



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101918836 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 200880023852.5

(22) 申请日 2008.05.08

(30) 优先权数据

60/916,719 2007.05.08 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.01.08

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/005983 2008.05.08

(87) PCT申请的公布数据

W02008/140774 EN 2008.11.20

(71) 申请人 皮可贝拉有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 B·王 M·瓦布

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 康健 林晓红

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 14 页 序列表 7 页  
附图 6 页

(54) 发明名称

诊断和治疗前列腺癌和肺癌的方法

(57) 摘要

公开了检测和治疗前列腺癌和肺癌的方法。在实施该方法中,检测对象样品中的 GPR110 蛋白或其 RNA 转录物,观察到的 GPR110 或转录水平被用于确定个体是否有与前列腺癌或肺癌相关的 GPR110 水平的升高。依照本发明,有此种水平升高的病人可以用各种 GPR110 相关的免疫治疗剂治疗。

1. 一种在人对象中筛查肺癌或前列腺癌的方法,包括
  - (a) 检测对象样品中的人 GPR110 或其 RNA 转录物的水平
  - (b) 确定人 GPR110 或其 RNA 转录物的检测水平是否分别比从大多数正常人样品确定的正常人对象内 GPR110 或其转录物水平高至少三倍。
2. 权利要求 1 所述的方法,其中对象样品是肺或前列腺的组织学组织样品,步骤 (a) 包括,在对抗体结合到具有 GPR110 表位的细胞有效的条件下将所述样品与特异性针对 GPR110 表位的抗 -GRP110 抗体接触,并检测结合于所述样品的抗体水平,和步骤 (b) 包括确定与对象肺或前列腺组织样品结合的抗体的检测水平是否分别比结合于从正常个体获得的人肺或前列腺组织样品的抗 -GPR110 抗体的检测水平高至少三倍。
3. 权利要求 2 所述的方法,其中所述抗体特异性针对 SEQ ID NO :1 中氨基酸残基代表的 GPR110 表位。
4. 权利要求 2 所述的方法,其中步骤 (a) 中的抗 -GPR110 抗体是放射性标记的 GPR110 抗体,步骤 (a) 包括通过闪烁扫描法检测所述组织内局部化的放射性标记的水平。
5. 权利要求 1 所述的方法,其中对象样品是对象血液或血清样品,步骤 (a) 包括在对抗体结合 GPR110 表位有效的条件下将所述样品与特异性针对 GPR110 表位的抗 -GPR110 抗体接触,从未结合抗体分离结合于 GPR110 表位的抗体,并检测结合于 GPR110 表位的抗体的水平,和步骤 (b) 包括确定结合于 GPR110 表位的抗体的检测水平是否比结合于从正常个体获得的血液或血清样品中存在的 GPR110 表位的抗 -GPR110 抗体的检测水平高至少三倍。
6. 权利要求 5 所述的方法,其中步骤 (a) 包括将血液或血清样品体液施加于固相免疫分析装置,其中样品中的 GPR110 水平由比色或荧光指标定性表示,确定步骤包括将该指标与已知标准比较。
7. 权利要求 1 所述的方法,其中对象样品是肺或前列腺组织样品,步骤 (a) 包括处理样品以从中提取 RNA 转录物并检测编码 GPR110 蛋白至少一个片段的 RNA 转录物的水平,和步骤 (b) 包括确定 RNA 转录物的检测水平是否比从正常个体获得的肺或前列腺组织样品中编码 GPR110 蛋白至少一个片段的转录物的检测水平高至少三倍。
8. 通过检测肺癌或前列腺癌的诊断性生物学标志或其他指标的降低或升高的水平来筛查肺癌或前列腺癌存在的方法中的改进,包括
  - (a) 检测对象样品中人 GPR110 或其转录物的水平,和
  - (b) 确定人 GPR110 或其转录物的检测水平是否分别比从多数正常人样品确定的正常人个体中 GPR110 或其转录物的水平高至少三倍,作为肺癌或前列腺癌存在的另一个指标。
9. 权利要求 8 所述的改进,其中对象样品是对象肺或前列腺组织学组织样品,步骤 (a) 包括在对抗体结合具有 GPR110 表位的细胞有效的条件下将所述样品与特异性针对 GPR110 表位的抗 -GPR110 抗体接触,检测结合于所述样品的抗体水平,和步骤 (b) 包括确定结合对象肺或前列腺组织样品的抗体的检测水平是否分别比结合于从正常个体获得的人肺或前列腺组织样品的抗 GPR110 抗体的检测水平高至少三倍。
10. 权利要求 9 所述的改进,其中所述抗体是特异性针对 SEQ IDNO :1 中氨基酸残基代表的 GPR110 表位。
11. 权利要求 9 所述的改进,其中步骤 (a) 中的抗 -GPR110 抗体是放射性标记的 GPR110 抗体,步骤 (a) 包括通过闪烁扫描检测所述组织中局部化的放射性标记的水平。

12. 权利要求 9 所述的改进,其中对象样品是对象血液或血清样品,步骤 (a) 包括在对抗体结合 GPR110 表位有效的条件下将所述样品与特异性针对 GPR110 表位的抗 GPR110 抗体接触,从未结合抗体分离结合于 GPR110 表位的抗体,并检测结合于 GPR110 表位的抗体的水平,和步骤 (b) 包括确定结合于 GPR110 表位的抗体检测水平是否比结合于从正常个体获得的血液或血清样品中存在的 GPR110 表位的抗 -GPR110 抗体的检测水平高至少三倍。

13. 权利要求 12 所述的改进,其中步骤 (a) 包括将血液或血清样品体液施加于固相免疫分析装置,其中样品中的 GPR110 水平由比色或荧光指标定性表示,确定步骤包括将该指标与已知标准比较。

14. 权利要求 8 所述的改进,其中对象样品是肺或前列腺组织样品,步骤 (a) 包括处理样品以从中提取 RNA 转录物和检测编码 GPR110 蛋白至少一个片段的 RNA 转录物的水平,和步骤 (b) 包括确定 RNA 转录物的检测水平是否比从正常个体获得的肺或前列腺组织样品中的编码 GPR110 蛋白至少一个片段的转录物的检测水平高至少三倍。

15. 权利要求 8 所述的改进,所述改进是在检测男性对象中的前列腺癌方法中,其通过将对象体液样品与特异性针对选自总前列腺特异性抗原 (PSA),游离 PSA,和磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(GPC3) 之一的至少一种标志蛋白的抗体反应,并确定该对象是否具有增加水平的至少一种所述标志蛋白,作为前列腺癌的指标。

16. 来自人对象的血液或血清样品中 GPR110 检测值和选自总前列腺特异性抗原 (PSA),游离 PSA 和磷脂酰肌醇蛋白聚糖 3(GPC3) 的至少一种标志抗原的检测值在筛查对象前列腺癌存在中的用途。

17. 用于筛查人对象中前列腺癌或肺癌或给对象前列腺癌或肺癌治疗分期的一种诊断装置,包括:

(a) 接受来自对象的体液样品的结构

(b) 一种抗体,其特异性针对 GPR110 的选定结构域或表位,结合于所述结构,能够与所述结构接受的体液反应,并与其他结合于该结构的试剂一起产生可检测的反应,指示包含所述表位或结构域的 GPR110 样品蛋白的存在,

(c) 第一已知标准指标,根据此指标,可检测反应所产生的水平可以被评定为与前列腺癌或肺癌有关的水平增加。

18. 权利要求 17 所述的装置,其中该装置内的结构包括多孔垫板,其中包埋抗体,当液体样品加到垫板上时用于与样品反应,可检测反应用比色或荧光指标指示,且已知的标准指标包括这样的标记,其代表包含相应于与前列腺癌或肺癌相关的表位或结构域的表位或结构域的 GPR110 的水平。

19. 权利要求 18 所述的装置,进一步包括用于产生与产生的 GPR110 水平相关的信号的分光光度计测量器,用于比较该信号与前列腺癌或肺癌相关的已知标准信号值的微处理器,和用于显示该微处理器的输出结果的显示器。

20. 权利要求 18 所述的装置,其中装置内的抗 -GPR110 结合蛋白是特异性针对包含在 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 中的表位的抗体。

21. 一种治疗对象前列腺癌或肺癌的方法,包含:

(a) 与同样组织的人细胞中的 GPR110 或其转录物的正常范围比较,确定是否来自对象的癌症组织细胞有增加水平的 GPR110 蛋白或 RNA 转录物,作为前列腺癌或肺癌的指标,和

(b) 如果该对象有如此增加的 GPR110 或转录物水平,施用治疗有效量的 GPR110 抗体,当其与前列腺癌或肺癌细胞发生免疫特异性反应时有效抑制该细胞的生长或生存。

22. 权利要求 21 所述的方法,其中 GPR110 抗体是特异性针对包含在 SEQ ID NO :1 中的表位的人或人源化的抗 -GPR110 抗体。

23. 权利要求 21 所述的方法,其中当结合于前列腺癌或肺癌细胞表面的 GPR110 时,该抗体有效促进抗体依赖性细胞毒。

24. 权利要求 21 所述的方法,其中该抗体偶联于治疗剂,当该治疗剂结合或掺入所述细胞时能有效杀伤或抑制癌症细胞。

## 诊断和治疗前列腺癌和肺癌的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及前列腺癌和肺癌相关的基因和编码的蛋白,以及检测和治疗前列腺癌和肺癌的方法和试剂。

[0002] 参考文献

[0003] 下列文献被下文引用,以支持本发明的背景技术或实施本发明所应用的方法。

[0004] 1. Bjarnadottir TK, Geirardsdottir K, Ingemansson M, Mirza MA, Fredriksson R, Schioth HB. Identification of novel splice variants of Adhesion G-protein-coupled receptors. *Gene*. 2007 Jan 31 ;387(1-2) :38-48. Epub 2006 Aug30.

[0005] 2. Bjarnadottir TK, Fredriksson R, Hoglund PJ, Gloriam DE, Lagerstrom MC, Schioth HB. The human and mouse repertoire of the adhesion family of G-protein-coupled receptors. *Genomics*. 2004 Jul ;84(1) :23-33.

[0006] 3. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Hoglund PJ, Schioth HB. Novel human G-protein-coupled receptors with long N-terminals containing GPS domains and Ser/Thr-rich regions. *FEBS Lett*. 2002 Nov 20 ;531(3) :407-14.

[0007] 4. Nusse, R., van Ooyen, A., Cox, D., Fung, Y. K. & Varmus, H. Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 307, 131-6 (1984).

[0008] 5. Nusse, R. & Varmus, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109 (1982).

[0009] 6. Sorensen, A. B., Duch, M., Amtoft, H. W., Jorgensen, P. & Pedersen, F. S. Sequence tags of provirus integration sites in DNAs of tumors induced by the murine retrovirus SL3-3. *J Virol* 70, 4063-70 (1996).

[0010] 7. Lund, A. H. et al. Genome-wide retroviral insertional tagging of genes involved in cancer in Cdkn2a-deficient mice. *Nat Genet* 32, 160-5 (2002).

[0011] 8. Mikkers, H. et al. High-throughput retroviral tagging to identify components of specific signaling pathways in cancer. *Nat Genet* 32, 153-9 (2002).

[0012] 9. Collier, L. S., Carlson, C. M., Ravimohan, S., Dupuy, A. J. & Largaespada, D. A. Cancer gene discovery in solid tumours using transposon-based somatic mutagenesis in the mouse. *Nature* 436, 272-6 (2005).

[0013] 10. Dupuy, A. J., Akagi, K., Largaespada, D. A., Copeland, N. G. & Jenkins, N. A. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature* 436, 221-6 (2005).

[0014] 11. Wang, et al., *Nucleic Acids Research*, (England) 2005, Vol. 33, p. 21.

[0015] 12. Oh da Y, Kim K, Kwon HB, Seong JY. Cellular and molecular biology of

orphan G protein-coupled receptors. *Int Rev Cytol.* 2006 ;252 :163-218.

[0016] 13. Lundstrom K. Latest development in drug discovery on G protein-coupled receptors. *Curr Protein Pept Sci.* 2006Oct ;7(5) :465-70.

[0017] 14. Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, Seuwen K. The 7TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem.* 2006Aug ;1(8) :761-82.

## 背景技术

[0018] 前列腺癌是北美男性中最普遍的恶性肿瘤。据估计在美国每年有大约 200,000 例新发病例和 31,500 例与前列腺癌相关的死亡发生。前列腺癌是目前男性癌症死亡中第二主要的病因,仅次于肺癌。其占有所有男性癌症的 29% 和男性癌症相关死亡的 11%。

[0019] 目前, FDA 已经批准血清 PSA (前列腺 - 特异性抗原) 用作前列腺癌筛查的实验室指标。与很多血清肿瘤标志一样, 正常和癌变的腺体都产生 PSA。患有前列腺癌的男性, 局部的和晚期或播散的疾病都增加其血清水平。PSA 水平一般与肿瘤体积成比例。由于癌症和良性前列腺增生测到的 PSA 水平之间有很大的重叠, 获得低点的或临界升高值的连续水平是重要的。

[0020] 游离 PSA (fPSA) 检测的引入导致了早期前列腺癌鉴定更高水平的特异性。1998 年, FDA 批准了 fPSA 检测作为总 PSA 值在 4.0-10.0ng/mL 间的男性的诊断辅助手段。此处经常是总 PSA 检测的诊断灰色地带, fPSA 可以帮助分类。通常, 在任意游离 PSA 水平, 越为增大的前列腺, 其癌变的可能越大。但是, 这些检测至多是定性的, 更可靠的检测类型和对癌症治疗分期的方法是必需的。

[0021] 前列腺癌, 与其它类型癌症一样, 是由基因变异, 即, 突变导致的。在突变细胞中, 促进和抑制生长的因子间的正常平衡被打破, 结果, 这些突变细胞持续增生——肿瘤细胞的标志。突变可以自发或由外部因素而引起, 例如化学诱变剂, 辐射, 或病毒整合, 其插入可能包含或不包含癌基因的外源基因组 DNA。细胞基因可以由点突变, 插入和移码 (包括截短), (功能) 缺失 (包括沉默), 或有时可以导致基因融合的易位修饰。这样, 原癌基因可以变成癌基因, 其促进增生, 抑癌基因可以失活, 也诱导肿瘤生长。上面提到的 DNA 变化的任意联合都能促使肿瘤形成。这些变化的结果可能会或不会被免疫系统的检查 (免疫监视) 所抑制。

[0022] 在此之前, GPR110 水平的变化和前列腺癌或肺癌之间不存在已被证明的关联。这样的关联可以有重要重要的诊断和治疗用途。依据本发明, 现已发现 (i) GPR110 水平在前列腺癌和肺癌细胞中显著增加, 和 (ii) 这种增加可以在病人血液或尿液中被检测。

## [0023] 发明概述

[0024] 本发明包括, 一方面, 在人对象中筛查肺癌或前列腺癌的方法。该方法包括步骤: (a) 检测对象样品中人 GPR110 的水平或其 RNA 转录物的水平, (b) 确定人 GPR110 或其 RNA 转录物的检测水平是否分别比从大多数正常人样品确定的正常人个体内 GPR110 或其转录物水平高至少三倍。可选择地, 该方法可以包括通过在人对象中分别独立检验肺癌或前列腺癌的方法筛查肺癌或前列腺癌的存在, 条件是测定水平比正常水平高至少三倍, 其中独立检验可以在步骤 (a) 和 (b) 之前, 同时, 或之后进行。

[0025] 在对象样品是肺或前列腺的组织学组织样品情况下, 步骤 (a) 可以包括, 在对抗

体结合到具有 GPR110 表位的细胞有效的条件下,将所述样品与特异性针对 GPR110 表位的抗 -GPR110 抗体接触,并检测结合于所述样品的抗体水平,和步骤 (b) 可以包括确定与对象肺或前列腺组织样品结合的抗体的检测水平是否分别比结合于从正常个体获得的人肺或前列腺组织样品的抗 -GPR110 抗体的检测水平高至少三倍。抗体可以特异性针对由 SEQ ID NO :1 内的氨基酸残基表示的 GPR110 表位。抗体可以是放射标记的 GPR110 抗体,步骤 (a) 可以包括通过闪烁扫描法检测所述组织内局部化的放射性标记的水平。

[0026] 在对象样品是对象血液或血清样品的情况下,步骤 (a) 可以包括,在对抗体结合 GPR110 表位有效的条件下,将所述样品与特异性针对 GPR110 表位的抗 -GPR110 抗体接触,从未结合抗体分离结合于 GPR110 表位的抗体,并检测结合于 GPR110 表位的抗体的水平,和步骤 (b) 可以包括确定结合于 GPR110 表位的抗体的检测水平是否比结合于从正常个体获得的血液或血清样品中存在的 GPR110 表位的抗 -GPR110 抗体的检测水平高至少三倍。步骤 (a) 可以包括将血液或血清样品的体液施加于固相免疫检测装置,其中样品中 GPR110 水平由比色或荧光指标定性表示,确定步骤包括将该指标与已知标准比较。

[0027] 在对象样品是肺或前列腺组织样品的情况下,步骤 (a) 可以包括处理样品以从中提取 RNA 转录物和检测编码 GPR110 蛋白至少一个片段的 RNA 转录物的水平,和步骤 (b) 可以包括确定 RNA 转录物的检测水平是否比从正常个体获得的肺或前列腺组织样品中编码 GPR110 蛋白至少一个片段的转录物的检测水平高至少三倍。

[0028] 另一方面,本发明包括检查肺癌或前列腺癌存在的方法中的改进,其通过检测肺癌或前列腺癌的诊断性生物学指标水平的降低或升高来进行。这种改进包括步骤:(a) 检测对象样品中人 GPR110 或其转录物的水平,和 (b) 确定人 GPR110 或其转录物的检测水平是否分别比从多数正常人样品确定的正常人个体中 GPR110 或其转录物的水平高至少三倍,作为肺癌或前列腺癌存在的另一个指标。上面提到的方法的多种优选实施方案也应用于本发明的这个方面。

[0029] 例如,所述改进可以用于检查人男性对象中前列腺癌的方法中,所述方法包括将对象体液样品与特异性针对选自总前列腺特异性抗原 (PSA),游离 PSA,和磷脂酰肌醇聚糖 3 蛋白 (GPC3) 之一的至少一种标志蛋白的抗体反应,确定对象是否有增加水平的至少一种所述标志蛋白,做为前列腺癌的指标。

[0030] 又另一方面,本发明涉及来自人对象的血液或血清样品中的 GPR110 的检测值和选自总前列腺特异性抗原 (PSA),游离 PSA 和磷脂酰肌醇聚糖 3 蛋白 (GPC3) 的至少一种的标志抗原的检测值在筛查个体前列腺癌的存在中的用途。

[0031] 本发明也公开了用于筛查人对象中的前列腺癌或肺癌,或对象前列腺癌或肺癌治疗分期的诊断装置,包括 (a) 接受对象体液样品的结构,(b) 一种抗体,其特异性针对 GPR110 的选定结构域或表位,结合于所述结构,能够与所述结构接受的体液反应,并与其他结合于该结构的试剂一起产生可检测的反应,指示包含所述表位或结构域的 GPR110 样品蛋白的存在,和 (c) 已知标准指标,根据此指标,可检测反应所产生的水平可以被评定为与前列腺癌或肺癌有关的增加水平。此装置可以更普遍地用于筛查或分期以 GPR110 水平增加为特征的其它类型的人类癌症。

[0032] 所述装置的结构可以包括多孔垫板,其中包埋有抗体,当液体样品加到垫板上时,用于与所述样品反应,可检测反应可以用比色或荧光指标指示,且已知的标准指标可以包

括这样的指标,其代表包含相应于前列腺癌或肺癌相关的表位或结构域的表位或结构域的 GPR110 水平。

[0033] 所述装置可以包括用于形成与产生的 GPR110 的水平有关的信号的分光光度计测量器,用于比较该信号与前列腺癌或肺癌相关的已知标准信号值的微处理器,和用于显示所述微处理器的输出结果的显示器。

[0034] 所述装置中的抗-GPR110 结合蛋白可以是特异性针对包含在 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :2 中的表位的抗体。

[0035] 为了用于筛查人对象的前列腺癌,所述装置的元件 (b) 可以进一步包括一种抗体,其 (i) 特异性针对至少一种选自总前列腺特异性抗原 (PSA),游离 PSA,和磷脂酰肌醇聚糖 3 蛋白 (GPC3) 之一的标志蛋白,(ii) 与所述结构结合和 (iii) 能够与所述结构接受的体液反应,与结合于该结构的其它试剂一起,产生指示样品中标志蛋白水平的可检测反应,和元件 (c) 可以进一步包括第二已知标准指标,根据该指标,产生的可检测的标志蛋白反应水平,与可检测的 GPR110 水平一起,被评定为前列腺癌的指标。两个标准指标可以被安排为,例如,配对值,每个配对代表个体前列腺癌预先确定的可能性。

[0036] 本发明还公开了一种治疗个体前列腺癌或肺癌的方法,步骤为:(a) 分别与同样组织的人细胞中 GPR110 蛋白或 RNA 转录物的正常范围比较,确定来自对象的癌症组织细胞是否有增加水平的 GPR110 蛋白或 RNA 转录物,作为前列腺癌或肺癌的指标,和 (b) 如果个体有如此增加的 GPR110 水平,施用治疗有效量的 GPR110 抗体,当其与前列腺癌或肺癌细胞免疫特异性反应时有效抑制该细胞的生长或生存。

[0037] GPR110 抗体可以是特异性针对包含在 SEQ ID NO :1 中的表位的人或人源化的抗-GPR110 抗体。当结合于前列腺癌或肺癌细胞表面的 GPR110 时,该抗体可以有效促进抗体依赖的细胞毒。该抗体可以偶联于一种治疗剂,当该治疗剂结合于或被掺入所述细胞,其有效杀伤或抑制癌症细胞。

[0038] 进一步公开的是一种减轻患有前列腺癌或肺癌的个体肿瘤负荷的方法,步骤为:(a) 将对象抗原呈递细胞暴露于人 GPR110 多肽或其抗原片段,和 (b) 通过暴露,刺激和引起 CD4 辅助性 T 细胞,CD8 细胞毒性淋巴细胞 Tc 和 CD8 非细胞毒性 T 抑制性淋巴细胞的克隆性扩增,从而引起对象中 GPR110 抗原特异性 CD4 辅助性 T 细胞,GPR110 抗原特异性 CD8 细胞毒性淋巴细胞 Tc 和 GPR110 抗原特异性 CD8 非细胞毒性 T- 抑制性淋巴细胞的扩增。

[0039] 所述暴露步骤可以包括,有效激活细胞的条件下,体外暴露对象抗原呈递细胞于人 GPR110 多肽或其抗原片段,并将激活的细胞注射给对象。

[0040] 可选择地,暴露步骤可以包括将合适佐剂中携带的人 GPR110 多肽或其片段注射给对象。

[0041] 在一个相关的方面,本发明包括一种减轻患有前列腺癌或肺癌的对象肿瘤负荷的方法,其是通过将合适佐剂中携带的人 GPR110 多肽或其抗原片段注射给对象。

[0042] 在另外的方面,本发明包括一种筛选可以有效治疗前列腺癌或肺癌的化合物的方法。该方法包括将每一系列待检化合物加入到其细胞表面表达 GPR110 蛋白的细胞中的步骤,在 GPR110 激动剂或拮抗剂结合到细胞表面蛋白的情况下,会有效导致细胞状态的可检测变化,加入每种待检化合物,确定是否发生了此种细胞状态的可检测变化。

[0043] 在另外的方面,本发明包括分析物 GPR110 或其片段或变体的检测。试剂包括特异

性针对 GPR110 或片段的抗 GPR110 抗体,和检测标签或标记,优选共价结合于该抗体,当结合于被测物 GPR110,其能用于检测和 / 或定量出现的抗体量。

[0044] 阅读了下面更充分描述的本发明内容的条件下,本发明的这些和其他方面,目的,优点,和特点对于本领域技术人员是显而易见的。

### 附图简介

[0045] 图 1 显示了小鼠 Gpr110 基因座的基因组排列,为 UCSC 基因组网络站点浏览器的专门屏幕打印视图 (February 2006 版 mm8 基因汇编)。顶部,在 17 号染色体上的碱基位置。“PicoSL3”下面的绿色垂直柱代表逆转录病毒整合到从单一肿瘤 (754S-2) 鉴定的基因座。公共结构域整合位点 (68SB865H07-1) 在“RTCGD”下面被标明。

[0046] 图 2A-2C 显示了人前列腺肿瘤 (2A),良性前列腺增生 (2B),和正常组织 (2C) 的免疫组化染色 (棕色)。在正常组织或良性前列腺增生中通常观察到没有表达或低表达,而在肿瘤组织中观察到显著的过表达。多克隆兔抗体血清与人 GPR110 的 1-590 氨基酸残基 (此处定义为 SEQ ID NO:1) 内发现的表位反应,。

[0047] 图 3A 和 3B 显示了用抗 -GPR110 抗体 (3A) 和抗 -PSA 抗体染人良性前列腺增生组织的免疫组化染色 (棕色)。箭头指向一小组癌症干细胞,其为 GPR110 阳性和 PSA 阴性。使用的 GPR110 肽血清与图 2 中描述的相同。

[0048] 图 4A 和 4B 显示了人肺肿瘤 (4A) 和正常组织 (4B) 的免疫组化染色 (棕色)。正常组织中观察到不表达或低表达,而肿瘤组织中观察到显著的过表达。使用的肽血清与图 2 中描述的相同。

[0049] 图 5A 和 5B 显示了确定病人 GPR110 水平的固相诊断装置,在检测初始阶段 (5A) 和最终阶段 (5B)。

[0050] 图 6 显示了依照本发明构建的用于诊断前列腺癌或肺癌基因易感性的基因芯片的一部分。

[0051] 图 7A 和 7B 显示了通过两份不同的正常和肿瘤肺组织中定量 PCR 检测的 GPR110RNA 的表达。GUSB 基因做为内对照被检测。相对于正常肺样品的平均表达,计算每份样品的表达。

[0052] 发明详述

[0053] A 定义

[0054] 下列术语具有下面给出的定义,除非另在说明书中指明。

[0055] “筛查”癌症意味着诊断信息,单独,或者与其他诊断信息一起,可以用于确定癌症的存在或不存在,或者癌症可能性的增加,或者用于癌症分类,例如,肺癌以 GPR110 表达水平升高为特征。

[0056] “诊断肺癌或前列腺癌的其它指标”指诊断试验,而不是可以用于检测或特征化癌症的存在或程度或类型的生物学指标。典型的指标包括 X-线,CT 扫描,或 MRI 成像方法获得的成像资料,或活组织的组织学观察。

[0057] 癌症的“分期”治疗,依照本发明,包括基于检测到的 GPR110 水平确定个体的癌症分期和制定该期的疗法。癌症有四个公认分期,其通过癌症细胞的定位和组织架构的程度定义。此外,癌症可以被定义为早期 (此时癌症对很多基于激素的治疗有反应),和晚期

(更严重的雄激素不依赖的阶段)。

[0058] “GPR110 的检测水平”指野生型人 GPR110, 或者变体 (例如, 剪接变体或该蛋白突变形式), 或 GPR110 片段的检测水平。

[0059] “人 GPR110 转录物的检测水平”指编码野生型人 GPR110, 或者变体 (例如, 剪接变体或该蛋白突变形式) 或 GPR110 片段的 RNA 转录物的检测水平。

[0060] GPR110 “增加”或“高于正常”的水平指例如通过免疫化学染色或检测确定的该蛋白或其片段或变体的水平比正常 (非癌性的) 个体群检测的该蛋白的可检测水平值高至少约百分之五十。优选地, GPR110 的水平至少比来自正常人的相似样品的 GPR110 值高三倍。

[0061] GPR110RNA 转录物“增加”或“高于正常”的水平指例如, 通过 PCR 扩增和转录物分离确定的转录物量的水平比正常 (非癌性的) 个体群检测的该转录物的可检测水平值高至少约百分之五十。优选地, GPR110 的水平至少比来自正常人的相似样品的 GPR110 值高三倍。

[0062] “正常 (非癌性的) 个体群检测的 GPR110 蛋白或其 RNA 转录物的可检测水平值”可以指, 例如, 5 个或更多, 优选 10 个或更多正常个体群的该值的统计学均数或平均值, 或者可以指正常个体群中个体的 GPR110 蛋白或转录物的最高记录值。该数值通过使用以下描述的检测方法检测来自所选样品源例如肺或前列腺组织或者血液或血清样品的 GPR110 或其转录物而迅速确定。应理解正常值是从与检测其中 GPR110 或其转录物水平增加的存在组织或样品源相同类型的组织例如肺或前列腺组织或样品源例如血液或血清样品确定的。

[0063] “GPR110 检测”指一种检测, 其测定野生型或变体形式的 GPR110 蛋白或其表位的水平或存在, 或测定编码 GPR110 蛋白或其片段的 RNA 转录物水平。

[0064] B. GPR110 蛋白和表达

[0065] 人 GPR110 基因编码一个推定的孤立“粘附类型”G 蛋白 - 偶联受体, 其生物学功能和天然配体是未知的 (refs. 1-3)。人 GPR110 基因有两种已知的同种型并被发现位于染色体区 6p12.3。同种型 1 (NM\_153840.2) 编码一种推定的蛋白 (NP\_722582.2), 具有 910 个氨基酸 (AA), 计算分子量 (MW) 101234Da。同种型 2 (NM\_025048.2) 编码一种推定蛋白 (NP\_079324.2), 具有 218 个氨基酸, 计算分子量 24745Da, 和与同种型 1 相比独特的 C- 末端。小鼠 Gpr110 基因 (NM\_133766.1) 被发现位于染色体区 17B3; 编码的蛋白 (NP\_598537.1) 具有 908 个氨基酸, 计算分子量 101338Da。人 GPR110 蛋白是一种推定的细胞表面 7 跨膜蛋白, 包含 G- 蛋白 - 偶联受体蛋白水解位点 (GPS) 结构域和 SEA 结构域, 以及几个可能的靠近 N- 端的 N- 连结糖基化位点。

[0066] C. 鉴定 GPR110 为癌症基因

[0067] 癌症基因 (癌基因和肿瘤抑制基因) 通过使用原病毒标记以高通量方式定义。尽管病毒还没有被提示为人类癌症的主要原因, 利用肿瘤病毒的研究已经导致发现了很多癌基因和原癌基因。在病毒标记中, 小鼠被不包含癌基因的逆转录病毒感染 (例如, 小鼠白血病病毒, MLV 或小鼠乳腺癌病毒, MMTV (4-8))。近来, 通过使用转座子, 这种方法的宿主范围已被拓宽 (9, 10)。

[0068] 在逆转录病毒的感染过程中, 病毒整合到细胞基因组, 将其 DNA 插入基因附近或内部, 其导致各种结果: (i) 插入位点距离原癌基因太远, 从而不能活化原癌基因。在此情

况下,不选择该细胞。(ii) 原病毒插入到一个原癌基因的 200kb 内,但不在该基因内(类型 1)。在此,或者病毒启动子或者病毒增强子增加了该原癌基因的表达水平。(iii) 原病毒插入一个基因内,破坏或改变其功能(类型 2)。不选择在不是原癌基因或肿瘤抑制基因的基因中包含类型 1 或类型 2 插入事件的细胞。如果整合导致了肿瘤的形成,邻近整合位点的基因能够被鉴定,可分类为原癌基因或者肿瘤抑制基因。本方法用于鉴定许多新原癌基因和进一步证实通过与病毒癌基因的同源性特点发现的已知的原癌基因(7,8)。如果逆转录病毒落入到一个基因内并截短或破坏它,可以获得一个肿瘤抑制基因。在这些情况下,该抑制基因可以是单倍体不足的,或可选择地,小鼠同时提供其它等位基因上的突变。整合事件也能够导致更复杂的结果,例如截短的基因产物或反义或微 RNA 的转录的显性负面效应。

[0069] 在用 T 淋巴细胞病毒 SL3-3 的筛选中,收获包含原病毒整合入 Gpr110 基因的内含子 1 中的小鼠肿瘤(图 1)。该整合引起 Gpr110 基因的过表达。该基因的人类同源体是人 GPR110 基因。

[0070] D. 人类肿瘤和正常组织中 GPR110 的表达和 RNA 转录物

[0071] GPR110 抗体的抗原性表位在人前列腺肿瘤中过表达(图 2A),而良性前列腺增生(BPH)细胞和前列腺肿瘤细胞的正常对应部分没有或只微弱表达 GPR110 蛋白(图 2B,2C),说明该蛋白分布和/或局部量(密度)的增加可以诊断人前列腺癌。有时,一小亚类 BPH 细胞被 GPR110 抗体染色(图 3A,箭头)。这些 GPR110 阳性细胞缺乏 PSA 表达(图 3B,箭头),并且符合被分类为前列腺癌干细胞。

[0072] 此外,GPR110 抗体的抗原表位在人肺肿瘤内也是过表达的(图 4A),而这些肿瘤细胞的正常对应部分没有或只微量表达 GPR110 蛋白(图 4B),说明该蛋白分布和/或局部量(密度)的增加可以诊断人肺癌。

[0073] 更为普遍地,本发明提供了一种检测通常只微弱表达或包含 GPR110 的组织或其他对象样品例如血液或血清以确定癌症存在和程度的方法。该方法尤其对检测前列腺和肺组织有用,例如确定病人前列腺癌和肺癌的亚型。在一种直接用于检测前列腺和肺组织的方法中,组织被标记的特异性针对 GPR110 的选择结构域或表位的抗体染色,例如,荧光标记抗体(见下面的 E 部分),以将标记连接到组织细胞。可选择地,组织用非标记的 GPR110 抗体染色,细胞结合抗体复合物用第二标记抗体标记,例如携带荧光、比色或金-颗粒报道子的第二抗体。根据相对于正常前列腺或肺细胞中标志的分布和范围的可检测标志增加的分布和/或范围(通常是两者)来确定组织中前列腺癌或肺癌的存在,程度和分期。给结合于组织学的组织样品的抗体的程度和范围评分的计分法众所周知(例如,“Loda 系统”)。在本方法中,强度评分 2+ 或 3+ 和 a%细胞染色评分 2 或 3 见于 35% -40%的用抗 GPR110 抗体标记的肺肿瘤。对于前列腺肿瘤,20%的肿瘤具有强度评分 1 和 %细胞染色评分 2。对于良性前列腺增生样品,当用抗 GPR110 抗体标记时,70%的强度评分和 %细胞染色评分都为 0 ;30%具有强度评分“痕量”或 1, a%细胞评分 1。

[0074] 为确证 GPR110 在肺癌中的作用,检测两种不同系列的正常和肿瘤肺组织中的 GPR110RNA 转录物水平(使用外显子连接(ExJ2-3) Taqman 探针)。在第一系列组织中,被检测的 15 份肺腺癌肿瘤中的 4 份(2,3,6 和 13)显示了比正常肺样品高 8 倍到超过 100 倍的 GPR110RNA 水平(图 7A)。在第二系列组织中,与正常肺样品相比,40 份肺癌样品中的 6 份具有从 5 倍到 35 倍 GPR110 的过表达(图 7B)。此 6 份升高的样品(27,33,34,和 39)中

的 4 份来自肺腺癌,剩下的 2 份 (26 和 40) 是鳞状细胞癌。从两个表达实验总的来说,升高的 GPR110 表达可见于约 20% 的被检测肺肿瘤。

#### [0075] E. 制备抗 -GPR110 抗体

[0076] 该部分描述了抗 -GPR110 抗体的产生,像在下面部分进一步描述的那样,用于诊断和治疗目的。本发明使用的抗 -GPR110 抗体能够通过各种生产单克隆,多克隆,和 / 或重组抗体的常规方法获得。一种优选的抗体,尤其用于诊断用途,是小鼠单克隆抗体,根据众所周知的杂交瘤方法制备。简要地,可以首先获得人 GPR110,例如,通过表达 GPR110 基因。纯化的 GPR110 蛋白用作免疫原。可选择地,GPR110 的一部分肽可以用做致敏抗原。特别地,为了产生特异性针对选择的 GPR110 表位或结构域的抗体,定义该结构域或表位的肽可以用做免疫原。示例性的免疫原包括 SEQ ID NO :1 内的氨基酸残基代表的 GPR110 表位。

[0077] 在诊断应用中有用的抗 -GPR110 抗体可以用多种可检测标签标记,包括可检测的报道子,例如用于酶联免疫吸附试验 (ELISA) 的酶,可检测的颗粒,例如金颗粒和携带报道子的脂质体,比色或荧光报道子,标记例如量子点纳米晶体颗粒 (quantum dot nanocrystal particle),放射性标记,和标记例如生物素标记,其可以连接第二可检测标记,例如可连接报道子标记的抗生蛋白链菌素标记。在一些检测形式中,未标记的抗 GPR110 抗体,例如,小鼠 IgG 抗体,通过与标记的抗体如标记的抗 - 小鼠 IgG 抗体反应而被检测。

[0078] 对于治疗用途,具有 GPR110 结合活性的人单克隆抗体能够通过用 GPR110 体外致敏人淋巴细胞,和使致敏的淋巴细胞与具有永久分裂潜能的人源骨髓瘤细胞融合而产生。可选择地,做为抗原的 GPR110 可以被施用给具有所有人类抗体基因库的转基因动物,以获得抗 -GPR110 抗体产生细胞,于是 GPR110 的人类抗体可以从永生化的抗 -GPR110 抗体产生细胞获得。

[0079] 同样用于治疗用途,抗体可以偶联于 (用其衍生化) 一种治疗剂,例如毒素,锚定于螯合形式的放射性标记的金属,或装载抗肿瘤剂的载体例如脂质体,其中抗体载体定位于细胞表面,有效引起细胞膜的破坏 (例如,通过载体与细胞膜的融合),并释放治疗剂到细胞内。

[0080] 在另外的方法中,特异性针对 GPR110 抗原的人或人源化抗体可以用重组技术制备,例如已被报道过的那些 (见,例如,美国专利 6,090,382 和 6,258,562)。

#### [0081] F. 诊断方法和试剂

[0082] 在一个方面,本发明包括筛查人对象前列腺癌或肺癌的方法,所述方法通过以下步骤进行:(a) 检测对象样品中人 GPR110 或其 RNA 转录物水平,和 (b) 确定人 GPR110 或其 RNA 转录物的检测水平是否分别比从多数正常人样品确定的正常人个体的 GPR110 或其转录物水平至少高三倍。如果检测水平比正常水平至少高三倍,该方法可以进一步包括通过在对象中分别独立检验肺癌或前列腺癌的方法检测肺癌或前列腺癌的存在,其中独立检验可以在步骤 (a) 和 (b) 之前,同时或以后进行。

[0083] 例如,当独立检验先于 GPR110 检测,该独立检验可以表明肺癌或前列腺癌的存在,并且 GPR110 检测随后被用于确证癌症的存在和 / 或指明癌症是以 GPR110 或其转录物水平增加为特征的类型。当独立检验与 GPR110 检测同时进行,该方法提供检测结果,其中两个或更多的癌症标志包括 GPR110 或其转录物被用于检测个体中的肺癌或前列腺癌。在第三种实施方案中,独立检验可以在 GPR110 检测之后进行,以证明肺癌或前列腺癌的诊

断,和 / 或表明癌症是以 GPR110 或其变体的增加的水平的存在为特征的类型。

[0084] 所述方法的一种实施方案中,对象样品是肺或前列腺组织学的组织样品,已经在上面描述。在该实施方案中,样品被制备用于组织学检测,在抗体结合具有 GPR110 表位的细胞的有效条件下,用特异性针对 GPR110 表位的抗 GPR110 抗体染色。与样品相关的抗体水平可以使用标准组织学方法确定,例如总体染色或荧光的检测,或在抗 -GPR110 抗体被放射性标志标记的情况下通过放射性水平的检测。

[0085] 该方法的一种实施方案中,对象样品是血液或血清样品,在下面详述。该实施方案包括在抗体结合 GPR110 表位的有效条件下,使样品与特异性针对 GPR110 表位的抗 GPR110 抗体接触,和分离未结合抗体和结合于 GPR110 表位的抗体,检测结合于 GPR110 表位的抗体的水平。具有固定的抗 -GPR 测定的固相 - 条带检测装置用于捕获样品中的 GPR110,在下面讨论。优选的体液样品是血液,尿液和唾液。尿液被检测的情况下,指示前列腺癌或肺癌的 GPR110 的检测水平典型地处于大于约 1ng/ml 样品液体的范围。

[0086] 第三种普遍实施方案中,对象样品是肺或前列腺组织,用于检测 GPR110 转录物,参照图 7A 和 7B 在上面详述。在此实施方案中,组织样品被处理,从中提取 RNA 转录物,依照公知的方法,编码 GPR110 蛋白至少一个片段的 RNA 转录物水平由标准方法确定,例如通过 PCR 序列特异性扩增,或其它方法,包括序列特异性探针。

[0087] 更普遍地, GPR110 或其转录物的检测,做为诊断前列腺癌或肺癌的存在、程度、或分期的一种辅助,可以单独或与前列腺癌或肺癌相关的另外的标志蛋白的检测和筛查联合使用。生物标记或标志蛋白指任何可检测的生物分子,其中改变的表达,分布或该生物标记的特定形式与生理条件例如疾病状态的存在、程度或分期相关。如本领域技术人员的理解,不需要生物标记和生理条件之间有严格的关联,在生物标记和生理条件之间只存在统计学显著性关联。另外的生物标记可以选自,但不限于,前列腺特异性抗原 (PSA),包括总的 PSA 或游离的 PSA 或两者,磷脂酰肌醇聚糖 3 蛋白 (GPC3) 和其组合。

[0088] 在另外的生物标记是 PSA 的情形下,根据本领域的方法,对于总 PSA、游离 PSA 或其组合可以如上述确定 PSA 的水平或分布。在一些例子中,总 PSA 和 fPSA 的水平,在本领域通常表示为 fPSA 对总 PSA 的比例,可以与 GPR110 的检测联合使用。PSA 检测可以在与检测 GPR110 所使用的相同或不同的生物学样品上进行。例如,为了筛查男性人对象前列腺癌,上面描述的本方法中的步骤 (a) 可包括使样品与特异性针对前列腺特异性抗原 (PSA) 的抗体反应,以产生与样品中 PSA 水平相关的反应产物,步骤 (b) 可以包括与非癌性人群样品中的 PSA 的正常范围比较,确定 PSA 的水平。

[0089] 另外的生物标记 GPC3 的特点在于硫酸肝素蛋白多糖,其通过糖基化磷脂酰肌醇锚定在细胞膜上。该蛋白分子量 65.6kDa,多肽链有 580 个氨基酸残基。该蛋白多糖的硫酸肝素链与肝素结合生长因子相互作用,从而作为细胞信号的共受体,尽管 GPC3 也可以其它方式结合。在胚胎发育中, GPC3 调节肾脏分支形态发生过程中 BMP 和 EGF- 介导效应。它也控制肢体成型和骨骼发育中对 BMP4 的细胞反应。GPC3 蛋白的水平在前列腺癌组织中增加。其做为前列腺癌的特异生物标记的用途和其检测方法,例如通过特异结合于 GPC3 的抗体的检测,在系列号为 11/325,847 的美国共同申请中描述。检测 GPC3 的方法可以使用特异性结合于 GPC3 的抗体,例如多克隆,单克隆,或重组抗体。一种示例性抗体,尤其用于诊断用途,包括小鼠单克隆抗体,其根据公知的杂交瘤方法制备。简要地,可以首先获得人

GPC3,例如,通过表达 GPC3(MXR7) 基因,如 Lage, H. 等 (Gene 188(1997),151-156) 公开的那样。纯化的 GPC3 蛋白被用做免疫原。可选择地,GPC3 的一部分肽可以被用做致敏抗原。部分肽可以通过从人 GPC3 氨基酸序列化学合成获得。例如可以应用的示例 GPC3 序列包括但不限于,DLFIDKKVLKVAHVEHEET,SEQ ID NO :3(氨基酸残基 365 到 383,由外显子 4 编码)和 LAYDLLVDDAPGNSQQ,SEQID NO :4(氨基酸残基 526 到 541,由外显子 8 编码)等。考虑到 GPR3 的序列已知,用于产生直接针对 GPC3 的抗体的其它肽对于本领域技术人员是显而易见的。

[0090] 检测可以通过多种用于检测体液抗原的测定方法中的任一种实现,包括 ELISA 技术,均相法,例如,包括荧光淬灭,和多种固相夹心检测,其中 GPR110 抗原被固相支持物上携带的抗 -GPR110 抗体捕获,固定的抗原 - 抗体复合物被第二抗 -GPR110 抗体标记,例如,携带比色或金 - 颗粒报道子的第二抗体。

[0091] 图 5A 和 5B 说明了依照本发明的一个实施方案构建的固相检测条,其适于进行刚才提到夹心免疫测定,并且分别显示了开始和最终的检测状态。检测条,总体显示在 10 处,包括多孔支持物或垫 12,其具有在支持物上游区的加样区 14 和在下游区的样品检测区 16。加样区包括可检测的抗 -GPR110 抗体试剂,例如,标记金颗粒的抗 GPR110 抗体,以非结合,即,非固定形式携带在该区内。该试剂由实心圆标示,例如在 18 处。与标记的抗体试剂中的抗体相同或不同的抗 GPR110 抗体被固定于固体支持物的检测区内,由“Y”形标示,例如在 20 处。

[0092] 还显示了参照区 22,其定位邻近于检测区,具有一个或多个有颜色的或阴影区,对应体液标本中 GPR110 的不同检测水平。在实施方案中显示,区 22 包括三个区域 22a,22b,和 22c,分别对应 GPR110 的以下检测水平:(a) 低于癌症相关的水平,(b) 对应较低的癌症相关阈值水平,和 (c) 比 22b 区的阈值明显高的水平,如,2-3 倍。这三个区域提供了一种已知的标准指示,照此指示,产生的可检测反应水平可以被评估作为与前列腺癌或肺癌相关的水平。检测条和参考区一起组成了检测装置,用于在人对象内筛查前列腺癌或肺癌,或用于人对象前列腺癌或肺癌的分期治疗。

[0093] 在实施中,已知量的待检体液样品被加入到检测条的加样区,其弥散入该区,使得抗体试剂与样品中的 GPR110 抗原反应以形成抗原 - 抗体复合物。然后该复合物和未结合抗体试剂借毛细作用移往下游检测区,在该处抗原 - 抗体复合物由固定的抗体捕获,未结合试剂被带到支持物的末端,如 24 处所示。正如所能理解的,体液中的抗原浓度越高,检测区捕获的试剂浓度越高,该区内的颜色或强度越大。所述检测区产生的颜色或强度与参照区的标准比较,以确定与前列腺癌或肺癌存在或不存在相关的 GPR110 的定性水平。如果在检测中观察到高于阈值水平的 GPR110,该对象可以归类于存在可能性更高的癌症类型,并且该对象可以被推荐进行另外的检查和 / 或更经常的检查。

[0094] 在另外一个实施方案中,检测装置包括如同上述的检测条,但其已知的参照指示是由检测条阅读仪器提供的,阅读器具有 (i) 接受检测条的阅读槽,(ii) 光源和光学检测,例如,分光光度计测量器,用于在检测条的检测区测量与检测相关的光学情况,(iii) 电子的或处理器单元,其记录和处理来自光学检测器的信号,并转换该信号为 GPR110 的检测水平,和 (iv) 用户显示屏或窗。该仪器可以报告检测的体液样品实际的 GPR110,允许操作者比较显示值与检测条或仪器提供的已知标准指示水平,以评估是否该个体有与前列腺癌或

肺癌相关联的 GPR110 水平的增加,或为了治疗设计,评估癌症的可能阶段。可选择地,仪器自身可以包含储存的已知标准指示水平,其可以在内部与检测的水平比较,以产生指明是否检测到了与前列腺癌或肺癌相关联的 GPR110 的增加水平的输出信号,或指明癌症的阶段。

[0095] 为了检测多种标志蛋白,刚才描述的检测装置可以怎样被改变,是能够被理解的,特别地,为了筛查或检测前列腺癌,GPR110 蛋白与总 PSA,游离 PSA 和 / 或 GPC3 组合。每个标记可以在限定了标记 - 特异性抗体的单独检测条中检测,装置可以进一步包括多种参照区,每个区提供已知标准指示,并由此可检测的标记蛋白反应产生的水平可以被评估,与可检测的 GPR110 水平一起,做为前列腺癌的指标。

[0096] 可选择地,在电子检测装置中,多种标志的参照值可以被存储或用元组值代表,例如,配对值,其中元组中的每个值代表给定标志的癌症指示值,所以通过对照储存的元组值,分析多个值检测结果,基于与多种标志的相关性,该装置可以确定癌症风险。

[0097] G. 鉴定与癌症相关的基因突变

[0098] 在另一个方面,本发明提供了一种鉴定与人对象体内癌症风险增加相关的突变,所述癌症例如前列腺癌或肺癌。以下部分描述与前列腺癌或肺癌有关;但是,应理解该方法可以实施加于其它导致 GPR110 表达增加的癌症。实施该方法时,从患有前列腺癌或肺癌的病人中提取基因组 DNA,所述病人优选包括选自代表不同种族和年龄组的男性或女性的病人。DNA 序列或被检测区,特别地,是 (i) 人 GPR110 基因的启动子或 15kB 内的或不超过外显子 1 的 5'UTR 区,(ii) 同一个基因 5kB 内的或不超过外显子 15 的 3'UTR 区,和 (iii) 同一个基因外显子 1-15 之内。

[0099] 位于上述区域的一个或多个位点的突变,包括基因扩增,通过比较每个序列和来自正常(野生型)前列腺或肺组织的同一个区域的序列被鉴定。优选地,确定来自许多野生型个体的序列以保证真实的野生型序列。对于每份提取的 DNA,比较病人序列和野生型序列,以鉴定病人序列中的突变,从而鉴定可能与前列腺癌或肺癌风险增加有关的突变。

[0100] 一旦大量的这些突变例如至少 50-200 或更多被鉴定,其可以被用于构建基因筛查装置,例如,基因芯片,其对筛查个体对前列腺癌或肺癌的基因易感性有用。在一种实施方案中,所述装置包括基因芯片,其如图 6 中 30 所示,具有阵列区,如区 34,36,各自包含结合的已知序列片段,如区 34 内的片段 37。片段或探针长度优选 25-27 个碱基,各自包括上文鉴定的 GPR110 基因上游与前列腺癌或肺癌相关的突变之一。基因芯片构建和用这样的芯片检测突变序列是公知的。

[0101] 在一种有代表性的基因筛查方法中,获得病人细胞,提取基因组 DNA,使用荧光素化探针通过标准 PCR 扩增感兴趣的序列区。扩增的物质于随后在适于杂交的条件下与芯片阵列的序列反应,清洗阵列表面以去除未结合物质,接着用合适的芯片阅读器扫描以鉴定与前列腺癌或肺癌相关的任何突变序列。附图显示了将标记的基因组 DNA 片段(标明为 42 处)结合到具有结合的探针分子 40 的阵列区 38。测定该阵列区的荧光信号可诊断临界上游 GPR110 区中的已知基因突变,能够诊断对前列腺癌或肺癌的基因易感性。

[0102] 在另一可选实施方案中,如上面被鉴定的突变用于构建一系列分子倒位探针(MIPs),其能够鉴定基因突变的存在。构建和使用 MIPs 用于鉴定基因突变已经描述过(见,例如,参考文献 11)。

#### [0103] H. 治疗方法和药物制剂

[0104] 该发明也包括治疗以癌症细胞中 GPR110 表达增加为特征的癌症的方法,例如,减轻人对象的肿瘤负荷。下面部分的描述与前列腺癌或肺癌相关;但是,应理解该方法可以用于以 GPR110 表达增加为特征的其它癌症。

[0105] 在一种方法中, GPR110 抗原,例如,全长 GPR110 或一个抗原肽,如,上面公开的 GPR110 肽中的一个,如包含来自 SEQ ID NO:1 之一的氨基序列被用于激活参与诱导特异性针对前列腺癌或肺癌细胞的细胞毒性 T 细胞的免疫细胞。在一种实施方案中,在有效激活细胞的条件下例如存在 GM-CSF 的条件下,其可以通过离体暴露将从病人获得的抗原呈递细胞给 GPR110 抗原实现。一旦被离体激活,该细胞再返回到病人体内,在那里激活的细胞有效刺激抗肿瘤的细胞毒性 T 细胞的克隆性扩增。该免疫治疗方法在例如美国专利号 6,080,409 和其中引用的相关文献中描述。

[0106] 可选择地, GPR110 抗原可以作为疫苗施用给病人,通常其存在于合适的佐剂中,例如包含 GM-CSF 的佐剂。该肽疫苗有效地刺激和引起 CD4 辅助性 T 细胞, CD8Tc 细胞毒性淋巴细胞和 CD8 非细胞毒性 T- 抑制性淋巴细胞的克隆性扩增,引起个体内 GPR110 抗原特异性 CD4 辅助性 T 细胞, GPR110 抗原特异性 CD8Tc 细胞毒性淋巴细胞和 GPR110 抗原特异性 CD8 非细胞毒性 T- 抑制性淋巴细胞的扩增。

[0107] 制备适于注射的包含抗原的组合物,和免疫刺激细胞毒性 T 细胞合适的抗原剂量已经在很多关于免疫治疗诱导 T 细胞的专利和发表文献中描述。那些方法在涉及治疗前列腺癌或肺癌的 GPR110 抗原的本方法中是可应用的。治疗之后,监测病人癌症状态的变化,特别是通过联合肿瘤可视化方法,例如 MRI 或 CAT 扫描,和监测包括 GPR110 自身的前列腺癌或肺癌相关抗原的水平。

[0108] 在另外一种常用的免疫治疗方法中,依照上述的检测方法,诊断患有前列腺癌或肺癌的病人首先被确证具有 GPR110 水平的升高。如果该检测中所述对象检验呈阳性,他或她通过施用抗 -GPR110 抗体被治疗。优选地,该抗体是人的或人源化抗体,如上面描述的那样制备,并通过在合适的生理学载体中静脉注射或皮下注射而施用。抗体量优选 1 到 10mg/ 针剂,病人以每 14 天左右的间隔进行治疗。在治疗过程中,监视病人癌症状态的变化(通常通过联合肿瘤可视化方法)和前列腺癌或肺癌相关抗原的水平,如上所述。该疗法可以与其他前列腺癌或肺癌的治疗方法包括药物或放射性同位素疗法联合进行,并且可以持续直至观察到肿瘤体积理想的缩小。GPR110 抗体可以是人或人源化抗体,当结合于前列腺癌或肺癌细胞表面的 GPR110 时,有效地促进抗体 - 依赖的细胞毒作用。该抗体可以用治疗剂例如毒素衍生,当偶联物结合于该细胞或被细胞吸收,有效地杀伤或抑制癌症细胞。

#### [0109] I 基于细胞的化合物筛选

[0110] 通常,多种表达系统和分析被用于评价 G 蛋白 - 偶联受体 (GPCR) 的功能和鉴定做为激动剂和拮抗剂的化合物。参考文献 12-14 综述了目前普遍针对 GPCR 的药物化合物筛选的高通量方法。在大规模筛选方案中, GPCR 通常使用基于细胞的重组表达系统表达,包括酵母,昆虫(杆状病毒),非洲爪蟾属卵母细胞,和哺乳动物细胞系。尽管确定 GPCR 的药理学活性传统上是通过进行放射示踪标记的配体结合实验处理的,简单受体结合使用非放射活性的方法,如荧光偏振和荧光共振能量转移技术,也可以被检测。

[0111] GPCR 与下游信号通路的功能性偶联可以通过测定下游事件如细胞内钙动员的标

准实验评估。使用这些基于细胞的实验,目的 GPCR 例如在哺乳动物细胞内连同泛宿主性的自然存在的 G 蛋白如  $G_{q15/16}$  (或其联合体) 或泛宿主性的改造的嵌合 G-蛋白一起表达,后者都可以与多个 GPCR 偶联并转导信号;细胞内钙的增多可以利用标准钙-敏感荧光染料检测。为了检测更多的即时第二信使信号分子,如 cAMP 和花生四烯酸,可以使用基因报告载体,其中 cAMP 结合位点例如与萤光素酶融合基因偶联。可选择地,基于荧光的系统可以用于检测与 GPCR 脱敏作用有关的蛋白例如 B-抑制蛋白 2 的易位。其他类型的表达系统包括在非洲爪蟾属黑素细胞中表达 GPCR,其中 GPCR 活性通过检测黑素细胞中存在的内源性色素的色散或凝结来测定。

[0112] 尽管本发明就特定实施方案和应用作了阐述,仍可以在不脱离要求保护的本发明情况下,进行多种变化和修改,这是可以理解的。

[0113] 序列表

[0114] SEQ ID NO :1 人 GPR110 蛋白的 N-末端细胞外结构域(同种型 1)(残基 1-590)

[0115] MKVGVWLWLSFFFTFDGHHGFLGKNDG IKTKKELIVNKKKHLGPVEEYQLLLQVT

[0116] YRDSKEKRDLRNFLK

[0117] LLKPPLLWSHGLIRI IRAKATTD CNSLNGVLQCTCEDSYTWFPSPCLDPQNCYL

[0118] HTAGALPSCECHLNNL

[0119] SQSVNFCERTKIWGTFKINERFTNDLLNSSSAIYSKYANGIEIQLKKAYERIQGFE

[0120] SVQVTQFRNGSIVA

[0121] GYEVVGVSSASSELLSAIEHVAEKAKTALHKLFPLEDGSFRVFGKAQCNDIVFGF

[0122] GSKDDEYTLPCSSGYR

[0123] GNITAKCESSGWQVIRETCVLSLLEELNKNFSMIVGNATEAAVSSFVQNL SVIIR

[0124] QNPSTTVGNLASVVS

[0125] ILSNISSLASHFRVSNSTMEDVISIADNINLSASVTNWTVLLREEKYASSRILET

[0126] LENISTLVPPTAL

[0127] PLNFSRKFIDWKGIPVNSQLKRGYSYQIKMCPQNTSIPIRGRVLI GSDQFQRSL

[0128] PETIISMASLTGNI

[0129] LPVSKNGNAQVNGPVIISTVIQNY SINEVFLFFSKIESNLSQPHCVFWD FSHLQW

[0130] NDAGCHLVNETQDIVT

[0131] CQCTHLTSFSILMSPFVPSTIFPVVKWITY

[0132] SEQ ID NO :2 人 GPR110 蛋白(同种型 1)(残基 1-910)

[0133] MKVGVWLWLSFFFTFDGHHGFLGKNDG IKTKKELIVNKKKHLGPVEEYQLLLQVT

[0134] YRDSKEKRDLRNFLK

[0135] LLKPPLLWSHG LIRI IRAKATTD CNSLNGVLQCTCEDSYTWFPSPCLDPQNCYL

[0136] HTAGALPSCECHLNNL

[0137] SQSVNFCERTKIWGTFKINERFTNDLLNSSSAIYSKYANGIEIQLKKAYERIQGFE

[0138] SVQVTQFRNGSIVA

[0139] GYEVVGVSSASSELLSAIEHVAEKAKTALHKLFPLEDGSFRVFGKAQCNDIVFGF

[0140] GSKDDEYTLPCSSGYR

[0141] GNITAKCESSGWQVIRETCVLSLLEELNKNFSMIVGNATEAAVSSFVQNL SVIIR

- [0142] QNPSTTVGNLASVVS
- [0143] ILSNISSLASHFRVSNSTMEDVISIADNINLSASVTNWTVLLREEKYASSRLEET
- [0144] LENISTLVPPTAL
- [0145] PLNFSRKFIDWKGIPVNKSQLKRGYSYQIKMCPQNTSIPTRGRVLIGSDQFQRSL
- [0146] PETIISMASLTGNI
- [0147] LPVSKNGNAQVNGPVIISTVIQNYSSINEVFLFFSKIESNLSQPHCVFWDFFSHLQW
- [0148] NDAGCHLVNETQDIVT
- [0149] CQCTHLTSFSILMSPFVPTIFPVVKWITYVGLGISIGSLILCLIEALFWKQIKKSQ
- [0150] TSHTRRICMVNI
- [0151] ALSLLIADVWFIVGATVDTTVNPSPGVCTAAVFFTHFFYLSLFFWMLMLGILLAYRII
- [0152] LVFHMAQHLMA
- [0153] VGFCLGYGCPLIISVITIAVTQPSNTYKRKDVCLNWSNGSKPLLAFFVVPALAIIV
- [0154] AVNFVVVLLVLTCLW
- [0155] RPTVGERLSRDDKATIIIRVGKSLILTPLLGLTWGFGIGTIVDSQNLAWHVIFALL
- [0156] NAFQGFILCFGIL
- [0157] LDSKLRQLLFNKLALSSWKQTEKQSSDLSAKPKFSKPFNPLQNKGHYAFSH
- [0158] TGDSSDNIMLTQFVSNE
- [0159] SEQ ID NO :3 (365 至 383 氨基酸残基, 由外显子 4 编码)
- [0160] DLFIDKKVLKVAHVEHEET
- [0161] SEQ ID NO :4 (526 至 541 氨基酸残基, 由外显子 8 编码)
- [0162] LAYDLVDVDDAPGNSQQ

## 序列表

<110> 皮可贝拉有限责任公司

<120> 诊断和治疗前列腺癌和肺癌的方法

<130>598498015W00

<140>To be Assigned

<141>Herewith

<150>US 60/916, 719

<151>2007-05-08

<160>4

<170>FastSEQ for Windows Version 4.0

<210>1

<211>590

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Met	Lys	Val	Gly	Val	Leu	Trp	Leu	Ile	Ser	Phe	Phe	Thr	Phe	Thr	Asp
1			5						10					15	
Gly	His	Gly	Gly	Phe	Leu	Gly	Lys	Asn	Asp	Gly	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys
			20					25						30	
Glu	Leu	Ile	Val	Asn	Lys	Lys	Lys	His	Leu	Gly	Pro	Val	Glu	Glu	Tyr
			35					40					45		
Gln	Leu	Leu	Leu	Gln	Val	Thr	Tyr	Arg	Asp	Ser	Lys	Glu	Lys	Arg	Asp
			50					55				60			
Leu	Arg	Asn	Phe	Leu	Lys	Leu	Leu	Lys	Pro	Pro	Leu	Leu	Trp	Ser	His
65				70						75					80
Gly	Leu	Ile	Arg	Ile	Ile	Arg	Ala	Lys	Ala	Thr	Thr	Asp	Cys	Asn	Ser
				85						90					95
Leu	Asn	Gly	Val	Leu	Gln	Cys	Thr	Cys	Glu	Asp	Ser	Tyr	Thr	Trp	Phe
				100						105					110
Pro	Pro	Ser	Cys	Leu	Asp	Pro	Gln	Asn	Cys	Tyr	Leu	His	Thr	Ala	Gly
				115						120					125

Ala Leu Pro Ser Cys Glu Cys His Leu Asn Asn Leu Ser Gln Ser Val  
 130 135 140  
 Asn Phe Cys Glu Arg Thr Lys Ile Trp Gly Thr Phe Lys Ile Asn Glu  
 145 150 155 160  
 Arg Phe Thr Asn Asp Leu Leu Asn Ser Ser Ser Ala Ile Tyr Ser Lys  
 165 170 175  
 Tyr Ala Asn Gly Ile Glu Ile Gln Leu Lys Lys Ala Tyr Glu Arg Ile  
 180 185 190  
 Gln Gly Phe Glu Ser Val Gln Val Thr Gln Phe Arg Asn Gly Ser Ile  
 195 200 205  
 Val Ala Gly Tyr Glu Val Val Gly Ser Ser Ser Ala Ser Glu Leu Leu  
 210 215 220  
 Ser Ala Ile Glu His Val Ala Glu Lys Ala Lys Thr Ala Leu His Lys  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Pro Leu Glu Asp Gly Ser Phe Arg Val Phe Gly Lys Ala Gln  
 245 250 255  
 Cys Asn Asp Ile Val Phe Gly Phe Gly Ser Lys Asp Asp Glu Tyr Thr  
 260 265 270  
 Leu Pro Cys Ser Ser Gly Tyr Arg Gly Asn Ile Thr Ala Lys Cys Glu  
 275 280 285  
 Ser Ser Gly Trp Gln Val Ile Arg Glu Thr Cys Val Leu Ser Leu Leu  
 290 295 300  
 Glu Glu Leu Asn Lys Asn Phe Ser Met Ile Val Gly Asn Ala Thr Glu  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Val Ser Ser Phe Val Gln Asn Leu Ser Val Ile Ile Arg Gln  
 325 330 335  
 Asn Pro Ser Thr Thr Val Gly Asn Leu Ala Ser Val Val Ser Ile Leu  
 340 345 350  
 Ser Asn Ile Ser Ser Leu Ser Leu Ala Ser His Phe Arg Val Ser Asn  
 355 360 365  
 Ser Thr Met Glu Asp Val Ile Ser Ile Ala Asp Asn Ile Leu Asn Ser  
 370 375 380  
 Ala Ser Val Thr Asn Trp Thr Val Leu Leu Arg Glu Glu Lys Tyr Ala  
 385 390 395 400  
 Ser Ser Arg Leu Leu Glu Thr Leu Glu Asn Ile Ser Thr Leu Val Pro  
 405 410 415  
 Pro Thr Ala Leu Pro Leu Asn Phe Ser Arg Lys Phe Ile Asp Trp Lys  
 420 425 430  
 Gly Ile Pro Val Asn Lys Ser Gln Leu Lys Arg Gly Tyr Ser Tyr Gln





Pro Thr Ala Leu Pro Leu Asn Phe Ser Arg Lys Phe Ile Asp Trp Lys  
 420 425 430  
 Gly Ile Pro Val Asn Lys Ser Gln Leu Lys Arg Gly Tyr Ser Tyr Gln  
 435 440 445  
 Ile Lys Met Cys Pro Gln Asn Thr Ser Ile Pro Ile Arg Gly Arg Val  
 450 455 460  
 Leu Ile Gly Ser Asp Gln Phe Gln Arg Ser Leu Pro Glu Thr Ile Ile  
 465 470 475 480  
 Ser Met Ala Ser Leu Thr Leu Gly Asn Ile Leu Pro Val Ser Lys Asn  
 485 490 495  
 Gly Asn Ala Gln Val Asn Gly Pro Val Ile Ser Thr Val Ile Gln Asn  
 500 505 510 Tyr Ser Ile Asn  
 Glu Val Phe Leu Phe Phe Ser Lys Ile Glu Ser Asn  
 515 520 525  
 Leu Ser Gln Pro His Cys Val Phe Trp Asp Phe Ser His Leu Gln Trp  
 530 535 540  
 Asn Asp Ala Gly Cys His Leu Val Asn Glu Thr Gln Asp Ile Val Thr  
 545 550 555 560  
 Cys Gln Cys Thr His Leu Thr Ser Phe Ser Ile Leu Met Ser Pro Phe  
 565 570 575  
 Val Pro Ser Thr Ile Phe Pro Val Val Lys Trp Ile Thr Tyr Val Gly  
 580 585 590  
 Leu Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Ile Leu Cys Leu Ile Ile Glu Ala  
 595 600 605  
 Leu Phe Trp Lys Gln Ile Lys Lys Ser Gln Thr Ser His Thr Arg Arg  
 610 615 620  
 Ile Cys Met Val Asn Ile Ala Leu Ser Leu Leu Ile Ala Asp Val Trp  
 625 630 635 640  
 Phe Ile Val Gly Ala Thr Val Asp Thr Thr Val Asn Pro Ser Gly Val  
 645 650 655  
 Cys Thr Ala Ala Val Phe Phe Thr His Phe Phe Tyr Leu Ser Leu Phe  
 660 665 670  
 Phe Trp Met Leu Met Leu Gly Ile Leu Leu Ala Tyr Arg Ile Ile Leu  
 675 680 685  
 Val Phe His His Met Ala Gln His Leu Met Met Ala Val Gly Phe Cys  
 690 695 700  
 Leu Gly Tyr Gly Cys Pro Leu Ile Ile Ser Val Ile Thr Ile Ala Val  
 705 710 715 720  
 Thr Gln Pro Ser Asn Thr Tyr Lys Arg Lys Asp Val Cys Trp Leu Asn



<400>4

Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln

1

5

10

15

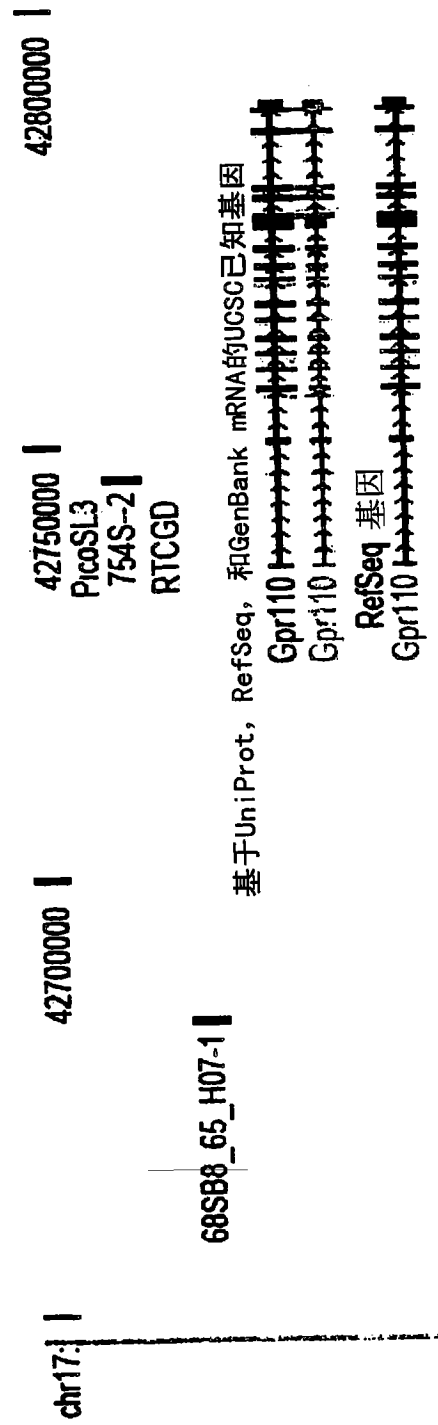
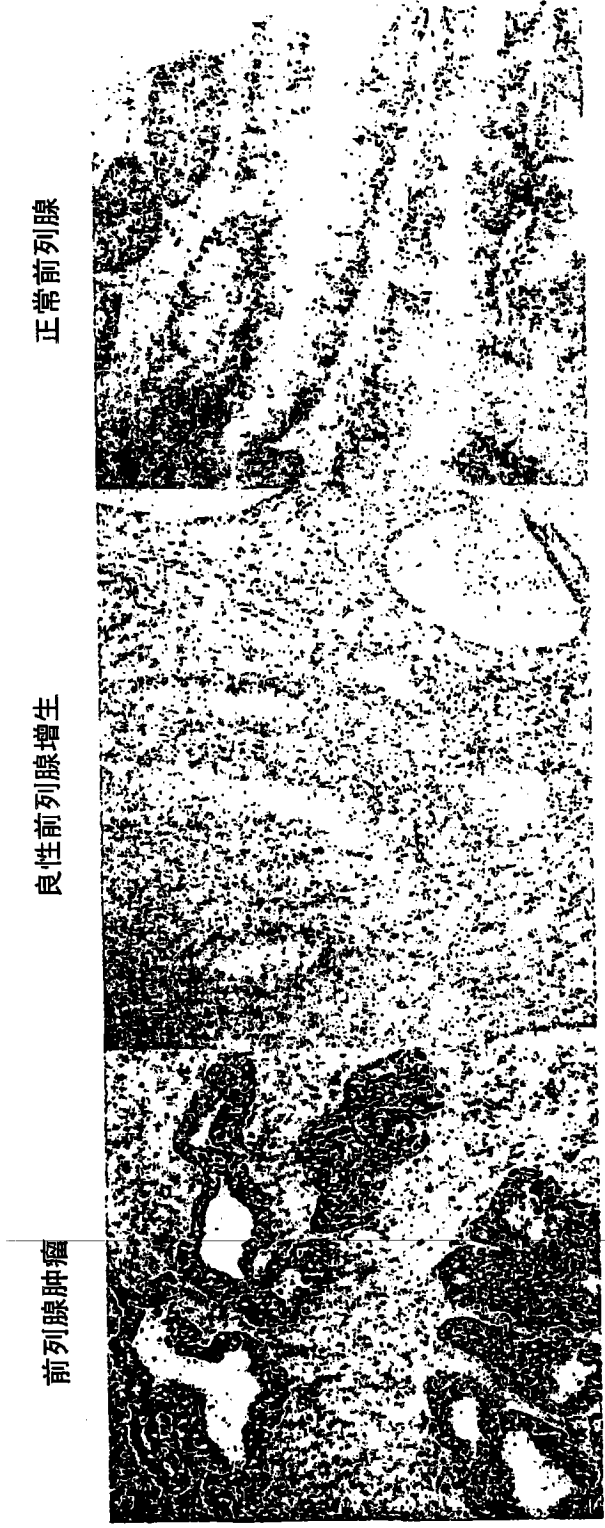


图 1



正常前列腺

良性前列腺增生

前列腺肿瘤

图2C

图2B

图2A

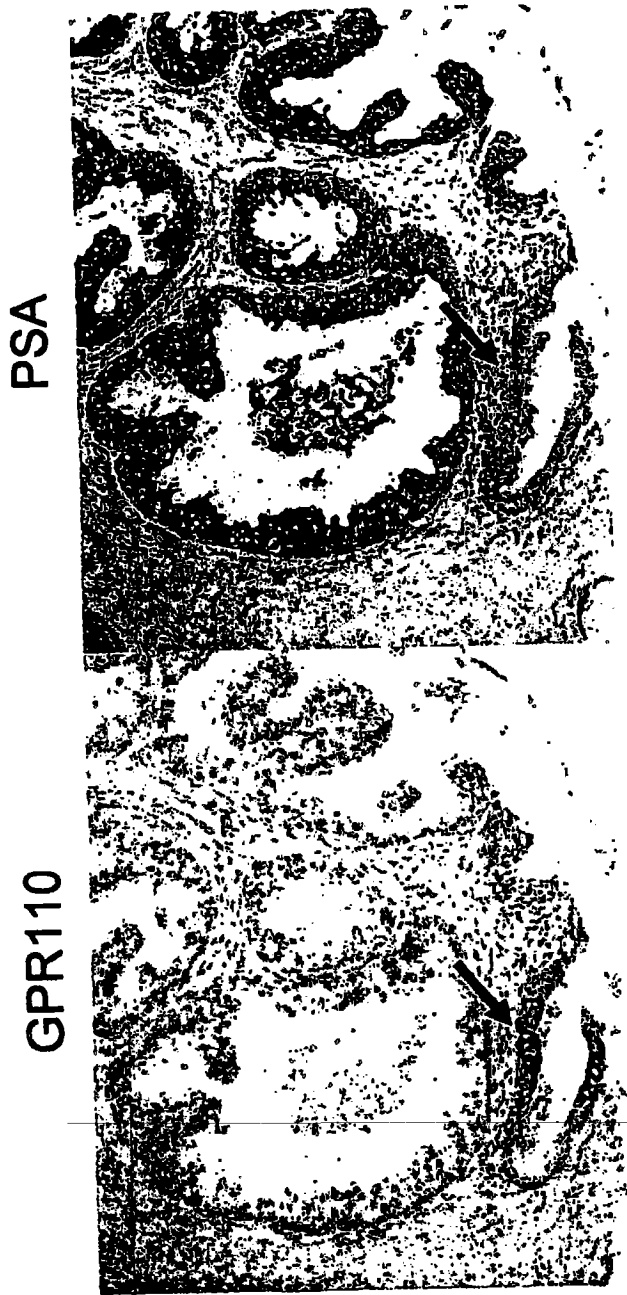


图3B

图3A

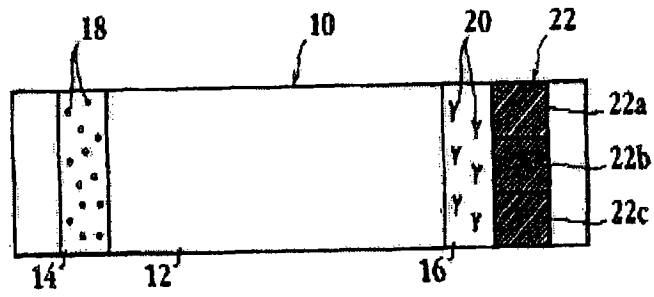
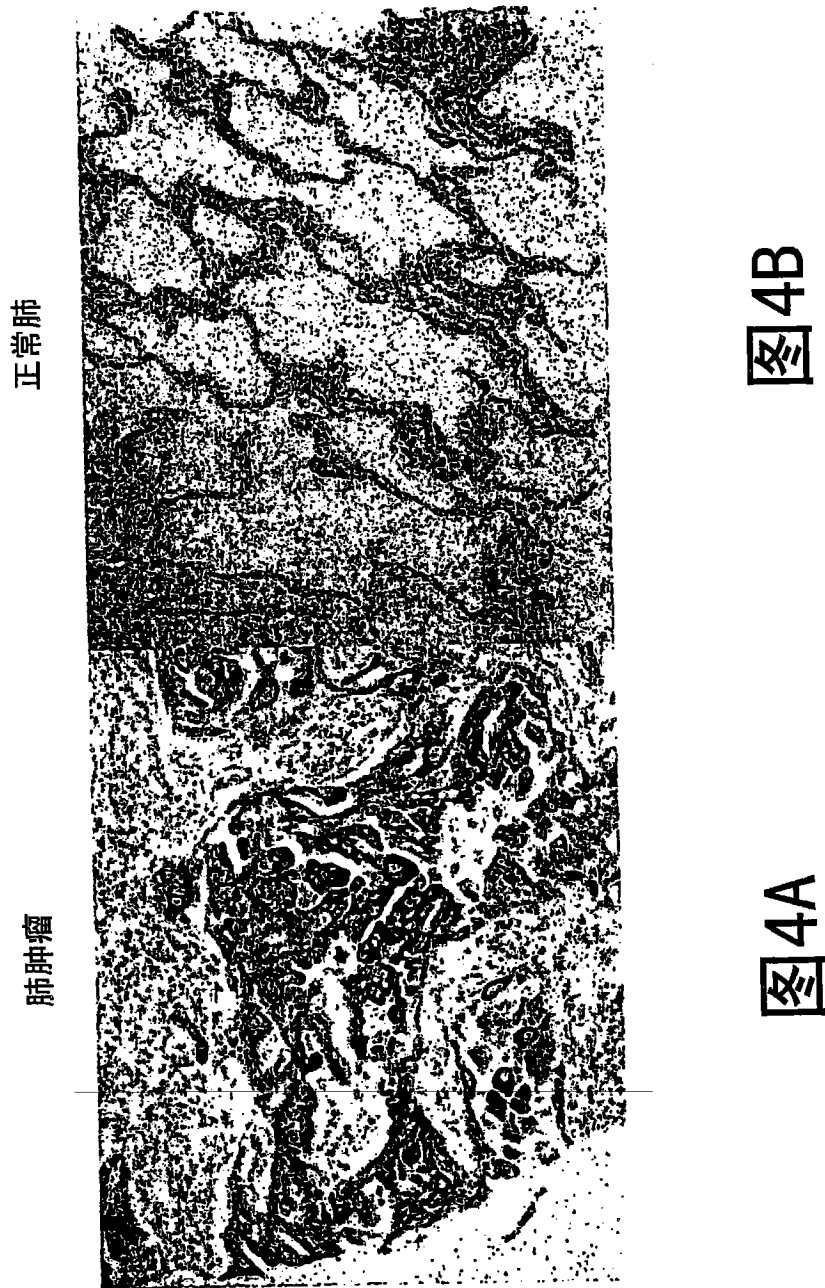


图 5A

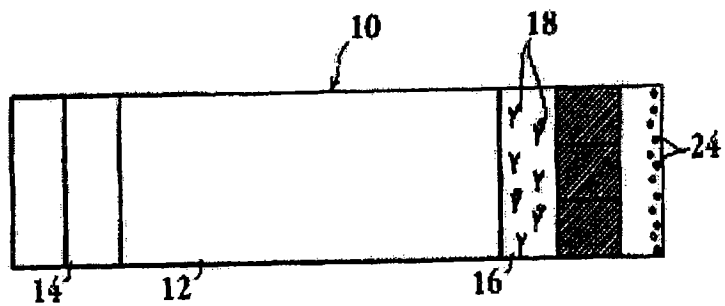


图 5B

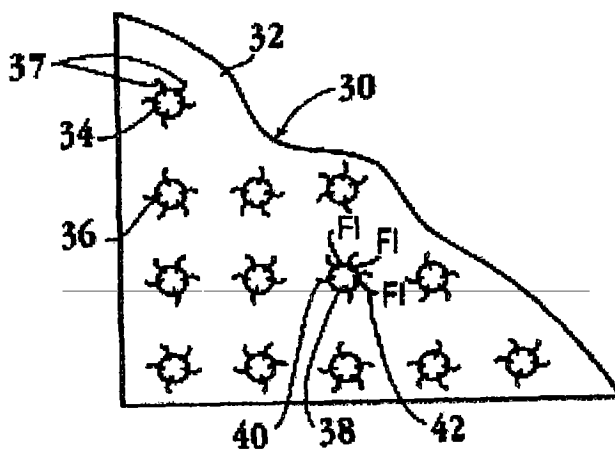


图 6

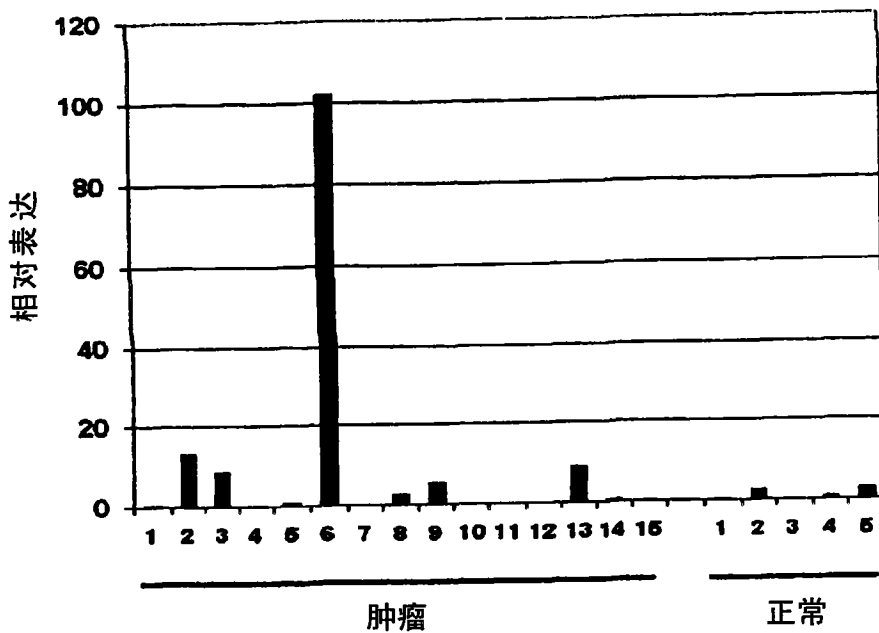


图 7A

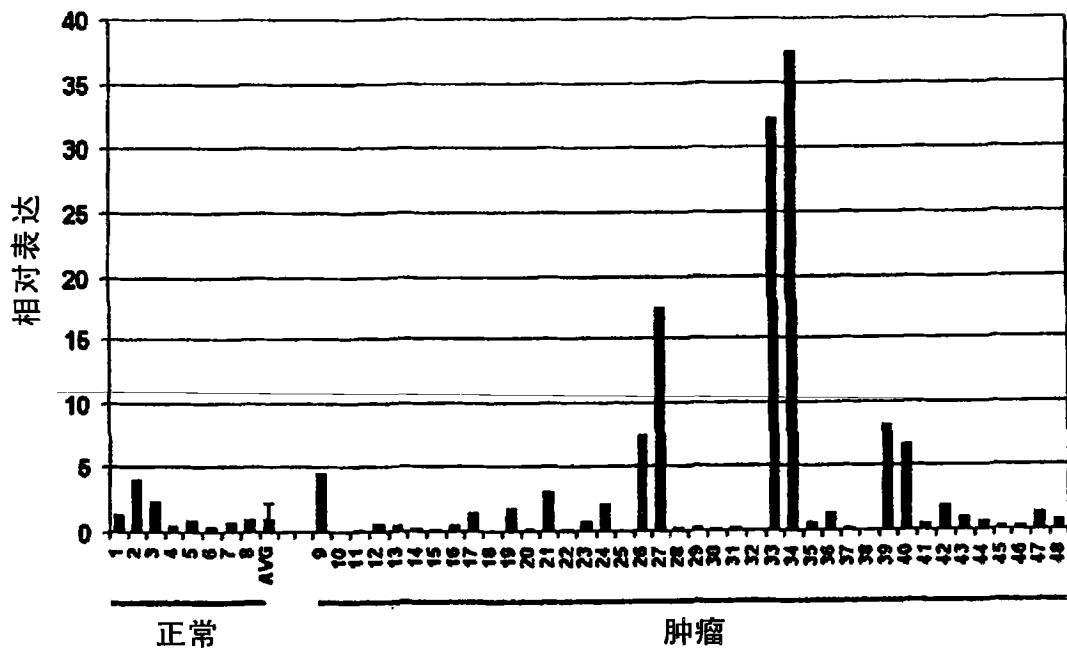


图 7B

