



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105408751 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201480042738. 2

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

(22) 申请日 2014. 10. 31

代理人 曲蕾 张广育

(30) 优先权数据

10-2013-0131150 2013. 10. 31 KR

10-2013-0131248 2013. 10. 31 KR

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 01. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2014/010354 2014. 10. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/065097 KO 2015. 05. 07

(71) 申请人 SK 电信有限公社

地址 韩国首尔

申请人 首尔大学校产学协力团

(72) 发明人 韩尚助 崔镕焕 李成坤 尹泰钧

南宫锭贤 金永洙 朴泰成

张晋荣

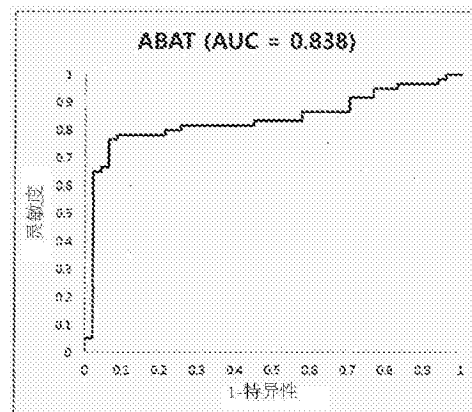
权利要求书2页 说明书14页 附图11页

(54) 发明名称

用于诊断胰腺癌的组合物以及使用该组合物诊断胰腺癌的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于诊断胰腺癌的组合物和试剂盒,其包含测量胰腺癌的蛋白质或基因的表达水平的制剂,其可用于确定胰腺癌的风险,涉及使用所述组合物或试剂盒诊断胰腺癌的方法。本发明通过提供用于胰腺癌的诊断标记物可有效地预测或识别胰腺癌的风险、更早期的诊断和严重性,并且可用于胰腺癌肿瘤发生的研究。此外,本发明的诊断方法可以无创性方式从血液等简单地进行更早的诊断。



1. 一种用于诊断胰腺癌的组合物,其包含用于测量 ABAT (4-氨基丁酸转氨酶 ;GenBank 登录号 :NP\_001120920. 1) 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂。

2. 权利要求 1 的用于诊断胰腺癌的组合物,其进一步包含用于测量 CA19-9 蛋白的蛋白表达水平或编码 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂。

3. 一种用于诊断胰腺癌的组合物,其包含用于测量 ABAT (4-氨基丁酸转氨酶 ;GenBank 登录号 :NP\_001120920. 1) 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂 ;以及用于测量 CHI3L1 ( 几 - 丁质酶 -3- 样蛋白 1 前体 ;GenBank 登录号 : NP\_001267. 2) 的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂。

4. 权利要求 3 的用于诊断胰腺癌的组合物,其进一步包含用于测量 CA19-9 蛋白的蛋白表达水平或编码 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项的用于诊断胰腺癌的组合物,其中所述用于测量蛋白表达水平的试剂包含抗体、寡肽、配体、PNA ( 肽核酸 ) 或适体,所有这些都可特异性结合至所述蛋白。

6. 权利要求 1 至 4 中任一项的用于诊断胰腺癌的组合物,其中所述用于测量 mRNA 表达水平的试剂包含引物、探针或反义核苷酸,所有这些都可特异性结合至编码所述标记物蛋白的基因的 mRNA。

7. 一种用于诊断胰腺癌的试剂盒,其包含权利要求 1 至 6 中任一项的组合物。

8. 权利要求 7 的试剂盒,其中所述试剂盒是 RT-PCR ( 反转录聚合酶链式反应 ) 试剂盒、DNA 芯片试剂盒、ELISA ( 酶联免疫吸附试验 ) 试剂盒、蛋白芯片试剂盒、快速试剂盒、或 MRM ( 多反应监测 ) 试剂盒。

9. 一种用于诊断胰腺癌的方法,其包括 :

(a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品 ;

(b) 测量 ABAT 蛋白 (4-氨基丁酸转氨酶 ;GenBank 登录号 :NP\_001120920. 1) 的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平 ;

(c) 将 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较 ;以及

(d) 基于 (c) 步骤中的比较结果,当待进行胰腺癌发病诊断的受试者的 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高时,确定胰腺癌发病的可能性高。

10. 一种用于诊断胰腺癌的方法,其包括 :

(a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品 ;

(b) 测量 ABAT 蛋白 (4-氨基丁酸转氨酶 ;GenBank 登录号 :NP\_001120920. 1) 和 CA19-9 蛋白各自的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白和 CA19-9 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平 ;

(c) 将 ABAT 蛋白和 CA19-9 蛋白各自的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白和 CA19-9 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较 ;以及

(d) 基于 (c) 步骤中的比较结果,当待进行胰腺癌发病诊断的受试者的 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高,并且待进行胰腺癌发病诊断的受试者的 CA19-9 蛋白的蛋白表达水平或编码 CA19-9 蛋白的

基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高时,确定胰腺癌发病的可能性高。

11. 一种用于诊断胰腺癌的方法,其包括:

(a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

(b) 测量 ABAT(4-氨基丁酸转氨酶;GenBank 登录号:NP\_001120920.1) 蛋白和 CHI3L1(几丁质酶-3-样蛋白 1 前体;GenBank 登录号:NP\_001267.2) 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白和 CHI3L1 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平;

(c) 将 ABAT 蛋白和 CHI3L1 蛋白各自的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白和 CHI3L1 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较;以及

(d) 基于 (c) 步骤中的比较结果,当待进行胰腺癌发病诊断的受试者的 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高,并且待进行胰腺癌发病诊断的受试者的 CHI3L1 蛋白的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更低时,确定胰腺癌发病的可能性高。

12. 一种用于诊断胰腺癌的方法,其包括:

(a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

(b) 测量 ABAT 蛋白、CHI3L1 蛋白和 CA19-9 蛋白各自的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白、CHI3L1 蛋白和 CA19-9 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平;

(c) 将 ABAT 蛋白、CHI3L1 蛋白和 CA19-9 蛋白各自的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白、CHI3L1 蛋白和 CA19-9 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较;以及

(d) 基于 (c) 步骤中的比较结果,当受试者的 ABAT 蛋白的表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高,

受试者的 CHI3L1 蛋白的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更低,并且

受试者的 CA19-9 蛋白的蛋白表达水平或编码 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高时,确定胰腺癌发病的可能性高。

13. 权利要求 9 至 12 中任一项的方法,其中所述样品是血液、血清或血浆。

14. 权利要求 9 至 12 中任一项的方法,其中蛋白表达水平的测量使用可分别特异性结合至相应标记物蛋白的抗体、寡肽、配体、PNA(肽核酸)或适体。

15. 权利要求 9 至 12 中任一项的方法,其中蛋白表达水平的测量或比较通过使用选自以下的至少一种进行:蛋白芯片测定、免疫测定、配体结合测试、MALDI-TOF(基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱)、SELDI-TOF(表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱)、放射免疫测定、放射免疫扩散、双向免疫扩散、火箭免疫电泳、免疫组化染色、补体结合试验、2-D 电泳、液相色谱-质谱(LC-MS)、液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)、免疫印迹、和 ELISA(酶联免疫吸附试验)。

16. 权利要求 9 至 12 中任一项的方法,其中 mRNA 表达水平的测量通过使用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、竞争性 RT-PCR、实时 RT-PCR、核糖核酸酶保护测定(RPA)、RNA 印迹和 DNA 芯片进行。

## 用于诊断胰腺癌的组合物以及使用该组合物诊断胰腺癌的方法

### 技术领域

[0001] 本公开内容涉及用于诊断胰腺癌的组合物和试剂盒,其包含用于测量蛋白的蛋白表达水平或编码所述蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂,可用于确定胰腺癌的发病或发病的可能性,以及涉及使用所述组合物或试剂盒诊断胰腺癌的方法。

### 背景技术

[0002] 目前,在人类主要疾病中具有代表性的是癌症。关于癌症的研究正在积极进行,特别是在高发癌症(包括肺癌、肝癌、胃癌等)领域,但是对低发癌症(包括食管癌、结直肠癌、胰腺癌等)进行的研究较少。

[0003] 特别地,胰腺癌在其早期通常不引起可识别的症状,并且该疾病通常由于其症状轻微(例如疼痛、体重减轻等),直到疾病从胰腺本身扩散至全身才被诊断出。此外,胰腺癌的存活率通常很低,因此定期诊断非常重要。在大多数情况下,胰腺癌的临床症状是缓慢暴露的,胰腺癌患者最常出现虚弱、厌食和体重减轻。已发现胰腺癌的五年存活率是1-4%,中位生存期是5个月,其非常致命并且是人类癌症中预后最差的。诊断后,发现80-90%的人不能通过有希望的根治性切除术治疗。这是通常预后非常差的主要原因之一。主要使用化学疗法治疗胰腺癌。因此,与其他癌症相比,迫切需要胰腺癌的早期诊断方法。尽管目前已知一些抗癌药物(包括5-氟尿嘧啶、吉西他滨和特罗凯)可用于治疗胰腺癌,但是它们表现出非常低的疗效和对癌症治疗的仅15%左右的反应率。这些情况表明,迫切需要更有效的胰腺癌的早期诊断和治疗,由此可改善预后。

[0004] 根据血液学检验(CA19-9)、使用X-射线造影剂的胃肠道造影术和十二指肠造影术、经皮肤和肝的胆管造影术、或内镜逆行胰胆管造影术确定胰腺癌的诊断。许多疾病病变可通过这样的方法检测,但是目前最优选的是超声波扫描术和计算机断层扫描术。更谨慎的活检方法可导致相对更精确的结果。上述诊断方法由于其通常是精确的而被使用,但是,受试者不愿经受检查,因为这些诊断方法是令人不舒服的或疼痛的。因此,需要方便并快速诊断胰腺癌的方法。

[0005] 在这一方面,韩国专利 No. 10-0819122 公开了使用多种胰腺癌标记物(包括母系蛋白、甲状腺素运载蛋白和人分层蛋白)的技术。此外,未经审查的韩国专利申请公开 No. 2012-0082373 描述了使用多种胰腺癌标记物诊断胰腺癌。KR2009-0003308 公开了通过检测受试者血液样品中 REG4 的表达水平诊断胰腺癌。KR 2012-0009781A 描述了测量受试者癌症组织中 XIST RNA 表达水平的分析方法,由此可提供受试者的胰腺癌的发病信息。KR2007-0119250A 公开了新的 LBFL313 基因家族,它们在正常胰腺组织和胰腺癌组织之间以不同模式表达。US 2011/0294136A1 公开了使用生物标记物(包括角蛋白8蛋白)的胰腺癌的诊断方法。但是,不同标记物之间的诊断效率和精确度非常不同。因此,迫切需要非常有效的标记物和使用该标记物的诊断方法。

[0006] 本发明人努力开发出一种可用于在早期诊断胰腺癌的标记物,因此鉴定出胰腺癌

中过表达或低表达的蛋白,并通过确认使用所述蛋白可容易地诊断胰腺癌而完成了本发明。

## 发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 因此,本公开内容的一个目的是提供胰腺癌的诊断组合物,使用该组合物可在早期方便地诊断胰腺癌发病的可能性。

[0009] 本公开内容的另一个目的是提供用于诊断胰腺癌的试剂盒,其包含所述组合物。

[0010] 本公开内容的再一个目的是提供用于使用所述诊断组合物或试剂盒诊断胰腺癌或提供关于胰腺癌的诊断结果的信息的方法。

[0011] 技术方案

[0012] 为实现以上目的,本公开内容提供了用于诊断胰腺癌的组合物,其包含用于测量 ABAT 蛋白(4-氨基丁酸转氨酶;GenBank 登录号:NP\_001120920.1)的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂。

[0013] 为实现以上目的,本公开内容提供了用于诊断胰腺癌的组合物,其包含用于测量 ABAT 蛋白(4-氨基丁酸转氨酶;GenBank 登录号:NP\_001120920.1)的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平;以及 CHI3L1 蛋白(几丁质酶-3-样蛋白 1 前体;GenBank 登录号:NP\_001267.2)的表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂。

[0014] 为实现以上目的,本公开内容提供了用于诊断胰腺癌的试剂盒,其包含所述组合物。

[0015] 为实现以上目的,本公开内容提供了用于诊断胰腺癌的方法,其包括:

[0016] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0017] (b) 测量 ABAT 蛋白(4-氨基丁酸转氨酶;GenBank 登录号:NP\_001120920.1)的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平;

[0018] (c) 将 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较;以及

[0019] (d) 基于(c)步骤中的比较结果,当待进行胰腺癌发病检测的受试者的 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比待进行胰腺癌发病检测的相应的正常对照的表达水平更高时,确定胰腺癌的发病或发病的可能性高。

[0020] 为实现以上目的,本公开内容提供了用于诊断胰腺癌的方法,其包括:

[0021] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0022] (b) 测量 ABAT 蛋白(4-氨基丁酸转氨酶;GenBank 登录号:NP\_001120920.1)的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平、以及 CHI3L1 蛋白(几丁质酶-3-样蛋白 1 前体;GenBank 登录号:NP\_001267.2)的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平;

[0023] (c) 将 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平、以及 CHI3L1 蛋白的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较;以及

[0024] (d) 基于(c)步骤中的比较结果,当待进行胰腺癌发病检测的受试者的 ABAT 蛋

白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高时,以及当待进行胰腺癌发病检测的受试者的 CHI3L1 蛋白的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比受试者的相应的正常对照的表达水平更低时,确定胰腺癌的发病或发病的可能性高。

[0025] 本发明的诊断胰腺癌的标记物可使得能够有效地估计或确定胰腺癌发病的可能性,以在早期诊断胰腺癌和胰腺癌的严重程度。此外,本发明的诊断方法允许以无创性方式从样品(例如血液)中方便地检测胰腺癌。

[0026] 有益效果

[0027] 如上所述,本公开内容的胰腺癌的诊断标记物可用于在早期预测或诊断胰腺癌的发病、发病的可能性及严重性。所述标记物还可用于胰腺癌肿瘤发生的研究。此外,本发明的诊断方法允许以无创性方式在样品(例如血液)中方便地检测胰腺癌。

### 附图说明

[0028] 图 1 是示出了对照组和胰腺癌患者组的 ABAT 蛋白的相对浓度的图,如通过 MRM 定量分析所测量的。

[0029] 图 2 是示出了 ABAT 的癌细胞 (AUC) 诊断性能的 ROC 曲线(接收者操作特征)。

[0030] 图 3 是示出了 CA19-9 的癌细胞 (AUC) 诊断性能的 ROC 曲线(接收者操作特征),本领域已知 CA19-9 是胰腺癌的血液标记物。

[0031] 图 4 是比较了 ABAT 与 CA19-9 的癌细胞 (AUC) 诊断性能的 ROC 曲线(接收者操作特征)。

[0032] 图 5 是示出了 ABAT 和 CA19-9 的结合物的癌细胞 (AUC) 诊断性能的 ROC 曲线(接收者操作特征)。

[0033] 图 6 是比较了单独的 CA19-9 和 ABAT 与 CA19-9 和 ABAT 的结合物的癌细胞 (AUC) 诊断性能的 ROC 曲线(接收者操作特征)。

[0034] 图 7 是示出了对照组和胰腺癌患者组的 CHI3L1 蛋白的相对浓度的图,如通过 MRM 定量分析所测量的。

[0035] 图 8 是示出了 CHI3L1 和 CA19-9 的结合物的癌细胞 (AUC) 诊断性能的 ROC 曲线(接收者操作特征)。

[0036] 图 9 是比较了 CA19-9 与 ABAT 和 CHI3L1 的结合物的癌细胞 (AUC) 诊断性能的 ROC 曲线(接收者操作特征)。

[0037] 图 10 是示出了 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 的结合物的癌细胞 (AUC) 诊断性能的 ROC 曲线(接收者操作特征)。

[0038] 图 11 是比较了 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 的结合物与 ABAT 和 CHI3L1 的结合物或单独的 CA19-9 的癌细胞 (AUC) 诊断性能的 ROC 曲线(接收者操作特征)。

### 具体实施方式

[0039] 术语为下文所定义。

[0040] 本文使用的术语“诊断”旨在涵盖确定受试者对某种疾病或病症的易感性、确定受试者是否患有某种疾病或病症、确定患有某种疾病或病症的受试者的预后(例如鉴

定癌症的转移前状态或转移状态、确定癌症的阶段或癌症对治疗的响应)或度量疗法(therametrics)(例如,监测受试者的状态以提供关于治疗功效的信息)。特别地,本文使用的诊断意指确定胰腺癌的发病或发病的可能性(风险)。

[0041] 本文使用的术语“胰腺癌”意指产生于胰腺中的细胞的癌症(癌)或恶性肿瘤。有多种类型的胰腺肿瘤,这类肿瘤的90%是胰腺导管腺癌(PDAC)。因此,胰腺导管腺癌在狭义上被称为胰腺癌。胰腺癌的其他实例包括神经内分泌肿瘤和囊腺癌。

[0042] 本文使用的术语“标记物”、“生物标记物”或“诊断标记物”意指允许区分正常和疾病状态、或能够使治疗结果被预测或客观测量的标签。具体地,在与胰腺癌相关的情况下,标记物意指在患胰腺癌或有胰腺癌发病风险的受试者中,相比于正常对照(未患胰腺癌的受试者),其蛋白或基因表达水平显著升高或降低的有机生物分子,例如多肽或核酸(例如mRNA等)、脂质、糖脂、糖蛋白、糖(单糖、二糖、寡糖等)。

[0043] 本公开内容提供了用于诊断胰腺癌的组合物,其包含用于测量ABAT蛋白(4-氨基丁酸转氨酶;GenBank登录号:NP\_001120920.1)的蛋白表达水平或编码ABAT蛋白的基因的mRNA表达水平的试剂。

[0044] 在本发明中,ABAT被用作检测胰腺癌的标记物,从而有效地诊断受试者的胰腺癌发病或发病的可能性。

[0045] 被用作检测胰腺癌的标记物的ABAT(4-氨基丁酸转氨酶)也被称为GABA氨基转移酶或4-氨基丁酸氨基转移酶,并参与在中枢神经系统中作为神经抑制物质的GABA到琥珀酸半醛的分解。ABAT是包含50kD亚基的同源二聚体,其与5-磷酸吡哆醛形成复合物。ABAT的缺陷引起例如智力迟钝、肌无力、反射亢进、昏睡、难治性癫痫的症状和脑电波问题。但是,目前尚不知ABAT可作为检测胰腺癌的标记物。

[0046] 本发明人证实了ABAT用作检测胰腺癌的标记物,从而以高灵敏度和可靠度有效地诊断出受试者的胰腺癌发病或发病的可能性。具体地,本发明人分析了患有胰腺导管腺癌(PDAC)、管内乳头状黏液瘤(IPMN)和慢性胆囊炎的受试者的血清样品,鉴定ABAT作为在胰腺癌中过表达的生物标记物,并通过分析患非乳腺癌的正常受试者的血清样品验证了胰腺癌的有效生物标记物。

[0047] 本公开内容提供了用于诊断胰腺癌的组合物,其包含用于测量ABAT蛋白(4-氨基丁酸转氨酶;GenBank登录号:NP\_001120920.1)的蛋白表达水平或编码ABAT蛋白的基因的mRNA表达水平;以及CHI3L1蛋白(几丁质酶-3-样蛋白1前体;GenBank登录号:NP\_001267.2)的蛋白表达水平或编码CHI3L1蛋白的基因的mRNA表达水平的试剂。

[0048] 在本发明中,ABAT与CHI3L1的结合物用作检测胰腺癌的标记物,从而有效地诊断受试者的胰腺癌发病或发病的可能性。

[0049] 在使用ABAT与CHI3L1的结合物诊断胰腺癌的组合物中,ABAT与上文所述相同。用作检测胰腺癌的标记物的CHI3L1(几丁质酶-3-样蛋白1前体;GenBank登录号:NP\_001267.2)也被称为软骨糖蛋白39,其属于糖基水解酶18家族。ABAT是包含50KD亚基的同源二聚体,其与5-磷酸吡哆醛形成复合物。CHI3L1是一种分泌到细胞外的糖蛋白,其表达在乳腺癌、肠癌、前列腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、肺癌、肝癌等癌症中增加。但是,目前尚不知ABAT与CHI3L1的结合物可作为检测胰腺癌的标记物。

[0050] 本发明人证实了ABAT与CHI3L1的结合物用作检测胰腺癌的标记物,从而以高灵

敏度和可靠度有效地诊断出受试者的胰腺癌发病或发病的可能性。具体地,本发明人分析了患有胰腺导管腺癌 (PDAC)、管内乳头状黏液瘤 (IPMN) 和慢性胆囊炎的受试者的血清样品,鉴定 ABAT 作为在胰腺癌中过表达的生物标记物以及 CHI3L1 作为在胰腺癌中低表达的生物标记物,并通过分析患非乳腺癌的正常受试者的血清样品验证了胰腺癌的有效生物标记物。

[0051] 在胰腺癌的情况下,本文使用的术语“测量蛋白表达水平”意指检测和鉴定生物样品中胰腺癌的诊断标记物(蛋白)或编码其的基因的存在和表达水平。用于测量或比较分析蛋白的方法的实例包括但不限于:蛋白芯片测定、免疫测定、配体结合测试、MALDI-TOF(基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱)、SELDI-TOF(表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱)、放射免疫测定、放射免疫扩散、双向免疫扩散(Ouchterlony immunodiffusion)、火箭免疫电泳、免疫组化染色、补体结合试验、2-D 电泳、液相色谱-质谱(LC-MS)、液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)、免疫印迹、和 ELISA(酶联免疫吸附试验)。

[0052] 在本公开内容的用于诊断胰腺癌的组合物中,用于测量 ABAT 或 CHI3L1 的蛋白表达水平的试剂可包含可特异性结合至蛋白 ABAT 或 CHI3L1 的抗体、寡肽、配体、PNA(肽核酸)或适体。

[0053] 本文使用的术语“抗体”是指特异性结合抗原以引发抗原-抗体反应的物质。出于本公开内容的目的,术语“抗体”意指特异性结合至 ABAT 或 CHI3L1 蛋白的抗体。落入本公开内容的抗体的范围的是多克隆抗体、单克隆抗体和重组抗体。使用本领域熟知的技术可容易地制备这些抗体。此外,可用于本公开内容的抗体可以由两条全长轻链和两条全长重链组成的完整抗体、或是完整抗体分子的功能片段。术语抗体分子的“功能片段”意指保留抗体结合功能的片段,例如 Fab、F(ab')、F(ab')<sub>2</sub>和 Fv。

[0054] 本文使用的术语“PNA(肽核酸)”是指与 DNA 或 RNA 相似的人工合成的聚合物,1991 年由 Nielsen、Egholm、Berg 和 Buchardt(哥本哈根大学,丹麦)教授首次引入。DNA 具有磷酸-核糖骨架,而 PNA 的骨架由通过肽键连接的重复的 N-(2-氨基乙基)-甘氨酸单元构成。由于这种结构,PNA 显著增强 DNA 或 RNA 的亲合力及稳定性,因此有效地用于分子生物学研究、诊断、和反义疗法。对于 PNA 的详细说明,可参考文献 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O(1991 年 12 月).“Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide”.*Science* 254(5037):1497-1500]。

[0055] 本文使用的“适体”是结合至特定靶分子的寡核苷酸或肽分子。对于适体的详细说明,可参考文献 [Bock LC et al.,*Nature* 355(6360):5646(1992);Hoppe-Seyler F, Butz K“Peptide aptamers:powerful new tools for molecular medicine”.*J Mol Med.* 78(8):42630(2000);Cohen BA, Colas P, Brent R.“An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library”.*Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):142727(1998)]。

[0056] 在胰腺癌的情况下,本文使用的术语“测量 mRNA 表达水平”意指检测和鉴定生物样品中编码诊断标记物(蛋白)的基因的 mRNA 的存在和表达水平。在本公开内容中,可用于测量 mRNA 表达水平的分析方法的实例包括反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、竞争性 RT-PCR、实时 RT-PCR、核糖核酸酶保护测定(RPA)、RNA 印迹和 DNA 芯片,但不限于此。

[0057] 在本公开内容的用于诊断胰腺癌的组合物中,用于测量编码 ABAT 或 CHI3L1 的基因的 mRNA 表达水平的试剂包含特异性结合至编码 ABAT 和 CHI3L1 的基因的 mRNA 的引物、探针或反义核苷酸。关于 ABAT 和 CHI3L1 蛋白的信息可通过 UniProt 获得,本领域技术人员可基于该信息设计特异性结合至编码该蛋白的基因的 mRNA 的引物、探针或反义核苷酸。

[0058] 本文使用的术语“引物”是识别靶基因序列的短核酸序列的链,其包括一对正反向引物。具体地,所述“引物”包括一对提供特异性和灵敏度的分析结果的引物。引物被认为在用于扩增靶基因序列时提供高度特异性,但它不引起与靶基因序列不一致或互补的非靶序列的扩增。

[0059] 本文使用的术语“探针”是指特异性结合至样品中待检测的靶标的物质。通过所述结合,探针可确定样品中靶标的存在。只要它通常用于本领域中,任何探针都可用于本公开内容。特别地,所述探针可以是 PNA(肽核酸)、LNA(锁核酸)、肽、多肽、蛋白、RNA 或 DNA,最优选 PNA。具体地,所述探针是一种生物材料,其可以来自有机体或可以体外合成、或是其模拟物。例如,所述探针可以是酶、蛋白、抗体、微生物、动物或植物细胞或器官、神经元、DNA 或 RNA。DNA 可包括 cDNA、基因组 DNA 和寡核苷酸。同样地,基因组 RNA、mRNA 和寡核苷酸可落入 RNA 的范围内。蛋白的实例包括抗体、抗原、酶和肽。

[0060] 本文使用的术语“反义”是指具有核苷酸碱基序列和亚基-亚基骨架的寡聚体,所述骨架允许反义寡聚体通过 Watson-Crick 碱基配对与 RNA 中的靶序列杂交以在靶序列中形成 RNA:寡聚体异源双链核酸分子。

[0061] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断胰腺癌的组合物,其进一步包括用于测量 CA19-9 蛋白(糖抗原 19-9)的蛋白表达水平或编码 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂。特别地,本发明的组合物可包括用于测量 ABAT 和 CA19-9 蛋白的表达水平或编码 ABAT 和 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平的试剂。此外,所述组合物可包括 ABAT、CHI3L1(几丁质酶-3-样蛋白 1 前体;GenBank 登录号:NP\_001267.2)和 CA19-9 蛋白的蛋白表达水平、或编码 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平。

[0062] 已知 CA19-9 蛋白是胰腺癌的标记物[Safi F. et al., "Diagnostic importance of the tumor marker CA 19-9 in pancreatic cancer", *Dtsch Med Wochenschr* 109(49):1869-73(1984); Wang FM et al., "The significance of CA19-9 tumor antigen in the serum of patients with carcinomas". *Proc Natl Sci Counc Repub China B*, Apr 9(2):119-25(1985)]。ABAT 和 CA19-9 这两个标记物、或 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 这三个标记物的测量值可提供更精确和有效的胰腺癌诊断。

[0063] 此外,本公开内容提供了用于诊断胰腺癌的试剂盒,其包含用于诊断胰腺癌的组合物。例如,所述试剂盒可以是 RT-PCR 试剂盒、DNA 芯片试剂盒、ELISA 试剂盒、蛋白芯片试剂盒、快速试剂盒、或 MRM(多反应监测)试剂盒。

[0064] 例如,所述诊断试剂盒可进一步包含反转录聚合酶链式反应所必需的元件。RT-PCR 试剂盒包含一对特异性针对编码标记物蛋白的基因的引物。各引物是具有特异性针对所述基因的核酸序列的序列的核苷酸,其长度可为约 7 至 50bp,更特别为约 10 至 39bp。此外,所述试剂盒可进一步包含特异性针对对照基因的核酸序列的引物。此外,所述 RT-PCR 试剂盒可包含测试管或合适的器皿、反应缓冲液(不同 pH 值和镁浓度)、脱氧核苷酸(dNTP)、酶(例如 Taq 聚合酶和反转录酶)、脱氧核糖核酸酶抑制剂、核糖核酸酶抑制剂、

DEPC-水、和无菌水。

[0065] 此外,本公开内容的诊断试剂盒可包含用于操作 DNA 芯片所必需的元件。所述 DNA 芯片试剂盒可包含与基因或 cDNA 或相当于其片段的寡核苷酸结合的底物、及用于构建荧光标记的探针的试剂、药剂和酶。此外,所述底物可包含对照基因或 cDNA 或相当于其片段的寡核苷酸。

[0066] 在一些实施方案中,本公开内容的诊断试剂盒可包含用于进行 ELISA 所必需的元件。所述 ELISA 试剂盒可包含特异性针对蛋白的抗体。所述抗体具有针对标记物蛋白的高选择性和亲合力,与其他蛋白无交叉反应性,并且可以是单克隆抗体、多克隆抗体或重组抗体。此外,所述 ELISA 试剂盒可包含特异性针对对照蛋白的抗体。此外,所述 ELISA 试剂盒可进一步包含能够检测被结合的抗体的试剂,例如,标记的第二抗体、发色团、酶(例如,与抗体缀合)、及其底物或能够结合所述抗体的物质。

[0067] 此外,本发明提供了用于诊断胰腺癌的方法。

[0068] 用于诊断胰腺癌的方法的一个实施方案包括以下步骤:

[0069] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0070] (b) 测量 ABAT 蛋白(4-氨基丁酸转氨酶;GenBank 登录号:NP\_001120920.1)的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平;

[0071] (c) 将 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较;以及

[0072] (d) 基于(c)步骤中的比较结果,当待进行胰腺癌发病检测的受试者的 ABAT 蛋白的表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高时,确定胰腺癌的发病或发病的可能性高。

[0073] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:

[0074] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0075] (b) 测量 ABAT 蛋白(4-氨基丁酸转氨酶;GenBank 登录号:NP\_001120920.1)的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平、以及 CHI3L1 蛋白(几丁质酶-3-样蛋白 1 前体;GenBank 登录号:NP\_001267.2)的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平;

[0076] (c) 将 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平、以及 CHI3L1 蛋白的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较;以及

[0077] (d) 基于(c)步骤中的比较结果,当待进行胰腺癌发病检测的受试者的 ABAT 蛋白的表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高时,以及当待进行胰腺癌发病检测的受试者的 CHI3L1 蛋白的表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更低时,确定胰腺癌的发病或发病的可能性高。

[0078] 与所述方法结合使用的术语“样品”是指随着胰腺癌的发病,蛋白或基因表达水平不同的生物样品,样品的实例包括组织、细胞、血清、血浆、唾液、脑脊液和尿,优选血液、血清或血浆。

[0079] 由于胰腺癌患者的 ABAT 蛋白的表达水平或编码该蛋白的基因的 mRNA 表达水平升

高,因此与正常对照相比,当 ABAT 蛋白的表达水平或编码该蛋白的基因的 mRNA 表达水平升高时,可确定胰腺癌的高的发病可能性。

[0080] 由于胰腺癌患者的 ABAT 蛋白的表达水平或编码该蛋白的基因的 mRNA 表达水平升高、并且 CHI3L1 蛋白的表达水平或编码该蛋白的基因的 mRNA 表达水平降低,因此与正常对照相比,当 ABAT 蛋白的表达水平或编码该蛋白的基因的 mRNA 表达水平升高、并且 CHI3L1 蛋白的表达水平或编码该蛋白的基因的 mRNA 表达水平降低时,可确定胰腺癌的高的发病可能性。

[0081] 表述或短语“待进行胰腺癌发病检查的受试者的 ABAT 的蛋白表达水平或编码 ABAT 的基因的 mRNA 表达水平比正常对照更高”意指如通过多种方法所测量的,待进行胰腺癌发病检查的受试者的 ABAT 的蛋白表达水平或编码 ABAT 的基因的 mRNA 表达水平比正常对照高 1.0、1.5、2.3、5 或 10 倍。

[0082] 表述或短语“待进行胰腺癌发病检查的受试者的 CHI3L1 的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 的基因的 mRNA 表达水平比正常对照更低”意指如通过多种方法所测量的,待进行胰腺癌发病检查的受试者的 CHI3L1 蛋白的蛋白表达水平或编码 CHI3L1 的基因的 mRNA 表达水平比正常对照低 0.1、0.2、0.3、0.5 或 1 倍。

[0083] 在一些实施方案中,“确定高度倾向于发生胰腺癌”可根据胰腺癌诊断公式决定,如通过以下公式 1 所示例的。

[0084] [公式 1]

$$f(x) = \operatorname{sgn}\left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

[0086] 其中,

[0087]  $x$  是胰腺癌诊断标记物的表达水平测量值,

[0088]  $\alpha_i$  是 SVM 中的拉格朗日乘数,

[0089]  $y_i$  是正常组 / 胰腺癌组的分离系数,

[0090]  $x_i$  是参考测量值,以及

[0091]  $b$  是校正值。

[0092] 此函数衍生自 SVM(支持向量机)。SVM 是被设计以基于拉格朗日最优化理论评估满足给定条件的函数的算法。其中,使用最大间隔分类器进行分类的例子被称为 SVC(支持向量分类机)。当将 ABAT 和 CHI3L1 的相对 MRM 测量值应用于此函数时,函数值为 1 则诊断为胰腺癌的高的发病可能性,而函数值为 -1 则说明为正常状态。

[0093] 根据本公开内容的方法,基于通过将 ABAT 和 CHI3L1 的蛋白或 mRNA 表达水平应用于所述胰腺癌诊断公式而获得的结果可容易地确定胰腺癌发病的可能性。因此,胰腺癌发病的可能性的确定不需要医生的临床决策。

[0094] 尽管由 SVM 构建,此诊断函数可由多种类型的区别分析构成,包括机器学习如神经网络、随机森林等。

[0095] 在本公开内容的方法中,可使用特异性结合至相应蛋白的各抗体测量和比较蛋白表达水平。允许抗体与生物样品中的相应蛋白形成抗原-抗体复合物并检测该复合物。

[0096] 本文使用的术语“抗原-抗体复合物”意指其中抗原与识别该抗原的抗体结合的

复合物,其被用于确定生物样品中是否存在相应的基因。抗原-抗体复合物的检测可使用本领域熟知的方法实现,例如光谱法、光化学法、生物化学法、免疫化学法、电学法、光化学法、化学法等。

[0097] 出于本公开内容的目的,蛋白表达的测量或比较可使用本领域熟知的方法实现,其实例包括但不限于:蛋白芯片测定、免疫测定、配体结合测试、MALDI-TOF(基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱)、SELDI-TOF(表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱)、放射免疫测定、放射免疫扩散、双向免疫扩散(Ouchterlony immunodiffusion)、火箭免疫电泳、免疫组化染色、补体结合试验、2-D 电泳、液相色谱-质谱(LC-MS)、液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)、免疫印迹、和 ELISA(酶联免疫吸附试验)。

[0098] 在本公开内容中,LC-MRM 可用于测量和比较 ABAT 和 CHI3L1 蛋白的表达水平。

[0099] 特别地,生物样品中的靶蛋白可通过 LC 分离,其使用 LC 分析柱,并使用浓度梯度为 95:5 至 15:85 的含 95 体积%蒸馏水、5 体积%乙腈和 0.1 体积%甲酸的溶液和含 5 体积%蒸馏水、95 体积%乙腈和 0.1 体积%甲酸的溶液。由于某些物质的解析度可随溶液的混合比而变化,因而设定了浓度梯度。所述梯度范围对于同时分离多种蛋白是最佳的。

[0100] 对于质谱分析,MRM(多反应监测)以 MS/MS 模式进行。SIM(选择性离子监测)利用在质谱仪的离子源上碰撞形成的离子,而 MRM 利用从已经碎裂的离子中选出特定离子然后使其再次碰撞串联的一个不同的 MS 源后而产生的离子。SIM 的问题在于如果所选择的定量离子与在血清中检测到的离子相同,则其可能干扰定量分析。另一方面,当离子再次碰撞时,尽管它们与未碰撞的离子具有相同的质量,但它们的分子结构与未碰撞的离子不同,表现出不同的特征。因此,使用这类离子去除背景中的噪声峰值,以使 MRM 允许甚至更清楚的基线。此外,与靶肽相比,合成并测量稳定的同位素标准(SIS)肽,从而使得对所需物质进行精确分析的同时具备更高的灵敏度。

[0101] 使用以上分析方法,可比较正常对照和疑似有胰腺癌发病的受试者之间的蛋白水平,评估胰腺癌标记物的蛋白表达水平的显著升高以确定胰腺癌发病的可能性。

[0102] 可用于测量和比较编码 ABAT 和 CHI3L1 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平的测定包括但不限于:RT-PCR、竞争性 RT-PCR、实时 RT-PCR、核糖核酸酶保护测定、RNA 印迹和 DNA 芯片。使用所述测定方法,可测量与正常对照相比的被怀疑的受试者的胰腺癌标记物的 mRNA 表达水平,以诊断或预测胰腺癌的发病可能性。

[0103] 本公开内容还提供了为胰腺癌诊断提供信息的方法,,其进一步包含除了 ABAT 或 CHI3L1 以外的 CA19-9。

[0104] 特别地,本公开内容提供了用于诊断胰腺癌的方法,其包括:

[0105] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0106] (b) 测量 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平、以及 CA19-9 的蛋白表达水平或编码 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平;

[0107] (c) 将 ABAT 蛋白和 CA19-9 蛋白的表达水平或编码 ABAT 蛋白和 CA19-9 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较;以及

[0108] (d) 基于(c)步骤中的比较结果,当待进行胰腺癌发病检测的受试者的 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高时,以及当待进行胰腺癌发病检测的受试者的 CA19-9 蛋白的表达水平或编码 CA19-9 蛋

白的基因的 mRNA 表达水平比受试者的相应的正常对照的表达水平更高时,确定胰腺癌的发病或发病的可能性高。

[0109] 另一个实施方案提供了用于诊断胰腺癌的方法,其包括:

[0110] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0111] (b) 测量 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 的蛋白表达水平或编码 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 蛋白的各基因的 mRNA 表达水平;

[0112] (c) 将 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较;以及

[0113] (d) 基于 (c) 步骤中的比较结果,当待进行胰腺癌发病检测的受试者的 ABAT 蛋白的表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比相应的正常对照的表达水平更高、待进行胰腺癌发病检测的受试者的 CHI3L1 蛋白的表达水平或编码 CHI3L1 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比待进行胰腺癌发病检测的受试者的相应的正常对照的表达水平更低、以及待进行胰腺癌发病检测的受试者的 CA19-9 蛋白的表达水平或编码 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平比受试者的相应的正常对照的表达水平更高时,确定胰腺癌的发病或发病的可能性高。

[0114] 一个实施方案提供了检测用于提供关于胰腺癌诊断的信息的胰腺癌标记物的方法,其包括

[0115] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0116] (b) 测量 ABAT 的蛋白表达水平或编码此蛋白的基因的 mRNA 表达水平;以及

[0117] (c) 将 ABAT 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较。

[0118] 其他实施方案提供了检测用于提供关于胰腺癌诊断的信息的胰腺癌标记物的方法,其包括

[0119] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0120] (b) 测量 ABAT 和 CA19-9 各自的蛋白表达水平或编码各蛋白的基因的 mRNA 表达水平;以及

[0121] (c) 将 ABAT 和 CA19-9 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 和 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较。

[0122] 其他实施方案提供了检测用于提供关于胰腺癌诊断的信息的胰腺癌标记物的方法,其包括

[0123] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0124] (b) 测量 ABAT 和 CHI3L1 各自的蛋白表达水平或编码各蛋白的基因的 mRNA 表达水平;以及

[0125] (c) 将 ABAT 和 CHI3L1 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT 和 CHI3L1 各蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较。

[0126] 其他实施方案提供了检测用于提供关于胰腺癌诊断的信息的胰腺癌标记物的方法,其包括

[0127] (a) 从待进行胰腺癌发病诊断的受试者中获得样品;

[0128] (b) 测量 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 各自的蛋白表达水平或编码各蛋白的基因的

mRNA 表达水平 ;以及

[0129] (c) 将 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 蛋白的蛋白表达水平或编码 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 蛋白的基因的 mRNA 表达水平与相应的正常对照的表达水平进行比较。

[0130] 通过以下实施例可获得对本发明的更好的理解,这些实施例只是用于说明而不应被解释为限制本发明。

[0131] 实施例 1 :胰腺癌中过表达或低表达的胰腺癌诊断标记物的发掘和性能分析

[0132] (1) 血液样品的预处理

[0133] 为发掘在胰腺癌中过表达或低表达的蛋白,从具有 50 例 PDAC 患者、10 例侵入性 IPMN 患者、22 例慢性胆囊炎患者、或 25 例正常对照的受试者组中获得样品,如表 1 所示。将来自 22 例慢性胆囊炎患者和 25 例正常对照的样品指定为正常组,并将来自 50 例 PDAC 患者和 10 例侵入性 IPMN 患者的样品指定为癌症组以进行测试和分析。

[0134] [表 1]

[0135]

分类	年龄		性别		
	范围	平均SD	女性	男性	总计
PDAC	44-88	65.729.85	23	27	50
侵入性IPMN	49-81	63.69.66	4	6	10
慢性胆囊炎	43-82	56.969.13	11	11	22
正常对照	35-65	49.048.92	16	9	25

[0136] PDAC :胰腺导管腺癌

[0137] IPMN :管内乳头状黏液瘤

[0138] 在 40  $\mu$ l 的各血液样品中,使用 MARS (多重亲和去除系统) 柱 (Aglient, 美国) 耗尽最丰富的 7 种蛋白,并经 3kDa 过滤器浓缩残余物。通过 BCA 对浓缩液进行定量。从浓缩液中取出相当于 200  $\mu$ g 的血浆,用 6M 尿素变性、用 20mM DTT 和 50mM 碘乙酸还原并烷基化。通过使用胰蛋白酶以 50:1 (蛋白 :胰蛋白酶, w/w) 的比例在 37 $^{\circ}$ C 下处理 16 小时将蛋白分解为肽,使用 C18OASIS 柱 (Waters, 美国) 使肽脱盐并将其冻干。将冻干物溶解于溶液 A (98% 蒸馏水、2% 乙腈、0.1% 甲酸) 中,加入 5fmol 内部  $\beta$ -半乳糖苷酶肽。然后进行 MRM 分析。

[0139] (2) 转换选择

[0140] 为了 MRM 分析,选择具有特定蛋白 (Q1) 的荷质 (m/z) 特征的肽。进一步地,在通过电碰撞从所述肽中产生的多种碎片离子中,选择具有特定蛋白的 m/z 特征的离子 (Q3)。其中特定蛋白的离子特征被结合的 Q1 和 Q3 的结合物被指定为转换。将使 Q1 和 Q3 中的特征离子连续经过高分辨率 (三重 - 四极杆) 质谱而获得的信号简化为用于定量分析的定量信息。使用美国华盛顿西雅图华盛顿大学医学院 (University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington, USA) 的 MacCoss 研究小组研发的软件 SKYLine, 基于 NIST (美国国家标准与技术研究院) 的肽串联质谱,对于由 ms/ms 提供的肽,每种蛋白选择最多达 10 种肽。肽的长度为至少 7 个氨基酸至最多达 24 个氨基酸。

[0141] 然而,从可由胰蛋白酶化产生的总的肽中,具有以下氨基酸或基序的肽由于信号状态差而被排除 :

[0142] **Ⓐ** 当蛋氨酸存在于靶肽中时,它在体内易于被 ROS(活性氧类)氧化,从而增加 32Da 的质量;

[0143] **Ⓑ** 当组氨酸存在于靶肽中时,R 基团的正电荷可改变所述靶肽的电荷状态;

[0144] **Ⓒ** 靶肽中存在的 NxS/T 基序可能经过 N-糖基化,导致质量值的改变;

[0145] **Ⓓ** 当脯氨酸残基仅存在于靶肽中的 R 或 K 残基之后时,错误裂解可发生在 R 或 K 位点,其可被胰蛋白酶切割。

[0146] 对于前体电荷,选择电荷为 +2 的肽,将 +1 的电荷用作离子电荷,具有 y 离子型。使用 Protein Blast P 和 Skyline 选择不同的转换和肽。最终,使用落入预期保留时间 (RT) 范围的转换。对于 RT 预期,进行 600SIS 肽的 MRM 分析,基于使用疏水性范围和 RT 色谱图的分析结果绘制校准曲线。

### [0147] (3) LC 和 MRM

[0148] 为了 LC 分析,采用 Agilent Technologies 的 1260-毛细管 LC,其装配有用于肽分离的毛细管 RR 0.5×1503.5um 柱。样品的注入量为 5 μl,流速为 20 μl/min。首先,使用溶液 A(95 体积%蒸馏水、5 体积%乙腈、0.1 体积%甲酸)使柱平衡 10min,然后使用溶液 B(5 体积%蒸馏水、95 体积%乙腈、0.1%体积甲酸)以 5%至 85%的浓度梯度对肽洗脱 50min 以及以 85%的浓度对肽洗脱 5min。

[0149] 使用 Agilent Technologies 的质谱仪三重四极杆 6490-QQQ,以 MRM 模式监测所选择的蛋白的转换。为补偿批次之间的偏差,同时监测每个样品所掺有的 5fmol β-半乳糖苷酶肽 (GDFQFNISR[C13N15],547.3/646.4)。

### [0150] (4) 数据的定量分析

[0151] 为了定量分析,将内标 β-半乳糖苷酶肽 (GDFQFNISR[C13N15],547.3/646.4m/z) 稀释至 0.09、0.27、0.82、2.5、7.4、22.2、66.7 和 200fmol,并将基质用 10 μg 血浆增补,如处于用于靶肽分析的条件中。也在不存在内标肽的情况下进行分析以确定内源性信号。将 MRM 定量在所有 9 个浓度点重复三次以构建标准曲线。

[0152] 对于每个个体的 MRM 结果,使用 SKYLine (MacCoss Lab,ver1.4.1) 产生相应的 MRM 转换的提取离子色谱 (XIC),并随时间计算和标绘各转换的峰面积。用内标 β-半乳糖苷酶肽 (GDFQFNISR[C13N15],547.3/646.4m/z) 的 XIC 峰面积将各转换的 XIC 峰面积标准化,并基于所述标准化,进行各蛋白的定量分析。

[0153] 基于图 1 的 MRM 分析结果,相比于正常组,胰腺癌患者组的 ABAT 表达水平显著升高,因此选择 ABAT 作为胰腺癌诊断的标记物。如图 2 所示,相比于正常组,胰腺癌患者组的 CHI3L1 表达水平显著降低,因此选择 CHI3L1 作为胰腺癌诊断的标记物。

### [0154] (5) 数据统计

[0155] 为了统计分析,使用 SVM(支持向量机)。SVM 是被设计以基于拉格朗日最优化理论评估满足给定条件的函数的算法。在 SVM 中,使用最大间隔分类器进行分类的例子被称为 SVC(支持向量分类机)。在此实施例中,通过使用具有两个样品组(正常组和胰腺癌组)之间最大差异的 SVC,构建以下胰腺癌诊断公式。

[0156] <公式 1>

$$[0157] \quad f(x) = \operatorname{sgn}\left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

[0158] 此公式的计算值为 1 时说明胰腺癌发病, 计算值为 -1 时说明是正常状态。使用此公式确定胰腺癌的发病或发病的可能性。

[0159] 详细地说, 从三个正常人获得 ABAT 和 CHI3L1 的相对 MRM 测量值, 分别如下: (0.000100328 和 0.14771372)、(0.000252726 和 0.260673196) 以及 (0.000301919 和 0.190724435)。当将这些值应用于此公式时, 所获得的各值计算为  $f(0.000100328, 0.14771372) = -1$ 、 $f(0.000252726, 0.260673196) = -1$  以及  $f(0.000301919, 0.190724435) = -1$ , 表明这三个人是正常的。另外, 从三个胰腺癌患者获得 ABAT 和 CHI3L1 的相对 MRM 测量值, 分别如下: (0.037046485&0.023796806)、(0.039893973&0.092394263) 以及 (0.039590355&0.071735919)。当将这些值应用于此公式时, 所获得的各值计算为  $f(0.037046485, 0.023796806) = 1$ 、 $f(0.039893973, 0.092394263) = 1$ 、 $f(0.039590355, 0.071735919) = 1$ , 表明这三个人患有胰腺癌。

[0160] 当使用胰腺癌诊断公式时, 以 ROC 曲线的 AUC 表示 ABAT 和 CHI3L1 的结合物对胰腺癌的诊断性能。ROC 曲线在 2D 平面上表示灵敏度和特异性之间关系的变化。曲线下较大的面积 (AUC;  $0 \leq \text{AUC} \leq 1$ ) 代表更准确的信息。

[0161] 观察到本公开内容的 ABAT 和 CHI3L1 的结合物的 AUC 为 0.838, 表明此结合物表现出作为胰腺癌诊断标记物的极好的性能 (图 2)。而已知的商业标记物 CA19-9 的 AUC 为 0.825 (图 3), 观察到 ABAT 和 CHI3L1 的结合物比 CA19-9 具有更高的胰腺癌诊断性能 (图 4)。

[0162] 此外, 如果将 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 一起使用, AUC 是 0.984 (图 5), 其仍比单独的 CA19-9、或 ABAT 和 CHI3L1 的结合物更高 (图 6)。

[0163] 分析结果表明 ABAT 和 CHI3L1 的结合物是检测胰腺癌的有用标记物。

[0164] 实施例 2: 胰腺癌中过表达或低表达的胰腺癌诊断标记物的发掘和性能分析

[0165] 根据与实施例 1 相同的方法, 步骤 (1) 至 (4) 之后的 MRM 定量分析显示, 相比于正常组, 胰腺癌患者组的 CHI3L1 的表达水平显著升高, 因此选择 CHI3L1 作为胰腺癌诊断的标记物, 如图 7 所示。

[0166] (1) 数据统计

[0167] 为了统计分析, 使用 SVM (支持向量机)。SVM 是被设计以基于拉格朗日最优化理论评估满足给定条件的函数的算法。在 SVM 中, 使用最大间隔分类器进行分类的例子被称为 SVC (支持向量分类机)。在此实施例中, 通过使用具有两个样品组 (正常组和胰腺癌组) 之间最大差异的 SVC, 构建以下胰腺癌诊断公式。

[0168] <公式 1>

$$[0169] \quad f(x) = \operatorname{sgn}\left(\sum_{i=1}^n \alpha_i y_i \langle x, x_i \rangle + b\right)$$

[0170] 此公式的计算值为 1 时说明胰腺癌发病, 计算值为 -1 时说明是正常状态。使用此公式确定胰腺癌的发病或发病的可能性。

[0171] 详细地说,从三个正常人获得 ABAT 和 CHI3L1 的相对 MRM 测量值,分别如下:(0.000100328&0.14771372)、(0.000252726&0.260673196)以及(0.000301919&0.190724435)。当将这些值应用于此公式时,所获得的各值计算为  $f(0.000100328, 0.14771372) = -1$ 、 $f(0.000252726, 0.260673196) = -1$  以及  $f(0.000301919, 0.190724435) = -1$ ,表明这三个人是正常的。另外,从三个胰腺癌患者获得 ABAT 和 CHI3L1 的相对 MRM 测量值,分别如下:(0.037046485&0.023796806)、(0.039893973&0.092394263)以及(0.039590355&0.071735919)。当将这些值应用于此公式时,所获得的各值计算为  $f(0.037046485, 0.023796806) = 1$ 、 $f(0.039893973, 0.092394263) = 1$ 、 $f(0.039590355, 0.071735919) = 1$ ,表明这三个人患有胰腺癌。

[0172] 当使用胰腺癌诊断公式时,以 ROC 曲线的 AUC 和  $S_n|_{s_p=0.9}$  表示 ABAT 和 CHI3L1 的结合物对胰腺癌的诊断性能。ROC 曲线在 2D 平面上表示灵敏度和特异性之间关系的变化。曲线下较大的面积 ( $AUC; 0 \leq AUC \leq 1$ ) 代表更准确的信息。

[0173] 观察到本公开内容的 ABAT 和 CHI3L1 的结合物的 AUC 为 0.956,表明此结合物表现出作为胰腺癌诊断标记物的极好的性能(图 8)。而已知的商业标记物 CA19-9 的 AUC 为 0.825(图 3),观察到 ABAT 和 CHI3L1 的结合物比 CA19-9 具有更高的胰腺癌诊断性能(图 9)。

[0174] 此外,如果将 ABAT、CHI3L1 和 CA19-9 一起使用,AUC 是 0.984(图 10),其仍比单独的 CA19-9、或 ABAT 和 CHI3L1 的结合物更高(图 11)。

[0175] 分析结果表明 ABAT 和 CHI3L1 的结合物是检测胰腺癌的有用标记物。

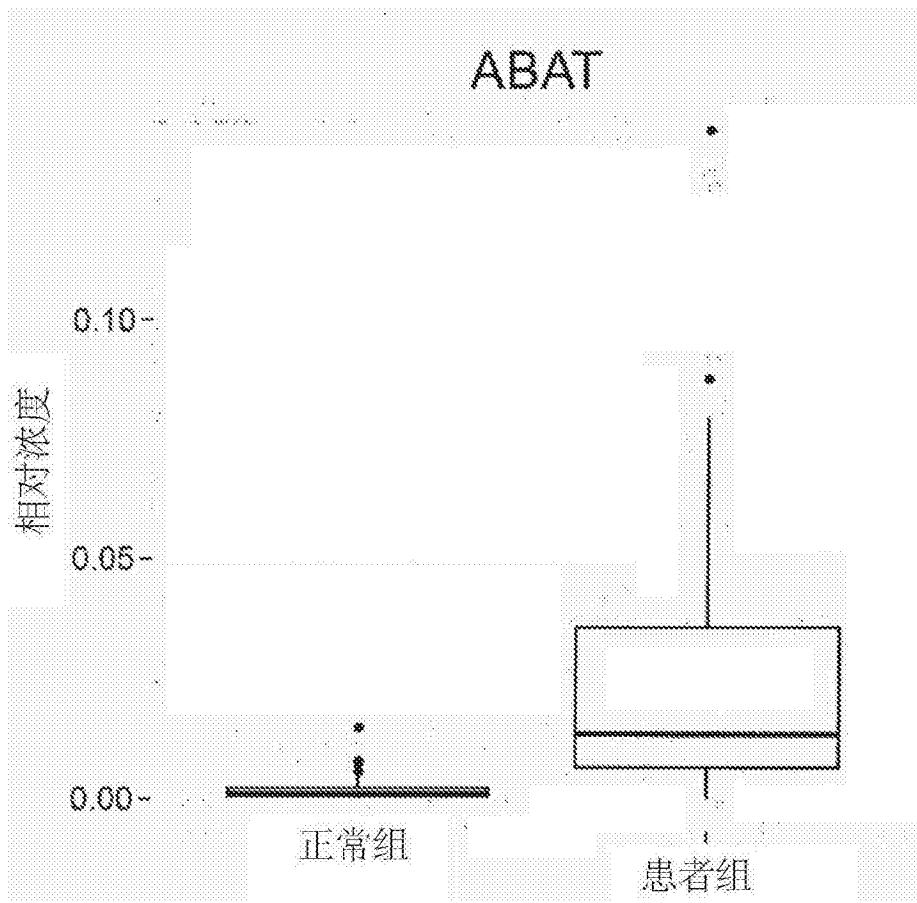


图 1

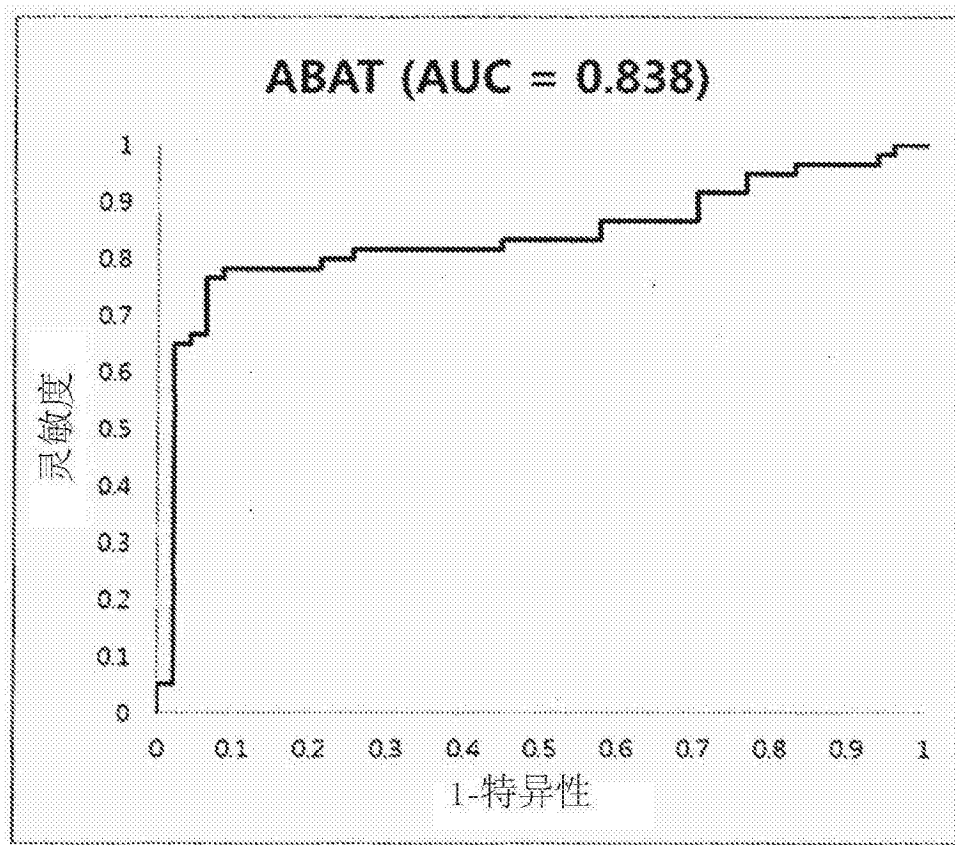


图 2

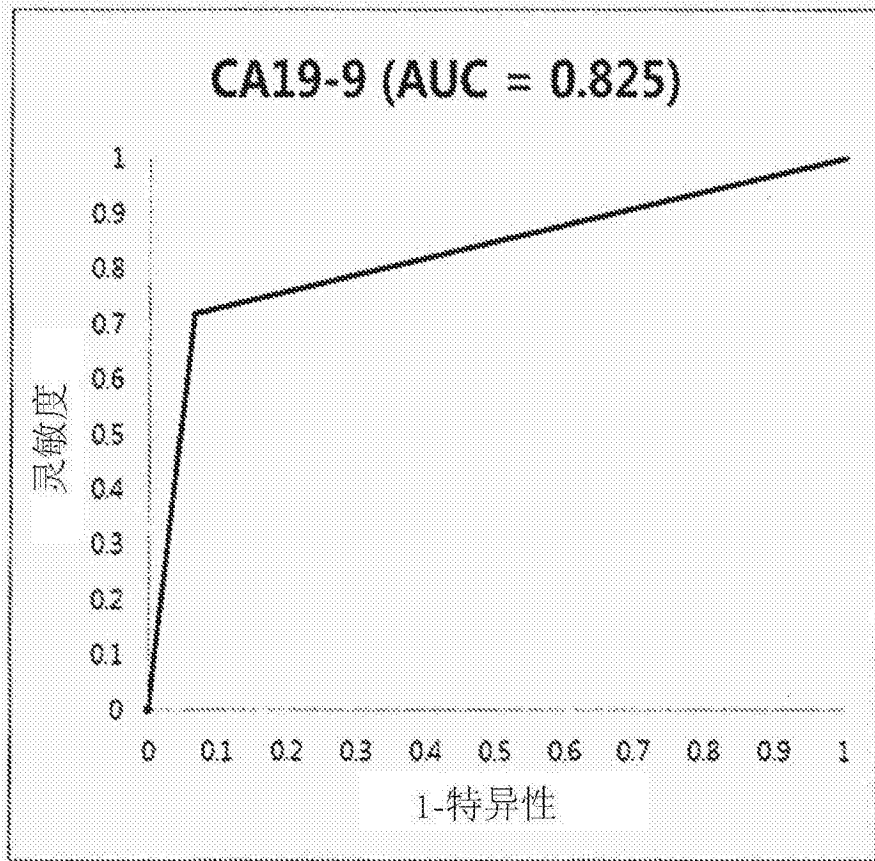


图 3

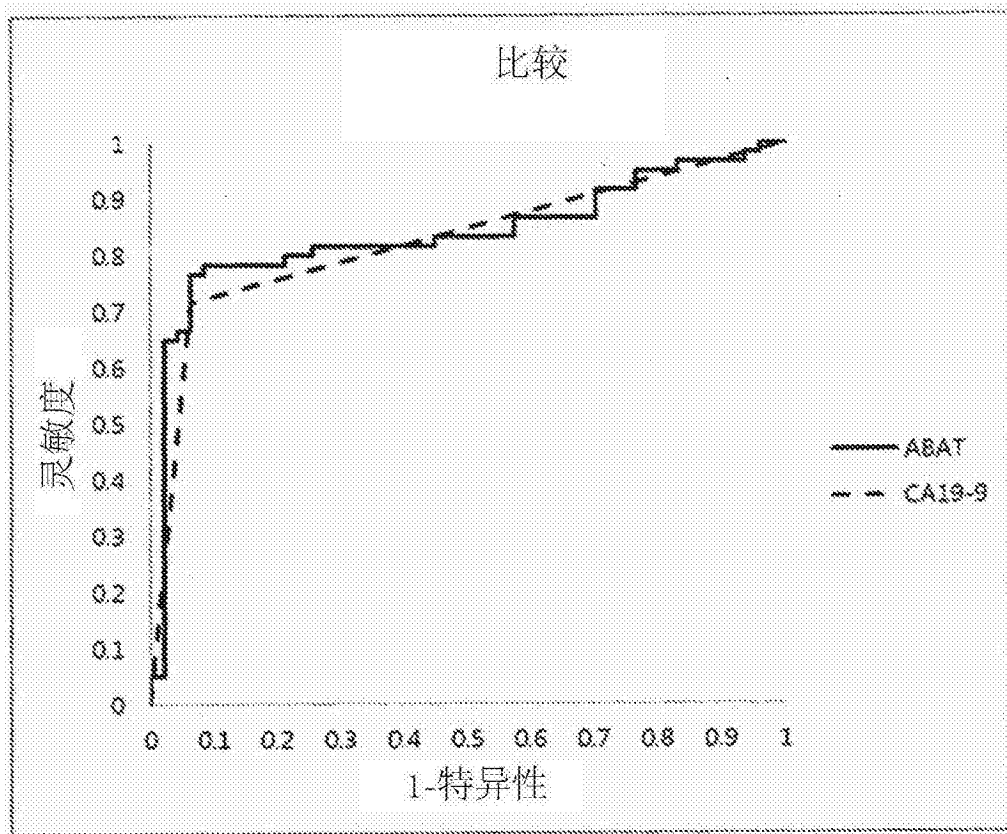


图 4

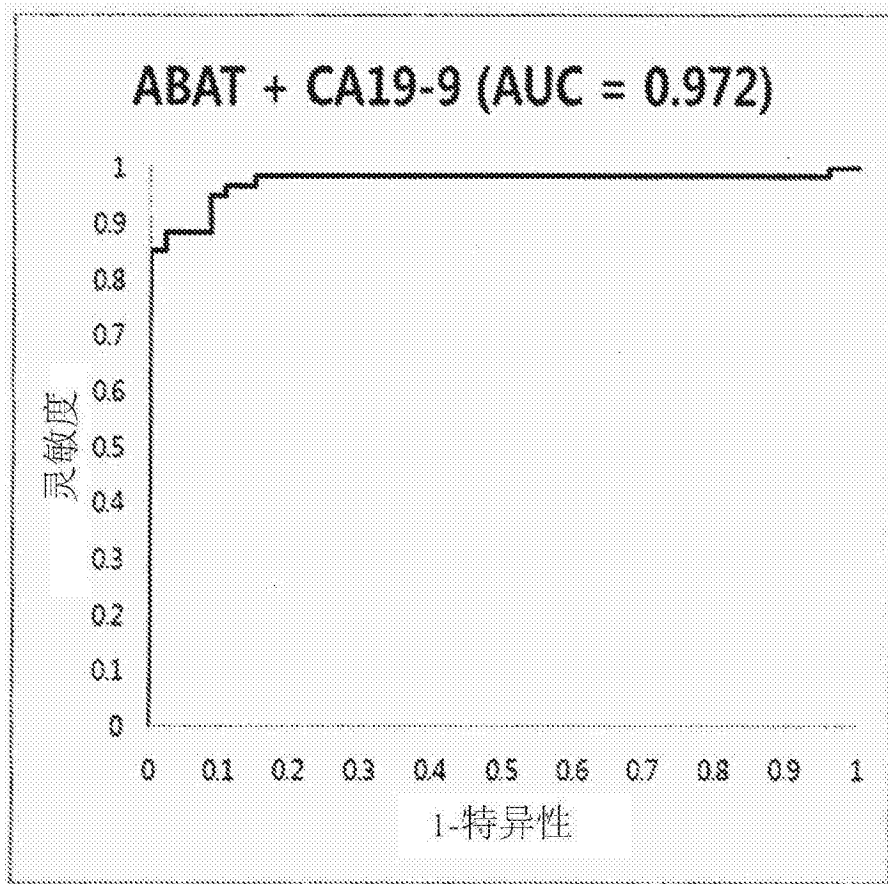


图 5

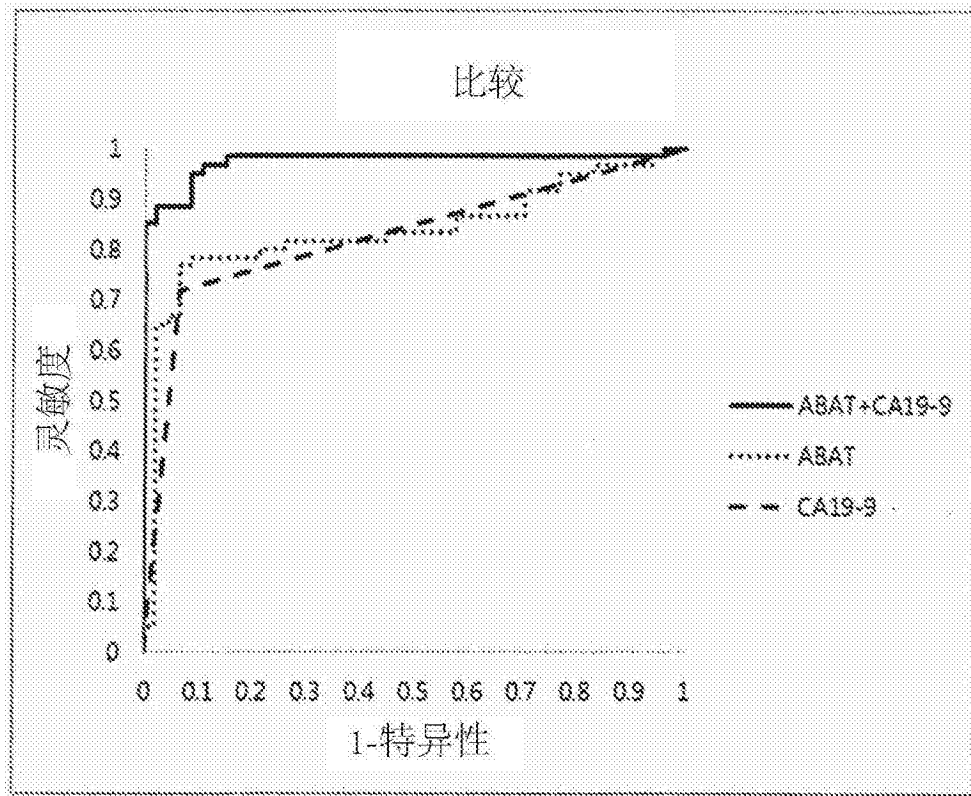


图 6

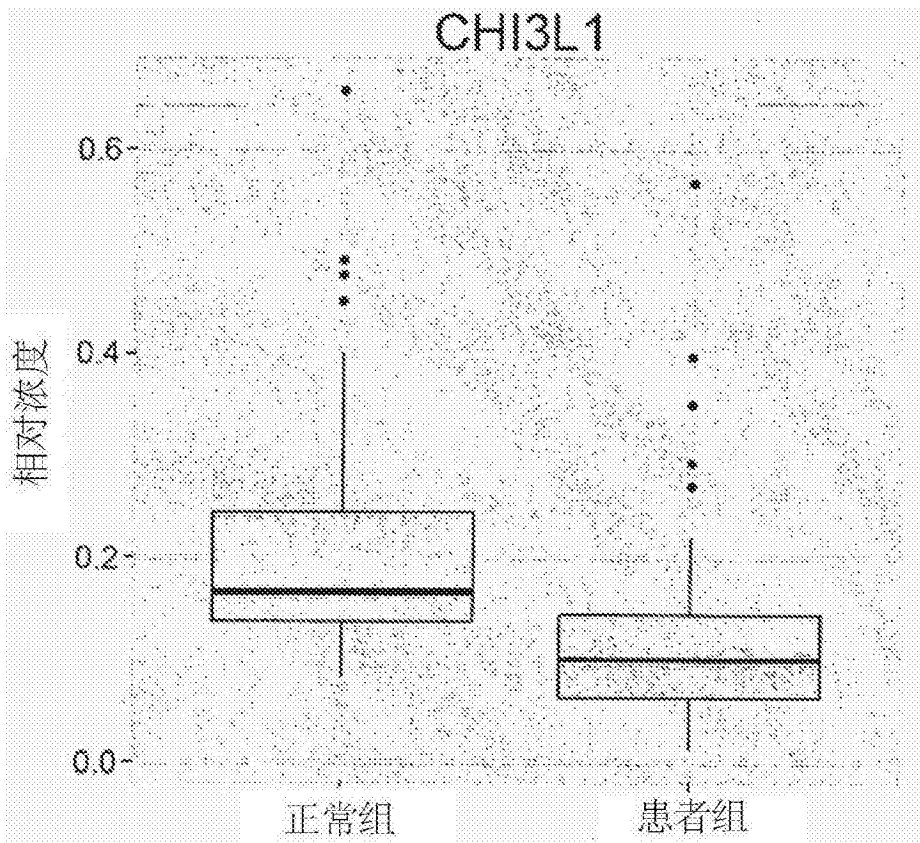


图 7

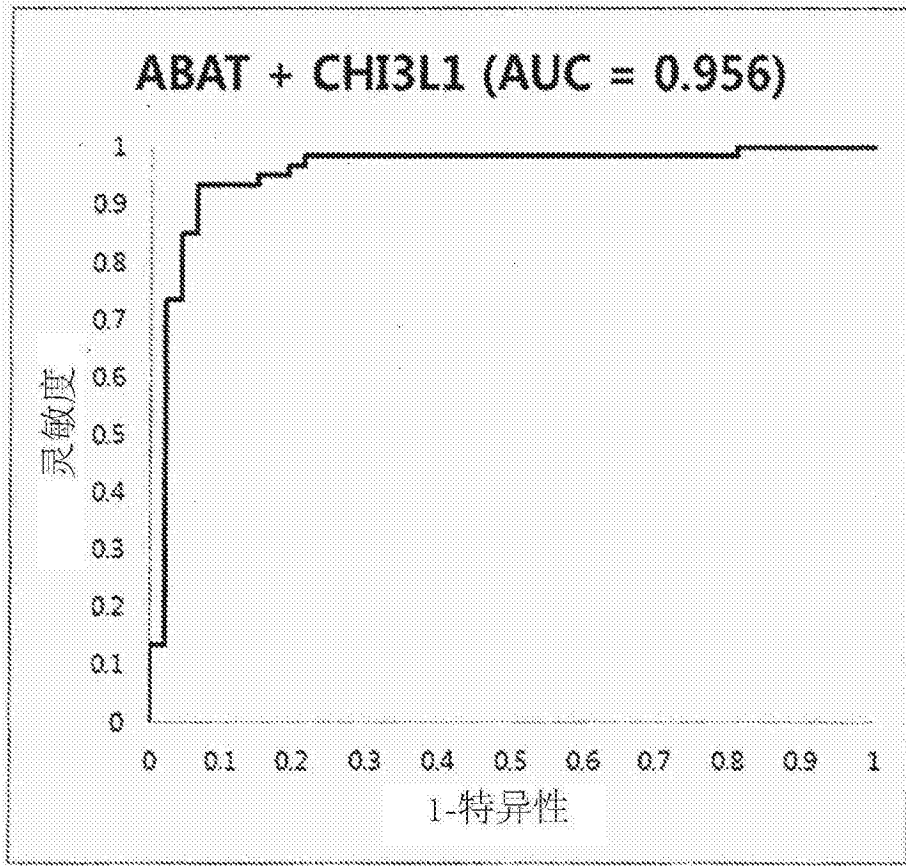


图 8

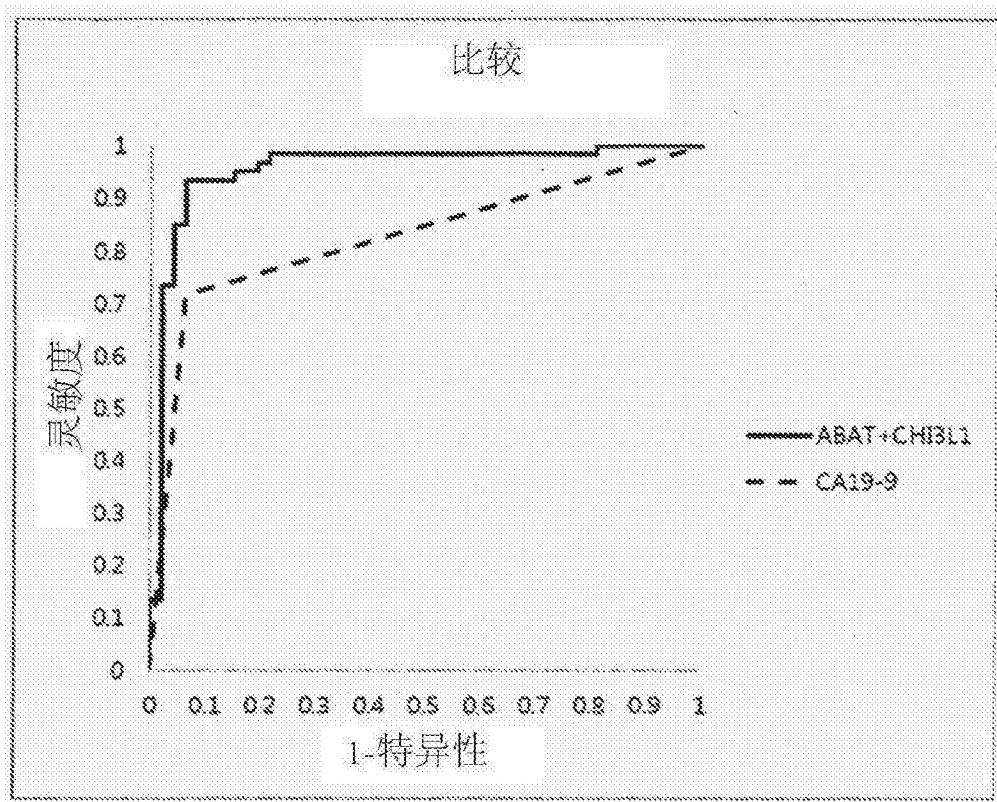


图 9

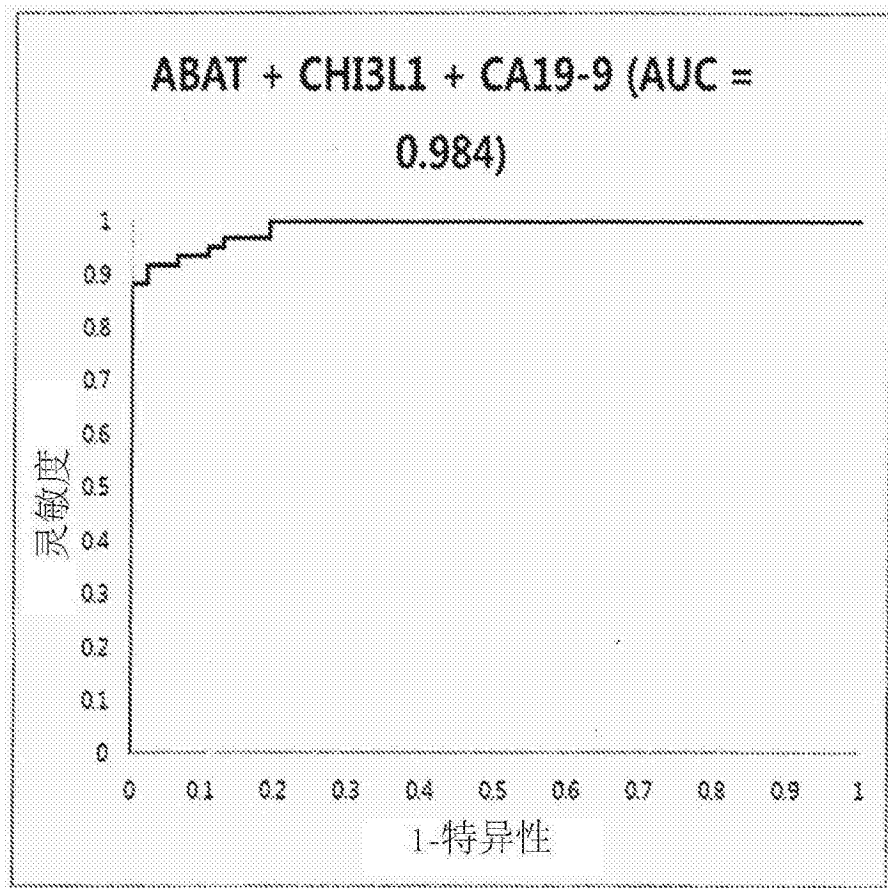


图 10

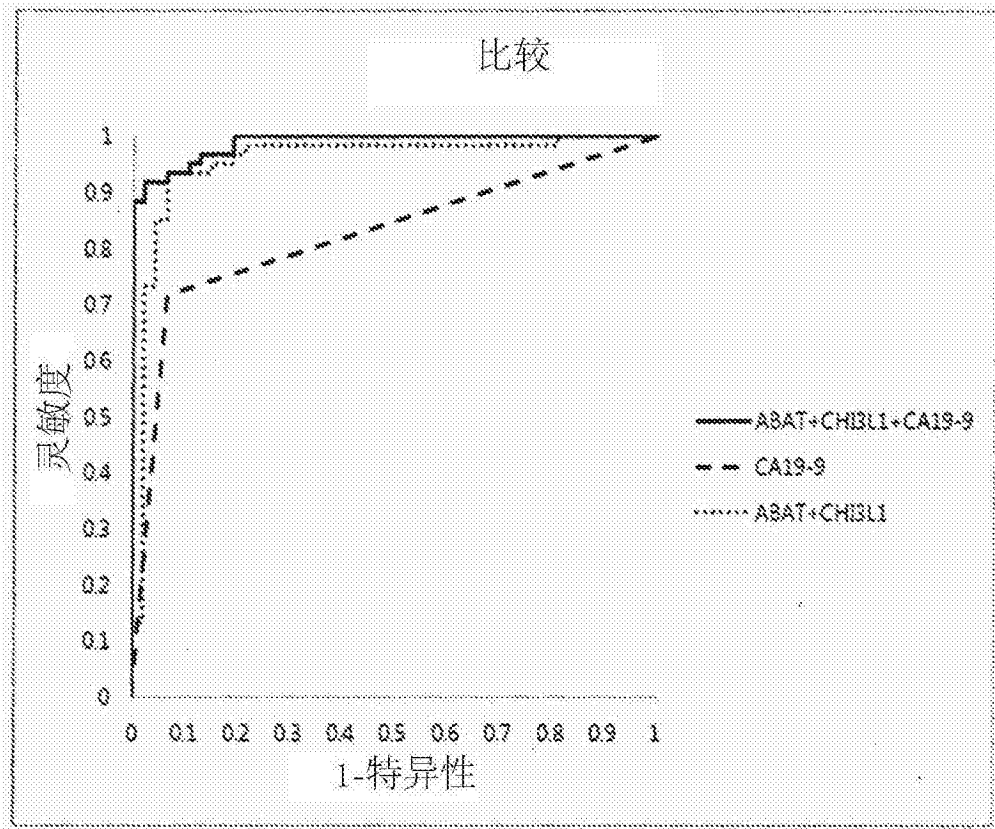


图 11

专利名称(译)	用于诊断胰腺癌的组合物以及使用该组合物诊断胰腺癌的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105408751A</a>	公开(公告)日	2016-03-16
申请号	CN201480042738.2	申请日	2014-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	韩国移动通信株式会社 首尔大学校产学协力团		
申请(专利权)人(译)	SK电信有限公社 首尔大学校产学协力团		
当前申请(专利权)人(译)	SK电信有限公社 首尔大学校产学协力团		
[标]发明人	韩尚助 崔镕焕 李成坤 尹泰钧 南宫锭贤 金永洙 朴泰成 张晋荣		
发明人	韩尚助 崔镕焕 李成坤 尹泰钧 南宫锭贤 金永洙 朴泰成 张晋荣		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57438 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N2333/705 G01N2333/91188 G01N2333/924		
代理人(译)	曲蕾		
优先权	1020130131150 2013-10-31 KR 1020130131248 2013-10-31 KR		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及用于诊断胰腺癌的组合物和试剂盒，其包含测量胰腺癌的蛋白质或基因的表达水平的制剂，其可用于确定胰腺癌的风险，涉及使用所述组合物或试剂盒诊断胰腺癌的方法。本发明通过提供用于胰腺癌的标记物可有效地预测或识别胰腺癌的风险、更早期的诊断和严重性，并且可用于胰腺癌肿瘤发生的研究。此外，本发明的诊断方法可以无创性方式从血液等简单地进行更早的诊断。

