



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102301236 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 28

(21) 申请号 200980155784. 2

(22) 申请日 2009. 12. 15

(30) 优先权数据

0822836. 3 2008. 12. 15 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2009/002885 2009. 12. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02010/070276 EN 2010. 06. 24

(71) 申请人 牛津生物医学(英国)有限公司

地址 英国牛津郡

(72) 发明人 A. 克莱顿

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 岑晓东

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 15 页

(54) 发明名称

方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于在受试者中检测 5T4 阳性癌症的方法,其包括下列步骤:(i) 鉴定和/或分离来自所述受试者的样品中的外来体;并(ii) 检测外来体相关 5T4。

1. 一种用于在受试者中检测 5T4 阳性癌症的方法,其包括下列步骤:
 - (i) 鉴定来自所述受试者的样品中的外来体和 / 或来自所述受试者的样品纯化外来体 ;并
 - (ii) 检测外来体相关 5T4。
2. 依照权利要求 1 的方法,其包括检测 5T4 肽、多肽或编码此类肽或多肽的核酸。
3. 依照前述权利要求中任一项的方法,其用于检测生殖泌尿道癌症。
4. 依照权利要求 3 的方法,其用于检测前列腺癌。
5. 依照前述权利要求中任一项的方法,其中所述样品是尿液样品。
6. 依照权利要求 1 至 4 中任一项的方法,其中所述样品是血液样品,或者自血液样品可衍生的。
7. 依照权利要求 6 的方法,其中所述样品是血清样品。
8. 依照前述权利要求中任一项的方法,其还牵涉检测下列一项或多项:
 - (i) 在 5T4 外的癌症生物标志物 ;
 - (ii) 外来体标志物 ;和 / 或
 - (iii) 特定组织或细胞类型的标志物。
9. 依照权利要求 8 的方法,其牵涉检测一种或多种前列腺标志物。
10. 依照权利要求 9 的方法,其牵涉检测 PSA 和 / 或 PSMA。
11. 一种通过使用依照前述权利要求中任一项的检测方法来测定受试者中的给定癌症是否是 5T4 阳性癌症的方法,其中 5T4 的检出确认所述癌症是 5T4 阳性的。
12. 一种用于在受试者中治疗癌症的方法,其包括下列步骤:
 - (i) 通过依照权利要求 11 的方法来测定所述癌症是否是 5T4 阳性的 ;并
 - (ii) 对通过步骤 (i) 测试呈阳性的受试者施用基于 5T4 的治疗剂。
13. 一种用于测定给定受试者是否会适合于用基于 5T4 的治疗剂治疗的方法,其包括通过依照权利要求 1 至 10 中任一项的方法来检测所述受试者中的 5T4 阳性癌症的步骤。
14. 一种使用依照权利要求 1 至 10 中任一项的检测方法来监测 5T4 阳性癌症进展的方法,其包括比较在多个时间点时自受试者采集的样品中的外来体相关 5T4 的水平步骤,其中升高指明所述 5T4 阳性癌症的恶化,而降低指明改善。
15. 依照权利要求 14 的方法,其用于在治疗期间监测 5T4 阳性癌症的进展,其中在治疗期间的多个时间点时自受试者采集样品。
16. 依照权利要求 15 的方法,其中所述治疗包括施用基于 5T4 的治疗剂。
17. 一种用于在受试者中检测 5T4 阳性癌症的试剂盒,其包括:
 - (i) 外来体检测、收集和 / 或纯化系统 ;和
 - (ii) 针对 5T4 的检测系统。
18. 依照权利要求 17 的试剂盒,其中所述检测系统检测 5T4 肽、多肽或编码此类肽或多肽的核酸。
19. 依照权利要求 17 或 18 的试剂盒,其中所述检测系统还量化 5T4 的水平。
20. 依照权利要求 1 至 16 中任一项的方法,或依照权利要求 17 至 19 中任一项的试剂盒,其中使用下列一种或多种方法来检测 5T4 :
 - (i) 结合抗 5T4 抗体 ;

- (ii) 结合对 5T4 肽特异性的 T 细胞受体；
- (iii) 结合与编码 5T4 的核酸序列整个或部分的互补物显示高程度同一性的核酸序列；和
- (iv) 使用 5T4 特异性引物来扩增 5T4 核酸。

方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于在受试者中检测癌症,特别是 5T4 阳性癌症的方法。本发明还涉及此类方法用于诊断癌症和监测癌症的进展和 / 或治疗的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 前列腺癌 (PCa) 仍然是西半球最流行的男性癌症,2008 年预期在美国预计有 186,000 例新病例,和 28,000 例死亡 (American Cancer Society, Atlanta, Georgia 2008)。虽然在了解此疾病下的生物学方面及在其治疗的许多方面正在取得进展,但是仍需要用于 PCa 诊断和监测的更好的工具。

[0004] 本发明涉及一种用于检测癌症,诸如前列腺或膀胱癌的新的基于生物标志物的方法,其提供了一种用于早期疾病检测、用于鉴定适合于特定疗法的患者、和用于监测治疗 / 疾病进展的非侵入性技术。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明人令人惊讶地发现了癌症相关生物标志物 5T4 在来自癌症患者的外来体,诸如尿外来体中表达,而且是可检测的。

[0007] 5T4 的表达表现为在外来体中 / 上高于在正常细胞中 / 上。

[0008] 如此,在第一方面,本发明提供了一种用于在受试者中检测 5T4 阳性癌症的方法,其包括下列步骤:

[0009] (i) 鉴定来自所述受试者的样品中的外来体和 / 或自来自所述受试者的样品纯化外来体;并

[0010] (ii) 检测外来体相关 5T4。

[0011] 所述方法可以牵涉检测例如 5T4 肽、多肽或编码此类肽或多肽的核酸。

[0012] 5T4 阳性癌症可以是生殖泌尿道癌症,诸如前列腺或膀胱癌。

[0013] 样品可以是例如尿液样品、血液样品、或自其可衍生的样品,诸如血清样品。尿外来体中 5T4 的检测具有尿液样品非侵入性可获得的优点。或者,样品可以来自肺的胸腔积液,或组织样品。

[0014] 为了证实和 / 或量化结果,所述方法还可以牵涉检测下列一项或多项:

[0015] (i) 在 5T4 外的癌症生物标志物;

[0016] (ii) 外来体标志物;和 / 或

[0017] (iii) 特定组织或细胞类型的标志物。

[0018] 对于例如前列腺癌检测,所述方法可以牵涉检测一种或多种前列腺标志物,诸如 PSA、PSCA 和 / 或 PSMA。

[0019] 在第二方面,本发明提供了一种通过使用依照本发明的第一方面的检测方法来确定受试者中的给定癌症是否是 5T4 阳性癌症的方法,其中 5T4 的检出确认所述癌症是 5T4 阳性的。

[0020] 在第三方面,本发明提供了一种用于在受试者中治疗癌症的方法,其包括下列步骤:

- [0021] (i) 通过依照本发明的第二方面的方法来测定所述癌症是否是 5T4 阳性的 ;并
- [0022] (ii) 对通过步骤 (i) 测试呈阳性的受试者施用基于 5T4 的治疗剂
- [0023] 在第四方面,本发明提供了一种用于测定给定受试者是否会适合于用基于 5T4 的治疗剂治疗的方法,其包括通过依照本发明的第一方面的方法来检测所述受试者中的 5T4 阳性癌症的步骤。
- [0024] 在第五方面,本发明提供了一种使用依照本发明的第一方面的检测方法来监测 5T4 阳性癌症进展的方法,其包括比较在多个时间点时自受试者采集的样品中的外来体相关 5T4 的水平步骤,其中升高指明所述 5T4 阳性癌症的恶化,而降低指明改善。
- [0025] 本发明的第五方面的方法可以用于在治疗期间监测 5T4 阳性癌症的进展,其中在治疗期间的多个时间点时自受试者采集样品。
- [0026] 癌症治疗可以牵涉施用基于 5T4 识别或表达的治疗剂。
- [0027] 在第六方面,本发明提供了一种用于在受试者中检测 5T4 阳性癌症的试剂盒,其包括:
- [0028] (i) 外来体检测、收集和 / 或纯化系统 ;和
- [0029] (ii) 针对 5T4 的检测系统。
- [0030] 检测系统可以例如检测 5T4 肽、多肽或编码此类肽或多肽的核酸。检测系统还可以量化 5T4 的水平。
- [0031] 结合本发明,可以使用下列一种或多种方法来检测 5T4:
- [0032] (i) 结合抗 5T4 抗体 ;
- [0033] (ii) 结合对由 MHC 分子呈递的 5T4 肽特异性的 T 细胞受体 ;
- [0034] (iii) 结合与编码 5T4 的核酸序列整个或部分的互补物显示高程度同一性的核酸序列 ;和
- [0035] (iv) 使用 5T4 特异性引物来扩增 5T4 核酸。
- [0036] 附图简述
- [0037] 图 1 :尿液衍生外来体的纯化
- [0038] 将健康供体尿液进行外来体纯化,并在每个步骤,保留 10 μ l 样品以进行电泳分析 (4-20% 梯度聚丙烯酰胺凝胶,银染色) (A),表明有效除去主要的非外来体蛋白质条带诸如为约 80Kd 的,并在最终的外来体产物中显著富集多种多样的蛋白质种类 (A)。运行平行凝胶以进行免疫印迹分析,其使用如标示的针对典型外来体蛋白质的抗体进行 (B)。比较蔗糖垫法与 Pisitkun 等的更简单的方法,其中将细胞培养基 (C) 或新鲜尿液 (D) 以 17,000g 进行离心,接着以 200,000g 沉淀。对于蛋白质差异,使外来体 (来自蔗糖法) 和 200,000g 沉淀物标准化,并通过 Western 印迹对 2.5 μ g/ 孔分析如标示的标志物。
- [0039] 图 2 :量化健康供体和前列腺癌患者中的尿液衍生外来体
- [0040] 使用 BCA 蛋白质测定法来测量每份制备物中存在的外来体数量。在尿液样本体积方面校正数值,并以 ng 外来体 /ml 尿液表示。比较来自 10 名健康供体和 ADT₄ (4 周 ADT 后)、ADT₁₂ (3 个月的 ADT 后)、和 RT₂₀ (和 20 份放射疗法后) 时的 10 名经历标准疗法的 PCa 患者的制备物。工形线表示均值 +SE。显示了使用 Wilcoxon 配对检验得到的 *p < 0.5。
- [0041] 图 3 :表征由 LNCaP 前列腺癌细胞系生成的外来体。
- [0042] 将如标示的前列腺癌细胞系 (LNCaP 和 DU145) 在培养物中作为阳性对照前列腺癌

外来体的来源维持（用于随后的分析）。用如标示的一组抗体通过 SDS-PAGE (5 μ g/ 孔) 来分析全细胞溶胞物 (CL) 或外来体 (Exo)。

[0043] 图 4: 表征来自健康供体尿液的外来体

[0044] 6 名健康供体 (表 3 中详述) 提供了尿液样本, 并将外来体纯化。用 5 μ g 尿液衍生外来体 / 孔, 或用 5 μ g LNCaP 衍生外来体 (Exo) 或 5 μ g LNCaP 全细胞溶胞物 (CL) 进行 Western 印迹。用如标示的针对 PSA、TSG101、5T4、CD9 和 GAPDH 的抗体来探查印迹。

[0045] 图 5: 表征来自 PCa 患者的外来体

[0046] 用如标示的一组抗体将自 8 名 PCa 患者 (在 ADT₄、ADT₁₂ 或 RT₂₀ 时) 分离的尿外来体 (5 μ g/ 孔) 进行 Western 印迹分析。在每块凝胶上包括 LNCaP 的全细胞溶胞物 (CL) 或外来体 (Exo) (5 μ g/ 孔) 作为阳性对照。

[0047] 图 6: 患者的 Western 印迹数据的汇总

[0048] 图 7: 使用 Western 印迹、流式细胞术和电子显微术来表征 HT1376 衍生外来体

[0049] 使用如标示的一系列抗体通过 Western 印迹来比较细胞 (CL) 或外来体 (Exo) 溶胞物 (5 μ g/ 孔)。这表明外来体中数种蛋白质的相对富集。一些标志物诸如 gp96 是外来体所没有的, 这指明细胞碎片对制备物的污染可忽略 (这代表 3 次实验) (A)。通过流式细胞术来分析与胶乳珠偶联的外来体, 并且这揭示了四跨膜蛋白 (tetraspanin) 分子在外来体表面上的阳性表达。显示了中值荧光强度值 (MFI) (代表大于 5 次实验) (B)。在与胶乳珠偶联前用增加量的 FBS 有意污染纯化的外来体揭示了 CD9 的信号强度降低 (均值 \pm SEM, $n = 6$, $**p < 0.001$, 单因素 ANOVA 及 Tukey 氏后检验) (B 线图)。将以 70,000g 自细胞条件化培养基沉淀的材料铺于线性蔗糖梯度 (0.2 至 2.02M) 上, 并以 210,000g 超速离心 18 小时。通过折光测定法来分析所收集的级分以确定级分密度, 此后使用针对作为外来体标志物的 TSG101 的抗体通过 Western 印迹来分析。TSG101 以 1.1 和 1.2g/ml 之间的典型外来体密度漂浮 (代表 4 次实验) (C)。典型外来体制备物的透射电子显微照片, 其揭示了直径为 30 和 100nm 之间的异质小囊泡 (D)。

[0050] 图 8: 纳级 LC/MS 衍生的蛋白质鉴定针对来自 ExoCarta 和 GeneGO 的基因集的过度表示分析的汇总。

[0051] 为了便于与 Exocarta 基因集比较, 首先将我们的蛋白质列表转换成 EntrezGene 鉴定的基因列表, 之后使用超几何分布来进行 ORA。过滤结果以仅包括与基于 MS 的研究的比较, 及与报告 10 种或更多种匹配基因的那些比较。这表明我们的 MS 数据多么好地与来自规定细胞类型的外来体蛋白质谱比较, 其以在假检出率方面校正的对数 (p 值) 显示 (A)。对于鉴定的蛋白质列表, 使用 MetaCore 进行的 ORA 分析利用 SwissProt ID。为了清楚, 我们报告了组标题疾病生物标志 (B)、疾病 (C)、生物学过程 (D) 和细胞区室 (E) 之每项内含有的前 10 种过度表示的基因。虚线标示 $p = 0.05$, 因此这左侧的柱不是统计学显著的。

[0052] 图 9: 通过 Western 印迹和流式细胞术分析验证一些经 MS 鉴定的蛋白质

[0053] 通过 Western 印迹对通过标准蔗糖垫法纯化的 HT1376 外来体 (5-20 μ g/ 孔) 分析如标示的一系列经 MS 鉴定的蛋白质的表达 (A)。通过在线性蔗糖梯度 (0.2M 至 2.5M) 上离心来将自 HT1376 细胞条件化培养基获得的 70,000g 沉淀物进行分级。收集 15 个总级分, 并通过折光测定法来测量密度。此后, 将每个级分的 1/3 与胶乳珠偶联, 接着是对如标示的外来体表面表达的流式细胞术分析 (B)。平行地, 对于如标示的蛋白质, 将每个级分剩余的

2/3 进行 Western 印迹 (C)。数据揭示于公认的外来体密度范围 (1.12-1.2g/ml) 漂浮的蛋白质。(数据代表 2 次实验)。

[0054] 图 10 :使用 2DE 和 MS 来分析 HT1376 衍生外来体

[0055] 通过在 pH 3-10 非线性梯度上的 2DE 解析来自 HT1376 外来体的蛋白质提取物。通过银染色来显现蛋白质 (A)。随机选择 32 个点,切出凝胶栓,并在胰蛋白酶消化后回收肽。这些中,对 17 个点获得成功的鉴定 (在 A 中注释),并列出 MS 鉴定的详情 (B)。来自数据集的代表性 MS/MS 分析显示于 (C),肽来自整联蛋白 α -6,点 10。肽具有 1191.9 的前体质量,并加以注释以显示衍生的肽序列。

[0056] 图 11A 和 B :外来体表达表面 5T4,其通过微量板测定法检测。

[0057] 发明详述

[0058] 5T4

[0059] 本发明涉及一种用于在受试者中检测 5T4 阳性癌症的方法。

[0060] 5T4 是一种在肿瘤中广泛表达,但是在正常成体组织中具有高度限制性表达样式的 72kDa 跨膜糖蛋白 (参见表 1)。它表现为与结肠直肠和胃癌的转移强烈相关。人 5T4 的完整核酸序列是已知的 (Myers 等,1994J Biol Chem 169 :9319-24)。

[0061] 表 1

[0062]

人5T4的分布

肿瘤类型	5T4频率(%)
乳腺	84
卵巢	71
胃	74
结肠直肠	85

[0063]

[0064] 5T4 表达与许多癌症有关,所述癌症包括但不限于:间皮瘤、肾癌、前列腺癌、乳腺、卵巢、肺、宫颈、结肠直肠、肝、胃、胰腺、膀胱、子宫内膜、脑和食管癌。

[0065] 结合本发明,“5T4 阳性”癌症指与 5T4 表达有关的癌症:5T4 作为肿瘤相关抗原的癌症。

[0066] 特别地,5T4 的过表达与高转移潜力和预后较差的癌症有关,因此本发明的检测方法也可以作为预后指标使用。

[0067] 外来体

[0068] 外来体是在一些体液,诸如血清和尿液中找到的纳米大小 (40-100nm) 的小囊泡。外来体以细胞中的多泡体 (MVB) 的内部小囊泡起源。它们首先被描述为循环血细胞,诸如红血球和淋巴细胞的产物。在肾中,外来体通过 MVB 的外膜与顶端质膜的融合而释放入尿液中。

[0069] 使用串联质谱术对尿外来体的蛋白质组学分析揭示了来自每种面向尿空间的细胞类型的膜蛋白。另外,外来体的腔含有来自其起源细胞的胞质蛋白质和 mRNA,它们在外来体在 MVB 中形成时被带走。

[0070] 外来体可以基于其外来体标志物诸如肿瘤易感性基因 (TSG101)、水膜孔蛋白

2(AQP2)、神经元特异性烯醇化酶 (NES)、膜联蛋白 V、足萼蛋白 (PODXL) 和 CD9 的表达来检测和 / 或纯化。

[0071] 外来体分离

[0072] 可以通过本领域中已知的方法诸如超速离心 (Pisitkun 等 (2004) PNAS101 : 13368-13373) 或超滤 (Cheruvanky 等 (2007) Am. J. Physiol. Renal Physiol. 292 : F1657-F1661) 来分离或纯化外来体。还已知可能优于 (precede) 离心的牵涉连续流电泳和层析规程的方法 (Taylor 和 Gercel-Taylor (2005) Br J Cancer92 :305-311)。错流超滤也可以作为外来体纯化方法的一部分使用 (Lamparski 等 (2002) J Immunol. Methods 270 : 211-226)。

[0073] 也有可能通过在不分离或纯化外来体的情况中鉴定外来体 (并且如此检测外来体相关 5T4) 来实施本发明方法。例如, 可以例如通过免疫亲和捕捉来将外来体捕获至微量板上, 接着进行 5T4 检测。

[0074] 也有可能例如通过使用能够检测外来体和 5T4 两者的双功能分子或使用针对外来体和 / 或 5T4 的抗体的二色免疫荧光来检测液相中的外来体相关 5T4。

[0075] 5T4 检测方法

[0076] 本发明的检测方法可以牵涉检测 5T4 肽、多肽、或编码此类多肽的核酸。

[0077] 如本文中所使用的, 术语“多肽”指其中单体为氨基酸而且经由肽键或二硫键连接在一起的聚合物。“多肽”指全长天然存在的氨基酸链或其片段, 诸如多肽中在结合相互作用方面感兴趣的选定区。包含 5T4 片段的肽可以长至少 100、200、300 或 400 个氨基酸。全长人 5T4 的长度是 420 个氨基酸。

[0078] 如此, “肽”指作为全长 5T4 的一部分或片段的氨基酸序列, 其可以长约 8- 约 100 个氨基酸。

[0079] 肽可以是或者包含 5T4 的 T 细胞表位。

[0080] T 细胞表位是一种自蛋白质抗原可衍生的短肽。抗原呈递细胞能使抗原内在化, 并将其加工成能够结合 MHC 分子的短片段。肽结合 MHC 的特异性取决于肽与特定 MHC 分子的肽结合沟之间的特异性相互作用。

[0081] 结合 MHC I 类分子 (并由 CD8+T 细胞识别) 的肽通常长 6-15, 例如 8-12 个氨基酸。肽的氨基端胺基团与肽沟一端的不变位点接触, 而羧基端的羧酸根基团结合沟的另一端的不变位点。肽处于沿着沟延伸的构象, 在主链原子与沿沟排列的保守氨基酸侧链之间有进一步接触。通过肽主链中, 经常在脯氨酸或甘氨酸残基处的扭结来调节肽长度变化。

[0082] WO 03/068816 描述了 5T4 的多种 MHC I 类表位, 包括 PLADLSPFA、LHLEDNALKV、LEDNALKVLH、HLEDNALKV、LEDNELKVL 和 LADNALKV。

[0083] 结合 MHC II 类分子的肽通常长至少 10 个氨基酸, 例如 10-50、10-30 或 15-25 个氨基酸。这些肽处于沿着 MHC II 肽结合沟延伸的构象, 所述 MHC II 肽结合沟在两个末端均开放。肽主要通过主链原子与沿肽结合沟排列的保守残基的接触来保持到位。

[0084] WO 03/068815 描述了 5T4 的多种 MHC II 类表位, 包括 YRYEINADPRLTNLSSNSSDV 和 QTSYVFLGIVLALIGAIPLL。WO2006/120473 和 WO2008/059252 描述了 5T4 的其它肽表位。

[0085] 人 5T4 如由 Myers 等 (如上文) 所表征, 其序列在 GenBank 中以编号 Z29083 出现。对于兽医应用, 还考虑相关同系物。犬和猫 5T4 的序列记载于 WO01/36486 和 WO 02/38612。

[0086] 使用本发明的方法可检测的 5T4 肽可以包含抗体结合位点。Myers 等（如上文）描述了一种结合 5T4 核心蛋白的小鼠多克隆抗 5T4 抗血清。

[0087] 可以使用本领域中已知的任何方法来检测 5T4 多肽或肽，所述方法包括 ELISA、Western 印迹、FACS 分析、免疫沉淀、原位杂交和质谱术。

[0088] 抗 5T4 抗体是本领域中已知的。Myers 等（(1994) J. Biol. Chem. 269 :9319-9324）描述了一种小鼠多克隆抗 5T4 抗血清。新近，描述了抗 5T4 抗体 H8 (Boghaert 等 (2008) Int. J. Oncol. 32 :221-234)。

[0089] 结合 5T4 检测的术语“抗体”包括功能性抗体片段，诸如 Fab、F(ab)₂、Fv、scFv 和域抗体 (dAb) 及其融合物和模拟物，诸如 Affibody、DARPin、Anticalin、Avimer、和 Versabody。

[0090] WO 03/020763 和 WO 99/18129 概述了会适合于 5T4 检测的可溶性 T 细胞受体形式的设计和生成。

[0091] 如本文中所使用的，术语“核酸”指能够编码 5T4 肽或多肽，或者与能够编码 5T4 肽或多肽的序列互补的核苷酸序列，其可以是 DNA 或 RNA、单链或双链。

[0092] 先前描述的 Northern 分析已经表明了一种 2.5kb mRNA 与 5T4 表达有关 (Myers 等 (如上文))。

[0093] 编码 5T4 多肽的核酸序列可以是或包含能够编码全长蛋白质的 1260 个碱基部分。编码 5T4 片段的核酸序列可以长 300-1200 个碱基，例如 500-1000 个碱基。编码 5T4 肽的核酸序列可以长 24-500 个碱基，例如 50-300 个碱基。

[0094] 先前描述了用于扩增 5T4 核苷酸序列的引物 (Myers 等 (1994) 如上文)。

[0095] 可以使用与 5T4 核苷酸序列的互补物显示高程度同源性的探针来检测该序列。合适的探针可以是具有包含 10-50，例如 15-30 和或至少约 20 个连续碱基的核苷酸序列的单链 DNA 或 RNA，所述连续碱基与 5T4 编码序列的相等或更大数目的连续碱基相同（或互补）。作为探针选择的核酸序列应当具有足够的长度且足够明确，使得假阳性结果最小化。为了使假阳性最小化，探针可以基于很大程度上对于 5T4 而言独特的序列部分，即其与任何其它序列不显示高程度同一性。

[0096] 可以标记核酸探针以杂交后即行进行检测。例如，可以将探针放射性标记。标记 DNA 片段的优选方法是通过在随机引发反应中用 DNA 聚合酶的 Klenow 片段掺入 α 32P dATP，其是本领域中公知的。通常用经 γ 32P 标记的 ATP 和多核苷酸激酶对寡核苷酸进行末端标记。然而，也可以使用其它方法（例如非放射性）来标记片段或寡核苷酸，包括例如酶标记、用合适荧光团的荧光标记和生物素化。

[0097] 可以使用本领域中已知的任何方法来检测 5T4 核酸，包括 Northern 印迹、聚合酶链式反应 (PCR) 和定量 PCR。WO 02/18645 描述了用于检测 5T4RNA 的多种方法，包括通过逆转录酶 PCR 进行的体外扩增、连接酶链式反应、DNA 信号扩增、可扩增 RNA 报告物、Q-bate 复制、基于转录的扩增、基于核酸序列的等温扩增、自维持序列复制测定法、飞反 (boomerand) DNA 扩增、链置换活化、循环探针技术；接着通过诸如凝胶电泳、毛细管电泳、常规的酶联免疫吸附测定法 (ELISA)、使用特异性标记探针的核酸杂交、Southern 印迹分析、Northern 印迹分析、电化学发光、激光诱导的荧光、反向点印迹检测和高效液相层析等方法来检测。

[0098] 使用 Western 印迹，尚未在健康个体中检测出外来体 5T4 表达。其它检测方法可

以能够检测出痕量的 5T4。外来体 5T4 的表达在患有 5T4 相关癌症的个体中比在健康个体中可以大 10、50、100、500 或 1000 倍。

[0099] 本发明的方法可以牵涉与自健康个体采集的等同样品比较受试者中的外来体 5T4 的步骤。这可以牵涉相对于所述样品中的外来体数目标准化获得的数值。

[0100] 在 5T4 外,检测方法可以牵涉检测一种或多种其它生物标志物。

[0101] 这些别的生物标志物可以是例如癌症(或其特定类型)、外来体、或特定组织或细胞类型特征性的。

[0102] 基于 5T4 表达或识别的治疗剂

[0103] 已经描述了多种基于 5T4 识别的治疗剂,诸如刺孢霉素(calicheamycin)与抗 5T4 抗体的偶联物(Boghaert 等(2008)如上文)和识别 5T4 的 Fab 与超抗原葡萄球菌肠毒素 A 的融合物(Shaw 等(2007)Br. J. Cancer 26:567-574)的使用。

[0104] 也有可能通过在受试者中诱导和/或提高 5T4 表达来刺激在癌症疗法中有用的免疫应答。

[0105] 受试者

[0106] 在本发明的第一方面的方法中接受样品采集的受试者可以是哺乳动物受试者,诸如人。

[0107] 受试者可以是非妊娠哺乳动物。在妊娠期间,可以在母系循环中找到胎盘外来体,其可以表达 5T4(Taylor 等(2006)J. Immunol. 176:1534-1542)。为了避免肿瘤检测方法的复杂化,因此对于妊娠哺乳动物,可以有必要自检测系统除去胎盘外来体。此类除去可以是物理的,或概念的,由此自检测方法扣除胚胎外来体,例如通过使用胎盘标志物的负选择或使用与另一种组织(诸如具有与基于 5T4 的癌症有关的潜力的组织)有关的标志物的正选择来实现。

[0108] 试剂盒

[0109] 本发明的第六方面提供了一种用于在受试者中检测 5T4 阳性癌症的试剂盒,其包括:

[0110] (i) 外来体检测、收集和/或纯化系统;和

[0111] (ii) 针对 5T4 的检测系统。

[0112] 外来体检测、收集和/或纯化系统可以适合于与上文所提及的已知的超速离心或超滤系统一起使用。或者,外来体检测系统可以是适合于外来体捕捉的基片,诸如用针对外来体标志物的抗体包被的微量滴定板。

[0113] 检测系统可以适合于通过上文所提及的任一种方法来检测 5T4 肽、多肽或核酸。检测系统可以包含抗 5T4 抗体。

[0114] 试剂盒还可以包含关于使用外来体检测、收集或纯化系统和/或 5T4 检测系统的指令。

[0115] 本发明现在会以实施例的形式进一步描述,所述实施例意图用来帮助本领域普通技术人员实施本发明,而并不意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0116] 实施例 1:尿外来体的纯化

[0117] 使用设计用于自细胞培养上清液进行外来体纯化的标准化方法,并应用于作为外来体来源的新鲜尿液。凭借此方法,将外来体基于其浮力特征来分离 (Raposo 等 (1996) J. Exp. Med. 183 :1161-1172)。在整个纯化过程中在多个步骤对尿液蛋白质含量的分析揭示所述方法在消除主要的非外来体污染物 (图 1a) (诸如 80Kd 的条带) 同时显著浓缩携带整个分子量谱上的独特蛋白质全集的小囊泡 (图 1a) 方面是有效的。在平行凝胶上实施免疫印迹分析揭示仅在最终的外来体产物中检测出典型的外来体蛋白质 (图 1b)。

[0118] 还直接比较此方法与 Pisitkun 等 ((2004) PNAS 101 :13369-13373) 的方法,其使用细胞培养上清液 (图 1c) 或健康供体尿液 (图 1d) 作为来源材料进行。此后一种方法牵涉以 17,000g 使碎片沉淀,接着是上清液的 200,000g 旋转以沉淀外来体。我们的蔗糖法产生更富集外来体的沉淀物,其根据外来体标志物诸如 CD9、TSG101 和 LAMP-1 的强条带强度是明显的。重要的是,蔗糖法导致肿瘤相关抗原,在此情况中为 5T4 (图 1c) 的良好富集,指明与沉淀的沉降物相比在对外来体的分析方面有重要的优点。虽然在比较制备物中检测出许多标志物,但是这些处于较低水平。更强烈的钙联接蛋白 (一种非外来体表达标志物) 条带是一种在使用比较方法时较多非外来体污染物的直接指示物 (图 1c)。使用蔗糖垫法的相似优点是显而易见的,其使用新鲜尿液作为来源材料进行 (图 1d),显示了较高水平的外来体表达蛋白质,和降低的 TammHorsfall 蛋白 (THP) 污染。数据支持用于自新鲜尿液样本富集外来体的此方法;而且赋予与先前发表的尿液-外来体方案相比的一些优点。

[0119] 实施例 2 :PCa 治疗期间尿液-外来体数量变化

[0120] 测量每份制备物中存在的外来体数量,对其校正起始尿液体积,并在图 2 中显示了健康供体与患者组间比较的数值。与健康男性相比,前列腺癌患者平均具有高 1.2 倍的尿外来体水平 (在 ADT₄ 时) (图 2A)。健康供体 ($366.8 \pm 92.56, n = 10$, 均值 \pm SE) 和患者 ($443.2 \pm 109.7, n = 10$, ADT₄) 两者在外来体含量方面均有广泛的变化,因此此差异没有达到显著性。还在 3 个月的雄激素剥夺疗法 (ADT₁₂) ($224.9 \pm 82.7, n = 10$) 后,及在 20 份放射疗法 (RT₂₀) ($499.6 \pm 225.6, n = 9$) 后测量外来体水平。12 周激素治疗后平均外来体水平降低 2 倍,其中 10 名患者中的 8 名显示尿外来体数量的降低。就放射治疗而言,与 ADT₄ 或 ADT₁₂ 相比,没有显著性差异,因为 9 名患者中的 3 名表明外来体水平的进一步降低,同时 9 名中的 6 名具有正在升高的尿外来体水平。使用血清 PSA 水平作为前列腺癌后果的替代标志物,指明在 9/10 名患者中,ADT 和 RT 的标准疗法在肿瘤体积缩小方面是成功的。

[0121] 总之,不可能表明局部晚期 PCa 与尿液中存在的外来体数量的关联,而且血清 PSA 与尿外来体水平之间没有关联。然而,从目前的数据集看,有一些提示,即在 ADT₁₂ 时,存在的外来体量有降低。

[0122] 实施例 3 :前列腺癌细胞系生成在前列腺和癌症相关抗原方面呈阳性的典型外来体

[0123] 将 2 种充分表征的前列腺癌细胞系在培养物中作为 PCa 外来体的来源维持,并检查典型的外来体标志物 (例如四跨膜蛋白 CD9) 和一些已知的前列腺标志物 (PSA 和 PSMA) 的表达。通过免疫印迹将 LNCaP 细胞 (全细胞溶胞物) 与 LNCaP 外来体直接比较,揭示 PSA 和 PSMA 的阳性外来体表达。LNCaP 外来体还有清楚的 5T4 阳性外来体表达。与亲本细胞相比,外来体中特别富集 PSA 和 5T4 两者 (图 3A)。DU145 细胞系 (其不表达 PSA 或 PSMA) 充当对照,表明特异性染色。GAPDH 的染色显示各孔的相等加载。得出结论,自 PCa 细胞分离

的外来体表达来自其它细胞来源的外来体的典型分子及前列腺标志物和肿瘤相关抗原。因此,认为此简单的免疫印迹组适合于在随后的研究中分析尿外来体。

[0124] 实施例 4:健康供体尿外来体的表型

[0125] 自健康供体 (HD) 实施相似的尿外来体分析,并与 LNCaP 衍生外来体比较这些分子的表达水平。虽然与 LNCaP 标准品相比处于低水平,但是通过 Western 印迹在大多数 HD 样本中检测出诸如 TSG101 和 CD9 等标志物。不管供体的年龄如何,前列腺标志物 (PSA 和 PSMA) 不在任何健康供体样本中表达,这指明健康供体尿液中即使有也很少的外来体源自前列腺。在任何 HD 样本中都没有找到肿瘤抗原 5T4 (图 4)。

[0126] 总之,通过此方法检查自不同供体获得的尿外来体揭示样品间的外来体质量变化。在外来体质量为中等/良好(即与 LNCaP 外来体相当)的情况下,可以确认健康供体尿外来体在 PSA、PSMA 和 5T4 方面呈阴性。

[0127] 实施例 5:PCa 患者的尿外来体的表型,并评估随治疗的变化

[0128] 以相似的方式通过 Western 印迹检查 PCa 患者衍生的外来体。显示了来自 8 名个体患者的数据(图 5)。总体上,样品系列间有条带强度(具有多种标志物)的变化性,其中与 LNCaP 外来体相比在大多数情况中为弱染色。虽然弱,但是 24 份样品中的 20 份中有外来体标志物(诸如 CD9)呈阳性的证据。有患者分组间的变化,和来自个体的样品系列(ADT₄、ADT₁₂ 和 RT₂₀)内的变化。因为非常注意加载每孔 5 μg 样品,所以我们认为结果很有可能反映样品的可变外来体含量,而非样品加载的技术问题。

[0129] 先前不知道前列腺能将任何外来体贡献给总尿液外来体集合。在健康供体中,在前列腺标志物 PSA 或 PSMA 方面没有阳性染色,而且肿瘤标志物 5T4 也呈阴性。在患者分组中,PSA 在 8/20 份样本中是明显的,而 PSMA 存在于 9/20 份样本中(其中 20/24 份样本在一种或多种外来体标志物方面呈阳性;即可评估为外来体阳性)。5T4 染色在 14/20 份样品中显示阳性。共同地,这第一次表明,尿外来体表达前列腺和癌症相关标志物。

[0130] 一名特殊的患者(p8)在三个时间点之每个表明相当的外来体存在,和响应疗法的外来体 PSA 的清楚的丧失,在 ADT₄ 时显示强的 PSA 条带,其随治疗而减弱,在 RT₂₀ 时变得检测不到。然而,出乎意料地,即使在 20 份放射疗法后,5T4 仍然强烈表达,提示了这可以是一种用于评估对雄激素剥夺或放射疗法的效果不应的残留恶性细胞的存在候选标志物。图 6 中汇总了数据。

[0131] 用于实施例 1 至 5 的材料和方法

[0132] 前列腺癌患者和健康供体

[0133] 募集 10 名 PCa 患者(其参与局部 II 期临床试验)及 10 名健康男性志愿者。通过活组织检查确认患者在 PCa 方面呈阳性,并在表 2 中汇总了肿瘤阶段、Gleason 得分、血清 PSA 和年龄。患者接受 3-6 个月新辅助雄激素剥夺疗法(ADT),之后进行根治性放射疗法(RT),其由以 20 份向前列腺投递 55Gy 和以 20 份向骨盆结投递 44Gy 的单一阶段组成。依照临床需要,患者继续进行辅助 ADT。试验得到西南威尔士伦理委员会(South East Wales Ethics Committee)批准,而且自参与研究的患者和志愿者获得知情同意。

[0134] 表 3 中给出了自健康供体收集的尿液样本的详情。

[0135] 表 2:参与此研究的患者的详情

[0136]

患者	临床阶段 (均为N0)	Gleason 得分	年龄 (岁)	血清PSA ADT ₄ (ng/ml)	血清PSA ADT ₁₂ (ng/ml)	6个月时的 血清PSA (ng/ml)
1	T2b	7 (3+4)	66	10.5	2.10	1.2
2	T2b	7 (3+4)	62	134.0	0.20	<0.01
3	T2	8 (3+5)	70	8.3	1.40	<0.1
4†	n/d	7 (3+4)	65	83.2	83.40	†
5	T2c	7 (3+4)	69	95.2	4.10	<0.1
6	T2	8 (4+4)	70	10.8	0.10	<0.1
7	T3a	7 (3+4)	53	36.5	7.20	0.3
8	T3b	6 (3+3)	61	14.1	0.80	0
9	T2	7 (4+3)	66	21.1	0.20	<0.1
10	T2	8 (4+4)	71	28.1	1.3	n/d

[0137]

[0138] †患者死于放射治疗前的无关脑肿瘤。

[0139] n/d 未测定。

[0140] 表 3 : 自健康供体收集的尿液样本的详情

[0141]

健康供体	供体年龄	浸渍片 血液、蛋白质、葡萄糖、 酮、pH						样本 体积 (ml)	所回收的 外来体 (μg)	外来体 浓度 (ng/ml)	
1	29		0	0	0	0	7		180	9.8	54.4
2	37		0	1	0	0	7		180	115.2	640.0
3	37		0	1	0	0	7		180	32.3	179.4
4	63		2	0	0	0	5		180	55.4	307.8
5	61		0	1	0	0	7		180	154.7	859.4
6	50		0	1	0	0	7		180	8.7	48.3
7	49		0	0	0	0	6		150	61.2	408.0
8	55		0	1	0	0	6		180	37.2	206.7
9	56		0	0	4	0	7		145	28.5	196.6
10	57		0	1	0	0	8		170	130.3	766.5

[0142] 尿液样品收集

[0143] 将多至 200ml 体积的尿液样本收集入无菌塑料容器 (Millipore) 中,并在 30 分钟内带到实验室进行处理。在上午的中期至后期收集样品,并且这些不是第一次晨尿。对尿液测试血液、蛋白质、葡萄糖和酮,并测量 pH(通过 Combur⁵ Test[®] D₅浸渍片 (Roche) 进行),表 4 中呈现了结果。在三个时间点时收集 PCa 患者尿液:“ADT₄”(启动 ADT 后 0-4 周)、“ADT₁₂”(3 个月的 ADT 后)和“RT₂₀”(20 份放射疗法后)。在治疗期间的的时间间隔 (ADT₄、ADT₁₂ 和放射疗法后 4 周时),测量血清 PSA 水平。

[0144] 表 4:自 PCa 患者收集的尿液样本的详情

[0145]

患者	时间点	浸渍片 血液、蛋白质、葡萄糖、 酮、pH						样本 体积 (ml)	所回收的 总外来体 (μg)	外来体 浓度 (ng/ml)	
1	ADT ₄		1	1	0	0	7		90	72.9	810.0

[0146]

	ADT ₁₂	0	1	0	0	5	180	141.9	788.3
	RT ₂₀	0	0	0	0	7	180	19.6	109.3
2	ADT ₄	1	1	0	0	-	170	125.5	738.2
	ADT ₁₂	1	2	0	0	7	180	2.61	14.5
	RT ₂₀	0	0	0	0	5	90	39.2	435.7
3	ADT ₄	4	2	4	0	5	180	72.9	405.3
	ADT ₁₂	2	1	1	0	5	180	70.9	393.9
	RT ₂₀	0	1	1	0	5	60	8	133.3
4 †	ADT ₄	0	1	0	0	5	95	25.4	268.0
	ADT ₁₂	1	3	3	0	5	55	6.54	118.9
	RT ₂₀	-	-	-	-	-	-	-	-
5	ADT ₄	4	0	0	0	5	180	38.4	213.6
	ADT ₁₂	1	2	0	0	7	90	27.1	301.2
	RT ₂₀	1	1	0	0	6	150	5.1	34.5
6	ADT ₄	0	0	0	0	6	180	19.4	108.1
	ADT ₁₂	1	0	0	0	5	180	6.2	34.7
	RT ₂₀	1	1	0	0	5	120	9.1	76.1
7	ADT ₄	3	1	1	0	6	97	39	402.1
	ADT ₁₂	0	1	0	0	5	120	12.1	101.0
	RT ₂₀	1	1	0	0	5	45	17.7	395.1
8	ADT ₄	0	1	1	0	6	150	125.1	834.4
	ADT ₁₂	0	1	0	0	5	110	26	236.4
	RT ₂₀	1	3	0	0	7	60	34.4	574.0
9	ADT ₄	0	1	0	0	5	120	8.2	68.3
	ADT ₁₂	0	1	0	0	6	180	17	94.4
	RT ₂₀	2	3	4	0	6	60	133.1	2218.7
10	ADT ₄	0	1	0	0	5	120	19.4	162.3
	ADT ₁₂	0	0	0	0	7	180	11.4	63.4
	RT ₂₀	0	0	0	0	6	170	88.3	519.4

[0147] †患者 4 在 RT 前死亡

[0148] - 未记录, 或样品不可得

[0149] 外来体纯化

[0150] 将新鲜尿液进行连续离心,除去细胞(300g,10分钟),除去非细胞碎片(例如脱落物、晶体、膜碎片等)(2000g,15分钟,重复直至没有可见的沉淀物)。然后,将上清液铺在30%蔗糖/D2O垫上面,并以100,000g进行超速离心达2小时(SW32转子,Optima LE80K超速离心机,Beckman Coulter)。将垫收集,在至少7x体积PBS中稀释,并使用70Ti转子(Beckman Coulter)通过以100,000g持续2小时的再次超速离心步骤来使外来体沉淀。将外来体沉淀物在100-150ul PBS中重悬浮,并于-80℃冷冻。通过微量BCA蛋白质测定法(Pierce/Thermo Scientific)来测定每份沉淀物中存在的外来体量。

[0151] 细胞培养

[0152] 将LNCaP和DU145前列腺癌细胞系(来自ATCC)接种入生物反应器烧瓶(来自Integra)中,并以高密度培养物维持,用于外来体生产。生物反应器烧瓶每7天补料,其中保留条件化培养基以进行外来体纯化,如上文的。

[0153] 电泳和免疫印迹

[0154] 通过免疫印迹来比较细胞溶胞物与外来体。简言之,通过添加30%体积的6M尿素、50mM Tris-HCl、2% SDS和0.002% w/v 溴酚蓝来溶解相等数量的蛋白质(每孔5μg)。将样品电泳通过10%聚丙烯酰胺凝胶,并转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,其在PBS中的3% w/v 脱脂奶、0.05% v/v Tween-20(PBS-T)中封闭过夜。将一抗温育1小时,在PBS-T中5次清洗后,添加来自Santa Cruz的山羊抗小鼠Ig-HRP偶联物(为1:35,000稀释)达30分钟。在PBS-T中5次清洗后,使用ECL+系统(Amersham/GE healthcare)来检测条带。单克隆一抗包括小鼠抗人PSA(即一份来自Atilla Turkes博士,Cardiff and Vale NHS Trust,Cardiff的赠品)、抗TSG101、抗LAMP-1、抗HSP90、抗钙联接蛋白、抗CD81和抗PSMA(来自Santa Cruz Biotechnology)、抗GAPDH(来自BioChain Institute, Inc)、抗CD9(来自R&D Systems)。抗5T4是一份来自RHarrop博士(Oxford BioMedica UK Ltd)的赠品。山羊多克隆抗Tamm Horsfall蛋白(THP)来自Santa Cruz,并使用抗山羊HRP(Dako)来检测条带。使用Restore Plus™ Western印迹剥离缓冲液(Pierce/Thermo Scientific)来将膜剥离,封闭过夜,并再探查。

[0155] 检查外来体膜完整性

[0156] 为了调查尿液是否破坏外来体膜,将自B细胞系分离的外来体固定化至经抗MHC II类包被的Dynaal珠(Dynaal/Invitrogen)上。将外来体-珠复合物于37℃在25mM钙黄绿素-AM中温育过夜。将加载有钙黄绿素的外来体-珠复合物于室温暴露于多种盐溶液或新鲜尿液达1小时。运行Cell Quest软件(BD)通过流式细胞术(FACScan, BD)来分析荧光。将钙黄绿素荧光与平行管中的经抗I类(RPE)染色的外来体-珠的荧光比较;即测量外来体是否仍附着于珠表面。结果表示为钙黄绿素:I类荧光的比。

[0157] 检查尿液对外来体的蛋白水解破坏

[0158] 在存在或没有蛋白酶抑制剂(包括EDTA、胃酶抑素A、亮肽素和PMSF)的情况下用新鲜尿液处理自LNCaP细胞纯化的外来体。2小时或18小时后,通过Western印迹对样品检查CD9、PSA和TSG101表达。作为蛋白水解的阳性对照,用胰蛋白酶(Cambrex)处理外来体。

[0159] 实施例6:对膀胱癌外来体的蛋白质组学分析

[0160] 6.1 HT1376 外来体的表征

[0161] 培养的 HT1376 细胞（一种典型的且充分表征的移行细胞癌（TCC）系）是供此研究用的外来体来源。本发明人使用基于先前所限定的外来体浮选特征（Raposo 等（1996）如上文）来分开外来体与非外来体材料的先前开发的方法，其利用差速超速离心和 30% 蔗糖 /D20 垫上的浮选来进行，以自细胞条件化培养基分离外来体（Lamparski 等（2002）*Immuno Methods* 270, 211-226）及 Andre（2002）*Lancet* 360, 295-305）。将以此方式纯化的外来体进行数种形式的分析以评估样品质量 / 纯度，之后使用蛋白质组学工作流程来分析。首先，实施 Western 印迹以比较全细胞溶胞物与外来体，以检查预期的外来体标志物（依照描述其它外来体类型的发表报告）（Théry 等（2006）*Curr Protoc Cell Biol*, UNIT 3. 22）的表达，并与作为整体的亲本细胞相比，评估这些标志物的相对表达。如预期的，与细胞溶胞物相比，外来体制备物中强烈富集多泡体标志物 TSG101（图 7A）。

[0162] 另外，类似地富集许多其它分子，包括 MHC I 类、四跨膜蛋白 CD9、CD81、溶酶体蛋白 LAMP-1、和在某种程度上为 GAPDH。此类特征是由各种各样的细胞类型生成的外来体典型的（Théry 等（2006）如上文）。热休克蛋白 hsp90 不是外来体富集的，并且这是不在细胞应激条件下的细胞典型的（Mitchell 等（2008）*J. Immunol Methods* 335, 98-105, Clayton 等（2005）*J Cell Sci* 118. 3631-3638 及 Dai 等（2005）*Clin Cancer Res* 11, 7554-7563）。细胞角蛋白 18 的染色揭示细胞溶胞物中的强条带，但是在外来体中很少的条带或检测不到的条带。类似地，内质网驻留的 gp96 容易在细胞溶胞物中而非在外来体中检出，这指明外来体制备物中存在即使有也很少的污染性细胞碎片。还在与胶乳珠偶联后通过流式细胞术来检查外来体表面的表型（图 7B）。实施此流式细胞术以表明外来体表面上正确取向的蛋白质的表达。四跨膜蛋白是其选择标志物，因为其表达是来自多种细胞类型的外来体的一项得到良好证明的特征。分析显示对于此癌细胞系和其它癌细胞系（未公开的观察结果）而言典型的次序 $CD9 > CD81 > CD63$ 的四跨膜蛋白的非常强的表达（图 7B）。此外，此测定法还能突出显示制备物中的显著的污染性蛋白质的存在，其中污染物而非外来体会在偶联反应期间结合珠表面，随后产生外来体标志物（像 CD9）的低荧光信号（图 7B 线图）。用 FBS（我们的系统中的最有可能的污染物来源）有意地污染纯化的外来体揭示添加 0.01% FBS 足以将 CD9 特异性染色降低 30% 左右。认为染色低于 5000 个中值荧光单位的外来体制备物（对于 CD9 染色）是低质量，并且不被进一步利用。与典型的外来体分子谱的表达一样，还调查另一项重要的外来体特征；即其密度特征。将以 70,000xg 沉淀的 HT1376 外来体铺于线性蔗糖梯度上，并进行超速离心达 18 小时。收集 15 份级分，并且通过 Western 印迹进行的分析揭示漂浮于 1.1-1.19g/ml 左右的密度范围的 TSG101 的存在（图 7C）。此类分析表明 HT1376 细胞生成具有与对来自其它细胞类型的外来体所描述的密度（Raposo 等（1996）如上文）相似的典型密度的外来体。还使用与胶乳微珠测定法（上述）结合的此方法作为用于验证此手稿后面部分中的 MS 蛋白质鉴定的工具。还实施制备物的电子显微术（图 7D），揭示在与其作为外来体的定义一致的大小范围（30-100nm）内的纳米小囊泡结构。总之，数据指明 HT1376 膀胱癌细胞生成与其它细胞类型的外来体具有相似分子和生物物理特征的外来体，而且我们的来自此来源的外来体制备物具有高质量，并且具有低污染性细胞碎片或没有污染性细胞碎片。

[0163] 8.2 通过纳级 LC-MALDI TOF/TOF 鉴定外来体蛋白质

[0164] 为了获得外来体衍生的胰蛋白酶消化肽来进行纳级 LC, 本发明人修改了涵盖 1% (w/v) SDS 提取以溶解膜蛋白的标准方案型式 (Tan 等 (2008) *Proteomics* 8, 3924-3932)。此修改方案牵涉通过超速离心来沉淀先前制备的 HT1376 外来体, 并将此沉淀物在含有 1% (w/v) SDS 和 20mM DTT 的 TEAB 缓冲液中煮沸。添加本文包含的 DTT 以提高增溶作用。这之后还包括再次超速离心步骤 (以 118,000g 旋转 45 分钟) 以除去任何剩余的不溶性材料和 / 或聚集物。将上清液进行基于溶剂的沉淀法以除去 SDS、盐和脂质 (2D 清除, GEHealthcare)。通过蛋白质测定法来量化外来体蛋白质的所得沉淀物, 之后进行胰蛋白酶消化和纳级 LC。此方法导致 353 种蛋白质 (2 种肽或更多种) 的鉴定。表 6 中列出了鉴定结果的全组, 并且注意到仅仅报告了高置信度蛋白质鉴定结果 (两种或更多种具有高质量 MS/MS 数据的肽)。由于这些选择标准, 我们的 FDR 是 0%。与许多其它蛋白质组学实验室一样, 单个肽尚不报告鉴定结果, 虽然不可避免地, 这些中的一些分配会是有效的。探索纳级 LC/MS 鉴定结果揭示与外来体生物合成一致的数种蛋白质。例如, 存在泛素依赖性复合物 ESCRT (转运需要的内体分选复合物) 的成员, 包括空泡蛋白分选相关蛋白 28 同系物 (vps-28) 和空泡蛋白分选相关蛋白 4B (vps-4B)、泛素样修饰基因激活酶和泛素。这些鉴定结果提示所分析样品的多泡体起源。牵涉膜运输和融合过程的蛋白质也是明显的 (网格蛋白重链 1、Rab-11B、Rab-5A、Rab-6a、Rab-7a、Rab GDP 解离抑制物 β 、膜联蛋白 A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、膜联蛋白 A8 样蛋白和膜联蛋白 A11)。还存在内体 / 溶酶体的标志物 (含 EH 域蛋白 1 和 2、溶酶体膜蛋白 2、溶酶体相关膜蛋白 -2、三肽基肽酶 1、组织蛋白酶 -D、Sequestosome-1), 而且鉴定出具有蛋白伴侣功能的数种蛋白质 (hsp70、hsc70、hsp90、应激诱导的磷蛋白 1、T 复合物蛋白 1、内质蛋白)。还预期在外来体腔内找到胞质溶胶的成分, 即多泡体形成期间膜出芽过程的天然后果, 而且本文还找到多种多样的胞质酶 (甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、胞质溶胶氨肽酶、胞质乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶、烟酸磷酸核糖基转移酶) 和细胞骨架成分 (肌动蛋白、 α - 辅肌动蛋白 -4、细胞角蛋白、埃兹蛋白、微管蛋白、肌球蛋白)。多种多样的跨膜蛋白也是丰富的 (包括多种整联蛋白 (β 1、 β 4、 α 3、 α 6、 α v)、MHC 分子、CD9、EGF 受体、MUCIN-1、CD44、粘蛋白聚糖 -1) 和多种膜转运蛋白 (溶质载体家族 2 和 3、4F2 细胞表面抗原重链、胆碱转运蛋白样蛋白、钠 / 钾 -14 转运 ATP 酶亚基 β -3)。因此, 本文鉴定的蛋白质组与对外来体期望的蛋白质组广泛一致, 这与由调查来自其它细胞或生理学来源的外来体的其它研究人员突出显示的蛋白质组学鉴定结果相当 (图 8A) (Simpson 等 (2009) *Expert Rev Proteomics* 6, 267-283)。

[0165] 8. 3Exocarta 和基因本体论分析

[0166] 为了帮助解读整个蛋白质鉴定组, 对我们的 MS 数据进行简要的生物信息学分析, 首先比较鉴定结果与 Exocarta 数据库 (外来体的先前蛋白质组学研究的全集), 其次使用 GeneGO Metacore (第 5.4 版) 鉴定数据中的重要生物学主题。Exocarta 数据库整理了自外来体研究出版物提取的 EntrezGene ID 列表。应用使用超几何分布的过度表示分析 (ORA) 以探索是否有比可偶然期望的更多的与 Exocarta 基因集交叠的基因。本发明人将比较限于利用基于 MS 的蛋白质组学方法的研究, 及那些具有至少 10 个匹配 (Wubbolts 等 (2003) *J Biol Chem* 278, 10963-10972) 鉴定结果的, 而且 FDR 修正结果以作为多重检验的对照。包括发现的概要图 (图 8A)。结果指明此数据集为与外来体的其它研究一致。然而, 重要的是, 在比较我们的数据与自结肠直肠癌细胞分离的外来体时看到非常显著的数据匹配。因

此,与癌瘤相关的蛋白质必定在目前的数据集中表现较多;其含有能够区别新生物与非新生物上皮的蛋白质鉴定结果。还使用基因本体论和 GeneGO Metacore 内的专有安排基因集两者来实施相似的无偏过度代表分析,其中分别在四种种类,即疾病生物标志物、全身疾病、生物学过程和细胞区室下进行查询。对于疾病生物标志物,我们的数据指明最显著的关联是与膀胱癌;因此支持如下的前提,即外来体分析有可能是一种对于疾病特异性生物标志物鉴定有用的工具。其它生物标志物关联包括结肠和乳腺癌(图 8B)。相似地,检查全身疾病关联的查询揭示与胃肠道癌症、转移癌、呼吸道疾病(包括肺癌)和癌瘤有关的特征(图 8C)。虽然在前 40 个显著关联中存在与生殖泌尿道(包括膀胱新生物)的显著关系,但是令人惊讶的是,没有看到在前 10 个(显示的)内表现的泌尿道相关疾病。因此,此 ORA 分析揭示 HT1376 外来体表达一般与新生物疾病,而且特别地与癌瘤强烈相关的蛋白质(图 8B 和图 8C)。检查与此蛋白质组有关的生物学过程揭示与控制细胞骨架、细胞间粘附、基质粘附过程、和蛋白质折叠相关过程的显著关联(图 8D)。就细胞区室而言,蛋白质组与胞质内的膜性小囊泡、胞质和细胞骨架强烈相关。然而,顶部关联规定黑素体和色素颗粒区室(图 8E)。细胞核、内质网和线粒体不表现为显著相关的区室。总之,本文呈现的基于统计学的无偏分析表明与来自其它来源的外来体相似的膀胱癌外来体蛋白质组的方面,但是此外,强调特别牵涉癌瘤的蛋白质组。

[0167] 8.4 使用 2DE 来验证纳级 LC 方法

[0168] 本发明人为了选择用于 MS 鉴定的随机点而实施 2DE,而且以便确认这些蛋白质在主鉴定表(表 6)中的缺失/存在。虽然使用 100 μ g 左右的纯化的外来体来尝试此类凝胶,但是点挑选物含有太少的材料以致不能产生确信的蛋白质鉴定,其中小于 10%的尝试产生成功的鉴定。然而,使用每块凝胶 500 μ g 左右的外来体来放大此方法产生大于 53%的鉴定命中率。通过 MS 分析成功鉴定出中间染色强度(银染色)的 17 个点。这些包括整联蛋白 $\alpha 3$ 和 $\alpha 6$ 、凝溶胶蛋白、胞质酶 LDH 和 GAPDH、细胞骨架蛋白肌动蛋白和细胞角蛋白、埃兹蛋白等。还通过纳级 LC 法将来自此基于凝胶的方法的 21 种鉴定结果鉴定出 19 种,表明这些用于解析外来体蛋白质/肽的不同方法之间卓越的一致性(90%)(图 10 中汇总了数据)。

[0169] 8.5 所鉴定蛋白质的验证:反常的 MHC I 类鉴定结果

[0170] 如同任何此类蛋白质组数据集一样,重要的是,对列表手工评估任何出乎意料的或不可解释的 MS 鉴定结果,并怀疑数据中发现的任何反常的有效性。在目前的分析中,纳级 LC/MS 数据含有 16 种 HLA 分子的多个鉴定结果,其通过了我们的质量标准(期望值小于 0.05,和基于超过一个肽的 ID)。然而,这些鉴定结果在生理学上是不可能的。这些包括 5 种 HLA-B 等位基因和 5 种 HLA-C 等位基因(表 5)。这点的解释可以包括来源细胞系被来自不同供体的其它细胞污染、研究人员对样本的疏忽污染、或与 MASCOT 如何基于自 MS 产生的肽序列指派 HLA 单元型命名有关的问题。为了解决这些可能性,采用临床诊断服务(Welsh Blood Service, Llantrisant, Wales, UK)来为研究人员和 HT1376 细胞系测定单元型。研究人员没有与 MS 表中的 HLA 等位基因对应的 HLA 等位基因,同时 HT1376 测定的单元型为 HLA-A*24 ;B*15(62) ;Cw*03(9),因此确认是均质细胞系。这引导我们更为详细地检查所获得的肽序列,并评估这些如何通过 MASCOT 归入给定的 HLA 命名(表 5)。显而易见的是,已经将数种肽序列归入多种 HLA 类型。例如,将序列 FDSAASPR 指派至 HLA-B15、

B52、B54、B59 及 HLA-C01、C12、C17 和 C03。然而,比较而言,有仅以单一指派出现的一些肽。将这些独特的序列归入 HLA-A24 (APWIEQEGPEYWDEETGK、AYLEGTCDVGLR 和 WEAHVAEQQR)、HLA-C03 (GEPHFIAVGYVDDTQFVR) 和 HLA-G (APWVEQEGPEYWEETR、FIAMGYVDDTQFVR 和 THVTHHPVFDYEATLR)。虽然在鉴定的 HLA-B 亚型中,HLA-B15 分配最大数目的肽,但是对于任何 HLA-B 等位基因而言没有独特的肽。总之,推荐对指派为 MHC I 类鉴定结果的肽进行手工分析以澄清源自此类 MASCOT 结果的潜在混淆。

[0171] 8.6 所鉴定蛋白质的外来体表达的验证

[0172] 通过其它技术来鉴定样品中的蛋白质存在以确定一些经 MS 鉴定的蛋白质的有效性也是重要的。凭借多达 353 种蛋白质的列表,不可能大批进行这点,因此本发明人将此验证限于一组可具有生物学兴趣的蛋白质。实施一系列的 Western 印迹板,分析每孔多达 20 μ g HT1376 外来体,以确定一些经 MS 鉴定的蛋白质在我们的外来体制备物中是否可检出。本发明人在作为我们选择的多泡体(因此为外来体)标志物的 TSG101 方面染色,所述 TSG101 是一种通过 MS 仅根据单一肽序列偶然检出,并且因此按此基础自我们的数据排除的蛋白质。通过 MS 在样品中检测出溶酶体相关膜蛋白-2(LAMP2),即一种预期存在于外来体中的分子,并在本文通过 Western 印迹确认为强阳性(图 8A)。在 MS 鉴定结果中的是许多细胞角蛋白鉴定结果(I 型细胞骨架角蛋白 1、7、13、14、16、17、18、19)。虽然在其它外来体蛋白质组学研究中找到,将此类细胞骨架成分加载入外来体中是一个尚未特别突出显示为外来体的生物学特征的方面。本发明人已经确认制备物中的细胞角蛋白 17 和细胞角蛋白 18 的表达,揭示外来体细胞角蛋白 17 的丰富表达。然而,细胞角蛋白 18 仅在每孔 20 μ g 外来体的情况中可检测,提示外来体真正确实表达多种细胞骨架成分,而且纳级 LC/MS 方法灵敏得足以检测出难以通过传统的 Western 印迹法揭示的分子诸如 CK18。由于围绕 MHC 鉴定结果的反常问题,重要的是,测定 HLA-G 是否实际上由 HT1376 外来体表达,因为这不包括在 HT1376 细胞的 PCR 单元型分析中。本文通过 Western 印迹明确地确认 HLA-G 呈阳性。确认在癌症生物学的各个不同方面具有已证明的关联的其它膜相关(半乳凝素-3、Basigin 和 CD73)或可溶性(hnRNPK、 β -联蛋白)分子由 HT1376 外来体阳性表达。虽然本文所使用的标准外来体纯化方法是有力的,但是仍有可能的是,一些非外来体污染性物质存在于制备物中,而且这些中的一些 MS 鉴定结果不是真正地外来体表达蛋白。为了尝试并解决此问题,自 HT1376 细胞条件化培养基实施线性蔗糖梯度制备,以测定所鉴定蛋白质在外来体密度处漂浮的性能。将 15 份所收集级分之每份分开,1/3 用于通过(经外来体包被的珠的)流式细胞术进行分析,而 2/3 用于 Western 印迹。前一种方法会揭示外来体表面上的候选蛋白质的可能的表达,而溶解外来体以进行 Western 印迹会让表面和腔内的成分得到揭示。在流式细胞术测定法中,通过在四跨膜蛋白 CD9 和 CD81 方面及在 MHC I 类(已知其在 HT1376 外来体的表面上表达)方面的强染色来鉴定含有外来体的级分,揭示于 1.12g/ml 密度的清楚的(和主要的)峰(图 9B),所述密度在期望的外来体密度内(图 7C)。因此,含有大多数外来体的此级分还揭示在经 MS 鉴定的蛋白质 β 1 和 α 6 整联蛋白、CD36、CD44、CD73、CD10、MUC1、滋养层糖蛋白(5T4)和 Basigin 方面的阳性表面染色。还用钙联接蛋白特异性抗体对相同级分染色,揭示主要在比含有外来体的级分大的密度的低水平表达,突出显示在所测试的其它标志物方面的阳性染色的特异性,而且显示含有外来体的级分中的此蛋白质的缺乏,如预期的(图 8B)。为了在 Western 印迹板中揭示相关级分,本发

明人在 TSG101 方面染色,这突出显示 1.12-1.2g/ml 的密度为含有外来体的。在高密度级分(大于 1.2g/ml)上有一些阳性染色,但是这相对较弱,而且可能是由于外来体或蛋白质聚集体。蛋白质 5T4、CD44、Basigin、半乳凝素-3 和 β - 联蛋白均共定位于相同密度范围,这与其外来体表达一致。数据显示此研究中实现的 MS 鉴定结果由 HT1376 外来体表达,而且已经将膜相关分子(其经常难以溶解并通过 MS 方法鉴定)成功鉴定并验证为位于外来体膜。

[0173] 总之,本发明人已经使用高纯度外来体制备物、严格的样本质量控制、严格的 MS 标准和实质验证来实现膀胱癌细胞衍生的外来体的第一次高质量蛋白质组描述。最终可以使用此系统集合的信息来用基于尿外来体的完全非侵入性技术替换目前在诊断和监测此疾病中利用的高度侵入性规程。

[0174] 用于实施例 6 的材料和方法

[0175] 细胞培养:HT1376 是一种源自膀胱原发性移行细胞癌(TCC)(T2 期,G4 级)的细胞系(Gardner 等(1997) *J Natl Cancer Inst* 58,881-890)。这些细胞作为此项研究的外来体来源使用,因为它们先前已经得到广泛表征,而且良好地代表 TCC 的行为和表型(Gardner 等(1997) 如上文;及 Masters 等 1986 *Cancer Res* 46,3630-3636)。将细胞在补充有 pen/strep 和 5% FBS(通过以 100,000g 的过夜超速离心,接着过滤流过 0.2 μ m,然后是 0.1 μ m 真空滤器,Millipore 来对其消减外来体)的 DMEM 中维持。将细胞接种入生物反应器烧瓶(来自 Integra)中,并以高密度培养物维持以进行外来体生成,如描述的(Mitchell 等 *Immuno Methods* 335,98-105)。通过每月筛选(mycoalert,Lonza)来确认细胞在枝原体污染方面呈阴性。

[0176] 外来体纯化:将细胞培养液进行连续离心,除去细胞(300g,10 分钟),除去细胞碎片(2000g,15 分钟)。然后,以 10,000g 将上清液离心 30 分钟,并保留上清液。将其铺在 30%蔗糖/D20 垫上面,并以 100,000g 进行超速离心达 2 小时。收集垫,并将外来体在 PBS 中清洗,如描述的(Lamparski 等(2002) *Immunol Methods*,270,211-226;Andre 等(2002) *Lancet* 360,295-305;及 Clayton 等(2007) *Cancer Res* 67,7458-7466)。将外来体沉淀物在 100-150 μ l PBS 中重悬,并于 -80 $^{\circ}$ C 冷冻。通过微量 BCA 蛋白质测定法(Pierce/Thermo Scientific)来测定外来体数量。实施制备物的透射电子显微术,如描述的(Clayton 等(2007) 如上文)。

[0177] 外来体密度的测定:为了量化由 HT1376 所生成的外来体的密度,使用与先前所描述的方案相似的方案,其基于线性蔗糖梯度上的超速离心进行(Raposo 等(1996) *J. Exp. Med.* 183,1161-1172 及 Théry 等(2006) *Curr Protoc Cell Biol*, UNIT 3.22)。简言之,将细胞培养上清液进行差速离心,并将 70,000g 的沉淀物铺于线性蔗糖梯度(0.2M 直至 2.5M 蔗糖)上。使用 Optima-Max 超速离心机(Beckman Coulter)在 MLS-50 转子中将样本于 4 $^{\circ}$ C 以 210,000g 离心过夜。使用自动折光计(J57WR-SV,Rudolph Scientific)来测量(于 20 $^{\circ}$ C)所收集级分的折射率,并从这点出发,计算密度,如所描述的(Raposo 等(1996) 如上文)。通过以 150,000g 超速离心(在 TLA-110 转子中,Optima-Max 超速离心机)将级分在缓冲液(PBS 或 MES 缓冲液;下文所讨论的)中清洗,并将沉淀物在 MES 缓冲液中重悬浮以与微珠偶联,或者在 SDS 样品缓冲液中重悬浮以通过 Western 印迹进行分析。

[0178] 对经外来体包被的珠的流式细胞术分析:将 1 微克纯化的外来体与 1 μ l 胶乳珠

(无表面活性剂, 醛-硫酸酯 $3.9 \mu\text{m}$ 珠, Interfacial Dynamics, Oregon) 一起温育, 所述胶乳珠已经在 MES 缓冲液 (0.025M MES、0.154M NaCl, pH6) 中清洗两次。对于对蔗糖梯度级分的分析, 将 30% 每份级分与 $0.5 \mu\text{l}$ 储用珠偶联。将外来体-珠在终体积 $100 \mu\text{l}$ MES 缓冲液中于 RT 在摇动平台上温育 1 小时, 此后于 4°C 滚动过夜。通过与 1% BSA/MES 缓冲液一起于 RT 温育 2 小时来封闭珠。洗去封闭缓冲液, 并将珠在 0.1% BSA/MES 缓冲液中重悬浮。将一抗于 4°C 添加 (以 $2\text{--}10 \mu\text{g/ml}$) 1 小时。一次清洗后, 添加 0.1% BSA/MES 缓冲液中的山羊抗小鼠偶联有 Alexa-488 的抗体 (以 1 : 200, Invitrogen) 达 1 小时。清洗后, 使用配置有高通量取样模块的 FACSCanto 仪运行 FACSDiva v6.1.2 软件 (Becton Dickinson) 通过流式细胞术来分析珠。

[0179] 1D 电泳和免疫印迹 : 通过免疫印迹来比较细胞溶胞物与外来体溶胞物, 如描述的 (Clayton 等 (2003) Eur. J. Immunol 33, 552-531), 其中通过添加 30% 体积的 6M 尿素、50mM Tris-HCl、2% SDS、20mM DTT 和 0.002% w/v 溴酚蓝来溶解蛋白质 (每孔多至 $20 \mu\text{g}$)。将样品电泳通过 4-12% Bis-Tris 凝胶 (Invitrogen), 并转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 将其封闭, 并使用 Qdot® 系统 (Invitrogen) 用抗体探查。使用 MiniBIS Pro 成像系统 (DNR Bio-Imaging Systems) 来显现条带。对 TSG101、LAMP-1、HSP90、钙联接蛋白、HLA-G、半乳糖凝集素-3、Basigin、hnRNPK、细胞角蛋白 18 和 17 及 CD44 特异的单克隆一抗来自 Santa Cruz Biotechnology。抗 GAPDH (来自 BioChain Institute, Inc)、抗 CD9 (来自 R&D Systems)、和抗 CD81 (来自 Serotec)。抗 5T4 是来自 R Harrop 博士 (Oxford BioMedica UK Ltd) 的赠品。

[0180] 2D 电泳和 MS : 使用标准的 2DE 方案, 采用基于凝胶的方法来检查外来体蛋白质谱。简言之, 将外来体 ($750 \mu\text{g}$) 于室温在 $150 \mu\text{l}$ 裂解缓冲液 (7M 尿素、2M 硫脲、20mM DTT、4% (w/v) CHAPS、0.005% (w/v) 溴酚蓝和 0.5% (v/v) 固定化的 pH 梯度 (IPG) 缓冲液 pH 3-10NL (GE Healthcare)) 中溶解 1 小时。然后, 使用 2D 清除试剂盒 (GE Healthcare) 将提取的蛋白质进行溶剂沉淀, 之后将沉淀物在裂解缓冲液中重悬浮。使用 18cm pH 3-10NL IPG 再水合条、Ettan IPGphor III IEF 系统 (GE Healthcare) 和推荐的电压来实施样品的等电聚焦。随后, 将 IPG 条在含有 1% (w/v) DTT 的平衡缓冲液 (50mM Tris-HCl pH8.8、6M 尿素、2% (w/v) SDS、30% (v/v) 甘油、0.002% (w/v) 溴酚蓝) 中平衡 15 分钟, 接着在含有 2.5% (w/v) 碘乙酰胺的平衡缓冲液中平衡 15 分钟。使用 Ettan™ DALTsix 系统 (GE Healthcare) 将经平衡的 IPG 条进行第二维分离。实施银染色, 并切割随机选定的凝胶点, 将其进行胰蛋白酶消化和 MALDI-TOF/TOF 质谱术分析, 如先前所描述的 (Brennan 等 (2009) Proteomics-Clin Apps 3, 359-369)。所采用的数据库搜索设置与对 LC-MALDI 蛋白质鉴定所描述的不同, 只是使用 50ppm 的前体质量容差。

[0181] 为纳级 LC 制备外来体衍生的肽 : 将 HT1376 衍生的外来体制备物于 4°C 在 TLA-110 转子, Optima-Max 超速离心机 (Beckman Coulter) 中以 118,000g 再沉淀 45 分钟。将沉淀物在 $100 \mu\text{l}$ 含有 20mM DTT 和 1% (w/v) SDS 的三乙基碳酸氢铵 (TEAB) 裂解缓冲液 (20mM TEAB) 中于 RT 溶解 10 分钟, 接着于 95°C 达 10 分钟, 并于 RT 再留 10 分钟。将样品再进行超速离心步骤 (于室温, 118,000g 达 45 分钟), 并将上清液 (现在没有不溶性材料) 进行溶剂沉淀以除去盐、脂质和去污剂 (使用 2D 除去, GE Healthcare)。将沉淀物在 20mM TEAB 中重悬浮, 并于 4°C 留下过夜。然后, 使用 BCA 蛋白质测定试剂盒 (Sigma) 来测定蛋白质含

量。然后,将样品还原,变性,并使用 Applied Biosystems iTRAQ 标记试剂盒和标准的方案来烷基化。用每份样品 0.8 μ g 胰蛋白酶将蛋白质进行消化,并于 37°C 温育 12 至 16 小时。然后,将样品干燥,并在具有 0.1% (v/v) TFA 的水中重悬浮。

[0182] LC-MALDI 和蛋白质鉴定:使用二维盐栓法来将经消化的肽在纳级 LC 系统 (UltiMate 3000, Dionex, Sunnyvale, USA) 上分离,如先前所描述的 (Brennan 等 (2009) Proteomics-Clin Apps 3,359-369)。使用 Applied Biosystems 4800MALDI TOF/TOF 质谱仪来实施质谱术,如记载于 Brennan 等 (2009) 的。使用嵌入 GPS Explorer 软件 v3.6Build 327 (Applied Biosystems) (缺省 GPS 参数,容许 1 处误切割、固定的对 MMTS 的修饰 (C)、可变的对氧化的修饰 (M)、pyro-glu (N 端 E) 和 pyro-glu (N 端 Q)、MS 中的 150ppm 质量容差和对于 MS/MS 的 0.3Da 质量容差) 的 MASCOT 数据库搜索引擎 v2.1.04 (Matrix Science Ltd, London, UK),使用 MS/MS 数据来搜索 Swiss-Prot 数据库 (第 57.1 版;发布日期 2009 年 4 月 14 日;462764 种序列;人分类学)。为了使蛋白质被鉴定,需要有最少两个具有小于 0.05 的 MASCOT 值的肽。有 0% 的假发现率 (FDR),其是使用相同 SwissProt 数据库及整个随机化的序列测得的。用两个生物学重复来实施分析,每个包括技术重复。

[0183] MS 数据分析:在针对限定列表的任何生物学富集方面使用 Metacore GeneGO (5.4 版) 分析所得的蛋白质列表,并且其来自选定的 ExoCarta 提交 (含有 10 或更多种匹配基因标识符的基于 MS 的数据)。对于使用 Exocarta 基因集的分析,使用 BioMart 将我们的蛋白质列表从 SwissProt 登录转换成 EntezGene ID,之后使用 R 中的超几何分布针对所有人基因的背景用 EntrezGene ID 进行过度代表分析 (ORA)。对于 MetaCore 中的 ORA,首先将数据转换成 SwissProtID (使用 BioMart 进行),之后再次使用超几何检验来分析。

[0184] 实施例 7:通过 ELISA 来检测外来体的 5T4 表达

[0185] 将捕捉抗体 CD9 ((克隆 209306-IgG2b) 纯化的小鼠抗人 (无载体蛋白) 抗体 (R&D Systems, US)) 在 dPBS (Lonza, UK) 中稀释至工作浓度 10 μ g/ml,并将 100 μ l 添加至要使用的每孔 (1 μ g/孔)。将捕捉抗体在 ELISA 板 (96 孔平底的、F 剥离的、高结合 ELISA 板 (Greiner bio9-oine Ltd, UK)) 上于 4°C 温育 18 小时。然后,用 300 μ l/孔 DELFIA™ (Perkin Elmer) 清洗溶液将平板孔清洗三次。

[0186] 为了封闭非特异性结合,将试剂稀释剂 (10x 浓缩物 2 (10% BSA) (R&D Systems, US)) 在 dPBS (10%) 中稀释 10 倍以生成 1% BSA。然后,将 300 μ l 添加至要封闭的每孔,并于室温温育 2 小时。然后,用 300 μ l/孔 DELFIA 清洗溶液将平板孔清洗三次。

[0187] 为了捕获外来体,将 100-200 μ l 含有外来体的样品 (诸如生物学流体或细胞条件培养基) 添加至每孔,并于室温温育 2 小时。用 300 μ l/孔 DELFIA 清洗溶液将平板孔清洗三次。

[0188] 可以如下用 5T4 抗体 (5T4 (克隆 H8):偶联有生物素的抗体 (Oxford BioMedica, Oxford UK)) 实施检测,即将 5T4 抗体在 DELFIA 测定缓冲液中稀释至工作浓度 0.1 μ g/ml,将 100 μ l 添加至每孔以进行检测 (0.01 μ g 或 10ng/孔),于室温温育 2 小时,然后用 300 μ l/孔 DELFIA 清洗溶液清洗平板孔。

[0189] 可以如下对 5T4-生物素抗体进行钕-链霉亲合素标记,即将钕-链霉亲合素在 DELFIA 测定缓冲液中稀释 1/1000,将 100 μ l 添加至每孔,于室温温育 45 分钟,并用 300 μ l/孔 DELFIA 清洗溶液将平板孔清洗六次。

[0190] 如下获得信号,即将 100 μ l DELFIA 增强溶液添加至每孔,于室温在混合的情况下温育 5 分钟,并在 Wallac Victor 2 多标记物计数器读板仪 (Perkin Elmer) 上读板。图 11 中显示了结果。

[0191] 通过提及而将上述说明书中所提及的所有出版物收入本文。本发明所描述的方法和系统的各种修饰和变型在不背离本发明的范围和精神的的前提下对于本领域技术人员会是显而易见的。虽然已经结合具体的优选实施方案描述了本发明,但是应当理解,如要求保护的发明不应过度限于此类具体的实施方案。实际上,对于使用流式细胞术进行细胞研究或相关领域的技术人员显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修饰意图在所附权利要求书的范围内。

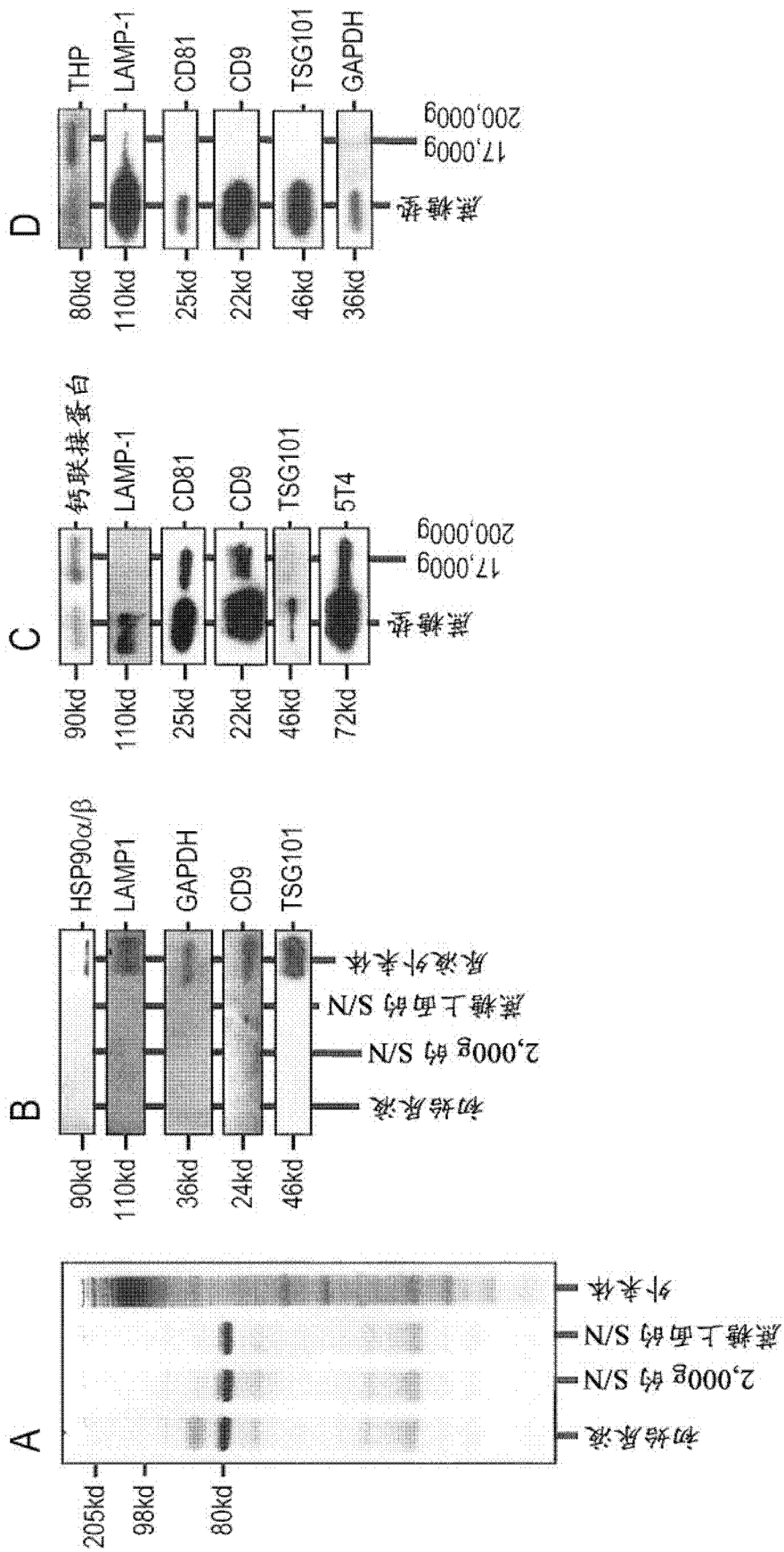


图 1

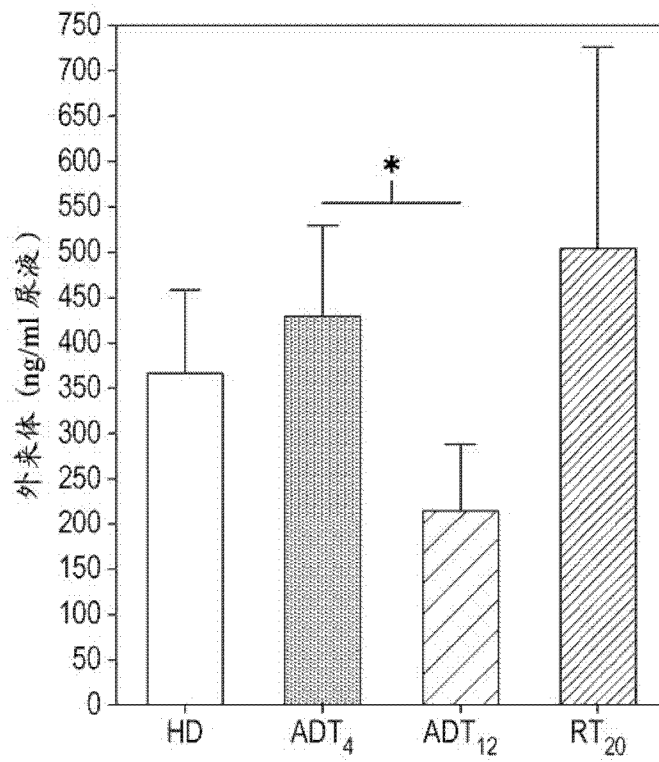


图 2

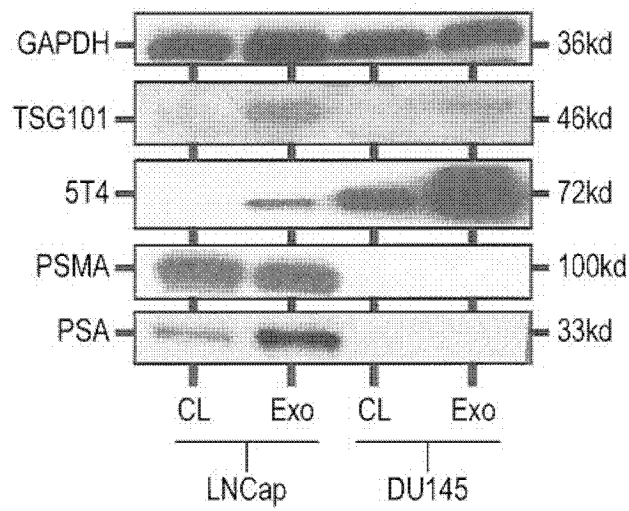


图 3

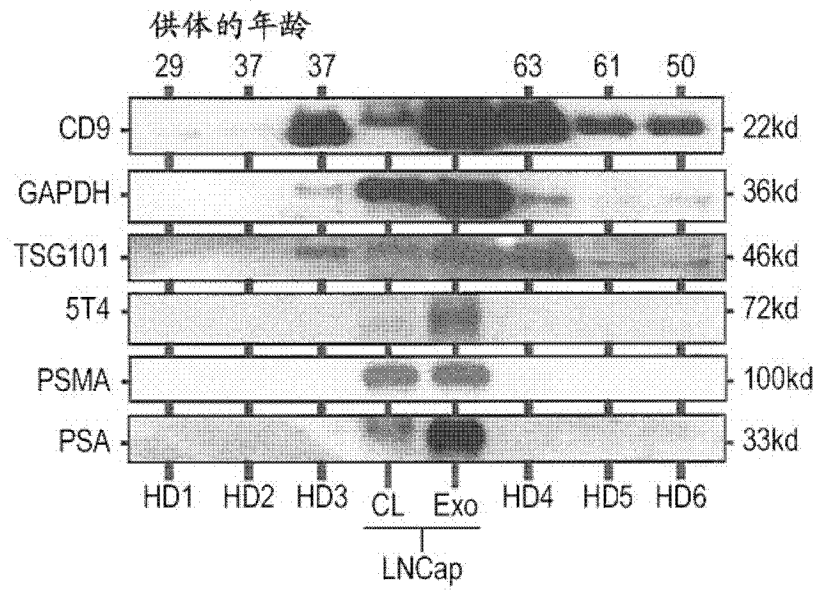


图 4

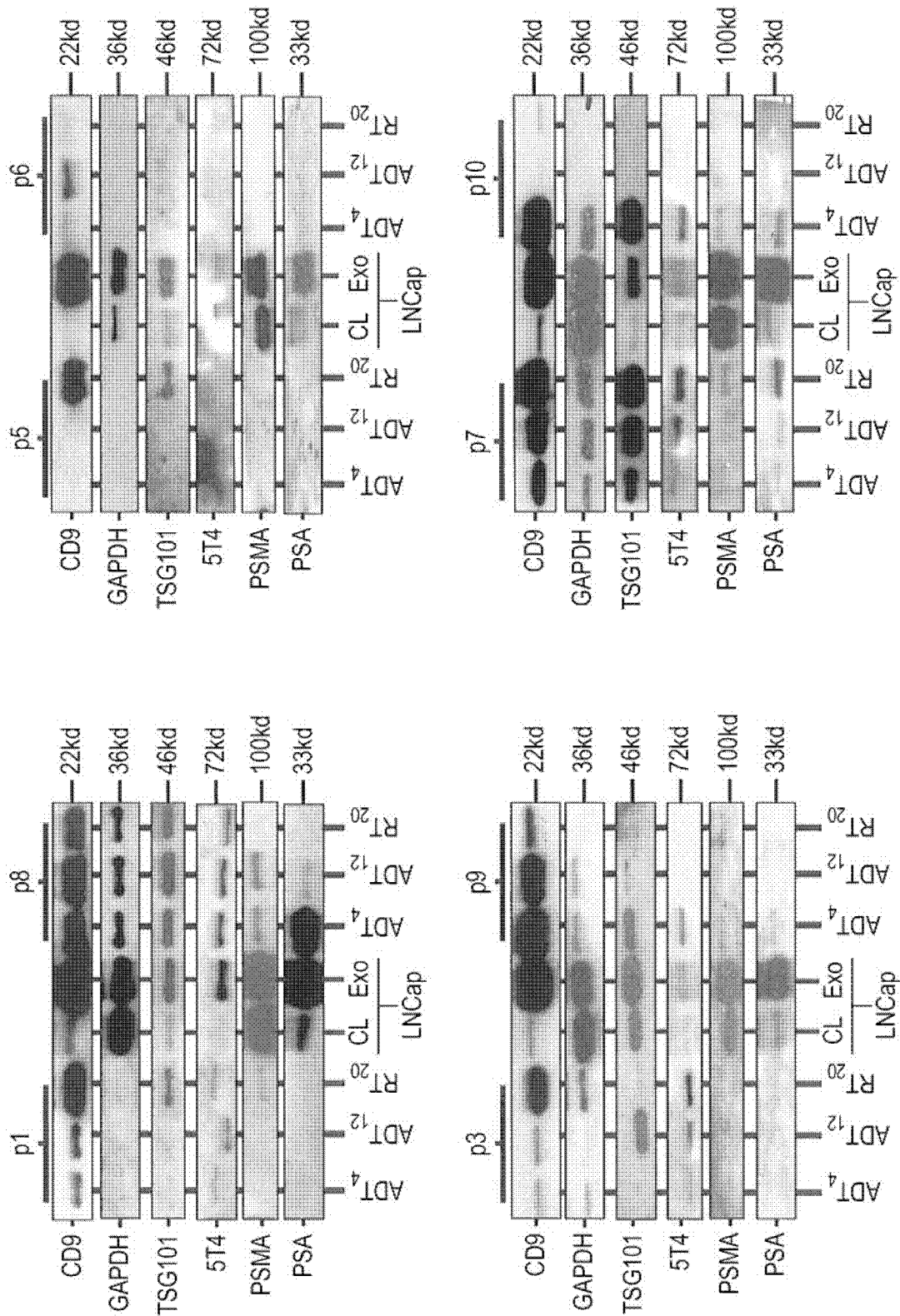


图 5

患者	时间	外来体标志物				癌症标志物	前列腺标志物		汇总
		CD9	GAPDH	TSG101	5T4		PSMA	PSA	
LNCap	N/A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	汇总 比较“标准”样品
p8	ADT ₄	+++	++	++	++	++	++	+++	一致的、高质量外来体。 前列腺标志物随治疗而减少。 5T4在RT ₂₀ 时仍是明显的。
	ADT ₁₂	+++	++	++	++	++	++	++	
	RT ₂₀	+++	++	++	+	-	-	-	
p7	ADT ₄	++	+	++	+	+	+	+	质量良好的外来体，但是不一致，(随治疗而增加)。 前列腺标志物和5T4在RT ₂₀ 时是明显的。
	ADT ₁₂	++	++	+++	++	+	+	+	
	RT ₂₀	+++	+++	+++	++	++	++	++	
p1	ADT ₄	+	-	-	+	-	-	+	不一致的(随治疗而减少)。 几乎检测不到前列腺标志物，没有清楚的样式。 5T4在RT ₂₀ 时仍是明显的。
	ADT ₁₂	++	-	-	+	-	-	-	
	RT ₂₀	+++	+	++	+	+	+	+	
p3	ADT ₄	+	+	-	+	-	-	-	不一致的(随治疗而减少)。 没有前列腺标志物。 在RT ₂₀ 时5T4强
	ADT ₁₂	+	-	++	+	-	-	-	
	RT ₂₀	+++	+++	-	++	-	-	-	
p9	ADT ₄	+++	+	+	+	+	+	+	不一致的(随治疗而减少)。 没有前列腺标志物。 在RT ₂₀ 时没有5T4
	ADT ₁₂	++	+	-	-	-	-	-	
	RT ₂₀	+	-	-	-	+	+	+	
p5	ADT ₄	-	-	-	-	-	-	-	在2/3时间点时质量较差。 不可评估
	ADT ₁₂	-	-	-	-	-	-	-	
	RT ₂₀	+++	-	++	-	-	-	-	
p10	ADT ₄	+++	++	+++	+	+	+	+	在2/3时间点时质量较差。 不可评估
	ADT ₁₂	-	-	-	-	-	-	-	
	RT ₂₀	+	-	-	-	-	-	-	
p6	ADT ₄	+	-	-	-	-	-	-	在3/3时间点时质量较差。 不可评估
	ADT ₁₂	++	-	-	-	-	-	-	
	RT ₂₀	-	-	-	-	-	-	-	


 =良好的质量
  =中间的
  =中间 / 较差
  =较差的质量

图 6

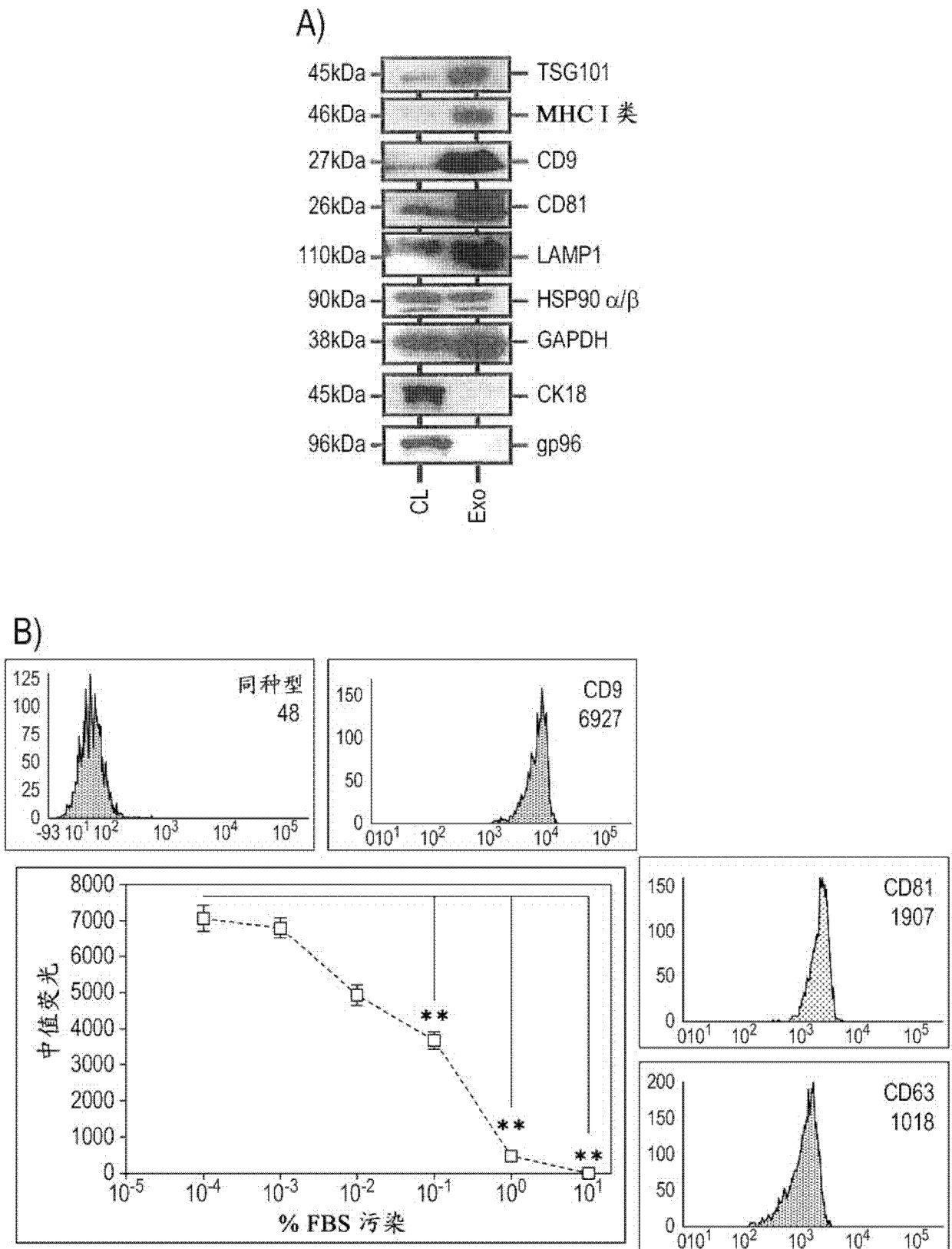


图 7

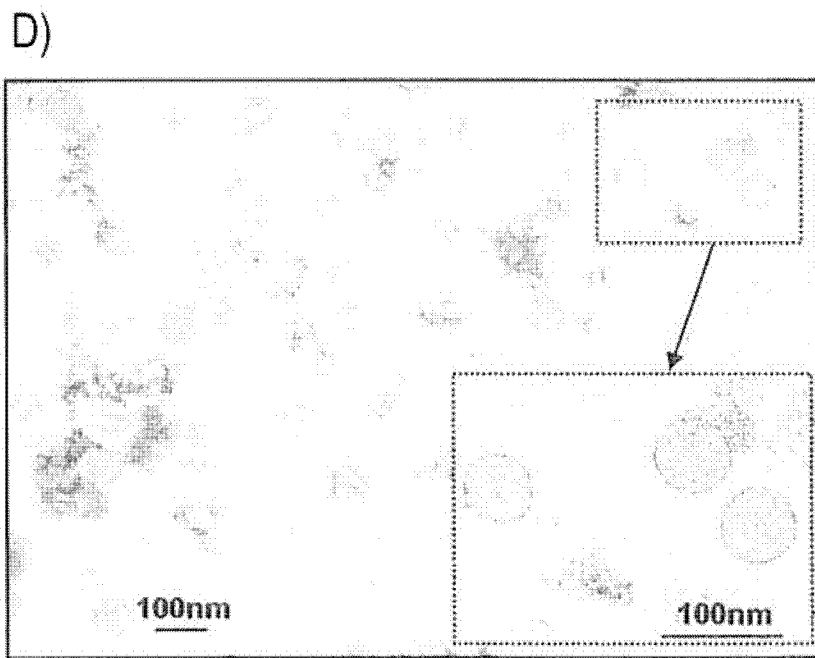
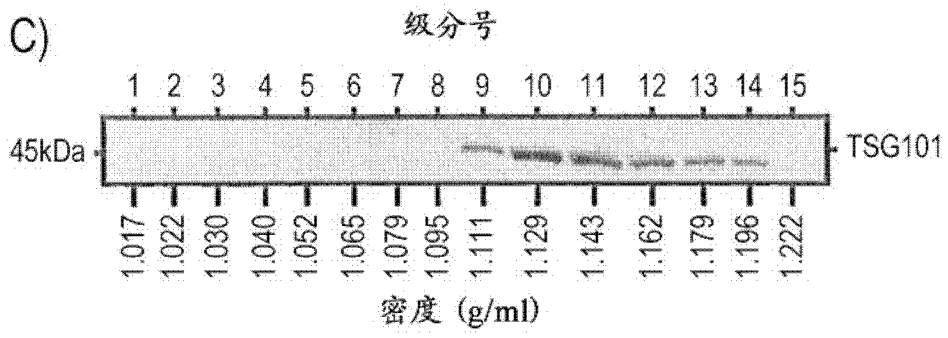


图7(续)

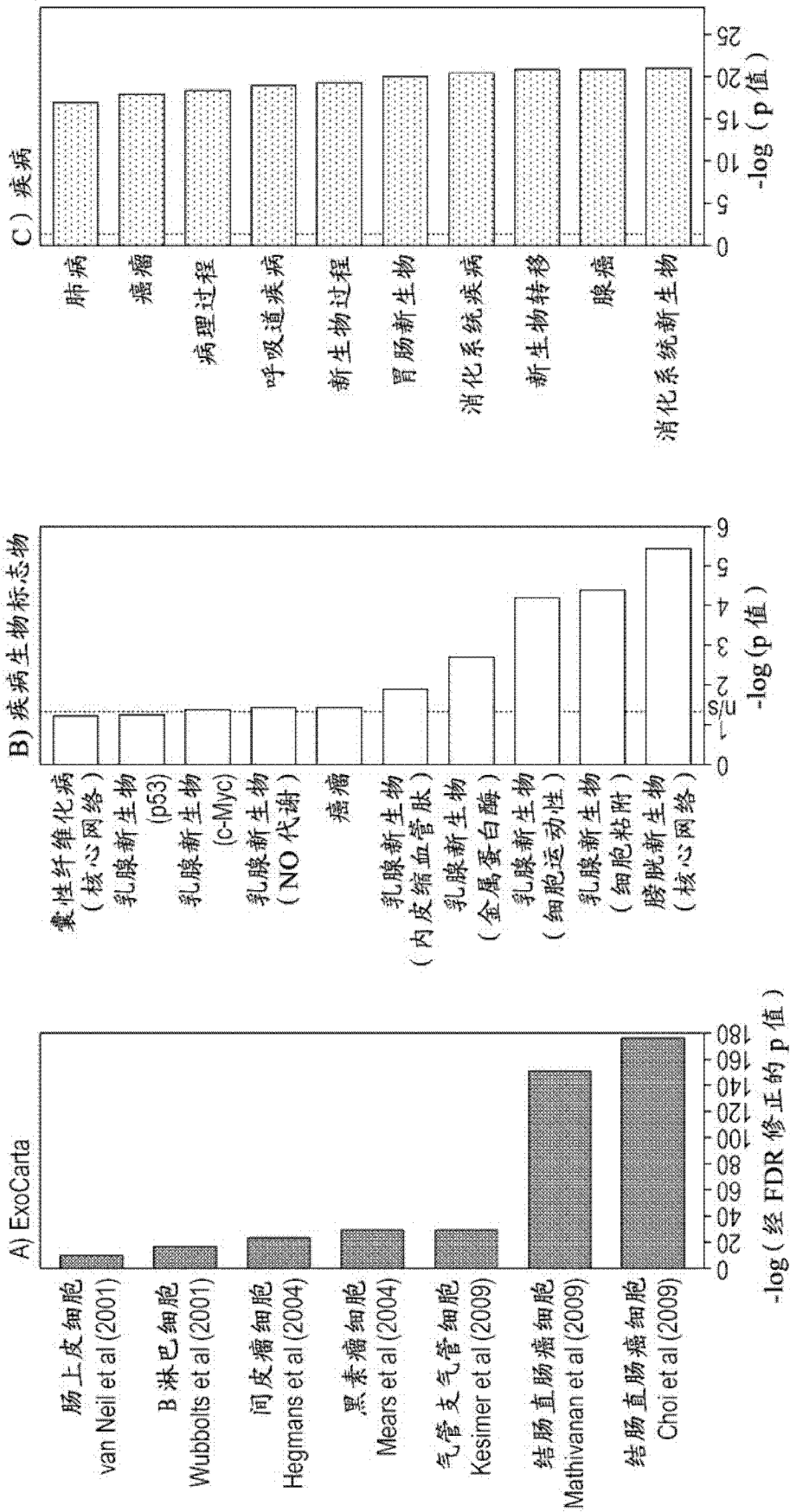


图 8

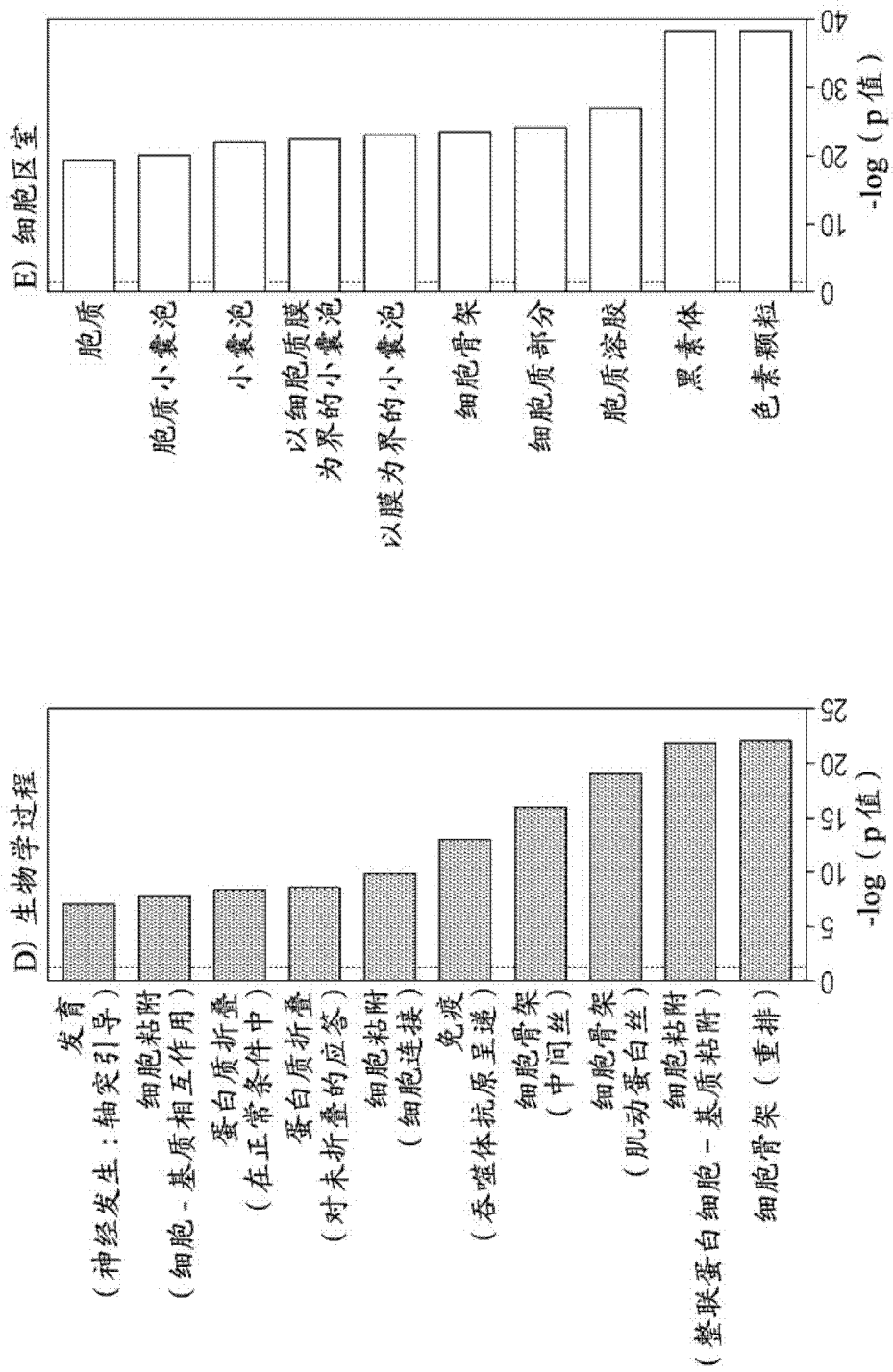


图8(续)

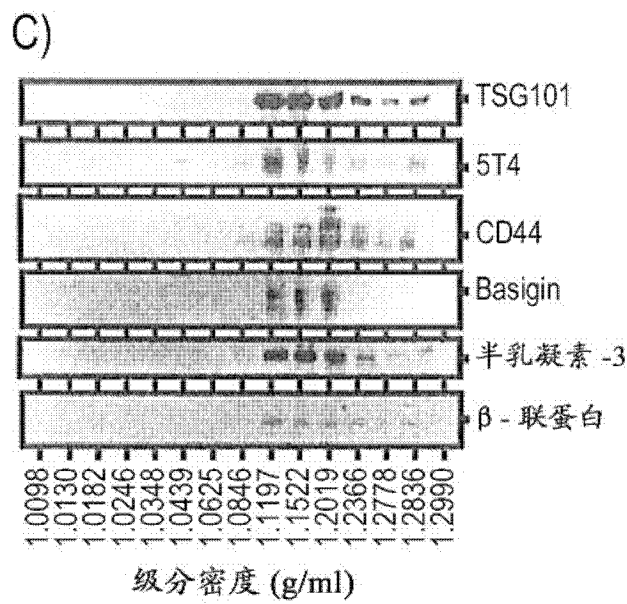
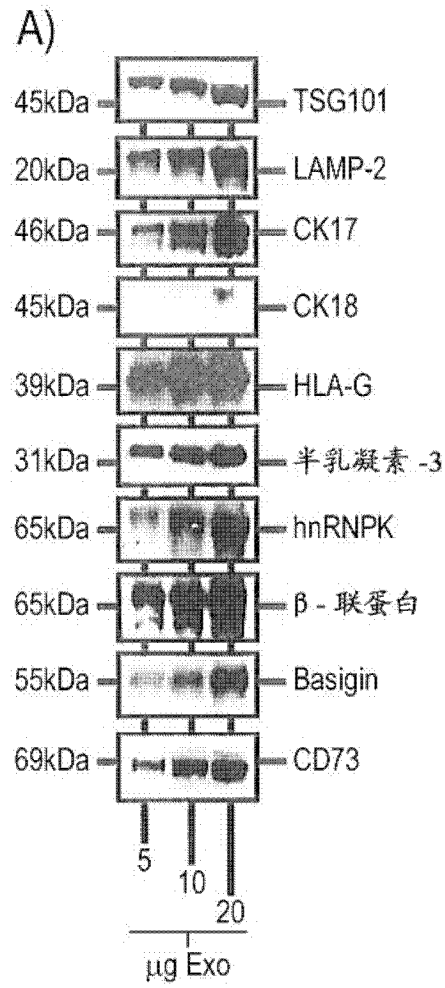


图 9

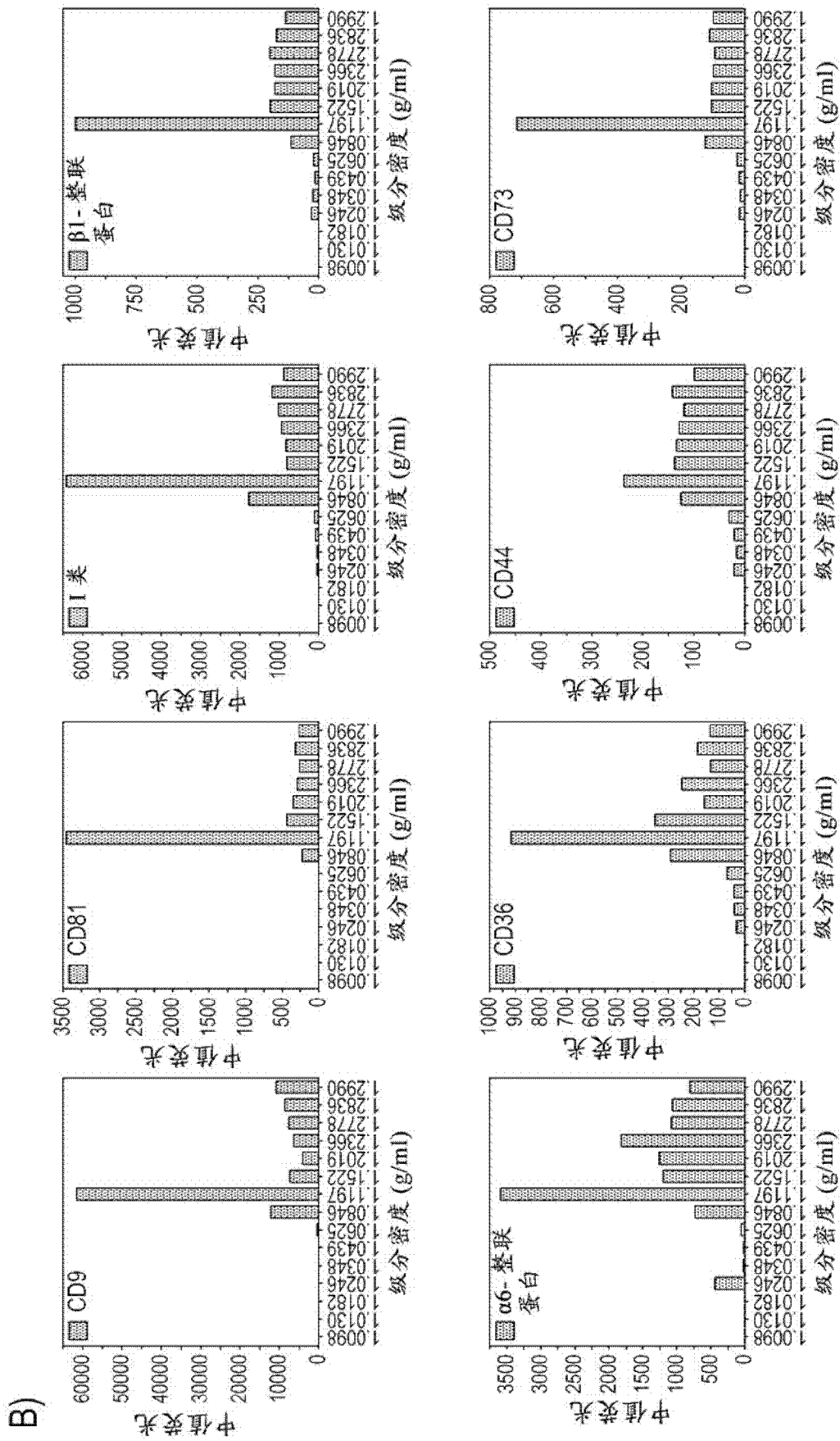


图6(续)

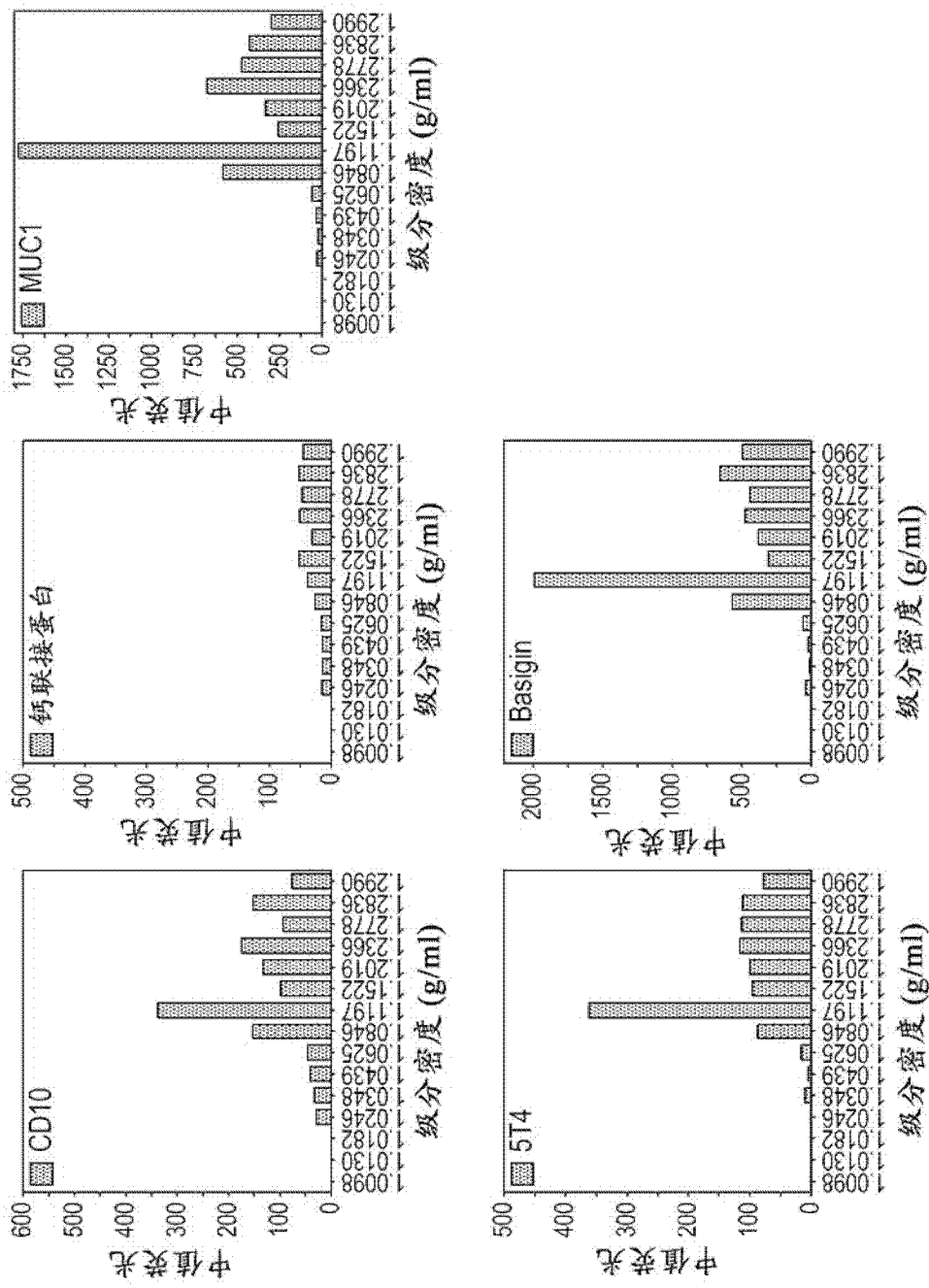
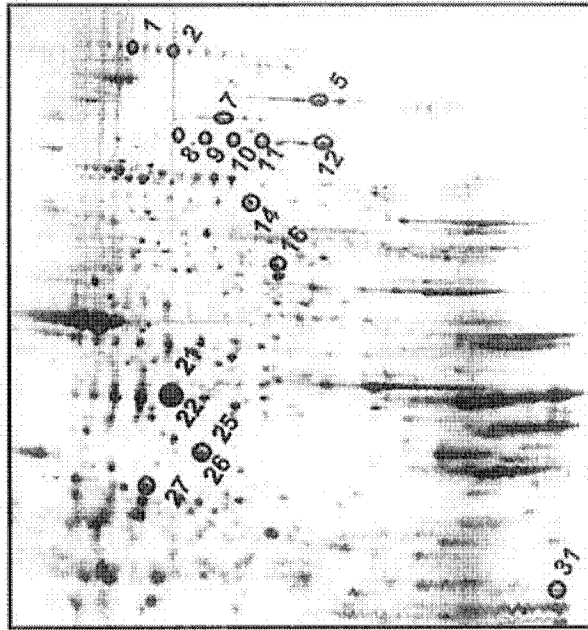


图9(续)

A)



C)

质量 1191.9 的肽的 MS/MS 谱

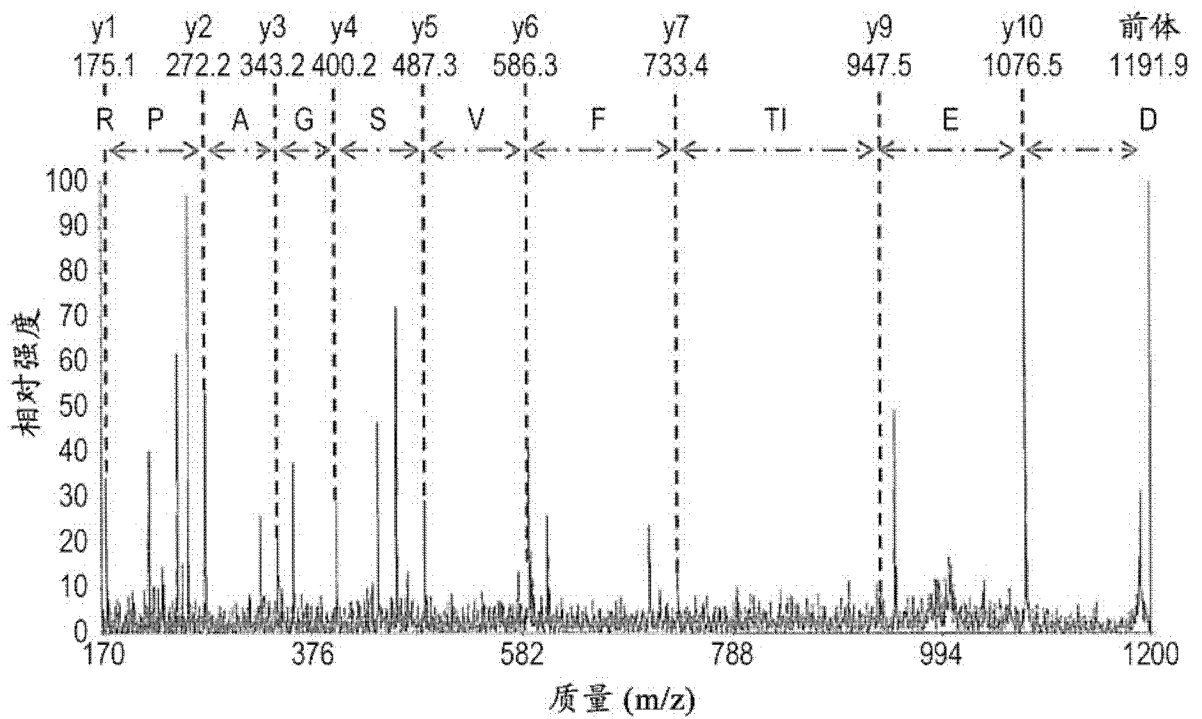


图 10

点号	蛋白质名称	编号	序列 1	预期值 1	序列 2	预期值 2	序列 3	预期值 3
21*	肌动蛋白, 胞质 I	ACTB_HUMAN	QEYDESGPSVHR	2.00E-07	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	1.00E-06	SYELPDGQVITIGNER	4.90E-06
22*	肌动蛋白, 胞质 I	ACTB_HUMAN	SYELPDGQVITIGNER	7.00E-10	VAPEEHPVLLTEAPLNPK	7.90E-10	QEYDESGPSVHR	3.80E-08
27	肌动蛋白, 胞质	ACTG_HUMAN	QEYDESGPSVHR	5.10E-05	SYELPDGQVITIGNER	0.0045		
26**	膜联蛋白 A4	ANXA4_HUMAN	GAGTDEGCIEIASR	1.60E-05	AEIDMLDIR	0.0048		
25**	膜联蛋白 A4	ANXA4_HUMAN	GLGTDEDALISVLYR	4.10E-12	GAGTDEGCIEIASR	8.70E-12	NHLLHVDFEYKR	8.00E-11
12	埃兹蛋白	EZRI_HUMAN	KAPDFVYAPR	1.00E-08	APDFVYAPR	1.90E-06	QLFDQVVK	0.00012
7	凝溶胶蛋白	GELS_HUMAN	EYQGFESATFLGYFK	0.0022	HVYPNENWOR	0.0035		
31	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	G3P_HUMAN	LVINGNPITIFQER	0.018	AGAHLQGGAK	0.03		
1	整联蛋白 α -3	ITA3_HUMAN	EAGNPGSLFGYSVALHR	0.0004	YLLLAGAPR	0.0021	ARPVINIVHK	0.0022
2	整联蛋白 α -3	ITA3_HUMAN	EAGNPGSLFGYSVALHR	3.00E-07	YTVLVWGSSEDQR	7.00E-05	YLLLAGAPR	0.00019
8	整联蛋白 α -6	ITA6_HUMAN	NSYPDVAVGSLSDSVTIFR	7.10E-09	DGEVGGAVVYVMNQGR	5.90E-07	DGWQDVIKAPCYFDR	8.60E-07
9	整联蛋白 α -6	ITA6_HUMAN	GIVSKDEITFVSGAPR	1.90E-09	DEITFVSGAPR	3.30E-09	NSYPDVAVGSLSDSVTIFR	6.60E-09
10	整联蛋白 α -6	ITA6_HUMAN	DGEVGGAVVYVMNQGR	9.70E-10	DEITFVSGAPR	2.60E-08	NSYPDVAVGSLSDSVTIFR	1.20E-07
11	整联蛋白 α -6	ITA6_HUMAN	DEITFVSGAPR	5.10E-06	DGEVGGAVVYVMNQGR	1.30E-05	NSYPDVAVGSLSDSVTIFR	0.0016
5	程序化细胞死亡 β 相互作用蛋白	PDC6_HUMAN	FYNELTEILVR	0.002	FLTALAQDGVINEEALSVTELDLR	0.019	ELPELLQR	0.038
16	Rho GTP 酶活化蛋白 1	RHG01_HUMAN	NPEQEPIPLVR	7.30E-05	FLLDHQGELEFPSPDPSGL	0.0074	LEQLGIPR	0.048
14	T 复合物蛋白 1 亚基 α	TCPA_HUMAN	AFHNEAQNPER	4.40E-06	EQLAAEFAR	0.0046		

*自同一点切出的 **自同一点切出的

图 10(续)

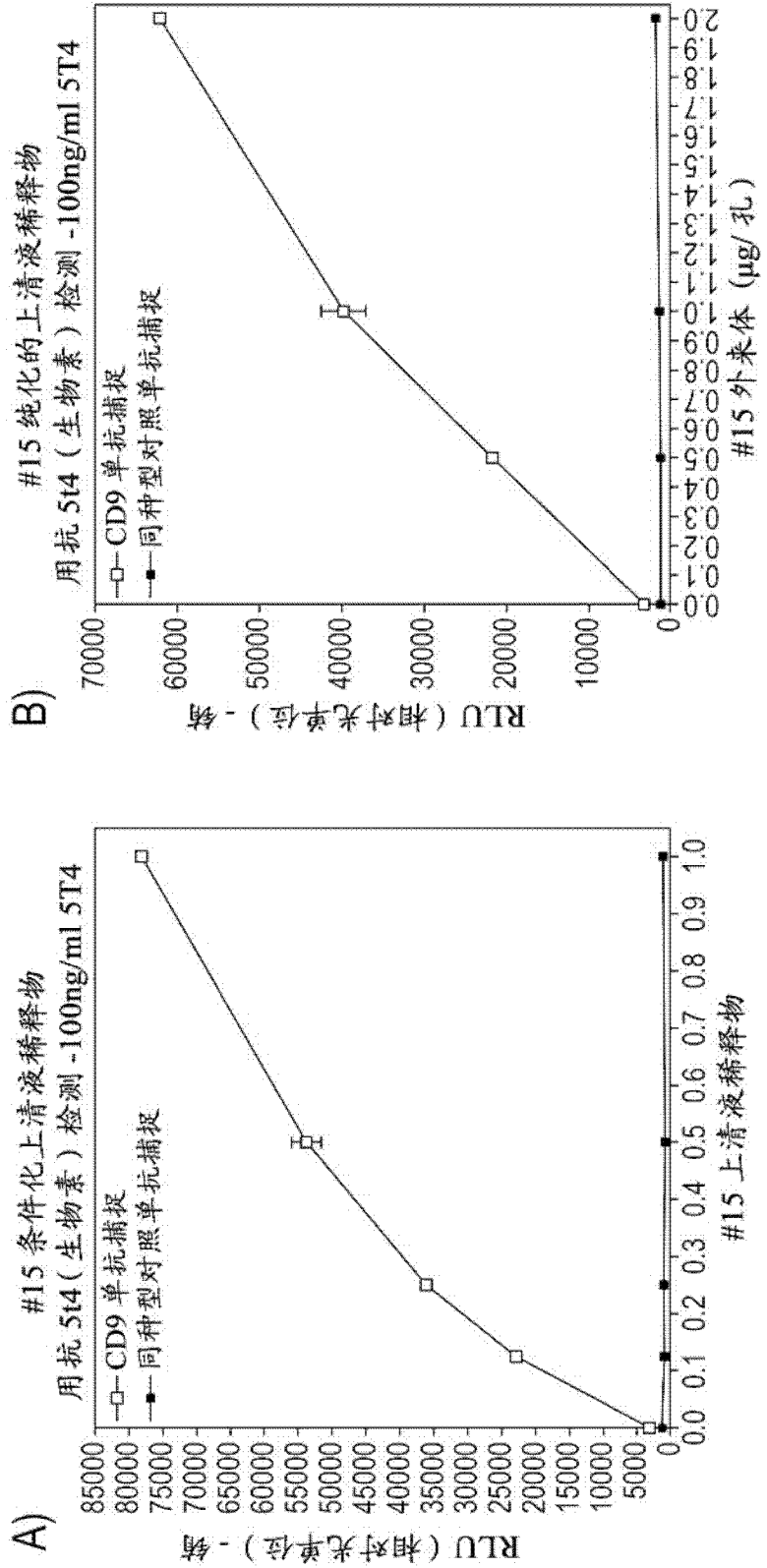


图 11