



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101896819 A

(43) 申请公布日 2010. 11. 24

(21) 申请号 200880120923. 3

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

(22) 申请日 2008. 10. 15

代理人 张广育 姜建成

(30) 优先权数据

0720113. 0 2007. 10. 15 GB

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 13

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2008/003501 2008. 10. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02009/050461 EN 2009. 04. 23

(71) 申请人 剑桥癌症诊断有限公司

地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 K·斯托伯 G·H·威廉斯

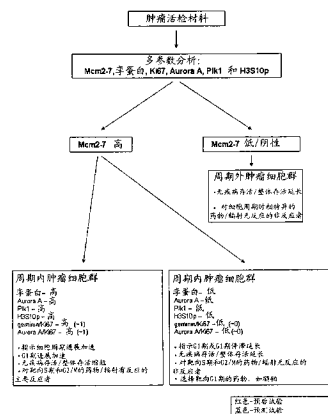
权利要求书 3 页 说明书 40 页 附图 17 页

(54) 发明名称

对癌症的诊断测试、预测测试和预后测试

(57) 摘要

本申请涉及一种确定受试者癌症进程的预后的方法、一种确定对患癌症的受试者的治疗方案的方法,或者一种确定受试者的治疗效果的方法,所述方法包括如下步骤:(a) 评估来自所述受试者的生物样本中第一生物标记物的水平,所述第一生物标记物选自 Mcm 2-7 中的至少一种;和 (b) 评估来自所述受试者的生物样本中第二生物标记物的水平,所述第二生物标记物选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3SI0ph,其中将所述第一生物标记物相对于一个预定值的水平变化以及所述第二生物标记物相对于一个预定值的水平变化相结合来指示所述受试者的癌症进程,或者指示为所述受试者制定的治疗方案,或者指示所述治疗的效果。



1. 一种在受试者中确定癌症进展的预后的方法,所述方法包括如下步骤:

(a) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 Mcm2-7 中的至少一种的第一生物标记物的水平;以及

(b) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第二生物标记物的水平,

其中将所述第一生物标记物相对于一个预定值的水平变化与与所述第二生物标记物相对于一个预定值的水平变化相结合来指示所述受试者中的癌症进展。

2. 权利要求 1 的方法,所述方法还包括在来自所述受试者的生物样品中评估选自 孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第三生物标记物的水平,其中所述第二和第三生物标记物不相同。

3. 权利要求 1 的方法,其中如果所述第一生物标记物的水平低于预定值并且所述第二生物标记物的水平低于预定值,那么所述受试者的预后被指示为癌症进展的可能性降低。

4. 权利要求 1 的方法,其中如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平低于预定值,那么所述受试者的预后被指示为癌症进展的可能性降低。

5. 权利要求 1 的方法,其中如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平高于预定值,那么所述受试者的预后被指示为癌症进展的可能性升高。

6. 权利要求 1 的方法,其中用于所述第一生物标记物的预定值为对所述第一生物标记物呈阳性的细胞的 20%。

7. 权利要求 1 的方法,其中用于所述第一生物标记物的预定值为对所述第一生物标记物呈阳性的细胞的 30%。

8. 权利要求 1 的方法,其中用于所述第二生物标记物的预定值为对所述第二生物标记物呈阳性的细胞的 20%。

9. 权利要求 1 的方法,其中用于所述第二生物标记物的预定值为对所述第二生物标记物呈阳性的细胞的 10%。

10. 权利要求 1 的方法,其中用于所述第二生物标记物的预定值为对所述第二生物标记物呈阳性的细胞的 7%。

11. 根据权利要求 1 的方法,其中所述生物样品选自肿瘤活检物、组织、全血、血浆、血清、宫颈涂片、尿、支气管灌洗液、痰和来自消化道的刷洗液。

12. 权利要求 1 的方法,其中使用免疫测定方法确定所述第一和第二生物标记物的水平。

13. 权利要求 12 的方法,其中所述免疫测定方法选自点印迹分析、狭线印迹分析、RIA、肽微阵列和 ELISA。

14. 权利要求 1 的方法,其中使用基于分子生物学的测定方法确定所述第一和第二生物标记物的水平。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述基于分子生物学的测定方法选自 RNA 印迹分析、DNA 印迹分析、蛋白质印迹分析、RT-PCR、PCR、基于核酸序列的扩增测定 (NASBA)、转录介导的扩增 (TMA) 或计算机化的检测矩阵。

16. 权利要求 1 的方法,其中所述受试者具有选自以下的癌症:乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、上皮卵巢癌、肺癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、口腔黏膜的癌症、食管癌、淋巴网状内皮

系统的癌症、脑癌、生殖泌尿癌、皮肤癌、结肠癌、胃癌、膀胱癌、输尿管的癌症和呼吸消化道的癌症。

17. 权利要求 1 的方法,其中可以连续地或同时地测量所述第一和第二生物标记物。

18. 权利要求 1 的方法,其中在测量所述第二生物标记物的水平之前测量所述第一生物标记物的水平。

19. 一种为患有癌症的受试者确定治疗方案的方法,所述方法包括如下步骤:

(a) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 Mcm2-7 中的至少一种的第一生物标记物的水平;以及

(b) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第二生物标记物的水平,

其中将所述第一生物标记物相对于一个预定值的水平变化与所述第二生物标记物相对于一个预定值的水平变化相结合来指示为所述受试者制定的治疗方案。

20. 权利要求 19 的方法,所述方法还包括在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第三生物标记物的水平,其中所述第二和第三生物标记物不相同。

21. 权利要求 19 的方法,其中如果所述第一生物标记物的水平低于预定值并且所述第二生物标记物的水平低于预定值,那么所述治疗方案选自以下的一项或多项:

(a) 监测;以及

(b) 以非细胞周期特异性化学治疗剂进行治疗。

22. 权利要求 19 的方法,其中如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平高于预定值,那么所述治疗方案选自以下的一项或多项:

(a) 监测;

(b) 以 G1 或非细胞周期特异性试剂进行治疗;以及

(c) 以非 S 和 G2/M 细胞周期特异性化学治疗剂进行治疗。

23. 权利要求 19 的方法,其中如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平高于预定值,那么所述治疗方案选自以下的一项或多项:

(a) 手术;以及

(b) 以 S 和 G2/M 细胞周期特异性化学治疗剂进行治疗。

24. 根据权利要求 19 的方法,其中所述生物样品选自肿瘤活检物、组织、全血、血浆、血清、宫颈涂片、尿、支气管灌洗液、痰和来自消化道的刷洗液。

25. 权利要求 19 的方法,其中使用免疫测定方法确定所述第一和第二生物标记物的水平。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述免疫测定方法选自点印迹分析、狭线印迹分析、RIA、肽微阵列和 ELISA。

27. 权利要求 19 的方法,其中使用基于分子生物学的测定方法确定所述第一和第二生物标记物的水平。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述基于分子生物学的测定方法选自 RNA 印迹分析、DNA 印迹分析、蛋白质印迹分析、RT-PCR、PCR、基于核酸序列的扩增测定 (NASBA)、转录介导的扩增 (TMA) 或计算机化的检测矩阵。

29. 权利要求 19 的方法,其中所述受试者具有选自以下的癌症:乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、上皮卵巢癌、肺癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、口腔黏膜的癌症、食管癌、淋巴网状内皮系统的癌症、脑癌、生殖泌尿癌、皮肤癌、结肠癌、胃癌、膀胱癌、输尿管的癌症和呼吸消化道的癌症。

30. 权利要求 19 的方法,其中可以连续地或同时地测量所述第一和第二生物标记物。

31. 权利要求 19 的方法,其中在测量所述第二生物标记物的水平之前测量所述第一生物标记物的水平。

32. 一种确定对患有癌症的受试者的治疗有效性的方法,所述方法包括如下步骤:

(a) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 Mcm2-7 中的至少一种的第一生物标记物的水平;以及

(b) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第二生物标记物的水平,

其中将所述第一生物标记物相对于一个预定值的水平变化与所述第二生物标记物相对于一个预定值的水平变化相结合来指示所述治疗有效性。

33. 权利要求 32 的方法,所述方法还包括在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第三生物标记物的水平,其中所述第二和第三生物标记物不相同。

34. 根据权利要求 32 的方法,其中所述生物样品选自肿瘤活检物、组织、全血、血浆、血清、宫颈涂片、尿、支气管灌洗液、痰和来自消化道的刷洗液。

35. 权利要求 32 的方法,其中使用免疫测定方法确定所述第一和第二生物标记物的水平。

36. 权利要求 35 的方法,其中所述免疫测定方法选自点印迹分析、狭线印迹分析、RIA、肽微阵列和 ELISA。

37. 权利要求 32 的方法,其中使用基于分子生物学的测定方法确定所述第一和第二生物标记物的水平。

38. 权利要求 37 的方法,其中所述基于分子生物学的测定方法选自 RNA 印迹分析、DNA 印迹分析、蛋白质印迹分析、RT-PCR、PCR、基于核酸序列的扩增测定 (NASBA)、转录介导的扩增 (TMA) 或计算机化的检测矩阵。

39. 权利要求 32 的方法,其中所述受试者具有选自以下的癌症:乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、上皮卵巢癌、肺癌、前列腺癌、肾癌、膀胱癌、口腔黏膜的癌症、食管癌、淋巴网状内皮系统的癌症、脑癌、生殖泌尿癌、皮肤癌、结肠癌、胃癌、膀胱癌、输尿管的癌症和呼吸消化道的癌症。

40. 权利要求 32 的方法,其中可以连续地或同时地测量所述第一和第二生物标记物。

41. 权利要求 32 的方法,其中在测量所述第二生物标记物的水平之前测量所述第一生物标记物的水平。

对癌症的诊断测试、预测测试和预后测试

技术领域

[0001] 本发明在广义上涉及癌症领域。具体而言,本发明涉及癌症的预后和治疗方案。

背景技术

[0002] 人体内大多数的细胞处于非增殖、离开细胞周期的状态,仅少数细胞群活跃地经历细胞周期。这些周期细胞主要位于如宫颈、结肠或皮肤等自我更新组织的干细胞转运增殖区室(stem-transit amplifying compartment)中。相反,大多数的功能细胞(如肝细胞)处于静止的(G0)、可逆停滞状态,或者已经从有丝分裂细胞分裂周期不可逆地转变为终末分化状态(如神经元、肌细胞或表面结肠上皮细胞)。与上述相反,癌症的特征在于不受控制的细胞生长,因此包含高比例的周期细胞。

[0003] 细胞在G1的不连续时间(称为限制点)对其环境中的丝裂原起反应。无丝裂原时不影响细胞周期经过S、G2和M期,直至细胞返回至它们在G1中的敏感窗口。细胞对高细胞密度或丝裂原缺乏的反应是积聚2N DNA内含物并退出至G0。细胞周期时相变化由细胞周期蛋白-CDK对的变化驱动。细胞周期蛋白D-CDK4、细胞周期蛋白D-CDK6和细胞周期蛋白E-CDK2可调节G0/G1,并且是完全的E2F活性所需的,S期由细胞周期蛋白A-CDK2启动,细胞周期蛋白B-CDK1可调节通过G2期并进入有丝分裂的过程。是什么可将离开细胞周期状态的细胞与处于细胞周期中的细胞区分开仍有待于被阐明。

[0004] 癌症是一类复杂的、由基因突变的积聚引起的异质疾病,所述基因突变可增加刺激细胞增殖的调节基因的活性,并降低在正常情况下限制细胞增殖的蛋白的活性。通过点突变、基因扩增、过甲基化、易位或与病毒癌蛋白的相互作用,显性刺激性癌基因的激活或隐性肿瘤抑制基因的失活可影响所有的生长信号传递通路水平,包括丝裂原、丝裂原生长因子受体、Ras、Raf、ABL、例如以下分子的上游的PI3激酶AKt;下游的p16INK4A、Myc、细胞周期蛋白D、细胞周期蛋白E、pRB和p53。

[0005] 微阵列基因表达谱理想地适合于分析表征肿瘤发生特征的基因表达中的复杂多因素的、交互的且分步骤的改变,并且目前成为旨在鉴定出可被用于癌症诊断和预后的独特分子标志的深入研究领域。有趣的是,这些表达阵列包括增殖标志、表达模式与肿瘤级别(分化状态)相关的基因、细胞周期状态和倍增时间。该增殖标志是在肿瘤数据集中观察到的最主要的基因表达模式之一(不管组织的来源如何),其包括许多细胞周期调节基因如E2F1、BUB1、PLK1、细胞周期蛋白E1、D1和B1。

[0006] 不幸地是,使用基因表达的预测规则的实际表现并不如最初针对许多肿瘤类型所提出的那样表现出具有信息含量,并且所鉴定的基因列表可能是高度不稳定的。例如,与常规的临床病理学标准如肿瘤分化状态、扩散范围和增殖指数相比,使用基因表达的大多数预测规则都未提供显著改良的乳腺癌预后分类。实际上,已经发现,许多发表的、预测癌症的无远端转移的存活的基因标志与分化状态显著相关。

[0007] 用于鉴定可用于临床的增殖标志的全局微阵列方法有可能受到限制。首先,微阵列方法在一定意义上假定了一种单区室肿瘤模型,其中癌症由增殖的对数生长细胞构成。

然而,新生物相对于个体肿瘤细胞的细胞周期状态是高度异质的。例如,在高度分化的、低级肿瘤中,仅很小部分的克隆原肿瘤细胞可处于周期中,而其中的大多数已完成其分化程序并不可逆地从周期中转至分化状态(非增殖区室)。因此,良性超增殖的状态(如增生)和生理修复性生长——包含大量有丝分裂细胞的反应性病理状态——可表现出高于高度分化的癌症的增殖标志。

[0008] 其次,肿瘤细胞在体内还可能从周期可逆地退到非增殖的 G0 状态。事实上,在许多肿瘤中多数都是非增殖细胞;即生长分数(增殖细胞与总细胞的比例)低于 0.5。这种情况可能不非令人意外,原因是正常组织是由混合的增殖元件和非增殖元件构成,并且该复杂表现的某剩余部分与大多数癌症实际相关(hardwire)。污染的良好新生物细胞、肿瘤间质、淋巴滤泡、瘤内和瘤周炎性浸润物以及其他结缔组织如血管的存在也会通过加入大量具有其他复杂的细胞周期动力学的细胞而扭曲分析结果。因此,个体肿瘤中复杂且异质的细胞周期动力学可能会妨碍对临床有用的微阵列增殖标志的鉴定,该问题还限制流式细胞术在常规临床实践中的应用。

[0009] 流式细胞术的使用同样具有有限的影响,这是因为临床样品经常不适于这类分析。这一点部分地是由于固定假象、组织的量不足,以及因为由来自活动间质和/或良性元件的污染群造成的解释困难。

[0010] 对细胞增殖标记物的评估以前未提供任何预后的和预测的解决方案,本领域的专家对增殖标记物将会提供有用的临床信息有怀疑。对细胞增殖参数的测量被认为可提供关于肿瘤的客观信息,但虽然有大量的研究,但是几乎没有直接证据表明使用某些细胞增殖标记物会真正改善最佳应用的常规组织学评估。甚至很少有研究说明增殖标记物与标准的组织病理学分级和分期相比的相对价值这一关键问题。

[0011] 虽然基因表达已在癌症中被应用于预测结果,但是使用基因表达的预测规则的实际表现出像最初提出的那样具有信息性。例如,在乳腺癌中与常规的 NPI 预后因子相比,现在使用基因表达的大多数预测规则未提供显著改善的预后分类。因此迫切需要鉴定新的生物标记物,以在普通癌症中改善预后评估。

[0012] 乳腺癌是常见癌症的一个示例,它是一种复杂疾病,原因是其形态学和生物学的异质性、其获得化学抗性的倾向性以及其发病机制背后存在多种分子机制。接受乳腺癌局部治疗的半数女性将不会复发,而另一半将最终死于转移的疾病。因此为了最佳的临床管理,必需在这两组患者之间进行清楚地区分。不幸地是,至今为止乳腺癌的预后标记物是有限的。还没有试验(预测性试验)来选择最适合的抗癌药物,特别是对于靶向参与生长控制和细胞周期转换的关键激酶的新产生小分子抑制剂而言。例如在乳腺癌中,预测性试验现阶段局限于 Her2 免疫表达作谱。

[0013] 上皮卵巢癌(EOC)是另一种常见癌症,并且在美国和英国是女性中第四大常见癌症。患者经常出现晚期疾病,虽然在药物治疗中有改善,但存活很少。在现阶段,肿瘤阶段是最重要的预后因素。手术后的残留疾病、组织学亚型和肿瘤等级也可预测存活,但几乎不能提供有关决定阶段进展和结果的生物学变量的信息。

[0014] 对于由异常增殖引起的疾病例如癌或前癌病症,仍然有对改良的诊断方法、预后方法和预测方法的需求。

[0015] 本发明涉及改善现有技术的至少一种不利情况。

[0016] 本说明书包括的任何关于文献、装置、作用或知识的描述用来解释本发明的上下文。不应认为,这些素材中任何一种可形成本公开内容和权利要求优先权日之时或之前的现有技术基础或相关领域公知常识的一部分。

发明内容

[0017] 本发明的其他适用范围将从下文中给出的具体描述中显而易见。然而,应了解,虽然那些具体的描述和具体的实施例表明了本发明的优选实施方案,但它们仅通过示例的方式给出,这是因为对于本领域技术人员来说,根据这些具体描述,在本发明主旨和范围内可明显作出多种变化和修改。

[0018] 在第一方面中,本发明提供了一种确定来自个体的身体样品中存在或不存在异常增殖细胞或细胞生长异常的方法,所述方法包括在所述样品中检测一种生物标记物,其中所述生物标记物选自:DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孪蛋白(geminin)、Polo 样激酶及其底物组蛋白 H3(下文中称为“H3S10ph”)以及它们的结合物。

[0019] 在一个实施方案中,使用针对所述生物标记物的靶多肽的特异性结合成员检测所述生物标记物。

[0020] 在第二方面中,本发明提供了一种将组织分为(i)正常型或者(ii)潜在的或实际的前癌型或癌型、发育异常型或新生物型的方法,所述方法包括确定针对一种生物标记物的特异性结合成员对所述组织的样品的结合,其中所述生物标记物选自 DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孪蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物。

[0021] 在一个实施方案中,所述特异性结合成员可针对一种所述生物标记物的靶多肽。

[0022] 在一个实施方案中,可将所述结合的模式或程度与已知的正常样品和/或已知的异常样品进行比较。

[0023] 在一个实施方案中,确定一种生物标记物与另一种生物标记物的比例。

[0024] 在第三方面中,本发明提供了一种在组织样品中标记异常细胞的方法,所述方法包括将所述样品与一种针对一种靶多肽的特异性结合成员在如下条件下相接触,其中所述靶多肽选自 DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孪蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物,所述条件即所述特异性结合成员可结合于异常增殖细胞,但不结合正常细胞的条件下。

[0025] 在第四方面中,本发明提供了针对一种靶多肽的一种特异性结合成员的如下用途,所述用途即在组织或组织样品中确定、评估或诊断存在或不存在异常细胞增殖、细胞生长异常、肿瘤细胞周期动力学、细胞周期时相分布、发育异常、新生物形成或者潜在的或实际的前癌状态或癌状态。

[0026] 在一个实施方案中,所述靶多肽包括选自以下的两种或多种标记物:DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孪蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物。

[0027] 在第五方面中,本发明提供了一种预测对癌症的治疗的反应或预测癌症的疾病进展的方法,所述方法包括在来自一个个体的身体样品中确定存在或不存在异常增殖细胞或细胞生长异常,所述方法包括在所述样品中检测一种靶多肽,其中所述靶多肽选自 DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孪蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物。

[0028] 在第六方面中,本发明提供了一种监测对治疗药物开发研究的反应的方法,所述

方法包括在身体样品中检测一种生物标记物,其中所述生物标记物选自 DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孕蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物,评估所述标记物的表达,以确定在所述样品中存在或不存在异常细胞增殖、细胞生长异常、肿瘤细胞周期动力学、细胞周期时相分布、发育异常、新生物形成或者潜在的或实际的前癌状态或癌状态。

[0029] 在一个实施方案中,所述药物开发研究为临床前药物开发研究。

[0030] 在一个实施方案中,所述药物开发研究为临床前药物开发研究。

[0031] 在一些实施方案中,所述临床前药物开发研究为体内异种移植肿瘤模型。

[0032] 在第七方面中,本发明提供了一种在受试者中确定癌症进展的预后的方法,所述方法包括步骤:

[0033] (a) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 Mcm2-7 中的至少一种的第一生物标记物的水平;以及

[0034] (b) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第二生物标记物的水平,

[0035] 其中将所述第一生物标记物相对于一个预定值的水平变化与所述第二生物标记物相对于一个预定值的水平变化相结合来指示所述受试者中的癌症进展。

[0036] 在一个实施方案中,所述在受试者中确定癌症进展的方法还包括,在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第三生物标记物的水平,其中所述第二和第三生物标记物不相同。

[0037] 在第八方面中,本发明提供了一种为患有癌症的受试者确定治疗方案的方法,所述方法包括步骤:

[0038] (a) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 Mcm2-7 中的至少一种的第一生物标记物的水平;以及

[0039] (b) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第二生物标记物的水平,

[0040] 其中将所述第一生物标记物相对于一个预定值的水平变化与所述第二生物标记物相对于一个预定值的水平变化相结合来指示为所述受试者制定的治疗方案。

[0041] 在一个实施方案中,所述为患有癌症的受试者确定治疗方案的方法还包括,在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、AuroraA、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第三生物标记物的水平,其中所述第二和第三生物标记物不相同。

[0042] 在第九方面中,本发明提供了一种确定对患有癌症的受试者的治疗有效性的方法,所述方法包括步骤:

[0043] (a) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 Mcm2-7 中的至少一种的第一生物标记物的水平;以及

[0044] (b) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第二生物标记物的水平,

[0045] 其中将所述第一生物标记物相对于一个预定值的水平变化与所述第二生物标记物相对于一个预定值的水平变化相结合来指示所述治疗有效性。

附图说明

[0046] 相关领域的技术人员通过结合附图参考下文对优选实施方案的描述,可更好地理解本发明的其他公开内容、目标、优点和方面,所述附图以仅示例性的方式给出,因此不限制本发明的范围,其中:

[0047] 图1示出Ki67、Mcm2、孪蛋白、Aurora A和H3S10ph在细胞有丝分裂周期过程中的存在情况。Mcm2-7 DNA复制准许因子的水平在经历细胞周期的过程中不会显著变化,而内源性准许阻遏蛋白孪蛋白的表达局限于S-G2-M期。孪蛋白表达增加在多个恶性肿瘤中被观察到,并与增殖正相关。值得注意的是,该表达增加总是局限于S-G2-M,甚至在侵袭性肿瘤中也是这样。Aurora A(和PLK1;数据未显示)水平在G1过程中可忽略,在S期过程中增加,在G2/M过程中达到峰值。H3S10ph的存在局限于有丝分裂,因此可用作有丝分裂标记物。Mcm 2-7蛋白表达可以用于在组织中确定细胞周期状态。Mcm2-7可标识处于细胞周期(G1-S-G2-M期)的细胞,但在细胞退到静止(G0)状态、分化状态和衰老的“离开细胞周期”的状态后被严格地下调。由于Ki67在增殖细胞的整个细胞周期中表达,因而可以将S-G2-M期或M期标记物与Ki67的比例(例如孪蛋白/Ki67、Aurora A/Ki67或H3S10ph/Ki67)用作G1期相对长度的指标,从而用作细胞周期进展速度的指标。

[0048] 图2示出自我更新组织中DNA复制准许因子表达的示意图。该模型包括干细胞区室、分裂-转运区室和功能性区室。细胞连续流过这些区室;新细胞由干细胞区室(S)提供,并且其数目在分裂-转运区室(T)中扩增。在细胞进入成熟区室(M)中时变成完全分化并且有功能能力。干细胞区室显示出低表达的DNA复制准许因子Mcm2-7。Mcm2-7水平在细胞进入分裂-转运区室中时迅速升高。随着细胞分化及采用完全分化的功能表型,Mcm2-7逐步下调。然而,随着细胞离开分裂-转运区室,增殖能力在执行分化程序过程中的较早时间点丧失,并且与Mcm2-7装载因子Cdc6相偶合。值得注意的是,可表征癌症特征的抑制分化(特别是在高级别的肿瘤中)与下调Mcm2-7失败相关联。

[0049] 图3示出乳腺癌中的细胞周期时相进展。Mcm2、Ki67、孪蛋白、Aurora A和H3p免疫染色的两个乳腺癌活检标本显示于(A)和(B)。两种情形都具有Mcm2蛋白高表达的特征,表明大多数的肿瘤细胞处于细胞分裂周期中。虽然两肿瘤标本都显示出如Mcm2表达所定义的高生长部分,但S-G2-M标记物孪蛋白和Aurora A与有丝分裂标记物H3S10ph的表达有显著差异。(A)该肿瘤显示出很低表达水平的孪蛋白和Aurora A,少量细胞显示出组蛋白H3第10位丝氨酸的磷酸化(H3S10ph),表明G1期的停滞或延长。(B)相反,该肿瘤显示出高表达水平的孪蛋白和Aurora A以及增加的H3S10磷酸化,表明快速的细胞周期时相进展。因此可以推定,(B)中显示的肿瘤对于S或G2/M细胞周期时相特异性药物更加敏感。

[0050] 图4示出对用于预后性和预测性癌症试验的DNA复制准许因子、Aurora激酶、Ki67、孪蛋白、Polo样激酶、H3S10ph和它们的结合物的多参数分析。在多参数分析中使用这些标记物组合,有可能确定肿瘤细胞是否离开周期(即非增殖肿瘤细胞)——对针对细胞周期的抗癌剂和辐射会产生抗性的细胞群。而且,对于那些处于周期中的肿瘤细胞(Mcm 2-7阳性),则可确定细胞周期进展的速度。

[0051] 图5示出对标记物多参数分析的验证。(A)Mcm2抗体、孪蛋白抗体、Aurora A抗体、Plk1抗体和H3S10ph抗体对非同步MCF-7全细胞裂解物的免疫印迹。(B)石蜡包埋的以Ki67抗体、Mcm2抗体、孪蛋白抗体、Aurora A抗体、Plk1抗体和H3S10ph抗体免疫组织

化学染色的 3 级乳腺癌组织切片的显微照片（原始放大率 400×）。插图显示出正常乳腺的免疫染色（放大率 800×）。

[0052] 图 6 示出 Aurora A 和 Plk1 在乳腺癌系列的各肿瘤级别中的表达。

[0053] 图 7 示出乳腺癌系列 (A) NPI、(B) Plk1 和 (C) Aurora A 的复发时间曲线。

[0054] 图 9 示出乳腺癌系列 (A) NPI 和 Plk1, 以及 (B) NPI 和 Aurora A 的复发时间曲线。

[0055] 图 10 示出 (A) Mcm2 抗体、孕蛋白抗体、Aurora A 抗体、AuroraB 抗体和 H3S10ph 抗体对非同步 HeLa S3 全细胞裂解物的免疫印迹。(B) 生物标记物和肌动蛋白（加载的对照物）在来自同步化 HeLa S3 细胞的全细胞裂解物中的免疫印迹。以 2 小时间隔的同步化 HeLa S3 细胞的 FACS 图谱。(C) 石蜡包埋的以 Ki67 抗体、Mcm2 抗体、孕蛋白抗体、Aurora A 抗体、Aurora B 抗体和 H3S10ph 抗体免疫组织化学染色的上皮卵巢癌 (EOC) 组织切片的显微照片。原始放大率, 400×; 插图, 1000×。

[0056] 图 11 示出各肿瘤级别 (EOC 系列) 中 Aurora A 的表达。

[0057] 图 12 中显示的 Kaplan-Meier 曲线示出 Aurora A、肿瘤倍性状态和 EOC 系列的患者存活率之间的关联。(A) 整个系列中的 Aurora A (低三分位组 < 11.3%, 中三分位组 11.3-21.3%, 高三分位组 > 21.3%) 和无疾病存活率; 对数秩检验, $p = 0.01$ 。(B) 整个系列中的肿瘤倍性状态和无疾病存活; 对数秩检验, $p = 0.03$ 。(C) 早期亚组中的 AuroraA (低三分位组 < 8.7%, 中三分位组 8.7-19.6%, 高三分位组 > 19.6%) 和无疾病存活; 对数秩检验, $p = 0.004$ 。(D) 早期亚组中的肿瘤倍性状态和无疾病存活; 对数秩检验, $p = 0.04$ 。(E) 早期亚组中的 Aurora A (低三分位组 < 8.7%, 中三分位组 8.7-19.6%, 高三分位组 > 19.6%) 和总存活; 对数秩检验, $p = 0.01$ 。(F) 早期亚组中的肿瘤倍性状态和总存活; 对数秩检验, $p = 0.08$ 。

[0058] 图 13 的图示显示了 Mcm2 在研究样品中的表达分布。Mcm2 蛋白在乳腺癌患者组中的表达频率。(平均值 = 64.4101, 标准差 = 30.4632, $N = 182$)。

[0059] 图 14 的图示显示了通过细胞周期标记物表达分布定义了 3 种不同细胞周期表型; (I) 离开细胞周期状态; (II) 在周期的 G1 期延迟 / 停滞状态; (III) 活动周期状态。显示了中值 (黑实线)、四分位数间距 (加框) 和排除偏离情况的可靠范围 (robust range) (闭合线)。偏离情况由孤立点显示。(LI: 标记指数)。

[0060] 图 15 的 Kaplan-Meier 曲线图显示出细胞周期表型和无疾病存活的关联。(I) 离开细胞周期状态; (II) 在周期的 G1 期延迟 / 停滞状态; (III) 活动周期状态。一元分析比较了表型 III 与表型 I 和 II 的组合; $HR = 3.90 (1.81-8.40)$ 、 $p < 0.001$ 。多元分析对 PI 进行调整, $HR = 2.71 (1.18-6.23)$ 、 $p = 0.19$ 。

[0061] 图 16 的图示显示了细胞周期表型和乳腺癌亚组的关系。子图显示了表现出细胞周期表型 I (离开周期)、II (G1 延迟 / 停滞) 和 III (活动周期) 的每种乳腺癌亚型的比例。值得注意的是, 大多数的 Her-2 和三重阴性肿瘤 (triple negative tumour) 表现活动周期表型 (III)。

具体实施方式

[0062] 提供了生物标记物的用途 (包括临床用途), 以及如何可将这些生物标记物的分析与其他关键细胞周期调节物相整合以提供患者肿瘤样品中细胞周期动力学和时相分布

的信息。该分析可提供诊断算法用于改善预后评估,而且具有预测对细胞周期时相特异性药物的治疗反应的能力。在该方法中,可使用生物标记物在常规的患者肿瘤活检材料上进行多参数细胞周期分析,所述生物标记物形成 DNA 复制准许通路和有丝分裂机制的核心组分。该算法不仅提供预后工具,而且还可以开发为细胞周期时相特异性药物(包括辐射)或抑制上游生长调节通路的药物的预测试验。该算法还可以在临床前研究(体内异种移植肿瘤模型)和临床试验中用来评估新药物候选物的有效性。

[0063] 在第一方面中,本发明提供了一种确定来自个体的身体样品中存在或不存在异常增殖细胞或细胞生长异常的方法,所述方法包括在所述样品中检测一种生物标记物,其中所述生物标记物选自:DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孕蛋白、Polo 样激酶及其底物组蛋白 H3(下文中称为“H3S10ph”)以及它们的结合物。

[0064] 在一个实施方案中,使用针对一种所述生物标记物的靶多肽的特异性结合成员检测所述生物标记物。

[0065] “身体样品”意指任何在其中可以检测生物标记物表达的取样细胞、组织或体液。这类身体样品的实例包括但不限于,血液、淋巴、尿、女性分泌液、活检物和涂片。可通过多种技术获得患者的身体样品,所述技术包括例如擦拭或拭取区域,或者使用针头吸出体液。用于收集多种身体样品的方法在本领域中是公知的。可将身体样品转移至玻片上放大观察。可将固定液和染色液加到玻片上的细胞上,用于保存标本以及用于有助于检查。

[0066] 在一个实施方案中,身体样品可源自于宫颈(包括试验性宫颈涂片)、乳房、尿道恶性肿瘤(对活检组织样品和尿细胞学涂片两者进行试验)、结肠、肺、膀胱、皮肤、喉、食管、支气管、淋巴结和血液恶性肿瘤的任一种,还可源自于血液和血清用于检查转移肉瘤和癌的迹象。在一些实施方案中,本发明可另外用于评估宫颈腺上皮细胞的恶变前异常(腺上皮内的瘤形成,GIN)或其他组织中的恶变前异常。

[0067] 在一些实施方案中,它可特别合适地用于在检测新生物细胞或它们与显示活性变化的细胞的区别方面可能非常困难的其他临床标本的细胞学或生物化学评估。这类标本包括痰、支气管肺泡灌洗液标本、尿和来自消化道(包括食道、胃和胰腺、胆管和胰管)的刷洗液。

[0068] 在一些实施方案中,本发明可应用于对组织进行组织学或生物学评估,这里对增殖的评估可能能够更准确地预测临床结果,以及/或者更合理地选择疗法。标本可包括恶性的腺细胞(如肺细胞、乳腺细胞、结肠细胞、前列腺细胞、胃细胞)、鳞状上皮细胞(如肺细胞、皮肤细胞、食管细胞)或其他上皮细胞类型(如膀胱细胞、输尿管细胞、肾细胞、卵巢细胞)。

[0069] 在一个实施方案中,对 Mcm2、Mcm3、Mcm4、Mcm5、Mcm6、Mcm7、孕蛋白、Aurora A 和 Aurora B 以及它们的底物组蛋白 H3 的多参数分析可用于在体外或体内评估 EOC 的进展和该肿瘤类型的细胞周期动力学。

[0070] 在第二方面中,本发明提供了一种将组织分为(i)正常型或者(ii)潜在的或实际的前癌型或癌型、发育异常型或新生物型,所述方法包括确定针对一种生物标记物的特异性结合成员对所述组织的样品的结合,其中所述生物标记物选自 DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孕蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物。

[0071] 在一个实施方案中,所述特异性结合成员可针对一种所述生物标记物的靶多肽。

[0072] 在一个实施方案中,可将所述结合的模式或程度与已知的正常样品和/或已知的

异常样品进行比较。

[0073] 在一个实施方案中,确定一种生物标记物与另一种生物标记物的比例。

[0074] “生物标记物”是在生物样品中的表达水平与一个预定水平相比有变化的任何基因或蛋白。预定水平可以是来自正常或健康受试者的生物样品中的水平。本发明的生物标记物对于异常增殖细胞或细胞生长异常是选择性的。

[0075] 在本发明的另一个实施方案中,所述生物标记物是在生物样品中其水平与一个预定表达水平相比有变化的任何基因或蛋白。例如,在所述生物样品中第一生物标记物的预定值大于所述生物样品中的所述第一生物标记物阳性细胞的 20%、大于 25% 或者 30% 或以上。

[0076] 在相关的方面中,在所述生物样品中第二或第三生物标记物的预定值小于所述生物样品中的所述第二或第三生物标记物阳性细胞的 20%、小于 15%、小于 10% 或者 7% 或以下。

[0077] 本发明的生物标记物包括基因和蛋白,以及它们的变体和片段。这类生物标记物包括这样的 DNA,即该 DNA 含有编码该生物标记物的核酸序列的全部或部分序列,或者含有该序列的互补序列。所述生物标记物核酸还包括这样的 RNA,即该 RNA 包含任意目的核酸序列的全部或部分序列。生物标记物蛋白由本发明的 DNA 生物标记物编码或对应于本发明的 DNA 生物标记物。生物标记物蛋白包含任意生物标记物蛋白或多肽的全部或部分氨基酸序列。

[0078] 本发明基于这样的意外发现,即通过对常规固定的外科活检材料进行免疫表达作谱而靶向如下的生物标记物可提供对这些肿瘤的细胞周期动力学的独特认识:调节 G1-S 时相转变的 DNA 复制准许通路的生物标记物(如 Mcm2、Mcm3、Mcm4、Mcm5、Mcm6、Mcm7 和孪蛋白)与参与 G2-M 转变的有丝分裂机制的生物标记物(如 Aurora A 及其底物 H3)的组合。在多参数分析中使用这些标记物组合,有可能确定肿瘤细胞是否从周期退出(即非增殖肿瘤细胞)——对针对细胞周期的抗癌剂和辐射具有抗性的细胞群。而且,对于这那处于周期中的肿瘤细胞(Mcm 2-7 阳性),则可确定细胞周期进展的速度。

[0079] 表现出进展延迟并主要停留于 G1 的肿瘤可能显示出对于靶向 S 和 G2-M 期的试剂(表 1)的反应较弱,因此应以靶向 G1 的试剂进行处理(肿瘤表型——Mcm2-7 水平高,但同时孪蛋白、Aurora A 和 H3S10ph 水平低并且孪蛋白/Ki67 比值趋向于 0)。相反,表现出细胞周期进展加快的肿瘤可能显示出对于靶向 S 和 G2/M 的试剂(表 1)反应良好(肿瘤表型——Mcm2-7 水平高、孪蛋白高、Aurora A 高、H3S10ph 高,并且孪蛋白/Ki67 比值趋向于 1)。表现出细胞周期进展加快和高 G2-M 分数的肿瘤还可能显示对辐射有最佳反应。特别有用的是针对 DNA 复制准许通路的核心组分(Mcm2-7 家族蛋白和孪蛋白)的结合分子以及针对有丝分裂机制核心组分(Aurora A、Polo 样激酶 1 和 H3S10ph)的结合分子。可将其他生物标记物用作可对细胞周期进展的速率进行分析的该算法中的其他参数。使得可对细胞周期进展的速率进行分析的生物标记物包括 Ki67。

[0080] 在一个实施方案中,本发明提供了一种在常规处理的手术活检材料中确定肿瘤群的细胞周期动力学的方法。所述多参数算法使得可将活性周期细胞与抗细胞周期时相特异性药物和辐射的非增殖的周期外(非增殖)细胞区分开。多参数分析使得可确定精确的肿瘤细胞周期动力学,并因此使得可以选出最适合治疗该具体的患者的、靶向细胞周期时相

的药物（个性化的药物）（表 1）。该多参数分析除了作为潜在的有力预测试验用于指导治疗干预之外，还可提供有力的预后工具，用于确定复发时间（无病存活期 / 无病期间）和死亡时间（总存活期）。

[0081] 在第三方面中，本发明提供了一种在组织样品中标记异常细胞的方法，所述方法包括将所述样品与一种针对一种靶多肽的特异性结合成员在如下条件下相接触，其中所述靶多肽选自 DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孪蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物，所述条件即所述特异性结合成员可结合于异常增殖细胞但不结合正常细胞的条件下。

[0082] 可确定所述特异性结合成员是否结合于所述样品，目的是确定异常增殖细胞在所述样品中的存在情况。

[0083] 在第四方面中，本发明提供了一种针对一种靶多肽的特异性结合成员的如下用途，所述用途即在组织或组织样品中确定、评估或诊断存在或不存在异常细胞增殖、细胞生长异常、肿瘤细胞周期动力学、细胞周期时相分布、发育异常、新生物形成或者潜在的或实际的前癌状态或癌状态。

[0084] 在一个实施方案中，所述靶多肽包括选自以下的两种或多种标记物：DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孪蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物。

[0085] 在每个细胞分裂周期过程中精确复制 DNA 对于基因组的稳定性而言是必需的，这种精确复制通过严格调节的起始事件实现。DNA 复制起始依赖于在有丝分裂晚期和早 G₁ 过程中在复制起始点组装复制前复合体。复制前复合体组装涉及起点识别复合体 (ORC)、Cdc6、Cdt1 和 Mcm2-7 与起始点的依次结合，并使得染色质“准许”在 S 期过程中进行 DNA 合成。DNA 复制准许因子如 Mcm2-7 蛋白水平的调节可提供控制人组织中的细胞增殖的有力下游机制。Mcm2-7 调节异常是多步骤肿瘤发生中的早期事件。对复制前复合体组装的抑制——其保证每个细胞周期起始点引发一次且仅一次——对于保持基因组完整性很关键。

[0086] 准许抑制物孪蛋白在 S-G₂-M 期过程中以高水平表达，并通过其与 Cdt1 的相互作用阻断 Mcm2-7 再次加载于染色质上。在人体内细胞群中，孪蛋白缺失会导致因 DNA 过度复制而使基因组极不稳定，这致使有非整倍体大核的细胞出现，这些细胞是侵袭性癌症的形态学 / 病理学标志。孪蛋白的失活也会造成中心体过量复制，这和 G₂-M 检查点机制失效一块导致了可促进染色体错误分离和非整倍性的多重有丝分裂缺陷。这些研究结果强调了孪蛋白在细胞周期的多个阶段保持基因组完整性中所起的关键作用。

[0087] 有丝分裂事件的严格控制对于成功完成姐妹染色单体分离和细胞分裂是必需的。虽然 CDK 是进入有丝分裂的主调节物，但它们不是单独发挥作用。Polo 样激酶 1 (PLK1)、Aurora A 和 Aurora B 是另外三种控制关键有丝分裂事件亚组的蛋白激酶。有丝分裂过程中的转变依赖于蛋白激酶例如 Polo 样激酶 (PLK) 和 Aurora 激酶。Aurora 激酶是数个有丝分裂阶段的重要调节物，所述有丝分裂阶段包括中心体成熟和分离、染色体定向和分离以及胞质分裂。

[0088] 如孪蛋白一样，Aurora 激酶的内源水平以细胞周期依赖的方式被严格地调节，在 G₁-S 具有低水平，在 G₂-M 过程中积聚并在有丝分裂结束时快速降解。

[0089] 肿瘤细胞周期动力学不仅会影响预后算法，而且对于预测对细胞周期时相特异性药物的反应也很重要（见上文）。本申请人已经证明，使用简单的免疫组织学技术并直接应

用于常规的手术活检材料来分析细胞周期机制的关键组分可获得对于体内存在的肿瘤细胞周期动力学谱的详细且独特的认识。

[0090] 如上文所述, Mcm2、Mcm3、Mcm4、Mcm5、Mcm6 和 Mcm7 (在本文中称为“Mcm2-7”或“Mcm2 至 7”) 表达使得正在经历细胞周期的细胞可以区别于停留于“周期外”状态的细胞。起始准许抑制物孪蛋白仅在 S-G2-M 期过程中可检测到, 有丝分裂激酶 PLK1、Aurora A 和 B 也是如此。组蛋白 H3 是 Aurora 激酶的底物, 仅在在有丝分裂中被磷酸化。因此, 磷酸组蛋白 H3 (H3S10ph) 是一种 M 期标记物。因此, 对这些 G1/S 和 G2/M 调节物的多参数分析可就 (常规固定和处理的) 手术活检材料提供对细胞周期状态详细表征。例如, 在绝经前期休眠乳腺中, Mcm2-7 高表达, 但孪蛋白、Aurora A/B、PLK1 和 H3S10ph 蛋白水平低, 表明乳房腔上皮细胞处于 G1 延长态或停滞态——一种还出现在恶变前损害和慢生长新生物中的表型。相反, 在快速生长的侵袭性肿瘤中, 不但 Mcm2-7 的表达水平高, 而且 S-G2-M 和 M 期标记物的表达增加。该谱指示出, 细胞周期进展加速似乎与肿瘤级别提高 (更低分化状态)、基因组不稳定性增加和存活率降低相关联。

[0091] 因此, 细胞周期生物标记物分析具有作为治疗反应预测物的价值, 尤其是对于细胞周期时相特异性药物的治疗反应预测。例如, Aurora A 和 PLK1 (小分子抑制物的有效靶) 的表达水平在卵巢癌和乳腺癌中可显著变化。这些肿瘤还显示非常不同的细胞周期动力学和细胞周期时相分布。呈现细胞周期进展加速以及这些靶蛋白高水平表达的肿瘤最有可能表现出对基于这类机制的治疗介入的最大反应。

[0092] 在异常增殖细胞或细胞生长异常中, 对细胞周期动力学的分析还可用于监测对通过激活检查点通路影响细胞周期进展的药物的反应。例如, 在治疗前和治疗后的活检材料中对孪蛋白、Aurora A、PLK1、H3S10ph 和 gemini/Ki67 的免疫表达分析可提供读数, 以鉴定 UCN-01 的耐受剂量, 然后可以将该耐受剂量用于使顺铂诱导的细胞周期停滞失效。

[0093] 在一些实施方案中, 提供了利用抗体来检测生物标记物多肽在来自个体的样品中的过表达的免疫细胞化学技术。在本发明的该方面中, 使用至少一种抗目的特异性生物标记物的抗体。过表达还可以通过基于核酸的技术检测, 所述技术包括例如杂交和 RT-PCR。还提供了包含用于实施本发明的方法的试剂盒。

[0094] 虽然本发明的方法需要在用于检测疾病的患者样品中检测至少一种生物标记物, 但是在一些实施方案中, 可使用 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多种生物标记物来实施本发明。对身体样品中多于一种的生物标记物进行检测被认为可用来鉴定疾病例。因此, 在一些实施方案中, 使用两种或多种生物标记物, 更优选使用两种或多种互补生物标记物。“互补”意指, 对身体样品中的生物标记物组合进行检测所成功实现的疾病识别的病例百分数大于仅使用一种所述生物标记物能识别的病例百分数。因此, 在一些病例中, 使用至少两种生物标记物可更准确地确定疾病。

[0095] 因此, 如果使用至少两种生物标记物, 那么可使用靶向不同生物标记物多肽的至少两种抗体来实施本文公开的免疫细胞化学方法。该抗体可同时地或共同地与身体样品相接触。

[0096] 在一个实施方案中, 根据第 1-5 方面中任一方面的方法可包括在所述样品中检测另一靶多肽, 其中所述靶多肽选自对 G1/S 期分界处或对 S 期特异的细胞周期调节基因。这类基因包括但不限于, 解旋酶 (DDX11)、尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (UNG)、E2F5、细胞周

期蛋白 E1 (CCNE1)、细胞周期蛋白 E2 (CCNE2)、CDC25A、CDC45L、CDC6、p21 WAF-1 (CDKN1A)、CDKN3、E2F1、NPAT、PCNA、茎环 BP (SLBP)、BRCA1、BRCA2、CCNG2、CDKN2C、二氢叶酸还原酶 (DHFR)、组蛋白 H1、组蛋白 H2A、组蛋白 H2B、组蛋白 H3、组蛋白 H4、MSH2、NASP、核苷酸还原酶 M1 (RRM1)、核苷酸还原酶 M2 (RRM2)、胸苷合成酶 (TYMS)、复制因子 C4 (RFC4)、RAD51、染色质因子 1A (CHAF1A)、染色质因子 1B (CHAF1B)、拓扑异构酶 III (TOP3A)、ORC1、引发酶 2A (PRIM2A)、CDC27、引发酶 1 (PRIM1)、侧翼结构内切核酸酶 (FEN1)、范可尼贫血互补组 A (FNACA)、PKMYT1 和复制蛋白 A2 (RPA2)。其他 S 期目的基因包括细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2)、DNA 聚合酶 I α (DNAPOL1)、DNA 连接酶 1、B-Myb、DNA 甲基转移酶 (DNA MET)、粒周蛋白 (pericentrin) (PER)、KIF4、DP-1、ID-3、RAN 结合蛋白 (RANBP1)、间隙连接 α 6 (GJA6)、氨基乙酰丙酸脱水酶 (ALDH)、组蛋白 2A Z (H2A. Z)、精胺合成酶 (SpmS)、增殖蛋白 2、T- 淋巴细胞活化蛋白、磷脂酶 A2 (PLA2) 和 L6 抗原 (L6)。

[0097] 在一些实施方案中,所述生物标记物包括由 E2F 转录因子诱导的基因。这类基因包括但不限于,胸苷酸合成酶、胸苷激酶 1、核苷酸还原酶 M1、核苷酸还原酶 M2、CDK2、细胞周期蛋白 E、PCNA、DNA 引发酶小亚基、拓扑异构酶 II A (Topo2A)、DNA 连接酶 1、侧翼内切核酸酶 1、RAD51、CDC2、细胞周期蛋白 A2、细胞周期蛋白 B1、细胞周期蛋白 B2、KIFC1、FIN16、BUB1、输入蛋白 α -2 (importin α -2)、HMG2、zeste 增强子、STK-1、组蛋白茎环 BP、Rb、P18-INK4C、膜联蛋白 VIII、c-Myb、CDC25A、细胞周期蛋白 D3、细胞周期蛋白 E1、脱氧胞嘧啶激酶、DP-1、内皮缩血管肽转化酶、烯醇化酶 2、P18INK4C、核苷酸还原酶和尿嘧啶 DNA 糖基化酶 2。在具体实施方案中,目的生物标记物为由参与细胞周期调节和 DNA 复制的 E2F 转录因子诱导的基因,例如细胞周期蛋白 E2、p57KIP2、RANBPM 和复制蛋白 A1。一些所需的 E2f 诱导基因参与细胞凋亡,包括 APAF1、Bcl-2、胱天蛋白酶 3 (Caspase 3)、MAP3 激酶 5 和 TNF 受体相关因子。其他 E2f 诱导的基因可参与转录调节,包括例如 ash2 样因子、polyhomeotic 2、胚胎外胚层蛋白、zeste 增强子、多毛或断裂增强子 (hairy/enhancer of split)、同源框 A10、同源框 A7、同源框 A9、同源结构域 TF1、前 B 细胞白血病 FT3、YY1 TF、POU 结构域 TF、TAFII130、TBP 因子 172、碱性 TF3、布罗莫结构域 / 锌指、SWI/SNF、ID4、TEA-4、NFATC1、NFATC3、BT、CNC-1、MAF、MAFF、MAFG、核心结合蛋白、E74 样因子 4、c-FOS、JUNB、锌指 DNA BP 和 Cbp/p300 反式激活因子。参与信号转导的 E2F 诱导基因也是可能的目的生物标记物,包括 TGF β 、卵泡抑素 (follistatin)、骨形态发生蛋白 2、1A 型 BMP 受体、卷曲同源物 1、WNT10B、鞘氨醇激酶 1、双特异性磷酸酶 7、双特异性 (Y) 磷酸酶、FGF 受体 3、蛋白酪氨酸磷酸酶、双特异性 (Y) 磷酸酶 D6655、胰岛素受体、成熟 T 细胞增殖 1、FGF 受体 2、TGF α 、CDC42 效应物蛋白 3、Met、CD58、CD83、TACC1 和 TEAD4。

[0098] 如果基于根据本发明在组织样品中检测的异常将组织分为潜在的前癌型或癌型,那么需要诊断的和 / 或临床的合适追踪观察。

[0099] 本发明还提供了一种用于确定对所诊断的病症的治疗进程的预测方法。

[0100] 因此,在第五方面中,本发明提供了一种预测癌症的治疗的反应或预测癌症的疾病进展的方法,所述方法包括在来自一个个体的身体样品中确定存在或不存在异常增殖细胞或细胞生长异常,所述方法包括在所述样品中检测一种靶多肽,其中所述靶多肽选自 DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、李蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物。

[0101] 细胞生长异常包括前癌细胞或癌细胞,其他细胞增殖性疾病包括但不限于,银屑病

病和炎性肠病如溃疡性结肠炎和克罗恩病 (Crohn' s disease)。

[0102] 炎性肠疾病除本身为细胞增殖性疾病外,还可为癌状态的前体(虽然不在所有患者中),因此本发明的方法对它们的检测可用来提供有价值的结果以用于更密切的追踪观察中。在炎性肠疾病中,可能有结肠细胞和肠细胞脱落,使得可对大便样品进行分析并从这类样品制备细胞。

[0103] 根据本发明的不同实施方案,可使用任意可用技术制备待与根据本发明的多个方面的特异性结合成员相接触样品,所述可用技术使特异性结合分子可与所述靶多肽结合,并使得可确定核酸水平、酶活性等。各种技术是本领域中的标准技术,例如(对于诸如结合靶多肽的抗体等分子)用于免疫组织化学中固定细胞的技术。

[0104] 可通过任何合适方法在对照样品和试验样品中进行特异性结合成员如抗体的检测。一种可能是以个体报告物分子加标签。所述报告物分子可直接地或间接地产生可检测的——优选可测量的——信号。报告分子的连接可以是直接的或间接的,共价的(如肽键)或非共价的。肽键连接可以为编码结合分子(如抗体)和报告分子的基因融合物的重组表达产物。

[0105] 一个有利的模型是将每个结合成员与具有光谱孤立吸收或发射特征的个体荧光染料、磷光体或激光染料共价连接。合适的荧光染料包括荧光素、罗丹明、藻红蛋白和德克萨斯红。合适的发色染料包括二氨基联苯胺。

[0106] 其他报告物包括大分子胶体颗粒或微粒材料,例如有色、磁性或顺磁的胶乳珠,以及可直接或间接产生可肉眼观察、电子检测或其他方式记录的可检测信号的生物活性剂或化学活性剂。例如,这些分子可以是催化形成颜色或改变颜色或者引起电性质变化的反应的酶。它们可以是分子可激发的,使得在能量态之间的电子转移可产生特征性的光谱吸收或发射。它们可包含用于连接生物传感器的化学实体。可应用生物素/亲和素或者生物素/链亲和素以及碱性磷酸酶检测系统。其他的实例有辣根过氧化物酶和化学发光。

[0107] 特异性结合分子可在试剂盒中提供,所述试剂盒可包含用于根据本发明的用途的说明书。这类试剂盒作为本发明的另一方面提供。可包含一种或多种其他试剂,例如标记分子。试剂可提供于避免试剂接触外部环境的容器如密封的玻璃瓶中。试剂盒可包含一种或多种用于提供试验样品本身的物品,其取决于目的组织,例如用于从口腔取细胞的拭子、用于取血样的注射器、用于取宫颈涂片的匙状片、活检枪等(这类组件通常是无菌的)。

[0108] 试剂盒可包含以下物质的任何组合或全部物质:减少非特异性染色的封闭剂、用于在保存过程中保持结合分子活性的保存缓冲物、在抗体染色过程中使用的染色缓冲物和/或洗涤缓冲物、阳性对照物、阴性对照物等。阳性和阴性对照物可用于验证根据本发明应用的试剂的活性和正确用途,它们可提供于试剂盒中。对照物可包括对于靶的存在已知呈阳性或阴性的样品,如组织切片、固定于盖玻片上的细胞等,所述靶例如为本文描述的一种或多种生物标记物。对照物的设计和使用是标准的,并且在本领域普通技术人员的常规能力范围内。

[0109] 可使用任何便利的手段和技术从身体取出样品。匙状片或拭子可用于取内皮细胞,例如从宫颈或口腔取。血液和其他流体样品可使用注射器或针取。其他组织样品可通过活检或组织切片取。

[0110] 在第六方面中,本发明提供了一种监测对治疗药物开发研究的反应的方法,所述

方法包括在身体样品中检测一种生物标记物,其中所述生物标记物选自 DNA 复制准许因子、Aurora 激酶、Ki67、孕蛋白、Polo 样激酶、H3S10ph 和它们的结合物,评估所述生物标记物的表达,以确定在所述样品中存在或不存在异常细胞增殖、细胞生长异常、肿瘤细胞周期动力学、细胞周期时相分布、发育异常、新生物形成或者潜在的或实际的前癌状态或癌状态。

[0111] 在一个实施方案中,所述药物开发研究为临床前药物开发研究。

[0112] 在一个实施方案中,所述药物开发研究为临床前药物开发研究。

[0113] 在一些实施方案中,所述临床前药物开发研究为体内异种移植肿瘤模型。

[0114] 在第七方面中,本发明提供了一种在受试者中确定癌症进展的预后的方法,所述方法包括步骤:

[0115] (a) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 Mcm2-7 中的至少一种的第一生物标记物的水平;以及

[0116] (b) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第二生物标记物的水平,

[0117] 其中将所述第一生物标记物相对于一个预定值的水平变化与所述第二生物标记物相对于一个预定值的水平变化相结合来指示所述受试者中的癌症进展。

[0118] 在一个相关的实施方案中,所述确定癌症进展预后的方法还包括,在来自所述受试者的生物样品中评估选自孕蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第三生物标记物的水平,其中所述第二和第三生物标记物不相同。

[0119] 在又一实施方案中,如果所述第一生物标记物的水平低于预定值并且所述第二生物标记物的水平低于预定值,那么所述受试者的预后被指示为癌症进展的可能性降低。

[0120] 在一个相关实施方案中,如果所述第一生物标记物的水平低于预定值并且所述第二生物标记物的水平低于预定值,那么所述受试者的预后被指示为 5 年存活率大于 80%、85%或 89%。

[0121] 在另一实施方案中,如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平低于预定值,那么所述受试者的预后被指示为癌症进展的可能性降低。

[0122] 在一个相关实施方案中,如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平低于预定值,那么所述受试者的预后被指示为 5 年存活率大于 80%、85%或 87%。

[0123] 在又一实施方案中,如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平高于预定值,那么所述受试者的预后被指示为癌症进展的可能性升高。

[0124] 在一个相关实施方案中,如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平高于预定值,那么所述受试者的预后被指示为 5 年存活率小于 70%、60%或 56%。

[0125] 可使用本领域技术人员已知的任意方法测量本发明的生物标记物的水平。在一个方面中,可以使用免疫测定方法测量生物标记物水平,所述免疫测定方法例如但不限于,点印迹、狭线印迹、RIA、微阵列和 ELISA。在另一方面中,可以使用基于分子生物学的测定方法测量生物标记物水平,所述基于分子生物学的测定方法例如但不限于,RNA 印迹分析、DNA 印迹分析、蛋白质印迹分析、RT-PCR、PCR、基于核酸序列的扩增测定 (NASBA)、转录介导的扩

增 (TMA) 或计算机化的检测矩阵。

[0126] 需重点指出的是,所述第一、第二、第三或之后的生物标记物的水平的测量顺序不是重要的。例如,可同时地测量所有生物标记物。或者,对第二、第三或之后的生物标记物的评估可早于对第一生物标记物的水平。

[0127] 在第八方面中,本发明提供了一种为患有癌症的受试者确定治疗方案的方法,所述方法包括步骤:

[0128] (a) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 Mcm2-7 中的至少一种的第一生物标记物的水平;以及

[0129] (b) 在来自所述受试者的生物样品中评估选自 彗蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第二生物标记物的水平,

[0130] 其中将所述第一生物标记物相对于一个预定值的水平变化与所述第二生物标记物相对于一个预定值的水平变化相结合来指示为所述受试者制定的治疗方案。

[0131] 在一个相关实施方案中,所述为受试者确定治疗方案的方法还包括,在来自所述受试者的生物样品中评估选自 彗蛋白、Aurora A、Plk1、Ki67 和 H3S10ph 中的至少一种的第三生物标记物的水平,其中所述第二和第三生物标记物不相同。

[0132] 在又一实施方案中,如果所述第一生物标记物的水平低于预定值并且所述第二生物标记物的水平低于预定值,那么所述治疗方案选自以下的一项或多项:

[0133] (a) 监测;以及

[0134] (b) 以非细胞周期特异性化学治疗剂进行治疗。

[0135] 在另一实施方案中,如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平低于预定值,那么所述治疗方案选自以下的一项或多项:

[0136] (a) 监测;

[0137] (b) 以 G1 或非细胞周期特异性试剂进行治疗;以及

[0138] (c) 以非 S 和 G2/M 细胞周期特异性化学治疗剂进行治疗。

[0139] 在再一实施方案中,如果所述第一生物标记物的水平高于预定值并且所述第二生物标记物的水平高于预定值,那么所述治疗方案选自以下的一项或多项:

[0140] (a) 手术;以及

[0141] (b) 以 S 和 G2/M 细胞周期特异性化学治疗剂进行治疗。

[0142] 非细胞周期化学治疗剂包括但不限于,丝裂霉素 C(MMC)、1-(4-氨基-2-甲基嘧啶-5-基)-甲基-3-(2-氯乙基)-3-亚硝基脒盐酸盐(ACNU)、氮芥(HN2)、顺铂、4-氢过氧环磷酰胺、夫拉平度(Flavopiridol)。

[0143] S 期细胞周期药剂包括但不限于,5-氟尿嘧啶、羟基脲、甲氨蝶呤、表柔比星、依托泊苷、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、5-氟脱氧尿苷、阿糖胞苷、吉西他滨、克拉屈滨、硫鸟嘌呤、氟达拉滨、羟基脲、拓扑异构酶 I 抑制剂(伊立替康,托泊替康)、拓扑异构酶 II 抑制剂(依托泊苷、替尼泊苷、蒽环类、表柔比星)。

[0144] G1 细胞周期药剂包括但不限于,门冬酰胺酶、泼尼松龙。

[0145] G2/M 细胞周期试剂包括但不限于,依托泊苷、顺铂、星状孢子素、ZM447439、长春碱类(长春地辛、长春瑞滨(vinelobrine)、长春新碱、长春碱)、紫杉烷类(紫杉醇、多西他赛)、博来霉素、星状孢子素、ZM447439(Aurora 激酶 A 和 B 抑制剂)、BI2536(Polo 样激酶 I

抑制剂)。

[0146] M 细胞周期试剂包括但不限于,多西他赛、BI 2536。

[0147] 在细胞周期多个步骤中起作用的药剂包括但不限于夫拉平度。

[0148] 虽然本发明已通过其具体实施方案加以描述,但应理解能够作出进一步修改。本申请意欲涵盖如下这样的本发明的任意变体、用途或改变,即它们遵循本发明一般原理并包含在本发明所述领域的已知技术或常规技术范围内且可适用于前文所述实质特征的相对本文公开内容的偏离方案。

[0149] 因为可以在不背离本发明的实质特征的主旨的情况下以多种方式实施本发明,所以应理解的是,除非另外指出,否则上述的实施方案不是对本发明进行限制,而应在随附权利要求书中定义的本发明的主旨和范围内进行宽泛地解释。多种修改和等同方案意欲被包括在本发明的主旨和范围内以及随附的权利要求书中。

[0150] “含有/包括”在用于本说明书中时用于叙述存在所述特征、整数、步骤或组分,但不排除存在或加入一种或多种其他特征、整数、步骤、组分或它们的组。

[0151] 实施例

[0152] 实施例 1 :DNA 复制准许因子和有丝分裂激酶在乳腺癌中的增殖状态表征及与临床后果的关联。

[0153] 研究组

[0154] 从英国伦敦 UCL Hospitals 外科拥有的乳腺癌数据库中鉴定了 182 名确诊患浸润性乳腺癌的患者。对于研究的所有患者进行常规的手术后临床评估,并用于横断面分析。10 人未能进行追踪观察,5 人癌症复发,其中 2 人死于乳腺癌。167 名患者用于存活和复发情况的预期分析,其中 24 人(14%) 在研究时间内死于癌症,12 人死于其他无关的原因,131 人在最后追踪观察时仍存活。有 40(24%) 例复发事件,包含癌症复发和因癌症死亡。追踪观察期的中值为 47 个月(范围:1-92 个月)。复发患者的平均复发时间是 26 个月(标准差(SD) = 15 个月,范围:2-55 个月)。未复发患者的平均追踪观察时间为 52 个月(SD = 20 个月,范围:2-92 个月)。死亡患者的平均存活时间为 21 个月(SD = 12 个月,范围:4-44 个月)。未死亡患者的平均追踪观察时间为 50 个月(SD = 21 个月,范围:1-92 个月)。从包括所有 3 个组织学分级(1-3) 的病理档案取出来自这些患者的福尔马林固定的石蜡包埋外科乳腺组织,所述组织学分级由 Nottingham 改良的 Bloom 和 Richardson 方法确定。可获取所有病例的组织学报告和载玻片。这些包括 142 例浸润性导管癌、26 小叶型、4 例粘蛋白型、1 例微乳头状型和 9 例混合型。记录的参数包括组织级别、肿瘤大小、肿瘤类型、淋巴结状态、淋巴管浸润(LVI)、年龄和 NPI。我们还研究了来自以下人员的正常乳腺组织的随机选择案例:21 名进行过乳房复位成形术的绝经前女性。地方研究伦理委员会对该研究的批准获自联合的 UCL/UCLH 人类研究伦理委员会。

[0155] 抗体

[0156] 如(Wharton SB,Hibberd S,Eward KL,et al.Br J Cancer2004 ;91 :262-9) 所述生成人类孕蛋白的兔多克隆抗体。Ki67 MAb(克隆 MIB-1) 获自 DAKO(Glostrup,丹麦),Mcm2 MAb(克隆 46) 获自 BD Transduction Laboratories(Lexington, KY),雌二醇受体 α (ER) MAb(克隆 1D5) 和孕酮受体 MAb(克隆 PgR 636) 获自 DAKO,AuroraA MAb NCL-L-AK2(克隆 JLM28) 获自 Novocastra Laboratories(Newcastle, UK),Polo 样激酶 1(PLK1)MAb(克隆

35-206),第10位丝氨酸磷酸化的组蛋白 H3(H3S10ph)PAb 获自 Upstate(LakePlacid,NY)。

[0157] 细胞培养

[0158] 将人 MCF-7 乳腺上皮腺癌细胞(ATCC HTB-22)培养于添加有 2mM 谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸、10% FCS、100U/ml 青霉素和 0.1mg/ml 链霉素的 EMEM(Gibco-BRL,Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中。

[0159] 制备蛋白提取物和免疫印迹

[0160] 以胰蛋白酶进行处理收获 MCF7 细胞,将其以 PBS 洗涤并以 2×10^7 细胞/ml 悬浮于裂解缓冲液(50mM Tris-Cl pH 7.5,150mM NaCl,20mM EDTA,0.5% NP40)中。将裂解物在冰上孵育 30 分钟,之后通过离心(13,000g,15min,4℃)使之澄清。将裂解物通过 4-20% SDS-PAGE[75 μg 蛋白/孔]分离,并如(Stoeber et al.J Cell Sci,114:2027-41,2001)所述进行免疫印迹。使用如下条件进行阻断、抗体孵育和洗涤步骤:对于 Mcm2、Aurora A 和 PLK1, PBS/0.1%吐温 20/5%乳;对于孕蛋白, PBS/1%吐温 20/10%乳;对于 H3S10ph, PBS/5%乳。

[0161] 免疫组织化学

[0162] 在初次诊断得到的档案记录的福尔马林固定的石蜡包埋组织(PWET)获自所有患者,对于每个标本选择包含代表性浸润肿瘤样品的一个标本块。将 3 μm 切片切于 Superfrost Plus 载玻片(VisionsBiosystems, UK)上,在二甲苯中脱蜡,并按乙醇至水的梯度进行复水。将组织切片在 pH 6.0 的 0.1M 柠檬酸缓冲液中压煮 2 分钟,并使用 Bond™ Polymer Refine Detection 试剂盒和 Bond™-Max 自动系统(Vision Biosystems,Newcastle Upon Tyne, UK)免疫染色。以如下稀释度应用一抗:Ki67(1/300)、Mcm2(1/2000)、孕蛋白(1/600)、ER(1/200)、PR(1/200)、Aurora A(1/70)、PLK1(1/1000)、H3S10ph(1/300)。依照制造商的说明书,使用 DAKO HercepTest™(DAKO)进行 HER-2 免疫染色。用 Pertex 封固剂(Cell Path Ltd, NewtownPowys, UK)加盖盖玻片。将无一抗的孵育用作阴性对照,将结肠上皮切片作为阳性对照。

[0163] 蛋白表达谱分析

[0164] 通过如(Shetty et al.Br J Cancer 93:1295-300,2005,Dudderidge et al.Clin Cancer Res 11:2510-7,2005)所述在每种肿瘤中确定标记物的标记指数(LI)进行蛋白表达分析。在低倍放大率(100×)下评估载玻片来识别具有最高染色强度的肿瘤区域。从这些选择的区域中,以电荷耦合器件照相机(charged coupled device camera)和分析软件(SIS, Münster, Germany)在 400× 放大率捕获 3-5 个视野。随后打印图像用于定量分析,该分析在观察者不知道临床病理变量的情况下进行。将该视野内的阳性和阴性细胞计数,并将间质细胞或炎症细胞排除。识别阳性细胞的标准取决于生物标记物:对于 Ki67、Mcm2、孕蛋白、ER、PR 和 H3S10ph,具有任何程度的核染色的细胞被记录为阳性;对于 Aurora A 和 PLK1,具有任何程度的核染色或细胞质染色的细胞被记录为阳性(Gritsko et al.Clin Cancer Res 9:1420-6,2003)。对每个试验例计数了最少的 500 个细胞。使用下式计算 LI: $LI = \text{阳性细胞数目} / \text{总细胞数目} \times 100$ 。为了评估 HER-2 蛋白过表达,依照 DAKO 推荐的 FDA 认可的评分体系评估膜染色。

[0165] DNA 图像细胞计数

[0166] 对于每个试验例,将获自如 IHC 所评估的同一标本块的一个 40 μm 的 PWET 切

片用于如 (Sudbo et al. N Engl J Med 344:1270-8, 2001. Haroske et al. Anal Cell Pathol 1998;17:189-200, 1997) 所述制备胞核。如 (Sudbo et al. 2001, 见上文) 所述, 将 Fairfield DNA Ploidy System (Fairfield Imaging Ltd, Nottingham, UK) 用于图像处理、分析和分类。淋巴细胞和浆细胞作为内部对照被包括在内, 高级别的膀胱肿瘤和正常结肠组织的 40 μ m 切片分别作为非整倍体群和二倍体群的外部对照。依照公开的标准 (Sudbo et al. 2001, 见上文, Haroske 1998, 见上文) 对直方图进行分类。直方图由两名独立评估员进行分类, 他们在不知道临床病理变量的情况下具有高度一致性。为了进行统计分析, 将四倍体肿瘤和多倍体肿瘤与非整倍体肿瘤成组。

[0167] 统计分析

[0168] 以中值和四分位数间距概括生物标记物。将 Mann-Whitney U 检验用于将每个标记物与淋巴结阶段、倍性状态和相对于正常样品的第 3 阶段进行比较。将趋势分析 Jonckheere-Terpstra 非参数检验用于将标记物与阶段和 Her2 状态比较。将 Spearman 秩相关系数用于评估标记物和 NPI 之间的关联。将通过与 1 维自由度的线性关联的线性分析 χ^2 检验用于测试 Her2 和倍性状态之间的关联。依照倍性状态将非配对 t 检验用于比较平均 NPI。

[0169] 将线性回归用于评估 Her2 的平均 NPI 趋势。将 Cox 回归用于分析癌症复发和癌症死亡, 以提供风险比并评估对标记物的预测, 在对 NPI 调整的单变量模型和多变量模型中在中值处分成两类。将 Kaplan-Meier 作图用于显示忽略 NPI 类且按 NPI 类分层的标记物的估计预测效应。所有分析涉及双侧检验, 结果使用 95% 的置信区间概括并使用 SPSS 软件 (版本 12.0.1) 评估为 5% 的统计显著性水平。

[0170] 结果

[0171] 验证生物标记物多参数分析及其生物学含义

[0172] 通过以下方式在来自非同步 MCF7 细胞的总细胞提取物中确认抗 Mcm2、孪蛋白、Aurora A、Plk1 和 H3S10ph 的抗体的单特异性: 检测具有与相应人抗原的报道电泳迁移率一致的分子量的单一蛋白 (图 5A)。在对 HeLa S3 细胞和 SK-OV 3 卵巢癌细胞中的该生物标记物组的独立研究中, 我们已经证明 Mcm2 水平在经过细胞周期过程中不显著变化, 而孪蛋白表达局限于 S-G2-M。Aurora A 和 PLK1 水平在 G1 过程中可忽略, 在 S 期升高并在 G2/M 过程中达到峰值, 降解发生在从有丝分裂停滞解除后 2-4 小时。H3S10ph 的存在局限于有丝分裂, 这就强化了将它用作有丝分裂标记物的合理性。由于增殖标记物 Ki67 存在于增殖细胞的整个细胞周期中, 可以将 S-G2-M 期或 M 期标记物与 Ki67 的比值 (如孪蛋白 / Ki67、Aurora A / Ki67 或 H3S10ph / Ki67) 用作 G1 期相对时长的指示物, 从而作为细胞周期进展速率的指示物。值得注意的是, 孪蛋白表达增加局限于 S-G2-M, 甚至在侵袭性肿瘤中也是如此。

[0173] 首先在乳房复位成形术后的正常乳腺标本 ($n = 21$) 中研究这些细胞周期标记物的蛋白表达分析。高水平的 Mcm2 表达出现于终末导管小叶单位 (TDLU) 的上皮细胞, 表明这些细胞处于“细胞周期内”状态 (中值: 33.5%)。然而, Mcm2 表达的水平较高, Ki67 以低水平表达 (中值: 2.8%)。值得注意的是, 孪蛋白、Aurora A、PLK1 (S-G2-M 期标记物) 和 H3S10ph (M 期标记物) 仅在 TDLU 的很小部分的细胞 ($< 1\%$) 中表达, 表明细胞周期进展的阻断。总之, 该细胞周期表型与 G1 停滞状态是一致的。相反, 浸润性乳腺癌显示出预示细

胞周期进展的高水平的生物标记物表达（图 5B）。当将侵袭性 3 级肿瘤与正常相比，Ki67、Mcm2、孕蛋白、Aurora A、Plk1 和 H3S10ph 的蛋白表达水平有显著升高（中值：Mcm2[33.5v 92.3%， $p < 0.001$]，Ki67[2.8v 40.2%， $p < 0.001$]，孕蛋白[0.98v 17.4%， $p < 0.001$]，Aurora A[0v11.7%， $p < 0.001$]，PLK1[0.37v 14.2%， $p < 0.001$]以及 H3S10ph[0v2.5%， $p < 0.001$]）。该升高与 Mcm2/Ki67 比值的显著增大相关联（中值：9.3v 1.71%， $p < 0.001$ ）。Mcm2/Ki67 值的减小可反映了从准许的非增殖 G1 停滞状态向活性的增殖状态的转变，并且与预示细胞周期进展的 S-G2-M 标记物的表达相关联。

[0174] 生物标记物、肿瘤 DNA 倍性状态和临床病理参数之间的关系

[0175] 该研究的临床病理特征总结于表 2 中。首先，我们检查了细胞周期生物标记物表达和肿瘤分化状态之间的关系。所有 6 种生物标记物的表达水平都与肿瘤分级强相关（表 3），然而生物标记物水平的分布在不同级别之间有一些重叠（如 Aurora A 和 PLK1 水平，图 6）。这些数据不但显示处于肿瘤间变增加的周期中的细胞比例增大，而且表明所述生物标记物没有将处于每个级别的所有患者的级别完全区分开。与这些发现一致的是，发现了肿瘤级别和倍性状态之间的高显著相关性（ $p < 0.001$ ）。孕蛋白/Ki67、Aurora A/Ki67、Aurora B/Ki67 和 H3S10ph/Ki67 的比值随级别增加未显示显著变化，表明在高级别肿瘤中分化停滞与细胞周期进展加速无关（表 3）。这显著不同于我们在卵巢癌中的发现，其中随肿瘤间变增加出现了细胞周期进展速度加快（孕蛋白/Ki67： $p < 0.007$ ，Aurora A/Ki67： $p < 0.0002$ ，H3S10ph/Ki67： $p < 0.0002$ ）。相反，并且与我们在其他癌症类型中的发现一致的是，Mcm2/Ki67 比值随肿瘤级别增加而减小，这反映了高度分化肿瘤中 DNA 复制准许的、但非增殖的细胞向低度分化肿瘤中活性循环细胞的比例转变（表 3）。孕蛋白表达与肿瘤间变和基因组不稳定性增加之间的正相关性可表明，该起点准许抑制物在乳腺癌中似乎不发挥肿瘤抑制物的作用。这已在其他肿瘤类型中发现，例如在外周 B 细胞淋巴瘤和卵巢癌中，其中孕蛋白表达细胞的数目与细胞增殖指数成比例。

[0176] 为了研究生物标记物和基因组不稳定性之间的关系，我们将它们的表达谱与肿瘤 DNA 含量相关联（表 4）。基因组不稳定性和包括以下所示在内的所有细胞周期生物标记物的表达水平之间具有显著高的相关性：Ki67（ $p < 0.001$ ）、Mcm2（ $p = 0.009$ ）、孕蛋白（ $p < 0.001$ ）、AuroraA（ $p < 0.001$ ）、PLK1（ $p = 0.002$ ）以及 H3S10ph（ $p < 0.001$ ）。Mcm2/Ki67 比值也显著减小（ $p = 0.004$ ）。总之，这些数据表明，非整倍体肿瘤中活性周期细胞的比例高于二倍体肿瘤。有趣的是，如在这些肿瘤的分化状态的情况一样，在非整倍体肿瘤中也没有细胞周期进展加速的证据，这不同于我们在卵巢癌中的发现，即其中多个细胞周期生物标记物/Ki67 比值增大。

[0177] 在 Ki67、Mcm2、孕蛋白、Aurora A、PLK1 表达和淋巴结转移之间没有发现显著关联（表 5）。发现了，与 H3S10ph 表达弱关联（ $p = 0.02$ ）。与 ER（ $p = 0.007$ ）和 PR（ $p = 0.005$ ）表达有强的逆相关。这不同于我们在卵巢中的发现，即在卵巢中 Aurora A（ $p = 0.006$ ）、H3S10ph（ $p = 0.002$ ）、Aurora A/Ki67（ $p = 0.003$ ）、H3S10ph/Ki67（ $p = 0.005$ ）和肿瘤分级之间出现显著相关性，反映了 Aurora A 调节异常在早期上皮卵巢肿瘤发生和发展成为晚期疾病中的作用。Ki67、Mcm2、孕蛋白、Aurora A、PLK1、H3S10ph 的表达水平显示了与 NPI 值增大的强正相关，ER 和 PR 显示了与 NPI 值增大的负相关（表 6）。Mcm2/Ki67 比值也有显著减小，表示随 NPI 值增大，准许非增殖状态转变成活性增殖状态。细胞周期生物标记物表

达与 Her2 状态不显著相关,但与 PR 表达有强逆相关 ($p < 0.001$) (表 7)。在 NPI 值增大和 Her2 过表达之间也有关联,并且观察到非整倍性和 NPI 值增大之间有弱相关性 (表 8)。弱相关还出现于 Her2 值增大和非整倍性之间 (χ^2 检验 = 3.03, $p = 0.082$)。

[0178] 生物标记物、肿瘤 DNA 倍性状态和患者结局的关系

[0179] 单变量分析

[0180] 在本患者组中, NPI 值是乳腺癌复发和死亡的强预测指标,其具有每单位 NPI 值 2 倍以下增大 ($HR = 1.81[1.47-2.23]$, $p < 0.001$) 的复发风险,每单位 NPI 值 2 倍以上增大的死亡风险 ($HR = 2.15[1.61-2.88]$, $p < 0.001$)。患者年龄不是预测性因素 (表 9) (图 7A)。Ki67、Mcm2、孪蛋白、Aurora A、PLK1 和 H3S10ph 被鉴定为乳腺癌复发的强预测物 (分别有 $HR = 2.77[1.44-5.30]$, $p = 0.002$; $HR = 3[1.56-5.76]$, $p < 0.001$; $HR = 3.93[1.98-7.80]$, $p < 0.001$; $HR = 3.31[1.67-6.57]$, $p < 0.001$; $HR = 4.48[2.21-9.09]$, $p < 0.001$; $HR = 3.49[1.76-6.92]$, $p < 0.001$) (图 7B 和 7C)。这些关联还出现于存活者中,但由于在该组中较少的事件数目关联性没那么强 (Mcm2: $HR = 2.32[0.99-5.43]$, $p = 0.05$; 孪蛋白: $HR = 2.43[1.04-5.68]$, $p = 0.04$; Aurora A: $HR = 2.18[0.93-5.12]$, $p = 0.07$; PLK1: $HR = 3.46[1.37-8.71]$, $p = 0.009$; H3S10ph: $HR = 3.29[1.31-8.30]$, $p = 0.01$)。较低的复发风险出现在二倍体组中,但不显著 ($HR = 0.62[0.33-1.18]$, $p = 0.14$)。在 Her2 表达增加组中复发或死亡的风险有显著增大的趋势 (分别有 $HR = 1.44[1.13-1.83]$, $p = 0.003$ 和 $HR = 1.40[1.02-1.94]$, $p = 0.04$)。

[0181] 优于和超过 NPI 的生物标记物预测值

[0182] 多变量分析表明,这些细胞周期生物标记物的效应甚至在对 NPI 调整后对癌症复发仍具有是统计学显著和预测性。Ki67、Mcm2、孪蛋白、Aurora A、PLK1 和 H3S10ph 被鉴定为优于和超过 NPI 的乳腺癌强独立预测物 (分别有 $HR = 2.13[1.08-4.23]$, $p = 0.03$; $HR = 2.22[1.12-4.41]$, $p = 0.02$; $HR = 2.64[1.27-5.49]$, $p = 0.01$; $HR = 2.82[1.37-5.80]$, $p = 0.005$; $HR = 3.31[1.57-6.97]$, $p = 0.002$; $HR = 2.07[1.02-4.20]$, $p = 0.04$) (图 8 和 9)。虽然使用一种细胞周期生物标记物来预测复发是有价值的,但包含两种或多种标记物没有获得更大的价值。这部分是因为在标记物和临床病理变量之间有关联。有趣的是,有丝分裂激酶 AuroraA 和 PLK1 被鉴定为乳腺癌复发的最强有力的独立预测物。

[0183] 细胞周期表型、临床病理变量和患者结果之间的关系

[0184] 我们发现,细胞周期相特异性生物标记物各自都是乳腺癌中有力的独立预后标记物。这产生了这样的问题,即肿瘤的细胞周期动力学或细胞周期表型是否还有可能对该具体肿瘤类型的病理生物学有影响。我们在以前的 DNA 复制体外测定中已证明, Mcm2-7 准许因子——DNA 解旋酶的组分——的下调是一种如下所述的遍在的下游机制,即在以下情形时细胞的增殖能力通过该机制降低:细胞离开细胞分裂周期进入周期状态之外的静止期 (G0)、分化态或衰老态 (Williams and Stoeber, Curr Opin Cell Biol 19:672-679, 2007; Blow and Hodgson, Trends Cell Biol 12:72-78, 2002; Stoeber et al., EMBO J 17:7219-7229, 1998; Stoeber et al., J Cell Sci 114:2027-2041, 2001; Kingsbury et al., Exp Cell Res 309:56-67, 2005; Barkley et al., Exp Cell Res 313:3789-3799, 2007)。为了确定细胞周期表型,我们为 Mcm2 蛋白表达选择了一个 30% 的割点以确定一个组 (Mcm2 < 30%, 表型 I), 在该组中大多数的肿瘤细胞处于周期状态之外 (图 13, 图 14)。该组 (表

型 I) 占有肿瘤的 18%, 具有低于 7% 的孕蛋白水平。这一点与我们的体外测定和自我更新组织的结果一致, 即在细胞进入静止期 (G0) 和周期状态外分化态时孕蛋白也被严格地下调 (Williams and Stoeber, 2007, 见上文; Eward et al., J Cell Sci 117:5875-5886, 2004; Kingsbury et al., 2005, 见上文; Barkley et al., 2007, 见上文) (图 4, 表 1)。相反, 大多数癌症的 Mcm2 表达水平高于 30% ($Mcm2 > 30\%$), 其中大多数的肿瘤细胞处于周期内状态 (Williams and Stoeber, 2007, 见上文) (图 13, 图 14, 表 15)。58% 的这些肿瘤 (表型 III) 显示出孕蛋白水平高于 7% 指示的活性细胞周期进展, 割点 7% 由周期外状态的标记指数定义 (图 14, 表 15)。值得注意的是, 许多乳腺癌 (表型 II) —— 占有肿瘤 24% —— 呈现周期内表型 ($Mcm2 > 30\%$), 但孕蛋白表达水平低于 7%, 其预示 G1 延迟或停滞的状态 (Williams and Stoeber, 2007, 见上文; Stoeber et al., 2001, 见上文; Blow and Hodgson, 2002, 见上文; Shetty et al., Br J Cancer 93:1295-1300, 2005; Dudderidge et al., ClinCancer Res 11:25110-2517, 2005; Gonzalez et al., J Pathol 204:121-130, 2004) (图 14, 表 15)。重要的是, 其他 S-G2-M 生物标记物在三组之间的分布完全反映了孕蛋白的观察结果, 这进一步加强了 3 种不同细胞周期表型的分离 (图 14)。

[0185] 我们接着研究了细胞周期表型是否影响体内表现及其与包括 NPI 在内的临床病理变量的相关性。值得注意的是, 与年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、ER/PR 或 Her-2 受体状态无关。然而, 呈现分化停滞的更大比例的 3 级肿瘤显示出活性周期表型。该细胞周期谱还与较高 NPI 值相关 ($p < 0.001$) (表 15)。对 NPI 调整的单变量和多变量分析还证明, 该细胞周期表型是无疾病存活者的强预测物。在单变量和多变量分析中, 活性周期表型 (表型 III) 都显示了大大高于表型 I 和 II 的复发风险, 分别有 $HR = 3.90 (1.81-8.40)$ 、 $p < 0.001$ 和 $HR = 2.71 (1.81-6.23)$ 、 $p = 0.019$ (图 15)。引人注意的是, 在高度分化的周期外肿瘤和呈现 G1 延迟 / 停滞表型的高级别肿瘤 (表型 I 和 II) ($HR = 1.00 [0.22-4.46]$ 、 $p = 0.99$; 图 15) 中出现几乎相同的低复发风险。值得注意的是, 显著的强相关出现在乳腺癌亚型和细胞周期表型之间 ($p < 0.001$)。与管腔亚型 (49%, 71/145) 相比, 具有活性周期表型 (表型 III) 的患者比例在 Her-2 (91%, 10/11) ($p = 0.003$) 和三重阴性亚型 (96%, 25/26) ($p < 0.001$) 中显著更高 (图 16)。然而, 呈现周期外表型 (表型 I) 和 G1 延迟 / 停滞表型 (表型 II) 的激素受体阴性肿瘤的比例仅分别为 4% (1/26) 和 9% (1/11), 该比例在管腔亚型中为 51% (74/145), 其中 21% (30/145) 呈现表型 I, 30% (44/145) 呈现表型 II (图 16)。

[0186] 讨论

[0187] 通过全基因组广泛分析对控制如增殖、分化、凋亡和 DNA 损伤反应这类过程的复杂且冗余的通路分析正证明了其作为乳腺癌的预后工具的局限性 (Dunkler et al. Eur J Cancer, 43:745-751, 2007)。我们在本文中聚焦于高度演化的保守细胞周期机制, 该机制位于影响细胞周期进展的复杂信号传递通路的下游, 因此可以看作是通过该通路的信息转导的整合点。我们已经证明, 这种新型的多参数细胞周期分析不仅可提供对肿瘤的细胞周期动力学的新认识, 而且在包括前列腺癌、肾癌和卵巢癌的一系列肿瘤类型中有重要的预后意义。

[0188] 我们对 DNA 复制准许因子和有丝分裂调节物的分析可进一步表征绝经期前乳腺组织中的异常细胞周期状态。虽然由标准增殖标记物 Ki67 鉴定的生长部分较小, 但 TDLU

中的大量乳房上皮细胞表达 Mcm2, 这表明大量细胞似乎被准许并因此“在周期内”。然而, 这些细胞不能表达细胞周期进展的标记物, 包括 S-G2-M 标记物孕蛋白、Aurora A、PLK1 和有丝分裂标记物 H3S10ph, 表明这些细胞处于 G1 停滞状态。非增殖性乳腺中这种引发的准许状态可能是为允许对妊娠快速反应的进化改变, 而且不能下调 DNA 复制准许通路可能使得转换成不受控制的细胞增殖更容易实现。

[0189] 我们对乳腺癌的细胞周期分析表明肿瘤分化水平的降低和基因组不稳定性的增加——侵袭性更高的肿瘤的标记物——与 Mcm2、孕蛋白、Aurora A、Plk1 和 H3S10ph 的水平升高相关联, 表明处于细胞周期中的细胞比例增大。然而, 与卵巢不同, 肿瘤分化和非整倍性水平降低与细胞周期进展加速没有关联。而且, 在肿瘤阶段和细胞周期生物标记物之间没有出现关联, 这再次与卵巢不同, 在卵巢中 urora A、H3S10ph 和肿瘤 FIGO 阶段之间有高显著的相关性。这意味着不同肿瘤类型之间细胞周期机制的调节异常有基本差异, 并且这可能与不同的癌症遗传背景相关。

[0190] 我们对乳腺癌的分析已表明, DNA 复制准许通路的核心组分 (G1-S 调节物) 和有丝分裂机制的核心组分 (G2-M 调节物) 在乳腺癌中是有力的独立预后标记物, 与单独的 NPI 分值的预后价值相比具有更高和更优的价值。吸引人的是, 最有效的复发和存活预后标记物为有丝分裂激酶 Aurora A 和 PLK1, 二者现在都是小分子抑制物癌症药物发现过程的主要关注点。这增大了将活检肿瘤样品的多参数细胞周期分析用作靶向所述细胞周期机制的小分子的预测性试验的可能性。重要的是, PLK1 和 Aurora A 表达在级别和阶段之间显示大量重叠, 表明常规的临床病理参数可能不足以预测治疗反应。我们的数据支持了为将新型小分子经济有效地引至临床实践中使生物标记物和个性化靶向疗法共同进化这一观念。除基于机制的治疗法之外, 多参数细胞周期分析在预测对常规化学治疗剂和电离辐射的反应中也可能有价值。已从周期退出的非增殖细胞对化学疗法具有特别的重要性, 这是因为它们对 S 期和有丝分裂相关试剂有免疫性。而且, 细胞周期时相可决定肿瘤细胞的相对放射敏感性, 细胞在 G2-M 期放射敏感性更高, 在 G1 较不敏感, 在 S 期的后期最不敏感。

[0191] 所研究的许多细胞周期标记物——包括 Ki67, Mcm2、孕蛋白、Aurora A、Plk1 和 H3S10ph——与乳腺癌复发相关。重要的是, 该效应在对 NPI 调整后仍是统计学显著的, 因此是独立的预后因子。然而, 细胞周期机制的这些关键组分位于即刻早期基因和延迟反应基因下游的丝裂原信号传递通路与 E2F 转录调节控制系统的交汇点处。

[0192] 总之, 我们已表明, 该细胞周期机制——上游生长调节通路的整合点——的核心组分可以大大增强乳腺癌的预后评估, 并为标准临床病理参数和整合的 NPI 分值提供额外的信息。Aurora A 和 PLK1 似乎有特别的预后重要性, 并因此可能作为用于正进入临床试验的选择性有丝分裂激酶抑制物的预测性标记物。

[0193] 实施例 2: 在上皮卵巢癌中 DNA 复制准许因子和 aurora 激酶与非整倍性和临床后果关联

[0194] 研究组

[0195] 从肿瘤学系 (University College London Hospital Gynaecological Cancer Centre, UCL Hospitals, London, UK) 拥有的卵巢癌数据库鉴定了在 1999 年 1 月 1 日至 2004 年 12 月 31 日被确诊患有 EOC 的 143 名患者。基于可用的组织学材料选择患者。组织学标本由妇科肿瘤学病理学者进行诊断观察, 并根据 WHO 标准进行组织学亚型评估和核

分级。在完成治疗后每 3-6 个月对大多数患者进行持续 2 年的观察,之后每年一次。从患者的医院记录直接获得了如下的临床信息:出生日期、诊断日期、包括残余疾病量在内的手术结果、基于临床检查和手术探查的结论以及细胞学结果的国际妇产科联盟 (Federation of International Obstetricians and Gynecologists, FIGO) 分期、诊断和复发时的 CA125 值、化学疗法开始时的行为状态、复发日期、最后一次追踪观察的日期以及死亡的日期和原因。在这 143 名患者中,67 (47%) 在研究时间内复发。复发的患者中的平均复发时间为 16.9 个月 (SD:11.0 个月;范围:0-47 个月)。未复发患者中的平均追踪观察时间为 33.2 个月 (SD:18.5 个月;范围:5-75 个月)。34 名患者 (24%) 在研究时间内死亡,107 名在最后一次追踪观察时仍存活。死亡患者的平均存活时间为 21.9 个月 (SD:15.6 个月;范围:0-60 个月)。未死亡患者的平均追踪观察时间为 33.3 个月 (SD:18.8 个月;范围:5-75 个月)。两名患者未能追踪观察。伦理委员会的批准获自联合的 UCL/UCLH 人类研究伦理委员会。

[0196] 抗体

[0197] 如 (Wharton SB et al. Br J Cancer 2004 ;91 :262-9, 2004) 所述生成人孕蛋白的兔多克隆抗体。Ki67 单克隆抗体 (克隆 MIB-1) 获自 DAKO (Glostrup, Denmark), Mcm2 单克隆抗体 (克隆 46) 获自 BD Transduction Laboratories, Aurora A 单克隆抗体 NCL-L-AK2 (克隆 JLM28) 获自 Novocastra Laboratories, Aurora B 单克隆抗体 Ab2254 获自 Abcam PLC, 第 10 位丝氨酸磷酸化的组蛋白 H3 (H3S10ph) 多克隆抗体获自 Upstate。

[0198] 细胞培养和同步化

[0199] 如 (Stoeber et al. 2001, 见上文) 所述培养 HeLa S3 细胞 (欧洲动物细胞培养物保藏中心 (European Collection of Animal Cell Cultures) 87110901) 并同步化。如前人描述 (Krude et al. Cell ;88 :109-19, 1997) 通过分离核的流式细胞术确认细胞周期同步化。制备蛋白提取物和免疫印迹。以胰蛋白酶进行处理收获 HeLa S3 细胞, 将其以 PBS 洗涤并以 2×10^7 细胞 /ml 悬浮于裂解缓冲液 [50mM Tris-Cl (pH 7.5), 150mM NaCl, 20mM EDTA, 0.5% NP40] 中。将裂解物在冰上孵育 30 分钟, 然后通过离心 ($13,000 \times g$, 15min, 4°C) 使之澄清。将裂解物通过 4-20% SDS-PAGE (75 μg 蛋白 / 孔) 分离, 并如前人所述 (Stoeber et al., 见上文) 进行免疫印迹。使用如下条件进行阻断、抗体孵育和洗涤步骤: 对于 Mcm2 和 Aurora A, PBS/0.1% 吐温 20/5% 乳; 对于孕蛋白, PBS/1% 吐温 20/10% 乳; 对于 Aurora B 和 H3S10ph, PBS/5% 乳。

[0200] 免疫组织化学

[0201] 在初次诊断得到的档案记录的福尔马林固定的石蜡包埋组织获自所有患者, 对于每个标本选择包含代表性浸润肿瘤样品的一个标本块。将来自每个石蜡包埋的组织块的连续系列切片用于免疫组织化学。将 3 微米切片切于 Superfrost Plus 载玻片 (Visions Biosystems) 上, 在二甲苯中脱蜡, 并按乙醇至水的梯度进行复水。将组织切片在 pH 6.0 下于 0.1mol/L 柠檬酸缓冲液中压煮 2 分钟, 并使用 Bond Polymer Refine Detection 试剂盒和 Bond-X 自动系统 (Vision Biosystems) 免疫染色。以如下稀释度应用一抗: Ki67 (1 : 100)、Mcm2 (1 : 2000)、孕蛋白 (1 : 600)、Aurora A (1 : 50)、Aurora B (1 : 200) 且 H3S10ph (1 : 300)。用 Pertex 封固剂 (Cell Path Ltd) 加盖盖玻片。将无一抗的孵育用作阴性对照, 将结肠上皮切片作为阳性对照。

[0202] 蛋白表达谱分析

[0203] 如前所述 (Shetty et al. 2005, 见上文 .Dudderidge et al. 2005, 见上文), 通过在每种肿瘤中确定标记物的标记指数进行蛋白表达分析。在低倍放大率 (x100) 下评估载玻片来识别具有最高染色强度的肿瘤区域。从这些选择的区域中, 以电荷耦合器件照相机和分析软件 (SIS) 在 x400 放大率下捕获 3-5 个视野。随后打印图像用于定量分析, 该分析在观察者不知道临床病理变量的情况下进行。将该视野中的阳性和阴性细胞计数, 并将间质细胞或炎症细胞排除。识别阳性细胞的标准取决于生物标记物: 对于 Ki67、Mcm2、孕蛋白、Aurora B 和 H3S10ph, 具有任何程度的核染色的细胞被记录为阳性; 对于 Aurora A, 具有任何程度的核染色和细胞质染色的细胞被记录为阳性 (Gritsko et al. 2003, 见上文)。对每个试验例计数了最少的 500 个细胞。使用下式计算标记指数: 标记指数 = 阳性细胞数目 / 总细胞数目 x100。由独立的评估人员对 10 个随机选择的试验例进行的再次评估显示了高水平的一致性。

[0204] DNA 图像细胞计数

[0205] 对于每个试验例, 将获自如免疫组织化学所评估的同一标本块的石蜡包埋组织的一个 40 μ m 切片用于如 (Sudbo et al. 2001, 见上文 .Haroske et al. 1997, 见上文) 所述制备胞核。如 (Sudbo et al. 2001, 见上文) 所述, 将 Fairfield DNA Ploidy System (Fairfield Imaging Ltd) 用于图像处理、分析和分类。淋巴细胞和浆细胞作为内部对照被包括在内, 高级别的膀胱肿瘤和正常结肠组织的 40 μ m 切片分别作为非整倍体群和二倍体群的内部对照。依照公开的标准 (Sudbo et al. 2001, 见上文, Haroske 1998, 见上文) 对直方图进行分类。直方图由两名独立评估人员进行分类, 他们在不知道临床病理变量的情况下具有高度一致性。为了进行统计分析, 将四倍体肿瘤和多倍体肿瘤与非整倍体肿瘤成组。

[0206] 统计分析

[0207] 将 Spearman 秩相关系数用于检查生物标记物之间的关联。根据需要, 使用非参数 Jonckheere-Terpstra 和 Mann-Whitney U 检验评估生物标记物表达与肿瘤分级、阶段和倍性状态之间的关系。然后将数据概括为观察到的整个组的标记指数的中值和四分位数间距。使用以下工具进行无疾病和所有存活数据的分析: Kaplan-Meier 作图 (对于生物标记物使用三分位数)、对数秩检验和 Cox 回归 (除非另外说明, 否则生物标记物作为连续变量处理)。对于每种生物标记物, 基于标记指数将该组分成三分位数组。在每个三分位数组中, 分别对于无疾病者和所有存活者使用 Kaplan-Meier 方法计算无疾病者或存活者的剩余比例。首先未校正地估计生物标记物的 95% 置信区间 (95% CI) 的风险比 (HR), 然后就年龄、分级和阶段进行校正。将数据不全的患者排除于多变量分析之外。候选生物标记物列于附表 S1 中。所有检验都是双侧的并使用 0.05 的显著性水平, 不允许进行多重假设检验。使用 Windows 下的 SPSS 12.0 (SPSS, Inc.) 进行分析。

[0208] 结果

[0209] 生物标记物多参数分析的验证及其生物学含义

[0210] 通过以下方式在来自非同步 HeLa S3 细胞的总细胞提取物中确认抗 Mcm2、孕蛋白、Aurora A、Aurora B 和 H3S10ph 的抗体的单特异性: 检测具有与相应人抗原的报道电泳迁移率一致的分子量的单一蛋白 (图 10A)。体外研究的首个实例选择 HeLa S3 细胞, 因为

该细胞系具有熟知的细胞周期相转变时间和成熟的同步化方案。将来自同步化细胞的总细胞裂解物以表征的抗体进行免疫印迹（图 10B）。Mcm2 水平在通过细胞周期的过程中不显著变化，而孕蛋白表达局限于 S-G2-M。Aurora A 水平在 S 期过程中升高并在有丝分裂过程中达到峰值，降解发生在从有丝分裂停滞解除后 2-4 小时。类似地，Aurora B 水平在 G1 过程中可忽略，在 S 期过程中逐渐升高并在 G2-M 过程中达到峰值，在有丝分裂后降低。H3S10ph 的存在局限于有丝分裂，这就强化了将它用作有丝分裂标记物的合理性。在同步化的 SK-OV3 卵巢癌细胞中观察到了这些生物标记物的相同细胞周期依赖性表达（数据未显示）。由于 Ki67 在增殖细胞的整个细胞周期中表达且孕蛋白表达局限于 S-G2-M 期，我们已提出，孕蛋白 /Ki67 比值可用作 G1 相对时长的指示物，并因此作为细胞周期进展速度的指示物。以上描述的数据可确认，Aurora A 和 Aurora B 的细胞周期依赖性表达使得还能用它们与 Ki67 的比值作为细胞周期进展的指示物。孕蛋白表达增加总是局限于 S-G2-M 期，甚至在高度侵袭性肿瘤中也是如此。因此，我们体外实验的发现还可表明，Aurora A 或 Aurora B 与孕蛋白之间的相对比值增大（比值 > 1 ）可指示激酶在细胞周期过程中激酶的过表达。为了评估我们的体外实验发现及其生物学含义在 EOC 中的预后意义，我们分析了生物标记物在一系列 143 个病例中的表达（图 10C）。还在 5 个正常卵巢组织中研究了蛋白表达。生物标记物在正常卵巢表面上皮中的表达非常低（ $< 4\%$ ），这与它的低增殖能力一致（数据未显示）。相反，EOC 显示出高水平的生物标记物表达，指示再次进入细胞周期和增殖。

[0211] 接下来，我们检查了肿瘤系列中生物标记物对之间的关联。AuroraA 和 Aurora B 的表达水平与它们的底物 H3S10ph 的表达水平显示了强正相关 [Spearman 相关度分别为 0.57 (95% CI, 0.45-0.67) 和 0.52 (95% CI, 0.39-0.63)]。Mcm2、孕蛋白和 H3S10ph 的表达水平与 Ki67 水平强正相关 [Spearman 相关度分别为 0.73 (95% CI, 0.64-0.8) ; 0.74 (95% CI, 0.66-0.81) ; 和 0.52 (95% CI, 0.39-0.63)]，这支持了它们作为增殖标记物的作用。值得注意的是，孕蛋白 /Ki67 和 Aurora A/Ki67 的比值与 H3S10ph 有强度较弱的正相关 [Spearman 相关度分别为 0.25 (95% CI, 0.09-0.40) 和 0.42 (95% CI, 0.27-0.55)]，这反映出 G1 的相对时长相对于延长的 S-G2-M 转换时间的变化，这可能出现在内 S 或 G2-M 检查点通路的活化过程中。

[0212] 这一点与肿瘤块只有在肿瘤细胞进行大比例的细胞群倍增——约为 40 个的总数中有 30 个倍增——后才逐渐可进行临床检测是一致的。该数目的细胞群倍增代表了与生命相容的最大物块，这是已经不考虑大多数细胞周期检查点机制的体克隆进化中的一个点。

[0213] 生物标记物、肿瘤 DNA 倍性状态和临床病理特征之间的关系

[0214] 该研究组的临床病理特征总结于表 10 中。为了研究生物标记物和基因组不稳定性之间的关系，我们将它们的表达谱与肿瘤 DNA 含量相关联。在所有生物标记物的表达水平和多个生物标记物 /Ki67 比值与基因组不稳定性之间有高度显著相关性（表 11），反映了与二倍体肿瘤相比非整倍体肿瘤中的周期细胞比例增大和细胞周期进展加速。

[0215] 所有 6 种生物标记物都与肿瘤分级强相关（表 12）；然而生物标记物水平的分布在不同级别之间有一些重叠（如 Aurora A 水平；图 11）。这些数据不但可确认肿瘤间变增加的处于周期中的细胞的比例增大，而且表明所述生物标记物没有将每个级别的所有患者的级别完全区分开。

[0216] 与这些发现一致的是，发现了肿瘤级别和倍性状态之间的高显著相关性（p

< 0.001)。孕蛋白 /Ki67、Aurora A/Ki67、Aurora B/Ki67 和 H3S10ph/Ki67 的比值也与肿瘤分化显著相关 (表 12), 指示在高级别肿瘤中细胞周期进展速度加快。相反, 并且与我们在其他肿瘤类型中的发现一致的是, Mcm2/Ki67 比值随肿瘤级别增加而减小 (表 12), 反映了高度分化肿瘤中 DNA 复制准许的、但非增殖的细胞向低度分化肿瘤中活性周期细胞的比例转变。孕蛋白表达与肿瘤间变和基因组不稳定性增加之间的正相关性 (表 11 和 12) 可表明, 该准许抑制物在 EOC 中不发挥肿瘤抑制物的作用。

[0217] 已发现 Aurora A、H3S10ph、Aurora A/Ki67、H3S10ph/Ki67 与肿瘤阶段之间有显著相关性 (表 13)。这表明 Aurora A 调节异常可能是早期上皮卵巢肿瘤发生和向晚期疾病发展中的关键事件。再者, 晚期疾病与 Aurora A/ 孕蛋白比值增大显著相关 ($p = 0.04$; 表 13), 这也支持了 Aurora A 调节异常和肿瘤进展之间的关联性。

[0218] 生物标记物、肿瘤 DNA 倍性状态和患者结果的关系

[0219] 单变量分析

[0220] Aurora A ($p = 0.01$; 图 12A)、Aurora A/Ki67、Aurora B/Ki67 和 H3S10ph (表 14) 都与较短的无疾病存活显著相关, 但不与总体存活相关。患者年龄、肿瘤级别和阶段也可预测无疾病存活, 较年轻的患者、高度分化的肿瘤以及特别是早期疾病具有显著更长的复发时间 [分别为 HR:1.02(1.00-1.05), $p = 0.05$; HR:1.59(1.03-2.45), $p = 0.04$; HR:2.07(1.58-2.71), $p < 0.0001$]。患者年龄和肿瘤阶段还预测了总体存活 [分别为 HR:1.05(1.02-1.09), $p = 0.003$; HR:3.21(1.33-7.79), $p = 0.01$], 但肿瘤级别未能预测 ($p = 0.70$), 这强调了现行分级体系的局限性。肿瘤倍性状态也与无疾病存活显著相关 [HR, 1.80(1.05-3.08), $p = 0.03$; 图 12B], 具有非整倍体肿瘤的患者具有更短的总体存活的倾向, 但这未达到统计显著性 [HR:1.95(0.88-4.31), $p = 0.10$]。

[0221] 我们将我们的系列细分成两组: 早期疾病 (FIGO 阶段 I 和 II) 及晚期疾病 (FIGO 阶段 III 和 IV), 以更准确地定义具体的亚组, 对于这些亚组, 生物标记物可具有特别的预后重要性。Aurora A 和 AuroraA/Ki67 比值都在早期亚组中对较短的无疾病存活 [分别为 HR:1.72(1.19-2.48), $p = 0.004$ (图 12C); HR:1.59(1.13-2.24), $p = 0.008$] 和总体存活 [分别为 HR:1.81(1.14-2.87), $p = 0.01$ (图 12E); HR:1.68(1.11-2.54), $p = 0.01$] 具有强预测性。该相关未出现于晚期亚组中 [分别为: 对于无疾病存活 HR:1.06(0.81-1.37), $p = 0.67$; HR:1.04(0.90-1.20), $p = 0.58$; 对于总体存活 HR:0.88(0.58-1.33), $p = 0.88$; HR:0.89(0.69-1.15), $p = 0.36$]。肿瘤倍性状态还在早期亚组中预测了无疾病存活 [HR:4.58(1.04-20.19), $p = 0.04$; 图 12D], 在具有非整倍体肿瘤中有较短总体存活的倾向 [HR:6.34(0.82-49.18), $p = 0.08$; 图 12D]。然而, 它对于晚期亚组则失去其预测价值 [对于无疾病存活和总体存活分别为 HR:1.47(0.81-2.66), $p = 0.21$ 和 HR:1.36(0.55-3.33), $p = 0.5$]。

[0222] 多变量分析

[0223] Cox 回归存活分析表明, 肿瘤阶段是无疾病存活仅有的显著有效的独立预测物 [HR:2.06(1.49-2.85), $p < 0.0001$]。患者年龄和肿瘤阶段是总体存活的独立预测物, 年龄较大的患者和晚期肿瘤具有较短的总体存活时间 [分别为 HR:1.05(1.01-1.09), $p = 0.007$; HR:3.19(1.31-7.75), $p = 0.01$]。虽然在多变量分析中多种生物标记物是显著有效的预后因子, 但在就年龄、级别和阶段校正后没有一种是无疾病存活或总体存活的显著

有效的预测物。这一点部分是由于生物标记物与肿瘤级别和阶段之间的高度显著相关性，使得难以分离出它们的独立效应。

[0224] 讨论

[0225] 进行该研究以获得对 EOC 的生物标记物的进一步认识，所述生物标记物可能具有预后价值和预测价值，并且可能导致更深入地理解其发病机制。我们的发现表明，在 EOC 中 Mcm2 和 孕蛋白复制准许因子、Aurora A 和 B 激酶以及它们的底物 H3S10ph 有预后价值。肿瘤分化和该生物标记物组之间存在的关联暗示着它们有可能被用作增殖标记物从而改进现有分级体系。我们的多参数分析表明，该多参数分析还可被用于提供患者肿瘤样品的细胞周期进展的信息，以及可翻译成重要预后信息的数据。

[0226] 这些发现与在乳腺和肾细胞癌症中对准许因子的分析是一致的。此外，该生物标记物组和肿瘤倍性状态之间的高度显著相关性表明，在 EOC 中准许机制和有丝分裂激酶的调节异常与基因组不稳定性形成有复杂的联系。Aurora A 在 G2-M 转化的数个关键阶段中起到调节作用。在本文中，我们报告了 Aurora A 的异常调节和 EOC 进展之间的有趣联系。我们的数据显示出 Aurora A、H3S10ph 与肿瘤 FIGO 阶段之间的高度显著的相关，其支持了 Aurora A 调节异常可能是上皮卵巢癌发生的早期事件的观点，并表明该调节异常可能在发展成晚期疾病中起到重要作用。

[0227] 与这些发现一致，Aurora A/孕蛋白在晚期阶段肿瘤中显著较高，这也表明 Aurora A 过表达可能在肿瘤进展中起作用或者可能是肿瘤进展的结果。在体内，这类过表达有可能不仅受基因扩增的调节，而且受其他机制例如蛋白降解的转录激活和抑制作用的调节。我们的数据表明，Aurora A 和 H3S10ph 的多参数分析使得可进行能用于补充临床分级方法的分子分级。在 EOC 中 FIGO 阶段是重要的预后指示物，然而，外科和放射学分级方法有其局限性。随机试验已显示，辅助化学疗法在具有 I 期疾病的亚最佳分级患者中是特别有利的。然而，在最近较大的随机对照试验中，仅 34% 的患者是依照指导方针 (Vegote I et al Curr. Op. Oncol. 2003 ;15 :452-5) 进行最佳分级的。在这些被不适当分级的患者中，这些生物标记物可能提供了真正的 I 期或更晚期疾病的支持性证据，对有关使用辅助化学疗法的决策提供辅助。ICON1/ACTION 试验的发现表明了对于辅助化学疗法的总体益处较少 (Trimbos JB et al J Natl Cancer Inst 2003 ;95 :105-12)，但仍不清楚哪些合适分级的 I 期疾病患者真正需要化学疗法。

[0228] 在该研究组中，Aurora A、H3S10ph 和基因组不稳定性也是无疾病存活的显著有效的预测物。进一步的亚组分析显示，Aurora A 和肿瘤倍性状态可在早期疾病中预测无疾病存活 (Aurora A 表达还可预测总体存活)。然而，当考虑到如年龄和阶段等预后因素时该关联有降低。相反，这些变量在后期疾病中失去其预测价值 [例如，Aurora A 的 HR 从早期疾病的 1.72 (1.19-2.48) 降至晚期疾病的 1.06 (0.81-1.37)]，表明其他生物学因素可能优先影响这些患者的复发和结局。另外，治疗方案的复杂性和异质性可能掩盖这些生物标记物在晚期的预测价值。

[0229] 总之，我们的数据支持如下这样的生物学机制，即通过该机制在肿瘤发生过程中较早时间点的 Aurora A 调节异常可能会促进遗传不稳定性，从而导致在早期疾病患者亚组中产生侵袭性肿瘤并且存活时间更短。

[0230] DNA 复制准许因子和有丝分裂激酶是细胞周期进展的关键调节物，因此是现行治

疗药物开发项目的焦点。在本文中,我们已经证明,对 G1-S 和 G2-M 转换的核心调节物的多参数表达分析使得可评估个体患者肿瘤样品中的细胞周期进展速度,以及评估与这些肿瘤的生物学表现有关的变量。该类型的分析可用作预测性试验,用于预测靶向细胞周期机制或加速细胞周期进展的上游生长信号转导通路的小分子。而且,各级别间的 Aurora A 表达并不能完全区分开的这一结果表明,传统的临床病理学变量不总是可预测治疗反应,这支持了生物标记物和个体化靶向治疗协同进化的观念。考虑到特异性 Aurora 激酶抑制剂最近的发展,我们的数据在将 Aurora A 用作生物标记物和潜在的治疗靶这一方面具有重要的——预后、预测和治疗——意义。

[0231] 参考文献

- [0232] Barkley et al., *Exp Cell Res* 313 :3789-3799, 2007
- [0233] Blow and Hodgson, *Trends Cell Biol* 12 :72-78, 2002
- [0234] Dudderidge et al. *Clin Cancer Res* 11 :2510-7, 2005
- [0235] Dudderidge et al., *Clin Cancer Res* 11 :25110-2517, 2005
- [0236] Dunkler et al. *Eur J Cancer*, 43 :745-751, 2007
- [0237] Eward et al., *J Cell Sci* 117 :5875-5886, 2004
- [0238] Gonzalez et al., *J Pathol* 204 :121-130, 2004
- [0239] Gritsko et al. *Clin Cancer Res* 9 :1420-6, 2003
- [0240] Haroske et al. *Anal Cell Pathol* 1998 ;17 :189-200, 1997
- [0241] Kingsbury et al., *Exp Cell Res* 309 :56-67, 2005
- [0242] Krude et al. *Cell* ;88 :109-19, 1997
- [0243] Shetty et al. *Br J Cancer* 93 :1295-300, 2005
- [0244] Shetty et al., *Br J Cancer* 93 :1295-1300, 2005
- [0245] Stoeber et al. *J Cell Sci*, 114 :2027-41, 2001
- [0246] Stoeber et al., *EMBO J* 17 :7219-7229, 1998
- [0247] Stoeber et al., *J Cell Sci* 114 :2027-2041, 2001
- [0248] Sudbo et al. *N Engl J Med* 344 :1270-8, 2001
- [0249] Wharton et al. *Br J Cancer* ;91 :262-9, 2004
- [0250] Williams and Stoeber, *Curr Opin Cell Biol* 19 :672-679, 2007
- [0251]

表1: 化学治疗剂的增殖靶

药物	靶	作用机制	影响的时相
5-氟尿嘧啶	胸苷酸合成酶	消耗核苷酸	S
羟基脲	核糖核苷酸还原酶	消耗核苷酸	S
甲氧蝶呤	二氢叶酸还原酶	消耗核苷酸	S
多柔比星	拓扑异构酶II	稳定拓扑异构酶II-DNA复合物， 其导致复制停滞	S
依托泊苷	拓扑异构酶II	稳定拓扑异构酶II-DNA复合物， 其导致复制停滞和链断裂	S 或 G2/M
顺铂	DNA	可导致复制停滞的链内交联	G1/S 和 G2/M
紫杉醇	微管蛋白	稳定微管	G2/M
夫拉平度	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 和 CDK7	通过干扰ATP结合抑制CDK	数个
星状孢子素 (UCN-01)	CDK1	CDK1通过磷酸化发生的非恰当活化	G2/M 消除
ZM447439	Aurora 激酶-A 和 -B	抑制组蛋白H3第10位丝氨酸磷酸化	G2/M
BI 2536	Plk-1	将细胞阻滞于前中期并启动细胞周期蛋白A破坏	M

CDK, 细胞周期蛋白依赖性激酶

[0252] 表 2 患者的特征

		频率 (数目)
年龄 (岁)	<40	7% (12)
	40-49	19% (34)
	50-59	28% (51)
	60-69	22% (41)
	70+	24% (44)
大小 (mm)	<11	9% (16)
	11-20	33% (60)
	21-30	30% (54)
	31-40	16% (29)
	>40	13% (23)
淋巴结阶段	阴性结	53% (97)
	阳性, 1-3	22% (40)
	阳性, 4或以上	18% (32)
	未知	7% (13)
分级	1	13% (24)
	2	44% (80)
	3	43% (78)
NPI 分值	平均值 (sd) 4.49 (1.31)	
	<3.4	18% (32)
	3.4-5.4	51% (93)
	>5.4	24% (44)
	未知	7% (13)
倍性状态	二倍体	47% (86)
	非整倍体	50% (90)
	未知	3% (6)
[0253] Her2	0	59% (108)
	1+	18% (33)
	2+	7% (13)
	3+	15% (28)
ER	阳性 (100%)	53% (96)
	阴性 (<100%)	47% (86)
PR	阳性 (<63%)	50% (91)
	阴性 (>63%)	50% (91)
BR阳性、PR阳性		37% (67)
BR或PR阴性		63% (115)
淋巴管浸润	不存在	47% (86)
	存在	38% (69)
	未知	15% (27)
肿瘤类型	浸润性导管癌	78% (142)
	小叶型	14% (26)
	粘蛋白型	2% (4)
	混合型	5% (9)
	微乳头状型	1% (1)
乳腺癌复发	是	26% (48)
	否	68% (124)
	未知	6% (10)
乳腺癌死亡	是	14% (26)
	否	80% (146)
	未知	6% (10)
复发跟踪观察 (年)		632 (每受试者3.8)
存活跟踪观测 (年)		684 (每受试者4.1)

[0254] 表3:生物标记物和肿瘤分化之间的关系

[0255]

	分级 1 (n=24)	分级 2 (n=80)	分级 3 (n=78)	p-值 [†]
Ki67*	7.3 (2.4-17.6)	16.6 (8.05-30.9)	40.2 (25-66.9)	<0.001
Mcm2*	45.8 (17.1-65.6)	57.8 (29.3-83)	92.3 (70.0-100.0)	<0.001
孕蛋白*	2.0 (0.9-5.8)	6.5 (3.3-10.6)	17.4 (10.6-24.8)	<0.001
ER*	100.0 (100.0-100.0)	100.0 (94.0-100.0)	30.2 (0.0-100.0)	<0.001
PR*	93.5 (52.8-100.0)	87.9 (38.0-100.0)	0.0 (0.0-90.3)	<0.001
Aurora A*	1.7 (0.4-4.1)	4.3 (1.4-7.2)	11.7 (6.2-20.2)	<0.001
Plk1*	2.3 (0.3-5)	5.3 (2.6-9.7)	14.2 (8.9-21.7)	<0.001
H3phS10*	0.2 (0.03-0.5)	0.8 (0.3-1.6)	2.5 (1.4-3.8)	<0.001
Mcm2/Ki67	4.48 (2.74-6.35)	2.77 (2.04-5.00)	1.71 (1.25-3.00)	<0.001
孕蛋白/Ki67	0.36 (0.21-0.60)	0.36 (0.25-0.52)	0.38 (0.29-0.58)	0.29
Aurora A/Ki67	0.26 (0.11-0.42)	0.24 (0.13-0.33)	0.29 (0.16-0.42)	0.11
Plk1/Ki67	0.27 (0.12-0.51)	0.29 (0.22-0.50)	0.34 (0.26-0.50)	0.09
H3phS10/Ki67	0.045 (0.01-0.08)	0.046 (0.02-0.09)	0.060 (0.04-0.09)	0.04

[0256] [†]Jonckheere-Terpstra 检验

[0257] *标记指数 (表示为百分数)

[0258] ‡中值 (四分位数间距)

[0259] 表 4: 肿瘤标记物和肿瘤 DNA 倍性状态之间的关系

	生物标记物	非整倍体 (n=90)	二倍体 (n=86)	p-值 [†]
	Ki67*	30.0 (16.8-53.1)	17.5 (7.2-33.1)	<0.001
	Mcm2*	75.8 (48.8-96.7)	63.1 (31.2-84.4)	0.009
	孕蛋白*	11.5 (5.9-21.9)	6.9 (2.4-12.2)	<0.001
	ER*	96.9 (8.0-100.0)	100.0 (65.7-100.0)	0.054
	PR*	59.1 (0.0-97.0)	69.3 (0.0-100.0)	0.12
[0260]	Aurora A*	7.3 (3.5-14.9)	4.1 (1.0-8.4)	<0.001
	Plk1*	9.8 (4.8-15.7)	7.1 (2.1-11.1)	0.002
	H3phS10*	1.78 (0.78-2.89)	0.70 (0.22-1.7)	<0.001
	Mcm2/Ki67	2.16 (1.43-3.40)	2.85 (1.97-4.99)	0.004
	孕蛋白/Ki67	0.38 (0.25-0.58)	0.36 (0.28-0.54)	0.74
	Aurora A/Ki67	0.28 (0.15-0.40)	0.25 (0.12-0.42)	0.40
	Plk1/Ki67	0.32 (0.22-0.48)	0.30 (0.22-0.57)	0.65
	H3phS10/Ki67	0.053 (0.03-0.09)	0.050 (0.02-0.10)	0.48

[0261] †Mann-Whitney 检验

[0262] *标记指数（表示为百分数）

[0263] ‡中值（四分位数间距）

[0264] 表 5：生物标记物和淋巴结阶段之间的关系

[0265]

	阴性 (n=97)	阳性 (n=72)	†p- 值
Ki67*	22.7 (9.5-43.3)	24.8 (11.1-47.3)	0.49
Mcm2*	70.3 (36.2-90.1)	71.9 (42.2-98)	0.25
孕蛋白*	7.9 (3.6-16.3)	10.4 (5.1-18.2)	0.22
ER*	100.0 (60.6-100.0)	90.7 (0.0-100.0)	0.007
PR*	74.3 (4.5-100.0)	31.3 (0.0-96.1)	0.005
Aurora A*	5.3 (1.5-10.8)	7.0 (2.9-14.0)	0.16
Plk1*	7.5 (3.3-14.3)	9.2 (4.2-14.7)	0.22
H3phS10*	0.94 (0.37-2.38)	1.67 (0.68-2.93)	0.02
Mcm2/Ki67	2.57 (1.54-3.77)	2.25 (1.64-4.78)	0.92
孕蛋白/Ki67	0.36 (0.25-0.56)	0.38 (0.29-0.56)	0.38
AuroraA/Ki67	0.26 (0.12-0.38)	0.29 (0.17-0.48)	0.15
Plk1/Ki67	0.28 (0.22-0.48)	0.37 (0.22-0.52)	0.20
H3phS10/Ki67	0.046 (0.02-0.08)	0.061 (0.04-0.10)	0.02

[0266] †Mann-Whitney 检验

[0267] *标记指数（表示为百分数）

[0268] ‡中值（四分位数间距）

[0269] 表 6：生物标记物和 NPI 之间的关系

[0270]

	定义标 记物中 值的表 达值	低于标 记物中 值的平 均NPI	高于标 记物中 值的平 均NPI	标记物和NPI 之间的相关度 [†]
Ki67*	24.0	4.13	4.86	+0.42, p<0.001
Mcm2*	70.7	4.10	4.88	+0.40, p<0.001
孕蛋白*	9.0	4.00	4.99	+0.44, p<0.001
ER*	99.9	4.97	4.05	-0.39, p<0.001
PR*	63.0	4.78	4.19	-0.34, p=0.005
Aurora A*	6.10	4.09	4.87	+0.39, p<0.001
Plk1*	8.40	3.97	5.01	+0.46, p<0.001
H3phS10	1.25	3.95	5.01	+0.47, p<0.001
Mcm2/Ki67	2.43	4.72	4.28	-0.24, p=0.02
孕蛋白/Ki67	0.370	4.44	4.57	+0.05, p=0.53
AuroraA/Ki67	0.263	4.33	4.66	+0.14, p=0.07
Plk1/Ki67	0.310	4.33	4.68	+0.12, p=0.12
H3phS10/Ki67	0.05087	4.23	4.76	+0.20, p=0.01

[0271] *标记指数（表示为百分数）

[0272] [†]非参数 Spearman 相关系数

[0273]

表7: 生物标记物和HER2状态之间的关系

	0 (n=108)	1+ (n=33)	2+ (n=13)	3+ (n=28)	p- 值 [†]
Ki67*	21.4 (9.5-43.9)	22.0 (7.2-35.8)	24.6 (10.2-52.1)	32.2 (19.7-48.2)	0.17
Mcm2*	70.5 (35.0-94.2)	63.3 (38.9-80.1)	75.0 (28.7-90.0)	78.3 (54.8-95.6)	0.67
孕蛋白*	8.4 (3.3-16.9)	7.9 (4.0-13.3)	10.6 (4.7-17.9)	15.7 (7.8-21.7)	0.056
ER*	100.0 (15.2-100.0)	100.0 (71.0-100.0)	96.4 (61.6-100.0)	70.0 (0.0-100.0)	0.12
PR*	81.2 (0.0-100.0)	58.4 (0.4-95.1)	45.8 (15.0-97.4)	0.0 (0.0-52.6)	<0.001
Aurora A*	5.8 (2.0-12.3)	6.0 (1.0-11.8)	5.9 (1.1-9.6)	8.9 (4.5-13.1)	0.43
Plk1*	7.5 (3.3-13.8)	6.1 (3.4-12.5)	10.2 (2.8-13.4)	11.2 (8.8-17.0)	0.073
H3phS10*	0.9 (0.34-2.67)	1.0 (0.46-2.60)	1.7 (0.72-2.39)	1.9 (0.98-2.82)	0.044
Mcm2/Ki67	2.57 (1.51-4.62)	2.96 (1.55-5.62)	2.22 (1.25-3.76)	2.27 (1.67-2.70)	0.38
孕蛋白/Ki67	0.37 (0.26-0.55)	0.35 (0.25-0.52)	0.43 (0.21-0.69)	0.37 (0.32-0.54)	0.60
Aurora A/Ki67	0.26 (0.15-0.39)	0.29 (0.13-0.44)	0.27 (0.11-0.38)	0.25 (0.15-0.41)	0.79
Plk1/Ki67	0.30 (0.21-0.48)	0.30 (0.23-0.55)	0.34 (0.16-0.54)	0.33 (0.25-0.50)	0.51
H3phS10/Ki67	0.050 (0.03-0.09)	0.062 (0.03-0.12)	0.066 (0.03-0.08)	0.050 (0.04-0.08)	0.47

[†]Jonckheere-Terpstra 检验

*标记指数 (表示为百分数)

‡中值 (四分位数间距)

[0274] 表8: HER2 状态和倍性状态与 NPI 之间的关系

[0275]

	平均 NPI	NPI均值的差异 (95% CI), p-值
<u>倍性</u>		
非整倍体 (n=83)	4.67	差异 = 0.33 (-0.07 to +0.74), p=0.11*
二倍体 (n=81)	4.33	
<u>HER2</u>		
0 (n=101)	4.35	每类HER2的平均NPI高 0.22 (0.04 - 0.40), p=0.014 [†]
1+ (n=31)	4.44	
2+ (n=11)	4.53	
3+ (n=26)	5.09	

[0276] *非成对 t- 检验

[0277] [†]时线性趋势的线性回归检验

[0278] 表 9 :NPI 对复发和癌症死亡的影响

[0279]

	复发率	癌死亡率
NPI		
<3.4	3% (1/30)	3% (1/30)
3.4-5.4	20% (17/87)	7% (6/87)
>5.4	54% (22/41)	34% (14/41)
HR	1.79 (1.46 - 2.20), p<0.001	2.18 (1.63 - 2.93), p<0.001
(95% CI)		
进行年龄 校正后 的HR	1.81 (1.47 - 2.23), p<0.001	2.15 (1.61 - 2.88), p<0.001

[0280] 表 10 :患者的特征

[0281]

		n (%)
年龄 (岁)	均值: 61 范围: 20-88	143
组织学分级 (n=124)	1 (高度分化的) 2 (中度分化的) 3 (低度分化的)	16 (13%) 33 (27%) 75 (60%)
组织学亚型 (n=143)	血清型 子宫内膜型 透明细胞型 粘蛋白型 腺癌型 (未特异化的) 其他	64 (45%) 31 (21%) 20 (14%) 13 (9%) 11 (8%) 4 (3%)
肿瘤 FIGO 阶段 (n=142)	1 2 3 4	48 (34%) 14 (10%) 66 (46%) 14 (10%)
治疗 (n=143)	手术+辅助化学治疗 手术+新辅助化学治疗 仅手术 仅化学治疗	109 (76%) 18 (13%) 13 (9%) 3 (2%)
残留疾病 (n=96)	无 微小 <2cm >2cm	39 (41%) 17 (18%) 17 (18%) 23 (24%)
细胞学 (n=95)	阴性 阳性	32 (34%) 63 (66%)
ECOG* (n=61) (在第一轮化学 治疗开始时)	0 1 2 3 4	49 (80%) 7 (11%) 1 (2%) 3 (5%) 1 (2%)
CA125 反应 (n=95) (在第一轮化学 治疗结束时)	<35 >35	82 (86%) 13 (14%)

[0282] *行为状态

[0283] 表 11 :生物标记物和肿瘤 DNA 倍性状态之间的关系

[0284]

生物标记物	二倍体 (n=52)	非整倍体 (n=91)	p- 值 [†]
Ki67*	46 (33-63) [‡]	65 (53-74)	<0.0001
Mcm2*	69 (54-83)	86 (71-92)	<0.0001
孕蛋白 *	9 (5-16)	16 (11-24)	<0.0001
Aurora A*	11 (5-15)	19 (12-28)	<0.0001
Aurora B*	5 (3-9)	11 (8-19)	<0.0001
H3S10ph*	1.1 (0.7-1.7)	2.3 (1.6-3.6)	<0.0001
Mcm2/Ki67	1.3 (1.1-1.7)	1.3 (1.2-1.4)	0.17
孕蛋白/Ki67	0.23 (0.14-0.31)	0.26 (0.18-0.34)	0.05
Aurora A/Ki67	0.24 (0.15-0.33)	0.32 (0.21-0.43)	0.01
Aurora A/孕蛋白	1.1 (0.7-1.5)	1.1 (0.8-1.6)	0.61
Aurora B/Ki67	0.12 (0.07-0.20)	0.29 (0.13-0.27)	0.001
Aurora B/孕蛋白	0.55 (0.34-1.08)	0.81 (0.46-1.05)	0.17
H3S10ph/Ki67	0.02 (0.02-0.04)	0.04 (0.03-0.06)	0.001

[0285] [†]Mann-Whitney 检验

[0286] *标记指数 (表示为百分数)

[0287] [‡]中值 (四分位数间距)

[0288] 表 12 :生物标记物和肿瘤分化^Q之间的关系

[0289]

生物标记物	1 级 (n=16)	2 级 (n=33)	3 级 (n=75)	p- 值 [†]
Ki67*	44 (28-49) [‡]	54 (42-67)	67 (49-77)	< 0.0001
Mcm2*	60 (54-71)	77 (62-86)	87 (76-93)	< 0.0001
李蛋白*	6 (3-13)	11 (6-16)	17 (10-25)	< 0.0001
Aurora A*	5 (2-11)	13 (7-21)	19 (12-30)	< 0.0001
Aurora B*	3 (1-6)	8 (4-15)	11 (8-19)	< 0.0001
H3S10ph*	0.8 (0.6-1.7)	1.3 (0.9-2.2)	2.6 (1.8-3.9)	< 0.0001
Mcm2/Ki67	1.4 (1.3-1.7)	1.3 (1.2-1.5)	1.3 (1.1-1.4)	0.02
李蛋白/Ki67	0.18 (0.13-0.25)	0.20 (0.14-0.32)	0.28 (0.20-0.35)	0.007
Aurora A/Ki67	0.14 (0.09-0.24)	0.26 (0.16-0.36)	0.33 (0.21-0.44)	0.0002
Aurora A/李蛋白	1.0 (0.3-1.3)	1.1 (0.6-1.6)	1.1 (0.8-1.6)	0.12
Aurora B/Ki67	0.09 (0.03-0.14)	0.16 (0.09-0.26)	0.20 (0.13-0.27)	0.001
Aurora B/李蛋白	0.45 (0.20-0.89)	0.64 (0.40-1.42)	0.82 (0.46-1.05)	0.20
H3S10ph/Ki67	0.02 (0.01-0.04)	0.03 (0.02-0.04)	0.04 (0.03-0.07)	0.0002

[0290] [†] Jonckheere-Terpstra 检验

[0291] * 标记指数 (表示为百分数)

[0292] [‡] 中值 (四分位数间距)

[0293] ^Ω 143 例中 19 例 (13%) 是不可分级的。

[0294] 表 13 : 生物标记物和肿瘤阶段之间的关系 ^Ω

[0295]

生物标记物	阶段 1 (n=48)	阶段 2,3,4 (n=94)	p- 值 [†]
Ki67*	52 (43-69) [‡]	62 (43-72)	0.20
Mcm2*	76 (60-86)	82 (68-91)	0.11
孕蛋白 *	12 (8-17)	16 (8-24)	0.10
Aurora A*	12 (6-20)	17 (11-27)	0.006
Aurora B*	7 (4-12)	10 (4-17)	0.06
H3S10ph*	1.3 (0.8-2.2)	2.2 (1.3-3.5)	0.002
Mcm2/Ki67	1.3 (1.1-1.5)	1.3 (1.1-1.5)	0.39
孕蛋白 /Ki67	0.24 (0.16-0.30)	0.25 (0.18-0.36)	0.24
Aurora A/Ki67	0.21 (0.15-0.33)	0.30 (0.19-0.43)	0.003
Aurora A/孕蛋白	1.0 (0.6-1.4)	1.2 (0.8-1.6)	0.04
Aurora B/Ki67	0.14 (0.08-0.22)	0.17 (0.11-0.26)	0.13
Aurora B/孕蛋白	0.75 (0.40-1.02)	0.68 (0.37-1.07)	0.76
H3S10ph/Ki67	0.03 (0.02-0.04)	0.04 (0.02-0.06)	0.005

[0296] [†] Mann-Whitney 检验

[0297] * 标记指数 (表示为百分数)

[0298] [‡] 中值 (四分位数间距)

[0299] [§] 1 个病例由于丢失阶段信息而被排除在分析外。

[0300] 表 14 : 生物标记物和无疾病存活之间的关系

[0301]

生物标记物	风险比 (95% CI)	p- 值 [†]
Ki67*	1.07 (0.95 to 1.22)	0.25
Mcm2*	1.13 (0.98 to 1.29)	0.09
孕蛋白*	1.17 (0.93 to 1.47)	0.19
Aurora A*	1.29 (1.06 to 1.58)	0.01
Aurora B*	1.19 (0.95 to 1.49)	0.13
H3S10ph [°]	1.76 (1.08 to 2.88)	0.02
Mcm2/Ki67	0.79 (0.45 to 1.41)	0.42
孕蛋白/Ki67 [^]	1.09 (0.90 to 1.32)	0.38
Aurora A/Ki67 [^]	1.20 (1.06 to 1.36)	0.004
Aurora A/孕蛋白	1.23 (0.97 to 1.56)	0.09
Aurora B/Ki67 [^]	1.22 (1.03 to 1.45)	0.02
Aurora B/孕蛋白	1.38 (0.98 to 1.96)	0.07
H3S10ph/Ki67 [°]	1.58 (0.96 to 2.57)	0.07

[0302] [†]对数秩检验

[0303] *风险比是指生物标记物百分数绝对增加 10%。

[0304] ^ 风险比是指比值绝对增加 0.1。

[0305] ° 变量高度偏移, 因此在中值 (对于 H3S10ph 是 1.99, 对于 H3S10ph/Ki67 是 0.032) 处将其分成两类。每个变量的风险比是较高组比较低组。

[0306] 对于其他变量, 风险比是指增加 1 个单位。

[0307] 表 15: 细胞周期表型和临床病理参数之间的关系

[0308]

	I (离开周期)	II (在周期G1延迟停滞)	III (活性周期)
	Mem2 ≥ 30%	Mem2 ≥ 30%	Mem2 ≥ 30%
		李蛋白 ≥ 7%	李蛋白 ≥ 7%
	N=33 (18%)	N=44 (24%)	N=105 (58%)
年龄-均值 (±d) (p=0.13)	61.9 (12.4)	61.2 (14.1)	57.4 (13.9)
分级 (p<0.001)*			
1	27% (9/33)	23% (10/44)	5% (5/105)
2	61% (20/33)	64% (28/44)	39% (32/105)
3	12% (4/33)	14% (6/44)	65% (68/105)
大小-均值 (±d) (p=0.55)	24.7 (17.5)	29.1 (19.8)	28.0 (17.4)
阳性结节 (p=0.23)	39% (12/31)	33% (13/40)	48% (47/98)
NPI - 均值 (±d) (p<0.001)	3.8 (1.3)	4.0 (1.2)	4.9 (1.2)
ER - vs 病例 † (p=0.08)	100% (73.9% - 100%)	100% (100% - 100%)	38.9% (0% - 100%)
PR - vs 病例 † (p=0.14)	72.4% (35.8% - 100%)	93.2% (47% - 100%)	18.3% (0% - 97.8%)
Her-2			
0	66.7% (22/33)	68.2% (30/44)	53.3% (56/105)
1+	15.2% (5/33)	18% (8/44)	19% (20/105)
2+	9.1% (3/33)	4.5% (2/44)	7.6% (8/105)
3+	9.1% (3/33)	9.1% (4/44)	20% (21/105)
(p=0.45)			

[0309] †中值 (四分位数间距)

[0310] *显著相关性局限于表型III

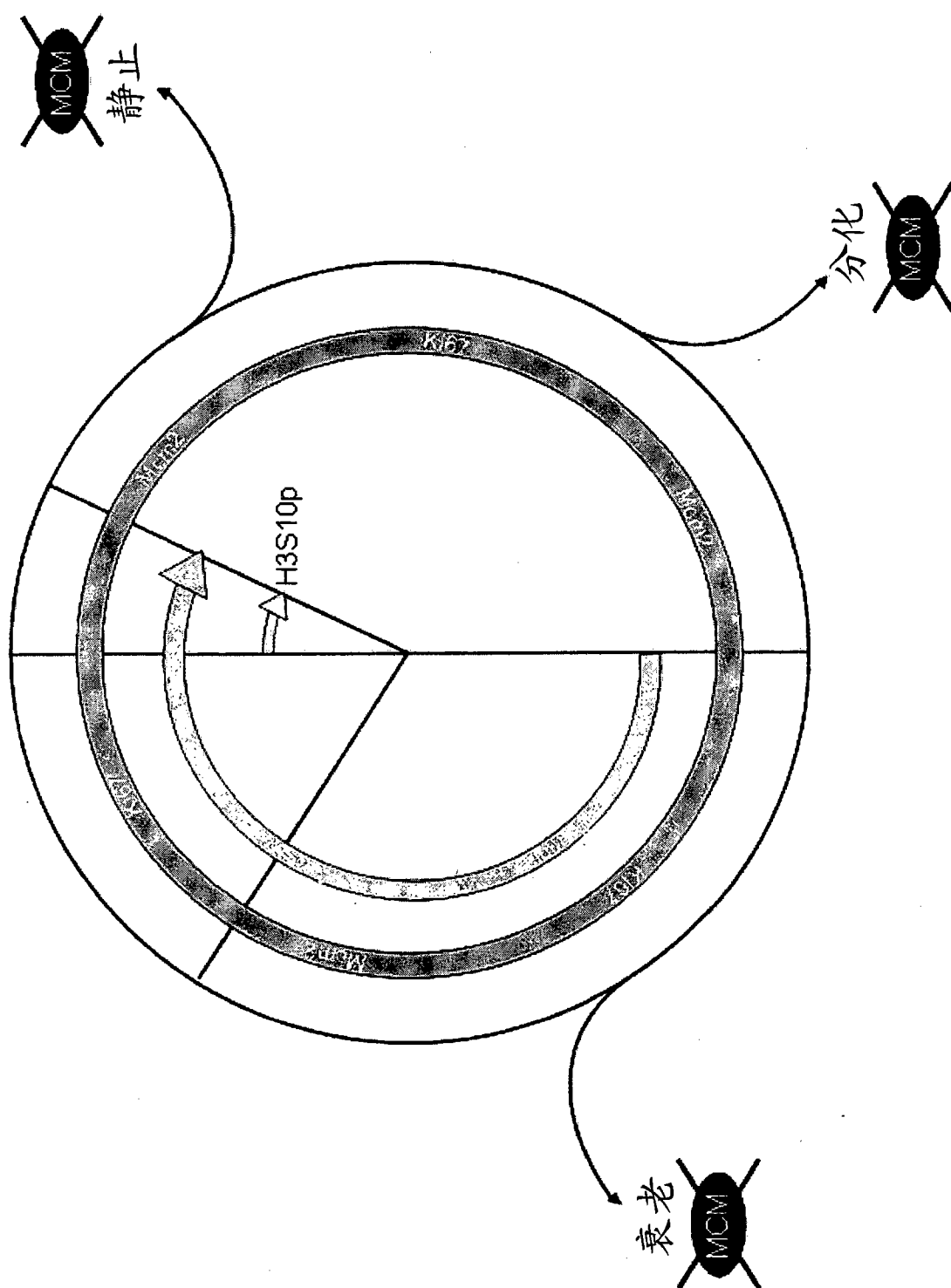


图 1

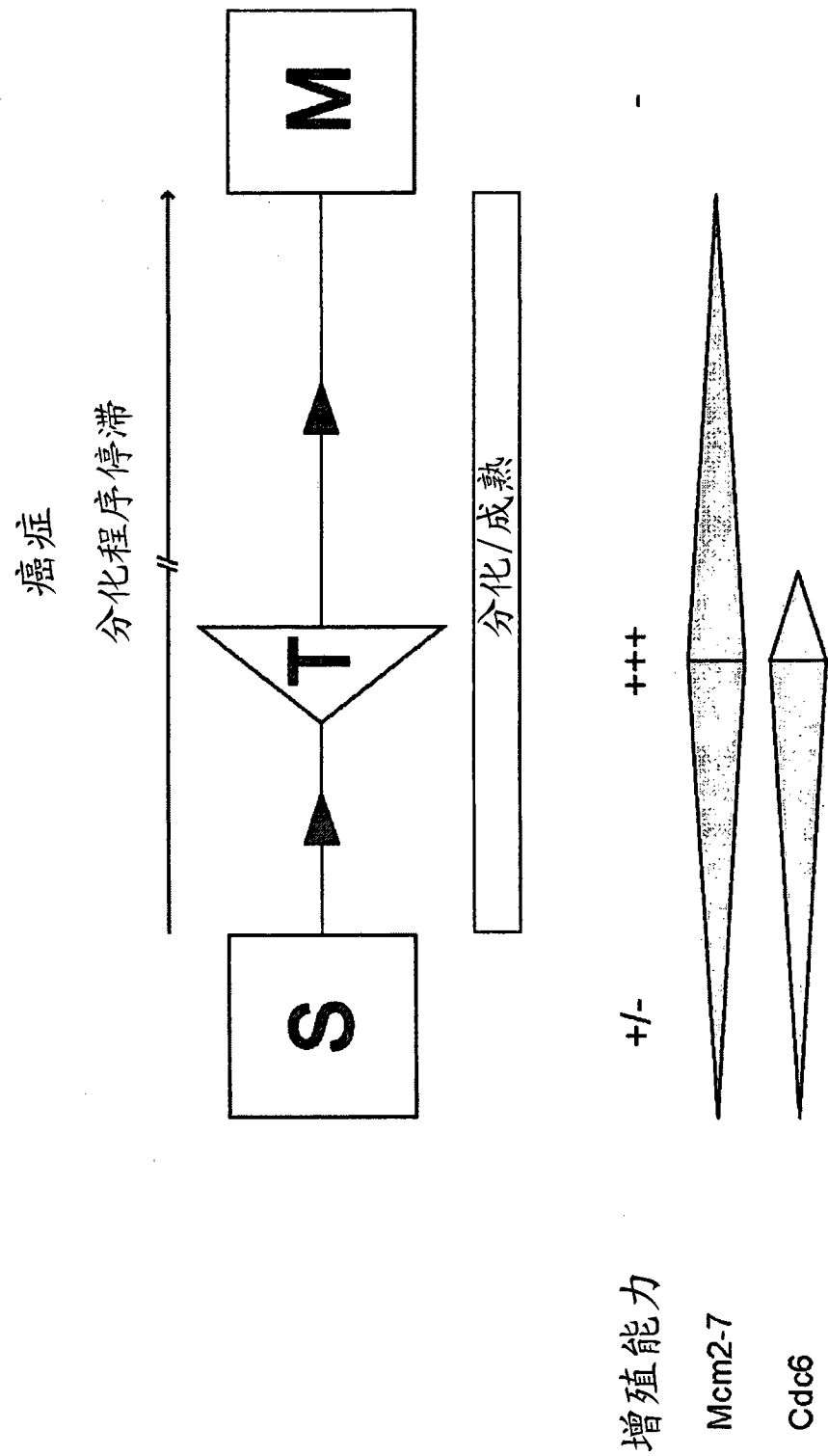


图 2

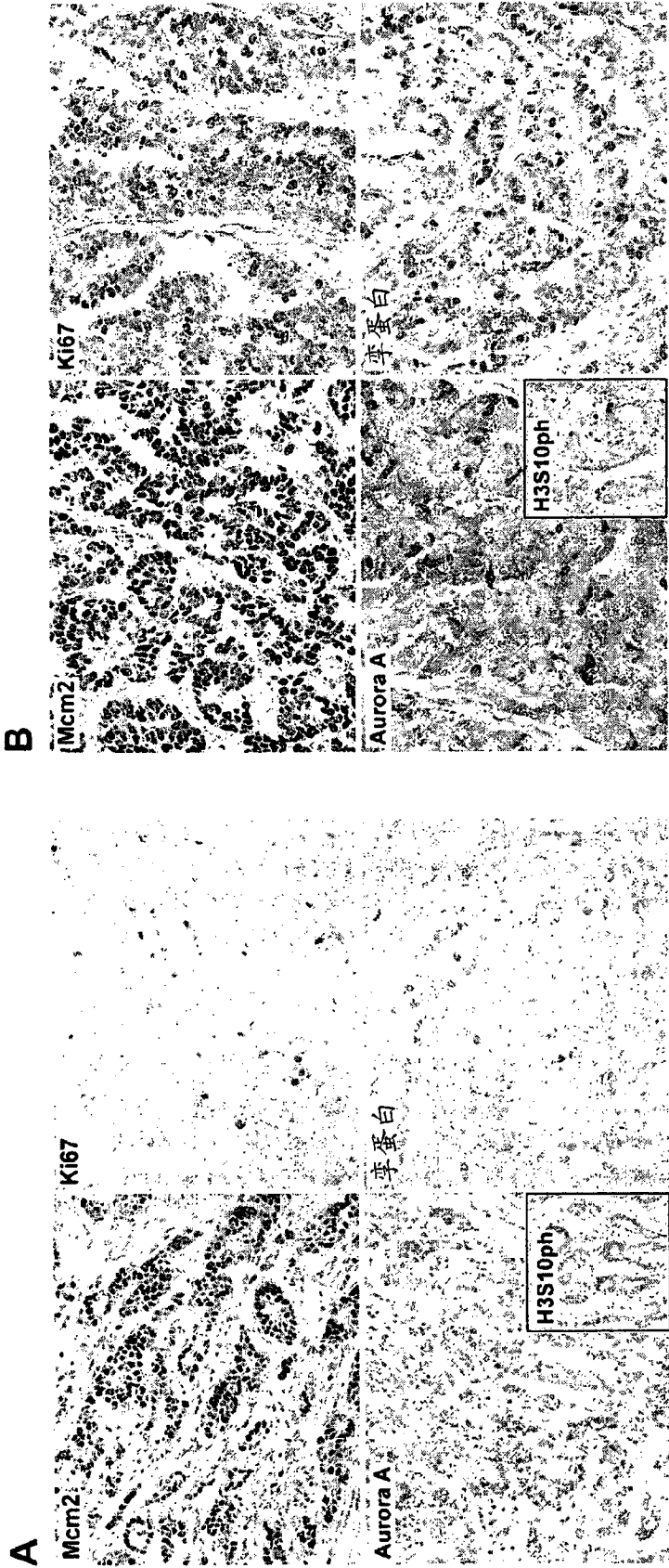


图 3

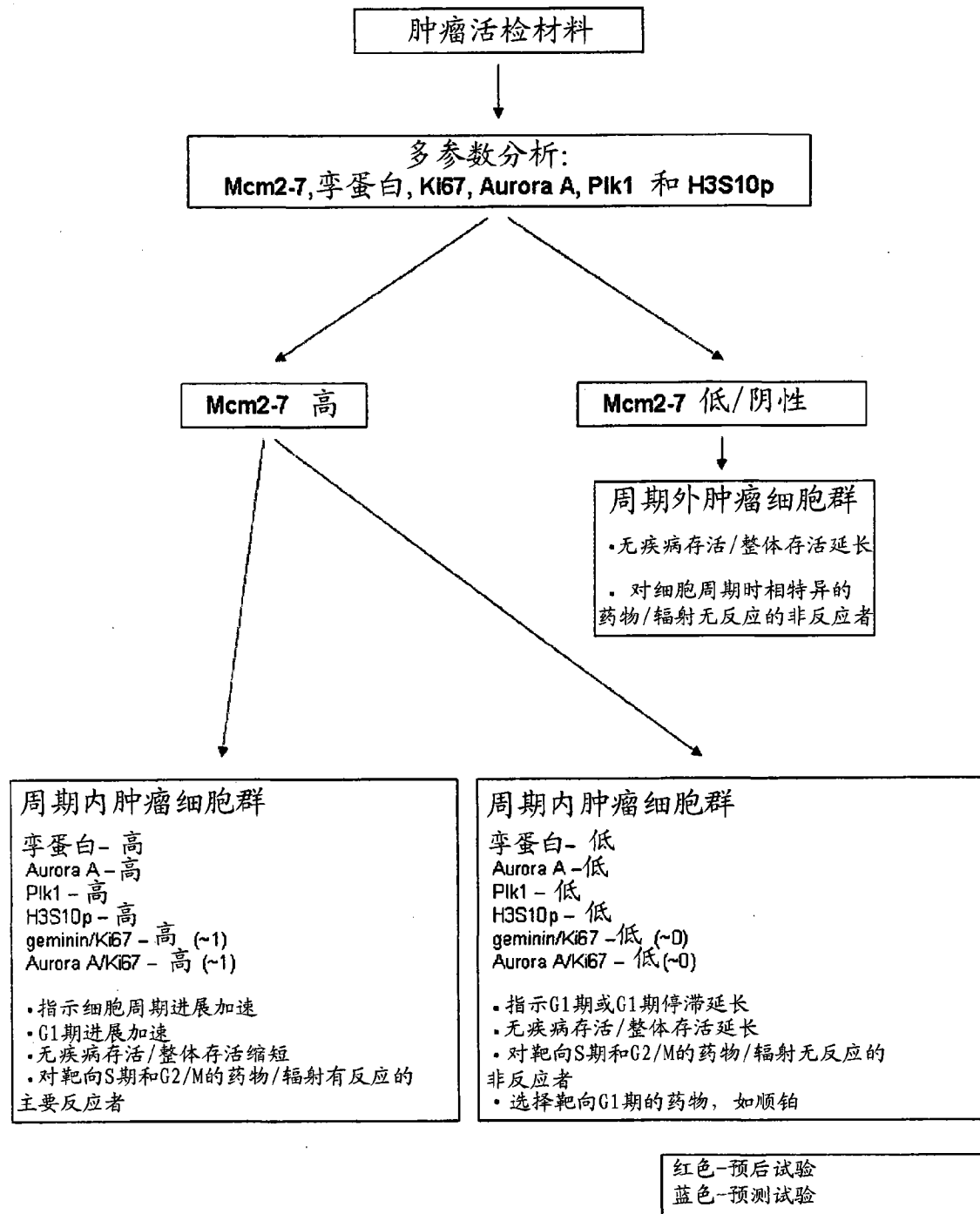


图 4

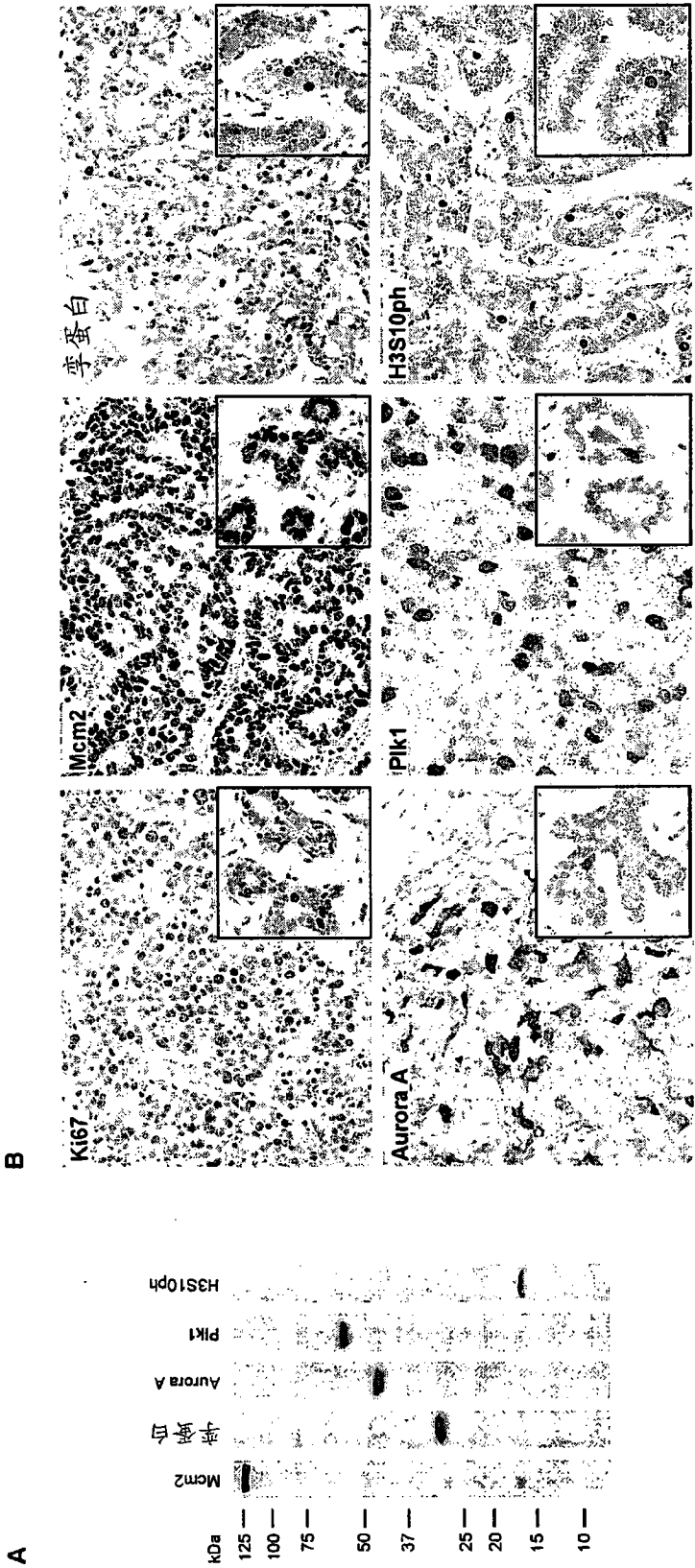


图 5

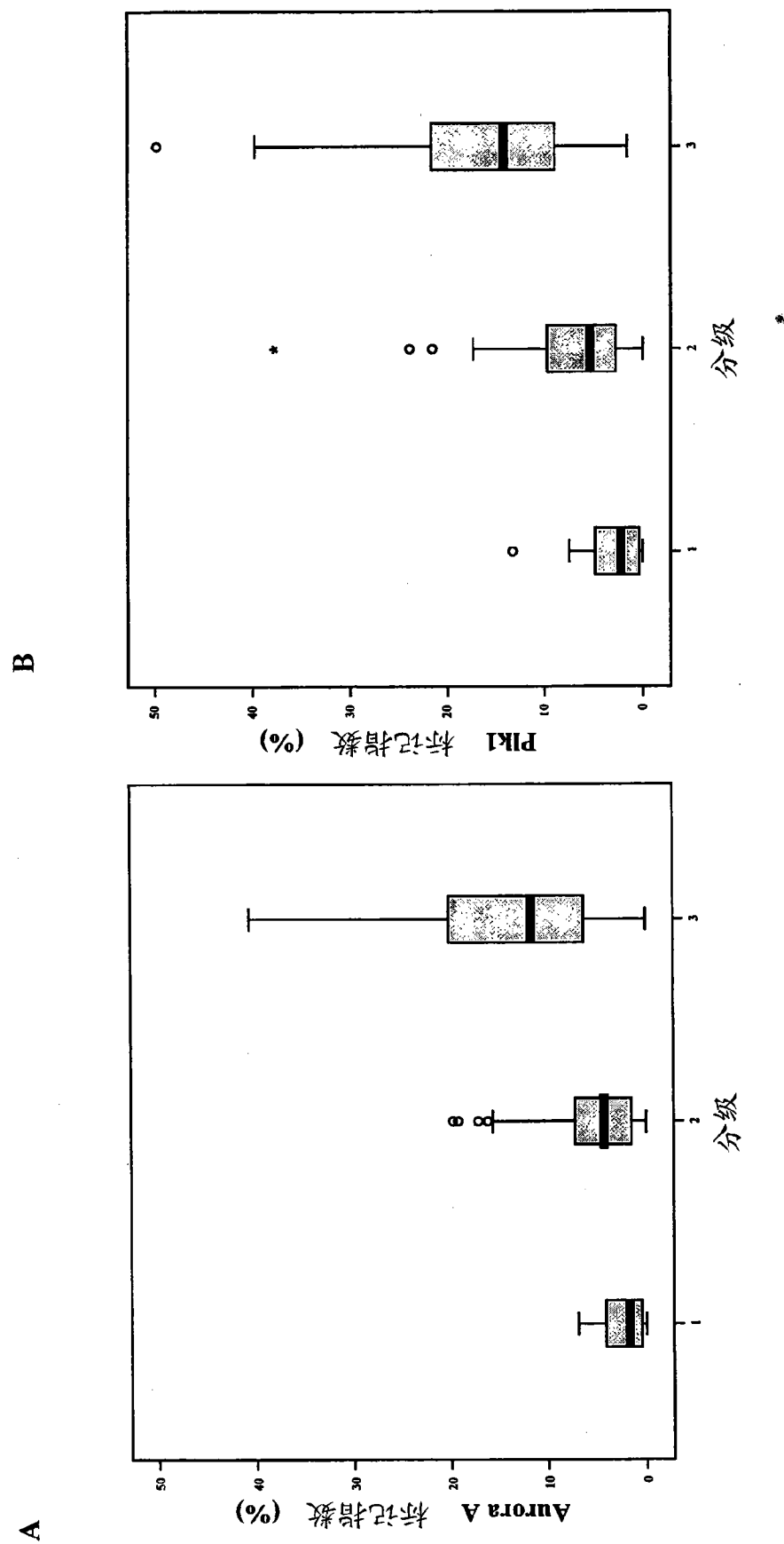


图 6

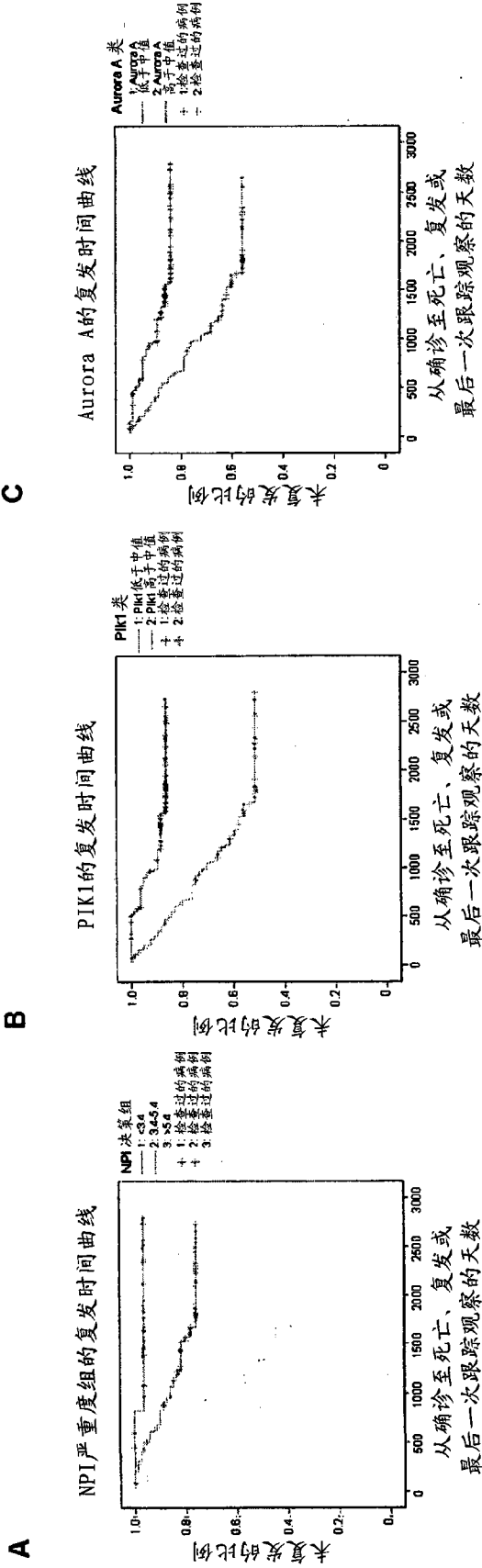


图 7

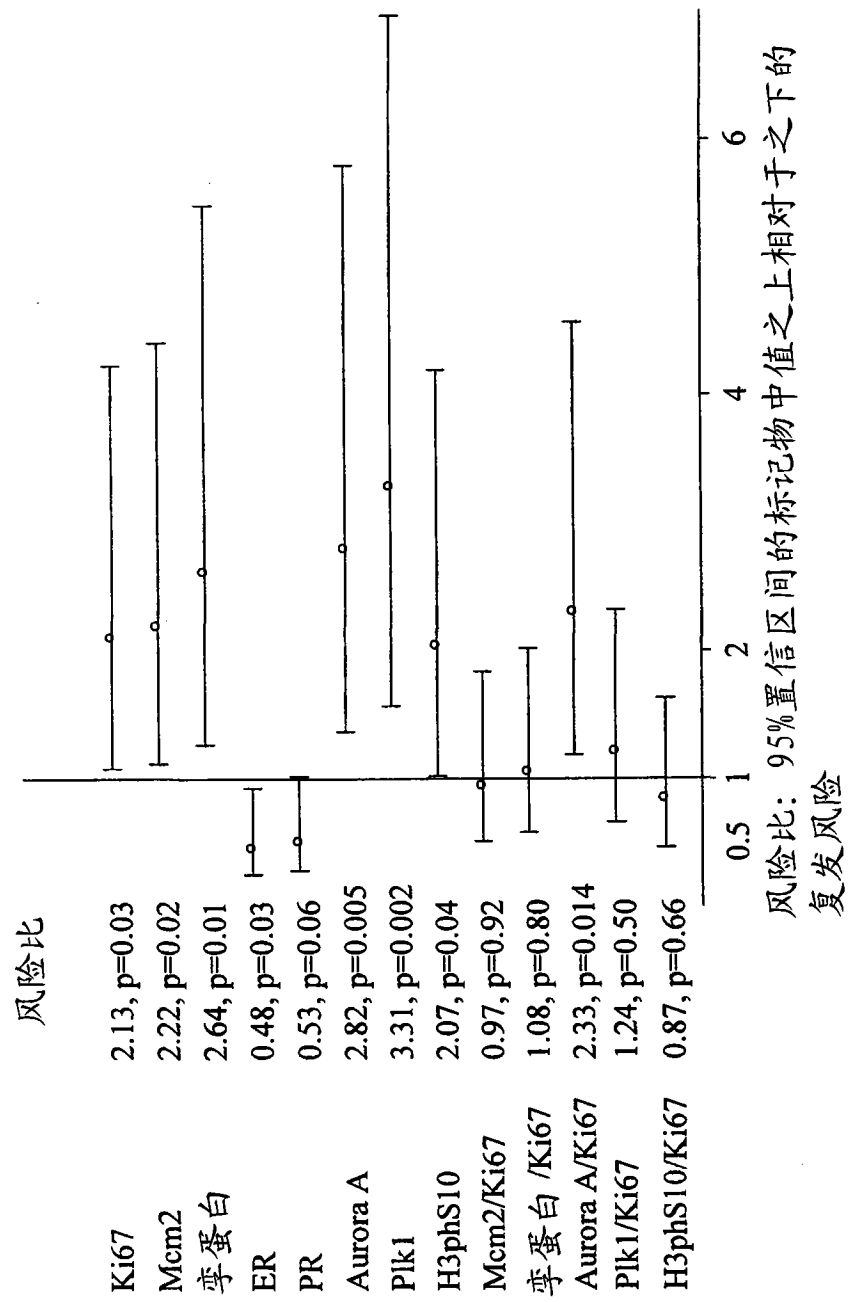
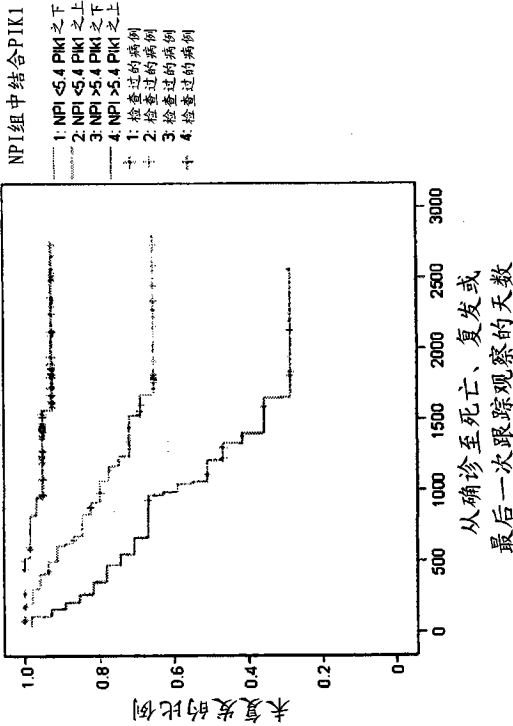


图 8

A

NPI和PIK1的复发时间曲线



B

NPI和Aurora A的复发时间曲线

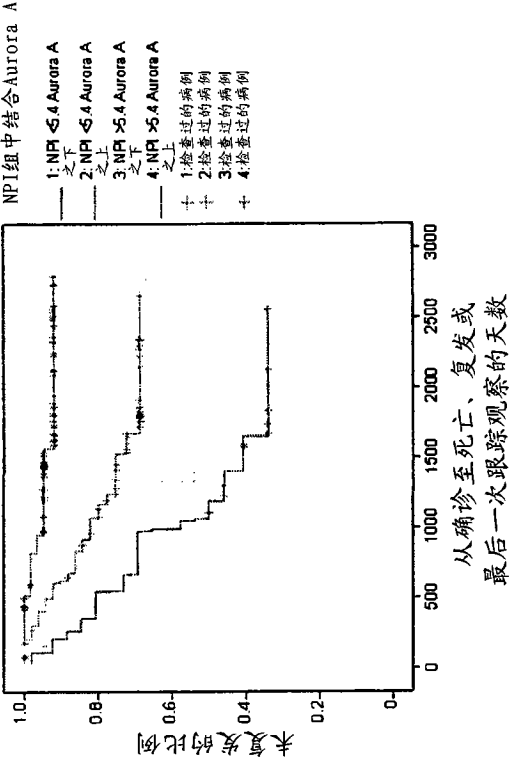


图 9

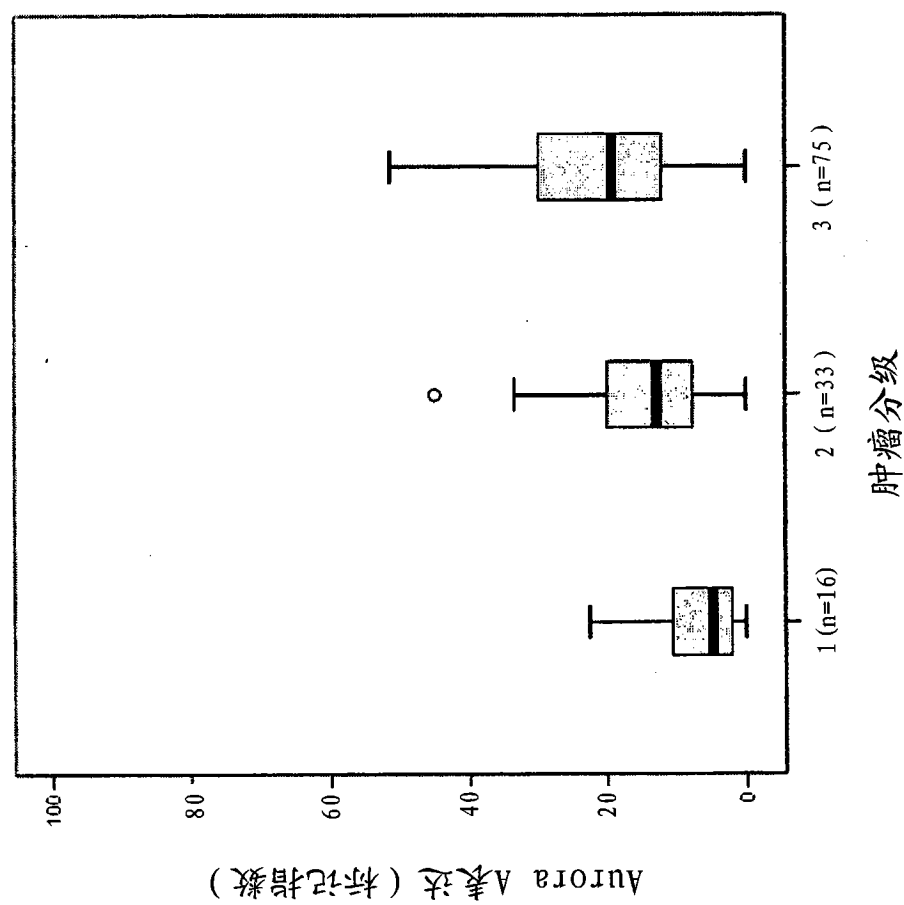


图 11

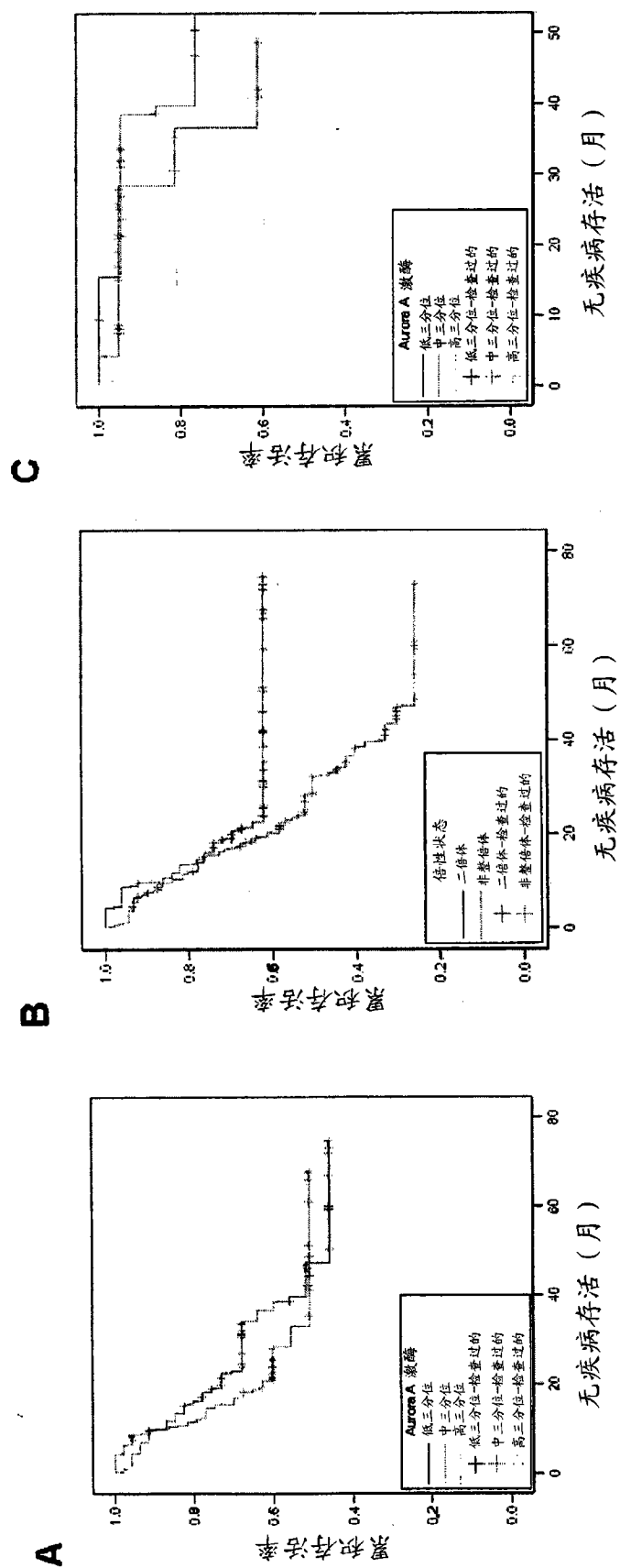


图 12

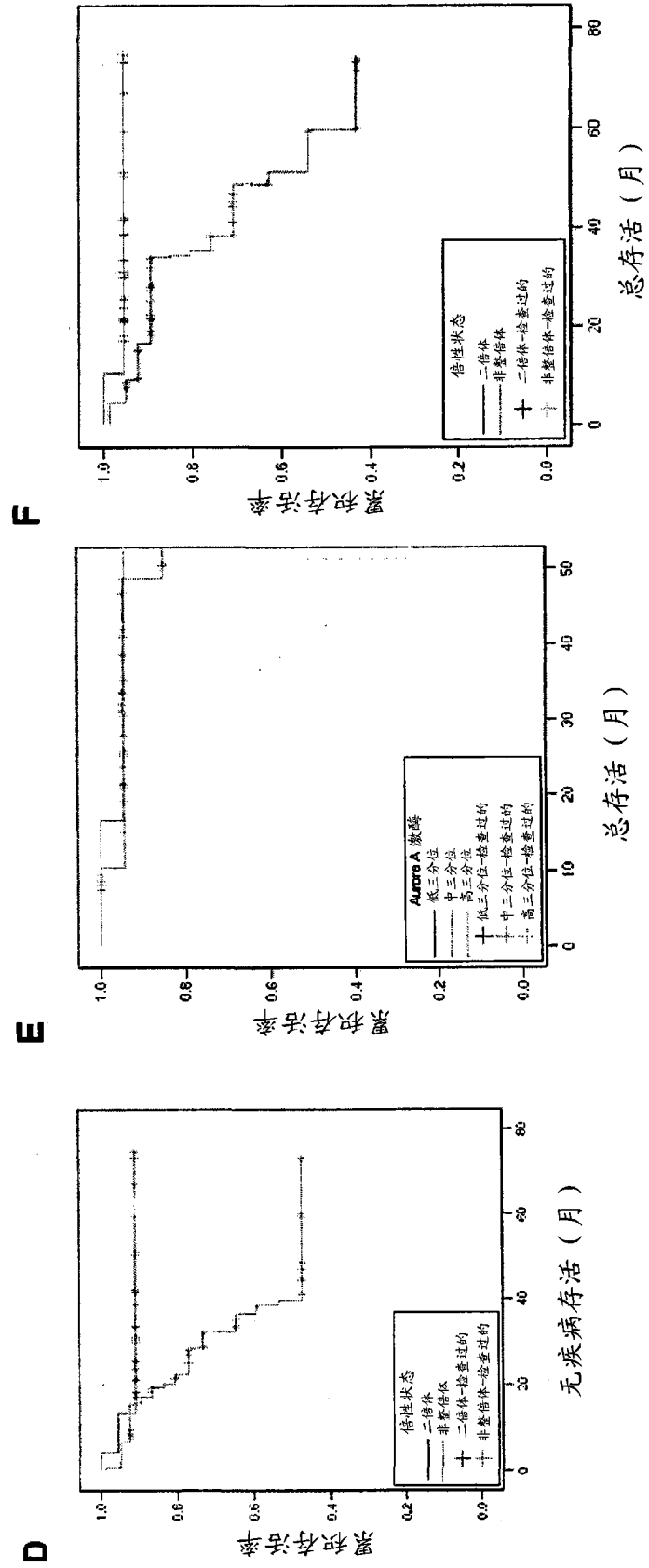


图 12(续)

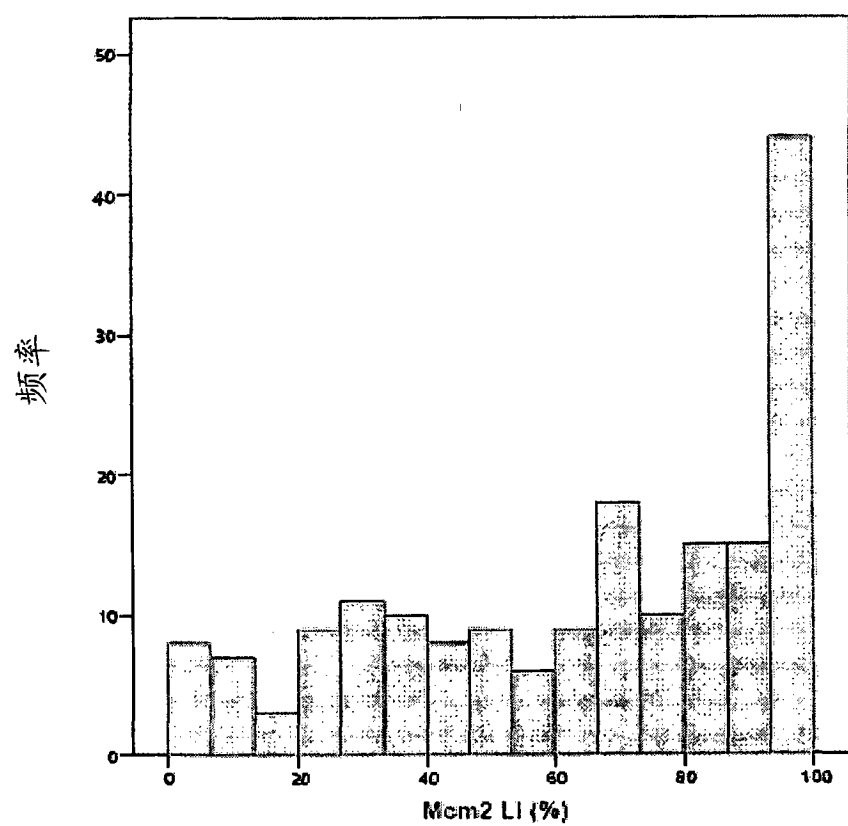


图 13

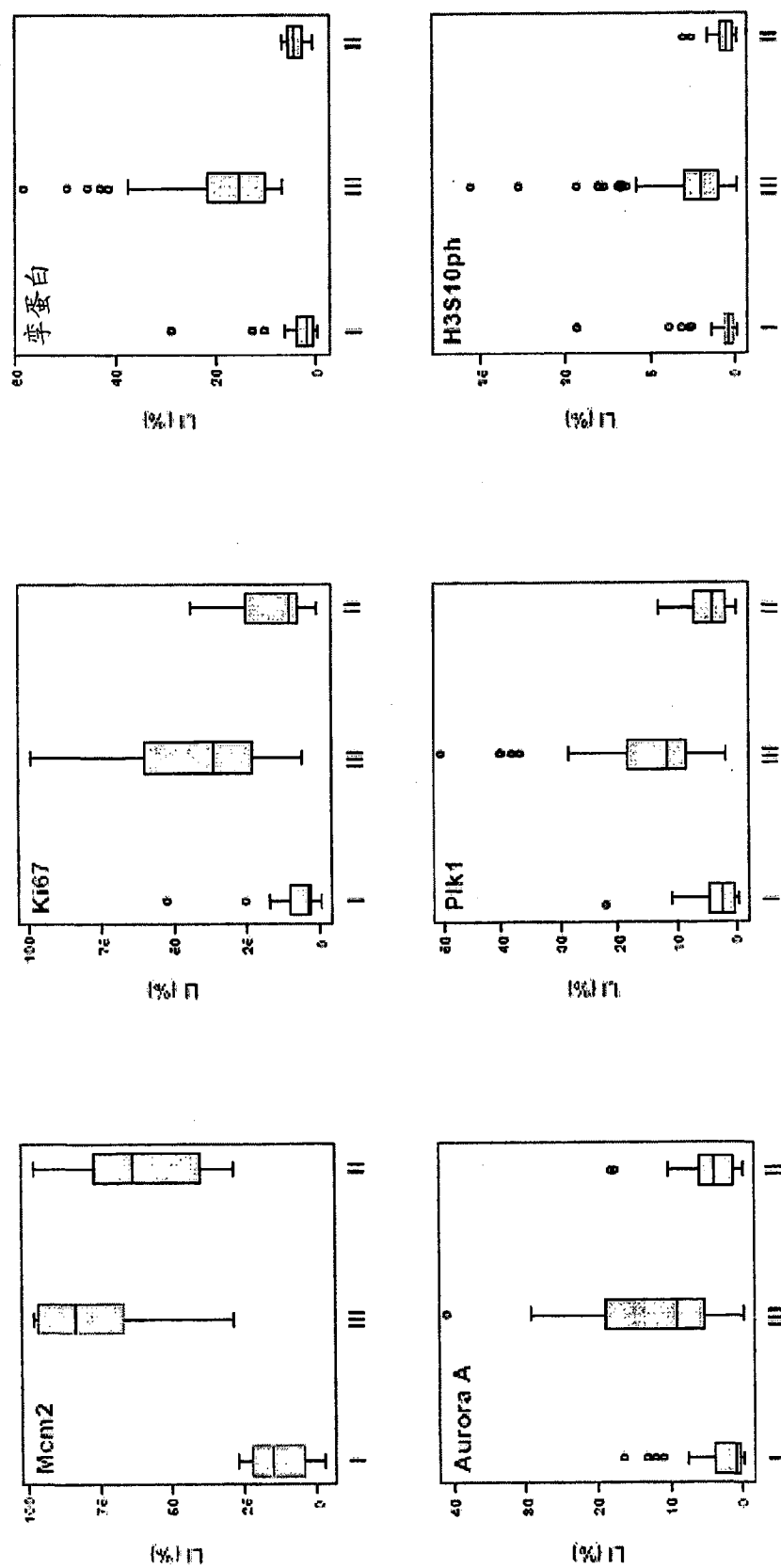


图 14

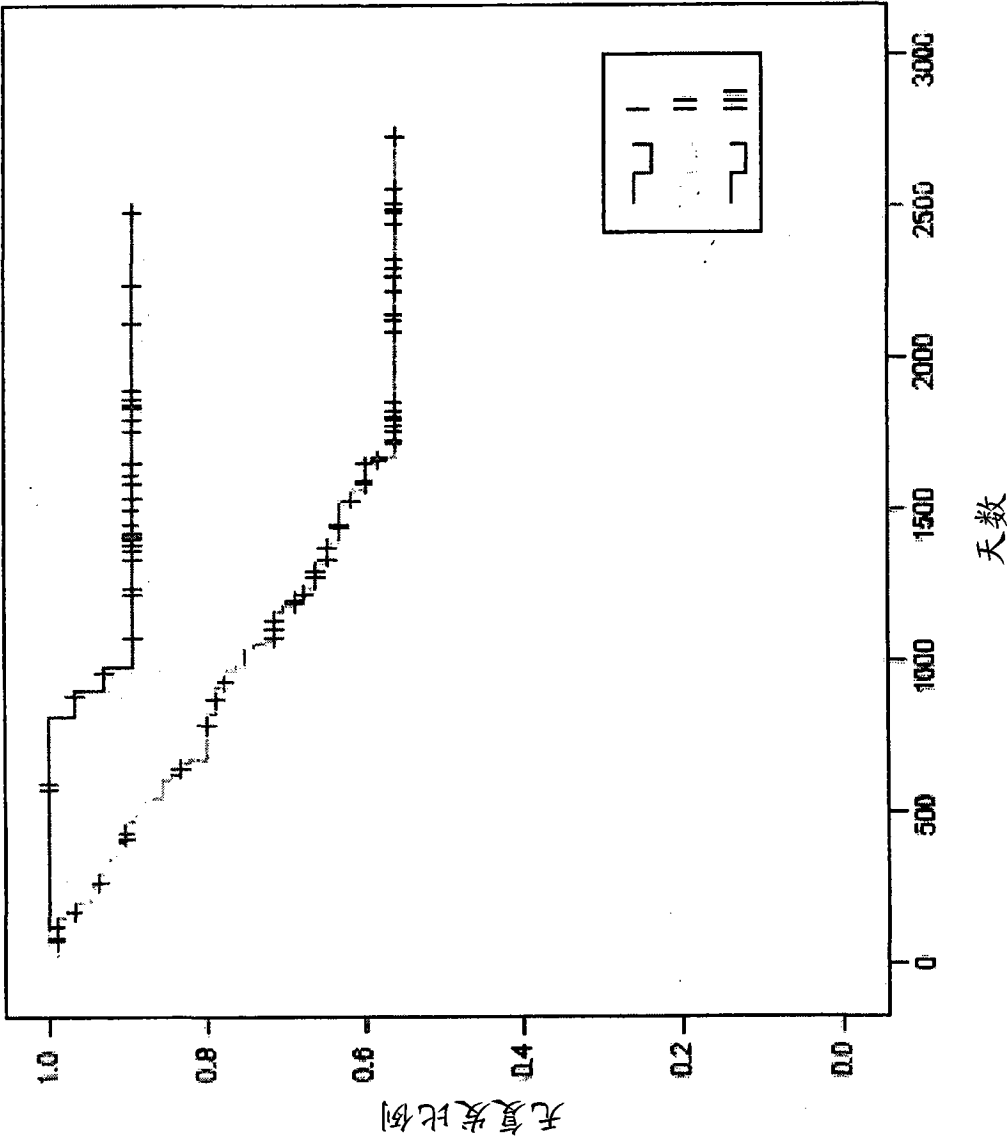


图 15

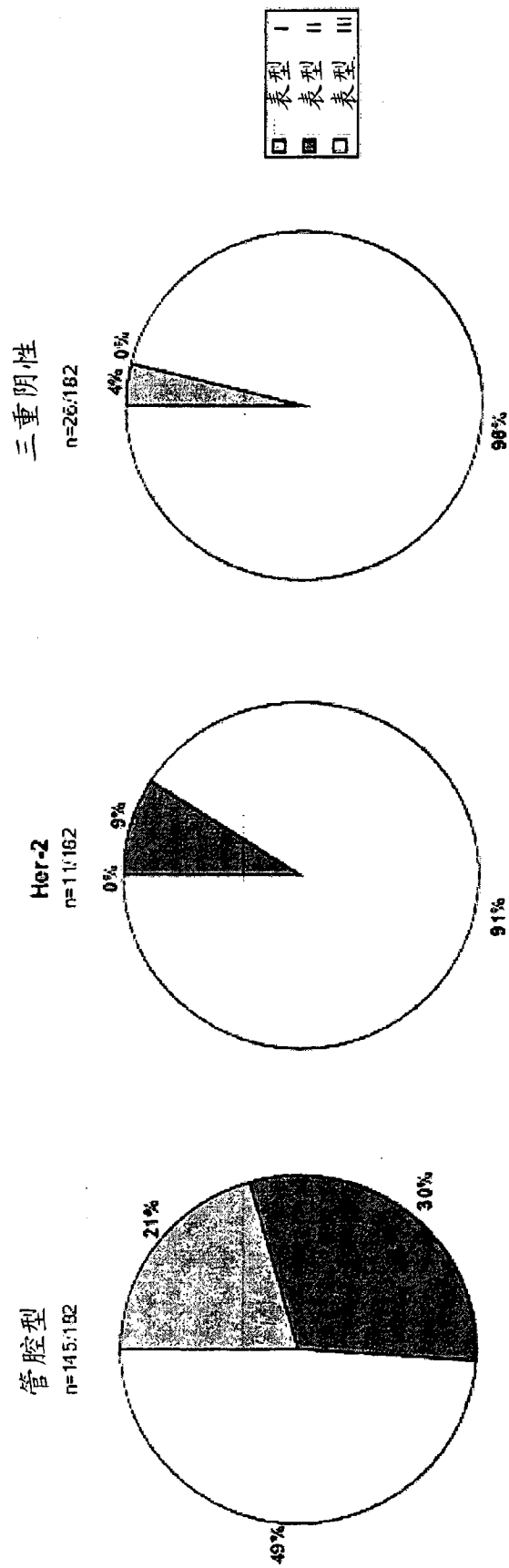


图 16