而言，报道基因为萤光素酶、绿色荧光蛋白 (GFP)、香菇珊瑚 (*Discosoma* sp.) 红色荧光蛋白 (DsRed)、氯霉素乙酰基转移酶 (CAT)、Laz 与 beta-葡萄糖醛酸糖苷酶 (GUS)，而宿主细胞为 COS7、HEK293、HeLa 等。所述筛选所需的报道构建体可通过将报道基因序列与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 转录调控区域连接来制备。本文所述的 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或

EF-1delta 转录调控区域是从起始密码子开始至少 500bp 上游的区域, 优选 1000bp, 较优选 5000 或 10000bp 上游。含有所述转录调控区域的核苷酸片段可从基因组文库中分离出来, 或可通过 PCR 扩增。所述筛选所需的报道构建体可通过将报道基因序列与这些基因中任一转录调控区域连接来制备。识别转录调控区域的方法, 以及其分析方法实验计划都是众所周知的 (Molecular Cloning third edition chapter 17, 2001, Cold Springs Harbor Laboratory Press)。

[0695] 用含有所述报道构建体的载体感染宿主细胞, 且用本领域众所周知的方法检测报道基因 (例如, 使用照度计 (luminometer)、吸收光谱仪、流式细胞仪等等)。在此定义的“降低表达或活性”优选较之在所述化合物不存在时, 报道基因的表达或活性优选地被降低至少 10%, 更优选地, 至少降低 25%、50% 或 75%, 最优选地, 降低 95%。

[0696] 降低 CDKN3 与 VRS、EF-1alpha、EF-1beta、EF-1gamma 或 EF-1delta 之间或 NPTX1 与 NPTXR 之间结合的化合物的筛选:

[0697] 在本发明中, CDKN3 (SEQ ID NO 5; GenBank 登录号: L27711) 与缬氨酰-tRNA 合成酶 (VRS) (SEQ ID NO 26 或 28; GenBank 登录号: NM_006295 或 BC012808) 或 EF-1beta (SEQ ID NO 30; GenBank 登录号: NM_001959) 或 EF-1gamma (SEQ ID NO 7; GenBank 登录号: BC009907) 或 EF-1delta (SEQ ID NO 32; GenBank 登录号: BC009865) 之间的相互作用通过免疫沉淀 (图 18A) 显示, 或 NPTX1 与 NPTXR 的相互作用在图 15B 中显示。另外, CDKN3 与对应于 EF-1gamma (SEQ ID NO: 48) 72 到 160 氨基酸的区域结合 (图 21B 与 21C)。此外, CDKN3 使 EF-1delta 去磷酸化 (图 20D 与 21A)。因此, 本发明提供了筛选抑制 CDKN3 与其相互作用对象之间的结合, 或 NPTX1 与 NPTXR 之间的结合的化合物方法, 所述 CDKN3 的相互作用对象选自 VRS、EF-1alpha、EF-1beta、EF-1gamma 与 EF-1delta。抑制 CDKN3 与这些相互作用对象或 NPTX1 与 NPTXR 之间结合的化合物可望会阻抑肺癌细胞增殖, 且因此对治疗或预防肺癌是有用的。因此, 本发明亦提供了筛选用于阻抑肺癌细胞增殖的化合物的方法, 以及筛选用于治疗或预防肺癌的化合物的方法。

[0698] 更具体地, 本发明包括以下步骤:

[0699] (a) 使 CDKN3 多肽或其功能等价物与相互作用对象或其功能等价物在测试化合物存在的情况下接触。所述相互作用对象选自 VRS、EF-1alpha、EF-1beta、EF-1gamma 与 EF-1delta;

[0700] (b) 检测所述多肽间的结合;

[0701] (c) 选择抑制所述多肽间结合的化合物;

[0702] 或者

[0703] (a) 使 NPTX1 多肽或其功能等价物与 NPTXR 多肽或其功能等价物在测试化合物存在的情况下接触;

[0704] (b) 检测所述多肽间的结合;

[0705] (c) 选择抑制所述多肽间结合的化合物;

[0706] 在本发明中, “相互作用对象”指涉及 CDKN3 生物活性的物质或化合物。相应地, 例如, 当 CDKN3 需要某多肽以表达其功能时, 该多肽可为“相互作用对象”。一般而言, CDKN3 与其相互作用对象相互结合以维持功能。在一些实施例中, 相互作用对象是多肽。本文揭示 CDKN3 与 VRS 多肽、EF-1alpha 多肽、EF-1beta 多肽、EF-1gamma 多肽、EF-1delta 多肽相

互作用。因此,这些分子及其功能等价物为优选的相互作用对象。在此,例如,相互作用对象的“功能等价物”包括具有与相互作用对象等价的生物活性的多肽。

[0707] 即,任何保留上述相互作用对象的至少一种生物活性的多肽均可在本发明中用作上述的功能等价物。举例而言,所述相互作用对象的功能等价物保留促进细胞增殖的活性。另外,相互作用对象的生物活性包括与 CDKN3 的结合活性和 / 或 CDKN3 介导的细胞迁移或增殖。相互作用对象的功能等价物包括在这些相互作用对象蛋白的天然氨基酸序列中替换、缺失、添加或插入了一个或多个氨基酸的那些。

[0708] 在此使用的短语“EF-1gamma 多肽的功能等价物”指包含 CDKN3 结合域氨基酸序列 (SEQ ID NO :48) 的多肽。类似地,术语“CDKN3 多肽的功能等价物”指包含 VRS 或 EF-1beta 或 EF-1alpha 或 EF-1gamma 或 EF-1delta 结合域的氨基酸序列的多肽,而术语“VRS 或 EF-1beta 或 EF-1gamma 的功能等价物”指包含 CDKN3 结合域氨基酸序列的多肽。

[0709] 本发明所述方法将在下面更加详细的加以描述。

[0710] 许多本领域技术人员众所周知的方法可用作筛选降低 CDKN3 与 VRS、EF-1beta、EF-1gamma 或 EF-1delta 之间或 NPTX1 与 NPTXR 之间结合的化合物的方法。上述筛选可作为体外测定系统来实施。更具体而言,首先,将 CDKN3 或 NPTX1 连接在支持物上,将 VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta 或 NPTXR 与测试化合物一起添加。然后,温育并漂洗所述混合物,并检测和 / 或测量与支持物连接的 VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta 多肽或 NPTXR。有希望的候选化合物可减少 VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta 多肽或 NPTXR 的检出量。相反,可将 VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta 多肽或 NPTXR 与支持物连接而添加 CDKN3 多肽或 NPTX1。这里,CDKN3 或 NPTX1,以及 VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta 或 NPTXR 多肽不但可以作为天然蛋白,也可以作为由基因重组技术制备的重组蛋白加以制备。所述天然蛋白可通过,例如,亲和层析来制备。另一方面,所述重组蛋白可通过培养经编码 CDKN3、VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta、NPTX1 或 NPTXR 的 DNA 转化的细胞以表达其中的蛋白,并随后将其回收的方法来加以制备。

[0711] 可用于结合蛋白的支持物的例子包括不溶性多肽,例如琼脂糖、纤维素与葡聚糖;以及合成树脂,例如聚丙烯酰胺、聚苯乙烯与硅树脂;亦可优选使用自上述材料制备的可市购的珠子与板(例如,多孔板,生物传感器芯片等等)。当使用珠子时,可将其填充入柱中。此外,使用磁性珠子亦是本领域已知的,其使得方便地通过磁性分离与柱子连接的蛋白成为可能。

[0712] 蛋白与支持物的结合可根据常规方法进行,例如化学键合和物理吸附。此外,蛋白质可通过特异性识别该蛋白的抗体连接到支持物上。另外,蛋白与支持物的结合亦可利用抗生物素蛋白与生物素方法进行。蛋白之间的结合可在缓冲液中实施,所述缓冲液包括但不限于,例如,磷酸盐缓冲液和 Tris 缓冲液,只需所述缓冲液不抑制所述蛋白间的结合。

[0713] 在本发明中,利用表面等离子体共振现象的生物传感器可用作检测或定量结合蛋白的装置。当使用这种生物传感器时,蛋白间的相互作用可以作为表面等离子体共振信号得以实时地观察,仅使用微量的多肽,并且无需标记(例如 BIAcore, Pharmacia)。因此,使用生物传感器例如 BIAcore 来评估 CDKN3 与 VRS、EF-1beta、EF-1gamma 或 EF-1delta 之间或 NPTX1 与 NPTXR 之间的结合是有可能的。

[0714] 此外,可标记 CDKN3、VRS、EF-1beta、EF-1gamma、或 EF-1delta、NPTX1 或 NPTXR,

利用多肽的标记来检测或测量结合活性。具体地,预标记其中一个多肽,然后使标记的多肽在测试化合物的存在下与另一多肽接触,经过清洗后,根据标记检测或测量结合的多肽。可用于在本发明中标记蛋白的标记物质有例如放射性同位素(例如氘、¹⁴C、³²P、³³P、³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I)、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、β-半乳糖苷酶、β-葡萄糖苷酶)、荧光底物(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、若丹明)和生物素/抗生物素蛋白。当用放射性同位素标记蛋白时,可以借助液体闪烁进行检测或测量。或者,对于用酶标记的蛋白,可以添加酶的底物,使用吸收测定仪检测底物的变化,例如颜色的产生,来检测或测量。此外,当使用荧光底物作为标记时,用荧光光度计检测或测量结合蛋白。

[0715] 进一步,CDKN3 与 VRS、EF-1beta、EF-1gamma 或 EF-1delta 之间或 NPTX1 与 NPTXR 之间的结合亦可使用针对 CDKN3、VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta、NPTX1 或 NPTXR 的抗体来检测或测量。举例而言,在将与测试化合物一起固定化在支持物上的 CDKN3 多肽或 NPTX1 多肽与 VRS、EF-1beta、EF-1gamma 或 EF-1delta 多肽接触后,温育并漂洗该混合物,并可用针对 VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta 多肽或 NPTXR 多肽的抗体进行检测或测量。

[0716] 或者,可将 VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta 多肽或 NPTXR 多肽固定化在支持物上,并用针对 CDKN3 或 NPTX1 的抗体作为抗体。当在本发明筛选中使用抗体时,该抗体优选上述标记物中之一进行标记,并根据该标记物进行检测或测量。此外,所述针对 CDKN3、VRS、EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta、NPTX1 或 NPTXR 多肽的抗体可用作第一抗体,并用经标记物标记的第二抗体对其进行检测。进一步,与在本发明所述筛选中所述蛋白质结合的抗体可使用蛋白 G 或蛋白 A 柱检测或测量。

[0717] 此外,在本发明所述筛选方法的另一个实施例中,可使用利用细胞的双杂交系统(“MATCHMAKER Two-Hybrid system”,“MammalianMATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit”,“MATCHMAKER one-Hybrid system”(Clontech);“HybriZAP Two-Hybrid Vector System”(Stratagene);thereferences“Dalton and Treisman,Cell 68 :597-612(1992)”,“Fields andSternglanz,Trends Genet 10 :286-92(1994)”)。

[0718] 在双杂交系统中,例如,使 CDKN3 多肽或 NPTX1 多肽与 SRF 结合区或 GAL4 结合区融合,并在酵母细胞中表达。使能结合 CDKN3 多肽的 VRS、EF-1beta、EF-1gamma 或 EF-1delta 多肽与 VP16 或 GAL4 转录激活区融合,在测试化合物的存在下,也在酵母细胞中表达。或者,可以使 CDKN3 多肽或 NPTX1 多肽和 SRF 结合区或 GAL4 结合区融合,而使 VRS、EF-1beta、EF-1gamma 或 EF-1delta 多肽或 NPTXR 多肽与 VP16 或 GAL4 转录激活区融合。两者的结合可激活报告基因,使阳性克隆可检测。作为报告基因,除了 HIS3 基因之外,还可以使用例如 Ade2 基因、lacZ 基因、CAT 基因、萤光素酶基因等。

[0719] 此外,当使用 CDKN3 与 EF-1gamma 时,本发明所述筛选方法是利用抗磷酸-丝氨酸抗体检测 EF-1gamma 的磷酸化水平。

[0720] 治疗或预防肺癌的化合物的进一步筛选:

[0721] 本发明揭示:阻抑下列一个或更多事件,可减少肺癌,包括 NSCLC 和 SCLC 的细胞增殖:

[0722] -EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的表达;

[0723] -EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的生物活性;

[0724] -CDKN3 与 EF-1alpha、EF-1beta、EF-1gamma 和 / 或 EF-1delta 的相互作用。

[0725] 因此,通过筛选抑制其中至少一个事件的测试化合物,可识别出具有治疗或预防肺癌的潜力的候选化合物。这些候选化合物治疗或预防肺癌的潜力可通过二次和 / 或进一步筛选识别癌症治疗剂的方法来评估。

[0726] EF-1delta 突变体 :

[0727] 本文公开之蛋白质的显性失活突变体可用于治疗或预防癌症。举例而言,本发明提供了在受试者中施用具有显性失活作用的 EF-1delta 突变体,或编码这样的突变体的多核苷酸,以治疗或预防癌症的方法。所述 EF-1delta 突变体可包括含有 CDKN3 结合区域(例如,EF-1delta 蛋白的一部分,包括 EF-1delta 亮氨酸拉链的一部分)的氨基酸序列(参见图 20A)。所述 EF-1delta 突变体可具有 SEQ ID NO :61 的氨基酸序列,其对应于 SEQ ID NO :8 的 90-108 位置。

[0728] 本发明亦提供了包含 ENQSLRGVVQELQQAI SKL (SEQ ID NO :61) 序列的多肽 ;或与该多肽功能上等价的多肽的氨基酸序列,其中所述多肽缺乏由 SEQ ID NO :8 组成的多肽的生物学功能。在一个优选的实施方案中,要缺失的生物学功能是促进肺癌细胞的细胞增殖的活性。本发明多肽的长度可小于全长 EF-1delta (SEQ ID NO :8 ;281 个残基)。一般而言,本发明的多肽可具有少于 200 个氨基酸残基、优选小于 100 个氨基酸残基、更优选 10-50,抑或 8-30 个氨基酸残基。

[0729] 本发明所述多肽包括修饰多肽。在本发明中,“修饰的”指,与其它物质结合。相应的,在本发明中,本发明所述多肽可进一步包括其它物质,例如细胞膜穿透性物质。其它物质包括有机化合物,例如肽、脂类、糖类以及各种天然存在或合成的多聚物。本发明所述多肽可具有任何修饰,只需所述多肽保留所期望的抑制 EF-1delta 与 CDKN3 结合的活性。在一些实施方案中,抑制性的多肽可直接与 EF-1delta 竞争与 CDKN3 的结合。修饰亦可为本发明所述多肽带来附加的功能。附加功能的例子包括可靶向性 (targetability)、可递送性 (deliverability) 以及稳定化作用。

[0730] 在一些优选实施方案中,所述 EF-1delta 突变体可与膜转导剂 (membrane transducing agent) 连接。许多肽序列具有能转位进入活细胞的特征,并可在本发明中用于此目的。上述膜转导剂(通常为肽)根据其被摄入活细胞中后,到达细胞质和 / 或核区室的能力来定义。从其可衍生出膜转导剂的蛋白的例子包括 HIV Tat 反式激活蛋白 1、2,果蝇转录因子 Antennapedia3。此外,使用了具有穿膜活性的非天然肽。这些肽通常为已知其膜相互作用特性,用来测试转位的小分子肽。已显示 K-成纤维细胞生长因子 (FGF) 分泌信号序列中的疏水区域,毒素蜂毒肽 (mastoparan) (Transportan) 13,与 Buforin II4(一种两栖类抗微生物肽)作为膜转导剂是有用的。关于可用于本发明的膜转导剂的综述参见 Joliot et al. Nature Cell Biology 6 :189-96 (2004)。

[0731] EF-1delta 突变体具有如下通式 :

[0732] [R]-[D],

[0733] 其中 [R] 是膜转导剂,而 [D] 是具有 SEQ ID NO :61 氨基酸序列的多肽。在所述通式中,[R] 可直接与 [D] 连接,或通过接头与 [D] 连接。具有多个功能基团的肽或化合物可用作接头。具体而言,氨基酸序列 -GGG- 可用作接头。此外,所述膜转导剂与所述具有 SEQ ID NO :61 氨基酸序列的多肽可与微粒表面结合。在本发明中,[R] 可与 [D] 的任意区域连

接。举例而言, [R] 可与 [D] 的 N 端或 C 端, 或与组成 [D] 的氨基酸侧链连接。进一步, 多个分子的 [R] 亦可与一个分子的 [D] 连接。在一些实施方案中, 多个分子的 [R] 可与 [D] 的不同位点连接。在另一个实施方案中, [D] 可被彼此连接的数个 [R] 所修饰。

[0734] 所述膜转导剂可选自下组:

[0735] [多聚精氨酸]; Matsushita, M. et al, J Neurosci. 21, 6000-7 (2003).

[0736] [Tat/RKKRRQRRR] (SEQ ID NO :63) Frankel, A. et al, Cell 55, 1189-93 (1988).

[0737] Green, M. & Loewenstein, P. M. Cell 55, 1179-88 (1988).

[0738] [Penetratin/RQIKIWFQNRRMKWKK] (SEQ ID NO :64)

[0739] Derossi, D. et al, J. Biol. Chem. 269, 10444-50 (1994).

[0740] [Buforin II/TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK] (SEQ ID NO :65)

[0741] Park, C. B. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50 (2000).

[0742] [Transportan/GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL] (SEQ ID NO :66)

[0743] Pooga, M. et al. FASEB J. 12, 67-77 (1998).

[0744] [MAP(模式两亲性肽)/KLALKLALKALKAALKLA] (SEQ ID NO :67)

[0745] Oehlke, J. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39 (1998).

[0746] [K-FGF/AAVALLPAVLLALLAP] (SEQ ID NO :68)

[0747] Lin, Y. Z. et al. J. Biol. Chem. 270, 14255-14258 (1995).

[0748] [Ku70/VPMLK] (SEQ ID NO :69)

[0749] Sawada, M. et al. Nature Cell Biol. 5, 352-7 (2003).

[0750] [Ku70/PMLKE] (SEQ ID NO :70)

[0751] Sawada, M. et al. Nature Cell Biol. 5, 352-7 (2003).

[0752] [朊病毒/MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKP] (SEQ ID NO :71)

[0753] Lundberg, P. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90 (2002).

[0754] [pVEC/LLIILRRRIRKQAHASK] (SEQ ID NO :72)

[0755] Elmquist, A. et al. Exp. Cell Res. 269, 237-44 (2001).

[0756] [Pep-1/KETWWETWWTEWSQPKKKRKV] (SEQ ID NO :73)

[0757] Morris, M. C. et al. Nature Biotechnol. 19, 1173-6 (2001).

[0758] [SynB1/RGGRLSYSRRRFSTSTGR] (SEQ ID NO :74)

[0759] Rousselle, C. et al. Mol. Pharmacol. 57, 679-86 (2000).

[0760] [Pep-7/SDLWEMMMVSLACQY] (SEQ ID NO :75)

[0761] Gao, C. et al. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65 (2002).

[0762] [HN-1/TSPLNIHNGQKL] (SEQ ID NO :76)

[0763] Hong, F. D. & Clayman, G. L. Cancer Res. 60, 6551-6 (2000).

[0764] 在本发明中, 组成多聚精氨酸的精氨酸残基数没有限制。在一些优选实施方案中, 可举出 5 到 20 个连续的精氨酸残基为例。在优选实施方案中, 多聚精氨酸中精氨酸残基的个数为 11 (SEQ ID NO :77)。

[0765] 本文中所使用的短语“显性失活 EF-1delta 片段”指可与 CDKN3 形成复合物的突变形式的 EF-1delta。因此, 显性失活片段是不与全长 EF-1delta 在功能上等价的。优选的显性失活片段是那些包含 CDKN3 结合区域的片段, 例如包含 EF-1delta 亮氨酸拉链的一部

分的 EF-1delta 蛋白部分。

[0766] 在另一个实施方案中,本发明提供具有序列 ENQSLRGVVQELQQAI SKL (SEQ ID NO : 61) 的多肽 ; 与该多肽功能上等价的多肽 ; 或编码上述多肽的多核苷酸,用于制备治疗或预防肺癌的药物组合物的用途,其中所述多肽缺乏由 SEQ ID NO :8 组成的肽的生物学功能。另外,在另一个实施方案中,本发明亦提供了用于治疗 and / 或预防肺癌的药剂,其包括含有序列 ENQSLRGVVQELQQAI SKL (SEQ ID NO :61) 的多肽、或与该多肽功能上等价的多肽、或编码上述多肽的多核苷酸 ; 作为活性成分,其中所述多肽缺乏由 SEQ ID NO :8 组成的肽的生物学功能。此外,本发明亦提供了用于治疗或预防肺癌的组合物,其包括含有序列 ENQSLRGVVQELQQAI SKL (SEQ ID NO :61) 的多肽或与该多肽功能上等价的多肽 ; 以及药学上可接受的载体,其中所述多肽缺乏由 SEQ ID NO :8 组成的肽的生物学功能。

[0767] 通过考虑诸如体重、年龄、细胞、疾病类型、症状和其它患者状况,给药途径以及给药是局域性的还是系统性等因素,本领域的技术人员可方便的确定本发明所述多肽适用于给定患者的有效量。

[0768] 尽管剂量可根据症状而可有所不同,作为例子的用于治疗或预防 NSCLC 的抗体或其片段的剂量,当口服施与正常成人 (体重 60kg) 时,为大约每日 0.1mg 至大约 100mg, 优选每日大约 1.0mg 到大约 50mg, 且较优选每日大约 1.0mg 到大约 20mg。

[0769] 当非消化道给药,以注射的形式施与正常成人 (体重 60kg) 时,尽管根据患者状况、疾病症状和给药方法不同有一些差异,静脉注射每日大约 0.01mg 到大约 30mg 的剂量, 优选每日大约 0.1 到大约 20mg 的剂量,较优选每日大约 0.1 到大约 10mg 的剂量是便利的。此外,对于其它动物,亦可能施用换算为 60kg 体重的量。

[0770] 考虑可以施用更大或更小量的所述肽。对于特定情况下所需的准确剂量可由本领域技术人员方便地和常规地确定。

[0771] 本发明进一步提供了用于制备治疗表达 EF-1delta 的肺癌的药物组合物的方法或过程,其中所述方法或过程包括将活性成分与药学上或生理学上可接受的载体混合的步骤,其中所述活性成分是包含序列 ENQSLRGVVQELQQAI SKL (SEQ ID NO :61) 的多肽,或与该多肽功能上等价的多肽。

[0772] 本发明的样态在下述实施例中加以描述,它们并无意对权利要求中描述的本发明范围进行限定。

[0773] 除非另行定义,在此使用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域一般技术人员通常理解的意义相同。下面描述了合适的方法和材料,虽然与在此描述的相似或等同的方法亦可用于实践或测试本发明。

[0774] 本发明将于下列实施例中进一步加以描述,其并不对权利要求中描述的本发明范围进行限定。

实施例

[0775] 本发明将于下列实施例中进一步加以描述,其并不对权利要求中描述的本发明范围进行限定。

[0776] [实施例 1] 一般方法

[0777] 1. 细胞系与组织样品

[0778] 本研究使用的 23 个人类肺癌细胞系包括 9 个腺癌 (ADC ;A427, A549, LC319, PC-3, PC-9, PC-14, NCI-H1373, NCI-H1666 与 NCI-H1781)、2 个腺鳞癌 (ASC ;NCI-H226 与 NCI-H647)、7 个 SCC (EBC-1, LU61, NCI-H520, NCI-H1703, NCI-H2170, RERF-LC-AI, 与 SK-MES-1)、1 个大细胞癌 (LX1) 与 4 个小细胞肺癌 (SCLC ;DMS114, DMS273, SBC-3, 与 SBC-5)。所有的细胞均于合适的补充有 10% FCS 的培养基中单层培养,且保持在 37 摄氏度下含 5% CO₂ 的湿润空气中。作为对照的人类小气道上皮细胞 (SAEC) 在来自 Cambrex Bioscience, Inc. (East Rutherford, NJ) 的优化培养基 (小气道生长培养基) 中生长。原代肺癌样品之前已在知情同意下获取 (Yamabuki T, et al., Int J Oncol 28 :1375-84 (2006), Kikuchi T, et al., Oncogene 22 :2192-205 (2003), Taniwaki M, et al., Int J Oncol 29 :567-75 (2006))。临床分期根据国际抗癌联盟 (International Union Against Cancer) 的 TNM 分级法进行判断 (Sobin L, et al., 6th ed. New York :Wiley-Liss ;(2002))。总共 423 个经福尔马林固定的原代 NSCLC (I-III A 期) 样品,包括 271 个 ADC、110 个 SCC、28 个 LCC、14 个 ASC 以及邻近的正常肺组织,之前与临床病理学资料一起已从在埼玉癌症中心 (Saitama, Japan) 进行手术的病人处获取。本研究以及所述所有临床材料的使用已经各机构伦理委员会批准。

[0779] 2. 血清样品

[0780] 血清在征得知情同意后从 120 个健康对照个体 (92 位男性与 24 位女性 ;中位年龄为 51.6 岁,范围为 27 到 60 岁) 与 63 个具有慢性阻塞性肺病 (COPD) 的非癌性肺病患者 (53 位男性与 10 位女性 ;中位年龄为 67.0 岁,范围为 54 到 73 岁) 处获取。所有这些 COPD 患者均为现行和 / 或前吸烟者 (平均 (+/- 标准偏差) 包 - 年指数 (PYI) 为 70.0 +/- 42.7 ; PYI 定义为每日消费的烟包数 (一包为 20 支烟) 乘以年数)。血清亦在征得知情同意后,从 95 个收治的肺癌患者 (49 为男性与 46 为女性,中位年龄为 64.4 岁,范围为 38 到 83 岁) 与 194 个罹患肺癌的患者 (142 位男性与 52 位女性,中位年龄为 68.0,范围为 38 到 89 岁)。这 289 个肺癌病例包括 170 个 ADC、37 个 SCC 与 82 个 SCLC。这些来自总共 289 个肺癌患者血清样品基于下述步骤被选用于本研究 : (a) 患者刚刚被诊断,且之前未受治疗,与 (b) 其肿瘤被病理学诊断为肺癌 (I-IV 期)。血清在诊断时获取,并储藏于 -150 摄氏度。

[0781] 3. 半定量逆转录 PCR

[0782] 来自每个样品的总共 3 微克等分的 mRNA 使用随机引物 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 与 SuperScript II (Invitrogen, Carlsbad, CA) 经逆转录为单链 cDNA。半定量逆转录 PCR (RT-PCR) 实验通过下列组针对 EBI3 的特异性合成引物或作为内部对照的 β 肌动蛋白 (ACTB) 特异性引物加以实施。

[0783] EBI3, 5' -TGTTCTCCATGGCTCCCTAC-3' (SEQ ID No :9) 与

[0784] 5' -AGCTCCCTGACGCTTGTAAC-3' (SEQ ID No :10) ;

[0785] ACTB, 5' -GAGGTGATAGCATTGCTTTCG-3' (SEQ ID No :11) 与

[0786] 5' -CAAGTCAGTGACAGGIAAGC-3' (SEQ ID No :12).

[0787] 优化 PCR 的循环数以保证产物的强度在扩增的线性期内。

[0788] 4. Northern 印迹分析

[0789] 将覆盖了 16 种组织的人类多组织印迹 (BD Biosciences, Palo Alto, CA) 与 [α -³²P]-dCTP 标记的 404-bp 的 EBI3 PCR 产物杂交,所述 PCR 产物系使用下述引物制

备,作为探针:

[0790] 5'-TGTTCTCCATGGCTCCCTAC-3' (SEQ ID No :13) 与

[0791] 5'-CTACTTGCCCAGGCTCATTG-3' (SEQ ID No :14).

[0792] 预杂交、杂交与漂洗遵循生产商的说明书进行。所述印迹通过在零下 70 摄氏度用增感屏放射自显影七天获得。

[0793] 5. 免疫细胞化学分析

[0794] 将细胞铺于玻璃盖玻片 (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) 上,用 4% 多聚甲醛固定,并用含有 0.1% Triton X-100 的 PBS 在室温下透化 3 分钟。非特异性结合用 Casblock (ZYMED, San Francisco, CA) 在室温下封闭 10 分钟。然后将细胞在室温下与稀释于含 3% BSA 的 PBS 中的第一抗体温育 60 分钟。在用 PBS 漂洗之后,用 Alexa488- 结合的第二抗体 (Invitrogen) 将细胞在室温下染色 60 分钟。再一次用 PBS 漂洗后,每个样本使用含有 4' 7- 二脒基 -2- 苯基吲哚的 Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) 封固,并用 Spectral Confocal Scanning Systems (TSC SP2A0BS ;Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 使其可视化。

[0795] 6. 免疫组织化学与组织微阵列

[0796] 为调查已包埋在石蜡块中的临床样品中的 EBI3 蛋白,切片用下述方法染色。简言之,在封闭了内源过氧化物酶和蛋白后,将 3.3mg/mL 山羊抗人 EBI3 多克隆抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 添加到每个载玻片上,并将切片与作为第二抗体的 HRP 标记抗山羊 IgG (Histofine SimpleStain MAX PO(G), Nichirei, Tokyo, Japan) 一起温育。添加底物 - 色原,并用苏木精复染样品。根据其它文献中的描述 (Chin SF, et al., Mol Pathol 56 :275-9 (2003), Callagy G, et al., Diagn Mol Pathol 12 :27-34 (2003), Callagy G, et al., J Pathol 205 :388-96 (2005)) 用 423 个福尔马林固定的原代肺癌构建肿瘤组织微阵列。基于与在载玻片上对应的 H&E 染色切片目视对准,选取用于取样的组织区域。将三个、四个或五个取自供体肿瘤块的组织芯 (直径 :0.6mm ;深度,3-4mm) 用微阵列点样器 (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) 置入受体石蜡块中。从每个病例中打孔取出正常组织芯,将所得微阵列块的 5 微米切片用于免疫组织化学分析。根据之前的报道,三个独立的调查者在事先不知晓临床病理学数据的情况下半定量地评估了 EBI3 阳性 (Suzuki C, et al., Cancer Res 65 :11314-25 (2005), Ishikawa N, et al., ClinCancer Res 10 :8363-70 (2004), Kato T, et al., Cancer Res 65 :5638-46 (2005), Hayama S, et al., Cancer Res 67 :4113-22 (2007))。用下列标准评价 EBI3 染色的强度:“强阳性”(计分为 2+),在大于 50% 肿瘤细胞中染成棕色使细胞质完全模糊;“弱阳性”(1+),在肿瘤细胞细胞质中任何可见的程度更低的棕色染色;以及“无染色”(计分为 0),即在肿瘤细胞中无可见的染色。只有在评议者独立的断定为强阳性时才可以接受该例为强阳性。

[0797] 7. 统计分析

[0798] 使用 StatView 统计程序 (SAS, Cary, NC) 进行统计分析。肿瘤特异生存曲线从手术之日到 NSCLC 相关的死亡之时,或到最后一次随访之时计算。对每个相关变量及 EBI3 表达计算 Kaplan-Meier 曲线。病人亚组之间存活时间的差异用时序检验 (log rank test) 进行分析。用 Cox 相对风险回归模型进行单变量和多变量分析以确定临床病理学变量与癌症相关死亡率之间的联系。首先,分析死亡与可能的预后因素,包括年龄、性别、病理学肿瘤

分类以及病理学结分类,之间的关系,每次考虑一个因素。其次,将多变量 Cox 分析应用于反向(分步的)过程,其中总是将强 EBI3 表达,以及任何及所有满足 P 值 < 0.05 准入水平的变量强制引入该模型。当所述模型继续增加因素时,独立因素不超过 P < 0.05 的退出水平。

[0799] 8. ELISA

[0800] 使用原创的 ELISA 系统测量 EBI3 的血清水平。首先,将对 EBI3 有特异性的山羊多克隆抗体添加到 96 孔微孔板 (Nunc, Roskilde, Denmark) 上作为捕获抗体,并在室温下温育 2 小时。在洗脱任何未结合抗体后,将 5% BSA 添加到孔中并在 4 摄氏度下温育 16 小时进行封闭。在漂洗后,将稀释 3 倍的血清添加到孔中,并在室温下温育 2 小时。在洗脱任何未结合物质后,将对 EBI3 具有特异性的生物素化多克隆抗体(使用 Biotin Labeling Kit-NH2(DOJINDO, Kumamoto, Japan)) 添加到孔中作为检测抗体,并在室温下温育 2 小时。在漂洗以去除任何未结合抗体-酶试剂后,将 HRP-链霉抗生物素蛋白链添加到孔中,并温育 20 分钟。在漂洗后,将底物溶液(R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) 添加到孔中,使其反应 30 分钟。添加 100 微升 2N 硫酸以中止反应。以波长 450nm,参照波长 570nm 用分光计确定色强度。血清中的 CEA 水平用可市购的酶测试试剂盒 (Hope Laboratories, Belmont, CA) 根据生产商推荐的方法通过 ELISA 进行测量。血清中的 ProGRP 水平用可市购的酶测试试剂盒 (TFB, Tokyo, Japan) 根据生产商提供的规程通过 ELISA 进行测量。肿瘤组与健康对照组之间 EBI3、CEA 与 proGRP 水平的差异通过 Mann-Whitney U 检验进行分析。用接受者操作特征 (ROC) 曲线分析评价 EBI3、CEA 与 proGRP 的水平以确定具有最佳诊断准确率与似然比的截断值。EBI3 与 CEA/ProGRP 之间的相关系数用 Spearman 秩相关计算。显著性定义为 P < 0.05。

[0801] 9. RNA 干扰测定

[0802] 使用 30 微升 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 遵循生产商提供的方法将小干扰 RNA (siRNA) 双链体 (Dharmacon, Inc., Lafayette, CO) (600pM) 转染到 NSCLC 细胞系 A549 与 LC319 中。将转染后的细胞培养 7 日,并用 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯四唑溴化物 (MTT) 分析 (cell counting kit-8 solution; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) 评价细胞的存活力。为验证 EBI3 表达的阻抑,使用对上述 EBI3 具有特异性的合成引物进行半定量 RT-PCR。RNAi 用的合成寡聚核苷酸序列如下:

[0803] 对照 1 (On-Target plus; Dharmacon, Inc.; 由下述组成的池

[0804] 5' -UGUUUACAUGUCGACUAA-3' (SEQ ID NO :53 的对应 RNA);

[0805] 5' -UGUUUACAUGUUUUCUGA-3' (SEQ ID NO :54 的对应 RNA);

[0806] 5' -UGUUUACAUGUUUCCUA-3' (SEQ ID NO :55 的对应 RNA);

[0807] 5' -UGUUUACAUGUUGUGUGA-3' (SEQ ID NO :56 的对应 RNA);

[0808] 对照 2 (萤光素酶 /LUC :北美萤火虫 (Photinus pyralis) 萤光素酶基因),

[0809] 5' -NNCGUACGCGAAUACUUCGA-3' (SEQ ID No :16 的对应 RNA);

[0810] 针对 EBI3-1 的 siRNA (si-EBI3-#1),

[0811] 5' -UACUUGCCCAGGCUCAUGUU-3' (SEQ ID NO :17)

[0812] 5' -CAATGAGCCTGGGCAAGTA-3' 作为 si-EBI3-#1 的靶序列 (SEQ IDNO :18);

[0813] si-EBI3-#2,

[0814] 5' -AACAGCUGGACAUCGUGAUU-3' (SEQ ID NO :19)

[0815] 5' -TCACGGATGTCCAGCTGTT-3' 作为 si-EBI3-#1 的靶序列 (SEQ IDNO :20).

[0816] 10. 表达 EBI3 的 COS-7 转染体

[0817] 稳定表达 EBI3 的转染体根据标准方法构建。通过 RT-PCR 使用引物组 (5' -CCG CTCGAGGGAATTCCAGCCATGACCCCGCAGCTT-3' 与 5' -TGCTCTAGAGCACTTGCCCAGGCTCATTGTGGC -3') 扩增 EBI3 的全部编码区域。产物用 EcoRI 与 XbaI 消化, 并克隆到 pcDNA3.1-myc/His A(+) (Invitrogen) 载体的合适位点上, 在 EBI3 蛋白 COOH 端含有 c-myc-His 表位序列 (LDEESILKQEHHHHH)。我们借助 Using FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 用表达 EBI3 的质粒 (pcDNA3.1-EBI3-myc/His) 或模拟质粒 (pcDNA3.1-myc/His) 根据生产商提供的方法转染了不表达内源 EBI3 的 COS-7 细胞。转染细胞在含有 10% FBS 与遗传霉素 (0.4mg/ml) 的 DMEM 中培养 14 日, 然后将 50 个单独的菌落用胰蛋白酶消化并用有限稀释法筛选稳定转染体。在每个克隆中用 Western 印迹和免疫染色确定 EBI3 的表达。

[0818] 11. MTT 与菌落形成分析

[0819] 将可稳定表达 EBI3 的 COS-7 转染体接种到六孔板 (1×10^4 细胞 / 孔) 上, 并保持在含有 10% FBS 与 0.4mg/ml 遗传霉素的 DMEM 中。在 120 小时后, 通过 MTT 法用 Cell Counting Kits (Wako, Osaka, Japan) 评价细胞增殖。对菌落染色并同时计数。所有的实验重复三次。

[0820] [实施例 2] 在肺癌与正常组织中的 EBI3 表达

[0821] 为了鉴别可应用于在早期检测癌症存在的新分子, 并为了基于癌细胞的生物学特征开发新治疗手段, 使用 cDNA 微阵列 (Kikuchi T, et al., Oncogene 22 :2192-205 (2003), Taniwaki M, et al., Int J Oncol 29 :567-75 (2006), Kikuchi T, et al., Int J Oncol 28 :799-805 (2006), Kakiuchi S, et al., MolCancer Res 1 :485-99 (2003), Kakiuchi S, et al., Hum Mol Genet 13 :3029-43 (2004)) 对 101 个肺癌进行了基因组范围表达谱分析。在被筛选的 32256 个基因中, 在大部分检查的肺癌样品的癌细胞中鉴别出 EBI3 转录物的表达提升 (三倍或更高)。该过表达通过半定量 RT-PCR 实验在 15 个癌组织中的 11 个, 23 个肺癌细胞系中的 12 个中被确证 (图 1A)。进行了免疫荧光分析以检查肺癌细胞中内源 EBI3 的亚细胞定位。在通过半定量 RT-PCR 实验在其中检测到了 EBI3 转录物的 LC319 与 NCI-H1373 细胞中, 在肿瘤细胞的细胞质中检测到高水平的颗粒状 EBI3 (图 1A), 但在 NCI-H2170 细胞以及源自支气管上皮的 BEAS-2B 细胞中则不然, 二者均未显示 EBI3 表达。所述结果亦显示所述抗体特异性地与 EBI3 结合 (图 1B)。由于 EBI3 编码分泌蛋白, 我们亦通过 ELISA 评价了培养上清液中的 EBI3 水平, 并确证 LC319 与 PC14 均分泌 EBI3, 而在 NCI-H2170 与 BEAS-2B 中未检测到分泌的 EBI3 (图 1C)。

[0822] 使用 EBI3 cDNA 片段作为探针的 Northern 印迹分析鉴别出一个仅在胎盘中高表达的 1.3kb 转录物, 且其转录物在其他任何正常组织中几乎无法检测到 (图 1D)。亦在 5 种正常组织 (肝、心、肾、肺与胎盘) 与肺癌组织中用针对 EBI3 具有特异性的多克隆抗体对 EBI3 蛋白的表达进行了检查。主要在肿瘤细胞与合胞体滋养层中观察到了 EBI3 染色, 但在其它四种正常组织中未检测出来 (图 1E)。在肺癌中 EBI3 蛋白的表达较之在胎盘中为高。

[0823] [实施例 3] EBI3 表达与 NSCLC 患者的不良预后的关联

[0824] 为调查在肺癌发生中 EBI3 的生物学与临床病理学意义,对含有来自 423 个进行了治愈性手术切除的 NSCLC 病例组织切片的组织微阵列实施了免疫组织化学染色。通过针对 EBI3 特异性的多克隆抗体检测到的 EBI3 染色主要见于肿瘤细胞的染色质,但不在正常肺细胞中观察到(图 2A)。在组织微阵列上将 EBI3 表达模式分为从缺乏(计分为 0)到弱/强阳性(计分为 1+ 到 2+)。在 423 个 NSCLC 中,EBI3 在 210(49.6%) 个病例中呈现强染色(计分 2+),在 159(37.6%) 个病例中弱染色(计分 1+),在 54(12.8%) 个病例中无染色(计分 0)(表 2A)。然后,发现 EBI3 的表达(强阳性-弱阳性/缺乏)与性别(在男性中为高,根据 Fisher 氏确然检验 $P < 0.0001$)、组织类型(在非 ADC 中为高,根据 Fisher 氏确然检验 $P < 0.0004$)、肿瘤大小(在 pT2-4 中为高,根据 Fisher 氏确然检验 $P < 0.0009$)以及淋巴结转移(在 pN1-2 中为高,根据 Fisher 氏确然检验 $P < 0.0039$)有显著相关性(表 2A)。NSCLC 患者的中位存活时间显著较短,与 EBI3 高表达水平一致($P = 0.0011$;时序检验;图 2B)。另外,应用单变量分析以评价患者预后与多种因素,包括年龄、性别、病理学肿瘤分期(肿瘤大小;T1-T2-4)、病理学结分期(nodestage)(结状态;N0-N1、N2)、组织学(ADC-其它组织类型)以及 EBI3 状态(计分 0、1+-2+)之间的关联。所有这些变量均与不良预后显著相关。使用 Cox 比例风险模型进行多变量分析,确定 EBI3($P = 0.0435$)以及其它三种因素(年龄、病理学肿瘤分期与病理学结分期)在经手术治疗的 NSCLC 患者中是独立的预后因素(表 2B)。

[0825] 表 2A. NSCLC 组织中 EBI3 阳性与患者特征之间的关联 ($n = 423$)

[0826]

	总数	EBI3表达			卡方	P值 强 - 弱 或无
		强表达	低表达	无表达		
	n=423	n=210	n=159	n=54		
性别						
女性	132	46	57	29	15.958	<0.0001*
男性	291	164	102	25		
年龄(岁)						
≥65	211	107	72	32	0.116	NS
<65	212	103	87	22		
T因子						
T1	136	51	58	27	11.124	0.0009*
T2+T3+	287	159	101	27		
T4						
N因子						
N0	264	120	107	37	4.499	0.0339*
N1+N2	159	90	52	17		
组织学类型						
ADC	272	117	110	45	12.674	0.0004*
非ADC	151	93	49	9		

[0827] *P < 0.05 (Fisher 氏确切检验)

[0828] NS, 不显著

[0829] ADC, 腺癌

[0830] 非 ADC, 鳞状细胞癌加大细胞癌以及腺鳞状细胞癌

[0831] 表 2B. NSCLC 患者中预后因素的 Cox' s 比例风险模型分析

[0832]

[0833]

变量	风险比	95% CI	不利/有利	P值
单变量分析				
EBI3	1.617	1.208-2.164	阳性/阴性	0.0012*
年龄(岁)	1.492	1.116-1.994	$\geq 65 / 65 >$	0.007*
性别	1.669	1.193-2.334	男/女	0.0028*
pT因子	2.761	1.895-4.023	T2+T3+T4 / T1	<0.0001*
pN因子	2.389	1.791-3.185	N1+N2 / N0	<0.0001*
组织学类型	1.390	1.040-1.858	非ADC/ADC	0.026*
多变量分析				
EBI3	1.361	1.009-1.835	阳性/阴性	0.0435*
年龄(岁)	1.678	1.245-2.261	$\geq 65 / 65 >$	0.0007*
性别	1.398	0.967-2.021	男/女	NS
pT因子	2.075	1.403-3.067	T2+T3+T4 / T1	0.0003*
pN因子	2.313	1.712-3.125	N1+N2 / N0	<0.0001*
组织学类型	0.921	0.670-1.266	非ADC/ADC	NS

[0834] ADC, 腺癌

[0835] 非 ADC, 鳞状细胞癌加大细胞癌以及腺鳞状细胞癌

[0836] NS, 不显著

[0837] *P < 0.05

[0838] [实施例 4] 肺癌患者的 EBI 血清水平

[0839] 因为 EBI3 编码分泌蛋白, 我们调查了 EBI3 蛋白是否分泌到肺癌患者的血清中。ELISA 实验在 310 位肺癌患者中绝大多数的血清样品中检测到了 EBI3 蛋白。肺癌患者中 EBI3 的平均 (± 1 标准偏差) 血清水平是 18.0 ± 16.4 单位 /mL。相反, 在 134 位健康个体中 EBI3 的平均 (± 1 标准偏差) 血清水平是 4.4 ± 4.7 单位 /mL, 而在 63 位为现行 / 前吸烟者的 COPD 的患者中, 是 5.8 ± 8.0 单位 /mL。较之健康供体或 COPD 患者, 在肺癌患者中, 血清 EBI3 蛋白的水平显著为高 ($P < 0.0001$, Mann-Whitney U 检验); 健康个体与 COPD 患者之间的差异不显著 ($P = 0.160$)。根据肺癌的组织学类型, 在 178 位腺癌患者中, EBI3 的血清水平是 17.8 ± 15.4 单位 /mL, 在 41 位 SCC 患者中为 19.9 ± 16.9 单位 /mL, 而在 82 位 SCLC 患者中为 17.6 ± 18.1 单位 /mL (图 3A); 这三种组织学类型之间的差异不显著。本发明人然后评价了 EBI3 水平与可获得其信息的肺癌患者的临床分期之间的关系。即使在更早期的肿瘤中仍然检测到高水平的血清 EBI3 (图 3B)。使用从这些 301 位癌症患者与 134 位健康对照的数据绘制的 ROC 曲线 (图 4A, 左边小图), 设置本测定法的截断值以为 EBI3 提供最佳诊断准确率与似然比 (最少假阴性与假阳性结果) [即, 15.4 单位 /mL, 灵敏度为 45.2% (301 中 136) 而特异性为 97.8% (134 中 131)]。根据肿瘤组织学, 血清 EBI3 阳性病例的比

例对 NSCLC 是 47.9% (219 中 105), 而对 SCLC 是 37.8% (82 中 31)。血清 EBI3 阳性病例的比例对 COPD 是 3.2% (63 中 2)。使用来自 NSCLC 患者的成对的手术前与手术后 (手术后 2 个月) 的血清样品进行 ELISA 实验以监视同一患者中血清 EBI3 的水平。在手术切除原发肿瘤后, 急剧地减少了血清中 EBI3 的浓度 (图 4A, 右边小图)。本发明人进一步在同组六个在手术前即已收集血清的 NSCLC 病例 (3 位患者罹患 EBI3 阳性肿瘤, 而 3 位患者罹患 EBI3 阴性肿瘤) 中, 将所述血清 EBI3 值与原发肿瘤中 EBI3 的表达水平加以比较。血清 EBI3 水平显示与原发肿瘤中 EBI3 的表达水平的较好相关度 (图 4B)。上述结果独立地支持了 EBI3 作为在早期检测癌症与监视该疾病复发的生物学标记的高特异性与巨大潜能。

[0840] [实施例 5] EBI3 与 CEA/CYFRA/ProGRP 作为肿瘤标记的组合测定

[0841] 为评价血清 EBI3 水平作为肿瘤检测生物标志的临床有用性, 在同一组来自癌症患者与对照个体的血清样品中通过 ELISA 对两个常规肿瘤标志 (对 ADC 患者为 CEA; 对 SCC 患者为 CYFRA; 对 SCLC 患者为 ProGRP) 的血清水平进行测量。据 ROC 分析确定, CEA 对 NSCLC 检测的截断值为 2.2ng/mL (灵敏度 36.0% (178 中 64) 以及特异性 97.5% (118 中 115); 图 4C, 左上小图)。血清 EBI3 与 CEA 值的相关系数不显著 (Spearman 秩相关系数: ρ (rho) = 0.063; $P = 0.4016$), 显示在血清中同时测量这两种标志可将 ADC 的总检测灵敏度改善到 65.7% (178 中 117); 对诊断 ADC, CEA 单独的灵敏度为 36.0% (178 中 64), 而 EBI3 为 46.1% (205 中 82)。两种肿瘤标志中任一种在正常志愿者 (对照组) 中的假阳性率为 5.1% (118 中 6), 虽然在同一个对照组中 CEA 与 EBI3 各自的假阳性率为 2.5% (118 中 3) 与 2.5% (118 中 3; 图 4C, 左下小图)。对 SCC 患者的 ROC 分析确定了 CYFRA 的截断值为 2.0ng/mL, 其灵敏度为 48.6% (37 中 18) 而特异性为 2.3% (130 中 3; 图 4C, 中上部分)。血清 EBI3 与 CYFRA 之间的相关系数不显著 (Spearman 秩相关系数: ρ (rho) = -0.117; $P = 0.4817$), 显示在血清中同时测量这两种标志可将 SCC 的总检测灵敏度改善到 78.5%; 对诊断 SCC, CYFRA 单独的灵敏度为 48.6% (37 中 18), 而 EBI3 为 54.1% (37 中 20)。正常志愿者 (对照组) 中两种肿瘤标志任一的假阳性率为 4.6% (130 中 6), 虽然在同一个对照组中 CYFRA 与 EBI3 各自的假阳性率为 2.3% (130 中 3) 与 2.3% (130 中 3; 图 4C, 中下小图)。对 SCLC 患者的 ROC 分析确定 ProGRP 的截断值为 39.5pg/mL, 其灵敏度为 64.6% (82 中 53) 而特异性为 97.4% (116 中 3; 图 4C, 右上小图)。血清 EBI3 与 CYFRA 之间的相关系数不显著 (Spearman 秩相关系数: ρ (rho) = 0.074; $P = 0.5075$), 同样显示在血清中同时测量这两种标志可将 SCLC 的总检测灵敏度改善到 74.4% (82 中 61); 对诊断 SCLC, ProGRP 单独的灵敏度为 64.6% (82 中 53), 而 EBI3 为 37.8% (82 中 31)。正常志愿者 (对照组) 中两种肿瘤标志任一的假阳性病例为 5.2% (116 中 6), 虽然在同一个对照组中 ProGRP 与 EBI3 各自的假阳性率为 2.6% (116 中 3) 与 2.6% (116 中 3; 图 4C, 右下部分)。

[0842] [实施例 6] 用针对 EBI3 的 siRNA 抑制肺癌细胞生长

[0843] 为评价 EBI3 的上调是否在肺癌细胞的生长或存活中起作用, 我们评价了 siRNA 以及两种不同的对照 siRNA (针对 ON-Target 与 LUC 的 siRNA) 导致的内源 EBI3 表达抑制。用有效的 siRNA 对两种不同 NSCLC 细胞: A549 与 LC319 的处理可减少 EBI3 表达 (图 4D), 并导致细胞存活率与集落数的显著抑制, 如用 MTT 以及集落形成测定所示 (图 4D)。上述结果提示 EBI3 的上调与癌细胞的生长或存活相关。

[0844] [实施例 7] EBI3 的促进生长效应

[0845] 为揭示 EBI3 在肿瘤发生中的潜在作用,我们制备了设计用来表达 EBI3 的质粒 (pcDNA3.1-EBI3-myc/His)。将该质粒或模拟质粒转染到 COS-7 细胞中,并建立表达 EBI3 的稳定克隆。通过使用抗 EBI3 抗体的免疫细胞化学染色确证了 EBI3 蛋白在细胞质内的表达 (数据未显示)。为确定 EBI3 对哺乳动物细胞生长的作用,本发明人对稳定表达 EBI3 的 COS-7 转染体实施了集落形成分析。本发明人构建了两个独立的表达外源 EBI3 的 COS-7 细胞系 (COS-7-EBI3-#1 与 -#2;图 4E,上面小图),并将其生长与用模拟载体 (COS-7-MOCK-M1 和 -M2) 转染的对照细胞相比。两种 COS-7-EBI3 细胞的生长均得到了显著的促进,与 EBI3 表达水平一致 (图 4E,下边小图)。与对照细胞相比,COS7-EBI3 细胞亦明显具有形成较大集落的倾向 (图 4E,下边小图)。与 siRNA 测定的结果一致,这些数据强烈暗示 EBI3 在肿瘤生长和 / 或存活中起重要作用。

[0846] 分析与讨论:

[0847] 虽然最近肿瘤的诊断性成像、联合化疗与放射疗法有所进展,在过去十年中在肺癌患者的预后与生活质量方面几乎没有取得进展。因此,现在迫切需要开发新型诊断生物标志,以帮助癌症早期检测,以及为个体患者更好地选择辅助治疗方案。在通过激光显微解剖富集癌细胞后,使用含有超过 32256 个基因的 cDNA 微阵列 101 个肺癌患者的基因组范围表达谱分析 (Kikuchi T, et al., *Oncogene* 22 :2192-205(2003), Taniwaki M, et al., *Int J Oncol* 29 :567-75(2006), Kikuchi T, et al., *Int J Oncol* 28 :799-805(2006), Kakiuchi S, et al., *Mol Cancer Res* 1 :485-99(2003), Kakiuchi S, et al., *HumMol Genet* 13 :3029-43(2004))。通过这些分析,揭示了几个基因具有作为开发新型诊断标志、治疗药物和 / 或免疫疗法候选的潜力 (Suzuki C, et al., *Cancer Res* 65 :11314-25(2005), Ishikawa N, et al., *Clin Cancer Res* 10 :8363-70(2004), Kato T, et al., *Cancer Res* 65 :5638-46(2005), Hayama S, et al., *Cancer Res* 67 :4113-22(2007))。

[0848] 在其中,认为编码推定的肿瘤特异性跨膜或分泌蛋白的基因具有显著的优势,这是因为它们位于细胞表面或胞外空间内,和 / 或在血清中,作为分子标志与治疗靶是易于接近的。在本发明的语境下,对上述基因中的一种编码分泌蛋白的 EBI3,通过组织微阵列和 ELISA 方法对其蛋白质表达状态进行了检查以评价其作为肺癌诊断与预后生物标志的有用性。

[0849] EBI3 是由于其在 B 淋巴细胞中的表达被埃 - 巴二氏病毒感染所诱导而被鉴定的 (Devergne O, et al., *J Virol* 70 :1143-1153(1996))。该 34kDa 的糖蛋白是与 IL-12 的 p40 亚基近缘的促红细胞生成素受体家族的成员,有人认为其在细胞介导的免疫应答的调节中起作用。

[0850] EBI3 是 34kDa 的糖蛋白,其最早的记载是关于其在 EBV 永生化的类成淋巴细胞系中强烈的体外表达 (Devergne O, et al., *J Virol* 70 :1143-1153(1996))。近年研究揭示,EBI3 通过与 p28——一种新的 p35 相关 IL-12 亚基——异源二聚化形成称为 IL-27 的新型细胞因子,且在 Th1 免疫应答的起始中起重要作用 (Pflanz S, et al., *Immunity* 16 : 779-90(2002))。相反,近年研究表面 EBI3 可与 IL-12alpha 形成 IL-35 且通过与调控性 T 细胞 (T_{reg}) 反应而调节对免疫抑制的免疫应答 (Niedbala W, et al., *Eur J Immunol* 37 : 1-9(2007), Collison LW, et al., *Nature* 450 :566-9(2007))。另外,已报道在人类妊娠过程中,可在胎盘绒毛中观察到 EBI3 的表达,暗示 EBI3 可能调节母体与胎盘间的免疫应答,

例如母体免疫耐受性 (Devergne O, et al., Am J Pathol 159 :1763-76(2001))。

[0851] 在本发明的语境下,在肺癌患者的组织样品中发现了高水平的 EBI3 表达。同时,证明了通过 siRNA 抑制 EBI3 内源性表达导致肺癌细胞存活力显著降低,而表达外源 EBI3 的哺乳动物细胞显示显著的生长促进。尽管 EBI3 在肺癌发生中的详细功能尚未明了,本发明的结果提示 EBI3 表达可促进癌细胞增殖 / 存活。

[0852] 在来自肺癌患者的血清样品中亦可见高水平的 EBI3 蛋白。由于本研究所用血清样品的一半源自早期癌症的患者,可能 EBI3 甚至对诊断早期癌症也是有用的。为考察将 EBI3 应用为诊断工具的可行性,将 EBI3 的血清水平与 CEA、CYFRA 或 ProGRP——三种传统的 NSCLC 与 SCLC 的诊断标志——在诊断的灵敏度与特异性方面进行了比较。组合两种标志 (EBI3+CEA、EBI3+CYFRA 或 EBI3+ProGRP) 的测定法将肺癌 (NSCLC 以及 SCLC) 的灵敏度提高到大约 65-75%,显著的高于单独使用 CEA 或 ProGRP,而 5%到 7%的健康志愿者被错误地诊断为阳性。尽管仍需使用涵盖多种临床分期的更大组的血清样品进行进一步验证,在此展示的现有数据充分地显示,EBI3 自身作为肺癌血清学 / 组织化学生物标志有潜在临床价值。

[0853] 综上所述,EBI3 在本文中被鉴定为用于肺癌患者血清诊断以及免疫组织化学预后预测的潜在生物标志。该分子亦为开发治疗手段,例如抗体治疗、小分子化合物与癌症疫苗的可能候选。

[0854] 第二部分 :DLX5 相关实验

[0855] [实施例 7] 一般方法

[0856] 1. 细胞系与组织样品

[0857] 本研究使用的人类肺癌细胞系如下 :肺腺癌 (ADC) A427, A549, LC319, PC3, PC9, 与 NCI-H1373 ;支气管肺泡癌 (BAC), NCI-H1781 ;肺鳞状细胞癌 (SCC), RERF-LC-AI, SK-MES-1, EBC-1, LU61, NCI-H520, NCI-H1703, 与 NCI-H2170 ;肺腺鳞癌 (ASC), NCI-H226 与 NCI-H647 ;肺大细胞癌 (LCC), LX1 ;与肺小细胞癌 (SCLC), DMS114, DMS273, SBC-3 和 SBC-5。所有的细胞均于合适的补充有 10%胎牛血清 (FCS) 的培养基中单层培养,且保持在 37 摄氏度下含 5% CO₂ 的湿润气氛下。人类小气道上皮细胞 (SAEC) 在购自 Cambrex Bio Science Inc. (Walkersville, MD) 的优化培养基 (SAGM) 上生长。14 种原代 NSCLC (7 个 ADC 与 7 个 SCC) 已在征得书面知情同意后从患者获取,如前所述 (Kato T, et al., Cancer Res 65 : 5638-46(2005))。从在埼玉癌症中心 (Saitama, Japan) 接受了治愈性手术的患者获取总共 369 个 NSCLC 以及邻近的正常肺组织,在组织微阵列上进行免疫染色。本研究以及所有临床材料的使用已经机构研究伦理委员会批准。

[0858] 2. 半定量 RT-PCR

[0859] 使用 TRIzol 试剂 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) 根据生产商提供的方法从培养细胞与临床组织中抽提总 RNA。用 DNase I (Nippon Gene, Tokyo, Japan) 处理抽提的 RNA 与正常人类组织多聚 (A) RNA,并使用寡聚 (dT) 引物与 SuperScript II 逆转录酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行逆转录。半定量 RT-PCR 实验通过下列组针对 DLX5 特异性的引物或作为内部对照的 ACTB 特异性引物加以实施。

[0860] DLX5, 5' -CTCGCTCAGCCACCACCCTCAT-3' (SEQ ID NO :21), 与

[0861] 5' -AGTTGAGGTCATAGATTTCAAGGCAC-3' (SEQ ID NO :22) ;

[0862] ACTB, 5' -GAGGTGATAGCATTGCTTTCG-3' (SEQ ID NO :11) 与

[0863] 5' -CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3' (SEQ ID NO :12)。

[0864] 优化 PCR 反应的循环数以保证产物的强度在扩增的对数期内。

[0865] 3. Northern 印迹分析

[0866] 将人类多组织印迹 (BD Biosciences, Palo Alto, CA) 与 32P 标记的 DLX5 PCR 产物杂交。DLX5 的 cDNA 探针通过 RT-PCR 用上述引物制备。预杂交、杂交与漂洗遵循生产商的推荐进行。所述印迹通过在室温下用增感 BAS 屏 (BIO-RAD, Hercules, CA) 放射自显影 30 小时获得。

[0867] 4. 抗 DLX5 抗体

[0868] 使用 pET 载体 (Novagen, Madison, WI) 制备表达在其 NH₂ 端包含 His 标签表位的 DLX5 全长片段的质粒。所述重组肽在大肠杆菌 BL21 codon-plus 菌株 (Stratagene, LaJolla, CA) 中表达, 并用 TALON 树脂 (BD Bioscience) 根据供应商提供的规程纯化。在 SDS-PAGE 胶上提取所述蛋白后, 接种到兔中; 其免疫血清根据常规方法在亲和柱上纯化。亲和纯化的抗 DLX5 抗体用于免疫组织化学研究。通过对来自经 DLX5 表达载体转染的细胞系的细胞裂解液进行 Western 印迹, 以及通过对内源表达 DLX5 或否的细胞系进行免疫细胞化学染色, 确证该抗体对 DLX5 具有特异性。

[0869] 5. 免疫细胞化学

[0870] 将 SBC-5 细胞接种于玻璃盖玻片上, 细胞用 4% 多聚甲醛固定, 并用冷甲醇丙酮在室温下透化 5 分钟。在用 PBS 漂洗一次之后, 将细胞与所述抗 DLX5 抗体在室温下温育 1 小时, 继以与 Alexa488 结合山羊抗兔抗体 (Molecular Probes) (1 : 1000 稀释) 在黑暗中温育 1 小时。在共聚焦显微镜 (TCSSP2-AOBS, Leica Microsystems) 下捕获影像。

[0871] 6. 免疫组织化学与组织微阵列分析

[0872] 为调查临床材料中 DLX5 蛋白的存在, 组织切片用 ENVISION+Kit/HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) 染色。在封闭了内源过氧化物酶与蛋白质后, 添加亲和纯化的抗 DLX5 抗体, 且将每个切片与作为第二抗体的 HRP- 标记抗兔 IgG 一起温育。添加底物色原, 并用苏木精复染样品。用福尔马林固定的 NSCLC 构建肿瘤组织微阵列, 如其他文献中所述 (Ishikawa N, et al., Clin Cancer Res 10 :8363-70 (2004))。基于与在载玻片上对应的 H&E 染色切片目视对准, 选取用于取样的组织区域。将三个、四个或五个取自供体肿瘤块的组织芯 (直径 0.6mm ; 高度 3-4mm) 用微阵列点样器 (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) 置入受体石蜡块中。从每个病例中打孔取出正常组织芯。将所得微阵列块的 5 微米切片用于免疫组织化学分析。三个独立的调查者在事先不知晓临床随诊数据的情况下半定量地评价 DLX5 阳性。其中每人将染色强度记录为“无” (计分为 0), “弱” (计分为 1+) 或“强阳性” (2+)。只有在所有评议者断定为强阳性时才将肺癌计为强阳性 (2+)。

[0873] 7. 统计分析

[0874] 所有的分析使用统计分析软件 (StatView, version 5.0 ; SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA) 进行。随后检查其表达水平与临床病理学变量, 例如年龄、性别、病理学 TNM 分期以及组织学类型的相关性。用 Fisher 氏确切检验评价强 DLX5 免疫反应性与临床病理学变量的联系。用 Cox 相对风险回归模型进行单变量和多变量分析以确定临床病理学变量与癌相关死亡率之间的联系。首先, 分析死亡与可能的预后因素, 包括年龄、性别、pT 分类

以及 pN 分类,之间的关系,每次考虑一个因素。其次,将多变量 Cox 分析应用于反向(分步的)过程,其中总是将强 EB13 表达,以及任何及所有满足 P 值 < 0.05 准入水平的变量强制引入该模型。当所述模型继续增加因素时,独立因素不超过 P < 0.05 的退出水平。

[0875] 8. RNA 干涉测定

[0876] 前人已建立了一种用于在哺乳动物细胞中产生 siRNA 的基于载体的 RNA 干扰(RNAi)系统:psiH1BX3.0(Suzuki C, et al., Cancer Res 63:7038-41(2003))。使用 30 微升 Lipofectamine 2000(Invitrogen) 将 10 微克 DLX5 特异性 siRNA 表达载体转染至内源过表达 DLX5 的 SBC-5 细胞系与 NCI-H1781 细胞系中。将转染细胞在合适浓度的遗传霉素(G418)存在的情况下培养 7 天,然后进行 MTT 分析,其中用吉姆萨染色计量集落数与存活细胞的数量,重复三次。RNAi 用的合成寡聚核苷酸靶序列如下所示

[0877] 对照 1(EGFP:增强的绿色荧光蛋白基因,维多利亚水母(Aequoreavictoria)GFP 的突变体),5'-GAAGCAGCAGACTTCTTC-3'(SEQ ID NO:23);

[0878] 对照 2(乱序:编码 5S 与 16S rRNA 的纤毛细虫(Euglena gracilis)叶绿体基因),5'-GCGCGCTTTGTAGGATTCG-3'(SEQ ID NO:16);

[0879] siRNA-DLX5-#1,5'-CCAGCCAGAGAAAGAAGTG-3';

[0880] siRNA-DLX5-#2,5'-GTGCAGCCAGCTCAATCAA-3'.

[0881] 为验证该 RNAi 系统,确证了在用于本分析的细胞系中,功能性的 siRNA 会下调 DLX5 表达,而对照 siRNA 或无效 siRNA 均不会。

[0882] [实施例 8] 在肺癌与正常组织中的 DLX5 表达

[0883] 为鉴别用于开发肺癌新型治疗剂和/或生物标志的靶分子,首先分析 86 个 NSCLC 与 SCLC,用 cDNA 微阵列筛选在超过 50% 的上述 NSCLC 与 SCLC 中显示 5 倍或更高表达的基因(Kikuchi T, et al., Oncogene 22:2192-205(2003), Taniwaki M, et al., Int J Oncol 29:567-75(2006), Kikuchi T, et al., Int J Oncol 28:799-805(2006), Kakiuchi S, et al., Mol Cancer Res 1:485-99(2003), Kakiuchi S, et al., Hum Mol Genet 13:3029-43(2004))。在筛选出的 27648 个基因中,确认 DLX5 基因在大部分肺癌中过表达,且其过表达还通过半定量 RT-PCR 实验的方法在另外 14 个 NSCLC 病例中的 9 个(7 个 ADC 中的 2 个以及所有 7 个 SCC)(图 5A),以及 23 个肺癌细胞系中的 10 个中被确证,而其表达在源自正常支气管上皮的 SAEC 细胞中几乎无法检测出来(图 5B)。为确定在肺癌细胞中内源 DLX5 的亚细胞定位,随后产生了针对人类 DLX5 特异性的兔多克隆抗体,并发现在 SBC-5 细胞的细胞核中染色强烈,但于细胞质中染色微弱(图 5C)。使用 DLX5 cDNA 作为探针进行 Northern 印迹分析,在 23 种检查的组织中仅于胎盘中检出了相当于 1.8kb 转录物的强烈信号(图 5D)。进一步,用抗 DLX5 单克隆抗体进行免疫组织化学分析,比较 DLX5 蛋白在 5 种正常组织(心、肝、肾、肺与胎盘)中的表达与在肺癌中的表达。与 Northern 分析的结果一致,在胎盘与肺癌中观察到了 DLX5 表达,但在其它四种正常组织中几乎无法检测到其表达(图 6A)。

[0884] [实施例 9] DLX5 表达与 NSCLC 患者的不良预后的关联

[0885] 为验证 DLX5 的临床病理学意义,用含有来自 369 个进行了治愈性手术切除的患者肺癌组织的组织微阵列进一步检查了 DLX5 的表达。在组织微阵列上对 DLX5 表达的模式进行分类,其范围从无/弱(计分为 0~1+)到强(2+)(图 6B)。阳性染色见于 234 个 ADC

肿瘤中的 191 个 (81.6%), 95 个 SCC 肿瘤中的 80 个 (84.2%), 27 个 LCC 肿瘤中的 24 个 (88.9%) 以及 13 个 ASC 肿瘤中的 10 个 (76.9%)。然后检查了 DLX5 表达 (强阳性 - 弱阳性 / 缺乏) 与多种临床病理学参数的相关性, 发现其与 pT 分类的显著相关性 (在越大的肿瘤中越高, 根据 Fisher 氏确切检验 $P = 0.0053$) (表 3A)

[0886] 在经检查的 369 个 NSCLC 病例中, 在 160 个病例中 DLX5 强染色 (43.4%; 计分 2+), 在 145 个病例中弱染色 (39.3%; 计分 1+), 而在 64 个病例中无染色 (17.3%; 计分 0) (详细情况见于表 3A)。肿瘤显示强 DLX5 表达的 NSCLC 患者与缺乏 / 弱 DLX5 表达的患者相比, 揭示较短的肿瘤特异性存活时间 (根据时序检验, $P = 0.0045$; 图 6C)。亦应用了单变量分析以评价患者预后与其它因素, 包括年龄 (<65- = 65)、性别 (女性 - 男性)、组织学类型 (ADC- 非 ADC)、pT 分类 (T1-T2、T3、4)、pN 分类 (N0-N1、N2) 以及 DLX5 状态 (0、1+-2+) 之间的关联。

[0887] 在上述参数中, DLX5 状态 ($P = 0.0048$)、年龄 ($P = 0.00028$)、男性 ($P = 0.001$)、非 ADC 组织学分类 ($P = 0.01$)、pT 晚期 ($P < 0.0001$) 以及 pN 晚期 ($P < 0.0001$) 显著与不良预后相联系 (表 3B)。在对这些预后因素的多变量分析中, 强 DLX5 表达、年龄、较晚 pT 分期以及较晚 pN 分期显示为独立的预后因素 (分别 $P = 0.0415$ 、 0.0007 、 0.0004 以及 < 0.0001 ; 表 3B)。

[0888] 表 3A. NSCLC 组织中 DLX5 阳性与患者特征之间的关联 ($n = 369$)

[0889]

	总计	DLX5 强 阳性	DLX5 弱 阳性	DLX5 无	P值 强-弱/ 无
	n = 369	n = 160	n = 145	n = 64	
性别					
男性	255	109	99	47	NS
女性	114	51	46	17	
年龄 (岁)					
> 65	189	90	64	35	NS
>= 65	180	70	81	29	
组织学类型					
ADC	234	96	95	43	NS*
SCC	95	44	36	15	
其它	40	20	14	6	
pT因子					
T1	121	40	59	22	0.0053**
T2-T4	248	120	86	42	
pN因子					
N0	226	90	97	39	NS
N1+N2	143	70	48	25	

[0890] ADC, 腺癌 ;SCC, 鳞状细胞癌

[0891] 其它, 大细胞癌 (LCC) 加上腺鳞状细胞癌 (ASC)

[0892] *ADC- 非 ADC

[0893] **P < 0.05 (Fisher 氏确然检验)

[0894] NS, 不显著

[0895] 表 3B. NSCLC 患者中预后因素的 Cox' s 比例风险模型分析

[0896]

变量	风险比	95% CI	不利/有利	P 值
单变量分析				
DLX5	1.517	1.136-2.026	强(+)/弱(+)或(-)	0.0048*
年龄(岁)	1.665	1.192-2.324	65>=/<65	0.0028*
性别	1.62	1.157-2.269	男/女	0.001*
组织学类型	1.466	1.096-1.963	非 ADC / ADC ¹	0.01*
pT因子	2.699	1.867-3.902	T2+T3+T4 / T1	<0.0001*
pN因子	2.674	1.999-3.576	N1+N2 / N0	<0.0001*
变量	风险比	95% CI	不利/有利	P 值
多变量分析				
DLX5	1.354	1.012-1.811	强(+)/弱(+)或(-)	0.0415*
年龄(岁)	1.674	1.244-2.254	65>=/<65	0.0007*
性别	1.387	0.960-2.004	男/女	NS
组织学类型	1.099	0.799-1.512	非 ADC / ADC ¹	NS
pT因子	2.206	1.357-2.912	T2+T3+T4 / T1	0.0004*
pN因子	2.536	1.879-3.421	N1+N2 / N0	<0.0001*

[0897] ¹ADC, 腺癌

[0898] *P < 0.05

[0899] NS, 不显著

[0900] [实施例 10] 用针对 DLX5 的特异性 siRNA 抑制 NSCLC 细胞生长

[0901] 为评价 DLX5 对肺癌细胞的生长或存活是否不可或缺, 构建针对 DLX5 的 siRNA (si-DLX5-#1 与 -#2) 的表达质粒, 以及两种对照质粒 (针对 EGFP 的与乱序的 siRNA), 并将它们转染入肺癌细胞系 SBC-5 与 NCI-H1781 中, 用 si-DLX5-#2 转染的细胞中 mRNA 水平较之用两种对照 siRNA 中任一或 si-DLX5-#1 转染的细胞中 mRNA 水平要显著降低。所述显著降低体现在集落的数量与通过 MTT 分析测量的存活细胞数量中, 表明 DLX5 的正调节与癌细胞的生长或存活相关 (在图 6D 中显示 SBC-5 的代表性数据)。

[0902] 讨论:

[0903] 尽管在开发癌症治疗的分子定位药物方面有所进展, 对现有治疗显示良好反应的患者的比例仍旧非常有限 (Imai K, et al., Nat Rev Cancer 6:714-27 (2006))。因此, 迫切需要开发对恶性细胞具有高特异性, 同时很少或无副反应的新型抗癌剂。为达此目的, 本发明人遵循下列策略以鉴定良好的药物开发分子靶标: 1) 基于 cDNA 微阵列分析筛选在癌细胞中上调的基因; 2) 用 RNAi 系统考察功能缺失表型并确定该蛋白的生物学功能; 以及 3) 在组织微阵列中数百个临床样品系统性的分析蛋白表达。本文中采用该方法, 阐明了 DLX5——一个 distal-less 同源框蛋白家族成员, 在大部分临床肺癌样品和细胞系中经常

过表达,且其基因产物是肺癌细胞的存活 / 生长必需的。

[0904] 脊椎动物 Dlx 基因编码一个含同源框转录因子家族,它们在序列上与果蝇 Distal-less(Dll) 基因产物近缘,是旁系同源物功能多样化的一个实例。所有已经调查的脊椎动物至少拥有六个 Dlx 基因,通常组织为三个双基因簇 :Dlx1/Dlx2、Dlx5/Dlx6 与 Dlx3/Dlx4(Dlx7) (24,28-30)。Dlx5 蛋白首先在小鼠胚胎的前部在早期胚胎发育中表达 (Simeone A, et al., Proc Natl Acad Sci U S A 91 :2250-4(1994))。已报道纯合体 Dlx5/Dlx6 双敲除小鼠展示裂手、足畸形 (SHFM) 表型——一种特征为缺乏中指以及爪样远端附肢的异种肢体障碍——这表明 DLX5 是哺乳动物肢体发育的关键调控子之一 (Merlo GR, et al., Genesis 33 :97-101(2002))。事实上,有资料表明 DLX5 是哺乳动物中对起始涉及成骨细胞分化的级联反应不可或缺的主调控转录因子 (Lee JY, et al., Mol Cells 22 :182-8(2006), Ryoo HM, et al., Mol Endocrinol 11 :1681-94(1997))。

[0905] 在本文的研究中,我们阐明了 DLX3 常常在肺癌中过表达,且可能在肺癌发生 / 进展中起重要作用。在该研究中,通过 siRNA 在肺癌细胞中敲低 DLX5 的表达,导致了细胞生长的阻抑。另外,本文所述的组织微阵列实验获取的临床病理学证据表明,罹患 DLX5- 强阳性肿瘤的 NSCLC 患者的癌症特异性存活时间短于罹患 DLX5 弱阳性 / 阴性肿瘤的患者。通过体外与体内测定所获取的结果提示,DLX5 很可能是一种重要的生长因子,且与肺癌细胞的恶性更高的表型相联系。由于 DLX5 蛋白主要存在于核中,且含有一个同源异型域,其可能在转录调控中起重要作用,并在肺癌细胞中直接或间接地反式激活多种下游基因。对 DLX5 通路的进一步考察可能获得对肺癌发生中癌基因激活机理的更深入认识。因为 DLX5 并不在任何除胎盘外的正常成人组织中表达,选择性地抑制 DLX5 活性应为值得期待的治疗策略,其可望具有强力的抗癌生物学活性,且具有最低的不良作用风险。

[0906] 综上所述,DLX5 基因似乎在肺癌的发生 / 进展中起重要作用。人们可以利用切除的样本中 DLX5 的过表达作为指示对预后可能不良的患者应用辅助治疗的指标。另外,本文的数据强烈提示,特异性地以 DLX5 为靶标来设计用于人类癌症治疗的新型抗癌药与癌症疫苗,具有很大的潜力。

[0907] 第三部分 :NPTX1 相关实验

[0908] [实施例 11] 一般方法

[0909] 1. 细胞系与组织样品

[0910] 本研究使用的 23 个人类肺癌细胞系包括 9 个腺癌 (ADCs ;A427, A549, LC319, PC-3, PC-9, PC-14, NCI-H1373, NCI-H1666, 与 NCI-H1781)、9 个鳞状细胞癌 (SCCs ;EBC-1, LU61, NCI-H226, NCI-H520, NCI-H647, NCI-H1703, NCI-H2170, RERF-LC-AI, 和 SK-MES-1)、1 个大细胞癌 (LCC ;LX1) 与 4 个小细胞肺癌 (SCLC ;DMS114, DMS273, SBC-3, 与 SBC-5)。所有的细胞均于合适的补充有 10% 胎牛血清 (FCS) 的培养基中单层培养,且保持在 37 摄氏度下含 5% CO₂ 的湿润气氛中。人类小气道上皮细胞 (SAEC) 在购自 Cambrex Bio Science Inc (Walkersville, MD) 的优化培养基 (SAGM) 上生长。原代肺癌样品在征得书面知情同意后获取,如之前描述 (Kikuchi 2003 ;Taniwaki 2006)。总共 374 个经福尔马林固定的原代 NSCLC 样品,包括 238 个 ADC、95 个 SCC、28 个 LCC、13 个 ASC 以及邻近的正常肺组织,以及临床病理学资料一起,获自埼玉癌症中心 (Saitama, Japan) 接受过手术的病人。13 个 SCLC 从在广岛大学 (Hiroshima, Japan) 进行了尸检的个体处获取。肿瘤样本的组织学分类基于

WHO 标准 (Travis WD)。来自死后材料 (两个罹患 ADC 的个体) 的 NSCLC 样本和 5 种组织 (心、肝、肺、肾与肾上腺) 亦从广岛大学获取。本研究以及所有临床材料的使用已经各机构研究伦理委员会批准。

[0911] 2. 血清样品

[0912] 在征得知情同意后从 102 个作为对照的健康个体 (84 位男性与 18 位女性; 中位年龄为 49.0 \pm 7.46SD 岁, 范围为 31 到 60 岁) 与 63 个参与了 Japanese Project for Personalized Medicine (BioBank Japan) 的或被广岛大学医院收诊的, 具有慢性阻塞性肺病 (COPD) 的非癌性肺病患者 (68 位男性与 12 位女性; 中位年龄为 66.4 \pm 5.92SD 岁, 范围为 54 到 73 岁) 获取血清样品。所有这些 COPD 患者均为现行和 / 或前吸烟者 (平均 (\pm 1 标准偏差) 包-年指数 (PYI) 为 64.2 \pm 41.6; PYI 定义为每日消费的烟包数 (一包为 20 支烟) 乘以年数)。所述健康个体在全血细胞计数、C-反应性蛋白 (CRP)、红细胞沉降速率、肝功能测试、肾功能测试、尿检验、粪便检验、胸 X 光或心电图未显示异常。亦在征得知情同意后, 从 223 个广岛大学医院以及金泽癌症中心医院收诊的肺癌患者, 以及 106 个参与了 Japanese Project for Personalized Medicine BioBank Japan 的肺癌患者处获取血清; (227 位男性与 102 位女性, 中位年龄为 66.6 \pm 11.2SD 岁, 范围为 30 到 86 岁)。基于下述标准选取样品用于本研究: (a) 患者新近被诊断, 且之前未接受过治疗, 与 (b) 其肿瘤被病理学诊断为肺癌 (I-IV 期)。这 329 个病例包括 185 个 ADC、51 个 SCC 和 93 个 SCLC。临床病理学档案都被完全记录下来。血清在诊断时获取, 并储藏于 -80 摄氏度。

[0913] 3. 半定量 RT-PCR

[0914] 使用 Trizol 试剂 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) 根据生产商提供的规程从培养细胞与临床组织中抽提总 RNA。用 DNase I (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 处理抽提的 RNA 与正常人类组织多聚 A RNA, 并然后使用寡聚 (dT)₁₂₋₁₈ 引物与 SuperScript II 逆转录酶 (Life Technologies, Inc.) 进行逆转录。半定量 RT-PCR 实验使用合成的 NPTX1 基因特异性引物 (5'-GTTGGGGACCGGAGGTA AAA-3' 与 5'-AAACCACGACTTCGTCAAGC-3')、并以合成的 NPTXR 基因特异性引物 (5'-TCTGCCAGATCTTCCATCT-3' 和 5'-GGCTCAGCTCCTCATCTG-3') 或 β -肌动蛋白 (ACTB) 特异性引物 (5'-ATCAAGATCATTGCTCCTCT-3' 与 5'-CTGCGCAAGTTAGGTTTGT-3') 作为内部对照。所有的 PCR 反应均包括起始在 92 摄氏度下变性 2 分钟, 继以 22 (对 ACTB) 或 35 (对 NPTX1) 个循环的 90 摄氏度 30 秒、54 或 60 摄氏度 30 秒、以及 72 摄氏度 60 秒, 在 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 上进行。

[0915] 4. Northern 印迹分析 将人类多组织印迹 (BD Biosciences, Palo Alto, CA) 与 ³²P 标记的 PCR 产物杂交。使用上述相同的引物通过 RT-PCR 制备 NPTX1 的 PCR 产物作为探针。预杂交、杂交与漂洗遵循供应商的推荐进行。所述印迹通过在 -80 摄氏度下用增感屏放射自显影一周获得。

[0916] 5. 制备抗 NPTX1 抗体 用 GST 融合的人 NPTX1 蛋白 (密码子 20-145 与 297-430) 免疫兔来产生针对 NPTX1 (BB017) 特异性的兔多克隆抗体 (pAb), 并使用常规程序纯化。此外, 通过用编码人类 NPTX1 蛋白的质粒 DNA 基因枪皮内免疫 BALB/c 小鼠 (Chowdhury) 产生针对人类 NPTX1 特异性的小鼠单克隆抗体 (mAb-75-1)。用亲和层析从细胞培养上清纯化 NPTX1 单抗。通过使用内源表达 NPTX1 或否的肺癌细胞系裂解液进行 Western 印迹分析, 确

认了该 NPTX1 单抗对人类 NPTX1 具有特异性。

[0917] 6. Western 印迹 细胞用含 Protease Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem, Darmstadt, Germany) 的放射性免疫沉淀测定缓冲液 [50mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 150mmol/L NaCl, 1% NP40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS] 裂解。蛋白质样品通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离, 并电印迹到 Hybond-ECL 硝酸纤维素膜 (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ) 上。将印迹与小鼠单克隆抗 NPTX1 抗体 (mAb-75-1) 一起温育。使用结合有辣根过氧化物酶 (GE Healthcare Bio-Sciences) 的第二抗体检测抗原-抗体复合物。用增强型化学发光 Western 印迹检测试剂 (GE Healthcare Bio-Sciences) 使蛋白条带可视化。

[0918] 7. 免疫荧光测定

[0919] 将细胞置于玻璃盖玻片 (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) 上, 用 4% 多聚甲醛固定, 用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 在室温下透化 3 分钟。在室温下用 CASBLOCK (ZYMED, South San Francisco, California) 封闭非特异性结合 10 分钟。然后将细胞在室温下与在用含有 3% BSA 的 PBS 稀释的针对人类 NPTX1 的第一抗体 (mAb-75-1) 温育 60 分钟。在用 PBS 漂洗后, 用 Alexa Fluor 488 结合第二抗体 (Molecular Probes) 在室温下将细胞染色 60 分钟。用 PBS 又漂洗一次后, 将每个样本用含有 4', 6' - 二脒 -2' - 苯基吲哚二盐酸盐的 Vectashield (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA) 封固, 并用 Spectral Confocal Scanning Systems (TSC SP2 AOBIS; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) 可视化。

[0920] 8. 免疫组织化学与组织微阵列

[0921] 为考察已包埋在石蜡块中的临床样品中 NPTX1 蛋白的存在, 将切片用下述方法染色。简言之, 在封闭了内源过氧化物酶与蛋白质后, 添加 100mg/ml 小鼠单克隆抗人 NPTX1 抗体 (mAb-75-1)。将切片与作为第二抗体的 HRP- 标记抗兔 IgG 进行温育。添加底物色原, 并用苏木精复染样品。

[0922] 如另外发表的那样 (Callagy, 2003, 2005; Chin), 用 387 个福尔马林固定的原发性肺癌 (374 个 NSCLC 与 13 个 SCLC) 构建肿瘤组织微阵列。基于在载玻片上与对应 HE 染色切片目视调准选取用于取样的组织区域。将三个、四个或五个取自供体肿瘤块的组织芯 (直径 0.6mm; 高度 3-4mm) 用微阵列点样器 (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) 置入受体石蜡块中。对于每个病例打孔取出正常组织芯, 将所得微阵列块的 5 微米切片用于免疫组织化学分析。由三个独立的调查者在事先不知道临床病理学数据的情况下半定量地评价 NPTX1 阳性。用下列标准评价 NPTX1 染色的强度: 强阳性 (计分为 2+), 在大于 50% 肿瘤细胞中染成棕色使细胞质完全模糊; 弱阳性 (1+), 在肿瘤细胞细胞质中任何可见的程度更低的棕色染色; 以及无染色 (计分为 0), 在肿瘤细胞中无可见的染色。只有在所有评议者都断定为强阳性时才将肺癌计为强阳性。

[0923] 9. 统计分析 使用 StatView 统计程序 (SAS, Cary, NC) 进行统计分析。临床病理学变量与 NPTX1 阳性之间的联系用 Fisher 氏确切检验进行比较。用 Kaplan-Meier 法评价肿瘤特异性存活, 且两组间的差异用时序检验评价。与预后相联系的风险因子用 Cox's 比例风险回归模型采用步降 (step-down) 过程评价。检验并满足比例风险假设, 只有在单变量分析中具有统计学上显著性结果的变量才纳入多变量分析中。从该模型中移除变量的标

准是似然比统计值,其基于最大部分似然性估计(移除的缺省 P 值为 0.05)

[0924] 10. ELISA 使用原创的 ELISA 系统测量 NPTX1 的血清水平。首先,将 100ml 每孔的针对 NPTX1 特异性的小鼠单克隆抗体 (mAb-75-1;4mg/ml) 添加到 96 孔微孔板 (Nunc, Roskilde, Denmark) 上作为捕获抗体并在室温下温育 2 小时。在用 PBST(含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 与 0.05% Tween 的 PBST) 在室温下洗去任何未结合抗体后,将 200ml 每孔的 5% BSA 添加到孔中,并在室温下温育 2 小时进行封闭。在漂洗三次后,将 100ml 每孔的用含 1% BSA 的 PBS3 倍稀释的血清添加到孔中,并在室温下温育 2 小时。在洗脱任何未结合的物质后,将 100ml 每孔的用 Biotin Labeling Kit-NH₂ (DOJINDO, Kumamoto, Japan) 生物素化的对 NPTX1 特异性的兔多克隆抗体 (BB017;0.01mg/ml) 添加到孔中作为检测抗体,并在室温下温育 2 小时。在漂洗 3 次以移除任何未结合的抗体-酶试剂后,将抗生物素蛋白链菌素-辣根过氧化物酶 (SAv-HRP) 添加到孔中,并温育 20 分钟。在漂洗三次后,将 100ml 每孔的底物溶液 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) 添加到孔中,并让其反应 30 分钟。通过添加 50ml 2N 硫酸中止反应。以波长 450nm,参照波长 570nm 用分光计确定色强度。血清中的 CEA 水平用可市购的酶测试试剂盒 (HOPE Laboratories, Belmont, CA) 根据供应商的推荐通过 ELISA 进行测量。血清中的 CYFRA 水平用可市购的酶测试试剂盒 (DRG International Inc USA, Mountainside, NJ) 根据供应商的推荐通过 ELISA 进行测量。血清中的 ProGRP 水平用可市购的酶测试试剂盒 (TFB Tokyo Japan) 根据供应商的推荐通过 ELISA 进行测量。对肿瘤组与健康对照组之间 NPTX1、CEA、CYFRA 与 proGRP 水平的差异通过 Mann-Whitney U 检验加以分析。用接受者操作特征 (ROC) 曲线分析评价 NPTX1、CEA、CYFRA 与 proGRP 的水平以确定具有最佳诊断准确率与似然比的截断值。EBI3 与 CEA/ProGRP 之间的相关系数用 Spearman 秩相关计算。显著性定义为 $P < 0.05$ 。

[0925] 11. RNA 干扰测定 如上所述,前人已建立了一种用于在哺乳动物细胞中产生 siRNA 的基于载体的 RNA 干扰 (RNAi) 系统;psiH1BX3.0 (Suzuki, 2003)。在此,使用 30 微升 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将 10 微克 siRNA 表达载体转染至过表达 NPTX1 的 NSCLC 细胞系 A549 与 SCLC 细胞系 SBC-5 中。将转染后细胞在合适浓度的遗传霉素 (G418) 存在下培养 5 天,随后用吉姆萨染色与三次重复 MTT 分析测量细胞数量和存活率;简言之,将 cell-counting kit-8 solution (DOJINDO) 以 1/10 体积的浓度添加到每个皿中,并将该平板在 37 摄氏度下再温育 2 小时。然后用 Microplate Reader 550 (BIO-RAD, Hercules, CA) 测量 450nm 吸光度。为确证 NPTX1 mRNA 表达的阻抑,使用合成的 NPTX1 特异性引物进行半定量 RT-PCR 实验。为 RNAi 的合成寡聚核苷酸靶序列如下所示:对照 1 (萤光素酶, LUC:北美萤火虫 (*Photinus pyralis*) 萤光素酶基因), 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3';对照 2 (乱序, SCR:编码 5S 与 16S rRNA 的纤细裸藻叶绿体基因), 5'-GCGCGCTTTGTAGGATTCG-3'; NPTX1 siRNA-1 (si-NPTX1-1), 5'-CTCGGGCAAACCTTTCGAAT-3'; NPTX1 siRNA-2 (si-NPTX1-2), 5'-GGTGAAGAAGAGCCTGCCA-3'。

[0926] 12. 细胞生长测定 将 NPTX1 的整个编码序列克隆入 pcDNA3.1 myc-His 质粒载体 (Invitrogen, Carlsbad, California) 的合适位点。COS-7 细胞用带 myc-His 标签的 NPTX1 的表达质粒或模拟质粒转染后在含有 10% FCS 的 DMEM 中在合适浓度的遗传霉素 (G418) 存在下生长 8 天。用 MTT 测定评价细胞存活力;简言之,将 cell-counting kit-8 solution (DOJINDO) 以 1/10 体积的浓度添加到每个皿中,并将平板在 37 摄氏度下再温育 2

小时。用 Microplate Reader 550 (BIO-RAD, Hercules, CA) 以 450nm 为参照测量吸光度。

[0927] 13. 基质胶侵袭测定 NIH-3T3 细胞用人类 NPTX1 的 pcDNA3.1myc-His 的表达质粒或模拟质粒转染后,在含有 10% 的 DMEM 中生长到接近汇合。通过胰蛋白酶消化收获细胞,在未添加血清或蛋白酶抑制剂的 DMEM 中漂洗,再以 1×10^5 个细胞 /ml 的浓度悬浮于 DMEM 中。在制备细胞悬浮液之前,用 DMEM 在室温下将基质胶基质 (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) 的干化层再水化 2 小时。将含有 10% FCS 的 DMEM (0.75ml) 添加到 24-孔基质胶侵袭室的每个下层小室中,并将 0.5ml (5×10^4 个细胞) 的细胞悬浮液添加到每个上层小室的插片中。在 37 摄氏度下将带插片的板温育 22 小时。温育后处理各个小室;依据供应商 (Becton Dickinson Labware) 的指导将通过基质胶侵袭的细胞固定并进行吉姆萨染色。

[0928] [实施例 12] 在肺肿瘤与正常组织中的 NPTX1 表达

[0929] 为搜寻用于开发肺癌治疗剂和 / 或诊断生物标记的新型靶分子,首先,对于 101 个肺癌样品用 cDNA 微阵列筛选在一半以上的肺癌样品中显示在癌细胞中的表达水平高于正常细胞超过 3 倍的基因 (Kikuchi, 2003, 2006, Kakiuchi, 2004, Taniwaki)。在被筛查的 27648 个基因中,在大部分被检测的肺癌中鉴定出 NPTX1 的过表达,并通过半定量 RT-PCR 实验的方法在另外 15 个癌组织中的 10 个、以及 23 个肺癌细胞系中的 17 个中确证了其反式激活 (图 7A, 上边和下边小图)。随后产生了针对人类 NPTX1 特异性的小鼠单克隆抗体,并在四种肺癌细胞系 (三种 NPTX1 阳性细胞: NCI-H226、NCI-H520 与 SBC-5; 及一种 NPTX1 阴性细胞系, NCI-H2170) 以及小气道上皮来源细胞 (SAEC) 中通过 Western 印迹分析确证了内源 NPTX1 蛋白的表达 (图 7B)。

[0930] 进行了免疫荧光分析以检查在这四种肺癌细胞系中内源 NPTX1 的亚细胞定位。在 NCI-H226 细胞中,检测到 NPTX1 在肿瘤细胞细胞质中呈现颗粒状并为高水平,在 NCI-H520 与 SBC-5 细胞中为低水平,但不存在于 NCI-H2170 细胞中,这与 Western 印迹的结果一致 (图 7C)。因为 NPTX1 是分泌型蛋白 (Schlimgen), 应用 ELISA 方法以检查它在这些肺癌细胞系培养基中的存在。在 NCI-H226、NCI-H520 与 SBC-5 细胞的培养基中检测到了 NPTX1 蛋白,但在 NCI-H2170 细胞的培养基中则没有 (图 7D)。Western 印迹在细胞裂解液中可检出的 NPTX1 量,以及 ELISA 在培养基中可检出的 NPTX1 量,均显示与通过 RT-PCR 检测的 NPTX1 量有良好的相关性,表明所述抗体特异性地与 NPTX1 蛋白结合。

[0931] 使用人类 NPTX1 cDNA 作为探针进行的 Northern 印迹仅在脑与肾上腺中检测到非常弱的 6.5kb 条带。在任何其它组织中未观察到其表达 (图 8A)。亦在五种正常组织 (肝、心、肾、肺、肾上腺) 以及肺 ADC 组织中用对 NPTX1 特异性的单克隆抗体检查了 NPTX1 的表达。NPTX1 染色主要见于肿瘤细胞的细胞质与肾上腺 (皮质) 细胞中,但在正常细胞中未检测出来 (图 8B)。在肺癌中 NPTX1 蛋白的表达水平显著高于肾上腺中的表达水平。

[0932] [实施例 13] NPTX1 表达与 NSCLC 患者的不良预后相关

[0933] 为验证 NPTX1 的生物学与临床病理学显著性,通过含有来自 374 个 NSCLC 患者的原发 NSCLC 以及来自 13 个患者的 SCLC 组织的组织微阵列方法检查 NPTX1 蛋白的表达。在 56.1% 的手术切除的 NSCLC (210/374) 以及在 69.2% 的 SCLC (9/13) 中观察到了 NPTX1 的阳性细胞质染色,而未在任何正常肺组织中观察到染色 (图 8C)。然后在 374 个 NSCLC 患者中检查其阳性染色与多种临床病理学参数的联系。在组织微阵列上将 NPTX1 表达的模式进行

分类,范围为从缺乏(计分为0)到弱/强阳性(计分为1+~2+)(图8D,上边小图;参见方法部分)。

[0934] 在检查的374个NSCLC病例中,在139(37.1%;计分2+)例中NPTX1强染色,在71(19.0%;计分1+)例中弱染色,以及在164例(43.9%;计分0)中未染色(表1A)。在此研究中,肿瘤大小(pT_{2-4} - pT_1 ;根据Fisher氏确然检验 $P < 0.0001$)与淋巴结转移(pN_{1-2} - pN_0 ;根据Fisher氏确然检验 $P = 0.0044$)与NPTX1状态有显著联系(表1B)。Kaplan-Meier分析显示具有强NPTX1染色(计分2+)患者的中位存活时间较之具有无/弱NPTX1染色(计分0,1+)的NSCLC患者显著为短(根据时序检验 $P < 0.0001$;图8D,下边小图)。预后因素的多变量分析显示pT分期、pN分期和强NPTX1阳性为独立的预后因素(表1B)

[0935] 表1A. 在NSCLC组织中NPTX1阳性与患者特征间的关联($n = 374$)

[0936]

	总计	NPTX1 强阳性	NPTX1 弱阳性	NPTX1 缺乏	P 值 强-弱/缺乏
	n = 374	n = 139	n = 71	n = 164	
性别					
男性	259	104	47	108	NS
女性	115	35	24	56	
年龄(岁)					
< 65	188	72	35	81	NS
>= 65	186	67	36	83	
组织学类型					
ADC	238	93	38	107	NS
SCC	95	26	24	45	
其它	41	20	9	12	
pT 因子					
T1	125	27	26	72	<0.0001**
T2-T4	249	107	45	92	
pN 因子					
N0	229	72	44	113	0.0044**
N1+N2	145	67	27	51	

[0937] ADC,腺癌 SCC,鳞状细胞癌

[0938] 其它,大细胞癌(LCC)加上腺鳞状细胞癌(ASC)

[0939] *ADC-非ADC

[0940] **P < 0.05 (Fisher 氏确然检验)

[0941] NS, 不显著

[0942] 表 1B. 在 NSCLC 患者中预后因素的 Cox' s 比例风险模型分析

[0943]

变量 单变量分析	风险比	95% CI	不利/有利	P 值
NPTX1	2.224	1.672-2.958	强(2+)/弱(1+)或 (-)	<0.0001*
年龄(岁)	1.329	0.998-1.770	65 >= / < 65	NS
性别	1.750	1.256-2.440	男性/女性	0.001*
组织学类型	1.474	1.106-1.965	非 ADC / ADC ¹	0.0081*
pT 因子	2.667	1.860-3.822	T2-T4 / T1	<0.0001*
pN 因子	2.565	1.928-3.414	N1+N2 / N0	<0.0001*

变量 多变量分析	风险比	95% CI	不利/有利	P 值
NPTX1	1.898	1.412-2.552	强(2+)/弱(1+)或 (-)	<0.0001*
年龄(岁)	1.331	0.922-1.921	65 >= / < 65	NS
性别	1.248	0.907-1.717	男性/女性	NS
组织学类型	1.910	1.309-2.789	非 ADC / ADC ¹	0.0008*
pT 因子	2.236	1.674-2.986	T2-T4 / T1	<0.0001*

[0944] ¹ADC, 腺癌

[0945] *P < 0.05

[0946] NS, 不显著

[0947] [实施例 14] 肺癌患者的 NPTX1 血清水平

[0948] 因为 NPTX1 编码分泌型蛋白, 调查了 NPTX1 蛋白是否被分泌到肺癌患者的血清中。ELISA 实验在 329 位肺癌患者中绝大多数人的血清样品中检测到了 NPTX1 蛋白; 肺癌患者中 NPTX1 的血清水平是 1.36 ± 1.60 ng/mL (平均 ± 1 标准偏差) 而在健康个体中是 0.59 ± 0.44 ng/mL (平均 ± 1 标准偏差) (该差异是显著的, $P < 0.001$, Mann-Whitney U 检验; 图 9A)。根据肺癌的组织学类型, NPTX1 的血清水平在 ADC 患者中是 1.41 ± 1.27 ng/mL, 在 SCC 患者中为 1.09 ± 0.95 ng/mL, 而在 SCLC 患者中为 1.42 ± 2.33 ng/mL; 这三种组织学类型之间的差异不显著。在良性肺病 COPD 患者中, NPTX1 的血清水平为 0.67 ± 0.48 ng/ml。

肺癌患者中 NPTX1 的血清水平显著高于正常志愿者与 COPD 患者 ($P < 0.0001$)。即使在早期肿瘤中仍然检测到高水平的血清 NPTX1。进一步,局部晚期肺癌(IIIB 期)或远端器官转移(IV 期或 ED)的患者血清中高 NPTX1 的水平比在罹患早期疾病(I-III A 期或 LD)的患者中显著更为常见。使用自该 329 个癌症患者与 102 个健康对照的数据绘制的接受者操作特性(ROC)曲线,设置本方法截断值以为 NPTX1 提供最佳诊断准确率与似然比,即,对 NPTX1 为 1.28ng/ml(灵敏度对 NSCLC 为 41.5%,对 ADC 为 44.3%,对 SCC 为 29.4%,对 SCLC 为 31.2%,特异性对 NSCLC 为 96.1%)。在 80 个罹患 COPD 的患者中,7 个(8.8%)具有阳性 NPTX1 水平。使用来自 NSCLC 患者的成对的手术前与手术后(手术后 2 个月)的血清样品进行 ELISA 实验,以监视同一患者中血清 NPTX1 的水平。在手术切除原生肿瘤后,急剧地减少了血清中 NPTX1 的浓度(图 9C)。本发明人进一步在同组 12 个在手术前即已收集血清的 NSCLC 病例(6 位患者罹患 NPTX1 阳性肿瘤,而 6 位患者罹患 NPTX1 阴性肿瘤)中,将血清 NPTX1 值与原生肿瘤中的 NPTX1 的表达水平进行比较。血清 NPTX1 水平显示与原生肿瘤中 NPTX1 的表达水平的较好相关度(图 9D)。上述结果独立地支持了 NPTX1 作为在早期检测癌症与监视肿瘤切除与该疾病复发的生物标志的高特异性与巨大潜能。

[0949] [实施例 15]NPTX1 与 CEA/CYFRA/ProGRP 作为肿瘤标志的组合分析

[0950] 为评价血清 NPTX1 水平作为肿瘤检测生物标记的临床有用性,针对来自同一组癌症患者以及对照个体的血清样品,通过 ELISA 测量其中两个常规肿瘤标记(对 ADC 患者为 CEA,对 SCC 患者为 CYFRA,以及对 SCLC 患者为 ProGRP)的血清水平。依据 ROC 分析的判断结果,设定本测定中的截断值以实现最佳诊断准确度与似然比:对 CEA 为 2.5ng/ml(对 ADC 灵敏度为 38.4%,特异性为 98.0%),对 CYFRA 为 2.0ng/ml(对 SCC 灵敏度为 29.4%,特异性为 98.0%)以及对 ProGRP 为 46pg/ml(对 SCLC 灵敏度为 62.4%,特异性为 99.0%)。血清 NPTX1 与 CEA 值的相关系数并不显著(Spearman 秩相关系数: $p = 0.109$; $P = 0.1474$)。

[0951] 在血清中测量 NPTX1 与 CEA 两者可将检测肺 ADC 患者的总体灵敏度改善至 64.9%。在正常志愿者(对照组)中这两种肿瘤标记任一的假阳性率为 4.9%。血清 NPTX1 与 CYFRA 值间的相关系数并不显著(Spearman 秩相关系数: $p = 0.013$; $P = 0.9242$)。在血清中测量 NPTX1 与 CYFRA 两者可将检测肺 SCC 患者的总体灵敏度改善至 62.3%。在正常志愿者(对照组)中这两种肿瘤标记任一的假阳性率为 5.9%。血清 NPTX1 与 ProGRP 值间的相关系数并不显著(Spearman 秩相关系数: $p = 0.161$; $P = 0.1232$)。在血清中测量 NPTX1 与 ProGRP 两者可将检测肺 SCLC 患者的总体灵敏度改善至 72.0%。在正常志愿者(对照组)中这两种肿瘤标记任一的假阳性率为 4.9%。

[0952] [实施例 16]NPTX1 对肺癌细胞的自分泌生长促进作用

[0953] 为评价 NPTX1 的上调是否在肺癌细胞的生长或存活中起作用,设计并构建质粒以表达针对 NPTX1 的 siRNA(si-NPTX1-1, -2),以及两种不同的对照质粒(针对萤光素酶(LUC)的 siRNA,与乱序(SCR)),并将它们转染至 A549 与 SBC-5 细胞中以阻抑内源 NPTX1 的表达。在 si-NPTX1-2 转染的细胞中 NPTX1 的量较之两种对照 siRNA 中任一种转染的细胞显著减少(图 10A,上边小图);si-NPTX1-1 几乎未显示任何对 NPTX1 表达的阻抑作用。与其对基因表达水平的阻抑作用一致,转染的 si-NPTX1-2 导致通过集落形成和 MTT 分析测量的集落数与细胞存活率显著减少,但上述作用未在两种对照 siRNA 或 si-NPTX1-1 中观察到(图 10A,中间和上边小图)。

[0954] 为进一步揭示 NPTX1 在肿瘤发生中的潜在作用, 本发明人制备了旨在用来表达 NPTX1 的质粒 (pcDNA3.1-NPTX1-myc/His) 或者模拟载体。这些质粒 DNA 转染到在其中 NPTX1 表达可检测出来的 COS-7 细胞中, 并实施集落形成与 MTT 测定。在含有经 NPTX1 cDNA 有义链转染的 COS-7 细胞的皿中, 较之用模拟载体转染的细胞, 细胞存活率显著增加 (图 10B)。

[0955] 接着, 考察了亲和纯化的抗 NPTX1 单克隆抗体 (mAb-75-1) 能否抑制在含有 NPTX1 培养基中培养的 COS-7 细胞的生长。如期待的, 通过添加 NPTX1 所得的生长增强作用被 50nM 浓度的抗 NPTX1 抗体所中和, 且 COS-7 细胞的存活率变得几乎与未与 NPTX1 培养的细胞相同 (图 10B)。随后, 使用重组 NPTX1 蛋白进行自分泌测定。为了考察分泌的 NPTX1 会否影响细胞生长, 将 COS-7 细胞与终浓度为 0.1nM 到 1nM 的 NPTX1 在培养基中温育。与 NPTX1 温育的 COS-7 细胞通过 MTT 分析显示与对照相比, 细胞生长以剂量依赖的方式增强 (图 10C)。

[0956] 这些结果表明 NPTX1 的促进生长作用很可能经 NPTX1 与 COS-7 细胞表面受体的结合而介导。接着, 考察了抗 NPTX1 抗体 (50nM) 能否抑制在含有 NPTX1 培养基中培养的 COS-7 细胞的生长。如期待的, 通过添加 NPTX1 所得的生长增强被 50nM 浓度的抗 NPTX1 抗体所中和, 且 COS-7 细胞的存活率变得几乎与未与 NPTX1 培养的细胞相同 (图 10C)。这些结果表明 NPTX1 的促进生长作用很可能经由 NPTX1 与 COS-7 细胞表面受体的结合而被介导。

[0957] 接着, 考察了抗 NPTX1 抗体对 NPTX1 阳性肺癌细胞系, SBC-5 与 A549, 以及 NPTX1 阴性 SBC-3 与 NCI-H2170 细胞的作用。通过添加抗 NPTX1 单克隆抗体 (25 或 50nM; mAb-75-1) 到培养基中, 以剂量依赖的方式阻抑了 SBC-5 与 A549 两者的生长 (SBC-5 : $P = 0.012$; A549 : 25 或 50nM 分别 $P = 0.027$ 与 $P = 0.003$; 均为配对 t 检验), 而 NPTX1 不表达的 SBC-3 细胞则不受影响 (图 10D)。这些数据显示 NPTX1 作为自分泌 / 副分泌生长因子对肺癌细胞的增殖起作用, 而且可能是基于抗体疗法的潜在的免疫治疗靶标。

[0958] [实施例 17] NPTX1 激活的细胞侵袭

[0959] 由于在组织微阵列上进行的免疫组织化学分析显示, NPTX1 强阳性肿瘤的 NSCLC 患者较之 NPTX1 弱阳性或阴性肿瘤, 显示较短的癌症特异性存活期间, 使用 NIH-3T3 细胞进行基质胶测定来检查 NPTX1 在细胞侵袭中可能起的作用。与用模拟载体转染的细胞相比, 通过将 NPTX1 cDNA 转染入 NIH-3T3 细胞, 显著增强了这些细胞穿过基质胶的侵袭活性 (图 11)。

[0960] [实施例 18] 抗 NPTX1 单克隆抗体在体内抑制肺癌细胞的生长

[0961] 本发明进一步考察了在小鼠模型中, 作为治疗剂的抗 NPTX1 抗体的体内肿瘤阻抑作用。本发明人将 A549 细胞移植到 7 周龄雌性 BALB/c 裸小鼠 (nu/nu) 皮下, 并每周两次向肿瘤中施加 300 微克 / 只的亲合纯化的抗 NPTX1 单克隆抗体 (mAb-75-1) 或正常小鼠 IgG (对照), 持续 30 日。所述抗 NPTX1 单克隆抗体 (mAb-75-1) 造成 A549 肺癌生长的显著阻抑, 而同剂量的正常小鼠 IgG 不影响肿瘤生长 ($P = 0.016$, 根据每个配对 t 检验; 图 12 上边小图)。使用切除肿瘤的冷冻切片进行 HE 染色, 检测出显著的纤维性变化, 以及在经抗 NPTX1 抗体处理的肿瘤组织中的活癌细胞减少 (图 12, 下边小图)。综上所述, 这些结果揭示抗 NPTX1 单克隆抗体 (mAb-75-1) 在体外与体内具有对癌细胞的生长阻抑作用。

[0962] [实施例 19] NPTXR 作为 NPTX1 在生长促进通路中的受体

[0963] 作为已知的 NPTX1 受体,有人提示 NPTXR 在一种前突触蛇毒毒素——太攀蛇毒素 (taipoxin) 运输入突触的过程中起作用,并可能代表涉及清除突触碎片的新神经元摄入途径 (Kirkpatrick LL, et al., J Biol Chem 278 :17786-92(2000), Dodds DC, et al., J Biol Chem 272(34) :21488-94(1997))。为考察 NPTXR 基因是否在肺癌中表达,且负责生长促进作用,本发明人通过半定量 RT-PCR 实验分析了肺癌细胞系以及临床组织中 NPTXR 的表达。NPTXR 在肺癌样品中以相对较高水平表达,但在正常肺中不然 (图 7E)。这些肿瘤中 NPTXR 的表达模式显示与 NPTX1 表达具有良好的一致性。如上所述检查 COS-7 细胞的 NPTX1 自分泌生长促进作用,依据半定量 RT-PCR 分析与免疫细胞化学分析确证了内源表达 NPTXR (数据未显示)。该数据表明, NPTX1 很可能通过与 NPTXR 在肺癌细胞中相互作用以介导其生长促进作用。

[0964] 为考察 NPTX1 与 COS-7 与肺癌细胞上的内源 NPTXR 的结合,使用内源表达 NPTXR 并经 NPTX1 表达载体转染的 COS-7 与肺癌 SBC-5 细胞进行了受体 - 配体结合测定。确证了外源 NPTX1 分泌到这些细胞的培养基中,且通过流式细胞术分析检测出 NPTX1 与这些细胞表面的结合 (COS-7 的代表性数据示于图 15A)。亦观察到分泌的 NPTX1 与内源 NPTXR 在这两种细胞系 (COS-7 与 SBC-5 细胞) 表面上的共定位 (图 13A)。为确证 NPTX1 对 COS-7 与 SBC-5 细胞的特异性相互作用,我们在其培养基中添加了剥离缓冲液 (100mM 甘氨酸、500mM NaCl, pH2.5) 以除去作为第一抗体结合于细胞表面的抗 NPTX1 与抗 NPTXR 抗体。在经甘氨酸处理后, NPTX1 以及 NPTXR 均未在这些细胞的细胞表面检测出来,表明 NPTX1 与 NPTXR 在所述细胞表面相互作用 (图 13B 与 13C)。为检查 NPTX1 与 NPTXR 的直接关联,本发明人在 COS-7 或 SBC-5 细胞中瞬时表达了带 myc/His 标签的 NPTX1。用抗 myc 抗体或抗 NPTXR 抗体对细胞裂解液进行免疫沉淀,并将其用抗 NPTXR 或抗 myc 抗体进行 Western 印迹分析。发现 NPTX1 与 NPTXR 共沉淀 (图 15B)。这些结果确证了 NPTX1 与 NPTXR 间的相互作用,暗示 NPTX1/NPTXR 复合物的存在。

[0965] 使用设计用来表达针对 NPTXR 的 siRNA (si-NPTXR-1 与 si-NPTXR-2) 的质粒考察了 NPTX1-受体相互作用在肺部癌症发生中的生物学意义。将这些质粒各自转染入 A549 或 SBC-5 细胞,结果,与含有两种对照 siRNA 中任一种的细胞相比,内源受体的表达被阻抑 (图 13D, 上边小图)。与受体表达的减少一致的是, A549 与 SBC-5 细胞显示细胞存活力与集落数显著减少 (图 13D, 中间与下边小图)。这些结果强烈支持 NPTX1 可能通过与 NPTXR 相互作用,在肺癌发生 / 进展中起非常重要作用的可能性。

[0966] [实施例 20] 在与 NPTXR 结合后 NPTX1 的内化

[0967] 为确定 NPTX1/NPTXR 信号传导的调控机理,本发明人用共聚焦显微镜观察 NPTX1 与 NPTXR 的亚细胞定位,以考察当细胞暴露于分泌的 NPTX1 时, NPTX1/NPTXR 能否被内化。受体 COS-7 或 SBC-5 细胞在盖玻片上培养基中 37℃ 培育过夜。还收集了用 NPTX1 载体转染的供体 COS-7 或 SBC-5 细胞的上清。然后,将受体 COS-7 或 SBC-5 细胞与供体细胞上清温育 3 小时。本发明人通过免疫细胞化学检测到 NPTX1 与这些细胞的表面的结合 (图 14A 与 14B)。亦观察到外源 NPTX1 与内源 NPTXR 在这两种细胞系表面的共定位 (数据未显示)。然后,我们在膜透化条件下进行免疫细胞化学,检测到被内化的外源 NPTX1 (图 14A 与 14B)。在用来自供体 NPTX1 转染 (+) 的 COS-7 细胞的限制培养基处理受体 COS-7 细胞 1 或 3 小时后,通过 Western 印迹使用抗 myc 抗体检测出经内化的 NPTX1。受体 COS-7 细胞似乎以时

间依赖的方式摄取由 NPTX1 转染 (+) COS-7 细胞分泌到条件化培养基中的 NPTX1 (图 14C)。所有这些分析都是用盲法进行的,实验者对处理条件一无所知。

[0968] 讨论:

[0969] 在过去 10 年间,尽管在肿瘤诊断成像、组合化学疗法、现代手术技术与放射性疗法方面有长足进展,对大部分肺癌患者而言,预后与生活质量方面的进展甚微。事实上,三分之二的患者是在晚期才诊断出来,没有了进行治愈性手术治疗的可能。针对晚期 NSCLC 的新化学治疗用药法有效性有所改善,然而对晚期 NSCLC 传统化学疗法的中位存活期仍仅为 7-8 个月左右 (Breathnach 2001, Hanna 2004)。

[0970] 因此,现在迫切需要开发实用的早期检测癌症的诊断用生物标志,以及对癌细胞的恶性重要的特定细胞信号为靶标的新型药物。如上所述,针对 101 例癌症,通过激光显微解剖富集肿瘤细胞后,使用含有 27648 个基因的 cDNA 微阵列对进行了全基因组范围的表达谱分析。通过此分析,鉴定出了数种基因,它们可能是开发新型诊断用标志、治疗药物、和 / 或免疫疗法的潜在良好候选物。在其中,编码推定的肿瘤特异性穿膜 / 分泌蛋白的基因可能具有显著的优势,因为它们存在于细胞表面或在胞外空间内,和 / 或于血清内,使其作为分子标志和治疗靶标易于接近。

[0971] 在本发明的语境下,编码分泌蛋白的 NPTX1,被鉴定为开发新型诊断和治疗肺癌工具的潜在靶标。NPTX1 是一种新近被承认的亚家族“正五聚蛋白”(Goodman) 的一员。NPTX1 介导突触大分子的摄取,而且在发育中的及成年人的脑中涉及突触发生与突触可塑性 (Breathnach, O. S, et al., J ClinOncol. 19 :1734-1742(2001))。然而并无对 NPTX1 与癌症发生相关性的记载。

[0972] 在此,显示了 NPTX1 蛋白在绝大多数肺癌样本中表达,而在正常组织中很少表达。进一步,越高的 NPTX1 表达水平与越短的癌症特异性存活期间相联系。相应的,诱导 NPTX1 外源表达,可增强 COS-7 细胞与 NIH-3T3 细胞的生长 / 侵袭活性。分泌的 NPTX1 可作为自分泌 / 旁分泌细胞生长 / 侵袭因子起作用。先前发现 NPTX1 与神经元正五聚蛋白受体 (NPTXR) 结合 (Goodman, AR, et al., Cytokine Growth Factor Rev. Aug ;7(2) :192-202(1996))。然而,当在肺癌细胞系与肺癌组织中通过半定量 RT-PCR 分析 NPTXR 的 mRNA 表达时, NPTXR 的表达模式与 NPTX1 的并不完全一致 (数据未显示)。尽管此观察背后隐藏的准确分子机理仍旧需通过在癌症细胞中鉴定 NPTX1 受体来阐明,通过体外与体内分析所得的结果清楚地表明过表达的 NPTX1 很可能是一种与癌细胞生长与侵袭相联系的自分泌 / 旁分泌生长因子,诱导肺癌细胞的高恶性表型。进一步,所述数据展示了 NPTX1 作为肺癌治疗分子靶标的潜能。

[0973] 有趣的是,缺氧条件诱使 NPTX1 在肺癌细胞中的表达显著提高 (数据未显示)。临床研究清楚地表明,肿瘤病灶内的低 pO_2 压力是独立的不良结果预后指标,并与远端转移相关的风险增高相关,不依赖于治疗 (46-48)。缺氧在肿瘤细胞存活、侵袭与转移中起关键作用。缺氧诱导因子 1a 调控一系列可在缺氧条件下增加肿瘤细胞存活的基因与蛋白,包括血管内皮生长因子 (VEGF)、胰岛素样生长因子、诱导型一氧化氮合酶、血小板衍生内皮生长因子、葡萄糖运载蛋白 1、促红细胞生成素以及一氧化氮合酶基因 (49-52)。其它临床研究表明在实体肿瘤中减少缺氧对放射性疗法的结果有负面影响。因此,本文数据表明以 NPTX1 为靶标治疗侵袭性、转移性以及抗放疗的缺氧型肺癌的策略是值得期望的。

[0974] 在另一方面,亦发现高水平的 NPTX1 蛋白存在于来自肺癌患者的血清样品中。血清标志可应用于鉴别性诊断、癌症的早期检测、预后预测、监测治疗有效性以及监视疾病复发。本文所述的研究揭示,即使在罹患早期肿瘤的患者中亦可检测出高的血清 NPTX1 水平。进一步,在手术切除原发肿瘤后, NPTX1 的血清浓度急剧减少。进一步,血清 NPTX1 的水平与 NPTX1 在同一患者原发肿瘤组织中的表达水平显示出良好的相关性。

[0975] 为证实将 NPTX1 应用为诊断工具的可行性,将 NPTX1 的血清水平与传统 ADC、SCC 与 SCLC 的诊断标志 -CEA、CYFRA 与 ProGRP 的血清水平,在诊断灵敏度与特异性方面进行了比较。一种组合两种标记 (NPTX1+CEA、NPTX1+CYFRA 或 NPTX1+ProGRP) 的测定法使对肺癌 (ADC、SCC 或 SCLC) 的灵敏度增加到大约 64-72%,较之仅使用 CEA、CYFRA 或 ProGRP 为高,而 5-6%的健康志愿者被错误诊断为阳性。尽管需要使用覆盖各种临床分期的更大组的血清进行进一步的验证,但本文中提出的数据已充分说明 NPTX1 作为血清学生物标记对诊断早期肺癌、监测治疗有效性以及监视疾病复发是有用的。

[0976] 总而言之, NPTX1 在绝大多数肺癌中过表达,且其血清水平在大部分患者的血清中提升。NPTX1 与其它肿瘤标志组合,可显著改善癌症诊断的灵敏度,而且其可作为免疫组织化学标志在初步诊断中使用,以鉴别可从早期系统性治疗获益的病人。因为 NPTX1 的上调是肺癌发生中常见且重要的特征,以 NPTX1 为靶标可能是设计肺癌特异性抗癌药的新策略。

[0977] 第四部分 :CDKN3 与 EF-1delta 相关实验

[0978] [实施例 18] 一般方法

[0979] 1. 细胞系与临床组织样品

[0980] 本研究使用的 15 种人类肺癌细胞系如下所示 :15 个 NSCLC :LC176, LC319, A549, NCI-H23, NCI-H226, NCI-H522, PC3, PC9, PC14, SK-LU-1, EBC-1, RERF-LC-AI, SK-MES-1, SW900 与 SW1573。所有的细胞在合适的补充 10%胎牛血清 (FCS) 培养基中单层生长,并在含有 5% CO₂ 的湿润空气中保持于 37 摄氏度下。人类小气道上皮细胞 (SAEC) 在购自 Cambrex BioScience Inc. (Walkersville, MD) 的优化培养基 (SAGM) 中生长。原发 NSCLC,包括七种 ADC 与七种 SCC,如他处所述 (Kikuchi et al., 2003) 获得。总共 385 个原发 NSCLC 的福尔马林固定样品,包括 243 个 ADC、102 个 SCC、28 个 LCC、12 个腺鳞状细胞癌 (ASC) 与邻近正常肺组织,是先前与临床病理学数据一起从在埼玉癌症中心 (Saitama, Japan) 接受治愈性手术的患者处获取的。来自尸检材料 (两个罹患 SCC 的个体) 的 NSCLC 样本与五种组织 (心、肝、肺、肾与胃) 亦自广岛大学获取。本研究以及所有临床材料的使用均得到了各机构研究伦理委员会的批准。

[0981] 2. 半定量 RT-PCR 分析

[0982] 使用 TRIzol 试剂 (Life Technologies, Inc.) 遵循生产商提供的方法自培养细胞与临床组织中提取总 RNA。用 DNase I (Nippon Gene) 处理提取的 RNA 与正常人类组织多聚 (A) RNA,并用寡聚 (dT) 20 引物与 SuperScript II 逆转录酶 (Invitrogen) 对其进行逆转录。用下列合成基因特异性引物或作为内部对照的 β -肌动蛋白 (ACTB) 特异性引物实施半定量 RT-PCR 实验 :

[0983] CDKN3, 5' -GTGAATTGTTCTCAGTTTCTCGG-3' (SEQ ID NP :34) 与

[0984] 5' -TCTCTTGATGATAGATGTGCAGC-3' (SEQ ID NP :35) ;

- [0985] EF-1delta, 5'-TGGCTACAACTTCCTAGCACAT-3' (SEQ ID NP :36) 与
- [0986] 5'-CTCCACCACACACTGAATCTGTA-3' (SEQ ID NP :37) ;
- [0987] ValRS, 5'-TAAGCATCACGCGAGCCGTG-3' (SEQ ID NP :38) 与
- [0988] 5'-GGATGGAGCAGCAGCGATCAGAA-3' (SEQ ID NP :39) ;
- [0989] EF-1alpha, 5'-AGACTGGTTAATGATAACAATGC-3' (SEQ ID NP :40) 与
- [0990] 5'-GGTCTCAAATTTCTGTGACAAAT-3' (SEQ ID NP :41) ;
- [0991] EF-1beta, 5'-CAGAAGCATTC AAGCAGACG-3' (SEQ ID NP :42) 与
- [0992] 5'-ATGCCATGATCCAGGATGGA-3' (SEQ ID NP :43) ;
- [0993] EF-1gamma, 5'-GGTGGACTACGAGTCATACACAT-3' (SEQ ID NP :44) 与
- [0994] 5'-CAGTTTCCTTTAATGACCCCC-3' (SEQ ID NP :45) ;
- [0995] CDK1, 5'-AGCCTAGCATCCCATGTCAA-3' (SEQ ID NP :46) 与
- [0996] 5'-GAAGACGAAGTACAGCTGAAG-3' (SEQ ID NP :47) ;
- [0997] ACTB, 5'-GAGGTGATAGCATTGCTTTCG-3' (SEQ ID NP :11) 与
- [0998] 5'-CAAGTCAGTGTACAGGTAAGC-3' (SEQ ID NP :12).
- [0999] 优化 PCR 反应的循环数以保证产物强度落在扩增的对数期内。

[1000] 3. Northern- 印迹分析

[1001] 将人类多组织印迹 (BD Biosciences Clontech) 与 32P 标记的 CDKN3 PCR 产物杂交。预杂交、杂交与漂洗根据供应商的推荐进行。用增感屏在 -80 摄氏度下对印迹进行放射性自显影 7 日。

[1002] 4. Western- 印迹分析

[1003] 用含有蛋白酶抑制剂 (Protease Inhibitor Cocktail Set III ;CALBIOCHEM) 的 RIPA 缓冲液 [50mM Tris-HCl (pH8.0), 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS] 裂解细胞。蛋白质样品通过 SDS- 多聚丙烯酰胺凝胶分离并电印迹到 Hybond-ECL 硝化纤维素膜 (GE Healthcare Bio-sciences) 上。将印迹与小鼠单克隆抗 CDKN3 (KAP) 抗体 (BD Bioscience Pharmingen)、兔多克隆抗 EF-1delta 抗体 (NOVUS Biologicals)、小鼠单克隆抗 EF-1alpha 抗体 (Upstate)、兔多克隆抗 Akt 抗体 (Cell Signaling Technology, Inc.)、兔多克隆抗磷酸 -Akt (Ser473) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、小鼠单克隆抗 β - 肌动蛋白抗体 (SIGMA)、小鼠单克隆抗 Flag 抗体 (SIGMA)、兔多克隆抗 c-Myc 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) 或大鼠单克隆抗 HA 抗体 (Roche Diagnostics Corporation) 温育。使用与辣根过氧化物酶结合的第二抗体 (GE Healthcare Bio-sciences) 检测抗原 - 抗体复合物。用 ECLWestern 印迹检测试剂 (GE Healthcare Bio-sciences) 将蛋白条带可视化, 如前所述 (Kato et al., 2005 ;Suzuki et al., 2005)。小鼠单克隆抗 CDKN3 (KAP) 抗体 (BD Bioscience Pharmingen) 与兔多克隆抗 EF-1delta 抗体 (NOVUS Biologicals) 各自通过使用表达所述内源蛋白与否的 NSCLC 细胞裂解液的 Western 印迹分析被证实对人类 CDKN3 与 EF-1delta 具有特异性 (参见图 19A)。

[1004] 5 免疫组织化学与组织微阵列

[1005] 为考察 CDKN3 或 EF-1delta 蛋白在临床样品中的存在, 将切片用 ENVISION+Kit/ 辣根过氧化物酶 (HRP) (DakoCytomation) 染色。简言之, 在封闭了内源过氧化物酶与蛋白后, 添加抗 CDKN3 抗体 (BD Bioscience Pharmingen) 或抗 EF-1delta 抗体 (NOVUS

Biologicals),并将切片与作为第二抗体的 HRP 标记抗小鼠或兔 IgG 温育。添加底物色原并用苏木精复染样本。

[1006] 如之前发表 (Chin, S. F., et al., Mol. Pathol. 56 :275-279(2003) ;Callagy, G., et al., Mol. Pathol. 12 :27-34(2003) ;Callagy, G., et al., J. Pathol. 205 :388-396(2005)) 所述构建肿瘤组织微阵列。基于在载玻片上与对应的 H&E 染色切片目视调准选取用于取样的组织区域。将三个、四个或五个取自供体肿瘤块的组织芯用微阵列点样器 (Beecher Instruments) 置入受体石蜡块中。在每个病例中打孔取正常组织芯,将所得微阵列块的 5 微米切片用于免疫组织化学分析。CDKN3 或 EF-1delta 蛋白的阳性情况由三名对临床随访数据事先无知的独立考察者根据染色强度来评价,评价为缺乏或阳性。只有在评议者独立地判定病例为阳性时,才可以接受该例为阳性。

[1007] 6. 统计分析

[1008] 进行组织微阵列分析,利用列联表确定临床病理学变量,例如年龄、性别、肿瘤大小 (pT) 以及淋巴结转移 (pN) 与 CDKN3 和 / 或 EF-1delta 阳性情况之间的相关性。计算从手术之日到 NSCLC 造成的死亡或最后一次随访观察之时的肿瘤特异性存活曲线。对每个相关变量与 CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达计算 Kaplan-Meier 曲线;对患者亚组之间存活时间的差异使用时序检验进行分析。与预后相联系的风险因素使用 Cox's 比例风险回归模型用步降过程进行评价。考察并满足了比例风险假定;只有在单变量分析中具有统计学上显著结果的变量才包含于多变量分析中。移除变量的标准是似然比统计,其基于最大似然估计 (从所述模型中移除的缺省 P 值为 0.05)。

[1009] 7. RNA 干扰测定

[1010] 如上所述,先前构建了基于载体的 RNA 干扰 (RNAi) 系统 psiH1BX3.0 以在哺乳动物细胞中指导 siRNA 的合成 (Suzuki, C., Cancer Res. 63 :7038-7041(2003))。用 30 微升 Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 将 10 微克表达 siRNA 的载体转染入 NSCLC 细胞系。将所述转染细胞在合适浓度的遗传霉素 (G418) 存在的情况下培养 5 天,继之通过吉姆萨染色与三次重复的 MTT 测定来测量细胞数量与存活力。RNAi 所用合成寡聚核苷酸的靶序列如下:

[1011] 对照 1 (EGFP:基因,维多利亚水母 (*Aequorea victoria*) GFP 的突变体),

[1012] 5' -GAAGCAGCACGACTTCTTC-3' (SEQ ID NO :23);

[1013] 对照 2 (萤光素酶:萤火虫 (*Photinus pyralis*) 萤光素酶基因),

[1014] 5' -CGTACGCGGAATACTTCGA-3' (SEQ ID NO :15);

[1015] 对照 3 (乱序:编码 5S 与 16S rRNA 的纤细裸藻叶绿体基因),

[1016] 5' -GCGCGCTTTGTAGGATTCG-3' (SEQ ID NO :16);

[1017] siRNA-CDKN3-A (si-A), 5' -TATAGAGTCCCAAACCTTC-3' (SEQ ID NO49);

[1018] siRNA-CDKN3-B (si-B), 5' -TACACTGCTATGGAGGACT-3' (SEQ IDNO :50);

[1019] siRNA-EF-1delta-1 (si-1), 5' -GTGGAGAACCAGAGTCTGC-3' (SEQ IDNO :51);

[1020] siRNA-EF-1delta-2 (si-2), 5' -CATCCAGAAATCCCTGGCT-3' (SEQ IDNO :52).

[1021] 为验证该 RNAi 系统,首先使用半定量 RT-PCR 来验证各个对照 siRNA (EGFP、萤光素酶与乱序) 减少其相应的靶基因 (事先被瞬间转染到 COS-7 细胞中) 表达的作用。用于本测定的细胞系中,通过半定量 RT-PCR 确认:si-CDKN3 与 si-EF-1delta,而非对照,下调了

CDKN3 与 EF-1delta 的表达。

[1022] 8. 免疫组织化学与组织微阵列

[1023] 为考察 CDKN3 或 EF-1delta 蛋白在临床样品中的存在,将切片用 ENVISION+Kit/辣根过氧化物酶 (HRP) (DakoCytomation) 染色。简言之,在封闭了内源过氧化物酶与蛋白后,添加抗 CDKN3 抗体 (BD BiosciencePharmingen) 或抗 EF-1delta 抗体 (NOVUS Biologicals),并将切片与作为第二抗体的 HRP 标记抗小鼠或兔 IgG 温育。添加底物色原并用苏木精复染样本。

[1024] 如先前发表的 (Chin, et al., 2003; Callagy, et al., 2003, 2005) 构建肿瘤组织微阵列。基于在载玻片上与对应的 H&E 染色切片目视调准选取用于取样的组织区域。将三个、四个或五个取自供体肿瘤块的组织芯用微阵列点样器 (Beecher Instruments) 置入受体石蜡块中。在每个病例中打孔取正常组织芯,将所得微阵列块的 5 微米切片用于免疫组织化学分析。CDKN3 或 EF-1delta 蛋白的阳性情况由三名对临床随访数据事先无知的独立考察者根据染色强度来评价,评价为缺乏或阳性。CDKN3 或 EF-1delta 染色的强度使用下列标准评价:强阳性 (2+),在大于 50% 肿瘤细胞中染成暗棕色使细胞质完全模糊;弱阳性 (1+),在肿瘤细胞细胞质中任何可见的程度较低的棕色染色;以及无染色 (计分为 0),在肿瘤细胞中无可见的染色。只有在评议者独立地判定病例为阳性时,才可以接受该例为阳性。

[1025] 9. 统计分析

[1026] 用组织微阵列分析使用列联表确定临床病理学变量,例如年龄、性别、肿瘤大小 (pT) 以及淋巴结转移 (pN) 与 CDKN3 和 / 或 EF-1delta 阳性间的相关性。计算从手术之日到 NSCLC 造成的死亡或最后一次随访观察之时的癌症特异性存活曲线。对每个相关变量与 CDKN3 和 / 或 EF-1delta 表达计算 Kaplan-Meier 曲线;对患者亚组中存活时间的差异使用时序检验进行分析。使用 Cox' s 比例风险回归模型用步降过程对与预后相联系的风险因素进行评价。考察并满足了比例风险假定;只有在单变量分析中具有统计学上显著结果的变量才包含于多变量分析中。移除变量的标准是似然比统计,其为基于最大部分似然估计 (从所述模型中移除的缺省 P 值为 0.05)。

[1027] 10. 基质胶侵袭分析

[1028] 使用 FuGENE 6 转染试剂 (Roche Diagnostics) 遵循生产商的指导,用表达 CDKN3 或模拟质粒的转染 NIH-3T3 细胞。收获转染细胞并将其悬浮在不含 FCS 的 DMEM 中。在制备细胞悬浮液之前,用 DMEM 在室温下将基质胶基质 (Becton Dickinson Labware) 的干化层再水化 2 小时。然后在 24-孔基质胶侵袭盒的每个下层小室中添加含有 10% FCS 的 DMEM,并将 0.5ml (5×10^4 个细胞) 的细胞悬浮液添加到每个上层小室的插片中。在 37 摄氏度下将插片的板温育 22 小时。在温育后固定通过基质胶包被的插片侵袭的细胞并对其进行吉姆萨染色。

[1029] 11. 合成细胞渗透肽

[1030] 将一组 19 氨基酸肽共价连接到膜转导 11 多聚精氨酸序列 (11R; refs. Futaki et al., Hayama et al., 2006, 2007) 的 NH₂ 端,这些 19 氨基酸肽对应于 EF-1delta 蛋白中包含其可能的 CDKN3 结合位点的部分。合成了五个细胞渗透性肽:11R-EF-1delta₇₃₋₉₁, RRRRRRRR RRR-GGG-TSGDHGELVVRIASLEVEN; 11R-EF-1delta₉₀₋₁₀₈, RRRRRRRRRRRR-GGG-ENQSLRGVVQELQQA ISKL; 11R-EF-1delta₁₀₈₋₁₂₆, RRRRRRRRRRRR-GGG-LEARLNVLEKSSPGHRATA; 11R-EF-1delta₁₂₅₋₁₄₃,

RRRRRRRRRRR-GGG-TAPQTQHVSPMRQVEPPAK ;11R-EF-1delta₁₄₂₋₁₆₀, RRRRRRRRRRRR-GGG-AKKPA TPAEEDDEDIDLF。用反相高压制备液相色谱纯化肽。用所述 11R 肽在浓度为 2.5、5.0 与 7.5 μM 下与 LC319 细胞温育 5 日。每隔 48 小时在每种肽合适浓度下更换培养液,并在处理 5 日后通过 MTT 测定评价细胞的存活力。

[1031] 12. 免疫沉淀与 CDKN3- 相关蛋白的 MALDI-TOF-MS 定位

[1032] 来自肺癌细胞系 LC319 的细胞抽提物在 4 摄氏度与 100 微升蛋白 G- 琼脂糖珠在终体积为 2ml 的免疫沉淀缓冲液 [0.5% NP-40, 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl] 在蛋白酶抑制剂存在下温育以进行预清理。在 4 摄氏度下 1000rpm 离心 5 分钟后,将上清在 4 摄氏度下与抗 CDKN3 单克隆抗体或正常小鼠 IgG 温育 2 小时。然后通过 5000rpm 离心 2 分钟以收集珠子,并用 1ml 每种免疫沉淀缓冲液漂洗六次。将漂洗后的珠子重悬在 50 微升 Laemmli 加样缓冲液中,并煮沸 5 分钟,然后将蛋白在 5-10% 的 SDS PAGE 胶 (BIO RAD) 上分离。电泳后,凝胶银染色。切出在用抗 CDKN3 单克隆抗体免疫沉淀的抽提物中特有的蛋白条带并对其基质协助解吸 / 电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析 (AXIMA-CFR plus, SHIMADZU BIOTECH)。

[1033] 13. 磷酸酶测定

[1034] 对于磷酸酶处理,将细胞提取物与 λ 磷酸酶 (New England Biolabs) 在磷酸酶缓冲液或单纯的缓冲液中 37 摄氏度温育 1 小时,随后用于免疫印迹。

[1035] [实施例 19] 在肺肿瘤与正常组织中 CDKN3 的表达

[1036] 为搜寻开发治疗剂和 / 或诊断用生物标志的新型靶分子,首先通过 cDNA 微阵列筛选在 101 个肺癌中超过 50% 的显示 3 倍以上高表达的基因。在被筛选的 27648 个基因中,鉴定出编码细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 3 (CDKN3) 常常在肺癌中过表达,且在 14 个额外的 NSCLC 病例中的 12 个 (7 个腺癌 (ADC) 中的 6 个以及 7 个鳞状细胞癌 (SCC) 中的 6 个) (图 16A) 确证 CDKN3 表达增加。有趣的是,在脑部转移以及晚期原发肺癌 (腺癌, ADC) 中较之那些早期原发肺癌的中,观察到远高于此的 CDKN3 表达模式 (图 16B)。在考察的 23 中正常人类组织中,使用 CDKN3 cDNA 作为探针的 Northern 印迹 ting 在睾丸中鉴别出对应 0.9kb 转录物的强信号,并在胸腺、结肠、胃与骨髓中为非常弱的信号 (图 16C)。亦用抗 CDKN3 抗体在六种正常组织 (心、肝、肾、肺、结肠与睾丸) 中考察 CDKN3 的表达,并且发现 CDKN3 在睾丸 (主要在初级精母细胞的细胞质中) 与肺癌中大量表达,但其表达在剩下五种正常组织中几乎无法检测出来 (图 17A)。

[1037] [实施例 20] CDKN3 过表达与不良预后的联系

[1038] 为验证 CDKN3 的生物学与临床病理学意义,利用含有来自 385 个患者的 NSCLC 以及来自 15 个患者的 SCLC 组织的组织微阵列,考察了临床 NSCLC 中 CDKN3 蛋白的表达。在 65.7% 的手术切除 NSCLC (253/385) 以及 80.0% 的 SCLC (12/15) 中观察到了 CDKN3 的阳性染色 (细胞质与核),而未在任何考察的正常肺组织中观察到染色 (图 17B)。然后在 385 个 NSCLC 患者中考察阳性染色与不同临床病理学参数间的联系。SCLC 的样本大小过小,无法进一步加以评价。性别 (男性为高;根据 Fisher' 氏确然检验, P = 0.0054)、组织学分类 (在非 ADC 中为高,根据 Fisher' 氏确然检验, P < 0.0001) 以及 pN 分期 (在 N1、N2 中为高,根据 Fisher' 氏确然检验, P = 0.0057) 与 CDKN3 阳性显著相关 (表 4A)。其肿瘤显示 CDKN3 阳性染色的 NSCLC 患者较之无 CDKN3 表达的 NSCLC 患者显示较短的肿瘤特异性存活

期间(根据时序检验, $P < 0.0001$) (图 17C)。通过单变量分析, 在 NSCLC 患者中, 老龄 ($> = 65$)、男性性别、非 ADC 的组织学分类、pT 晚期、pN 晚期以及 CDKN3 阳性均显著性地与不良肿瘤特异性存活相关(表 4B)。在预后因素的多变量分析中, 显示老龄、pT 晚期、pN 晚期以及 CDKN3 阳性可能为独立的预后因素(表 4B)。

[1039] 表 4A. 在 NSCLC 组织中 CDKN3 阳性与患者特征的联系

[1040]

	总计	CDKN3 阳性	CDKN3 阴性	P 值 强/弱-阴性
	n = 385	n = 253	n = 132	
性别				
男性	264	186	78	0.0054*
女性	121	67	54	
年龄(岁)				
< 65	188	129	59	0.2828
≥ 65	197	124	73	
组织学类型				
ADC	243	140	103	<0.0001*,**
SCC	102	80	22	
其它	40	33	7	
pT 因子				
T1+T2	274	176	98	0.3463
T3+T4	111	77	34	
pN 因子				
N0	237	143	94	0.0057*
N1+N2	148	110	38	

[1041]

pN 因子

[1042] ADC, 腺癌; SCC, 鳞状细胞癌

[1043] 其它, 大细胞癌加上腺鳞状细胞癌

[1044] * $P < 0.05$ (Fisher' 氏确切检验)

[1045] **ADC- 非 ADC 组织学

[1046] 表 4B. NSCLC 中预后因素的 Cox 比例风险模型分析

[1047]

变量	风险比	95% CI	不利/有利	P-值
单变量分析				
CDKN3	2.121	1.488-3.025	强(+)或弱(+) (-)	<0.0001*
年龄(岁)	1.425	1.060-1.918	65 >= / < 65	0.0192*
性别	1.626	1.164-2.273	男性/女性	0.0044*
组织学类型	1.438	1.072-1.929	非ADC / ADC ¹	0.0153*
pT因子	1.913	1.413-2.590	T3+T4 / T1+T2	<0.0001*
pN因子	2.420	1.805-3.243	N1+N2 / N0	<0.0001*
多变量分析				
CDKN3	1.897	1.313-2.742	强(+) 或弱(+) / (-)	0.0007*
年龄(岁)	1.797	1.327-2.433	65 >= / < 65	0.0002*
性别	1.357	0.938-1.963	男性/女性	0.1053
组织学类型	0.993	0.713-1.383	非ADC / ADC ¹	0.9680
pT因子	1.895	1.389-2.584	T3+T4 / T1+T2	<0.0001*
pN因子	2.284	1.690-3.086	N1+N2 / N0	<0.0001*

[1048] ¹ADC, 腺癌

[1049] *P < 0.05

[1050] [实施例 21]EF-1beta-gamma-delta/Va1RS 作为与 CDKN3 相互作用的新型分子的鉴定

[1051] 为阐明 CDKN3 在癌症发生中的功能, 寻找可在肺癌细胞中与 CDKN3 相互作用的蛋白。对 LC319 细胞的细胞提取物用抗 CDKN3 单克隆抗体或小鼠 IgG (阴性对照) 免疫沉淀。在用 SDS-PAGE 分离后, 对蛋白质复合物进行银染。将见于用抗 CDKN3 抗体的免疫沉淀物, 但不见于小鼠 IgG 的免疫沉淀物的 140-、50-、31- 与 25-kDa 的蛋白条带切出, 用胰蛋白酶消化, 并加以质谱分析。来自 140-、50-、31- 与 25-kDa 条带的肽分别与缬氨酰-tRNA 合酶 (缬氨酰-tRNA 合成酶, Va1RS ;140-kDa)、真核翻译延伸因子 1gamma (EF-1gamma ;50-kDa)、真核翻译延伸因子 1delta (EF-1delta ;31-kDa)、真核翻译延伸因子 1beta (EF-1beta ;25-kDa) 的序列吻合。

[1052] 这四种蛋白包括负责蛋白合成的延伸因子 1 的鸟嘌呤-核苷酸交换复合物。为考察 NSCLC 细胞中延伸因子 1 的鸟嘌呤-核苷酸交换复合物组分的表达模式以及与其相关的分子, 通过半定量 RT-PCR 分析 Va1RS、EF-1delta、EF-1alpha1、EF-1beta、EF-1gamma 与 CDK1 的 mRNA 表达。在肺癌中 CDKN3 的表达与 EF-1delta 中非常相似 (图 18B)。通过 Western 印迹, 进一步确证了在肺癌细胞系中 CDKN3 与 EF-1delta 蛋白共激活 (图 19A)。先前有报

道显示在哺乳动物细胞中 EF-1delta 有致癌潜能 (Joseph, P., et al., J Biol Chem. 277: 6131-6136(2002))。

[1053] 基于这些发现,考察了肺癌细胞中 CDKN3 对 EF-1delta 在功能上的相关性。通过免疫沉淀反应考察了 CDKN3 与 EF-1delta 基因表达丰富的 LC319 细胞中内源 CDKN3 与 EF-1delta 间的天然相互作用 (图 20A)。在经阿菲迪霉素 (aphidicolin) 同步化的 LC319 细胞中,通过使用小鼠单克隆抗 CDKN3 与兔多克隆抗 EF-1delta 抗体进行免疫细胞化学分析考察它们的亚细胞定位。在细胞周期中,这两种蛋白质的共定位主要在细胞质与细胞核中检出 (代表性图像示于图 20B)。

[1054] [实施例 22]EF-1delta 对 NSCLC 生长与进展的作用

[1055] 为阐明 EF-1delta 的临床病理学意义,用含有来自 385 个患者的肺癌组织的组织微阵列考察临床 NSCLC 中 EF-1delta 的蛋白表达。在 67.5% (260/385) 的手术切除的 NSCLC 中观察到 EF-1delta 的阳性染色 (于细胞质与细胞核) (图 19B)。在任何经考察的正常肺组织中几乎无法观察到 EF-1delta 染色。在这些肿瘤中 CDKN3 的表达与 EF-1delta 表达显著地一致 (根据 Fisher' 氏确然检验, $P < 0.0001$)。在 NSCLC 中 EF-1delta 的阳性染色与性别 (在男性中更高;根据 Fisher' 氏确然检验, $P = 0.0004$)、组织学类型 (在非 ADC 中更高;根据 Fisher' 氏确然检验, $P < 0.0001$)、pN 晚期 (在 N1、N2 中更高;根据 Fisher' 氏确然检验, $P = 0.0141$) 以及 5 年存活 (根据时序检验, $P = 0.0006$) 显著相联系 (图 19C; 表 5A)。在这些预后因素的多变量分析中,显示年龄、pT 分期、pN 分期以及 EF-1delta 阳性为独立的预后因素 (表 5B)。

[1056] 为进一步评价 EF-1delta 是否在生物学上对肺癌细胞的生长或存活不可或缺,我们设计并构建了表达针对 EF-1delta 的 siRNA 的质粒 (si-EF-1delta-1 与 -2), 以及三种不同的对照质粒 (针对 EGFP、LUC 或 SCR 的 siRNA), 并将它们转染至肺癌细胞中以阻抑内源 EF-1delta 的表达。在用 si-1 转染的细胞中,EF-1delta 转录物的量较之用三种对照 siRNA 中任一种转染的细胞而言显著减少 (图 22B); si-2 几乎不显示对 CDKN3 表达的阻抑作用。si-1 转染亦导致通过 MTT 与集落形成分析测得的细胞存活力与集落数显著减少 (图 22B)。这些结果表明 CDKN3 可通过激活 EF-1delta 和 / 或与之相互作用促进 NSCLC 的生长和 / 或进行。

[1057] 表 5A. 在 NSCLC 组织中,EF-1delta 阳性与患者特征间的联系

[1058]

	总计 n = 385	EF-1delta 阳性 n = 260	EF-1delta 阴性 n = 125	P-值阳性— 阴性
性别				
男性	264	194	70	0.0004*
女性	121	66	55	
年龄 (岁)				
< 65	188	134	54	0.1292
≥ 65	197	126	71	
组织学 类型				
ADC	243	145	98	<0.0001*,**
SCC	102	79	23	
其它	40	36	4	
pT因子				
T1+T2	260	179	81	0.1519
T3+T4	125	95	30	
pN因子				
[1059] N0	237	149	88	0.0141*
N1+	148	111	37	
N2				

[1060] ADC, 腺癌 ;SCC, 鳞状细胞癌

[1061] 其它, 大细胞癌加上腺鳞状细胞癌

[1062] *P < 0.05 (Fisher' 氏确然检验)

[1063] **ADC- 非 ADC 组织学

[1064] 表 5B. 在 NSCLC 中对预后因素的 Cox 比例风险模型分析

[1065]

变量	风险比	95% CI	不利/有利	P-值
单变量分析				
EF-1delta	1.813	1.282-2.562	强(+)或弱(+)/(-)	0.0008*
年龄(岁)	1.425	1.060-1.918	65 >= / < 65	0.0192*
细胞	1.626	1.164-2.273	男性/女性	0.0044*
组织学类型	1.438	1.072-1.929	非ADC / ADC ¹	0.0153*
pT因子	1.913	1.413-2.590	T3+T4 / T1+T2	<0.0001*
pN因子	2.420	1.805-3.243	N1+N2 / N0	<0.0001*
多变量分析				
EF-1delta	1.589	1.102-2.290	强(+)或弱(+)/(-)	0.0131*
年龄(岁)	1.839	1.354-2.498	65 >= / < 65	<0.0001*
细胞	1.340	0.925-1.942	男性/女性	0.1222
组织学类型	1.021	0.731-1.426	非ADC / ADC ¹	0.9023
pT因子	1.838	1.348-2.505	T3+T4 / T1+T2	0.0001*
pN因子	2.345	1.733-3.172	N1+N2 / N0	<0.0001*

[1066] ¹ADC, 腺癌

[1067] *P < 0.05

[1068] [实施例 23] CDKN3 介导的 EF-1delta 去磷酸化

[1069] 在肺癌细胞中, Western- 印迹检测出两种不同大小的 EF-1delta 蛋白, 而有报道 EF-1delta 在体外在其丝氨酸与苏氨酸位点磷酸化 (Minella 0, et al., Biosci Rep. 3: 119-27 (1998)). 为考察 EF-1delta 在体内磷酸化的可能性, 我们在蛋白质磷酸酶存在或不存在的条件下温育过表达 Flag-HA 标签化的 EF-1delta 的 COS-7 细胞的提取物, 并通过 Western 印迹分析 EF-1delta 蛋白的分子量。在经磷酸酶处理的提取物中大部分 EF-1delta 蛋白测得的重量较之未处理的细胞中为小 (图 20C, 左边部分)。相反, Flag-HA 标签化的 EF-1beta 与 Flag-HA 标签化的 EF-1gamma 的分子量在经磷酸酶处理后不变 (图 20C, 中右部分)。

[1070] 进一步, 我们确证了 EF-1delta 的磷酸化形式存在于肺癌 LC319 细胞中 (图 20D, 左边部分)。因为 CDKN3 编码双重特异性蛋白磷酸酶, 我们随后将表达 Flag-HA 标签化的 CDKN3 表达载体转染至 LC319 细胞中。使用抗 EF-1delta 抗体的 Western 印迹分析显示内源 EF-1delta 以依赖于 CDKN3 剂量的方式被去磷酸化 (图 20D, 右边部分)。

[1071] 为确证 CDKN3 对 EF-1delta 的特异性磷酸化, 将 Flag-HA 标签化的 CDKN3 表达载体与 Flag-HA 标签化的 EF-1delta 表达载体转染入 COS-7 细胞, 并检测出过表达 CDKN3 导致磷酸化 EF-1delta 蛋白的减少 (图 21A, 左边部分)。用抗 Flag 抗体免疫沉淀 EF-1delta

与 CDKN3, 继而用泛磷酸化 (磷酸 - 丝氨酸、- 苏氨酸或 - 酪氨酸) 特异性抗体进行免疫印迹, 结果显示 EF-1delta 在其丝氨酸残基处去磷酸化 (图 21A, 右边部分)。未观察到 CDKN3 的过表达对苏氨酸和酪氨酸残基的作用 (数据未显示)。

[1072] [实施例 24] 在 EF-1delta 中鉴别 CDKN3- 结合区域

[1073] 随后考察了这两种蛋白的联系的生物学重要性, 以及其作为肺癌治疗靶标的潜能。为确定在 EF-1delta 中与 CDKN3 相互作用所需的域, 将每个在其 N- 或 C- 端带有 Flag-HA 序列的 EF-1delta 构建体转染入 LC319 细胞 (EF-1delta72-160, EF-1delta161-281, EF-1delta1-160, EF-1delta72-281 与全长 EF-1delta1-281; 图 21B)。用单克隆抗 Flag 抗体的免疫沉淀显示 EF-1delta72-160、EF-1delta1-160、EF-1delta72-281、和 EF-1delta1-281 可与 CDKN3 相互作用, 但 EF-1delta161-281 不可 (图 21B)。这些实验提示在 EF-1delta 中含有亮氨酸拉链基序的 89 氨基酸多肽 (密码子 72-160; SEQ IDNO:48) 可能在与 CDKN3 的相互作用中起重要作用。

[1074] [实施例 25] 针对 CDKN3 与 EF-1delta 的 siRNA 对 NSCLC 细胞的生长阻抑作用

[1075] 为评价 CDKN3 是否对肺癌细胞的生长或存活不可或缺, 设计并构建了表达针对 CDKN3 的 siRNA 的质粒 (si-A 与 -B), 以及三种不同的对照质粒 (针对 EGFP、LUC 或乱序 (SCR) 的 siRNA), 并将它们转染至 LC319 细胞 (图 22A) 与 A549 细胞 (数据未显示) 中。在用 si-A 转染的细胞中, CDKN3 转录物的量较之用三种对照 siRNA 中任一种转染的细胞而言非常显著地减少, 而 si-B 几乎不显示对 CDKN3 表达的阻抑作用 (图 22A, 左上小图)。与其对基因表达的阻抑作用一致的是, si-A 转染导致通过 MTT 与集落形成分析测量的细胞存活力与集落数显著降低, 但三种对照或 Si-B 未观察到上述作用 (图 22A, 右上与下边小图)。

[1076] 为了进一步评价 EF-1delta 是否在生物学上对肺癌细胞的生长或存活不可或缺, 我们设计并构建了表达针对 EF-1delta 的 siRNA 的质粒 (si-EF-1delta-1 与 -2), 以及三种不同的对照质粒 (针对 EGFP、LUC 或 SCR 的 siRNA), 并将它们转染至 LC319 细胞中以阻抑内源 EF-1delta 的表达。在用 si-1 转染的细胞中, EF-1delta 转录物的量较之用三种对照 siRNA 中任一种转染的细胞而言显著减少 (图 22B 左上小图); si-2 几乎不显示对 EF-1delta 表达的阻抑作用。si-1 转染亦导致通过 MTT 与集落形成分析测量的细胞存活力与集落数显著降低 (图 22B 右上与下边小图)。这些结果表明 CDKN3 可通过激活 EF-1delta 和 / 或与之相互作用促进 NSCLC 的生长和 / 或进展。

[1077] [实施例 26] CDKN3 的过表达可增加细胞侵袭并足以激活 Akt

[1078] 由于对组织微阵列的免疫组织化学分析显示, 罹患 CDKN3 强阳性肿瘤的肺癌患者的癌症特异性存活期间较之 CDKN3 阴性肿瘤的患者为短 (图 19B 与 19C), 进行基质胶侵袭测定以确定 CDKN3 是否在细胞侵袭能力中起作用。经 CDKN3 表达载体转染的 NIH-3T3 通过基质胶的侵袭较之经模拟载体转染的对照细胞显著增强 (图 19C), 表明 CDKN3 亦可对肺癌细胞的高恶性表型起贡献。另一方面, EF-1alpha, 已知其与 EF-1beta、gamma、delta 与 ValRS 相联系, 似乎在许多功能中都涉及它。

[1079] 因此, 为考察在 NSCLC 细胞中 CDKN3 与 EF-1alpha (EF-1alpha1 与 EF-1alpha2) 的表达模式, 通过半定量 RT-PCR 实验分析了 CDKN3、EF-1alpha1 与 EF-1alpha2 的 mRNA 表达。在肺癌中 EF-1alpha2 的表达模式与 EF-1delta 的类似 (图 23)。EF-1alpha2 很可能是一种重要的人类癌基因, EF-1alpha2 表达导致啮齿动物成纤维细胞转化并在裸小鼠

中增加它们的致癌性 (Lee, 2003 ;Anand et al., 2002)。另一方面, EF-1alpha 很可能由 EF-1beta-gamma-delta/ValRS 调控, 但对 EF-1alpha 作为多功能蛋白如何被调控所知甚少 (Minella et al., 1998)。近来报道亦显示 EF-1alpha2 是 Akt 的激动剂, 且以依赖于 Akt 与 PI3K 的方式增强细胞侵袭与迁移。为确定 CDKN3 是否可能参与 Akt 激活, 在 LC319 细胞中瞬时过表达 CDKN3, 并用 Western 印迹分析确定 Akt 的磷酸化状态。然后使用 Ser473 的磷酸化作为 Akt 激活的代用标志进行了考察。如图 19D 所示, 瞬时过表达 CDKN3 的 LC319 细胞相对于经模拟载体转染的对照细胞增加了 Ser473 磷酸化水平。为确定细胞侵袭的 CDKN3 依赖性的增加是否需要 PI3K 活性, 我们在 LY294002 的存在下进行了侵袭测定。这些测定显示, 在 CDKN3 过表达细胞中, PI3K 的抑制以依赖于 LY294002 剂量的方式显著降低了侵袭的程度 (图 23, 上边小图)。另一方面, LY294002 对模拟载体转染的对照细胞的侵袭几乎无抑制作用 (图 23, 下边小图)。

[1080] [实施例 27] 显性失活的 CDKN3 肽对 NSCLC 的生长抑制作用

[1081] 然后, 为考察 CDKN3 与 EF-1delta 间相互作用对肺癌细胞的生长或存活的功能上的重要性, 开发了可望抑制这两种蛋白结合的生物活性细胞渗透肽。然后合成了 5 个不同的 19 氨基酸序列的肽, 这些序列都包含于 EF-1delta 的密码子 73-160 中 (图 24A)。这些肽的 NH₂ 端与膜转导性的 11 精氨酸残基 (11R) 共价相连。评价了将所述五个 11R-EF-1delta 肽添加到 LC319 的培养基中后对生长的作用, 其中用 11R-EF-1delta₉₀₋₁₀₈ 肽的处理导致通过 MTT 测量的细胞存活力显著下降 (图 24B, 上边小图)。根据免疫沉淀实验, 将 11R-EF-1delta₉₀₋₁₀₈ 肽添加入 LC319 细胞的培养基中减少内源 CDKN3 与 EF-1delta 之间复合物的形成 (图 24B, 下边小图)。这些数据显示 11R-EF-1delta₉₀₋₁₀₈ 可特异性的抑制 CDKN3 与 EF-1delta 间的相互作用。

[1082] 讨论:

[1083] 在识别与鉴定癌症治疗新型分子靶标方面最近发展神速, 因而人们对开发新型抗癌剂的兴趣高涨 (Kelly, K., et al., J. Clin. Oncol. 19 :3210-3218(2001))。迄今为止, 人们已考察了无数的肺癌靶向疗法, 然而对其有应答的肿瘤类型范围以及治疗的有效性均仍非常有限。分子定位药物, 由于其作用机理清楚, 可以期待它们对恶性细胞具有高特异性, 而副作用最低。作为实现此目标所用的方法, 一种有前景的策略是发挥全基因组范围表达分析的力量来有效地鉴定在癌细胞中过表达的基因。另外, 使用组织微阵列, 辅以用 RNAi 技术的方法进行的高通量筛选功能缺失作用, 分析数百种归档的临床样品来验证潜在的靶蛋白。本文使用此方法显示了 CDKN3 常常在临床肺癌样品以及细胞系中表达, 且其基因产物在肺癌细胞的发生与进展中起着不可或缺的作用。

[1084] CDKN3 (亦名 KAP) 属于双特异性磷酸酶家族, 并起初被识别为与 cdk2 或 cdc2 相互作用的蛋白, 显示 CDKN3 可能在细胞周期调控中起作用 (Gyuris et al., 1993 ;Hannon et al., 1994 ;Brown et al., 1999)。已报道 CDKN3 在原位与侵袭性导管癌中过表达 (Lee, S. W., et al., Mol Cell Biol. 20 :1723-1732(2000)), 然而其癌基因功能尚不清楚。

[1085] EF-1delta, 延伸因子 -1 复合物的一个亚基, 已知其作为鸟嘌呤核苷酸交换因子的功能, 且负责氨酰 tRNA 向核糖体的酶促转运。EF-1delta 被发现为 CDKN3 的新型胞内靶分子。氨酰 tRNA 是核糖体蛋白合成中的氨基酸供体。所述 tRNA 分子通过氨酰 tRNA 合酶与相应的氨基酸氨酰化。所述氨酰 -tRNA 被转化为与延伸因子 1alpha (EF-1alpha) 构成

的三元复合物,为蛋白合成供给氨基酸的直接前体。所述延伸因子-1(EF-1)是一种包括四个不同亚基(EF-1beta、EF-1gamma、EF-1delta与ValRS)的鸟嘌呤-核苷酸交换复合物;EF-1alpha是一种G蛋白,负责氨酰 tRNA 与核糖体的结合 Brandsma et al.,1995;Riis et al.,1990;Nygard et al.,1990;Motorin et al.,1988;Motorin et al.,1991)。所述 EF-1beta-gamma-delta/ValRS 被蛋白激酶 C(PKC)、酪蛋白激酶 II(CK2)和细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)磷酸化。至少在哺乳动物中,已知作为 EF-1 复合物组分的 EF-1delta 被 PKC 磷酸化(Venema, R. C., et al, J Biol Chem. 266,11993-11998. (1991);Venema R. C., et al, J Biol Chem. 266,12574-12580. (1991))。另一方面,EF-1delta 的过表达可转化 NIH3T3 细胞,并使它们在裸小鼠具有致癌性,而且,用其反义 mRNA 阻断 EF-1delta,进一步导致其癌基因潜能显著反转(Joseph,P.,et al.,J BiolChem. 277 :6131-6136(2002);Lei, Y. X., et al., Teratog Carcinog Mutagen. 22 :377-383(2002))。另一方面,EF-1delta 的过表达可转化 NIH3T3 细胞,并使它们在裸小鼠具有致癌性,而且,用其反义 mRNA 阻断 EF-1delta,进一步导致其癌基因潜能显著逆转(Joseph, P., et al., J Biol Chem. 277 : 6131-6136(2002);Lei, Y. X., et al., Teratog Carcinog Mutagen. 22 :377-383(2002))。

[1086] 另一方面,EF-1alpha 涉及多种细胞功能,且受 EF-1beta-gamma-delta/ValRS 调控(Minella O, et al., Biosci Rep. 3 :119-27(1998))。近来报道显示 EF-1alpha2——EF-1alpha 两种亚型之一——可在乳癌细胞中激发细胞迁移与侵袭(Amiri A, et al., Oncogene 26 :3027-40(2007)),而且,其在转移性大鼠乳腺癌细胞中相对于非转移性对照过表达(Pencil SD, Breast Cancer Res Treat. 25 :165-74(1993);Edmonds BT, et al., J Cell Sci. 109 :2705-14(1996))。另一方面,EF-1alpha 涉及多种细胞功能,且受 EF-1beta-gamma-delta/ValRS 调控(Minella O, et al., Biosci Rep. 3 :119-27(1998))。近来报道显示 EF-1alpha2——EF-1alpha 两种亚型之一——可在乳癌细胞中激发细胞迁移与侵袭(AmiriA,et al.,Oncogene 26 :3027-40(2007)),而且,其在转移性大鼠乳腺癌细胞中相对于非转移性对照过表达(Pencil SD,Breast Cancer Res Treat. 25 :165-74(1993);Edmonds BT, et al., J Cell Sci. 109 :2705-14(1996))。

[1087] 之前有报道显示 EF-1beta-gamma-delta/ValRS 的活性增加应与 CDK1 对 EF-1gamma 的磷酸化相关,同时,EF-1delta 的磷酸化可导致 ValRS 的抑制,并因此导致聚(缬氨酸)合成的抑制(Monnier et al.,2001)。另一方面,EF-1delta 的过表达可转化 NIH3T3 细胞并使其在裸小鼠中具有致癌性。进一步,用 EF-1delta 的反义 mRNA 阻断 EF-1delta,导致其癌基因潜能显著逆转(Joseph et al.,2002;Lei et al.,2002)。另外,EF-1alpha 涉及多种细胞功能,且受 EF-1beta-gamma-delta/ValRS 调控(Minella et al., 1998)。近来报道显示 EF-1alpha2——EF-1alpha 两种亚型之一——可在乳癌细胞中激发细胞迁移与侵袭(Amiri et al.,2006),而且,相对于非转移性对照,其在转移性大鼠乳腺癌细胞中过表达(Pencil et al.,1993;Edmonds et al.,1996)。

[1088] 本文对 NSCLC 细胞的处理,用特异性 siRNA 以减少 CDKN3 或 EF-1delta 的表达,导致了生长阻抑。已确证 EF-1delta 在肺癌细胞中与 CDKN3 共表达,且为 CDKN3 磷酸酶在体内的生理底物,提示 CDKN3 可通过 EF-1delta 的去磷酸化在肺肿瘤中发挥促进生长的功能。通过我们的组织微阵列实验获取的临床病理学证据显示,CDKN3 和 / 或 EF-1delta 强阳性肿瘤的 NSCLC 患者的生存期间较之对 CDKN3 和 / 或 EF-1delta 具有阴性或弱染色的患者为

短,提高了过表达 CDKN3 和 / 或 EF-1delta 可促成肺癌细胞的高度恶性表型的可能性。进一步,已显示穿膜 11R-EF-1delta₉₀₋₁₀₈ 肽可抑制 CDKN3 与 EF-1delta 的功能性复合物形成,且导致癌细胞生长的阻抑。

[1089] 减少 CDKN3 或 EF-1delta 之表达的特异性 siRNA 导致了 NSCLC 细胞的生长阻抑。已确证在肺癌细胞中 EF-1delta 与 CDKN3 共表达,且很可能是 CDKN3 磷酸酶在体内的生理底物,提示 CDKN3 可通过 EF-1delta 的去磷酸化在肺肿瘤中具有促进生长的功能。通过本发明的组织微阵列实验获取的临床病理学证据显示,CDKN3 和 / 或 EF-1delta 强阳性肿瘤的 NSCLC 患者的生存期间较之对 CDKN3 和 / 或 EF-1delta 具有阴性或弱染色的患者为短,提高了过表达 CDKN3 和 / 或 EF-1delta 可促成肺癌细胞的高度恶性表型的可能性。综合本文的数据可见,CDKN3 与 EF-1beta-gamma-delta/Va1RS 的结合可导致 EF-1delta 的去磷酸化并激活肿瘤细胞的细胞功能,因此导致肿瘤生长和 / 或进展。

[1090] 综上所述,作为一种双重特异性蛋白磷酸酶,CDKN3 似乎在肺癌的生长促进通路中起不可或缺的作用,该作用是通过使其新发现的相互作用分子——EF-1delta 的去磷酸化实现的。CDKN3 与 EF-1delta 可在临床上作为有用的预后生物标志,且以 CDKN3 的酶活性、或 CDKN3 与 EF-1delta 的相互作用为靶标,应为开发新型抗癌药的有前景的治疗途径。

[1091] 工业应用性

[1092] 如本文所述,特异性地靶向 EBI3、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 的双链分子阻抑细胞生长。因此,这些新型双链分子是抗癌药物开发的有用的候选。举例而言,阻断 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 和 / 或 EF-1delta 蛋白和 / 或阻止其活性的药剂可作为抗癌药,特别是治疗肺癌的抗癌药,更加特别是治疗 NSCLC 和 SCLC 具有治疗上的用处。

[1093] 人类基因 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 与 EF-1delta 的表达在肺癌中较之正常器官显著提升。相应的,这些基因可便利地用作肺癌的诊断性标志,而且它们编码的蛋白在肺癌的诊断性分析中 useful。

[1094] 进一步,本文所描述的方法也可用于诊断肺癌,包括小细胞肺癌 (SCLC) 与非小细胞肺癌 (NSCLC),以及预测罹患这些疾病的患者的不良预后。另外,本方面为癌症包括肺癌的治疗手段的开发提供可能的候选。

[1095] 在一方面,本发明涉及下述发现,即 EBI3 水平在肺癌患者血清中较之正常对照中为高。相应地,所述 EBI3 蛋白可以用作诊断性标志,特别是肺癌的血清学标志。本发明提供了使用 EBI3 的血清水平作为指标诊断癌症患者以及监视癌症治疗进展的方法。现有技术没有提供适用于肺癌的血清学标志。本发明的新型血清学标志 EBI3 可改善检测肺癌的灵敏度。另外,EBI3 与 CEA 或 pro-GRP 的组合有助于提高检测胰腺癌灵敏度。

[1096] 进一步,EBI3、DLX5、CDKN3、NPTX1 或 EF-1delta 多肽是对开发抗癌医药有用的靶标。举例而言,与 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 结合或阻断 EBI3、DLX5、NPTX1、CDKN3 或 EF-1delta 表达或阻止其活性,或抑制 CDKN3 与 EF-1delta 结合的药剂可作为抗癌剂,特别是治疗肺癌的抗癌剂用于治疗。

[1097] 本文引用所有的出版物、数据库、序列、专利与专利申请以引用的方式包含于本文中。

[1098] 尽管已详细并参照其特定实施例描述了本发明,对于本领域技术人员显然在其中可进行多种变化与修饰而不背离本发明的精神与范围,其限界由所附的权利要求界定。

序列表

<110> 肿瘤疗法科学股份有限公司 (ONCOTHERAPY SCIENCE INC.)

<120> EBI3、DLX5、NPTX1 和 CDKN3 用作肺癌治疗和诊断的靶基因

<130> ONC-A0714P

<150> US 60/957, 956

<151> 2007-08-24

<150> US 60/977, 360

<151> 2007-10-03

<160> 91

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1149

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

ccgcagccat gaccccgcag cttctcctgg cccttgcct ctgggccage tgcccgcct 60
gcagtggaag gaaagggccc ccagcagctc tgacactgcc ccgggtgcaa tgccgagcct 120
ctcggtagcc gatcgccgtg gattgctcct ggacctgcc gcctgctcca aactccacca 180
gcccctgtgc cttcattgcc acgtacagge tcggcatggc tgcccggggc cacagctggc 240
cctgcctgca gcagacgcca acgtccacca gctgcacat cacggatgtc cagetgttet 300
ccatggctcc ctacgtgctc aatgtcaccg ccgtccaccc ctggggctcc agcagcaget 360
tcgtgccttt cataacagag cacatcatca agcccgaccc tccagaagge gtgcgcctaa 420
gccccctcgc tgagcgccag ctacaggtgc agtgggagcc tcccgggtcc tggeccttc 480
cagagatctt ctactgaag tactggatcc gttacaagcg tcaggagct gcgcgcttc 540
accgggtggg gccattgaa gccacgtcct tcacctcag ggctgtgcgg ccccagagcca 600
ggtactacgt ccaagtggcg gctcaggacc tcacagacta cggggaactg agtgactgga 660
gtctccccgc cactgccaca atgagcctgg gcaagtagca agggcttccc gctgcctcca 720
gacagcacct gggctctcgc caccctaage cccgggacac ctggttgagg gcggatggga 780
tctgcctagc ctgggctgga gtccttgctt tgctgctgct gagctgccgg gcaacctcag 840
atgaccgact tttccctttg agcctcagtt tctctagctg agaaatggag atgtactact 900

```

```

ctctccttta cctttacctt taccacagtg cagggctgac tgaactgtca ctgtgagata 960
ttttttattg ttttaattaga aaagaattgt tgttgggctg ggcgcagtgg atcgcacctg 1020
taatcccagt cactgggaag cgcacgtggg agggtagctt gaggccagga gctcgaaacc 1080
agtccgggcc acacagcaag accccatctc taaaaaatta atataaatat aaaataaaaa 1140
aaaaaaaaa 1149

```

<210>2

<211>229

<212>PRT

<213>人 (Homo sapiens)

<400>2

```

Met Thr Pro Gln Leu Leu Leu Ala Leu Val Leu Trp Ala Ser Cys Pro
1           5           10           15
Pro Cys Ser Gly Arg Lys Gly Pro Pro Ala Ala Leu Thr Leu Pro Arg
           20           25           30
Val Gln Cys Arg Ala Ser Arg Tyr Pro Ile Ala Val Asp Cys Ser Trp
           35           40           45
Thr Leu Pro Pro Ala Pro Asn Ser Thr Ser Pro Val Ser Phe Ile Ala
           50           55           60
Thr Tyr Arg Leu Gly Met Ala Ala Arg Gly His Ser Trp Pro Cys Leu
65           70           75           80
Gln Gln Thr Pro Thr Ser Thr Ser Cys Thr Ile Thr Asp Val Gln Leu
           85           90           95
Phe Ser Met Ala Pro Tyr Val Leu Asn Val Thr Ala Val His Pro Trp
           100          105          110
Gly Ser Ser Ser Ser Phe Val Pro Phe Ile Thr Glu His Ile Ile Lys
           115          120          125
Pro Asp Pro Pro Glu Gly Val Arg Leu Ser Pro Leu Ala Glu Arg Gln
           130          135          140
Leu Gln Val Gln Trp Glu Pro Pro Gly Ser Trp Pro Phe Pro Glu Ile
145          150          155          160
Phe Ser Leu Lys Tyr Trp Ile Arg Tyr Lys Arg Gln Gly Ala Ala Arg
           165          170          175
Phe His Arg Val Gly Pro Ile Glu Ala Thr Ser Phe Ile Leu Arg Ala
           180          185          190
Val Arg Pro Arg Ala Arg Tyr Tyr Val Gln Val Ala Ala Gln Asp Leu
           195          200          205

```

Thr Asp Tyr Gly Glu Leu Ser Asp Trp Ser Leu Pro Ala Thr Ala Thr
 210 215 220
 Met Ser Leu Gly Lys
 225

<210>3

<211>1419

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>3

```

cggagacaga gacttcacga ctcccagtct cctcctcgcc gcggccgccg cctcctcctt      60
ctctcctcct cctcttctct ctctccctc gctcccacag ccatgtctgc ttagaccaga      120
gcagccccac agccaactag ggcagctgcc gccgccacaa cagcaaggac agccgctgcc      180
gccgcccgctg agcgatgaca ggagtgtttg acagaagggt cccagcattc cgatccggcg      240
acttccaagc tccgttccag acgtccgcag ctatgcacca tccgtctcag gaatcgccaa      300
ctttgcccga gtcttcagct accgattctg actactacag ccctacgggg ggagccccgc      360
acggctactg ctctcctacc tcggcttctt atggcaaagc tctcaacccc taccagtatc      420
agtatcacgg cgtgaacggc tccgccggga gctaccagc caaagcttat gccgactata      480
gctacgctag ctctaccac cagtacggcg ggcctacaa ccgctccca agcgcaccca      540
accagccaga gaaagaagtg accgagcccc aggtgagaat ggtgaatggc aaaccaaaga      600
aagttegtaa acccaggact atttatcca gctttcagct ggccgcatta cagagaaggt      660
ttcagaagac tcagtacctc gccttgccgg aacgcgccga gctggccgcc tcgctgggat      720
tgacacaaac acaggtgaaa atctggtttc agaacaaaag atccaagatc aagaagatca      780
tgaaaaacgg ggagatgccc ccggagcaca gtcccagctc cagcgaccca atggcgtgta      840
actcgccgca gtctccagcg gtgtgggagc cccagggctc gtcccgcctc ctccagccacc      900
accctcatgc ccaccctccg acctccaacc agtccccagc gtccagctac ctggagaact      960
ctgcatcctg gtacacaagt gcagccagct caatcaattc ccacctgccg ccgccgggct     1020
ccttacagca cccgctggcg ctggcctccg ggacactcta ttagatgggc tgctctctct     1080
tactctcttt tttgggacta ctgtgttttg ctgttctaga aaatcataaa gaaaggaatt     1140
catatgggga agttcggaaa actgaaaaag attcatgtgt aaagcttttt tttgcatgta     1200
agttattgca tttcaaaaga ccccccttt ttttacagag gacttttttt gcgcaactgt     1260
ggacactttc aatgggtgctt tgaatctat gacctcaact tttcaaaaga cttttttcaa     1320
tgttatttta gccatgtaaa taagtgtaga tagaggaatt aaactgtata ttctggataa     1380
ataaaattat ttcgacatg aaaaaaaaa aaaaaaaaaa     1419

```

<210>4

<211>289

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>4

Met Thr Gly Val Phe Asp Arg Arg Val Pro Ser Ile Arg Ser Gly Asp
 1 5 10 15
 Phe Gln Ala Pro Phe Gln Thr Ser Ala Ala Met His His Pro Ser Gln
 20 25 30
 Glu Ser Pro Thr Leu Pro Glu Ser Ser Ala Thr Asp Ser Asp Tyr Tyr
 35 40 45
 Ser Pro Thr Gly Gly Ala Pro His Gly Tyr Cys Ser Pro Thr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Tyr Gly Lys Ala Leu Asn Pro Tyr Gln Tyr Gln Tyr His Gly Val
 65 70 75 80
 Asn Gly Ser Ala Gly Ser Tyr Pro Ala Lys Ala Tyr Ala Asp Tyr Ser
 85 90 95
 Tyr Ala Ser Ser Tyr His Gln Tyr Gly Gly Ala Tyr Asn Arg Val Pro
 100 105 110
 Ser Ala Thr Asn Gln Pro Glu Lys Glu Val Thr Glu Pro Glu Val Arg
 115 120 125
 Met Val Asn Gly Lys Pro Lys Lys Val Arg Lys Pro Arg Thr Ile Tyr
 130 135 140
 Ser Ser Phe Gln Leu Ala Ala Leu Gln Arg Arg Phe Gln Lys Thr Gln
 145 150 155 160
 Tyr Leu Ala Leu Pro Glu Arg Ala Glu Leu Ala Ala Ser Leu Gly Leu
 165 170 175
 Thr Gln Thr Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Lys Arg Ser Lys Ile
 180 185 190
 Lys Lys Ile Met Lys Asn Gly Glu Met Pro Pro Glu His Ser Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ser Asp Pro Met Ala Cys Asn Ser Pro Gln Ser Pro Ala Val Trp
 210 215 220
 Glu Pro Gln Gly Ser Ser Arg Ser Leu Ser His His Pro His Ala His
 225 230 235 240
 Pro Pro Thr Ser Asn Gln Ser Pro Ala Ser Ser Tyr Leu Glu Asn Ser
 245 250 255
 Ala Ser Trp Tyr Thr Ser Ala Ala Ser Ser Ile Asn Ser His Leu Pro
 260 265 270
 Pro Pro Gly Ser Leu Gln His Pro Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Leu

	275	280	285	
Tyr				
<210>5				
<211>844				
<212>DNA				
<213> 人 (Homo sapiens)				
<400>5				
gcacgagctg cagagggagg cggcactggt ctcgacgtgg ggcggccagc gatgaagccg				60
cccagttcaa tacaacaag tgagtttgac tcatcagatg aagagcctat tgaagatgaa				120
cagactccaa ttcatatatc atggctatct ttgtcacgag tgaattgttc tcagtttctc				180
ggtttatgtg ctcttcagg ttgtaaattt aaagatgtta gaagaaatgt ccaaaaagat				240
acagaagaac taaagagctg tggatacaaa gacatatttg ttttctgcac cagaggggaa				300
ctgtcaaaat atagagtccc aaaccttctg gatctctacc agcaatgtgg aattatcacc				360
catcatcatc caatcgaga tggagggact cctgacatag ccagctgctg tgaataatg				420
gaagagctta caacctgcct taaaattac cgaaaacct taatacactg ctatggagga				480
cttgggagat cttgtcttgt agctgcttgt ctctactat acctgtctga cacaatatca				540
ccagagcaa g ccatagacag cctgcgagac ctaagaggat ccggggcaat acagaccatc				600
aagcaataca attatcttca tgagtttcgg gacaaattag ctgcacatct atcatcaaga				660
gattcacaat caagatctgt atcaagataa aggaattcaa atagcatata tatgaccatg				720
tctgaaatgt cagttctcta gcataattg tattgaaatg aaaccaccag tgttatcaac				780
ttgaatgtaa atgtacatgt gcagatattc ctaaagtttt attgacaaaa aaaaaaaaaa				840
aaaa				844

<210>6

<211>212

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>6

Met	Lys	Pro	Pro	Ser	Ser	Ile	Gln	Thr	Ser	Glu	Phe	Asp	Ser	Ser	Asp
1				5				10					15		
Glu	Glu	Pro	Ile	Glu	Asp	Glu	Gln	Thr	Pro	Ile	His	Ile	Ser	Trp	Leu
			20					25					30		
Ser	Leu	Ser	Arg	Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Gly	Leu	Cys	Ala	Leu
		35					40						45		
Pro	Gly	Cys	Lys	Phe	Lys	Asp	Val	Arg	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Asp	Thr

50	55	60			
Glu Glu Leu Lys Ser Cys Gly Ile Gln Asp Ile Phe Val Phe Cys Thr					
65	70	75	80		
Arg Gly Glu Leu Ser Lys Tyr Arg Val Pro Asn Leu Leu Asp Leu Tyr					
	85	90	95		
Gln Gln Cys Gly Ile Ile Thr His His His Pro Ile Ala Asp Gly Gly					
	100	105	110		
Thr Pro Asp Ile Ala Ser Cys Cys Glu Ile Met Glu Glu Leu Thr Thr					
	115	120	125		
Cys Leu Lys Asn Tyr Arg Lys Thr Leu Ile His Cys Tyr Gly Gly Leu					
	130	135	140		
Gly Arg Ser Cys Leu Val Ala Ala Cys Leu Leu Leu Tyr Leu Ser Asp					
145	150	155	160		
Thr Ile Ser Pro Glu Gln Ala Ile Asp Ser Leu Arg Asp Leu Arg Gly					
	165	170	175		
Ser Gly Ala Ile Gln Thr Ile Lys Gln Tyr Asn Tyr Leu His Glu Phe					
	180	185	190		
Arg Asp Lys Leu Ala Ala His Leu Ser Ser Arg Asp Ser Gln Ser Arg					
	195	200	205		
Ser Val Ser Arg					
210					

<210>7

<211>1031

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>7

cccgcgtccg ccgattcctc ctcttggtc gccgcgtcct tggctggcgt cagaaaaatg	60
gctacaaact tctagcaca tgagaagatc tggttcgaca agttcaaata tgacgacgca	120
gaaaggagat tctacgagca gatgaacggg cctgtggcag gtgcctcccg ccaggagaac	180
ggcgccagcg tgatcctccg tgacattgag agagccagag agaacatcca gaaatccctg	240
gctggaagct caggccccgg ggcctccagc ggcaccagcg gagaccacgg tgagctcgtc	300
gtccggattg ccagtctgga agtggagaac cagagtctgc gtggcgtggt acaggagctg	360
cagcaggcca tctccaagct ggaggccccg ctgaacgtgc tggagaagag ctcgcctggc	420
caccgggcca cgccccaca gaccagcac gtatctcca tgcgccaagt ggagcccca	480
gccaagaagc cagccacacc agcagaggat gacgaggatg atgacattga cctgtttggc	540
agtgacaatg aggaggagga caaggaggcg gcacagctgc gggaggagcg gctacggcag	600
tacgcggaga agaaggccaa gaagcctgca ctggtggcca agtctctccat cctgctggat	660

gtcaagcctt gggatgatga gacggacatg gctcagctgg aggcctgtgt gcgctctatc 720
cagctggacg ggctggctcg gggggcttcc aagctgggtgc ccgtgggcta cggtatccgg 780
aagctacaga ttcagtgtgt ggtggaggac gacaaggtgg ggacagactt gctggaggag 840
gagatcacca agtttgagga gcacgtgcag agtgtcgata tcgcagcttt caacaagatc 900
tgaagcctga gtgtgtgtac gtgcgcgcgt gcgtgaggcc ctgccacgat taaagactga 960
gaccggcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1020
aaaaaaaaaa a 1031

<210>8

<211>281

<212>PRT

<213>人 (Homo sapiens)

<400>8

Met Ala Thr Asn Phe Leu Ala His Glu Lys Ile Trp Phe Asp Lys Phe
1 5 10 15
Lys Tyr Asp Asp Ala Glu Arg Arg Phe Tyr Glu Gln Met Asn Gly Pro
20 25 30
Val Ala Gly Ala Ser Arg Gln Glu Asn Gly Ala Ser Val Ile Leu Arg
35 40 45
Asp Ile Ala Arg Ala Arg Glu Asn Ile Gln Lys Ser Leu Ala Gly Ser
50 55 60
Ser Gly Pro Gly Ala Ser Ser Gly Thr Ser Gly Asp His Gly Glu Leu
65 70 75 80
Val Val Arg Ile Ala Ser Leu Glu Val Glu Asn Gln Ser Leu Arg Gly
85 90 95
Val Val Gln Glu Leu Gln Gln Ala Ile Ser Lys Leu Glu Ala Arg Leu
100 105 110
Asn Val Leu Glu Lys Ser Ser Pro Gly His Arg Ala Thr Ala Pro Gln
115 120 125
Thr Gln His Val Ser Pro Met Arg Gln Val Glu Pro Pro Ala Lys Lys
130 135 140
Pro Ala Thr Pro Ala Glu Asp Asp Glu Asp Asp Asp Ile Asp Leu Phe
145 150 155 160
Gly Ser Asp Asn Glu Glu Glu Asp Lys Glu Ala Ala Gln Leu Arg Glu
165 170 175
Glu Arg Leu Arg Gln Tyr Ala Glu Lys Lys Ala Lys Lys Pro Ala Leu
180 185 190

Val Ala Lys Ser Ser Ile Leu Leu Asp Val Lys Pro Trp Asp Asp Glu
 195 200 205
 Thr Asp Met Ala Gln Leu Glu Ala Cys Val Arg Ser Ile Gln Leu Asp
 210 215 220
 Gly Leu Val Trp Gly Ala Ser Lys Leu Val Pro Val Gly Tyr Gly Ile
 225 230 235 240
 Arg Lys Leu Gln Ile Gln Cys Val Val Glu Asp Asp Lys Val Gly Thr
 245 250 255
 Asp Leu Leu Glu Glu Glu Ile Thr Lys Phe Glu Glu His Val Gln Ser
 260 265 270
 Val Asp Ile Ala Ala Phe Asn Lys Ile
 275 280

<210>9

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>9

tgttctccat ggctccctac

20

<210>10

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>10

agctccctga cgcttgtaac

20

<210>11

<211>21

<212>DNA

<213> 人工的

<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>11	
gaggtgatag cattgctttc g	21
<210>12	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>12	
caagtcagtg tacaggtaag c	21
<210>13	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 RNA 印迹探针的人工合成引物	
<400>13	
tgtttctccat ggctccctac	20
<210>14	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 RNA 印迹探针的人工合成引物	
<400>14	
ctacttgccc aggetcattg	20

<210>15	
<211>18	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>15	
cgtacgcgga atacttcg	18
<210>16	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>16	
gcgcgctttg taggattcg	19
<210>17	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>17	
uacuugccca ggcucuuugu u	21
<210>18	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	

<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>18	
caatgagcct gggcaagta	19
<210>19	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>19	
aacagcugga cauccgugau u	21
<210>20	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>20	
tcacggatgt ccagctggt	19
<210>21	
<211>22	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>21	
ctcgcgcage caccaccctc at	22
<210>22	
<211>26	

<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>22	
agttgaggtc atagatttca aggcac	26
<210>23	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>23	
gaagcagcac gacttcttc	19
<210>24	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>24	
ccagccagag aaagaagtg	19
<210>25	
<211>19	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>25	

gtgcagccag ctcaatcaa	19
<210>26	
<211>4308	
<212>DNA	
<213> 人 (Homo sapiens)	
<400>26	
gcgcctgacg ggagcgtcgt gctcaggggt gtcctctcgt cctgcgtccg cgcccagcgc	60
cccgcgcccc gcgctgttcc tcgtgagacc ggcggggcggc gagccgcgcg gccccggggg	120
cagtgtcggg cacggcgggc gcgcactcgc aggcggggca cggccgcccc cgccaggacc	180
cgcaggcccc gaaacgctcc ctgtcacaaa ggggggaaca cgtgggcgcc ggctgccggg	240
gcggcgatct tagggaacta gggtcacctg gagagccgcc caccgtctct gcccgtcga	300
ctcctccgcc cgggcccgtc ggccgggtcca gccgcggccg gcgcctggct gtgaggtgga	360
ttcccggccc agtctgacca tctccctcca gttttccac ttcgttcgga ctttctcata	420
actatgtcca ccctctacgt ctcccctcac ccagatgcct tccccagcct ccgagccctc	480
atagccgctc gctatgggga ggctggggag ggtcccgat ggggaggagc ccacc ccgc	540
atctgtctcc agccaccccc gactagcagg actccctttc cccaccccc cctgccggcc	600
ctggagcagg ggcccgggtg gctctgggtg tggggggcca cggctgtggc ccagctgctg	660
tggccagcag gcctgggggg cccagggggc agccgggcgg ctgtccttgt ccaacagtgg	720
gtcagttacg ccgacacgga gttaatacca gctgcctgtg gagcaacgct gccggccctg	780
ggactccgaa gctcggcca ggacccccag gctgtgctgg gggccctggg cagggccctg	840
agccccttgg aggagtggct tcggctgcac acctacttgg ccggggaggc cccactctg	900
gctgacctgg cggctgtcac agccttggct ctgcctttcc gatacgtcct agaccacct	960
gcccggcga tctggaataa tgtgactcgc tggttgtca cgtgtgtccg gcagccagaa	1020
ttccgagccg tctaggaga agtggttcta tactcaggag ccaggcctct ctctcatcag	1080
ccaggcccc aggtcctgc cctcccaaag acagctgctc agtcaagaa agaggcaaag	1140
aaacgggaga agctagagaa attccaacag aagcagaaga tccaacagca gcagccacct	1200
ccaggggaga agaaacaaa accagagaag agggagaaac gggatcctgg ggtcattacc	1260
tatgacctcc caacccacc cggggaaaag aaagatgtca gtggcccat gccgactcc	1320
tacagccctc ggtatgtgga ggctgcctgg tacccttggg gggagcagca gggctttctc	1380
aagccagagt atggcgctcc taatgtgtca gcagcaaate cccgagggtg ctctcatgatg	1440
tgcatccac ccccaatgt gacaggctcc ctgcacctgg gccatgcaact caccaacgcc	1500
atccaggact cctgactcg atggcaccgc atgcgtgggg agaccaccct gtggaaccct	1560
ggctgtgacc atgcaggtat tgccaccag gtgggtgggg agaagaagct atggcgtgag	1620
cagggactga gccggacca gctgggccc gcaggccttc tacaggaagt ctggaagtgg	1680
aaggaggaga aagtgaccg gatttaccac cagttgaaga agcttggcag ctcccttgac	1740
tgggatcgag cctgtttcac catggaccct aaactctcag cagctgtgac agaggccttt	1800
gtccggcttc acgaggaagg catcatctat cgcagtacc gccttgttaa ctggtcctgc	1860

accctcaact	ccgccatctc	tgacattgag	gtggataaga	aggagctgac	aggtcgcacc	1920
ctgctctccg	tgcctggcta	caaggagaag	gtggagtctg	gggtcctcgt	gtcctttgcc	1980
tataaggtcc	aaggctcaga	tagcgacgag	gaggtggtgg	tggcaacaac	tcggatcgag	2040
acaatgctgg	gagatgtggc	tgtagctgtg	caccccaaag	ataccagata	ccagcacctg	2100
aaggggaaga	acgtgatcca	cccattcctg	tctcggagcc	ttcccattgt	cttcgatgaa	2160
tttgtggaca	tggacttttg	cacaggtgct	gtgaagatca	ccccgcaca	tgacaaaat	2220
gactatgaag	ttgggcagcg	gcacgggctg	gaggccatca	gcatcatgga	ctcccggggg	2280
gccctcatca	atgtgcctcc	gcctttcctg	ggcctgceca	ggtttgagge	caggaaagcg	2340
gtgctggtgg	cgctgaagga	gcggggactg	ttccgtggca	ttgaggacaa	ccccatggtg	2400
gtgccacttt	gcaaccggtc	gaaggacgtg	gtagagcctc	tgctgcggcc	gcagtggtag	2460
gttcgctgcg	gggagatggc	ccaggctgcc	agcgccgctg	tgactcgggg	tgacctccgc	2520
atcctgcctg	aggcccatca	gcgcacatgg	catgcctgga	tggacaacat	ccgggagtg	2580
tgcatttcca	ggcagctgtg	gtggggccat	cgcatcccag	cctactttgt	cactgtcagt	2640
gaccagcgg	tgccccctgg	ggaggaccct	gatgggcggt	actgggtgag	tggacgcaat	2700
gaggcggagg	cccgggagaa	ggcagccaag	gagttcggag	tgtcccctga	caagatcagt	2760
ctccagcaag	atgaggatgt	attggatacc	tggttctect	ctggcctctt	ccccttatec	2820
attttgggct	ggcccaacca	gtcagaagac	ctgagtgtgt	tctaccccgg	gacactgctg	2880
gagaccggtc	atgacatcct	cttcttctgg	gtggcccgga	tggatcatgct	gggcctgaag	2940
ctcacgggca	ggctgccctt	tagagaggtc	tacctccatg	ccatcgtgcg	agatgctcac	3000
ggccggaaga	tgagcaagtc	tctaggcaat	gtcatcgatc	ccctggacgt	catctatgga	3060
atctccctgc	aggcctcca	caaccagctg	ctgaacagca	acctggatcc	cagcgaggtg	3120
gagaaggcca	aagaaggcca	gaaagctgac	ttcccagcgg	ggattcctga	atgtggcacc	3180
gatgctctcc	ggtttggatt	atgtgcctac	atgtcccagg	gtcgtgacat	caacctggat	3240
gtgaaccgga	tactgggtta	ccgccacttc	tgcaacaagc	tctggaatgc	caccaagttt	3300
gcccttcgtg	gccttgggaa	gggttttctg	ccctcaccca	cctcccagcc	cggaggccat	3360
gagagcctgg	tggaccgctg	gatccgcagc	cgccctgacag	aggctgtgag	gctcagcaat	3420
caaggcttcc	aggcctacga	cttcccggcc	gtcaccactg	cccagtaca	gcttctggctc	3480
tatgagctct	gtgatgtcta	cttggagtgc	ctgaaacctg	tactgaatgg	ggtggaccag	3540
gtggcagctg	agtgtgcccc	ccagaccctg	tacacttgcc	tggacgttgg	cctgcggctg	3600
ctctaccct	tcatgccctt	cgtagcggag	gagctgttcc	agaggctgcc	ccggaggatg	3660
ccgcaagctc	cccctagcct	ctgtgttacc	ccctaccggg	agccctcaga	gtgctcctgg	3720
aaggaccccc	aggcagaagc	cgcccttgag	ctggcgctaa	gcatcacgcg	agccgtgcgc	3780
tcctgcggg	ccgactacaa	cctcacccgg	atccggcctg	actgtttcct	ggaagtggcg	3840
gatgaggcca	cgggcgccct	ggcatcggcg	gtgtcgggct	acgtgcagge	cctggccagc	3900
gcaggtgtgg	tggctgttct	ggccctgggg	gctcccgcgc	cccagggttg	cgctgtggct	3960
ctggcttctg	atcgctgctc	catccacctg	cagcttcagg	ggctggtgga	ccctgcacgg	4020
gagctgggca	agctgcaagc	caagcgagtt	gaggcccagc	ggcaggccca	gcgtctgcgg	4080
gaacgccgtg	ctgcctcggg	ctatcctgtc	aaggtgccgc	tcgaagtcca	ggaggcagat	4140
gaagccaagc	tccaacagac	agaagcagag	ctcaggaagg	tggatgagge	catcgcctca	4200

ttccagaaga tgctgtgata caccaccag cttcaccct cacccccage ggctcacat 4260
 ggggatggca gcaataaaat attttccac aaaaaaaaa aaaaaaaa 4308

<210>27

<211>1264

<212>PRT

<213>人 (Homo sapiens)

<400>27

Met Ser Thr Leu Tyr Val Ser Pro His Pro Asp Ala Phe Pro Ser Leu
 1 5 10 15
 Arg Ala Leu Ile Ala Ala Arg Tyr Gly Glu Ala Gly Glu Gly Pro Gly
 20 25 30
 Trp Gly Gly Ala His Pro Arg Ile Cys Leu Gln Pro Pro Pro Thr Ser
 35 40 45
 Arg Thr Pro Phe Pro Pro Pro Arg Leu Pro Ala Leu Glu Gln Gly Pro
 50 55 60
 Gly Gly Leu Trp Val Trp Gly Ala Thr Ala Val Ala Gln Leu Leu Trp
 65 70 75 80
 Pro Ala Gly Leu Gly Gly Pro Gly Gly Ser Arg Ala Ala Val Leu Val
 85 90 95
 Gln Gln Trp Val Ser Tyr Ala Asp Thr Glu Leu Ile Pro Ala Ala Cys
 100 105 110
 Gly Ala Thr Leu Pro Ala Leu Gly Leu Arg Ser Ser Ala Gln Asp Pro
 115 120 125
 Gln Ala Val Leu Gly Ala Leu Gly Arg Ala Leu Ser Pro Leu Glu Glu
 130 135 140
 Trp Leu Arg Leu His Thr Tyr Leu Ala Gly Glu Ala Pro Thr Leu Ala
 145 150 155 160
 Asp Leu Ala Ala Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Phe Arg Tyr Val Leu
 165 170 175
 Asp Pro Pro Ala Arg Arg Ile Trp Asn Asn Val Thr Arg Trp Phe Val
 180 185 190
 Thr Cys Val Arg Gln Pro Glu Phe Arg Ala Val Leu Gly Glu Val Val
 195 200 205
 Leu Tyr Ser Gly Ala Arg Pro Leu Ser His Gln Pro Gly Pro Glu Ala
 210 215 220
 Pro Ala Leu Pro Lys Thr Ala Ala Gln Leu Lys Lys Glu Ala Lys Lys

225	230	235	240
Arg Glu Lys Leu Glu Lys Phe Gln Gln Lys Gln Lys Ile Gln Gln Gln			
	245	250	255
Gln Pro Pro Pro Gly Glu Lys Lys Pro Lys Pro Glu Lys Arg Glu Lys			
	260	265	270
Arg Asp Pro Gly Val Ile Thr Tyr Asp Leu Pro Thr Pro Pro Gly Glu			
	275	280	285
Lys Lys Asp Val Ser Gly Pro Met Pro Asp Ser Tyr Ser Pro Arg Tyr			
	290	295	300
Val Glu Ala Ala Trp Tyr Pro Trp Trp Glu Gln Gln Gly Phe Phe Lys			
305	310	315	320
Pro Glu Tyr Gly Arg Pro Asn Val Ser Ala Ala Asn Pro Arg Gly Val			
	325	330	335
Phe Met Met Cys Ile Pro Pro Pro Asn Val Thr Gly Ser Leu His Leu			
	340	345	350
Gly His Ala Leu Thr Asn Ala Ile Gln Asp Ser Leu Thr Arg Trp His			
	355	360	365
Arg Met Arg Gly Glu Thr Thr Leu Trp Asn Pro Gly Cys Asp His Ala			
	370	375	380
Gly Ile Ala Thr Gln Val Val Val Glu Lys Lys Leu Trp Arg Glu Gln			
385	390	395	400
Gly Leu Ser Arg His Gln Leu Gly Arg Glu Ala Phe Leu Gln Glu Val			
	405	410	415
Trp Lys Trp Lys Glu Glu Lys Gly Asp Arg Ile Tyr His Gln Leu Lys			
	420	425	430
Lys Leu Gly Ser Ser Leu Asp Trp Asp Arg Ala Cys Phe Thr Met Asp			
	435	440	445
Pro Lys Leu Ser Ala Ala Val Thr Glu Ala Phe Val Arg Leu His Glu			
	450	455	460
Glu Gly Ile Ile Tyr Arg Ser Thr Arg Leu Val Asn Trp Ser Cys Thr			
465	470	475	480
Leu Asn Ser Ala Ile Ser Asp Ile Glu Val Asp Lys Lys Glu Leu Thr			
	485	490	495
Gly Arg Thr Leu Leu Ser Val Pro Gly Tyr Lys Glu Lys Val Glu Phe			
	500	505	510
Gly Val Leu Val Ser Phe Ala Tyr Lys Val Gln Gly Ser Asp Ser Asp			
	515	520	525
Glu Glu Val Val Val Ala Thr Thr Arg Ile Glu Thr Met Leu Gly Asp			
	530	535	540

Val Ala Val Ala Val His Pro Lys Asp Thr Arg Tyr Gln His Leu Lys
 545 550 555 560
 Gly Lys Asn Val Ile His Pro Phe Leu Ser Arg Ser Leu Pro Ile Val
 565 570 575
 Phe Asp Glu Phe Val Asp Met Asp Phe Gly Thr Gly Ala Val Lys Ile
 580 585 590
 Thr Pro Ala His Asp Gln Asn Asp Tyr Glu Val Gly Gln Arg His Gly
 595 600 605
 Leu Glu Ala Ile Ser Ile Met Asp Ser Arg Gly Ala Leu Ile Asn Val
 610 615 620
 Pro Pro Pro Phe Leu Gly Leu Pro Arg Phe Glu Ala Arg Lys Ala Val
 625 630 635 640
 Leu Val Ala Leu Lys Glu Arg Gly Leu Phe Arg Gly Ile Glu Asp Asn
 645 650 655
 Pro Met Val Val Pro Leu Cys Asn Arg Ser Lys Asp Val Val Glu Pro
 660 665 670
 Leu Leu Arg Pro Gln Trp Tyr Val Arg Cys Gly Glu Met Ala Gln Ala
 675 680 685
 Ala Ser Ala Ala Val Thr Ara Gly Asp Leu Arg Ile Leu Pro Glu Ala
 690 695 700
 His Gln Arg Thr Trp His Ala Trp Met Asp Asn Ile Arg Glu Trp Cys
 705 710 715 720
 Ile Ser Arg Gln Leu Trp Trp Gly His Arg Ile Pro Ala Tyr Phe Val
 725 730 735
 Thr Val Ser Asp Pro Ala Val Pro Pro Gly Glu Asp Pro Asp Gly Arg
 740 745 750
 Tyr Trp Val Ser Gly Arg Asn Glu Ala Glu Ala Arg Glu Lys Ala Ala
 755 760 765
 Lys Glu Phe Gly Val Ser Pro Asp Lys Ile Ser Leu Gln Gln Asp Glu
 770 775 780
 Asp Val Leu Asp Thr Trp Phe Ser Ser Gly Leu Phe Pro Leu Ser Ile
 785 790 795 800
 Leu Gly Trp Pro Asn Gln Ser Glu Asp Leu Ser Val Phe Tyr Pro Gly
 805 810 815
 Thr Leu Leu Glu Thr Gly His Asp Ile Leu Phe Phe Trp Val Ala Arg
 820 825 830
 Met Val Met Leu Gly Leu Lys Leu Thr Gly Arg Leu Pro Phe Arg Glu
 835 840 845
 Val Tyr Leu His Ala Ile Val Arg Asp Ala His Gly Arg Lys Met Ser

850	855	860
Lys Ser Leu Gly Asn Val Ile Asp Pro Leu Asp Val Ile Tyr Gly Ile		
865	870	875
Ser Leu Gln Gly Leu His Asn Gln Leu Leu Asn Ser Asn Leu Asp Pro		
885	890	895
Ser Glu Val Glu Lys Ala Lys Glu Gly Gln Lys Ala Asp Phe Pro Ala		
900	905	910
Gly Ile Pro Glu Cys Gly Thr Asp Ala Leu Arg Phe Gly Leu Cys Ala		
915	920	925
Tyr Met Ser Gln Gly Arg Asp Ile Asn Leu Asp Val Asn Arg Ile Leu		
930	935	940
Gly Tyr Arg His Phe Cys Asn Lys Leu Trp Asn Ala Thr Lys Phe Ala		
945	950	955
Leu Arg Gly Leu Gly Lys Gly Phe Val Pro Ser Pro Thr Ser Gln Pro		
965	970	975
Gly Gly His Glu Ser Leu Val Asp Arg Trp Ile Arg Ser Arg Leu Thr		
980	985	990
Glu Ala Val Arg Leu Ser Asn Gln Gly Phe Gln Ala Tyr Asp Phe Pro		
995	1000	1005
Ala Val Thr Thr Ala Gln Tyr Ser Phe Trp Leu Tyr Glu Leu Cys		
1010	1015	1020
Asp Val Tyr Leu Glu Cys Leu Lys Pro Val Leu Asn Gly Val Asp		
1025	1030	1035
Gln Val Ala Ala Glu Cys Ala Arg Gln Thr Leu Tyr Thr Cys Leu		
1040	1045	1050
Asp Val Gly Leu Arg Leu Leu Sar Pro Phe Met Pro Phe Val Thr		
1055	1060	1065
Glu Glu Leu Phe Gln Arg Leu Pro Arg Arg Met Pro Gln Ala Pro		
1070	1075	1080
Pro Ser Leu Cys Val Thr Pro Tyr Pro Glu Pro Ser Glu Cys Ser		
1085	1090	1095
Trp Lys Asp Pro Glu Ala Glu Ala Ala Leu Glu Leu Ala Leu Ser		
1100	1105	1110
Ile Thr Arg Ala Val Arg Ser Leu Arg Ala Asp Tyr Asn Leu Thr		
1115	1120	1125
Arg Ile Arg Pro Asp Cys Phe Leu Glu Val Ala Asp Glu Ala Thr		
1130	1135	1140
Gly Ala Leu Ala Ser Ala Val Ser Gly Tyr Val Gln Ala Leu Ala		
1145	1150	1155

Ser Ala Gly Val Val Ala Val Leu Ala Leu Gly Ala Pro Ala Pro
 1160 1165 1170
 Gln Gly Cys Ala Val Ala Leu Ala Ser Asp Arg Cys Ser Ile His
 1175 1180 1185
 Leu Gln Leu Gln Gly Leu Val Asp Pro Ala Arg Glu Leu Gly Lys
 1190 1195 1200
 Leu Gln Ala Lys Arg Val Glu Ala Gln Arg Gln Ala Gln Arg Leu
 1205 1210 1215
 Arg Glu Arg Arg Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Val Lys Val Pro Leu
 1220 1225 1230
 Glu Val Gln Glu Ala Asp Glu Ala Lys Leu Gln Gln Thr Glu Ala
 1235 1240 1245
 Glu Leu Arg Lys Val Asp Glu Ala Ile Ala Leu Phe Gln Lys Met
 1250 1255 1260

Leu

<210>28

<211>4078

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>28

ggctgccggg gcggcgatct tagggaacta gggtcacctg gagagccgcc caccgtctct 60
 gcccgtctga ctctccgcc cgggcegtc ggccggcca gcccgggccg gcgcctggt 120
 gtgaggtgga ttcccggccc agtctgacca tctcccacca gtttttccac ttcgttcgga 180
 ctttctcata actatgtcca cctctacgt ctcccctcac ccagatgcct tcccagcct 240
 ccgagccctc atagccgctc gctatgggga ggctggggag ggtcccggat ggggaggagc 300
 ccacccccgc atctgtctcc agccacccc gactagcagg actagctttc ccccacccc 360
 cctgccggcc ctggagcagg ggcccgttg gctctgggtg tggggggcca cggtgtggtc 420
 ccagctgctg tggccagcag gcctgggggg cccagggggc agccgggagg ctgtccttgt 480
 ccaacagtgg gtcagttacg ccgacacgga gttaatacca gctgcctgtg gagcaacgct 540
 gccggccctg ggactccgaa gctcggccca ggacccccag gctgtgctgg gggccctggg 600
 cagggccctg agccccttgg aggagtggct tcggctgcac acctacttgg ccggggaggc 660
 ccccactctg gctgacctgg cggctgtcac agccttctgt ctgcctttcc gatacgtcct 720
 agaccacct gcccgccgga tctggaataa tgtgactcgc tggtttgc cgtgtgtccg 780
 gcagccagaa ttccgagccg tgctaggaga agtggttcta tactcaggag ccaggectct 840
 ctctcatcag ccagggccc aggctctgc cctccc aaag acagctgctc agctcaagaa 900
 agaggcaaag aaacgggaga agctagagaa attccaacag aagcagaaga tccaacagca 960
 gcagccacct ccaggggaga agaaacaaa accagagaag agggagaaac gggatcctgg 1020

ggtcattacc	tatgacctcc	caaccccacc	cggggaaaag	aaagatgtca	gtggccccat	1080
gcccgactcc	tacagccctc	ggtatgtgga	ggctgcctgg	tacccttggt	gggagcagca	1140
gggctttctc	aagccagagt	atgggcgtcc	taatgtgtca	gcagcaaate	cccagaggtg	1200
cttcatgatg	tgcatcccac	cccccaatgt	gacaggctcc	ctgcacctgg	gccatgcact	1260
caccaacgcc	atccaggact	ccctgactcg	atggcaccgc	atgcgtgggg	agaccacct	1320
gtggaac cct	ggctgtgacc	atgcaggtat	tgccaccag	gtggtggtgg	agaagaagct	1380
atggcgtgag	cagggactga	gccggcacca	gctgggcccgc	gaggcctttc	tacaggaagt	1440
ctggaagtgg	aaggaggaga	aaggtgaccg	gatttaccac	cagttgaaga	agcttggcag	1500
ctccttggac	tgggatcgag	cctgttttac	catggaccct	aaactctcag	cagctgtgac	1560
agaggccttt	gtccggcttc	acgaggaagg	catcatctat	cgagtagacc	gccttgtaa	1620
ctggctctgc	accctcaact	ccgcatctc	tgac attgag	gtggataaga	aggagctgac	1680
aggtcgcacc	ctgctctccg	tgccctggcta	caaggagaag	gtggagtctg	gggtcctcgt	1740
gtcctttgcc	tataaggtcc	aaggctcaga	tagcgacgag	gaggtggtgg	tggcaacaac	1800
tcggatcgag	acaatgctgg	gagatgtggc	tgtagctgtg	caccccaaag	ataccagata	1860
ccagcacctg	aagggaaga	acgtgatcca	ccattcctg	tctcggagcc	ttccattgt	1920
cttcgatgaa	tttgtggaca	tggactttgg	cacaggtgct	gtgaagatca	ccccgcaca	1980
tgacaaaaat	gactatgaag	ttgggcagcg	gcacgggctg	gaggccatca	gcatcatgga	2040
ctccccgggg	gccctcatca	atgtgcctcc	gcctttcctg	ggcctgccc	ggtttgaggc	2100
caggaaagcg	gtgctggtgg	cgctgaagga	gcggggactg	ttccgtggca	ttgaggacaa	2160
ccccatggtg	gtgccacttt	gcaaccggtc	gaaggacgtg	gtagagcctc	tgctgcggcc	2220
gcagtggtag	gttcgctgcg	gggagatggc	ccaggctgcc	agcggcctg	tgactcgggg	2280
tgacctccgc	atcctgcctg	aggcccatca	gcgcacatgg	catgcctgga	tggacaacat	2340
ccgggagtgg	tgcatttcca	ggcagctgtg	gtggggccat	cgcatcccag	cctactttgt	2400
caactgtcagt	gaccagcgg	tgccccctgg	ggaggaccct	gatgggcggt	actgggtgag	2460
tggacgcaat	gaggcggagg	cccgggagaa	ggcagccaag	gagttcggag	tgtcccctga	2520
caagatcagt	ctccagcaag	atgaggatgt	attggatacc	tggttctcct	ctggcctctt	2580
ccccttatec	atthtgggct	ggcccaacca	gtcagaagac	ctgagtgtgt	tctaccccgg	2640
gacactgctg	gagaccggtc	atgacatcct	cttcttctgg	gtggcccgga	tggatcatgct	2700
gggcctgaag	ctcacgggca	ggctgccctt	tagagaggtc	tacctccatg	ccatcgtgcg	2760
agatgctcac	ggccggaaga	tgagcaagtc	tctaggcaat	gtcatcgatc	ccctggacgt	2820
catctatgga	atctccctgc	aggcctcca	caaccagctg	ctgaacagca	acctggatcc	2880
cagcgaggtg	gagaaggcca	aagaagggca	gaaagctgac	ttcccagcgg	ggattcctga	2940
atgtggcac c	gatgctctcc	ggtttggatt	atgtgcctac	atgtcccagg	gtcgtgacat	3000
caacctggat	gtgaaccgga	tactgggtta	ccgccacttc	tgcaacaagc	tctggaatgc	3060
caccaagttt	gcccttcgtg	gccttgggaa	gggttttctg	ccctcaccca	cctcccagcc	3120
cggaggccat	gagagcctgg	tggaccgctg	gatccgcagc	cgctgacag	aggctgtgag	3180
gctcagcaat	caaggcttcc	aggcctacga	cttcccggcc	gtcaccactg	cccagtacag	3240
cttctggctc	tatgagctct	gtgatgtcta	cttggagtgc	ctgaaacctg	tactgaatgg	3300
ggtggaccag	gtggcagctg	agtgtgcccc	ccagaccctg	tacacttggc	tggacgttgg	3360

```

cctgcggctg ctctaccct tcattgccctt cgtgacggag gagctgttcc agaggctgcc      3420
ccggaggatg ccgcaagctc ccctagcct ctgtgttacc ccctaccceg agccctcaga      3480
gtgctcctgg aaggaccccg aggcagaagc cgcccttgag ctggcgctaa gcatcacgcg      3540
agccgtgcgc tccctgcggg ccgactacaa cctcaccceg atccggcctg actgtttcct      3600
ggaagtggcg gatgaggcca cgggcgccct ggcatcggcg gtgtcgggct acgtgcaggc      3660
cctggccagc gcaggtgtgg tggctgttct ggccctgggg gctcccggcc cccagggttg      3720
cgctgtggct ctggcttctg atcgtgtctc catccacctg cagcttcagg ggctggtgga      3780
ccctgcacgg gagctgggca agctgcaagc caagcgagtt gaggcccage ggcaggccca      3840
gcgtctgcgg gaacgccgtg ctgcctcggg ctatcctgtc aaggtgccgc tcgaagtcca      3900
ggaggcagat gaagccaagc tccaacagac agaagcagag ctcaggaagg tggatgaggc      3960
catgcacctt ttccagaaga tgctgtgatc caccaccag cttcaccct cacccccage      4020
ggctcaccat ggggatggca gcaataaaat attttccac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      4078

```

<210>29

<211>1264

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>29

```

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

```

145	150	155	160
Asp Leu Ala Ala Val	Thr Ala Leu Leu Leu	Pro Phe Arg Tyr Val	Leu
	165	170	175
Asp Pro Pro Ala Arg	Arg Ile Trp Asn Asn Val	Thr Arg Trp Phe Val	
	180	185	190
Thr Cys Val Arg Gln	Pro Glu Phe Arg Ala Val	Leu Gly Glu Val Val	
	195	200	205
Leu Tyr Ser Gly Ala	Arg Pro Leu Ser His Gln	Pro Gly Pro Glu Ala	
210	215	220	
Pro Ala Leu Pro Lys	Thr Ala Ala Gln Leu Lys	Lys Glu Ala Lys Lys	
225	230	235	240
Arg Glu Lys Leu Glu	Lys Phe Gln Gln Lys	Gln Lys Ile Gln Gln Gln	
	245	250	255
Gln Pro Pro Pro Gly	Glu Lys Lys Pro Lys	Pro Glu Lys Arg Glu Lys	
	260	265	270
Arg Asp Pro Gly Val	Ile Thr Tyr Asp Leu	Pro Thr Pro Pro Gly Glu	
275	280	285	
Lys Lys Asp Val Ser	Gly Pro Met Pro Asp	Ser Tyr Ser Pro Arg Tyr	
290	295	300	
Val Glu Ala Ala Trp	Tyr Pro Trp Trp Glu	Gln Gln Gly Phe Phe Lys	
305	310	315	320
Pro Glu Tyr Gly Arg	Pro Asn Val Ser Ala	Ala Asn Pro Arg Gly Val	
	325	330	335
Phe Met Met Cys Ile	Pro Pro Pro Asn Val	Thr Gly Ser Leu His Leu	
	340	345	350
Gly His Ala Leu Thr	Asn Ala Ile Gln Asp	Ser Leu Thr Arg Trp His	
355	360	365	
Arg Met Arg Gly Glu	Thr Thr Leu Trp Asn	Pro Gly Cys Asp His Ala	
370	375	380	
Gly Ile Ala Thr Gln	Val Val Val Glu Lys	Lys Leu Trp Arg Glu Gln	
385	390	395	400
Gly Leu Ser Arg His	Gln Leu Gly Arg Glu	Ala Phe Leu Gln Glu Val	
	405	410	415
Trp Lys Trp Lys Glu	Glu Lys Gly Asp Arg	Ile Tyr His Gln Leu Lys	
	420	425	430
Lys Leu Gly Ser Ser	Leu Asp Trp Asp Arg	Ala Cys Phe Thr Met Asp	
435	440	445	
Pro Lys Leu Ser Ala	Ala Val Thr Glu Ala	Phe Val Arg Leu His Glu	
450	455	460	

Glu Gly Ile Ile Tyr Arg Ser Thr Arg Leu Val Asn Trp Ser Cys Thr
 465 470 475 480
 Leu Asn Ser Ala Ile Ser Asp Ile Glu Val Asp Lys Lys Glu Leu Thr
 485 490 495
 Gly Arg Thr Leu Leu Ser Val Pro Gly Tyr Lys Glu Lys Val Glu Phe
 500 505 510
 Gly Val Leu Val Ser Phe Ala Tyr Lys Val Gln Gly Ser Asp Ser Asp
 515 520 525
 Glu Glu Val Val Val Ala Thr Thr Arg Ile Glu Thr Met Leu Gly Asp
 530 535 540
 Val Ala Val Ala Val His Pro Lys Asp Thr Arg Tyr Gln His Leu Lys
 545 550 555 560
 Gly Lys Asn Val Ile His Pro Phe Leu Ser Arg Ser Leu Pro Ile Val
 565 570 575
 Phe Asp Glu Phe Val Asp Met Asp Phe Gly Thr Gly Ala Val Lys Ile
 580 585 590
 Thr Pro Ala His Asp Gln Asn Asp Tyr Glu Val Gly Gln Arg His Gly
 595 600 605
 Leu Glu Ala Ile Ser Ile Met Asp Ser Arg Gly Ala Leu Ile Asn Val
 610 615 620
 Pro Pro Pro Phe Leu Gly Leu Pro Arg Phe Glu Ala Arg Lys Ala Val
 625 630 635 640
 Leu Val Ala Leu Lys Glu Arg Gly Leu Phe Arg Gly Ile Glu Asp Asn
 645 650 655
 Pro Met Val Val Pro Leu Cys Asn Arg Ser Lys Asp Val Val Glu Pro
 660 665 670
 Leu Leu Arg Pro Gln Trp Tyr Val Arg Cys Gly Glu Met Ala Gln Ala
 675 680 685
 Ala Ser Ala Ala Val Thr Arg Gly Asp Leu Arg Ile Leu Pro Glu Ala
 690 695 700
 His Gln Arg Thr Trp His Ala Trp Met Asp Asn Ile Arg Glu Trp Cys
 705 710 715 720
 Ile Ser Arg Gln Leu Trp Trp Gly His Arg Ile Pro Ala Tyr Phe Val
 725 730 735
 Thr Val Ser Asp Pro Ala Val Pro Pro Gly Glu Asp Pro Asp Gly Arg
 740 745 750
 Tyr Trp Val Ser Gly Arg Asn Glu Ala Glu Ala Arg Glu Lys Ala Ala
 755 760 765
 Lys Glu Phe Gly Val Ser Pro Asp Lys Ile Ser Leu Gln Gln Asp Glu

770	775	780
Asp Val Leu Asp Thr Trp Phe Ser Ser Gly Leu Phe Pro Leu Ser Ile		
785	790	795
Leu Gly Trp Pro Asn Gln Ser Glu Asp Leu Ser Val Phe Tyr Pro Gly		800
	805	810
Thr Leu Leu Glu Thr Gly His Asp Ile Leu Phe Phe Trp Val Ala Arg		815
	820	825
Met Val Met Leu Gly Leu Lys Leu Thr Gly Arg Leu Pro Phe Arg Glu		830
	835	840
Val Tyr Leu His Ala Ile Val Arg Asp Ala His Gly Arg Lys Met Ser		845
	850	855
Lys Ser Leu Gly Asn Val Ile Asp Pro Leu Asp Val Ile Tyr Gly Ile		860
865	870	875
Ser Leu Gln Gly Leu His Asn Gln Leu Leu Asn Ser Asn Leu Asp Pro		880
	885	890
Ser Glu Val Glu Lys Ala Lys Glu Gly Gln Lys Ala Asp Phe Pro Ala		895
	900	905
Gly Ile Pro Glu Cys Gly Thr Asp Ala Leu Arg Phe Gly Leu Cys Ala		910
	915	920
Tyr Met Ser Gln Gly Arg Asp Ile Asn Leu Asp Val Asn Arg Ile Leu		925
	930	935
Gly Tyr Arg His Phe Cys Asn Lys Leu Trp Asn Ala Thr Lys Phe Ala		940
945	950	955
Leu Arg Gly Leu Gly Lys Gly Phe Val Pro Ser Pro Thr Ser Gln Pro		960
	965	970
Gly Gly His Glu Ser Leu Val Asp Arg Trp Ile Arg Ser Arg Leu Thr		975
	980	985
Glu Ala Val Arg Leu Ser Asn Gln Gly Phe Gln Ala Tyr Asp Phe Pro		990
	995	1000
Ala Val Thr Thr Ala Gln Tyr Ser Phe Trp Leu Tyr Glu Leu Cys		1005
	1010	1015
Asp Val Tyr Leu Glu Cys Leu Lys Pro Val Leu Asn Gly Val Asp		1020
	1025	1030
Gln Val Ala Ala Glu Cys Ala Arg Gln Thr Leu Tyr Thr Cys Leu		1035
	1040	1045
Asp Val Gly Leu Arg Leu Leu Ser Pro Phe Met Pro Phe Val Thr		1050
	1055	1060
Glu Glu Leu Phe Gln Arg Leu Pro Arg Arg Met Pro Gln Ala Pro		1065
	1070	1075
		1080

Pro Ser Leu Cys Val Thr Pro Tyr Pro Glu Pro Ser Glu Cys Ser		
1085	1090	1095
Trp Lys Asp Pro Glu Ala Glu Ala Ala Leu Glu Leu Ala Leu Ser		
1100	1105	1110
Ile Thr Arg Ala Val Arg Ser Leu Arg Ala Asp Tyr Asn Leu Thr		
1115	1120	1125
Arg Ile Arg Pro Asp Cys Phe Leu Glu Val Ala Asp Glu Ala Thr		
1130	1135	1140
Gly Ala Leu Ala Ser Ala Val Ser Gly Tyr Val Gln Ala Leu Ala		
1145	1150	1155
Ser Ala Gly Val Val Ala Val Leu Ala Leu Gly Ala Pro Ala Pro		
1160	1165	1170
Gln Gly Cys Ala Val Ala Leu Ala Ser Asp Arg Cys Ser Ile His		
1175	1180	1185
Leu Gln Leu Gln Gly Leu Val Asp Pro Ala Arg Glu Leu Gly Lys		
1190	1195	1200
Leu Gln Ala Lys Arg Val Glu Ala Gln Arg Gln Ala Gln Arg Leu		
1205	1210	1215
Arg Glu Arg Arg Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Val Lys Val Pro Leu		
1220	1225	1230
Glu Val Gln Glu Ala Asp Glu Ala Lys Leu Gln Gln Thr Glu Ala		
1235	1240	1245
Glu Leu Arg Lys Val Asp Glu Ala Ile Ala Leu Phe Gln Lys Met		
1250	1255	1260

Leu

<210>30

<211>1128

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>30

gccggaagtg gccccagcct cgaggccggg cgtcttcggt catctccggc gcttctaggg	60
ctggttcccc tcattcttcgg gagccgtgga ggtacgaaet taagacatgc ctatattatt	120
aatttacttc caaacgcaac gaaaggtcca tggacaattt gtgggccatt taattcaggg	180
cccccaatte gtacgtggag aagtgggaat gcaaaaagtac tttgaccttt aaccttcggt	240
ccggcgcggg ggagggaaac gcctccgtct ctatataagg aattttccgg tctcttcggg	300
tcctttttcc tctcttcagc gtggggcgcc cacaatttgc gcgctctctt tctgetgetc	360
cccagctctc ggatacagcc gacacatgg gtttcggaga cctgaaaage cctgcccggc	420

tccaggtgct caacgattac ctggcggaca agagctacat cgaggggtat gtgccatcac 480
aagcagatgt ggcagtattht gaagccgtgt ccagcccacc gcctgccgac ttgtgtcatg 540
ccctacgttg gtataatcac atcaagtctt acgaaaagga aaaggccagc ctgccaggag 600
tgaagaaagc tttgggcaaa tatggtcctg ccgatgtgga agacactaca ggaagtggag 660
ctacagatag taaagatgat gatgacattg acctctttgg atctgatgat gaggaggaaa 720
gtgaagaagc aaagaggcta agggaagaac gtcttgcaca atatgaatca aagaaagcca 780
aaaaacctgc acttgttgcc aagtcttcca tcttactaga tgtgaaacct tgggatgatg 840
agacagatat ggcgaaatta gaggagtgcg tcagaagcat tcaagcagac ggcttagtct 900
ggggctcatc taaactagtt ccagtgggat acggaattaa gaaacttcaa atacagtgtg 960
tagttgaaga tgataaagtt ggaacagata tgctggagga gcagatcact gcttttgagg 1020
actatgtgca gtccatggat gtggctgctt tcaacaagat ctaaaatcca tcctgatca 1080
tggcatttaa ataaaagatt gaaagattac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1128

<210>31

<211>225

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>31

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

145	150	155	160
Cys Val Arg Ser Ile Gln Ala Asp Gly Leu Val Trp Gly Ser Ser Lys			
	165	170	175
Leu Val Pro Val Gly Tyr Gly Ile Lys Lys Leu Gln Ile Gln Cys Val			
	180	185	190
Val Glu Asp Asp Lys Val Gly Thr Asp Met Leu Glu Glu Gln Ile Thr			
	195	200	205
Ala Phe Glu Asp Tyr Val Gln Ser Met Asp Val Ala Ala Phe Asn Lys			
	210	215	220

Ile

225

<210>32

<211>1435

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>32

```

atcaccatgg cggctgggac cctgtacacg tatectgaaa actggagggc cttcaaggct      60
ctcatcgctg ctcagtacag cggggctcag gtccgcgtgc tctccgcacc accccacttc      120
cattttggcc aaaccaaccg caccctgaa tttctccgca aatttcctgc cggcaaggtc      180
ccagcatttg agggatgatga tggattctgt gtgtttgaga gcaacgcat tgcctactat      240
gtgagcaatg aggagctgcg gggaagtact ccagaggcag cagcccaggt ggtgcagtgg      300
gtgagctttg ctgattccga tatagtgcc ccagccagta cctgggtgtt cccaccttg      360
ggcatcatgc accacaacaa acaggccact gagaatgcaa aggaggaagt gaggcgaatt      420
ctggggctgc tggatgctta cttgaagacg aggacttttc tgggtggcga acgagtgaca      480
ttggctgaca tcacagttgt ctgcaccctg ttgtggctct ataagcaggt tctagagcct      540
tctttccgcc aggcctttcc caataccaac cgctggttcc tcacctgcat taaccagccc      600
cagttccggg ctgtcttggg ggaagtgaaa ctgtgtgaga agatggccca gtttgatget      660
aaaaagtttg cagagacca acctaaaaag gacacaccac ggaaagagaa gggttcacgg      720
gaagagaagc agaagcccca ggctgagcgg aaggaggaga aaaaggcggc tgcccctget      780
cctgaggagg agatggatga atgtgagcag gcgctggctg ctgagcccaa ggccaaggac      840
cccttcgctc acctgcccga gactaccttt gtgttggatg aatttaagcg caagtactcc      900
aatgaggaca cactctctgt ggcactgcca tttttctggg agcactttga taaggacggc      960
tggtcctgtg ggtactcaga gtatecttc cctgaagaac tcactcagac cttcatgagc     1020
tgcaatctca tcaactggaat gttccagcga ctggacaagc tgaggaagaa tgccttcgcc     1080
agtgatcatc tttttggaac caacaatagc agctccattt ctggagtctg ggtcttccga     1140
ggccaggagc ttgcctttcc gctgagtcca gattggcagg tggactacga gtcatacaca     1200
tggcggaaac tggatcctgg cagcagaggag acccagacgc tggttcgaga gtacttttcc     1260

```

tgggaggggg ccttccagca tgtgggcaaa gccttcaatc agggcaagat cttcaagtga 1320
 acatctcttg ccatcaccta gctgcctgca cctgcccttc agggagatgg gggtcattaa 1380
 aggaaactga acattgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1435

<210>33

<211>437

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>33

Met Ala Ala Gly Thr Leu Tyr Thr Tyr Pro Glu Asn Trp Arg Ala Phe
 1 5 10 15
 Lys Ala Leu Ile Ala Ala Gln Tyr Ser Gly Ala Gln Val Arg Val Leu
 20 25 30
 Ser Ala Pro Pro His Phe His Phe Gly Gln Thr Asn Arg Thr Pro Glu
 35 40 45
 Phe Leu Arg Lys Phe Pro Ala Gly Lys Val Pro Ala Phe Glu Gly Asp
 50 55 60
 Asp Gly Phe Cys Val Phe Glu Ser Asn Ala Ile Ala Tyr Tyr Val Ser
 65 70 75 80
 Asn Glu Glu Leu Arg Gly Ser Thr Pro Glu Ala Ala Ala Gln Val Val
 85 90 95
 Gln Trp Val Ser Phe Ala Asp Ser Asp Ile Val Pro Pro Ala Ser Thr
 100 105 110
 Trp Val Phe Pro Thr Leu Gly Ile Met His His Asn Lys Gln Ala Thr
 115 120 125
 Glu Asn Ala Lys Glu Glu Val Arg Arg Ile Leu Gly Leu Leu Asp Ala
 130 135 140
 Tyr Leu Lys Thr Arg Thr Phe Leu Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Ala
 145 150 155 160
 Asp Ile Thr Val Val Cys Thr Leu Leu Trp Leu Tyr Lys Gln Val Leu
 165 170 175
 Glu Pro Ser Phe Arg Gln Ala Phe Pro Asn Thr Asn Arg Trp Phe Leu
 180 185 190
 Thr Cys Ile Asn Gln Pro Gln Phe Arg Ala Val Leu Gly Glu Val Lys
 195 200 205
 Leu Cys Glu Lys Met Ala Gln Phe Asp Ala Lys Lys Phe Ala Glu Thr
 210 215 220
 Gln Pro Lys Lys Asp Thr Pro Arg Lys Glu Lys Gly Ser Arg Glu Glu

<210>35	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>35	
tctcttgatg atagatgtgc agc	23
<210>36	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>36	
tggtacaaa cttcctagca cat	23
<210>37	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>37	
ctccaccaca cactgaatct gta	23
<210>38	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	

<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>38

taagcatcac gcgagccgtg

20

<210>39

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>39

ggatggagca gcagcgatca gaa

23

<210>40

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>40

agactggтта atgataacaa tgc

23

<210>41

<211>23

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>41

ggtctcaaaa ttctgtgaca aat

23

<210>42

<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>42	
cagaagcatt caagcagacg	20
<210>43	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>43	
atgcatgat ccaggatgga	20
<210>44	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	
<400>44	
ggtggactac gagtcataca cat	23
<210>45	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 用于 PCR 的人工合成引物	

<400>45
cagtttcctt taatgacccc c 21

<210>46
<211>20
<212>DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>46
agcctagcat cccatgtcaa 20

<210>47
<211>21
<212>DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>47
gaagacgaag tacagctgaa g 21

<210>48
<211>89
<212>PRT
<213> 人工的

<220>
<223>EF-1delta 的 CDKN3- 结合序列

<400>48

Gly Thr Ser Gly Asp His Gly Glu Leu Val Val Arg Ile Ala Ser Leu
1 5 10 15
Glu Val Glu Asn Gln Ser Leu Arg Gly Val Val Gln Glu Leu Gln Gln

	20	25	30
Ala Ile Ser Lys Leu Glu Ala Arg Leu Asn Val Leu Glu Lys Ser Ser			
35	40	45	
Pro Gly His Arg Ala Thr Ala Pro Gln Thr Gln His Val Ser Pro Met			
50	55	60	
Arg Gln Val Glu Pro Pro Ala Lys Lys Pro Ala Thr Pro Ala Glu Asp			
65	70	75	80
Asp Glu Asp Asp Asp Ile Asp Leu Phe			
	85		

<210>49

<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列

<400>49

tatagagtcc caaaccttc

19

<210>50

<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列

<400>50

tacactgcta tggaggact

19

<210>51

<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列

<400>51 gtggagaacc agagtctgc	19
<210>52 <211>19 <212>DNA <213> 人工的	
<220> <223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>52 catccagaaa tccctggct	19
<210>53 <211>19 <212>DNA <213> 人工的	
<220> <223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>53 ugguuuacau gucgacuaa	19
<210>54 <211>19 <212>DNA <213> 人工的 <220> <223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列	
<400>54 ugguuuacau guuuucuga	19
<210>55 <211>19 <212>DNA	

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列

<400>55

ugguuuacau guuuuccua

19

<210>56

<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列

<400>56

ugguuuacau guuguguga

19

<210>57

<211>3528

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>57

ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca caggtgtcgt gaaaactacc cctaaaagcc	60
aaaatgggaa aggaaaagac tcatatcaac attgtcgtca ttggacacgt agattcgggc	120
aagtccacca ctactggcca tctgatctat aaatgcggtg gcatcgacaa aagaaccatt	180
gaaaaatttg agaaggaggc tgctgagatg ggaaagggt ccttcaagta tgccctgggc	240
ttggataaac tgaaagctga gcgtgaacgt ggtatcacca ttgatatctc cttgtggaaa	300
tttgagacca gcaagtacta tgtgactatc attgatgccc caggacacag agactttatc	360
aaaaacatga ttacaggac atctcaggct gactgtgctg tcctgattgt tgctgctggt	420
gttggtgaat ttgaagctgg tatctccaag aatgggcaga cccgagagca tgcccttctg	480
gcttacacac tgggtgtgaa acaactaatt gtcggtgtta acaaaatgga ttccactgag	540
ccaccctaca gccagaagag atatgaggaa attgttaagg aagtcagcac ttacattaag	600
aaaattggct acaaccccga cacagtagca tttgtgccaa tttctggttg gaatggtgac	660
aacatgctgg agccaagtgc taacatgcct tggttcaagg gatggaaagt cacccgtaag	720
gatggcaatg ccagtggaac cacgctgctt gaggctctgg actgcatcct accaccaact	780
cgtccaactg acaagccctt gcgcctgcct ctccaggatg tctacaaaat tgggtgtatt	840

ggtactgttc	ctgttggccg	agtggagact	ggtgttctca	aacccggat	ggtggtcacc	900
tttgcctcag	tcaacgttac	aacggaagta	aaatctgtcg	aatgcacca	tgaagctttg	960
agtgaagctc	ttcctgggga	caatgtgggc	ttcaatgtca	agaatgtgtc	tgtcaaggat	1020
gttcgtcgtg	gcaacgttgc	tggtgacagc	aaaaatgacc	accaatgga	agcagctggc	1080
ttcactgctc	aggtgattat	cctgaacat	ccaggccaaa	taagcgccgg	ctatgccct	1140
gtattggatt	gccacacggc	tcacattgca	tgcaagtttg	ctgagctgaa	ggaaaagatt	1200
gatcgccgtt	ctggtaaaaa	gctggaagat	ggccctaaat	tcttgaagtc	tggtgatgct	1260
gccattgttg	atatggttcc	tggcaagccc	atgtgtgttg	agagcttctc	agactatcca	1320
cctttgggtc	gctttgctgt	tcgtgatatg	agacagacag	ttgcggtggg	tgtcatcaaa	1380
gcagtgga	agaaggctgc	tggagctggc	aaggtcacca	agtctgccc	gaaagctcag	1440
aaggctaaat	gaatattatc	cctaatacct	gccaccacac	tcttaatcag	tggtggaaga	1500
acggtctcag	aactgtttgt	ttcaattggc	catttaagtt	tagtagtaaa	agactggtta	1560
atgataacaa	tgcatcgtaa	aaccttcaga	aggaaaggag	aatgttttgt	ggaccacttt	1620
ggttttcttt	tttgcgtgtg	gcagttttaa	gttattagtt	tttaaaatca	gtacttttta	1680
atggaaacaa	cttgacaaa	aatttgtcac	agaattttga	gaccattaa	aaaagttaaa	1740
tgagaaacct	gtgtgttctt	ttggtaaca	ccgagacatt	taggtgaaag	acatctaatt	1800
ctggttttac	gaatctggaa	acttcttgaa	aatgtaattc	ttgagttaac	acttctgggt	1860
ggagaatagg	gttgttttcc	ccccacataa	ttggaagggg	aaggaatata	atftaaagct	1920
atgggagggt	tgctttgatt	acaacactgg	agagaaatgc	agcatgttgc	tgattgcctg	1980
tcactaaaac	aggccaaaaa	ctgagtcctt	gtgttgcata	gaaagcttca	tgttgctaaa	2040
ccaatgttaa	gtgaatcttt	gaaacaaaa	tgtttccaaa	ttactgggat	gtgcatgttg	2100
aaacgtgggt	taaaatgact	gggcagtgaa	agttgactat	ttgcatgac	ataagaaata	2160
agtgtagtgg	ctagtgtaca	ccctatgagt	ggaagggtcc	atfttgaagt	cagtggagta	2220
agctttatgc	cagtttgatg	gtttcacaag	ttctattgag	tgctattcag	aataggaaca	2280
aggttcta	agaaaaagat	ggcaatttga	agtagctata	aaattagact	aatctacatt	2340
gcttttctcc	tgcagagtct	aatacctttt	atgctttgat	aattagcagt	ttgtctactt	2400
ggtcactagg	aatgaaacta	catggtaata	ggcttaacag	gtgtaatagc	ccacttactc	2460
ctgaatcttt	aagcatttgt	gcatttga	aatgcttttc	gcatcttcc	tgctgggatt	2520
acaggcatga	gccactgtgc	ctgacctccc	atatgtaaaa	gtgtctaaag	gttttttttt	2580
ggttataaaa	ggaaaatftt	tgcttaagtt	tgaaggatag	gtaaaattaa	aggacatgct	2640
ttctgtttgt	gtgatggttt	ttaaaaatft	tttttaagat	ggagtftctg	ttgccaggc	2700
tagaatgcaa	tggcaaaatc	tactgcaat	ctctctctcc	tgggttcaag	caattctct	2760
acttcagcct	ccaagttagc	tgggattaca	ggcatgtgct	aatttgggtg	ttttaataga	2820
gatgaggttt	ttcatgtttg	gtcaggctgg	tctcaaactc	ctgaccttag	gtgatgcct	2880
cggcctccta	aagtgtgga	attacaggca	tgagccacca	tgcttgcca	ggacatgtgt	2940
tcttaaggac	atgctaagca	ggagttaaag	cagcccaaga	gataaggcct	cttaaagtga	3000
ctggcaatgt	gtattgctca	agattcaaa	gtacttgaat	tggccataga	caagtctgta	3060
atgaagtgtt	atcgtttcc	ctcatctgag	tctgaattag	ataaaatgcc	ttcccatcag	3120
ccagtgtctt	gaggatca	gtctaaattg	aactagagat	ttttgtcctt	agtttctttg	3180

ctatctaattg ttacacaag taaatagtct aagatttgct ggatgacaga aaaaacaggt 3240
aaggccttta atagatggcc aatagatgcc ctgataatga aagttgacac ctgtaagatt 3300
taccagtaga gaattcttga catgcaagga agcaagattt aactgaaaaa ttgttcccac 3360
tggaagcagg aatgagtcag ttacttgcata tatactgaga ttgagattaa cttcctgtga 3420
aaccagtggt cttagacaac tgtggcttga gcaccacctg ctggtattca ttacaaactt 3480
gctcactaca ataaatgaat tttaagcttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3528

<210>58

<211>462

<212>PRT

<213>人 (Homo sapiens)

<400>58

Met Gly Lys Glu Lys Thr His Ile Asn Ile Val Val Ile Gly His Val
1 5 10 15
Asp Ser Gly Lys Ser Thr Thr Thr Gly His Leu Ile Tyr Lys Cys Gly
20 25 30
Gly Ile Asp Lys Arg Thr Ile Glu Lys Phe Glu Lys Glu Ala Ala Glu
35 40 45
Met Gly Lys Gly Ser Phe Lys Tyr Ala Trp Val Leu Asp Lys Leu Lys
50 55 60
Ala Glu Arg Glu Arg Gly Ile Thr Ile Asp Ile Ser Leu Trp Lys Phe
65 70 75 80
Glu Thr Ser Lys Tyr Tyr Val Thr Ile Ile Asp Ala Pro Gly His Arg
85 90 95
Asp Phe Ile Lys Asn Met Ile Thr Gly Thr Ser Gln Ala Asp Cys Ala
100 105 110
Val Leu Ile Val Ala Ala Gly Val Gly Glu Phe Glu Ala Gly Ile Ser
115 120 125
Lys Asn Gly Gln Thr Arg Glu His Ala Leu Leu Ala Tyr Thr Leu Gly
130 135 140
Val Lys Gln Leu Ile Val Gly Val Asn Lys Met Asp Ser Thr Glu Pro
145 150 155 160
Pro Tyr Ser Gln Lys Arg Tyr Glu Glu Ile Val Lys Glu Val Ser Thr
165 170 175
Tyr Ile Lys Lys Ile Gly Tyr Asn Pro Asp Thr Val Ala Phe Val Pro
180 185 190
Ile Ser Gly Trp Asn Gly Asp Asn Met Leu Glu Pro Ser Ala Asn Met

195	200	205
Pro Trp Phe Lys Gly Trp Lys Val Thr Arg Lys Asp Gly Asn Ala Ser		
210	215	220
Gly Thr Thr Leu Leu Glu Ala Leu Asp Cys Ile Leu Pro Pro Thr Arg		
225	230	235
Pro Thr Asp Lys Pro Leu Arg Leu Pro Leu Gln Asp Val Tyr Lys Ile		
245	250	255
Gly Gly Ile Gly Thr Val Pro Val Gly Arg Val Glu Thr Gly Val Leu		
260	265	270
Lys Pro Gly Met Val Val Thr Phe Ala Pro Val Asn Val Thr Thr Glu		
275	280	285
Val Lys Ser Val Glu Met His His Glu Ala Leu Ser Glu Ala Leu Pro		
290	295	300
Gly Asp Asn Val Gly Phe Asn Val Lys Asn Val Ser Val Lys Asp Val		
305	310	315
Arg Arg Gly Asn Val Ala Gly Asp Ser Lys Asn Asp Pro Pro Met Glu		
325	330	335
Ala Ala Gly Phe Thr Ala Gln Val Ile Ile Leu Asn His Pro Gly Gln		
340	345	350
Ile Ser Ala Gly Tyr Ala Pro Val Leu Asp Cys His Thr Ala His Ile		
355	360	365
Ala Cys Lys Phe Ala Glu Leu Lys Glu Lys Ile Asp Arg Arg Ser Gly		
370	375	380
Lys Lys Leu Glu Asp Gly Pro Lys Phe Leu Lys Ser Gly Asp Ala Ala		
385	390	395
Ile Val Asp Met Val Pro Gly Lys Pro Met Cys Val Glu Ser Phe Ser		
405	410	415
Asp Tyr Pro Pro Leu Gly Arg Phe Ala Val Arg Asp Met Arg Gln Thr		
420	425	430
Val Ala Val Gly Val Ile Lys Ala Val Asp Lys Lys Ala Ala Gly Ala		
435	440	445
Gly Lys Val Thr Lys Ser Ala Gln Lys Ala Gln Lys Ala Lys		
450	455	460

<210>59

<211>2794

<212>DNA

<213>人 (Homo sapiens)

<400>59

cggcaggacc	gagcgcggca	ggcggctggc	ccagcgcagc	cagcgcggcc	cgaaggacgg	60
gagcaggcgg	ccgagcaccg	agcgcctggc	accgggcacc	gagcggcggc	ggcacgcgag	120
gcccggcccc	gagcagcgcc	cccggccgcc	gcgccctcca	gcccggcccc	gcccagcgcc	180
ggcccgcggg	gatgcggagc	ggcgggcgcc	ggaggccgcg	gcccggctag	gcccgcgctc	240
gcgcccggac	gcggcgcccc	gaggctgtgg	ccaggccagc	tgggctcggg	gagcgcaccg	300
ctgagaggag	cgcgtgagcg	tcgcgggagc	ctcgggcacc	atgagcgacg	tggctattgt	360
gaaggagggt	tggctgcaca	aacgagggga	gtacatcaag	acctggcggc	cacgctactt	420
cctcctcaag	aatgatggca	ccttcattgg	ctacaaggag	cggccgcagg	atgtggacca	480
acgtgaggct	cccctcaaca	acttctctgt	ggcgcagtgc	cagctgatga	agacggagcg	540
gccccggccc	aacaccttca	tcatecgctg	cctgcagtgg	accactgtca	tcgaacgcac	600
cttccatgtg	gagactcctg	aggagcggga	ggagtggaca	accgcatcc	agactgtggc	660
tgacggcctc	aagaagcagg	aggaggagga	gatggacttc	cggtcgggct	caccagtgga	720
caactcaggg	gctgaagaga	tggaggtgtc	cctggccaag	ccaagcacc	gcgtgacat	780
gaacgagttt	gagtacctga	agctgctggg	caagggcact	ttcggcaagg	tgatcctggt	840
gaaggagaag	gccacaggcc	gctactacgc	catgaagatc	ctcaagaagg	aagtcatcgt	900
ggccaaggac	gaggtggccc	acacactcac	cgagaaccgc	gtcctgcaga	actccaggca	960
ccccttctc	acagccctga	agtactcttt	ccagaccac	gaccgcctct	gctttgtcat	1020
ggagtacgcc	aacgggggcg	agctgttctt	ccacctgtcc	cgggagcgtg	tgttctccga	1080
ggaccgggcc	cgcttctatg	gcgctgagat	tgtgtcagcc	ctggactacc	tgactcggga	1140
gaagaacgtg	gtgtaccggg	acctcaagct	ggagaacctc	atgctggaca	aggacgggca	1200
cattaagatc	acagacttcg	ggctgtgcaa	ggaggggatc	aaggacggtg	ccacatgaa	1260
gaccttttgc	ggcacacctg	agtacctggc	ccccgaggtg	ctggaggaca	atgactacgg	1320
ccgtgcagtg	gactggtggg	ggctgggcgt	ggtcatgtac	gagatgatgt	gcggtcgcct	1380
gcccttctac	aaccaggacc	atgagaagct	ttttgagctc	atcctcatgg	aggagatccg	1440
cttcccgcgc	acgcttggtc	ccgaggccaa	gtccttgctt	tcagggctgc	tcaagaagga	1500
ccccaagcag	aggcttggcg	ggggctccga	ggacccaag	gagatcatgc	agcatcgctt	1560
ctttgccggt	atcgtgtggc	agcacgtgta	cgagaagaag	ctcagccac	ccttcaagcc	1620
ccaggtcacg	tcggagactg	acaccaggta	ttttgatgag	gagttcacgg	cccagatgat	1680
caccatcaca	ccacctgacc	aagatgacag	catggagtgt	gtggacagcg	agcgcaggcc	1740
ccacttcccc	cagttctect	actcggccag	cggcacggcc	tgaggcggcg	gtggactgcg	1800
ctggacgata	gcttggaggg	atggagaggc	ggcctcgtgc	catgatctgt	atthaatggt	1860
ttttatttct	cgggtgcatt	tgagagaagc	cacgctgtcc	tctcagccc	agatggaaag	1920
acgtttttgt	gctgtgggca	gcaccctccc	ccgcagcggg	gtagggaaga	aaactatcct	1980
gcgggtttta	atthatttca	tccagtttgt	tctccgggtg	tggcctcagc	cctcagaaca	2040
atccgattca	cgtagggaaa	tgtaaggac	ttctgcagct	atgcgcaatg	tggcattggg	2100
gggccgggca	ggtcctgccc	atgtgtcccc	tactctgttc	agccagccgc	cctgggctgt	2160
ctgtcaccag	ctatctgtca	tctctctggg	gccctgggcc	tcagttcaac	ctggtggcac	2220
cagatgcaac	ctcactatgg	tatgctggcc	agcaccctct	cctgggggtg	gcaggcacac	2280

agcagccccc cagcactaag gccgtgtctc tgaggacgtc atcggaggct gggcccctgg 2340
 gatgggacca gggatggggg atgggccagg gtttaccag tgggacagag gagcaaggtt 2400
 taaatttggt attgtgtatt atgttgttca aatgcatttt gggggttttt aatctttgtg 2460
 acaggaagc cctccccctt ccccttctgt gtcacagtgc ttggtgactg tcccaccggg 2520
 agcctcccc tcagatgac tctccacggg agcacttgac cttttcgac cttaaccttt 2580
 ccgctgtcgc cccaggccct ccctgactcc ctgtgggggt ggccatccct gggcccctcc 2640
 acgcctcctg gccagacgct gccgctgccg ctgcaccacg gcgttttttt acaacattca 2700
 actttagtat ttttactatt ataataat atggaacctt ccctccaaat tcttcaataa 2760
 aagttgcttt tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2794

<210>60

<211>480

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>60

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

	180		185		190
Ala His Thr Leu Thr Glu Asn Arg Val Leu Gln Asn Ser Arg His Pro					
	195		200		205
Phe Leu Thr Ala Leu Lys Tyr Ser Phe Gln Thr His Asp Arg Leu Cys					
	210		215		220
Phe Val Met Glu Tyr Ala Asn Gly Gly Glu Leu Phe Phe His Leu Ser					
225		230		235	240
Arg Glu Arg Val Phe Ser Glu Asp Arg Ala Arg Phe Tyr Gly Ala Glu					
	245		250		255
Ile Val Ser Ala Leu Asp Tyr Leu His Ser Glu Lys Asn Val Val Tyr					
	260		265		270
Arg Asp Leu Lys Leu Glu Asn Leu Met Leu Asp Lys Asp Gly His Ile					
	275		280		285
Lys Ile Thr Asp Phe Gly Leu Cys Lys Glu Gly Ile Lys Asp Gly Ala					
	290		295		300
Thr Met Lys Thr Phe Cys Gly Thr Pro Glu Tyr Leu Ala Pro Glu Val					
305		310		315	320
Leu Glu Asp Asn Asp Tyr Gly Arg Ala Val Asp Trp Trp Gly Leu Gly					
	325		330		335
Val Val Met Tyr Glu Met Met Cys Gly Arg Leu Pro Phe Tyr Asn Gln					
	340		345		350
Asp His Glu Lys Leu Phe Glu Leu Ile Leu Met Glu Glu Ile Arg Phe					
	355		360		365
Pro Arg Thr Leu Gly Pro Glu Ala Lys Ser Leu Leu Ser Gly Leu Leu					
	370		375		380
Lys Lys Asp Pro Lys Gln Arg Leu Gly Gly Gly Ser Glu Asp Ala Lys					
385		390		395	400
Glu Ile Met Gln His Arg Phe Phe Ala Gly Ile Val Trp Gln His Val					
	405		410		415
Tyr Glu Lys Lys Leu Ser Pro Pro Phe Lys Pro Gln Val Thr Ser Glu					
	420		425		430
Thr Asp Thr Arg Tyr Phe Asp Glu Glu Phe Thr Ala Gln Met Ile Thr					
	435		440		445
Ile Thr Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Met Glu Cys Val Asp Ser Glu					
	450		455		460
Arg Arg Pro His Phe Pro Gln Phe Ser Tyr Ser Ala Ser Gly Thr Ala					
465		470		475	480

<210>61

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

<210>64

<211>16

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的 Penetrat in 序列

<400>64

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210>65

<211>21

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的 Buforin II 序列

<400>65

Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His
1 5 10 15
Arg Leu Leu Arg Lys
20

<210>66

<211>27

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>66

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu

<400>72

Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
 1 5 10 15
 Ser Lys

<210>73

<211>21

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的 Pep-1 序列

<400>73

Lys Glu Thr Trp Trp Glu Thr Trp Trp Thr Glu Trp Ser Gln Pro Lys
 1 5 10 15
 Lys LysArg Lys Val
 20

<210>74

<211>18

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的 SynB1 序列

<400>74

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Arg Phe Ser Thr Ser Thr
 1 5 10 15
 Gly Arg

<210>75

<211>15

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的 Pep-7 序列

<400>75

Ser Asp Leu Trp Glu Met Met Met Val Ser Leu Ala Cys Gln Tyr
1 5 10 15

<210>76

<211>12

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的 HN-1 序列

<400>76

Thr Ser Pro Leu Asn Ile His Asn Gly Gln Lys Leu
1 5 10

<210>77

<211>11

<212>PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的聚精氨酸 -11 序列

<400>77

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5 10

<210>78

<211>5441

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>78

agtgggggccc	tgatagecgcg	gcggtgtgga	ccgcgcggcc	gaagagcgcg	gcgcccagag	60
cgcgggccgc	tcgcggagcc	acagcccag	ccgggtccca	gccggagccg	agccccagcc	120
gagccgagcc	gggcccggag	cgcccgtgc	ccgcagccat	gccggccggc	cgcgccgcg	180
gcacctgtgc	gctgctcgcc	ctctgcctcc	tgggcgcccg	ggcccaggat	ttcgggcca	240
cgcgcttcat	ctgcacctcg	gtgcccgtgg	acgccgacat	gtgcgcccgcg	tccgtggccg	300
ccggcggcgc	cgaggagctc	eggagcagcg	tgctgcagct	ccgcgagacg	gtgctgcagc	360
agaaggagac	catcctgagc	cagaaggaga	ccatccgcga	gctgaccgcc	aagctgggcc	420
gctgcgagag	ccagagcacg	ctggacccc	gagccggcga	ggcccgggcg	ggcggcggcc	480
gcaagcagcc	cggctcgggc	aagaacacca	tgggcgacct	gtcccggaca	ccggccgccg	540
agacgctcag	ccaactcggg	caaactttgc	aatcgctcaa	aaccgcctg	gagaacctcg	600
agcagtacag	ccgcctcaat	tctccagcc	agaccaacag	cctcaaggat	ctgctgcaga	660
gcaagatcga	tgagctggag	aggcaggtgc	tgtcccgggt	gaacaccctg	gaggagggca	720
aggggggccc	caggaacgac	accgaggaga	gggtcaagat	cgagaccgcc	ctgacctccc	780
tgcaccagcg	gatcagcgag	ctcgagaaag	gtcagaaaga	caaccgcct	ggagacaagt	840
tccagctcac	attcccactg	cggaccaact	atatgtatgc	caaggtgaag	aagagcctgc	900
cagagatgta	cgccttcaact	gtctgcatgt	ggctcaagtc	cagcgccacg	ccaggtgtgg	960
gcacgccctt	ctcctacgct	gtgcccggcc	aggccaacga	gctggtcctc	attgagtggg	1020
gcaacaacc	catggagatc	ctcatcaatg	acaaggtggc	caagttgcct	tttgtcatca	1080
atgatggcaa	gtggcaccac	atctgtgtca	cctggaccac	ccgggacggg	gtctgggagg	1140
cctaccagga	tggcacgcag	ggtggcagtg	gcgagaactt	ggcgcctat	caccccatca	1200
agccccaggg	cgtgctggtg	ctgggcccagg	agcaggacac	tctgggtggt	gggtttgatg	1260
ccaccaggc	atttgtgggt	gagctggccc	acttcaacat	ctgggaccgc	aagctgacc	1320
ccggggaggt	gtacaacctg	gccacctgca	gcaccaaggc	tctgtccggc	aatgtcatcg	1380
cctgggctga	atccacatc	gagatctacg	gaggggccac	caagtggacc	ttcgaggcct	1440
gtcgccagat	caactgagca	cggcaggcca	ggctgagccc	gcccgcctc	gccccctgct	1500
tgtcgggcga	tgatctgttt	tgtcgtctc	ttctctccct	ttccccagg	aatgaaccga	1560
ggccgtcgcc	cctgcacacg	cacacgcaca	cagcctggtt	ttgtcctcat	gcacacgaag	1620
cagcccctgc	tcccatctgt	ccctgaggaa	gccccacttc	tctgtaggag	cccggactct	1680
ctcaggcatg	ccccattcac	agctgaagtg	ggtgctgcaa	cgtcttgaac	aaggcagaag	1740
ttggtgagag	gatctgtgtg	tgcgtgtcta	catgtgtgtg	tctacgtgtg	tgcgtgcgtg	1800
gctgggggag	gccttttctt	tgaggacgta	cctcatttcc	ttctttcttc	tggctttgga	1860
aaaatctcat	gatgaaaatt	catatttggc	aactttgtta	gctgcgtgcg	tgctttgggg	1920
ttggtgcaac	ctcagtacac	gcatttgtct	ttgtttgcaa	acctttctca	gagcgcacata	1980
tctttatatt	gatgtaataa	atgtctttta	gtggtttgtc	aaaggccggg	ggcgggggct	2040
ctctacagag	aatttttatt	ttgtaataga	agtgaactgt	ctctgaaggg	tgaaggcagg	2100
ccgtcctggg	atggtaccct	gtgctctccc	gtggaggaga	gggatggct	gaggacactg	2160
gcccttacc	cagggccaga	cagcatccat	ccctgctgtt	tgcactctgag	agcagcatgg	2220
ggcctgggag	gtcggcctgt	gtgcccagct	cagctagctc	tgcccagga	cgccctgcc	2280

ctcgaccttc	ccacctcctc	agatcctgca	aggctgggggt	ctgccccctcc	cttctcacct	2340
ctggagctgt	gctgcaactgc	ttcagcccag	agggccctga	gagaggagcg	tgccaccac	2400
agccccggaa	gccgggcccc	agcaccctc	tcctttggcc	tccggcagtg	cagaccagag	2460
gggacctttt	aaggaaagaa	gccgtgtttc	gatgaagacc	tggccacatg	gggccactgg	2520
gacttcaacc	cagcccatcg	gtgggaaggt	cctttttggg	ggcctttgac	agccatatcc	2580
ctcccagcac	accaggcgcc	aggtgagctg	gttcagacct	ctccaggggt	actccagaga	2640
cctcacgtgt	ggagccaggc	ctggccaggg	caggggcctg	aaaccactc	ctccatctca	2700
tggggctcac	ggcctacagc	agcccacaag	ctgccactgg	ccggcgacac	tgacacctga	2760
gcagtgcca	gaacctttt	gcctttttt	gttccccgtg	aaaagcaaca	tggacatttc	2820
cttctagtcc	ttccaaggag	gggagagaag	tgtatgtgca	tttgtgtgtg	tgtgtgtgtg	2880
tttgtgtgtg	gtgtgcgcta	agtgagaaag	agagcaggct	cgggaggccc	tgcccagggt	2940
aggaggagct	tcctgctttg	caccatctgg	tggctgcacg	ccctgagggc	accccgactc	3000
tgtctccagg	agtctcatca	gcaaaccgct	gacaagtct	tctagaaatt	ctactgcaact	3060
gcctggctca	gctgcagctg	cagacatttc	tgcaggagga	gcaggtgttt	ctgtcttctg	3120
ttccttctag	ggccacctgt	ccccttaaac	acaggtccac	gttgtgtcaa	gaacctagtg	3180
catctgtgtg	tgtctgtcag	tgtctctgtg	tcagtgttct	tgtgggtgtc	tgcaaggctac	3240
ccggccgccc	ttctgcaatg	catcactccc	gcagaggggg	gtgcagatca	ggcgccgtgc	3300
tgcgcgttgt	tgttcaacag	tggctttttc	ttagataatc	gtgcttcctc	agcgcccgtc	3360
gggttgtggc	atccttgat	ctgcagggat	cttctccgtt	tgcatgttcc	tcggggtggc	3420
gtgttccttg	ctccctgggt	ccgacatgtg	ttcccgcacc	tgcatggact	gccccggttc	3480
tgtgttgtgt	gccgagtgcc	gcccagtgtt	ctgtgaccac	ccgtgtagct	actgaaaatg	3540
gctgggtaag	caagtcaagg	gtgtttgagg	aggtcaagag	agagctcagt	ttccctctcc	3600
ccctcccaa	acacaccaag	aagcattttt	aacgtgtagg	ttgagaacaa	gcctaaagga	3660
ttcccacagc	tgggagccag	caagagagct	tggagtcgcc	tctctagacc	agatctagcc	3720
ccaccctcac	tccagccatc	tccgagccct	tgtgtaggca	acgcccgggtg	cgggctgtgt	3780
ggggtgctcc	cctgccagca	cctccggcca	gccccgcccc	tgccgatcta	ctggaccgca	3840
gaccaccttc	tgccccctg	ggccaggtgg	gagctgtccg	ttcaggacc	atgagccatcc	3900
tctgccctga	ctagcgaggg	gcagagcaca	ccccagtgtc	tacgcctcca	cccctgcagc	3960
ctcctggccc	gctcaccttc	ctcaccctc	ctctgacca	cccatggtgc	cagggccgaa	4020
gctgaccttt	agctccctcc	tgcccttgc	tagggctctga	gccaagcccc	tcgactccct	4080
cactgtgttg	acacttgcca	ctttgctggc	cccagaaaag	gtcgtatgaca	cagccgcaaa	4140
tctaatecac	gtagttccca	tttactcctt	aatctgattg	atgttccctc	ttgcaactgaa	4200
taatacatgc	ctctctcagg	taagccattt	tataaaacaa	gaagataaaa	agcaactgtt	4260
aggcagtgtt	tgcttttgcc	gagctgggtg	ccgacagctc	cctgggtgtc	cgggggtggga	4320
gagctgttga	cagaagctct	ccgggcccctc	aggggcttag	atcccacttg	agtcgtaagc	4380
cttcttgctt	ttgataaac	agtattatct	ctcttactgt	agaagaaaa	gtttattacc	4440
aaacaagagt	atctttatga	aagaaaagga	caaacctata	aattaactca	acctatatct	4500
cccttgaaaa	tactttcagg	ctccaccaa	acgtagaact	gaaagcatgt	atctttggaag	4560
aaagagatac	atctttgtatg	ctttcttttc	ctttttaga	ttcccagttt	atctttctaag	4620

```

actgcaaaga tcactttgtc accagccctg ggacctgaga ccaagggggt gtcttgtggg 4680
cagtgagggg gtgaggagag gctggcatga ggttcagtca ttccagtgag ctccaaagag 4740
gggccacctg ttctcaaaag catgttgggg accaggaggt aaaactggcc atttatggtg 4800
aacctgtgtc ttggagctga cttactaagt ggaatgagcc gaggatttga atatcagttc 4860
taaccttgat agaagaacct tgggttacat gtggttcaca ttaagaggat agaatccttt 4920
ggaatcttat ggcaaccaa tgtggcttga cgaagtcgtg gtttcatctc ttaaacacag 4980
tgtgtaaatt tattcaacta acgatgggaa atgtattact tctgtacaca gtggactgaa 5040
gtgcaatttg ttgaaaggga acaagtcatt gaagagaaaa aaaaaaagcc caatacttag 5100
agtccaatt ttgtctcatt tgccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaagca aacccttat 5160
ggttgatatt gttataatgt atatactgta taatatgaaa gagaatcgat gtatctcact 5220
tttccattat ttgctaacca aagctgtaca tttt tcatat gatctgcagc cttttgggta 5280
tcaaattgggt caaaaccatg ggacctgcca cctcccatca gcaattctgg aaatgacta 5340
tttctactgg tattcttgct ttttttttt ttttcatttt cttgctgaaa tgacatgaat 5400
tgttgagttt atttttaccc agtaaagagt ggagaaagac t 5441

```

<210>79

<211>432

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>79

```

Met Pro Ala Gly Arg Ala Ala Arg Thr Cys Ala Leu Leu Ala Leu Cys
1           5           10           15
Leu Leu Gly Ala Gly Ala Gln Asp Phe Gly Pro Thr Arg Phe Ile Cys
           20           25           30
Thr Ser Val Pro Val Asp Ala Asp Met Cys Ala Ala Ser Val Ala Ala
           35           40           45
Gly Gly Ala Glu Glu Leu Arg Ser Ser Val Leu Gln Leu Arg Glu Thr
           50           55           60
Val Leu Gln Gln Lys Glu Thr Ile Leu Ser Gln Lys Glu Thr Ile Arg
65           70           75           80
Glu Leu Thr Ala Lys Leu Gly Arg Cys Glu Ser Gln Ser Thr Leu Asp
           85           90           95
Pro Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Gly Gly Gly Arg Lys Gln Pro Gly
           100          105          110
Ser Gly Lys Asn Thr Met Gly Asp Leu Ser Arg Thr Pro Ala Ala Glu
           115          120          125
Thr Leu Ser Gln Leu Gly Gln Thr Leu Gln Ser Leu Lys Thr Arg Leu

```


<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>80

gttggggacc ggaggtaaa

19

<210>81

<211>20

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 PCR 的人工合成引物

<400>81

aaaccacgac ttcgtcaagc

20

<210>82

<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列

<400>82

ctcgggcaaa ctttgcaat

19

<210>83

<211>19

<212>DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列

<400>83		
ggtgaagaag agcctgcca		19
<210>84		
<211>19		
<212>DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列		
<400>84		
gacaatggct ggcaccaca		19
<210>85		
<211>19		
<212>DNA		
<213> 人工的		
<220>		
<223> 用于 siRNA 的人工合成靶序列		
<400>85		
catcaagcct catgggatc		19
<210>86		
<211>5814		
<212>DNA		
<213> 人 (Homo sapiens)		
<400>86		
cggccgcggc gacagctcca gctccggctc eggctccggc tccggctccg gctcccgcgc		60
ctgccccgct cggcccagcg cgcccgggct ccgcgccccg accccgcccgc cgcgctgccc		120
gggggcctcg ggcgcccccg ccgcccgcct cacgctgaag ttcctggccg tgctgtggtg		180
cgcgggcatg ctggcgttcc tcggtgcccgt catctgcatc atcgccagcg tgccccgtggc		240
ggccagcccc ggcggggcgc tgcccggcgg cgccgacaat gcttcggctc cctcgggcgc		300
cgccgcgtcc ccgggcccgc agcggagcct gagcgcgctg cacggcgcgg gcggttcage		360
cgggcccccc gcgctgcccg gggcacccgc ggccagcgcg caccgctgc cgcccgggccc		420
cctgttcage cgcttctgt gcacgcccgt ggctgtgccc tgcccgtcgg gggcccagca		480

gggggacgcg	gcgggcgctg	cgccgggcga	gcgcgaagag	ctgctgctgc	tgacagacac	540
ggccgagcag	ctgcgccaga	cggecgtgca	gcaggaggcg	cgcatccgcg	ccgaccagga	600
caccatccgt	gagctcaccg	gcaagctggg	ccgctgcgag	agcggcctgc	cgcgccgctt	660
ccagggcgcc	gggccccgcc	gcgacacat	ggccgacggg	ccctgggact	cgctgctgct	720
cattctggag	ctggaggacg	ccgtgcgcgc	cctgcgggac	cgcatcgacc	gcctggagca	780
ggagcttcca	gcccgtgtga	acctctcage	tgccccagcc	ccagtctctg	ctgtgcccac	840
cggcctacac	tccaagatgg	accagctgga	ggggcagctg	ctggcccagg	tgctggcact	900
ggagaaggag	cgtgtggccc	tcagccacag	cagccgccgg	cagaggcagg	aagtggaaaa	960
ggagttggac	gtcctgcagg	gtcgtgtggc	tgagctggag	cacgggtcct	cagcctacag	1020
tcctccagat	gccttcaaga	tcagcatccc	catccgtaac	aactacatgt	acgccccgct	1080
gcggaaggct	ctgcccagac	tctacgatt	caccgcctgc	atgtggctgc	ggtccaggtc	1140
cagcggcacc	ggccagggca	cccccttctc	ctactcagtg	cccgggcagg	ccaacgagat	1200
tgtactgcta	gaggcgggcc	atgagcccat	ggagctgctg	atcaacgaca	aggtggccca	1260
gctgcccctg	agcctgaagg	acaatggctg	gcaccacatc	tgatcgcct	ggaccacaag	1320
ggatggccta	tggctgcct	accaggacgg	ggagctgcag	ggctccggtg	agaacctggc	1380
tgctggcac	cccatcaagc	ctcatgggat	ccttatcttg	ggccaggagc	aggataccct	1440
gggtggccgg	tttgatgcca	cccaggcctt	tgctgggtgac	attgcccagt	ttaacctgtg	1500
ggaccacgcc	ctgacaccag	cccaggctct	gggcattgcc	aactgcactg	cgccactgct	1560
gggcaacgtc	cttcctggg	aagacaagtt	ggtggaggcc	tttgggggtg	caacaaaggc	1620
tgcttccgat	gtctgcaagg	ggagggccaa	ggcatgaggg	gccacctcat	ccagggcccc	1680
tcctttgctt	gccactttgg	ggacttgagg	gggtcataat	tcctctctca	gcctgcccac	1740
gactggcctt	tcctctctgc	cccactctg	gctgtgcctc	ccatttcccc	tcacctgtac	1800
ccacacctcc	agaatgcctt	gccctgcgag	tgtgtcccct	gtccccacct	gagtggggag	1860
gagcgtctca	agtgaacagt	gggagcctgc	ccacctggca	ctgcaactga	gttgtctctt	1920
acccacctcc	ccctgcccac	caactgtatc	tgatttcaact	aattttgaca	gcacccccag	1980
tagggtagga	ttgtgtatga	gggggacccc	actatctcag	tggtgggggt	ggccgccccg	2040
ccccttgctc	cccatgcaac	aggcccagtg	gcttcccctt	cagggccaca	acaggc tgta	2100
gaaggggatg	acgaggacat	cagaggttag	acttaccctc	ctcccctttt	ccaccagctg	2160
ccagtcaagg	gcagtgggat	ctcgatggag	cctccccccc	ccccaccaca	tgctcctctc	2220
ttctctctct	ttctctctct	ctttgtgtgt	agcggtttga	atgttggttc	catgcctggc	2280
ccagccccac	ctcagtctcc	aggacattcc	tttcccagct	ccagcctgga	gggaagggga	2340
caaagacccc	aggaggccaa	agggctgcag	tcaccctttg	tgctcaccca	tagtgatggc	2400
cactgggtata	gtcatcgtc	tcctccatg	ccaaggacag	gacttggacc	gcttcagcct	2460
gggctgggag	cagccctaag	gtagaggcct	catggcccag	gagaccccc	ctctggcaga	2520
gccacattac	ctaccctgtg	catggtcctg	gggcagcaag	gaagaagctc	agagggtggg	2580
gagaagcatg	aagcagtgag	cagagcactg	ggtgagaggg	agaagacctt	ggttccctagc	2640
cagccctgct	aatgtgctgt	gtggccttct	gtaagtcctt	gccctctctg	ggcctggcct	2700
tcctcattcg	tgagctgagg	ccctcgcttt	ggtcatttgc	tctccagatt	gggtgtgagc	2760
ttctctgtga	ttccaggtgg	atatgtgggg	aaagctctgg	tgaccctggg	cttcgcaggg	2820

gtagatccca	ggactcggca	gtggatggga	tgcagccagt	catgggttag	ggtcagcaga	2880
gactcagagt	ccagggcaag	gttcaaggca	gactaacctc	atgcatggat	tgtaaaaaac	2940
cagctccctt	tgatcaacc	cagcctggca	cccttgccctg	tctgagagtg	tctcaaaggg	3000
ctgatggctt	cctggteccc	ttgagtcac	accagcttcc	ccaagagagt	gtcagaatct	3060
taagagctga	gaggccgggc	acggtggctc	acgcctgtaa	tcccagcact	ttgggaggct	3120
gagacag gca	gatacacttga	ggtcaggagt	tgaagtcag	cctggccaac	gtggtgaaac	3180
cccattctca	ctaaaaatac	aaaacttagc	tggttaggtg	gtgcatgcct	gtagtcccag	3240
ctactcggga	ggccgaggca	gaagaatctc	ttgaactgag	gaggtggagg	ttgacgtgag	3300
ccgagatcac	gccattgcac	tccagcctgg	gcaacagagc	aagactccat	ctcaaaaaaa	3360
taataataat	cttaaagatg	agaaaagcca	ccccatctgg	caccacagct	gcattcttgc	3420
tgtgagaaat	ggggaagagt	tcagggagga	cacg tgacct	gcacaggatc	acagagcatg	3480
gggcagagcc	aggactagag	ctcagggcac	ctgactccct	cttcagtgtt	cttccccctc	3540
catgttgcct	gcccctgaag	acctttgagt	tcagtctaca	cctaagcagg	tagacatccg	3600
cgaggtcaga	tgctttccaa	catgacacct	gaacatcttc	ctttatgcaa	cacccaaaca	3660
tcttggcatc	cccaccccag	gaagtgcggg	gaggaggtta	tgatccctgg	gcgcttcggc	3720
agaatggaga	gctgaggtgt	ccctcccctg	ctagtcacct	accaggtgtc	tgagcagctg	3780
catgctccct	ggctcaagtg	ggcactgtac	cttttgccctg	ctttttgtt	ccctatctcc	3840
actccctgag	gccacttagc	ctgagacatg	atgcaagagc	tgcaggccgg	ggggctcagt	3900
gccatggaag	ctactccaag	ttgcattgcc	tcccgcgcc	agatcctgct	ttcatttcg	3960
agaacataaa	tagattgccc	agccccctca	gtacaatccc	actggaagaa	aaggcaatgg	4020
cgggcttcag	ccagacctgc	tgagacctag	gttgccacgg	taacagccaa	agacatcaac	4080
ccaagtgctg	ggtaagtgt	ctcatcatac	tggcactgtt	gctgggggtga	cggcagaatt	4140
cagaacttca	atttcagtga	cgccaagctt	gatgtgtttc	tgttattgtt	ttgaagaagg	4200
tagctcttgt	ggaggacttg	ggagaaggat	ggggctcttag	gaaggaggtg	acagcacttg	4260
catggtcact	tgagcccaca	cacacgtca	accccaagtc	ctttatgctt	tgtcacagtg	4320
aagatgagac	ctctgacgtc	caagccttgt	tccctgtgctg	catcaccac	tcagccttcc	4380
aaaggaaca	ggaacaaatt	tccccagcac	cactgtttgg	gtcccgtt t	tcctatcttc	4440
tgctgcccct	gagcacatcc	aagcagacag	ggaaagagga	gtcagacatg	gcccagtcac	4500
atcctgagct	gctcctggct	gataaccacg	atggagcccc	tgtttgcct	gccatctggc	4560
actgactga	gtgtggcaca	ggcaccgtcc	tgttgatctc	acaacacagt	tctaagttag	4620
gacgttcttg	gctccgttag	acaggtgagg	aaactggggc	acagagaggt	gatgtcatct	4680
gcctgggtgc	aatcagctag	caagtgatgg	agcccagatt	tcaaacaaa	gggggttacg	4740
tccaggggc t	gagttcccac	tcacctgtgt	agagtgccat	ctgggcacca	ttgctccaga	4800
cgtgttccga	cccctttccc	agcccacagg	gcttgaagtg	aaggaacaga	ggcaggggggt	4860
gggccagccc	cagggccagg	gtccccttgg	tgaagccgtg	ccagggggct	cagctgcttc	4920
agggaatgtg	tccctcccac	catgggccag	agcttcagcc	cttcttttagc	tcagctagag	4980
ttcacaggag	agccaaaaaa	gaaaaggaag	ctgagcatct	cccagctct	gggcagggaa	5040
ggggagggaa	attgctgctt	ctccaactct	tgcttggggc	caagccctgc	accagttgct	5100
tcccagctgt	tatctgccag	atcttcccat	cttgtggcat	gtggtgcccc	caccaacatc	5160

ccaaggggac caatcccctt gccaccactt tgcatacact gggaccacag atttggacag 5220
 gaagggctct gagaagagge caaagccctc attttacaga tgaggaagct gaagcccggg 5280
 gaggggagcg accctcaagg ccaccagct ggacacggga gacttgagcc cagccttctg 5340
 actgcattca gccctctcta ggacgcagca gcctctcccc agcactgagt cccccctct 5400
 ttgtgtgtcc cagcaccctt ggctgagta aacttgaaa ggggctccct cccagagaag 5460
 ggactactct cttcaccctt ttattccagc tgccctgccac cccagacccc cacctcccac 5520
 cctgaccccc gaccctggg tggggaaggg gctcacatgg gccaggctg agtgtgagtg 5580
 agcatgtcaa gttgtctgac actgtgacat tagtgcaccc tactgacaac ccctccccag 5640
 ccttgcccct ttctctctc cctgttttgt acataaattg acatgagctg caacatgtgt 5700
 gcgtgtgtgt gcgtgtgtgt gtgtgtgtat gtgtgtgtga tctgtgtcat ggTTTTGTTA 5760
 cTTTTTgtt tttgtaaact tgaatgttca aaataaacat gctgtttact ctga 5814

<210>87

<211>500

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>87

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

Cys Glu Ser Gly Leu Pro Arg Gly Leu Gln Gly Ala Gly Pro Arg Arg
 165 170 175
 Asp Thr Met Ala Asp Gly Pro Trp Asp Ser Pro Ala Leu Ile Leu Glu
 180 185 190
 Leu Glu Asp Ala Val Arg Ala Leu Arg Asp Arg Ile Asp Arg Leu Glu
 195 200 205
 Gln Glu Leu Pro Ala Arg Val Asn Leu Ser Ala Ala Pro Ala Pro Val
 210 215 220
 Ser Ala Val Pro Thr Gly Leu His Ser Lys Met Asp Gln Leu Glu Gly
 225 230 235 240
 Gln Leu Leu Ala Gln Val Leu Ala Leu Glu Lys Glu Arg Val Ala Leu
 245 250 255
 Ser His Ser Ser Arg Arg Gln Arg Gln Glu Val Glu Lys Glu Leu Asp
 260 265 270
 Val Leu Gln Gly Arg Val Ala Glu Leu Glu His Gly Ser Ser Ala Tyr
 275 280 285
 Ser Pro Pro Asp Ala Phe Lys Ile Ser Ile Pro Ile Arg Asn Asn Tyr
 290 295 300
 Met Tyr Ala Arg Val Arg Lys Ala Leu Pro Glu Leu Tyr Ala Phe Thr
 305 310 315 320
 Ala Cys Met Trp Leu Arg Ser Arg Ser Ser Gly Thr Gly Gln Gly Thr
 325 330 335
 Pro Phe Ser Tyr Ser Val Pro Gly Gln Ala Asn Glu Ile Val Leu Leu
 340 345 350
 Glu Ala Gly His Glu Pro Met Glu Leu Leu Ile Asn Asp Lys Val Ala
 355 360 365
 Gln Leu Pro Leu Ser Leu Lys Asp Asn Gly Trp His His Ile Cys Ile
 370 375 380
 Ala Trp Thr Thr Arg Asp Gly Leu Trp Ser Ala Tyr Gln Asp Gly Glu
 385 390 395 400
 Leu Gln Gly Ser Gly Glu Asn Leu Ala Ala Trp His Pro Ile Lys Pro
 405 410 415
 His Gly Ile Leu Ile Leu Gly Gln Glu Gln Asp Thr Leu Gly Gly Arg
 420 425 430
 Phe Asp Ala Thr Gln Ala Phe Val Gly Asp Ile Ala Gln Phe Asn Leu
 435 440 445
 Trp Asp His Ala Leu Thr Pro Ala Gln Val Leu Gly Ile Ala Asn Cys
 450 455 460
 Thr Ala Pro Leu Leu Gly Asn Val Leu Pro Trp Glu Asp Lys Leu Val

<223> 人工合成的表位肽序列

<400>89

Lys Val Ala Lys Leu Pro Phe Val Ile Asn Asp Gly Lys Trp His His
 1 5 10 15
 Ile Cys Val Thr Trp Thr Thr Arg Asp Gly Val Trp Glu Ala Tyr Gln
 20 25 30
 Asp Gly Thr Gln Gly Gly Ser Gly Glu Asn Leu Ala Pro Tyr His Pro
 35 40 45
 Ile Lys Pro Gln Gly Val Leu Val Leu Gly Gln Glu Gln Asp Thr Leu
 50 55 60
 Gly Gly Gly Phe Asp Ala Thr Gln Ala Phe Val Gly Glu Leu Ala His
 65 70 75 80
 Phe Asn Ile Trp Asp Arg Lys Leu Thr Pro Gly Glu Val Tyr Asn Leu
 85 90 95
 Ala Thr Cys Ser Thr Lys Ala Leu Ser Gly Asn Val Ile Ala Trp Ala
 100 105 110
 Glu Ser His Ile Glu Ile Tyr Gly Gly Ala Thr Lys Trp Thr Phe Glu
 115 120 125
 Ala Cys Arg Gln Ile Asn
 130

<210>90

<211>1841

<212>DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>90

actgcgccgc caccgtcaat aggtggaccc cctccccggag ataaaaccgc cggcgccggc 60
 gccgccagtc cctctggctg agaccteggc tccggaatca ctgcagcccc cctcgccttg 120
 agccagagca ccccgggtcc cgccagcccc tcacactccc agcaaaatgg gcaaggagaa 180
 gaccacate aacatcgtgg tcateggcca cgtggactcc ggaaagtcca ccaccacggg 240
 ccacctcate tacaaatgcg gaggtattga caaaaggacc attgagaagt tcgagaagga 300
 ggcggctgag atggggaagg gatccttcaa gtatgcctgg gtgctggaca agctgaaggc 360
 ggagcgtgag cgcggcatca ccatcgacat ctccctctgg aagtctgaga ccaccaagta 420
 ctacateacc atcategatg cccccggcca ccgcgacttc atcaagaaca tgatcacggg 480
 tacatcccag gcgactgcg cagtgctgat cgtggcggcg ggcgtgggcg agttcgagge 540
 gggcatctcc aagaatgggc agacgcggga gcatgccctg ctggcctaca cgctgggtgt 600

gaagcagctc atcgtgggcg tgaacaaaat ggactccaca gagccggcct acagcgagaa 660
 gcgctacgac gagategtca aggaagtcag cgcctacatc aagaagatcg gctacaaccc 720
 ggccaccgtg ccctttgtgc ccatctccgg ctggcacggt gacaacatgc tggagccctc 780
 cccaacatg ccgtggttca agggctggaa ggtggagcgt aaggagggca acgcaagcgg 840
 cgtgtccctg ctggaggccc tggacacat cctgcccccc acgccccca cggacaagcc 900
 cctgcgcctg ccgctgcagg acgtgtacaa gattggcggc attggcacgg tgcccgtggg 960
 ccgggtggag accggcatcc tgcggccggg catggtggtg acctttgcgc cagtgaacat 1020
 caccactgag gtgaagtcag tggagatgca ccacaggct ctgagcgaag ctctgcccgg 1080
 cgacaacgtc ggcttcaatg tgaagaacgt gtcggtgaag gacatccggc ggggcaacgt 1140
 gtgtggggac agcaagtctg acccgccgca ggaggctgct cagttcacct cccaggatcat 1200
 catcctgaac caccggggc agattagcgc cggctactcc ccggtcatcg actgccacac 1260
 agcccacatc gcctgcaagt ttgcggagct gaaggagaag attgaccggc gctctggcaa 1320
 gaagctggag gacaaccca agtccctgaa gtctggagac gcggccatcg tggagatggt 1380
 gccgggaaag cccatgtgtg tggagagctt ctcccagtac ccgctctcg gccgcttcgc 1440
 cgtgcgcgac atgaggcaga cggtgccgt aggcgtcatc aagaacgtgg agaagaagag 1500
 cggcggcgcc ggcaagtc ccaagtcggc gcagaaggcg cagaaggcgg gcaagtgaag 1560
 cgcgggcgcc cgcggcgca ccctccccgg cggcgccgcg ctccgaacct cggcccggcc 1620
 cccgccccgc cccgccccg cgcgcccgtc cggcgccccg cacccccgc aggcgcatgt 1680
 ctgcacctcc gcttgccaga ggccctcggg cagcgactgg atgctcgcca tcaaggtcca 1740
 gtggaagttc ttcaagagga aaggcgcccc cgccccaggc ttccgcgccc agcgctcgcc 1800
 acgctcagtg cccgttttac caataaactg agcgaccca g 1841

<210>91

<211>463

<212>PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400>91

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

385	390	395	400
Ile Val Glu Met Val Pro Gly Lys Pro Met Cys Val Glu Ser Phe Ser			
	405	410	415
Gln Tyr Pro Pro Leu Gly Arg Phe Ala Val Arg Asp Met Arg Gln Thr			
	420	425	430
Val Ala Val GlyVal Ile Lys Asn Val Glu Lys Lys Ser Gly Gly Ala			
	435	440	445
Gly Lys Val Thr Lys Ser Ala Gln Lys Ala Gln Lys Ala Gly Lys			
450	455	460	

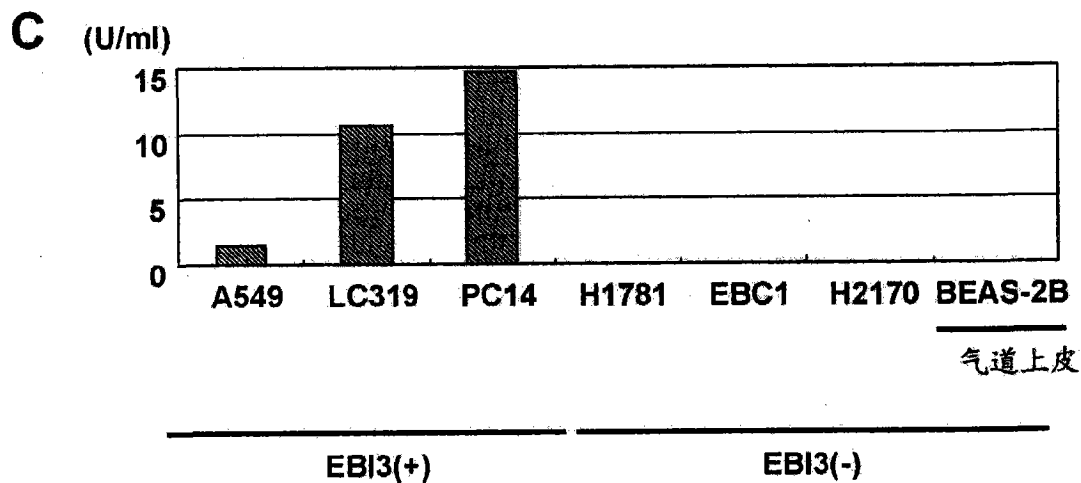
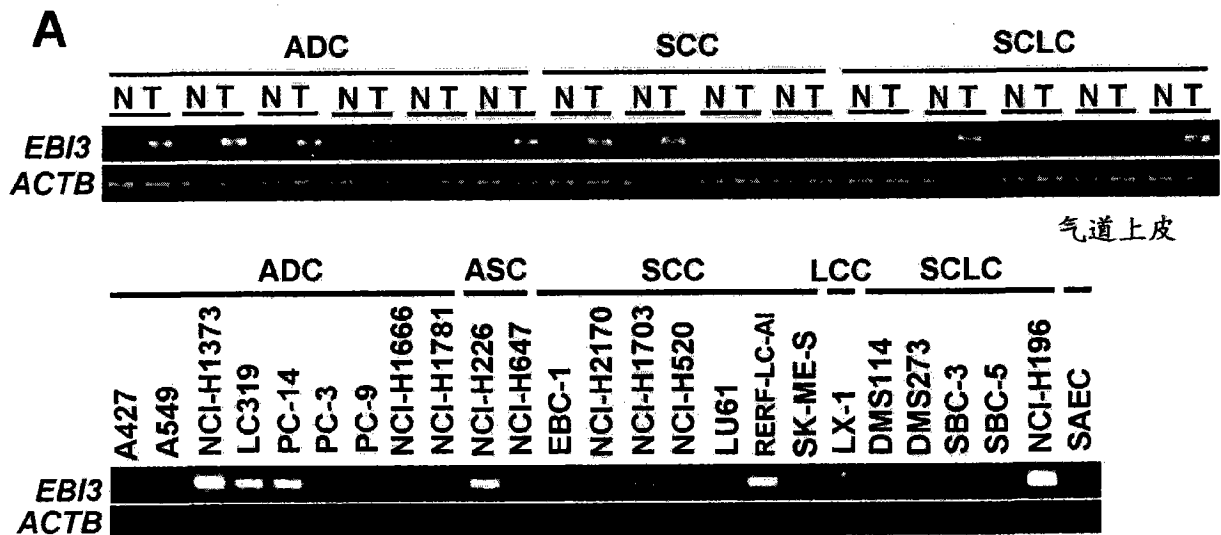
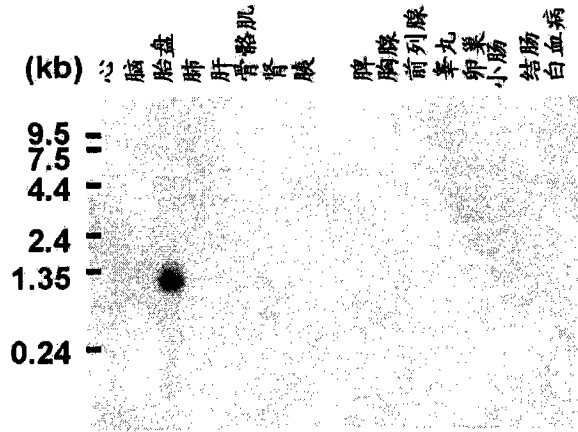


图 1

D



E

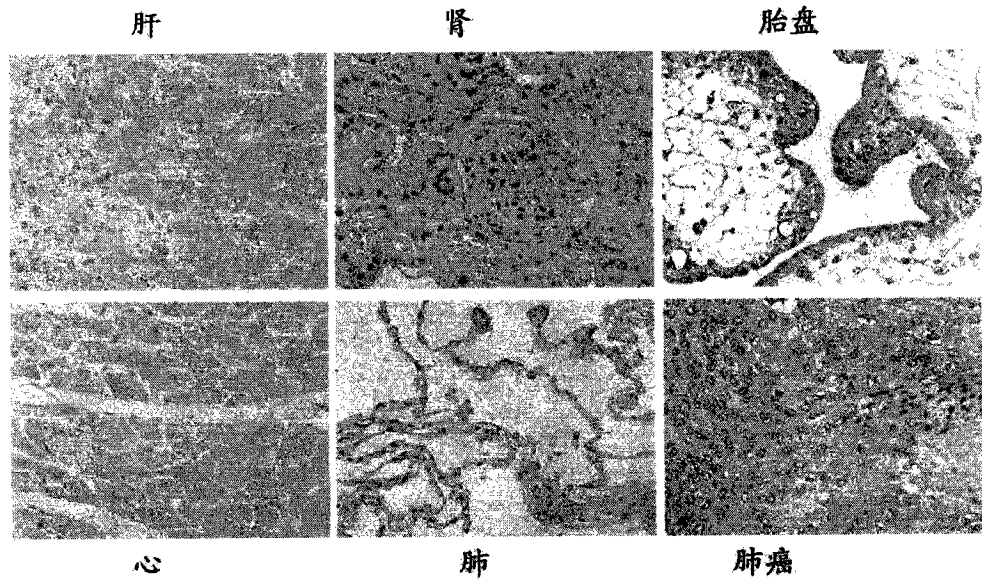
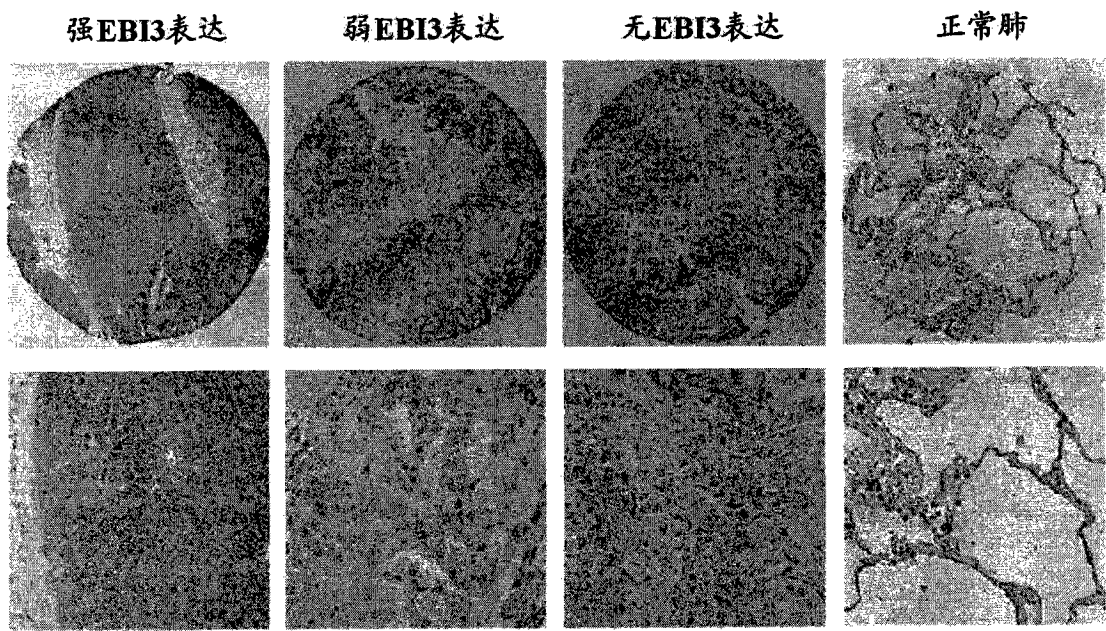


图1(续)

A



B

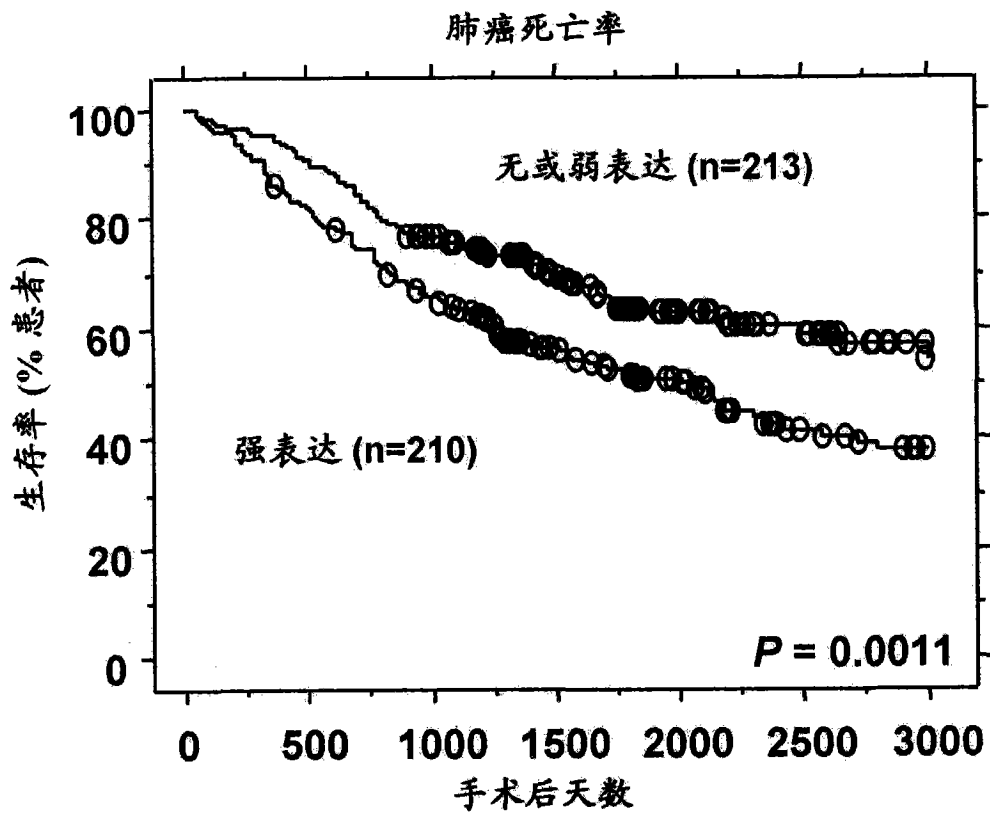


图 2

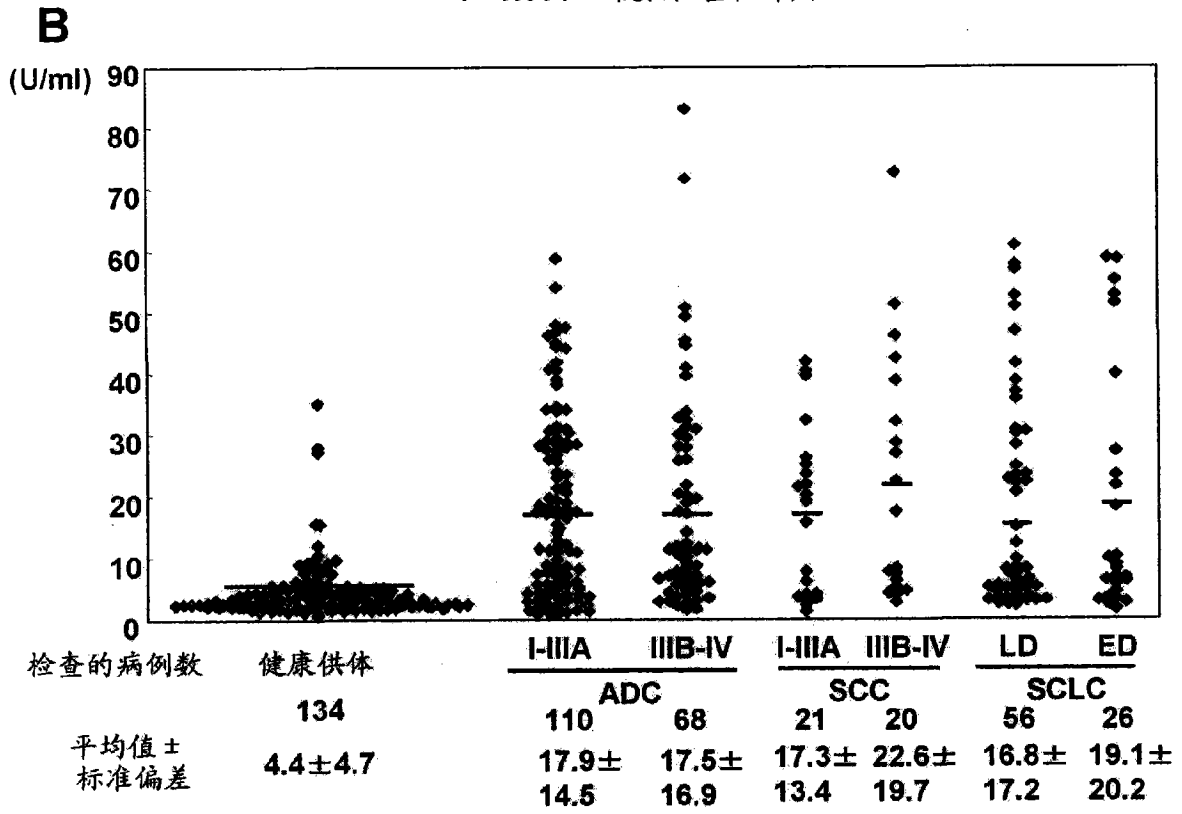
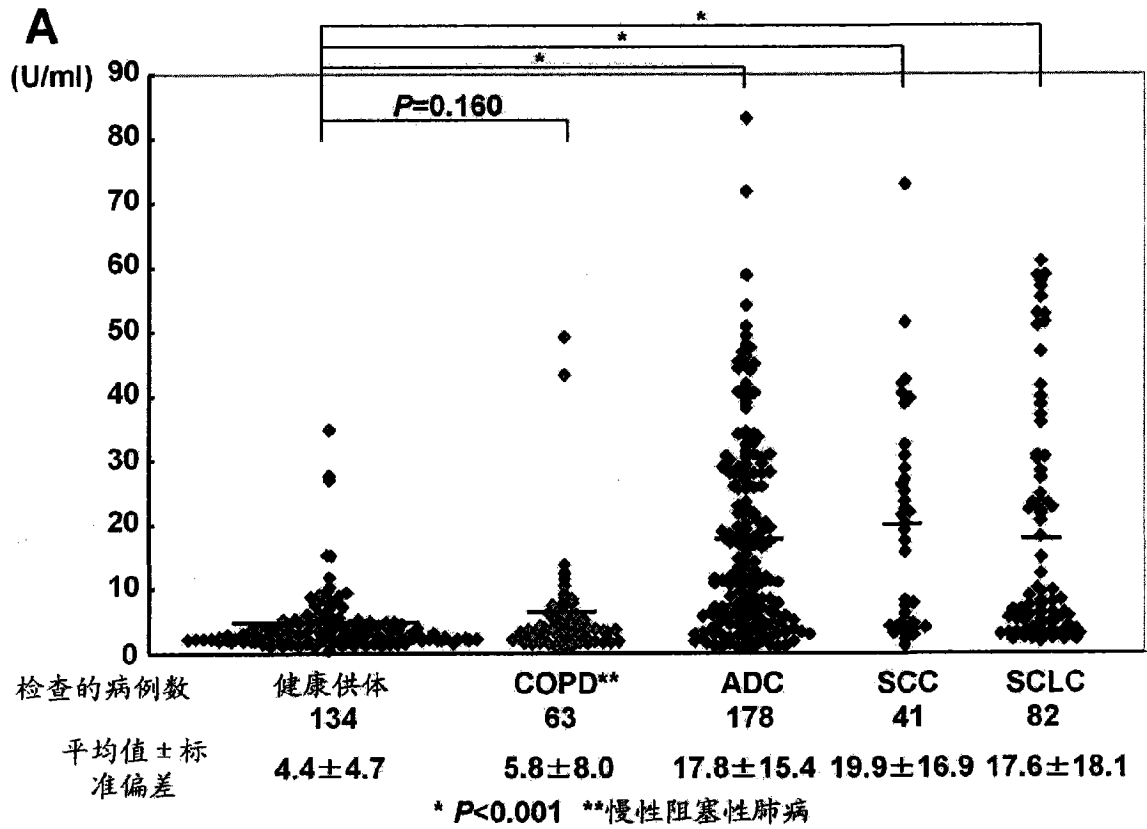
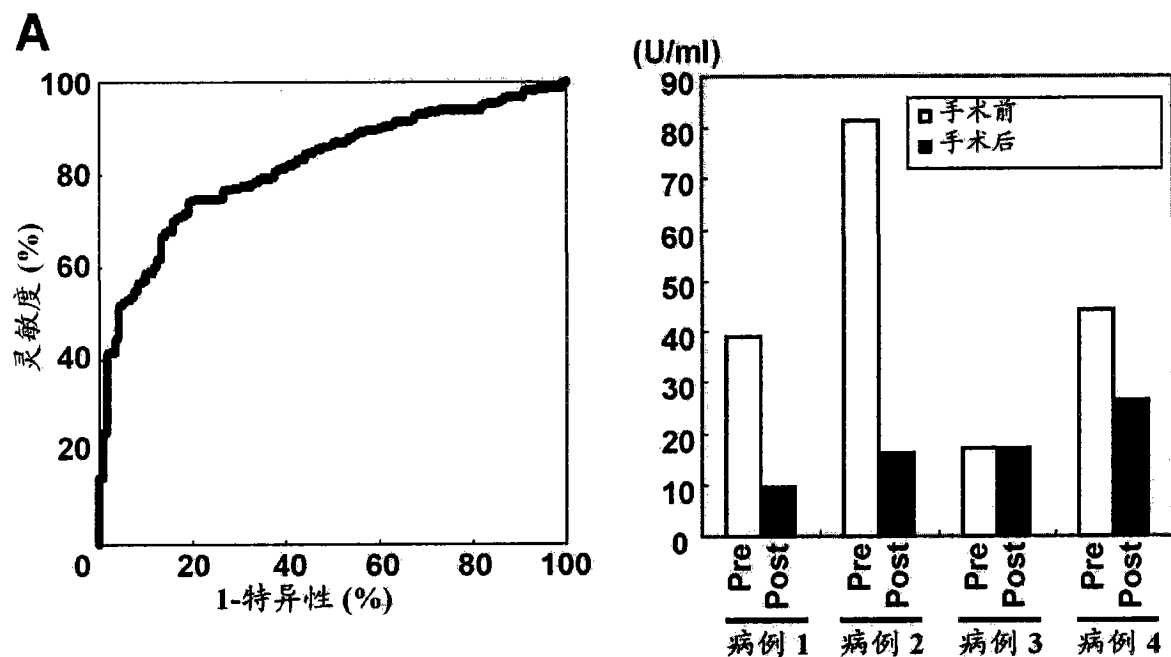
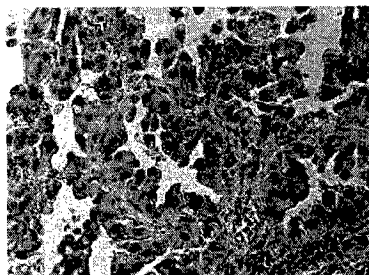


图 3

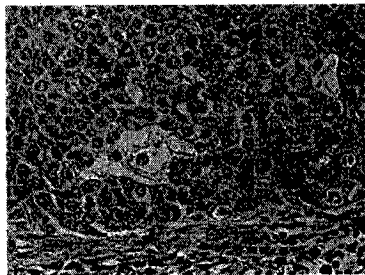


B

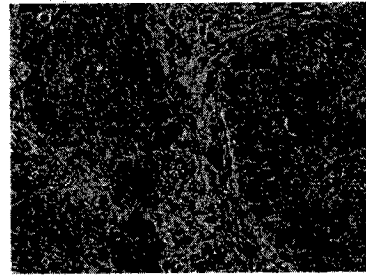
血清EBI3 35.1U/ml,
ADC, 阶段IB



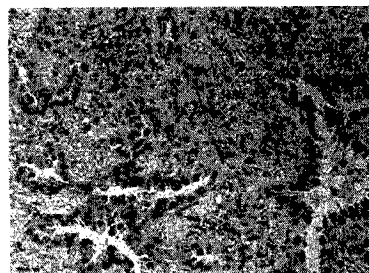
血清EBI3 18.1U/ml,
ADC, 阶段IIIA



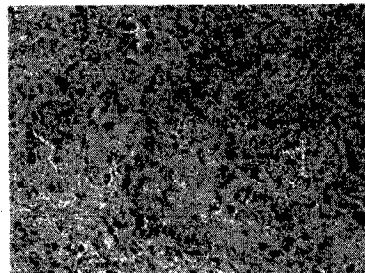
血清EBI3 40.7U/ml,
SCC, 阶段IIIA



血清EBI3 3.6U/ml,
ADC, 阶段IA



血清EBI3 3.3U/ml,
ADC, 阶段IIIB



血清EBI3 5.0U/ml,
SCC, 阶段IIIB

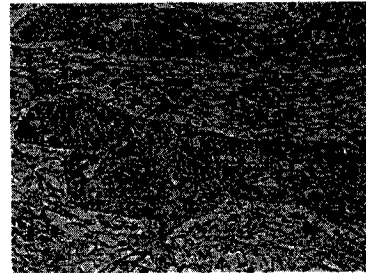


图 4

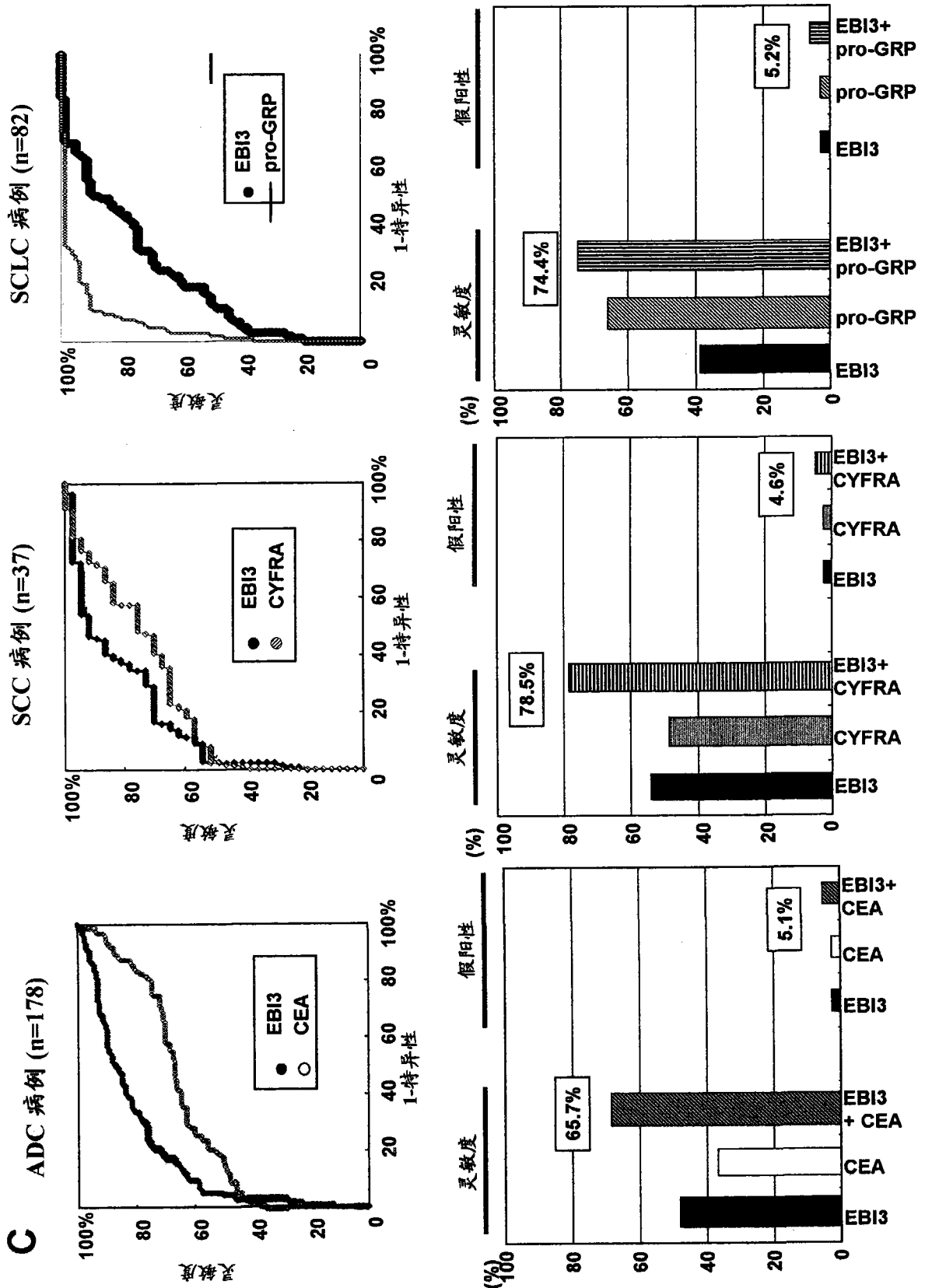


图4(续)

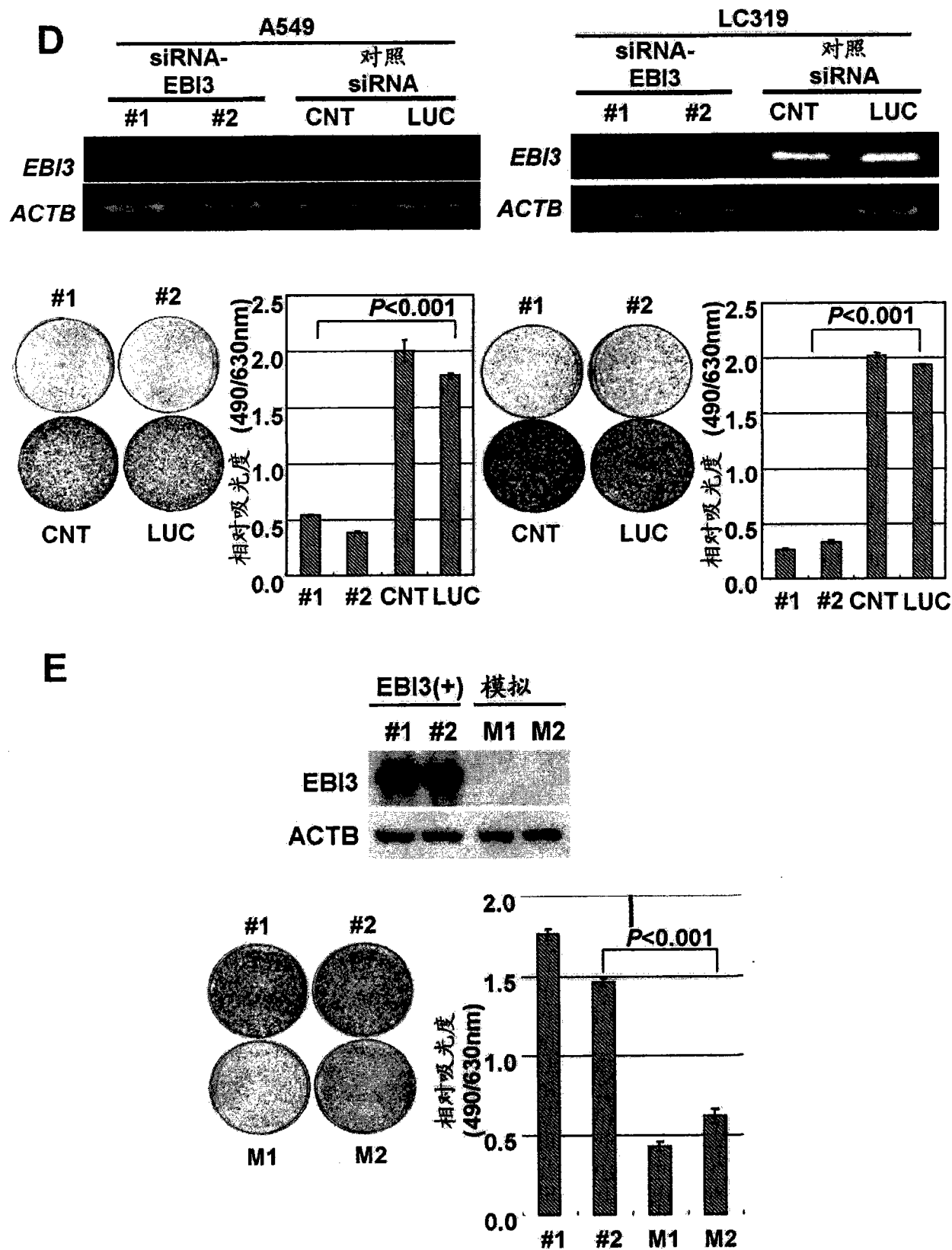


图4(续)

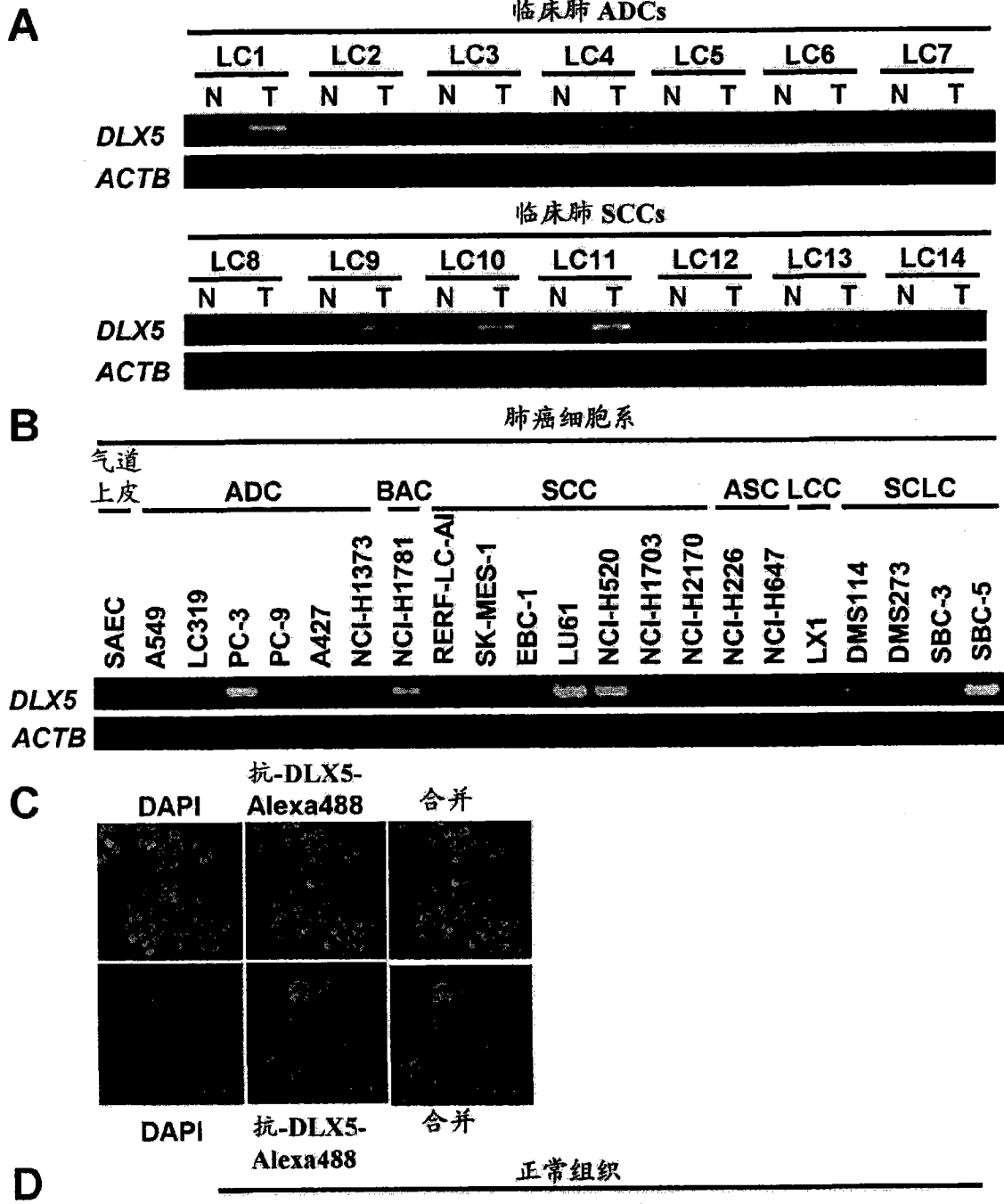


图 5

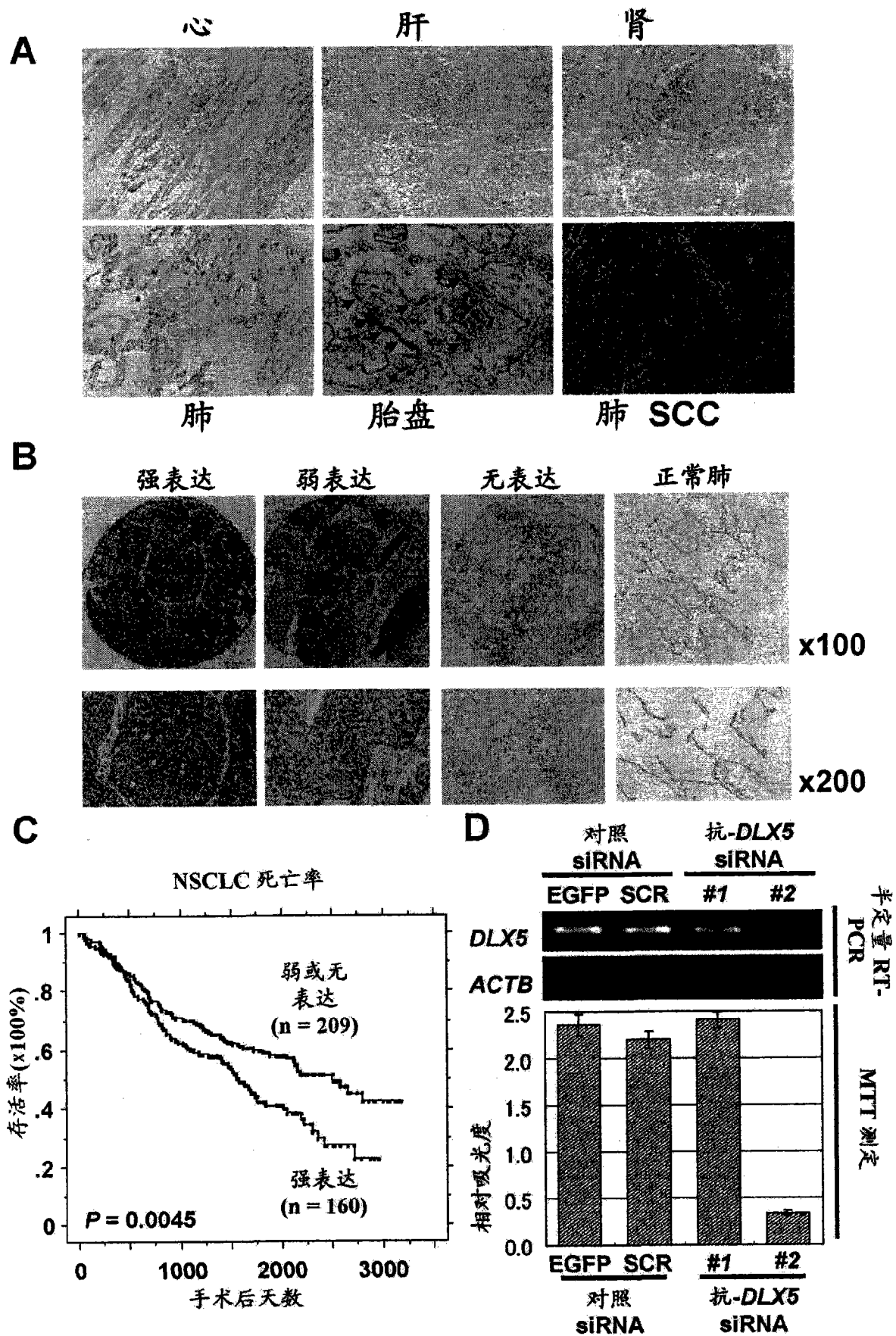
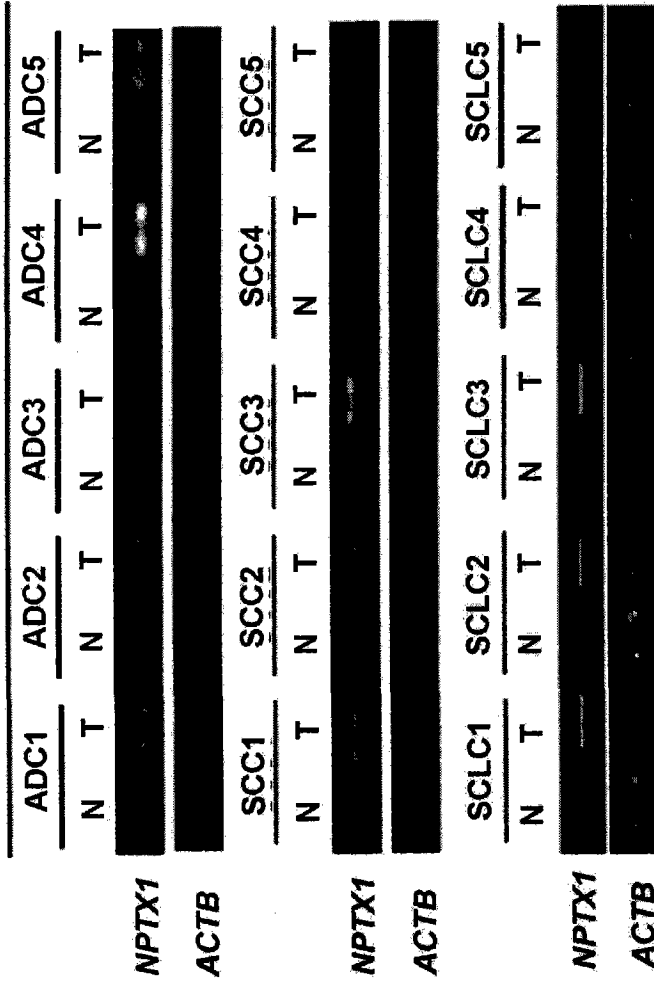


图 6

临床肺癌

A. 上边小图



A. 下边小图

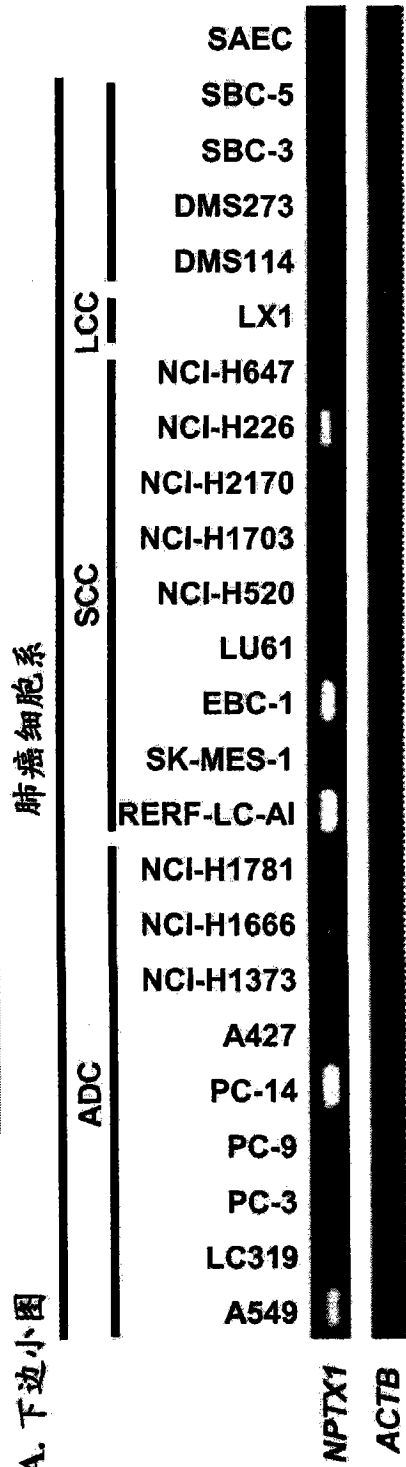
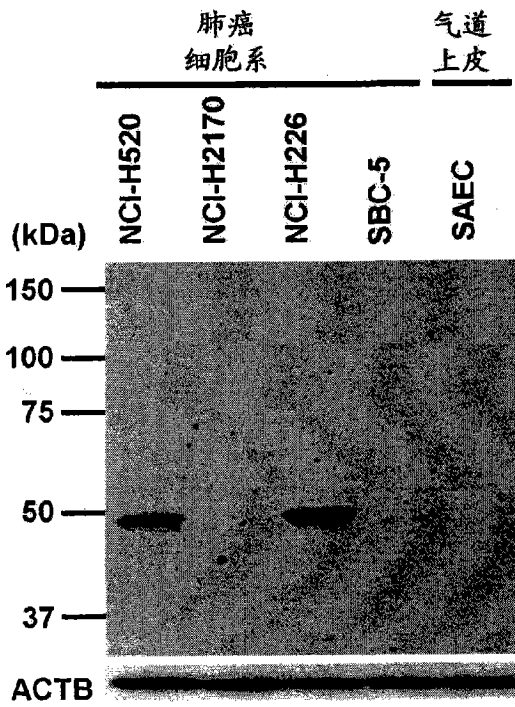
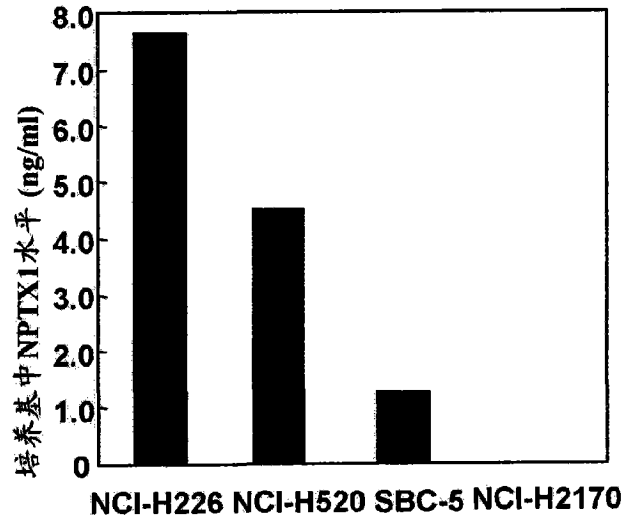


图 7

B



D



C

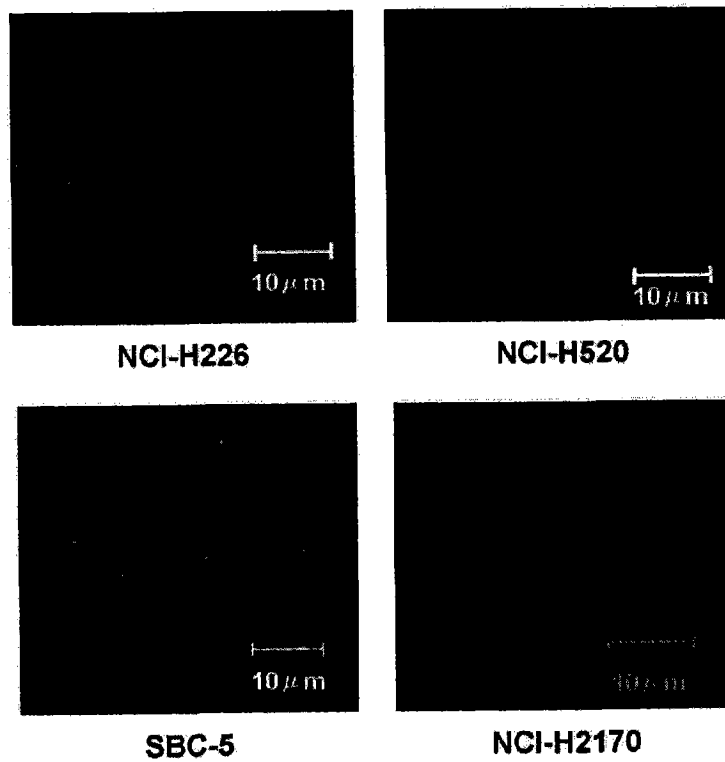


图7(续)

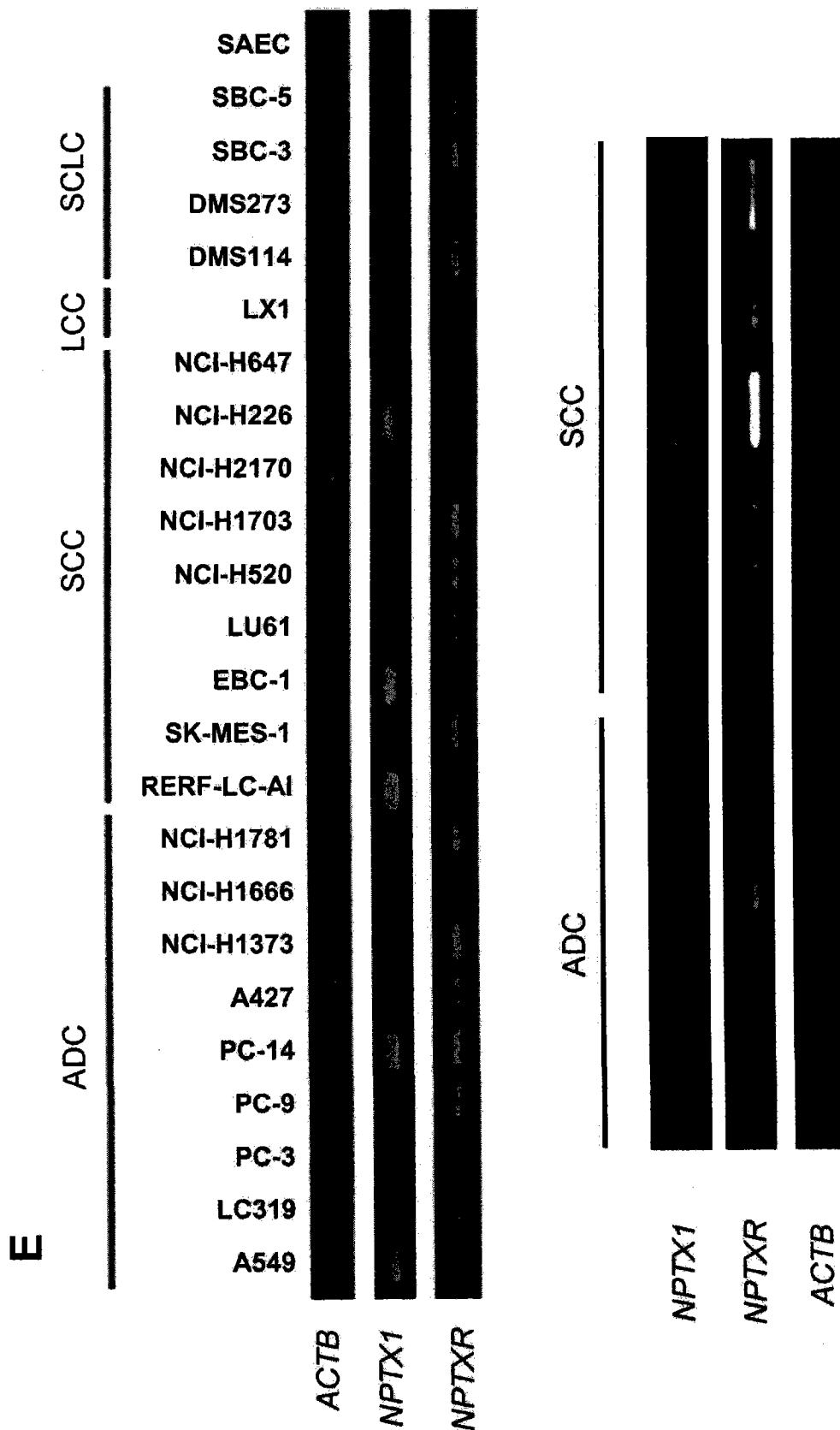
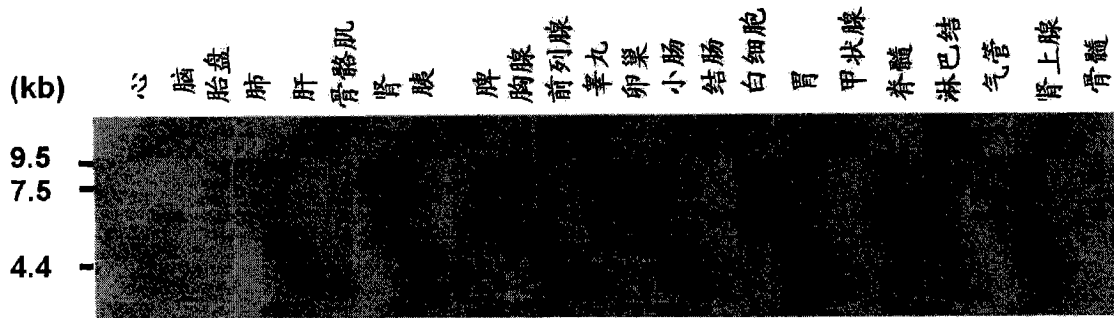
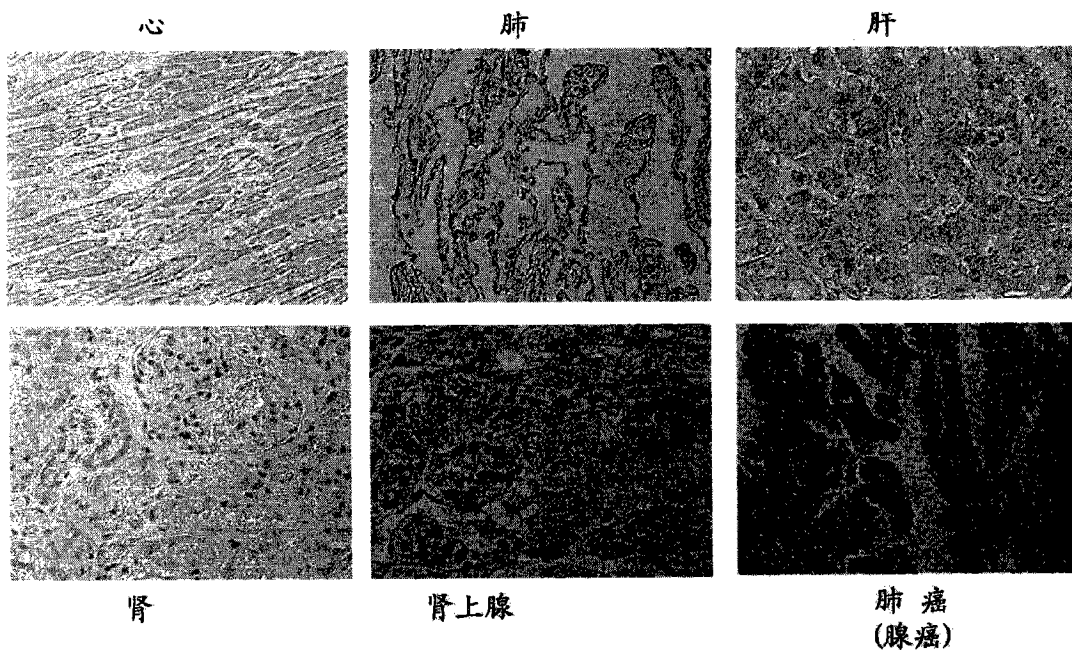


图7(续)

A



B



C

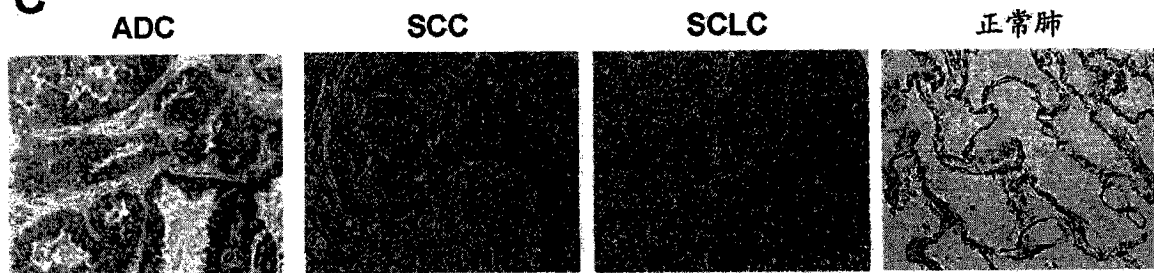


图 8

D

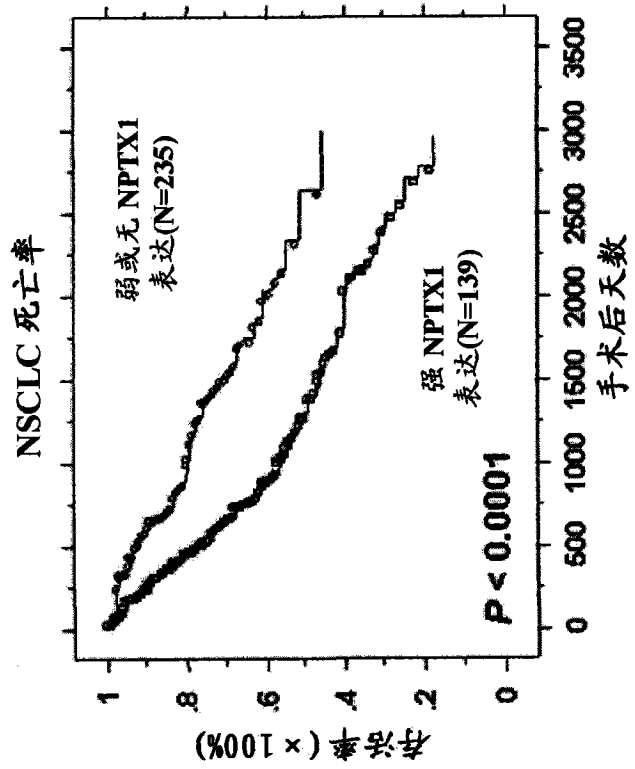
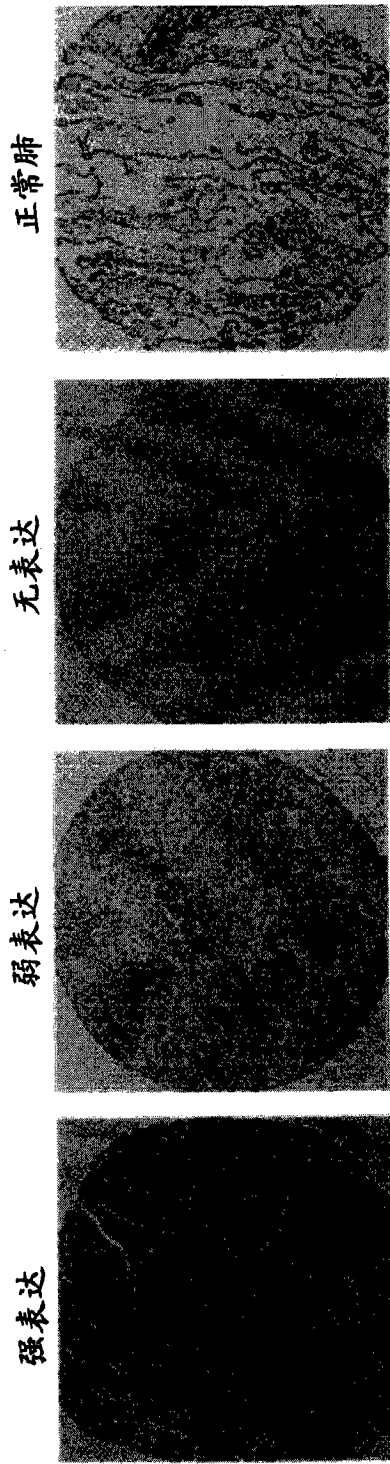
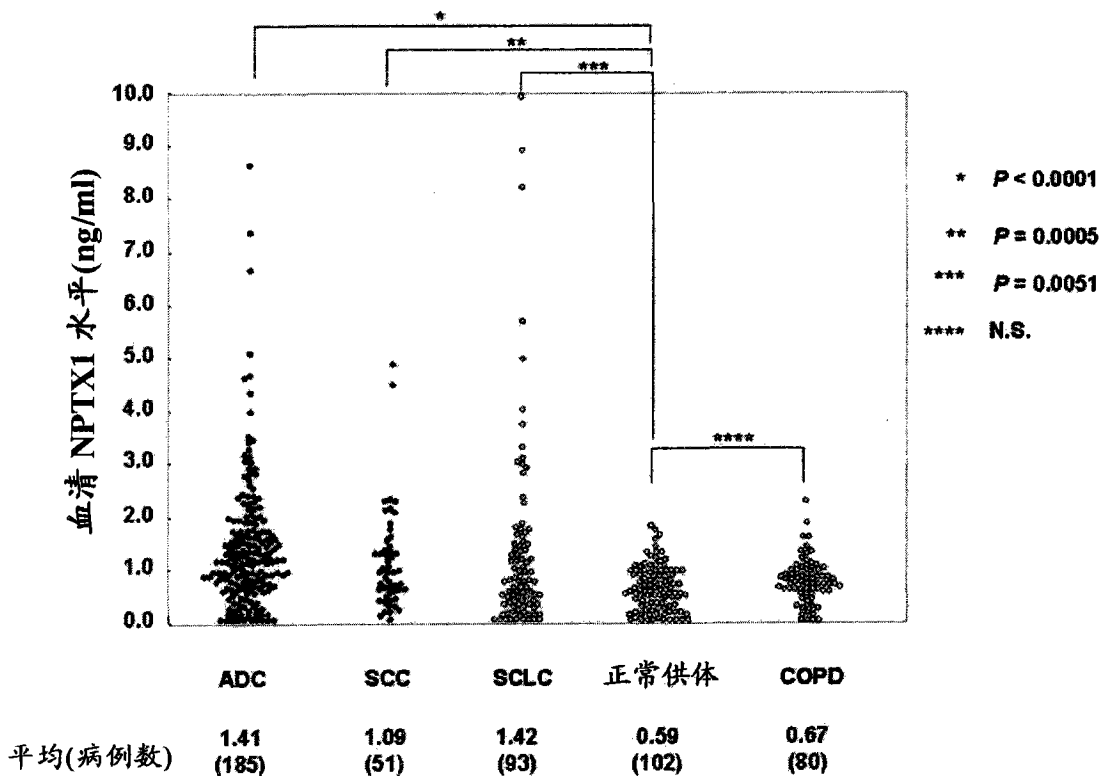


图8(续)

A



B

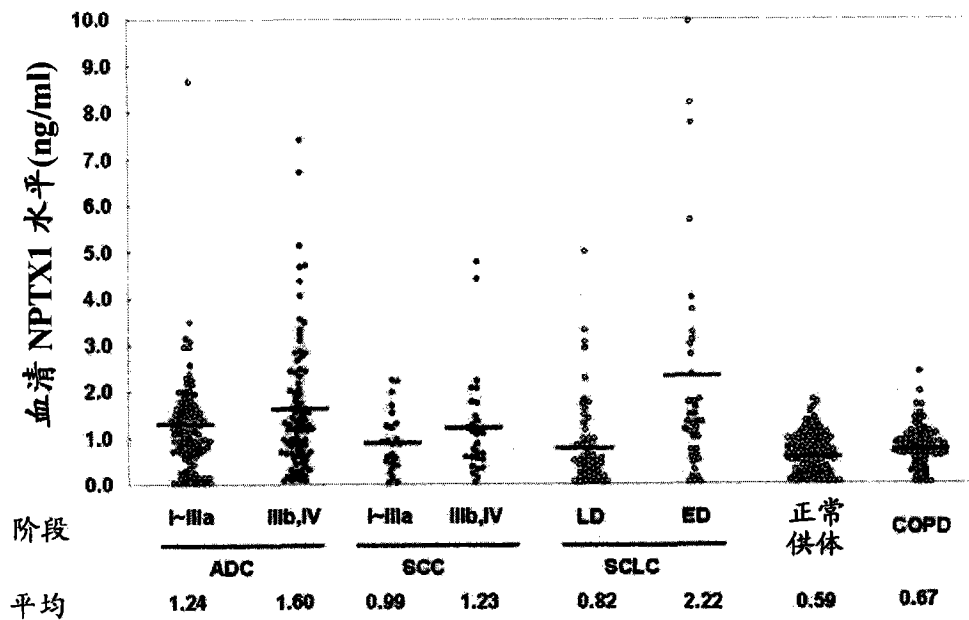


图 9

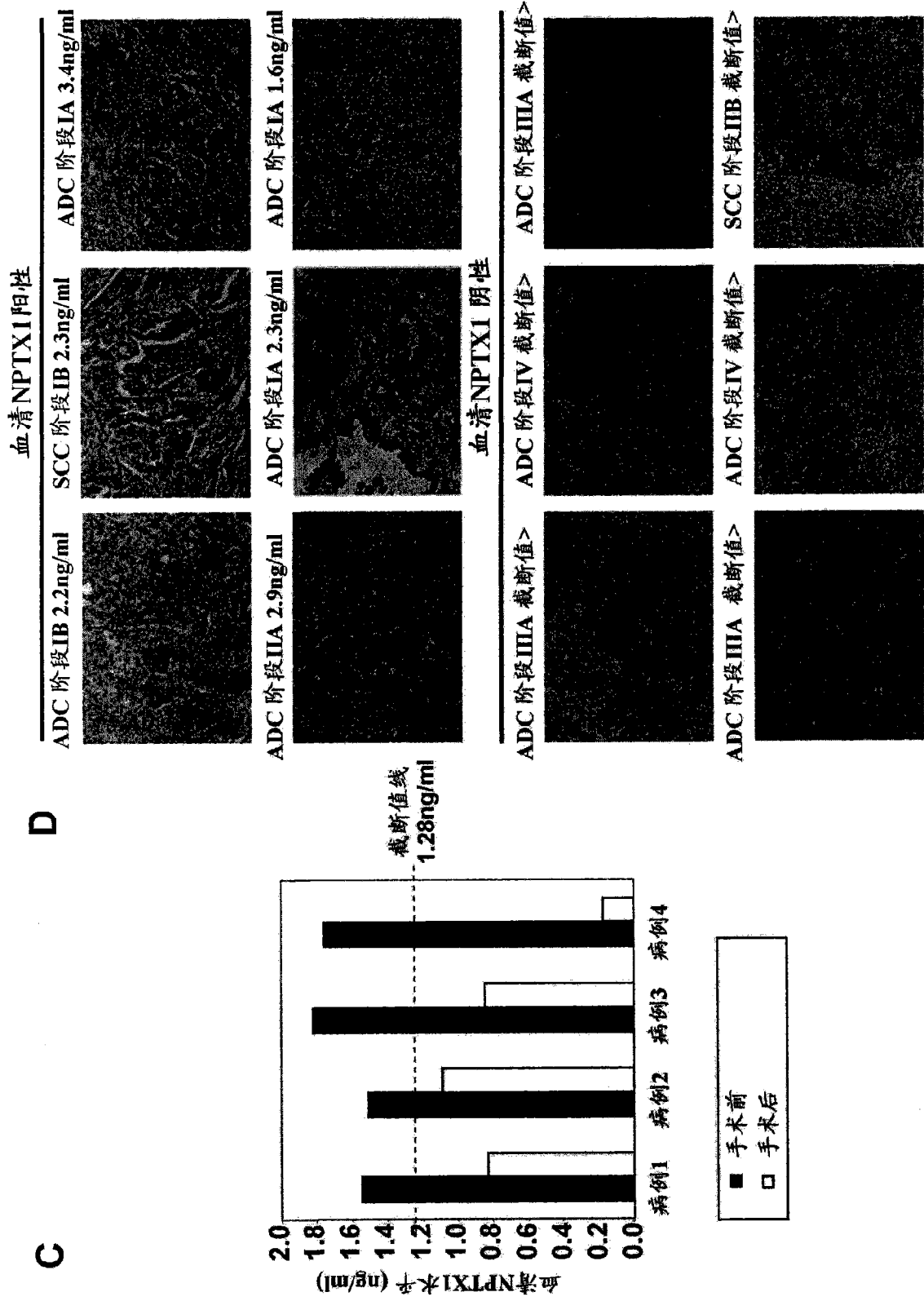


图9(续)

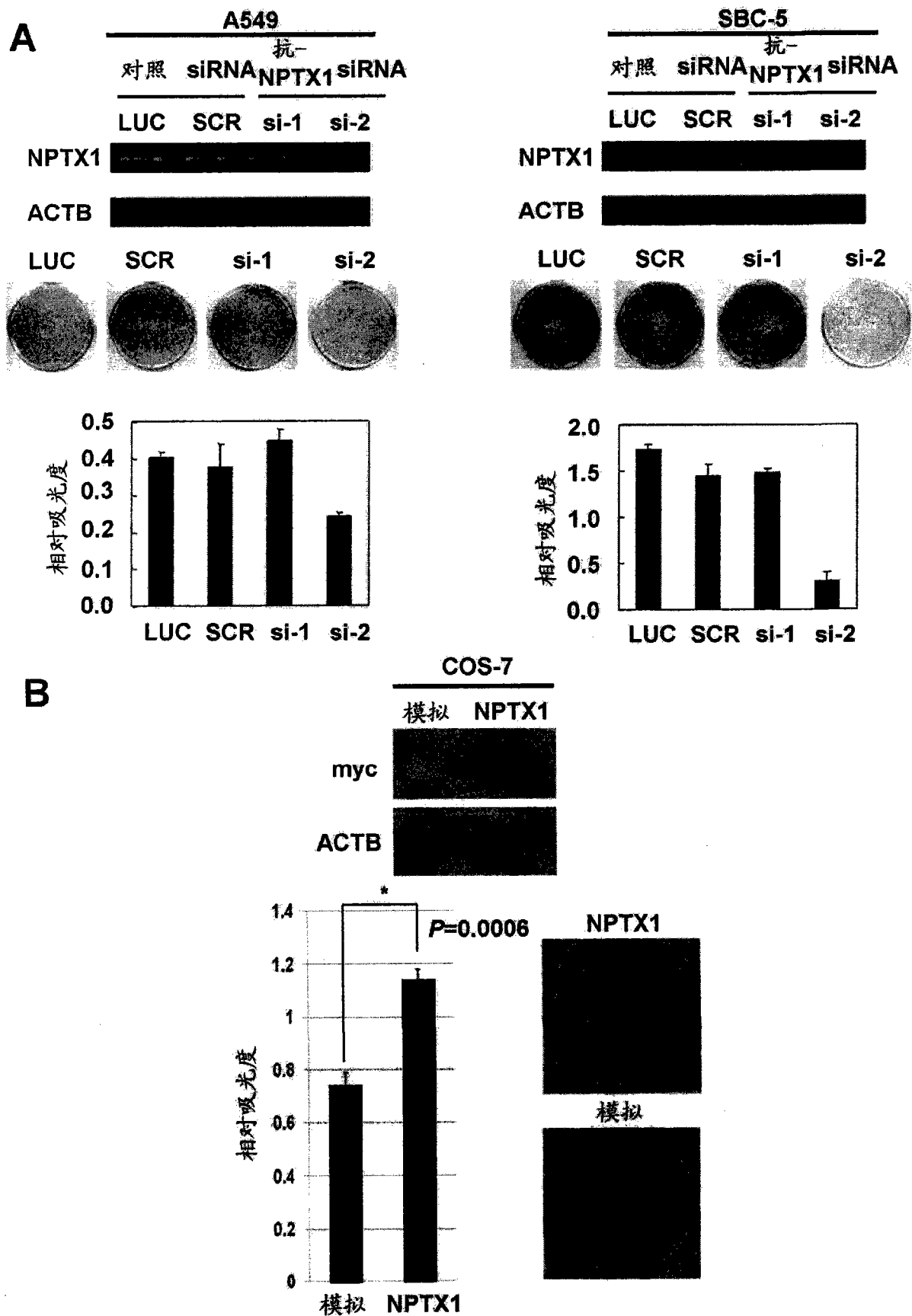


图 10

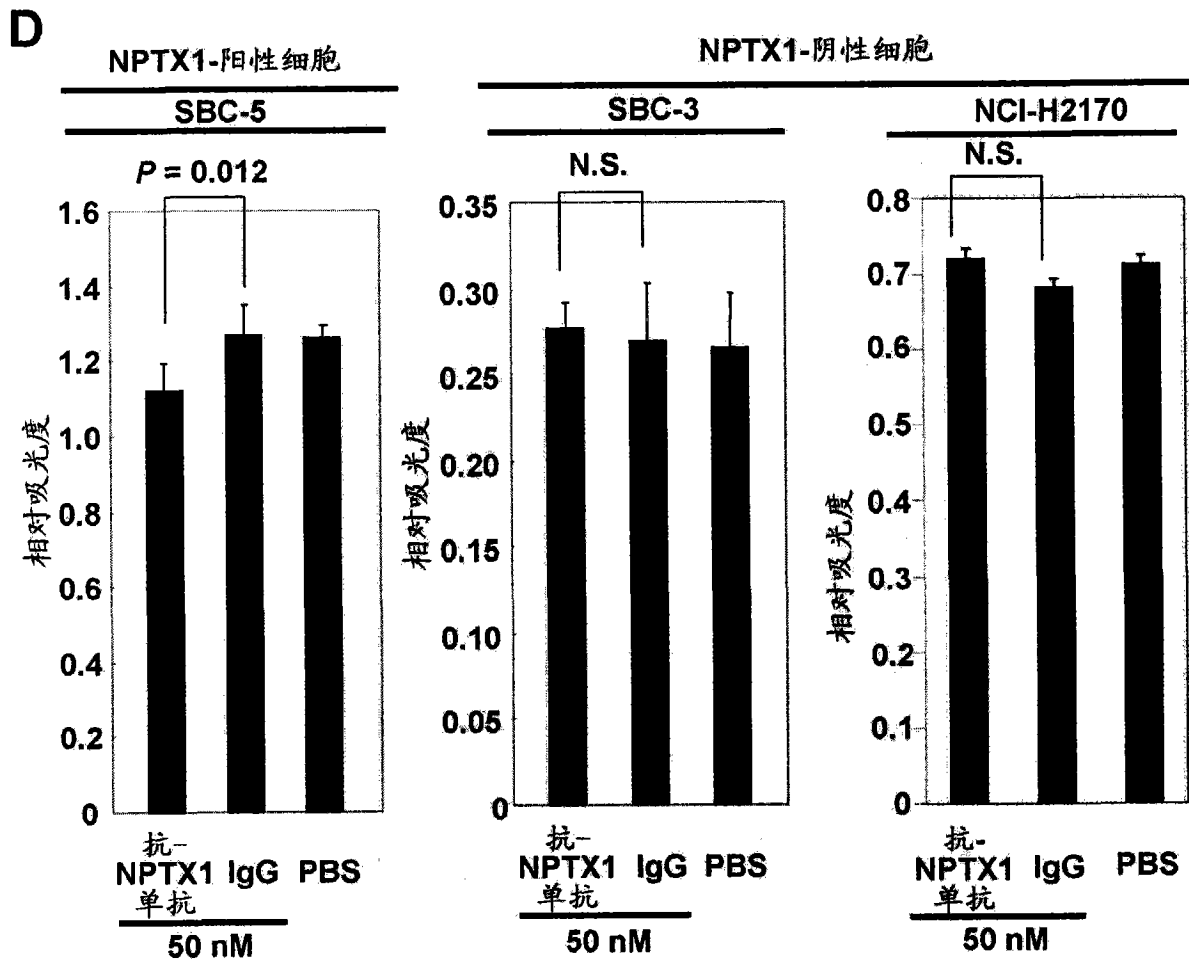
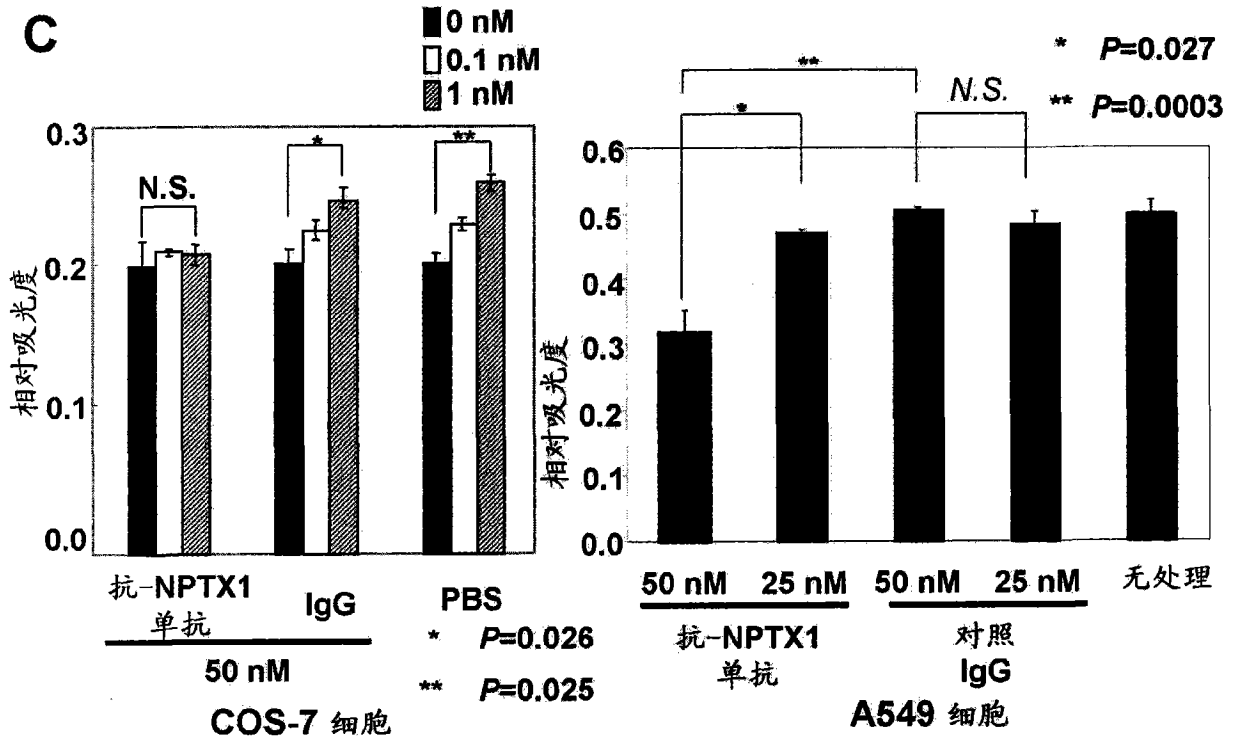


图 10(续)

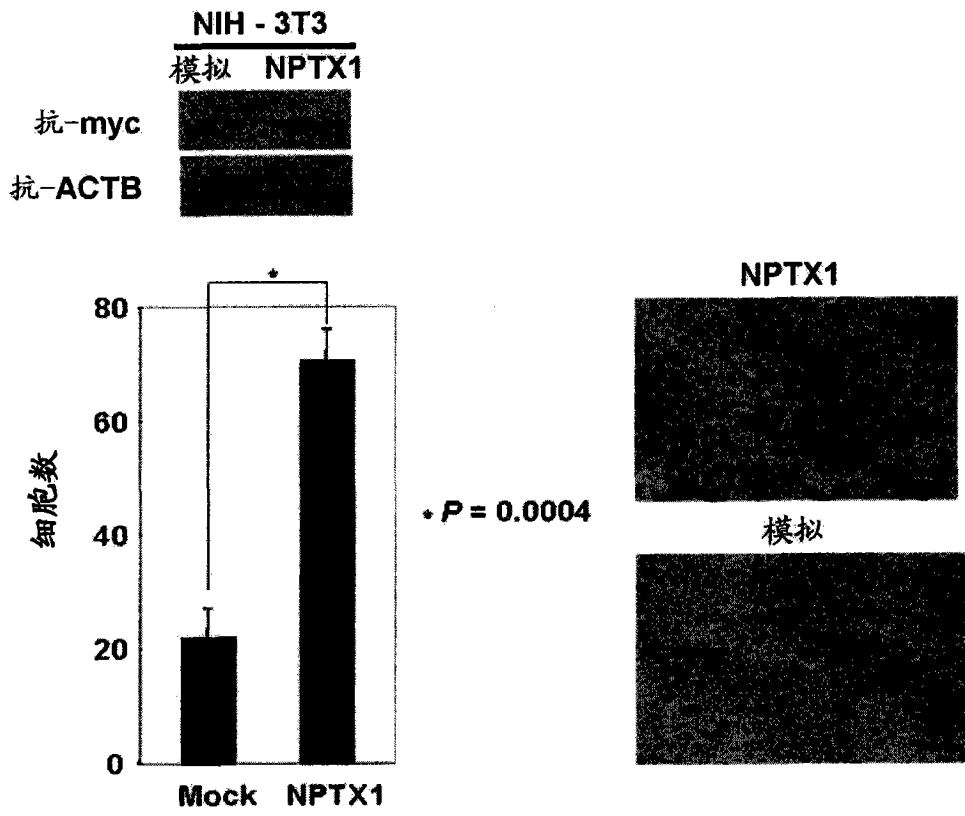


图 11

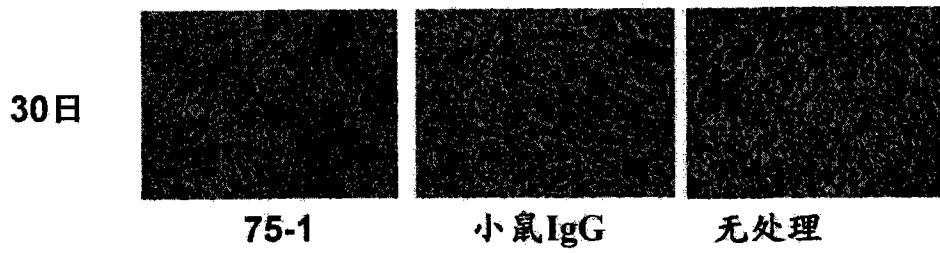
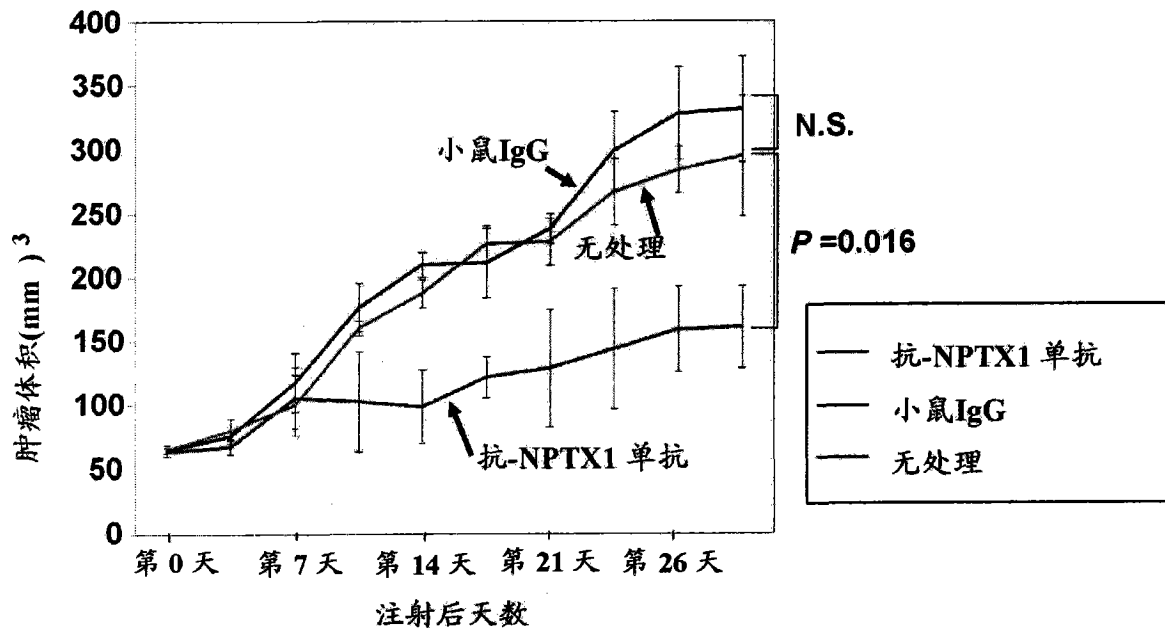


图 12

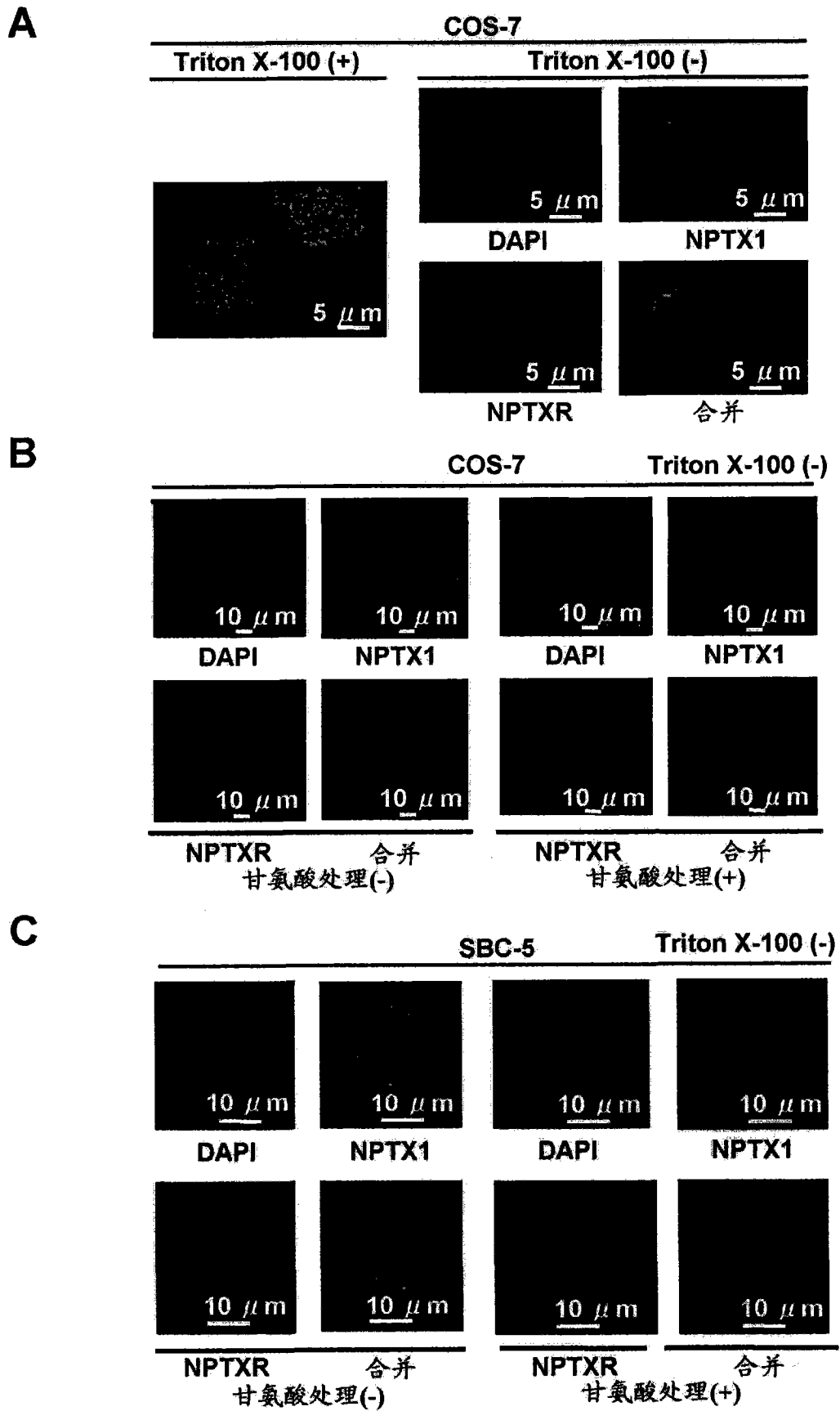


图 13

D

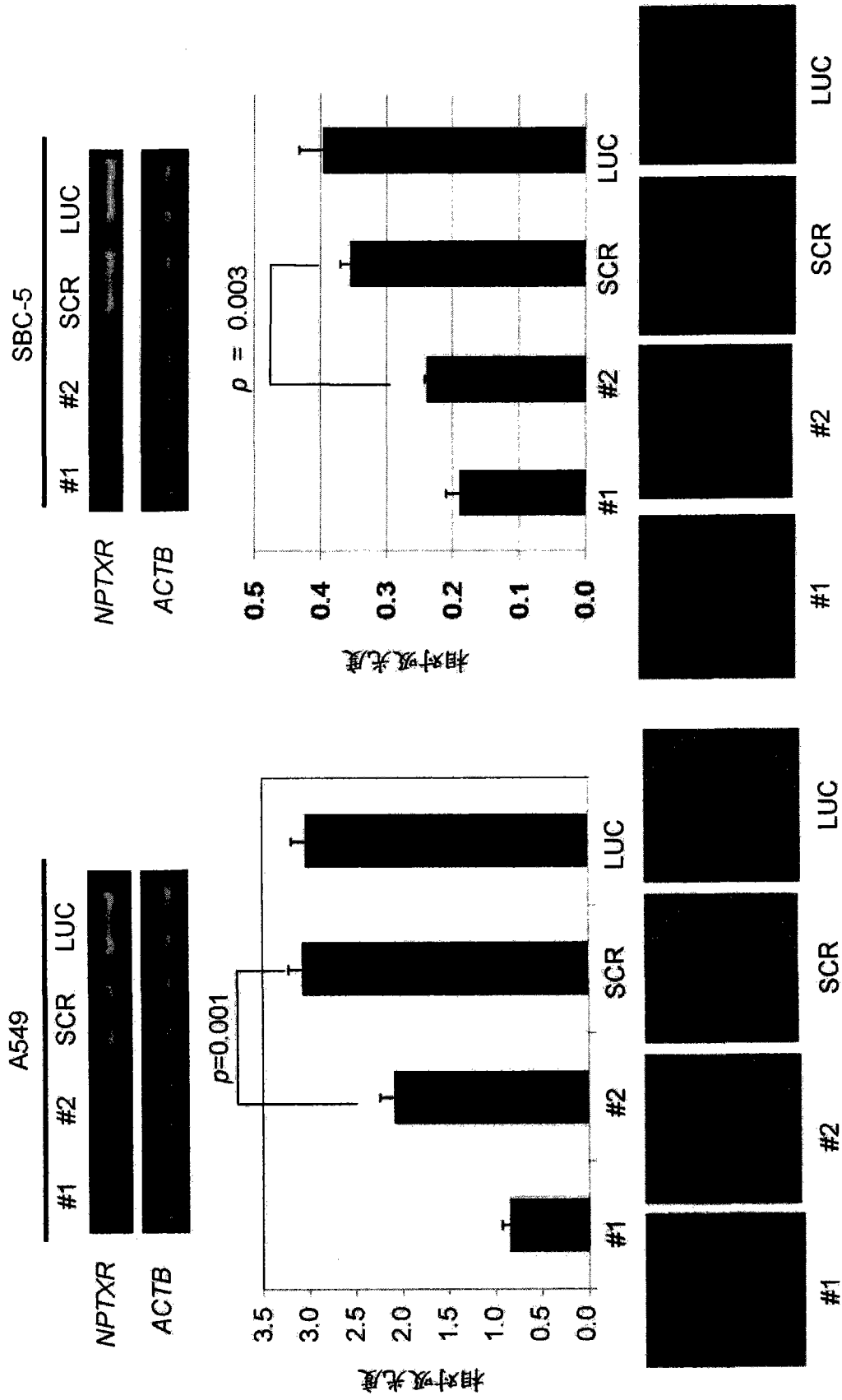


图 13(续)

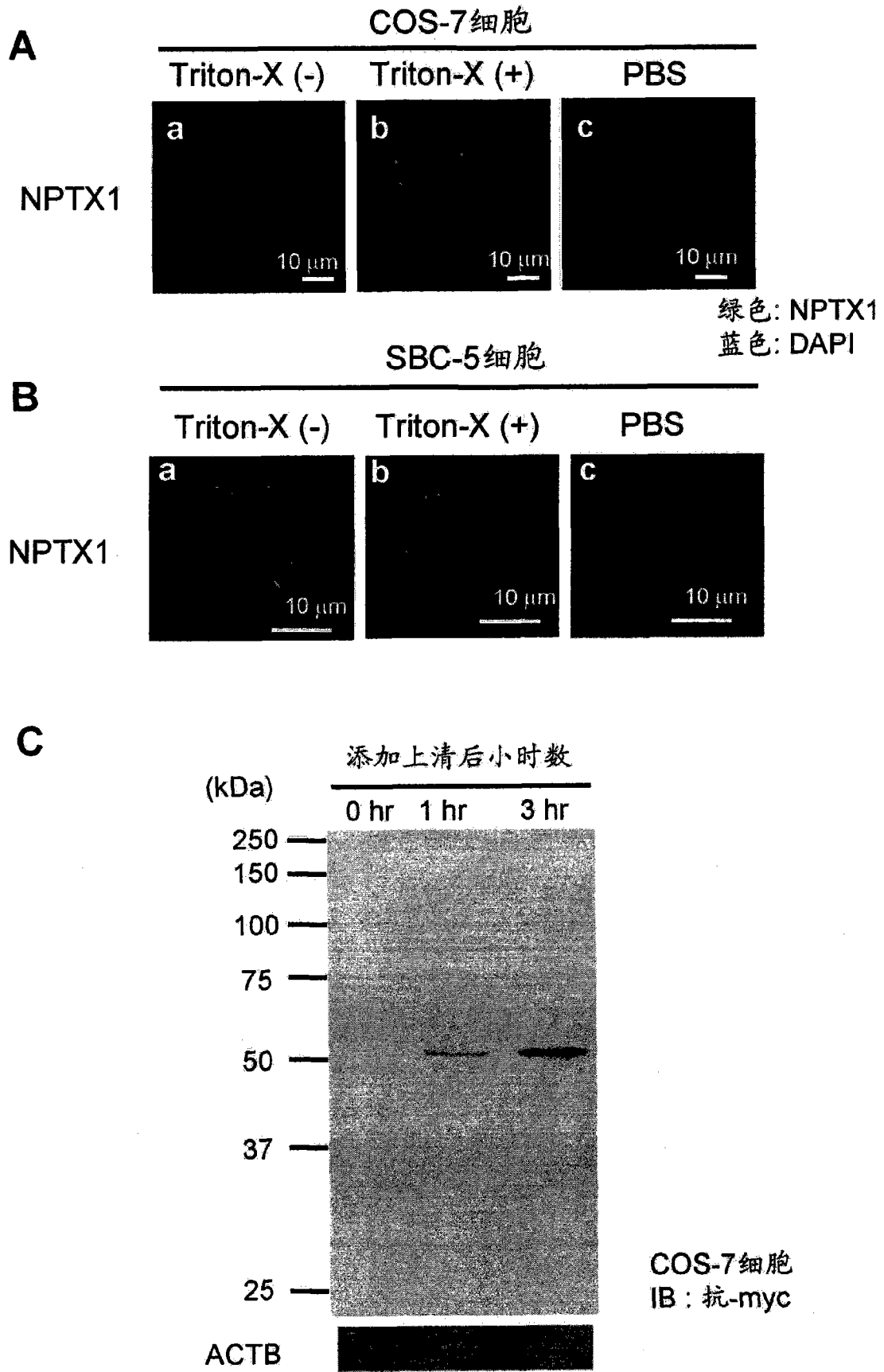


图 14

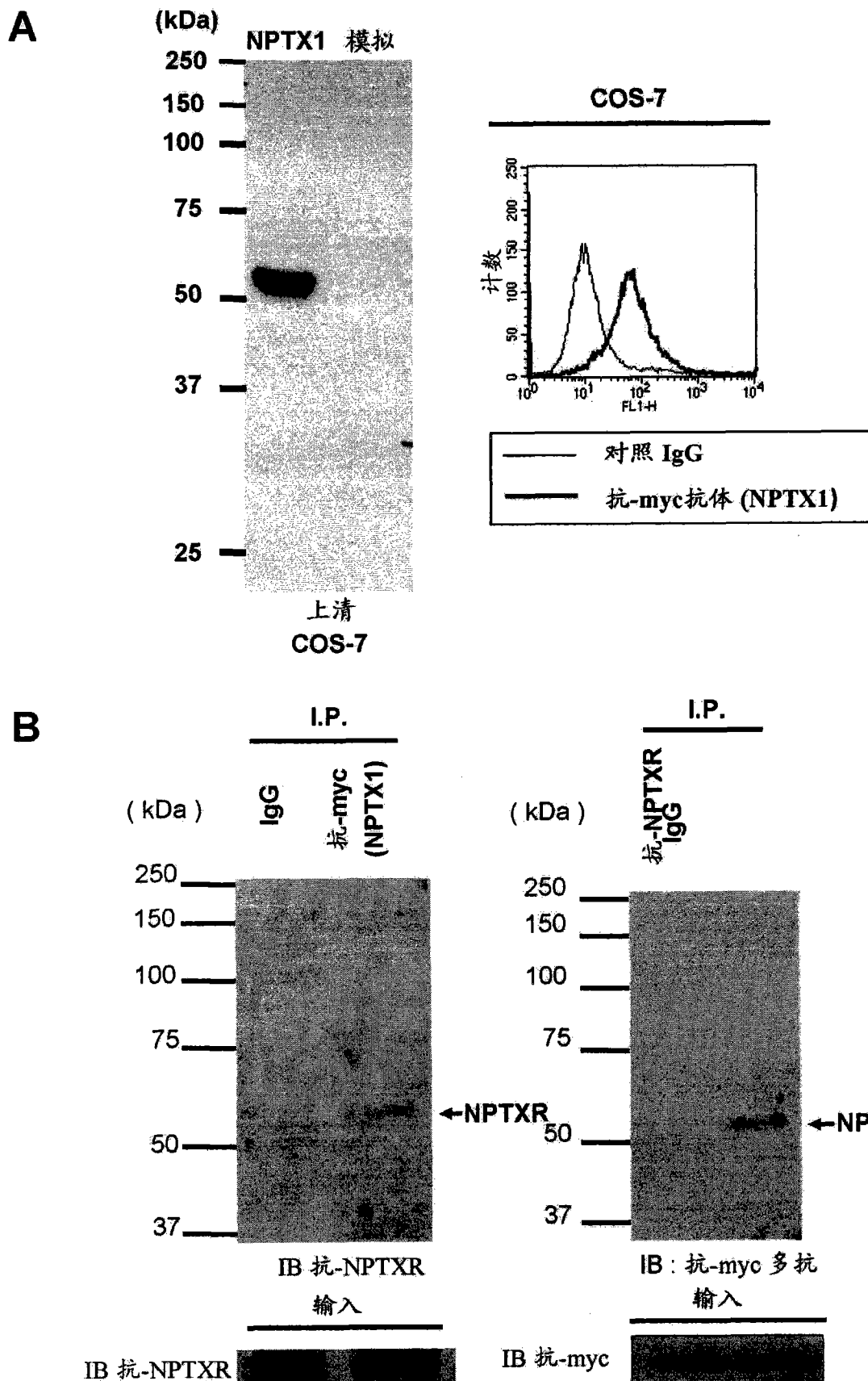


图 15

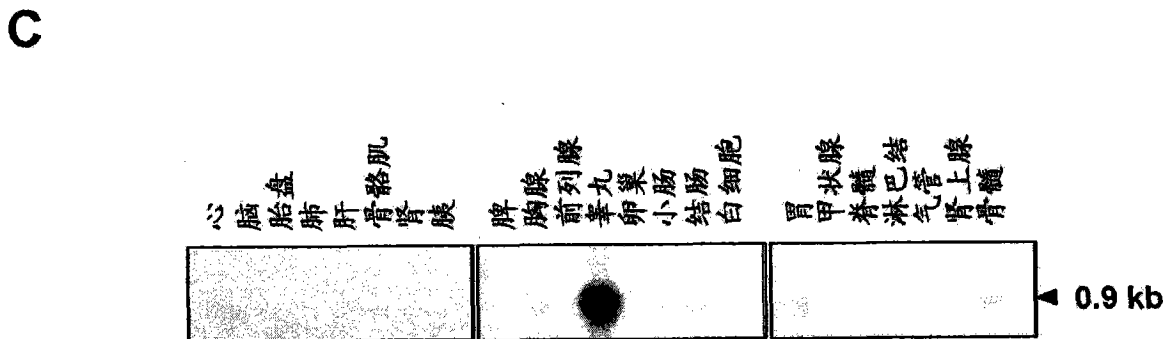
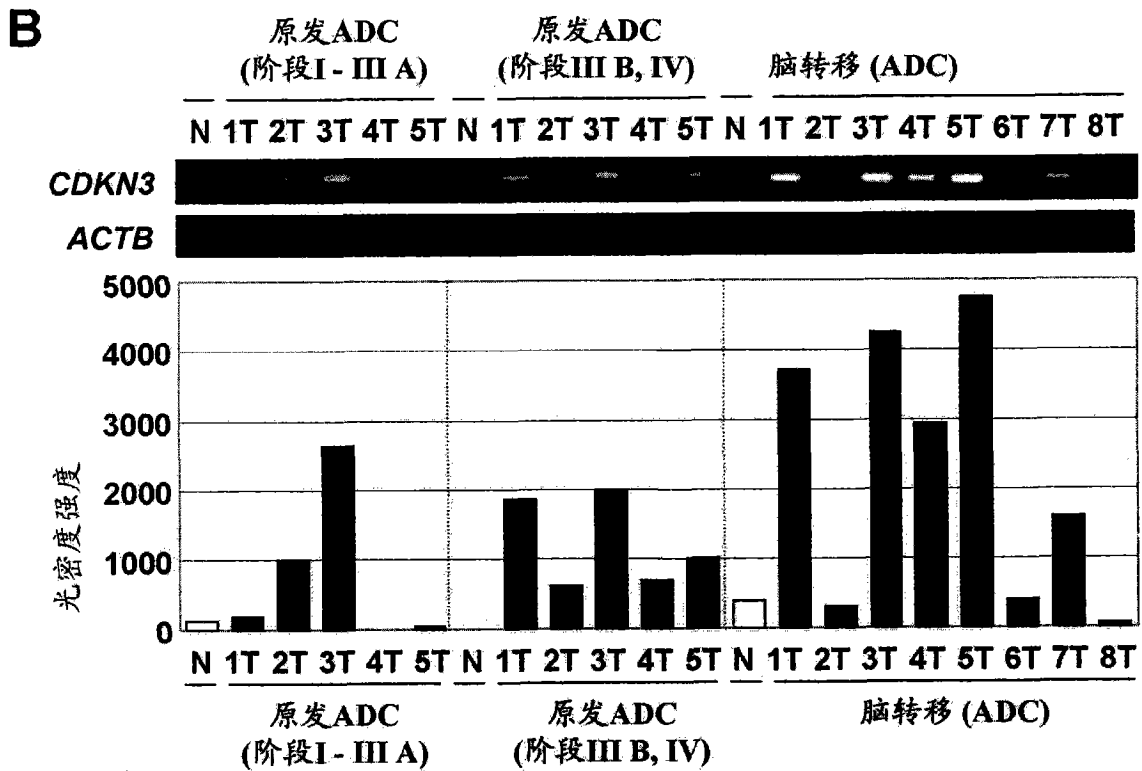
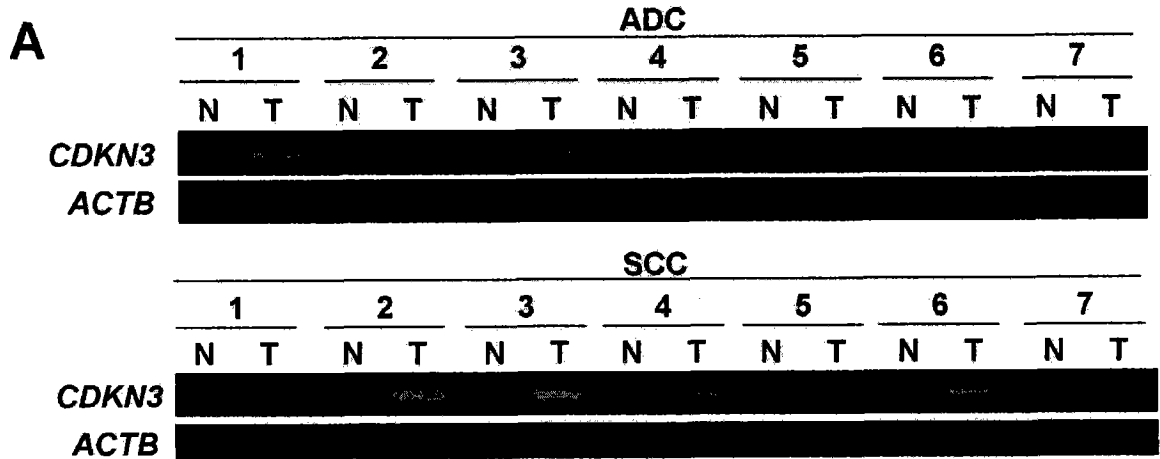


图 16

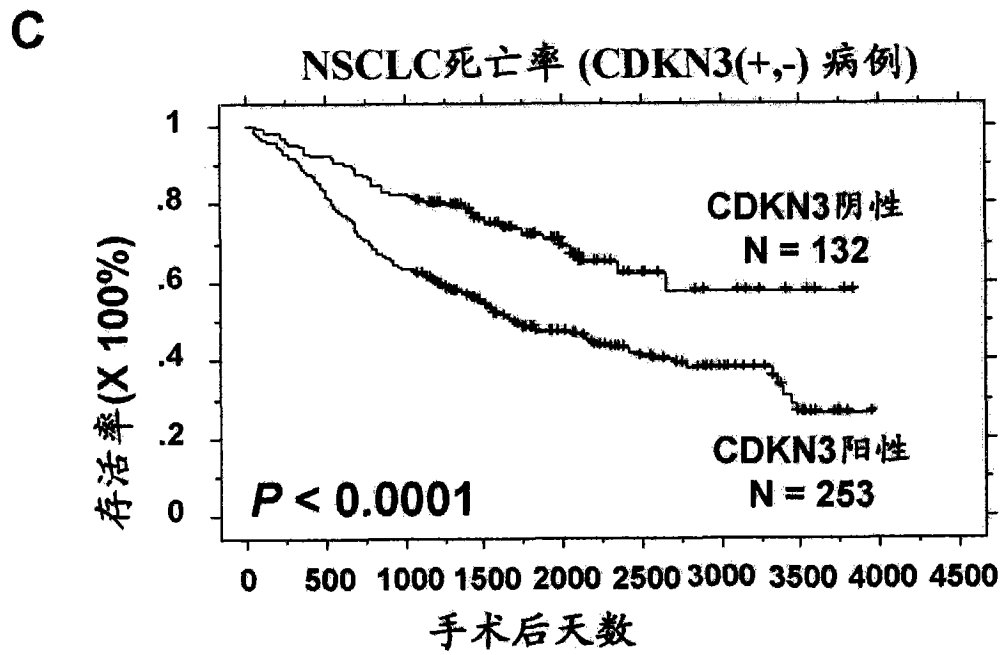
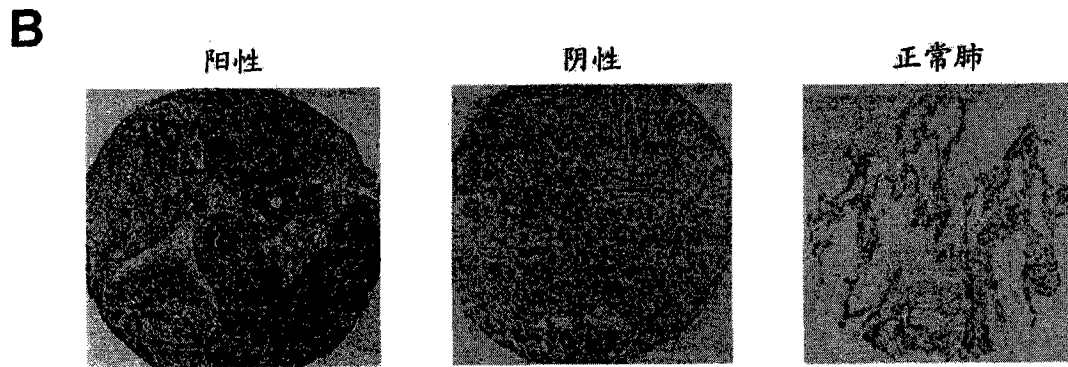
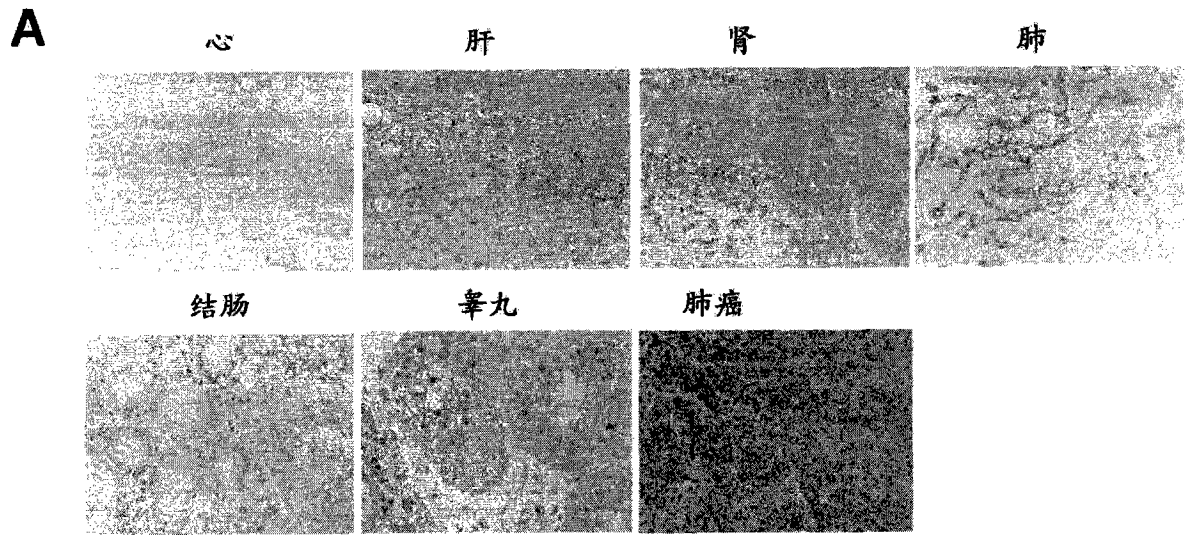


图 17

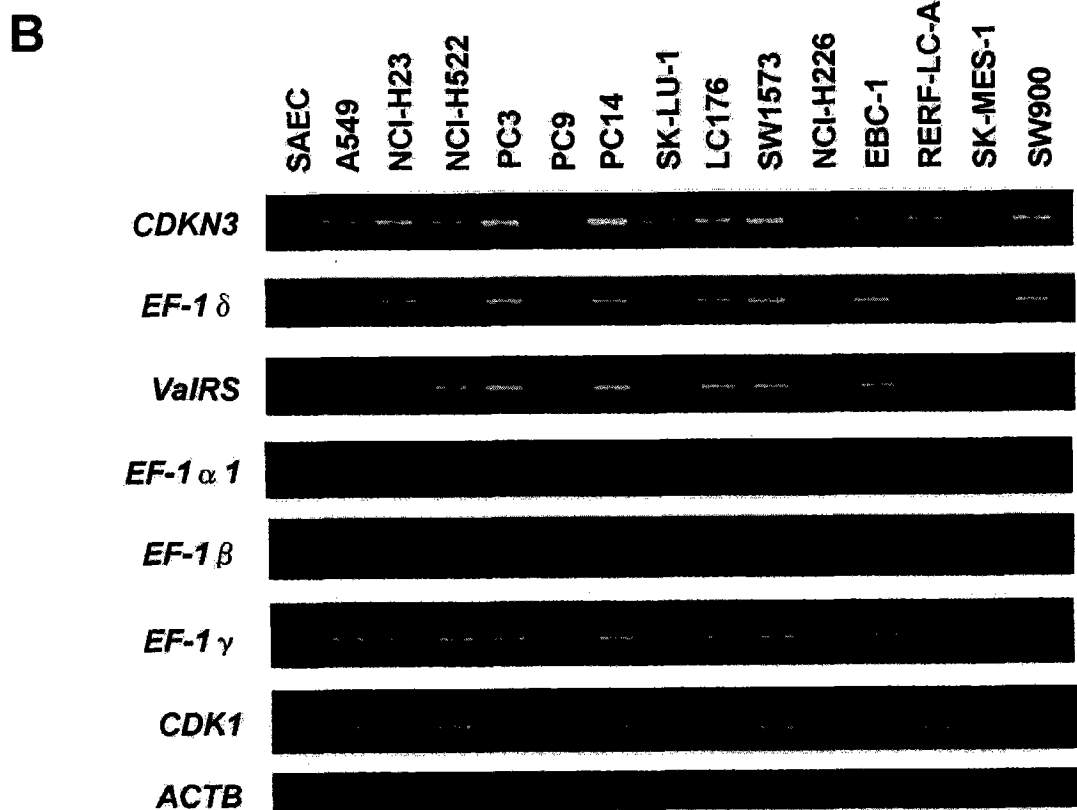
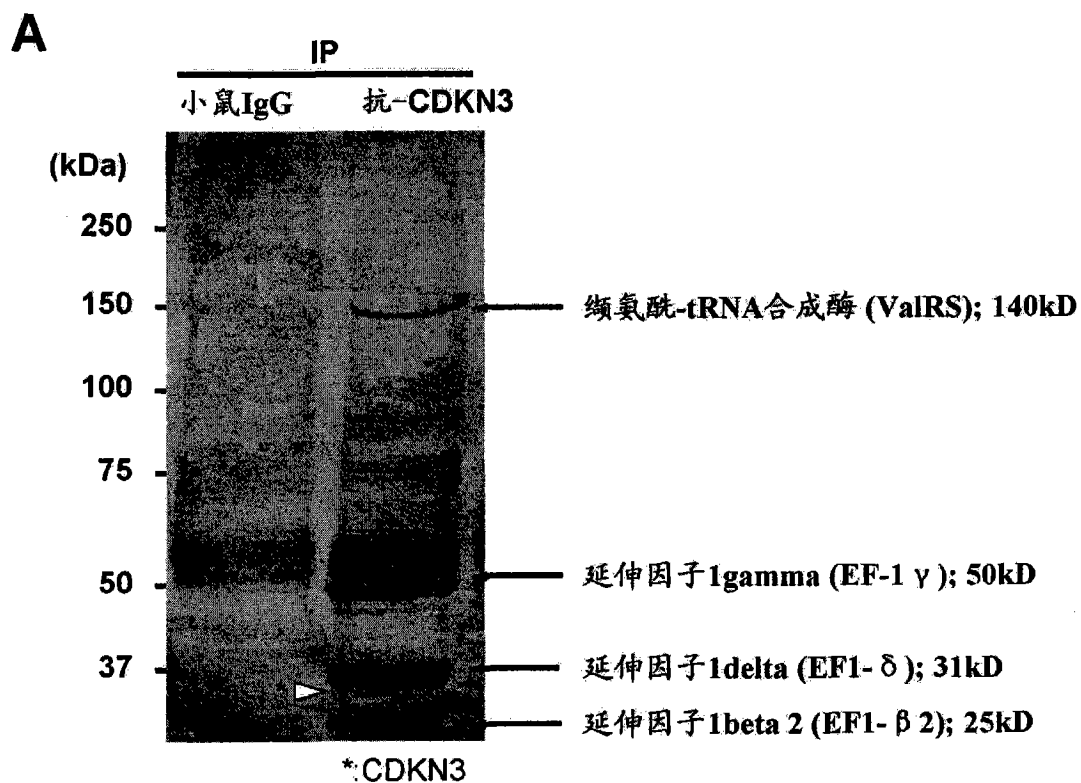
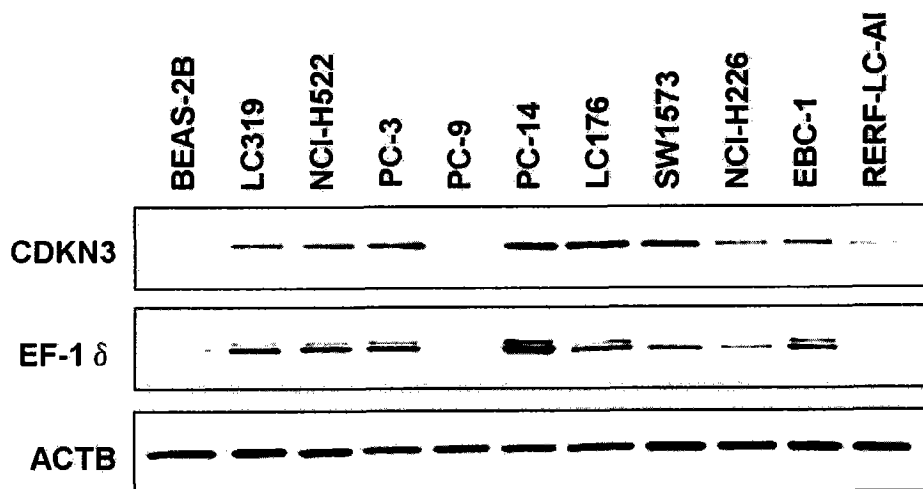
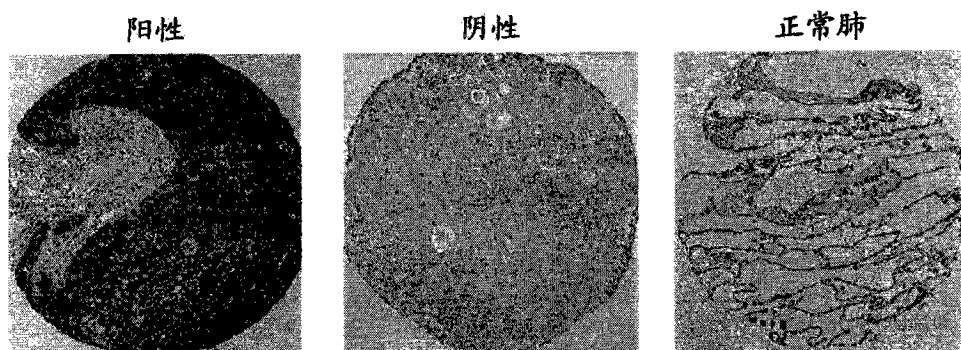


图 18

A



B



C

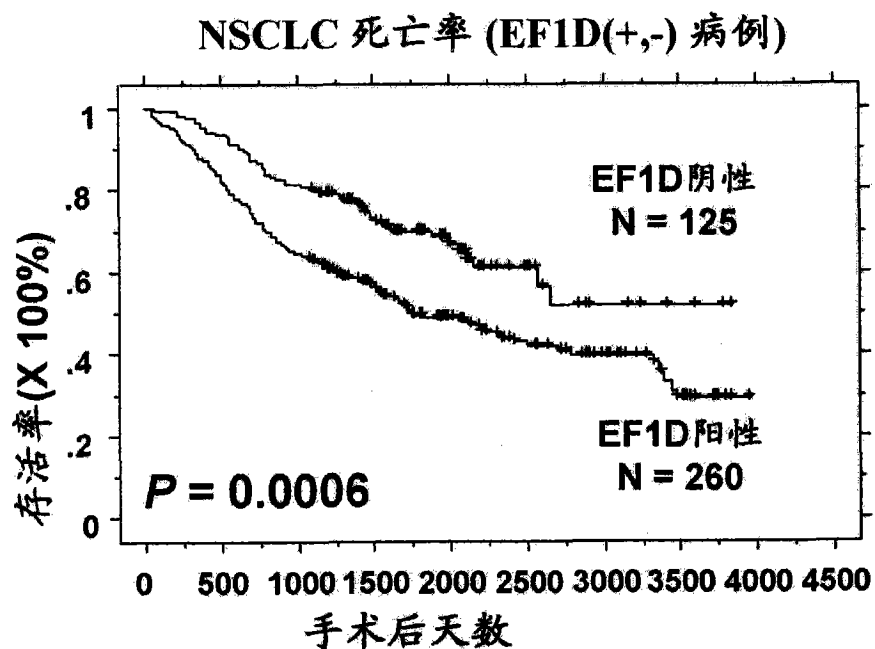


图 19

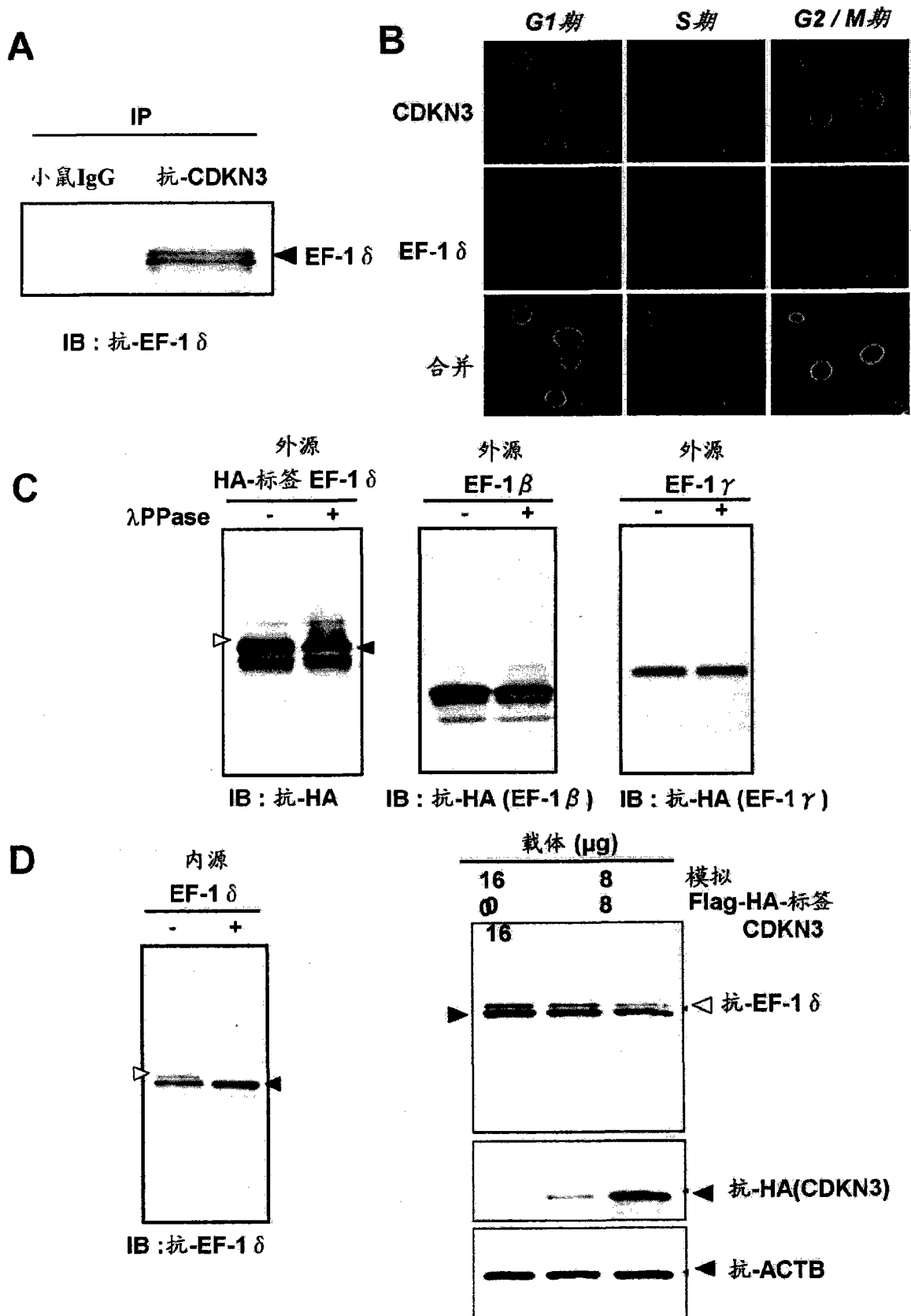


图 20

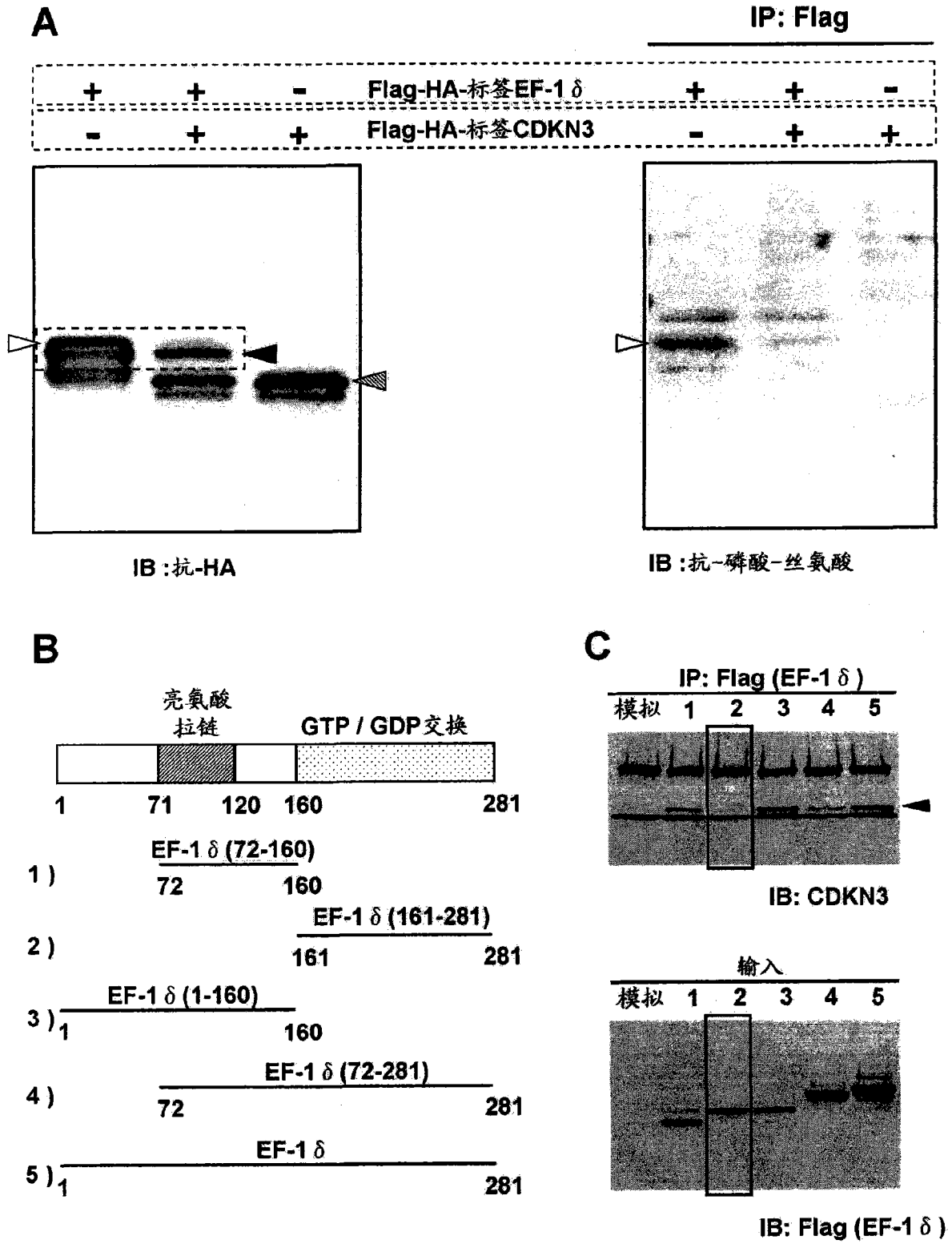


图 21

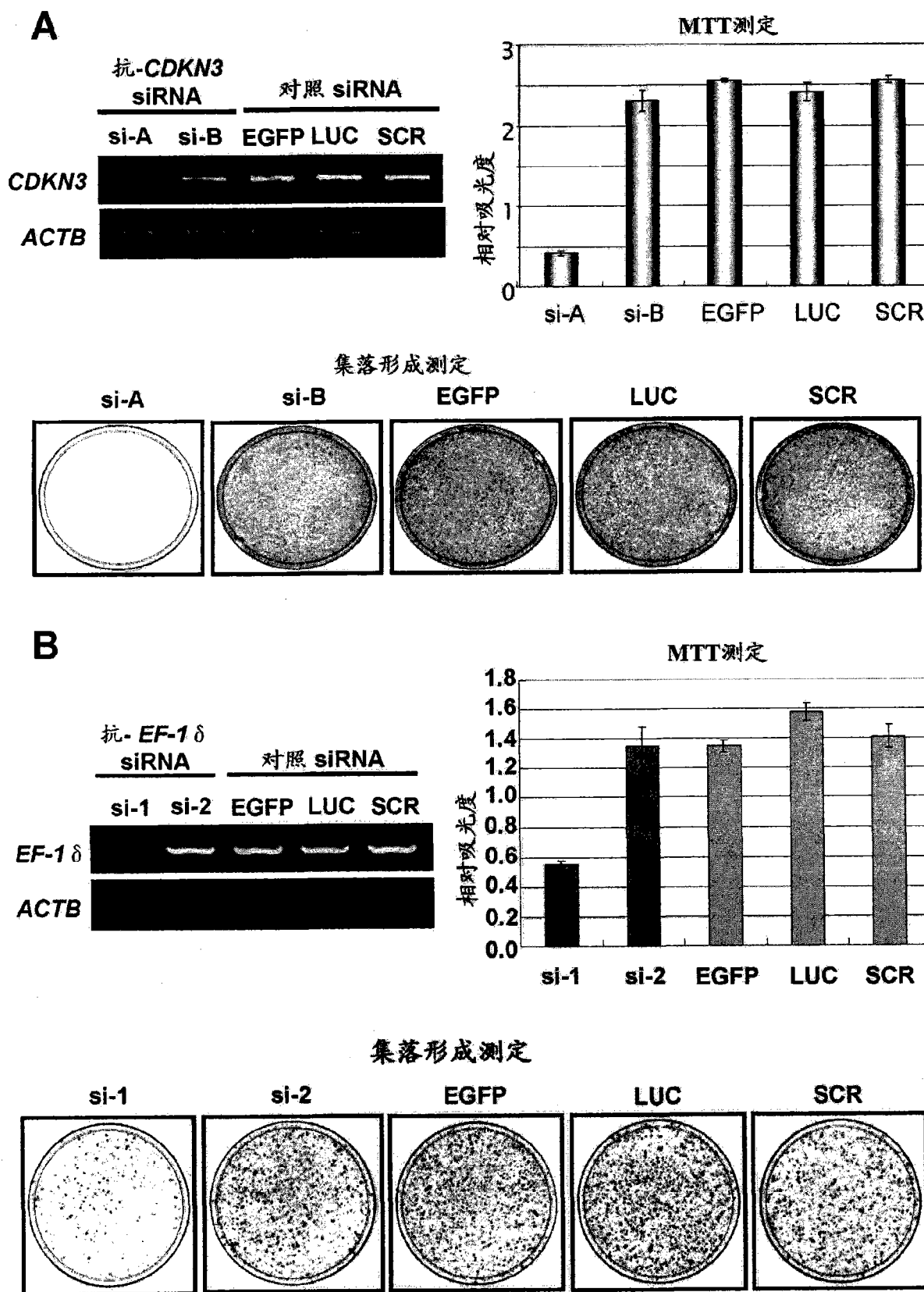


图 22

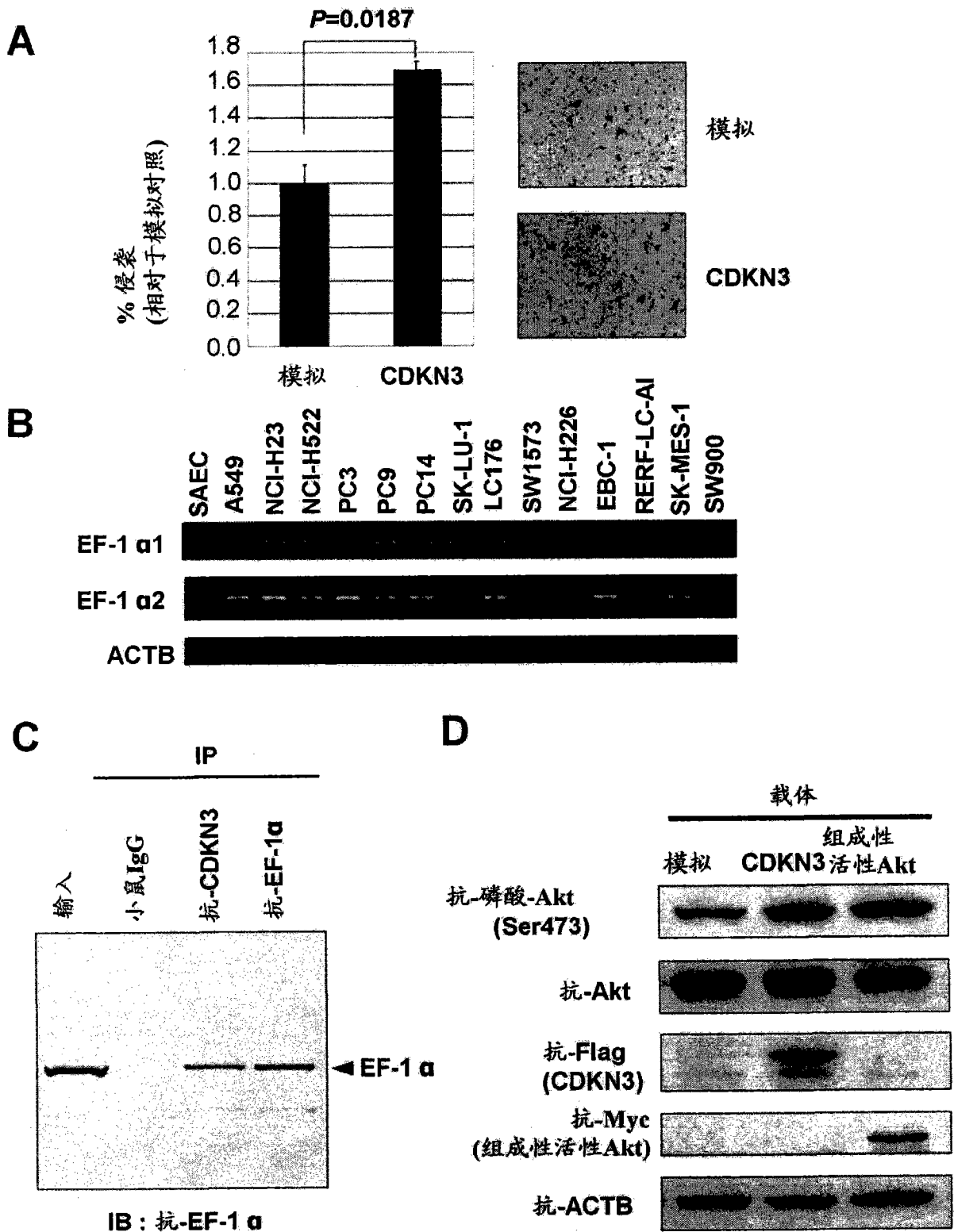


图 23

E

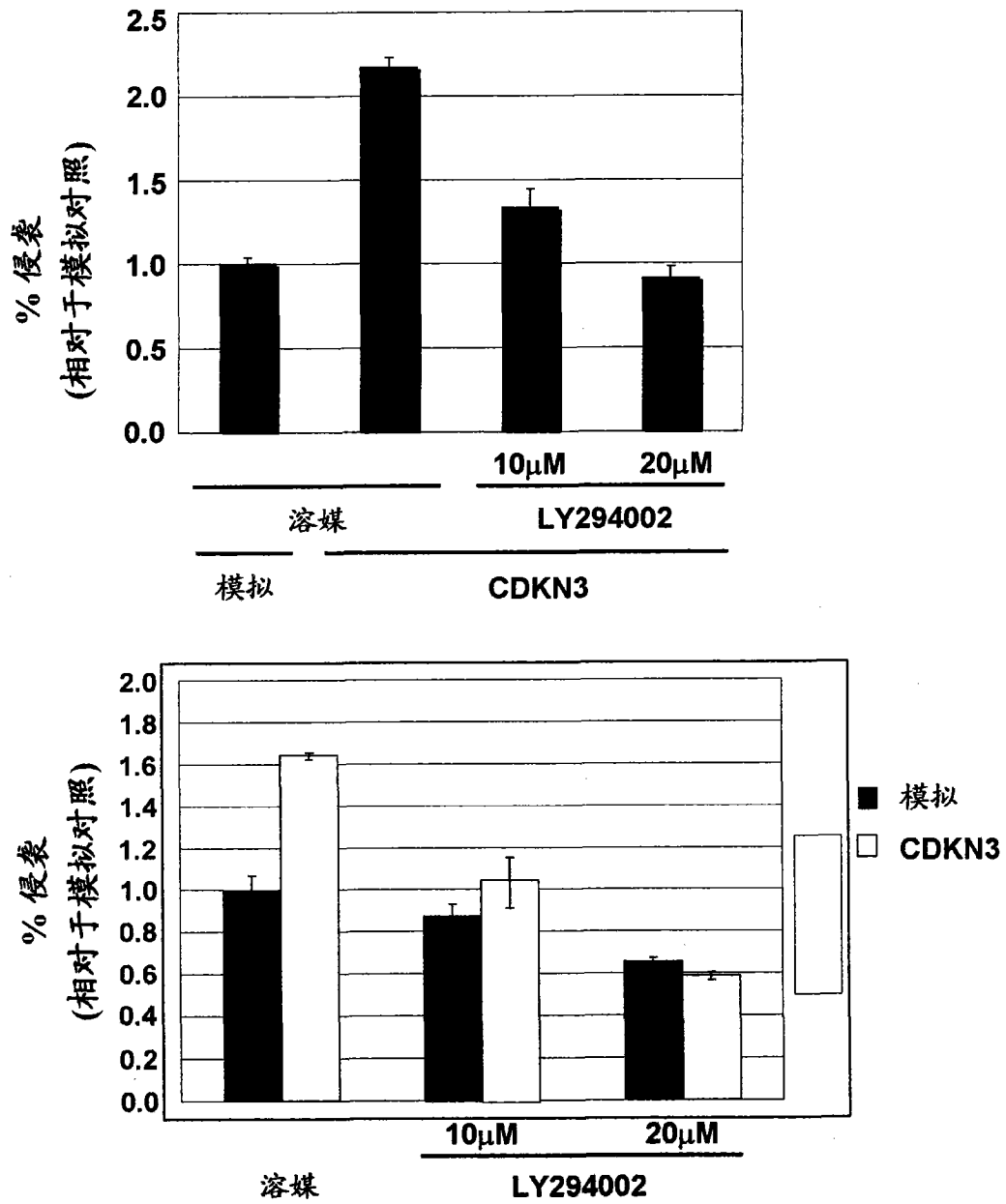


图 23(续)

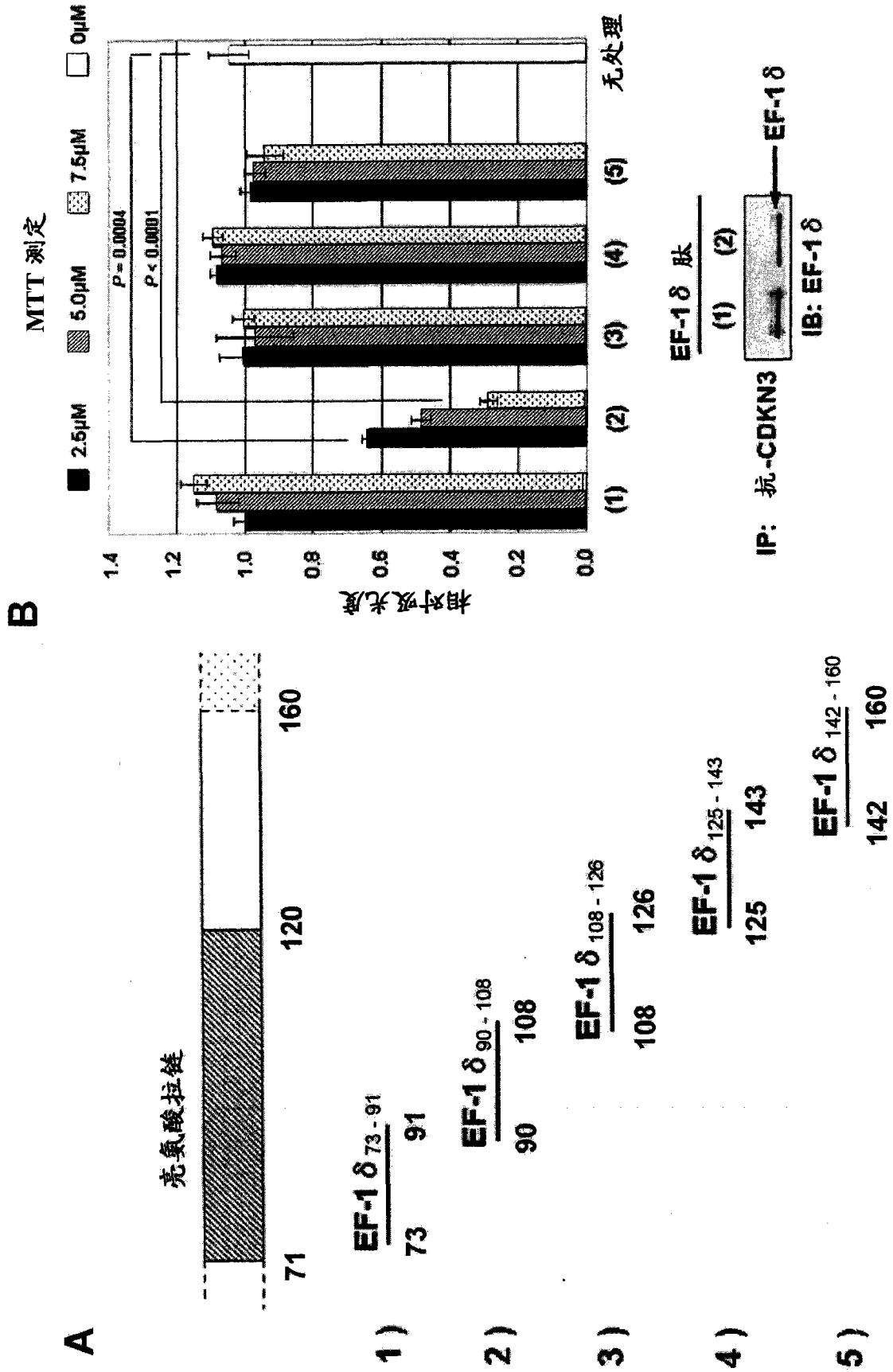


图 24