(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101896817 A
(43)申请公布日 2010.11.24

(21)申请号 200880119928.4

(22)申请日 2008.12.08

(30)优先权数据
07023897.7 2007.12.10 EP
08017119.2 2008.09.29 EP

(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.06.09

(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2008/010386 2008.12.08

(87)PCT申请的公布数据
WO2009/074276 EN 2009.06.18

(71)申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 J·卡尔 H·安德烈斯
U·加扎雷克 W·罗林格
N·威尔德

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李志东 郭文洁

(51)Int.Cl.
*G01N 33/574*(2006.01)

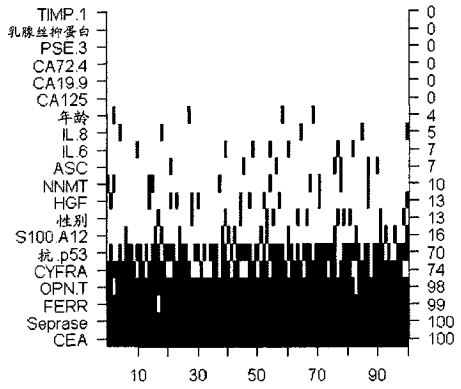
权利要求书 1 页 说明书 23 页 序列表 4 页
附图 2 页

(54)发明名称

用于结直肠癌的标记物组

(57)摘要

本发明涉及用于体外评估结直肠癌的方法，其包括测量样品中 seprase 多肽和/或其片段和抗 p53 和/或骨桥蛋白和/或铁蛋白、任选地一个或更多个其他 CRC 的标记物的浓度和/或活性，并且将组合测量结果用于 CRC 的评估。此外，其特别地涉及用于从来源于个体的液体样品评估(通过测量所述样品中 seprase 和至少抗 p53、铁蛋白和/或骨桥蛋白)CRC 的方法。根据本发明的方法可以例如用于通过筛查无症状个体进行的癌症的早期检测或用于经历手术的患者的监测。




CN 101896817 A

1. 用于体外评估结直肠癌 (CRC) 的方法，其包括测量样品中下列物质的浓度和 / 或活性：

a) seprase 多肽和 / 或其片段，

b) 抗 p53、骨桥蛋白和 / 或铁蛋白，

c) 任选地一个或更多个其他 CRC 的标记物，和

d) 将步骤 (a) 和 (b) 以及任选地步骤 (c) 的组合测量结果用于 CRC 的评估。

2. 权利要求 1 的方法，其中将至少 seprase 和抗 p53 的测量结果组合以用于 CRC 的评估。

3. 权利要求 1 的方法，其中将至少 seprase 和骨桥蛋白的测量结果组合以用于 CRC 的评估。

4. 权利要求 1 的方法，其中将至少 seprase 和铁蛋白的测量结果组合以用于 CRC 的评估。

5. 权利要求 1 的方法，其中任选地一个或更多个其他标记物选自癌胚抗原 (CEA) 和 CYFRA21-1。

6. 权利要求 1 至 3 和 5 的任一项的方法，其中组合至少 seprase、CEA、骨桥蛋白和铁蛋白的测量结果。

7. 权利要求 1 至 6 的任一项的方法，其中组合至少 seprase、CEA、抗 p53、CYFRA21-1、CEA 和铁蛋白的测量结果。

8. 权利要求 1 至 7 的任一项的方法，其中测量 seprase 多肽和 / 或其片段和 / 或包含 seprase 和 / 或其片段的复合物的浓度。

9. 包括至少 seprase 和抗 p53 的测量结果的标记物组用于 CRC 的评估的用途。

10. 包括至少 seprase 和骨桥蛋白的测量结果的标记物组用于 CRC 的评估的用途。

11. 包括至少 seprase 和铁蛋白的测量结果的标记物组用于 CRC 的评估的用途。

12. 包括至少 seprase、CEA、抗 p53 和铁蛋白的测量结果的标记物组用于 CRC 的评估的用途。

13. 包括至少 seprase、CEA、抗 p53、CYFRA21-1、CEA 和铁蛋白的测量结果的标记物组用于 CRC 的评估的用途。

14. 包括用于进行权利要求 1 至 8 的任一项的方法或用于测量根据权利要求 9 至 13 的用途的标记物组的工具的装置。

15. 包括用于进行权利要求 1 至 8 的任一项的方法或用于测量根据权利要求 9 至 13 的用途的标记物组的工具的试剂盒。

# 用于结直肠癌的标记物组

[0001] 本发明的详细描述

[0002] 本发明涉及用于体外评估结直肠癌 (CRC) 的方法，其包括测量样品中 seprase 多肽和 / 或其片段以及抗 p53 和 / 或骨桥蛋白和 / 或铁蛋白，任选地一个或更多个其他 CRC 的标记物的浓度和 / 或活性，以及将组合的测量结果用于评估 CRC。此外，其特别地涉及用于从来源于个体的液体样品评估（通过测量所述样品中 seprase 和至少一个选自抗 p53、铁蛋白和骨桥蛋白的标记物来进行评估）CRC 的方法。根据本发明的方法可以例如用于癌症的早期检测（通过筛选无症状个体）或用于经历手术的患者的监测。

[0003] 癌症仍然是主要的公共卫生挑战，尽管在检测和治疗上已取得进步。癌细胞以癌症相关标记蛋白的产生为特征。在携带癌细胞的个体的组织和体液中都发现了癌症相关蛋白。它们的水平在致癌性进展的早期通常很低，在疾病的进展过程中增加，并且只在极少数情况下观察到蛋白在疾病进展过程中显示降低的水平。此类蛋白的灵敏检测是用于诊断癌症（特别地在癌症的早期诊断中）的有利的和有前景的方法。最普遍的癌症类型是乳腺癌 (BC)、肺癌 (LC) 和结直肠癌 (CRC)。

[0004] 用于实体瘤的最重要的治疗方法是：

[0005] a) 肿瘤的手术切除，

[0006] b) 化学疗法，

[0007] c) 使用生物学如抗肿瘤抗体或抗血管生成抗体的疗法和

[0008] d) 上述方法的组合。

[0009] 肿瘤的手术切除已被广泛接受为早期实体瘤的一线疗法。然而，大多数癌症只有当它们显示症状，即当患者已处于疾病进展的相当晚期时才被检测到。

[0010] 结直肠癌是最常见的从腺瘤（息肉 (polyps)）至恶性癌的进展。

[0011] 癌症的分期是根据程度、进展和严重度对疾病的分类。其将癌症患者分类，这样可对治疗的预后和选择进行归纳。

[0012] 按照 Duke 的分期 A 至 D 将 CDR 的不同分期用于分类。当今，TNM 系统是最为广泛使用的癌症的解剖学范围的分类。其代表了国际上接受的统一的分期系统。存在 3 个基本变量：T（原发性肿瘤的范围）、N（区域淋巴结的状态）和 M（远端转移的存在或不存在）。TNM 标准由 UICC（国际防癌联盟 (International Union Against Cancer)），Sobin, LH.，Wittekind, Ch. (eds)：TNM Classification of Malignant Tumours，第 6 版，2002) 公布。一旦 TNM 状态被确定，患者则被分类至范围从 I 至 IV(IV 是最晚期疾病的分期）的由罗马数字表示的疾病分期。TNM 分期和 UICC 疾病分期彼此相应，如取自 Sobin L.H. 和 Wittekind(eds.)（同上）的下表中所示的。

[0013] TNM 分期与 UICC 疾病分期的相互关系

[0014]

| UICC疾病分期 | T 分期 | N 分期 | M 分期 |
|---|---|---|---|
| 0 期 | Tis | NO | MO |
| I 期 | T1，T2 | NO | MO |
| IIA 期 | T3 | NO | MO |
| IIB 期 | T4 | NO | MO |
| IIIA 期 | T1，T2 | N1 | MO |
| IIIB 期 | T3，T4 | N1 | MO |
| IIIC 期 | 任何 T | N2 | MO |
| IV 期 | 任何 T | 任何 N | M1 |

[0015] 尤其重要的是 CRC 的早期诊断转变为好得多的预后。结肠直肠的恶性肿瘤起于良性肿瘤，即来自腺瘤。因此，最佳预后使患者在腺癌期被诊断。早在 $T_{is}$、NO、MO 或 T1-3 ；NO ；MO 期被诊断的患者，如果经适当治疗，与对于当远端转移已存在时诊断的患者只有 10％的 5 年存活率相比较，在诊断后具有 90％以上的机会存活 5 年。

[0016] 目前的检测方法（包括成像方法，例如 X 射线或核共振）在理论上可能至少部分适合用作一般筛查工具。然而，它们极其昂贵，因而对于卫生保健系统来说不能承担其在大量受试者（特别对于无任何肿瘤症状的受试者）的普查中普遍和广泛的使用。

[0017] 因此，本发明的目的是提供简单且成本效率的肿瘤评估方法，例如以鉴定怀疑患有结直肠癌的个体。为此目的，可在体液例如血液或血清或血浆中检测到的肿瘤标记物或一组此类标记物将是令人期待的。

[0018] 尽管在 CRC 的领域中候选蛋白质标记物的名录众多并且在日益增长，但迄今为止此类分子的临床 / 诊断效果仍是未知的或未确定的。目前基于体液作为样品的适合用于 CRC 的筛查的方法似乎是不可获得的。

[0019] 基于癌胚抗原 (CEA)、肿瘤相关糖蛋白的检测的诊断性血液试验是可获得的。CEA 在 95％的获自患有结直肠癌、胃癌和胰腺癌的患者的组织样品中和在大部分乳腺癌、肺癌和头颈癌中得到增加 (Goldenberg，D.M. 等人，J.Natl.Cancer Inst.(Bethesda)57(1976)11-22)。在患有非恶性疾病的患者中报导了升高的 CEA 水平，许多患有结直肠癌的患者特别地在疾病的早期过程中在血清中具有正常的 CEA 水平 (Carriquiry，LA.and Pineyro，A.，Dis.Colon Rectum 42(1999)921-929 ；Herrera，M.A. 等人，Ann.Surg.183(1976)5-9 ；Wanebo，H.J. 等人，N.Engl.J.Med.299(1978)448-451)。CEA 在复发检测中的效果（如从血清或血浆测量的）据报导是有争议的，并且还未得到广泛应

用 (Martell,R.E. 等人,Int.J.Biol.Markers 13(1998)145-149 ;Moertel,C.G. 等人,JAMA 270(1993)943-947)。

[0020] 根据可获得的数据,血清 CEA 测定不具有使得其能够在无症状群体中用作结直肠癌的筛查试验的灵敏度和特异性 (Reynoso, G. 等人, JAMA 220(1972)361-365 ;Sturgeon, C. , Clin.Chem.48(2002)1151-1159)。

[0021] 目前用于 CRC 的所有筛查方法依赖于粪便作为样品的用途。采自粪便的样品具有潜在的有利方面 :可能利用非侵袭性工具对它们进行容易地取样,并且该样品具有一些组织特异性 ( 即对于肠组织的特异性 )。相反从体液样品筛查 CRC 被认为是几乎不可能的,因为肠腔可被视为在人体的外部 ( 外胚层 ) 上,从而具有较少的血液供应。这反过来可意味着对从体液样品如全血、血清或血浆筛查 CRC 的另外的障碍。

[0022] 愈创木脂试验目前被最广泛用作从粪便进行的 CRC 的筛选测定。然而,愈创木脂试验具有较差的灵敏度和较差的特异性。基于愈创木脂的粪便隐血试验的灵敏度为大约 26%,其是指 74% 的患有恶性损伤的患者仍将未被检测到 (Ahlquist, D.A. , Gastroenterol.Clin.North Am.26(1997)41-55)。

[0023] 癌前损伤或癌性损伤的可视化代表了最佳的早期检测方法,但结肠镜检查是侵袭性的,伴随高昂的花费、风险和合并症 (Silvis, S.E. 等人, JAMA 235(1976)928-930 ; Geenen,J.E. 等人,Am.J.Dig.Dis.20(1975)231-235 ;Anderson,W.F. 等人,J.Natl.Cancer Institute 94(2002)1126-1133)。

[0024] 最近 Sieg,A. 等人,Int.J.Colorectal Dis.14(1999)267-271 调查了作为愈创木脂试验的诊断备选方法的灵敏度和特异性。特别地,分别比较了来自粪便样品的血红蛋白和血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物的测量。已指出,血红蛋白测定对于检测结直肠瘤具有不令人满意的灵敏度。然而以大约 87% 的灵敏度检测到处于其进展的癌分期的癌症,未能以足够的灵敏度检测到早期肿瘤分期。血红蛋白 - 结合珠蛋白复合物测定在检测 CRC 的早期分期中更灵敏。该更灵敏的检测伴随着较差的特异性。然而,由于较差的特异性较变成大量的无必要的二次调查,如结肠镜检查,因此具有较差的特异性的测定也不满足通常接受的筛查测定的要求。.

[0025] 在 US 5,455,16 中和相应地在由 Roseth, A.G., 等人 (Scand. J.Gastroenterol.27(1992)793-798 ;Scand.J.Gastroenterol.28(1993)1073-1076 ) 编著的科学文献中,钙卫蛋白被描述为用于从粪便样品检测 CRC 的备选生物标记物。虽然钙卫蛋白是炎性疾病的标记物,但在几个出版物 (Johne, B. , 等人, Scand. J.Gastroenterol.36(2001)291-296 ;Limburg,P.J. ,等人,Am.J.Gastroenterol.98(2003) 2299-2305 ;Hoff,G. ,等人,Gut 53(2004)1329-1333) 中记录了其作为用于从粪便检测 CRC 的标记物的潜能。虽然钙卫蛋白的灵敏度和特异性与免疫血红蛋白测定相当,但与血红蛋白相比较,钙卫蛋白似乎具有一些有利于诊断生物标记物的特征。其均匀地分布在粪便中,其在室温下是稳定的,这使得将样品通过邮件递送至实验室是可行的,并且其显示不干扰食物成分或药物化合物 (Ton,H. ,等人,Clin.Chim.Acta 292(2000)41-54)。然而,在来自患有 CRC、克罗恩病或炎性肠病的患者的粪便中检测到升高的钙卫蛋白,S100A8 和 S100A9 的异二聚体,的浓度。这些结果与钙卫蛋白在炎症中的更一般的作用一致 (Ryckman,C. ,等人, J.Immunol.170(2003)3233-3242)。因此,钙卫蛋白在胃肠病学中的用途不限于 CRC 的检

测，而且还扩展至其他疾病，特别地炎性肠病，如由 Poullis，A.，等人 (J.Gastroenterol. Hepatol.18(2003)756-762) 综述的。

[0026] 最近已公布了用于检测粪便中的 CRC 的愈创木脂试验的另外的备选方法，其在于结直肠癌特异性抗原的检测，结肠细胞中通过免疫组织化学显示的“微型染色体维持蛋白 2”流入粪便。由于较小的研究范围，关于结直肠癌的检测的诊断值的结论是初步性的。然而，检测似乎对检测右侧的结肠癌只具有有限的灵敏度 (Davies，R.J. 等人，Lancet 359(2002)1917-1919)。

[0027] 最近，用于检测丙酮酸激酶 M2 同工酶 (M2-PK) 的测定已被引进市场 (Schebo Biotech，Gieβen，Germany)。Vogel，T. 等人，Dtsch.Med.Wochenschr.130(2005)872-877 将愈创木脂 (guaiac) 测定与用于例如血红蛋白和 M2-PK 的免疫测定进行了比较。他们显示免疫测定优于愈创木脂检测并且在相当的特异性下，M2-PK 测定与血红蛋白测定相比较，在检测 CRC 中灵敏度较低。然而，作者得出这两个基于粪便的测定的有用性仍然不可靠的结论。

[0028] 通过非侵袭性方法从体液样品鉴定允许可靠的癌症检测或提供早期预后信息的早期 CRC 肿瘤标记物或标记物组将极大地促进该疾病的诊断和筛查。相当多的患者或诊断检查服务的提供者更喜欢处理体液如血液、血清或血浆而不喜欢处理粪便样品。

[0029] 提高 CRC 的早期诊断尤其重要，因为对于早期诊断的患者，存活的机会与在疾病的晚期 (progressed stage) 诊断的患者相比要高得多。因此，存在对提高 CRC( 特别地来自体液样品的 CRC) 的诊断的急迫临床需要。

[0030] 本发明的任务是调查是否可鉴定可用于体外评估结直肠癌 (CRC) 的新型标记物或标记物组。令人惊讶地，已发现包括至少对于 seprase、对于抗 p53 或对于骨桥蛋白和 / 或对于铁蛋白的测量结果的标记物组的使用在来自体液样品的 CRC 的体外评估中是非常有利的。

[0031] 为了具有临床效果 (clinical utility)，作为单个标记物的新型诊断标记物应当可与本领域内的其他标记物相当，或更好。或者，如果分别地将新型标记物单独使用或与一个或更多个其他标记物组合使用，其应当导致诊断灵敏度和 / 或特异性的提高。最好通过其受试者工作特性 ( 将在下面进行详细地描述 ) 评估检测的诊断灵敏度和 / 或特异性。如下面详细地显示的，已令人惊讶地发现本发明的新型标记物组显著提高了诊断精确性，特别在对 CRC 的筛查中。

[0032] 在优选实施方案中，本发明涉及用于体外评估结直肠癌 (CRC) 的方法，其包括测量样品中 seprase 多肽和 / 或其片段、抗 p53、骨桥蛋白和 / 或铁蛋白或任选地一个或更多个 CRC 的其他标记物的浓度和 / 或活性，并且将 seprase、抗 p53、骨桥蛋白和 / 或铁蛋白和任选地一个或更多个其他标记物的组合测量用于 CRC 的评估。

[0033] 令人惊讶地，发现受试样品中减少的 seprase 多肽和 / 或其片段的浓度和 / 或活性与癌症特别地 CRC 的风险和 / 或发生相关。可将标记物 seprase 与标记物抗 p53、骨桥蛋白和 / 或铁蛋白组合并且，如果需要，与 CRC 的其他标记物，如 CEA 和 / 或 CYFRA21-1 组合。

[0034] 本发明的一个实施方案涉及区分可能不患结直肠癌的个体与可能被分类为“疑似”病例的个体即可能患 CRC 的个体的人群的普查。然后可以例如利用成像方法或其他合适的其他诊断方法使后一个个体群体经历进一步的诊断过程。

[0035] 本发明的另外的实施方案涉及适合用于评估结直肠癌的肿瘤标记物组的改进。

[0036] 在一个实施方案中，本发明涉及用于通过生物化学标记物评估 CRC 的方法，其包

括测量样品中 seprase 的浓度和 / 或活性，并且将测量结果，特别地测定的浓度或活性用于结直肠癌的评估。

[0037] 本发明还涉及用于利用生物化学标记物体体外评估 CRC 的方法，其包括测量样品中 seprase、选自 p53、骨桥蛋白和铁蛋白的标记物以及一个或更多个其他标记物的浓度和 / 或活性，以及将测量结果，特别地测定的浓度用于结直肠癌的评估。与 seprase、抗 p53、骨桥蛋白和铁蛋白组合使用的优选标记物是为一般性肿瘤标记物（即不特异于单个肿瘤类型的标记物）的标记物或，在另一方面，是为特定肿瘤的标记物（为特异于单个肿瘤类型的标记物）的标记物。优选一个或更多个其他标记物是癌胚抗原 (CEA) 和 / 或 CYFRA21-1。优选，可将此类标记物以任何组合与 seprase 一起使用。

[0038] 单个标记物或标记物组的截止值可以例如根据一组健康个体的检测来确定。优选地设置截止值以使导致 90％的特异性，还优选地设置截止值以使导致 95％的特异性，或还优选地设置截止值以使导致 98％的特异性。上述单个标记物或标记物组合的值可以例如表示癌症的存在。如本领域技术人员理解的，对于某些标记物如对于 seprase，对于低于截止值的值情况是一样的。

[0039] 本发明在优选实施方案中涉及用于评估 CRC 的方法，其包括测量 seprase 和抗 p53 并且将组合测量值用于 CRC 的评估。

[0040] 本发明在优选实施方案中涉及用于评估 CRC 的方法，其包括测量 seprase 和骨桥蛋白并且将组合测量值用于 CRC 的评估。

[0041] 本发明在优选实施方案中涉及用于评估 CRC 的方法，其包括测量 seprase 和铁蛋白并且将组合测量值用于 CRC 的评估。

[0042] 本发明在优选实施方案中涉及用于评估 CRC 的方法，其包括测量 seprase、铁蛋白、CEA 和骨桥蛋白并且将组合测量值用于 CRC 的评估。

[0043] 本发明在优选实施方案中涉及用于评估 CRC 的方法，其包括测量 seprase、铁蛋白、CEA、骨桥蛋白和抗 p53 并且将组合测量值用于 CRC 的评估。

[0044] 本发明在优选实施方案中还涉及用于评估 CRC 的方法，其包括测量 seprase、铁蛋白、CEA、CYFRA21-1、骨桥蛋白和抗 p53 并且将组合测量值用于 CRC 的评估。

[0045] 本发明在优选实施方案中还涉及包括至少 seprase 和抗 p53 的标记物组在评估结直肠癌中的用途。

[0046] 本发明在优选实施方案中还涉及包括至少 seprase 和抗 p53 的标记物组在评估结直肠癌中的用途。

[0047] 本发明在优选实施方案中还涉及包括至少 seprase 和骨桥蛋白的标记物组在评估结直肠癌中的用途。

[0048] 本发明在优选实施方案中还涉及包括至少 seprase 和铁蛋白的标记物组在评估结直肠癌中的用途。

[0049] 本发明在优选实施方案中还涉及包括至少 seprase 和 CEA 的标记物组在评估结直肠癌中的用途。

[0050] 本发明在优选实施方案中还涉及包括至少 seprase 和 CYFRA21-1 的标记物组在评估结直肠癌中的用途。

[0051] 本发明还涉及 seprase 多肽和 / 或其片段在评估结肠癌中的用途，其中减少的

seprase 和 / 或其片段的浓度和 / 或活性预示着癌症。

[0052] 本发明还涉及抗 seprase 多肽和 / 或其片段的抗体在评估结肠癌中的用途，其中减少的 seprase 和 / 或其片段的浓度和 / 或活性预示着结肠癌。

[0053] 本发明还涉及用于测量 seprase 多肽和 / 或其片段的酶促活性的试剂在评估结肠癌的用途，其中减少的 eprase 和 / 或其酶促活性片段的浓度和 / 或活性预示着结肠癌。

[0054] 本发明还涉及包括用于进行根据本发明的方法或用于使用公开的标记物组合的工具的装置。

[0055] 本发明还提供了包括用于进行根据本发明的工具的试剂盒，即用于至少测量 seprase 和选自抗 p53、骨桥蛋白和铁蛋白的标记物的工具。

[0056] 本发明还提供了用于进行根据本发明的方法的试剂盒，其包括至少分别特异性地测量 seprase 和抗 p53 所需的试剂和任选地用于进行测量的辅助试剂。

[0057] 本发明还提供了用于进行根据本发明的方法的试剂盒，其包括至少分别特异性地测量 seprase 和骨桥蛋白所需的试剂和任选地用于进行测量的辅助试剂。

[0058] 本发明还提供了用于进行根据本发明的方法的试剂盒，其包括至少分别特异性地测量 seprase 和铁蛋白所需的试剂和任选地用于进行测量的辅助试剂。

[0059] 本发明还提供了用于进行根据本发明的方法的试剂盒，其包括至少分别特异性地测量 seprase 和 CYFRA 21-1 所需的试剂和任选地用于进行测量的辅助试剂。

[0060] 本发明还提供了用于进行根据本发明的方法的试剂盒，其包括至少分别地特异性地测量 seprase 和 CEA 所需的试剂和任选地用于进行测量的辅助试剂。

[0061] 在一个优选实施方案中，本发明涉及用于体外评估结直肠癌的方法，其包括测量样品中 (a) seprase 多肽和 / 或其片段，(b) 任选地一个或更多个其他 CRC 的标记物的浓度和 / 或活性，和 (c) 将步骤 (a) 和任选地 (b) 的测量结果用于 CRC 的评估。

[0062] 在优选实施方案中，本发明涉及用于体外评估结直肠癌 (CRC) 的方法，其包括测量样品中 (a) seprase 多肽和 / 或其片段，(b) 抗 p53、骨桥蛋白和 / 或铁蛋白，(c) 任选地一个或更多个其他 CRC 的标记物的浓度和 / 或活性，和 (d) 将步骤 (a) 和 (b) 以及任选地步骤 (c) 的组合测量结果用于 CRC 的评估。

[0063] 在优选实施方案中，将 seprase 的浓度和 / 或活性与至少抗 p53、骨桥蛋白或铁蛋白的测量组合，然后使组合值与基本诊断问题例如 CRC 的存在或不存在的可能性、疾病的分期、疾病进展或对治疗的反应发生关联。

[0064] 人 seprase （别名成纤维细胞活化蛋白 (FAP)）是 170kDa 的具有明胶酶和二肽基肽酶活性的膜结合糖蛋白。其由两个相同的单体单位 (UniProt KB 数据库，登录号 P 27487)（特征在于 SEQ ID NO :1（图 3）中给定的序列）组成。Seprase 单体包含 766 个氨基酸并且具有 97kDa(SDS-PAGE) 的表观分子量 (Pineiro-Sanchez 等人，J.Biol. Chem.272(1997)7595-7601 ;Park 等 人，J.Biol.Chem.274(1999)36505-36512)。seprase 的可溶性形式是抗纤溶酶切割酶 (antiplasmin-cleaving enzyme)APCE(Lee 等人，Blood 103(2004)3783-3788 ;Lee 等人，Blood 107(2006)1397-1404)。APCE 的 N 末端氨基酸序列相应于 seprase 的残基 24 至 38，预测其在成纤维细胞细胞质内具有前 6 个 N 末端残基，接着是 20 个残基的跨膜结构域，然后是 734 个残基的细胞外 C 末端催化结构域 (Goldstein 等人，Biochim.Bjophys.Acta.1361(1997)11-19 ;Scanlan 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA

91(1994)5657-5661)。

[0065] Piñeiro-Sánchez 等人（同上）发现增加的 seprase 的表达与人黑色素瘤和癌细胞的侵袭性表型相关。Henry 等人，Clin. Cancer Res. 13(2007)1736-1741 描述了具有高水平的间质 seprase 的人结肠肿瘤患者更可能具有侵袭性疾病进展以及转移或复发的潜在发展。

[0066] 因此，本领域的上述文献中没有一个表明体液中减少的 seprase 多肽和 / 或其片段的浓度和 / 或活性预示着癌症。

[0067] 令人惊讶地，在本发明中发现体液中 seprase 多肽和 / 或其片段的，特别地 APCE 的浓度和 / 或活性例如酶促活性的确定使得能够评估癌症疾病例如肺癌、乳腺癌、结肠癌或肾癌疾病和特别地肺癌疾病。甚至更令人惊讶地，发现与正常对照相比较，样品中减少的 seprase 或其片段的浓度和 / 或活性预示着癌症的风险或发生。

[0068] 如本文中所使用的，每一个下列术语在该部分中具有与其相关的意义。

[0069] 冠词“a”和“an”在本文中用于指一个或更多个（即，至少一个）冠词的语法宾语。例如，“a 标记物”意指一个标记物或更多个标记物。术语“至少”用于表示任选地一个或更多个另外的物体可存在。例如，包括至少（标记物）seprase 和 CYFRA 21-1 的标记物组可任选地包括一个或更多个其他标记物。

[0070] 表述“一个或更多个”表示 1 至 50，优选 1 至 20，还优选 2、3、4、5、6、7、8、9、10、12 或 15。

[0071] 本文中使用的术语“标记物”或“生物化学标记物”是指被用作靶以分析患者的受试样品的分子。此类分子靶的实例是蛋白质或多肽。在本发明中用作标记物的蛋白质或多肽预期包括所述蛋白质的天然发生的变体以及所述蛋白质或所述变体的片段，特别地免疫学可检测片段。免疫学可检测片段优选包括所述标记物多肽的至少 6、7、8、10、12、15 或 20 个连续氨基酸。本领域技术人员认识到由细胞释放的或存在于细胞外基质中的蛋白质可在例如炎症期间被破坏，并且可开始降解或被切割成这样的片段。某些标记物以无活性的形式合成，所述形式随后可通过蛋白质水解激活。如本领域技术人员将理解的，蛋白质或其片段还可作为复合物的部分存在。这样的复合物在本发明的意义上也可用作标记物。标记物多肽的变体由相同基因编码，但作为备选的 mRNA 或 pre-mRNA 剪接的结果，可在它们的等电点（＝ PI）或分子量（＝ MW）或两者上不同。变体的氨基酸序列与相应的标记物序列达到 95％或更多的同一。此外，或备选地，标记物多肽或其变体可具有翻译后修饰。翻译后修饰的非限定性实例是糖基化、酰基化和 / 或磷酸化。

[0072] 在本发明的意义上“癌症的标记物”和特别地“结肠癌或结直肠癌的标记物”是如果与包括 seprase 和选自抗 p53、骨桥蛋白和铁蛋白的标记物组合相组合可在 CRC 的评估中增加相关信息的任何标记物。如果可通过将所述标记物包括入已包含标记物 seprase 和选自抗 p53、骨桥蛋白和铁蛋白的标记物的标记物组合来分别提高对于癌症评估的特异性（在给定的灵敏度下）或敏感度（在给定的特异性下），则信息被认为是相关或为相加值 (additive value)。在优选 CRC 评估的实施方案中，灵敏度或特异性的提高分别地在 p ＝ .05、.02、.01 或更低的显著性水平上是统计学上显著的。

[0073] 本文中使用的术语“样品”是指获得用于体外评估目的的生物样品。在本发明的方法中，样品或患者样品优选包括任何体液。优选样品是全血、血清、血浆，血浆或血清是最优选的。

[0074] 术语“评估癌症”和特别地“评估结肠癌或结直肠癌”用于表示根据本发明的方法将（单独地或与其他标记物或变量，例如由 UICC 所示的标准（参见上文）一起）例如帮助医师确定或确认癌症特别地 CRC 的不存在或存在或帮助医师预后、检测复发（术后患者的随访）和 / 或监测治疗特别地化学治疗。

[0075] 如本领域技术人员将理解的，任何此类评估是在体外进行的。之后弃去患者样品。患者样品只用于本发明的体外诊断方法，并且不将患者样品的材料转移回患者体内。通常，样品是液体样品，例如全血、血清或血浆。

[0076] 术语“测量”优选包括样品中标记物的定性、半定量或定量测量。在优选实施方案中，根据本发明的方法中的测量是定量测量。

[0077] Seprase ：

[0078] 根据本发明，术语“seprase 多肽和 / 或其片段”是指单体或多聚体，特别地二聚体多肽。此外，术语“seprase 多肽和 / 或其片段”特别地指 seprase 和 / 或其片段的可溶性形式，特别地抗血纤溶酶切割酶 (APCE) 以及指以与另一种多肽的复合物的形式存在的 seprase 和 / 或 seprase 片段。.

[0079] 优选在合适的样品中，特别地在体液中检测 Seprase 多肽，特别地 seprase 多肽和 / 或其片段的可溶性形式。优选样品是体液，例如血液、血浆、血清、痰和尿。优选，样品来源于人受试者，例如肿瘤患者或处于肿瘤的风险中的人或怀疑患有肿瘤的人。

[0080] 根据本发明，测定 seprase 多肽和 / 或其片段的浓度和 / 或活性。在一个实施方案中，通过使用特异性结合试剂从样品特异性地测量标记物 seprase。

[0081] 不同的免疫诊断方法可用于获得可与本发明的成就相当的结果。例如，可使用产生抗体的备选策略。这样的备选策略包括除其他以外，合成肽的使用、提供 seprase 的表位以进行免疫。备选地，可使用也称为 DNA 疫苗接种的 DNA 免疫。

[0082] 优选，在夹心类型测定形式中检测 seprase。在这样的测定中，将第一特异性结合剂用于将 seprase 捕获在一侧，并且将经标记可被直接或间接检测的第二特异性结合剂用于另一侧。用于夹心类型测定形式的特异性结合剂可以是特异性抗 seprase 抗体。在一方面，可通过使用不同的捕获和标记抗体（即，识别 seprase 多肽上的不同表位的抗体）进行检测。在另一个方面，还可使用抗 seprase 的相同表位的捕获和标记抗体进行夹心类型测定。在该实施方案中，只有 seprase 的二聚体和多聚体形式可被检测到。

[0083] 根据本发明的另外的实施方案，通过使用适合于检测 seprase 的酶促活性的检测方案来从样品特异性地测量标记物 seprase。酶促活性可以例如是明胶酶活性或肽酶活性。可以例如使用明胶酶的酶谱，通过酶谱法来测定明胶酶活性。可以例如，使用适当的标记肽底物，通过荧光测定法来测定肽酶活性。用于测量 seprase 活性的测定法由例如 Lee 等人 (2006)（同上）描述。

[0084] 骨桥蛋白 (OPN) ：

[0085] OPN 见于正常血浆、尿、牛奶和胆汁中。(US 6,414,219 ;US5,695,761 ; Denhardt, D.T. 和 Guo, X., FASEB J.7(1993)1475-1482 ;Oldberg, A., 等人, PNAS 83(1986)8819-8823 ;Oldberg, A., 等人, J.Biol.Chem.263(1988)19433-19436 ; Giachelli,C.M.,等人,Trends Cardiovasc.Med.5(1995)88-95)。人 OPN 蛋白和 cDNA 已被分离并且进行了测序 (Kiefer M.C.,等人,Nucl.Acids Res.17(1989)3306)。

[0086] OPN 在细胞粘附、趋化性、巨噬细胞导向的白细胞介素 10(IL-10) 抑制(macrophage-directed interleukin-10(IL-10)suppression)、应激依赖性血管生成(stress-dependent angiogenesis)、细胞凋亡的阻止和通过调控细胞基质相互作用导致的肿瘤细胞的非停泊性生长和通过与整联蛋白和 CD44 受体的结合产生的细胞信号转导中发挥作用。虽然 OPN 的组成型表达存在于几种细胞类型中,但已在重构过程(remodelingprocesses) 例如炎症、缺血 - 再灌注、骨质吸收和进行性肿瘤中在 T 淋巴细胞、表皮细胞、骨细胞、巨噬细胞和肿瘤细胞中检测到诱导的表达 ( 由 Wai, P.Y. 和 Kuo, P.C., J.Surg.Res.121(2004)228-241 综述 )。

[0087] OPN 已知与许多整联蛋白受体相互作用。已报导在许多人癌症中存在增加的 OPN 表达,并且已鉴定其关联受体 (av-b3、av-b5 和 av-b1 整联蛋白和 CD44)。由 Irby,R.B.,等人, Clin.Exp.Metastasis 21(2004)515-523 进行的体外研究表明内源 OPN 表达 ( 通过稳定的转染 ) 以及外源 OPN( 加入至培养基的 ) 在体外增强人结肠癌细胞系的运动性和侵袭能力。OPN 似乎通过与 CD44 的相互作用调控运动性。OPN 的表达还减少细胞间 ( 同型的 ) 粘着,这被认为是转移癌细胞的特征。使用 OPN 对 4 个较弱的致瘤人结肠癌细胞系的稳定转染也导致体内增强的致肿瘤性,增加的增殖和增加的 CD31 阳性微血管计数与 OPN 表达的程度一致。OPN 的片段还可用于根据本发明的方法。

[0088] Mor, G., 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102(2005)7677-7682 报导了用于基于 OPN 和 3 个其他分析物的同时定量的上皮卵巢癌的早期诊断的血液 ( 血清 ) 检测。

[0089] 在优选实施方案中,本发明涉及用于通过生物化学标记物体外评估 CRC 的方法,其包括测量样品中骨桥蛋白和 seprase 的浓度,组合测量值并且将组合值用于 CRC 的评估。

[0090] 癌胚抗原 (CEA) :

[0091] CEA( 癌胚抗原 ) 是具有大约 45-60% 的可变碳水化合物组分的单体糖蛋白 ( 分子量大约 180.000 道尔顿 )(Gold,P. 和 Freedman,S.O.,J.ExpMed 121(1965)439-462)。CEA,与 AFP 一样,属于在胚胎和胎儿期中产生的胎儿癌性抗原类型。CEA 基因家族由两个亚类中的大约 17 个活性基因组成。第一类包括 CEA 和非特异性交叉反应性抗原 (NCA) ;第二类包括妊娠特异性糖蛋白 (PSG)。

[0092] CEA 主要见于胎儿胃肠道和胎儿血清中。其也以少量存在于健康成人的肠、胰脏和肝组织中。出生后 CEA 的形成被抑制,因此血清 CEA 值在健康成人中几乎不可测量。

[0093] 高 CEA 浓度通常见于结直肠癌的情况下 (Fateh-Modhadam, A. 等人 (eds.), Tumormarker und ihr sinnvoller Einsatz, Juergen Hartmann VerlagGmbH, Marloffstein-Rathsberg(1993),ISBN-3-926725-07-9)。在 20-50% 的肠、胰腺、肝和肺的良性疾病 ( 例如,肝硬化、慢性肝炎、胰腺炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、肺气肿 ) 中发生轻微至中度的 CEA 升高 ( 罕见地大于 10ng/mL)(Fateh-Moghadam,A.,等人,同上 )。吸烟者也具有提高的 CEA 值。

[0094] CEA 测定的主要指标是患有结直肠癌的患者的治疗 (therapymanagement) 和随访。不推荐 CEA 测定用于一般人群的癌症筛查。正常范围内的 CEA 浓度不排除恶性疾病的可能存在。

[0095] 由 Roche Diagnostics 制造的测定中的抗体与 CEA 和 ( 与几乎所有 CEA 检测方法一样 ) 与胎粪抗原 (NCA2) 反应。与 NCA1 的交叉反应性是 0.7% (Hammarstrom, S., 等人,

Cancer Res.49(1989)4852-4858;和 Bormer,O.P.,Tumor Biol.12(1991)9-15)。已按照厂商的说明书使用 Roche 产品编号 11731629 在Elecsys®分析仪上测量 CEA。

[0096] CYFRA21-1：

[0097] 用于“CYFRA21-1”的测定特异性地测量如存在于循环中的细胞角蛋白 19 的可溶液性片段。CYFRA21-1 的测量通常基于两个单克隆抗体 (Bodenmueller,H.,等人,Int.J.Biol.Markers 9(1994)75-81)。在来自 Roche Diagnostics,German 的 CYFRA21-1 测定中,使用两个特异性单克隆抗体 (KS 19.1 和 BM 19.21),测量具有大约 30,000 道尔顿的分子量的细胞角蛋白 19 的可溶液性片段。细胞角蛋白是形成上皮中间纤维的亚基的结构蛋白。目前已鉴定了 20 种不同的细胞角蛋白多肽。由于它们的特异性分布模式,它们显然适合在肿瘤病理学中用作分化标记物。完整的细胞角蛋白多肽溶解性较差,但可在血清中检测到可溶液性片段 (Bodenmueller,H.,等人,同上)。

[0098] CYFRA21-1 是非小细胞肺癌 (NSCLC) 的良好确立的标记物。CYFRA21-1 的主要指征是监测非小细胞肺癌 (NSCLC) 的病程 (Sturgeon,C.,Clinical Chemistry 48(2002)1151-1159)。

[0099] 在初步诊断中,高 CYFRA21-1 血清水平表示患有非小细胞肺癌的患者中的晚期肿瘤分期和不良预后 (van der Gaast,A..,等人,Br.J.Cancer69(1994)525-528)。正常的或只有稍微升高的值不排除肿瘤的存在。成功的治疗通过 CYFRA21-1 血清水平快速回落至正常范围来证明。恒定的 CYFRA21-1 值或 CYFRA21-1 值或略微或仅仅缓慢的减小表明肿瘤的不完全清除或具有相应的治疗和预后结果的多发性肿瘤的存在。除了利用临床症状学 (symptomatology) 和成像方法外,通常通过不断增加的 CYFRA21-1 值来早期显示疾病的进展。

[0100] 极少在被监测的良性肝疾病和肾功能衰竭中发现略微升高的值 ( 达到 10ng/mL)。与性别、年龄或吸烟不存在相关性。CYFRA21-1 的值也不受怀孕影响。

[0101] 优选按照厂商的说明书使用 Roche 产品编号 11820966 在Elecsys®分析仪上测量 CYFRA21-1。

[0102] 铁蛋白：

[0103] 铁蛋白是具有至少 440kD 的分子量 ( 取决于铁的含量 ) 的大分子,并且由 24 个亚基的蛋白质外鞘 ( 脱铁铁蛋白 ) 和含有平均大约 2500 个 $Fe^{3+}$ 离子 ( 在肝和脾铁蛋白中 ) 的铁核心组成 (Wick,M. 等人,Ferritin in IronMetabolism-Diagnosis of Anemieas( 第 2 版 ).Springer-Verlag 1995;ISBN3-211-82525-8 和 ISBN 0-387-82525-8)。铁蛋白倾向于形成寡聚体,当其过量存在于贮藏器官的细胞中时,倾向于凝聚成半晶质含铁血黄素 (hemosiderin) 存在于溶酶体中。

[0104] 借助于等电点聚焦 (Arosio,P. 等人,Heterogeneity of ferritin II:Immunological aspects.In:Albertini A,Arosio P,Chiancone E,Drysdale J(eds).Ferritins and isoferritins as biochemical markers.Elsevier,Amsterdam 1984;33-47) 可区分至少 20 种同种铁蛋白 (isoferritin)。该微不均一性是由于酸性 H 和弱碱性 L 亚基的含量的差异导致的。碱性同种铁蛋白负责长期铁贮藏功能,并且主要发现于肝、脾和骨髓中 (Kaltwasser,J.P. 等人,Serumferritin:Methodische und Klinische Aspekte.SpringerVerlag(1980))。酸性同种铁蛋白主要见于心肌、胎盘和肿瘤组织。它们具有更低的铁含量并且推测在各种合成中用作铁转移的媒介物 (intermediary)(Morikawa,

K. 等 人，Leuk.Lymphoma 18(5-6)(1995)429-433；Borch-Iohnson，B.，Analyst 120(3)(1995)891-903；Cook，J. 等人，Adv.Exp.Med.Biol.356(1994)219-228)。

[0105] 铁蛋白的测定是用于确定铁代谢状况的合适方法。在治疗开始时铁蛋白的确定提供了身体的铁储量的代表性测量。临床上，已证明 20μg/L(ng/mL) 的阈值在隐性缺铁前期(prelatent iron deficiency) 的检测中是有用的。该值提供了可被动员用于血红蛋白合成的铁储备的耗尽的可靠指标。当铁蛋白水平提高时，可排除分布病症的可能性，这是体内铁超负荷的表现。将 400μg/L(ng/mL) 铁蛋白用作阈值。升高的铁蛋白值也遭遇下列肿瘤：急性白血病、霍奇金病和肺癌、肝癌和前列腺癌。已证明铁蛋白的测定在肝转移中是有价值的。研究表明 76％的所有患有肝转移的患者具有高于 400μg/L(ng/mL) 的铁蛋白值。提高的值的原因可以是细胞坏死、被阻断的红细胞生成或肿瘤组织中增加的合成。

[0106] 在另一个方面，其被描述为特征，该血清铁蛋白水平在胃肠癌中不升高(Niitsu，Y. 等人，Rinsho Ketsueki 21(1980)1135-1143)。此外，已报导平均血清铁蛋白水平在患有晚期结直肠癌的患者中比对照中显著更低 (Kishida，T. 等人，J.Gastroenterol.29(1994)19-23)。血清铁蛋白水平的降低由连续放血引起，该血液损失与肿瘤的大小和位置相关 (Feng，L 等人，J.Gastroenterol.34(1999)195-199)。

[0107] 优选按照厂商的说明书使用 Roche 产品编号 11820982 在Elecsys®分析仪上测量铁蛋白。

[0108] 抗 p53：

[0109] 25 年前，在不具备 p53 基因的突变的知识的情况下，在乳腺癌患者中进行的肿瘤相关抗原筛查的过程中发现了 p53 抗体 (Crawford，L 等人，Int.J.Cancer 30(1982)403-408)。肿瘤抑制基因 p53 是在正常细胞的细胞核中几乎不能被检测到的磷蛋白 (Benchimol，S. 等人，EMBO J.1(1982)1055-1062)。当细胞应激（特别地由 DNA 损伤诱导的细胞应激）时，p53 可停止细胞周期进程，从而允许 DNA 被修复或其可导致细胞凋亡。在具有突变的 p53 的癌症细胞中，该蛋白不再能够控制细胞增殖，这导致不充分的 DNA 修复 (Levine，A.Cell 88(1997)323-331)。人癌症中 p53 的最常见的变化是在结肠癌、胃癌、乳腺癌、肺癌、脑癌和食道癌中发现的点错义突变 (Greenblatt，M. 等人，Cancer Res.54(1994)4855-4878)。据估计 p53 突变是人癌症中最常见的遗传事件，其占据了 50％以上的病例。在 p53 抗体的频率与 p53 突变的频率之间存在非常强的关联性，这表明 p53 突变牵涉此类抗体的出现 (Soussi，T.Cancer Res.60(2000)1777-1788)。在人癌症患者中以 96％的特异性发现 P53 抗体，但这样的检测的灵敏度只有 30％。

[0110] 优选使用野生型 p53 蛋白的两个免疫显性肽测量疫抗 p53(Lubin 等人，Cancer Res.53(1993)5872-5876)。

[0111] 如上文中提及的，多肽，如 seprase，优选通过使用一个或更多个特异性结合试剂来测量。特异性结合试剂是例如 seprase 的受体、结合 seprase 的凝集素或抗 seprase 抗体。特异性结合试剂具有至少 $10^7$1/mol 的对于其相应靶分子的亲和力。特异性结合试剂优选具有 $10^8$1/mol 的或还优选 $10^9$1/mol 的对于其靶分子的亲和力。如本领域技术人员将认识到的，术语特异性用于表示样品中存在的其他生物分子不显著结合特异于 seprase 的结合剂。优选，对除了靶分子外的生物分子的结合水平分别导致至多仅为 10％或更少，仅为 5％或更少，仅为 2％或更少或仅为 1％或更少的对于靶分子的亲和力的结合亲和力。优选

特异性结合剂将满足上述关于亲和力以及特异性的最低标准。

[0112] 特异性结合试剂优选是能与 seprase 反应的抗体。术语抗体是指多克隆抗体、单克隆抗体、这些抗体的抗原结合片段、单链抗体以及包含抗体结合区域的遗传构建体。

[0113] 可使用保持特异性结合剂的上述标准的任何抗体。通过现有技术方法，例如，如 Tijssen，P.，Practice and theory of enzyme immunoassays，11，Elsevier Science Publishers B.V.，Amsterdam，the whole book，特别地第 43 至 78 页中描述的方法，产生抗体。此外，本领域技术人员十分了解基于可用于抗体的特异性分离的免疫吸附剂的方法。通过此类方法，可提高多克隆抗体的质量，从而增强它们在免疫测定中的性能。(Tijssen，P.，同上，第 108 至 115 页）。

[0114] 为了达到本发明中公开的成就，可使用例如在兔子中产生的单克隆抗体和多克隆抗体。然而，也很显然，还可使用来自不同物种例如大鼠或豚鼠的多克隆抗体以及单克隆抗体。因为单克隆抗体可以以任何需要的量和恒定的性质产生，它们代表了用于临床常规测定的开发的理想的工具。在根据本发明的方法中抗 seprase 的单克隆抗体的产生和应用分别代表了其他优选实施方案。适合于检测 seprase 的抗体的优选实例公开于 Piñeiro-Sánchez 等人，同上，例如抗体 D8、D28 和 D43。

[0115] 为了测量根据本发明的标记物组，将合适量的获自个体的样品或其等分在适合于结合剂标记物复合物形成的条件下与标记物组的不同标记物的特异性结合剂一起温育。这样的条件不必详细说明的，因为本领域技术人员无需任何发明努力就可容易地鉴定这样的合适的温育条件。在癌症优选 CRC 的评估中测量和使用结合剂标记物复合物的量。本领域技术人员将理解，存在许多测量特异性结合剂标记物复合物的量的方法，其全都详细地描述于相关教科书（参见，例如，Tijssen，P.，同上，或 Diamandis，E.P.，和 Christopoulos，T.K.(eds.)，Immunoassay，AcademicPress，Boston(1996)）中。

[0116] 在目的标记物是抗体或自身抗体的情况下，本领域技术人员十分熟练的各种检测方法是极易获得的。用于抗体或视情况而定自身抗体的检测的非限定性且优选的方法是间接夹心测定法或双抗原夹心 (double-antigen-sandwich)(DAGS) 法。在间接夹心法中，将（自身 -) 抗体（一抗）结合至（自身 -) 抗原，然后通过抗该（自身 -) 抗体或一抗的标记抗原（二抗）间接检测。在 DAGS 法中，设置测定以提供 2 个各自包含（自身 -) 抗体的表位的抗原，其中两个抗原中的一个与固相结合，或能够结合至固相，并且其中可检测地标记第二抗原。如果（自身 -) 抗体提供桥，其将连接第一和第二抗原，从而可检测 / 测量形成的复合物。

[0117] 在优选实施方案中，本发明涉及用于利用生物化学标记物评估 CRC 的方法，其包括测量样品中 seprase 的浓度和将测定的浓度和 / 或活性用于 CRC 的评估。

[0118] 在另外的优选实施方案中，本发明涉及用于利用生物化学标记物体外评估 CRC 的方法，其包括测量样品中 seprase 以及至少抗 p53、骨桥蛋白和 / 或铁蛋白的浓度，将测定的浓度和 / 或活性组合，以及将组合值用于评估 CRC。

[0119] 本发明的发明者已令人惊讶地能够在显著百分比的来源于患有癌症特别地患有结肠癌的患者的样品中检测到减少的标记物 seprase 的浓度和 / 或活性。再次令人惊讶地，他们已能够证明获自个体的此类样品中减少的 seprase 的浓度和 / 或活性可用于 CRC 的评估。更令人惊讶地，他们已能够证明可将获自个体的此类样品中减少的 seprase 的浓度和

/ 或活性与至少抗 p53、铁蛋白和 / 或骨桥蛋白的测量组合并且用于 CRC 的评估。

[0120] 进行诊断的理想的情形是其中单个事件或过程可在例如感染性疾病中引起各自疾病的情形。在所有其他情况下，正确的诊断可能非常困难，尤其当疾病的病因学未完全明了时，对于许多癌症类型例如对于 CRC 的情况就是如此。如本领域技术人员将理解的，不存在对于给定的多因子疾病例如 CRC 的诊断既具有 100％的特异性同时又具有 100％的灵敏度的生物化学标记物。相反，生物化学标记物例如 CYFRA 21-1、或 CEA、或如本文中所显示的包括 sperase 的某些标记物组合可用于以某种可能性或预测值例如存在、不存在或严重度来评估疾病。因此在常规临床诊断中，通常在潜在的疾病的诊断、治疗和管理中同时考虑不同的临床症状和生物学标记物。

[0121] 可以单个地测定生物化学标记物或在本发明的优选实施方案中使用基于芯片或珠粒的阵列技术同时测量它们。然后组合生物标记物的浓度以进行解释。

[0122] 在 CRC 的评估中，标记物 seprase 或包括 seprase 和至少一个选自抗 p53、铁蛋白和骨桥蛋白的标记物的标记物组在一个或更多个下列方面中是有利的 ：筛查 ；诊断辅助 ；预后 ；治疗例如化学治疗、放射治疗和免疫治疗的监测。

[0123] 筛查 ：

[0124] 筛查定义为就疾病的指标，例如癌症的存在鉴定个体例如处于风险中的个体的检测的系统性应用。优选筛查群体由已知处于比平均水平更高的癌症风险中的个体组成。例如，CRC 的筛查群体由已知处于比平均水平更高的 CRC 风险中的个体（如年龄 45 岁以上，或 50 岁以上的人或具有 CRC 家族史的人）组成。

[0125] 在优选实施方案中，体液例如全血、血清或血浆在结直肠的筛查中用作样品。

[0126] 对于许多疾病，循环中没有单个生物化学标记物可以总是满足筛查目的所需的灵敏度和特异性标准。这对于癌症，特别地对于结直肠癌似乎也是如此。这势必期望必须将包括多个标记物的标记物组用于癌症的筛查。本发明中确定的数据表明标记物 seprase，优选与选自抗 p53、铁蛋白和骨桥蛋白的标记物一起，将形成适合用于 CRC 筛查目的的标记物组的构成整体所必需的 (integral) 部分。本发明因而涉及 seprase 作为用于 CRC 筛查目的的 CRC 的标记物组（例如包括标记物 seprase 和选自抗 p53、铁蛋白和骨桥蛋白的标记物组）的一个标记物的用途。关于用于 CRC 的筛选的优选实施方案，本发明还涉及包括 seprase 和 CYFRA21-1 的标记物组或包括 seprase 和 CEA 的标记物组或包括 seprase 和两个或更多个选自抗 p53、铁蛋白、骨桥蛋白、CYFRA21-1 和 CEA 的标记物的标记物组的用途。

[0127] 诊断辅助物 ：

[0128] 标记物可以有助于特定器官中良性对恶性疾病的鉴别诊断，帮助区分不同的组织学类型的肿瘤或在手术前建立基线标记物值。

[0129] 当今，用于检测癌症的重要方法是放射学和 / 或计算机断层 (CT) 扫描（虚拟结肠镜检查）。可通过这些方法显现可疑组织的小区域。然而，许多此类区域 -90％以上（通过 CT)- 代表良性组织变化，只有少数小瘤代表癌性组织。包括 seprase 和选自抗 p53、铁蛋白和骨桥蛋白的标记物的标记物组的使用可有助于良性对恶性疾病的区分。

[0130] 因为作为单个标记物的 sepras 可能优于其他标记物，例如在 CRC 的情况下优于其他标记物，如 CEA 或 CYFRA21-1，因此势必期望将 seprase 单独地或与本发明中描述的其他优选标记物一起用作诊断辅助物（特别地通过在手术前确定基线值）。本发明因此还涉及

seprase 或包括 seprase 的标记物组合用于在癌症的手术之前确定基线值的用途。

[0131] 预后：

[0132] 预后指标可定义为以一定的可能性预测疾病结果的癌症患者和它们的肿瘤的临床、病理学或生物化学特性。它们的主要用途是帮助合理地计划患者管理，即分别避免对侵袭性疾病的处理不足和对怠惰性疾病 (indolent disease) 的治疗过度。

[0133] 由于根据本发明的标记物组显著促进了 CRC 患者与健康对照的区分，因此势必期望其将有助于评估患有 CRC 的患者的预后。术前 seprase 的水平将最可能与一个或更多个其他 CRC 的标记物和 / 或 TNM 分期系统相组合。在一个优选实施方案中，根据本发明的标记物组用于患有 CRC 的患者的预后。

[0134] 化学治疗的监测：

[0135] 几个报告已描述了 CEA 在分别监测患有 LC(Fukasawa, T., 等人, Cancer&Chemotherapy 13(1986)1862-1867) 或结直肠癌的患者的治疗中的用途。大多数此类研究是基于回忆的、非随机化的并且包括少数患者。如在使用 CYFRA 21-1 的研究的情况下一样，CEA 研究表明：a)CEA 水平降低同时接受化学治疗的患者通常具有比其 CEA 水平未能降低的患者更好的结果以及 (b) 对于几乎所有患者，CEA 水平的升高与疾病的进展相关。

[0136] 预期根据本发明的 CRC 标记物组，即，包括 seprase 的标记物组将是与 CEA 至少一样好的用于 CRC 中化学治疗的监测的标记物。本发明因此还涉及包括 seprase 和至少一个选自抗 p53、铁蛋白和 / 或骨桥蛋白的标记物的标记物组在监测处于化学治疗中的癌症患者优选 CRC 患者中的用途。在一个优选实施方案中的治疗监测中，可将对于 seprase 的测量与对于至少一个选自抗 p53、铁蛋白和 / 或骨桥蛋白以及任选地 CYFRA 21-1 和 / 或 CEA 的标记物的测量组合，并且将其用于 CRC 治疗的监测。

[0137] 随访：

[0138] 大部分经历目的在于完全清除癌性组织的手术切除的 CRC 患者日后发生复发性或转移性疾病。大部分此类复发在术后前 2 至 3 年内发生。因为如果检测得太迟，复发性 / 转移性疾病常常是致命的，因此相当多的研究集中在处于早期（从而潜在地可治疗的分期）上的癌症复发的检测上。

[0139] 因此，许多癌症患者例如 CRC 患者经历了频繁包括使用 CEA 的定期监测的术后监测方案。因此，术后患有 CRC 的患者的随访是合适的生物化学标记物的用途的最重要的领域之一。由于 seprase 在被调查的 CRC 患者中的高度灵敏度，seprase（单独地或与一个或更多个其他标记物组合）将可能极大地帮助 CRC 患者的随访，尤其在术后 CRC 患者的随访。包括 seprase 和一个或更多个其他 CRC 的标记物的标记物组合在 CRC 患者的随访中的用途代表了本发明的另外的优选实施方案。另外的优选实施方案涉及包括 seprase 和至少一个选自抗 p53、铁蛋白和 / 或骨桥蛋白的标记物的标记物组在 CRC 患者的随访中的用途。

[0140] 本发明还涉及在 CRC 的评估中的用途。

[0141] 如上所论述的，某些优选实施方案涉及 seprase 和至少一个选自抗 p53、铁蛋白和 / 或骨桥蛋白的标记物的测量值，涉及这些测量值的组合和涉及组合值在 CRC 的评估中的用途。

[0142] 如本领域技术人员将理解的，存在许多使用两个或更多个标记物的测量以改进调查中的诊断问题的方法。在相当简单但通常有效的方法中，如果样品对于至少一种被调查

的标记物是阳性的，则假定为阳性结果。例如，当诊断感染性疾病如 AIDS 时，情况可以如此。

[0143] 然而，频繁地，评估标记物的组合。优选，将对于标记物组的标记物例如 seprase 和抗 p53 测量的值算术组合，并且使组合值与基本诊断问题发生关系。可通过任何合适的现有技术数学方法来组织标记物值。用于使标记物组合与疾病发生关联的熟知的数学方法使用方法如判别分析 (DA)（即线性 -、二次 -、正则化 -DA)、核方法（即 SVM)、非参数法（即 k- 最近邻分类器 (k-Nearest-Neighbor Classifiers))、PLS（偏最小二乘法）、基于树的方法（即逻辑斯蒂回归、CART、随机森林法 (Random ForestMethod)、Boosting/ 套袋法 (Bagging Methods))、广义线性模型（即逻辑斯蒂回归）、基于主成分的方法 (Principal Components based Method)（即 SIMCA)、广义加法模型、基于模糊逻辑的方法 (Fuzzy Logic basedMethod)、神经网络和基于遗传算法的方法。本领域技术人员在选择合适的方法评估本发明的标记物组合中将没有问题。优选，用于使本发明的标记物组合例如与 CRC 的不存在或存在发生关联的方法选自 DA（即线性 -、二次 -、正则化判别分析）、核方法（即 SVM)、非参数法（即 k- 最近邻分类器）、PLS（偏最小二乘法）、基于树的方法 (Tree-Based Method)（即逻辑斯蒂回归、CART、随机森林法、Boosting 法）或广义线性模型（即逻辑斯蒂回归）。关于此类统计方法的详细内容见于下列参考文献 :Ruczinski, I.，等人，J.of Computational and Graphical Statistics,12(2003)475-511 ;Friedman, J.H., J.of the American Statistical Association 84(1989)165-175 ;Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, TheElements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics(2001) ;Breiman, L, Friedman, J.H., Olshen, R.A., Stone, C.J.(1984) Classification and regression trees, Califomia :Wadsworth ;Breiman, L., Random Forests, Machine Learning,45(2001)5-32 ;Pepe, M.S., TheStatistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series 28(2003) ;和 Duda,R.O.,Hart,P.E.,Stork,D.G.,Pattern Classification,Wiley Interscience,第 2 版 (2001)。

[0144] 本发明的优选实施方案是使用生物学标记物的基本组合的最优化多变量截止值来区分状态 A 与状态 B（例如区分患病的与健康的）。在该类型的分析中，标记物不再是独立的而是形成标记物组。

[0145] 诊断方法的精确性通过其受试者工作特性 (ROC)（特别地参见 Zweig, M.H.，和 Campbell,G.,Clin.Chem.39(1993)561-577) 得到最佳描述。ROC 图是由在整个观察到的数据范围内连续改变决策阈值产生的所有灵敏度 / 特异性对的曲线。

[0146] 实验室检测的临床性能取决于其诊断精确性或正确地将受试者分类至临床相关亚组的能力。诊断精确性测量检测的正确区分被调查的受试者的两个不同状况的能力。此类状况是例如健康和疾病或良性疾病对恶性疾病。

[0147] 在各情况下，ROC 曲线通过在完全的决策阈值范围内将灵敏度对 1- 特异性作图来描述两个分布之间的重叠。灵敏度或真阳性分数 [ 定义为（真阳性检测结果的数目）/（真阳性检测结果的数目 + 假阴性检测结果的数目）] 在 y 轴上。这也称为在疾病或病状存在的情况下的阳性。其只根据受影响的亚组来计算。假阳性分数或 1- 特异性 [ 定义为（假阳性结果的数目）/（真阴性结果的数目 + 假阳性结果的数目）] 在 x 轴上。其是特异

性的指数并且完全根据未受影响的亚组来计算。因为通过使用来自两个不同亚组的检测结果完全分别地计算真阳性分数和假阳性分数，因此 ROC 曲线不依赖于样品中疾病的流行性(prevalence)。ROC 曲线上的各点代表相应于特定决策阈值的灵敏度 /1- 特异性对。具有完美区分（两个结果的分布中无重叠）的检测具有通过左上角的 ROC 曲线，其中真阳性分数是 1.0 或 100％（完美的灵敏度），并且假阳性分数为 0（完美的特异性）。无区分（对于两组为相同的结果分布）的检测的理论曲线是从左下角至右上角的 45° 对角线。大部分曲线落在这两个极端值之间。（如果 ROC 曲线完全落在 45° 对角线以下，这可通过将“阳性”标准从“大于”转变成“小于”或反之亦然来容易地矫正）。定性地，曲线越接近左上角，检测的总体精确性越高。

[0148] 定量实验室检测的诊断精确性的一个优选方法是利用单个数字表示其性能。这样的总体参数是例如所谓的“总误差 (total error)”或备选地“曲线下的面积＝ AUC”。最普遍的全局测量是 ROC 曲线下的面积。按常规，该面积总是大于等于 0.5（如果不是，可颠倒决策规则来使其大于等于 0.5)。值在 1.0（两组检测值完全分开）至 0.5（两组检测值之间无显著分布差异）之间变化。面积不仅取决于曲线的特定部分例如离对角线最近的点或在 90％特异性下的灵敏度，而且还取决于整个曲线。这是 ROC 曲线接近完美曲线（面积＝ 1.0) 的程度的定量描述性表述。

[0149] 在优选实施方案中，本发明涉及方法，所述方法用于通过分别测量样品中至少 seprase 和选自抗 p53、铁蛋白和 / 或骨桥蛋白的标记物的浓度，算术组合测定的浓度并且使组合值与 CRC 的存在或不存在发生关联来提高 CRC 对对照的诊断精确性，提高导致与基于任何单个被单独调查的标记物的分类相比较，更多患者被正确地分类为处于风险或或患有 CRC（相对于对照）。

[0150] 在根据本发明的优选方法中，分别测定至少生物标记物 seprase 和选自抗 p53、铁蛋白和 / 或骨桥蛋白的标记物的浓度，并且将标记物组合用于 CRC 的评估。

[0151] 在根据本发明的另外的优选方法中，分别测定至少生物标记物 seprase 和 CYFRA21-1 的浓度，并且将标记物组合用于 CRC 的评估。

[0152] 在根据本发明的另外的优选方法中，分别测定至少生物标记物 seprase 和 CEA 的浓度，并且将标记物组合用于 CRC 的评估。

[0153] 在根据本发明的另外的优选方法中，将至少生物标记物 seprase、CEA、抗 p53 和铁蛋白的测量值组合以进行 CRC 的评估。

[0154] 在根据本发明的另外的优选方法中，将至少生物标记物 seprase、CEA、抗 p53 和骨桥蛋白的测量值组合以进行 CRC 的评估。

[0155] 在根据本发明的另外的优选方法中，测定至少 seprase、CEA、抗 p53、CYFRA21-1 和骨桥蛋白的测量结果，将其算术组合，并且将该标记物组合用于 CRC 的评估。

[0156] 在根据本发明的另外的优选方法中，测定至少 seprase、CEA、抗 p53、CYFRA21-1 和铁蛋白的测量结果，将其算术组合，并且将该标记物组合用于 CRC 的评估。

[0157] 在根据本发明的另外的优选方法中，测定至少 seprase、CEA、抗 p53、CYFRA21-1、骨桥蛋白和铁蛋白的测量结果，将其算术组合，并且将该标记物组合用于 CRC 的评估。

[0158] 提供下列实施例、序列表和图来帮助理解本发明，其真实范围示于所附权利要求中。应当理解，可在所示的方法中进行变动而不背离本发明的精神。

[0159] 附图概述

[0160] 图 1 选择用于研究的患者的流程图

[0161] 图 2 用于算法优化的图解。

[0162] 图 3 交叉效度分析中标记物的选择。图 3 显示在 100 个统计操作中 seprase 和 CEA 各自每一次都被统计方法选择，铁蛋白和 OPN 分别被选择 99 次和 98 次。

[0163] 实施例 1

[0164] 临床样品

[0165] 按预期在两个欧洲多中心研究中收集血清样品。第一研究在胃肠病学科室在平均风险筛查群体中招募患者，所述群体经历通过结肠镜检查进行的预防性抑制 (preventive check)。在参与中心 (participating centers) 对每一个患者进行结肠镜检查，在每一个位置使用制剂和镇静。在即将进行结肠镜检查之前以收集血清样品。记录各伤口的范围和位置。病理学家现场检查每一个手术切除样品以确定诊断和各自的分期。由于预防性筛查群体中大约 0.05％的 CRC 患者的低发病率，在不同的手术系统中在第二前瞻性研究中额外招募癌症患者。在该研究中，还在手术或结肠镜检查之前收集血清样品。由病理学家现场通过各患者的病理分期来确认结直肠癌的诊断。用于两个研究的研究方案由适当的伦理委员会评审和批准，并且所有参与者提供书面知情同意书。

[0166] 汇集来自两个多中心研究的临床样品以进行之前提及的标记物的评估（参考图 1)，分别产生对照组群“A”和 CRC 组群“B”，即：

[0167] A：具有 266 个患者的对照组群。（对照组群中未包括患有腺癌或炎性肠病的患者）。

[0168] B：具有 301 个结直肠癌患者的 CRC 组群。

[0169] 血液 / 血清收集：

[0170] 将血液样品抽入血清管中并且让其在室温下凝固至少 1 小时和达到 2 小时。在离心后，将上清液（血清）以 1ml 等分于 -25℃下冷冻，在两周内转移至 -70℃冰箱。在测量前，将血清样品解冻，为方便起见再等分入更小的体积并且再冷冻。然后在即将分析前解冻样品。因此，在分析前只将装置中的每一个样品冷冻和解冻两次。

[0171] 实施例 2

[0172] 用于检测肿瘤标记物的免疫测定

[0173] 2.1Roche Elecsys®测定

[0174] 获得用于下列肿瘤标记物的Elecsys®试剂盒：CEA、CA 15-3、CA19-9、CA125、CA 72-4、铁蛋白、β-hCG、NSE、AFP 和 CYFRA21-1（细胞角蛋白 -19)。按照厂商说明书在 Elecsys® 2010 系统 (Roche DiagnosticsGmbH,Mannheim,Germany) 上进行所有测定。由仪器测量的浓度用于计算 / 产生 AUC 数据（示于表 1 中）。

[0175] 2.2 微量滴定板测定

[0176] 内部开发标记物 seprase、骨桥蛋白和抗 p53 微量滴定测定。

[0177] 2.2.1 骨桥蛋白 (OPN)

[0178] 为了捕获和检测抗原，使用两种不同的抗体。此类抗体经选择具有不同的非重叠表位。使用的两种抗体的表位在骨桥蛋白序列的氨基酸 167 与羧基末端之间 (Kiefer, M.C. 等人，Nucl.Acids Res.17(1989)3306)。一个抗体已被生物素化并且用作捕获抗体。

第二抗体被地高辛化。然后通过使用适当的抗 DIG 二抗来检测地高辛化的抗体。

[0179] 测定方法：

[0180] 用 100μl 10μg/mL 的生物素化的抗 OPN 多克隆抗体于 10mM 磷酸缓冲盐溶液 (PBS)，pH 7.4，1% BSA 和 0.1% Tween 20 中温育链霉抗生物素涂铺的 96 孔微量滴定板，进行 60 分钟。温育后，用磷酸缓冲盐溶液 pH 7.4(PBS)，0.1% Tween 20 清洗板 3 次。然后用系列稀释的重组蛋白（作为标准抗原）或用稀释的来自患者的血浆样品温育孔进行 2 小、时。在 OPN 结合后，用 PBS，0.1% Tween 20 清洗板 3 次。为了特异性检测结合的 OPN，用 100μl 10μg/ml 的地高辛化的抗 OPN 多克隆抗体于 10mM 磷酸盐，pH 7.4，1% BSA，0.9% NaCl 和 0.1% Tween 20 中温育孔，进行 60 分钟。然后，清洗板 3 次以除去未结合的抗体。在下一步骤中，用 20mU/ml 抗地高辛 -POD 缀合物 (Roche Diagnostics GmbH，Mannheim，Germany，Catalogue No.1633716) 于 10mM 磷酸盐，pH 7.4，1% BSA，0，9% NaCl 和 0.1% Tween 20 中温育孔，进行 60 分钟。随后用相同的缓冲液清洗板 3 次。为了检测抗原 - 抗体复合物，用 100μl ABTS 溶液 (RocheDiagnostics GmbH，Mannheim，Germany，Catalog No.11685767) 温育孔，在 30 至 60 分钟后，使用 ELISA 读数器在 405nm 处测量 OD。

[0181] 2.2.2 抗 p53

[0182] 以一式二份重复在链霉抗生物素涂铺的微量滴定板上以间接检测形式进行抗 p53 自身抗体的测量。分别将两个免疫反应性、生物素化的肽

[0183] Bi-p53(11-35)：生物素 -EPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPL(SEQID NO：2) 和

[0184] Bi-p53(41-60)：生物素 -DDLMLSPDDIEQWFTEDPGP(SEQ ID NO：3)

[0185] 溶解在 PBS/0.05% Tween 20（各 50ng/ml）中，然后固定在链霉抗生物素涂铺的微量滴定板 (100μl/ 孔，60 分钟，30℃，震荡）上。在用 PBS/0.05% Tween 20 清洗后，将稀释的含有自身抗体的血清样品与固相（稀释度：1 ： 50，使用 PBS/0.05% Tween 20；体积：100μl/ 孔，120 分钟，30° C，震荡）一起温育。在用 PBS/0.05% Tween 20 清洗后，以适当的稀释度用抗人 IgG-POD- 缀合物标记结合的 IgG。（于 PBS/0.05% Tween 20 中稀释；150μl/ 孔；在震荡的条件下于 30℃下温育 60 分钟）。在清洗后，使用四甲基联苯胺 / 过氧化氢 (TMB) 作为底物 (200μl/ 孔；15 分钟；30℃；震荡）检测结合的缀合物。通过加入 50μl/ 孔的 1M 硫酸终止酶促反应。使用 620nm 作为参照波长，在 450nm 通过光度计定量颜色。使用高阳性癌症血清，通过标准曲线将 OD450nm- 值转换成 U/ml。在上述测定条件下，1000U/ml 的稀释的癌症血清产生大约 3.0OD450nm。

[0186] 2.2.3Seprase

[0187] 使用两种不同的大鼠单克隆抗 seprase 抗体（克隆 D8 和 D28）作为 seprase 特异性结合分子 (Pineiro-Sanchez 等人，M.L 等人，J.Biol.Chem.12(1997)7595-7601)。

[0188] 单克隆大鼠 IgG 的生物素化：

[0189] 使单克隆大鼠 IgG（克隆 D28）在 10mM $NaH_2PO_4$/NaOH，pH 7.5，30mM NaCl 中达到 10mg/ml。每 mlIgG 溶液加入 50μl 生物素 -N- 羟基琥珀酰亚胺 (3.6mg/ml 于 DMSO 中）。在室温下进行 30 分钟后，将样品在 Superdex 200(10mM $NaH_2PO_4$/NaOH，pH 7.5，30mM NaCl) 上进行层析。收集含有生物素化的 IgG 的级分

[0190] 单克隆大鼠 IgG 的地高辛化：

[0191] 使单克隆大鼠 IgG（克隆 D8）在 10mM $NaH_2PO_4$/NaOH，30mM NaCl，pH 7.5 中达到

10mg/ml。每 mlIgG 溶液加入 50μl 地高辛 -3-O- 甲基羰基 - ε - 氨基己酸 -N- 羟基丁二酰亚胺活化脂 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, Cat.No.1333054)(3.8mg/ml 于 DMSO 中 )。在室温下进行 30 分钟,将样品在Superdex® 200(10mM $NaH_2PO_4$/NaOH,pH 7.5, 30mMNaCl) 上进行层析。收集含有地高辛化的 IgG 的级分。

[0192] 用于人血清和血浆样品中 seprase 的测量的 ELISA :

[0193] 为了检测人血清或血浆中的 seprase,发展了夹心 ELISA。将缀合有生物素的抗 seprase 单克隆抗体 D28 和缀合有地高辛的 D8( 参见上文 ) 的等分用于捕获或检测抗原。

[0194] 将样品 (75μl) 与 150μl 各自含有 0.375μg 的 D28- 生物素和 D8- 地高辛抗体的抗体试剂于温育缓冲液 ( 除其他添加剂以外包含 40mM 磷酸盐、200mM 酒石酸钠、10mM EDTA、0.1% Tween 20 并且调整至 pH 7.4) 中混合。在温育 2 小、时后,将 2x100μl 的混合物转移入链霉抗生物素涂铺的微量滴定板的分开的孔中,再温育另外 1 小时。用清洗缓冲液 (10mM Tris、150mM NaCl、0.05% Tween 20) 清洗板 3 次。在下一步骤中,用 30mU/ml 的通用缀合缓冲液 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalog#11684825) 中的抗地高辛 -HRP 缀合物 (RocheDiagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalog#1633716) 温育孔,进行 60 分钟,然后如之前一样进行清洗。然后用 100μl TMB 底物溶液 (RocheDiagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalog#12034425) 温育孔进行 1 小时。加入 2N 硫酸 (50μl) 终止显色并且将蓝色转变成黄色。用 ELISA 读数器 ( 参见上文 ) 在 450nm 测量 OD。

[0195] 所有温育在室温下进行。用温育缓冲液预稀释人血清或血浆的样品至 0.15% 的终浓度。为了进行校准,将血清池用作标准。用温育缓冲液将其稀释至 0.09/0.18/0.27/0.36/0.45% 的终浓度以分别产生具有 0.03/0.06/0.09/0.12/0.15 单位 /ml 的任意给定的值的标准。

[0196] 通过线性回归分析计算校正曲线方程,将其用于将孔的吸光度读数转换成相应的浓度值。将结果乘以预稀释因子以获得各样品本身的任意 seprase 浓度。

[0197] 实施例 3

[0198] 所有标记物的单变量结果

[0199] 将所有血清样品随机化,并且在我们的实验室中测量所有标记物。对于每一个微量滴定板测定,以一式两份重复独立地在不同样品等分中估量标记物,将平均浓度用于进一步分析。在另一个方面,在单个测定中从一个单个等分测量所有Elecsys®参数。

[0200] 在对照集合 A 中通过 95% 的分位数 ( 导致 95% 的特异性 ) 的计算来确定各测定的截止值。通过计算受试者工作特征曲 (ROC) 或在 95% 的预设特异性下的临床灵敏度 ( 表 1) 来评估生物标记物的诊断潜能。

[0201] 表 1 :

[0202] 所有单个标记物 (301 个 CRC,266 个对照,在 95% 的特异性下 ) 的 ROC 分析和灵敏度

[0203]

| 标记 | 测定 | AUC(%) | 灵敏度所有 UICC 分期 (%) | 灵敏度 UICC 分期 I-III(%) |
|---|---|---|---|---|
| CEA | ElecSys | 77 | 43,9 | 30,9 |
| CA 15-3 | Elecsys | 53 | 4,0 | 3,4 |
| CA 125 | Elecsys | 56 | 17,6 | 10,3 |
| CA 19-9 | Elecsys | 64 | 22,6 | 15,0 |
| CA 72-4 | Elecsys | 66 | 20,6 | 12,9 |
| CYFRA21-1 | Elecsys | 78 | 35,5 | 22,3 |
| 铁蛋白 | Elecsys | 65 | 23,9 | 27,0 |
| NSE | ElecSys | 57 | 14,0 | 6,4 |
| AFP | Elecsys | 56 | 6,6 | 5,6 |
| β-hCG | Elecsys | 51 | 3,7 | 3,4 |
| OPN | Roche-MTP | 77 | 30,2 | 23,2 |
| 抗 p53 | Roche-MTP | 57 | 20,0 | 18,8 |
| Seprase | Roche-MTP | 79 | 42,4 | 45,4 |
| S100A12 | Roche-MTP | 69 | 20,3 | 12,9 |
| HGF | MTP | 70 | 30,4 | 24,7 |
| TIMP-1 | MTP | 66 | 26,8 | 15,6 |
| IL-6 | MTP | 74 | 30,6 | 23,6 |
| IL-8 | MTP | 76 | 27,9 | 15,4 |

[0204] 一些标记物显示高于 70%的 AUC 值,即 CEA、CYFRA21-1、骨桥蛋白、seprase 和炎症标记物 IL-6 和 IL-8。重要地要指出,铁蛋白和 Seprase 在 CRC 中都被下调,然而所有其他标记物在 CRC 患者通常增加。

[0205] 为了模拟筛查状况，还计算对于所有癌症分期（无 UICC 分期 IV）的灵敏度。该计算清楚地表明标记物候选物铁蛋白、抗 p53 和 seprase 不受 UICC 分期 IV 的消除影响。注意这 3 个标记物的分期依赖性，没有发现显著差异。Seprase 和抗 p53 分别在 UICC 分期 I 显示最高的灵敏度。其他标记物受到肿瘤分期的强烈影响并且对于处于分期 IV 的患者显示最高的灵敏度，如 CEA（参见表 2）。

[0206] 表 2：

[0207] 在 95％的特异性下对于处于 CRC 的不同分期的患者的个体标记物的灵敏度

[0208]

| 标记物 | 灵敏度（％）<br>UICC I | 灵敏度（％）<br>UICC II | 灵敏度（％）<br>UICC III | 灵敏度（％）<br>UICC IV |
|---|---|---|---|---|
| CEA | 13,2 | 36,8 | 34,2 | 88,2 |
| CA 19-9 | 11,3 | 16,2 | 17,1 | 48,5 |
| CYFRA21-1 | 13,2 | 26,5 | 23,7 | 80,9 |
| 铁蛋白 | 13,2 | 30,9 | 34,2 | 13,2 |
| OPN | 13,2 | 22,1 | 27,6 | 54,4 |
| 抗 p53 | 16,0 | 17,9 | 15,8 | 24,2 |
| Seprase | 36,0 | 49,3 | 51,3 | 31,8 |
| S100A12 | 9,4 | 13,2 | 13,2 | 45,6 |
| HGF | 18,9 | 23,5 | 25,3 | 50,0 |
| TIMP-1 | 13,2 | 16,2 | 17,3 | 64,7 |
| IL-6 | 13,2 | 30,9 | 19,7 | 54,4 |
| IL-8 | 7,8 | 19,7 | 17,3 | 71,2 |

[0209] 实施例 4

[0210] 标记物组合 / 统计分析和结果

[0211] 将惩罚 logistic 回归 (Penalized Logistic Regression)(PLR) 用作标记物组合的数学模型，如“惩罚的”R 工具箱中应用的 (http://cran.r-project.org/)。将总样品集合随机分入训练集 (2/3 的样品）和试验集 (1/3 的样品）。为了将患者分配至两个样品集，考虑变量如年龄、性别、收集部位和肿瘤分期的分布。通过在训练集内在 Monte-Carlo 交叉效度分析设计中进行 100 次操作来进行算法优化（即惩罚类型和其惩罚参数的选择）。

[0212] 在各 Monte-Carlo 交叉效度分析操作内，将所训练组的有 CRC 和对照病例的三分之二随机选择为亚训练组。将 PLR 用于亚训练组以产生诊断规则。对亚训练组的对照确定

关于估计的后验病例概率 (posteriorcase-probability) 的阈值以获得 95％或 98％的的多变量诊断规则的表观特异性。然后将该规则用于剩下的三分一的数据（亚试验集）以估计在给定的阈值下的灵敏度和特异性。将该方法重复 100 次。

[0213] 来自交叉效度分析的单个操作的仔细分析显示在 100 次统计操作中，seprase 和 CEA 各自每一次都被统计方法选择，而铁蛋白和 OPN 分别被选择 99 次和 98 次（参见图 3）。Cyfra 21-1 和抗 p53 分别被选择 74 和 70 次，而所有其他受试标记物只被选择 20 次以下或未被选择。

[0214] 因此根据交叉效度分析，训练集中 CRC 和对照集合的所有多变量结果报告为中等灵敏度。然后使用所有训练数据用最佳算法研究最终诊断规则和其阈值，并且将其应用于试验集，所述试验集用于验证产生的诊断规则。

[0215] 表 3：

[0216] 由 seprase、CEA、铁蛋白、OPN、抗 p53 和 CYFRA21-1 组成的最佳标记物组合的结果

[0217]

| | 训练集* | | | 试验集 | |
|---|---|---|---|---|---|
| 95% 的预设特异性 | 灵敏度(%) 亚训练集 | 灵敏度(%) 亚试验集 | 灵敏度(%) 亚试验集 | 灵敏度 (%) | 特异性 (%) |
| CRC 病例 0-IV | 75 | 71 | 95 | 71 | 96 |
| CRC 病例 0-III | 68 | 63 | 94 | 69 | 96 |
| 98% 预设特异性 | | | | | |
| CRC 病例 0-IV | 65 | 62 | 98 | 60 | 97 |
| CRC 病例 0-III | 59 | 54 | 98 | 53 | 98 |

[0218] ＊来自 100 次 Monte-Carlo 交叉效度分析操作的亚训练集或亚试验集的中位数

[0219] 表 3 中的结果清楚地显示，通过组合 6 个标记物，与在无任何特异性损失的情况下最佳的单个标记物 seprase 相比较，可显著地提高灵敏度。血清样品中的这些结果可与使用免疫学 FOBT 测定 (Morikawa T. 等人，Gastroenterology 2005 ;129 :422-428) 获得的结果相当或更好。

[0220] 为了估量终诊断规则中各标记物候选物的重要性，评估这些标记物的各理论上可能的组合。为此目的，我们使用训练集的样品，并且以基本上与终规则相同的方式计算各标记物组合的灵敏度，然而只给算法提供经考虑的标记物亚集的数据。基于训练数据就 95％和 98％的预设特异性计算结直肠癌（只有 UICC 分期 I 至 III，无分期 IV) 的灵敏度。然后将这些所谓的表观灵敏度的绝对值经历过拟合，与实际“终规则”的表观灵敏度的差异虽然

对个体标记物的重要性给出了可解释的见解，因为其适当地考虑标记物的相关结构。

[0221] 表 4：

[0222] 训练集上的不同标记物组合的结果

[0223]

| Sepr. | CEA | 铁蛋白 | 抗 p53 | OPN | CYFRA 21-1 | 灵敏度（%）在 95%的特异性下 | 灵敏度（%）在 98%的特异性下 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| X | | | | | | 51,7 | 32,4 |
| X | X | | | | | 60,7 | 40,7 |
| X | | X | | | | 55,2 | 45,5 |
| X | | | X | | | 60,0 | 37,2 |
| X | | | | X | | 51,7 | 37,2 |
| X | | | | | X | 45,5 | 43,4 |
| X | X | X | X | X | X | 69,0 | 61,4 |
| X | X | X | X | X | | 67,6 | 61,4 |
| X | X | X | X | | X | 67,6 | 51,7 |
| X | X | X | | X | X | 67,6 | 56,6 |
| X | X | | X | X | X | 66,9 | 53,1 |
| X | | X | X | X | X | 58,6 | 51,0 |
| | X | X | X | X | X | 51,7 | 44,8 |

[0224] 可通过组合表 4 中提及的 6 个标记物获得最佳结果。除了在 98%的预设特异性下 CYFRA21-1 外，通过忽略掉 6 个标记物的组合中的一个标记物，灵敏度稍微增加。在另一个方面，忽略掉最主要的标记物 seprase，即使所有其他 5 个标记物的组合也只导致与单独使用 seprase 获得的灵敏度相当的灵敏度。表 4 中的数据还显示 2 个标记物的最佳组合依赖于需要的特异性水平。在 95%的特异性下，最佳两标记物组合是 seprase+CEA 和 seprase+抗 p53，然而在 98%的特异性下，组合 seprase+ 铁蛋白和 seprase+CYFRA21-1 是最重要的组合。根据表 4 中提供的数据也很明显的是在 98%的高特异性极限下，必需要更多的标记物来获得关于高灵敏度的最佳结果。在忽略掉 6 标记物组中的一个标记物后，在 98%的预设特异性下，与在 95%的预设特异性极限下相应的降低相比较，灵敏度的降低更大。

# 序列表

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

<120> 用于结直肠癌的标记物组

<130>25319WO

<150>EP 07023897.7
<151>2007-12-10

<150>EP 08017119.2
<151>2008-09-29

<160>3

<170>PatentIn version 3.2

<210>1
<211>766
<212>PRT
<213> 智人

<400>1

Met Lys Thr Pro Trp Lys Val Leu Leu Gly Leu Leu Gly Ala Ala Ala
1 5 10 15
Leu Val Thr Ile Ile Thr Val Pro Val Val Leu Leu Asn Lys Gly Thr
20 25 30
Asp Asp Ala Thr Ala Asp Ser Arg Lys Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
35 40 45
Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu Lys Leu Tyr Ser Leu Arg Trp Ile Ser
50 55 60
Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile Leu Val Phe Asn
65 70 75 80
Ala Glu Tyr Gly Asn Ser Ser Val Phe Leu Glu Asn Ser Thr Phe Asp
85 90 95
Glu Phe Gly His Ser Ile Asn Asp Tyr Ser Ile Ser Pro Asp Gly Gln

100 105 110

Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp Arg His Ser Tyr
115 120 125

Thr Ala Ser Tyr Asp Ile Tyr Asp Leu Asn Lys Arg Gln Leu Ile Thr
130 135 140

Glu Glu Arg Ile Pro Asn Asn Thr Gln Trp Val Thr Trp Ser Pro Val
145 150 155 160

Gly His Lys Leu Ala Tyr Val Trp Asn Asn Asp Ile Tyr Val Lys Ile
165 170 175

Glu Pro Asn Leu Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Trp Thr Gly Lys Glu Asp
180 185 190

Ile Ile Tyr Asn Gly Ile Thr Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Val Phe
195 200 205

Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Thr Phe Leu Ala
210 215 220

Tyr Ala Gln Phe Asn Asp Thr Glu Val Pro Leu Ile Glu Tyr Ser Phe
225 230 235 240

Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln Tyr Pro Lys Thr Val Arg Val Pro Tyr
245 250 255

Pro Lys Ala Gly Ala Val Asn Pro Thr Val Lys Phe Phe Val Val Asn
260 265 270

Thr Asp Ser Leu Ser Ser Val Thr Asn Ala Thr Ser Ile Gln Ile Thr
275 280 285

Ala Pro Ala Ser Met Leu Ile Gly Asp His Tyr Leu Cys Asp Val Thr
290 295 300

Trp Ala Thr Gln Glu Arg Ile Ser Leu Gln Trp Leu Arg Arg Ile Gln
305 310 315 320

Asn Tyr Ser Val Met Asp Ile Cys Asp Tyr Asp Glu Ser Ser Gly Arg
325 330 335

Trp Asn Cys Leu Val Ala Arg Gln His Ile Glu Met Ser Thr Thr Gly
340 345 350

Trp Val Gly Arg Phe Arg Pro Ser Glu Pro His Phe Thr Leu Asp Gly
355 360 365

Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile Ser Asn Glu Glu Gly Tyr Arg His Ile
370 375 380

Cys Tyr Phe Gln Ile Asp Lys Lys Asp Cys Thr Phe Ile Thr Lys Gly
385 390 395 400

Thr Trp Glu Val Ile Gly Ile Glu Ala Leu Thr Ser Asp Tyr Leu Tyr
405 410 415

Tyr Ile Ser Ash Glu Tyr Lys Gly Met Pro Gly Gly Arg Asn Leu Tyr
420 425 430
Lys Ile Gln Leu Ser Asp Tyr Thr Lys Val Thr Cys Leu Ser Cys Glu
435 440 445
Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ser Val Ser Phe Ser Lys Glu
450 455 460
Ala Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Cys Ser Gly Pro Gly Leu Pro Leu Tyr
465 470 475 480
Thr Leu His Ser Ser Val Asn Asp Lys Gly Leu Arg Val Leu Glu Asp
485 490 495
Ash Ser Ala Leu Asp Lys Met Leu Gln Ash Val Gln Met Pro Ser Lys
500 505 510
Lys Leu Asp Phe Ile Ile Leu Ash Glu Thr Lys Phe Trp Tyr Gln Met
515 520 525
Ile Leu Pro Pro His Phe Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Leu
530 535 540
Asp Val Tyr Ala Gly Pro Cys Ser Gln Lys Ala Asp Thr Val Phe Arg
545 550 555 560
Leu Asn Trp Ala Thr Tyr Leu Ala Ser Thr Glu Asn Ile Ile Val Ala
565 570 575
Ser Phe Asp Gly Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Gly Asp Lys Ile Met His
580 585 590
Ala Ile Asn Arg Arg Leu Gly Thr Phe Glu Val Glu Asp Gln Ile Glu
595 600 605
Ala Ala Arg Gln Phe Ser Lys Met Gly Phe Val Asp Asn Lys Arg Ile
610 615 620
Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr Ser Met Val Leu
625 630 635 640
Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
645 650 655
Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu Arg Tyr Met Gly
660 665 670
Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg Asn Ser Thr Val
675 680 685
Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr Leu Leu Ile His
690 695 700
Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Gln Ser Ala Gln Ile Ser
705 710 715 720
Lys Ala Leu Val Asp Val Gly Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Thr

725 730 735
Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His Gln His Ile Tyr
740 745 750
Thr His Met Ser His Phe Ile Lys Gln Cys Phe Ser Leu Pro
755 760 765

<210>2
<211>25
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽 Bi-p53(11-35)

<400>2

Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu
1 5 10 15
Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu
20 25

<210>3
<211>20
<212>PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 肽 Bi-p53(41-60)

<400>3

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu
1 5 10 15
Asp Pro Gly Pro
20

选择用于研究的患者的流程图

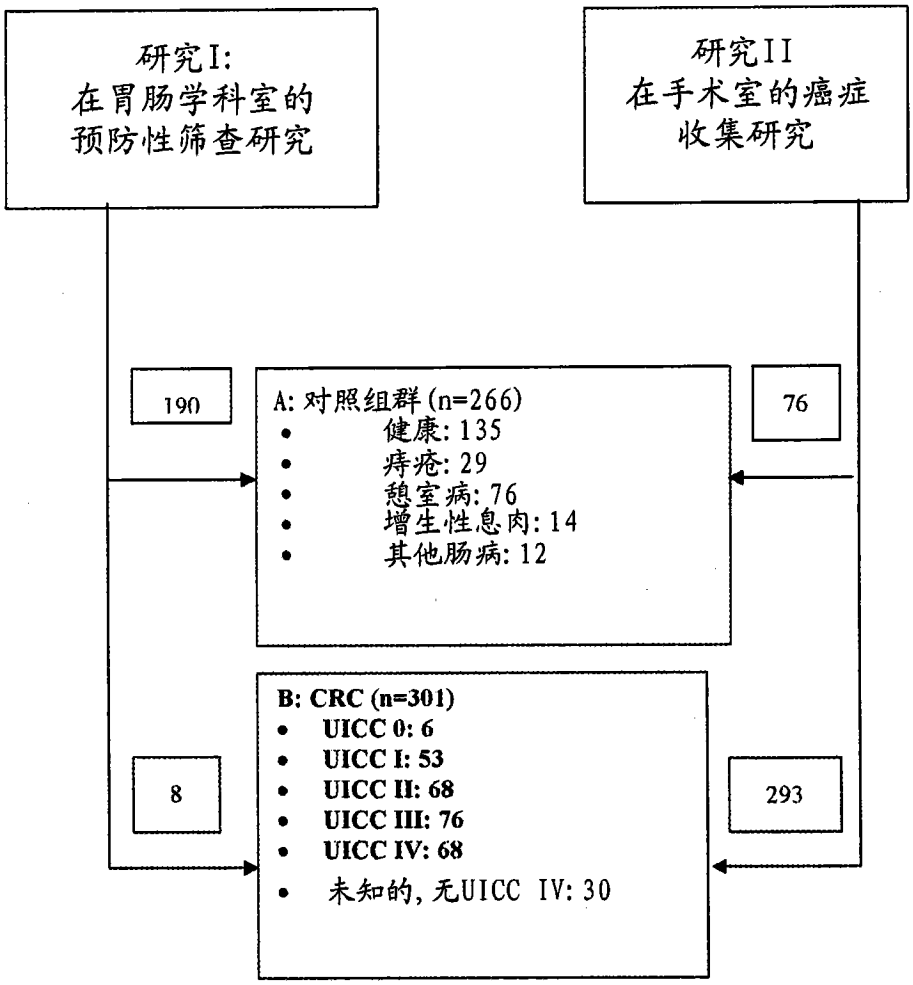



图 1

算法优化的示意图

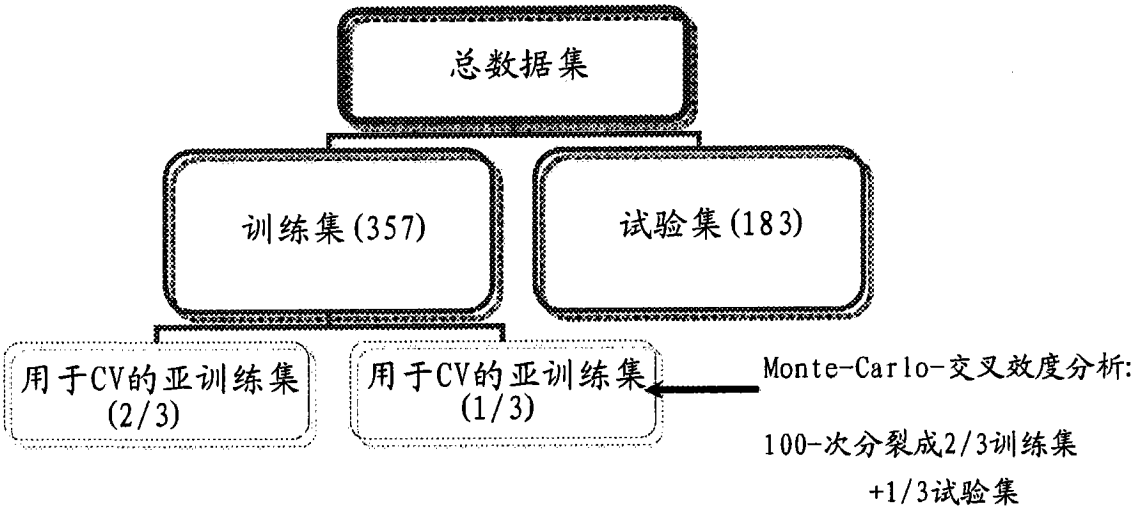



图 2

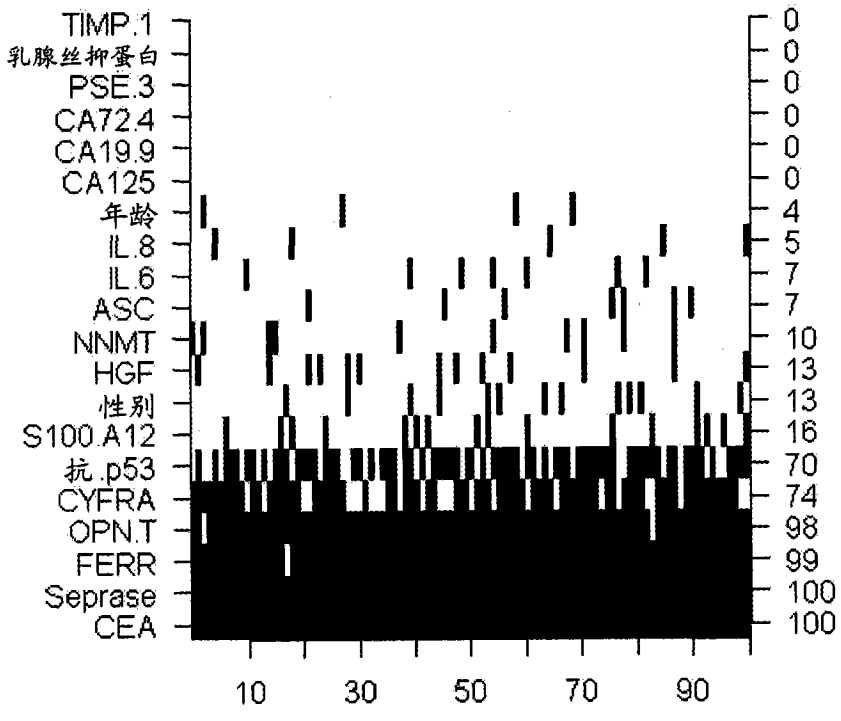



图 3