



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107110867 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580067274.5

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410

(22)申请日 2015.12.07

代理人 石宝忠

(30)优先权数据

10-2014-0179004 2014.12.12 KR

10-2015-0172020 2015.12.04 KR

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2015/013296 2015.12.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/093567 KO 2016.06.16

(71)申请人 首尔大学校产学协力团

地址 韩国首尔市

(72)发明人 金永洙 尹晶焕 金炫秀

权利要求书2页 说明书20页 附图20页

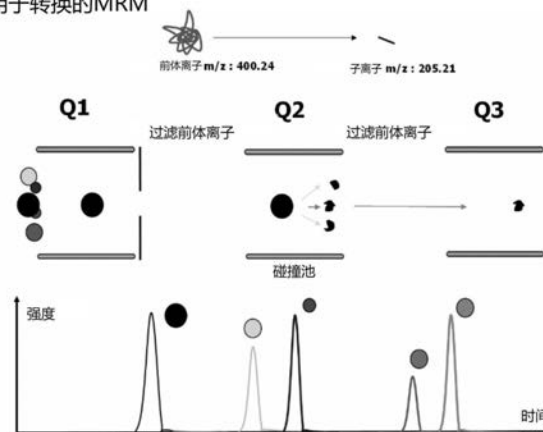
(54)发明名称

用于肝癌诊断的生物标记物及其用途

(57)摘要

本发明公开一种能够以较高的准确度和敏感度进行肝癌的诊断、预后或治疗监测的标记物或标记物的组合。本发明的标记物能够通过利用血液的非侵袭性检查来进行简单且有效的肝癌诊断或监测,并且能够开发成多种检查试剂盒,例如能够在通过POCT开发进行的家庭及一般医院中的肝癌早期发现中非常有效地使用该标记物。

用于转换的MRM



1. 一种用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,所述组合物包含生物标记物的检测试剂,所述生物标记物为选自由以下组成的组中的一个以上:ALS(胰岛素样生长因子结合蛋白复合酸不稳定亚基)、AMBP(α -1-微球蛋白/双库尼茨抑制剂前体)、CPB2(羧肽酶B2)、CHLE(胆碱酯酶)、CLUS(丛生蛋白)、CNDP1(肌肽二肽酶1)、C06(补体成分6)、CPN2(羧肽酶N2)、FA11(凝血因子XI)、FINC(纤维连接蛋白)、HGFA(肝细胞生长因子激活剂)、IBP3(胰岛素样生长因子结合蛋白3)、IGF2(胰岛素样生长因子II)、ITIH1(间 α -胰蛋白酶抑制因子重链H1)、KAIN(组织激肽释放酶结合蛋白)、KLKB1(血浆激肽释放酶)、LCAT(卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶)、PLGA(血纤维蛋白溶酶原相关蛋白A)、PLMN(血纤维蛋白溶酶原)、THRB(凝血酶原)、VTDB(维生素D结合蛋白)和VTNC(玻璃粘连蛋白)。

2. 根据权利要求1所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,所述生物标记物选自由ALS、CBPB2、CLUS、CNDP1、CPN2、FA11、FINC和HGFA组成的组。

3. 根据权利要求1所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,所述生物标记物为FINC、THRB和FINC的组合,或者所述生物标记物为ALS、ITIH1、THRB和FINC的组合。

4. 根据权利要求1所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,所述肝癌预后评估对肝癌治疗后的恢复与否进行判断。

5. 根据权利要求4所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,用于判断所述肝癌治疗后的恢复与否的生物标记物选自由THRB、FINC、ITIH1、IBP3、PLMN、CBPB2和PLGA组成的组。

6. 根据权利要求1所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,所述检测试剂为能够基于蛋白质或核酸水平而检测所述生物标记物的试剂。

7. 根据权利要求6所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,所述蛋白质水平的检测试剂为用于免疫印迹试验、ELISA(酶联免疫吸附分析)、放射免疫分析、免疫扩散法、免疫电泳、组织免疫染色、免疫沉淀分析法、补体固定分析法、FACS(荧光激活细胞分选)、质量分析或蛋白质微阵列的试剂,

所述核酸水平的检测试剂为用于核酸扩增反应、聚合酶链反应、逆转录聚合酶链反应、竞争性聚合酶链反应、核酸酶保护分析(核糖核酸酶、S1核酸酶分析)、原位杂交法、核酸微阵列或诺瑟杂交的试剂。

8. 根据权利要求7所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,

所述蛋白质水平的检测试剂包含特异性地识别所述生物标记物的蛋白质全长或蛋白质片段的抗体、抗体片段、适体、亲和性多聚体、肽模拟物、受体、配体或辅因子,

所述核酸水平的检测试剂包含所述生物标记物的核酸序列、与所述核酸序列互补的核酸序列、用于特异性地识别所述核酸序列和所述互补的核酸序列的片段的引物或探针或者引物和探针。

9. 根据权利要求1所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,

所述组合物用于ELISA分析、试纸快速检测试剂盒分析、MRM(质谱多反应监测)分析、微阵列、核酸扩增或免疫分析的组合物。

10. 根据权利要求9所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,

所述组合物为用于MRM分析的组合物,在表1-1及表1-2中记载了所述MRM分析中使用的

各标记物的缩氨酸。

11. 根据权利要求1至10中的任一项所述的用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,其中,

所述组合物所针对的所述生物标记物中添加并进一步包含AFP(甲胎蛋白)生物标记物。

12. 一种从活体外检测出肝癌标记物的方法,所述方法为了提供肝癌诊断或肝癌预后中所需要的信息而包括以下步骤:

从来源于对象体的生物学样本中检测生物标记物的核酸和/或蛋白质的存在与否以及/或者浓度,所述生物标记物为选自由以下组成的组中的一个以上:ALS(胰岛素样生长因子结合蛋白复合酸不稳定亚基)、AMBIP(α -1-微球蛋白/双库尼茨抑制剂前体)、CPB2(羧肽酶B2)、CHLE(胆碱酯酶)、CLUS(丛生蛋白)、CNDP1(肌肽二肽酶1)、C06(补体成分6)、CPN2(羧肽酶N2)、FA11(凝血因子XI)、FINC(纤维连接蛋白)、HGFA(肝细胞生长因子激活剂)、IBP3(胰岛素样生长因子结合蛋白3)、IGF2(胰岛素样生长因子II)、ITIH1(间 α -胰蛋白酶抑制因子重链H1)、KAIN(组织激肽释放酶结合蛋白)、KLKB1(血浆激肽释放酶)、LCAT(卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶)、PLGA(血纤维蛋白溶酶原相关蛋白A)、PLMN(血纤维蛋白溶酶原)、THRB(凝血酶原)、VTDB(维生素D结合蛋白)和VTNC(玻璃粘连蛋白);

将关于所述核酸或所述蛋白质的水平或存在与否的检测结果和对照组样本中的所述生物标记物的相应结果进行比较;以及

通过与所述对照组样本进行比较,在对象体样本的核酸或蛋白质浓度具有变化或者所述核酸或蛋白质的存在与否具有变化的情况下,将所述对象体样本判定为肝癌。

13. 根据权利要求12所述的从活体外检测出肝癌标记物的方法,其中,

所述生物学样本为全血、血清或血浆,

所述对照组样本为来源于正常人、肝炎患者、肝硬化患者或经肝癌治疗后痊愈的患者的样本。

14. 根据权利要求12所述的从活体外检测出肝癌标记物的方法,其中,

所述生物标记物选自由ALS、CPB2、CLUS、CNDP1、CPN2、FA11、FINC和HGFA组成的组。

15. 根据权利要求12所述的从活体外检测出肝癌标记物的方法,其中,

所述方法所针对的所述生物标记物进一步包含AFP(甲胎蛋白)生物标记物。

16. 根据权利要求12所述的从活体外检测出肝癌标记物的方法,其中,

以蛋白质或核酸微阵列分析法、核酸扩增、抗原-抗体反应或质量分析方式实施所述方法。

17. 根据权利要求12所述的从活体外检测出肝癌标记物的方法,其中,

所述肝癌诊断包括对从肝硬化向肝癌发展的患者的诊断,

所述肝癌预后评估包括判断肝癌治疗后的恢复与否。

用于肝癌诊断的生物标记物及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于肝癌诊断的生物标记物及其用途。

背景技术

[0002] 肝癌或肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 为在成人肝癌中最常见的类型, 在因癌症而导致的死亡原因中占据第三位 (Stefaniuk P, et al., 2010, World J Gastroenterol 16:418-424 (斯蒂芬妮克P等, 2010, 世界胃肠病学杂志16:418-424))。肝癌为发展到一定程度才出现症状的疾患, 因此经常出现错过恰当治疗时期的情况, 并且即使进行治疗也预后非常差。特别是, 在无法通过手术切除的情况下, 肝癌为一年内死亡的危急的疾患, 当考虑这种临床上的现实时, 能够进行癌症早期诊断及预后预测的技术为癌症治疗的最现实的对策, 并且为新一代肝癌治疗的指南。

[0003] 特别是, 众所周知, 肝细胞癌为在具有如肝炎病毒或酒精、肝硬化等危险因子的患者中容易发生的疾病, 需要利用早期诊断标记物实施针对高危险群体的筛选性监视检查 (surveillance) 的对象是明确的。实际上, 调查显示以六个月为间隔实施的早期诊断增加肝癌患者的生存率 (减少死亡率37%)。

[0004] 截止目前, 尚未开发出能够在正常人中早期准确地发现肝癌的生物标记物检查, 为了在高危险群体中进行非侵袭性早期肝癌诊断而使用的检查方法为血清甲胎蛋白检查。虽然开发当时提出AFP (甲胎蛋白) 能够使敏感度和特异度均达到良好的水平的基准值为20ng/mL, 但在该情况下敏感度不会超过60%, 并且当根据目前国际学术会议的肝癌诊断指南以200ng/mL为基准进行肝癌诊断时, 虽然特异度上升但敏感度仅仅是22%。根据现有的研究结果, 已知AFP整体上具有约66%的敏感度和82%的特异度, 因此无法诊断出所有肝癌患者。

[0005] 除此之外, 虽然未确定为诊断基准, 但作为有助于肝癌诊断的血清标记物具有脱羧基凝血酶原 (DCP, Descarboxyprothrombin)、维生素K缺乏诱导的凝血酶原-II (PIVKA-II, Prothrombin Induced by Vitamin K Absence II)、糖基化AFP相对于总AFP (L3fraction, L3比例) 的分布、 α -岩藻糖苷酶 (alpha fucosidase)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (glypican3)、热休克蛋白70 (HSP-70) 等。但是, 各个血清标记物大多作为预后因子具有意义, 在单独使用时因准确度较低而尚未用于筛选检查, 且利用单一血清学标记物进行肝癌的早期诊断这一方法被认为已经达到极限。并且, 实际上在能够进行如手术或高频热治疗的根治性治疗的阶段中诊断出的患者仅限于全体肝癌患者的30%左右。

[0006] 美国公开专利公报第2010/0304372号涉及一种肝癌诊断及组合物, 并公开了通过检测BASF1、SPINT2、APC、CCND2、CFTR、RASSF1及SRD5A2基因的CpG岛来进行肝癌诊断的方法。

[0007] 韩国专利第1161789号涉及一种关于肝癌的新生物标记物及其用途, 并公开了用于通过检测NK4蛋白等进行肝癌诊断或肝癌预后分析的标记物。

[0008] 因此, 急需开发如下标记物: 即在能够进行肝癌的根治性治疗的阶段中可进行最

大限度的早期诊断并且具有提高的特异性和敏感度以能够克服个别检查的局限性的标记物。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明提供一种能够进行肝癌诊断的生物标记物。

[0011] 技术方案

[0012] 在一实施方式中,本发明提供一种用于肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物,该组合物包含生物标记物的检测试剂,该生物标记物选自由ALS (Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit,胰岛素样生长因子结合蛋白复合酸不稳定亚基)、AMBP (Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor, α -1-微球蛋白/双库尼茨抑制剂前体)、CPB2 (Carboxypeptidase B2,羧肽酶B2)、CHLE (Cholinesterase,胆碱酯酶)、CLUS (Clusterin,丛生蛋白)、CNDP1 (Beta-Ala-His dipeptidase,肌肽二肽酶1)、C06 (Complement component C6,补体成分6)、CPN2 (Carboxypeptidase N subunit 2,羧肽酶N2)、FA11 (Coagulation factor XI,凝血因子XI)、FINC (Fibronectin,纤维连接蛋白)、HGFA (Hepatocyte growth factor activator,肝细胞生长因子激活剂)、IBP3 (Insulin-like growth factor-binding protein 3,胰岛素样生长因子结合蛋白3)、IGF2 (Insulin-like growth factor II,胰岛素样生长因子II)、ITIH1 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1,间 α -胰蛋白酶抑制因子重链H1)、KAIN (Kallistatin,组织激肽释放酶结合蛋白)、KLKB1 (Plasma kallikrein,血浆激肽释放酶)、LCAT (Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase,卵磷脂胆固醇脂酰基转移酶)、PLGA (Plasminogen-related protein A,血纤维蛋白溶酶原相关蛋白A)、PLMN (Plasminogen,血纤维蛋白溶酶原)、THRB (Prothrombin,凝血酶原)、VTDB (Vitamin D binding protein,维生素D结合蛋白)和VTNC (Vitronectin,玻璃粘连蛋白)组成的组中的一个以上。

[0013] 在另一方式中,本发明提供一种从活体外检测出肝癌标记物的方法,该方法为了提供肝癌诊断、肝癌预后评估或肝癌诊断及肝癌预后评估中所需要的信息而包括以下步骤:从来源于对象体的生物学样本中检测生物标记物的核酸和/或蛋白质的存在与否以及/或者浓度,该生物标记物为选自由ALS (Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit)、AMBP (Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)、CPB2 (Carboxypeptidase B2)、CHLE (Cholinesterase)、CLUS (Clusterin)、CNDP1 (Beta-Ala-His dipeptidase)、C06 (Complement component C6)、CPN2 (Carboxypeptidase N subunit 2)、FA11 (Coagulation factor XI)、FINC (Fibronectin)、HGFA (Hepatocyte growth factor activator)、IBP3 (Insulin-like growth factor-binding protein 3)、IGF2 (Insulin-like growth factor II)、ITIH1 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1)、KAIN (Kallistatin)、KLKB1 (Plasma kallikrein)、LCAT (Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase)、PLGA (Plasminogen-related protein A)、PLMN (Plasminogen)、THRB (Prothrombin)、VTDB (Vitamin D binding protein)和VTNC (Vitronectin)组成的组中的一个以上;将关于上述核酸或上述蛋白质的水平或存在的检测结果和对照组样本的该生物标记物的相应结果进行比较;以及通过与上述对照组样本进

行比较,在上述对象体样本的核酸或蛋白质浓度具有变化或者上述核酸或蛋白质的存在与否具有变化的情况下,将该对象体样本判定为肝癌。

[0014] 本发明的标记物可利用血清样本来进行检测,并且通过与来源于正常人、肝炎患者、肝硬化患者或经肝癌治疗后痊愈的患者的样本进行比较而在肝癌患者中差异性表达,由此能够在对肝癌患者的诊断、对从肝硬化向肝癌发展的患者的早期诊断、治疗后的进展测定中有效地使用本发明的标记物。

[0015] 有益效果

[0016] 本发明的生物标记物能够以较高的特异性和敏感度进行肝癌的诊断。特别是,由于本发明的生物标记物不仅能够区分肝癌患者,还能区分肝硬化与肝癌患者,因此能够预先对从肝硬化向肝癌发展的患者进行早期诊断,并且由于能够区分肝癌痊愈后处于肝癌已去除的状态的肝硬化患者,因此在预测肝癌治疗预后时能够利用本发明的生物标记物。

[0017] 此外,本发明的标记物能够利用血液进行非侵袭性诊断,因此对家庭以及一般医院中的早期发现非常有用,并且在健康检查时可通过简单的血液检查来检测出肝癌,因此从国家观点上来看可具有削减医疗费用的效果。

[0018] 本发明的生物标记物能够以利用针对该生物标记物的抗体、蛋白质或缩氨酸的诊断试剂盒形式开发,例如能够以ELISA(酶联免疫吸附测定)、试条形式的快速试剂盒、以缩氨酸为核心的MRM(质谱多反应监测)试剂盒形式开发。特别是,可利用MRM检测缩氨酸的方法来代替现有的医院临床应用中的免疫分析方法,并进行产业化,进而在与作为肝癌标记物周知的AFP一同使用并通过设置加权值来进行分析时,能够作为改善并超过现有的肝癌诊断法的方法来应用。

附图说明

[0019] 图1图示生物标记物的发现及分析中使用的MRM分析过程。

[0020] 图2表示是否同时洗脱(coelution)内源性缩氨酸和合成缩氨酸。

[0021] 图3表示血液的内源性缩氨酸和合成缩氨酸的Q3强度图案。

[0022] 图4表示血液的内源性缩氨酸水平的确认方法。

[0023] 图5是在测定血液的内源性缩氨酸浓度之后以动态范围(dynamic range)分布表示其结果的图。

[0024] 图6表示关于低丰度及高丰度(low and high abundance)靶的血液内水平。

[0025] 图7示意性地表示SIS缩氨酸注入浓度的确定方式。

[0026] 图8表示在LC组与HCC组之间建立多重蛋白质标记面板的结果。

[0027] 图9表示在HCC组与恢复组之间建立多重蛋白质标记面板的结果。

[0028] 图10表示为了检验早期诊断标记物而对表达倾向性一致的十个靶蛋白质进行免疫印迹试验的结果,图10a表示作为蛋白质-01的A2AP(alpha-2-antiplasmin,α2-抗纤溶酶),图10b表示作为蛋白质-02的AMBP,图10c表示作为蛋白质-03的AFP(alpha-fetoprotein,甲胎蛋白),图10d表示作为蛋白质-04的CATB(cathepsin B,组织蛋白酶B),图10e表示作为蛋白质-05的FETUA(alpha-2-HS-glycoprotein,α2-HS-糖蛋白),图10f表示作为蛋白质-06的FINC(fibronectin,纤维连接蛋白),图10g表示作为蛋白质-07的ITIH1(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1,间α-胰蛋白酶抑制因子重链H1),图

10h表示作为蛋白质-08的ITIH3 (Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3, 间 α -胰蛋白酶抑制因子重链H3), 图10i表示作为蛋白质-09的PLGA (Plasminogen-related protein A, 血纤维蛋白溶酶原相关蛋白A), 图10j表示作为蛋白质-10的THRB (Prothrombin, 凝血酶原)。

具体实施方式

[0029] 本发明的依据在于, 通过利用MRM技术以肝硬变、肝癌患者治疗前及治疗后的样本为对象依次筛选并检验差异性表达的蛋白质/缩氨酸表达量, 从而找到组之间呈现显著性差异并作为用于肝癌诊断的生物标记物很有效的蛋白质/缩氨酸。

[0030] 因此, 在一方面中, 本发明涉及一种肝癌诊断或肝癌预后评估的组合物或试剂盒, 该组合物或试剂包含针对选自IGFALS (Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit)、AMBP (Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)、CPB2 (Carboxypeptidase B2)、CHLE (Cholinesterase)、CLUS (Clusterin)、CNDP1 (Beta-Ala-His dipeptidase)、C06 (Complement component C6)、CPN2 (Carboxypeptidase N subunit 2)、FA11 (Coagulation factor XI)、FINC (Fibronectin)、HGFA (Hepatocyte growth factor activator)、IBP3 (Insulin-like growth factor-binding protein 3)、IGF2 (Insulin-like growth factor II)、ITIH1 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1)、KAIN (Kallistatin)、KLKB1 (Plasma kallikrein)、LCAT (Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase)、PLGA (Plasminogen-related protein A)、PLMN (Plasminogen)、THRB (Prothrombin)、VTDB (Vitamin D binding protein) 和VTNC (Vitronectin) 组成的组中的一个以上生物标记物的检测试剂。

[0031] 在本发明中, 肝癌或肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC) 是指在具有如酒精滥用、病毒性肝炎和代谢性肝疾患的危险因子的患者中发生的在肝组织自身发生的原发性恶性肿瘤。对于肝癌而言, 由于不存在纤维基质而发生出血和细胞坏死, 引起通向肝门静脉系统的血管浸润, 严重时会导致肝破裂和腹腔内血液渗出。这种肝癌与由于肝脏中发生的慢性炎症而导致肝组织再生结节并纤维化而最终呈现肝细胞损伤、瘢痕、肝功能衰减、腹水、出血性疾患、肝昏迷症状的肝硬变症或肝硬化症相区别。在肝癌患者的情况下通常具有肝炎 (inflammation) 和肝硬化 (fibrosis), 肝炎通过药剂而在大部分肝癌患者中被消除, 但肝硬化患者中的90%左右被诊断为肝癌, 因此区分肝硬化症和肝癌很重要。

[0032] 在本发明中, 用语“诊断”包括: 对特定疾病或疾患判定检查对象对疾患的感受性 (susceptibility); 判定目前是否具有特定疾病或疾患; 判断患有特定疾病或疾患的对象者的转变性 (transitional) 癌状态的动向、癌的阶段或发展状态或者判定癌对治疗的反应性; 或者进行therametrics (例如, 为了提供关于治疗功效的信息而对客体状态进行监测)。

[0033] 在本发明中, 预后评估包括判断在被诊断为肝癌并接受治疗之后是否恢复。

[0034] 在本发明中, 用语“用于诊断的生物标记物或诊断标记物 (diagnosis marker)”为能够将发生肝癌的患者与肝硬变患者、正常细胞患者或接受适当肝癌治疗的患者相区分来进行诊断的物质, 该用于诊断的生物标记物或诊断标记物包括: 与对照组的样本相比在来源于发生肝癌的患者的样本 (特别是血液) 中呈现浓度变化的蛋白质、来源于上述蛋白质的

聚缩氨酸、对上述蛋白质进行编码的基因或其片段。

[0035] 与对照组的样本相比较,本发明的生物标记物的量在肝癌患者的血液中增加,例如能够利用表1中记载的ID来在UniProt数据库(www.uniprot.org)中检索本发明的生物标记物的序列。

[0036] 本发明的标记物可使用一个或两个以上的标记物的组合,例如可使用两个、三个、四个或五个标记物的组合,并且能够与现有的标记物(例如AFP)和/或诊断方法(例如肝超声波等)一同使用。本领域技术人员可通过如本实施例中记载的方法,即可通过如使用包括正常人和患者的对象体的生物学样本的分析和/或逻辑回归(Logistic regression)分析的方法,来筛选满足所期望的敏感度和特异性的标记物的组合。

[0037] 在本发明的一实施方式中,尤其使用ALS、CBPB2、CLUS、CNDP1、CPN2、FA11、FINC或HGFA中的一个以上的标记物,上述标记物在如本发明的实施例所记载的一次及二次样本组中均以较高的AUC(曲线下面积)值在对照组和肝癌患者中呈现差异性表达。

[0038] 在本发明的另一实施方式中,单独使用FINC标记物,或者使用THRB和FINC的组合或ALS、ITIH1、THRB和FINC的组合。

[0039] 在本发明的另一实施方式中,用于判断在肝癌治疗后是否恢复的生物标记物选自由THRB、FINC、ITIH1、IBP3、PLMN、CBPB2和PLGA组成的组,上述标记物或标记物的组合具有特别高的AUC值,但并不排除其他标记物组合。

[0040] 在另一实施方式中,本发明的一个以上的标记物可与AFP标记物组合使用。

[0041] 可通过定量或定性分析,基于针对是否存在核酸(特别是蛋白质和/或mRNA(信使核糖核酸))的检测和/或其表达量自身、表达量的变化、表达量差异的水平而检测本发明的标记物。

[0042] 在本发明中,检测是指包括定量和/或定性分析的检测,并且包括关于存在、不存在的检测和表达量检测,这种方法在本领域中已公知,本领域技术人员为了实施本发明而能够选择适当的方法。

[0043] 这种本发明的标记物检测可以是以标记物的功能特征和/或抗原特征为基础的检测。

[0044] 在一实施方式中,可通过检测标记物的活性或功能,或通过基于对蛋白质进行编码的核酸(特别是在mRNA和/或蛋白质)的水平而使用特异性地相互作用的物质来检测本发明的标记物。

[0045] 在另一实施方式中,可通过检测来源于标记物蛋白质的相应缩氨酸,例如与表1-1及表1-2中记载的各标记物相应的缩氨酸来执行对本发明的标记物的检测。对一个蛋白质,可利用一个或两个以上的缩氨酸。

[0046] 在这种方面中,本发明的组合物中所包含的检测试剂为能够基于蛋白质或核酸水平而以多种方式通过定量或定性分析来检测本发明的标记物的试剂。

[0047] 在本发明的标记物的定量和定性分析中,可使用公知的对蛋白质或核酸进行定性或定量检测的多种方法。

[0048] 作为基于蛋白质水平的定性或定量检测方法,可使用诸如免疫印迹试验、ELISA、放射免疫分析、免疫扩散法、免疫电泳、组织免疫染色、免疫沉淀分析法、补体固定分析法、利用在溶液/悬浮液中与标记抗体的结合、质量分析器或使用抗体的蛋白质阵列等的方法。

[0049] 或者,作为基于核酸水平的定性或定量检测方法,可使用核酸转录及扩增方法、利用eTag系统、基于标记磁珠的系统、诸如核酸阵列的阵列系统等方法。

[0050] 这种方法为公知方法,例如可参照chip-based capillary electrophoresis: Colyer et al.1997.J Chromatogr A.781(1-2):271-69(芯片毛细管电泳:科利尔等,1997.色谱A杂志781(1-2):271-6);mass spectroscopy:Petricoin et al.2002.Lancet 359:572-77(质谱法;Petricoin等,2002.柳叶刀359:572-77);eTag systems:Chan-Hui et al.2004.Clinical Immunology 111:162-174(eTag系统:Chan-Hui等,2004.临床免疫学111:162-174);microparticle-enhanced nephelometric immunoassay:Montagne et al.1992.Eur J Clin Chem Clin Biochem.30:217-22(微颗粒增强免疫比浊分析:蒙塔等,1992.欧洲临床化学与临床生物化学杂志30:217-22)等。

[0051] 在本发明的一实施方式中,可利用质量分析法(Mass spectrometry)来检测标记物,该质量分析法可从试料中分离蛋白质或缩氨酸之后例如按照本实施例中记载的方式进行分析,并且例如可参照(Kim,et al.2010J Proteome Res.9:689-99(金等,2010蛋白质组学研究杂志9:689-99);Anderson,L et al.2006.Mol Cell Proteomics 5:573-88.(安德森,L等2006.分子细胞蛋白质组学5:573-88.)).在一实施方式中,例如使用利用诸如三重四级杆液相二级质谱(Triple Quadrupole LC-MS/MS)、QTRAP(线性离子阱质谱)等的质谱多反应监测(Multiple reaction monitoring,MRM)技术。MRM为能够定量且准确地多重测定诸如活体样本中存在的微量生物标记物等物质的方法,该方法利用第一质量过滤器Q1选择性地向碰撞管传递离子还原过程中生成的离子片段中的前体离子或母离子。接着,到达碰撞管的前体离子与内部碰撞气体进行碰撞而碎裂并生成产物离子或子离子后,向第二质量过滤器Q2传送,在该传送过程中向检测部只传递特定离子。MRM方法为能够以这种方式只检测所期望的成分信息的具有较高选择性及敏感度的分析方法。例如,可参照Gillette et al.,2013,Nature Methods 10:28-34(吉列等,2013,自然方法10:28-34)中记载的内容。

[0052] 在另一实施方式中,使用与各蛋白质或来源于对上述蛋白质进行编码的基因的mRNA特异性结合的结合制剂或包含该结合制剂的阵列。

[0053] 在又一实施方式中,可使用如ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay,酶联免疫吸附分析)、RIA(Radio Immuno Assay,放射免疫分析)等的三明治式免疫分析法。这种方法在与由例如玻璃、塑料(例如,聚苯乙烯)、多糖、尼龙或硝化纤维的固相基质制成的磁珠、膜、载片或微孔板结合的第一抗体中添加生物学样本之后,可通过与抗体之间的结合来定性或定量地检测蛋白质,其中,所述抗体由例如放射线物质(如³H或¹²⁵I)、荧光物质、化学发光物质、半抗原、生物素、地高辛(digoxigenin)等能够被直接或间接检测的标记物质所标记或与通过与基质的作用来进行发色或发光的诸如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、苹果酸脱氢酶等酶共轭。

[0054] 在另一实施方式中,能够使用可通过抗原抗体结合来简便地检测标记物的Ouchterlony(奥克特洛尼)平板、蛋白质印迹法、诸如Crossed IE(交叉免疫电泳)、Rocket IE(火箭免疫电泳)、Fused Rocket IE(融合火箭免疫电泳)、Affinity IE(亲和免疫电泳)的免疫电泳(Immuno Electrophoresis)。在Enzyme Immunoassay,E.T.Maggio,ed.,CRC Press,Boca Raton,Florida,1980(酶免疫分析,E.T.Maggio,男,CRC出版社,博卡拉顿,佛

罗里达,1980);Gaastra,W.,Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),in Methods in Molecular Biology,Vol.1,Walker,J.M.ed.,Humana Press,NJ,1984(Gaastra,W.,酶联免疫吸附分析(ELISA)、分子生物学方法,Vol.1,Walker,J.M.男,Humana出版社,新泽西,1984)等中记载了上述免疫分析或免疫染色方法。可通过分析因上述免疫分析过程而导致的最终信号强度,即,可通过进行与正常样本的信号对照,从而诊断是否发生疾患。

[0055] 这种方法中使用的试剂或物质为公知的试剂或物质,例如可使用特异性地结合于上述标记物的抗体、基质、核酸或缩氨酸适体、或者与上述标记物特异性地相互作用的受体、配体或辅因子。与上述本发明的标记物特异性地相互作用或结合的试剂或物质可与芯片方式或纳米粒子(nanoparticle)一同使用。

[0056] 此外,可使用基于核酸水平(特别是mRNA水平)的公知的多种方法对本发明的标记物进行定量和/或定性检测。

[0057] 作为基于核酸水平的定性或定量检测方法,例如为了进行基于mRNA水平的检测、表达量或图案的检测,可使用利用基于逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)/聚合酶链反应、竞争性RT-PCR、实时RT-PCR、核酸酶(Nuclease)保护分析(NPA)(例如核糖核酸酶(RNase)、S1核酸酶(S1nuclease)分析)、原位(in situ)杂交法、DNA微阵列、芯片或诺瑟杂交等的方式,这种分析法为公知的分析法,并且可使用市场上销售的试剂盒来执行这种分析法,本领域技术人员为了实施本发明而能够进行适当的选择。例如,诺瑟杂交具有能知晓细胞中存在的转录体的大小且能够使用多种探针的优点,NPA对多重标记物分析有用,原位(in situ)杂交法容易识别如mRNA的转录体在细胞或组织内的位置,逆转录聚合酶链反应对少量的样本检测有用。此外,可使用与来自对本发明的生物标记物蛋白质进行编码的基因的诸如mRNA或cRNA(互补核酸)等核酸特异性结合的结合制剂或包含该结合制剂的阵列。

[0058] 基于上述核酸水平的生物标记物检测方法中使用的试剂或物质为公知的试剂或物质,例如在用于测定mRNA的存在与否和通过逆转录(RT-PCR)测定该mRNA的量的方法中,检测试剂例如包括聚合酶、对本发明的标记物的mRNA特异性的探针和/或引物对。“引物”或“探针”是指能够与模板互补结合并具有能够使逆转录酶或DNA聚合酶开始模板复制的自由3末端氢氧化基(free 3'hydroxyl group)的核酸序列。本发明中使用的上述检测试剂可用如上所述的发色、发光或荧光物质进行标记,以便检测信号。在一实施方式中,为了检测mRNA,使用诺瑟杂交或逆转录PCR(聚合酶链式反应)。在后者即逆转录PCR的情况下,在分离试料的RNA特别是mRNA之后,由此合成cDNA,然后通过使用特定引物或引物与探针的组合,来检测试料中的特定基因,逆转录PCR为能够确定特定基因的存在/不存在或表达量的方法。例如在(Han,H.et al,2002.Cancer Res.62:2890-6)(韩,H等,2002.癌症研究进展.62:2890-6)中记载了这种方法。

[0059] 可根据检测所使用的方法,为了检测而直接或以三明治形式间接标记本发明的组合物中所包含的检测试剂。在直接标记方法的情况下,阵列等中使用的血清样本由如Cy3、Cy5的荧光标记所标记。在三明治方式的情况下,首先使未标记血清样本与附着有检测试剂的阵列反应而结合,然后通过使标的蛋白质与标记检测抗体相结合而进行检测。由于在三明治方式的情况下能提高敏感度和特异性,因此能够进行甚至pg/mL水平的检测。除此之外,放射线物质、发色物质、磁性粒子和高密度电子粒子等可被用作标记物质。荧光光度可使用共聚焦显微镜,例如可从Affymetrix,Inc.或Agilent Technologies,Inc等获得该荧

光光度。

[0060] 本发明的组合物进一步可包括结合分析中所需要的一个以上的附加成分,例如可进一步包括结合缓冲液、准备样本时所需要的试剂、采血用注射器或阴性和/或阳性对照组。

[0061] 包含如上所述的多种检测试剂的本发明的组合物可根据分析方式作为ELISA分析用、试纸快速检测试剂盒(dip stick rapid kit)分析用、MRM分析用试剂盒、微阵列用、基因扩增用或免疫分析用的组合物来提供,并且能够与分析方式相应地筛选适当的检测试剂。

[0062] 在一实施方式中,使用ELISA或试纸快速检测试剂盒,在该情况下,本发明的用于识别一个以上的标记物的抗体可附着在例如多重孔板的孔或玻璃片的表面或硝化纤维素的基质上。在试纸的情况下,作为POCT(Point of Care Test,床边检验)领域中广泛利用的技术为如下技术:本发明的用于识别生物标记物的一个以上的抗体被结合到如硝化纤维素的基质上,并且在将其与如血清的样本接触时,例如在将试纸的一末端浸入到血清样本中时,样本因毛细管现象而在基质中移动,从而在样本与基质中的抗体结合时以发色的方式检测标记物。

[0063] 在另一实施方式中,提供以缩氨酸为核心的MRM试剂盒,对于MRM方式而言与前述说明的方式相同。MRM方法为利用用于选择性地识别特定蛋白质的缩氨酸的方法,与利用对温度、湿度等环境敏感的抗体的现有方法相比较,能够从活体样本中更稳定地检测标记物。例如,缩氨酸可使用本发明的表1-1和表1-2中记载的缩氨酸,在一个标记物中可使用一个或两个以上的缩氨酸。例如,相当于蛋白质的缩氨酸(其中,用文字氨基酸表示)为凝血酶原(THR B)-HQDFNSAVQLVENFCR、SGIECQLWR;纤维连接蛋白(FINC)-WCGTTQNYDADQKGEWTCIAYSQLR、HTSVQTTSSGSGPFTDVR;ITIH1-EVAFDLEIPK、LDAQASFLPK;IBP3-ALAQCAPPAVCAELVR;PLMN-LSSPAVITDK、EAQLPVIENK;CBPB2-DTGTYGFLPER、YPLYVLK;PLGA-DVVLFEK。

[0064] 在另一实施方式中,可以以包含微阵列的阵列或芯片形式提供试剂盒。在如玻璃或消化纤维素的基质表面上可附着有检测试剂,作为阵列制造技术可参照Schna等,1996, Proc Natl Acad Sci (美国科学院学报)USA.93(20):10614-9;Schna等,1995, Science (科学)270(5235):467-70;以及U.S.Pat.Nos.5,599,695,5,556,752或5,631,734。可附着在阵列上的检测试剂例如包括能够与蛋白质特异性结合的抗体、抗体片段、适体(aptamer)、亲和性多聚体(avidity multimer)或肽模拟物(peptidomimetics)。

[0065] 在另一方面中,本发明涉及一种包含生物标记物的检测试剂的肝癌诊断或肝癌预后分析用的试剂盒或系统。检测试剂和使用这种试剂的方法如上所述。这种能够检测本发明的标记物的试剂可被分注到经划分后的容器中而存在,从这种含义来看,本发明还涉及一种划分本发明的标记物检测试剂并包含的装置/器具。此外,试剂盒可进一步包括使用指南。

[0066] 在又一方面中,本发明涉及一种肝癌标记物检测方法,该方法为了提供肝癌诊断或肝癌预后所需要的信息而包括以下步骤:从来源于对象体的生物学样本中检测是否存在选自自由ALS(Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit)、AMBP(Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor)、CPB2(Carboxypeptidase

B2)、CHLE (Cholinesterase)、CLUS (Clusterin)、CNDP1 (Beta-Ala-His dipeptidase)、C06 (Complement component C6)、CPN2 (Carboxypeptidase N subunit 2)、FA11 (Coagulation factor XI)、FINC (Fibronectin)、HGFA (Hepatocyte growth factor activator)、IBP3 (Insulin-like growth factor-binding protein 3)、IGF2 (Insulin-like growth factor II)、ITIH1 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1)、KAIN (Kallistatin)、KLKB1 (Plasma kallikrein)、LCAT (Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase)、PLGA (Plasminogen-related protein A)、PLMN (Plasminogen)、THR3 (Prothrombin)、VTDB (Vitamin D binding protein) 和VTNC (Vitronectin) 组成的组中的一个以上生物标记物的核酸和/或蛋白质以及/或者检测其浓度

[0067] 这种本发明的肝癌标记物检测方法进一步包括以下步骤:将关于上述核酸或上述蛋白质的水平或存在的检测结果和对照组样本的与该标记物相应的结果进行比较;以及通过与上述对照组样本进行比较,在上述对象体样本的核酸或蛋白质浓度具有变化或者上述核酸或蛋白质的存在与否具有变化的情况下,将该对象体样本判定为肝癌。

[0068] 在本发明的方法中,为了进行对肝癌患者的诊断而用作对照组的样本可使用来源于正常人、肝炎患者、肝硬化患者或治疗肝癌后痊愈的患者(维持肝硬化)的样本。与这种对照组患者相比,在肝癌患者中本发明的标记物的表达量增加。

[0069] 在本发明的方法中使用的生物学样本使用全血、血清或血浆。

[0070] 在与来源于正常人的样本和肝硬化患者进行比较时,在肝癌患者中本发明的标记物的表达量增加。

[0071] 因此,由于在本发明的方法中肝癌诊断能够区分肝硬化和肝癌患者,从而能够诊断从肝硬化向肝癌发展的患者,特别是对早期诊断有利。在该情况下,作为对照组可包括来源于肝硬化患者的样本,来源于肝硬化患者的样本包括维持肝硬化的肝癌痊愈患者。此外,本发明的方法对肝癌治疗后恢复的患者的判别也有利。在该情况下,来源于相同患者的肝癌样本可被用作对照组。

[0072] 在本发明中,生物学样本是指包含能够检测生物标记物的一个以上的成分的物质或物质的混合物,该生物学样本包括生物体特别是体液,尤其包括全血、血浆、血清或尿液,但并不限于此。

[0073] 在本发明的一实施方式中,尤其适用ALS、CBPB2、CLUS、CNDP1、CPN2、FA11、FINC或HGFA中的一个以上的标记物,上述标记物在如本发明的实施例中记载的一次及二次样本组中均以较高的AUC表示对照组和肝癌患者的差异性表达。

[0074] 在本发明的另一实施方式中,用于判断在治疗后是否恢复的生物标记物可选自由THR3、FINC、ITIH1、IBP3、PLMN、CBPB2和PLGA组成的组。

[0075] 在本发明的另一实施方式中,可单独使用FINC标记物,或者可使用THR3和FINC的组合或ALS、ITIH1、THR3和FINC的组合。

[0076] 在另一实施方式中,本发明的一个以上的标记物可通过与AFP标记物组合来使用。

[0077] 本方法中使用的对照组或参照组、生物标记物的检测方法以及该方法中使用的试剂及用于判断的数据分析方法可参考前述说明的内容和后述说明的内容。

[0078] 本发明的方法可利用前述提及的方法或使用检测试剂的方法来执行,特别是可以以蛋白质或核酸微阵列分析法、核酸扩增、抗原抗体或质量分析方式实施本发明的方法。

[0079] 本发明的方法作为对象包含哺乳类特别是人类。人类对象体包括怀疑患有HCC的人、肝炎、肝硬化患者或是否因未被怀疑的人而需要进行HCC诊断的人。在一实施方式中,能够对具有肝疾患关联症状例如腹部疼痛、肥大肝、腹水、黄疸、肌肉衰弱、肝炎(例如,HCV肝炎)或食道静脉曲张等且用于确定对象体是否患有HCC的其他症状的对象体执行本方法。在其他实施方式中,人类对象体为外观上正常且未呈现HCC症状的对象体。

[0080] 在其他实施方式中,由于对象体的血浆AFP浓度有可能较低或正常,因此该对象体也可以是无法以AFP为基准被诊断为HCC的人。在这种情况下,AFP的血清浓度可以是约0 μ g/l(非检测)至20 μ g/l,例如可以是0 μ g/l(非检测)至5 μ g/l、5 μ g/l至10 μ g/l、10 μ g/l至15 μ g/l或者15 μ g/l至20 μ g/l。

[0081] 在使用上述方法而使用包含两个以上的标记物组合的情况下,可生成包括表达谱(profile)即与样本中的标记物蛋白质表达相关联的定量信息的数据组。

[0082] 在利用标记物获取表达谱之后,通过与参照组或对照组的结果比较来判断对象体的样本是否为肝细胞癌。作为对照组或参照组,可以是阴性对照组的正常样本或者来源于患上肝细胞癌后已治好的患者的样本、来源于作为阳性对照组且通过本发明的标记物之外的方法判定为肝细胞癌的患者样本、来源于肝硬化患者的样本、来源于肝炎患者的样本。

[0083] 在本发明的一实施方式中,来源于正常人的样本、来源于判定为肝细胞癌后接受治疗的患者的样本被用作对照组或参照组,并且在获取到的表达谱的比较中被使用。

[0084] 在对照组与利用样本的试验组之间的标记物表达谱的比较中可使用公知的方法。例如,可参照表达谱的数字图像比较、对表达数据利用DB的比较或者美国专利6,308,170和6,228,575中记载的比较。

[0085] 可利用公知的数据分析方法对通过本发明的标记物检测获取到的表达谱进行处理。例如,该数据分析方法可使用最近邻分类器(nearest neighbor classifier)、偏最小二乘法(partial-least squares)、SVM(支持向量机)、AdaBoost(一种迭代算法)和基于聚类的分类(clustering-based classification)方法,例如可参照包含Ben-Dor等(2007, J.Comput.Biol.(计算生物学杂志)7:559-83)、Nguyen等(2002,Bioinformatics(生物信息学)18:39-50)、Wang等(2003,BMC Bioinformatics(BMC生物信息学)4:60)、Liu等(2001, Genome Inform.Ser.Workshop Genome Inform.12:14-23)、Yeang等(2001, Bioinformatics 17Suppl1:S316-22)和Xiong(2000,Biotechniques(生物技术)29(6):1264-8,1270)等的文献。

[0086] 此外,为了判定为通过本发明的标记物检测到的结果对肝细胞癌的判别有益,可使用多种统计处理方法。在一实施方式中,作为统计学处理方法使用逻辑回归(logic regression)方法,可参照Ruczinski,2003,Journal of Computational and Graphical Statistics 12:475-512(Ruczinski,2003,计算与图解统计学杂志12:475-512)。上述方法与分类器被提供为二叉树的CART方法类似,但各节点使用通过CART生成的“and”算子和相对更一般的与特性相关联的Boolean算子。作为其他分析方法的例,可列举最近缩小重心(nearest shrunken centroids)(Tibshirani.2002PNAS(美国科学院学报).99:6567-72)、随机森林(random forests)(Breiman.2001.Machine Learning(机器学习)45:5-32)和MART(Hastie.2001.The Elements of Statistical Learning(统计学习基础),Springer)。

[0087] 在一实施方式中,为了通过统计处理诊断为HCC,可确定关于试验物质与对照组之间的显著差异的可靠程度。统计处理中使用的元数据为对各标记物进行二重、三重或多重分析的值。

[0088] 这种统计学分析方法在通过生物标记物以及临床和遗传数据的统计学处理而进行临床上的显著判断时非常有用。

[0089] 本发明的方法在判断HCC的严重程度时可被使用。例如,可通过与阳性对照组及阴性对照组的表达谱相比较,被判断为轻度HCC、中度HCC或重度HCC。并且,可通过对规定HCC群落执行标记物表达谱分析,从而以表达谱结果为依据按照规定基准进行分类。也可以利用这种方式且通过早期发现不进行如磁共振成像(MRI)的高价检查。

[0090] 在另一实施方式中,在特定期间例如一年内可执行数次本方法,并且在表达图案的变化推移监测中可使用本方法。可根据标记物的种类而将表达的增加或减少与HCC的状态相关联。可通过与针对相同对象体的以前的检查数值或对照组的数值相比较,判断HCC发病、浸渍、恶化等时使用本方法。可以以HCC标记物在时间流逝下的变化为依据,采取用于阻止向肝细胞癌或重度肝细胞癌发展的预防措施。为了确诊HCC,生物标记物可作为辅助单元来使用,并且能够与例如AFP检查、超声波检查、计算机轴向断层摄影(computerized axial tomography (CT scan,CT扫描))检查或磁共振成像(magnetic resonance imaging (MRI))检查的其他诊断方法一同使用该生物标记物。

[0091] 以下,为了有助于理解本发明而提供实施例。但是,下述实施例仅为了更容易理解本发明而提供的,本发明并不限定于下述实施例。

[0092] 实施例

[0093] 实施例1:本发明中使用的临床样本信息

[0094] 本试验根据首尔大学医学研究伦理审查委员会允许的协议而执行,并且从各患者取得了基于充分说明的书面同意,临床信息如下所示。

[0095] 为了选定标记物候选群且为了从正常人和肝癌患者的合并(pooling)样本中选定呈现表达差异的蛋白质候选群,使用正常人60名(男/女=41/19)和肝癌患者60名(男/女=42/18)的样本进行了研究。实际上,为了应用及分析个别样本,一次样本组使用了肝硬化患者30名、肝癌治疗前患者30名、肝癌治疗后痊愈的患者30名的样本,二次样本组使用了肝硬化患者50名、肝癌治疗前患者50名、肝癌治疗后痊愈的患者50名的样本。在相同患者中提取肝癌治疗前和治疗后的样本,并且仅使如下肝癌患者的样本包含在分析中:即在治疗肝癌前采取血清样本之后,进行肝癌治疗,然后以六个月以上的跟踪资料(follow-up data,随访数据)为依据未复发或转移肝癌,且完全治愈的恢复健康的肝癌患者的样本。

[0096] 实施例2:用于选定标的候选群的数据挖掘

[0097] 靶候选群以如下方式选定。利用目前与肝疾患相关联的、作为最综合资源(comprehensive resource)的肝阿特拉斯(Liver Atlas)数据库,来确保肝癌早期诊断蛋白质标记物候选群。在肝阿特拉斯(Liver Atlas)数据库中被皆知为与肝疾患相关联的蛋白质为总计50,265个,为了在该蛋白质中只选定能够从血液内检测到的蛋白质,只筛选能够分泌到血液内或具有能够分泌的可能性的蛋白质(Uniprot database(蛋白质数据库)基准),其结果选定了总计1,683蛋白质。最后,为了利用质量分析装置只选定能够检测到的蛋白质,利用四个彼此不同的缩氨酸MS/MS库源(NIST Ion-Trap、NIST Q-TOF、ISB human

plasma(人血浆)、Home made library(国产图书馆),来只选定存在缩氨酸MS/MS数据的蛋白质,其结果最终选定了总计960个蛋白质。接着,以如下方式执行能够检测到的靶候选群的选定。实际上,为了利用质量分析装置只选定能够检测到的靶候选群,以合并正常组60名和HCC组60名的样本为对象,通过MRM分析只选定能够正常检测到信号的缩氨酸,其结果最终选定了537个蛋白质和1316个缩氨酸。

[0098] 实施例3:通过MRM分析导出靶候选群

[0099] 实施例3-1:准备血清样本

[0100] 以如下方式准备实验中使用的血清样本。利用BD Vacutainer血清分离管 (serum separation tube) (BD,USA) 进行采血 (Silica clot activator (二氧化硅促凝剂), 10mL, 16X 100mm; Product number (产品号) = #367820)。在抽取的血液中添加苯甲基磺酰氟 (PMSF) 以使最终达到1.0mM。在进行10次左右的反相混合 (inverting mix) 之后,在3000rpm下进行10分钟的离心分离 (维持4℃) 而收集上层液 (经颜色观察后,不使用溶血后的红色样本)。

[0101] 在1.5mL eppendorf管中分别分注100μL的上层液,并分注后立即放置在冰块上,然后在管上进行标注 (进行标注时对样本组记入相应的代码 (例如,NC-01、MC-01、PD-01等))。然后,在-80℃下即时保管。上述步骤在冰块上实施,并且在采血后一个小时内均结束。

[0102] 实施例3-2:血清蛋白质的消耗 (depletion) 处理

[0103] 为了发掘血液内以低浓度存在的标记物,首先实施如下的消耗过程:即去除在血液内以高丰度 (high-abundant) 存在的六种蛋白质 (albumin (血浆蛋白)、IgG、IgA、haptoglobin (结合珠蛋白)、transferrin (铁传递蛋白)、alpha-1-antitrypsin (α-1-抗胰蛋白酶))。通过去除六种多量蛋白质,从而在血液内去除总蛋白质质量 (mass) 的85%左右,只剩下相当于剩余15%蛋白质质量的蛋白质,并在分析中使用该剩余蛋白质。关于消耗,按照制造公司的方法利用MARS (Multiple affinity removal system,多重亲和去除系统) 来使血液中量最多的六种蛋白质结合到吸附柱而去除,并且通过使未结合的少量存在的蛋白质洗脱而在分析中使用。

[0104] 实施例3-3:血清蛋白质的缩氨酸化

[0105] 对上述消耗过程之后获得的血清样本进行浓缩 (w/3K filter, w/3K过滤器), 然后通过BCA (Bicinchoninic acid, 二喹啉甲酸) 分析方式对蛋白质浓度进行定量。在采取100μg血清样本之后,利用最终浓度为6M的尿素/20mM的DTT (二硫苏糖醇) 进行处理 (Tris pH 8.0, 三羟甲基氨基甲烷pH 8.0), 然后在37℃下进行60分钟的繁殖。在进行最终浓度为50mM的IAA (Iodoacetamide, 碘乙酰胺) 处理之后,在常温下进行30分钟的繁殖。进行100mM的三羟甲基氨基甲烷pH 8.0处理以使尿素的浓度为0.6以下。在进行胰蛋白酶处理以使胰蛋白酶和血清浓度比例为1:50之后,在37℃下进行16小时的繁殖。在进行处理以使甲酸溶液的浓度为5%之后,实施下述脱盐过程。

[0106] 实施例3-4:血清蛋白质的脱盐

[0107] 通过在OASIS吸附柱 (Waters,USA) 中滴入三次60%ACN/0.1%的甲酸1mL而实施活性化。通过在OASIS吸附柱中滴入五次0.1甲酸1mL而实施平衡化 (equilibration)。加入缩氨酸样本,并通过滴入五次0.1甲酸1mL而进行清洗。通过进行40%ACN/0.1%甲酸1mL和

60%ACN/0.1%甲酸1mL的处理而使缩氨酸被洗脱(elution)。在-70℃下冷冻一小时以上之后,通过真空离心法(Speed-vac)使其干燥。在Sol A缓冲器(3%ACN/0.1%formic acid, 3%ACN/0.1%蚁酸)50μL中融化经干燥的缩氨酸样本,然后在15,000rpm下进行60分钟的离心分离,仅将其中的50μL移入到小玻璃瓶中而实施分析。

[0108] 实施例3-5:MRM分析

[0109] 出于MRM分析目的,为了选定能够以如实施例2那样选定的537个蛋白质和1316个缩氨酸为对象进行具有再现性的检测(Technical reproducibility,技术可重现性)并且呈现正常组与HCC组之间的表达差异的靶,分别制作按每组20名将正常组60名合并(pooling)为三组的样本、按每组20名将HCC组60名合并为三组的样本,由此如上述那样按每组三次利用MRM进行反复分析。

[0110] MRM分析通过对各标的蛋白质使用Skyline(<http://proteome.gs.washington.edu/software/skyline>)而筛选MRM分析用缩氨酸和片段离子。Skyline为MRM方法开发及分析用的开源软件(Stergachis AB等,2011,Nat Methods(自然方法)8:1041-1043)。

[0111] 即,在Skyline中以FASTA格式输入前述的蛋白质序列之后,将其设计为缩氨酸而生成产物离子列表,并利用MRM对该产物离子列表进行监测。在转变选择中使用的缩氨酸过滤器条件如下所述:最大长度为30个缩氨酸,最小长度为六个氨基酸,不包括重复的精氨酸(Arg,R)或赖氨酸(Lys,K)。如果甲硫氨酸(Met,M)也包含在缩氨酸中,则因可变形性而去除甲硫氨酸。在精氨酸或赖氨酸之后出现的情况下也未使用脯氨酸,在包含组胺酸(His,H)的情况下虽然电荷变更但使用了脯氨酸。

[0112] 在满足这种条件的缩氨酸作为Q1转变来使用。四倍体(Quadruple)1执行仅使特定Q1m/z经过的过滤器功能。经过Q1过滤器的前体离子(precursor ion)在四倍体(Quadruple)2(collision cell,碰撞池)中因电能而引起单片化(fragmentation)或被分解为子离子(product ion)。关于该子离子,可通过如四倍体1(Q1)那样执行过滤功能的四倍体3(Q3)仅使特定子离子经过。经过四倍体3(Q3)的离子在检测器(detector)中被转换为数字信号而呈现为峰值色谱,并且通过分析该峰值面积而执行相对及绝对定量分析。为了进行MRM、分析,在Analyst(AB SCIEX,USA)中输入包含这种信息的文件之后,利用不定期(nonscheduled)MRM方法进行分析。MRM结果被生成为wiff和wiff.scan文件,并利用mzWiff将该MRM结果变换为mzXML格式,并且为了进行MRM数据处理而将该mzXML格式输入到Skyline,由此求出MRM转变的峰值强度。图1示意性地表示该过程。

[0113] 在以定量性确保为目的,使用已知浓度的特定缩氨酸来分析所有MRM时,会经过标准化为该缩氨酸的峰值面积值的操作,在此将相应的缩氨酸称为内部标准缩氨酸,该内部标准缩氨酸为具有包含同位素的氨基酸的缩氨酸。在本研究中,利用人类蛋白质组中不存在且来源于E.coli的作为β-半乳糖苷酶(lacZ)的重标记(heavy-labeled)缩氨酸的LNVENPK来分析所有样本时,通过注入5-fmol的相同的内部标准缩氨酸,来经过将从MRM分析得到的所有靶缩氨酸的峰值面积值标准化为该内部标准缩氨酸的峰值面积值的操作。

[0114] 如此,为了通过半定量(Semi-quantitative)MRM分析,只选定能够用质量分析装置(MRM-technique,MRM-技术)进行再现性检测的蛋白质,按每组反复分析三次之后,从两组(正常组或HCC组)中的至少一侧组中只选定%CV值为20以内的靶,其结果利用具有再现

性的靶选定347个蛋白质和754个缩氨酸。

[0115] 之后,为了选定呈现正常组与HCC组之间的表达差异的靶以作为被检测为具有再现性的靶对象,确认组之间的p值(p-value,假定值)及倍数变化水平(fold-change level)。在以具有再现性(Reproducible)的靶(347个蛋白质和754个缩氨酸(peptides))为对象,通过正规性检验(Normality test,Shaipro-Wilk)追随正态分布(p值>0.05)的情况下,利用作为参数方法的独立T检验(T-test)进行分析,在未追随正态分布的情况下(p值≤0.05),利用作为非参数方法的曼-惠特尼检验(Mann-Whitney test)进行分析。在独立T检验的情况下,通过等分散性检验(Levene's test,Levene检验)划分为追随等分散性的情况(p值>0.05)和未追随的情况(p值≤0.05)来确认p值,由此通过独立T检验和曼-惠特尼检验来确认靶为呈现正常组与HCC组之间的显著差异(p值≤0.05)的靶蛋白/缩氨酸。

[0116] 此外,进一步选定呈现正常组与HCC组之间的倍数变化水平增加或减少为1.5倍以上的图案的蛋白质标记物候选群。由此,确认正常组与HCC组之间的p值为0.05以下的蛋白质为195个、缩氨酸为443个,并且确认1.5倍数变化以上的蛋白质为191个、缩氨酸为389,由此最终将227个蛋白质和492个缩氨酸选定为靶候选群。

[0117] 接着,为了确认已选定的227个蛋白质、492个缩氨酸是否在整个人类蛋白质组中为唯一的缩氨酸,利用NCBI的BLAST搜索程序(BlastP search program)来确认是否为唯一缩氨酸。由此,去除相当于不唯一的37个缩氨酸的15个蛋白质,并且最终作为呈现正常组与HCC组之间的显著差异的单独缩氨酸的靶候选群,最终选定216个蛋白质、460个缩氨酸。

[0118] 实施例4:靶候选群标记物是否确认血液内源性缩氨酸

[0119] 以如下方式确认是否在血液内存在由实施例3选定的蛋白质及缩氨酸。

[0120] 因此,利用相当于216个蛋白质的SIS(stable-isotope labeled standard,稳定同位素标准)缩氨酸且利用将正常组60名和HCC组60名一起合并(pooling)的样本,来重新确认已选定的缩氨酸是否为实际血液内存在的缩氨酸。SIS缩氨酸为将位于缩氨酸C-末端的赖氨酸(Lys,K)或精氨酸(Arg,R)氨基酸上的¹²C和¹⁴N用¹³C和¹⁵N替代的缩氨酸。这是因为,虽然与血液内存在的内源性缩氨酸(endogenous peptide,内源性肽)相比存在质量值差异,但由于具有相同序列,因此缩氨酸的疏水性(hydrophobicity)相同,在与血液内缩氨酸相同的时间(RT)内被洗脱到色谱图上(参照图2)。

[0121] 在MRM分析时,为了确认是否在复合(Complex)血液样本中因除靶缩氨酸之外的其他缩氨酸而呈现信号干涉(interference)现象,确认SIS缩氨酸与血液内源性缩氨酸的子离子(Q3)的强度图案(intensity pattern)(图3)。

[0122] 为了判断是否产生信号干涉现象,利用AuDIT(Automated detection of inaccurate and imprecise transitions,不准确和不精确转换的自动检测)程序,来比较血液内缩氨酸和SIS缩氨酸的相对子离子强度(P-value threshold:0.05,P值阈值:0.05),并确认反复测定时是否规定地检测血液内缩氨酸和SIS缩氨酸的峰值面积值(CV threshold:0.2,CV阈值:0.2)。由此,在不存在信号干涉现象的情况下,作为能够定量的血液内源性靶蛋白质/缩氨酸最终选定了123个蛋白质和231个缩氨酸。

[0123] 实施例5:确认血液内源性缩氨酸的水平

[0124] 如实施例4所示那样,以能够定量的血液内源性靶(123个蛋白质和231个缩氨酸)为对象,确认血液内存在的浓度。通过对在合并正常组60名和HCC组60名的样本10μg中以3

点 (20nM、200nM、2000nM) 依次稀释并彼此混合231个SIS缩氨酸混合物的样本进行MRM分析, 从而一同确认关于血液内源性缩氨酸的信号和与该血液内源性缩氨酸互补的合成 (SIS) 缩氨酸的信号。

[0125] 通过仅以不存在干涉现象 (Interference) 的子离子 (Q3) 为对象, 分别求出关于血液内缩氨酸的峰值面积值和与该缩氨酸互补的SIS缩氨酸 (3-points, 三点) 的峰值面积值, 从而计算相对比率 (ratio), 并且在该相对比率乘以注入的SIS缩氨酸量, 最终确认关于靶缩氨酸的血液内水平 (参照图4)。

[0126] 对231个缩氨酸确认血液内水平, 其结果确认在血清中浓度最低的蛋白质为ISLR (Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat protein, 富含亮氨酸重复蛋白的免疫球蛋白超家族), 浓度为0.15-fmol/ μ g, 并且确认浓度最高的蛋白质为A2MG (Alpha 2macroglobulin, α 2巨球蛋白), 浓度为5.57-pmol/ μ g (Dynamic range (动态范围): 3.7×10^4 order) (图5)。

[0127] 测定血液内源性缩氨酸的浓度, 其结果确认血液浓度为20-fmol/ μ g, 测定到的少量 (Low-abundance) 靶为34个蛋白质和36个缩氨酸, 并且确认在20-fmol/ μ g与2000-fmol/ μ g之间测定到的中间量 (Middle-abundance) 靶为93个蛋白质和174个缩氨酸, 测定为2000-fmol/ μ g以上的高量 (High-abundance) 靶为11个蛋白质和22个缩氨酸 (图6)。

[0128] 实施例6: 通过应用实际个别样本来导出肝癌早期诊断标记物候补群

[0129] 由于肝硬化患者中90%左右被诊断为肝癌, 因此可分类为肝硬化患者为肝癌高危险群, 但是在肝癌诊断中利用的现有血清学检查 (AFP, PIVKA II) 的情况下, 具有诊断力 (敏感度: 30-40%) 较低的问题。因此, 如果可通过MRM法预先确认呈现肝硬化患者与肝癌患者之间的差异的蛋白质质量, 则能够预选早期诊断从肝硬化患者向肝癌患者发展的患者。

[0130] 以从血液中检验到的内源性缩氨酸为对象, 确定与该内源性缩氨酸互补的SIS缩氨酸注入浓度。在少量 (low abundance) 靶 (血液内水平 < 20-fmol/ μ g) 的情况下, 均统一注入20-fmol的SIS缩氨酸, 在中间量 (Middle-abundance) 靶 (20-fmol/ μ g < 血液内水平 < 2000-fmol/ μ g) 的情况下, 注入与血液内缩氨酸量相同的SIS缩氨酸量, 在多量 (High-abundance) 靶 (血液内水平 > 2000-fmol/ μ g) 的情况下, 均统一注入2000-fmol量的SIS缩氨酸。

[0131] 在测定为血液内水平最低的ISLR蛋白质的情况下, 以及在注入20-fmol的SIS缩氨酸的情况下, 按比血液内水平最多高1.3倍的量注入SIS缩氨酸, 在测定为血液内水平最高的A2MG蛋白质的情况下, 以及在注入2000-fmol的SIS缩氨酸的情况下, 按与血液内水平相比最多稀释为1/28左右的较低的量注入SIS缩氨酸 (图7)。

[0132] 如上述, 以最终检验到的靶候选群 (123个蛋白质、231个蛋白质) 为对象且以早期诊断为目的, 作为一次样本使用肝硬变患者30名、肝癌患者30名、肝癌发病后痊愈患者30名的样本, 作为二次样本使用与一次样本组独立的肝硬变患者30名、肝癌患者30名、痊愈患者30名的样本, 由此导出呈现三组差异的肝癌诊断用标记物。

[0133] 在以实验者无法确认患者群的方式进行致盲之后, 随意排列MRM分析顺序而进行分析, 并且对每个样本反复进行三次分析。在将由此获得的关于靶缩氨酸的峰值面积值和血液内缩氨酸的峰值面积值标准化 (normalization) 为与此互补的SIS缩氨酸的峰值面积值之后, 通过IBM SPSS statistics (版本21.0) 和GraphPad (版本6.00) 进行分析。

[0134] 实施例7: 导出肝癌早期诊断的单一标记物组

[0135] 由于现有的通过甲胎蛋白 (AFP) 进行的早期诊断检查难以区别慢性肝疾患 (慢性肝炎和肝硬化) 和肝癌, 从而无法用于肝癌早期诊断, 因此为了提供代替该甲胎蛋白的新的早期诊断标记物, 对 LC (肝硬化) 组与 HCC 组之间的比较和呈现 HCC 组与恢复 (Recovery) 组 (肝癌痊愈的 LC 组状态) 之间的表达差异的靶进行了分析。结果记载在下述表 1 中。

[0136] 为了以肝癌早期诊断为目的, 确认实际临床领域 (医院) 中能够应用的验证诊断力 (确认在独立样本组中是否具有相同的表达倾向性) 后的单一标记物候选群, 在用一次样本 (Training set, 训练组) 分析的结果和用二次样本 (测试组) 分析的结果中共同确认 AUC 值高的标记物。其结果, 最终确认在用一次样本 (Training set, 训练组) 分析的结果和用二次样本 (测试组) 分析的结果中共同呈现 LC 组与 HCC 组、HCC 组与恢复组之间的显著差异 (p 值 ≤ 0.05), 诊断力高的 (AUC 值 ≥ 0.700) 靶为 23 个蛋白质和来源于上述蛋白质的 51 个缩氨酸 (表 1-1 和表 1-2)。表 1-1 和表 1-2 表示对训练组/测试组进行个别样本分析之后 AUC 值为 0.700 以上的靶蛋白质和缩氨酸。在下述表中, 红色表示表达量在组之间比较中增加的情况, 蓝色表示表达量减少的情况。

[0137] [表 1-1]

[0138]

蛋白质名称 (23)	Uniprot ID (23)	氨基酸序列 (51)	训练集 (LC-30, HCC-30, 恢复-30)				测试集 (LC-30, HCC-30, 恢复-30)							
			组04 (LC vs HCC)		组05 (LC vs 恢复)		组06 (HCC vs 恢复)		组08 (LC vs HCC)		组09 (LC vs 恢复)		组10 (HCC vs 恢复)	
			区域	1-区域	区域	1-区域	区域	1-区域	区域	1-区域	区域	1-区域	区域	1-区域
胰岛素样生长因子结合蛋白复合物不稳定亚基	ALS	ANFVQLPR	.782	.208	.700	.300	.327	.673	.768	.232	.449	.551	.179	.821
胰岛素样生长因子结合蛋白复合物不稳定亚基	ALS	LEALPNSLLAPLGR	.826	.174	.731	.269	.326	.674	.755	.245	.486	.534	.197	.803
胰岛素样生长因子结合蛋白复合物不稳定亚基	ALS	LEYLLSR	.821	.179	.734	.286	.311	.689	.733	.267	.426	.574	.187	.813
胰岛素样生长因子结合蛋白复合物不稳定亚基	ALS	NLAAVAPGALGK	.817	.183	.723	.277	.348	.652	.769	.241	.439	.561	.187	.813
蛋白前AMBP	AMBP	AFIQLWADFVK	.769	.201	.506	.184	.388	.612	.749	.251	.476	.524	.237	.763
蛋白前AMBP	AMBP	TVAACNLPVR	.860	.140	.750	.250	.344	.656	.714	.288	.438	.562	.243	.757
按肽酶B2	CBPB2	DTGYGFLPVR	.812	.188	.656	.344	.282	.718	.712	.288	.432	.568	.234	.766
按肽酶B2	CBPB2	YPLVYLK	.853	.167	.648	.322	.283	.717	.829	.371	.418	.582	.289	.711
Cholinesterase	CHLE	IFFGVSEFGK	.873	.127	.818	.182	.359	.641	.711	.289	.373	.627	.180	.820
Cholinesterase	CHLE	YLTLNTESTR	.873	.127	.843	.187	.384	.616	.719	.281	.393	.607	.174	.826
Clusterin	CLUS	ASSHDLFQDR	.916	.084	.846	.164	.368	.632	.648	.352	.399	.611	.226	.774
Clusterin	CLUS	EQNAVNGVK	.929	.071	.877	.123	.368	.632	.685	.320	.386	.604	.214	.786
Beta-Ala-His dipeptidase	CNDP1	AHLDLEEVK	.583	.417	.508	.482	.397	.603	.685	.335	.382	.618	.220	.780
Beta-Ala-His dipeptidase	CNDP1	ALHQDLPNVHK	.793	.237	.832	.398	.331	.669	.687	.313	.386	.614	.179	.821
Complement component C6	CO6	ALNHLPLEYNSALYSR	.789	.231	.653	.347	.345	.655	.724	.276	.553	.447	.322	.678
Complement component C6	CO6	GGNQLYCVK	.762	.238	.681	.319	.356	.644	.704	.296	.542	.458	.341	.659
按肽酶N2	CPN2	LNNALSGLPQGVFGK	.866	.134	.854	.146	.348	.652	.664	.336	.501	.499	.312	.688
凝血因子XI	CPN2	TLNLAQNLIAQLPEELFHLPLSLQTLK	.907	.093	.878	.124	.352	.648	.672	.328	.493	.507	.281	.709
凝血因子XI	FALL	ALSGFLQSCR	.864	.136	.740	.260	.335	.665	.737	.263	.499	.501	.282	.748
凝血因子XI	FALL	DSVTIELR	.883	.117	.791	.206	.432	.568	.781	.219	.558	.472	.223	.777
甲胎蛋白	FETA	AENAVECFQIK	.667	.333	.567	.433	.420	.580	.729	.271	.550	.450	.339	.661
甲胎蛋白	FETA	GYQELLEK	.853	.367	.533	.487	.409	.591	.775	.225	.587	.413	.335	.665
纤维连接蛋白	FINC	GEWTCIAYSQLR	.911	.089	.598	.402	.254	.748	.916	.084	.549	.481	.119	.881
纤维连接蛋白	FINC	HTSVQITSSGGFFTDVSR	.901	.099	.591	.409	.267	.733	.920	.080	.553	.447	.111	.889
纤维连接蛋白	FINC	WCGTITQYVDADQK	.904	.098	.580	.420	.242	.758	.926	.074	.550	.420	.104	.898
肝细胞生长因子激活剂	HGFA	LCNIEPDER	.490	.510	.449	.551	.401	.599	.719	.281	.476	.524	.274	.726
肝细胞生长因子激活剂	HGFA	TIIDVTQIFGEEK	.806	.194	.644	.356	.357	.643	.672	.328	.394	.606	.262	.748

[0139]

[表1-2]

[0140]

蛋白质名称 (23)	Uniprot ID (23)	氨基酸序列 (51)	训练集 (LC-30, HCC-30, 恢复-30)						测试集 (LC-30, HCC-30, 恢复-30)					
			组04 (LC vs HCC)		组05 (LC vs 恢复)		组06 (HCC vs 恢复)		组08 (LC vs HCC)		组09 (LC vs 恢复)		组10 (HCC vs 恢复)	
			区域 1	区域 2	区域 1	区域 2	区域 1	区域 2	区域 1	区域 2	区域 1	区域 2	区域 1	区域 2
肝细胞生长因子激活剂	HGFA	VANYVDWNR	.761	.239	.548	.462	.260	.740	.659	.341	.457	.543	.311	.689
胰岛素样生长因子结合蛋白3	IBP3	ALAOAPPVAVCAELNR	.848	.152	.737	.263	.296	.704	.782	.218	.448	.552	.151	.849
胰岛素样生长因子结合蛋白3	IBP3	YGQPLPGYTIK	.840	.160	.748	.254	.304	.698	.748	.252	.489	.531	.183	.817
胰岛素样生长因子II	IGF2	GIVEECCFR	.814	.186	.877	.323	.323	.877	.746	.264	.413	.587	.168	.832
同c-胰岛素白抑制因子重链H1	ITH1	EVAFDLEIPK	.983	.017	.852	.148	.283	.717	.739	.261	.364	.636	.137	.863
同c-胰岛素白抑制因子重链H1	ITH1	LDAQSFLPK	.981	.019	.808	.192	.288	.712	.753	.247	.416	.584	.168	.832
同c-胰岛素白抑制因子重链H2	ITH2	TEVNVLPGAK	.926	.072	.858	.182	.301	.699	.786	.214	.374	.628	.109	.891
同c-胰岛素白抑制因子重链H2	ITH2	TILDDLK	.820	.174	.701	.269	.322	.678	.782	.238	.434	.566	.198	.802
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	FFSAQINR	.869	.131	.724	.276	.353	.647	.708	.292	.340	.600	.154	.840
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	FNISGVLDQLPR	.920	.080	.821	.179	.379	.621	.698	.304	.311	.689	.157	.843
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	FYLLALETFGK	.786	.244	.811	.359	.351	.649	.756	.244	.353	.647	.148	.852
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	LGFTDLFK	.888	.112	.748	.282	.343	.657	.694	.246	.384	.616	.208	.792
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	VGSALFLSHNLK	.814	.186	.863	.337	.367	.633	.791	.209	.347	.653	.114	.890
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	WADLSGITK	.888	.112	.749	.251	.397	.603	.717	.283	.336	.682	.164	.836
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	DSVTGTLFK	.859	.141	.811	.189	.412	.588	.628	.372	.373	.627	.190	.810
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	VLTPDAFVK	.867	.133	.816	.184	.401	.599	.660	.340	.350	.650	.206	.784
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	SSGLVSNAPQVQR	.853	.147	.832	.168	.454	.546	.741	.259	.368	.612	.208	.792
组织黏液素前体结合蛋白	KAIN	STELCGLWQGR	.930	.070	.800	.100	.366	.634	.703	.297	.431	.569	.158	.842
卵磷脂固醇酰基转移酶	PLGA	DVVLFEK	.927	.073	.833	.187	.299	.701	.717	.283	.480	.534	.280	.718
卵磷脂固醇酰基转移酶	PLGA	EAQLPVIENK	.899	.101	.744	.256	.219	.781	.708	.294	.470	.530	.282	.718
血纤维蛋白溶酶原	PLMN	LSSPAVIIDK	.883	.117	.748	.254	.286	.714	.764	.236	.483	.537	.166	.804
血纤维蛋白溶酶原	PLMN	HQDNSAVQLVENFCR	.870	.030	.847	.153	.260	.740	.810	.190	.433	.567	.086	.914
维生素D结合蛋白	VTDB	SQECQLWR	.967	.043	.766	.234	.290	.710	.802	.196	.448	.552	.116	.884
维生素D结合蛋白	VTDB	HLSLITLSNR	.881	.139	.736	.284	.371	.629	.673	.327	.417	.583	.210	.790
维生素D结合蛋白	VTDB	VLEPTLK	.892	.108	.758	.242	.356	.644	.693	.307	.437	.563	.231	.769
维生素D结合蛋白	VTDB	FEDGVLDFDPR	.876	.124	.817	.183	.343	.657	.649	.351	.349	.651	.224	.776

[0141] 实施例8:导出肝癌多重标记物

[0142] 如实施例7所示,在一次分析(Training set,训练集)结果和二次分析(Training

set,测试集)结果,以在LC组与HCC组、HCC组与恢复组中共同呈现高诊断力的23-蛋白质和51-缩氨酸为对象,通过多变量分析(Multi-variate Analysis,MA)进行多重蛋白质标记面板的建构及比较。

[0143] 利用作为统计分析法中的一个的逻辑回归法执行向一个面板结合的分析,其结果在比较LC组与HCC组之间时,确认四个缩氨酸面板(ALS+ITIH1+THRB+FINC)为呈现最高诊断力的组合,并且在HCC组与恢复组之间确认两个缩氨酸面板(THRB、FINC)为呈现最高诊断力的组合。具体而言,在比较LC组与HCC组之间时,确认经确认的四个缩氨酸面板的AUC值为0.994,这有可能在整个60名肝硬变患者中将57名肝硬变患者(准确度95%)诊断为肝癌患者,并且在60名肝癌患者中将58名(准确度96.7%)诊断为肝癌患者,因此确认利用四个缩氨酸(4-蛋白质)标记面板的诊断准确度为95.8%(图8)。此外,在该4-蛋白质(4-缩氨酸)中附加剩余19-蛋白质(47-缩氨酸)的情况下,确认能够制作无数个AUC为0.990以上的蛋白质组合。

[0144] 在比较HCC组与恢复组之间时,确认经确认的两个缩氨酸面板的AUC值为0.957(图9),这有可能在整个60名肝癌患者中将53名诊断为肝癌患者(准确度88.3%),并且在整个60名肝癌治疗后患者(肝硬变患者)中将52名(准确度86.7%)诊断为肝癌患者,因此确认利用两个缩氨酸标记面板的诊断准确度为87.5%。此外,在该2-蛋白质(2-缩氨酸)中附加剩余21-蛋白质(49-缩氨酸)的情况下,确认能够制作无数个AUC为0.950以上的蛋白质组合。

[0145] 实施例9:利用抗体进一步检验肝癌标记物

[0146] 可在蛋白质水平下检测本发明的标记物,蛋白质水平下的检测方法可列举本实施例中使用的MRM分析及使用抗体的分析,可仅使用一种分析即MRM分析得到本发明所期望的目的,或者为了重新确认而也可以使用两种方法。

[0147] 为了通过抗体分析进行重新确认,通过从作为肝癌诊断标记物的利用MRM分析(Peptide Level,缩氨酸水平)验证的23个蛋白质中筛选具有上位AUC值的七个蛋白质,从而进一步执行利用抗体的分析(表2)。

[0148] 由于抗体识别由整个蛋白质(whole protein)中的一部分残基组成的抗原,因此抗体选定基准使通过MRM分析的缩氨酸部分包含在抗体免疫原部分(或尽可能靠近),优先选定具有关于血浆/血清的免疫印迹试验结果的抗体以及存在单克隆抗原的抗体,并且对于A2AP(alpha-2-antiplasmin, α 2-抗纤溶酶)(Mouse monoclonal,小鼠单克隆)、AMBP(兔单克隆)、AFP(alpha-fetoprotein)(Mouse monoclonal)、FETUA(Rabbit monoclonal)、FINC(fibronectin,纤维连接蛋白)(Rabbit monoclonal)、ITIH1(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain,人间 α -胰蛋白酶抑制因子重链)(Mouse polyclonal)、ITIH3(Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3,人间 α -胰蛋白酶抑制因子重链H3)(Goat polyclonal,山羊单克隆)、PLGA(Plasminogen-related protein A,人纤溶酶原激活剂)(Rabbit polyclonal)、THRB(Prothrombin,凝血酶原)(Rabbit monoclonal)而言,利用括号内记载的抗体执行免疫印迹试验(Santa Cruz Biotechnology,USA)。

[0149] 因此,在每三个组(LC、HCC和恢复)中筛选12名的样本,其使用未用于一次及二次MRM分析的独立样本组。作为筛选的HCC/恢复组样本,筛选阶段I(Stage I)(肝癌初期)样本,并利用从对照组(loading control,负载控制)中测定到的O.D(吸光度)进行标准化,从而进行SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)凝胶间的偏差(Variation,变量)修正。作为对照组,

使用关于β肌动蛋白和铁传递蛋白的小鼠单克隆 (mouse monoclonal) 抗体。

[0150] 结果记载在图10中。这种结果表示可通过多种蛋白质分析方法对本发明的标记物进行分析。

[0151] 接着,以应用/利用到实际临床上为目的,对利用上述抗体的免疫印迹试验中的组之间区分力最高的靶蛋白质的一种 (FINC) 进一步进行ELISA分析 (Protein Level, Native form, 蛋白水平, 自然形式)。为了执行ELISA分析,在每三组 (LC、HCC, and Recovery) 中筛选20名的样本,该筛选只使用未用于一次及二次MRM分析的独立样本组。

[0152] 在按照制造工序的方法使用关于该靶蛋白质的一种 (FINC) 的ELISA (Usen Life Science Inc. Korea) 试剂盒进行分析的结果,样本组之间的表达状态在MRM分析及免疫印迹试验分析结果中均一致,在比较肝硬变群和肝癌群时,最终确认AUC值为0.832,在比较肝癌群和肝癌恢复群时,最终确认AUC值为0.658 (表2)。这种结果表示可通过如MRM、免疫印迹试验、ELISA的多种蛋白质分析试剂盒来开发并使用本发明的标记物。

[0153] [表2]ELISA分析信息

[0154] • ELISA分析结果总结

[0155]

蛋白质名称	Uniprot ID	测定敏感度	测定范围	标准样本范围	样本范围	缺失数据
Fibronectin	FINC	0.670 ng/mL	1.56-100 ng/mL	1.56-100 ng/mL	0.370-92.95	4

[0156] LC组vs.HCC组

AUC值	临界值	敏感性/特异性
0.832	8.95 ng/mL	65.0% / 94.1%

[0158] HCC组vs.Recovery组

AUC值	临界值	敏感性/特异性
0.658	4.44 ng/mL	85.0% / 42.1%

用于转换的MRM

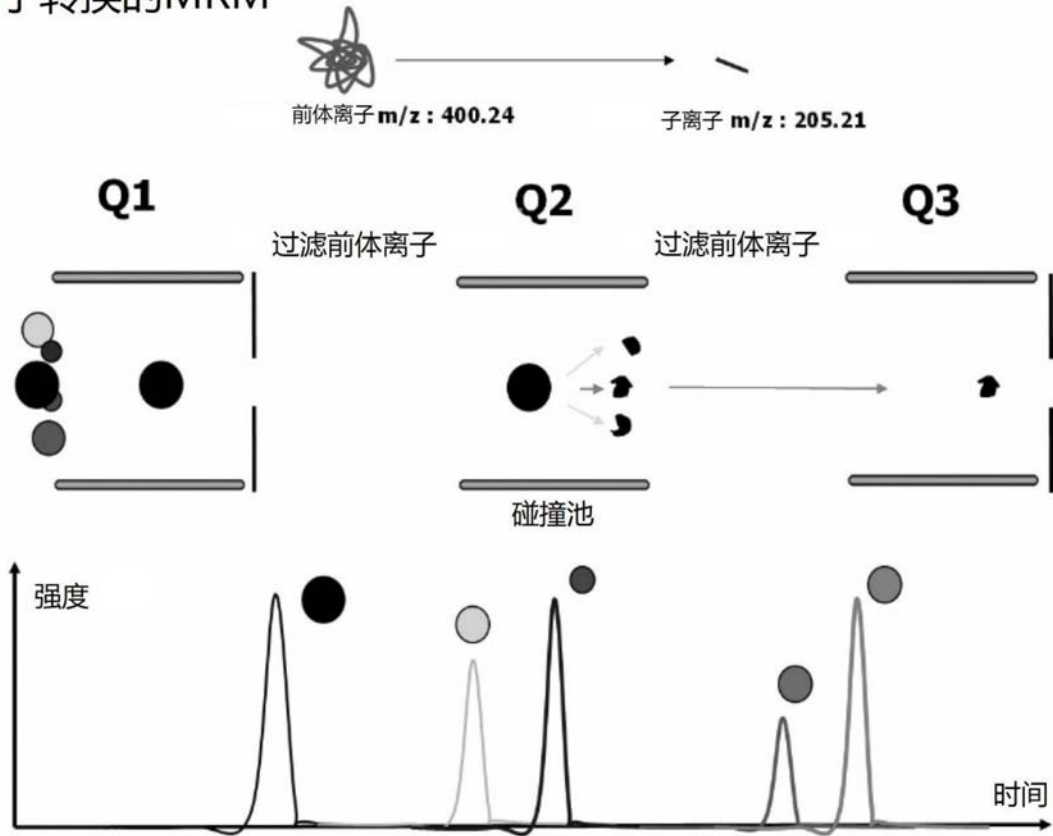


图1

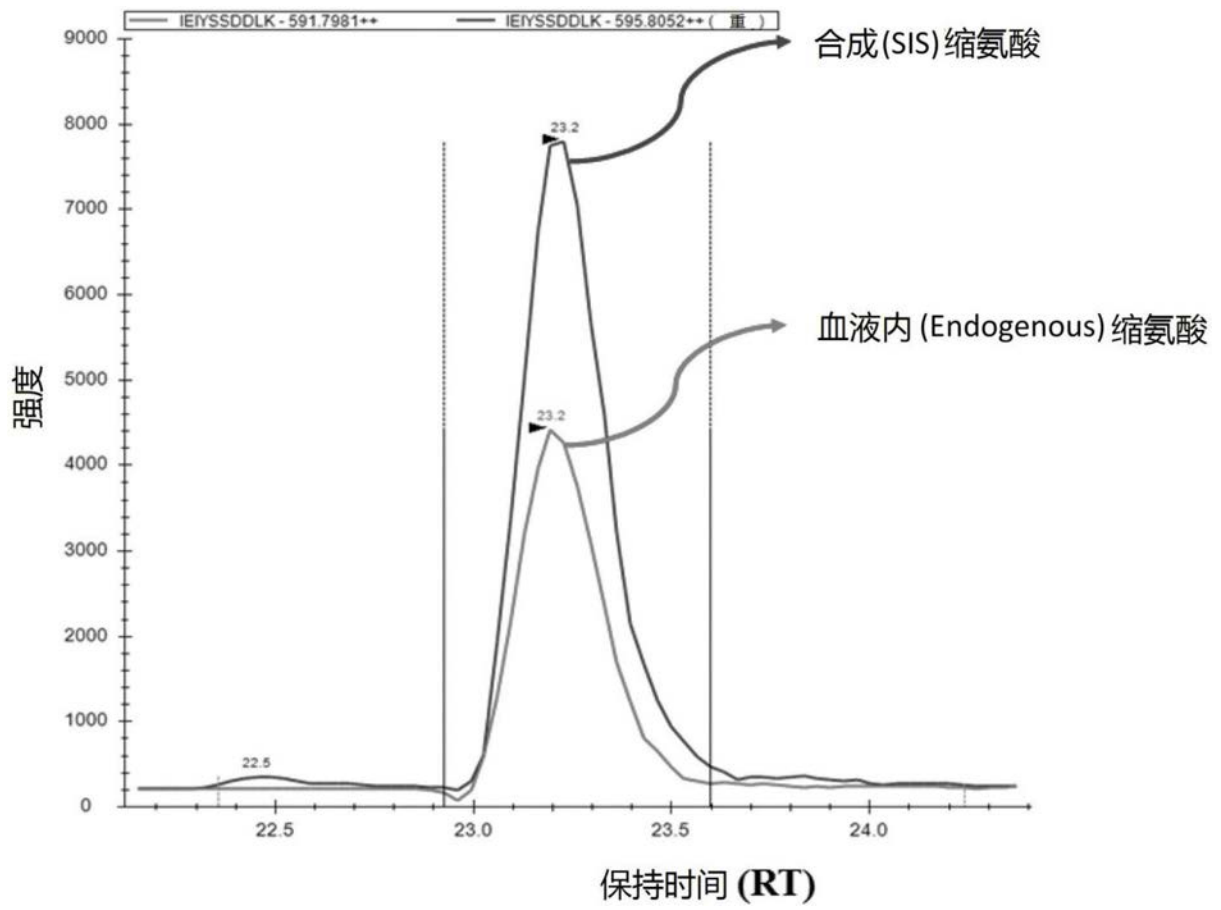


图2

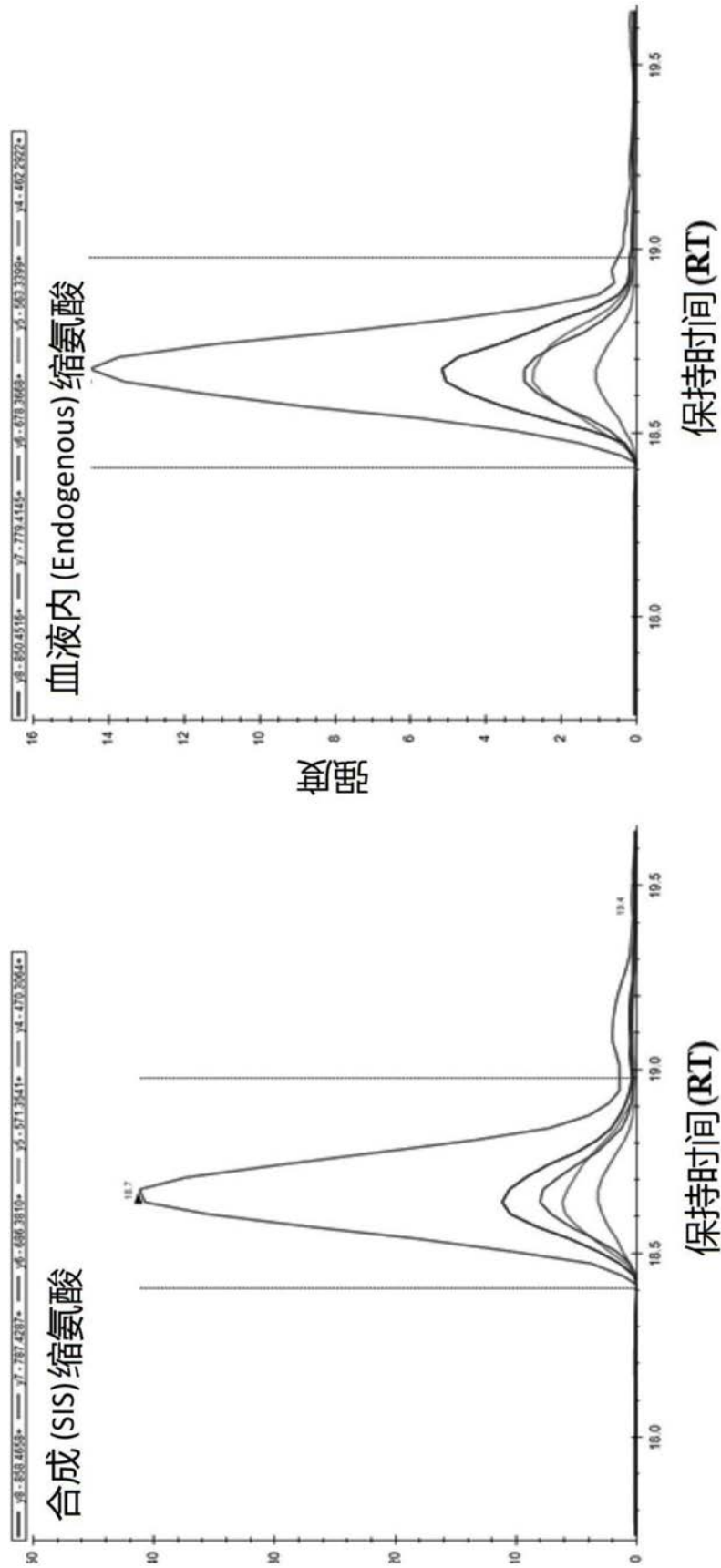


图3

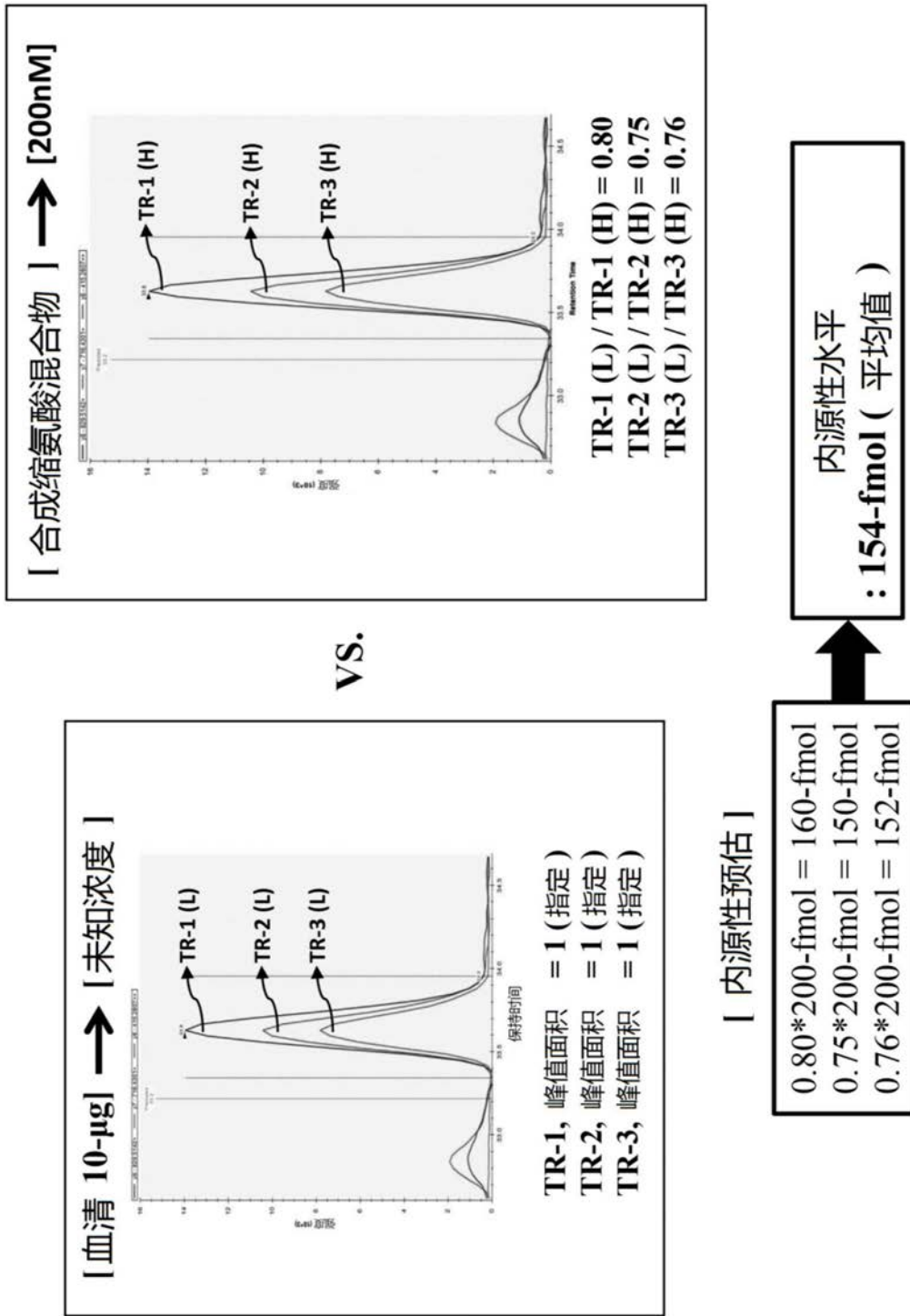


图4

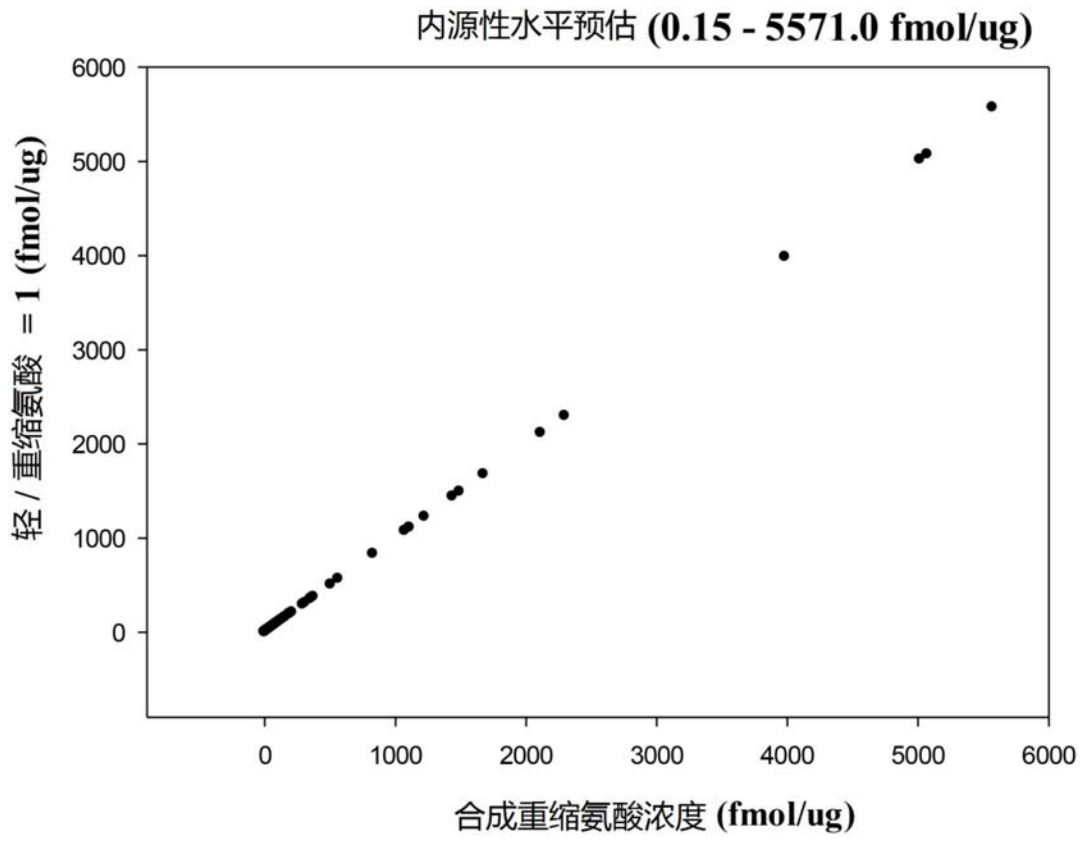


图5

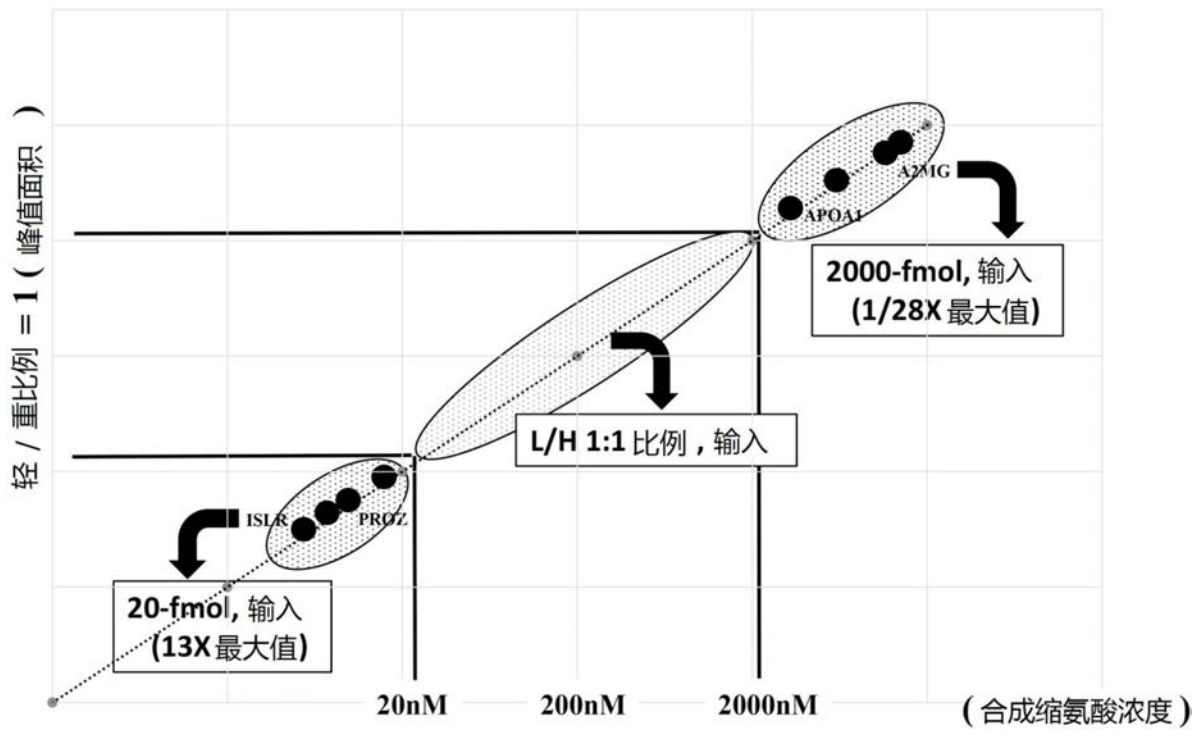


图7

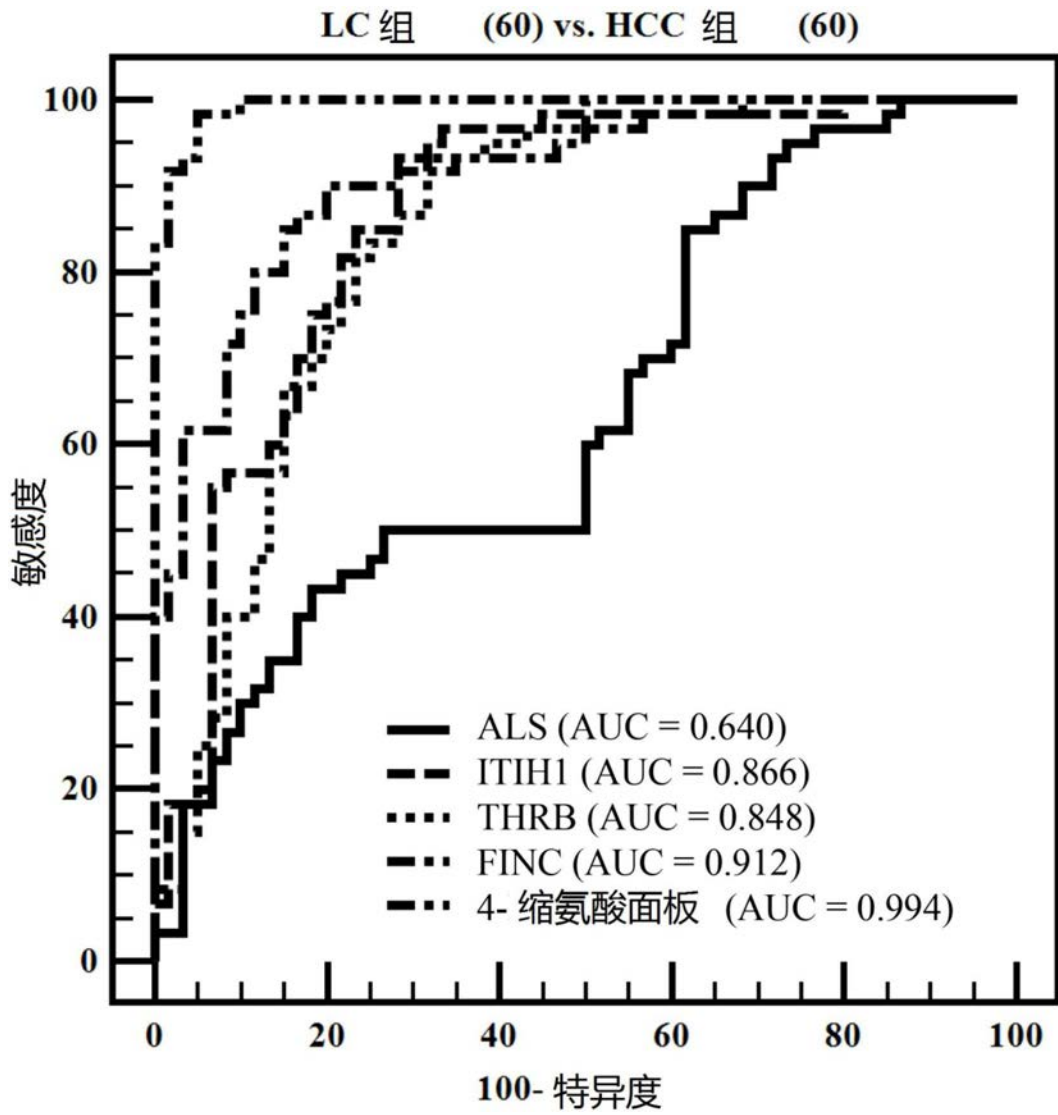


图8

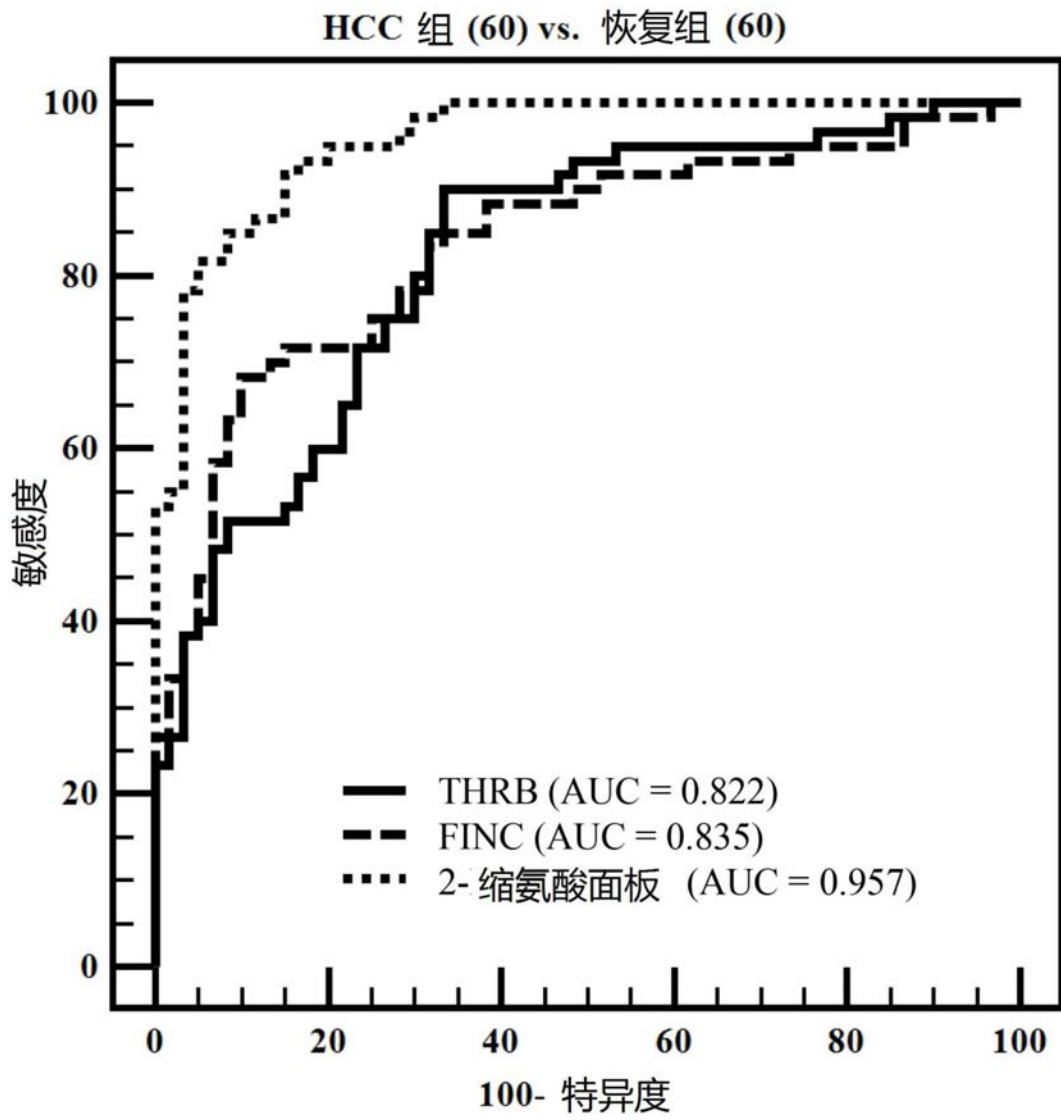


图9

蛋白质-01. $\alpha 2$ -抗纤溶酶 (A2AP)

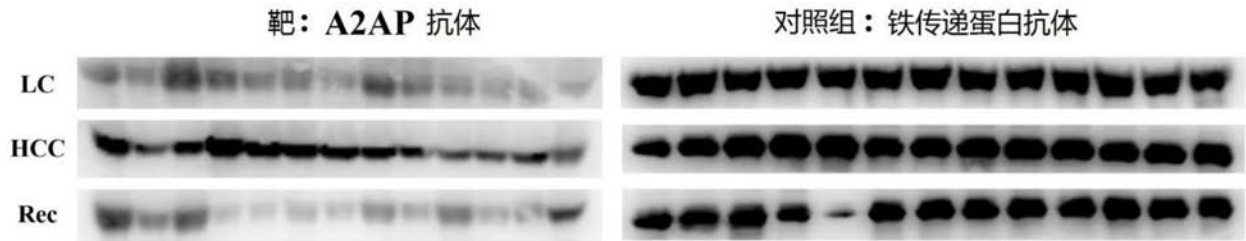
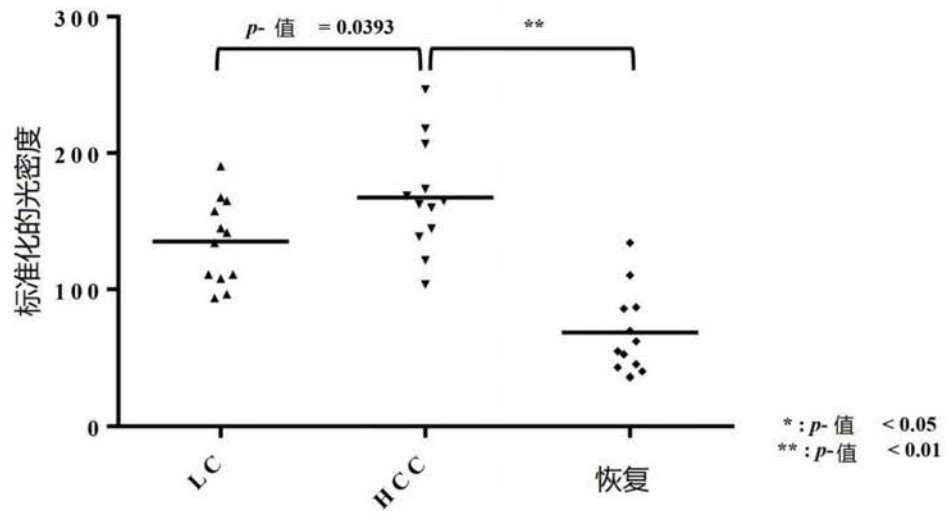


图10a

蛋白质-02. 蛋白质 AMBP (AMBP)

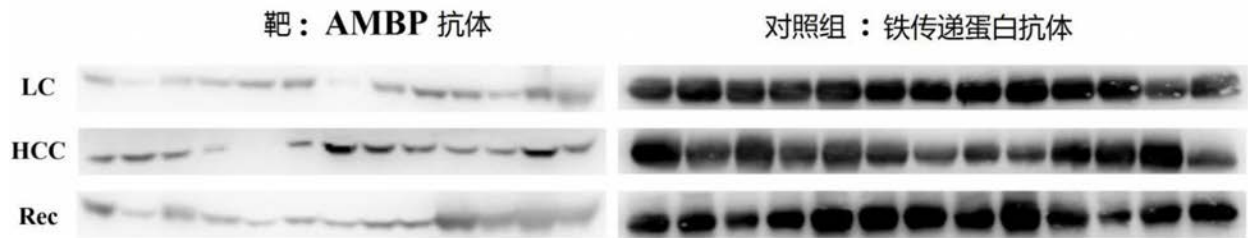
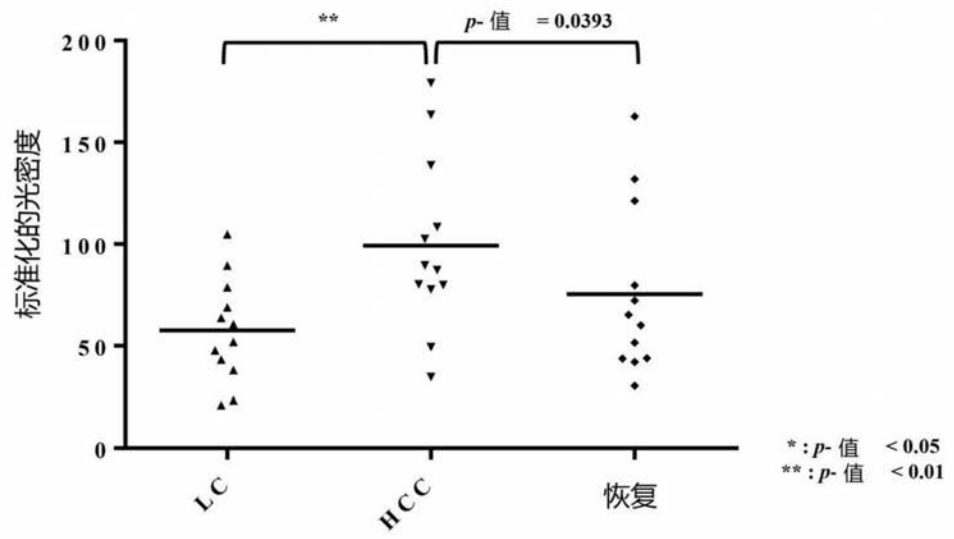


图10b

蛋白质-03. 甲胎蛋白 (AFP)

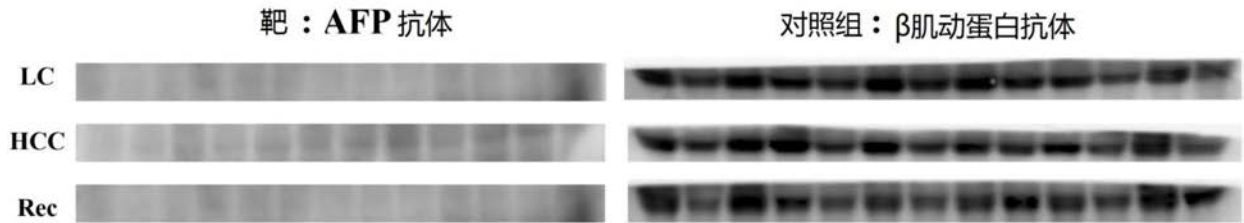
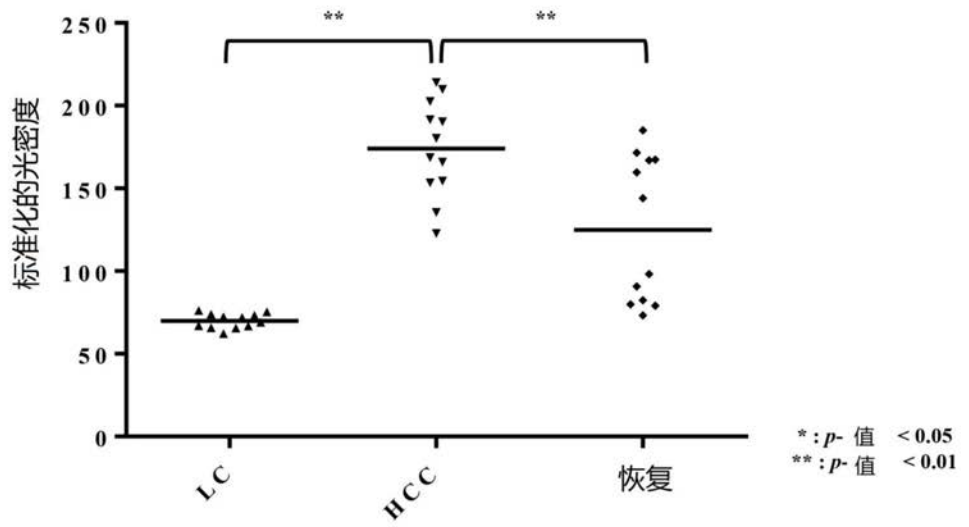
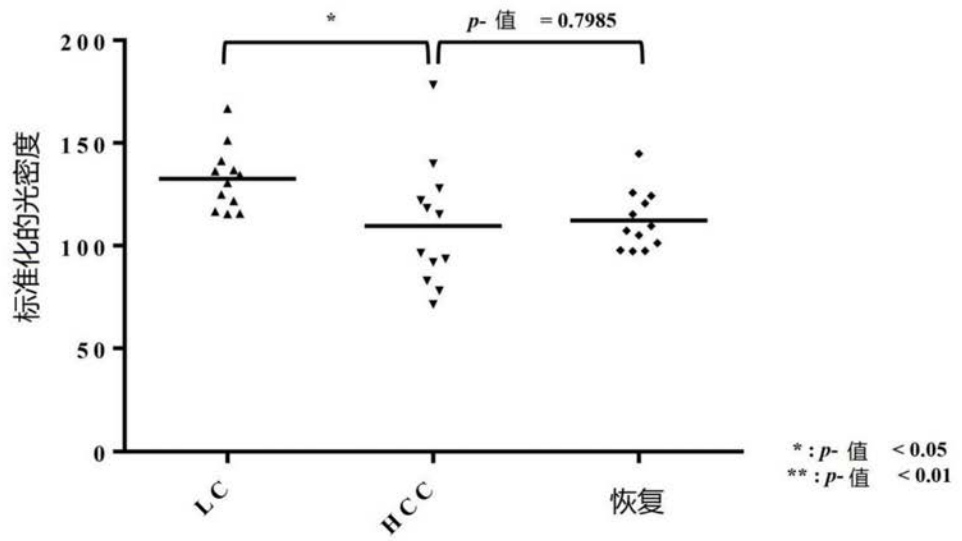


图10c

蛋白质-04. 组织蛋白酶 B (CATB)



靶: CATB 抗体

对照组: 铁传递蛋白抗体

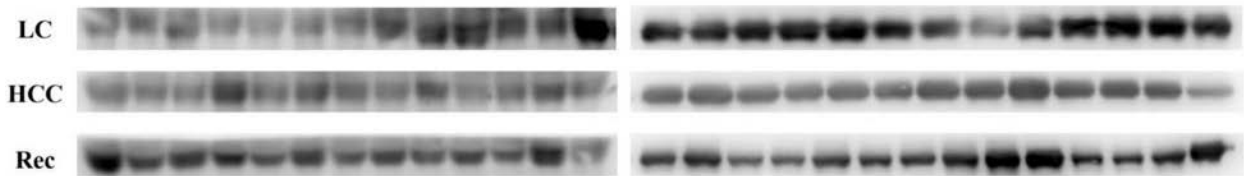


图10d

蛋白质-05. α 2-HS-糖蛋白 (FETUA)

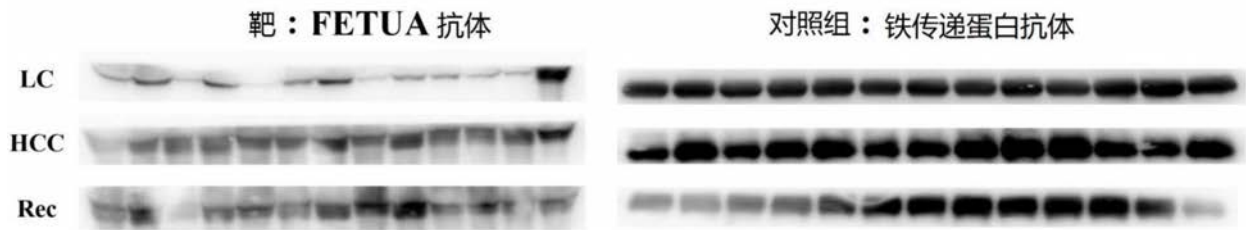
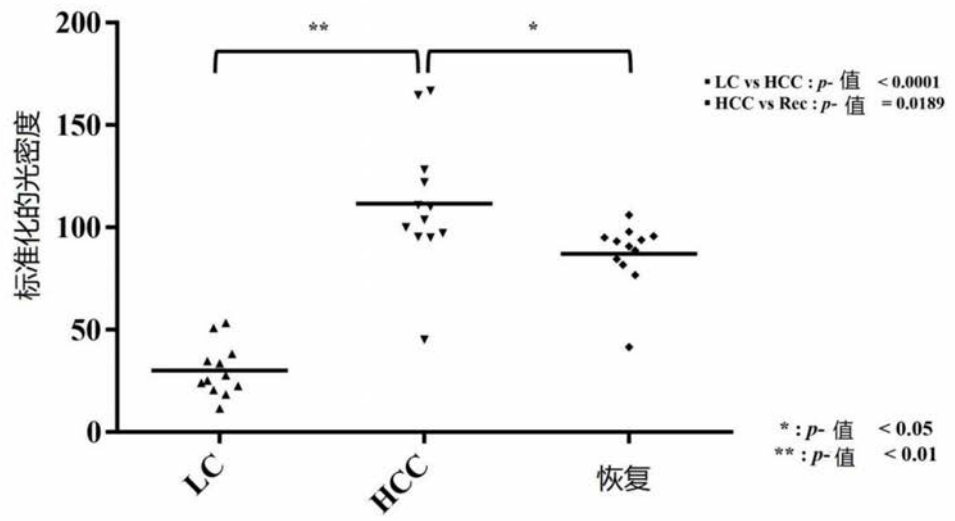
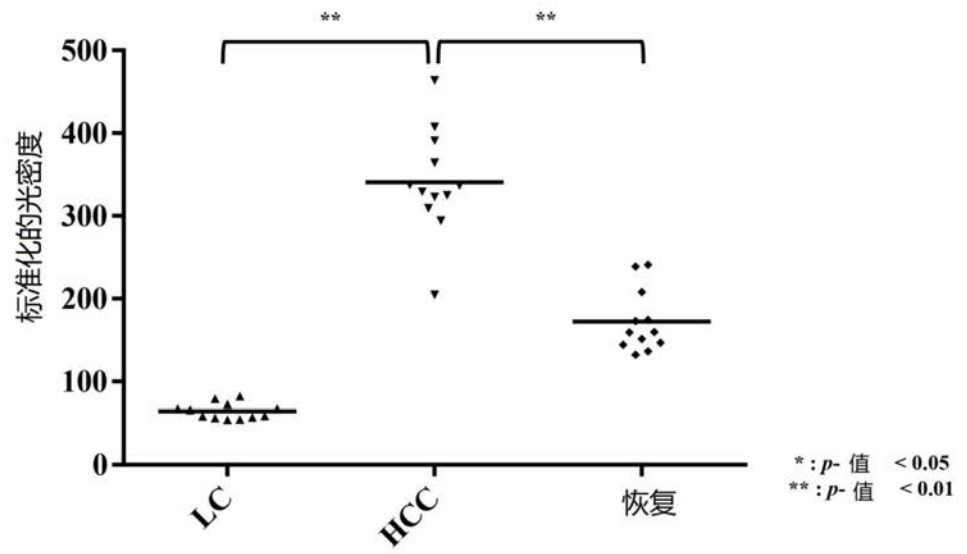


图10e

蛋白质 -06. 纤维连接蛋白 (FINC)



靶：FINC 抗体

对照组：β肌动蛋白抗体

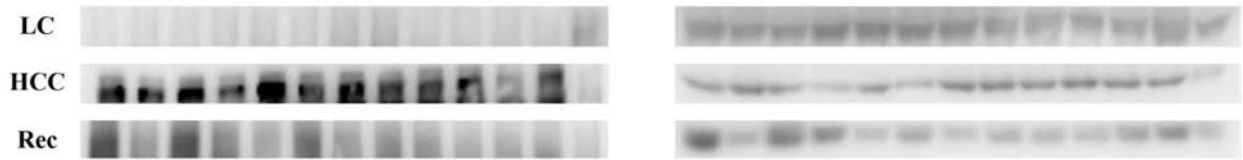


图10f

蛋白质 -07. 间α-胰蛋白酶抑制因子重链 H1 (ITIH1)

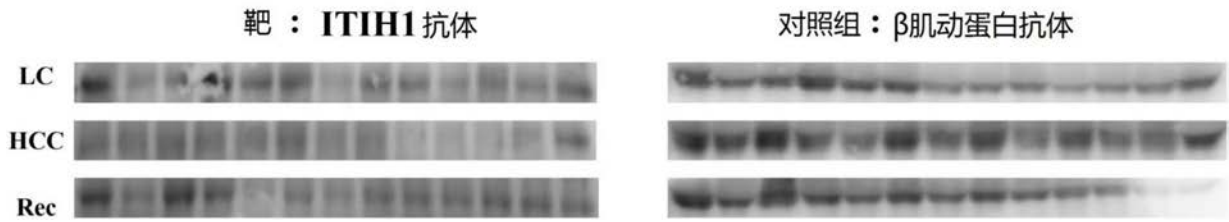
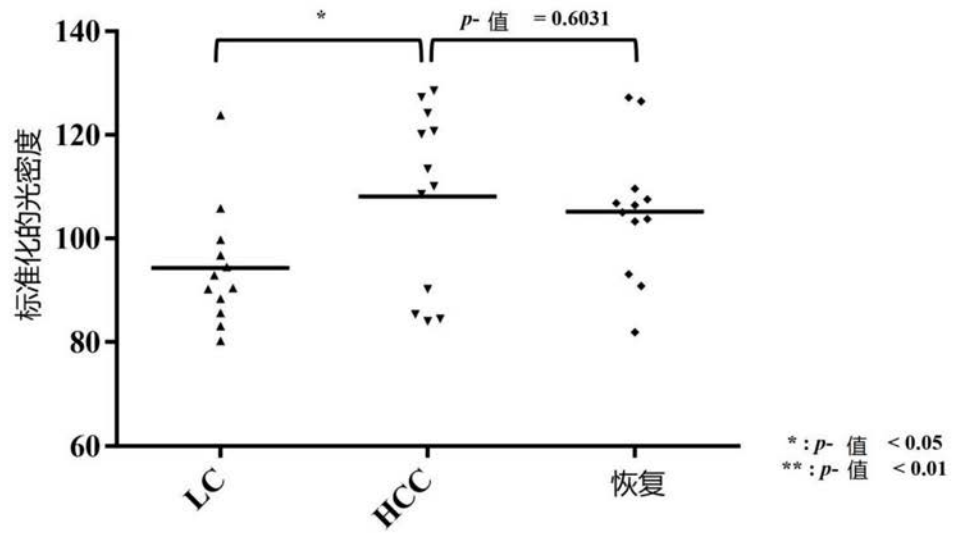


图10g

蛋白质 -08. 间α-胰蛋白酶抑制因子重链 H3 (ITIH3)

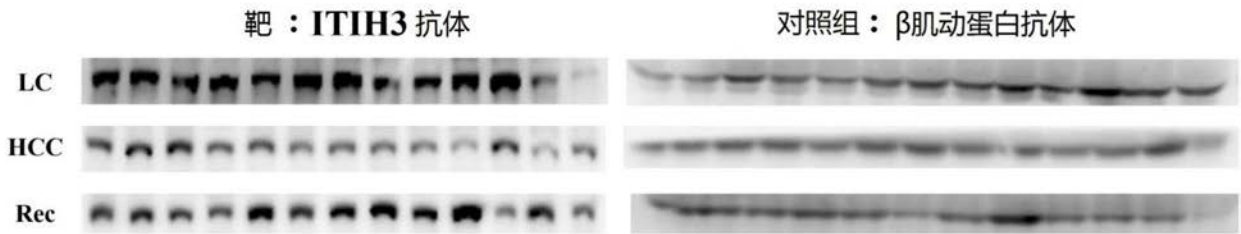
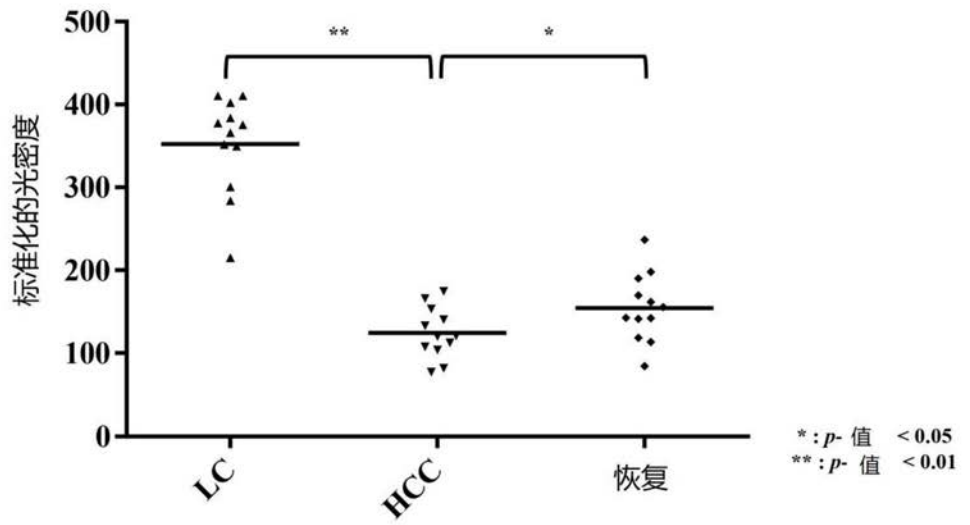
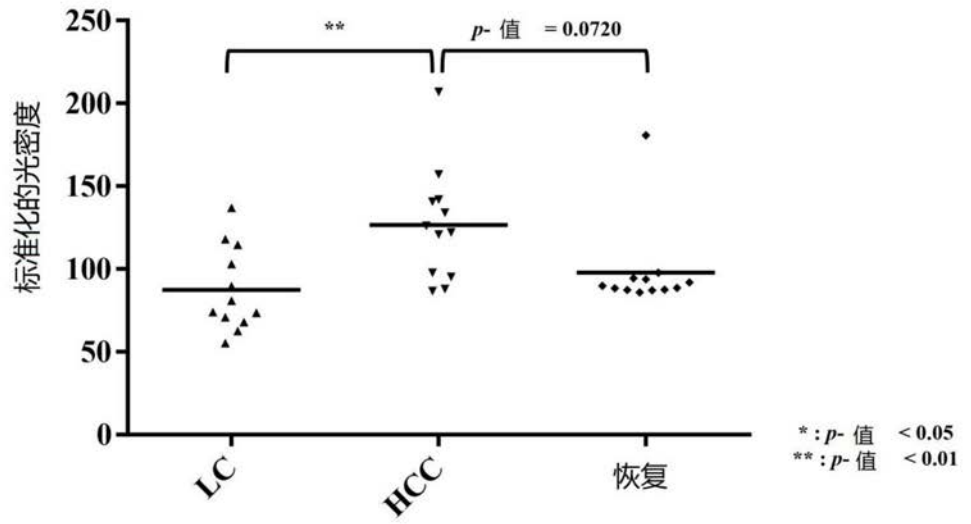


图10h

蛋白质 -09. 血纤维蛋白溶酶原相关蛋白 A (PLGA)



靶：PLGA 抗体

对照组：铁传递蛋白抗体

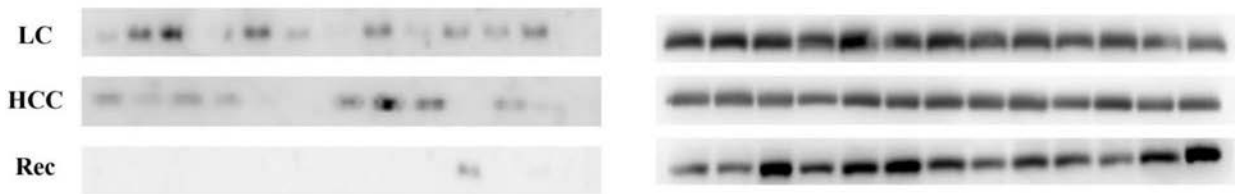


图10i

蛋白质 -10. 凝血酶原 (THRB)

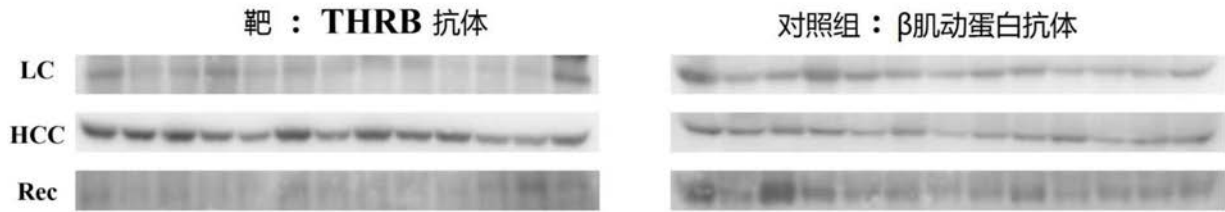
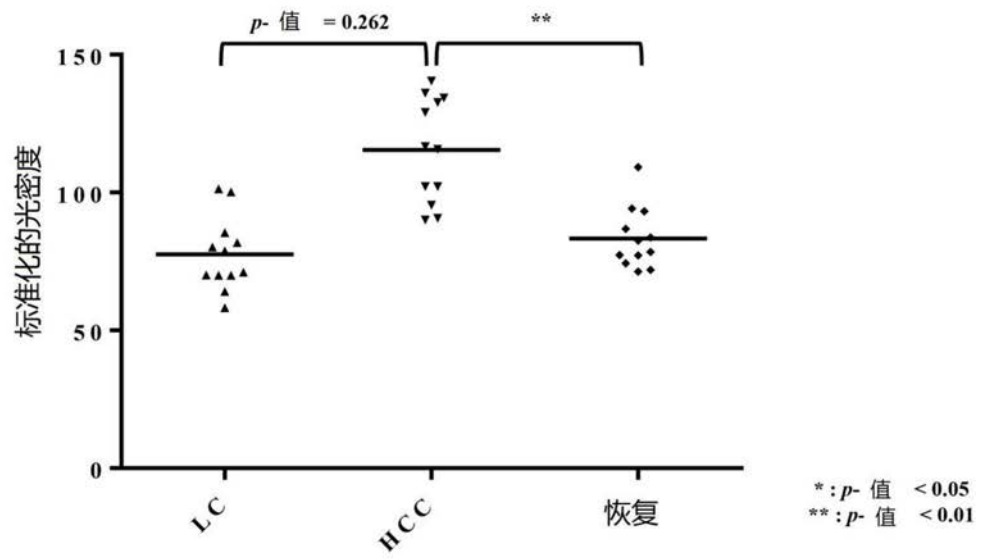


图10j

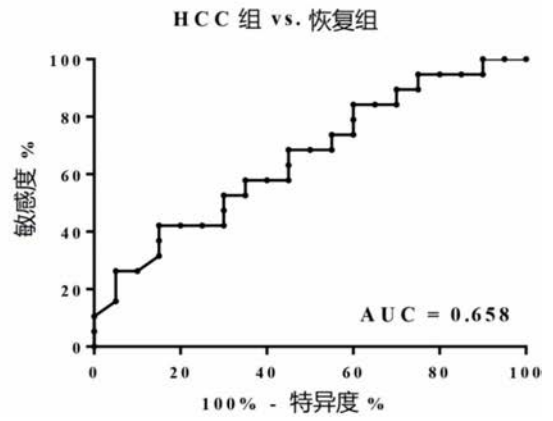
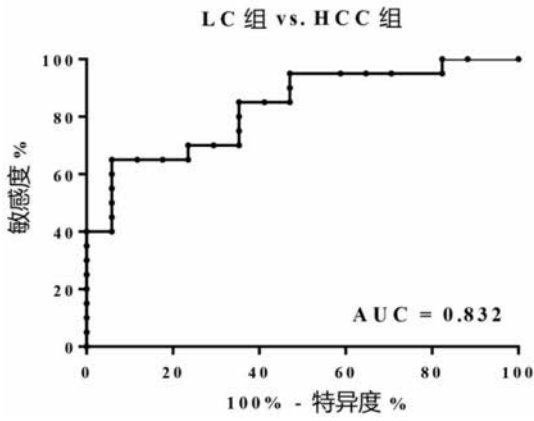
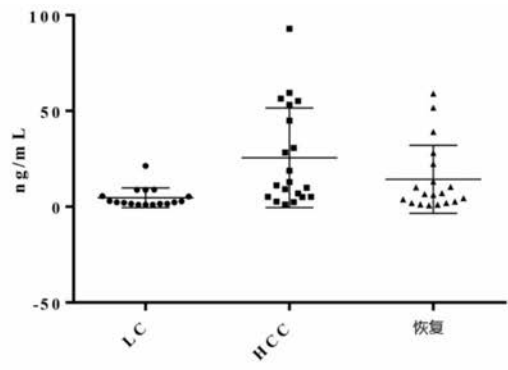
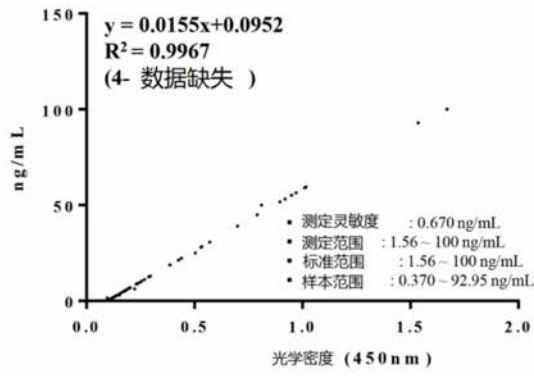


图11

专利名称(译)	用于肝癌诊断的生物标记物及其用途		
公开(公告)号	CN107110867A	公开(公告)日	2017-08-29
申请号	CN201580067274.5	申请日	2015-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团		
申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团		
当前申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团		
[标]发明人	金永洙 尹晶焕 金炫秀		
发明人	金永洙 尹晶焕 金炫秀		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57438 G01N33/574		
代理人(译)	石宝忠		
优先权	1020140179004 2014-12-12 KR 1020150172020 2015-12-04 KR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种能够以较高的准确度和敏感度进行肝癌的诊断、预后或治疗监测的标记物或标记物的组合。本发明的标记物能够通过利用血液的非侵袭性检查来进行简单且有效的肝癌诊断或监测，并且能够开发成多种检查试剂盒，例如能够在通过POCT开发进行的家庭及一般医院中的肝癌早期发现中非常有效地使用该标记物。

用于转换的MRM

