



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201400498 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：102115935

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 03 日

(51)Int. Cl.：

C07K14/435 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

(30)優先權：2012/05/04

美國

13/464,174

2013/03/13

美國

13/800,741

(71)申請人：天普大學(美國) TEMPLE UNIVERSITY OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF
HIGHER EDUCATION (US)

美國

(72)發明人：章 法蘭克 N CHANG, FRANK N (US)；塔絲竹司基 喬治 P TUSZYNSKI,
GEORGE P (US)

(74)代理人：詹銘文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：59 項 圖式數：6 共 66 頁

(54)名稱

做為癌症生物標記之 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1

G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING PROTEIN 1 AS A CANCER
BIOMARKER

(57)摘要

本發明提供一種判定個體是否存在早期癌症之方法，包括藉由偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量來偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。因為癌症可在早期偵測到，所以可在癌症達到晚期之前(例如在發展出明顯症狀之前)起始治療性靶向。本發明提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制早期癌症進展為晚期癌症。本發明開發了一種能夠偵測濃度小於 1 奈克/毫升之 GASP-1 肽片段的競爭性酶聯免疫吸附分析。

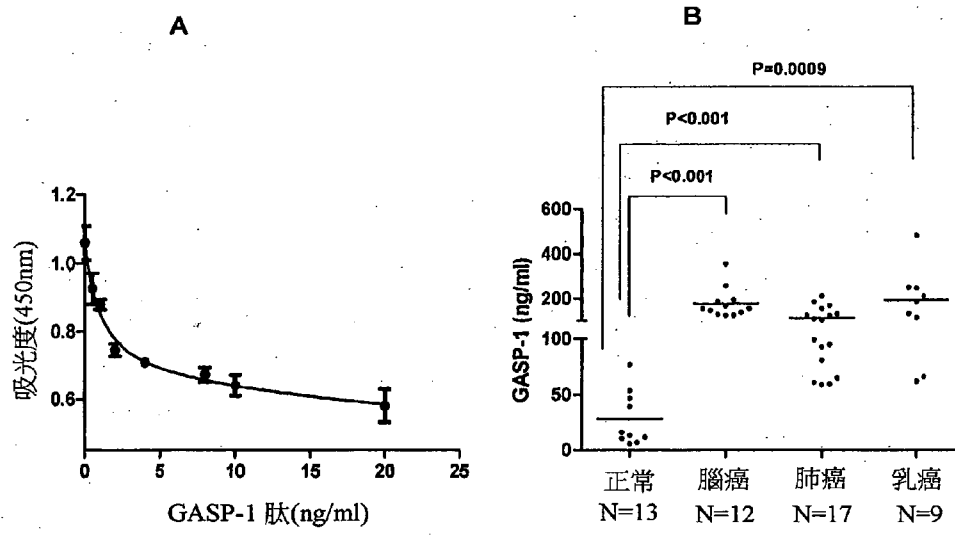


圖 1



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201400498 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：102115935

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 05 月 03 日

(51)Int. Cl.：

C07K14/435 (2006.01)

G01N33/53 (2006.01)

G01N33/574 (2006.01)

(30)優先權：2012/05/04

美國

13/464,174

2013/03/13

美國

13/800,741

(71)申請人：天普大學(美國) TEMPLE UNIVERSITY OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF
HIGHER EDUCATION (US)

美國

(72)發明人：章 法蘭克 N CHANG, FRANK N (US)；塔絲竹司基 喬治 P TUSZYNSKI,
GEORGE P (US)

(74)代理人：詹銘文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：59 項 圖式數：6 共 66 頁

(54)名稱

做為癌症生物標記之 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1

G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING PROTEIN 1 AS A CANCER
BIOMARKER

(57)摘要

本發明提供一種判定個體是否存在早期癌症之方法，包括藉由偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量來偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。因為癌症可在早期偵測到，所以可在癌症達到晚期之前(例如在發展出明顯症狀之前)起始治療性靶向。本發明提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制早期癌症進展為晚期癌症。本發明開發了一種能夠偵測濃度小於 1 奈克/毫升之 GASP-1 肽片段的競爭性酶聯免疫吸附分析。

發明摘要

※ 申請案號：102/115935

※ 申請日：102.5.3

※IPC 分類：

C07K 14/435(2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574(2006.01)

【發明名稱】

做為癌症生物標記之 G-蛋白耦合性受體關聯排序蛋白 1

G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING
PROTEIN 1 AS A CANCER BIOMARKER

【中文】

本發明提供一種判定個體是否存在早期癌症之方法，包括藉由偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量來偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。因為癌症可在早期偵測到，所以可在癌症達到晚期之前（例如在發展出明顯症狀之前）起始治療性靶向。本發明提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制早期癌症進展為晚期癌症。本發明開發了一種能夠偵測濃度小於 1 奈克/毫升之 GASP-1 肽片段的競爭性酶聯免疫吸附分析。

【英文】

A method for determining whether early stage cancer is present in a subject comprises detecting the expression level of GASP-1 in the subject by detecting the amount of GASP-1 peptide fragments present in a biological sample of the subject. Because cancer can be detected at an early stage, therapeutic targeting

may be initiated before cancer reaches late stage (e.g., before the development of overt symptoms). A method for treating early stage cancer in a subject comprises administering to the subject an effective amount of a GASP-1 inhibitor to inhibit the progression of early stage cancer to late stage cancer. A Competitive ELISA capable of detecting GASP-1 peptide fragments at a concentration of less than 1 ng/ml was developed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 1。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

may be initiated before cancer reaches late stage (e.g., before the development of overt symptoms). A method for treating early stage cancer in a subject comprises administering to the subject an effective amount of a GASP-1 inhibitor to inhibit the progression of early stage cancer to late stage cancer. A Competitive ELISA capable of detecting GASP-1 peptide fragments at a concentration of less than 1 ng/ml was developed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 1。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

做為癌症生物標記之 G-蛋白耦合性受體關聯排序蛋白 1

G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING
PROTEIN 1 AS A CANCER BIOMARKER

【技術領域】

【0001】 本發明是關於 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1 (G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1 , GASP-1)、其肽片段及 GASP-1 核酸作為早期或晚期癌症生物標記之用途，以及所述生物標記用於判定個體之診斷、預後或治療性治療(therapeutic treatment)之用途。

【先前技術】

【0002】 在未來十年內，預計生物標記會顯著改變藥物發現及開發之效率及經濟效益。製藥工業將其焦點自簡單地區分治療性反應者/無反應者群體之生物標記轉移至鑑別自身經證實為治療性標靶之新生物標記。據估計，若生物標記資料可促進藥物開發方法中僅 10%之重大決策，則每種藥物可節約多達\$1 億(巴頓(Barton), 2006)。估計到 2014 年全球生物標記市場可達\$205 億，自 2009 年至 2014 年以約 20%之 CAGR 增長。市場發展主要由藥物發現及開發對生物標記之高度需求來驅動。

【0003】 目前，腫瘤學是疾病生物標記研究及開發中最活躍的領域，主要是因為癌症療法通常提供用於新療法開發中之生檢及手術切除組織。舉例而言，伊馬替尼（*imatinib*）靶向因染色體易位（*chromosomal translocation*）而產生之酶，發現所述染色體易位與慢性骨髓性白血病（*chronic myelogenous leukemia*）關聯（德魯克（*Druker*），2004；巴塞爾加（*Baselga*），2006）。在乳癌中，使用雌激素受體之表現作為用於預後之生物標記且鑑別可能受益於抗雌激素療法之女性（達菲（*Duffy*），2005；阿拉亞茲（*Ariazi*）等人，2006），而 HER2（生長因子受體）之過表現作為用於預後及用於曲妥珠單抗（*trastuzumab*）治療之生物標記（妍及皮格勒姆（*Yeon and Pegram*），2005；達菲，2005；巴塞爾加，2006）。然而，儘管有這些顯著的成就，但相對少數的患者曾受益於生物標記指導療法，因為僅在百分之幾的群體中鑑別到大部分生物標記，且極少數經充分證實為藥物標靶。大部分候選生物標記未曾越過發現階段，且經證實用於藥物開發或適於臨床應用之生物標記數目仍極小（達菲，2005；海斯（*Hayes*），2005；葛氏巴利尼（*Gasparini*）等人，2006）。亟需鑑別作為治療性標靶之更多生物標記，尤其是早期癌症生物標記，且開發可有益於其餘癌症患者之藥物。

【0004】 生物標記研究蓬勃發展，此主要歸因於使用著重於鑑別患病與正常狀態之間的蛋白質結構及豐度的差異之蛋白質體方法。一旦鑑別出，這些生物標記蛋白可用於開發診斷工具，且因為其為功能分子，所以其亦更有可能作為有效治療性標靶。

【0005】 血漿中大量蛋白質之可得性及存在使其成為極佳基質，因此在其中尋找新生物標記。然而，人類血清中多種蛋白質

濃度之估計動態範圍(estimated dynamic range)為至多 10 個數量級 (庫塞爾斯 (Corthals) 等人, 2000), 使得個別疾病關聯蛋白之快速鑑別成為極大的分析難題。雖然總血清蛋白質濃度為約 70-90 毫克/毫升, 但大部分有用生物標記 (諸如細胞激素及前列腺特異性抗原) 以皮克範圍存在, 且可預期疾病特異性變化逐漸變小, 尤其在疾病初期 (邁樂 (Merrell) 等人, 2004)。綜合這些問題, 許多疾病特異性蛋白質 (例如癌症生物標記) 在細胞內部由蛋白水解酶降解, 產生肽片段, 隨後釋放至血液中。因為在自然界中為低分子量, 所以這些肽片段一般半衰期僅為約兩個小時且其中大部分由腎臟自循環清除 (勞溫賽爾 (Lowenthal) 等人, 2005)。

【0006】 為了克服由可能有用肽之低濃度及快速代謝迴轉 (turnover) 所產生之難題, 已研究蛋白質及肽之白蛋白關聯部分作為有用新疾病特異性生物標記之來源。為最豐富的血漿蛋白 (40-50 毫克/毫升) 的白蛋白作為用於結合細胞間隙中之小分子、脂質以及蛋白質的骨架。已發現與以下物質形成複合物: 肽激素, 諸如胰島素及升糖素; 尤其是緩激肽、血清類澱粉蛋白 A、干擾素、HIV-1 之胺基端肽、gp41 以及鏈球菌蛋白 G 之 14 kDa 片段。有趣的是, 發現少量百分比之來自經降解之癌症蛋白質的分泌性肽片段對於血清白蛋白複合物具有高親和力, 此使其半衰期延長至約 19 天 (勞溫賽爾等人, 2005)。藉由其與血清白蛋白關聯形成複合物, 這些癌症相關肽片段 (癌症肽基元 (cancer peptide motifs)) 之壽命可延長約 60 倍至 100 倍 (丹尼斯 (Dennis) 等人, 2002)。由於其對於所述各種配位體之高親和力, 預期血清白蛋白群體高度異質, 很可能包括數百種不同白蛋白複合物。

【0007】 目前使用之技術被設計成用以分離蛋白質或肽且其無法用於分離血清白蛋白複合物。舉例而言，目前用於蛋白質以及肽分離之技術包含電泳（一維及二維；毛細管等）、層析（逆相、離子交換、尺寸排除、親和力（affinity）等）以及溶劑沈澱。已使用這些多維分離技術之不同組合分離蛋白質之混合物。舉例而言，使用不同分離技術將樣品分離為個別斑點 (spot) 或部分 (fraction)，接著藉由質譜法分析所述個別蛋白質以確定其身分。亦開發了一種「鳥槍法 (shotgun)」策略，其中在不進行先前分離之情況下，由胰蛋白酶以蛋白分解方式將含有大量不同蛋白質之混合物的整個樣品（諸如血漿或血清）消化為肽（赫 (He) 等人, 2005）。接著藉由多維分離技術分離胰蛋白酶消化中之肽，接著藉由質譜法進行分析以確定樣品中存在之蛋白質的身分。希望這些多維分離技術將藉由除去高度豐富蛋白質之掩蔽作用來向低豐度蛋白質提供顯著敏感度增強，從而能夠更深地滲入血漿蛋白質體。然而，因為這些技術均不會分離血清白蛋白複合物，所以其尚未產生有用生物標記。

【0008】 即使是最廣泛使用之蛋白質分離技術，由奧弗萊爾 (O'Farrell) (1975) 引入之 2 維聚丙烯醯胺凝膠電泳 (2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis; 2-D PAGE) 亦無法分離血清白蛋白複合物，因為其通常在「變性」條件下進行。另外，2-D PAGE 具有許多其他缺點，包含需要大量樣品（每次實驗約 50 微克至 100 微克蛋白質）以及當分析血清時產生參差不齊且多半擴散之分佈圖。此外，藉由 2-D PAGE 分離之蛋白質需要「點樣 (blotted)」或轉移至點樣膜上，諸如用於西方墨點分析 (Western blot analysis)

之聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride ; PVDF)。蛋白質點樣之效率亦有不同。

【0009】 如 WO 2011/008746 中所述，本發明者開發了一種新電泳程序，其直接在 PVDF 膜上分離蛋白質複合物，由此繞過繁瑣、耗時之凝膠電泳以及其後續點樣步驟(常(Chang)及永安(Yonan), 2008 ; 常等人, 2009)。在本發明者之 2-D 高效液相電泳 (2-D High Performance Liquid Electrophoresis ; 2-D HPLE) 中分離白蛋白複合物是基於其淨電荷或等電點 (isoelectric point ; pI)。新產生之癌症肽片段(癌症肽基元)與原有白蛋白複合物之結合(association)改變其 pI 且此新複合物遷移至 PVDF 膜上之不同位置，從而允許在數百種已存在之白蛋白複合物中將其偵測出。因為其著重於疾病特異性蛋白質片段，所以所述技術不僅能夠鑑別新癌症蛋白質生物標記，而且能夠鑑別這些蛋白質中之癌症肽基元。當在進行 LC/MS/MS 分析之前使用 2-D HPLE 進行部分分離(fraction separation)時，其動態範圍增強至偵測低複本數癌症生物標記所需之範圍的 10^{10} 倍，此為先前使用其他蛋白質分離技術未達成之靈敏度。

【0010】 使用以 G 蛋白耦合性受體 (δ 類鴉片受體(delta opioid receptor)) 之羧基端尾作為誘餌之酵母雙雜交篩選，惠斯勒(Whistler) 等人，(2002) 發現其相互作用搭配物之一是 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1 (GASP-1)。後來發現 GASP-1 與許多其他 G-蛋白耦合性受體之胞質尾相互作用，包含 D2 多巴胺(dopamine) 受體/DRD2、 β -2 腎上腺素激導性受體/ADRB2 以及 D4 多巴胺受體/DRD4 (賽蒙因 (Simonin) 等人, 2004)。GASP-1 s

藉由靶向用於溶酶體降解及各種 G-蛋白耦合性受體 (GPCR) 之功能性下調的受體而與沉默信號有關。

【0011】 在惠斯勒等人 (2002) 之同一研究中，進行重要結構-功能實驗且將 GASP-1 之 C 端片段 (cGASP-1) 鑑別為結合於溶酶體之蛋白質的域(domain)。有趣的是，亦顯示 GASP-1 (cGASP-1) 之這些截短形式(truncated form)作為抑制 δ 類鴉片受體降解且促進其再循環之顯性陰性突變體(dominant negative mutant)。這些實驗首次證明了 GASP-1 具有調節 GPCR 之再循環或降解之能力。自此以後，已顯示多種 GPCR 之遷移 (trafficking) 由 GASP-1 調節 (摩瑟 (Moser) 等人, 2010)。

【0012】 如 WO 2011/008746 中所述，本發明者已使用 2-D HPLE 研究來自乳癌患者之血漿中的疾病特異性白蛋白複合物 (常等人, 2009; 圖申斯基 (Tuszynski) 等人, 2011)。在 2-D HPLE 後自 PVDF 膜切去自 I 期乳癌新鑑別出之血清白蛋白複合物之一且使其經受膜上胰蛋白酶消化。藉由個別肽之液相層析及串聯光譜法測序 (LC/MS/MS) 將癌症肽基元鑑別為 16 個胺基酸之序列 EEASPEAVAGVGFESK (SEQ ID NO: 1)。由虛擬胰蛋白酶肽資料庫之資料庫搜索以及胰蛋白酶肽之分段光譜 (fragmentation spectra) 確定蛋白質身分。此 16 個胺基酸之序列特異性地來自 GASP-1。先前尚無研究將 GASP-1 與癌症發病機制連結起來。然而，本發明者使用針對來自 GASP-1 之 16 個胺基酸之序列之多株抗體偵測癌症患者之腫瘤萃取物中 GASP-1 及其片段之表現 (常等人, 2009)。發現如藉由西方墨點分析所揭露，GASP-1 在所有 7 例晚期 (II 期及 III 期) 乳癌患者而非在相鄰正常組織中表現 (常等

人, 2009 ; 圖申斯基等人, 2011)。因此, 2-D HPLE 方法不僅發現 1,395 個胺基酸之 GASP-1 為晚期癌症的新蛋白質生物標記, 而且特定地鑑別出此蛋白質中之 16 個胺基酸殘基之癌症肽基元 (涵蓋胺基酸殘基 850 至 865)。

【0013】 目前, 關於用於偵測早期癌症之生物標記無可用之報導。人們經常被告知留意癌症之早期症狀。然而, 當症狀出現時, 許多腫瘤已增長的頗大且可能已轉移。此外, 許多癌症並無症狀。仍需要能夠在癌症發展最早期偵測、診斷以及治療癌症之早期癌症生物標記。

【發明內容】

【0014】 根據本發明之多種態樣, GASP-1、其肽片段、GASP-1 mRNA 或 GASP-1 cDNA 之表現量單獨或作為微陣列或 PCR 陣列之一部分可用作提供關於許多癌症之存在、進展以及轉移性可能性之早期資訊的診斷工具或生物標記。本發明之一實施例提供一種判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法, 包括偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。本發明之一例示性實施例提供一種判定個體是否存在早期癌症之方法, 包括偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。偵測個體中 GASP-1 之表現量可包括偵測個體之生物樣品中存在的諸如 EEASPEAVAGVGFESK (SEQ ID NO: 1) 之 GASP-1 肽片段之量。

【0015】 本發明之另一態樣是關於用於抑制癌症進展 (例如擴散) 目的之 GASP-1、其肽片段、GASP-1 iRNA (抑制性 RNA)、GASP-1 shRNA (短髮夾 RNA)、GASP-1 mRNA、GASP-1 cDNA

或 GASP-1 之相互作用搭配物(interacting partner)的治療性靶向(therapeutic targeting)。因為本發明之方法可偵測早期癌症，所以可在癌症達到晚期之前(例如在發展出明顯症狀之前)起始(initiate)治療性靶向。本發明之一實施例提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制早期癌症進展為晚期癌症。

【0016】 本發明進一步提供一種用於偵測生物樣品中之 GASP-1 及其片段的改良酶聯免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)，稱為「競爭性 ELISA」。「競爭性 ELISA」能夠偵測濃度小於 1 奈克/毫升之本發明之 GASP-1 肽片段。

【0017】 本發明之一個態樣提供一種判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，包括偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。在一個實施例中，所述癌症是早期癌症。所述早期癌症可由良性病狀、增生、發育不良(dysplasia)以及原位癌所組成的族群中選出。早期癌症可為早期乳癌。所述乳癌可為三陰性乳癌。所述方法可更包括將個體中 GASP-1 之表現量與無癌症個體中 GASP-1 之表現量進行比較。在上述方法中，偵測個體中 GASP-1 之表現量可包括偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量。所述生物樣品可由血液、尿液、脊髓液、羊水、血清、齦溝液(gingival, cervical fluid)、淚液、淋巴液、乳腺分泌物、黏液、唾液、精液、眼淚、陰道分泌物以及玻璃狀體液所組成的族群中選出。生物樣品可包括自個體獲得之癌前組織。上述方法可包括自個體之癌前組織獲得生物樣品，偵測所述生物樣品中存在之 GASP-1 肽片段之量，以及將生物樣品中存在之 GASP-1 肽片段之量與無癌組織中存在之

GASP-1 肽片段之量進行比較。偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量可包括使生物樣品與選擇性結合 GASP-1 肽片段之結合劑（例如抗體）接觸以及偵測結合於所述結合劑之 GASP-1 肽片段之量。GASP-1 肽片段可具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 1 及/或可包括約 6 個至約 30 個胺基酸。在上述方法中，偵測個體中 GASP-1 之表現量可包括偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 核酸之量。在一個實施例中，個體尚未發展晚期癌症。「競爭性 ELISA（Competitive ELISA）」可用於偵測個體中 GASP-1 肽片段之量，其中所述「競爭性 ELISA」能夠偵測生物樣品中存在之濃度小於 1 奈克/毫升的 GASP-1 肽片段。

【0018】 本發明之另一態樣提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制或停止早期癌症進展為晚期癌症。所述 GASP-1 抑制劑可包括對於 GASP-1 或其肽具有選擇性之抗體。GASP-1 抑制劑可包括對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之抗體。GASP-1 抑制劑可於醫藥學上可接受之載劑中投與。

【0019】 本發明之又一態樣提供一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括（i）在第一時間點偵測所述個體中 GASP-1 之表現量；（ii）在一個或大於一個後續時間點偵測個體中 GASP-1 之表現量；以及（iii）將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量進行比較。偵測個體中 GASP-1 之表現量可包括偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量。GASP-1 肽片段可具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 1。偵測個體中 GASP-1 之表現量可包括偵測

個體之生物樣品中存在的 GASP-1 核酸之量。在上述方法中，所述第一時間點可在治療方案之前且所述後續時間點可在所述治療方案期間，其中所述方法監測治療方案隨時間之有效性。

【0020】 本發明之另一態樣提供一種判定個體是否存在早期癌症之方法，包括：

偵測所述個體之生物樣品中 GASP-1 核酸之表現量，

其中個體尚未診斷患有晚期癌症，

其中與無癌症個體或無癌症生物樣品中 GASP-1 之表現量相比，個體中 GASP-1 核酸之較高表現量指示個體存在早期癌症。偵測 GASP-1 核酸之表現量的步驟可包括測定樣品中 GASP-1 mRNA 之量。樣品中 GASP-1 mRNA 之量可藉由例如 RT-qPCR 或 qPCR 來測定。所述方法可包括將個體中 GASP-1 mRNA 之表現量與無癌症個體中 GASP-1 mRNA 之表現量進行比較。偵測 GASP-1 核酸之表現量的步驟可包括測定樣品中 GASP-1 cDNA 之量。樣品中 GASP-1 cDNA 之量可藉由 Immuno-PCR (IPCR)、藉由微陣列或藉由 PCR 陣列來測定。早期癌症可由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。早期癌症可為早期乳癌。所述乳癌可為三陰性乳癌。生物樣品可由血液、尿液、脊髓液、羊水、血清、齦溝液、淚液、淋巴液、乳腺分泌物、黏液、唾液、精液、眼淚、陰道分泌物以及玻璃狀體液所組成的族群中選出。生物樣品可包括自個體獲得之癌前組織。所述方法可包括自個體之癌前組織獲得生物樣品，偵測所述生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量，以及將生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量與無癌症生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量進行比較。如申請專利範圍

第 27 項所述之方法可包括自個體之癌前組織獲得生物樣品，偵測所述生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量，以及將生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量與無癌症生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量進行比較。

【0021】 本發明之另一態樣提供一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體中 GASP-1 mRNA 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測個體中 GASP-1 mRNA 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 mRNA 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 mRNA 之表現量進行比較，

其中個體尚未診斷患有晚期癌症，

其中與在第一時間點 GASP-1 mRNA 之表現量相比，在一個或大於一個後續時間點 GASP-1 mRNA 之較高表現量指示早期癌症之進展。第一時間點可在治療方案之前且後續時間點可在所述治療方案期間，其中所述方法監測治療方案隨時間之有效性。

【0022】 本發明亦提供一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體中 GASP-1 cDNA 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測個體中 GASP-1 cDNA 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 cDNA 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 cDNA 之表現量進行比較，

其中個體尚未診斷患有晚期癌症，

其中與在第一時間點的 GASP-1 cDNA 之表現量相比，在一個或大於一個後續時間點的 GASP-1 cDNA 之較高表現量指示早

期癌症之進展。第一時間點可在治療方案之前且後續時間點可在所述治療方案期間，其中所述方法監測治療方案隨時間之有效性。

【0023】 本發明亦提供一種判定個體是否存在早期癌症之套組，其中所述套組包括：

包括 GASP-1 核苷酸序列之至少 6 個連續核苷酸的核酸分子，其中所述套組適用於偵測對應於所述個體之生物樣品中的核酸分子之 mRNA。

【0024】 本發明之另一個態樣提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制或停止早期癌症進展為晚期癌症。所述 GASP-1 抑制劑可包括抑制劑生物分子、對於 GASP-1 或其肽具有選擇性之抗體、對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之抗體、對於 GASP-1 cDNA 序列具有選擇性之小抑制性 RNA (siRNA)、對於 GASP-1 cDNA 序列具有選擇性之短髮夾 RNA (shRNA)、對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之小抑制性 RNA (siRNA)、對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之短髮夾 RNA (shRNA) 及/或干擾 GASP-1 或其肽片段與其搭配物之相互作用的 GASP-1 抑制劑。所述方法可包括投與於醫藥學上可接受之載劑中的 GASP-1 抑制劑。早期癌症可由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。早期癌症可為早期乳癌。早期乳癌可為早期三陰性乳癌。

【圖式簡單說明】

【0025】

圖 1 說明與無癌症患者相比，患有腦癌、肺癌以及乳癌之患

者的血清中升高之 GASP-1 肽含量。圖 1 的 A 展示藉由使用 GraphPad Prism 5.01 版(加利福尼亞州聖地亞哥(San Diego, CA))擬合為單位點-總結合曲線(one site-total binding curve)之資料的最小二乘法分析(least squares analysis)所獲得之「競爭性 ELISA」標準曲線。圖 1 的 B 展示資料之散點圖。由標準曲線外推未知值。藉由使用未配對之 t 檢驗比較各組來計算 P 值。

圖 2 說明與無癌症或肝硬化患者相比，肝癌患者之血清中升高之 GASP-1 肽含量。

圖 3 說明與正常組織相比，良性、癌前乳房病變以及乳房腫瘤中顯著升高之 GASP-1。如圖申斯基等人，2011 中所述針對 GASP-1 將乳癌陣列 BR1003 及 BR1503 (美國百麥克斯公司 (US Biomax)) 染色，且由病理學家以不知情方式評估染色強度。

圖 4 展示 GASP-1 在三陰性乳癌以及諸如導管原位癌(ductal carcinoma *in situ*; DCIS)之早期乳癌中高度表現。如圖申斯基 G. P.等人，2011 中所述針對 GASP-1 將乳癌陣列 BR1503 (美國百麥克斯公司) 染色。由病理學家以不知情方式評估染色強度。

圖 5 說明與正常胰臟相比，胰臟癌以及胰臟之增生及發炎性病變中 GASP-1 之過表現。如圖申斯基等人，2011 中所述針對 GASP-1 將胰臟癌陣列 PA2081 (美國百麥克斯公司) 染色，且由病理學家以不知情方式評估染色強度。

圖 6 說明使用 GASP-1 shRNA 之 GASP-1 沉默對 MB-231 細胞生長之作用。在圖 6 的 A 中，對 MB-231 細胞使用抗-GASP-1 抗體的西方墨點法顯示經單一 shRNA 構築體轉染之細胞展現 GASP-1 之野生型表現，而經所有四種構築體一起轉染之細胞顯示

GASP-1 表現降低約 90%。圖 6 的 B 展示 GASP-1 沉默導致 MB-231 細胞生長降低約 10 倍。

【實施方式】

【0026】 在早期癌症期間出現之生物標記可用於在出現症狀之前偵測以及篩選疾病。因為許多癌症不顯示症狀，尤其是在早期不顯示症狀，所以在早期過表現且接著在疾病進展期間含量增加之生物標記可提供臨床醫師重要資訊，其將使得更早地偵測、更成功地治療、患者更快治癒以及降低成本。

【0027】 如 WO 2011/008746 中所述，使用西方墨點分析顯示 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1 (GASP-1) 在七位晚期 (II 期及 III 期) 乳癌患者每一者中高度表現。GASP-1 僅在腫瘤細胞 (T) 中而不在來自同一患者之相鄰正常 (亦即非癌性) 細胞 (C) 中表現。最初使用 2-D HPLE 技術由來自 I 期乳癌患者之血清白蛋白複合物的分析發現 GASP-1 之片段。這些結果表明 GASP-1 (在 I 期中表現) 穩定且持續至 II 期及 III 期乳癌，或 GASP-1 在整個 I 期、II 期以及 III 期中連續表現。

【0028】 因為其容易獲得，所以文獻中幾乎所有報導之研究均關於乳癌進展且使用晚期乳癌樣品 (例如 I 期至 IV 期)。重要的是，儘管癌症可在幾乎任何身體組織中發展，且各種類型之癌症具有其獨特特徵，但產生癌症之基本過程可能在所有形式之疾病中頗為相似。就此而言，本發明者現已出乎意料地發現，在極早期癌症中，可能是在涉及正常細胞轉變為癌細胞之疾病過程開始時出現 GASP-1 之過表現。此驚人的發現具有意味深長的暗示，因為迄

今為止尚未發現用於任何癌症之早期偵測（例如在晚期癌症之前）的生物標記。許多癌症無症狀，且當症狀出現時，許多腫瘤已增長得頗大且可能已轉移。本發明對許多癌症之早期生物標記的發現允許將癌症之偵測及診斷推回至其發展最早期。用於癌症之醫學干預現在可能變得著重於鑑別初期疾病以及防止其進展為明顯疾病，而不是在癌症明確後對其進行治療。

【0029】 本發明者不僅已發現 GASP-1 在許多癌症之極早期過表現，而且發現其表現量在癌症進展期間增加。GASP-1 調節持續癌細胞生長所需之許多 G 蛋白耦合性受體（質膜上）的可用性 (availability)。此外，在許多癌症中，來源於過表現之 GASP-1 的肽片段釋放至血流中且肽片段含量之增加指示癌症之存在及嚴重程度。由於其在癌症早期出現，因此 GASP-1 蛋白與其肽片段均可用作用於在症狀出現之前偵測及篩選癌症之早期生物標記。尚未報導涉及偵測早期癌症之生物標記研究。本發明研究在發現腫瘤之前在癌前（良性）及其他早期（諸如發育不良）出現之生物標記。

【0030】 因此，本發明之一個實施例利用來源於 GASP-1 之肽片段作為對於早期癌症具有特異性之生物標記。因為 GASP-1 由蛋白水解酶（在癌細胞內部）降解，產生隨後分泌至血流中之片段，所以可偵測到癌症肽片段。大部分這些肽片段由腎臟移除且自循環中快速消失。僅極小部分之肽片段（含有癌症肽基元之肽片段）對於原有血清白蛋白複合物(pre-existing serum albumin complex) 具有高結合親和力，以產生新（癌症）血清白蛋白複合物。如 WO 2011/008746 中所述，新形成之癌症複合物（在循環中已存在之數

S

百種血清白蛋白複合物外)可藉由 2-D 高效液相電泳(2-D HPLE)利用聚偏二氟乙烯(PVDF)作為載體基質來分離(常等人, 2009)。接著藉由質譜法(LC/MS/MS)鑑別來自分離之癌症血清白蛋白複合物之癌症肽基元的胺基酸序列。

【0031】 癌症肽基元可具有與血清白蛋白複合物中所螯合(sequestered)之癌症肽片段相同的長度。很可能癌症肽基元將具有比初始癌症肽片段短的長度。此是因為癌症肽基元(藉由 LC/MS/MS 鑑別之肽片段)僅在用酶(諸如胰蛋白酶)消化所螯合之癌症肽片段後回收, 此導致移除癌症肽片段之羧基末端的一些胺基酸殘基。所移除之胺基酸殘基不在質譜分析中回收且因此損失。同樣, 癌症肽片段在 N 末端之一些胺基酸亦可藉由酶促消化移除且未回收。因此, 預期癌症肽基元將具有與其所來源之癌症肽片段相比較短的胺基酸序列。自 GASP-1 回收具有胺基酸序列 EEASPEAVAGVGFESK (SEQ ID NO: 1) 之癌症肽基元(常等人, 2009)。一般而言, 癌症肽基元僅佔癌症蛋白質之約 1%至 3%(常等人, 2009)。舉例而言, EEASPEAVAGVGFESK (SEQ ID NO: 1) 具有 1,395 個胺基酸之 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1 (GASP-1) 的 16 個胺基酸(殘基 850 至 865)。此特定肽序列對於癌症偵測是獨特的, 因為其他人類蛋白質不含有此序列。

【0032】 如本文中所使用,「早期癌症(early stage cancer)」包含晚期癌症前之任何癌前病況, 包含(但不限於)良性病狀、侵襲性癌瘤前病狀及/或癌性腫瘤發展前病狀。關於乳癌, 如下文更詳細地描述,「早期癌症」包含 I 期、II 期、III 期或 IV 期癌症前之任何癌前病況。早期乳癌之實例包含良性病狀(例如非增生性

病變(non-proliferative lesions)、無異形型增生性病變(proliferative lesions without atypia)以及有異形型增生性病變(proliferative lesions with atypia))、發育不良及/或原位癌。關於除乳癌外之癌症(例如神經膠質瘤、膀胱癌、結腸癌、食道癌、肝細胞癌、喉癌、肺癌、皮膚癌、卵巢癌、前列腺癌、胰臟癌、腎癌或胃癌),「早期癌症」包含晚期癌症(諸如對應於乳癌中之I期、II期、III期或IV期的晚期癌症)前之任何癌前病況。

【0033】 良性病狀包含具有發展成晚期癌症之可能性的任何非癌性異常。如本文中所使用,「無癌症(cancer-free)」是指個體無早期或晚期癌症,或個體之組織無早期或晚期癌症。如本文中所使用,個體較佳為動物,包含(但不限於)哺乳動物,且最佳為人類。

【0034】 本發明之一實施例提供一種判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法,包括偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。本發明之一例示性實施例提供一種判定個體是否存在早期癌症之方法,包括偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。所述方法較佳對未發展晚期癌症(例如I期、II期、III期或IV期癌症)或癌症(諸如癌性腫瘤)之明顯症狀的個體進行。舉例而言,所述個體尚未診斷出患有晚期癌症,諸如侵襲性癌瘤。個體可能具有一種或大於一種良性病狀、一種或大於一種侵襲性癌瘤前病狀及/或一種或大於一種癌性腫瘤發展前病狀(例如個體可能具有非癌性異常,諸如良性病變)。因此,本發明之方法可藉由使用 GASP-1、GASP-1 肽片段或 GASP-1 核酸作為早期生物標記來偵測早期癌症。

【0035】 可將個體中 GASP-1 之表現量與無癌症個體中 GASP-1 S

之表現量（或無癌症生物樣品中 GASP-1 之表現量）進行比較以判定 GASP-1 是否在個體中過表現。與無癌症個體中（或無癌症生物樣品中）GASP-1 之表現量相比，個體中 GASP-1 之較高表現量指示個體存在癌症。在不患有晚期癌症之個體（例如不患有 I 期、II 期、III 期、或 IV 期乳癌之個體）中，與無癌症個體中（或無癌症生物樣品中）GASP-1 之表現量相比，個體中 GASP-1 之較高表現量指示個體存在早期癌症。在替代實施例中，可將個體中 GASP-1 之表現量與將 GASP-1 之表現量與癌症各階段（例如無癌症、早期癌症及/或晚期癌症）關聯的預定參考資料進行比較，以判定 GASP-1 是否在個體中過表現。

【0036】 根據較佳實施例，偵測個體中 GASP-1 之表現量包括偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量。肽片段較佳具有至少約 6 個、至少約 10 個、至少約 15 個、至少約 20 個、至少約 25 個或至少約 30 個胺基酸。GASP-1 肽片段可包括例如約 6 個至約 50 個胺基酸、約 10 個至約 30 個胺基酸或約 15 個至約 20 個胺基酸。GASP-1 肽片段可包括序列 EEASPEAVAGVGFESK (SEQ ID NO: 1) 或由其組成。或者，GASP-1 肽片段包括序列 EEASPEAVAGVGFESK (SEQ ID NO: 1) 之片段或由其組成。

【0037】 本文所討論之生物樣品的非限制性實例包含血液、尿液、脊髓液、羊水、血清、齦溝液、淚液、淋巴液、乳腺分泌物、黏液、唾液、精液、眼淚、陰道分泌物以及玻璃狀體液。生物樣品可自任何類型之生物物質獲得，包含來自個體之組織、細胞、流體以及類似物。在替代實施例中，生物樣品包括自個體獲得之可能為癌前之血清或組織（諸如包括例如增生性病變、非增生性

病變之良性病變的組織，或展現發育不良之組織）。舉例而言，所述方法可包括自不患有晚期癌症之個體（例如自所述個體之潛在癌前組織(potentially pre-cancerous tissue)）獲得生物樣品，偵測所述生物樣品中存在之 GASP-1 肽片段之量，以及將生物樣品中存在之 GASP-1 肽片段之量與無癌症組織中存在之 GASP-1 肽片段之量，或與預定參考資料進行比較。在特定實施例中，潛在癌前組織及無癌症組織可自同一個體獲得。

【0038】 根據特定實施例，偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量包括使生物樣品與選擇性結合 GASP-1 肽片段之結合劑接觸以及偵測結合於所述結合劑之 GASP-1 肽片段之量。結合劑較佳為抗體。抗體可例如由多株抗體、單株抗體、單鏈抗體、Fab 以及抗體之抗原決定基結合片段選出。結合劑可結合於放射性標記、螢光標記、化學發光標記或生物發光標記。偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量的方法可包括使用此項技術中熟知之免疫分析（例如 ELISA）。如下文更詳細地討論，本發明之「競爭性 ELISA」（酶聯免疫吸附分析）較佳用於偵測個體中 GASP-1 肽片段之量。

【0039】 本發明之實施例更包含治療個體之早期癌症，其藉由向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑或拮抗劑以抑制早期癌症進展為晚期癌症（例如減慢或停止早期癌症進展為晚期癌症）來進行。在一較佳實施例中，向患有早期癌症之個體投與 GASP-1 抑制劑。舉例而言，GASP-1 抑制劑可包括對於 GASP-1 或其肽片段具有選擇性之生物分子（例如抗體）（例如對於 SEQ ID NO: 1 之肽片段具有選擇性之抗體），或對於 GASP-1 cDNA 序列或 SEQ 5

ID NO: 1 具有選擇性之小抑制性 RNA (siRNA) 或短髮夾 RNA (shRNA)。或者，GASP-1 抑制劑對於 GASP-1 或其肽片段之相互作用搭配物具有選擇性。因為本發明之方法可偵測早期癌症，所以治療性靶向較佳在癌症變成晚期之前（例如在 I 期乳癌之前）起始。如本文中所使用，術語「有效量 (effective amount)」是指當鑒於個體疾病或病狀之性質及嚴重程度投與特定個體時將具有所需治療性作用之彼等量，例如將治癒、防止、抑制或至少部分停止或部分防止早期癌症進展為晚期癌症之量。

【0040】 GASP-1 抑制劑或拮抗劑可於醫藥學上可接受之載劑中投與(administered in a pharmaceutically acceptable carrier)。如本文中所使用，術語「醫藥學上可接受之載劑 (pharmaceutically acceptable carrier)」是指與 GASP-1 抑制劑或拮抗劑一起投與之稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑。所述載劑可為無菌液體，諸如水及油，包含石油、動物、植物或合成來源之油，諸如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油以及類似物，聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶劑。當靜脈內投與化合物時，水為較佳載劑。生理鹽水溶液及右旋糖與甘油水溶液亦可用作液體載劑，尤其用於可注射溶液。適合之賦形劑包含澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化鈉、甘油、丙二醇、水、乙醇以及類似物。醫藥學上可接受之載劑亦可包含少量潤濕劑或乳化劑或 pH 值緩衝劑（諸如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽）。載劑中亦可包含以下物質：抗細菌劑，諸如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯(methyl parabens)；抗氧化劑，諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸；以及用於調節張力之試劑，

諸如氯化鈉或右旋糖。製備化合物與載劑之組合的方法為本領域的技術人員所已知。

【0041】 可使用本發明之方法偵測及/或治療之早期癌症之類型的非限制性實例包含早期乳癌（包含早期三陰性乳癌）、早期膀胱癌、早期結腸癌、早期食道癌、早期肝細胞癌、早期喉癌、早期肺癌、早期皮膚癌、早期卵巢癌、早期前列腺癌、早期胰臟癌、早期腎癌以及早期胃癌。

【0042】 本發明之另一實施例提供一種製備抗體之方法，包括向免疫勝任型宿主投與有效量之本發明之肽片段（來自過表現之 GASP-1 蛋白），以及自所述宿主回收對於所述肽片段具有特異性之抗體。針對來自 GASP-1 之肽片段的抗體為僅識別癌症蛋白質之小區域（而非整個蛋白質）之高度特異性「肽抗體（peptide antibodies）」。因為抗體是針對極小區域（或獨特區域）而非整個蛋白質，所以其將具有高度特異性且一般將不會與體內其他蛋白質交叉反應。如商業上常用之直接針對整個癌症蛋白質之抗體很可能將漏掉特異性癌症肽基元且因此使得其在偵測特定癌症肽片段方面無效（或有效性小得多）。此外，靶向短癌症肽（或癌症肽基元）序列之治療性藥物將具有高度特異性且將預期具有少得多的副作用（若存在）。本發明之治療劑包含對於本發明之 GASP-1 肽片段具有高親和力的生物分子。治療劑亦可靶向 GASP-1 之相互作用搭配物。

【0043】 在本發明之一個態樣中，可獲得特異性結合於來自 GASP-1 蛋白之癌症肽片段（或癌症肽基元）的抗體。舉例而言，已產生特異性結合於具有胺基酸序列 EEASPEAVAGVGFESK 5

(SEQ ID NO: 1) 之癌症肽基元的兔抗體。所述抗體可用於偵測來自個體之生物樣品中的癌症肽片段、或癌症肽基元、或其相應 GASP-1 蛋白。或者，癌症中過表現之 GASP-1 蛋白可藉由使用針對此蛋白之其他區域的抗體偵測。

【0044】 本發明之抗體亦可用於抑制癌細胞之生長及/或早期癌症進展為晚期癌症。所述抗體可特異性結合本發明之 GASP-1 肽片段，諸如具有胺基酸序列 EEASPEAVAGVGFESK (SEQ ID NO: 1) 之癌症肽基元。抗體亦可用於治療癌症患者，其藉由向所述個體投與有效量之抗體來進行，藉此抗體抑制個體中之腫瘤生長或癌症遷移。適於早期抗體治療之腫瘤或癌症包含乳癌、三陰性乳癌、神經膠質瘤、膀胱癌、結腸癌、食道癌、肝細胞癌、喉癌、肺癌、皮膚癌、卵巢癌、前列腺癌、胰臟癌、腎癌以及胃癌。抗體治療可單獨使用或結合其他治療使用。

【0045】 與 GASP-1 cDNA 之閱讀框架或 GASP-1 cDNA 之 3 引子或 5 引子未轉譯序列互補的小抑制性 RNA (siRNA) 或小髮夾 RNA (shRNA) 可用於抑制或停止癌細胞之生長及/或早期癌症進展為晚期癌症。siRNA 或 shRNA 可特異性結合編碼本發明之肽片段的 GASP-1 mRNA，諸如具有胺基酸序列 EEASPEAVAGVGFESK (SEQ ID NO: 1) 之癌症肽基元。siRNA 或 shRNA 亦可用於治療癌症患者，其藉由直接注射寡核苷酸或使用適當 DNA 載體（諸如腺病毒載體）產生寡核苷酸向所述個體投與有效量之 RNA 來進行，藉此 RNA 抑制個體中之腫瘤生長或癌症遷移。適於早期抗體治療之腫瘤或癌症包含乳癌、三陰性乳癌、神經膠質瘤、膀胱癌、結腸癌、食道癌、肝細胞癌、喉癌、肺癌、皮膚癌、卵巢癌、前列腺癌、

胰臟癌、腎癌以及胃癌。所述治療可單獨使用或結合其他治療使用。

【0046】 疾病可由調節細胞生長及分裂之基因的 DNA 損傷（例如突變）引起。癌症可使身體產生異常蛋白質、蛋白質過量產生或產生不足。根據本發明之實施例，在本發明中癌症蛋白質之過表現可由 GASP-1 蛋白、其肽片段或其核酸之含量偵測。舉例而言，可在組織、細胞、細胞膜、細胞質、細胞提取物或生物流體（諸如血液、血清、尿液）中偵測 GASP-1 或其肽片段。可由編碼 GASP-1 之 mRNA 直接或間接（例如經由來源於其之 cDNA）偵測 GASP-1 核酸。根據特定實施例，樣品中 GASP-1 cDNA 之量可藉由微陣列或 PCR 陣列來測定。

【0047】 如上文所論述，在本發明之多種態樣中，GASP-1 及其肽片段之表現量可用作與乳癌及許多其他癌症之偵測及進展有關之診斷工具或生物標記。本發明之另一態樣是關於用於抑制癌症進展及擴散目的之 GASP-1 及其片段之治療性靶向。因此，在一個態樣中，本發明提供一種偵測來自個體之生物樣品之早期癌症的方法，包括評估 GASP-1 或其肽片段之表現量。

【0048】 良性乳房疾病是乳癌之重要風險因素。目前，無可用之用於良性（癌前）或早期乳癌的生物標記。已確知乳癌的各階段且過程通常需要多年來進展。因為乳癌進展步驟亦在上皮組織之許多其他惡性癌症（癌瘤）中出現，所以乳癌是模型系統。癌瘤之實例為肺癌、前列腺癌、結腸癌、胰臟癌等。

【0049】 導致乳癌之真正第一步驟是所謂的良性病狀，其廣泛地涵蓋任何非癌性乳房異常。一些類型之良性乳房病狀與較高乳癌

風險有關，而其他類型並非如此。基於細胞是否倍增（增生）以及是否存在異常細胞（異形型）將良性病狀進一步分成三個普通組。

【0050】 在非增生性良性病變中，病狀與乳房組織之過度生長無關。其似乎不影響乳癌風險，或若其有影響，則作用極小。無異形型增生性病變（增生）略微增加癌症風險，因為這些病狀與乳房組織之導管或小葉中之細胞生長有關。另一方面，有異形型增生性病變（非典型增生）提高癌症風險，因為這些病狀與乳房組織之導管或小葉中之細胞過度生長有關，且細胞不再顯得正常。其可使乳癌風險提高至正常之約 4 倍至 5 倍。

【0051】 繼良性乳房病狀進展為癌性病況之後為發育不良、原位癌以及侵襲性癌瘤之其他步驟。發育不良是癌前病變之最早形式，病理學家可在子宮頸抹片（pap smear）或生檢組織中識別所述形式。發育不良可為低度或高度（其為原位癌）。

【0052】 在原位癌（意謂「原位癌（cancer in place）」）中，上皮細胞已失去其組織身分且已復原回生長快速且對組織類型具有異常調節之原始細胞形式。然而，此形式之癌症保持位置固定，且未穿過基底膜侵襲至表面下組織中。

【0053】 一旦形成腫瘤，則乳癌向更晚期之進一步發展可基於腫瘤大小及其已擴散之程度歸類為 I 期至 IV 期（亦稱為晚期癌症）之一系列階段。表 1 總結各階段。

【0054】 表 1

期	腫瘤尺寸	涉及淋巴結	轉移（擴散）
I	小於 2 公分	否	否
II	2-5 公分	否或在乳房同一側	否
III	大於 5 公分	是，在乳房同一側	否

IV	不適用	不適用	是
----	-----	-----	---

【0055】 在 I 期中，原發性（初始）癌症直徑為 2 公分或小於 2 公分且未擴散至淋巴結。在 IIA 期中，原發性腫瘤直徑介於 2 公分與 5 公分之間且未擴散至淋巴結。在 IIB 期中，原發性腫瘤直徑介於 2 公分與 5 公分之間且已擴散至腋窩（腋下）淋巴結；或原發性腫瘤超過 5 公分且未擴散至淋巴結。在 IIIA 期中，任何種類之原發性乳癌已擴散至腋窩（腋下）淋巴結及腋窩組織。在 IIIB 期中，原發性乳癌為任何大小，自身已附著至胸腔壁，且已擴散至胸（胸部）淋巴結。最後，在 IV 期中，原發性癌症已自乳房擴散至身體其他部分（諸如骨骼、肺、肝臟、腦）。IV 期乳癌之治療著重於延長存活時間及緩解症狀。

【0056】 本發明者已指出在正常乳房細胞中 GASP-1 不表現或僅極最低程度地表現(only very minimally expressed)。與來自同一患者之正常相鄰組織相比，甚至在良性（癌前）期已出現驚人的 GASP-1 含量之 4 倍至 6 倍過表現。當良性（癌前）病狀進展至病理學家首次可偵測到之癌前期（發育不良）時，GASP-1 過表現進一步增加且達到約 8 倍過表現。當乳癌進展至更晚之晚期癌瘤（例如 I 期至 IV 期）時，觀察到 GASP-1 含量之表現的進一步增加。

【0057】 在乳癌中，在實驗室中約 15%-20%患者對於雌激素、孕酮受體以及 HER2 之測試為陰性且稱為「三陰性（triple-negatives）」。因為激素不支持其生長，所以癌症不可能對激素療法起反應，包含他莫昔芬（tamoxifen）、Arimidex®（化學名稱：阿那曲唑（anastrozole））、Aromasin®（化學名稱：依西美坦（exemestane））、Femara®（化學名稱：來曲唑（letrozole））以

及 Faslodex® (化學名稱：氟維司群 (fulvestrant))。三陰性乳癌亦不可能對靶向 HER2 之藥物起反應，諸如 Herceptin® (化學名稱：曲妥珠單抗 (trastuzumab)) 或 Tykerb® (化學名稱：拉帕替尼 (lapatinib))。另外，三陰性乳癌比其他類型之乳癌易於具有更大侵襲性。研究已指出三陰性乳癌更有可能擴散至乳房外且更有可能在治療後復發 (捲土重來)。目前無可用之用於三陰性的生物標記。本發明者已發現 GASP-1 是適用於三陰性乳癌之偵測及可能性治療的生物標記。

【0058】 如 WO 2011/008746 中所述，使用免疫組織化學染色顯示 GASP-1 在為極晚期乳癌之侵襲性導管癌中高度表現 (常等人, 2009)。GASP-1 之過表現亦見於許多其他癌症之晚期，包含腦、膀胱、肝臟、肺以及其他腫瘤組織。由這些結果無法知道在何期出現 GASP-1 之過表現且並不預期過表現出現在早期癌症期間。本發明者現已驚人地發現 GASP-1 過表現起始於極早期癌症。

【0059】 迄今為止，不同癌症始終被視為各別疾病。普遍想法是諸如乳癌、肝癌、肺癌等不同癌症一定存在特異性標記。本發明消除此觀念，尤其在癌症早期，因為許多 (若非所有) 癌症似乎具有相同初始狀況。這些生物化學狀況之一是 GASP-1 之過表現。GASP-1 在癌症發展中極其重要，因為其與持續 (不受控制) 細胞生長所需之許多 G 蛋白受體再循環有關。G 蛋白受體識別信號傳導分子，諸如生長因子、細胞激素、雌激素等，所述分子告知細胞持續生長。癌細胞需要更多 GASP-1，因為其細胞表面上需要更多受體。因此，GASP-1 控制可用於癌細胞之受體數目。隨著癌症發展，需要更多 GASP-1 分子。在某種程度上，GASP-1 可視為信

號轉導過程之「主要調節因子 (master regulator)」。藉由確定早期癌症發展對 GASP-1 之需求，本發明者已首次指出癌症發展可由調節 G 蛋白耦合性受體之可用性的蛋白質之過表現引起。

【0060】 藉由確定 GASP-1 是極早期癌症之一般標記，本發明提供不僅在許多癌症之發展最早期偵測癌症而且還治療癌症之方法。

【0061】 根據特定實施例，評估可為免疫分析類測試。舉例而言，ELISA 或甚至經標記抗體可用於免疫分析中以評估 GASP-1 或其肽片段之含量。此項技術中熟知之其他方法可包含使用螢光顯微術、西方墨點分析、mRNA 北方及狹縫式墨點分析 (mRNA Northern and slot blot analyses)、mRNA 酶促擴增以及分析、螢光活化細胞排序、諸如此類。評估 GASP-1 之表現的方法可為此項技術中習知，例如如賴伯格 (Ryberg) (2007) 中所述，或如以下實例中所示。

【0062】 本發明提供一種偵測分泌至血液或其他生物流體中之肽片段 (來源於 GASP-1) 的新穎 ELISA (稱為「競爭性 ELISA」) 方法。如早先所指示，GASP-1 在癌症組織中之過表現導致包含含有 16 個胺基酸之序列 (EEASPEAVAGVGFESK (SEQ ID NO: 1)) 之特異性片段的 GASP-1 肽片段分泌至血液中並積累。16 個胺基酸之 GASP-1 片段僅組成整個蛋白質之約 1% 且其胺基酸序列獨特，因為其他人類蛋白質不含有此特定序列。非常需要偵測來自過表現之 GASP-1 蛋白的此肽片段或其他肽片段。

【0063】 夾心式 ELISA 診斷套組常用於偵測較大疾病蛋白質生物標記而非短肽，如本發明者所發現之肽。在此類型之分析中，

需要針對蛋白質之兩個不同區域的兩種抗體。載體(support)上對於蛋白質之一個區域具有高親和力之第一抗體（捕捉抗體）捕捉蛋白質且第二抗體（偵測抗體）識別同一蛋白質之不同抗原決定基。

【0064】 由於本發明較佳研究極短肽片段（例如約 6 個至約 30 個胺基酸、約 10 個至約 25 個胺基酸或約 15 個至約 20 個胺基酸），因此一般將不可能(generally not be possible)產生識別小肽片段（諸如上述 16 個胺基酸之肽序列）之不同區域的兩種抗體。發明出一種新穎「競爭性 ELISA」，其藉由在血清中存在之 GASP-1 肽與微量滴定盤之各孔中所吸附的肽之間對生物素標記之抗-GASP-1 肽抗體進行平衡分配來起作用。血清中存在之 GASP-1 愈多，結合於培養盤之抗體愈少。接著藉由 HRP-抗生蛋白鏈菌素（streptavidin）及比色底物四甲基聯苯胺（tetramethylbenzidine；TMB）偵測吸附於培養盤底部上之經標記抗體。圖 1（圖 1 的 A）展示用於偵測 GASP-1 或 GASP-1 肽片段之代表性標準物。本發明之競爭性 ELISA 具有高度靈敏度且可偵測癌症患者血清中小於 1 奈克/毫升的 GASP-1 肽片段含量。因為此「競爭性 ELISA」如此靈敏，所以其可量測血液中極少量 GASP-1 肽片段之存在。

【0065】 應指出，因為多株抗體是針對短（或甚至獨特）肽片段而非整個蛋白質，所以其將極具特異性且不與體內其他蛋白質交叉反應。當用作治療劑時預期肽抗體將更具特異性且產生少得多的副作用（若存在）。

【0066】 本發明之替代性方法包括偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 核酸之量。舉例而言，核酸可包括 GASP-1 mRNA 或 GASP-1 cDNA。GASP-1 mRNA 可藉由 RT-qPCR 或 qPCR 來偵測

且 GASP-1 cDNA 可藉由 Immuno-PCR (IPCR) 來偵測。根據特定實施例，樣品中 GASP-1 cDNA 之量可藉由微陣列或 PCR 陣列來測定。

【0067】 測定測試樣品中 GASP-1 mRNA 之量的步驟可包括使測試樣品曝露於在嚴格條件下與 GASP-1 mRNA 雜交之核酸分子。舉例而言，所述方法可利用約 30 個核苷酸或更長之探針，在 0.5 莫耳濃度 NaHPO_4 /7% SDS/1 毫莫耳濃度 EDTA 中，在 65°C 下。所述嚴格條件可包括在 68°C 下用 0.1% SDS/0.1×SSC 洗滌。

【0068】 更佳地，測定測試樣品中 GASP-1 mRNA 之量的步驟需要特異性擴增 mRNA，接著定量所擴增之產物，例如經由 RT-qPCR 或 qPCR 分析。可將 GASP-1 mRNA 之表現量與對照組進行比較，例如人類癌症及正常非癌症個體；或人類癌細胞株及人類非癌細胞株。

【0069】 在一個態樣中，本發明提供偵測來自個體之生物樣品的早期癌症或疾病之另一方法，所述方法包括使用 Immuno-PCR (IPCR) 評估生物組織樣品中 cDNA 之含量。

【0070】 定量 Immuno-PCR (IPCR) 技術組合了靈活性及穩固性免疫分析之優點與 PCR 之指數信號擴增能力。IPCR 允許使用經雙股 DNA 標記之特異性抗體偵測抗原。所述標記用於藉由定量 PCR 產生信號。由於核酸擴增之效率，IPCR 通常使得與同功酶 (analogous enzyme) 擴增之免疫分析相比靈敏度增加 10 倍至 1,000 倍。本文描述使用夾心免疫分析偵測特異性抗原之 IPCR 分析結合實時 PCR 讀出之標準方案。所述方案包含抗原之初始固定，接著進行此抗原與抗體-DNA 結合物之耦合。繼此之後，添加核苷酸、

特異性引子以及聚合酶且藉由 PCR 擴增標記以產生信號。所產生之 PCR 擴增子數目與待偵測之抗原的初始數量成正比。使用 IPCR 分析能夠偵測複雜生物樣品中藉由習知免疫分析不可充分取得 (accessible) 之稀有生物標記。

【0071】 因為 GASP-1 蛋白及 GASP-1 肽片段含量在癌症進展期間增加，所以其亦可用於監測癌症進展。因此，在本發明之其他態樣中，GASP-1 或其肽片段之表現可用作選擇或監測特定治療性方案及化學治療組合之生物標記。本發明之一實施例提供一種監測個體之癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體中 GASP-1 之表現量(例如藉由在早期癌症期間偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段，諸如包括序列 EEASPEAVAGVGFESK 之片段之量)；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測個體中 GASP-1 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量進行比較。舉例而言，與步驟 (i) 中所偵測到之 GASP-1 之表現量相比，步驟 (ii) 中所偵測到之 GASP-1 之較高表現量指示癌症進展；且與步驟 (i) 中所偵測到之 GASP-1 之表現量相比，步驟 (ii) 中所偵測到之 GASP-1 之較低表現量指示癌症消退。

【0072】 疾病治療(例如化學療法、放射線或藥物)之有效性可藉由比較在治療方案之前、期間及/或之後 GASP-1 之表現量來監測。舉例而言，若表現量隨時間增加，則可判定癌症正在進展中，然而若表現量保持恆定或隨時間降低，則癌症可能不在進展中。根據所述實施例，第一時間點可包括在治療方案已開始前(或在

治療方案起始時)之時間點且一個或大於一個後續時間點可包括在治療方案過程中及/或在治療方案已結束後之時間點。上述方法或者可包括將個體中之 GASP-1 表現量與將 GASP-1 之表現量與癌症各階段關聯之預定參考資料進行比較，以判定個體癌症之階段。所述方法可用於監測患者隨時間之癌症風險及癌症進展。方法亦可用於判定是否應繼續治療性治療，或監測患者正接受之抗癌療法的功效。

【0073】 本文所述之診斷、預後以及其他方法可藉由使用套組來進行。因此，本發明提供一種評估或輔助上述診斷或預後方法中之任一者(例如量測樣品中 GASP-1 或其肽片段之存在或量)的套組。本發明之一實施例提供一種判定個體是否存在癌症(例如早期癌症)之套組，包括對於 GASP-1 肽片段或 GASP-1 核酸具有選擇性之結合劑。所述結合劑較佳為抗體且所述抗體較佳對於包括序列 EEASPEAVAGVGFESK 或由其組成之 GASP-1 肽片段具有選擇性。在另一態樣中，測試套組可包括核酸分子，所述核酸分子包括 GASP-1 核苷酸序列之至少 6 個連續核苷酸。所述套組適用於偵測對應於個體之生物樣品中的核酸分子之 mRNA。

【0074】 核酸可為藉由北方或其他墨點分析直接分析 mRNA 之核酸，或可用於 mRNA 之酶促擴增及分析之核酸(例如引子)。在任一情況下，套組可包括對照樣品，所述對照樣品包括由人類癌症及人類非癌症所組成的族群中選出的細胞或生物流體。抗體可為適用於螢光顯微術、西方墨點分析、螢光活化細胞排序、免疫組織化學或其他免疫分析之抗體。

【0075】 按照本文揭露內容，可見對 GASP-1、其肽片段或其相 5

互作用搭配物之抑制可適用於治療癌症。

【0076】 術語「治療」或「療法」在本文中使用时是指干擾 GASP-1（或其肽片段）與其搭配物相互作用之 GASP-1、其肽片段之抑制劑或拮抗劑的任何投藥以減輕個體癌症之嚴重程度，且可包含意欲治癒疾病、減輕疾病症狀及/或抑制或停止處於發展疾病風險中之個體或具有指示所述個體發展疾病之症狀的個體發展疾病之治療。在一個實施例中，一種抑制癌症進展之方法包括使來源於其之腫瘤與干擾 GASP-1（或其肽片段）與其搭配物相互作用之 GASP-1 抑制劑或拮抗劑接觸。

【0077】 提供以下實例來更詳細地描述本發明之實施例且意欲說明而不限制本發明。

【0078】 實例

【0079】 實例 1、鑑別來自 GASP-1 之癌症肽基元。

【0080】 如早先所示，使用 2-D HPLC 分離來自 I 期乳癌之血清白蛋白複合物。使所述蛋白質複合物斑點經胰蛋白酶消化且藉由個別肽之液相層析及串聯光譜法測序（LC/MS/MS）來鑑別胰蛋白酶肽。由虛擬胰蛋白酶肽資料庫之資料庫搜索或胰蛋白酶肽之分段光譜確定蛋白質身分。位於費城（Philadelphia）之瓦斯特蛋白質體廠（Wistar Proteomic Facility）已開發出一種在 PVDF 膜上分析血清白蛋白複合物中存在之蛋白質及其片段的胰蛋白酶消化程序。藉由 LC/MS/MS 分析差異表現之癌症蛋白質複合物斑點之一揭露了具有序列 EEASPEAVAGVGFESK（SEQ ID NO: 1）之肽片段的存在。此序列與 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1（GASP-1）100%匹配。GASP-1（參考編號：Q5JY77）具有 1,395

個胺基酸，分子量為 156,865。所鑑別出之肽包括此 GASP-1 蛋白之胺基殘基 850 至 865。

【0081】 實例 2、開發定量患者血清中之 GASP-1 及其肽片段的「競爭性 ELISA」。

【0082】 如早先所示，GASP-1 在癌症組織中之過表現可導致含有此蛋白質之 16 個胺基酸之序列(EEASPEAVAGVGFESK(SEQ ID NO: 1))之特異性片段分泌至血液中並積累。所述 GASP-1 片段僅組成整個蛋白質之約 1%且其胺基酸序列獨特，因為其他人類蛋白質不含有此特定序列。非常需要偵測來自過表現之 GASP-1 蛋白的此肽序列或其他肽序列。下文提供使用針對 GASP-1 肽片段之單一抗體的本發明之「競爭性 ELISA」的方案。

【0083】 實驗重複三次進行。製備插入適當孔數目之兩個條形框架且稱為「培養盤 A」及「培養盤 B」。在 4°C 下用 300 微升含 1% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 之 PBS (pH 7.4) 塗佈培養盤 A 上用於標準物與樣品之孔隔夜。在 4°C 下用含 200 微升含有 100 奈克肽之肽溶液的碳酸鈉緩衝液 (pH 9.6) 塗佈培養盤 B 上用於標準物與樣品之孔隔夜。

【0084】 將範圍為 1 奈克/毫升、2 奈克/毫升、4 奈克/毫升、6 奈克/毫升、8 奈克/毫升、16 奈克/毫升、20 奈克/毫升以及 40 奈克/毫升之 110 微升標準物溶液以及待分析之樣品溶液添加至塗有 BSA 之培養盤中。樣品與標準物均於 TSBT 高鹽 (含 0.05% 吐溫 (Tween-20) 及 0.5 莫耳濃度 NaCl 之 Tris 緩衝生理鹽水) 中。在室溫下培育 30 分鐘後，添加 110 微升生物素標記之抗-GASP-1 抗體 (藉由 A/G 樹脂純化，美國伊利諾斯州羅克福德的皮爾斯化學

公司 (Pierce Chemical, Rockford, IL, USA))。以 1:100000 稀釋抗體 (1 微升抗體 + 99 微升 TBST-高鹽，取出 20 微升且用 20 毫升 TBST 高鹽稀釋)。添加抗體溶液後，標準物溶液之最終濃度變成 0.5 奈克/毫升、1 奈克/毫升、2 奈克/毫升、3 奈克/毫升、4 奈克/毫升、8 奈克/毫升、10 奈克/毫升以及 20 奈克/毫升。在 4°C 下震盪各孔隔夜。

【0085】 次日，藉由用 1% BSA 塗佈、在室溫下震盪 30 分鐘來阻斷塗有肽之孔的未佔據間隙。用 300 微升 TBST 高鹽洗滌各孔 5 次。將來自塗有 BSA 之培養盤的 200 微升抗原-抗體混合物轉移至塗有肽之培養盤中且在室溫下震盪 1.5 小時。在此之後用 300 微升 TBST 高鹽洗滌 5 次。接著將抗生蛋白鏈菌素-HRP (用 TBST 高鹽以 1:54000 稀釋) 添加至中各孔中 (每孔 200 微升)。在室溫下震盪 1 小時後，用 300 微升 TBST 高鹽洗滌各孔 5 次。在此之後添加 100 微升四甲基聯苯胺 (TMB，美國伊利諾斯州羅克福德的皮爾斯化學公司)。在室溫下震盪各孔直至 TBST 對照組 (在標準曲線中為 0 奈克/毫升) 之 O.D. 450 達到 1.0。接著將 1 莫耳濃度 HCl (每孔 50 微升) 添加至各孔中以中止反應。在 O.D.450 下讀取後，使用 Prism 5.0 產生標準曲線 (單位點-全函數 (one site-total function)) 且計算未知樣品之 GASP-1 濃度。圖 1 (圖 1 的 A) 展示用於偵測 GASP-1 或 GASP-1 肽片段之代表性標準物。競爭性 ELISA 具有高度靈敏度且可偵測癌症患者血清中小於 1 奈克/毫升的 GASP-1 肽含量。因為此「競爭性 ELISA」如此靈敏，所以其可量測血液中極少量 GASP-1 肽片段之存在。

【0086】 實例 3、與無癌症患者相比患有腦癌、肺癌以及乳癌之

患者的血清中 GASP-1 肽含量升高。

【0087】 基於標準曲線，測定正常健康個體以及腦癌、肺癌以及乳癌患者中之 GASP-1 含量(圖 1、圖 1 的 B)。使用「競爭性 ELISA」程序，發現來自腦癌、肺癌以及肺癌患者之血清表現的 GASP-1 肽是來自正常健康個體之血清的 10 倍。顯然這些 ELISA 可用於偵測這些癌症之存在。

【0088】 實例 4、肝癌而非肝硬化患者之血清中的 GASP-1 肽含量升高。

【0089】 GASP-1 之過表現及其肽片段之釋放似乎對於癌症發展具有特異性。圖 2 展示雖然肝癌中 GASP-1 肽片段之含量極高，但肝硬化（肝病）中 GASP-1 肽片段之含量幾乎與正常個體中相同。此發現表明 GASP-1 之過表現可能對於癌症具有特異性。

【0090】 實例 5、GASP-1 染色腫瘤及其各別正常組織之實例

【0091】 藉由正常及癌性組織之免疫組織化學分析來證實 GASP-1 在癌症組織中之過表現。使用 GASP-1 肽抗體將購自美國百麥克斯公司之數個癌症陣列染色。這些陣列為乳癌陣列 BR1003 及 BR1503、胰臟癌陣列 PA2081、腦癌陣列 BS17016、結腸癌陣列 TP242 以及肝癌陣列 T032。由天普大學病理學及實驗室醫學副教授（Associate Professor of Pathology and Laboratory Medicine at Temple University）張新民博士（Dr. Xinmin Zhang）以不知情方式評估在所述陣列中 GASP-1 染色之程度。其以 0 至 3 之等級對各例進行計分，其中 1 顯示低染色強度，2 顯示中等染色強度且 3 顯示高染色強度。發現如使用此肽特異性 GASP-1 抗體對組織陣列進行免疫組織化學染色所評估，與其各別正常組織相比 GASP-1

在腦、乳房、結腸、肝臟、肺、胰臟、前列腺癌中高度過表現。發現在研究之所有癌症中，GASP-1 在癌症中之表現與正常組織相比高 6 倍至 8 倍。

【0092】 實例 6、與正常組織相比 GASP-1 在良性、癌前乳房病變以及乳房腫瘤中顯著升高。

【0093】 使用 GASP-1 肽抗體，將 37 例良性癌前（亦即早期癌症）、21 例發育不良（亦即早期癌症）以及 36 例癌瘤（具有可檢測症狀之乳癌）以免疫組織化學方式染色。由張新民博士以不知情方式評估所述陣列中 GASP-1 染色之程度。有趣的是，觀察到良性導管中存在惡變前導管上皮細胞之染色增強的寬光譜。在這些良性導管中存在 GASP-1 之 4 倍至 6 倍過表現（圖 3）。與正常組織相比可見在發育不良（早期癌症）中 GASP-1 之表現增加 6 至 8 倍（圖 3）。這些發現表明 GASP-1 之過表現在癌症發展中在症狀出現之前極早發生。

【0094】 實例 7、GASP-1 在三陰性乳癌中以及在諸如導管原位癌（DCIS）之早期乳癌及諸如非典型導管增生（atypical ductal hyperplasia；ADH）之高增生性病變中高度表現。

【0095】 目前，未發現用於三重陰性之生物標記。圖 4 展示根據使用此肽特異性 GASP-1 抗體對組織陣列進行免疫組織化學染色，與相鄰正常組織相比，在三陰性乳癌中之 GASP-1 染色增加約 6 倍。此發現表明 GASP-1 是用於三陰性乳癌之可能的新腫瘤生物標記。亦觀察到在其他乳癌（ADH/DCIS 及癌瘤）中之類似增加。這些結果進一步表明 GASP-1 表示用於乳癌療法之新標靶。拮抗 GASP-1 之受體再循環活性可阻斷重要乳癌 GPCR(諸如

GPCR30)，已顯示此正向地(positively)影響乳癌進展（托馬斯（Thomas）等人, 2006；菲拉爾多（Filardo）等人, 2007）。

【0096】 實例 8、與正常胰臟相比 GASP-1 在胰臟癌以及胰臟之增生及發炎性病變中過表現。

【0097】 在胰臟癌中，與胰臟癌組以及增生（早期癌症）及發炎性胰臟疾病（其與癌症進展關聯）相比，極少或無染色之正常胰腺組織之染色與上述組別之間存在統計顯著差異。圖 5 展示在胰臟癌中，與正常組織相比，在增生及發炎性病變中可見 GASP-1 表現增加。

【0098】 實例 9、癌細胞生長取決於 GASP-1。

【0099】 為證實 GASP-1 是癌症病理病原學（pathoetiology）之生物標記以及潛在治療性標靶，在原型乳癌細胞株中評估 GASP-1 基因沉默之作用。MB-231 細胞株是高侵襲性雌激素受體陰性轉移性乳癌細胞株之一實例。藉由傲銳公司（Origene）使用預期將與 GASP-1 之編碼序列具有高雜交活性之 GASP-1 之互補 RNA 序列在 pGFP-V-RS 質體中構築四種 GASP-1 特異性 shRNA 表現載體。根據製造商之說明書將每一載體分別以及全部組合轉染至細胞中。另外，用含有來自 GASP-1 非編碼區之 RNA、零亂 RNA(scrambled RNA)或不含 RNA 之陰性對照質體轉染細胞。在含有 1 微克/毫升嘌呤黴素（puromycin）之培養基中選擇細胞。在轉染後 72 小時內評估細胞生長，接著使用抗-GASP-1 抗體製備用於西方墨點法。與陰性對照組及經任何單一構築體轉染之細胞相比，經所有四種 shRNA 構築體轉染之細胞展現實質上（90%）較低 GASP-1 表現（圖 6 的 A）。這些 GASP-1 抑制細胞之生長速率 5

比對照組慢十倍(圖 6 的 B)。這些結果指示 GASP-1 促進 MB-231 細胞增殖且在乳癌進展中起重要作用。很可能其他轉移性乳癌細胞株亦將使用 GASP-1 介導其增殖,尤其鑒於經檢查之所有患者導管乳房腫瘤均表現高含量之 GASP-1 的事實。

【0100】 癌細胞生長取決於 GASP-1 基因之過表現的事實表明使用 GASP-1 mRNA 或 cDNA 之過表現作為用於癌症偵測之替代生物標記的可能性。

【0101】 參考文獻

【0102】 阿拉亞茲 EA, 阿拉亞茲 JL, 庫德瑞 F, 喬丹 VC. 作為乳癌治療劑之雌激素受體。(2006) 醫藥化學當前論題 6(3):181-202 (Ariazi EA, Ariazi JL, Cordera F, Jordan VC. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. (2006) *Current Topics in Medicinal Chemistry* 6(3):181-202)。

【0103】 巴頓 CL (2006) 轉變藥物發現、臨床發展以及分子診斷之生物標記的商業機會。英國倫敦: 商業觀察有限公司 (Barton CL (2006) Commercial opportunities from biomarkers transforming drug discovery, clinical development and molecular diagnostic. London, UK: Business Insights Ltd)。

【0104】 巴塞爾加 J. 靶向癌症中之酪胺酸激酶: 第二波。(2006) 科學 312(5777): 1175-1178 (Baselga J. Targeting tyrosine kinases in cancer: The second wave. (2006) *Science* 312(5777): 1175-1178)。

【0105】 常 FN, 永安 CR. 在蛋白質結合膜上電泳分離蛋白質之系統及方法。(2008) 美國專利 7,326,326 (Chang FN, Yonan CR. System and methods for electrophoretic separation of proteins on

protein binding membranes. (2008) U.S Patent 7,326,326)。

【0106】 常 FN, 東 P, 圖申斯基, GP (2009) 偵測疾病標記之方法. WO/2009/014552 (Chang FN, Duong P, Tuszynski, GP (2009) Method for detecting disease markers. WO/2009/014552)。

【0107】 庫塞爾斯 GL, 瓦辛格 VC, 霍赫斯特拉塞爾 DF, 桑切斯 JC: 蛋白質表現之動態範圍: 蛋白質體研究之一項難題. (2000) 電泳 21:1104-1115 (Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC: The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research. (2000) *Electrophoresis* 21:1104-1115)。

【0108】 丹尼斯 MS 等人 作為改善蛋白質藥物動力學之普通策略的白蛋白結合. (2002) 生物化學雜誌 277: 35035-43(Dennis MS, et al. Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins. (2002) J. Biol. Chem. 277: 35035-43)。

【0109】 德魯克 BJ. 作為靶向療法之範例的伊馬替尼. (2004) 癌症研究進展 91:1-30 (Druker BJ. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. (2004) *Advances in Cancer Research* 91:1-30)。

【0110】 達菲 MJ. 乳癌及其他癌症中之預示標記: 評論. (2005) 臨床化學 51(3):494-503 (Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: A review. (2005) *Clinical Chemistry* 51(3):494-503)。

【0111】 菲拉爾多 E, 奎因 J, 龐 Y, 格雷伯 C, 肖 S, 董 J, 托馬斯 P. 質膜處之新穎雌激素受體 G 蛋白耦合性受體 30 (GPR30) 的活化. (2007) 內分泌學 148:3236-3245 (Filardo E, Quinn J, Pang S

Y, Graeber C, Shaw S, Dong J, Thomas P. Activation of the novel estrogen receptor G Protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. (2007) *Endocrinology* 148:3236-3245)。

【0112】 葛氏巴利尼 G, 隆戈 R, 托里諾 F, 加圖索 D, 莫拉比托 A, 託福利 G. 定製療法在腫瘤學中可行嗎? (2006) 腫瘤學與血液學評論 57(1):79-101 (Gasparini G, Longo R, Torino F, Gattuso D, Morabito A, Toffoli G. Is tailored therapy feasible in oncology? (2006) *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 57(1):79-101)。

【0113】 海斯 DF. 回顧預後及預示因子. (2005) 乳房 14(6):493-499(Hayes DF. Prognostic and predictive factors revisited. (2005) *Breast* 14(6):493-499)。

【0114】 何 P, 何 HZ, 戴 J, 王 Y, 沈 QH, 周 LP, 張 ZS, 孫 YL, 劉 F, 王 K 等人 人類血漿蛋白質體：使用鳥槍法策略分析中國人血清. (2005) 蛋白質體學, 5:3442-3453(He P, He HZ, Dai J, Wang Y, Sheng QH, Zhou LP, Zhang ZS, Sun YL, Liu F, Wang K, et al. The human plasma proteome: Analysis of Chinese serum using shotgun strategy. (2005) *Proteomics*, 5:3442-3453)。

【0115】 勞溫賽爾 M.S.等人 來自卵巢癌患者之白蛋白關聯肽及蛋白質的分析. (2005) 臨床化學 51: 1933-45 (Lowenthal, M.S. et al. Analysis of albumin-associated peptide and proteins from ovarian cancer patients. (2005) *Clinical Chemistry* 51: 1933-45)。

【0116】 邁樂 K, 斯維克 K, 格雷夫斯 SW, 艾斯皮林 MS, 路易斯 NE, 圖林 CD: 使用質譜法分析低豐度、低分子量血清蛋白. (2004) 生物分子學技術雜誌 15:238-248 (Merrell K, Southwick K,

Graves SW, Esplin MS, Lewis NE, Thulin CD: Analysis of low-abundance, low-molecular-weight serum proteins using mass spectrometry. (2004) *J. Biomol. Tech.* 15:238-248)。

【0117】 摩瑟 E., 卡喬 J 等人 G 蛋白耦合性受體關聯分選蛋白-1 調節七次跨膜 G 蛋白耦合性受體之內吞後排序. (2010) 藥理學 86:22-29 (Moser E., Kargl J, et al. G Protein-coupled receptor associated sorting protein-1 regulates the postendocytic sorting of seven-transmembrane-spanning G Protein-coupled receptors. (2010) *Pharmacology* 86:22-29)。

【0118】 奧弗萊爾 PH. 蛋白質之高解析度二維電泳. (1975) 生物化學雜誌 250: 4007-21 (O'Farrell, PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. (1975) *J Biol Chem* 250: 4007-21)。

【0119】 賴伯格 E., 拉森 N. 等人 孤兒受體 GPR55 是新穎類大麻酚受體. 英國藥理學雜誌 152(7): 1092-1101 (Ryberg E., Larsson N. et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Brit. J Pharmacol.* 152(7): 1092-1101)。

【0120】 賽蒙因 F, 凱馳 P, 波尤夫 JJ, 馬替法斯 A, 基亞菲 BL. G 蛋白耦合性受體關聯分選蛋白之新穎家族的鑑別. (2004) 神經化學雜誌 89: 766-775 (Simonin F, Karcher P, Boeuf JJ, Matifas A, Kieffer BL. Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. (2004) *J Neurochem.* 89: 766-775)。

【0121】 托馬斯 P, 董 J. 由環境雌激素結合及活化七次跨膜雌激 S

素受體 GPR30：內分泌破壞之潛在新穎機制。(2006) 類固醇生物化學與分子生物學雜誌 102:175-179(Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. (2006) *J Steroid Biochem. and Mol. Biol.* 102:175-179)。

【0122】 圖申斯基 GP.等人, 2011. G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1 (GASP-1), 乳癌之潛在生物標記. 實驗與分子病理學. 91, 608-13 (Tuszynski, GP., et al., 2011. G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1 (GASP-1), a potential biomarker in breast cancer. *Exp Mol Pathol.* 91, 608-13)。

【0123】 惠斯勒 J., 恩奎斯特 J.等人 G 蛋白耦合性受體之內吞後排序的調節.(2002). 科學 297: 615-620 (Whistler, J., Enquist J. et al. Modulation of postendocytic sorting of G Protein-coupled receptors. (2002). *Science* 297: 615-620)。

【0124】 妍 CH, 皮格勒姆 MD. 在治療 HER2 擴增之乳癌中之抗-erbb-2 抗體曲妥珠單抗.(2005) 研究用新藥 23(5):391-409 (Yeon CH, Pegram MD. Anti-erbB-2 antibody trastuzumab in the treatment of HER2-amplified breast cancer. (2005) *Investigational New Drugs* 23(5):391-409)。

【0125】 儘管本發明已結合特定實施例來描述，但應瞭解如所主張之本發明不應過度限於所述特定實施例。實際上，本發明之所描述組成物及方法之多種修改及變化對於本領域的技術人員將顯而易見且意欲在隨附申請專利範圍之範疇內。

【符號說明】

【0126】

無

【序列表】

<110> 天普大學

<120> 做為癌症生物標記之 G-蛋白耦合性受體關聯分選排序蛋白 1

<150> US 13/464,174

<151> 2012-05-04

<150> US 13/384,014

<151> 2012-01-13

<150> US 61/225,254

<151> 2009-07-14

<150> PCT/US10/041813

<151> 2010-07-13

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 完全合成

<400> 1

Glu Glu Ala Ser Pro Glu Ala Val Ala Gly Val Gly Phe Glu Ser Lys

1 5 10 15

申請專利範圍

1. 一種判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，包括偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述癌症是早期癌症。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，更包括將所述個體中 GASP-1 之表現量與無癌症個體中 GASP-1 之表現量進行比較。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述早期癌症是由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中偵測所述個體中 GASP-1 之表現量包括偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述生物樣品是由血液、尿液、脊髓液、羊水、血清、齦溝液、淚液、淋巴液、乳腺分泌物、黏液、唾液、精液、眼淚、陰道分泌物以及玻璃狀體液所組成的族群中選出。

7. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述生物樣品包括自所述個體獲得之癌前組織。

8. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，包括自所述個體之癌前組織獲得生物樣品，偵測所述生物樣品中存在之 GASP-1 肽片段之量，以及將所述生物樣品

中存在之 GASP-1 肽片段之量與無癌組織中存在之 GASP-1 肽片段之量進行比較。

9. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量包括使所述生物樣品與選擇性結合 GASP-1 肽片段之結合劑接觸以及偵測結合於所述結合劑之 GASP-1 肽片段之量。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述結合劑是抗體。

11. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述 GASP-1 肽片段具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 1。

12. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述 GASP-1 肽片段包括約 6 至約 30 個胺基酸。

13. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中偵測所述個體中 GASP-1 之表現量包括偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 核酸之量。

14. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述個體尚未發展晚期癌症。

15. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，包括使用「競爭性酶聯免疫吸附分析」偵測所述個體中 GASP-1 肽片段之量，其中所述「競爭性酶聯免疫吸附分析」能夠偵測生物樣品中存在之濃度小於 1 奈克/毫升的 GASP-1 肽片段。

16. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述早期癌症是早期乳癌。

17. 如申請專利範圍第 16 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述乳癌是三陰性乳癌。

18. 一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制或停止早期癌症進展為晚期癌症。

19. 如申請專利範圍第 18 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 GASP-1 或其肽具有選擇性之抗體。

20. 如申請專利範圍第 18 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之抗體。

21. 如申請專利範圍第 18 項所述之治療個體之早期癌症的方法，包括投與於醫藥學上可接受之載劑中的所述 GASP-1 抑制劑。

22. 一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體中 GASP-1 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測所述個體中 GASP-1 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量進行比較。

23. 如申請專利範圍第 22 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中偵測所述個體中 GASP-1 之表現量包括偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量。

24. 如申請專利範圍第 23 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中所述 GASP-1 肽片段具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 1。

25. 如申請專利範圍第 22 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中偵測所述個體中 GASP-1 之表現量包括偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 核酸之量。

26. 如申請專利範圍第 22 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中所述第一時間點是在治療方案之前且所述後續時間點是在所述治療方案期間，其中所述方法隨時間監測所述治療方案之有效性。

27. 一種判定個體是否存在早期癌症之方法，包括：
偵測所述個體之生物樣品中 GASP-1 核酸之表現量，
其中所述個體尚未診斷出患有晚期癌症，
其中與無癌症個體或無癌症生物樣品中 GASP-1 之表現量相比，所述個體中 GASP-1 核酸之較高表現量指示所述個體存在早期癌症。

28. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中偵測 GASP-1 核酸之表現量的步驟包括測定所述樣品中 GASP-1 mRNA 之量。

29. 如申請專利範圍第 28 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述樣品中 GASP-1 mRNA 之量藉由 RT-qPCR 或 qPCR 來測定。

30. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，包括將所述個體中 GASP-1 mRNA 之表現量與無癌症個體中 GASP-1 mRNA 之表現量進行比較。

31. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中偵測 GASP-1 核酸之表現量的步驟包括測定所述樣 S

品中 GASP-1 cDNA 之量。

32. 如申請專利範圍第 31 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述樣品中 GASP-1 cDNA 之量藉由 Immuno-PCR (IPCR) 來測定。

33. 如申請專利範圍第 31 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述樣品中 GASP-1 cDNA 之量藉由微陣列來測定。

34. 如申請專利範圍第 31 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述樣品中 GASP-1 cDNA 之量藉由 PCR 陣列來測定。

35. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述早期癌症是由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。

36. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述生物樣品是由血液、尿液、脊髓液、羊水、血清、齦溝液、淚液、淋巴液、乳腺分泌物、黏液、唾液、精液、眼淚、陰道分泌物以及玻璃狀體液所組成的族群中選出。

37. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述生物樣品包括自所述個體獲得之癌前組織。

38. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，包括自所述個體之癌前組織獲得所述生物樣品，偵測所述生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量，以及將所述生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量與無癌症生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量進行比較。

39. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，包括自所述個體之癌前組織獲得所述生物樣品，偵測所述生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量，以及將所述生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量與無癌症生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量進行比較。

40. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述早期癌症是早期乳癌。

41. 如申請專利範圍第 40 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述乳癌是三陰性乳癌。

42. 一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體中 GASP-1 mRNA 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測所述個體中 GASP-1 mRNA 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 mRNA 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 mRNA 之表現量進行比較，

其中所述個體尚未診斷出患有晚期癌症，

其中與在所述第一時間點的 GASP-1 mRNA 之表現量相比，在所述一個或大於一個後續時間點的 GASP-1 mRNA 之較高表現量指示所述早期癌症之進展。

43. 如申請專利範圍第 42 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中所述第一時間點是在治療方案之前且所述後續時間點是在所述治療方案期間，其中所述方法隨時間監測所述治療方案之有效性。

44. 一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一

時間點偵測所述個體中 GASP-1 cDNA 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測所述個體中 GASP-1 cDNA 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 cDNA 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 cDNA 之表現量進行比較，

其中所述個體尚未診斷出患有晚期癌症，

其中與在所述第一時間點的 GASP-1 cDNA 之表現量相比，在所述一個或大於一個後續時間點的 GASP-1 cDNA 之較高表現量指示所述早期癌症之進展。

45. 如申請專利範圍第 44 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中所述第一時間點是在治療方案之前且所述後續時間點是在所述治療方案期間，其中所述方法隨時間監測所述治療方案之有效性。

46. 一種判定個體是否存在早期癌症之套組，包括：

包括 GASP-1 核苷酸序列之至少 6 個連續核苷酸的核酸分子，其中所述套組適用於偵測對應於所述個體之生物樣品中的核酸分子之 mRNA。

47. 一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制或停止早期癌症進展為晚期癌症。

48. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括抑制劑生物分子。

49. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 GASP-1 或其肽具有選擇性之抗體。

50. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之抗體。

51. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 GASP-1 cDNA 序列具有選擇性之小抑制性 RNA (small inhibitory RNA ; siRNA)。

52. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 GASP-1 cDNA 序列具有選擇性之短髮夾 RNA (short hairpin RNA ; shRNA)。

53. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之小抑制性 RNA (siRNA)。

54. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之短髮夾 RNA (shRNA)。

55. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述 GASP-1 抑制劑包括干擾 GASP-1 或其肽片段與其搭配物之相互作用的 GASP-1 抑制劑。

56. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，包括投與於醫藥學上可接受之載劑中的所述 GASP-1 抑制劑。

57. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述早期癌症是由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。

58. 如申請專利範圍第 47 項所述之治療個體之早期癌症的方法 5

法，其中所述早期癌症是早期乳癌。

59. 如申請專利範圍第 58 項所述之治療個體之早期癌症的方法，其中所述早期乳癌是早期三陰性乳癌。

修正本			
版次	修	正	日期
1	年	月	日
2	年	月	日
3	年	月	日

優先權日：101年5月4日、11
公開準備日：102年8月5日



函稿檔名：*B0200352.208*

專利案件公開書目資料

申請實體審查：無

申請案號：102115935

申請日期：中華民國 102 (2013) 年 5 月 3 日

專利名稱：做為癌症生物標記之 G－蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1

G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING PROTEIN 1
AS A CANCER BIOMARKER

優先權：

美國	2012/05/04	13/464,174
美國	2013/03/13	13/800,741

申請人：

天普大學

TEMPLE UNIVERSITY OF THE
COMMONWEALTH
SYSTEM OF HIGHER EDUCATION

美國(US)

美國

發明/創作人：

章 法蘭克 N

CHANG, FRANK N

美國(US)

塔絲竹司基 喬治 P

TUSZYNSKI, GEORGE P

美國(US)

代理人：

詹銘文

圖式

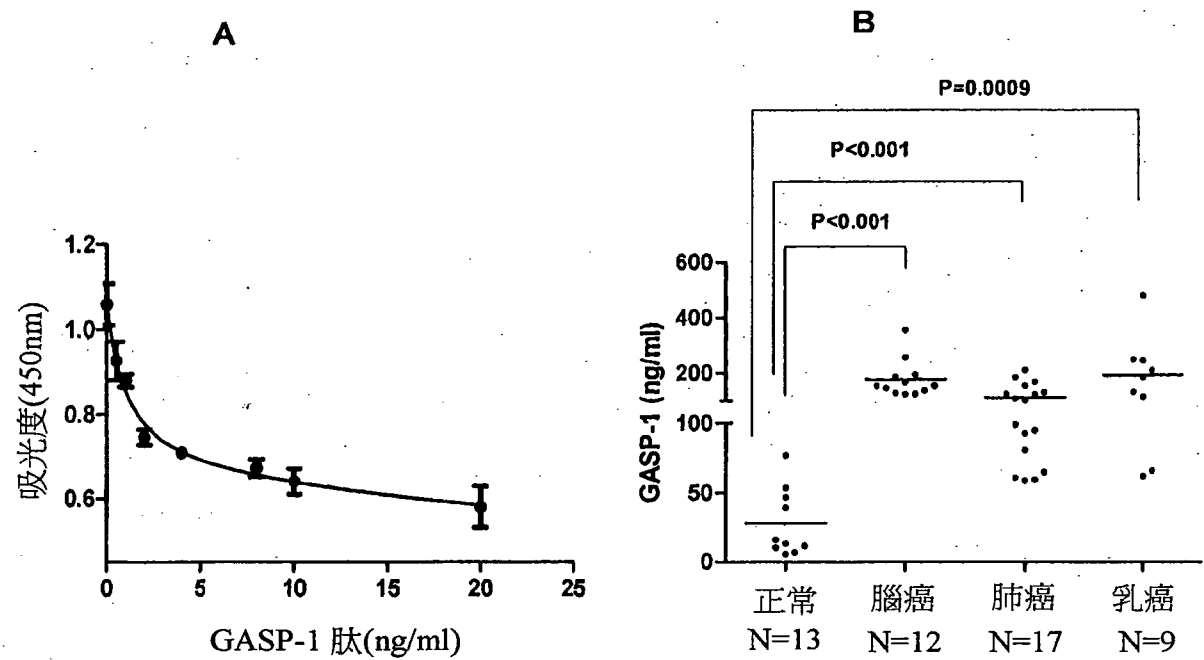


圖 1

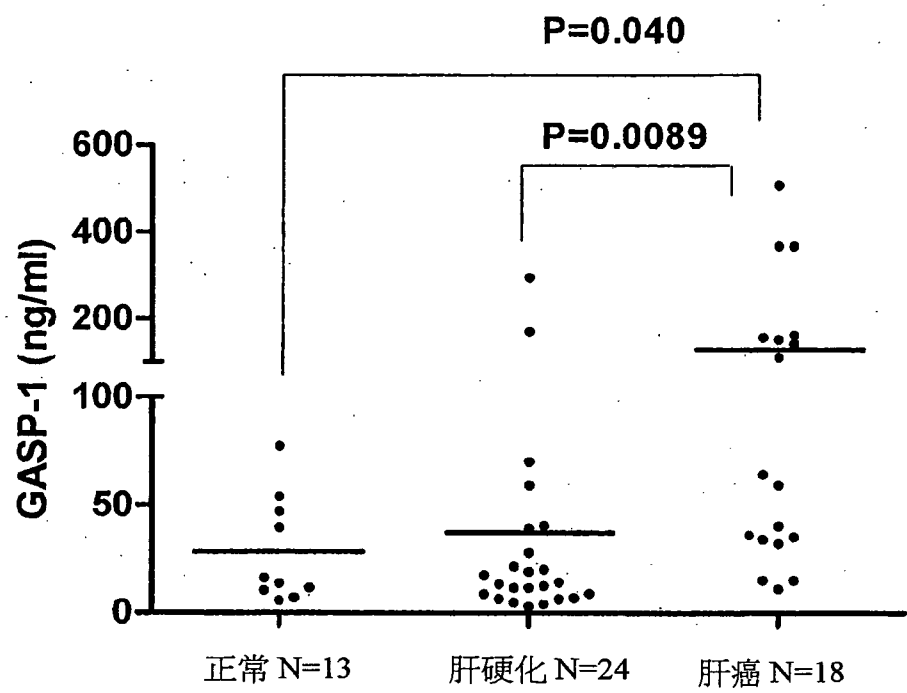


圖 2

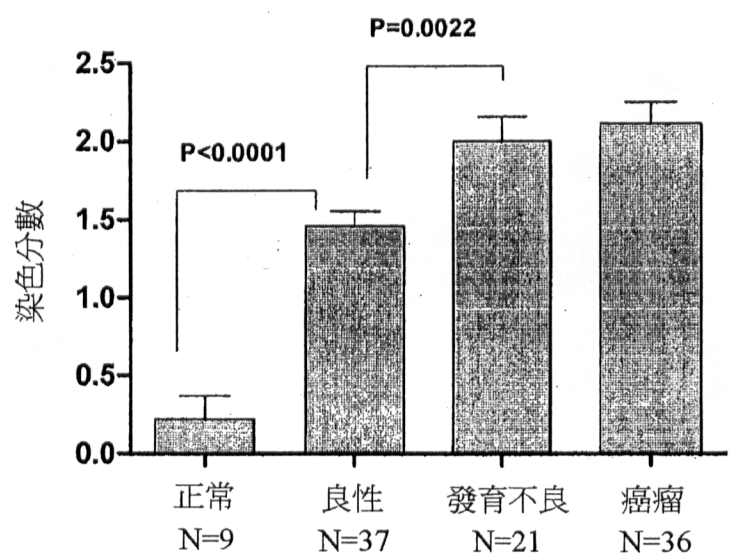


圖 3

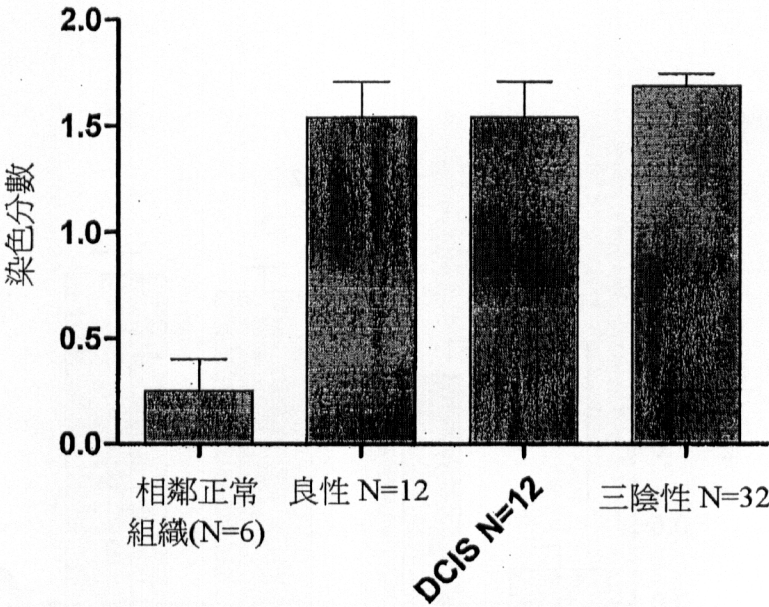


圖 4

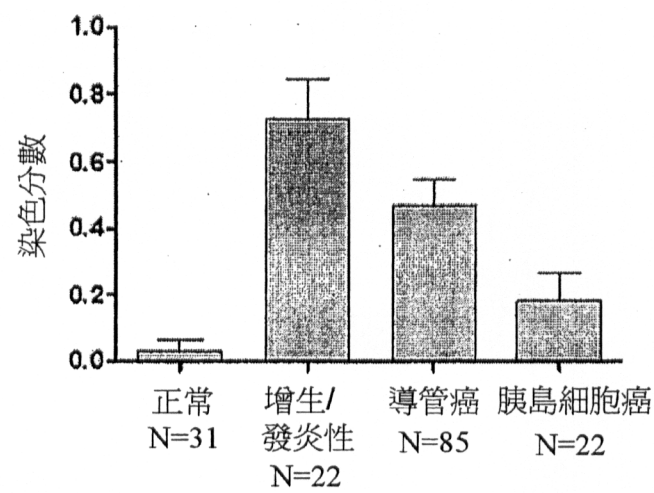


圖 5

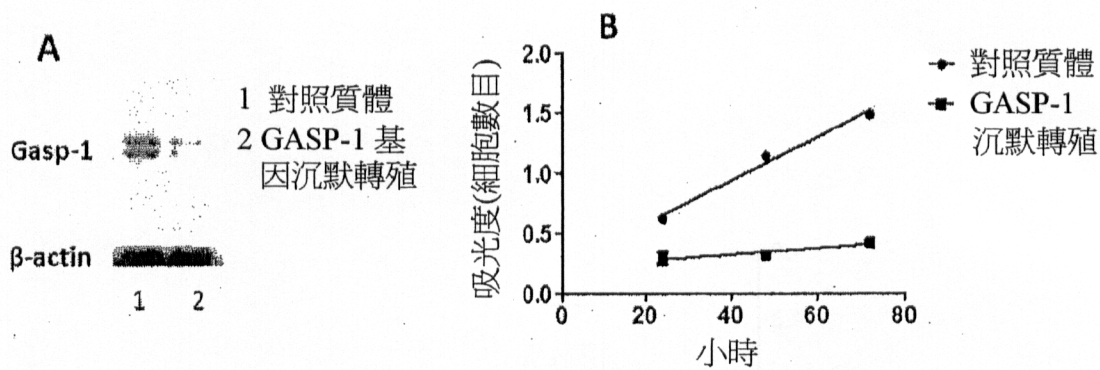


圖 6

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

C67K 14/435 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

【發明名稱】

做為癌症生物標記之 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1

G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING
PROTEIN 1 AS A CANCER BIOMARKER

【中文】

本發明提供一種判定個體是否存在早期癌症之方法，包括藉由偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量來偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。因為癌症可在早期偵測到，所以可在癌症達到晚期之前（例如在發展出明顯症狀之前）起始治療性靶向。本發明提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制早期癌症進展為晚期癌症。本發明開發了一種能夠偵測濃度小於 1 奈克/毫升之 GASP-1 肽片段的競爭性酶聯免疫吸附分析。

【英文】

A method for determining whether early stage cancer is present in a subject comprises detecting the expression level of GASP-1 in the subject by detecting the amount of GASP-1 peptide fragments present in a biological sample of the subject. Because cancer can be detected at an early stage, therapeutic targeting

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

C67K 14/435 (2006.01)
 G01N 33/53 (2006.01)
 G01N 33/574 (2006.01)

【發明名稱】

做為癌症生物標記之 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1

G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING
 PROTEIN 1 AS A CANCER BIOMARKER

【中文】

本發明提供一種判定個體是否存在早期癌症之方法，包括藉由偵測所述個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量來偵測所述個體中 GASP-1 之表現量。因為癌症可在早期偵測到，所以可在癌症達到晚期之前（例如在發展出明顯症狀之前）起始治療性靶向。本發明提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制早期癌症進展為晚期癌症。本發明開發了一種能夠偵測濃度小於 1 奈克/毫升之 GASP-1 肽片段的競爭性酶聯免疫吸附分析。

【英文】

A method for determining whether early stage cancer is present in a subject comprises detecting the expression level of GASP-1 in the subject by detecting the amount of GASP-1 peptide fragments present in a biological sample of the subject. Because cancer can be detected at an early stage, therapeutic targeting

may be initiated before cancer reaches late stage (e.g., before the development of overt symptoms). A method for treating early stage cancer in a subject comprises administering to the subject an effective amount of a GASP-1 inhibitor to inhibit the progression of early stage cancer to late stage cancer. A Competitive ELISA capable of detecting GASP-1 peptide fragments at a concentration of less than 1 ng/ml was developed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 1。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

may be initiated before cancer reaches late stage (e.g., before the development of overt symptoms). A method for treating early stage cancer in a subject comprises administering to the subject an effective amount of a GASP-1 inhibitor to inhibit the progression of early stage cancer to late stage cancer. A Competitive ELISA capable of detecting GASP-1 peptide fragments at a concentration of less than 1 ng/ml was developed.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖 1。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

做為癌症生物標記之 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1

G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR-ASSOCIATED SORTING
PROTEIN 1 AS A CANCER BIOMARKER

【技術領域】

【0001】 本發明是關於 G-蛋白耦合性受體關聯分選蛋白 1 (G-protein coupled receptor-associated sorting protein 1 , GASP-1)、其肽片段及 GASP-1 核酸作為早期或晚期癌症生物標記之用途，以及所述生物標記用於判定個體之診斷、預後或治療性治療(therapeutic treatment)之用途。

【先前技術】

【0002】 在未來十年內，預計生物標記會顯著改變藥物發現及開發之效率及經濟效益。製藥工業將其焦點自簡單地區分治療性反應者/無反應者群體之生物標記轉移至鑑別自身經證實為治療性標靶之新生物標記。據估計，若生物標記資料可促進藥物開發方法中僅 10%之重大決策，則每種藥物可節約多達\$1 億(巴頓(Barton), 2006)。估計到 2014 年全球生物標記市場可達\$205 億，自 2009 年至 2014 年以約 20%之 CAGR 增長。市場發展主要由藥物發現及開發對生物標記之高度需求來驅動。

【0003】 目前，腫瘤學是疾病生物標記研究及開發中最活躍的領域，主要是因為癌症療法通常提供用於新療法開發中之生檢及手術切除組織。舉例而言，伊馬替尼（imatinib）靶向因染色體易位（chromosomal translocation）而產生之酶，發現所述染色體易位與慢性骨髓性白血病（chronic myelogenous leukemia）關聯（德魯克（Druker），2004；巴塞爾加（Baselga），2006）。在乳癌中，使用雌激素受體之表現作為用於預後之生物標記且鑑別可能受益於抗雌激素療法之女性（達菲（Duffy），2005；阿拉亞茲（Ariazi）等人，2006），而 HER2（生長因子受體）之過表現作為用於預後及用於曲妥珠單抗（trastuzumab）治療之生物標記（妍及皮格勒姆（Yeon and Pegram），2005；達菲，2005；巴塞爾加，2006）。然而，儘管有這些顯著的成就，但相對少數的患者曾受益於生物標記指導療法，因為僅在百分之幾的群體中鑑別到大部分生物標記，且極少數經充分證實為藥物標靶。大部分候選生物標記未曾越過發現階段，且經證實用於藥物開發或適於臨床應用之生物標記數目仍極小（達菲，2005；海斯（Hayes），2005；葛氏巴利尼（Gasparini）等人，2006）。亟需鑑別作為治療性標靶之更多生物標記，尤其是早期癌症生物標記，且開發可有益於其餘癌症患者之藥物。

【0004】 生物標記研究蓬勃發展，此主要歸因於使用著重於鑑別患病與正常狀態之間的蛋白質結構及豐度的差異之蛋白質體方法。一旦鑑別出，這些生物標記蛋白可用於開發診斷工具，且因為其為功能分子，所以其亦更有可能作為有效治療性標靶。

【0005】 血漿中大量蛋白質之可得性及存在使其成為極佳基質，因此在其中尋找新生物標記。然而，人類血清中多種蛋白質

GASP-1 肽片段之量進行比較。偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量可包括使生物樣品與選擇性結合 GASP-1 肽片段之結合劑（例如抗體）接觸以及偵測結合於所述結合劑之 GASP-1 肽片段之量。GASP-1 肽片段可具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 1 及/或可包括約 6 個至約 30 個胺基酸。在上述方法中，偵測個體中 GASP-1 之表現量可包括偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 核酸之量。在一個實施例中，個體尚未發展晚期癌症。「競爭性 ELISA（Competitive ELISA）」可用於偵測個體中 GASP-1 肽片段之量，其中所述「競爭性 ELISA」能夠偵測生物樣品中存在之濃度小於 1 奈克/毫升的 GASP-1 肽片段。

【0018】 本發明之另一態樣提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制或停止早期癌症進展為晚期癌症。所述 GASP-1 抑制劑可包括對於 GASP-1 或其肽具有選擇性之抗體。GASP-1 抑制劑可包括對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之抗體。GASP-1 抑制劑可於醫藥學上可接受之載劑中投與。

【0019】 本發明之又一態樣提供一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括（i）在第一時間點偵測所述個體中 GASP-1 之表現量；（ii）在一個或大於一個後續時間點偵測個體中 GASP-1 之表現量；以及（iii）將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量進行比較。偵測個體中 GASP-1 之表現量可包括偵測個體之生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量。GASP-1 肽片段可具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 1。偵測個體中 GASP-1 之表現量可包括偵測

個體之生物樣品中存在的 GASP-1 核酸之量。在上述方法中，所述第一時間點可在治療方案之前且所述後續時間點可在所述治療方案期間，其中所述方法監測治療方案隨時間之有效性。

【0020】 本發明之另一態樣提供一種判定個體是否存在早期癌症之方法，包括：

偵測所述個體之生物樣品中 GASP-1 核酸之表現量，

其中個體尚未診斷患有晚期癌症，

其中與無癌症個體或無癌症生物樣品中 GASP-1 之表現量相比，個體中 GASP-1 核酸之較高表現量指示個體存在早期癌症。偵測 GASP-1 核酸之表現量的步驟可包括測定樣品中 GASP-1 mRNA 之量。樣品中 GASP-1 mRNA 之量可藉由例如 RT-qPCR 或 qPCR 來測定。所述方法可包括將個體中 GASP-1 mRNA 之表現量與無癌症個體中 GASP-1 mRNA 之表現量進行比較。偵測 GASP-1 核酸之表現量的步驟可包括測定樣品中 GASP-1 cDNA 之量。樣品中 GASP-1 cDNA 之量可藉由 Immuno-PCR (IPCR)、藉由微陣列或藉由 PCR 陣列來測定。早期癌症可由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。早期癌症可為早期乳癌。所述乳癌可為三陰性乳癌。生物樣品可由血液、尿液、脊髓液、羊水、血清、齕溝液、淚液、淋巴液、乳腺分泌物、黏液、唾液、精液、眼淚、陰道分泌物以及玻璃狀體液所組成的族群中選出。生物樣品可包括自個體獲得之癌前組織。所述方法可包括自個體之癌前組織獲得生物樣品，偵測所述生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量，以及將生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量與無癌症生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量進行比較。所述之方法可包

括自個體之癌前組織獲得生物樣品，偵測所述生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量，以及將生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量與無癌症生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量進行比較。

【0021】 本發明之另一態樣提供一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體中 GASP-1 mRNA 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測個體中 GASP-1 mRNA 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 mRNA 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 mRNA 之表現量進行比較，

其中個體尚未診斷患有晚期癌症，

其中與在第一時間點 GASP-1 mRNA 之表現量相比，在一個或大於一個後續時間點 GASP-1 mRNA 之較高表現量指示早期癌症之進展。第一時間點可在治療方案之前且後續時間點可在所述治療方案期間，其中所述方法監測治療方案隨時間之有效性。

【0022】 本發明亦提供一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體中 GASP-1 cDNA 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測個體中 GASP-1 cDNA 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 cDNA 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 cDNA 之表現量進行比較，

其中個體尚未診斷患有晚期癌症，

其中與在第一時間點的 GASP-1 cDNA 之表現量相比，在一個或大於一個後續時間點的 GASP-1 cDNA 之較高表現量指示早期癌症之進展。第一時間點可在治療方案之前且後續時間點可在

所述治療方案期間，其中所述方法監測治療方案隨時間之有效性。

【0023】 本發明亦提供一種判定個體是否存在早期癌症之套組，其中所述套組包括：

包括 GASP-1 核苷酸序列之至少 6 個連續核苷酸的核酸分子，其中所述套組適用於偵測對應於所述個體之生物樣品中的核酸分子之 mRNA。

【0024】 本發明之另一個態樣提供一種治療個體之早期癌症的方法，包括向所述個體投與有效量之 GASP-1 抑制劑以抑制或停止早期癌症進展為晚期癌症。所述 GASP-1 抑制劑可包括抑制劑生物分子、對於 GASP-1 或其肽具有選擇性之抗體、對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之抗體、對於 GASP-1 cDNA 序列具有選擇性之小抑制性 RNA (siRNA)、對於 GASP-1 cDNA 序列具有選擇性之短髮夾 RNA (shRNA)、對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之小抑制性 RNA (siRNA)、對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之短髮夾 RNA (shRNA) 及/或干擾 GASP-1 或其肽片段與其搭配物之相互作用的 GASP-1 抑制劑。所述方法可包括投與於醫藥學上可接受之載劑中的 GASP-1 抑制劑。早期癌症可由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。早期癌症可為早期乳癌。早期乳癌可為早期三陰性乳癌。

【圖式簡單說明】

【0025】

圖 1 說明與無癌症患者相比，患有腦癌、肺癌以及乳癌之患

患者的血清中 GASP-1 肽含量升高。

【0087】 基於標準曲線，測定正常健康個體以及腦癌、肺癌以及乳癌患者中之 GASP-1 含量(圖 1、圖 1 的 B)。使用「競爭性 ELISA」程序，發現來自腦癌、肺癌以及乳癌患者之血清表現的 GASP-1 肽是來自正常健康個體之血清的 10 倍。顯然這些 ELISA 可用於偵測這些癌症之存在。

【0088】 實例 4、肝癌而非肝硬化患者之血清中的 GASP-1 肽含量升高。

【0089】 GASP-1 之過表現及其肽片段之釋放似乎對於癌症發展具有特異性。圖 2 展示雖然肝癌中 GASP-1 肽片段之含量極高，但肝硬化(肝病)中 GASP-1 肽片段之含量幾乎與正常個體中相同。此發現表明 GASP-1 之過表現可能對於癌症具有特異性。

【0090】 實例 5、GASP-1 染色腫瘤及其各別正常組織之實例

【0091】 藉由正常及癌性組織之免疫組織化學分析來證實 GASP-1 在癌症組織中之過表現。使用 GASP-1 肽抗體將購自美國百麥克斯公司之數個癌症陣列染色。這些陣列為乳癌陣列 BR1003 及 BR1503、胰臟癌陣列 PA2081、腦癌陣列 BS17016、結腸癌陣列 TP242 以及肝癌陣列 T032。由天普大學病理學及實驗室醫學副教授 (Associate Professor of Pathology and Laboratory Medicine at Temple University) 張新民博士 (Dr. Xinmin Zhang) 以不知情方式評估在所述陣列中 GASP-1 染色之程度。其以 0 至 3 之等級對各例進行計分，其中 1 顯示低染色強度，2 顯示中等染色強度且 3 顯示高染色強度。發現如使用此肽特異性 GASP-1 抗體對組織陣列進行免疫組織化學染色所評估，與其各別正常組織相比 GASP-1

在腦、乳房、結腸、肝臟、肺、胰臟、前列腺癌中高度過表現。發現在研究之所有癌症中，GASP-1 在癌症中之表現與正常組織相比高 6 倍至 8 倍。

【0092】 實例 6、與正常組織相比 GASP-1 在良性、癌前乳房病變以及乳房腫瘤中顯著升高。

【0093】 使用 GASP-1 肽抗體，將 37 例良性癌前（亦即早期癌症）、21 例發育不良（亦即早期癌症）以及 36 例癌瘤（具有可檢測症狀之乳癌）以免疫組織化學方式染色。由張新民博士以不知情方式評估所述陣列中 GASP-1 染色之程度。有趣的是，觀察到良性導管中存在惡變前導管上皮細胞之染色增強的寬光譜。在這些良性導管中存在 GASP-1 之 4 倍至 6 倍過表現（圖 3）。與正常組織相比可見在發育不良（早期癌症）中 GASP-1 之表現增加 6 至 8 倍（圖 3）。這些發現表明 GASP-1 之過表現在癌症發展中在症狀出現之前極早發生。

【0094】 實例 7、GASP-1 在三陰性乳癌中以及在諸如導管原位癌（DCIS）之早期乳癌及諸如非典型導管增生（atypical ductal hyperplasia；ADH）之高增生性病變中高度表現。

【0095】 目前，未發現用於三重陰性之生物標記。圖 4 展示根據使用此肽特異性 GASP-1 抗體對組織陣列進行免疫組織化學染色，與相鄰正常組織相比，在三陰性乳癌中之 GASP-1 染色增加約 6 倍。此發現表明 GASP-1 是用於三陰性乳癌之可能的新腫瘤生物標記。亦觀察到在其他乳癌（ADH/DCIS 及癌瘤）中之類似增加。這些結果進一步表明 GASP-1 表示用於乳癌療法之新標靶。拮抗 GASP-1 之受體再循環活性可阻斷重要乳癌 GPCR（諸如

<213> 人工序列

<220>

<223> 完全合成

<400> 1

Glu Glu Ala Ser Pro Glu Ala Val Ala Gly Val Gly Phe Glu Ser Lys

1 5 10 15

申請專利範圍

1. 一種判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，包括偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 之表現量。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述癌症是早期癌症。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，更包括將所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 之表現量與無癌症個體之體外生物樣品中 GASP-1 之表現量進行比較。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述早期癌症是由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 之表現量包括偵測所述個體之體外生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述體外生物樣品是由血液、尿液、脊髓液、羊水、血清、齧溝液、淚液、淋巴液、乳腺分泌物、黏液、唾液、精液、眼淚、陰道分泌物以及玻璃狀體液所組成的族群中選出。
7. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述體外生物樣品包括自所述個體獲得之癌前組織。
8. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，包括自所述個體之癌前組織獲得所述體外生物樣

品，偵測所述體外生物樣品中存在之 GASP-1 肽片段之量，以及將所述體外生物樣品中存在之 GASP-1 肽片段之量與無癌組織中存在之 GASP-1 肽片段之量進行比較。

9. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中偵測所述個體之體外生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量包括使所述體外生物樣品與選擇性結合 GASP-1 肽片段之結合劑接觸以及偵測結合於所述結合劑之 GASP-1 肽片段之量。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述結合劑是抗體。

11. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述 GASP-1 肽片段具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 1。

12. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述 GASP-1 肽片段包括 6 至 30 個胺基酸。

13. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 之表現量包括偵測所述個體之體外生物樣品中存在的 GASP-1 核酸之量。

14. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述個體尚未發展晚期癌症。

15. 如申請專利範圍第 5 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，包括使用競爭性酶聯免疫吸附分析偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 肽片段之量，其中所述競爭性酶聯免

疫吸附分析能夠偵測所述體外生物樣品中存在之濃度小於 1 奈克/毫升的 GASP-1 肽片段。

16. 如申請專利範圍第 1 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述早期癌症是早期乳癌。

17. 如申請專利範圍第 16 項所述之判定個體是否存在早期或晚期癌症之方法，其中所述乳癌是三陰性乳癌。

18. 一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 之表現量進行比較。

19. 如申請專利範圍第 18 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 之表現量包括偵測所述個體之體外生物樣品中存在的 GASP-1 肽片段之量。

20. 如申請專利範圍第 19 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中所述 GASP-1 肽片段具有胺基酸序列 SEQ ID NO: 1。

21. 如申請專利範圍第 18 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 之表現量包括偵測所述個體之體外生物樣品中存在的 GASP-1 核酸之量。

22. 如申請專利範圍第 18 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中所述第一時間點是在治療方案之前且所述後續時間點是在所述治療方案期間，其中所述方法隨時間監測所述治療方

案之有效性。

23. 一種判定個體是否存在早期癌症之方法，包括：

偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 核酸之表現量，

其中所述個體尚未診斷出患有晚期癌症，

其中與無癌症個體或無癌症體外生物樣品中 GASP-1 之表現量相比，所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 核酸之較高表現量指示所述個體存在早期癌症。

24. 如申請專利範圍第 23 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中偵測 GASP-1 核酸之表現量的步驟包括測定所述樣品中 GASP-1 mRNA 之量。

25. 如申請專利範圍第 24 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述樣品中 GASP-1 mRNA 之量藉由 RT-qPCR 或 qPCR 來測定。

26. 如申請專利範圍第 23 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，包括將所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 mRNA 之表現量與無癌症個體之體外生物樣品中 GASP-1 mRNA 之表現量進行比較。

27. 如申請專利範圍第 23 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中偵測 GASP-1 核酸之表現量的步驟包括測定所述樣品中 GASP-1 cDNA 之量。

28. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述樣品中 GASP-1 cDNA 之量藉由 Immuno-PCR (IPCR) 來測定。

29. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌

症之方法，其中所述樣品中 GASP-1 cDNA 之量藉由微陣列來測定。

30. 如申請專利範圍第 27 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述樣品中 GASP-1 cDNA 之量藉由 PCR 陣列來測定。

31. 如申請專利範圍第 23 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述早期癌症是由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。

32. 如申請專利範圍第 23 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述體外生物樣品是由血液、尿液、脊髓液、羊水、血清、齦溝液、淚液、淋巴液、乳腺分泌物、黏液、唾液、精液、眼淚、陰道分泌物以及玻璃狀體液所組成的族群中選出。

33. 如申請專利範圍第 23 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述體外生物樣品包括自所述個體獲得之癌前組織。

34. 如申請專利範圍第 23 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，包括自所述個體之癌前組織獲得所述體外生物樣品，偵測所述體外生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量，以及將所述體外生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量與無癌症體外生物樣品中存在之 GASP-1 mRNA 之量進行比較。

35. 如申請專利範圍第 23 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，包括自所述個體之癌前組織獲得所述體外生物樣品，偵測所述體外生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量，以及將所述體外生物樣品中存在之 GASP-1 cDNA 之量與無癌症體外生物樣

品中存在之 GASP-1 cDNA 之量進行比較。

36. 如申請專利範圍第 23 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述早期癌症是早期乳癌。

37. 如申請專利範圍第 36 項所述之判定個體是否存在早期癌症之方法，其中所述乳癌是三陰性乳癌。

38. 一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 mRNA 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 mRNA 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 mRNA 之表現量與在所述第一時間點所偵測到之 GASP-1 mRNA 之表現量進行比較，

其中所述個體尚未診斷出患有晚期癌症，

其中與在所述第一時間點的 GASP-1 mRNA 之表現量相比，在所述一個或大於一個後續時間點的 GASP-1 mRNA 之較高表現量指示所述早期癌症之進展。

39. 如申請專利範圍第 38 項所述之監測個體之早期癌症進展的方法，其中所述第一時間點是在治療方案之前且所述後續時間點是在所述治療方案期間，其中所述方法隨時間監測所述治療方案之有效性。

40. 一種監測個體之早期癌症進展的方法，包括 (i) 在第一時間點偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 cDNA 之表現量；(ii) 在一個或大於一個後續時間點偵測所述個體之體外生物樣品中 GASP-1 cDNA 之表現量；以及 (iii) 將在所述一個或大於一個後續時間點所偵測到之 GASP-1 cDNA 之表現量與在所述第

一時間點所偵測到之 GASP-1 cDNA 之表現量進行比較，

其中所述個體尚未診斷出患有晚期癌症，

其中與在所述第一時間點的 GASP-1 cDNA 之表現量相比，
在所述一個或大於一個後續時間點的 GASP-1 cDNA 之較高表現
量指示所述早期癌症之進展。

41. 如申請專利範圍第 40 項所述之監測個體之早期癌症進展
的方法，其中所述第一時間點是在治療方案之前且所述後續時間
點是在所述治療方案期間，其中所述方法隨時間監測所述治療方
案之有效性。

42. 一種判定個體是否存在早期癌症之套組，包括：

包括 GASP-1 核苷酸序列之至少 6 個連續核苷酸的核酸分
子，其中所述套組適用於偵測對應於所述個體之體外生物樣品中
的核酸分子之 mRNA。

43. 一種 GASP-1 抑制劑在製備治療個體之早期癌症之藥物的
用途。

44. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治
療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述 GASP-1 抑制劑包括抑
制劑生物分子。

45. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治
療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對
於 GASP-1 或其肽具有選擇性之抗體。

46. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治
療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對
於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之抗體。

47. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 GASP-1 cDNA 序列具有選擇性之小抑制性 RNA (small inhibitory RNA ; siRNA)。

48. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 GASP-1 cDNA 序列具有選擇性之短髮夾 RNA (short hairpin RNA ; shRNA)。

49. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之小抑制性 RNA (siRNA)。

50. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述 GASP-1 抑制劑包括對於 SEQ ID NO: 1 具有選擇性之短髮夾 RNA (shRNA)。

51. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述 GASP-1 抑制劑包括干擾 GASP-1 或其肽片段與其搭配物之相互作用的 GASP-1 抑制劑。

52. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述早期癌症是由良性病狀、增生、發育不良以及原位癌所組成的族群中選出。

53. 如申請專利範圍第 43 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述早期癌症是早期乳癌。

54. 如申請專利範圍第 53 項所述之 GASP-1 抑制劑在製備治療個體之早期癌症之藥物的用途，其中所述早期乳癌是早期三陰

201400498

為第 102115935 號中文專利範圍無劃線修正本

修正日期:102 年 8 月 29 日

性乳癌。