

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680007808.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

A01N 37/18 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年5月28日

[11] 公开号 CN 101189516A

[22] 申请日 2006.3.10

[21] 申请号 200680007808.6

[30] 优先权

[32] 2005.3.11 [33] US [31] 60/662,090

[86] 国际申请 PCT/US2006/008578 2006.3.10

[87] 国际公布 WO2006/099126 英 2006.9.21

[85] 进入国家阶段日期 2007.9.10

[71] 申请人 赛弗吉生物系统公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 约翰·霍普金斯大学

德克萨斯州系统大学管理委员会

[72] 发明人 E·T·冯 R·巴斯特

D·W·尚 J·宋 V·波杜斯特

Z·张

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书6页 说明书52页 附图17页

[54] 发明名称

卵巢癌及子宫内膜癌的生物标记：抗菌蛋白  
(HEPCIDIN)

[57] 摘要

本发明提供以蛋白质为主的生物标记及生物标记组合，其可用于定性病人卵巢癌状态及子宫内膜癌状态。尤其，发现抗菌蛋白(hepcidin)为卵巢癌及子宫内膜癌二者的生物标记；且发现一组生物标记包括抗菌蛋白、甲状腺素运送蛋白(transthyretin)及任选的其它标记，其有用于将个体样本分类为卵巢癌或非卵巢癌。该等生物标记可通过 SELDI 质谱术检测。

1. 一种定性个体卵巢癌状态的方法，包含：
  - (a) 测量得自该个体的生物样本中的一个或多个生物标记，其中至少一个生物标记为抗菌蛋白 (hepcidin)；以及
  - (b) 将该测量值或该等测量值与选自卵巢癌及非卵巢癌的卵巢癌状态交互关联。
  
2. 如权利要求 1 所述的方法，包含测量该生物样本中的多个生物标记，其中，该多个生物标记进一步包含甲状腺素运送蛋白 (transthyretin)。
  
3. 如权利要求 2 所述的方法，其中，该多个生物标记进一步包含选自于由下列所组成的组群：Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少一个生物标记。
  
4. 如权利要求 3 所述的方法，其中，该多个生物标记进一步包含选自于由下列所组成的组群：Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少两个生物标记。
  
5. 如权利要求 3 所述的方法，其中，该多个生物标记进一步包含选自于由下列所组成的组群：Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少三个生物标记。
  
6. 如权利要求 3 所述的方法，其中，该多个生物标记进一步包含 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段。

7.如权利要求3所述的方法，其中，抗菌蛋白为抗菌蛋白-25，甲状腺素运送蛋白为半胱胺酸化(cysteinylated)甲状腺素运送蛋白及ITIH4片段为ITIH4片段1。

8.如权利要求3所述的方法，其中，该多个生物标记进一步包含 $\beta$ -2微球蛋白。

9.如权利要求1-3中任一项所述的方法，其中，该一个或多个生物标记是通过质谱测量。

10.如权利要求9所述的方法，其中，质谱为SELDI-MS。

11.如权利要求1-3中任一项所述的方法，其中，该至少一个生物标记是通过免疫检定分析测量。

12.如权利要求1-3中任一项所述的方法，其中，该样本为血液或血液衍生物。

13.如权利要求1-3中任一项所述的方法，其中，该样本为卵巢囊肿液体、腹水或尿液。

14.如权利要求1-3中任一项所述的方法，其中，该交互关联是通过执行软件分类算法来进行。

15.如权利要求1-3中任一项所述的方法，其中，非卵巢癌为良性卵巢疾病。

16.如权利要求1-3中任一项所述的方法，其中，卵巢

癌为第一期或第二期卵巢癌。

17.如权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中，该个体已经接受卵巢癌的治疗，且该卵巢癌为癌症的复发。

18.如权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其中，非卵巢癌为选自良性卵巢囊肿、子宫内膜异位、子宫纤维瘤、乳癌及子宫颈癌的妇科疾病。

19.如权利要求 1-3 中任一项所述的方法，进一步包含：  
(c)报告该状态予该个体。

20.如权利要求 1-3 中任一项的方法，进一步包含：  
于具体介质上记录该状态。

21.如权利要求 1-3 中任一项所述的方法，进一步包含：  
(c)基于该状态来管理个体的治疗。

22.如权利要求 21 所述的方法，进一步包含：(d)  
于个体管理后测定该至少一个生物标记，以及将该测量值与疾病进行交互关联。

23.一种测定卵巢癌的病程的方法，包含：

(a)首先，测定得自个体的生物样本中的一个或多个生物标记，其中至少一个生物标记为抗菌蛋白；

(b)其次，测定得自该个体的生物样本中的至少一个生物标记；以及

(c)比较该第一测量值与第二测量值；其中，比较测量值可决定卵巢癌的病程。

24. 一种方法，包含测量得自个体的样本中的抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白。

25. 如权利要求 24 所述的方法，进一步包含测量该样本中的 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少一者。

26. 一种定性个体的子宫内膜癌状态的方法，包含：

(a) 测量得自该个体的生物样本中的一个或多个生物标记，其中至少一个生物标记为抗菌蛋白；以及

(b) 将该测量值或该等测量值与子宫内膜癌的状态交互关联。

27. 一种套件组，包含：

(a) 包含至少一种捕捉试剂附接于其上的固体支撑件，其中该捕捉试剂结合抗菌蛋白；以及

(b) 使用该固体支撑件来检测抗菌蛋白的说明书。

28. 如权利要求 27 所述的套件组，其中，包含捕捉试剂的该固体支撑件为 SELDI 探针。

29. 如权利要求 27 所述的套件组，进一步包含抗菌蛋白的标准参考品。

30. 一种套件组，包含：

(a) 包含至少一种捕捉试剂附接于其上的至少一种固体支撑件，其中该捕捉试剂结合抗菌蛋白

及甲状腺素运送蛋白；以及

(b)使用该固体支撑件来检测抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白的说明书。

31.如权利要求30所述的套件组，其中，包含捕捉试剂的该固体支撑件为 SELDI 探针。

32.如权利要求30所述的套件组，进一步包含抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白的标准参考品。

33.一种套件组，包含：

(a)包含至少一种捕捉试剂附接于其上的至少一种固体支撑件，其中该捕捉试剂结合抗菌蛋白、甲状腺素运送蛋白及 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少一者；以及

(b)使用该固体支撑件来检测抗菌蛋白、甲状腺素运送蛋白及 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少一者的说明书。

34.如权利要求33所述的套件组，其中，包含捕捉试剂的该固体支撑件为 SELDI 探针。

35.如权利要求33所述的套件组，进一步包含抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白及 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少一者的标准参考品。

36.一种软件产品，包含：

(a)存取来自于样本的资料的编码，该资料包含该样本中的至少一个生物标记的测量值，其中，至少一个生物标记为抗菌蛋白；以及

(b) 执行分类算法的编码，该分类算法可将该样本的卵巢癌状态作为测量值的函数来分类。

37. 如权利要求 36 所述的软件产品，其中，该至少一个生物标记进一步包含甲状腺素运送蛋白。

38. 如权利要求 36 所述的软件产品，其中，该至少一个生物标记进一步包含选自 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 或 ITIH4 片段中的至少一个生物标记。

39. 如权利要求 36 所述的软件产品，其中，该至少一个生物标记进一步包含  $\beta$ 2-微球蛋白。

40. 一种方法，包含将与得自个体的样本中的至少一个生物标记交互关联测得的卵巢癌状态相关的诊断传达告知该个体，其中该至少一个生物标记为抗菌蛋白。

41. 如权利要求 40 所述的方法，其中，该至少一个生物标记进一步包含甲状腺素运送蛋白。

42. 如权利要求 40 所述的方法，其中，该诊断是通过电脑产生的介质而传达告知该个体。

43. 一种识别与抗菌蛋白相互作用的化合物的方法，其中，该方法包含：

- a) 抗菌蛋白与试验化合物接触；以及
- b) 测定该试验化合物是否与抗菌蛋白相互作用。

## 卵巢癌及子宫内膜癌的生物标记：抗菌蛋白 (HEPCIDIN)

### 【技术领域】

本案请求美国临时专利申请案 60/662,090，申请日 2005 年 3 月 11 日的权益，该案全文以引用方式并入此处。

大致上本发明有关临床诊断。

### 【先前技术】

卵巢癌属于已开发国家的最具有致命性的妇科恶性疾病。每年单于美国即有约 23,000 名妇女被诊断出患有此种疾病，每年几乎有 14,000 名妇女死于卵巢癌 (Jamal, A. 等人, CA 癌症 J. Clin, 2002; 52:23-47)。尽管癌症治疗的进展，过去 20 年间卵巢癌的死亡率几乎未曾改变 (Id)。与疾病被诊断出的阶段相关的存活率梯度陡峭，因此早期诊断仍然是改善卵巢癌病人的长期存活率的最重要因素。

后期诊断出卵巢癌的预后不良，确证诊断程序的成本高及风险高，且于一般族群普及率相对低，共同造成卵巢癌对试验敏感度及试验专一性有极端苛刻要求用来筛检一般族群的卵巢癌。

适合早期检测与早期诊断癌症的肿瘤标记的识别对改善病人的临床结果有极大展望。特别重要地是由模糊症状或无症状病人或患有身体检查时不容易接近的肿瘤的病人，肿瘤标记的识别变成特别重要。尽管相当致力于直接早期诊断，但至今为止尚未发展出具有成本效益的筛检试验 (Paley PJ., Curr Opin Oncol, 2001; 13 (5):399-402)，当妇女于诊断时通常出现弥漫性疾病。(Ozols RF 等人, 上皮卵巢癌。于: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC 编辑, 妇科肿瘤原理与实务, 第 3 版, 费城: Lippincott、Williams 及 Wilkins; 2000 年, 981-1057 页)。

于约 30%至 40%第一期卵巢癌，已经最被明确特征化的肿瘤标记亦即 CA125 呈阴性，于多种良性疾病的 CA125 的浓度升高。(Meyer T. 等

人, Br J 癌症, 2000;82 (9):1535-8;Buamah P., J Surg Oncol, 2000; 75 (4):264-5;Tuxen MK 等人, 癌症治疗 Rev, 1995;21 (3):215-45)。CA125 用作为基于族群的筛检工具用来早期筛检及诊断卵巢癌, 由于其敏感度低及专一性低而受妨碍。(MacDonald ND 等人, Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1999;82 (2):155-7; Jacobs I. 等人, Hum Reprod, 1989;4 (1):1-12;Shih I-M 等人, 卵巢癌的肿瘤标记于: Diamandis EP, Fritsche, H., Lilja, H., Chan, D.W. 及 Schwartz, M. 编辑。肿瘤标记生理、病理、技术与临床应用。费城: AACC)。虽然骨盆超音波扫描且近来阴道超音波扫描已经用来筛检高风险病人, 但两种技术的敏感度和专一性皆不足以应用于一般族群(MacDonald ND 等人, 参见上文)。晚近致力于使用 CA125 与额外肿瘤标记的组合(Woolas RP XF 等人, J Natl 癌症 Inst, 1993;85 (21):1748-51; Woolas RP 等人, Gynecol Oncol, 1995;59 (1):111-6;Zhang Z. 等人, Gynecol Oncol, 1999;73 (1):56-61;Zhang Z. 等人, 多种标记用来检测第一期上皮卵巢癌的用途: 神经网络分析改善性能。美国临床肿瘤学会 2001 年; 年度会议摘要)用于纵向癌症风险研究模型(Skates SJ 等人, 癌症, 1995;76 (10 Suppl):2004-10), 及用于与超音波衔接来用作为第二线试验(Jacobs IDA 等人, Br Med J, 1993;306 (6884):1030-34;Menon U TA 等人, 英国产科学及妇科学期刊 2000;107 (2):165-69)已经显示用于改良整体试验专一性具有展望的结果, 此点对于诸如卵巢癌等普及率相当低的疾病有关键重要性。也参考 Menon 等人 J.Clin 肿瘤学(2005)23 (31):7919-26。

由于末期卵巢癌的预后悲惨, 一般同意医生须接受有最少 10%阳性预测值的试验。(Bast, R.C. 等人, 癌症治疗及研究, 2002;107:61-97)。将此点扩大至一般族群, 一般筛检试验要求大于 70%的敏感度及 99.6%专一性。目前并无任何既有的血清标记诸如 CA125、CA72-4、或 M-CSF 个别可发挥此种效能(Bast, R.C. 等人, Int J Biol 标记, 1998;13:179-87)。

如此, 相当需要有新颖的血清标记, 该等血清标记个别或与其它标记或诊断研究模型组合可发挥早期检测卵巢癌所要求的敏感度和专一性(Bast, R.C. 等人, 卵巢癌的早期诊断: 展望与实际。卵巢癌: ISIS

医疗媒体公司(ISIS Medical Media Ltd.)，英国牛津)。

由于卵巢癌的发生率低，无法理解有意图具有适当阳性预测性意图用于无症状妇女的筛检试验。但已经验证，即使于无全面性筛检试验的存在下，确实能改善卵巢癌病人的长期存活率的一项因素为妇科肿瘤专家所做适当分类(Craig, CC 等人，手术专长对卵巢癌病人照护程序及结果的影响，J Natl Canc Inst, 2006:98, 172-80)。对于妇女呈现给医生的症状提示可能患有卵巢质块的病例，此点特别为真。

如此期望有一种可靠而准确的测定病人的卵巢癌状态的方法，结果可用来处置个体的治疗。

### 【发明内容】

发现抗菌蛋白为卵巢癌(侵袭性上皮癌)的生物标记。进一步发现抗菌蛋白为患有子宫内膜癌病人所差异性存在的生物标记。更特别，发现生物样本中的抗菌蛋白浓度于卵巢癌病人比非卵巢癌升高，于子宫内膜癌比非子宫内膜癌升高。换言之，抗菌蛋白浓度的升高是与卵巢癌且与子宫内膜癌有交互关联。

于若干实施例中，欲区别诊断的疾病状态有卵巢癌相对于良性卵巢疾病；卵巢癌相对于良性妇科疾病；卵巢癌相对于选自于子宫内膜异位、子宫纤维瘤、乳癌及子宫颈癌的妇科疾病；恶性病(例如乳癌或结肠癌)以外的卵巢疾病；第一期卵巢癌相对于非卵巢癌及卵巢癌的复发相对于非卵巢癌。基于所测定的状态，适用于进一步程序，包括额外诊断试验或治疗程序或方案。

进一步发现，当抗菌蛋白浓度用来与其它生物标记浓度组合时，诊断试验的预测能力改良。更特别，抗菌蛋白浓度升高与甲状腺素运送蛋白浓度降低是与卵巢癌有交互关联。抗菌蛋白浓度升高与甲状腺素运送蛋白浓度降低连同 Apo A1 (浓度降低)、转铁蛋白(transferring) (浓度降低)、CTAP-III (浓度升高)及 ITIH4 内部片段(浓度升高)中的一者或多者的浓度是与卵巢癌有交互关联。此等生物标记可与 $\beta$ -2 微球蛋白(浓度升高)、CA125 (浓度升高)及/或其它已知的卵巢癌生物标记组合用于诊断试验。

于一个态样中，本发明提供一种定性个体的卵巢癌状态的方法，包含测量得自该个体的生物样本中的一个或多个生物标记，其中至少

一个生物标记为抗菌蛋白(hepcidin)；以及将该测量值或该等测量值与选自于卵巢癌及非卵巢癌中的一卵巢癌状态交互关联。于此种方法的一个实施例中，测定该生物样本中的多个生物标记，其中该测量得的生物标记除了抗菌蛋白的外进一步包含甲状腺素运送蛋白。于此种方法的另一个实施例中，测量生物样本中的多个生物标记，其中，该测量得的生物标记除了抗菌蛋白的外，包含选自于由：Apo A1、转铁蛋白(transferrin)、CTAP-III 及 ITIH4 片段所组成的组群的至少一个生物标记。于此种方法的又一个实施例中，测量生物样本中的多个生物标记，其中，该测量得的生物标记除了抗菌蛋白的外，包含选自于由：Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段所组成的组群的至少两个生物标记。于此种方法的又另一实施例中，测量生物样本中的多个生物标记，其中，该测量得的生物标记除了抗菌蛋白的外，包含选自于由：Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段所组成的组群的至少三个生物标记。于又一态样中，测量多个生物标记，测量得的生物标记包含 $\beta$ -2 微球蛋白。

于一实施例中，抗菌蛋白可为抗菌蛋白-25，甲状腺素运送蛋白可为半胱胺酸化(cysteinyllated)甲状腺素运送蛋白及/或 ITIH4 片段可为 ITIH4 片段 1。

于另一个实施例中，通过质谱术测定一个或多个生物标记。质谱术适合为 SELDI-MS。于又一态样中，藉免疫检定分析测量一个或多个生物标记。

多个生物样本可用于本发明的方法，包括例如生物样本包含血液或血液衍生物，或生物样本包含卵巢囊肿瘤体、腹水或尿液。

于本发明方法的一个实施例中，非卵巢癌为良性卵巢疾病。于另一个实施例中，非卵巢癌为妇科疾病诸如良性卵巢囊肿、子宫内膜异位、子宫纤维瘤、乳癌及子宫颈癌。于又一个实施例中，卵巢癌为第一期或第二期卵巢癌。于若干态样中，个体已经接受卵巢癌治疗，且该卵巢癌为癌症复发。

于另一态样中，提供定性个体子宫内膜癌状态的方法，包含(a)测定得自该个体的生物样本中的一个或多个生物标记，其中该至少一个生物标记为抗菌蛋白；以及(b)将该测量值或该等测量值与子宫内膜

癌状态交互关联。于一个实施例中，该状态为子宫内膜癌相对于非子宫内膜癌。

本发明方法进一步包含将该状态报告予该个体，将该状态记录于一有形的实体介质上，及/或基于该状态管理该个体的治疗。一项或多项生物标记可为后续个体的处理以及该等测量值与疾病进展的交互关联。

于一较佳态样中，提供一种测定卵巢癌的病程的方法，包含(a)首先，测定得自个体的生物样本中的一个或多个生物标记，其中至少一个生物标记为抗菌蛋白；(b)其次，测定得自该个体的一生物样本中的至少一个生物标记；以及(c)比较该第一测量值与第二测量值；其中，所述比较测量值可决定卵巢癌的病程。

于又一较佳态样中，提供的方法包含测量得自个体样本中的抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白。于若干实施例中，此等方法进一步包含测定于该样本中的 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少一者。

于另一实施例中，本发明提供一种套件组，包含(a)包含至少一种捕捉试剂附接于其上的固体支撑件，其中，该捕捉试剂可结合抗菌蛋白；以及(b)使用该固体支撑件来检测抗菌蛋白的说明书。固体支撑件例如可包含 SELDI 探针。套件组视需要也可包含抗菌蛋白的标准参考品。

于又一实施例中，本发明提供一种套件组，包含(a)包含至少一种捕捉试剂附接于其上的至少一种固体支撑件，其中，该捕捉试剂结合抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白；以及(b)使用该固体支撑件来检测抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白的说明书。该固体支撑件例如包含 SELDI 探针。该套件组视需要也可包含抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白的标准参考品。

于又另一实施例中，本发明提供一种套件组，包含(a)包含至少一种捕捉试剂附接于其上的至少一种固体支撑件，其中，该捕捉试剂结合抗菌蛋白、甲状腺素运送蛋白及 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少一者；以及(b)使用该固体支撑件来检测抗菌蛋白、甲状腺素运送蛋白、及 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中

的至少一者的说明书。该固体支撑件例如包含 SELDI 探针。该套件组视需要也可包含抗菌蛋白、甲状腺素运送蛋白及 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III 及 ITIH4 片段中的至少一者的标准参考品。

本发明进一步包括一种软件产品，包含 (a) 存取来自于样本的资料 的编码，该资料包含该样本中的至少一个生物标记的测量值，其中，该至少一个生物标记为抗菌蛋白；以及 (b) 执行分类算法的编码，该分类算法可将样本的卵巢癌状态呈测量值的函数来分类。于一个态样中，至少一个生物标记进一步包含甲状腺素运送蛋白。于另一态样中，该至少一个生物标记进一步包含选自于 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III、及 ITIH4 片段中的至少一个生物标记。于又另一态样中，该至少一个生物标记进一步包含  $\beta$ 2-微球蛋白。

本发明也提供一种方法，包含将与由得自个体的样本中的至少一个生物标记交互关联测得的卵巢癌状态相关的诊断传达告知该个体，其中该至少一个生物标记为抗菌蛋白。于一个态样中，该至少一个生物标记进一步包含甲状腺素运送蛋白。该诊断例如适合通过一电脑产生的介质来传达告知予该个体。

本发明进一步提供一种识别与抗菌蛋白相互作用的化合物的方法，其中，该方法包含 a) 抗菌蛋白与试验化合物接触；以及 b) 测定该试验化合物是否与抗菌蛋白相互作用。

本发明的其它态样讨论如下。

#### 附图说明

图 1 显示 ROC 曲线分析，显示于  $m/z$  2789 的抗菌蛋白尖峰用于区别卵巢癌与健康对照组的能力。AUC 为 0.876，显著高于 0.5， $p$  值  $<0.0001$ 。

图 2 显示各种抗菌蛋白片段的序列，包括四个交互关联的片段亦即抗菌蛋白-25 (SEQ ID NO:13)、抗菌蛋白-24 (SEQ ID NO:14)、抗菌蛋白-22 (SEQ ID NO:16)、及抗菌蛋白-20 (SEQ ID NO:18)。21 个序列是由顶至底编号 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:22。

图 3 显示于使用抗体对 ITIH4 片段进行免疫沉淀/下拉后，血清样本的 SELDI 光谱 ( $m/z$  3272)。有矩形标签的尖峰为已知 ITIH4 片段。四个所发现的抗菌蛋白变异株是于本光谱于接近  $m/z$  位置 2191、2436、

2673、及 2788 (以箭头指示)。

图 4 显示 ROC 曲线分析, 显示于  $m/z$  2789 的抗菌蛋白尖峰用于区别卵巢癌与其它癌症的能力。AUC 为 0.774, 显著高于 0.5,  $p$  值  $<0.0001$ 。

图 5 显示 ROC 曲线分析, 显示抗菌蛋白尖峰用于两个分开确认诊断集合的能力。AUC 为 0.756 及 0.772, 二者皆是大于 0.5,  $p$  值  $<0.0001$ 。

图 6 显示四个表示抗菌蛋白变异株尖峰中的二者的五组样本的散点图。

图 7 显示使用抗菌蛋白尖峰中的二者由一独立确认诊断集合中的五组病人的散点图。显示此等尖峰于无癌症病人以及治疗后病人较低, 于有卵巢癌前处理病人较高以及复发卵巢癌病人较高。抗菌蛋白浓度是与肿瘤负荷有交互关联。

图 8 显示使用抗菌蛋白尖峰中的二者由一第二独立确认诊断集合中的五组病人的散点图。显示此等尖峰于健康对照组以及于良性疾病病人较低, 而于卵巢癌病人较高。

图 9A 至 9G 显示显示此处所述的各种生物标记的 SELDI 质谱。图 9A 显示捕捉于以铜充电的 IMAC-50 生物晶片上的 ITIH4 片段 1。图 9B 显示捕捉于以铜充电的 IMAC-50 生物晶片上的抗菌蛋白-25。图 9C 显示捕捉于以铜充电的 IMAC-50 生物晶片上的 CTAP-III。图 9D 显示捕捉于以铜充电的 IMAC-50 生物晶片上的  $\beta$ 2-微球蛋白。图 9E 显示捕捉于 Q-10 生物晶片上的甲状腺素运送蛋白。图 9F 显示捕捉于 H50 生物晶片上的 Apo A1。图 9G 显示捕捉于以铜充电的 IMAC-50 生物晶片上的转铁蛋白。

图 10 显示血浆中的多种形式的甲状腺素运送蛋白的质谱的特写。

图 11 显示 ROC 曲线分析, 显示后文实例 4 的迷你检定分析。

## 【具体实施方式】

### 1. 引言

生物标记为有机生物分子, 生物标记差异地呈现于取自一种表现型状态(例如患病)比较有另一种表现型状态(例如未患病)个体的样本中差异存在。若于不同组群中生物标记的平均表现程度或中间表现程度计算为统计上显著, 则生物标记是差异地呈现于不同的表现型状态

间。常用的统计显著试验尤其包括 t 试验、ANOVA、Kruskal-Wallis、Wilcoxon、Mann-Whitney 及优胜率。生物标记单独使用或组合使用提供个体属于一种表现型状态或另一种表现型状态的相对风险的测量值。如此，生物标记可用作疾病标记(诊断)、药物疗效标记(治疗诊断)及药物毒性标记。

本发明的生物标记是使用 SELDI 发现。如此部分是以其质量对电荷比、质谱中的尖峰形状、及其结合特性来特征化。此等特征表示生物分子的特有特性，而非生物分子被区别的方法极限。

本发明的生物标记部分是以其质量对电荷比特征化。各个生物标记的质量对电荷比提供于此。标示为例如「M2789」的特殊分子标记具有 2789D 的质量对电荷比测量值。质量对电荷比是由赛佛金生物系统公司(Ciphergen Biosystems, Inc.) PBS II 质谱仪或赛佛金 PCS 4000 质谱仪所产生的质谱测定。PBS II 为有质量准确度约 $\pm 0.15\%$ 。此外，所述仪器具有质量解析度约 400 至 1000m/dm，此处 m 为质量及 dm 为于 0.5 尖峰高度的质谱尖峰宽度。PCS4000 仪器具有约 $\pm 0.12\%$ 原始资料的质量准确度，有预期外部校准质量准确度 0.1%，及内部校准质量准确度 0.01%。此外，所述仪器具有质量解析度约 1000 至 2000m/dm，此处 m 为质量及 dm 为于 0.5 尖峰高度的质谱尖峰宽度。所述生物标记的质量对电荷比是使用生物标记精灵(Biomarker Wizard)软件(赛佛金生物系统公司)测定。生物标记精灵是通过如藉 PBSII 或 PCS4000 测得由全部分析光谱所得相同尖峰的质量对电荷比丛集，取丛集中的最大和最小质量对电荷比，除以 2 来分派一个质量对电荷比予一生物标记。如此，所提供的质量反映此等规格。

本发明的生物标记是以于飞行时间质谱术中的质量尖峰形状来进一步特征化。显示表示生物标记尖峰的质谱示于附图。

本发明的生物标记也以其对被吸附表面的结合特性来特征化。各个生物标记的结合特性也说明于此。

## 2. 卵巢癌的生物标记

### 2.1 抗菌蛋白

抗菌蛋白为原先于人血浆与人尿液中被识别的 25 氨基酸肽(抗菌蛋白-25)，抗菌蛋白具有抗微生物活性。全长抗菌蛋白前驱物为包含

信号序列及前区(参考Kulaksiz, H. 等人(2004)肠 53:735-743)的 84 胺基酸蛋白质(瑞士寄存号码P81172)。本发明的抗菌蛋白生物标记是衍生自全长抗菌蛋白的C端。抗菌蛋白是由得自例如美国生物公司(型录号码H2008-51) ([www.usbio.net](http://www.usbio.net), Swampscott, MA) 的抗体所辨识。可用作为本发明的生物标记的四个不同抗菌蛋白变异株是通过计算质量对电荷比为 2789、2673、2436、及 2191 特征化。

发现抗菌蛋白为采用得自赛佛金生物系统公司(加州福里蒙)的蛋白质晶片阵列(「赛佛金」), 使用 SELDI 技术的卵巢癌及子宫内膜癌的生物标记。更具体而言, 抗菌蛋白浓度可区别卵巢癌与非卵巢癌、子宫颈癌及良性卵巢疾病。也可区别子宫内膜癌及非子宫内膜癌。由诊断患有卵巢癌、子宫内膜癌、子宫颈癌的个体以及诊断为正常个体或诊断为患良性疾病个体收集尿液样本及血清样本。样本施用于 SELDI 生物晶片有使用或无使用 ITIH4 3272 m/z 片段进行共同免疫沉淀(参考国际公告案 WO 2004/099432), 使用对 ITIH4 片段 1 提引出的抗体(细节讨论如下), 样本中的多肽光谱是藉于赛佛金 PBSIIc 或 PCS4000 质谱仪上的飞行时间质谱术来产生。如此所得光谱是藉赛佛金快速资料管理员(Express Data Manager)软件附有生物标记精灵及生物标记型样软件(得自赛佛金生物系统公司)分析而获得。各组的质谱接受散点分析。Mann-Whitney 试验分析用来比较散点图中各个蛋白质丛集的卵巢癌组及对照组, 选择两组间有显著差异( $p < 0.01$ )的蛋白质。此种方法的进一步细节说明于实例章节。

如此发现的特定生物标记显示于表 1。「蛋白质晶片检定分析」栏是指于各实例中发现生物标记的层析洗提分、生物标记所结合的生物晶片类型及洗涤条件。于各例中, 生物标记各自是使用多种其它蛋白质晶片检定分析找出。「理论质量」提供基于胺基酸序列的期望的质量及修改诸如双硫键。

表 1

标记	P 值	于卵巢癌的 向上调节或 向下调节	蛋白质晶片检定分析
抗菌蛋白 -25M2789 (理论质量 =2789.41D)	0.002	向上	尿液, CM10, 以 100 mM 乙酸钠 pH4 洗涤
	0.0011	向上	尿液, IMAC30-Cu <sup>+</sup> , 以 100 mM 磷酸钠、0.5 M NaCl pH7 洗涤
	0.0000069	向上	血清, IMAC30-Cu <sup>+</sup> , 以 50 mM 磷酸钠缓冲液、205 mM NaCl pH6.0 洗涤
	样本集合 1 发现卵巢癌相对于对照: 0.001040 卵巢癌相对于其它癌症: 0.000002	向上	血清, 免疫沉淀ITI14 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝基甲苯(Triton)洗涤, 以有机缓冲液IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲液洗涤
	样本集合 2 验证 0.000007	向上	血清, 免疫沉淀ITI14 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝基甲苯洗涤, 以有机缓冲液IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲液洗涤
	样本集合 3 验证 0.000000	向上	血清, 免疫沉淀ITI14 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝基甲苯洗涤, 以有机缓冲液IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲液洗涤
抗菌蛋白 -24 M2673	0.001	向上	尿液, CM10, 以 100 mM 乙酸钠 pH4 洗涤

(理论质量 =2674.32D)	0.01	向上	尿液, IMAC30-Cu <sup>+</sup> , 以100 mM 磷酸钠、0.5 M NaCl pH7 洗涤
	样本集合 1 发现卵巢 癌相对于对照: 0.000009 卵巢癌相对 于其它癌症: 0.000002	向上	血清, 免疫沉淀ITIH4 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝 基甲苯洗涤, 以有机缓冲液 IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲 液洗涤
	样本集合 2 验证 0.000097	向上	血清, 免疫沉淀ITIH4 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝 基甲苯洗涤, 以有机缓冲液 IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲 液洗涤
	样本集合 3 验证 0.000001	向上	血清, 免疫沉淀ITIH4 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝 基甲苯洗涤, 以有机缓冲液 IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲 液洗涤
抗菌蛋白 -22 M2436	0.0002	向上	尿液, CM10, 以100 mM 乙 酸钠 pH4 洗涤
(理论质量 =2436.07D)	0.0619	向上	尿液, IMAC30-Cu <sup>+</sup> , 以100 mM 磷酸钠、0.5 M NaCl pH7 洗涤
	样本集合 1 发现卵巢 癌相对于对照: 0.000030 卵巢癌相对 于其它癌症: 0.000015	向上	血清, 免疫沉淀ITIH4, 以 PBS/0.1%三硝基甲苯洗涤, 以有机缓冲液IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗 提, 以有机缓冲液洗涤

	样本集合 2 验证 0.002027	向上	血清, 免疫沉淀ITIH4 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝基甲苯洗涤, 以有机缓冲液 IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲液洗涤
	样本集合 3 验证 0.000000	向上	血清, 免疫沉淀ITIH4 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝基甲苯洗涤, 以有机缓冲液 IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲液洗涤
抗菌蛋白 -20 M2191 (理论质量 =2191.78D)	0.0061	向上	尿液, CM10, 以 100 mM 乙酸钠 pH4 洗涤
	0.0023	向上	尿液, IMAC30-Cu <sup>+</sup> , 以 100 mM 磷酸钠、0.5 M NaCl pH7 洗涤
	样本集合 1 发现卵巢癌相对于对照: 0.000009 卵巢癌相对于其它癌症: 0.000007	向上	血清, 免疫沉淀ITIH4 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝基甲苯洗涤, 以有机缓冲液 IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲液洗涤
	样本集合 2 验证 0.020419	向上	血清, 免疫沉淀ITIH4 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝基甲苯洗涤, 以有机缓冲液 IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲液洗涤
	样本集合 3 验证 0.000000	向上	血清, 免疫沉淀ITIH4 (3272 m/z片段), 以PBS/0.1%三硝基甲苯洗涤, 以有机缓冲液 IMAC-Cu <sup>+</sup> 洗提, 以有机缓冲液洗涤

抗菌蛋白-25、-24、-22、及-20 的胺基酸序列为：

抗菌蛋白-25 (SEQ ID NO:13)：DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT

抗菌蛋白-24 (SEQ ID NO:14)：THFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT

抗菌蛋白-22 (SEQ ID NO:16)：FPICIFCCGCCHRSKCGM CCKT|

抗菌蛋白-20 (SEQ ID NO:18)：ICIFCCGCCHRSKCGMCCKT|

本发明的生物标记进一步是以其于层析表面上的结合性质来特征化。于使用 100 mM 乙酸钠于 pH 4 洗涤后，抗菌蛋白结合至阳离子交换吸附剂(例如赛佛金 CM10 蛋白质晶片阵列)。于以 100 mM 磷酸钠、0.5 M NaCl、pH 7 或有机缓冲液洗涤后，抗菌蛋白也结合至金属螯合物吸附剂(例如赛佛金 IMAC-Cu<sup>++</sup>蛋白质晶片阵列)。抗菌蛋白也可如用来让 ITIH4 变成目测可见的相同检定分析中变成目测可见，容后详述。

较佳检测抗菌蛋白的生物来源为尿液或血清。抗菌蛋白也可于腹水及囊肿瘤体、组织及器官诸如肝脏及特殊细胞例如巨噬细胞中检测得。

## 2.2 甲状腺素运送蛋白

甲状腺素运送蛋白也称作为甲状腺素前白蛋白(pre-albumin)乃另一种可用于本发明方法的生物标记。甲状腺素运送蛋白及其变异株于美国专利公开案 2005-0059013 A1 及国际专利公开案 WO 2005/098447 描述为卵巢癌的生物标记。未经修改的甲状腺素运送蛋白为衍生自 147 胺基酸前驱物(瑞士寄存号码 P02766)的 127 胺基酸蛋白质。本发明的甲状腺素运送蛋白生物标记包括未经修改的甲状腺素运送蛋白中的任一者或全部及多种其改性形式。甲状腺素运送蛋白是由得自例如 Dako (型录号码 A0002) ([www.dako.com](http://www.dako.com), Glostrup 丹麦)的抗体所辨识。

于血清的质谱中，甲状腺素运送蛋白显示为尖峰约为 13.9 千道耳顿的丛集。此丛集包括数种甲状腺素运送蛋白形式，包括未经修改的甲状腺素运送蛋白、S-磺酸化甲状腺素运送蛋白、S-半胱胺酸化甲状腺素运送蛋白、S-Gly-Cys 甲状腺素运送蛋白及 S-麸胱甘肽化甲状腺素运送蛋白。此等甲状腺素运送蛋白中的任一者及/或全部可用作为卵巢癌的生物标记。但 S-半胱胺酸化版本表示光谱中的主控形式，当使用质谱术时为较佳生物标记。可用作为生物标记的甲状腺素运送蛋白的另一个变异株为甲状腺素运送蛋白  $\Delta$ N10。如此发现的特定甲状腺

素运送蛋白生物标记示于表 2。

表 2

标记	P 值	于卵巢癌的向上调节或向下调节	蛋白质晶片检定分析
甲状腺素运送蛋白 $\Delta$ N10 (M12,870.9) (预测质量 12,887 道尔顿)	p<0.001	向下(卵巢癌相对于非卵巢癌)	Q10 阵列使用 100 mM 磷酸钠缓冲液、pH 7.0 (PB 缓冲液)
未经修改的甲状腺素运送蛋白 (M13900) (预测质量 13,761 道尔顿)	p<0.001	向下(卵巢癌相对于非卵巢癌)	Q10 阵列使用 100 mM 磷酸钠缓冲液、pH 7.0 (PB 缓冲液)
磺酸化甲状腺素运送蛋白 (M13850) (预测质量 13,841 道尔顿)	p<0.001	向下(卵巢癌相对于非卵巢癌)	Q10 阵列使用 100 mM 磷酸钠缓冲液、pH 7.0 (PB 缓冲液)
半胱氨酸酸化甲状腺素运送蛋白 (M13,890.8) (预测质量 13,880 道尔顿)	p<0.001	向下(卵巢癌相对于非卵巢癌)	Q10 阵列使用 100 mM 磷酸钠缓冲液、pH 7.0 (PB 缓冲液)
CysGly 改性的甲状腺素运送蛋白 (M13944) (预测质量 13,937 道尔顿)	p<0.001	向下(卵巢癌相对于非卵巢癌)	Q10 阵列使用 100 mM 磷酸钠缓冲液、pH 7.0 (PB 缓冲液)
麸胱甘肽化甲状腺素运送蛋白 (M14,086.9) (预测质量 14,066 道尔顿)	p<0.001	向下(卵巢癌相对于非卵巢癌)	Q10 阵列使用 100 mM 磷酸钠缓冲液、pH 7.0 (PB 缓冲液)

### 2.3 Apo A1

另一种可用于本发明方法的生物标记为阿朴脂蛋白A1 也称之为

Apo A1。Apo A1 于美国专利公开案 2005-0059013 A1 及国际专利公开案 WO 2005/098447 中被描述为卵巢癌的生物标记。Apo A1 为衍生自 267 氨基酸前驱物(瑞士寄存号码 P02647)的 243 氨基酸蛋白质。Apo A1 是由得自例如 EMD 生科公司(型录号码 178474) ([www.emdbiosciences.com/home.asp](http://www.emdbiosciences.com/home.asp), San Diego, CA) 的抗体所辨识。特定 Apo A1 生物标记示于表 3。Apo A1 也可于 H50 阵列或 IMAC30 或 IMAC50 阵列目测可见, 但较佳是于 H50 阵列上变成目测可见。

表 3

标记	P 值	于卵巢癌的向上调节或向下调节	蛋白质晶片检定分析
Apo A1 (M28043) (预测质量: 28,078.62D)	<.000001	向下	H50 缓冲液(10%乙, 0.1% TFA IMAC Cu <sup>++</sup> )
Apo A1 变异株 (M29977.4) (出现为于 28,043D 尖峰的肩部)		向下	H50 缓冲液(10%乙, 0.1% TFA)

较佳本发明方法包括使用改性形式的 Apo A1。Apo A1 的改性包括多个化学基团的转译后添加例如糖苷化及脂质化。

#### 2.4 转铁蛋白

本发明方法中可使用的另一种生物标记为转铁蛋白。转铁蛋白于美国专利公开案 2005-0214760 A1 被描述为卵巢癌的生物标记。转铁蛋白为衍生自 698 氨基酸前驱物(基因存库存取号码 NP\_001054 GI:4557871; 瑞士寄存号码 P02787)的 679 氨基酸蛋白质。转铁蛋白是藉得自例如 Dako (型录号码 A006) ([www.dako.com](http://www.dako.com), Glostrup, Denmark) 的抗体所辨识。转铁蛋白经糖基化。因此测得的分子量是高于理论重量, 理论重量并未考虑糖化。特定转铁蛋白生物标记示于表 4。

表 4

标记	P 值	于卵巢癌的向上调节 或向下调节	蛋白质晶片检定分析
转铁蛋白 (M79K) (预测质量： 75, 181D)	<0.0001	向下	IMAC-Ni 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、 pH 6.0 IMAC Cu 50 mM 磷酸钠、0.25M NaCl pH 6.0

## 2.5 CTAP-III:

另一种可用于本发明方法的生物标记为衍生自血小板碱性蛋白质CTAP-III (结缔组织活化胜 III)。CTAP-III于美国临时专利申请案 60/693,324, 申请日 2005 年 6 月 22 日 (Zhang 等人) 被描述为卵巢癌的生物标记。CTAP-III 为 85 氨基酸蛋白质 (瑞士寄存号码 P02775)。CTAP-III 是藉例如得自化学康国际公司 (Chemicon International) (型录号码 1484P) ([www.chemicon.com](http://www.chemicon.com), Temecula, CA) 的抗体所辨识。CTAP-III 为血小板碱性蛋白片段, 包括血小板碱性蛋白氨基酸 44-128。特定 CTAP-III 生物标记示于表 5。

表 5

标记	P 值	于卵巢癌的向上 调节或向下调节	蛋白质晶片检定分析
CTAP-III (M9290) (预测 质量: 9287.74D)	<0.0001	向上	IMAC Cu <sup>++</sup> 100 mM 磷酸钠, pH 7.0

## 2.6 ITIH4 片段

其它可用于本发明方法的生物标记为密切相关的一组间- $\alpha$ -胰蛋白酶抑制剂重链 H4 前驱物的裂解片段的密切相关集合中的一者或多者, 于此处又称作为「ITIH4 片段」。ITIH4 片段于美国专利公开案 2005-0059013 A1、国际专利公开案 W0 2005/098447 及 Fung 等人, Int. J. 癌症 115:783-789 (2005) 描述为卵巢癌的生物标记。ITIH4 片段是选自于由 ITIH4 片段 1 号、ITIH4 片段 2 号、及 ITIH4 片段 3 号所组成的组群。特定 ITIH4 内部片段生物标记示于表 6。

表 6

标记	P 值	于卵巢癌的向上调节 或向下调节	蛋白质晶片检定 分析
ITIH4 片段 1 (M3272) (预 测质量: 3273.72D)	<0.01	向上	IMAC Cu <sup>++</sup> 100 mM 磷酸钠, pH 7.0
ITIH4 片段 2 (M2725) (预 测质量: 2725.06D)	<0.02	向上	IMAC Cu <sup>++</sup> 100 mM 磷酸钠, pH 7.0
ITIH4 片段 3 (M2627) (预 测质量: 2627.94D)	<0.0057	向上	IMAC Cu <sup>++</sup> 100 mM 磷酸钠, pH 7.0

ITIH4 片段的氨基酸序列测定为:

ITIH4 片段 1 (SEQ ID NO:23): **MNFRPGVLSRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF**

ITIH4 片段 2 (SEQ ID NO:24): **PGVLSRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF**

ITIH4 片段 3 (SEQ ID NO:25): **GVLSSRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF**

ITIH4 前驱物为 930 氨基酸蛋白质(瑞士寄存号码 Q14624)。ITIH4 片段 1 跨据人 ITIH4 前驱物的氨基酸 658-687。ITIH4 片段 2 跨据人 ITIH4 前驱物的氨基酸 662-687。ITIH4 片段 3 跨据人 ITIH4 前驱物的氨基酸 663-687。

此外, 较佳本发明方法包括使用 ITIH4 片段的改性形式。ITIH4 片段的改性包括各个化学基团的转译后添加, 诸如糖基化、脂质化、半胱氨酸酸化及麸胱甘肽化。

## 2.7 $\beta$ 2-微球蛋白

另一种可用于本发明方法的生物标记为 $\beta$ 2-微球蛋白。 $\beta$ 2-微球蛋白于美国临时专利申请案 60/693,679, 申请日 2005 年 6 月 24 日(Fung 等人)被描述为卵巢癌的生物标记。 $\beta$ 2-微球蛋白生物标记为衍生自 119 氨基酸前驱物(GI:179318; 瑞士寄存号码P61769)的 99 氨基酸蛋白质。 $\beta$ 2-微球蛋白是藉例如得自阿康公司(Abcam) (型录号码 AB759) ([www.abcam.com](http://www.abcam.com), Cambridge, MA)的抗体所辨识。特定 $\beta$ 2-微球蛋白生

物标记示于表 7。

表 7

标记	P 值	于卵巢癌的向上调节或向下调节	蛋白质晶片检定分析
$\beta$ 2-微球蛋白 (M11.7K) (预测质量 : 11729.17D)	<0.000 1	向上	IMAC-Cu <sup>++</sup>

### 3. 生物标记及不同形式的蛋白质

蛋白质常是以多种不同形式存在于样本。此等形式可能来自于转译前改性及转译后改性中的任一者及二者。转译前改性形式包括等位变异株、剪接变异株、及 RNA 编辑形式。转译后改性形式包括由蛋白质分解裂解所得形式(例如亲代蛋白质的片段)、糖基化、磷酸化、脂质化、氧化、甲基化、半胱胺酸化、磺化、及乙酰化所得的形式。当检测或测量样本中的蛋白质时, 区别不同形式蛋白质的能力是依据差异的本质及用来检测或测量的方法决定。举例言之, 使用单株抗体的免疫检定分析将检测含有抗原决定部位的蛋白质的全部形式, 且无法区别。但使用针对蛋白质上的不同抗原决定部位的两种抗体的三明治免疫检定分析将检测含有两种抗原决定部位的所述全部蛋白质形式, 而不会检测只含有其中一个抗原决定部位的蛋白质形式。于诊断检定分析中, 当藉所使用的特殊方法检测的形式为如同任何特定形式的同等良好的生物标记时, 无法区别不同形式蛋白质的影响极小。但当一特定形式(或特定形式的一个子集)蛋白质为比不同形式的集合藉特定方法共同检测时为更佳生物标记, 则可能造成检定分析能力的降低。此种情况下, 可采用一种检定分析方法, 其可区别不同形式的蛋白质, 可专一性检测及测量期望形式的蛋白质。区别不同形式的被分析物或专一性检测特定形式的被分析物称作为「解析」该被分析物。

质谱术为解析不同形式蛋白质的特别有用的方法, 原因在于不同形式典型有不同质量可藉质谱术解析。如此若一种形式蛋白质为比较另一种形式的生物标记为某种疾病的优异的生物标记, 则质谱术可特别检测及测量有用的形式, 此处传统免疫检定分析无法区别各种形式,

也无法专一性检测有用的生物标记。

一种有用的方法是组合质谱术与免疫检定分析。首先，使用生物专一性捕捉试剂(例如辨识该生物标记及其其它形式的抗体、调适抗体(apramer)、或亲和抗体(Affibody))用来捕捉感兴趣的生物标记。较佳地，生物专一性捕捉试剂结合至固相，诸如珠粒、平板、膜或晶片。于未结合的材料被洗掉后，所捕捉的被分析物是藉质谱术检测及/或测定(此种方法也导致捕捉蛋白质相互作用剂，蛋白质相互作用剂是结合至蛋白质，或可以其它方式由抗体所辨识，且本身为生物标记)。多种形式的质谱术可用于检测各种形式的蛋白质，包括雷射解吸附办法诸如传统 MALDI 或 SELDI 及电喷洒游离。

如此，当此处述及检测特殊蛋白或测量特殊蛋白的含量时，表示检测及测定蛋白质带有解析或未解析各种蛋白质形式。例如，「测定抗菌蛋白」的步骤包含藉无法区别各种蛋白质形式的手段、以及藉可区别若干形式与其它形式的手段或测量特定形式蛋白质的手段(例如抗菌蛋白-25、抗菌蛋白-24、抗菌蛋白-22、及抗菌蛋白-20 中的任一者及/或全部可呈个别形式或组合形式)来测定抗菌蛋白。相反地，当期望测定特定形式蛋白质，例如特定形式抗菌蛋白时，规定该特定形式。举例言的，「测定抗菌蛋白-25」表示以可区别抗菌蛋白-25 与其它形式抗菌蛋白例如抗菌蛋白-24、抗菌蛋白-22、及抗菌蛋白-20 的方式测定抗菌蛋白-25。同理，述及「测定甲状腺素运送蛋白」包括测定个体试验样本中的任何形式及/或全部形式的甲状腺素运送蛋白，包括个别形式或组合形式；或当述及「测定半胱胺酸化甲状腺素运送蛋白」时表示以允许区别半胱胺酸化甲状腺素运送蛋白与于病人样本中所找到的其它形式甲状腺素运送蛋白，例如甲状腺素运送蛋白 $\Delta$ N10、未经改性甲状腺素运送蛋白、麸胱甘肽化甲状腺素运送蛋白、磺酸化甲状腺素运送蛋白等的方式来测定甲状腺素运送蛋白。「测定未经裂解的甲状腺素运送蛋白」表示测定任何个别形式或组合形式的未经改性甲状腺素运送蛋白、磺酸化甲状腺素运送蛋白、半胱胺酸化甲状腺素运送蛋白、CysGly 改性甲状腺素运送蛋白及麸胱甘肽化甲状腺素运送蛋白。

#### 4. 卵巢癌的生物标记的检测

本发明的生物标记可藉任一种适当方法检测。检测方法包括光学

法、电化学法(电压计量技术及电流计量技术)、原子力显微术及射频法例如多极共振光谱术。除了显微术的外光学法的说明例(包括共焦及非共焦)为检测荧光、冷光、化学冷光、吸光比、反射比、透射比、及双折射或折射率(例如表面电浆子共振、椭圆计、共振镜法、光栅耦合器光导法、或干涉计量法)。

于一个实施例中,样本是利用生物晶片分析。生物晶片通常包含有实质上平坦面,平坦面上附接捕捉试剂(也称作为吸附剂或亲和试剂)的固体基质。经常生物晶片表面包含多个可定址位置,其各自有捕捉试剂结合于其上。

蛋白质生物晶片为适合捕捉多肽的生物晶片。技艺界说明多种蛋白质生物晶片。例如包括由赛佛金生物系统公司(加州福里蒙)、左麦斯公司(Zyomyx)(加州海沃)、因维左金公司(Invitrogen)(加州卡斯贝)、拜可公司(Biacore)(瑞典乌普萨拉)及普可尼亚公司(Procognia)(英国博克夏)所制造的蛋白质生物晶片。此等蛋白质生物晶片的实例说明于下列专利案或公告的专利申请案:美国专利案 6,225,047 (Hutchens&Yip);美国专利案 6,537,749 (Kuimelis 及 Wagner);美国专利案 6,329,209 (Wagner 等人);PCT 国际公开案 WO 00/56934 (Englert 等人);PCT 国际公开案 WO 03/048768 (Boutell 等人)及美国专利案 5,242,828 (Bergstrom 等人)。

#### 4.1 藉质谱术检测

于一较佳实施例中,本发明的生物标记是利用质谱检测,该方法采用质谱仪来检测气相离子。质谱仪的实例为飞行时间、磁扇区、四极滤器、离子阱、离子迴旋共振、静电扇区分析器、及其混成型质谱仪。

于进一步较佳实施例中,所述质谱仪为雷射解吸附/游离质谱仪。于雷射解吸附/游离质谱术中,被分析物置于质谱术探针表面上,探针为适合接合于质谱仪的探针界面的装置,探针可呈现被分析物至游离能来进行游离且导入质谱仪内部。雷射解吸附质谱仪是采用雷射能,典型是来自于紫外光雷射,但也来自于红外光雷射,来将被分析物由表面解吸附,将被分析物气化及游离,来让被分析物可由质谱仪的离子光学装置利用。藉 LDI 分析蛋白质可呈 MALDI 形式或 SELDI 形式。

#### 4.1.1 SELDI

供本发明使用的较佳质谱术为「表面增强雷射解吸附及游离」技术或称作「SELDI」述于美国专利案 5,719,060 及 6,225,047, 二案皆核发给 Hutchens 及 Yip。此种技术述及解吸附/游离气相离子光谱术(例如质谱术)方法, 其中被分析物(此处为生物标记中的一者或多者)被捕捉于 SELDI 质谱术探针表面上。

SELDI 也称作为「亲和捕捉质谱术」或「表面增强亲和捕捉」(「SEAC」)。此种质谱术版本涉及使用探针, 探针表面上已经有材料可透过材料与被分析物间的非共价亲和相互作用(吸附)来捕捉被分析物。材料有各种名称, 可称作为「吸附剂」、「捕捉试剂」、「亲和试剂」或「结合部分」。此种探针可称作为「亲和捕捉探针」, 且具有「吸附面」。所述捕捉试剂可为任一种可结合被分析物的材料。所述捕捉试剂藉物理吸附或化学吸附而附接至探针表面上。于若干实施例中, 所述探针具有已经附接至该表面的捕捉试剂。于其它实施例中, 所述探针预先经活化, 包括反应性部分, 其例如可通过形成共价键或配位共价键的反应来结合捕捉试剂。环氧化物及酰基-咪唑为可共价结合多肽捕捉试剂(诸如抗体或细胞受体)的有用的反应性部分。氨基三乙酸及亚胺基二乙酸为可作为螯合剂来结合可与含组胺酸的肽非共价相互作用的金属离子的有用的反应性部分。吸附剂通常归类为层析吸附剂及生物专一性吸附剂。

「层析吸附剂」是指典型用于层析术中的吸附剂材料。层析吸附剂例如包括离子交换材料、金属螯合剂(例如氨基三乙酸或亚胺基二乙酸)、制动的金属螯合物、疏水相互作用吸附剂、亲水相互作用吸附剂、染料、简单生物分子(例如核苷酸、胺基酸、简单糖及简单脂肪酸)及混合模式吸附剂(例如疏水吸引/静电互斥吸附剂)。

「生物专一性吸附剂」是指包含生物分子的吸附剂, 该等生物分子例如为核酸分子(例如调适抗体)、多肽、多醣、脂质、类固醇、或其共轭物(例如糖蛋白、脂蛋白、糖脂、核酸(例如DNA)-蛋白质共轭物)。于某些情况下, 所述生物专一性吸附剂为巨分子结构诸如多蛋白错合物、生物膜或病毒。生物专一性吸附剂的实例为抗体、受体蛋白质、及核酸。相较于层析吸附剂, 生物专一性吸附剂典型对目标被分析物

有较高专一性。供SELDI使用的吸附剂的额外实例可参考美国专利案 6, 225, 047。「生物选择性吸附剂」是指以至少  $10^{-8}$ M的亲和力结合至被分析物的吸附剂。

赛佛金生物系统公司所制造的蛋白质生物晶片包括有层析吸附剂或生物专一性吸附剂附接于其上的可定址位置的表面。赛佛金蛋白质晶片(Ciphergen ProteinChip®)阵列包括NP20 (亲水性); H4 及H50 (疏水性); SAX-2、及Q10 (阴离子交换); WCX-2 及CM-10 (阳离子交换); IMAC-3、IMAC-30 及IMAC-50 (金属螯合物); 及PS-10、PS-20 (与酰基-咪唑、环氧化物的反应性表面)及PG-20 (通过酰基-咪唑耦接的蛋白质G)。疏水蛋白质晶片阵列具有异丙基或壬基苯氧基-聚(乙二醇)甲基丙烯酸酯官能基。阴离子交换蛋白质生物晶片阵列具有第四铵官能基。阳离子交换蛋白质晶片阵列具有羧酸根官能基。制动的金属螯合物蛋白质晶片阵列具有氨基三乙酸官能基(IMAC3 及IMAC30)或O-甲基丙烯酰氧基-N,N-二-羧基甲基酰胺酸官能基(IMAC50)其藉螯合吸附过渡金属离子, 诸如铜、镍、锌、及镓。预活化蛋白质晶片阵列具有酰基-咪唑官能基或环氧官能基其可与蛋白质上的基团反应用于共价结合。

此种生物晶片进一步说明于美国专利案件 6, 579, 719 (Hutchens 及 Yip), 「滞留物层析术」, 2003 年 6 月 17 日; 美国专利案 6, 897, 072 (Rich 等人, 「气相离子光谱仪探针」, 2005 年 5 月 24 日); 美国专利案 6, 555, 813 (Beecher 等人, 「具有气相质谱仪的疏水涂层的样本架」, 2003 年 4 月 29 日); 美国专利公开案 U. S. 2003-0032043 A1 (Pohl 及 Papanu, 「基于乳胶的吸附剂晶片」, 2002 年 7 月 16 日); 及 PCT 国际公开案 WO 03/040700 (Um 等人, 「疏水表面晶片」, 2003 年 5 月 15 日); 美国专利公开案 US 2003-0218130 A1 (Boschetti 等人, 「表面涂覆有以多醣为主的水凝胶的生物晶片」, 2003 年 4 月 14 日)及美国专利公开案 U. S. 2005-059086 A1 (Huang 等人, 「光交联水凝胶掺合物表面涂层」, 2005 年 3 月 17 日)。

大致上, 有吸附剂表面的探针与样本接触一段时间足够允许可存在于样本的所述生物标记结合至吸附剂。于培育期的后, 所述基质经洗涤去除未结合材料。可使用任何适当洗涤液; 较佳使用水性溶液。分子维持结合的程度可通过调整洗涤的苛刻程度来操控。洗涤液的洗

提特性是依据例如 pH、离子强度、疏水性、混沌趋性程度、清洁剂强度、及温度等因素决定。除非探针有 SEAC 性质及 SEND 性质(如本文说明), 否则随后施用能量吸附分子至已经结合有生物标记的表面。

于又另一种方法中, 可以具有抗体与生物标记结合的固相结合免疫吸附剂来捕捉生物标记。洗涤吸附剂来去除未结合的材料后, 所述生物标记由固相洗提, 藉施用结合生物标记的 SELDI 晶片来检测及藉 SELDI 来分析。

结合于基质的生物标记是于气相离子光谱仪诸如飞行时间质谱仪检测。所述生物标记藉游离来源诸如雷射游离, 所产生的离子藉离子光学总成收集, 然后质量分析仪分散且分析通过的离子。然后检测器将检测得的离子资讯转译成质量对电荷比。生物标记的检测典型是涉及信号强度的检测。如此可测定生物标记的数量及质量二者。

#### 4.1.2. SEND

另一种雷射解吸附质谱术的方法称作为表面增强静解吸附(「SEND」)。SEND 涉及使用包含能量吸附分子化学结合于探针表面的探针(「SEND 探针」)。「能量吸附分子」(EAM)一词表示可从雷射解吸附/游离来源吸收能量, 以及随后促成与其接触的被分析物分子的解吸附及游离的分子。所述 EAM 类别包括用于 MALDI 的分子, 常称作为「基质」, 基质例如为桂皮酸衍生物、芥子酸(SPA)、氰基-羟基-桂皮酸(CHCA)及二羟基苯甲酸、阿魏酸及羟基苯乙酮衍生物。于若干实施例中, 所述能量吸附分子被结合入线性聚合物或交联聚合物例如聚甲基丙烯酸酯内。举例言之, 组合物可为 $\alpha$ -氰基-4-甲基丙烯醯氧基桂皮酸与丙烯酸酯的共聚物。于另一个实施例中, 组合物为 $\alpha$ -氰基-4-甲基丙烯醯氧基桂皮酸、丙烯酸酯与 3-(三乙氧基)硅烷基丙基甲基丙烯酸酯的共聚物。于另一个实施例中, 组成物为 $\alpha$ -氰基-4-甲基丙烯醯氧基桂皮酸与甲基丙烯酸十八烷酯的共聚物(「C18 SEND」)。SEND 进一步说明于美国专利案 6,124,137 及 PCT 国际公开案 W0 03/64594 (Kitagawa, 「有能量吸附部分可用于被分析物的解吸附/游离的单体及聚合物」, 2003 年 8 月 7 日)。

SEAC/SEND 为雷射解吸附质谱术版本, 其中捕捉试剂及能量吸附分子二者是附接于样本呈现表面。因此 SEAC/SEND 探针允许通过亲和

捕捉及游离解吸附来捕捉被分析物，而无需施用外部基质。所述 C18 SEND 生物晶片为 SEAC/SEND 的一个版本，包含作为捕捉试剂的 C18 部分，及作为能量吸附部分的 CHCA 部分。

#### 4.1.3. SEPAR

LDI 的另一个版本称作为表面增强光不稳定附接及释放 (「SEPAR」)。SEPAR 涉及使用探针，该探针具有附接至表面的部分可与被分析物共价结合，然后于曝光后，例如暴露于雷射光后，通过打断该部分中的光不稳定键结来释放出被分析物(参考美国专利案 5,719,060)。SEPAR 及其它形式的 SELDI 方便调整适合遵照本发明来检测生物标记或生物标记的轮廓资料。

#### 4.1.4. MALDI

MALDI 为用来分析诸如蛋白质及核酸等生物分子的传统雷射解吸附/游离方法。于一种 MALDI 方法中，所述样本与基质混合，样本直接沉积于 MALDI 晶片上。但诸如血清或尿液等生物样本的复杂，造成若未事先将样本分选，则此种方法较为不适当。如此，于使用生物标记的若干实施例中，较佳首先以偶合至固体支撑件如树脂(例如于离心管柱内部)的生物专一性材料(例如抗体)或层析材料来捕捉生物标记。可与本发明的生物标记接合的特定亲和材料说明如前。于亲和材料上纯化后，所述生物标记经洗提，然后藉 MALDI 检测。

#### 4.1.5. 于质谱术中的其它游离形式

于另一个方法中，生物标记是藉 LC-MS 或 LC-LC-MS 检测。涉及藉一次或两次通过液相层析术来解析样本中的蛋白质，接着为质谱术分析，典型为电喷洒游离分析。

#### 4.1.6. 资料分析

藉飞行时间质谱术分析被分析物，产生飞行时间光谱。最终所分析的飞行时间光谱典型并非表示来自于对样本游离能单一脉冲的信号，反而为来自于多个脉冲的信号总和。如此减少杂讯而增加动态范围。此种飞行时间资料随后接受资料处理。于赛佛金蛋白质晶片软件中，资料处理典型包括 TOF-至-M/Z 转换来产生质谱，基准线扣除来消除仪器补偿值，及高频杂讯滤波来减少高频杂讯。

通过生物标记解吸附及检测所产生的资料可使用可程序数位电

脑分析。所述电脑程序分析资料来指出检测得的生物标记数目，及视需要可检测信号强度及对各个所检测的生物标记所测定的分子量。资料分析包括下列步骤：测定生物标记的信号强度；去除偏离预定统计分布的资料。举例言之，藉计算相对于某个参考品的各个尖峰高度，将观察得的尖峰规格化。

所述电脑可将所得资料转换成各种显示格式。可显示标准光谱，但于一种有用格式中，只有峰高及质量资讯保留于光谱上，获得较为干净的影像，因此更容易看见有接近完全相同的分子量的生物标记。于另一种有用格式中，比较两个或多个光谱，方便强调独特生物标记、及样本间向上调节或向下调节的生物标记。使用此等格式中的任一者，方便判定一个特定生物标记是否存在于一个样本。

分析通常是涉及识别光谱中表示来自于被分析物的信号的尖峰。尖峰的选择可以视觉进行，但也有可用软件来作为赛佛金蛋白质晶片套装软件的一部分，该软件可自动化检测尖峰。大致上，此种软件是通过识别具有信号对杂讯比是高于选定的临界值的信号，以及标记出于尖峰信号的矩心的尖峰质量来发挥功能。一项有用应用中，多个光谱经比较来识别出以所述质谱的某个选定的百分比存在的相同尖峰。本软件的一个版本丛集出现于界定的质量范围内部的所有光谱的全部峰，对于接近质量(M/Z)丛集的中点的所有峰指派质量(M/Z)。

用来分析资料的软件包括应用算法至信号分析来判定该信号是否表示于与根据本发明的生物标记相对应的一信号中的一峰的编码。所述软件也可将有关观察得的生物标记峰的资料接受分类树分析或ANN分析，来判定是否存在有生物标记峰或生物标记峰的组合，其指示接受检查的特定临床参数的状态。所述资料的分析可「锁定」多个参数，该等参数可直接或间接得自所述样本的质谱分析。此等参数包括但非限于是否存在有一个或多个峰、一峰或一组峰的形状、一个或多个峰的高度、一个或多个峰高度的对数值，及其它峰高度资料的算术运算。

#### 4.1.7. 卵巢癌的生物标记的 SELDI 检测的大致方案

本发明的生物标记的较佳检测方案说明如下。欲测试的生物样本例如血清，较佳是于 SELDI 分析前接受预先分选。如此可简化样本及

改良敏感度。预先分选的较佳方法涉及样本与阴离子交换层析材料诸如 Q HyperD(生物赛普拉(BioSeptra), SA)接触。然后结合物质使用于 pH9、pH7、pH5、与 pH4 的缓冲液接受逐步 pH 洗提。(生物标记被洗提出的洗提分也示于表 1)。收集含生物标记的多个洗提分。

然后欲试验样本(较佳经过预先分选)与包含阳离子交换吸附剂(较佳为 CM10 蛋白质晶片阵列(赛佛金生物系统公司))或 IMAC 吸附剂(较佳为 IMAC30 蛋白质晶片阵列(赛佛金生物系统公司))的亲合捕捉探针接触,再度如表 1 指示。所述探针以缓冲液洗涤,该缓冲液将保有生物标记,同时将洗掉未结合的分子。各生物标记的适当洗涤为表 1 列举的缓冲液。生物标记是藉雷射解吸附/游离质谱术检测。

另外,样本可经变性或未经变性,于适当阵列结合缓冲液内稀释,于检测各被分析物为最适化的条件下结合及洗涤。

于提肯阿夸瑞斯(TecanAquarius)-96 进行 Apo A1 层析检定分析:

1. 变性血清: 添加 7.5 微升 9M 尿素 2% CHAPS 50mM Tris HCl pH9 至 5 微升人血清,于室温混合 20 分钟。以含有: H50 缓冲液(10%乙 / 0.1%TFA)及 0.12 毫克/毫升大肠杆菌(E. coli)溶解产物的溶液稀释 1:400。

2. 预活化 H50 阵列: 以每孔 50%乙 洗涤生物处理器(BioProcessor)的各孔。于室温培养 5 分钟。去除溶液。以 150 微升 H50 洗涤缓冲液(10%乙 /0.1%TFA)平衡两次,各 5 分钟。去除缓冲液。

3. 添加 50 微升经过 1:400 稀释的血清样本至各孔。于室温培养 120 分钟。

4. 以 150 微升 H50 缓冲液洗涤阵列 4 次。以 150 微升水洗涤阵列 1 次。

5. 移出生物处理器的顶端。风干 10 分钟。

6. 使用生物墨点机(BioDot), 每点添加 0.75 微升芥子酸基质(SPA, 赛佛金, 12.5 毫克/毫升于 50%乙 /0.5%TFA/0.1%TX100)。于生物墨点室中风干 10 分钟。每点施加额外 0.75 微升 SPA 溶液。于室内风干 30 分钟,随后于 PCS4000 读取阵列。

7. 于 PCS4000 上读取, 焦点质量于 28,000 Da, 每个隔间收集 10 发, 每点共击发 530 发。

于提肯阿夸瑞斯-96 上进行甲状腺素运送蛋白层析检定分析：

1. 样本稀释：血清样本于溶液进行 1:250 稀释，该溶液含有：100M 磷酸钠缓冲液、pH7.0 (PB 缓冲液)且添加 0.05 毫克/毫升大肠杆菌溶解产物。彻底混合。

2. 使用 PB 缓冲液预处理 Q10 阵列，培养 5 分钟。去除缓冲液。重复一次。

3. 添加 50 微升 1:250 倍稀释的样本至各孔，于室温培养 120 分钟。去除样本。

4. 以 150 微升 PB 缓冲液洗涤阵列 4 次。各次洗涤后去除缓冲液。

5. 以 150 微升水洗阵列一次。去除水。

6. 去除生物处理器。风干阵列 30 分钟。

7. 使用生物墨点机，每点添加 0.75 微升芥子酸基质 (SPA, 赛佛金, 12.5 毫克/毫升于 50%乙 /0.5%TFA)。于生物墨点室中风干 10 分钟。每点施加额外 0.75 微升 SPA 溶液。于室内风干 30 分钟，随后于 PCS4000 读取阵列。

8. 于 PCS4000 上读取，焦点质量于 14,000 Da，每个隔间收集 10 发，每点共击发 530 发。

于提肯阿夸瑞斯-96 上进行 ITIH4 层析检定分析：

1. 样本稀释：血清样本于 IMAC 结合/洗涤缓冲液 (50mM 磷酸钠 0.25M NaCl pH 6.0) 稀释 1:50。彻底混合。

2. 预先活化 IMAC50 阵列：添加 50mM CuSO<sub>4</sub> 于生物处理器的每孔。于室温培养 10 分钟。去除铜溶液。以水洗 4 次。以结合缓冲液平衡 IMAC 阵列两次。

3. 添加 50 微升 1:50 倍稀释的样本至各孔，于室温培养 120 分钟。去除样本。

4. 以 150 微升 IMAC 结合/洗涤缓冲液洗涤阵列 3 次。各次洗涤后去除缓冲液。

5. 以 150 微升水洗阵列二次。去除水。

6. 去除生物处理器。风干阵列 30 分钟。

7. 使用生物墨点机，每点添加 0.75 微升芥子酸基质 (SPA, 赛佛金, 12.5 毫克/毫升于 50%乙 /0.5%TFA)。于生物墨点室中风干 10 分

钟。每点施加额外 0.75 微升 SPA 溶液。于室内风干 30 分钟，随后于 PCS4000 读取阵列。

8. 于 PCS4000 上读取，焦点质量于 3,273 Da，每个隔间收集 10 发，每点共击发 530 发。

另外，若辨识生物标记的抗体例如是得自达可公司(Dako)、美国生物公司、化学康公司(Chemicon)、阿博康公司(Abcam)、及金威公司(Genway)。此等抗体可附接至探针表面，诸如预先活化的 PS10 或 PS20 蛋白质晶片阵列表面(赛佛金生物系统公司)。此等抗体可捕捉探针表面上得自样本的生物标记。然后生物标记例如可藉雷射解吸附/游离质谱术检测。

任何进行流体操作的机器人皆可用于此等检定分析，例如得自惠普公司(Hewlett Packard)及汉米顿公司(Hamilton)的机器人。

#### 4.2. 免疫检定分析的检测

于本发明的另一个实施例中，本发明的生物标记是藉质谱术以外的方法或藉仰赖测量生物标记质量的方法以外的方法测定。于未仰赖质量的一个实施例中，本发明的生物标记是藉免疫检定分析测定。免疫检定分析要求生物专一性捕捉试剂(诸如抗体)捕捉生物标记。抗体可藉技艺界众所周知的方法例如将动物接受生物标记免疫接种的方法来制造。生物标记可基于其结合特性而分离自样本。另外，若多肽生物标记的胺基酸序列为已知，则所述多肽可经合成，用来藉技艺界已知的方法产生抗体。

本发明意图涵盖传统免疫检定分析，例如包括三明治免疫检定分析，包括 ELISA 或基于荧光的免疫检定分析及其它 免疫检定分析。散射测浊法是一种于液相进行的检定分析，其中抗体是呈溶液。抗原结合的抗体，导致吸光比改变，测量该吸光比的改变。于基于 SELDI 的免疫检定分析中，生物标记的生物专一性捕捉试剂附接至 MS 探针表面，诸如预先活化的蛋白质晶片阵列。然后所述生物标记通过此种试剂专一性捕捉于生物晶片上，被捕捉的生物标记是藉质谱术检测。

#### 5. 个体卵巢癌状态的判定

本发明的生物标记可用于诊断试验中来评估个体的卵巢癌状态，例如诊断卵巢癌。「卵巢癌状态」一词包括疾病的任何可区别的特征，

包括非卵巢癌疾病。例如卵巢癌状态包括但非限于是否存在有疾病(例如卵巢癌相对于非卵巢癌)、发病风险、疾病阶段、疾病的进行(例如疾病随着时间的进行或疾病随着时间的缓解),及对疾病治疗的功效及反应。

试验结果与卵巢癌状态的交互关联涉及施加某种分类算法至该等结果来产生卵巢癌状态。所述分类算法可简单判定抗菌蛋白的测量量是否高于或是否低于特定的截止数目。当使用多个生物标记时,分类算法可为线性回归方程式。另外,所述分类算法可为此处说明的多个学习算法中任一者的积。

于复杂的分类算法的情况下,可能需要对资料进行算法,藉此使用电脑例如可程序数位电脑来判定分类。于任一种情况下,随后可将状态记录于具体介质上,例如以电脑可读取的格式记录于记忆体驱动器或碟片内或单纯列印于纸张。结果也可报告于电脑萤幕上。

#### 5.1. 单一标记

诊断试验正确预测癌症状态的能力通常是测定为检定分析敏感度、检定分析专一性,或接受者操作特性(「ROC」)曲线下方面积。敏感度为藉试验预测为阳性的真阳性百分比,专一性为试验预测为阴性的真阴性百分比。ROC 曲线提供试验敏感度呈专一性的函数。ROC 曲线下方面积愈大,则试验的预测值愈有力。其它有用的试验利用测量值为阳性预测值及阴性预测值。阳性预测值为测试为阳性且实际为阳性的人们百分比。阴性预测值为测试为阴性且实际为阴性的人们百分比。

本发明的生物标记显示于不同卵巢癌状态的统计差异。单独使用或组合使用此等生物标记的诊断试验,显示敏感度和专一性至少为 75%,至少为 80%,至少为 85%,至少为 90%,至少为 95%,至少为 98%,及约 100%。

表 1 列举的各个生物标记是差异存在于卵巢癌,因此各个标记个别可用于协助判定卵巢癌状态。该方法涉及首先,使用此处所述方法测定个体样本中选定的生物标记,例如捕捉于 SELDI 生物晶片上接着藉质谱术检测;以及第二,比较测量值与诊断量或截取值,其可区别阳性卵巢癌状态与阴性卵巢癌状态。所述诊断量表示高于或低于个体被归类为有特定卵巢癌状态的生物标记测量量。举例言的,因于卵巢

癌中抗菌蛋白比正常状态向上调节，则高于诊断截取值的抗菌蛋白测量量将提供卵巢癌的诊断。如技艺界人士众所周知，通过调整于检定分析中所使用的特定诊断截取量，依据诊断者的偏好可提高诊断检定分析的敏感度或专一性。例如，所述特定的截取量可通过测量得自患有不同卵巢癌状态的个体的具有统计上显著数目的样本中的生物标记量而测定，取出适合诊断师期望的专一性程度及敏感度程度的截取量。

## 5.2. 标记的组合

当个别生物标记为有用的诊断生物标记时，发现生物标记的组合可提供比较单独单一生物标记更高的特定状态的预测值。具体而言，一个样本中多个生物标记的检测可提高试验的敏感度及专一性。至少两种生物标记的组合偶尔称作为「生物标记轮廓资料」或「生物标记指纹」。如此，抗菌蛋白可与其它卵巢癌或子宫内膜癌的生物标记组合来改良诊断试验的敏感度及/或专一性。

尤其，发现涉及测量抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白二者的卵巢癌状态的诊断试验具有比单独抗菌蛋白更高的预测能力。如前文指示，抗菌蛋白浓度于卵巢癌升高，而甲状腺素运送蛋白浓度降低。进一步发现组合至少三个生物标记或于某些情况下组合七个生物标记的诊断试验提供比抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白二者的测量值更高的预测能力。更具体而言，预期卵巢癌状态的诊断试验将包括测量抗菌蛋白、甲状腺素运送蛋白及 Apo A1、转铁蛋白、CTAP-III、及 ITIH4 片段中的至少一者，将此等测量值与卵巢癌状态交互关联。也预期 $\beta$ 2-微球蛋白可与抗菌蛋白及甲状腺素运送蛋白连同四种前述生物标记中的任一者一起组合。

于一组日本人样本进行研究，发现抗菌蛋白、Apo A1、 $\beta$ 2-微球蛋白与 CTAP-III 的组合为特别有效的诊断组合。

卵巢癌的诊断典型涉及 CA125 的测量值，原因在于此种标记的浓度增高是与卵巢癌有交互关联。因此，CA125 浓度可与前述标记的任一种组合交互关联来判定卵巢癌状态。

其它抗菌蛋白可组合的生物标记的实例包括但非限于 CA125、CA125II、CA15-3、CA19-9、CA72-4、CA195、肿瘤相关联的胰蛋白酶抑制剂(TATI)、CEA、胎盘碱性磷酸酶(PLAP)、唾液酸多糖(Sialyl TN)、

半乳糖基转移酶、巨噬细胞群落刺激因子(M-CSF、CSF-1)、溶血磷脂酸(LPA)、表皮生长因子受体的胞外领域的 110 kD 成分(p110EGFR)、组织激肽释放素(kallikreins), 例如激肽释放素 6 及激肽释放素 10 (NES-1)、前列腺素(prostasin)、HE4、肌酸激酶 B(CKB)、LASA、HER-2/neu、尿促生殖激素肽、戴安诺(Dianon)NB 70/K、组织抗原(TPA)、造骨蛋白(osteopontin)、及结合蛋白(haptoglobin)、瘦素(leptin)、促泌乳激素、类似胰岛素的生长激素 I 或 II。于接受卵巢癌试验妇女典型使用 CA125 作为例行诊断检查的一部分时, CA125 特别有用。

### 5.3. 卵巢癌状态

判定卵巢癌状态典型涉及是基于诊断试验结果来将个体分类成为两组或多组(状态)的一。此处所述诊断试验可用于多个不同状态间分类。

#### 5.3.1. 疾病的存在

于一个实施例中, 本发明提供判定个体是否存在有卵巢癌的方法(状态: 卵巢癌相对于非卵巢癌)。卵巢癌是否存在是通过测量相关生物标记判定, 然后将其接受分类算法, 或将其与特定风险程度相关联的生物标记的参考量及/或生物标记样式比较来判定。

#### 5.3.2. 判定发展出疾病的风险

于一个实施例中, 本发明提供判定个体发展出卵巢癌的风险的方法(状态: 低风险相对于高风险)。生物标记量或生物标记样式为各种风险状态例如高、中、或低的特征。发展出疾病的风险是通过测量相关生物标记判定, 然后将其接受分类算法, 或将其与特定风险程度相关联的生物标记的参考量及/或生物标记样式比较来判定。

#### 5.3.3. 判定疾病阶段

于一个实施例中, 本发明提供判定个体疾病阶段的方法。疾病的各个阶段有特征数量的生物标记或相对数量的一组生物标记(一种样式)。疾病的阶段是通过测量相关生物标记判定, 然后将其接受分类算法, 或将其与特定阶段相关联的生物标记的参考量及/或生物标记样式比较来判定。例如, 可于早期卵巢癌与非卵巢癌间分类, 或于第一期卵巢癌、第二期卵巢癌及第三期卵巢癌间分类。

#### 5.3.4. 测定疾病的过程(进行/缓解)

于一个实施例中,本发明提供于个体判定疾病过程的方法。病程是指疾病状态随着时间的变化,包括疾病的进行(恶化)及疾病的退行(改善)。随着时间的经过,生物标记的数量或相对量(例如样式)改变。举例言的,抗菌蛋白随着疾病的增加,而甲状腺素运送蛋白随着疾病而减少。因此此等标记的趋势,此等标记随着患病或非患病的增加或减少指示病程。如此,本方法涉及测量个体的一个或多个生物标记经历至少两个不同时间点,例如第一时间和第二时间,且比较数量的变化(若有)。病程是基于此等比较来判定。

#### 5.4. 报告状态

本发明的额外实施例是有关将检定分析结果或诊断或二者传达告知技术员、医生、或病人(举例)。于若干情况下,电脑将用来将检定分析结果、或诊断、或二者传达告知感兴趣方,例如医生及其病人。于若干实施例中,将进行检定分析,于一个国家或司法管辖权的检定分析结果与结果或诊断为不同的国家或司法管辖权将彼此传达告知。

于本发明的较佳实施例中,于表1任何生物标记于试验个体差异存在的诊断,于获得诊断的后尽快通知该个体。所述诊断可由个体的治疗医师来传达告知个体。另外,所述诊断可藉电子邮件发送至试验个体,或电话告知个体。电脑也可用来藉电子邮件或电话作诊断传达告知。于若干实施例中,含有诊断结果的讯息可使用电脑硬体与软件的组合自动传输予个体,此乃熟谙电信技艺人士众所周知。一种健康照护导向通讯系统的实例说明于美国专利案6,283,761;但本发明非仅限于利用此种特殊通讯系统的方法。于本发明方法的若干实施例中,全部或部分方法步骤,包括样本的检定分析、疾病的诊断、及检定分析结果或诊断的通讯可于不同(例如外国)司法管辖权下进行。

#### 5.5. 个体管理

于定性卵巢癌状态的方法的若干实施例中,该等方法进一步包含基于卵巢癌状态来管理个体的治疗。此等管理包括于判定卵巢癌状态的后医师或临床医师的动作。例如,若医师做出卵巢癌诊断,则接着可处方某个治疗计划,诸如处方或投予化学治疗。另外,非卵巢癌诊断或非卵巢癌的后进一步试验判定病人是否患有特定疾病。此外,若

诊断试验获得卵巢癌状态的非决定性结果，则需要进一步试验。

#### 6. 定性卵巢癌状态的分类算法的产生

于若干实施例中，使用诸如「已知样本」的样本产生的光谱(例如质谱或飞行时间光谱)衍生而得的资料随后用来「训练」一个分类模型。「已知样本」为已经预先分类的样本。由该光谱所导出且用来形成分类模型的资料称作为「训练资料集合」。一旦训练时，分类模型可使用未知样本所产生的光谱衍生得的资料来辨识该资料样式。则该分类模型可用来将未知样本分成不同类别。例如可用来预测特定样本是否与某个生物情况(例如生病相对于未生病)有关。

用来形成分类模型的训练资料集合包含原始资料或经过前处理的资料。于若干实施例中，原始资料可直接得自飞行时间光谱或质谱，然后可如前文说明视需要「前处理」。

使用任一种适当统计分类(或「学习」)方法，试图基于资料中所存在的客观参数来将资料本体分成多类，可形成分类模型。分类方法可经监督或未经监督。经监督分类及未经监督分类方法实例是说明于Jain, 「统计样式辨识: 综论」, IEEE 型样分析与机器智慧会报, 22 卷, 第一期, 2000 年 1 月, 其教示以引用方式并入此处。

于监督分类中，含有已知类别实例的训练资料呈现予学习机制，学习机制学习定义各个已知类别的一个或多个集合关系。新资料可施加至该学习机制，然后使用所习得的关系来分类该新资料。监督分类方法实例包括线性回归法[例如多线性回归(MLR)、部分最小平方(PLS)回归、及主要成分回归(PCR)]、二进制决策树(例如递归区隔法，诸如CART亦即分类与回归树)、人工神经网络，诸如反向传播网路、判别式分析(例如拜叶辛(Bayesian)分类器或费雪(Fischer)分析)、逻辑分类器、及支援向量分类器(支援向量机器)。

较佳监督分类法为递归区隔法。递归区隔法使用递归区隔树来分类衍生自未知样本的光谱。有关递归区隔法的进一步细节提供于美国专利 6,675,104 (Paulse 等人, 「质谱分析方法」)。

于其它实施例中，所形成的分类模型可使用未经监督的学习方法来形成。未经监督的分类试图基于训练资料集合的类似性来学习分类，而未预先分类训练资料集合由其中所导出的该光谱。未经监督的学习

方法包括丛集分析。丛集分析尝试将资料分成「丛集」或「组群」，其理想上应该具有彼此极为类似的成员，而与其它丛集的成员极为不类似。然后使用若干距离尺规来测量相似性，距离尺规测定各个资料项间的距离，将彼此较为接近的资料项丛集在一起。丛集技术包括麦克昆恩 (MacQueen) 的 K-平均算法及科荷尼 (Kohonen) 的自行组织拼图算法。

用来分类生物资讯所宣告的学习算法例如是说明于 PCT 国际公开案 WO 01/31580 (Barnhill 等人, 「识别生物系统中的型样的方法及装置及其用法」)、美国专利申请案 2002 0193950 A1 (Gavin 等人, 「质谱分析方法」)、美国专利申请案 2003 0004402 A1 (Hitt 等人, 「基于得自生物资料的隐藏型样判别生物状态的方法」), 及美国专利申请案 2003 0055615 A1 (Zhang 及 Zhang, 「处理生物表现资料的系统及方法」)。

分类模型可于任何适当数位电脑形成及使用。此等数位电脑包括使用标准作业系统或特殊作业系统诸如基于 Unix、Windows、或 Linux 作业系统的微电脑、迷你电脑或大型电脑。使用的数位电脑实体上可与质谱仪分开, 质谱仪用来形成感兴趣的光谱, 或数位电脑可耦接至质谱仪。

根据本发明的实施例的训练资料集合及分类模型可由数位电脑所执行或所使用的电脑编码来具体实施。电脑编码可储存于任何适当电脑可读取介质上, 包括光学或磁学碟片、棒、带等, 可以任一种电脑程序语言包括 C、C++、视觉基础 (visual basic) 等电脑程序语言写成。

前述学习算法可用来发展对已经发现的生物标记的分类算法, 或用来找出卵巢癌的新生物标记。通过提供单独使用或组合使用的生物标记诊断值 (例如截取点), 分类算法转而形成诊断试验的基础。

对由如下实例 4 所述实验 (小型样本集合) 产生的资料进行逻辑回归分析。所述分析产生分类算法来基于七种生物标记区别卵巢癌与非卵巢癌: 抗菌蛋白、ITIH4 片段 1、CTAP-III、甲状腺素运送蛋白、转铁蛋白、 $\beta$ -2 微球蛋白及 Apo-A1。所述算法涉及两个步骤。于第一个步骤中, 基于如下方程式而由试验样本产生一个数目:

对数优劣比(Logit)=

$$-1.673 + 0.7349 * hepc - 0.6252 * 1TIH4conc + 0.1458 * CTAP-III2 - |$$

$$0.4923 * Tconc - 0.5023 * TFR - 0.1595 * M2B + 0.0265 * Apo A1conc$$

测量值表示规格化的峰值强度或被分析物浓度(标示为「conc」)。于第二步骤中,藉如下方程式判定样本来自于患卵巢癌个体的机率:  $e^{\text{对数优劣比}} / (1 + e^{\text{对数优劣比}})$ 。然后基于试验期望的敏感度及期望的专一性来施加截取。截取数目愈高,则检定分析的敏感度愈佳。用于本检定分析的特定数目是依据所使用的检定分析条件及仪器决定,每当检定分析被设定时需要重新校准。

## 7. 物质组成物

于另一态样中,本发明提供基于本发明的生物标记的物质组合物。

于一个实施例中,本发明提供呈纯化形式的本发明的生物标记。纯化后的生物标记可用作为抗原来提引出抗体。纯化后的生物标记也可用于检定分析程序作为标准。如此处使用,「纯化后的生物标记」为已经与其它蛋白质及肽分离及/或与找到该生物标记的生物样本中的其它材料分离的生物标记。所述生物标记可分离自生物体液,诸如尿液或血清。生物标记可使用技艺界已知的任一种方法纯化,纯化方法包括但非限于机器分离(例如离心)、硫酸铵沉淀、透析(包括尺寸排除透析)、电泳(例如丙烯酰胺凝胶电泳)尺寸排除层析术、亲和层析术、阴离子交换层析术、阳离子交换层析术、及金属螯合物层析术。此等方法可以任何适当规模例如于层析管柱内或于生物晶片上进行。

于另一实施例中,本发明提供视需要可呈纯化形式且特别结合本发明的生物标记的生物专一性捕捉试剂。于一个实施例中,生物专一性捕捉试剂为抗体。此种组合物可用于检测检定分析中检测生物标记例如用于诊断。

于另一个实施例中,本发明提供一种包含生物专一性捕捉试剂其可结合本发明的生物标记的物件,其中该捕捉试剂是结合至固相。例如,本发明涵盖一种装置包含使用该生物专一性捕捉试剂所衍生的珠粒、晶片、膜、单块、或微量滴定板。此种物件可用于生物标记检测检定分析。

于另一态样中，本发明提供一种包含一生物专一性捕捉试剂(诸如抗体)结合至本发明的生物标记的组合物。该组合物视需要可为纯化形式。此种组合物可用于纯化生物标记，或用于检测生物标记的检定分析。

于另一实施例中，本发明提供一种包含固体基质附接有吸附剂的物件，该吸附剂例如为层析吸附剂或生物专一性捕捉试剂，其上可进一步结合本发明的生物标记。于一个实施例中，物件为质谱术的生物晶片或探针，例如 SELDI 探针。此种物件可用于纯化生物标记或检测生物标记。

#### 8. 检测卵巢癌生物标记的套件组

于另一个态样中，本发明提供定性卵巢癌状态的套件组，该套件组是用来检测根据本发明的生物标记。于一个实施例中，该套件组包括一固体支撑件诸如晶片、微量滴定板或珠粒或树脂，其上附接有捕捉试剂，其中所述捕捉试剂是与本发明的生物标记结合。如此例如本发明的套件组包含 SELDI 的质谱术探针，诸如蛋白质晶片阵列。于生物专一性捕捉试剂的情况下，套件组包含有反应性表面的固体支撑件及包含生物专一性捕捉试剂的容器。

所述套件组也包含洗涤溶液或洗涤溶液的制造说明书，其中捕捉试剂与洗涤溶液的组合允许例如藉质谱术来捕捉固体支撑件上的生物标记供随后的检测的用。所述套件组可包括多种吸附剂类型各自存在于不同的固体支撑件上。

于又一实施例中，此种套件组包含呈标签或分开的仿单形式的适当操作参数的说明书。举例言之，所述说明书可告知消费者有关如何收集样本，如何洗涤探针，或欲检测的特定生物标记。

于又另一个实施例中，所述套件组包含带有生物标记样本一个或多个容器来用作为校准标准。

#### 9. 判定药物的疗效

于另一个实施例中，本发明提供判定药物的疗效的方法。此等方法可用于进行药物的临床试验，以及监视用药病人的进展。治疗或临床试验涉及以特殊用药计划投予药物。所述用药计划涉及单剂药物或随着时间的经过的多剂药物。医师或临床研究者监视于投药过程中药

物对病人或个体的功效。若药物对该疾病有药理影响，则本发明的生物标记的数量或相对量(例如样式或轮廓资料)朝向无病的轮廓资料而改变。举例言之，抗菌蛋白随着疾病而升高，甲状腺素运送蛋白随着疾病而降低。因此可追踪治疗期间个体的生物标记数量的变化过程。如此，本方法涉及测定接受药物治疗个体的一个或多个生物标记，将生物标记量与个体的疾病状态交互关联。本方法的一个实施例涉及于药物治疗过程中判定于至少两个不同时间点(例如第一时间和第二时间)的所述生物标记含量，且比较所述生物标记量的变化(若有变化)。举例言之，可于投药前及投药后、或于投药过程中的两个不同时间点测定所述生物标记。治疗效果是基于比较来决定。若治疗为有效，则生物标记将趋向于正常，而若治疗为无效，则生物标记将趋向于生病指示。若治疗为有效，则生物标记将趋向于正常，而若治疗为无效，则生物标记将趋向于生病指示。

#### 10. 卵巢癌的生物标记用于筛检检定分析及卵巢癌的治疗方法的用途

本发明方法也有其它应用。举例言之，生物标记可用于筛检试管内或活体内调控生物标记的表现的化合物，该化合物又可用于病人治疗或预防卵巢癌。于另一个实例中，生物标记可用来监视对卵巢癌治疗的反应。于又另一个实例中，生物标记可用于遗传研究，判定个体是否有出现卵巢癌的风险。

适合供治疗试验的化合物初步可通过识别与抗菌蛋白及一个或多个此处列举的生物标记相互作用的化合物来筛检。举例言之，筛检包括重组表现生物标记，纯化所述生物标记，生物标记固定于基质。试验化合物与基质典型于水性条件下接触，例如藉测定洗提速率呈盐浓度的函数来测量试验化合物与生物标记间的相互作用。若干蛋白质可识别与裂解表 1 的一个或多个生物标记，于该种情况下，通过监视于标准检定分析中一个或多个生物标记的消化，例如藉蛋白质的凝胶电泳监视而可检测所述蛋白质。

于相关实施例中，测定试验化合物抑制一个或多个生物标记的活性的能力。熟谙技艺人士了解用来测定特定生物标记的活性的技术将依据生物标记的功能及性质而改变。例如，可检定分析生物标记的酶

活性，但限制条件为可取得适当基质，且限制条件为基质的浓度或反应产物的出现容易测量。可能的治疗性试验化合物抑制或提升一给定生物标记的活性的能力可通过测定于有或无试验化合物存在下的催化速率来决定。也可测量试验化合物干扰抗菌蛋白或另外一个或多个此处描述的生物标记的非酶催化功能(例如结构功能)或活性的能力。举例言的，包括抗菌蛋白的多蛋白复体的自我组装可藉光谱术于有或无试验化合物存在下监视。另外，若生物标记为非酶催化的转录促进因子，则通过测量于有或无试验化合物存在下于活体内或于试管内的生物标记依赖型转录程度，可识别生物标记促进转录的能力。

可调控表1中的任一个生物标记的活性的试验化合物可投予患有或有出现卵巢癌或其它癌症风险病人。举例言的，投予可提高特定生物标记活性的化合物若该特定生物标记的活体内活性妨碍卵巢癌的蛋白质的积聚，则可降低病人的卵巢癌风险。相反地，投予降低特定生物标记活性的化合物，若生物标记活性的增高造成或至少部分造成卵巢癌的启动，则投予该试验化合物可降低病人卵巢癌的风险。

于额外态样中，本发明提供一种识别可用于治疗诸如卵巢癌等与抗菌蛋白的改性形式浓度增高相关联的疾病的化合物的方法。例如，于一实施例中，细胞萃取物或表现文库可筛检催化全长抗菌蛋白的裂解来形成抗菌蛋白截头形式的化合物。于此种筛检检定分析的一个实施例中，通过将荧光基团附接于抗菌蛋白，可检测抗菌蛋白的裂解，当抗菌蛋白未裂解时，维持淬熄，而当抗菌蛋白裂解时发荧光。另外，全长抗菌蛋白的改性版本因而让胺基酸 x 与 y 间的酰胺键不可裂解，该抗菌蛋白版本可用来选择性结合或「捕捉」于活体内于该位置裂解全长抗菌蛋白的细胞蛋白酶。蛋白酶及其目标的筛检及识别方法于科学文献中有明确记载，例如于 Lopez-Ottin 等人(自然综论, 3:509-519 (2002))。

于又一个实施例中，本发明提供一种治疗或减少与截头抗菌蛋白的浓度升高相关联的疾病(例如卵巢癌)的进行或机率的方法。例如，已经识别出一种或多种可裂解全长抗菌蛋白的蛋白质后，筛检综合文库找出可抑制所识别出的蛋白质的裂解活性的化合物。筛检此种化合物的化学文库的方法为技艺界众所周知。例如参考 Lopez-Otin 等人

(2002)。另外，可基于抗菌蛋白的结构式智慧型设计抑制化合物。

相信全长抗菌蛋白涉及调节身体的铁存量，以及涉及遗传性色素沉着病、慢性肾功能不全及肾性贫血。通过介白素串级，抗菌蛋白的表现也被诱导成为身体免疫反应的一部分。因抗菌蛋白由其前-原-形式及原-形式经过高度加工处理，因此可能有锁定于抗菌蛋白且裂解抗菌蛋白的蛋白酶。因此于又一个实施例中，本发明提供识别可提高截头抗菌蛋白对其目标蛋白酶的亲和力的化合物。例如，可筛检化合物裂解抗菌蛋白的能力。可调控抗菌蛋白的裂解或调控与抗菌蛋白相互作用的分子活性的试验化合物随后可于活体内测试其减慢或停止个体的卵巢癌及/或子宫内膜癌的进行的能力。

于临床层面，筛检试验化合物包括于个体已经暴露于试验化合物前或暴露后，由试验个体取得样本。样本中，表 1 列举的一个或多个生物标记的含量可经测量及分析，该判定于暴露于试验化合物后，生物标记的含量是否改变。如本文说明，所述样本可藉质谱术分析，或所述样本可藉熟谙技艺人士已知的任一种适当手段分析。例如，表 1 列举的一个或多个生物标记的浓度可藉西方墨点法，使用可专一性与生物标记结合的放射性标记抗体或萤光标记抗体来直接测定。另外，编码一个或多个生物标记的 mRNA 浓度的改变可经测量且与一给定试验化合物授予一个体交互关联。于又一实施例中，一个或多个生物标记表现程度的改变可使用试管内方法及材料测定。例如，表现或可表现一个或多个表 1 的生物标记的人组织培养细胞可与试验化合物接触。已经使用试验化合物处理的个体例行性检验由所述处理所得的任一种生理效应。特别，将评估试验化合物于个体降低生病机率的能力。另外，若该试验化合物是授予先前已经被诊断患有卵巢癌的个体，则试验化合物将筛检其减慢或停止所述疾病的进行的能力。

## 11. 实例

### 11.1. 实例 1. 卵巢癌的生物标记的发现

须了解此处说明的实例及实施例仅供举例说明的用，鉴于该等实例及实施例，多种修改或变化对熟谙技艺人士显然自明，且含括于本案的应用范围与精神及随附的申请专利范围的范围内。

样本：血清样本及尿液样本取自 MDACC 卵巢癌样本存库 (MD

Anderson)。所述样本是由公元 2000 年至 2004 年收集自手术前的癌症病人，且于 $-80^{\circ}\text{C}$ 储存。样本的分布如下：卵巢癌(OvCa)、200；子宫内膜癌、50；子宫颈癌、50 及良性、50。多个(但非全部)卵巢癌及良性血清样本及尿液样本是得自同一个病人。所述样本分成两组进行。第一组包含 200 个卵巢癌样本及 50 个良性样本。如此提供初始候选生物标记表单。为了测试此等候选生物标记的肿瘤种型专一性，分析一个子集(50 个)卵巢癌样本，连同 50 个良性样本及 50 个子宫内膜癌及 50 个子宫颈癌样本。

血清轮廓资料：血清轮廓资料的取得只于卵巢癌样本及良性样本进行。含有欲取得轮廓资料的样本的随机化样板是使用赛佛金快速(Ciphergen Express)软件程序产生。得自肿瘤存库的样本于冰上解冻，添加至 96 孔孔板(遵照样本的排列)，及于 4000 rpm 离心 20 分钟。然后一整份血清置于新准备的 96 孔孔板内，于 $-80^{\circ}\text{C}$ 储存至使用前。血清样本是于IMAC-Cu<sup>++</sup>及于Q10 (参考如下方案)上于三重蛋白质晶片阵列上进行轮廓资料的取得。全部重复样本皆是于同一天准备，于PBSIIc(于准备后的该上午开始)及/或于PCS4000 (始于准备后数日)上读取。阵列是使用生物麦克(Biomek)2000 机器人以样本处理。

IMAC-Cu 血清的轮廓资料决定方案：首先藉尿液处理来让血清变性。添加 5 微升血清至 96 孔 v 字形孔板中的 7.5 微升 9M 尿素、2% CHAPS、50mM Tris HCl、pH9 中。所述孔板覆盖以胶带，于室温振摇 20 分钟。237.5 微升结合缓冲液(50 mM 磷酸钠缓冲液，250 mM NaCl, pH 6.0)添加至各孔(=1:50 稀释)，彻底混合。50 微升经稀释的血清添加至另一个 96 孔 v 字形孔板，加入 150 微升结合缓冲液(=1:200 稀释)。通过添加每孔 50 微升 50mM 硫酸铜及于室温培养 10 分钟，无振摇，将 IMAC 阵列预先活化。通过上下混合一次，所述阵列以每点 150 微升水洗涤，然后以每点 50 微升 50 mM NaAc, pH 4 洗涤，未经振摇于室温培养 5 分钟。然后以每点 150 微升水洗两次，每次上下混合一次。

IMAC30 晶片使用结合缓冲液平衡两次。所述晶片未经振摇各自培养 5 分钟。50 微升 1:200 倍稀释的血清样本添加至各孔，未经振摇而于室温培养 120 分钟。所述晶片以每孔 150 微升结合缓冲液洗三次，然后以「吸与吐」方式混合三次，未经振摇。所述晶片以 150 微升水

洗两次，有三次混合周期，然后移开所述生物处理器贮器。吸掉水，晶片经过风干 10 分钟。每孔添加 1 微升 SPA 基质(12.5 毫克/毫升)于 50%乙腈/0.5% TFA 水，晶片经风干 10 分钟。重复施用，晶片风干隔夜。

Q-10 血清轮廓资料决定方案：所述样本稀释于结合缓冲液。样本稀释：1:250 病人血清样本稀释于 100mM 磷酸盐缓冲液(PB)，pH 7.0。所述 Q10 晶片以 150 微升 100 mM PB，pH 7.0 前处理两次，未经振摇培养 5 分钟。50 微升 1:250 倍稀释的病人样本添加于各孔。所述晶片于离心机于 900 rpm 离心 45 秒，未经振摇于室温培养 120 分钟。所述晶片以每孔 150 微升 100 mM PB，pH 7.0 洗四次，进行三次「吸与吐」混合，各次洗涤皆未经振摇。所述晶片以 150 微升水洗一次，有三次混合周期。移开所述生物处理器贮槽，去除水，晶片风干 10 分钟。每点添加 1 微升 SPA 基质(12.5 毫克/毫升)于 50%乙腈/0.5%TFA 水，晶片风干 10 分钟。重复施用，晶片风干隔夜。

尿液轮廓资料：尿液轮廓资料的决定是于第一集合(200 卵巢癌样本及 50 良性样本)以及于第二集合(各 50 个卵巢癌、良性、子宫内膜癌及子宫颈癌)进行。得自肿瘤存库的样本于冰上解冻，添加至 96 孔孔板(遵照前述样板的排列)，于 4000 rpm 离心 20 分钟(尿液于初步冷冻及储存于样本存库的前未离心)。然后整份尿液置于新准备的 96 孔孔板，于-80°C 储存至使用时。进行两回合尿液轮廓资料的决定。第一回合中，只使用卵巢癌样本及良性样本。样本是于 CM10 上及于 IMAC-Cu<sup>++</sup>上决定轮廓资料。使用决定血清轮廓资料的相同随机分配样板；但有若干样本非匹配病人的尿液样本，此种情况下，使用不同的病人样本来取代。于双重蛋白质晶片阵列上决定尿液样本的轮廓资料(参考下文方案)。全部重复皆是于同一日准备，于 PBSIIc(始于制备后的早晨)及/或于 PCS4000(始于制备后数日)上读取。阵列是使用样本使用生物麦克 2000 机器人处理。于第二回合，决定子宫内膜癌、子宫颈癌、良性及原先卵巢癌样本的一个小组(得自第一回合)的轮廓资料。样本的轮廓资料是于 CM10 及 IMAC-Cu<sup>++</sup>读取。再度使用原先随机分配的样板，但 100 个卵巢癌样本以子宫内膜癌或子宫颈癌尿液样本取代，只包括 50 个原先卵巢癌样本集合。

CM10 尿液轮廓资料取得方案：15 微升尿液样本添加至 23 微升变

性缓冲液(9M 尿素/2%CHAPS), 于 4°C 培养 30 分钟。263 微升结合缓冲液(BB)、100mM 乙酸钠、pH 4 添加至各个变性样本, 彻底混合。所述晶片表面以两次 BB 洗涤 5 分钟来准备。去除所述缓冲液, 150 微升经稀释的尿液样本添加至各孔, 于室温振摇培养 30 分钟。所述样本经移除, 以新鲜 125 微升相同稀释样本置换于适当点上, 然后于室温伴以振摇培养 30 分钟。所述样本经移出, 所述晶片以三次 5 分钟 BB 洗涤来洗涤。去除所述缓冲液, 所述晶片以水快速(未经培养)洗涤两次。移出所述生物处理器贮槽, 所述晶片经风干。每点添加 1 微升 SPA 基质(12.5 毫克/毫升)于 50%乙腈/0.5%TFA 水, 晶片风干 10 分钟。重复施用, 晶片风干隔夜。

IMAC\_Cu<sup>++</sup>尿液轮廓资料决定方案: 15 微升尿液样本添加至 23 微升变性缓冲液(9M尿素/2%CHAPS)。所述样本于 4°C 培养 30 分钟。263 微升结合缓冲液(BB)、100mM磷酸钠+0.5 M NaCl pH 7 添加至各个变性样本, 彻底混合。通过添加每孔 50 微升 50 mM硫酸铜及于室温培养 10 分钟, 所述IMAC晶片使用铜准备。所述晶片以每点 150 微升水洗一次 2 分钟, 与每点 50 微升 50 mM NaAc pH 4 培养 5 分钟, 然后使用每点 150 微升水以水洗 2 分钟。去除水, 所述IMAC30 晶片与结合缓冲液BB平衡两次各 5 分钟。去除BB缓冲液, 加入 150 微升经稀释的尿液样本。所述晶片于室温以振摇培养 30 分钟。所述样本经移出, 以新鲜 125 微升相同经稀释的样本于适当点上置换, 所述晶片于室温以振摇培养 30 分钟。所述样本经移出, 晶片以三次 5 分钟BB洗涤来洗涤。去除所述缓冲液, 所述晶片以水快速(未经培养)洗涤两次。移出所述生物处理器贮槽, 所述晶片经风干。每点添加 1 微升SPA基质(12.5 毫克/毫升)于 50%乙腈/0.5%TFA水, 所述晶片风干 10 分钟。重复施用, 所述晶片风干隔夜。

资料分析: 资料是使用赛佛金快速软件获得。使用外部校准剂来进行质量校准, 强度的规度化是使用外部规度化因数基于总离子电流规度化, 进行基准线的扣除。使用尖峰必须具有信号/杂讯比 3:1 且以占光谱的 20%存在的标准, 于赛佛金快速软件进行尖峰检测。使用 Mann-Whitney 试验(两组例如良性相对于卵巢癌)或 Kruskal-Wallis 试验(用于多组比较例如良性相对于卵巢癌相对于子宫内膜癌), 于赛

佛金快速软件中进行统计分析。

结果：首先分析由尿液样本分析所得的资料(200 卵巢癌及 50 良性疾病)。

表 2：比较良性相对于卵巢癌时，使用 Mann-Whitney 试验，得自具有  $p < 0.05$  的峰值。

阵列	p 值	AUC	m/z
IMAC30	2.52E-04	0.664118	2785.654
IMAC30	8.01E-04	0.642618	2187.061
IMAC30	0.002658	0.642618	2431.063

AUC > 0.5 指示卵巢癌组的峰值大于良性组；AUC < 0.5 指示卵巢癌组的峰值小于良性组。

表 3：个别比较具有  $p < 0.05$  的峰值。卵巢癌及子宫内膜癌专一性标记是定义为用于相对于良性病及子宫颈癌比较时具有  $p$  值 < 0.05 的峰值。

P 值：卵巢癌相对于 中间强度

条件	基准线	质量	良性	子宫颈	子宫内膜	良性	子宫颈	子宫 内膜	卵巢
卵巢癌标记及子宫内膜癌标记									
IMAC 低	5	2193.623	0.0023	0.0211	0.5997	10.83	15.54	23.58	28.63
CM10 低	5	2194.852	0.0061	0.0012	0.0855	21.61	20.34	29.83	47.21
CM10 低	5	2434.871	0.002	0.0936	0.5628	5.459	13.16	16.13	22.21
IMAC 低	5	2437.971	0.0619						
IMAC 低	5	2664.621	0.01	0.0045	0.1311	1.468	1.437	1.755	2.076
CM10 低	5	2664.983	0.0001	0.0001	0.0132	4.211	3.612	7.373	10.96
IMAC 低	5	2792.399	0.0011	0.0311	0.9721	2.37	5.568	10.73	13.55
CM10 低	5	2793.231	0.002	0.0004	0.0578	7.158	5.549	14.51	40.42

为了测定此等峰值用于卵巢癌的专一性，得自多种妇科癌症(50 卵巢癌、50 子宫内膜癌及 50 子宫颈癌)及良性骨盆腔疾病(n=50)的尿液样本经决定其轮廓资料。轮廓资料的决定及资料的分析是如第一组的方式进行，但使用、Kruskal-Wallis 试验来测试多组间的试验的显著性。

得自血清样本的资料分析是如对尿液样本般进行。表 3 显示使用

IMAC 蛋白质晶片阵列，由血清分析获得的显著峰 ( $p < 0.05$ ，使用 Mann-Whitney 试验来比较良性相对于卵巢癌)。如前文说明， $AUC < 0.5$  指示峰值为卵巢癌的向下调节；而  $AUC > 0.5$  指示峰值为卵巢癌的向上调节。此等峰值证实可表示前文揭示的各种抗菌蛋白形式。于 2789.4 的峰值为抗菌蛋白-25。

表 4

质量	P 值	AUC	ID 备注
2789.4	0.0000069	0.70	抗菌蛋白

#### 11.2. 得自 MD Anderson 尿液样本的 2789 的纯化及识别：

尿液样本是得自 MDACC 卵巢癌样本存库。所述样本是收集自 2000 年至 2004 年手术前癌症病人且储存于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。样本的分布如下：卵巢癌 (OvCa) 200；子宫内膜癌 50；子宫颈癌 50 及良性 50。所述样本是分两组操作。实验#1：第一集合包含 200 卵巢癌样本及 50 良性样本。如此提供候选生物标记的第一表单。样本是于 CM10 及 IMAC-Cu 决定轮廓资料。实验#2：欲试验候选生物标记的肿瘤型别专一性，卵巢癌样本子集 (50) 连同 50 良性样本及 50 子宫内膜癌及 50 子宫颈癌样本接受分析。样本的轮廓资料是于 CM10 及 IMAC-Cu 取得。

1.0 毫升尿液添加至 375 微升 IMAC 海普赛尔 (HyperCel) (生物赛普拉公司 (Biosepra)) 珠粒，珠粒预先载荷铜且于  $4^{\circ}\text{C}$  培养 1 小时。所述珠粒以 350 微升 100 mM  $\text{NaPO}_4$ 、pH7 洗一次，以 100 mM NaAc、pH5 洗两次，及以有机溶剂 (33.3% 乙腈、16.7% 异丙醇及 0.1% TFA) 洗两次。大部分 2789 Da 标记是存在于有机洗涤液。5 微升施用于 NP20 晶片 (赛佛金 C553-0043)。其上有 2789 Da 的 NP20 晶片以 SPA (赛佛金 C300-0002) 处理，且载荷至微质量 (MicroMass) Q-TOF 上，Q-TOF 装配有蛋白质晶片介面 (赛佛金 Z300-0003)。使用以每秒 30 脉冲操作，传输平均脉冲流量 130 毫焦耳/平方厘米的脉冲化氮雷射 (雷射科学公司 (Laser Science Inc.) VSL 337 NDS 麻省富兰克林) 产生离子。于 10 毫托耳压力的氮气用于所形成离子的碰撞冷却，氙气用于全部低能碰撞诱导解离实验作为碰撞气体。前述 CHCA 基质系统用于酸水解产物的汇接分析。应用碰撞能通常是遵循 50 eV/kD 的法则，各次获得典型为光谱的 5 分钟总和。用于 MS 及 MS/MS 模式，所述系统是使用已知肽混合物由外部校

准。所述CID光谱经过平顺化，加矩心，输出为sequest档案。蛋白质的识别是使用基质科学公司(Matrix Science)Mascot程序(于线上可来自于<http://www.matrixscience.com>)进行。

### 11.3. 得自 JHU 血清样本的 2789 的纯化及识别

共178个已经建档的血清检体是于约翰霍普金斯医学院经过医学院的核准收集。所述样本集合包括得自40位健康妇女(年龄, 平均±标准差, 42±7岁)、40位III/IV期(23/17病例)卵巢癌病人(年龄, 平均±标准差, 56±14岁)、每组19位病人各自患有0/I/II/III(3/5/8/3病例)期乳癌病人(年龄, 平均±标准差, 54±15岁)、或I/II/III(1/10/8病例)期大肠癌病人(年龄, 平均±标准差, 69±16岁)、及每组20位病人各自患有I/II/III期(1/12/7病例)摄护腺癌(年龄, 平均±标准差, 58±8岁)、II/III期(4/16病例)胰癌(年龄, 平均±标准差, 66±8岁)或糖尿病(年龄, 平均±标准差, 52±18岁)病人的检体。全部乳癌、大肠癌、胰癌及糖尿病病人皆为女性。全部前述血清样本于收集后即刻处理且储存于-70℃至使用前。另外, 得自3位III/IV期卵巢癌病人(年龄, 平均±标准差, 57±13岁)的三对血浆和血清样本以及一个得自健康对照者的血清样本经新鲜收集且即刻处理。BD加强塑胶(Plus Plastic)K2EDTA管用于血浆的制备。全部检体皆是于处理前且于手术前取得。

7.5 毫克兔抗-ITIH4抗体(专一对抗MNF<sub>R</sub>PGVLSSRQLGLPGPPDVPDHAAYIHPF|(SEQ ID NO:26)的客制化抗体)联结至12.5毫升胺基联结(AminoLink®)偶合珠粒(皮尔斯公司(Pierce)P/N 20501B)。70微升血清样本以630微升PBS pH 7.2含0.05%吞恩(Tween)稀释, 且载荷至70微升抗-ITIH4珠粒上。于4℃培养隔夜后, 珠粒以1毫升PBS+0.1%吞恩缓冲液洗三次, 接着以1毫升水洗一次。然后所述珠粒以50微升有机洗提液(33.3%异丙醇/16.7%乙腈/0.1%三氟乙酸)洗提三次。流经的液体及三次PBS洗涤液连同有机洗提剂是使用PBS II蛋白质晶片读取器而于IMAC30-铜蛋白质晶片阵列(赛佛金C553-0078)上决定轮廓资料。所述2789Da蛋白质存在于流通过液体中以及全部三个PBS洗涤液及有机洗提液中。得自IP的流经部分载荷至YM10膜(米里普公司(Millipore)42407)上, 得自YM10的50微

升流经部分是于 IMAC30-铜(赛佛金 C553-0078)阵列上决定轮廓资料。所述 IMAC30-铜阵列使用 SPA(赛佛金 C300-0002)处理,且载荷至 Q-TOF 上, Q-TOF 装配有赛佛金介面(赛佛金 Z200-0003)用于汇接质谱术。此外, 800 微升得自 IP 的洗提液载荷至 YM10 膜(米里普 42407)上。得自 YM10 膜的流过部分经干燥, 于 50 微升 50%乙腈再度水合。1 微升浓缩洗提分施用于 NP20 晶片上带有 SPA 作为基质。此 NP20 晶片载荷至 Q-TOF 上, Q-TOF 装配有赛佛金介面用于汇接质谱术。用于 MS/MS 实验, 于装配有赛佛金(加州福里蒙)的蛋白质晶片阵列(蛋白质晶片 Qq-TOF)的微质量 QTOF II 汇接质谱仪上获得质谱。使用以每秒 30 脉冲操作, 传输平均脉冲流量 130 毫焦耳/平方厘米的脉冲化氮雷射(雷射科学 VSL 337 NDS 麻省富兰克林)产生离子。于 10 毫托耳压力的氮气用于所形成离子的碰撞冷却, 氩气用于全部低能碰撞诱导解离实验作为碰撞气体。前述 CHCA 基质系统用于酸水解产物的汇接分析。应用碰撞能通常是遵循 50 eV/kD 的法则, 各次获得典型为光谱的 5 分钟总和。用于 MS 及 MS/MS 模式, 所述系统是使用已知肽混合物由外部校准。CID 光谱经过平顺化, 加矩心, 输出为 sequest 档案。蛋白质的识别是使用基质科学公司 Mascot 程序(于线上可得自于 <http://www.matrixscience.com>)进行。

#### 11.4. 得自 MD Anderson 血清样本的 2789 的纯化及识别

160 微升血清样本使用 240 微升 9M 尿素、50mM Tris、pH9、2% CHAPS 于 4°C 变性 20 分钟。所述变性后的血清载荷于 720 微升 Q-hyper-DF 珠粒(生物赛普拉 20078)上, 且于 4°C 培养 40 分钟。以递减 pH 梯度收集 12 个选分。使用 PBS II 蛋白质晶片读取器, 于 CM10 蛋白质晶片阵列(赛佛金 C553-007)上决定所述选分的轮廓资料, 2789Da 蛋白质是存在于所述流经液中。0 微升载荷至 CM10 晶片上。此 CM10 晶片使用 SPA(赛佛金 C300-00 流经液的 pH 随后藉 1M 乙酸调整至 pH4, 502)处理, 且载荷至 Q-TOF 上, Q-TOF 装配有赛佛金介面(赛佛金 Z200-0003)用于汇接质谱术。用于 MS/MS 实验, 于装配有赛佛金(加州福里蒙)的蛋白质晶片阵列(蛋白质晶片 Qq-TOF)的微质量 QTOF II 汇接质谱仪上获得质谱。使用以每秒 30 脉冲操作, 传输平均脉冲流量 130 毫焦耳/平方厘米的脉冲化氮雷射(雷射科学 VSL 337 NDS 麻省富兰克林)产生离子。

于 10 毫托耳压力的氮气用于所形成离子的碰撞冷却，氩气用于全部低能碰撞诱导解离实验作为碰撞气体。前述 CHCA 基质系统用于酸水解产物的汇接分析。应用碰撞能通常是遵循 50 eV/kD 的法则，各次获得典型为光谱的 5 分钟总和。用于 MS 及 MS/MS 模式，系统是使用已知肽混合物由外部校准。所述 CID 光谱经过平顺化，加矩心，输出为 sequest 档案。蛋白质的识别是使用基质科学公司 Mascot 程序(于线上可得自于 <http://www.matrixscience.com>)进行。

### 11.5. 实例 2. 卵巢癌的生物标记的发现

先前研究工作识别出一片段 $\alpha$ 胰蛋白酶抑制剂重链 4 (ITIH4, 偶尔于此也称作为 ITIH4)片段作为生物标记, 具有检测卵巢癌的甄别能力。本例中, 分析使用于临床血清样本中与 ITIH4 片段共同沉淀的蛋白质资料的表现来组成交互关联的网路。

第一分析是使用一组 142 血清样本进行(41 个卵巢癌, 41 个健康对照, 及各 20 个乳癌、大肠直肠癌及摄护腺癌)。使用对 ITIH4 3272 m/z 片段所产生的多株抗体, 通过免疫沉淀/下拉以三次重复来产生表现资料, 接着进行表面增强雷射解吸附/游离质谱术。用于验证, 得自两个额外位置的样本以类似方式处理。第一集合包含 114 卵巢癌样本(16 个前处理、17 个后处理、37 个无癌症监控病例及 30 个复发病例)。第二集合有 11 个卵巢癌病例、16 个良性病例及 30 个健康对照。

使用交互关联网路分析, 除了所述 ITIH4 片段外, 发现一组四个峰值, 其经过向上调节, 且于 41 个卵巢癌病例中有高度交互关联, 但于健康对照组及其它癌症样本中则表现较低且极少交互关联。此等峰值被进一步识别为抗菌蛋白的变异株。图 2 显示多种抗菌蛋白片段包括四个相关的片段抗菌蛋白-25、抗菌蛋白-24、抗菌蛋白-22、及抗菌蛋白-20 的序列。

于 142 样本中, 接受者-操作-特征(ROC)曲线分析显示, 与全长抗菌蛋白相对应的峰具有曲线下方面积(AUC), 于分开卵巢癌与健康对照组为 0.876 (95%CI:0.795-0.957) (参考图 1); 以及而于分开卵巢癌与另外三类型癌症为 0.774 (0.678-0.871) (参考图 4)。于第一确认集合中, 抗菌蛋白于前处理组及复发组比后处理组及无癌症监控组高(AUC=0.756 (0.702-0.811)), 复发病例有最高抗菌蛋白浓度(参考

图 5)。于第二确认集合中，于分开卵巢癌与良性及健康对照组的 AUC 为 0.722 (0.693-0.851) (对两个确认集合，分析中皆包括全部三次重复试验；参考图 5)。初步结果指出抗菌蛋白及 ITIH4 片段为结合伴侣。

于第一种办法中，10 微升血清添加至 10 微升 ITIH4 珠粒于 90 微升 PBS 含 0.5% 崔顿 (Triton)。所述珠粒于 4°C 培养隔夜。于此阶段，去除流经液体 (100 微升)，5 微升于 IMAC 晶片及 CM10 晶片上进行分析。珠粒以含 0.1% 崔顿的 150 微升 PBS 洗三次。各次洗涤后，移出 20 微升洗涤缓冲液，于 IMAC 晶片及 CM10 晶片接受分析。各次洗涤后，以 50 微升有机洗提缓冲液洗提所述珠粒。然后于 IMAC 晶片及 CM10 晶片上分析共 50 微升洗提分。于第二种办法中，得自 ITIH4 IP 流经部分 A13 的样本经浓缩且于 IMAC 晶片上分析。

图 3 显示于使用对 ITIH4 片段的抗体进行免疫沉淀/下拉后，所述血清样本的 SELDI 光谱。交互关联网路分析显示四个峰 ( $m/z$  2191、2436、及 2788) 间有高度交互关联，与得自卵巢癌病人的血清样本中的该组 ITIH4 片段有相反的交互关联。于健康对照组中的交互关联较为不强力。于卵巢癌、摄护腺癌、乳癌及健康对照组间也进行类似的交互关联网路分析。四个峰值间最强力的交互关联为有卵巢癌的峰值。图 6 显示于表示抗菌蛋白变异株的四个峰值中的两个峰值五组样本的散点图。图 7 显示使用其中两个抗菌蛋白峰，得自一个独立确认集合的五组病人的散点图。显示此等峰值于无癌症病人及治疗后癌症病人为较低，于卵巢癌前处理病人及复发卵巢癌病人为较高。所述抗菌蛋白浓度与肿瘤负载量间有交互关联。图 8 显示使用其中两种抗菌蛋白峰，由第二个独立确认集合所得五组病人的散点图。显示于健康对照组以及良性病病人此等峰值为较低，于卵巢癌病人为较高。

### 11.6. 实例 3. 使用大型样本集合的生物标记检定分析

为了进一步评估抗菌蛋白作为卵巢癌标记的品质，进行大型多机构的研究。使用对七个生物标记为最佳化的 SELDI TOF-MS 方案来分析得自五个位置共 607 个血清样本。包括 234 位良性妇科疾病妇女，及 373 位侵袭性上皮卵巢癌病人 (101 个早期、231 个晚期及 40 个期别未知)。其中 165 个良性及 228 个癌症于分析时有 CA125。良性、早期、以及晚期或未知期别的 CA125 的中间值及四分位点分别为 26/11/57

IU、80/22/434 IU、及 234/40/1114 IU。所述生物标记个别是使用 Mann-Whitney U 试验评估。使用得自一个位置以未经监督方式导出线性复合指数，然后使用固定方程式由其余资料计算。ROC 曲线分析是于得自个别位置的资料进行，将全部位置组合。

得自五个位置共 607 个血清样本使用 SELDI TOF-MS 方案来分析，该方案对七种生物标记为最佳化：抗菌蛋白-25 (M2789)、半胱胺酸化甲状腺素运送蛋白、Apo A1 (M28043)、转铁蛋白 (M79K)、CTAP-III (M9313.9)、ITIH4 片段 1 (M3272) 及  $\beta$ 2-微球蛋白 (M11.7K) (「七个标记小组」)。包括 234 位良性妇科疾病妇女，及 373 位侵袭性上皮卵巢癌病人 (101 个早期、231 个晚期及 40 个期别未知)。其中 165 个良性及 228 个癌症于分析时有 CA125。良性、早期、以及晚期或未知期别的 CA125 的中间值及分位点分别为 26/11/57 IU、80/22/434 IU、及 234/40/1114 IU。所述生物标记个别是使用 Mann-Whitney U 试验评估。使用得自一个位置以未经监督方式导出线性复合指数，然后使用固定方程式由其余资料计算。ROC 曲线分析是于得自个别位置的资料进行，将全部位置组合。全部七个生物标记个别皆验证统计上显著的判别能力，大部分具有  $p$  值  $< 0.00001$ 。六个位置的 ROC 分析中复合指数的 AUC 用于检测各阶段癌症与良性病，该 AUC 分别为 0.602、0.566、0.821、0.813、及 0.592。对组合资料，指数与 CA125 间的 AUC 差异用于检测各阶段癌症 (AUC=0.706 对 0.725) 或只有检测早期阶段癌症 (AUC=0.534 对 0.653) 并无统计上显著差异。但所述指数于高度敏感度范围确实较佳。于 86% 的固定敏感度，所述指数的专一性为 34% (77/226)，比较 CA125 于 26% (42/163)。于早期病例，于 84% 的固定敏感度，比较 CA125 于 14% (22/163)，指数的专一性为 24% (55/226)。

#### 11.7. 实例 4. 使用小型样本集合的生物标记检定分析

由接受评估卵巢病变的 202 位病人所得手术前血清样本经过汇集，且于收集得血清样本的 6 小时以内冷冻。所述血清样本是使用 SELDI-TOF-MS 蛋白体检定分析对七个生物标记小组进行评估。使用 126 个样本来训练研究模型，其余样本则用于盲目试验。202 位病人中，132 位患良性病 (包括子宫内膜异位、良性骨盆腔囊肿、子宫纤维瘤)，11 位患边缘肿瘤，50 位患侵袭性上皮卵巢癌，3 位患胚细胞肿瘤，其余

患有转移性的非妇科癌症。所述良性疾病组的平均年龄 48.3 岁(范围 20-84 岁), 侵袭性卵巢癌组的平均年龄 65.1 (范围 40-89 岁)。

由接受评估卵巢病变的 202 位病人所得手术前血清样本经过汇集, 且于收集得血清样本的 6 小时以内冷冻。所述血清样本是使用 SELDI-TOF-MS 蛋白体检定分析对七个生物标记小组进行评估。使用 126 个样本来训练研究模型, 其余样本则用于盲目试验。202 位病人中, 132 位患良性病(包括子宫内膜异位、良性骨盆腔囊肿、子宫纤维瘤), 11 位患边缘肿瘤, 50 位患侵袭性上皮卵巢癌, 3 位患胚细胞肿瘤, 其余患有转移性的非妇科癌症。所述良性疾病组的平均年龄 48.3 岁(范围 20-84 岁), 侵袭性卵巢癌组的平均年龄 65.1 (范围 40-89 岁)。于训练组中, CA125 具有敏感度 100%(95% CI:88.1-100.0%)及专一性 63.3%(95% CI:52.2-73.3%); 于试验组中, CA125 具有敏感度(95% CI:75.1-99.9%)及专一性 67.5%(95% CI:50.9-81.4%)。结合七个标记及 CA125 的多变因算法具有训练组的敏感度 86.2%(95% CI:68.3-96.1%)及专一性 94.4%(95% CI:87.5-98.2%); 以及试验组的敏感度 80.0%(95% CI:68.3-96.1%)及专一性 90.0%(95% CI:76.4-97.2%)。七个标记小组可用于协助检别接受评估病人是否有持久性骨盆腔肿块。本标记小组可改善 CA125 的专一性, 但降低其敏感度。

以下各小组, 敏感度为 85.2%具有 95% CI 65.4%~95.1%; 专一性为 96.7%具有 95% CI 89.9%~99.1%。

3 标记:

Apo、甲状腺素运送蛋白、ITIH4

Apo、甲状腺素运送蛋白、转铁蛋白

4 标记:

Apo、甲状腺素运送蛋白、ITIH4、转铁蛋白

Apo、甲状腺素运送蛋白、ITIH4、CTAP-III

5 标记:

Apo、甲状腺素运送蛋白、ITIH4、转铁蛋白、CTAP-III

Apo、甲状腺素运送蛋白、ITIH4、转铁蛋白、 $\beta$ 2-微球蛋白

6 标记:

Apo、甲状腺素运送蛋白、ITIH4、转铁蛋白、CTAP-III、 $\beta$ 2-微

## 球蛋白

用于下列小组，敏感度为 81.5%具有 95% CI 61.3%~93.0%；专一性为 97.8%具有 95% CI 91.4%~99.6%。

3 标记：

Apo、甲状腺素运送蛋白、抗菌蛋白

4 标记：

Apo、甲状腺素运送蛋白、抗菌蛋白、转铁蛋白

Apo、甲状腺素运送蛋白、抗菌蛋白、CTAP-III

5 标记：

Apo、甲状腺素运送蛋白、抗菌蛋白、转铁蛋白、CTAP-III

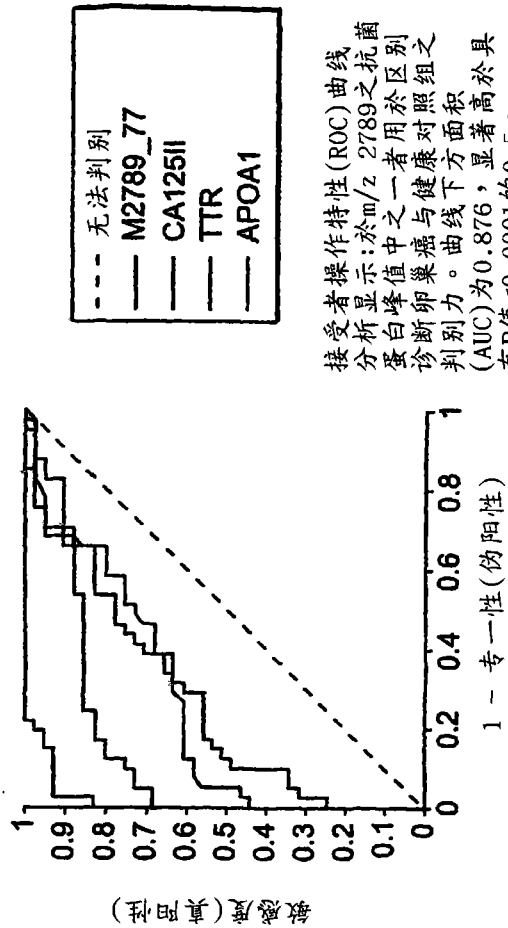
Apo、甲状腺素运送蛋白、抗菌蛋白、转铁蛋白、 $\beta$ 2 微球蛋白

6 标记：

Apo、甲状腺素运送蛋白、抗菌蛋白、转铁蛋白、CTAP-III、 $\beta$ 2 微球蛋白

须了解此处所述实例及实施例仅供举例说明的用，鉴于此等实例及实施例的各项修改及变化为熟谙技艺人士显然易知，且是含括于本案的精髓及范围及随附的申请专利范围的范围。此处引用的全部公告案、专利案及专利申请案全文皆以引用方式并入此处用于各项目的。

曲线	面积	SE	p	面积之95%	组别 =:
M2789_77	0.876	0.0413	<0.0001	0.795 至 0.957	有较高值
CA125II	0.984	0.0098	<0.0001	0.965 至 1.000	有较高值
TTR	0.759	0.0539	<0.0001	0.654 至 0.865	有较低值
APOA1	0.729	0.0556	<0.0001	0.620 至 0.838	有较低值



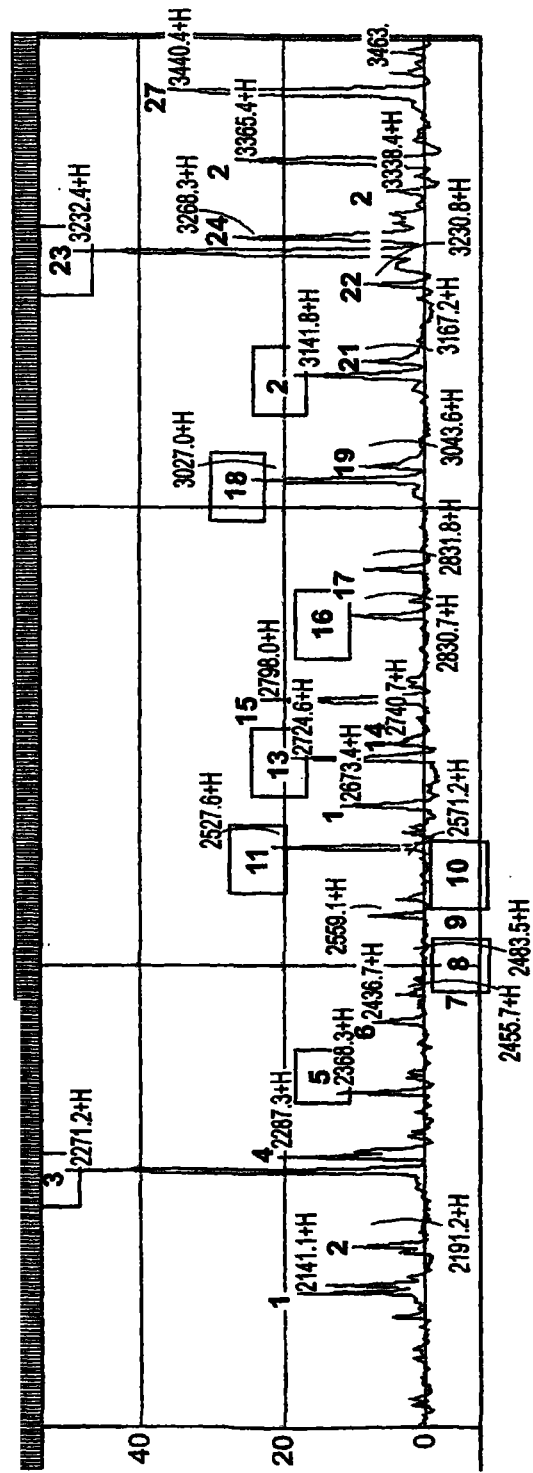
接受者操作特性(ROC)曲线  
分析显示:於m/z 2789之抗  
蛋白峰值巢癌与健康对照  
诊断卵力。曲线下方面积  
判别力。曲线下方面积  
(AUC)为0.876,显著高於具  
有P值<0.0001的0.5。

卵巢癌相对于健康对照组(HC)

图1

SWMPMFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	pI/Mw(M+H)
WMPMFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37/4487.44
MPMFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37/4400.37
PMFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37/4214.15
MFQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.39/4082.96
FQRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37/3985.84
QRRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37/3854.65
RRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37/3707.47
RRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.37/3579.34
RRRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	9.17/3423.16
RRRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.97/3266.97 (Met, 3275 Da之4-s-s氧化)
RRDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.76/3110.78
RDTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53/2954.59
DTHFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.22/2798.41 (抗菌蛋白-25)
THFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.51/2682.32 (抗菌蛋白-24)
HFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53/2581.21
FPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53/2444.07 (抗菌蛋白-22)
PICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.60/2296.89
ICIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53/2199.78 (抗菌蛋白-20)
CIFCC GCCHRSKCGM CCKT	8.53/2086.62
CIFCC GCCHRSKCGM CCK	8.53/1985.51
CIFCC GCCHRSKCGM CC	8.22/1857.34

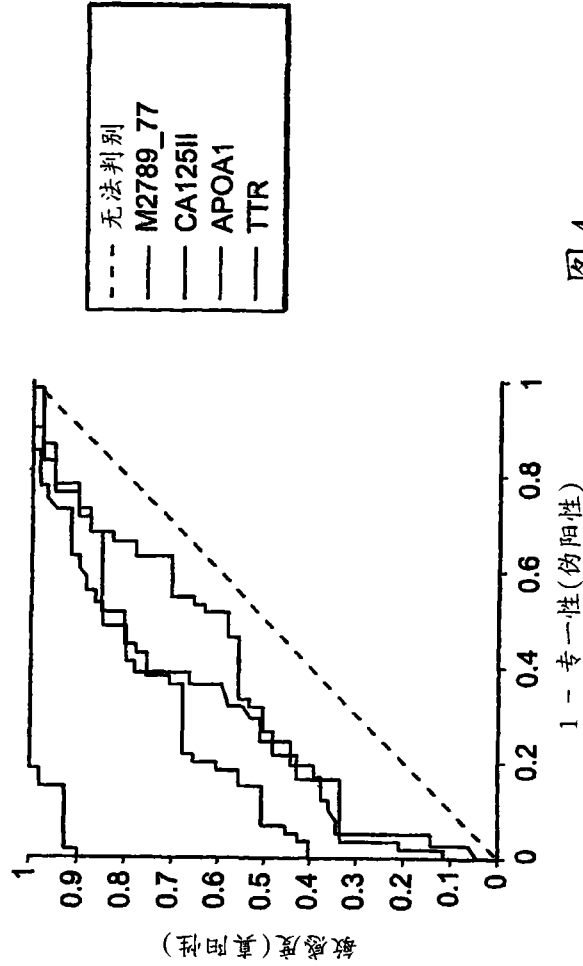
图2



使用抗JITIH4片段之抗体(m/z 3272)峰(矩形标记)经免疫  
 沉淀/下拉後之血清样本之SELDI光谱。发现四个抗  
 蛋白变异株於此光谱分别於m/z位置2191、2436、2673  
 和2788 (以红箭头指示)。

图3

组别	n	面积	SE	p	面积之95%	组别 =:
0	60					
2	41					
曲线						
M2789_77	0.774	0.0493	<0.0001	0.678 至 0.871	有较高值	
CA125II	0.988	0.0077	<0.0001	0.973 至 1.000	有较高值	
TTR	0.725	0.0515	<0.0001	0.625 至 0.826	有较低值	
APOA1	0.656	0.0565	0.0029	0.545 至 0.767	有较低值	



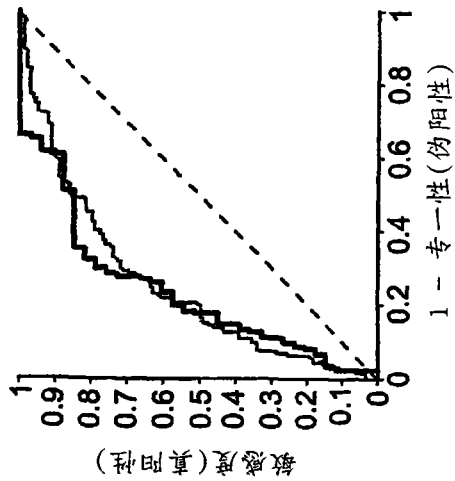
NCI n (包括三重试验) | 171 | 亦即三重试验 | 300 (排除病例; 因遗失数值, 42个标示为「X」)

DX		n	
0	1	138	33
DX		n	
0	1	162	138

曲线	面积	SE	P	面积之.95%	DX = 1
M2790_74 GRN 样本	0.756	0.0279	<0.0001	0.702 至 0.811	有较高值
M2790_74 NCI 样本	0.772	0.0403	<0.0001	0.693 至 0.851	有较高值

对比	差	P
m2437_28 v M2790_74	-0.083	0.0117

ROC曲线分析显示抗菌蛋白峰值中之一者对两个独立确认集合之判别力。AUC为0.756和0.772, 皆系大於具有p值<0.0001的0.5。



--- 无法判别  
 — M2790\_74 GRN 样本  
 — M2790\_74 NCI 样本

图5

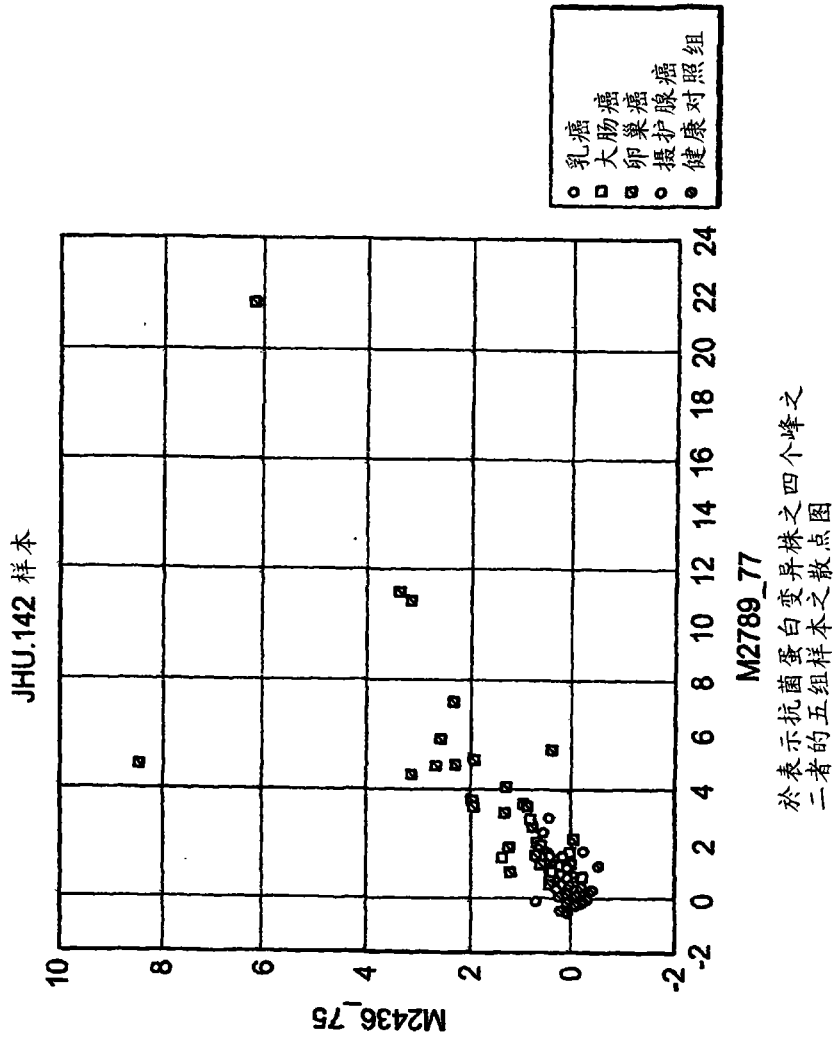


图6

每组合五位病人得自使用抗细菌蛋白峰值之二的一独立确认后  
 集点图。显示此等峰值於无癌病人和复发病人和治卵巢癌病  
 病人为较低，而於有卵巢癌前处理和肿瘤负荷量。  
 病人为较高。抗细菌蛋白含量似乎可反映出肿瘤负荷量。

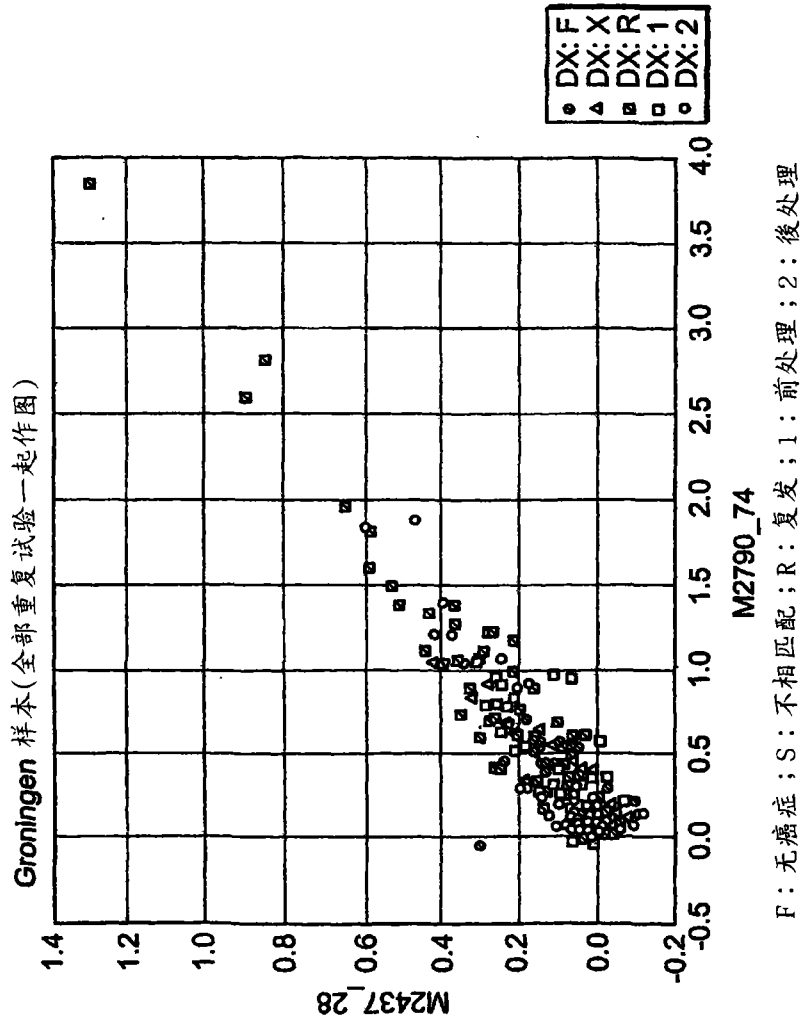


图7

每组五位病人得自使用抗菌蛋白峰值之二的第二独立确认集合  
峰值於健康对照组和患良性病病人人为较低，而於有卵巢  
癌病人人为较高。

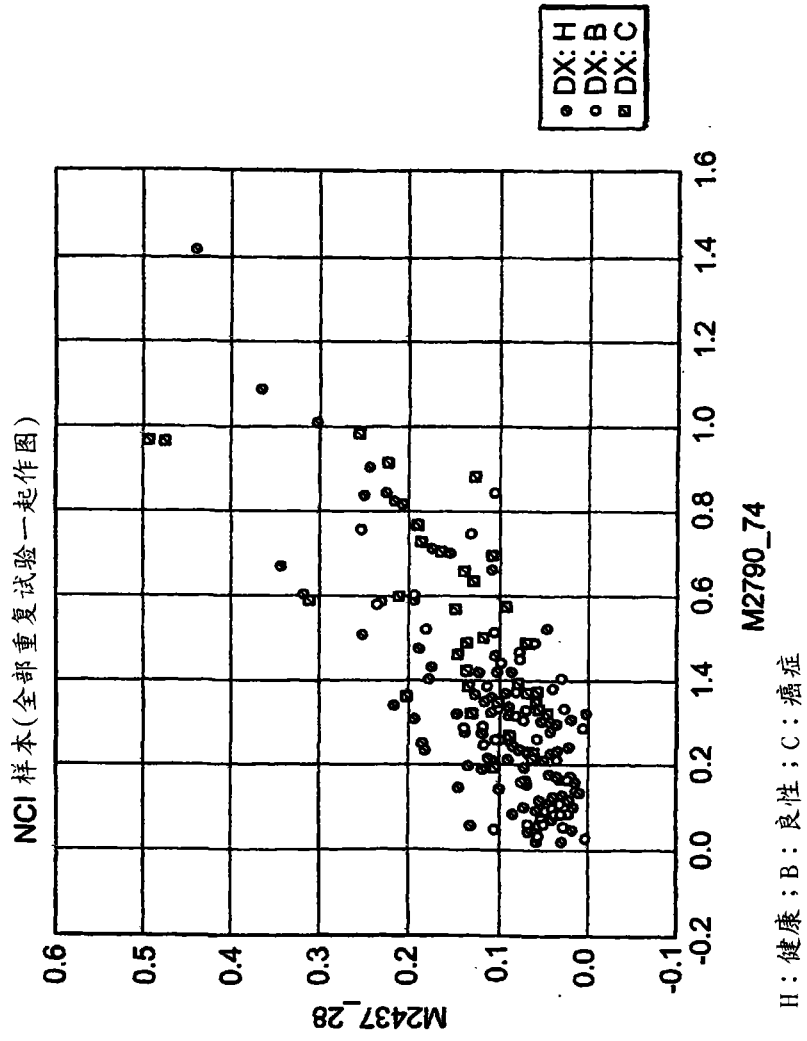


图8

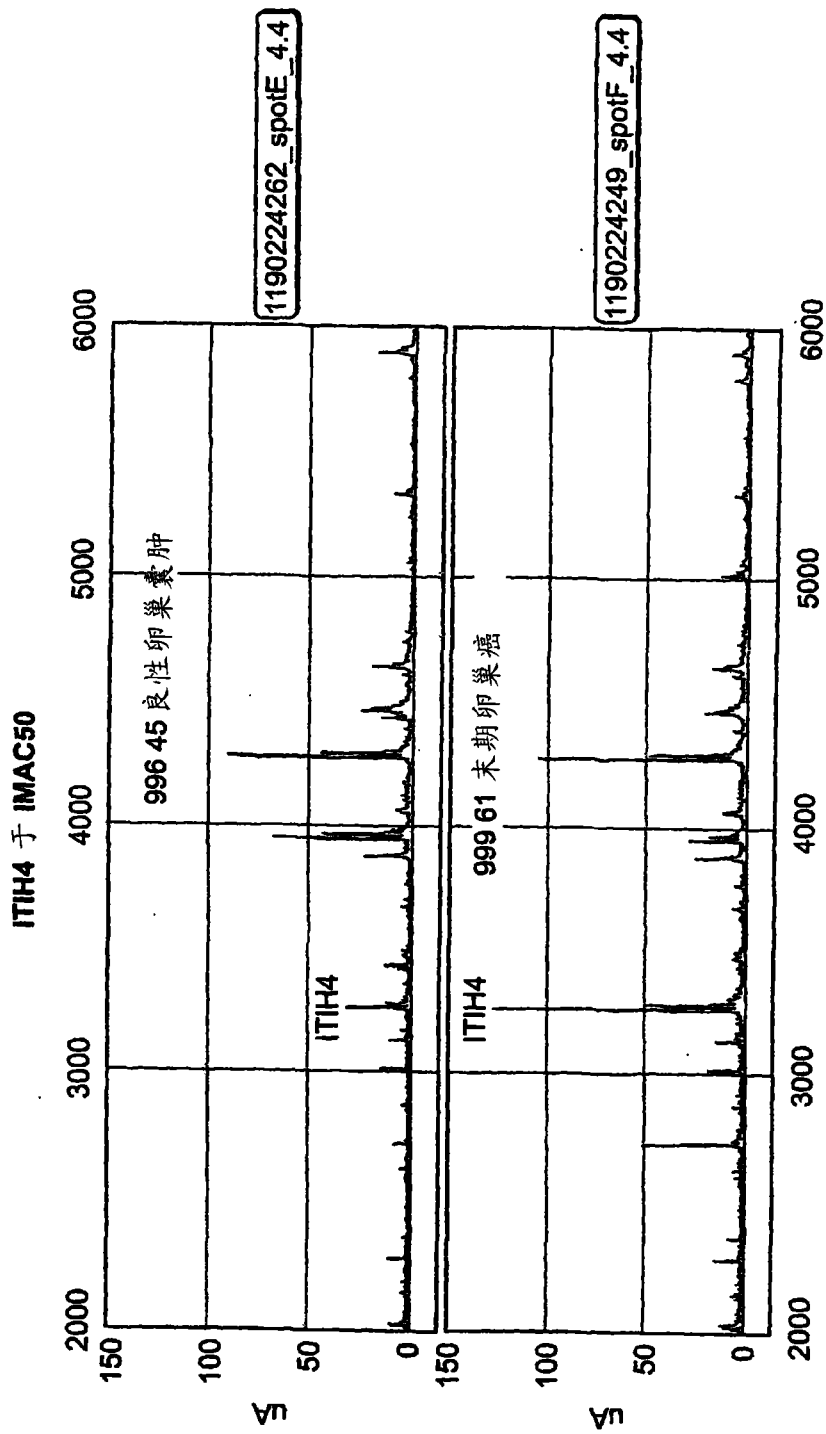


图9A

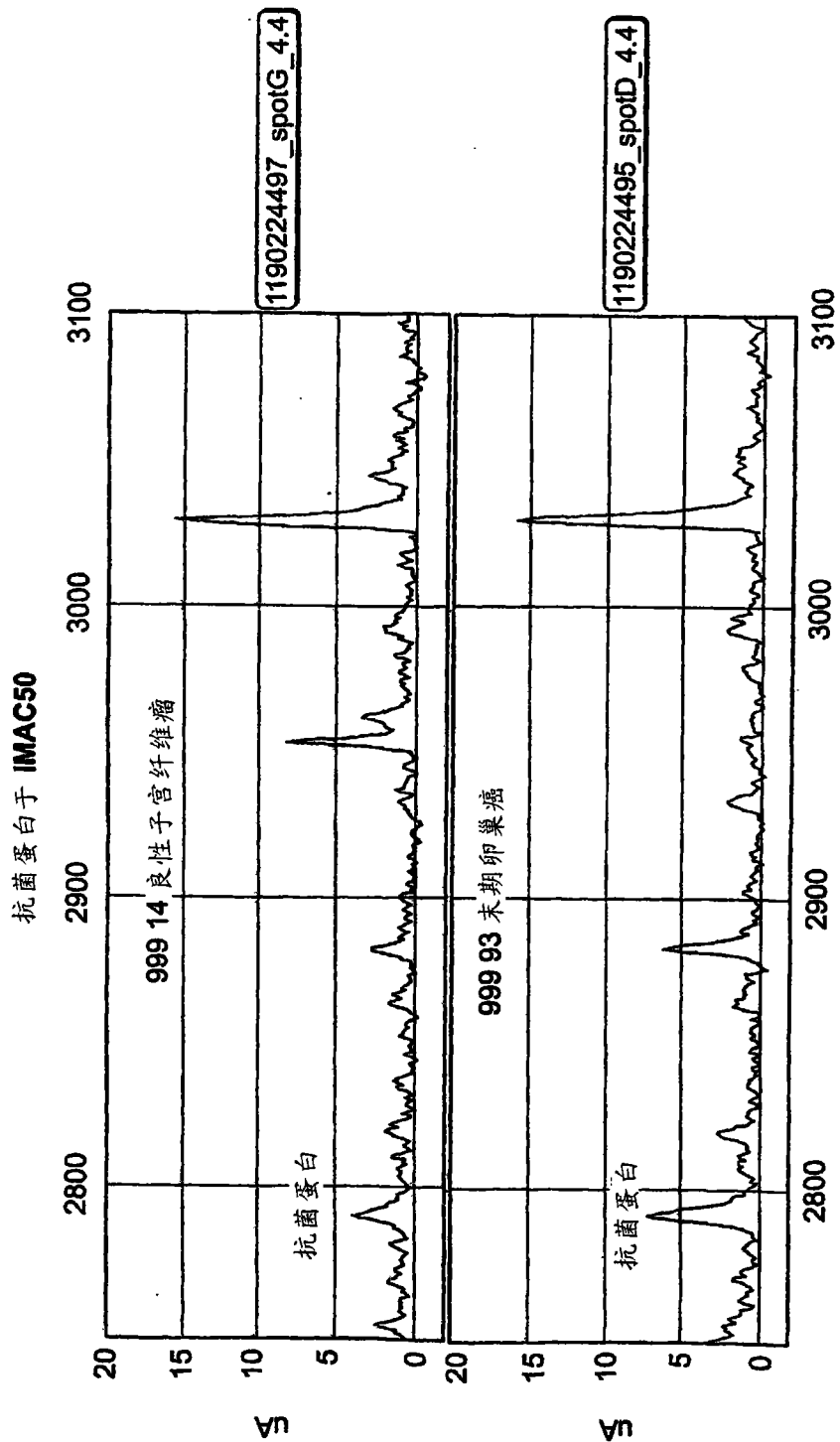


图 9B

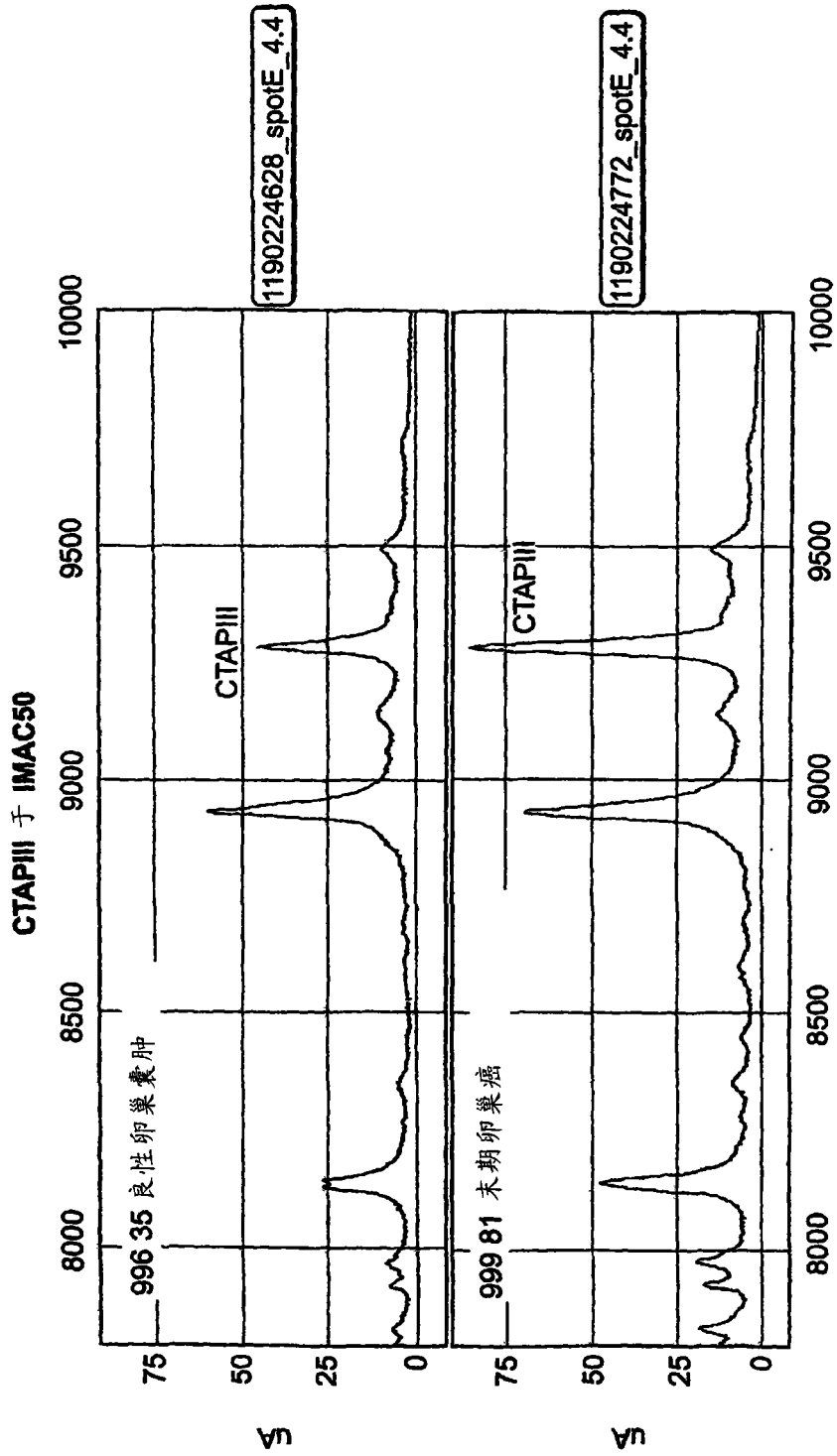


图 9C

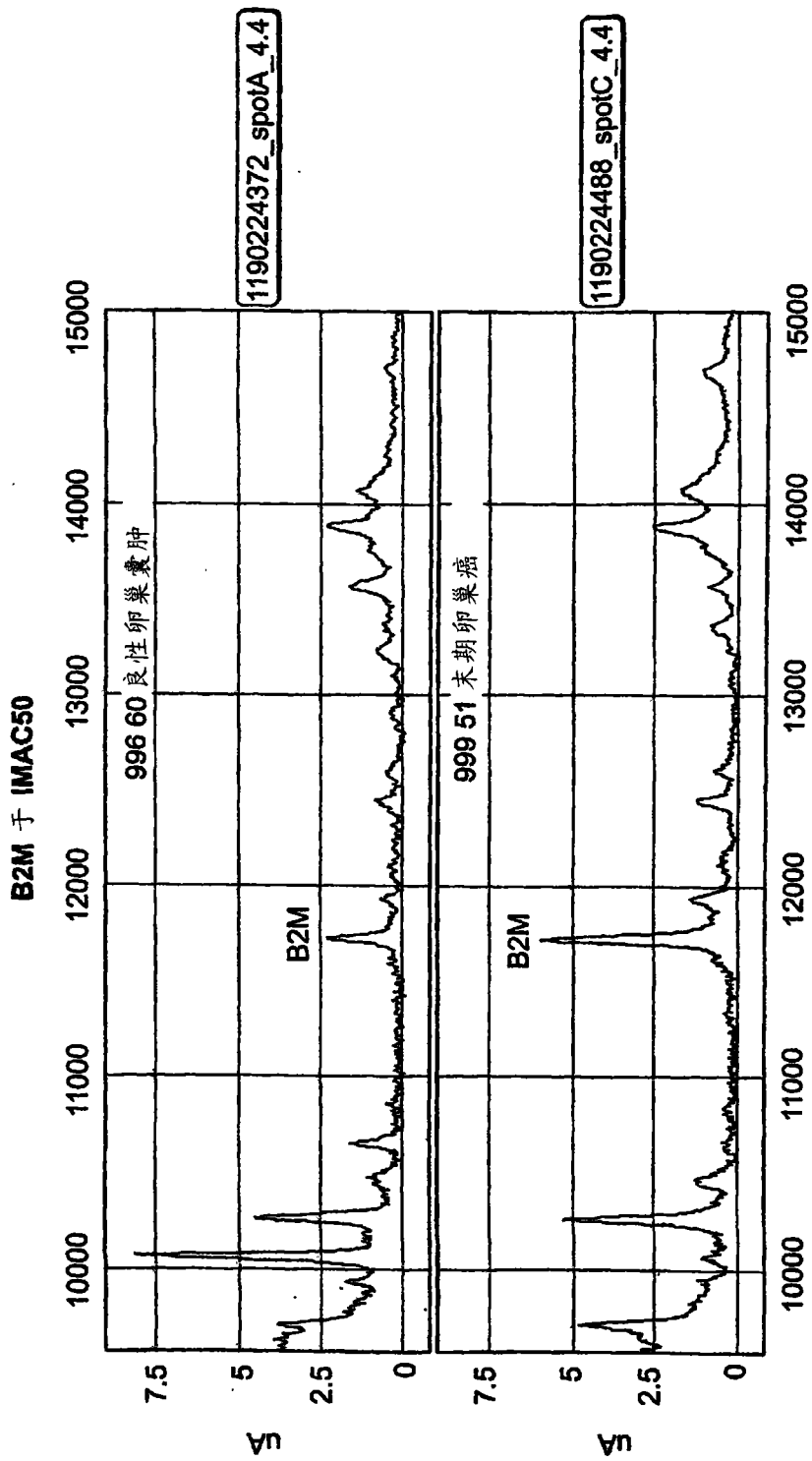


图9D

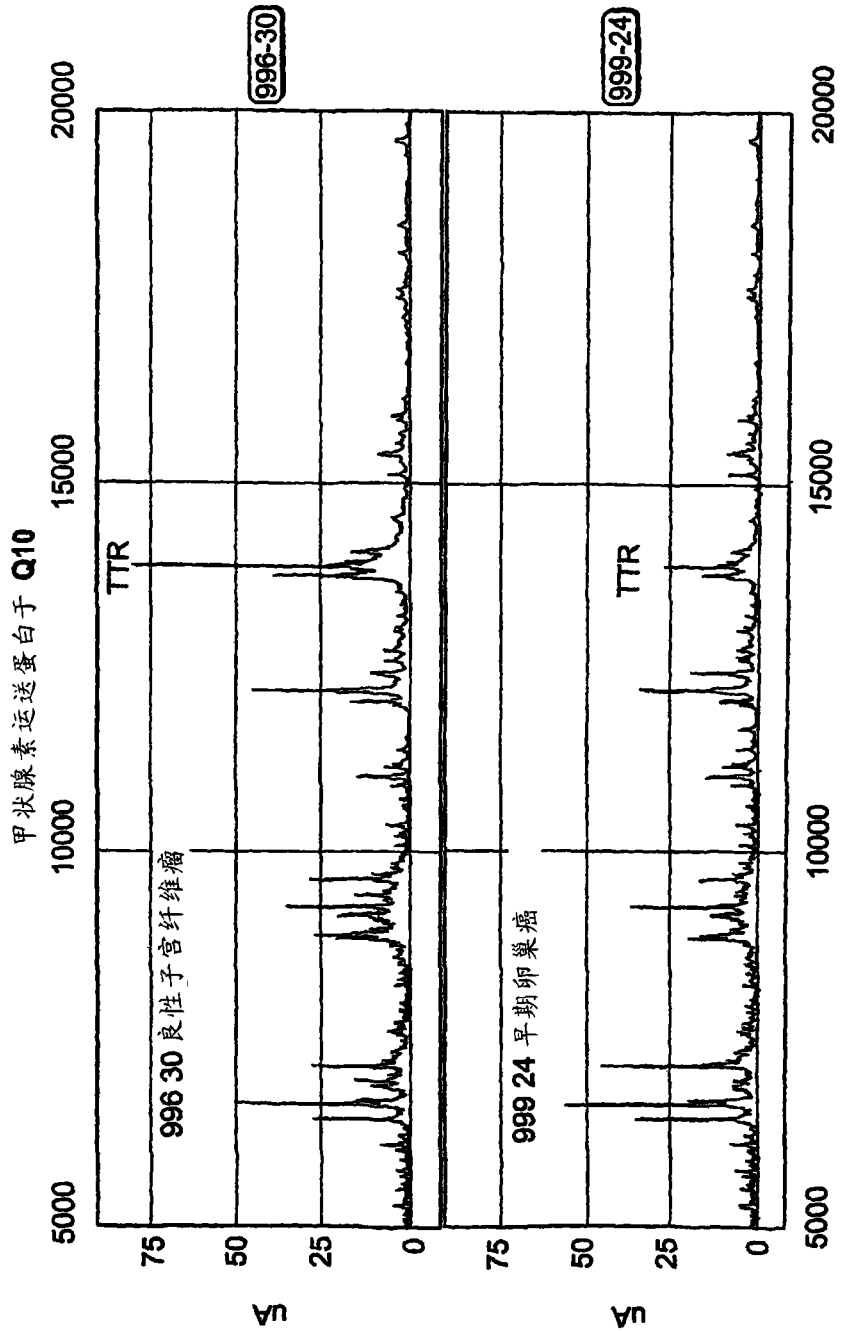


图9E

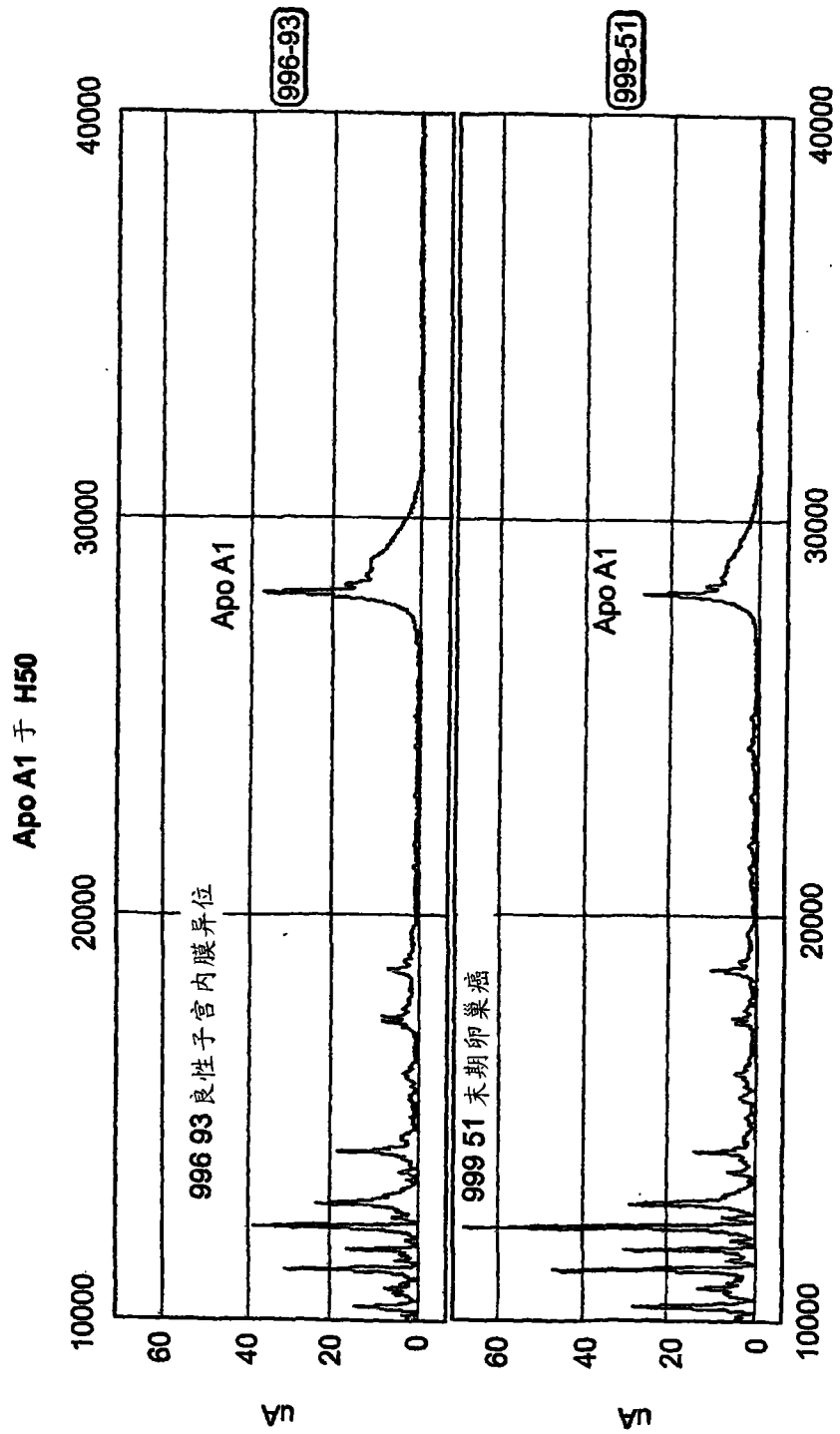


图 9F

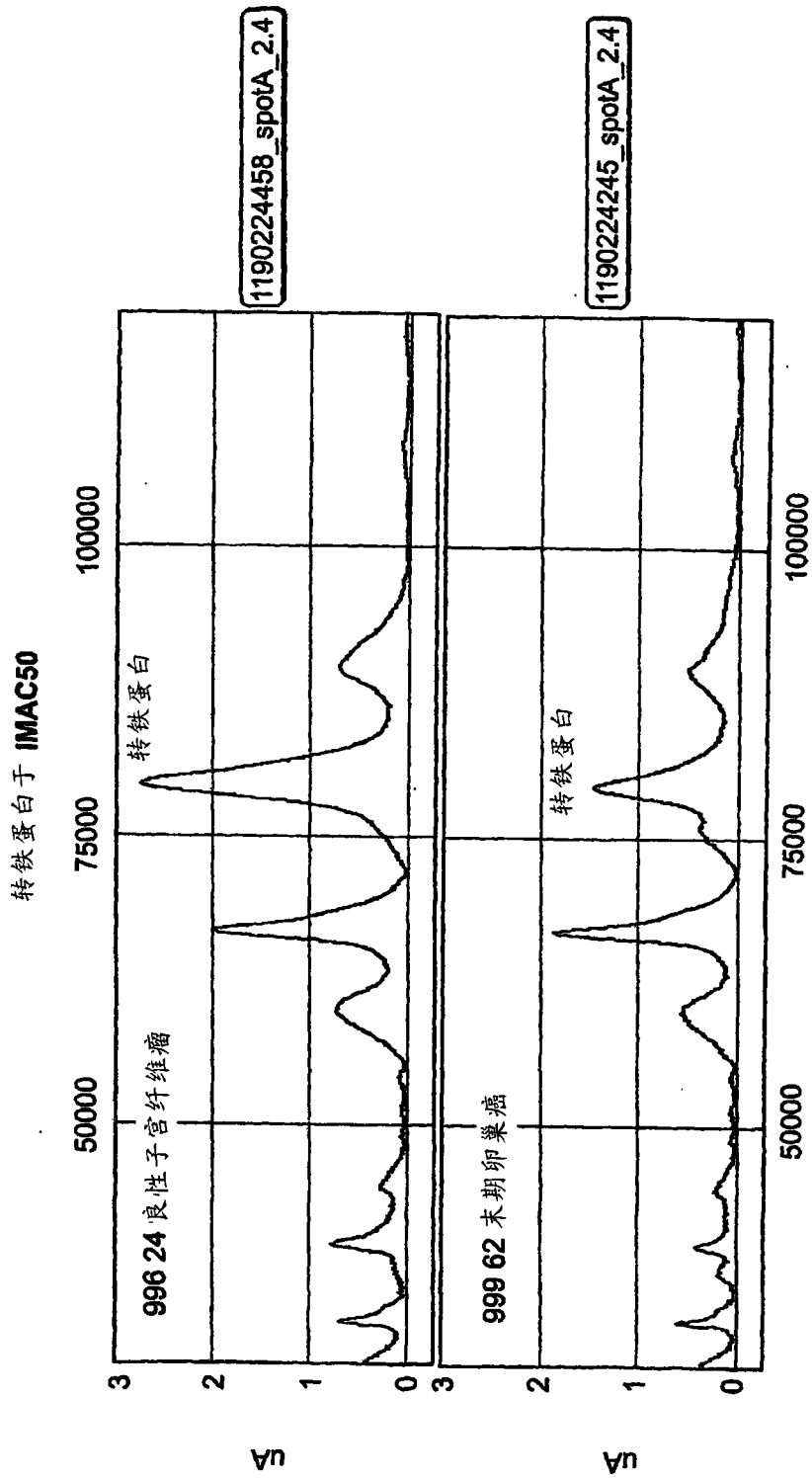


图9G

甲状腺素运送蛋白峰于Q10阵列

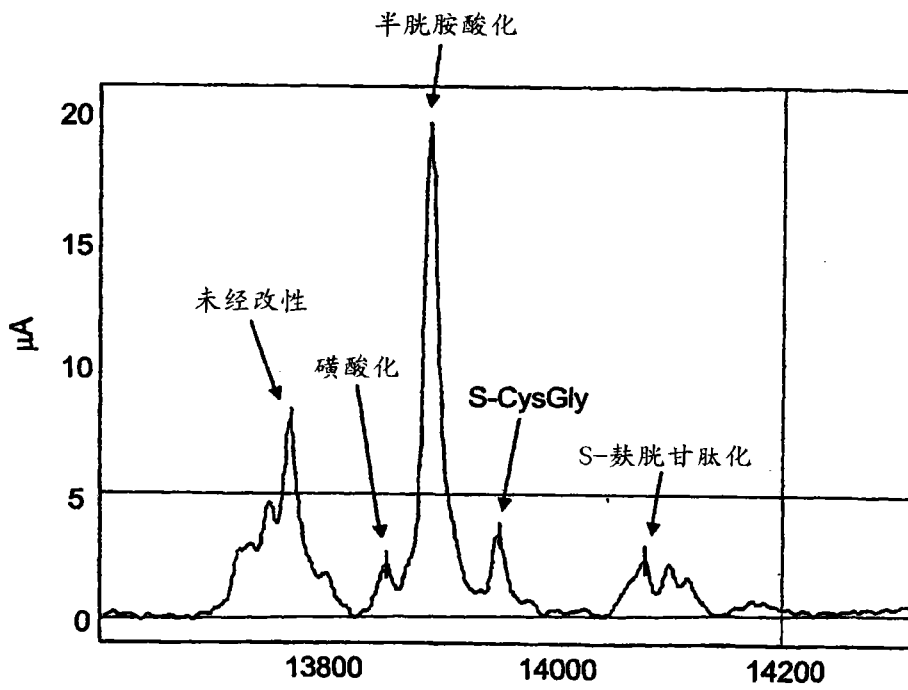


图10

於迷你檢定分析研究中有  
七个标记之ROC—曲线下  
面积(AUC)：0.79

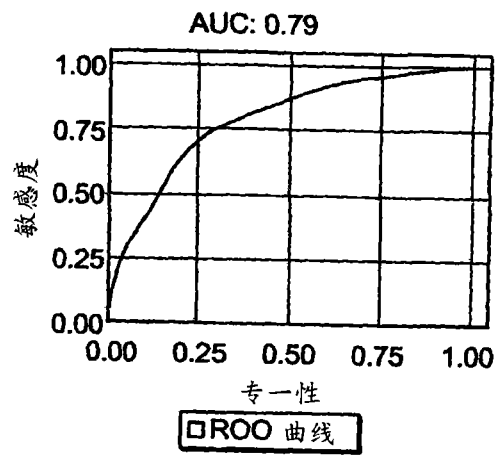


图 11