



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102171241 A

(43) 申请公布日 2011.08.31

(21) 申请号 200980138943.8

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.10.06

C07K 14/47 (2006.01)

(30) 优先权数据

C07K 16/22 (2006.01)

08165897.3 2008.10.06 EP

G01N 33/574 (2006.01)

61/102,948 2008.10.06 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011.03.31

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/062956 2009.10.06

(87) PCT申请的公布数据

W02010/040737 EN 2010.04.15

(71) 申请人 阿特拉斯抗体有限公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

(72) 发明人 K·杰斯托姆 F·庞顿 M·乌伦

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 6 页 说明书 31 页

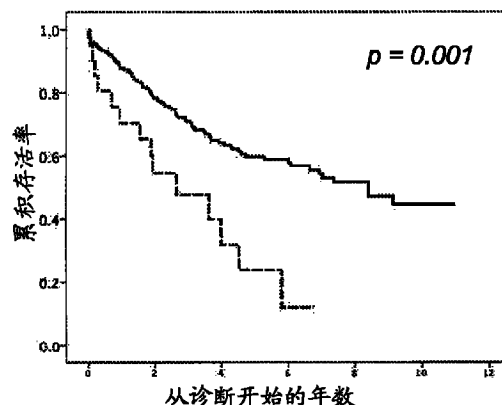
序列表 45 页 附图 7 页

(54) 发明名称

从 SATB2 衍生的表位及其用途

(57) 摘要

本发明涉及一种能够选择性地与一种表位序列相互作用的亲和配体,该表位序列包括 47 个或更少的氨基酸并且包括 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。此外,它涉及一种包括该表位序列的多肽并且涉及该亲和配体和该多肽的用途。



1. 一种能够与一种表位序列选择性地相互作用的亲和配体,该表位序列由 47 个或更少的氨基酸组成并且包括 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。

2. 根据权利要求 1 所述的亲和配体,其中所述表位序列包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列。

3. 根据权利要求 2 所述的亲和配体,其中所述表位序列包括氨基酸序列 SEQ ID NO :3 和 / 或 SEQ ID NO :4。

4. 根据权利要求 2 和 3 的任一项所述的亲和配体,其中所述表位序列包括一种选自下组的氨基酸序列,该组的组成为 :SEQ ID NO :6-14 以及 31-37。

5. 根据权利要求 4 所述的亲和配体,其中所述表位序列由选自下组的一个氨基酸序列组成,该组的组成为 :SEQ ID NO :6-14 以及 31-37。

6. 根据权利要求 1 所述的亲和配体,其中所述表位序列包括氨基酸序列 SEQ ID NO :5。

7. 根据权利要求 1 或 6 所述的亲和配体,其中所述表位序列包括选自下组的一个氨基酸序列,该组的组成为 :SEQ ID NO :52-59 以及 78-82。

8. 根据权利要求 7 所述的亲和配体,其中所述表位序列由选自下组的一个氨基酸序列组成,该组的组成为 :SEQ ID NO :52-59 以及 78-82。

9. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体,其中所述表位序列由 34 个或更少的氨基酸残基组成。

10. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体,其中所述表位序列由 17 个或更少的氨基酸残基组成。

11. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体,该亲和配体是一种抗体或它的一种片段或衍生物。

12. 根据权利要求 11 所述的亲和配体,其中所述抗体是多克隆的。

13. 根据权利要求 11 所述的亲和配体,其中所述抗体是单克隆的。

14. 根据权利要求 1 至 10 的任一项所述的亲和配体,该亲和配体是从选自下组的一种支架衍生的一种蛋白配体,该组的组成为 :葡萄球菌蛋白 A 和其域、脂质运载蛋白、锚蛋白重复域、纤维素结合域、 γ 晶型、绿色荧光蛋白、人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4、蛋白酶抑制剂、PDZ 域、肽适体、葡萄球菌核酸酶、淀粉酶抑肽、纤连蛋白 III 型域以及锌指结构。

15. 根据权利要求 1 至 10 的任一项所述的亲和配体,该亲和配体是一种寡核苷酸分子。

16. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体,该亲和配体用于一种体内方法,该方法用于建立一种对患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测。

17. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体作为一种预测试剂的用途。

18. 根据权利要求 17 所述的用于建立一种对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测的用途。

19. 用于确定一种对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测是否差于或等于一种参比预测的方法,该方法包括以下步骤 :

a) 提供一种较早从所述受试者获得的样品 ;

b) 使用一种根据权利要求 1 至 16 的任一项所述的亲和配体对所述样品的至少一部分中存在的包括氨基酸序列 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的蛋白的量进行评估,并且确定一个对应于所述评估的量的样品值 ;

c) 将步骤 b) 中所得到的所述样品值与一个与所述参比预测相关的参比值进行比较；并且如果所述样品值低于或等于所述参比值，

d) 则得出结论，即用于所述受试者的所述预测差于或等于所述参比预测。

20. 一种治疗对其有需要的受试者的方法，其中所述受试者患有一种结肠直肠癌，该方法包括以下步骤：

a) 提供一种来自所述受试者的样品；

b) 使用一种根据权利要求 1 至 16 的任一项所述的亲和配体对所述样品的至少一部分中存在的包括氨基酸序列 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 的蛋白的量进行评估，并且确定一个对应于所述评估的量的样品值；

c) 将步骤 b) 中所得到的所述样品值与一个与所述参比预测相关的参比值进行比较；并且如果所述样品值低于或等于所述参比值，

d) 则用一种辅助结肠直肠癌治疗方案来治疗所述受试者。

21. 根据权利要求 20 所述的方法，其中步骤 c) 的所述参比值是与一个参比预测相关的并且所述步骤 d) 的辅助结肠直肠癌治疗方案是适合于用于所述受试者的预测的，该预测是差于或等于所述参比预测的。

22. 根据权利要求 20 或 21 所述的方法，其中所述辅助结肠直肠癌治疗方案是选自化学疗法、新辅助疗法以及它们的组合。

23. 根据权利要求 20 至 22 的任一项所述的方法，其中所述辅助结肠直肠癌治疗方案是新辅助疗法。

24. 根据权利要求 23 所述的方法，其中所述新辅助疗法是选自 i) 只有放射疗法以及 ii) 放射疗法与化学疗法相结合。

25. 根据权利要求 19 至 24 的任一项所述的方法，其中步骤 b) 的蛋白包括 SEQ ID NO:1。

26. 根据权利要求 19 至 25 的任一项所述的方法，其中步骤 b) 包括在能够使所述亲和配体结合到所述样品中的蛋白上的条件下将所述亲和配体施用于所述样品，并且所述评估的量是通过对所述亲和配体的量进行评估而得到的，所述亲和配体是与所述样品的所述至少一部分相关联的。

27. 根据权利要求 19 至 26 的任一项所述的方法，其中步骤 b) 包括：

b1) 在所述条件下将所述亲和配体施用于所述样品，所述条件使得所述亲和配体能够结合到所述样品中的蛋白上；

b2) 从所述样品中去除未结合的亲和配体；并且

b3) 对保持与所述样品的所述至少一部分结合的亲和配体的量进行评估，从而获得所述评估的量。

28. 根据权利要求 19 至 27 的任一项所述的方法，其中所述亲和配体包括一种选自下组的标记物，该组的组成为：荧光染料类和金属类、发色染料类、化学发光化合物类和生物发光蛋白类、酶类、放射性同位素类、颗粒以及量子点。

29. 根据权利要求 19 至 28 的任一项所述的方法，其中所述亲和配体是使用能够识别所述亲和配体的一种第二亲和配体来检测的。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述第二亲和配体包括一种选自下组的标记

物,该组的组成为:荧光染料类和金属类、发色染料类、化学发光化合物类和生物发光蛋白类、酶类、放射性同位素类、颗粒以及量子点。

31. 根据权利要求 19 至 30 的任一项所述的方法,其中所述结肠直肠癌是处于 Dukes A 或 B 期的。

32. 根据权利要求 19 至 31 的任一项所述的方法,其中所述结肠直肠癌是结肠直肠腺瘤。

33. 根据权利要求 19 至 31 的任一项所述的方法,其中所述结肠直肠癌是结肠直肠癌。

34. 根据权利要求 19 至 30 以及权利要求 32 至 33 的任一项所述的方法,其中所述结肠直肠癌是转移性的。

35. 根据权利要求 19 至 30 以及权利要求 32 至 34 的任一项所述的方法,其中所述结肠直肠癌是处于 Dukes C 或 D 期的。

36. 根据权利要求 19 以及权利要求 21 至 35 的任一项所述的方法,其中所述预测是一种存活概率,例如总存活率,并且所述参比预测是一种参比存活概率,例如总存活率,其中两个存活率都是相同类型的存活率。

37. 根据权利要求 36 所述的方法,其中该存活概率是五年、十年或 15 年存活的概率。

38. 根据权利要求 19 至 37 的任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。

39. 根据权利要求 19 至 38 的任一项所述的方法,其中所述样品是一种体液样品。

40. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述体液是选自下组,其组成为:血液、淋巴、血浆、血清、脑脊液、尿液、精液以及渗出物。

41. 根据权利要求 19 至 38 的任一项所述的方法,其中所述样品是一种细胞学样品。

42. 根据权利要求 19 至 38 的任一项所述的方法,其中所述样品是一种粪便样品。

43. 根据权利要求 19 至 42 的任一项所述的方法,其中所述样品包括来自所述受试者的细胞。

44. 根据权利要求 19 至 43 的任一项所述的方法,其中所述样品包括来自所述受试者的肿瘤细胞。

45. 根据权利要求 19 至 44 的任一项所述的方法,其中所述样品是一种组织样品。

46. 根据权利要求 45 所述的方法,其中所述组织样品是一种结肠直肠组织样品。

47. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述结肠直肠组织样品是一种结肠直肠癌组织样品。

48. 根据权利要求 46 或 47 所述的方法,其中所述组织样品是从乙状结肠得到的。

49. 根据权利要求 19 至 48 的任一项所述的方法,其中所述步骤 b) 的评估限于所述样品的细胞的细胞核。

50. 根据权利要求 49 所述的方法,其中所述样品的所述细胞是所述样品的肿瘤细胞。

51. 根据权利要求 19 至 50 的任一项所述的方法,其中所述参比值是一个对应于在一个参比样品中的包括氨基酸序列 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 的蛋白的一个量的值。

52. 根据权利要求 19 至 51 的任一项所述的方法,其中所述步骤 b) 的样品值被确定为或者是 1,这对应于在所述样品中可检出包括 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的蛋白,亦或是 0,这对应于在所述样品中不可检出包括 SEQ ID NO:1 和 / 或 SEQ ID

NO :2 的氨基酸序列的蛋白。

53. 根据权利要求 19 至 51 的任一项所述的方法,其中所述步骤 c) 的参比值对应于一个不具有可检出的包括 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的蛋白的参比样品。

54. 根据权利要求 19 至 53 的任一项所述的方法,其中步骤 c) 的所述参比值是 0。

55. 根据权利要求 19 至 54 的任一项所述的方法,其中所述参比值是选自下组,其组成为:一种细胞质部分、一种细胞质强度、一种细胞质部分与一种细胞质强度的一种函数、一种细胞核部分、一种细胞核强度、以及一种细胞核部分与一种细胞核强度的一种函数。

56. 根据权利要求 19 至 55 的任一项所述的方法,其中所述参比值是选自下组,其组成为:一种细胞核部分、一种细胞核强度、以及一种细胞核部分与一种细胞核强度的一种函数。

57. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述参比值是一种细胞核部分。

58. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述参比值是 25%或更少的细胞核部分。

59. 根据权利要求 56 所述的方法,其中所述参比值是一种细胞核强度。

60. 根据权利要求 59 所述的方法,其中所述参比值是一种弱的细胞核强度或更低。

61. 根据权利要求 60 所述的方法,其中所述参比值是无细胞核强度。

62. 根据权利要求 19 以及权利要求 25 至 61 的任一项所述的方法,其中,如果所述样品值高于或等于所述参比值,则该方法进一步包括以下步骤:

e) 则得出结论,即对于所述受试者的所述预测好于所述参比预测。

63. 用于进行根据权利要求 19 至 62 的任一项所述的方法的试剂盒,该试剂盒包括:

a) 一种根据权利要求 1 至 16 的任一项所述的亲和配体;以及

b) 用于对所述亲和配体的量进行定量所必需的试剂。

64. 根据权利要求 63 所述的试剂盒,其中所述亲和配体包括一种选自下组的标记物,该组的组成为:荧光染料类和金属类、发色染料类、化学发光化合物类和生物发光蛋白类、酶类、放射性同位素类、颗粒以及量子点。

65. 根据权利要求 63 至 64 的任一项所述的试剂盒,其中用于对所述亲和配体的所述量进行定量所必需的所述试剂包括能够识别所述亲和配体的一种第二亲和配体。

66. 根据权利要求 65 所述的试剂盒,其中所述第二亲和配体包括一种选自下组的标记物,该组的组成为:荧光染料类或金属类、发色染料类、化学发光化合物类和生物发光蛋白类、酶类、放射性同位素类、颗粒以及量子点。

67. 根据权利要求 63 至 66 的任一项所述的试剂盒,进一步包括至少一种用于提供一个参比值的参比样品。

68. 根据权利要求 67 所述的试剂盒,其中至少一种参比样品是一种不包含可检出的包括 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的蛋白的组织样品。

69. 根据权利要求 67 至 68 的任一项所述的试剂盒,其中至少一种参比样品包含包括 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的蛋白。

70. 根据权利要求 67 至 69 的任一项所述的试剂盒,其中至少一种参比样品包括对应于 25%或更少的细胞核部分的一个量的蛋白,该蛋白包括 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。

71. 根据权利要求67至70的任一项所述的试剂盒,其中至少一种参比样品包括对应于一个弱的细胞核强度或更低的一个量的蛋白,该蛋白包括SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

72. 根据权利要求67至71的任一项所述的试剂盒,其中至少一种参比样品包括对应于无细胞核强度的一个量的蛋白,该蛋白包括SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

73. 根据权利要求67至72的任一项所述的试剂盒,其中至少一种参比样品包括对应于一个值高于所述方法的所述参比值的一个量的蛋白,该蛋白包括SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

74. 根据权利要求73所述的试剂盒,其中至少一种参比样品包括对应于强细胞核强度的一个量的蛋白,该蛋白包括SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

75. 根据权利要求73所述的试剂盒,其中至少一种参比样品包括对应于75%或更高的细胞核部分的一个量的蛋白,该蛋白包括SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

76. 根据权利要求67至75的任一项所述的试剂盒,该试剂盒包括:

一种第一参比样品,该参比样品包括对应于一个值(阳性参比值)高于所述方法的所述参比值的一个量的蛋白,该蛋白包括SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2的氨基酸序列;以及

一个第二参比样品,该样品包括对应于一个值(阴性参比值)低于所述方法的所述参比值的一个量的蛋白,该蛋白包括SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

77. 根据权利要求67至76的任一项所述的试剂盒,其中所述一种或多种参比样品是一种或多种组织样品。

78. 一种分离的多肽,该多肽由47个或更少的氨基酸残基组成并且包括SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

79. 根据权利要求78所述的多肽,包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

80. 根据权利要求79所述的多肽,包括氨基酸序列SEQ ID NO:3和/或SEQ ID NO:4。

81. 根据权利要求79和80的任一项所述的多肽,该多肽包括选自下组的一种氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:6-14以及31-37。

82. 根据权利要求81所述的多肽,该多肽由选自下组的一种氨基酸序列组成,该组的组成为:SEQ ID NO:6-14以及31-37。

83. 根据权利要求78所述的多肽,包括SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

84. 根据权利要求78或83所述的多肽,该多肽包括选自下组的一种氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:52-59以及78-82。

85. 根据权利要求78或83所述的多肽,该多肽由选自下组的一种氨基酸序列组成,该组的组成为:SEQ ID NO:52-59以及78-82。

86. 根据权利要求78至85的任一项所述的多肽,该多肽由34个或更少的氨基酸残基组成。

87. 根据权利要求86的任一项所述的多肽,该多肽由17个或更少的氨基酸残基组成。

88. 根据权利要求78至87的任一项所述的多肽在免疫中作为一种抗原的用途。

89. 根据权利要求78至88的任一项所述的多肽在多克隆或多克隆抗体的制备中的用

途。

90. 根据权利要求 78 至 89 的任一项所述的一种多肽作为一种抗原的用途。
91. 根据权利要求 78 至 89 的任一项所述的一种多肽用于免疫的用途。
92. 根据权利要求 91 所述的用途,其中该免疫是一种非人类哺乳动物的免疫。
93. 根据权利要求 78 至 89 的任一项所述的一种多肽在抗体的制备中的用途。
94. 根据权利要求 93 所述的用途,其中所述抗体是单克隆的或多克隆的。
95. 根据权利要求 78 至 89 的任一项所述的多肽在选择或纯化一种亲和配体中的用途。
96. 根据权利要求 95 所述的多肽的用途,其中该亲和配体是用于建立一个对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测的。

从 SATB2 衍生的表位及其用途

技术领域

[0001] 本披露涉及表位以及结合到其上的亲和配体的领域。此外,本披露的一些方面涉及使用该亲和配体的方法,例如用于结肠直肠癌预测。

背景技术

[0002] 癌症

[0003] 癌症是西方世界中疾病和死亡的最普通的原因之一。通常,对于癌症的大多数形式,发病率随着年龄而增加。随着人类种群持续活得更长,由于一般健康状态的增进,癌症将影响越来越多数量的个体。虽然在环境因素(饮食、吸烟、紫外线辐射等等)连同遗传因素(“癌基因”如 p53、APC、BRCA1、XP 等的种系突变)与癌症的发生风险之间提供一种联系的知识体有增加,最普通癌症类型的病因大部分仍然是未知的。

[0004] 从一种细胞生物学观点看没有完全令人满意的癌症的定义,尽管事实上癌症基本上是一种细胞疾病并且被定义为具有净细胞生长以及抗群体行为的一种转化细胞群体。恶性转化代表基于不可逆的遗传改变以向一种恶性表型的转变。虽然这还没有正式证明,恶性转化是被认为是发生在一个细胞中,随后从该细胞发展出的肿瘤开始了(“癌症的克隆性”教义)。致癌作用是通过它产生癌症的过程并且通常被认为包括最后导致恶性肿瘤生长的多个事件。这种多级过程包括若干限速步骤,如突变以及还可能的次生事件的加入,其导致在癌前期增殖阶段之后癌症的形成。这些分级改变涉及决定细胞分裂、不合群行为、以及细胞死亡的重要调节通路的错误(突变)的累积。与周围的细胞相比,这些改变的每一个可以提供一个选择性的达尔文生长优势,导致该肿瘤细胞群的净生长。重要的是强调一种恶性肿瘤不仅必需由这些转化的肿瘤细胞它们本身,而且由周围充当为一种支持性基质的正常细胞组成。这种募集的癌基质包括结缔组织、血管、以及各种其他的正常细胞例如炎症细胞,它们一致地起作用从而为这些转化的肿瘤细胞提供持续的肿瘤生长必需的信号。

[0005] 最常见的癌症的形式出现在体细胞中并且主要是上皮细胞起源的,例如前列腺、乳腺、结肠、泌尿道以及皮肤;随后是从造血系起源的癌症例如白血病和淋巴瘤、从神经外胚层起源的癌症例如恶性胶质瘤、以及软组织肿瘤例如肉瘤。

[0006] 癌症诊断和预测

[0007] 取自肿瘤的一种组织切片的显微镜评估仍然是确定一种癌症的诊断的金标准。对于显微镜诊断,收集来自可疑肿瘤的活组织检查材料并且在显微镜下检查。为了获得一个确定的诊断,将该肿瘤组织在福尔马林中固定、组织学处理、并且石蜡包埋。从该生成的石蜡块,可以产生组织切片并且使用组织化学(即苏木精-伊红染色)染色以及免疫组织化学法二者。然后用病理学技术(包括肉眼分析以及显微镜分析)评估该外科标本。这种分析通常形成用于给定一个特异性诊断的基础,即进行肿瘤类型的分类以及一种肿瘤的恶性程度的分级。

[0008] 根据对于各癌症类型特异的分类方案可以将恶性肿瘤分成若干阶段。用于实体瘤的最常见的分类系统是肿瘤-淋巴结-转移(TNM)分期系统。T 阶段说明原发性肿瘤的局

部范围,即该肿瘤已经侵袭并且强加地生长进入周围正常组织到什么程度,而 N 阶段以及 M 阶段说明该肿瘤已经怎样发生转移,N 阶段说明该肿瘤扩散到淋巴结,并且 M 阶段说明在其他远隔器官中肿瘤的生长。早期包括:T0-1、N0、M0,表示具淋巴结阴性的局部性肿瘤。更晚期包括:T1-4、N0-4、M0,表示具有更广泛生长的局部性肿瘤,以及 T1-4、N1-4、M0 表示已经转移到淋巴结的肿瘤,并且 T1-4、N1-4、M1 表示具有在远隔器官中检出的转移的肿瘤。肿瘤的分期通常是基于检查的若干形式,包括外科、放射学以及组织病理学分析。除了分期之外,还有一种对大多数肿瘤类型的恶性级别进行分级的分类系统。该分级系统依赖于一种肿瘤组织样品的形态学评估,并且以在一种给定的肿瘤中发现的微观特征为基础。这些分级系统可以是基于肿瘤细胞的分化、增殖、以及非典型外观。通常采用的分级系统的实例包括用于前列腺癌的 Gleason 分级以及用于乳腺癌的 Elston-Ellis 分级。

[0009] 准确的分期以及分级对于一种正确的诊断是重要的,并且提供一种预测预后的工具。对于一种特异肿瘤的诊断和预测信息其后决定了一种对于给定的癌症患者的适当的治疗策略。除组织切片的组织化学染色之外,为了获得关于一种肿瘤的更多信息的最通常使用的方法是免疫组织化学染色(IHC)。IHC 允许使用特异性抗体检测在组织和细胞中的蛋白质表达谱。除了从组织化学染色的肿瘤组织切片评估的关于组织结构和细胞形态学的信息之外,IHC 在临床诊断学中的用途允许检测在不同的细胞群中的免疫反应性。IHC 对于支持准确的诊断可以是重要的,该诊断包括一种原发性肿瘤的分期和分级连同未知起源的转移的诊断。在当今临床实践中最通常使用的抗体包括针对细胞类型“特异的”蛋白质,例如 PSA(前列腺)、MelanA(黑色素细胞)、以及甲状腺球蛋白(甲状腺)的抗体,以及识别中间丝(上皮细胞、间充质、神经胶质)、分化群(CD)抗原(造血细胞、淋巴样细胞的亚类)、以及恶性潜能的标志物(例如 Ki67(增殖)、p53(通常突变的肿瘤抑制基因)以及 HER-2(生长因子受体)的抗体。

[0010] 除了 IHC 以外,用于检测基因扩增的原位杂交以及用于突变分析的基因测序的使用是在癌症诊断之内发展的技术。另外,所有转录物、蛋白质、或代谢物的整体分析增加了重要的信息。然而,大多数的这些分析仍然代表基础研究并且对于在临床医学中的使用还有待评估和标准化。

[0011] 来自结肠和直肠的腺癌(结肠直肠癌)

[0012] 结肠直肠癌,一种作为腺癌存在的恶性上皮细胞瘤,是全世界人类癌症的最常见形式之一。来自 Parkin 等人提供的 GLOBOCAN 2002 数据库的数据表明每年鉴定约 1 百万个新的结肠直肠癌病例(Parkin DM et al(2005)CA Cancer J Clin 55,74-108)。此外,全世界结肠直肠癌的发病率是所有癌症的约 9.4%,并且结肠直肠癌构成了西方世界中死亡的第二最常见的病因。在西方世界中结肠直肠癌的五年生存率为约 60%但是在东欧和印度低至 30%。

[0013] 目前该肿瘤的早期检测和手术切除对于成功治疗是关键性重要的。对于局部性肿瘤,即没有发展成转移性疾病的肿瘤,进行了根治性切除该肿瘤以及周围的肠和组织的手术干预。根据 Dukes 分期 A-D 或更近的根据 TNM 分级将结肠直肠肿瘤分类成几个阶段。最小恶性的肿瘤(Dukes A 和 B 期)通常与相对较好的结果相关,而具有转移的高度恶性的肿瘤(Dukes C 和 D 期)具有差的存活率。不幸的是,在检测出之前结肠直肠癌通常已经生长到相当大的尺寸,并且因此转移不是罕见的。该肿瘤典型地转移到局部的淋巴结,但是到肝

和肺的远处转移也是常见的。

[0014] 症状取决于该肿瘤位于远处胃肠道中什么地方,并且包括肠不适 (bowel distress)、腹泻、便秘、疼痛以及贫血(继发于来自肿瘤的出血进入该肠中)。目前的诊断是基于患者的病史、临床的以及内窥镜的检查(直肠镜检查 and 结肠镜检查),任选地随后进行放射学制图以确定肿瘤生长的范围。与内镜检查相结合,从可疑的损伤进行组织活检。

[0015] 在不同的诊断中,细胞角蛋白 20 (CK20),一种在胃肠道的腺细胞中富含的中间纤维标志物,通常用于诊断胃肠道中的原发性肿瘤,包括结肠直肠癌。该 CK20 标志物不是理想的,因为若干其他的腺癌也可以对于 CK20 抗体是阳性的,然而不是所有的结肠直肠癌都是阳性的。

[0016] 预测信息主要地是从肿瘤期的分类获得的,因为没有公认的可提供另外的预测数据的分级系统或蛋白标志物。当今还没有可供使用的可以将低恶性级别以及低风险发展成转移性疾病的肿瘤与具有减少的存活机会的高度恶性的肿瘤区别开的标志物。因此对于可以用于预测患者结果以及用于指导患者管理(包括治疗性干预)的分子标志物存在着强烈的需要。

[0017] 简要说明

[0018] 本披露的一些方面的一个目的是提供新的表位以及结合到其上的亲和性配体。此外,一些方面的一个目的是提供在建立对患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测有用的装置和方法。

[0019] 本发明是由所附权利要求定义的。

[0020] 附图简要说明

[0021] 图 1 显示了基于使用单克隆抗体 5E2 来诊断的患有结肠直肠的乙状结肠癌的 305 个受试者的免疫组织化学染色的总存活数分析 (OS) 的结果。实线表示细胞核部分 $\geq 2\%$ ($NF > 0$),并且虚线表示细胞核部分 $< 2\%$ ($NF = 0$)。图 1A 显示了所有患者的结果。在图 1B 中,仅对患有处于 Dukes C 或 D 期中的结肠直肠癌的受试者进行了分析。

[0022] 图 2 显示了基于使用单克隆抗体 5E2 来诊断的患有结肠直肠的乙状结肠癌的 305 个受试者的免疫组织化学染色的总存活数分析 (OS) 的结果。实线表示弱的、中等的或强的细胞核强度 ($N1 > 0$) 并且虚线表示无细胞核强度 ($N1 = 0$)。图 2A 显示了所有患者的结果。在图 2B 中,仅对患有处于 Dukes C 或 D 期中的结肠直肠癌的受试者进行了分析。

[0023] 图 3 显示了基于使用单克隆抗体 8F11 来诊断的患有结肠直肠的乙状结肠癌的 305 个受试者的免疫组织化学染色的总存活数分析 (OS) 的结果。实线表示细胞核部分 $\geq 75\%$ ($NF = 1$),并且虚线表示细胞核部分 $< 75\%$ ($NF < 1$)。

[0024] 图 3A 显示了所有患者的结果。在图 3B 中,仅对患有处于 Dukes C 或 D 期中的结肠直肠癌的受试者进行了分析。

[0025] 图 4 显示了基于使用单克隆抗体 8F11 来诊断的患有结肠直肠的乙状结肠癌 305 个受试者的免疫组织化学染色的总存活数分析 (OS) 的结果。实线表示强的细胞核强度 ($N1 = 1$) 并且虚线表示无、弱的以及中等的细胞核强度 ($N1 < 1$)。图 4A 显示了所有患者的结果。在图 4B 中,仅对患有处于 Dukes C 或 D 期中的结肠直肠癌的受试者进行了分析。

[0026] 图 5 显示了单克隆抗体 5E2 和 8F11 之间的交叉列表。

[0027] 图 6 显示了结肠直肠癌的两个样品的免疫组织化学染色。下面的图像是在较高放

大倍数下显示的。图 6A 显示了使用多克隆抗体 HPA001042 (HPAmsAB) 的染色结果并且图 6B 显示了多克隆抗体 5E2 的结果。

[0028] 图 7 显示了结肠直肠癌的两个样品的免疫组织化学染色。下面的图像是在较高放大倍数下显示的。图 7A 显示了使用多克隆抗体 HPA001042 (HPAmsAB) 的染色结果并且图 7B 显示了多克隆抗体 8F11 的结果。

[0029] 详细说明

[0030] 作为本披露的一个第一方面,提供了一种能够选择性地与一种表位序列相互作用的亲和配体,该表位序列由 47 个或更少的氨基酸组成并且包括 SEQ ID NO :1 和 / 或 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列。

[0031] 在本披露的背景下,“与一种表位序列选择性地相互作用”是指选择性地与该表位序列中所包含的氨基酸残基相互作用。例如,能够与表位序列选择性地相互作用的一种亲和配体可以能够与由该表位序列的氨基酸残基组成的一个片段选择性地相互作用,这个片段可以在溶液中游离存在或被固定例如结合至一种珠粒上。还有,这种片段可以结合至报告基因基序上用于相互作用的检测。作为另一个实例,“能够与一种表位序列选择性地相互作用的亲和配体”可以是指该表位序列被包括在一个长的多肽中的情况,它是在该亲和配体与该表位序列的氨基酸残基而不是周围的例如侧翼的氨基酸残基相互作用的前提下建立的。

[0032] 在本披露的背景下,“特异的”或“选择性的”相互作用(例如一种亲和配体与其靶标或抗原的“特异的”或“选择性的”相互作用)表示:该相互作用是这样使得在特异的与非特异的相互作用之间或在选择性的与非选择性的相互作用之间的区别变得有意义。在两种蛋白质之间的相互作用有时是通过解离常数测量的。解离常数描述了在两个分子之间的结合强度(或亲和性)。典型地亲和配体例如抗体与其抗原之间的解离常数是从 10^{-7}M 至 10^{-11}M 。然而,高特异性不是必须要求高亲和性的。对于其对应物具有低亲和性的分子(在摩尔范围内)已经显示出与具有很高亲和性的分子一样的特异性。在本披露的情况下,一种特异性或选择性的相互作用是指:对于在给定条件下在一种自然发生的或处理过的生物学流体的组织样品或液体样品中的其他蛋白质存在下,确定包括一种特异性表位序列的蛋白的存在和 / 或量的一种特定的方法可使用的程度。换言之,特异性或选择性是用于区分相关多肽序列之间的能力。在本说明书中特异性的与选择性的有时是可互换使用的。特异性与选择性测定还被描述于 Nilsson P et al. (2005) Proteomics 5:4327-4337。

[0033] 本披露的这个第一方面是基于诸位发明人已经鉴定出某些表位(即 SEQ ID NO :1 和 2) 并且已经研制出结合到这些表位上的亲和配体。并且,诸位发明人已经发现这些结合到包含 SEQ ID NO :1 和 / 或 2 的氨基酸序列的蛋白上的亲和配体对于建立对患有结肠直肠癌的患者的预测可能是有用的。在此显示了在结肠直肠癌患者中包含 SEQ ID NO :1 和 / 或 2 的蛋白的表达与这类患者的存活率相关。因此,例如该第一方面的亲和配体可以用于建立对于患有结肠直肠癌的受试者的预测的各种分析、方法、测定或装置中。通常在这类应用中,更想要的是具有亲和配体,这些配体对于某一表位而不是亲和配体(例如多克隆抗体)是特异性的,它们仅对全长蛋白或其较长的片段(例如抗原)是特异性的。根据该第一方面该亲和配体的一个应用的一个实例是如以下的第三方面来提供的。

[0034] 已经发现与具有序列 SEQ ID NO :1 的表位相互作用的抗体特别适合用于建立对于

患有结肠直肠癌的受试者的预测。

[0035] 因此,在该第一方面的实施方案中,所讨论的表位序列可以包括 SEQ ID NO:1。例如,诸位发明人已经发现与也结合到这类蛋白上但是对于包含 SEQ ID NO:1(也参见图 6-7)的表位序列不具有选择性的多克隆抗体相比,根据这类实施方案的一种单克隆抗体表现出一种与包含包括氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的蛋白的组织样品的更强的并且更加显著的免疫反应性。

[0036] 通过使用两种不同的单克隆抗体进行表位作图,诸位发明人已经鉴定出两种不同的氨基酸序列 (SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4),这两种氨基酸序列都包括 SEQ ID NO:1。因此,在该第一方面的实施方案中,所讨论的表位序列可以包括 SEQ ID NO:3 和 / 或 SEQ ID NO:4。

[0037] 在此显示出用于鉴定 SEQ ID NO:3 的单克隆抗体是与建立对于患有结肠直肠癌的受试者的预测相关的(参见图 3 和 4)。因此,该第一方面的实施方案中,所讨论的表位序列可以包括 SEQ ID NO:3。

[0038] 在此显示出具有定义长度的许多多肽片段,即所有包括 SEQ ID NO:3 的 SEQ ID NO:31-37,与该单克隆抗体相互作用。因此,在该第一方面的实施方案中,所讨论的表位序列可以包含或其组成为选自下组的氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:31-37。

[0039] 在此显示出用于鉴定 SEQ ID NO:4 的单克隆抗体是特别地与建立对于患有结肠直肠癌的受试者的预测相关的(参见图 1 和 2)。因此,该第一方面的实施方案中,所讨论的表位序列可以包括 SEQ ID NO:4。

[0040] 在此显示出具有定义长度的许多多肽片段,即所有包含 SEQ ID NO:4 的 SEQ ID NO:6-14,与该特别相关的单克隆抗体相互作用。因此,在该第一方面的实施方案中,所讨论的表位序列可以包括或其组成为选自下组的氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:6-14。

[0041] 通过使用两种不同的单克隆抗体进行表位作图,诸位发明人已经鉴定出两种不同的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:5),这两种氨基酸序列都包括 SEQ ID NO:2。

[0042] 因此,在该第一方面的实施方案中,所讨论的表位序列可以包括 SEQ ID NO:5。

[0043] 将具有定义长度的许多多肽片段,即 SEQ ID NO:52-59 和 78-82 用于鉴定 SEQ ID NO:2。因此,该第一方面的实施方案中,所讨论的表位序列可以包括或其组成为选自下组的氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:52-59 和 78-82。

[0044] 包括 SEQ ID NO:3 的上述的片段对应地是 33、38、39、42、43、45 以及 47 个氨基酸长度。此外,包括 SEQ ID NO:4 的上述片段对应地是 31、34、37、38、41、42、43、45、以及 47 个氨基酸长度。

[0045] 因此,在该第一方面的实施方案中,所讨论的表位序列可以包括 45 个氨基酸残基或更少,例如 43 个氨基酸残基或更少、例如 42 个氨基酸残基或更少、例如 41 个氨基酸残基或更少、例如 39 个氨基酸残基或更少、例如 38 个氨基酸残基或更少、例如 37 个氨基酸残基或更少、例如 34 个氨基酸残基或更少、例如 33 个氨基酸残基或更少、例如 31 个氨基酸残基或更少。

[0046] 然而,只要该表位序列包括 SEQ ID NO:1 或 2,它就可以不必是使其能够与该第一方面的亲和配体相互作用的长度(> 30 个氨基酸)。因此,在该第一方面的实施方案中,该表位序列可以包括 25 个氨基酸或更少、例如 20 个氨基酸或更少、例如 17 个氨基酸或更

少、例如 14 个氨基酸或更少、例如 12 个氨基酸或更少。在该表位序列中,在 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 侧翼的氨基酸可以是例如在蛋白 SATB2 中它们位于侧翼的那些。

[0047] 一旦提供了在此披露的本发明的表位信息,根据该第一方面选择或制造一种亲和配体被认为是在本领域普通技术人员的能力范围内的。尽管如此,为了说明,以下给出了可以证明有用的亲和配体的实例连同用于检测和 / 或定量的形式和条件的实例。

[0048] 因此,在该第一方面的一些实施方案中,这些亲和配体可以选自下组,该组的组成为:抗体及其片段及其衍生物,即基于一种免疫球蛋白支架的亲和配体。例如,这些抗体可以是分离的和 / 或单特异性的。例如,抗体包括任何起源的单克隆和多克隆抗体,包括鼠类的、兔的、人的、以及其他的抗体,连同包括来自不同物种的序列的嵌合抗体,如部分人源化的抗体例如部分人源化的鼠抗体。通过用选择的抗原免疫动物产生了多克隆抗体。可以使用由 Köhler 和 Milstein 研制的杂交瘤技术生产具有限定特异性的单克隆抗体 (Köhler G 和 Milstein C(1976)Eur. J. Immunol. 6 :511-519)。在此显示的与用于建立对于患有结肠直肠癌的受试者的预测特别相关的该亲和配体是一种单克隆抗体。因此,该第一方面的实施方案中,该亲和配体可以是一种单克隆抗体。

[0049] 在本披露的背景下,一种“单特异性抗体”是多克隆抗体的群体的一种,其依靠自身的抗原已经亲合纯化,由此从其他的抗血清蛋白以及非特异性抗体分离出这类单特异性抗体。这种亲和纯化产生了与其抗原选择性地结合的抗体。在本发明的情况下,这些多克隆抗血清是通过基于一种两步免疫亲和性的科学试验计划而纯化的以获得对该靶蛋白选择性的单特异性抗体。使用固化标签蛋白作为捕获剂,在一个初次消耗步骤中将定向针对抗原片段的属类亲和标签的抗体去除。继该第一消耗步骤之后,将该血清荷载到第二亲和柱 (具有该抗原作为捕获剂) 上,以便富集对于该抗原特异性的抗体 (还参见 Nilsson P et al. (2005)Proteomics 5 :4327-4337)。

[0050] 抗体片段以及衍生物包括:Fab 片段,这些 Fab 片段包括一个完整的免疫球蛋白的重链的第一恒定域 (CH1)、轻链的恒定域 (CL)、重链的可变域 (VH)、以及轻链的可变域 (VL);Fv 片段,这些 Fv 片段包括这两个可变抗体结构域 VH 和 VL(Skerra A and Plückthun A(1988)Science 240 :1038-1041);单链 Fv 片段 (scFv),这些单链 Fv 片段包括由一种柔性连接肽连接在一起的两个 VH 和 VL 结构域 (Bird RE and Walker BW(1991)Trends Biotechnol. 9 :132-137);Bence Jones 二聚体 (Stevens FJ et al. (1991)Biochemistry 30 :6803-6805);骆驼科动物重链二聚体 (Hamers-Casterman C et al. (1993)Nature 363 :446-448) 以及单链可变域 (Cai X and Garen A(1996)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 :6280-6285;Masat L et al. (1994)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 :893-896), 以及单域支架,像例如来自护士鲨 (nurse shark) 的新抗原受体 (New Antigen Receptor, NAR) (Dooley H et al. (2003)Mol. Immunol. 40 :25-33) 以及基于一种可变重链结构域的微型抗体 (minibody) (Skerra A and Plückthun A(1988)Science 240 :1038-1041)。

[0051] 多克隆和单克隆抗体连同它们的片段和衍生物,代表了在要求选择性生物分子识别的应用中亲和配体的传统选择,如在根据以下方法方面的靶蛋白的检测和 / 或定量中。然而,在本领域中的那些普通技术人员知道:由于选择性结合配体的高流通量产生以及低成本生产系统的要求增加,已经在近十年期间研发了新的生物分子多样性技术。这已经能够使免疫球蛋白连同非免疫球蛋白 (已经证明作为结合配体在生物分子识别应用中同样

有用,并且可以代替或与免疫球蛋白一起使用)二者起源的新类型的亲和配体的产生。

[0052] 根据该第一方面需要用于亲和配体选择的生物分子多样性可以通过多种可能的支架分子之一的组合工程而产生,并且然后使用一种适当的选择平台来选择这些亲和配体。该支架分子可以是免疫球蛋白起源的 (Bradbury AR 和 Marks JD(2004) *J. Immunol. Meths.* 290 :29-49), 非免疫球蛋白起源的 (Nygren P Å 和 Skerra A(2004) *J. Immunol. Meths.* 290 :3-28), 或一种寡核苷酸起源的 (Gold L et al. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 64 : 763-797)。

[0053] 在新颖的结合蛋白的研制中已经将许多非免疫球蛋白蛋白支架用作支持结构。对于生成根据该第一方面的亲和配体有用的这类结构的非限制性实例是:葡萄球菌蛋白 A 和其结构域以及这些结构域的衍生物,比如蛋白 Z(Nord K et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15 :772-777); 脂质运载蛋白 (Beste G et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 :1898-1903); 锚蛋白重复结构域 (Binz HK et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 332 : 489-503); 纤维素结合结构域 (CBD) (Smith GP et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 277 :317-332; **Lehtiö** J et al. (2000) *Proteins* 41 :316-322); γ 晶型 (Fiedler U and Rudolph R, W001/04144); 绿色荧光蛋白 (GFP) (Peelle B et al. (2001) *Chem. Biol.* 8 :521-534); 人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) (Hufton SE et al. (2000) *FEBS Lett.* 475 : 225-231; Irving RA et al. (2001) *J. Immunol. Meth.* 248 :31-45); 蛋白酶抑制剂, 如 Knottin 蛋白 (Wentzel A et al. (2001) *J. Bacteriol.* 183 :7273-7284; Baggio R et al. (2002) *J. Mol. Recognit.* 15 :126-134) 以及 Kunitz 结构域 (Roberts BL et al. (1992) *Gene* 121 :9-15; Dennis MS and Lazarus RA(1994) *J. Biol. Chem.* 269 :22137-22144); PDZ 结构域 (Schneider S et al. (1999) *Nat. Biotechnol.* 17 :170-175); 肽适体, 如硫氧还蛋白 (Lu Z et al. (1995) *Biotechnology* 13 :366-372; Klevenz B et al. (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* 59 :1993-1998); 葡萄球菌核酸酶 (Norman TC et al. (1999) *Science* 285 : 591-595); 淀粉酶抑肽 (McConnell SJ and Hoess RH(1995) *J. Mol. Biol.* 250 :460-479; Li R et al. (2003) *Protein Eng.* 16 :65-72); 基于纤连蛋白 III 型结构域的三连接素 (trinectin) (Koide A et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 284 :1141-1151; Xu L et al. (2002) *Chem. Biol.* 9 :933-942); 以及锌指结构 (Bianchi E et al. (1995) *J. Mol. Biol.* 247 : 154-160; Klug A(1999) *J. Mol. Biol.* 293 :215-218; Segal DJ et al. (2003) *Biochemistry* 42 :2137-2148)。

[0054] 以上提到的非免疫球蛋白支架的实例包括:呈现有用于新颖的结合特异性的产生的一种单随机化环 (single randomized loop) 的支架蛋白;具有一种刚性次级结构的蛋白支架,其中从该蛋白表面突出的侧链被随机化以用于新颖的结合特异性的产生;以及展示有用于新颖的结合特异性的产生的一种非邻接高可变环区域 (non-contiguous hyper-variable loop region) 的支架。

[0055] 除了非免疫球蛋白之外,寡核苷酸也可以用作根据该第一方面的亲和配体。单链核酸被称为适体或假目标 (decoys), 折叠成轮廓分明的三维结构并且以高亲合性和特异性结合至它们的靶标。(Ellington AD 和 Szostak JW(1990) *Nature* 346 :818-822; Brody EN 和 Gold L(2000) *J. Biotechnol.* 74 :5-13; Mayer G 和 Jenne A(2004) *BioDrugs* 18 : 351-359)。这些寡聚核苷酸配体可以是 RNA 或 DNA, 并且可以结合至宽范围的靶分子类别。

[0056] 为了从任何上述支架结构的变体的集合体 (pool) 选择根据该第一方面的亲和配体,许多选择平台可用于分离一种特异的新颖的配体 (针对选择的一种靶蛋白)。选择平台包括但不限于:噬菌体展示 (Smith GP(1985)Science228:1315-1317)、核糖体展示 (Hanes J and Plückthun A(1997)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:4937-4942)、酵母双杂交系统 (Fields S and Song O(1989)Nature 340:245-246)、酵母展示 (Gai SA and Wittrup KD(2007)Curr Opin Struct Biol 17:467-473)、mRNA 展示 (Roberts RW and Szostak JW(1997)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94:12297-12302)、细菌展示 (Daugherty PS(2007)Curr Opin Struct Biol 17:474-480、Kronqvist N et al. (2008)Protein Eng Des Sel 11-9、Harvey BR et al. (2004)PNAS 101(25):913-9198)、微珠粒展示 (Nord O et al. (2003)J Biotechnol 106:1-13、W001/05808)、SELEX(System Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk C and Gold L(1990)Science 249:505-510)、以及蛋白质片段互补测定 (PCA) (Remy I and Michnick SW(1999)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:5394-5399)。

[0057] 因此,在第一方面的实施方案中,该亲和配体可以是源自任何以上所列出的蛋白支架或一种寡核苷酸分子的一种非免疫球蛋白亲和配体。

[0058] 可以将该亲和配体标记用于不同的分析、测定、方法以及装置中。下面与该第三和第四方面相结合讨论根据该第一方面的标记的亲和配体的实施方案。

[0059] 根据该第一方面的配体可以用于体内诊断,如体内成像。

[0060] 诸位发明人已经认识到在乙状结肠中靶蛋白的表达是与建立用于结肠直肠癌的预测特别相关的。因此,该亲和配体可以是体内地用于检测靶蛋白的表达 (参见以下定义)。

[0061] 因此,在该第一方面的一个实施方案中,该亲和配体可以用于一个用于检测靶蛋白 (参见以下定义) 的表达的体内方法中,例如用于建立对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测。

[0062] 在这些体内实施方案中,例如可以标记该亲和配体以使之能够成像,即用一种可检出的标记物如一种放射性同位素进行标记。用于标记亲和配体的适当标记物 (如抗体) 对于技术人员是熟知的。因此,用于建立对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测的体内方法例如可以揭示在体内肿瘤中的靶蛋白的表达,进而可以形成一种治疗决定的基础。

[0063] 在此还显示了,根据该第一方面的亲和配体可以具有与建立对于患有结肠直肠癌的受试者的预测相关的不同的应用。因此,作为本披露的一个第二方面,在此提供了作为一种预测试剂的一种根据该第一方面的亲和配体的用途。

[0064] 在本披露的背景下,“预测试剂”是指一种试剂,该试剂具有至少一种特性,该特性在建立一个预测中是有价值的。例如,该“预测试剂”可以能够选择性地与一种预测标志物 (如一种标志物蛋白) 相互作用。

[0065] 另外,在本披露的背景下,一种“预测标志物”是指某一种物质,该物质的存在在一个预测的建立中是有价值的。例如,该预测标志物可以是一种如下定义的靶蛋白。

[0066] 在该第二方面的实施方案中,该用途可以是用于建立一个对于患有癌症例如结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测。

[0067] 作为本披露的一个第三方面,在此提供了一种用于确定对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测是否比参比预测更差或相等的方法,该方法包括以下步骤:

[0068] a) 提供一个早期从所述受试者获得的样品;

[0069] b) 使用一种根据该第一方面的亲和配体对在所述样品的至少一部分中存在的靶蛋白的量进行评估,并且确定对应于所述评估的量的样品值;

[0070] c) 将步骤 b) 中得到的所述样品值与一个与所述参比预测相关的参比值进行比较;并且如果所述样品值低于或等于所述参比值,

[0071] d) 得出以下结论,即所述的用于所述受试者的预测比所述参比预测更差或相等。

[0072] 在本披露的方面一至七的背景下,“靶蛋白”是指包括氨基酸序列 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 的蛋白。SATB1 蛋白和 SATB2 蛋白是包括氨基酸序列 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 的蛋白的实例。在一个实施方案中,该靶蛋白可以是 SATB2,它包括 SEQ ID NO:1。

[0073] 根据该第三方面的一个第一构型,在此提供了一种用于确定对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测的方法,该方法包括以下步骤:

[0074] a) 提供早期从所述受试者获得的样品;

[0075] b) 使用一种根据该第一方面的亲和配体对在所述样品的至少一部分中存在的靶蛋白的量进行评估,并且确定对应于所述评估的量的样品值;

[0076] c) 步骤 b) 中得到的所述样品值与一个与一种参比预测相关的参比值进行比较;并且如果所述样品值低于或等于所述参比值,

[0077] d) 得出以下结论,即所述的用于所述受试者的预测比所述参比预测更差或相等。

[0078] 在多个实施方案中,上述方法的任何一个可以包括另外的步骤:

[0079] 如果该样品值高于该参比值,

[0080] e) 得出以下结论,即对于该受试者的预测比该参比预测更好。

[0081] 根据该第三方面的一个第二构型,提供了一种用于确定一种对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测是否比参比预测更差或相等、或它是否比所述参比预测更好的方法,所述方法包括以下步骤:

[0082] a) 提供一种早期从所述受试者获得的样品;

[0083] b) 用一种根据该第一方面的亲和配体对所述样品的至少一部分中存在的靶蛋白的量进行评估,并且确定对应于所述评估的量的样品值;

[0084] c) 将在步骤 b) 中得到的所述样品值与一个参比预测相关的参比值进行比较;并且,如果所述样品值等于或小于所述参比值,

[0085] d1) 得出以下结论,即用于所述受试者的预测等于或差于所述参比预测,或者如果所述样品值高于所述参比值,

[0086] d2) 得出以下结论,即用于所述受试者的预测好于所述参比预测。

[0087] 然而由同样的概念的密切相关和覆盖,该第三方面的该第二构型的 d1) 和 d2) 提供了两个可替代的结论选项。因此,该第三方面的第二构型的方法可以回答用于所述受试者的预测是否等于或差于所述参比预测的问题或用于所述受试者的预测是否好于所述参比预测的问题。然而,该第三方面的第二构型的方法还可以(但不是必需的)包括步骤 d1) 连同其所附的条件(“如果短语”)以及步骤 d2) 连同其所附的条件(“如果短语”)二者。

[0088] 因此,该第三方面限于根据该第一方面的亲和配体的用途,即限于本披露的表位的识别。例如,该第三方面可以提供一种用于鉴定结肠直肠癌的侵袭形式的工具,并且进而,结直肠癌的侵袭形式的早期鉴定是极其重要的,因为它有助于医生选择适当的治疗策略。而且,通过在早期阶段鉴定出较少侵袭的形式,可以避免过度治疗。

[0089] 在本披露中,对应于不同的预测呈现出的不同的蛋白表达值(样品值)。典型地,相比于高样品值,低样品值是与较差的预测相关的。在以上方法中,样品值是与一个参比值比较的,并且如果该样品值等于或低于该参比值,可以得出结论,即对于该受试者的预测等于或差于与该参比值相关的参比预测。

[0090] 因此,以上方法可以适合于一个参比值。在这样的情况下,从一个给出的在某些情况下被认为是相关的样品值开始,可以选择一个等于或高于该给出的样品值的参比值。随后,可以确立一个与该参比值相关的参比预测。通过本披露的指导,本领域普通技术人员知道如何建立一个相应于一个给出的参比值的参比预测。例如,如以下部分 4 的实例中所述可以在一组癌症患者中检查蛋白表达值与存活数据之间的关系,并且在此所描述的步骤可以适合于一个给出的参比值。然后,可以选择对应于该给出的参比值的预测作为参比预测。

[0091] 并且,以上方法可以适合于一个给出的参比预测。在这样的情况下,从一个给出的在某些情况下被认为是例如与选择适当的治疗相关的参比预测开始,可以建立一个相应的参比值。通过本披露的指导,本领域普通技术人员知道如何建立一个对应于一个给出的参比预测的参比值。例如,如以下部分 4 的实例中所述可以在一组癌症患者中检查样品值与存活数据之间的关系,但是在此所描述的步骤适合于建立对应于一个给出的参比预测的参比值。例如,可以测试不同的参比值直到发现与该给出的参比预测相关的一个。普通技术人员可以进行这样的测试而没有过多的负担,例如因为本披露提出了可以减少所要求的测试的量的适合的起始值。

[0092] 因此,以上方面的方法的实施方案中,该参比预测可以是基于一个以前建立的预测的,例如通过检查相同的受试者或受试者的群体而获得的。并且,该参比预测可以适合于一般群体中的背景风险、一个统计预测/风险或一个基于该受试者的检查的假设。这样的检查可以将受试者的年龄、一般情况、性别、种族、和/或健康状况以及病史考虑进去,例如癌症病史或结肠直肠癌的状况。例如,一个医生可以使该参比预测适合于该受试者的癌症病史、该肿瘤的阶段、该肿瘤的形态、该肿瘤的位置、转移的出现和扩散和/或另外的癌症特征。

[0093] 根据该第三方面的一个第三构型,在此提供了一种用于建立一种对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测的方法:

[0094] a) 提供一种来自该受试者的样品;

[0095] b) 使用一种根据该第一方面的亲和配体对所述样品的至少一部分中存在的靶蛋白的量进行评估,并且确定对应于所述评估的量的一个样品值;

[0096] c) 使步骤 b) 的样品值与对于该受试者的预测相关联。

[0097] 在本披露的背景下,“建立一个预测”是指建立一个特异性的预测或一个预测间隔。

[0098] 在以上方法的一个实施方案中,该样品可以是一种较早获得的样品。

[0099] 步骤 c) 的相关是指使存活数据与获得的样品值相关联以建立一个对于该受试者

的预测的任何途径。

[0100] 根据该第一方面,已鉴定的该亲和配体的结合活性与结肠直肠癌预测之间的相关性还可以形成用于治疗决定的基础。例如,基于这样一个相关性的方法可以表明一个在其他情况下可能不会被考虑的治疗方案。因此,根据本披露的一个第四方面,在此提供了一种对其有需要的受试者的治疗的方法,其中该受试者患有一种结肠直肠癌,该方法包括以下这些步骤:

[0101] a) 提供一种来自所述受试者的样品;

[0102] b) 使用一种根据该第一方面的亲和配体对所述样品的至少一部分中存在的靶蛋白的量进行评估,并且确定一个对应于所述评估的量的样品值;

[0103] c) 将在步骤 b) 中获得的所述样品值与一个参比值进行比较;并且,如果所述样品值低于或等于所述参比值,

[0104] d) 则用一种辅助结肠直肠癌治疗方案来治疗所述受试者。

[0105] 在该第二方面的一个实施方案中,该方法可以包括另外的步骤:

[0106] 并且如果所述样品值高于所述参比值,

[0107] e) 则避免用辅助结肠直肠癌治疗方案来治疗所述受试者。

[0108] 在该第四方面的一个实施方案中,步骤 c) 的参比值可以是与一个参比预测相关的,并且步骤 d) 的所述结肠直肠癌治疗方案可以适合于一个差于或等于该参比预测的预测。在这样一个实施方案中,该方法可以包括另外的步骤:e) 并且如果所述样品值高于所述参比值,则用一种适合于一个好于该参比预测的预测的治疗方案来治疗所述受试者。

[0109] 例如,该第二方面的治疗方案可以是选自化学疗法、新辅助疗法或它们的组合。

[0110] 因此,该治疗方案可以是新辅助疗法。这样的新辅助疗法可以包括仅有放射疗法或放射疗法与化学疗法相结合。

[0111] 通常,当决定对于患有结肠直肠癌的患者的一個适合的治疗策略时,负责治疗的医生可以将几个参数考虑在内,例如免疫组织化学评估的结果、患者的年龄、一般情况、肿瘤期、血管浸润以及分化的等级。为了在这样的决定中被指导,医生可以根据任何以上给出的这些方法方面的一个实施方案来进行一个测试,或者命令进行一个测试。

[0112] 在本披露的背景下,“预测”是指一种疾病的病程或结果以及它的治疗或指遭受该疾病的受试者的存活的预测。例如,预测可以是指确定来自一种疾病的存活或恢复的可能性,以及指所期望的一位受试者的存活时间的预测。它还可能是疾病复发的可能性,例如局部的、区域的或远处的事件。此外,预测可以包括确定在未来的一个时间段期间(例如,三年、五年、十年、十五年或任何其他时间段)一位患者的存活的可能性。因此,对于一位受试者的预测可以是例如一个存活的概率,例如“总存活率”,它被认为是一个存活的量度。

[0113] 在涉及一个预测以及参比预测的以上方法中,这两种预测是相同类型的预测。作为一个实例,如果该参比预测是一种总存活率的参比概率,之后的结论将是对于该受试者的总存活率的概率,它将与该总存活率的参比概率相关。

[0114] 因此,在该第三方面(并且如果可应用的话该第四方面)的方法的实施方案中,该预测可以是存活的概率,它要求对于该受试者的预测是存活的概率并且该参比预测是一种存活的概率。例如,存活的概率可以是一个五年存活、十年存活或 15 年存活的概率。

[0115] 此外,在本披露的背景下,“患有一种结肠直肠癌的哺乳动物受试者”是指患有一

种原发性或继发性结肠直肠癌的哺乳动物受试者或已经从结肠和 / 或直肠中去除肿瘤的哺乳动物受试者,其中该肿瘤的去除是指通过任何适当类型的手术或治疗杀死或去除该肿瘤。例如,在其中已经将该受试者的肿瘤去除的情况下,该肿瘤可能在少于五年之前,例如少于一年或六个月之前已经被去除。在本披露的方法和用途方面中,“患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者”还包括其中该哺乳动物受试者在进行该用途或方法的时候被怀疑患有结肠直肠癌并且随后确定了该结肠直肠癌的诊断的情形。

[0116] 在本披露的这些方法方面的背景下,“较早获得”是指在进行该方法之前获得。因此,如果在一种方法中提供了较早从一个受试者获得的一种样品,该方法不涉及从该受试者中获得该样品,即该样品是在与该方法分离的一个步骤中从该受试者先获得的。

[0117] 因此,本披露的所有方法和用途可以完全在体外进行。

[0118] 本披露的以上方法方面的步骤 b) 涉及对该样品的至少一部分中存在的蛋白的量进行评估并且确定与该量对应的一个样品值。该“样品的至少一部分”是指用于建立该预测或得出关于适当的治疗的结论的样品的一个相关部分或多个相关部分。本领域的技术人员了解当提出进行该方法的情况下哪个或哪些部分是相关的。例如,如果该样品包括肿瘤和非肿瘤细胞,该技术人员可以仅仅考虑这些肿瘤细胞,并且仅仅考虑该样品的这些肿瘤细胞的细胞核。

[0119] 此外,在步骤 b) 中评估了一个量,并且确定了与该量对应的一个样品值。因此,用于获得该样品值不要求精确地测量该蛋白的量。例如,可以通过目测一种染色的组织样品来评估该蛋白的量,并且然后将该样品值进行分类为高或低(例如基于该评估的量)。本领域的普通技术人员了解如何进行这类评估和测定。

[0120] 并且关于根据上述方面的这些方法的步骤 b),该蛋白的量的增加典型地导致了样品值的增加。然而,在一些实施方案中,该评估的量可以与任何一个预设的离散样品值的数量对应。在这类实施方案中,第一个量和第二个增加的量可以与该同样的样品值对应。无论如何,在根据以上方面的方法的情况下,该蛋白的量的增加将不会导致该样品值的减少。

[0121] 虽然不便,但在一个等效的方式中,如果在步骤 c) 与 d) 之间的条件是“如果该样品量高于或等于该参比值”,则该评估的量可能与样品值逆相关。

[0122] 仍然进一步在本披露的背景下,该“参比值”是指一个预定值,该值是与作出关于对于该受试者的预测或其治疗的决定或结论相关的。

[0123] 并且,在本披露的背景下,参比预测与参比值“相关联”是指基于经验数据和 / 或临床相关的假设将该参比值指定到该参比预测上。参见例如该第三方面的方法的步骤 c) 以及该第四方面的某些实施方案。该参比值不是必须被指定到直接从一组显示该参比值的受试者的预测数据得到的一个参比预测上的。例如该参比预测可以对应于显示该参比值或更低的受试者的预测。即,如果在从 0 至 3 的尺度上该参比值是 1,则该参比预测可以是这些显示值 0 或 1 的受试者的预测。因此,该参比预测还可以适合于可获得的数据的性质。如以上进一步所讨论的,该参比预测还可以适合于其他参数。

[0124] 可以将不同的条件用于步骤 b) 中的评估以获得所述样品值。在第三和第四方面的方法的实施方案中,步骤 b) 可以包括在能够使所述亲和配体结合到所述样品中的蛋白上的条件下将所述亲和配体施用于所述样品,并且所述评估的量是通过对所述亲和配体的量进行评估而得到的,所述亲和配体是与所述样品的所述至少一部分相关联的。

[0125] 在此,“相关联”是指该亲和配体与在该样品中的多个组分例如蛋白之间特异性的和 / 或选择性的相互作用。

[0126] 在第三和第四方面的方法的实施方案中,步骤 b) 可以包括以下步骤:

[0127] b1) 在所述条件下将所述亲和配体施用于所述样品,所述条件使所述亲和配体能够结合到所述样品中的蛋白上;

[0128] b2) 从所述样品中去除未结合的亲和配体;并且

[0129] b3) 对保持与所述样品的所述至少一部分相结合的亲和配体的量进行评估,从而得到所述评估的量。

[0130] 在此,“保持与该样品相结合的亲和配体”是指在步骤 b2) 中没有去除的亲和配体,例如结合到该样品上的亲和配体。该结合可以是例如在样品中存在的抗原与抗体之间的特异性的和 / 或选择性的相互作用。此外,在这类实施方案中,步骤 b2) 可以例如用洗涤缓冲剂来进行洗涤。洗涤缓冲剂的实例对于普通技术人员是熟知的。并且,在这类实施方案中的样品可以是组织样品,并且在这种情况下,步骤 b1)-b3) 反映了一个染色步骤。例如,洗涤是这样一个步骤,即在本领域中是标准的操作。

[0131] 在第三和第四方面的方法的一些实施方案中,该亲和配体可以是可检出的和 / 或可定量的。这种亲和配体的检测和 / 或定量可以按技术人员已知的用于在基于生物学相互作用的测定中的结合试剂的检测和 / 或定量的任何方式来完成。如以上所说明的任何亲和配体可以用于定性或定量检测靶蛋白的存在。这些“第一”亲和配体可以用不同的标志物将它们自身标记或可以进而由第二标记的亲和配体检出,以允许检测、可视化和 / 或定量。这可以使用许多标记的任何一种或多种来完成,这些标记可以使用技术人员已知的许多技术的任何一种或多种(而不像涉及任何过度实验的那样)而被结合至能够与靶蛋白相互作用的亲和配体或结合至任何第二亲和配体。

[0132] 可以结合到第一和 / 或第二亲和配体上的标记的非限制性实例包括荧光染料类或金属类(例如,荧光素、玫瑰精、藻红蛋白、荧光胺)、发光染料类(例如,视紫红质)、化学发光化合物类(例如,鲁米诺、咪唑)以及生物发光蛋白类(例如,萤光素、萤光素酶)、半抗原类(例如,生物素)。多种其他有用的荧光剂和生色团被描述于 Stryer L(1968) Science 162:526-533 以及 Brand L and Gohlke JR(1972) Annu. Rev. Biochem. 41:843-868 中。还可以用酶类(例如,辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -内酰胺酶)、放射性同位素类(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I) 以及颗粒(例如,金)来标记亲和配体。在本披露的情形下,“颗粒”是指适合用于标记分子的颗粒,如金属颗粒。此外,还可以用荧光半导体纳米晶体(量子点)来标记这些亲和配体。量子点具有优越的量子产率并且相比于有机荧光团是更耐光的,并且因此更容易被检出(Chan et al. (2002) Curr Opin Biotech. 13:40-46)。可以使用不同的化学作用(例如胺反应或硫醇反应)将这些不同类型的标记物结合至一种亲和配体。然而,除了胺和硫醇外,可以使用其他的反应基团,例如醛、羧酸以及谷氨酰胺。

[0133] 可以将本披露的方法方面使用在任何若干已知的形式和装置中,其中一种非限制性的选择在以下论述。

[0134] 在基于组织学的一种装置中,结合到靶蛋白上的一种标记的亲和配体的检测、定位、和 / 或定量可以包括可视化技术,如光学显微术或免疫荧光显微术。其他的方法可以包括经由流式细胞术或发光测定法的检测。

[0135] 可以将一种生物样品,如一种肿瘤组织样品(活组织检查)例如来自已经从受试者移出的结肠直肠组织用于靶蛋白的检测和/或定量。该生物样品(如该活组织检查)可以是一种较早获得的样品。如果在一种方法中使用一种较早获得的样品,该方法的步骤没有在人或动物体上实践。可以将亲和配体应用到该生物样品用于靶蛋白的检测和/或定量。这个步骤不仅使得能够检测靶蛋白,而且可以另外显示其表达的相对水平以及分布。

[0136] 在亲和配体上的标记的可视化的方法可以包括但不局限于荧光测定、发光测定和/或酶的技术。通过将荧光标记暴露于一种特定波长的光下而将荧光检测和/或定量,并且其后在一个特定波长区域中检测和/或定量发射的光。可以通过在一种化学反应期间发生的荧光而检测和/或定量一种荧光标记的亲和配体的存在。一种酶促反应的检测是由于在样品中起于化学反应的一种色移。在本领域中的那些普通技术人员知道可以改进许多种不同的科学试验计划以便用于适当的检测和/或定量。

[0137] 在第三和第四方面的这些方法的实施方案中,一种生物样品可以被固化到一种固相支持物或载体上,如硝酸纤维素或任何其他能够固化存在于施用于它的生物样品中的靶蛋白的固体支持基质。在本发明中有一些众所周知的固态支持材料包括:玻璃、碳水化合物(例如 Sepharose)、尼龙、塑料、羊毛、聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯、右旋糖酐、淀粉酶、薄膜、树脂、纤维素、聚丙烯酰胺、琼脂糖、氧化铝、辉长岩、以及磁铁矿。在该生物样品固定之后,可以施用根据该第一方面的第一亲和配体,例如在本披露的部分4或5的实例中的描述。如果该第一亲和配体没有完全地被标记,可以用在本领域中已知的一种或多种适当的缓冲液洗涤该支持基质,随后暴露于一种第二标记的亲和配体,并且再一次用缓冲液洗涤以除去未结合的亲和配体。其后,可以用常规的方法将选择性亲和配体检测和/或定量。对于一种亲和配体的结合性质可能在一个固态支持物与另一个之间不同,但那些在本领域中的普通技术人员将能够通过常规实验确定对于每一测定有效的和最佳的测定条件。

[0138] 因此,在第三和第四方面的方法的实施方案中,可以使用能够识别该可定量的亲和配体的一种第二亲和配体来检测 b1) 中所施用的亲和配体(第一亲和配体)。b3) 的定量因此可以借助于一种第二亲和配体(具有对于该第一亲和配体的亲合性)来进行。作为一个实例,该第二亲和配体可以是一种抗体或它的一种片段或一种衍生物。

[0139] 作为一个实例,用于该靶蛋白的检测和/或定量的一个可用的方法是通过将根据该第一方面的亲和配体连接到一种酶,然后可以在一种酶免疫测定(如一种 EIA 或 ELISA)中检测和/或定量。很好地建立了这类技术,并且它们的实现对于技术人员不存在任何过度的困难。在这类方法中,使该生物样品与一种固体材料接触或与一种结合到该亲和配体上的一种固体材料接触,然后用一种酶标记的第二亲和配体进行检测和/或定量。此后,加入一种适当的底物,在具有这种酶性标记的适当的缓冲液中反应以产生一种化学部分,例如使用一种分光光度计、荧光计、光度计或通过直观的方式进行检测和/或定量。

[0140] 如上所述,可以用放射性同位素标记第一和任何第二亲和配体以使其能够检测和/或定量。在本披露中适当的放射性标记的非限制性的实例是: ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I 。该标记的亲和配体的比活性取决于该放射性标记的半衰期、同位素纯度、以及该标记如何已经结合进入该亲和配体中。优选地使用众所周知的技术将亲和配体标记(Wensel TG 和 Meares CF(1983) in :Radioimmunoimaging 和 Radioimmunotherapy(Burchiel SW and Rhodes BA eds.)Elsevier, New York, pp 185-196)。因此一种放射性标记的亲和配体可用于通过在体

内或体外检测放射性来可视化靶蛋白。放射性核扫描,如用 γ 照相机、磁共振波谱学或发射断层术功能用于体内以及体外检测,同时还在体外使用 γ/β 计数器、闪烁计数器、以及放射线照相术。

[0141] 在第三和第四方面的方法的实施方案中,该受试者可以患有处于不同形式和 / 或阶段的结肠直肠癌。在这些方面的一些实施方案中,所讨论的结肠直肠癌是一种淋巴结阴性结肠直肠癌,即没有发展成淋巴结转移期的结肠直肠癌。在其他类似的实施方案中,所讨论的结肠直肠癌的特征是处于或者 Dukes A 期亦或 B 期。在又另外的实施方案中,所讨论的结肠直肠癌是结肠直肠腺瘤或结肠直肠癌瘤。在这些实施方案中,确定该受试者显示出低的靶蛋白表达对于预测该疾病的未来进展可能是很有价值的,并且因此形成了用于关于未来疾病管理的一个信息决定的基础。在一组罹患这类相对早期的疾病的受试者中,具有低的靶蛋白表达的受试者可能处于相对高的发展一种更具侵袭性的疾病的风险。在患有淋巴结阴性结肠直肠癌或 Dukes A 期或 B 期结肠直肠癌的受试者中,低的靶蛋白表达因此可以表明这些受试者应该被更密切地监测和 / 或与未显示低的靶蛋白表达的受试者进行不同的治疗。由于通过使用根据该第一方面的亲和配体的该方法给出了另外的预测信息,因此根据本发明的这些方法对于这类受试者提供了经一定时间段的更大存活机会和 / 或更长的存活时间的可能性。患有 Dukes A 期结肠直肠癌的受试者典型地未用辅助性化学疗法进行治疗。然而,通过本披露的传授内容的指导,医生可以决定对这样的具有低的或没有靶蛋白表达的受试者给予这样一种辅助性化学疗法。

[0142] 因此,在第三和第四方面的方法的实施方案中,该结肠直肠癌处于 DukesA 期。在一个可替代的或补充的实施方案中,所述结肠直肠癌处于根据上述 TNM 分期系统的 T1-2、N0 以及 M0 期。

[0143] 此外,如在此所示,该靶蛋白表达分析是与建立一个对于患有处于 DukesC 或 D 期的结肠直肠癌的受试者的预测相关的(参见图 1B、2B、3B 以及 4B)。经常用具有严重副作用的方案治疗患有处于这样的晚期的结肠直肠癌的受试者。作为一个实例,如果这类受试者被诊断为具有相对高的靶蛋白的表达,则他们可以被给予具有较少或较低严重副作用的较小广泛性的治疗。

[0144] 在第三和第四方面的方法的实施方案中,该样品可以是一种体液样品。例如,该体液样品可以是选自下组,该组的组成为:血液、血浆、血清、脑脊液、尿液、精液以及渗出物。可替代地,该样品可以是一种细胞学样品或一种粪便样品。

[0145] 在第三和第四方面的方法的另外的实施方案中,该样品可以是一种组织样品,例如一种结肠直肠组织样品,例如一种从结肠或直肠中得到的样品。例如,该组织样品是从乙状结肠中得到的。诸位发明人已经认识到在结肠 / 直肠的这个部分中的靶蛋白表达对于建立用于结肠直肠癌的预测是特别相关的。在本领域中,乙状结肠有时也被称为盆部结肠或乙状弯曲(sigmoid flexure)。

[0146] 在第三和第四方面的方法的补充实施方案中,该样品可以是一种肿瘤组织样品。

[0147] 在第三和第四方面的方法的实施方案中,该样品可以包括来自所述受试者的腺细胞。因此,除了组织样品,例如粪便样品或血液样品还可以包括可以通过使用根据该第一方面的亲和配体来评估表达靶蛋白的这类细胞。

[0148] 诸位发明人已经发现靶蛋白被表达于相关细胞的细胞核中。因此,在样品中靶蛋

白表达的评估可以限于存在于该样品（例如来自手术去除结肠直肠癌的一个较早获得的肿瘤组织活检材料或标本）中的肿瘤细胞中的细胞核表达的分析。作为一个实例，上述方法的步骤b)的评估可以被限于对所述样品的肿瘤细胞（例如起源于上皮细胞的肿瘤细胞，例如腺细胞）的细胞核中的靶蛋白的量进行评估。当该评估限于细胞核时，仅有例如该亲和配体与细胞核的相互作用的特征被考虑在该评估中。这类评估例如可以是一种免疫组织化学染色。此外，诸位发明人已经发现靶蛋白的细胞核表达可以与预测相关。

[0149] 一个比该参比值高的靶蛋白的样品值或一个获得这样的样品值的受试者，有时在此称为“靶蛋白高的”。此外，一个比该参比值低的或与之相等的靶蛋白的样品值或一个获得这样的样品值的受试者，有时在此称为“靶蛋白低的”。

[0150] 在本披露的背景下，术语“样品值”以及“参比值”应当被广义地解释。为了获得这些值的靶蛋白的定量可以通过自动装置、通过一个基于样品的视觉或显微检查的评分系统、或通过它们的组合而完成，只要使用了根据该第一方面的抗体。然而，对于一位技术人员如组织病理学领域的一位技术人员还可能的是，仅仅通过例如使用所讨论的亲和配体检查已经染色的用于靶蛋白表达的组织切片就确定该样品值和参比值。比该参比值高的该样品值的测定可以因此对应于在视觉或显微检查上的测定（一种样品组织切片比在一个参比组织切片的情况下染色更致密和/或展示了一个更大的染色细胞的部分）。还可以将该样品值与由一篇文字引用给出的一个参比值（如以文字描述的一个参比值）进行比较。因此，该样品和/或参比值可以被认为是普通技术人员根据检查和比较而确定的精神值 (mental value)。

[0151] 例如，该技术人员可以将一个样品分类为靶蛋白高或低，其中如果该样品含有比一个先前检查的参比样品更多的靶蛋白，则被分类为高；如果该样品含有比一个先前检查的参比样品少或与之几乎相等的靶蛋白，则被分类为低。可以通过用包括根据该第一方面的抗体的一种染色液进行染色该样品（并且，如果有必要，一个参比样品）来辅助这样的评估。

[0152] 可以以各种方式提供被发现与对于患有结肠直肠癌的受试者的预测的规定或对于作出关于这类受试者的治疗决定有关的、以用于与来自该受试者的样品值进行比较的一个参比值。用本披露的这些传授内容的知识，技术人员可以在无需不适当的负担下提供用于进行第三和第四方面的这些方法的相关参比值。

[0153] 进行第三和第四方面的这些方法的人员例如可以使该参比值适合于所希望的预测信息。例如，该参比值可以适合于产生显著的预测信息，例如在高存活率曲线与低存活率曲线之间的最大间距（参见这些图）。

[0154] 可替代地，该参比值可以适合于鉴定一组具有预定预测的受试者，例如具有五年总存活低于预定百分比的概率的该组受试者。

[0155] 在第三和第四方面的这些方法的实施方案中，该参比值可以对应于在一种健康组织（如该方法的受试者的健康乳房组织或基质组织）中的靶蛋白表达的量。作为另一个实例，该参比值可以按照在来自另一个可比较的受试者的正常组织的一种标准样品中测量的靶蛋白表达的量而提供。作为另一个实例，该参比值可以按照在一种包括肿瘤细胞的参比样品如一种包括肿瘤组织（例如结肠直肠癌组织）的参比样品中测量的靶蛋白表达的量而提供。可优选地，该参比样品的靶蛋白表达的量是先前确定的。因此，该参比值可以按照在

包括表达一种预定量的靶蛋白的细胞的参比样品中测量的靶蛋白的量而提供。

[0156] 此外,该参比值例如可以按照在一种包括表达一个预定或控制量的靶蛋白的细胞系(如癌细胞系)的参比样品中测量的靶蛋白表达的量而提供。本领域的技术人员了解如何提供这类细胞系,例如按照 Rhodes 等披露的(2006)The biomedical scientist, p 515-520 的指导。

[0157] 因此,在第三和第四方面的这些方法的实施方案中,该参比值可以是与在一个参比样品中靶蛋白表达的量相对应的一个预定值。

[0158] 然而,如以下进一步论述的,在这个参比样品中靶蛋白的量不必直接与该参比值相对应。该参比样品还可以提供靶蛋白的量,这个量有助于一个进行该方法的人员评定不同的参比值。例如,该一种或多种参比样品可以有助于通过提供一个“阳性”(高的)和/或一个“阴性”(低的)值来创造该参比值的一个精神图像(mental image)。

[0159] 诸位发明人在此显示患有结肠直肠癌并且具有基本上没有靶蛋白表达的受试者实质上具有相对差的预测(参见例如图1)。因此,在第三和第四方面的这些方法的实施方案中,步骤b)的样品值可以是1(对应于在该样品中可检出的靶蛋白)或0(对应于在该样品中没有可检出的靶蛋白)。因此,在这类实施方案中,该样品的评估是数字的:靶蛋白被认为是或者存在或者缺乏的。在本披露的背景下,“没有可检出的靶蛋白”是指靶蛋白的量是如此低以至于在正常的操作情况期间它通过一个人或一个器具进行根据第三和第四方面的任一项的方法是不可检出的。该“正常的操作情况”是指本领域的技术人员将会发现的适合用于进行本发明的实验室方法和技术。

[0160] 因此,第三和第四方面的方法的实施方案中,步骤c)的参比值可以是0。并且随后的是,在第三和第四方面的方法的另外的实施方案中,步骤c)的参比值可以对应于一个不具有可检出的靶蛋白的参比样品。这意味着该参比值可以通过分析缺少靶蛋白的参比样品而获得。对于在一个样品(如从该受试者较早获得的样品或参比样品)中的靶蛋白表达的定量的一个替代方案,是确定在显示出靶蛋白表达超过某一水平的样品中的细胞的部分。该部分例如可以是:一种“细胞部分”,其中整个细胞的靶蛋白表达被考虑;一种“细胞质部分”,其中仅仅这些细胞的细胞质的靶蛋白表达被考虑;或一种“核部分”,其中仅仅这些细胞的细胞核的靶蛋白表达被考虑。例如可以将该细胞核部分分类为<2%、2%至25%、>25%至75%、或>75%的有关细胞群体的免疫反应细胞。可替代地,或作为一个补充,该细胞核部分可以被分类为≤10%或>10%-100%,或者为≤1%或>1%-100%。该“细胞核部分”对应于在细胞核中显示出阳性染色的样品中的相关细胞的百分比,其中一种在细胞核中的中等的或显著而强烈的免疫反应性被认为是阳性的,并且在细胞核中没有或微弱的免疫反应性被认为是阴性的。病理学领域的技术人员了解在当进行该方法时存在的条件下哪些细胞是有关的,并且可以基于他的常识和本披露的传授内容而确定一种细胞核部分。这些有关的细胞可以是,例如肿瘤细胞。此外,技术人员了解如何采用该“细胞部分”或该“细胞质部分”进行对应的测量。

[0161] 对于在一个样品(如从该受试者较早获得的样品或参比样品)中的靶蛋白表达的定量的另一个替代方案,是确定该样品的总的染色强度。该强度例如可以是:一种“细胞强度”,其中整个细胞的靶蛋白表达被考虑;一种“细胞质强度”,其中仅仅这些细胞的细胞质的靶蛋白表达被考虑,或一种“细胞核强度”,其中仅仅这些细胞的细胞核的靶蛋白表达被

考虑。细胞核强度是依照临床组织病理学诊断上使用的标准而被主观评估的。一种细胞核强度测定的结果可以被分类为：无=在该样品的相关细胞的细胞核中没有总体免疫反应性，弱=在该样品的相关细胞的细胞核中微弱的总体免疫反应性，中等=在该样品的相关细胞的细胞核中的中等的总体免疫反应性，或强=在该样品的相关细胞的细胞核中显著而强烈的总体免疫反应性。本领域的普通技术人员了解在当进行该方法时存在的条件下哪些细胞是有关的，并且可以基于他的常识和本披露的传授内容而确定一种细胞核强度。这些有关的细胞可以是，例如肿瘤细胞。此外，技术人员了解如何采用该“细胞强度”或该“细胞质强度”进行对应的测量。

[0162] 诸位发明人已经发现靶蛋白的细胞核表达与建立一种预测是特别相关的。因此，在第三和第四方面的这些方法的实施方案中，该参比值可以是一种细胞核部分、一种细胞核强度或它们的一种组合。因此，该样品值可以是一种细胞核部分、一种细胞核强度或它们的一种组合。

[0163] 优选地，该样品值以及该参比值二者都是相同类型的值。因此，在第三和第四方面的这些方法的实施方案中，该样品值以及该参比值可以各自是一种细胞核部分、一种细胞核强度或它们的一种组合。

[0164] 在第三和第四方面的方法的实施方案中，用于在步骤 d) 中的结论的标准可以是用于靶蛋白阳性细胞的细胞核部分的样品值，即低于或等于一个参比值的“细胞核部分”，该参比值是 90%、例如低于或等于 80%、例如低于或等于 70%、例如低于或等于 60%、例如低于或等于 50%、例如低于或等于 40%、例如低于或等于 35%、例如低于或等于 30%、例如低于或等于 25%、例如低于或等于 20%、例如低于或等于 15%、例如低于或等于 10%、例如低于或等于 5%、例如低于或等于 2%、例如低于或等于 1%、例如等于 0%。

[0165] 在以上方面的方法的可替代的或补充的实施方案中，步骤 c) 的参比值是一个 90% 或更低的细胞核部分、例如 80% 或更低、例如 70% 或更低、例如 60% 或更低、例如 50% 或更低、例如 40% 或更低、例如 35% 或更低、例如 30% 或更低、例如 25% 或更低、例如 20% 或更低、例如 15% 或更低、例如 10% 或更低、例如 5% 或更低、例如 2% 或更低、例如 1% 或更低、例如 0%。

[0166] 此外，在第三和第四方面的这些方法的实施方案中，用于步骤 d) 中的结论的标准可以是一个样品的用于染色强度的样品值，即细胞核强度，该强度低于或等于一种中等的细胞核强度，例如低于或等于一种弱的细胞核强度，例如无细胞核强度。在第三和第四方面的这些方法的可替代的或补充的实施方案中，步骤 c) 的参比值可以是靶蛋白表达的中等或更低的细胞核强度，如靶蛋白表达的一种弱的或更低的细胞核强度，如一种无靶蛋白表达的细胞核强度。

[0167] 此外，在第三和第四方面的这些方法的实施方案中，该参比值可以由两个值组成，其中用于在步骤 d) 中的结论的标准是一个比这两个值的任何一个高的样品值。

[0168] 可替代地，在第三和第四方面的这些方法的实施方案中，该参比值可以是一种部分值与一种强度值（如一种细胞核部分值与一种细胞核强度值）的组合。

[0169] 此外，在第三和第四方面的这些方法的实施方案中，该参比值可以是一种细胞核部分值与一种细胞核强度值的函数。例如，这样一种函数可以是一种染色评分。如在实例、部分 3、以及以下表 1 中所说明计算该“染色评分”。例如，该参比值可以是一个 0、1 或 2 的

染色评分。

[0170] 本领域普通技术人员认识到为强度值或部分值的其他参比值也落在本发明的范围内。同样,本领域的一名普通技术人员认识到多个部分和强度的其他组合也落在本发明的范围内。因此,该参比值可以包括两个以及可能更多个标准。

[0171] 通常,作为该参比值的一种细胞核强度值和 / 或一种细胞核部分值可以取决于染色步骤,例如取决于根据该第一发明所施用的抗体的性质以及取决于染色试剂。

[0172] 通过本披露的指导,本领域的普通技术人员例如一位病理学家,了解如何进行产生一种部分(如一种细胞的、细胞质的或细胞核的部分)或一种强度(如一种细胞的、细胞质的或细胞核的强度)的评估。例如,技术人员可以使用一个包括预定量的靶蛋白的参比样品用于建立一定的部分或强度的外观。

[0173] 然而,一个参比样品可能不仅用于提供实际参比值,而且还被用于提供一种样品(具有比对应于该参比值的量更高的靶蛋白的量)的一个实例。作为一个实例,在组织化学染色中(如在免疫组织化学染色中),技术人员可以使用一个参比样品用于建立具有高量的靶蛋白的一种染色样品的外观,例如一个阳性参比。随后,技术人员可以评定具有较低量的靶蛋白的样品的外观,如具有与该参比值对应的靶蛋白的量的一种样品的外观。换言之,技术人员可以使用一个参比样品以创造对应于靶蛋白的量(低于该参比样品)的一个参比值的精神图像。可替代地或作为一种补充,在这样的评定中,技术人员可以使用具有一个低量的靶蛋白或实质上没有靶蛋白的另一个参比样品,用于建立这种样品的外观,例如作为一种“阴性参比”。

[0174] 例如,如果使用 10% 细胞核部分的参比值,可以将不具有可检出的靶蛋白并且因此对应于一个细胞核部分为 0(低于该参比值)的一个第一参比样品与具有对应于细胞核部分为 75% 或更高(高于该参比值)的靶蛋白的量的一个第二参比样品一起使用。

[0175] 因此,在评估中,技术人员可以使用一个参比样品用于建立具有高量的靶蛋白的一种样品的外观。这类参比样品可以是一种样品,其包括表达一种高量的靶蛋白的组织,如包括结肠直肠癌组织(具有一种预先建立的靶蛋白的高表达)的一种样品。

[0176] 因此,该参比样品可以提供一种具有强的细胞核强度(NI)的一个实例。用一种具有强的 NI 样品的外观的知识,然后技术人员可以将样品分成其他 NI 类别,例如上述的无、弱、中等、以及强。可以通过缺乏可检出的靶蛋白的一个参比样品(阴性参比),即提供一种无细胞核强度的一个参比样品而进一步辅助这种区分。此外,该参比样品可以提供具有 75% 或更高的一种细胞核部分(NF)的样品的一个实例。用一种具有超过 75% 阳性细胞的样品的外观的知识,技术人员然后可以评估例如具有一个更低百分比的阳性细胞的其他样品的细胞核部分。可以通过实质上缺乏靶蛋白(阴性参比)、即提供一个低的 NF(例如 $< 2\%$) 的参比样品或 0 的 NF 的参比样品来进一步帮助区分。

[0177] 如上述,表达一种控制量的靶蛋白的细胞系可以用作该参比,尤其是用作一种阳性参比。

[0178] 如上所讨论,第三和第四方面的这些方法可以适合于一个选择的参比值,例如以上提出的这些参比值之一,并且在这种情况下该参比预测可以是该选择的参比值的一个结果。作为一个非限制性实例,如果使用一个 $< 2\%$ (NF $< 2\%$) 的细胞核部分作为参比值,可以从图 1A(分析的总存活率,处于所有阶段的肿瘤)中通过研究“低的”曲线(虚线)得

到一个相关的参比预测。在来自诊断的给出的时间点,可以从该图中读出对应于该“低的”曲线的累积存活率,例如 5 年(60 个月)后 25%,这导致了一个参比预测是 25%的五年总存活概率。因此,具有等于该参比值 $NF < 2\%$ 的样品值的受试者具有 25%的五年总存活概率。

[0179] 然而,上述参比预测仅仅是作为说明性的实例而提供,并且普通技术人员知道根据以上方面的这些方法的有用性不限于任何特定的参比预测或预测量度。

[0180] 作为本披露的一个第五方面,在此提供了一种用于进行根据第三或第四方面的实施方案的方法的试剂盒,该试剂盒包括:

[0181] a) 一种根据该第五方面的亲和配体;以及

[0182] b) 用于对所述亲和配体的量进行定量所必需的试剂。

[0183] 根据第六方面的试剂盒的不同的组分可以结合以上本披露的这些方法方面的说明而选择并且限定。因此,例如这些试剂可以包括如上述的一种第二亲和配体。此外,该试剂盒可以包括用于提供该参比值的一个或多个参比样品。术语“用于提供该参比值的参比样品”在本披露的情况下应当被宽泛地解释。该参比样品可以包括实际上与该参比值对应的量的靶蛋白,但是它也可以包括与高于该参比值的一个值对应的一个量的靶蛋白。在后者情况下,该“高”值可以被一个进行该方法的人员用作一个上参比(阳性参比)用于评定例如低于该“高”值的一个参比值的外观。免疫组织化学领域的技术人员了解如何做这样一种评定。此外,作为一种可替代的或一种补充的实例,该技术人员可以使用包括一个低量的靶蛋白的另一个参比样品例如作为一个阴性参比用于提供在这样一种评估中的一个“低”值。结合这些方法方面在以上进一步论述了这种情况。在试剂盒方面的实施方案中,该参比样品可以是一种组织样品,如适合于用眼或显微镜评估的一种组织样品。作为一个实例,该组织参比样品可以被固定在石蜡或在缓冲福尔马林中和/或组织处理为装在显微载玻片上的 μm 薄切片。该组织参比样品可以进一步适应于用亲和配体(如根据该第一方面的亲和配体)染色。

[0184] 因此,根据本披露的试剂盒包括根据该第一方面的一种亲和配体,连同其他的有助于定量该亲和配体(在它已经特异性和/或选择性地结合到该靶蛋白之后)的工具。例如,该试剂盒可以包含一种第二亲和配体,用于检测和/或定量一种由该靶蛋白与所讨论的亲和配体形成的络合物。该试剂盒还可以包含除了亲和配体以外的不同的助剂物质,以使该试剂盒能够容易并且有效地使用。助剂物质的实例包括:用于进行溶解或复原该试剂盒的冻干蛋白组分的溶剂、洗涤缓冲液、用于对酶活性进行测量(在一种酶被用作一种标记物的情况下)的底物、在使用石蜡或福尔马林固定组织样品的情况下为提高对抗原的可接近性的靶标恢复溶液、以及在免疫测定试剂盒中通常使用的物质如反应阻止剂,例如为降低背景染色的内源性酶封闭溶液和/或为增加染色对比的复染溶液。

[0185] 作为本发明的一个第六方面,在此提供了一种分离的多肽,该多肽由 47 个或更少的酸残基组成并且包括 SEQ ID NO:1 和/或 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

[0186] 本披露的这个第六方面是基于但不限于诸位发明人认识到某些表位例如对于检测在不同的背景中的该靶蛋白的表达是特别感兴趣的,并且认识到可以将包括这些表位的片段用于诊断或预测工具的生产、选择或纯化。

[0187] 以上与该第一方面相结合讨论了下面描述的该第六方面的不同的实施方案。

[0188] 该第六方面的实施方案中,该多肽可以包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列。此外,在这类实施方案中,该多肽可以包括氨基酸序列 SEQ ID NO:3 和 / 或 SEQ ID NO:4。又另外地,在其中该多肽包括序列 SEQ ID NO:3 的这些实施方案中,该多肽可以包括或其组成为选自下组的一种氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:31-37。并且在其中该多肽包括序列 SEQ ID NO:4 的实施方案中,该多肽以包括或其组成为选自下组的一种氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:6-14。

[0189] 并且,该第六方面的实施方案中,该多肽可以包括 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列。在这类实施方案中,该多肽可以包括或其组成为选自下组的一种氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:52-59 以及 78-82。

[0190] 在该第六方面的实施方案中,该多肽可以由 45 个或更少的氨基酸残基、例如 43 个或更少的氨基酸残基、例如 42 个或更少的氨基酸残基、例如 41 个或更少的氨基酸残基、例如 39 个或更少的氨基酸残基、例如 38 个或更少的氨基酸残基、例如 37 个或更少的氨基酸残基、例如 34 个或更少的氨基酸残基、例如 33 个或更少的氨基酸残基、例如 31 个或更少的氨基酸残基组成。

[0191] 此外,在该第六方面的多个实施方案中,该多肽可以由 25 个或更少的氨基酸残基、例如 20 个或更少的氨基酸残基、例如 17 个或更少的氨基酸残基、例如 14 个或更少的氨基酸残基组成。

[0192] 例如,可以将该第六方面的多肽用于免疫中,例如用于单克隆或多克隆抗体的制备中。

[0193] 因此,在该第六方面的多个实施方案中,可以将该多肽在免疫中用作抗原,例如用于单克隆或多克隆抗体的制备中。

[0194] 因此,作为本披露的一个第七方面,在此提供了例如在免疫中根据该第六方面的多肽作为抗原的用途。例如,该免疫可以是非人类的动物的免疫。类似地,在此提供了根据该第六方面的一种多肽在抗体(例如单克隆或多克隆抗体)的制备中的用途。

[0195] 此外,在此提供了根据该第六方面的一种多肽在一种亲和配体的选择或纯化中的用途。像例如可以将亲和配体用于建立对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测或另一种类型的预测方法。例如,这样的用途可以包括在一种固相支持物(其上已经固定该多肽)上的亲和纯化。例如可以将该固相支持物安排在一个柱中。此外,该用途可以包括使用一种固相支持物(其上已经固定该多肽)对具有根据该第三方面的一种多肽的特异性的亲和配体进行选择。这样的固相支持物可以是 96 孔板、磁珠、琼脂糖珠粒或琼脂糖凝胶珠粒。此外,该用途可以包括在一种可溶基质(例如使用一种葡聚糖基质)上的亲和配体的分析,或在一种表面等离子共振仪(如一种 Biacore™ 仪)中的用途,该分析例如可以包括监测该固定的多肽与许多潜在的亲和配体的亲合性。

[0196] 作为本披露的一个第八方面,在此提供了一种能够选择性地与一种表位序列相互作用的亲和配体,该表位序列有 26 个或更少的氨基酸组成并且包括 SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:105 和 / 或 SEQ ID NO:106 的氨基酸序列。

[0197] 本披露的这个第八方面是基于诸位发明人已经鉴定针对 SATB2 抗原 (SEQ ID NO:111) 所产生的多克隆抗体与其相互作用的某些表位(即,SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:105 和 / 或 SEQ ID NO:106)。例如可以将这些与这类表位相互作用的亲和配体用于建立对于患有

结肠直肠癌的受试者的预测的各种分析、方法、测定或装置中。通常,在这类应用中,更希望的是具有多种亲和配体,这些配体对于某一表位而不是亲和配体(例如多克隆抗体)是特异性的,它们仅对全长蛋白或其较长的片段(例如抗原)是特异性的。此外,该全长 SATB2 蛋白及其抗原片段(SEQ ID NO:111)包括 SATB1 蛋白和 SATB2 蛋白共有的几个序列部分。在一些情况下,例如当它们都被表达时,在这两种蛋白之间进行区分可能是所希望的。SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:105 和 / 或 SEQ ID NO:106 对于 SATB2 都是唯一的,并且因此能够与这些中的任何一个选择性地相互作用的亲和配体可以满足这样的需要。

[0198] 具有定义长度的许多个多肽片段(即,SEQ ID NO:88-91)被用于鉴定 SEQ ID NO:87。因此,在该第八方面的多个实施方案中,所讨论的表位序列可以包括或其组成为选自下组的一个氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:88-91。

[0199] 此外,具有定义长度的许多个其他的多肽片段(即 SEQ ID NO:108-110)被用于鉴定 SEQ ID NO:105。因此,在该第八方面的多个实施方案中,所讨论的表位序列可以包括或其组成为选自下组的一个氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:108-110。

[0200] 上述的片段对应地是 25、26、22、24 以及 14 个氨基酸长度。

[0201] 因此,在该第八方面的多个实施方案中,所讨论的表位序列可以由 25 个或更少的氨基酸残基、例如 24 个或更少的氨基酸残基、例如 22 个或更少的氨基酸残基、例如 14 个或更少的氨基酸残基组成。

[0202] 在根据该第八方面的表位序列中,在 SEQ ID NO:87、SEQ ID NO:105 或 SEQ ID NO:106 侧翼的氨基酸例如可以是在蛋白 SATB2 中它们位于侧翼的那些。

[0203] 加以必要的变通,将根据该第一方面的亲和配体的不同实施方案(例如它们的类型以及制造)应用于该第八方面的亲和配体。

[0204] 该第二方面的用途也这样做。因此,根据该第八方面的亲和配体的用途构成本披露的一个第九方面。

[0205] 此外,可以根据第八方面的这些亲和配体用于对应于该第三方面的方法中。因此,作为本披露的一个第十方面,在此提供了一种用于确定一个对于患有结肠直肠癌的哺乳动物受试者的预测是否差于或等于一种参比预测的方法,该方法包括以下步骤:

[0206] a) 提供一种较早从所述受试者获得的样品;

[0207] b) 使用一种根据该第八方面的亲和配体对所述样品的至少一部分中存在的 SATB2 蛋白的量进行评估,并且确定一个对应于所述评估的量的样品值;

[0208] c) 将步骤 b) 中得到的所述样品值与一个与所述参比预测相关的参比值进行比较;并且如果所述样品值低于或等于所述参比值,

[0209] d) 则得出结论,即用于所述受试者的所述预测差于或等于所述参比预测。

[0210] 因此,在该第十方面中的 SATB2 蛋白对应于在该第三方面中的靶蛋白。

[0211] 并且,可以根据第八方面的这些亲和配体用于对应于该第四方面的方法中。因此,作为本披露的一个第十一方面,在此提供了一种治疗对其有需要的受试者的方法,其中所述受试者患有一种结肠直肠癌,该方法包括以下这些步骤:

[0212] a) 提供一种来自所述受试者的样品;

[0213] b) 使用一种根据该第八方面的亲和配体对所述样品的至少一部分中存在的 SATB2 蛋白的量进行评估,并且确定一个相应于所述评估的量的样品值;

[0214] c) 将步骤 b) 中得到的所述样品值与一个与所述参比预测相关的参比值进行比较 ; 并且如果所述样品值低于或等于所述参比值,

[0215] d) 则用一种辅助结肠直肠癌治疗方案来治疗所述受试者。

[0216] 加以必要的变通, 将该第三和第四方面的不同的构型以及实施方案对应地应用于该第十和第十一方面。

[0217] 作为本披露的一个第十二方面, 在此提供了一种用于进行根据第十或第十一方面的实施方案的方法的试剂盒, 该试剂盒包括 :

[0218] a) 根据该第八方面的亲和配体 ; 以及

[0219] b) 用于对所述亲和配体的量进行定量所必需的试剂。

[0220] 加以必要的变通, 将该第五方面的不同实施方案应用于该第十二方面。

[0221] 作为本披露的一个第十三方面, 在此提供了一种多肽, 该多肽包括 26 个或更少的氨基酸并且包括 SEQ ID NO :87、SEQ ID NO :105 和 / 或 SEQ ID NO :106 的氨基酸序列。

[0222] 如上述, 具有定义长度的许多个多肽片段 (即, SEQ ID NO :88-91) 被用于鉴定 SEQ ID NO :87。因此, 在该第十三方面的多个实施方案中, 所讨论的多肽可以包括或其组成为选自下组的一个氨基酸序列, 该组的组成为 : SEQ ID NO :88-91。

[0223] 并且如上述, 具有定义长度的多个其他多肽片段 (即 SEQ ID NO :108-110) 被用于鉴定 SEQ ID NO :105。因此, 在该第十三方面的多个实施方案中, 所讨论的多肽可以包括或其组成为选自下组的氨基酸序列, 该组的组成为 : SEQ ID NO :108-110。

[0224] 最后, 也如上讨论, 上述片段对应地是 25、26、22、24 以及 14 个氨基酸长度。

[0225] 因此, 在该第十三方面的多个实施方案中, 所讨论的多肽由 25 个或更少的氨基酸残基、例如 24 个或更少的氨基酸残基、例如 22 个或更少的氨基酸残基、例如 14 个或更少的氨基酸残基组成。在根据该第十三方面的多肽中, 在 SEQ ID NO :87、SEQ ID NO :105 或 SEQ ID NO :106 侧翼的氨基酸可以是例如在蛋白 SATB2 中在它们侧翼上的那些。

[0226] 作为本披露的一个第十四方面, 提供了根据该第十三方面的多肽的用途。加以必要的变通, 将该第七方面的不同实施方案应用于该第十四方面。

[0227] 实例

[0228] 1) 抗原的生成

[0229] a. 材料和方法

[0230] 用人基因组序列作为模板使用生物信息学工具来设计由 Ensembl Gene ID ENSG00000119042 编码的靶蛋白的一种适当的片段 (Lindskog M et al. (2005) Biotechniques 38 :723-727, Ensembl, www.ensembl.org)。设计了对应于蛋白 SATB2 (Ensembl 登陆号 ENSP00000260926) 的氨基酸 377-499 (SEQ ID NO :111) 的一个由 123 个氨基酸组成的片段。通过一个具有 Platinum®Taq (Invitrogen) 和作为模板的人类总 RNA 集合板 (人类总 RNA 板 IV, BD Biosciences Clontech) 的 Superscript™ One-Step RT-PCR 扩增试剂盒分离一个对该靶蛋白进行编码的多核苷酸, 该多核苷酸包含长 SATB2 基因转录本 (Ensembl 登录号 ENST00000260926) 的核苷酸 1542-1910。通过 PCR 扩增引物将侧翼限制酶切位点 NotI 和 AscI 引入该片段中以允许框内克隆进入表达载体中 (正向引物 : GTGTCCCAAGCTGTCTTTG, 反向引物 : CTTGGCCCTTTTCATCTCC)。

[0231] 如上述对下游引物进行生物素酰化以允许进行固相克隆, 并且将该生成的生物素

酰化的 PCR 产物固定在 Dynabeads M280 链霉亲和素上 ((Dynal Biotech, Oslo, Norway) (Larsson M et al (2000) J. Biotechnol. 80 :143-157))。通过 NotI-AscI 消化 (New England Biolabs) 来从该固体支撑物上释放该片段,将该片段与一个双亲和标记物一起连接到框内 pAffdc 载体 (Larsson M et al, 如上) 中,该双亲和标记物包括一个用于固定化金属离子层析 (IMAC) 纯化的六组氨酸标签以及一个来自链球菌 G 蛋白的免疫增强白蛋白结合蛋白 (ABP) (Sjölander A et al/(1997) J. Immunol. Methods 201 :115-123 ; S&Shl S et al/(1999) Encyclopedia of Bioprocess Technology :Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation (Fleckinger MC and Drew SW, eds) John Wiley and Sons Inc., New York, pp 49-63), 并且转化到 E. coli BL21 (DE3) 细胞 (Novagen) 中。根据制造商的建议,使用 TempliPhiDNA 测序扩增试剂盒 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), 通过质粒 DNA 扩增的染料终止循环测序验证这些克隆的序列。

[0232] 通过在相同培养基中加入 1ml 一种过夜培养物,将包含有该表达载体的 BL21 (DE3) 细胞接种在 100ml 30g/l 大豆胰蛋白酶肉汤 (Merck KGaA) 中,该大豆胰蛋白酶肉汤补充有 5g/l 的酵母提取物 (Merck KGaA) 以及 50mg/l 的卡那霉素 (Sigma-Aldrich, St-Louis)。在 37°C 以及 150rpm 下将该细胞培养物在一个 1 公升的摇瓶中进行孵育直到在 600nm 下的光密度达到 0.5-1.5。然后通过添加异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷 (Apollo Scientific) 至一个 1mM 的终浓度诱导蛋白表达,并且在 25°C 和 150rpm 下继续孵育过夜。通过在 2400g 离心收获细胞,并且将片状沉淀物再悬浮在 5ml 的溶解缓冲液中 (7M 盐酸胍、47mM Na₂HPO₄、2.65mM NaH₂PO₄、10mM Tris-HCl、100mM NaCl、20mM β-巯基乙醇;pH=8.0), 并且在 37°C 和 150rpm 下孵育 2 小时。在 35300g 下离心以后,收集包含变性并且溶解的基因产物的上清液。

[0233] 使用一个自动化蛋白纯化步骤 (Steen J et al. (2006) Protein Expr. Purif. 46 : 173-178) 在一种 ASPEC XL4™ (Gilson) 上,通过在具有 1ml 的 Talon® 金属 (Co²⁺) 亲和树脂的柱子 (BD Biosciences Clontech) 上进行固定化金属离子亲和层析 (IMAC) 纯化 His₆ 标签的融合蛋白。在载入该澄清的细胞溶解产物之前,用 20ml 变性洗涤缓冲液 (6M 盐酸胍、46.6mM Na₂HPO₄、3.4mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、pH 8.0-8.2) 将该树脂平衡。其后,将该树脂在 2.5ml 洗脱缓冲液 (6M 胍、50mM NaH₂PO₄、100mM NaCl、30mM 乙酸、70mM 乙酸 Na, pH 5.0) 洗涤之前用不少于 31.5ml 的洗涤缓冲液洗涤。将洗脱的物质分馏成 500、700 和 1300 毫升的三个集合。该 700 毫升馏分,在此称为抗原馏分,并且该收集的 500 和 1300 毫升馏分存储以备以后使用。

[0234] 将该抗原馏分用磷酸盐缓冲盐水 (PBS ;1.9mM NaH₂PO₄、8.1mM Na₂HPO₄、154mM NaCl) 稀释到 1M 胍的终浓度,随后使用具有 7500Da 截留分子量的 Vivapore 10/20ml 浓缩器通过一个浓缩步骤以增加该蛋白质的浓度 (Vivascience AG)。根据制造商的推荐使用一种具有牛血清白蛋白标准品的一种双金鸡宁酸 (BCA) 微测定科学试验计划 (Pierce) 测定该蛋白质的浓度。使用蛋白 50 或 200 测定法 (Agilent Technologies) 在一台 Bioanalyzer 仪器上分析该蛋白质的质量。

[0235] b 结果

[0236] 使用对于该蛋白片段特异的引物,通过 RT-PCR 从一个人 RNA 池成功分离了一种对应于该 SATB2 基因的长转录物的核苷酸 1542 至 1910 并且编码一种肽 (SEQ ID NO :111)

的基因片段,该肽由该 SATB2 蛋白的 377 至 499 位氨基酸组成。然而,与来自 EnsEMBL 的 ENSG00000119042 的序列相比较,在该序列中存在一个单一的沉默核苷酸突变。将该靶蛋白的 123 氨基酸片段 (SEQ ID NO:111) 设计成缺乏跨膜区域以确保在大肠杆菌中有效表达,并且缺乏任何信号肽,因为那些在成熟蛋白中被裂开。此外,该蛋白片段被设计为具有适合的尺寸以允许构象表位的形成并且还允许在细菌系统中有效地克隆和表达。

[0237] 将编码该正确的氨基酸序列的一个克隆进行鉴定,并且在大肠杆菌中表达产生这种正确大小的一种单一蛋白质,并且随后使用固定化金属离子层析进行纯化。将该抗原馏分稀释到为 1M 脲的终浓度之后,测定该蛋白片段的浓度为 7,4mg/ml,并且根据纯化分析为 98% 纯。

[0238] 2) 单克隆抗体的生成。

[0239] a) 材料和方法

[0240] 将如部分 1 的实例中得到的纯化的片段 (SEQ ID NO:111) 用作用于生产单克隆抗体的抗原。将抗原送到 AbSea Biotechnology Ltd (中国北京) 并且简言之,将该抗原以三周的间隔皮下注入 BALB/c 小鼠 (4-6 周龄,雌性) 体内。将该抗原与弗氏完全佐剂混合用于第一次注射,并且与弗氏不完全佐剂混合用于随后的注射。在融合之前三天,静脉内用抗原最后激发 (challenged) 该小鼠。通过将小鼠脾细胞与 Sp2/0 骨髓瘤细胞系进行融合来产生杂交瘤。使用 ELISA 通过筛选几种细胞系,鉴定出分泌对该抗原 (SEQ ID NO:111) 特异的抗体的细胞,并且将这些细胞递送到 Atlas Antibodies AB 用于进一步表征。选择在 ELISA、蛋白质印迹 (WB) 以及免疫组织化学 (IHC) 中显示阳性结果的细胞系用于亚克隆,这是由 AbSea Biotechnology Ltd 完成的。

[0241] 此外,将该单克隆抗体的免疫组织化学染色模式与内部的多克隆抗 SATB2 抗体 (HPA001042, Atlas Antibodies AB, 瑞典; 使用抗原 SEQ ID NO:111 来产生) 进行比较。这种抗体有时在此称为“HPA 多克隆抗体”或“HPA msAb”。

[0242] b) 结果

[0243] 通过 ELISA (在 AbSea) 来筛选细胞系以鉴定出生产识别该抗原 (SEQ ID NO:111) 而不是该亲和标签 His-ABP 的单克隆抗体 (mAbs) 的细胞系。在 ELISA 中十三个细胞系显示出与该抗原 SEQ ID NO:111 特异性结合,并且选择用于进一步的测试。对于所选择的十三个克隆的每一个,收集 150 微升至 300 微升的上清液,加入叠氮化物,并且将这些上清液在湿冰上递送到 Atlas Antibodies AB。当抵达时根据 AbSea 的技术说明书将这些上清液存储在 +4°C 下。对这些细胞系的进一步测试导致鉴定出四个细胞系 (克隆) (3B10、8F11、2B11 以及 5E2), 它们在蛋白质印迹和 IHC 两者分析中给出阳性结果。对这四个克隆进行选择用于亚克隆和扩增,这是由 AbSea Biotechnology Ltd. 来完成的。

[0244] 使用多克隆抗体 HPA001042 以及单克隆抗体 5E2 和 8F11 进行的结肠直肠癌免疫组织化学染色显示了用于这些测试抗体的肿瘤细胞的细胞核染色。与该多克隆抗体 HPA001042 相比较,单克隆抗体 5E2 和 8F11 产生了更显著的和更强的图案 (图 6 和 7)。

[0245] 因此,与多克隆抗体 HPA001042 相比较,至少在某些方面,5E2 和 8F11 更适合用于免疫组织化学。

[0246] 3) 使用细菌展示进行表位作图

[0247] a) 将文库亚克隆到该葡萄球菌的展示载体中。将大肠杆菌株 RR1 Δ M15 (Rüther,

U.pUR 250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. Nucleic Acids Res. 10,57655772(1982)) 用作用于质粒构建的宿主株。通过将一种含有一个新的限制酶切位点 (PmeI) 的基因片段连接到先前描述的葡萄球菌载体 pSCXm 而创建一种新的葡萄球菌载体 pSCEM1 (Wernerus, H. and **Ståhl**, S. Vector engineering to improve a staphylococcal surface display system. FEMS Microbiol Lett 212,47-54(2002)), 用 BamHI 和 Sail (New England Biolabs, Beverly, MA) 将其消化。用于扩增 SATB2 片段基因的模板是由 Anja Persson (皇家技术学院, 斯德哥尔摩; 瑞典) 惠赠的。通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增该基因片段 (9.6ml, 合并的) 并且在冰上的 50ml Falcon 管中使用一种微尖 (microtip) 进行超声处理 60 分钟 (21% 幅值, 持续超声处理) 以便产生随机片段。随后使用 Centhcon Plus 20 柱 (CO 10kDa; Millipore, Billerica, MA) 通过超滤将样品进行浓缩。根据供应商的推荐, 通过加入 T4 DNA 聚合酶以及 T4 多核苷酸激酶 (New England Biolabs) 使浓缩的片段末端钝化并且磷酸化。此后, 使用 T4 DNA 连接酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 使这些末端钝化的片段连接进入该葡萄球菌展示载体 pSCEM1, 用 PmeI 消化 (New England Biolabs)。将该文库转化到电转化感受态 *S. carnosus* TM300 (**Götz**, F. Staphylococcus carnosus: a new host organism for gene cloning and protein production. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19, 49S-53S (1990)), 如先前的描述 (**Löfblom**, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., **Ståhl**, S. & Wernérus, H. Optimization of electroporation-mediated transformation: Staphylococcus carnosus as model organism. J Appl Microbiol 102, 736-747 (2007)), 并且在 15% 的甘油中于 -80°C 下储存。

[0248] b) 细胞标记以及荧光激活细胞分选 (FACS)

[0249] 将等分部分的 Sc:SATB2-lib (至少十倍于该文库大小) 接种到具有 20 µg/ml 氯霉素的 100ml TSB+Y (大豆胰蛋白酶肉汤 + 酵母提取物) 并且在 37°C 以及 150rpm 下生长过夜。16 小时后, 用具有 0.1% Pluronic® F108NF 表面活性剂 (PBSP; BASF Corporation, Mount Olive, NJ) 的 1ml 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 7.4) 洗涤 10^7 个细胞。通过离心作用 (3500xg, 4°C, 6 分钟) 使这些细胞沉淀, 并且重悬于含有抗体 (即用于表位作图的抗体, 典型地在浓度 100nM 左右) 的 100 µl PBSP 中, 并且在室温下孵育并轻柔混合 1 小时以达到平衡结合。此后, 用 1ml 的冰冷 PBSP 洗涤细胞, 随后在黑暗中的冰上在 1ml PBSP (含有 4 µg/ml 的 Alexa Fluor® 488 (Invitrogen) 羊抗兔 IgG 或 4 µg/ml 的 Alexa Fluor® 488 羊抗鼠 IgG (Invitrogen) 以及 225nM 的 Alexa Fluor® 647HAS 结合物 (Invitrogen)) 中孵育 1 小时。在 1ml 冰冷 PBSP 中的最终洗涤步骤之后, 在分选之前将这些细胞重悬在 300 µl 冰冷的 PBSP 中。使用 FACSVantage SE (BD Biosciences, San Jose, CA) 流式细胞仪将这些细胞分选。将这些细胞直接分选进入 0.5ml 的 B2 培养基 (**Löfblom**, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., **Ståhl**, S. & Wernérus, H. Optimization of electroporation-mediated transformation: Staphylococcus carnosus as model organism. J Appl Microbiol 102, 736-747 (2007)) 并且涂布在含有 10 µg/ml 的氯霉素的血琼脂基质 (Merck) 板上, 并且在 37°C 下孵育 24 小时。在最后一轮中, 将细胞分选进入在 96 孔板的单独的孔 (含有半固体培养基) 中以形成集落。

[0250] c) DNA 测序以及 BLAST 比对

[0251] 将每一集落的部分转移到在 96 孔板中的两个分离的孔用于 PCR。使用两个不同

的引物对通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增该葡萄球菌展示载体的插入片段区域,产生两种分别在正向端和在反向端含有一种生物素分子的 PCR 产物。通过在包被链亲和素的顺磁珠粒 (Dynabeads M-270 ;Dynal Biotech,Oslo,Norway) 上固定的生物素酰化的 PCR 产物的 NaOH 链分离来生成单链 DNA。焦磷酸测序引物的链分离和退火是使用 Magnatrix 1200 移液机器人 (Magnetic Biosolutions AB, Stockholm, Sweden) 根据生产厂家的技术说明书来完成的。根据制造商的说明使用一台 PSQ™ 96HS 仪器 (Biotage AB, Uppsala, Sweden) 在每一插入片段两端进行 10 个循环焦磷酸测序。补充的软件是用 Perl 写成的用于自动分析焦磷酸测序输出文件,包括确定阅读框以及与该抗原进行 BLAST 比对。

[0252] d) 结果

[0253] 如上述建立了一个 SATB2 肽文库并且转化产生约 60,000 个单独的克隆,导致在该葡萄球菌的表面上展示约 2,400 (4%) 个不同的功能性抗原衍生片段。使用以前通过用抗原 SEQ ID NO:111 免疫生产的一群多克隆抗体 (该多克隆抗体 HPA001042) 以及四个单克隆抗体 (3B10、8F11、2B11 以及 5E2) 进行流式细胞计数分选,所有这些多克隆抗体都从相同的抗原 (SEQ ID NO:111) 产生。在成功地富集抗体结合细胞后在第二轮分选中将阳性细胞分离出来。对于该多克隆抗体,使用两个分离的门来收集具有微小差异的抗体结合特性的细胞群,其中每一个单克隆抗体使用一个门。对所收集的来自各基于抗体分选的克隆进行的测序显示了对于该多克隆抗体的五个不同的表位,而所有单克隆抗体的结合模式证实为单一的结合表位。发现已鉴定出的单克隆抗体的共有序列表位 (SEQ ID:1 和 2) 与两个所鉴定的对于多克隆抗体 HPA001042 (序列未包括) 的表位是重叠的。这两个表位被表示为表位 1 (SEQ ID NO:1) 和 2 (SEQ ID NO:2)。

[0254] 基于使用单克隆抗体 8F11 和 5E2 所得到的测序信息,诸位发明人发现用于表位 1 (SEQ ID NO:1, QNFLNLPE) 的共有序列。8F11 的作图显示 16 个氨基酸长度的表位 (SEQ ID NO:3, LRAMQNFLNLPEVERD), 这由 SEQ ID NO:31-51 所支持。换言之,发现了片段 SEQ ID NO:31-51 与 8F11 相互作用并且鉴定出了 SEQ ID NO:3 的共有序列。对于单克隆抗体 5E2,作图显示了 13 个氨基酸长度的表位 (SEQ ID NO:4, QNFLNLPEVERDI), 这由 SEQ ID NO:6-30 所支持。换言之,发现了片段 SEQ ID NO:6-30 与 5E2 相互作用并且鉴定出了 SEQ ID NO:4 的共有序列。

[0255] 此外,诸位发明人基于使用单克隆抗体 3B10 和 2B11 获得的测序信息发现了对于表位 2 的共有序列 (SEQ ID NO:2, GLLSEILRK)。3B10 的作图显示了 10 个氨基酸长度的表位 (SEQ ID NO:5, QGLLSEILRKE), 这由 SEQ ID NO:78-86 所支持。对于单克隆抗体 2B11,作图显示了 9 个氨基酸长度的表位 (SEQ ID NO:2, GLLSEILRK), 这由 SEQ ID NO:52-77 所支持。

[0256] 并且,诸位发明人已经使用多克隆抗体 HPA001042 鉴定出三个另外的表位,即表位 3 (SEQ ID NO:87)、表位 4 (SEQ ID NO:105) 以及表位 5 (SEQ ID NO:106)。诸位发明人使用作图鉴定出该 12 个氨基酸的表位 3 (KTSTPTTDLPIK), 并且该表位是一个基于来自 SEQ ID NO:88-104 的测序信息的共有序列。同样地,诸位发明人通过作图鉴定出该 12 个氨基酸的表位 5, 并且该表位是一个基于来自 SEQ ID NO:107-110 的测序信息的共有序列。此外诸位发明人使用作图还鉴定出该 24 个氨基酸的表位 4 (VSSASSS PSSS RTPQAKTSTPTTD)。

[0257] 4) 结肠癌 TMA (乙状结肠队列)

[0258] a) 材料和方法

[0259] 从瑞典马尔默大学医院的病理系收集在 1993 年与 2003 年之间的对乙状结肠癌进行手术治疗的 305 个患者 (148 名女性以及 157 名男性) 的归档的福尔马林固定的石蜡包埋的组织。患者的中位年龄是 74 岁 (39-97 岁)。49 位的肿瘤是在 Dukes A 期, 127 位是在 Dukes B 期, 89 位是在 Dukes C 期, 并且 46 位是在 Dukes D 期。对于所有患者关于死亡日期的信息是从地区的死亡原因登记册得到的。从地方伦理委员会得到伦理许可。

[0260] 所有 305 个病例在用苏木精和伊红染色的载玻片上进行了组织病理学再评估。然后通过对每个病例从代表乙状结肠癌的区域取样 2x1.0mm 核心构建了 TMA:s。

[0261] 如先前的说明进行自动免疫组织化学 (Kampf C et al. (2004) Clin. Proteomics 1:285-300)。简要地, 在 60°C 下将这些载玻片孵育 45 分钟, 在二甲苯中脱石蜡 (2x15 分钟), 并且在梯度醇中水合。为了抗原恢复, 将载玻片浸于 TRS (靶标恢复溶液, pH 6.0, Dako, Copenhagen, Denmark) 中并且在一种 Decloaking chamber® (Biocare Medical) 中在 125°C 下煮沸 4 分钟。将载玻片放置于该 Autostainer® (Dako) 中并且开始用 H₂O₂ (Dako) 封闭内源性过氧化物酶。在室温下将这些载玻片与如在实例部分 2 中获得的第一抗体 5E2 和 8F11 孵育 30 分钟, 随后用结合 Envision_i® 的羊抗兔过氧化物酶在室温下孵育 30 分钟。在所有步骤之间, 将载玻片在洗涤缓冲液 (Dako) 中漂洗。最后, 用二氨基联苯胺 (Dako) 作为色原体并且用 Harris 苏木精 (Sigma-Aldrich) 进行复染。用 Pertex® (Histolab) 装上这些载玻片。

[0262] 在显微镜下对所有免疫组织化学染色的组织的样品进行人工评估, 并且由认证的病理学家进行评注。使用简化的方案对每个样品就其 IHC 结果的分类进行评注。对每一组织就其代表性和免疫反应性进行检查。对肿瘤细胞和间质两者都进行评注。基本的评注参数包括 i) 亚细胞定位 (细胞核和 / 或细胞质 / 膜), ii) 染色强度 (SI), 以及 iii) 染色细胞的部分 (FSC) 的评估。根据临床上组织病理学诊断使用的标准主观地评估染色强度, 并且将结果分类为: 无 = 无免疫反应性, 弱 = 微弱的免疫反应性, 中等 = 中等免疫反应性, 或强 = 显著而强烈的免疫反应性。普通技术人员会认识到这个步骤与一种 Allred 评分的计算是相似的, 参见例如 Allred et al (1998) Mod Pathol 11(2), 155。

[0263] 为了统计分析, 对细胞核部分 (NF) 和细胞核强度 (NI) 的水平进行了评估。NF 和 NI 两者都是根据在临床组织病理学诊断中所使用的标准来主观评估的: 该“细胞核部分”对应于在细胞核中显示出阳性染色的样品中的肿瘤细胞的百分比, 其中一种在细胞核中的中等的或显著而强烈的免疫反应性被认为是阳性的, 并且在细胞核中没有或微弱的免疫反应性被认为是阴性的。“细胞核强度”对应于该样品的总染色强度。然而, 仅将这些细胞的细胞核的表达考虑在内。一种细胞核强度测定的结果被分类为: 无 = 在该样品的肿瘤细胞的细胞核中没有总体免疫反应性, 弱 = 在该样品的肿瘤细胞的细胞核中微弱的总体免疫反应性, 中等 = 在该样品的肿瘤细胞的细胞核中的中等的总体免疫反应性, 或强 = 在该样品的肿瘤细胞的细胞核中显著而强烈的总体免疫反应性。基于对于单独的层的存活趋势, 构建了一种用于进一步统计分析的二分变数 (dichotomized variable)。对于使用该 5E2 抗体的分析, 高的细胞核部分 (NF > 0) 被定义为 2% 至 100% 的细胞的部分被染色并且低的细胞核部分 (NF = 0) 被定义为 < 2% 的细胞的部分被染色。此外, 弱、中等以及强细胞核强度 (NI > 0) 被定义为高蛋白表达水平, 并且无细胞核强度 (NI = 0) 被定义为低蛋白表

达水平。该 8F11 抗体被更强地染色并且因此高的细胞核部分 ($NF = 1$) 被定义为 $> 75\%$ 的细胞的部分被染色并且低的细胞核部分 ($NF < 1$) 被定义为 0% 至 75% 的细胞的部分被染色。此外, 强的细胞核强度 ($N1 = 1$) 被定义为高蛋白表达并且无、弱以及中等的细胞核强度 ($N1 < 1$) 被定义为低蛋白表达。

[0264] 将样品的上述分类用于根据卡普兰 - 迈耶方法的总存活率 (OS) 分析, 并且使用时序检验来比较在不同层中的存活率。所有统计检验是双侧的, 并且认为 p 值 $< 0.05\%$ 是显著的。所有计算是用统计软件包 SPSS 16.0 (SPSS Inc. Illinois, USA) 作出的。

[0265] b) 结果

[0266] 305 个乙状结肠癌患者的基于组织微阵列的分析表明使用单克隆抗体 5E2 导致强的并且清楚的细胞核染色, 其中 261 位受试者 (86%) 显示了高表达 ($NF \geq 2\%$)。对于患有具有低表达的被 5E2 结合的蛋白的肿瘤的患者, 基于整个队列的细胞核部分的存活率分析显示出显著 ($p = 0.001$) 较低的五年总存活率 (OS) (图 1A)。在五年后约 60% 的具有高表达水平的患者仍然存活, 而在该时间期之后仅有约 25% 的具有低表达水平的患者存活。此外, 当研究诊断为 Dukes C 和 D 期的受试者时, 在预期存活率方面的差别可以被认为是甚至更显著的: 在五年后在这个亚组中约 40% 的具有高表达水平的患者仍然存活, 而在相同的时间期之后仅有约 10% 的具有低蛋白表达水平的患者存活 ($p = 0.01$), 参见图 1B。作为所使用的截断的结果, “低的”种类包括基本上已经失去它们的表达的患者。因此, 蛋白表达的丧失似乎与显著更差的预测相关联, 并且在该疾病的晚期 (例如对于诊断为 Dukes C 和 D 期的患者) 这可以被认为是特别显著的。当研究细胞核强度时得到类似的结果 (图 2A 和 B)。

[0267] 305 个乙状结肠癌患者的基于组织微阵列的分析表明使用单克隆抗体 8F11 导致强的并且清楚的细胞核染色, 其中 275 个受试者 (90%) 显示了高表达 ($NF > 75\%$)。对于患有具有低蛋白表达的肿瘤的患者, 基于整个队列的细胞核部分的存活率分析显示出显著 ($p = 0.004$) 更短的五年总存活率 (OS) (图 3A)。在五年后约 60% 的具有高蛋白水平的患者仍然存活, 而在相同的时间期之后仅有约 27% 的具有低表达水平的患者存活。此外, 当研究诊断为 Dukes C 和 D 期的受试者时, 在预期存活率方面的差别可以被认为是甚至更显著的。在五年后在这个亚组中约 40% 的具有高蛋白水平的患者仍然存活, 而在相同的时间期之后仅有约 12% 的具有低蛋白表达水平的患者存活, 参见图 3B。因此, 低水平的蛋白表达是与显著更差的预测相关联的, 并且在该疾病的晚期 (例如对于诊断为 Dukes C 和 D 期的患者) 该相关性可以被认为是甚至更显著的。当研究细胞核强度时得到类似的结果 (图 4A 和 B)。

[0268] 在图 5 中, 分析了 5E2 和 8F11 的染色的相关性。通过交叉表对染色的肿瘤细胞的细胞核部分进行比较, 并且显示该两种单克隆抗体之间的显著 ($p = 0.001$) 相关性。因此, 这支持了两种单克隆抗体与相同的表位相互作用。

[0269] 结论是, 对于诊断患有结肠直肠癌 (例如, 乙状结肠癌) 的患者, 5E2 和 8F11 的使用对于建立一个用于患者的预测 (即存活概率, 例如五年存活率, 如从图 1 至 4 中可见的) 可能具有重要的价值。

[0270] 建立一个对于结肠直肠癌患者的预测

[0271] 5. 一个非限制性实例

[0272] 癌症患者可以表现出由于肿瘤生长的多种症状或体征、局部症状（包括来自肿瘤生长在其中的病灶的疼痛和不适）或更多的全身症状（例如体重减轻和疲劳）。由于结肠直肠癌的生长，体征还可以通过便血和 / 或机能障碍（例如，腹泻 / 便秘）变得明显。

[0273] 下面，使用一种能够与 SEQ ID NO :1 的表位序列选择性地相互作用的单克隆抗体 (mAB)。这样的单克隆抗体的一个实例是如上在部分 2 的实例中得到的 5E2。

[0274] 确立在患者中的结肠直肠癌诊断之后，获得了来自乙状结肠的肿瘤组织样品。该肿瘤组织样品可以在该癌症的诊断期间从早期进行的活检中获得或从来自较早手术去除的肿瘤的标本中获得。此外，为了提供一种“阴性参比”，从归档的材料中得到一种样品，该材料包括缺乏可检出的包含 SEQ ID NO :1 的蛋白（靶蛋白）的表达的组织。这类归档的组织例如可以是以前显示的当用 mAB 染色时展示无表达的结肠直肠癌组织。此外，为了提供一种“阳性参比”，从归档的材料中得到一种样品，该材料包括具有预先建立的高靶蛋白表达的组织。这类归档的组织可以是例如以前显示的当用 mAB 染色时展示高表达（例如 NF > 75% 或 N1 = 强）的结肠直肠癌组织。将该样品材料在缓冲的福尔马林中进行固定并且进行组织处理从而得到该样品材料薄切片 (4 μm)。

[0275] 如根据部分 4 的实例所述，进行了免疫组织化学。将来自每一样品的一个或多个样品切片固定在载玻片上，在 60°C 下孵育 45 分钟，在二甲苯中脱石蜡 (2x15 分钟)，并且在梯度醇中水合。为了抗原恢复，将载玻片浸于 TRS（靶标恢复溶液，pH 6.0, Dako）中并且在一种 Decloaking chamber® (Biocare Medical) 中在 125°C 下煮沸 4 分钟。将载玻片放置于该 Autostainer® (Dako) 中并且开始用 H₂O₂ (Dako) 封闭内源性过氧化物酶。安装多个样品切片的原因可能是为了增加结果的准确度。

[0276] 将 mAB 加到这些载玻片上并且在室温下孵育 30 分钟，随后用一种标记的第二抗体（例如，羊抗兔过氧化物酶结合的 Envision®）在室温下孵育 30 分钟。为了检测该第二抗体，将二氨基联苯胺 (Dako) 用作色原体并且用 Harris 苏木精 (Sigma-Aldrich) 进行对比复染。在所有步骤之间，将载玻片在洗涤缓冲液 (Dako) 中漂洗。然后，用 Pertex® (Histolab) 封固剂将这些载玻片封固。

[0277] 作为验证该染色步骤的一种工具，可以使用二种对照细胞系；例如一个载玻片具有表达该靶蛋白的细胞（阳性细胞系），并且一个载玻片具有无靶蛋白表达的细胞（阴性细胞系）。技术人员了解如何提供这类细胞系，例如按照 Rhodes 等人披露的 (2006) The biomedical scientist, p 515-520 的指导。这些对照系载玻片可以与这些结肠直肠癌载玻片在同一步骤中同时染色，即与相同的第一和第二抗体孵育。

[0278] 例如，可以使用一种 ScanScope T2 自动化载玻片扫描系统 (Aperio Technologies) 在 20 倍放大率下在一个光学显微镜中扫描一个或多个乙状结肠肿瘤组织载玻片、染色的参比载玻片、以及任选地具有对照细胞系的载玻片。

[0279] 如果使用对照细胞系，检查这些以验证该染色步骤。如果这些细胞系显示可接受标准之外的染色结果，例如由技术人员识别的染色假象，则这些活检样品的染色被认为是无效的并且用新的载玻片重复该整个染色步骤。如果这些阳性和阴性细胞系分别显示强的染色强度和不清楚的或无染色强度，则该染色被认为是有效的。

[0280] 根据在临床组织病理学诊断中使用的标准通过目检人工地对来自该肿瘤组织活检的一个或多个染色的样品载玻片进行评估，并且与部分 4 的实例一致而将一个或多个结

肠直肠癌肿瘤载玻片的免疫反应性进行分级。

[0281] 例如,可以确定细胞核部分(NF)。即,对在细胞核中显示阳性染色的样品载玻片中的肿瘤细胞的百分比进行评估。在肿瘤细胞的细胞核中的中等或显著和强的免疫反应性被认为是阳性的,并且在细胞核中无或弱的免疫反应性被认为是阴性的。例如,可以使用 $NF < 2\%$ 的参比值,并且在这种情况下,这种或这些样品被分成 $NF < 2\%$ 或 $NF \geq 2\%$ 。

[0282] 在确定该 NF 时,人们通过目检这些染色的参比载玻片(即“阳性参比”以及“阴性参比”)的帮助来完成该评估和分级。

[0283] 然后将来自该肿瘤组织的这种或这些样品载玻片的这种或这些样品值(即,一个或多个 NF)与一个参比值进行比较。如果这个或这些样品值等于或低于该参比值,则得出结论,即该预测差于或等于一个与该参比值相关的参比预测。如上述,该参比值可以是 $NF < 2\%$ 。在这种情况下,可以从图 1A 中得到与该参比值相关联的参比预测。在图 1A 中, $NF < 2\%$ (虚线)与 25% 的五年总存活概率相关联。因此,如果所讨论的患者的一个或多个样品值是 $NF < 2\%$ (等于该参比值),则对于该患者的预测是 25% 的五年总存活概率(等于该参比预测)。

[0284] 总结

[0285] 将在本申请中涉及的所有引证材料(包括但不限于公开文件、DNA 或蛋白质数据登录、以及专利)通过引用结合在此。

[0286] 因此很显然本发明的描述可以在许多方面做出同样的改变。此类改变将不被视为是偏离了本发明的精神以及范围,并且对本领域的普通技术人员而言将是显而易见的所有此类变更旨在包含在以下权利要求的范围之内。

[0001]

序列表

<110> Atlas抗体AB

<120> NEW EPITOPES AND USES THEREOF
新的表位及其用途

<130> 21044111

<150> EP08165897.3

<151> 2008-10-06

<150> US 61/102,948

<151> 2008-10-06

<160> 111

<170> PatentIn version 3.3

PatentIn 版本3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人类

<400> 1

~~Gln Asn~~ Phe Leu Asn Leu Pro Glu
1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> 人类

<400> 2

Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys
1 5

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 人类

<400> 3

Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp
1 5 10 15

[0002]

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> 人类

<400> 4

Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile
1 5 10

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> 人类

<400> 5

Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu
1 5 10

<210> 6
<211> 31
<212> PRT
<213> 人类

<400> 6

Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln
1 5 10 15

Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser
20 25 30

<210> 7
<211> 34
<212> PRT
<213> 人类

<400> 7

Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu
1 5 10 15

Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu
20 25 30

[0003]

Arg Ser

<210> 8
<211> 37
<212> PRT
<213> 人类

<400> 8

Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg
1 5 10 15

Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile
20 25 30

Tyr Gln Asp Glu Arg
35

<210> 9
<211> 38
<212> PRT
<213> 人类

<400> 9

Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu
1 5 10 15

Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu
20 25 30

Arg Ser Met Asn Pro Asn
35

<210> 10
<211> 41
<212> PRT
<213> 人类

<400> 10

Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu
1 5 10 15

Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu

[0004]

	20	25	30
Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met			
	35	40	
<210>	11		
<211>	42		
<212>	PRT		
<213>	人类		
<400>	11		
Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu			
1	5	10	15
Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu			
	20	25	30
Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val			
	35	40	
<210>	12		
<211>	43		
<212>	PRT		
<213>	人类		
<400>	12		
Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu			
1	5	10	15
Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu			
	20	25	30
Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser			
	35	40	
<210>	13		
<211>	45		
<212>	PRT		
<213>	人类		
<400>	13		
Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala			
1	5	10	15

[0005]

Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr
20 25 30

Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser
35 40 45

<210> 14
<211> 47
<212> PRT
<213> 人类

<400> 14

Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu
1 5 10 15

Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala
20 25 30

Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile
35 40 45

<210> 15
<211> 49
<212> PRT
<213> 人类

<400> 15

Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys
1 5 10 15

Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg
20 25 30

Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile
35 40 45

Tyr

<210> 16
<211> 49
<212> PRT

[0006]

<213> 人类

<400> 16

Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu
1 5 10 15

Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg
20 25 30

Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met
35 40 45

Val

<210> 17

<211> 50

<212> PRT

<213> 人类

<400> 17

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
1 5 10 15

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
20 25 30

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
35 40 45

Met Asn
50

<210> 18

<211> 51

<212> PRT

<213> 人类

<400> 18

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

[0007]

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
35 40 45

Pro Glu Val
50

<210> 19
<211> 52
<212> PRT
<213> 人类

<400> 19

Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr
1 5 10 15

Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu
20 25 30

Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu
35 40 45

Arg Ser Met Asn
50

<210> 20
<211> 55
<212> PRT
<213> 人类

<400> 20

Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln
1 5 10 15

Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser
35 40 45

Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro

[0008]

50

55

<210> 21
<211> 56
<212> PRT
<213> 人类

<400> 21

Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro
20 25 30

Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met
35 40 45

Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser
50 55

<210> 22
<211> 64
<212> PRT
<213> 人类

<400> 22

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
35 40 45

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
50 55 60

<210> 23
<211> 68
<212> PRT
<213> 人类

[0009]

<400> 23

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
35 40 45

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
50 55 60

Met Asn Pro Asn
65

<210> 24

<211> 68

<212> PRT

<213> 人类

<400> 24

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
1 5 10 15

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
20 25 30

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser
35 40 45

Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu
50 55 60

Pro Ile Lys Val
65

<210> 25

<211> 88

<212> PRT

<213> 人类

<400> 25

[0010]

Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg
1 5 10 15

Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe
20 25 30

Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg
35 40 45

Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser
50 55 60

Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr
65 70 75 80

Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp
85

<210> 26

<211> 90

<212> PRT

<213> 人类

<400> 26

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
35 40 45

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
50 55 60

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser
65 70 75 80

Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser
85 90

[0011]

<210> 27
<211> 91
<212> PRT
<213> 人类

<400> 27

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
1 5 10 15

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
20 25 30

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser
35 40 45

Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu
50 55 60

Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr
65 70 75 80

Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys Arg Ala Lys
85 90

<210> 28
<211> 96
<212> PRT
<213> 人类

<400> 28

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
35 40 45

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
50 55 60

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser

[0012]

65		70		75		80
Ser Ser Arg Thr	Pro Gln Ala Lys Thr	Ser Thr Pro Thr Thr	Asp Leu			
	85	90	95			

<210> 29
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 29

Val Ser Gln Ala	Val Phe Ala Arg	Val Ala Phe Asn Arg	Thr Gln Gly
1	5	10	15

Leu Leu Ser	Glu Ile Leu Arg Lys	Glu Glu Asp Pro Arg	Thr Ala Ser
	20	25	30

Gln Ser Leu Leu	Val Asn Leu Arg	Ala Met Gln Asn Phe	Leu Asn Leu
	35	40	45

Pro Glu Val Glu	Arg Asp Arg Ile Tyr	Gln Asp Glu Arg	Glu Arg Ser
	50	55	60

Met Asn Pro Asn	Val Ser Met Val Ser	Ser Ala Ser Ser	Ser Pro Ser
	65	70	75

Ser Ser Arg Thr	Pro Gln Ala Lys Thr	Ser Thr Pro Thr Thr	Asp Leu
	85	90	95

Pro Ile Lys Val	Asp Gly Ala Asn	Ile Asn Ile Thr	Ala Ala Ile Tyr
	100	105	110

Asp Glu

<210> 30
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 30

Val Ser Gln Ala	Val Phe Ala Arg	Val Ala Phe Asn Arg	Thr Gln Gly
1	5	10	15

[0013]

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
35 40 45

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
50 55 60

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser
65 70 75 80

Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu
85 90 95

Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr
100 105 110

Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys Arg Ala Lys
115 120

<210> 31
<211> 33
<212> PRT
<213> 人类

<400> 31

Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val
1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg
20 25 30

Asp

<210> 32
<211> 38
<212> PRT
<213> 人类

<400> 32

[0014]

Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val
1 5 10 15

Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro
20 25 30

Asn Val Ser Met Val Ser
35

<210> 33
<211> 39
<212> PRT
<213> 人类

<400> 33

Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg
1 5 10 15

Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile
20 25 30

Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg
35

<210> 34
<211> 42
<212> PRT
<213> 人类

<400> 34

Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn
1 5 10 15

Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg
20 25 30

Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser
35 40

<210> 35
<211> 43
<212> PRT
<213> 人类

[0015]

<400> 35

Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn
1 5 10 15

Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg
20 25 30

Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser
35 40

<210> 36

<211> 45

<212> PRT

<213> 人类

<400> 36

Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu
1 5 10 15

Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu
20 25 30

Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
35 40 45

<210> 37

<211> 47

<212> PRT

<213> 人类

<400> 37

Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala
1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn
20 25 30

Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu
35 40 45

<210> 38

[0016]

<211> 49
<212> PRT
<213> 人类

<400> 38

Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys
1 5 10 15

Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg
20 25 30

Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile
35 40 45

Tyr

<210> 39
<211> 53
<212> PRT
<213> 人类

<400> 39

Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala
1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn
20 25 30

Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg
35 40 45

Ser Met Asn Pro Asn
50

<210> 40
<211> 54
<212> PRT
<213> 人类

<400> 40

Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn
1 5 10 15

[0017]

Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu
20 25 30

Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Pro Ser Ser Ser
50

<210> 41
<211> 63
<212> PRT
<213> 人类

<400> 41

Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val
1 5 10 15

Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro
20 25 30

Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg
35 40 45

Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile
50 55 60

<210> 42
<211> 64
<212> PRT
<213> 人类

<400> 42

Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp
1 5 10 15

Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln
20 25 30

Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp
35 40 45

[0018]

Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
50 55 60

<210> 43
<211> 65
<212> PRT
<213> 人类

<400> 43

Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val
1 5 10 15

Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro
20 25 30

Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg
35 40 45

Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys
50 55 60

Val
65

<210> 44
<211> 65
<212> PRT
<213> 人类

<400> 44

Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys
1 5 10 15

Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg
20 25 30

Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile
35 40 45

Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val
50 55 60

[0019]

Ser
65

<210> 45
<211> 66
<212> PRT
<213> 人类

<400> 45

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
1 5 10 15

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
20 25 30

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser
35 40 45

Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu
50 55 60

Pro Ile
65

<210> 46
<211> 68
<212> PRT
<213> 人类

<400> 46

Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg
1 5 10 15

Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu
20 25 30

Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg
35 40 45

Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met
50 55 60

Val Ser Ser Ala

[0020]

65

<210> 47
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 47

Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp
 1 5 10 15

Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln
 20 25 30

Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp
 35 40 45

Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
 50 55 60

Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln
 65 70 75

<210> 48
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> 人类

<400> 48

Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met
 1 5 10 15

Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln
 20 25 30

Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser
 35 40 45

Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser
 50 55 60

Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile
 65 70 75

[0021]

<210> 49
<211> 83
<212> PRT
<213> 人类

<400> 49

Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp
1 5 10 15

Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln
20 25 30

Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp
35 40 45

Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
50 55 60

Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr
65 70 75 80

Pro Thr Thr

<210> 50
<211> 85
<212> PRT
<213> 人类

<400> 50

Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp
1 5 10 15

Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser
20 25 30

Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln
35 40 45

Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly
50 55 60

[0022]

Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr Asp Glu Ile Gln Gln Glu
65 70 75 80

Met Lys Arg Ala Lys
85

<210> 51
<211> 107
<212> PRT
<213> 人类

<400> 51

Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp
1 5 10 15

Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln
20 25 30

Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp
35 40 45

Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
50 55 60

Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr
65 70 75 80

Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile
85 90 95

Thr Ala Ala Ile Tyr Asp Glu Ile Gln Gln Glu
100 105

<210> 52
<211> 21
<212> PRT
<213> 人类

<400> 52

Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg
1 5 10 15

[0023]

Thr Ala Ser Gln Ser
20

<210> 53
<211> 23
<212> PRT
<213> 人类

<400> 53

Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys
20

<210> 54
<211> 26
<212> PRT
<213> 人类

<400> 54

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu
20 25

<210> 55
<211> 27
<212> PRT
<213> 人类

<400> 55

Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro
20 25

<210> 56
<211> 28
<212> PRT
<213> 人类

[0024]

<400> 56

Val	Ser	Gln	Ala	Val	Phe	Ala	Arg	Val	Ala	Phe	Asn	Arg	Thr	Gln	Gly
1				5					10					15	

Leu	Leu	Ser	Glu	Ile	Leu	Arg	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro
			20					25			

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> 人类

<400> 57

Val	Ser	Gln	Ala	Val	Phe	Ala	Arg	Val	Ala	Phe	Asn	Arg	Thr	Gln	Gly
1				5					10					15	

Leu	Leu	Ser	Glu	Ile	Leu	Arg	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro	Arg	Thr	Ala	Ser
			20					25					30		

<210> 58

<211> 34

<212> PRT

<213> 人类

<400> 58

Ala	Val	Phe	Ala	Arg	Val	Ala	Phe	Asn	Arg	Thr	Gln	Gly	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15	

Glu	Ile	Leu	Arg	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro	Arg	Thr	Ala	Ser	Gln	Ser	Leu
			20					25					30		

Leu Val

<210> 59

<211> 36

<212> PRT

<213> 人类

<400> 59

Asn	Arg	Thr	Gln	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Ile	Leu	Arg	Lys	Glu	Glu	Asp
1					5				10					15	

[0025]

Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln
20 25 30

Asn Phe Leu Asn
35

<210> 60
<211> 49
<212> PRT
<213> 人类

<400> 60

Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys
1 5 10 15

Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg
20 25 30

Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile
35 40 45

Tyr

<210> 61
<211> 53
<212> PRT
<213> 人类

<400> 61

Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu
1 5 10 15

Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala
20 25 30

Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Glu Arg Glu
50

[0026]

<210> 62
<211> 54
<212> PRT
<213> 人类

<400> 62

Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu
1 5 10 15

Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met
20 25 30

Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln
35 40 45

Asp Glu Arg Glu Arg Ser
50

<210> 63
<211> 57
<212> PRT
<213> 人类

<400> 63

Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser
1 5 10 15

Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu
20 25 30

Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val
35 40 45

Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu
50 55

<210> 64
<211> 60
<212> PRT
<213> 人类

<400> 64

[0027]

Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala
1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn
20 25 30

Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg
35 40 45

Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
50 55 60

<210> 65
<211> 67
<212> PRT
<213> 人类

<400> 65

Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln
20 25 30

Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro
35 40 45

Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met
50 55 60

Asn Pro Asn
65

<210> 66
<211> 69
<212> PRT
<213> 人类

<400> 66

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser

[0028]

	20	25	30
Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu	35	40	45
Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser	50	55	60
Met Asn Pro Asn Val	65		
<210> 67			
<211> 69			
<212> PRT			
<213> 人类			
<400> 67			
Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu	5	10	15
Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln	20	25	30
Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro	35	40	45
Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met	50	55	60
Asn Pro Asn Val Ser	65		
<210> 68			
<211> 72			
<212> PRT			
<213> 人类			
<400> 68			
Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp	5	10	15
Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln	20	25	30

[0029]

Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp
35 40 45

Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
50 55 60

Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg
65 70

<210> 69
<211> 73
<212> PRT
<213> 人类

<400> 69

Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp
1 5 10 15

Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln
20 25 30

Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp
35 40 45

Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
50 55 60

Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr
65 70

<210> 70
<211> 75
<212> PRT
<213> 人类

<400> 70

Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp
1 5 10 15

Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln
20 25 30

[0030]

Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp
35 40 45

Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
50 55 60

Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln
65 70 75

<210> 71
<211> 89
<212> PRT
<213> 人类

<400> 71

Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu
1 5 10 15

Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala
20 25 30

Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser
50 55 60

Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr
65 70 75 80

Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile
85

<210> 72
<211> 92
<212> PRT
<213> 人类

<400> 72

Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser
1 5 10 15

[0031]

Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu
20 25 30

Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val
35 40 45

Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro
50 55 60

Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg
65 70 75 80

Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp
85 90

<210> 73
<211> 100
<212> PRT
<213> 人类

<400> 73

Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser
1 5 10 15

Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu
20 25 30

Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val
35 40 45

Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro
50 55 60

Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg
65 70 75 80

Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys
85 90 95

Val Asp Gly Ala
100

<210> 74

[0032]

<211> 103
<212> PRT
<213> 人类

<400> 74

Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser
1 5 10 15

Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu
20 25 30

Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val
35 40 45

Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro
50 55 60

Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg
65 70 75 80

Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys
85 90 95

Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn
100

<210> 75
<211> 107
<212> PRT
<213> 人类

<400> 75

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
35 40 45

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
50 55 60

[0033]

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser
65 70 75 80

Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu
85 90 95

Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile
100 105

<210> 76
<211> 116
<212> PRT
<213> 人类

<400> 76

Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln
20 25 30

Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu Pro
35 40 45

Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met
50 55 60

Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser
65 70 75 80

Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro
85 90 95

Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr Asp
100 105 110

Glu Ile Gln Gln
115

<210> 77
<211> 114
<212> PRT

[0034]

<213> 人类

<400> 77

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
35 40 45

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
50 55 60

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser
65 70 75 80

Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu
85 90 95

Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr
100 105 110

Asp Glu

<210> 78

<211> 21

<212> PRT

<213> 人类

<400> 78

Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu
1 5 10 15

Ile Leu Arg Lys Glu
20

<210> 79

<211> 22

<212> PRT

<213> 人类

[0035]

<400> 79

Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser
1 5 10 15

Glu Ile Leu Arg Lys Glu
20

<210> 80

<211> 25

<212> PRT

<213> 人类

<400> 80

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu
20 25

<210> 81

<211> 35

<212> PRT

<213> 人类

<400> 81

Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu
1 5 10 15

Asp Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met
20 25 30

Gln Asn Phe
35

<210> 82

<211> 35

<212> PRT

<213> 人类

<400> 82

Phe Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu

[0036]

1	5	10	15
Asp Pro Arg Thr	Ala Ser Gln Ser	Leu Leu Val Asn Leu	Arg Ala Met
20		25	30

Gln Asn Phe
35

<210> 83
<211> 49
<212> PRT
<213> 人类

<400> 83

Gln Gly Leu Leu	Ser Glu Ile Leu	Arg Lys Glu Glu	Asp Pro Arg Thr
1	5	10	15

Ala Ser Gln Ser	Leu Leu Val Asn	Leu Arg Ala Met	Gln Asn Phe Leu
20		25	30

Asn Leu Pro Glu	Val Glu Arg Asp	Arg Ile Tyr Gln	Asp Glu Arg Glu
35		40	45

Arg

<210> 84
<211> 55
<212> PRT
<213> 人类

<400> 84

Arg Val Ala Phe	Asn Arg Thr Gln	Gly Leu Leu Ser	Glu Ile Leu Arg
1	5	10	15

Lys Glu Glu Asp	Pro Arg Thr Ala	Ser Gln Ser Leu	Leu Val Asn Leu
20		25	30

Arg Ala Met Gln	Asn Phe Leu Asn	Leu Pro Glu Val	Glu Arg Asp Arg
35		40	45

Ile Tyr Gln Asp	Glu Arg Glu
50	55

[0037]

<210> 85
<211> 56
<212> PRT
<213> 人类

<400> 85

Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp
1 5 10 15

Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln
20 25 30

Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp
35 40 45

Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro
50 55

<210> 86
<211> 75
<212> PRT
<213> 人类

<400> 86

Asn Arg Thr Gln Gly Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp
1 5 10 15

Pro Arg Thr Ala Ser Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln
20 25 30

Asn Phe Leu Asn Leu Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp
35 40 45

Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala
50 55 60

Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln
65 70 75

<210> 87
<211> 12
<212> PRT

[0038]

<213> 人类

<400> 87

Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys
1 5 10

<210> 88

<211> 25

<212> PRT

<213> 人类

<400> 88

Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser
1 5 10 15

Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys
20 25

<210> 89

<211> 25

<212> PRT

<213> 人类

<400> 89

Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys
1 5 10 15

Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr
20 25

<210> 90

<211> 26

<212> PRT

<213> 人类

<400> 90

Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala
1 5 10 15

Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr Asp
20 25

[0039]

<210> 91
<211> 26
<212> PRT
<213> 人类

<400> 91

Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr
1 5 10 15

Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys
20 25

<210> 92
<211> 30
<212> PRT
<213> 人类

<400> 92

Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr
1 5 10 15

Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile
20 25 30

<210> 93
<211> 31
<212> PRT
<213> 人类

<400> 93

Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp
1 5 10 15

Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr Asp Glu Ile Gln
20 25 30

<210> 94
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类

<400> 94

Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp

[0040]

1	5	10	15
Leu Pro Ile	Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr	Ala Ala Ile	
20	25	30	

<210> 95
<211> 34
<212> PRT
<213> 人类

<400> 95

Ser Ala Ser Ser	Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr	
1	5	10

Ser Thr Pro Thr	Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile	
20	25	30

Asn Ile

<210> 96
<211> 36
<212> PRT
<213> 人类

<400> 96

Ala Ser Ser Ser	Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser	
1	5	10

Thr Pro Thr Thr	Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn	
20	25	30

Ile Thr Ala Ala
35

<210> 97
<211> 43
<212> PRT
<213> 人类

<400> 97

Met Val Ser Ser	Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln	
1	5	10

[0041]

Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly
20 25 30

Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr Asp
35 40

<210> 98
<211> 44
<212> PRT
<213> 人类

<400> 98

Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro
1 5 10 15

Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr
20 25 30

Ala Ala Ile Tyr Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys
35 40

<210> 99
<211> 45
<212> PRT
<213> 人类

<400> 99

Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met
1 5 10 15

Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala
20 25 30

Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val
35 40 45

<210> 100
<211> 48
<212> PRT
<213> 人类

<400> 100

Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr
1 5 10 15

Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val
20 25 30

Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr Asp Glu Ile Gln
35 40 45

<210> 101
<211> 45
<212> PRT
<213> 人类

<400> 101

Ser Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro
1 5 10 15

Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp
20 25 30

Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr
35 40 45

<210> 102
<211> 47
<212> PRT
<213> 人类

<400> 102

Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr
1 5 10 15

Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile
20 25 30

Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys
35 40 45

<210> 103
<211> 49
<212> PRT
<213> 人类

[0043]

<400> 103

Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser Met Asn
1 5 10 15

Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser
20 25 30

Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile
35 40 45

Lys

<210> 104

<211> 51

<212> PRT

<213> 人类

<400> 104

Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala
1 5 10 15

Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala
20 25 30

Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met
35 40 45

Lys Arg Ala
50

<210> 105

<211> 24

<212> PRT

<213> 人类

<400> 105

Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala
1 5 10 15

Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp

[0044]

20

<210> 106
<211> 12
<212> PRT
<213> 人类

<400> 106

Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr
1 5 10

<210> 107
<211> 29
<212> PRT
<213> 人类

<400> 107

Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr
1 5 10 15

Ala Ala Ile Tyr Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys Arg
20 25

<210> 108
<211> 22
<212> PRT
<213> 人类

<400> 108

Thr Thr Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr
1 5 10 15

Ala Ala Ile Tyr Asp Glu
20

<210> 109
<211> 24
<212> PRT
<213> 人类

<400> 109

Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr
1 5 10 15

[0045]

Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys
20

<210> 110
<211> 14
<212> PRT
<213> 人类

<400> 110

Asp Leu Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr
1 5 10

<210> 111
<211> 123
<212> PRT
<213> 人类

<400> 111

Val Ser Gln Ala Val Phe Ala Arg Val Ala Phe Asn Arg Thr Gln Gly
1 5 10 15

Leu Leu Ser Glu Ile Leu Arg Lys Glu Glu Asp Pro Arg Thr Ala Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Leu Val Asn Leu Arg Ala Met Gln Asn Phe Leu Asn Leu
35 40 45

Pro Glu Val Glu Arg Asp Arg Ile Tyr Gln Asp Glu Arg Glu Arg Ser
50 55 60

Met Asn Pro Asn Val Ser Met Val Ser Ser Ala Ser Ser Ser Pro Ser
65 70 75 80

Ser Ser Arg Thr Pro Gln Ala Lys Thr Ser Thr Pro Thr Thr Asp Leu
85 90 95

Pro Ile Lys Val Asp Gly Ala Asn Ile Asn Ile Thr Ala Ala Ile Tyr
100 105 110

Asp Glu Ile Gln Gln Glu Met Lys Arg Ala Lys
115 120

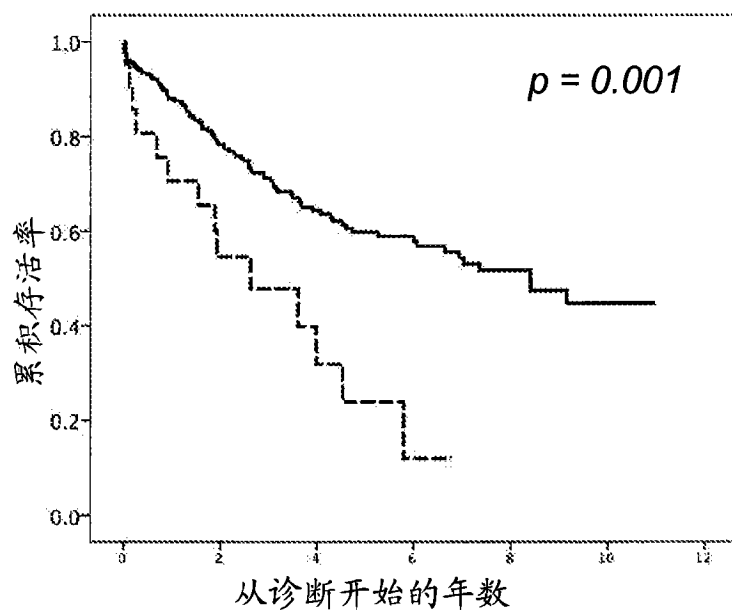


图 1A

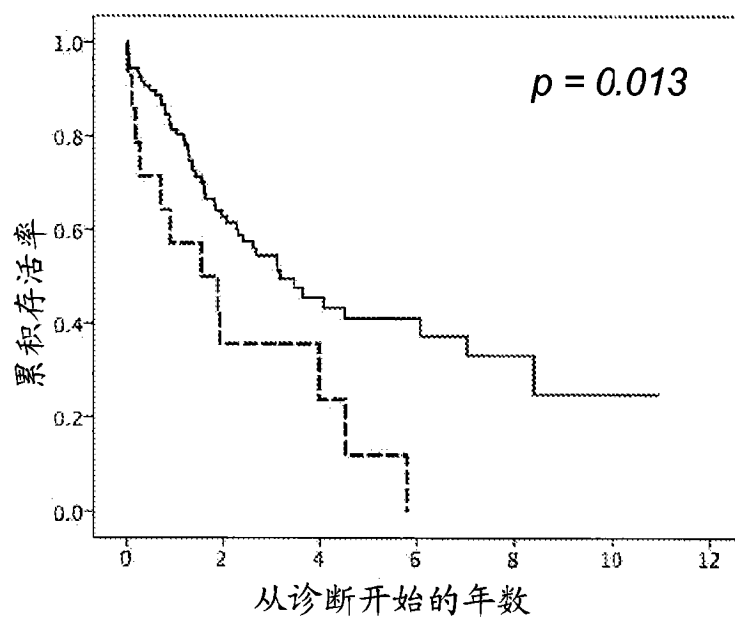


图 1B

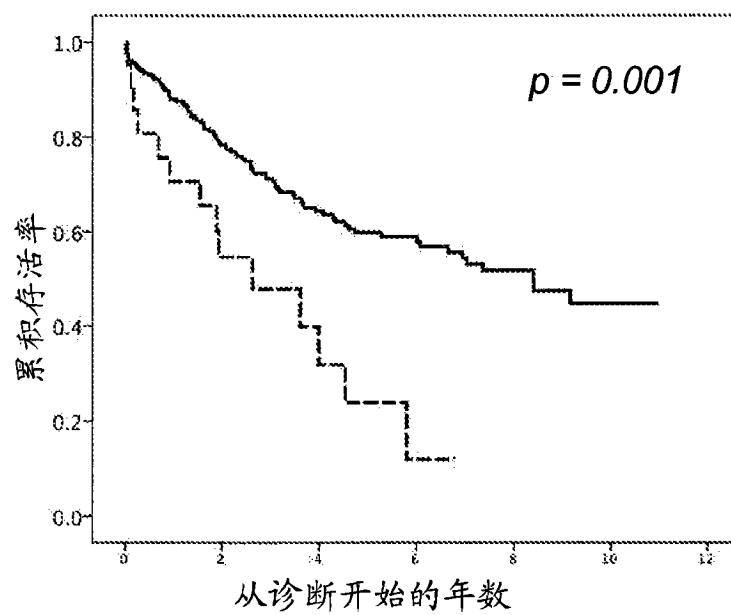


图 2A

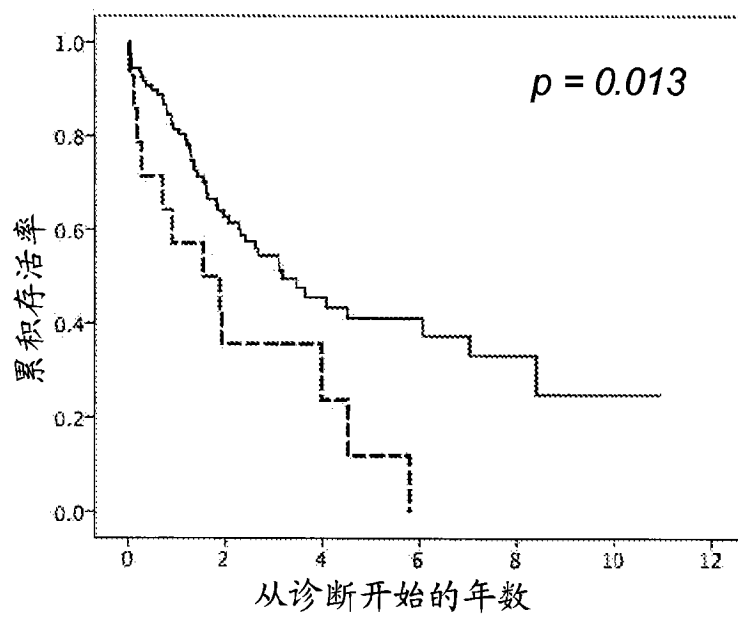


图 2B

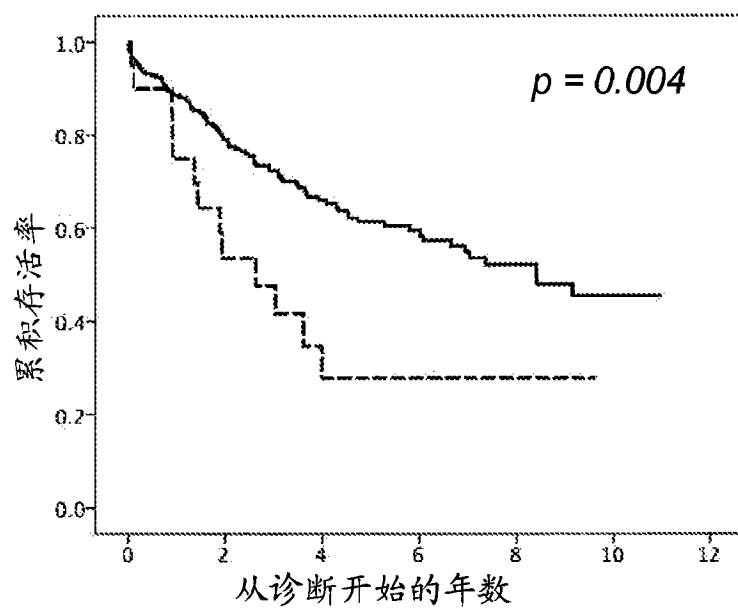


图 3A

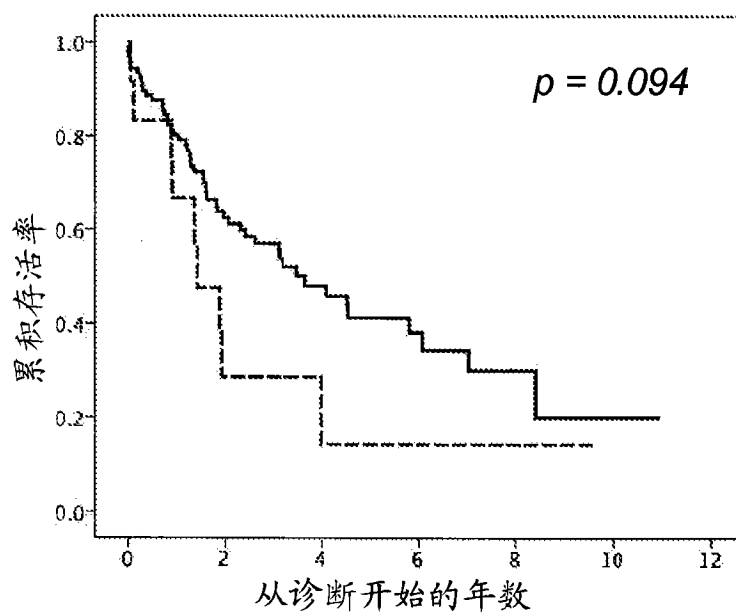


图 3B

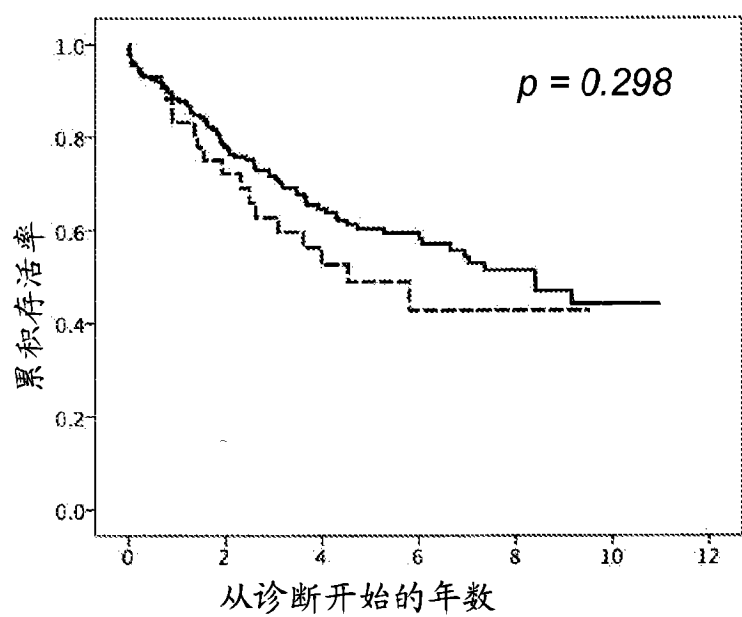


图 4A

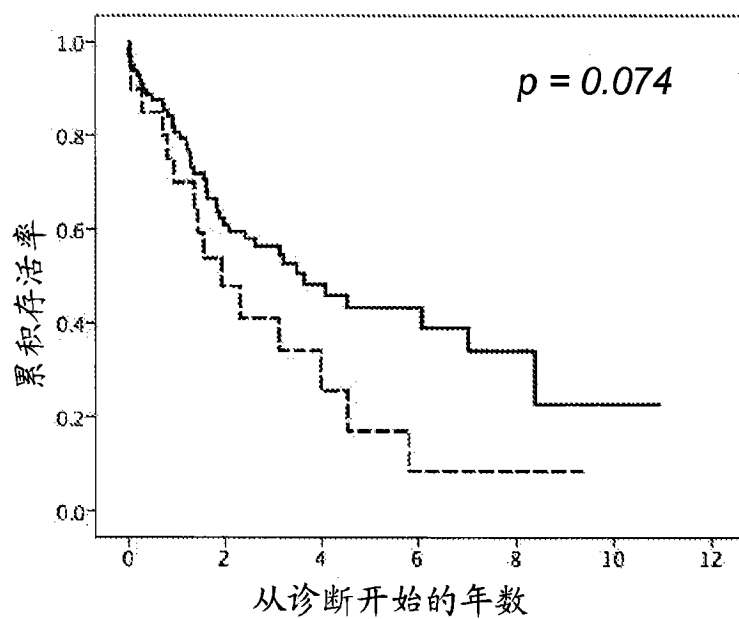


图 4B

计数		5E2 NFdic		
		<2 % 阳性细胞	≥ 2%阳性 细胞	总计
8F11_NFdic	0-75%	8	12	20
	>75%	13	238	251
	Total	21	250	271

图 5

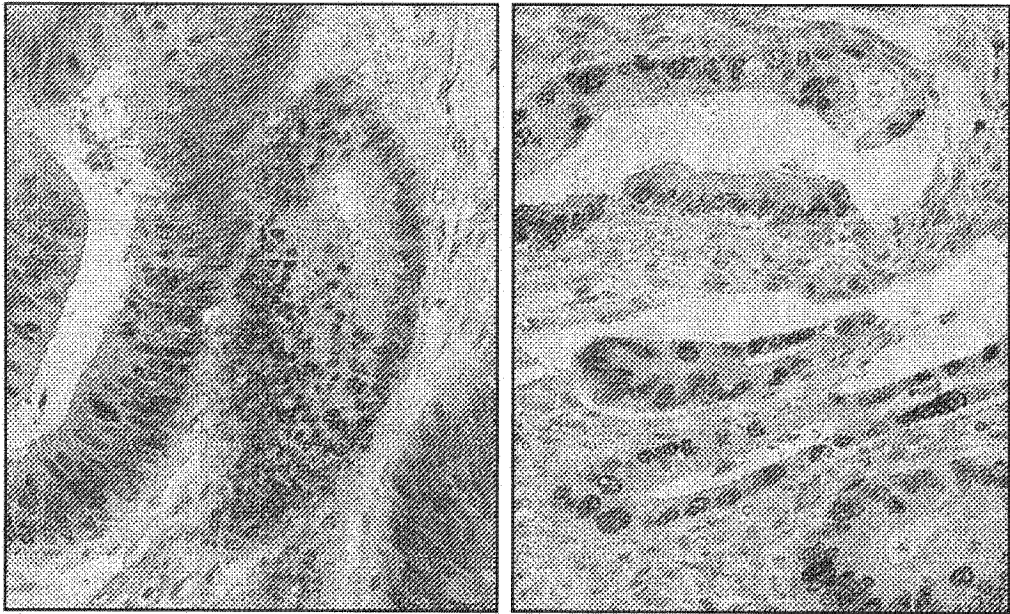


图 6A

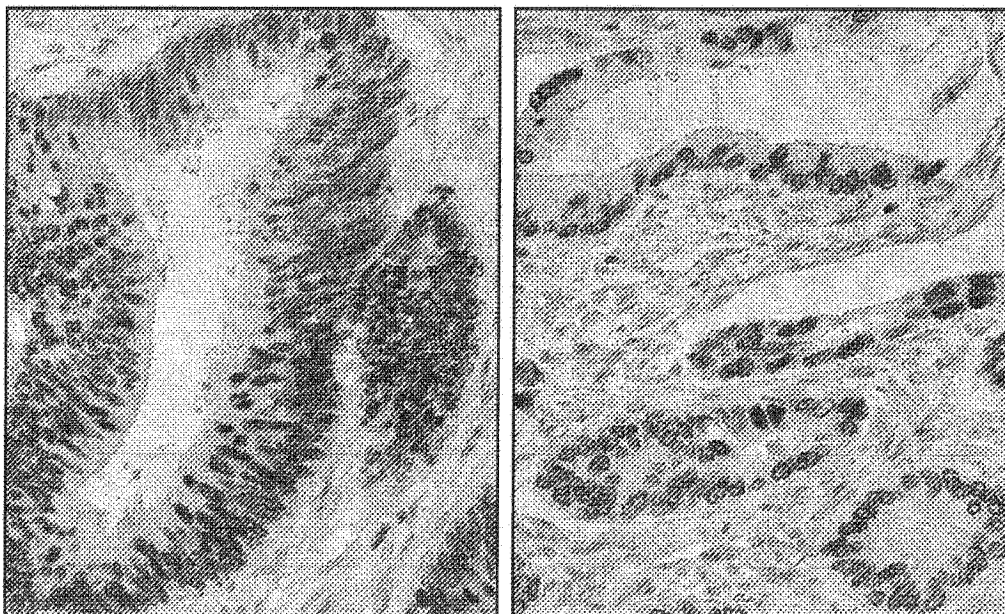


图 6B

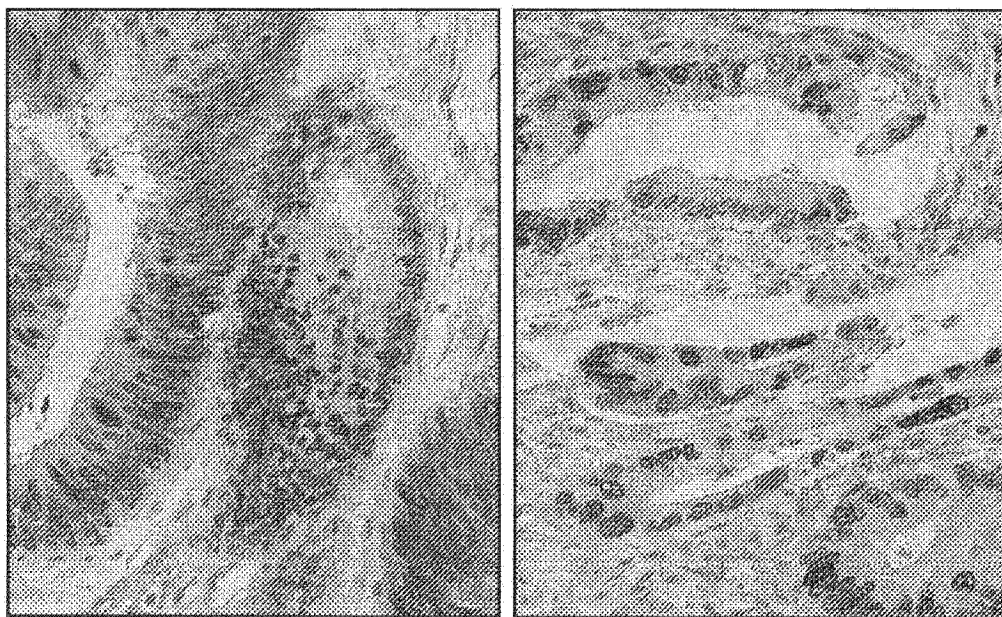


图 7A

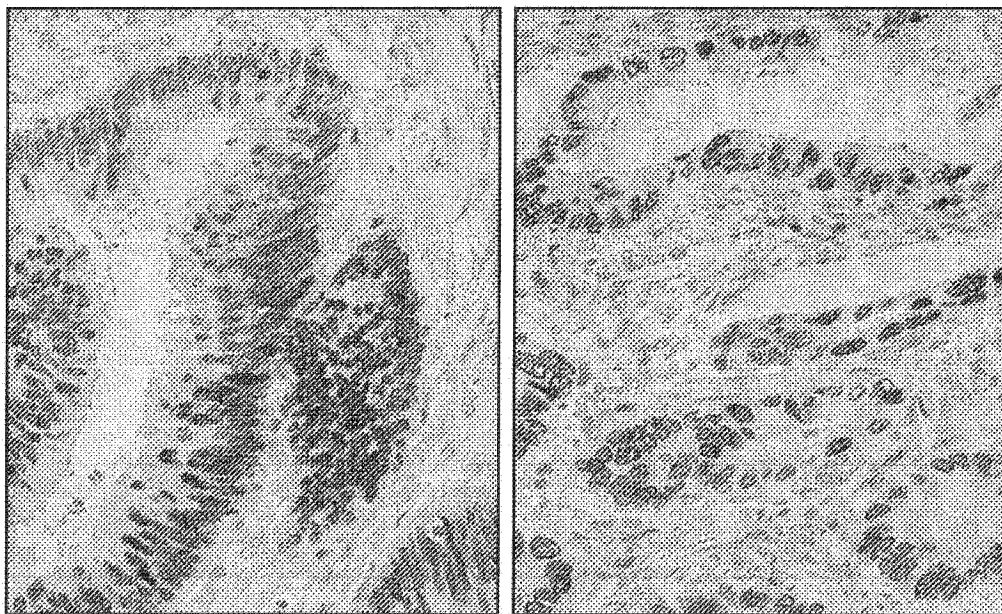


图 7B