



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103874768 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201280030348. 4

代理人 张玲

(22) 申请日 2012. 05. 04

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/483, 028 2011. 05. 05 US

C12Q 1/68 (2006. 01)

G01N 33/574 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 12. 20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2012/000483 2012. 05. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/149609 EN 2012. 11. 08

(71) 申请人 临床基因组学股份有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

申请人 联邦科学和工业研究组织

(72) 发明人 L·C·拉普因忒 S·K·派德森

P·莫里

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

权利要求书3页 说明书34页

序列表26页 附图1页

(54) 发明名称

诊断肿瘤的方法

(57) 摘要

本发明一般性地涉及用于通过筛查一个或多个核酸标记的表达水平的调节来筛查受试者的结肠直肠肿瘤的发生、发生倾向和 / 或结肠直肠肿瘤的进展的方法。更具体地, 本发明提供了用于通过筛查一个或多个核酸标记在膜质微泡中的表达水平的调节来筛查受试者的结肠直肠肿瘤的发生、发生倾向和 / 或结肠直肠肿瘤的进展的方法。本发明的表达特征谱可用于一系列应用, 包括但不限于与结肠直肠肿瘤例如结肠直肠腺瘤和腺癌的诊断和 / 或监测相关的那些应用。

1. 一种筛查个体的大肠肿瘤的发生或发生倾向的方法,所述方法包括测量如下基因在来自所述个体的膜质微泡样品中的表达水平:

(i) 选自下述的任一个或多个基因:

- | | | | |
|---------------|-------------|---------------|--------------|
| 1. KIAA1199 | 2. CRNDE | 3. OLFM4 | 4. DPEP1 |
| 5. TESC | 6. SLC12A2 | 7. ITGA6 | 8. REG4 |
| 9. S100A11 | 10. ACAA2 | 11. ANPEP | 12. ANXA3 |
| 13. APP | 14. APPL2 | 15. AZGP1 | 16. BGN |
| 17. c20orf199 | 18. CALR | 19. CAP1 | 20. COL12A1 |
| 21. CSE1L | 22. CTSC | 23. CXCL3 | 24. DMBT1 |
| 25. ENO1 | 26. EPS8L3 | 27. FAT | 28. FTH1 |
| 29. GALNT6 | 30. GMDS | 31. GNB2L1 | 32. GPRC5A |
| 33. HEPH | 34. HLADRB1 | 35. HPGD | 36. HSP90AA1 |
| 37. IFITM1 | 38. IFITM2 | 39. KRT8 | 40. LCN2 |
| 41. LDHB | 42. LIMA1 | 43. LOC440264 | 44. LRPPRC |
| 45. LRSAM1 | 46. MLLT3 | 47. MMP7 | 48. MUC13 |
| 49. MYO5B | 50. NDRG1 | 51. NEBL | 52. NQO1 |
| 53. OLA1 | 54. PIGR | 55. PRDX1 | 56. PROS1 |
| 57. PSAT1 | 58. PUS7 | 59. RAB8A | 60. RPL6 |
| 61. RPS4X | 62. RPS7 | 63. S100A1 | 64. S100A6 |
| 65. S100P | 66. SLC39A5 | 67. SLC7A5 | 68. SLK |
| 69. SOD1 | 70. SORD | 71. TACSTD2 | 72. TCP1 |
| 73. TFRC | 74. TGFBI | 75. THBS2 | 76. TM7SF3 |
| 77. TUBB6 | 78. VAMP3 | 79. VAT1; 或 | |

(ii) 由Hg19坐标确定的任一个或多个区域:

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1. chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999 | 2. chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079 |
| 3. chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196 | 4. chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839 |
| 5. chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251 | 6. chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380 |
| 7. chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181 | 8. chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203 |
| 9. chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511 | 10. chr18: 47, 309, 874-47, 340, 251 |
| 11. chr15: 90, 328, 126-90, 358, 072 | 12. chr4: 79, 472, 742-79, 531, 605 |
| 13. chr21: 27, 252, 861-27, 543, 138 | 14. chr12: 105, 567, 075-105, 630, 008 |
| 15. chr7: 99, 564, 350-99, 573, 735 | 16. chrX: 152, 760, 347-152, 775, 004 |
| 17. chr20: 47894715-47905797 | 18. chr20: 47894715-47905797 |

19. chr20: 47894715-47905797
20. chr20: 47894715-47905797
21. chr20: 47894808-47905797
22. chr20: 47895179-47905797
23. chr20: 47895179-47905797
24. chr19: 13, 049, 414-13, 055, 304
25. chr1: 40, 506, 255-40, 538, 321
26. chr6: 75, 794, 042-75, 915, 623
27. chr20: 47, 662, 838-47, 713, 486
28. chr11: 88, 026, 760-88, 070, 941
29. chr4: 74, 902, 312-74, 904, 490
30. chr10: 124, 320, 181-124, 403, 252
31. chr1: 8, 921, 059-8, 939, 151
32. chr1: 110, 292, 702-110, 306, 644
33. chr4: 126315091-126414087
34. chr5: 150935821-150948505
35. chr4: 187627717-187647850
36. chr4: 187508937-187516980
37. chr5: 150883653-150948505
38. chr5: 150883653-150911531
39. chr4: 187508937-187644987
40. chr4: 126237567-126414087
41. chr4: 126369616-126412943
42. chr11: 92085262-92629635
43. chr11: 92573728-92629635
44. chr11: 61, 731, 757-61, 735, 132
45. chr12: 51, 745, 833-51, 785, 200
46. chr6: 1, 624, 035-2, 245, 868
47. chr5: 180, 663, 928-180, 670, 906
48. chr12: 13, 043, 956-13, 066, 600
49. chrX: 65, 382, 433-65, 487, 230
50. chr6 : 3, 774, 425-3, 787, 546
51. chr4: 175, 411, 328-175, 443, 792
52. chr14: 102547075-102606086
53. chr11: 313, 991-315, 272
54. chr11: 308, 107-309, 410
55. chr12: 53, 290, 971-53, 298, 868
56. chr9: 130, 911, 732-130, 915, 734
57. chr12: 21, 788, 275-21, 810, 789
58. chr12: 50, 569, 563-50, 677, 353
59. chr15: 30, 262, 050-30, 265, 947
60. chr2: 44, 113, 363-44, 223, 144
61. chr9: 130, 214, 534-130, 265, 780
62. chr9: 20, 344, 968-20, 622, 514
63. chr11: 102, 391, 239-102, 401, 478
64. chr3: 124, 624, 289-124, 653, 595
65. chr18: 47, 349, 156-47, 721, 451
66. chr8: 134, 249, 414-134, 309, 547
67. chr10: 21, 068, 903-21, 186, 531
68. chr16: 69, 743, 304-69, 760, 533
69. chr2: 174, 937, 175-175, 113, 365
70. chr1: 207, 101, 867-207, 119, 811
71. chr1: 45, 976, 707-45, 988, 562
72. chr3: 93, 591, 881-93, 692, 934
73. chr9: 80, 912, 059-80, 945, 009
74. chr7: 105, 096, 960-105, 162, 685
75. chr19: 16, 222, 490-16, 244, 445
76. chr12: 112, 842, 994-112, 847, 443
77. chrX: 71, 492, 453-71, 497, 141
78. chr2: 3, 622, 853-3, 628, 509
79. chr1: 153, 600, 873-153, 604, 513
80. chr1: 153, 507, 076-153, 508, 717
81. chr4: 6, 695, 566-6, 698, 897
82. chr12: 56, 623, 820-56, 631, 629
83. chr16: 87, 863, 629-87, 903, 100
84. chr10: 105, 727, 470-105, 787, 342
85. chr21: 33, 031, 935-33, 041, 243
86. chr15: 45, 315, 302-45, 367, 287
87. chr1: 59, 041, 095-59, 043, 166
88. chr6: 160, 199, 530-160, 210, 735
89. chr3: 195, 776, 155-195, 809, 032
90. chr5: 135, 364, 584-135, 399, 507
91. chr6: 169, 615, 875-169, 654, 137
92. chr12: 27, 124, 506-27, 167, 339
93. chr18: 12, 308, 257-12, 326, 568
94. chr1: 7, 831, 329-7, 841, 492
95. chr17: 41, 166, 622-41, 174, 459

其中所述基因的表达水平相对于对照水平的升高表明肿瘤的发生或发生倾向。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述肿瘤是腺瘤。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述肿瘤是腺癌。
4. 权利要求 1-3 的任一项的方法,其中所述大肠肿瘤是结肠直肠肿瘤。
5. 权利要求 1-4 的任一项的方法,其中所述方法用于筛查从所述基因转录的 RNA 或从其反转录的 cDNA 的水平。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述 RNA 是 mRNA。
7. 权利要求 1-4 的任一项的方法,其中所述方法用于筛查所述基因的蛋白质表达产物或其片段。
8. 权利要求 1-7 的任一项的方法,其中所述微泡是外来体、细胞凋亡膜泡、微粒、细胞凋亡小体或细胞膜泡。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述微泡是外来体。
10. 权利要求 1-9 的任一项的方法,其中所述生物样品是血液、血清、血浆、尿、粪便、唾液、眼泪或腹水样品。
11. 权利要求 1-10 的任一项的方法,其中所述基因是如下基因的一个或多个:
 - (i)
 1. KIAA1199 2. CRNDE 3. OLFM4 4. DPEP1
 5. TESC 6. SLC12A2 7. ITGA6 8. REG4
 9. S100A11; 或
 - (ii) 由 Hg19 坐标定义的区域:
 1. **chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999** 2. **chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079**
 3. **chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196** 4. **chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839**
 5. **chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251** 6. **chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380**
 7. **chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181** 8. **chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203**
 9. **chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511.**
12. 权利要求 11 的方法,其中所述基因是如下基因的一个或多个:
 - (i)
 1. KIAA1199 2. CRNDE 3. OLFM4; 或
 - (ii) 由 Hg19 坐标定义的区域:
 1. chr15:81, 071, 712-81, 243, 999 2. chr16:54, 952, 778-54, 963, 079
 3. chr13:53, 602, 876-53, 626, 196。
13. 权利要求 1-12 的任一项的方法,其中所述个体是人。

诊断肿瘤的方法

发明领域

[0001] 本发明一般性地涉及通过筛查一个或多个核酸标记的水平的调节来筛查受试者的结肠直肠肿瘤的发生、发生倾向和 / 或结肠直肠肿瘤的进展的方法。更具体地,本发明提供了用于通过筛查膜质微泡中一个或多个基因标记的表达水平的调节来筛查受试者的结肠直肠肿瘤的发生、发生倾向和 / 或结肠直肠肿瘤的进展的方法。本发明的表达特征谱可用于一系列应用,包括但不限于与结肠直肠肿瘤例如结肠直肠腺瘤和腺癌的诊断和 / 或监测相关的应用。

[0002] 发明背景

[0003] 作者在本说明书中参考的出版物的参考资料详情按字母顺序被集中于说明书的结尾处。

[0004] 本说明书中对任何先前的出版物(或来源于其的信息)或对已知的任何内容的参考不被,并且不应当被当作是对该先前的出版物(或来源于其的信息)或已知的内容形成了本说明书所涉及的努力领域中的共同一般知识的一部分的确认或承认或任何形式的提议。

[0005] 腺瘤是上皮来源的良性肿瘤或肿瘤,其源自腺组织或显示明确确定的腺结构。一些腺瘤显示可识别的组织元素例如纤维组织(纤维腺瘤)和上皮结构,而其它腺瘤例如支气管腺瘤产生可能引起临床症状的活性化合物。

[0006] 腺瘤可进展成为侵袭性肿瘤,从而被称为腺癌。因此,腺癌被定义为由腺结构产生的恶性上皮性肿瘤,其是身体的许多器官的构成部分。术语腺癌也用于显示腺生长模式的肿瘤。这些肿瘤可根据它们产生的物质而被进行亚分类,例如粘液分泌腺癌和浆液性腺癌,或按照它们的细胞显微排列成的模式进行亚分类,例如乳头状腺癌和滤泡状腺癌。这些腺癌可以为实体的或囊性的(囊腺癌)。每一个器官可产生显示多种组织学类型的肿瘤,例如卵巢可产生粘液腺癌和囊腺癌。

[0007] 不同器官中的腺瘤行为不同。一般而言,癌存在于腺瘤内的总体机会(即,已在良性损伤内发展的癌症的病灶)为约 5%。然而,这与腺瘤的尺寸相关。例如,在大肠(特别是结肠和直肠)中,癌症在腺瘤内的发生在小于 1 厘米的腺瘤中是罕见的。这样的发展在大于 4 厘米的腺瘤中据估计为 40 至 50%,并且显示某些组织病理学变化例如绒毛状变化或高等级发育异常。具有更高等级的发育异常的腺瘤具有更高的癌发病率。在任意给定的结肠直肠腺癌中,癌症在器官中的现在或将来发生的癌症存在的预测者包括从管状至绒毛状形态学的变化的尺寸(特别是大于 9mm)程度,高等级发育异常的存在和被描述为“锯齿状腺癌”的形态学变化。在任意给定的个体中,渐增的年龄、结肠直肠腺瘤或癌症的家族性发生、雄性性别或腺瘤多样性这些其它特征预测器官中将来增加的癌症风险 - 所谓的癌症风险因素。除腺瘤的存在及其尺寸外,这些因素中没有一个被客观地定义,并且除数目和尺寸外的所有这些因素受观察者的错误以及对所述特征的准确定义的混淆的影响。因为这样的因素可难以评价和定义,因此它们作为癌症的当前或将来风险的预测者的价值是不准确的。

[0008] 一旦发生了散发性腺瘤,则新型腺瘤发生的概率在 26 个月内为约 30%。

[0009] 结肠直肠腺瘤代表了一类显示渐增发病率（特别在更富裕的国家中）的腺瘤。腺瘤的原因以及至腺癌的进展的原因仍然是集中研究的主题。迄今为止，已假定除了遗传素因以外，环境因子（例如饮食）在该病况的发展中起重要作用。大多数研究显示相关环境因素涉及高膳食脂肪、低纤维、低蔬菜摄入、吸烟、肥胖、身体不活动和高度精制的碳水化合物。

[0010] 结肠腺瘤是发育异常的上皮的局部区域，所述区域最初仅包括一个或几个隐窝并且可不从表面突出，但随着尺寸生长的增加（这通常由增殖和 / 或细胞凋亡的不平衡导致）它们可突出。腺瘤可以以几种方式分类。一个方式是通过它们的大体外观（gross appearance），并且主要的描述符包括突出的程度：扁平无蒂（即突出但无明显茎）或具柄的（即具有茎）。其它总体性的描述符包括结肠 / 直肠中最大尺度的实际尺寸和实际数目。虽然小的腺瘤（少于例如 5 或 10 毫米）显示光滑的黄褐色表面，但具柄的、特别是更大的腺瘤倾向于具有鹅卵石状或分成小叶的棕红色表面。更大的无蒂腺瘤可显示更精细的绒毛状表面。另一组描述符包括组织病理学分类；临床值的主要描述符包括发育异常的程度（低或高）、是否存在侵袭性癌的病灶、从管状腺形成至绒毛状腺形成的变化程度（因此分类为管状的、绒毛状的或管绒毛状的），混合增生性变化和所谓的“锯齿状”腺瘤及其亚组的存在。腺瘤可位于结肠和 / 或直肠的任何位置，尽管它们倾向于在直肠和末端结肠更为常见。除数目和尺寸外的所有这些描述符是相对主观的受观察者之间不一致的影响。

[0011] 腺瘤的不同描述特征不仅对于确定任意给定的腺瘤的增生性状态（当检测时）有价值，而且还对于预测人将来发生结肠直肠腺瘤或癌症的风险有价值。个体中指向增加的患癌或新的腺瘤再发生的将来风险的腺瘤的那些特征或腺瘤数目包括：最大腺瘤的尺寸（特别是 10mm 或更大的）、绒毛状变化的程度（特别是至少 25% 的此类变化，和特别地 100% 的此种变化）、高等级发育异常、锯齿状腺瘤特征的数目（3 个或更多个任意尺寸或组织学状态）的存在。除尺寸或数目外没有一个特征是客观性的并且所有特征都是相对主观的，并且受观察者之间不一致的影响。将来产生癌形成的风险（此后为“风险”）的这类预测者在实践中是至关重要的，因为它们被用于确定将来结肠镜监测的速度和对所述结肠镜监测的需要以及所述结肠镜监测的频率。更准确的风险分类从而可能减少结肠镜检查的工作负荷量，使得其更具成本效益并且减小来自不必要过程的并发症的风险。

[0012] 腺瘤通常是无症状的，从而使得难以在当它们可能发展侵袭性特征从而变成癌症之前的阶段诊断和治疗它们。在技术上不可能基于腺瘤的外观预测癌的存在或不存在，尽管较大的腺瘤比较小的腺瘤更可能显示恶性改变的区域。无柄腺瘤显示比相同尺寸的具柄腺瘤更高的恶性肿瘤发病率。一些腺瘤导致失血，这可在大便中观察到或检测到；虽然有时可被眼睛看见，但其通常（当其发生时）是微观的或“潜隐的”。相较于较小的腺瘤。更大的腺瘤更倾向于出血。然而，由于粪便中的血液，无论是明显的还是潜隐的，也可表明非腺瘤性病况，在不应用高度侵袭性程序（例如与组织获取（通过取出（即息肉切除术）或生物活组织检查）组合的结肠镜检查 and 随后的组织病理学分析）的情况下，难以进行腺瘤的准确诊断。

[0013] 因此，存在对阐明腺瘤的病因和开发提供更多信息的诊断方案或诊断辅助（其使得人们能够对更可能具有腺瘤的人进行直接结肠镜检查）的持续需要。这些腺瘤可以是高风险的，晚期的或这两者都不是。此外，在结肠镜检查后可能难以确定已去除了所有腺瘤，

特别是在已具有多个腺瘤的人中。准确的筛查测试可使对进行早期第二结肠镜检查术（以确保已清除了所述结肠中的肿瘤）的需要减少至最低程度。因此，腺瘤的分子标记的鉴定可为理解腺瘤和癌症的原因，改善腺瘤的诊断（包括开发有用的筛查测试），阐明腺瘤的组织学分期，基于腺瘤的分子状态表征患者患结肠直肠癌形成的将来风险以及促进腺瘤的治疗提供手段。

[0014] 迄今为止，研究倾向于集中在对结肠直肠肿瘤具有决定作用的基因突变的鉴定上。然而，最近的发现显示出事实上在健康个体中表达的未突变的基因的表达水平的变化对于肿瘤产生也是指示性的。这些基因表达的变化在结肠直肠组织样品中通常是可被常规检测的。然而，从患者的角度看，收集结肠直肠组织样品是侵入性的并且在术后病发症例如感染方面并非没有风险。外周血的取样在收集用于分析的生物样品方面通常是显著优选的方法，但这完全取决于基因在组织中的表达水平的变化在对诊断有用的水平上在血液中是否是可检测的。

[0015] 在本发明之前的工作中，已确定在结肠直肠癌形成基因标记的情境中，其表达水平在瘤形成中升高，该表达的增加因诊断灵敏度的问题而在血浆中不一定可被容易地检测。然而，出人意料地发现了这些基因标记中的一小部分显示它们在循环外来体中表达水平的显著升高。该发现是预料之外的，因为并非所有在癌性组织中表达增加的结肠直肠标记必定也在外来体中增加。该确定特别重要，因为外来体在外周循环，从而可被容易地收集，例如通过血液样品。此外，虽然全血或血浆内基因表达水平的分析可受到缺乏灵敏度的问题的困扰，但一个小亚组的先前鉴定的结肠直肠癌形成标记在确定的外来体环境内实际上是可检测的这一确定现因无关污染性遗传物质的降低的水平而提供显著更灵敏的检测手段。从其涉及使用最低限度的侵入性收集技术例如血液样品的抽取的观点上来看，这也是高度期望的。

[0016] 发胆概述

[0017] 本发明的一个方面涉及筛查个体的大肠肿瘤的发生或发生倾向的方法，所述方法包括测量如下基因在来自所述个体的膜质微泡中的表达水平：

[0018] (i) 选自下述的任一个或多个基因：

[0019]

1. KIAA1199	2. CRNDE	3. OLFM4	4. DPEP1
5. TESC	6. SLC12A2	7. ITGA6	8. REG4
9. S100A11	10. ACAA2	11. ANPEP	12. ANXA3
13. APP	14. APPL2	15. AZGP1	16. BGN
17. c20orf199	18. CALR	19. CAP1	20. COL12A1
21. CSE1L	22. CTSC	23. CXCL3	24. DMBT1
25. BNO1	26. EPS8L3	27. FAT	28. FTH1
29. GALNT6	30. GMDS	31. GNB2L1	32. GPRC5A
33. HEPH	34. HLADRB1	35. HPGD	36. HSP90AA1
37. IFITM1	38. IFITM2	39. KRT8	40. LCN2
41. LDHB	42. LIMA1	43. LOC440264	44. LRPPRC
45. LRSAM1	46. MLLT3	47. MMP7	48. MUC13
49. MYO5B	50. NDRG1	51. NEBL	52. NQO1
53. OLA1	54. PIGR	55. PRDX1	56. PROS1
57. PSAT1	58. PUS7	59. RAB8A	60. RPL6
61. RPS4X	62. RPS7	63. S100A1	64. S100A6
65. S100P	66. SLC39A5	67. SLC7A5	68. SLK
69. SOD1	70. SORD	71. TACSTD2	72. TCP1
73. TFRC	74. TGFBI	75. THBS2	76. TM7SF3

[0020]

77. TUBB6 78. VAMP3 79. VAT1; 或

[0021] (ii) 由 Hg19 坐标确定的任一个或多个区域：

[0022]

1. chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999
2. chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079
3. chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196
4. chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839
5. chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251
6. chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380
7. chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181
8. chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203
9. chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511
10. chr18: 47, 309, 874-47, 340, 251
11. chr15: 90, 328, 126-90, 358, 072
12. chr4: 79, 472, 742-79, 531, 605
13. chr21: 27, 252, 861-27, 543, 138
14. chr12: 105, 567, 075-105, 630, 008
15. chr7: 99, 564, 350-99, 573, 735
16. chrX: 152, 760, 347-152, 775, 004
17. chr20: 47894715-47905797
18. chr20: 47894715-47905797
19. chr20: 47894715-47905797
20. chr20: 47894715-47905797
21. chr20: 47894808-47905797
22. chr20: 47895179-47905797
23. chr20: 47895179-47905797
24. chr19: 13, 049, 414-13, 055, 304
25. chr1: 40, 506, 255-40, 538, 321
26. chr6: 75, 794, 042-75, 915, 623
27. chr20: 47, 662, 838-47, 713, 486
28. chr11: 88, 026, 760-88, 070, 941
29. chr4: 74, 902, 312-74, 904, 490
30. chr10: 124, 320, 181-124, 403, 252
31. chr1: 8, 921, 059-8, 939, 151
32. chr1: 110, 292, 702-110, 306, 644
33. chr4: 126315091-126414087
34. chr5: 150935821-150948505
35. chr4: 187627717-187647850
36. chr4: 187508937-187516980
37. chr5: 150883653-150948505
38. chr5: 150883653-150911531
39. chr4: 187508937-187644987
40. chr4: 126237567-126414087
41. chr4: 126369616-126412943
42. chr11: 92085262-92629635
43. chr11: 92573728-92629635
44. chr11: 61, 731, 757-61, 735, 132
45. chr12: 51, 745, 833-51, 785, 200
46. chr6: 1, 624, 035-2, 245, 868
47. chr5: 180, 663, 928-180, 670, 906
48. chr12: 13, 043, 956-13, 066, 600
49. chrX: 65, 382, 433-65, 487, 230
50. chr6 : 3, 774, 425-3, 787, 546
51. chr4: 175, 411, 328-175, 443, 792
52. chr14: 102547075-102606086
53. chr11: 313, 991-315, 272
54. chr11: 308, 107-309, 410
55. chr12: 53, 290, 971-53, 298, 868
56. chr9: 130, 911, 732-130, 915, 734
57. chr12: 21, 788, 275-21, 810, 789
58. chr12: 50, 569, 563-50, 677, 353
59. chr15: 30, 262, 050-30, 265, 947
60. chr2: 44, 113, 363-44, 223, 144
61. chr9: 130, 214, 534-130, 265, 780
62. chr9: 20, 344, 968-20, 622, 514
63. chr11: 102, 391, 239-102, 401, 478
64. chr3: 124, 624, 289-124, 653, 595
65. chr18: 47, 349, 156-47, 721, 451
66. chr8: 134, 249, 414-134, 309, 547
67. chr10: 21, 068, 903-21, 186, 531
68. chr16: 69, 743, 304-69, 760, 533
69. chr2: 174, 937, 175-175, 113, 365
70. chr1: 207, 101, 867-207, 119, 811
71. chr1: 45, 976, 707-45, 988, 562
72. chr3: 93, 591, 881-93, 692, 934
73. chr9: 80, 912, 059-80, 945, 009
74. chr7: 105, 096, 960-105, 162, 685

[0023]

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 75. chr19: 16, 222, 490-16, 244, 445 | 76. chr12: 112, 842, 994-112, 847, 443 |
| 77. chrX: 71, 492, 453-71, 497, 141 | 78. chr2: 3, 622, 853-3, 628, 509 |
| 79. chr1: 153, 600, 873-153, 604, 513 | 80. chr1: 153, 507, 076-153, 508, 717 |
| 81. chr4: 6, 695, 566-6, 698, 897 | 82. chr12: 56, 623, 820-56, 631, 629 |
| 83. chr16: 87, 863, 629-87, 903, 100 | 84. chr10: 105, 727, 470-105, 787, 342 |
| 85. chr21: 33, 031, 935-33, 041, 243 | 86. chr15: 45, 315, 302-45, 367, 287 |
| 87. chr1: 59, 041, 095-59, 043, 166 | 88. chr6: 160, 199, 530-160, 210, 735 |
| 89. chr3: 195, 776, 155-195, 809, 032 | 90. chr5: 135, 364, 584-135, 399, 507 |
| 91. chr6: 169, 615, 875-169, 654, 137 | 92. chr12: 27, 124, 506-27, 167, 339 |
| 93. chr18: 12, 308, 257-12, 326, 568 | 94. chr1: 7, 831, 329-7, 841, 492 |
| 95. chr17: 41, 166, 622-41, 174, 459 | |

[0024] 其中所述基因的表达水平相对于对照水平的升高表明肿瘤的发生或发生倾向。

[0025] 在另一个方面,所述肿瘤是腺瘤或腺癌,甚至更优选地为结肠直肠腺瘤或腺癌。

[0026] 在另一个方面,所述方法涉及筛查所述基因的蛋白质表达产物或其片段。

[0027] 在另一个方面,提供了筛查个体的大肠肿瘤的发生或发生倾向的方法,所述方法包括测量从基因转录的 RNA 转录物在来自所述个体的膜质微泡中的的水平,所述基因选自:

[0028] (i) 选自下述的任一个或多个基因:

[0029]

- | | | | |
|---------------|-------------|---------------|--------------|
| 1. KIAA1199 | 2. CRNDE | 3. OLFM4 | 4. DPEP1 |
| 5. TBSC | 6. SLC12A2 | 7. ITGA6 | 8. REG4 |
| 9. S100A11 | 10. ACAA2 | 11. ANPEP | 12. ANXA3 |
| 13. APP | 14. APPL2 | 15. AZGP1 | 16. BGN |
| 17. c20orf199 | 18. CALR | 19. CAP1 | 20. COL12A1 |
| 21. CSB1L | 22. CTSC | 23. CXCL3 | 24. DMBT1 |
| 25. BNO1 | 26. EPS8L3 | 27. FAT | 28. FTH1 |
| 29. GALNT6 | 30. GMDS | 31. GNB2L1 | 32. GPRC5A |
| 33. HEPH | 34. HLADRB1 | 35. HPGD | 36. HSP90AA1 |
| 37. IFITM1 | 38. IFITM2 | 39. KRT8 | 40. LCN2 |
| 41. LDHB | 42. LIMA1 | 43. LOC440264 | 44. LRPPRC |
| 45. LRSAM1 | 46. MLLT3 | 47. MMP7 | 48. MUC13 |
| 49. MYO5B | 50. NDRG1 | 51. NEBL | 52. NQO1 |
| 53. OLA1 | 54. PIGR | 55. PRDX1 | 56. PROS1 |
| 57. PSAT1 | 58. PUS7 | 59. RAB8A | 60. RPL6 |

[0030]

61. RPS4X	62. RPS7	63. S100A1	64. S100A6
65. S100P	66. SLC39A5	67. SLC7A5	68. SLK
69. SOD1	70. SORD	71. TACSTD2	72. TCP1
73. TFRC	74. TGFBI	75. THBS2	76. TM7SF3
77. TUBB6	78. VAMP3	79. VAT1; 或	

[0031] (ii) 由 Hg19 坐标确定的任一个或多个区域：

[0032]

1. chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999
2. chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079
3. chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196
4. chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839
5. chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251
6. chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380
7. chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181
8. chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203
9. chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511
10. chr18: 47, 309, 874-47, 340, 251
11. chr15: 90, 328, 126-90, 358, 072
12. chr4: 79, 472, 742-79, 531, 605
13. chr21: 27, 252, 861-27, 543, 138
14. chr12: 105, 567, 075-105, 630, 008
15. chr7: 99, 564, 350-99, 573, 735
16. chrX: 152, 760, 347-152, 775, 004
17. chr20: 47894715-47905797
18. chr20: 47894715-47905797
19. chr20: 47894715-47905797
20. chr20: 47894715-47905797
21. chr20: 47894808-47905797
22. chr20: 47895179-47905797
23. chr20: 47895179-47905797
24. chr19: 13, 049, 414-13, 055, 304
25. chr1: 40, 506, 255-40, 538, 321
26. chr6: 75, 794, 042-75, 915, 623
27. chr20: 47, 662, 838-47, 713, 486
28. chr11: 88, 026, 760-88, 070, 941
29. chr4: 74, 902, 312-74, 904, 490
30. chr10: 124, 320, 181-124, 403, 252
31. chr1: 8, 921, 059-8, 939, 151
32. chr1: 110, 292, 702-110, 306, 644
33. chr4: 126315091-126414087
34. chr5: 150935821-150948505
35. chr4: 187627717-187647850
36. chr4: 187508937-187516980
37. chr5: 150883653-150948505
38. chr5: 150883653-150911531
39. chr4: 187508937-187644987
40. chr4: 126237567-126414087
41. chr4: 126369616-126412943
42. chr11: 92085262-92629635
43. chr11: 92573728-92629635
44. chr11: 61, 731, 757-61, 735, 132
45. chr12: 51, 745, 833-51, 785, 200
46. chr6: 1, 624, 035-2, 245, 868
47. chr5: 180, 663, 928-180, 670, 906
48. chr12: 13, 043, 956-13, 066, 600
49. chrX: 65, 382, 433-65, 487, 230
50. chr6 : 3, 774, 425-3, 787, 546
51. chr4: 175, 411, 328-175, 443, 792
52. chr14: 102547075-102606086
53. chr11: 313, 991-315, 272
54. chr11: 308, 107-309, 410
55. chr12: 53, 290, 971-53, 298, 868
56. chr9: 130, 911, 732-130, 915, 734
57. chr12: 21, 788, 275-21, 810, 789
58. chr12: 50, 569, 563-50, 677, 353
59. chr15: 30, 262, 050-30, 265, 947
60. chr2: 44, 113, 363-44, 223, 144
61. chr9: 130, 214, 534-130, 265, 780
62. chr9: 20, 344, 968-20, 622, 514
63. chr11: 102, 391, 239-102, 401, 478
64. chr3: 124, 624, 289-124, 653, 595
65. chr18: 47, 349, 156-47, 721, 451
66. chr8: 134, 249, 414-134, 309, 547

[0033]

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 67. chr10: 21, 068, 903-21, 186, 531 | 68. chr16: 69, 743, 304-69, 760, 533 |
| 69. chr2: 174, 937, 175-175, 113, 365 | 70. chr1: 207, 101, 867-207, 119, 811 |
| 71. chr1: 45, 976, 707-45, 988, 562 | 72. chr3: 93, 591, 881-93, 692, 934 |
| 73. chr9: 80, 912, 059-80, 945, 009 | 74. chr7: 105, 096, 960-105, 162, 685 |
| 75. chr19: 16, 222, 490-16, 244, 445 | 76. chr12: 112, 842, 994-112, 847, 443 |
| 77. chrX: 71, 492, 453-71, 497, 141 | 78. chr2: 3, 622, 853-3, 628, 509 |
| 79. chr1: 153, 600, 873-153, 604, 513 | 80. chr1: 153, 507, 076-153, 508, 717 |
| 81. chr4: 6, 695, 566-6, 698, 897 | 82. chr12: 56, 623, 820-56, 631, 629 |
| 83. chr16: 87, 863, 629-87, 903, 100 | 84. chr10: 105, 727, 470-105, 787, 342 |
| 85. chr21: 33, 031, 935-33, 041, 243 | 86. chr15: 45, 315, 302-45, 367, 287 |
| 87. chr1: 59, 041, 095-59, 043, 166 | 88. chr6: 160, 199, 530-160, 210, 735 |
| 89. chr3: 195, 776, 155-195, 809, 032 | 90. chr5: 135, 364, 584-135, 399, 507 |
| 91. chr6: 169, 615, 875-169, 654, 137 | 92. chr12: 27, 124, 506-27, 167, 339 |
| 93. chr18: 12, 308, 257-12, 326, 568 | 94. chr1: 7, 831, 329-7, 841, 492 |
| 95. chr17: 41, 166, 622-41, 174, 459 | |

[0034] 其中所述 RNA 转录物的表达水平相对于对照水平的升高表明肿瘤的发生或发生倾向。

[0035] 在另一个方面,所述 RNA 转录物是 mRNA。

[0036] 在另一个方面,所述膜质微泡是外来体。

[0037] 在其它方面,所述基因是下述的一个或多个:

[0038] (i)

[0039] 1. KIAA1199 2. CRNDE 3. OLFM4 4. DPEP1

[0040] 5. TESC 6. SLC12A2 7. ITGA6 8. REG4

[0041] 9. S100A11; 或

[0042] (ii) 由 Hg19 坐标确定的一个或多个区域:

[0043]

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999 | 2. chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079 |
| 3. chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196 | 4. chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839 |
| 5. chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251 | 6. chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380 |
| 7. chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181 | 8. chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203 |
| 9. chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511 | |

[0044] 在其它方面,所述区域是如下的一个或多个:

[0045] (i)

[0046] 1. KIAA1199 2. CRNDE 3. OLFM4; 或

[0047] (ii) 由 Hg19 坐标确定的一个或多个区域:

[0048] 1. chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999 2. chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079

[0049] 3. chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196

[0050] 贯穿本说明书和其后的权利要求,除非上下文另有要求,否则用语“包含”以及变型例如“包含 (comprises)”和“包含 (comprising)”将被理解为意指包括所述整体或步骤,

或整体或步骤的组,但不排除任何其它整体或步骤,或整体或步骤的组。

[0051] 如本文中所用,术语“来源于”应被认为表明特定整体或整体的组源自指定的物种,但不一定直接获自所指定的来源。此外,如本文中所用,除非上下文另外明确地指出,否则“一种/一个(a)”、“和”以及“所指物(the)”的单数形式包括复数指代。

[0052] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属的领域内的技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0053] 附图简述

[0054] 图 1 是人血浆中的 GAPDH 水平的图示 (n=398)。

[0055] 图 2 是描述在来自结肠直肠癌患者 (显示了 45 名患者的组) 的血浆中更频繁地检测到 KIAA1199 的图示。

[0056] 发明详述

[0057] 本发明是部分地基于如下确定:在已知在结肠直肠癌形成患者中进行增加的表达的基因的组中,事实上存在一个小亚组的基因,所述基因在这些患者的膜质微泡例如外来体中的升高的水平是可检测的。该确定是令人惊讶的。虽然大多数在组织中以升高的水平表达的基因被预期在血浆中,特别是在蛋白质水平上是可检测的,但事实是检测的灵敏度并非总是足够的。由于外来体的固有性质,以及现可以可靠地富集它们的事实,提供了比仅筛查全血或血浆的蛋白质或 RNA 显著更灵敏和精确的在 RNA 水平上测试这些基因的表达水平的变化的手段。当与外来体可从血液样品中方便地收集的事实一起考虑时,提供了基于最低限度的侵入方案来筛查结肠直肠癌形成的特别灵敏的手段。这在使得能够进行结肠直肠癌形成的早期诊断的情境中是高度相关的。

[0058] 因此,本发明的一个方面涉及筛查个体的大肠肿瘤的发生或发生倾向的方法,所述方法包括测量下述在来自所述个体的膜质微泡中的表达水平:

[0059] (i) 选自下述的任一个或多个基因:

[0060]

1. KIAA1199	2. CRNDE	3. OLFM4	4. DPEP1
5. TBSC	6. SLC12A2	7. ITGA6	8. REG4
9. S100A11	10. ACAA2	11. ANPEP	12. ANXA3
13. APP	14. APPL2	15. AZGP1	16. BGN
17. c20orf199	18. CALR	19. CAP1	20. COL12A1
21. CSB1L	22. CTSC	23. CXCL3	24. DMBT1
25. BNO1	26. EPS8L3	27. FAT	28. FTH1
29. GALNT6	30. GMDS	31. GNB2L1	32. GPRC5A
33. HEPH	34. HLADRB1	35. HPGD	36. HSP90AA1
37. IFITM1	38. IFITM2	39. KRT8	40. LCN2
41. LDHB	42. LIMA1	43. LOC440264	44. LRPPRC
45. LRSAM1	46. MLLT3	47. MMP7	48. MUC13
49. MYO5B	50. NDRG1	51. NEBL	52. NQO1
53. OLA1	54. PIGR	55. PRDX1	56. PROS1
57. PSAT1	58. PUS7	59. RAB8A	60. RPL6
61. RPS4X	62. RPS7	63. S100A1	64. S100A6
65. S100P	66. SLC39A5	67. SLC7A5	68. SLK
69. SOD1	70. SORD	71. TACSTD2	72. TCP1
73. TFRC	74. TGFBI	75. THBS2	76. TM7SF3
77. TUBB6	78. VAMP3	79. VAT1; 或	

[0061] (ii) 由 Hg19 坐标确定的任一个或多个区域：

[0062]

1. chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999	2. chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079
3. chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196	4. chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839
5. chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251	6. chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380
7. chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181	8. chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203
9. chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511	10. chr18: 47, 309, 874-47, 340, 251
11. chr15: 90, 328, 126-90, 358, 072	12. chr4: 79, 472, 742-79, 531, 605
13. chr21: 27, 252, 861-27, 543, 138	14. chr12: 105, 567, 075-105, 630, 008
15. chr7: 99, 564, 350-99, 573, 735	16. chrX: 152, 760, 347-152, 775, 004

[0063]

17. chr20: 47894715-47905797
19. chr20: 47894715-47905797
21. chr20: 47894808-47905797
23. chr20: 47895179-47905797
25. chr1: 40, 506, 255-40, 538, 321
27. chr20: 47, 662, 838-47, 713, 486
29. chr4: 74, 902, 312-74, 904, 490
31. chr1: 8, 921, 059-8, 939, 151
33. chr4: 126315091-126414087
35. chr4: 187627717-187647850
37. chr5: 150883653-150948505
39. chr4: 187508937-187644987
41. chr4: 126369616-126412943
43. chr11: 92573728-92629635
45. chr12: 51, 745, 833-51, 785, 200
47. chr5: 180, 663, 928-180, 670, 906
49. chrX: 65, 382, 433-65, 487, 230
51. chr4: 175, 411, 328-175, 443, 792
53. chr11: 313, 991-315, 272
55. chr12: 53, 290, 971-53, 298, 868
57. chr12: 21, 788, 275-21, 810, 789
59. chr15: 30, 262, 050-30, 265, 947
61. chr9: 130, 214, 534-130, 265, 780
63. chr11: 102, 391, 239-102, 401, 478
65. chr18: 47, 349, 156-47, 721, 451
67. chr10: 21, 068, 903-21, 186, 531
69. chr2: 174, 937, 175-175, 113, 365
71. chr1: 45, 976, 707-45, 988, 562
73. chr9: 80, 912, 059-80, 945, 009
75. chr19: 16, 222, 490-16, 244, 445
77. chrX: 71, 492, 453-71, 497, 141
79. chr1: 153, 600, 873-153, 604, 513
81. chr4: 6, 695, 566-6, 698, 897
83. chr16: 87, 863, 629-87, 903, 100
85. chr21: 33, 031, 935-33, 041, 243
87. chr1: 59, 041, 095-59, 043, 166
89. chr3: 195, 776, 155-195, 809, 032
91. chr6: 169, 615, 875-169, 654, 137
93. chr18: 12, 308, 257-12, 326, 568
18. chr20: 47894715-47905797
20. chr20: 47894715-47905797
22. chr20: 47895179-47905797
24. chr19: 13, 049, 414-13, 055, 304
26. chr6: 75, 794, 042-75, 915, 623
28. chr11: 88, 026, 760-88, 070, 941
30. chr10: 124, 320, 181-124, 403, 252
32. chr1: 110, 292, 702-110, 306, 644
34. chr5: 150935821-150948505
36. chr4: 187508937-187516980
38. chr5: 150883653-150911531
40. chr4: 126237567-126414087
42. chr11: 92085262-92629635
44. chr11: 61, 731, 757-61, 735, 132
46. chr6: 1, 624, 035-2, 245, 868
48. chr12: 13, 043, 956-13, 066, 600
50. chr6 : 3, 774, 425-3, 787, 546
52. chr14: 102547075-102606086
54. chr11: 308, 107-309, 410
56. chr9: 130, 911, 732-130, 915, 734
58. chr12: 50, 569, 563-50, 677, 353
60. chr2: 44, 113, 363-44, 223, 144
62. chr9: 20, 344, 968-20, 622, 514
64. chr3: 124, 624, 289-124, 653, 595
66. chr8: 134, 249, 414-134, 309, 547
68. chr16: 69, 743, 304-69, 760, 533
70. chr1: 207, 101, 867-207, 119, 811
72. chr3: 93, 591, 881-93, 692, 934
74. chr7: 105, 096, 960-105, 162, 685
76. chr12: 112, 842, 994-112, 847, 443
78. chr2: 3, 622, 853-3, 628, 509
80. chr1: 153, 507, 076-153, 508, 717
82. chr12: 56, 623, 820-56, 631, 629
84. chr10: 105, 727, 470-105, 787, 342
86. chr15: 45, 315, 302-45, 367, 287
88. chr6: 160, 199, 530-160, 210, 735
90. chr5: 135, 364, 584-135, 399, 507
92. chr12: 27, 124, 506-27, 167, 339
94. chr1: 7, 831, 329-7, 841, 492

[0064]

95. chr17: 41, 166, 622-41, 174, 459

[0065] 其中所述基因的表达水平相对于对照水平的升高表明肿瘤的发生或发生倾向。

[0066] 应当理解,在本文中通过提及所涉及的基因的名称和它们的染色体坐标来描述所述基因。染色体坐标与 2009 年 2 月发布的人基因组数据库 Hg19 版(在本文中称为“Hg19 坐标”)一致。

[0067] “大肠”应当理解为是指来源于大肠的 6 个解剖区之一的细胞,所述区域始于回肠的末端区域之后,这些解剖区是:

[0068] (i) 盲肠;

[0069] (ii) 升结肠;

[0070] (iii) 横结肠;

[0071] (iv) 降结肠;

[0072] (v) 乙状结肠;和

[0073] (vi) 直肠。

[0074] “肿瘤”应当理解为是指包括赘生性细胞的损伤、肿块或其它被包封的或未被包封在包膜内的团块或其它生长形式。“赘生性细胞”应当被理解是指显示异常生长的细胞。术语“生长”应当以其最广的意义来理解,包括指增殖。在方面,异常细胞生长的实例是细胞的不受控制的增殖。另一个实例是细胞中失败的细胞凋亡,从而延长其通常的寿命。赘生性细胞可以是良性细胞或恶性细胞。在优选的实施方案中,受试肿瘤是腺瘤或腺癌。不将本发明限制于任何一个理论或作用模式,腺瘤通常是来源于上皮组织或显示明确确定的上皮结构的上皮来源的良性肿瘤。这些结构可采取腺状外观。其可在腺瘤内包含恶性细胞群体,例如随着良性腺瘤至恶性腺癌的进展而发生。

[0075] 本发明被设计来筛查位于大肠内的赘生性细胞或细胞群体。因此,“细胞或细胞群体”应当理解是指个体细胞或细胞群。所述细胞群可以是细胞的弥散群体、细胞悬浮物、被包封的细胞群体或采取组织形式的细胞群。

[0076] 在一个实施方案中,所述肿瘤是腺瘤或腺癌,甚至更优选地是结肠直肠腺瘤或腺癌。

[0077] 上文详述的基因(在本文中统称为“基因标记物”)及其转录的和翻译的表达产物应当理解是指这些基因和蛋白质的所有形式以及其片段。如本领域技术人员将理解的,已知基因显示个体间的等位基因或多态性变异。因此,这些基因应当理解为扩展至这样的变体,所述变体在本诊断应用方面实现了相同的结果,尽管实际核酸序列之间的少数遗传变异可存在于个体之间。通常还可存在基因标记的剪接变体,这是指这些基因的可变转录形式,所述可变转录形式显示外显子表达和排列上的变化,例如在多个外显子组合或可变的 5'-或 3'-末端的方面。本发明从而应当被理解为扩展至 RNA 的所有形式(例如,mRNA、初级 RNA 转录物、miRNA 等)、cDNA 和源自可变剪接或任何其它突变、多态性或等位基因变化的同种型。还应当理解包括意指任何亚单位多肽例如前体形式。

[0078] 在本发明的方法方面,筛查这些基因标记的“表达水平”可以以多种方式实现,包括筛查从这些基因转录的 RNA 或从其产生的 cDNA 的任何形式。“筛查 RNA 转录物水平”应当理解是指直接筛查 RNA 或筛查从其转录的 cDNA。任何这些产物的水平的变化表明受试基因的表达的变化。此外,被鉴定和测量的核酸分子可以是完整的分子或其片段。例如,可仅鉴定来自外来体样品的 RNA 的片段,这取决于其是如何被加工的。如果所述片段包含足够

的对于特定基因表明其来源的序列,则片段化的基因分子在本发明的方法的情境中是有用的。

[0079] 还应当理解,表达水平可通过筛查受试基因的蛋白质表达产物(包括其片段)在膜质微泡中的水平来评估。本文中描述的基因的蛋白质序列是公知的并且可由本领域技术人员从公共可进入的数据库常规地获得。然而,本文中提供了 KIA1199(SEQ ID NO:1)、OLF4(SEQ ID NO:2)、DPEP1(SEQ ID No:3 和 4)、S100A11(SEQ ID NO:5)、ITGA6(SEQ ID No:6 和 7)、TESC(SEQ ID No:8 和 9)、REG4(SEQ ID No:10、11 和 12) 和 SLC12A2(SEQ ID NO:13) 的蛋白质序列。

[0080] 在一个实施方案中,所述方法涉及筛查所述基因的蛋白质表达产物或其片段。

[0081] “核酸分子”应当被理解为指脱氧核糖核酸分子和核糖核酸分子及其片段。本发明从而扩展至直接筛查外来体样品中的 RNA 水平或筛查已从目标 RNA 群体反转录的互补 cDNA。设计用于筛查 DNA 或 RNA 的方法完全在本领域技术人员的技能之内。

[0082] “片段”应当被理解为指一部分受试基因或核酸分子。如在上文中详细描述,这特别是与筛查外来体样品中经调节的 RNA 水平相关,所述 RNA 可能经酶促处理,因为受试 RNA 可能已被降解或以其它方式片段化。从而可实际上检测受试 RNA 分子的片段,所述片段通过使用适当的特异性探针来鉴定。

[0083] 在另一个实施方案中,提供了筛查个体的大肠肿瘤的发生或发生倾向的方法,所述方法包括测量从基因转录的 RNA 转录物在来自所述个体的膜质微泡样品中的水平,所述基因选自:

[0084] (i) 选自下述的任一个或多个基因:

[0085]

1. KIAA1199	2. CRNDE	3. OLFM4	4. DPEP1
5. TESC	6. SLC12A2	7. ITGA6	8. REG4
9. S100A11	10. ACAA2	11. ANPEP	12. ANXA3
13. APP	14. APPL2	15. AZGP1	16. BGN
17. c20orf199	18. CALR	19. CAP1	20. COL12A1
21. CSE1L	22. CTSC	23. CXCL3	24. DMBT1
25. ENO1	26. BPS8L3	27. FAT	28. FTH1
29. GALNT6	30. GMDS	31. GNB2L1	32. GPRC5A
33. HEPH	34. HLADRB1	35. HPGD	36. HSP90AAA1
37. IFITM1	38. IFITM2	39. KRT8	40. LCN2
41. LDHB	42. LIMA1	43. LOC440264	44. LRPPRC
45. LRSAM1	46. MLLT3	47. MMP7	48. MUC13
49. MYO5B	50. NDRG1	51. NEBL	52. NQO1
53. OLA1	54. PIGR	55. PRDX1	56. PROS1
57. PSAT1	58. PUS7	59. RAB8A	60. RPL6
61. RPS4X	62. RPS7	63. S100A1	64. S100A6
65. S100P	66. SLC39A5	67. SLC7A5	68. SLK
69. SOD1	70. SORD	71. TACSTD2	72. TCP1
73. TFRC	74. TGFBI	75. THBS2	76. TM7SF3
77. TUBB6	78. VAMP3	79. VAT1; 或	

[0086] (ii) 由 Hg19 坐标确定的任一个或多个区域：

[0087]

1. chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999
2. chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079
3. chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196
4. chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839
5. chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251
6. chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380
7. chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181
8. chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203
9. chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511
10. chr18: 47, 309, 874-47, 340, 251
11. chr15: 90, 328, 126-90, 358, 072
12. chr4: 79, 472, 742-79, 531, 605
13. chr21: 27, 252, 861-27, 543, 138
14. chr12: 105, 567, 075-105, 630, 008
15. chr7: 99, 564, 350-99, 573, 735
16. chrX: 152, 760, 347-152, 775, 004
17. chr20: 47894715-47905797
18. chr20: 47894715-47905797
19. chr20: 47894715-47905797
20. chr20: 47894715-47905797
21. chr20: 47894808-47905797
22. chr20: 47895179-47905797
23. chr20: 47895179-47905797
24. chr19: 13, 049, 414-13, 055, 304
25. chr1: 40, 506, 255-40, 538, 321
26. chr6: 75, 794, 042-75, 915, 623
27. chr20: 47, 662, 838-47, 713, 486
28. chr11: 88, 026, 760-88, 070, 941
29. chr4: 74, 902, 312-74, 904, 490
30. chr10: 124, 320, 181-124, 403, 252
31. chr1: 8, 921, 059-8, 939, 151
32. chr1: 110, 292, 702-110, 306, 644
33. chr4: 126315091-126414087
34. chr5: 150935821-150948505
35. chr4: 187627717-187647850
36. chr4: 187508937-187516980
37. chr5: 150883653-150948505
38. chr5: 150883653-150911531
39. chr4: 187508937-187644987
40. chr4: 126237567-126414087
41. chr4: 126369616-126412943
42. chr11: 92085262-92629635
43. chr11: 92573728-92629635
44. chr11: 61, 731, 757-61, 735, 132
45. chr12: 51, 745, 833-51, 785, 200
46. chr6: 1, 624, 035-2, 245, 868
47. chr5: 180, 663, 928-180, 670, 906
48. chr12: 13, 043, 956-13, 066, 600
49. chrX: 65, 382, 433-65, 487, 230
50. chr6 : 3, 774, 425-3, 787, 546
51. chr4: 175, 411, 328-175, 443, 792
52. chr14: 102547075-102606086
53. chr11: 313, 991-315, 272
54. chr11: 308, 107-309, 410
55. chr12: 53, 290, 971-53, 298, 868
56. chr9: 130, 911, 732-130, 915, 734
57. chr12: 21, 788, 275-21, 810, 789
58. chr12: 50, 569, 563-50, 677, 353
59. chr15: 30, 262, 050-30, 265, 947
60. chr2: 44, 113, 363-44, 223, 144
61. chr9: 130, 214, 534-130, 265, 780
62. chr9: 20, 344, 968-20, 622, 514
63. chr11: 102, 391, 239-102, 401, 478
64. chr3: 124, 624, 289-124, 653, 595
65. chr18: 47, 349, 156-47, 721, 451
66. chr8: 134, 249, 414-134, 309, 547
67. chr10: 21, 068, 903-21, 186, 531
68. chr16: 69, 743, 304-69, 760, 533
69. chr2: 174, 937, 175-175, 113, 365
70. chr1: 207, 101, 867-207, 119, 811
71. chr1: 45, 976, 707-45, 988, 562
72. chr3: 93, 591, 881-93, 692, 934

[0088]

- | | |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| 73. chr9: 80,912,059-80,945,009 | 74. chr7: 105,096,960-105,162,685 |
| 75. chr19: 16,222,490-16,244,445 | 76. chr12: 112,842,994-112,847,443 |
| 77. chrX: 71,492,453-71,497,141 | 78. chr2: 3,622,853-3,628,509 |
| 79. chr1: 153,600,873-153,604,513 | 80. chr1: 153,507,076-153,508,717 |
| 81. chr4: 6,695,566-6,698,897 | 82. chr12: 56,623,820-56,631,629 |
| 83. chr16: 87,863,629-87,903,100 | 84. chr10: 105,727,470-105,787,342 |
| 85. chr21: 33,031,935-33,041,243 | 86. chr15: 45,315,302-45,367,287 |
| 87. chr1: 59,041,095-59,043,166 | 88. chr6: 160,199,530-160,210,735 |
| 89. chr3: 195,776,155-195,809,032 | 90. chr5: 135,364,584-135,399,507 |
| 91. chr6: 169,615,875-169,654,137 | 92. chr12: 27,124,506-27,167,339 |
| 93. chr18: 12,308,257-12,326,568 | 94. chr1: 7,831,329-7,841,492 |
| 95. chr17: 41,166,622-41,174,459 | |

[0089] 其中所述 RNA 转录物的表达水平相对于对照水平的升高表明肿瘤的发生或发生倾向。

[0090] 在一个实施方案中,所述 RNA 转录物是 mRNA。

[0091] “膜质微泡”应当理解为指由细胞质膜组分组成的任何颗粒。所述膜质微泡可采用采取由质膜包围的管腔的形式的结构。膜质微泡的实例包括但不限于微粒、外来体、细胞凋亡膜泡、细胞凋亡小体、细胞膜泡等。在一个实施方案中,所述膜质微泡是外来体。

[0092] 因此,本发明的另一个方面涉及筛查个体的大肠肿瘤的发生或发生倾向的方法,所述方法包括测量如下基因在来自所述个体的外来体样品中的表达水平;

[0093] (i) 选自下述的任一个或多个基因:

[0094]

- | | | | |
|---------------|-------------|---------------|--------------|
| 1. KIAA1199 | 2. CRNDE | 3. OLFM4 | 4. DPEP1 |
| 5. TESC | 6. SLC12A2 | 7. ITGA6 | 8. REG4 |
| 9. S100A11 | 10. ACAA2 | 11. ANPEP | 12. ANXA3 |
| 13. APP | 14. APPL2 | 15. AZGP1 | 16. BGN |
| 17. c20orf199 | 18. CALR | 19. CAP1 | 20. COL12A1 |
| 21. CSE1L | 22. CTSC | 23. CXCL3 | 24. DMBT1 |
| 25. ENO1 | 26. EPS8L3 | 27. FAT | 28. FTH1 |
| 29. GALNT6 | 30. GMDS | 31. GNB2L1 | 32. GPRC5A |
| 33. HEPH | 34. HLADRB1 | 35. HPGD | 36. HSP90AA1 |
| 37. IFITM1 | 38. IFITM2 | 39. KRT8 | 40. LCN2 |
| 41. LDHB | 42. LIMA1 | 43. LOC440264 | 44. LRPPRC |
| 45. LRSAM1 | 46. MLLT3 | 47. MMP7 | 48. MUC13 |

[0095]

49. MYO5B	50. NDRG1	51. NEBL	52. NQO1
53. OLA1	54. PIGR	55. PRDX1	56. PROS1
57. PSAT1	58. PUS7	59. RAB8A	60. RPL6
61. RPS4X	62. RPS7	63. S100A1	64. S100A6
65. S100P	66. SLC39A5	67. SLC7A5	68. SLK
69. SOD1	70. SORD	71. TACSTD2	72. TCP1
73. TFRC	74. TGFBI	75. THBS2	76. TM7SF3
77. TUBB6	78. VAMP3	79. VAT1; 或	

[0096] (ii) 由 Hg19 坐标确定的任一个或多个区域：

[0097]

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1. chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999 | 2. chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079 |
| 3. chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196 | 4. chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839 |
| 5. chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251 | 6. chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380 |
| 7. chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181 | 8. chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203 |
| 9. chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511 | 10. chr18: 47, 309, 874-47, 340, 251 |
| 11. chr15: 90, 328, 126-90, 358, 072 | 12. chr4: 79, 472, 742-79, 531, 605 |
| 13. chr21: 27, 252, 861-27, 543, 138 | 14. chr12: 105, 567, 075-105, 630, 008 |
| 15. chr7: 99, 564, 350-99, 573, 735 | 16. chrX: 152, 760, 347-152, 775, 004 |
| 17. chr20: 47894715-47905797 | 18. chr20: 47894715-47905797 |
| 19. chr20: 47894715-47905797 | 20. chr20: 47894715-47905797 |
| 21. chr20: 47894808-47905797 | 22. chr20: 47895179-47905797 |
| 23. chr20: 47895179-47905797 | 24. chr19: 13, 049, 414-13, 055, 304 |
| 25. chr1: 40, 506, 255-40, 538, 321 | 26. chr6: 75, 794, 042-75, 915, 623 |
| 27. chr20: 47, 662, 838-47, 713, 486 | 28. chr11: 88, 026, 760-88, 070, 941 |
| 29. chr4: 74, 902, 312-74, 904, 490 | 30. chr10: 124, 320, 181-124, 403, 252 |
| 31. chr1: 8, 921, 059-8, 939, 151 | 32. chr1: 110, 292, 702-110, 306, 644 |
| 33. chr4: 126315091-126414087 | 34. chr5: 150935821-150948505 |
| 35. chr4: 187627717-187647850 | 36. chr4: 187508937-187516980 |
| 37. chr5: 150883653-150948505 | 38. chr5: 150883653-150911531 |
| 39. chr4: 187508937-187644987 | 40. chr4: 126237567-126414087 |
| 41. chr4: 126369616-126412943 | 42. chr11: 92085262-92629635 |
| 43. chr11: 92573728-92629635 | 44. chr11: 61, 731, 757-61, 735, 132 |
| 45. chr12: 51, 745, 833-51, 785, 200 | 46. chr6: 1, 624, 035-2, 245, 868 |
| 47. chr5: 180, 663, 928-180, 670, 906 | 48. chr12: 13, 043, 956-13, 066, 600 |
| 49. chrX: 65, 382, 433-65, 487, 230 | 50. chr6 : 3, 774, 425-3, 787, 546 |
| 51. chr4: 175, 411, 328-175, 443, 792 | 52. chr14: 102547075-102606086 |
| 53. chr11: 313, 991-315, 272 | 54. chr11: 308, 107-309, 410 |
| 55. chr12: 53, 290, 971-53, 298, 868 | 56. chr9: 130, 911, 732-130, 915, 734 |

[0098]

- | | |
|--|--|
| 57. chr12: 21, 788, 275-21, 810, 789 | 58. chr12: 50, 569, 563-50, 677, 353 |
| 59. chr15: 30, 262, 050-30, 265, 947 | 60. chr2: 44, 113, 363-44, 223, 144 |
| 61. chr9: 130, 214, 534-130, 265, 780 | 62. chr9: 20, 344, 968-20, 622, 514 |
| 63. chr11: 102, 391, 239-102, 401, 478 | 64. chr3: 124, 624, 289-124, 653, 595 |
| 65. chr18: 47, 349, 156-47, 721, 451 | 66. chr8: 134, 249, 414-134, 309, 547 |
| 67. chr10: 21, 068, 903-21, 186, 531 | 68. chr16: 69, 743, 304-69, 760, 533 |
| 69. chr2: 174, 937, 175-175, 113, 365 | 70. chr1: 207, 101, 867-207, 119, 811 |
| 71. chr1: 45, 976, 707-45, 988, 562 | 72. chr3: 93, 591, 881-93, 692, 934 |
| 73. chr9: 80, 912, 059-80, 945, 009 | 74. chr7: 105, 096, 960-105, 162, 685 |
| 75. chr19: 16, 222, 490-16, 244, 445 | 76. chr12: 112, 842, 994-112, 847, 443 |
| 77. chrX: 71, 492, 453-71, 497, 141 | 78. chr2: 3, 622, 853-3, 628, 509 |
| 79. chr1: 153, 600, 873-153, 604, 513 | 80. chr1: 153, 507, 076-153, 508, 717 |
| 81. chr4: 6, 695, 566-6, 698, 897 | 82. chr12: 56, 623, 820-56, 631, 629 |
| 83. chr16: 87, 863, 629-87, 903, 100 | 84. chr10: 105, 727, 470-105, 787, 342 |
| 85. chr21: 33, 031, 935-33, 041, 243 | 86. chr15: 45, 315, 302-45, 367, 287 |
| 87. chr1: 59, 041, 095-59, 043, 166 | 88. chr6: 160, 199, 530-160, 210, 735 |
| 89. chr3: 195, 776, 155-195, 809, 032 | 90. chr5: 135, 364, 584-135, 399, 507 |
| 91. chr6: 169, 615, 875-169, 654, 137 | 92. chr12: 27, 124, 506-27, 167, 339 |
| 93. chr18: 12, 308, 257-12, 326, 568 | 94. chr1: 7, 831, 329-7, 841, 492 |
| 95. chr17: 41, 166, 622-41, 174, 459 | |

[0099] 其中所述基因的表达水平相对于对照水平的升高表明肿瘤的发生或发生倾向。

[0100] 在一个实施方案中,所述大肠瘤形成是结肠直肠腺瘤或腺癌。

[0101] 在另一个实施方案中,所述基因表达水平是 RNA 转录物例如 mRNA 的水平。

[0102] 在另一个实施方案中,所述方法涉及筛查所述基因的蛋白质表达产物或其片段。

[0103] “外来体”应当被理解为指由多种细胞类型分泌的囊泡。不将本发明限定于任何一个理论或作用模式,晚期内体或多泡体包含管腔内囊泡,所述管腔内囊泡是通过囊泡从有限的内体膜向内出芽和分离进入这些封闭的纳米囊泡而形成的。这些管腔内囊泡随后在与质膜融合后的胞吐作用过程中从多泡体腔释放进入细胞外环境中。当膜的片段陷入并且被内吞时,在细胞内产生外来体。分裂成更小的囊泡并且最终从细胞排出的内化的片段包含蛋白质和 RNA 分子例如 mRNA 和 miRNA。由于血浆来源的外来体大体上不含核糖体 RNA,因此它们是有用的 RNA 来源,特别是因为现已确定了在结肠直肠瘤形成中观察到的某些增加的基因表达被反映在循环外来体群体中。

[0104] 从生物样品富集本发明的外来体。“生物样品”是指来源于个体的任何生物材料。此类样品包括但不限于血液、血清、血浆、尿、淋巴、脑脊髓液、腹水、唾液、粘液、粪便、活检标本、母乳、胃液、胸膜液、精液、汗、眼泪、毛发、阴道分泌物和被引入个体的身体并且随后被除去的液体,例如在肺灌洗后从肺提取的盐溶液或从肠灌洗回收的溶液。按照本发明的方法测试的生物样品可被直接测试或可在测试前需要某种形式的预处理。例如,样品可能需要添加试剂例如缓冲剂来使样品运动。还应当理解,作为测试的受试体的样品可以是新鲜分离的,或其可以已在更早的时刻被分离并且随后被贮存或以其它方式在测试之前被处

理。例如,可在更早的时刻收集样品,将其冷冻或以其它方式保存以帮助其转运至测试位置。在另一个实例中,可处理样品以中和任何可能的病原性感染,从而减少感染向技术人员传播的风险。

[0105] 在一个实施方案中,所述生物样品是血液、血清、血浆、尿、粪便、唾液、眼泪或腹水样品。

[0106] 在从个体收集的受试者生物样品的方面,术语“个体”应当理解为包括人、灵长类动物、家畜类动物(例如,绵羊、猪、牛、马、驴)、实验室试验动物(例如,小鼠、大鼠、兔子、豚鼠)、伴侣动物(例如狗、猫)、俘获的野生动物(例如狐狸、袋鼠、鹿)、鸟类(例如鸡、鹅、鸭、鹌鹑、鸵鸟)、爬行动物或鱼。优选地,受试个体是人。

[0107] 在另一个实施方案中,所述基因是下述的一个或多个:

[0108] (i)

[0109] 1. KIAA1199 2. CRNDE 3. OLFM4 4. DPEP1

[0110] 5. TESC 6. SLC12A2 7. ITGA6 8. REG4

[0111] 9. S100A11 ;或

[0112] (ii) 由 Hg19 坐标确定的一个或多个区域:

[0113]

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1. chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999 | 2. chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079 |
| 3. chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196 | 4. chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839 |
| 5. chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251 | 6. chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380 |
| 7. chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181 | 8. chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203 |
| 9. chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511 | |

[0114] 在另一个实施方案中,所述区域是下述的一个或多个

[0115] (i)

[0116] 1. KIAA1199 2. CRNDE 3. OLFM4; 或

[0117] (ii) 由 Hg19 坐标确定的一个或多个区域:

[0118] chr15:81, 071, 712-81, 243, 999 chr16:54, 952, 778-54, 963, 079

[0119] chr13:53, 602, 876-53, 626, 196

[0120] 本发明的方法基于所述基因标记在外来体样品中的表达水平与这些基因的对照水平的比较。“对照水平”是“正常水平”,其是由来自正常个体的对应外来体群体所表达的基因的水平。

[0121] 正常(或“非赘生性”)水平可使用任何适当的方法来测定,例如测试结果相对于标准结果的分析,所述标准结果反映从除了所述患者外的个体获得的个体或集体结果。该分析形式实际上是优选的分析方法,因为其使得能够相对于预定的标准设计需要收集和分析单个外来体样品(为目标测试样品)的试剂盒。提供正常水平的标准结果可通过任何适当的方法来计算,所述方法对于本领域技术人员来说将是熟知的。例如,可在组织中基因标记的水平方面评价一群源自正常血浆的外来体,从而提供针对其对所有将来的测试样品进行分析的标准值或值的范围。还应当理解,正常水平可从特定的受试者群体测定并且用于测试来源于该群体的样品。因此,可测定许多对应于在特征例如年龄、性别、种族性或健康状态方面不同的群体的标准值或范围。所述“正常水平”可以是离散的水平或一系列水平。

受试基因标记的表达水平相对于正常水平的升高表明组织是赘生性的。

[0122] 优选地,所述对照水平是非赘生性水平。

[0123] 根据本发明的这些方面,所述大肠组织优选是结肠直肠组织。

[0124] 更优选地,所述肿瘤是结肠直肠腺瘤或腺癌。

[0125] 在基因标记转录产物存在于外来体样品中的方面,可直接测试生物样品,否则可在测试之前分离存在于外来体样品中的全部或一些核酸物质。为此,以及如上文中所描述的,将理解当筛查所述基因标记的表达水平的变化时,可筛查 RNA 转录物本身或已从其转录的 cDNA。在测试之前预处理(例如灭活活病毒或在凝胶上电泳)外来体群体或来源于其的分子在本发明的范围内。还应当理解外来体样品可以是新鲜收集的或可在测试之前被贮存(例如通过冷冻)或在测试之前以其它方式被处理。

[0126] 选择什么类型的样品最适合于按照本文中公开的方法进行测试将取决于情形的性质。

[0127] 肿瘤例如腺瘤或腺癌的“发生”应当被理解为指显示发育异常的该个体的一个或多个细胞。在这方面,由于发育异常的细胞团块已产生,腺瘤或腺癌可能是良好发展的。或者,腺瘤或腺癌可处于非常早的阶段,这在于在诊断时仅有相对少的异常细胞分裂发生。本发明还扩展至评价个体发生肿瘤例如腺瘤或腺癌的倾向。不以任何方式限定本发明,基因标记的改变的水平可表明个体发生瘤形成(例如,将来发生腺瘤或腺癌或另一种腺瘤或腺癌)的倾向。

[0128] 虽然优选的方法是诊断瘤形成的产生或其倾向,但检测所述标记的水平的逆向改变在某些情况(例如监测用于调节赘生性病况例如腺瘤或腺癌发展的治疗性或预防性治疗的功效)下可能是需要的。例如,在升高的基因标记水平表明个体已发生特征在于腺瘤或腺癌发展的病况时,筛查在治疗方案开始后该标记水平的下降可用于指示受试个体的病况的逆转或其它形式的改善。

[0129] 本发明的方法从而可用作一次性测试(one time test)或用作对被认为处于瘤形成发展的风险中的那些个体的持续监测物或用作对用于抑制或以其它方式减缓瘤形成发展的治疗性或预防性治疗方案的功效的监测物。在这些情况下,绘制外来体中基因标记表达水平的调节是个体状态或目前使用的治疗或预防性方案的功效的有价值的指示者。因此,本发明的方法应被理解为扩展至监测个体中基因标记表达水平相对于正常水平(如上文中定义的)或相对于从所述个体的生物样品测定的一个或多个更早的标记表达水平的改变。

[0130] 外来体样品可来源于任何适当的生物样品,并且可从该样品分离或富集。用于进行分离或富集的方法是已知的,并且选择和应用适合于特定情境的方法在本领域技术人员的技能之内。例如,可通过使外来体为其一部分的生物样品经受机械破裂(从而细胞材料而非外来体被破裂和酶促清除)来富集外来体。由于细胞相对于外来体的物理特征的差异,可设计机械细胞破裂方法而使得它们显示充分力量以破裂细胞但不破裂外来体。这归因于物理特征的显著差异例如细胞相对于外来体的相对更大的质量。因为用于检查生物样品以鉴定完整细胞或外来体的存在的方法是极其简单和常规的,因此用来优化用于机械细胞破裂的任何公知标准技术以确保外来体不也被破裂的手段是常规程序。类似地,优化任何新产生的技术也将是简单直接的。

- [0131] 实现机械细胞破裂的方法在本领域是公知,包括但不限于:
- [0132] (i) 离心
- [0133] (ii) 超声处理(包含或不包含表面活性剂)
- [0134] (iii) 使用例如小玻璃珠、陶瓷珠、锆珠或钢珠,添加或不添加表面活性剂而进行珠磨法
- [0135] (iv) 匀浆化
- [0136] (v) 氮爆搅动法
- [0137] (vi) 小型探头超声
- [0138] (vii) 低渗休克
- [0139] (viii) 高剪切机械法;
- [0140] (ix) 转子-定子扰乱器,
- [0141] (x) 阀式处理器 (valve-type processors),
- [0142] (xi) 固定几何形状处理器,
- [0143] (xii) 恒压处理器,
- [0144] (xiii) 基于渗透作用的电穿孔,和
- [0145] (xiv) 电通透作用。

[0146] 在受试生物样品是血液或血浆样品,或天然地或以其它方式包含降解目标诊断分子的酶的任何其它生物样品的方面,例如,该富集法将不仅相对于该样品中的细胞群体而且还相对于非外来体蛋白质性质和非蛋白质性质的材料方便地实现外来体群体的富集。

[0147] 因为本发明的诊断法需要对外来体核酸物质进行扩增或测序以检测目标基因标记的存在,因此使用上文中所述的富集法将意味着将无需进一步纯化受试生物样品,因为用于分析核酸物质的技术在这方面是选择性的并且如果非外来体核酸物质已被降解,将获得准确的结果。该富集法实现了在分析源自外来体的核酸之前,不破坏外来体的结构而除去不想要的细胞物质,以及因天然存在于血浆中的核酸酶而降解污染性的核酸分子。

[0148] 尽管在其标准应用中该富集法可基于密度应用离心力来分离样品中的组分,但其主要被设计来选择性地破裂细胞(而非仅将它们推入沉淀中),然后倾析/收集包含外来体的上清液。如果不使用破裂细胞的适当的离心力,则即使上清液与沉淀分离,其仍可能包含保留它们的核酸内容物的污染性细胞。在此情况下,由于收集外来体群体的目的是分析其RNA,因此这将必然导致异常结果,因为所有被设计为维持和收集外来体RNA的步骤将同样地维持和收集存留在溶液中的完整细胞的RNA。然而,通过施用选择性破裂细胞的力,所有的细胞被裂解,从而外来体群体被高度富集。因此不必将上清液与可能形成的任何沉淀分离,因为任何这样的沉淀将不包含完整的细胞。此种额外分离步骤从而将是多余的。

[0149] 甚至在寻求分析外来体RNA的方面,外来体保留在具有经降解的细胞材料的溶液中产生的后果很小,因为新暴露的细胞核酸将被天然存在于生物样品中或被添加至样品中的酶降解。因此,无需进行进一步富集和纯化。然而,应当理解,这不排除进行任何其它的步骤。例如,可能希望进行一次或多次离心以沉淀出并且除去一部分存在于样品中的最致密的颗粒物质,以及此后对从其中收集的上清液施行诊断方法。然而,该特定富集技术的独特优势是这实际上不是必需的。然而,在应用本诊断法之前确定使用哪种类型的样品和其制备模式的性质以及在富集后如何处理经富集的外来体群体完全在本领域技术人员的技

能范围内。

[0150] 如上文中所详述的,应当理解在机械细胞破裂后,溶液中仍然可存留一些污染物(即,非外来体分子)。在这些污染物是核酸分子例如 DNA 和 RNA 的方面,可方便地去除它们。类似地,也可除去蛋白质。这可通过使用酶例如核酸酶和蛋白酶来实现。如果为了评估它们的核酸或蛋白质含量而未曾裂解外来体本身,这提供了进一步纯化通过本发明的方法获得的样品的方便的手段。为此,已观察到在至少血浆样品中,存在充足的核糖核酸酶来降解游离 RNA,例如因机械破裂步骤后污染性细胞的破碎而被释放的源自胞质的 RNA。由于该方法确保了维持外来体(尽管不是细胞)的完整性,在外来体内包含的 RNA 是最终目标的方面,这提供了除去污染性游离 RNA(从而由分析源自外来体的 RNA 获得的结果是准确的)的方便手段。应当理解,如果不足量的功能性核酸酶(DNA 酶或核糖核酸酶)或甚至蛋白酶天然存在于样品中,可将这些子在任何适当的时刻(例如在机械细胞破裂过程开始之前或在此过程当中)引入样品。

[0151] 纯化外来体的其它方法包括公知的现有技术例如基于密度的分离技术、过滤或膜抗原特异性亲和分离。

[0152] 在寻求分离和分析外来体内的 RNA 例如以评估基因标记表达水平的变化方面,必需裂解外来体以暴露其核酸内容物并且随后分析核酸分子的 mRNA 亚群。为此,外来体 RNA 的分析通常基于总 RNA 的分离,随后对特定目标转录物进行 PCR 扩增。用于分离和分析总 RNA 的方法是公知的。

[0153] 存在许多可用于和已被用于从外来体分离总 RNA 的方法。从此类外来体分离总 RNA 的第一步是在变性条件下破开外来体。所利用的方法反映了用于从细胞分离 RNA 的方法。Chirgwin 等人 *Biochemistry*, 18(24):5294-9, 1979) 设计了用于高效分离(通过在具有 0.1M β -巯基乙醇的蛋白质变性剂硫氰酸胍的 4M 溶液中匀浆化以断裂蛋白质二硫键)总 RNA 的方法。Chirgwin 随后通过乙醇提取或通过经由氯化铯的超速离心分离了 RNA。Chomczynski 和 Sacchi (*Analytical Biochemistry*, 162(1):156-9, 1987) 改良了该方法,从而设计了使用硫氰酸胍和酚氯仿的混合物的快速单步骤提取程序,其为对于处理大量样品或从少量细胞或组织分离 RNA 特别有用的方法。

[0154] 许多目前可获得的试剂盒是基于这两种方法,使用硫氰酸胍和酚氯仿的专有混合物以获得最佳结果。还可使用备选的裂解法例如去污剂裂解和用至亲和基质的吸附替代的有机提取法。

[0155] 获得分离的核酸需要细胞裂解和细胞核酸酶的灭活,这是一个必须足够严苛以破开细胞,但足够温和以产生完整的核酸的过程。这可通过匀浆化而机械地实现或通过去污剂裂解或离液剂而化学地来实现。在大多数程序中,裂解和灭活使通过单一溶液实现的。例如,由 Molecular Research Center Inc. 制造的并且用于 Life Technologies' **MessageMaker**[®] mRNA 分离系统中的 TRIzol 试剂是酸性苯酚和异硫氰酸胍的混合物。将组织样品在 TRIzol 中裂解,通过氯仿提取和异丙醇沉淀获得总 RNA。类似地,用于来自 BIOTECH Laboratories Inc. 的 **ULTRASPEC**[®] RNA 分离试剂盒的 Chaosolv 是 14M 的胍盐和尿素的溶液,其用作变性剂并且与苯酚及其它去污剂结合使用。

[0156] 对于难以通过常规方法从其中提取 RNA 的细胞和组织,Bio101 提供了 FastPrep 系

统。该系统基于台式设备,其使用快速往复运动以及基质与离液试剂的组合来在数秒内同时匀浆组织、裂解细胞和稳定 RNA。裂解基质的快速搅拌引起多种物质的高效裂解。每一种 **FastRNA®** 试剂盒(被设计来从特定细胞和组织类型分离 RNA) 包含不同的裂解基质:二氧化硅颗粒(用于细菌)、陶瓷颗粒(用于酵母、真菌和藻类)以及铅颗粒(用于植物和动物组织)。

[0157] 基于二氧化硅或玻璃的基质或过滤器是用于选择性吸附 RNA 的普遍选择。总 RNA 在离液盐的存在下结合至基质或过滤器,通常使得用户能够避免使用有机溶剂来从裂解物进行提取。

[0158] Ambion 的 RNAqueous 系统依赖于 RNA 对玻璃纤维滤器的结合。在被设计用来小规模应用的标准 RNAqueous 试剂盒中,将过滤器置于离心管内的滤芯中。通过离心或在真空下驱动溶液通过过滤器。对于更大规模的应用,将过滤器置于 RNAqueous-MIDI 试剂盒的 lure lock 注射器滤器中。可使用 10- 或 20-ml 注射器推动溶液通过玻璃纤维滤器。为了同时处理数个样品,可将注射器滤器装置装配在真空歧管上。

[0159] Bio101 的 RNaid Plus 试剂盒包括基于专有硅胶的 **RNAMATRIX®**。在使 RNA 结合至 RNAMATRIX 之前,该方案需要对裂解物进行酸酚提取。RNA 结合是以分批的形式,并且使用离心组件从基质分离经洗脱的 RNA。

[0160] 通过使用反相结合策略,将 Bionline Ltd. 的 RNace 试剂盒用于通过将污染性 DNA 结合至矿物载体来从细胞裂解物分离 RNA。所产生的上清液包含不含污染性 DNA 的未降解的 RNA。

[0161] CLONTECH 提供 **NucleoSpin®** RNA II 和 NucleoTrap mRNA 试剂盒,两者都基于通过二氧化硅支持体的 RNA 的纯化。NucleoSpin 柱包含在离液盐的存在下结合 DNA 和 RNA 的独特二氧化硅膜。通过将 DNA 酶 I 直接添加至柱子来从制备物除去 DNA。NucleoTrap 是悬浮的活化的球状二氧化硅基质,其结合 RNA。

[0162] S. N. A. P. 是可从 Invitrogen Corp 获得的基于二氧化硅的树脂。在 S. N. A. P. 总 RNA 分离试剂盒中,树脂为膜/柱子形式,其允许高效的多样品处理。

[0163] Life Technologies 的 GLASSMAX RNA 分离离心芯包含结合 RNA 的带负电荷的二氧化硅基质。在异硫氰酸胍中裂解细胞,将样品悬浮于酸性钠溶液中。将其应用于离心芯,随后可从所述离心芯洗脱结合的 RNA。

[0164] QIAGEN 的 RNeasy 试剂盒通过硅胶膜将异硫氰酸胍裂解物与快速纯化的优势相结合。为了适应多种应用,将膜置于各种尺寸的离心柱内和 96 孔板中。可使用真空歧管、离心机来手工地进行 RNeasy96 程序,或在 BioRobot9604 上自动化地进行。为了增加来自植物组织的 RNA 产率,将 QIAshredder 柱包括在 RNeasy Plant Mini 试剂盒中。在使用 RNeasy 离心柱之前,使用这些柱子来匀质化和过滤粘稠的植物和真菌裂解物。

[0165] Roche Molecular Biochemicals 的 High Pure RNA 分离试剂盒在离心过滤管中采用玻璃纤维网(fleece)以结合总核酸。共纯化的 DNA 最终通过 DNA 酶 I- 消化步骤降解。可获得用于从所培养的细胞、组织和病毒分离 RNA 的试剂盒。

[0166] StrataPrep Total RNA Miniprep 试剂盒从宽范围的样品量、从多种组织和细胞分离总 RNA。被设计用于需要少量 RNA 的实验的方案包括特定的 DNA 去除步骤,该步骤使得

其理想地用于制备用与 RT-PCR 的总 RNA。微离心杯 (microspin-cup) 形式允许同时处理大量样品。

[0167] 磁力分离提供分离 RNA 的快速手段。超顺磁性颗粒(可从许多物质例如聚苯乙烯或氧化铁及多糖制造)在置于磁场中时是有磁性的,但当从磁场中除去时不存留残余的磁性。这种缺少残余磁性确保了可反复分离和重悬所述颗粒而没有磁力诱导的聚集。

[0168] 来自 Advanced Biotechnologies 的 RiboMag 总 RNA 分离试剂盒将磁力分离和二氧化硅吸附相结合来进行总 RNA 的分离。在无酚裂解步骤和快速离心以沉淀细胞壁后,将上清液与磁性二氧化硅混合。对于超过 10 μ g 的量,可用醇沉淀替代磁力分离。可获得用于 10 或 20 个 1.5-ml 管和 96 孔板的磁力分离器。Advanced Biotechnologies 还提供基于苯酚胍的总 RNA 分离试剂 (TRIR),其用于进行从组织、细胞、细菌、植物、酵母和生物液体单步分离总 RNA。

[0169] 然而,要注意的是总 RNA 不仅仅包含 mRNA,当其仅形成总 RNA 的较少组分时(特别是当特定目标 mRNA 转录物为极低拷贝数时),mRNA 的特定分析不会是理想的。

[0170] 为此,由于最近确定了源自外来体的 mRNA 可以是全长的和多腺苷酸化的,这使得能够开发基于靶向 poly(A) 尾来特异性分离外来体 mRNA 的方法。靶向和分离多腺苷酸化 RNA 的方法在本领域是公知的并且被容易且常规地应用。

[0171] 本诊断性发明的 RNA 扩增和探测步骤依赖于引物的使用。“引物”或“寡核苷酸引物”应当被理解为指包含核苷酸序列的任意分子,或其功能性衍生物或类似物,所述分子的功能包括与目标核酸分子的区域杂交。应当理解,引物可包含非核酸组分。例如,引物还可包含非核酸标签例如荧光或酶促标签,或有助于将分子用作探针或以其它方式有助于其检测或固定的某些其它非核酸组分。引物还可包含其它的核酸组分例如在下文中更详细讨论的寡核苷酸标签。在另一个实例中,引物可以是包含展现核酸侧链的肽主链的蛋白质核酸。

[0172] 适用于本发明的引物的设计和合成对于本领域技术人员来说是公知的。在一个实施方案中,受试引物在长度上为 4 至 60 个核苷酸,在另一个实施方案中,长度为 10 至 50 个核苷酸,在又一个实施方案中,长度为 15 至 45 个核苷酸,在另一个实施方案中,长度为 20 至 40 个核苷酸,在另一个实施方案中,长度为 25 至 35 个核苷酸。在另一个实施方案中引物在长度上为约 26、27、28、29、30、31、32、33 或 34 个核苷酸。

[0173] 可将各种技术用于分析扩增产物以确定相对基因表达水平。它们的操作特征例如使用的容易性或灵敏度不同,从而不同的技术可用于不同目的。它们包括但不限于:

- [0174] • 测序
- [0175] • 焦磷酸测序
- [0176] • 酶降解
- [0177] • 微阵列分析
- [0178] • 变性梯度凝胶电泳
- [0179] • 基于琼脂糖凝胶的分离
- [0180] • 在实时 PCR 循环仪上进行的熔解曲线分析
- [0181] • 定量实时 PCR
- [0182] • 变性高效液相色谱
- [0183] • 质谱法

- [0184] • 引物延伸
- [0185] • 寡核苷酸 - 连接
- [0186] • 突变特异性聚合酶链式反应
- [0187] • 变性梯度电泳 (DGGE)
- [0188] • 温度梯度变性电泳
- [0189] • 恒定变性电泳
- [0190] • 单链构象电泳
- [0191] • 变性高效液相色谱 (DHPLC)

[0192] 在蛋白质表达产物的检测方面,可通过许多本领域技术人员公知的适当方法的任何一种测试生物样品种的蛋白质性质表达产物。适当的方法的实例包括但不限于基于抗体的筛查,例如在 Western 印迹、ELISA、免疫组织化学或流式细胞术的情境中。当然,这些方法包括非竞争性类型的单位点和两位点或“夹心”测定,以及常规竞争性结合测定。这些测定还包括标记抗体与靶标的直接结合。

[0193] 选择和应用筛查上文中论述的基因标记表达水平的适当方法完全在本领域技术人员的技能之内。

[0194] 本发明通过参考下列非限制性实施例而被进一步描述。

[0195] 实施例 1

[0196] 为了测试基因标记在血浆样品中的可检测性,商购可得的 TaqMan 测定购自 Applied Biosystems。利用 42 个匹配的正常样本和锯齿状腺瘤的 Human ST Exon1.0 微阵列研究来指导 PCR 扩增子位置的定位(即哪个外显子 - 外显子连接),即朝向显示正常与腺瘤性结肠样本之间最高倍数的差异的外显子。

[0197] 将靶向总共 46 个基因(在附录 1 和 2 中具有红色 / 绿色的基因)的总共 68 个 TaqMan 测定被用于 2.5 μ L 从 RNA(从 2mL 血浆提取的)产生的 cDNA(RNA:cDNA1:1)。从对收集在 9mL K3-EDTA 真空采血管中的全血进行的两个连续离心步骤(1500g, 10min, 4 $^{\circ}$ C)产生血浆。在至少一组 45 个血浆样本(来自 15 名正常患者,15 名结肠直肠癌患者和 15 名结肠直肠癌患者(通过结肠镜检查获得的表型))上测试了 TaqMan 测定。表 1(和表 2 及 3)总结了源自 46 个独特基因的 RNA 的信号。

[0198] 根据表 2 很明显的是组织 mRNA 在血浆中的可检测性与在结肠直肠增生性组织样本中观察到的表达水平不相关。例如,相较于非增生性对照,在增生性结肠组织样本中差异表达为前 5 的基因中,3 种转录物(即 DPEP1、MMP7 和 CDH3)在获自结肠直肠癌患者的人血浆中不可检测(即使使用非常灵敏的方法)。相反地,在正常与增生性样本之间仅显示相对小的差异表达的那些结肠直肠组织生物标志物中一些在血浆样本中被容易地检测到,例如 CRNDE 和 OLFM4。

[0199] 研究了下述因素:例如扩增子位置(即什么外显子 - 外显子连接被 PCR 测定扩增)、扩增子尺寸(更大的扩增子尺寸更难以 PCR 扩增)、通过 PCR 测定扩增的剪接变体的数目、染色体链和染色体位置、mRNA 的尺寸和 mRNA 的亚细胞定位。未看到这些因素相对于 mRNA 在血浆中的可检测性之间的相关性。

[0200] 然而,观察到的出乎意料和令人惊讶的相关性是一些 mRNA 靶标的血浆可检测性与假定的外来体含量之间的相关性。这导致确定了一些在结肠直肠癌形成中表达增加的基

因标记实际上在外来体中可以以显著升高的水平检测,而其它的基因标记(令人惊讶地)则不能。

[0201] 实施例 2

[0202] 材料和方法

[0203] 临床样本

[0204] 通过与 Flinders 医学中心 (Adelaide, Australia) 的合作或从临床样本提供商 (Proteogenex, USA) 获得了来自健康供体 (136)、腺瘤 (124, 任何分级) 和癌症 (138, 任何分级) 患者的血液样本。通过对所有样本的结肠镜检查 and 病理学检查确认了结肠直肠增生性状态。使用 2x1500g 离心方案在 4 小时的抽血内从全血取血样本 (K3EDTA 真空采血管) 产生血浆。

[0205] 血浆 RNA 提取、cDNA 文库的产生和提取质量控制

[0206] 使用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Extraction 试剂盒 (Qiagen, Australia) 从 2mL 血浆等分提取 RNA, 将其洗脱至 100pL 的终体积中。为了归一化样本之间核酸提取效率的差异, 在 RNA 分离之前将 arRNA 肠道病毒 (Asuragen, US) 掺入每一个血浆样本, 并在提取过程的下游测量了回收。通过将 10 μ L RNA 转化成 20 μ l cDNA 反应 (**SuperScript®**, Invitrogen, USA) 产生了 10 个不同的 cDNA 组 (每组包含 15 个健康供体、15 个腺瘤和 15 个癌症)。

[0207] 通过 qRT-PCR 进行的血浆 mRNA 表达分析

[0208] 使用靶向 48 个独特基因的 Taqman 基因表达测定 (Applied Biosystems, USA) 检查组织至血浆表达可移植性。以一式三份对 2.5 μ L cDNA/ 患者进行测定。患者倍数变化被计算为相对于“正常”样本的中位 Ct 值的患者平均 Ct 值 (arRNA 校正的)。

[0209] 血浆可检测的 vs. 不可检测的 mRNA 转录物的分析

[0210] 将在血浆中可检测的 mRNA 的亚组与在血浆中不可检测的 mRNA 转录物在一系列描述符协变量 (例如扩增子长度、染色体位置、GC 含量等) 上相比较。具体地, 评价了 mRNA 表达与已观察到特定 mRNA 或蛋白质在来源于一系列人和鼠组织细胞的外来体中是可检测的证据的对应性。

[0211] 结果

[0212] (1) 容易地从血浆样本提取了总 RNA

[0213] 在所有 398 个使用商购可得的 TaqMAN Gene Expression GAPDH 测定 Hs99999905_m1 (Applied Biosystems, USA) 分析的血浆样本中检测到了 GAPDH (Ct 平均值 30.21; 95%CI: 27.5 至 32.9)。

[0214] (2) 血浆中的可检测性与结肠组织中的生物标志物表达之间的关系

[0215] 在所测试的 46 个不同的基因中, 21 个在任何血浆样本中未显示可检测的 RNA 信号, 而 22 个是可检测的, 但在癌症与非增生性对照血浆之间未差异性表达。相对于非增生性对照, 仅 3 个在组织中验证的 mRNA 生物标志物在增生性血浆中同样以更高的浓度表达。

[0216] (3) 血浆升高的增生性样本中的 KIAA1199 mRNA 水平

[0217] 将商购可得的 TaqMAN Gene Expression KIAA1199 测定 Hs01552116_m1 用于检测 6 个包含总共 96 个健康供体以及 95 个结肠直肠腺瘤和 99 个癌症患者的 cDNA 血浆文库中的 KIAA1199, 当应用如果一式三份重复的 3 个中有 2 个产生阳性 qRT-PCR 信号则称样本阳

性的标准时,平均灵敏度为 74%(CI:58-90%) 并且特异性为 66%(CI:45-87%)。

[0218] (4) 组织生物标志物的可检测性与微泡的外观相关

[0219] 调查了许多因素,但未解释缺乏组织-至-血液存在对应性,例如扩增子尺寸/位置、%GC、扩增的剪接变体的数目、转录物尺寸等。然而,血浆中的 RNA 检测与外来体表达的证据之间的对应性被鉴定。虽然这不完全与 ExoCarta 数据库(其为外来体蛋白质和 RNA 的数据库)中提供的信息相关。具体地,虽然近 30% 的在血浆中不具有 PCR 可扩增信号的基因被列于 ExoCarta 数据库中,然而近 30% 的在血浆中可检测的基因未出现在该数据库中。这可通过该数据库是从非人细胞系数据产生的事实来解释,并且显示出这些结果不可预测的性质和必须小心对待该数据库的效用的事实。

[0220] 本领域技术人员将理解,除了明确描述的之外,本文中描述的发明易于变化和修饰。应理解,本发明包括所有这样的变化和修饰。本发明还包括在本说明书中单个地或集体地提及或指明的所有步骤、特性、组合物和化合物,以及所述步骤或特性的任意两个或更多的任意组合和全部组合。

[0221] 表 1:

[0222] 基于使用商购可得的 TaqMan 测定在血浆中获得的信号

[0223]

	血浆中无信号	血浆中的信号, 但无表型差异	血浆中的信号和表型差异
# 基因	21	22	3
基因 ID	表 2 (以粗体文本表示的基因)	表 2 (加以下划线的基因)	OLFM4, KIAA1199, CRNDE

[0224] 表 2:

[0225] 上调的基因标记(已确认的并且大于 2 倍上调的)

[0226]

基因ID	改变倍数	基因ID	改变倍数	基因ID	改变倍数
MMP7	69.2940889	<u>TUBB6</u>	5.900896434	RNF43	3.235950018
CDH3	37.54418585	GDF15	5.837723023	COL12A1	3.159411751
<u>KIAA1199</u>	25.15771962	ESM1	5.770701347	IL8	3.099634128
DPEP1	23.90265692	SPINK4	5.532287396	<u>PUS7</u>	3.055262871
<u>TESC</u>	16.8359447	PSAT1	5.522261448	PVT1	3.032897709
TACSTD2	15.71389259	<u>GALNT6</u>	5.273892946	TIMP1	3.01157947
MMP3	15.62573272	PHLDA1	5.266112409	SOX4	2.885880403
TCN1	15.22244133	HPGD	5.163051582	<u>C20orf199</u>	2.86516777
<u>LCN2</u>	14.5998521	SLC6A6	5.024940341	CCND1	2.850006054
WDR72	14.11279645	CLCA4	4.936369867	UBE2C	2.821499493
REG1B	13.1524883	SLCO4A1	4.839723453	BGN	2.688136526
CLDN1	13.09118948	DUSP27	4.808410411	ANLN	2.629414188
CST1	13.0112388	NFE2L3	4.573155915	<u>ITGA6</u>	2.622725944
REG3A	12.09396998	MMP11	4.548834746	NQO1	2.615683201
TRIM29	11.01384395	CXCL5	4.479689229	GPR56	2.601986204
FOXQ1	10.96687218	AXIN2	4.438003402	COL11A1	2.601582944

[0227]

基因ID	改变倍数	基因ID	改变倍数	基因ID	改变倍数
REG1A	10.93384951	<u>S100P</u>	4.371856797	CTHRC1	2.570488121
MMP1	10.58656426	<u>SORD</u>	4.363772545	KCNQ1	2.531742623
CXCL1	10.40161869	<u>TGFBI</u>	4.312124487	COL1A1	2.499187467
SERPINB5	10.35507344	SCD	4.284540732	IFITM2	2.377199791
CCL20	10.13514886	CDCA7	4.270186463	PLCB4	2.369558592
RPESP	9.074780109	HIG2	4.252714357	FAP	2.326011697
LGR5	7.892049455	RPL22L1	4.185452765	EXO1	2.308015816
<u>CXCL3</u>	7.852054187	CKS2	4.153736931	FERMT1	2.280865345
CXCL2	7.852054187	MYC	4.114034116	CSE1 L	2.28086168
REG4	7.746359355	MTHFD1L	4.038731263	CDH11	2.248504671
ASCL2	7.733047831	ENC1	3.929471365	TMEPAI	2.195453935
DEFA6	7.106277407	<u>IFITM1</u>	3.866248082	LDHB	2.176297011
KRT23	6.809993042	SOX9	3.846462925	MUC12	2.126657261
LY6G6D	6.64089123	<u>S100A11</u>	3.832630399	SLC7A1	2.073994601
UBD	6.585360578	INHBA	3.758881226	TPX2	2.028679461
CADPS	6.45432004	GIF	3.666184963	TMEM97	2.773664788
TDGF1	6.33018716	<u>SLC12A2</u>	3.419383434	<u>GMDS</u>	2.699668005
SLC7A5	6.308424061	MET	3.346688346	SQLE	2.692691797
MMP12	6.240660755	ANXA3	3.337731608	NEBL	5.515804992
AZGP1	6.187044505	SPP1	3.324938278	ECT2	2.816640259

[0228] 表 3: 在血浆中筛查的其它标记

[0229]

GIF	GPA33	<u>RPL14</u>	<u>GAPDH</u>
HTERT	AOF2	<u>SDHA</u>	<u>OLFM4</u>
JUB	<u>AUTS2</u>	<u>CRNDE</u>	
SLITRK6	<u>ACTB</u>	<u>ALDOA</u>	

[0230] 表 4:

[0231] mRNA 转录物在人血浆中的可检测性

[0232]

血浆中无信号	检测到扩增子 无表型特征谱	检测到扩增子 表型特征谱
测试的 46 个中的 21 个 (46%) ASCL2; CDH3; COL11A1; DEFA6; GDF15; GIF; hTERT; INHBA; JUB; LGR5; MET; RNF43; SLITRK6; TCN1; NFE2L3; DPEP1; FOXQ1; GPA33; MMP7; NEBL; REG4	测试的 46 个中的 22 个 (48%) AOF2; AUTS2; CXCL3; GALNT6; TESC; SNORD12; ACTB; ALDOA; GAPDH; GMDS; IFITM1; ITGA6; LCN2; PUS7; RPL14; S100A11; SLC12A2; SORD; TGFBI; S100P; SDHA;	测试的 46 个中的 3 个 (6%) CRNDE; KIAA1199; OLFM4

[0233] 表 5:

基因名称	染色体坐标 (Hg19)
KIAA1199	chr15: 81, 071, 712-81, 243, 999
CRNDE	chr16: 54, 952, 778-54, 963, 079
OLFM4	chr13: 53, 602, 876-53, 626, 196
DPEP1	chr16: 89, 687, 000-89, 704, 839
TESC	chr12: 117, 476, 728-117, 537, 251
SLC12A2	chr5: 127, 419, 483-127, 525, 380
ITGA6	chr2: 173, 292, 314-173, 371, 181
REG4	chr1: 120, 336, 641-120, 354, 203
S100A11	chr1: 152, 004, 982-152, 009, 511
ACAA2	chr18: 47, 309, 874-47, 340, 251
ANPEP	chr15: 90, 328, 126-90, 358, 072
ANXA3	chr4: 79, 472, 742-79, 531, 605
APP	chr21: 27, 252, 861-27, 543, 138
APPL2	chr12: 105, 567, 075-105, 630, 008
AZGP1	chr7: 99, 564, 350-99, 573, 735
BGN	chrX: 152, 760, 347-152, 775, 004
c20orf199	chr20: 47894715-47905797, chr20: 47894715-47905797, chr20: 47894715-47905797,

[0234]

[0235]

基因名称	染色体坐标 (Hg19)
	chr20: 47894715-47905797, chr20: 47894808-47905797, chr20: 47895179-47905797, chr20: 47895179-47905797
CALR	chr19: 13, 049, 414-13, 055, 304
CAP1	chr1: 40, 506, 255-40, 538, 321
COL12A1	chr6: 75, 794, 042-75, 915, 623
CSE1L	chr20: 47, 662, 838-47, 713, 486
CTSC	chr11: 88, 026, 760-88, 070, 941
CXCL3	chr4: 74, 902, 312-74, 904, 490
DMBT1	chr10: 124, 320, 181-124, 403, 252
ENO1	chr1: 8, 921, 059-8, 939, 151
EPS8L3	chr1: 110, 292, 702-110, 306, 644
FAT FAT4	chr4: 126315091-126414087
FAT2	chr5: 150935821-150948505
FAT1	chr4: 187627717-187647850
FAT1	chr4: 187508937-187516980
FAT2	chr5: 150883653-150948505
FAT2	chr5: 150883653-150911531
FAT1	chr4: 187508937-187644987
FAT4	chr4: 126237567-126414087
FAT4	chr4: 126369616-126412943
FAT3	chr11: 92085262-92629635
FAT3	chr11: 92573728-92629635
FTH1	chr11: 61, 731, 757-61, 735, 132
GALNT6	chr12: 51, 745, 833-51, 785, 200
GMDS	chr6: 1, 624, 035-2, 245, 868
GNB2L1	chr5: 180, 663, 928-180, 670, 906
GPRC5A	chr12: 13, 043, 956-13, 066, 600
HEPH	chrX: 65, 382, 433-65, 487, 230
HLADRB1	chr6 : 3, 774, 425-3, 787, 546
HPGD	chr4: 175, 411, 328-175, 443, 792
HSP90AA1	chr14: 102547075-102606086
IFITM1	chr11: 313, 991-315, 272
IFITM2	chr11: 308, 107-309, 410
KRT8	chr12: 53, 290, 971-53, 298, 868
LCN2	chr9: 130, 911, 732-130, 915, 734

[0236]

基因名称	染色体坐标 (Hg19)
LDHB	chr12: 21, 788, 275-21, 810, 789
LIMA1	chr12: 50, 569, 563-50, 677, 353
LOC440264	chr15: 30, 262, 050-30, 265, 947
LRPPRC	chr2: 44, 113, 363-44, 223, 144
LRSAM1	chr9: 130, 214, 534-130, 265, 780
MLLT3	chr9: 20, 344, 968-20, 622, 514
MMP7	chr11: 102, 391, 239-102, 401, 478
MUC13	chr3: 124, 624, 289-124, 653, 595
MYO5B	chr18: 47, 349, 156-47, 721, 451
NDRG1	chr8: 134, 249, 414-134, 309, 547
NEBL	chr10: 21, 068, 903-21, 186, 531
NQO1	chr16: 69, 743, 304-69, 760, 533
OLA1	chr2: 174, 937, 175-175, 113, 365
PIGR	chr1: 207, 101, 867-207, 119, 811
PRDX1	chr1: 45, 976, 707-45, 988, 562
PROS1	chr3: 93, 591, 881-93, 692, 934
PSAT1	chr9: 80, 912, 059-80, 945, 009
PUS7	chr7: 105, 096, 960-105, 162, 685
RAB8A	chr19: 16, 222, 490-16, 244, 445
RPL6	chr12: 112, 842, 994-112, 847, 443
RPS4X	chrX: 71, 492, 453-71, 497, 141
RPS7	chr2: 3, 622, 853-3, 628, 509
S100A1	chr1: 153, 600, 873-153, 604, 513
S100A6	chr1: 153, 507, 076-153, 508, 717
S100P	chr4: 6, 695, 566-6, 698, 897
SLC39A5	chr12: 56, 623, 820-56, 631, 629
SLC7A5	chr16: 87, 863, 629-87, 903, 100
SLK	chr10: 105, 727, 470-105, 787, 342
SOD1	chr21: 33, 031, 935-33, 041, 243
SORD	chr15: 45, 315, 302-45, 367, 287
TACSTD2	chr1: 59, 041, 095-59, 043, 166
TCP1	chr6: 160, 199, 530-160, 210, 735
TFRC	chr3: 195, 776, 155-195, 809, 032
TGFBI	chr5: 135, 364, 584-135, 399, 507
THBS2	chr6: 169, 615, 875-169, 654, 137
TM7SF3	chr12: 27, 124, 506-27, 167, 339
TUBB6	chr18: 12, 308, 257-12, 326, 568

	基因名称	染色体坐标 (Hg19)
[0237]	VAMP3	chr1: 7, 831, 329-7, 841, 492
	VAT1	chr17: 41, 166, 622-41, 174, 459

[0238] 书目

[0239] Chirgwin 等人 Biochemistry, 18(24):5294-9, 1979)

[0240] Chomczynski and Sacchi (Analytical Biochemistry, 162(1):156-9, 1987

[0001]

序列表

<110> Clinical Genomics Pty. Ltd.
 LAPOINTE, Lawrence C (US only)
 PEDERSEN, Susanne K (US only)

<120> 诊断肿瘤的方法

<130> 35108339/TDQ

<150> US 61/483028
 <151> 2011-05-05

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 1361
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 1

Met Gly Ala Ala Gly Arg Gln Asp Phe Leu Phe Lys Ala Met Leu Thr
 1 5 10 15

Ile Ser Trp Leu Thr Leu Thr Cys Phe Pro Gly Ala Thr Ser Thr Val
 20 25 30

Ala Ala Gly Cys Pro Asp Gln Ser Pro Glu Leu Gln Pro Trp Asn Pro
 35 40 45

Gly His Asp Gln Asp His His Val His Ile Gly Gln Gly Lys Thr Leu
 50 55 60

Leu Leu Thr Ser Ser Ala Thr Val Tyr Ser Ile His Ile Ser Glu Gly
 65 70 75 80

Gly Lys Leu Val Ile Lys Asp His Asp Glu Pro Ile Val Leu Arg Thr
 85 90 95

Arg His Ile Leu Ile Asp Asn Gly Gly Glu Leu His Ala Gly Ser Ala
 100 105 110

Leu Cys Pro Phe Gln Gly Asn Phe Thr Ile Ile Leu Tyr Gly Arg Ala
 115 120 125

Asp Glu Gly Ile Gln Pro Asp Pro Tyr Tyr Gly Leu Lys Tyr Ile Gly
 130 135 140

Val Gly Lys Gly Gly Ala Leu Glu Leu His Gly Gln Lys Lys Leu Ser
 145 150 155 160

Trp Thr Phe Leu Asn Lys Thr Leu His Pro Gly Gly Met Ala Glu Gly
 165 170 175

Gly Tyr Phe Phe Glu Arg Ser Trp Gly His Arg Gly Val Ile Val His
 180 185 190

Val Ile Asp Pro Lys Ser Gly Thr Val Ile His Ser Asp Arg Phe Asp
 195 200 205

[0002]

Thr Tyr Arg Ser Lys Lys Glu Ser Glu Arg Leu Val Gln Tyr Leu Asn
 210 215 220
 Ala Val Pro Asp Gly Arg Ile Leu Ser Val Ala Val Asn Asp Glu Gly
 225 230 235 240
 Ser Arg Asn Leu Asp Asp Met Ala Arg Lys Ala Met Thr Lys Leu Gly
 245 250 255
 Ser Lys His Phe Leu His Leu Gly Phe Arg His Pro Trp Ser Phe Leu
 260 265 270
 Thr Val Lys Gly Asn Pro Ser Ser Ser Val Glu Asp His Ile Glu Tyr
 275 280 285
 His Gly His Arg Gly Ser Ala Ala Ala Arg Val Phe Lys Leu Phe Gln
 290 295 300
 Thr Glu His Gly Glu Tyr Phe Asn Val Ser Leu Ser Ser Glu Trp Val
 305 310 315 320
 Gln Asp Val Glu Trp Thr Glu Trp Phe Asp His Asp Lys Val Ser Gln
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gly Glu Lys Ile Ser Asp Leu Trp Lys Ala His Pro Gly
 340 345 350
 Lys Ile Cys Asn Arg Pro Ile Asp Ile Gln Ala Thr Thr Met Asp Gly
 355 360 365
 Val Asn Leu Ser Thr Glu Val Val Tyr Lys Lys Gly Gln Asp Tyr Arg
 370 375 380
 Phe Ala Cys Tyr Asp Arg Gly Arg Ala Cys Arg Ser Tyr Arg Val Arg
 385 390 395 400
 Phe Leu Cys Gly Lys Pro Val Arg Pro Lys Leu Thr Val Thr Ile Asp
 405 410 415
 Thr Asn Val Asn Ser Thr Ile Leu Asn Leu Glu Asp Asn Val Gln Ser
 420 425 430
 Trp Lys Pro Gly Asp Thr Leu Val Ile Ala Ser Thr Asp Tyr Ser Met
 435 440 445
 Tyr Gln Ala Glu Glu Phe Gln Val Leu Pro Cys Arg Ser Cys Ala Pro
 450 455 460
 Asn Gln Val Lys Val Ala Gly Lys Pro Met Tyr Leu His Ile Gly Glu
 465 470 475 480
 Glu Ile Asp Gly Val Asp Met Arg Ala Glu Val Gly Leu Leu Ser Arg
 485 490 495
 Asn Ile Ile Val Met Gly Glu Met Glu Asp Lys Cys Tyr Pro Tyr Arg
 500 505 510

[0003]

Asn His Ile Cys Asn Phe Phe Asp Phe Asp Thr Phe Gly Gly His Ile
 515 520 525
 Lys Phe Ala Leu Gly Phe Lys Ala Ala His Leu Glu Gly Thr Glu Leu
 530 535 540
 Lys His Met Gly Gln Gln Leu Val Gly Gln Tyr Pro Ile His Phe His
 545 550 555 560
 Leu Ala Gly Asp Val Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Asp Pro Pro Thr Tyr
 565 570 575
 Ile Arg Asp Leu Ser Ile His His Thr Phe Ser Arg Cys Val Thr Val
 580 585 590
 His Gly Ser Asn Gly Leu Leu Ile Lys Asp Val Val Gly Tyr Asn Ser
 595 600 605
 Leu Gly His Cys Phe Phe Thr Glu Asp Gly Pro Glu Glu Arg Asn Thr
 610 615 620
 Phe Asp His Cys Leu Gly Leu Leu Val Lys Ser Gly Thr Leu Leu Pro
 625 630 635 640
 Ser Asp Arg Asp Ser Lys Met Cys Lys Met Ile Thr Glu Asp Ser Tyr
 645 650 655
 Pro Gly Tyr Ile Pro Lys Pro Arg Gln Asp Cys Asn Ala Val Ser Thr
 660 665 670
 Phe Trp Met Ala Asn Pro Asn Asn Asn Leu Ile Asn Cys Ala Ala Ala
 675 680 685
 Gly Ser Glu Glu Thr Gly Phe Trp Phe Ile Phe His His Val Pro Thr
 690 695 700
 Gly Pro Ser Val Gly Met Tyr Ser Pro Gly Tyr Ser Glu His Ile Pro
 705 710 715 720
 Leu Gly Lys Phe Tyr Asn Asn Arg Ala His Ser Asn Tyr Arg Ala Gly
 725 730 735
 Met Ile Ile Asp Asn Gly Val Lys Thr Thr Glu Ala Ser Ala Lys Asp
 740 745 750
 Lys Arg Pro Phe Leu Ser Ile Ile Ser Ala Arg Tyr Ser Pro His Gln
 755 760 765
 Asp Ala Asp Pro Leu Lys Pro Arg Glu Pro Ala Ile Ile Arg His Phe
 770 775 780
 Ile Ala Tyr Lys Asn Gln Asp His Gly Ala Trp Leu Arg Gly Gly Asp
 785 790 795 800
 Val Trp Leu Asp Ser Cys Arg Phe Ala Asp Asn Gly Ile Gly Leu Thr
 805 810 815

[0004]

Leu Ala Ser Gly Gly Thr Phe Pro Tyr Asp Asp Gly Ser Lys Gln Glu
 820 825 830

Ile Lys Asn Ser Leu Phe Val Gly Glu Ser Gly Asn Val Gly Thr Glu
 835 840 845

Met Met Asp Asn Arg Ile Trp Gly Pro Gly Gly Leu Asp His Ser Gly
 850 855 860

Arg Thr Leu Pro Ile Gly Gln Asn Phe Pro Ile Arg Gly Ile Gln Leu
 865 870 875 880

Tyr Asp Gly Pro Ile Asn Ile Gln Asn Cys Thr Phe Arg Lys Phe Val
 885 890 895

Ala Leu Glu Gly Arg His Thr Ser Ala Leu Ala Phe Arg Leu Asn Asn
 900 905 910

Ala Trp Gln Ser Cys Pro His Asn Asn Val Thr Gly Ile Ala Phe Glu
 915 920 925

Asp Val Pro Ile Thr Ser Arg Val Phe Phe Gly Glu Pro Gly Pro Trp
 930 935 940

Phe Asn Gln Leu Asp Met Asp Gly Asp Lys Thr Ser Val Phe His Asp
 945 950 955 960

Val Asp Gly Ser Val Ser Glu Tyr Pro Gly Ser Tyr Leu Thr Lys Asn
 965 970 975

Asp Asn Trp Leu Val Arg His Pro Asp Cys Ile Asn Val Pro Asp Trp
 980 985 990

Arg Gly Ala Ile Cys Ser Gly Cys Tyr Ala Gln Met Tyr Ile Gln Ala
 995 1000 1005

Tyr Lys Thr Ser Asn Leu Arg Met Lys Ile Ile Lys Asn Asp Phe
 1010 1015 1020

Pro Ser His Pro Leu Tyr Leu Glu Gly Ala Leu Thr Arg Ser Thr
 1025 1030 1035

His Tyr Gln Gln Tyr Gln Pro Val Val Thr Leu Gln Lys Gly Tyr
 1040 1045 1050

Thr Ile His Trp Asp Gln Thr Ala Pro Ala Glu Leu Ala Ile Trp
 1055 1060 1065

Leu Ile Asn Phe Asn Lys Gly Asp Trp Ile Arg Val Gly Leu Cys
 1070 1075 1080

Tyr Pro Arg Gly Thr Thr Phe Ser Ile Leu Ser Asp Val His Asn
 1085 1090 1095

Arg Leu Leu Lys Gln Thr Ser Lys Thr Gly Val Phe Val Arg Thr
 1100 1105 1110

[0005]

Leu Gln Met Asp Lys Val Glu Gln Ser Tyr Pro Gly Arg Ser His
 1115 1120 1125
 Tyr Tyr Trp Asp Glu Asp Ser Gly Leu Leu Phe Leu Lys Leu Lys
 1130 1135 1140
 Ala Gln Asn Glu Arg Glu Lys Phe Ala Phe Cys Ser Met Lys Gly
 1145 1150 1155
 Cys Glu Arg Ile Lys Ile Lys Ala Leu Ile Pro Lys Asn Ala Gly
 1160 1165 1170
 Val Ser Asp Cys Thr Ala Thr Ala Tyr Pro Lys Phe Thr Glu Arg
 1175 1180 1185
 Ala Val Val Asp Val Pro Met Pro Lys Lys Leu Phe Gly Ser Gln
 1190 1195 1200
 Leu Lys Thr Lys Asp His Phe Leu Glu Val Lys Met Glu Ser Ser
 1205 1210 1215
 Lys Gln His Phe Phe His Leu Trp Asn Asp Phe Ala Tyr Ile Glu
 1220 1225 1230
 Val Asp Gly Lys Lys Tyr Pro Ser Ser Glu Asp Gly Ile Gln Val
 1235 1240 1245
 Val Val Ile Asp Gly Asn Gln Gly Arg Val Val Ser His Thr Ser
 1250 1255 1260
 Phe Arg Asn Ser Ile Leu Gln Gly Ile Pro Trp Gln Leu Phe Asn
 1265 1270 1275
 Tyr Val Ala Thr Ile Pro Asp Asn Ser Ile Val Leu Met Ala Ser
 1280 1285 1290
 Lys Gly Arg Tyr Val Ser Arg Gly Pro Trp Thr Arg Val Leu Glu
 1295 1300 1305
 Lys Leu Gly Ala Asp Arg Gly Leu Lys Leu Lys Glu Gln Met Ala
 1310 1315 1320
 Phe Val Gly Phe Lys Gly Ser Phe Arg Pro Ile Trp Val Thr Leu
 1325 1330 1335
 Asp Thr Glu Asp His Lys Ala Lys Ile Phe Gln Val Val Pro Ile
 1340 1345 1350
 Pro Val Val Lys Lys Lys Lys Leu
 1355 1360
 <210> 2
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2
 Met Arg Pro Gly Leu Ser Phe Leu Leu Ala Leu Leu Phe Phe Leu Gly

[0006]

1	5	10	15
Gln Ala Ala Gly Asp Leu Gly Asp Val Gly Pro Pro Ile Pro Ser Pro	20	25	30
Gly Phe Ser Ser Phe Pro Gly Val Asp Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser	35	40	45
Ser Ser Arg Ser Gly Ser Ser Ser Ser Arg Ser Leu Gly Ser Gly Gly	50	55	60
Ser Val Ser Gln Leu Phe Ser Asn Phe Thr Gly Ser Val Asp Asp Arg	65	70	75
Gly Thr Cys Gln Cys Ser Val Ser Leu Pro Asp Thr Thr Phe Pro Val	85	90	95
Asp Arg Val Glu Arg Leu Glu Phe Thr Ala His Val Leu Ser Gln Lys	100	105	110
Phe Glu Lys Glu Leu Ser Lys Val Arg Glu Tyr Val Gln Leu Ile Ser	115	120	125
Val Tyr Glu Lys Lys Leu Leu Asn Leu Thr Val Arg Ile Asp Ile Met	130	135	140
Glu Lys Asp Thr Ile Ser Tyr Thr Glu Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys	145	150	155
Val Glu Val Lys Glu Met Glu Lys Leu Val Ile Gln Leu Lys Glu Ser	165	170	175
Phe Gly Gly Ser Ser Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Val Glu Ile Arg	180	185	190
Asn Met Thr Leu Leu Val Glu Lys Leu Glu Thr Leu Asp Lys Asn Asn	195	200	205
Val Leu Ala Ile Arg Arg Glu Ile Val Ala Leu Lys Thr Lys Leu Lys	210	215	220
Glu Cys Glu Ala Ser Lys Asp Gln Asn Thr Pro Val Val His Pro Pro	225	230	235
Pro Thr Pro Gly Ser Cys Gly His Gly Gly Val Val Asn Ile Ser Lys	245	250	255
Pro Ser Val Val Gln Leu Asn Trp Arg Gly Phe Ser Tyr Leu Tyr Gly	260	265	270
Ala Trp Gly Arg Asp Tyr Ser Pro Gln His Pro Asn Lys Gly Leu Tyr	275	280	285
Trp Val Ala Pro Leu Asn Thr Asp Gly Arg Leu Leu Glu Tyr Tyr Arg	290	295	300
Leu Tyr Asn Thr Leu Asp Asp Leu Leu Leu Tyr Ile Asn Ala Arg Glu			

[0007]

```

305                310                315                320

Leu Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Gly Ser Gly Thr Ala Val Tyr Asn Asn
    325                330                335

Asn Met Tyr Val Asn Met Tyr Asn Thr Gly Asn Ile Ala Arg Val Asn
    340                345                350

Leu Thr Thr Asn Thr Ile Ala Val Thr Gln Thr Leu Pro Asn Ala Ala
    355                360                365

Tyr Asn Asn Arg Phe Ser Tyr Ala Asn Val Ala Trp Gln Asp Ile Asp
    370                375                380

Phe Ala Val Asp Glu Asn Gly Leu Trp Val Ile Tyr Ser Thr Glu Ala
    385                390                395                400

Ser Thr Gly Asn Met Val Ile Ser Lys Leu Asn Asp Thr Thr Leu Gln
    405                410                415

Val Leu Asn Thr Trp Tyr Thr Lys Gln Tyr Lys Pro Ser Ala Ser Asn
    420                425                430

Ala Phe Met Val Cys Gly Val Leu Tyr Ala Thr Arg Thr Met Asn Thr
    435                440                445

Arg Thr Glu Glu Ile Phe Tyr Tyr Tyr Asp Thr Asn Thr Gly Lys Glu
    450                455                460

Gly Lys Leu Asp Ile Val Met His Lys Met Gln Glu Lys Val Gln Ser
    465                470                475                480

Ile Asn Tyr Asn Pro Phe Asp Gln Lys Leu Tyr Val Tyr Asn Asp Gly
    485                490                495

Tyr Leu Leu Asn Tyr Asp Leu Ser Val Leu Gln Lys Pro Gln
    500                505                510

<210> 3
<211> 411
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Met Trp Ser Gly Trp Trp Leu Trp Pro Leu Val Ala Val Cys Thr Ala
 1                5                10                15

Asp Phe Phe Arg Asp Glu Ala Glu Arg Ile Met Arg Asp Ser Pro Val
    20                25                30

Ile Asp Gly His Asn Asp Leu Pro Trp Gln Leu Leu Asp Met Phe Asn
    35                40                45

Asn Arg Leu Gln Asp Glu Arg Ala Asn Leu Thr Thr Leu Ala Gly Thr
    50                55                60

His Thr Asn Ile Pro Lys Leu Arg Ala Gly Phe Val Gly Gly Gln Phe
    65                70                75                80

```

[0008]

Trp Ser Val Tyr Thr Pro Cys Asp Thr Gln Asn Lys Asp Ala Val Arg
 85 90 95

Arg Thr Leu Glu Gln Met Asp Val Val His Arg Met Cys Arg Met Tyr
 100 105 110

Pro Glu Thr Phe Leu Tyr Val Thr Ser Ser Ala Gly Ile Arg Gln Ala
 115 120 125

Phe Arg Glu Gly Lys Val Ala Ser Leu Ile Gly Val Glu Gly Gly His
 130 135 140

Ser Ile Asp Ser Ser Leu Gly Val Leu Arg Ala Leu Tyr Gln Leu Gly
 145 150 155 160

Met Arg Tyr Leu Thr Leu Thr His Ser Cys Asn Thr Pro Trp Ala Asp
 165 170 175

Asn Trp Leu Val Asp Thr Gly Asp Ser Glu Pro Gln Ser Gln Gly Leu
 180 185 190

Ser Pro Phe Gly Gln Arg Val Val Lys Glu Leu Asn Arg Leu Gly Val
 195 200 205

Leu Ile Asp Leu Ala His Val Ser Val Ala Thr Met Lys Ala Thr Leu
 210 215 220

Gln Leu Ser Arg Ala Pro Val Ile Phe Ser His Ser Ser Ala Tyr Ser
 225 230 235 240

Val Cys Ala Ser Arg Arg Asn Val Pro Asp Asp Val Leu Arg Leu Val
 245 250 255

Lys Gln Thr Asp Ser Leu Val Met Val Asn Phe Tyr Asn Asn Tyr Ile
 260 265 270

Ser Cys Thr Asn Lys Ala Asn Leu Ser Gln Val Ala Asp His Leu Asp
 275 280 285

His Ile Lys Glu Val Ala Gly Ala Arg Ala Val Gly Phe Gly Gly Asp
 290 295 300

Phe Asp Gly Val Pro Arg Val Pro Glu Gly Leu Glu Asp Val Ser Lys
 305 310 315 320

Tyr Pro Asp Leu Ile Ala Glu Leu Leu Arg Arg Asn Trp Thr Glu Ala
 325 330 335

Glu Val Lys Gly Ala Leu Ala Asp Asn Leu Leu Arg Val Phe Glu Ala
 340 345 350

Val Glu Gln Ala Ser Asn Leu Thr Gln Ala Pro Glu Glu Glu Pro Ile
 355 360 365

Pro Leu Asp Gln Leu Gly Gly Ser Cys Arg Thr His Tyr Gly Tyr Ser
 370 375 380

[0009]

Ser Gly Ala Ser Ser Leu His Arg His Trp Gly Leu Leu Leu Ala Ser
 385 390 395 400

 Leu Ala Pro Leu Val Leu Cys Leu Ser Leu Leu
 405 410

 <210> 4
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 4

 Met Trp Ser Gly Trp Trp Leu Trp Pro Leu Val Ala Val Cys Thr Ala
 1 5 10 15

 Asp Phe Phe Arg Asp Glu Ala Glu Arg Ile Met Arg Asp Ser Pro Val
 20 25 30

 Ile Asp Gly His Asn Asp Leu Pro Trp Gln Leu Leu Asp Met Phe Asn
 35 40 45

 Asn Arg Leu Gln Asp Glu Arg Ala Asn Leu Thr Thr Leu Ala Gly Thr
 50 55 60

 His Thr Asn Ile Pro Lys Leu Arg Ala Gly Phe Val Gly Gly Gln Phe
 65 70 75 80

 Trp Ser Val Tyr Thr Pro Cys Asp Thr Gln Asn Lys Asp Ala Val Arg
 85 90 95

 Arg Thr Leu Glu Gln Met Asp Val Val His Arg Met Cys Arg Met Tyr
 100 105 110

 Pro Glu Thr Phe Leu Tyr Val Thr Ser Ser Ala Gly Ile Arg Gln Ala
 115 120 125

 Phe Arg Glu Gly Lys Val Ala Ser Leu Ile Gly Val Glu Gly Gly His
 130 135 140

 Ser Ile Asp Ser Ser Leu Gly Val Leu Arg Ala Leu Tyr Gln Leu Gly
 145 150 155 160

 Met Arg Tyr Leu Thr Leu Thr His Ser Cys Asn Thr Pro Trp Ala Asp
 165 170 175

 Asn Trp Leu Val Asp Thr Gly Asp Ser Glu Pro Gln Ser Gln Gly Leu
 180 185 190

 Ser Pro Phe Gly Gln Arg Val Val Lys Glu Leu Asn Arg Leu Gly Val
 195 200 205

 Leu Ile Asp Leu Ala His Val Ser Val Ala Thr Met Lys Ala Thr Leu
 210 215 220

 Gln Leu Ser Arg Ala Pro Val Ile Phe Ser His Ser Ser Ala Tyr Ser
 225 230 235 240

[0010]

Val Cys Ala Ser Arg Arg Asn Val Pro Asp Asp Val Leu Arg Leu Val
 245 250 255
 Lys Gln Thr Asp Ser Leu Val Met Val Asn Phe Tyr Asn Asn Tyr Ile
 260 265 270
 Ser Cys Thr Asn Lys Ala Asn Leu Ser Gln Val Ala Asp His Leu Asp
 275 280 285
 His Ile Lys Glu Val Ala Gly Ala Arg Ala Val Gly Phe Gly Gly Asp
 290 295 300
 Phe Asp Gly Val Pro Arg Val Pro Glu Gly Leu Glu Asp Val Ser Lys
 305 310 315 320
 Tyr Pro Asp Leu Ile Ala Glu Leu Leu Arg Arg Asn Trp Thr Glu Ala
 325 330 335
 Glu Val Lys Gly Ala Leu Ala Asp Asn Leu Leu Arg Val Phe Glu Ala
 340 345 350
 Val Glu Gln Ala Ser Asn Leu Thr Gln Ala Pro Glu Glu Glu Pro Ile
 355 360 365
 Pro Leu Asp Gln Leu Gly Gly Ser Cys Arg Thr His Tyr Gly Tyr Ser
 370 375 380
 Ser Gly Ala Ser Ser Leu His Arg His Trp Gly Leu Leu Leu Ala Ser
 385 390 395 400
 Leu Ala Pro Leu Val Leu Cys Leu Ser Leu Leu
 405 410
 <210> 5
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 5
 Met Ala Lys Ile Ser Ser Pro Thr Glu Thr Glu Arg Cys Ile Glu Ser
 1 5 10 15
 Leu Ile Ala Val Phe Gln Lys Tyr Ala Gly Lys Asp Gly Tyr Asn Tyr
 20 25 30
 Thr Leu Ser Lys Thr Glu Phe Leu Ser Phe Met Asn Thr Glu Leu Ala
 35 40 45
 Ala Phe Thr Lys Asn Gln Lys Asp Pro Gly Val Leu Asp Arg Met Met
 50 55 60
 Lys Lys Leu Asp Thr Asn Ser Asp Gly Gln Leu Asp Phe Ser Glu Phe
 65 70 75 80
 Leu Asn Leu Ile Gly Gly Leu Ala Met Ala Cys His Asp Ser Phe Leu
 85 90 95

[0011]

Lys Ala Val Pro Ser Gln Lys Arg Thr
 100 105

 <210> 6
 <211> I140
 <212> PRT
 <213> 智人

 <400> 6

 Arg Ala His Ser Ala Val Ala Ser Cys Pro Arg Gly Gly Ala Ala Gly
 1 5 10 15

 Arg Arg Ala Arg Pro Val Pro Gly Val Gly Pro Gly Ala Ala Ala Arg
 20 25 30

 Gly Gly Glu Gly Gly Cys Gly Ser Ser Ser Ala Ala Ala Ser Asp Pro
 35 40 45

 Ala Arg Ser Ala Gly Arg Pro Leu Gln Val Pro Ala Pro Leu Pro Val
 50 55 60

 Arg Pro Pro Met Ala Ala Ala Gly Gln Leu Cys Leu Leu Tyr Leu Ser
 65 70 75 80

 Ala Gly Leu Leu Ser Arg Leu Gly Ala Ala Phe Asn Leu Asp Thr Arg
 85 90 95

 Glu Asp Asn Val Ile Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Gly Ser Leu Phe Gly
 100 105 110

 Phe Ser Leu Ala Met His Trp Gln Leu Gln Pro Glu Asp Lys Arg Leu
 115 120 125

 Leu Leu Val Gly Ala Pro Arg Ala Glu Ala Leu Pro Leu Gln Arg Ala
 130 135 140

 Asn Arg Thr Gly Gly Leu Tyr Ser Cys Asp Ile Thr Ala Arg Gly Pro
 145 150 155 160

 Cys Thr Arg Ile Glu Phe Asp Asn Asp Ala Asp Pro Thr Ser Gly Ser
 165 170 175

 Lys Glu Asp Gln Trp Met Gly Val Thr Val Gln Ser Gln Gly Pro Gly
 180 185 190

 Gly Lys Val Val Thr Cys Ala His Arg Tyr Glu Lys Arg Gln His Val
 195 200 205

 Asn Thr Lys Gln Glu Ser Arg Asp Ile Phe Gly Arg Cys Tyr Val Leu
 210 215 220

 Ser Gln Asn Leu Arg Ile Glu Asp Asp Met Asp Gly Gly Asp Trp Ser
 225 230 235 240

 Phe Cys Asp Gly Arg Leu Arg Gly His Glu Lys Phe Gly Ser Cys Gln
 245 250 255

 Gln Gly Val Ala Ala Thr Phe Thr Lys Asp Phe His Tyr Ile Val Phe

[0012]

260	265	270
Gly Ala Pro Gly Thr Tyr Asn Trp Lys Gly Ile Val Arg Val Glu Gln 275 280 285		
Lys Asn Asn Thr Phe Phe Asp Met Asn Ile Phe Glu Asp Gly Pro Tyr 290 295 300		
Glu Val Gly Gly Glu Thr Glu His Asp Glu Ser Leu Val Pro Val Pro 305 310 315 320		
Ala Asn Ser Tyr Leu Gly Phe Ser Leu Asp Ser Gly Lys Gly Ile Val 325 330 335		
Ser Lys Asp Glu Ile Thr Phe Val Ser Gly Ala Pro Arg Ala Asn His 340 345 350		
Ser Gly Ala Val Val Leu Leu Lys Arg Asp Met Lys Ser Ala His Leu 355 360 365		
Leu Pro Glu His Ile Phe Asp Gly Glu Gly Leu Ala Ser Ser Phe Gly 370 375 380		
Tyr Asp Val Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Asp Gly Trp Gln Asp Ile 385 390 395 400		
Val Ile Gly Ala Pro Gln Tyr Phe Asp Arg Asp Gly Glu Val Gly Gly 405 410 415		
Ala Val Tyr Val Tyr Met Asn Gln Gln Gly Arg Trp Asn Asn Val Lys 420 425 430		
Pro Ile Arg Leu Asn Gly Thr Lys Asp Ser Met Phe Gly Ile Ala Val 435 440 445		
Lys Asn Ile Gly Asp Ile Asn Gln Asp Gly Tyr Pro Asp Ile Ala Val 450 455 460		
Gly Ala Pro Tyr Asp Asp Leu Gly Lys Val Phe Ile Tyr His Gly Ser 465 470 475 480		
Ala Asn Gly Ile Asn Thr Lys Pro Thr Gln Val Leu Lys Gly Ile Ser 485 490 495		
Pro Tyr Phe Gly Tyr Ser Ile Ala Gly Asn Met Asp Leu Asp Arg Asn 500 505 510		
Ser Tyr Pro Asp Val Ala Val Gly Ser Leu Ser Asp Ser Val Thr Ile 515 520 525		
Phe Arg Ser Arg Pro Val Ile Asn Ile Gln Lys Thr Ile Thr Val Thr 530 535 540		
Pro Asn Arg Ile Asp Leu Arg Gln Lys Thr Ala Cys Gly Ala Pro Ser 545 550 555 560		
Gly Ile Cys Leu Gln Val Lys Ser Cys Phe Glu Tyr Thr Ala Asn Pro		

[0013]

565	570	575
Ala Gly Tyr Asn Pro Ser Ile Ser Ile Val Gly Thr Leu Glu Ala Glu 580 585 590		
Lys Glu Arg Arg Lys Ser Gly Leu Ser Ser Arg Val Gln Phe Arg Asn 595 600 605		
Gln Gly Ser Glu Pro Lys Tyr Thr Gln Glu Leu Thr Leu Lys Arg Gln 610 615 620		
Lys Glu Lys Val Cys Met Glu Glu Thr Leu Trp Leu Gln Asp Asn Ile 625 630 635 640		
Arg Asp Lys Leu Arg Pro Ile Pro Ile Thr Ala Ser Val Glu Ile Gln 645 650 655		
Glu Pro Ser Ser Arg Arg Arg Val Asn Ser Leu Pro Glu Val Leu Pro 660 665 670		
Ile Leu Asn Ser Asp Glu Pro Lys Thr Ala His Ile Asp Val His Phe 675 680 685		
Leu Lys Glu Gly Cys Gly Asp Asp Asn Val Cys Asn Ser Asn Leu Lys 690 695 700		
Leu Glu Tyr Lys Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Gln Asp Lys Phe Ser 705 710 715 720		
Tyr Leu Pro Ile Gln Lys Gly Val Pro Glu Leu Val Leu Lys Asp Gln 725 730 735		
Lys Asp Ile Ala Leu Glu Ile Thr Val Thr Asn Ser Pro Ser Asn Pro 740 745 750		
Arg Asn Pro Thr Lys Asp Gly Asp Asp Ala His Glu Ala Lys Leu Ile 755 760 765		
Ala Thr Phe Pro Asp Thr Leu Thr Tyr Ser Ala Tyr Arg Glu Leu Arg 770 775 780		
Ala Phe Pro Glu Lys Gln Leu Ser Cys Val Ala Asn Gln Asn Gly Ser 785 790 795 800		
Gln Ala Asp Cys Glu Leu Gly Asn Pro Phe Lys Arg Asn Ser Asn Val 805 810 815		
Thr Phe Tyr Leu Val Leu Ser Thr Thr Glu Val Thr Phe Asp Thr Pro 820 825 830		
Asp Leu Asp Ile Asn Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Asn Gln Asp Asn 835 840 845		
Leu Ala Pro Ile Thr Ala Lys Ala Lys Val Val Ile Glu Leu Leu Leu 850 855 860		
Ser Val Ser Gly Val Ala Lys Pro Ser Gln Val Tyr Phe Gly Gly Thr		

[0014]

```

865                870                875                880
Val Val Gly Glu Gln Ala Met Lys Ser Glu Asp Glu Val Gly Ser Leu
                885                890                895
Ile Glu Tyr Glu Phe Arg Val Ile Asn Leu Gly Lys Pro Leu Thr Asn
                900                905                910
Leu Gly Thr Ala Thr Leu Asn Ile Gln Trp Pro Lys Glu Ile Ser Asn
                915                920                925
Gly Lys Trp Leu Leu Tyr Leu Val Lys Val Glu Ser Lys Gly Leu Glu
                930                935                940
Lys Val Thr Cys Glu Pro Gln Lys Glu Ile Asn Ser Leu Asn Leu Thr
                945                950                955                960
Glu Ser His Asn Ser Arg Lys Lys Arg Glu Ile Thr Glu Lys Gln Ile
                965                970                975
Asp Asp Asn Arg Lys Phe Ser Leu Phe Ala Glu Arg Lys Tyr Gln Thr
                980                985                990
Leu Asn Cys Ser Val Asn Val Asn Cys Val Asn Ile Arg Cys Pro Leu
                995                1000                1005
Arg Gly Leu Asp Ser Lys Ala Ser Leu Ile Leu Arg Ser Arg Leu
                1010                1015                1020
Trp Asn Ser Thr Phe Leu Glu Glu Tyr Ser Lys Leu Asn Tyr Leu
                1025                1030                1035
Asp Ile Leu Met Arg Ala Phe Ile Asp Val Thr Ala Ala Ala Glu
                1040                1045                1050
Asn Ile Arg Leu Pro Asn Ala Gly Thr Gln Val Arg Val Thr Val
                1055                1060                1065
Phe Pro Ser Lys Thr Val Ala Gln Tyr Ser Gly Val Pro Trp Trp
                1070                1075                1080
Ile Ile Leu Val Ala Ile Leu Ala Gly Ile Leu Met Leu Ala Leu
                1085                1090                1095
Leu Val Phe Ile Leu Trp Lys Cys Gly Phe Phe Lys Arg Asn Lys
                1100                1105                1110
Lys Asp His Tyr Asp Ala Thr Tyr His Lys Ala Glu Ile His Ala
                1115                1120                1125
Gln Pro Ser Asp Lys Glu Arg Leu Thr Ser Asp Ala
                1130                1135                1140
<210> 7
<211> 1091
<212> PRT
<213> 智人
    
```

[0015]

<400> 7

Met Ala Ala Ala Gly Gln Leu Cys Leu Leu Tyr Leu Ser Ala Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Arg Leu Gly Ala Ala Phe Asn Leu Asp Thr Arg Glu Asp Asn
 20 25 30
 Val Ile Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Gly Ser Leu Phe Gly Phe Ser Leu
 35 40 45
 Ala Met His Trp Gln Leu Gln Pro Glu Asp Lys Arg Leu Leu Leu Val
 50 55 60
 Gly Ala Pro Arg Ala Glu Ala Leu Pro Leu Gln Arg Ala Asn Arg Thr
 65 70 75 80
 Gly Gly Leu Tyr Ser Cys Asp Ile Thr Ala Arg Gly Pro Cys Thr Arg
 85 90 95
 Ile Glu Phe Asp Asn Asp Ala Asp Pro Thr Ser Glu Ser Lys Glu Asp
 100 105 110
 Gln Trp Met Gly Val Thr Val Gln Ser Gln Gly Pro Gly Gly Lys Val
 115 120 125
 Val Thr Cys Ala His Arg Tyr Glu Lys Arg Gln His Val Asn Thr Lys
 130 135 140
 Gln Glu Ser Arg Asp Ile Phe Gly Arg Cys Tyr Val Leu Ser Gln Asn
 145 150 155 160
 Leu Arg Ile Glu Asp Asp Met Asp Gly Gly Asp Trp Ser Phe Cys Asp
 165 170 175
 Gly Arg Leu Arg Gly His Glu Lys Phe Gly Ser Cys Gln Gln Gly Val
 180 185 190
 Ala Ala Thr Phe Thr Lys Asp Phe His Tyr Ile Val Phe Gly Ala Pro
 195 200 205
 Gly Thr Tyr Asn Trp Lys Gly Ile Val Arg Val Glu Gln Lys Asn Asn
 210 215 220
 Thr Phe Phe Asp Met Asn Ile Phe Glu Asp Gly Pro Tyr Glu Val Gly
 225 230 235 240
 Gly Glu Thr Glu His Asp Glu Ser Leu Val Pro Val Pro Ala Asn Ser
 245 250 255
 Tyr Leu Gly Phe Ser Leu Asp Ser Gly Lys Gly Ile Val Ser Lys Asp
 260 265 270
 Glu Ile Thr Phe Val Ser Gly Ala Pro Arg Ala Asn His Ser Gly Ala
 275 280 285
 Val Val Leu Leu Lys Arg Asp Met Lys Ser Ala His Leu Leu Pro Glu
 290 295 300

[0016]

His Ile Phe Asp Gly Glu Gly Leu Ala Ser Ser Phe Gly Tyr Asp Val
 305 310 315 320
 Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Asp Gly Trp Gln Asp Ile Val Ile Gly
 325 330 335
 Ala Pro Gln Tyr Phe Asp Arg Asp Gly Glu Val Gly Gly Ala Val Tyr
 340 345 350
 Val Tyr Met Asn Gln Gln Gly Arg Trp Asn Asn Val Lys Pro Ile Arg
 355 360 365
 Leu Asn Gly Thr Lys Asp Ser Met Phe Gly Ile Ala Val Lys Asn Ile
 370 375 380
 Gly Asp Ile Asn Gln Asp Gly Tyr Pro Asp Ile Ala Val Gly Ala Pro
 385 390 395 400
 Tyr Asp Asp Leu Gly Lys Val Phe Ile Tyr His Gly Ser Ala Asn Gly
 405 410 415
 Ile Asn Thr Lys Pro Thr Gln Val Leu Lys Gly Ile Ser Pro Tyr Phe
 420 425 430
 Gly Tyr Ser Ile Ala Gly Asn Met Asp Leu Asp Arg Asn Ser Tyr Pro
 435 440 445
 Asp Val Ala Val Gly Ser Leu Ser Asp Ser Val Thr Ile Phe Arg Ser
 450 455 460
 Arg Pro Val Ile Asn Ile Gln Lys Thr Ile Thr Val Thr Pro Asn Arg
 465 470 475 480
 Ile Asp Leu Arg Gln Lys Thr Ala Cys Gly Ala Pro Ser Gly Ile Cys
 485 490 495
 Leu Gln Val Lys Ser Cys Phe Glu Tyr Thr Ala Asn Pro Ala Gly Tyr
 500 505 510
 Asn Pro Ser Ile Ser Ile Val Gly Thr Leu Glu Ala Glu Lys Glu Arg
 515 520 525
 Arg Lys Ser Gly Leu Ser Ser Arg Val Gln Phe Arg Asn Gln Gly Ser
 530 535 540
 Glu Pro Lys Tyr Thr Gln Glu Leu Thr Leu Lys Arg Gln Lys Gln Lys
 545 550 555 560
 Val Cys Met Glu Glu Thr Leu Trp Leu Gln Asp Asn Ile Arg Asp Lys
 565 570 575
 Leu Arg Pro Ile Pro Ile Thr Ala Ser Val Glu Ile Gln Glu Pro Ser
 580 585 590
 Ser Arg Arg Arg Val Asn Ser Leu Pro Glu Val Leu Pro Ile Leu Asn
 595 600 605

[0017]

Ser Asp Glu Pro Lys Thr Ala His Ile Asp Val His Phe Leu Lys Glu
 610 615 620
 Gly Cys Gly Asp Asp Asn Val Cys Asn Ser Asn Leu Lys Leu Glu Tyr
 625 630 635
 Lys Phe Cys Thr Arg Glu Gly Asn Gln Asp Lys Phe Ser Tyr Leu Pro
 645 650 655
 Ile Gln Lys Gly Val Pro Glu Leu Val Leu Lys Asp Gln Lys Asp Ile
 660 665 670
 Ala Leu Glu Ile Thr Val Thr Asn Ser Pro Ser Asn Pro Arg Asn Pro
 675 680 685
 Thr Lys Asp Gly Asp Asp Ala His Glu Ala Lys Leu Ile Ala Thr Phe
 690 695 700
 Pro Asp Thr Leu Thr Tyr Ser Ala Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Phe Pro
 705 710 715 720
 Glu Lys Gln Leu Ser Cys Val Ala Asn Gln Asn Gly Ser Gln Ala Asp
 725 730 735
 Cys Glu Leu Gly Asn Pro Phe Lys Arg Asn Ser Asn Val Thr Phe Tyr
 740 745 750
 Leu Val Leu Ser Thr Thr Glu Val Thr Phe Asp Thr Pro Asp Leu Asp
 755 760 765
 Ile Asn Leu Lys Leu Glu Thr Thr Ser Asn Gln Asp Asn Leu Ala Pro
 770 775 780
 Ile Thr Ala Lys Ala Lys Val Val Ile Glu Leu Leu Ser Val Ser
 785 790 795 800
 Gly Val Ala Lys Pro Ser Gln Val Tyr Phe Gly Gly Thr Val Val Gly
 805 810 815
 Glu Gln Ala Met Lys Ser Glu Asp Glu Val Gly Ser Leu Ile Glu Tyr
 820 825 830
 Glu Phe Arg Val Ile Asn Leu Gly Lys Pro Leu Thr Asn Leu Gly Thr
 835 840 845
 Ala Thr Leu Asn Ile Gln Trp Pro Lys Glu Ile Ser Asn Gly Lys Trp
 850 855 860
 Leu Leu Tyr Leu Val Lys Val Glu Ser Lys Gly Leu Glu Lys Val Thr
 865 870 875 880
 Cys Glu Pro Gln Lys Glu Ile Asn Ser Leu Asn Leu Thr Glu Ser His
 885 890 895
 Asn Ser Arg Lys Lys Arg Glu Ile Thr Glu Lys Gln Ile Asp Asp Asn
 900 905 910

[0018]

Arg Lys Phe Ser Leu Phe Ala Glu Arg Lys Tyr Gln Thr Leu Asn Cys
 915 920 925

Ser Val Asn Val Asn Cys Val Asn Ile Arg Cys Pro Leu Arg Gly Leu
 930 935 940

Asp Ser Lys Ala Ser Leu Ile Leu Arg Ser Arg Leu Trp Asn Ser Thr
 945 950 955 960

Phe Leu Glu Glu Tyr Ser Lys Leu Asn Tyr Leu Asp Ile Leu Met Arg
 965 970 975

Ala Phe Ile Asp Val Thr Ala Ala Ala Glu Asn Ile Arg Leu Pro Asn
 980 985 990

Ala Gly Thr Gln Val Arg Val Thr Val Phe Pro Ser Lys Thr Val Ala
 995 1000 1005

Gln Tyr Ser Gly Val Pro Trp Trp Ile Ile Leu Val Ala Ile Leu
 1010 1015 1020

Ala Gly Ile Leu Met Leu Ala Leu Leu Val Phe Ile Leu Trp Lys
 1025 1030 1035

Cys Gly Phe Phe Lys Arg Ser Arg Tyr Asp Asp Ser Val Pro Arg
 1040 1045 1050

Tyr His Ala Val Arg Ile Arg Lys Glu Glu Arg Glu Ile Lys Asp
 1055 1060 1065

Glu Lys Tyr Ile Asp Asn Leu Glu Lys Lys Gln Trp Ile Thr Lys
 1070 1075 1080

Trp Asn Glu Asn Glu Ser Tyr Ser
 1085 1090

<210> 8
 <211> 268
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8

Tyr Met Arg Pro Arg Ser Gly Pro Thr Arg Asn Pro Arg Leu Arg Ala
 1 5 10 15

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

Cys Ala Ala Glu Ala Ser Ala Gly Pro Glu Arg Asp Ala Arg Pro Gly
 35 40 45

Ala Pro Ala Ala Gly Thr Met Gly Ala Ala His Ser Ala Ser Glu Glu
 50 55 60

Val Arg Glu Leu Glu Gly Lys Thr Gly Phe Ser Ser Asp Gln Ile Glu
 65 70 75 80

[0019]

Gln Leu His Arg Arg Phe Lys Gln Leu Ser Gly Asp Gln Pro Thr Ile
 85 90 95
 Arg Lys Glu Asn Phe Asn Asn Val Pro Asp Leu Glu Leu Asn Pro Ile
 100 105 110
 Arg Ser Lys Ile Val Arg Ala Phe Phe Asp Asn Arg Asn Leu Arg Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Gly Leu Ala Asp Glu Ile Asn Phe Glu Asp Phe Leu Thr
 130 135 140
 Ile Met Ser Tyr Phe Arg Pro Ile Asp Thr Thr Met Asp Glu Glu Gln
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Ser Arg Lys Glu Lys Leu Arg Phe Leu Phe His Met Tyr
 165 170 175
 Asp Ser Asp Ser Asp Gly Arg Ile Thr Leu Glu Glu Tyr Arg Asn Val
 180 185 190
 Val Glu Glu Leu Leu Ser Gly Asn Pro His Ile Glu Lys Glu Ser Ala
 195 200 205
 Arg Ser Ile Ala Asp Gly Ala Met Met Glu Ala Ala Ser Val Cys Met
 210 215 220
 Gly Gln Met Glu Pro Asp Gln Val Tyr Glu Gly Ile Thr Phe Glu Asp
 225 230 235 240
 Phe Leu Lys Ile Trp Gln Gly Ile Asp Ile Glu Thr Lys Met His Val
 245 250 255
 Arg Phe Leu Asn Met Glu Thr Met Ala Leu Cys His
 260 265
 <210> 9
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 9
 Tyr Met Arg Pro Arg Ser Gly Pro Thr Arg Asn Pro Arg Leu Arg Ala
 1 5 10 15
 Phe Ala Gly Val Pro Thr Arg Gly Arg Thr Arg Gly Gln Ser Arg Arg
 20 25 30
 Cys Ala Ala Glu Ala Ser Ala Gly Pro Glu Arg Asp Ala Arg Pro Gly
 35 40 45
 Ala Pro Ala Ala Gly Thr Met Gly Ala Ala His Ser Ala Ser Glu Glu
 50 55 60
 Val Arg Glu Leu Glu Gly Lys Thr Gly Phe Ser Ser Asp Gln Ile Glu
 65 70 75 80

[0020]

Gln Leu His Arg Arg Phe Lys Gln Leu Ser Gly Asp Gln Pro Thr Ile
85 90 95

Arg Asn Leu Arg Lys Gly Pro Ser Gly Leu Ala Asp Glu Ile Asn Phe
100 105 110

Glu Asp Phe Leu Thr Ile Met Ser Tyr Phe Arg Pro Ile Asp Thr Thr
115 120 125

Met Asp Glu Glu Gln Val Glu Leu Ser Arg Lys Glu Lys Leu Arg Phe
130 135 140

Leu Phe His Met Tyr Asp Ser Asp Ser Asp Gly Arg Ile Thr Leu Glu
145 150 155 160

Glu Tyr Arg Asn Val Val Glu Glu Leu Leu Ser Gly Asn Pro His Ile
165 170 175

Glu Lys Glu Ser Ala Arg Ser Ile Ala Asp Gly Ala Met Met Glu Ala
180 185 190

Ala Ser Val Cys Met Gly Gln Met Glu Pro Asp Gln Val Tyr Glu Gly
195 200 205

Ile Thr Phe Glu Asp Phe Leu Lys Ile Trp Gln Gly Ile Asp Ile Glu
210 215 220

Thr Lys Met His Val Arg Phe Leu Asn Met Glu Thr Met Ala Leu Cys
225 230 235 240

His

<210> 10
<211> 158
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu Leu Leu Leu Leu Ser Cys Leu Ala
1 5 10 15

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

Gly Trp Phe Tyr His Lys Ser Asn Cys Tyr Gly Tyr Phe Arg Lys Leu
35 40 45

Arg Asn Trp Ser Asp Ala Glu Leu Glu Cys Gln Ser Tyr Gly Asn Gly
50 55 60

Ala His Leu Ala Ser Ile Leu Ser Leu Lys Glu Ala Ser Thr Ile Ala
65 70 75 80

Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Gln Arg Ser Gln Pro Ile Trp Ile Gly Leu
85 90 95

His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp Ile Asp Gly Ala Met

[0021]

100	105	110
Tyr Leu Tyr Arg Ser Trp Ser Gly Lys Ser Met Gly Gly Asn Lys His 115	120	125
Cys Ala Glu Met Ser Ser Asn Asn Asn Phe Leu Thr Trp Ser Ser Asn 130	135	140
Glu Cys Asn Lys Arg Gln His Phe Leu Cys Lys Tyr Arg Pro 145	150	155
<210> 11 <211> 158 <212> PRT <213> 智人		
<400> 11		
Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu Leu Leu Leu Leu Ser Cys Leu Ala 1	5	10
Lys Thr Gly Val Leu Gly Asp Ile Ile Met Arg Pro Ser Cys Ala Pro 20	25	30
Gly Trp Phe Tyr His Lys Ser Asn Cys Tyr Gly Tyr Phe Arg Lys Leu 35	40	45
Arg Asn Trp Ser Asp Ala Glu Leu Glu Cys Gln Ser Tyr Gly Asn Gly 50	55	60
Ala His Leu Ala Ser Ile Leu Ser Leu Lys Glu Ala Ser Thr Ile Ala 65	70	75
Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Gln Arg Ser Gln Pro Ile Trp Ile Gly Leu 85	90	95
His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp Ile Asp Gly Ala Met 100	105	110
Tyr Leu Tyr Arg Ser Trp Ser Gly Lys Ser Met Gly Gly Asn Lys His 115	120	125
Cys Ala Glu Met Ser Ser Asn Asn Asn Phe Leu Thr Trp Ser Ser Asn 130	135	140
Glu Cys Asn Lys Arg Gln His Phe Leu Cys Lys Tyr Arg Pro 145	150	155
<210> 12 <211> 134 <212> PRT <213> 智人		
<400> 12		
Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu Leu Leu Leu Leu Ser Cys Leu Ala 1	5	10
Lys Thr Gly Val Leu Gly Asp Ile Ile Met Arg Pro Ser Cys Ala Pro 20	25	30

[0022]

Gly Trp Phe Tyr His Lys Ser Asn Cys Tyr Gly Tyr Phe Arg Lys Leu
 35 40 45

Arg Asn Trp Ser Asp Ala Glu Val Arg Asn Leu Leu Pro Ala Trp Pro
 50 55 60

Gly Leu Ser Arg Ala Lys Asp Gln Pro Glu Pro Gln Ile Ser Phe Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Ser Val Leu Pro Gly His Tyr Glu Glu Lys Pro Leu Trp
 85 90 95

Leu Val Lys Trp Arg Glu Glu Gly Cys Val Phe Asn Ser Phe Asn Ser
 100 105 110

Val Ser Ile Ala Glu Ala Gly Ala Val Cys Gln Thr Leu Asp Gly Leu
 115 120 125

Gln Ala His Thr Asp Thr
 130

<210> 13
 <211> 1212
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 13

Met Glu Pro Arg Pro Thr Ala Pro Ser Ser Gly Ala Pro Gly Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Val Gly Glu Thr Pro Ser Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ala Arg Val
 20 25 30

Glu Leu Pro Gly Thr Ala Val Pro Ser Val Pro Glu Asp Ala Ala Pro
 35 40 45

Ala Ser Arg Asp Gly Gly Gly Val Arg Asp Glu Gly Pro Ala Ala Ala
 50 55 60

Gly Asp Gly Leu Gly Arg Pro Leu Gly Pro Thr Pro Ser Gln Ser Arg
 65 70 75 80

Phe Gln Val Asp Leu Val Ser Glu Asn Ala Gly Arg Ala Ala Ala Ala
 85 90 95

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 100 105 110

Ala Lys Gln Thr Pro Ala Asp Gly Glu Ala Ser Gly Glu Ser Glu Pro
 115 120 125

Ala Lys Gly Ser Glu Glu Ala Lys Gly Arg Phe Arg Val Asn Phe Val
 130 135 140

Asp Pro Ala Ala Ser Ser Ser Ala Glu Asp Ser Leu Ser Asp Ala Ala
 145 150 155 160

[0023]

Gly Val Gly Val Asp Gly Pro Asn Val Ser Phe Gln Asn Gly Gly Asp
 165 170 175
 Thr Val Leu Ser Glu Gly Ser Ser Leu His Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 180 185 190
 Ser Gly His His Gln His Tyr Tyr Tyr Asp Thr His Thr Asn Thr Tyr
 195 200 205
 Tyr Leu Arg Thr Phe Gly His Asn Thr Met Asp Ala Val Pro Arg Ile
 210 215 220
 Asp His Tyr Arg His Thr Ala Ala Gln Leu Gly Glu Lys Leu Leu Arg
 225 230 235 240
 Pro Ser Leu Ala Glu Leu His Asp Glu Leu Glu Lys Glu Pro Phe Glu
 245 250 255
 Asp Gly Phe Ala Asn Gly Glu Glu Ser Thr Pro Thr Arg Asp Ala Val
 260 265 270
 Val Thr Tyr Thr Ala Glu Ser Lys Gly Val Val Lys Phe Gly Trp Ile
 275 280 285
 Lys Gly Val Leu Val Arg Cys Met Leu Asn Ile Trp Gly Val Met Leu
 290 295 300
 Phe Ile Arg Leu Ser Trp Ile Val Gly Gln Ala Gly Ile Gly Leu Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Val Ile Met Met Ala Thr Val Val Thr Thr Ile Thr Gly Leu
 325 330 335
 Ser Thr Ser Ala Ile Ala Thr Asn Gly Phe Val Arg Gly Gly Gly Ala
 340 345 350
 Tyr Tyr Leu Ile Ser Arg Ser Leu Gly Pro Glu Phe Gly Gly Ala Ile
 355 360 365
 Gly Leu Ile Phe Ala Phe Ala Asn Ala Val Ala Val Ala Met Tyr Val
 370 375 380
 Val Gly Phe Ala Glu Thr Val Val Glu Leu Leu Lys Glu His Ser Ile
 385 390 395 400
 Leu Met Ile Asp Glu Ile Asn Asp Ile Arg Ile Ile Gly Ala Ile Thr
 405 410 415
 Val Val Ile Leu Leu Gly Ile Ser Val Ala Gly Met Glu Trp Glu Ala
 420 425 430
 Lys Ala Gln Ile Val Leu Leu Val Ile Leu Leu Leu Ala Ile Gly Asp
 435 440 445
 Phe Val Ile Gly Thr Phe Ile Pro Leu Glu Ser Lys Lys Pro Lys Gly
 450 455 460

[0024]

Phe Phe Gly Tyr Lys Ser Glu Ile Phe Asn Glu Asn Phe Gly Pro Asp
 465 470 475 480
 Phe Arg Glu Glu Glu Thr Phe Phe Ser Val Phe Ala Ile Phe Phe Pro
 485 490 495
 Ala Ala Thr Gly Ile Leu Ala Gly Ala Asn Ile Ser Gly Asp Leu Ala
 500 505 510
 Asp Pro Gln Ser Ala Ile Pro Lys Gly Thr Leu Leu Ala Ile Leu Ile
 515 520 525
 Thr Thr Leu Val Tyr Val Gly Ile Ala Val Ser Val Gly Ser Cys Val
 530 535 540
 Val Arg Asp Ala Thr Gly Asn Val Asn Asp Thr Ile Val Thr Glu Leu
 545 550 555 560
 Thr Asn Cys Thr Ser Ala Ala Cys Lys Leu Asn Phe Asp Phe Ser Ser
 565 570 575
 Cys Glu Ser Ser Pro Cys Ser Tyr Gly Leu Met Asn Asn Phe Gln Val
 580 585 590
 Met Ser Met Val Ser Gly Phe Thr Pro Leu Ile Ser Ala Gly Ile Phe
 595 600 605
 Ser Ala Thr Leu Ser Ser Ala Leu Ala Ser Leu Val Ser Ala Pro Lys
 610 615 620
 Ile Phe Gln Ala Leu Cys Lys Asp Asn Ile Tyr Pro Ala Phe Gln Met
 625 630 635 640
 Phe Ala Lys Gly Tyr Gly Lys Asn Asn Glu Pro Leu Arg Gly Tyr Ile
 645 650 655
 Leu Thr Phe Leu Ile Ala Leu Gly Phe Ile Leu Ile Ala Glu Leu Asn
 660 665 670
 Val Ile Ala Pro Ile Ile Ser Asn Phe Phe Leu Ala Ser Tyr Ala Leu
 675 680 685
 Ile Asn Phe Ser Val Phe His Ala Ser Leu Ala Lys Ser Pro Gly Trp
 690 695 700
 Arg Pro Ala Phe Lys Tyr Tyr Asn Met Trp Ile Ser Leu Leu Gly Ala
 705 710 715 720
 Ile Leu Cys Cys Ile Val Met Phe Val Ile Asn Trp Trp Ala Ala Leu
 725 730 735
 Leu Thr Tyr Val Ile Val Leu Gly Leu Tyr Ile Tyr Val Thr Tyr Lys
 740 745 750
 Lys Pro Asp Val Asn Trp Gly Ser Ser Thr Gln Ala Leu Thr Tyr Leu
 755 760 765

[0025]

Asn Ala Leu Gln His Ser Ile Arg Leu Ser Gly Val Glu Asp His Val
 770 775 780

Lys Asn Phe Arg Pro Gln Cys Leu Val Met Thr Gly Ala Pro Asn Ser
 785 790 795 800

Arg Pro Ala Leu Leu His Leu Val His Asp Phe Thr Lys Asn Val Gly
 805 810 815

Leu Met Ile Cys Gly His Val His Met Gly Pro Arg Arg Gln Ala Met
 820 825 830

Lys Glu Met Ser Ile Asp Gln Ala Lys Tyr Gln Arg Trp Leu Ile Lys
 835 840 845

Asn Lys Met Lys Ala Phe Tyr Ala Pro Val His Ala Asp Asp Leu Arg
 850 855 860

Glu Gly Ala Gln Tyr Leu Met Gln Ala Ala Gly Leu Gly Arg Met Lys
 865 870 875 880

Pro Asn Thr Leu Val Leu Gly Phe Lys Lys Asp Trp Leu Gln Ala Asp
 885 890 895

Met Arg Asp Val Asp Met Tyr Ile Asn Leu Phe His Asp Ala Phe Asp
 900 905 910

Ile Gln Tyr Gly Val Val Val Ile Arg Leu Lys Glu Gly Leu Asp Ile
 915 920 925

Ser His Leu Gln Gly Gln Glu Glu Leu Leu Ser Ser Gln Glu Lys Ser
 930 935 940

Pro Gly Thr Lys Asp Val Val Val Ser Val Glu Tyr Ser Lys Lys Ser
 945 950 955 960

Asp Leu Asp Thr Ser Lys Pro Leu Ser Glu Lys Pro Ile Thr His Lys
 965 970 975

Val Glu Glu Glu Asp Gly Lys Thr Ala Thr Gln Pro Leu Leu Lys Lys
 980 985 990

Glu Ser Lys Gly Pro Ile Val Pro Leu Asn Val Ala Asp Gln Lys Leu
 995 1000 1005

Leu Glu Ala Ser Thr Gln Phe Gln Lys Lys Gln Gly Lys Asn Thr
 1010 1015 1020

Ile Asp Val Trp Trp Leu Phe Asp Asp Gly Gly Leu Thr Leu Leu
 1025 1030 1035

Ile Pro Tyr Leu Leu Thr Thr Lys Lys Lys Trp Lys Asp Cys Lys
 1040 1045 1050

Ile Arg Val Phe Ile Gly Gly Lys Ile Asn Arg Ile Asp His Asp
 1055 1060 1065

[0026]

Arg Arg Ala Met Ala Thr Leu Leu Ser Lys Phe Arg Ile Asp Phe
 1070 1075 1080

Ser Asp Ile Met Val Leu Gly Asp Ile Asn Thr Lys Pro Lys Lys
 1085 1090 1095

Glu Asn Ile Ile Ala Phe Glu Glu Ile Ile Glu Pro Tyr Arg Leu
 1100 1105 1110

His Glu Asp Asp Lys Glu Gln Asp Ile Ala Asp Lys Met Lys Glu
 1115 1120 1125

Asp Glu Pro Trp Arg Ile Thr Asp Asn Glu Leu Glu Leu Tyr Lys
 1130 1135 1140

Thr Lys Thr Tyr Arg Gln Ile Arg Leu Asn Glu Leu Leu Lys Glu
 1145 1150 1155

His Ser Ser Thr Ala Asn Ile Ile Val Met Ser Leu Pro Val Ala
 1160 1165 1170

Arg Lys Gly Ala Val Ser Ser Ala Leu Tyr Met Ala Trp Leu Glu
 1175 1180 1185

Ala Leu Ser Lys Asp Leu Pro Pro Ile Leu Leu Val Arg Gly Asn
 1190 1195 1200

His Gln Ser Val Leu Thr Phe Tyr Ser
 1205 1210

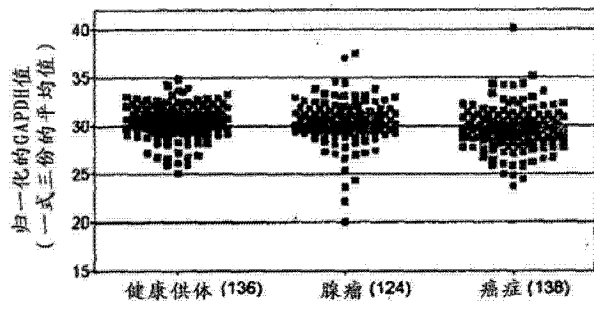


图 1

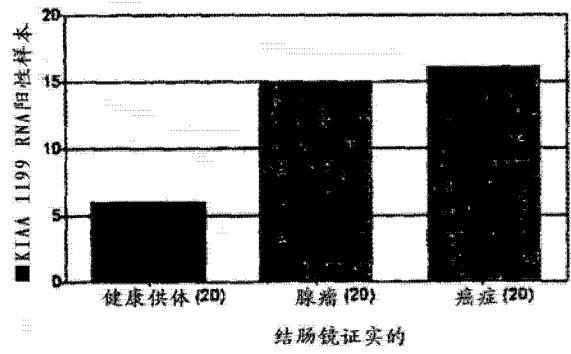


图 2