

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02815804.0

G01N 33/53

G01N 33/574

A61B 5/055

A61K 31/138

A61K 49/06

A61K 49/22

C12Q 1/68

[43] 公开日 2005 年 10 月 12 日

[11] 公开号 CN 1682111A

[22] 申请日 2002. 6. 14 [21] 申请号 02815804.0

[30] 优先权

[32] 2001. 6. 15 [33] US [31] 09/880,842

[86] 国际申请 PCT/US2002/018549 2002. 6. 14

[87] 国际公布 WO2002/102229 英 2002. 12. 27

[85] 进入国家阶段日期 2004. 2. 12

[71] 申请人 A&G 药品公司

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 G·塞尔雷罗

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 孟凡宏

C07K 16/00 C07K 14/82 C07H 21/04

权利要求书 7 页 说明书 43 页 附图 29 页

[54] 发明名称 诊断致瘤力以及确定对抗癌疗法的抗性

[57] 摘要

诊断致瘤力和确定癌症患者是否抵抗抗雌激素疗法的药理作用的方法和试剂盒。PCDGF(GP88)生长因子水平增加指示致瘤力以及对抗雌激素疗法的药理作用的抗性。本发明的方法和试剂盒用于评价来自患者的生物样品的致瘤力以及确定所述患者是否是抗雌激素(包括他莫昔芬)疗法的对象。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种诊断人类患者的致瘤力的方法，所述方法包括：
从所述患者获取包含细胞的生物样品；
- 5 检测所述生物样品中所述细胞内的 GP88；
确定所述样品内的 GP88 阳性细胞数目；然后
确定所述生物样品中 GP88 阳性细胞与总细胞数目的比例，其中
所述比例指示致瘤力。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述生物样品包括选自以下的材料：
10 血液、血清、血浆、尿、乳头吸出物、脑脊髓液、肝、肾、乳腺、骨、
脑、结肠、肺、睾丸或卵巢。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述患者经诊断患有癌症。
4. 权利要求 3 的方法，其中所述癌症选自：乳腺癌、卵巢癌、肾
癌、骨癌、胰癌、睾丸癌、肝癌、脑癌、结肠癌、肺癌和皮肤癌。
- 15 5. 权利要求 1 的方法，其中使用抗人 GP88 抗体通过免疫染色检
测所述 GP88。
6. 权利要求 1 的方法，其中使用抗人 GP88 抗体通过诊断性成像
检测所述 GP88。
7. 权利要求 6 的方法，其中通过磁性共振成像检测所述 GP88。
- 20 8. 权利要求 6 的方法，其中通过超声波检测所述 GP88。
9. 权利要求 6 的方法，其中通过单克隆抗体成像检测所述 GP88。
10. 权利要求 6 的方法，其中放射标记所述抗人 GP88 抗体。
11. 权利要求 5 的方法，其中标记所述抗体。
12. 权利要求 11 的方法，其中所述标记选自：生物素标记、酶标
25 记、放射性同位素标记、荧光标记和化学标记。
13. 权利要求 1 的方法，其中使用人 GP88 cDNA 探针通过原位
杂交检测所述 GP88。
14. 权利要求 13 的方法，其中标记所述人 GP88 cDNA 探针。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述标记选自：酶标记、放射性同位素标记、荧光标记和化学标记。

16. 权利要求 1 的方法，其中使用人 GP88 cDNA 探针通过荧光原位杂交检测所述 GP88。

5 17. 权利要求 1 的方法，其中使用人 GP88 cDNA 探针通过逆转录酶-聚合酶链反应检测所述 GP88。

18. 权利要求 1 的方法，其中使用人 GP88 cDNA 探针通过 RNAse 保护测定检测所述 GP88。

10 19. 权利要求 1 的方法，其中使用人 GP88 cDNA 探针通过微阵列分析检测所述 GP88。

20. 权利要求 1 的方法，其中通过显微镜检查确定所述 GP88 阳性细胞数。

15 21. 权利要求 1 的方法，其中通过选自以下的技术确定所述 GP88 阳性细胞数：FACS 分析、发光检测、抗体微阵列、数字化扫描和细胞分选仪。

22. 权利要求 1 的方法，其中所述比例是至少约 1%。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述比例是至少约 5%。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述比例是至少约 10%。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述比例是至少约 25%。

20 26. 权利要求 25 的方法，其中所述比例是至少约 50%。

27. 一种确定人类患者是否抵抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的方法，所述方法包括：

从所述患者获取包含细胞的生物样品；检测所述生物样品中的 GP88；然后

25 确定所述样品中的 GP88 量，其中所述 GP88 量指示抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的抗性。

28. 一种确定人类患者是否抵抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的方法，所述方法包括：

- 从所述患者获取包含细胞的生物样品；
检测所述生物样品中所述细胞内的 GP88；
确定所述样品中 GP88 阳性细胞的数目；然后
确定所述生物样品中 GP88 阳性细胞与总细胞数目的比例，其中
5 所述比例指示抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的抗性。
29. 权利要求 27 的方法，其中所述生物样品包括选自以下的材料：血液、血清、血浆、尿、乳头吸出物、脑脊髓液、肝、肾、乳腺、骨、睾丸、脑、结肠、肺或卵巢。
30. 权利要求 27 的方法，其中所述患者经诊断患有癌症。
- 10 31. 权利要求 30 的方法，其中所述癌症选自：乳腺癌、卵巢癌、肾癌、骨癌、胰癌、睾丸癌、肝癌、脑癌、结肠癌、肺癌和皮肤癌。
32. 权利要求 27 的方法，其中使用抗人 GP88 抗体通过免疫染色检测所述 GP88。
33. 权利要求 32 的方法，其中使用抗人 GP88 抗体通过诊断性成
15 像检测所述 GP88。
34. 权利要求 33 的方法，其中通过磁性共振成像检测所述 GP88。
35. 权利要求 33 的方法，其中通过超声波检测所述 GP88。
36. 权利要求 33 的方法，其中通过单克隆抗体成像检测所述
GP88。
- 20 37. 权利要求 33 的方法，其中放射标记所述抗人 GP88 抗体。
38. 权利要求 32 的方法，其中标记所述抗体。
39. 权利要求 38 的方法，其中所述标记选自以下：生物素标记、酶标记、放射性同位素标记、荧光标记和化学标记。
40. 权利要求 27 的方法，其中使用人 GP88 cDNA 探针通过原位
25 杂交检测所述 GP88。
41. 权利要求 40 的方法，其中标记所述人 GP88 cDNA 探针。
42. 权利要求 41 的方法，其中所述标记选自以下：酶标记、放射性同位素标记、荧光标记和化学标记。

43. 权利要求 27 的方法, 其中通过荧光原位杂交检测所述 GP88。
44. 权利要求 27 的方法, 其中通过显微镜检查确定所述 GP88 阳性细胞数目。
45. 权利要求 27 的方法, 其中通过选自以下的技术确定所述 GP88 阳性细胞的数目: FACS 分析、发光检测、抗体微阵列、数字化扫描和细胞分选仪。
46. 权利要求 27 的方法, 其中所述比例是至少约 10%。
47. 权利要求 46 的方法, 其中所述患者是雌激素受体阳性患者。
48. 权利要求 46 的方法, 其中所述比例是至少约 25%。
- 10 49. 权利要求 48 的方法, 其中所述患者是雌激素受体阳性患者。
50. 权利要求 48 的方法, 其中所述比例是至少约 50%。
51. 权利要求 50 的方法, 其中所述患者是雌激素受体阳性患者。
52. 权利要求 27 的方法, 其中所述量是至少约 10%。
53. 权利要求 52 的方法, 其中所述患者是雌激素受体阳性患者。
- 15 54. 权利要求 53 的方法, 其中所述量是至少约 25%。
55. 权利要求 54 的方法, 其中所述患者是雌激素受体阳性患者。
56. 权利要求 55 的方法, 其中所述量是至少约 50%。
57. 权利要求 56 的方法, 其中所述患者是雌激素受体阳性患者。
58. 权利要求 28 的方法, 其中所述比例是至少约 10%。
- 20 59. 权利要求 58 的方法, 其中所述患者是雌激素受体阳性患者。
60. 权利要求 59 的方法, 其中所述比例是至少约 25%。
61. 权利要求 60 的方法, 其中所述患者是雌激素受体阳性患者。
62. 权利要求 61 的方法, 其中所述比例是至少约 50%。
63. 权利要求 62 的方法, 其中所述患者是雌激素受体阳性患者。
- 25 64. 一种诊断致瘤力的方法, 所述方法包括:
从患者获取包含细胞的乳腺组织样品;
使用抗人 GP88 抗体通过免疫染色检测所述乳腺组织中所述细胞内的 GP88;

通过显微镜检查确定所述样品中的 GP88 阳性细胞数；然后确定所述乳腺组织样品中 GP88 阳性细胞与总细胞数目的比例，其中至少约 1% 的比例指示致癌力。

5 65. 一种确定雌激素受体阳性患者是否抵抗他莫昔芬的抗肿瘤效应的方法，所述方法包括：

从所述患者获取包含细胞的乳腺组织样品；

使用抗人 GP88 抗体通过免疫组织化学染色检测所述乳腺组织样品中所述细胞内的 GP88；

10 通过显微镜检查确定所述样品中 GP88 阳性细胞的数目；然后确定所述生物样品中 GP88 阳性细胞与总细胞数目的比例，其中至少约 10% 的比例说明所述患者抵抗他莫昔芬的抗肿瘤效应。

66. 一种用于实施权利要求 1 的方法的试剂盒，所述试剂盒包括：一个容器；以及抗人 GP88 抗体。

15 67. 权利要求 66 的试剂盒，所述试剂盒还包括重组 GP88 蛋白以及一种底物。

68. 权利要求 66 的试剂盒，其中标记所述抗体。

69. 权利要求 68 的试剂盒，其中所述标记选自以下：酶标记、放射性同位素标记、荧光标记和化学标记。

20 70. 一种用于实施权利要求 1 的方法的试剂盒，所述试剂盒包括：一个容器；以及人 GP88 cDNA 探针。

71. 权利要求 70 的试剂盒，其中标记所述人 GP88 cDNA 探针。

25 ID NO:16。
72. 权利要求 70 的试剂盒，其中所述人 GP88 cDNA 探针是 SEQ

73. 权利要求 71 的试剂盒，其中所述标记选自以下：酶标记、放射性同位素标记、荧光标记和化学标记。

74. 一种用于实施权利要求 27 的方法的试剂盒，所述试剂盒包

括:

一个容器; 以及
抗人 GP88 抗体。

75. 权利要求 74 的试剂盒, 所述试剂盒还包括重组 GP88 蛋白以
5 及一种底物。

76. 权利要求 74 的试剂盒, 其中标记所述抗体。

77. 权利要求 76 的试剂盒, 其中所述标记选自以下: 酶标记、放
射性同位素标记、荧光标记和化学标记。

78. 一种用于实施权利要求 27 的方法的试剂盒, 所述试剂盒包
10 括:

一个容器; 以及
人 GP88 cDNA 探针。

79. 权利要求 78 的试剂盒, 其中标记所述人 GP88 cDNA 探针。

80. 权利要求 79 的试剂盒, 其中所述人 GP88 cDNA 探针是 SEQ
15 ID NO:16。

81. 权利要求 79 的试剂盒, 其中所述标记选自以下: 酶标记、放
射性同位素标记、荧光标记和化学标记。

82. 一种治疗或预防患者癌症复发的方法, 所述方法包括:
确定从所述患者获得的生物样品中的 GP88 量; 然后
20 如果所述生物样品中的所述 GP88 量少于约 5%, 则给予足以治疗
或预防所述癌症的剂量的他莫昔芬。

83. 一种治疗或预防雌激素受体阳性患者癌症复发的方法, 所述
方法包括:

确定从所述患者获得的生物样品中的 GP88 量; 然后
25 如果所述生物样品中的所述 GP88 量少于约 10%, 则给予足以治
疗或预防所述癌症的剂量的他莫昔芬。

84. 一种治疗或预防患者癌症复发的方法, 所述方法包括:
确定从所述患者获得的生物样品中的 GP88 阳性细胞百分率; 然

后

如果所述生物样品中所述 GP88 阳性细胞百分率少于约 5%，则给予足以治疗或预防所述癌症的剂量的他莫昔芬。

85. 一种治疗或预防雌激素受体阳性患者癌症复发的方法，所述方法包括：

确定从所述患者获得的生物样品中的 GP88 阳性细胞百分率；然后

如果所述生物样品中的所述 GP88 阳性细胞百分率少于约 10%，则给予足以治疗或预防所述癌症复发的剂量的他莫昔芬。

诊断致瘤力以及确定对抗癌疗法的抗性

5 本发明是2001年6月15日申请的美国申请第09/880,842号的继续申请,美国申请第09/880,842号是1999年12月8日申请的美国申请第09/456,886号的部分继续申请,美国申请第09/456,886号是1997年12月16日申请的美国申请第08/991,862号的一个分案,08/991,862号申请是1997年5月23日申请、目前已放弃的美国申请
10 第08/863,079的部分继续申请。

发明背景

多细胞生物中细胞的增殖和分化受到高度受控过程的支配。癌症细胞的一个显著特点是对该过程缺乏控制;增殖和分化失去控制,
15 导致不受控制的生长。已经进行大量努力,以更好地理解正常细胞和肿瘤细胞之间的这种差异。研究焦点的一个领域是生长因子,更具体地说,是自分泌生长因子刺激。

生长因子是携带涉及生长、分化、迁移和基因表达的信息到细胞去的多肽。一般地说,生长因子在一个细胞内产生,作用于另一个细胞,刺激增殖。然而,培养物中的某些恶性细胞表现对自分泌生长机制更大或完全的依赖性。遵循该自分泌行为的恶性细胞避开
20 其它细胞生长因子产生的调节,因此它们的生长不受调节。

对自分泌生长控制的研究促进对细胞生长机制的理解,并导致肿瘤诊断和治疗中的重要进步。为此,已经研究多种生长因子,包括胰岛素样生长因子(“IGF1”和“IGF2”)、胃泌素释放肽(“GRP”)、
25 转化生长因子 α 和 β (“TGF-a”和“TGF-b”)以及表皮生长因子(“EGF”)。

本发明涉及一种最近发现的生长因子。该生长因子首先在高度致瘤的“PC细胞”的培养基中发现,“PC细胞”是从来自畸胎瘤的

脂肪生成细胞系 1246 分离的依赖于胰岛素的变体。该生长因子在本文中称为“GP88”。已经纯化和在结构上特征鉴定 GP88。GP88 的氨基酸测序指出：GP88 与小鼠颗粒体蛋白/上皮素前体有氨基酸序列相似性。

5 颗粒体蛋白/上皮素(“grn/epi”)是 6kDa 多肽，属于新型的富含双半胱氨酸多肽家族。美国专利第 5,416,192 号(Shoyab 等)涉及 6 kDa 上皮素，尤其是上皮素 1 和上皮素 2。根据 Shoyab，这两种上皮素都由一种通用的 63.5 kDa 前体编码，该前体合成后立即被加工成为更小的形式，以致于在生物样品中仅有的天然产物是所述 6 kDa 形式。Shoyab 等教导说该上皮素前体在生物学上没有活性。

10 与 Shoyab 等的教导相反，本发明发明人的实验室已经证明：该前体并不总是在其合成后立即受到加工。由本发明发明人部分进行的研究已经证明：该前体(即 GP88)事实上作为携带 20kDa N-连接糖类部分的 88kDa 糖蛋白分泌。对 GP88 的 N 末端序列分析指出：GP88 15 开始于所述 grn/epi 前体的氨基酸 17，这证明从前体 cDNA 推导出的蛋白序列的前 17 个氨基酸对应于信号肽，所述信号肽用于靶向膜定位或靶向分泌。与 Shoyab 等的教导相反，GP88 在生物学上是有活性的，有生长促进活性，尤其是作为生产细胞的自分泌生长因子。

20 乳腺癌是世界范围内妇女发病或死亡的主要病因。已知雌激素是雌激素受体阳性(ER+)人乳腺癌细胞在体内和体外生长的主要刺激物。虽然雌激素最初是乳腺癌建立和增殖所需的，但乳腺癌病程中依赖于雌激素的肿瘤发展指示较差的预后。已经假设乳腺癌细胞中雌激素的促有丝分裂效应至少部分由自分泌生长因子介导，所述自分泌生长因子包括由雌激素调节的生长因子。因此，鉴定和特征鉴定 25 雌激素反应性基因(尤其是编码生长因子的基因)有助于理解乳腺癌细胞中雌激素的效应。

 枸橼酸他莫昔芬(“他莫昔芬”)是一种非类固醇抗雌激素，通常开处方给表现强烈抗雌激素和抗肿瘤性质的乳腺癌患者。见美国专

利第 4,536,516 号。他莫昔芬是一种与雌激素竞争结合雌激素受体的雌激素受体拮抗剂。其它抗雌激素包括雷洛昔芬、芳香酶抑制剂(如 Arimidex® (阿那曲唑)、Femera®)和雌激素受体负调节剂(如 Faslodex®)。他莫昔芬的抗雌激素效应可能涉及其与雌激素竞争靶组织中结合位点的能力。其它抗雌激素如芳香酶抑制剂抑制或减少可利用的雌激素的量。例如,芳香酶抑制剂预防雄激素转化为雌激素,由此减少可利用的雌激素的量。雌激素受体负调节剂抑制或减少细胞表面雌激素受体的数量。

目前可以从 AstraZeneca and Barr Laboratories 以商品名 Nolvadex®获得 10 mg 和 20 mg 形式的他莫昔芬,他莫昔芬适用于转移乳腺癌、乳腺癌的辅助疗法、原位腺管癌以及降低乳腺癌高危妇女中乳腺癌的发病率。因此,可以使用他莫昔芬治疗和预防各种癌症,尤其是乳腺癌。

然而,他莫昔芬给药伴随其对患者潜在的严重危险。例如,他莫昔芬给药与卵巢癌风险增加有关。此外,一些患者表现对他莫昔芬预期有益效应的抗性。因此,他莫昔芬给予抵抗其益处的患者时,卵巢癌的风险增加,同时延迟或引起所述患者放弃更有效的治疗,由此对所述患者造成不必要的伤害。

因此,给予他莫昔芬应当限制于那些最有可能从他莫昔芬治疗中受益的患者。在开始他莫昔芬治疗疗程前准确确定患者是否对他莫昔芬给药的抗肿瘤效应敏感或有抗性将是有价值的诊断工具。

目前本领域教导:患者体内缺乏雌激素受体对应于他莫昔芬抗性。例行检测癌症患者体内雌激素受体存在与否,试图预测该患者是否会对他莫昔芬疗法有抗性或有响应。根据目前的测试,一般为雌激素受体测试阳性的癌症患者(“ER+”或“雌激素受体阳性患者”)开他莫昔芬的处方。

然而,大量 ER+患者事实上抵挡他莫昔芬。因此,为 ER+患者例行开他莫昔芬的处方可能是有害的,并且增加患者发展卵巢癌或

其它形式癌症的风险。

发明简述

5 本发明的发明人目前出人意料地发现：在正常细胞中以受到严格调控方式表达的糖蛋白(GP88)在来自正常细胞的高度致瘤性细胞中过量表达和失去调控，GP88 作为所述致瘤性细胞严格需要的生长刺激物起作用，并且所述致瘤性细胞中对 GP88 表达或作用的抑制导致抑制所述过量产生细胞的致瘤力。

10 本发明的发明人进一步出人意料地发现：GP88 的表达水平指示患者是否抵抗抗雌激素化合物如他莫昔芬的药学效应。乳腺癌患者体内肿瘤细胞的雌激素受体状态并不提供确定他莫昔芬是否是乳腺癌患者合适或优选治疗疗程的足够信息。本发明提供确定患者是否抵抗他莫昔芬的更准确工具，因此代表癌症治疗中有价值的进步。

15 本发明的优选实施方案提供诊断致瘤力的方法，包括从患者获得包含细胞的生物样品，检测所述样品的细胞中的 GP88，确定所述样品中 GP88 阳性或染色细胞的数量，然后确定所述生物样品中 GP88 阳性或染色细胞与总细胞数目的比例。该比例指示致瘤力。

20 本发明还提供确定受检查者是否抵抗抗雌激素的抗肿瘤效应的方法。根据一个尤其优选的实施方案，检测来自患者的包含细胞的生物样品中的 GP88，然后确定所述样品中 GP88 的量。所述生物样品中 GP88 的量指示对抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的抗性。在另一优选实施方案中，确定生物样品中 GP88 阳性或染色细胞的数量，然后确定所述生物样品中 GP88 阳性或染色细胞与总细胞数目的比例。该比例指示对抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的抗性。

25 本发明的优选实施方案还提供诊断致瘤力和确定患者是否抵抗抗雌激素的抗肿瘤效应的试剂盒。所述试剂盒优选包含一个容器以及一种或多种用于检测 GP88 的化合物(如抗 GP88 抗体以及抗 GP88 核苷酸探针)。

本发明的另一优选实施方案提供治疗或预防癌症的方法。根据一个优选实施方案，测定从患者获得的生物样品中 GP88 的量，假如所述样品中 GP88 的量少于约 5%，则给予所述患者抗雌激素疗法。或者，如果所述生物样品中 GP88 的量少于约 10%，则给予雌激素受体阳性患者抗雌激素疗法。在另一优选实施方案中，确定从患者获得的生物样品中 GP88 阳性细胞的百分率，假如所述生物样品中 GP88 阳性或染色细胞的百分率少于约 5%，则给予所述患者足以治疗或预防所述癌症的量的抗雌激素疗法。或者，假如所述生物样品中 GP88 阳性或染色细胞的百分率少于约 10%，则给予雌激素受体阳性患者抗雌激素疗法。

本发明提供用于诊断和治疗疾病的组合物，所述疾病包括但不限于其中细胞表现 GP88 表达改变或对 GP88 响应改变的癌症。本文中术语“表达改变”的使用指：根据 mRNA 或蛋白的水平，与对应正常细胞或周围的外周细胞相比，GP88 的表达增加或过量表达增加至少两倍，有时增加 10 倍或更多。术语“表达改变”也指表达失去控制或变成组成型表达而不一定存在表达增强。术语对 GP88 的“响应”增加或改变指这样一种情况：GP88 赋予的任何生物学功能(如生长、分化、病毒感染力)的增加导致与 GP88 表达改变同样或等同的情况。

“瘤形成”指在缺乏原始生长刺激的情况下持续存在的不正常细胞生长或肿瘤细胞生长。术语“抗肿瘤效应”指逆转或抑制瘤形成的性质。术语“癌症”指任何由不正常细胞生长引起的疾病，包括但不限于乳腺癌、卵巢癌、肾癌、骨癌、胰癌、睾丸癌、肝癌、脑癌和皮肤癌。术语“致瘤力”指细胞或组织表现瘤形成特性的程度。

本文所用的“ER”除特别指出外，指雌激素受体。“PR”除特别指出外，指孕酮受体。

“GP88 阳性细胞”或“GP88 染色细胞”指那些在其中检测到

GP88 的细胞。本文所用的“GP88 阴性细胞”指那些其中没有检测到 GP88 的细胞。细胞是 GP88 阳性还是阴性可能部分取决于检测方法(即免疫染色、原位杂交、成象)的灵敏度。“细胞总数”指在生物样品中分析细胞的总数,并且可能包括在生物样品特定部分中存在的所有或某种细胞。

术语“生物样品”指来自脊椎动物机体的材料,包括但不限于血液、血清、血浆、尿、乳头吸出物、脑脊髓液、肝、肾、乳腺、骨、骨髓、睾丸或卵巢和脑、结肠和肺。

本文所用的“抵抗”抗雌激素疗法的患者是对抗雌激素疗法的抗肿瘤效应没有响应或响应降低或有限的患者。

术语“抗雌激素疗法”指给予预防雌激素或雌激素类似物形成或者干扰雌激素或雌激素类似物功能的化合物。用于抗雌激素疗法的化合物的例子在本文中称为“抗雌激素药”,包括但不限于他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制剂(如 Arimidex®、Femera®)以及雌激素受体负调节剂(如 Faslodex®)。

本文中术语“GP88”的应用指细胞提取物和细胞外液体中上皮素/颗粒体蛋白前体,不仅包括依照图 8 和图 9 中氨基酸序列的小鼠来源和人类来源的 GP88,而且包括其它物种的 GP88。此外,该术语还包括其具有添加成分如糖部分的功能衍生物,包括糖蛋白或其它修饰结构。术语“GP88”和“PCDGF”在本文中可互换使用。术语 GP88 还包括具有上述序列中存在的至少 10 个氨基酸的任何多肽片段。该长度的序列可用作抗原以及用于制造与载体缀合的免疫原性缀合物,生产特异性针对所述完整蛋白各种表位的抗体。所述多肽用于筛选所述抗体以及目的在于检测生物体液中 GP88 的方法。本领域内众所周知:肽可用于产生针对更大蛋白的抗体。在本发明的一个实施方案中,显示长度从 12 到 19 个氨基酸的肽已经成功地用于发展识别全长 GP88 的抗体。

本发明的多肽可以共价结合或者不共价结合另一种分子而存

在。例如，本发明的多肽可以通过一个或多个肽键与一种或多种其它多肽融合，例如谷胱甘肽转移酶、多组氨酸、绿荧光蛋白、myc 标记或其它受标记的化合物(如生物素)。

5 所述多肽大得足以包含抗原性独特决定簇或表位，所述独特决定簇或表位可以用作免疫原，用于复制或测试针对 GP88 或其功能衍生物的抗体。

10 一个实施方案包括基本不含其它哺乳动物肽的多肽。本发明的 GP88 可以从细胞、组织或生物体液中通过生物化学方法或通过免疫化学方法纯化。或者，可以在原核或真核表达系统和宿主细胞中通过重组方法产生所述多肽。

GP88 的“片段”指更小的肽，所述肽是该分子的任何亚部分。这对应于例如但不限于小鼠 GP88 的 K19T 和 S14R 以及人 GP88 的 E19V 和 A14R (分别等价于鼠 K19T 和 S14R)等区段。

15 GP88 的“变体”指基本类似于完整肽或其片段的分子。可以使用本领域内已知方法通过直接化学合成变体肽，制备所述变体肽。

20 或者，可以通过修饰编码所述合成蛋白或肽的 DNA，制备所述肽的氨基酸序列变体。所述变体包括例如 GP88 氨基酸序列内残基的缺失、插入或取代。可以制造缺失、插入和取代的任何组合来完成最终构建物，只要所述最终构建物具有所需活性。在编码所述变体肽的 DNA 制造的突变必须不改变可读框，并且优选不创造可能产生二级 mRNA 结构的互补区。在遗传水平上制备这些变体：定点诱变(8) 编码所述肽分子的 DNA 中的核苷酸，由此产生编码所述变体的 DNA，然后在重组细胞培养物中表达所述 DNA。所述变体一般表现与非变体肽相同的定性生物学活性。

25 GP88 蛋白的“类似物”指与所述完整分子或其片段基本相似的非天然分子。

本发明的抗体(中和抗体和其它抗体)优选用作其中细胞表现 GP88 表达提高的癌症或其它疾病。术语“中和”应当理解为所述抗

体具有抑制或阻断 GP88 正常生物学活性的能力, 所述 GP88 正常生物学活性包括但不限于 GP88 刺激细胞增殖、增加细胞存活率、阻断细胞凋亡或诱导实验动物和人体内肿瘤生长的能力。通过各种途径给予动物(包括人)有效量抗 GP88 抗体。在可替代的实施方案中, 所述抗 GP88 抗体用作诊断方法, 检测疾病(例如但不限于癌症)中出现的 GP88 表达改变、鉴定生长依赖于 GP88 并且响应 GP88 拮抗疗法的疾病细胞。在又一实施方案中, 所述抗 GP88 抗体用于传递化合物例如细胞毒性因子或反义寡核苷酸到表达或响应 GP88 的细胞。

应当理解, 根据本文的教导, 应用本发明对特定问题或环境的教导将在本领域内一般技术人员的能力范围内。附图插入本说明书并构成本说明书的一部分, 举例说明本发明的实施方案, 并且与发明详述一起解释本发明的原则。本发明产品的例子以及应用它们的方法见后面的实施例。

15

附图简述

图 1 比较 1246、1246-3A 和 PC 细胞系中 GP88 蛋白的表达水平。在补充 2%胎牛血清(FBS)的 DME-F12 培养基中培养细胞。通过免疫沉淀和使用抗 K19T 抗体的蛋白质印迹分析测量 GP88 表达水平。

图 1B 比较 1246、1246-3A 和 PC 细胞系中 GP88 mRNA 的表达水平。使用编码 RPL32 的 mRNA 作为等量 RNA 载量的内部对照。

图 1C 比较无血清培养基和含血清培养基中 GP88 mRNA 在 1246 细胞(左图)和 PC 细胞(右图)中的表达。结果显示: GP88 在 1246 细胞中的表达受到添加胎牛血清的抑制, 而在高度致瘤的 PC 细胞中没有观察到所述抑制。

图 2 展示用浓度增加的抗 GP88 中和抗体治疗高度致瘤的 PC 细胞的效应。

图 3 显示皮下注射 10^6 反义 GP88 转化 PC 细胞(底部)和空载体转化对照 PC 细胞(顶部)的 C3H 小鼠。

图 4 显示 C3H 小鼠肿瘤组织和周围正常组织中 GP88 的体内表达水平。

图 5 显示雌激素受体阳性和雌激素受体阴性人乳腺癌细胞系中 GP88 mRNA 的表达水平。

5 图 6 显示浓度增加的 GP88 对小鼠乳腺上皮细胞系 C57 生长的效应。

图 7 显示用巨细胞病毒启动子控制的含反义取向 GP88 的表达载体转染的 PC 细胞的生长性质和致瘤能力，以及用空载体转染的 PC 细胞的生长性质和致瘤能力。

10 图 8 显示小鼠 GP88 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列。下划线标出用作抗原产生抗 GP88 抗体的肽区 K19T 和 S14R。在括号之间指出 pCMV 哺乳动物表达载体中以反义取向克隆的区。

图 9A 显示人 GP88 cDNA 的核苷酸序列。在括号之间指出以反义取向克隆进 pcDNA3 哺乳动物表达系统的区；和

15 图 9B 显示人 GP88 推导的氨基酸序列。下划线标出用作抗原发展抗人 GP88 中和抗体的 E19V 区。还指出等价于小鼠 S14R 区的 A14R 区。

图 10 显示排列以显示 7 个半重复的小鼠 GP88 的氨基酸序列，所述 7 个半重复定义为颗粒体蛋白 g、f、B、A、C、D 和 e (右侧)。该说明显示：在认为是变异区的两个上皮素/颗粒体蛋白重复之间发现用于产生 GP88 抗体(用于发展抗 GP88 中和抗体)的区 K19T 和 S14R。右侧根据 Bateman 等(6)指出所述重复的颗粒体蛋白分类。根据 Plowman 等, 1992 (5), 颗粒体蛋白 B 和颗粒体蛋白 A 也分别定义为上皮素 2 和上皮素 1。

25 图 11 显示 pCMV4 和一个 GP88 cDNA 克隆的图示，该图示指出用于克隆 GP88 反义 cDNA 进入所述表达载体的限制位点。

图 12 显示 ^{125}I -rGP88 与 CCL-64 细胞表面 GP88 细胞表面受体的交联。使用双琥珀酰亚胺辛二酸(DSS)进行所述交联反应。在 7%聚

丙烯酰胺凝胶上通过 SDS-PAGE 分析反应产物。

图 13 显示 ^{125}I -rGP88 与 3T3 成纤维细胞、PC 细胞和 C57MG 哺乳动物表皮细胞表面 GP88 细胞表面受体的交联。结果显示：这些各种细胞系显示与 CCL64 细胞表面 GP88 细胞表面受体(图 12)有相似分子量的所述受体。

图 14 显示在非致瘤力 MCF 10A 和恶性(MCF 7、MDA-MB-468)人乳腺上皮细胞内的 GP88 表达水平。

图 15 显示 GP88 表达在人乳腺癌雌激素受体阴性 MDA-MB-468 细胞中受到反义 GP88 cDNA 转染的抑制。

图 16 显示 PCDGF 对 MCF-7 细胞增殖的效应。图 16(A)图解 PCDGF 在缺乏 17β -雌二醇(E2)的情况下刺激 MCF-7 细胞的 DNA 合成。图 16(B)图解抗 PCDGF 抗体特异性抑制所述 E2 的促有丝分裂效应。结果表示为三个平行测定的平均值 \pm SD。

图 17 显示抑制 PCDGF 表达对 E2 的促有丝分裂效应的影响。图 17(A)图解通过用反义 PCDGF cDNA 转染进 MCF-7 细胞，抑制 PCDGF 表达。图 17(B)图解抑制 MCF-7 细胞中 PCDGF 表达抑制所述 E2 的促有丝分裂活性。

图 18 显示 PCDGF 在 MCF-7 细胞中的过量表达导致能够在不存在 E2 的情况下增殖并且抗他莫昔芬的细胞。图 18(A)显示 PCDGF 在 O4 细胞和对照 MCF-7C 细胞中的表达。图 18(B)显示 O4 细胞和对照 MCF-7 细胞在雌激素耗尽 PFMEM 培养基中的增殖。图 18(C)显示 MCF-7 细胞和 O4 细胞对他莫昔芬反应的比较。结果表示为平均值 \pm SD。

图 19 显示测定 MCF-7 细胞中的 PCDGF 信号途径。图 19(A)图解 MAP 激酶抑制物对 PCDGF 促有丝分裂效应的影响。图 19(B)图解 PCDGF 激活 MAP 激酶。

图 20 显示 PCDGF 对 MCF-7 细胞中细胞周期蛋白 D1 和 c-myc 表达的效应。图 20(A)显示通过 PCDGF 刺激细胞周期蛋白 D1 表达。

图 20(B)显示 E2 和 PCDGF 对 c-myc 表达的效应。

图 21 显示用抗 GP88 抗体通过免疫组织化学(IHC)对包埋在石蜡中的乳腺癌活组织检查的 GP88 染色强度。

5 图 22 显示侵袭性腺管癌(IDC)肿瘤中雌激素受体状态与 GP88 染色强度的相关性。

图 23 显示 ER+IDC 肿瘤对他莫昔芬的响应性与 GP88 染色强度之间的相关性。当 GP88 染色强度增加时, 雌激素受体阳性肿瘤变得对抗雌激素治疗有抗性。

10

发明详述

下面将详细描述本发明目前优选的实施方案, 所述实施方案将与后面的实施例一起解释本发明的原理。

GP88 的生物学活性

15

本发明涉及用于治疗 and 诊断与 GP88 表达改变(增加)有关的疾病的 GP88 及抗肿瘤和抗病毒组合物。或者本发明用于治疗 and 诊断与对 GP88 响应性增加有关的疾病。本发明的发明人使用由三种细胞系构成的小鼠模型系统, 已经显示过量表达 GP88 的细胞形成肿瘤。亲本细胞系 1246 是一种 C3H 小鼠脂肪生成细胞系, 在胰岛素严格调控下, 20 在确定成分培养基中增殖和分化成为脂肪细胞。所述 1246 细胞不能在同系动物(C3H 小鼠)中形成肿瘤, 甚至当以高细胞浓度注射时也是如此。从不含胰岛素的培养基中维持的 1246 细胞分离一种依赖于胰岛素的细胞系 1246-3A。当对同系小鼠皮下注射 10^6 个所述 1246-3A 细胞时, 所述细胞失去分化和形成肿瘤的能力。通过体外-体内穿梭技术从 1246-3A 细胞发展出一种高度致瘤力的细胞系 PC。当对同系 25 小鼠注射 10^4 个所述 PC 细胞时, 所述细胞形成肿瘤。

相对于亲本非致瘤力的依赖于胰岛素的细胞系, 依赖于胰岛素的致瘤性细胞系过量表达 GP88。此外, GP88 过量表达的程度确实

与这些细胞的致瘤力程度相关，这第一次证明 GP88 在肿瘤发生中是重要的(图 1)。参考图 1，由于 GP88 由细胞合成但不分泌入培养基中，因此测定细胞裂解物和培养基(CM)中的 GP88 水平。所有细胞都在补充 2%胎牛血清的 DME/F12 营养培养基中培养。当细胞达到汇合后，收集细胞培养基(CM)，并通过在含去污剂的缓冲液中温育然后 10,000 x g 离心，制备细胞裂解物。根据细胞数量归一化处理细胞裂解物和条件培养基。如下所述，通过使用抗 GP88 抗体的蛋白质印迹分析来自细胞裂解物和条件培养基的样品。

中和抗体的发展证实 GP88 在肿瘤发生中的关键作用。当在培养基中加入针对小鼠 GP88 的 K19T 区的抗 GP88 抗体时，以依赖于剂量的方式抑制高度致瘤力的 PC 细胞的生长(图 2)。参考图 2，在 96 孔板中以 2×10^4 细胞/孔的浓度在补充人纤连蛋白(2 $\mu\text{g/ml}$)和人运铁蛋白(10 $\mu\text{g/ml}$)的 DME/F12 培养基中培养 PC 细胞。细胞贴壁后，在各孔中加入浓度增加的抗 GP88 IgG 组分。用相当浓度的非免疫性 IgG 处理对照细胞。两天后，每孔加入 0.25 mCi ^3H -胸苷处理 6 小时。然后收获细胞，计数掺入 DNA 的 ^3H -胸苷，作为细胞增殖的量度。

然而，当 PC 细胞内 GP88 的表达受到反义 GP88 cDNA 的特异性抑制时，GP88 的生产减少，并且这些 PC 细胞再也不能在同系 C3H 小鼠中形成肿瘤。此外，这些 PC 细胞重新获得对胰岛素的响应性。参考图 3 和表 1 及表 2，对 C3H 雌性小鼠皮下注射 10^6 个反义 GP88 转染的 PC 细胞(如下文解释)或 10^6 个空载体转染的 PC 细胞。每日监测小鼠体内的肿瘤出现。注射所述细胞 45 天后拍照。结果显示：与用作对照的注射空载体转染的 PC 细胞的小鼠不同，注射反义 GP88 PC 细胞的小鼠不发展肿瘤。

25

表 1. 比较 GP88 反义转染细胞、对照转染细胞和 PC 细胞的致瘤力质

注射的细胞	检测到肿瘤的平均天数	患有肿瘤的小鼠的数目	平均肿瘤重量 (g)
PC	15±3.0	5/5	9.0±3.2
P14	15±3.7	5/5	7.8±2.7
ASGP88	---	0/5	---

PC: 对照, 未转染的细胞

5 P-14: 空载体对照转染的 PC 细胞

ASGP88: 用含 GP88 反义 cDNA 的表达载体转染的 PC 细胞在第 45 天切除和称重肿瘤。---显示没有肿瘤形成。

表 2. 比较 1246、PC 细胞和 GP88 反义细胞的性质

1246 细胞	PC 细胞	反义 GP88 细胞
生长和分化响应胰岛素	生长分化不依赖于胰岛素的缺陷型 自分泌产生胰岛素相关因子	恢复生长(分化?)对胰岛素的响应
细胞表面胰岛素受体表达高	细胞表面胰岛素受体表达非常低	细胞表面胰岛素受体表达提高
GP88 表达低	GP88 表达组成型地高	GP88 表达受到反义抑制
GP88 表达受到血清抑制	不受到血清抑制	
GP88 表达受到胰岛素调节	组成型 GP88 表达	恢复胰岛素对内源 GP88 表达的调节
非致瘤力	高度致瘤力	非致瘤力

GP88 表达的比较指出：肿瘤中的体内 GP88 水平比正常组织显著更高(图 4)。为 C3H 小鼠注射 10^6 个 PC 细胞。无痛性处死携带肿瘤的小鼠。收集肿瘤、脂垫和结缔组织。如上文针对图 1 所述，通过在含去污剂的缓冲液中温育，制备细胞裂解物。测定组织提取物的蛋白浓度，通过 SDS-PAGE 和随后使用抗 GP88 抗体的蛋白质印迹分析等量的每种样品蛋白，测定组织提取物中 GP88 的含量。结果显示：肿瘤提取物中 GP88 的水平是周围结缔组织和脂肪组织中 GP88 水平的至少 10 倍。

在正常细胞(1246 细胞、成纤维细胞)中，GP88 的表达受到调节，尤其是胰岛素的调节，受到胎牛血清的抑制。在致瘤性细胞中，丧失对正常生长的调节导致 GP88 表达增加和获得生长对 GP88 的依赖性。因此，抑制 GP88 表达和/或作用是抑制肿瘤发生的有效方法。在活组织检查中检测 GP88 表达提高，提供对于响应 GP88 抑制疗法的肿瘤的诊断分析。

GP88 也是人类癌症中的肿瘤诱导因子。如 1246-3A 细胞系中所见，在几种人类癌症(包括但不限于乳腺癌)中已经很好地记录(13, 14)丧失对胰岛素(或对 IGF-I)的响应性以及恶性度同时增加。具体地说，乳腺癌伴随着获得胰岛素/IGF-I 自分泌环，这也是发展本文讨论的小鼠模型中发展致瘤力质的开始点。此外，GP88 表达在人乳腺癌中提高。参考图 5，更具体地说，人 GP88 在雌激素受体阳性以及雌激素受体阴性不依赖于胰岛素/IGF-I 的高度恶性细胞中高度表达。此外，GP88 是乳腺上皮细胞的有效生长因子(图 6)。通过在补充 10%胎牛血清(FBS)的 DME/F12 培养基中培养 MCF7、MDA-MB-453 和 MDA-MB-468 细胞，获得图 5 中的数据。通过 RNAzol 方法和所制备的 poly-A⁺ RNA，从每种细胞系提取 RNA。使用 ³²P 标记的 GP88 cDNA 探针，对每种细胞系用 3 μg poly-A⁺ RNA 通过 RNA 印迹分析检查 GP88 mRNA 表达。

为 RNA 印迹分析啮齿动物细胞或组织(小鼠和大鼠)中的 GP88

mRNA 表达, 我们使用从核苷酸 551 开始到 862 (对应于氨基酸序列 160 到 270) 长度 311 bp 的小鼠 GP88 mRNA 探针。可以通过本领域内技术人员众所周知的多种方法(Sambrook, Molecular Biology manual: 35)提取 RNA。优选方法是使用 RNazol (Cinnabiotech) 或 Trizol (Gibco-BRL) 溶液提取 RNA, 所述方法包括通过异硫氰酸胍和苯酚-氯仿的单步提取。

为 RNA 印迹分析人细胞系中的 GP88 mRNA 表达, 发展对应于人 GP88 核苷酸 1002 到 1674 (对应于氨基酸序列 334-558) 的 672 bp 人 GP88 cDNA 探针。见实施例 8 中关于在优选实施方案中使用的 RNA 印迹分析方法的详细具体描述。

参考图 6, 在浓度增加的从 PC 细胞条件培养基纯化的 GP88(底图)和在昆虫细胞中表达的重组 GP88 (顶图)存在下, 培养 C57MG 细胞, 证明浓度增加的 GP88 对小鼠乳腺上皮细胞系 C57MG 生长的生长刺激效应。

针对成胶质细胞瘤、畸胎瘤和乳腺癌已经很好建立 IGF-I 自分泌产生与恶性性增加之间的相关性。在这些癌症中, 当与非致瘤力人成纤维细胞和其它人类细胞系比较时, 人类肿瘤中 GP88 表达提高。GP88 促进乳腺癌细胞的生长。

20 抗 GP88 抗体

本发明提供治疗和诊断与 GP88 表达增加有关的疾病的组合物。也将适用于治疗和诊断与对 GP88 响应性增加有关的疾病。本发明的组合物包括中和 GP88 生物学活性的抗 GP88 抗体。

本发明还涉及特异性针对 GP88 表位的抗体以及应用所述抗体检测 GP88 分子的存在或测量 GP88 分子的数量或浓度、其功能衍生物或动物物种的细胞中、细胞或组织提取物中、培养基或生物体液中的同源物。此外, 可以使用抗体将细胞毒性分子靶向特定位点。

为获得用于发展抗体的抗原, 获得天然产生或以重组形式表达

的 GP88 蛋白或其功能衍生物(优选具有至少 9 个氨基酸), 用于免疫动物, 产生多克隆抗体或单克隆抗体。假如一种抗体能够与一种分子反应, 由此使所述分子与抗体结合, 那么就说明所述抗体能够结合所述分子。特异性反应是指所述抗原能够以高度选择性的方式与其对应抗体反应, 并且不与多数其它抗原刺激产生的抗体反应。

本文中术语抗体包括但不限于人类和非人类多克隆抗体、人类和非人类单克隆抗体(mAb)、嵌合抗体、抗特应抗体(抗 IdAb)和人源化抗体。多克隆抗体是或者来自用抗原免疫的动物的血清、或者来自鸡蛋的异源抗体分子群体。单克隆抗体(“mAb”)是针对特定抗原的基本同源的抗体群体。可以通过本领域内技术人员已知的方法(如美国专利第 4,376,110 号)获得 mAb。所述抗体可以是包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 在内的任何免疫型和其任何亚型。生产针对 GP88 的人类或非人类抗体的杂交瘤可以在体外或体内培养。为生产大量 mAb, 体内是目前优选的生产方法。简要地说, 将来自各个杂交瘤的细胞腹膜内注射入姥鲛烷引发的 Balb/c 小鼠或 Nude 小鼠, 生产包含高浓度所需 mAb 的腹水液。可以使用本领域内技术人员众所周知的标准层析方法, 从所述腹水液或从培养物上纯化 mAb。

可以通过免疫表达人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠, 制备针对人 GP88 的人类单克隆 Ab。使用来自这些转基因动物的淋巴细胞产生的杂交瘤生产人类免疫球蛋白而不是小鼠免疫球蛋白。

由于大多数单克隆抗体来自小鼠来源和其它非人类来源, 因此它们的临床效率可能因为下面原因而有限: 给予人体的啮齿动物 mAb 的免疫原性、效应物功能的弱募集以及从血清的快速清除。为克服这些问题, 可以将小鼠抗体的抗原结合特性通过称为人源化的方法赋予人类抗体。人源化抗体包含来自亲本小鼠 mAb 的 6 个互补决定区(CDR)的氨基酸序列, 所述氨基酸序列被移植到人类抗体构架上。已经证明人源化抗体中低含量的非人类序列(约 5%)有效降低免疫原性和延长人体内血清半衰期。方法例如应用单价噬菌体展示和组合

文库策略于人源化单克隆抗体目前广泛应用于多种抗体的人源化并且为本领域内技术人员众所周知。这些人源化抗体和使用上文所述转基因动物发展的人类抗体对包括但不限于癌症的几种疾病有极大的治疗应用。

5 通过本领域内众所周知的多种免疫测定，根据特异性针对 GP88 的抗体的存在筛选杂交瘤上清液和血清，所述免疫测定包括斑点印迹和标准免疫测定(EIA 或 ELISA)。一旦已经鉴定含有目的抗体的上清液，可以进一步通过蛋白质印迹筛选，鉴定所述抗体结合的抗原的大小。本领域内技术人员知道如何不必经过不必要的实验就制备和筛选所述杂交瘤，以获得所需多克隆抗体或单克隆抗体。

10 嵌合抗体具有来自不同动物物种的不同部分。例如，嵌合抗体可能具有来自小鼠 mAb 的可变区和人类免疫球蛋白恒定区。嵌合抗体和生产它们的方法也是本领域内技术人员已知的。

15 抗独特型抗体(“抗 IdAb”)是一种抗体，识别一般与抗体的抗原结合位点有关的独特决定簇。如下制备抗 IdAb: 用要制备的抗 IdAb 所针对的 mAb 免疫与所述 mAb 的来源相同物种和基因型的动物(如小鼠品系)。接受免疫的动物通过生产抗这些独特型决定簇的抗体(抗 IdAb)，识别和响应所述免疫抗体的独特型决定簇。也可以使用所述抗 IdAb 作为免疫原，在另一种动物中产生免疫反应，产生所谓抗抗 IdAb。所述抗抗 IdAb 可能在表位上与诱导所述抗 IdAb 的原始 mAb 相同。因此，通过使用针对 mAb 独特型决定簇的抗体，有可能鉴定表达具有相同特异性的抗体的其它克隆。

20 因此，可以使用针对 GP88 产生的 mAb 在合适动物体内诱导人类和非人类抗 IdAb。使用来自所述免疫小鼠的脾细胞生产分泌人类或非人类抗 Id mAb 的杂交瘤。此外，可以将所述抗 Id mAb 偶联到载体例如匙孔蠔血蓝蛋白(KLH)或牛血清白蛋白(BSA)，用于免疫其它小鼠。来自这些小鼠的血清可以包含与特异性针对 GP88 多肽表位的原始 mAb 有结合性质的人类或非人类抗抗 IdAb。因此，所述抗 Id

mAb 具有自身独特型表位或与需要评价的表位在结构上相似的独特型。

术语抗体也包括完整分子和其片段，例如能够结合抗原的 Fab 和 F(ab')₂。Fab 和 F(ab')₂ 片段缺乏完整抗体的 Fc 片段，从循环中更快清除，并且可能比完整抗体具有更少的非特异性组织结合。通常使用酶例如木瓜蛋白酶(产生 Fab 片段)和胃蛋白酶(产生 F(ab')₂ 片段)，通过蛋白水解切割产生所述片段。应当知道的是，根据本文针对完整抗体分子公开的方法，可以使用本发明所用抗体的 Fab 和 F(ab')₂ 以及其它片段检测或定量 GP88，以及治疗与 GP88 表达有关的病理状态。

根据本发明，可以使用在体外中和 GP88 活性的抗体在体内中和 GP88 活性，治疗与 GP88 表达增加或者对 GP88 响应性增加有关的疾病，所述疾病例如但不限于癌症和病毒感染。使用针对 GP88 的抗体治疗患有与 GP88 表达增加有关的疾病的患者，优选人类患者。所述治疗可以与其它抗肿瘤或抗病毒疗法一起进行。典型的治疗方案包括在一周或几周、包括一个月到六个月之间的时间内给予有效量特异性针对 GP88 的抗体。可以通过任何获得其既定目的的方法给予本发明的抗体。例如，可以通过包括但不限于皮下、静脉内、皮内、肌肉内、腹膜内和口服在内的各种途径进行给药。可以通过弹丸式注射(bolus injection)或一定时间内逐渐灌注进行胃肠外给药。用于胃肠外给药的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳浊液，所述制剂中可以包含本领域内已知的辅助剂或赋形剂。也可以根据常规方法制备药用组合物例如片剂和胶囊剂。应该知道，所需剂量将依赖于接受者的年龄、性别和体重、同时进行的治疗的种类(如果有的话)、治疗频率以及所需效应的性质。下文提供的有效剂量范围并不是限制本发明，仅代表优选剂量范围。然而，正如本领域内技术人员理解的，应该根据各个患者定制最优选的剂量，并且本领域内技术人员能够根据各个患者定制最优选剂量。可以通过多剂或单剂给

予每次治疗所需的总剂量。抗体的有效量从约 0.01 μg 到约 100 mg/kg 体重，优选从约 10 μg 到约 50 mg/kg。可以单独给予抗体，或者与针对同一疾病的其它治疗药物一起给予所述抗体。

5 根据本发明并且考虑所述中和抗体，GP88 中和抗体可以用于有
必要抑制 GP88 生物学活性、即使不一定有 GP88 表达改变的所有治
疗情况，包括其中 GP88 细胞表面受体过量表达并进而导致生物学活
性提高的情况，或者其中 GP88 信号途径或受体改变、导致所述信号
途径总是“打开”的情况。针对生长因子和针对生长因子受体的中
10 和抗体已经成功地用于抑制其增殖依赖于该生长因子的细胞的生
长。人乳腺癌细胞中 IGF-I 受体和肺癌中铃蟾肽就如此。也可以使用
针对 GP88 的抗体传递化合物例如但不限于细胞毒性剂例如毒素、癌
毒素(oncotxin)、有丝分裂毒素(mitotoxin)和免疫毒素或其它反义寡
核苷酸，以将它们特异性靶向表达 GP88 或响应 GP88 的细胞(30)。

15 允许抗原发展针对 GP88 的中和抗体的一个区是小鼠 GP88 中定
义为 K19T 的 19 个氨基酸的区，以及人 GP88 中的 E19V，所述 E19V
不在上皮素/颗粒体蛋白 6 kDa 重复之中，而是在这些重复之间，具
体地说是在被认为是变异区的颗粒体蛋白 A (上皮素 1)和颗粒体蛋白
C (5)之间(见图 10)。尽管不希望被理论所限制，但是还是认为该区
对于所述上皮素重复之外的 GP88 生物学活性是重要的。

20 在本发明中使用的抗体或抗体片段也可以用于定量或定性检测
表达 GP88 蛋白的细胞的存在。这可以通过免疫荧光技术完成，所述
免疫荧光技术使用荧光标记的抗体(见下文)，并进行荧光显微显微镜
检查测、流式细胞术检测或荧光计检测。可以通过本领域内众所周
知的免疫测定方法检测本发明抗体和多肽的反应。

25 本发明的抗体可以在光学显微镜术、免疫荧光或免疫电子显微
镜术中进行组织学应用，以原位检测组织样品或活组织检查中的 GP88
蛋白。可以如下完成原位检测：从患者取组织标本，然后应用合适
标记的本发明的抗体。优选将所述标记抗体(或片段)应用或覆盖于所

述生物样品，从而提供所述抗体(或片段)。通过使用这种程序，有可能不仅确定 GP88 蛋白的存在，而且确定其在所检查组织中的分布。使用本发明，本领域内技术人员将容易地理解，可以修改许多种组织学方法(例如染色程序)以实现所述原位检测。

- 5 针对 GP88 的测定通常包括在能够鉴定 GP88 蛋白的可检测标记抗体存在下，温育生物样品例如生物体液、组织提取物、新鲜收获或培养的细胞或它们的培养基，通过多种本领域内众所周知的技术检测抗体。

10 可以用固相支持物或载体例如硝酸纤维素或其它能够固定化细胞或细胞颗粒或可溶蛋白的固相支持物处理所述生物样品。洗涤所述支持物，然后用可检测标记的抗 GP88 抗体处理。然后洗涤所述支持物，除去未结合的抗体。随后通过常规方法检测所述支持物上结合标记的量。固相支持物指能够结合抗原或抗体的任何支持物，例如但不限于玻璃、聚苯乙烯聚丙烯、尼龙、改性纤维素或聚丙烯酰胺。

15 可以根据众所周知的方法确定给定批号抗体对 GP88 蛋白的结合活性。本领域内技术人员将能够通过使用常规实验，确定每种测定的操作测定条件和最佳测定条件。

20 可以通过本领域内众所周知的多种免疫测定例如酶联免疫测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)检测 GP88 蛋白或其功能衍生物以及检测针对所述蛋白的特异性抗体。所述测定是本领域内众所周知的，并且本领域内技术人员能够容易地知道如何使用本发明的抗 GP88 抗体和 GP88 蛋白进行所述测定。

25 所述免疫测定用于检测和定量在血清或其它生物体液以及组织、细胞、细胞提取物或活组织中的 GP88 蛋白。在优选实施方案中，测量组织标本中 GP88 的浓度，作为诊断与 GP88 表达增加有关的癌症或其它疾病的方法。

 据说某些类型癌症的存在以及恶性程度与 GP88 蛋白的水平增加

“成比例”。本文所用术语“成比例”不是限制于蛋白水平与所述癌症的恶性性质之间的线性或恒定关系。本文所用术语“成比例”指在本领域内技术人员能够容易测定的 GP88 蛋白浓度范围内,与 GP 蛋白表达增加有关的癌症或其它疾病恶性性质的出现、重现或展示与 GP88 蛋白的水平增加相关。

本发明的另一个实施方案涉及通过评价抗癌或抗病毒药物抑制 GP88 表达或产生的能力,评价所述药物的功效。本发明的抗体用于评价抗癌或抗病毒药物的方法,因为可以在其中一种上述免疫测定中使用它们测定 GP88 蛋白的量。或者,如本文所述通过生物测定(细胞增殖测定)测量所产生的 GP88 蛋白的量。可以组合使用生物测定和免疫测定,进行更精确的评价。

另一个实施方案涉及用于诊断与 GP88 表达增加有关的癌症或疾病的测定,所述测定基于测量组织或生物体液中存在的编码 GP88 或其功能衍生物的 mRNA 序列的量,优选使用 RNA-DNA 杂交测定。某些癌症的存在和恶性程度与所述 mRNA 存在的量成比例。对于所述测定,mRNA 的来源是活组织检查和周围组织。测量 mRNA 的量的优选技术是使用具有互补碱基序列的 DNA 的杂交测定。

另一个相关实施方案涉及用于诊断与 GP88 响应性增加有关的癌症或疾病的测定,所述测定基于对组织活检检测用抗 GP88 中和抗体的治疗是否会抑制其生长或其它生物学活性。

另一个相关实施方案是测量抗癌或抗病毒药物疗效的方法,所述方法包括测量所述药物对于抑制编码 GP88 的 mRNA 表达的效应的步骤。相似地,可以使用所述方法通过测量所述药物抑制 GP88 mRNA 产生的能力,鉴定或评价 GP88 拮抗剂的功效。

核酸检测测定尤其是杂交测定可以基于所述核酸分子的任何特征,例如其大小、序列或对限制性内切酶消化的敏感性。通过改变报告检测或传递检测信号给观察者的方式,可以增加所述测定的灵敏度。已经大量发展多种标记并为本领域内技术人员所使用,包括

酶促标记、放射性同位素标记、荧光标记、化学标记和修饰碱基。

克服核酸对检测的灵敏度限制的一种方法是在进行测定前选择性扩增所述核酸。该方法被称为“聚合酶链反应”或 PCR (美国专利第 4,683,202 号和第 4,582,788 号)。所述 PCR 反应提供选择性增加特定核酸序列浓度的方法，甚至当所述序列以前未被纯化并且仅在特定样品中以单拷贝存在时也是如此。

GP88 反义成分

本发明还提供 GP88 反义成分。已经显示：在细胞内组成型表达反义 RNA 抑制超过 20 种基因的表达，并且这份名单还在继续增长。反义效应的可能机制是阻断翻译或阻止剪接，这两种机制都已经在体外观察到。干涉剪接允许应用较不保守的内含子序列，因此导致更高的特异性，抑制一种物种基因产物的表达而不抑制该基因产物在另一物种中的同源物。

术语反义成分对应于 RNA 序列以及编码所述 RNA 序列的 DNA 序列，所述 RNA 序列与其所特异性针对的特定 mRNA 分子足够互补，引起所述反义 RNA 和所述 mRNA 之间的分子杂交，以便抑制所述 mRNA 的翻译。所述杂交可以在体内条件下发生。所述反义 RNA 的作用导致细胞中基因表达的特异性抑制。

根据本发明，用与 GP88 cDNA 反义的 DNA 转染致瘤性细胞抑制内源 GP88 表达，并且抑制所述反义 cDNA 转染的细胞的致瘤力。该反义 DNA 长约 18-30 个核苷酸，必须与所述 GP88 基因有足够互补性，以便所述反义 RNA 能够与所述 GP88 基因(或 mRNA)杂交，抑制 GP88 基因表达，而不论所述作用是在剪接、转录或翻译水平。根据本文的教导而不需过度实验，本领域内技术人员能够容易地鉴别抑制程度，并且优选抑制程度足以抑制其增殖依赖于 GP88 表达的细胞的生长。本领域内技术人员将认识到，反义 RNA 方法仅是可以用于阻断特异性基因表达的多种已知机制。

本发明的反义成分也能够与靶 GP88 cDNA 几个部分中的任一个杂交，或者能够与 GP88 mRNA 杂交，所述靶 GP88 cDNA 的部分包括编码序列、3'或 5'非翻译区或其它内含子序列。本领域内技术人员所容易看出的，本发明所需的最小量同源性是这样的同源性：所述同源性足以导致与 GP88 DNA 或 mRNA 的杂交，抑制所述 DNA 的转录或所述 mRNA 的翻译或功能，优选不影响其它 mRNA 分子的功能和其它不相关基因的表达。

经由载体，通过转化或转染将反义 RNA 传递到细胞，所述载体包括逆转录载体和质粒，其中有编码所述反义 RNA 的 DNA 以及合适的调节序列，所述调节序列包括导致所述反义 RNA 在宿主细胞中的表达的启动子。已经稳定转染以反义取向包含 GP88 cDNA 片段的各种反义表达载体。技术人员可以使用逆转录载体传递反义成分到细胞。也可以通过脂质体完成传递。

为在体内疗法中应用反义技术的目的，目前优选的方法是使用反义寡核苷酸，而不是进行构建入表达载体的反义 cDNA 片段的稳定转染。优选长度为 15-30 碱基大小并且具有可以与靶 GP88 cDNA 几个区中的任一个或者与 GP88 mRNA 杂交的序列的反义寡核苷酸，所述靶 GP88 cDNA 的区包括编码序列、3'或 5'非翻译区或其它内含子序列。最好选择编码针对 GP88 的反义寡核苷酸的序列作为具有最有效反义效应的序列。控制反义寡核苷酸序列靶位点的因素与所述寡核苷酸的长度、结合亲和性以及靶序列的可接近性有关。通过测量对 GP88 蛋白翻译和 GP88 相关表型的抑制(如抑制培养物细胞的细胞增殖)，根据它们反义活性的效价在体外筛选序列。一般地说，已知可以使用反义寡核苷酸靶向所述 RNA 的大多数区(5'和 3'非翻译区、AUG 起始区、编码区、剪接点和内含子)。

优选的 GP88 反义寡核苷酸是具有下列性质的寡核苷酸：稳定、对核酸酶(能够有力降解寡核苷酸的酶)有高复原性、具有合适药物代谢动力学以允许它们在无毒剂量下到达疾病组织、并且具有跨越膜

的能力。

可以使用硫代磷酸反义寡核苷酸。对磷酸二酯键以及杂环或糖的修饰增加效力。至于对磷酸二酯键的修饰，可以使用硫代磷酸。已经描述 N3'-P5'氨基磷酸酯键，该键使寡核苷酸对核酸酶稳定并增加与 RNA 的结合。肽核酸(PNA)键是核糖和磷酸二酯骨架的完全替代物，对核酸酶稳定，增加与 RNA 的结合亲和力，并且不被 RNase H 的切割。其碱性结构也能接受修饰，允许其优化成为反义成分。至于对杂环的修饰，已经证明某些异环修饰增加反义效应，同时不干扰 RNase H 活性。所述修饰的例子是 C-5 噻唑修饰。最后，也可以考虑对糖的修饰。2'-O-丙基和 2'-甲氧乙氧基核糖修饰使寡核苷酸在细胞培养物和体内对核酸酶稳定。使用上述类型靶向 c-raf-1 的寡核苷酸的细胞培养物和体内肿瘤实验导致增强的效价。

传递途径将是根据上文标准测量，提供最佳反义效应的传递途径。使用反义寡核苷酸的体外细胞培养测定和体内肿瘤生长测定已经显示：阳离子脂质体、逆转录载体和直接传递介导的传递是有效的。另一种可能的传递模式是使用针对肿瘤细胞表面标记的抗体进行导向。针对 GP88 或其受体的抗体可以用于该目的。

重组 GP88

本发明也涉及用于表达重组 GP88 多肽或其功能衍生物的 DNA 表达系统，所述 DNA 表达系统基本不含其它哺乳动物 DNA 序列。所述 DNA 可以是双链或单链的。所述 DNA 序列应当最好具有约 20 个或更多核苷酸，以允许与另一种多核苷酸的杂交。为获得更高的杂交特异性，优选至少 50 个核苷酸的长度，所述更高杂交特异性的特征在于不存在与除编码所述 GP88 蛋白或其同源物或功能衍生物的序列以外序列的杂交。

本发明还涉及上文的 DNA 分子、可表达媒介物或载体以及用所述媒介物转染或转化并且能够表达所述多肽的宿主。所述宿主可以

是原核细胞(最好是细菌)或真核细胞(最好是酵母或哺乳动物细胞)。优选载体系统包括在昆虫细胞中表达的杆状病毒。所述 DNA 可以通过转化、转导、转染、感染或本领域内已知的相关方法导入宿主生物。除编码所述 GP88 多肽的 DNA 和 mRNA 外, 本发明还提供用于
5 表达所述核酸序列的方法。此外, 所述遗传序列和寡核苷酸允许鉴定和克隆具有与本文所述多肽 GP88 有同源性的序列的其它多肽。

表达载体是能够表达已经克隆入所述载体的 DNA (或 cDNA)分子并因此产生多肽或蛋白的载体(由于合适转录和/或翻译控制序列的存在)。当将所述表达载体引入合适宿主细胞时, 发生所克隆序列的
10 表达。假如使用一种原核生物表达载体, 那么合适的宿主细胞将是任何能够表达所述克隆序列的原核细胞。相似地, 假如使用真核表达系统, 那么合适的宿主细胞将是任何能够表达所述克隆序列的真核细胞。例如, 可以使用杆状病毒载体克隆 GP88 cDNA 并随后在昆
15 虫细胞中表达所述 cDNA。

可以根据常规技术, 将编码 GP88 多肽或其功能衍生物的 DNA 序列与载体 DNA 重组, 所述常规技术包括平端化或用于连接的交错化末端、限制酶消化以提供合适末端、根据需要填平粘端、碱性磷酸酶处理以避免不希望
20 的连接以及用合适连接酶进行连接。在(35)中讨论用于所述操作的技术。

假如一种核酸分子包含含有转录和翻译调节信息的核苷酸序列并且所述序列与编码所述多肽的核苷酸序列有效连接, 那么这种核酸分子就能够表达所述多肽。有效连接是这样的连接: 其中调节 DNA 序列与要表达的 DNA 序列以允许基因表达的方式连接。基因表达所需调节区的明确性质可能在生物之间各不相同, 但一般应当包括一个启动子区, 在原核细胞中所述启动子区包含启动子(指导 RNA 转录的开始)以及当转录成 RNA 时将引发蛋白合成起始的 DNA 序列。所述区一般包含那些涉及转录、翻译起始的 5'非编码序列, 例如 TATA
25

盒、加帽序列、CAAT 序列等。

如果需要，可以通过所需方法(筛选合适 cDNA 文库或 PCR 扩增)获得编码所述蛋白的基因序列的 3'非编码区。可以为转录终止调节序列例如终止和聚腺苷酸化的存在而保留该区。因此，通过保留
5 与编码所述蛋白的 DNA 序列天然相邻的 3'区，可以提供所述转录终止信号。当不提供所述转录终止信号或者所述转录终止信号在表达宿主细胞中不能满意地起作用，那么可以用来自另一基因的 3'区取代。

两个 DNA 序列例如启动子区序列和 GP88 编码序列在下面情况下有效连接：假如序列间连接的性质并不导致引入移框突变或干扰
10 所述启动子序列指导所述多肽基因序列的转录。

所述启动子序列可以是原核的、真核的或病毒的。合适的启动子是诱导型、阻抑型或组成型。合适原核启动子的例子见综述文献。

真核启动子包括但不限于小鼠金属硫蛋白 I 基因启动子、疱疹病毒的 TK 启动子、gla4 基因启动子、SV40 早期启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子和巨细胞病毒(CMV)启动子。优选强启动子。
15 所述启动子的例子是那些识别 T3、SP6 和 T7 聚合酶的启动子、噬菌体λ的 PL 启动子、recA 启动子、小鼠金属硫蛋白 I 基因的启动子、SV40 启动子和 CMV 启动子。

20

诊断方法

本发明还提供用于确定致瘤力的 GP88 诊断方法以及用于确定患者是否抵抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的诊断方法。如上文所述，
25 GP88 水平升高指示致瘤力增加。此外，本发明出人意料地发现 GP88 水平升高指示对抗雌激素的抗肿瘤效应的抗性。

抗雌激素疗法干扰或抑制雌激素的功能或合成。例如，他莫昔芬干扰雌激素结合其受体。芳香酶抑制剂如阿那曲唑干扰催化雄激素转化成为雌激素的酶，由此降低雌激素水平。

尽管不希望受到理论的限制，但是我们仍然相信 GP88 水平增加促进细胞从生长依赖于雌激素转变为生长不依赖于雌激素。不依赖于雌激素的细胞对雌激素存在与否不敏感，因此不受抗雌激素疗法的影响。以前，用雌激素受体的存在作为抗雌激素疗法抗性必需的预测标志。然而，当 GP88 水平增加并且细胞获得不依赖于雌激素的生长时，雌激素存在与否不再足以指示所述患者是否响应抗雌激素疗法。GP88 水平以及伴随的和理论上的雌激素不依赖性(而不是雌激素受体的存在)作为确定患者是否将抵抗或响应抗雌激素疗法的增强的和更准确、更早期和可靠的预测标记。如上文解释的，考虑到众所周知抗雌激素如他莫昔芬有在患者体内引起卵巢癌的趋势，尤其是那些直到本发明出现前仍不知不觉地抵抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的患者，该新型预测标记尤其有价值。

本发明的优选实施方案涉及确定患者是否抵抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的方法。检测从患者获得的生物样品中的 GP88 蛋白或编码 GP88 的多核苷酸，然后确定所述样品中 GP88 阳性细胞的数目以及 GP88 阳性细胞与总细胞数的比例。GP88 阳性细胞与总细胞数的比例指示所述患者是否抵抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应。或者，通过检测生物样品中的 GP88，并从根据检测已知 GP88 蛋白或核酸量获得的标准曲线(“标准曲线技术”)外推 GP88 的量，可以确定生物样品中 GP88 的量。对于不容易在离散数量的细胞中检测 GP88 的生物样品，所述标准曲线技术是测量 GP88 量的优选方法。例如，可以使用标准曲线技术确定生物体液(如血清或脑脊髓液)中的 GP88 量。生物样品中的 GP88 量指示所述患者是否抵抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应。

优选的生物样品包括但不限于血液、脑脊髓液、血清、血浆、尿、乳头吸出物、肝、肾、乳腺、骨、骨髓涂片、睾丸、脑、卵巢、皮肤或肺。所述生物样品可以是任何大小、形状或组织类型，并且包括任何细胞数量和/或细胞类型。所述生物样品可以包含非致瘤性

细胞和致瘤性细胞。非致瘤性细胞可以包括但不限于来自正常组织、外周组织、良性小叶癌、上皮细胞增生和任何其它良性病变的基质细胞或上皮细胞。所述生物样品可以包括包含细胞或组织的生物体液。

5 如上文讨论, 可以通过任何合适方法检测 GP88 蛋白, 包括免疫染色(如免疫组织学染色)、蛋白质印迹分析、色谱、微阵列、使用抗 GP88 抗体的细胞分选仪。最好标记所述抗 GP88 抗体(如荧光染料标记、生物素标记、酶标记、放射性同位素标记、荧光标记和化学标记), 用于合适的检测系统。也可以通过多种诊断成像技术, 检测 GP88
10 蛋白或其功能衍生物。术语“诊断成像”指使用标记分子检测成像系统(如磁性共振成像、超声波等)中标记蛋白或核酸诊断疾病疾病的任何技术。可以利用使用放射标记单克隆抗体的抗体成像诊断多种癌症(如结肠癌、前列腺癌、肺癌和卵巢癌)。诊断成像系统的例子包括单克隆抗体成像系统如 OncoScint®单克隆抗体成像系统, 该系统
15 目前用于扫描机体或对机体成像, 以诊断癌症。在常规扫描技术如 MRI 或超声波中可以使用单克隆抗体, 以特异性检测 GP88 并确定生物样品中 GP88 的量或 GP88 阳性细胞的数目。

 可以通过使用抗 GP88 核酸(如 GP88 cDNA 探针)的任何合适检测测定(如原位杂交、荧光原位杂交、逆转录酶-聚合酶链反应、RNA
20 印迹分析、DNA 印迹分析、Southwestern 印迹分析、RNase 保护测定、微阵列), 用反义 GP88 核酸检测 GP88 核酸。最好使用例如酶标记、放射性同位素标记、荧光标记或化学标记来标记所述抗 GP88 核酸。

 可以使用本领域内技术人员已知的任何合适方法(如显微镜检查、MRI、超声波、FACS 分析、发光(luminex)检测、抗体微阵列、
25 数字扫描仪和细胞分选系统)计数 GP88 阳性细胞。例如, 可以通过类似于 Ki-67 指数的方式, 构建 GP88 指数, 确定生物样品中 GP88 阳性细胞的数目。Ki-67 是一种 DNA 聚合酶标记, 指示组织的增殖

率。确定 Ki-67 阳性细胞的数目，表达为每 1000 个计数的细胞中 Ki-67 阳性染色细胞的百分率。最好计数对 GP88 染色阳性的细胞，表达为每 1000 个计数的细胞中 GP88 阳性染色细胞的百分率。然而，可以计数任何数量的细胞。例如，为从患者获得更有代表性的细胞样品，优选计数超过 1000 个细胞。假如所述样品看起来代表不同细胞类型并且分析可利用的样品量有限，那么优选计数少于 1000 个细胞。

对于确定患者是否抵抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的方法，最好如下分级生物样品中 GP88 染色的存在和强度：少于约 5% GP88 阳性细胞被认为是 GP88 阴性；约 10-25% GP88 阳性细胞被认为是 GP88 弱阳性(1+)；约 25-50% GP88 阳性细胞(2+)被认为是 GP88 中等阳性；超过约 50% GP88 阳性细胞被认为是 GP88 强阳性(3+)。根据所述生物样品库的大小和/或用于鉴定 GP88 的检测技术(如免疫染色、原位杂交、荧光原位杂交(FISH)、反向聚合酶链反应、RNA 印迹分析、蛋白质印迹分析、DNA 印迹分析等)，可以重新调整每个级别 GP88 阳性细胞的百分率。例如，当使用更灵敏的 GP88 检测技术或更大的生物样品库时，可以向下调节每个级别的 GP88 阳性或染色细胞百分率。根据本发明的一个优选实施方案，至少约 5%、更优选 10%、最优选 25% 的 GP88 阳性或染色细胞百分率指示对抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的抗性。在另一优选实施方案中，在雌激素受体阳性患者体内至少约 10% GP88 阳性或染色细胞百分率指示对抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的抗性。

本发明还提供诊断致瘤力的方法，所述方法包括从患者获得生物样品，检测所述生物样品中的 GP88 蛋白或编码 GP88 的多核苷酸，确定所述样品中 GP88 阳性或染色细胞的数目以及给定样品中 GP88 阳性或染色细胞与总细胞数相比的比例。GP88 阳性或染色细胞与总细胞数的比例指示致瘤力。检测生物样品中 GP88 最好如上文所述进行，参考确定患者是否抵抗抗雌激素疗法的抗肿瘤效应的方法。

在本发明的一个优选实施方案中，根据本领域内已知的标准强度分级技术，以 GP88 阳性细胞百分率为基础，构建 GP88 染色强度的分级等级。对于诊断致瘤力的方法，最好如下分级生物样品中 GP88 染色的强度：少于约 1% GP88 染色细胞被认为是 GP88 阴性或 0；约 5-10 5 1-5% GP88 染色细胞被认为是 GP88 弱阳性(1+)；约 5-25% GP88 染色细胞(2+)被认为是 GP88 中等阳性；超过约 25% GP88 染色细胞(3+)被认为是 GP88 强阳性。根据所述生物样品库的大小以及用于鉴定 GP88 的检测技术(如免疫染色、原位杂交、荧光原位杂交(FISH)、反向聚合酶链反应、RNA 印迹分析、蛋白质印迹分析、DNA 蛋白质印迹分析等)，重新调整每个级别 GP88 染色细胞的百分率。例如，当 10 使用更灵敏的 GP88 检测技术或增加所述生物样品库时，可以向下调节每个级别的 GP88 阳性或染色细胞百分率。根据本发明优选实施方案，至少约 1%的 GP88 染色细胞百分率指示致瘤力。

本发明还涉及诊断致瘤力或确定患者是否抵抗抗雌激素疗法的 15 抗肿瘤效应的试剂盒。本发明的优选试剂盒包含一个容器和一种用于检测 GP88 的分子(如抗 GP88 抗体、GP88 cDNA 探针、GP88 寡聚体探针)。试剂盒也可以包括用于生物样品免疫染色或原位杂交的试剂。在优选实施方案中，本发明的试剂盒包括用于进行酶联免疫测定(“ELISA”)的试剂(如抗 GP88 抗体、用于产生标准曲线的缀合的和未缀合的重组 GP88，用于检测的底物)。另一优选实施方案包括用于 20 实施检测 GP88 多核苷酸存在的反向聚合酶链反应方法的试剂。

本发明还提供治疗或预防癌症如乳腺癌的方法，所述方法包括确定从患者获得的生物样品中 GP88 的量或 GP88 阳性细胞的百分率，假如所述乳腺组织样品中 GP88 阳性或染色细胞的百分率少于约 25 5%，那么给予足以治疗或预防乳腺癌的量的他莫昔芬。在本发明另一优选实施方案中，假如所述生物样品中 GP88 阳性或染色细胞的百分率少于约 10%，那么给予雌激素受体阳性患者他莫昔芬或其它抗雌激素疗法。假如 GP88 阳性或染色细胞的百分率大于 5%，可以给

予抗 GP88 疗法(即应用抗 GP88 抗体或反义 GP88 多核苷酸), 恢复对抗雌激素疗法的敏感性。根据每个病例确定足以治疗或预防癌症的抗雌激素药的量。关于给予患者抗雌激素疗法的指导(如 Nolvadex®、雷洛昔芬、芳香酶抑制剂、雌激素受体负调节剂等)是

5 治疗医师容易获得并且已知的。

应当理解, 根据本文的教导, 应用本发明的教导于特定问题或环境将在本领域内技术人员的能力范围内。本发明将通过下面非限制性的实施例更完全地举例说明。

10

实施例 1

PC 细胞衍生的生长因子(GP88)介导人乳腺癌 MCF-7 细胞中的雌激素促有丝分裂效应。

15

在雌激素受体阳性细胞中, 一种雌激素替代化合物 17- β -雌二醇(E2)在转录水平上以依赖于剂量和时间的方式刺激 PCDGF 表达。我们在这里证明: PCDGF 在 MCF-7 细胞中介导雌二醇(E2)的促有丝分裂效应。PCDGF 取代 E2 刺激 DNA 合成。抗 PCDGF 中和抗体以依赖于剂量的方式抑制 E2 的促有丝分裂效应。通过反义抑制对 MCF-7 细胞中 PCDGF 表达的抑制也抑制 E2 的促有丝分裂效应。与此不同, PCDGF 在 MCF-7 细胞中的过量表达导致能够在不存在雌激素的情况下增殖并且抵抗他莫昔芬的 MCF-7 细胞。PCDGF 象 E2 一样, 刺激促细胞分裂原激活的蛋白激酶活性。PCDGF 能够取代 E2, 刺激细胞周期蛋白 D1 表达。抗 PCDGF 抗体抑制 50% E2 对细胞周期蛋白 D1 的激活。与此不同, PCDGF 不刺激 E2 另一个分子靶 c-myc 的表达。我们得出结论: 自分泌 PCDGF 通过刺激细胞周期蛋白 D1, 介导 E2

20 的促有丝分裂效应。

25

根据 PCDGF 表达筛选人肿瘤细胞系指出: PCDGF 在雌激素受体阴性(ER⁻)人类乳腺癌中高度表达。通过反义 PCDGF cDNA 转染抑制这些细胞中的 PCDGF 表达导致当注射入裸鼠时抑制 90%肿瘤发生

率和肿瘤大小。这些数据提示 PCDGF 涉及维持肿瘤表型。如上文指出，在 ER+细胞中，应答雌激素受体刺激而产生的 PCDGF 介导 E2 的促有丝分裂活性。当 PCDGF 过量表达时，细胞变得不依赖于雌激素并且抵抗抗雌激素的抗肿瘤效应。

5

结果

在缺乏雌激素的情况下，PCDGF 刺激 MCF-7 细胞的 DNA 合成

我们首先检查加入 PCDGF 是否刺激在缺乏 E2 的情况下维持的 MCF-7 细胞的 DNA 合成。在这些情况下，PCDGF 的内源生产非常

10 低。在 10 ng/ml PCDGF 观察到 ³H-胸苷掺入相对于对照增加 2 倍(细胞在缺乏 E2 和 PCDGF 的情况下维持)(图 16A)。图 16A 图解 PCDGF 在缺乏 E2 的情况下刺激 MCF-7 细胞的 DNA 合成。将 MCF-7 细胞(每孔 10⁵ 细胞)接种在 DMEM 和加入 5% FBS 的 Ham's F-12 培养基的 1:1 混合物中。48 小时后，用 PFMEM 取代所述培养基，然后 24 小时后

15 用无血清 α -MEM 培养基取代。在培养基中一式三份加入浓度增加的人 PCDGF。分别使用仅仅 EtOH (CON)或 10⁻⁹ E2 (E2)作为阴性和阳性对照。24 小时后加入 ³H-胸苷(1 μ Ci/ml)处理 5 小时。结果表示为三次平行测定的平均值 \pm SD。使用 100 ng/ml PCDGF 观察到 4 倍的最大刺激(P<0.001)，与用 10⁻⁹ M E2 观察到的最大刺激类似。PCDGF

20 刺激另一 ER⁺细胞系 T47D 的 DNA 合成。使用 100 ng/ml PCDGF 观察到 2.9 \pm 0.3 倍的刺激 DNA 合成。

用抗 PCDGF 抗体处理细胞抑制 E2 的促有丝分裂效应。根据这些结果并假设 E2 刺激 MCF-7 细胞中的 PCDGF 表达，我们确定内源 PCDGF 是否能够通过自分泌环介导 E2 的促有丝分裂效应。为该目的，

25 我们首先检查用阻断 MCF-7 细胞生产 PCDGF 的抗 PCDGF 抗体处理是否会抑制 E2 的促有丝分裂活性。亲和纯化的抗人 PCDGF 抗体的加入以依赖于剂量的方式抑制 E2 所刺激的细胞的生长(图 16B)。图 16B 图解抗 PCDGF 抗体特异性抑制 E2 的促有丝分裂效应。单独

用 10^{-9} M E2 (E2)或者用浓度增加的亲和纯化的抗 PCDGF 抗体处理 MCF-7 细胞: 50 $\mu\text{g/ml}$ (Ab1)、100 $\mu\text{g/ml}$ (Ab2)、200 $\mu\text{g/ml}$ (Ab3)和 300 $\mu\text{g/ml}$ (Ab4)。用 10^{-9} M E2 和 300 $\mu\text{g/ml}$ 免疫前 IgG (preIgG)处理的细胞和用 10 ng/ml IGF-II (IGF)单独或者在 300 $\mu\text{g/ml}$ 抗 PCDGF 抗体 (Ab+IGF)存在下处理的细胞作为对照。结果如图, 表示为三次平行测定的平均值 \pm SD。用 300 $\mu\text{g/ml}$ 抗 PCDGF 抗体观察到对 E2 促有丝分裂效应 74%的抑制($P<0.003$), 而相似浓度的未免疫 IgG 没有效应。该抗体浓度不显示细胞毒性。加入 PCDGF (200 ng/ml)恢复用抗 PCDGF 抗体处理的细胞的增殖。PCDGF 抗体效应的特异性也得到证明, 因为它不能抑制 MCF-7 细胞的一种已知生长刺激物胰岛素样生长因子 II 的刺激效应。这些结果显示: PCDGF 作为一种自分泌生长因子作用, 介导 E2 对 MCF-7 细胞的促有丝分裂效应。

对 PCDGF 表达的抑制在 E2 存在下抑制 MCF-7 细胞的生长。下一步我们试图确定是否抑制 MCF-7 细胞中的 PCDGF 表达将阻止 E2 的生长刺激效应。为该目的, 我们检查其中 PCDGF 表达已经受到反义 PCDGF cDNA 转染抑制的 MCF-7 细胞中 E2 的促有丝分裂效应。对用相同细胞数目制备的样品进行蛋白质印迹分析, 确定两个有代表性的反义克隆 As13 和 As22 以及空载体对照转染 MCF-7 细胞 (MCF-7C)中的 PCDGF 水平(图 17A)。图 17A 图解通过 MCF-7 细胞中的反义 PCDGF cDNA 转染抑制 PCDGF 表达。通过蛋白质印迹分析检查反义(As13 和 As22)以及空载体对照转染细胞(MCF7-C)中的 PCDGF 表达。用 PFMEM 中的 10^{-9} M E2 处理 AS13 (道 1)、AS22 (道 2)和 MCF-7C 细胞(道 3)。24 小时后收集条件培养基, 归一化到相同细胞数目(4×10^6 细胞), 以测量 PCDGF 表达。As13 细胞抑制 80% PCDGF 表达, 而 As22 与 MCF-7C 细胞相比显示 50%抑制。

然后在这些反义和对照 MCF-7C 细胞中检查 E2 对 DNA 合成的效应。 [^3H]胸苷掺入测定显示: E2 在 MCF-7C 细胞中的刺激效应与 PCDGF 的抑制程度相关, 在 AS13 和 AS22 中降低(图 17B)。图 17B

图解抑制 MCF-7 细胞中的 PCDGF 表达抑制 E2 的促有丝分裂活性。在反义和对照 MCF-7C 细胞中检查 E2 的促有丝分裂效应。用 10^{-9} M E2 (E2)、100 ng/ml 重组 PCDGF (PCDGF) 或仅 0.1% EtOH (CON) 处理 AS13 (实心条)、AS22 (阴影条) 和 MCF-7C 细胞(空心条)。如上文所述测量 ^3H -胸苷掺入。结果如图, 表示为平均值 \pm SD。AS13 显示对 E2 效应的最高抑制。E2 介导的 DNA 合成在 AS13 仅是 MCF-7C 细胞中观察到的 DNA 合成的 25% ($P < 0.001$), 在 AS22 中是 60% ($P < 0.001$)。加入 PCDGF 恢复反义克隆的增殖到在 E2 存在下培养的对照 MCF-7 细胞中的水平。

10

PCDGF 的过量表达导致雌激素非依赖性和他莫昔芬抗性

根据上面结果, 我们检查 ER⁺ MCF-7 细胞中 PCDGF 组成型过量表达对它们的雌激素和他莫昔芬响应性的效果。用 pcDNA3 表达载体转染 MCF-7 细胞, 所述 pcDNA3 表达载体包含在巨细胞病毒启动子控制下的 PCDGF cDNA。获得几个 PCDGF 过量表达克隆, 其中包括一个命名为 O4 的有代表性的克隆。图 18A 显示: 与耗尽 E2 的培养基中的对照 MCF-7C 细胞相比, O4 细胞生产水平提高的 PCDGF。图 18A 图解 O4 细胞和对照 MCF-7C 细胞中的 PCDGF 表达。在 PFMEM 中培养 O4 和空载体对照 MCF-7 细胞。24 小时后收集条件培养基, 确定 PCDGF 表达。

15

20

O4 细胞中的胸苷掺入是 MCF-7C 细胞的 2.2 倍($P < 0.01$), 这证明 O4 细胞在缺乏 E2 的情况下增殖的能力(图 18B)。图 18B 显示 O4 和对照 MCF-7 细胞在耗尽雌激素的 PFMEM 培养基中的增殖。细胞一式三份接种在耗尽雌激素的 PFMEM 培养基中。细胞或者在缺乏 E2 的情况下维持(对照: Con), 或者用 10^{-9} M E2 或 200 ng/ml PCDGF 处理 24 小时。然后加入 ^3H -胸苷, 测量 DNA 合成。结果表示为平均值 \pm SD。此外, 在耗尽 E2 的培养基内 O4 细胞的胸苷掺入水平以及用 PCDGF 或 E2 处理的 MCF-7C 细胞的胸苷掺入水平之间没有显著差

25

异($P>0.05$)。与 MCF-7C 细胞不同, 在 O4 细胞加入 E2 或 PCDGF 没有任何显著的加性效应。在长期生长测定中, 虽然 MCF-7C 细胞不能在缺乏 E2 的情况下生长, 但 O4 细胞以倍增时间 42 小时增殖, 该倍增时间接近 MCF-7C 细胞在 E2 存在下的倍增时间 36 小时。这些数据指出: 在 E2 缺乏的情况下, PCDGF 过量表达提供生长好处。

根据这些结果, 检查 O4 细胞和 MCF-7C 细胞的他莫昔芬响应性。图 18C 显示 MCF-7 细胞和 O4 细胞对他莫昔芬响应的比较。MCF-7C 细胞(实心条)和 O4 细胞(空心条)仅接受 10^{-9} M E2, 或者在浓度增加的他莫昔芬存在下接受 10^{-9} M E2。还检查用 200 ng/ml 人 PCDGF 和 1 μ M 他莫昔芬(T+P)处理的 MCF-7C 细胞。如图 16 所述测量 DNA 合成。结果表示为仅用 E2 处理的细胞内 DNA 合成值的百分率。他莫昔芬以依赖于剂量的方式抑制 MCF-7C 细胞增殖, 在 100 nM 抑制 E2 效应达 60%, 在 500 nM 抑制达 80%, 在 1 μ M 他莫昔芬达到最大抑制 90% (图 18C)。与此不同, 表现对他莫昔芬显著降低的响应性, 因为它们的增殖不受 100 nM 他莫昔芬的影响, 而在 500 nM 和 1 μ M 他莫昔芬分别仅观察到对 E2 效应的 20%抑制和 55%抑制 ($P<0.001$)。有趣的是, 在 MCF-7 细胞加入 PCDGF 降低他莫昔芬抑制, 从 90%降到 38% ($P<0.0001$)。这些数据显示: PCDGF 能够克服他莫昔芬抑制, 并且在 MCF-7 细胞中 PCDGF 表达增加导致他莫昔芬抗性。

在所有转染细胞中评价与雌激素响应性有关的其它参数的状态, 例如雌激素受体表达、E2 对雌激素响应元件的激活以及 E2 对孕酮受体 mRNA 表达的刺激。这些测定中, 在反义、对照和 PCDGF 过量表达细胞之间没有观察到差异(数据未显示)。这些数据指出: 在反义或过量表达细胞中观察到的 E2 增殖性响应改变不是由于 ER 数目或功能的总体变化, 而是与 PCDGF 表达的改变相关。

PCDGF 通过激活有丝分裂原激活蛋白激酶(“MAP 激酶”)途径刺激 MCF-7 细胞中的 DNA 合成

5 下一步我们检查 MCF-7 细胞中与 E2 相比, PCDGF 刺激的信号转导途径。已经显示 E2 刺激通过细胞周期 G1 期的进展。目前已经阐明一些潜在的分子靶。已知 E2 刺激 MCF-7 细胞中的 MAP 激酶活性。在下游, E2 激活 c-myc 途径和 D 型细胞周期蛋白/cdk 复合物。最近的研究推断乳腺癌细胞中所述 c-myc 和细胞周期蛋白 D1 途径独立地受到 E2 激活。因此, 我们尝试确定 PCDGF 是否能够取代 E2, 在 MCF-7 细胞中刺激 MAP 激酶、细胞周期蛋白 D1 和/或 c-myc 途
10 径。

两种方法显示 MAP 激酶涉及介导 MCF-7 细胞中的 PCDGF 活动。首先, PCDGF 对 DNA 合成的刺激效应以依赖于剂量的方式受到 MEK 抑制物 PD098059 的抑制(图 19A)。图 19A 显示 MAP 激酶抑制物对于 PCDGF 促有丝分裂效应的影响。如图 16 所述培养 MCF-
15 7 细胞。用 10 μ M (PD10)或 30 μ M (PD30) PD098059 预处理细胞 60 分钟, 然后仅加入媒介物(Con)或单独加入 100 ng/ml 重组人 PCDGF (P)。胸苷掺入数据表示为平均值 \pm SD。PCDGF 效应几乎受到 10 μ M PD098059 的完全废止。用 30 μ M PD098059 观察到完全抑制, 已知该浓度在其它系统中完全抑制 MAP 激酶活性。其次, 通过使用体外
20 MAP 激酶测定, 我们显示 PCDGF (200 ng/ml)引起 MCF-7 细胞中 MAP 激酶活性增加三倍(图 19B)。该效应被 PD098059 (30 μ M)完全废止。图 19B 图解 PCDGF 激活 MAP 激酶。细胞在 PFMEM 培养基中培养 24 小时, 然后在无血清 α -MEM 培养基中培养。检查的样品是: 用 0、50 ng/ml 和 200 ng/ml 人 PCDGF 处理 10 分钟的 MCF-7 细胞(分别是道 1-3); 以及用 200 ng/ml PCDGF 和 30 μ M PD098059 处理 10 分钟
25 的 MCF-7 细胞(道 4)。如本文所述进行所述激酶测定。通过光密度扫描分析磷酸化 MBP 带的强度。使用等量原始上清液检查 MAP 激酶表达(Erk1 和 Erk2), 作为归一化 MAP 激酶活性的内部对照。

PCDGF 在 MCF-7 细胞中刺激细胞周期蛋白 D1 表达而不刺激 c-myc 表达

进行实验确定 PCDGF 对细胞周期蛋白 D1 表达的效应。PCDGF 在 MCF-7 细胞中以依赖于时间的方式刺激细胞周期蛋白 D1 表达，5 小时后达到最大值，即未处理对照的 4 倍(图 20A)。PD98095 以其抑制 PCDGF 促有丝分裂效应的相同方式废止细胞周期蛋白 D1 的刺激效应。图 20A 显示 PCDGF 刺激细胞周期蛋白 D1 表达。MCF-7 细胞一式三份在 PFMEM 培养基中培养，同时用 1 μ M 他莫昔芬处理。用仅补充 200 ng/ml PCDGF 或补充 200 ng/ml PCDGF 以及 30 μ M PD98095 (上)或 10^{-9} M E2 (下)的新鲜培养基替换培养基。在指定时间裂解细胞，用 60 μ g 全细胞裂解物，使用抗细胞周期蛋白 D1 抗体通过蛋白质印迹分析测定细胞周期蛋白 D1 表达。样品是用 200 ng/ml PCDGF 在 0 小时(道 1)、3 小时(道 2)、5 小时(道 3)和 12 小时(道 4)处理的 MCF-7 细胞;在 5 小时未处理的 MCF-7 细胞(道 5);用 200 ng/ml PCDGF 和 PD08950 在 5 小时处理的 MCF-7 细胞(道 6);以及用 10^{-9} M E2 在时间 0 小时、3 小时和 5 小时处理的 MCF-7 细胞(分别是道 7-9)。

PCDGF 刺激细胞周期蛋白 D1 表达伴随着 pRb 磷酸化和表达的增加，pRb 是 G1 期进展严格所需的。PCDGF 处理 6 小时后，pRB 变得高度磷酸化。24 小时后，所有 pRb 都处于高度磷酸化的形式，蛋白表达与未处理细胞相比增加到 5 倍。PD98095 也阻断该效应(数据未显示)。

下一步我们比较 E2 和 PCDGF 刺激 c-myc 表达表达的能力，c-myc 表达是 MCF-7 细胞中雌激素作用的另一个靶。如图 20B 所示，E2 (10^{-9} M)在除去类固醇的 MCF-7 细胞中刺激 c-myc 表达快速增加，3 小时内达到最大 4 倍诱导。E2 诱导的 c-myc 水平持续超过 10 小时。与此不同，同一时期内 PCDGF 对 c-myc 蛋白表达没有效应(图 20B)。图 20B 图解 E2 和 PCDGF 对 c-myc 表达的效应。同时用 1 μ M 他莫昔芬处理 MCF-7 细胞。然后用 10^{-9} M E2 (上)或 200 ng/ml PCDGF (下)

处理细胞指定时间。使用 60 μg 全细胞裂解物和抗 myc 多克隆抗体，进行 c-myc 表达的蛋白质印迹分析检测。

5 因为 PCDGF 诱导细胞周期蛋白 D1 表达而不诱导 c-myc 表达，所以我们确定内源 PCDGF 的增加是否涉及 E2 刺激细胞周期蛋白 D1 表达的能力。用抗 PCDGF 中和抗体(300 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理 MCF-7 细胞在加入所述抗体 5 小时后导致 $52\pm 8\%$ 抑制 E2 对细胞周期蛋白 D1 的刺
10 激。抑制程度在加入抗体后维持 12 小时。这些数据显示：E2 在 MCF-7 细胞中刺激细胞周期蛋白 D1 的能力至少部分由内源产生的 PCDGF 介导。

讨论

我们以前报道，ER⁺人乳腺癌细胞表达 PCDGF，并且 E2 以依赖于剂量和时间的方式刺激 PCDGF 表达。我们在本文中证明：PCDGF 介导 E2 的生长刺激效应。我们显示：PCDGF 刺激在缺乏 E2 的情况下维持的人乳腺癌细胞 MCF-7 和 T47D 的增殖。我们随后显示：用
15 抗 PCDGF 抗体阻断 PCDGF 自分泌途径抑制 E2 的促有丝分裂效应。该效应特异性针对 PCDGF，因为所述抗体不能抑制 IGF-II 的促有丝分裂效应。通过显示反义 cDNA 转感染对 PCDGF 表达的抑制降低 E2 对 MCF-7 细胞的促有丝分裂效应，并且与 PCDGF 表达的抑制程度
20 相关，进一步证明 PCDGF 参与 E2 的促有丝分裂效应。加入外源 PCDGF 恢复这些反义细胞的增殖。此外，MCF-7 细胞中 PCDGF 表达增加导致能够在不存在 E2 的情况下增殖并且抗他莫昔芬的细胞。E2 响应性的其它参数如 ER 表达、雌激素响应元件荧光素酶报道基因的激活或刺激孕酮受体表达没有改变，这指示转染细胞中 E2 促有
25 丝分裂效应的改变不是由于 E2 受体的改变，而明确地是由于 PCDGF 表达的改变。

我们的结果显示：PCDGF 上调细胞周期蛋白 D1，介导 E2 在人乳腺癌细胞中的促有丝分裂效应。支持该假设的是，用抗 PCDGF

中和抗体处理 MCF-7 细胞 5-12 小时内, E2 抑制 52% 细胞周期蛋白 D1 表达的激活。总之, 本文描述的研究鉴定 PCDGF 至少部分是 E2 对人乳腺癌细胞系 MCF-7 的促有丝分裂效应的新型介质。

5

实施例 2

确定他莫昔芬抗性

我们已经显示: 通过反义 cDNA 转染抑制 ER 阴性乳腺癌细胞中的 GP88 表达导致抑制致瘤力, 这指出 GP88 过量表达在乳腺癌细胞致瘤力中的重要性。因为乳腺癌在本质上是异质性的, 并且可影响腺体的各种细胞功能部分, 所以优选检查进展模型各个阶段有代表性的活组织检查, 观察 GP88 表达。已经显示: 检测肿瘤标记是在诊断或初级治疗时评价和预测乳腺癌临床发病病程的优选方法, 并且在确定疗法选择时是重要的。这些研究直接与妇女的健康相关, 因为它们提供了新型生长因子 PCDGF 作为潜在的乳腺癌预测标记的分析。

15

使用亲和纯化的抗人 GP88 抗体, 通过对石蜡包埋的活组织检查的切片的免疫组织化学分析, 跟踪 GP88 表达(图 21)。所检查疾病的进行期包括良性增生→非典型腺管增生(ADH)→(原位腺管癌) DCIS→侵袭性腺管癌(IDC)→转移疾病。同时平行检查在乳腺癌进展期间出现的代表遗传和生物学改变的选定标记。

20

对于所检查疾病的每个阶段(即包括上皮增生和纤维囊性改变的良性阶段、非典型腺管增生、原位腺管癌、侵袭性腺管癌; 以及转移乳腺癌), 根据其它标记如 Ki-67 (增殖标记)、p53 (肿瘤抑制子)、ER/PR (响应性)、cerbB2 表达(生长因子受体)的检测平行检测 GP88 表达, 并与疾病的等级、阶段以及淋巴结状态进行相关研究。

25

通过组织病理学确定病变的阶段和类型以及通过检查几种其它预测标记如 Ki-67 和 ER/PR 状态, 对活组织检查进行分类。结果指出: 3 级 ER-/PR 腺管癌中上皮细胞内的 GP88 表达对应于预后差的

肿瘤。正常组织或良性小叶癌中的 GP88 表达为阴性。

方法

5 制备组织。从石蜡块上切下 4 μm 厚的组织切片，固定在带电荷的玻璃载玻片上。通过标准程序进行去石蜡、固定、抗原回收和切片脱水。

10 制备抗人 GP88 抗体：检测 GP88 表达的优选方法是通过使用亲和纯化的抗人 PCDGF 抗体的免疫染色。用在本发明发明人是实验室内表达和纯化的人重组 PCDGF 免疫兔或小鼠，发展多克隆或单克隆抗人 GP88 抗体。对于多克隆抗体，通过硫酸钠沉淀和透析从兔抗血清制备抗 GP88 IgG 组分。该组分在缀合 GP88 的 Sepharose 柱上层析，进行亲和纯化，所述柱通过将纯人 GP88 偶联到 CNBr 活化的 Sepharose 上而制备。通过 SDS-PAGE 层析分析所述高度纯化的抗体组分，显示该组分包含对应于 IgG 的单一带，根据免疫染色，该组
15 分在固定细胞和组织切片上提供没有背景的高度特异性染色。或者，可以使用抗 GP88 单克隆抗体。

20 如下进行免疫染色：在湿度室内用特异性抗体在室温下温育如上文所述制备的组织切片 1 小时，然后与抗 GP88 抗体温育。最好通过与生物素化第二抗体和链霉抗生物素过氧化物酶复合物(Ventana 试剂盒)温育，检测抗体结合。最好通过将切片浸入 3,3-二氨基联苯胺溶液(0.25 mg/mL，含有 3%过氧化氢)，获得产色显影。然后最好用苏木精负染所述载玻片，然后盖上盖玻片。

25 通过显微镜检查分析所述免疫染色数据。使用如下文指出的公开方法为选定标记评分。在先技术的染色强度评分方法包括以下：用广泛使用的方法为核染色分级，确定 ER 和 PR 状态以及 p53 突变形式的存在(<5%核染色-阴性；阳性染色为从弱(1+)到中等(2+)到强(3+)的强度分级。通过膜染色存在和强度评价 c-erbB-2 染色，并如下分级：<5%染色-阴性；阳性染色从弱(1+)到中等(2+)到强(3+)分级。

分别对肿瘤细胞和周围基质的溶基质素-3 表达进行分级, 最好使用用于 ER/PR、p53 和 c-erbB-2 的方法进行评分。所述染色强度分级方法可直接应用于检测 GP88。

5 我们的结果显示: 在正常组织和良性病变中, 上皮细胞不对 GP88 染色。与此不同, 在 ER/PR-侵袭性腺管癌中, 上皮细胞显示对 GP88 非常强的阳性染色。可以根据常规用于评分和标注其它乳腺癌预测标记的方法, 为 GP88 阳性上皮细胞的存在评分并分配级别。下面评分和标注标准可用于评价 GP88 染色: 少于约 5%染色是阴性; 约 10-25%阳性染色分级为从弱(1+)到(中等 25-50%阳性细胞(2+))到强
10 (3+)(多于 50%阳性细胞)。只要获得大量样品的分析时, 向下重新调整每个级别阳性细胞的百分率。

除上文所述的方法和生物样品类型外, 为预测抗雌激素疗法反应而检测 GP88 表达可以延伸到测量生物体液如血清或血浆、尿或乳头吸出物中 GP88 表达的增加。为预测抗雌激素疗法反应而检测 GP88
15 表达也可以容易地延伸到测量细胞提取物中的 GP88 表达增加。

所述检测方法包括但不限于酶联免疫测定, 例如直接缀合酶(例如但不限于过氧化物酶、碱性磷酸酶、生物素)或缀合荧光标记的抗体或应用缀合的第二抗体(例如但不限于过氧化物酶、碱性磷酸酶、链霉抗生物素或荧光标记)。

20 为选定标记评分的优选方法是本领域内众所周知的, 在下面参考文献中描述, 所述参考文献的内容特此通过引用结合到本申请中: (1)Ferno, M. (1998) 乳腺癌的预后因素, Anticancer Research, 18, 2167-2172; (2)Harbeck N., Dettmar, P., Thomssen, C., Henlselmann, B., Kuhn, W., Ulm, K., Janicke, F., Hofler, H., Graeff, H., Schmitt, M. (1998),
25 肿瘤生物学因子对淋巴结阴性乳腺癌存活率的预后影响, Anticancer Res. 18, 2187-2198; (3)Allred, D. C., Harvey, J. M., Berardo, M., Clark, G. M. (1998), 通过免疫组织化学分析乳腺癌中的预后和预测因子, Mod. Pathol. 11, 155-168; 和(4)Thor, A. D., Moore, D. H., Edgerton, S. M., Kawasaki, E. S., Reihsaus, E., Lynch, H. T., Marcus, J. N., Schwartz,

L., Chen, L. C., Mayall, B. H. (1992), p53 抑制子基因产物积累增加是乳腺癌的独立预后变量, J. Natl. Cancer. Inst., 84, 845-855.

用抗 GP88 抗体的 GP88 染色

5 使用免疫组织化学技术, 用抗 GP88 抗体对来自乳腺癌患者的石蜡包埋的乳腺组织活组织检查进行染色。如图 21 所示, 良性病变不表现 GP88 染色, 而侵袭性腺管癌(“IDC”)样品表现 GP88 细胞的强染色。与良性病变相比, GP88 表达在致瘤力侵袭性腺管癌中升高。

10 雌激素受体阳性(ER+)和雌激素受体阴性(ER-)侵袭性腺管癌 (IDC)肿瘤中的 GP88 染色强度

 用抗 GP88 抗体对 IDC 肿瘤的生物样品进行免疫染色, 根据它们的雌激素受体状态(ER+ = 雌激素受体阳性, ER- = 雌激素受体阴性)和 GP88 染色强度等级进行分类。如图 22 所示, GP88 染色强度增加直接与 IDC 肿瘤中的雌激素受体损失相关。在染色强度 0, 所有分析的 IDC 肿瘤样品都是 ER+。在染色强度 1, 80%的 IDC 肿瘤是 ER+, 20%是 ER-。在染色强度 2, 50%的 IDC 肿瘤是 ER+, 50%是 ER-。在染色强度 3, 20%的 IDC 肿瘤是 ER+, 80%是 ER-。因此, 当 GP88 染色强度增加时, ER+ IDC 肿瘤百分率降低。

20

根据 GP88 染色强度分类的 ER+ IDC 肿瘤的他莫昔芬响应性

 GP88 染色强度增加指示细胞丧失生长对雌激素的依赖性, 变为不依赖于雌激素。细胞生长不再手来自激素例如雌激素的外部信号控制, 而是由来自 GP88 的自分泌生长信号控制。以前认为雌激素受体的存在指示细胞是否能够响应抗雌激素疗法。然而, 当细胞从雌激素依赖型生长转换到不依赖于雌激素的生长时, 雌激素受体的存在与抗雌激素疗法是否有效不相关, 因为细胞生长信号是组成型的, 不受雌激素或抗雌激素存在或不存在的控制。因此, 有高水平 GP88 (+2 或更多)的雌激素受体阳性肿瘤抵抗抗雌激素疗法, 尽管细胞具

有雌激素受体。

为检查 GP88 水平增加对抗雌激素抗性的效应，从抵抗他莫昔芬治疗的患者以及响应他莫昔芬治疗的患者获取 IDC 肿瘤样品。如上文所述用抗人 GP88 抗体免疫染色所述肿瘤样品。如图 23 所示，根据 IDC 肿瘤的 GP88 染色强度，在 0 到 3 的分级标准(x 轴)上将它们分级。沿 y 轴确定雌激素受体阳性(ER+)的总 IDC 肿瘤百分率，并分类为响应他莫昔芬 (白条)或抵抗他莫昔芬(黑条)。在染色强度级别 0，所有 ER+ IDC 肿瘤(40%的肿瘤总数目)都来自响应他莫昔芬的患者。在染色强度级别 1，所有 ER+ IDC 肿瘤(60%的肿瘤总数目)都来自响应他莫昔芬的患者。然而，当染色强度从级别 1 增加到级别 2，所有 ER+ IDC 肿瘤(80%的肿瘤总数目)都来自抵抗他莫昔芬的患者。在染色强度 3，所有 ER+肿瘤(30%的肿瘤总数目)都来自抵抗他莫昔芬的患者。因此，当 GP88 强度从级别 0 增加到级别 3 时，甚至 ER+ IDC 肿瘤对他莫昔芬效应的抗性也不断增加。此外，当染色强度从级别 1 增加到级别 2，ER+ IDC 肿瘤完全从响应他莫昔芬转化到抵抗他莫昔芬。尽管不希望被理论所限制，但是看起来从阶段 3 到阶段 4，他莫昔芬抗性肿瘤百分率随后的降低是由于 GP88 水平升高时损失了雌激素受体(即 ER+ IDC 肿瘤的百分率)。因此，图 23 证明：在丧失雌激素受体前，GP88 水平增加将细胞从响应他莫昔芬疗法的阶段(级别 0 和 1)转化到抵抗他莫昔芬疗法的阶段(级别 2 和 3)。因此，与雌激素受体的存在相比，GP88 作为指示患者是否响应抗雌激素疗法或不受所述疗法过分伤害的更准确和更可靠的预后指标。

上面描述和附图仅举例说明能够实现本发明特征和好处的示例实施方案。其意图不是限制本发明于本文详细显示和描述的实施方案。可以修改本发明，加入直到目前未描述的但符合本发明精神和范围的任何数量的变更、变化、取代或等价安排。本发明仅受到下面权利要求的限制。

图 1A

致瘤力和非致瘤力细胞的 GP88 产生



图 1B

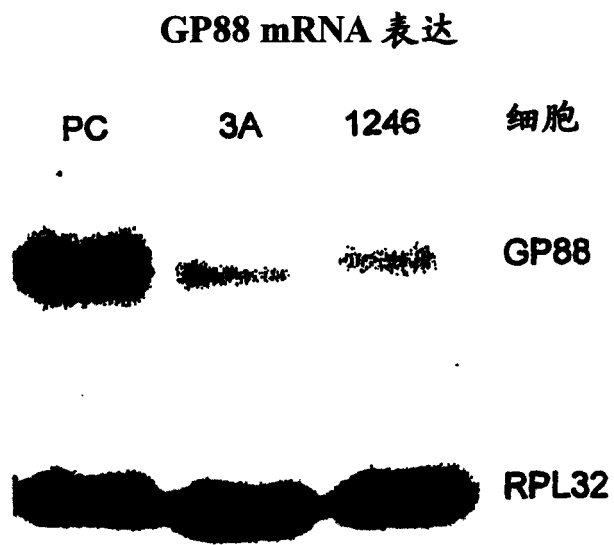


图 1C

不同培养条件下的 GP88 mRNA 表达

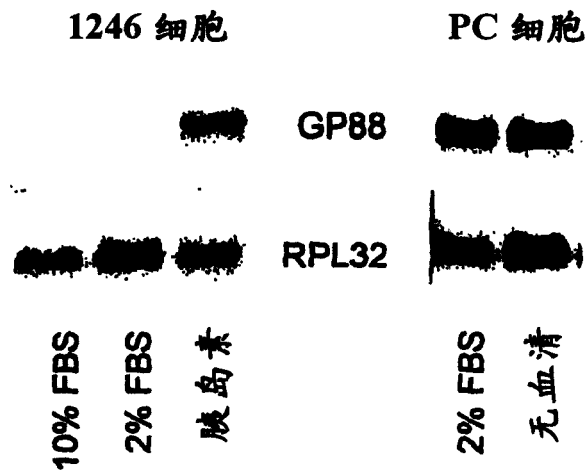


图 2

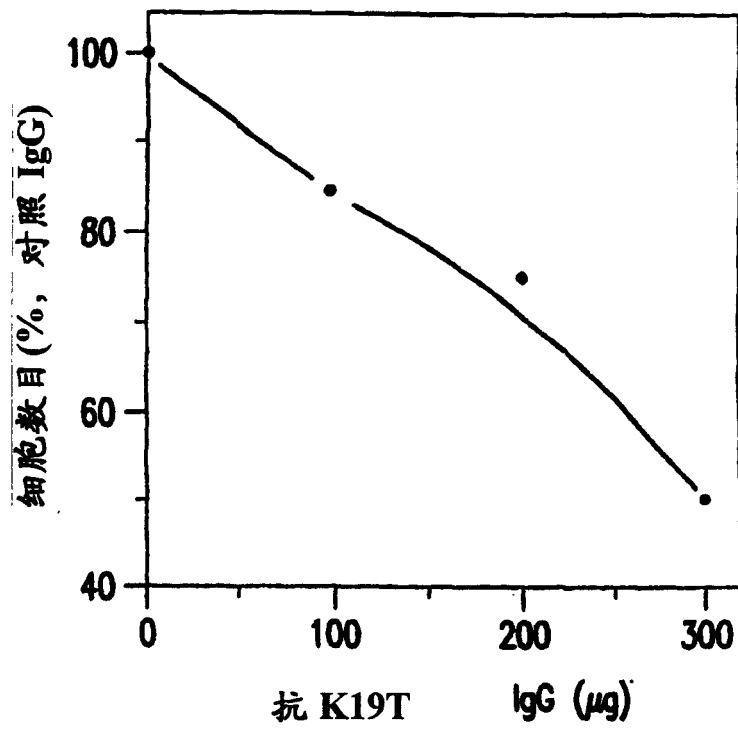


图 3

通过抑制 GP88 表达 C3H 小鼠体内没有肿瘤形成



GP88 反义转染的 PC 细胞



对照转染的 PC 细胞

图 4

肿瘤和周围组织中的 GP88 蛋白表达

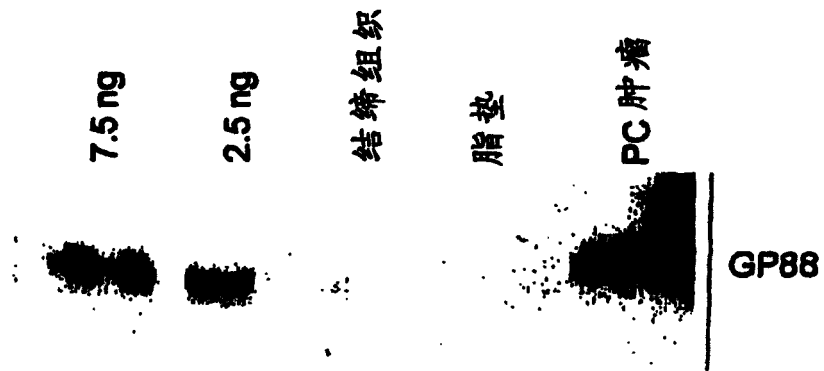


图 5

雌激素依赖型和雌激素非依赖型
人乳腺癌细胞内的 GP88 mRNA 表达



图 6A

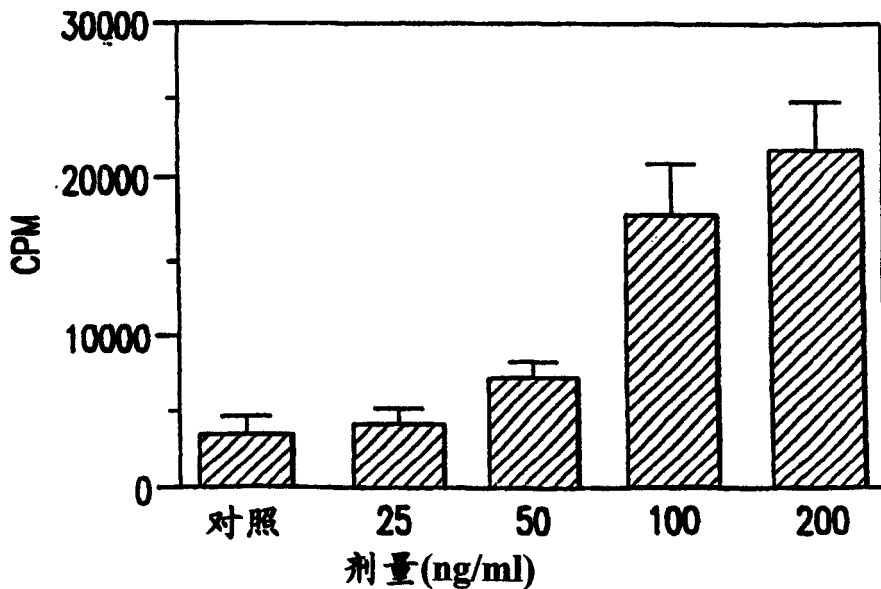
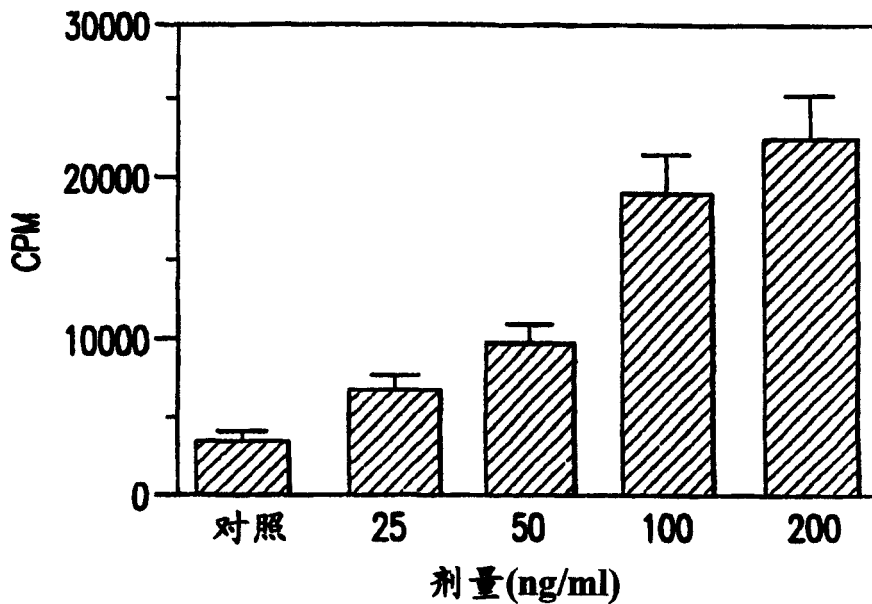


图 6B

图 7

反义和对照转染的 PC 细胞中的 GP88 表达

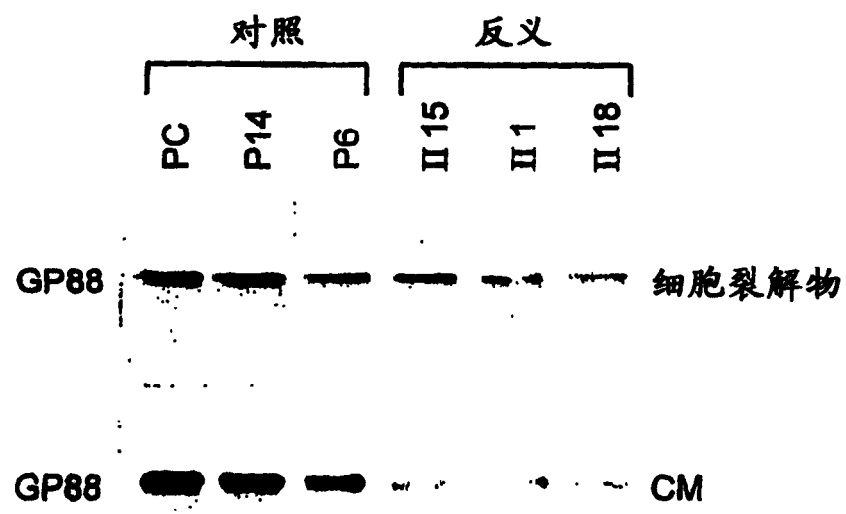


图 8B

小鼠 GP88 cDNA (续)

GAT TCT ACC TGC TGT GAG CTA CCC ACT GGG AAG TAT GGC TGC TGT CCA	718
D S T C C E L P T G K Y G C C P	232
ATG CCC AAT GCC ATC TGC TGT TCC GAC CAC CTG CAC TGC TGC CCC CAG	766
M P N A I C C S D H L H C C P Q	248
GAC ACT GTA TGT GAC CTG ATC CAG AGT AAG TGC CTA TCC AAG AAC TAC	814
D T V C D L I Q S K C L S K N Y	264
ACC ACG GAT CTC CTG ACC AAG CTG CCT GGA TAC CCA GTG AAG GAG GTG	862
T T D L L T K L P G Y P V K E V	280
AAG TGC GAC ATG GAG GTG AGC TGC CCT GAA GGA TAT ACC TGC TGC CGC	910
K C D M E V S C P E G Y T C C R	296
CTC AAC ACT GGG GCC TGG GGC TGC TGT CCA TTT GCC AAG GCC GTG TGT	958
L N T G A W G C C P F A K A V C	312
TGT GAG GAT CAC ATT CAT TGC TGC CCG GCA GGG TTT CAG TGT CAC ACA	1006
C E D H I H C C P A G F Q C H T	328
GAG AAA GGA ACC TGC GAA ATG GGT ATC CTC CAA GTA CCC TGG ATG AAG	1054
E K G T C E X G I L Q V P W M <u>K</u>	344
AAG GTC ATA GCC CCC CTC CGC CTG CCA GAC CCA CAG ATC TTG AAG AGT	1102
<u>K V I A P L R L P D P Q I L K S</u>	360
GAT ACA CCT TGT GAT GAC TTC ACT AGG TGT CCT ACA AAC AAT ACC TGC	1150
<u>D T</u> P C D D F T R C P T N N T C	376
TGC AAA CTC AAT TCT GGG GAC TGG GGC TGC TGT CCC ATC CCA GAG GCT	1198
C K L N S G D W G C C P I P E A	392
GTC TGC TGC TCA GAC AAC CAG CAT TGC TGC CCT CAG GGC TTC ACA TGT	1246
V C C S D N Q H C C P Q G F T C	408
CTG GCT CAG GGG TAC TGT CAG AAG GGA GAC ACA ATG GTG GCT GGC CTG	1294
L A Q G Y C Q K G D T M V A G L	424
GAG AAG ATA CCT GCC CGC CAG ACA ACC CCG CTC CAA ATT GGA GAT ATC	1342
E K I P A R Q T T P L Q I G D I	440

图 8C

小鼠 GP88 cDNA (续)

GGT TGT GAC CAG CAT ACC AGC TGC CCA GTA GGG CAA ACC TGC TGC CCA	1390
G C D Q H T S C P V G Q T C C P	456
AGC CTC AAG GGA AGT TGG GCC TGC TGC CAG CTG CCC CAT GCT GTG TGC	1438
S L K G S W A C C Q L P H A V C	472
TGT GAG GAC CCG CAG CAC TGT TGC CCG GCC GGG TAC ACC TGC AAC GTG	1486
C E D R Q H C C P A G Y T C N V	488
AAG GCG AGG ACC TGT GAG AAG GAT GTC GAT TTT ATC CAG CCT CCC GTG	1534
K A R T C E K D V D F I Q P P V	504
CTC CTG ACC CTC GGC CCT AAG GTT GGG AAT GTG GAG TGT GGA GAA GGG	1582
L L T L G P K V G N V E C G E G	520
CAT TTC TGC CAT GAT AAC CAG ACC TGT TGT AAA GAC AGT GCA GGA GTC	1630
H F C H D N Q T C C K D S A G V	536
TGG GCC TGC TGT CCC TAC CTA AAG GGT GTC TGC TGT AGA GAT GGA CGT	1678
W A C C P Y L K G V C C R D G R	552
CAC TGT TGC CCC GGT GGC TTC CAC TGT TCA GCC AGG GGA ACC AAG TGT	1726
H C C P G G F H C <u>S A R G T K C</u>	568
TTG CGA AAG AAG ATT CCT CGC TGG GAC ATG TTT TTG AGG GAT CCG GTC	1774
<u>L R K K I P R</u> W D M F L R D P V	584
CCA ACA CCG CTA CTG TAA GGA AGG GCT ACA GAC TTA AGG AAC TCC ACA	1822
P R P L L *	589
GTC CTG GGA ACC CTG TTC CGA GGG TAC CCA CTA CTC AGG CCT CCC TAG	1870
CGC CTC CTC CCC TAA CGT CTC CCC GGC CTA CTC ATC CTG AGT CAC CCT	1918
ATC ACC ATG GGA GGT GGA GCC TCA AAC TAA AAC CTT CTT TTA TGG AAA	1966
GAA GGC TGT GGC CAA AAG CCC CGT ATC AAA CTG CCA TTT CTT CCG GTT	2014
TCT GTG GAC CTT GTG GCC AGG TGC TCT TCC CGA GCC ACA GGT GTT CTG	2062
TGA GCT TGC TTG TGT GTG TGT GCG CGT GTG CGT GTG TTG CTC <u>QAA TAA</u>	2110
<u>AGT</u> TTG TAC GCT TTC TGA AAA AAA AAA	2137

图 9A

人颗粒体蛋白/上皮素前体(人 GP88)的核苷酸序列。
人颗粒体蛋白 Genbank M75161\$

```

[gcaggcaga ccatgtggac cttggtgagc tgggtggcct taacagcagg gctggtggct
ggaacgcggt gccagatgg tcagttctgc cctgtggcct gctgcctgga ccccgagga
gccagctaca gctgctgccg tcccctctg gacaaatggc ccacaacact gagcaggcat
ctgggtggcc cctgccaggt tgatgccac tgctctgccg gccactcctg catcttacc
gtctcagga cttccagttg ctgcccctc ccagaggccg tggcatggg ggatggccat
cactgctgcc cacggggctt ccaactgcagt gcagacggga gatcctgctt ccaagatca
ggtaacaact ccgtgggtgc catccagtgc cctgatagtc agttcgaatg cccggacttc
tccacgtgct gtgttatggt cgatggctcc tgggggtgct gccccatgcc ccaggcttcc
tgctgtgaag acagggtgca ctgctgtccg cacggtgcct tctgcgacct ggttcacacc
cgctgcatca caccacggg caccacccc ctggcaaaga agctccctgc ccagaggact
aacagggcag tggccttgtc cagctcggtc atgtgtccgg acgcacggtc ccgggtgccct
gatggttcta cctgctgtga gctgccagt ggaagtatg gctgctgcc aatgccaac
gccacctgct gctccgatea cctgcaactg tggcccaag acaactgtgtg tgacctgatc
cagagtaagt gcctctcaa ggagaacgct accacggacc tcctactaa gctgcctgcg
cacacagtgg gcgatgtgaa atgtgacatg gaggtgagct gccagatgg ctatacctgc
tgccgtctac agtcgggggc ctggggctgc tgcccttta cccaggctgt gtgctgtgag
gaccacatac actgctgtcc cgcggggttt acgtgtgaca cgcagaaggg tacctgtgaa
cagggcccc accaggtgcc ctggatggag aaggccccag ctcacctcag cctgccagac
ccacaagcct tgaagagaga tgtcccctgt gataatgtca gcagctgtcc ctctccgat
acctgctgcc aactcacgtc tggggagtgg ggctgctgtc caatcccaga ggctgtctgc
tgctcggacc accagcactg ctgccccag cgatacacgt gtgtagctga ggggcagtgt
cagcgaggaa gcgagatcgt ggctggactg gagaagatgc ctgcccgcg cggttcctta
tcccaccca gagacatcgg ctgtaccag cacaccagct gcccgtggg cggaacctgc
tgcccagacc aggggtgggag ctgggcctgc tgccagttgc cccatgctgt gtgctgcgag
gatcggcagc actgctgcc ggctggctac acctgcaacg tgaaggctcg atcctgcgag
aaggaaagtgg tctctgcca gcctgccacc tcctggccc gtagccctca cgtgggtgtg
aaggacgtgg agtgtgggga aggacacttc tgccatgata accagacctg ctgccgagac
aaccgacagg gctgggcctg ctgtccctac gccagggcg tctgttgtgc tgatcggcgc
cactgctgtc ctgctggctt ccgctgcga cgcaggggta ccaagtgtt gcgcagggag
gccccgcgct gggacgcccc tttgagggac ccagccttga gacagctgct gtgagggaca
gtactgaaga ctctgcagcc ctcgggacc cactcggagg gtgccctctg ctcaggcctc
gtactgaaga ctctgcagcc ctcgggacc cactcggagg gtgccctctg ctcaggcctc
cctagcacct ccccctaacc aaattctccc tggaccccat tctgagctcc ccataccat
gggaggtggg gcctcaatct aaggcccttc cctgtcagaa ggggggtgag gcaaaagccc
attacaagct gccatcccct ccccgttca gtggaccctg tggccaggtg cttttcccta
tccacagggg tgtttgtgtg ttgggtgtgc tttcaataaa gtttgtcact ttctt*

```

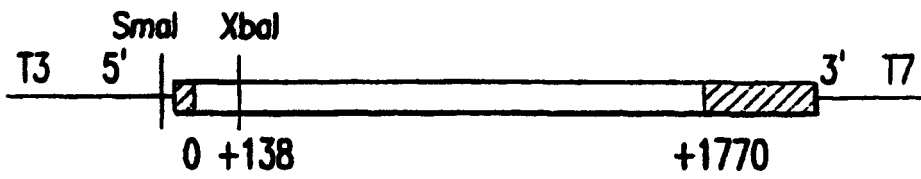
图 9B

人颗粒体蛋白/上皮素前体(人 GP88)的氨基酸序列。

MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRP
LLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHCCPRG
FHCSADGRSFCQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCED
RVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDG
STCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTYLPA
HTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCCRLQSGANGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGT
CEQGPHQVPMNEKAPAHLSLPDPOALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCP
EAVCCSDHQHCCPQRYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRGSLSHPRDIGCDQHTSC
PVGGTCCPSQGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNWKARSCEKEVVSAPATFL
ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYAQGVCCADRRHCCPAGFRCA
RRGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQLL*

图 11

SK 中的 GP88 cDNA 克隆



pCMV4 表达载体的结构

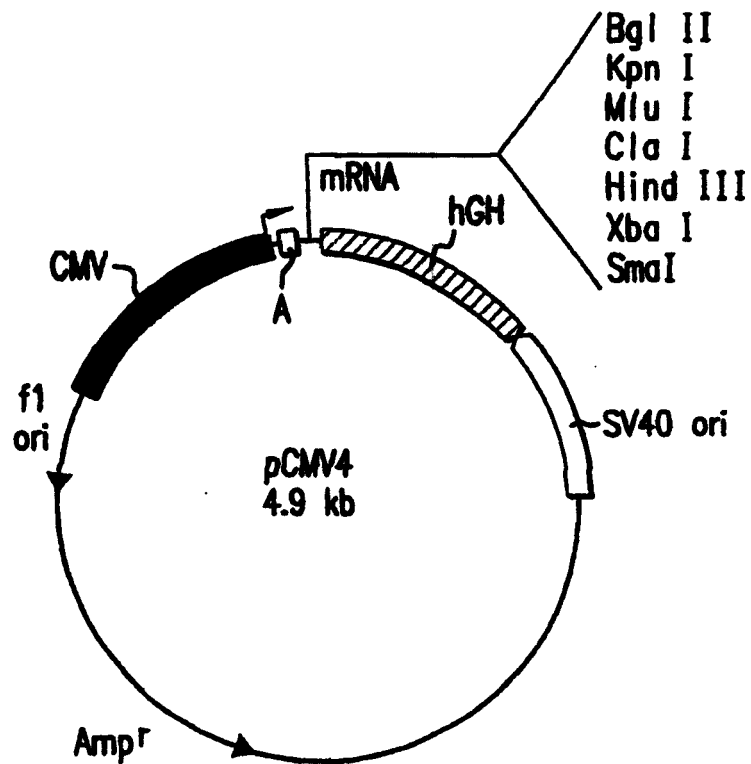


图 12

¹²⁵I-rGP88 与 CCL64 细胞的交联

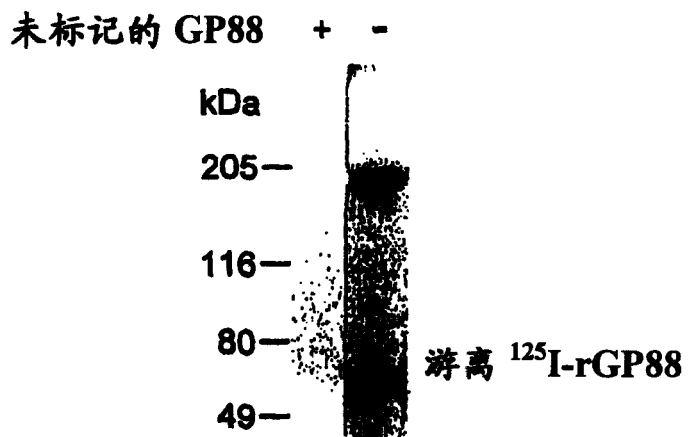


图 13

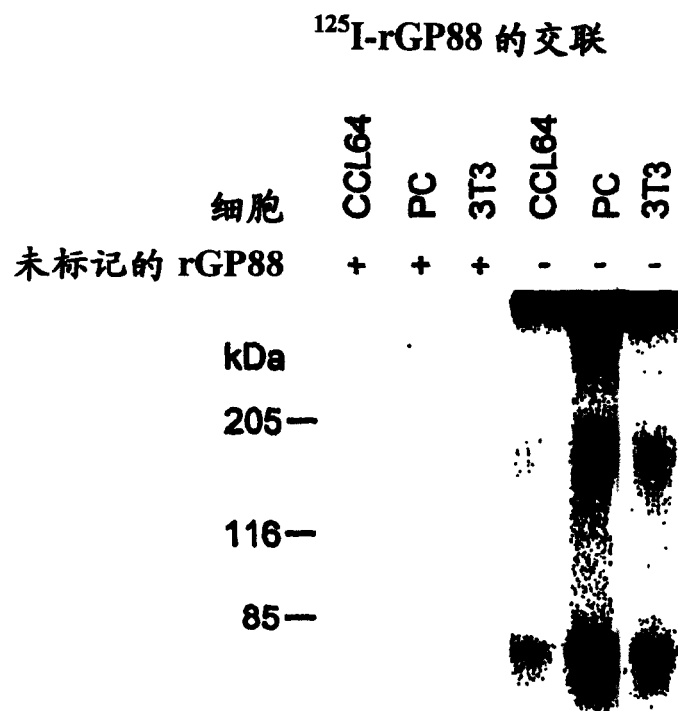


图 14

非致瘤力(MCF 10A) 人乳腺上皮细胞和恶性
(MCF 7, MDA-468)人乳腺上皮细胞中的 GP88 表达



反义 GP88 cDNA 转染抑制人乳腺癌
MDA-468 中的 GP88 表达

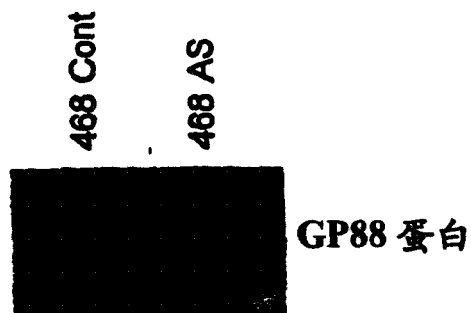


图 15

图 16A

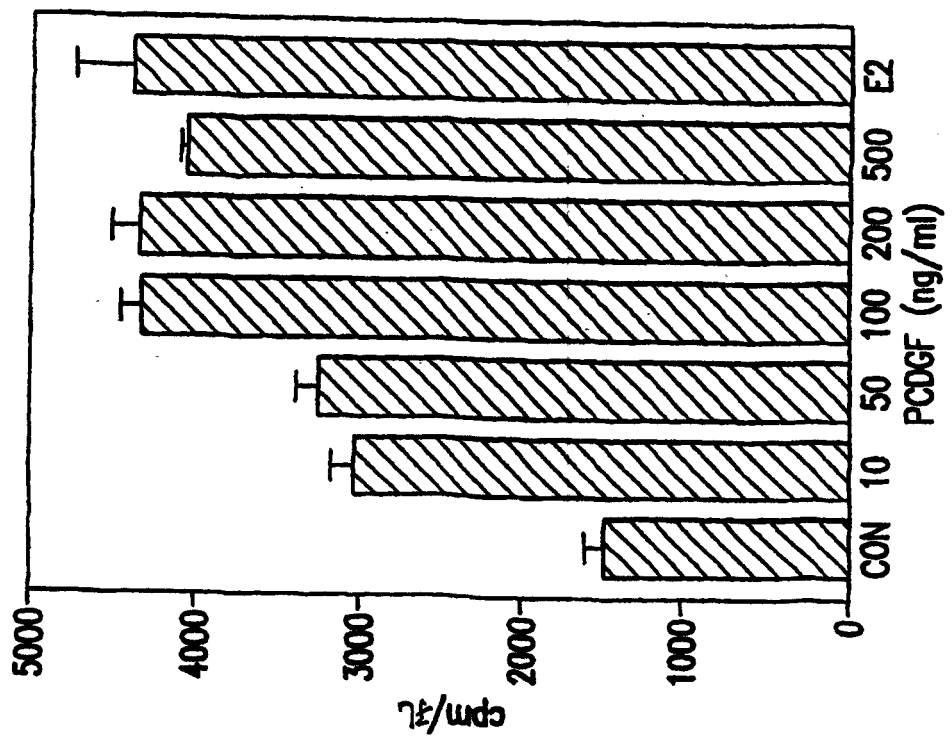


图 16B

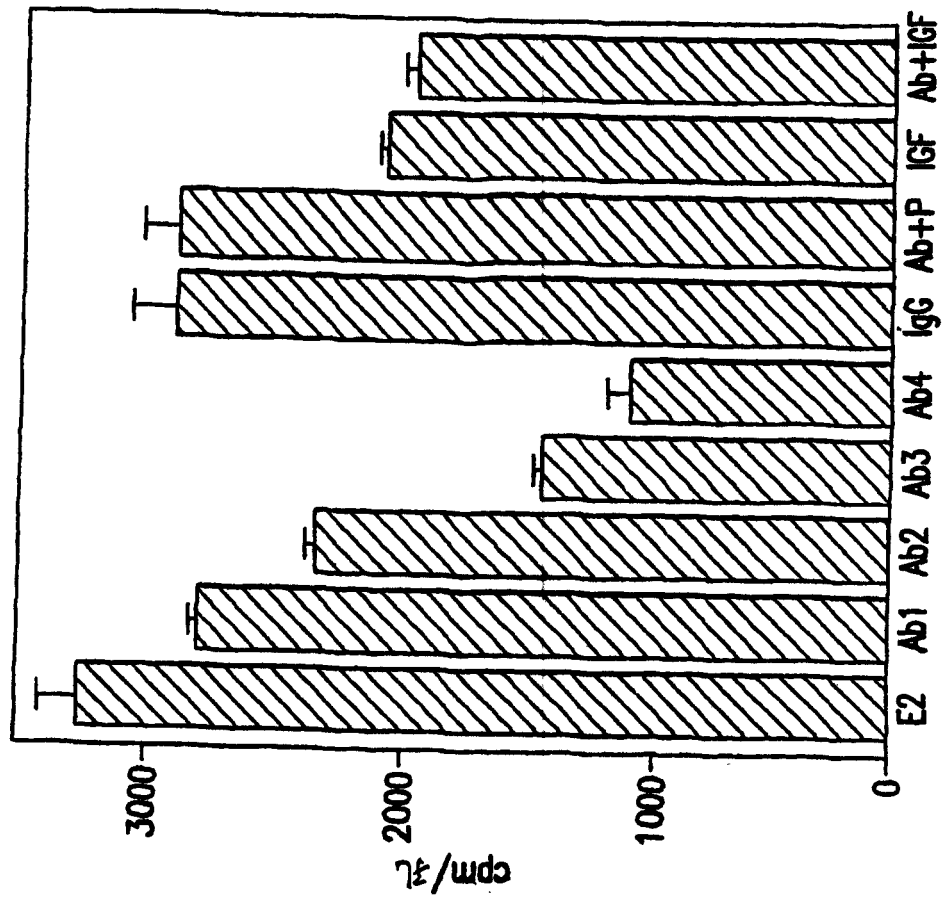


图 17A

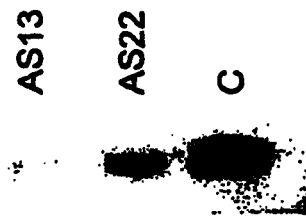


图 17B

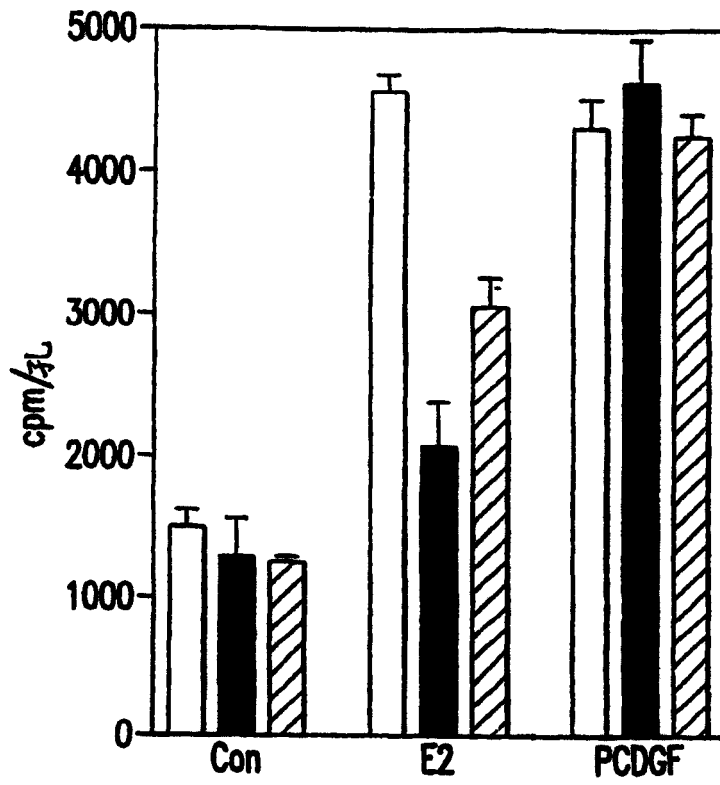


图 18A

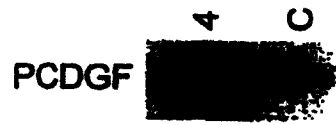


图 18C

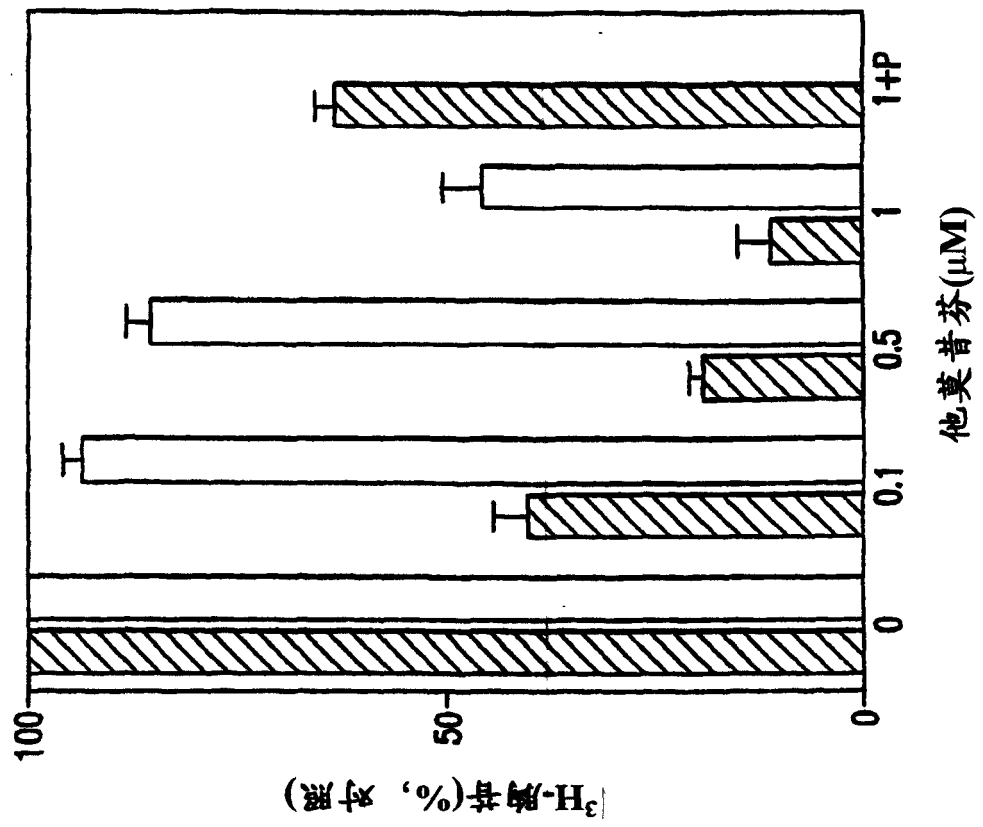


图 18B

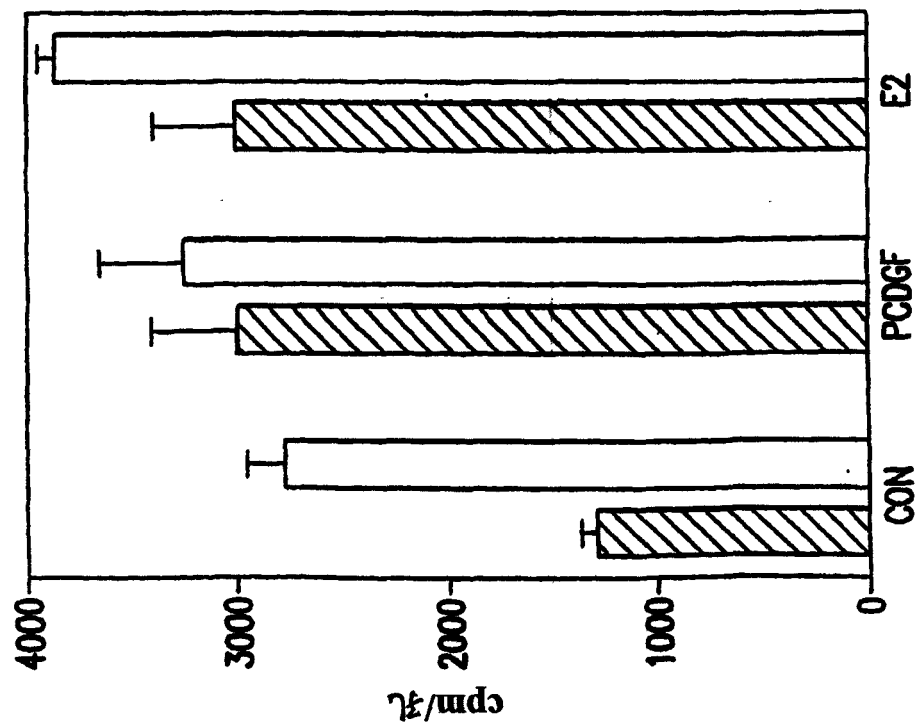


图 19A

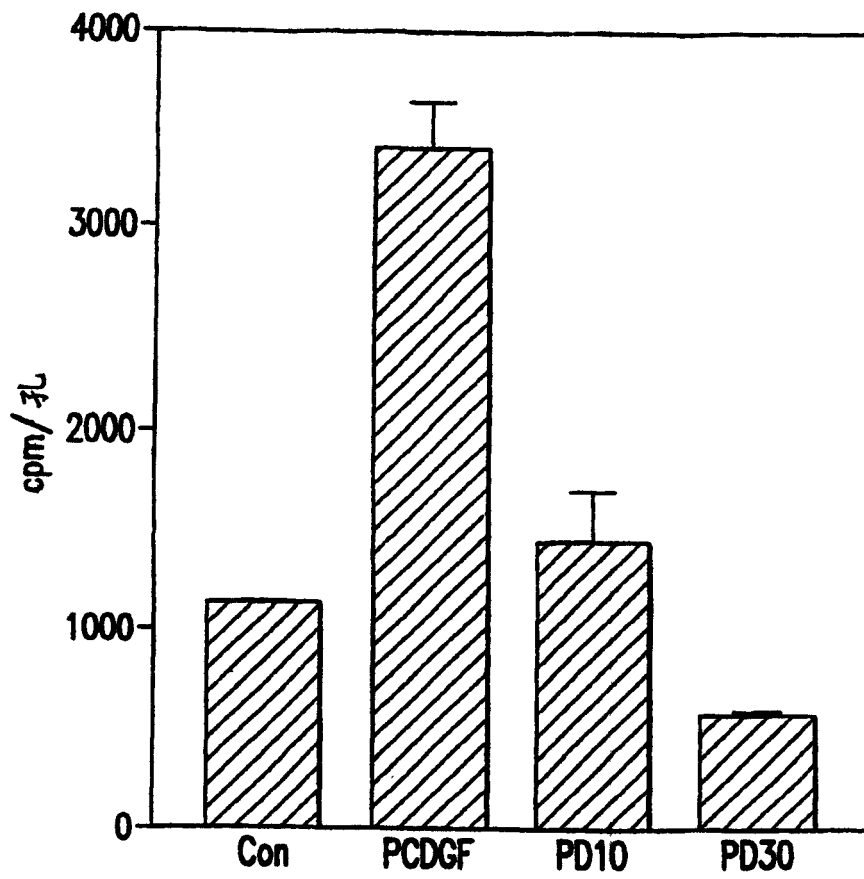


图 19B

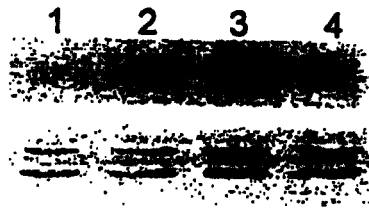


图 20A

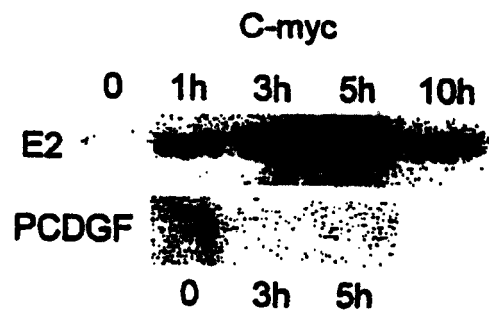
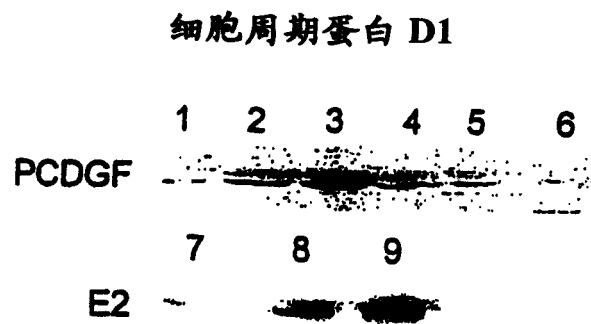
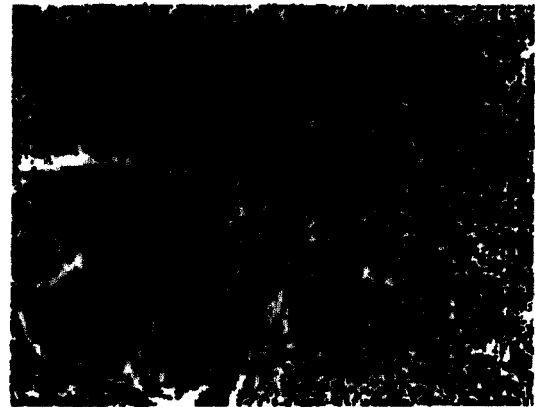


图 20B

图 21



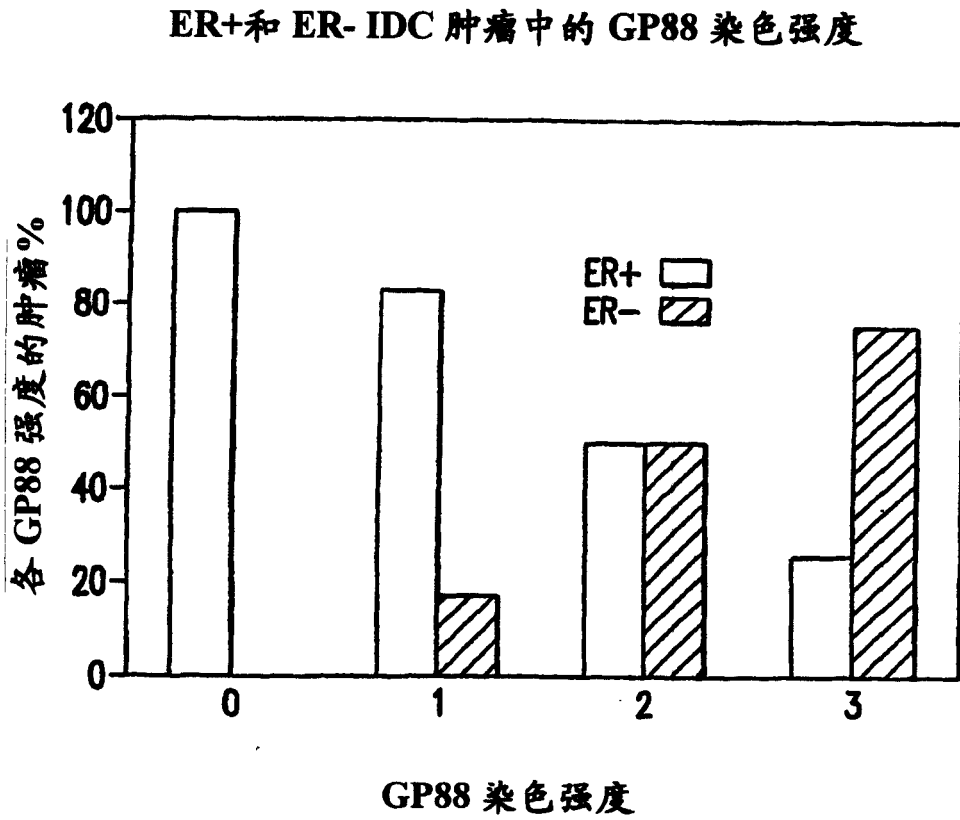
良性病变





侵袭性腺管癌

在石蜡包埋的乳腺癌活组织检查上用抗 GP88 抗体通过免疫组织化学(IHC)进行 GP88 染色

图 22



专利名称(译)	诊断致瘤力以及确定对抗癌疗法的抗性		
公开(公告)号	CN1682111A	公开(公告)日	2005-10-12
申请号	CN02815804.0	申请日	2002-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	A&G药品公司		
申请(专利权)人(译)	A&G药品公司		
当前申请(专利权)人(译)	A&G药品公司		
[标]发明人	G塞尔雷罗		
发明人	G·塞尔雷罗		
IPC分类号	A61K45/00 A61K31/138 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/475 C07K16/22 C07K16/30 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/574 G01N37/00 G01N33/53 A61B5/055 A61K49/06 A61K49/22 C07K16/00 C07K14/82 C07H21/04		
CPC分类号	A61K38/00 G01N2333/475 C07K14/475 A61K2039/505 C07K2317/73 C07K2316/96 C12N2799/026 C07K16/22 A61P15/00 C07K2317/76		
优先权	09/880842 2001-06-15 US		
其他公开文献	CN100397081C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)	PC	3A	1246	373
诊断致瘤力和确定癌症患者是否抵抗抗雌激素疗法的药理作用的方法和试剂盒。PCDGF(GP88)生长因子水平增加指示致瘤力以及对抗雌激素疗法的药理作用的抗性。本发明的方法和试剂盒用于评价来自患者的生物样品的致瘤力以及确定所述患者是否是抗雌激素(包括他莫昔芬)疗法的对象。				细胞裂解物
				CM