

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910167473. X

[51] Int. Cl.

*C12Q 1/68 (2006.01)*

*C12Q 1/48 (2006.01)*

*C12Q 1/02 (2006.01)*

*G01N 33/573 (2006.01)*

*A61K 39/00 (2006.01)*

*A61K 48/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2010年3月31日

[11] 公开号 CN 101684499A

[51] Int. Cl. (续)

*A61K 45/00 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[22] 申请日 2003.4.12

[21] 申请号 200910167473. X

分案原申请号 03808810. X

[30] 优先权

[32] 2002. 4. 19 [33] EP [31] 02008831.6

[71] 申请人 约翰内斯·科伊

地址 德国大奥斯特海姆

[72] 发明人 约翰内斯·科伊

[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  
代理人 罗菊华

权利要求书 3 页 说明书 28 页 附图 12 页

[54] 发明名称

诊断和治疗与人转酮酶样 - 1 基因过表达有关的  
增殖异常的组合物和方法

[57] 摘要

本发明涉及治疗 and 诊断与异常增殖细胞有关的病症的方法。一方面本发明涉及方法, 根据生物样品中人转酮酶样 - 1 基因过表达的检测, 该方法特别用于肿瘤及其前兆期的诊断。另一方面本发明涉及用于治疗与人转酮酶样 - 1 基因过表达有关的病症的方法。治疗方法可包括基因治疗方法和抑制或降低转酮酶样 - 1 多肽活性方法。

1.一种检测个体中特征在于异常的细胞增殖的病症的方法,包括 a.对从所述个体获得的生物样品中人转酮酶样-1 基因表达的有无和/或表达水平进行检测;b.从所述的表达有无和/或表达水平进行诊断评价,其中过表达是特征在于异常的细胞增殖的病症的指征。

2.根据权利要求1的方法,其中特征在于异常的细胞增殖的病症为癌症。

3.根据权利要求2的方法,其中癌症为结肠癌、肺癌、胃癌或胰腺癌。

4.根据权利要求1-3任一项的方法,其中生物样品为体液、分泌物、涂片、活组织检查、含有细胞、裂解细胞、细胞碎片、肽或核酸的液体。

5.根据权利要求4的方法,其中的样品为血清、尿、精液、大便、胆汁、活组织检查或细胞样品或组织样品。

6.根据权利要求1-5任一项的方法,其中人转酮酶样-1基因表达的检测在多肽水平上进行。

7.根据权利要求1-5任一项的方法,其中人转酮酶样-1基因表达的检测在核酸水平上进行。

8.根据权利要求6的方法,其中使用针对人转酮酶样-1多肽的结合剂进行多肽水平上的检测。

9.根据权利要求8的方法,其中所述的结合剂是抗体、抗体片段、包含抗原结合表位的肽模拟物或微小抗体。

10.根据权利要求6、8或9任一项的方法,其中检测是指免疫细胞化学检测方法。

11.根据权利要求7的方法,其中至少一种与人转酮酶样-1核酸杂交的核酸探针用于检测。

12.根据权利要求11的方法,其中探针是可检测标记的。

13.根据权利要求12的方法,其中标记选自放射性同位素、生物发光化合物、化学发光化合物、荧光化合物、金属螯合物或酶。

14.根据权利要求 7 或 11-13 任一项的方法, 其中检测反应包括核酸扩增反应。

15.根据权利要求 11-13 任一项的方法, 其中扩增反应是 PCR、LCR 或 NASBA。

16.根据权利要求 7 或 11-13 任一项的方法, 该方法用于原位杂交。

17.根据前面权利要求中任一项的方法, 该方法用于体内或体外分子成像方法过程中。

18.一种试剂盒, 用于完成权利要求 1-17 中任一项的方法, 该试剂盒是研究试剂盒或诊断试剂盒。

19.权利要求 18 中的试剂盒, 包含 a.至少一种用于检测生物样品中人转酮酶样-1 基因表达产物的探针; b.用作阳性对照反应的人转酮酶样-1 基因产物样品。

20.权利要求 19 中的试剂盒, 其中探针是一种核酸探针, 与人转酮酶样-1 核酸特异性杂交; 或是一种抗体, 与人转酮酶样-1 蛋白特异性结合。

21.一种治疗特征在于异常的细胞增殖的病症的方法, 该方法基于给予呈药物可接受形式的含有人转酮酶样-1 基因或基因产物的药物组合物。

22.根据权利要求 21 的方法, 其中人转酮酶样-1 基因或基因产物是核酸的有义链或反义链或多肽。

23.根据权利要求 22 的方法, 其中药物组合物包含含有人转酮酶样-1 核酸或其片段的嵌合核酸, 或含有人转酮酶样-1 多肽或其片段的融合多肽。

24.根据权利要求 21-23 任一项的方法, 其中特征在于异常的细胞增殖的病症为癌症。

25.根据权利要求 24 的方法, 其中的癌症是结肠癌、肺癌、胃癌或胰腺癌。

26.根据权利要求 21-25 任一项的方法, 其中治疗方法为免疫治疗。

27.根据权利要求 21-26 任一项的方法, 其中治疗方法为疫苗接种治

疗。

28.人转酮酶样-1 多肽或人转酮酶样-1 核酸用于制备治疗癌症的药物组合物的用途。

29.一种鉴别和获得用于结肠肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤或胃肿瘤治疗的候选药物的方法，包括以下步骤：a.在能够提供响应转酮酶活性或细胞增殖调控的改变的可检测信号的组分存在下，接触用于本发明方法的 TKT-L1 多肽或表达上述多肽的细胞；和 b.检测由转酮酶活性或细胞增殖调控改变产生的信号的有无或增加，其中信号的缺失或减少指示为推定药物。

30.一种治疗结肠肿瘤、肺肿瘤、胰腺肿瘤或胃肿瘤的药物组合物，包含根据权利要求 29 的方法可鉴别的化合物、抗硫胺素化合物、转酮酶活性抑制剂、转酮酶样-1 活性抑制剂、转酮酶样-1 多肽或人转酮酶样-1 核酸。

31.一种合理的肿瘤处理方法，包括 a.检测生物样品中转酮酶样-1 基因的有无和/或过表达的水平，b.根据转酮酶样-1 基因的有无和/或水平建立亚群，c.根据亚群定制一种合适的疗法，包括降低个体或个体细胞中转酮酶样-1 的活性。

32.根据权利要求 31 的方法，其中可以通过给予抗硫胺素化合物、权利要求 31 的药物组合物、转酮酶酶活性抑制剂、转酮酶样-1 反义核酸构建物、转酮酶样-1 特异性核酶，或通过减少硫胺素的给予，实现转酮酶样-1 活性的降低。

33.根据权利要求 30 的药物组合物，用于根据权利要求 31 或 32 的方法中。

## 诊断和治疗与人转酮酶样-1基因过表达 有关的增殖异常的组合物和方法

本申请是申请日为2003年4月12日的第03808810.X号发明专利申请的分案申请。

本发明涉及与治疗与诊断与异常增殖细胞有关的病症的方法。一方面本发明涉及方法，其根据生物样品中人转酮酶样-1基因(transketolase like-1 gene)过表达的检测，该方法特别用于肿瘤及其前兆期的诊断。另一方面本发明涉及用于治疗与人转酮酶样-1基因过表达有关的病症的方法。治疗方法可包括基因治疗方法和抑制或降低转酮酶样-1多肽活性方法。

尽管有许多有意义的科学和医学研究工作，肿瘤疾病仍然是人类致死的主要因素。例如：在德国每年有超过34万人发生癌症，超过21万人死于癌症。上皮细胞肿瘤占癌症的大多数：肺癌是男性癌症死亡的主要原因，乳腺癌是女性癌症死亡的主要原因。结肠癌同时是男性和女性死亡的第二个主要原因(Becker, N.和 Wahrendorf, J., (1997) Atlas of Cancer Mortality in the Federal republic of Germany 1981-1990, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg)。

造成这种令人不满意的局面的主要原因是，大多数肿瘤疾病要在很晚期才能诊断出来，这时分离的肿瘤细胞或小的肿瘤细胞聚集物已经从原发肿瘤释放并且分布到宿主的整个有机体并且可能已经最终导致隐蔽的或明显的转移性疾病。早期癌特别是前期癌(pre cancers)通常不产生任何症状并且不为患者所知。

为克服这种情况，需要更多的研究工作和临床规划来改进癌早期诊断技术，并且开发出真正的预防或治疗用疫苗接种策略，在患者出现明确的癌之前或在癌或其前体切除之后进行免疫，以防止扩散的分离的癌细胞(DTC)存活，这些癌细胞可能是在最初手术干预前或者手术过程中由肿瘤释放的。

对少数癌而言，特别是子宫颈癌，可以建立有效的癌早期诊断方案。

随后的这些特殊肿瘤死亡率的降低令人信服地证实了早期诊断方案的有效性。

总之，不幸的是，迄今为止所用的诊断方法很不灵敏，并且由于缺乏特异性还有产生假阳性结果的风险。此外，使用当前的诊断方法不能精确预测任何与肿瘤恶性分级、肿瘤发展及其转移可能性有关的结论。

因此，使用可靠的诊断分子标记物对于了解上皮肿瘤的分子基础，例如结肠肿瘤，区分良性与恶性组织并对癌的分级和分段十分有益，特别是对于预后很差的转移性癌患者而言。这种标记物还可望用于开发癌症治疗的新途径。

对正常细胞转变成不同程度的侵袭性肿瘤细胞分子事件的了解，以及合适的选择癌相关基因的实验体系的有效性，绝对是识别此类新的诊断标记物和治疗药物靶的先决条件。

通常认为肿瘤发生是一个复杂的多阶段过程，其中遗传改变和环境因素被认为使控制细胞增殖和分化的细胞程序失控。结肠癌的例子很好地阐释了这一多阶段过程，结肠癌的发展通常超过几十年且显然需要多个遗传事件形成(见 Kinzler 和 Vogelstein, 1996, Cell 87,159-170 综述)。该过程归因于基因改变的可遗传性(由一种明显的诱因所致)和基因组不稳定性(由环境中基因毒剂引起)导致额外的体细胞突变。显然，涉及肿瘤形成的决定性因素还很不周详，并且明显取决于不同的肿瘤类型。

因此，本发明的技术问题就是为上皮细胞肿瘤的诊断和治疗提供手段，以克服现有诊断和治疗方法的缺点。通过提供权利要求书中的实施方案描述了上述技术问题的解决方法。

本发明是基于发明者的发现，即 SEQ.ID. 1 (cf.TKT-L1, TKR: NM-012253 ; Accession number: X91817) 所示的人的转酮酶样-1 基因在结肠癌、胰腺癌、肺癌和胃癌组织中,同各自的正常对照组织中的水平相比，高度过表达。这对诊断来说特别重要，因为转酮酶在肿瘤组织中没有类似的过表达。

因此，肿瘤诊断方法可以基于检测在生物样品中转酮酶样-1 基因产

物的过表达。根据检测转酮酶样-1 基因产物的有或无和/或其水平可预测疾病的过程、评价预后和为患者定制适当患者的治疗方案。

此外,本发明可以为与转酮酶样-1 基因产物过表达有关的病症提供可行的治疗方法。一方面,本发明提供用转酮酶样-1 核酸或多肽治疗病症的方法。另一方面,本发明提供基于降低转酮酶样-1 基因多肽的酶活性的治疗方法。因此本发明的一个方面提供以检测患者样品中转酮酶样-1 基因产物为基础的合理的肿瘤管理和定制与检出的上述基因产物过表达相应的治疗方案的方法。

最后,本发明涉及诊断和研究试剂盒以及用于完成此处公开方法的药物组合物。

#### 附图简述

图1 :用 RT - PCR 方法检测结肠癌中转酮酶样-1 基因的过表达;图中显示与对照组织相比转酮酶样-1 基因在结肠癌组织中的诱导表达。

图2 :用 RT - PCR 方法检测肺腺癌中转酮酶样-1 基因的过表达;图中显示与对照组织相比转酮酶样-1 基因在肺腺癌组织中的诱导表达。

图3 :用 RT - PCR 方法检测胃癌中转酮酶样-1 基因的过表达;图中显示与对照组织相比转酮酶样-1 基因在胃癌组织中的诱导表达。

图4 :用 RT - PCR 方法检测结肠癌中转酮酶的过表达;图中显示与对照组织相比转酮酶在结肠癌组织中的诱导表达。

图5 :用 RT - PCR 方法检测肺腺癌中转酮酶的过表达;图中显示与对照组织相比转酮酶在肺腺癌组织中的诱导表达。

图6 :用 RT - PCR 方法检测胃癌中转酮酶的过表达;图中显示与对照组织相比转酮酶在胃癌组织中的诱导表达。

图7 :tktl1 的 DNA 和氨基酸序列;用于免疫以产生抗体的蛋白质部分以黑体字母表示;其它用于多肽免疫产生抗体的多肽以下划线标记。

图8 :用针对 tktl1 的初级抗体对胃癌组织(B)和相应正常组织(A)的免疫组化分析。在 1666 号患者的癌症中检测到 tktl1 蛋白很强的过表达。

图 9：用针对 tktl1 的初级抗体对 1682 号胃癌患者 (A) 和 1697 号胃癌患者 (B) 的免疫组化分析。在 1682 号患者癌的细胞核与细胞质中均检测到 tktl1 蛋白很强的过表达。在 1697 号患者癌的细胞核与细胞质中均检测到 tktl1 蛋白极强的过表达。

图 10：用针对 tktl1 的初级抗体对 1699 号胃癌患者的免疫组化分析。图 A 显示伴有正常组织的癌。其中在正常组织中检测到 tktl1 的低表达而在癌肿瘤细胞中检测到 tktl1 的很强的过表达。图 B 是正常和肿瘤组织的边界放大图。可检测到肿瘤特异性的颗粒状染色。

图 11：用针对 tktl1 的初级抗体对 1698 号胃癌患者的免疫组化分析。图 A 显示在胃肿瘤细胞的细胞核和细胞质中均检测到 tktl1 蛋白很强的过表达。在周围成纤维细胞可检测到低表达或无表达。图 B 是癌细胞区和周围结缔组织的放大图。可检测到肿瘤特异性的颗粒状染色。

本发明提供了特征在于异常的细胞增殖的病症例如癌症的诊断和治疗方法。

本发明的第一个方面是提供基于测定生物学样品中如 SEQ.ID.1 (cf.TKT-L1,TKR:NM\_012253;Accession number:X91817) 所示序列的人转酮酶样-1 基因的有无和/或其表达水平的特征在于异常的细胞增殖的病症例如癌症的诊断方法。

本发明的第二个方面是提供用人转酮酶样-1 基因产物作为治疗活性剂的特征在于异常的细胞增殖的病症例如癌症的治疗方法。

本发明的第三个方面是研究或诊断用试剂盒,用于完成检测人转酮酶样-1 基因的有无和/或过表达水平中涉及的反应。

本发明的第四个方面涉及可用于根据本发明的病症的治疗的药物组合物。

本发明提及的转酮酶样-1 基因产物可以包含多肽和转酮酶样-1 基因编码的核酸。

完成根据本发明方法所用的多肽和多核苷酸是分离的。这意味着这些分子从其原始环境中移出。如果天然存在的蛋白质与其自然环境下共存的某些或所有材料分开,则所述天然存在的蛋白质是分离的。

多核苷酸例如要克隆入载体，则为分离的。

用于完成根据本发明方法的人转酮酶样-1 核酸分子可以包含多核苷酸或其片段。优选多核苷酸可包含至少 20 个连续核苷酸，优选至少 30 个连续核苷酸，并且更优选至少 45 个连续核苷酸，其与野生型转酮酶样-1 多肽相同或具有序列同源性或编码相同或同源性多肽，但不编码其它转酮酶样多肽或转酮酶。根据本发明的核酸还可与任何所述多核苷酸互补或反向互补。例如多聚核苷酸可能包括单链（有义或反义）或双链分子，可以是 DNA（基因组 DNA，cDNA 或合成 DNA）或 RNA。RNA 分子包括 hnRNA（包含内含子）和 mRNA（不包含内含子）。根据本发明多核苷酸还可与任何其它分子相连接，例如支持材料或检测标记分子，并且可能但不必包含另外的编码或非编码序列。

根据本发明所用的人转酮酶样-1 多核苷酸可以是天然序列或其变体。变体可以包含一或多个置换、添加、删除和/或插入，以使编码的多肽的免疫原性相对于天然肿瘤蛋白不至降低。变体例如是多核苷酸的等位突变。这里所说的等位变异是基因的另一种（alternative）形式，可由核酸序列中至少一个突变引起。等位基因可能导致改变的 mRNA 或多肽，其结构或功能可能改变也可能不变。任何给定基因可能没有、有一个或多个等位基因形式。出现在等位基因的常见突变一般是由核苷酸的天然缺失、添加或置换所致。每种类型的改变可能单独发生或与其它改变一起发生，或在给定序列中发生一次或多次。根据本发明的变体表现与此处公开的天然核酸分子优选 70%、更优选至少 80%、最优选至少 90% 的序列同一性。确定序列相似性的方法为本领域技术人员众所周知。

例如使用 DKFZ Heidelberg 的 HUSAR 服务器提供的 FastA 和/或 BlastN 生物信息学软件，可以进行序列相似性测定。

本发明提及的核酸可能是全部多核苷酸，在严谨条件下，它们可以与此处所用转酮酶样-1 序列特异性的探针杂交。用于杂交反应的严谨条件为本领域技术人员众所周知，并且也可使用如在 Sambrook 等人的 *Molecular cloning : A Laboratory Manual, 2nd Edition, 1989* 中描述的。

本发明还包含多核苷酸，其编码人转酮酶样-1 核酸所天然编码的多肽，由于遗传密码的简并性，其核酸序列不表现上述序列同源性的百分比。这样的核酸可通过例如用简并密码子替换公开序列的密码子而产生，从而制备合成的核酸。这种人工核酸序列的制备可用本领域技术人员已知的方法完成。

根据本发明所用的人转酮酶样-1 核苷酸序列可与多种其它核酸序列用已知的重组 DNA 技术连接起来。例如序列可以被克隆入任何一种克隆载体，例如质粒、噬菌粒、 $\lambda$  噬菌体衍生物和粘粒。而且，载体例如表达载体、复制载体、探针生成载体和测序载体均可和此处公开的序列连接。

可以克隆根据本发明的核酸的序列包含编码序列、非编码序列、和包括启动子、增强子和终止子在内的调控序列。此处公开的人转酮酶样-1 核酸序列可以与其它编码序列相连的形式存在。这些序列可能编码多种蛋白质例如酶、受体、抗原、免疫原性片段或表位、结合蛋白等等。核酸序列可直接相连，或由一段编码间隔子或连接子区域的核酸分开。核酸序列可由一段转录后可去除的核酸分开。可与此处公开序列相连的非编码序列例如可能是启动子区、增强子、顺式调控元件、5'非翻译区、终止子等等。

在一优选实施方案中可配制人转酮酶样-1 多核苷酸以便其能够进入原核或真核细胞如哺乳动物细胞内，并在所述细胞中表达。这些配方例如可用于治疗目的。核酸序列在靶细胞中的表达可采用本领域技术人员已知的方法来实现。例如核酸可以与使其适于在宿主细胞中表达的元件相连。这些元件可能包含启动子或增强子，诸如 CMV-、SV40-、RSV-、金属硫蛋白 I-或多角体蛋白的启动子，如 CMV 或 SV40 的增强子。用于表达的可能方法例如将多核苷酸掺入病毒载体，包括腺病毒、腺伴随病毒、反转录病毒、牛痘病毒或痘病毒。以在哺乳动物宿主细胞中表达核酸为目的的病毒载体可能包含 pcDNA3、pMSX、pKCR、pEFBOS、cDM8、pCEV4 等等。这些技术为本领域技术人员已知。

此处所用的人转酮酶样-1 序列片段可以包含寡核苷酸例如用于杂

交的核酸探针、用于扩增反应的引物或用于反义技术的反义核酸构建体。根据本发明的核酸探针可能是任何核酸探针，该探针与人转酮酶样-1 基因核酸序列至少 15 个连续核苷酸部分至少 80%相同，或与该序列互补或反向互补，但不与其它转酮酶或转酮酶样序列杂交。根据本发明的核酸探针其特征还在于，它们可以在严谨条件下与此处公开的核酸序列杂交。引物可以是适合进行特异性扩增反应的任何核苷酸。因此根据本发明所用的引物可以是至少 15 个连续核苷酸与人转酮酶样-1 基因核酸序列至少 80%序列相同的核酸寡聚体，或与其互补或反向互补。根据本发明的引物，在适用于核酸扩增反应过程的条件下可以与此处公开的序列或其部分特异性杂交，但不与其它转酮酶或转酮酶样序列杂交。此处所用的反义寡核苷酸可以是与公开的编码序列转录物反向互补的核酸分子，它们可以通过碱基配对与转录物结合因而抑制或降低该编码序列的表达。

根据本发明所用的核酸也可能是化学预处理的核酸。这些化学预处理的核酸可包含此处公开的任何核酸，该核酸经适于在核酸分子产生修饰的化学试剂处理。所谓修饰可包含例如核酸内特定碱基的特异性修饰。化学处理可以包含用例如亚硫酸氢钠、胼或高锰酸钾处理。采用化学预处理核酸的实验中特别的序列可以包含例如序列的编码区或非编码区。可以被化学处理的非编码区的实例包括启动子区或 5'UTR 中的 CpG 岛。

根据本发明所用的人转酮酶样-1 多肽可以包含任意长度的氨基酸链，包括全长蛋白质，其中氨基酸残基通过共价肽键连接。因此，包含一种上述人的转酮酶样-1 蛋白质一部分的多肽，例如，包含人转酮酶样-1 蛋白质的氨基酸序列的蛋白可以由整个部分组成，或该部分存在于含有额外序列的大的多肽中。额外序列可以来源于天然蛋白质或异源蛋白，并且这种序列可以（但不一定）具有免疫活性和/或抗原性。如下面详述，该多肽可以从肿瘤组织分离或用合成或重组方法制备。

此处所用的显示人转酮酶样-1 多肽的生物学性质的多肽，理解为至少具有一种下列活性，例如酶的活性（转酮酶活性）、蛋白质之间相互

作用活性、对硫胺素存在的酶活敏感性、或抗原性或免疫原性性质，例如与针对所述人类转酮酶-1多肽的所述多肽（即包含免疫原性部分）的抗体的结合能力的多肽。

如此处所用的免疫原性部分是指可被B细胞和/或T细胞表面抗原受体识别的蛋白部分。免疫原性部分含有此处公开蛋白的至少5个氨基酸残基，更优选至少10氨基酸残基，最优选至少15氨基酸残基。在本发明一优选实施方案中，蛋白的特定结构域，例如跨膜区或N-末端的前导序列已被删除。

根据本发明的免疫原性部分与抗血清或特异性抗体反应的强度与天然全长蛋白相同或几乎相同。免疫原性部分通常使用本领域众所周知的方法来鉴定。可能的方法例如对多肽与抗原特异性抗体、抗血清和/或T细胞系或克隆的反应能力进行筛选。

根据本发明人所用的类转酮酶-1多肽还包含天然蛋白质的变体。这些变体可有一或多个改变如替换、缺失、添加和/或插入而不同于天然蛋白。根据本发明的变体的免疫反应性和/或生物活性与天然蛋白质相比基本没有减低。与天然多肽相比，在本发明一优选的实施方案中免疫反应性和/或活性减低少于50%，在一更优选实施例中免疫反应性和/或活性减低少于20%。在本发明另一优选实施方案中，多肽的变体可能发生变化以致天然蛋白质活性增加、减少或缺失。这些变体可用于例如与人转酮酶样-1基因过表达有关的病症的治疗。在一优选的实施方案中，变体可能缺少一或多个部分，例如N-末端前导序列、跨膜区或小的N和/或C末端序列。变体显示与根据本发明公开的多肽优选70%、更优选至少90%并且最优选至少95%的同一性。

根据本发明所用的变体优选包含保守性置换，以便改变的氨基酸为性质相似的氨基酸代替。涉及的性质可以包括极性、电荷、可溶性、疏水性、亲水性和/或氨基酸残基的两亲性。

根据发明所用的变体可能还包含额外的末端前导序列、接头或序列，使得多肽的合成、纯化或稳定简单而轻松。

根据本发明方法所用的多肽变体可采用传统的分子生物学方法制

备（见如 Sambrook 等，1989，分子克隆实验操作指南，Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY）。例如有可能将不同的突变引入本发明的核酸分子内。结果可能合成生物学性质有可能改良的人转酮酶样-1 多肽。一种可能是产生缺失突变体，其核酸分子通过从编码 DNA 序列的 5' 或 3' 末端连续删除而产生，结果合成相应缩短的多肽。另一种可能是在例如氨基酸序列的修饰会影响酶活性或酶的调控的位置上，引入单点突变。通过这种方法可以产生突变蛋白质，例如具有改变的  $K_m$  值或不再遵守细胞中正常的调控机制（例如与变构调节或共价修饰有关的调控机制）的蛋白质。这种突变蛋白质例如可用作治疗用化合物，例如拮抗剂。

在原核细胞中通过基因工程操作，可将本发明方法所用的核酸分子或这些分子的某部分导入质粒中，通过 DNA 序列重组获得序列突变或修饰。采用传统的方法（参照，Sambrook 等，上文），可置换碱基并加入天然或合成的序列。要使 DNA 片段互相连接，可在片段上加上连接物或接头。此外，可进行操作以提供适当的切割位点或去除多余的 DNA 或切割位点。如果可能插入、删除或置换，则可能进行体外突变、引物修复，限制性酶切或连接反应。作为分析方法，常用的序列分析、限制性酶切分析和其它生物化学或分子生物学的分析方法均可使用。

多肽可以包含融合或嵌合的包含此处公开的序列的多肽。融合蛋白包含发明多肽或其部分或发明多肽的变体或其部分，连同任何第二个和更多个多肽，例如另一个发明多肽或其部分或发明多肽的变体或其部分，和/或任何异源多肽。异源多肽可以包含酶、受体分子、抗原、抗原性或免疫原性表位或其片段、抗体或其片段、信号多肽或信号转导多肽等等。免疫原性蛋白例如能够引起记忆反应的蛋白。这种蛋白的实例包括破伤风、肺结核和肝炎蛋白（见，例如，Stoute 等 *New Engl. J. Med.*, 336:8691(1997)）。本发明一个实施方案中可能构建融合肽以提高多肽的检测或纯化。为纯化可将标签，例如 his-标签、myc-标签等加到多肽上。

为检测，抗原性部分、酶、生色序列等可融合到多肽上。本发明的融合蛋白可能（但不必须）在第一和第二个多肽之间包括接头肽。

编码本发明所用的融合蛋白的核酸序列利用已知重组DNA技术构建，将分别编码第一和第二个多肽的核酸序列组装入适当的表达载体中。编码第一多肽的核酸序列的3'端，用或不用肽接头，与编码第二多肽的核酸序列5'端连接，以保证合适的序列阅读框使两个核酸序列mRNA翻译成单一的融合蛋白，其同时保留第一和第二个多肽的生物活性。

肽接头序列可用来使第一和第二个多肽分开足够的距离以保证各个多肽折叠成其二级和三级结构。这种肽接头序列利用本领域众所周知的标准技术引入融合蛋白。可根据下列因素选择适当的肽接头序列：

(1) 其采取柔韧性伸展构象的能力；(2) 其不能采取可能与第一和第二个多肽功能性抗原表位相互作用的二级结构的能力；和(3) 没有与多肽功能性抗原表位起反应的疏水性或带电荷的残基。优选肽接头序列包含甘Gly、Asn和Ser残基。其它接近中性的氨基酸，例如Thr和Ala也可用于接头序列中。可用作接头的氨基酸序列包括公开于Maratea等，Gene 40:39-46, 1985；Murphy等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262,1986；U.S.Pat. No.4,935, 233和U.S.Pat.No.4,751, 180的序列。接头序列可长1到约50个氨基酸。当第一和第二个多肽有可使功能域分开和防止位阻影响的非必须N-端氨基酸部位时，不需要肽序列。

用于根据本发明方法的人转酮酶样-1多肽和编码这种多肽的核酸，可利用本领域众所周知的任何方法从肿瘤组织中分离。编码本发明肿瘤多肽之一的基因（或其一部分）相应的核酸序列，可利用消减技术从肿瘤cDNA文库中分离。这样获得的部分的核酸序列可用作设计聚合酶链反应(PCR)的寡核苷酸引物，利用本领域众所周知的技术(见，例如，Mullis等,Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 51:263, 1987; Erliched., PCR技术, Stockton Press, NY, 1989)从人类基因组核酸文库或肿瘤cDNA文库中，扩增全长核酸序列。这种方法所用的序列特异性引物可根据此处提供的核苷酸序列设计、购买或合成。

此处公开的方法中所用的人转酮酶样-1多肽还可通过合成的方法产生。特别地,合成的多肽少于大约100个氨基酸,通常少于大约50氨基酸,可利用本领域技术人员众所周知的技术产生。例如:这种多肽可利用任何商业化的固相技术,例如Merrifield固相合成法,氨基酸顺序被加到增长的氨基酸链上(见,例如, merrifield, J.Am.Chem.Soc. 85:2149-2146, 1963)。多肽自动化合成设备可向供应商诸如Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, Calif.)购买,并可根据厂家说明书进行操作。

此处公开方法所用的已连接的编码多肽的核酸序列,与本技术领域技术人员已知的适当的转录或翻译调控元件相连。负责核酸表达的调控元件可位于例如编码第一个多肽的核酸序列的5'端、编码序列内部或编码第一个或任何增加的多肽的核酸序列的3'端。翻译和转录终止信号需要的终止密码子位于编码第二个多肽的核酸序列的3'端。

根据本发明方法所用的多肽可以是分离的。这意味着这些分子可从其原始环境中除去。如果其与自然环境下共存的某些或所有材料分开,天然存在的蛋白就是分离的。多核苷酸例如要克隆入载体,则是分离的。

在以下将更详细地描述的某些优选实施方案中,此处公开的方法所用多肽可采用分离的、基本纯的形式制备(即多肽经氨基酸组成和基本序列分析测定是均质的)。优选地,多肽纯度至少在大约90%,更优选至少在大约95%,最优选至少在大约99%。基本纯的多肽可以用作例如药用组合物。

此外本发明使用特异性结合人转酮酶样-1蛋白的结合因子。这些结合因子可以包含例如抗体和抗原结合片段、双功能的杂合抗体、包含最小的抗原结合表位的肽模拟物(peptidomimetic)等等。

如果所述抗体或抗原结合因子与此处所用蛋白以可检测水平反应,且基本不与其它蛋白反应,则称为特异性的反应。根据本发明的抗体可以是单克隆或多克隆抗体。此处所用抗体或单克隆抗体术语意味着包括完整分子和能特异性地结合蛋白的抗体片段(例如,Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段)。Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段没有完整抗体的Fc片段,更迅速地从循环系统清除,并

且可能比完整抗体更少与非特异组织结合 (wahl等. J. Nucl. Med. 24: 316-325 (1983))。因此, 同Fab或其它免疫球蛋白表达文库的产物一样, 这些片段是更优选的。此外, 本发明所用抗体包括嵌合、单链和 人源化的抗体。

根据本发明结合因子可单独或结合使用。通过结合使用可获得高灵敏度。抗体术语优选涉及, 基本上由不同表位特异性的单克隆抗体和不同的单克隆抗体制剂组合而成。

单克隆抗体采用任何本领域技术人员已知的技术(见, 例如, Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), 由本发明所用的包含多肽片段的抗原制成。在一种 该类技术中, 包含抗原性多肽或合成的其部分的免疫原, 最初注射到多种哺乳动物任一种体内(例如小鼠、大鼠、家兔、绵羊和山羊)。在该 步骤中, 本发明的多肽不经修饰即可作为免疫原。作为选择, 特别是对于较短的多肽, 如果将多肽连接到载体蛋白, 例如牛血清白蛋白或匙孔 血蓝蛋白上, 可引起较高的免疫应答。把免疫原注入到动物宿主内, 优 选根据预定时间表合并一或多次加强免疫, 并对动物定期采血。针对多 肽的特异性多克隆抗体可从抗血清中纯化, 例如通过用偶联在适当固体 支持物上的多肽进行亲和层析纯化。

目的抗原性多肽的特异性单克隆抗体, 可利用 Köhler 和 Milstein(*Eur. J. Immunol.* 6: 511-519, 1976)以及其改良的技术制备。简 要地, 这些方法包括制备能产生具有目的特异性(即与目的多肽的反应 性)抗体的永生细胞系。这些细胞系可例如由从上述免疫动物中获得的 脾细胞产生。脾细胞通过例如与骨髓瘤细胞融合配偶体融合, 优选与免 疫动物同系的骨髓瘤细胞融合配偶体融合以永生化。可应用多种融合技 术。例如, 脾细胞和骨髓瘤细胞可用非离子型去污剂合并几分钟, 然后 低密度接种于支持杂交细胞而不支持骨髓瘤细胞生长的选择培养基中。 优选选择技术运用 HAT(次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶脱氧核苷)选 择。足够时间后, 通常大约1到2周, 可观察到杂合的克隆。选择单克隆 并测定针对多肽的结合活性。优选高反应性和特异性的杂交瘤。

可从杂交瘤克隆生长上清中分离单克隆抗体。另外,可使用各种技术提高产量,例如将杂交瘤细胞系注射入适当的脊椎动物宿主例如小鼠的腹膜腔内。然后可从腹水液或血液中收获单克隆抗体。可采用传统方法例如层析法、凝胶过滤、沉淀和萃取,除去杂质。人转酮酶样-1多肽可被用于例如亲和层析步骤的纯化过程。

根据本发明所用的人转酮酶样-1的特异性抗体可以包含另外的结合位点,以结合治疗剂或其它多肽,或可偶联到所述治疗剂或多肽上。治疗剂可以包含药物、毒素、放射性核素及其衍生物。试剂可例如通过接头或者载体基团,直接或间接地偶联到结合因子上。接头基团可起例如能使结合因子与治疗剂或其它因子发生偶联反应的作用,或作为融合分子不同部分间的间隔物。在一定条件下接头还可被切除,并因此在该条件下释放出结合因子。治疗剂可直接或通过接头基团与载体基团共价偶联。治疗剂也可与载体非共价偶联。根据本发明可使用例如白蛋白、多肽、多糖或脂质体作为载体。

根据本发明所用的人转酮酶样-1特异性抗体可与一或多个因子(agent)偶联。偶联在一种抗体上的多个因子可能完全相同,或几种不同的因子与一种抗体结合。

此处公开的方法适用于所有受到与转酮酶样-1基因过表达有关的病症侵袭的真核生物。本发明所用的个体可以包含例如哺乳动物,例如农业效益动物(奶牛、绵羊、马、猪等等)、宠物(猫、狗等等)、研究常用动物(大鼠、小鼠、仓鼠等等)或人类。

本发明提及的诊断可包含某样品中人转酮酶样-1基因产物水平的测定。根据测定的样品中人转酮酶样-1基因产物的水平,可将个体分成几个亚群。亚群可根据与样品中测定的转酮酶样-1基因产物的特定水平有关的临床资料产生,例如存活率、疾病复发、转移频率等等。

根据这些亚群可进行预后的评定。根据亚群可为受肿瘤侵袭的个体定制治疗方案。

例如转酮酶样-1基因的过表达及其在结肠、胃、胰腺和肺肿瘤中磷酸戊糖循环中增强的活性,表明硫胺素(维生素B1)经非氧化的转酮酶

途径促进核酸核糖合成和肿瘤细胞增殖的机制。因此癌症患者的硫胺素的摄入与肿瘤生长率和转酮酶样-1基因过表达有直接的因果关系。这同时提供了背景资料，有助于研究出临床情况下用抗硫胺素转酮酶抑制剂的选择治疗指南。临床和实验数据表明人肿瘤对硫胺素利用的增加及其对化疗实验的干扰作用。RNA核糖分析显示在培养的宫颈癌和胰腺癌细胞中核糖合成的90%以上由葡萄糖碳原子贡献，且核糖主要通过硫胺素依赖转酮酶依赖途径(>70%)合成。在几个肿瘤模型中，抗硫胺素化合物显著抑制体外和体内的核酸合成和肿瘤细胞增殖。医学文献很少报导有关硫胺素依赖转酮酶依赖反应在肿瘤细胞核糖产生中的作用，而核糖的产生是核酸从头合成和嘌呤补救途径的中心过程。

因为硫胺素依赖的转酮酶途径是为肿瘤核酸提供磷酸核糖的中心途径，过度的硫胺素补充可能会导致终止癌细胞增殖的治疗尝试的失败。对转酮酶样-1基因过表达的结肠和肺肿瘤亚型的检测，为肿瘤个性化治疗提供了重要的一步，并且限制硫胺素的给药和采用转酮酶抑制剂伴随治疗成为治疗癌症更为合理的方法。

因此，基于对TKT-L1过表达的检测，可针对磷酸戊糖循环的特异性生化反应来定制新的治疗策略，通过葡萄糖代谢相关激素、控制硫胺素摄入、非氧化的转酮酶磷酸戊糖循环反应的辅助因子，或用抗硫胺素类似物来治疗癌症患者。

因此本发明一个实施方案中特征在于人转酮酶样-1过表达的病症，可根据转酮酶样-1基因过表达水平进行治疗。用非氧化的磷酸戊糖循环反应抑制葡萄糖利用途径有选择地产生核酸，通过对细胞周期的强调控作用，提供了肿瘤治疗的新靶点。

在一个实施方案中，与转酮酶样-1基因过表达有关的病症的治疗可能包含对受侵袭个体限制给予硫胺素。在另一个实施方案中，治疗可能包含给予转酮酶抑制剂，例如抗硫胺素化合物。

监测可能包括对不同的时间点所取样品中人转酮酶样-1基因产物水平的检测，以及上述水平变化的检测。根据所述变化可跟踪疾病病程。疾病病程可用来为特定个体选择治疗方案。

根据本发明诊断和疾病病程的监测的另一方面可能包含检测轻微后遗症。这可能包含例如某一个体开始治疗后，一或几个时间点的一个或多个身体样品中人转酮酶样-1基因产物水平的检测。根据样品中检测到的人转酮酶样-1基因产物的水平，可为特定个体选择适当的治疗方案。

在另一个优选实施方案中，执行诊断方法检测生物样品中弥散性肿瘤细胞，作为轻微后遗症的诊断(MRD)。

本发明提及的特征在于异常的细胞增殖的病症，可能包含例如肿瘤，诸如良性和恶性肿瘤，癌、肉瘤、白血病、淋巴瘤或发育不良。肿瘤可能包含头颈部肿瘤、呼吸道肿瘤、胃肠道肿瘤、泌尿系肿瘤、生殖系统肿瘤、内分泌系统肿瘤、中枢和周围神经系肿瘤、皮肤及其附属物肿瘤、软组织和骨肿瘤、淋巴和造血系统肿瘤等等。

在一优选实施方案中，肿瘤例如头颈癌、呼吸道癌、胃肠道癌、皮肤及其附属物癌、中枢和周围神经系统癌、泌尿系癌、生殖系统癌、内分泌系统癌、软组织和骨癌、淋巴和造血系统癌。在本发明最优选的实施方案中，癌为颈癌、结肠癌、胃癌、乳腺癌、膀胱癌等等。

根据本发明的肿瘤可能包含有可检出的淋巴结受累肿瘤(淋巴结阳性肿瘤)和没有可检出的波及到淋巴结的(淋巴结阴性肿瘤)肿瘤。本发明的一个实施方案中，胃肠肿瘤为没有可检出的波及到淋巴结的肿瘤。

根据本发明方法的样品可能包含任何含有细胞或细胞碎片的样品。样品可能包含临床相关样品，例如分泌物，诸如胃液、胆汁或胰液、涂片，体液，诸如血清、血液、血浆尿、精液、大便、活组织检查或细胞和组织样本。本发明提及的活组织检查可能包含肿瘤切除样本、通过内窥镜方法制备的组织样本或器官穿刺的活检组织。此外任何可能包含欲被检测的标记分子的样本都可作为根据本发明的样品。

这些样品可能包含例如完整细胞、裂解细胞或任何含有蛋白、肽或核酸的液体。甚至细胞、细胞碎片或标记分子(例如人转酮酶样-1核酸或人转酮酶样-1蛋白)可附着其上的固体都可能作为根据本发明的样

品。此类固体可能包含例如薄膜、载玻片、小珠等等。

样品的制备可能包含例如来自患者的组织样品、体液样品、细胞样品、细胞碎片样品的获得。根据本发明样品的制备可能还包含样品的几个进一步预加工步骤，例如解剖标本的制备、裂解细胞的制备、组织阵列的制备、多肽或核酸的分离、固定的肽或核酸的固相制备，或与待测分子共价或非共价偶联的珠、薄膜或载片的制备。

根据本发明的人转酮酶样-1基因产物水平的检测方法是任何一种适于检测生物样品中微量的特异性生物学活性分子的方法。根据本发明的检测反应是在核酸水平或多肽水平的检测。

检测可在溶液中使用或固定到固相的试剂进行。一种或多种分子标记物，例如多肽或核酸的检测可在单一反应混合物或两个或分开的反应混合物中进行。作为选择，几个标记分子的检测反应可例如同时在多孔反应皿中进行。人转酮酶样-1基因产物的特征标记物可用特异性识别这些分子的试剂检测。标记分子的检测反应可包含一或多个与检测试剂的反应，检测试剂识别初始标记分子或识别用来识别其它分子前一分子。

检测反应还可能包含指示人转酮酶样-1基因标记物存在与否和/或其水平的报告反应。报告反应可以是例如生成有色化合物的反应、生物发光反应、荧光反应，通常的放射发射反应等等。在一优选实施方案中，不同的标记分子可被生成不同报告信号的物质所识别，结果指示标记分子的信号可以被区分开来。

根据本发明检测反应的适当形式可以是印迹技术例如Western印迹、Southern印迹、Northern印迹。印迹技术为本领域技术人员众所周知，可采用例如电印迹、半干印迹、真空印迹或斑点印迹法进行。扩增反应也可应用于如核酸分子的检测。此外还可应用免疫学方法进行分子检测，例如免疫沉淀或免疫学测定，诸如ELISA、RIA、侧流测定(lateral flow assay)、免疫细胞化学法等等。

本发明的一个优选的实施方案中，人转酮酶样-1基因产物水平的检测通过检测存在于样品中的编码人转酮酶样-1基因产物的核酸或它的片段水平来完成。核酸分子的检测方法为本领域技术人员众所周知。核

酸的检测方法可通过例如待测分子与互补的核酸探针、特异性结合核酸的蛋白，或任何其它特异性识别和结合上述核酸的实体的结合反应来完成。这些方法可在体外也可直接在原位完成，例如在染色反应过程中的检测。根据本发明的方法，另一种在核酸水平检测样品中人转酮酶样-1基因产物的方法为核酸扩增反应，可采用定量的方式，例如聚合酶链反应来完成。本发明的一优选的实施方案中，实时RT-PCR可用来定量测定肿瘤样品中的转酮酶样-1 RNA水平。

本发明的另一个优选实施方案中，通过测定蛋白表达水平来检测人转酮酶样-1基因产物水平。在蛋白水平上测定人转酮酶样-1基因产物可由例如包含特异性检测人转酮酶样-1蛋白的抗体的反应来完成。抗体可被用于多种不同的检测技术例如在Western印迹、ELISA或免疫沉淀中。通常基于抗体的检测可在体外也可直接在原位进行，例如在免疫组化染色反应过程中进行。根据本发明任何其它测定生物样品中特定多肽数量的方法均可使用。

本发明的一个优选实施方案中，人转酮酶样-1基因产物的水平与对照试验样品相比显著升高。在这种情况下样品中人转酮酶样-1基因过表达。

一个诊断与人转酮酶样-1基因表达有关的病症的实例，可能包含检测针对由人转酮酶样-1基因编码的多肽的自身抗体。根据本发明方法所用的多肽，可用于使用本领域技术人员已知的方法检测体液中有或没有这种抗体。

在一个优选实施方案中，对表达转酮酶样-1基因产物的组织的检测可以分子成像方法的形式进行。有关的方法为本领域技术人员已知。本发明文中所用的成像方法可能包含例如MRI、SPECT、PET和其它适于活体内成像的方法。

一个实施方案中的方法可能基于，在分子成像方法过程中通过转酮酶样-1分子将惰性的或标记的化合物酶促转变成可检测分子。在另一个实施方案中，分子成像方法可能基于使用携带适当的用于体内分子成像的标记化合物诸如放射性同位素、金属离子等等，在体内特异性地与转酮

酶样-1分子结合。

本发明一优选实施方案中，这些化合物是无毒化合物，并可在一定时间内从生物体例如人的循环中清除，从而允许对过表达转酮酶样-1基因的肿瘤组织内累积的标记进行检测。本发明的另一个优选实施方案中，用于分子成像的化合物从循环清除与分子成像反应无关。这可能由于例如由循环分子等等产生的低背景所致。分子成像方法中所用的化合物以药理学容许的形式在组合物中给予，组合物可能还包含任何其它适当的物质例如其它诊断用材料、治疗用材料、载体材料等等。

本发明的另一方面是进行根据本发明的方法的试剂盒。试剂盒可以是例如诊断试剂盒或研究试剂盒。

根据本发明的试剂盒包含至少一种适合检测此处公开的分子的试剂。此外根据本发明试剂盒可能包含：a) 用于检测人转酮酶样-1基因产物的试剂；b) 通常用来进行检测反应的试剂和缓冲液，例如缓冲液、检测标记物、载体材料等等；c) 作为阳性对照反应的人转酮酶样-1样品。

检测人转酮酶样-1基因的试剂可能包括任何能够与人转酮酶样-1分子结合的试剂。这种试剂可能包括蛋白、多肽、核酸、肽核酸、糖蛋白、蛋白聚糖、多糖或脂类。

作为阳性对照的人转酮酶样-1样品可能包含例如适当形式的人转酮酶样-1核酸或多肽或其片段，例如溶液或盐形式的，适当形式的肽、组织切片样品或阳性细胞。

本发明一优选实施方案中，人转酮酶样-1基因产物的检测在多肽水平上进行。在该实施方案中，结合试剂可以是例如人转酮酶样-1或其片段的特异性抗体。

本发明试剂盒另一优选实施方案中，人转酮酶样-1的检测在核酸水平上进行。在该发明实施方案中，检测试剂可以是例如核酸探针或上述的人类转酮酶样-1核酸的反向-互补引物。

另一方面，本发明涉及用于根据本发明方法的一种或多种化合物的用途，例如核酸分子、重组载体、多肽、反义RNA序列、核酶或抗体，

用于制备治疗癌症，优选结肠癌、胰腺癌、胃癌、肺癌的药物组合物。

用于根据本发明方法的多肽、多核苷酸和结合试剂，可掺入药物或免疫原性组合物。该药物组合物包含上述的化合物和生理学可接受的载体。

药物组合物或疫苗可能包含例如编码一种或多种根据本发明的多肽的DNA。该DNA可以允许原位产生多肽的方式引入。适当的表达系统为本领域技术人员众所周知。多肽的表达可能是例如永久性或瞬时性的。在药物组合物和/或疫苗中，为提供多肽的原位表达，核酸可存在于本领域技术人员已知的任何适当的运载系统中，包括核酸表达系统、细菌和病毒表达系统。适当的核酸表达系统包含在患者体内表达必需的核酸调控序列，例如适当的启动子、终止子等等。细菌运载系统可能使用例如引入在细胞表面表达细胞抗原表位的细菌。在一优选实施方案中，核酸可由病毒表达系统引入，例如痘苗病毒、逆转录病毒或腺病毒，可能包括使用无致病性、有复制能力的病毒。适当的系统公开于，例如：Fisher-Hoch等,PNAS 86:317-321,1989; Flexner等,Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103,1989; Flexner等 Vaccine 8:17-21,1990; U.S.Pat.Nos. 4,603,112, 4,769,330, 和5,017,487; WO89/01973; U.S.Pat.No. 4,777,127; GB 2,200,651; EP 0,345,242; WO91/02805; Berkner, Biotechniques 6:616-627,1988; Rosenfeld等,Science 252: 431-434, 1991; Kolls等,PNAS 91: 215-219,1994; Kass-Eisler等, PNAS 90:11498-11502,1993; Guzman等 ,Circulation 88:2838-2848, 1993; 和 Guzman等 , Cir.Res. 73:1202-1207,1993。在另一个实施方案中，转基因哺乳动物细胞可能被用来运送和/或表达核酸。适合于多肽原位表达多肽的核酸构建体的产生方法为本领域技术人员众所周知。

本发明的另一个实施方案中核酸可能是例如反义构建体。

核酸也可以裸核酸形式给予。在这种情况下可使用适当的促进核酸摄取的运载系统，例如将核酸包被于生物可降解的小珠上，该小珠能有效地运送到细胞内。裸核酸的给予可能例如有助于在宿主或宿主细胞内的瞬时表达。

做为选择，药物组合物可能包含一种或多种多肽。引入药物组合物的多肽可能是人转酮酶样-1多肽，结合一种或多种其它已知的多肽，例如酶、抗体，调节因子诸如细胞周期蛋白、细胞周期蛋白-依赖的激酶或CKI或毒素。

药物组合物可用任何本领域技术人员已知的适当方法给药。所述给药可能包括例如注射，诸如皮内、肌肉、静脉或皮下注射，鼻内给药例如吸入，或口服给药。应根据本领域技术人员已知的参数，诸如患者年龄、性别、体重等等，选择适当的剂量以保证治疗的药物疗效。

本发明药物组合物中使用的载体的类型，依给药方式变化。对于肠胃外给药，例如皮下注射，载体优选包含水、盐水、酒精、脂类、蜡和/或缓冲液。对于口服给药，任何上述载体或固相载体，例如甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖、和/或碳酸镁，均可能使用。生物可降解的微球体（如polylactic glycolide）也可能用作本发明药物组合物的载体。适当的生物可降解的微球体公开于例如：U.S.Pat.Nos.4,897,268和5,075,109。

本发明的化合物还可能掺入免疫原性组合物。

免疫原性组合物的成分可能包含疫苗、抗原、抗原性片段或编码原位表达的抗原或抗原性片段的核酸。该化合物可能以多肽或允许多肽原位表达的核酸形式存在。免疫原性组合物包含上述的化合物和另外的免疫刺激剂或免疫原性佐剂。

本发明的多肽或其片段，包含人转酮酶样-1蛋白的免疫原性部分，可用作免疫原性组合物，其中多肽能刺激患者对肿瘤细胞的自身免疫反应。患者可能受疾病折磨也可能没有可诊断的疾病。因此此处公开的化合物可用于治疗癌症或抑制癌症发展。化合物可在肿瘤常规治疗之前或之后给药，常规治疗如手术切除原发肿瘤，施行放疗、传统的化疗或任何对相应癌或其前体的其他形式的治疗。

免疫原性组合物例如疫苗，可能包含一种或多种多肽和非特异性的免疫应答增强剂，其中非特异性免疫应答增强剂能够引起或提高对外原性抗原的免疫应答。非特异性免疫应答增强剂的实例包括佐剂、生物可

降解的微球体（如polylactic galactide）和例如可掺入多肽的脂质体。药物组合物和疫苗可能还包含其它的肿瘤抗原表位，或掺入上述融合蛋白内（即包含多个表位的单一多肽）或存在单独的多肽内。

任何适当的免疫应答增强剂可应用于本发明的疫苗。例如：可包括佐剂。大多数佐剂包含保护抗原免遭快速分解的材料，例如氢氧化铝或矿物油，和非特异性的免疫应答刺激物，例如类脂A,百日咳博德特氏杆菌（*Bordetella pertussis*）、或结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）。这种佐剂是商品化的，例如：弗氏不完全佐剂和完全佐剂（Difco实验室，Detroit, Mich.）和Merck Adjuvant65（Merck and Company, Inc., Rahway N.J.）。

为治疗目的，多肽、多核苷酸或结合剂可以通过各种途径给药。可能的途径例如包含皮内、肌肉、静脉内或皮下注射，例如通过吸入来鼻内给药或口服给药。

本发明的另一个方面是提供治疗和/或接种方法。根据本发明可以用人的转酮酶样-1多肽和/或多核苷酸来治疗细胞增生性病征。治疗例如可以是免疫治疗或体细胞基因治疗。

根据本发明人转酮酶样-1多肽和/或多核苷酸可用于疫苗接种预防细胞增生性病征。根据本发明的疫苗接种可以包含给予个体一种免疫原性化合物，以刺激针对该免疫化合物的免疫应答，并因此免疫该个体以对抗该免疫原性化合物。刺激免疫应答可包含诱导针对上述化合物的抗体的产生和刺激细胞毒性T-细胞。为疫苗接种目的，根据本发明的多肽、核酸和结合试剂可以生理学可接受的形式给药。引入个体内的组合物可以包含一种或多种抗原性成分、生理学可接受的载体材料或缓冲溶液、免疫刺激剂和/或佐剂。佐剂可以包含例如弗氏不完全佐剂或弗氏完全佐剂或其它为本领域众所周知的佐剂。

组合物可以任何可使用的方法例如静脉、皮下、肌肉等等方式给药。组合物的剂量取决于具体的病案和接种疫苗的目的。需要根据治疗个体的参数，例如年龄、重量、性别等等进行调整。此外还要考虑引起的免疫应答的类型。通常优选个体接受100ug-1g根据本发明的多肽，

$10^6$ - $10^{12}$ MOI含有可原位表达形式的根据本发明核酸的重组核酸。

疫苗接种的个体可以是任何包含转酮酶样-1蛋白并可受细胞增生性病症的侵袭的生物体。

例如，在与细胞增生性病症相关的标记分子的发生变化的、非野生型序列或结构的情况下，个体接种疫苗可能是有益的。

此处公开的多肽还可用于过继性免疫疗法治疗癌症。过继性免疫疗法广义上可划分为主动或被动免疫疗法。在主动免疫疗法中，治疗依赖于通过给予免疫应答调节剂（例如，肿瘤疫苗、细菌佐剂、和/或细胞因子）刺激内源性宿主免疫系统以对抗肿瘤。

在被动免疫疗法中，治疗涉及具有确定的肿瘤免疫反应性的生物试剂（例如效应细胞或抗体）的运送，它们可直接或间接地介导抗肿瘤效应并且不必依赖整个宿主免疫系统。效应细胞的实例包括表达公开抗原的T淋巴细胞（例如： $CD8^+$ 细胞毒性T-淋巴细胞、 $CD4^+$ 辅助T细胞、肿瘤-浸润性淋巴细胞）、杀伤细胞（例如自然杀伤细胞，淋巴因子激活性杀伤细胞）、B细胞、或抗原提呈细胞（例如树突状细胞和巨噬细胞）。此处公开的多肽可能用于产生被动免疫用抗体或抗独特型抗体（见美国专利号4,918,164）。

生产足够多过继性免疫治疗用T细胞的首选方法是免疫T细胞的体外生长。将单个抗原特异性的T细胞扩增到几十亿并保持其识别体内抗原的培养条件为本领域所周知。这些体外培养条件一般使用抗原间歇刺激，经常是在细胞因子，例如IL-2和非分化滋养细胞存在的情况下。如上所述，此处描述的免疫反应性多肽可以用来快速地培养扩增抗原特异性的T细胞以产生足量的免疫治疗细胞。特别地，抗原提呈细胞、例如树突细胞巨噬细胞或B细胞，可使用本领域众所周知的标准技术，由免疫反应性多肽脉冲刺激或转染核酸序列。例如：抗原提呈细胞可转染核酸序列，该序列含有适于增加表达的启动子区，可以表达为重组病毒或其它表达系统的一部分。为培养有效治疗用的T细胞，培养的T细胞必须能够生长、分布广泛且能在体内长期存活。研究表明通过反复用添加IL-2的抗原刺激，可诱导培养T细胞在体内的生长并大量长期地存活（见

例如：Cheever M.等 "Therapy With Cultured T Cells: Principles Revisited" *Immunological Reviews*, 157 : 177,1997)。

此处公开的多肽还可能用于产生和/或分离肿瘤反应性T细胞,以给患者使用。在一种方法中,可通过用公开多肽的免疫原性部分相应的短肽在体内免疫产生抗原特异性T细胞系。产生的抗原特异的CD8+CTL克隆可从患者体内分离出来,用标准组织培养技术扩增并返回患者体内。

或者,可使用本发明多肽免疫原性部分相应的肽,可产生肿瘤反应性的T细胞亚群,通过选择性体外刺激和自体T细胞扩增,提供抗原特异性T细胞,随后转入患者体内,例如Chang等描述的(*Crit. Rev. oncol. hemato*, 22 ( 3 ), 213、1996)。免疫系统细胞,例如T细胞,可使用商业化细胞分离体系,例如CellPro公司的(Bothell,Wash.) CEPRATE.<sup>TM</sup>系统(见U.S.Pat.No. 5,240,856; U.S.Pat.No.5,215,926; WO89/06280; WO91/16116和WO92/07243)从患者外周血中分离。分离的细胞用包含于载体例如微球中的一种或多种免疫反应性多肽刺激,以提供抗原特异性T细胞。然后使用标准技术扩增肿瘤抗原特异性T细胞群,并将细胞返回给患者。

在另一个实施方案中,多肽特异性的T细胞和/或抗体受体可被克隆、扩增,并转入其它载体或效应细胞内用于过继性免疫疗法。

在另一个实施方案中,同源的或自体的树突细胞可用相当于至少此处公开多肽的免疫原性部分的肽进行脉冲刺激。产生的抗原特异性树突细胞可转入患者体内,或用于刺激T细胞以提供抗原特异性T细胞,然后给予患者。Cheever等阐述了在小鼠模型中,利用肽脉冲树突细胞产生抗原特异性T细胞,随后用这种抗原特异性T细胞消除肿瘤(Cheever等, *Immunological Reviews*,157:177,1997)。

另外,可将表达公开的核酸的载体引入取自患者的干细胞,在体外克隆增殖后返回相同患者进行自体移植。

本发明单克隆抗体还可用作减少或消除肿瘤的治疗性化合物。抗体可独自使用(例如抑制转移性病灶)或与一种或多种治疗剂一起使用。

合适的治疗剂包括放射性核素、分化诱导物、药物、毒素和其衍生物。优选的放射核素包括<sup>90</sup>Y、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>186</sup>Re、<sup>186</sup>Re、<sup>211</sup>At和<sup>212</sup>Bi。优选的药物包括氨甲蝶呤、嘧啶和嘌呤类似物。优选的分化诱导物包括佛波醇酯和丁酸。优选的毒素包括蓖麻毒、相思豆毒素、白喉毒素（diphtheria toxin）、霍乱毒素、gelonin、假单胞菌外毒素、志贺氏菌属毒素和美洲商陆抗病毒蛋白。

此外治疗与转酮酶样-1基因有关的病症的方法可以包含任何适于在个体或个体细胞内降低转酮酶样-1多肽活性的方法。这些方法可以包含通过降低基因表达或降低酶活性来降低转酮酶样-1多肽活性。实例可包含给予反义构建体、核酶、酶抑制剂、给予转酮酶样-1多肽辅助因子拮抗剂，例如抗硫胺素化合物，或减少酶活性必需辅助因子（如硫胺素）的给予。

给予核酶或反义构建体的方法为本领域技术人员众所周知。给予可以采用给予裸核酸或给予适于原位表达相应活性产物的核酸。

一个优选的实施方案中，治疗与转酮酶样-1基因过表达有关的病症包含给予抗硫胺素化合物，或减少特征在于转酮酶样-1基因过表达的病症的个体对硫胺素的摄取。

在另一实施方案中，本发明涉及鉴别和获得治疗结肠癌、胃癌、胰腺癌或肺癌的候选药物的方法，包括以下步骤：在存在能够提供响应转酮酶活性或细胞增殖调控的改变的可检测信号组分时，接触用于本发明方法的TKT-L1多肽或表达该多肽的细胞；检测由转酮酶活性或细胞增殖调控改变产生的信号的有无或增加，其中信号的缺失或减少为推定药物的指示。

候选药物可以是单一化合物或多个化合物。本发明的方法中术语“多个化合物”可理解为可能相同或不同多个物质。

所述的化合物或多个化合物可以化学合成或微生物产生和/或含在样品例如植物、动物或微生物中提取的细胞内。此外，所述化合物可能为本领域已知的，但迄今不了解其能否抑制或激活TKT-L1多肽。反应混合物可以是无细胞提取物或包含细胞或组织培养物。本发明方法适当

的方法为本领域众所周知，且通常在Albert等Nolecular Biology of the Cell, 第三版(1994)及附录实例中描述。多个化合物可能例如加入到反应混合物、培养基中，注入到细胞中或应用到转基因动物。可用于本发明的方法的细胞或组织优选本发明实施方案描述的宿主细胞、哺乳动物细胞或非人类转基因动物。

如果本发明的方法中鉴定包含一种化合物或多个化合物的样品，则可能从确定含有能够抑制或激活 TKT-L1 的化合物的原始样品中分离该化合物，或者将原始样品再分离，例如如果样品由多个不同的化合物组成，以降低每个样品中不同物质的数目，并重复该分离原始样品的方法。根据样品复杂性，上述步骤可以进行多次，优选直至根据本发明方法鉴定的样品只包含限定数目的或唯一的物质为止。优选所述样品包含具有相似的化学和/或物理特性的物质，最优选所述物质相同。

根据本发明方法可以试验和鉴定的化合物可以是肽、蛋白质、核酸、抗体、小的有机化合物、激素、肽模拟物、PNAs 等等。

用上述方法分离的化合物还可作为前导化合物(lead compound)来研制类似物化合物。类似物有稳定的电子构型和分子构象，允许关键的功能基团以同前导复合物基本相同的方式呈现于 TKT-L1。具体的，该类似物具有同结合区域相当的空间电子性质，但可以是比前导化合物更小的分子，通常分子量低于大约 2 kD 并且优选低于大约 1 kD。可以通过使用例如 self-consistent field (SCF) 分析、构型相互作用(CI)分析和正常方式的动态分析技术来鉴定类似物。可用计算机程序完成这些分析；例如 Rein 的受体配体相互作用的计算机辅助模建(Alan Liss, 纽约, 1989)。化学衍生物和类似物的制备方法为本领域众所周知，在例如 Beilstein 的《有机化学手册》，Springer edition New York Inc., 175 Fifth Avenue, New York, N.Y 10010 U.S.A 和《有机合成》，Wiley, New York, USA 中也有描述。此外，上述衍生物和类似物可根据本领域已知方法测定其效应(亦见上)。此外，例如根据上述方法，可使用肽模拟物和/或计算机辅助设计的适当衍生物和类似物。

所述化合物一经鉴别和获得，即优选以治疗可用形式提供。

本发明提供诊断和治疗特征为细胞增殖异常的病症（例如癌症）的方法。本发明的一个方面提供基于生物样品中人转酮酶样-1基因的有无和/或其表达水平的测定的、特征在于异常的细胞增殖的病症例如癌症的检测方法。本发明的第二个方面提供特征在于异常的细胞增殖的病症的治疗方法，例如癌症，用人转酮酶样-1基因产物作为治疗活性剂。本发明还提供了基于降低转酮酶样-1基因多肽酶活性的治疗方法。本发明的一个方面是基于患者样本中转酮酶样-1基因产物的检测，提供合理的肿瘤处置并定制相应于检测到的基因产物过表达的治疗方案的方法。此外本发明提供研究或诊断用试剂盒，用于完成人转酮酶样-1基因的有无和/或过表达水平检测涉及的反应。最后本发明涉及用于根据本发明的治疗病症的药物组合物。

以下实施例的目的仅为说明而非限制此处公开的发明范围。

实施例 1：测定结肠癌组织中人的转酮酶样-1 mRNA 水平。

通过原位染色反应，可半定量地分析肿瘤活检解剖物中人的转酮酶样-1 基因 mRNA 的水平。染色反应如下进行：

将组织解剖物在浓度递增直到 100%的乙醇中温育。在乙醇挥发后解剖物在 10 mM 柠檬酸盐缓冲液（pH 6,0）中煮沸以进行组织预处理。将 50  $\mu$ l 即用杂交缓冲液（DAKO A/S, Glostrup, Danmark）与约 5-10 pmol 的探针混合制备杂交混合物。探针为荧光标记的如下序列寡核苷酸：TCTCATCACAAGCAGCACAGGAC

杂交混合物加热到 95 $^{\circ}$ C 然后平衡到 37 $^{\circ}$ C。解剖标本煮沸后与 50 $\mu$ l 杂交混合物一起在 37 $^{\circ}$ C 温育 2 小时。解剖物用过量洗涤缓冲液 2 x SSC 溶液在室温下洗两次各 15 分钟，再用 1 x SSC 在 50 $^{\circ}$ C 洗一次 15 分钟。然后解剖物在室温下用 2 x SSC 漂洗两次。洗涤后解剖物和封闭缓冲液（NEN, Blockingpuffer）一起在室温温育 30 分钟。然后和 1 : 100 稀释（用封闭缓冲液，见上）的抗荧光素-AP（DAKO A/S）一起温育 1 小时。解剖物在室温用 1x PBS/0.1% Triton x 100 洗涤两次各 10 分钟，再用 1 x PBS, 50 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 9.2) 在室温洗一次 10 分钟。

室温下用 NBT/BCIP (Sigma) 进行染色反应大约 30 分钟。染色反应

通过与含 1 mM EDTA 的 PBS 一起短暂温育来终止。最后把解剖物浸入 H<sub>2</sub>Odest 中并用 AquaTex (Merck) 固定。染色的解剖物可进行显微分析。

结果显示,与正常结肠组织相比,人的转酮酶样-1 基因在结肠癌组织中过表达。

实施例 2:用半定量 RT-PCR 方法测定癌组织和对照组织中的人转酮酶样-1 基因和转酮酶水平。

用半定量 RT-PCR 方法测定结肠癌样品、肺腺癌样品和胃癌样品中的人转酮酶样-1 mRNA 和人转酮酶 mRNA 的水平。本研究使用肿瘤活检标本。

采集肿瘤、速冻并保存于 -80℃。它们经组织病理学分析证实主要由肿瘤细胞组成。用 Qiagen 试剂 (Qiagen, Hilden, Germany) 从患者的肿瘤和相应正常组织中分离 mRNA, 用 SuperscriptII (Life Technologies, Inc) 合成单链 cDNA。定量 PCR 使用 7700 序列测定仪 (Taqman™) 和 SYBR Green PCR Master - Mix, 按厂家操作手册 (Applied Biosystems, Foster City, CA) 进行。

PCR 反应的体积为 25 μl, 每种引物的终浓度为 300 nmol, 95℃ 15 秒, 60℃ 60 秒, 40 个循环。下列引物用于定量 PCR:

转酮酶样-1: 引物 A: CACCTTGGGATTCTGTGTGC

引物 B: TCTCATCACAAAGCAGCACAG

转酮酶: 引物 A: TGTGTCCAGTGCAGTAGTGG

引物 B: ACACTTCATACCCGCCCTAG.

通过凝胶电泳 (数据未列出) 验证 PCR 产物特异性。

结果显示,同正常对照组织相比,人的转酮酶样-1 基因在结肠癌中有 1/10、肺腺癌中有 2/5 和胃癌中有 3/5 高度过表达。

特别是转酮酶样-1 基因在样品中的过表达程度很显著。合计 6/20 的癌症中显示 TKT-L1 基因 8 倍以上的过表达。相反没有病例显著地过表达转酮酶基因。

结果显示,在不同来源的癌症亚型中转酮酶样-1 基因都过表达。相

反转酮酶基因在试验肿瘤组织中的表达没有差异。

实施例 3: 免疫化学法检测 tkll 在癌症样品中的过表达

用针对 tkll 的抗体对福尔马林固定、石蜡包埋的胃组织样品切片进行免疫细胞化学染色。

切片通过与二甲苯和分级的乙醇一起温育再水合后转移到 Aqua bidest。用 10mM 的柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 进行抗原恢复。因此切片在 95℃ 水浴中加热 40 分钟, 冷却至室温 20 分钟, 再转到洗涤缓冲液 (PBS/0.1% Tween20) 中。

要灭活内源性过氧化物酶, 样品与 3% 的  $H_2O_2$  一起在室温温育 10 分钟, 然后用 PBS/0.1% Tween20 洗 10 分钟。

切片与初级抗体, 即鼠抗 tkll 抗体 (1 : 300) 在室温下温育 1 小时, 然后用洗涤缓冲液漂洗, 再置于新鲜缓冲液浴中 5 分钟。所用抗体针对如图 7 中粗体字所示的人 tkll 蛋白序列。

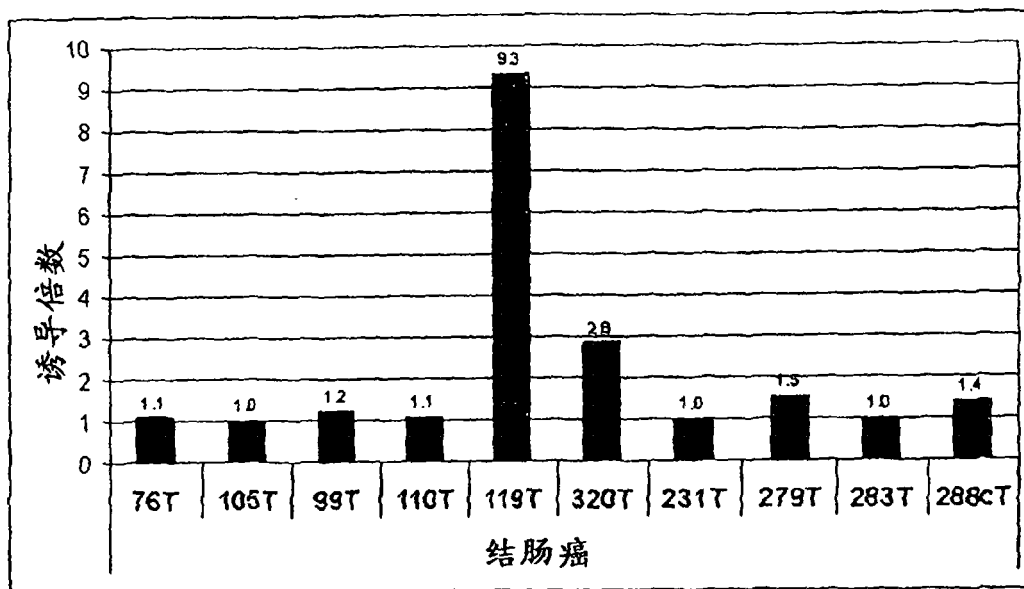
随后切片与第二抗体即羊抗鼠 (1 : 500) 抗体一起于室温温育 1 小时。洗 3 次, 每次 5 分钟。切片用 200 $\mu$ l 的生色底物溶液 (DAB) 覆盖 10 分钟。然后切片用如前所述的方法漂洗, 再在苏木精中复染 2 分钟, 用蒸馏水漂洗残留的苏木精, 固定标本并用液态的封固剂封盖。

切片显微检查显示, 经显微鉴定为胃癌的样品中可发现 tkll 免疫反应性细胞。在癌症细胞核和细胞质中可见 tkll 特异染色。此外在肿瘤细胞中可观察到颗粒状染色形式。

还将上述免疫组化染色方法用在来自乳腺癌、肺癌、子宫颈癌 (CINIII)、胃癌、食道癌、子宫内膜癌和卵巢癌的组织上。在所有这些实例中, 均可以观察到癌细胞中核和细胞质的 tkll 染色。

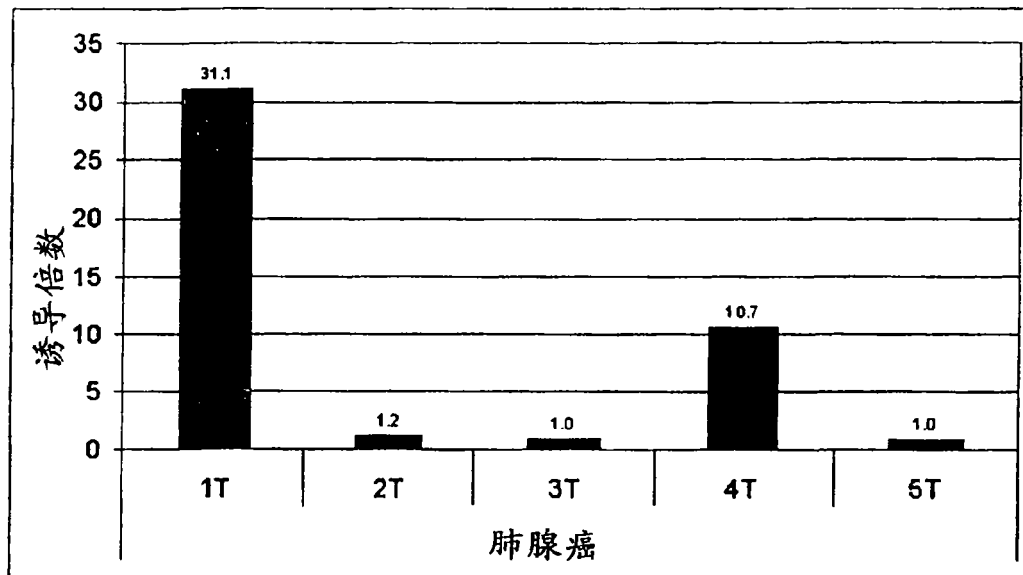
此外, 用上述免疫化学的方法分析了结肠直肠癌到肝内的转移性病灶。结果表明 tkll 蛋白有很强的过表达。

图1



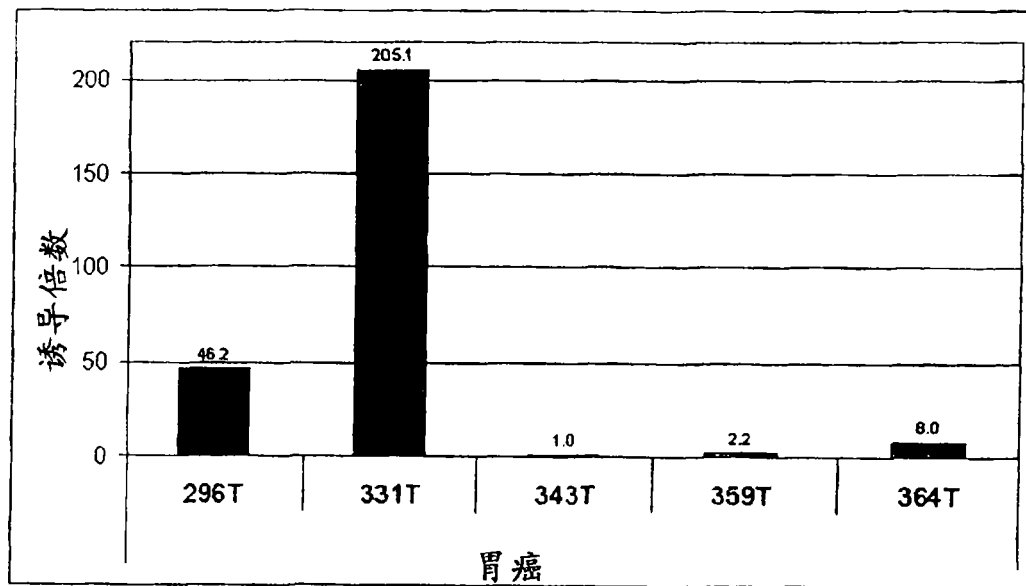
TKT-L1

图 2



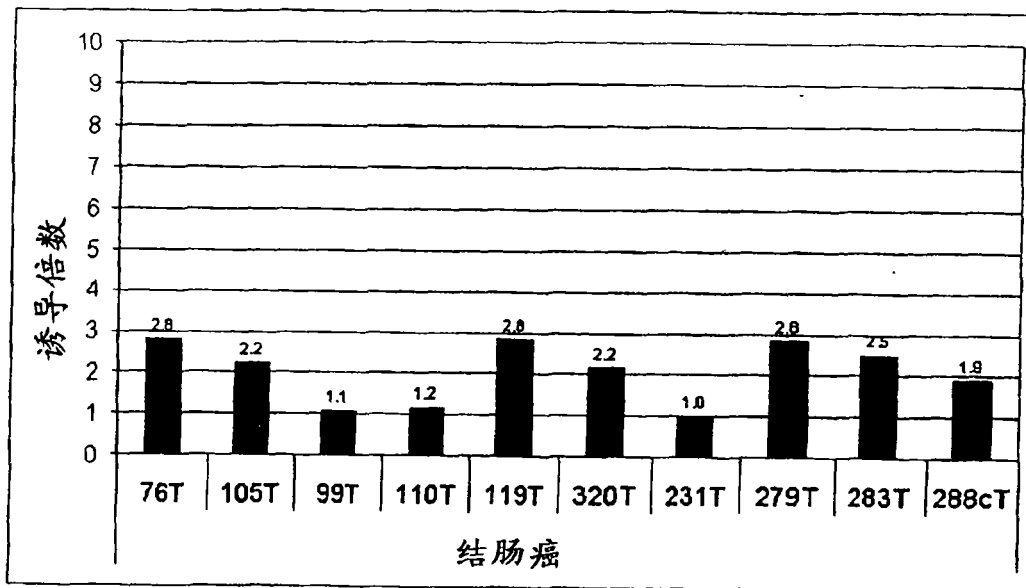
TKT-L1

图 3



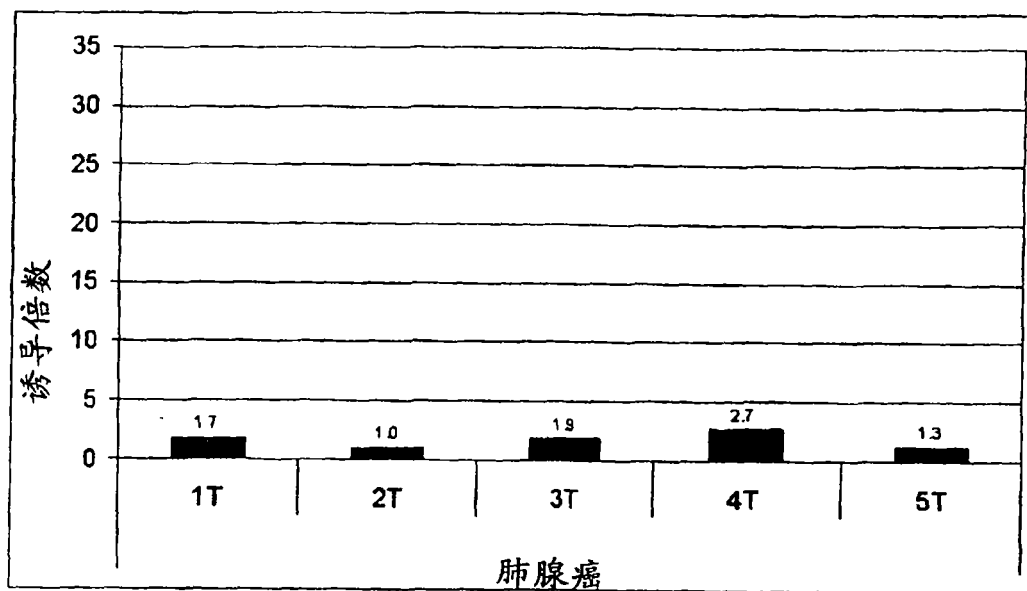
TKT-L1

图 4



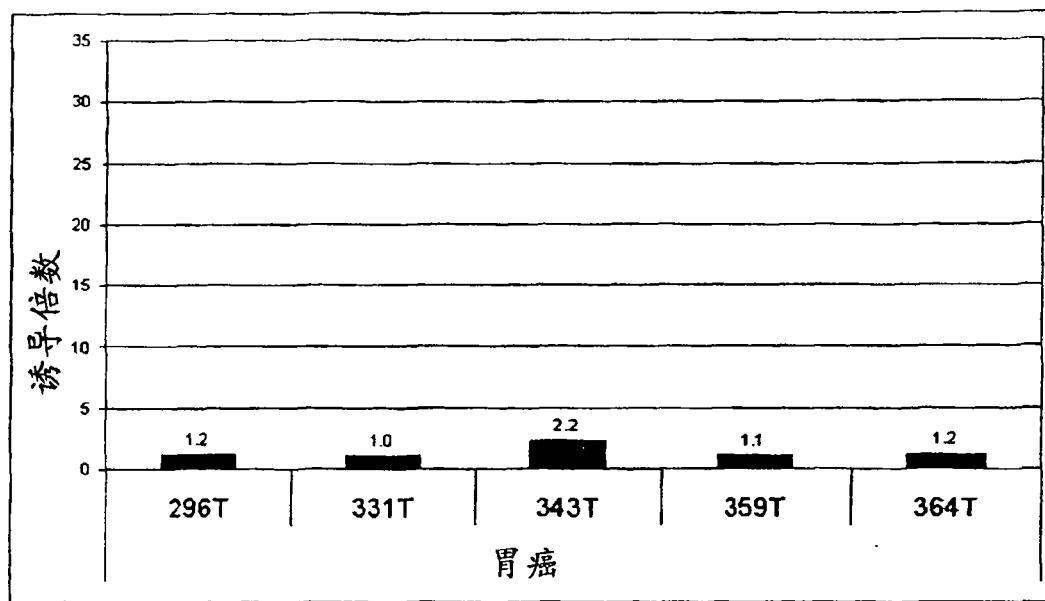
TKT

图5



TKT

图6



TKT

图 7

## TKT-L1的DNA和氨基酸序列

1 GCCATTGCTCTTCAGACGCCGAGACGTAGGAGTGGGTCTTCAGACTCCAAAGGGGTTG  
 61 GACTAATGGCGGATGCTGAGGCGAGGGCTGAGTCCCGGAGGAGGCCAGACCTGACAGGG  
 M A D A E A R A E F P E E A R P D R G  
 121 GCACCTTGCAAGTGTGCAAGATATGGCCAGCCGCTTGCGAATCCATTCATCAGGGCCA  
 T L Q V L Q D M A S R L R I H S I R A T  
 181 CATGCTCCACGAGCTCCGGCCACCCTACATCATGTAGCAGTTCCTCTGAGATCATGTCTG  
 C S T S S G H P T S C S S S S E I M S V  
 241 TGCTGTTCTTCTACATCATGAGGTACAAGCAGTCAGATCCAGAGAATCCGGACAACGACC  
 L F F Y I M R Y K Q S D P E N P D N D R  
 301 GATTGTCTCGCAAAGAGACTGTCGTTTGTGGATGTGGCAACAGGATGGCTCGGACAAG  
 F V L A K R L S F V D V A T G W L G Q G  
 361 GACTGGGAGTGCATGTGGAATGGCATATACTGGCAAGTACTTCGACAGGGCCAGCTACC  
 L G V A C G M A Y T G K Y F D R A S Y R  
 421 GGGTGTTCCTCATGAGTGATGGCGAGTCTCAGAAGGCTCTGTCTGGGAGGCAATGG  
 V F C L M S D G E S S E G S V W E A M A  
 481 CCTTTGCTTCTACTACAGTCTGGACAATCTTGTGGCAATCTTTGATGTGAACCGCTGG  
 F A S Y Y S L D N L V A I F D V N R L G  
 541 GACACAGTGGTGCATTGCCCGCCGAGCACTGCATAAACATCTATCAGAGGCGCTGCGAAG  
 H S G A L P A E H C I N I Y Q R R C E A  
 601 CCTTTGGGTGGAACACTTATGTGGTGGACGGCCGGGACGTGGAGGCACTGTGCCAGGTAT  
 F G W N T Y V V D G R D V E A L C Q V F  
 661 TCTGGCAGGCTTCTCAGGTGAAGCAAGCCCACTGCTGTGGTGGCCAAGACCTTCAAGG  
 W Q A S Q V K H K P T A V V A K T F K G  
 721 GCCGGGACCCCAAGTATGAGGATGCAGAAAGTTGGCATGCAAGCCAATGCCGAGAG  
 R G T P S I E D A E S W H A K P M P R E  
 781 AAAGACGATGCCATTATCAAATTAATTGAGAGCCAGATACAGACCAGCAGGAATCTTG  
 R A D A I I K L I E S Q I Q T S R N L D  
 841 ACCACAGCCCCCATTGAGGACTCACCTGAAGTCAACATCACAGATGTAAGGATGACCT  
P Q P P I E D S P E V N I T D V R M T S  
 901 CTCCACCTGATTACAGAGTTGGTGACAAGATAGCTACTCGGAAAGCATGCGGTCTGGCTC  
 P P D Y R V G D K I A T R K A C G L A L  
 961 TGGCTAAGCTGGGCTACGCGAACAACAGAGTCGTTGTGCTGGATGGTGACACCAGGTA  
 A K L G Y A N N R V V V L D G D T R Y S  
 1021 CTACTTCTCTGAGATATTCAACAAGGAGTACCCTGAGCGCTTCATCGAGTGCCTTTATGG  
 T F S E I F N K E Y P E R F I E C F M A  
 1081 CTGAACAAAAATGGTGGAGCGTGGCTCTGGGCTGTGCTCCCGTGGACGGACCATTGCTT  
 E Q N M V S V A L G C A S R G R T I A F  
 1141 TTGCTAGCACCTTTGCTGCCCTTCTGACTCGAGCATTGATCACATCCGGATAGGAGGCC  
 A S T F A A F L T R A F D H I R I G G L

1201 TCGCTGAGAGCAACATCAACATTATTGGTCCCCTGTGGGGTATCTGTTGGTGACGATG  
A E S N I N I I G S H C G V S V G D D G

1261 GTGCTTCCCAGATGGCCCTGGAGGATATAGCCATGTTCCGAACCATTCCCAAGTGCACGA  
A S Q M A L E D I A M F R T I P K C T I

1321 TCTTCTACCCAACTGATGCCGTCTCCACGGAGCATGCTGTTGCTCTGGCAGCCAATGCCA  
F Y P T D A V S T E H A V A L A A N A K

1381 AGGGGATGTGCTTCATTCCGACCACCCGACCAGAACTATGGTTATTTACACCCCAACG  
G M C F I R T T R P E T M V I Y T P Q E

1441 AACGCTTTGAGATCGGACAGGCCAAGGTCTCCGCCACTGTGTGAGTGCAGCAAGGTACAG  
R F E I G Q A K V L R H C V S D K V T V

1501 TTATTGGAGCTGGAATTACTGTGTATGAAGCCTTAGCAGCTGCTGATGAGCTTTGAAAC  
I G A G I T V Y E A L A A A D E L S K Q

1561 AAGATATTTTTATCCGTGTCACTGACCTGTTACCATTAAACCTCTGGATGTCGCCACCA  
D I F I R V I D L F T I K P L D V A T I

1621 TCGTCTCCAGTGCAAAAGCCACAGAGGGCCGGATCATTACAGTGGAGGATCACTACCCGC  
V S S A K A T E G R I I T V E D H Y P Q

1681 AAGGTGGCATCGGGGAAGCTGTCTGCGCAGCCGTCTCCATGGATCCTGACATTGAGTTTC  
G G I G E A V C A A V S M D P D I Q V H

1741 ATTCGCTGGCAGTGTGCGGAGTGCCCCAGAGTGGGAAGTCCGAGGAATGCTGGATATGT  
S L A V S G V P Q S G K S E E L L D M Y

1801 ATGGAATTAGTGCCAGACATATCATAGTGGCCGTGAAATGCATGTTGCTGAACTAAAATA  
G I S A R H I I V A V K C M L L N \*

1861 GCTGTTAGCCTTGGTCTTTTGGCCTCTTACCCTGTGTTTATGTTGTTCCAAAACCATC

1921 ATTTAAATCTCTACTGTCACATTTTGTTCCTAAAAGCAAAGCCAGCTAACACCTTCATT

1981 CATCCCTAGTTCGGAATTCAGCTAACTACTTACCCTTTAAACTGTCACCTGCATATGCA

2041 AGTACCGCTCTAATTTTGGATCATTAAAGGGAGTTACACAACCTTTAAGTGAAAAAAT

2101 AGGTAACAAAACAACCACCTGATAGTAAGTTTCTGATAAGACTATAGATAAGTGGTAGA

2161 GGTAATCAATCTTCCGAAGTGTTCCTTCGTGAATAACTGGTAGAGGTAATAGTTTTTT

2221 CAATGTATTTCTTCATGAGTAAAGAAAATGTGGATTGAAGTATAGATTCCAGTAGCCTA

2281 GTTTCACAGCACGATAACACCATGACGCCTACTGCTGTTCCACCTGGGATTCTGTGT

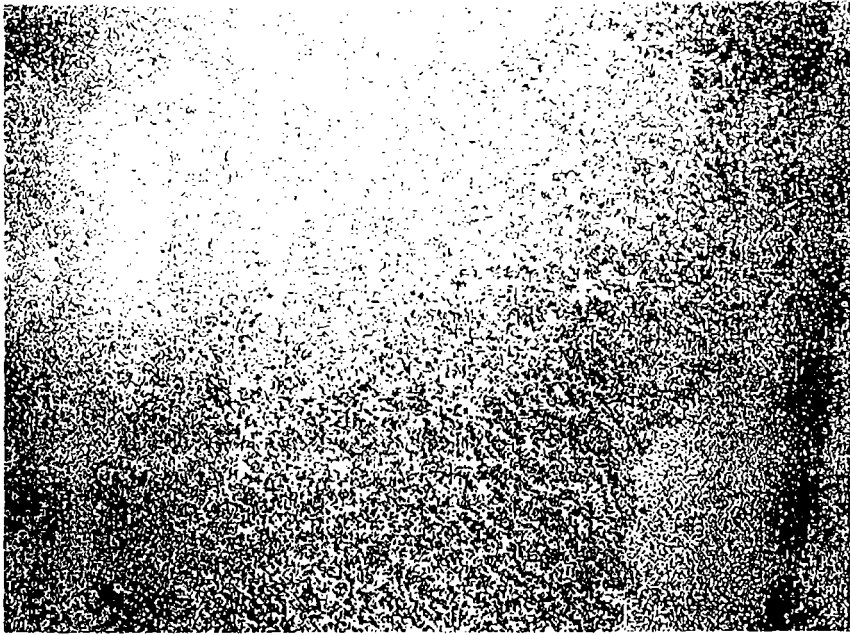
2341 GCTGCCATCCACCTGCAGCTGCCCTGGAATTCCTTCGCTGTTTGCCTTCATCTCCCTC

2401 CACGTTTGAGAGGCTGTCAGGCAGCAGCGAAAGCTTGTTAGGATGTCCTGTGCTGCTTGT

2461 GATGAGAGCCTCCACACTGTACTGTTCAAGTCAATGTTAATAAAGCATTTCAAAACCAA

2521 AAAAAAAAAA

图 8

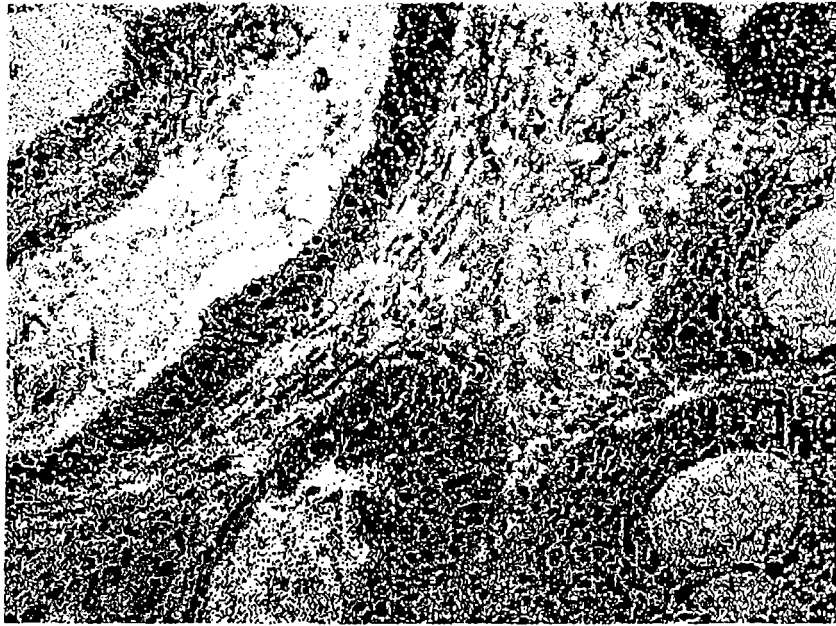


A 1666



B 1666

图9



A

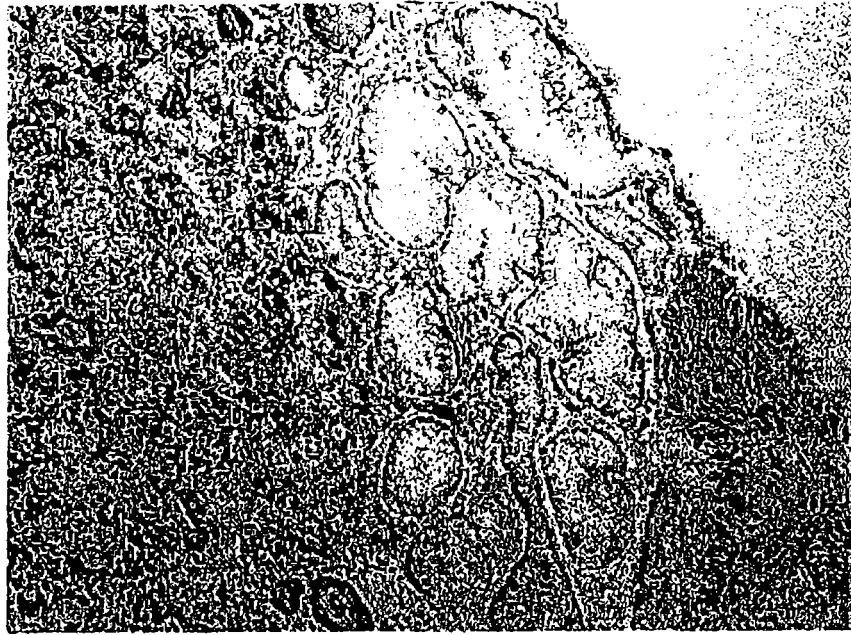
1682



B

1697

图10

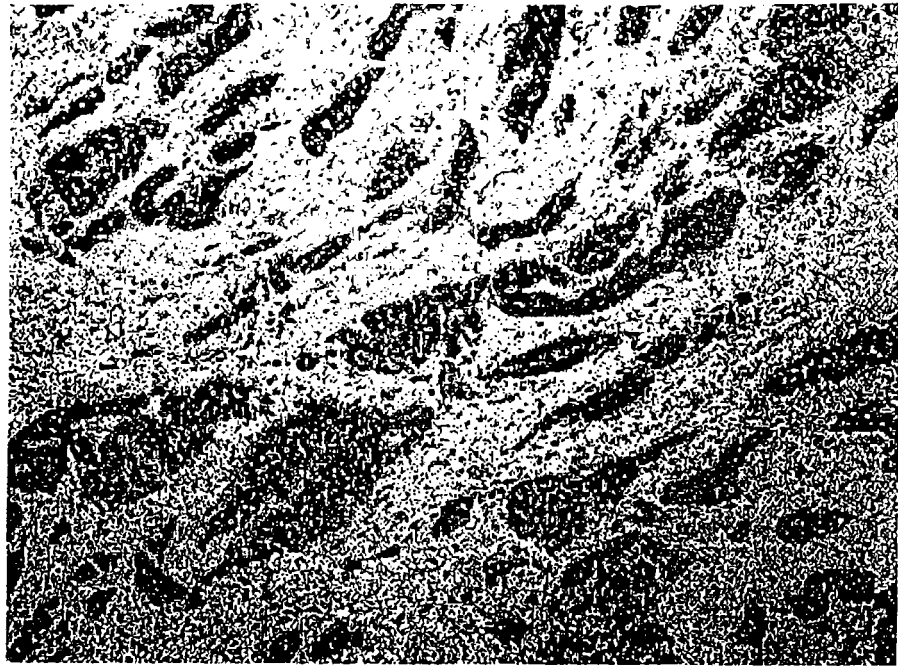


A 1699

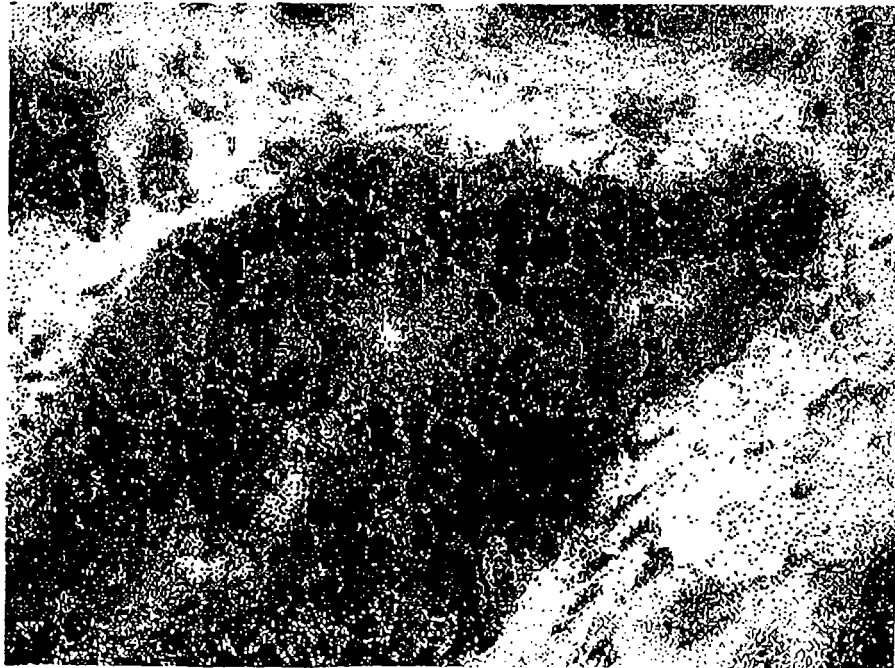


B 1699

图11



A 1698



B 1698

专利名称(译)	诊断和治疗与人转酮酶样 - 1基因过表达有关的增殖异常的组合物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101684499A</a>	公开(公告)日	2010-03-31
申请号	CN200910167473.X	申请日	2003-04-12
申请(专利权)人(译)	约翰内斯·科伊		
当前申请(专利权)人(译)	约翰内斯·科伊		
[标]发明人	约翰内斯科伊		
发明人	约翰内斯·科伊		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/48 C12Q1/02 G01N33/573 A61K39/00 A61K48/00 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 C12N15/09 G01N21/78 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C12Q1/6886 A61P35/00 C12Q2600/158		
优先权	2002008831 2002-04-19 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及治疗 and 诊断与异常增殖细胞有关的病症的方法。一方面本发明涉及方法，根据生物样品中人转酮酶样 - 1基因过表达的检测，该方法特别用于肿瘤及其前兆期的诊断。另一方面本发明涉及用于治疗与人转酮酶样 - 1基因过表达有关的病症的方法。治疗方法可包括基因治疗方法和抑制或降低转酮酶样 - 1多肽活性方法。