



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101473041 B

(45)授权公告日 2017. 11. 14

(21)申请号 200780007052.X

(22)申请日 2007.01.04

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 101473041 A

(43)申请公布日 2009.07.01

(30)优先权数据
60/756,131 2006.01.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2008.08.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2007/000215 2007.01.04

(87)PCT国际申请的公布数据
W02007/081767 EN 2007.07.19

(73)专利权人 富士瑞必欧美国公司

地址 美国特拉华州

(72)发明人 理查德·摩尔 伊丽莎白·萨默斯
杰弗里·W·阿拉德

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51)Int.Cl.
C12Q 1/25(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)

审查员 蔡玉品

权利要求书2页 说明书18页
序列表2页

(54)发明名称

HE4与其它生化标记物在评估子宫内膜癌和
子宫癌中的应用

(57)摘要

本发明涉及HE4/HE4a标记物在评估患者的
子宫内膜癌和子宫癌中的应用。本发明还涉及将
肿瘤标记物用于子宫内膜癌和子宫癌的诊断、分
级和分期。本发明还涉及了对被诊断患有子宫内
膜癌或子宫癌的患者的预后和治疗有效性的确
定。

1. 特异性针对HE4或HE4a多肽的抗体在制备用于评估患者是否患子宫内膜癌的试剂中的应用,其中从所述患者获得的体液样品中HE4或HE4a多肽的表达升高表明患者患有子宫内膜癌,其中所述体液样品是血液、血清或血浆样品。

2. 权利要求1的应用,其中样品中HE4或HE4a多肽的表达与参比值进行比较。

3. 权利要求2的应用,其中所述参比值对应于未患有子宫内膜癌的患者中HE4或HE4a多肽的表达。

4. 权利要求1的应用,其中样品中HE4或HE4a多肽的表达与在早期从该患者获得的早期样品中HE4或HE4a多肽的表达进行比较。

5. 权利要求1的应用,还包括使用特异性针对选自CA125和SMRP的第二个多肽的抗体制备用于评估患者是否患子宫内膜癌的试剂,其中第二个多肽的表达升高进一步表明患者患有子宫内膜癌。

6. 特异性针对HE4或HE4a多肽的抗体在制备用于评估患有子宫内膜癌的患者对治疗的反应的试剂中的应用,其中在较晚时间从患者获得的体液样本中HE4或HE4a多肽的表达相对于在较早时间从患者获得的体液样本中HE4或HE4a多肽的表达降低表明患者对治疗有反应,其中所述体液样品是血液、血清或血浆样品。

7. 权利要求6的应用,进一步包括使用特异性针对选自CA125和SMRP的第二个多肽的抗体制备用于评估患有子宫内膜癌的患者对治疗的反应的试剂,其中第二个多肽的表达降低进一步表明患者对治疗有反应。

8. 特异性针对HE4或HE4a多肽的抗体在制备用于对已经进行了子宫内膜癌治疗的患者复发进行评估的试剂中的应用,其中在从治疗后的患者获得的体液样品中HE4或HE4a多肽的表达升高表明患者的子宫内膜癌复发,其中所述体液样品是血液、血清或血浆样品。

9. 权利要求8的应用,进一步包括使用特异性针对选自CA125和SMRP的第二个多肽的抗体制备对已经进行了子宫内膜癌治疗的患者复发进行评估的试剂,其中从患者获得的样品中第二个多肽的表达升高进一步表明患者的子宫内膜癌复发。

10. 权利要求8的应用,其中在治疗后多次评估HE4或HE4a多肽的表达,并且其中逐渐升高的HE4或HE4a多肽表达表明患者的子宫内膜癌复发。

11. 特异性针对HE4或HE4a多肽的抗体在制备用于对患者将发展子宫内膜癌的可能性进行评估的试剂中的应用,其中在从患者获得的体液样品中HE4或HE4a多肽的表达升高与患者将发展子宫内膜癌的可能性增加相关,其中所述体液样品是血液、血清或血浆样品。

12. 权利要求11的应用,进一步包括使用特异性针对选自CA125和SMRP的第二个多肽的抗体制备用于对患者将发展子宫内膜癌的可能性进行评估的试剂,其中在从患者获得的样品中第二个多肽的表达升高进一步表明患者将发展子宫内膜癌。

13. 特异性针对HE4或HE4a多肽的抗体在制备用于在患有子宫内膜癌的患者中对肿瘤进行分期的试剂中的应用,其中在从患者获得的体液样品中逐渐升高的HE4或HE4a多肽表达表明更晚期的癌症,其中所述体液样品是血液、血清或血浆样品。

14. 权利要求13的应用,进一步包括使用特异性针对选自CA125和SMRP的第二个多肽的抗体制备用于在患有子宫内膜癌的患者中对肿瘤进行分期的试剂,其中第二个多肽的表达升高进一步表明更晚期的癌症。

15. 特异性针对HE4或HE4a多肽的抗体在制备用于在患有子宫内膜癌的患者中对肿瘤

进行分级的试剂中的应用,其中在从患者获得的体液样品中逐渐升高的HE4或HE4a多肽表达表明更高等级的癌症,其中所述体液样品是血液、血清或血浆样品。

16. 权利要求15的应用,进一步包括使用特异性针对选自CA125和SMRP的第二个多肽的抗体制备用于在患有子宫内膜癌的患者中对肿瘤进行分级的试剂,其中在从患者获得的样品中第二个多肽的表达升高进一步表明更高等级的癌症。

17. 特异性针对HE4或HE4a多肽的抗体在制备用于评估被诊断患有子宫内膜癌的患者对治疗性干预的需要的试剂中的应用,其中在从患者获得的体液样品中HE4或HE4a多肽的表达升高表明患者需要治疗性干预,其中所述体液样品是血液、血清或血浆样品。

18. 权利要求17的应用,进一步包括使用特异性针对选自CA125和SMRP的第二个多肽的抗体制备用于评估被诊断患有子宫内膜癌的患者对治疗性干预的需要的试剂,其中在从患者获得的样品中第二个多肽的表达升高进一步表明患者需要治疗性干预。

19. 权利要求17的应用,其中所述治疗性干预为化疗。

HE4与其它生化标记物在评估子宫内膜癌和子宫癌中的应用

[0001] 发明背景

[0002] 本公开一般性涉及癌症的诊断、分级、分期和预后领域。更具体来说,本公开涉及了子宫内膜癌和子宫癌领域。本公开还涉及了使用蛋白表达进行诊断、分级、分期和预后的领域。

[0003] 癌症包括范围广泛的疾病,在世界范围内大约每4个人中就有1个人受到影响。癌症的负面影响的严重性是深刻的,普遍影响到了医疗保险和程序以及社会。由于多种类型的癌症标志是恶性细胞的快速和不受调控的增殖,因此改善针对癌症的方法的一个决定性难题是对早期检测和诊断的需求。早期检测被广泛认为是降低癌症死亡率的最好方法。相应地,已经做了许多尝试以开发出准确而可靠的诊断恶性病症存在的标准。具体来说,已经针对被称为肿瘤相关抗原的血清学定义的抗原性标记物的应用进行了研究,这些肿瘤相关抗原或者仅由癌症细胞表达,或者以明显较高的水平存在于患有恶性病症的对象中。

[0004] 然而,由于肿瘤相关抗原表达的高度异质性,例如癌抗原的极端多样性,因此对癌症诊断中有用的其它肿瘤标记物存在着需求。已知有许多与癌相关抗原具有反应性的单克隆抗体。这些单克隆抗体结合多种不同的癌相关抗原,包括糖蛋白、糖脂和粘蛋白。许多这类单克隆抗体识别在来源于给定的细胞谱系或组织类型的某些肿瘤但不是其它肿瘤上表现出受限表达的肿瘤相关抗原。

[0005] 表现出可用于鉴定特定类型的恶性肿瘤的肿瘤相关抗原的例子相对较少。例如单克隆抗体B72.3,特异性地结合一种高分子量(>106Da)的肿瘤相关粘蛋白抗原,该抗原选择性地表达于许多不同的癌上,包括即便不是所有也是大部分的卵巢癌、绝大多数非小细胞肺癌、结肠癌和乳腺癌。然而,在外科切除肿瘤后检测细胞相关的肿瘤标记物,例如被B72.3所识别的粘蛋白抗原,对于诊断筛查来说可能用途有限,在诊断筛查中在实体肿瘤块积累以前对恶性病症的早期检测是优选的。

[0006] 通过筛查外科切除的样本的肿瘤相关抗原对特定类型的癌症进行诊断时,通常只有在检测到积累的肿瘤块后才进行有创手术,这种诊断方法的替代方法是提供可用于在得自无创或微创术对象的样本中检测此类抗原的组合物和方法。例如,在卵巢癌、子宫内膜癌和其它癌症中,目前有许多可溶性肿瘤相关抗原,它们可在易获得的生物流体样品例如血清或粘膜分泌物中检出。一种此类标记物是CA125,其为一种也散落于血流中的癌相关抗原,可在血清中检出(例如Bast等,1983N.Eng.J.Med.309:883;Lloyd等,1997Int.J.Canc.71:842)。血清和其它生物流体中的CA125水平同其它标记物的水平一起被测量,如癌胚抗原(CEA)、鳞状细胞癌抗原(SCC)、组织多肽特异性抗原(TPS)、唾液酸化TN粘蛋白(STN)和胎盘碱性磷酸酶(PLAP),以试图提供卵巢癌、子宫内膜癌和其它癌的诊断和/或预后情况(例如Sarandakou等,1997Acta Oncol.36:755;Sarandakou等,1998Eur.J.Gynaecol.Oncol.19:73;Meier等,1997Anticanc.Res.17(4B):2945;Kudoh等,1999Gynecol.Obstet.Invest.47:52;Ind等,1997Br.J.Obstet.Gynaecol.104:1024;Bell等,1998Br.J.Obstet.Gynaecol.105:1136;Cioffi等,1997Tumori83:594;Meier等,1997Anticanc.Res.17(4B):2949;Meier等,1997Anticanc.Res.17(4B):3019)。

[0007] 但是,升高的血清CA125水平单独或与其它已知指标相结合,并不能提供对恶性肿瘤或特定恶性肿瘤如卵巢癌或子宫内膜癌的确切诊断。例如,相对于宫颈癌和生殖道癌症来说,阴道液和血清中CA125、CEA和SCC升高与良性妇科疾病中的炎症最密切相关(例如Moore等,1998Infect.Dis.Obstet.Gynecol.6:182;Sarandakou等,1997Acta Oncol.36:755)。血清CA125升高也可伴有神经母细胞瘤,而CEA和SCC水平升高可伴有结肠直肠癌。另一种标记物,分化抗原间皮素,表达于正常间皮细胞表面还有某些癌细胞上,包括上皮性卵巢肿瘤和间皮瘤。与间皮素(Chang等,1992Canc.Res.52:181;Chang等,1992Int.J.Canc.50:373;Chang等,1992Int.J.Canc.51:548;Chang等,1996Proc.Nat.Acad.Sci.USA93:136;Chowdhury等,1998Proc.Nat.Acad.Sci.USA95:669;Yamaguchi等,1994J.Biol.Chem.269:805;Kojima等,1995J.Biol.Chem.270:21984)和结构相关的间皮素相关抗原(MRA;参见例如Scholler等,1999Proc.Nat.Acad.Sci.USA96:11531)有关的组合物和方法在本技术领域内是已知的,包括如在W000/50900和美国申请系列号No.09/513,597中描述的在癌症检测和治疗中的应用。对于可用于多标记物诊断筛查的其它标记物存在着迫切的需求。

[0008] 发明简述

[0009] 本公开的主题包括评估患者是否患有子宫内膜癌或子宫癌的方法。该方法包括在从患者获得的样品(如实体组织样品、体液样品或与患者身体的相关部位接触过的流体样品)中HE4的表达进行评估。HE4表达升高是患者患有子宫内膜癌或子宫癌的指征。如果需要,可以将HE4表达的水平与参比值进行比较,例如对应于未患有子宫内膜癌或子宫癌的患者中HE4表达的参比值。或者,样品中HE4的表达可以与在较早时间从患者获得的较早样品中HE4的表达进行比较。

[0010] 在优选实施方案中,所述方法还包括评估样品中第二个标记物(例如CA125和/或SMRP)的表达。第二个标记物的表达升高进一步表明了患者患有子宫内膜癌或子宫癌。

[0011] 本公开还涉及了评估患有子宫内膜癌或子宫癌的患者对治疗的反应的方法。该方法包括评估治疗过程中不同时间从患者获得的样品中HE4的表达。在后来的时间HE4的表达降低(或表达随时间降低)表明患者对治疗有反应。样品中第二个标记物(例如CA125和/或SMRP)的表达也可以被评估。第二个标记物的表达降低进一步表明了患者对治疗有反应。

[0012] 本公开还涉及了在已经进行了子宫内膜癌或子宫癌治疗的患者中评估复发的方法。该方法包括在从治疗后的患者获得的样品中评估HE4的表达,单独评估或与一种或多种第二种标记物组合评估。HE4的表达升高表明在患者中子宫内膜癌或子宫癌复发了,第二种标记物的表达升高进一步表明了患者子宫内膜癌或子宫癌复发。HE4的表达可以在例如治疗后进行多次评估。HE4的表达随时间增加表明了患者子宫内膜癌或子宫癌复发。

[0013] 在另一个实施方案中,本公开涉及了对患者将发展子宫内膜癌或子宫癌的可能性进行评估的方法。该方法包括在从患者获得的样品中评估HE4的表达,单独评估或与一种或多种第二种标记物组合评估。HE4的表达升高与患者将发展子宫内膜癌或子宫癌的可能性增加相关,第二个标记物的表达升高进一步表明了患者将发展子宫内膜癌或子宫癌。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明涉及了在患有子宫内膜癌或子宫癌的患者中对肿瘤进行分期和/或分级的方法。该方法包括在从患者获得的样品中评估HE4单独或与一种或多种第二标记物组合的表达。HE4(以及第二标记物,如果评估的话)的表达升高表明了更晚期

的癌症阶段和/或更高的癌症等级。

[0015] 本文公开的主题的还有一个方面涉及评估被诊断患有子宫内膜癌或子宫癌的患者对于治疗性干预(例如化疗)的需要的办法。该方法包括在从患者获得的样品中评估HE4单独或与一种或多种第二标记物组合的表达。HE4(以及第二标记物,如果评估的话)的表达升高表明患者需要治疗性干预。

[0016] 几个表的简述

[0017] 表1是本文实施例1中描述的实验获得的ROC(接受者操作特征,Receiver Operating Characteristic)曲线数据的曲线下面积(AUC)分析的概述。

[0018] 表2是实施例2中描述的血清肿瘤标记物的平均值和对于由每个被分析的标记物进行分组的每组值所确定的分期。

[0019] 表3是对于实施例2中描述的每个肿瘤标记物计算出的ROC-AUC。

[0020] 表4是对实施例2中提出的组合中每个肿瘤标记物独立地在特异性为90%时的对数回归分析。

[0021] 表5是对实施例2中提出的组合中每个肿瘤标记物独立地在特异性为95%时的对数回归分析。

[0022] 表6是对实施例2中提出的组合中每个肿瘤标记物独立地在特异性为98%时的对数回归分析。

[0023] 发明具体内容

[0024] 本公开涉及这样一个发现,即HE4a抗原是子宫内膜癌和子宫(“子宫体”)癌存在、等级和阶段的指标。

[0025] 本发明的主题总的来说涉及使用HE4标记物或HE4与其它生物标记物的组合评估妇女的子宫内膜癌和子宫癌。评估HE4与子宫内膜癌和子宫癌的一种或多种其它标记物(特别是标记物CA125和SMRP)可用于诊断这类癌症在人类患者中的发生,以及评估这些癌症对于各种类型治疗的反应。此外,对这些标记物的评估可用于监测这些癌症在患者中的复发,或用于评估患者将发展这些癌症的可能性。

[0026] 在美国,每年诊断出大约40,880例子宫癌新病例,导致7,310人死亡。对子宫癌进行的外科分期表明75%患者患有I期疾病(Kottmeier, H. L., Int. J. Gynaecol. Obstet. 1971; 9: 172)。被诊断患有I期疾病的具有中度到高度风险因子的患者的复发率为20%到30%(Keys等, 2004, Gynecol. Oncol.; 92 (3): 744-751; Creutzberg等, 2003, Gynecol. Oncol., 89 (2): 201-209)。在患有晚期III期和IV期疾病的患者中大约75%有血清CA125水平升高,而患有早期I期和II期疾病的患者只有17%升高(Niloff等, 1984, Am. J. Obstet. Gynecol., 148 (8): 1057-1058; Berchuck等, 1989, Cancer Res., 49 (8): 2091-2095; Olt等, 1990, Obstet. Gynecol. Surv., 45: 570-577)。血清CA125水平升高已经与子宫内膜癌的阶段和肿瘤向宫颈、淋巴结和腹膜表面的扩散相关联(Ginath等, 2002, Int. J. Gynecol. Cancer, 12 (4): 372-375; Vuento等, 1997, Gynecol. Oncol., 64 (1): 141-146; Sood等, 1997, Obstet. Gynecol. 90 (3): 441-447; Hsieh等, 2002, Gynecol. Oncol., 86 (1): 28-33; Powell等, 2005, J. Reprod. Med., 50 (8): 585-590)。目前CA125是最有用的检测复发疾病的血清肿瘤标记物。但是,CA125在检测复发疾病中的用途充其量来说也是有限的。仅仅10%到20%患有早期疾病的患者和25%患有无症状复发疾病的患者有CA125升高

(Niloff等,2002;Duk等,1986,Am.J.Obstet.Gynecol.,155(5):1097-1102)。已经对许多新的血清肿瘤标记物在子宫内膜癌中的临床用途进行了研究,包括CA15.3、CA19.9、CA72.4、CEA、OVX1和M-CSF(Cherchi等,1999,Eur.J.Gynaecol.Oncol.,20(4):315-317;Takeshima等,1994,Gynecol Oncol1994;54(3):321-326;Hareyama等,1996,J.Clin.Pathol.,49(12):967-970;Olt等1996,Am.J.Obstet.Gynecol.,174(4):1316-1319;Beck等,1997,Gynecol.Oncol.,65(2):291-296)。最近已经使用了蛋白质组学分析来鉴定子宫内膜癌的新标记物,例如蛋白伴侣10(Yang等,2004,J.Proteome Res.,3(3):636-643)。在子宫内膜癌的应用中利用了多标记物分析策略的研究很少。在本文描述的方法公开之前,到目前为止用于检测复发疾病的最有希望的组合是CA125与CA19.9(Lo等,1999,Cancer Detect.Prev.23(5):397-400)。

[0027] 定义

[0028] 本文中使用的术语“样品”是指可以与患者特异地相关联的材料,从其中可以确定、计算或推断出与患者有关的特定信息。样品可以全部或部分由来自患者的生物材料构成。样品也可以是以某种方式与患者接触过的材料,这种接触方式使得对样品进行的测试可以提供与患者有关的信息。样品也可以是已经与其它材料接触过的材料,这种其它材料不是患者的,但是能够使第一材料随后被测试以确定与患者有关的信息,例如样品可以是探针或解剖刀的清洗液。样品可以接触患者之外的生物材料源,只要本技术领域的专业人员仍然能够从样品确定与患者有关的信息就行。还可以理解的是,不是样品的外来材料或信息也可用于将患者与样品结论性地联系在一起。举一个非限制性的例子,双盲实验需要图表或数据库以将样品与患者相匹配。

[0029] 本文中使用的术语“患者”是指作为分析对象以确定与生物体有关的信息的生物体。尽管在本文公开的方法的大部分实施方案中患者是人类,但所述方法不限于用于人类个体。患者可以是一组人类。患者也可以是人的一部分。这种实施方案的一个非限制性的例子是,患者可以是与人体不相连的组织样品,或转化的细胞系。在某些实施方案中,患者也可以是非人类的生物体。

[0030] 本文中使用的术语“参比值”是指当与分析结果相比时与特定结果统计学相关的值。在优选实施方案中,参比值是根据对比较HE4a的表达与已知的临床结果的研究进行的统计学分析来确定的。在本文的实施例部分中显示了一些这样的研究。但是,来自文献的研究和本文公开的方法的用户经验也可用于产生或调整参比值。参比值也可以通过考虑与患者的医疗史、遗传学、年龄和其它因素特别相关的情况和结果来确定。

[0031] 本文使用的术语“体液”是指从患者获得的稠度基本为流体的材料,但是可以有固体或颗粒物质与其相连。体液也可以含有不是来自于患者的材料和部分。例如体液可以用水稀释,或可以含有防腐剂例如EDTA。体液的非限制性例子是血液、血清、浆膜液、血浆、淋巴液、尿液、脑脊液、唾液、分泌组织和器官的粘膜分泌液、阴道分泌物、乳汁、眼泪、以及腹水液例如与非实体肿瘤有关的腹水液。其它的例子包括胸膜、心包、腹膜、腹腔和其它体腔的流体等。生物流体还可以包括与对象或生物源接触的液体溶液,例如细胞和器官培养基,包括细胞或器官条件培养基、灌洗液等。

[0032] 如果样品是在治疗性组合物或方法的施用前、施用时或施用后或在其后进行的随诊阶段过程中获得的,那么样品是“在治疗过程中”从患者获得的。该术语的使用明确地包

含了样品在进行治疗之前和之后(即为了评估治疗的有效性或复发)获得的情况,以及在长期治疗过程中间断地获取多个样品的情况。

[0033] 具体说明

[0034] 本文公开的方法涉及HE4a,是本文描述的“四个二硫键核心”蛋白家族的成员。“四个二硫键核心”蛋白家族包含了功能多样的酸和热稳定的小分子的异质群组,其包括人类附睾四个二硫键核心蛋白、或“HE4a”(Kirchhoff等,1991Biol.Reprod.45:350-357;Wang等,1999Gene229:101;Schummer等,1999Gene238:375)。

[0035] HE4cDNA首先从人类附睾中分离(Kirchhoff等,1991 Biol.Reprod.45:350-357),随后HE4cDNA在从卵巢癌构建的cDNA文库中被高频率检出(Wang等,1999Gene229:101;Schummer等,1999Gene238:375)。HE4a,“四个二硫键核心”蛋白家族的新成员,被描述在美国专利申请公布号No.2003/0108965A1和美国专利申请No.10/233,150中,在此引为参考,它包括了在本公开中使用的SEQ ID NO名称。HE4a显示出与HE4高度相似但有所不同的序列。

[0036] 对于本发明的目的来说,HE4或HE4a的检测被认为是同义的,其任一分子的检测都可以用于本文描述的方法中。HE4a是否是HE4不同的分子、或HE4a的序列是否只是代表了对已经发表的HE4序列的校正,并不重要。

[0037] 本文公开的方法还部分涉及了用于对在对象中天然存在的细胞表面和/或可溶形式的HE4a、包括在患有某些癌症(例如子宫内膜癌)的对象中这类多肽的水平升高进行检测的组合物和方法。因此,本公开提供了通过特异性检测这些细胞表面和/或可溶HE4a多肽而用于检测和诊断对象的恶性肿瘤病症的有用组合物和方法。

[0038] 按照本文公开的方法,可以在来自对象或生物来源的生物样品中检测可溶性人类HE4a抗原多肽(或HE4a多肽)。生物样品可以通过从对象或生物来源获得血液样品、活检样本、组织外植体、器官培养物、生物流体或任何其它的组织或细胞制备物来提供。对象或生物来源可以是人类或非人类的动物、原代细胞培养物或改造的培养物细胞系,包括但不限于可以含有染色体整合的或游离的重组核酸序列的遗传工程细胞系、永生化的或可以永生化的细胞系、体细胞杂交细胞系、分化的或可以分化的细胞系、转化的细胞系等。在本文公开的方法的某些优选实施方案中,对象或生物来源可以怀疑患有恶性肿瘤病症或有恶性肿瘤病症的风险,该病症在某些其它的优选实施方案中可以是子宫内膜癌症例如子宫内膜癌,在本文公开的方法的某些其它的优选实施方案中,对象或生物来源可以已知没有这些疾病的风险或存在。

[0039] 在某些实施方案中,生物样品包括至少一种来自对象或生物来源的细胞,在其它某些优选实施方案中,生物样品是含有另一种肿瘤标记物例如CA-125或可溶性人类间皮素相关抗原多肽的生物流体。生物流体典型为生理温度下的液体,可以包括在对象或生物来源中存在、从中抽取、表达或以其他方式从中提取的天然存在的流体。某些生物流体源于特定的组织、器官或定位的区域,而某些其它的生物流体可以更为整体或全身地存在于对象中。生物流体的非限制性例子包括血液、血清和浆膜液、血浆、淋巴液、尿液、脑脊液、唾液、分泌组织和器官的粘膜分泌液、阴道分泌物、乳汁、眼泪、以及腹水液例如与非实体肿瘤有关的腹水液。其它例子包括胸膜、心包、腹膜、腹腔和其它体腔的流体等。生物流体还可以包括与对象或生物源接触的液体溶液,例如细胞和器官培养基包括细胞或器官条件培养

基、灌洗液等。在其它的优选实施方案中,生物样品是无细胞的液体溶液,例如血清、血浆或离心的尿液的上清液。

[0040] 在某些其它的优选实施方案中,生物样品含有完整的细胞,在某些其它的优选实施方案中,生物样品包含了含核酸序列的细胞提取物,该核酸序列编码具有SEQ ID NOS:11或13中显示的氨基酸序列的HE4a抗原多肽、或其片段或变异体。在本文公开的方法的其它实施方案中,需要在进行分析以前对细胞进行物理或化学的破碎或裂解,以提供分析用细胞内容物。

[0041] 样品中的“以可溶形式天然存在的分子”可以是可溶性蛋白、多肽、肽、氨基酸或其衍生物;脂类、脂肪酸或类似物、或其衍生物;碳水化合物、糖或类似物、或其衍生物;核酸、核苷酸、核苷、嘌呤、嘧啶或相关的分子、或其衍生物等;或其任何组合,例如糖蛋白、糖脂、脂蛋白、蛋白脂或任何其它的可溶性生物分子或本文提供的生物样品的无细胞组分。“以可溶形式天然存在的分子”也指溶液中存在或存在于生物样品、包括本文提供的生物流体中的分子,并且它们不与完整细胞的表面结合。例如,以可溶形式天然存在的分子包括但不是必须限于溶质;大分子复合物的成分;从细胞脱落、分泌或输出的物质;胶体;微粒或纳米粒子或其它细的悬浮颗粒等。

[0042] 对象中恶性肿瘤病症的存在是指对象中存在发育异常的、癌性的和/或转化的细胞,包括例如赘生的、肿瘤的、非接触性抑制的或致癌转化的细胞等。出于说明而不是限制,在本文公开的方法中,恶性肿瘤病症还可以是指对象中存在能够分泌、脱落、输出或释放HE4a抗原多肽(或HE4a多肽)的癌细胞,以至于在来自对象的生物样品中可以检测到这种多肽的水平升高。例如,在优选实施方案中,这样的癌细胞是恶性上皮细胞例如癌细胞,在特别优选实施方案中这样的癌细胞是恶性间皮瘤细胞,它们是在例如内胸膜、心包、腹膜、腹腔和其它体腔中发现的鳞状上皮或间皮细胞的变异体。

[0043] 在本文公开的方法的大多数优选实施方案中,其存在意味着存在恶性肿瘤病症的肿瘤细胞是子宫内膜癌细胞,包括原发和转移的子宫内膜癌细胞。将恶性肿瘤分类为子宫内膜癌的标准在本技术领域是众所周知的,来自原发和转移肿瘤的人类子宫内膜癌细胞系的建立和表征也是同样。在其它实施方案中,恶性肿瘤病症可以是间皮瘤、胰腺癌、非小细胞肺癌或其它形式的癌症,包括任何各种癌症例如鳞状细胞癌和腺癌,也包括肉瘤和血液恶性肿瘤(例如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤等)。这些以及其它恶性肿瘤病症的分类对于熟悉本技术领域的人来说是已知的,本公开提供了在这样的恶性肿瘤病症中无需过多试验就确定HE4a多肽的存在的方法。

[0044] 在本文包含的实施例中提供了参比值。这些值适合于本文公开的方法的实践。但是应该注意的是,本文公开的方法的使用并不限于那些参比值或数据。本技术领域的专业人员可以根据他们的具体需要获得参比值。这样的参比值可以在患者因为疑似恶性肿瘤的子宫或子宫内膜肿块而进行组织活检程序时,通过分析患者的HE4a表达来获得。获得这类参比值的方法被包含在本文中并在实施例中提供。本文公开的方法的使用者可能希望获得不同于本文所提供的参比值,以致力于特定的患者类型。可以预见到这样的类型可以包括年龄、遗传背景、癌症风险、医疗史、血型、生理特征例如体重,以及其它的类型。

[0045] 本文提供的用于在对象中筛查恶性肿瘤病症的存在的方法,其特征可以是使用特异性针对HE4a抗原多肽的抗体或特异性针对HE4a多肽的抗体。

[0046] 特异性针对HE4a抗原多肽(或HE4a多肽)的抗体容易产生为单克隆抗体或多克隆抗血清,或可以使用本技术领域众所周知的方法产生为被设计成具有所需性质的遗传工程免疫球蛋白(Ig)。例如,作为说明而不是限制,抗体可以包括重组IgG、具有来自免疫球蛋白的序列的嵌合融合蛋白或“人源化的”抗体(参见例如美国专利Nos.5,693,762、5,585,089、4,816,567、5,225,539、5,530,101,在此引为参考),它们都可以用于按照本文公开的方法检测人类HE4a多肽。这样的抗体可以按照本文提供的方法制备,包括下面描述的用HE4a多肽进行免疫。例如,如本文所提供,公开了编码HE4a多肽的核酸序列,因此本技术领域的专业人员可以常规制备这些多肽用作免疫原。例如将在下面更详细描述的单克隆抗体如2H5、3D8和4H4,可用于实践在本文公开的方法中的某些方法。

[0047] 术语“抗体”包括多克隆抗体、单克隆抗体、其片段例如F(ab')₂和Fab片段、以及作为与HE4a多肽特异性结合的分子的任何天然存在或重组产生的结合配偶体。抗体,如果能够以K_a大于或等于大约10⁴M⁻¹、优选大于或等于大约10⁵M⁻¹、更优选大于或等于大约10⁶M⁻¹、更加优选大于或等于大约10⁷M⁻¹与HE4a多肽结合,就被定义为是“免疫特异性的”或特异性地结合。结合配偶体或抗体的亲和性可以使用常规技术容易地确定,例如在Scatchard等,Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660(1949)中描述的那些技术。其它蛋白作为HE4a多肽配偶体的确定,可以使用许多已知的用于鉴定和获得与其它蛋白或多肽特异性相互作用的蛋白的任何方法来进行,例如酵母双杂交筛选系统,如在美国专利No.5,283,173和美国专利No.5,468,614中描述的那些,或其等同物。本文公开的方法也包括使用HE4a多肽和基于HE4a多肽的氨基酸序列的肽来制备与HE4a多肽特异性结合的结合配偶体和抗体。

[0048] 抗体一般可以通过本技术领域的专业人员所熟知的各种不同技术中的任何一种来制备(参见例如Harlow和Lane,《抗体:实验室手册》Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,1988)。在一种这样的技术中,首先将含有HE4a多肽的免疫原,例如在表面上具有HE4a多肽的细胞或分离的HE4a多肽,注射到适当的动物中(例如小鼠、大鼠、兔、绵羊和山羊),优选按照预定的计划加入一次或多次增强免疫,然后定期从动物取血。然后可以从这些抗血清中通过例如使用与适当的固相支持物偶联的多肽的亲和层析方法,纯化出特异性针对HE4a多肽的多克隆抗体。

[0049] 特异性针对HE4a多肽或其变异体的单克隆抗体可以使用例如Kohler和Milstein的技术(1976Eur.J.Immunol.6:511-519)以及对它进行的改进来制备。简单来说,这些方法包括制备能够产生具有所需特异性(即与目的间皮多肽具有反应性)的抗体的永生的细胞系。这样的细胞系可以例如从上述免疫的动物获得的脾细胞来产生。然后通过例如与骨髓瘤细胞融合伴侣、优选为与被免疫的动物同种同源者进行融合,来使脾细胞永生化。例如,可以使用膜融合促进剂例如聚乙二醇或非离子去污剂将脾细胞和骨髓瘤细胞结合几分钟,然后以低密度接种在支持杂交细胞生长但不支持骨髓瘤细胞生长的选择性培养基上。优选的筛选技术使用HAT(次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸腺嘧啶)进行筛选。经过足够的时间,通常为大约1到2周之后,观察到杂交体的集落。挑选单个集落并测试与多肽的结合活性。具有高反应性和特异性的杂交瘤是优选的。本文公开的方法考虑到了产生与HE4a多肽特异性结合的单克隆抗体的杂交瘤。

[0050] 单克隆抗体可以从生长的杂交瘤集落的上清液中分离。此外,各种不同的技术可以用于增加产率,例如将杂交瘤细胞系注射到适合的脊椎动物宿主例如小鼠或其它适合的

宿主的腹膜腔中。然后可以从腹水液或血液中收获单克隆抗体。污染物可以通过常规的技术例如层析、凝胶过滤、沉淀和抽提从抗体中除去。例如,抗体可以使用标准技术通过在固定蛋白G或蛋白A上进行层析来纯化。

[0051] 在某些实施方案中,使用抗体的抗原结合片段可能是优选的。这样的片段包括Fab片段,它可以使用标准技术来制备(例如通过用木瓜蛋白酶消化来产生Fab和Fc片段)。Fab和Fc片段可以通过亲和层析(例如在固定蛋白A柱上)使用标准技术来分离。这样的技术在本技术领域是众所周知的,参见例如Weir, D.M.,《实验免疫学手册》Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston。

[0052] 利用与编码各种不同效应蛋白的序列按阅读框架连接的DNA序列编码的免疫球蛋白V区结构域而对于预先选定的抗原具有特异结合亲和性的的多功能融合蛋白,在本技术领域是已知的,例如公开于EP-B1-0318554、美国专利No. 5,132,405、美国专利No. 5,091,513和美国专利No. 5,476,786。这样的效应蛋白包括多肽结构域,所述结构域可以通过本技术领域的专业人员熟悉的各种技术中的任何一种用来检测融合蛋白的结合,这些技术包括但不限于生物素模拟序列(参见例如Luo等, 1998 J. Biotechnol. 65:225, 在此引为参考)、用可检测的标记部分进行的直接共价修饰、与特异性标记的报告分子的非共价结合、可检测的底物的酶法修饰或固定在(共价或非共价地)固相支持物上。

[0053] 用于本文公开的方法的单链抗体也可以通过例如噬菌体展示这样的方法来产生和筛选(参见例如美国专利No. 5,223,409; Schlebusch等1997 Hybridoma 16:47; 在此引为参考)。简单来说,在该方法中,DNA序列被插入到丝状噬菌体例如M13的基因III或基因VIII基因中。已经开发了几种带有多克隆位点的载体用于插入(McLafferty等, Gene 128:29-36, 1993; Scott和Smith, Science 249:386-390, 1990; Smith和Scott, Methods Enzymol. 217:228-257, 1993)。插入的DNA序列可以随机产生,或可以是结合HE4a多肽的已知结合结构域的变异体。使用这种方法可容易地产生单链抗体。一般来说,插入片段编码6到20个氨基酸。插入序列编码的肽展示在噬菌体表面上。表达了HE4a多肽的结合结构域的噬菌体通过与固定的HE4a多肽的结合来进行筛选,例如使用本技术领域熟知的的方法和本文公开的核酸编码序列制备的重组多肽。未结合的噬菌体通过清洗液除去,清洗液一般含有10mM Tris、1mM EDTA,并且不含盐或含有低浓度盐。结合的噬菌体用例如含有盐的缓冲液洗脱。NaCl的浓度逐步增加,直到所有的噬菌体都被洗脱。一般来说,以较高亲和力结合的噬菌体将被较高的盐浓度所释出。将洗脱的噬菌体在细菌宿主中繁殖。可以进行附加轮次的筛选以选出几个高亲和力结合的噬菌体。然后测定结合的噬菌体中插入片段的DNA序列。一旦知道了结合的肽的预测的氨基酸序列,就可以通过重组手段或合成方法制备足够的肽,在本文中用作特异性针对HE4a多肽的抗体。当抗体作为融合蛋白产生时,使用重组的方法。肽也可以被产生成两个或多个相似的或不相似肽的串联排列,以最大化亲和力或结合。

[0054] 为了检测与特异性针对HE4a多肽的抗体反应的抗原决定簇,检测试剂一般为抗体,它可以按照本文的描述制备。对于本技术领域的普通专业人员来说,使用抗体检测样品中的多肽已知有各种不同的分析方式,包括但不限于酶联免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、免疫荧光、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散以及其它的技术。参见,例如Harlow和Lane,《抗体:实验室手册》Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Weir, D.M.,《实验免疫学手册》Handbook of Experimental

Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston。例如, 分析可以以Western印迹的方式进行, 其中将来自生物样品的蛋白制备物进行凝胶电泳、转移到适当的膜上并使其与抗体反应。然后可以使用适合的检测试剂来检测膜上抗体的存在, 这是本技术领域熟知的并将在下面描述。

[0055] 在另一个实施方案中, 分析包括使用固定在固相支持物上的抗体来结合靶HE4a多肽并将其从其余的样品中取出。然后可以使用与不同的HE4a多肽抗原性决定簇反应的第二抗体来检测结合的HE4a多肽, 例如含有可检测的报告部分的试剂。作为非限制性的例子, 根据本实施方案, 识别不同抗原性决定簇的固定抗体和第二抗体可以是本文描述的选自单克隆抗体2H5、3D8和4H4的任何两个单克隆抗体。或者, 可以使用竞争性分析, 其中HE4a多肽用可检测的报告部分标记, 并在将固定抗体与样品孵育之后允许其与固定的HE4a多肽特异性抗体结合。样品的成分对标记的多肽与抗体结合的抑制程度表明了样品与固定抗体的反应性, 因此表明了样品中HE4a的水平。

[0056] 固相支持物可以是本技术领域的普通专业人员已知的可以结合抗体的任何材料, 例如微量滴定板中的测试孔、硝酸纤维素滤膜或其它适合的膜。或者, 支持物可以是珠子或圆盘, 例如玻璃、纤维玻璃、胶乳或塑料例如聚苯乙烯或聚氯乙烯。抗体可以使用本技术领域中已知的各种不同的技术固定在固相支持物上, 这些技术在专利和科学文献中有充分的描述。

[0057] 在某些优选实施方案中, 检测样品中HE4a抗原多肽的分析方法是双抗体夹心分析。该分析可以如下进行, 首先将固定在固相支持物、通常为微量滴定板的孔上的HE4a多肽特异性抗体(例如单克隆抗体如2H5、3D8或4H4)与生物样品进行接触, 使得样品中天然存在的并具有与抗体反应的抗原性决定簇的可溶性分子能够与固定抗体结合(例如在室温下30分钟的孵育时间一般就足够了), 以形成抗原-抗体复合物或免疫复合物。然后从固定的免疫复合物中除去未结合的样品组分。接下来, 加入特异性针对HE4a抗原多肽的第二抗体, 其中第二抗体的抗原结合位点不会竞争性地抑制固定的第一抗体的抗原结合位点与HE4a多肽的结合(例如, 与固定在固相支持物上的单克隆抗体不同的单克隆抗体例如2H5、3D8或4H4)。第二抗体可以按照本文提供的方法可检测地标记, 以便它可以被直接检测。或者, 第二抗体可以通过使用可检测地标记的第二(或“第二阶段”)抗-抗体、或通过使用本文提供的特异性检测试剂而间接检测。本文提供的方法不限于任何特定的检测程序, 因为熟悉免疫分析方法的人员将会认识到, 在双抗体夹心免疫分析中有大量的试剂和安排可用于免疫学检测特定的抗原(例如间皮素多肽)。

[0058] 在使用上面描述的双抗体夹心分析的本文公开的方法的某些优选实施方案中, 第一种特异性针对HE4a抗原多肽的固定抗体是多克隆抗体, 第二种特异性针对HE4a抗原多肽的抗体是多克隆抗体。任何非竞争性HE4a抗体的组合都可以与本文公开的方法一起使用。包括单克隆抗体、多克隆抗体及其组合。在本文公开的方法的某些其它实施方案中, 第一种特异性针对HE4a抗原多肽的固定抗体是单克隆抗体, 第二种特异性针对HE4a抗原多肽的抗体是多克隆抗体。在本文公开的方法的某些其它的实施方案中, 第一种特异性针对HE4a抗原多肽的固定抗体是多克隆抗体, 第二种特异性针对HE4a抗原多肽的抗体是单克隆抗体。在本文公开的方法的某些其它高度优选的实施方案中, 第一种特异性针对HE4a抗原多肽的固定抗体是单克隆抗体, 第二种特异性针对HE4a抗原多肽的抗体是单克隆抗体。例如, 在这

些实施方案中,应该注意的是本文提供的单克隆抗体2H5、3D8和4H4识别HE4a多肽上不同的和非竞争性的抗原性决定簇(例如表位),因此这些单克隆抗体的任何成对组合都可以使用。在本文公开的方法的其它优选实施方案中,第一种特异性针对HE4a抗原多肽的固定抗体和/或第二种特异性针对HE4a抗原多肽的抗体可以是本技术领域已知的和本文提到的任何种类的抗体,例如,作为说明而非限制,是Fab片段、F(ab')₂片段、免疫球蛋白V区融合蛋白或单链抗体。熟悉本技术领域的人员将会认识到,本文公开的方法包含了在本文公开和要求权利的方法中使用其它的抗体形式、片段、衍生物等。

[0059] 在某些特别优选的实施方案中,第二抗体可以含有可检测的报告部分或标记例如酶、染料、放射性核素、发光部分、荧光部分或生物素等。任何报告部分或标记都可以与本文公开的方法一起使用,只要其信号与清洗后保留在支持物上的抗体的量直接相关或成比例就行。然后使用适合于特定的可检测的报告部分或标记的方法,确定仍然结合在固相支持物上的第二抗体的量。对于放射活性基团来说,闪烁计数或放射自显影方法通常是适合的。可以使用各种偶联技术来制备抗体-酶偶联物(综述参见,例如Scouten, W.H., *Methods in Enzymology* 135:30-65, 1987)。光谱方法可用于检测染料(包括,例如,酶反应的可比色产物)、发光基团和荧光基团。生物素可以使用与不同的报告基团(通常为放射活性或荧光基团或酶)偶联的亲合素或链亲合素来检测。酶报告基团一般可以通过加入底物(一般进行特定的时间段),然后对反应产物进行分光镜、分光光度法或其它分析来检测。标准品或标准添加物可用于使用众所周知的技术确定样品中抗原的水平。

[0060] 在另一个实施方案中,本文公开的方法考虑到了使用本文提供的HE4a抗原多肽,通过检测来自生物来源或对象的生物样品中免疫特异性的反应性抗体来筛查恶性肿瘤病症的存在。根据本实施方案,HE4a抗原多肽(或其包含本文提供的截短的HE4a抗原多肽的片段或变体)被可检测地标记,并与生物样品相接触,以检测样品中以可溶形式天然存在的抗体与HE4a抗原多肽的结合。例如,可以使用本文公开的序列配合众所周知的方法例如在体外翻译过程中掺入易于检测的(例如放射性标记的)氨基酸、或者通过使用其它可检测的报告部分例如在上面描述的那些,以生物合成来标记HE4a抗原多肽。不希望受到理论的束缚,本文公开的方法的本实施方案考虑到了本文公开的某些HE4a多肽例如HE4a融合多肽,可以提供具有特定免疫原性的肽,因此产生了特异性的和可检测的抗体。例如,根据该理论,某些HE4a融合多肽可以代表能够唤起强烈的免疫反应的“非自身”抗原,而缺少融合结构域的HE4a多肽可能被免疫系统视为更类似“自身的”抗原,不容易引发体液或细胞介导的免疫。

[0061] 正如上面注意到的那样,本文公开的方法部分涉及令人吃惊的发现,即可溶形式的HE4a抗原多肽在对象中天然存在,包括在患有某些癌症的对象中这类可溶性HE4a多肽的水平升高了。

[0062] 根据本文公开的方法,筛查恶性肿瘤病症的存在的方法可以通过在来自对象的生物样品中对一个以上肿瘤相关标记物进行检测来进一步加强。因此,本文公开的方法的某些实施方案提供了筛查的方法,该方法除了检测天然存在的可溶性样品成分与特异性针对HE4a抗原多肽的抗体的反应性之外,还包括使用本技术领域已知的和本文提供的已建立的方法检测至少一种恶性肿瘤病症的其它溶性标记物。正如前面注意到的那样,目前有许多可溶性肿瘤相关抗原可以在容易获得的生物流体样品中检测到。例如,本文公开的方法

的某些实施方案涉及人类间皮素多肽,其包括了例如新的可溶的间皮素相关抗原(MRA)多肽这样的多肽,它们被描述在Scholler等(1999Proc.Nat.Acad.Sci.USA96:11531)中以及还描述于美国专利No.6,770,445中。

[0063] 正如本文提供的那样,“间皮素多肽”是可溶性的多肽,具有含有下面的肽的氨基酸序列:

[0064] 1EVEKTACPSGKKAREIDES SEQ ID NO:14

[0065] 并还具有至少一个与至少一种具有抗原结合位点的抗体具有反应性的抗原性决定簇,该抗体竞争性地抑制MAb K-1 (Chang等1996Proc.Nat.Acad.Sci.USA93:136;MAb K-1可以从例如Signet Laboratories,Inc.,Dedham,Mass.获得)或在美国专利No.6,770,445中提供的单克隆抗体0V569、4H3、3G3或1A6的免疫特异性结合。

[0066] 因此,这些根据本文公开的方法使用的其它可溶性肿瘤相关抗原可以包括但不必限于间皮素和间皮素相关抗原、CEA、CA125、唾液酸化TN、SCC、TPS和PLAP (参见,例如Bast等,1983N.Eng.J.Med.309:883;Lloyd等,1997Int.J.Canc.71:842;Sarandakou等,1997ActaOncol.36:755;Sarandakou等,1998Eur.J.Gynaecol.Oncol.19:73;Meier等,1997Anticanc.Res.17 (4B):2945;Kudoh等,1999Gynecol.Obstet.Invest.47:52;Ind等,1997Br.J.Obstet.Gynaecol.104:1024;Bell等,1998Br.J.Obstet.Gynaecol.105:1136;Cioffi等,1997Tumori83:594;Meier等,1997Anticanc.Res.17 (4B):2949;Meier等,1997Anticanc.Res.17 (4B):3019),并还可以包括任何已知的标记物,所述标记物在生物样品中的存在可以与本文提供的至少一种恶性肿瘤病症的存在相关联。

[0067] 或者,编码HE4a多肽的核酸序列可以使用标准杂交和/或聚合酶链反应(PCR)技术来检测。本技术领域的普通专业人员可以根据本文提供的HE4a cDNA序列来设计适合的探针和引物。分析一般来说可以使用从生物来源获得的多种样品中的任何一种来进行,这些生物来源例如真核细胞、细菌、病毒、从这些生物体制备的提取物以及在活生物体中发现的流体。

[0068] 实施例

[0069] 一般方法

[0070] 在实施例中使用的标准重组DNA和分子克隆技术在本技术领域是众所周知的,描述在Sambrook,J.,Fritsch,E.F.和Maniatis,T.的《分子克隆:实验室手册》Molecular Cloning:A Laboratory Manual;ColdSpring Harbor Laboratory Press;Cold Spring Harbor,(1989) (Maniatis)和T.J.Silhavy,M.L.Bennan,和L.W.Enquist的《基因融合实验》Experiments with Gene Fusions,Cold Spring Harbor Laboratory,ColdSpring Harbor,N.Y.(1984)以及Ausubel,F.M.等的《分子生物学现代方法》Current Protocols in Molecular Biology,Green Publishing Assoc.and Wiley-Interscience出版(1987)中。

[0071] 缩写的意义如下:“h”表示小时,“min”表示分钟,“sec”表示秒,“d”表示天,“mL”表示毫升,“L”表示升,“U”表示单位,“pM”表示皮摩尔,“ROC”表示接受者操作特征,“AUC”表示曲线下的面积,“StDev”表示标准偏差,“Min”表示最小值,“Max”表示最大值,“p”表示p-值。

[0072] 现在将参考下面的实施例对本公开的主题进行描述。提供这些实施例的目的仅仅是为了说明,而主题不限于这些实施例,而是应该包括所有明显是本文提供的指导的结果的变体。

[0073] 实施例1

[0074] 新的血清肿瘤标记物HE4相对于CA-125在患有子宫内膜癌的患者中的应用

[0075] 在美国,每年诊断出大约40,880例子宫癌新病例,导致7,310人死亡。对子宫癌进行的外科分期表明75%的患者患有I期疾病。在患有晚期疾病的患者中,75%的血清CA-125水平升高,而在患有早期疾病的患者中仅为17%。CA-125在检测复发疾病中的用途充其量来说也是有限的。仅仅25%患有无症状复发疾病的患者的CA-125升高。指示早期复发疾病的更好标记物是需要的。本研究的目的是考查新的血清肿瘤标记物HE4的值,并将它与CA-125作为子宫内膜癌的标记物进行比较。

[0076] 现在描述在本实施例中使用的方法。

[0077] 这是一项IRB批准的前瞻性研究,比较了在因为良性疾病或子宫癌而将要经历切除子宫和卵巢的外科手术的患者的HE4和CA-125。从所有的患者获得了知情同意书。在手术前抽取血液样品,在抽取后4小时内收集血清并冷冻到-80℃。使用Fujirebio Diagnostics Inc.的分析方法测定HE4和CA-125水平。然后将外科病理结果与肿瘤标记物水平进行比较。对于每种肿瘤标记物建立ROC曲线。

[0078] 现在描述本实施例的实验的结果。

[0079] 在方案中总共征集了221位患者,128例良性和93例子宫内膜癌。子宫内膜癌患者具有下列的外科阶段:I期62例、II期4例、III期19例、IV期8例。子宫内膜癌患者的平均HE4是161pM(15到1052),而良性疾病患者为49.3pM(14到254)。子宫内膜癌患者的平均CA-125是52U/ml(3到1427),良性疾病患者是46U/ml(3到773)。对于每个类型计算了HE4和CA-125的ROC曲线的AUC,并进行了比较(表1)。

[0080] 表1

ROC 曲线的 AUC			
	HE4a (AUC)	CA-125 (AUC)	p-值
良性对子宫内膜癌	79%	54%	<0.001
[0081] 良性对 I 期	76%	48%	<0.001
良性对 II 期	88%	69%	0.253
良性对 III 期	86%	66%	0.002
良性对 IV 期	86%	66%	0.006

[0082] 根据本文提供的信息,可以得出结论,在子宫内膜癌的所有阶段中HE4都升高了,并且与CA-125相比在检测所有阶段的子宫内膜癌中都具有较高的灵敏度。HE4可以用在子宫内膜癌患者中作为早期复发疾病的标记物。

[0083] 实施例2

[0084] 现在描述在本实施例中使用的方法。

[0085] 从妇幼医院/布朗大学(Women and Infants Hospital/BrownUniversity)征集进入IRB批准的前瞻性方案的患者中以及从德克萨斯大学MD Anderson癌症中心(The University of Texas MD AndersonCancer Center)的IRB批准的血清库中获得血清样品。

在收集研究用的血液样品之前,所有进入方案的患者都签署了知情同意书。所有的血液样品在马上进行手术前收集并离心,在收集后4小时内取出血清并冷冻到-80℃。随后所有的患者经历了外科手术,手术由探测性剖腹术以及子宫切除术与双侧卵巢输卵管切除术以及全外科分级包括清洗、以及骨盆和主动脉周围的淋巴结清除术组成。从妇幼医院获得的血清样品在Fujirebio Diagnostics Inc的实验室进行分析。从MD Anderson癌症中心获得的样品就地分析。正常的对照样品从健康患者获得。使用Fujirebio Diagnostic Inc的分析方法测定了CA125、HE4、CA72.4和SMRP的肿瘤标记物血清水平和尿SMRP水平。对于每种肿瘤标记物建立了ROC曲线,在特异性设置为95%的情况下确定了敏感性。

[0086] 现在描述本实施例的结果。

[0087] 从患有外科分期的子宫内膜癌患者获得了233份血清样品,从健康对照者获得了156份血清样品。

[0088] 在患有外科分期的子宫内膜癌患者的组中,有151例I期、21例II期、47例III期和14例IV期。对于健康对照者、外科I期患者和外科II到IV期患者计算了每个被分析的标记物的平均血清肿瘤标记物水平,显示在(表2)中。对于每种标记物确定了CA125、HE4、CA72.4、SMRP和尿SMRP水平的ROC曲线下面积(ROC-AUC)(表3)。使用对数回归分析,在特异性设置为90%、95%和98%下,独立地和在各种不同组合中对子宫内膜癌样品和对照的每种肿瘤标记物进行了比较(表4、5和6)。对于个体标记物区分对照和子宫内膜癌的灵敏度表明HE4表现得最好。当特异性设置为95%时,对于所有阶段的子宫内膜癌来说HE4的灵敏度为44.9%,相比之下CA125为25.2% ($p=0.0001$)。对于I期病例来说,HE4与单独的CA125相比,表现出灵敏度高出20.5% (37.1%对16.6%, $p=0.0001$) (表3)。对于患有II到IV期疾病的患者来说,当特异性设置为95%时,HE4的灵敏度上升到59.8%,比CA125高18.3% ($p=0.0001$)。

[0089] 当分析任何两种标记物的组合时,HE4和CA125或HE4和尿SMRP的组合对于所有阶段的子宫内膜癌来说将灵敏度分别提高到了48.7和49.6。在患有II到IV期疾病的患者中对HE4和CA125组合的分析表明,当特异性设置为95%时,灵敏度为69.5%。这表示灵敏度与单独使用CA125相比增加了24.4% ($p=0.0001$)。HE4、CA125和尿SMRP的组合在所有的子宫内膜癌患者中产生了最大的灵敏度增加,比单独的CA125增加了26.1%。但是,这比HE4和CA125的组合的灵敏度增加了2.6%,没有显著意义。也发现了在患有I期子宫内膜癌的患者中HE4比CA125具有更高的灵敏度,灵敏度分别为37.1%对16.6%。HE4和CA-125的组合也将灵敏度增加到了39.1%,超过CA125。但是,HE4、CA125和尿SMRP的组合在患有I期疾病的患者中表现最好,灵敏度为44.7%,将灵敏度增加到超过单独使用CA125的灵敏度28.1% ($p=0.0001$)。

[0090] 表2

[0091]

诊断	血清 CA125					
	N	平均	StDev	Min	Max	中值
正常	156	13.9	9.8	3.3	73.6	11.2
子宫内膜癌 (I 期)	151	22.4	35.4	3.0	402.2	13.9
子宫内膜癌 (II-IV 期)	82	75.5	178.5	1.8	1426.6	24.0
所有子宫内膜癌	234	41.0	112.0	1.8	1426.6	16.5
诊断	血清 HE4					
	N	平均	StDev	Min	Max	中值
正常	156	39.7	18.7	18.0	127.8	35.4
子宫内膜癌 (I 期)	151	107.9	172.3	1.1	1523.0	61.0
子宫内膜癌 (II-IV 期)	82	221.6	487.9	9.2	4062.7	95.4
所有子宫内膜癌	234	147.3	323.9	1.1	4062.7	70.7
诊断	血清 CA72-4					
	N	平均	StDev	Min	Max	中值
正常	153	3.0	3.6	0.9	24.4	1.6
子宫内膜癌 (I 期)	151	4.4	22.8	0.8	280.3	1.8
子宫内膜癌 (II-IV 期)	82	5.3	11.1	0.5	69.5	2.4
所有子宫内膜癌	234	4.7	19.5	0.5	280.3	1.9
诊断	血清 SMRP					
	N	平均	StDev	Min	Max	中值
正常	156	0.7	0.4	0.1	2.2	0.6
子宫内膜癌 (I 期)	151	0.8	1.2	0.0	13.3	0.6
子宫内膜癌 (II-IV 期)	82	0.6	0.5	0.0	3.4	0.6
所有子宫内膜癌	234	0.8	1.0	0.0	13.3	0.6
诊断	尿 SMRP					
	N	平均	StDev	Min	Max	中值
正常	104	0.0	0.1	0.0	0.5	0.0
子宫内膜癌 (I 期)	150	0.3	0.6	0.0	4.0	0.1
子宫内膜癌 (II-IV 期)	81	0.4	0.9	0.0	4.7	0.1
所有子宫内膜癌	232	0.3	0.7	0.0	4.7	0.1

[0092] 表3

[0093]

标记物	ROC-AUC(正常 vs. 子宫内膜癌)		
	I 期	II-IV 期	所有阶段
CA125	61.5%	76.3%	66.7%
HE4	76.5%	83.5%	78.7%
CA72-4	49.5%	60.9%	53.5%
SMRP	52.2%	50.6%	51.0%
尿 SMRP	70.4%	74.2%	71.6%
CA125 & HE4	76.4%	85.9%	79.1%
CA125 & CA72-4	60.8%	76.7%	66.2%
CA125 & SMRP	61.0%	79.3%	66.9%
CA125 & 尿 SMRP	75.9%	81.5%	77.6%
HE4 & CA72-4	76.8%	83.6%	78.9%
HE4 & SMRP	76.6%	84.4%	78.8%
HE4 & 尿 SMRP	77.3%	84.6%	79.5%
CA125 & HE4 & CA72-4	76.6%	85.7%	79.3%
CA125 & HE4 & SMRP	76.6%	88.3%	79.6%
CA125 & HE4 & 尿 SMRP	78.0%	85.9%	80.3%
CA125 & CA72-4 & SMRP	60.1%	79.6%	66.2%
HE4 & CA72-4 & SMRP	76.8%	84.3%	79.0%
HE4 & CA72-4 & 尿 SMRP	77.4%	84.7%	79.5%
CA125 & CA72-4 & 尿 SMRP	75.3%	81.2%	77.1%
CA125 & HE4 & CA72-4 & SMRP	76.8%	88.0%	79.7%
CA125 & HE4 & CA72-4 & 尿 SMRP	77.9%	85.9%	80.1%
CA125 & HE4 & CA72-4 & SMRP & 尿 SMRP	78.4%	89.7%	81.0%

[0094] 表4

[0095]

标记物组合	正常 vs. 所有子宫内膜癌：灵敏度		
	90%特异性	95%特异性	98%特异性
CA125	35.9%	25.2%	16.7%
HE4	55.6%	44.9%	35.5%
CA72-4	9.4%	6.8%	3.4%
SMRP	9.8%	6.8%	3.4%
尿 SMRP	37.5%	25.9%	19.8%
CA125 & HE4	59.8%	48.7%	39.7%
CA125 & CA72-4	35.0%	24.8%	17.1%
CA125 & SMRP	35.0%	24.4%	17.1%
CA125 & 尿 SMRP	44.0%	35.3%	24.6%
HE4 & CA72-4	56.0%	44.4%	33.8%
HE4 & SMRP	53.4%	43.6%	35.0%
HE4 & 尿 SMRP	59.9%	49.6%	48.3%
CA125 & HE4 & 尿 SMRP	61.6%	51.3%	46.1%
HE4 & CA72-4 & 尿 SMRP	58.6%	50.0%	47.4%

[0096] 表5

[0097]

标记物组合	正常 vs.所有子宫内膜癌 (I 期) : 灵敏度		
	90%特异性	95%特异性	98%特异性
CA125	26.5%	16.6%	8.6%
HE4	49.0%	37.1%	28.5%
CA72-4	6.6%	4.6%	2.0%
SMRP	11.9%	7.9%	4.6%
尿 SMRP	36.0%	23.3%	16.7%
CA125 & HE4	51.7%	39.1%	29.8%
CA125 & CA72-4	26.5%	16.6%	10.6%
CA125 & SMRP	27.2%	13.2%	9.9%
CA125 & 尿 SMRP	36.0%	28.7%	20.0%
HE4 & CA72-4	49.7%	37.1%	27.2%
HE4 & SMRP	47.7%	37.1%	27.2%
HE4 & 尿 SMRP	54.0%	43.3%	40.0%
CA125 & HE4 & 尿 SMRP	56.7%	44.7%	40.7%
HE4 & CA72-4 & 尿 SMRP	54.0%	42.0%	40.0%

[0098] 表6

[0099]

标记物组合	正常 vs.所有子宫内膜癌 (II-IV 期)：灵敏度		
	90%特异性	95%特异性	98%特异性
CA125	53.7%	41.5%	31.7%
HE4	68.3%	59.8%	48.8%
CA72-4	14.6%	11.0%	6.1%
SMRP	6.1%	4.9%	1.2%
尿 SMRP	40.7%	30.9%	25.9%
CA125 & HE4	73.2%	65.9%	52.4%
CA125 & CA72-4	46.3%	39.0%	32.9%
CA125 & SMRP	56.1%	40.2%	29.3%
CA125 & 尿液 SMRP	53.1%	45.7%	42.0%
HE4 & CA72-4	69.5%	59.8%	48.8%
HE4 & SMRP	68.3%	56.1%	46.3%
HE4 & 尿 SMRP	69.1%	67.9%	59.3%
CA125 & HE4 & 尿 SMRP	74.1%	66.7%	56.8%
HE4 & CA72-4 & 尿 SMRP	69.1%	67.9%	60.5%

[0100] 在本文中引用的每个专利、专利申请和出版物的公开内容在此以其全文引为参考。

[0101] 尽管已经参考具体的实施方案公开了本发明的主题,但是显然本技术领域的其它专业人员可以设计出其它的实施方案和修改,而不背离本文描述的主题的真实精神和范围。随附的权利要求包含了所有这样的实施方案和等同修改。

-
- [0001] 序列表
- [0002] <110>富士瑞必欧美国公司
- [0003] <120>HE4与其它生化标记物在评估子宫内膜癌和子宫癌中的应用
- [0004] <130>SCT082977-00
- [0005] <140>PCT/US07/00215
- [0006] <141>2007-01-04
- [0007] <150>US 60/756,131
- [0008] <151>2006-01-04
- [0009] <160>14
- [0010] <170>PatentIn version 3.3
- [0011] <210>1
- [0012] <400>1
- [0013] 000
- [0014] <210>2
- [0015] <400>2
- [0016] 000
- [0017] <210>3
- [0018] <400>3
- [0019] 000
- [0020] <210>4
- [0021] <400>4
- [0022] 000
- [0023] <210>5
- [0024] <400>5
- [0025] 000
- [0026] <210>6
- [0027] <400>6
- [0028] 000
- [0029] <210>7
- [0030] <400>7
- [0031] 000
- [0032] <210>8
- [0033] <400>8
- [0034] 000
- [0035] <210>9
- [0036] <400>9
- [0037] 000
- [0038] <210>10

