说 明 书

一种新的肿瘤标志物

技术领域

本发明涉及肿瘤的诊断和治疗领域，并具体涉及一种新的肿瘤标志物以及用于诊断肿瘤的发生和转移的方法和试剂盒，并涉及治疗肿瘤以及肿瘤转移的方法和药物。

背景技术

目前，全世界每年约有 1100 万人被诊断为肿瘤。并且预计在 2020 年以前每年将会有 1600 万新增病例。2005 年，在全世界 5800 万的总死亡人数中，有 760 万是由癌症导致的（约占总死亡人数的 13%），并且这一数字还有逐年增加的趋势，预计到 2015 年将会有 900 万人死于癌症，而到 2030 年将会达到 1140 万（World Health Organization, 2006）。

肿瘤标志物是肿瘤细胞在癌变过程中由于基因的表达水平的变化而生成或减少的抗原和其他生物活性物质，可用于肿瘤的早期诊断、分期、监测肿瘤进程，和评价药物的治疗效果（ASCO, 1996）。它会对肿瘤的临床治疗带来巨大的影响，尤其当它能够在临床病症出现之前被检测到，或者可以用于治疗效果的实时检测时。目前，为了满足肿瘤的临床诊断和治疗的需求，肿瘤标志物的研发亟待加速。

目前用于肿瘤早期诊断的肿瘤标志物，大多由于缺乏灵敏度和特异性而不能在体检中广泛应用。例如，对于肝癌，甲胎蛋白和超声波检查是普遍采用的诊断高危病人的方式，并且确实显著提高了肝癌病人的生存率，但灵敏度比较低；肿瘤抗原 CA-125 有更高的灵敏度，但却缺乏特异性。同样地，用于乳腺癌检测的血液肿瘤标志物 CA15-3 因灵敏度低在早期诊断中几乎没用。因此，肿瘤的早期诊断、以及良性和恶性肿瘤的区分仍然是一个临床难题，需要新的技术和方法来发现新的肿瘤标志物和提高肿瘤标志物检测的灵敏度和可信度。

肿瘤蛋白质组学的出现为新的肿瘤标志物的发现，和肿瘤的普查、早期诊断以及预后带来了新的希望。肿瘤的恶性转化会伴随有某些蛋白表达

水平的变化，这些变化能够在蛋白水平被定性和定量的检测到，这就是肿瘤蛋白质组学的主要研究内容。由此获得的肿瘤的蛋白质信息能够为更加有效的诊断、预后肿瘤和评价治疗效果提供有价值的帮助。

热休克蛋白 90α (Heat shock protein 90α，Hsp90α)是一种分子伴侣蛋白，其存在对于许多肿瘤相关蛋白的稳定性和行使功能都是必需的。Hsp90α 是真核细胞胞质当中含量最为丰富的伴侣蛋白之一，约占细胞内总蛋白的 1-2%。细胞内 Hsp90α 的主要功能包括稳定蛋白（如雌激素受体）和帮助蛋白成熟（如某些激酶和信号蛋白），但在细胞的一些其他生理过程中也发现有它的参与，包括突变蛋白的进化稳定，细胞骨架的重排，细胞核蛋白的转运，细胞增殖和凋亡，蛋白降解，抗原呈递，和脂多糖的识别等。Hsp90α 还和多种疾病相联系，包括癌症、自身免疫性疾病和心血管疾病等。例如，以 Hsp90α 的 LKVIRK 序列为抗原决定簇的单克隆抗体在抗真菌感染方面有治疗活性，目前 Neutec 公司在对其进行临床试验，商品名为 Mycogrip®。

有文章发现 Hsp90α 在极端条件刺激下会被分泌 (Liao et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, 189-96)，作为一个经典的胞内蛋白，有关 Hsp90α 出现在胞外以及在胞外如何行使功能的报道很少。在以往报道中，Hsp90α 被发现在抗原呈递细胞中可以帮助抗原呈递，还被发现是与细胞表面的脂筏相联系的四个蛋白之一，与脂多糖结合，引起胞内蛋白的响应 (Triantafilou et al. (2002) Trends in Immunology 23, 301-4)。

Hsp90α 还被发现在许多肿瘤细胞的表面高表达，包括小细胞癌，黑色素瘤，和肝癌细胞株 (Ferrarini et al. (1992) Int. J. Cancer 51, 613-19)。Hsp90α 在这些细胞系表面的高表达被推测是与抗原提呈相联系的，但目前还没有确切的证据。

还有报道说 Hsp90α 能够帮助穿膜蛋白的转运 (Schlatter et al. (2002) Biochem. J. 362, 675-84)，并且与白血病、肺癌和卵巢癌的药物外排(drug efflux)有关 (Rappa et al (2002) Oncol. Res. 12, 113-9 and Rappa et al (2000) Anticancer Drug Des 15,127-34)。

胞内 Hsp90α 目前也是抗肿瘤药物开发的一个重要靶点。胞内 Hsp90α 参与了导致细胞癌变的许多信号通路的调节。对 Hsp90α 的抑制能够引起一些与细胞增殖、细胞周期调节和细胞凋亡相关的信号蛋白的选择性降解。

最近发现许多已知的抗生素（如 Geldanamycin、Radicicol 和 Coumermycin A1 等)是 Hsp90α 的抑制剂，WO 00/53169 描述了这一发现，并提出了通过抑制伴侣蛋白与其底物的结合来抑制伴侣蛋白活性的方法，其中 Coumarin 及其衍生物被认为具有这样的功能。但 WO 00/53169 所提到的抑制剂是针对于胞内的 Hsp90α 的。

Geldanamycin 的类似物 17-AAG 也是 Hsp90α 的抑制剂，目前已经进入临床试验，但有文章认为 17-AAG 因与多种细胞组分的蛋白相结合产生的非特异性的抑制作用而具有较大的毒性 (Dunn (2002) J. Natl. Cancer Inst. 94, 1194-5)。另外，因对胞内 Hsp90α 与其底物结合所参与的多种细胞信号过程缺乏足够的认识，直接抑制胞内 Hsp90α 的活性也确实存有风险。

EP1457499A1 描述了胞外 Hsp90α 在肿瘤细胞侵袭中的功能，Hsp90α 通过促进基质金属蛋白酶 MMP-2 的分泌或激活来促进肿瘤侵袭。依据这一发现，EP1457499A1 提出可以通过抑制胞外 Hsp90α 的活性来抑制肿瘤的侵袭和转移，并且可以通过检测肿瘤细胞对 Hsp90α 的抑制剂的响应，来确定肿瘤细胞的侵袭能力，以及其侵袭与 Hsp90α 的相关性。

WO/2008/070472 提出通过检测血浆中的 Hsp90α 以及其相关因子来对针对 Hsp90α 的抗肿瘤治疗效果进行检测和预后，其实施例中提供了血浆 Hsp90α 的水平与其抑制剂 BA（包括 17-AAG 和 17-DMAG）的治疗效果的相关性，以及在小鼠肿瘤模型中肿瘤体积大小与血浆 Hsp90α 的水平的相关性。但并未鉴定出 Hsp90α 在肿瘤病人的血液中的存在形式，也未发现 Hsp90α 与癌症病人肿瘤恶性程度尤其是转移的相关性；也并未提出 Hsp90α 作为独立的肿瘤标志物在肿瘤诊断和预后中的用途。

另有文章报道说血清中的 Hsp90α 与非小细胞肺癌的临床分期相关 (Xu et al. (2007) J. Cancer Mol. 3,107-112)。肺癌病人血清中的 Hsp90α 与正常人和良性肿瘤患者相比有显著提高。但此文章同样未鉴定出 Hsp90α 在肿瘤病人的血液中的存在形式，也未提及其与肿瘤转移的相关性；另外此文章只就非小细胞肺癌进行了研究，对乳腺癌、肝癌、胰腺癌与血浆 Hsp90α 的相关性以及特异性并未涉及；并且此文章仅对血清 Hsp90α 水平在肿瘤病人中的变化进行了定性研究，对其绝对含量的变化，以及肿瘤诊断和预后所必需的正常和非正常含量范围没有进行定义。

发明内容

本发明基于这样一个发现，即血液中的 Hsp90α 的水平与多种肿瘤的发生及其恶性程度和转移相关。因此，血液中的 Hsp90α 可以作为一种新的肿瘤标志物。本发明人发现，血液中的 Hsp90α 与细胞内的 Hsp90α 不同，前者 C 末端缺失 4 个氨基酸。

因此，在一个方面，本发明提供一种分离的多肽，本发明的多肽包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成。

本发明的多肽可以是磷酸化的，其中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列中的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。优选地，所述多肽的第 90 位的苏氨酸是磷酸化的。

本发明的多肽可作为肿瘤标志物。通过使用本发明的多肽的特异性结合物来检测本发明的多肽在血液中的水平，可有助于判断多种肿瘤的发生及其恶性程度和转移。

因此，在另一个方面，本发明涉及本发明的多肽的特异性结合物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒例如可用于通过检测血浆中的本发明的多肽的水平而辅助确定肿瘤的存在、分期和/或转移，用于通过检测血浆中的本发明的多肽的水平而对高危人群进行肿瘤筛查，用于通过检测血浆中的本发明的多肽的水平而对肿瘤患者的预后进行判断，或用于通过检测血浆中的本发明的多肽的水平而判断对肿瘤病人的手术、放疗或药物治疗是否有效和/或决定何时停止治疗。

优选地，本发明的多肽的特异性结合物是本发明的多肽的特异性抗体。优选地，所述抗体是单克隆抗体或其抗原结合片段，例如 scFv、Fab、Fab' 和 F(ab')2。在一个具体的实施方式中，所述抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2903 或 2904 的细胞系产生的单克隆抗体 E9 或 D10。

根据本发明，所述抗体特异性结合本发明的多肽，且优选地特异性结合血浆中的本发明的多肽。优选地，所述抗体特异性结合磷酸化的本发明的多肽，其中所述多肽的相应于 SEQ ID No.1 的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。更优选地，所述抗体特异性结合第 90 位的苏氨酸是磷酸化的本发明的多肽。

在另一个方面，本发明涉及本发明的多肽的抑制剂在制备用于预防或治疗肿瘤转移的药物组合物中的用途。

根据本发明的一个实施方式，所述抑制剂是本发明的多肽的特异性抗体。优选地，所述抗体是人源化抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中，所述抗体特异性结合磷酸化的本发明的多肽，其中所述多肽的相应于SEQ ID No.1 的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。在一个优选的实施方式中，所述抗体特异性结合第 90 位的苏氨酸是磷酸化的本发明的多肽。在一个具体的实施方式中，本发明的抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2903 或 2904 的细胞系产生的单克隆抗体 E9 或 D10。

在本发明的各种用途中，肿瘤可以是例如肺癌、肝癌、胃癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、淋巴癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、口腔癌、鼻咽癌、宫颈癌、白血病、恶性黑素瘤、肉瘤、肾癌、胆癌。

本发明也涉及特异性结合本发明的多肽的抗体，所述抗体特异性结合血浆中的本发明的多肽。在一个具体的实施方式中，所述抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2903 或 2904 的细胞系产生的单克隆抗体 E9 或 D10。优选地，所述抗体是人源化抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中，所述抗体特异性结合磷酸化的本发明的多肽，其中所述多肽的相应于 SEQ ID No.1 的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。在一个优选的实施方式中，所述抗体特异性结合第 90 位的苏氨酸是磷酸化的本发明的多肽。

在另一个方面，本发明涉及一种抑制肿瘤的侵袭和转移的方法，其步骤包括抑制肿瘤细胞内 Hsp90α 的磷酸化。在一个实施方式中，本发明的方法包括抑制肿瘤细胞内 Hsp90α 第 90 位的苏氨酸的磷酸化。在一个具体的实施方式中，本发明的方法包括在肿瘤细胞内过量表达编码蛋白磷酸化酶 5 (PP5)的核酸，且优选地可通过基因导入的方式过量表达 PP5。

附图说明

图 1：与正常小鼠相比，荷瘤小鼠血浆中 Hsp90α 的含量升高。

图 2：与正常人相比，恶性肿瘤病人血浆中 Hsp90α 的含量升高。

图 3：鼠单抗 E9 和 D10 的效价的检测

图 4：使用鼠单抗 E9 和兔多抗 S2（夹心法 ELISA）测定血浆 Hsp90α 浓度的标准曲线。

图 5：使用夹心法 ELISA 的方法，定量比较肝癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌病人和良性乳腺囊肿和子宫肌瘤病人血浆中 Hsp90α 的含量。

A：使用夹心法 ELISA 测定肝癌病人血浆 Hsp90α 的含量，良性肿瘤患者血浆 Hsp90α 的含量在 2-10 ng/ml 区间内，多数集中于 2-5 ng/ml；69%（20/29）肝癌病人血浆中 Hsp90α 的含量在 50 ng/ml 以上，其均值与良性肿瘤病人相比有> 10 倍的升高，与免疫印迹的结果基本一致，也初步显示了血浆 Hsp90α 的含量水平与肿瘤的恶性程度的相关性。

B：使用夹心法 ELISA 测定肺癌病人血浆 Hsp90α 的含量，与良性肿瘤患者相比，64% （9/14）肺癌病人血浆 Hsp90α 的含量在 50 ng/ml 以上，其均值与良性肿瘤病人相比有> 10 倍的升高，显示出血浆 Hsp90α 的含量水平与肿瘤的恶性程度的相关性。

C：使用夹心法 ELISA 测定乳腺癌病人血浆 Hsp90α 的含量，与良性肿瘤患者相比，最高者可有 > 5 倍的升高，总体水平与良性肿瘤患者相比有显著性差异。

D：使用夹心法 ELISA 测定胰腺癌病人血浆 Hsp90α 的含量，与良性肿瘤患者相比，100%（10/10）胰腺癌病人血浆 Hsp90α 的含量在 50 ng/ml 以上，其均值与良性肿瘤病人相比有>10 倍的升高，显示出血浆 Hsp90α 的含量水平与肿瘤的恶性程度的相关性。

图 6：使用夹心法 ELISA 的方法，定量比较肿瘤发生转移和未发生转移的病人血浆中 Hsp90α 的含量。

A：将肝癌患者按照肿瘤是否发生转移进行分组，比较两组发现，肿瘤发生转移的病人血浆 Hsp90α 的含量在 200ng/ml 以上，而未发生转移的在 50-200ng/ml 之间。

B：将肺癌患者按照肿瘤是否发生转移进行分组，比较两组发现，肿瘤发生转移的病人血浆 Hsp90α 的含量在 200ng/ml 以上，而未发生转移的在 50-200ng/ml 之间。

C：将乳腺癌患者按照肿瘤是否发生转移进行分组，比较两组发现，肿

瘤发生转移的病人血浆 Hsp90α 的含量有显著的升高。

图 7：使用夹心法 ELISA 的方法，定量比较炎症病人（包括肺炎、肝炎病人）、正常人和肿瘤病人血浆中 Hsp90α 的含量。

A：为了确证血浆中 Hsp90α 的含量在肿瘤病人中的升高是特异性的，我们比较了肺炎病人、正常人和肿瘤病人血浆中 Hsp90α 的含量，发现肺炎病人血浆中的 Hsp90α 的水平在 2-10 ng/ml 之间，与正常人相比，没有显著差异。

B：肝炎病人（甲肝和乙肝）血浆中 Hsp90α 的含量在 2-10 ng/ml 之间，与正常人相比，亦没有显著差异。

图 8：血浆中的 Hsp90α 由肿瘤细胞分泌而来。

图 9：肿瘤细胞分泌的 Hsp90αC 末端缺失的情况的确定。

图 10：血浆中的 Hsp90α 是 C 末端缺失 4 个氨基酸的形式。

图 11：血浆中的 Hsp90α 磷酸化形式的检测。

图 12：肿瘤病人血浆中第 90 位苏氨酸磷酸化的 Hsp90α 的含量升高。

图 13：肿瘤病人血浆中第 90 位苏氨酸磷酸化的 Hsp90α 的含量升高与肿瘤病人血浆中 Hsp90α 的总含量升高是一致的。

图 14：第 90 位苏氨酸的磷酸化对于 Hsp90α 的分泌是必需的。

图 15：PP5 去磷酸化 Hsp90α 的第 90 位苏氨酸。

A：将纯化的 PP5 和第 90 位苏氨酸磷酸化的 Hsp90α (pT90-Hsp90α)混合孵育，检测释放出来的游离磷酸基团。Peptide 作为阳性对照。结果显示，PP5 可以直接去磷酸化 Hsp90α 的第 90 位苏氨酸。

B：在人乳腺癌细胞系 MCF-7 中，过量表达人 PP5，或者利用 RNA 干扰技术，对人 PP5 的表达进行抑制，观察 Hsp90α 的第 90 位苏氨酸的磷酸化情况，结果显示，过量表达人 PP5 后，第 90 位苏氨酸磷酸化的 Hsp90α (pT90-Hsp90α)明显减少（为对照组的 0.55）；当内源的人 PP5 的表达被抑制的时候，第 90 位苏氨酸磷酸化的 Hsp90α (pT90-Hsp90α)明显增加（为对照的 1.58）。

图 16：细胞内 PP5 调节 Hsp90α 的分泌。

A：在乳腺癌细胞系 MCF-7 中，过量表达人 PP5，观察细胞分泌 Hsp90α 的变化，结果显示，过量表达人 PP5 后，细胞分泌的 Hsp90α 明显减少。

B：在乳腺癌细胞系 MCF-7 中，利用 RNA 干扰技术，对人 PP5 的表达

进行抑制，观察细胞分泌 Hsp90α 的变化，结果显示，当内源的人 PP5 的表达被抑制的时候，细胞分泌的 Hsp90α 明显增加。

图 17：PP5 的表达水平和细胞分泌 Hsp90α 的关系。

图 18：PP5 的表达水平和肿瘤细胞迁移能力的关系。

图 19：Hsp90α 的特异性抗体能够抑制肿瘤细胞迁移。

图 20：Hsp90α 特异性抗体抑制肿瘤转移的活性。

微生物材料保藏信息

产生的单克隆抗体 E9 的 SP2/0-Ag14 小鼠杂交瘤细胞系于 2009 年 2 月 24 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC，北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所)，保藏号为 CGMCC No. 2903。

产生的单克隆抗体 D10 的 SP2/0-Ag14 小鼠杂交瘤细胞系于 2009 年 2 月 24 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC，北京市朝阳区大屯路，中国科学院微生物研究所)，保藏号为 CGMCC No. 2904。

发明详述

细胞的癌变是由细胞某些信号转导途径的变化所引起的，伴随有蛋白质表达水平、修饰类型以及空间分布的变化，这些蛋白质的变化信息可以用来监测肿瘤的发生和进展，这些蛋白质被称为肿瘤标志物。随着蛋白质组学方法和技术的进步和发展，使得定性和定量的监测肿瘤蛋白质组的变化成为可能，许多新的肿瘤标志物从而被发现，为肿瘤临床诊断和预后提供了更为准确可信的依据。

本发明基于发现了一种新的血浆肿瘤标志物，即存在于血浆中的 Hsp90α。与细胞内的 Hsp90α (其氨基酸序列为 SEQ ID No.3，编码核酸序列为 SEQ ID No.4)比较，血浆中的 Hsp90α 的 C 末端缺失 4 个氨基酸。

因此，在一个方面，本发明提供一种分离的多肽，该多肽是血浆或血清中的 Hsp90α，所述多肽包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成。在本申请中，术语“本发明的多肽”指的是血浆或血清中的 Hsp90α，其包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨

基酸序列组成。优选地，术语“本发明的多肽”在本申请中指的是由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成的多肽。在本申请中，术语“血浆中的 Hsp90α”或“血清中的 Hsp90α”等价地指存在于血液中的非细胞内和细胞表面的 Hsp90α 蛋白，它可单独游离存在，也可以与其他血液中的细胞外蛋白相结合的形式存在。在本申请中，术语“多肽”可与“蛋白质”互换使用。

本发明还涉及多核苷酸，其编码包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成的多肽。在一具体的实施方式中，所述多核苷酸包含 SEQ ID No.2 的序列或由 SEQ ID No.2 的序列组成。

本发明人还发现，本发明的多肽在血浆中的形式是磷酸化的，其中相应于 SEQ ID No.1 的氨基酸序列中的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。优选地，所述多肽的第 90 位的苏氨酸是磷酸化的。

以往从未发现血浆 Hsp90α 的特殊存在形式，也未有报道其水平与肿瘤发生、发展相关。EP1457499A1 对细胞外 Hsp90α 进行了描述，并提出其抑制剂可以用于治疗肿瘤转移，以及诊断肿瘤细胞的侵袭能力，及该能力是否依赖于 Hsp90α。但 EP1457499A1 所述的方法检测的是细胞膜表面 Hsp90α，并未涉及血浆中的 Hsp90α，也并未涉及依据 Hsp90α 的水平判定肿瘤的恶性水平，及用于肿瘤早期诊断、分期、疗效检测和预后。WO/2008/070472 提出通过检测血浆中的 Hsp90α 及其相关因子来判断针对 Hsp90α 的抗肿瘤治疗的效果，但未提及 Hsp90α 作为独立的肿瘤标志物在肿瘤诊断和预后中的用途。

本发明人通过对来自近百名肿瘤患者（患有乳腺癌、肝癌、胰腺癌和肺癌等 4 种类型的肿瘤）中的血液进行检测发现，血浆中的 Hsp90α 水平与肿瘤的恶性程度，尤其是转移具有相关性，而炎症反应对血浆 Hsp90α 的水平没有影响。因此血浆中的 Hsp90α 是一种新的肿瘤标志物，可以用于肿瘤及其转移的诊断和预后。

因此，在另一个方面，本发明涉及检测血浆中的本发明多肽的水平的试剂盒。本发明的试剂盒抗包括例如本发明的多肽的特异性结合物。本发明的试剂盒可用于检测血浆中 Hsp90α 的含量。

本发明还涉及本发明的多肽的特异性结合物在制备试剂盒中的用途，

所述试剂盒例如可用于通过检测血浆中的Hsp90α水平而辅助确定肿瘤的存在、恶性程度或转移；用于通过检测血浆中的 Hsp90α 水平而对高危人群进行肿瘤筛查；用于通过检测血浆中的 Hsp90α 水平而对肿瘤患者的预后进行判断；或用于通过检测血浆中的 Hsp90α 水平而判断对肿瘤病人的手术、放疗或药物治疗是否有效和/或决定何时停止治疗。

在本申请中，术语“特异性结合物”指的是以高亲和力结合本发明的多肽的分子，其也包括以高亲和力结合细胞内或细胞表面的Hsp90α的分子。特异性结合物例如是蛋白质，优选地，特异性结合物是 Hsp90α 特异性抗体。在优选的实施方式中，所述抗体是单克隆抗体或其抗原结合片段，例如 scFv、Fab、Fab'和 F(ab')2。在一个具体的实施方式中，所述抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2903 或 2904 的细胞系产生的单克隆抗体 E9 或 D10。

单克隆抗体是通过将分泌所需要的抗体的细胞选出并在体外进行培养获得的。制备单克隆抗体的方法是本领域熟知的(Köhler G & Milstein C. (1975) Nature. 256, 495-7)。制备特异性识别 Hsp90α 的单克隆的具体过程如下：使用重组人 Hsp90α 免疫 BALB/C 小鼠，初次免疫使用抗原 100μg 加福氏完全佐剂背部皮下多点注射；3 周后第二次免疫，剂量同上，加福氏不完全佐剂腹腔内注射；再过 3 周后第三次免疫，剂量同上，不加佐剂腹腔内注射（5～7 天后采血测其效价）；另 3 周后加强免疫，剂量 200μg，腹腔内注射。3 天后取脾细胞与 SP2/0-Ag14 (SP2/0)杂交瘤细胞（来源：ATCC，编号：CRL-1581）融合，使用 HAT 进行筛选，有限稀释法进行杂交瘤细胞的克隆化，免疫印迹和 ELISA 的方法进行鉴定，最终得到分泌特异性识别 Hsp90α 的抗体的杂交瘤细胞株。

根据本发明，可用于制备上述试剂盒的抗体特异性结合 Hsp90α，且优选地特异性结合血浆中的 Hsp90α。在一个实施方式中，所述抗体特异性结合磷酸化的 Hsp90α，其中所述 Hsp90α 的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。在优选的实施方式中，所述抗体特异性结合第 90 位的苏氨酸是磷酸化的 Hsp90α。

本发明同时也涉及检测血浆中的本发明多肽的水平的方法。可通过任何合适的方法检测血浆中 Hsp90α 的含量。所述方法包括直接或间接测定本发明的多肽在血浆中的水平，以便有助于判断肿瘤的发生及其恶性程度和

转移。

直接测定的方法包括使用所述多肽的特异性结合物来检测本发明的多肽，例如使用识别所述多肽的特异性抗体进行免疫印迹或 ELISA 检测。

间接测定的方法包括例如通过检测 Hsp90α 的活性来反映 Hsp90α 的浓度，例如以检测 Hsp90α 分子伴侣活性为基础的荧光素酶热变性检测 (Johnson et al. (2000) J. Biol. Chem., 275, 32499-32507)。

优选地，通过 ELISA 或免疫印迹方法检测血浆中 Hsp90α 的含量，其主要包括以下步骤：

a) 采集个体如肿瘤病人的全血，按常规方法离心处理获得血浆或血清；

b) 用 ELISA 或免疫印迹方法检测步骤 a)所得血浆或血清中 Hsp90α 的含量，并使用健康正常人的血浆作阴性对照，已确诊恶性肿瘤患者的血浆作阳性对照，任选地可产生 Hsp90α 浓度的标准曲线；

c) 根据所测定到的血浆 Hsp90α 的含量，判定肿瘤的发生及恶性程度及分期。从而对肿瘤的诊断、预后和治疗效果做出判断。

步骤 b)也可使用以抗原抗体反应为原理的其他检测手段，以及其他原理的、可以直接或间接的反映 Hsp90α 的浓度的检测手段，比如通过检测 Hsp90α 的活性来反映 Hsp90α 的浓度。

测定 Hsp90α 浓度的标准曲线所使用的 Hsp90α 标准品纯化于肿瘤病人的血浆，也可以通过基因重组表达获得，包括 Hsp90α 的全长、片段，以及包含有 Hsp90α 序列的重组蛋白和与其他基团相偶联的复合物。“Hsp90α 浓度的标准曲线”指的是使用已知浓度的 Hsp90α 标准样品，用 ELISA 方法测定的浓度和吸光度测定值的对应曲线。“Hsp90α 标准品”指的是纯度大于 95% 的血浆 Hsp90α 蛋白、重组 Hsp90α 蛋白、片段以及衍生物样品。

“判定肿瘤的恶性程度”，是指依据测定样品 Hsp90α 的浓度，阴性对照和阳性对照的值，判定患者血浆 Hsp90α 的含量属于何种水平，从而对患者的肿瘤性质(即良性或恶性)进行判断。

可使用的 ELISA 方法包括夹心法和竞争法两种。其中优选灵敏度高的竞争法。

夹心法的一般步骤包括：a）将特异性抗体与固相载体连接，形成固相抗体，并洗涤除去未结合的抗体及杂质；b）加受检标本：使之与固相抗体

接触反应一段时间，让标本中的抗原与固相载体上的抗体结合，形成固相抗原抗体免疫复合物，并洗涤除去其他未结合的物质；c）加酶标抗体：使固相免疫复合物上的抗原与酶标抗体结合，并彻底洗涤未结合的酶标抗体，此时固相载体上带有的酶量与标本中受检物质的量正相关；d）加底物，夹心式复合物中的酶催化底物成为有色产物。根据颜色反应的程度进行该抗原的定性或定量。

竞争法的一般步骤包括：a）将特异抗体与固相载体连接，形成固相抗体，洗涤；b）待测管中加受检标本和一定量酶标抗原的混合溶液，使之与固相抗体反应。如受检标本中无抗原，则酶标抗原能顺利地与固相抗体结合。如受检标本中含有抗原，则与酶标抗原以同样的机会与固相抗体结合，竞争性地占去了酶标抗原与固相载体结合的机会，使酶标抗原与固相载体的结合量减少。参考管中只加酶标抗原，保温后，酶标抗原与固相抗体的结合可达最充分的量，洗涤。c）加底物显色，参考管中由于结合的酶标抗原最多，故颜色最深。参考管颜色深度与待测管颜色深度之差，代表受检标本抗原的量。待测管颜色越淡，表示标本中抗原含量越多。

所述方法使用 ELISA 夹心法进行检测，所使用的抗体来源于两种不同种属的血浆 Hsp90α 的特异性抗体，其中铺板抗体优选结合能力强的兔多抗，另外一个抗体优选识别特异性好的鼠单抗。两种抗体须没有交叉反应。

所述方法若使用 ELISA 竞争法进行检测，所使用的抗体为血浆 Hsp90α 的特异性抗体，对竞争物和 Hsp90α 都要有较强的识别能力和识别的特异性。

所述方法若使用 ELISA 竞争法进行检测，所使用的竞争物为血浆 Hsp90α 标准品的标记物。且此标记不会干扰 Hsp90α 标准品与其抗体的结合。

所述方法若使用免疫印迹法进行检测，所使用的抗体为血浆 Hsp90α 的特异性抗体；二抗可以是辣根过氧化物酶偶联的，也可以是碱性磷酸酶偶联的；反应底物包括 DAB 以及荧光底物，其中优选灵敏度高的荧光底物。

上述检测方法的灵敏度需达到 10 纳克/毫升或者更低。

本发明中所使用的血浆 Hsp90α 的特异性抗体，包括抗体全长、片段及其衍生物。

本发明中的抗体还可以由其他的 Hsp90α 特异性结合物所代替，所述结合物包括小分子化合物、多肽及其衍生物。

本发明中所使用的血浆 Hsp90α 标准品的标记物，其中的标记基团包括生物素和各种荧光标记试剂。其中优选生物素标记的竞争物。

可采用本发明的试剂盒进行检测的癌症包括，但不仅限于，肺癌、肝癌、胃癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、淋巴癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、口腔癌、鼻咽癌、宫颈癌、白血病、恶性黑素瘤、肉瘤、肾癌、胆癌等。“肿瘤及其恶性程度”是指肿瘤是否良性、是否恶性、是否转移。

本发明人经初步的研究证实，正常人血浆 Hsp90α 的范围是 2-50 ng/ml，更集中于 2-10 ng/ml，确诊为肿瘤的患者的血浆 Hsp90α 水平高于正常人水平，而血浆 Hsp90α 的水平在发生转移的患者体内高于 50 ng/ml，多数高于 200ng/ml 水平以上。这使得血浆的 Hsp90α 水平成为一种新的肿瘤标志物，可以用于辅助判断肿瘤是否存在，尤其是是否存在肿瘤的转移。

因此，在一个实施方式中，本发明的试剂盒或方法可用于确定个体是否存在肿瘤、尤其是恶性肿瘤以及肿瘤是否转移。为此，可采用本发明的试剂盒或方法测定来自肿瘤疑似患者或肿瘤转移疑似患者的血浆样品内的 Hsp90α 水平，并任选地与正常对照进行比较，然后根据样品内的 Hsp90α 水平判断该患者出现肿瘤或肿瘤转移的可能性。Hsp90α 水平升高提示患者患有恶性肿瘤的可能性较大，而对于已知患有肿瘤的患者，Hsp90α 水平显著升高提示肿瘤转移的可能性较大。

在另一个实施方式中，本发明的试剂盒或方法可用于通过检测血浆中的 Hsp90α 水平而对高危人群进行肿瘤筛查。为此，可采用本发明的试剂盒或方法测定来自高危人群的血浆样品内的 Hsp90α 水平，并任选地与正常对照进行比较，然后根据样品内的 Hsp90α 水平判断该人群中哪些个体可能已经出现肿瘤。Hsp90α 水平升高提示个体发生恶性肿瘤的可能性较大。本领域人员已知，不同类型的肿瘤有其相应的高危人群，这取决于肿瘤的类型，个体因素如年龄、家族史、生活习惯、工作环境、有害物的接触史等等。例如，慢性乙型肝炎或丙型肝炎患者是肝细胞癌的高危人群。

在另一个实施方式中，本发明的试剂盒或方法可用于通过检测血浆中的 Hsp90α 水平而对肿瘤患者的预后进行判断。为此，可采用本发明的试剂盒或方法测定来自肿瘤患者的血浆样品内的 Hsp90α 水平，并任选地与正常

对照或该患者以往的血浆 Hsp90α 水平进行比较，然后根据样品内的 Hsp90α 水平判断该肿瘤患者的预后。Hsp90α 维持高水平或 Hsp90α 水平进一步升高可能与不利的预后相关。因此，可提醒临床医生对该患者进行更加密切的观察，且必要时改变目前的治疗方案。

在另一个实施方式中，本发明的试剂盒或方法可用于通过检测血浆中的 Hsp90α 水平而判断对肿瘤病人的手术、放疗或药物治疗是否有效和/或决定何时停止治疗。为此，可采用本发明的试剂盒或方法测定来自肿瘤患者的血浆样品内的 Hsp90α 水平，并任选地与正常对照或该患者以往的血浆 Hsp90α 水平进行比较，然后根据样品内的 Hsp90α 水平判断对该肿瘤病人的手术、放疗或药物治疗是否有效和/或决定何时停止治疗。

本领域人员了解，与所有已知的肿瘤标记物或利用肿瘤标记物对肿瘤进行筛查和诊断的方法一样，本发明的通过检测血浆样品内的 Hsp90α 水平来判断患者是否存在恶性肿瘤或肿瘤转移的方法是肿瘤诊断过程中的一种辅助检测方法。依据该方法的结果，并不能直接确定患者是否患有恶性肿瘤，也不能直接确定是否存在恶性肿瘤的转移，同样也不能直接确定恶性肿瘤的组织来源及其病理类型或者转移病灶的位置和数量。因此，对于肿瘤学临床医生而言，诊断的确立仍依靠影像学、病理学等手段以及临床医生的判断。就此而言，本发明的方法仅为临床医生或科研人员提供辅助的参考信息。不过，正如说明书中所提到的并如实施例中所证明的那样，检测血浆中的 Hsp90α 水平能够为判断患者是否存在恶性肿瘤、尤其是是否存在肿瘤的转移提供有价值的辅助的参考信息。同样，本发明的上述对高危人群进行肿瘤筛查、对肿瘤患者的预后进行判断以及对治疗效果进行评价等方法的目的也是为临床医生或科研人员提供辅助的参考信息。

本发明人进一步证实，血浆中的 Hsp90α 来源于肿瘤细胞，但与肿瘤细胞内的 Hsp90α 不同，因此通过抑制血浆中的 Hsp90α 有可能抑制肿瘤的发展和转移。本发明人还通过血浆 Hsp90α 的特异性抗体能够抑制小鼠肿瘤转移的实验证明了这一点，从而更进一步的，血浆 Hsp90α 可以作为一个新的靶点，用于筛选新的抗癌药物。

在另一个方面，本发明涉及本发明的多肽的抑制剂在制备用于预防或治疗肿瘤转移的药物组合物中的用途。

根据本发明的一个实施方式，所述抑制剂是 Hsp90α 特异性抗体。优选

地，所述抗体是人源化抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中，所述抗体特异性结合磷酸化的 Hsp90α，其中所述 Hsp90α 的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。在一个优选的实施方式中，所述抗体特异性结合第 90 位的苏氨酸是磷酸化的 Hsp90α。在一个具体的实施方式中，所述抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2903 或 2904 的细胞系产生的单克隆抗体 E9 或 D10。正如下文实施例所述，此抗体可以完全抑制小鼠肿瘤的淋巴节转移，抑制肺转移的效率可达 56%。

因此，在另一个方面本发明也涉及特异性结合本发明的多肽的抗体，所述抗体特异性结合血浆中的 Hsp90α。在一个具体的实施方式中，所述抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2903 或 2904 的细胞系产生的单克隆抗体 E9 或 D10。优选地，所述抗体是人源化抗体或其抗原结合片段。在一个实施方式中，所述抗体特异性结合磷酸化的 Hsp90α，其中所述 Hsp90α 的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。在一个优选的实施方式中，所述抗体特异性结合第 90 位的苏氨酸是磷酸化的 Hsp90α。优选地，所述抗体抑制肿瘤的生长，特别是转移。本发明还涉及一种缀合物，其包含本发明的抗体和一种检测部分或治疗部分。所述检测部分例如为荧光团，所述治疗部分例如为肿瘤化疗剂。

本发明人还发现，肿瘤细胞分泌 Hsp90α 的水平高低和细胞内蛋白磷酸酶 5（Protein phosphatase 5，PP5）的表达水平存在一定的相关性。在良性肿瘤中，Hsp90α 的分泌量较低，而 PP5 的表达水平却较高；在恶性肿瘤中，Hsp90α 的分泌量很高，而 PP5 的表达水平却很低。因此肿瘤细胞分泌 Hsp90α 的水平和胞内 PP5 的水平呈负相关。因此通过检测肿瘤组织中 PP5 的表达水平，可以预测肿瘤细胞分泌到血浆中的 Hsp90α 的水平，从而可以进行肿瘤的早期诊断。

本发明还通过实验证明了 Hsp90α 的分泌受到细胞内 PP5 的抑制性调节。当在细胞内过量表达编码 PP5 的核酸的时候，Hsp90α 的分泌受到了抑制，而降低细胞内 PP5 的表达水平，细胞分泌的 Hsp90α 有明显的增加。因此通过过量表达编码 PP5 的核酸，从而抑制 Hsp90α 的分泌，有可能抑制肿瘤的发展和转移。而通过我们的实验，我们也发现过量表达 PP5 可以抑制

乳腺癌细胞 MCF-7 的迁移，因此 PP5 可以作为一个新的肿瘤治疗靶点。

因此，在另一个方面，本发明涉及一种抑制肿瘤的侵袭和转移的方法，其步骤包括抑制肿瘤细胞内 Hsp90α 的磷酸化。在一个实施方式中，本发明的方法包括抑制肿瘤细胞内 Hsp90α 第 90 位的苏氨酸的磷酸化。在一个具体的实施方式中，本发明的方法包括在肿瘤细胞内过量表达编码 PP5 的核酸，且优选地可通过基因导入的方式过量表达 PP5。在一个实施方式中，本发明的方法包括在肿瘤细胞内过量表达编码包含 SEQ ID No.5 的氨基酸序列的 PP5 的核酸，在一个具体的实施方式中，核酸包含 SEQ ID No.6 所示的核苷酸序列。本发明也涉及携带可操纵地连接于启动子的上述编码 PP5 的核酸的载体在制备用于通过在肿瘤细胞内过量表达 PP5 而抑制肿瘤细胞内 Hsp90α 的磷酸化的药物中的用途。所述药物可用于抑制肿瘤的侵袭和转移。

本发明还提供使用血浆 Hsp90α 及其衍生物进行抗肿瘤药物的筛选的方法和模型，包括但不仅限于寻找血浆 Hsp90α 的结合蛋白、小肽和小分子化合物，以及抑制血浆 Hsp90α 活性的抑制剂的筛选。

实施例

实施例 1：小鼠血浆样品的采集、制备，以及血浆 Hsp90α 的检测

选用平均体重 20 克左右的 Balb/c 小鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司），随机分为两组，每组 3 只，其中一组腋下接入 H22 小鼠肝癌细胞（CCTCC，编号：GDC091）每只接入细胞数 10^6 个，对照组不接种肿瘤。当小鼠肿瘤直径生长至平均 2 厘米（约 20 天）时，自眼底静脉丛取血，血中加入抗凝剂，须避免溶血。样品如果发生溶血，则重新采集。全血收集后于 4℃，6000g 离心两次，取上清，用免疫印迹方法检测血浆中 Hsp90α 的含量，抗体为 Rabbit anti-human Hsp90α pAb (Labvasion)。使用 BCA 法（Pierce）测定样品总蛋白的含量，使得每个样品的上样量（蛋白量）保持一致。结果如图 1 所示，与正常小鼠相比，荷瘤小鼠血浆中 Hsp90α 的含量升高。

实施例 2：正常人和肿瘤患者血浆样品的采集、制备，以及血浆 Hsp90α 的检测

取正常人或癌症病人的全血，在 24 小时以内、低温条件下（4℃左右）送至实验室，须避免溶血，样品如果发生溶血，则重新采集。于 4℃、6000g 离心两次，取上清，采用免疫印迹方法检测 Hsp90α 在血浆中的含量，若不能立即检测则分装后保存于-80℃。检测结果将与临床诊断进行对照，以验证血浆中 Hsp90α 的含量与肿瘤恶性程度的相关性。

免疫印迹检测的具体操作方法为：血浆样品与上样缓冲液 1：1 混合，上样 1-2 微升进行 SDS-PAGE, 一抗为识别血浆 Hsp90α 的特异性抗体（大鼠单抗 SPA-840，Stressgen)，二抗为辣根过氧化物酶偶联的山羊抗大鼠的抗体（购自中杉金桥)。结果如图 2 所示，使用免疫印迹检测肝癌病人血浆中 Hsp90α 的含量，与正常人比较有 10 倍左右的升高(A)；良性乳腺囊肿和子宫肌瘤病人的血浆 Hsp90α 的含量，与正常人相比约有 2 倍左右的升高(B)。

实施例 3：Hsp90α 特异性兔多抗和小鼠单抗的制备

使用由 Hsp90α-Sal1-Re: ACGCGTCGACTTAGTCTACTTCTTCCATGC (SEQ ID No.8)和 Hsp90α-Sph1-For: ACATGCATGCATGCCTGAGGAAAC CCAGACC (SEQ ID No.9)的核苷酸序列组成的引物（合成自 Invitrogen）和 Pfu DNA 聚合酶（来源：NEB）从人肝脏 cDNA 文库中（来源：Stratagene）扩增得到 Hsp90α 全长序列，使用 Sph1 和 Sal1（来源：NEB）对片段和 pQE80L 载体（来源：Qiagen）进行双酶切，得到的片段使用 T4 连接酶（来源：NEB）进行连接。连接产物转化到 Top10 大肠杆菌感受态细胞（来源：Transgen）中进行扩增和验证，验证后的质粒再转化到 BL21DE3 大肠杆菌感受态细胞（来源：Transgen）中进行表达，得到重组人 Hsp90α 蛋白。重组人 Hsp90α 蛋白的纯化方法：离子交换层析 SP HP，pH6.8，收集电导 10 ms/ml 的洗脱峰；Q HP，pH7.8，收集电导 19 ms/ml 的洗脱峰。

使用纯度 > 95% 的重组人 Hsp90α 蛋白免疫成年雄性新西兰白兔，经背部皮内多点注射新西兰白兔，每次抗原剂量为 100μg/只。2 周后以相同方法进行第 2 次免疫(抗原剂量减半)，之后每隔 1 周加强免疫 1 次，共加强 2 次，并于加强免疫后 7～10 天耳缘静脉取血，测定血清中抗体的效价。于最后 1 次免疫后 8 天，颈动脉插管放血，分离血清，置- 20℃保存。使用偶联有抗原的亲和柱料对血清进行纯化。纯化后的兔多抗命名为 S2。

使用重组人 Hsp90α 免疫 BALB/C 小鼠，初次免疫使用抗原 100μg 加福氏完全佐剂背部皮下多点注射；3 周后第二次免疫，剂量同上，加福氏不完全佐剂腹腔内注射；再过 3 周后第三次免疫，剂量同上，不加佐剂腹腔内注射（5～7 天后采血测其效价）；另 3 周后加强免疫，剂量 200μg，腹腔内注射。3 天后取脾细胞与 SP2/0-Ag14(SP2/0)杂交瘤细胞（来源：ATCC，编号：CRL-1581）融合，使用 HAT 进行筛选，有限稀释法进行杂交瘤细胞的克隆化，免疫印迹和 ELISA 的方法进行鉴定，最终得到分泌特异性识别 Hsp90α 的抗体的杂交瘤细胞株 E9 和 D10，保藏号分别为：CGMCC No. 2903 和 2904，于 2009 年 2 月 24 日保藏于 CGMCC。

使用间接法 ELISA 检测 E9 和 D10 的效价，结果如图 3 所示，E9 和 D10 的效价均可以达到 500,000，可用其对血浆中的 Hsp90α 进行检测。间接法 ELISA 的具体步骤如下：使用重组人 Hsp90α 于 4℃包板过夜，包被浓度为 10 μg/ml；37℃封闭一小时后加入按照 1:400，1:1600，1:6400，1:25600，1:102400，1:509600 梯度稀释的 E9 或 D10，室温孵育 2 小时；然后用辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠二抗（购自中杉金桥）室温孵育 1 小时，使用邻苯二胺显色，于 OD 490nm 读数。

实施例 4：使用鼠单抗 E9 和兔多抗 S2（夹心法 ELISA）测血浆 Hsp90α 浓度的标准曲线的测定

在使用夹心法 ELISA 测定血浆 Hsp90α 浓度的方法中，所使用的抗体来源于两种不同种属的血浆 Hsp90α 的特异性抗体，其中铺板抗体使用结合能力强的兔多抗 S2（制备方法在实施例 3 中进行了描述），另外一个抗体优选识别特异性好的鼠单抗 E9（制备方法在实施例 3 中进行了描述）。两种抗体没有交叉反应，且重复性好，检测灵敏度高。由图 4 的标准曲线可见此方法的检测水平可达 5 ng/ml。

实施例 5：人血浆样品的采集、制备，以及血浆 Hsp90α 的测定和肿瘤恶性程度的判定（夹心法 ELISA）

取正常人、癌症病人或炎症病人 24 小时以内采集的全血，在低温条件下送至实验室，须避免溶血。样品如果发生溶血，则重新采集。于 4℃、6000g 离心两次，取上清，采用 ELISA 的方法检测 Hsp90α 在血浆中的含量，若

不能立即检测则分装后保存于-80℃。检测结果将与临床诊断进行对照，以验证血浆中 Hsp90α 的含量与肿瘤恶性程度的相关性。

夹心法 ELISA 使用两种不同来源的抗 Hsp90α 的抗体，其中自制兔源多抗 S2（制备方法在实施例 3 中进行了描述）用于 4℃铺板过夜，37℃封闭一小时后加待测血浆样品和标准曲线的样品，待测血浆稀释 10 倍，每孔加入 100 微升；标准曲线的样品每孔加入已知量的标准 Hsp90α 样品以及 10 微升空白阴性血清，以排除血清背景；于 37℃孵育 2 小时后，加入另外一种抗体，自制鼠单抗 E9（制备方法在实施例 3 中进行了描述），37℃孵育 2 小时；然后用辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠二抗孵育 1 小时，使用邻苯二胺显色，于 OD 450nm 读数。结果如图 5、6、7 所示。

如图 5 所示，良性肿瘤患者（包括良性乳腺囊肿和子宫肌瘤病人, 共 7 例）血浆 Hsp90α 的含量在 2-10 ng/ml 区间内，多数集中于 2-5 ng/ml；69%（20/29）肝癌病人（29 例）血浆中 Hsp90α 的含量在 50 ng/ml 以上，其均值与良性肿瘤病人相比有> 10 倍的升高，P =0.00263，学生 t 检验 (A)；64%（9/14）肺癌病人（14 例）血浆 Hsp90α 的含量在 50 ng/ml 以上，其均值与良性肿瘤病人相比有> 10 倍的升高，P =0.0497，学生 t 检验 (B)；78%（25/32）乳腺癌病人（32 例）血浆 Hsp90α 的含量在 50 ng/ml 以上，其均值与良性肿瘤病人相比有> 10 倍的升高，P <0.001，学生 t 检验 (C)；100%（10/10）胰腺癌病人（10 例）血浆 Hsp90α 的含量在 50 ng/ml 以上，其均值与良性肿瘤病人相比有> 10 倍的升高，P <0.05，学生 t 检验 (D)。

如图 6 所示，在肝癌（共 17 例，其中发生转移 7 例）(A)、肺癌（共 10 例，其中发生转移 2 例）(B)和乳腺癌（共 21 例，其中发生转移 10 例）(C)病人中，发生转移的病人的血浆 Hsp90α 的含量较未发生转移的病人显著提高, 其中肝癌 P 值=0.003，乳腺癌 P 值=0.002，学生 t 检验。

如图 7 所示，炎症病人，包括肺炎 10 例(A)、肝炎病人（甲肝 5 例和乙肝 5 例）(B)血浆中 Hsp90α 的含量在 2-10ng/ml 之间，与正常人（3 例）相比，亦没有显著差异，P 值分别为 0.2988，0.5177，0.138，学生 t 检验。

以上血浆样品，其中正常人样品来自健康志愿者，肿瘤病人和炎症病人样品来自北京肿瘤医院和厦门第一医院。

实施例 6：血浆中的 Hsp90α 是由肿瘤细胞分泌而来的

选用平均体重 20 克左右的裸鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司），分为两组，每组 6 只，腋下接入 Hela 宫颈癌细胞（来源：ATCC，编号：CCL-2），每只接入细胞数 10^6 个。对照组为不接种肿瘤正常鼠。当小鼠肿瘤直径生长至平均 2 厘米（约 20 天）时，眼底静脉丛取血，使用能够特异性识别人源、但不能识别鼠源的 Hsp90α 的抗体（大鼠单抗，Stressgen）检测血浆中的 Hsp90α。结果如图 8 所示，接种人源的肿瘤的小鼠血浆中的 Hsp90α 可以被特异性识别人源、但不能识别鼠源的 Hsp90α 的抗体所识别，说明血浆中的 Hsp90α 是由肿瘤细胞分泌而来的。

实施例 7：肿瘤细胞分泌的 Hsp90α 是 C 末端缺失情况的确定

使用由 Hsp90α-pc3.1-Nhe1-For-Myc: GCTAGCTAGCGCCACCATGGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGCCTGAGGAAACCCAGACCCAAGAC (SEQ ID No.10)和 Hsp90α-pc3.1-Xho1-Re-nostop: CCCGCTCGAGTGTCTACTTCTTCCATGCGTGATG (SEQ ID No.12)的核苷酸序列组成的引物（合成自 Invitrogen）和 Pfu DNA 聚合酶（来源：NEB），以实施例 3 中得到的 pQE80L-Hsp90α 质粒为模版，扩增得到 Hsp90α 全长序列，经酶切、连接构建到 pcDNA3.1/Myc-His(-)（载体来源：Invitrogen）中，得到在 N 末端额外增加一个 Myc 标签的 Hsp90α，命名为 Myc-H；或者使用由 Hsp90α-pc3.1-Nhe1-For-His-Myc:GCTAGCTAGCGCCACCATGCATCATCATCATCATCATGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGCCTGAGGAAACCCAGACCCAAGAC (SEQ ID No.11)和 SEQ ID No.12 的核苷酸序列组成的引物（合成自 Invitrogen）在其 N 末端额外增加一个连续的 His-Myc 标签，命名为 His-Myc-H。在人乳腺癌细胞系 MCF-7 中，瞬时转染这两种载体使之过量表达，观察外源 Hsp90α (即过量表达的 Hsp90α，区别于内源、本底的 Hsp90α) 的分泌情况。用抗 Hsp90α，抗 Myc 标签，抗 His 标签的抗体检测分泌到胞外培养基中的 Hsp90α 的变化。结果显示分泌到胞外的 Hsp90α 是 C 末端缺失的形式（图 9A）。

以 Myc-His-H 为模板，对其 C 末端的最后四个氨基酸（EEVD）进行突变，其中 EE->AA 表示两个 EE 突变成两个 Ala（使用 SEQ ID No.11 和 Hsp90α-EE-AA: GGCCGCTCGAGTGTCTACTGCTGCCATGCGTGATGTG (SEQ ID No.13)的核苷酸序列组成的引物扩增得到），VD->AA 表示两个 VD

突变成两个 Ala（使用 SEQ ID No.11 和 Hsp90α-VD-AA: GGCCGCTCGAGTTGCTGCTTCTTCCATGCGTGATGTG (SEQ ID No.14)的核苷酸序列组成的引物扩增得到），All Ala 表示 EEVD 都突变成 Ala（使用 SEQ ID No.11 和 Hsp90α-EEVD-AAAA: GGCCGCTCGAGTTGCTGCTGCTGCCATGCGTGATGTG (SEQ ID No.15)的核苷酸序列组成的引物扩增得到），CΔ4 表示最后的 EEVD 四个氨基酸缺失（使用 SEQ ID No.11 和 Hsp90α-CΔ4-Xho: CCGCTCGAGTCATGCGTGATGTGTCGTCATCTC (SEQ ID No.16)的核苷酸序列组成的引物扩增得到）。在人乳腺癌细胞系 MCF-7 中，瞬时转染这几种突变体，使之过量表达，观察外源 Hsp90α (即过量表达的 Hsp90α，区别于内源、本底的 Hsp90α) 的分泌情况。用抗 Hsp90α 的抗体检测分泌到胞外培养基中的 Hsp90α 的变化。结果显示，C 末端的四个氨基酸调节了 Hsp90α 的分泌，这四个氨基酸上任意的点突变或者缺失可以导致分泌到胞外的 Hsp90α 不再以 C 末端缺失的形式存在，证明分泌到胞外的 Hsp90αC 末端缺失的是 EEVD 四个氨基酸（图 9B）。

实施例 8：人血浆中的 Hsp90α 存在形式的检测

取肝癌病人 24 小时以内采集的全血，离心两次取血浆，采用免疫共沉淀和免疫印迹方法检测 Hsp90α 在血浆中的形式。即首先使用特异性识别 Hsp90α 的兔多克隆抗体（来源：Labvision）将血浆中的 Hsp90α 进行免疫沉淀，进而使用特异性识别 Hsp90α C 末端 4 个氨基酸 EEVD 的兔多克隆抗体（Anti-C4）（自制，免疫所用抗原为与载体蛋白偶联的 EEVD 三次重复的肽段，合成自赛百盛）检测血浆中的 Hsp90α C 末端缺失的情况。结果如图 10 所示，特异性识别 Hsp90α C 末端 4 个氨基酸 EEVD 的兔多克隆抗体能够识别全细胞中的 Hsp90α，而不能识别血浆中的 Hsp90α，说明血浆中的 Hsp90α 是 C 末端缺失 4 个氨基酸的形式，与细胞内的 Hsp90α 不同（图 10）。

实施例 9：人血浆中的 Hsp90α 磷酸化形式的检测

取肝癌病人 24 小时以内采集的全血，离心两次取血浆，采用免疫共沉淀和免疫印迹方法检测 Hsp90α 在血浆中的形式。即首先使用特异性识别 Hsp90α 的兔多克隆抗体（来源：Labvision）将血浆中的 Hsp90α 进行免疫沉淀，进而使用特异性识别 Hsp90α 第 90 位点的苏氨酸磷酸化的抗体（Rabbit

anti-phospho-(Ser/Thr) PKA substrate pAb, Cell signaling）检测血浆中的Hsp90α 第 90 位点的苏氨酸磷酸化情况。

结果如图 11 所示，血浆中的 Hsp90α 能够被特异性识别 Hsp90α 第 90 位点的苏氨酸磷酸化的抗体所识别，说明血浆中的 Hsp90α 是第 90 位点的苏氨酸磷酸化的形式。

实施例 10：人血浆样品中第 90 位点的苏氨酸磷酸化的 Hsp90α 的含量检测

取正常人和肝癌病人 24 小时以内采集的全血，离心两次取血浆，采用夹心法 ELISA 的方法检测 Hsp90α 在血浆中相对含量。操作步骤为首先使用自制兔源多抗 S2（制备方法在实施例 3 中进行了描述）于 4℃铺板过夜，37℃封闭一小时后加待测血浆样品，待测血浆稀释 10 倍，每孔加入 100 微升；于37℃孵育2小时后，加入特异性识别第90位点苏氨酸磷酸化的Hsp90α的抗体（Cell signaling），37℃孵育 2 小时；然后用辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔二抗孵育 1 小时，使用邻苯二胺显色，于 OD 490nm 读数。结果显示，肝癌病人血浆的检测值明显高于正常人的检测值，P 值=0.003，学生 t 检验，表明肝癌病人血浆中第 90 位点的苏氨酸磷酸化的 Hsp90α 的含量升高（图 12）。

实施例 11：人血浆样品中第 90 位点的苏氨酸磷酸化的 Hsp90α 含量和 Hsp90α 总含量的一致性检测

将同样一份（共 8 份）肝癌病人的血浆同时进行第 90 位点的苏氨酸磷酸化的 Hsp90α 含量和 Hsp90α 总含量的检测。Hsp90α 总含量的检测方法同实施例 5；第 90 位点的苏氨酸磷酸化 Hsp90α 含量的检测方法同实施例 10。结果显示，肝癌病人血浆中第 90 位点的苏氨酸磷酸化的 Hsp90α 含量和 Hsp90α 总含量是一致的，进一步证明血浆中的 Hsp90α 是在第 90 位点的苏氨酸发生磷酸化，且 Hsp90α 总含量升高可代表第 90 位点的苏氨酸磷酸化的 Hsp90α 的含量升高（图 13）。

实施例 12：第 90 位点的苏氨酸磷酸化对于 Hsp90α 的分泌是必需的

以实施例 3 中得到的 pcDNA3.1-Myc-His -Hsp90α 质粒为模版（又名野生型 Hsp90α （WT Hsp90α）），使用 Hsp90α-T89A-Sense: GATCGA

ACTCTTGCAATTGTGGATACTGGAATTGGAATG (SEQ ID No.17) 和 Hsp90α-T89-AntiSense: CATTCCAATTCCAGTATCCACAATTGCAAGAGT TCGATC (SEQ ID No.18)的核苷酸序列组成的引物构建突变型 Hsp90α (T90A)，即第 90 位点的苏氨酸突变为丙氨酸，使之不能被磷酸化，命名为（T90A Hsp90α）。在人乳腺癌细胞系 MCF-7（购自 ATCC，编号 HTB-22）中，过量表达野生型 Hsp90α (WT) 和突变型和 Hsp90α (T90A)，收集培养基，观察外源 Hsp90α (即过量表达的 Hsp90α，区别于内源、本底的 Hsp90α)的分泌情况。用抗 Hsp90α 的抗体检测分泌到胞外培养基中的 Hsp90α 的变化。

结果显示，外源野生型 Hsp90α 可以在胞外被检测到，而 T90A 突变体不能被检测到，证实第 90 位苏氨酸的磷酸化对于 Hsp90α 的分泌是必需的（图 14）。

实施例 13：PP5 去磷酸化 Hsp90α 的第 90 位苏氨酸

第 90 位苏氨酸磷酸化的 Hsp90α (pT90-Hsp90α)的制备：将重组人 Hsp90α 蛋白和重组蛋白激酶 A（美国 Promega 公司）在反应缓冲液（英国 NEB 公司）中 30 度混合孵育 1 小时后，纯化出 pT90-Hsp90α 蛋白，三次透析去除游离的磷酸基团。将纯化得到的 pT90-Hsp90α 蛋白和重组人 PP5 蛋白混合 30 度孵育，利用非放射性丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性检测试剂盒（美国 Promega 公司）检测释放出来的游离磷酸基团。多肽底物是该试剂盒的组成部分，作为阳性对照。结果如图 15A 所示，PP5 与多肽底物共同孵育，游离磷酸基团的释放显著增加，P 值<0.005，学生 t 检验，表明 PP5 可以将多肽底物直接去磷酸化（阳性对照）；将 pT90-Hsp90α 蛋白与 PP5 共同孵育，游离磷酸基团的释放也显著增加，P 值<0.005，学生 t 检验，表明 PP5 可以直接去磷酸化 Hsp90α 的第 90 位苏氨酸。

从人肝脏 cDNA 文库中扩增得到 PP5 的全长序列(SEQ ID No.6)，基因测序正确后构建到 pcDNA3.1/Myc-His(-)（载体来源：Invitrogen）。在人乳腺癌细胞系 MCF-7 中转入该载体，进行过量表达。或者利用 RNA 干扰技术，以 5'-ACTCGAACACCTCGCTAAAGAGCTC-3' (SEQ ID No.7)作为 PP5 的 siRNA 的靶序列，转入针对人 PP5 的特异性小 RNA (由 Invitrogen 合成)，对人 PP5 的表达进行抑制，观察 Hsp90α 的第 90 位苏氨酸的磷酸化情况，

结果如图 15B 所示，过量表达人 PP5 后，第 90 位苏氨酸磷酸化的 Hsp90α (pT90-Hsp90α)明显减少（为对照组的 0.55）；当内源的人 PP5 的表达被抑制的时候，第 90 位苏氨酸磷酸化的 Hsp90α (pT90-Hsp90α)明显增加（为对照的 1.58）。

实施例 14：通过促进或抑制 PP5 的表达调节分泌 Hsp90α 的水平

PP5 能够导致 Hsp90α 第 90 位苏氨酸的磷酸化去磷酸化。使用 PP5-NheI-For: CTAGCTAGCATGTACCCATACGACGTCCCAGACTACGCT (SEQ ID No.19)和 PP5-XhoI-Re: CCGCTCGAGTTAATGATGATGATGATG ATGCACGTGTACC (SEQ ID No.20)的核苷酸序列组成的引物从人肝脏 cDNA 文库中扩增得到 PP5 的全长序列，基因测序正确后构建到 pcDNA3.1/Myc-His(-)（载体来源：Invitrogen）。在人乳腺癌细胞系 MCF-7 中转入该载体，进行过量表达，观察细胞分泌 Hsp90α 的水平，结果显示，过量表达人 PP5 后，细胞分泌的 Hsp90α 明显减少（图 16A）。

在乳腺癌细胞系 MCF-7 中，利用 RNA 干扰技术（即转入针对人 PP5 的特异性小 RNA，Invitrogen），对人 PP5 的表达进行抑制，调节细胞分泌 Hsp90α 的水平，结果显示，当内源的人 PP5 的表达被抑制的时候，细胞分泌的 Hsp90α 明显增加（图 16B）。

实施例 15：PP5 含量的检测和肿瘤恶性程度的判定

在人乳腺癌细胞系 MCF-7，SKBR3，MDA-MB-453，435s 和 231（ATCC，编号分别为 HTB-22，-30，-131，-129 和 HTB-26）中，利用免疫印迹技术，检测细胞内 PP5 的表达水平和细胞分泌 Hsp90α 的关系。MCF-7，SKBR3 是恶性程度较低的乳腺癌细胞系，在裸鼠成瘤模型中，这两株细胞只能形成原位肿瘤，而不能发生转移；MDA-MB-453，435s 和 231 是恶性程度较高的乳腺癌细胞系，在裸鼠成瘤模型中，这两株细胞即可以形成原位肿瘤，又可以发生转移，其中 MDA-MB-435s 和 231 常用来建立肿瘤转移模型。在图 17 中，这五株乳腺癌细胞系按照恶性程度由低到高依次排列。

结果显示，当细胞内 PP5 的表达量高的时候，细胞分泌较少的 Hsp90α，而当细胞内 PP5 的表达量低的时候，细胞分泌较多的 Hsp90α（图 17）；同时，分泌型 Hsp90α 的水平与肿瘤恶性程度正相关，而 PP5 与肿瘤恶性程度

负相关（图 17），分泌型 Hsp90α 及其调节因子 PP5 的水平可用于肿瘤恶性程度的判定。

实施例 16：PP5 的表达水平和肿瘤细胞迁移能力的关系

采用伤口愈合模型（wound healing model）检测 PP5 的表达水平和肿瘤细胞迁移能力的关系。

在人乳腺癌细胞系 MCF-7 中，过量表达人 PP5，或者利用小 RNA 干扰，降低内源 PP5 的表达，然后分别接种 12 孔板，当细胞接近长满培养皿底的时候，使用枪尖刮掉部分细胞，形成“伤口”，将刮下的细胞吸走，换新鲜的 DMEM 培养基（GIBCO），置于 37℃培养箱中继续培养。在 0h、12h、24h 的时候拍照纪录“伤口”（图 18A）。通过“伤口”愈合的速度来检测 PP5 的表达水平对细胞迁移的影响。结果显示，过表达 PP5 可以抑制 MCF-7 的细胞迁移能力，而 PP5 干扰可以促进 MCF-7 细胞的迁移能力（图 18B）。

实施例 17：血浆 Hsp90α 特异性抗体抑制肿瘤细胞迁移活性的检测。

采用伤口愈合模型（wound healing model）检测血浆 Hsp90α 特异性抗体抑制肿瘤细胞迁移的活性。

将 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞（ATCC，编号分别为 HTB-22 和 HTB-26）分别接种 12 孔板，当细胞接近长满培养皿底的时候，使用枪尖刮掉部分细胞，形成“伤口”，将刮下的细胞吸走，换新鲜的 DMEM 培养基（GIBCO），同时加入血浆 Hsp90α 的特异性小鼠单克隆抗体 E9（20 μg/ml）或对照 IgG（20 μg/ml），置于 37℃培养箱中继续培养。在 0h、6h、12h、24h、48h 和 72h 的时候拍照纪录“伤口”。通过“伤口”愈合的速度来检测 Hsp90α 抗体对细胞迁移的抑制作用。结果如图 19 所示。血浆 Hsp90α 的特异性抗体对于 MDA-MB-231（图 19A）和 MCF-7（图 19B）细胞的迁移有 >40%的抑制。

实施例 18：血浆 Hsp90α 的特异性抗体抑制肿瘤转移活性的检测。

选用平均体重 20 克左右的裸鼠（购自北京维通利华实验动物技术有限公司），尾静脉接种 B16/F10 小鼠恶性黑色素瘤细胞（ATCC，编号：CRL-6475）每只接入细胞数 2×10^5 个。第二天随机分组，每组 8 只，分别

设定阴性对照组（IgG）和给药组（Hsp90αAb）（小鼠单克隆抗体 E9），每隔一天给药一次，给药剂量为 40 μg/只/次，15 天后检查转移情况。结果如图 20 所示，血浆 Hsp90α 的特异性抗体能够完全抑制 B16/F10 细胞的淋巴转移（A），对肺转移的抑制率为 56%（B）。

权 利 要 求 书

1. 一种分离的多肽，其包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成。

2. 权利要求 1 所述的多肽，其中 SEQ ID No.1 的氨基酸序列中的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。

3. 权利要求 2 所述的多肽，其中第 90 位的苏氨酸是磷酸化的。

4. 权利要求 1-3 中任一项的多肽的特异性结合物在制备用于通过检测血浆中的包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成的多肽的水平而确定肿瘤的存在、分期和/或转移的试剂盒中的用途。

5. 权利要求 1-3 中任一项的多肽的特异性结合物在制备用于通过检测血浆中的包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成的多肽的水平而对高危人群进行肿瘤筛查的试剂盒中的用途。

6. 权利要求 1-3 中任一项的多肽的特异性结合物在制备用于通过检测血浆中的包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成的多肽的水平而对肿瘤患者的预后进行判断的试剂盒中的用途。

7. 权利要求 1-3 中任一项的多肽的特异性结合物在制备用于通过检测血浆中的包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成的多肽的水平而判断对肿瘤病人的手术、放疗或药物治疗是否有效和/或决定何时停止治疗的试剂盒中的用途。

8．权利要求 4-7 中任一项的用途，其中所述肿瘤选自肺癌、肝癌、胃癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、淋巴瘤、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、口腔癌、鼻咽癌、宫颈癌、白血病、恶性黑素瘤、肉瘤、肾癌、胆癌。

9. 权利要求 4-8 中任一项的用途，其中所述结合物是所述多肽的特异性抗体。

10. 权利要求 9 的用途，其中所述抗体是单克隆抗体或其抗原结合片段。

11. 权利要求 10 的用途，其中所述抗原结合片段选自 scFv、Fab、Fab' 和 F(ab')2。

12. 权利要求 10 的用途，其中所述抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2903

或 2904 的细胞系产生的单克隆抗体 E9 或 D10。

13. 权利要求 9 的用途，其中所述抗体特异性结合血浆中的所述多肽。

14. 权利要求 9 的用途，其中所述抗体特异性结合磷酸化的所述多肽，其中所述多肽在相应于 SEQ ID No.1 的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。

15. 权利要求 14 的用途，其中所述抗体特异性结合第 90 位的苏氨酸是磷酸化的所述多肽。

16. 权利要求 1-3 中任一项的多肽的抑制剂在制备用于预防或治疗肿瘤转移的药物组合物中的用途。

17. 权利要求 16 的用途，其中所述抑制剂是包含 SEQ ID No.1 的氨基酸序列或由 SEQ ID No.1 的氨基酸序列组成的多肽的特异性抗体。

18. 权利要求 17 的用途，其中所述抗体是人源化抗体或其抗原结合片段。

19. 权利要求 17 的用途，其中所述抗体特异性结合磷酸化的所述多肽，其中所述多肽在相应于 SEQ ID No.1 的选自以下一组中的一或多个氨基酸残基是磷酸化的：第 90 位的苏氨酸、第 231 位的丝氨酸、第 263 位的丝氨酸、第 309 位的酪氨酸及其组合。

20. 权利要求 19 的用途，其中所述抗体特异性结合第 90 位的苏氨酸是磷酸化的所述多肽。

21. 权利要求 16 的用途，其中所述抗体是由保藏号为 CGMCC No. 2903 或 2904 的细胞系产生的单克隆抗体 E9 或 D10。

22. 权利要求 16-23 中任一项的用途，其中所述肿瘤选自肺癌、肝癌、胃癌、食道癌、骨肉瘤、胰腺癌、淋巴癌、结肠癌、乳腺癌、前列腺癌、口腔癌、鼻咽癌、宫颈癌、白血病、恶性黑素瘤、肉瘤、肾癌、胆癌。

23. 一种抑制肿瘤的侵袭和转移的方法，其步骤包括抑制肿瘤细胞内 Hsp90α 的磷酸化。

24. 权利要求 23 的方法，其步骤包括抑制肿瘤细胞内 Hsp90α 第 90 位的苏氨酸的磷酸化。

25. 权利要求 23 或 24 的方法，其步骤包括在肿瘤细胞内过量表达编码蛋白磷酸化酶 5 的核酸。

26. 权利要求 25 的方法，其中通过基因导入的方式过量表达所述核酸。

27. 权利要求25的方法，其中所述蛋白磷酸化酶5包含SEQ ID No.5 的氨基酸序列。