

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103180732 A

(43) 申请公布日 2013.06.26

(21) 申请号 201180051336.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011.08.26

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

(30) 优先权数据

61/377,387 2010.08.26 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013.04.24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/049274 2011.08.26

(87) PCT申请的公布数据

W02012/027631 EN 2012.03.01

(71) 申请人 华盛顿大学商业中心

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 卡尔·埃里克·赫尔斯特罗姆

因格戈尔德·赫尔斯特罗姆 刘璞

嘉德·贾法尔 伊丽莎白·思惟舍尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张颖 谢丽娜

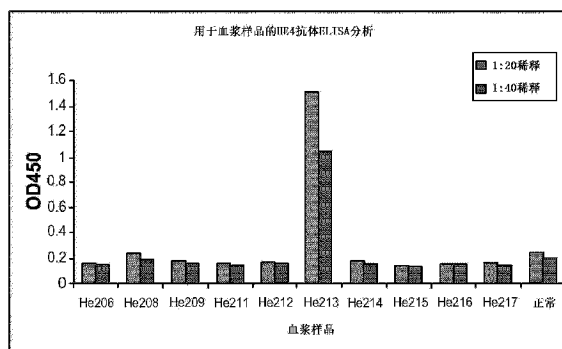
权利要求书2页 说明书17页 附图2页

(54) 发明名称

检测抗 HE4 抗体的方法以及诊断和 / 或预后与 HE4 表达细胞相关的病症的方法

(57) 摘要

本发明的特征在于与检测对象中表达 HE4 的肿瘤细胞相关的组合物和方法等。所述方法包括检测从所述对象获得的生物样品中的抗 HE4 抗体。所述方法可用于诊断和监测癌症的治疗功效, 在所述癌症中表达有 HE4, 例如卵巢癌。



1. 用于检测人类对象中 HE4 表达细胞的存在的方法,所述方法包括确定从所述人类对象获得的生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量,其中所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量指示所述人类对象中存在 HE4 表达细胞。

2. 权利要求 1 的方法,其中通过将所述生物样品与多肽接触来确定所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量,所述多肽由多核苷酸编码,所述多核苷酸选择性杂交于与包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 90% 同一性的序列。

3. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括将确定的抗 HE4 抗体的量与参比标准进行比较,其中检测到的抗 HE4 抗体的量大于参比标准指示所述人类对象中存在 HE4 表达细胞。

4. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括执行至少一种附加的诊断分析以确定具有抗 HE4 抗体的对象是否患有卵巢癌。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述多肽与抗 HE4 抗体的结合包括检测选自以下的信号:放射性核素、荧光团、抗生物素蛋白分子与生物素分子之间的结合事件、链霉亲和素分子与生物素分子之间的结合事件、以及酶反应的产物。

6. 权利要求 2 的方法,其中使用 ELISA 分析来确定所述生物样品中抗 HE4 抗体的量。

7. 权利要求 3 的方法,其中人类对象中存在 HE4 表达细胞指示所述对象患有卵巢癌或者具有发展卵巢癌的风险。

8. 权利要求 1 的方法,其中所述生物样品是选自以下的生物流体:血液、血浆、血清、腹水、尿液、唾液、眼泪、胸膜液、痰、阴道液、以及在医疗过程中获得的冲洗液。

9. 权利要求 1 的方法,其中所述人类对象正接受癌症的治疗性治疗,所述癌症与表达 HE4 的肿瘤细胞相关。

10. 用于监测正接受表达 HE4 的肿瘤的治疗性治疗的人类癌症患者的治疗功效的方法,所述方法包括:

(a) 提供来自于正接受癌症的治疗性治疗的人类患者的生物样品,所述癌症与表达 HE4 的肿瘤细胞相关;

(b) 通过将所述生物样品与多肽接触来确定所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量,所述多肽由多核苷酸编码,所述多核苷酸选择性杂交于与包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 90% 同一性的序列;以及

(c) 将确定的抗 HE4 抗体的存在或量与抗体参比标准进行比较,其中抗 HE4 抗体的量大于参比标准指示对所述癌症的治疗性治疗的阳性响应。

11. 权利要求 10 的方法,其中从获自健康对照对象的生物样品确定所述参比标准。

12. 权利要求 10 的方法,其中从获自癌症治疗前的患者的生物样品确定所述参比标准。

13. 权利要求 10 的方法,其中所述抗体特异性结合于包含与包含 SEQ ID NO:2 的至少 10 个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的序列的多肽。

14. 权利要求 10 的方法,其中所述生物样品是选自以下的生物流体:血液、血浆、血清、腹水、尿液、唾液、眼泪、胸膜液、痰、阴道液、以及在医疗过程中获得的冲洗液。

15. 权利要求 10 的方法,其中使用 ELISA 分析来确定抗 HE4 抗体的量。

16. 权利要求 1 或 10 的方法,所述方法还包括确定所述生物样品中可溶性 HE4 相关肽(SHRP)的存在或量,其中所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量与可溶性 HE4 相关肽的存

在或量的组合指示所述人类对象中存在 HE4 表达细胞。

17. 权利要求 1 或 10 的方法,其中所述生物样品是血清。

18. 权利要求 10 的方法,其中所述治疗包括施用化疗剂、放射治疗、抗体疗法、癌症疫苗疗法、基因疗法或干细胞移植中的至少一种。

19. 权利要求 10 的方法,其中所述治疗包括手术切除表达 HE4 的肿瘤的至少一部分。

20. 用于检测人类对象中 HE4 表达细胞的存在试剂盒,所述试剂盒包含特异性检测从人类对象获得的生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量的试剂,以及用于将检测到的抗 HE4 抗体的存在或量与参比标准进行比较的印刷的说明书。

21. 权利要求 20 的试剂盒,其中所述参比标准选自特定的数值阈值、用于并行评估的阴性对照样品、以及将检测到的抗 HE4 抗体的量与所述对象中存在 HE4 表达细胞的可能性相关联的统计学信息。

22. 权利要求 20 的试剂盒,其中特异性检测抗 HE4 抗体的试剂包括由选择性杂交于与包含 SEQ ID NO :1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 90% 同一性的序列的多核苷酸编码的多肽。

23. 权利要求 20 的试剂盒,其中特异性检测抗 HE4 抗体的试剂包括包含与包含 SEQ ID NO :2 的至少 10 个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的序列的多肽。

24. 权利要求 20 的试剂盒,其中所述多肽与固体支撑物连接。

## 检测抗 HE4 抗体的方法以及诊断和 / 或预后与 HE4 表达细胞相关的病症的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2010 年 8 月 26 日提交的美国临时专利申请 No. 61/377, 387 的提交日权益。出于可以要求美国临时专利申请 No. 61/377, 387 的权益的任何美国专利申请的目的, 早先提交的专利申请的内容以其全文通过参考结合于此。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于评估对象的风险、诊断和 / 或预后的组合物和方法, 所述对象具有与表达人附睾四二硫化物核心蛋白(“HE4”)的肿瘤相关的癌症的风险或患有所述癌症, 具体地, 本发明涉及测定抗 HE4 抗体以用作存在 HE4 表达细胞例如卵巢瘤细胞的指示、和 / 或确定正接受与一种或多种表达 HE4 的肿瘤相关的癌症的治疗的患者的临床状况的方法。

### 背景技术

[0004] 在西方国家, 卵巢癌(OvC)是第二位最常见和最致命的妇科恶性肿瘤。大多数病例被确诊时为晚期, 这表现为预后不良, 总的 5 年生存率不超过 35%。卵巢癌是不成比例地致命的, 因为其症状不明确且不特定。卵巢癌脱落的恶性细胞会进入到腹腔内天然存在的体液中。然后, 这些细胞有可能漂浮在这种体液中, 并经常植入到其它腹部(腹膜)结构上, 包括子宫、膀胱、肠、和肠壁的内膜(网膜)。甚至在怀疑患有癌症之前, 这些细胞就可以开始形成新的肿瘤生长。患有这种疾病的患者中超过 60% 已患有 III 期或 IV 期疾病, 此时它已经扩散到卵巢以外的地方, 并且这些患者中超过 75% 的患者死于疾病, 尽管卵巢癌的化疗最近已有所改善。然而, 如果在疾病的早期得到诊断, 则 5 年生存率可以达到 90% 至 98%。

[0005] 一种在卵巢癌的血清分析中使用的卵巢癌标志物是 CA125 (Bast, R. C. 等, *Gynecol. Oncol.* 22:115-120 (1985); Einhorn, N. 等, *Obstet. Gynaecol.* 67:414-416 (1986); Einhorn 等, *Obstet. Gynecol.* 50:14-18 (1992); Jacobs, I. J. 等, *Br. Med. J.* 313:1355-1358 (1996))。然而, 虽然 CA125 被发现在所有卵巢癌中的大部分中都升高, 但是, 它仅在患有早期疾病的一半患者中被发现 (Hellstrom, I. 等, *Cancer Research* 63:3695-3700 (2003))。此外, CA125 在一些非恶性病症中也升高 (Fung, M. F. 等, *J. Obstet. Gynaecol. Can.*, 26:717-728 (2004); Mas, M. R. 等, *Dig. Liver Dis.* 32:595-597 (2000); Malkasian, G. D. 等, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 159:341-346 (1988)), 这可能会导致假阳性结果。

[0006] 因此, 对于开发用于检测有可能治愈的早期恶性病症例如卵巢癌的更有效的工具, 存在着极大的需求。

### 发明内容

[0007] 根据上述内容, 一方面, 本发明提供了用于检测人类对象中 HE4 表达细胞的存在的方法, 所述方法包括确定从所述人类对象获得的生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量, 其

中所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量指示所述人类对象中存在 HE4 表达细胞。在一些实施方式中,人类对象中存在 HE4 表达细胞指示所述对象患有卵巢癌或者具有发展卵巢癌的风险。

[0008] 另一方面,本发明提供了用于监测正接受针对表达 HE4 的肿瘤的治疗性治疗的人类癌症患者的治疗功效的方法,所述方法包括:(a) 提供来自于正接受针对癌症的治疗性治疗的人类患者的生物样品,所述癌症与表达 HE4 的肿瘤细胞相关;(b) 通过将所述生物样品与多肽接触来确定所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量,编码所述多肽的多核苷酸选择性杂交于与包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 90% 同一性的序列;以及(c) 将确定的抗 HE4 抗体的存在或量与抗体参比标准进行比较,其中抗 HE4 抗体的量大于参比标准指示对所述癌症的治疗性治疗的阳性响应。

[0009] 另一方面,本发明提供了用于检测人类对象中 HE4 表达细胞的存在或量的试剂盒,所述试剂盒包含特异性检测从人类对象获得的生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量的试剂,以及用于将检测到的抗 HE4 抗体的存在或量与参比标准进行比较的印刷的说明书。

### 附图说明

[0010] 通过结合附图参考下面的具体实施方式,本发明的前述方面和许多附带的优点将变得更容易被意识到,同时变得更好地被理解,其中:

[0011] 图 1 图示说明了用于测试从 10 个患有卵巢癌的患者和 1 个健康对照对象获得的人血清样品中抗 HE4 抗体的存在/量的 ELISA 分析的结果,如实施例 2 中所描述的。

[0012] 图 2 绘出了使用表 1 中所示的引物被表达为具有外壳蛋白 pVIII 的融合蛋白的 HE4 片段。

### 具体实施方式

[0013] 除非本文中有特别定义,否则本文中使用的术语都具有与它们对于本发明所属领域的技术人员而言会具有的相同的含义。

[0014] 当适用于多肽序列例如 HE4 多肽或其部分时,术语“同一性百分数”或“% 同一性”被定义为在将候选蛋白质序列与对象蛋白质序列比对以获得最大的同一性百分数后,候选蛋白质序列中与对象蛋白质序列(例如如 SEQ ID NO:2 中所示的氨基酸序列,或其包含至少 10 个连续氨基酸残基的部分)具有同一性的氨基酸残基的百分数。例如,可以通过使用美国国家医学图书馆(U.S. National Library of Medicine), 8600 Rockville Pike, Bethesda, Maryland 20894, U.S.A 国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information) (NCBI) 的网站上的 b12seq 界面进行两个蛋白质序列的配对比较来确定两个蛋白质序列之间的同一性百分数。b12seq 界面允许使用由 Tatiana, A. 等, “Blast 2 序列——用于比较蛋白质和核苷酸序列的新工具(Blast2Sequences—A New Tool for Comparing Protein and Nucleotide Sequences)”, FEMS Microbiol. Lett. 174:247-250(1999) 描述的 BLAST 工具进行序列比对。使用以下比对参数:矩阵(Matrix)=BLOSUM62;空位开放罚分(Gap open penalty)=11;空位延伸罚分(Gap extension penalty)=1;空位 x\_下降值(Gap x\_dropff)=50;期望值(Expect)=10.0;字长(Word size)=3;以及过滤(Filter)=关闭。

[0015] 当适用于核酸分子时,术语“同一性百分数”或“%同一性”是在将序列比对以获得最大的同一性百分数后,并且在不将任何核酸残基置换视为序列同一性的一部分的情况下,候选核酸序列中与对象核酸分子序列(例如如 SEQ ID NO :1 中所示的核酸分子序列,或其包含至少 20 个连续核苷酸的部分)具有同一性的核苷酸的百分数。候选核酸序列中未引入任何空位,以便实现最佳的比对。可以以下面的方式来确定核酸序列的同一性。使用 BLASTN2.1 版的程序将对象多核苷酸分子序列用于检索核酸序列数据库例如 Genbank 数据库(根据 Altschul 等, *Nucleic Acids Research*25:3389-3402(1997))。以无空位的模式使用该程序。使用默认过滤来去除由于低复杂度的区域引起的序列同源性,如 Wootton, J. C. 和 S. Federhen, *Methods in Enzymology*255:554-571(1996) 中所定义的。使用 BLASTN 的默认参数。

[0016] 在本文中使用时,术语“健康人类对象”是指已知不患有癌症的个体,这种认知源自于所述个体的临床数据,包括但不限于与本文中所描述的不同的癌症分析。健康个体还优选相对于与表达 HE4 的肿瘤例如卵巢癌相关的早期症状而言是无症状的,所述早期症状包括例如直肠压力、腹胀和肿胀;并且,还优选相对于其它生殖疾病或病症而言是无症状的。

[0017] 在本文中使用时,术语“表达 HE4 的肿瘤”是指被鉴定为与正常组织相比,具有与 HE4 或其片段表达增加相关的瘤性病症的任何类型的癌细胞和 / 或肿瘤,其中 HE4 是指 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :2 及其哺乳动物的同源物中的至少一个,所述片段包含蛋白质(SEQ ID NO :2)的至少 10 个连续残基或包含 cDNA (SEQ ID NO :1)的至少 20 个连续核苷酸,所述癌细胞和 / 或肿瘤包括但不限于卵巢癌、肺腺癌(Bingle 等, *Respiratory Research*7:61-80(2006)) 和唾液腺肿瘤。

[0018] 在本文中使用时,术语“卵巢癌”是指任何类型的卵巢癌,包括但不限于浆液性卵巢癌、非侵入性卵巢癌、混合表型性卵巢癌、粘液性卵巢癌、子宫内膜性卵巢癌、透明细胞性卵巢肿瘤、浆液性乳头状卵巢癌、布伦纳细胞和未分化的腺癌。

[0019] 在本文中使用时,术语“表达 HE4 的肿瘤复发”是指根据个体的临床数据,包括但不限于与本文中所描述的不同的癌症分析,获得了与表达 HE4 的细胞相关的癌症例如卵巢癌或其来源的肿瘤细胞的临床证据。

[0020] 在本文中使用时,在与一种或多种表达 HE4 的肿瘤相关的癌症(例如卵巢癌)的情形中,术语“预后良好”是指患者有可能从他们的疾病中被治愈或者在初始诊断后具有至少 5 年的无肿瘤生存期。

[0021] 在本文中使用时,在与一种或多种表达 HE4 的肿瘤相关的癌症(例如卵巢癌)的情形中,术语“预后不良”是指患者有可能在初始诊断后的 5 年时间内死于他们的疾病。

[0022] 人附睾四二硫化物核心蛋白(“HE4”) (SEQ ID NO :2) 由如 SEQ ID NO :1 所示的 mRNA 序列(其对应于 Genbank 登录号 AY212888) 编码。HE4cDNA 首先分离自人附睾(Kirchhoff 等, 1991), 后来在从卵巢癌构建的 cDNA 文库中高频率检测到 HE4cDNA (Wang 等, *Gene* 229:101(1999))。HE4 蛋白属于“四二硫化物核心”蛋白质家族,其包含一组功能多样的酸和热稳定的异质性小分子,被称为“可溶性 HE4 相关肽”(SHRP) (Kirchhoff 等, *Biol. Reprod.* 45:350-357(1991))。四二硫化物核心家族成员多肽的氨基酸序列中 8 个核心半胱氨酸残基的保守间隔(SEQ ID NO :2 的 32-73 和 76-123 位氨基酸区域)被认为指

导这些分子折叠成紧密且稳定的结构。四二硫化物核心家族的许多成员是蛋白酶抑制剂，然而，对于一些家族成员、包括 HE4 来说，尚未鉴定到任何功能。

[0023] 在本文中使用时，术语“HE4”蛋白包涵分离自从人类对象获得的生物样品的天然存在的 HE4 蛋白，以及分离自制造 HE4 的培养细胞（例如培养的卵巢癌细胞）的 HE4 蛋白或通过重组 DNA 技术（例如在真核表达系统（例如 COS 细胞）中）在酵母、哺乳动物或细菌表达系统中制造的 HE4 蛋白。

[0024] 根据上述内容，本发明人已产生了用于检测生物样品（例如血浆或血清）中抗天然 HE4 蛋白（SEQ ID NO :2）的抗体的可重复的分析，如实施例 2 中所描述的。正如在实施例 2-3 中进一步描述的，本发明人已使用这种分析来检测人类对象中抗 HE4 抗体的存在，并已发现与正常健康女性对象相比，在临床上被鉴定为患有卵巢癌的对象具有显著更高的抗 HE4 抗体的发生率。

[0025] 根据上述内容，一方面，本发明提供了用于检测人类对象中 HE4 表达细胞的存在的方法。所述方法包括确定从所述人类对象获得的生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量，其中所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量指示所述人类对象中存在 HE4 表达细胞。在一种实施方式中，通过将所述生物样品与多肽接触来确定所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量，编码所述多肽的多核苷酸选择性杂交于与包含 SEQ ID NO :1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 80% 同一性、或至少 90% 同一性、或至少 95% 同一性、或至少 98% 同一性、或至少 99% 同一性的序列。在一些实施方式中，通过将所述生物样品与多肽接触来确定所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量，所述多肽包含与包含 SEQ IDNO :2 的至少 10 个连续氨基酸的序列具有至少 80% 同一性、或至少 90% 同一性、或至少 95% 同一性、或至少 98% 同一性、或至少 99% 同一性的序列。在一种实施方式中，与参比标准（例如阴性对照）相比，抗 HE4 抗体的存在或量指示所述人类对象中存在 HE4 表达细胞例如肿瘤细胞。在另一种实施方式中，抗 HE4 抗体的量超过预定的阈值量指示人类对象中存在 HE4 表达细胞。在所述方法的一些实施方式中，人类对象中存在 HE4 表达细胞指示所述对象患有卵巢癌或者具有发展卵巢癌的风险。

[0026] 各种各样的生物样品可被用在本发明的方法中，包括生物体液。生物体液的非限制性实例包括血液、血浆、血清、腹水、尿液、唾液、眼泪、胸膜液、痰、阴道液（排出物）、以及在医疗过程中获得的冲洗液（例如盆腔冲洗液，或在活检、内窥镜检查或手术期间获得的其它冲洗液）。

[0027] 本发明的这方面的方法可被用作诊断工具，以区分患有与 HE4 的表达相关的疾病或病症的对象和患有与 HE4 的表达不相关的疾病或病症的对象。在所述方法的一种实施方式中，从患有至少一种与卵巢癌相关的症状的人类对象获得生物样品。与卵巢癌相关的症状是医学领域的技术人员已知的。这样的症状的非限制性实例包括腹部肿胀 / 腹胀、腹部 / 盆腔疼痛或压力、胃肠道症状（例如胃肠气、消化不良、恶心、或排便改变）、阴道出血或排出物、泌尿问题（例如尿急、灼烧感或痉挛）、疲劳、发烧、背痛和呼吸困难。

[0028] 在一些实施方式中，本发明的这方面的方法还包括执行至少一种附加的诊断分析以确定具有抗 HE4 抗体的对象是否患有卵巢癌。在一些实施方式中，本发明的这方面的方法还包括在对象上执行至少一种附加的用于卵巢癌的诊断分析，例如检测生物样品中 CA125 的存在、超声波检测、CT 扫描、MRI 扫描、活检、抽出物等。

[0029] 如本文中更详细描述, 在一些实施方式中, 包括检测抗天然 HE4 抗体的本发明方法可以与用于检测 SHRP 抗原的分析一起使用并任选组合, 以便检测表达 HE4 的肿瘤细胞的存在, 确定与表达 HE4 的肿瘤相关的癌症例如卵巢癌的存在或复发的可能性, 评估患有与表达 HE4 的肿瘤相关的癌症的患者的临床状况和 / 或预后, 和 / 或监测患者中癌症治疗的功效。可以将生物样品中检测到的 SHRP 抗原的量与参比标准例如抗原参比值进行比较, 其中与参比标准相比在所述样品中检测到 SHRP 抗原的量增加指示所述人类对象中存在表达 HE4 的肿瘤细胞。

[0030] 在另一种实施方式中, 本发明提供了用于监测正接受针对表达 HE4 的肿瘤的治疗性治疗的人类癌症患者的治疗功效的方法。所述方法包括: (a) 提供来自于正接受针对癌症的治疗性治疗的人类患者的生物样品, 所述癌症与表达 HE4 的肿瘤相关; (b) 通过将所述生物样品与多肽接触来确定所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量, 编码所述多肽的多核苷酸选择性杂交于与包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 90% 同一性的序列; 以及 (c) 将确定的抗 HE4 抗体的存在或量与抗体参比值进行比较, 其中抗 HE4 抗体的量大于抗体参比值指示对所述癌症的治疗性治疗的阳性响应。

[0031] 在另一种实施方式中, 本发明提供了用于确定正接受针对与表达 HE4 的肿瘤相关的癌症的治疗性治疗的人类患者中表达 HE4 的肿瘤复发的可能性的方法。所述方法包括: (a) 提供来自于正接受针对癌症的治疗性治疗的人类患者的生物样品, 所述癌症与表达 HE4 的肿瘤相关; (b) 通过将所述生物样品与多肽接触来确定所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量, 编码所述多肽的多核苷酸选择性杂交于与包含 SEQ IDNO:1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 80% 例如至少 90% 同一性的序列; 以及 (c) 将在步骤 (b) 中确定的抗 HE4 抗体的存在或量与抗体参比值进行比较, 其中抗 HE4 抗体的量大于抗体参比值指示所述人类对象中表达 HE4 的肿瘤复发的风险较小, 并且其中抗 HE4 抗体的量低于参比值指示所述人类对象中表达 HE4 的肿瘤复发的风险较大。

[0032] 根据本发明的所述方法的一种实施方式, 对正接受针对与表达 HE4 的肿瘤相关的癌症的治疗性治疗的人类患者的临床状况和癌症复发的可能性进行评估。可以用先前被确诊并对表达 HE4 的肿瘤例如卵巢癌、肺腺癌或唾液腺肿瘤进行过治疗(例如用手术和 / 或先前或目前正接受的治疗性治疗例如化疗、放射疗法、包括抗体的蛋白质治疗剂、基因疗法、癌症疫苗疗法、干细胞移植或其它疗法进行治疗)的患者来实践该实施方式的方法。卵巢癌的复发是临床复发, 如由卵巢癌的一种或多种临床症状例如转移的存在所确定的, 或者如在生物化学试验、免疫学试验或血清学试验例如生物样品中对 CA125 抗体的交叉反应性、或其它诊断性试验中所确定的。优选地, 卵巢癌的复发能够在从治疗起至少约 2 年、更优选从治疗起约 2-3 年、甚至更优选从治疗起约 4 或 5 或 10 年时被检测到。

[0033] 1-4 分期系统被用于描述卵巢癌, 如由国际妇产科联合会(International Federation of Gynecology and Obstetrics) (“FIGO”) 分期系统所阐释的, 该系统利用手术后获得的信息。手术可以包括腹式全子宫切除术、切除一侧或双侧卵巢和输卵管、切除网膜、和 / 或供细胞学用的盆腔冲洗。

[0034] I 期——局限于一侧或双侧卵巢

[0035] IA——涉及一侧卵巢, 包膜完整, 卵巢表面无肿瘤, 腹水或腹膜冲洗液无恶性细胞

[0036] IB——涉及双侧卵巢, 包膜完整, 卵巢表面无肿瘤, 阴性冲洗液

[0037] IC——肿瘤局限于卵巢,并伴有以下任何症状:包膜破裂,卵巢表面有肿瘤,阳性冲洗液

[0038] II 期——扩展或植入到盆腔

[0039] IIA——扩展或植入到子宫或输卵管,阴性冲洗液

[0040] IIB——扩展或植入到其它盆腔结构,阴性冲洗液

[0041] IIC——扩展或植入到盆腔,并伴有阳性冲洗液

[0042] III 期——在盆腔外部的显微镜可见的腹膜植入物,或者局限于盆腔但扩展至小肠或网膜

[0043] IIIA——在盆腔外部的显微镜可见的腹膜转移

[0044] IIIB——在盆腔外部的尺寸小于 2cm 的肉眼可见的腹膜转移

[0045] IIIC——在盆腔外部的大于 2cm 的腹膜转移或淋巴结转移,

[0046] 注意:主动脉旁淋巴结转移被认为是局部淋巴结

[0047] IV 期——远距离转移,即,在肝脏中或在腹腔外部

[0048] 根据本发明的一些实施方式,从人类患者(先前被确诊患有卵巢癌并且先前对卵巢癌进行过治疗,或目前正接受卵巢癌的治疗)获得生物样品,并分析所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或浓度。在本发明的方法中使用的生物样品包括生物流体。生物流体的非限制性实例包括血液、血浆、血清、腹水、尿液、唾液、眼泪、胸膜液、痰、阴道液(排出物)、以及在医疗过程中获得的冲洗液(例如盆腔冲洗液,或在活检、内窥镜检查或手术期间获得其它冲洗液)。与获得肿瘤的组织活检样品相比,使用生物流体样品针对表达 HE4 的肿瘤(例如卵巢癌或表达 HE4 的其它肿瘤)评估对象的临床状况的能力提供了相对的便利性。此外,它还使得能够在治疗期间和 / 或治疗后对患者进行监测,重要的是,允许早期检测卵巢癌(或表达 HE4 的其它肿瘤)的复发和 / 或进展。

[0049] 根据本发明的这方面的方法,测定从人类患者获得的生物样品中抗 HE4 抗体的浓度。任何免疫分析均可用于测定抗 HE4 抗体的浓度,例如酶联免疫吸附分析(ELISA)和放射免疫分析(RIA)、蛋白质印迹、FACS 分析等。更优选地,所述分析将能够产生定量结果。生物样品可以在分析之前被稀释在适当的缓冲液中,例如,可以以至少 1:2、1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50、1:80、1:100、1:200 或更大的系数将样品稀释。

[0050] 在一种实施方式中,通过将生物样品与 HE4 多肽接触来确定生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量,编码所述 HE4 多肽的多核苷酸选择性杂交于与 SEQ ID NO:1 或其包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸(或至少 25 或 30 个,或至少 40、60 或 80 个连续核苷酸)的片段具有至少 80% 同一性(例如至少 85% 同一性、或至少 90% 同一性、或至少 95% 同一性、或至少 99% 同一性)的序列。

[0051] 在另一种实施方式中,通过将生物样品与 HE4 多肽接触来确定生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量,所述 HE4 多肽与如 SEQ ID NO:2 所提供的人类可溶性 HE4 相关蛋白或其包含 SEQ ID NO:2 的至少 10 个连续氨基酸残基(或者,至少 20 个或至少 30 个,例如至少 50 个连续氨基酸残基)的片段具有至少 80% 同一性(例如至少 85% 同一性、或至少 90% 同一性、或至少 95% 同一性、或至少 99% 同一性)。

[0052] HE4 多肽的片段所具有的氨基酸序列含有比如 SEQ ID NO:2 中所示的全长 HE4 氨基酸序列少的氨基酸。在一些实施方式中,所述片段可以包括 N-端结构域 N-WFDC。如图

2 中所示, N-WFDC (SEQ ID NO :5) 从 SEQ ID NO :2 的 31 位氨基酸延伸至 75 位氨基酸。在一些实施方式中, 所述片段可以包括 C- 端结构域 C-WFDC。如图 2 中所示, C-WFDC (SEQ ID NO :6) 从 SEQ ID NO :2 的 76 位氨基酸延伸至 124 位氨基酸。HE4 的其它示例性片段可以包括具有对应于在 SEQ ID NO :2 的以下位置间延伸的氨基酸序列的氨基酸序列的多肽: 31-52 位 (SEQ ID NO :7)、42-63 位 (SEQ ID NO :8)、53-75 位 (SEQ ID NO :9)、76-100 位 (SEQ ID NO :10)、89-112 位 (SEQ ID NO :11)、89-112 位 (SEQ ID NO :12)、或 101-124 位 (SEQ ID NO :13)。在一些实施方式中, HE4 的片段可以跨越 N-WFDC 和 C-WFDC 结构域。示例性片段包括具有对应于从 SEQ ID NO :2 的 53 位延伸至 100 位的氨基酸序列的氨基酸序列的多肽。包含 SEQ ID NO :1 的至少 20 个连续核苷酸(或至少 25 或 30 个, 或至少 40、60 或 80 个连续核苷酸) 的片段可以是例如编码 SEQ ID NO :5-13 的 SEQ ID NO :1 的片段。

[0053] 本发明的抗 HE4 抗体特异性结合于 HE4 多肽上的表位。表位是指被互补位特异性结合的在靶标上的抗原决定簇, 即抗体的结合位点。表位决定簇通常由分子, 例如氨基酸或糖的侧链形成的化学活性表面簇构成, 并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特性。表位通常具有约 4 至约 10 个连续氨基酸(连续表位), 或者可以是限定特定结构的一组非连续氨基酸(例如构象表位)。因此, 表位可以由至少 4 个、至少 6 个、至少 8 个、至少 10 个和至少 12 个这样的氨基酸构成。确定氨基酸的空间构象的方法是本领域已知的, 并包括例如 x- 射线晶体学和二维核磁共振。

[0054] 可以使用标准方法来分析抗 HE4 抗体的结合。绘制表位图的方法是本领域公知的。表位的类型即线性或构象依赖性表位可以通过将抗体对变性和还原的 HE4 的反应性与抗体对未变性和还原的抗 HE4 的反应性进行比较来确定。抗 HE4 抗体对噬菌体融合蛋白的反应性可以被用于鉴定与 HE4 的特定片段的结合。这样的方法被描述在实施例 4 和 PCT US11/25321 中, PCT US11/25321 以其全文通过参考结合于此。

[0055] 特异性结合抗体可以是 1) 表现出阈值水平的结合活性的抗体, 和 / 或 2) 不与已知的相关多肽分子显著交叉反应的抗体。抗体的结合亲和性可以由本领域的普通技术人员通过例如 Scatchard 分析 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949) 容易地确定。

[0056] 在一些实施方式中, 抗 HE4 抗体结合于它们的 HE4 目标表位或模拟诱饵的亲和性可以比它们结合于据预测与 HE4 具有一定同源性的其它蛋白质的亲和性高至少 1.5 倍、2 倍、5 倍、10 倍、100 倍、 $10^3$  倍、 $10^4$  倍、 $10^5$  倍、 $10^6$  倍或更高。

[0057] 在一些实施方式中, 抗 HE4 抗体以  $10^{-4}$ M 以下、 $10^{-7}$ M 以下、 $10^{-9}$ M 以下的高亲和性或以亚纳摩尔的亲和性 (0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1nM 或甚至更低) 结合。在一些实施方式中, 所述抗体的结合亲和性为至少  $1 \times 10^6$ Ka、至少  $5 \times 10^6$ Ka、至少  $1 \times 10^7$ Ka、至少  $2 \times 10^7$ Ka、至少  $1 \times 10^8$ Ka 或更高。抗体还可以从它们对 HE4 的结合亲和性方面进行描述或指定。在一些实施方式中, 结合亲和性包括 Kd 小于  $5 \times 10^{-2}$ M、 $10^{-2}$ M、 $5 \times 10^{-3}$ M、 $10^{-3}$ M、 $5 \times 10^{-3}$ M、 $10^{-4}$ M、 $5 \times 10^{-5}$ M、 $10^{-5}$ M、 $5 \times 10^{-6}$ M、 $10^{-6}$ M、 $5 \times 10^{-7}$ M、 $10^{-7}$ M、 $5 \times 10^{-8}$ M、 $10^{-8}$ M、 $5 \times 10^{-9}$ M、 $5 \times 10^{-10}$ M、 $10^{-10}$ M、 $5 \times 10^{-11}$ M、 $10^{-11}$ M、 $5 \times 10^{-12}$ M、 $10^{-12}$ M、 $5 \times 10^{-13}$ M、 $10^{-13}$ M、 $5 \times 10^{-14}$ M、 $10^{-14}$ M、 $5 \times 10^{-15}$ M、或  $10^{-15}$ M 或更低的亲和性。

[0058] 在一种实施方式中, 通过使用 ELISA 分析来测定生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量。具体地, 标准的固相 ELISA 形式可用于从多种生物样品例如血清确定蛋白质或抗体的浓度。在一种形式中, 这样的分析包括将 HE4 多肽或其片段固定到固体基质例如聚苯乙烯

或聚碳酸酯微孔或浸渍片、膜或玻璃支撑物(例如载玻片)上。例如,可以利用 ELISA 板的包被有 HE4 的孔。将生物样品与包被有 HE4 的孔接触,并结合和捕获样品中的抗 HE4 抗体。在结合并洗涤以去除非特异性结合的免疫复合物后,检测抗体-抗原复合物。可以使用任何适合的方法例如添加连接有标签的第二抗体来进行检测。

[0059] 根据本发明这方面的方法的多种实施方式,可以从明显健康对象的对照组获得抗 HE4 抗体参比值,例如,如在实施例 2 和 3 中所描述的。在一些实施方式中,使用至少 1:20 稀释的从健康对象获得的血清在 ELISA 分析中确定抗体参比值。在一种实施方式中,使用从被确诊患有包含表达 HE4 的肿瘤细胞的癌症和/或先前对所述癌症进行过治疗的患者获得的血清来确定抗体参比值。用于检测血液样品中的抗 HE4 抗体水平的示例性 ELISA 分析被描述在实施例 2 中。

[0060] 根据本发明的预后应用,在一种实施方式中,然后将从卵巢癌患者获得的生物样品中抗 HE4 抗体的水平与抗体参比值进行比较。如果所测试的患者中抗体浓度高于参比值例如至少 1.5 倍、更优选至少 2 倍或更高且 P 值小于 0.05,并且患者先前已接受过对卵巢癌的治疗,则患者复发卵巢癌的可能性降低。如果卵巢癌患者中的抗体浓度低于参比值例如至少 1.5 倍或 2 倍或更低且 P 值小于 0.05,并且患者先前已接受过对卵巢癌的治疗,则患者复发卵巢癌的可能性增加。在另一种实施方式中,通过与阴性抗体对照样品进行比较并任选还与阳性抗体对照样品进行比较来确定抗 HE4 抗体的存在。

[0061] 另一方面,本发明提供了评估患有表达 HE4 的肿瘤的人类癌症患者的预后的方法。所述方法包括:(a) 通过将来自于患有表达 HE4 的肿瘤的人类患者的生物样品与多肽接触来确定所述生物样品中抗 HE4 抗体的存在或量,编码所述多肽的多核苷酸选择性杂交于与包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 80% 同一性例如至少 90% 同一性的序列;(b) 确定来自于步骤 (a) 中所测试的人类患者的生物样品中可溶性 HE4 相关肽(SHRP)的存在或量,编码所述可溶性 HE4 相关肽的多核苷酸选择性杂交于与包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 80% 例如至少 90% 同一性的序列;以及 (c) 将在步骤 (a) 中确定的抗 HE4 抗体的量与抗体参比水平进行比较,并将在步骤 (b) 中确定的 SHRP 的量与抗原参比水平进行比较,其中在所述样品中检测到比抗原参比水平低的量的 SHRP 以及在所述样品中检测到比抗体参比水平高的量的抗 HE4 抗体的组合指示患者的预后良好。

[0062] 根据本发明的这方面,所述方法包括确定从患有表达 HE4 的肿瘤的患者例如卵巢癌患者获得的生物样品中 SHRP 的存在和/或量的步骤。如上所述,SHRP 是已在健康和癌症患者两者的循环系统中被发现的可溶性蛋白质。可以使用任何能够检测和/或测定 SHRP 多肽的量的分析来确定 SHRP 的存在或量。

[0063] 在一种实施方式中,测定生物样品中 SHRP 多肽的浓度,编码所述 SHRP 多肽的多核苷酸选择性杂交于与 SEQ ID NO:1 或其包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸(或至少 25 或 30 个、或至少 40、60 或 80 个连续核苷酸)的片段具有至少 80% 同一性(例如至少 85% 同一性、或至少 90% 同一性、或至少 95% 同一性、或至少 99% 同一性)的序列。

[0064] 在另一种实施方式中,测定生物样品中 SHRP 多肽的量,所述 SHRP 多肽与如 SEQ ID NO:2 所提供的人类可溶性 HE4 相关蛋白或其包含 SEQ ID NO:2 的至少 10 个连续氨基酸残基(或者,至少 20 或至少 30 个例如至少 50 个连续氨基酸残基)的片段具有至少 80% 同一性

(例如至少 85% 同一性、或至少 90% 同一性、或至少 95% 同一性、或至少 99% 同一性)。

[0065] 可以使用任何方便的用于测定 SHRP 的方法来确定生物体液样品中存在的可溶性 HE4 相关蛋白 (SHRP) 的浓度和 / 或相对量或检测所述可溶性 HE4 相关蛋白, 所述方法包括但不限于 ELISA、放射免疫分析、化学发光分析、免疫荧光染色以及包含与 SHRP 特异性结合的抗体的类似方法。其它蛋白质检测方法也可用于测定 SHRP, 包括质谱法、蛋白质印迹、FACS 等。适合的生物样品包括选自以下的生物流体: 血液、血浆、血清、腹水和尿液。

[0066] 可以使用常规技术容易地制备针对 SHRP 及其变体的特异性抗体、包括单克隆抗体, 并且所述抗体可以被用在这样的方法中。例如, 使用 2H5 和 3D8 (识别相同抗原上的两个不同的表位) 两种 MAbs 的双决定簇 (“夹心”) ELISA 分析可用于检测血清中的 SHRP, 如 Hellstrom, I. 等, *Cancer Research* 63:3695-3700 (2003) 中所描述的。其它 ELISA 分析也可被用于使用上述抗体或其它抗 HE4 抗体检测一种或多种 HE4 变体。

[0067] 根据本发明这方面的方法的多种实施方式, 可以从明显健康对象的对照组获得 SHRP 抗原参比值, 例如, 如实施例 3 中所描述的。在一些实施方式中, 使用从健康对象获得的血清在 ELISA 分析中确定抗原参比值。例如, 在血清样品中, 血清可以被稀释高达 1:100, 并在 ELISA 分析中进行测定, 其中从健康对象获得的阴性对照给出 <0.2 的吸光度值, 并且从卵巢癌患者获得的阳性对照给出 >0.2 的吸光度值。参见 Hellstrom, I. 等, *Cancer Research* 63:3695-3700 (2003)。可以通过本领域已知的任何方法来确定吸光度值。例如, 常用的是往往被称为光密度 (OD) 的在 450 纳米处的光的吸光度。在一种实施方式中, 使用从被确诊患有包含表达 HE4 的肿瘤细胞的癌症和 / 或先前对所述癌症进行过治疗的患者获得的血清来确定抗原参比值。

[0068] 在一些实施方式中, 本发明的方法还包括确定从所述对象获得的生物样品中另一种卵巢癌标志物的水平的步骤, 所述另一种卵巢癌标志物例如整合素连接激酶 (INK)、CA125、TADG-12、激肽释放酶 10、前列腺蛋白 (prostasin)、骨桥蛋白、肌酸激酶  $\beta$ 、血清铁传递蛋白、嗜中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)、CD163 或 Gc 球蛋白。可以使用本领域已知的常规方法在 DNA、RNA 或蛋白质水平检测第二标志物。

[0069] 另一方面, 本发明提供了监测被确诊患有表达 HE4 的肿瘤的人类患者的治疗功效的方法。所述方法包括: (a) 确定在开始癌症治疗之前从被确诊患有表达 HE4 的肿瘤的人类患者获取的第一生物样品中 HE4-间皮素抗体的第一浓度; (b) 确定在开始癌症治疗之后从所述人类患者获取的第二生物样品中抗 HE4 抗体的第二浓度; 以及 (c) 将抗 HE4 抗体的第一浓度和第二浓度进行比较, 其中与在第一生物样品中测定到的抗 HE4 抗体的第一浓度相比, 抗 HE4 抗体的第二浓度增加指示对癌症的治疗的阳性响应。

[0070] 根据本发明这方面的方法, 在开始治疗之前从癌症患者获取第一生物样品, 并且在开始治疗之后从所述患者至少获取一次第二生物样品。在一些实施方式中, 在开始治疗之后经周期性时间间隔从对象 (例如在临床前试验中的对象) 获取多个处理过的生物样品。

[0071] 在本文中使用时, 术语 “治疗” 是指外科手术或施用一种或多种用于减轻与癌症相关的症状或停止所述症状的进一步进展或恶化的癌症抑制剂。例如, 成功治疗可以包括切除肿瘤例如表达 HE4 的肿瘤; 减轻症状或停止疾病的进展, 如由肿瘤的生长率降低所测定的; 肿瘤生长的停止; 肿瘤大小的降低; 癌症的部分或完全缓解; 或者存活或临床益处增加。例如, 患有表达 HE4 的肿瘤的对象的治疗可以包括以下的一种或多种: 手术切除一种或

多种肿瘤,和 / 或施用治疗剂例如化疗、放射疗法,蛋白质治疗剂(例如抗体、基因疗法、癌症疫苗疗法、干细胞移植等)。

[0072] 例如,对于卵巢癌的治疗而言,手术是优选的治疗。手术的类型取决于癌症被确诊时的扩散程度(癌症期)以及癌症的类型和等级。外科医生可以切除一侧(单侧卵巢切除术)或双侧卵巢(双侧卵巢切除术)、输卵管(输卵管切除术)和子宫(子宫切除术)。对于一些非常早期的肿瘤(1期、低等级或低风险的疾病)来说,只会切除所涉及的卵巢和输卵管(称为“单侧输卵管卵巢切除术”或“USO”),尤其是在希望保持其生育能力的年轻女性中。在疾病的晚期中,尽可能多的肿瘤被切除(瘤体减灭术)。在这种类型的手术是成功的情形下,与留下大的肿瘤块(直径大于1cm)的患者相比,预后得到改善。在手术后通常使用化疗来治疗任何残留的疾病。化疗剂例如铂衍生物(例如紫杉烷)可以被全身施用,或者可以通过直接输注到腹腔中进行腹膜内施用。用于治疗卵巢癌的治疗剂的其它实例包括但不限于蛋白质治疗剂(例如抗体)、基因疗法、癌症疫苗疗法和干细胞移植。还可以使用本发明这方面的方法来测定用于治疗卵巢癌的候选治疗剂的功效。

[0073] 还可以使用本发明这方面的方法来确定在接受治疗例如手术切除肿瘤后的患者的临床状况。根据该实施方式,然后将从已对表达 HE4 的肿瘤进行过治疗的癌症患者获得的生物样品中抗 HE4 抗体的水平与抗体参比值进行比较。如果所测试的患者中抗体浓度高于参比值例如至少 1.5 倍、更优选至少 2 倍或更高且 P 值小于 0.05,则患者的临床状况据预期能被治疗改善(即,患者复发卵巢癌的可能性降低)。如果所治疗的癌症患者中抗体浓度低于参比值例如至少 1.5 倍或 2 倍或更低且 P 值小于 0.05,则患者的临床状况据预期不能被治疗改善(即,患者复发卵巢癌的可能性增加)。

[0074] 另一方面,本发明提供了用于检测人类对象中 HE4 表达细胞的存在试剂盒。所述试剂盒包含特异性检测从人类对象获得的生物样品中抗 HE4 抗体的试剂,以及用于将检测到的抗 HE4 抗体的存在或量与参比标准进行比较的印刷的说明书。可以使用本发明的试剂盒来执行本文中描述的用于检测抗 HE4 抗体的方法。在一种实施方式中,所述试剂盒包含用于检测抗 HE4 抗体的检测试剂,所述检测试剂包含 HE4 多肽,编码所述 HE4 多肽的多核苷酸选择性杂交于与包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸的序列具有至少 80% 同一性、或至少 90% 同一性、或至少 95% 同一性、或至少 98% 同一性、或至少 99% 同一性的序列。在一些实施方式中,所述试剂盒包含用于检测抗 HE4 抗体的检测试剂,所述检测试剂包含与包含 SEQ ID NO:2 的至少 10 个连续氨基酸的氨基酸序列具有至少 80% 同一性、或至少 90% 同一性、或至少 95% 同一性、或至少 98% 同一性、或至少 99% 同一性的 HE4 多肽。在一些实施方式中,所述试剂盒包含被固定到固体基质上的 HE4 多肽或其片段,所述固体基质例如聚苯乙烯或聚碳酸酯微孔或浸渍片、膜或玻璃支撑物(例如载玻片)。例如,可以利用 ELISA 板的包被有 HE4 的孔,其中将生物样品与包被有 HE4 的孔接触,并结合和捕获样品中的抗 HE4 抗体。

[0075] 在一些实施方式中,所述试剂盒还包含选自以下的参比标准:特定的数值阈值、用于并行评估的阴性对照样品、以及将检测到的抗 HE4 抗体的量与所述对象中存在表达 HE4 的癌细胞的可能性相关联的统计学信息。在一些实施方式中,参比标准是阴性对照样品,并且其中所述阴性对照样品被包含在试剂盒中。

[0076] 在优选的实施方式中,本发明的方法和试剂盒能够在现场(point-of-care)位

置例如医疗诊所(例如医生办公室)或医院进行使用,以便快速获得测试结果。现场测试(Point-of-care testing)(POCT)是指任何医院或医疗诊所(例如医生办公室)的工作人员在中心实验室之外执行任何类型的实验室测试。POCT通过有效地在患者的床边为多种测试例如HIV测试、尿浸渍片等提供实验室结果使得患者护理过程的连续性得以革新。例如,已开发出用于检测HIV抗体的快速测试,所述测试表现出与酶免疫分析相当的灵敏度和特异性,而不需要复杂的实验室设备和高度培训后的技术人员。用未处理的全血或口腔液样本即可使用POCT。参见Branson, B. M., J. Lab. Medicine 27(7/8):288-295(2003)。POCT分析可以是允许快速测试的任何分析形式,例如粒子凝集、免疫浓缩和免疫层析。

[0077] 例如,用于检测抗HE4抗体的粒子凝集POCT分析可以通过将含有抗HE4抗体的患者样本与包被有HE4多肽(抗原)的胶乳粒子混合来执行,如果存在抗HE4抗体,则在10至60分钟内发生交联并导致凝集,其结果是可见的。

[0078] 在用于检测抗HE4抗体的POCT分析形式的另一种实例中,可以使用免疫浓缩装置(流过),所述装置采用固相捕获技术,所述技术包括将HE4多肽(抗原)固定在多孔膜上。患者样本流过所述膜并被吸收到吸收垫中。如果所述样本中存在抗HE4抗体,则当用信号试剂(例如胶体金或硒结合物)显影时,在所述膜上形成可见的点或线。程序性对照也可以被包含在所述膜上。

[0079] 在用于检测抗HE4抗体的POCT分析形式的又一种实例中,可以使用免疫层析(侧向流动)条,其将抗原(HE4)和信号试剂两者掺入到硝酸纤维素条中。将患者样本施加到吸收垫上,或者可以将所述样本稀释在其中插入测试设备的缓冲液小瓶中。所述样本迁移通过所述条并与信号试剂结合。阳性反应在其中已施加了HE4抗原的膜上产生可见的线。可以将程序性对照线施加到所述条上HE4抗原线以外的地方。

[0080] 下面的实施例只说明现在所设想的用于实施本发明的最佳模式,但不应被解释为限制本发明。

[0081] 实施例1

[0082] 该实施例描述了在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中生产和纯化重组人附睾蛋白4(HE4)蛋白。

[0083] 方法:

[0084] HE4-CIHDpa质粒的构建

[0085] 如下产生重组HE4蛋白(SEQ ID NO:2)。

[0086] 使用下面的引物通过高保真聚合酶链反应扩增编码人附睾蛋白4(HE4)(SEQ ID NO:2)的cDNA片段:

[0087] 正向正义引物:

[0088] 5'-AAAAACCGGTATGCCTGCTTGTGCGCTAGG-3'(SEQ ID NO:3)被设计成在适合于克隆的基因的5'末端引入Age I限制性内切酶识别位点。

[0089] 反向反义引物:

[0090] 5'-AAAACCTGCAGGTCAGAAATTGGGAGTGACAC-3'(SEQ ID NO:4)被设计成在适合于克隆的基因的3'末端引入Sbf I限制性内切酶识别位点。

[0091] 用Age I和Sbf I消化含有HE4cDNA的扩增的DNA片段,并将其克隆到CIHDpa哺乳动物表达载体中(通过用HE4片段替代IFN- $\gamma$ )。由新加坡国立大学的Say Kong Ng博

士提供的 CIHDpa 载体在选择标记上使用去稳定序列以提高 CHO-DB44 细胞中的重组蛋白生产率,如在 Ng 等, *Metab Eng*9:304(2007) 中所描述的,其通过参考结合于此。简单地说, CIHDpa 表达载体在 cDNA 插入位点的上游含有标准的巨细胞病毒(CMV)启动子。单纯疱疹病毒胸苷激酶(HSV-th)启动子位于二氢叶酸还原酶(dhfr)基因的上游,所述二氢叶酸还原酶基因是成功转染子的选择标记(即, dhfr 缺陷的细胞需要次黄嘌呤和胸苷补充剂而生存)。紧邻 dhfr 标记下游的是鼠类鸟氨酸脱羧酶 PEST (MODC PEST)区和一系列富含 AU 的元件(ARE),所述元件被表达为在 dhfr 蛋白的羧基末端的融合组分。MODC PEST 肽起到导致标记蛋白的不稳定性的降解信号的作用。ARE 区起到使编码标记蛋白的 mRNA 不稳定化的作用。随着 dhfr 标记在转录和翻译水平的不稳定化,只有高效生产质粒编码的蛋白质的转染细胞才能存活,从而导致在选择后重组 HE4 蛋白的生产率提高。

[0092] 得到的含有 HE4 的表达载体被命名为“HE4-CIHDpa”,通过限制性内切酶分析证实所述表达载体,并且还通过对完整的 cDNA 插入片段进行测序来证实插入的 HE4cDNA。

[0093] 将 HE4-CIHDpa 质粒转染到中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中

[0094] 在 37°C 和 5%CO<sub>2</sub> 下将二氢叶酸还原酶缺陷(DHFR-)的中国仓鼠卵巢(CHO-DG44)细胞生长在无血清的 CHO 培养基(Hyclone, Logan, Utah; SH30333)中。用每孔 500 μl 的无血清培养基将 0.5×10<sup>6</sup> 或 1×10<sup>6</sup> 个 CHO-DG44 细胞接种到 24 孔板的每个孔中,并在上述条件下温育过夜。在 100 μl Opti-MEM 无血清培养基中将 1 μg 或 5 μg 无内毒素的 HE4-CIHDpa 质粒与 2 μl Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)组合。在温育 20 分钟后,将 DNA-Lipofectamine™ 复合物加入到含有 CHO-DG44 细胞的每个孔中。然后将细胞转移到补充有次黄嘌呤和胸苷(“HT”)的 HyQ PF-CHO 培养基中并允许恢复 2 天,然后转移到没有补充 HT 的 HyQ PF-CHO 培养基中以对转染子进行选择。在选择培养基中 28 天后,用 1 μg 质粒转染的 1×10<sup>6</sup> 个细胞生长,并以 >95% 的细胞存活率回收。

[0095] 通过转染的 CHO 细胞生产和纯化 HE4 蛋白

[0096] 通过使用由 Fujirebio Diagnostics, Inc. 销售的可商购的试剂盒对来自于转染有 HE4-CIHDpa 质粒的 CHO 细胞的培养上清液中 HE4 蛋白的生产进行评估,所述试剂盒基于双决定簇(夹心)ELISA 分析,如 Hellstrom I. 等, *Cancer Research*63:3695-3700 (2003) 中所描述的,其通过参考结合于此。

[0097] 如在 Hellstrom 等 (2003) 中所描述的,将单克隆抗体 3D8 (特异性针对 HE4 上的一个表位)在分析板的孔上包被过夜,然后将来自于转染有 HE4-CIHDpa 质粒的 CHO 培养物的 100 μl 上清液加入到细胞中并温育 1 小时。然后将分析板与生物素化的第二抗 HE4 单克隆抗体 2H5 (特异性针对不同的 HE4 表位)温育 1 小时。

[0098] 加入过氧化物酶的发色底物 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺)(KPL, Gaithersburg, MD)并允许温育 15 分钟。获得 450nm 处的光密度(OD)读数。来自于 CHO 上清液的 OD<sub>450</sub> 为 3.1,相比之下,单独的培养基的 OD<sub>450</sub> 为 0.078,表明 CHO 细胞高表达 HE4 蛋白,并且 HE4 蛋白被分泌到培养基中。

[0099] 通过亲和层析纯化 HE4 重组蛋白

[0100] 如下通过亲和层析从转染有 HE4-CIHDpa 质粒的高生产的 CHO 细胞系纯化重组 HE4 蛋白。

[0101] 将抗 HE4 单克隆抗体 3D8 和 2H5 偶联到 6-氨基己酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯活化的

琼脂糖 4B (Sigma, St. Louis, Missouri; #A9019)。简单地说,将 0.5g 粉末在 1mM HCl 中溶胀 15 分钟。将珠子排出并重新悬浮在含 3mg 抗 HE4 单克隆抗体的 1ml 的 0.5M NaCl/0.1M NaHCO<sub>3</sub> (pH8.3) 溶液中。将柱子在 4°C 下储存过夜。第二天,用 1M Tris-HCl 将树脂封闭 2 小时。通过用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤树脂来去除未结合的抗 HE4 单克隆抗体。收集来自于转染有 HE4-CIHDpa 质粒的 CHO 细胞的大规模培养物的上清液,并用 NaHCO<sub>3</sub> 将 pH 调节至 pH8.0。将调节后的细胞上清液施加到柱子,并用 0.1M 甘氨酸-HCl(pH2.7)洗脱结合的 HE4 蛋白,并用 200  $\mu$ l 2M Tris-HCl 进行中和。用 10kD 离心过滤管(Millipore, Billerica, MA)浓缩洗脱的 HE4 蛋白。通过如上所述执行的夹心 ELISA 对柱纯化的 HE4 重组蛋白进行分析。ELISA 分析的结果被显示在下面的表 1 中。

[0102] 表 1 :通过夹心 ELISA 确定的 HE4 蛋白的存在。

[0103]

样品	稀释系数	OD450
未纯化的 CHO 上清液(即在柱纯化之前)	未稀释	2.832
CHO 培养基对照	未稀释	0.110
柱纯化的 HE4 蛋白(0.1 $\mu$ g)	未稀释	3.432

[0104] 如上所述获得柱纯化的从 CHO 细胞获得的人重组 HE4 蛋白,并将所述蛋白汇集用于开发检测患者样品中的抗 HE4 抗体的 ELISA 分析,如实施例 2 中所描述的。还在 ELISA 分析中测试了重组人 HE4 蛋白与小鼠抗 HE4 抗体的结合,并且确定了小鼠抗 HE4 抗体识别天然和重组两种人 HE4 蛋白(数据未示出)。

[0105] 结论:

[0106] 这些结果证实成功克隆、表达和纯化了来自于 CHO 细胞的重组人 HE4 蛋白。

[0107] 实施例 2

[0108] 该实施例描述了能够检测人血清中天然存在的人类抗 HE4 抗体的 ELISA 分析的成功开发。

[0109] 方法:

[0110] 用于检测抗 HE4 抗体的 ELISA 分析的开发:

[0111] 如下开发 ELISA 分析用于检测 / 测定血清中抗 HE4 抗体的量。将 0.6  $\mu$ g/mL 纯化的重组人 HE4 蛋白(如实施例 1 中所描述的生产)在 ELISA 分析板的孔上包被过夜。留下匹配孔未包被作为背景对照。在用 3%BSA/PBS 封闭 2 小时后,将稀释度为 1:20 和 1:40 的人血清或血浆(如下文所述获得)添加到 ELISA 分析板上的所有孔中。样品和试剂两者的所有稀释都在 3%BSA/PBS 中执行。

[0112] 在与结合 HRP 的小鼠抗人 IgG 抗体和 TMB 底物温育后,用 Dynatech MR5000 酶标仪在 450nm 处扫描分析板。背景对照(由于 IgG 非特异性粘附于 ELISA 分析板对照孔的固有性质引起的粘性)被测定为平行对照孔(其上未连接抗原)中的 OD450,并从包被的孔中的读数减去背景对照值以得到最终的 IgG 水平。

[0113] 从卵巢癌患者获得的血浆样品

[0114] 进行了试验性研究,其中从 10 个卵巢癌患者和 1 个健康女性对象获得血浆样品,

并在抗 HE4 ELISA 分析中进行测试,以测试天然存在的抗 HE4 抗体的存在,所述 10 个卵巢癌患者中大部分已患有晚期(III-IV 期)疾病。以 1:20 和 1:40 的稀释度将人血浆样品加入到 ELISA 板的每个孔中,并在室温下温育 1 小时。用 PBS-吐温 20 洗涤所述孔,然后将 1:1000 稀释的结合 HRP 的小鼠抗人 IgG 抗体(Invitrogen, Carlsbad, California)加入到每个孔中,并在室温下温育 1 小时。在再次用 PBS-吐温 20 洗涤所述板后,将 SureBlue™TMB 微孔过氧化物酶底物(KPL)加入到每个孔中,并在室温下温育 15 分钟,然后通过加入 TMB 停止溶液(KPL)来终止相互作用。用 DynaTech MR5000 酶标仪(DynaTech Laboratories, Inc.)测定 450 纳米处的光密度(OD)。

[0115] 结果:

[0116] 对来自于人血清样品的抗 HE4 抗体的存在 / 量进行测试的 ELISA 分析的结果被显示在图 1 中。如图 1 中所示,10 个卵巢癌患者中有 1 个患者(对象 He213)的两个稀释度的 OD<sub>450</sub> ≥ 1.0,从而指示抗 HE4 抗体的存在。值得注意的是,使用如美国专利 No. 7, 270, 960 中描述的用于检测 HE4 抗原的存在的分析发现来自于患者 He213 (具有抗 HE4 抗体阳性的血浆)的血浆对于 HE4 抗原的存在而言是阴性的(数据未示出),所述美国专利通过参考结合于此。然而,据显示,源自于患者 He213 的肿瘤的培养的肿瘤细胞表达 HE4 抗原(数据未示出)。

[0117] 结论:

[0118] 该实施例中描述的结果证实成功开发了能够检测人血清中天然存在的人类抗 HE4 抗体的 ELISA 分析。所述结果还证实了患有卵巢癌的对象中存在抗 HE4 抗体。根据我们以前对抗间皮素(mesothelium)抗体的研究(参见 Hellstrom I. 等, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 17(6):1520-1526(2008)),据期望,在正接受或已接受治疗(通过手术、化疗、放射和 / 或免疫疗法)的卵巢癌患者中鉴定到的抗 HE4 抗体的存在或滴度增加单独或与 HE4 抗原的量降低(与开始治疗时的基线量相比)或没有循环的 HE4 抗原这一发现的组合将指示癌症疗法已有效地破坏肿瘤。此外,据预期,在正接受治疗的卵巢癌患者中抗 HE4 抗体的滴度降低或无可检测的抗 HE4 抗体单独或与循环的 HE4 抗原的量增加(与开始治疗时的基线量相比)的组合将指示癌症疗法在破坏肿瘤方面是无效的,和 / 或指示复发。

[0119] 实施例 3

[0120] 该实施例描述了一个研究,其中所开发的用于检测抗 HE4 抗体的存在 / 量的 ELISA 分析(被描述在实施例 2 中)被用于滴定来自于 3 个卵巢癌患者和 20 个健康女性对照对象的血清中存在的抗 HE4 抗体的量。

[0121] 方法:

[0122] 从卵巢癌患者获得的血清样品

[0123] 如下表 2 中所示,在弗雷德哈钦森癌症研究中心(Fred Hutchinson Cancer Research Center) (Seattle, Washington) 从 3 个早期(I/II) 卵巢癌患者和 20 个健康人类女性对象获得血清样品,下表 2 中示出了 20 个健康人类女性对象中的 4 个。从对象抽取血清,并使用如实施例 2 中描述的方法进行分析。

[0124] 结果:

[0125] 使用实施例 2 中描述的 ELISA 方法对稀释度为 1:20 和 1:40 的如上所述获得的血清进行分析。结果被总结在下面的表 2 中。

[0126] 表 2:使用用于检测/测定 HE4 抗体的 ELISA 分析对来自于 3 个卵巢癌患者和 4 个健康对照的血清的 HE4 抗体进行分析的结果。

患者编号	临床疾病/病症	<b>OD450&gt;0.500</b> (至少在 1:20 的稀释度中)
100C17	卵巢癌	+
206241	卵巢癌	+
208448	卵巢癌	+
[0127] 1	健康女性对照	-
2	健康女性对照	-
3	健康女性对照	-
4	健康女性对照	-
5-24 (共 24 个健康女性对照对象)	健康女性对照	3 个阳性/21 个阴性 (共测试了 24 个)

[0128] 如表 2 中所总结的,来自于卵巢癌患者的所有 3 个血清样品和来自于健康女性对象的 24 个血清样品中的 3 个血清样品的 1:20 稀释度的 OD450>0.5。如表 2 中所示的,所有 3 个卵巢癌患者在其血清中均具有抗 HE4 抗体,如由 1:20 稀释度的 OD450>0.5 所指示的。这些结果与实施例 2 中所描述的结果一致,并且进一步证实成功开发了能够检测人血清中天然存在的人类抗 HE4 抗体的 ELISA 分析。所述结果还证实患有早期和晚期两种卵巢癌的对象中存在抗 HE4 抗体。

[0129] 实施例 4

[0130] 与展示为噬菌体融合蛋白的 HE4 片段的反应性

[0131] 在噬菌体 ELISA 中,通过测试表现出抗 HE4 反应性的人类样品对 HE4 片段的反应性来确定人类抗 HE4 抗体的表位特异性,所述 HE4 片段被表达为具有噬菌体外壳蛋白 pVIII 的融合蛋白。

[0132] 在 f88-4 中克隆 HE4 片段

[0133] 从分离自 OvCar-3 细胞的 mRNA 制备 cDNA 用作于 PCR 扩增的模板,所述 PCR 扩增的是编码 HE4 结构域的基因部分,其用于在噬菌体展示载体 f88-4 中的克隆。构建了表 3 中列出的 PCR 引物对,用于扩增图 x 中指出的编码区。在 5'-末端中是插入的 Hind III 和 PstI 限制性位点,用于在与 pVIII 信号肽和 pVIII 成熟外壳蛋白融合中的克隆。

[0134] 表 3. 用于扩增 HE4 片段的 PCR 引物

[0135]	引物	序列 5' 至 3'	WAP
[0136]	W1F1	TGCTAAGCTTTGCC GAGAAGACTGGCGTGTCCCC	N-WAP
[0137]	W1F2	TGCTAAGCTTTGCC AGCGAATGCGCCGACAACC	N-WAP
[0138]	W1F3	TGCTAAGCTTTCCC GACCAGAACTGCACGCAAG	N-WAP
[0139]	W1R1	CCTTCTGCAGG ATCATTGGGCAGACAGCAG	N-WAP

[0140]	WIR2	CCTTCTGCAGG GTCCGAGACGCACTCTTGC	N-WAP
[0141]	WIR3	CCTTCTGCAGG GCTGCAGCACTTGAGGTTG	N-WAP
[0142]	W2F1	TGCTAAGCTTTGCC AACCCAGGGTTCTGCCCCCA	C-WAP
[0143]	W2F2	TGCTAAGCTTTGCC AGCCAGTGTCTGGCCAG	C-WAP
[0144]	WZF3	TGCTAAGCTTTGCC CAGCTCGGCCTCTGTCTGGGAC	C-WAP
[0145]	W2R1	CCTTCTGCAGG GAAATTGGGAGTGACACAGGA	C-WAP
[0146]	W2R2	CCTTCTGCAGG GTCCACCTGGCACTGGTCC	C-WAP
[0147]	WZR3	CCTTCTGCAGG ATTGCGGCAGCATTTCATCTG	C-WAP

[0148] 在含有各 1  $\mu$  M 的正向和反向引物、75mM Tris-HCl (pH8.8, 在 25  $^{\circ}$ C 下)、20mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1% (v/v)吐温 20、2mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.02u/ $\mu$ l Taq 聚合酶(Abgene, Surrey, UK)和各 0.1mM 的脱氧核苷酸的最终体积为 25  $\mu$ l 的反应混合物中,使用下面的温度循环重复 30 次,从 0.5  $\mu$ l 在所述反应混合物中的 cDNA 分别扩增 HE4 片段:在 95 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C 和 72 $^{\circ}$ C 下温育 30 秒。

[0149] 将 PCR 产物和 f88-4 用 Hind III 和 PstI 消化并连接在一起,并转染到大肠杆菌(E. coli) JM109 中,然后在具有四环素的 LB 板上选择克隆。在大肠杆菌 JM109 中扩增了每个构建物的两个克隆,并制备双链 DNA 用于 DNA 测序。使用大染料终止物 v1.1 循环测序试剂盒和 f88-4 载体特异性引物进行 DNA 测序。测序反应被送到 CyberGene AB (Huddinge, Sweden) 进行分析。使用免费软件 Chromas1.45 版(Technelysium Pty Ltd., Australia) 分析序列的原始数据。核苷酸测序证实了在具有前导肽和成熟噬菌体外壳蛋白 pVIII 的框中的插入序列。HE4 插入序列证实与预期的 HE4 片段序列(登录号 AY212888)一致。使用表 1 中所示的引物被表达为具有外壳蛋白 pVIII 的融合蛋白的 HE4 片段的位置被显示在图 2 中。氨基酸数字是指在 SEQ ID NO:2 所示的 HE4 氨基酸序列中的位置。

#### [0150] 噬菌体 ELISA

[0151] 将序列验证后的噬菌体克隆扩增、纯化、用 PEG/NaCl 浓缩、并稀释在 PBS 中用作直接噬菌体 ELISA 分析中的包被抗原,或者稀释在含 1%BSA 的 PBS 中作为夹心噬菌体 ELISA 中的抗原。

[0152] 在直接噬菌体 ELISA 中,将 HE4 片段噬菌体稀释在 pH9.2 的碳酸盐缓冲液中,并包被在微孔滴定板的孔中。在将患者血清稀释在 PBS-1%BSA 中并在 HE4 噬菌体包被的板中温育后,确定人类抗 HE4 抗体的结合。通过与 HRP 抗 hIg 抗体温育来确定结合的 hIg。

[0153] 在夹心 HE4 噬菌体 ELISA 中,用 PBS-1%BSA 稀释患者样品,并在包被有抗人 IgG 抗体的微量滴定板中进行温育以吸附 hIgG。将包被的板与以 100  $\mu$ l/孔的体积加入的不同的 HE4pVIII 噬菌体粒子进行温育。在温育 2 小时后,洗涤孔,并加入兔抗 M13 抗体(内部建立)。在温育和洗涤后,加入带 HRP 标签的猪抗兔抗体(Dako)。在最后一次洗涤后,加入 TMB 底物,并在温育 5 分钟后在 620nm 处对板进行测定,野生型 M-13 噬菌体在两种 ELISA 分析中都被用作阴性对照。

[0154] 尽管已说明和描述了本发明的优选实施方式,但应意识到,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以在其中作出多种改变。

#### [0155] 序列表

- [0156] SEQIDNO :1 :HE4cDNA (人类),486bp, CDS :38-418
- [0157] GenBank :AY212888. 1 人类 HE4 蛋白(WFDC2) mRNA,完整的 cds
- [0158] TGAGAGAAAGGGGCCGACCCCGCCGGCATAGCACCATGCCTGCTTGTGCGCTAGGCCCGCTAGCCGC  
C
- [0159] GCCCTCCTCCTCAGCCTGCTGCTGTTTCGGCTTCACCCTAGTCTCAGGCACAGGAGCAGAGAAGACTGGC  
G
- [0160] TGTGCCCCGAGCTCCAGGCTGACCACAACTGCACGCAAGAGTGCCTCGGACAGCGAATGCGCCGACA  
A
- [0161] CCTCAAGTGTGTCAGCGCGGGCTGTGCCACCTTCTGCTCTCTGCCCAATGATAAGGAGGGTTCTGCC  
C
- [0162] CAGGTGAACATTAACCTTTCCCCAGCTCGGCCTCTGTGCGGACCAGTGCCAGGTGGACAGCCAGTGTCT  
G
- [0163] GCCAGATGAAATGCTGCCGCAATGGCTGTGGGAAGGTGTCCTGTGTCACTCCCAATTTCTGAGCTCCGG  
C
- [0164] CACCACCAGGCTGAGCAGTGAAGATAGAAAAGTTTCTGCCTGGCCCTGCAGCGTGTACAGCCCACC
- [0165] SEQIDNO :2 :HE4 蛋白(人类) (124 个氨基酸)
- [0166] GenBank :AA052683. 1 HE4 蛋白 [ 人类 ]
- [0167] MPACRLGPLAAALLLSLLLFGFTLVSGTGAEKTGVCPLLQADQNCTQECVSFSECADNLKCCSAGCATF  
CSL
- [0168] PNDKEGSCPQVNTMFPQLGLCRDQCQVDSQCPGQMKCCRNGCGKVSCVTPNF
- [0169] SEQ ID NO :3 : (正向引物)
- [0170] 5' -AAAAACCGGTATGCCTGCTTGTGCGCTAGG-3
- [0171] SEQ ID NO :4 (反向引物)
- [0172] 5' -AAAACCTGCAGGTCAGAAATTGGGAGTGACAC-3'

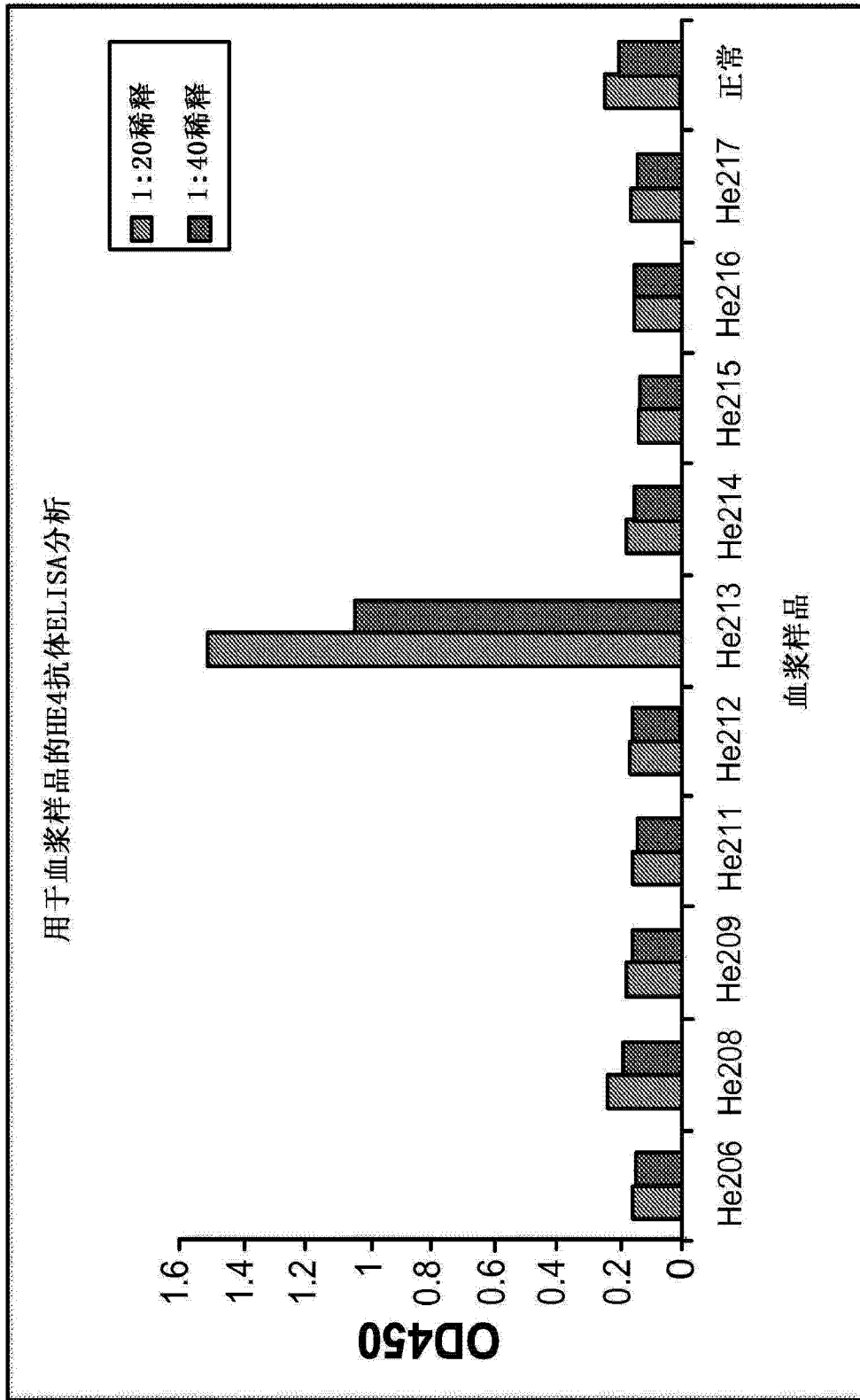


图 1

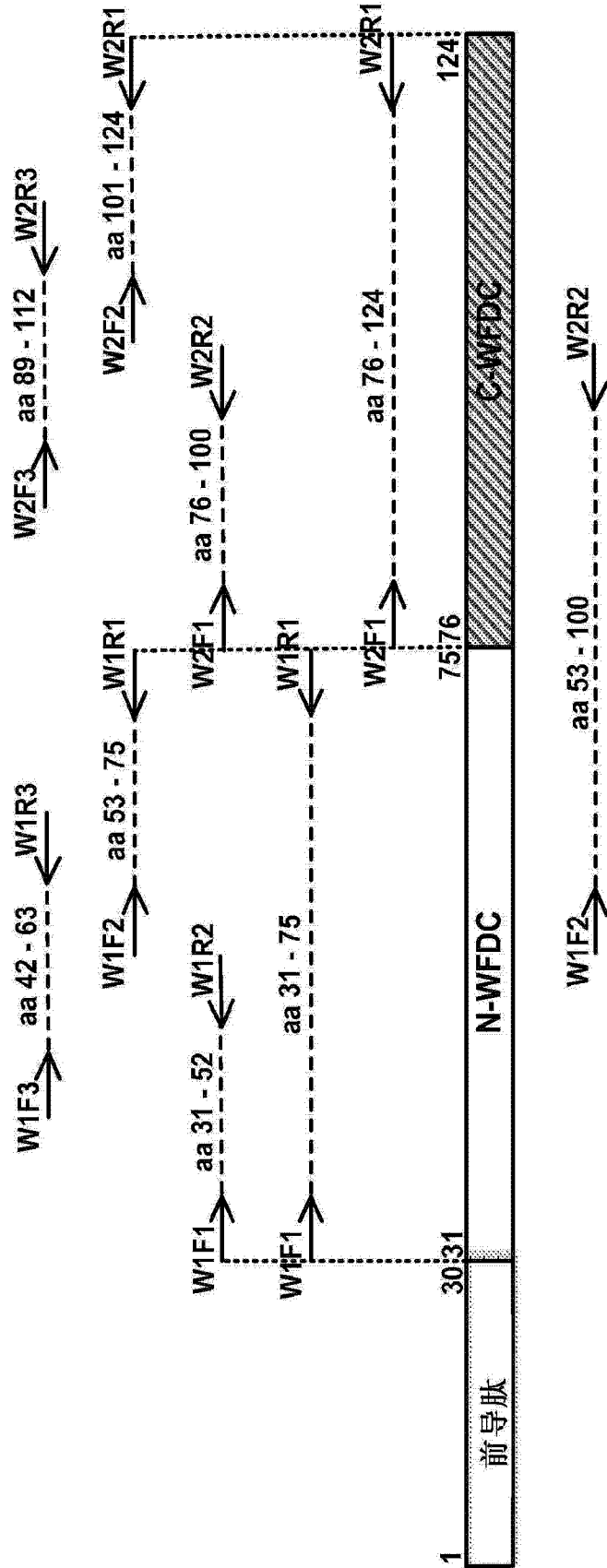


图 2

专利名称(译)	检测抗HE4抗体的方法以及诊断和/或预后与HE4表达细胞相关的病症的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103180732A</a>	公开(公告)日	2013-06-26
申请号	CN201180051336.5	申请日	2011-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	华盛顿大学		
申请(专利权)人(译)	华盛顿大学商业中心		
当前申请(专利权)人(译)	华盛顿大学商业中心		
[标]发明人	卡尔埃里克赫尔斯特罗姆 因格戈尔德赫尔斯特罗姆 刘璞 嘉德贾法尔 伊丽莎白思惟舍尔		
发明人	卡尔·埃里克·赫尔斯特罗姆 因格戈尔德·赫尔斯特罗姆 刘璞 嘉德·贾法尔 伊丽莎白·思惟舍尔		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/57449 G01N2800/52		
代理人(译)	张颖 谢丽娜		
优先权	61/377387 2010-08-26 US		
其他公开文献	CN103180732B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明的特征在于与检测对象中表达HE4的肿瘤细胞相关的组合物和方法等。所述方法包括检测从所述对象获得的生物样品中的抗HE4抗体。所述方法可用于诊断和监测癌症的治疗功效，在所述癌症中表达有HE4，例如卵巢癌。

患者编号	临床疾病/病症	OD450>0.500 (至少在1:20的稀释度中)
100C17	卵巢癌	+
206241	卵巢癌	+
208448	卵巢癌	+
1	健康女性对照	-
2	健康女性对照	-
3	健康女性对照	-
4	健康女性对照	-
5-24 (共 24 个健康女性对照对象)	健康女性对照	3 个阳性/21 个阴性 (共测试了 24 个)