



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104225575 B

(45)授权公告日 2019.08.02

(21)申请号 201310226123.2

A61P 35/00(2006.01)

(22)申请日 2013.06.07

G01N 33/68(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/531(2006.01)

申请公布号 CN 104225575 A

C12Q 1/6886(2018.01)

(43)申请公布日 2014.12.24

C12N 15/85(2006.01)

C12N 15/861(2006.01)

(73)专利权人 北京大学人民医院

(56)对比文件

地址 100044 北京市西城区西直门南大街
11号

CN 101148472 A,2008.03.26,

专利权人 北京大学

Dan Li等.an alternative splice form
of CMTM8 induces apoptosis.《THE
INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY &
CELL BIOLOGY》.2007,第2107-2119页.

(72)发明人 许克新 胡浩 张石英 裴晓磊

宋泉声 王应

Caining Jin等.regulation of EGF
receptor signaling by the MARVEL domain-
containing protein CKLFSF8.《FEBS
letters》.2005,第6375-6382页.

(74)专利代理机构 北京攀腾专利代理事务所
(普通合伙) 11374

代理人 彭蓉

审查员 朱兵

(51)Int.Cl.

A61K 38/17(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

序列表5页 附图10页

(54)发明名称

一种肿瘤抑制基因或蛋白及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种新的肿瘤抑制基因或蛋白及其在膀胱癌和肾癌中的临床和实验室研究的应用,特别是涉及CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段,CMTM8或/和CMTM8-v2或/和它们的免疫性片段在诱导膀胱肿瘤和肾肿瘤细胞凋亡中的应用、在制备治疗和/或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中的应用、包含CMTM8或/和CMTM8-v2的载体或药物组合物,以及应用于临床和实验室研究的检测CMTM8或/和CMTM8-v2或/和它们的免疫性片段的表达的试剂在膀胱肿瘤和肾肿瘤预后诊断和治疗方案确定中的应用。

1. 一种蛋白或其免疫性片段在制备药物中的应用,其中所述蛋白选自:
 - (a) 由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的蛋白;或
 - (c) 由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的蛋白;其中所述药物用于诊断或治疗肿瘤,其为肾肿瘤或膀胱肿瘤。
2. 编码权利要求1所述的蛋白或其免疫性片段的多核苷酸序列在制备药物中的应用,其中:

所述多核苷酸序列为SEQ ID NO:1所示的多核苷酸序列、SEQ ID NO:1的核苷酸295-813所示的多核苷酸序列或SEQ ID NO:3的核苷酸1-345所示的多核苷酸序列;

所述免疫性片段为SEQ ID NO:2的氨基酸157-173所示的序列、SEQ ID NO:2的氨基酸1-21所示的序列、SEQ ID NO:2的氨基酸22-42所示的序列或SEQ ID NO:2的氨基酸127-143所示的序列;

其中所述药物用于诊断或治疗肿瘤,其为肾肿瘤或膀胱肿瘤。
3. 根据权利要求1所述的蛋白或其免疫性片段或根据权利要求2所述的多核苷酸序列在制备药物中的应用,其中所述药物用于诱导肿瘤细胞凋亡其中所述肿瘤为肾肿瘤或膀胱肿瘤。
4. 根据权利要求2或3所述的应用,其中所述多核苷酸序列包含于载体中。
5. 根据权利要求4所述的应用,其中所述载体为质粒或病毒;所述病毒为腺病毒。
6. 根据权利要求4所述的应用,其中所述药物含有权利要求1所述的蛋白或其免疫片段或权利要求2所述的多核苷酸序列或权利要求5所述的载体,以及一种或多种药用赋形剂或药用载体。
7. 一种试剂在制备用于检测肿瘤试剂中的应用,其中所述试剂用于检测权利要求1所述的蛋白或其免疫性片段或权利要求2所述的多核苷酸序列的表达,所述肿瘤为肾肿瘤或膀胱肿瘤。
8. 根据权利要求7所述的应用,其中所述试剂为抗体。

一种肿瘤抑制基因或蛋白及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肿瘤抑制基因或蛋白在肿瘤中的表达及其应用,具体地涉及CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段在肾肿瘤及膀胱肿瘤中的表达及其应用。

背景技术

[0002] 众所周知,凋亡在所有动物的发育和稳态中起十分重要的作用,决定一个细胞是否处于凋亡状态的主要标志包括典型的细胞形态的改变以及一些生化和分子标志的改变。就形态而言,凋亡细胞变圆、皱缩、脱落,染色体凝集并分布于核边缘。凋亡发生的主要生化标志有:线粒体失去跨膜电位,质膜磷脂酰丝氨酸外翻,胱冬酶(caspase)的活化,蛋白质如IAPs和聚ADP核糖聚合酶(PARP, Poly (ADP-ribose) polymerase)的酶切,基因组DNA的片断化和线粒体质量以及f-肌动蛋白成分的改变等。

[0003] 在哺乳类动物中,胱冬酶是一组与细胞凋亡有关的蛋白酶。胱冬酶激活的一个主要途径是细胞色素c从线粒体的释放,胞浆中的细胞色素c可与Apaf-1形成复合物,此复合物可识别并酶切胱冬酶原-9,活化后的胱冬酶-9酶切并激活胱冬酶-3,从而引起细胞进行一系列凋亡的形态改变。

[0004] 膀胱肿瘤和肾肿瘤对人类健康和生命构成重大威胁,肾肿瘤占成年人肿瘤发生率的3-4%,据估计,2010年美国将约有58240例肾肿瘤新发病例,并将有13040例患者将死于肾肿瘤。在过去30年里,肾肿瘤的发病率以每年3%的速度递增。

[0005] 膀胱肿瘤在世界范围内的发病率居恶性肿瘤的第九位,在男性排名第六位,女性排在第十位之后。在我国,男性膀胱癌发病率位居全身肿瘤的第八位,女性排在第十二位以后,发病率低于西方国家,但近年来,我国部分城市肿瘤发病率报告显示膀胱癌发病率有增高趋势。

[0006] 膀胱癌和肾癌的治疗均首选手术治疗。但根据肿瘤的生物特性,治疗方法有所不同。

[0007] 目前用于膀胱癌治疗的方法是首选手术治疗,包括经尿道膀胱肿瘤切除术、经尿道激光手术和光动力治疗。TUR-BT术后有10%~67%的患者会在12个月内复发,术后5年内有24%~84%的患者复发。因此,所有非肌层浸润性膀胱癌患者术后均进行辅助性膀胱灌注治疗。膀胱灌注化疗常用药物包括表柔比星、丝裂霉素、吡柔比星、阿霉素、羟基喜树碱等。但是这些治疗方法的效果往往都不是很满意,患者应从性较差,并且复发率很高。术后3年内复发率高达70%,而且复发者中约有三分之一的病例向更高级别和期别进展。

[0008] 肿瘤的治疗中,一个非常重要的问题是如何判断肿瘤的生物特性。目前还没有合适的生物学指标可以准确的预测膀胱癌的发展和预后。因此寻找具有早期诊断、有判断预后价值的肿瘤标记物,并根据其生物学特点采取及时合理的治疗方法,提高膀胱癌患者的总体生存率,一直是泌尿外科学者研究的重要课题。目前对膀胱癌预后因子的研究开发虽已取得进展,但除了个别指标,对于多数指标的预后价值仍存在争议。

[0009] 随着现代生物技术特别是分子免疫学和分子生物学的发展以及对肿瘤发病机制从细胞、分子水平的进一步认识,膀胱癌的分子生物学研究日益受到国内外学者的重视,并且已有部分研究针对膀胱癌的分子治疗进行研究,包括免疫治疗,靶向治疗和基因治疗等。

[0010] 近年来,越来越多的证据显示,肿瘤的复发和进展与多种癌基因过度表达,以及肿瘤抑制基因失活密切相关。目前对这些抑癌基因的研究还处于探索阶段,还需在膀胱癌大样本中进行验证及在临床试验中进行有效性评估,以期寻找到更有利于膀胱癌早期诊断及实现个体化治疗的抑癌基因,总之,进一步研究抑癌基因将有助于推进肿瘤研究,为临床诊断和治疗提供新的方向和思路。

[0011] 目前用于肾癌治疗的方法是首选手术治疗。约30%的肾癌诊断时即发现远处转移。术后患者约30%~40%发生远处转移。转移性肾癌对放化疗等治疗不敏感。预后较差。中位生存期约13个月。尽管医疗技术、分子生物学水平的不断提高,使得肾癌的早期诊断、治疗有了很大进展,但晚期肾癌的五年生存率仍未见明显改善。NCCN《肾癌临床实践指南》认为肾癌术后目前尚无推荐的标准辅助治疗方案。因此,开发针对肾癌的新的治疗方法尤为迫切。

[0012] 近二十余年,基于免疫治疗的细胞因子、肿瘤抗原、树突突细胞的疫苗生物免疫治疗在肾癌治疗中取得了许多进展。近年许多研究报道:包括干扰素、白细胞介素-2以及疫苗、树突状细胞等进行了大量的临床试验,表现出很高的安全性和效果。尽管在这些试验中取得了抗肿瘤免疫反应和显著临床成效,但回应率仍然偏低,仅仅少数患者表现出长期的临床改善。

[0013] 人类基因组计划的研究成果给分子肿瘤学带来了巨大的影响,肿瘤的分子治疗已开始进入临床。分子靶向治疗是指在肿瘤分子生物学的基础上,将与肿瘤相关的特异分子作为靶点,再用针对靶分子特异制剂或药物进行治疗的手段。这种方法在取得明显疗效的同时,又避免对正常细胞的损伤,具有高效、低毒的优点。

[0014] 分子靶向药物治疗使肾癌治疗变得更有针对性,有希望成为转移性肾癌的标准治疗,并可能用于早期肾癌的治疗,但同时面临着很多问题和挑战。如患者的适当选择,最理想剂量和给药时间的确定,与免疫治疗等系统治疗联合应用的前景,能否作为局限型肾癌术后标准辅助治疗方案,能否与传统抗体抗原等生物治疗及靶向基因治疗有效结合。

[0015] 故寻找能更好预测靶向治疗疗效的生物学标记物和影像学技术来指导个性化治疗显得尤为迫切。毫无疑问肾癌治疗已进入了一个新时代,研究者需更加深入地研究肾癌发生发展的分子通路,进行更为广泛的基础和临床研究,为肾癌治疗带来新的曙光。

[0016] 大型测序工作揭示了越来越多的驱动基因,影响肿瘤的发生和发展,为肿瘤的治疗提供了更多的新靶点。可以预见,通过整合各种高通量平台,在不久的将来RCC病人肿瘤的个体化治疗将会变成现实。基因疗法将会成为最有潜力的治疗手段。

[0017] 综上所述,对于膀胱肿瘤和肾肿瘤的治疗和诊断,成为现代医学需要解决的重要课题。细胞凋亡异常是肿瘤发生、发展的重要因素,因此通过诱导肿瘤细胞凋亡来清除肿瘤已成为当前肿瘤治疗的一个新的重要策略。

[0018] CMTM8(CKLF-Like MARVEL Transmembrane Domain Containing8)的表达产物为四次跨膜蛋白,具有MARVEL结构域(MAL and related proteins for vesicle trafficking and membrane link)。CMTM8功能研究证明CMTM8加速转铁蛋白受体、EGFR、c-

MET的内化,加速配体诱导的EGFR、c-MET从细胞表面的清除,抑制EGFR、c-MET活化信号及细胞增殖、迁移、ERK磷酸化,并且超表达CMTM8可诱导肿瘤细胞凋亡。CMTM8-v2为CMTM8缺失exon2的可变剪接体。CMTM8-v2诱导肿瘤细胞凋亡的功能与其全长分子类似。超表达CMTM8和CMTM8-v2表达质粒过表达HeLa(宫颈癌细胞系,ATCC CCL2)和PC3细胞(前列腺癌细胞系,ATCC CRL-1435)可抑制其细胞生长并诱导细胞凋亡,并可使磷酸化的ERK1/2、磷酸化Akt及其下游的磷酸化Bad明显降低。

[0019] 目前,CMTM8及其变异体CMTM8-v2表达与泌尿系统肿瘤发生发展的相关性和在膀胱肿瘤、肾肿瘤发生发展中的作用及机制研究尚无任何报道。

发明内容

[0020] 本发明在一方面是提供CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的蛋白或由它们衍生的蛋白或上述蛋白的免疫性片段在肾肿瘤及膀胱肿瘤中的表达及其应用。

[0021] 本发明在另一方面是提供编码CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的蛋白或由它们衍生的蛋白或上述蛋白的免疫性片段的多核苷酸序列在肾肿瘤及膀胱肿瘤中的表达及其应用。

[0022] 本发明在另一方面是提供CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段在诱导肾肿瘤或膀胱肿瘤细胞凋亡中的应用。

[0023] 本发明在另一方面是提供CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段在诊断和治疗肾肿瘤或膀胱肿瘤中的应用,以及在制备治疗和/或抑制肾肿瘤或膀胱肿瘤的药物中的应用。

[0024] 本发明在另一方面是提供一种包含CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的载体及其在诊断和治疗肾肿瘤或膀胱肿瘤以及制备相应药物中的应用。

[0025] 本发明在另一方面是提供一种用于治疗 and/或抑制肾肿瘤或膀胱肿瘤的药物组合物。

[0026] 本发明在另一方面是提供一种试剂及其用于临床检测CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因和蛋白或它们的免疫性片段的表达以及在制备用于检测膀胱肿瘤和肾肿瘤的组合物中的应用。

附图说明

[0027] 图1.免疫组化研究CMTM8及CMTM8-v2在人膀胱癌组织中的表达情况。随机选取了34例人膀胱组织标本,其中正常膀胱粘膜组织8例,不同分期的肿瘤组织26例。从实验结果中可以看到,CMTM8及CMTM8-v2在正常膀胱粘膜组织中表达呈强阳性(图片1),而在肿瘤组织中,CMTM8及CMTM8-v2的表达水平明显下降,呈弱阳性或阴性,且随着肿瘤出现肌层浸润,或肿瘤分级增加,CMTM8的表达水平下降(图片2,3,4)。

[0028] 图2A-2B.统计分析CMTM8及CMTM8-v2在人膀胱癌组织中的表达情况。利用统计学分析免疫组化结果,显示CMTM8及CMTM8-v2在膀胱癌肿瘤组织中呈低表达,在正常组织中高表达,差异具有显著性($p < 0.05$);在高级别低分化或肌层浸润性膀胱癌中低表达,在低级别高分化或非肌层浸润性膀胱癌中相对高表达,差异具有显著性($p < 0.05$)。

[0029] 图3A-3B.CMTM8及CMTM8-v2表达与患者生存率之间的关系。通过病案查询和电话

随访收集到从2004年到2010年的84例膀胱癌患者的资料和病理组织蜡块(图3A中表2)。进行免疫组化实验后,Kaplan-Meier生存分析显示患者生存率与CMTM8及CMTM8-v2表达水平呈明显相关(log-rank test, $P=0.011$) (图3B)。为进一步验证实验结果,采用COX多因素分析对实验结果进行检验,结果证实CMTM8及CMTM8-v2是膀胱癌患者生存率的独立影响因素(HR,0.539;95%CI,0.296-0.982; $P=0.043$)。

[0030] 图4.CMTM8及CMTM8-v2在膀胱癌细胞系中的表达。在体外实验中选取了两种细胞系—MGH-U1和RT112,MGH-U1来源于高级别低分化尿路上皮癌,而RT112来源于低级别高分化尿路上皮癌,通过细胞免疫化学检测了两种细胞的CMTM8及CMTM8-v2的表达后发现,MGH-U1的CMTM8及CMTM8-v2的表达明显低于RT112。

[0031] 图5.Western blotting检测CMTM8及CMTM8-v2在膀胱癌细胞系中的表达。MGH-U1的CMTM8及CMTM8-v2的表达明显低于RT112。

[0032] 图6.实时定量PCR检测CMTM8及CMTM8-v2在膀胱癌细胞系中的表达。RT112细胞系CMTM8及CMTM8-v2的mRNA表达量是MGH-U1表达量的4.344倍,进一步证实了两种不同级别膀胱癌细胞系CMTM8表达的差异性。

[0033] 图7.构建CMTM8上调的膀胱癌细胞系。通过腺病毒感染构建CMTM8上调的T24膀胱癌细胞系。并利用Western blotting实验检验转染后的CMTM8表达水平。上调后的T24细胞CMTM8表达水平明显高于野生型T24细胞。

[0034] 图8和图9.CMTM8腺病毒感染的T24细胞系的细胞迁移能力明显降低。Boyden Chamber趋化小室检测CMTM8腺病毒感染的T24细胞的细胞迁移能力。空载体腺病毒感染的T24细胞作为对照(Nu11)。37℃条件下趋化6小时后对迁移至趋化膜向下一面的细胞进行染色(图8)和计数(图9)。图示中标尺代表100 μm 。CMTM8腺病毒明显抑制T24细胞对于由SDF-1或者EGF诱导的迁移。

[0035] 图10.CMTM8腺病毒感染的T24细胞系的增值能力明显降低。MTT实验检测上调CMTM8后的T24细胞增殖情况。将CMTM8腺病毒感染的T24细胞和感染空载体腺病毒的T24细胞(作为对照Nu11)计数后分别平铺于96孔板中,分别在1天,2天,3天,4天,5天,加入MTT溶液,4小时后用酶标仪检测OD值。实验结果证实,CMTM8腺病毒能够明显抑制T24细胞的增殖。

[0036] 图11.CMTM8腺病毒与化疗药物表柔比星联合应用具有协同抗肿瘤作用。Annexin V实验检测CMTM8腺病毒与化疗药物表柔比星的协同作用。实验结果证实,一定剂量单纯的CMTM8腺病毒和单纯应用化疗药物表柔比星均无明显的致膀胱癌细胞凋亡效果。而这一剂量CMTM8腺病毒与表柔比星合用则可显著提高膀胱癌细胞的凋亡率。因此CMTM8腺病毒与表柔比星联合应用具有协同抗肿瘤作用。

[0037] 图12.Western blot实验检测CMTM8及CMTM8-v2在癌旁组织中的表达水平明显高于肿瘤组织。随机选取了4例因患肾癌而行根治性肾切除术的病例,手术采集新鲜组织标本后进行western blot实验检测CMTM8及CMTM8-v2的蛋白表达情况。结果显示CMTM8及CMTM8-v2在癌旁组织中的表达水平明显高于肿瘤组织。“N”代表癌旁组织,“Ca”代表肿瘤组织。

[0038] 图13A.免疫组化检测CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin在人原发性和转移性肾透明细胞癌中的表达。44例人肾透明细胞癌病理组织标本,进行CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin免疫组化检测。

[0039] 图13B-13C.统计分析CMTM8及CMTM8-v2在人肾透明细胞癌组织中的表达情况。对

44例人肾透明细胞癌病理组织标本的CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin免疫组化检测进行了统计分析。从分析结果中可以看到,CMTM8及CMTM8-v2在高度恶性肾癌组织中表达多呈弱阳性或阴性表达,而随着肿瘤恶性程度的降低,CMTM8及CMTM8-v2在肿瘤组织中的表达水平呈较强阳。正上肾小管CMTM8及CMTM8-v2表达水平呈强阳性。

[0040] 图14A-14C.CMTM8及CMTM8-v2在人肾癌组织中的表达与生存相关性的统计分析。进行免疫组化实验后,采用Kaplan-Meier生存分析,结果显示患者生存率与CMTM8及CMTM8-v2表达水平呈明显相关(log-rank test,P=0.011)(图14C,图14A中表5)。为进一步验证实验结果,采用COX多因素分析对实验结果进行检验,结果证实CMTM8及CMTM8-v2是膀胱癌患者生存率的独立影响因素(HR,0.463;95%CI,0.271-0.789;P=0.005)(图14B中表6)。

具体实施方式

[0041] 以下针对前述的发明内容就不同的实施方式并结合附图进行较为详细的描述。应当理解,这些描述以及后面所列的具体实施例只是用来进一步说明本发明的技术内容,而不是用来限制本发明的保护范围。

[0042] 根据本发明的一种实施方式,本发明提供了一种选自如下(a)、(b)、(c)或(d)所示的蛋白或其免疫性片段在膀胱癌和肾癌中的应用:

[0043] (a)由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列组成的蛋白;

[0044] (b)在(a)限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且与(a)具有相同功能的由(a)衍生的蛋白;

[0045] (c)由SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列组成的蛋白;或

[0046] (d)在(c)限定的氨基酸序列中经过取代、缺失或添加一个或几个氨基酸且与(c)具有相同功能的由(c)衍生的蛋白。

[0047] 如SEQ ID NO:2所述的氨基酸序列为本发明的CMTM8蛋白序列,共173个氨基酸。CMTM8基因为编码本发明的SEQ ID NO:2的多核苷酸序列,其可以为SEQ ID NO:2所示氨基酸的编码序列,除了上述氨基酸序列的编码序列之外,还可以包括非编码序列,例如内含子、编码序列5'或3'端的非编码序列等在膀胱癌和肾癌中的应用。所述多核苷酸序列可以是DNA或RNA,其中DNA包括cDNA、基因组DNA以及合成的DNA。其中优选的基因为SEQ ID NO:1所示的多核苷酸序列,该序列全长1185个核苷酸,其包含编码CMTM8蛋白的序列(例如编码序列(CDS:核苷酸295-813)和5'非编码区(核苷酸1-294)及3'非编码区(核苷酸814-1185)。或者,更优选一种分离的核苷酸序列在膀胱癌和肾癌中的应用,其只包含CMTM8蛋白的编码序列,例如SEQ ID NO:1所示的编码序列:核苷酸295-813。CMTM8-v2蛋白为如SEQ ID NO:4所述的氨基酸序列,其编码115个氨基酸。CMTM8-v2为CMTM8的可变剪切体,其中剪切掉了第二个外显子,即CMTM8-v2(SEQ ID NO:4)缺少CMTM8(SEQ ID NO:2)的氨基酸残基50-107。所述CMTM8-v2编码基因优选为SEQ ID NO:4所示氨基酸的编码序列,例如本发明SEQ ID NO:3所示的多核苷酸序列,其相当于SEQ ID NO:1的核苷酸295-441加616-813,即缺少SEQ ID NO:1的编码序列(CDS:核苷酸295-813)中的核苷酸442-615。

[0048] 本领域普通技术人员已知,本发明CMTM8的核苷酸序列可以完全相同于如SEQ ID NO:1所示的编码序列,CMTM8-v2的核苷酸序列可以完全相同于如SEQ ID NO:3所示的编码序列,也可以由于遗传密码的简并性,不完全等同于上述核苷酸的编码序列。例如,根据每

个具体的原核宿主或者真核宿主所使用的密码子的频率不同,可以选择相应的密码子,从而提高所述的多核苷酸在相应的宿主中表达效率。也可以为了获得比天然的核苷酸序列具有更好性能的多核苷酸(如更长的半衰期)而转换密码子。本发明的CMTM8基因或蛋白的免疫性片段包括本发明的CMTM8蛋白的免疫性片段或本发明的CMTM8基因的免疫性片段。本发明的CMTM8蛋白的免疫性片段可以为CMTM8蛋白的任何具有免疫原性的片段,例如SEQ ID NO:2的氨基酸157-173所示的序列、SEQ ID NO:2的氨基酸1-21所示的序列、SEQ ID NO:2的氨基酸22-42所示的序列或SEQ ID NO:2的氨基酸127-143所示的序列。本发明的CMTM8基因的免疫性片段可以为编码所述CMTM8蛋白的免疫性片段的核苷酸序列。

[0049] 本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的多核苷酸序列或其免疫性片段可以依据标准的PCR扩增技术将cDNA、mRNA或者基因组DNA作为模板,并选取合适的寡核苷酸引物扩增得到。这样得到核苷酸可以克隆进合适的载体中,然后利用在所述载体中的复制得到。也可以通过标准DNA合成技术得到,例如,使用可以按本领域熟知的固相亚磷酸酰胺三酯法在DNA合成仪上合成。

[0050] 本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的蛋白或其免疫性片段可以通过常规方法获得,例如通过用CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或其免疫性片段转化宿主细胞并在被转化的宿主细胞生长到适当的细胞密度后,用适当的方法(如温度变动或化学特质诱导)诱导启动子,然后继续培养。培养完成后,可用离心法收集细胞,并用任何已知的方法,如冻融法、超声处理法、溶菌酶溶解法或机械破碎法破碎细胞。可以用各种已知的方法从宿主细胞培养物中回收和纯化本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的蛋白或其免疫性片段,这些方法包括硫酸铵或乙醇沉淀法、酸萃取法、超滤法、离子交换层析法、磷酸纤维素层析法、疏水相互作用层析法、凝胶过滤法、亲和层析法及高压液柱层析法。

[0051] 根据本发明的另外一种实施方式,本发明提供了CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段在诱导膀胱癌和肾癌细胞凋亡中的应用。细胞凋亡又称程序性细胞死亡,是一种在特定时空主动发生的、受基因严密调控的细胞逐渐死亡的现象。细胞凋亡在肿瘤发生、肿瘤治疗、胚胎发育、免疫反应、神经系统发育、组织代谢过程中有重要的作用。由于本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段能够诱导膀胱肿瘤细胞和肾肿瘤细胞凋亡,所以本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段可以广泛用于临床膀胱肿瘤和肾肿瘤的治疗。

[0052] 细胞凋亡异常是肿瘤发生、发展的重要因素,因此通过诱导肿瘤细胞凋亡来清除肿瘤已成为当前膀胱癌和肾癌肿瘤治疗的一个新的重要策略。在本发明的一个实施例中,证明了本发明的CMTM8在膀胱癌肿瘤细胞中的表达能够诱导肿瘤细胞的凋亡,从而本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2或其免疫性片段可用于治疗和/或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤。

[0053] 根据本发明的其他一种实施方式,本发明提供了CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段在制备治疗和/或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中的应用。本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段在膀胱肿瘤和肾肿瘤细胞的表达可以抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞的凋亡,而且CMTM8及CMTM8-v2在膀胱癌和肾癌组织中的表达水平显著低于正常膀胱组织和肾组织。因此,本发明的CMTM8及CMTM8-v2基因为新的肿瘤抑制基因。从而,本发明的CMTM8及CMTM8-v2基因或蛋白

或它们的免疫性片段可用于制备治疗和/或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物。本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因和蛋白可以以基因和蛋白的形式直接包含在用于治疗和/或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中利用其瞬时表达产物进行治疗,也可以以包含在表达载体中的形式包含在用于治疗和/或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中利用瞬时和稳定的表达产物进行治疗。

[0054] 本发明还提供一种用于治疗和/或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物组合物,该药物组合物含有CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段,和一种或多种药用赋形剂或药用载体。药用赋形剂或药用载体指无毒固态、半固态或液态填充剂、稀释剂、包囊材料或其他制剂辅料。所述药物组合物适于胃肠外、舌下、脑池内、阴道内、腹膜内、直肠内、颊内、肿瘤内或表皮给药。胃肠外给药包括静脉内、肌内、腹膜内、胸骨内、皮下、关节内注射和输注。适于胃肠外给药的药物组合物包括无菌水溶液或非水溶液、分散液、悬浮液或乳液,以及用于在临使用前在无菌可注射溶液或分散液中配制的粉末。适宜的水性或非水性载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、羧甲基纤维素、植物油和可注射的有机酯如油酸乙酯。这些组合物还可以含有防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂等辅料。加入等渗剂如糖类、氯化钠等可能是有利的。表皮给药包括在皮肤、黏膜上、以及在肺和眼的表面给药。这样的药物组合物包括粉剂、软膏、滴剂、透皮贴剂、离子电渗疗法装置以及吸入剂等。直肠或阴道给药的组合物优选为栓剂,它可以通过将本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2序列或其免疫性片段或含有CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2多核苷酸序列或其免疫性片段的载体与适宜的非刺激性药用赋形剂或药用载体如可可脂、聚乙二醇或栓剂蜡混合制备,所述药用赋形剂或药用载体在室温为固态,在体温下为液态,因此在直肠或阴道腔内融化并释放出活性化合物。

[0055] 当以上述或其他方式进行治疗时,治疗有效量的本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2可以是本发明CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段的纯净形式、药用盐形式,或选择性与药用赋形剂组合。对膀胱肿瘤和肾肿瘤患者的具体治疗有效剂量取决于许多因素,包括所治疗的疾病和其严重程度;所用具体化合物的活性;所用的特定组合物;患者的年龄、体重、性别、饮食和一般健康状况;给药时间;给药途径;具体化合物的排泄速度;治疗的持续时间联合或同时服用的其他药物等,对于本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2来说,其治疗有效量一般为0.1~1000 μ g/人/天。

[0056] 本发明还提供检测CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段的表达的试剂在制备用于检测膀胱肿瘤和肾肿瘤的组合物中的应用。所述试剂可以为蛋白、核酸、碳水化合物等,优选为抗体、反义RNA或小干扰RNA(siRNA)。

[0057] 本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段可以作为膀胱肿瘤和肾肿瘤诊断指标。因此,可以利用限制性片段长度多态性分析(RFLP)、反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、荧光原位杂交法(FISH)等方法或它们的组合,检测体内因本发明的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2表达不足或过量所致的病理状态。同样,也可以使用本发明CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2蛋白的抗体,通过放射性免疫分析、竞争性结合法、Western印迹分析法或酶联免疫吸附法(ELISA)达到相同的目的。

[0058] 实施例

[0059] 下面的实施例用来针对本发明的实施进行说明。应理解,本发明的范围不受这些

具体实施例的限制。除非另有说明,下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如Sambrook等人,分子克隆:实验手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0060] 实施例1膀胱癌手术蜡块CMTM8及CMTM8-v2免疫组织化学检测及统计学分析

[0061] 一、方法:

[0062] 将收集的病理组织蜡块进行切片,石蜡切片的厚度为4 μ m,然后脱蜡。脱蜡:组织芯片置于二甲苯中浸泡20分钟,换新鲜二甲苯重复一次;水化:将脱蜡后的组织切片于100%乙醇中浸泡5分钟x2次,95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、蒸馏水各浸泡3分钟x1次;抗原修复:抗原修复液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,将抗原修复液微波高火加热至沸腾,将切片放入,再用微波高火加热5分钟,补加蒸馏水恢复体积后再用微波高火加热5分钟,自然冷却至室温;去除内源性过氧化物酶:新鲜配置3%H₂O₂,滴片,室温下避光孵育10分钟;PBS洗5分钟x3次,不时晃动;封闭:用10%正常羊血清PBS封闭液室温封闭20分钟;一抗反应:滴片,加1:100的CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2兔多抗(以封闭液稀释),4℃过夜反应,以同样稀释度的正常兔IgG作为阴性对照;PBS洗5分钟x3次,不时晃动;二抗反应:HRP-抗兔IgG抗体1:1000PBS稀释,37℃反应30分钟;PBS洗5分钟x3次,不时晃动;DAB显色,滴片,镜下观察反应结果,苏木精复染细胞核后,中性树脂胶封片。由两位病理科大夫分别评定染色阳性程度,如有评级不一致的,由两位病理科大夫协商后评定。

[0063] 所有数据均采用SPSS17.0软件进行统计分析。正常膀胱组与膀胱癌组,高级别膀胱癌与低级别膀胱癌,不同临床TNM分期之间均采用卡方检验进行统计学分析。采用Kaplan-Meier生存分析检验患者生存与CMTM8及CMTM8-v2表达水平之间的相关性,COX多因素回归分析检验CMTM8及CMTM8-v2表达水平是否是膀胱癌患者生存的独立影响因素。以P<0.05为差异具有统计学意义。

[0064] 二、结果:

[0065] 如图1所示,CMTM8及CMTM8-v2的抗体对不同分化程度的膀胱癌组织着色不同,包括癌旁组织,提示不同分化程度的膀胱癌表达不同水平的CMTM8及CMTM8-v2。从切片中可以看出大致趋势:癌旁组织表达CMTM8及CMTM8-v2水平最高,随着膀胱癌恶性程度增高,CMTM8及CMTM8-v2的表达量越低。通过对几十例膀胱癌患者的膀胱组织石蜡切片进行统计,结果如图2A中表1所示,膀胱癌组织中CMTM8及CMTM8-v2的表达水平明显低于膀胱癌旁组织,并且如图2B所示,恶性程度越高,分化水平越低,CMTM8及CMTM8-v2表达水平越低。通过对膀胱癌切片来源的患者进行生存率统计,结果如图3A中表2和图3B所示,CMTM8及CMTM8-v2的表达跟患者的生存率呈正相关关系,其中在CMTM8及CMTM8-v2表达++与-和+比,生存率存在显著差异。

[0066] 实施例2膀胱癌细胞系MGHU-1和RT112免疫细胞化学

[0067] 一、方法:

[0068] 将培养的MGHU-1和RT112细胞用胰酶消化,制成细胞悬液,注入铺有小玻片的六孔板中,37℃5%CO₂孵育箱中过夜培养。4%多聚甲醛固定30分钟。PBS洗两次各5分钟。3%H₂O₂室温封闭30分钟,PBS洗3次,每次5分钟。PBS洗3次,每次5分钟。滴加正常山羊血清封闭液,室温30分钟。甩去多余液体。滴加CMTM8抗体,浓度1:600,4℃过夜。PBS洗三次,每次5分钟。滴加羊抗兔来源二抗,室温30分钟。PBS洗3次,每次5分钟。滴加试剂SABC,室温30分钟。PBS洗3

次,每次5分钟。DAB显色。蒸馏水洗终止显色。苏木素复染细胞核2分钟、盐酸酒精分化。脱水、透明、封片、镜检。

[0069] 二、结果:

[0070] 如图4所示,MGHU-1中CMTM8及CMTM8-v2的表达比在RT112中低,且已知MGHU-1细胞系的恶性程度高于RT112细胞系,说明,CMTM8及CMTM8-v2在恶性程度较高的细胞系中表达水平较低。

[0071] 实施例3CMTM8及CMTM8-v2在膀胱癌细胞系MGHU-1和RT112中mRNA表达水平检测

[0072] 一、方法:

[0073] 应用RT-PCR的方法检测膀胱癌细胞系MGHU-1和RT112的内源性CMTM8及CMTM8-v2。首先,用TRIZOL™试剂提取细胞总RNA。具体方法如下:收获对数生长期的细胞,在35mm培养皿中加入1ml TRIZOL™试剂,反复吹打破碎细胞,并将其转移到1.5ml无RNA酶的离心管中,于室温静置5分钟,加入0.2ml氯仿,猛烈振荡15秒,在4℃于不大于12000g离心15分钟,收集上层水相,加入500μl异丙醇来沉淀RNA,用70%乙醇洗一遍,于室温干燥后,将沉淀得到的RNA复悬于DEPC(焦碳酸二乙酯)处理的H₂O中,通过分光光度计定量后将所得RNA溶液用于逆转录。其次,通过逆转录合成单链cDNA,并进行PCR扩增,具体方法如下:利用Invitrogen公司的SuperScript II试剂盒,用2μg总RNA合成单链cDNA。PCR反应所用引物序列如表7所示,反应条件如表8所示,GAPDH作为系统内参(对照)。

[0074] 表7. PCR反应所用的引物序列

[0075]

	上游引物(从 5'到 3')	SEQ ID NO	下游引物(从 5'到 3')	SEQ ID NO
CMTM8	TGCTGGAAGTCTGAGTAC TTCCG	SEQ ID NO:5	AGAGAGGTACAAGACG AAGGC	SEQ ID NO: 6
GAPDH	tgaaggtcggagtcaacggatttgg	SEQ ID NO:7	catgtggccatgaggtccaccac	SEQ ID NO: 8

[0076] 表8. PCR反应条件

[0077]

	预变性	变性	退火	延伸	循环数	进一步延伸
CMTM8	94℃4min	94℃30s	59℃30s	72℃40s	30	72℃10min
GAPDH	94℃4min	94℃20s	58℃20s	72℃30s	25	72℃10min

[0078] 二、结果:

[0079] RT-PCR结果如图6所示,MGHU-1细胞系中的mRNA水平的CMTM8及CMTM8-v2明显低于RT112细胞系,与免疫细胞化学结果一致。

[0080] 实施例4 CMTM8及CMTM8-v2在膀胱癌细胞系MGHU-1和RT112蛋白表达水平检测

[0081] 一、方法:

[0082] 将处于对数生长期的MGHU-1和RT112细胞弃去培养液,并用冷的PBS洗细胞三次,用裂解液(50mM Tris-HCL,pH7.4,150mM NaCl,1%Nonidet P-40,0.25%脱氧胆酸钠,1mM

EDTA, 2mM Na₃VO₄, 1mM NaF and Protease Inhibitor Cocktail Tablets) 4℃裂解细胞30分钟。收获细胞蛋白, 细胞裂解液18,000g, 20分钟离心, 上清即为所需总蛋白的裂解液, 以牛血清白蛋白作为标准品, 用BCA蛋白测定试剂盒 (Pierce, USA) 定量总蛋白的浓度。总蛋白上样量80ug, 用7.5%SDS-PAGE胶分离, 并用湿式法将蛋白转到尼龙膜 (HybondTM, ECLTM, Amersham Pharmacia, UK) 上。已转有蛋白条带的尼龙膜用5%BSA (用含0.05%Tween-20的TBS-T配制) 室温封闭1小时, 用TBS-T室温洗膜两遍, 加入用TBS-T配制的一抗, 4℃过夜孵育, 次日用TBS-T洗膜三次, 10分钟/次, 加入Alexa Fluor780标记的IgG二抗, 室温孵育1.5小时。用TBS-T洗膜三次之后用LI-COR Infrared Imaging System (Odyssey, Lincoln, NE) 扫描成像。

[0083] 二、结果:

[0084] 结果如图5所示, MGHU-1细胞系中CMTM8在蛋白水平上表达多于RT112细胞系, 结果与RT-PCR和免疫细胞化学结果一致。

[0085] 实施例5 Western blot检测CMTM8腺病毒感染后膀胱癌细胞系T24细胞CMTM8表达水平

[0086] 一、方法

[0087] 复制缺陷5型腺病毒Ad5-CMTM8、及对照病毒Ad5-GFP委托本元正阳公司重组、包装、纯化获得。使用空斑法测定病毒滴度。Ad5-CMTM8腺病毒表达的蛋白为全基因编码产物。

[0088] 将T24细胞培养液中加入Ad5-CMTM8或Ad5-GFP腺病毒, 37℃孵育箱过夜, 进行细胞裂解。并用冷的PBS洗细胞三次, 用裂解液 (50mM Tris-HCL, pH7.4, 150mM NaCl, 1%Nonidet P-40, 0.25%脱氧胆酸钠, 1mM EDTA, 2mM Na₃VO₄, 1mM NaF and Protease Inhibitor Cocktail Tablets) 4℃裂解细胞30分钟。收获细胞蛋白, 细胞裂解液18,000xg, 20分钟离心, 上清即为所需总蛋白的裂解液, 以牛血清白蛋白作为标准品, 用BCA蛋白测定试剂盒 (Pierce, USA) 定量总蛋白的浓度。总蛋白上样量30ug, 用8%SDS-PAGE胶分离, 并用湿式法将蛋白转到尼龙膜 (HybondTM, ECLTM, Amersham Pharmacia, UK) 上。已转有蛋白条带的尼龙膜用5%BSA (用含0.05%Tween-20的TBS-T配制) 室温封闭1小时, 用TBS-T室温洗膜两遍, 加入用TBS-T配制的一抗, 4℃过夜孵育, 次日用TBS-T洗膜三次, 10分钟/次, 加入Alexa Fluor780标记的IgG二抗, 室温孵育1.5小时。用TBS-T洗膜三次之后用LI-COR Infrared Imaging System (Odyssey, Lincoln, NE) 扫描成像。

[0089] 二、结果:

[0090] 结果如图7所示, Ad5-CMTM8感染T24细胞系后能成功上调CMTM8的表达。

[0091] 实施例6 Boyden Chamber小室趋化实验检测CMTM8腺病毒感染的膀胱癌细胞系T24细胞的迁移能力

[0092] 一、方法:

[0093] 待T24细胞生长铺满培养皿后, 在T24细胞培养液中加入实施例5中制备的Ad5-CMTM8腺病毒, 以Ad5空载体腺病毒感染野生型T24细胞作为对照组 (Null), 培养于10cm培养皿, 细胞培养48小时后, 将细胞刮下, 大体积RPMI1640培养基洗2遍, 将细胞用0.1%BSA的RPMI1640重悬至密度为 1×10^6 个细胞/ml。Boyden Chamber趋化膜孔径为10μm, 预包被鼠尾胶原。趋化物SDF-1和EGF均用0.1%BSA的RPMI1640稀释至100ng/ml。将稀释好的趋化物25μl加入趋化小室的下孔, 细胞悬液50μl加入趋化小室的上孔。正常细胞培养条件下趋化5小

时,将迁移至趋化膜趋化物面的细胞染色计数。

[0094] 二、结果:

[0095] 结果如图8和图9所示,CMTM8腺病毒感染的T24细胞迁移能力明显降低。

[0096] 实施例7MTT实验检测CMTM8腺病毒感染的膀胱癌细胞系T24细胞增殖能力

[0097] 一、方法:

[0098] 将T24细胞采用胰酶消化后制成单细胞悬液,以每孔10000个细胞的浓度接种到96孔板,每孔液体体积为100u1,平均分成两组,一组加入Ad5-CMTM8腺病毒,另外一组加入Ad5空载腺病毒(Nu11)作为对照组。置于37℃孵育箱中培养,分别在培养1天、2天、3天、4天和5天时每组各取一孔加入MTT溶液(5mg/ml用PBS配制,pH=7.4)20u1,继续孵育4h后,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加100u1裂解液,振荡10分钟,使结晶物充分融解,进行比色。选择570nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值,记录结果,以小时数做为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

[0099] 二、结果:

[0100] 结果如图10所示,在T24细胞系中感染CMTM8腺病毒可明显抑制T24细胞的增值能力。

[0101] 实施例8CMTM8腺病毒与化疗药物表柔比星具有协同抗肿瘤作用

[0102] 一、方法:

[0103] 将处于对数生长期的T24细胞分为四组:野生型阴性对照T24细胞组(Nu11),CMTM8腺病毒感染的T24细胞组,加入化疗药物表柔比星(Epirubicin)的野生型T24细胞组,CMTM8腺病毒感染的T24细胞加化疗药物表柔比星组。表柔比星的溶度为0.25μg/ml,作用时间为48h。所有实验组均在细胞计数后同时铺板,待加入化疗药物48h后同时提取细胞悬液。然后在细胞悬液加入5μl Annexin V-FITC,轻轻混匀后于2-8℃避光条件下孵育15分钟。并加入10μl PI后轻轻混匀于2-8℃避光条件下孵育5分钟后进行流式细胞仪分析。

[0104] 二、结果:

[0105] 结果如图11所示,单独加入表柔比星可使T24细胞系出现部分凋亡,单独感染CMTM8腺病毒的T24细胞无明显凋亡,如果同时加入表柔比星和感染CMTM8腺病毒可以显著增加T24细胞系凋亡的数量。

[0106] 实施例9Western blot实验检测新鲜肾癌组织标本及癌旁正常肾组织CMTM8及CMTM8-v2表达水平

[0107] 一、方法:

[0108] 手术室收集因肾癌行根治性切除患者手术标本。每例均采集新鲜肿瘤组织和癌旁正常组织。距肿瘤组织边缘大于5厘米,病理检测是正常肾组织。所有手术标本均在离体30分钟之内采集,并置于液氮中保存。

[0109] 将所有组织标本包括肿瘤组织和癌旁组织,在冰冷的生理盐水中漂洗,出去血液,滤纸拭干,称重,各取100mg。用眼科剪在冰上剪碎,然后采用匀浆机12000rpm/min进行组织匀浆,3分钟。用裂解液(50mM Tris-HCL,pH7.4,150mM NaCl,1%Nonidet P-40,0.25%脱氧胆酸钠,1mM EDTA,2mM Na3VO4,1mM NaF and Protease Inhibitor Cocktail Tablets)4℃裂解30分钟。收获组织蛋白,组织裂解液18,000xg,20分钟离心,上清即为所需总蛋白的裂解液,以牛血清白蛋白作为标准品,用BCA蛋白测定试剂盒(Pierce,USA)定量总蛋白的浓

度。总蛋白上样量30 μ g,用8%SDS-PAGE胶分离,并用湿式法将蛋白转到尼龙膜(HybondTM, ECLTM, Amersham Pharmacia, UK)上。已转有蛋白条带的尼龙膜用5%BSA(用含0.05%Tween-20的TBS-T配制)室温封闭1小时,用TBS-T室温洗膜两遍,加入用TBS-T配制的一抗,4 $^{\circ}$ C过夜孵育,次日用TBS-T洗膜三次,10分钟/次,加入Alexa Fluor780标记的IgG二抗,室温孵育1.5小时。用TBS-T洗膜三次之后用LI-COR Infrared Imaging System(Odyssey, Lincoln, NE)扫描成像。

[0110] 二、结果:

[0111] Western blot结果如图12所示,在4例患者的标本中,肾癌旁组织(N)中CMTM8及CMTM8-v2的表达水平明显高于肾癌组织(Ca)。

[0112] 实施例10CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin在正常肾组织、肾透明细胞癌和转移性肾透明细胞癌组织中表达的免疫组织化学检测及统计学分析

[0113] 一、方法:

[0114] 首先将收集的病理组织蜡块进行切片,石蜡切片的厚度为4 μ m,然后脱蜡。脱蜡:组织芯片置于二甲苯中浸泡20分钟,换新鲜二甲苯重复一次;再水化:将脱蜡后的组织切片于100%乙醇中浸泡5分钟x2次,95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇、蒸馏水各浸泡3分钟x1次;抗原修复:抗原修复液为柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液,将抗原修复液微波高火加热至沸腾,将切片放入,再用微波高火加热5分钟,补加蒸馏水恢复体积后再用微波高火加热5分钟,自然冷却至室温;去除内源性过氧化物酶:新鲜配置3%H₂O₂,滴片,室温下避光孵育10分钟;PBS洗5分钟x3次,不时晃动;封闭:用10%正常羊血清PBS封闭液室温封闭20分钟;一抗反应:滴片,加入一抗(CMTM8及CMTM8-v2兔多抗1:500, E-cadherin1:200)(以封闭液稀释),4 $^{\circ}$ C过夜反应,以同样稀释度的正常兔IgG作为阴性对照;PBS洗5分钟x3次,不时晃动;二抗反应:HRP-抗兔IgG抗体1:1000PBS稀释,37 $^{\circ}$ C反应30分钟;PBS洗5分钟x3次,不时晃动;DAB显色,滴片,镜下观察反应结果,苏木精复染细胞核后,中性树胶封片。由两位病理科大夫分别评定染色阳性程度,如有评级不一致的,由两位病理科大夫协商后评定。

[0115] 由病理科医生遵循以下CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin的染色评价标准进行染色评价。图片在200倍显微镜下采集,CMTM8和E-cadherin的配对图片均来自同一蜡块的连续切片。

[0116] 根据CMTM8在肾组织的表达方式和强度,将染色结果分为4个级别:3级为细胞膜完整连续的强阳性染色;2级为细胞膜完整连续的弱阳性染色,细胞浆染色阴性;1级为细胞膜非连续的弱阳性染色,细胞浆染色阳性;0级为仅有细胞浆染色阳性。

[0117] 根据E-cadherin在肾组织的表达方式和强度,将染色结果分为4个级别:3级为细胞膜完整连续的强阳性染色;2级为细胞膜完整连续的弱阳性染色,细胞浆染色阴性;1级为细胞膜非连续的弱阳性染色,细胞浆染色阳性;0级为细胞膜和细胞浆染色均为阴性。

[0118] 统计分析:所有数据都采用SPSS13.0软件进行统计分析。通过Fisher确切概率法评价组间差异性;通过Spearman相关性分析评价相关性。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

[0119] 二、结果:

[0120] CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin在正常肾小管上皮细胞的细胞膜上呈强阳性表达(3级)。而在肾透明细胞癌组织中,CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin在细胞膜表达水平明显降低(2级或1级,图13A,图13B中表3, $p < 0.001$)。CMTM8及CMTM8-v2表达在高级别和低级别

的肾透明细胞癌中也存在明显的差异(图13B中表3, $P=0.024$)。

[0121] 在肾癌肺转移标本中,统计结果显示,CMTM8及CMTM8-v2在原发性肾癌和转移性肾癌中的表达存在显著性差异,具有统计学意义(图13C中表4, $P=0.003$);而且,CMTM8及CMTM8-v2在肾癌肺转移和骨转移标本中的表达差异,也具有统计学意义(图13B中表4, $P=0.020$)。

[0122] 然后通过Spearman相关性分析计算相关系数。结果显示,CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin均与肾组织分级有显著负相关性(r 值分别为-0.841和-0.732, $p<0.001$),而且CMTM8及CMTM8-v2与E-cadherin也具有显著的相关性(r 值为0.694, $p<0.001$)。实施例11肾癌手术标本蜡块CMTM8及CMTM8-v2的免疫组织化学检测及其表达与生存相关性统计学分析

[0123] 一、方法:

[0124] CMTM8及CMTM8-v2的免疫组化检测方法同实施例10。

[0125] 所有数据均采用SPSS17.0软件进行统计分析。采用Kaplan-Meier生存分析检验患者生存与CMTM8及CMTM8-v2表达水平之间的相关性,COX多因素回归分析检验CMTM8及CMTM8-v2表达水平是否是肾癌患者生存的独立影响因素。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

[0126] 二、结果:

[0127] Kaplan-Meier生存分析检验结果显示肾癌组织中CMTM8及CMTM8-v2表达呈高水平的患者在生存率方面与肾癌组织中CMTM8及CMTM8-v2低表达的患者的生存率存在显著性的差异($P=0.011$) (图14A中表5、图14C)。COX多因素回归分析结果显示,CMTM8及CMTM8-v2表达水平是肾癌患者生存期的独立影响因素(HR, 0.463; 95%CI, 0.271-0.789; $P=0.005$) (图14B中表6)。

[0128] 实施例12抗CMTM8及CMTM8-v2蛋白的兔多抗制备及其特异性

[0129] 一、方法:

[0130] 由杭州中肽公司按照标准方法化学合成CMTM8及CMTM8-v2的四段肽段各10mg,其中5mgKLH偶联,5mg裸肽。肽的纯度都达到了70%以上,四段肽段的序列分别如表9所示:

[0131] 表9

[0132]

肽段 1	Ala-Gly-Asn-Thr-Tyr-Phe-Ser-Phe-Ile-Ala-Trp-Arg-Ser-Arg-Thr-Ile-Gln-Cys	SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列 157~173 (SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列 99~115), 末尾加上 Cys
肽段 2	Met-Glu-Glu-Pro-Gln-Arg-Ala-Arg-Ser-His-Thr-Val-Thr-Thr-Thr-Ala-Ser-Ser-Phe-Ala-Glu-Cys	SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列 1~21, 末尾加上 Cys
肽段 3	Asn-Phe-Ser-Thr-Ser-Ser-Ser-Ser-Phe-Ala-Tyr-Asp-Arg-Glu-Phe-Leu-Arg-Thr-Leu-Pro-Gly-Cys	SEQ ID NO: 2 和 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列 22~42, 末尾加上 Cys
肽段 4	Ala-Ser-Ser-Val-Ser-Pro-Glu-Arg-Asp-Ser-His-Asn-Phe-Asn-Ser-Trp-Ala-Cys	SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列 127~143 (SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列 69~85), 末尾加上 Cys

[0133] 进行免疫前,将四条KLH偶联的肽段用5ml双蒸水稀释成浓度为1mg/ml,分装,-70℃保存备用。本发明利用混合免疫的方法制备多抗,免疫的具体过程如下:①选择雄性兔子两只;②四条肽各100μg混合,共400μg,将这400μg混合肽与弗氏完全佐剂以1:1的比例混匀,多点注射兔子的足蹠部和背部皮下;③两周后加强免疫,四条肽各100μg混合,共400μg,将这400μg混合肽与弗氏不完全佐剂以1:1混匀,仅背部皮下多点注射。10-14天后可以试血,用ELISA检测抗体效价。要是抗体效价不够高的话,两周后可以再次加强免疫,具体方法同第一次加强免疫。

[0134] 本发明采用直接ELISA的方法检测抗体的效价,具体方法如下:

[0135] (1) 抗原包被:①四条裸肽用双蒸水分别稀释至10mg/ml,分装冻存备用;②混合四条裸肽,用包被液(Na₂CO₃1.59g,NaHCO₃2.93g,加双蒸水至1000ml,pH9.6)将混合裸肽稀释至1ug/ml;③每孔100ul(相当于每孔100ng),37℃包被4个小时;④用PBS-T(0.5%Tween-20)洗包被好的酶标板三次;⑤1%BSA37℃封闭4小时,拍干,-20℃备用。

[0136] (2) 检测:①用抗体稀释液(PBS-T+0.3%BSA)将抗血清按照不同的滴度稀释(如10²,10³,10⁴,10⁵,10⁶……),每孔100ul,37℃反应2小时;②PBS-T洗三遍;③加50μl/孔HRP偶联的抗兔二抗(抗体稀释液,1:5000),37℃反应1小时;④PBS-T洗三遍;⑤每孔50μl显色液(5ml显色缓冲液,1μl H₂O₂,0.5μg OPD粉末)显色。显色缓冲液的配方是:Na₂HPO₄·12H₂O,1.84g;柠檬酸,0.51g;加双蒸水至100ml;⑥用酶标仪490nm读数。

[0137] 二、结果:

[0138] 因抗体制备免疫的肽段为CMTM8及CMTM8-v2共有的序列,因此获得抗体既能识别CMTM8也能识别CMTM8-v2。ELISA检测结果显示,CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2多肽免疫产生的多抗效价都达到了1×10⁶以上。进一步,将CMTM8及CMTM8-v2兔多抗血清,经实施例11所示4条肽段各2mg偶联溴化氰活化的Sephrose4B的亲合层析柱纯化后用于Western印迹

检测和免疫组织化学分析。

[0139] 本文通过一些实施方式和具体的实施例对本发明进行了说明,而且还针对许多细节进行了描述。对于本领域技术人员而言,本发明可以通过采用一些其它的具体实施方式来实现,也可以在不偏离本发明主旨的情况下针对所披露的内容进行调整和变化。本发明的内容应当包括针对本文所披露内容的调整或变化,或者说应当包括由所附权利要求书所定义的以及与之等同的范围。

[0001]

序 列 表

110 北京大学

120 一种肿瘤抑制基因或蛋白及其应用

130 P131356CN1

160 15

170 PatentIn version 3.1

210 1

211 1185

212 DNA

213 智人(Homo sapiens)

220

221 CDS

222 (295)..(813)

400 1

ggcctccacc gccttccccg gctgcccggc agcctcccct cgctcgtct cctettctc 60

tagggcccca ggcagctcg ggagcccggc caccgaggcg ctaggggcac cgcgactag 120

aggacaccc gccgcgctg gacagcccc ggcgggcgcc cccctcgac ctctgcccc 180

gcgcgggccc cgctcccctc ccccgcgct gtgtcccag ggcgagggc cgcggtcca 240

gccccagacc cgccggggtc cctggggacg cgccagcccg gcagtggctc gacg atg 297
Met
1gag gag ccg cag cgc gcc cgc teg cac aca gtc acc acc acc gcc agc 345
Glu Glu Pro Gln Arg Ala Arg Ser His Thr Val Thr Thr Thr Ala Ser
5 10 15tcc ttc gca gag aac ttc tcc acc agc agc agc agc ttc gcc tac gac 393
Ser Phe Ala Glu Asn Phe Ser Thr Ser Ser Ser Ser Phe Ala Tyr Asp
20 25 30cgg gag ttc ctc cgc acc ctg ccc ggc ttc ctc atc gtg gcc gag atc 441
Arg Glu Phe Leu Arg Thr Leu Pro Gly Phe Leu Ile Val Ala Glu Ile
35 40 45gtt ctg ggg ctg ctg gta tgg acg ctt att gct gga act gag tac ttc 489
Val Leu Gly Leu Leu Val Trp Thr Leu Ile Ala Gly Thr Glu Tyr Phe
50 55 60 65cgg gtc ccc gca ttt ggc tgg gtc atg ttt gta gct gta ttt tac tgg 537
Arg Val Pro Ala Phe Gly Trp Val Met Phe Val Ala Val Phe Tyr Trp
70 75 80gtc ctc acc gtc ttc ttc ctc att atc tac ata aca atg acc tac acc 585
Val Leu Thr Val Phe Phe Leu Ile Ile Tyr Ile Thr Met Thr Tyr Thr
85 90 95

[0002]

```

agg att ccc cag gtg ccc tgg aca aca gtg ggc ctg tgc ttt aac ggc      633
Arg Ile Pro Gln Val Pro Trp Thr Thr Val Gly Leu Cys Phe Asn Gly
      100                      105                      110

agt gcc ttc gtc ttg tac ctc tct gcc gct gtt gta gat gca tct tcc      681
Ser Ala Phe Val Leu Tyr Leu Ser Ala Ala Val Val Asp Ala Ser Ser
      115                      120                      125

gtc tcc cct gag agg gac agt cac aac ttc aac agc tgg gcg gcc tca      729
Val Ser Pro Glu Arg Asp Ser His Asn Phe Asn Ser Trp Ala Ala Ser
      130                      135                      140                      145

tcg ttc ttt gcc ttc ctg gtc acc atc tgc tac gct gga aat aca tat      777
Ser Phe Phe Ala Phe Leu Val Thr Ile Cys Tyr Ala Gly Asn Thr Tyr
      150                      155                      160

ttc agt ttt ata gca tgg aga tcc agg acc ata cag tgattacca      823
Phe Ser Phe Ile Ala Trp Arg Ser Arg Thr Ile Gln
      165                      170

ttttgataat taaaaggaaa aaaaaaggaa gactctcact gtaaaaacag ctgtaggtat      883
aatgtatatt cccagagaat tgtatttaac taattaatgt tttttatatt cttaaatttg      943
ctcacaaatt gtggtttggtt acaattaaac tggatactta tttgcaaagt gttgtagctt      1003
ataatgaact cttaagtatc ttattaatgt attaatgtct tcatagatca tattttctta      1063
gacaatgttt aaatagataa attgctaata ttgagaatgt gtcaagtttg taaacctaac      1123
ttttaagatg ccagattctt ttttgattaa atgttgcaaa atcccaaaaa aaaaaaaaaa      1183
aa                                                                 1185

```

210 2
211 173
212 PRT
213 智人

400 2

```

Met Glu Glu Pro Gln Arg Ala Arg Ser His Thr Val Thr Thr Thr Ala
1      5      10      15

Ser Ser Phe Ala Glu Asn Phe Ser Thr Ser Ser Ser Ser Phe Ala Tyr
      20      25      30

Asp Arg Glu Phe Leu Arg Thr Leu Pro Gly Phe Leu Ile Val Ala Glu
      35      40      45

Ile Val Leu Gly Leu Leu Val Trp Thr Leu Ile Ala Gly Thr Glu Tyr
      50      55      60

Phe Arg Val Pro Ala Phe Gly Trp Val Met Phe Val Ala Val Phe Tyr
65      70      75      80

Trp Val Leu Thr Val Phe Phe Leu Ile Ile Tyr Ile Thr Met Thr Tyr
      85      90      95

```

[0003]

Thr Arg Ile Pro Gln Val Pro Trp Thr Thr Val Gly Leu Cys Phe Asn
 100 105 110

Gly Ser Ala Phe Val Leu Tyr Leu Ser Ala Ala Val Val Asp Ala Ser
 115 120 125

Ser Val Ser Pro Glu Arg Asp Ser His Asn Phe Asn Ser Trp Ala Ala
 130 135 140

Ser Ser Phe Phe Ala Phe Leu Val Thr Ile Cys Tyr Ala Gly Asn Thr
 145 150 155 160

Tyr Phe Ser Phe Ile Ala Trp Arg Ser Arg Thr Ile Gln
 165 170

210 3
 211 348
 212 DNA
 213 智人

220
 221 CDS
 222 (1).. (348)

400 3
 atg gag gag ccg cag cgc gcc cgc tcg cac aca gtc acc acc acc gcc 48
 Met Glu Glu Pro Gln Arg Ala Arg Ser His Thr Val Thr Thr Thr Ala
 1 5 10 15

agc tcc ttc gca gag aac ttc tcc acc agc agc agc agc ttc gcc tac 96
 Ser Ser Phe Ala Glu Asn Phe Ser Thr Ser Ser Ser Ser Phe Ala Tyr
 20 25 30

gac cgg gag ttc ctc cgc acc ctg ccc ggc ttc ctc atc gtg gcc gag 144
 Asp Arg Glu Phe Leu Arg Thr Leu Pro Gly Phe Leu Ile Val Ala Glu
 35 40 45

atc ggc ctg tgc ttt aac ggc agt gcc ttc gtc ttg tac ctc tct gcc 192
 Ile Gly Leu Cys Phe Asn Gly Ser Ala Phe Val Leu Tyr Leu Ser Ala
 50 55 60

gct gtt gta gat gca tct tcc gtc tcc cct gag agg gac agt cac aac 240
 Ala Val Val Asp Ala Ser Ser Val Ser Pro Glu Arg Asp Ser His Asn
 65 70 75 80

ttc aac agc tgg gcg gcc tca tcg ttc ttt gcc ttc ctg gtc acc atc 288
 Phe Asn Ser Trp Ala Ala Ser Ser Phe Phe Ala Phe Leu Val Thr Ile
 85 90 95

tgc tac gct gga aat aca tat ttc agt ttt ata gca tgg aga tcc agg 336
 Cys Tyr Ala Gly Asn Thr Tyr Phe Ser Phe Ile Ala Trp Arg Ser Arg
 100 105 110

acc ata cag tga 348
 Thr Ile Gln
 115

[0004]

210 4
 211 115
 212 PRT
 213 智人

400 4

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

210 5
 211 21
 212 DNA
 213 人工序列

220
 223 引物

400 5
 tgctggaact gagtacttcc g 21

210 6
 211 21
 212 DNA
 213 人工序列

220
 223 引物

400 6
 agagaggtac aagacgaagg c 21

210 7
 211 26

[0005]

212 DNA

213 人工序列

220

223 引物

400 7

tgaaggtcgg agtcaacgga tttggt

26

210 8

211 24

212 DNA

213 人工序列

220

223 引物

400 8

catgtgggcc atgaggtcca ccac

24

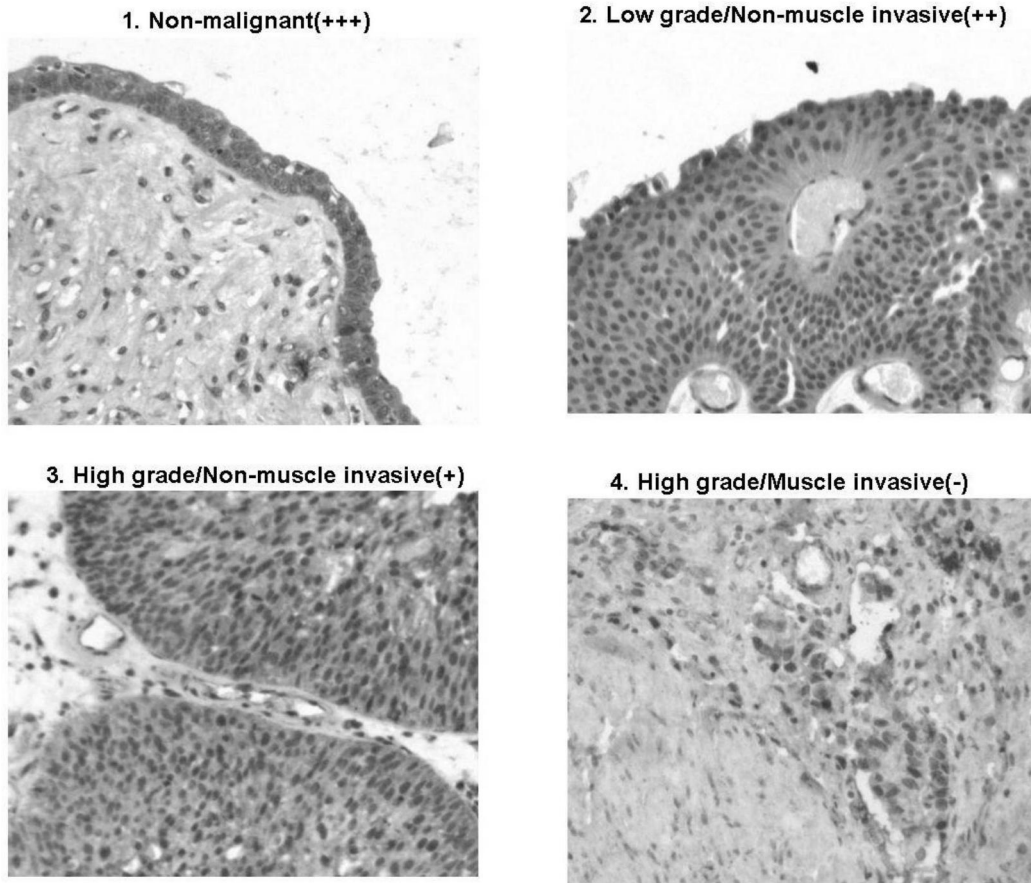


图1

表 1. CMTM8 及 CMTM8-v2 在人膀胱癌组织中表达的统计分析

		Staining Intensity				p value
		-	+	++	+++	
CMTM8	Non-malignant	0	1	3	4	0.008
	Malignant	7	12	5	2	
	Ta/T1	0	7	5	1	0.043 vs normal
	T2/T3	7	5	0	1	0.001 vs normal 0.001 vs Ta/T1
	Low-grade	0	6	2	2	0.099 vs normal
	High-grade	7	6	3	0	0.001vs normal 0.01 vs low grade

图2A

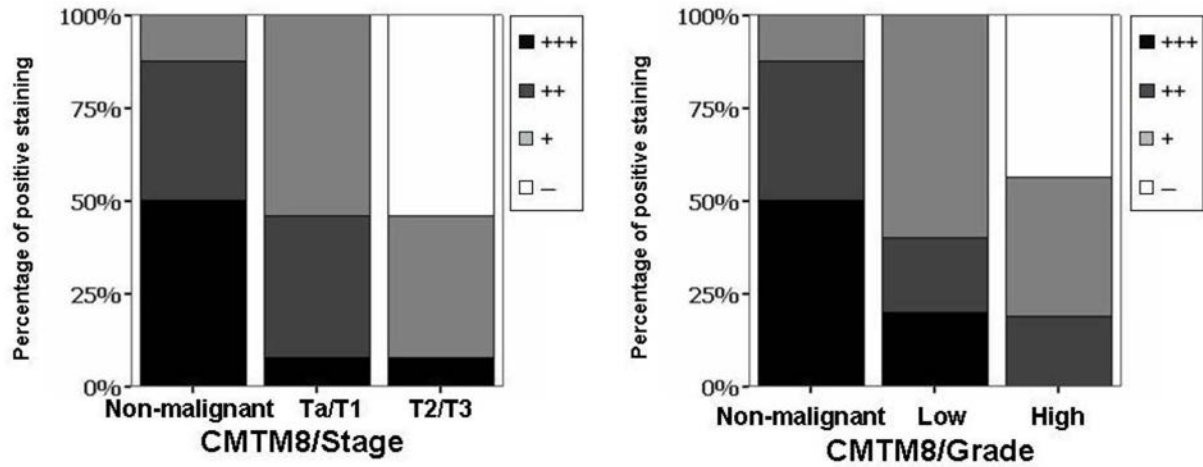


图2B

表 2. 用于 CMTM8 及 CMTM8-v2 表达与患者生存率之间的关系统计的病例特征

Criteria	n (%)
Sex	
Men	65 (76.20%)
Women	20 (23.80%)
Surgical	
TURBt	59 (70.24%)
partial cystectomy	11 (13.10%)
radical cystectomy	14 (16.67%)
Recurrence	
Yes	19 (22.62%)
No	65 (77.38%)
Multiplicity	
Single	33 (39.29%)
Multiple	51 (60.71%)
TNM	
Ta	2 (2.38%)
T1	49 (58.33%)
T2	21 (25.00%)
T3	9 (10.71%)
T4	3 (3.57%)
CMTM8	
-	22 (26.19%)
+	37 (44.05%)
++	22 (26.19%)
+++	3 (3.57%)

图3A

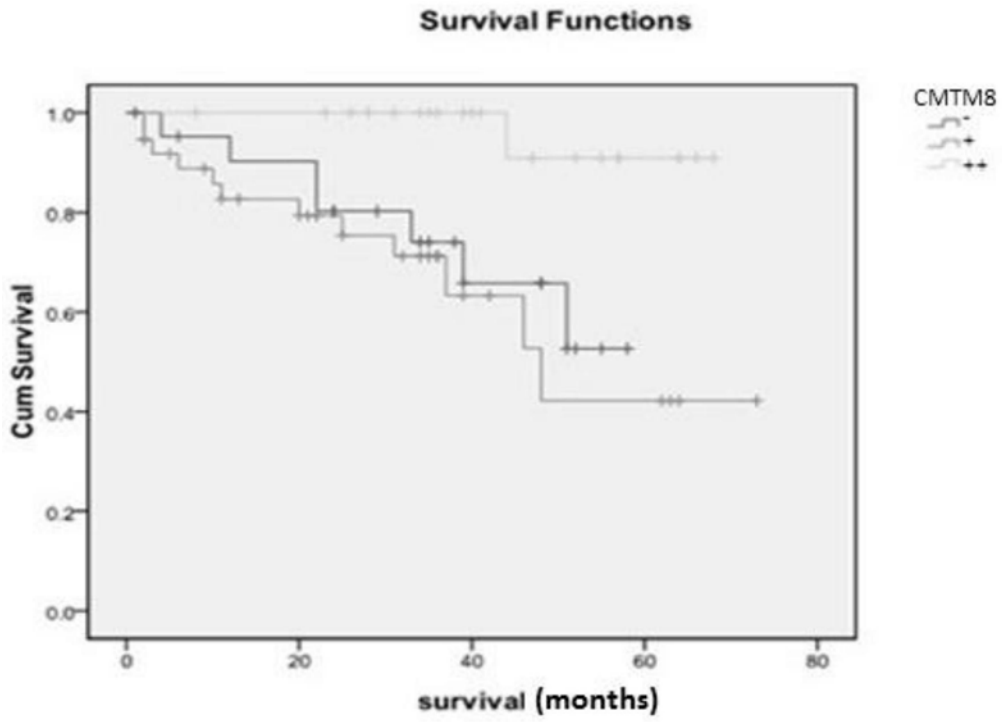
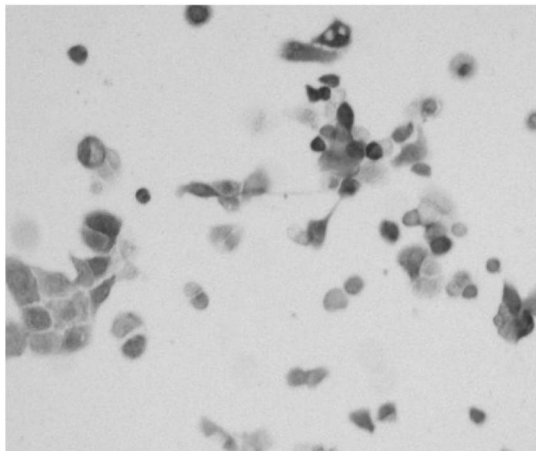
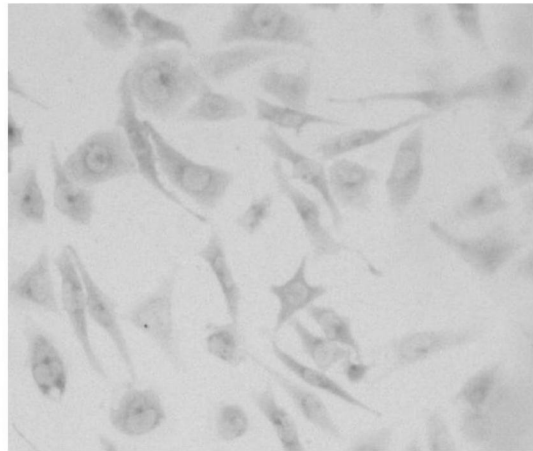


图3B



RT112



MGH-U1

图4

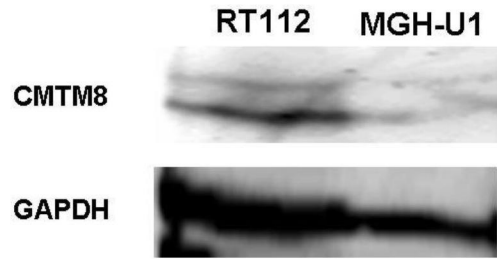


图5

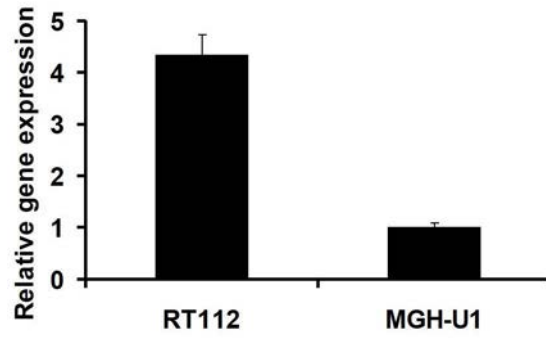


图6



图7

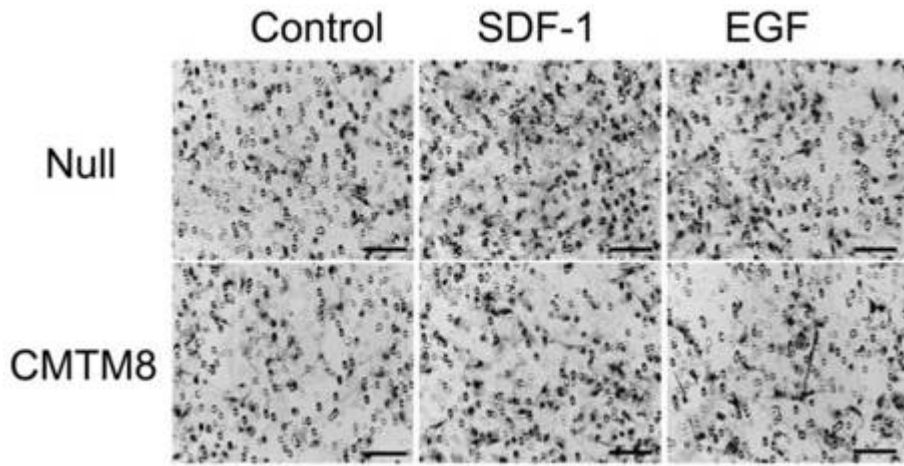


图8

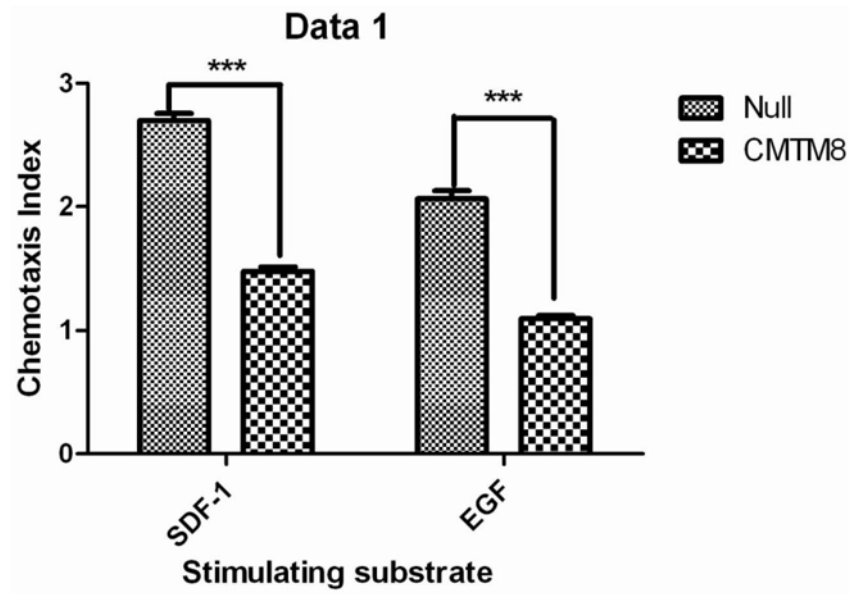


图9

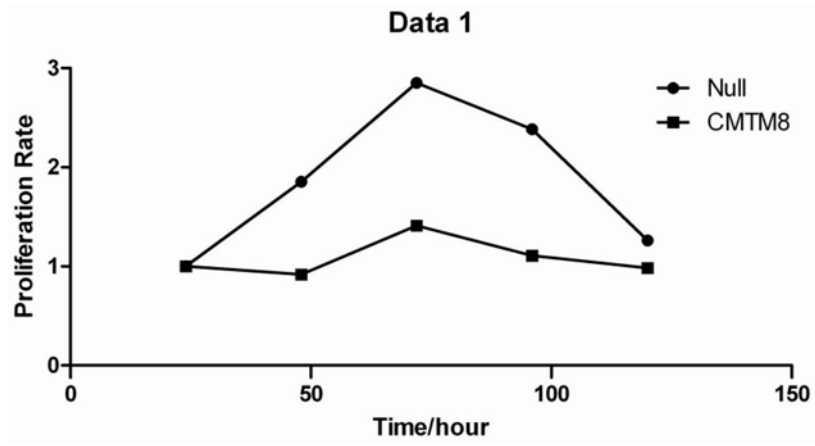


图10

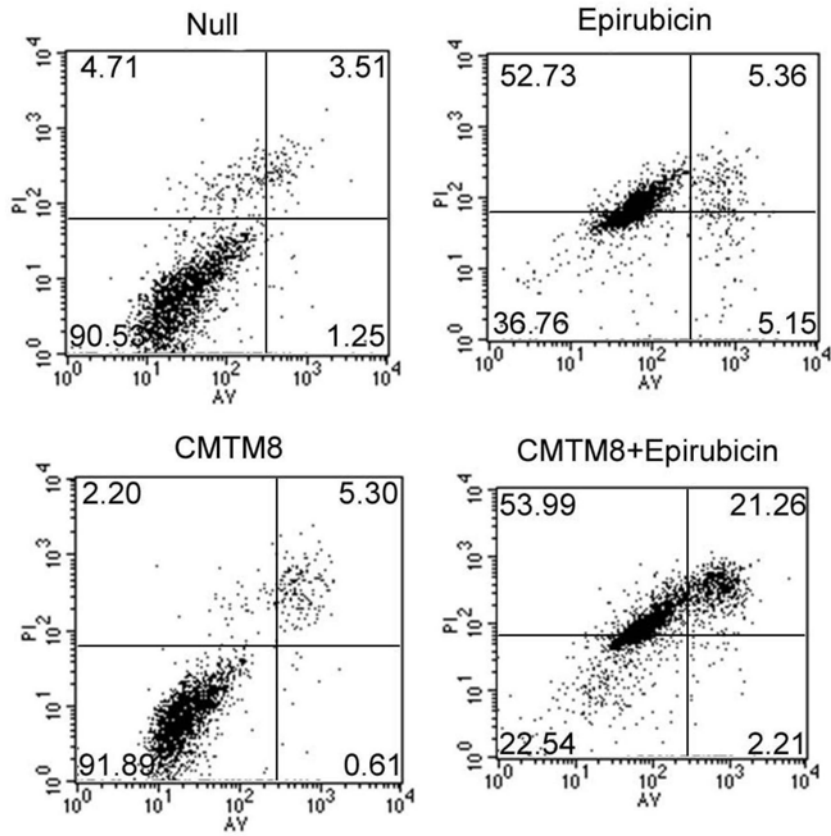


图11

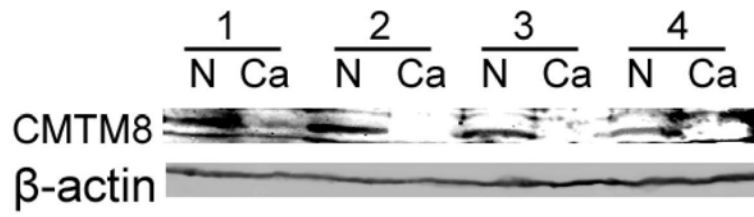


图12

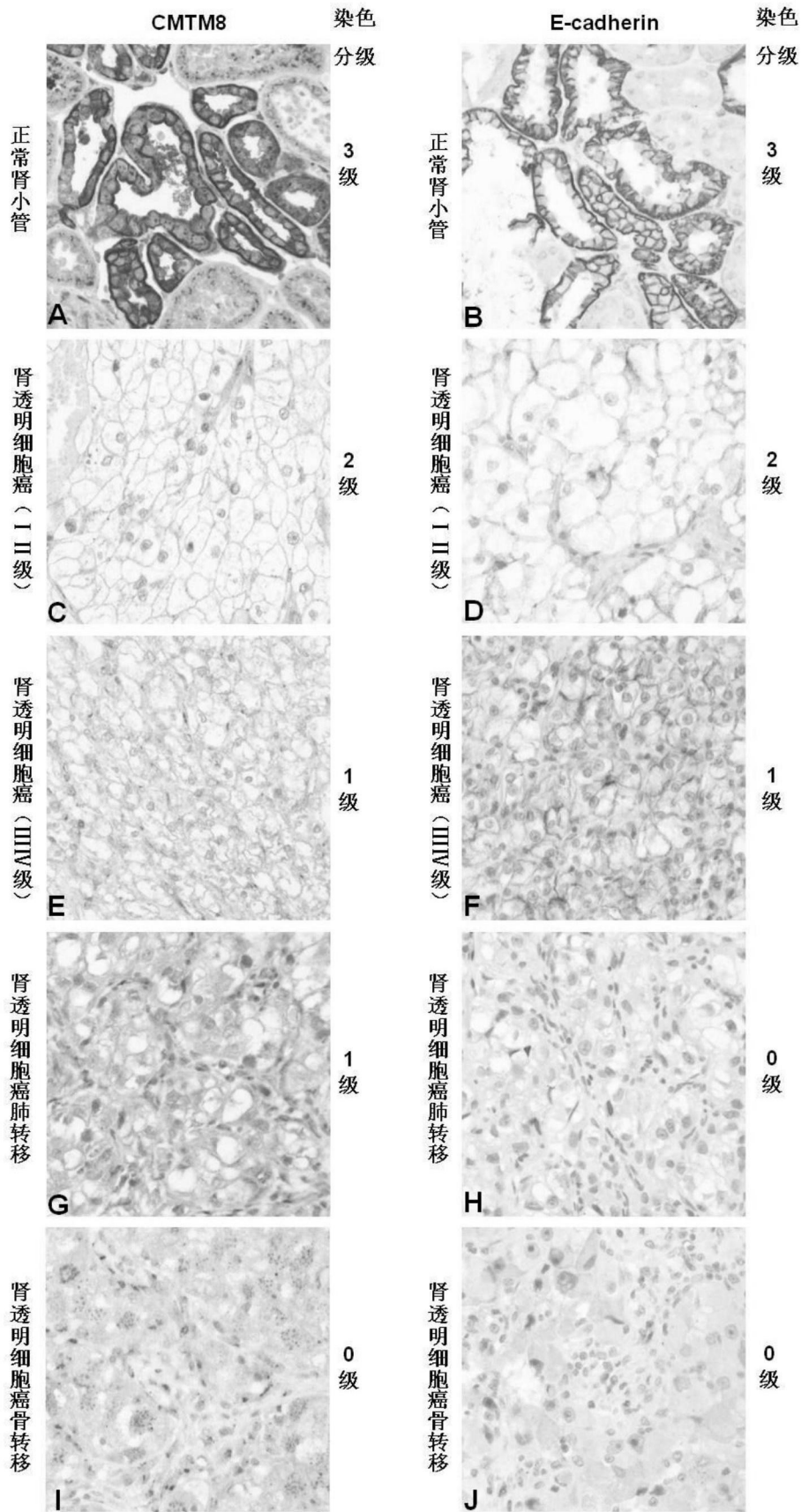


图13A

表3. CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin在正常肾组织和肾透明细胞癌组织中的表达

		染色分级				p值
		0级	1级	2级	3级	
CMTM8	正常肾小管	0	0	0	8	p<0.001*
	原发性肾癌	2	8	7	0	
	肾癌 I -II 级	0	2	6	0	P=0.024*
	肾癌III-IV级	2	6	1	0	
E-cadherin	正常肾小管	0	0	0	8	p<0.001*
	原发性肾癌	0	7	8	2	
	肾癌 I -II 级	0	2	6	0	P=0.081
	肾癌III-IV级	0	5	2	2	

*p<0.05, 有统计学意义。

图13B

表4. CMTM8及CMTM8-v2和E-cadherin在原发性和转移性肾透明细胞癌组织中的表达

		染色分级				p值
		0级	1级	2级	3级	
CMTM8	原发性肾癌	2	8	7	0	p=0.003*
	转移性肾癌	8	11	0	0	
	肾癌肺转移	1	8	0	0	p=0.020*
	肾癌骨转移	7	3	0	0	
E-cadherin	原发性肾癌	0	7	8	2	p=0.018*
	转移性肾癌	6	9	4	0	
	肾癌肺转移	2	5	2	0	p=0.836
	肾癌骨转移	4	4	2	0	

*p<0.05, 有统计学意义。

图13C

表 5. Kaplan-Meier 生存分析

整体比较			
	卡方	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	11.045	3	.011

图14A

表 6. COX 多因素分析

方程中的变量									
		B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95.0% CI 用于 Exp(B)	
								下部	上部
步骤 1	positive	-.770	.272	8.010	1	.005	.463	.271	.789

图14B

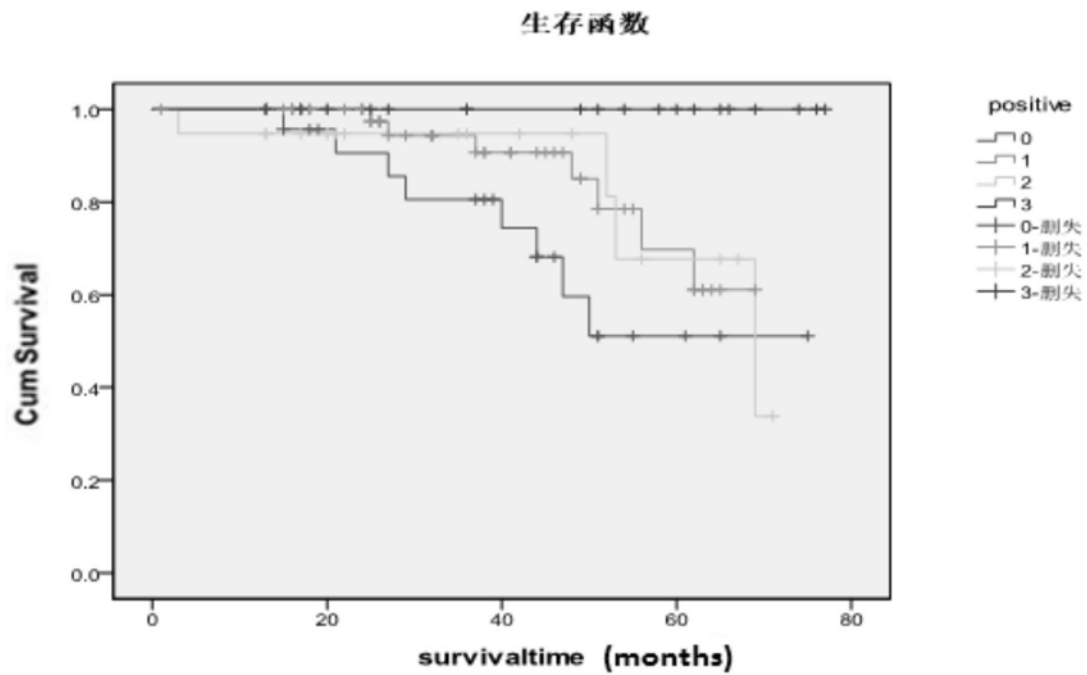


图14C

专利名称(译)	一种肿瘤抑制基因或蛋白及其应用		
公开(公告)号	CN104225575B	公开(公告)日	2019-08-02
申请号	CN201310226123.2	申请日	2013-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院 北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院 北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院 北京大学		
[标]发明人	许克新 胡浩 张石英 裴晓磊 宋泉声 王应		
发明人	许克新 胡浩 张石英 裴晓磊 宋泉声 王应		
IPC分类号	A61K38/17 A61K48/00 A61P35/00 G01N33/68 G01N33/531 C12Q1/6886 C12N15/85 C12N15/861		
代理人(译)	彭蓉		
审查员(译)	朱兵		
其他公开文献	CN104225575A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种新的肿瘤抑制基因或蛋白及其在膀胱癌和肾癌中的临床和实验室研究的应用，特别是涉及CMTM8或其可变剪切体CMTM8-v2的基因或蛋白或它们的免疫性片段，CMTM8或/和CMTM8-v2或/和它们的免疫性片段在诱导膀胱肿瘤和肾肿瘤细胞凋亡中的应用、在制备治疗和/或抑制膀胱肿瘤和肾肿瘤的药物中的应用、包含CMTM8或/和CMTM8-v2的载体或药物组合物，以及应用于临床和实验室研究的检测CMTM8或/和CMTM8-v2或/和它们的免疫性片段的表达的试剂在膀胱肿瘤和肾肿瘤预后诊断和治疗方案确定中的应用。

