

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780040599.X

[43] 公开日 2009年11月25日

[11] 公开号 CN 101589308A

[22] 申请日 2007.8.20

[21] 申请号 200780040599.X

[30] 优先权

[32] 2006.9.5 [33] SG [31] 200605961-2

[86] 国际申请 PCT/SG2007/000264 2007.8.20

[87] 国际公布 WO2008/030186 英 2008.3.13

[85] 进入国家阶段日期 2009.4.30

[71] 申请人 新加坡国立大学

地址 新加坡新加坡市

[72] 发明人 M·A·初拉尼

K·R·B·M·贾巴鲁拉汗

L·安娜玛莱 A·比斯瓦斯

C·赵

[74] 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限公司

代理人 周建秋 王凤桐

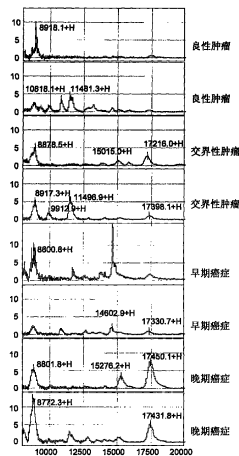
权利要求书7页 说明书37页 序列表6页  
附图9页

[54] 发明名称

诊断生物分子

[57] 摘要

本发明涉及用于对生物分子进行鉴定和/或定量的方法。本发明还提供了对细胞增殖疾病中的生物分子进行鉴定和/或定量的方法，该方法通过提供至少一种囊液样品并对触珠蛋白，触珠蛋白的衍生物、突变体和/或片段的表达进行检测。



1、一种对受试者是否患有细胞增殖疾病、或者是否具有患细胞增殖疾病的诱因和/或患有的细胞增殖疾病的严重程度进行检测和/或定量的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少一种囊液样品；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达与它们在对照中的表达进行比较，以表达的差异来指示所述受试者是否患有细胞增殖疾病、或者是否具有患细胞增殖疾病的诱因和/或患有的细胞增殖疾病的严重程度。

2、一种对受试者的细胞增殖疾病的结果进行预测的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少一种囊液样品；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达与它们在至少一个对照中的表达进行比较，以表达的差异来指示所述受试者的细胞增殖疾病的预后。

3、一种筛选用于临床试验、实验和/或诊断测试的至少一个候选者的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少一种囊液样品；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋

白的片段的表达与它们在至少一个对照中的表达进行比较，以表达的差异来指示所述受试者是否适合作为候选者。

4、一种对受试者的细胞增殖疾病的治疗功效进行监测的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少两种囊液样品，各样品得自不同的时间点；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将至少两种样品中的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行比较，以表达的差异来指示对所述受试者的治疗功效。

5、根据权利要求 1-3 中的任意一项所述的方法，其中，所述对照为至少一个未被诊断患有所述细胞增殖疾病的受试者。

6、根据权利要求 1-5 中的任意一项所述的方法，其中，所述触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段是人源的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段。

7、根据权利要求 1-6 中的任意一项所述的方法，其中，所述细胞增殖疾病为癌症。

8、根据权利要求 1-7 中的任意一项所述的方法，其中，所述细胞增殖疾病为卵巢癌。

9、根据权利要求 1-8 中的任意一项所述的方法，其中，所述触珠蛋白

的序列如 SEQ ID NO:2 所示。

10、根据权利要求 1-9 中的任意一项所述的方法，其中，所述检测是通过比色法进行的。

11、根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述比色法基于血红蛋白-触珠蛋白复合物对底物的过氧化物酶活性。

12、根据权利要求 1-9 中的任意一项所述的方法，其中，所述检测是通过质谱法进行的。

13、根据权利要求 12 所述的方法，其中，所述质谱法为衬质辅助的激光解吸/电离飞行时间质谱法。

14、根据权利要求 1-9 中的任意一项所述的方法，其中，所述检测是通过免疫反应性测定进行的。

15、根据权利要求 14 所述的方法，其中，所述免疫反应性测定为酶联免疫吸附测定。

16、根据权利要求 1-15 中的任意一项所述的方法，其中，该方法还包括对所述样品进行至少一次 CA-125 检测。

17、根据权利要求 1-15 中的任意一项所述的方法，其中，该方法还包括对所述受试者进行至少一次超声评价。

18、一种对受试者的细胞增殖疾病进行治疗的方法，该方法包括改变触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达，或者改变触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或突变体的表达。

19、根据权利要求 18 所述的方法，其中，该方法包括改变具有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列的触珠蛋白的表达。

20、根据权利要求 18 或 19 所述的方法，其中，所述改变是通过对所述受试者给药能够与所述触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的全部的或部分的氨基酸序列结合的多肽而获得的。

21、根据权利要求 20 所述的方法，其中，所述能够结合的多肽为抗体。

22、根据权利要求 18 所述的方法，其中，该方法包括改变具有如 SEQ ID NO:1 所示的 DNA 序列的触珠蛋白基因的表达。

23、根据权利要求 22 所述的方法，其中，所述改变是通过对所述受试者给药能够与所述触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或突变体的全部的或部分的序列结合的核酸而获得的。

24、根据权利要求 23 所述的方法，其中，所述核酸为 DNA 或 RNA。

25、根据权利要求 23 或 24 所述的方法，其中，所述核酸为 siRNA。

26、根据权利要求 22 所述的方法，其中，所述改变是通过给药与如 SEQ

ID NO:1 所示的全部的或部分的 DNA 序列互补的化合物而获得的。

27、根据权利要求 18-26 中的任意一项所述的方法，其中，改变所述表达包括降低触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达，或者降低触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或它们的突变体的表达。

28、根据权利要求 1-27 中的任意一项所述的方法，其中，所述细胞增殖疾病为癌症。

29、根据权利要求 1-28 中的任意一项所述的方法，其中，所述细胞增殖疾病为卵巢癌。

30、根据权利要求 1-29 中的任意一项所述的方法，其中，所述受试者为哺乳动物。

31、根据权利要求 1-30 中的任意一项所述的方法，其中，所述受试者为人。

32、一种用于对受试者的细胞增殖疾病进行诊断和/或预后评价的诊断和/或预后试剂盒，该诊断和/或预后试剂盒包括至少一种分子或化合物，该至少一种分子或化合物能够与从囊液样品中获得的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合和/或进行反应。

33、根据权利要求 32 所述的诊断和/或预后试剂盒，其中，所述分子为多肽，该多肽能够与触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/

或触珠蛋白的片段相结合。

34、根据权利要求 32 或 33 所述的诊断和/或预后试剂盒，其中，所述分子为抗体，该抗体能够与触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合。

35、根据权利要求 32 所述的诊断和/或预后试剂盒，其中，所述分子为触珠蛋白的底物，所述反应为触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的酶促作用。

36、一种用于治疗受试者的细胞增殖疾病的试剂盒，该试剂盒包括：能够与从囊液样品中获得的触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或它们的突变体进行反应的至少一种分子或化合物；和/或能够与从囊液样品中获得的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合的至少一种分子或化合物。

37、根据权利要求 36 所述的试剂盒，其中，所述分子为抗体，该抗体能够与触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合。

38、根据权利要求 36 所述的试剂盒，其中，所述分子为核酸分子，该核酸分子能够与所述触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或它们的突变体相结合。

39、根据权利要求 36 或 38 所述的试剂盒，其中，所述分子为 siRNA，该 siRNA 能够与所述触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物

---

和/或它们的突变体进行杂交。

40、根据权利要求 32-39 中的任意一项所述的试剂盒，其中，所述细胞增殖疾病为癌症。

41、根据权利要求 32-40 中的任意一项所述的试剂盒，其中，所述细胞增殖疾病为卵巢癌。

---

## 诊断生物分子

### 技术领域

本发明涉及生物分子。具体说，本发明涉及用于细胞增殖疾病的诊断生物分子。

### 背景技术

上皮卵巢癌是导致女性死亡的最主要的生殖道癌。大多数的早期癌症是无症状的，并且超过四分之三的诊断通常是在疾病已无法治疗时进行的，因为在此时区域性或者远距离的转移已经确定（Wingo 等，1998）。由于癌症初期的症状极为轻微，并且发作时也难以察觉，因此，绝大多数患有晚期癌症的患者的五年存活率仅为 30%（Kristensen 等，1997）。

目前，用于检测这种高深莫测的疾病的实践是在进行定期的骨盆检查和在 CA-125 生物标记测量后进行个性化的放射性诊断。尽管目前的早期检测的方案通常结合使用超声波检测和血清中 CA-125 水平的检测，但这些方案的成功率是有限的（Karlan 等，1999）。到目前为止，评估了超过 20,000 个妇女的最大的随机筛选试验，显示有利于存活，然而，这种有利于存活不能转化为被筛选的妇女组比未筛选的妇女组更低的死亡率（Jacobs 等 1999）。

此外，在患有良性的妇产科疾病（包括卵巢囊肿、子宫内膜异位、子宫纤维瘤）的妇女中，CA-125 浓度增加；CA-125 浓度的增加形成用于卵巢癌的鉴别诊断的一部分（Mackey 等，1995）。此外，在患有肝疾病、肾衰竭、胰腺炎和其它病症的妇女中，CA-125 的浓度也可能增加，因此，限制了 CA-125 作为卵巢癌的标记的作用（Devarbhavi 等，2002）。作为 CA-125 筛选辅助手段，附加的血清标记（包括 CA-19-9 和溶血磷脂酸）的筛选在临床上也没有发挥出作为诊断目的重要作用（Woolas 等，1999）。

大多数患有卵巢癌的妇女在早期是无症状的，并且在大多数的妇女在 FIGO（妇科和产科国际联盟）（International Federation of Gynecology and Obstetrics）的第 III 期和第 IV 期出现症状。目前，对于晚期的卵巢癌，公认的处理方法是进行初次肿瘤减灭术，以获得最佳的细胞减少（定义为残余的肿瘤小于 2 cm），随后进行化疗。外科手术通常包括剖腹全子宫切除术、双边输卵管卵巢切除术、网膜切除术、盆腔及腹主动脉淋巴结切除术。尽管进行了细胞减少的外科手术，但是发病和死亡率仍然很高，对存活率影响很小（Michel 等，1997；Vergote 等，1998）。相反，对早期疾病的治疗的存活率高达 95%（Cannistra，2004），并且可以对希望保留生育能力的患者采用保留生育的外科手术方法（Robinson 等，1992）。

腹腔镜检查的发展可以使妇科医生进行一些以前只有通过剖腹手术才能完成的处理。目前，妇科医生进行腹腔镜处理，以治疗良性卵巢囊肿和偶尔意外的恶性肿瘤（Maiman 等，1991）。由于误诊导致的不适当的外科手术会导致患者不良的后果。因此，为了进行适当的外科手术和治疗干预，在术中对恶性肿瘤进行准确的诊断是很重要的。

对于术中的诊断，本领域目前的状态是进行冷冻切片检查（Yeo 等，1998）。这种检查不仅昂贵，而且需要大量的人力和物力；在世界范围内，这种检查在许多医院都不能够进行；即使可以进行，通常在工作时间内也仅能够提供有限的服务。据报道，该方法的准确率为 100%（Lim 等，1997）到 88.7%（Canis 等，2004）。因此，需要对于大多数的医院来说可以使用的且可靠的、更便宜的和更便于使用的替代方法。

同样地，能够解决或者至少缓和本领域中的问题和限制将是受欢迎的。

#### 发明内容

本发明着手于解决上述问题，并提供了对生物分子进行鉴定和/或定量

的方法。具体地说,本发明提供了一种对生物标记进行鉴定和/或定量的方法。一般而言,本发明提供了对细胞增殖疾病进行检测和/或定量的新方法。

具体地说,本发明的发明人意外地发现在至少一种囊液样品中存在和/或表达的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段,可以用作对受试者是否存在细胞增殖疾病、患细胞增殖疾病的诱因和/或患有的细胞增殖疾病的严重程度进行检测和/或定量的生物标记。

测定触珠蛋白的水平的方法公开于 US 6,451,550 中。然而,该专利没有明示也没有暗示使用这种分析方法来测定囊液样品中的触珠蛋白,和/或用于检测和/或定量细胞增殖疾病。

本发明的一个方面提供了一种对受试者是否患有细胞增殖疾病、或者是否具有患细胞增殖疾病的诱因和/或患有的细胞增殖疾病的严重程度进行检测和/或定量的方法,该方法包括:

(a) 提供源自受试者的至少一种囊液样品;

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测; 和

(c) 将触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达与它们在对照中的表达进行比较,以表达的差异来指示所述受试者患有细胞增殖疾病、或者具有患细胞增殖疾病的诱因和/或患有的细胞增殖疾病严重程度。

本发明还提供了一种对受试者的细胞增殖疾病的结果进行预测的方法,该方法包括:

(a) 提供源自受试者的至少一种囊液样品;

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测; 和

(c) 将触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋

白的片段的表达与它们在至少一个对照中的表达进行比较，以表达的差异来指示所述受试者的细胞增殖疾病的预后。

本发明还提供了一种筛选用于临床试验、实验和/或诊断测试的至少一个候选者的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少一种囊液样品；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达与它们在至少一个对照中的表达进行比较，以表达的差异来指示所述受试者是否适合作为候选者。

本发明还提供了一种对受试者的细胞增殖疾病的治疗功效进行监测的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少两种囊液样品，各样品得自不同的时间点；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将至少两种样品中的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行比较，以表达的差异来指示对所述受试者的治疗功效。

所述囊液样品可以从卵巢囊肿中获得。

所述对照是至少一个未被诊断患有细胞增殖疾病的受试者，或者所述对照可以为参照的受试者、试验、或者在样品或测试中获得的可以相互比较的值。所述触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段可以是人源的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段。所述细胞增殖疾病可以是癌症，尤其是卵巢癌。

所述触珠蛋白的序列如 SEQ ID NO:2 所示。所述测定可以通过比色法进

行。所述比色法可以基于血红蛋白-触珠蛋白复合物对底物的过氧化物酶活性。所述测定可以通过质谱法进行。所述质谱法可以是衬质辅助的激光解吸/电离飞行时间质谱法 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry)。所述测定可以通过免疫反应性测定进行。所述免疫反应性测定可以为酶联免疫吸附测定。所述方法还包括对所述样品进行至少一次 CA-125 检测和/或对所述受试者进行至少一次超声评价。

本发明还提供了一种对受试者的细胞增殖疾病进行治疗的方法, 该方法包括改变触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达, 或者改变触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或它们的突变体的表达。

所述触珠蛋白可以具有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。所述改变可以通过对所述受试者给药能够与所述触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的全部的或部分的氨基酸序列结合的多肽而获得的。所述能够结合的多肽可以为抗体。

所述触珠蛋白可以具有如 SEQ ID NO:1 所示的基因序列。所述改变可以通过对所述受试者给药能够与所述触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或突变体的全部的或部分的序列结合的核酸而获得的。所述核酸可以为 DNA 或 RNA。所述核酸可以为 siRNA。

所述改变可以通过给药与如 SEQ ID NO:1 所示的全部的或部分的 DNA 序列互补的化合物而获得。所述改变可以包括降低触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达, 或者降低触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或突变体的表达。

本发明提供了一种用于对受试者的细胞增殖疾病进行诊断和/或预后评价的诊断和/或预后试剂盒, 该诊断和/或预后试剂盒包括至少一种分子或化合物, 该至少一种分子或化合物能够与从囊液样品中获得的触珠蛋白、触珠

蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合和/或进行反应。

本发明提供了一种用于治疗受试者的细胞增殖疾病的试剂盒，该试剂盒包括：能够与从囊液样品中获得的触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或突变体进行反应的至少一种分子或化合物；和/或能够与从囊液样品中获得的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合的至少一种分子或化合物。

所述分子可以为多肽，该多肽能够与触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合。所述分子可以为抗体，该抗体能够与触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合。所述分子可以为所述触珠蛋白的底物，所述反应可以为触珠蛋白，触珠蛋白的衍生物、突变体和/或片段的酶促作用。

所述受试者可以为哺乳动物，尤其是人。所述细胞增殖疾病为癌症，尤其为卵巢癌。

#### 附图说明

图 1：采用 NP20 蛋白质芯片根据核质比在分子量为 8-20kDa 的囊液蛋白质中的代表性的 SELDI-TOF 蛋白质谱。将相对的峰强度标准化为全部数据组的总的离子流。箭头指示出在卵巢癌中观察到的 17kDa 峰的位置，该峰在良性肿瘤中很少被观察到。

图 2：来自卵巢肿瘤的代表性的囊液蛋白质样品的一维凝胶电泳图。指示的位于 15-20 kDa 之间的蛋白质条带相应于分子量为 17kDa 峰的独特蛋白质，该蛋白质还进行了表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱技术 (SELDI) 分析。泳道 1 和 2 为良性卵巢肿瘤；泳道 3 和 4 为交界性肿瘤(borderline tumours)；泳道 5 和 6 为早期卵巢癌；以及泳道 7 和 8 为晚期卵巢癌。

图 3: 使用 MALDI-TOF/MS 的由 15-20 kDa 的蛋白质产生的质谱图。质谱峰处的箭头表示来自触珠蛋白  $\alpha_2$  亚单位的肽。

图 4: 通过蛋白质印迹来确认在来自卵巢肿瘤的囊液中存在触珠蛋白亚单位。来自良性卵巢肿瘤 (泳道 1 和 2)、卵巢交界性肿瘤 (泳道 3 和 4)、早期卵巢癌 (泳道 5 和 6) 和晚期卵巢癌 (泳道 7 和 8) 的等量的蛋白质 (10 $\mu$ g) 加样到 15% 的 SDS-PAGE 中。通过蛋白质印迹可以检测出: 在癌的囊液中的触珠蛋白 (泳道 7 和 8) 比在良性肿瘤中的触珠蛋白 (泳道 1 和 2) 有所增加。

图 5: 采用已与抗-触珠蛋白的抗体进行预孵育的 PS20 蛋白质芯片进行免疫捕获实验。5mg/ml 触珠蛋白 (图谱 1) 抗原与二硫苏糖醇 (DTT) 预先孵育 (室温下 1 小时) 作为阳性对照, 用牛的 IgG 作为阴性对照 (图谱 2)。使来自晚期的卵巢癌和良性肿瘤的囊液蛋白暴露于覆盖有抗体的阵列。

图 6: 通过如实施例 5 中描述的夹层 ELISA 方法, 来测定的在良性卵巢肿瘤中以及在早期和晚期卵巢癌中的触珠蛋白的矩形图 (box plot) (A) 或者触珠蛋白  $\alpha$  亚单位 (B) 的水平。

图 7: 通过对良性肿瘤 (C 行)、早期癌症 (E 行)、和晚期癌症 (G 行) 进行相区 (PHASE RANGE) 触珠蛋白分析而获得的代表性的结果。A 行表示对照中的不同浓度的触珠蛋白的颜色的变化。在良性肿瘤的情况下, 57 个样品中有 6 个样品 (10.5%) 的测试为阳性, 即, 在测试中颜色发生变化。在早期癌症的情况下, 14 个样品中有 8 个样品 (57.1%) 的测试为阳性, 即, 在测试中颜色发生变化。在恶性癌症中, 19 个样品中有 18 个样品 (94.7%) 的测试为阳性, 即, 在测试中颜色发生变化。

图 8: 由 ELISA 和 PHASE RANGE 分析所检测到的触珠蛋白水平之间的皮尔森氏 (Pearson's) 相关性 (正相关,  $r^2=0.79$ )。触珠蛋白水平 (相区法) =  $-0.02 + 0.16 *$  的触珠蛋白水平 (ELISA 法)。

图 9: 触珠蛋白、CA125 和超声分析的受试者工作特征曲线 (Receiver operating characteristic (ROC) curves), 并使用分裂点分析 (split point analysis) 的这三种受试者工作特征曲线的组合。

### 具体实施方式

为了方便的目的是, 本说明书中提到的参考文献以参考文献列表的形式列出, 并且列在实施例的后面。这些参考文献的全部内容引入本文作为参考。

### 定义

生物分子: 如氨基酸、肽、蛋白质、核酸 (DNA 和/或 RNA)、脂质、碳水化合物、和它们的衍生物的生物分子。

生物标记: 生物标记为生物化学物质或者生物分子 (蛋白质、多肽、碳水化合物、脂质等, 以及它们的衍生物), 这些生物化学物质或者生物分子与特定疾病的状态或者不同治疗疾病的存在和严重程度相关。所述生物分子可以为野生型的分子, 或者为该野生型分子的突变体、衍生物和/或片段。为了实现本发明的目的, 野生型分子的突变体、衍生物和/或片段意指具有或共享一些特征 (如, 与所述野生型的分子的结构和/或生物活性相似的, 或者相关的或者可比的, 结构和/或生物活性) 的生物分子。根据本发明, 蛋白质或者蛋白质的衍生物可以用作生物标记。生物标记可以通过各种方法来检测和测量。为了测定生物标记, 通常必须检测生物分子的表达或者丰度的差异或变化, 并且测定改变的特定的分子。

生物标记的表达或者丰度: 生物标记的表达可以通过该生物标记的基因、基因转录物和基因产物的存在或者丰度来测定。术语“基因”和“基因转录物”包括与所述基因互补的 RNA 序列和通过对所述基因的转录物进行反转录获得的 cDNA 序列。所述术语还包括野生型基因、该野生型基因及其转录物的变体和突变体, 其中, 所述变体或者突变体与所述基因或者该基因

的转录物基本上相同。类似地，“基因产物”包括野生型基因产物、该野生型基因产物的变体、片段或者衍生物。“基本上相同”意指所述基因或者基因产物的变体具有的同源性足以使它们可以通过用于检测所述野生型基因或者基因产物的方法和探针能够被检测到，并且使它们具有与野生型基因或者基因产物的相同的功能。所述测定可以是定性的，例如，所述生物标记是否被表达，或者所述测定可以是定量的，或者所述测定可以通过本领域公知的任何方法进行的半定量的，例如，通过微阵列技术、聚合酶链式反应或者比色方法。在非疾病状态中偏离（增加或者降低）正常水平，可以指示为疾病状态或者有患疾病状态的诱因。例如，一种蛋白质的过表达或者增加的丰度，可以指示疾病的状态、疾病状态的严重程度、和已检测了生物标记的受试者诊断；和/或可以作为易患疾病状态的指示。不同的生物标记之间或者相同的生物标记在不同的条件下或者不同的时间点之间表达和丰度的不同，可以被测定出。然后，可以将生物标记的表达量与参照值或者在不同的时间点或者不同生物标记之间获得的其它值进行比较和判断其相关性，以确定与疾病状态的存在、严重性程度的相关性，以确定治疗的功效，或者确定对所述受试者的疾病结果的预后。参照值可以通过患有或者不患有所述疾病的受试者的统计学上的显著性数值来确定。所述生物标记的表达可以与其它适当的诊断或预示性的标记、生物标记、或者指示物结合使用，以获得更高水平的可信度。当生物标记与对照相比被称为“过表达”时，这意指该生物标记表达的丰度或水平在统计学上显著高于至少一种野生型的或者未被诊断患有所述疾病状态或者病症的非突变的对照受试者的天然表达的量。类似地，当所述生物标记为“低表达”时，所述生物标记的表达在统计学上显著低于至少一种野生型的或者未被诊断患有所述疾病状态或者病症的非突变的对照受试者的天然表达的量。在这种定义的情况下，在遗传上缺乏所述生物标记的受试者不能称为所述生物标记低表达。类似地，当用所述生物标记的基因

对所述有缺陷的受试者进行转染，以使所述生物标记被表达，该有缺陷的受试者不能因为他最初缺乏所述生物标记而被称为过表达了所述生物标记。

对照：参照的受试者、试验或者值，通过它们可以对测试中获得的值进行相互比较。对照值或者对照范围通常代表“正常的状态”，在统计学上与对照值或者范围不同的、或者在统计学上偏离对照值或者范围的代表异常或者疾病状态。本领域的技术人员知道如何筛选和/或获得用于参照的对照受试者、试验或者值。

筛选受试者或者候选者：通过测量受试者或者候选者的至少一个特征，以确定所述受试者或者候选者是否适于进行临床试验、实验、诊断和/或其它测试。然后，对代表所述特征的值与参照或者对照值或者值的范围进行比较，所得到的结果用于确定所述受试者或者候选者是否适于进行所述试验、实验、诊断和/或其它测试。本领域的技术人员知道根据受试者或者候选者对特定治疗的顺从的程度、或者他们对特定挑战或者疾病易感程度如何筛选受试者或者候选者。

癌症：部分机体中的恶性地且不受控制地生长的细胞，这些细胞可以扩散到所述机体的其它部分。

囊液：囊肿是充满流体的囊，该囊可以位于机体的任何位置。所述囊肿中含有的流体为囊液。

核酸：“核酸”是通过 3', 5'磷酸二酯键连接的核苷酸的线性聚合物。在 DNA 中，即在脱氧核糖核酸中，糖基为脱氧核糖，并且核苷酸的碱基为腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶和胞嘧啶。RNA 或者核糖核酸以核糖作为糖基，并且以尿嘧啶代替胸腺嘧啶。“分离的核酸”是指其结构与天然存在的任何核酸的结构不同的核酸，或者指其结构与天然存在的基因组核酸的任何片段的结构不同的核酸。因此，所述术语包括，例如 (a) DNA，该 DNA 的序列为天然存在的基因组 DNA 分子的一部分的序列，但该 DNA 的序列的两端

没有与编码序列的侧翼连接，所述编码序列与天然存在于生物体中的基因组 DNA 分子的一部分的两端侧翼连接；(b)插入到载体中的核酸或者插入到原核或者真核的基因组 DNA 中的核酸，所述插入使得到的分子与任何天然存在载体或者基因组 DNA 不同；(c)分离的分子，例如，cDNA、基因组片段、由聚合酶链式反应(PCR)制备的片段或者限制性片段；和(d)重组的核苷酸序列，该序列为杂交基因的部分，即编码融合蛋白质的基因。本发明还以分离的核酸为特征，该分离的核酸与 SEQ ID NO: 1 具有至少 50% (包括 50-100% 中的任何百分比，例如，85%、95%、或 100%) 的同一性，例如，所述分离的核酸可以用于检测受试者中的人源触珠蛋白，或者用于筛选用于治疗与细胞增殖有关的疾病的治疗化合物。

**基因产物：**根据本发明，所述基因产物是指除蛋白质之外的其它基因产物。所述基因产物可以是除由特定基因编码的基因转录物之外的具有生物功能的一段 RNA。

**基因转录物：**由基因编码的信使 RNA 序列。

**蛋白质：**由一条或者多条按照特定顺序排列的氨基酸链组成的生物分子。蛋白质可以具有衍生物，例如异构体。蛋白质异构体是具有一些小的变化的蛋白质的形式，通常是剪接变体或者某些翻译后修饰的产物。根据本发明，除了异构体外，蛋白质还包括通过所使用的方法能够被检测、鉴定和/或定量的足够大的片段。蛋白质复合物是不同蛋白质的混合物。蛋白质的表达可能受药物的影响。这种蛋白质被称为药物响应的蛋白质。本发明还以分离的蛋白质为特征，该分离的蛋白质与 SEQ ID NO: 2 具有至少 50% (包括 50-100% 中的任何百分比，例如，85%、95%、或 100%) 的同一性，例如，所述分离的蛋白质可以用于检测受试者中的人源触珠蛋白，或者用于筛选用于治疗与细胞增殖有关的疾病的治疗化合物。

**蛋白质组：**由细胞或者器官在特定的时间并在明确的条件下表达的一组

蛋白质。因此，蛋白质组分析是指对由基因组编码的一组中的所有蛋白质进行的研究。

同一性的百分比：两种核酸序列的“同一性的百分比可以使用 Karlin 和 Altschul (1990)算法、改进的 Karlin 和 Altschul (1993)算法来测定。将这种算法并入到 Altschul 等(1990)的 XBLAST 程序中。使用 XBLAST 程序进行 BLAST 核酸搜索。当两条序列中存在缺口时，使用由 Altschul 等(1997)描述的有缺口的 BLAST (Gapped BLAST)。当使用 BLAST 和有缺口的 BLAST 程序时，使用各个程序（例如，XBLAST）的默认参数。参见万维网地址 [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov)。其它序列（例如，蛋白质的序列）的同一性的百分比可以通过类似的方法来测定。

抗体：由免疫系统中的 B 淋巴细胞产生的能够结合到特定的免疫原分子的免疫球蛋白。所述术语包括单克隆抗体、多克隆抗体以及它们的片段，例如 Fab、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv 片段。

药物：用于治疗（改善、缓解、或者治愈）任何疾病或者病理状态或者病症的任何化合物。

筛选：选择对任何的疾病或者病理状态具有一定疗效的化合物。筛选可以包括检测、鉴定和/或定量其表达受所述化合物影响的任何生物分子，例如，蛋白质。

治疗：对患有与细胞增殖有关的疾病的受试者给药组合物，以治愈、缓解、治疗、预防或者改善所述疾病、所述疾病的症状、所述疾病的继发性疾病的状态、或者患所述疾病的诱因。“有效量”是指在接受治疗的受试者体内能够在药学上产生所需要的结果（例如，上述效果）的所述组合物的量。所述方法可以单独地进行，或者与其它药物或者治疗结合进行。

杂交、可杂交的：如果生物分子，例如一种序列的核酸与另一种序列的核酸之间具有足够长度的互补的核苷酸，则所述一种序列的核酸可以杂交到

所述另一种序列的核酸上。对于肽和蛋白质，如果一种蛋白质（例如，抗体或者抗体的片段）与另一种蛋白质之间具有足够的互补性的或者可识别的结构，则所述一种蛋白质可以杂交到所述另一种蛋白质上。

本发明提供了对生物分子进行鉴定和/或定量的方法。具体地说，本发明提供了一种对生物标记进行鉴定和/或定量的方法。一般而言，本发明提供了对细胞增殖疾病进行检测和/或定量的新方法。

本发明的一个方面提供了一种对受试者是否患有细胞增殖疾病、或者是否具有患细胞增殖疾病的诱因和/或患有的细胞增殖疾病的严重程度进行检测和/或定量的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少一种囊液样品；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达与它们在对照中的表达进行比较，以表达的差异来指示所述受试者是否患有细胞增殖疾病、或者是否具有患细胞增殖疾病的诱因和/或患有的细胞增殖疾病的严重程度。

本发明还提供了一种对受试者的细胞增殖疾病的结果进行预测的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少一种囊液样品；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达与它们在至少一个对照中的表达进行比较，以表达的差异来指示所述受试者的细胞增殖疾病的预后。

本发明还提供了一种筛选至少一个用于临床试验、实验和/或诊断测试

的候选者的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少一种囊液样品；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达与它们在至少一个对照中的表达进行比较，以表达的差异来指示所述受试者适合作为候选者。

本发明还提供了一种对受试者的细胞增殖疾病的治疗功效进行监测的方法，该方法包括：

(a) 提供源自受试者的至少两种囊液样品，各样品得自不同的时间点；

(b) 对触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行检测；和

(c) 将至少两个样品中的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达进行比较，以表达的差异来指示对所述受试者的治疗功效。

所述对照是至少一个未被诊断患有细胞增殖疾病的受试者，或者所述对照可以为参照的受试者、试验、或者在样品或者测试中获得的可以相互进行比较的值。对照值或者对照范围通常代表“正常的”状态，在统计学上与对照值或者范围不同或者在统计学上偏离对照值或者范围代表异常或者疾病状态。所述触珠蛋白，触珠蛋白的衍生物、突变体和/或片段可以是人源的触珠蛋白，触珠蛋白的衍生物、突变体和/或片段。所述细胞增殖疾病可以是癌症，尤其是卵巢癌。

所述触珠蛋白的序列如 SEQ ID NO:2 所示。所述测定可以通过比色法进行。所述比色法可以基于血红蛋白-触珠蛋白复合物对底物的过氧化物酶活性。所述测定可以通过质谱法进行。所述质谱法可以是衬质辅助的激光解吸

/电离-飞行时间质谱法。所述测定可以通过免疫反应性测定进行。所述免疫反应性测定可以为酶联免疫吸附测定。所述方法还包括对所述样品进行至少一次 CA-125 检测和/或对所述受试者进行至少一次超声评价。

本发明还提供了一种对受试者中细胞增殖疾病进行治疗的方法，该方法包括改变触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达，或者改变触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或它们的突变体的表达。

所述触珠蛋白可以具有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。所述改变可以通过对所述受试者给药能够与所述触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的全部的或部分的氨基酸序列结合的多肽而获得的。所述能够结合的多肽可以为抗体。

所述触珠蛋白的基因可以具有如 SEQ ID NO:1 所示的 DNA 序列。所述改变可以通过对所述受试者给药能够与所述触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们衍生物和/或突变体的全部的或部分的序列结合的核酸而获得的。所述核酸可以为 DNA 或 RNA。所述核酸可以为 siRNA。

所述改变可以通过给药与如 SEQ ID NO:1 所示的全部的或部分的 DNA 序列互补的化合物而获得。所述改变可以包括降低触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的表达，或者降低触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或突变体的表达。

本发明提供了一种用于对受试者的细胞增殖疾病进行诊断和/或预后评价的诊断和/或预后试剂盒，该诊断和/或预后试剂盒包括至少一种分子或化合物，该至少一种分子或化合物能够与从囊液样品中获得的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合和/或进行反应。

本发明还提供了一种用于治疗受试者的细胞增殖疾病的试剂盒，该试剂

盒包括能够与从囊液样品中获得的触珠蛋白的基因、基因转录物、RNA、它们的衍生物和/或突变体反应的至少一种分子或化合物；和/或能够与从囊液样品中获得的触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合的至少一种分子或化合物。

所述分子可以为抗体，该抗体能够与触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段相结合。所述分子可以为所述触珠蛋白的底物，所述反应可以为所述触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、触珠蛋白的突变体和/或触珠蛋白的片段的酶促作用。

所述受试者可以为哺乳动物，尤其是人。所述细胞增殖疾病为癌症，尤其为卵巢癌。

目前已经知道，存活时间与癌症被诊断时所处的时期成陡的梯度关系，已提出早期的检测是提高卵巢癌患者长时间存活比率的最有前景的方法。了解卵巢癌早期发展时期的细胞和分子水平是很重要的，因为改变的蛋白质表达是瘤变的特点。因此，由卵巢癌细胞分泌的进入囊液中的蛋白质可能是用于在术中区分癌症和良性囊肿的有用的标记。它们还可以提供潜在肿瘤标记的富集源，所述的肿瘤标记被较大体积的循环血液中更丰富的蛋白质所稀释时，则更难以进行分离和鉴定。癌症肿瘤的标记是一个以集中研究蛋白组学为当前研究目标的领域。

在这些肿瘤患者的腹水中观察到 CA125、CA19-9、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、白介素 6 (IL-6)、IL-8 和肿瘤坏死因子(TNF)的水平升高(Darai 等, 2003)。此外，据报道，在这些卵巢癌患者的囊液中，血纤维蛋白溶酶原激活系统的标记的浓度较高，所述标记包括 uPA、PAI-1、和 uPA:PAI-1 的比例以及 tPA:PAI-1 的比例 (Boss 等, 2002)。然而，没有关于可以将囊液中的触珠蛋白用作细胞增殖疾病的诊断生物标记的任何教导或者建议。

进行了使用基于蛋白质组学的方法从卵巢癌的囊液中检测潜在的生物

标记以用于上皮卵巢癌的早期诊断的研究。

为了进一步了解瘤变过程中的生物化学机制，将基于蛋白质组学的方法应用于医药应用和诊断。高通量的蛋白质组学技术是新出现的蛋白质科学领域，该技术补充了传统的一维或者二维的凝胶电泳。在这一点上，可以使用近来的 SELDI 技术，以分离和分馏蛋白质，随后通过质谱方法(MS)对这些特定的蛋白质进行鉴定 (Zhang 等, 2004)，以试图描述生物流体中潜在的生物标记的特征。

通过研究良性卵巢肿瘤和恶性卵巢癌的卵巢囊液中的蛋白质表达的不同，可以检测出与恶性卵巢疾病相关而与良性卵巢疾病无关的蛋白质。根据本发明，我们可以使用许多方法来鉴定蛋白质表达的变化。

在本研究的一个实施方式中，使用了 SELDI (表面增强的激光解吸/电离飞行时间质谱技术)、SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)、蛋白质印迹分析、串联 MALDI-TOF-MS/MS (基质辅助的激光解吸电离飞行时间质谱) 技术和免疫反应性测定，如定量 ELISA (酶联免疫吸附测定)。我们首次确定了可以将囊液中的触珠蛋白作为潜在的生物标记的证据，所述触珠蛋白能够区分卵巢癌和良性卵巢肿瘤。

收集了六十三例囊液 (28 例来自恶性上皮卵巢肿瘤和 35 例来自良性上皮卵巢肿瘤)，并进行了 SELDI-TOF 质谱分析。在进行 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF-MS-MS 后，使用 MASCOT 进行数据库搜索，以鉴定潜在的蛋白质标记。

进行蛋白质印迹技术和免疫捕获测定，以鉴定触珠蛋白。还开发了如实施例 5 中所述的夹层 ELISA 方法，以对上皮卵巢癌和良性肿瘤中的囊液中的这种蛋白质的水平进行比较。此外，为了对快速扫描 (ca. 5 分钟) 引入临床相关性和适用性，我们使用了比色法、染料结合的分析，以确定对这种靶蛋白进行实时鉴定，这可能有助于诊断癌症所处的特定时期。

质谱 (MS) 基于核质比( $m/z$ )分离分子。在 MS 系统中, 感兴趣的分子被电离, 在分析器中基于核质比进行分离, 然后通过检测器检测。结果可以以  $m/z$  谱图的形式显示。MS 系统通常包括用于数据分析的数据分析亚系统。可以通过本领域公知的任何方法实现分子的电离。例如, 可以通过以下方法实现分子的电离, 所述以下方法包括: 大气压化学电离(APCI)、热喷雾电离(TSP)、化学电离(CI)、电子轰击(EI)、电喷雾电离(ESI)、快原子轰击(FAB)、场电离/场解吸(FD/FI)、表面增强激光解吸电离(SELDI)和基质辅助激光解吸电离(MALDI)。

所述分析器可以使用不同的原理分析离子, 所述分析器包括丝极分析器、扇形磁场和傅立叶转化分析器、四极离子阱和飞行时间(TOF) 分析器。两种或者两种以上的分析器可以以串联的形式布置。通常使用的串联几何形式包括四极-四极几何形式、扇形磁场-四极几何形式、和四极-飞行时间几何形式。

本领域的技术人员能够选择不同的电离方法、分析方法和/或检测方法, 以对感兴趣的生物分子 (例如, 蛋白质) 进行最好地研究。

本发明的预测方法包括对来自患者的样品中的生物标记的表达值和参照值进行比较, 所述参照值从一个或者多个患有已知疾病的患者中获得, 或者从已知良性或者恶性组织或者细胞中获得。然后, 可以对这些患者进行预测。

本发明的诊断的方法包括对从受试者 (即, 动物或者人) 中制备的样品中的一种或多种触珠蛋白和/或核酸的水平与从正常受试者或者对照样品中制备的样品中的一种或多种触珠蛋白和/或核酸的水平进行比较, 所述正常受试者为未患有与细胞增殖相关的疾病或者具有发展成与细胞增殖相关的疾病的风险的受试者。

对于预测方法和诊断方法, 较高的触珠蛋白水平指示所述受试者患有与

细胞增殖相关的疾病或者具有发展成与细胞增殖相关的疾病的风险。这种方法可以单独地使用或者与其它方法结合使用，以诊断适当受试者的与细胞增殖相关的疾病，并对这种疾病的结果进行预测。

本发明还提供了用于预防和/或治疗与细胞增殖相关的疾病的方法。例如，待治疗的受试者可以通过测定由上述方法从至少一例受试者中制备的至少一个样品中的所述触珠蛋白的基因组 DNA、DNA 转录物或者 DNA 产物的水平来进行鉴定。如果在来自靶受试者中的样品中的基因组 DNA 水平高于来自正常受试者的样品中基因组 DNA 水平，则所述靶受试者是可以采用有效量的能够降低所述触珠蛋白基因组 DNA、DNA 转录物或者 DNA 产物水平的化合物进行治疗的候选者。

在至少一种体内方法中，对所述受试者给药治疗组合物（例如，包括如上所述鉴定的至少一种化合物的组合物）。通常，所述化合物悬浮在药学上可接受的载体（例如，生理盐水）中，并可以通过口服或静脉输液、或注射或皮下植入、肌肉内、蛛网膜下腔、腹膜内、直肠内、阴道内、鼻内、胃内、呼吸管内、或肺内给药。为了预防和治疗癌症，可以将所述化合物直接给药到所述癌症组织中。

所述剂量取决于所选择的给药路线，制剂的性质，受试者的疾病的性质，受试者的身高、体重、表面积、年龄和性别，给予的其它药物，以及主治医师的判断。适当的剂量为 0.01-100.0 mg/kg。考虑到可利用的各种化合物以及不同给药的路线的不同效率，可以预期所需要的剂量变化很大。例如，可以预期口服所需要的剂量高于静脉注射所需要的剂量。可以使用本领域公知的标准试验路线，对这些剂量水平的变化进行调节以进行优化。将所述化合物包封在适当的输送媒介物（例如，聚合物微粒或者可植入的装置）中可以增加输送的效率，尤其对于通过口输送的效率。

可供选择地，可以将包括编码触珠蛋白的反义 RNA 的核酸序列的多聚

核苷酸输送给所述受试者，例如，通过使用本领域公知的可生物降解的聚合物微粒或者微胶囊输送装置进行给药。

另一种能够实现所述核酸吸收的方法是使用由标准方法制备的脂质体。所述载体可以单独掺入到所述输送媒介物中，或者与组织特异的抗体一起掺入到所述输送媒介物中。可供选择地，可以制备包括质粒或者通过静电力或者共价力连接到聚 L-赖氨酸上的其它载体的分子结合物。聚 L-赖氨酸结合到配体上，该配体能够结合到靶分子上的受体上。可供选择地，可以通过使用本领域中公知的组织特异性的调节元件(TRE)来实现对组织特异性的定靶。将“裸露的 DNA”（不具有输送媒介物）输送到肌肉内、皮内、或者皮下位置，是实现体内表达的另一种手段。

在有关的聚核苷酸（例如，表达载体）中，所述编码触珠蛋白反义 RNA 的核酸序列被可操作地连接到启动子上或者连接到增强子-启动子的组合上。增强子按照时间、位置和水平，促进专一性的表达。与启动子不同，当增强子的位点与转录起始位点是可变的时，如果存在启动子，增强子可以起作用。增强子还可以位于所述转录起始位点的下游。

可以通过使用小的抑制性 RNA 序列(siRNA)来实现对基因表达的抑制。还可以通过使用 RNA 干扰(RNAi)来抑制所述触珠蛋白基因的表达。这是用于转录后基因沉默("PTGS")的技术，其中，靶基因被同源的双链 RNA ("dsRNA")专一性地失活。在许多实施方式中，将约 21 个核苷酸的 dsRNA（与靶基因同源）导入到细胞中，可以观察到序列专一性地降低了基因的活性。RNA 干扰提供了在 mRNA 水平的基因沉默的机制。这提供了用于基因敲除以及用于治疗目的的有效的并能够广泛应用的方法。

用于这些多聚核苷酸的合适的表达载体包括质粒和病毒载体，例如，疱疹病毒、逆转录病毒、牛痘病毒、减毒牛痘病毒、金丝雀痘病毒、腺病毒、和腺相关病毒、其它的病毒。

多聚核苷酸可以在药学上可接受的载体、媒介物、稀释液和/或赋形剂中的至少一种存在的情况下进行给药。药学上可接受的载体为在生物上可兼容的媒介物，这些媒介物可以适合对动物或者人类进行给药，例如，生理盐水或者脂质体。多聚核苷酸的优选给药剂量可以为约  $10^6$ - $10^{12}$  个拷贝的多聚核苷酸分子。如果需要，可以反复地以这种剂量进行给药，给药的途径可以为上述所述的任何一种途径。

可以使用抗触珠蛋白的抗体（单克隆或者多克隆），以降低受试者的触珠蛋白蛋白质的水平，或者以减少受试者的触珠蛋白的水平。术语“抗体”包括完整的分子及其片段，例如 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、和 Fv，这些片段能够结合到存在于所述触珠蛋白蛋白质中的抗原决定簇上。制备单克隆和多克隆抗体以及它们的片段的方法是本领域公知的。参见，例如 Harlow 和 Lane, (1988) 抗体：实验室手册，冷泉港实验室，纽约（Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.）。

可以用于抑制触珠蛋白的其它化合物包括含有触珠蛋白 C 末端氨基酸序列的肽或者多肽。

此外，本发明提供了一种开发用于治疗与细胞增殖相关的疾病的方法，该方法包括提供患有与细胞增殖相关的疾病的至少一位受试者（例如，所述受试者的触珠蛋白的基因组 DNA 增多）；在单独的时间点对每一位受试者给药有效量的触珠蛋白抑制剂，随后在单独的时间点给药有效量的核苷酸或者核苷类似物（例如，吉西他滨（gemcitabine））；并筛选出与细胞增殖相关的疾病被最大程度地抑制的最佳时间点。一旦识别了最佳的时间点，可以使用所述方法对适当的受试者的与细胞增殖相关的疾病进行治疗。

下述的具体的实施例仅仅用于说明的目的，无论如何不以任何的方式限制本说明书的其余部分。无需进一步详细说明，可以相信本领域的技术人员可以基于本文的说明书完全地使用本发明。本文中所叙述的所有出版物的全

部内容引入本文作为参考。

已经对本发明进行了一般的描述，通过参照以下实施例将更容易理解本发明，所述实施例用于说明的目的，而不是为了限制本发明。

尽管实施例说明了如何使用本发明的方法来治疗不同的病症，但本领域的技术人员能够理解的是本发明的方法还可以用于比较不同疾病情况之间的蛋白质组的变化。

### 原料和方法

#### 患者和临床样品

在新加坡国立大学医院 (National University Hospital, Singapore) 的妇产科征募患有恶性癌症的年龄为 20-72 岁的妇女 (n=28, 包括 11 例早期癌症和 17 例晚期癌症) 和 35 例患有良性上皮卵巢癌的患者, 以进行开放性手术治疗或者腹腔镜治疗。在外科手术时收集卵巢癌和良性肿瘤的流体, 并在术中不让这些流体逸出。在 4°C 下将这些流体在 1500g 下离心 10 分钟, 将上清分成 1 ml 的等份, 然后速冻在液氮中。将所有的样品储存在 -80°C 直到进行分析。收集的用于本研究的囊液样品获得了新加坡国立健保集团特定领域批准局 (the Domain Specific Review Board, National Healthcare Group, Singapore) 的批准, 并获得患者的知情同意。

#### SELDI-TOF 分析

使用亲水 (NP20-亲水表面) 蛋白质芯片 (Ciphergen Biosystems, CA, USA) 获得亲水囊液蛋白质的 SELDI-TOF 图谱。将蛋白质芯片预先与 5 $\mu$ l 的 Millipure 水孵育 5 分钟。然后将 5 $\mu$ l 的样品加入到 NP20 蛋白质芯片的斑点(spots), 并孵育 1 小时。使用预先被抗-触珠蛋白的抗体包被的 PS20 蛋白质芯片阵列(ProteinChip array (Ciphergen Biosystems, CA, USA))进行免疫捕获试验。将样品(10  $\mu$ L)与 90  $\mu$ L 的结合缓冲液孵育, 然后使之结合 2 小时。用洗涤缓冲液 (含有 0.5% 的 Triton X-100 的 PBS) 洗涤两次后, 将阵列风

干，并用在 0.5%的三氟乙酸和 50%的乙腈中饱和的芥子酸处理，然后，使用 Ciphergen 蛋白质芯片阅读器(型号：PBSII; Ciphergen Biosystems, CA, USA) 进行分析。对每一个样品进行三组分析。

使用 Ciphergen 蛋白质芯片阅读器分析阵列。通过对一个样品进行平均 80 次激光射击，产生蛋白质的质谱。为了获得低分子量蛋白质的数据，检测大小的范围为 8-25kDa，最大值为 30kDa。检测器的强度设定为 10，并将激光的强度设定为 240V。对于分子质量为 25-50kDa 且最大值为 60kDa 的蛋白质，所述检测器的灵敏度和激光的强度分别使用 10 和 260V。根据外部校准 (Ciphergen Biosystems, CA, USA): 牛胰岛素(5,733.6Da)、人泛素 (8,564.8 Da)、牛细胞色素 c (12,230.9Da)、马肌球蛋白(16,951.5Da)、牛  $\beta$ -乳球蛋白 A (18,363.3 Da)和马辣根过氧化酶(43,240 Da)，测定在阵列表面上捕获的每一个蛋白质的核质比(m/z)。

首先使用 Ciphergen 蛋白质芯片软件版本 3.0 通过自动模式进行基线校正和峰值检测，对从质谱仪获得的质谱进行处理。从图谱中减去基线，以根除主要由化学噪音所导致的任何基线，所述化学噪音是由于能量吸附分子 (EAM)导致的。峰检测通过比较信号与附近的谷深度计算，将质谱的面积确定为峰，其信噪比大于 5。

#### 蛋白质的分离和鉴定

使用丙酮沉淀方法将囊液蛋白质在 4°C 浓缩过夜。将蛋白质沉淀重悬在 PBS 缓冲液中，然后离心。采用 Bradford 方法 (Bradford, 1976)估计蛋白质浓度，然后将等量的蛋白质(20 $\mu$ g)加样到 15% SDS-PAGE 凝胶中。采用与质谱可兼容的银染色试剂盒 (Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad laboratories, CA, USA)) 对所述凝胶染色。切离蛋白质带，并进行凝胶内消化。将所述凝胶带切割成小片，然后进行脱色、洗涤和脱水。通过加入二硫苏糖醇(DTT; 10mM)和吡啶-3-乙酸(IAA; 55mM) (Sigma-Aldrich, MO, USA)进行还原和烷

基化，随后进行洗涤和脱水。然后将所述凝胶片悬浮在含有 12.5ng/ $\mu$ l 胰蛋白酶的 50mM 碳酸氢铵中。提取所述肽并在真空中进行浓缩，然后采用 Zip-Tip (Millipore, MA, USA) 脱盐。采用 Tandem Mass Spectrometry Voyager-DE STR MALDI-TOF 质谱仪(Applied Biosystems, CA, USA), 按照以下栅极标准对肽进行鉴定。所述 MS 数据自动提取以延时提取、反射的模式 (reflection mode) 进行；加速电压为 20500 伏，栅压为 73.5%，线栅，0.01%，提取时间为 380ns。激光强度设定为 2700，每个谱图具有 100 个射击点 (shots)。质量范围设定为 800-3500Da。采用血管紧张素 I 和 ACTH 肽 (1296.6835Da 和 2465.1989 Da(M+H<sup>+</sup>) 离子)的混合物为内标。

Mascot 数据库的搜索条件：

使用 Mascot (<http://matrixscience.com>)进行数据库的搜索。对于 Mascot 搜索，参数按照以下方式设置：在 NCBI 非冗余数据库和 Swissprot、智人、0-250 kDa 分子质量、具有最大量的一个漏切位点的胰酶消化中选择数据库。肽质量表示为单同位素峰，并且蛋氨酸残基被认为是部分氧化的。此外，用半胱氨酸残基的酰胺甲基化进行所述搜索。质量公差设定为 100 ppm。

蛋白质印迹分析

为了对触珠蛋白进行蛋白质分析，通过 15%的 SDS-PAGE 对每个样品的 10 $\mu$ g 蛋白进行分离。然后采用 Semi-dry Transblot Cell (Bio-Rad laboratories, CA, USA)将带电转移到 0.45 $\mu$ m 的硝酸纤维素膜上。在室温下将膜浸泡在含有 5% 的脱脂干奶粉的 TBST (20mM Tris 碱; 500mM NaCl; 0.05% Tween 20; pH 7.5) 中 1 小时，并在 4 $^{\circ}$ C 下与兔抗人触珠蛋白多克隆抗体(1:5000) (Dakocytomation, Glostrup, Denmark)孵育过夜。用 TBST 洗涤 3 次，然后在室温下与 HRP 标记的抗-兔二抗(Pierce Biotechnology, IL, USA) 孵育 1 小时，所述二抗用含有 5% 的脱脂干奶粉的 TBST 稀释的(1:1000)。然后将所述膜洗涤，并用化学发光底物(Pierce Biotechnology, IL, USA)显影。

抗体的产生和采用夹层美联免疫吸附(ELISA)方法进行定性分析

采用氨基酸序列 CKNYYKLRTQGDGVY (SEQ ID NO:3) (BioGenes, Berlin, Germany)产生抗 Hp  $\alpha$ -亚单位的多克隆兔抗体。然后, 将产生的亲和纯化抗体用于 ELISA 分析。采用具有抗 Hp 或 Hp  $\alpha$ -亚单位的多克隆抗体的夹层 ELISA 来定量总触珠蛋白的水平或者触珠蛋白的  $\alpha$ -亚单位的水平。将用含有 0.5% BSA 的 PBST 缓冲液 (含有 0.05% Tween 20 的 PBS 缓冲液)进行适当稀释的(1:200)山羊抗人 Hp 抗体(Biodesign, ME, USA)置于 PVC 板中, 在 4°C 下过夜, 以将山羊抗人 Hp 抗体覆盖到 PVC 板上 (NUNC, Roskilde, Denmark)。在室温下, 用 200 $\mu$ l 的含有 3% 脱脂干奶粉的 PBST 封闭 2 小时, 将单个的囊液样品与含有 0.5% BSA 的 PBST 缓冲液(1:100)混合。加入 200 $\mu$ l 稀释的混合物, 然后在室温下孵育 2 小时。使用纯化的人触珠蛋白 (Sigma-Aldrich, MO, USA)或者触珠蛋白  $\alpha$ -亚单位 (BioGenes, Berlin, Germany) 作为标准。

然后, 在室温下将所述板与用含有 0.5%BSA 的 PBST 稀释的兔抗人 Hp 抗体(1:400) (Dakocytomation, Glostrup, Denmark)或者 Hp  $\alpha$ -亚单位抗体 (1:100) 孵育 2 小时, 随后加入生物素标记的抗兔二抗(1:400)和碱性磷酸酶链霉亲和素(1:400) (Vector Laboratories, CA, USA)。在 37°C 下使用浓度为 5mM 的置于 100mM 的碳酸氢钠溶液的对硝基苯磷酸(Vector Laboratories, CA, USA)约 1 小时。为了测定触珠蛋白的浓度, 使用 ELISA 阅读机(Tecan, Salzburg, Austria)在 405nm 处测定触珠蛋白的浓度。在每两次分析阶段之间, 通过将所述板浸没在 PBST 缓冲液中并然后倒空的方式洗涤所述板 4 次。

使用相区(PHASE RANGE)触珠蛋白分析试剂盒测量触珠蛋白

为了测定基于在囊液中存在的蛋白质的准确的并快速地检测卵巢肿瘤的恶性的方法的效率, 在低 pH 环境下用商业的 PHASE RANGE 触珠蛋白分析 (Tridelta Development Ltd, Kildare, 爱尔兰; 还描述在 US 6,451,550 中)

进行了触珠蛋白的分析。选择清晰的囊肿用于该测试，并且选择来自 20 个良性的和 14 个恶性的卵巢肿瘤的囊液用于评价。该分析是基于游离的血红蛋白的过氧化物酶的活性在低的 pH 环境中被抑制的事实。在复合物中的触珠蛋白与血红蛋白的结合能够保护结合的血红蛋白的过氧化物酶的活性。因此，过氧化物酶的活性与样品中存在的触珠蛋白的量直接成比例。该分析在 96 孔板中进行，并按照生产厂商的用法说明进行。在该分析中，将 7.5  $\mu\text{l}$  的每一个制备的标准物 (calibrator) (0-2mg/ml) 与测试样品转移到空白的小平板中，标准物与测试样品均为两份。然后，加入 100 $\mu\text{l}$  的触珠蛋白溶液并与样品混合均匀。加入 140 $\mu\text{l}$  的色素原和底物的混合物并孵育 3 分钟和 5 分钟。进行初始的实验，并确定作为区分恶性和良性囊肿的分离点的颜色。分别在 3 和 5 分钟时，记录阳性颜色反应。

#### 使用超声图记录仪得分系统来评价卵巢肿瘤

使用具有 210°/240° 移象部分的扇形传感器(5-8MHz) (5-8MHz)，对排空的膀胱进行经阴道的超声检测。使用简单的得分系统记录来自这些患者的超声信息，以基于以下因素来评价卵巢肿瘤的恶性状态：1)囊肿或者固体肿瘤的存在；2)在囊肿中存在的固体面积；3)隔的存在；和 4)初期描述的血流 (Daskalakis 等，2004)。这些形态学上的标准可以克服对卵巢损害的主观解释，并且可以评定诊断技术在患有卵巢损害的患者病情检查中精确的作用。大于 3 的总得分被认为是区分恶性和良性卵巢肿瘤的截断值(cut off value)。在外科手术后，对超声图记录仪的结果和组织病理学结果进行比较。

#### 统计学分析

为了比较在良性和恶性卵巢癌的囊液中触珠蛋白的浓度的平均值的差异，使用 SPSS 11.0 软件进行独立样品的 t 检验。进行皮尔森 (Pearson's ) 相关性分析，以评价通过 PHASE RANGE 方法和 ELISA 方法测量的触珠蛋白的浓度的任何关系。采用受试者工作特征曲线 (ROC)，以评价基于以前研

究的使用分裂点分析的在囊液中的生物标记的性能。将每一个生物标记的阈值设定为 55，以使假阳性和假阴性比值最小。

## 结果

### 质谱分析

一维凝胶分析、MALDI-TOF-MS--MS 分析和免疫捕获实验证明了触珠蛋白  $\alpha 2$  亚单位可以作为用于恶性卵巢肿瘤的潜在的生物标记。SELDI-TOF 分析表明存在的潜在的生物标记的分子量为 17kDa。

图 1 表示根据核质比分子量为 7-20kDa 的代表性的 SELDI 谱图。来自上皮卵巢癌的囊液的蛋白质谱图显示在 17kDa 处存在平均强度为  $3.23 \pm 0.85$  的强峰，该峰在良性肿瘤中大大地减小或者不存在。

图 2 显示分子量为 15kDa-20kDa 的蛋白质带，这些蛋白质主要在卵巢癌样品的囊液中表达，而不是在良性卵巢肿瘤中表达。切离选择的蛋白质带并进行凝胶内消化，随后进行串联 MALDI-TOF-MS/MS 分析。通过肽质量指纹识别在 NCBI 数据库中对蛋白质的相应光谱进行蛋白质进行搜索。选择四个最强的肽进行 MS/MS 分析。匹配的肽的序列与触珠蛋白的  $\alpha 2$  亚单位具有 74% 的同源性。

通过凝胶电泳确定来自生物流体中的蛋白质的质谱需要的蛋白质的量的范围通常为微克级 (Mortz 等, 1994)。来自处于早期和晚期的上皮卵巢癌的患者囊液具有丰富的蛋白质，因此适于这种评价。为了找到具有质量约为 17kDa 的潜在的蛋白质标记的身份，所述标记能够区分卵巢癌与良性肿瘤；使用 SDS-PAGE 以分离蛋白质混合物，并分离出质量为 15-20 kDa 的相应蛋白质带。

使用高通量分析得到的清晰的蛋白质谱图证实存在触珠蛋白的  $\alpha 2$  亚单位 (图 3)。在下文中概括了 SEQ ID NO:4 的序列信息，而通过 MS/MS 分

析确定的肽序列描述在表 1 中。为了再次证实在 SDS-PAGE 中的触珠蛋白相应于蛋白质芯片和免疫捕获实验中的峰，再次进行蛋白质芯片实验，不同的是将 PS20 蛋白质芯片与抗触珠蛋白抗体预先进行孵育。从该方法中获得的结果证实 17kDa 的峰就是在 SDS-PAGE 鉴定的触珠蛋白（图 5）。

SEQ ID NO:4 是人触珠蛋白  $\alpha 2$  亚单位（NCBI 数据库登记号 No. 701184A）的序列，匹配的肽序列为粗体字并带下划线。序列覆盖率为 74%。

VNDSGNDVTD IADDGQPPPK CIAHGYVEHS **VRYQCKNYYK**  
**LRTQGDGVYT LNNEKQWINK AVGDKLPECE ADDGQPPPKC**  
**IAHGYVEHSV RYQCKNYYKL RTQGDGVYTL NNEKQWINKA**  
**VGDKLPECEAVGKPKNPANP VQ** (SEQ ID NO:4)

表 1: 来自使用 MS/MS 分析进行的质谱中观察到的四个最强峰的肽序列。

观察的	Mr (实验的)	开始	终止	离子	肽 (SEQ ID NO)
1439.72	1438.71	60	72	106	TEGDGVYTLNDKK (5)
1580.85	1579.84	58	71	17	LRTEGDGVYTLNDK (6)
1708.91	1707.90	117	131	49	LRTEGDGVYTLNNEK (7)
1857.98	1856.97	137	153	29	AVGDKLPECEAVCGKPK (8)

### 蛋白质印迹分析

为了进一步证实蛋白质的身份，使用多克隆的兔抗人触珠蛋白抗体进行蛋白质印迹分析，以检测触珠蛋白的不同的亚单位。由印迹方法获得的结果显示出，在上皮卵巢肿瘤的囊液中存在不同的触珠蛋白的亚单位（图 4）。根据分子量，鉴定的相应的亚单位为  $\beta$  (40 kDa)、 $\alpha 2$  (16.5 kDa) 和  $\alpha 1$  (9 kDa)。

这些结果与 SELDI 和 SDS-PAGE 数据清楚地显示：与良性上皮卵巢肿瘤相比，上皮卵巢癌中的触珠蛋白的水平升高。

已经对本发明进行了一般性的描述，通过参照以下的实施例，本发明将

更易于理解，所述实施例用于说明的目的，而不是为了限制本发明的范围。

### 实施例

#### 实施例 1 – 通过酶联免疫吸附测定进行定量确认

为了进一步对囊液中的触珠蛋白或者 Hp  $\alpha$  亚单位的水平进行测定和定量，建立了组织内夹层 ELISA 方法。在同一天内对不同浓度的 3 个样品进行 8 次测试（批内分析(inter-assay)），并连续 5 天进行反复的测试（批间分析 (inter-assay)）。对于 Hp 的批内分析和批间分析的变异系数(CV)分别为 3.8%和 14.2%；对于 Hp  $\alpha$  亚单位的批内分析和批间分析的变异系数(CV)分别为 4.5% 和 13.2%。采用 ANOVA 分析，对良性受试者和处于早期和晚期癌症的受试者中的 Hp 或者 Hp  $\alpha$  亚单位水平的平均值进行比较分析。观察到在三组患者中存在显著的差异，如表 2 所示；然后根据被鉴定的疾病所处的时期获得预后。数据的矩形图给出在图 6 中。

表 2

	组	Hp 水平 (mg/ml)		Hp $\alpha$ 亚单位( $\mu$ g/ml)	
		平均	P	平均	P
晚期癌症	15	6.35	<0.001	216.3	<0.001
早期癌症	11	3.33	<0.05	137.9	
良性	35	1.43		71.4	

因此，可以通过使用 ELISA 技术来测量囊液中的触珠蛋白、触珠蛋白的片段或者衍生物以诊断癌症并确定癌症的严重级别。

#### 实施例 2 – 通过 PHASE RANGE 触珠蛋白分析试剂盒进行定量确认

使用 SPSS 13.0 软件对 PHASE RANGE 方法在 3 分钟和 5 分钟时测定的良性和恶性卵巢肿瘤的囊液的 OD 值的区别进行分析。在来自上皮卵巢癌患者的 28 个样品中的 25 个(89%)中观察到的彩色显影的强度与在良性肿瘤的

患者的样品中观察到的彩色显影的强度明显不同（图 7）。

然而，如图 7 所示，由 ELISA 和 PHASE RANGE 方法测量的触珠蛋白的水平之间明显存在正相关，皮尔森(Pearson's)相关系数  $r$  的平方值为 0.81。因此，通过任何一种方法测量的囊液中的触珠蛋白均能够用于区分良性肿瘤和恶性癌症，并且还能对癌症进行预后的评价。基于这些标准，本发明的数据表明对触珠蛋白进行的 5-分钟的 PHASE RANGE 测定，能够快速并有效地预测患有恶性疾病的患者的恶性程度。这种结合染料的分析方法可以单独使用，或者作为其它诊断方法（例如，在建立的肿瘤学中心目前使用的冷冻切片技术）的辅助方法，并且使妇科学家在进行手术时能够辨别恶性状态。

### 实施例 3 – 结合其它诊断方法来测量触珠蛋白

#### 超声评价

通过使用经过阴道的彩色多普勒超声检测，从 28 例恶性肿瘤中正确地鉴定了 25 例，从 33 例良性肿瘤中正确地鉴定了 24 例。彩色多普勒超声检测的灵敏性和特异性分别为 89.3%和 72.7%。该方法的正的和负的预测值（分别为 PPV 和 NPV）分别为 52.2%和 88.4%。

#### 组合使用 CA-125 和超声检测的触珠蛋白的多变量分析

单独使用触珠蛋白的染料结合分析的灵敏性为 89%，特异性为 91%，正预测值(PPV)为 76.7%，以及负预测值(NPV)为 96.8%。然后制备囊液中的触珠蛋白、血清中的 CA-125 水平以及超声波检测法的 ROC（受试者工作特征）曲线，以检测这些参数能够更好地区分恶性卵巢癌和良性卵巢肿瘤的能力。当结合使用 CA-125 和超声参数时，能够增强触珠蛋白的预测性能，产生的曲线下面积(AUC)为 0.957，具有 95%的置信度，置信区间为 0.903-1.012（图 9）。此外，对患者组合使用三参数时，对于卵巢癌，灵敏性为 89%，特异性为 94.3%，PPV 为 83.9%以及 NPV 为 96.4%（表 3）。

表 3

	<b>AUC</b>	<b>95% C.I.</b>
组合	0.957	0.903-1.012
超声	0.853	0.753-0.952
CA-125	0.866	0.773-0.952
Hp	0.903	0.821-0.984

因此，组合使用定量测定囊液中的触珠蛋白的多种方法能够以高置信度且灵敏地检测卵巢癌。

### 试剂盒

#### 实施例 4 - 诊断和预后试剂盒

本发明还提供一种诊断和/或预后试剂盒，该试剂盒包括能够与触珠蛋白反应的至少一种分子或者化合物。所述反应可以是结合反应或杂交反应，如抗触珠蛋白的抗体识别并结合到触珠蛋白、触珠蛋白的衍生物、突变体或者片段上的反应。所述反应还可以为化学的或者酶的反应，其中，血红蛋白-触珠蛋白复合物与底物分子的过氧化物活性以及反应可以通过比色法检测。

#### 本发明的应用

卵巢癌的进展与腹腔中卵巢囊肿中的囊液的积累有关。触珠蛋白是遗传决定的  $\alpha_2$  酸性糖蛋白，具有结合血红蛋白的能力 (Bowman 等, 1982)，存在于人类和其它哺乳动物的绝大多数的体液中。触珠蛋白主要由肝脏合成，作为抗氧化剂起作用，并且通过结合血红蛋白来预防可能通过游离的血红蛋白介导的氧化组织的损伤 (Langlois 等, 1996)。

本发明的研究数据表明触珠蛋白可以作为患有上皮卵巢癌患者的囊液中的标记。采用 SELDI 分析和 SDS-PAGE 方法，以检测 17 kDa 蛋白的存在，

该蛋白主要存在患有恶性肿瘤的患者的囊液中，而不是主要存在于患有良性肿瘤的患者的囊液中。后来通过 MALDI-TOF-MS/MS 方法将所述蛋白确定为触珠蛋白。这种糖蛋白的身份进一步通过蛋白质印迹分析被确认。此外，夹层 ELISA 方法还显示在检测的癌症与良性组之间的这种生物标记的浓度存在显著的区别( $P < 0.001$ )。采用触珠蛋白和 CA-125 水平以及超声参数的总的诊断准确性分别为：灵敏性为 89%，特异性为 94.3%，正预测值(PPV)为 83.9%，负预测值(NPV)为 96.4%。然而，单独采用触珠蛋白染料结合分析，其总的诊断准确性分别为：灵敏性为 89%，特异性为 91%，正预测值(PPV)为 76.7%，负预测值(NPV)为 96.8%。本发明的数据表明触珠蛋白为能够快速检测恶性的可靠的生物标记。

通过对 SELDI-TOF、SDS-PAGE 蛋白质图谱和蛋白质印迹的比较证实 17kDa 肽的身份为触珠蛋白  $\alpha_2$  亚单位。类似地，对于触珠蛋白分子的组织内的 ELISA 技术显示这种糖蛋白在早期和晚期上皮卵巢癌的囊液中的浓度显著高于良性卵巢肿瘤的囊液中的浓度。

以前采用 ELISA 方法的研究报道触珠蛋白在卵巢癌患者的血清和腹水中升高 (Elg 等, 1993)。最近，使用基于蛋白质组的方法以发现和鉴定新的蛋白质作为潜在的诊断生物标记。Ye 等(2003)已经确定触珠蛋白  $\alpha$ -亚单位作为卵巢癌的潜在的血清生物标记，触珠蛋白  $\alpha$ -亚单位与 CA-125 结合时的灵敏性为 95%，特异性为 91%。然而，这没有教导或者建议可以使用囊液中的触珠蛋白作为卵巢癌的生物标记。

采用 SELDI-TOF 分析发现位于约 17kDa 的峰主要存在于晚期卵巢癌中。采用 SDS-PAGE 和 MALDI-TOF-MS/MS 确定该特定的蛋白为触珠蛋白的  $\alpha$  亚单位。此外，使用组织内夹层三明治 ELISA 方法表明上皮卵巢癌的囊液中触珠蛋白的浓度显著高于良性肿瘤的囊液中触珠蛋白的浓度。从本发明中，可以使用简单的截断测量值作为恶性癌症的可靠的预测值。

由于在本发明的试验中, PHASE RANGE 触珠蛋白测定是确定卵巢癌为恶性的可靠的方法, 因此, 这具有重要的临床意义。目前, 在外科手术中, 病理学家通过冷冻切片方法测定卵巢癌。在本发明中发现, 在截断时间为 5 分钟时, 使用 PHASE RANGE 试剂盒能够区分恶性肿瘤和良性肿瘤, 该测试的总的特征分别为: 灵敏性为 89%, 特异性为 91%, PPV 为 76.7%和 NPV 为 96.8%。与此形成对照的是, 冷冻切片技术既昂贵又耗时, 并且在许多医疗机构或者临床机构中, 冷冻切片技术取决于是否可以得到主治病理学家。本发明的方法包括对患者组合使用三个参数(触珠蛋白、CA125 和超声波检测法), 以获得比单独使用任何一个参数时增强的诊断准确性。

然而, 当单独考虑时, 触珠蛋白是能够检测这些肿瘤的恶性程度的可行的诊断标记, 其 AUC 为 0.903 (图 9; 表 3)。

然而, 以前的研究显示血清蛋白标记的最小的 PPV 为 10% (即, 对每一个真的阳性不超过 9 个假阳性) 的一般的群体筛选有益于上皮卵巢癌的鉴别。然而, 在临床情况下, 这种方法不可行而且昂贵, 因为在临床情况下, 妇女很少患这种卵巢癌, 据推测需要对任何卵巢癌筛选测试具有 99.6% 的专一性, 以产生真正的影响 (Mor 等, 2005)。然而, 在本研究中, 仅仅选择具有卵巢囊肿的患者, 以在外科手术中区分恶性卵巢囊肿和良性卵巢囊肿。在本发明的研究组中, 这种检测方法能够增强对发病率相对高的卵巢癌的检测能力, 观察到的该检测方法的 PPV 为 83.9%。基于这一标准, 本发明重视对于囊液中的触珠蛋白颜色反应的简单的时间点截断值, 在手术室可以有效地使用时间点截断值以鉴定恶性肿瘤, 这更为容易和快速。

Bin Ye 等和 Ahmed 等的报道集中于采用蛋白质组学的方法鉴定患有卵巢癌的妇女的血清中的触珠蛋白前体或者亚单位以及它们可能作为肿瘤标记的作用 (Ye 等, 2003; Ahmed 等, 2004)。然而, 在人体中循环的触珠蛋白的主要来源为肝脏, 由于恶性疾病导致的血清中的触珠蛋白水平的升高还

没有被充分地研究。它是非特异性标记，因为它在各种其它病症中增加，因此，它作为有用的血清肿瘤标记的有效性可能是难以确定。

然而，采用免疫组织化学技术，Ahmed 等(2004)还报道触珠蛋白的活性在正常卵巢组织中缺失，而在卵巢癌组织中，产生中等到强的染色。由本发明确定的在卵巢癌的囊液中的触珠蛋白的水平显著增加具有更重要的临床意义。

使用具有特定截断值的简单的测试试剂盒测定术中囊液中的触珠蛋白的水平能够确定可能需要采用冷冻切片进行进一步病理学评价的妇女，因此，可能要建立更为复杂的手术方法。已经证明由经专门训练的妇产科肿瘤学家进行的最初的手术对于患有这种疾病的患者的长期存活时间具有有利的影响（Guidelines, Gynecol Oncol, 2000）。这种方法能够对卵巢癌进行适当的外科手术，因而能够避免需要对恶性癌症进行反复的手术，因为这些恶性癌症被错误诊断为“良性”囊肿。这些触珠蛋白标记能够反映受折磨的妇女的肿瘤的恶性状态，并且能够积极地影响临床结果。

即使本发明的否定的结果也是有教益的。由于更多的卵巢囊肿在腹腔镜下进行手术，否定的结果表示该囊肿不是癌，因此外科医生更有信心地进行囊肿切除手术。

对于本领域的技术人员来说，本发明还可以用于兽医医药，这是显而易见的。尽管提供了实施本发明的特定的实施例，可以理解的是本领域的技术人员可以进行各种改变和改进而不偏离本发明的精神实质和范围。

## 参考文献

Ahmed N, Barker G, Oliva KT, et al. Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *Br J Cancer*;91(1):129-40 (2004)

Boss EA, Massuger LF, Thomas CM, et al. Clinical value of components of the plasminogen activation system in ovarian cyst fluid. *Anticancer Res* ;22(1A):275-82 (2002)

Bowman BH, Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Genet* ;12:189-261, 453-4 (1982)

Bradford MM *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976)

Canis et al. Frozen section in laparoscopic management of macroscopically suspicious ovarian masses. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*; 11:365-9 (2004).

Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med.* 1993; 329(21): 1550-1559

Darai E, Detchev R, Hugol D, Quang NT. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL) -6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours. *Hum Reprod* ;18(8):1681-5 (2003)

Daskalakis G, Kalmantis K, Skartados N, Thomakos N, Hatzioannou L, Antsaklis A. Assessment of ovarian tumors using transvaginal color Doppler ultrasonography. *Eur J Gynaecol Oncol*;25(5):594-6 (2004).

Devarbhavi H, Kaese D, Williams AW, Rakela J, Klee GG, Kamath PS. Cancer antigen 125 in patients with chronic liver disease. *Mayo Clin Proc* ;77(6):538-41 (2002)

Elg SA, Carson LF, Fowler JM, Twiggs LB, Moradi MM, Ramakrishnan S. Ascites levels of haptoglobin in patients with ovarian cancer. *Cancer* ;71(12):3938-41 (1993)

Guidelines for referral to a gynecologic oncologist: rationale and benefits. The Society of Gynecologic Oncologists. *Gynecol Oncol*;78(3 Pt 2):S1-13 (2000).

Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics* ;3(4):355-66 (2004)

Jacobs IJ, Skates SJ, MacDonald N, et al. Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet* ;353(9160):1207-10 (1999)

Jennings TS, Dottino PR. The application of operative laparoscopy to gynecologic oncology. *Curr Opin Obstet Gynecol*;6(1):80-5 (1994).

Karlan BY, Baldwin RL, Lopez-Luevanos E, et al. Peritoneal serous papillary carcinoma, a phenotypic variant of familial ovarian cancer: implications for ovarian cancer screening. *Am J Obstet Gynecol* ;180(4):917-28 (1999)

Kristensen GB., Trope C. Epithelial ovarian carcinoma. *Lancet*. 1997; 349(9045): 113-117.

Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* ;42(10):1589-600 (1996)

Lim et al., 1997 Lim FK, Yeoh CL, Chong SM, Arulkumaran S. Pre and intraoperative diagnosis of ovarian tumours: how accurate are we? *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1997 May;37(2):223-7.

Mackey SE, Creasman WT. Ovarian cancer screening. *J Clin Oncol* ;13(3):783-93 (1995)

Maiman M, Seltzer V, Boyce J Laparoscopic excision of ovarian neoplasms subsequently found to be malignant. *Obstet Gynecol*.;77(4):563-5 (1991).

Michel G, De Iaco P, Castaigne D et al. Extensive cytoreductive surgery in advanced ovarian carcinoma. *Eur J Gynaec Oncol*; 18: 9–15 (1997).

Mor G, Visintin I, Lai Y, et al. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;102(21):7677-82 (2005)

Mortz E, Vorm O, Mann M, Roepstorff P. Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom* ;23(5):249-61 (1994)

Robinson WR, Curtin JP, Morrow CP. Operative staging and conservative surgery in management of low malignant potential ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer*;2:113–8 (1992).

Vergote IB, De Wever I, Decloedt J et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary debulking surgery in advanced ovarian carcinoma: a retrospective analysis of 285 patients. *Gynecol Oncol*; 71: 431–436 (1998).

Wingo, P.A., Ries, L.A., Rosenberg, H.M., Miller D.S., Edwards B.K. Cancer incidence and mortality, 1973-1995: a report card for the U.S. *Cancer* 1998; 82: 1197-1207.

---

Woolas RP, Oram DH, Jeyarajah AR, Bast RC, Jacobs IJ. Ovarian cancer identified through screening with serum markers but not by pelvic imaging. *Int J Gynecol Cancer*;9(6):497-501 (1999)

Ye B, Cramer DW, Skates SJ, et al. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* ;9(8):2904-11 (2003)

Yeo ELK, Ju KM, Poddar NC, Hui PK, Tang LCH. The accuracy of intraoperative frozen section in the diagnosis of ovarian tumors. *J Obstet Gynaecol*;24:189–95 (1998).

Zhang R, Barker L, Pinchev D, et al. Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics* ;4(1):244-56 (2004)

US 6,451,550

<110> 新加坡国立大学

<120> 诊断生物分子

<130> FP3804

<150> SG 200605961-2

<151> 2006-09-05

<160> 8

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1433

<212> DNA

<213> 人

<400> 1

```

agatgccccca cagcactgct cttccagagg caagaccaac caagatgagt gccctgggag      60
ctgtcattgc cctcctgctc tggggacagc tttttgcagt ggactcaggc aatgatgtca      120
cggatatcgc agatgacggc tgcccgaagc cccccgagat tgcacatggc tatgtggagc      180
actcggttcg ctaccagtgt aagaactact acaaactgcg cacagaagga gatggagtat      240
acaccttaaa tgataagaag cagtggataa ataaggctgt tggagataaa cttcctgaat      300
gtgaagcaga tgacggctgc ccgaagcccc ccgagattgc acatggctat gtggagcact      360
cggttcgcta ccagtgtaag aactactaca aactgcgcac agaaggagat ggagtgtaca      420
ccttaaacia tgagaagcag tggataaata aggctgttgg agataaactt cctgaatgtg      480
aagcagtatg tgggaagccc aagaatccgg caaacccagt gcagcggatc ctgggtggac      540
acctggatgc caaaggcagc tttccctggc aggctaagat ggtttccac cataatctca      600
ccacaggtgc cacgctgatc aatgaacaat ggctgctgac cacggctaaa aatctcttcc      660
tgaaccattc agaaaatgca acagcgaag acattgcccc tactttaaca ctctatgtgg      720
ggaaaaagca gcttgtagag attgagaagg ttgttctaca ccctaactac tcccaggtag      780
atattgggct catcaaactc aaacagaagg tgtctgttaa tgagagagtg atgcccattc      840
gcctaccttc aaaggattat gcagaagtag ggcgtgtggg ttatgtttct ggctgggggc      900

```

gaaatgcaa ttttaaattt actgaccatc tgaagtatgt catgctgcct gtggctgacc 960  
 aagaccaatg cataaggcat tatgaaggca gcacagtccc cgaaaagaag acaccgaaga 1020  
 gccctgtagg ggtgcagccc atactgaatg aacacacctt ctgtgctggc atgtctaagt 1080  
 accaagaaga cacctgctat ggcgatgcgg gcagtgcctt tgccgttcac gacctggagg 1140  
 aggacacctg gtatgcgact gggatcctaa gctttgataa gagctgtgct gtggctgagt 1200  
 atgggtgtga tgtgaagggt acttccatcc aggactgggt tcagaagacc atagctgaga 1260  
 actaatgcaa ggctggccgg aagcccttgc ctgaaagcaa gatttcagcc tggaagaggg 1320  
 caaagtggac gggagtggac aggagtggat gcgataagat gtggtttgaa gctgatgggt 1380  
 gccagccctg cattgctgag tcaatcaata aagagctttc ttttgacca ttt 1433

<210> 2

<211> 406

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Met Ser Ala Leu Gly Ala Val Ile Ala Leu Leu Leu Trp Gly Gln Leu  
 1 5 10 15

Phe Ala Val Asp Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ala Asp Asp Gly  
 20 25 30

Cys Pro Lys Pro Pro Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val  
 35 40 45

Arg Tyr Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly  
 50 55 60

Val Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly  
 65 70 75 80

Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Asp Asp Gly Cys Pro Lys Pro Pro  
 85 90 95

Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr Gln Cys Lys  
 100 105 110

Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn  
 115 120 125

Asn Glu Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu  
 130 135 140

Cys Glu Ala Val Cys Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn Pro Val Gln  
 145 150 155 160

Arg Ile Leu Gly Gly His Leu Asp Ala Lys Gly Ser Phe Pro Trp Gln  
 165 170 175

Ala Lys Met Val Ser His His Asn Leu Thr Thr Gly Ala Thr Leu Ile  
 180 185 190

Asn Glu Gln Trp Leu Leu Thr Thr Ala Lys Asn Leu Phe Leu Asn His  
 195 200 205

Ser Glu Asn Ala Thr Ala Lys Asp Ile Ala Pro Thr Leu Thr Leu Tyr  
 210 215 220

Val Gly Lys Lys Gln Leu Val Glu Ile Glu Lys Val Val Leu His Pro  
 225 230 235 240

Asn Tyr Ser Gln Val Asp Ile Gly Leu Ile Lys Leu Lys Gln Lys Val  
 245 250 255

Ser Val Asn Glu Arg Val Met Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Asp Tyr  
 260 265 270

Ala Glu Val Gly Arg Val Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Asn Ala  
 275 280 285

Asn Phe Lys Phe Thr Asp His Leu Lys Tyr Val Met Leu Pro Val Ala  
 290 295 300

Asp Gln Asp Gln Cys Ile Arg His Tyr Glu Gly Ser Thr Val Pro Glu  
305 310 315 320

Lys Lys Thr Pro Lys Ser Pro Val Gly Val Gln Pro Ile Leu Asn Glu  
325 330 335

His Thr Phe Cys Ala Gly Met Ser Lys Tyr Gln Glu Asp Thr Cys Tyr  
340 345 350

Gly Asp Ala Gly Ser Ala Phe Ala Val His Asp Leu Glu Glu Asp Thr  
355 360 365

Trp Tyr Ala Thr Gly Ile Leu Ser Phe Asp Lys Ser Cys Ala Val Ala  
370 375 380  
Glu Tyr Gly Val Tyr Val Lys Val Thr Ser Ile Gln Asp Trp Val Gln  
385 390 395 400

Lys Thr Ile Ala Glu Asn  
405

<210> 3  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> 人工的

<220>  
<223> 用于产生抗 Hp  $\alpha$ 亚单位的多克隆兔抗体的序列  
<400> 3

Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Gln Gly Asp Gly Val Tyr  
1 5 10 15

<210> 4  
<211> 142  
<212> PRT  
<213> 人

<400> 4

Val Asn Asp Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ala Asp Asp Gly Gln  
1 5 10 15

Pro Pro Pro Lys Cys Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg  
 20 25 30

Tyr Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Gln Gly Asp Gly Val  
 35 40 45

Tyr Thr Leu Asn Asn Glu Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp  
 50 55 60

Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Asp Asp Gly Gln Pro Pro Pro Lys Cys  
 65 70 75 80

Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr Gln Cys Lys Asn  
 85 90 95

Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Gln Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asn  
 100 105 110

Glu Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu Cys  
 115 120 125

Glu Ala Val Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn Pro Val Gln  
 130 135 140

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Lys  
 1 5 10

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

---

Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asp Lys  
 1                    5                    10

<210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 7

Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asn Glu Lys  
 1                    5                    10                    15

<210> 8  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人

<400> 8

Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Val Cys Gly Lys Pro  
 1                    5                    10                    15

Lys

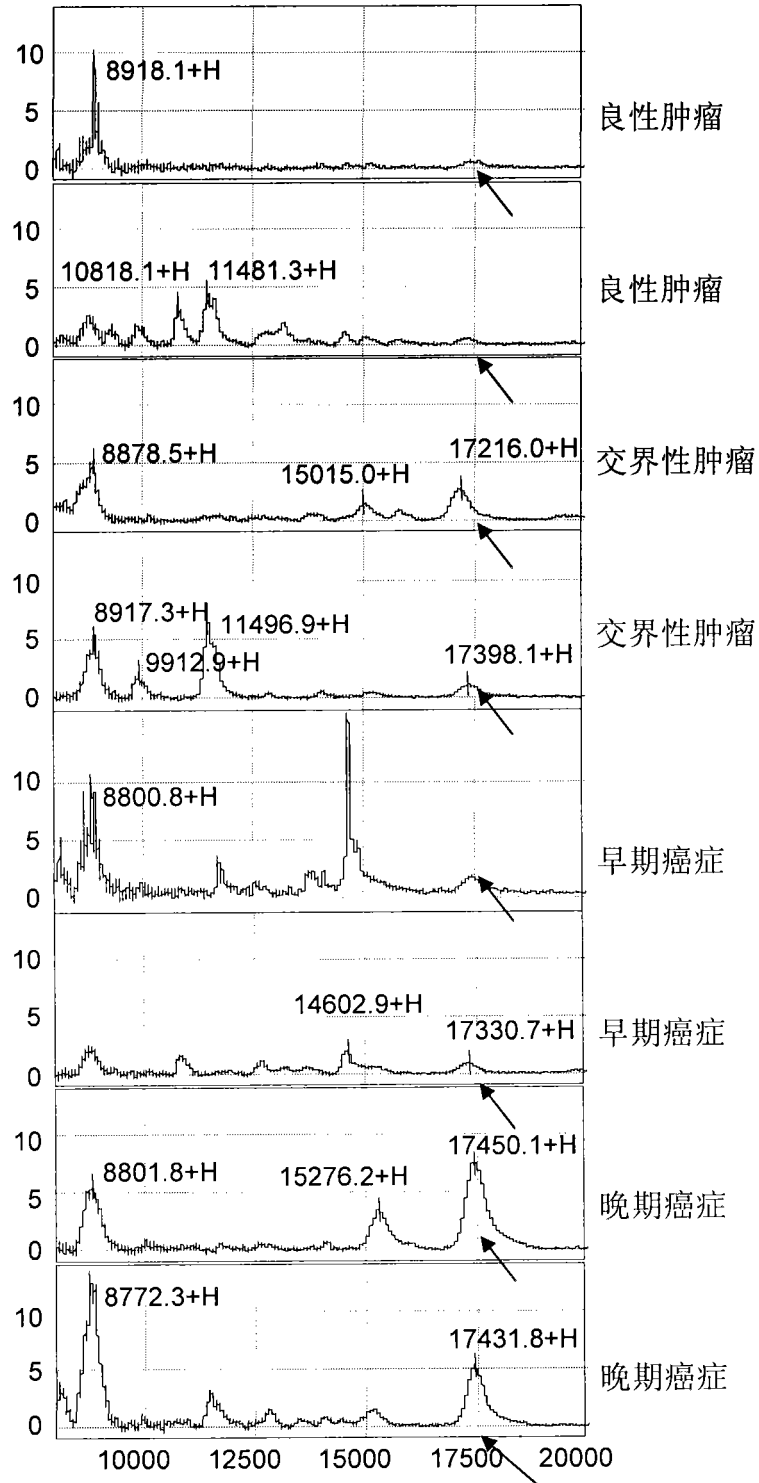


图 1

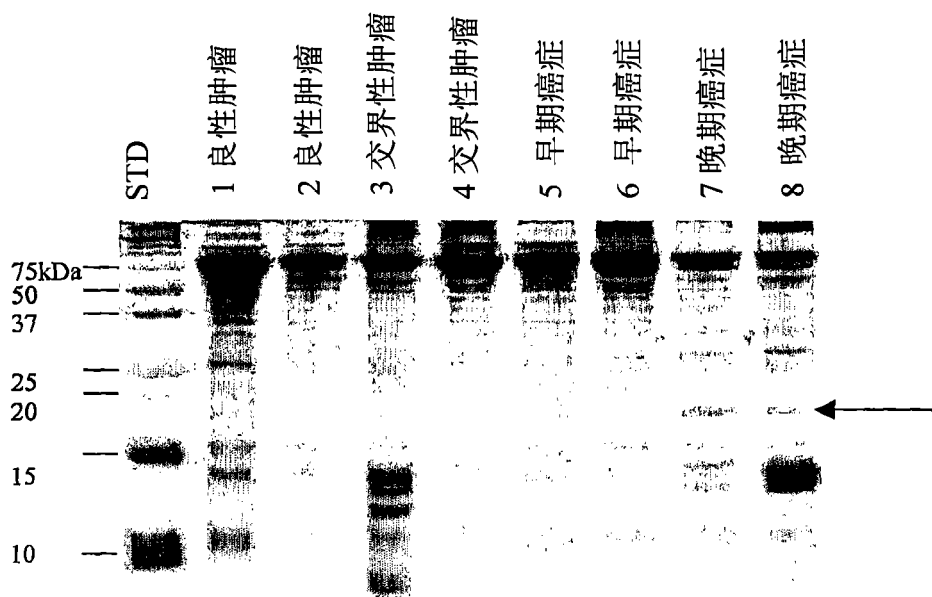


图 2

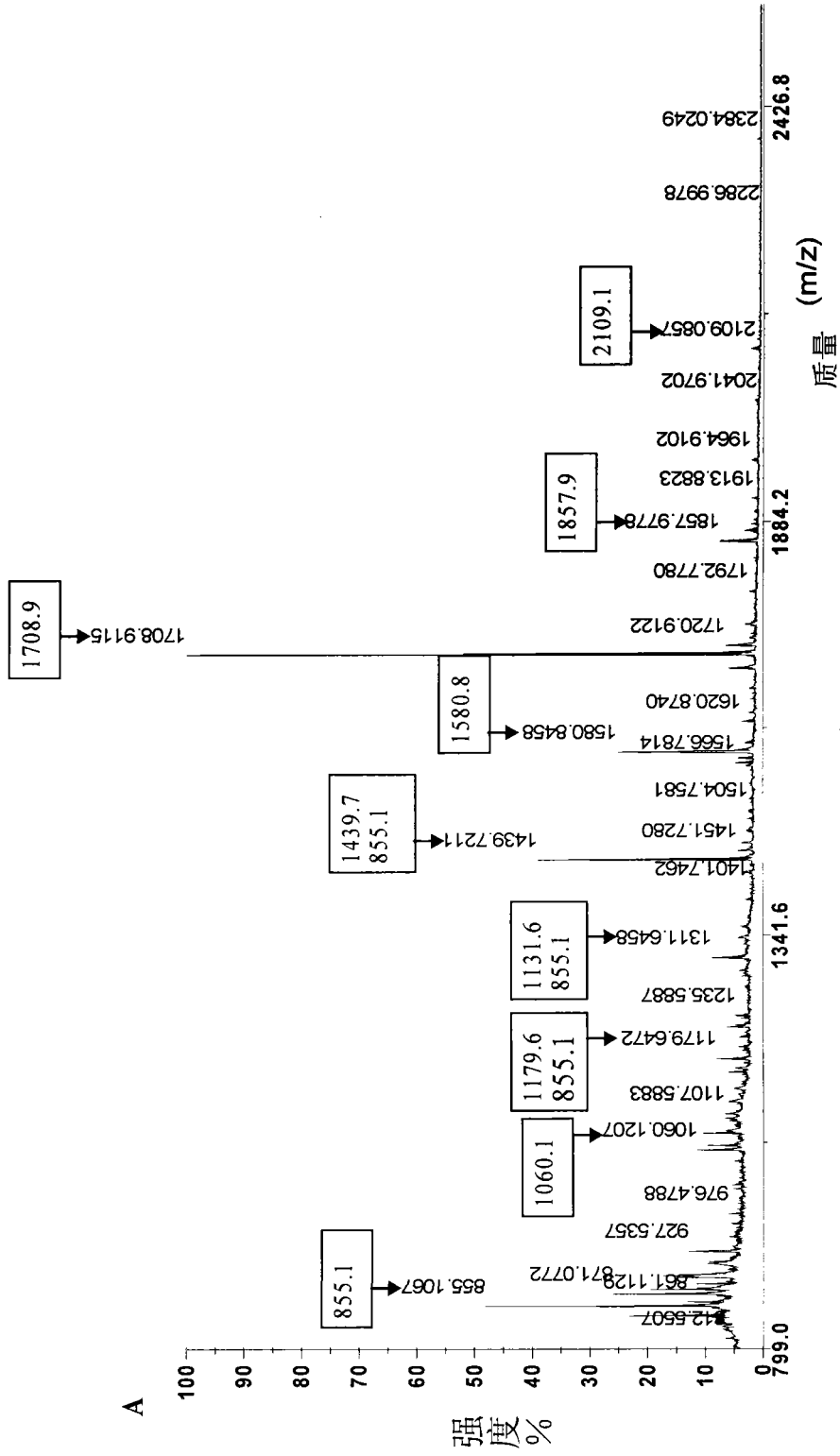


图 3

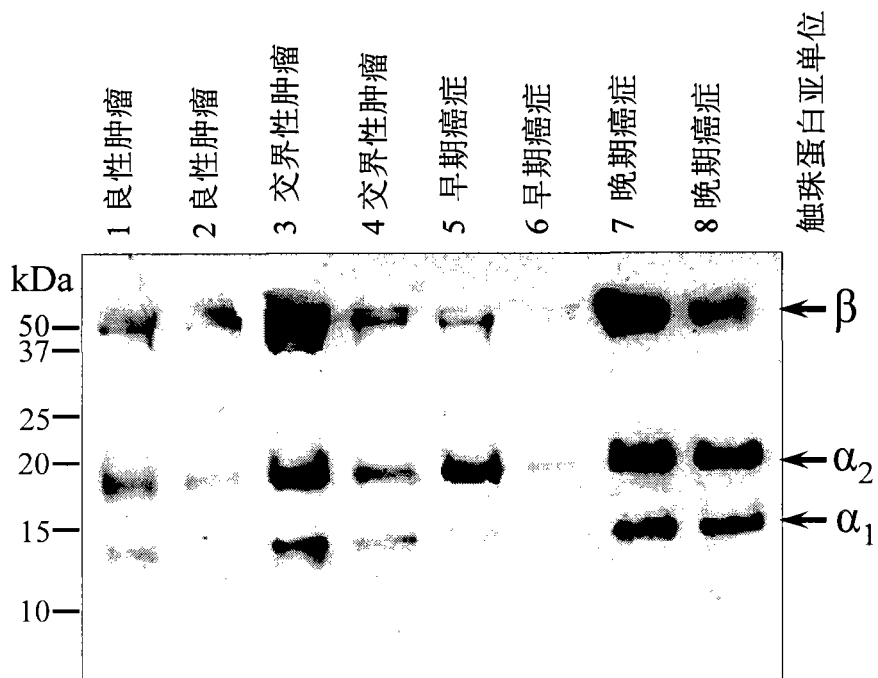


图 4

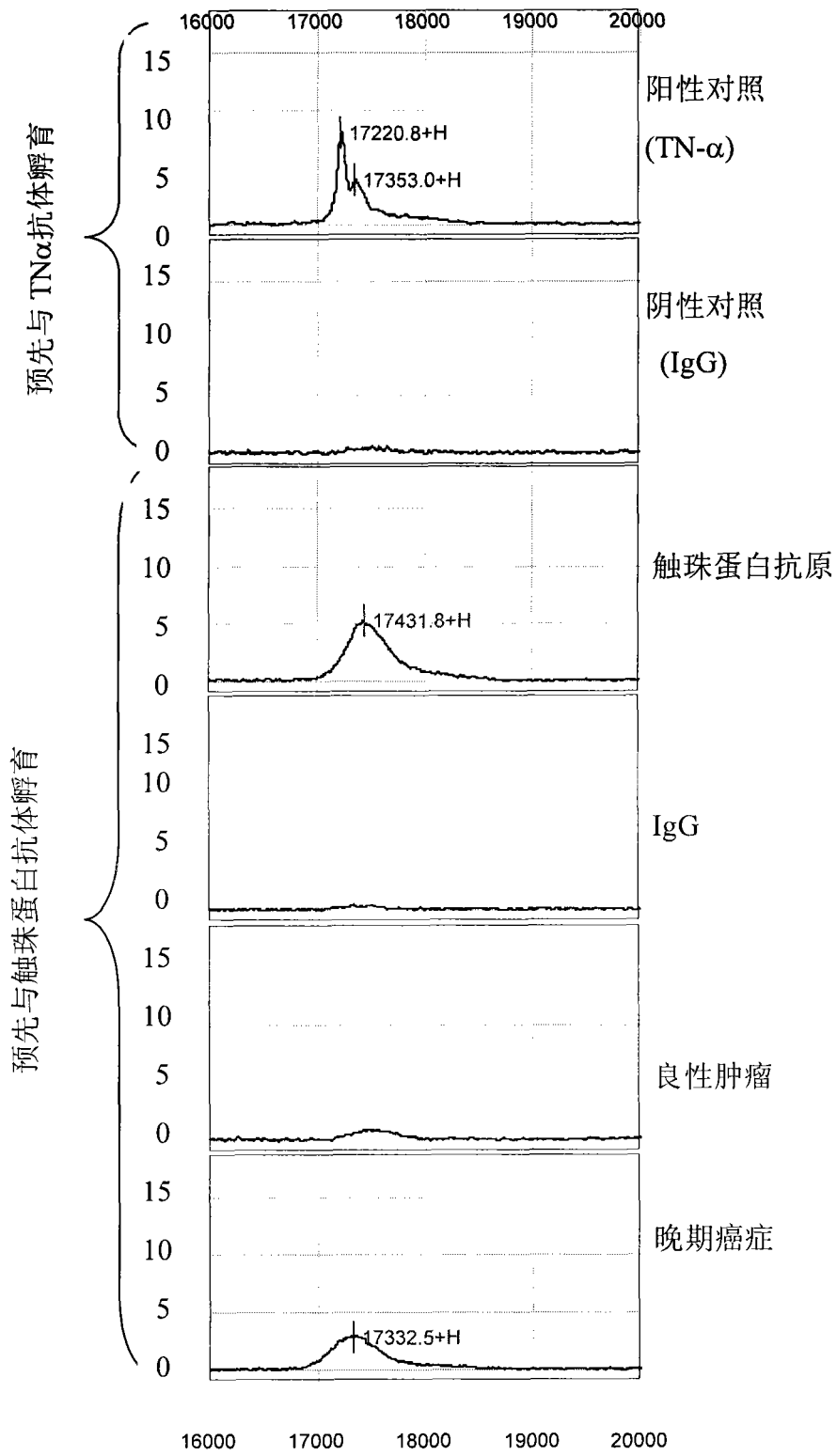


图 5

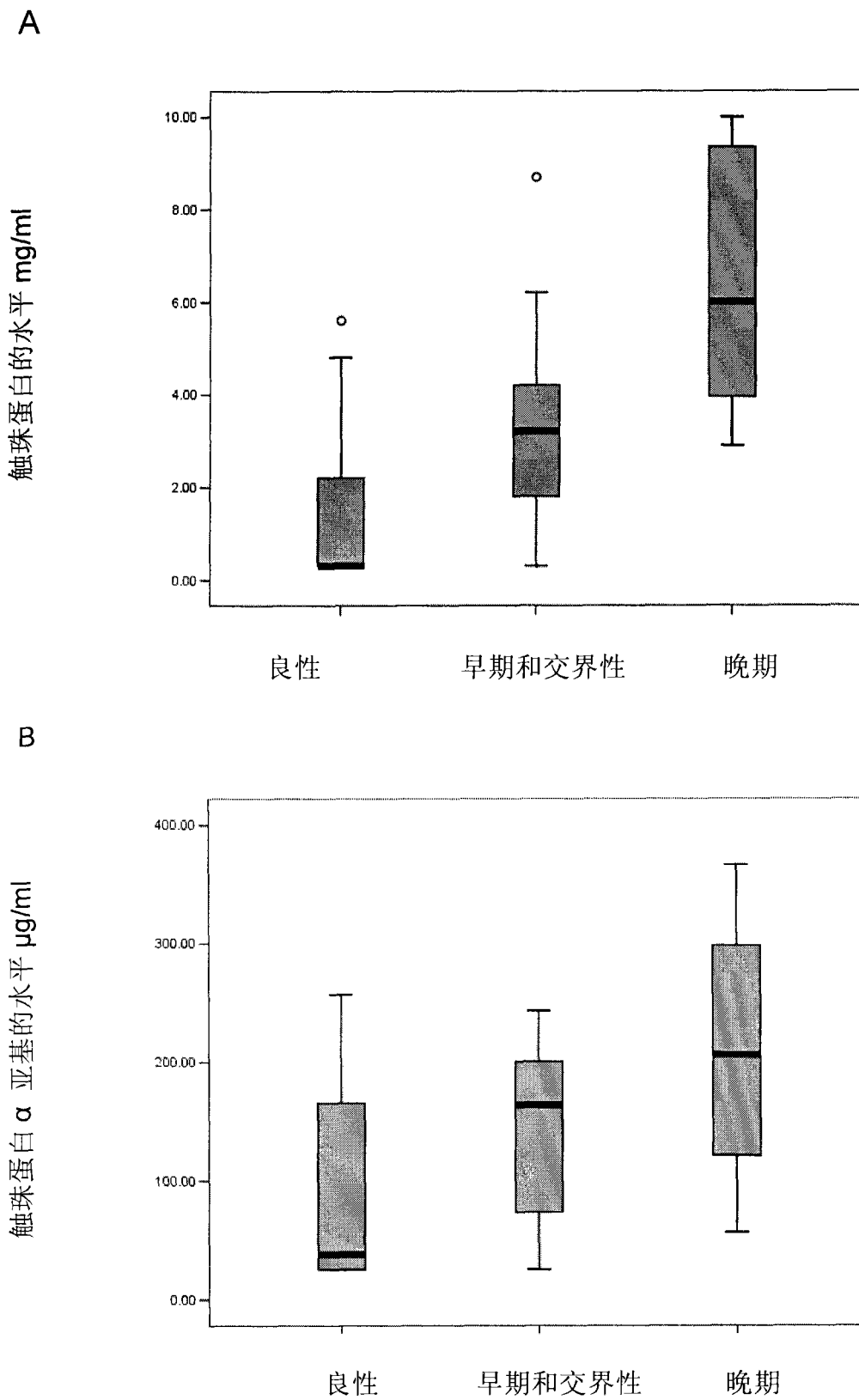


图 6

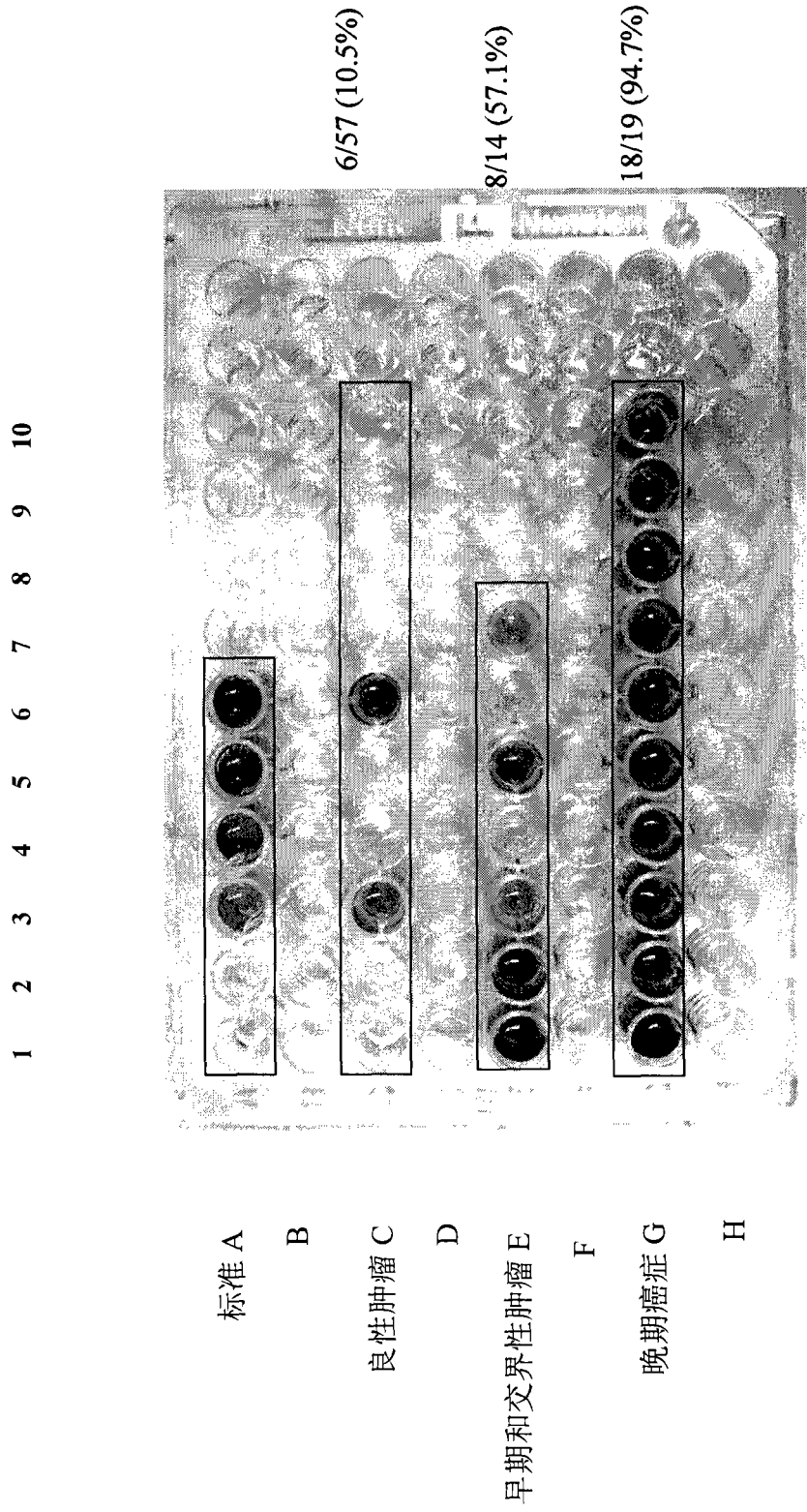


图 7

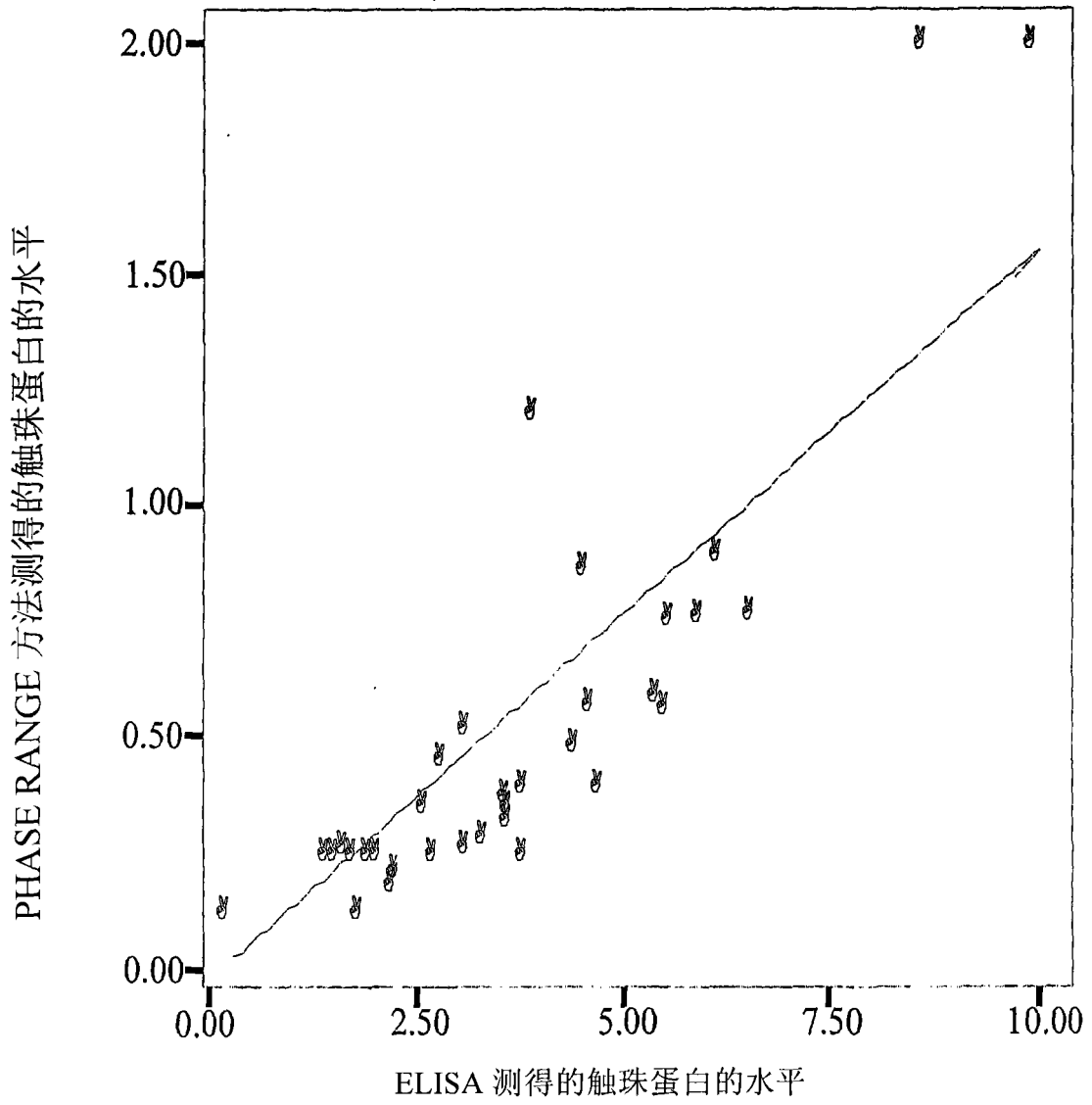
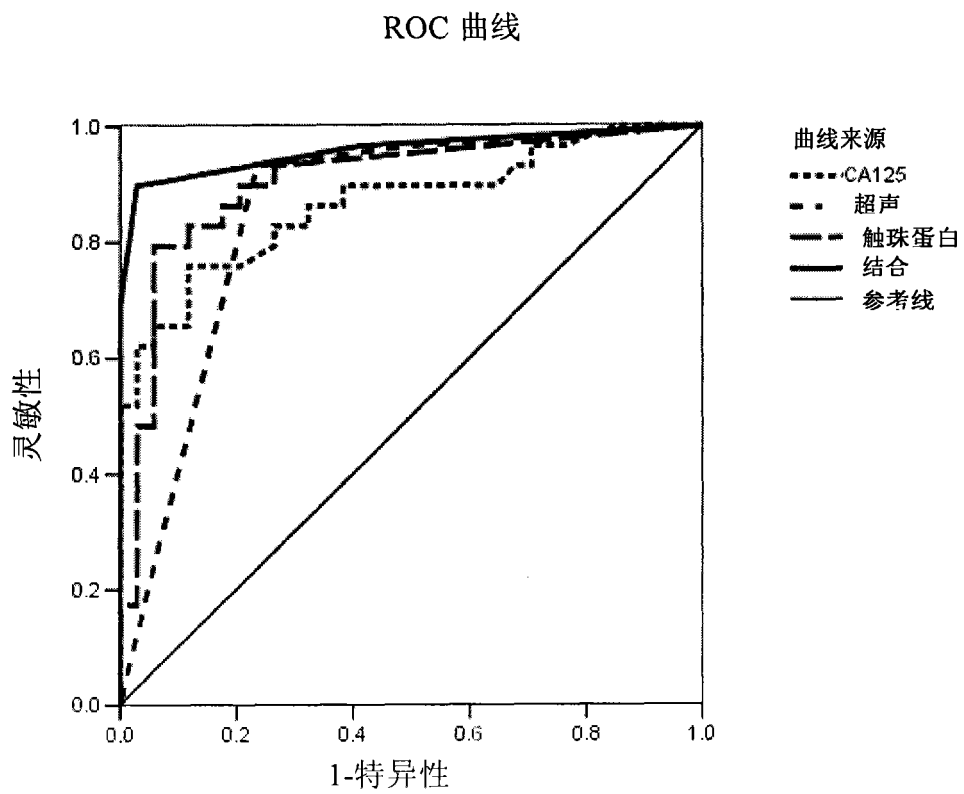


图 8



通过连接产生的诊断片段

图 9

专利名称(译)	诊断生物分子		
公开(公告)号	<a href="#">CN101589308A</a>	公开(公告)日	2009-11-25
申请号	CN200780040599.X	申请日	2007-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
当前申请(专利权)人(译)	新加坡国立大学		
[标]发明人	MA初拉尼 KRBM贾巴鲁拉汗 L安娜玛莱 A比斯瓦斯 C赵		
发明人	M·A·初拉尼 K·R·B·M·贾巴鲁拉汗 L·安娜玛莱 A·比斯瓦斯 C·赵		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57449 G01N2800/52 G01N33/574		
代理人(译)	周建秋 王凤桐		
优先权	200605961 2006-09-05 SG		
其他公开文献	CN101589308B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于对生物分子进行鉴定和/或定量的方法。本发明还提供了对细胞增殖疾病中的生物分子进行鉴定和/或定量的方法，该方法通过提供至少一种囊液样品并对触珠蛋白，触珠蛋白的衍生物、突变体和/或片段的表达进行检测。

