



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105745543 B

(45)授权公告日 2018.02.02

(21)申请号 201480063118.7

(22)申请日 2014.09.18

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105745543 A

(43)申请公布日 2016.07.06

(30)优先权数据

2013903595 2013.09.18 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2014/000925 2014.09.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/039175 EN 2015.03.26

(73)专利权人 阿德莱德研究及创新控股有限公司
司

地址 澳大利亚南澳大利亚

(72)发明人 P·霍夫曼 M·奥伊赫勒
K·马丁

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 杨昀 陶家蓉

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

(56)对比文件

CN 1675372 A,2005.09.28,

CN 101410715 A,2009.04.15,

CN 101762699 A,2010.06.30,

CN 101855553 A,2010.10.06,

CN 102590531 A,2012.07.18,

CN 101268367 A,2008.09.17,

US 2008/0300141 A1,2008.12.04,

W0 2008/115710 A2,2008.09.25,

A. Murray et al.Technical validation

of an autoantibody test for lung cancer.
《Annals of Oncology》.2010,第21卷(第8期),

审查员 舒霏霏

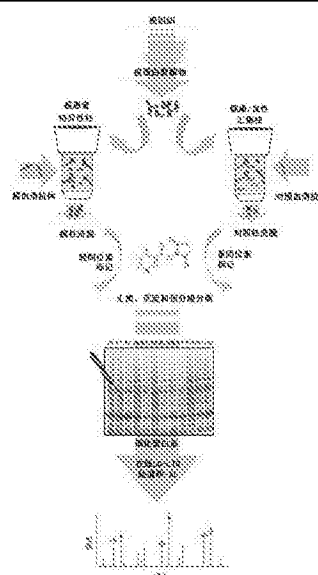
权利要求书4页 说明书33页 附图7页

(54)发明名称

卵巢癌的自身抗体生物标志物

(57)摘要

本发明涉及对卵巢癌的生物标志物的鉴定。具体而言,已在具有早期卵巢癌的对象中鉴定出针对ANXA1、ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、ATP1A1、UBA1和CFAH的癌相关的自身抗体。这些自身抗体可用于多种目的,包括用于检测卵巢癌的方法、用于筛选早期卵巢癌的方法,和用于评估治疗反应和疾病进展与复发的方法。所述自身抗体还代表卵巢癌发展的预后标志物。



1. 用于检测卵巢癌相关的自身抗体的存在的物质在制备用于检测对象中卵巢癌的试剂盒中的用途,其中,所述卵巢癌相关的自身抗体是针对ANXA1的自身抗体。

2. 如权利要求1所述的用途,其中,所述试剂盒还包含用于检测所述对象中一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体的存在的物质,其中,所述一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体选自下组:针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的用途,其中,在获自所述对象的样品中检测所述卵巢癌相关的自身抗体的存在。

4. 如权利要求3所述的用途,其中,所述样品选自下组中的任何一种或多种:血清、全血、血浆、唾液、颊粘膜拭子、宫颈巴氏涂片、粪便、尿、膀胱冲洗物、子宫冲洗物、痰、淋巴液、脑脊液,和来自所述对象的转移肿瘤组织或卵巢之一或两者的组织样品。

5. 如权利要求1所述的用途,其中,所述对象中的卵巢癌相关的自身抗体的存在通过与所述卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂来检测。

6. 如权利要求5所述的用途,其中,所述试剂是衍生出所述卵巢癌相关的自身抗体的抗原,或是对所述卵巢癌相关的自身抗体具有特异性的抗体。

7. 如权利要求6所述的用途,其中,所述试剂带有可检测的标记。

8. 如权利要求2所述的用途,其中,检测所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体的存在。

9. 如权利要求2所述的用途,其中,检测所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体的存在。

10. 如权利要求2所述的用途,其中,检测所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和肿瘤相关的抗原CA125的存在。

11. 用于测试卵巢癌相关的自身抗体的存在的物质在制备用于筛选对象中的早期卵巢癌的试剂盒中的用途,其中,所述卵巢癌相关的自身抗体是针对ANXA1的自身抗体。

12. 如权利要求11所述的用途,其中,所述试剂盒还包含用于测试所述对象中一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体的存在的物质,其中,所述一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体选自下组:针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

13. 如权利要求11或权利要求12所述的用途,其中,在获自所述对象的样品中测试所述卵巢癌相关的自身抗体的存在。

14. 如权利要求13所述的用途,其中,所述样品选自下组中的任何一种或多种:血清、全血、血浆、唾液、颊粘膜拭子、宫颈巴氏涂片、粪便、尿、膀胱冲洗物、子宫冲洗物、痰、淋巴液、脑脊液,和来自所述对象的转移肿瘤组织或卵巢之一或两者的组织样品。

15. 如权利要求11所述的用途,其中,所述早期卵巢癌是I期癌。

16. 如权利要求11所述的用途,其中,所述对象中的卵巢癌相关的自身抗体的存在通过与所述卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂来检测。

17. 如权利要求16所述的用途,其中,所述试剂是衍生出所述卵巢癌相关的自身抗体的

抗原,或是对所述卵巢癌相关的自身抗体具有特异性的抗体。

18. 如权利要求17所述的用途,其中,所述试剂带有可检测的标记。

19. 如权利要求12所述的用途,其中,测试所述对象中针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体的存在。

20. 如权利要求12所述的用途,其中,测试所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体的存在。

21. 如权利要求12所述的用途,其中,测试所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和肿瘤相关的抗原CA125的存在。

22. 用于检测卵巢癌相关的自身抗体的存在的物质在制备用于评估对象中卵巢癌的进展或复发的试剂盒中的用途,其中,所述卵巢癌相关的自身抗体是针对ANXA1的自身抗体。

23. 如权利要求22所述的用途,其中,所述试剂盒还包含用于检测所述对象中一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体的存在的物质,其中,所述一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体选自下组:针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

24. 如权利要求22或权利要求23所述的用途,其中,所述试剂盒用于包括如下步骤的方法:

(a) 检测所述对象中卵巢癌相关的自身抗体的水平;

(b) 将所述对象中所述卵巢癌相关的自身抗体的水平与各卵巢癌相关的自身抗体的参照水平做比较;和

(c) 基于所述比较,评估所述对象中卵巢癌的进展或复发。

25. 如权利要求22所述的用途,其中,所述对象正经历针对卵巢癌的治疗。

26. 如权利要求22所述的用途,其中,在获自所述对象的样品中检测所述卵巢癌相关的自身抗体的存在或水平。

27. 如权利要求26所述的用途,其中,所述样品选自下组中的任何一种或多种:血清、全血、血浆、唾液、颊粘膜拭子、宫颈巴氏涂片、粪便、尿、膀胱冲洗物、子宫冲洗物、痰、淋巴液、脑脊液,和来自所述对象的转移肿瘤组织或卵巢之一或两者的组织样品。

28. 如权利要求22所述的用途,其中,通过与所述卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂来检测所述对象中所述卵巢癌相关的自身抗体的存在或水平。

29. 如权利要求28所述的用途,其中,所述试剂是衍生出所述卵巢癌相关的自身抗体的抗原,或是对所述卵巢癌相关的自身抗体具有特异性的抗体。

30. 如权利要求29所述的用途,其中,所述试剂带有可检测的标记。

31. 如权利要求24所述的用途,其中,若所述对象中的卵巢癌相关的自身抗体的水平高于所述卵巢癌相关的自身抗体的参照水平,则指示卵巢癌在所述对象中的进展或复发。

32. 如权利要求23所述的用途,其中,检测所述对象中针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体的存在或水平。

33. 如权利要求23所述的用途,其中,检测所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体的存在或水平。

34. 如权利要求23所述的用途,其中,检测所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对

ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和肿瘤相关的抗原CA125的存在或水平。

35. 用于检测卵巢癌相关的自身抗体的存在的物质在制备用于筛选有用于治疗对象中的卵巢癌的候选治疗剂的试剂盒中的用途,其中,所述试剂盒用于包括如下步骤的方法:评估所述候选治疗剂在减少卵巢癌相关的自身抗体的水平方面的活性,并且其中,所述卵巢癌相关的自身抗体是针对ANXA1的自身抗体。

36. 如权利要求35所述的用途,其中,所述试剂盒还包含用于检测所述对象中一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体的存在的物质,其中,所述一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体选自下组:针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

37. 如权利要求35或权利要求36所述的用途,其中,所述方法包括:

(a) 给予所述对象所述候选治疗剂;

(b) 检测所述对象中卵巢癌相关的自身抗体的水平;和

(c) 将所述对象中的卵巢癌相关的自身抗体的水平与患有卵巢癌的未经治疗的对象中的所述卵巢癌相关的自身抗体的水平做比较,

其中,如果所述对象中的卵巢癌相关的自身抗体的水平低于所述未经治疗的对象中的卵巢癌相关的自身抗体的水平,则所述候选治疗剂有用于治疗卵巢癌。

38. 如权利要求35所述的用途,其中,在获自所述对象的样品中检测所述卵巢癌相关的自身抗体的水平。

39. 如权利要求38所述的用途,其中,所述样品选自下组中的任何一种或多种:血清、全血、血浆、唾液、颊粘膜拭子、宫颈巴氏涂片、粪便、尿、膀胱冲洗物、子宫冲洗物、痰、淋巴液、脑脊液,和来自所述对象的转移肿瘤组织或卵巢之一或两者的组织样品。

40. 如权利要求35所述的用途,其中,所述对象中的卵巢癌相关的自身抗体的存在或水平通过与所述卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂来检测。

41. 如权利要求40所述的用途,其中,所述试剂是衍生出所述卵巢癌相关的自身抗体的抗原,或是对所述卵巢癌相关的自身抗体具有特异性的抗体。

42. 如权利要求41所述的用途,其中,所述试剂带有可检测的标记。

43. 如权利要求36所述的用途,其中,检测针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体的存在或水平。

44. 如权利要求36所述的用途,其中,检测针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体的存在或水平。

45. 如权利要求36所述的用途,其中,检测针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和肿瘤相关的抗原CA125的存在或水平。

46. 与对象中的卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂在制备用于检测所述对象中的卵巢癌、用于筛选所述对象中的早期卵巢癌和/或用于评估所述对象中的卵巢癌进展的组合物中的用途,其中所述卵巢癌相关的自身抗体是针对ANXA1的自身抗体。

47. 如权利要求46所述的用途,其中,所述组合物还包含与所述对象中的一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂,其中,所述一种或多种其它卵巢癌相关的自身抗体选自下组:针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身

抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

48. 如权利要求46或权利要求47所述的用途,其中,所述试剂是衍生出所述卵巢癌相关的自身抗体的抗原,或是对所述卵巢癌相关的自身抗体具有特异性的抗体。

49. 如权利要求48所述的用途,其中,所述试剂带有可检测的标记。

50. 如权利要求47所述的用途,其中,所述卵巢癌相关的自身抗体包括:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体。

51. 如权利要求47所述的用途,其中,所述卵巢癌相关的自身抗体包括:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体。

52. 如权利要求46所述的用途,其中,所述组合物还包含与肿瘤相关的抗原CA125发生结合或相互作用的试剂。

卵巢癌的自身抗体生物标志物

[0001] 优先权声明

[0002] 本国际专利申请请求2013年9月18日提交的澳大利亚临时专利申请2013903595的优先权,其内容通过引用纳入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及对卵巢癌的生物标志物的鉴定。具体而言,鉴定了患有早期卵巢癌的对象中的癌相关的自身抗体。这些自身抗体可用于多种目的,包括用于检测卵巢癌的方法、用于筛选早期卵巢癌的方法,和用于评估治疗反应和疾病进展与复发的方法。所述自身抗体还代表卵巢癌发展的预后标志物。

[0004] 发明背景

[0005] 卵巢癌是妇科恶性病的主要致死病因,并且位列女性所有癌相关致死病因中的第五位。事实上,经估计在美国,每72名女性中将有一名会在其生命中发展卵巢癌,并且每96名女性中将有一名死于该疾病。例如,已经估计,2013年,单在美国就有22,240例新诊断出的卵巢癌病例,并且有14,030名女性将会死于该疾病。

[0006] 目前就卵巢癌而言最为公认的风险因素是月经、生殖和激素因素。然而,已将许多其它因素与卵巢癌的发展相联系,并且这些包括饮食、成人身高、体重和吸烟状况。此外,也有临床观察结果表明,根据卵巢癌的家族族聚性,卵巢癌风险也有遗传因素。事实上,已发现携带BRCA1和BRCA2突变的女性发展卵巢癌的风险较高。

[0007] 卵巢癌的高死亡率归因于该疾病的无症状进展,这种无症状进展导致有60%的病例被诊断为晚期(国际妇产科联盟(FIGO) I、II和IV期),此时癌已经扩散至腹腔或其它器官。当其还限制在卵巢时(FIGO I期),卵巢癌的检测与约90%的5年存活率相关,相比之下,处于晚期卵巢疾病(FIGO I、II/IV期)的女性的5年存活率低于30%。因此,早期卵巢癌的检测是提高该疾病的总体存活率的最佳途径。然而,目前,还没有临床上可应用的测试和生物标志物能够用于所述早期检测,以及卵巢癌的筛选。

[0008] 迄今为止,癌抗原125(CA125)和HE4是经过临床批准以区分良性和恶性卵巢病灶以检测疾病负担和评价卵巢癌治疗的,仅有的两种基于蛋白质的生物标志物。然而,在患有卵巢癌的所有患者中,这些标志物均没有升高,并且,其可能在健康女性或患有良性疾病的女性中增多。因此,它们对于基于群体的风险评估或早期检测而言并不具有充分的灵敏度和特异性。例如,对于具有附件肿块的女性,CA125的血清水平大于35U/mL是现用于检测的金标准。然而,仅在50%的早期患者和80%的晚期患者中观察到CA125的水平升高。

[0009] 在集中于肿瘤相关抗原的传统的生物标志物发现方面存在许多不小的障碍。例如,在早期疾病中,当肿瘤极小时,存在定量困难,因此仅产生极小量的靶抗原(这可能依然无法被目前可用的技术检测)。还存在定量问题,因为在许多情况中,标志物对于疾病过程而言是偶然的,并且常常被待检测生物样本的复杂性掩盖。该问题因人类群体的遗传多样性而进一步复杂化,并且不可控环境因素的影响意味着潜在的生物标志物可能会被生物标志物表达中的高度自然变化而遮蔽。最后,难以获得有效数量的早期卵巢癌的人类样品用

于研究,因为稀缺处于该阶段的疾病。

[0010] 鉴于缺乏早期检测测试,以及现有方法的限制,急需鉴定出早期卵巢癌的新生物标志物。

[0011] 本说明书中涉及对于文件、作用、材料、装置、论文等的讨论仅仅为了提供本发明内容。这不意味着或不代表这些中的任何或全部内容仅因其存在于本申请各权利要求的优先权之前就形成现有技术基础中的部分或是本发明相关领域中的常规知识。

发明内容

[0012] 发明人已经识别出,针对肿瘤相关的抗原的自体抗体可作为灵敏标志物用于卵巢癌检测。针对肿瘤相关抗原的循环自身抗体的丰度远高于抗原,尤其是在疾病早期具有低肿瘤负担的时候,并且,其稳定性也远高于血清抗原。此外,已观察到自身抗体的出现早于恶性状况的显现。发明人现已鉴定出对于早期卵巢癌显示高灵敏度和特异度的多种自身抗体。

[0013] 因此,在本发明的第一方面中,提供一种检测对象中卵巢癌的方法,所述方法包括如下步骤:检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0014] 发明人已确定,前述的卵巢癌相关的自身抗体由具有最早期卵巢癌的患者产生。

[0015] 因此,在本发明的第二方面中,提供一种筛选对象中的早期卵巢癌的方法,所述方法包括如下步骤:测试所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0016] 在一个实施方式中,所述早期卵巢癌是I期癌。

[0017] 对于具有早期卵巢癌的患者中的前述卵巢癌相关的自身抗体的鉴定也允许评估针对所述癌症的治疗在对象中的疗效的方法。

[0018] 因此,在本发明的第三方面中,提供一种评估对象中卵巢癌的进展或复发的方法,所述方法包括如下步骤:检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0019] 在一个实施方式中,所述方法包括:

[0020] (a) 检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平;

[0021] (b) 将所述对象中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平与所述卵巢癌相关的自身抗体的参照水平或其各自的参照水平做比较;和

[0022] (c) 基于所述比较,评估所述对象中卵巢癌的进展或复发。

[0023] 在一个实施方式中,所述对象正经历针对卵巢癌的治疗。在一些实施方式中,所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平高于所述卵巢癌相关的自身抗体的参

照水平或其各自的参照水平,指示卵巢癌在所述对象中的进展或复发。

[0024] 在本发明前述方面的一些实施方式中,检测获自所述对象的样品中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在或水平。在一些实施方式中,所述样品选自下组中的任何一种或多种:血清、全血、血浆、唾液、颊粘膜拭子、宫颈巴氏涂片、粪便、尿、膀胱冲洗物、子宫冲洗物、痰、淋巴液、脑脊液、精液,和来自所述对象的转移肿瘤组织或卵巢之一或两者的组织样品。

[0025] 在本发明前述方面的一些实施方式中,所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在或水平通过与所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂来检测。在一个实施方式中,所述试剂是衍生出所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的抗原,或是对所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体具有特异性的抗体。在一个实施方式中,所述试剂带有可检测的标记。

[0026] 在本发明前述方面的一些实施方式中,检测对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体的存在或水平。在一些实施方式中,检测对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体的存在或水平。在一些实施方式中,检测对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和肿瘤相关的抗原CA125的存在或水平。

[0027] 在本发明的第四方面中,提供一种筛选有用于治疗对象中卵巢癌的候选治疗剂的方法,所述方法包括如下步骤:评估所述候选治疗剂在减少所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平方面的活性,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0028] 在一个实施方式中,所述方法包括:

[0029] (a) 给予所述对象所述候选治疗剂;

[0030] (b) 检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平;和

[0031] (c) 将所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平与患有卵巢癌的未经治疗的对象中的所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平做比较,

[0032] 其中,如果所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平低于所述未经治疗的对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平,则所述候选治疗剂有用于治疗卵巢癌。

[0033] 在一个实施方式中,检测获自所述对象的样品中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在或水平。所述样品可选自上文所列那些中的一种或多种。

[0034] 在本发明第四方面中的一些实施方式中,所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平通过与所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂来检测。所述试剂可选自上文所列那些,并且可带有可检测的标记。

[0035] 在本发明第四方面中的一些实施方式中,检测所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体的水平。在一些实施方式中,检测所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体的水平。在一些实施方式中,检测所述对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对

ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和肿瘤相关的抗原CA125的水平。

[0036] 在本发明的第五方面中,提供一种用于检测对象中的卵巢癌的组合物,用于筛选对象中的早期卵巢癌和/或用于评估对象中的卵巢癌进展,所述组合物包含:与所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0037] 在一个实施方式中,所述试剂是衍生出所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的抗原,或是对所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体具有特异性的抗体。在一个实施方式中,所述试剂带有可检测的标记。

[0038] 在本发明第五方面中的一些实施方式中,所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体包括:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体。在一些实施方式中,所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体包括:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体。在本发明第五方面的一些实施方式中,所述组合物还包含:与肿瘤相关的抗原CA125发生结合或相互作用的试剂。

[0039] 在本发明的第六方面中,提供一种用于检测对象中的卵巢癌的试剂盒,用于筛选对象中的早期卵巢癌,和/或用于评估对象中的卵巢癌进展,所述试剂盒包含:用于检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在的装置,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。在一个实施方式中,所述试剂盒还包含:用于检测对象中的肿瘤相关的抗原CA125的装置。

附图说明

[0040] 为了进一步理解本发明的方面和优势,应参考与如下附图结合的如下详述内容。

[0041] 图1-描述用于鉴定本发明的卵巢癌自身抗体的免疫蛋白质组学方法的示意图。

[0042] 图2-代表性的蛋白质微阵列,其显示两种自身抗体候选物的差异调节。(A) 健康,(B) 良性,(C) I期,和(D) II期血清。自身抗体A信号(检测为平均强度)示于图E,而自身抗体B信号示于图F。

[0043] 图3-原始和转换的蛋白质微阵列数据的数据图。图3A显示所有样品的抗原平均值/SD。X轴-平均值(群体);Y轴-SD(群体)。图3B:X轴-理论分位数;Y轴-样品分位数(标准化的强度)。图3C:X轴-群体平均值(vsn数据);Y轴-群体SD(vsn数据)。图3D:X轴-理论分位数;Y轴-样品分位数(标准化的强度vs_n)。

[0044] 图4-显示所选的九种自身抗体在早期和晚期卵巢疾病中的调节模式的图表,将其与健康个体和具有良性妇科疾病的患者作比较。

[0045] 图5-所述九种自身抗体生物标志物各自的受试者工作特征(ROC)曲线。

[0046] 图6-合并的自身抗体生物标志物组的受试者工作特征(ROC)曲线。

[0047] 发明详述

[0048] 本发明部分基于对多种自身抗体的鉴定,所述自身抗体对于卵巢癌细胞上存在的

抗原具有特异性。这些抗体对于卵巢癌的高灵敏度和特异度指示,它们是合适的生物标志物,其可形成卵巢癌的诊断测试和预后测试的基础。

[0049] 生物标志物是有效的有机生物分子,相较于其它表型状态(例如,未患某疾病)而言,其在取自一种表型状态(例如,患有该疾病)的对象的样品中差异存在。如果计算的不同表型状态的组之间的生物标志物的平均或中值水平或量不同(例如存在/不存在,较高/较低),则所述生物标志物在所述组间差异存在。因此,生物标志物,单独或组合地,提供对象属于一种或另一种表型状态的指示。关于对具体癌类型具有特异性的自身抗体而言,这些自身抗体一般仅预期存在于患有该癌症的对象中,但不存在于不患有该癌症的“正常”对象中。然而,应明了,本发明的生物标志物在卵巢癌发展的最早期是可检测的,因此可能存在于患病的对象中(因为缺乏卵巢癌的表型表达,其认为其自身是“正常”的)。

[0050] 因此,在本发明的第一方面中,提供一种检测对象中卵巢癌的方法,所述方法包括如下步骤:检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0051] 通过测试处于浆液性卵巢癌的各个阶段的对象中的前述自身抗体的存在,发明人已确定这些生物标志物中的每一种存在于卵巢疾病的早期(I期及此外)。

[0052] 因此,在本发明的第二方面中,提供一种筛选对象中的早期卵巢癌的方法,所述方法包括如下步骤:测试所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0053] 在一个实施方式中,所述早期卵巢癌是I期癌。癌的时期(阶段)通过癌已扩散的程度来确定。I期卵巢癌定义为癌细胞位于具有癌细胞的卵巢处,而扩散至骨盆表面或器官(则为2期),腹腔或淋巴结(3期),而远距离器官(4期)。因此,I期卵巢癌位于一个或两个卵巢。

[0054] “卵巢癌”的含义应由本领域技术人员熟知。为避免疑义,卵巢癌是从卵巢出现生长的癌。多于90%的卵巢癌的起源是上皮,鉴于其来源于卵巢表面。然而,认为输卵管也可能是一些卵巢癌的来源,而在这种情况下,由输卵管发展的癌也被术语“卵巢癌”涵盖。卵巢癌也被分类为妇科癌症。

[0055] 如上文所示,自身抗体是由对象响应该对象中存在的蛋白质(抗原)而产生的抗体。一般而言,个体不对其本身具有的蛋白质产生免疫应答,因此不产生相应的抗体。然而,在稀有情况中,个体会将其本身具有的蛋白质识别为抗原,并针对其产生抗体。这导致各种自身免疫疾病,例如,类风湿性关节炎和全身性红斑狼疮。对于本发明,本发明的自身抗体并非响应所述对象自己本身具有的蛋白质而产生,而是响应所述对象中如下蛋白质的存在而产生:该蛋白质与所述对象中存在的癌细胞特异性地结合。这些蛋白质称为肿瘤相关抗原。

[0056] 检测或测试对象中自身抗体的存在可通过本领域技术人员理解的多种方式进行。在一个实施方式中,可采用与所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互

作用的本发明试剂。所述试剂可直接结合至自身抗体,或可以间接方式与自身抗体相互作用,例如,通过结合至靶向所述自身抗体的一种或多种中间配体。所述试剂可以是特异性靶向在研自身抗体的任何分子、物质或试剂。示例性的试剂在下文中详述。

[0057] 在一些实施方式中,所述试剂可以是衍生出所述自身抗体的肿瘤相关的蛋白质(抗原)。例如,针对ANXA1的自身抗体可采用ANXA1蛋白本身来检测。然而,能够特异性结合至对应的自身抗体的抗原的任何部分或局部均被本发明涵盖。因此,自身抗体可通过采用所述抗原的片段来检测,前提是其能被该自身抗体识别。就此而言,所述抗原的片段可由少至该抗原的约5个氨基酸残基组成;然而,所述片段可由该抗原的至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少45个、至少50,或多于50个氨基酸残基组成。优选地,所述抗原的片段代表能够被对应的自身抗体识别的表位序列。所述表位的大小或类型不受限制,只要其能被自身抗体识别即可。关于衍生出本发明的自身抗体的特定肿瘤相关抗原的具体内容如下所述。

[0058] 可用于本文所述检测方法中的抗原或其抗原性部分可通过本领域熟知的方法制备。例如,可采用重组DNA技术,其中,可将编码所述抗原或其部分的DNA分子遗传工程改造进入合适的表达载体,供于该抗原的大规模制备。对有助于标记、固定或检测抗原的融合蛋白质进行工程改造也可能是有利的。标准分子生物学课本中也描述了多种方法,例如Green MR和Sambrook等,《分子克隆-实验室手册》(分子Cloning-A Laboratory Manual)(第4版),冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),2012。或者,抗原可采用本领域熟知的蛋白质分离技术从天然来源纯化,例如从细胞纯化。此类纯化技术可包括但不限于分子筛色谱和/或离子交换色谱。

[0059] 在一些实施方式中,所述试剂可以是特异性结合至自身抗体的抗体。本文中所用的术语“抗体”具有其最广泛含义,并且涵盖完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(例如线性抗体、单链抗体分子、Fc或Fc'肽、Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、多特异性抗体,例如由至少两种完整抗体产生的双特异性抗体、包含抗体部分的融合蛋白质,和包含抗原识别位点的任何其它经修饰的免疫球蛋白分子,只要所述抗体显示所需的生物活性即可。抗体可以是五类主要的免疫球蛋白中任一类之一:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或其亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),基于对其重链恒定结构域(分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ)的鉴定。不同类别的免疫球蛋白具有不同的且熟知的亚基结构和三维构型。抗体可以是裸抗体,或与其它分子(例如毒素、放射性同位素等)偶联。

[0060] 天然产生的免疫球蛋白具有常规核结构,其中两个相同的轻链(约24kD)和两个相同的重链(约55或70kD)形成四聚体。各链的氨基-末端部分已知是可变(V)区,并且可与各链的剩余部分的其它保守恒定(C)区区分开来。轻链的可变区中是已知为J区的C-末端部分。重链的可变区中,除J区外还存在D区。免疫球蛋白中的大多数氨基酸序列变化限于称为高度可变区或互补性决定区(CDR)的V区中的三个分开的位置,其直接涉及抗原结合。由氨基-末端起,这些区分别被称为CDR1、CDR2和CDR3。CDR由更保守的框架区(FR)固定。由氨基-末端起,这些区分别被称为FR1、FR2、FR3和FR4。CDR和FR区的位置以及编号系统已由例如Kabat等,1991(《免疫学感兴趣的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生及公共服务部,美国政府印刷局)所定义。

[0061] 抗体作为完整免疫球蛋白或由不同肽酶消化所产生的多种成熟表征的片段而存

在。因此,例如,胃蛋白酶在铰链区中的二硫键连接之下消化抗体,产生F(ab)'₂,Fab的二聚体,Fab本身是轻链经二硫键连接于VH-CH1。可在温和条件下还原F(ab)'₂以打断铰链区中的二硫连接,从而将F(ab)'₂二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体实质上是具有铰链区部分的Fab。虽然根据对完整抗体的消化定义了多种抗体片段,但是本领域技术人员会理解,这类片段也可用化学方法或重组DNA方法从头合成。因此,本文中所用术语抗体,也包括通过修饰整个抗体而生成的抗体片段,或用重组DNA方法从头合成所产生(例如,单链Fv),或使用噬菌体展示文库鉴定的那些抗体片段(参见如McCafferty等,1990,Nature 348:552-554)。

[0062] “嵌合抗体”是一种抗体分子,其中(a)恒定区或其部分被改变、替代或交换,从而使抗原结合位点(可变区)连接至类型、效应物功能和/或种类不同或变化的恒定区,或连接至赋予所述嵌合抗体新性质的完全不同的分子,例如,酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或(b)可变区或其部分被具有不同或变化的抗原特异性的可变区改变、替代或交换。嵌合抗体可以是单价、二价或多价免疫球蛋白。例如,单价嵌合抗体是由嵌合H链通过二硫桥与嵌合L链联合形成的二聚体(HL),如上所述。二价嵌合抗体是由两个HL二聚体通过至少一个二硫桥联合形成的四聚体(H₂L₂)。多价嵌合抗体基于链的集聚。

[0063] 在一些实施方式中,抗体可以是人源化的抗体。“人源化的”抗体是保留了非人抗体的反应性,同时在人体内具有较低免疫原性的抗体。这可以,例如,通过保留非-人CDR区,并且用其人对对应物替换该抗体的剩余部分来获得。参见例如Morrison等,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855;Morrison和Oi,1988,Adv.Immunol.,44:65-92;Verhoeyen等,1988,Science,239:1534-1536;Padlan,1991,Molec.Immun.,28:489-498;和Padlan,1994,Molec.Immun.,31:169-217。

[0064] 在一些实施方式中,抗体可以是完全人抗体。如同本领域技术人员理解的那样,完全人抗体是其中可变区和恒定区均为人类来源的抗体。用于产生或鉴定此类抗体的方法如下所述。

[0065] 本发明也设想其它的抗体类型。这些包括源自非哺乳动物(例如软骨鱼(如鲨鱼))的抗体,或功能与鲨鱼抗体类似的经修饰的人蛋白质支架,例如i-体(i-body)。鲨鱼抗体也称为Ig新抗原受体(IgNAR)。它们是由五个恒定结构域(CNAR)、一个可变结构域(VNAR)组成(无轻链)的二硫键链的同源二聚体,(Greenberg等,1995,Nature 374:168-173;Nuttall等,2001,Mol.Immunol.,38:313-326;Diaz等,2002,Immunogenetics 54:501-512;和Nuttall等,2003,Eur.J.Biochem.,270:3543-3554)。本发明也设想源自骆驼(骆驼科抗体)、单峰骆驼和美洲驼的抗体。此类抗体仅由两个重链组成,并且缺乏轻链。归因于骆驼科和鲨鱼抗体的重链二聚体结构,它们有时被称为“重链迷你抗体”(mnHCAb)或“迷你抗体”(mnAb)(Holliger和Hudson,2005,Nat.Biotechnol.,23(1):1126-1136)。没有轻链的情况下,这些抗体通过单一结构域-重链免疫球蛋白的可变抗原结合结构域(称为Vab(骆驼科抗体)或V-NAR(鲨鱼抗体))结合至其抗原。

[0066] 本发明也考虑亲和体(affibody)。亲和体分子是一类亲和蛋白质,其基于源自葡萄球菌蛋白A的IgG-结合结构域之一的58-氨基酸残基的蛋白质结构域。该三螺旋束型结构域已被用作构建组合型噬菌粒文库的支架,可采用噬菌体展示技术从其中选择靶向所需分子的亲和体变体(Nord K等,1997,Nat.Biotechnol.,15:772-777;Ronmark J等,2002,Eur.J.Biochem.,269:2647-2655)。关于亲和体的其它详细内容及其生成方法还公开于美

国专利号5831012。

[0067] 用于本文述及的任何方法和应用的抗体可根据本领域成熟建立的技术生成,例如,通过用ANXA1、ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、ATP1A1、UBA1和CFAH抗原中的一种或多种对动物进行免疫。或者,鉴于已知这些抗原的氨基酸序列,可通过本领域熟知的方法来合成相关的多肽并用于生成抗体。例如,针对所述抗原中一种或多种的单克隆抗体可采用通过培养连续细胞系来提供抗体分子的生成的任何技术进行制备。这些包括但不限于,杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术,和EBV-杂交瘤技术(例如,参见Kohler等,1975,Nature 256:495-497;Kozbor等,1985,J.Immunol.Methods 81:31-42;Cote等,1983,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80:2026-2030;和Cole等,1984,Mol.Cell Biochem.62:109-120)。

[0068] 抗体还可通过淋巴细胞群中的体内诱导生成法来产生,或通过筛选免疫球蛋白文库或如下文献中公开的高度特异性结合试剂的组来产生(例如,参见Orlandi等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:3833-3837;和Winter和Milstein,1991,Nature 349:293-299)。抗体也可采用噬菌体展示法产生。例如,功能性抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒表面上。这类噬菌体可用于展示抗体库或组合抗体文库(例如人或鼠的)表达的抗原结合结构域。可采用相关抗原,例如,带标记的抗原或其部分,来选择或鉴定表达与前述抗原中一种或多种结合的抗原结合结构域的噬菌体。这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括fd和M13结合结构域,其表达自具有与噬菌体基因III或基因VIII蛋白重组融合的Fab、Fv或二硫稳定化的Fv抗体结构域的噬菌体。可用于制备所述抗体的噬菌体展示法的示例可公开于如下文献中的那些:Brinkman等,1995,J.Immunol.Methods 182:41-50;Ames等,1995,J.Immunol.Methods 184:177-186;Kettleborough等,1994,Eur.J.Immunol.24:952-958;Persic等,1997,Gene 187:9-18;Burton等,1994,Advances in Immunology 57:191-280;PCT公开号PCT/GB91/01134;PCT公开号WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;和美国专利号5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743和5,969,108;上述文献各自通过引用全文纳入本文。

[0069] 可用于生产单链Fv和抗体的技术包括以下文献中公开的那些:美国专利号4,946,778和5,258,498;Huston等,1991,Methods in Enzymology 203:46-88;Shu等,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:7995-7999;和Skerra等,1988,Science 240:1038-1040。

[0070] 包含供于一种或多种前述的抗原的特异性结合位点的抗体片段可采用本领域已知的标准技术产生。例如,F(ab')₂片段可通过Flightless I抗体分子的胃蛋白酶消化和通过还原F(ab')₂片段的二硫桥产生的Fab片段来产生。或者,可构建Fab表达文库以允许快速和简易鉴定具有所需特异性的单克隆Fab片段(例如,参见Huse等,1989,Science 246:1275-1281)。

[0071] 完全人抗体可采用多种技术生成。这些包括采用如上所述的展示技术,例如,其中人抗体或抗体片段展示于噬菌体表面。在另一种方法(Lonberg N,2008,Handb.Exp.Pharmacol.,69-97)中,针对ANXA1、ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、ATP1A1、UBA1和CFAH抗原中一种或多种的第一代人抗体可通过利用从人基因产生抗体的转基因动

物来生成。当用所述抗原,或寡肽、肽或其片段攻击后,这些动物产生人抗体,避免了人源化步骤。人抗体还可从采用Crowe JE Jr, 2009, Vaccine 27:47-51中所述的技术分离自人类的B细胞产生。用于人抗体生成的其它技术描述于PCT国际公开号WO 2013/168150和Duvall M等, 2011, mAbs 3(2):203-208等。例如, Duvall等采用的技术从人扁桃体组织分离的原初B细胞产生人IgG抗体文库。所述抗体由人基因产生,因此是100%人抗体。

[0072] 采用上述试剂来检测或测试对象中自身抗体的存在的方法可通过多种方式进行。示例性的方法包括但不限于,蛋白质微阵列、基于质谱的技术(包括耦合串联质谱的液相色谱(LC-MS/MS)、纳米LC-MS/MS、基质辅助的激光解吸/离子化质谱(MALDI-MS)(见述于WO 2009/004576)(包括表面增强的激光解吸/离子化质谱(SELDI-MS),尤其是表面增强的亲和捕获(SEAC)、表面增强的需求解吸(SEND)或表面增强的光标记连接与释放(SEPAR))、基质辅助的激光解吸/离子化飞行时间(MALDI-TOF)质谱、基于抗体的(基于免疫检测的)测试技术(包括Western印迹、免疫印迹、酶联免疫吸附试验(ELISA)、“夹心法”免疫检测、放射免疫检测法(RIA)、免疫沉淀和解离强化的镧系荧光免疫检测法(DELFIA)、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散试验、免疫辐射测量试验和蛋白质A免疫检测)、蛋白质组学技术、表面等离子体共振(SPR)、基于多功能纤维的SPR、化学发光法、荧光偏振技术、磷光法、免疫组化、免疫荧光、微细胞计数法、显微镜检法、荧光活化的细胞分选法(FACS),和流式细胞术。这些技术中的一些在下文中详细描述。

[0073] 前述技术中的大多数依赖于带有可检测标记的试剂。所述试剂通常通过如下方式来标记:将所述试剂共价或非共价地结合提供或允许可检测信号的产生的物质或配体。一些示例包括但不限于,放射性同位素、酶、荧光物质、发光物质、配体、微粒、氧化还原性分子、底物、辅助因子、抑制剂、磁性颗粒等。放射性同位素的示例包括但不限于, ^3H 、 ^{12}C 、 ^{13}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 和 ^{186}Re 。例如,当该试剂是衍生所述自身抗体的抗原时,可采用同位素编码的蛋白质标记(ICPL)技术来用 ^{12}C -烟酰氧基琥珀酰亚胺和/或 ^{13}C -烟酰氧基琥珀酰亚胺标记蛋白质上的伯胺。可作为检测标记物的酶的示例包括但不限于, β -葡萄糖醛酸酶、 β -葡萄糖苷酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、过氧化物酶或碱性磷酸酶、乙酰胆碱酯酶、葡萄糖氧化酶、己糖激酶和GDP酶、RNA酶、葡萄糖氧化酶和荧光素酶、果糖磷酸激酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、天冬氨酸转氨酶、磷酸烯醇丙酮酸脱羧酶,和 β -内酰胺酶。荧光物质的示例包括但不限于,荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛和荧光胺(fluorescamin)。发光物质的示例包括但不限于,吖啶酯、荧光素和荧光素酶。配体的示例包括但不限于,生物素及其衍生物。微粒的示例包括但不限于,胶体金和有色胶乳。氧化还原分子的示例包括但不限于,二茂铁、钌络合物、紫罗碱、醌、 Ir 离子、 Cs 离子、二酰亚胺、1,4-苯醌、氢醌、 $\text{K}_4\text{W}(\text{CN})_8$ 、 $[\text{Os}(\text{bpy})_3]^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$,和 $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$ 。

[0074] 当试剂是衍生出本发明的一种或多种自身抗体的抗原时,可采用如上所述的多种方法来检测抗原-自身抗体相互作用。一般而言,这些方法基于:使源自对象的样品与包含对应抗原的样品或其部分接触,所述接触在允许免疫特异性抗原-抗体结合反应发生的条件下进行。所述抗原可存在于溶液中,或可锚定于固体支持物,从而可采用基于芯片的检测方法或微阵列检测方法。一般而言,在基于芯片的方法或微阵列方法中,具有代表所述抗原的全部或部分的氨基酸序列的肽占据底物上的已知位置。然后,使已从感兴趣对象获得的样品杂交至芯片或微阵列,并采用如上所述的技术(例如,质谱技术或基于免疫检测的技

术)来检测对应的自身抗体(若存在于样品中)与所述抗原的结合。本领域中描述了许多蛋白质微阵列,包括例如,由OG技术公司(OriGene Technologies(马里兰州罗克维尔)、Zyomyx公司(加利福尼亚州海沃德)、英杰公司(Invitrogen)(加利福尼亚州卡尔斯巴德)、必爱可公司(Biacore)(瑞典乌普萨拉)和Procognia公司(英国贝克郡)生产的蛋白质生物芯片。所述蛋白质生物芯片的示例描述于如下专利或公开的专利申请文本中:美国专利号6,225,047、6,537,749、6,329,209和5,242,828,以及PCT国际专利号WO 00/56934和WO 03/048768。

[0075] 如上文所示,感兴趣的自身抗体的存在还可通过质谱检测,其为一种采用质谱来检测气相离子的方法。质谱的示例有:飞行时间、扇形磁场、四极滤质器、离子阱、离子回旋共振、静电扇形分析仪及其组合。质谱可以是激光解吸/离子化(LDI)质谱。在激光解吸/离子化质谱中,将待检测的一种或多种自身抗体置于质谱探针(一种适于接合质谱的探针接口的装置)的表面,并且将所述一种或多种自身抗体呈现在供于离子化的电离能下,并引入质谱仪。激光解吸质谱仪采用激光能量(通常来自紫外线激光器,但也可来自红外线激光器),以解吸来自表面的分析物,以使其挥发或离子化并使其能够接触该质谱仪的离子光学系统。通过LDI对自身抗体进行的分析可采用MALDI或SELDI的形式,如下文所述。

[0076] SELDI方法在例如美国专利号5,719,060和6,225,047中有描述,并且涉及解吸/离子化气相离子光谱法(例如,质谱),其中分析物(在该情况下是一种或多种待测自身抗体)被捕获在SELDI质谱探针的表面上。SELDI也涵盖亲和捕获质谱、表面增强的亲和捕获(SEAC)和免疫-捕获质谱(icMS),如Penno MA等,2012,Res.Vet.Sci.,93:611-617中所述。这些平台涉及在探针表面上具有材料的探针的应用,所述材料能够通过该材料与自身抗体之间的非共价亲和相互作用(吸附)来捕获自身抗体。所述材料具有不同名称:“吸附剂”、“捕获试剂”、“亲和试剂”或“结合部分”。所述探针可称为“亲和捕获探针”和具有“吸附表面”。所述捕获试剂可以是能够结合自身抗体的任何材料。所述捕获试剂通过物理吸附或化学吸附连接至探针表面。可以是功能化的生物芯片或磁珠形式的探针可具有已经连接至表面的捕获试剂,或者,所述探针经预活化并且包括能够结合捕获试剂的反应性部分,例如,通过反应形成共价或配位共价键。环氧化物和酰基-咪唑是有利于共价结合蛋白质捕获试剂(例如抗体或细胞受体)的反应性部分。次氨基三乙酸和次氨基二乙酸是有用的反应性部分,其起螯合剂的作用,以结合与包含组氨酸的蛋白质非共价相互作用的金属离子。吸附剂一般分类为色谱吸附剂和生物特异性吸附剂。

[0077] 色谱吸附剂指的是常用于色谱中的吸附材料。色谱吸附剂包括,例如,离子交换材料、金属螯合剂(例如,次氨基三乙酸或次氨基二乙酸)、固定的金属螯合剂、疏水性相互作用吸附剂、亲水性相互作用吸附剂、染料、简单生物分子(例如,核苷酸、氨基酸、简单的糖和脂肪酸),和混合形式的吸附剂(例如,疏水吸引/静电排斥吸附剂)。采用色谱吸附剂的一种方法是耦合至串联质谱的液相色谱(LC-MS/MS),包括纳米-LC-MS/MS。纳米-LC-MS/MS技术描述于Gaspari M和Cuda G,2011,“纳米蛋白质组学:方法与方案(Nanoproteomics: Methods and Protocols)”,Methods in分子Biology,790:115-126。

[0078] 生物特异性吸附剂指的是包含生物分子的吸附剂,所述生物分子例如核酸分子(例如,适体)、多肽、多糖、脂质、类固醇或其偶联物(例如,糖蛋白、脂蛋白、糖脂、核酸(例如,DNA-蛋白质偶联物)。在某些示例中,生物特异性吸附剂可以是高分子结构,例如,多蛋

白复合物、生物膜或病毒。生物特异性吸附剂的示例有：抗体、受体蛋白和核酸。生物特异性吸附剂对目标自身抗体的特异性通常高于色谱吸附剂。

[0079] 一般而言，使有吸附表面的探针接触测试样品足以允许所述一种或多种在研自身抗体结合至所述吸附剂的一段时间。在孵育阶段之后，清洗底物以去除未结合的材料。可采用任何合适的清洗溶液；优选地，采用水性溶液。可通过调节清洗的严谨性来操控分子保持结合的程度。清洗溶液的洗脱特性可基于，例如，pH、离子强度、疏水性、离液 (chaotropism) 程度、洗涤剂强度，和温度。除非探针同时具有SEAC和SEND性质 (如本文所述)，随后向具有结合的生物标志物的底物施加能量吸收分子。

[0080] 在另一个方法中，一种或多种在研自身抗体可用具有特异性结合至该自身抗体或各自身抗体的抗体的固相结合免疫吸附剂捕获。在清洗吸附剂以去除未结合材料之后，从固相洗脱该一种或多种自身抗体，并通过将其施加至能够结合所述自身抗体的生物芯片来进行检测。

[0081] 在气相离子光谱仪 (例如飞行时间质谱) 中检测结合至基质的在研自身抗体。该自身抗体被离子化源 (例如激光仪) 离子化，产生的离子通过离子光组件收集，然后质量分析仪散开并分析通过的离子。然后，检测仪将检测到的离子信息转换成质荷比。自身抗体的检测将通常涉及信号强度的检测。因此，可确定自身抗体的量和质。

[0082] 激光解吸质谱的另一种方法称作表面增强净解吸 (SEND)。SEND涉及采用包含能量吸收分子的探针，其通过化学方式结合至探针表面 (“SEND探针”)。短语“能量吸收分子” (EAM) 表示能够从激光解吸/离子化源吸收能量，并且随后贡献于与其接触的分析物分子的解吸和离子化的分子。EAM种类包括用于MALDI的分子，常称为“基质”，并且示例有：肉桂酸衍生物、芥子酸 (SPA)、氰基-羟基-肉桂酸 (CHCA) 和二羟基苯甲酸、阿魏酸，和羟丙酮-苯酮衍生物。可将能量吸收分子纳入线性或交联聚合物，例如聚甲基丙烯酸酯。例如，所述组合物可以是 α -氰基-4-甲基丙烯酰氧基肉桂酸和丙烯酸酯的共聚物。或者，所述组合物可以是 α -氰基-4-甲基丙烯酰氧基肉桂酸、丙烯酸酯和3-(三乙氧基) 甲硅烷基丙基甲基丙烯酸酯的共聚物，或者可以是 α -氰基-4-甲基丙烯酰氧基肉桂酸和十八基甲基丙烯酸酯的共聚物 (“C18SEND”)。SEND还描述于美国专利号6,124,137和PCT国际公开号WO 03/64594。

[0083] SEAC/SEND是激光解吸质谱的形式，其中捕获试剂和能量吸收分子连接至样品呈递表面。因此，SEAC/SEND探针允许通过亲和捕获和离子化/解吸来捕获在研自身抗体，无需施加外部基质。C18SEND生物芯片是SEAC/SEND的一种形式，包含C18部分 (其作为捕获试剂)，和CHCA部分 (其作为能量吸收部分)。

[0084] LDI的另一种形式称为表面增强的光不稳定附着和释放 (SEPAR)。SEPAR涉及采用具有连接至表面的部分的探针，其可共价结合至自身抗体，然后通过暴露至光 (例如激光) 之后断裂该部分中的光不稳定键来释放自身抗体。SEPAR和SELDI的其它形式易于适应本发明方法所需的对于自身抗体的检测。

[0085] MALDI是激光解吸/离子化的传统方法。在一种MALDI方法中，使待测试样品与基质混合，并直接沉积在MALDI芯片上。根据待测试的样品，在研自身抗体优选首先用偶联至固体支持物 (例如树脂 (例如离心柱)) 的生物特异性 (例如其对应抗原) 或色谱材料捕获。能够结合待检测自身抗体的特异性亲和材料如上所述。在亲和材料上纯化之后，在研自身抗体经洗脱并由MALDI检测。

[0086] 通过飞行时间质谱对自身抗体进行的分析产生飞行时间谱。最终分析的飞行时间谱通常不代表来自针对样品的电离能的单一脉冲的信号,而是多个脉冲的信号加和。这能降低噪音并增加动态范围。然后,采用专用软件对飞行时间数据进行数据处理。数据处理通常包括TOF-M/Z转换以产生质谱,基线扣减以消除仪器偏移,和高频噪音过滤以降低高频噪音。

[0087] 通过自身抗体的解吸和检测产生的数据可采用可编程的数字计算机来分析。计算机程序分析数据,以指示检测到的自身抗体的数量,以及任选地,信号强度和对于检测的各自自身抗体的测定的分子质量。数据分析可包括如下步骤:确定自身抗体的信号强度,和,从预定的统计学分布移出数据偏移。例如,可通过计算相对于一些参照物的各峰峰高来将观察到的峰标准化。计算机能够将所得数据转换成供于显示的不同形式。可显示标准谱,但在一种有用的形式中,谱视图中仅保留峰高和质量信息,生成更清晰的图像,并且允许更容易地观察到具有近乎相同的分子量的自身抗体。采用这些形式中的任一种,能够容易地确定具体的自身抗体是否存在于样品中。

[0088] 分析一般涉及对代表来自自身抗体的信号的谱中的峰的鉴定。峰的选择可视觉上进行,但可采用市售软件来使峰的检测自动化。一般而言,该软件的作用是鉴定信噪比高于所选阈值的信号,并且标记处于该峰信号形心(centroid)处的峰的质量。在一个有用的应用中,可比较多个谱来鉴定质谱中一些选定百分比中存在的相同的峰。该软件的一个版本簇集不同谱中某一确定质量范围中出现的所有的峰,并向接近质量(M/Z)簇集中点的全部的峰分配质量(M/Z)。

[0089] 用于分析数据的软件可包括如此编码,所述编码对信号分析应用算法以确定该信号是否代表信号中对应于在研自身抗体的峰。该软件还可对观察到的自身抗体的峰的有关数据进行分类树或ANN分析,以确定自身抗体峰或自身抗体峰的组合是否存在,其指示所检测的特定临床参数的状态。对于所述数据的分析可以从对所述样品的质谱分析直接或间接地获得的各种参数为“重心()”。这些参数包括但不限于,一个或多个峰的存在或不存在、一个峰或一组峰的形状、一个或多个峰的高度、一个或多个峰的高度的对数,和峰高数据的其它算法操作。

[0090] 用于检测自身抗体的存在的其它技术涉及基于多功能纤维的表面等离子共振(VeSPR)生物传感器,如PCT国际公开号WO 2011/113085中所述。传统的SPR是成熟建立的用于无标记生物传感的方法,其依赖于电介质基质和薄金属覆层之间界面处的游离电子的激发。使引入光线结合进入等离子体波的条件取决于入射角和引入光线的波长,以及传感器本身的物理性质(介电常数/折射率)和周围环境。出于该原因,SPR甚至对传感器的紧密邻近处的密度(折射率)中的小的变化敏感,因而不需要采用荧光标记物。由生物分子(例如自身抗体)结合至所述传感器表面而诱导的折射率的小变化可通过监测经由引入光的入射角或波长的结合条件来检测。现有的SPR系统是Krestschmann棱镜构造,其中棱镜的一侧被覆有能够支持等离子体波金属(例如金或银)。可选的SPR构造已被开发,其基于具有沉积于纤维短区段周围的金属覆层的光学纤维。该方法降低了此类传感器的复杂性和成本,开创了不同的应用方式,例如倾角传感(dip sensing)。位于传感器表面的材料通过监测因与表面等离子体的偶联而吸收的广谱中的波长来探测。这些技术受困于与需要细致温度校准相关的实践限制,造成难以一致地分析大量的样品。最近已开发出基于光学纤维的SPR传感器

的新型且有力的变化形式,称为VeSPR。VeSPR具有多种已经证明的优于现有SPR技术的优势,包括:(i)更高的信噪比,由此更高的灵敏度;(ii)转导信号的自我参照,由此避免昂贵/大量的温度控制;和(iii)能够采用单一纤维对不同分析物进行多重检测。

[0091] 如上文所示,自身抗体可通过在用间接方式与自身抗体结合/相互作用的试剂来检测。参照上述基于抗体的检测方法,可通过采用针对一抗的二抗或试剂来检测对在研自身抗体具有特异性的一抗。实际上,检测二抗或试剂与一抗的结合或相互作用。二抗或试剂可采用前述方法检测。

[0092] 此外,在某些示例中,通过采用对抗原或自身抗体(若存在于样品中)具有结合亲和性(例如对自身抗体的Fc区具有反应性或自身抗体的结合区不同的抗原的区具有反应性)的中间配体来检测自身抗体的存在可能是有利的。在这些情况中,所述中间试剂可连接至可检测标记物或标志物分子,如上所述。所述配体本身通常是抗体,因此其可被称为二抗。通常,使抗原-自身抗体与带标记的配体或二抗接触,所述接触在足以允许形成第二免疫复合物的有效条件和时间下进行。然后,一般会清洗第二免疫复合物以去除任何未结合的带标记的配体或二抗,然后检测第二免疫复合物中剩余的标记物。

[0093] 在对象中,可直接检测对象中的本发明的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在,或在替代性实施方式中,可检测获自对象的样品中的它们的存在。应明确,通过本发明方法分析的获自对象的样品可以已经先从对象获得,并且,例如,已经贮存于合适的储藏室中。在该示例中,所述样品已从所述对象获得,与本发明方法相分离,因此独立于本发明方法。

[0094] 获自对象的样品可包括但不限于,血清、全血、血浆、血清、全血、血浆、唾液、颊粘膜拭子、宫颈巴氏涂片、粪便、尿、膀胱冲洗物、子宫冲洗物、痰、淋巴液、脑脊液、精液,和来自所述对象的转移肿瘤组织或卵巢之一或两者的组织样品。在某些情况中,所述样品可在获取后以任何方式处理,例如,用试剂处理、溶解,或富集某些组分,例如,相关的在研自身抗体。

[0095] 在一个实施方式中,所述样品是获自所述对象的血清样品。血清源自血浆,其为血液的黄色液体成分,正常情况下,全血中的血细胞在其中悬浮。其占总血液体积的约55%。其大部分是水(90体积%)并且包含溶解的蛋白质、葡萄糖、凝血因子、矿物离子、激素和二氧化碳。血浆通过在离心机中对管中的新鲜血液进行离心直至血细胞沉降于管底来制备。然后倾倒或吸出血浆。血浆,优选补充有凝集抑制剂,例如肝素或EDTA,具有约1.025kg/l的密度。血清是不含血纤蛋白原或其它凝集因子的血浆(即,全血减去细胞和凝集因子)。

[0096] 发明人已确定,本发明的自身抗体是在卵巢癌进展的早期(并且早至该癌症的I期)可检测的。在该疾病的更晚期的阶段中,患病的对象中的自身抗体的水平将预期高于具有较不晚期的癌的对象中的所述自身抗体的水平,这是因为具有晚期癌症的对象中存在较大数量的肿瘤细胞(因此,对应的肿瘤相关的抗原)。

[0097] 因此,在本发明的第三方面中,提供一种评估对象中卵巢癌的进展或复发的方法,所述方法包括如下步骤:检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0098] 在一个实施方式中,所述方法包括:

[0099] (a) 检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平;

[0100] (b) 将所述对象中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平与所述卵巢癌相关的自身抗体的参照水平或其各自的参照水平做比较;和

[0101] (c) 基于所述比较,评估所述对象中卵巢癌的进展或复发。

[0102] 用于检测所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在或水平的方法已在上文中详细描述。如上文所示,可直接检测所述对象中的一种或多种本发明的卵巢癌相关的自身抗体,或在替代性实施方式中,可检测获自对象的样品中的它们的存在。所述样品可以是本文所述那些中的一种或多种。

[0103] 一旦检测到该对象中的,或获自所述对象的样品中的一种或多种所述自身抗体的水平,即将所述水平与各自身抗体的参照水平做比较。具体自身抗体的参照水平是与具体卵巢癌进展阶段(即,I、II、III或IV期)相关联的自身抗体的量。各自身抗体的参照水平可源自具有特定进展阶段的卵巢癌的至少一个对象,并且优选源自此类对象的平均(例如 $n=2-100$ 或更多)。

[0104] 在本发明的一些实施方式中,在多于一个时间点检测一种或多种自身抗体的存在或水平。这种“连续”取样非常适于,例如,监测卵巢癌的进展。连续取样可以任何所需时间线进行,例如每月一次、每季一次(即,每三个月一次)、半年一次、每年一次、每两年一次,或更低频率。对象中的检测水平和参照水平之间的比较可在每次新样品检测时进行,或可将水平有关的数据用于更低频率的分析。

[0105] 在本发明第三方面的一些实施方式中,所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平高于所述卵巢癌相关的自身抗体的参照水平或其各自的参照水平,指示卵巢癌在所述对象中的进展。

[0106] 在本发明第三方面的一个实施方式中,所述对象正经历针对卵巢癌的治疗。所述治疗可以是传统治疗,例如化疗或放疗,或所述治疗可以是替代性治疗。在替代性实施方式中,所述对象可以,出于选择原因或者该对象在疗法后被认为无疾病的原因,而根本没有经历治疗。

[0107] 因此,可采用本发明第三方面的方法来监测针对卵巢癌的治疗方案的功效,最终目的在于消除疾病。在所述情况中,治疗的成功可检测为来自患病的对象的一种或多种自身抗体的减少或消除。因此,在一些实施方式中,所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平低于所述自身抗体或其各自的参照水平,则指示卵巢癌在所述对象中衰退。在已达到对象中卵巢癌消除或接近消除的情况中,所述自身抗体或其各自的参照水平可被视为已知在不患有卵巢癌的对象(本发明内容中的“正常”对象)中发现的水平。在该示例中,所述自身抗体或其各自的参照水平可源自至少一个正常对象,并且优选源自多个正常对象的平均(例如, $n=2-100$ 或更多),其中该一个或多个对象先前无卵巢癌史。所述自身抗体或其各自的参照水平还可获自来自疑似患有或患有卵巢癌的对象的一个或多个正常样品。例如,所述自身抗体或其各自的参照水平可获自至少一个正常样品,并且优选获自多个正常样品的平均(例如, $n=2-100$ 或更多),其中所述对象疑似患有或患有卵巢癌。

[0108] 如上文所示,根据本发明第三方面的方法还可用于评估或监测先前已被视作疗法后无疾病的对象中的卵巢癌复发。因此,在一些实施方式中,若所述对象中的一种或多种卵

巢癌相关的自身抗体的水平高于所述自身抗体或其各自的参照水平,则指示卵巢癌在所述对象中复发。在已于对象中保持该对象中卵巢癌消除或接近消除的情况中,所述自身抗体或其各自的参照水平可被视作已知在不患有卵巢癌的对象(如上文指示)中发现的水平。

[0109] 在一些实施方式中,本发明第三方面的方法可用于进行新药的临床试验,以及监测对象对该药物的进展。治疗或临床试验涉及在具体方案中给予待测试药物。所述方案可涉及一定时间内该药物的单剂量给药或该药物的多剂量给药。医生或临床研究者监测药物在给予过程中对于对象的作用。如果所述药物对卵巢癌具有药理学影响,则前述的自身抗体的水平将低于所述自身抗体的参照水平。因此,可在治疗过程中监测对象中的自身抗体的水平的趋势。可采用上文详述的方法来确定所述一种或多种自身抗体的水平。该方法的一个实施方式涉及:在药物治疗过程中的至少两个不同的时间点确定前述的自身抗体的水平,例如第一时间和第二时间,和,比较所述自身抗体的水平(若存在)的变化。例如,所述自身抗体的水平可在药物给予之前和之后检测,或在药物给予过程中的两个不同时间点检测。基于这些比较来确定疗效。如果治疗有效,则前述自身抗体的水平将低于所述自身抗体的参照水平,而如果治疗无效,则前述自身抗体的水平将保持与该生物标志物的参照水平相同或者高于该生物标志物的参照水平。例如,如果在临床试验起始时,对象中卵巢癌的阶段是II期,那么所述自身抗体的参照水平或其各自的参照水平将对应于这一阶段的癌的所述自身抗体的水平或其各自的水平。当对象中的所述自身抗体的水平或其各自的水平变得低于参照水平时,将观察到成功的治疗。

[0110] 在本发明的第四方面中,本发明提供一种筛选有用于治疗卵巢癌的候选治疗剂的方法,所述方法包括如下步骤:评估所述候选治疗剂在减少所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平方面的活性,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0111] 在一个实施方式中,所述方法包括:

[0112] (a) 给予所述对象所述候选治疗剂;

[0113] (b) 检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平;和

[0114] (c) 将所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平与患有卵巢癌的未经治疗的对象中的所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平做比较,

[0115] 其中,如果所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平低于所述未经治疗的对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平,则所述候选治疗剂有用于治疗卵巢癌。

[0116] 可采用上文所述的方法来检测所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的水平。在一些实施方式中,在获自所述对象的样品中检测所述一种或多种自身抗体的水平。所述样品可以是上文所述那些中的一种或多种。

[0117] 筛选试验可以体外和/或体内方式进行。例如,可在基于细胞的试验中筛选预期的试剂以鉴定用于治疗卵巢癌的候选治疗剂。就此而言,使各预期试剂与培养的细胞(例如获自正常对象或患卵巢癌对象的卵巢的细胞,或源自正常或患病对象的细胞系)孵育,然后检测一种或多种自身抗体的水平。因此,在本发明第四方面的一个实施方式中,所述方法包

括:

[0118] (a) 使所述候选治疗剂暴露至表达一种或多种所述自身抗体的细胞;

[0119] (b) 检测所述细胞中所述自身抗体的水平或其各自的水平的变化;和

[0120] (c) 将所述对象中所述自身抗体的水平或其各自的水平和所述自身抗体的参照水平或其各自的参照水平,

[0121] 其中,如果所述自身抗体的水平或其各自的水平低于所述自身抗体的参照水平或其各自的参照水平,则所述候选治疗剂有用于治疗对象中的卵巢癌。

[0122] 可如上所述确定所述自身抗体或其各自的参照水平。

[0123] 在另一个示例中,可在基于器官培养的试验中筛选候选治疗剂。就此而言,使各预期治疗剂与源自非人类动物的完整器官或器官的部分(例如正常或患病对象的卵巢的部分)孵育,并检测所述目标自身抗体的水平的转变。

[0124] 如上所述,本发明前述方面中的方法涉及,检测选自下组的一种或多种自身抗体的存在或水平:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。衍生这些自身抗体的肿瘤蛋白质(肿瘤相关的抗原)的详细内容,尤其是关于氨基酸和核酸序列信息,可从美国国家生物技术信息中心的GenBank数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)获取。具体详细信息如下所述。

[0125] ANXA1(膜联蛋白A1)

[0126] ANXA1蛋白属于蛋白质的膜联蛋白家族,并且是钙/磷脂结合性蛋白质,其促进膜融合,并且涉及胞吐。ANXA1蛋白调节磷脂酶A2活性,并且疑似以高亲和性结合2-4个钙离子。因为磷脂酶A2为炎症有力介导剂、前列腺素和白三烯的生物合成所需,ANXA1可具有潜在抗炎性活性。ANXA1基因也称为膜联蛋白I、膜联蛋白A1、ANX1、膜联蛋白-1、依钙蛋白II、依钙蛋白-2、嗜铬粒结合蛋白-9、脂皮质素I、磷脂酶A2抑制蛋白、LPC1和p35。人ANXA1的GenBank基因识别号是301,且人ANXA1基因编码由GenBank登录号NP_00069.1代表的蛋白质。编码ANXA1蛋白的核苷酸序列由GenBank登录号NM_000700.1代表。由ANXA1编码的氨基酸序列的详细信息还可获取自UniProt数据库,其中人ANXA1的UniProt编号是P04083。

[0127] ARP3(肌动蛋白相关的蛋白质3)

[0128] 已显示,ARP3蛋白的功能是Arp2/3复合物的ATP-结合组分,其涉及肌动蛋白聚合的调节。与活化性成核促进因子(NPF)一起,ARP3介导支化的肌动蛋白网络的形成。ARP3基因也称为肌动蛋白样蛋白质3、ACTR3和肌动蛋白相关的蛋白质3同源物(酵母)。人ARP3的GenBank基因识别号是10096,并且人ARP3基因编码两种蛋白质变体,其分别由GenBank登录号NP_005712.1(同种型1)和NP_001264069.1(同种型2)代表。编码这些变体的核苷酸序列由GenBank登录号NM_005721.4(同种型1)和NM_001277140.1(同种型2)代表。由ARP3编码的氨基酸序列的详细信息还可获取自UniProt数据库(www.uniprot.org),其中同种型1的UniProt编号是P61158,同种型2是B4DXW1。

[0129] SAHH(腺苷高半胱氨酸酶)

[0130] SAHH蛋白属于腺苷高半胱氨酸酶家族。其催化S-腺苷同型半胱氨酸(AdoHcy)可逆水解成腺苷(Ado)和L-同型半胱氨酸(Hcy)。因此,其调节胞内S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)浓度,其被认为对于转甲基反应具有重要性。SAHH基因也称为腺苷高半胱氨酸酶、S-腺苷同型

半胱氨酸水解酶、S-腺苷-L-同型半胱氨酸水解酶,和AHCY。人SAHH的GenBank基因识别号是191,并且人SAHH基因编码两种蛋白质变体,其分别由GenBank登录号NP_000678.1(同种型1)和NP_001155238.1(同种型2)代表。编码这些变体的核苷酸序列由GenBank登录号NM_000687.2(同种型1)和NM_001161766.1(同种型2)代表。关于SAHH编码的氨基酸序列的详细信息也可获取自UniProt数据库,其中人SAHH(包括各变体)的UniProt编号是P23526。

[0131] SERPH(丝抑蛋白H1)

[0132] SERPH基因编码丝氨酸蛋白酶抑制剂的丝抑蛋白超家族的成员。编码的蛋白质定位至内质网,并且在胶原生物合成中起胶原特异性分子伴侣的作用。SERPH基因也称为丝抑蛋白H1前体、SERPINH1、胶原结合蛋白-1、胶原结合蛋白-2、砷-转移活化蛋白3(AsTP3)、丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制剂、进化支H(热激蛋白47)成员1、(胶原结合蛋白1)(CBP1)、丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制剂、进化支H(热激蛋白47)成员2、(胶原结合蛋白2)(CBP2)、gp46、47kDa热激蛋白(HSP47)、OI10、PIG14、PPROM、类风湿性关节炎抗原A-47(RA-A47)和丝抑蛋白H2。人SERPH的GenBank基因识别号是871,并且人SERPH基因编码两种蛋白质变体,其分别由GenBank登录号NP_001193943.1(变体1)和NP_001226.2(变体2)代表。编码这些变体的核苷酸序列由GenBank登录号NM_001207014.1(变体1)和NM_001235.3(变体2)代表。关于SERPH编码的氨基酸序列的详细信息可获取自UniProt数据库,其中人SERPH(包括各变体)的UniProt编号是P50454。

[0133] ARAP1(具有RhoGAP结构域、锚蛋白重复和PH结构域1的ArfGAP)

[0134] 由ARAP1基因编码的蛋白质包含SAM、ARF-GAP、RHO-GAP、锚蛋白重复、RAS-缔合,和普列克底物蛋白同源性(PH)结构域。ARAP1在体内显示RHO-GAP和磷脂酰肌醇(3,4,5)三磷酸酯(PIP3)-依赖性ARF-GAP活性。ARAP1与高尔基体相关联,并且ARF-GAP活性介导高尔基体和丝状伪足的形成的变化。认为ARAP1蛋白调节凋亡中涉及的受体蛋白的细胞特异性运输。ARAP1也称为CENTD2、cnt-d2、矢车菊苷- δ -2、矢车菊苷 δ 2和含有ARF-GAP、RHO-GAP、锚蛋白重复和普列克底物蛋白同源性结构域的蛋白质1。人ARAP1的GenBank基因识别号是116985,并且人ARAP1基因编码三种蛋白质变体,其分别由GenBank登录号NP_056057.2(变体1-同种型a)、NP_001035207.1(变体2-同种型c)和NP_001128662.1(变体3-同种型d)代表。编码这些变体的核苷酸序列由GenBank登录号NM_015242.4(变体1)、NM_001040118.2(变体2)和NM_001135190.1(变体3)代表。关于ARAP1编码的氨基酸序列的详细信息也可获取自UniProt数据库,其中人ARAP1(包括各变体)的UniProt编号是Q96P48。

[0135] OTUB1(泛素硫酯酶)

[0136] OTUB1是预测的半胱氨酸蛋白酶的OTU(卵巢肿瘤)超家族的成员。编码的蛋白质是高度特异性的泛素异肽酶,并且切割从支化的多聚泛素链切割泛素,但不从泛素化的底物切割。其与另一种泛素蛋白酶和E3泛素连接酶(抑制免疫系统中细胞因子基因转录)相互作用。提出其在特定泛素依赖性通路中起作用,可能通过为多聚泛素链生长提供编辑功能来起作用。OTUB1也称为Otubain-1、OTB1、OTU1、HSPC263、OTU-结构域Uba1-结合1、去泛素化酶、泛素特异性蛋白酶Otubain 1、泛素-特异性-加工蛋白酶,和含OTU结构域泛素醛-结合蛋白质1。人OTUB1的GenBank基因识别号是55611,并且人OTUB1基因编码两种蛋白质变体。一种变体由GenBank登录号NP_060140.2(变体1)代表,而第二变体是相对于变体1在3'编码区中具有替代性区段(其导致移码)的转录本变体。尚不知晓该第二变体是否实际翻译为多

肽。该第二转录本变体的mRNA序列由GenBank登录号NR_003089.1代表。编码变体1的核苷酸序列由GenBank登录号NM_017670.2代表。关于OTUB1编码的氨基酸序列的详细信息还可获取自UniProt数据库,其中人OTUB1的UniProt编号是Q96FW1。

[0137] ATP1A1 (钠/钾-转运ATP酶亚基 α -1)

[0138] ATP1A1属于P-类型阳离子转运ATP酶的家族,并且属于Na⁺/K⁺-ATP酶的亚家族。Na⁺/K⁺-ATP酶是负责建立并维持跨越质膜的Na和K离子的电化学梯度的膜整合蛋白。这些梯度是渗透调节所必需的,供于多种有机和无机分子的钠偶合转运,以及神经和肌肉的电兴奋。该酶包含两个亚基,大催化亚基(α)和小糖蛋白亚基(β)。Na⁺/K⁺-ATP酶的催化亚基由多个基因编码。ATP1A1基因编码 α 1亚基。ATP1A1也称为ATP酶、Na⁺/K⁺转运 α 1多肽、钠泵1、Na⁺/K⁺ATP酶1、Na,K-ATP酶 α -1亚基、钠泵亚基 α -1、Na⁺,K⁺ATP酶 α 亚基、Na(+)/K(+)ATP酶 α -1亚基、Na,K-ATP酶、 α -A催化多肽、钠-钾-ATP酶, α 1多肽、Na,K-ATP酶催化亚基 α -A蛋白和钠-钾ATP酶催化亚基 α -1。人ATP1A1的GenBank基因识别号是476,并且人ATP1A1基因编码三种蛋白质变体,其分别由GenBank登录号NP_000692.2(变体1-同种型a)、NP_001153705.1(变体2-同种型c)和NP_001153706.1(变体3-同种型d)代表。编码这些变体的核苷酸序列由GenBank登录号NM_000701.7(变体1)、NM_001160233.1(变体2)和NM_001160234.1(变体3)代表。关于ATP1A1编码的氨基酸序列的详细信息还可获取自UniProt数据库,其中人ATP1A1(包括各变体)的UniProt编号是P05023。

[0139] UBA1 (泛素样修饰因子激活酶1)

[0140] UBA1催化泛素偶联中的第一步,以标记待降解的细胞蛋白质。UBA1基因补足DNA合成中的X-连接的小鼠温度敏感缺陷,因而可能在DNA修复中起作用。UBA1也称为A1S9、A1ST、GXP1、UBE1、A1S9T、AMCX1、POC20、SMAX2、UBA1A、UBE1X、POC20中心粒蛋白质同源物、泛素活化酶E1同源物A,和A1S9T与BN75温度灵敏度补充物。人UBA1的GenBank基因识别号是7317,并且人UBA1基因编码两种蛋白质变体,其分别由GenBank登录号NP_003325.2(变体1)和NP_695012.1(变体2)代表。编码这些变体的核苷酸序列由GenBank登录号NM_003334.3(变体1)和NM_153280.2(变体2)代表。关于UBA1编码的氨基酸序列的详细信息还可获取自UniProt数据库,其中人UBA1(包括各变体)的UniProt编号是P22314。

[0141] CFAH(补体因子H)

[0142] CFAH基因是补体活化调节剂(RCA)基因簇的一员,并且编码具有二十个短同源重复序列(SCR)结构域的蛋白质。CFAH蛋白被分泌进入血流,并且在补体活化的调节中具有实质作用,针对微生物感染限制该先天防御机制。已将该基因中的突变与溶血性尿毒症综合征(HUS)和慢性低补体血症性肾病联系起来。CFAH也称为CFH、因子H(FH)、HF、H因子1(补体)(HF1)、H因子2(补体)(HF2)、HUS、因子H样1(FHL1)、AHUS1、肾上腺髓质素结合蛋白(AMBP1)、ARMD4、年龄相关的黄斑病敏感型1(ARMS1)、CFHL3、 β -1H、 β -1-H-球蛋白,和补体因子H,同种型b。人CFAH的GenBank基因识别号是3075,并且人CFAH基因编码两种蛋白质变体,其由GenBank登录号NP_000177.2(变体1)和NP_001014975.1(变体2)代表。编码这些变体的核苷酸序列由GenBank登录号NM_000186.3(变体1)和NM_001014975.2(变体2)代表。关于CFAH编码的氨基酸序列的详细信息还可获取自UniProt数据库,其中人CFAH的UniProt编号是P08603(变体1)和F8WDX4(变体2)。

[0143] 参考上文段落,应明了述及ANXA1、ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、ATP1A1、UBA1

和CFAH,包括述及这些蛋白质(抗原)的天然产生的变体。就此而言,“变体”可显示与天然序列至少80%相同,至少90%相同,至少95%相同,至少98%相同,至少99%相同,或至少99.9%相同的氨基酸序列(或编码所述氨基酸序列的核酸序列)。在一些实施方式中,天然蛋白质的变体可保持天然生物活性或其本质等同物。在一些实施方式中,变体可不具有本质生物活性,例如,作为生物活性蛋白质的前体的那些变体。ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、ATP1A1、UBA1和CFAH的天然产生的变体的示例如上所述。

[0144] 在本发明的前述方面的方法中,还可检测多于一种自身抗体的存在或水平。相比任何一种单独的自身抗体,对于自身抗体的具体组合的存在或水平的检测可提供更高的灵敏度、特异度和预测力。就此而言,发明人已显示,通过采用前述的自身抗体的组合,在真阳性和真阴性的鉴定中的灵敏度和特异度均被最大化。例如,检测针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体的组合的存在或水平,在真阳性和真阴性的鉴定中提供了(经测试组合的)最高的灵敏度和特异度。此外,针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体的组合也显示显著的特异度和灵敏度。此外,发明人已显示将来自对象中针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体的数据,与该对象中肿瘤相关的抗原CA125的存在或水平的数组组合,也提供显著的特异度和灵敏度。

[0145] 因此,在本发明前述方面的一些实施方式中,检测对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体,和针对SAHH的自身抗体的存在或水平。在一些实施方式中,检测对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和针对SERPH的自身抗体的存在或水平。在一些实施方式中,检测对象中的针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体,和肿瘤相关的抗原CA125的存在或水平。

[0146] 本文中所用的术语“对象”指任何动物(例如,哺乳动物),其包括但不限于,人、非人灵长类、狗、猫、马、牛、绵羊、鹿、猪、啮齿类和已知患卵巢癌的任何其它动物。因此,虽然上文述及的是关于人ANXA1、ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、ATP1A1、UBA1和CFAH抗原的信息,应理解本发明的方法不限于人类。关于其它物种中的这些抗原,以及其相关氨基酸和mRNA序列的详细信息,可容易地获取自GenBank和UniProt数据库,或序列可通过BLAST检索来鉴定。

[0147] 本发明还允许组合物,其可用于进行本发明前述方法中任何一种或多种。因此,在本发明的第五方面中,提供一种用于检测对象中的卵巢癌的组合物,用于筛选对象中的早期卵巢癌和/或用于评估对象中的卵巢癌进展,所述组合物包含:与所述对象中的一种或多种卵巢癌相关的自身抗体发生结合或相互作用的试剂,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0148] 在本发明第五方面的一个实施方式中,所述试剂是衍生出一种或多种自身抗体的抗原,或者是对所述一种或多种自身抗体具有特异性的抗体。关于这些试剂的详细信息如上提供。

[0149] 在本发明的第六方面中,提供一种用于检测对象中的卵巢癌的试剂盒,用于筛选对象中的早期卵巢癌,和/或用于评估对象中的卵巢癌进展,所述试剂盒包含:用于检测所

述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在的装置,其中所述一种或多种卵巢癌相关的自身抗体选自:针对ANXA1的自身抗体、针对ARP3的自身抗体、针对SAHH的自身抗体、针对SERPH的自身抗体、针对ARAP1的自身抗体、针对OTUB1的自身抗体、针对ATP1A1的自身抗体、针对UBA1的自身抗体,和针对CFAH的自身抗体。

[0150] 在一个实施方式中,用于检测所述对象中一种或多种卵巢癌相关的自身抗体的存在的装置包括固体支持物,例如芯片、传感器、微滴定板或其上附有捕获试剂的珠或树脂,其中所述捕获试剂结合至本发明的自身抗体。例如,所述捕获试剂可以是衍生出所述自身抗体的抗原,如上所述。因此,例如,所述试剂盒可包含用于SELDI的质谱探针,例如蛋白质Chip[®]阵列,或基于多功能纤维的SPR传感装置。在生物特异性捕获试剂的情况中,所述试剂盒可包含具有反应性表面的固体支持物,和包含生物特异性捕获试剂的容器。

[0151] 在一个实施方式中,所述试剂盒还可包含清洗溶液或用于进行清洗的说明,其中所述捕获试剂和所述清洗溶液的组合允许捕获所述固体支持物上的一种或多种自身抗体以供后续检测,例如,通过质谱或免疫学技术进行的检测。试剂盒可包含多于一种类型的吸附剂,其各自存在于不同的固体支持物上。

[0152] 在一些实施方式中,所述试剂盒可包含标签或分开的嵌入物形式的供于合适操作参数的说明书。例如,说明书可向消费者提供关于如何收集待测试样品,如何清洗探针或待检测的具体自身抗体的信息。

[0153] 在一些实施方式中,所述试剂盒可包括一个或多个含样品的容器,代表各自身抗体的参照水平,因此待用作校正标准。

[0154] 本发明还允许用于治疗卵巢癌的方法和组合物。例如,ANXA1、ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、ATP1A1、UBA1和CFAH抗原中的一种或多种可用于治疗形式,以免患有卵巢癌的对象。针对此类抗原的免疫学应答的刺激意图引发对于癌细胞的更有效攻击,其能够由此抑制细胞生长,或者甚至促进对癌细胞的杀伤。对于卵巢癌对象中针对这些抗原的自身抗体的鉴定,提供用于所述疾病的免疫治疗的基础。如上文所示,能够特异性结合至对应的自身抗体的抗原的任何部分或局部均可用于免疫治疗。

[0155] 在一些实施方式中,等同于本发明的一种或多种自身抗体的一种或多种抗体可用于治疗形式。在该示例中,各抗体应具有等同自身抗体的免疫反应特点。如上所述,抗体片段也可用于所述治疗形式,并且认为本发明该方面中术语“抗体”的应用包括抗体片段。用于治疗应用或本文所述的任何其它应用的抗体可根据本领域成熟建立的技术(包括上文所述那些)产生。

[0156] 各抗体,一旦给予,将识别待治疗对象中癌细胞上存在的对应抗原。因此,各抗体能与多种放射性核素和/或细胞毒性药物联合来杀伤癌细胞。可用的放射性基团的示例包括 α -发射和 β -发射放射性核素,例如I-131、Yt-99、Cu-67、Au-198、P-32,和其它细胞毒性放射性核素。可采用本领域技术人员熟知的方法将放射性核素偶联至载体抗体。例如,可采用氯胺-T方法来碘化载体抗体,以用I-125或I-131标记抗体。可通过与苄基EDTA螯合或DPTA偶联法将其它放射性核素连接至载体抗体。对于癌治疗,通常采用高剂量的放射性。然后将带标记的载体抗体注射进入患病对象,其将定位于肿瘤内的坏死区域。辐射将从上述位置渗透进入周围肿瘤,其在那里对于癌细胞具有细胞毒性作用。

[0157] 能够与治疗性抗体联合的合适的细胞毒性药物的示例包括叶酸抑制剂、嘧啶类似

物、嘌呤类似物、烷基化试剂和抗生素。具体示例包括阿西维辛、阿柔比星、阿考达唑、亚德里亚霉素、阿美蒽醌、氨基多睡丹、氨基霉素、天冬酰胺酶、阿扎胞苷、阿扎替派、必桑郡、博来霉素、白消安、放线菌素、卡普唑酮、卡酰胺、卡铂、卡莫司汀、卡柔比星、瘤可宁、顺铂、环磷酰胺、阿糖胞苷、达卡巴嗪、放线菌素D、道诺霉素、地扎胍宁、亚丝醌、阿霉素、依匹哌啶、依托泊苷、艾托卜宁、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟他滨、羟基脲、异丙铂、醋酸亮丙瑞林、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、醋酸甲地孕酮、醋酸美仑孕酮、巯嘌呤、甲氨蝶呤、氯苯氨啶、丝裂红素、丝林霉素、丝裂霉素、丝裂帕菌素、米托蒽醌、霉酚酸、诺考达唑、诺加霉素、亚磺酰吡啶、培利霉素、戊氮芥、泊非霉素、泼尼氮芥、盐酸甲基苄肼、嘌呤霉素、吡唑呋喃菌素、利波腺苷、司莫司汀、司帕霉素、锗螺胺、螺莫司汀、螺铂、链脲霉素、他利霉素、喃氟啶、替尼泊苷、替罗昔隆、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤、噻唑羧胺核苷、磷酸曲西瑞宾、三乙撑蜜胺、三甲曲沙、乌拉莫司汀、乌瑞替哌、长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春匹定、长春罗定、长春利定、净司他丁和佐柔比星。还包括毒素，例如，蓖麻毒素和白喉毒素。全部这些化合物均可采用本领域技术人员熟知的方法偶联至载体抗体。例如，多种含羧酸的化合物（例如甲氨蝶呤）可经由该化合物与N-羟基琥珀酰亚胺和二环己基碳二亚胺的反应通过活性酯中间体偶联至免疫球蛋白；含氨基糖的药物（例如亚德里亚霉素和道诺霉素）可通过所述药物的高碘酸盐氧化作用，随后将氧化的药物连接至免疫球蛋白并后续用硼氢化钠还原产物，来共价结合至抗体。将任何具体药物偶联至载体抗体的方法将视所述药物的性质而变化。然而，这些根据常规实验方法进行，并视作落在本发明范围内。然后将带标记的载体抗体给予患病对象，其将定位于肿瘤内的坏死区域。药物将从上述位置扩散进入周围组织，其在那里对于癌细胞具有细胞毒性作用。

[0158] 在一些实施方式中，所述治疗可包括组合治疗，其中ANXA1、ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、ATP1A1、UBA1和CFAH抗原中的一种或多种可与等同于这些抗原的抗体中的一种或多种联用。

[0159] 鉴于上述治疗应用，在另一个方面，本发明提供用于治疗或预防对象中的卵巢癌的药物组合物，所述组合物包括有效量的ANXA1、ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、ATP1A1、UBA1和CFAH抗原中的一种或多种，和/或有效量的针对这些抗原（如上所述）中一种或多种的一种或多种抗体。

[0160] 所述药物组合物还可包括一种或多种药学上可接受的添加剂的应用，包括药学上可接受的盐、氨基酸、多肽、聚合物、溶剂、缓冲剂、赋形剂和膨胀剂，考虑待给予试剂的具体的物理和化学性质。所述药物组合物的制备是本领域已知的，例如，如《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)，第18版，1990，马克出版公司(Mack Publishing Co.)，宾夕法尼亚州伊斯顿，和《美国药典：国家药品集》(U.S. Pharmacopeia: National Formulary)，1984，马克出版公司，宾夕法尼亚州伊斯顿。

[0161] 例如，可将所述抗原和/或抗体制备成如下形式的各种药物组合物，例如，水性溶液、含油制剂、脂肪乳液、乳液、凝胶等，并且这些制剂可作为肌肉或皮下注射物或注射进入器官（例如卵巢）的注射物，或作为包埋制剂或作为通过鼻腔、直肠、子宫、阴道、肺等的透粘膜制剂给予。所述组合物可以口服制剂（例如固体制剂，例如片剂、胶囊、粒剂或粉剂）；液体制剂（例如糖浆、乳液或悬浮液）形式给予。包含所述抗原和/或抗体的组合物还可包含防腐剂、稳定剂、分散剂、pH控制剂或等渗剂。合适的防腐剂的示例有：甘油、丙二醇、苯酚或苯

醇。合适的稳定剂的示例有：葡聚糖、明胶、 α -醋酸生育酚或 α -硫代甘油。合适的分散剂的示例包括：聚氧乙烯(20)、山梨醇酐单油酸(吐温80)、失水山梨醇倍半油酸酯(司盘30)、聚氧乙烯(160)聚氧丙烯(30)乙二醇(普朗尼克F68)或聚氧乙烯氢化蓖麻油60。合适的pH控制剂的示例包括：盐酸、氢氧化钠等。合适的等渗剂的示例有：葡萄糖、D-山梨醇或D-甘露醇。

[0162] 所述药物组合物还可包含药学上可接受的运载体、稀释剂、赋形剂、悬浮剂、润滑剂、佐剂、载剂、递送系统、乳化剂、崩解剂、吸收剂、防腐剂、表面活性剂、着色剂、香料或甜味剂，考虑待给予试剂的物理和化学性质。

[0163] 出于这些目的，所述组合物可口服、胃肠道外、通过吸入喷雾、吸收、吸收、外敷、经直肠、经鼻、经颊、经阴道、心室内、经由植入的储器(在含有常规非毒性药学上可接受的运载体的制剂中)或通过任何其他便利的剂型给予。本文所用术语胃肠外包括皮下、静脉内、肌内、腹膜内、鞘内、心室内、胸骨内或颅内注射或输注技术。

[0164] 胃肠外给予时，所述组合物通常是单位剂型形式，无菌可注射形式(溶液、悬液或乳液)，其优选与具有药学上可接受的运载体的受者血液等渗。无菌可注射形式的示例有：无菌可注射水性或油质悬浮液。可利用合适的分散剂或湿润剂和助悬剂，按照本领域已知技术配制这些悬浮液。该无菌注射形式也可以是在胃肠道外可接受的无毒稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液，例如，在1,3-丁二醇中的溶液。可用的可接受载剂和溶剂是水、盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液、等渗氯化钠溶液和汉克斯溶液。此外，通常采用无菌非挥发油作为溶剂或悬浮介质。出于此种目的，可采用任何刺激性小的非挥发油，包括合成的甘油单酯或甘油二酯、玉米油、棉籽油、花生油和芝麻油。脂肪酸(例如油酸乙酯、豆蔻酸异丙酯和油酸)及其甘油酯衍生物，包括橄榄油和蓖麻油，尤其是其聚氧乙烯化形式，可用于可注射物的制备。这些油溶液或悬浮液还可包含长链醇稀释剂或分散剂。

[0165] 运载体可包含少量添加剂，例如，提高溶剂度、等渗性，和化学稳定性的物质，例如抗氧化剂、缓冲剂和防腐剂。

[0166] 口服给予时，所述药物组合物通常被配制成单位剂型，例如片剂、扁囊剂、粉剂、粒剂、珠、可咀嚼的锭剂、胶囊剂、液体、水性悬浮液或溶液，或类似剂型，采用本领域常规设备和技术配制。所述制剂通常包括固体、半固体或液体运载体。示例性的运载体包括：乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、矿物油、可可脂、可可属的油、藻酸盐、黄蓍胶、明胶、糖浆、甲基纤维素、聚氧乙烯山梨醇酐月桂酸酯、羟苯酸甲酯、羟苯酸丙酯、滑石、硬脂酸镁等。

[0167] 片剂可通过将所述药物组合物任选地与一种或多种辅助成分压制或模塑来制造。压缩片剂可通过在合适的机器中压缩诸如粉末或颗粒等自由流动形式的活性成份，任选与粘结剂、润滑剂、惰性稀释剂、表面活性剂或分散剂混合。模塑片剂可通过在合适的机器中对用惰性液态稀释剂湿润的粉末状活性成分和合适运载体的混合物进行模塑。

[0168] 本发明各实施方式中的药物组合物的给予还可采用控释技术。所述组合物可以缓释药物形式给予。为了进一步提高缓释效应，所述药物组合物可配制有额外组分，例如，植物油(例如大豆油、芝麻油、山茶油、蓖麻油、花生油、菜籽油)；中等脂肪酸甘油三酯；脂肪酸酯，例如油酸乙酯；聚硅氧烷衍生物；或者，水溶性高分子量化合物，例如透明质酸或起盐(重均分子量：ca.80,000-2,000,000)、羧甲基纤维素钠(重均分子量：ca.20,000-400,000)、羟丙基纤维素(2%水性溶液中粘度：3-4,000cps)、组织修复用蛋白质

(atherocollagen) (重均分子量:ca.300,000)、聚乙二醇(重均分子量:ca.400-20,000)、聚环氧乙烷(重均分子量:ca.100,000-9,000,000)、羟丙甲纤维素(1%水性溶液中粘度:4-100,000cSt)、甲基纤维素(2%水性溶液中粘度:15-8,000cSt)、聚乙烯醇(粘度:2-100cSt)、聚乙烯吡咯烷酮(重均分子量:25,000-1,200,000)。

[0169] 或者,药物组合物可纳入疏水聚合物基质,用于持续数天时间的控释。然后,可将所述组合物模制成固体植入物,或外施贴片,适于长时间提供有效浓度的活性试剂而无需频繁重复给药。此类控释薄膜是本领域熟知的。产用于该目的的聚合物的其它示例可包括不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯共聚物、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物,其可外施或内施使用。某些水凝胶,例如聚(羟基乙基甲基丙烯酸酯)或聚(乙醇醇)也是可用的,但其释放循环短于其它聚合物释放系统,例如上述那些。

[0170] 所述运载体也可以是固体生物可降解聚合物或生物可降解聚合物的混合物,其具有合适的时间释放特点和释放动力学。然后,可将所述药物组合物模制成固体植入物,适于长时间提供有效浓度的活性试剂而无需频繁重复给药。所述药物组合物可以本领域普通技术人员已知的任何合适方式纳入生物可降解聚合物或聚合物混合物,并且可与生物可降解聚合物形成均一基质,或可以某方式封装在聚合物内,或可模制成固体植入物。

[0171] 对于局部给予,本发明的组合物可以是溶液、喷雾、洗液、乳膏(例如非离子乳膏)、凝胶、糊剂或油膏形式。或者,所述组合物可通过脂质体、纳米微体,或营养-扩散剂载剂递送。

[0172] 乳膏是包含水和油并且由乳化剂稳定化的制剂。亲脂性乳膏称为油包水乳液,而亲水性乳膏是水包油乳液。用于油包水乳液的乳膏基通常是吸收基例如凡士林、地蜡或羊毛脂。用于水包油乳液的基底有脂肪酸或脂肪醇的甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯,采用皂、烷基硫酸盐或烷基聚乙二醇醚作为乳化剂。

[0173] 洗液是不透明、薄质、不油腻液体剂型,用于外施至皮肤,其通常包含具有多于50%的挥发物和足够的低粘度以能够倾倒递送的水型载剂。洗液通常是亲水性的,并且包含多于50%的挥发物(以LOD(干燥减重)计)。在皮肤上揉搓时,洗液趋于快速蒸发,并带来清凉感受。

[0174] 糊剂是不透明或半透明的、粘性、多脂乳液或悬浮液半固体剂型,用于外施至皮肤,其一般包含多于50%的基于烃或基于聚乙二醇的载剂,和少于20%的挥发物。糊剂在脂肪或水性载剂中包含大比例(20-50%)的分散的固体。在皮肤上揉搓时,油膏不趋于蒸发或被吸收。

[0175] 油膏是不透明或半透明的、粘性、多脂乳液或悬浮液半固体剂型,用于外施至皮肤,其一般包含多于50%的基于烃或基于聚乙二醇的载剂,和少于20%的挥发物。油膏通常是亲脂性的,并且包含>50%的烃或聚乙二醇作为载剂,和<20%的挥发物(以LOD计)。在皮肤上揉搓时,油膏不趋于蒸发或被吸收。

[0176] 凝胶通常是半透明的,非油脂乳液或悬浮液半固体剂型,用于外施至皮肤,其包含足以提供三维、交联基质的量的凝胶剂。凝胶通常是亲水性的,并且包含足够量的凝胶剂,例如淀粉、纤维素衍生物、卡波姆、硅酸镁-铝、黄原胶、硅胶,和铝或锌皂。

[0177] 用于局部给予的组合物还可包含干燥剂、消泡剂;缓冲剂、中和剂、pH调节剂;着色剂和褪色剂;润肤剂;乳化剂、乳液稳定剂和增粘剂;湿润剂;除臭剂;防腐剂、抗氧化剂,和

化学稳定剂;溶剂;和增稠剂、硬化剂,和悬浮剂,余量为水或溶剂。

[0178] 本发明的自身抗体还可用于对对象中的肿瘤或癌细胞成像的目的。就此而言,自身抗体可与多种肿瘤显像剂联用。这些包括放射性核素例如Tc-99m、I-123、I-125、In-111、In-113m、Ga-67、或其它 γ 发射体。自身抗体还可采用氯胺-T法被碘化,以用I-125或I-131标记蛋白质。可通过与苄基EDTA螯合或DPTA偶联法将其它放射性核素连接至载体自身抗体,如上所述。然后,将放射性核素标记的载体自身抗体注射进入患病对象,其将与肿瘤组织或癌细胞接触。带标记的自身抗体将结合至肿瘤或癌细胞上存在的对应肿瘤相关的抗原,并且将放射性定位于肿瘤发生区域内。相反,带标记的自身抗体不会识别不表达所述抗原的正常组织和细胞。采用 γ 射线扫描或组织取样技术来检测不同组织位置处的放射性的量。

[0179] 说明书中所用的术语“约”指的是,大约或接近,并且在本文所示的数值或范围中表示涵盖所述或所要求保护的数值或范围 $\pm 10\%$ 或更少, $\pm 5\%$ 或更少, $\pm 1\%$ 或更少,或 $\pm 0.1\%$ 或更少的变化。

[0180] 引用了包含进行本发明涵盖的基础技术的方法的分子生物学标准课本。参见例如,Green MR和Sambrook J,《分子克隆:实验室手册》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual) (第四版),冷泉港实验室出版社,2012。

[0181] 就本领域技术人员而言显而易见的是,尽管本发明出于清楚和理解的目的已做出详细描述,可不偏离本说明书中公开的本发明概念的范围而做出对本文所述实施方式和方法的各种修改形式和变化

[0182] 以下实施例中进一步说明本发明。实施例仅意在描述具体实施方式,且不意在限制上文描述的范围。

[0183] 实施例1

[0184] 卵巢癌自身抗体的鉴定

[0185] 发明人已采用成熟的免疫蛋白质组学技术鉴定了由患有最早期卵巢癌的对象产生的自身抗体。针对肿瘤相关抗原产生的自身抗体代表着一种检测早期卵巢癌并提高患者存活率的新方式。自身抗体是理想候选物,用于生物标志物验证并就其在癌发展早期患者的血液中的可检测性进行筛选,基于通过体液免疫应答的信号放大。此外,循环自身抗体是代谢稳定的,这允许对其进行可靠检测,并促进了其在诊断学发展中的应用。最后,自身抗体存在于患者血清(一种可获取的生物材料)中,因此能通过如上详述的成熟建立的技术来分析。

[0186] 材料与方法

[0187] 该研究探索诊断患有浆液性卵巢癌患者的血清和血浆中针对肿瘤相关的抗原的自身抗体的存在。研究过程中采用免疫蛋白质组学策略(示于图1),并如下详述。源自卵巢癌组织的免疫捕获的自身抗原从成对的患者特异性和对照免疫亲和柱洗脱。然后采用同位素编码的蛋白质标记(ICPL)技术进行洗脱蛋白质的相对定量。采用蛋白质微阵列对鉴定的自身抗体生物标志物候选物进行后续检验。在早期卵巢癌和健康与良性疾病之间做出最佳区分的那些自身抗体候选物代表用于卵巢癌检测的理想生物标志物。

[0188] 临床样品

[0189] 由当地研究道德委员会(阿德雷德皇家医院(RAH),澳大利亚阿德雷德)授予道德

批准,然后开始研究并由经历妇科疾病手术的患者提供签署的同意书。在手术过程中从原发卵巢位点收集的治疗前(Pre-therapeutic)血清和组织样本贮存在-80℃。获取自其它机构或生物样本库的生物样本具有患者同意书和根据参与中心的道德规范的道德批准。样品切除标准包括具有个人患癌史和二次恶性肿瘤的那些个体。必要时,根据年龄、更年期状态和收集中心/贮存库来匹配对照样品。

[0190] 研究组包括来自12名浆液性卵巢癌患者的组织和血清,以及来自10名良性妇科疾病患者和10名健康个体的血清。研究组的人口统计信息示于下表1。

[0191] 表1

[0192]

人口统计	特点	浆液性卵巢癌 (n=12)	健康 (n=10)	良性 (n=10)
年龄	平均±SD 范围	54.3 ± 10.5 37-75	49.8 ± 8.0 42-70	58.9 ± 12.5 44-84
更年期状态	前	5	6	3
	后	7	4	7
FIGO期	III	12		
研究所/生物样本库	RAH	12	10	10

[0193] 为了检验候选自身抗体生物标志物,采用独立样品组 (n=98),示于下表2。这些样品中,先前分析的11例III期浆液性卵巢癌病例和5例对照作为研究组的部分。还检测了来自10例I期/II期浆液性卵巢癌患者的血浆(源自澳大利亚VIC亨利王子医学研究所(PHI))。

[0194] 表2

[0195]

人口统计	特点	浆液性卵巢癌 (n=38)	健康 (n=30)	良性(n=30)
年龄	平均±SD 范围	60.4 ± 12.6 37-86	55.8 ± 11.7 42-61	56.4 ± 12.4 25-86
更年期状态	前	11	11	9
	后	27	19	21
FIGO期	I	10		
	II	8		
	III	20		
研究所/生物样本库	RAH	28	30	30
	PHI	10		

[0196] 组织蛋白质提取和抗体纯化

[0197] 从肿瘤块切下卵巢组织(约1.2g),并速冻于液氮。采用研钵和杵进行机械匀质化,并将蛋白质提取进入自制提取缓冲剂(150mg/mL)(包含1xTBS pH7.5、1%曲通X-100、1%蛋白酶抑制剂掺混物(西格玛奥德里奇(Sigma-Aldrich))和1%Pefabloc SC PLUS保护溶液(罗氏应用科学公司(Roche Applied Science)))。匀浆物在4℃孵育2小时,并超速离心

(100,000 $\times$ g, 2小时, 15℃) 以去除细胞碎片。蛋白质浓度采用EZQ[®]蛋白质定量试验 (Invitrogen[™], 美国加利福尼亚州) 测定。

[0198] 采用1mL Pierce[®] 色谱柱Melon[™]凝胶 (皮尔斯生物技术公司 (Pierce Biotechnology), 美国伊利诺斯州), 按照生产商说明从血清纯化免疫球蛋白G。简言之, 血清 (0.5mL) 在Melon[™]凝胶纯化缓冲剂 (专有, 皮尔斯生物技术公司, 美国伊利诺斯州) 中稀释10倍, 并采用注射器泵以0.5mL/分钟施加至色谱柱。对于汇集的健康和良性血清 (10mL) 的纯化, 采用5mL Pierce[®] 色谱柱Melon[™]凝胶 (皮尔斯生物技术公司, 美国伊利诺斯州)。在抗体纯化之前, 汇集的血清在Melon[™]凝胶纯化缓冲剂 (皮尔斯生物技术公司, 美国伊利诺斯州) 中透析, 采用CelluSep[®] 再生纤维素管状膜 (MWCO 12-14kDa, 膜过滤产品公司 (Membrane Filtration Products Inc), 美国德克萨斯州塞金)。透析在1升缓冲剂中于4℃搅拌下进行1小时。然后更换缓冲剂并持续透析2小时。最后, 透析在新鲜缓冲剂中进行过夜, 并从透析的血清纯化IgG, 如上所述, 按照生产商的说明。

[0199] 免疫亲和色谱

[0200] 采用Vivaspin500装置 (10kDa MWCO, 赛多利斯斯特特定生物技术公司 (Sartorius Stedium Biotech)), 将纯化的IgG经缓冲剂更换进入0.02M HEPES偶联缓冲剂 (pH 6.8), 并采用EZQ[®]蛋白质定量试验 (Invitrogen[™], 美国加利福尼亚州) 测定蛋白质浓度。将IgG (4mg) 偶联至0.6mL Affi-Gel 10活化的亲和介质 (伯乐实验室公司 (Bio-Rad Laboratories Inc.), 美国加利福尼亚州), 该偶联在温和振荡下于4℃过夜进行。通过添加200mM甘氨酸 (pH 6.8), 在温和振荡下室温持续1小时来停止反应。将Affi-Gel固定的IgG浆料倾倒进入Poly-prep[®] 色谱柱 (BioRad)。该柱用4个柱体积的PBST (0.1%吐温20) 和1个柱体积的TBST (0.01%吐温20) 冲洗。

[0201] 将预清理的组织蛋白质裂解物 (27mg) 施加至免疫亲和柱, 并允许在温和振荡下4℃孵育过夜。在自身抗原洗脱之前, 该柱用9mL的PBS 0.1%吐温20在4℃温和振荡下清洗5分钟, 清洗5次。免疫捕获的自身抗原的洗脱以一步法采用0.5mL TUC4缓冲剂 (7M脲、2M硫脲、4%CHAPS、34mM Tris) 室温下进行45分钟。采用Vivaspin500装置 (10kDa MWCO, 赛多利斯斯特特定生物技术公司 (Sartorius Stedium Biotech)), 将洗脱的自身抗原经缓冲剂更换进入6M盐酸胍pH 8.5 (pH 6.8), 并采用EZQ[®]蛋白质定量试验 (Invitrogen[™], 美国加利福尼亚州) 测定蛋白质浓度。

[0202] 同位素编码的蛋白质标记 (ICPL)

[0203] ICPL标记采用双重ICPL-试剂盒 (赛瓦电泳公司 (Serva Electrophoresis), 德国海德堡) 按照生产商说明并如下述文献所述Lottspeich F和Kellermann J, 2011, Methods in Molecular Biology, 753:55-64进行。简言之, 各样品 (15 μ g) 通过添加6M盐酸胍 (pH 8.5) 调节至2.5 μ g/ μ l。分别采用0.2M三 (2-羧乙基) 膦和0.4mM碘乙酰胺来进行二硫键的还原和烷基化。赖氨酸残基和蛋白质N-末端的标记采用轻 (¹²C-烟酰氧基琥珀酰亚胺) 或重 (¹³C-烟酰氧基琥珀酰亚胺) ICPL在室温下进行2小时。完成后, 用6M羟胺淬灭过量试剂, 并合并成对的轻/重标记的样品。合并的样品通过丙酮沉淀浓缩, 溶解于1x LDS样品缓冲剂 (英杰公司), 并通过1D SDS-PAGE预分级分离。采用考马斯蓝G-250进行蛋白质显影后, 切割回收20条凝胶条带, 并经凝胶内胰蛋白酶消化处理, 如Condina MR等, 2009, Proteomics 9:

3047-3057所述。然后,从凝胶提取蛋白水解肽,该提取通过在如下溶液中连续孵育进行:1%FA(v/v),ACN/H₂O/FA,50/50/1(v/v/v)和100%ACN。汇集的肽提取物通过真空离心浓缩至终体积1μl,并在ACN/H₂O/FA,3/97/1(v/v/v)中重建至10μl。

[0204] 纳米-LC-MS/MS

[0205] 纳米-LC-MS/MS分析在偶联至Ultimate 3000快速分离液相色谱(RSLC)系统(赛默飞世尔科学公司(Thermo Fisher Scientific),德国不来梅)的LTQ轨道阱XL质谱(赛默飞世尔科学公司(Thermo Fisher Scientific),德国不来梅)上进行。简言之,肽在反相捕获柱(Acclaim PepMap 100纳米阱,100μm id,长2cm,C18颗粒大小3μm,孔大小100 Å,赛默飞世尔科学公司(Thermo Fisher Scientific))上预浓缩,随后在分析型毛细管柱(100μm id,长15cm,C18颗粒大小5μm,孔大小100 Å,Nikkoy Technos有限公司)上采用二元梯度(溶剂A:0.1%FA、2%ACN,溶剂B:0.1%FA、80%ACN)以300nL/分钟的流速分离。肽采用60分钟洗脱程序分析:4%B,10分钟;线性梯度4-55%的B,40分钟,维持90%的B,10分钟;用4%B重新平衡柱10分钟。在LTQ-轨道阱XL质谱上以m/z 400下60,000(半最大值全宽)获取从m/z 300至2000的完全MS调查扫描。对于500毫秒的最大填充时间的MS,轨道阱自动化增益控制(AGC)靶离子计数设置为 1×10^6 。六个最大强度的峰在离子阱中经历MS/MS(AGC值设置为 1×10^4 ,最大填充时间100毫秒)。采用35%的标准化碰撞能量获得CID谱;动态排除时间30秒;前体离子分离宽度m/z 3.0;以轮廓模式记录谱;活化时间30毫秒。排除单一带电和电荷未分配的前体离子。

[0206] 蛋白质鉴定和相对定量

[0207] 相对蛋白质定量采用ICPL_ESIQuant软件(v2.0)获得,如以下文献所述Brunner A等,2010,Proteomics,10:315-326;Achim Brunner JK等,2012,Proteomics Bioinform.,5:279-282;和Brunner A等,2013,Biochimica et Biophysica acta,doi:10.1016/j.bbapap.2013.02.019。本文中,原始数据文件采用MSConvert(版本3.0.4001)(Kessner D等,2008,Bioinformatics,24:2534-2536)转换成开放mzXML形式(Pedrioli PG等,2004,Nat.Biotechnol.,22:1459-1466),并采用如下参数分析:20ppm标记δ精度,0.02Da同位素图案精度,电荷态范围+2至+5,化合物大小≥5,和供洗脱计数≥2。全部其它定量参数保持推荐的默认设置。采用Proteome Discoverer v1.3软件(赛默飞世尔科学公司(Thermo Fisher Scientific)),利用Mascot算法(Mascot server v2.3.02,矩阵科学公司(Matrix Science)),基于MS/MS谱检索UniprotKB/Swiss-Prot数据库(版本2011_08,哺乳动物分类法,65451序列条目)。检索采用如下参数进行:胰蛋白酶消化允许两个丢失的切割,±0.01Da前体容差,0.5Da片段离子容差,半胱氨酸的固定脲基甲基化和甲硫氨酸的可变氧化。通过轻(ICPL_0,单一同位素质量105.02Da)或重(ICPL_6,单一同位素质量111.04)ICPL试剂进行的N-末端或赖氨酸残基的标记设置为变量修改。编辑各ICPL双重分析(对应于20个条带)的蛋白质列表。基于如下标准认为鉴定的蛋白质是未调节的:蛋白质比率 $0.5 \geq x \geq 1.5$ 倍(>3SD),标记的肽/蛋白质≥2,蛋白质变异系数≤15%。

[0208] 基因本体(GO)分析采用通用蛋白质资源知识数据库(UniProtKB,UniProt联盟,<http://www.uniprot.org/>)进行,以研究未调节(disregulated)自身抗原的“细胞组分”和“生物加工”。生物和疾病网络采用IGenuity通路分析(IPA)软件(Ingenuity®系统,<http://www.ingenuity.com/>)研究。选择自身抗体候选物用于基于多个患者的失调、GO注

释和重组自身抗原的市售可得性来进行检验。

[0209] 蛋白质微阵列

[0210] 蛋白质微阵列经生成并通过Arrayit®公司(美国加利福尼亚州森尼维耳)分析。简言之,重组自身抗原(傲锐基因技术公司(OriGene Technologies)/亚诺法(Abnova))采用纳米Print™蛋白质微阵列测位器,以0.3μg/μl的终浓度打印至SuperEpoxy 2玻璃微阵列基质玻片上。阵列斑点直径为约50μm,具有200μm的水平和垂直间距。自身抗原以三重排列,获得3,600个斑点的阵列(150个斑点/微阵列),贯穿5个阵列,总计17,550个斑点。封闭进行1小时,采用Bloc试剂盒™ Plus和血清(反应缓冲剂(加)中1:100稀释度)施加至各蛋白质微阵列,室温下持续1小时。自身抗体结合采用Cy5-偶联的二抗(Alexa Fluor® 647-AffiniPure山羊抗人IgG(H+L)(杰克逊免疫研究公司(Jackson Immuno Research))检测。荧光检测采用InnoScan 710微阵列扫描仪以635nm波长,3μm分辨率,10激光功率和100PMT检测增益进行。采用Mapix软件V4.6.2进行图像定量以产生斑点强度数据。

[0211] 采用局部特征背景扣减的平均斑点像素强度数据来从各三重测定计算平均值。方差稳定化和标准化(vsn)(Huber W等,2002,Bioinformatics 18(增刊1):S96-S104;和Sundaresh S等,2006,Bioinformatics 22:1760-1766)以及方差分析(ANOVA),并采用R(用于统计学计算的A语言与环境,V2.15.2)进行事后杜凯氏‘可靠显著性差异(Honest Significant Difference)’(HSD)检验。采用GraphPad Prism(V6.0b)进行受试者工作特征(ROC)分析以评估候选自身抗体生物标志物的灵敏度和特异性。

[0212] 结果

[0213] 用于鉴定卵巢癌自身抗体的免疫蛋白质组学方法示于图1,详细步骤如上所述。这导致鉴定出九种自身抗体候选物,其后续验证在卵巢癌对象的检测中的特异度和灵敏度。候选物包括针对ANXA1、ARP3、SAHH、SERPH、ARAP1、OTUB1、AT1A1、UBA1和CFAH的自身抗体。关于这些蛋白质的信息在说明书详述部分提供。九种自身抗体候选物的ICPL定量参数汇总示于表3。

[0214] 显示自身抗体靶标中的两种(即自身抗体A和自身抗体B)的差异调节的代表性的蛋白质微阵列示于图2。如图2E和2F可见,相对于其中几乎没有或没有自身抗体存在的健康和良性样品,自身抗体在I期癌样品和III期癌样品中显著上调。

[0215] 对于通过DNA或蛋白质微阵列获取的强度数据而言存在方差-均值依赖性(Huber W等,2002,Bioinformatics 18(增刊1):S96-S104;和Sundaresh S等,2006,Bioinformatics 22:1760-1766)。对于全部98个样品中的具体抗原的平均强度和标准偏差的分析显示该依赖性(图3A)。如同预期,标准偏差随着强度增加而成比例增加($r=0.94$)。此外,重复抗原的平均强度的分位数-分位数图/(q-q图)显示该数据并非正态分布。

[0216]

表3

蛋白质名称	简称	登录号*	患者	多重计数	蛋白质比率	STDEV	CV (%)	Mascot评分(加和)
肌动蛋白相关的 蛋白质3	ARP3	P61158	P363	1	1.73	0	0	161.64
			P376	1	1.99	0	0	109.93
			P385	2	1.545	0.007071068	0	235.92
腺苷高半胱氨酸 酶	SAHH	P23526	P56	2	1.85	0.028284271	2	161.63
			P385	4	1.455	0.085780728	6	243.25
膜联蛋白A1	ANXA1	P04083	P363	8	1.49	0.205461154	14	407.37
			P467	9	1.54	0.139258239	9	674.79
			P544	10	1.55	0.206303444	13	597.4
丝抑蛋白H1	SERPH	P50454	P363	1	1.63	0	0	41.65
			P385	1	1.44	0	0	35.45
			P467	1	1.66	0	0	89.55
具有Rho-GAP结 构域的Arf-GAP	ARAP1	Q96P48	P363	1	1.68	0	0	100.63
			P363	1	1.79	0	0	117.94
			P544	1	2.34	0	0	107.33
泛素硫酸酯酶	OTUB1	Q96FW1	P8	1	1.62	0	0	116.36
			P363	1	1.71	0	0	183.82
			P385	1	1.69	0	0	105.65
			P467	1	1.47	0	0	124.06

[0217]

表3(续)

蛋白质名称	简称	登录号*	患者	多重计数	蛋白质比率	STDEV	CV (%)	Mascot评分(加和)
钠/钾-转运ATP酶 亚基α-1	ATP1A1	P05023	P56	1	2.22	0	0	101.86
			P363	1	1.77	0	0	78.09
			P363	1	2.02	0	0	171.9
			P467	2	1.54	0.028284271	2	171.25
			P467	1	1.7	0	0	65.15
			P467	1	1.53	0	0	66.91
			P544	4	1.89	0.110151411	6	210.04
泛素样修饰因子激活酶1	UBA1	P22314	P544	2	1.905	0.091923882	5	102.73
			P544	3	2.02	0.227156334	11	150.65
			P56	1	2.85	0	0	152.15
			P281	1	1.54	0	0	74.21
			P363	1	2.59	0	0	281.89
			P376	1	2.45	0	0	140.86
			P467	2	1.55	0.169705627	11	252.05
补体因子H	CFAH	P08603	P544	2	2.455	0.728319985	30	152.66
			P544	1	1.93	0	0	241.41
			P363	3	5.02	0.33126022	7	237.01
			P544	3	2.39	0.355011737	15	282.54

注：* 蛋白质登录号来自通用蛋白质资源知识库(UniProtKB, UniProt联盟, <http://www.uniprot.org/>)

[0218] 仅68%的数据(相对于平均值的1标准偏差)似乎是正态的(图3B),无法使用标准统计学方法。因此,在统计学分析之前进行方差稳定化和校准(标准化)。微阵列强度数据采

用R中的VSN功能转换,其采用仿射线性绘图和概括的算法(基准2)。通过q-q图进行的vsu-转换的微阵列强度数据的评价显示数据基本正态,其中中心(中点)95%的数据沿直线分布(图3D)。此外,数据不再显示出方差-均值依赖性(图3C)。因此,参数统计学可用于评估数据中的显著性差异。

[0219] 图4显示所选的九种自身抗体在早期和晚期卵巢疾病中的调节模式,将其与健康个体和具有良性妇科疾病的患者作比较。对各靶抗原进行方差分析(ANOVA)以确定不同组(健康、良性、早期和晚期)的群均值存在显著差异。后续事后分析采用杜凯氏‘可靠显著性差异’(HSD)检验,以0.05的临界值进行,以确定哪些群的平均值(组)彼此存在显著差异。如表4汇总,九种抗原显示关键组间最大显著性差异。如图4所示,相较于健康个体和具有良性妇科疾病的患者,针对癌抗原(A) ARP3, (B) SAHH和(C) ANXA1的自身抗体水平在早期和晚期癌中均有显著调节。针对癌抗原(D) SERPH、(E) ARAP1、(F) OTUB1和(G) AT1A1的自身抗体水平在早期癌过程中有显著调节,并且在晚期疾病过程中略有调节。针对癌抗原(H) UBA1和(I) CFAH的自身抗体水平仅在早期癌过程中有显著调节。

[0220] 表4

[0221]

自身抗体	早期-健康	早期-良性	晚期-健康	晚期-良性
ARP3	***	***	**	**
SAHH	***	***	*	***
ANXA1	***	***	**	*
SERPH	***	***	0.2347531	*
ARAP1	**	**	.	*
OTUB1	***	***	*	0.183457
AT1A1	***	***	*	0.1147197
UBA1	**	***	0.9999932	0.6047896
CFAH	**	**	0.896731	0.8498267

[0222] 注:显著性 $p < 0.001$ (***) ; $p < 0.01$ (**) ; $p < 0.05$ (*) ; $p < 0.1$ (.)

[0223] 然后评估九种自身抗体候选物的受试者工作特征曲线以确定其对于早期卵巢疾病的灵敏度和特异度。相关ROC曲线示于图5。抗ARP3似乎是最优候选诊断性自身抗体标志物,其具有0.94的最大曲线下面积(AUC),如表5中总结。以83%的灵敏度,前三种候选标志物能够鉴定15/18真阳性,然而,抗ARP3、抗ANXA1和抗SAHH的特异度分别是98%、97%和92%。剩余六种自身抗体生物标志物在0.81和0.93之间也具有高AUC,如表6所示。

[0224] 表5

[0225]

自身抗体	灵敏度 (%)	特异度 (%)	AUC	真阳性(/18)	真阴性(/60)
ARP3	83.33	98.33	0.941	15	59
ANXA1	83.33	96.67	0.891	15	58
SAHH	83.33	91.67	0.931	15	55

[0226] 表6

[0227]

自身抗体	AUC
AT1A1	0.925
OTUB1	0.905
SERPH	0.898
UBA1	0.83
ARAP1	0.815
CFAH	0.811

[0228] 前三种自身抗体候选物被评估为生物标志物组,含和不含肿瘤相关的抗原CA125。结果示于图6。对标准化的微阵列强度数据采用线性判别分析(LDA)以产生对于抗ARP3、抗ANXA1和抗SAHH自身抗体的分类器。采用分类器的完整数据集(18例早期、30例健康和30例良性)的分析分别产生100%和91.7%的灵敏度和特异度(图6A)。或者,采用25%的数据和施加的参数产生分类器,以分类剩余的75%的数据。该训练显示,保留了生物标志物的强健性(94.4%的高灵敏度和96.7%的高特异度)(图6B)。类似地,前四种自身抗体候选物(包括抗ARP3、抗ANXA1、抗SAHH和抗SERPH)通过ROC评估,并显示关于自身抗体组合的最具前景的结果,其具有100%的灵敏度和98.3%的特异度(图6C)。

[0229] 此外,早期癌样品(n=17)相较于对照(n=55)的ROC分析采用CA125血清水平进行(图6D和表7)。有趣的是,仅单独CA125分别具有82.4%和90.9%的灵敏度和特异度。当与我们的前三种自身抗体生物标志物组(抗ARP3、抗ANXA1和抗SAHH)联合评估时,早期癌检测的灵敏度和特异度分别提高至100%和94%(图6E和表8)。因此,前述的生物标志物组(抗ARP3、抗ANXA1和抗SAHH;抗ARP3、抗ANXA1、抗SAHH和抗SERPH;以及CA125、抗ARP3、抗ANXA1和抗SAHH)在灵敏度和特异度方面提供了优于现有卵巢癌(包括早期卵巢癌)标志物的预料之外且显著的进步。

[0230] 表7

[0231]

标 准 (U/mL)	灵 敏 度 (%)	特 异 度 (%)	AU C	真阳性(/17)	真阴性(/55)
>31.0	82.4	90.9	0.90	14	50

[0232] 表8

[0233]

生物标志物组合	AUC
CA125	0.9032
CA125+ARP3	0.9519
CA125+ANXA1	0.9016
CA125+SAHH	0.9679
CA125+ARP3+ANXA1	0.9872
CA125+ARP3+SAHH	0.9701
CA125+ANXA1+SAHH	0.9850
CA125+ARP3+ANXA1+SAHH	0.9914

[0234] 本领域技术人员会理解,除了特定说明以外,本文所述的发明易进行变化和修改。应理解本发明包含这些变化和修改。本发明还包括说明书中单独或共同提到或指出的所有步骤、特征、组合物和化合物,以及所述步骤或特征中任意两种或更多种的任意和全部组合。

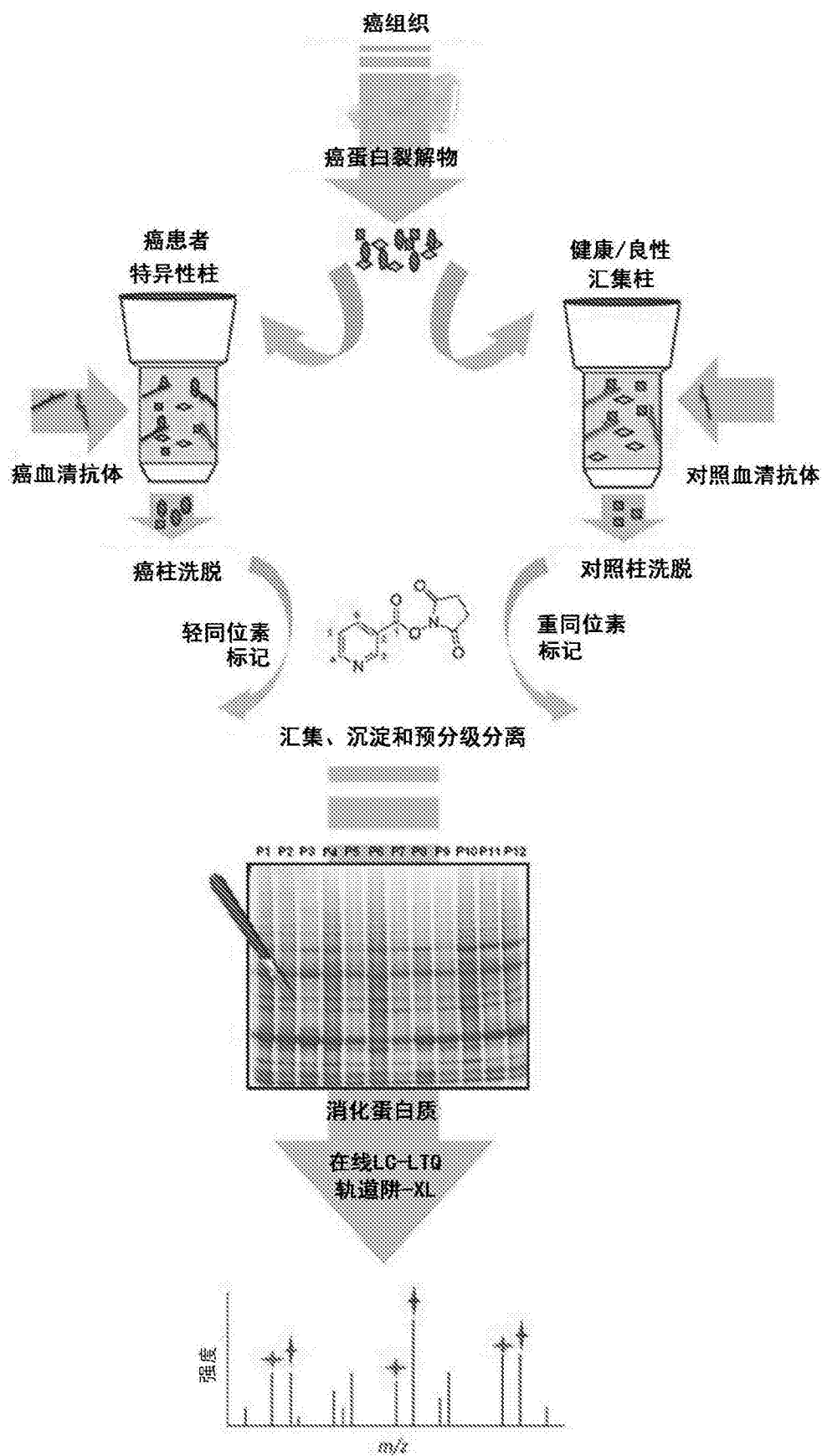


图1

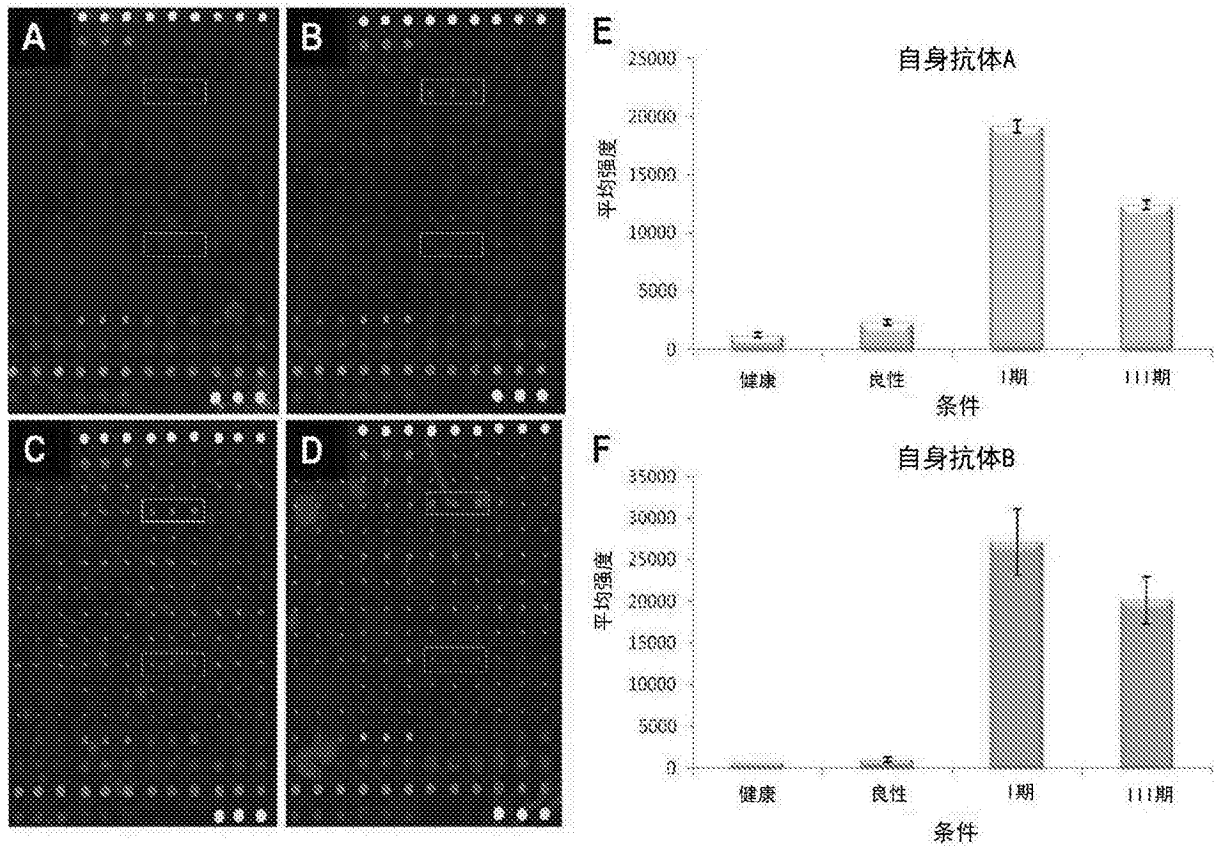


图2

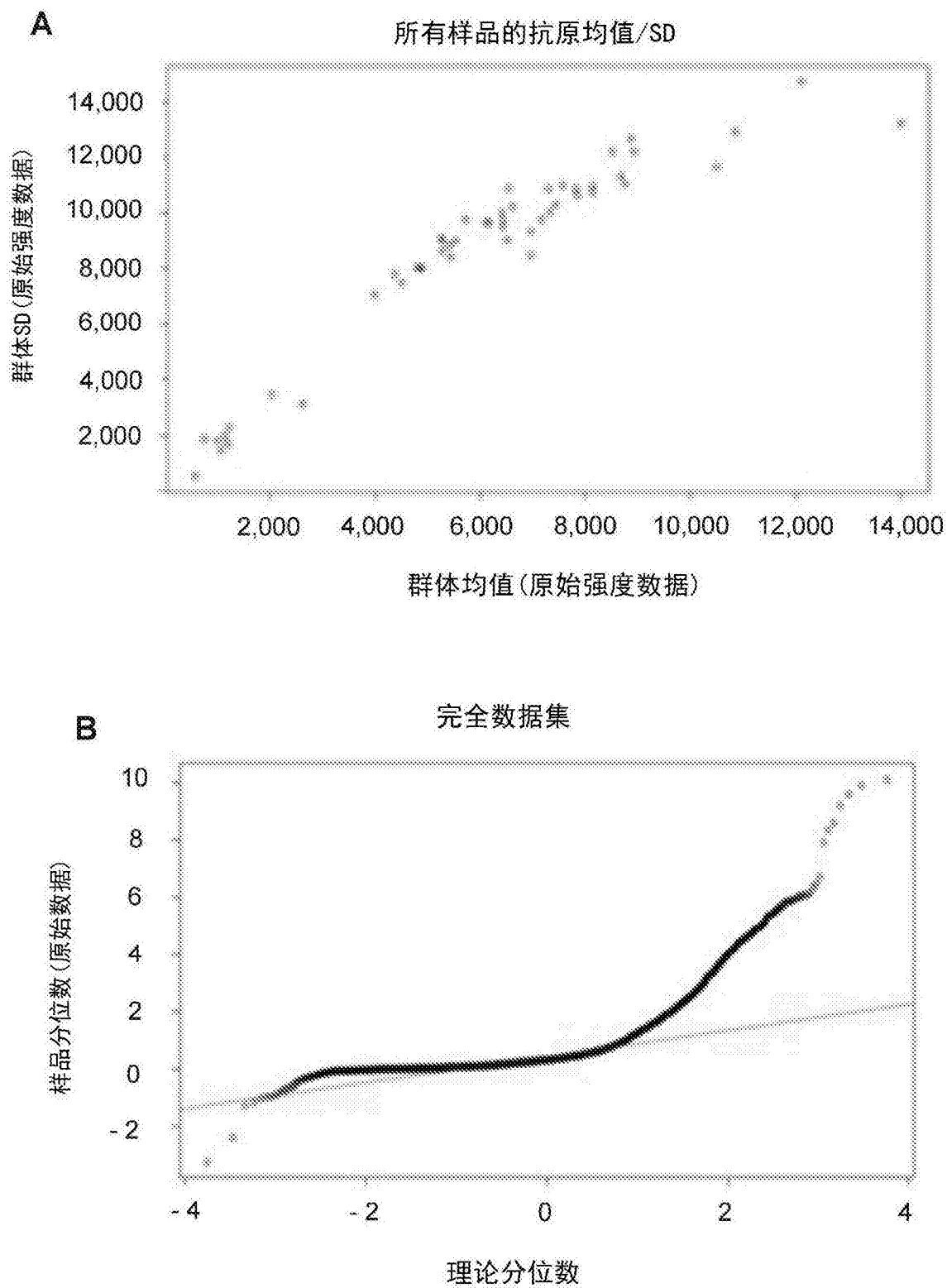


图3

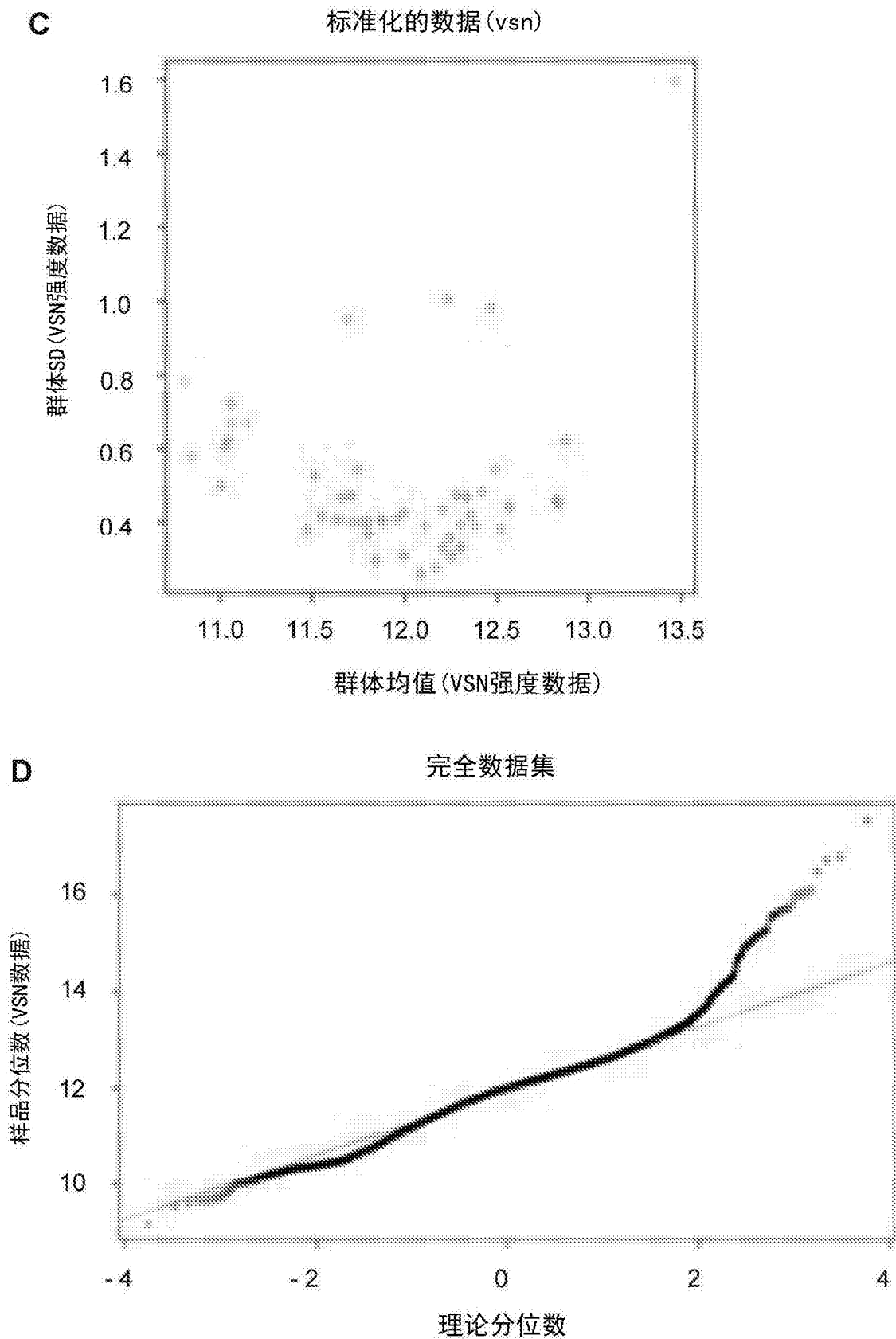


图3(续)

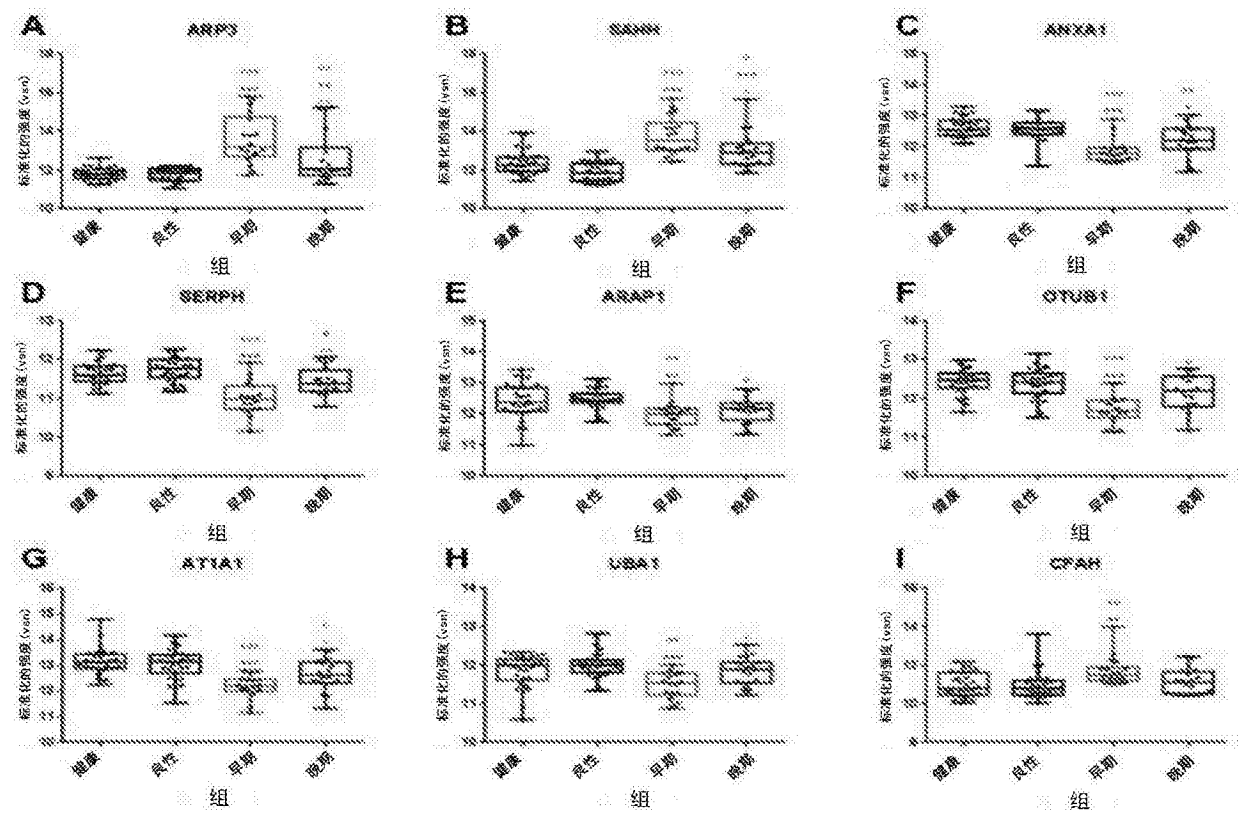


图4

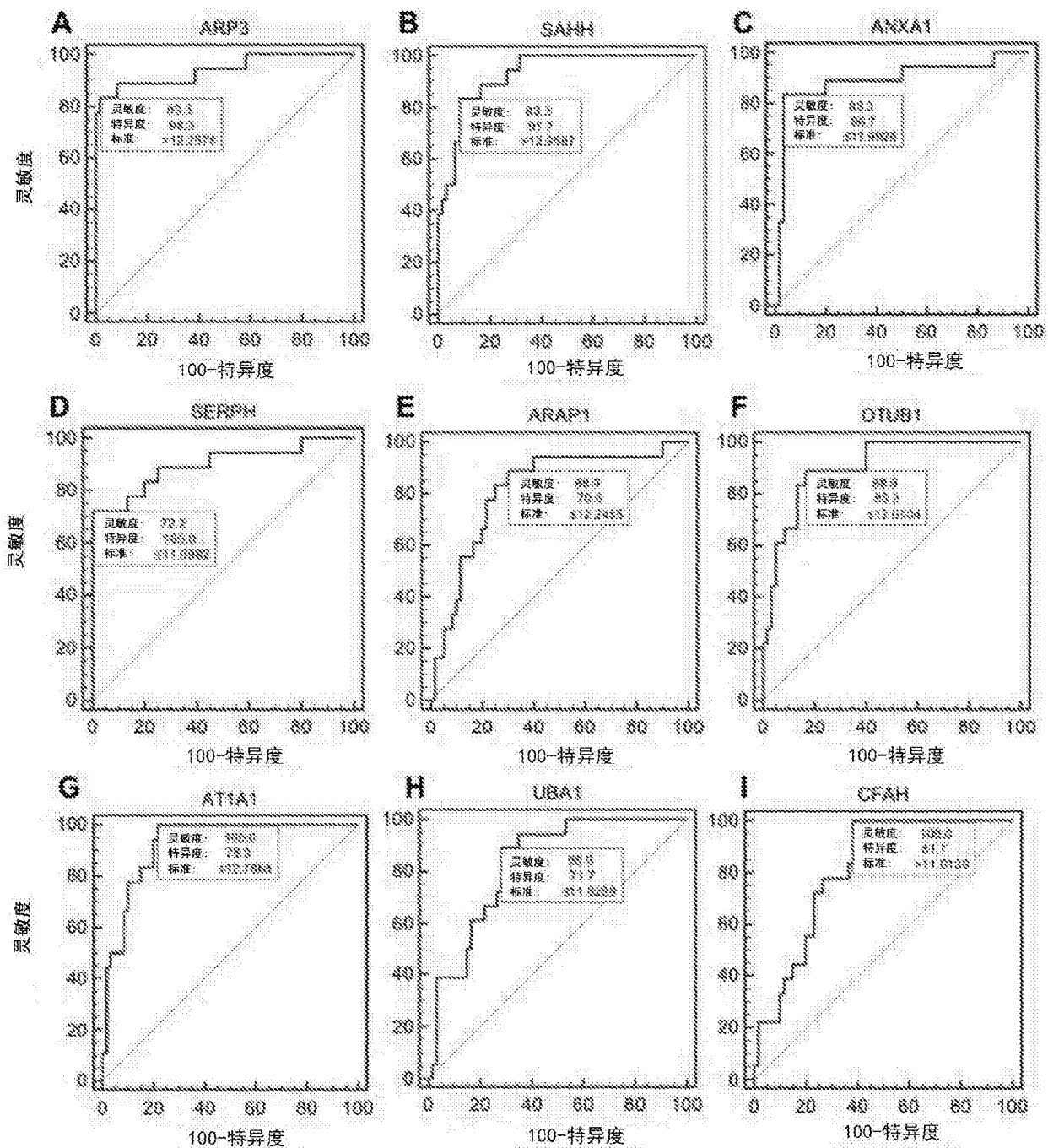


图5

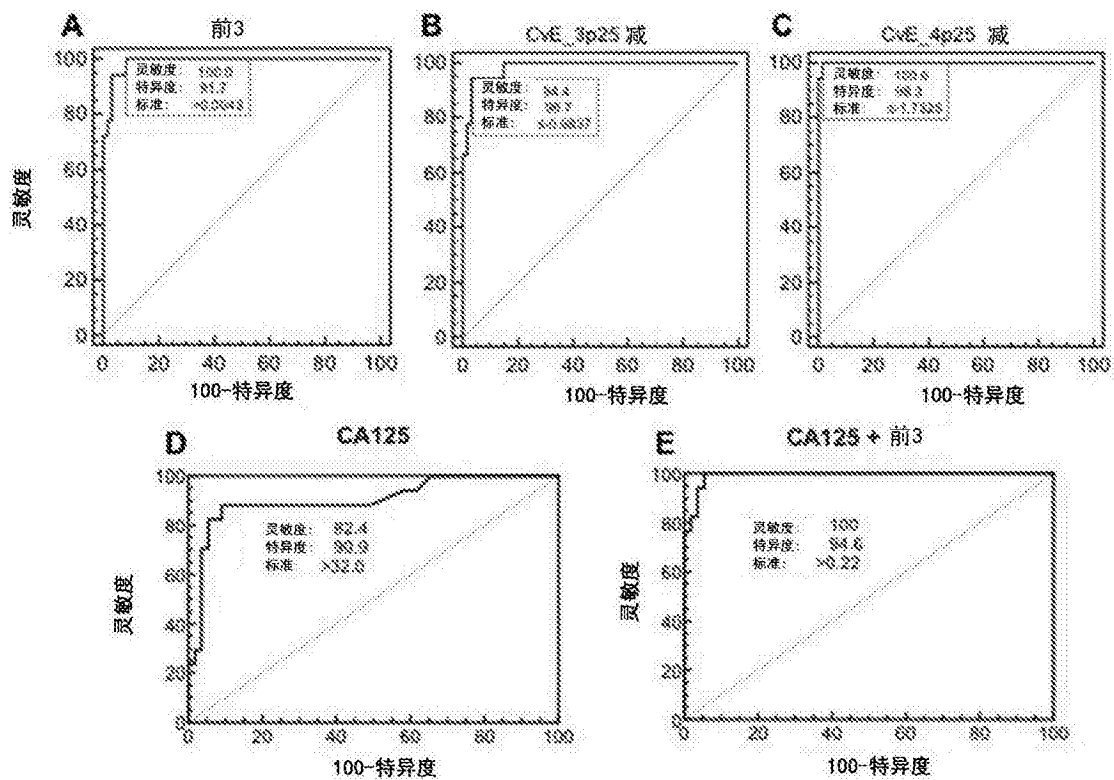


图6