

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200880015574.9

[43] 公开日 2010 年 3 月 24 日

[11] 公开号 CN 101680898A

[22] 申请日 2008.5.7

[21] 申请号 200880015574.9

[30] 优先权

[32] 2007.5.10 [33] EP [31] 07009396.8

[86] 国际申请 PCT/EP2008/003642 2008.5.7

[87] 国际公布 WO2008/138522 英 2008.11.20

[85] 进入国家阶段日期 2009.11.10

[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 W·罗林杰 H·安德烈斯

U·加查雷克 A·盖斯坦杰

P·海斯 J·卡尔 F·克劳斯

N·威尔德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 林毅斌 黄可峻

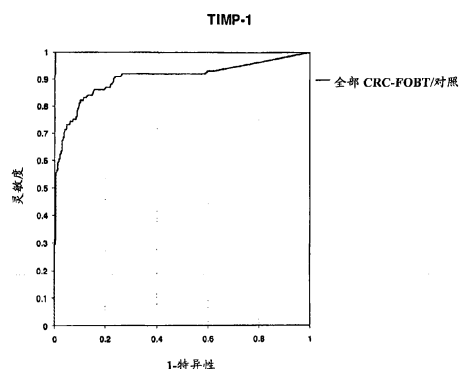
权利要求书 2 页 说明书 26 页 序列表 2 页
附图 1 页

[54] 发明名称

TIMP-1 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诊断。其公开了蛋白 TIMP-1 (= 组织金属蛋白酶抑制剂 1) 作为标志分子在结肠直肠癌诊断中的用途。本发明涉及从来源于个体的粪便样本中诊断结肠直肠癌的方法, 即通过测定所述样本中的 TIMP-1 来进行。对 TIMP-1 的测定, 例如可用于结肠直肠癌的早期检测或诊断。



1. 用于结肠直肠癌诊断的方法，所述方法包括以下步骤：
 - a) 提供从个体获取的粪便样本，
 - b) 使所述样本与针对 TIMP-1 的特异性结合剂在适于所述结合剂和 TIMP-1 间形成复合体的条件下接触，
 - c) 测定步骤(b)中形成的复合体的量，和
 - d) 将形成的复合体的量同结肠直肠癌诊断相关联。
2. 用于结肠直肠癌诊断的方法，所述方法包括以下步骤：
 - a) 提供从个体获取的粪便样本，
 - b) 使所述样本与针对 TIMP-1 的特异性结合剂在适于所述结合剂和 TIMP-1 间形成复合体的条件下接触，
 - c) 使所述样本与针对第二标志的特异性结合剂在适于所述结合剂和第二标志间形成复合体的条件下接触，所述第二标志选自：血红蛋白/触珠蛋白复合体、血红蛋白、钙防卫蛋白和肿瘤 M2 丙酮酸激酶 (M2-PK)，
 - d) 测定步骤(b)和(c)中形成的复合体的量，和
 - e) 将步骤(b)和(c)中形成的复合体的量同结肠直肠癌诊断相关联。
3. 权利要求 2 的方法，其中所述第二标志是血红蛋白。
4. 权利要求 2 的方法，其中所述第二标志是血红蛋白/触珠蛋白复合体。
5. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中用提取缓冲液处理所述粪便样本，并且从所述经处理的粪便样本中特异性检测 TIMP-1。
6. 权利要求 1-5 中任一项的方法，其中在提供粪便样本的步骤中，使用含有提取缓冲液的粪便采集装置。
7. 权利要求 1-6 中任一项的方法，其中所述特异性结合剂是抗体。
8. 蛋白 TIMP-1 作为标志分子在从取自个体的粪便样本中诊断结

肠直肠癌中的用途。

9. 蛋白 TIMP-1 作为标志分子在从取自个体的粪便样本中早期诊断结肠直肠癌中的用途。

10. 蛋白 TIMP-1 的以下用途：作为结肠直肠癌标志分子与一种或多种其它结肠直肠癌标志分子联合用于从取自个体的粪便样本中诊断结肠直肠癌，所述其它结肠直肠癌标志分子选自：血红蛋白/触珠蛋白复合体、血红蛋白、钙防卫蛋白和肿瘤 M2 丙酮酸激酶(M2-PK)。

TIMP-1 作为结肠直肠癌标志的用途

本发明涉及结肠直肠癌诊断。其公开了蛋白 TIMP-1(=组织金属蛋白酶抑制剂 1)作为标志分子在结肠直肠癌诊断中的用途。此外,本发明特别涉及从来源于个体的粪便样本中诊断结肠直肠癌的方法,即通过测定所述样本中的 TIMP-1 来进行。对 TIMP-1 的测定,例如可用于结肠直肠癌的早期检测或诊断。

虽然在癌症的检测和治疗方面取得进展,但癌症仍然是主要的公众健康难题。在各种类型的癌症中,结肠直肠癌(= CRC)是西方世界最常见的癌症之一。

能在越早期检出/确诊癌症,总存活率就越高。对于 CRC 而言尤其如此。肿瘤晚期的预后差。三分之一以上的患者在确诊后 5 年内死于进行性疾病,相当于 5 年存活率为约 40%。目前的治疗只能治愈一小部分患者,并且明显对那些在疾病早期被确诊的患者最有效果。

鉴于 CRC 成为公众健康难题,有必要开发出更有效的结肠直肠癌筛查方法和预防措施。

目前有效用于结肠直肠癌的最早期检测方法包括采用测试便血或内视镜法。然而,在能检出便血之前,通常必然已存在大小显著的肿瘤。对于从粪便样本中检测 CRC,目前最常用的检验法是基于愈创木脂的大便潜血测试。

近年来,有大量的所谓结肠特异性基因甚至所谓结肠直肠癌特异性基因被报道。绝大多数的相应研究论文或专利申请是基于分析结肠(癌症)组织分别相对不同的组织或邻近正常组织的 RNA 表达图式而获得的数据。这些方法可概括为 mRNA 差别显示技术。

作为从 mRNA 展示技术获得数据的实例,WO 01/96390 应被提及和讨论。该申请描述并要求保护超过 200 种分离的多核苷酸和与其相

应的多肽, 以及它们在 CRC 检测中的用途。然而, mRNA 水平的差异并不能反映相应的蛋白质水平, 这是一般常识。由稀有 mRNA 编码的蛋白质可以非常大的数量存在, 而由高丰度 mRNA 编码的蛋白质也许却难以被检测出甚至完全不能找到。mRNA 水平和蛋白质水平之间相关性的此类缺乏是由诸如 mRNA 稳定性、翻译效率及蛋白质稳定性等原因所造成。

近来还有方法调查在不同组织间或在健康组织和患病组织之间的蛋白质模式差异, 以确定可用于 CRC 诊断的候选标志分子。Bruenagel 等(Bruenagel, G.等, Cancer Research 62 (2002)2437-2442)已确定了 7 种核基质蛋白, 这些蛋白质在 CRC 组织中似乎比在邻近正常组织中更丰富。没有来自取自个体的液体和粪便样本的数据的报道。

WO 02/078636 报道了通过表面增强激光解吸和电离(SELDI)发现的约 9 个与结肠直肠癌相关的点。与取自健康者对照的血清相比, 这些点更频繁地出现在取自 CRC 患者的血清中。然而, 包含于该点中的一种或多种分子的特征(例如它(它们)的序列)还是还未知。

尽管在 CPC 领域有大量和日益增加的候选蛋白标志名单, 但迄今仍不清楚这些分子的临床/诊断效用。为了具备临床效用, 作为单个标志的新诊断标志应至少与本领域已知的最好单个标志一样好。或者, 如果单独使用或分别与一种或多种其它标志联合使用, 则新标志应导致诊断灵敏度和/或特异性中的任一项的提高。测试的诊断灵敏度和/或特异性往往由其接受者工作特性来评估, 这将在下文进行详细叙述。

目前, 例如基于检测癌胚抗原(CEA)(肿瘤相关糖蛋白)的诊断血液测试可用于协助 CRC 领域的诊断。在取自结肠直肠癌、胃癌和胰腺癌患者的 95%组织样本中以及在大多数的乳腺癌、肺癌和头颈部癌中 CEA 都有增加(Goldenberg, D.M. 等, J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 57 (1976) 11-22)。在非恶性疾病患者中也报告了 CEA 水平的升高, 而许

多结肠直肠癌患者的血清中 CEA 水平正常,尤其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, *Ann. Surg.* 183 (1976) 5-9; Wanebo, H.J. 等, *N. Engl. J. Med.* 299 (1978) 448-451)。从血清或血浆中检测的 CEA 在检测复发中的效用在报道上备受争议,且尚未得到广泛应用(Martell, R.E. 等, *Int. J. Biol. Markers* 13 (1998) 145-149; Moertel, C.G.等, *JAMA* 270 (1993) 943-947)。

根据现有数据,血清 CEA 测定既无灵敏度也无特异性,使其不能被用作无症状人群中的结肠直肠癌筛查测试(Reynoso, G.等, *JAMA* 220 (1972) 361-365; Sturgeon, C., *Clin. Chem.* 48 (2002) 1151-1159)。

由于转移性疾病是引起癌症患者发病率和死亡率的主要原因,因而参与调控肿瘤侵袭和转移的分子作为潜在的诊断/预后靶标而引起关注。公认的是,由癌细胞或肿瘤基质中细胞产生的蛋白水解酶参与了胞外组织的降解,从而导致癌细胞侵袭和转移。许多酶与此过程相关,被研究得最彻底的酶是金属蛋白酶(如胶原酶和溶基质蛋白酶)和丝氨酸蛋白酶(如纤维蛋白溶酶)。

基质金属蛋白酶(MMP)在癌细胞的生长和扩散中发挥关键作用,促进胞外基质的酶降解。MMP的天然存在的抑制剂,被称为组织 MMP 抑制剂或 TIMP。TIMP 与 MMP 活性形式以 1:1 形成紧密的复合物,从而抑制这些酶的催化活性。MMP 的基质降解特性和 TIMP 的抑制作用之间的平衡在正常生理条件下是被精密调节的(Matrisian, L.M., *Bioessays* 14 (1992) 455-463; Birkedal-Hansen, H.等, *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4 (1993) 197-250),但这种平衡在恶性组织可能被扰乱。

已报道了许多酶联免疫测定法用于检测 TIMP-1 (Kodama, S.等, *Matrix* 9 (1989) 1-6; Cooksley, S.等, *Matrix* 10 (1990) 285-291; Clark, I.M.等, *Matrix* 11 (1991) 76-85)和 TIMP-2 (Fujimoto, N.等, *Clin. Chim. Acta* 220 (1993) 31-45)。这些测定法已被应用到体液,如血清、血浆、羊水、脑脊液、尿液,但所检验的样本数量尚不足以建立健康个体中

TIMP 水平的正常范围(Kodama, S.等, Matrix 9 (1989) 1-6; Clark, I.M.等, Matrix 11 (1991) 76-85)。此外, 这些测定法无一得到技术性能或临床应用的充分验证。

Mimori 等 (Mimori, K.等, Br. J. Cancer 76 (1997) 531-536)研究了胃癌患者肿瘤组织 TIMP - 1 mRNA 水平, 发现 TIMP-1 mRNA 的肿瘤/正常组织比高与入侵增加和预后差有关。然而, 前列腺癌患者和健康者供体的血清 TIMP - 1 蛋白水平显示了高度的重叠(Baker, T.等, Br. J. Cancer 70 (1994) 506-512)。同样, 对前列腺癌患者和健康者供体的血浆的另一项独立研究也显示, 两组间 TIMP-1 水平无差异(Jung, K.等, Int. J. Cancer 74 (1997) 220-223)。

对晚期胃肠道癌症和妇科癌症患者血浆中与 MMP-9 复合的 TIMP-1 的研究(Zucker, S.等, Cancer 76 (1995) 700-708)显示, 转移性疾病癌症患者的血液样本中所述 TIMP-1 的水平显著高于健康对照个体, 而且其循环中 TIMP-1: MMP-9 复合体高水平的患者的生存期更短(Zucker, S.等, Cancer 76 (1995) 700-708, 和美国专利 US 5,324,634)。

Holten-Anderson M. N.(美国专利 2003/082652)描述了从体液样本测量的 TIMP-1 可以用于癌症评估。虽然提到了样本的几种来源(包括粪便), 但只显示了血浆中的数据。对技术人员来说明显的是, 无论如何, 血浆中检出的蛋白浓度与该蛋白在粪便样本中的存在或甚至浓度之间都不存在任何关联。本领域还没有发现可以证明粪便样本中有 TIMP-1 存在的数据。本领域没有可用的数据, 指出这样的事实: 粪便样本中 TIMP-1 的存在可具有临床效用。

从粪便获取样本的优势在于其取样可通过非侵入性手段而易于实现。

如上所述, 愈创木脂测试是目前最广泛用于从粪便中筛查 CRC 的检验方法。但是, 该愈创木脂检验的灵敏度和特异性都低。基于愈创木脂大便潜血测试的灵敏度为约 26%, 这意味着在基于愈创木脂检验法的筛查程序中有 74%恶性病变患者将无法被检出(Ahlquist, D.A.,

Gastroenterol. Clin. North Am. 26 (1997) 41-55)。

利用结肠镜检查术对癌前及癌症病变的可视化代表了早期检测的最佳方法。然而，结肠镜检查是侵入性的，并带来巨大花费、风险和并发症(Silvis, S.E.等, JAMA 235 (1976) 928-930; Geenen, J.E. 等, Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 231-235; Anderson, W.F. 等, J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126-1133)。

最近, Sieg 等(Sieg, A. 等, Int. J. Colorectal Dis. 14 (1999) 267-271)调查了替代愈创木脂测试的诊断方法的灵敏度和特异性。特别比较了粪便样本中血红蛋白和血红蛋白-触珠蛋白复合体的测量结果。注意到，血红蛋白检验法对检测结直肠肿瘤没有理想的灵敏度。尽管检出进行性癌变期癌症的灵敏度为约 87%，但仍不能以足够的灵敏度检出早期阶段的肿瘤。血红蛋白-触珠蛋白复合体检测法对 CRC 早期阶段的检测较为灵敏。该灵敏度较高的检测却伴随着低特异性。但是，由于低特异性将转变为大量不必要的后继验查，如结肠镜检查术，因此低特异性的检验法也不能满足作为普遍接受筛查法的要求。

Roseth, A.G.等在 US 5,455,160 和相应的科学论文中描述了将钙防卫蛋白作为用于从粪便样品中检测 CRC 的备选生物标志(Scand J Gastroenterol 27 (1992) 793-798; Scand. J. Gastroenterol. 28 (1993) 1073-1076)。虽然钙防卫蛋白是炎症性疾病的标志，但其作为从粪便中检测 CRC 的标志的潜能被一些出版物报道(Johne, B.等, Scand. J. Gastroenterol. 36 (2001) 291-296; Limburg, P.J.等, Am. J. Gastroenterol. 98 (2003) 2299-2305; Hoff, G.等, Gut 53 (2004) 1329-1333)。虽然钙防卫蛋白的灵敏度和特异性可与免疫血红蛋白检验法媲美，但钙防卫蛋白似乎比血红蛋白更具有一些有利于作为诊断标志的特点。其在粪便中分布均匀，在室温下稳定而使得将样本邮递到实验室变为可行，而且其不受任何食物成分或药物化合物的干扰(Ton 等, Clin. Chim. Acta 292 (2000) 41-54)。然而，在来自 CRC、克罗恩氏病(Crohn's disease)或炎症性肠道疾病患者的粪便样本中检测到高浓度的钙防卫蛋白

(S100A8 和 S100A9 的异二聚体)。这些结果与钙防卫蛋白在炎症中的作用更普遍的结论相一致(Ryckman, C.等, J. Immunol. 170 (2003) 3233-3242)。因此,钙防卫蛋白在胃肠病学中的应用并不限于检测 CRC 而是延伸到其它疾病,特别是炎症性肠道疾病,参见 Poullis 等人的综述(Poullis, A.等, J. Gastroenterol. Hepatol. 18 (2003) 756-762)。

近来,检测丙酮酸激酶 M2 同工酶(M2-PK)的检验法已被引入市场(Schebo Biotech, Gießen, 德国)。愈创木脂检验法与用于血红蛋白和 M2-PK 的免疫测定法的比较已由例如 Vogel 等人完成(Vogel, T.等, Dtsch. Med. Wochenschr. 130 (2005) 872-877)。他们表明,免疫测定法优于愈创木脂测试,而在相近的特异性下,M2-PK 检验法检测 CRC 的灵敏度低于血红蛋白检验法。而且,作者认为这两个基于粪便的检验法的实用性仍是值得怀疑的。

另一替代愈创木脂测试的在粪便中检测 CRC 的方法已在最近被发表,其在于通过脱落到粪便中的结肠细胞的免疫组织化学来检测结肠直肠癌特异性抗原:“微染色体维持蛋白 2”(MCM2)。由于研究规模小,其关于检测结肠直肠癌的诊断价值的结论是初步的。但是,该项检验似乎只对检测右半结肠癌具有有的有限灵敏度(Davies, R.J. 等, Lancet 359 (2002) 1917-1919)。

Osborn, N.K. 和 Ahlquist, D.A. (Gastroenterology 128 (1995) 192-206)讨论了血红蛋白标志的缺点,并强烈主张在筛查 CRC 中使用从粪便样本中回收的 DNA。

通过非侵入手段从粪便样本中鉴别能容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,将产生大大有助于诊断和治疗该疾病的诊断检验法。因此,在改善 CRC 诊断(特别是从粪便中)方面存在迫切的临床需要。特别重要的是改善 CRC 的早期诊断,因为被早期确诊的患者的生存机会远远高于在疾病进展阶段的被确诊患者。

本发明的任务就是研究是否可以确定出可有助于 CRC 诊断的新

型标志。优选地，该标志存在于粪便中并使得能够进行非侵入性诊断。

预料不到的是，已经发现使用蛋白 TIMP-1 作为 CRC 标志多肽至少可以部分地克服本领域现有技术中已知的问题。

因此，本发明涉及包括以下步骤的结肠直肠癌诊断方法：

- a) 提供从个体获取的粪便样本，
- b) 使所述样本与针对 TIMP-1 的特异性结合剂在适于所述结合剂和 TIMP-1 间形成复合体的条件下接触，
- c) 测定步骤(b)中形成的复合体的量，和
- d) 将步骤(c)中确定的复合体量同结肠直肠癌诊断相关联。

作为进一步优选的实施方案，本发明公开了诊断结肠直肠癌的方法，其包括以下步骤：提供从个体获取的粪便样本，使所述样本与针对 TIMP-1 的特异性结合剂在适于所述结合剂和 TIMP-1 间形成复合体的条件下接触，使所述样本与针对至少一种第二标志的特异性结合剂在适于所述结合剂和所述第二标志间形成复合体的条件下接触，所述第二标志选自：血红蛋白/触珠蛋白复合体、血红蛋白、钙防卫蛋白和肿瘤型 M2 丙酮酸激酶(M2-PK)，测定针对 TIMP-1 和所述至少一种第二标志形成的复合体的量，以及将步骤中形成的复合体的量同结肠直肠癌诊断相关联。在进一步优选的实施方案中，依据本发明的方法分别基于对 TIMP-1 和作为第二标志的血红蛋白的测定、对 TIMP-1 和作为第二标志的血红蛋白/触珠蛋白复合体的测定、对 TIMP-1 和作为第二标志的钙防卫蛋白的测定以及对 TIMP-1 和作为第二标志的 M2-PK 的测定。

对技术人员来说明显的是，对 TIMP-1 的测定和对任选的一种或多种其它标志的测定在等分粪便样本中进行。所述一种或多种测量可分别在粪便样本的同一等分试样或已处理粪便样本的同一等分试样中进行，或分别在患者粪便样本的不同等分试样或患者已处理粪便样本的不同等分试样中进行。

技术人员也明白，任何此类从粪便样本中测量 TIMP-1 都是在体

外进行的。之后，患者样本将被丢弃。患者样本仅仅是用于本发明的体外方法。无论是测量 TIMP-1 还是评估 CRC 都不是在人体或动物体内进行。

本发明的体外诊断方法用于评估粪便样本中是否存在 TIMP-1 或 TIMP-1 的相对浓度。TIMP-1 的测量值将有助于临床医生评估 CRC，例如有助于他确定临床诊断和/或作出合适的治疗决定。如果在 CRC 评估中使用 TIMP-1 的相对浓度，则该 TIMP-1 相对浓度最简便地并优选地基于 TIMP-1 量/粪便量的比例计算。

在优选的实施方案中，对粪便样本进行处理以获得比粪便样本更易于操作的经处理的样品液体。然后将这种经处理的样品与针对 TIMP-1 的特异性结合剂一起温育。因此，本发明还涉及包括以下步骤的结肠直肠癌诊断方法：

- a) 提供从个体获取的粪便样本，
- b) 处理所述粪便样本以获得经处理的液体样品，
- c) 使所述经处理的液体样本与针对 TIMP-1 的特异性结合剂在适于所述结合剂和 TIMP-1 间形成复合体的条件下接触，和
- d) 将步骤(c)中形成的复合体的量同结肠直肠癌诊断相关联。

本发明的另一优选实施方案，是包括以下步骤的结肠直肠癌诊断方法：

- a) 处理从个体获取的粪便样本以获得经处理的液体样品
- b) 使所述经处理的液体样本与针对 TIMP-1 的特异性结合剂在适于所述结合剂和 TIMP-1 间形成复合体的条件下接触，
- c) 测定步骤(b)中形成的复合体的量，和
- d) 将步骤(c)中测定的复合体量同结肠直肠癌诊断相关联。

蛋白 TIMP-1(=组织金属蛋白酶抑制剂 1)的特征在于给出的 SEQ

ID N0: 1 序列。

在优选的实施方案中,该新标志 TIMP-1 被用于个体的 CRC 筛查。

在优选的实施方案中,本发明的诊断方法被用于筛查目的。也就是说,该方法通过测量粪便样本中 TIMP-1 的水平并将测得的水平与是否存在 CRC 相关联,被用来评估检验对象而无需预先诊断 CRC。

技术人员很容易明白,在这种筛查中必须注意使用适量的粪便样本。优选地,使用定量的粪便样本去测量其中所包含的 TIMP-1。优选地, TIMP-1 的量表示为每份粪便中的 TIMP-1 量,即给出的是 TIMP-1 的相对浓度。

技术人员也明白, TIMP-1 的截断值的确立是基于来自健康正常人群的个体粪便样本中测得的 TIMP-1 值。筛查设置中的临床有关正常人群优选由年纪在 55 至 65 岁的健康个体组成。粪便样本中高于已确定截断值的 TIMP-1 值,可被考虑为 CRC 的指示或至少有必要对该个别个体作进一步的诊断检查。

结肠直肠癌最常见是从腺瘤(息肉)发展为恶性癌。

癌症的分期是按照疾病的程度、发展和严重性来划分。它可将癌症患者分类,以便于对预后和疗法的选择进行概括。

CRC 的不同阶段通常是按 Dukes 的 A 至 D 分期来划分。如今, TNM 分期系统是应用最广泛的癌症解剖程度分类。其代表了国际公认的、统一的分期系统。有三个基本变量: T(原发性肿瘤的程度)、N(区域淋巴结的状态)和 M(是否存在远距离转移)。TNM 标准由 UICC(International Union Against Cancer, 国际抗癌联盟)公布(Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (编辑), 恶性肿瘤的 TNM 分类 (TNM Classification of Malignant Tumours), 第六版, 2002)。一旦确定了 TNM 状况,患者就被分为各个疾病阶段,所述阶段由范围从 I 至 IV 的罗马数字表示, IV 是最晚期的疾病阶段。TNM 分期和 UICC 疾病阶段相互对应,如从上述 Sobin L.H.和 Wittekind(编辑)的书中摘录的下表所示。

TNM 分期和 UICC 疾病阶段的相互关系:

UICC 疾病阶段	T 分期	N 分期	M 分期
阶段 0	Tis	N0	M0
阶段 I	T1, T2	N0	M0
阶段 IIA	T3	N0	M0
阶段 IIB	T4	N0	M0
阶段 IIIA	T1, T2	N1	M0
阶段 IIIB	T3, T4	N1	M0
阶段 IIIC	任何 T	N2	M0
阶段 IV	任何 T	任何 N	M1

尤其重要的是, CRC 的早期诊断可转变为更好的预后。结直肠恶性肿瘤起因于良性肿瘤(即腺瘤)。因此, 那些在腺瘤阶段被诊断的患者有最好的预后。早至阶段 T_{is}、N0、M0 或 T1-3; N0; M0 被确诊的患者, 如果被合理治疗, 其确诊后存活 5 年的机会超过 90%, 而对于在已经存在远距离转移时才被确诊的患者, 其 5 年存活率只有 10%。

在本发明的意义中, CRC 的早期确诊是指在根本不存在转移(既没有近距离转移= N0, 也没有远距离转移= M0)的肿瘤阶段的确诊, 即阶段 T_{is}、N0、M0 或者 T1-4; N0; M0。T_{is} 表示原位癌。

优选的是, CRC 在其还没有完全长成穿越肠壁时就被确诊, 因此既没有脏体腔膜被穿孔也没有其它器官或结构被入侵, 即确诊为在从 T_{is}; N0; M0 至 T3; N0; M0 (=T_{is}-3; N0; M0) 的任一阶段。

本发明的诊断方法是基于从个体获取的粪便样本。提取粪便样本, 并用特异性结合剂从经处理粪便样本中特异性测量 TIMP-1。

特异性结合剂是, 例如, TIMP-1 的受体、结合 TIMP-1 的凝集素、TIMP-1 的适配体或 TIMP-1 的抗体。特异性结合剂对其相应靶分子的亲和力至少为 10⁷ l/mol。该特异性结合剂对其靶分子的亲和力优选为 10⁸ l/mol 或甚至更优选为 10⁹ l/mol。技术人员会明白, 术语特异性是

用来表明样本中存在的其它生物分子不会显著地与对 TIMP-1 有特异性的结合剂发生结合。优选地,与除靶分子以外的其它生物分子结合水平所产生的结合亲和力只有靶分子亲和力的 10%、更优选只有 5% 或更少。最优选的特异性结合剂应能满足上述亲和力以及特异性的最低标准。

特异性结合剂优选是与 TIMP-1 反应的抗体。术语抗体是指多克隆抗体、单克隆抗体、这些抗体的片段以及包含抗体结合域的遗传结构。保留特异性结合剂上述标准的任何抗体片段都可以被使用。抗体由本领域现有方法产生,例如,参见 Tijssen 的描述(Tijssen, P., 酶联免疫测定的实践与理论(Practice and theory of enzyme immunoassays), Elsevier, Amsterdam (1990), 全书,特别是第 43-78 页)。此外,技术人员也深知基于可用于特异分离抗体的免疫吸附剂的方法。通过这些手段,可提高多克隆抗体的质量并从而提高其在免疫测定中的性能(Tijssen, P., 如上所述,第 108-115 页)。

为了得到本发明所公开的效果,可使用由兔产生的多克隆抗体。但很明显,也可使用来自不同物种(例如大鼠或豚鼠)的多克隆抗体以及单克隆抗体。由于单克隆抗体可按所需的任何量产生且性能恒定,因而它们代表了开发临床常规检验法的理想工具。在本发明的方法中制备和利用针对 TIMP-1 的单克隆抗体是又一优选的实施方案。

技术人员现在明白,通过免疫测定程序鉴别出 TIMP-1 并将其作为诊断 CRC 的有效标志,也可使用其结果能和本发明效果相比的其它方法。可用任何适当方法检测标志蛋白 TIMP-1 并将其用作 CRC 标志。所述优选的适当方法包括由免疫测定方法、液相色谱法(特别是高效液相色谱法)、电泳(特别是结合蛋白质印迹法的 SDS-PAGE)和质谱分析来检测 TIMP-1 多肽。

为了进行测量,从个体获取了粪便样本。可直接使用粪便样本的等份试样。优选地,将粪便样本的等份试样进行处理以制备液体样品。经处理的粪便样品是用提取缓冲液提取粪便样本后得到的液体样本。

可以使用任何适合的提取缓冲液。适合的提取缓冲液应满足至少三个基本要求：能使目标分析物从粪便基质中释放；能稳定游离的分析物；能尽量减少粪便基质对随后的分析物检测的干扰。在一个实施方案中，粪便样本的处理由根据该任务作了优化的提取缓冲液来进行。由于标志组合可能拥有更多的诊断潜力，因此优化缓冲液应不只适用于一种特异生物标志而应适用于所有目标分析物。提取缓冲液可含有尿素以改善粪便样本的均一化及提取。可含 Ca^{2+} 以稳定 Ca^{2+} 结合蛋白。应使用弱螯合剂，一方面能够断裂 Ca^{2+} 结合蛋白和粪便基质之间的离子键。优化和优选的提取缓冲液含有尿素、 Ca^{2+} 和螯合剂。优选地，螯合剂选自次氨基三乙酸或柠檬酸盐。

最简便的是将优化的提取缓冲液与特制的粪便取样器结合使用。在最简便的方式中，个人采集定量的粪便样本并将其直接转移入预装有稳定的提取缓冲液的收集器中。这种取样和提取的简便模式使得标本运送至诊断实验室的过程中没有分析物降解。由于粪便样本的提取可以直接在取样器中进行，因而减少了必要的处理和转移程序。

一些近期的发展关注于便于对粪便样本采样和处理的装置。EP 1 366 715 公开了收集粪便样本的特殊收集管。该提取管主要包括：(a) 里面中空、顶部开口并能接受缓冲溶液的容器体；(b) 带用于粪便样本收集的螺纹小杆的顶盖，当顶盖用于容器体的顶端时，所述螺纹小杆在容器体内轴向伸出，以及(c) 在容器体内中央位置提供的分区隔板 (dividing partition)，以在所述容器体内分成顶室与底室，所述分区隔板具有轴向孔而适于容许所述螺纹小杆穿过，以便将过量的粪便留在所述顶室而容许所述小杆的螺纹部分穿入所述底室。该提取管还具有底部开口并带底帽的容器体，所述底帽可移动地应用于容器体底端，因此，在移开所述底帽并倒置容器体后，可以直接将所述提取管用作初级取样管插入自动分析器的装样盘。在 EP 1 366 715 公开的该装置使得能够简易地处理定量的粪便样本，其优点是，经适当提取后可将该管直接放置入自动分析器的装样盘。

在 WO 03/068398 中描述了第二例适于简便地取样和处理粪便样本的高级粪便取样装置。

粪便样本优选在采样后直接使用或处理，或进行冷却贮存，或更适宜地进行冷冻保存。冷冻的粪便样本可以通过解冻进行处理，随后用适当的缓冲液稀释、混合并离心。上清液被用作液体样品进行后续的标志 TIMP - 1 测量。

在适于形成结合剂 TIMP - 1 复合体的条件下，将经处理的粪便样本的等份试样与 TIMP-1 特异性结合剂一起温育。不需要指定这些条件，因为技术人员不需要任何创造性努力就可以很容易地确定这些合适的温育条件。

本发明公开方法的最后一步是，测定复合体的量并将其与 CRC 诊断相关联。技术人员明白，有很多方法可被用来测定特异性结合剂 TIMP-1 复合体的量，所有这些方法都在教科书中有详细描述(参见，如，Tijssen P.,如上所述；或 Diamandis, E.P.和 Christopoulos, T.K. (编辑), 免疫测定(Immunoassay), Academic Press, Boston (1996))。

优选地，用夹心式测定方式检测 TIMP-1。在这种测定中，第一特异性结合剂是用来捕获 TIMP-1 的一侧，而经过标记可直接或间接检测的第二特异性结合剂用在另一侧。优选地，选择测定的设置，以确保能测量游离 TIMP-1 和复合的 TIMP-1 的总和。

在 CRC 评估中，抗 TIMP-1 抗体也可以被用于其它程序，例如检测原位结肠直肠癌细胞、活组织检查或免疫组织化学染色程序。

优选地，抗 TIMP-1 抗体被用于定性(是否存在 TIMP-1)或定量(确定 TIMP - 1 的量)的免疫测定。

如上所述，出人意料地发现 TIMP - 1 可在取自个体样本的粪便样品中被测量。不需要任何组织样品和任何活检样品来提供 CRC 诊断中的标志 TIMP-1。

虽然将常规蛋白质组学方法应用于组织样本(例如通过比较健康的和癌变的组织)会导致鉴定出许多关于所选组织/疾病的潜在候选标

志,但是这些候选标志只是偶然地并在少数情况下存在于循环中。预料不到的是,本发明的发明人已经能够在粪便样本中检出蛋白 TIMP-1。他们已经能够证明, TIMP-1 在这些取自个体的粪便样本中的存在可与结肠直肠癌诊断相关联。

也已经发现,在这些取自个体的粪便样本中是否存在 TIMP-1,可以与患者是否患有结肠直肠癌相关联。本发明还涉及排除结肠直肠癌的方法,其包括以下步骤: a)提供从个体获取的粪便样本, b)处理所述样本以得到经处理的液体样本, c)使所述经处理的液体样本与针对 TIMP-1 的特异性结合剂在适于所述结合剂和 TIMP-1 间形成复合体的条件下接触,和 d)不存在(c)中的复合体用作没有结肠直肠癌的指标。

技术人员明白,粪便样本的 TIMP-1 阳性结果不一定意味着患者有 CRC。然而,粪便样本的 TIMP-1 阳性值应被视为明确指标以证明需作进一步和更高级的诊断。在优选的实施方案中,从粪便样本测量的 TIMP-1 阳性值被用作该患者应该接受进一步验查(尤其是 PET 扫描或结肠镜检查)的指示。优选地,粪便样本的阳性值被用作指标,证明需进行结肠镜检查来作为患者(诊断)检查的下一步骤。

在优选的实施方案中,新标志 TIMP-1 被用于 CRC 患者的监护。

当用于监护患者时,本发明的诊断方法可有助于在患者随访中评估肿瘤负荷、治疗效果和肿瘤复发。TIMP-1 水平的增加与肿瘤负荷有直接关联。在化疗后, TIMP-1 的短期内(几小时至 14 天)增加可作为肿瘤细胞死亡的指标。在手术和/或化疗后患者的长期随访(从 3 个月至 10 年)中, TIMP-1 的增加可用作在结直肠中肿瘤复发的指标。

测量蛋白 TIMP-1 的水平已被证明在 CRC 领域非常有优势。因此,在进一步优选的实施方案中,本发明涉及蛋白 TIMP-1 作为标志分子在从取自个体的粪便样本中诊断结肠直肠癌中的用途。

术语标志分子是用以表示,在取自个体的经处理粪便样本中测定的分析物 TIMP-1 水平的增加标志着 CRC 的存在。标志分子 TIMP-1

以游离形式和 TIMP-1/MMP 复合体形式存在于粪便中。在本发明的诊断方法中, 游离 TIMP-1、TIMP-1/MMP 复合体或总 TIMP-1(游离 TIMP-1 与 TIMP-1/MMP 复合体中的 TIMP-1 的总和)都可用作标志分子。优选地, 测定总 TIMP-1 并用测定量去评估 CRC。

对技术人员来说很明显, 本发明不应被解释为仅限于对具 SEQ ID NO: 1 的全长蛋白 TIMP-1 的测量。当应用本发明时, 也可测定 TIMP-1 的生理片段并用作 CRC 标志。免疫可检测的片段优选包括所述标志多肽的至少 6、7、8、10、12、15 或 20 个连续氨基酸。本领域技术人员会认识到, 由细胞释放出来的或存在于胞外基质的蛋白质可能被破坏, 如在炎症期间被破坏, 并可能被降解或切割成这些片段。此外, 或者可选的是, TIMP-1 多肽可能具有翻译后修饰, 该修饰的 TIMP-1 也可以作为 CRC 标志。

对 TIMP-1 的测定可以被设置为测量 TIMP-1 总量, 即结合到基质金属蛋白酶的 TIMP-1 加上游离 TIMP-1 的量。在该优选的实施方案中, 至少一种特异性结合剂被用来分别结合游离的 TIMP-1 和在 MMP 上结合的 TIMP-1 两者。例如, 抗体可被用来结合游离的 TIMP-1 以及 TIMP-1/MMP 复合体中的 TIMP-1。在使用夹心式测定方式的情况下, 使用满足相同要求的第二抗体。在优选的实施方案中, 本发明的方法通过测定粪便样本中的总 TIMP-1 在实践中进行。

对 TIMP-1 的测定也可以被设置为仅测定游离的 TIMP-1, 即未结合到基质金属蛋白酶上的 TIMP-1。在优选的实施方案中, 游离 TIMP-1 被用作 CRC 标志。在测量游离 TIMP-1 的测定中, 至少一种特异性结合剂被用来仅结合游离 TIMP-1。例如, 抗体可被用来结合游离 TIMP-1 而不结合在 TIMP-1/MMP 复合体中的 TIMP-1。

如上所述, TIMP-1 与基质金属蛋白酶以 1:1 形成复合体。在本发明的优选实施方案中, TIMP-1/MMP 复合体被用作 CRC 标志。在该测定中, TIMP-1 的特异性结合剂可被用作捕获试剂, 而 MMP 的特异性结合剂被用作检测试剂, 或反之亦然。或者, 可测定总 TIMP-1 和

游离 TIMP-1，并根据这两个测量值之差计算 TIMP-1/MMP 复合体中的 TIMP-1 的量。

可以使用 TIMP-1 人工片段，例如作为免疫测定法的阳性对照或作为免疫原。人工片段优选包含通过合成或重组技术制备的肽，所述肽由衍生自 SEQ ID NO:1 中公开序列的至少 6、7、8、9、10、12 或至少 15 个连续氨基酸组成。优选地，这种人工片段包含至少一个具诊断意义的表位。还优选的人工片段至少包含两个目标表位，并适合在夹心免疫测定法中用作阳性对照。

优选是在结肠直肠癌的早期检测中使用新标志 TIMP-1。然而，技术人员明白，与其它标志一样，TIMP-1 对以下已患者的诊断和随访也具有巨大优势，所述患者患有已经处于肿瘤发展较晚期的 CRC。

TIMP-1 浓度与 CRC 中肿瘤负荷密切关联。因此，该标志也适用于 CRC 患者治疗后的随访。在优选的实施方案中，新标志 TIMP-1 被用于 CRC 患者的随访。通过定期测量 CRC，例如以 3 个月、6 个月或一年的间隔，对肿瘤发展和/或可能是肿瘤复发的情况进行评估。高于正常截断值的 TIMP 增加或重现，被认为分别指示了肿瘤进展或肿瘤复发。因此，进一步优选的实施方案涉及通过体外测量切除癌症病变手术后的结肠直肠癌患者的评估方法，该方法包括以下步骤：a) 提供取自所述患者的粪便样本，b) 使所述样本与针对 TIMP-1 的特异性结合剂在适于所述结合剂和 TIMP-1 间形成复合体的条件下接触，c) 测定步骤(b)中形成的复合体的量，和 d) 将(c)中测定的复合体量与结肠直肠癌的复发或进展相关联。治疗后 TIMP-1 的增加表明在相应患者中复发 CRC。测量粪便样本的 TIMP-1 是特别有用的，并在优选的实施方案中被用于胃肠道内 CRC 肿瘤复发的早期检测。

结肠以及直肠两者都是胃肠道的部分。既然已经显示 TIMP-1 很可能在结肠直肠癌患者的筛查中 useful，那么极有可能的是，TIMP-1 在粪便样本中的存在情况也可以用作评估其它类型胃肠道肿瘤的辅助诊断。在进一步优选的实施方案中，本发明涉及在粪便样本中测定

的 TIMP-1 在评估胃肠道肿瘤中的用途。优选地，从粪便样本测量的 TIMP-1 也被用于评估胃肿瘤。

蛋白 TIMP-1 本身的应用，在灵敏度以及特异性两方面都展示了出乎意料的良好性能。将 TIMP-1 测量与其它已知标志(如血红蛋白或血红蛋白/触珠蛋白复合体)或尚未被发现的其它 CRC 标志相结合，分别导致和可能导致 CRC 评估的进一步改善。因此，在进一步优选的实施方案中，本发明涉及 TIMP-1 的以下用途：作为结肠直肠癌标志分子与一种或多种其它结肠直肠癌标志分子联合用于从取自个体的粪便样本中诊断结肠直肠癌。可与 TIMP-1 测量联合的优选的其它 CRC 标志为钙防卫蛋白、肿瘤型 M2 丙酮酸激酶(M2-PK)、血红蛋白和/或血红蛋白/触珠蛋白复合体。

作为进一步优选实施方案，本发明公开了 TIMP-1 作为结肠直肠癌标志分子与一种或多种其它结肠直肠癌标志分子联合的应用，所述其他标志分子选自：血红蛋白/触珠蛋白复合体、血红蛋白、钙防卫蛋白和肿瘤型 M2 丙酮酸激酶(M2-PK)。

在优选的实施方案中，本发明涉及包含标志 TIMP-1 和标志血红蛋白的标志组合在评估 CRC 中的用途，而这两项标志都从粪便样本测定。

在优选的实施方案中，本发明涉及包含标志 TIMP-1 和标志血红蛋白/触珠蛋白复合体的标志组合在评估 CRC 中的用途，而这两项标志都从粪便样本测定。

特异性结合检测法(如免疫测定法)领域中的诊断试剂通常最好是以试剂盒的形式提供，试剂盒包含特异性结合试剂和操作该方法所需的辅助试剂。因此，本发明还涉及免疫试剂盒，其包括至少一种针对 TIMP-1 的特异性结合剂和为测量 TIMP-1 的辅助试剂。

诊断测试的准确度通常由其接受者工作特性(ROC)来描述(特别参见 Zweig, M.H.和 Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577)。ROC 图是由在整个所观察数据的范围内不断改变判断阈(decision

thresh-hold)而产生的所有灵敏度/特异性对的曲线图。

实验室测试的临床性能取决于其诊断的准确性，或其正确地将检验对象分成各临床相关亚组的能力。诊断准确性测量了该测试正确区分调查对象的两类不同状态的能力。这些状态为例如健康与疾病，或者良性与恶性疾病。

在每一情形下，ROC 曲线通过标绘关于整个判断阈范围的灵敏度比对 1-特异性，而描述两种分布间的重叠。在 y 轴上是灵敏度，或真阳性分数[定义为(真阳性检测结果数)/(真阳性检测结果数+假阴性检测结果数)]。这也被称为疾病或病症存在的阳性。其仅由受影响的亚组计算得到。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)]。这是特异性的指标，并完全由不受影响的亚组计算得到。因为真阳性分数和假阳性分数通过使用来自两个不同亚组的测试结果而完全独立地来计算，所以 ROC 曲线图独立于样本的患病率。ROC 曲线图上的每个点代表相应于特定判断阈的灵敏度/1-特异性对。辨别性理想的测试(这两个结果的分布没有重叠)的 ROC 曲线经过左上角，那里的真阳性分数为 1.0，即 100%(完美灵敏度)，而假阳性分数为 0(完美特异性)。无辨别性的测试理论曲线(两个组的结果分布相同)是一条从左下角至右上角的 45°对角线。大多数点落在这两个极端之间。(如果 ROC 曲线完全在 45°对角线之下，则这很容易通过将“阳性”标准从“大于”颠倒为“小于”来弥补，或反之亦然。)从质量方面看，曲线越接近左上角，则测试的整体准确度越高。

对实验室测试的诊断准确度量化的一个合宜目标是借助单个数字来表示其性能。最常见的全局量度(global measure)为 ROC 图的曲线下面积。按照惯例，该面积总是 ≥ 0.5 (如果不是这样，人们可以颠倒判断规则(decision rule)来使之如此)。值的范围在 1.0(两组的测试值完全分离)和 0.5(两组的测试值之间没有明显的分布差异)之间。该面积并非仅仅依赖于曲线的特定部分(比如最靠近对角线的点或在 90%特异性下的灵敏度)，而是依赖于整条曲线。这是对 AUC 在多大程度上接

近完美(面积= 1.0)的定量、描述性表示。

借助接受者工作特性分析,通过与已确定的标志血红蛋白比较以及与其联合,评估了新型标志 TIMP-1 的临床效用(ROC; Zweig, M.H. 和 Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577)。该分析基于实施例部分中给出的定义明确的患者群中所取得的样本。

预料不到的是,研究证明基于 TIMP-1 值和血红蛋白值(两者都是从粪便样本测得)的标志组合表现出比它们之一被分别用作单个标志时提高的诊断准确性。

下面所列出的实施例、图和序列表是提供来帮助理解本发明的,在所附的权利要求中提出了本发明的实际范畴。应该明白,可在不背离本发明的精神下对提出的方法作出修改。

附图描述

附图 1: 针对 TIMP-1 的 ROC

给出了比较 101 个 CRC 患者样本与 252 个健康个体筛查样本(=对照)的评估的接受者工作曲线(ROC)。

实施例 1

研究人群

为了获得大量在临床上充分表征的粪便样本,启动了预期多中心研究。参与者接受了关于必须如何采集粪便样本的详细说明。每名患者需要在单个粪便样本的不同位置采集两个不同的部分,并将二者在同一天内于-20℃下冻结。粪便样本的采集必需是在进行结肠镜检查前(对照组(control collective))或进行手术前(癌症组(cancer collective))。在-20℃下最多储存 2 周后,将粪便样本储存在-70℃下直到进行粪便提取。对照组的患者是在胃肠病学单位(gastroenterology unit)的平均风险筛查群(average-risk screening population)中征募,他们经历了结肠镜检查。对照组中排除了有肠道炎症疾病和任何类型腺瘤的患者。由于在预防性筛查群(preventive screening population)中结肠直肠癌患者的发

病率低，因而癌症患者是从不同的手术单位征募的。结肠直肠癌诊断由每名癌症患者的病理分期来确证。为了避免免疫化学 FOBT(大便潜血试验)的正向偏差(positive bias)，从在结肠镜检查前进行基于愈创木脂的 FOBT 的患者中或从因可见的直肠出血而被检出的患者中排除所有的癌症患者。总共 252 名对照患者和 101 名结肠直肠癌患者被纳入本研究(表 1)。

表 1: 样本组的基线特征

	总数	年龄 (年)	性别 (男/女)
对照	252	63,0 +/- 8,0	151/101
健康对照 (无任何肠道疾病证据)	132	62,3 +/- 6,8	81/51
痔疮	28	60,1 +/- 7,1	13/15
憩室病	73	64,7 +/- 9,5	46/27
增生性息肉	14	67,9 +/- 9,9	8/6
其它胃肠疾病	5	59,2 +/- 6,7	3/2
CRC (所有阶段)	101	68,4 +/- 11,5	48/53
- UICC 0	1	-	0/1
- UICC I	22	65,9 +/- 9,3	8/14
- UICC II	27	73,1 +/- 10,9	14/13
- UICC III	12	70,9 +/- 12,3	8/4
- UICC IV	23	69,6 +/- 10,3	12/11
- w/o 分期	16	61,9 +/- 12,6	6/10

实施例 2

提取粪便样本用于测定血红蛋白和 TIMP-1

从每名患者中采集单个粪便样本不同位置的两个等份。由患者以

每个样本约 1 克粪便采集到特定的取样装置中(Sarstedt, 德国, 序号: 80 623 022), 在一天内冻结, 并保存于-70℃直至提取。

为处理粪便样本, 新鲜制备提取缓冲液, 其方法是将蛋白酶抑制剂混合液(Mini Complete EDTA-free, Roche, 德国, 序号: 11 873 580)加入下述缓冲液:

TRIS	0.10 mol/l, pH 8.0
柠檬酸	0.10 mol/l
尿素	1.00 mol/l
CaCl ₂	0.01 mol/l
BSA	0.50 %

解冻粪便样本并使用该装置的一次性刮铲将 50-100 毫克每份样本转移到粪便样品制备试剂盒(Roche, 德国, 序号: 10 745 804)。根据粪便样本重量加入提取缓冲液, 得到 50 倍稀释液。在定轨振荡器上剧烈混合样本 30 分钟, 转移入 10 毫升管(Sarstedt, 德国, 序号: 62 551 201), 并于 1200g 离心 10 分钟。采用 5 微米截留滤器(Ultrafree®-CL, Millipore, 德国, 序号: UFC40SV25)过滤上清液, 取等分试样并保存于-70℃待作进一步分析。这些提取物被用于本项研究中所有目标生物标志的测定。

实施例 3

粪便提取液中 TIMP-1 的分析物稳定性

TIMP-1 的测量用“Quantikine®人 TIMP-1 Immunoassay”(目录号 DTM100; R&D Systems, Minneapolis)进行, 基本依据制造商给出的用于测量血清或血浆样品中的 TIMP-1 的说明书。然而, 为了能够测量粪便中的 TIMP-1, 用该试剂盒的校准稀释液 RD5P 按 1:2 比例稀释粪便提取液(见实施例 2)。然后将这些预稀释粪便提取液用作包装说明书中所描述的样本(50μL 预稀释粪便提取液+ 100μL 测定稀释液 RD1X)。该商业化 TIMP-1 测定采用了抗 TIMP-1 的单克隆抗体作为捕获试剂和抗 TIMP-1 多克隆抗体作为检测试剂, 因此可检测样本中的总 TIMP-1。

血红蛋白的测量用“RIDASCREEN ®血红蛋白”测定(目录号

G09030, R-Biopharm AG, Darmstad)并依据制造商的提供的说明书来进行。使用 10 μ L 上述的粪便提取液并用该测定的样品稀释液 90 μ L 进行稀释(1:10 的稀释比)。

按如上所述新鲜提取其分析物浓度在达到或超过截断值的临界范围(critical range)内的 20 个粪便样本,然后在室温下保存 1 天或 3 天。在用以评估稳定性的这 20 个样本中,18 个是血红蛋白阳性而 7 个是 TIMP-1 阳性,这些样本可用于计算分析物的稳定性。

表 2:

温度胁迫下粪便提取液中 TIMP-1 和血红蛋白的回收率

	N	样品浓度范围	室温下 1 天的回收率 (中值 +/- SD)	室温下 3 天的回收率 (中值 +/- SD)
TIMP-1	7	1,0 ng/g-17,6 ng/g	96,7 %	99,7 %
血红蛋白	18	0,32 μ g/g-10,4 μ g/g	79,1 %	58,6 %

从表 2 中很明显得知,按如上所述制备的粪便提取液中, TIMP-1 似乎极为稳定而且稳定性显著超过血红蛋白。这具有巨大优势,尤其是在粪便提取缓冲液被加入到特制的粪便取样装置的情况下。因此,可将粪便样本直接收集到含有提取缓冲液的装置中,在该装置中立即制备粪便提取液,并可在室温下将含待分析样品的管送至实验室。

实施例 4

TIMP-1 在结肠直肠癌诊断中的临床效用

通过分析从实施例 1 所述充分表征的患者群获得的粪便样本,来评估 TIMP-1 的临床效用。对每名患者,测定了来自同一次排便的两个粪便样本并分析其浓度。用 Pearson 相关系数评估这两个浓度的相关性。该分析显示了这两份提取液密切的相关性。为了提高该检验法的灵敏度,两个成对样本中测得浓度最高的一个被用于进一步分析。

TIMP-1 的诊断值依据 Zweig 等(同上)用 ROC 分析来评价。结果发现, CRC 群与筛查群比较,通过曲线下面积测量的从健康个体辨别出 CRC 组患者的辨认力为 91%(图 1)。

为计算标志 TIMP-1 在 CRC 早期检测中的灵敏度,阳性截断设在与对照组相比分别导致 95%或 98%的特异性处。

表 3: TIMP-1 的 ROC 分析、灵敏度和特异性

样品组	N	ROC 面积%
CRC 样本 w/o 血液/FOBT	101	91
UICC I 期	23	85
UICC II 期	27	95
UICC III 期	12	96
UICC IV 期	23	90
截断值:		
- 95 %特异性		23,8 ng/g 粪便
- 98 %特异性		44,7 ng/g 粪便
灵敏度 (%)	101	
- 95 % 特异性		73
- 98 % 特异性		62

从表 3 可以看出,在 95%特异性处,有 73%的 CRC 患者粪便样品被检出升高的 TIMP-1 值。在 98%特异性水平处,仍然有 62%的 CRC 患者粪便样品被检出升高的 TIMP-1 值。

实施例 5

TIMP-1 与其它粪便标志物的组合

对粪便提取液中 TIMP-1 与其它生物标志的组合进行了评价。用商业化 ELISA 测定标志血红蛋白、血红蛋白与触珠蛋白的异质复合体、钙防卫蛋白、M2-PK 和 CEA。测量血红蛋白、血红蛋白/触珠蛋白和钙防卫蛋白的测定盒(assay)从 R-Biopharm(德国)获得。Calpro

Calprotectin ELISA 由 Calpro SA,(挪威)生产而且在德国以外是以 PhiCal™ Test 被销售。测量 CEA 的测定盒是从 Roche Diagnostics(德国)获得。M2-PK 的测定盒是由 Schebo Biotech(德国)提供。虽然一些测定盒是旨在用于粪便提取液的测量,但对于 CEA,粪便不是常用的样品材料。因此,其测定不得被调整为测量可代表经提取的粪便样品的样品中的相应分析物。样本(粪便提取液)被预稀释 20 倍用于 CEA 测定,然而在其他方面该测定是根据制造商的建议来进行。

表 4: 用于粪便提取液测量的测定法和提取液稀释度的概况

测定法	供应商	粪便净重/ 提取方法	测定的总提 取物稀释度
Hb	R-Biopharm	见实施例 2	1:10
Hb-触珠蛋白	R-Biopharm	见实施例 2	1:10
TIMP-1	R&D-Systems	见实施例 2	1:6
CEA	Roche-Elecsys	见实施例 2	1:400
钙防卫蛋白	Calpro AS	见实施例 2	1:51
M2-PK	Schebo-Biotech	来自 Schebo Biotech 的原取样 装置	1:6

为测试标志组合是否可改善 CRC 诊断,将标志按贝叶斯逻辑回归法(BLR)进行组合。在评价标志组合的 BLR 算法中,使用高斯先验(Gaussian prior)并实施于 Alexander Genkin、David D. Lewis 和 David Madigan 的 BBR 软件(用于文本分类的大规模 Bayesian 逻辑回归法(Large-scale Bayesian logistic regression for text categorization)。Technometrics)。使用了下述设置:无自动特征选择、设定在 0.05 的先验方差、无阈值调整和借助正常化的输入标准化。对于数值处理,0.0005 收敛阈值(convergence threshold)、1000 迭代和无准确度模式

(no-accuracy-mode)的默认设置保持不变。用该基本算法得到的结果通过在 Monte-Carlo 交叉核实设计中运行 100 次进行评定。在每次运行中,经由启动值为 19022007 用于默认随机数生成器的 Matlab® R2006a 内置功能随机采样(in-build function randsample),所有病例和对照的三分之二分别被选为训练集(training set)。随后基本算法被应用于训练集以产生诊断规则。对训练集的对照确定估计的后验病例概率(posterior case-probability)的阈值,以分别达到 95%特异性或 98%特异性。然后将诊断规则应用到数据的其它三分之一以估计在给定阈值的灵敏度和特异性。

对于筛查检验,不只有 ROC 值是相关的。在筛查设置中相当严格的要求使得在高特异性时有足够好的灵敏度。高特异性是至关重要的,因为低特异性将造成大量的假阳性结果而伴随不必要的后续程序和患者的痛苦。表 5 总结了对如表 1 中指定的 101 名 CRC 患者与 225 名对照进行评定的 ROC 值,以及在特异性分别预设 95%和 98%下的灵敏度。

表 5: 检测 CRC 的标志物组合

标志组合	TIMP-1	TIMP-1+ Hb-Hp	TIMP-1+ Hb	TIMP-1+ 钙防卫蛋白	TIMP-1+ M2-PK	TIMP-1+ CEA
ROC 面积 (%)	91	95	94	92	92	91
95%特异性 下的灵敏度	73	88	85	79	79	73
98%特异性 下的灵敏度	62	79	73	64	70	61

从表 5 可推断, CRC 诊断中的这些各别的标志的 AUC 值非常相近。另一方面,通过联用 TIMP-1 和 CRC 的其它标志, CRC 检测的

灵敏度可显著提高。这在特异性水平为 98%下尤其明显。单独的 TIMP-1 在 98%特异性水平下灵敏度为 61%，而与其它 CRC 标志(如 Hb、M2PK 和 Hb/Hp)的组合提高了灵敏度。尤其是由 TIMP-1 和血红蛋白/触珠蛋白复合体组成的标志组合显示出灵敏度从 62%增至 79%。因此，为了在早期检出 CRC，包含 TIMP-1 的标志组合被认为是非常重要的。特别地，这种组合分别在结肠直肠癌 I 期或 II 期的检测中似乎是有价值的。

<110> 霍夫曼—拉罗奇有限公司

<120> TIMP-1 作为结肠直肠癌标志的用途

<130> 24232 WO

<150> EP07009396

<151> 2007-05-10

<160> 1

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 207

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<220>

<221> 信号肽

<222> (1).. (23)

<220>

<221> 成熟肽

<222> (24).. (207)

<400> 1

Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Leu Trp
-20 -15 -10

Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro Pro His Pro Gln
-5 -1 1 5

Thr Ala Phe Cys Asn Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala Lys Phe Val Gly
10 15 20 25

Thr Pro Glu Val Asn Gln Thr Thr Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Ile Lys
30 35 40

Met Thr Lys Met Tyr Lys Gly Phe Gln Ala Leu Gly Asp Ala Ala Asp
45 50 55

Ile Arg Phe Val Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val Cys Gly Tyr Phe
60 65 70

His Arg Ser His Asn Arg Ser Glu Glu Phe Leu Ile Ala Gly Lys Leu
75 80 85

Gln Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe Val Ala Pro Trp
90 95 100 105

Asn Ser Leu Ser Leu Ala Gln Arg Arg Gly Phe Thr Lys Thr Tyr Thr
110 115 120

Val Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Leu Ser Ile Pro Cys
125 130 135

Lys Leu Gln Ser Gly Thr His Cys Leu Trp Thr Asp Gln Leu Leu Gln
140 145 150

Gly Ser Glu Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala Cys Leu Pro Arg
155 160 165

Glu Pro Gly Leu Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Ser Gln Ile Ala
170 175 180

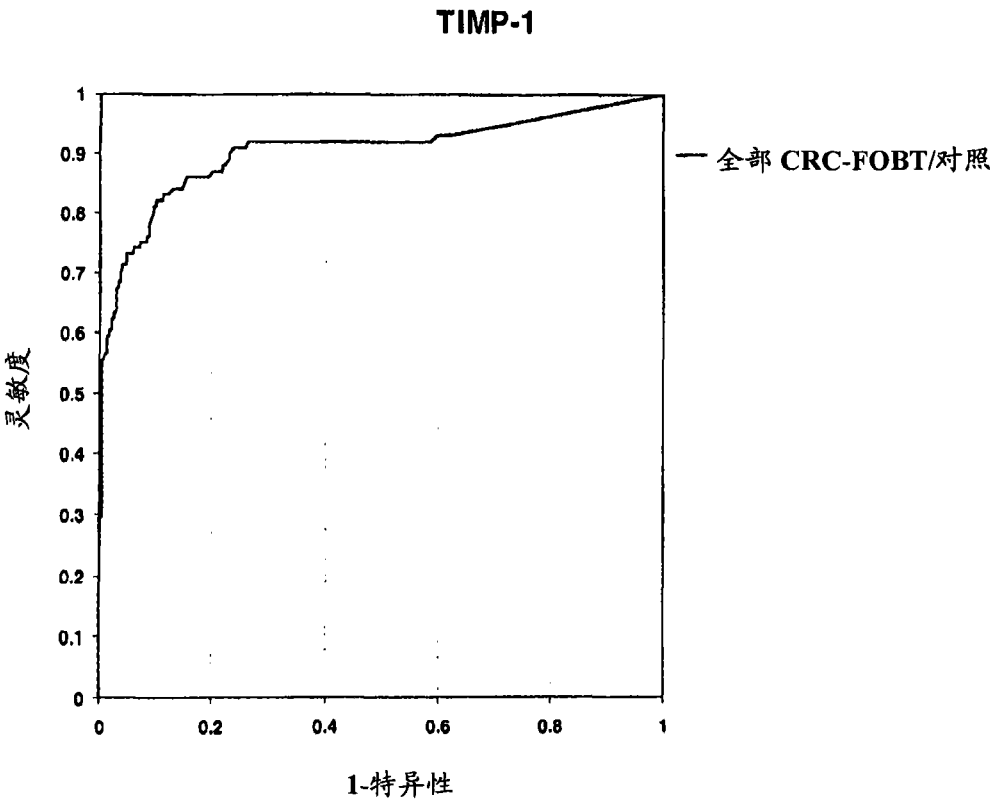


图 1