(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2025 年 1 月 2 日 (02.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2025/002484 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/6886 (2018.01) *A61K 45/00* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2024/114759

(22) 国际申请日: 2024 年 8 月 27 日 (27.08.2024)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202310770107.3 2023年6月27日 (27.06.2023) CN

(71) 申请人: 南通大学附属医院 (**AFFILIATED HOSPITAL OF NANTONG UNIVERSITY**) [CN/CN]; 中国江苏省南通市崇川区西寺路 20 号, Jiangsu 226001 (CN)。

(72) 发明人:肖明兵(**XIAO, Mingbing**); 中国江苏省南通市崇川区西寺路20号, Jiangsu 226001 (CN)。吴桐(**WU, Tong**); 中国江苏省南通市崇川区西寺路20号, Jiangsu 226001 (CN)。樊兴娟(**FAN, Xingjuan**); 中国江苏省南通市崇川区西寺路20号, Jiangsu 226001 (CN)。史加海(**SHI, Jiahai**); 中国江苏省南通市崇川区西寺路20号, Jiangsu 226001 (CN)。郑文杰(**ZHENG, Wenjie**); 中国江苏省南通市崇川区西寺路20号, Jiangsu 226001 (CN)。倪温慨(**NI, Wenkai**); 中国江苏省南通市崇川区西寺路20号, Jiangsu 226001 (CN)。管程齐(**GUAN, Chengqi**); 中国江苏省南通市崇川区西寺路20号, Jiangsu 226001 (CN)。陈子微(**CHEN, Ziwei**); 中国江苏省南通市崇川区西寺路20号, Jiangsu 226001 (CN)。

(74) 代理人:北京方圆嘉禾知识产权代理有限公司 (**BEIJING FINELAND IP FIRM**); 中国北京市海淀区彩和坊路8号11层1104-2, Beijing 100080 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) **Title:** USE OF TMED8 GENE IN PREPARATION OF DRUG FOR TREATING TUMOR AND KIT FOR DIAGNOSING TUMOR

(54) 发明名称: TMED8基因在制备治疗肿瘤药物及其诊断试剂盒中的应用

(57) **Abstract:** The present application belongs to the technical field of precision medicine of tumors. Disclosed is the use of a TMED8 gene in the preparation of a drug for treating a tumor and a kit for diagnosing the tumor. The up-regulation of TMED8 gene expression can significantly inhibit the migration and proliferation abilities of pancreatic cancer cells, and can promote the apoptosis of pancreatic cancer cells; also, the TMED8 gene is related to an MAPK signaling pathway. Therefore, TMED8 can be used as an effective target for the gene diagnosis and treatment of pancreatic cancer. The expression of TMED8 in pancreatic cancer, the relationship between TMED8 and the prognosis and survival of patients, and the effect of TMED8 on the biological behavior of pancreatic cancer cells are studied, and it is explored that the action mechanism of TMED8 may be closely related to MAPK signaling pathway. TMED8 can be used as a kit for diagnosing pancreatic cancer and a drug for treating pancreatic cancer, which provides effective support for the early diagnosis and treatment of pancreatic cancer.

(57) 摘要: TMED8基因在制备治疗肿瘤药物及其诊断试剂盒中的应用，属于肿瘤精准医疗技术领域。上调TMED8基因表达后，可以明显抑制胰腺癌细胞的迁移和增殖能力，并促进胰腺癌细胞的凋亡；而且TMED8基因与MAPK信号通路相关。因此TMED8可作为胰腺癌基因诊疗的有效靶点。TMED8在胰腺癌中的表达情况，与患者预后及生存的关系，以及对胰腺癌细胞生物行为学的影响，并探究了其作用机制可能与MAPK信号通路密切相关。TMED8可以作为胰腺癌诊断试剂盒和治疗药物，为胰腺癌的早期诊断和治疗提供有效的支持。

WO 2025/002484 A1

[见续页]

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 在修改权利要求的期限届满之前进行，在收到该修改后将重新公布(细则48.2(h))。
— 包括关于请求恢复一项或多项优先权要求的信息(细则26之二.3和48.2(b)(vii))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

TMED8 基因在制备治疗肿瘤药物及其诊断试剂盒中的应用

技术领域

本申请属于肿瘤精准医疗技术领域，具体涉及 TMED8 基因在制备治疗肿瘤药物及其诊断试剂盒中的应用。

背景技术

胰腺癌（PC）是一种极为常见且恶性程度极高的肿瘤，具有早期诊断困难、易转移、进展迅速且预后极差，是全球癌症死亡的主要原因。遗传性遗传因素虽然不能直接改变，但却是胰腺癌症风险的重要组成部分，包括遗传性癌症基因中的致病性变体、与遗传性胰腺炎相关的基因以及全基因组关联研究中确定的常见变体。确定癌症的基因变化不仅可以深入了解这种癌症的病因，还可以提供指导早期检测策略的机会。胰腺癌在早期并没有明显的症状，导致难以及时发现和诊断，目前临床普遍使用的肿瘤标志物如 CA199 和 CEA 等对于胰腺癌早期诊断的敏感性和特异性较差。一旦确诊，多数患者已处于中晚期，除根治性手术切除外，辅助放化疗等手段对预后的改善十分有限。因此，探索和发现敏感性和特异性更强的早期标志物和有效治疗靶点具有重要意义。

TMED 家族（跨膜 emp24 结构域家族）由 I 型单通道跨膜蛋白组成，在所有真核生物中均有发现，在人类发育和疾病中的地位不容忽视。作为分泌途径中的重要转运蛋白，受其所控的蛋白质运输路径一旦异常，将会导致先天畸形、糖尿病以及癌症在内的多种疾病的发生。既往研究表明 TMED 蛋白的异常表达通常与肝脏疾病、胰腺疾病和免疫系统失调密切关联，可在疾病发生发展的过程中形成分泌环路，维持细胞及胞内各细胞器的正常形态，在细胞器间循环运输多种多样的重要货物成分，实现细胞器间的沟通，从而对疾病进程进行持续调节，尤其是在恶性肿瘤细胞的增殖与分化中发挥重要作用。

TMED8（ NCBI Gene: 283578）是该家族的重要成员之一，位于 14 号染色体的 77,335,021-77,377,094 碱基之间，分子量约为 55kDa，在细胞核和细胞质内均有表达。目前尚未有任何 TMED8 与人类疾病和正常生理功能关系的文献报道。

发明内容

本申请的目的在于提供 TMED8 基因在制备治疗肿瘤药物及其诊断试剂盒中的应用，以及提供一种 TMED8 在制备用于治疗肿瘤药物中的应用。

本申请提供了一种检测 TMED8 表达量的试剂在制备诊断疾病的产品中的应用。

优选的，所述试剂包括检测 TMED8 的 mRNA 或蛋白质的表达量的试剂。

优选的，所述检测 TMED8 表达量的方法包括以下至少一种：免疫组化、Western Blot 和实时荧光定量 PCR。

优选的，所述疾病的类型包括肿瘤。

本申请还提供了一种诊断肿瘤的试剂盒，包括以下试剂中的至少一种：免疫组化检测 TMED8 蛋白质表达量的试剂、Western Blot 检测 TMED8 蛋白质表达量的试剂、实时荧光定量 PCR 检测 TMED8 基因和/或 mRNA 表达量的引物对。

优选的，所述肿瘤包括胰腺癌。

本申请还提供了一种提高 TMED8 表达量的试剂在制备治疗疾病的产品中的应用。

优选的，所述试剂包括以下至少一种：TMED8 的激动剂、TMED8 的类似物、过表达 TMED8 的试剂。

本申请还提供了一种治疗肿瘤的药物，包括提高内源 TMED8 表达量的试剂或外源 TMED8。

优选的，所述治疗包括以下至少一种：抑制肿瘤细胞迁移、抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、抑制 MAPK 信号通路激活。

有益效果：本申请通过制备胰腺癌组织芯片，利用免疫组化技术检测胰腺癌中 TMED8 的表达情况，结果提示 TMED8 在胰腺癌肿瘤组织中的表达水平明显高于癌旁组织。另外，通过建立过表达 TMED8 的胰腺癌稳转细胞系，利用 qRT-PCR、Western Blot、细胞划痕、CCK8、Transwell、流式检测、裸鼠皮下成瘤等体内外实验，探究 TMED8 对胰腺癌细胞生物学行为的影响，发现上调 TMED8 基因表达后，明显抑制了胰腺癌细胞的迁移和增殖能力，并促进了胰腺癌细胞的凋亡；本申请还发现 TMED8 基因与 MAPK 信号通路相关。因此 TMED8 可作为胰腺癌基因诊疗的有效靶点，在制备精准医疗的胰腺癌诊断试剂盒和治疗药物中具有重要的应用意义。本申请探索了 TMED8 在胰腺癌中的表达情况，以及对胰腺癌细胞生物行为学的影响，并探究了可能的作用机制与 MAPK 信号通路密切相关。TMED8 有望作为胰腺癌诊断试剂盒和治疗药物，为胰腺癌的早期诊断和治疗提供有效的支持。

附图说明

图 1 为 IHC 检测 TMED8 在胰腺癌及癌旁组织芯片中的表达，选取代表性位点的展示图：a-b.低分化 PC 癌和癌旁组织染色结果；c-d.中分化 PC 癌和癌旁组织染色结果；e-f.高分化 PC 癌和癌旁组织染色结果；

图 2 为 TMED8 表达情况、相应的 WB 及 PCR 验证结果图；

图 3 为胰腺癌正常导管上皮细胞和肿瘤细胞系中 TMED8 的表达情况比较图；

图 4 为胰腺癌稳转细胞系的 TMED8 过表达效率验证图；

图 5 为细胞划痕实验研究 TMED8 的过表达对胰腺癌细胞迁移能力的影响图；

图 6 为 Transwell 实验研究 TMED8 的过表达对胰腺癌细胞迁移能力的影响图；

图 7 为 CCK8 实验研究 TMED8 的过表达对胰腺癌细胞增殖能力的影响图；

图 8 为隆形成实验研究 TMED8 的过表达对胰腺癌细胞增殖能力的影响图；

图 9 为流式细胞术检测 TMED8 过表达对胰腺癌细胞凋亡能力的影响图；

图 10 为 TMED8 过表达对胰腺癌细胞对裸鼠皮下成瘤的影响图；

图 11 为 TMED8 过表达对胰腺癌细胞对裸鼠皮下成瘤后的组织加染 TMED8 和增殖指标 Ki67 抗体的 IHC 检测结果图；

图 12 为过表达 TMED8 的胰腺癌细胞系转录组测序热图；

图 13 为过表达 TMED8 的胰腺癌细胞系转录组测序得出的差异表达分子数量的火山图；

图 14 为对过表达 TMED8 后的差异分子的 KEGG 富集分析结果图；

图 15 为 TMED8 过表达对 MAPK 相关分子的影响图；

图 16 为 TMED8 过表达质粒 pLV3-CMV-TMED8(human)-3×FLAG-EF1a-CopGFP-Puro 的构建图谱。

具体实施方式

本申请提供了一种检测 TMED8 表达量的试剂在制备诊断疾病的产品中的应用。

本申请实施例中基于生物样本库制备胰腺癌组织芯片，利用免疫组化技术检测胰腺癌中 TMED8 的表达情况，结果显示 TMED8 在胰腺癌肿瘤组织中的表达水平明显高于癌旁组织，且经过统计 TMED8 高表达组患者的预后较好，由此将所述 TMED8 作为诊断胰腺癌的生物标志物。

本申请所述试剂优选包括检测TMED8的mRNA或蛋白质的表达量的试剂，并且所述检测的方法优选包括以下至少一种：免疫组化、Western Blot和实时荧光定量PCR。本申请所述疾病的类型优选包括肿瘤，更优选为胰腺癌。

本申请还提供了一种诊断肿瘤的试剂盒，包括以下试剂中的至少一种：免疫组化检测TMED8蛋白质表达量的试剂、Western Blot检测TMED8蛋白质表达量的试剂、实时荧光定量PCR检测TMED8基因的mRNA表达量的引物对。TMED8及内参18S的引物序列如表1所示。

表1 引物序列

基因	序列	SEQ ID No.
TMED8	F:CCACCTCTGATGGCTCCT	1
	R:CTCACCACGCTTCACCAC	2
18S	F:GGAGCCTGCGGCTTAATTTG	3
	R:CCACCCACGGAATCGAGAAA	4

本申请所述肿瘤优选包括胰腺癌。

本申请还提供了一种提高TMED8表达量的试剂在制备治疗疾病的产品中的应用。

本申请实施例中，通过建立过表达TMED8的胰腺癌稳转细胞系，利用qRT-PCR、Western Blot、细胞划痕、CCK8、Transwell、流式检测、裸鼠皮下成瘤等体内外实验，探究了TMED8对胰腺癌细胞生物学行为的影响；发现上调TMED8基因表达后，明显抑制了胰腺癌细胞的迁移和增殖能力，并促进了胰腺癌细胞的凋亡；本申请还发现TMED8基因与MAPK信号通路相关。因此TMED8可作为胰腺癌基因治疗的有效靶点。

本申请所述试剂包括优选以下至少一种：TMED8的激动剂、TMED8的类似物、过表达TMED8的试剂。

本申请所述过表达TMED8的方法优选包括构建TMED8过表达质粒pLV3-CMV-TMED8(human)-3×FLAG-EF1a-CopGFP-Puro，质粒序列如SEQ ID No.5所示。

本申请还提供了一种治疗肿瘤的药物，包括提高内源TMED8表达量的试剂或外源TMED8。

本申请所述提高内源TMED8表达量的试剂优选与上述过表达TMED8的试剂相同，在此不再赘述。本申请所述外源TMED8优选与上述的TMED8的激动剂、TMED8的类似物相同，在此不再赘述。本申请所述治疗优选包括以下至少一种：抑制肿瘤细胞迁移、抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、抑制MAPK

信号通路激活。

为了进一步说明本申请，下面结合实施例对本申请提供的 TMED8 基因在制备胰腺癌药物及其诊断试剂盒中的应用进行详细地描述，但不能将它们理解为对本申请保护范围的限定。

本申请实施例中所用的试剂和仪器如非特殊说明，均为本领域的常见试剂盒仪器，可购自试剂商店：

1、本申请实施例中的主要试剂：

IHC 检测试剂盒（Servicebio，中国）；4%多聚甲醛固定溶液（Servicebio，中国）；PBS 缓冲液（Servicebio，中国）；牛血清白蛋白 BSA 粉末（Solarbio Life Sciences，中国）；TritonX-100（Solarbio Life Sciences，中国）；二甲苯（国药集团，中国）；苏木素染色液（Byotime，中国）；苏木素分化液（Byotime，中国）；无水乙醇（国药集团，中国）；柠檬酸钠抗原修复液（Beyotime，中国）；兔来源抗 TMED8 抗体（Invitrogen，美国）；兔来源抗 Ki67（Absin，中国）；HRP 标记山羊抗兔二抗（Abcam，美国）；95%乙醇（国药集团，中国）；DMEM 基础培养基（Cytiva，中国）；IMDM 基础培养基（Cytiva，中国）；RPMI 基础培养基（Cytiva，中国）；PBS 基础缓冲液（Servicebio，中国）；胎牛血清（Gibco，美国）；无血清细胞冻存液（新赛美，中国）；含 EDTA 的胰蛋白酶消化液（新赛美，中国）；青霉素-链霉素溶液（新赛美，中国）；盐酸四环素溶液（上海生工，中国）；嘌呤霉素（Sangon，美国）；细胞培养皿（Nest，中国）；Lipofectamine 2000（Invitrogen，美国）；6 孔板、96 孔板、24 孔板（Nest，中国）；细胞培养小室 8μm 透明 PET 膜（BD Falcon，美国）；1.5mL、4mL、10mL 离心管、细胞冻存管（Biosharp，美国）；Trizol（诺维赞，中国）；细胞刮（Nest，中国）；DEPC 水（上海生工，中国）；LC 八联管（Roche，瑞士）；无酶枪头、离心管（Biosharp，中国）；无水乙醇（国药集团，中国）；异丙醇（国药集团，中国）；三氯甲烷/氯仿（国药集团，中国）；（1）RIPA 强效裂解液（Byotime，中国）；蛋白酶抑制剂 CM（Amresco，美国）；磷酸酶抑制剂 PI（Amresco，美国）；BCA 蛋白分析试剂盒（Byotime，中国）；蛋白上样缓冲液 4×Loading Buffer（诺维赞，中国）；Marker 标准蛋白（诺维赞，中国）；PVDF 膜（Sigma，美国）；TEMED 四甲基乙二胺（Sigma，美国）；0×电泳液预制粉（Servicebio，武汉）；10×转膜液预制粉（Servicebio，武汉）；10×TBST 预制粉（Servicebio，武汉）；氯化钠（NaCl）（国药集团，中国）；异丙醇（国

药集团，中国）；过硫酸铵（AP）（Sigma，美国）；甘氨酸（Glycine）（国药集团，中国）；十二烷基硫酸钠（SDS）（国药集团，中国）；三羟甲基氨基甲烷（Tris）（国药集团，中国）；甲醇（国药集团，中国）；脱脂奶粉（伊利乳业，中国）；超敏 ECL 化学发光试剂盒（新赛美，中国）；30%聚丙烯酰胺溶液（Servicebio，中国）；吐温（国药集团，中国）；鼠抗人 GAPDH 抗体（Proteintech，中国）；兔抗人 TMED8 抗体（Invitrogen，美国）；兔抗人 ERK1/2 抗体（CST，美国）；兔抗人 ERK 磷酸化抗体（CST，美国）；兔抗人 P38 抗体（CST，美国）；兔抗人 P38 磷酸化抗体（CST，美国）；兔抗人 JNK 抗体（CST，美国）；兔抗人 JNK 磷酸化抗体（CST，美国）；兔抗人 Casepase3 抗体（Santa，日本）；兔抗人 CD63 抗体（Abcam，美国）；兔抗人 CD81 抗体（Abcam，美国）；兔抗人 CD9 抗体（Abcam，美国）；鼠抗人 Ki-67 抗体（武汉三鹰，中国）；HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体（Invitrogen，美国）；HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体（Invitrogen，美国）；CCK-8 试剂盒（Byotime，中国）；细胞周期分析试剂盒（福麦斯生物，中国）；细胞凋亡检测试剂盒：AnnexinV-PE/7-AAD 双染（凯基生物，中国）；结晶紫染液（Byotime，中国）。

2、本申请实施例中使用的主要仪器:

组织芯片系统（UT06，韩国 Unitma 公司）；倒置显微镜（Leica，德国）；化学发光凝胶成像系统（伯乐，美国）；全自动酶标仪（伯乐，美国）；电泳系统（伯乐，美国）；细胞培养箱（赛默飞，美国）。

实施例 1

2020-2023 年间，从南通大学附属医院临床生物库获得了 79 例福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）的胰腺癌组织样本，包括癌和癌旁组织。没有癌症患者接受任何治疗，包括放射疗法，化学疗法或免疫疗法，临床病例资料详细完整。该研究方案 已得到中国南通大学附属医院人类研究伦理委员会的批准。

1、组织芯片的制作:

（1）根据 HE 切片的镜下观察结果，对蜡块中有代表性的癌巢区域进行标记。

（2）石蜡与蜂蜡 1：1 混合，制作成 TMA 空白受体蜡块。在蜡块上设计 10×7 点组织陈列，然后用组织芯片仪打孔制成 TMA 空白蜡块。

（3）将供体蜡块在标记的点上选取最有代表性的癌巢区域，采集直径 2mm 的组织块，每例各取 1 个芯。

（4）将取好的组织芯转移到受体蜡块的孔中，每个组织芯之间间隔一定的距离，并取相应癌旁组织做对照。

（5）组织阵列块放入55℃的温箱中加热融合10分钟，在蜡块快融化之前取出放至室温冷却，使受体蜡块与供体组织融为一体。

（6）切片前，将组织芯片置于4℃条件下预冷4小时左右，随后用全自动组织切片机对组织阵列块进行修正，速度为20mm/转，修到全部组织完整为止。

（7）用切片机对组织阵列块进行切片，将连续切片分别漂在凉水中，使其自然展开，再将切片转移至45℃的温水中展片2分钟左右，待展开后将其贴在经过防脱片处理的载玻片上晾干。

（8）将切片置于60℃的高温烘箱中中烤片3分钟，58℃继续烤片18h。

（9）将做好的组织芯片保存于切片盒，置于-20℃保存备用。

2、免疫组化染色:

（1）首先将组织芯片放于60℃恒温烘箱中烘烤约40min至石蜡熔化;

（2）立即将芯片放入二甲苯I，二甲苯II，100％乙醇I和100％乙醇II中，各浸泡5分钟，接着再依次放入95％乙醇，90％乙醇，80％乙醇和70％乙醇中，各浸泡2分钟，再用清水冲洗;

（3）提前在免疫组化盒中放入抗原修复液，并通过水浴法，预热到95℃，然后将芯片放入容器中，接着95℃处理20分钟进行抗原修复，然后自然冷却至室温，再用PBS冲洗3 次，每次5分钟;

（4）然后用免疫组化笔在芯片上的组织周围画上边界线，接着在圈内部滴满3％ H_2O_2，孵育10min，然后用PBS洗3次，每次5分钟;

（5）滴加一抗（兔抗人TMED8抗体），4℃孵育过夜;

（6）在室温下复温1小时，去除一抗，PBS冲洗3次，每次5分钟，滴加聚合物增强剂，室温孵育20min; 然后用PBS洗3次，每次5分钟;

（7）滴加二抗（酶标抗小鼠/兔IgG聚合物），室温孵育30min，然后用PBS洗3次，每次5分钟;

（8）滴加新鲜配置的DAB试剂，显色后将芯片放于自来水下冲洗5分钟终止显色;

（9）将芯片放于苏木素染色2分钟，并立即用流水缓慢冲洗，然后放入0.5％HCl乙醇溶液中，浸泡2分钟，最后流水冲洗15分钟;

（10）把芯片依次在80％乙醇，90％乙醇，95％乙醇，100％乙醇I，100％

乙醇 II，二甲苯中浸泡 1 分钟，并在通风橱中自然风干；

（11）最后用中性树胶封片。

3、结果判断:

根据组织内细胞的着色程度，可将阳性强度分为 3 级，无阳性着色则为 0 级（阴性），淡黄色为 1 级（弱阳性），棕黄色为 2 级（中阳性），棕褐色为 3 级（强阳性）；细胞阳性比率=阳性细胞数/细胞总数，可分为 4 级，0~4 级的比率依次为为 0~5%，6%~25%，26%~50%，51%~75%和>75%。芯片结果由 3 位病理科专家根据进行独立阅片给予评分后，按评分的四分位数分为“-，+，++，+++”四组进行统计与分析。

79 例胰腺癌肿瘤和癌旁组织切片标本行免疫组化染色后结果如图 1 所示，TMED8 蛋白阳性主表达于癌组织的肿瘤细胞胞质和癌组织间质中，呈棕黄色，而大部分癌旁组织低表达或无表达。统计结果显示 TMED8 在胰腺癌组织芯片中确为高表达*$P < 0.05$。

并选取 8 对胰腺癌患者的癌和癌旁组织进行 WB 验证，结果如图 2 所示，与上述一致。

实施例 2

1、细胞转染:

（1）质粒的转化与抽提：取出于-20℃冰箱保存的 TMED8 过表达质粒 pLV3-CMV-TMED8(human)-3×FLAG-EF1a-CopGFP-Puro 的质粒干粉，加入 40μL 的 DEPC 水进行溶解，同时将电热恒温水浴锅打开升至 42℃，并将储存于-80℃超低温冰箱中的 DH5α感受态，置于冰上融化，当感受态融化的即刻进行转化实验操作;

将 TMED8 过表达质粒（图 16）与融化的感受态按 1:3 的体积比混合，轻弹管壁轻吹 2~3 下混匀，冰上静置，计时 25 分钟后立即放入 42℃水浴锅中精确计时 45 秒进行孵育，随即立刻转移至冰中冰浴 3 分钟，将转化好的质粒加入装有 40μL 无抗生素 LB 液培的摇菌管中，使用恒温摇床，在 37℃条件下，以 200rpm 转速预摇 1 小时，预摇结束再添加 4mL 含 50μg/mL 浓度的氨苄霉素的液培，37℃条件下，以 250rpm 转速摇菌过夜，具体时间控制在 14~16 小时范围内，以免长出杂菌；用 Axygen 质粒抽提试剂盒，根据标准流程对菌液进行抽提，获取的质粒浓度进行测量和记录，可将剩余菌液与甘油混合保种，于-80℃条件下储存。

（2）建立稳转细胞株：将适量的野生型待转染细胞（PANC-1 和 BXPC-3

胰腺癌细胞系）种于六孔板内，控制在 6 小时贴壁后密度达 60%~70%为宜，将 80μL 不含血清和双抗的 1640 基础培养基与 3μg 质粒进行融合，轻弹管壁，混匀试剂，不可使用移液枪吹打，避免 DNA 断裂，室温静置 5 分钟后再加入 3μL 的 Lipofectamine 2000 转染试剂，室温静置 20~30 分钟后，加入 6 孔板的完全培养基中，用移液枪轻柔吹打混匀，放入 37℃，5%二氧化碳条件的细胞培养箱中培养 24~48 小时，第一个 24 小时观察一次，之后每 12 小时观察一次细胞状态，一旦出现转染试剂毒性导致的细胞状态变差则即刻换液；待转染稳定后于荧光显微镜下，利用质粒自带的荧光标签观察细胞转染效率，转染成功后使用对应抗性，一般使用嘌呤霉素对未转染成功的野生型细胞进行筛杀，筛选出转染成功的细胞，建立稳转细胞株，传代保种后收取细胞总蛋白或总 RNA 进行 WB 或 qRT-PCR 实验，验证细胞的过表达效率，结果如图 4 所示。

2、CCK-8 细胞增殖活力检测

使用中皿预培养待测的过表达稳转细胞及野生型对照细胞株，待皿内细胞融合度达 90%时消化重悬，注意皿内细胞量须控制得当，拥挤状态下生长的细胞可能触发其自身的凋亡，影响后续结果的准确性。对细胞进行计数，根据细胞生长特性，以每孔 5000~10000 个的数量种于 96 孔板中，每组均设置 5~6 个重复孔，以减少操作手法带来的实验误差；注意对照细胞和处理组细胞数量必须相等以达到控制变量的目的 6~12 小时细胞贴壁后开始细胞增殖活力的检测，因细胞增殖活力需要根据细胞倍增周期连续检测 5 天，所以应在每日同一时间点进行实验操作和结果检测。

CCK8 试剂与对应细胞的基础培养基按 1:9 的体积比进行混合得到新鲜工作液，弃去原孔中的培养基，1×PBS 缓冲液清洗后，按每孔 100μL 加入 10%浓度的 CCK8 工作液，37℃培养箱中静置反应 1~2 小时后，使用酶标仪在 460nm 处对其进行吸光度的测量，记录数据，待全部检测完成后进行数据的处理和对比分析。

结果如图 6 所示，过表达 TMED8 抑制了胰腺癌细胞的增殖能力。

3、细胞划痕愈合实验

将全新的无菌包装六孔板置于超净工作台中倒扣，用直尺和马克笔在孔板底部划九宫格坐标线，便于后期划痕实验显微镜下拍照的定位。将适量的野生型和过表达细胞株种于六孔板内，对照组和过表达组各设 3 个重复孔，根据其生长周期，使用新鲜的完全营养培养基培养至 90%密度时，用酒精消杀过的直

尺和 1mL 无菌蓝枪头进行细胞划痕，过程中注意手法垂直和力度均匀，各重复孔内划痕的大小应控制到基本相等，以减少操作带来的结果误差，更好的控制实验变量，每孔内也各划 3 条划痕线，确保实验结果的重复性；划痕完成后加入 1×PBS 缓冲液，将划出的漂浮细胞和细胞碎片清洗干净，力度应轻柔，以防划痕边界处细胞被冲走；更换低血清浓度的完全培养基，维持细胞生长的同时控制生长速度便于后续观察，记下时间点作为实验开始的 0h，并拍照，每隔 24h 一次，镜下观察细胞划痕的愈合情况并拍照，72h 后整合分析实验最终结果。

结果如图 5 和图 6 所示，过表达 TMED8 抑制了胰腺癌细胞的迁移能力。

4、细胞集落形成实验

使用含 EDTA 的胰蛋白酶将待测细胞消化成单个状态，收集细胞悬液，对细胞进行计数，按每孔 500 个的数量，将对照组和过表达组的细胞分别种于 6 孔板中，每组设 3 个重复孔，每孔均加入 2mL 新鲜完培培养，置于细胞培养箱中，37℃，5%二氧化碳条件下培养 5~7 天，因细胞初始数量较少，集落形成期间无需换液，5~7 天后将培养板取出，镜下观察集落形成状态，用 1×PBS 洗净弃净后每孔加入 1mL 的 4%多聚甲醛固定液固定 2 小时，PBS 冲洗 3 次再加入结晶紫染液染色 1 小时，弃去工作液用双蒸水冲洗晾干后进行拍照，观察两组细胞间集落形成的差异。

结果如图 7 和图 8 所示，过表达 TMED8 抑制了胰腺癌细胞集落的形成，即抑制了胰腺癌细胞的增殖能力。

5、Transwell 细胞迁移实验

对待测细胞进行消化重悬和计数，留旁待用；取出 24 孔细胞培养板和配套型号的带有 8μm 透明 PET 膜的小室，将小室置于 24 孔板培养孔中，小室槽外即培养孔内加入 600μL 含 5%浓度胎牛血清的血清的完全营养培养基；计数并吸取 30000 个细胞，用 200μL 不含胎牛血清的基础营养培养基充分重悬，移液枪转移至小室内槽，根据细胞生长周期培养 24~72 小时不等，使细胞充分穿过生物膜，观察细胞的迁移能力；取出小室，吸弃内槽培养基，放在干净的 24 孔板孔内，浸泡 4%多聚甲醛固定液固定 2 小时后用双蒸水轻轻漂洗，再加入结晶紫染色液染色 1 小时，染色后双蒸水清洗，若染色过深影响结果观察，则可使用甲醇进行脱色漂洗，使膜空白处的结晶紫洗脱；染色完成后将小室倒扣，室温晾干，使用普通光学显微镜观察，并选取合适的视野进行拍照。

结果如图 5 和图 6 所示，过表达 TMED8 抑制了胰腺癌细胞的迁移能力。

6、流式细胞术

细胞凋亡的流式检测：选用 PE 荧光素标记的 Annexin V 染料和 7-AAD 染料对待测细胞进行双染，检测细胞凋亡的情况；首先使用不含 EDTA 的胰酶将细胞消化并收集，用 1×PBS 细胞清洗液清洗 2~3 次，对细胞进行计数，每个样本一般控制在 10000~50000 个细胞为宜，无需固定，以防后续荧光的淬灭；将收集到的洁净细胞沉淀用 100μL 缓冲液进行重悬，每 100μL 悬液中分别加入 1μL 的 Annexin V 染料和 5μL 的 7-AAD 染料，轻轻混匀后在避光和室温状态下进行赋予染色，反应 5 到 10 分钟后再加入 400μL 的缓冲液混匀，转移至流式专业试管中，在 1 小时内完成上机检测；PE 为橙红色荧光，其激发波长 Ex=488 nm，发射波长 Em=578 nm，建议使用 FL2 通道；7-AAD 染料为红色荧光，其激发波长为 Ex=546 nm；发射波长为 Em=647 nm，建议使用 FL3 通道进行检测，后续数据分析过程中需要进行荧光补偿调节。

结果如图 9 所示，过表达 TMED8 促进了胰腺癌细胞的凋亡。

7、裸鼠皮下成瘤

选择 4 周龄的雄性 BALB/c 免疫缺陷裸鼠进行皮下成瘤实验，实验前对每只裸鼠进行称重和记录，将 PANC-1 对照细胞和过表达细胞分别用胰酶消化后进行细胞计数，每只裸鼠每种细胞需注射约 2×10^7 个为宜，用无菌的 1×PBS 溶液进行重悬，注意细胞悬液进行动物实验前须置于冰上以免细胞损伤死亡；在同一只裸鼠上肢左右腋下分别注射等量的过表达 TMED8 的 PANC-1 细胞和 PANC-1 对照细胞；此后每天都需要观察老鼠状态，待 4~6 周成瘤后对裸鼠进行处死和解剖，取出瘤体进行称重和体积测量后进行固定以供后续免疫组化实验使用；注意在同一裸鼠进行对照实验便于控制老鼠异质性带来的干扰因素，更直观的判断出 TMED8 对肿瘤体内生长的影响。

结果如图 10 和图 11 所示，TMED8 抑制了胰腺癌细胞在裸鼠皮下的成瘤能力，即抑制了胰腺癌细胞在动物体内的增殖能力。

8、Western Blot

（1）细胞和组织总蛋白的提取：整个过程应将需要获取总蛋白的细胞样本置于冰上操作，弃去皿中培养基，并用 1×PBS 溶液清洗，加入 0.2 到 0.4mL 的 RIPA 强效裂解液，裂解约半小时后，用细胞刮辅助裂解刮取后，转移至 1.5mL 离心管，并放入 4℃环境下的电动轮转仪上轮转过夜，使蛋白充分裂解后，以 7500rpm 转速离心 15 分钟，吸上清弃细胞碎片沉淀，加入上清总体积 1/4 量的

样品缓冲液（Loading Buffer），煮沸至少 30 分钟，确保蛋白充分加热稳定变性，冷却至室温后分装至-20℃或-80℃冰箱中保存，以免蛋白反复冻融而降解。

（2）SDS-PAGE 胶的制备：将胶板洗净晾干并置于配胶架上夹紧，加入双蒸水验漏，验漏通过后再竖直晾干，按不同浓度分离胶的成分比例进行配制（见表 2），将制备好的分离胶平缓均匀的注入预先架好的胶板中，注意过程中避免气泡的产生，异丙醇压胶静置约 40 分钟，轻晃胶板，确认胶体凝固后到处异丙醇并用双蒸水轻轻冲洗晾干；再加入配置好的上层浓缩胶并迅速垂直插上梳子（见表 3），此步骤尤其需要避免气泡的产生，否则易出现上样孔变形和漏样。

表 2 制备 10mL 不同浓度 SDS-PAGE 分离胶组分（mL）

成分	6%	8%	10%	12%	15%
双蒸水	4.0	3.3	4.0	2.0	1.0
30%Acr-Bis	2.0	2.7	5.0	4.0	5.0
1.5M Tris，pH8.8	4.8	3.8	5.7	3.8	3.8
10%SDS	0.1	0.1	0.15	0.1	0.1
AP	0.1	0.1	0.15	0.1	0.1
TEMED	0.008	0.004	0.006	0.004	0.06

表 3 制备 8mL 上层浓缩胶的配比方案

成分	体积（mL）
双蒸水	5.5
30%Acr-Bis	1.3
1M Tris，pH6.8	1.0
10%SDS	0.08
AP	0.08
TEMED	0.008

9、TMED8 可能通过 MAPK 通路调节 PAAD 肿瘤细胞的生物功能从而对胰腺癌的发生发展产生影响

选用 PANC-1 对照及过表达细胞系（每组均有 3 个重复样本）进行转录组测序，通过数据分析获取了 248 个差异基因，其中上调的 103 个，下调的 145 个，分别用热图和火山图进行可视化，并对它们进行了功能注释和 KEGG 富集分析，选取具有显著相关性的 MAPK 信号通路进行下一步研究，对关键分子 ERK、JNK、P38 及其磷酸化的表达水平进行 WB 验证。

结果如图 10 至图 15 所示，TMED8 抑制了 MAPK 通路的活化。

尽管上述实施例对本申请做出了详尽的描述，但它仅仅是本申请一部分实施例，而不是全部实施例，人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得

其他实施例，这些实施例都属于本申请保护范围。

权 利 要 求 书

1.一种检测 TMED8 表达量的试剂在制备诊断肿瘤的产品中的应用。

2.根据权利要求 1 所述应用，其特征在于，所述检测 TMED8 表达量包括检测 TMED8 的 mRNA 或蛋白质的表达量。

3.根据权利要求 1 或 2 所述应用，其特征在于，所述检测 TMED8 表达量的试剂包括以下至少一种：免疫组化试剂、Western Blot 试剂和实时荧光定量 PCR 试剂。

4.根据权利要求 1 所述应用，所述肿瘤包括胰腺癌。

5.一种诊断肿瘤的试剂盒，其特征在于，包括以下试剂中的至少一种：免疫组化检测 TMED8 蛋白质表达量的试剂、Western Blot 检测 TMED8 蛋白质表达量的试剂、实时荧光定量 PCR 检测 TMED8 基因和/或 mRNA 表达量的引物对。

6.根据权利要求 5 所述试剂盒，其特征在于，所述实时荧光定量 PCR 检测 TMED8 的 mRNA 表达量的引物对的核苷酸序列如 SEQ ID No.1~SEQ ID No.2 所示。

7.根据权利要求 5 或 6 所述试剂盒，其特征在于，在利用实时荧光定量 PCR 检测 TMED8 的 mRNA 表达量时，还包括检测内参基因 18S 的引物，引物序列如 SEQ ID No.3~SEQ ID No.4 所示。

8.一种提高 TMED8 表达量的试剂在制备治疗肿瘤的产品中的应用。

9.根据权利要求 8 所述应用，其特征在于，所述提高 TMED8 表达量的试剂包括以下至少一种：TMED8 的激动剂、TMED8 的类似物、过表达 TMED8 的试剂。

10.根据权利要求 9 所述应用，其特征在于，所述过表达 TMED8 的试剂包括 TMED8 过表达质粒 pLV3-CMV-TMED8(human)-3×FLAG-EF1a-CopGFP-Puro，质粒的核苷酸序列如 SEQ ID No.5 所示。

11.一种治疗肿瘤的药物，其特征在于，包括提高内源 TMED8 表达量的试剂或外源 TMED8。

12.一种治疗肿瘤的方法，其特征在于，包括以下步骤：包括提高内源 TMED8 表达量。

13.根据权利要求 12 所述方法，其特征在于，所述肿瘤包括胰腺癌。

14.根据权利要求 12 或 13 所述方法，其特征在于，所述治疗包括以下至少一种：抑制肿瘤细胞迁移、抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡、抑制 MAPK

信号通路激活。

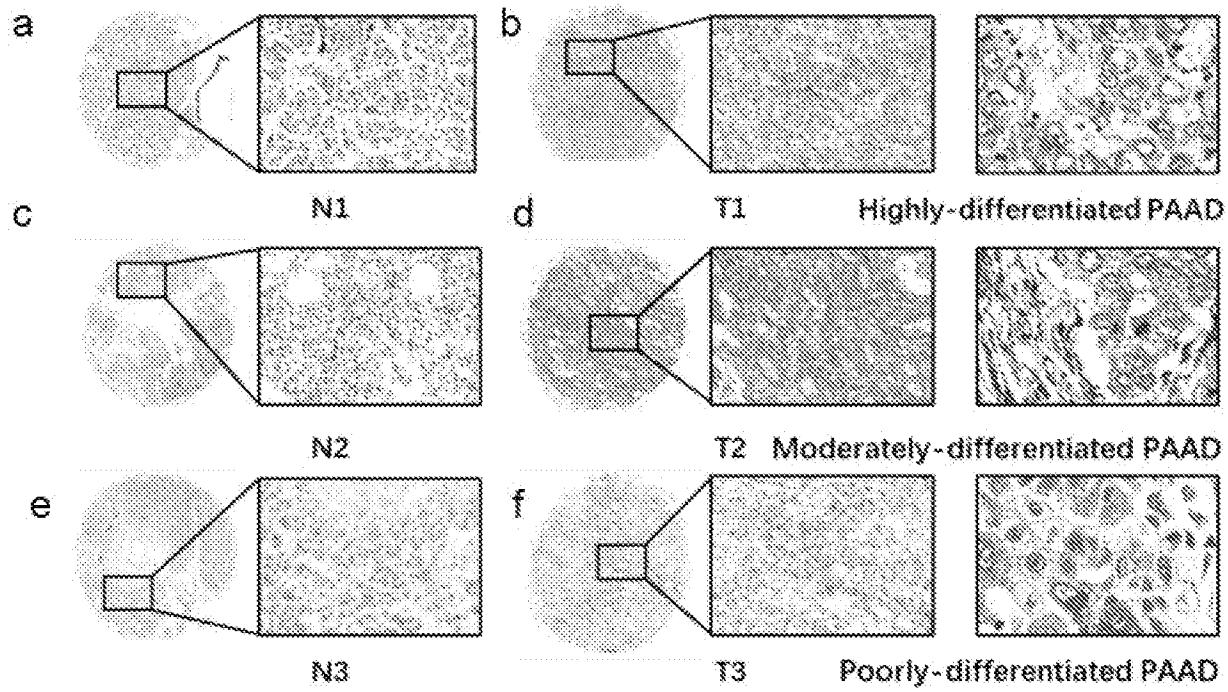

a
b
N1
T1
Highly-differentiated PAAD
c
d
N2
T2
Moderately-differentiated PAAD
e
f
N3
T3
Poorly-differentiated PAAD

图 1

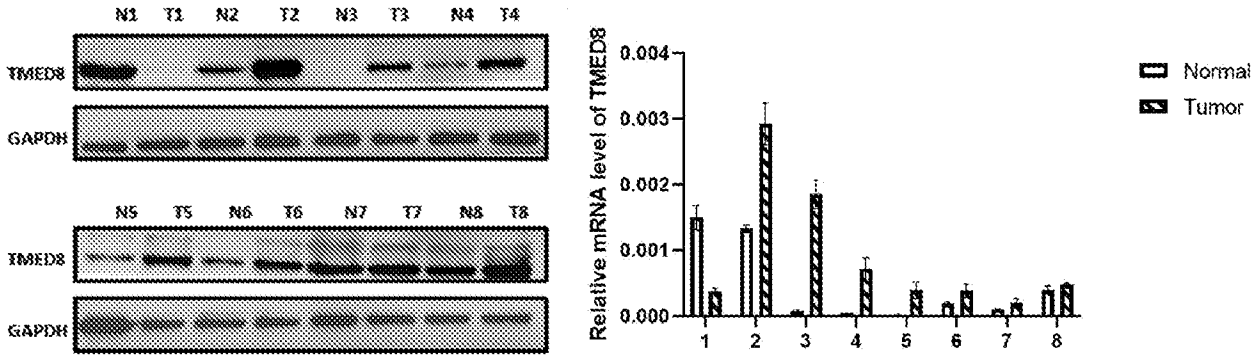

N1 T1 N2 T2 N3 T3 N4 T4
TMED8
GAPDH
N5 T5 N6 T6 N7 T7 N8 T8
TMED8
GAPDH
Relative mRNA level of TMED8
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
1 2 3 4 5 6 7 8
Normal
Tumor

图 2

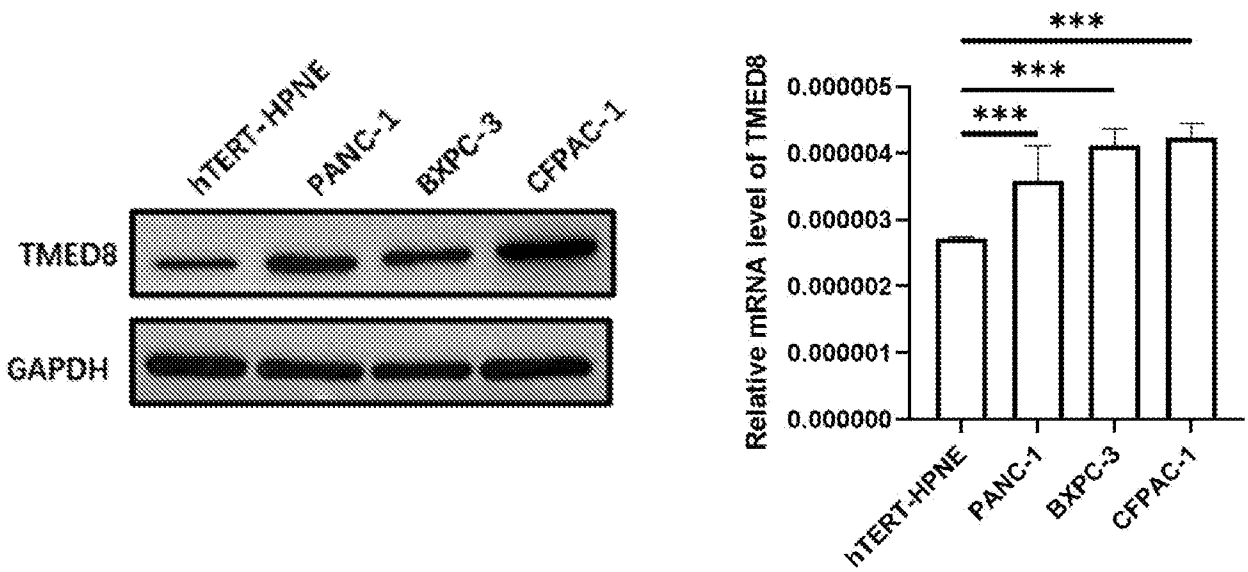

hTERT-HPNE
PANC-1
BXPC-3
CFPAC-1
TMED8
GAPDH
***
***
***
Relative mRNA level of TMED8
0.000005
0.000004
0.000003
0.000002
0.000001
0.000000
hTERT-HPNE
PANC-1
BXPC-3
CFPAC-1

图 3

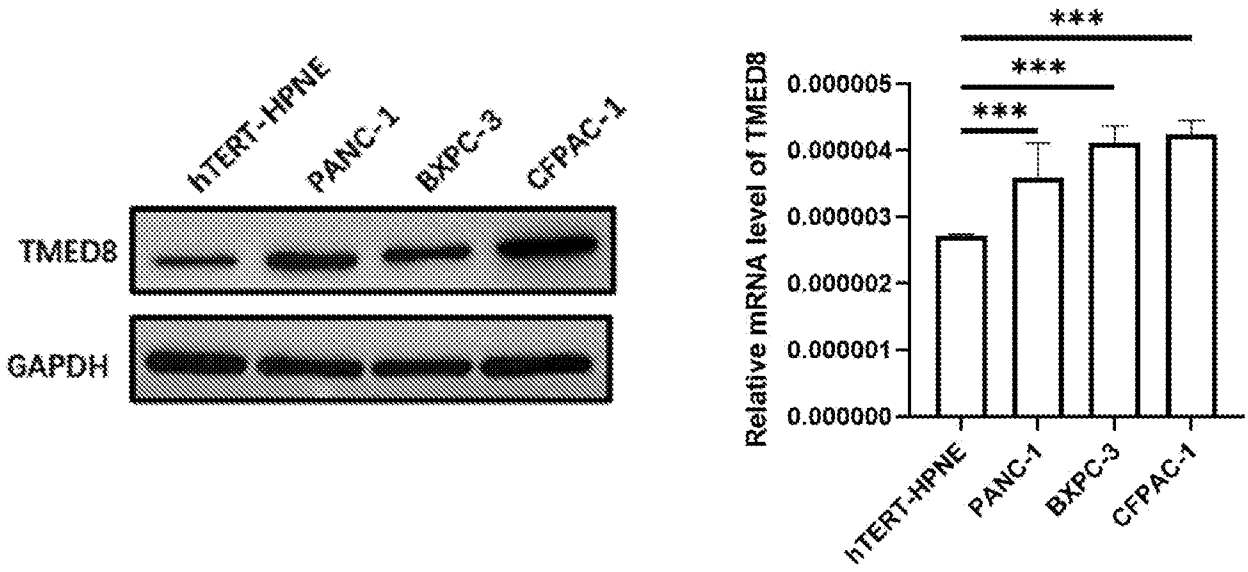

hTERT-HPNE
PANC-1
BXPC-3
CFPAC-1
TMED8
GAPDH
***
***
***
Relative mRNA level of TMED8
0.000005
0.000004
0.000003
0.000002
0.000001
0.000000
hTERT-HPNE
PANC-1
BXPC-3
CFPAC-1

图 4

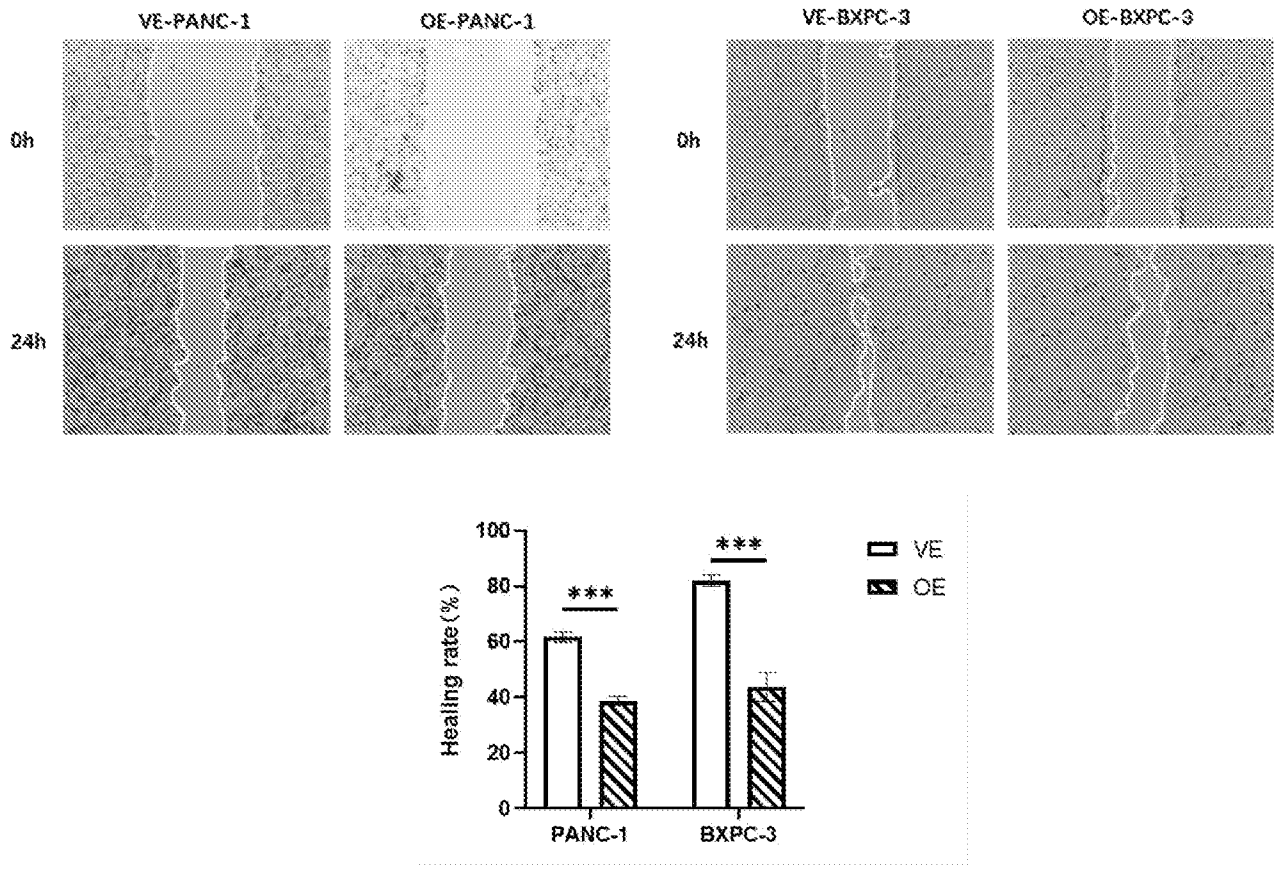

VE-PANC-1
OE-PANC-1
VE-BXPC-3
OE-BXPC-3
0h
24h
0h
24h
Healing rate (%)
100
80
60
40
20
0
***
***
PANC-1
BXPC-3
VE
OE

图 5

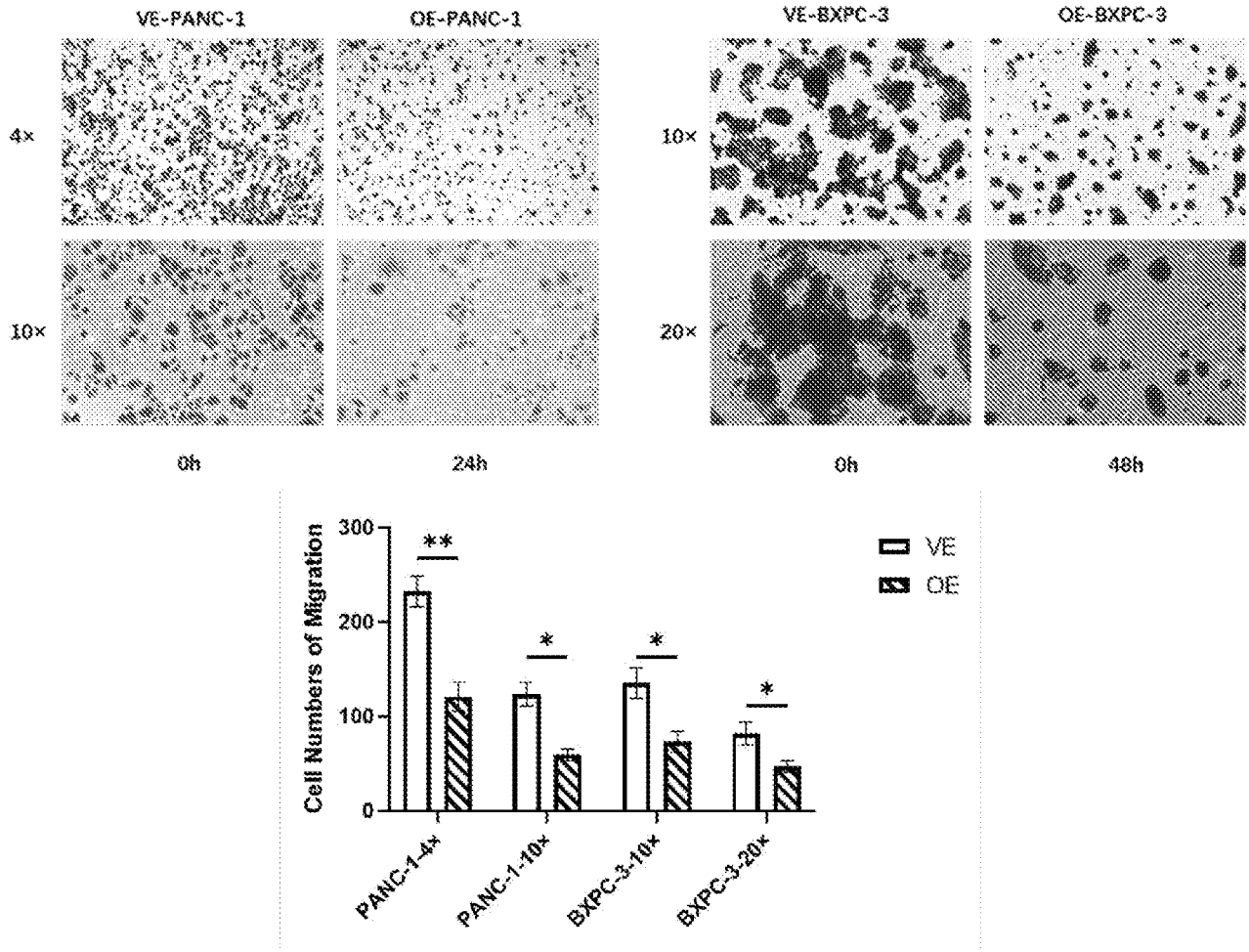

VE-PANC-1
OE-PANC-1
VE-BXPC-3
OE-BXPC-3
4×
10×
10×
20×
0h
24h
0h
48h
Cell Numbers of Migration
300
200
100
0
**
*
*
*
VE
OE
PANC-1-4×
PANC-1-10×
BXPC-3-10×
BXPC-3-20×

图 6

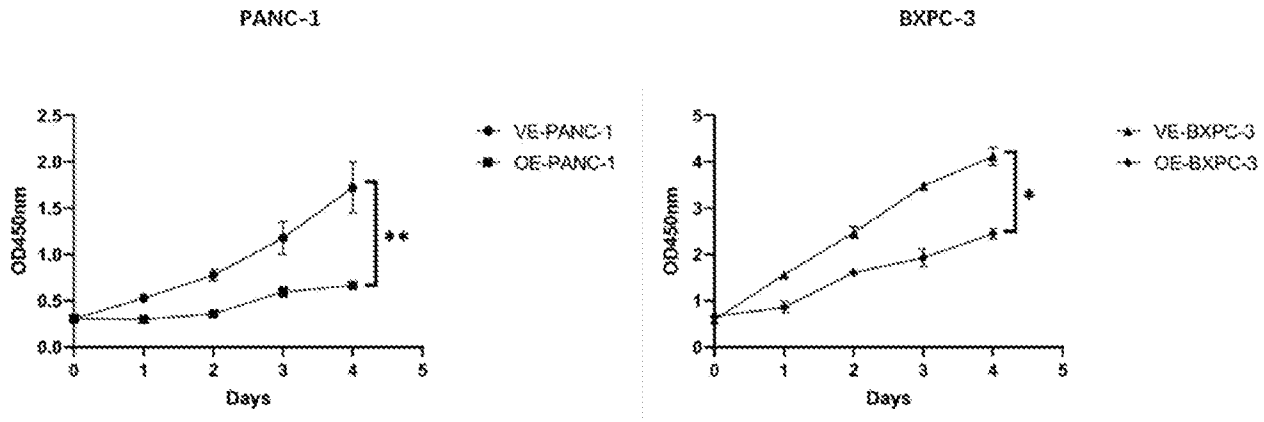

PANC-1
BXPC-3
OD450nm
Days
VE-PANC-1
OE-PANC-1
VE-BXPC-3
OE-BXPC-3
**
*

图 7

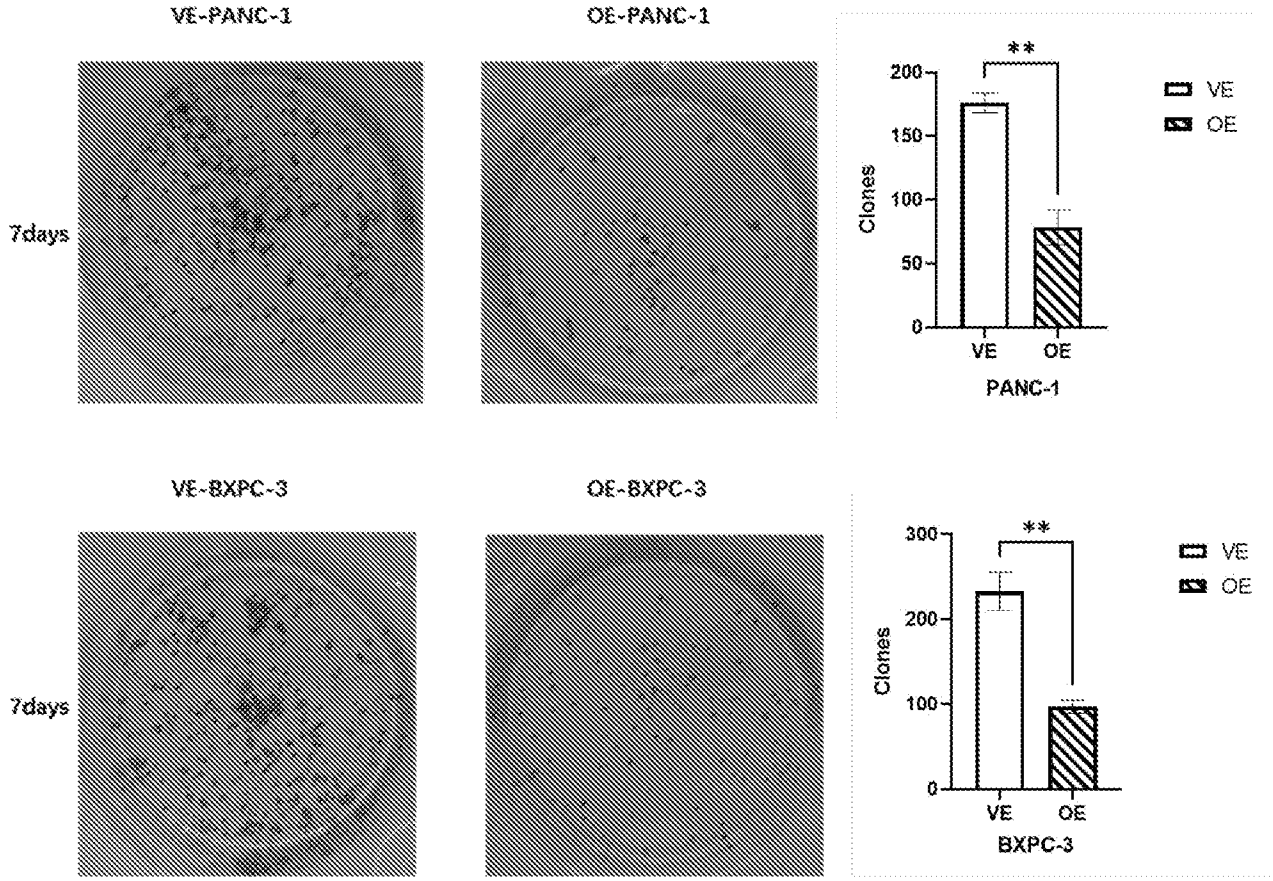

VE-PANC-1
OE-PANC-1
7days
**
200
150
100
50
0
Clones
VE
OE
VE
OE
PANC-1
VE-BXPC-3
OE-BXPC-3
7days
**
300
200
100
0
Clones
VE
OE
VE
OE
BXPC-3

图 8

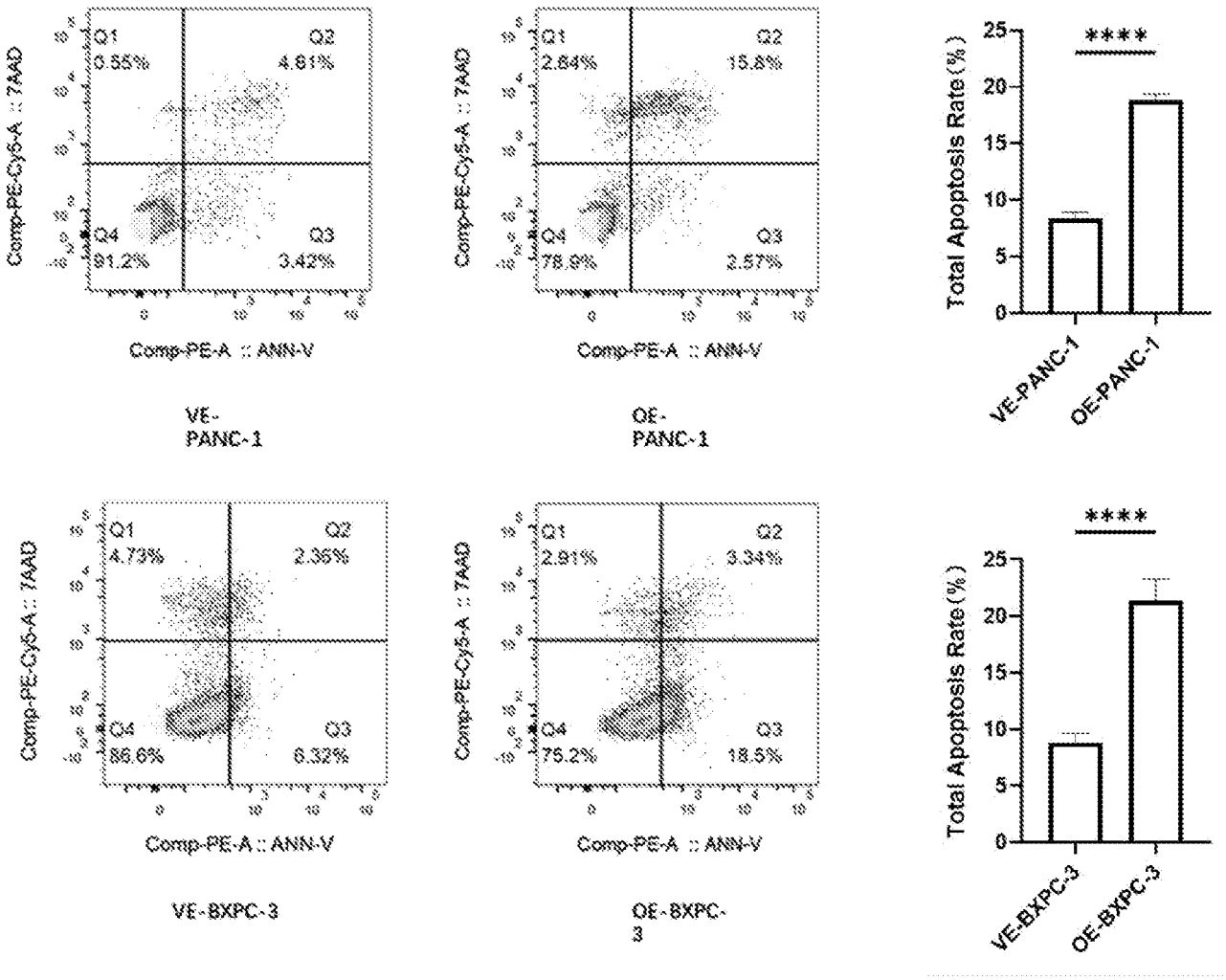

Q1
0.55%
Q2
4.61%
Q4
91.2%
Q3
3.42%
Comp-PE-Cy5-A :: 7AAD
Comp-PE-A :: ANN-V
VE-PANC-1
Q1
2.84%
Q2
15.8%
Q4
78.9%
Q3
2.57%
Comp-PE-Cy5-A :: 7AAD
Comp-PE-A :: ANN-V
OE-PANC-1
Total Apoptosis Rate(%)
****
VE-PANC-1
OE-PANC-1
Q1
4.73%
Q2
2.36%
Q4
86.6%
Q3
6.32%
Comp-PE-Cy5-A :: 7AAD
Comp-PE-A :: ANN-V
VE-BXPC-3
Q1
2.91%
Q2
3.34%
Q4
75.2%
Q3
18.5%
Comp-PE-Cy5-A :: 7AAD
Comp-PE-A :: ANN-V
OE-BXPC-3
Total Apoptosis Rate(%)
****
VE-BXPC-3
OE-BXPC-3

图 9

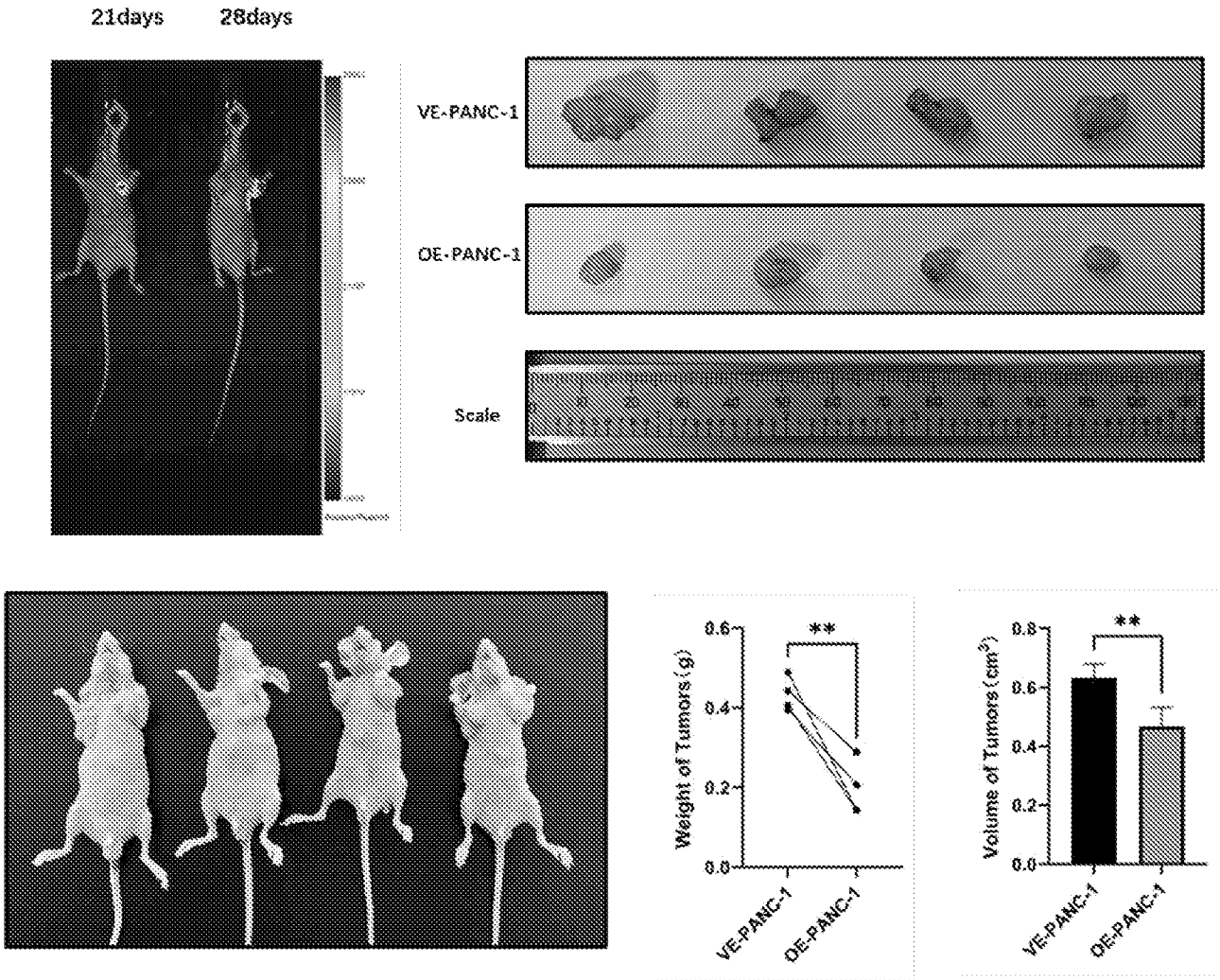

21days
28days
VE-PANC-1
OE-PANC-1
Scale
Weight of Tumors (g)
0.6
0.4
0.2
0.0
**
VE-PANC-1
OE-PANC-1
Volume of Tumors (cm³)
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
VE-PANC-1
OE-PANC-1

图 10

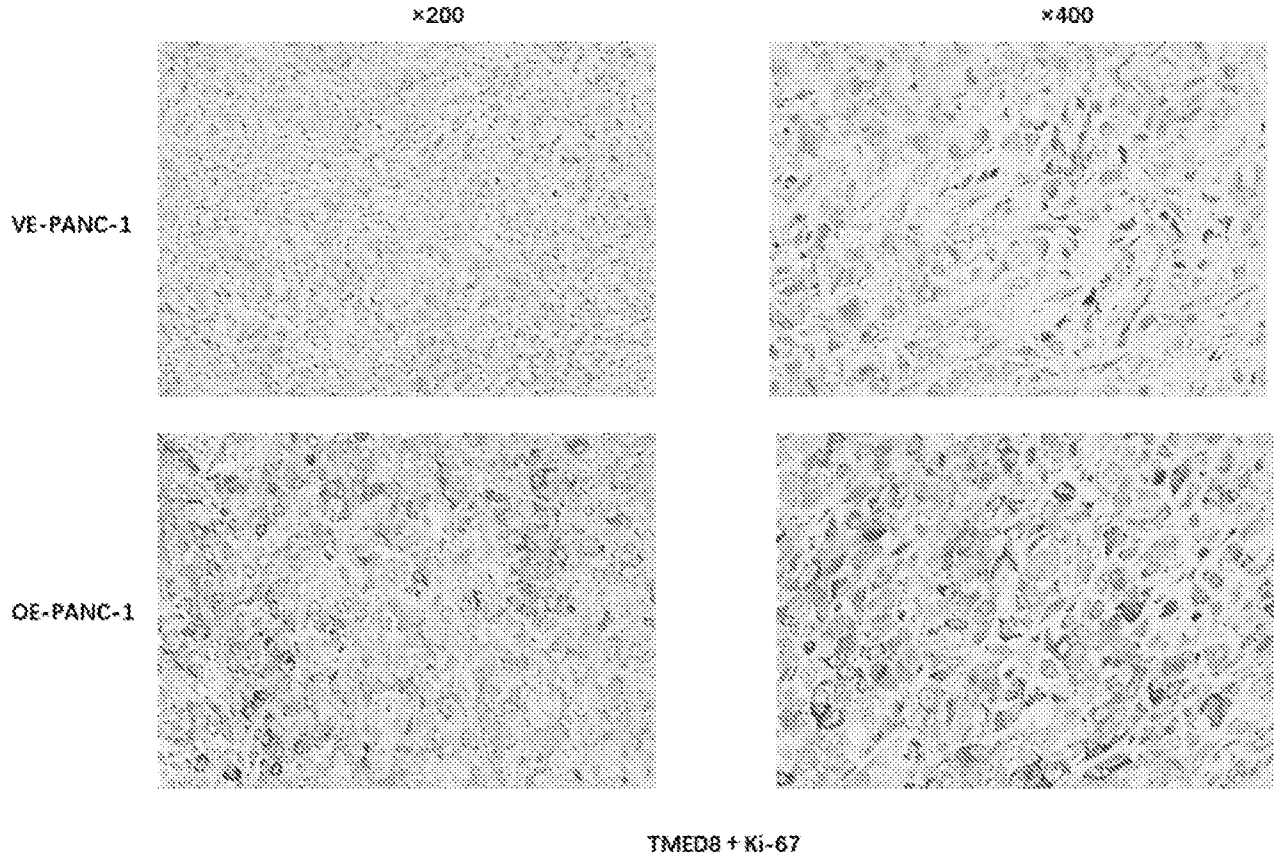


图 11

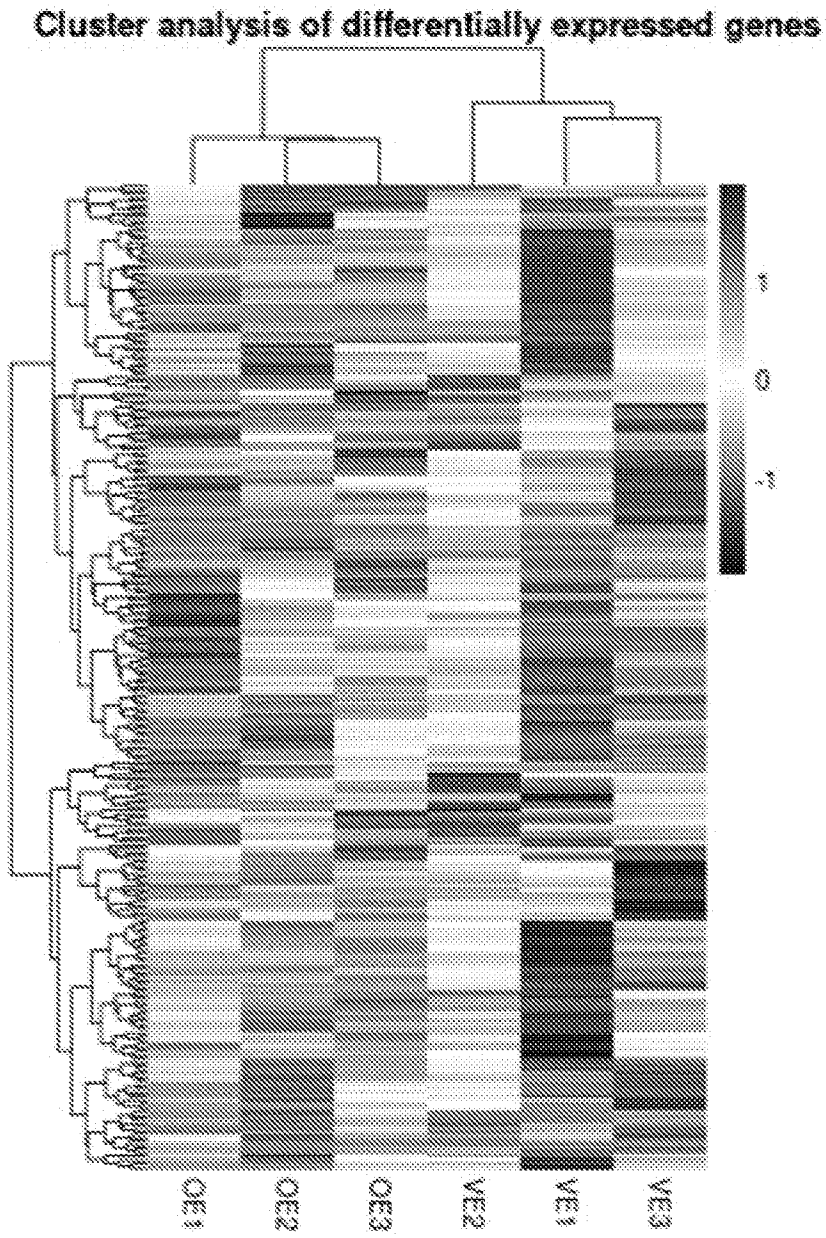

Cluster analysis of differentially expressed genes
1
0
-1
OE1
OE2
OE3
VE2
VE1
VE3

图 12

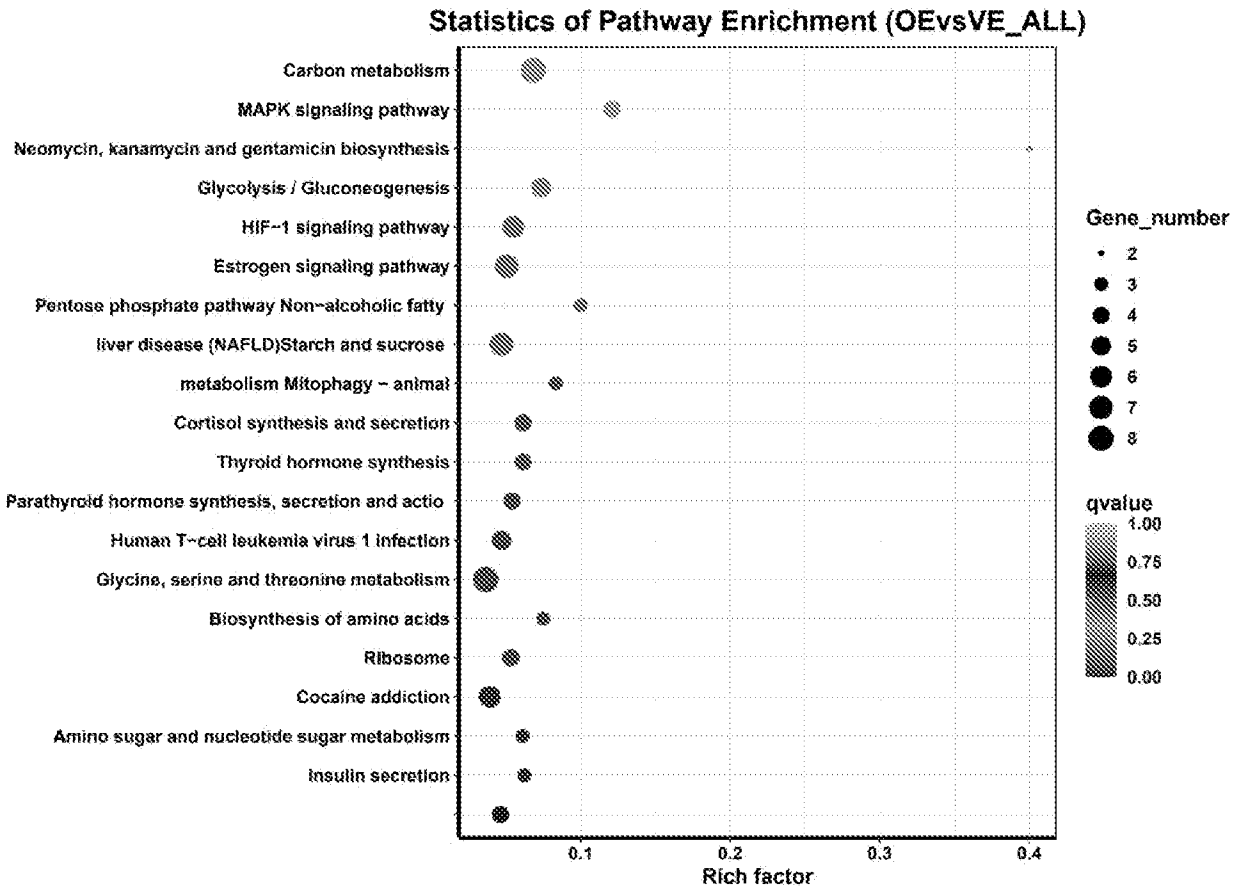

Statistics of Pathway Enrichment (OEvsVE_ALL)
Carbon metabolism
MAPK signaling pathway
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis
Glycolysis / Gluconeogenesis
HIF-1 signaling pathway
Estrogen signaling pathway
Pentose phosphate pathway Non-alcoholic fatty
liver disease (NAFLD)Starch and sucrose
metabolism Mitophagy - animal
Cortisol synthesis and secretion
Thyroid hormone synthesis
Parathyroid hormone synthesis, secretion and actio
Human T-cell leukemia virus 1 infection
Glycine, serine and threonine metabolism
Biosynthesis of amino acids
Ribosome
Cocaine addiction
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism
Insulin secretion
0.1
0.2
0.3
0.4
Rich factor
Gene_number
2
3
4
5
6
7
8
qvalue
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00

图 13

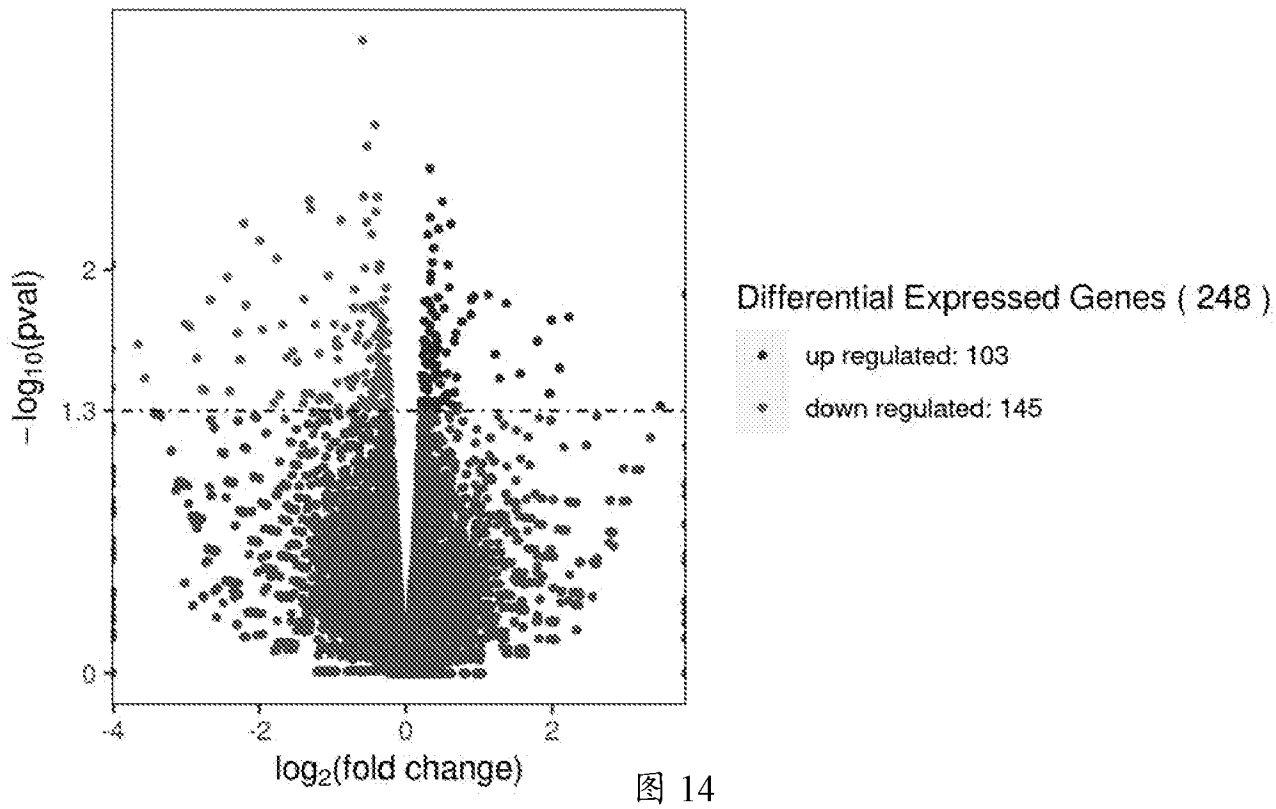

$-\log_{10}$(pval)
2
1.3
0
-4
-2
0
2
$\log_2$(fold change)
Differential Expressed Genes (248)
up regulated: 103
down regulated: 145

图 14

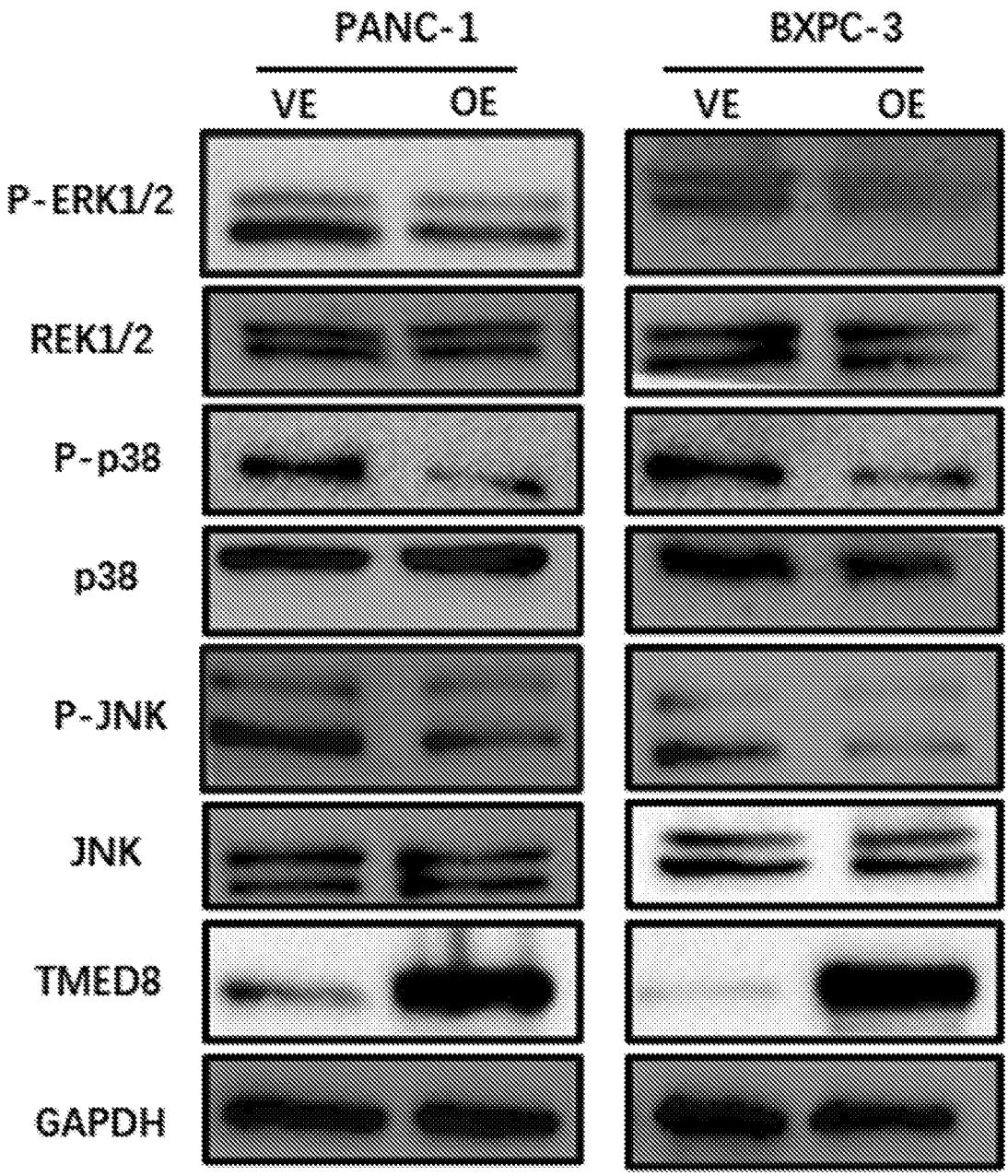
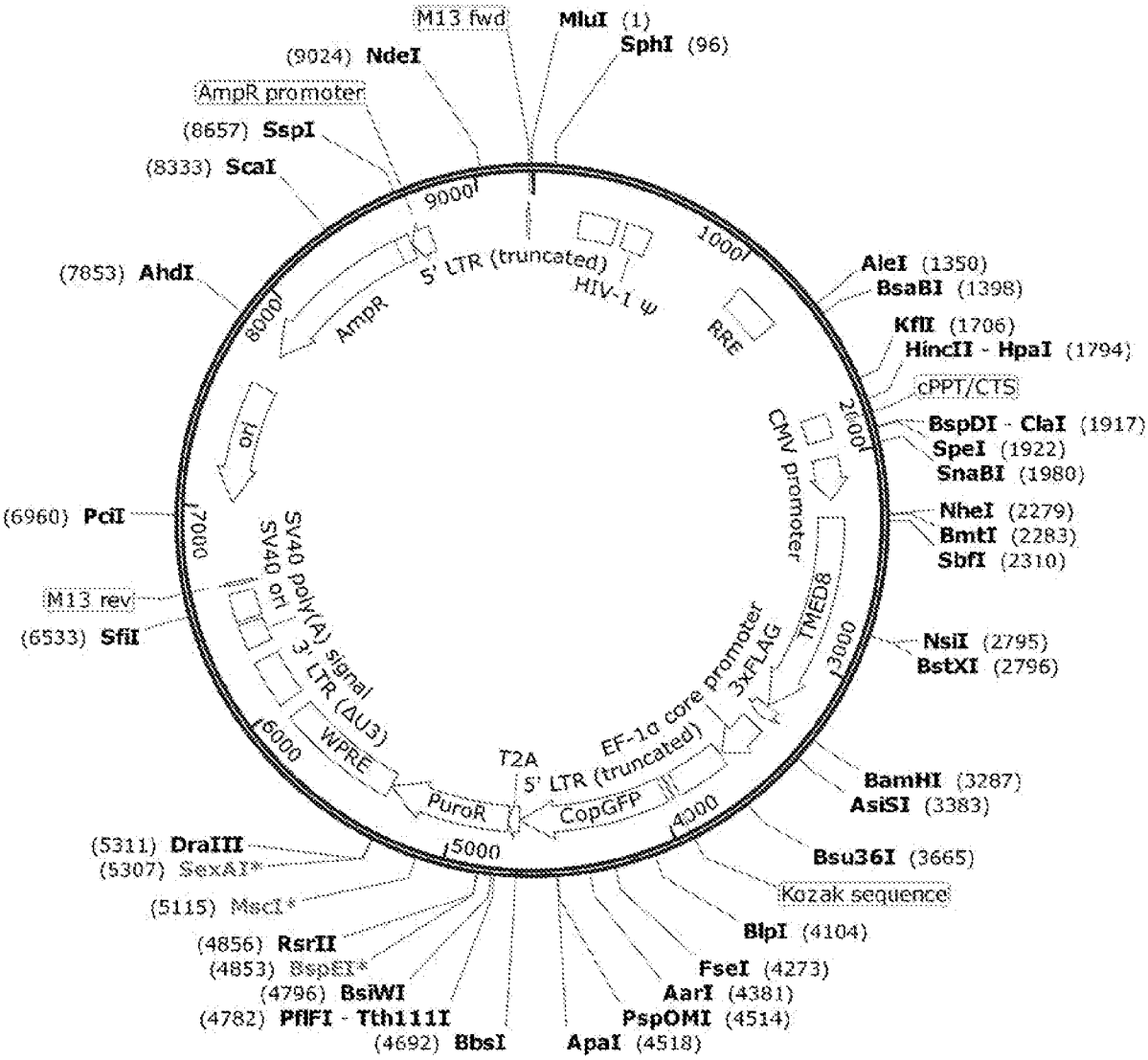

PANC-1
BXPC-3
VE
OE
VE
OE
P-ERK1/2
REK1/2
P-p38
p38
P-JNK
JNK
TMED8
GAPDH

图 15



pLV3-CMV-TMED8（human）-3×FLAG-EF1a-CopGFP-Puro

9244 bp

图 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2024/114759

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/6886(2018.01)i; G01N33/574(2006.01)i; A61K45/00(2006.01)i; A61P35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C12Q,G01N,A61K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CJFD, CNTXT, ENTXT, ENTXTC, STN, PUBMED, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Wiley InterScience, Nature, Science, CNKI, NCBI, 万方, WANFANG: SEQ ID NOs: 1-5, TMED8, pancreatic, cancer, diagnosing tumor, PC, 胰腺癌, 肿瘤, 诊断, MAPK信号通路

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 116769916 A (AFFILIATED HOSPITAL OF NANTONG UNIVERSITY) 19 September 2023 (2023-09-19) claims 1-10	1-14
PX	WO 2023162878 A1 (NIPPON MEDICAL SCHOOL FOUNDATION) 31 August 2023 (2023-08-31) claims 1-15	1-14
X	CN 101541977 A (NOVARTIS AG) 23 September 2009 (2009-09-23) claims 1-7, and description, pages 16-18 and 497-500, and table VIII	1-14
X	US 2014342946 A1 (MONI ABRAHAM KURIAKOSE et al.) 20 November 2014 (2014-11-20) claims 1-7, and description, paragraphs 7-18, and table v	1-7
A	CN 115678995 A (SHANGHAI IPROTEOME BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 03 February 2023 (2023-02-03) claims 1-8	1-14

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 November 2024	**20 November 2024**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 116004810 A (SHENZHEN LUWEI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 25 April 2023 (2023-04-25) claims 1-7	1-14
A	GUO, X.L. et al. "TMED3 Promotes the Development of Malignant Melanoma by Targeting CDCA8 and Regulating PI3K/Akt Pathway" *Cell & Bioscience*, Vol. vol. 13, 29 March 2023 (2023-03-29), Article 65, abstract	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2024/114759

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2024/114759

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **12-14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 12-14 relate to a method for treating tumors, which falls within methods for treatment of diseases as defined in PCT Rule 39.1(iv). However, a search is still performed on the basis of the pharmaceutical use thereof.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2024/114759

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	116769916	A	19 September 2023	None			
WO	2023162878	A1	31 August 2023	JPWO	2023162878	A1	31 August 2023
CN	101541977	A	23 September 2009	JP	2010504530	A	12 February 2010
				AU	2007340265	A1	10 July 2008
				AU	2007340265	B2	26 July 2012
				KR	20090071603	A	01 July 2009
				MX	2009002936	A	01 April 2009
				BRPI	0716944	A2	17 September 2013
				IL	197450	A0	24 December 2009
				US	2010004253	A1	07 January 2010
				RU	2009114745	A	27 October 2010
				CA	2662508	A1	10 July 2008
				JP	2013128487	A	04 July 2013
				WO	2008082730	A2	10 July 2008
				WO	2008082730	A3	08 January 2009
				EP	2074226	A2	01 July 2009
				SG	174826	A1	28 October 2011
US	2014342946	A1	20 November 2014	IN	4915/CHENP/2014	A	18 September 2015
				WO	2013098797	A2	04 July 2013
				WO	2013098797	A3	12 September 2013
CN	115678995	A	03 February 2023	None			
CN	116004810	A	25 April 2023	None			

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2024/114759

A. 主题的分类

C12Q1/6886(2018.01)i；G01N33/574(2006.01)i；A61K45/00(2006.01)i；A61P35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C12Q,G01N,A61K,A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CJFD,CNTXT,ENTXT,ENTXTC,STN,PUBMED,SpringerLink,ISI Web of Knowledge,Elsevier Science Direct,Wiley InterScience,Nature,Science,CNKI,NCBI,万方:SEQ ID NO:1-5,TMED8，pancreatic，cancer，diagnosing tumor，PC，胰腺癌，肿瘤，诊断，MAPK信号通路

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 116769916 A (南通大学附属医院) 2023年9月19日 (2023 - 09 - 19) 权利要求1-10	1-14
PX	WO 2023162878 A1 (学校法人日本医科大学) 2023年8月31日 (2023 - 08 - 31) 权利要求1-15	1-14
X	CN 101541977 A (诺瓦提斯公司) 2009年9月23日 (2009 - 09 - 23) 权利要求1-7，说明书第16-18、497-500页，表VIII	1-14
X	US 2014342946 A1 (MONI ABRAHAM KURIAKOSE等) 2014年11月20日 (2014 - 11 - 20) 权利要求1-7，说明书第7-18段，表v	1-7
A	CN 115678995 A (上海爱谱蒂康生物科技有限公司) 2023年2月3日 (2023 - 02 - 03) 权利要求1-8	1-14
A	CN 116004810 A (深圳市陆为生物技术有限公司) 2023年4月25日 (2023 - 04 - 25) 权利要求1-7	1-14

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2024年11月14日	2024年11月20日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	受权官员 张丽玮 电话号码 (+86) 010-53962036

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	GUO, X.L.等. "TMED3 promotes the development of malignant melanoma by targeting CDCA8 and regulating PI3K/Akt pathway" CELL & BIOSCIENCE, 第13卷，2023年3月29日 (2023 - 03 - 29)， 第65篇，摘要	1-14

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2024/114759

第I栏　　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交（细则13之三.1(a)），

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST.26标准的序列表的情况下，考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列，在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2024/114759

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项）

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 12−14
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

权利要求12−14涉及治疗肿瘤的方法，属于PCT细则39.1（iv）规定的疾病的治疗方法，但仍然基于其制药用途进行了检索。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2024/114759

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	116769916	A	2023年9月19日	无			
WO	2023162878	A1	2023年8月31日	JPWO	2023162878	A1	2023年8月31日
CN	101541977	A	2009年9月23日	JP	2010504530	A	2010年2月12日
				AU	2007340265	A1	2008年7月10日
				AU	2007340265	B2	2012年7月26日
				KR	20090071603	A	2009年7月1日
				MX	2009002936	A	2009年4月1日
				BR-PI	0716944	A2	2013年9月17日
				IL	197450	A0	2009年12月24日
				US	2010004253	A1	2010年1月7日
				RU	2009114745	A	2010年10月27日
				CA	2662508	A1	2008年7月10日
				JP	2013128487	A	2013年7月4日
				WO	2008082730	A2	2008年7月10日
				WO	2008082730	A3	2009年1月8日
				EP	2074226	A2	2009年7月1日
				SG	174826	A1	2011年10月28日
US	2014342946	A1	2014年11月20日	IN	4935	CHN2014A	2015年9月18日
				WO	2013098797	A2	2013年7月4日
				WO	2013098797	A3	2013年9月12日
CN	115678995	A	2023年2月3日	无			
CN	116004810	A	2023年4月25日	无			