

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480014319.4

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)

[43] 公开日 2006年6月28日

[11] 公开号 CN 1795385A

[22] 申请日 2004.5.25

[21] 申请号 200480014319.4

[30] 优先权

[32] 2003.5.26 [33] EP [31] 03011158.7

[86] 国际申请 PCT/EP2004/005598 2004.5.25

[87] 国际公布 WO2004/104593 英 2004.12.2

[85] 进入国家阶段日期 2005.11.24

[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 P·伯恩德特 M·-L·哈格曼
H·朗根 S·帕尔姆 M·勒斯勒
W·罗林格尔 M·塔克
W·措尔格 J·卡尔

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张轶东 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 18 页 序列表 3 页
附图 2 页

[54] 发明名称

蛋白 MASP 作为结肠直肠癌标志的用途

[57] 摘要

本发明涉及结肠直肠癌的诊断。它公开了蛋白 MASP 在结肠直肠癌诊断中的用途。它涉及从来自个体的液体样品诊断结肠直肠癌的方法，该方法通过测量所述样品中的 MASP 进行诊断。MASP 的测量可以用于例如结肠直肠癌的早期检测或诊断。

1. 诊断结肠直肠癌的方法，包括下列步骤：
 - a) 提供从个体获得的液体样品，
 - b. 在适于乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂前体 (MASP) 特异性结合试剂与 MASP 之间形成复合物的条件下，将所述样品与所述结合试剂接触，以及
 - c. 将 (b) 中形成的复合物的量与结肠直肠癌的诊断关联。
2. 根据权利要求 1 的方法，其进一步的特征在于所述样品为血清。
3. 根据权利要求 1 的方法，其进一步的特征在于所述样品为血浆。
4. 根据权利要求 1 的方法，其进一步的特征在于所述样品为全血。
5. 蛋白 MASP 作为标志分子在从个体获得的液体样品进行结肠直肠癌的诊断中的用途。
6. 蛋白 MASP 作为标志分子在从个体获得的液体样品进行结肠直肠癌的早期诊断中的用途。
7. 根据权利要求 6 的用途，其中所述早期诊断使用得自腺瘤病期 CRC 患者的样品进行。
8. 根据权利要求 6 的用途，其中所述早期诊断使用得自 T_{is}-3; N0; M0 病期 CRC 患者的样品进行。
9. 蛋白 MASP 作为结肠直肠癌的标志分子，与另一个结肠直肠癌的标志分子联合在从个体获得的液体样品进行结肠直肠癌诊断中的用途。
10. 免疫学试剂盒，其包括至少一种 MASP 的特异性结合试剂和用于 MASP 测量的辅助试剂。

蛋白 MASP 作为结肠直肠癌标志的用途

5 本发明涉及结肠直肠癌的诊断。它公开了 MASP (乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂 (maspin) 前体) 蛋白在结肠直肠癌诊断中的用途。另外, 它特别涉及从来自个体的液体样品诊断结肠直肠癌的方法, 该方法通过测量所述样品中的 MASP 进行诊断。MASP 的测量可以用于例如结肠直肠癌的早期检测或诊断。

10 尽管检测 and 治疗的进展, 癌症仍然是主要的公共健康挑战。在多种类型的癌症中, 结肠直肠癌 (=CRC) 是西方世界最常见的癌症之一。

癌症能够越早得到检测/诊断, 总生存率就越高。对于 CRC, 这一点尤其正确。晚期肿瘤的预后差。三分之一以上的患者将在诊断后五年内死于进行性疾病, 相应为约 40% 的五年生存率。目前的治疗
15 仅仅治愈一部分患者, 而且对在疾病早期诊断的那些患者显然具有最佳作用。

关于作为公共健康问题的 CRC, 有必要发展对结肠直肠癌更有效的筛选和预防措施。

20 目前, 关于结肠直肠癌现有的最早检测程序包括便血检验或内窥镜镜检查程序。然而, 在检测便血之前一般必须存在显著的肿瘤大小。以愈创木脂为基础的大便潜血试验的灵敏性约为 26%, 意味着 74% 具有恶性病变的患者将仍然未检测到 (Ahlquist, D. A., Gastroenterol. Clin. North Am. 26 (1997) 41-55) 。癌变前和癌性病变的显像代表早期检测的最佳方法, 但是结肠镜检查是昂贵、具有风险和并发症的
25 侵入性方法 (Silvis, S. E. 等人, JAMA 235 (1976) 928-930; Geenen, J. E., 等人, Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 231-235; Anderson, W. F. 等人, J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126-1133) 。

近年来, 巨大量的所谓结肠特异的或甚至所谓结肠直肠癌特异的
30 RNA 表达模式分析获得的数据的基础上, 所述分析为结肠 (癌) 组织分别相对于不同组织或邻近的正常组织的 RNA 表达模式的分析。这些方法可以概括为示差 mRNA 展示技术。

作为可从 mRNA 展示技术得到的数据的实例，可以提及并讨论 WO01/96390。该申请对超过两百个分离的多核苷酸和相应的等量多肽、及其在 CRC 检测中的用途进行了说明并要求保护。然而，不能由相应蛋白水平来反映 mRNA 水平的差异，这是常识。由稀有 mRNA 编码的蛋白可能具有非常高的量，但是由丰富 mRNA 编码的蛋白可能根本难以检测和发现。mRNA 水平和蛋白水平之间相关性的缺乏归结于诸如 mRNA 稳定性、翻译效率、蛋白稳定性等原因。

也有最近研究不同组织之间或健康和疾病组织之间的蛋白模式差异的方法，以鉴定可能用于 CRC 诊断的候选标志分子。Brünagel, G.等人, *Cancer Research* 62 (2002) 2437-2442 鉴定了 7 个核基质蛋白，与邻近的正常组织比较，它们在 CRC 组织中看来更为丰富。尚无从个体的液体样品得到的数据报导。

WO 02/078636 报告了约 9 个经表面增强激光解吸和电离 (SELDI) 发现的结肠直肠癌相关点。与从健康对照获得的血清相比，在从 CRC 患者获得的血清中更频繁地见到这些点。然而，这些点中包括的分子的特性（例如其序列）还未知。

尽管 CRC 领域中候选蛋白标志的名单巨大且不断增长，但到此为止，这些分子的临床/诊断效用尚且未知。为了具有临床效用，作为单独标志的新的诊断标志应当至少与本领域已知的最佳单独标志一样好。或者，如果单独或分别与一个或多个其他标志联合使用，一个新的诊断标志应当引起诊断灵敏性和/或特异性的提高。通过检验的承受操作特性 (receiver-operating characteristics) 对其诊断灵敏性和/或特异性进行最佳评价，所述承受操作特性将在下面详细介绍。

目前，仅可利用建立在检测肿瘤相关糖蛋白癌胚抗原 (CEA) 基础上的诊断性血液检验来辅助 CRC 领域的诊断。从结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌和大部分乳腺癌、肺癌以及头部和颈部癌症患者得到的组织样品中，95% 的样品中 CEA 升高 (Goldenberg, D. M.等人, *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* 57 (1976) 11-22)。在非恶性疾病患者中也有过 CEA 水平升高的报导，而且许多结肠直肠癌患者具有正常的血清 CEA 水平，特别是在疾病的早期阶段 (Carriquiry, L. A., 和 Pineyro, A., *Dis. Colon Rectum* 42 (1999) 921-929; Herrera, M. A.

等人, *Ann. Surg.* 183 (1976) 5-9; Wanebo, H. J., 等人, *N. Engl. J. Med.* 299 (1978) 448-451)。从血清或血浆测量 CEA 在检测复发中的效用据报导是有争议的, 也未得到广泛应用 (Martell, R. E., 等人, *Int. J. Biol. Markers* 13 (1998) 145-149; Moertel, C. G.等人, *JAMA* 270 (1993) 943-947)。

根据现有数据, 血清 CEA 测定既不具有灵敏性也不具有特异性来使其用于无症状人群中结肠直肠癌的筛选检验 (Reynoso, G.等人, *JAMA* 220 (1972) 361-365; Sturgeon, C., *Clinical Chemistry* 48 (2002) 1151-1159)。

全血、血清或血浆是临床常规中最广泛使用的样品来源。对允许可靠的癌症检测或提供早期预后信息的早期 CRC 肿瘤标志的鉴定, 可以产生将大大帮助该疾病诊断和治疗的诊断性测定。因此, 存在急迫的临床需求来改进 CRC 由血液的诊断。由于早期诊断的患者的存活机会大大高于在疾病进展后期得到诊断的患者, 所以改进 CRC 的早期诊断尤其重要。

本发明的任务是研究是否可以鉴定能够帮助 CRC 诊断的新的标志。

令人惊讶的是, 已发现蛋白 MASP 的使用至少可以部分地克服从本领域技术水平已知的问题。

本发明因此涉及结肠直肠癌的诊断方法, 该方法包括步骤 a) 提供从个体获得的液体样品, b) 在适于 MASP 特异性结合试剂与 MASP 之间形成复合物的条件下, 将所述样品与所述结合试剂接触, 以及 c) 将 (b) 中形成的复合物的量与结肠直肠癌的诊断关联。优选的方法使用从个体获得的液体样品。

本发明另一个优选的实施方案是诊断结肠直肠癌的方法, 该方法包括步骤 a) 在适于 MASP 特异性结合试剂与 MASP 之间形成复合物的条件下, 将从个体获得的液体样品与所述结合试剂接触, 以及 b) 将 (a) 中形成的复合物的量与结肠直肠癌的诊断关联。

技术人员将认识到, 任何这样的诊断都是在体外进行的。其后将患者的样品丢弃。患者的样品仅仅用于本发明的体外诊断方法, 且不会将患者样品材料转移回患者体内。一般地, 所述样品是液体样品。

蛋白 MASP (乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂前体; Swiss-PROT:

P36952) 以 SEQ ID NO: 1 给出的序列为特征。克隆的人乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂 cDNA 编码 42-kDa 的蛋白, 其与丝氨酸蛋白酶抑制剂的蛋白酶抑制剂超家族共有同源性。免疫染色研究证实乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂发现于细胞外基中和质膜上 (Zou, Z. 等人, Science 263 (1994) 526-529)。

人 MASP 基因 (PI5 的 SERPINB5) 最初在其 mRNA 水平表达的基础上通过扣除杂交分离自正常哺乳动物上皮 (Zou 等人, 同上)。乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂在正常哺乳动物上皮细胞中表达, 但在大多数哺乳动物癌细胞系中表达。Zou 等人 (同上) 显示其表达降低了转化的细胞诱导肿瘤形成和转移的能力, 提示所述乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂基因编码肿瘤抑制剂。

Bass, R. 等人 (J. Biol. Chem. 277 (2002) 46845-46848) 表征了真核的乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂, 并发现它对任何测试的蛋白水解系统都没有蛋白酶抑制作用。但是, 它的确抑制肿瘤和血管平滑肌细胞的迁移。

Song, S.Y. 等人 (Digestive Diseases and Sciences 47 (2002) 1831-1835) 通过对来自腺瘤、腺癌和转移性腺癌的组织切片进行免疫组织化学染色, 研究了乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂在结肠癌中的表达。由 Song 等人 (同上) 发现的乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂的免疫反应性是细胞质的, 同时在核中有一些染色。超过 90% 的腺瘤、75% 的腺癌和 47% 的转移性癌组织切片对乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂染色呈阳性。该研究具有没有使用定量测定系统例如蛋白印迹分析的局限性。没有估计与邻近的正常结肠组织相比的表达水平。

对技术人员显而易见的是, 本发明不应该解释为局限于 SEQ ID NO:1 的全长蛋白 MASP。MASP 的生理或人工片段、MASP 的二级修饰以及 MASP 的等位基因变体也包括在本发明中。人工片段优选包括合成或由重组技术产生的肽, 该肽至少包括一个诊断性目的表位, 该表位由至少 6 个邻接的氨基酸组成, 这 6 个氨基酸衍生自 SEQ ID NO:1 公开的序列。这样的片段可以有利地用于抗体的产生, 或者作为免疫测定的标准物。人工片段更优选包括至少两个适于建立夹心免疫测定的目的表位。

在优选的实施方案中, 新标志 MASP 可以用于监控和筛选目的。

用于患者监控时,根据本发明的诊断方法有助于在患者随访中评价肿瘤负荷、治疗功效和肿瘤复发。MASP水平的升高与肿瘤负担直接相关。短期(数小时至14天)化学治疗后,MASP的增加可以作为肿瘤细胞死亡的指示物。在患者的随访中(3个月至10年),MASP的升高可以用作肿瘤复发的指示物。

在优选的实施方案中,根据本发明的诊断方法用于筛选目的。即,该方法通过测量MASP水平、并将测量的水平与是否存在CRC关联,用于评价没有先前CRC诊断的受试者。

结肠直肠癌最常由腺瘤(息肉)进展为恶性癌症。通常根据Dukes'氏病期A至D来分类CRC的不同病期。

癌症的分期是疾病关于程度、进展和严重性的分类。它将癌症患者分组从而可以对预后和选择治疗作出概括。

TNM系统是当前最广泛使用的癌症解剖学程度的分类。该系统代表国际接受的统一分期系统。它有三个基本变量:T(原发肿瘤的程度),N(局部淋巴结状态)以及M(是否出现远处转移)。TNM标准由UICC(International Union Against Cancer)出版(Sobin, L. H., Wittekind, Ch. (编), TNM Classification of Malignant Tumours, 第五版, 1997)。

特别重要的是,CRC的早期诊断能转化为好很多的预后。结肠直肠的恶性肿瘤起于良性肿瘤,即腺瘤。因此,在腺瘤病期诊断的患者具有最好的预后。在已经出现远处转移时诊断的患者仅有10%的五年生存率,与此相比,如果处理得当,在早至T_{is}、N₀、M₀或T₁₋₃; N₀; M₀病期诊断的患者,在诊断后具有90%以上的五年生存机会。

从本发明的理解,CRC的早期诊断指在癌前状态(腺瘤)或在完全没有转移(既非邻近的也非远处的)的肿瘤病期,即腺瘤、T_{is}、N₀、M₀或T₁₋₄; N₀; M₀存在的病期进行的诊断。T_{is}表示原位癌。

在优选的实施方案中,使用MASP在早至腺瘤病期诊断CRC。更优选在CRC尚未完全生长穿过肠壁时进行诊断,这样既没有脏体腔膜穿孔也没有其他器官或结构受侵,即,在T_{is}; N₀; M₀至T₃; N₀; M₀(=T_{is-3}; N₀; M₀)的任一个病期中作出诊断。

根据本发明的诊断方法建立在得自个体的液体样品的基础上。与本领域已知的方法不同,使用特异性结合试剂从该液体样品特异性地

测量 MASP。

特异性结合试剂为，例如，MASP 受体、结合 MASP 的凝集素或 MASP 抗体。特异性结合试剂对其相应的靶分子具有至少 10^7 l/mol 的亲合力。特异性结合试剂优选对其靶分子具有 10^8 l/mol 的亲合力，或甚至更优选 10^9 l/mol 的亲合力。技术人员将理解，使用术语“特异性的”表示样品中存在的其他生物分子不与 MASP 的特异性结合试剂发生显著的结合。优选地，与靶分子之外的生物分子结合的水平导致与靶分子亲和力的仅仅 10%，更优选仅仅 5% 或更低。最优选的特异性结合试剂将同时满足上述亲和力和特异性的最小标准。

10 特异性结合试剂优选是与 MASP 反应的抗体。术语抗体指多克隆抗体、单克隆抗体、这类抗体的片段、以及包括抗体结合结构域的遗传构建体。

术语抗体指多克隆抗体、单克隆抗体、这类抗体的片段、以及包括抗体结合结构域的遗传构建体。可以使用任何保留了特异性结合试剂的上述标准的抗体。使用现有技术方法产生抗体，例如 Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990) 全书，尤其 43-78 页；Elsevier, Amsterdam) 中所说明的。另外，熟练的技术人员充分认识到以免疫吸附剂为基础的方法可以用于抗体的特异性分离。使用这些方法，可以加强多克隆抗体的质量以及其在免疫测定中的性能 (Tijssen, P., 见上, 108-115 页)。

20 为达到在本发明中公开的成绩，使用在兔中产生的多克隆抗体。然而，显然也可以使用来自不同物种，例如大鼠或豚鼠的多克隆抗体，以及单克隆抗体。由于具有恒定特征的单克隆抗体能够以任何需要量产生，所以它们代表了临床常规测定开发中的理想工具。在根据
25 本发明的方法中，MASP 的单克隆抗体的产生和使用是另一个优选的实施方案。

技术人员现在将理解，MASP 已鉴定为用于 CRC 诊断的标志，可以使用可选的途径达到能够与本发明成绩相比的结果。例如，可以使用可选的策略产生抗体。这些策略其中包括使用合成肽，该肽为免疫呈递 MASP 表位。作为选择，可以使用 DNA 免疫，也称为 DNA
30 疫苗。

为了测量，在适于形成结合试剂 MASP-复合物的条件下，将从

个体获得的液体样品与 MASP 特异性结合试剂温育。由于不具有任何创造性努力的技术人员可以轻易地确定这类适宜的温育条件，所以这样的条件无需说明。

5 根据本发明公开的方法，作为最后步骤，测量复合物的量，并将其与 CRC 的诊断关联。技术人员将理解，测量特异性结合试剂 MASP-复合物量的大量方法都在有关教科书中得到详细说明（参阅，例如 Tijssen P., 见上，或 Diamandis 等人编(1996) *Immunoassay*, Academic Press, Boston）。

10 优选以夹心型测定形式检测 MASP。在这类测定中，使用第一个特异性结合试剂将 MASP 捕获于一侧，在另一侧使用第二个特异性结合试剂，该试剂经过标记，可以直接或间接检测。

如上所述，令人惊讶地发现可以在从个体样品获得的液体样品中测量 MASP。在 CRC 诊断中，不需要组织和活组织检查样品来应用标志 MASP。

15 在优选的实施方案中，以血清为液体样品材料，实施根据本发明的方法。

在另一个优选的实施方案中，以血浆为液体样品材料，实施根据本发明的方法。

20 在另一个优选的实施方案中，以全血为液体样品材料，实施根据本发明的方法。

另外，也可以使用技术人员已知的多种方法处理粪便产生液体样品。这些由粪便产生的液体样品也代表了根据本发明的优选实施方案。

25 尽管常规蛋白组学（proteomics）方法在组织样品的应用导致许多所选组织的潜在标志候选物的鉴定，但本发明的发明者可以令人惊讶地在体液样品中检测到蛋白 MASP。更惊讶的是，他们能够证实，从个体获得的液体样品中 MASP 的存在可以与结肠直肠癌诊断关联。

30 具有巨大优点的 MASP 抗体可以用于已经确定的程序中，例如，在原位、活组织检查或免疫组织程序中检测结肠直肠癌细胞。

MASP 抗体优选用于定性（有无 MASP 存在）或定量（确定 MASP 量）免疫测定中。

已证明测量蛋白 MASP 水平在 CRC 领域中非常有利。因此，在另一个优选的实施方案中，本发明涉及在获得自个体的液体样品的结肠直肠癌诊断中，使用蛋白 MASP 作为标志分子。

术语标志分子用于指示，从个体体液测量的提高的分析物 MASP 水平标志着 CRC 的存在。

特别优选在结肠直肠癌的早期诊断中使用新标志 MASP。

蛋白 MASP 的使用本身代表了充满挑战的 CRC 诊断领域的重大进展。将 MASP 与其他已知的标志例如 CEA、或其他有待发现的 CRC 标志的测量联合，引起了更深远的进步。因此，在另一个优选的实施方案中，本发明涉及从获得自个体的液体样品的结肠直肠癌诊断中，与一种或多种结肠直肠癌标志分子联合来使用 MASP 作为结肠直肠癌标志分子。在这一点上，表述“一种或多种”指 1-10，优选 1-5，更优选 3。可以与 MASP 的测量联合的其他优选 CRC 标志为 CEA、CA 19-9、CA 72-4 和/或 CA 242。因而，本发明非常优选的实施方案是从获得自个体的液体样品的结肠直肠癌诊断中，与一种或多种结肠直肠癌标志分子联合来使用蛋白 MASP 作为结肠直肠癌标志分子，其中至少一种其他标志分子选自 CEA、CA 19-9、CA 72-4 和 CA 242。

在诸如免疫测定的特异性结合测定领域中，诊断试剂通常最好以试剂盒形式提供，试剂盒包括特异性结合试剂和实施该测定需要的辅助试剂。本发明因此也涉及免疫学试剂盒，其包括至少一种 MASP 特异性结合试剂以及 MASP 测量的辅助试剂。

测试的精确性最好由其承受操作特性 (ROC) 说明 (特别见 Zweig, M. H. 和 Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577)。ROC 曲线图是在整个观察数据范围内连续变化决定阈值 (decision thresh-hold) 产生的所有灵敏性/特异性对的图。

实验室检验的临床性能依赖于其诊断精确性、或将受试者正确分类为临床相关亚群的能力。诊断精确性衡量了检验将研究的受试者的两种不同状况正确区分的能力。这类状况为例如健康和疾病或良性对恶性疾病。

在每个病例中，ROC 图通过在决定阈值的全部范围将灵敏性对 1-特异性作图，描述了两种分布之间的重叠。在 y 轴上是灵敏性或真阳性分数 [定义为 (真阳性试验结果数) / (真阳性数 + 假阴性试验结

果数)]。它也指疾病或状况存在的确定性。它从受影响的亚群单独计算。在 x 轴上是假阳性分数或 1-特异性[定义为 (假阳性结果数) / (真阴性数+假阳性结果数)]。它是特异性的指标, 并完全从未受影响的亚群计算。因为使用两个不同亚群的检验结果, 完全独立地计算真和假阳性分数, 所以 ROC 图不依赖于样品中疾病的流行率。ROC 上的每点代表对应于特定决定阈值的灵敏性/特异性对。具有最佳辨别力的检验(在结果的两个分布中没有重叠)具有经过左上角的 ROC 图, 在左上角, 真阳性分数为 1.0, 或者 100% (理想的灵敏性), 且假阳性分数为 0 (理想的特异性)。没有辨别力的检验的理论图(两组结果的同样分布)为从左下角至右上角的 45° 对角线。大多图介于这两个极端之间。(如果 ROC 图完全落在 45° 对角线之下, 则容易通过将“确定性”标准从“高于”反转为“低于”来矫正这种情况, 反之亦然。)从定性上, 图越接近左上角, 检验的总精确度就越高。

定量实验室检验诊断精确度的一个方便的目标是通过单独的数字表达其性能。最普通的全面测量是 ROC 图下的面积。按照惯例, 该面积总是 ≥ 0.5 (如果不是, 可以反转决定规则使其 ≥ 0.5)。值在 1.0 (两组检验值的理想分离) 和 0.5 (在两组检验值之间没有明显的分布差异) 之间变化。该面积不仅依赖于该图的特定部分, 例如最接近对角线的点或在 90% 特异性的灵敏性, 也依赖于全图。这是对 ROC 图有多么接近理想 ROC 图 (面积=1.0) 的定量的说明性表达。

使用承受操作曲线分析 (ROC; Zweig, M. H., 以及 Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577), 与确定的标志 CEA 比较并与其联合, 评价新标志 MASP 的临床效用。该分析以由 50 个样品组成的明确患者群组为基础, 其中各个样品分别来自 T1-3; N0; M0、进展更晚期的肿瘤即 T4 和/或不同严重性的转移 (N+和/或 M+) 的患者, 以及健康对照。

经曲线下面积证明, 建立在单独测量 MASP 基础上的诊断方法具有的诊断精确度 (灵敏性/特异性特征), 至少与确定的单独标志 CEA 相比一样好。

提供下列实施例、参考文献、序列表和附图以帮助对本发明的理解, 其真实范围于附加的权利要求中提出。应当理解, 可以在不偏离本发明精神的情况下, 在提出的方法中进行修饰。

附图说明

图1 图1显示以肿瘤样品上样的2D-凝胶(左侧)、以匹配的获得自邻近的健康粘膜层的对照样品上样的凝胶(右侧)的典型实例。MASP的表观分子量和等电点分别相应为理论值约46 kDA和5.98。这些凝胶放大部分的圆形指示蛋白MASP的位置。在健康粘膜层中,以同样的方法不能检测到该蛋白。

图2 图2显示蛋白印迹的典型实例。凝胶以来自结肠直肠肿瘤组织和邻近的健康对照组织的组织裂解物上样,所述组织来自4个患者(受试者36:直肠癌, Dukes B; 受试者37:直肠癌, Dukes A; 受试者39:结肠癌, Dukes A; 以及受试者40:结肠癌, Dukes B)。使用多克隆兔抗-MASP血清检测样品中MASP的存在。以“T”指示含有肿瘤裂解物的泳道,以“N”指示含有正常对照组织的泳道。以“Ma”指示含有分子量蛋白标准物的标志泳道。以“300”、“1000”和“3000”指示含有不同浓度所重组MASP的泳道。箭标指示MASP条带在凝胶中的位置。所有肿瘤样品在MASP位置给以强信号,而来自邻近的正常对照组织的裂解物中只能检测到弱信号。在13个检验的受试者中,13个显示结肠直肠癌患者肿瘤组织中MASP的强烈超表达。

20

缩写

ABTS	2,2'-叠氮基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐
BSA	牛血清清蛋白
cDNA	互补DNA
25 CHAPS	(3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲氨基]-1-丙磺酸盐)
DMSO	二甲亚砷
DTT	二硫苏糖醇
EDTA	乙二胺四乙酸
ELISA	酶联免疫吸附测定
30 HRP	辣根过氧化物酶
IAA	碘乙酰胺
IgG	免疫球蛋白G

	IEF	等电聚焦
	IPG	固定 pH 梯度
	LDS	十二烷基硫酸锂
	MALDI-TOF	基质辅助的激光解吸/电离-飞行时间质谱
5	MES	莱基, 2,4,6-三甲苯基
	OD	光密度
	PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
	PBS	磷酸缓冲盐水
	PI	等电点
10	RTS	快速翻译体系
	SDS	十二烷基硫酸钠

实施例 1

MASP 作为可能的结肠直肠癌标志的鉴定

15 组织来源

为了鉴定作为可能的结肠直肠癌诊断标志的肿瘤特异性蛋白, 使用蛋白质组学方法进行三种不同种类组织的分析。

20 总共分析来自 10 个患有结肠直肠癌的患者的组织样品。以治疗性切除术从各个患者收集三种不同的组织类型: 肿瘤组织 (>80% 肿瘤) (T)、邻近的健康组织 (N) 和由邻近的健康粘膜层剥除的粘膜层 (M)。后两种组织类型作为匹配的健康对照样品。组织在切除后立即冰冻, 并在处理前保存于 -80℃。肿瘤经组织病理学标准诊断。

组织制备

25 将 0.8-1.2 g 冰冻组织置于研钵并以液氮完全冰冻。将组织在研钵中粉碎, 于 10 倍体积 (w/v) 的裂解缓冲液 (40 mM 柠檬酸钠, 5 mM MgCl₂, 1% Genapol X-080, 0.02% 叠氮化钠, Complete[®] EDTA-free [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国, Cat. No. 1 873 580]) 中溶解, 随后在 Wheaton[®] 玻璃匀浆器中匀浆 (20x 松配合, 20x 紧配合)。将 3 ml 匀浆物以 4500 × g 进行蔗糖密度离心 (10-60% 蔗

30 糖) 1 小时。离心步骤后获得三个级分。梯度顶端的级分含有可溶性蛋白, 用于进一步分析。

等电聚焦 (IEF) 及 SDS-PAGE

对于 IEF, 将 3 ml 悬液与 12 ml 样品缓冲液 (7 M 尿素, 2 M 硫脲, 2% CHAPS, 0.4% IPG 缓冲液 pH 4-7, 0.5% DTT) 混合, 温育 1 小时。在 Amicon[®] Ultra-15 装置 (Millipore GmbH, Schwalbach, 德国) 中浓缩样品, 使用 Bio-Rad[®] 蛋白测定 (Cat. No. 500-0006; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, 德国) 按照厂商手册说明测定蛋白浓度。对于相当于 1.5 mg 的蛋白的体积, 添加样品缓冲液至 350 μ l 终体积。使用该溶液将 IPG 条 pH 4-7 (Amersham Biosciences, Freiburg, 德国) 再水化过夜。使用下列梯度方案进行 IEF: 1.) 1 分钟至 500 V; 2.) 2 小时至 3500 V; 3.) 22 小时恒定于 3500 V, 使发生 82 kVh。IEF 后, 将条保存于 -80 $^{\circ}$ C, 或直接用于 SDS-PAGE。

SDS-PAGE 之前, 条在平衡缓冲液 (6 M 尿素, 50 mM Tris/HCl, pH 8.8, 30% 甘油, 2% SDS) 中温育, 添加 DDT (15 分钟, +50 mg DTT/10 ml) 以还原, 添加 IAA (15 分钟, +235 mg 碘乙酰胺/10 ml) 以烷基化。将条置于 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶上, 以 1 W/凝胶电泳 1 小时, 其后以 17 W/凝胶进行电泳。随后, 将凝胶固定 (50% 甲醇, 10% 醋酸盐) 并以 Novex[™] Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen, Karlsruhe, 德国, Cat No. LC6025, 45-7101) 染色过夜。

MASP 作为可能的结肠直肠癌标志的检测

使用 ProteomeWeaver[®] 软件 (Definiens AG, 德国, München) 通过影像分析分别分析各个患者。另外, 使用采集自动机械切割凝胶上所有的点, 使用 MALDI-TOF 质谱 (Ultraflex[™] Tof/Tof, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, 德国) 鉴定点中存在的蛋白。对于每个患者, 将肿瘤样品的 4 块凝胶与邻近的正常和剥除的粘膜层组织的 4 块凝胶比较, 分析相应于差异表达蛋白的不同点。使用这种方法, 发现蛋白 MASP 在肿瘤组织中特异地表达或强烈超表达, 在健康对照组织中不可检测或强度较低地表达。因此, 在其他许多蛋白中, MASP 取得用于结肠直肠癌诊断的候选标志的资格。

30 实施例 2

结肠直肠癌标志蛋白 MASP 抗体的产生

产生结肠直肠癌标志蛋白 MASP 的多克隆抗体用于抗体在进一

步测量 MASP 的血清和血浆和全血水平中的用途，测量使用免疫检测测定，例如蛋白印迹和 ELISA。

大肠杆菌 (E. coli) 中的重组蛋白表达

为了产生 MASP 抗体，进行该蛋白的重组表达以获得免疫原。

- 5 结合使用 RTS 100 表达系统和大肠杆菌进行表达。第一步，分析 DNA 序列，并使用“ProteoExpert RTS E. coli HY”系统获得高产量 cDNA 沉默突变变体推荐和各自的 PCR 引物序列。该系统是以网络为基础的商业服务 (www. proteoexpert. com)。使用推荐的引物对，利用
- 10 “RTS 100 E. coli Linear Template Generation Set, His-tag” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国, Cat. No. 3186237) 系统，从 cDNA 产生线性 PCR 模板，并用于编码 MASP 蛋白的核苷酸序列的体外转录和表达。对于蛋白印迹检测和随后的纯化，表达的蛋白含有 His-标志。鉴定最佳的表达变体。根据厂商说明执行从 PCR 到表达和检测的所有步骤。根据厂商说明，将各自的 PCR 产物克隆到 pBAD
- 15 TOPO[®]载体 (Invitrogen, Karlsruhe, 德国, Cat. No. K 4300/01) 中，PCR 产物含有所有必需的 T7 调节区域 (启动子、核糖体结合位点和 T7 终止子)。对于使用 T7 调节序列的表达，将构建体转化到大肠杆菌 BL 21 (DE 3) 中 (Studier, F. W.等人, Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89)，分批培养转化的细菌以表达蛋白，每批 1L。

- 20 按照标准程序在 Ni 螯合柱上进行 His-MASP 融合蛋白的纯化。简要地说，通过离心将 1 L 含有 His-MASP 融合蛋白表达载体的细菌培养物沉淀。在裂解缓冲液中将细胞沉淀重悬，随后使用 Ultra-Turrax[®]匀浆，所述裂解缓冲液中含有磷酸盐，pH 8.0，7 M 氯化胍，咪唑和硫甘油。通过高速离心使不溶材料沉淀，将上清液应用于 Ni
- 25 螯合层析柱。使用数个柱床体积的裂解缓冲液洗涤柱子，随后使用含有磷酸盐，pH 8.0 和尿素的缓冲液洗涤。最后，在酸性条件下，使用含有 SDS 的磷酸盐缓冲液洗脱结合的抗原。

抗 MASP 单克隆抗体的生产

a) 小鼠的免疫

- 30 使用 100 μ g MASP 腹膜内初次免疫 12 周龄 A/J 小鼠。初次免疫六周后继之以另外两次腹膜内免疫，这两次免疫间隔一个月。在此过程中，向每只小鼠施用吸附至氢氧化铝的 100 μ g MASP、以及 10^9 个

百日咳博德特氏菌 (*Bordetella pertussis*)。随后,在融合前第三和第二
5 天,每只小鼠使用 100 μg MASP 的 PBS 缓冲液溶液静脉内进行最后
两次免疫。

b) 融合与克隆

5 将根据 a) 免疫的小鼠脾细胞与根据 Galfre, G. 和 Milstein, C.,
Methods in Enzymology 73 (1981) 3-46 的骨髓瘤细胞融合。在此过
程中,将约 1×10^8 个免疫小鼠脾细胞与 2×10^7 个骨髓瘤细胞
(P3X63-Ag8-653, ATCC CRL1580) 混合并离心(10 分钟, 300 g,
10 4 $^{\circ}\text{C}$)。以不含胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养基将细胞洗涤一
次,在 50 ml 锥形管中于 400 g 再次离心。弃上清液,轻敲以温和地
松散细胞沉淀,经吸液添加并混合 1 ml PEG (分子量 4000, Merck,
Darmstadt)。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 分钟后,于室温在 4-5 分钟时间段内滴
加 5 ml 不含 FCS 的 RPMI 1640。然后在大约 1 分钟内滴加 5 ml 含有
15 10% FCS 的 RPMI 1640,充分混合,以培养基(RPMI 1640+10%
FCS)填充至 50 ml,随后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 以 $400 \times g$ 离心 10 分钟。将沉淀的细
胞置于含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中,接种于次黄嘌呤-重氮
丝氨酸选择培养基(100 mmol/l 次黄嘌呤, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 重氮丝氨酸于
RPMI 1640+10% FCS 中)。白细胞介素 6 作为生长因子以 100 U/ml
添加于培养基中。

20 约 10 天后,将原代培养物对特异性抗体进行检验。使用荧光激
活细胞分选仪将 MASP 阳性原代培养物克隆到 96 孔细胞培养板中。
在此过程中,白细胞介素 6 再次作为生长添加剂以 100 U/ml 添加于
培养基中。

c) 从细胞培养上清液中分离免疫球蛋白

25 获得的杂交瘤细胞以每毫升含有 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基
中 1×10^5 个细胞的密度接种,并于发酵罐中增殖 7 天(Thermodux
Co., Wertheim/Main, Model MCS-104XL, Order No. 144-050)。
在培养物上清液中获得平均浓度为每毫升 100 μg 的单克隆抗体。使
用蛋白化学中的常规方法(例如根据 Bruck, C. 等人, *Methods in*
30 *Enzymology* 121 (1986) 587-695) 进行该抗体从培养物上清液中的
纯化。

多克隆抗体的产生

a) 免疫

为了免疫，以 1:1 比例制备蛋白溶液（100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白 MASP）和完全弗氏佐剂的新鲜乳剂。在 1、7、14 和 30、60 和 90 天以 1 ml 乳剂免疫各兔。吸出血液，将产生的抗 MASP 血清用于实施例 3 和 4 中说明的进一步实验。

b) 使用辛酸和硫酸铵依次沉淀（sequential precipitation）从兔血清纯化 IgG（免疫球蛋白 G）

以 4 体积醋酸盐缓冲液（60 mM, pH 4.0）稀释 1 体积兔血清。以 2 M Tris 碱调节 pH 至 4.5。在剧烈搅动下滴加辛酸（25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 稀释样品）。30 分钟后，将样品离心（13 000 $\times g$, 30 分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$ ），弃沉淀，收集上清液。通过添加 2 M Tris 碱将上清液 pH 调节至 7.5 并过滤（0.2 μm ）。

通过在剧烈搅动下滴加 4M 硫酸铵至 2 M 的终浓度，将上清液中的免疫球蛋白沉淀。通过离心收集沉淀的免疫球蛋白（8000 $\times g$, 15 分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$ ）。

弃上清液。以 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7.5, 30 mM NaCl 溶解沉淀并彻底透析。将透析液离心（13 000 $\times g$, 15 分钟, 4 $^{\circ}\text{C}$ ）并过滤（0.2 μm ）。

多克隆兔 IgG 的生物素化

在 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7.5, 30 mM NaCl 中制备 10 mg/ml 多克隆兔 IgG。每毫升 IgG 溶液添加 50 μl 生物素-N-羟基琥珀酰亚胺（3.6 mg/ml 于 DMSO 中）。于室温 30 分钟后，将样品在 Superdex 200（10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7.5, 30 mM NaCl）上层析。收集含有生物素化 IgG 的级分。根据相同程序将单克隆抗体生物素化。

多克隆兔 IgG 的洋地黄毒苷化（Digoxigenylation）

在 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, 30 mM NaCl, pH 7.5 中制备 10 mg/ml 多克隆兔 IgG。每毫升 IgG 溶液添加 50 μl 洋地黄毒苷-3-O-甲基羰基- ϵ -氨基己酸-N-羟基琥珀酰亚胺酯（Roche Diagnostics, Mannheim, 德国, Cat. No. 1 333 054）（3.8 mg/ml 于 DMSO 中）。于室温 30 分钟后，将样品在 Superdex[®] 200（10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7.5, 30 mM NaCl）上层析。收集含有洋地黄毒苷化的 IgG 的级分。根据相同程序将单克隆抗体以洋地黄毒苷标记。

实施例 3

利用实施例 2 中产生的多克隆抗体检测人结肠直肠癌组织中 MASP 的蛋白印迹

5 如实施例 1 中“组织制备”所说明的，制备肿瘤样品和健康对照样品的组织裂解物。

使用 Invitrogen, Karlsruhe, 德国的试剂和设备进行 SDS-PAGE 和蛋白印迹。对于每个检验的组织样品，在还原 NuPAGE[®] (Invitrogen) SDS 样品缓冲液中稀释 10 μ g 组织裂解物，并于 95 $^{\circ}$ C 10 加热 10 分钟。在 MES 运行缓冲系统中的 4-12% NuPAGE[®] 凝胶 (Tris-Glycine) 上运行样品。使用 Invitrogen XCell IITM Blot Module (Invitrogen) 和 NuPAGE[®] 转移缓冲系统将凝胶分离的蛋白混合物印迹于硝化纤维素膜上。于 PBS/0.05% Tween-20 中将膜洗涤 3 次，并以 Roti[®]-Block 封闭缓冲液 (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, 15 德国) 封闭 2 小时。将第一抗体多克隆兔抗 MASP 血清 (根据实施例 2 中说明产生) 以 1:10 000 稀释于 Roti[®]-Block 封闭缓冲液中，并与膜温育 1 小时。在 PBS/0.05% Tween-20 中将膜洗涤 6 次。使用 POD 缀合的多克隆绵羊抗兔 IgG 抗体标记特异性结合的兔第一抗体，POD 缀合的多克隆绵羊抗兔 IgG 抗体以 0.5 \times Roti[®]-Block 封闭缓冲液稀释 20 至 10 mU/ml。温育 1 小时后，在 PBS/0.05% Tween-20 中将膜洗涤 6 次。为了检测结合的 POD 缀合的抗兔抗体，将膜与 Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate (Order-No. 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国) 温育，并曝光于放射自显影胶片。

25 实施例 4

测量人血清和血浆样品中 MASP 的 ELISA

为了检测人血清或血浆中的 MASP，开发了夹心法 ELISA。为了捕获和检测抗原，分别使用生物素和洋地黄毒苷缀合等分试样的抗 MASP 多克隆抗体 (见实施例 2)。

30 将链霉抗生素蛋白包被的 96 孔微孔滴定板与 100 μ l 生物素化的抗 MASP 多克隆抗体温育 60 分钟，生物素化的抗 MASP 多克隆抗体以 10 μ g/ml 溶于 10 mM 磷酸盐，pH 7.4，1% BSA，0.9% NaCl 和

0.1% Tween-20 中。温育后，以 0.9% NaCl, 0.1% Tween 20 将板洗涤 3 次。然后，将孔与作为标准抗原的重组蛋白（见实施例 2）的连续稀释液或稀释的患者血浆样品温育 2 小时。MASP 结合后，使用 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20 将板洗涤 3 次。为了结合的 MASP 的特异性检测，将孔与 100 μ l 洋地黄毒苷化抗 MASP 多克隆抗体温育 60 分钟，洋地黄毒苷化抗 MASP 多克隆抗体以 10 μ g/ml 溶于 10 mM 磷酸盐，pH 7.4, 1% BSA, 0.9% NaCl 和 0.1% Tween-20 中。此后，将板洗涤 3 次以去除未结合的抗体。在下一步中，将孔与 20 mU/ml 抗洋地黄毒苷-POD 缀合物（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国, Catalog No. 1633716）温育 60 分钟，抗洋地黄毒苷-POD 缀合物溶于 10 mM 磷酸盐，pH 7.4, 1% BSA, 0.9% NaCl 和 0.1% Tween-20 中。随后使用相同缓冲液将板洗涤 3 次。为了检测抗原-抗体复合物，将孔与 100 μ l ABTS 溶液（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 德国, Catalog No. 11685767）温育，并于 30-60 分钟后使用 ELISA 读出器（ELISA reader）在 405 nm 测量 OD。

实施例 5:

根据诊断精确度评价临床效用的 ROC 分析

通过分析从充分表征的患者群组获得的个体液体样品评价精确度，即，分别为 50 个经历结肠镜检查并发现没有腺瘤或 CRC 的患者；50 个诊断并分期为 CRC T_{is}-3、N0、M0 的患者；以及 50 个诊断为进展后期 CRC 的患者，其具有肿瘤浸润于至少一个邻近淋巴结、或更严重形式的转移。使用商业供应的测定（Roche Diagnostics, CEA-assay (Cat. No. 1 173 1629 用于 Elecsys[®] Systems 免疫测定分析仪) 测量的 CEA，以及如上说明测量的 MASP，在从这些个体的每一个中获得的血清中得到定量。根据 Zweig, M. H., 和 Campbell, 如上，进行 ROC 分析。经曲线下面积测量发现，对于 MASP，将 T_{is}-3、N0、M0 组的患者与健康个体区分分辨力至少与确定的标志 CEA 相比一样好。

初步数据显示，MASP 也可能用于外科手术患者的随访。

参考文献表

- Ahlquist, D.A., *Gastroenterol. Clin. North Am.* 26 (1997) 41-55
- Anderson, W.F., et al., *J. Natl. Cancer Institute* 94 (2002) 1126-1133
- Bass, R., et al., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46845-46848
- Bruck, C., et al., *Methods Enzymol.* 121 (1986) 587-695
- Brünagel, G., et al., *Cancer Research* 62 (2002) 2437-2442
- Carriquiry, L.A., and Pineyro, A., *Dis. Colon Rectum* 42 (1999) 921-929
- Diamandis, et al., eds. (1996) *Immunoassay*, Academic Press, Boston.
- Galfre, G., and Milstein, C., *Methods Enzymol.* 73 (1981) 3-46
- Geenen, J.E., et al., *Am. J. Dig. Dis.* 20 (1975) 231-235
- Goldenberg, D.M., et al., *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)* 57 (1976) 11-22
- Herrera, M.A., et al., *Ann. Surg.* 183 (1976) 5-9
- Martell, R.E., et al., *Int. J. Biol. Markers* 13 (1998) 145-149
- Moertel, C.G., et al., *JAMA* 270 (1993) 943-947
- Reynoso, G., et al., *JAMA* 220 (1972) 361-365
- Silvis, S.E., et al., *JAMA* 235 (1976) 928-930
- Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds), *TNM Classification of Malignant Tumours*, fifth edition, 1997
- Song, S.Y., et al., *Digestive Diseases and Sciences* 47 (2002) 1831-1835
- Studier, F.W., et al., *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60-89
- Sturgeon, C., *Clinical Chemistry* 48 (2002) 1151-1159
- Tijssen, P., *Practice and theory of enzyme immunoassays* 11 (1990) the whole book, especially pages 43-78; Elsevier, Amsterdam
- UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds), *TNM Classification of Malignant Tumours*, fifth edition, 1997
- Wanebo, H.J., et al., *N. Engl. J. Med.* 299 (1978) 448-451
- WO 01/96390
- WO 02/078636
- Zou, Z., et al., *Science* 263 (1994) 526-529
- Zweig, M. H., and Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> 蛋白 MASP 作为结肠直肠癌标志的用途

<130> 21767

<150> EP 03011158.7

<151> 2003-05-26

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 375

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> 乳腺丝氨酸蛋白酶抑制剂前体; Swiss-PROT: P36952

<400> 1

Met Asp Ala Leu Gln Leu Ala Asn Ser Ala Phe Ala Val Asp Leu Phe
1 5 10 15

Lys Gln Leu Cys Glu Lys Glu Pro Leu Gly Asn Val Leu Phe Ser Pro
 20 25 30

Ile Cys Leu Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ala Gln Val Gly Ala Lys Gly
 35 40 45

Asp Thr Ala Asn Glu Ile Gly Gln Val Leu His Phe Glu Asn Val Lys
 50 55 60

Thr Gly Leu Glu Lys Ile Glu Lys Gln Leu Asn Ser Glu Ser Leu Ser
 245 250 255

Gln Trp Thr Asn Pro Ser Thr Met Ala Asn Ala Lys Val Lys Leu Ser
 260 265 270

Ile Pro Lys Phe Lys Val Glu Lys Met Ile Asp Pro Lys Ala Cys Leu
 275 280 285

Glu Asn Leu Gly Leu Lys His Ile Phe Ser Glu Asp Thr Ser Asp Phe
 290 295 300

Ser Gly Met Ser Glu Thr Lys Gly Val Ala Leu Ser Asn Val Ile His
 305 310 315 320

Lys Val Cys Leu Glu Ile Thr Glu Asp Gly Gly Asp Ser Ile Glu Val
 325 330 335

Pro Gly Ala Arg Ile Leu Gln His Lys Asp Glu Leu Asn Ala Asp His
 340 345 350

Pro Phe Ile Tyr Ile Ile Arg His Asn Lys Thr Arg Asn Ile Ile Phe
 355 360 365

Phe Gly Lys Phe Cys Ser Pro
 370 375

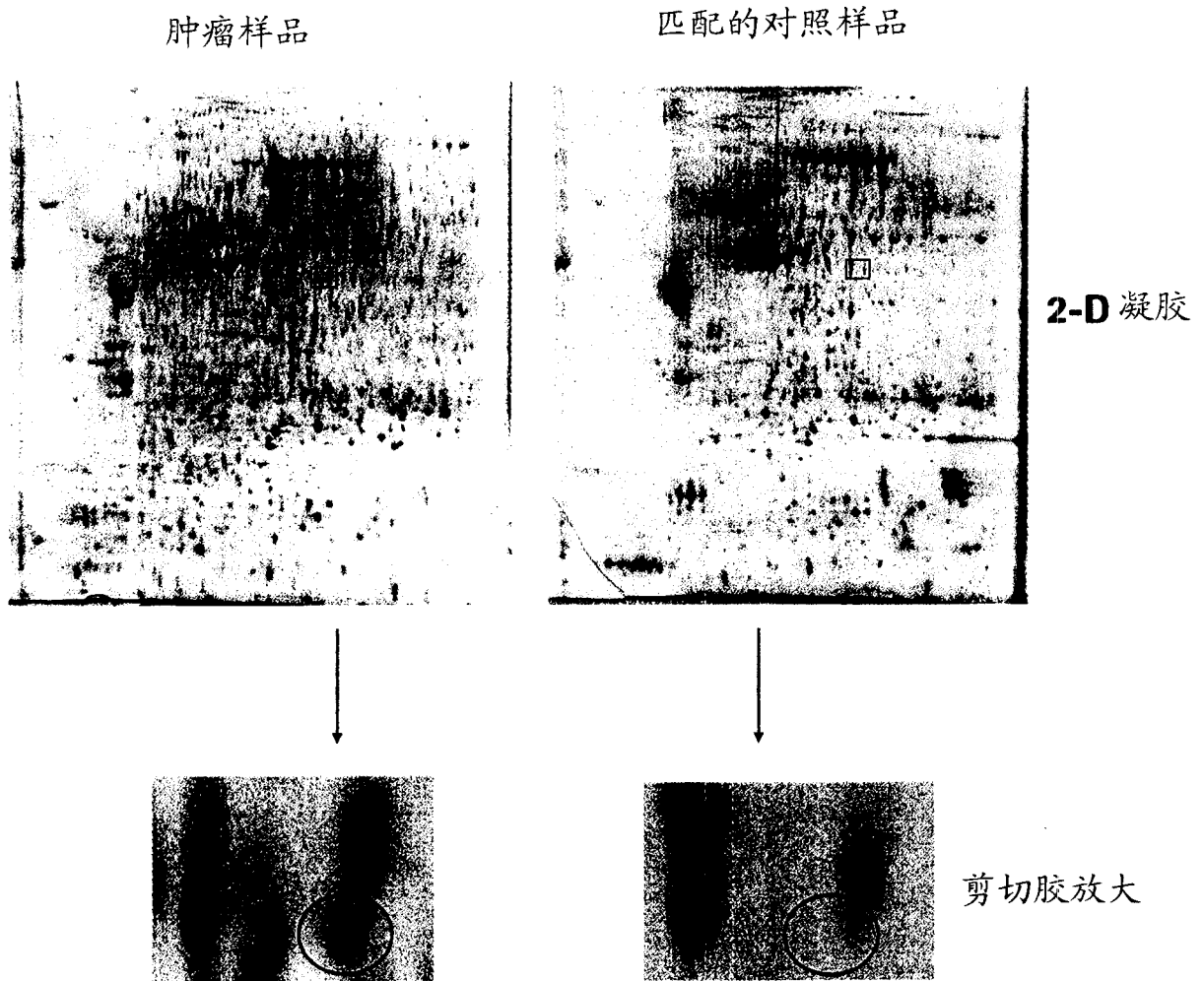


图 1

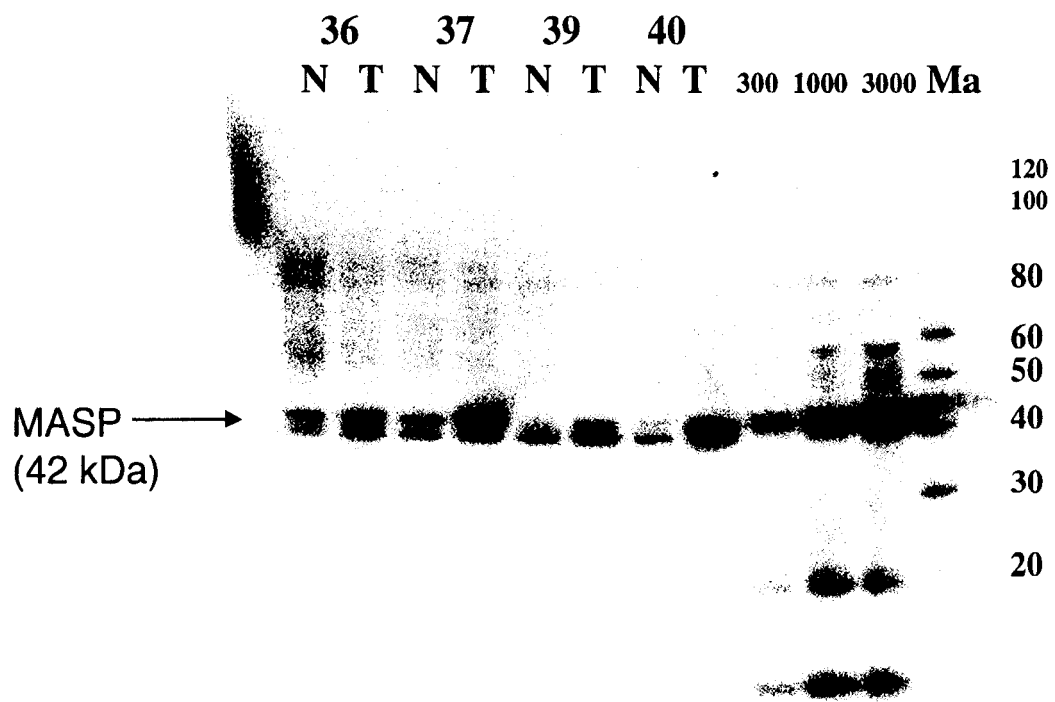


图 2

专利名称(译)	蛋白MASP作为结肠直肠癌标志的用途		
公开(公告)号	CN1795385A	公开(公告)日	2006-06-28
申请号	CN200480014319.4	申请日	2004-05-25
申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	霍夫曼-拉罗奇有限公司		
[标]发明人	P伯恩德特 M L哈格曼 H朗根 S帕尔姆 M勒斯勒 W罗林格尔 M塔克 W措尔格 J卡尔		
发明人	P·伯恩德特 M· - L·哈格曼 H·朗根 S·帕尔姆 M·勒斯勒 W·罗林格尔 M·塔克 W·措尔格 J·卡尔		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/536		
CPC分类号	G01N2333/8107 G01N33/57419 G01N2800/52		
代理人(译)	王景朝		
优先权	2003011158 2003-05-26 EP		
其他公开文献	CN100504393C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及结肠直肠癌的诊断。它公开了蛋白MASP在结肠直肠癌诊断中的用途。它涉及从来自个体的液体样品诊断结肠直肠癌的方法，该方法通过测量所述样品中的MASP进行诊断。MASP的测量可以用于例如结肠直肠癌的早期检测或诊断。

