

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610071748.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年9月26日

[11] 公开号 CN 101042402A

[22] 申请日 2006.3.24

[21] 申请号 200610071748.6

[30] 优先权

[32] 2005.3.24 [33] KR [31] 10-2005-24363

[71] 申请人 生物哲麦克斯公司

地址 韩国京畿道

[72] 发明人 尹S·调正

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 程金山

权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 7 页

[54] 发明名称

用于癌症诊断的自身抗体检测

[57] 摘要

本发明公开了用于在生物样品中检测抗 - ECP-KA 自身抗体的组合物和方法, 以及这些组合物和方法在人和非人哺乳动物中癌症诊断的应用。

1. 一种在哺乳动物的生物样品中测量抗-ECPKA自身抗体的存在或者浓度的免疫测定法，其中所述的免疫测定法包含下列步骤：
  - (a) 将所述的生物样品与特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原接触，所述接触是在足以允许抗-ECPKA自身抗体在一旦存在于所述样品中的情况下，与所述的抗原结合并形成抗原-抗-ECPKA自身抗体复合物的条件下进行；
  - (b) 将所述的形成的抗原-抗-ECPKA自身抗体复合物与抗-ECPKA自身抗体结合分子接触，所述的接触是在足以允许所述的抗-ECPKA自身抗体结合分子结合到所述形成的抗原-抗-ECPKA自身抗体复合物的抗-ECPKA自身抗体并且形成延伸的复合物的条件下进行；和
  - (c) 通过确定所述形成的延伸的复合物的存在或者浓度来确定所述抗-ECPKA自身抗体在所述生物样品中的存在或者浓度。
2. 权利要求1的免疫测定法，其中所述的特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原是细胞外PKA蛋白。
3. 权利要求1的免疫测定法，其中所述的抗-ECPKA自身抗体是哺乳动物物种的抗体，其与所述哺乳动物的抗体不同并且特异于由所述哺乳动物产生的抗体。
4. 权利要求3的免疫测定法，其中所述的哺乳动物是人而且所述的抗-ECPKA自身抗体是人IgG抗体。
5. 权利要求1的免疫测定法，其中所述的抗-ECPKA自身抗体结合分子被可检测地标记。
6. 权利要求5的免疫测定法，其中所述的可检测的标记是化学标记。
7. 权利要求1的免疫测定法，其中在所述的步骤(a)中，所述的特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原在与所述的生物样品发生所述的接触前被固定到固体支持物上。
8. 权利要求1的免疫测定法，其中在所述的步骤(a)中，所述的特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原在与所述的生物样品发生所述的接触后被固定到

固体支持物上。

9. 权利要求1的免疫测定法，其中的免疫测定法是免疫色谱免疫测定法，其中：

在所述步骤(a)中，所述生物样品被放置与第一多孔载体接触，所述的第一多孔载体含有非固定的、特异于抗-ECPKA自身抗体的标记的抗原；

在所述步骤(b)中，所述形成的抗原-抗-ECPKA自身抗体复合物被放置与第二多孔载体接触，所述的第二多孔载体与所述的第一多孔载体相通，并且含有固定的抗-ECPKA自身抗体结合分子；和

在所述步骤(c)中，通过检测在所述第二多孔载体中所述的特异于抗-ECPKA自身抗体的所述标记的抗原的存在来确定所述抗-ECPKA自身抗体在所述生物样品中的存在或者浓度。

10. 一种免疫复合物，其含有结合到抗-ECPKA自身抗体的特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原，其中所述的抗-ECPKA自身抗体还另外地结合到抗-ECPKA自身抗体结合分子上。

11. 权利要求10的免疫复合物，其中所述的特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原是细胞外PKA蛋白。

12. 权利要求10的免疫复合物，其中所述的抗-ECPKA自身抗体结合分子被可检测地标记。

13. 权利要求12的免疫复合物，其中所述的可检测的标记是化学标记。

14. 权利要求10的免疫复合物，其中所述的抗-ECPKA自身抗体结合分子是免疫分子。

15. 权利要求14的免疫复合物，其中所述的抗-ECPKA自身抗体是人自身抗体，而且所述的抗-ECPKA自身抗体结合分子是抗人IgG抗体。

16. 一种试剂盒，其用于测定哺乳动物的生物样品中抗-ECPKA自身抗体的存在或者浓度，其中所述的试剂盒含有包含多层滤过系统的中空的外壳，和第一及第二多孔载体，其中所述的第二多孔载体与所述第一多孔载体相通，而且所述的第一多孔载体与所述的多层滤过系统相通，其一部分可以从所述的外壳达到，其中：

所述的第一多孔载体含有非固定的、标记的PKA C $\alpha$  或者C $\alpha$  片段；和所述的第二多孔载体含有固定的、未标记的结合到人IgG的抗体。

- 
- 17.权利要求16的试剂盒，其中所述的PKA C $\alpha$  是ECPKA。
  - 18.权利要求16的试剂盒，其中所述的标记的PKA C $\alpha$  的所述标记是化学标记。
  - 19.权利要求16的试剂盒，其中所述的试剂盒检测人抗-ECPKA自身抗体，而且所述的结合人IgG的抗体是非人哺乳动物的抗体。
  20. 利用权利要求10-15中任何一项的免疫复合物来诊断非人哺乳动物的癌症的方法。
  21. 利用权利要求 16-19 中任何一项的试剂盒来诊断非人哺乳动物的癌症的方法。

## 用于癌症诊断的自身抗体检测

### 发明领域

本发明涉及用于在生物样品中检测抗-ECPKA自身抗体的组合物和方法，以及这些组合物和方法在人和非人哺乳动物中诊断癌症的应用。

### 发明背景

用恶性细胞合成肿瘤标记并将其释放入血液。这些标记也可以通过宿主组织对侵入的应答而生成，或者是作为肿瘤诱导的代谢变化的结果而生成。肿瘤标记在血液或者组织液中的水平对于诊断，筛查，和监测肿瘤进展或者消退是有帮助的。理想的肿瘤标记允许简单的血液测试来检测出癌症，而且其水平与肿瘤进展的阶段相关。然而，由于缺少敏感性和特异性，至今尚未在一般健康人群或者最高危人群中建立单一的标记。肿瘤标记在癌症诊断中的使用已经被很好地描述在 (Sluss, P.M et al. [2004] “ESTABLISHMENT OF A CENTRAL LABORATORY SERUM TUMOR MARKER SERVICE ON A CONSOLIDATED IMMUNODIAGNOSTIC PLATFORM: DEVELOPMENT OF PRACTICE STANDARDS, SERVICE IMPROVEMENTS, AND OPERATIONAL EFFICIENCY” Clin Leadersh Manag Rev. 18[1] 25-31; Gion, M. [2000] “SERUM TUMOUR MARKERS: FROM QUALITY CONTROL To TOTAL QUALITY MANAGEMENT,” Breast 9[6]:306-11; Wiesner, A [2004] “DETECTION OF TUMOR MARKERS WITH PROTEINCHIP® TECHNOLOGY, Curr Pharm Biotechnol. Feb;5[1]:45-67; Crawford, NP. et al. [2003] “TUMOR MARKERS AND COLORECTAL CANCER: UTILITY IN MANACEMENT,” J Surg Oncol. 84[4]:239-48; Agnantis, N.J. et al. [2003] “TUMOR MARKERS. AN UPDATE APPROACH FOR THEIR PROGNOSTIC SIGNIFICANCE. PART I. IN VIVO,” 17[6]609-18; Riley, R.D. et al. [2004] “A SYSTEMATIC

REVIEW OF MOLECULAR AND BIOLOGICAL TUMOR MARKERS IN NEUROBLASTOMA,” Clin Cancer Res. 10[1 Pt 1]:4-12; Given, M. et al. [2000] “THE PREDICTIVE OF TUMOUR MARKERS CA 15-3, TPS AND CEA IN BREAST CANCER RECURRENCE,” Breast. 9[5]:277-80)。

目前可用的癌症标记测定癌症抗原。例如前列腺癌可以通过测量前列腺特异性抗原 (PSA) 癌症标记来诊断(Gretzer, M.B. et al. [2003] “PSA MARKERS IN PROSTATE CANCER DETECTION,” Urol Clin North Am. 30[4]:677-86)。已经发现癌胚抗原 (CEA) 标记在评价结肠直肠癌中具有诊断用途。(Crawford, NP. et al. [2003] “ TUMOR MARKERS AND COLORECTAL CANCER: UTILITY IN MANAGEMENT. J. Surg Oncol. 84[4]: 239—48)。癌症抗原 CA15-3, 已经与乳腺癌相关联(Cheung, K.L. et al. [2003] “OBJECTIVE MEASUREMENT OF REMISSION AND PROGRESSION IN METASTATIC BREAST CANCER BY THE USE OF SERUM TUMOUR MARKERS,” Minerva Chir. Jun;58[3]:297-303)。癌症抗原CA 19-9已经被使用来诊断胃肠癌 (Grotowski, M.[2002] “ANTIGENS [CEA AND CA 19-9] IN DIGNOSIS AND PRGNOSIS COLORECTAL CANCER,” Pol Merkuriusz Lek. 12[67]:77-80; Trompetas, V. et al. [2002] “GIANT BENIGN TRUE CYST OF THE SPLEEN WITH HIGH SERUM LEVERL OF CA19-9,” Eur J Gastroenterol Hepatol. 14[1]:85-8)。癌症抗原CA125已经被用于诊断卵巢癌(Anderiesz, C. et al. [2003] “SCREEING FOR OVARIAN CANCER,” Med J Aust 178[12]:655-6)。

多数实体肿瘤显示由细胞分裂过程中的染色体分离畸变引起的染色体不稳定性。几种酶激酶参与保持正常的染色体分离并调控细胞周期进展。cAMP依赖性蛋白激酶 (PKA) 是一种这样的激酶, 其似乎在细胞信号传导、代谢和增殖的多个方面具有功能性作用(Matyakhina L et al. [2002] “PROTEIN KINASE A AND CHROMOSOMAL STABILITY,” Ann NY Acad Sci. 968: 139-47; Tortora, G. et al.[2002] “PROTEIN KINASE A AS TARGET FOR NOVEL INTEGRATED STRATEGIES OF CANCER THERAPY,’ Ann NY Acad Sci. 968:139-47)。

哺乳动物细胞具有两种类型的cAMP依赖性蛋白激酶 (PKA) 种类

(Krebs, E.G. et al. [1979] “PHOSPHORYLATION-DEPHOSPHORYLATION OF ENZYMES,” *Annu Rev Biochem.* 48:923-39)。这些蛋白激酶被指定为类型I (PKA-I) 和类型II (PKA-II)；其通过不同的调节亚基 (R亚基) RI和RII来区分，而且其分享一个共同的催化亚基 (C亚基) (Beebe. S.J. et al. [1986] “CYCLIC NUCLEOTIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASES,” In: *The Enzymes: Control by Phosphorylation*; E.G. Krebs et al. [Eds] Academic Press: Orlando and London. pp. 43-111)。

传统上，蛋白激酶的酶活性通过追踪从 ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ) ATP传递到适当蛋白或者肽底物的残基上的放射性磷酸基团而测定 (参见例如Witt, J.J. et al. [1975] *Anal Biochem.* 66:253-8; Casnellie. J.E. [1991] *Methods Enzymol.* 200:115-20;美国专利号6,498,005)。PKA酶测定已有描述 (Cohen, C.B. et al. [1999] “A MICROCHIP-BASED ENZYME ASSAY FOR PROTEIN KINASE A,” *Anal Chem.* [1999] 73 :39-97; Cho, Y.S. et al. [2000] “EXTRACELLULAR PROTEIN KINASE A AS A CANCER BIOMARKER :ITS EXPRESSION BY TUMOR CELLS AND REVERSAL BY A MYRISTATE-LACKING  $\text{C}_{\text{ALPMA}}$  AND  $\text{RII}_{\text{BETA}}$  SUBUNIT OVEREXPRESSION,” *Proc Natl Acad Sci USA.*97[2]: 835-40)。

通过生化研究和基因克隆，已鉴别出四个同种型的R亚基， $\text{RI}\alpha$ ， $\text{RI}\beta$ ， $\text{RII}\alpha$ ，和 $\text{RII}\beta$  (Amieux, P.S. et al. [2002] “THE ESSENTIAL ROLE OF RI ALPHA IN THE MAINTENANCE OF REGULATED PKA ACTIVITY,” *Ann NY Acad Sci.* 968:75-95; McKnight, G.S. et al. [1988] “ANALYSIS OF cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE SYSTEM USING MOLECULAR GENETIC APPROACHES,” *Recent Prog Honn Res.*44:307-35; Levy, F.O. et al. [1998] “MOLECULAR CLONING, COMPLEMENTARY DEOXYRIBONUCLEIC ACID STRUCTURE AND PREDICTED FULL-LENGTH AMINO ACID SEQUENCE OF THE HORMONE-INDUCIBLE REGULATORY SUBUNIT OF 3',5'-CYCLIC ADENOSINE MONOPHOSPHATE-DEPENDENT PROTEIN KINASE FROM HUMAN TESTIS” *Mol Endocrinol* 2:1364-73)。

重要地，PKA-I与PKA-II的比率可以在细胞发育，分化和转化过程中

发生显著变化 (Lohmann, S .M. et al. [1984] “REGULATION OF THE CELLULAR AND SUBCELLULAR CONCENTRATIONS AND DISTRIBUTION OF CYCLIC NUCLEOTIDE-DEPENDENT PROTEIN KINASES,” In: Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research, P. ‘Greengard et al. [Eds] Raven Press: New York. pp 63-117; Cho-Chung, Y.S. [1990] “ROLE OF CYCLIC AMP RECEPTOR PROTEINS IN GROWTH, DIFFERENTIATION, AND SUPPRESSION OF MALIGNANCY: NEW APPROACHES TO THERAPY,” Cancer Res. 50:7093-100; Cho-Chung, Y.S. [2003] “cAMP SIGNALING IN CANCER GENESIS AND TREATMENT” Cancer Treat Res. 115:123-43)。

cAMP信号传导途径已在淋巴样恶性肿瘤中被提出作为治疗靶目标 (Lerner, A. et al. [2000] “THE cAMP SIGNALING PATHWAY As A THERAPEUTIC TARGET IN LYMPHOID MALIGNANCIES,” Leuk Lymphoma. 37[1-2]:39-51; Cho-Chung, Y.S. et al. [1995] “cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE; ROLE IN NORMAL AND MALIGNANT GROWTH,” Crit Rev Oncol Hematol. 21[1-3]:33-61; Cho-Chung, Y.S. et al. [1993] “THE REGULATORY SUBUNIT OF cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE AS A TARGET FOR CHEMOTHERAPY OF CANCER AND OTHER CELLULAR DYSFUNCTIONAL-RELATED DISEASES,” Pharmacol Ther. 60[2]:265-88)。在被化学物质或者病毒致癌剂和Ki-ras原癌基因或转化生长因子 $\alpha$ 转化后的细胞中, 和当用粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子或者佛波酯进行细胞生长刺激时(Cho-Chung, Y.S. [1990] “ROLE OF CYCLIC AMP RECEPTOR PROTEINS IN GROWTH, DIFFERENTIATION. AND SUPPRESSION OF MALIGNANCY: NEW APPROACHES TO THERAPY,” Cancer Res. 50:7093-100; Cho-Chung, Y.S. et al. [2002] “DISSECTING THE CIRCUITRY OF PROTEIN KINASE A AND cAMP SIGNALING IN CANCER GENESIS: ANTISENSE. MICROARRAY, GENE OVEREXPRESSION, AND TRANSCRIPTION FACTOR DECOY,” Ann NY Acad Sci. 968:22-36), 相比于正常对应物, 增加表达的RI $\alpha$ /PKA-I已经出现

在人癌细胞系和原发肿瘤 (Cho-Chung, Y.S. [1990] "ROLE OF CYCLIC AMP RECEPTOR PROTEINS IN GROWTH, DIFFERENTIATION. AND SUPPRESSION OF MALIGNANCY: NEW APPROACHES TO THERAPY," *Cancer Res.* 50: 7093-100; Miller, W.R. et al. [1993] "TYPES OF CYCLIC AMP BINDING PROTEINS IN HUMAN BREAST CANCERS," *Eur J Cancer.* 29A:989-91)。相反, RI $\alpha$ /PKA-I表达的降低与位点选择性的cAMP类似物和反义寡核苷酸诱导的生长抑制相关联, 所述的反义寡核苷酸在裸鼠内靶向广谱的人癌细胞系和人肿瘤生长中PKA的RI $\alpha$ 亚基。(Cho-Chung, Y.S. et al. [1989] "SITE-SELECTIVE CYCLIC AMP ANALOGS AS NEW BIOLOGICAL TOOLS IN GROWTH CONTROL, DIFFERENTIATION AND PROTO-ONCOGENE REGULATION," *Cancer Inv.* 7:161-77; Cho-Chung, Y.S. et al. [1999] "ANTISENSE DNA-TARGETING PROTEIN KINASE A-RI $\alpha$  SUBUNIT: A NOVEL APPROACH TO CANCER TREATMENT," *Front Biosci* 4:D898-D907)。

先前已经证明多种类型癌细胞将PKA分泌到条件培养基中 (Cho, Y.S. et al. [2000] "EXTRACELLULAR PROTEIN KINASE A As A CANCER BIOMARKER: ITS EXPRESSION BY TUMOR CELLS AND REVERSAL BY A MYRISTATE-LACKING C<sub>ALPHA</sub> 和 RII<sub>BETA</sub> SUBUNIT OVEREXPRESSION," *Proc Natl Acad Sci USA.* 97 [2]: 835-40)。该细胞外蛋白激酶A (ECPKA) 以活性、游离的催化亚基(C亚基)形式存在("PKA C $\alpha$ ") , 而且其活性被PKA抑制蛋白PKI特异抑制。PKA的C $\alpha$ 或者RI $\alpha$ 亚基基因在表达载体中的过表达(其上调细胞内PKA-I)显著地上调ECPKA表达。与此对比, RII $\beta$ 亚基的过表达—其消除PKA-I, 上调PKA-II, 并恢复转化的表型—下调ECPKA。在C $\alpha$ 基因中防止十四烷基化的突变允许细胞内PKA上调并且阻断ECPKA增加, 暗示ECPKA表达需要C $\alpha$ 的NH<sub>2</sub>-端肉豆蔻基。与正常血清相比, 在癌症患者的血清中, ECPKA表达被显著上调。(Cho, Y.S. et al. [2000] "EXTRACELLULAR PROTEIN KINASE A As A CANCER BIOMARKER: ITS EXPRESSION BY TUMOR CELLS AND REVERSAL BY A MYRISTATE-LACKING C<sub>ALPHA</sub> AND RII<sub>BETA</sub> SUBUNIT OVEREXPRESSION," *Proc Natl Acad Sci USA.* 97[2] 835-40)。

单克隆抗体的发展已导致鉴定了在恶性肿瘤患者的血清和组织中许多肿瘤相关抗原。原癌基因和肿瘤抑制基因的蛋白产物可以在细胞外流体中被探测出来并且其被作为体内癌发生的潜在标记。这些生长因子中的一些由原癌基因编码。例如，更高水平的p21-ras蛋白由在患者血液中发现的ras原癌基因编码。对p53肿瘤抑制蛋白的循环抗体已经在乳腺癌和肺癌患者以及患有B-淋巴瘤的儿童的血清中被发现。(Winter, S.F. et al. [1992] “DEVELOPMENT OF ANTIBODIES AGAINST p53 IN LUNG CANCER PATENTS APPEARS TO BE DEPENDENT ON THE TYPE OF p53 MUTATION.” *Cancer Res.* 52:4168-74; Lubin, R. et al. [1993] “ANALYSIS Of p53 ANTIBODIES IN PATIENTS WITH VARIOUS CANCERS DEFINE B-CELL EPITOPES OF HUMAN p53: DISTRIBUTION ON PRIMARY STRUCTURE AND EXPOSURE ON PROTEIN SURFACE *Cancer Res.* 53:5872-6; Crawford, L.V. et al. [1982] “DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST THE CELLULAR PROTEIN p53 IN SERA FROM PATIENTS WITH BREAST CANCER.” *Int. J. Cancer.* 30:403—8)。对原癌基因如c-myc和c-myb的抗体也已经在患有结肠直肠肿瘤和乳腺肿瘤患者的血清中被发现 (Sorokine. L, K. et al. [1991] “PRESENCE OF CIRCULATING ANTI-C-MYB ONCOGENE PRODUCT ANTIBODIES IN HUMAN SERA.” *Int. J. Cancer.* 47:665-9; Ben-Mahrez, K., et al. [1988] “DETECTION OF CIRCULATING ANTIBODIES AGAINST C-MYC PROTEIN IN CANCER PATIENT SERA.” *Br J Cancer.* 57:529-34; Ben-Mahrez, K., et al. [1990] “CIRCULATING ANTIBODIES AGAINST C-MYC ONCOGENE PRODUCT IN SERA OF COLORECTAL CANCER PATIENTS.” *Int J Cancer,* 46:35-8)。

除了上述提及的新标记外，其它蛋白质、激素和酶已经被用作标记30年了。其中著名的有癌胚抗原（CEA），甲种胎儿球蛋白（AFP），人绒毛膜促性腺激素（HCG），和前列腺酸性磷酸酶（PAP）。但是，这些标记多数缺乏特异性。这些水平在良性条件下和在妊娠过程中也增加。所有这些标记均基于抗原确定方法；这些标记缺乏特异性和敏感性。因此急需发现新型的生物标记并将其转入常规临床应用。本发明就是为了解决这样

的需要。

### 发明概述

本发明涉及一种高度敏感的测量细胞外蛋白激酶A (ECPKA) 的IgG抗体的酶免疫测定法 (EIA)。对来自295个患有各种类型癌症的患者和100个无癌症的人的血清进行测试。结果发现癌症患者中抗-ECPKA IgG抗体的频率 (92%) 要明显高于那些没有患癌症的人 (14%)。在由EIA测量的抗-ECPKA IgG抗体和通过PKA酶测定所测量的ECPKA抗原之间没有明显的关联, 而且抗ECPKA IgG抗体-EIA方法比ECPKA酶测定得到了更高的敏感性和特异性。这些结果证明自身抗体分析的方法, 而不是传统抗原分析, 提供了用于癌症诊断的有用方法。

详细地说, 本发明提供了一种在哺乳动物的生物样品中测量抗-ECPKA自身抗体的存在或者浓度的免疫测定法, 其中免疫测定法包含下列步骤:

- a) 将生物样品与特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原接触, 所述接触是在足以允许抗-ECPKA自身抗体在一旦存在于样品中的情况下, 与抗原结合并形成抗原-抗-ECPKA自身抗体复合物的条件下进行;
- b) 将形成的抗原-抗-ECPKA自身抗体复合物与抗-ECPKA自身抗体结合分子接触, 所述接触是在足以允许抗-ECPKA自身抗体结合分子结合到形成的抗原-抗-ECPKA自身抗体复合物的抗-ECPKA自身抗体上并且形成延伸的复合物的条件下进行; 和
- c) 通过确定形成的延伸的复合物的存在或者浓度来确定抗-ECPKA自身抗体在所述生物样品中的存在或者浓度。

本发明还涉及上述免疫测定法的实施方案, 其中特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原是细胞外PKA蛋白。

本发明还涉及上述免疫测定法的实施方案, 其中抗-ECPKA自身抗体是哺乳动物类的抗体, 其与哺乳动物的抗体不同并且特异于由哺乳动物产生的抗体。

本发明还涉及上述免疫测定法的实施方案, 其中哺乳动物是人而且抗-ECPKA自身抗体是人IgG抗体。本发明还涉及上述免疫测定法的实施方

案，其中抗-ECPKA自身抗体结合分子被可检测地标记（特别是用化学或者酶标记）。

本发明还涉及上述免疫测定法的实施方案，其中在步骤(a)中，特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原在与生物样品发生接触前被固定到固体支持物上。

本发明还涉及上述免疫测定法的实施方案，其中在步骤(a)中，特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原在与生物样品发生接触后被固定到固体支持物上。

本发明还涉及上述免疫测定法的实施方案，其中的免疫测定法是免疫色谱免疫测定法，其中：

在步骤(a)中，生物样品被放置与第一多孔载体接触，第一多孔载体含有非固定的、特异于抗-ECPKA自身抗体的标记的抗原；

在步骤(b)中，形成的抗原-抗-ECPKA自身抗体复合物被放置与第二多孔载体接触，第二多孔载体与第一多孔载体连通，并且含有固定的抗-ECPKA自身抗体结合分子；和

在步骤(c)中，通过检测在第二多孔载体中特异于抗-ECPKA自身抗体的标记的抗原的存在来确定抗-ECPKA自身抗体在生物样品中的存在或者浓度。

本发明提供了一种免疫学复合物，其含有结合到抗-ECPKA自身抗体的特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原，其中抗-ECPKA自身抗体还另外地结合到抗-ECPKA自身抗体结合分子上。

本发明还涉及上述免疫学复合物的实施方案，其中特异于抗-ECPKA自身抗体的抗原是细胞外PKA蛋白。

本发明还涉及上述免疫学复合物的实施方案，其中抗-ECPKA自身抗体结合分子被可检测地标记（特别是用化学或者酶标记）。

本发明还涉及上述免疫学复合物的实施方案，其中抗-ECPKA自身抗体结合分子是免疫学分子。本发明还涉及上述免疫学复合物的实施方案，其中抗-ECPKA自身抗体是人自身抗体，而且抗-ECPKA自身抗体结合分子是人IgG抗体。

本发明还涉及一种试剂盒，其用于测定哺乳动物的生物样品中测量抗

-ECPKA自身抗体的存在或者浓度，其中试剂盒含有包含多层滤过系统的中空的外壳，和第一及第二多孔载体，其中第二多孔载体与第一多孔载体相通，而且第一多孔载体与多层滤过系统相通，其一部分可以从外壳到达，其中：

第一多孔载体含有非固定的、标记的PKA C $\alpha$  或者C $\alpha$  片段；和  
第二多孔载体含有固定的、未标记的、结合到人IgG的抗体。

本发明还涉及上述试剂盒的实施方案，其中标记的PKA C $\alpha$  是ECPKA（特别是用化学或者酶标记）。

本发明还涉及上述试剂盒的实施方案，其中试剂盒检测人抗-ECPKA自身抗体，而且结合人IgG的抗体是非人哺乳动物的抗体。

#### 附图说明

图1显示了使用本发明优选的免疫测定形式对正常个体和癌症患者中获得的数值。患者的频率和平均滴度（频率=92%，平均滴度 2.2）均明显高于正常对照的那些（频率=14%，平均滴度 0.6）。数值超过 1.0（虚线上）为阳性。

图2显示了抗 ECPKA 自身抗体 ELISA（图1）的接受器工作特征（ROC）曲线。在交汇点，ELISA 测定的截止值为 1.0 滴度，而且敏感性和特异性分别为 90%和 89%。

图3显示了对癌症患者血清中抗 ECPKA 自身抗体的蛋白印迹分析结果。用考马斯蓝染色含有 M（mw 标记）和 C $\alpha$ （1 $\mu$ g）的泳道；条带1用 Santa Cruz Ab 抗 C $\alpha$ 抗体印迹（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）；条带2-7用癌症患者血清印迹（10,000 倍稀释）；条带8-12用正常人血清印迹（10,000 倍稀释）；条带1-12含有纯化的 PKA C $\alpha$ （每个 1 $\mu$ g）。

图4显示了通过将 ECPKA 酶测定作为本发明免疫检测形式的敏感性和辨别能力的对照而获得的数值。该图显示了从正常个体和癌症患者获得的数值（癌症患者，频率=83%，平均值=130 mU/ml；正常个体对照，频率=21%，平均值=60 mU/ml），其显示缺少敏感性和特异性。大于 75 mU/ml（虚线上）的数值为阳性。

图5显示了来自癌症患者和健康人的血清的抗-ECPKA 抗体滴度和

ECPKA 酶活性之间的相关研究的结果。0.003 的癌症患者系数和 0.001 的健康人系数在统计学上无意义。

图 6 显示了将 HCT-15Z 肿瘤提取物用作癌症抗原的来源，来自癌症患者和健康人的血清的抗癌抗原抗体的滴度。数值大于 1.5（虚线）是阳性。

图 7 显示了来自患有不同类型癌症（肺，肾，胰腺的，卵巢的，结肠，肝，胃，膀胱，和宫颈癌，黑色素瘤，肉瘤，和平滑肌瘤）的癌症患者的血清中观测到的抗原抗体的滴度。

### 优选实施方式的描述

本发明涉及用于在生物样品中检测抗-ECPKA 自身抗体的组合物和方法，以及这些组合物和方法在人和非人哺乳动物（特别是犬科，猫科，牛科，羊科(ovine)，猪科，和马科哺乳动物）中诊断癌症中的应用。

细胞外形式的PKA（ECPKA）从癌细胞中分泌出来 (Cho, Y. S et al. [2000] “EXTRACELLULAR PROTEIN KINASE A As A CANCER BIOMARKER: ITS EXPRESSION BY TUMOR CELLS AND REVERSAL By A MYRISTATE-LACKING C<sub>ALPHA</sub> AND RII<sub>BETA</sub> SUBUNIT OVEREXPRESCTON,” Proc Natl Acad Sci USA. 97[2]:835-40)。本发明的动机部分来自这样的认识，ECPKA 分泌激发血清自身抗体的形成，而且这种自身抗体的存在和/或浓度可以作为癌症诊断和预测的标记。如本文所述，本发明提供了在怀疑的或者被证实癌症患者的生物样品中测量抗-ECPKA 自身抗体（特别是抗ECPKA IgG抗体）浓度和/存在的高度灵敏的免疫测定法。此基于自身抗体的免疫测定法提供了用于检测各种类型癌细胞的常规诊断程序。

本发明涉及抗原与抗体的结合。如此处所用，“表位”是被识别并特异结合于抗体的抗原的2或者3维区域。如此处所用，如果其能够免疫学特异的相互结合，则可以说抗原和抗体相互“特异”，或者相互“识别”，或者相互“结合”。

任何广泛类型的测定模式均可依照本发明的方法使用。这些模式可以是异质的或者同质的，连续的或者同时的，竞争性的或者非竞争性的。美

国专利号 5,563,036; 5,627,080; 5,633,141; 5,679,525; 5,691,147; 5,698,411; 5,747,352; 5,811,526; 5,851,778; 和5,976,822 举例说明了几种不同的测试模式和应用。这样的测试可以被模式化为定量的以测量抗-ECPKA自身抗体的浓度或量, 或者其可以被模式化为定性的以测量抗-ECPKA自身抗体的存在或者缺少。

异质的免疫测定技术典型地涉及使用反应产物将与其结合的固相材料, 但是也适合于涉及非固定的抗原与抗体的结合(即, 溶液相免疫测定)。通过将固相从反应混合物中移除(例如通过清洗), 反应产物从过量样品, 测试试剂, 和其它物质中分离。一种可以依照本发明使用的固相免疫测定类型是夹心免疫测定法。在夹心测定中, 样品中的分析物越多, 固相上存在的标记量越多。通常优选这种类型的测定模式, 特别是用于肉眼检测低浓度的分析物, 这是因为出现在固相的标记更容易被检测到。

依照本发明的优选实施方案, 特异地与抗ECPKA自身抗体反应的抗原被结合到固体支持物上(即: 固定)并与被用来测试抗-ECPKA IgG抗体存在的生物样品接触温育。如将被理解, 可以将抗原与生物样品以未结合状态一起温育, 并随后将其结合到固体支持物上(即可固定的)。随后优选将支持物彻底地进行处理(例如通过清洗等等)以基本上移除可能存在但是没有结合到结合抗原的非ECPKA IgG抗体。这样处理的结果是在抗原和抗ECPKA IgG抗体之间形成免疫复合物。

优选随后添加可检测的标记的第二抗体并且将支持物置于在足以使得第二抗体结合到任何可能存在的抗-ECPKA IgG抗体的条件下温育。随后优选将支持物彻底地进行处理(例如通过清洗等等)以基本上移除任何没有结合的第二抗体。如果在测试样品中存在抗-ECPKA IgG抗体, 那么两种抗体将与分析物形成免疫复合物(即: 第二抗体/抗-ECPKA IgG抗体/抗原夹心)。在这样的测试中, 测定到结合到支持物的第二抗体表明被测试流体中抗-ECPKA IgG抗体的存在。夹心测定模式被描述在Schuurs et al. 美国专利号3,791,932 和 4,016,043中, 以及Pankratz et al. 美国专利号5,876,935中。第二抗体可以是从小于人灵长动物中分离出来的天然免疫球蛋白(例如抗人IgG鼠抗体, 抗人IgG羊抗体, 等等), 或者可以经过重组或者合成产生。其可以是完整的免疫球蛋白, 或者免疫球蛋白片段(例如Fab,

F[Ab]<sub>2</sub>, 等)。如果需要, 可以使用其它的结合分子(能够结合抗-ECPKA 自身抗体)协调或者代替这类第二抗体。例如, 抗-ECPKA 自身抗体可以是生物素化的而且可以用标记的抗生素蛋白或者链霉抗生物素来代替第二抗体。

为了消除未结合的分步步骤并减少化学结合测定所需的时间和设备, 也可以选择性地使用同质测定模式。在这样的测试中, 结合对的一种组分可以仍然是被固定的; 但是, 不用未结合分离来测定结合对的第二组分的存在。同质的光学方法的实例是 Syva, Inc. (Sunnyvale, CA) 的 EMIT 方法, 其通过测定荧光猝灭来操作; Behringwerke (Marburg, Germany) 的激光比浊胶乳颗粒凝集法, 其通过测定光散射的变化来操作; Mitsubishi Chemical Industries (Tokyo, Japan) 的 LPIA 胶乳颗粒凝集法; Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 的 TDX 荧光去极化法; Cis Bio International (Paris, France) 的荧光能量转移法。任何这些测定法都可以被改变以适用于本发明的目的。

本发明的结合测定可以被设定成竞争性测定。在竞争性测定中, 测试样品中存在的抗-ECPKA IgG 抗体越多, 固相上存在的标记量越少。

以类似于夹心测定法的方式, 竞争性测定可以通过提供定量的标记的抗-ECPKA IgG 抗体并确定被测试流体是否含有将与标记抗体竞争结合支持物的抗-ECPKA IgG 抗体来进行。在这样的竞争性测定中, 所捕集的标记抗体量与存在于测试样品中的分析物量成反比。Smith (美国专利号 4,401,764) 描述了备选的竞争性测定模式, 其使用混合的可以结合分析物或者标记分析物的结合复合物, 但是其中的分析物和标记分析物不能同时与复合物结合。Clagett (美国专利号 4,746,631) 描述了使用反应室的免疫测定法, 在反应室中, 分析物/配体/标记缀合物在测试样品分析物存在的情况下被从反应表面取代, 而且被取代的分析物/配体/标记缀合物被固定在第二反应位点。缀合物包括生物素, 牛血清白蛋白, 和作为缀合物的配体组分的合成肽, 和酶, 化学发光材料, 酶抑制剂, 和作为缀合物的标记组分的放射性核苷酸。Li (美国专利号 4,661,444) 描述了使用抗独特型抗体和第二抗体的缀合物的竞争性免疫测定法, 其特异于可检测的标记, 其中可检测的应答与样品中分析物的存在呈反比相关。Allen (欧洲专利申请

号177,191)描述了涉及配体类似物和第二试剂如荧光素的缀合物的结合测定,其中缀合物与分析物(配体)竞争结合到标记的特异于配体的结合配偶体上,而且其中所得到的标记的缀合物随后通过携带第二试剂结合配偶体的固相被从反应混合物中分离。这种结合测定模式将竞争性结合技术的使用和反向夹心测定构型相结合;即:通过将缀合物结合到固相,在缀合物与混合物分离前将缀合物结合到标记的结合部件。但是,这种测定结果被确定为在传统的竞争性测定中,其中结合到固相的标记的量与测试样品中分析物的量成反比。Chieragatt et al.(GB专利号2,084,317)描述了类似的测定模式,其使用特异于分析物的间接标记结合配偶体。Mochida et al.(美国专利号4,185,084)还描述了使用双抗原的缀合物,其与抗原分析物竞争结合到固定的抗体上并随后被标记。该方法还导致检测在固相上的标记,其中标记的量与测试样品中分析物的量成反比。Sadeh et al.(美国专利号4,243,749)描述了类似的酶免疫测定,其中半抗原缀合物与分析物竞争结合固定在固相上的抗体。任何这些测定法的变体都适用于依照本发明使用。

在所有这些测定模式中,优选标记测定试剂的至少一种成分,或者在其他情况下通过光的发出或者熄灭来检测。这种组分可以是第二抗体,抗-ECPKA IgG抗体,或者结合到抗-ECPKA IgG抗体的抗原,这依赖于所使用的免疫测定模式。放射性同位素结合测试模式(例如:放射性免疫测试法等等)使用放射性同位素作为这种标记;在荧光或者荧光部分的存在下,通过光的发出来测定信号(见Lucas et al.[美国专利号5,698,411]和Landrum et al.[美国专利号5,976,822])。酶结合测定模式(例如ELISA等等)使用酶作为标记;在生色团或者荧光部分的存在下,通过颜色或者光的发出来测定信号。其它标记,例如顺磁标记,用作着色颗粒的材料,胶乳颗粒,胶体金属如硒和金,和染料颗粒(见美国专利号4,313,734; 4,373,932,和5,501,985)也可以被使用。优选使用酶(特别是碱性磷酸酶, $\beta$ -半乳糖苷酶,辣根过氧化物酶,或者脲酶)作为可检测标记(即:酶免疫测定或者EIA)。

酶标记的存在可以通过使用应答于酶标记催化的发色底物(包括发出或者吸收荧光、UV,可见光等等的那些)来检测。更优选的,可以使用

化学标记（例如胶体金，胶乳珠标记等等）。可以通过使用多个探测器，多程滤器(multipass filter)，光栅，或者光谱不同的荧光材料来实现标记检测（见美国专利5,759,781）等。特别优选使用过氧化物酶作为酶标记，特别是与发色底物3,3',5,5'-四甲基联苯胺（TMB）相协同。在用过氧化物酶作为酶来标记抗体的过程中，可以使用高碘酸盐技术（Nakane, P.K. et al. [1974] “PEROXIDASE-LABELED ANTIBODY. A NEW METHOD OF CONJUGATION,” J Histochem Cytochem. 22:1084-90）或者已报道的方法，其中的配偶体与杂双官能团试剂连接（Ishikawa, E. et al.[1983] “ENZYME-LABELING OF ANTIBODIES AND THEIR FRAGMENTS FOR ENZYME IMMUNOASSAY AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STAINING,” J. Immunoassay. 4[3]:209-327）。

在本发明免疫测定中可以使用多种支持物的任何一种。固体支持物的合适的材料是合成材料例如聚苯乙烯，聚氯乙烯，聚酰胺，或者其它合成聚合物，天然聚合物例如纤维素，以及衍生的天然聚合物如乙酸纤维素或者硝基纤维素和玻璃，特别是玻璃纤维。支持物的形式可以是球状，杆状，管状，和微测定或者微量滴定板。片状结构例如纸条，小板，和膜也同样适用。对于水溶液，载体表面可以是可渗透的或者不可渗透的。

尽管前面的描述涉及生物样品中抗-ECPKA自身抗体存在的测定，所述生物样品是流体（例如血清，血液，尿，唾液，胰液，脑脊液，精液等），但是应该理解任何流体性生物样品（例如组织或者活检提取物，粪便的提取物、痰等等）都可以同样地使用在本发明的测定法中。最优选地，被检测的生物样品是血清。

理想地，用于本发明测定中的材料适用于制备试剂盒。这样的试剂盒可以含有被区室化从而以封闭形式接受的载体装置，一个或者多个容器装置瓶，管等；每一个容器装置含有在方法中使用的一个分离的元素。例如，一个容器装置可以含有结合到固体支持物的合适的抗原（例如ECPKA（PKA C $\alpha$  或者C $\alpha$  片段））或者一种或者多种不同类型癌症细胞和肿瘤的提取物）。第二容器可以含有可溶的、可以检测的标记的第二抗体，优选以冻干的形式，或者在溶液中。此外，试剂盒还可以含有一个或者多个容器，每个容器含有（不同的）预定量的ECPKA（PKA C $\alpha$  或者C $\alpha$  片段）

或者抗-ECPKA (PKA C $\alpha$ ) 自身抗体。这些后种容器可以被用于制备标准曲线, 曲线可以插入从含有未知量针对ECPKA的自身抗体的样品中所得到的结果。

在使用试剂盒的时候, 使用者所需作的全部就是将预测量的样品加入到容器中, 所述的样品怀疑含有可测量但是未知量的针对ECPKA的自身抗体, 在第一容器中存在的预测量的支持物结合抗原, 和在第二容器中存在的预测量的可检测的标记的第二抗体。在温育适当的时间后, 免疫复合物形成并从上清液流体中分离, 通过放射性计数, 加入酶底物, 和颜色显色, 或者通过并入化学标记 (例如胶体金, 胶乳珠等等) 来检测免疫复合物或者上清液流体。

本发明特别涉及使用免疫色谱测定模式来检测抗-ECPKA自身抗体。在优选的免疫色谱测定模式中, 使用两种接触但是空间不同的多孔载体。第一种这样的载体将含有不固定的、标记的PKA C $\alpha$  或者C $\alpha$  片段 (ECPKA[ C $\alpha$  ]或者蛋白酶消化物或者C $\alpha$  ), 而且第二种这样的载体将含有固定的但是未标记的抗体, 该抗体与IgG结合 (例如, 其中人抗-ECPKA自身抗体被测定时, 未标记的抗体可以是抗人IgG抗体)。

优选地, 装置将含有中空的外壳, 其由例如塑料材料等制造, 其中第一载体与外壳的内部通过可以从装置到达的多层滤器系统不直接地相通 (例如通过从其伸出或者被装置不完全覆盖), 这样, 血清, 血浆, 或者全血测试样品可以被直接应用到滤器系统并从中渗透入第一多孔载体。在这样的装置中, 含有抗-ECPKA自身抗体的流体的渗透将会引起第一载体的非固定的标记的PKA C $\alpha$  或者C $\alpha$  片段结合到迁移的抗体上, 并随后渗透入第二载体。因为第二载体含有固定的结合人IgG的抗体, 任何进入第二载体的标记的PKA C $\alpha$  或者C $\alpha$  片段将被捕获其中。

含有固定的未标记抗体的载体中的标记的PKA C $\alpha$  或者C $\alpha$  片段的检测因此表明抗-ECPKA自身抗体在被评价的样品中存在。通过测定结合在第二多孔载体中的标记PKA C $\alpha$  或者C $\alpha$  片段的量可以使得该测定成为定量的测定。

已经一般性地描述了本发明之后, 可以通过参考下面的实施例更进一步理解本发明, 这些实施例是通过举例说明的方式提供的, 除非另外指出,

其不能被认为限制了本发明。

## 实施例

实施例1 人癌症诊断中抗-ECPKA自身抗体免疫检测和PKA酶检测的对比评价

## 材料与amp;方法

受试者：血清样品从295个具有不同类型癌细胞的人患者和100个未患癌症的人中取得。

酶联免疫吸附测定（ELISA）：通过固相ELISA测定法测量癌症患者和健康个体血清中抗-ECPKA IgG自身抗体。为了进行这样的测定，用100  $\mu$  l的稀释的（50  $\mu$  g/ml浓度，用PBS）纯化重组人PKA C $\alpha$  抗原包被圆底聚氯乙烯微孔滴定板（Thermolab System, Helsinki, Finland）。将这些板在室温下温育1小时，而后用清洗缓冲液（20 mM Hepes, 0.9% NaCl, 30mM蔗糖-0.1%牛血清白清蛋白[BSA], pH 7.0）清洗一次，每个孔用100  $\mu$  l的Blockace（Serotec, <http://www.serotec.com>）水溶液（4 g/400 ml）在室温下封闭2小时，而后用柠檬酸钠洗液（50 mM 柠檬酸钠, 0.15 M NaCl, 0.1%聚氧化乙烯山梨糖醇酐单月桂酸脂 吐温® 20, pH 5.0-5.2）将板清洗2次。用样品稀释缓冲液（PBS pH 7.4, 0.25% BSA [不含脂肪酸级VI], 0.05% 吐温20）将血清样品稀释到25,000倍，将100  $\mu$  l稀释的样品加入到每个孔中，随后37°C下温育1小时。在用柠檬酸钠洗液清洗3次后，将100  $\mu$  l 20,000倍PBS稀释的抗人IgG-HRP抗体-酶缀合物（Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA）（1%BSA）加入到孔中，而后，将板在室温下温育1小时。在用柠檬酸钠洗液清洗板5次后，加入100  $\mu$  l的TMB底物。用100  $\mu$  l的0.45M硫酸试剂终止反应，而后在ELISA读出器（BioRad [Hercules, CA] micropiate reader benchmark）上记录在450nm的吸收。通过同时在血清样品进行抑制测试来证实ELISA的特异性，其中血清样品已经在室温下用终浓度为1mg/ml的上述抗原温育了1小时。

PKA C $\alpha$  的纯化：将来自OT1529-C $\alpha$  质粒 (Cho, Y.S. et al. [2000] “EXTRACELLULAR PROTEIN KINASE A As A CANCER BIOMAKER: ITS EXPRESSION By TUMOR CELLS AND REVERSAL BY A MYRISTATE- LACKING C $\alpha$  AND RII $\beta$  SUBUNIT OVEREXPRESSION,” Proc Natl Acad Sci USA. 97[2]835-40) 的重组人PKA C $\alpha$  (1.1kb) 注入(infuse)pQE31 DNA从而产生pQE-C $\alpha$  (Hong, S.H. Seoul National University, 韩国, 未发表)。pQE-C $\alpha$  质粒在大肠杆菌中表达并且实现了天然PKA C $\alpha$  蛋白的纯化 (Paragon, Baltimore MD)。

PKA 测定：PKA酶活性的测量通过Rohlf C. (1993)等的方法(“8-Cl-cAMP INDUCES TRUNCATION AND DOWN-REGULATION OF THE RI ALPHA SUBUNIT AND UP-REGULATION OF THE RII BETA SUBUNIT OF CAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE LEADING TO TYPE II HOLOENZYME-DEPENDENT GROWTH INHIBITION AND DIFFERENTIATION OF HL-60 LEUKEMIA CELLS,” J Biol Chem, 268:5774-82)。为了测定血清ECPKA活性，将测定 (总体积50  $\mu$ l) 在37  $^{\circ}$ C下在反应混合物 (含有50mM Tris HCl[pH 7.5], 1mM DTT, 10mM MgCl $_2$ , 5  $\mu$  M 肯普肽 (Kemptide) [一种PKA的合成底物; GIBCO/BRL], 1.2  $\mu$  M [  $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP [25Ci/mmol; ICN], 有或者没有5  $\mu$  M cAMP和5  $\mu$  M PKI) 和10  $\mu$  l血清中进行20分钟。在温育后，将反应混合物点涂到磷酸纤维素板(disk) (GLBCO/BRL) 上并用0.5%的磷酸清洗三次。将滤器风干并用液体闪烁计数器计数。一个单位的PKA活性被定义为在37 $^{\circ}$ C的标准测定系统中在一分钟的时间内将1pmol  $^{32}$ P从 ( $\gamma$ - $^{32}$ P) ATP转移到回收蛋白的酶的量。LDH活性通过商用试剂盒 (Sigma) 来测定。

## 结果

使用上述ELISA来测定人患者和正常对照个体的血清，将抗-ECPKA自身抗体滴度任意表达为对正常对照血清的平均吸收度的比率。相比于正常对照的抗-ECPKA自身抗体滴度，大于1.0的比率被认为是阳性。

测定是可重复的，其流程内 (within-run) 和流程间 (between-run) 的CV分别为<8.8%和 <9.0%。图1显示了癌症患者血清中抗-ECPKA自身抗体的数值。患者的频率和平均滴度 (频率=92%，平均滴度2.2) 均显著高于正常对照 (频率=14%，平均滴度0.60)。

接收器工作特性 (ROC) 曲线 (图 2) 用图解表示了在不同截止值计算的 ELISA 测定的灵敏性和特异性。在交汇点，抗-ECPKA 自身抗体滴度的截止值为 1.0 (图 1)，而且 ELISA 测定的敏感性和特异性分别为 90% 和 89%。

免疫印迹在癌症患者的血清中鉴别出抗-ECPKA 自身抗体 (图 3)。随机选择的患者血清显示了对纯化 PKA C $\alpha$  蛋白 (40kDa) 的免疫交叉反应性 (图 3, 条带 2-7)，然而在正常血清中没有观察到对 C $\alpha$  蛋白的这种免疫交叉反应性 (图 3, 条带 8-12)。

ECPKA 酶测定 (其测量抗原浓度) 在癌症患者 (n=66) 和正常对照 (n=66) 间的频率和平均数值得到了显著的重叠 (患者, 频率=83%，平均数值=130mU/ml; 正常对照, 频率=21%; 平均数值=60mU/ml)，表明缺少敏感性和特异性 (图 4)。

通过 ELISA 获得的个体抗-ECPKA 自身抗体滴度与通过 PKA 酶测定测量的 ECPKA 之间的比较见图 5。通过 ELISA 获得的抗-ECPKA IgG 抗体滴度和通过酶测定测量的 ECPKA 滴度 (ECPKA 抗原测量) 之间没有关联。

实施例 2 关于抗-ECPKA 自身抗体免疫测定及其在人癌症中的用途的结论

本发明证实指向 ECPKA 的自身抗体在血清中的存在与癌症高度相关。为抗-ECPKA 自身抗体而开发的 ELISA 是高度敏感和特异的，其在癌症患者中显示了非常高 (平均滴度 2.2, 频率 92%) 的抗-ECPKA 自身抗体滴度，而在正常个体对照中显示低的或者负的滴度和频率 (14%)。由 ELISA 检测的频率与由酶测定检测的频率之间的比较显示，与测量抗原活性的酶测定相比，检测 ECPKA 自身抗体的 ELISA 是高度敏感和特异的。

为了检查是否本发明的自身抗体检测方法可以延伸到其它癌症抗原 (细胞外分泌的)，进行下面的实验：将 HCT-15 肿瘤 (裸鼠上生长的多药抗性人结肠癌) 用作癌症抗原源。将肿瘤在缓冲液#10 (20 mM Tris-HCl

pH7.4, 100mMNaCl, 0.5% 脱氧胆酸钠, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 蛋白酶抑制剂鸡尾酒组合 I [Calbiochem] 中匀浆 (1:3), 1 份肿瘤 (重量), 3 份缓冲液 (体积)。将匀浆在 10,000 rpm 下离心 10 分钟, 并收集上清液 (提取物)。将提取物与蛋白 A 琼脂糖 (3: 1) 温育, 在 4°C 下旋转 1 小时, 将制剂以 6,000 rpm 离心 2 分钟。收集上清液并在 4°C 在 PBS 中透析过夜。透析后, 提取物已经可备用于在 ELISA 中包被微量滴定板。图 6 显示了来自癌症患者 (n=36) 和健康人 (n=25) 血清中抗癌抗原抗体的滴度。数值大于 1.5 (虚线) 是阳性。图 7 显示了来自患有不同类型癌症 (肺, 肾, 黑色素瘤, 胰腺的, 卵巢的, 结肠, 肝, 胃, 膀胱, 和宫颈癌, 和肉瘤, 和平滑肌瘤) 的患者的血清中观测到的抗原抗体的滴度。患者血清 (n=36) 和正常血清 (n=25) 与图 6 中的那些相同。

这些结果证明使用本发明自身抗体检测方法来检测人和动物中的癌症抗原是可能的。所得到的结果显示用 ELISA 来检测自身抗体, 而不是检测 ECPKA 的抗原和其它癌症抗原, 提供了在人和动物中诊断癌症的新途径。

所有在说明书中提及的出版物和专利都作为参考结合于此, 如同每个单独的出版物或专利申请都已经被特殊地和各自地结合作为参考一样。

虽然结合其具体实施方案已对本发明进行了描述, 应该理解它是可被进一步修改的, 并且本申请意欲涵盖通常遵循本发明的原则, 并且包括例如偏离本发明的公开内容但是却在本发明所属领域已知的或者惯例范围内并且适用于在上文中阐明的必要特征的本发明的各种变体, 用途, 和改变。

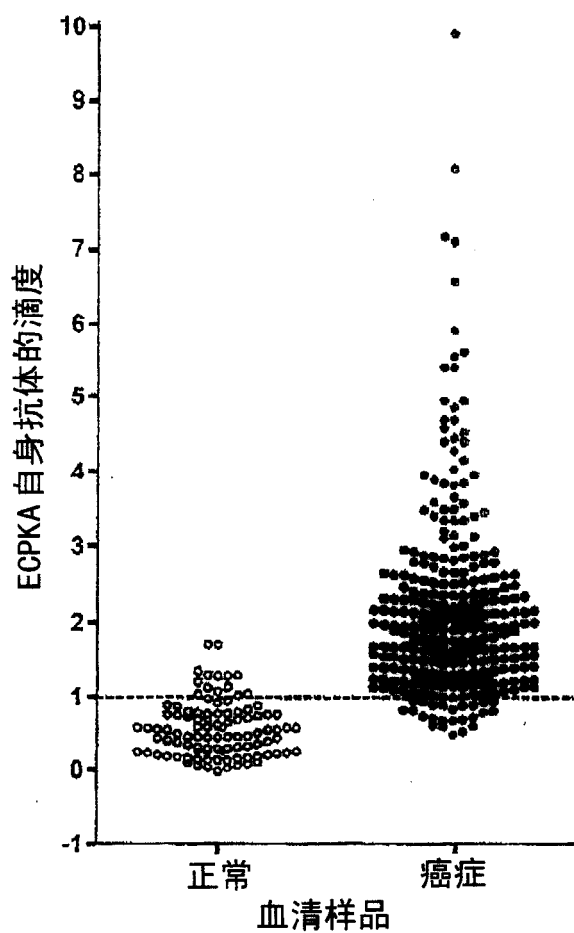


图 1

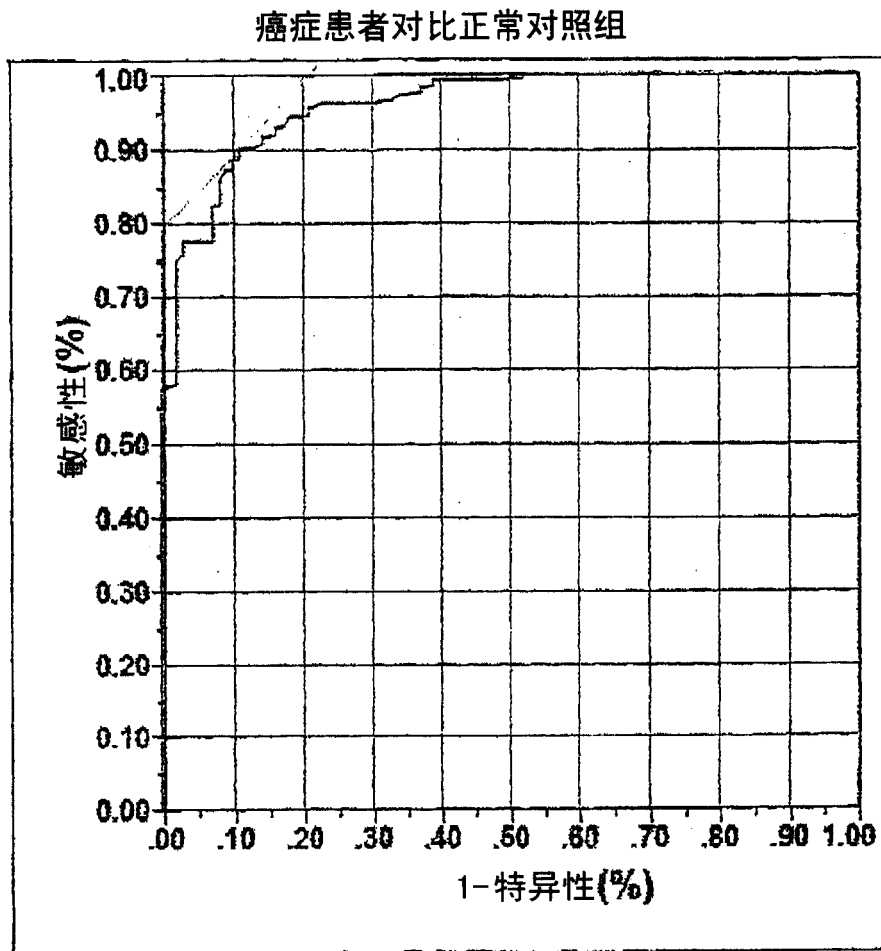


图 2

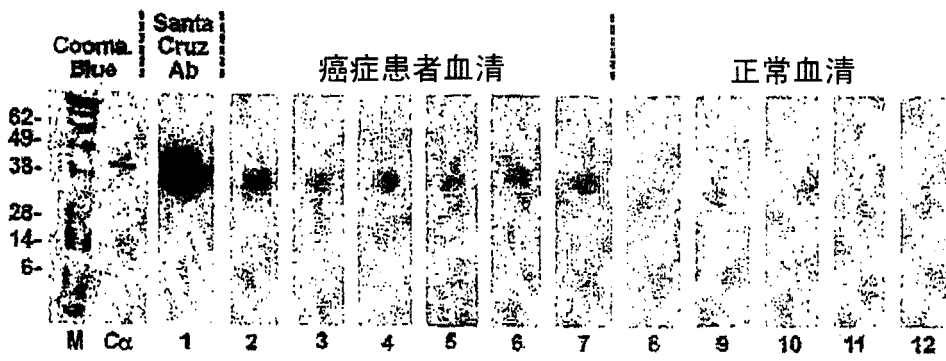


图 3

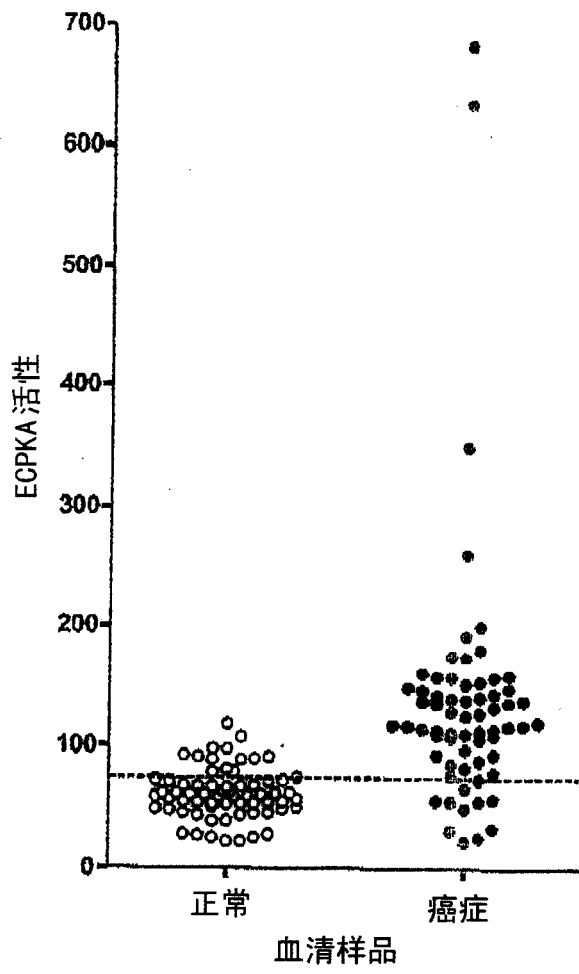


图 4

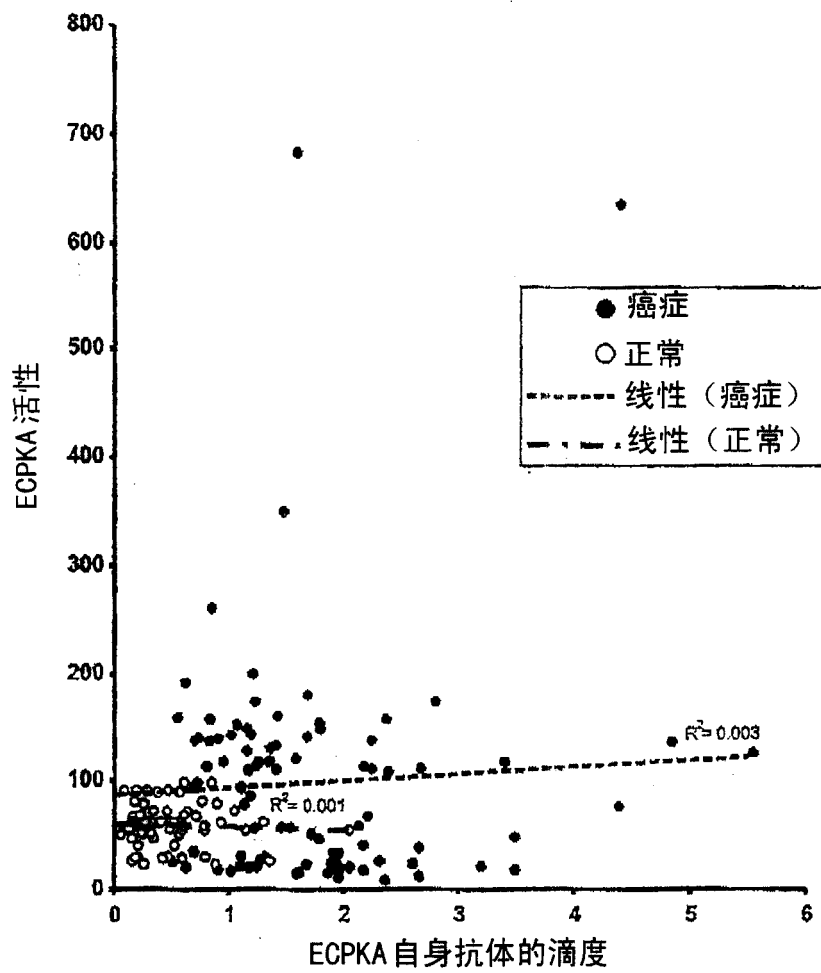


图 5

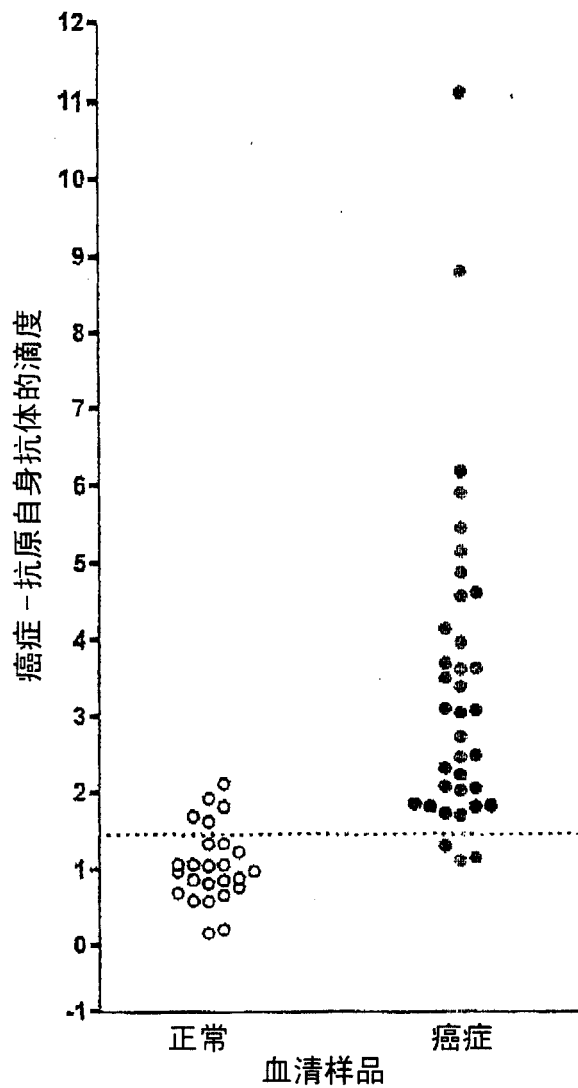


图 6

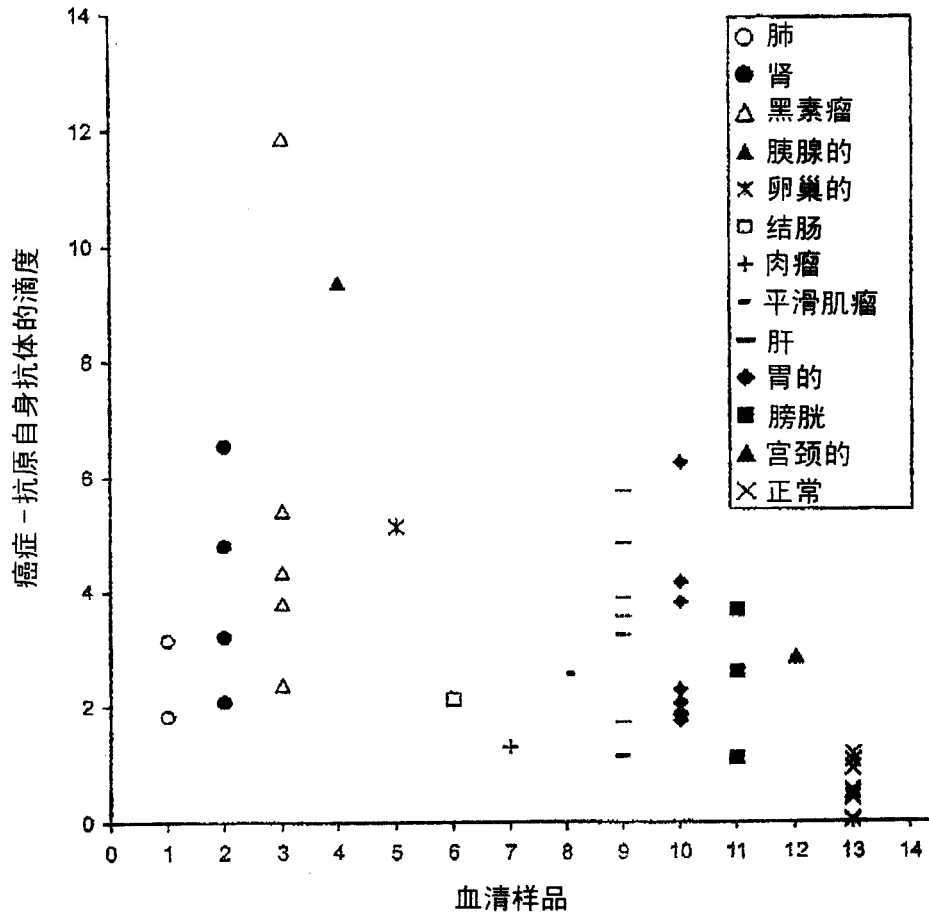


图 7

专利名称(译)	用于癌症诊断的自身抗体检测		
公开(公告)号	<a href="#">CN101042402A</a>	公开(公告)日	2007-09-26
申请号	CN200610071748.6	申请日	2006-03-24
发明人	尹S·调正		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	A47G9/007 A47G9/10 A61H39/04		
代理人(译)	程金山		
优先权	1020050024363 2005-03-24 KR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">SIPO</a>	

摘要(译)

本发明公开了用于在生物样品中检测抗 - ECPKA自身抗体的组合物和方法，以及这些组合物和方法在人和非人哺乳动物中癌症诊断的应用。

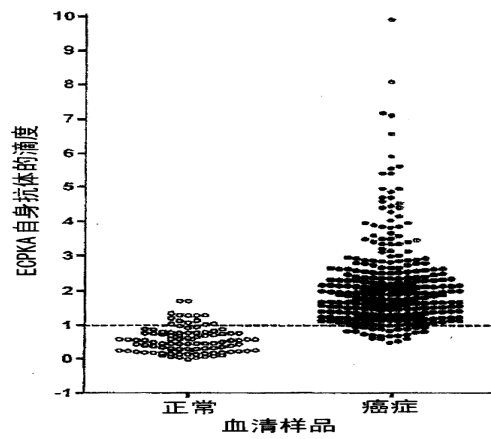


图 1