[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580007273.8

[51] Int. Cl.
G01N 1/00 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 3 月 14 日

[11] 公开号 CN 1930461A

[22] 申请日 2005.1.10
[21] 申请号 200580007273.8
[30] 优先权
[32] 2004. 1. 9 [33] US [31] 60/535,306
[86] 国际申请 PCT/US2005/000714 2005.1.10
[87] 国际公布 WO2005/071387 英 2005.8.4
[85] 进入国家阶段日期 2006.9.6
[71] 申请人 儿童医疗中心有限公司
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 M·A·莫塞斯 R·罗伊
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘 玥
权利要求书 2 页 说明书 32 页 附图 7 页

[54] 发明名称

上皮源性癌症的诊断及预后方法

[57] 摘要

上皮源性癌症例如乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌和皮肤癌以及其它癌症的患者的 ADAM12 表达及活性被上调。 因此，本发明涉及上皮源性癌症预后评价及诊断的方法。 具体地说，生物样品中存在 ADAM 12 说明存在上皮源性癌症。 另外，在生物样品例如尿液中所检测到的 ADAM 12 蛋白量与疾病状态有关，因此 ADAM 12 水平可用于预测癌症的存在及其转移潜力。 因此，测量生物样品(例如尿液或血液)中 ADAM 12 的水平，提供了快速、方便、安全的筛选，这既可用于诊断又可用于预测患者的癌症。

1. 一种帮助诊断上皮源性癌症患者的方法，该方法包括:

a. 获得患者的生物样品；和

b. 检测所述生物样品中是否存在解联蛋白和金属蛋白酶结构域12 (ADAM 12);

其中存在 ADAM 12 说明存在上皮源性癌症。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述生物样品选自血液、组织、血清、尿液、大便、痰液、脑脊液、乳头吸出液和来自细胞裂解物的上清液。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述生物样品为尿液。

4. 一种诊断患者上皮源性癌症的方法，该方法包括:

a. 测量来自所述患者的试验样品中存在的 ADAM 12 水平

b. 将所述试验样品中的 ADAM 12 水平与对照样品中存在的ADAM 12 水平进行比较;

其中试验样品中的 ADAM 12 水平高于对照样品中的 ADAM 12 水平，说明存在上皮源性癌症。

5. 权利要求 4 的方法，其中所述试验样品和所述对照样品选自血液、组织、血清、尿液、大便、痰液、脑脊液、乳头吸出液和来自细胞裂解物的上清液。

6. 权利要求 4 的方法，其中所述试验样品和对照样品为尿液。

7. 一种用于怀疑患有或患有上皮源性癌症的患者预后评价的方法，该方法包括:

a. 测量从所述患者获得的试验样品中存在的 ADAM 12 水平;

b. 将步骤(a)所测定的水平与对照样品中的 ADAM 12 水平进行比较；和

c. 根据步骤(b)的比较评价所述患者的预后，其中所述试验样品中的 ADAM 12 水平是对照样品中的 ADAM 12 水平的至少 3 倍，说明存在攻击形式的癌症，因此预后不良。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述试验样品选自血液、组织、血清、尿液、大便、痰液、脑脊液、乳头吸出液和来自细胞裂解物的上清液。

9. 权利要求 1、4 或 7 中任一项的方法，其中所述上皮源性癌症选自乳腺癌、基底细胞癌、腺癌、胃肠癌、唇癌、口腔癌、食管癌、小肠癌、胃癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌、皮肤癌、前列腺癌和肾细胞癌。

10. 权利要求 1 的方法，其中用特异性结合 ADAM 12 的基于抗体的结合部分检测 ADAM 12 的存在与否。

11. 权利要求 4-7 中任一项的方法，其中所述 ADAM 12 水平通过测量 ADAM 12 蛋白水平来测量。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述 ADAM 12 蛋白水平通过包括下述步骤的方法来测量:

a. 使所述试验样品或其制备物与特异性结合 ADAM 12 的基于抗体的结合部分接触，以形成抗体-ADAM 12 复合物；和

b. 检测所述复合物的存在，由此来测量存在的 ADAM 12 水平。

13. 权利要求 10 或 12 的方法，其中所述基于抗体的结合部分用可检测标记物来标记。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述标记物选自放射性标记物、半抗原标记物、荧光标记物和酶标记物。

15. 权利要求 10 或 12 的方法，其中所述基于抗体的结合部分为抗体。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述抗体为单克隆抗体。

17. 一种检测尿液样品 ADAM 12 的试剂盒，该试剂盒包括装有尿液样品和至少一种特异性结合 ADAM 12 的抗体的容器。

18. 权利要求 17 的试剂盒，其中所述试剂盒包含两种与 ADAM 12 特异性结合的抗体，其中一种抗体固定在固相上，另一种抗体被可检测地标记。

19. 权利要求 17 的试剂盒，该试剂盒还包括使用说明书。

上皮源性癌症的诊断及预后方法

交叉引用

根据 35 U.S.C §119(e)，本申请要求于 2004 年 1 月 9 日申请的美国专利临时申请第 60/535,306 号的权益。

发明领域

本发明涉及通过评价从患者得到的生物样品中 ADAM 12 水平来诊断及预测上皮源性癌症的方法。

发明背景

癌症幸存者最重要的因素之一是早期检测。检测癌症早期活动的临床分析提供干预及预防癌症进展的机会。随着基因概况分析及蛋白质组学的发展，在鉴定可用于诊断及预测特定癌症的分子标记或“生物标记”方面已取得了显著的进步。举例而言，在前列腺癌中，可在血液中检测抗原 PSA (为前列腺特异性抗原)，而其存在说明存在前列腺癌。因此，可快速、方便、安全地筛选出具前列腺癌风险的男人血液中升高的 PSA 水平。

即使癌症检测领域已取得了显著的进步，在该领域中仍需要有可方便地用于临床应用的鉴定各种癌症的新生物标记。举例而言，迄今为止方便地使用可检测生物标记来诊断乳腺癌的有用选择相当少。过量表达 EGFR (尤其是与雌激素受体下调相关)为乳腺癌患者预后不良的标记。其它已知的乳腺癌标记包括血液中高水平 M2 丙酮酸激酶(M2 PK) (美国专利第 6,358,683 号)、血液中高 ZNF217 蛋白水平(WO 98/02539)及乳腺癌中新鉴定的蛋白 PDEBC 的差别表达，该蛋白可用于诊断(美国专利申请第 20030124543 号)。这些生物标记提供可供选择的诊断方法，然而，却不能被广泛应用。而且，尽管使用

众多组织化学、遗传学和免疫学标记，临床医生预测肿瘤将转移至其它器官仍有一段困难时间。

ADAM 12 (解联蛋白和金属蛋白酶结构域 12 (a disintegrin and metalloproteinase domain 12))，已知通过多配体蛋白聚糖(syndecan)和整联蛋白相互作用介导细胞粘着及扩散，最近已暗示其作为肝癌的肿瘤攻击性及进展的标记(Pabic 等，Hepatology (2003), 第 37 卷, (5): 1056-1066)。然而，在该研究中 ADAM 12 水平检测需要活组织检查，且未公开有关血清或尿液中 ADAM 12 的检测。因此，由 Pabic 等人公开的 ADAM 12 显然不能作为易于检测的生物标记。

鉴定生物标记尤其与改进疾病的诊断、预后和治疗有关。因此，在本领域需要鉴别可快速、方便、安全地检测的可供选择的生物标记。此生物标记可用于乳腺癌患者的诊断、分期或监测其进展或治疗，尤其是对该疾病的侵袭、潜在转移期。

发明概述

本发明基于 ADAM 12 (存在有活性及潜伏期两种)蛋白存在于上皮源性癌症患者的尿液中及在上皮源性癌症患者中 ADAM 12 表达和活性上调这一令人惊讶的发现，所述上皮源性癌症例如有乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌和皮肤癌以及其它癌症。因此，本发明涉及预后评价、帮助诊断上皮源性癌症及作为治疗功效标记的方法。具体地说，生物样品例如尿液中所检测的 ADAM 12 蛋白的量与疾病状态有关，致使 ADAM 12 水平可用于预测癌症的存在以及转移潜力。因此，生物样品(例如尿液或血液)中 ADAM 12 水平的测量提供快速、方便、安全的筛选，这既可用于诊断又可用于预测患者的上皮源性癌症例如乳腺癌。

在一个实施方案中，提供帮助诊断患者上皮源性癌症的方法。该方法包括从患者获得生物样品且检测该生物样品中是否存在 ADAM 12 (或其片段)，其中存在 ADAM 12 说明存在上皮源性癌症。

在另一个实施方案中，该方法包括测量来自患者的试验生物样品中存在的 ADAM 12 水平，将所测得的 ADAM 12 水平与同样类型对照样品中存在的 ADAM 12 水平进行比较。试验样品中的 ADAM 12 水平高于对照样品中的 ADAM 12 水平，说明存在癌症。本发明方法优选用于上皮源性癌症(尤其是乳腺癌)的早期检测。举例而言，患者可在每年体检期间每年由医生筛选出来。

术语“对照样品”是指从认为没有癌症的“正常”或“健康”个体获得的生物样品。可用本领域熟知方法来选择对照。一旦对照群体水平适当地确立了，来自试验生物样品的数组结果可直接与已知水平进行比较。

术语“试验样品”是指从待测上皮源性癌症患者获得的生物样品。

举例而言，生物样品可从血液、组织(例如肿瘤或乳腺)、血清、大便、尿液、痰液、脑脊液、乳头吸出液(nipple aspirates)和来自细胞裂解物的上清液中获得。一种优选的生物样品为尿液。

一方面，待诊断的上皮源性癌症有乳腺癌、基底细胞癌、腺癌、胃肠癌(例如唇癌、口腔癌、食管癌、小肠癌和胃癌)、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌和皮肤癌(例如鳞状细胞癌和基底细胞癌)、前列腺癌、肾细胞癌及已知通过身体影响上皮细胞的其它癌症。

在另一个实施方案中，本发明提供怀疑患有或患有上皮源性癌症的患者的预后评价方法。该方法包括下述步骤：i)测量从该患者获得的试验样品中存在的 ADAM 12 水平；ii)将该试验样品中的 ADAM 12 水平与同样类型的生物样品中存在的已知 ADAM 12 蛋白水平进行比较，该同样类型的生物样品从认为没有癌症的健康患者获得(对照样品)；iii)基于该比较评价该患者预后，若试验样品中 ADAM 12 水平是对照样品水平的至少 3 倍，则说明患有攻击形式(aggressive form)的癌症(例如转移或侵袭(invasive)形式的癌症)，因此预后不良。

本发明也涉及评价从同一患者获得的多种试验样品中存在的ADAM 12水平，若随时间ADAM 12含量进行性增加，则说明癌症肿瘤攻击性(例如转移潜力)增加。因此，ADAM 12水平作为疾病状态及病期的预报器(predictor)。

本发明还涉及评价ADAM 12水平以监测设计为治疗上皮源性癌症患者的治疗方案的治疗功效。

在一个优选实施方案中，所述生物样品为尿液样品。然而，也可使用血液、组织、血清、大便、痰液、脑脊液、乳头吸出液和来自细胞裂解物的上清液等生物样品。

在本发明的一方面，试验生物样品中存在的ADAM 12水平通过将该试验样品或其制备物与基于抗体的结合部分接触来测量，该部分可与ADAM 12蛋白或其部分特异性结合。基于抗体的结合部分与ADAM 12形成可检测的复合物，由此来测量ADAM 12水平。

基于抗体的免疫测定是测量ADAM 12蛋白水平的优选手段。然而，任何本领域技术人员已知的手段皆可用于评价ADAM 12水平。举例而言，在某些实施方案中ADAM 12表达水平可通过测量ADAM 12 mRNA转录物水平来检测。或者，ADAM 12水平可通过质谱分析法(包括SELDI质谱分析法)来评价。ADAM 12水平也可通过生物学活性分析来评价，包括但不限于底物凝胶电泳。

在另一个实施方案中，本发明提供包含测量生物样品中ADAM 12的手段的试剂盒。

本发明其它方面在下文中公开。

附图简述

附图结合到本发明说明书中并构成本发明说明书的一部分，用于举例说明本发明的实施方案，与本发明说明书共同起着解释本发明的目的、优势和原理的作用。

图1显示从乳腺癌患者获得的尿液样品与从未患乳腺癌且年龄

及性别相当的正常对照获得的尿液样品比较的 ADAM 12 的免疫印迹分析。

图 2 显示从各期乳腺癌患者获得的尿液样品与从正常健康个体获得的尿液样品中的 ADAM 12 水平比较的 ADAM 12 免疫印迹分析。第 11 泳道表示纯重组 ADAM 12，包括该蛋白的 92 kDa 潜伏形式和 68 kDa 成熟形式。

图 3 显示所有样品免疫印迹光密度测定法的柱状图。该柱状图指出晚期乳腺癌尿液中 ADAM 12 中位水平增加。误差条表示标准误差(*, p, 0.01，方差分析)。

图 4 显示阐明存在 ADAM 12 与乳腺癌之间相关性存在的图表。94%癌症患者的尿液样品为 ADAM 12 阳性，相比之下，正常尿液样品中明显低频率检出 ADAM 12 (15%)。

图 5 显示 ADAM 12 的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)。

图 6 显示乳腺癌组和对照组中尿液有 ADAM 12 的患者百分比。将对照样品的平均光密度分值作为阈值，计算相对于该对照组各癌症组的阳性百分比。

图 7 显示基于逻辑斯谛回归分析的理论曲线，阐明基于 ADAM 12 水平升高患乳腺癌的概率(相对于正常)。该概率曲线叠加在 ADAM 12 水平特定区间的对照和乳腺癌患者百分比($p<0.00001$)。x 轴表示 ADAM 12 水平区间，y 轴表示各区间内患者和对照的实际百分比。

发明详述

我们已发现，患者生物样品中存在的 ADAM 12 水平与上皮源性癌症存在与否相关。另外，已确定高水平 ADAM 12 与癌症肿瘤的攻击性和转移潜力相关。

本文所用的“上皮源性癌症”是指起于上皮细胞的癌症，包括但不限于乳腺癌、基底细胞癌、腺癌、胃肠癌、唇癌、口腔癌、食管癌、小肠癌和胃癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、

宫颈癌、肺癌、乳腺癌和皮肤癌例如鳞状细胞和基底细胞癌、前列腺癌、肾细胞癌及其它已知通过身体影响上皮细胞的癌症。

术语“攻击性(aggressive)”或“侵袭性(invasive)”，就癌症而言，是指肿瘤超过其界限扩展至邻近组织的倾向(Darnell, J. (1990), Molecular Cell Biology, 第三版, W. H. Freeman, NY)。侵袭性癌可与其中肿瘤局限于某一特定器官的器官局限性癌形成对照。肿瘤的侵袭特性通常伴有蛋白水解酶例如胶原酶的合成加工，降解基质材料和基底膜材料使得肿瘤可超过被膜界线及超过肿瘤位于其中的特定组织界线向外扩展。

本文所用的术语“转移”是指癌症从源器官扩散到患者的另外远端部位的情况。肿瘤转移过程为多步骤的活动，包括局部侵袭及破坏胞间基质，进入血管、淋巴管或其它运输通道，存在于循环中，在第二个部位溢出血管，并且在新位置生长(Fidler 等, Adv. Cancer Res. 28, 149-250 (1978), Liotta 等, Cancer Treatment Res. 40, 223-238 (1988), Nicolson, Biochim. Biophy. Acta 948, 175-224 (1988); Zetter, N. Eng. J. Med. 322, 605-612 (1990))。恶性细胞移动性增加一直与动物肿瘤以及人类肿瘤增加转移潜力有关(Hosaka 等, Gann 69, 273-276 (1978); Haemmerlin 等, Int. J. Cancer 27, 603-610 (1981))。

本文所用的“生物样品”是指从患者(优选病人)获得的生物材料样品，包括组织、组织样品、细胞样品(例如组织活检样品，例如吸出活检样品、刷拭活检样品、表面活检样品、针吸活检样品、钻取活检样品、切除活检样品、开胸腹活检样品、切开式活检样品或内窥镜活检样品)和肿瘤样品。生物样品也可为生物流体样品。在一个优选实施方案中，生物样品为尿液。然而，也可使用血液、血清、唾液、脑脊液、乳头吸出液和细胞裂解物上清液。

本发明也包括生物样品分离物在本发明方法中的用途。本文所用的生物样品“分离物”(例如组织或肿瘤样品分离物)是指已从样品中分开的、从样品中获取的、从样品中提取的、从样品中纯化的或

从样品中分离的材料或组合物(例如生物材料或组合物)，优选基本上无与生物样品相关的不需要的组合物和/或杂质或污染物。

在一个优选实施方案中，对生物样品进行处理以防降解 ADAM 12 蛋白或 ADAM 12 mRNA。抑制或防止降解的方法包括但不限于用蛋白酶或 RNA 酶抑制剂处理生物样品，冷冻生物样品或将生物样品放在冰上。优选在分析之前，将生物样品或分离物恒定保持在防止降解 ADAM 12 蛋白或 ADAM 12 RNA 的条件下。

本文所用的“组织样品”是指从受试者(优选人类受试者)获得或从受试者完整组织取出的组织的部分、小块、局部、节片或小部分。一种优选的组织样品为乳腺组织。

本文所用的“肿瘤样品”是指肿瘤的部分、小块、局部、节片或小部分，举例而言，从受试者(优选人类受试者)获得或取出(例如从受试者组织取出或提取)的肿瘤。

本文所用的“原发性肿瘤”是在受试者体内开始部位出现的肿瘤，并且可以与“转移性肿瘤”区别开来，后者出现在受试者体内远离原发性肿瘤的部位。

本文所用的“LCIS”是指小叶原位癌。LCIS 也称作小叶瘤，有时划分为非侵袭型乳腺癌。其不穿透小叶壁。尽管其本身通常不变为侵袭性癌，但患有该病的妇女在同一乳房或对侧乳房具有发生侵袭性乳腺癌的较高风险。

本文所用的“DCIS”是指导管原位癌。导管原位癌为最常见的非侵袭型乳腺癌。在 DCIS 中，恶性细胞不通过导管壁转移至乳腺脂肪组织。在乳房肿瘤切除后，粉刺癌为比其它类 DCIS 更可能回到同一部位的一类 DCIS，比起其它形式的 DCIS，与侵袭性导管癌的最终进展更密切相关。

本文所用的“ADAM 12”是指基因库(Genebank)检索号为 NM_003474 (人(Homosapiens))的 ADAM 12 蛋白(SEQ ID NO: 1) (图 5)。该术语也包括其变异体、同源物、等位形式、突变形式及其等同

物。

本发明涉及帮助诊断患者上皮源性癌症的方法。在一个实施方案中，该方法包括获得患者的生物样品，检测该生物样品中是否存在 ADAM 12 (或其片段)，其中存在 ADAM 12 说明存在上皮源性癌症。

在另一个实施方案中，该方法包括测量从怀疑患有癌症的患者获得的试验样品中的 ADAM 12 水平，将所测得的水平与对照样品中发现的 ADAM 12 水平进行比较，举例而言，对照样品为从据信未患癌症的个体患者或群体获得的样品。ADAM 12 水平高于在正常对照所测得的水平，说明存在癌症。ADAM 12 水平可用任意单位表示，例如，表示为得自光密度计、发光计或 Elisa 读板仪的单位。

本文所用的“试验样品中的 ADAM 12 水平高于对照样品中的水平”，是指 ADAM 12 含量高于对照样品中存在的 ADAM 12 含量。术语“更高水平”是指统计学显著性水平，即显著高于对照样品中存在的水平的水平。优选该“更高水平”为至少 2 倍大。说明存在攻击形式的癌症的 ADAM 12 蛋白水平，是指 ADAM 12 含量是对照样品中存在的 ADAM 12 含量的至少 3 倍，优选 5 倍至 6 倍。

术语“统计学显著性”或“显著性”是指统计学上有意义(显著性)，一般指超出正常或高于标记物浓度的两个标准差(2SD)。

为了比较的目的，试验样品和对照样品为相同类型，也就是说，均从相同生物学来源获得。对照样品也可为标准样品，其浓度与在从健康个体获得的相同类型生物样品中正常情况下发现的 ADAM 12 的浓度相同。举例而言，对于正常情况下发现于生物样品例如尿液、血液、脑脊液或组织中的 ADAM 12 含量而言，可以有标准正常对照样品。

在一个实施方案中，本文所述方法用于检测乳腺癌。任意类型的乳腺癌皆可检测。举例而言，可检测腺癌、导管原位癌(DCIS)、浸润性(或侵袭性)导管癌(IDC)、浸润性(或侵袭性)小叶癌(ILC)、炎性

乳腺原位癌、小叶原位癌(LCIS)、髓样癌、粘蛋白性腺癌、乳头佩吉特病(Paget's disease)、叶状肿瘤和小管癌。另外，任何进行性病期的乳腺癌皆可检测，例如原发性乳腺癌、转移性乳腺癌和复发性乳腺癌。例如从美国癌症学会(the American Cancer Society)或例如从Wilson等，(1991)，内科学的哈里斯原理(Harrison's Principles of Internal Medicine)，第 12 版，McGraw-Hill, Inc.)可找到关于众多类型乳腺癌的资料。

在本发明的一方面，可实施第二诊断步骤。举例而言，若发现 ADAM 12 水平就说明存在癌症，则可实施另外的检测癌症的方法，以确证存在该癌症。可使用多种另外诊断步骤中的任何一种，例如乳房 X 线照相术(乳腺癌)、超声波、PET 扫描、MRI 或任何其它显像技术、活组织检查、临床检查、管腔造影或任何其它方法。

本发明还提供怀疑患有或患有上皮源性癌症的患者的预后评价方法。该方法包括测量从患者获得的试验生物样品中存在的ADAM 12水平，将所测得的水平与在健康个体生物样品(相同类型的)中发现的正常 ADAM 12 水平范围进行比较。举例而言，高水平说明转移活性的较大的可能性及相应的不好的预后，而低水平说明肿瘤攻击性较小且对应较好的预后。

另外，通过跟踪个体患者 ADAM 12 水平可评价疾病进展。举例而言，通过比较患者随时间 ADAM 12 表达水平的变化可监测患者病症的变化。ADAM 12 水平进行性增加，说明肿瘤侵袭及转移潜力增加。

本发明预后方法也可用于确定癌症患者合适的治疗过程。治疗过程是指在癌症诊断后或治疗后对患者采取的治疗措施。举例而言，确定癌症复发、扩散或患者幸存的可能性，可帮助确定是否应该采取更为保守的或更加激进的方法来治疗，或是否应该联合治疗形式。举例而言，当癌症很可能复发时，在外科手术之前或之后用化疗、辐射、免疫疗法、生物改良疗法、基因疗法、疫苗等等治疗可能有

利，或调整患者治疗期间的时间段可能有利。

测量 ADAM 12 水平

如本文所述，可通过本领域技术人员所知的任何手段来测量 ADAM 12 水平。在本发明中，一般优选使用抗体或抗体等同物来检测生物样品中的 ADAM 12 蛋白水平。然而，检测 ADAM 12 表达的其它方法也可使用，例如通过分析 mRNA 转录物来测量 ADAM 12 表达。举例而言，当生物样品为肿瘤或组织样品时，可优选测量 ADAM 12 mRNA。

mRNA 水平的评价方法为本领域技术人员所熟知。举例而言，通过 RNA 印迹法可完成 RNA 转录物的检测，其中 RNA 制备物在变性琼脂糖凝胶上进行，并转移至合适支持物上，例如活性纤维素膜、硝酸纤维素膜或玻璃膜或尼龙膜。然后使标记(例如放射性标记)的 cDNA 或 RNA 与该制备物杂交，洗涤，并通过例如放射自显影等方法来分析。

还可用已知扩增方法来完成对 RNA 转录物的检测。举例而言，在本发明范围内可将 mRNA 逆转录为 cDNA，然后进行聚合酶链式反应 (RT-PCR)；或如美国专利第 5,322,770 号所述两步用一单酶来完成；或将 mRNA 逆转录为 cDNA，然后进行对称缺口连接酶链式反应(lipase chain reaction) (RT-AGLCR)，参见 R.L. Marshall 等，PCR Methods and Applications (PCR 方法及应用)，4: 80-84 (1994)。一种检测 ADAM 12 mRNA 转录物的合适方法描述于参考文献 Pabic 等，Hepatology, 37(5):1056-1066, 2003，所述文献的全部内容通过引用结合到本文中。

可用于本文的其它已知的扩增方法包括但不限于所谓“NASBA” 或 “3SR” 技术，描述于 PNAS USA 87: 1874-1878 (1990)，也描述于 Nature 350 (No. 6313): 91-92 (1991)；Q-β扩增法，描述于公布的欧洲专利申请(EPA)第 4544610 号；链置换扩增法，参见 G. T.

Walker 等，Clin. Chem. 42: 9-13 (1996)；欧洲专利申请第 684315 号；目标介导扩增，参见 PCT 公布的 WO 9322461。

也可采用原位杂交显现，其中放射性标记的反义 RNA 探针与活检样品薄切片杂交，洗涤，用 RNA 酶切割，对放射自显影感光乳剂曝光。所述样品可用苏木精染色以证明样品中的组织学组成，而带合适的滤光镜的暗视野图像显示感光的乳剂。也可用非放射性标记例如地高辛配基。

或者，可在 DNA 阵列、芯片或微阵列上检测 mRNA 表达。将对应于 ADAM 12 的寡核苷酸固定在芯片上，然后与从患者获得的试验样品中标记的核酸杂交。用含有 ADAM 12 转录物样品获得阳性杂交信号。DNA 阵列的制备方法及其应用在本领域已熟知(参见例如以下美国专利：第 6,618,6796 号；第 6,379,897 号；第 6,664,377 号；第 6,451,536 号；第 548,257 号；美国专利申请第 20030157485 号，Schena 等，1995 Science 20: 467-470; Gerhold 等，1999，Trends in Biochem. Sci. 24, 168-173; Lennon 等，2000，当今药物发现(Drug discovery Today) 5:59-65，上述参考文献的全部内容通过引用结合到本文中)。也可进行基因表达的系列分析(SAGE)（参见例如美国专利申请第 20030215858 号)。

举例而言，为监测 mRNA 水平，从待测生物样品中提取 mRNA，逆转录，产生荧光-标记的 cDNA 探针。然后用标记的 cDNA 探针探测能够与 ADAM 12 cDNA 杂交的微阵列，扫描载玻片，测量荧光强度。该强度和杂交强度及表达水平相关。

也可测量 ADAM 12 蛋白水平或 ADAM 12 活性，尤其是当该生物样品为流体样品例如血液或尿液时。在一个实施方案中，通过让生物样品与特异性结合 ADAM 12 或 ADAM 12 片段的基于抗体的结合部分接触，来测量 ADAM 12 蛋白水平。然后检测形成的抗体-ADAM 12 复合物，以测量 ADAM 12 水平。

术语“基于抗体的结合部分”或“抗体”包括与 ADAM 12 特异

性结合(起免疫反应)的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫学活性决定簇，例如含有抗原结合位点的分子。术语“基于抗体的结合部分”意指包括全抗体，例如任何同种型(IgG、IgA、IgM、IgE 等等)，包括也与 ADAM 12 蛋白特异性反应的抗体片段。可使用常规技术使抗体片段化。因此，该术语包括能够选择性地与某一蛋白反应的抗体分子的蛋白水解片段或重组制备的部分。此等蛋白水解和/或重组片段的非限制性实例包括 Fab、$F(ab')_2$、Fab'、Fv、dAbs 及含有由多肽接头连接的 VL 区和 VH 区的单链抗体(scFv)。所述 scFv 可共价或非共价连接形成含两个以上结合位点的抗体。因此，“基于抗体的结合部分”包括多克隆抗体、单克隆抗体或抗体的其它纯化制备物和重组抗体。术语“基于抗体的结合部分”还指包括人源化抗体、双特异性抗体及含至少一个源自抗体分子的抗原结合决定簇的嵌合分子。在一个优选实施方案中，基于抗体的结合部分被可检测地标记。

本文所用的“标记抗体”包括以可检测的方式标记的抗体，包括但不限于酶标记抗体、放射性标记抗体、荧光标记抗体和化学发光标记抗体。也可用可检测标签例如 c-Myc、HA、VSV-G、HSV、FLAG、V5 或 HIS 标记抗体。

在本发明诊断及预后方法中使用基于抗体的结合部分检测 ADAM 12，生物样品中存在的 ADAM 12 水平与可检测标记抗体发射的信号强度相关。

在一个优选实施方案中，可通过将抗体与酶连接，来可检测地标记基于抗体的结合部分。进而当该酶与其底物接触时，将与该底物反应，其反应方式能产生可检测化学部分，举例而言，通过分光光度法、荧光测定法或通过视觉手段来检测。可用于可检测地标记本发明抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、δ-V-类固醇异构酶、酵母乙醇脱氢酶、α-甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、β-

半乳糖苷酶、核糖核酸酶、尿素酶、过氧化氢酶、葡萄糖-VI-磷酸脱氢酶、葡萄糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。化学发光是另一种可用于检测基于抗体的结合部分的方法。

使用多种其它免疫测定中的任一种也可完成检测。举例而言，通过放射性标记抗体，通过使用放射免疫测定可能检测该抗体。通过使用例如γ计数器或闪烁计数器或通过放射自显影等手段可检测放射性同位素。对本发明目的尤其有用的同位素为 ^{3}H、^{131}I、^{35}S、^{14}C，优选 ^{125}I。

用荧光化合物标记抗体也是可行的。当荧光标记的抗体暴露于合适波长的光时，由于荧光于是可检测其存在。在最常用荧光标记化合物中有 CYE 染料、异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白(phycoerytherin)、藻青蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛和荧光胺。

用发射荧光的金属例如 ^{152}Eu 或其它镧系元素也可检测地标记抗体。利用如二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)等金属螯合基团可将这些金属连接至抗体。

通过将抗体偶联到化学发光化合物，也可检测地标记抗体。然后通过检测化学反应期间产生的化学光的存在来确定化学发光抗体的存在。尤其有用的化学发光标记化合物实例为鲁米诺、萤光素、异鲁米诺、theromatic 吖啶鎓酯、咪唑、吖啶鎓盐和草酸酯。

如上所述，可通过免疫测定来检测 ADAM 12 蛋白水平，例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫放射测定(IRMA)、蛋白质印迹法或免疫组织化学，每一种方法皆更详细地在下面阐述。通常更优选可极快速测定的免疫测定例如 ELISA 或 RIA。也可采用抗体阵列或蛋白质芯片，参见例如美国专利申请第 20030013208A1 号、第 20020155493A1 号、第 20030017515 号和美国专利第 6,329,209 号、第 6,365,418 号，所述文献的全部内容通过引用结合到本文中。

免疫测定法

“放射免疫测定”是使用标记(例如放射性标记)形式的抗原来检测和测量抗原浓度的技术。抗原的放射性标记物实例包括 ^{3}H、^{14}C 和 ^{125}I。通过用生物样品中含有的抗原与标记(例如放射性)抗原竞争性结合抗该抗原的抗体，来测量生物样品中的 ADAM 12 抗原浓度。为确保在标记抗原与未标记抗原之间的竞争性结合，标记抗原以足够饱和抗体结合位点的浓度存在。样品中抗原浓度愈高，将结合该抗体的标记抗原浓度愈低。

在放射免疫测定中，为确定结合抗体的标记抗原浓度，应该将抗原-抗体复合物与游离抗原分离开来。把抗原-抗体复合物与游离抗原分离开来的一种方法是，用抗同种型抗血清沉淀该抗原-抗体复合物。把抗原-抗体复合物与游离抗原分离开来的另一方法是，用福尔马林杀死的金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)沉淀该抗原-抗体复合物。把抗原-抗体复合物与游离抗原分离开来的又一方法是，实施“固相放射免疫测定”，其中使抗体与琼脂糖凝胶珠粒、聚苯乙烯孔、聚氯乙烯孔或微量滴定孔结合(例如共价结合)。通过将与抗体结合的标记抗原浓度与基于含已知抗原浓度样品的标准曲线进行比较，可以确定生物样品中的抗原浓度。

“免疫放射测定”(IRMA)是一种抗体试剂被放射性标记的免疫测定法。IRMA 需要通过例如与蛋白例如兔血清白蛋白(RSA)缀合等技术，产生多价抗原缀合物。该多价抗原缀合物每分子必须至少有 2 个抗原残基，该抗原残基应该具有足够的间隔距离，以使至少 2 个抗体与该抗原结合。举例而言，在 IRMA 中，该多价抗原缀合物可与固体表面例如塑料球连接。将未标记“样品”抗原和抗放射性标记抗原的抗体加入到装有多价抗原缀合物包被的球体的试管中。样品中的抗原与多价抗原缀合物竞争抗原抗体结合位点。在经过适当温育后，通过洗涤除去未结合的反应物，测定固相上的放射性量。结合的放射性抗体量与样品中的抗原浓度成反比。

最普通的酶免疫测定为“酶联免疫吸附测定(ELISA)”。ELISA是使用标记(例如酶联)形式的抗体来检测和测量抗原浓度的技术。有不同形式的 ELISA，均为本领域人员所熟知。本领域已知的 ELISA 标准技术描述于“Methods in Immunodiagnosis (免疫诊断方法)”第 2 版，Rose 和 Bigazzi 编辑，John Wiley & Sons, 1980; Campbell 等，“Methods and Immunology (方法与免疫学)”，W. A. Benjamin, Inc., 1964; Oellerich, M. 1984, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22: 895-904。

在“夹层 ELISA”中，先将抗体(例如抗 ADAM 12)连接至固相(即微量滴定板)，再与含有抗原(例如 ADAM 12)的生物样品接触。然后洗涤该固相，以除去未结合的抗原。然后将标记抗体(例如酶联)结合该已结合的抗原(若存在)，形成抗体-抗原-抗体夹层。可与该抗体连接的酶的实例为碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、萤光素酶、尿素酶和β-半乳糖苷酶。该酶联抗体与底物反应，以产生可测量的有色反应产物。

在“竞争性 ELISA”中，将抗体与含有抗原(即 ADAM 12)的样品一起温育。然后让抗原-抗体混合物与已包被抗原(即 ADAM 12)的固相(例如微量滴定板)接触。样品中存在的抗原越多，可用于结合该固相的游离抗体就越少。然后将标记(例如酶联)的第二抗体加入到该固相中，以确定已结合该固相的第一抗体的量。

在“免疫组织化学分析”中，通过将组织暴露于对拟分析的蛋白质具特异性的抗体来测试组织切片的特异性蛋白质。然后通过很多方法中的任一种来显现抗体，以确定蛋白质的存在和存在量。举例而言，用于显现抗体的方法的实例有通过酶连接至抗体(例如萤光素酶、碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶或β-半乳糖苷酶)或化学方法(例如 DAB/Substrate chromagen)。

可根据专业人员的偏爱，基于本发明公开的内容，使用其它技术检测 ADAM 12。一种如此技术为蛋白质印迹法(Towbin 等, Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 4350 (1979))，其中适宜地处理的样品进行 SDS-PAGE

凝胶分离，然后转移至固体支持物例如硝酸纤维素滤膜上。然后可将可检测地标记的抗 ADAM 12 抗体用于评价 ADAM 12 水平，其中来自可检测标记物的信号强度对应于存在的 ADAM 12 量。举例而言，可通过光密度测定法来定量测定水平。

质谱法

另外，可使用质谱法检测 ADAM 12，例如 MALDI/TOF (飞行时间)、SELDI/TOF、液相层析-质谱联用(LC-MS)、气相层析-质谱联用(GC-MS)、高效液相层析-质谱联用(HPLC-MS)、毛细管电泳-质谱联用、核磁共振质谱法或串联质谱法(例如 MS/MS、MS/MS/MS、ESI-MS/MS 等等)。参见例如美国专利申请第 20030199001 号、第 20030134304 号、第 20030077616 号，所述文献通过引用结合到本文中。

质谱法为本领域所熟知，一直用于定量和/或鉴定生物分子例如蛋白质(参见例如 Li 等, (2000) Tibtech 18: 151-160; Rowley 等, (2000) Methods 20: 383-397; Kuster 和 Mann (1998) Curr. Opin. Structural Biol. 8: 393-400)。此外，质谱测定技术已发展为允许至少部分从头测定分离的蛋白质序列。Chait 等，Science 262: 89-92 (1993)；Keough 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96: 7131-6 (1999)；有关综述参见 Bergman, EXS 88: 133-44 (2000)。

在某些实施方案中，使用气相离子分光光度计。在其它实施方案中，使用激光-解吸/电离质谱法来分析样品。现代激光解吸/电离质谱法(“LDI-MS”)可以两种主要版本来实行：基质辅助激光解吸/电离(“MALDI”)质谱法和表面增强激光解吸/电离法(“SELDI”)。在 MALDI 中，被分析物与含有基质的溶液混合，将一滴液体置于基底表面。然后让基质溶液与生物分子共结晶。将该基底插入质谱仪中。激光能量对准基底表面，在此处其使生物分子解吸附并电离而不会使其明显成为片段。然而，MALDI 作为分析工具有很多限制。其不能提

供分馏样品的手段，该基质材料可干扰检测，尤其是对低分子量的分析物。参见例如美国专利第 5,118,937 号(Hillenkamp 等)和美国专利第 5,045,694 号(Beavis 和 Chait)。

在 SELDI 中，基底表面经修饰以便在解吸过程中其为主动参与者。在一版本中，该表面用吸附剂和/或选择性结合目标蛋白质的捕获剂衍生。在另一版本中，该表面用能量吸收分子衍生，当用激光撞击时该能量吸收分子不再吸收。在另一版本中，该表面用结合目标蛋白质的分子衍生，该分子含有在使用激光时断裂的光解键。在这些方法每一种中，通常将衍生剂固定于上样样品的基底表面上的特定位置。参见例如美国专利第 5,719,060 号和 WO 98/59361。举例而言，使用 SELDI 亲和表面来捕获分析物，将含有基质的液体加到所捕获的分析物上，以提供能量吸收材料，这两种方法可联合使用。

关于质谱仪的其它信息，参见例如《仪器分析原理》(Principles of Instrumental Analysis)，第 3 版，Skoog, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1985;和 Kirk-Othmer 的《化学技术百科全书》(Encyclopedia of Chemical Technology), 4.sup.th ed. Vol. 15 (John Wiley & Sons, New York 1995), 第 1071-1094 页。

检测标记物或其它物质存在，通常将包括检测信号强度。这进而又可反映结合底物的多肽的数量和特性。举例而言，在某些实施方案中，可比较来自第一样品和第二样品光谱的峰值信号强度(例如视觉上、通过计算机分析等等)，以确定具体生物分子的相对量。可使用软件程序例如生物标记 Wizard 程序(Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, Calif.)来帮助分析质谱。质谱法及其技术为本领域技术人员所熟知。

任何本领域技术人员理解质谱仪的任一种组件(例如解吸源、质谱分析仪、检测等等)和各种样品制备物可与本文所述或为本领域技术人员所知的其它合适组分或制备物联合。举例而言，在某些实施方案中，对照样品可含有重原子(例如 ^{13}C)，从而使得可在同一次质

谱测定分析中将试验样品与已知对照样品混合。

在一个优选实施方案中，使用激光解吸飞行时间(TOF)质谱仪。在激光解吸质谱法中，将结合标记物的基底引入至入口系统。解吸该标记物并通过来自电离源的激光使其电离成为气相。由离子光缆收集产生的离子，然后在飞行时间质谱分析仪中通过突然的高压电场来加速离子，使其漂流入高真空室内。在高真空室内的远端，加速的离子在不同时间撞击灵敏检测器表面。因为飞行时间是离子质量的函数，在离子形成与离子检测器撞击之间消逝的时间可用于鉴别有或无特定质荷比的分子存在。

在某些实施方案中，可部分通过用可编程数字计算机执行运算法则，来确定第一或第二样品中存在的一种或多种生物分子的相对量。运算法则至少识别第一质谱和第二质谱的一个峰值。然后运算法则将第一质谱峰值的信号强度与第二质谱峰值的信号强度进行比较。相对信号强度说明第一和第二样品中存在的生物分子量。含有已知量生物分子的标准品可作为第二样品来分析，以对第一样品中存在的生物分子的量提供更好的定量。在某些实施方案中，也可确定第一和第二样品中生物分子的身份。

在一个优选实施方案中，通过 MALDI-TOF 质谱法来测量 ADAM 12 水平。

其它分析

ADAM 12 水平也可使用其它生物分析方法来测量，举例而言，测量活性，包括但不限于酶谱法(zymography)。酶谱法是一种本领域技术人员所熟知的方法，描述于 Heusen 等，Anal. Biochem., (1980) 102:196-202; Wilson 等, Journal of Urology, (1993)149:653-658; Hernon 等，J. Biol. Chem. (1986) 261:2814-2828; Braunhut 等，J. Biol. Chem. (1994) 269:13472-13479; Moses 等，Cancer Research 58, 1395-1399, 1998 年 4 月 1 日，上述参考文献的全部内容通过引用结合到本文中。

ADAM 12 抗体

本发明使用的抗体可市购获得。或者，抗体可针对 ADAM 12 多肽或 ADAM 12 多肽部分来产生。ADAM 12 抗体的生产方法公开于 PCT 公布号 WO 97/40072 或美国专利申请第 2002/0182702 号，所述文献通过引用结合到本文中。

可使用抗体的标准产生方法来产生本发明使用的抗体，举例而言，通过单克隆抗体生产(Campbell, A.M., Monoclonal Antibodies Technology: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (单克隆抗体技术：生物化学及分子生物学的实验室技术), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands (1984); St. Groth 等, J. Immunology, (1990) 35: 1-21; Kozbor 等, Immunology Today (1983) 4: 72)。通过本领域熟知方法，使用蛋白质抗原部分来筛选抗体文库，例如噬菌体展示文库，也可易于获得抗体。举例而言，美国专利第 5,702,892 号(U.S.A. Health & Human Services)和 WO 01/18058 (Novopharm Biotech Inc.)公开了噬菌体展示文库和生产抗体结合结构域片段的选择方法。

ADAM 12 检测试剂盒

本发明也涉及检测和预后评价上皮源性癌症的商用试剂盒。该试剂盒可以是本领域普通技术人员所熟知的任何配置，用于实施一种或多种本文所述检测 ADAM 12 的方法。所述试剂盒方便使用，因为其中提供了大量(如果不是所有的)实施分析生物样品中 ADAM 12 检测的必需试剂。另外，优选用包括于试剂盒中的一种标准或多种标准同时实施测试，例如预先确定 ADAM 12 蛋白或核酸量以便该测试结果可定量或确证。

试剂盒包括检测 ADAM 12 水平的手段，例如选择性结合 ADAM 12 蛋白的抗体或抗体片段，或一套可使编码该蛋白质的 cDNA 合成的 DNA 寡核苷酸引物，举例而言，检测 ADAM 12 mRNA 表达的 DNA

探针。诊断检测试剂盒优选以标准双抗体结合形式配制，其中一种ADAM 12特异性抗体捕获患者样品中的ADAM 12，另一种ADAM特异性抗体用于检测捕获的 ADAM 12。举例而言，将该捕获抗体固定于例如测试板、测试孔、硝酸纤维素膜、珠粒、浸棒(dipstick)或洗脱柱组件等固相上。通常用可检测标记例如量热剂或放射性同位素来给第二抗体即检测抗体作标签。

在一个优选实施方案中，该试剂盒包括检测尿液样品中 ADAM 12水平的手段。在一个具体实施方案中，试剂盒包括具抗ADAM 12抗体或片段的“浸棒”，抗体固定在其上，并可特异性结合ADAM 12蛋白。然后可使用例如使用量热剂或放射性同位素可检测地标记的第二抗体，来检测特异性地结合的ADAM 12蛋白。

在其它的实施方案中，检测试剂盒可采用(但不限于)下列技术:竞争性和非竞争性测定、放射免疫测定(RIA)、生物发光和化学发光测定、荧光测定、夹层试验、免疫放射测定、斑点印迹、酶联测定(包括 ELISA)、微量滴定板和免疫细胞化学法。对每一试剂盒，测试的范围、灵敏度、准确度、可靠性、特异性和再现性均通过本领域技术人员所熟知的方法来确立。

上述检测试剂盒将还提供使用说明书。

上文及下文引用的所有参考文献都通过引用结合到本文中。

本发明由下列实施例作进一步说明。

提供这些实施例是为了帮助理解本发明，不得解释为对本发明的限制。

实施例 1 尿液 ADAM 12 与乳腺癌疾病状态和病期的相关性

ADAM (解联蛋白和金属蛋白酶)是最近发现的与蛇毒金属蛋白酶(SVMP)和基质金属蛋白酶(MMP)有关的整合膜和分泌型糖蛋白质家族。在正常发展和病理状态(例如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、类风湿性关节炎和癌症)两种情况下，该家族成员在细胞表

面重建改变、胞外结构域脱落、调节生长因子有效性方面和在介导细胞-细胞和细胞-基质之间相互作用方面显示出不同的作用。人 ADAM 12 表达为两种可变剪接形式，一种长锚定膜型(ADAM 12-L)和一种较短的分泌型(ADAM 12-S)。先前已报道在乳腺癌组织、结肠癌组织、肺癌组织和肝细胞癌组织中增加了 ADAM 12 mRNA 和蛋白质水平。我们先前已报道可检测各种不同癌症患者尿液中的基质金属蛋白酶(MMP)，其存在为一种独立的疾病状态预报器(predictor)。然而，尿液中作为疾病标记物的不同于 MMP 的其它蛋白酶的存在还没有完全弄清楚。本研究的目的是鉴定癌症患者尿液中存在的其它蛋白酶，确定它们的存在是否可能与疾病状态有关。通过联合使用层析步骤与 MALDI-TOF 质谱法，我们报告了对乳腺癌患者尿液中 ADAM 12 的检测结果。

材料与方法

尿液 ADAM 12 的鉴定

用 50 毫升尿液(总蛋白约 5 毫克)进行 ADAM 12 的初步鉴定。通过用 Amicon 膜 XM-50 (Millipore Corporation, Bedford, MA)超滤来浓缩尿液。用 2 倍体积 pH 7.5 的 50 mM Tris (缓冲液 A)稀释样品，上样到 Q 琼脂糖凝胶柱。洗涤后用缓冲液 A 中的 0-400 mM NaCl 梯度洗脱。合并含有明胶酶活性的部分，将 NaCl 浓度调节至 200 mM，与明胶琼脂糖凝胶(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)于 4℃持续振荡温育 16 小时。在洗涤步骤后，用含有 200 mM NaCl 的缓冲液 A 中的分别为 5%、10%和 20%的 DMSO 实施分级梯度洗脱。浓缩洗脱部分，通过在非还原条件下的 SDS-PAGE 分离，用 Sterling 快速银染试剂盒(National Diagnostics, Atlanta, GA)，按照厂商用法说明进行染色。检测到几条约 52 kDa、80 kDa、120 kDa 和 140 kDa 的明显的条带。从该凝胶上切下蛋白质条带，用胰蛋白酶消化，通过 MALDI 飞行时间(TOFMS)质谱法(Perceptive STR, Applied Biosystems,

Framingham, MA)分析，来确定所述蛋白质的分子量，并用 337 nm 波长的解吸激光和分析反射方式来确定胰蛋白酶消化物的肽图谱。用 MSFit (Baker, P.R.和 Clauser, K.R.)搜索程序，在 NCBI 和 Swiss-Prot 拥有的非冗余数据库中蛋白质词条构成的公共领域蛋白质 FASTA 数据库里搜索产生的肽图谱。按照所观察的肽和蛋白质的 MOWSE 分值、质量匹配百分比、分子量和数量来过滤由 MSFit 鉴别的肽匹配物。为保守鉴定蛋白质，需要至少两个具有与单个蛋白质匹配的有效分值的肽。

ADAM 12-S 的表达及纯化

将全长人 ADAM 12-S 基因克隆到质粒(p1151)中，如前述(5)转染 Cos-7 细胞(ATCC, CRL 1651)。表达的重组 ADAM 12-S 分泌到条件培养基中，如前述加上小改变来纯化。简言之，来自转染 Cos-7 细胞的条件培养基接受如(6)所述的连续的 SP 琼脂糖凝胶及 ConA 琼脂糖凝胶层析步骤。将来自 ConA 琼脂糖凝胶柱含有 ADAM 12-S 的部分合并，缓冲液交换后上样到用含有 0.05% CHAPS 的缓冲液 A 预平衡的 Vivapure H Mini Q 柱(VivaScience, Carlsbad, CA)。通过 SDS-PAGE 及免疫印迹分析来检测流通部分中的纯 ADAM 12-S。

底物特异性研究

如前述(14)测量 ADAM 12-S 降解明胶、IV 型胶原、纤连蛋白和酪蛋白的活性。将 ADAM 12-S (1 μM)与非还原性样品缓冲液混合，在含有 0.1%明胶、0.1% IV 型胶原或 0.02%纤连蛋白的 10%聚丙烯酰胺凝胶及含有 0.1%酪蛋白的 12%聚丙烯酰胺凝胶上分离。电泳后，用 2.5% Triton X-100 洗涤电泳凝胶 30 分钟。通过让电泳凝胶在 pH 7.6 的 50 mM Tris (含有 5 mM $CaCl_2$、1 μM $ZnCl_2$和 0.02% NaN_3)中于 37℃温育 18 小时，来实施底物消化。用 0.1%考马斯染色凝胶，在均衡的蓝染色背景上酶活性条带检测为清晰区带。为确定 ADAM 12 是否

具有 I 型胶原降解活性，如前述(16)用放射分析胶原酶法来分析纯酶(1 μM)。对于抑制分析，ADAM 12 (160 nM)与 30 微克明胶在测试缓冲液(50 mM Tris, pH 7.5)中于 37℃温育 18 小时，在 30 微升终体积缓冲液中有或无各种抑制剂存在：5 mM 1,10-二氮杂菲、5 mM EDTA、1 mM 马立马司他或两种不同浓度(100 nM 和 500 nM)的 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3 或 TIMP-4。加入非还原性样品缓冲液来终止反应，通过 SDS-PAGE 分析后进行考马斯染色来分辨样品。

尿液样品采集及处理

如前所述(14)实施尿液采集。样品采集于无菌容器中且立即冷冻于-20℃。按照制定的与丢弃的临床材料有关的生物伦理指导原则收集尿液。在分析之前，用 Multistix 9 尿分析试条(Bayer, Elkhart, IN)测试尿液中有无红细胞和白细胞存在，含有红细胞或白细胞的样品排除在外。用商用试剂盒(Sigma, St. Louis, MO)，按照厂商说明，测定尿液肌氨酸酐浓度。用牛血清白蛋白作为标准品，通过 Bradford 方法测定尿液蛋白质浓度。

患者群体

分析了 117 份尿液样品存在的 ADAM 12。对照组由无可辨别的疾病的 46 位妇女组成(中位年龄约 50 岁)。乳腺癌组包括 71 位诊断患有各期乳腺癌的患者，包括不典型导管增生(ADH)、小叶原位癌(LCIS)、导管原位癌(DCIS)、局部侵袭性乳腺癌(IBC)和转移性疾病(参见图 2)。

蛋白质印迹分析

在还原条件下，通过 SDS-PAGE 分离等量蛋白质(20μg)。将分离蛋白质电泳转移至硝酸纤维素膜(Schleicher 和 Schuell, Keene, NH)，如前述(15)处理。用增强化学发光(Pierce Chemical Company,

Rockford, IL)来显现标记蛋白质。使用浓度分别为 1 微克/毫升和 2 微克/毫升的人 ADAM 12、rb122 (4)、S-18 多克隆抗体(sc-16526, Santa Cruz Biotechnology, CA)。用 UN-SCAN-IT™ (Silk Scientific, Orem, UT)软件数字转换器技术，分析分离带的强度。

统计分析

用标准公式计算灵敏度、特异性、假阳性率(FPR)、假阴性率(FNR)和似然比(LR)。用逻辑斯谛回归分析比较癌症组(ADH/LCIS、DCIS、IBC 和转移性疾病)与对照之间 ADAM 12 的存在。对每一组而言，以百分比来表示 ADAM 12 的存在，根据正态近似计算 95%置信区间。用逻辑斯谛回归分析来模拟 ADAM 12 水平与乳腺癌之间的非线性关系，通过对选择的 ADAM 12 区间的最大似然估计来确定概率(17)。用 Kruskal-Wallis 检验法(其基于 Mann-Whitney U 检验成双比较)，比较对照与癌症患者之间的 ADAM 12 中位水平，而通过方差分析(ANOVA)比较平均水平。为了评价 ADAM 12 的诊断准确度，使用受试者抽检特征(ROC)曲线分析，对不同 ADAM 12 水平的所有成对的真阳性和假阳性作图。为区别所有乳腺癌患者和对照，绘制 ROC 曲线，分别为每一癌症组构建。从(0,0)陡峭上升且达到接近(0,1)的 ROC 曲线，表明测试几乎能完美区别癌症患者与对照，然而接近 45 度斜线的曲线的鉴别力很低。用 Hanley-McNeil 运算法则来确定具 95%置信区间的曲线下面积(AUC)，作为 ADAM 12 (其作为疾病的生物标记)性能指数。另外，AUC 等于将随机选择患者和对照对恰当地分类的概率。将癌症患者和对照的实际人数绘成柱状图，附加理论概率曲线以说明更高 ADAM 12 水平增加了乳腺癌的可能性。为说明 5 个独立组(根据病期的 4 个乳腺癌组和正常对照组)之间的多重比较，把保守的双尾检验准则 $P < 0.01$ (0.05 除以 5)看作是统计上显著。使用 SAS 统计软件包(6.12 版, SAS Institute, Cary, NC)实施所有统计分析。功效分析表明，每组乳腺癌期最少有 13 名患者提供 80%

的检测 ADAM 12 水平差别的功效(5.0 版, nQuery Advisor, Statistical Solutions, Boston, MA)。

结果

ADAM 12 的分离和鉴定

乳腺癌患者的尿液接受分步层析，用明胶琼脂糖凝胶实施亲和层析步骤来努力分离蛋白酶。ADAM 12 结合明胶琼脂糖凝胶珠粒这一事实支持了我们的数据(参见下文)，即该酶具有降解明胶的能力。当用 20% DMSO 上样到明胶琼脂糖凝胶柱时收集的部分含有几种独特的约 52 kDa、80 kDa、120 kDa 和 140 kDa 蛋白质条带(数据未列出)。约 120 kDa 蛋白质条带的 MALDI-TOF 分析确定其为解联蛋白和金属蛋白酶结构域 12 (ADAM 12) (检索号为 NP_003465)。鉴定出了四种截然不同的横跨人 ADAM 12 氨基酸序列的肽。所鉴别的肽的高 MOWSE 分值、质量匹配百分比和数量预测该以高置信度分析的蛋白质条带中存在 ADAM 12。为确证这些结果，分析了较大群体的尿液 ADAM 12，包括乳腺癌患者样品和年龄相当、性别一样的对照样品。浓缩尿液样品，使蛋白质标准化(每一分析使用 20 微克总蛋白质)，进行蛋白质印迹分析。在非还原性尿液样品中，多克隆 ADAM 12-特异性抗体 rb122 可识别~120 kDa 蛋白质条带(数据未列出)，然而，当用β-巯基乙醇还原该样品且煮沸 5 分钟时，可检测出~68kDa 条带。用其它 ADAM 12-特异性抗体、多克隆抗体 S18 和单克隆抗体 8F8 和 6E6 进行免疫印迹分析时得到相似的结果(数据未列出)。根据分子量，将该~68 kDa 条带鉴定为成熟形式的 ADAM 12-S (5)。根据 ADAM 12-特异性抗体可检测癌症患者尿液中蛋白质的成熟形式这一事实，通过质谱法鉴定来自 ADAM 12 前域的 2 种肽是有价值的发现。已报道即使在非还原条件下弗林蛋白酶(furin)裂解后，ADAM 12 前域仍具有与该蛋白酶的相关性(6)。这提示胰蛋白酶切割(质谱分析前的必需步骤)该成熟的与 ADAM 12 有关的前肽，导致可检测来自该前域

的 2 种肽。尽管使用 ADAM 12-特异性抗体，通过免疫印迹分析检测的蛋白质条带的大小与成熟的 ADAM 12-S 大小最相符，但多克隆抗体 rb122 识别 ADAM 12 的富半胱氨酸区，该区具有 L 和 S 二种形式的同源性。因此，我们不能排除所检测的条带为加工过的 ADAM 12-L 形式的可能性。全长 ADAM 12-L 具有报告过的~120 kDa 的质量，而成熟的(无该前肽)锚定膜形式为~90 kDa (18)。尽管通过质谱法分析的~120 kDa 种类含有全长蛋白质，但免疫印迹分析表明，尿液中的主要种类似乎为该酶的~68 kDa 的成熟形式。

ADAM 12 的底物特异性

为测试 ADAM 12 降解 ECM 蛋白的能力，将重组 ADAM 12-S 蛋白在 Cos-7 细胞中表达，如前述纯化为同质物。当通过底物酶谱法分析时，ADAM 12 可蛋白水解降解明胶。该纯化的人 ADAM 12-S 样品由表现明胶酶活性条带的该酶的~68 kDa 的成熟形式组成。放射测定胶原酶分析中检测时用底物酶谱法或 I 型胶原分析，ADAM 12 也降解纤连蛋白和 IV 型胶原，但不能降解酪蛋白(数据未列出)。ADAM 12 降解明胶的活性用于评价不同种类蛋白酶抑制剂对该酶的效果。纯 ADAM 12-S 与明胶在没有(图 2C 第 3-4 泳道)或有各种抑制剂存在时于 37℃温育 2 小时或 18 小时。~140 kDa 条带的消失表明，ADAM 12 以时间依赖方式来切割明胶。锌金属蛋白酶的典型螯合剂、EDTA 和 1,10-二氮杂菲抑制 ADAM 12 降解明胶，而加入 1 mM 马立马司他导致部分抑制酶活性。内源性抑制剂 TIMP-1、TIMP-2 和 TIMP-4 即使是在高于该酶 5 倍的浓度下也不抑制 ADAM 12 的明胶酶活性，然而，TIMP-3 (500 nM)为 ADAM 12 活性的有效抑制剂。

疾病进展中的 ADAM 12 水平

分析了 117 份尿液样品，包括 46 份来自健康年龄相当的女性志愿者和 71 份来自已诊断患有各期乳腺癌患者的样品。大部分来自癌

症患者的样品(图 1，表 I)与其中 ADAM 12 以显著低频率检测到的正常尿液比较为 ADAM 12 阳性。乳腺癌组(71 份尿液中 67 份为阳性)中 ADAM 12 物质检测频率与对照组(15%) (46 份中 7 份为阳性)比较较高(94%)。乳腺癌患者与对照组的尿液样品在 ADAM 12 蛋白水平上也不同。健康个体和进展期乳腺癌患者的代表性尿液样品的免疫印迹分析见图 2。ADAM 12 条带的光密度分析表明，疾病进展期的尿液 ADAM 12 水平增高。对照中检出的 ADAM 12 极低或没有 ADAM 12，稍高一点的蛋白水平与早期乳腺癌例如 ADH/LCIS 和 DCIS 相关，而在局部侵袭和转移性疾病的患者尿液中可观察到明显较高的水平(图 3)。

统计分析

ADAM 12 阳性表达患者的百分比以及各组中位数水平见表 I。将对照样品的平均光密度值(12 DU)设为阈值，相对于该对照组计算各癌症组的%阳性。如图 6 所示，根据比较百分比，与对照比较在各乳腺癌组中 ADAM 12 表达具有明显较高的个体比例(所有组 $P<0.01$)。表 II 列出了作为所有患者和各期癌症组的二分检验(根据阳性或阴性试验结果)的 ADAM 12 诊断特征。对于所有癌症患者，基于任意阳性表达水平 ADAM 12 灵敏度为 0.94 (95%置信区间：0.86-0.98)，而特异性为 0.61 (46 名对照中有 28 名) (95%置信区间：0.46-0.75)。设定 12 DU 阈值对所有癌症患者得到高得多的特异性，为 0.85 (46 名对照中有 39 名)。根据 117 名个体中有 95 名正确地分类为病例或对照(95%置信区间：0.73-0.88)，总准确度为 0.81。计算的似然比(LR)为 2.4，因为阳性测试结果表明，尿液 ADAM 12 的存在与高于 2.4 倍的个体有乳腺癌的可能性有关。所有 71 名癌症患者和 46 名对照的 ADAM 12 中位数水平分别为 37 (四分位数间距：14-84)和 0 (四分位数间距：0-7) ($P < 0.001$, Mann Whitney U-检验)。以经验 ADAM 12 水平作为连续变量绘制出不同组包括所有癌症患者、ADH/LCIS 患

者、DCIS 患者、IBC 患者和转移性疾病患者的受试者抽检特征(ROC)曲线以确定 TPR (灵敏度)和 FPR (1-特异性)之间的相互关系(数据未列出)。所有 ROC 曲线都显示出极为明显的区别，急剧地从 45 度斜线上升(即非歧视线)。ROC 曲线作为区别正常对照与 IBC 女性患者的基础，那些比较对照与转移性疾病患者的 ROC 曲线的 AUC 最高(分别为 0.90 和 0.92)，ADAM 12 水平大于 0，鉴别 IBC 患者和转移性疾病患者的灵敏度很理想(即灵敏度=1.00)。使用逻辑斯谛回归分析导出基于 ADAM 12 水平的乳腺癌概率(图 7)。经验 ADAM 12 水平以柱状图表示，具 ADAM 12 水平的女性病例和对照百分比绘在 x-轴上。在 46 名对照中，28 名(61%)的 ADAM 12 水平为 0，而 71 名癌症患者仅 4 名(6%)的 ADAM 12 水平为 0。另外，6 名对照(13%)的 ADAM 12 水平超过 20，而 71 名癌症患者中有 46 名(65%)的水平超过 20。逻辑斯谛回归确证 ADAM 12 水平与癌症概率(似然比检验=34.62, $P < 0.0001$)之间高度显著的直接关系。如图 7 中的理论非线性曲线所指出，对于 ADAM 12 水平为 0 (即无表达)的个体，乳腺癌概率为 32%，而当水平在 1 和 20 之间时为将近 50%。模型预测，对于 ADAM 12 水平介于 21 和 40 之间乳腺癌概率为 67%，当水平介于 41 和 60 之间为 80%，水平介于 61 和 80 之间为 90%，ADAM 12 水平为 81-100 的个体为 95%，而当水平超过 100 时为 98%。

表 I. 乳腺癌患者和对照的 ADAM 12 表达

		对照	ADH/LCIS	DCIS	IBC	转移
患者数		46	13	16	29	13
年龄(岁)		41 ± 13	52 ± 6	57 ± 13	59 ± 12	55 ± 7
ADAM 12 的存在		7 (15%)	10 (78%)	13 (82%)	25 (86%)	11 (85%)
ADAM 12 水平(DU)	平均值±SE	12.4 ± 4.2	23.0 ± 6.5	47.0 ± 9.8	68.4 ± 12.9	85.9 ± 17.8
	中位	0	14	46	43	80
	IQR	0-7	12-31	15-67	20-92	42-106
	范围	0-144	0-80	0-140	6-289	4-290

ADH = 不典型导管增生，LCIS = 小叶原位癌，

DCIS = 导管原位癌，IBC = 局部侵袭性乳腺癌，

DU = 光密度单位，IQR = 四分位数间距。

表 II. ADAM 12 在不同乳腺癌患者和对照中的诊断特征

	所有患者	ADH/LCIS	DCIS	IBC	转移
灵敏度	0.94 (67/71)	0.85 (11/13)	0.88 (14/16)	1.00 (29/29)	1.00 (13/13)
FNR	0.06 (4/71)	0.15 (2/13)	0.12 (2/16)	0.00 (0/29)	0.00 (0/13)
特异性	0.61 (28/46)	0.61 (28/46)	0.61 (28/46)	0.61 (28/46)	0.61 (28/46)
FPR	0.39 (18/46)	0.39 (18/46)	0.39 (18/46)	0.39 (18/46)	0.39 (18/46)
准确度	0.81 (95/117)	0.66 (39/59)	0.68 (42/62)	0.76 (57/75)	0.70 (41/59)
LR 阳性试验	2.4	2.4	2.3	2.6	2.6

ADH = 不典型导管增生，LCIS = 小叶原位癌，

DCIS = 导管原位癌，IBC = 局部侵袭性乳腺癌，

FNR = 假阴性率，FPR = 假阳性率 LR = 似然比。

下面引用的参考文献及贯穿本说明书的参考文献都通过引用全部结合到本文中。

参考文献

1. Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L.和 Peschon, J. J. (1998) J. Biol. Chem. 273, 27765-27767
2. Chubinskaya, S., Mikhail, R., Deutsch, A.和 Tindal, M. H. (2001) J.

Histochem. Cytochem. 49, 1165-1176

3. Seals, D. F.和 Courtneidge, S. A. (2003) Genes Dev. 17, 7-30
4. Gilpin, B. J., Loechel, F., Mattei, M. G., Engvall, E., Albrechtsen, R. 和 Wewer, U. M. (1998) J. Biol. Chem. 273, 157-166
5. Loechel, F., Gilpin, B. J., Engvall, E., Albrechtsen, R.和 Wewer, U. M. (1998) J. Biol. Chem. 273, 16993-16997
6. Loechel, F., Fox, J. W., Murphy, G., Albrechtsen, R.和 Wewer, U. M. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 278, 511-515
7. Shi, Z., Xu, W., Loechel, F, Wewer, U. M.和 Murphy, L. J. (2000) J. Biol. Chem. 275, 18574-18580
8. Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumara, Y., Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M.和 Higashiyama, S. (2002) Nature Med., 8, 35-40
9. Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B. J., Loechel, F.和 Wewer, U. M. (1999) Amer. J. Pathol. 154, 1489-1501
10. Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B., Frohlich, C., Loechel, F., Zolkiewska, A., Ishiguro, K., Kojima, T., Liu, W., Langford, J. K., Sanderson, R. D., Brakebusch, C., Fassler, R.和 Wewer, U. M. (2000) J. Cell Biol. 149, 1143-1155
11. Le Pabic, H., Bonnier, D., Wewer, U. M., Coutand, A., Musso, O., Baffet, G., Clement, B.和 Theret, N. (2003) Hepatology 37, 1056-1066
12. Lochter, A., Sternlicht, M. D., Werb, Z.和 Bissell, M. J. (1998) Ann. N. Y. Acad. Sci. 857, 180-193
13. Kleiner, D. E.和 Stetler-Stevenson, W. G. (1999) Cancer Chemother. Pharmacol. 43, S42-S51
14. Moses, M. A., Wiederschain, D., Loughlin, K. R., Zurakowski, D., Lamb, C. C.和 Freeman, M. R. (1998) Cancer Res. 58, 1395-1399
15. Yan, L., Borregaard, N., Kjeldsen, L.和 Moses, M. A. (2001) J. Biol.

Chem. 276, 37258-37265

16. Moses, M. A., Sudhalter, J.和 Langer, R. (1990) Science 248, 1408-1410
17. Breslow, N. E.和 Day, N. E. (1980) in Statistical methods in cancer research. Vol. 1-The analysis of case-control studies 第 192-224 页, Lyon, France: IARC
18. Cao, Y., Kang, Q., Zhao, Z.和 Zolkiewska, A. (2002) J. Biol. Chem. 277, 26403-26411
19. Pieper, R., Gatlin, C. L., McGrath, A. M., Makusky, A. J., Mondal, M., Seonarain, M., Field, E., Schatz, C. R., Estock, M. A., Ahmed, N., Anderson, N. G.和 Steiner, S. (2004) Proteomics 4, 1159-1174
20. Thongboonkerd, V., McLeish, K. R., Arthur, J. M.和 Klein, J. B. (2002) Kidney Inter. 62, 1461-1469
21. Millichip, M. I., Dallas, D. J., Wu, E., Dale, S.和 Mckie, N. (1998) Biochem. Biophys. Res. Comm. 245, 594-598
22. Martin, J., Eynstone, L. V., Davies, M., Williams, J. D.和 Steadman, R. (2002) J. Biol. Chem. 277, 33683-33689
23. Shannon, J. D., Baramova, E. N., Bjarnason, J. B.和 Fox, J. W. (1989) J. Biol. Chem. 264, 11575-11583
24. Alfandari, D., Cousin, H., Gaultier, A., Smith, K., White, J. M., Darribere, T., DeSimone, D. W. (2001) Curr. Biol. 11, 918-930
25. Amour, A., Knight, C. G., Webster, A., Slocombe, P. M., Stephens, P. E., Knauper, V., Docherty, A. J.和 Murphy, G. (2000) FEBS Lett. 473, 275-279
26. Amour, A., Slocombe, P. M., Webster, A., Butler, M., Knight, C. G., Smith, B. J., Stephens, P. E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., Docherty, A. J.和 Murphy, G. (1998) FEBS Lett. 435, 39-44
27. Zou, J., Zhu, F., Liu, J., Wang, W., Zhang, R., Garlisi, C. G., Liu, Y-H., Wang, S., Shah, H., Wan, Y.和 Umland, S. P. (2004) J. Biol. Chem. 279, 9818-9830

28. Visse, R.和 Nagase, H. (2003) Cir. Res. 92, 827-839

29. Fernández, C. A., Butterfield, C., Jackson, G.和 Moses, M. A. (2003) J. Biol. Chem. 278, 40989-40995

30. Prestigiacomo, A. F., Lilja, H., Pettersson, K., Wolfert, R. L.和 Stamey, T. A. (1996) J. Urol. 156, 350-354

31. Moertel, C. G., Fleming, T. R., Macdonald, J. S., Haller, D. G., Laurie, J. A.和 Tangen, C. (1993) J. Am. Med. Assoc. 270, 943-947

32. Berek, J. S.和 Bast, R. C., Jr. (1995) Cancer (Phila.) 76, 2092-2096。

<110> 儿童医疗中心有限公司(CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION)

<120> 上皮源性癌症的诊断及预后方法

<130> 701039-054481-PCT

<140> PCT/US05/00714
<141> 2005-01-10

<150> 60/535,306
<151> 2004-01-09

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1
<211> 909
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 1

```
Met Ala Ala Arg Pro Leu Pro Val Ser Pro Ala Arg Ala Leu Leu Leu
  1               5                  10                  15

Ala Leu Ala Gly Ala Leu Leu Ala Pro Cys Glu Ala Arg Gly Val Ser
             20                  25                  30

Leu Trp Asn Gln Gly Arg Ala Asp Glu Val Val Ser Ala Ser Val Arg
         35                  40                  45

Ser Gly Asp Leu Trp Ile Pro Val Lys Ser Phe Asp Ser Lys Asn His
     50                  55                  60

Pro Glu Val Leu Asn Ile Arg Leu Gln Arg Glu Ser Lys Glu Leu Ile
 65                  70                  75                  80

Ile Asn Leu Glu Arg Asn Glu Gly Leu Ile Ala Ser Ser Phe Thr Glu
                 85                  90                  95

Thr His Tyr Leu Gln Asp Gly Thr Asp Val Ser Leu Ala Arg Asn Tyr
            100                 105                 110

Thr Val Ile Leu Gly His Cys Tyr Tyr His Gly His Val Arg Gly Tyr
        115                 120                 125
```

```
Ser Asp Ser Ala Val Ser Leu Ser Thr Cys Ser Gly Leu Arg Gly Leu
    130                 135                 140

Ile Val Phe Glu Asn Glu Ser Tyr Val Leu Glu Pro Met Lys Ser Ala
145                 150                 155                 160

Thr Asn Arg Tyr Lys Leu Phe Pro Ala Lys Lys Leu Lys Ser Val Arg
                165                 170                 175

Gly Ser Cys Gly Ser His His Asn Thr Pro Asn Leu Ala Ala Lys Asn
            180                 185                 190

Val Phe Pro Pro Pro Ser Gln Thr Trp Ala Arg Arg His Lys Arg Glu
        195                 200                 205

Thr Leu Lys Ala Thr Lys Tyr Val Glu Leu Val Ile Val Ala Asp Asn
    210                 215                 220

Arg Glu Phe Gln Arg Gln Gly Lys Asp Leu Glu Lys Val Lys Gln Arg
225                 230                 235                 240

Leu Ile Glu Ile Ala Asn His Val Asp Lys Phe Tyr Arg Pro Leu Asn
                245                 250                 255

Ile Arg Ile Val Leu Val Gly Val Glu Val Trp Asn Asp Met Asp Lys
            260                 265                 270

Cys Ser Val Ser Gln Asp Pro Phe Thr Ser Leu His Glu Phe Leu Asp
        275                 280                 285

Trp Arg Lys Met Lys Leu Leu Pro Arg Lys Ser His Asp Asn Ala Gln
    290                 295                 300

Leu Val Ser Gly Val Tyr Phe Gln Gly Thr Thr Ile Gly Met Ala Pro
305                 310                 315                 320

Ile Met Ser Met Cys Thr Ala Asp Gln Ser Gly Gly Ile Val Met Asp
                325                 330                 335

His Ser Asp Asn Pro Leu Gly Ala Ala Val Thr Leu Ala His Glu Leu
            340                 345                 350

Gly His Asn Phe Gly Met Asn His Asp Thr Leu Asp Arg Gly Cys Ser
        355                 360                 365

Cys Gln Met Ala Val Glu Lys Gly Gly Cys Ile Met Asn Ala Ser Thr
    370                 375                 380
```

```
Gly Tyr Pro Phe Pro Met Val Phe Ser Ser Cys Ser Arg Lys Asp Leu
385                 390                 395                 400

Glu Thr Ser Leu Glu Lys Gly Met Gly Val Cys Leu Phe Asn Leu Pro
                405                 410                 415

Glu Val Arg Glu Ser Phe Gly Gly Gln Lys Cys Gly Asn Arg Phe Val
            420                 425                 430

Glu Glu Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Glu Pro Glu Glu Cys Met Asn
        435                 440                 445

Arg Cys Cys Asn Ala Thr Thr Cys Thr Leu Lys Pro Asp Ala Val Cys
    450                 455                 460

Ala His Gly Leu Cys Cys Glu Asp Cys Gln Leu Lys Pro Ala Gly Thr
465                 470                 475                 480

Ala Cys Arg Asp Ser Ser Asn Ser Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Thr
                485                 490                 495

Gly Ala Ser Pro His Cys Pro Ala Asn Val Tyr Leu His Asp Gly His
            500                 505                 510

Ser Cys Gln Asp Val Asp Gly Tyr Cys Tyr Asn Gly Ile Cys Gln Thr
        515                 520                 525

His Glu Gln Gln Cys Val Thr Leu Trp Gly Pro Gly Ala Lys Pro Ala
    530                 535                 540

Pro Gly Ile Cys Phe Glu Arg Val Asn Ser Ala Gly Asp Pro Tyr Gly
545                 550                 555                 560

Asn Cys Gly Lys Val Ser Lys Ser Ser Phe Ala Lys Cys Glu Met Arg
                565                 570                 575

Asp Ala Lys Cys Gly Lys Ile Gln Cys Gln Gly Gly Ala Ser Arg Pro
            580                 585                 590

Val Ile Gly Thr Asn Ala Val Ser Ile Glu Thr Asn Ile Pro Leu Gln
        595                 600                 605

Gln Gly Gly Arg Ile Leu Cys Arg Gly Thr His Val Tyr Leu Gly Asp
    610                 615                 620

Asp Met Pro Asp Pro Gly Leu Val Leu Ala Gly Thr Lys Cys Ala Asp
625                 630                 635                 640

Gly Lys Ile Cys Leu Asn Arg Gln Cys Gln Asn Ile Ser Val Phe Gly
```

645 650 655

Val His Glu Cys Ala Met Gln Cys His Gly Arg Gly Val Cys Asn Asn
660 665 670

Arg Lys Asn Cys His Cys Glu Ala His Trp Ala Pro Pro Phe Cys Asp
675 680 685

Lys Phe Gly Phe Gly Gly Ser Thr Asp Ser Gly Pro Ile Arg Gln Ala
690 695 700

Asp Asn Gln Gly Leu Thr Ile Gly Ile Leu Val Thr Ile Leu Cys Leu
705 710 715 720

Leu Ala Ala Gly Phe Val Val Tyr Leu Lys Arg Lys Thr Leu Ile Arg
725 730 735

Leu Leu Phe Thr Asn Lys Lys Thr Thr Ile Glu Lys Leu Arg Cys Val
740 745 750

Arg Pro Ser Arg Pro Pro Arg Gly Phe Gln Pro Cys Gln Ala His Leu
755 760 765

Gly His Leu Gly Lys Gly Leu Met Arg Lys Pro Pro Asp Ser Tyr Pro
770 775 780

Pro Lys Asp Asn Pro Arg Arg Leu Leu Gln Cys Gln Asn Val Asp Ile
785 790 795 800

Ser Arg Pro Leu Asn Gly Leu Asn Val Pro Gln Pro Gln Ser Thr Gln
805 810 815

Arg Val Leu Pro Pro Leu His Arg Ala Pro Arg Ala Pro Ser Val Pro
820 825 830

Ala Arg Pro Leu Pro Ala Lys Pro Ala Leu Arg Gln Ala Gln Gly Thr
835 840 845

Cys Lys Pro Asn Pro Pro Gln Lys Pro Leu Pro Ala Asp Pro Leu Ala
850 855 860

Arg Thr Thr Arg Leu Thr His Ala Leu Ala Arg Thr Pro Gly Gln Trp
865 870 875 880

Glu Thr Gly Leu Arg Leu Ala Pro Leu Arg Pro Ala Pro Gln Tyr Pro
885 890 895

His Gln Val Pro Arg Ser Thr His Thr Ala Tyr Ile Lys
900 905

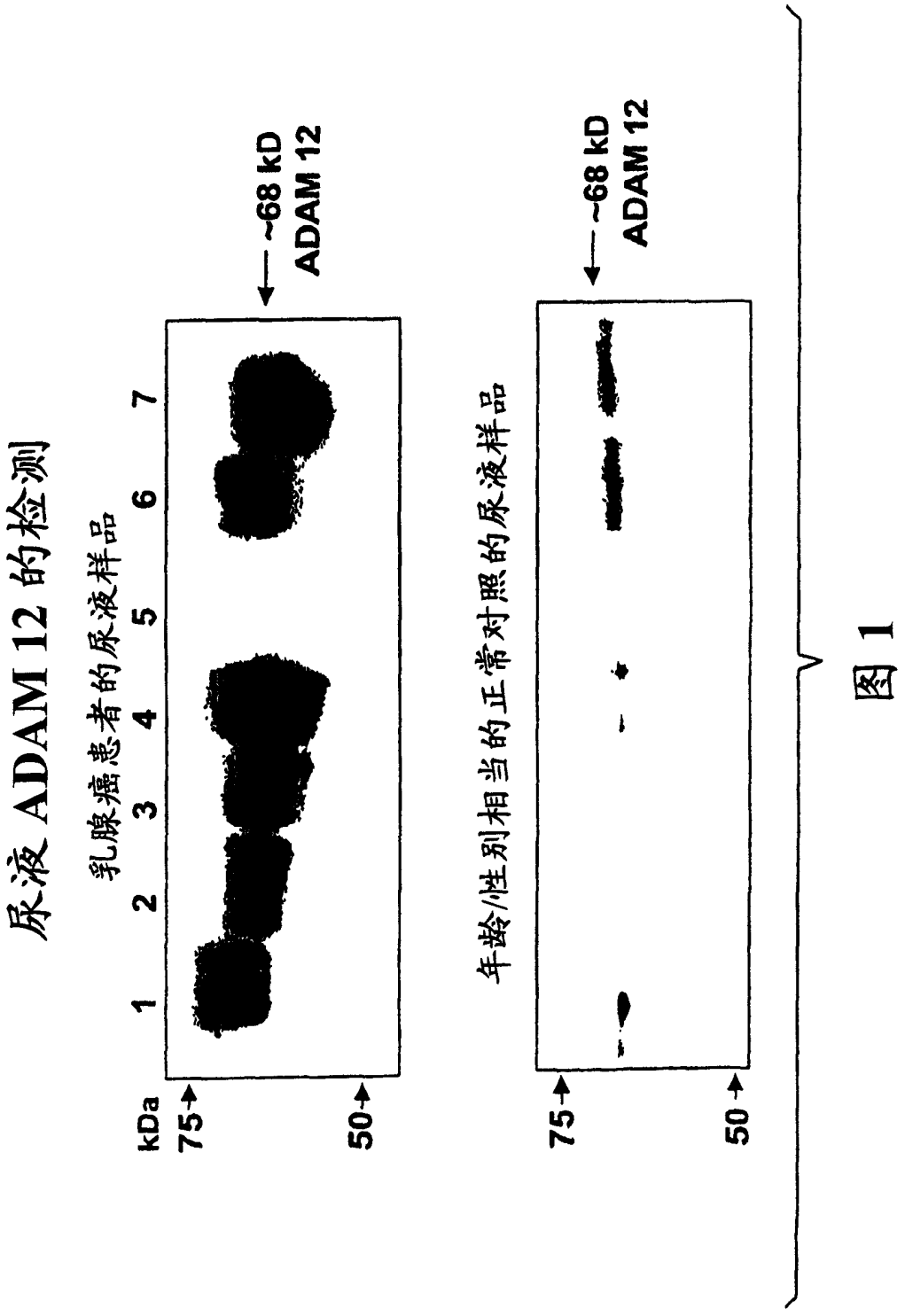

尿液 ADAM 12 的检测
乳腺癌患者的尿液样品
1
2
3
4
5
6
7
kDa
75
50
~68 kD
ADAM 12
年龄/性别相当的正常对照的尿液样品
75
50
~68 kD
ADAM 12

图 1

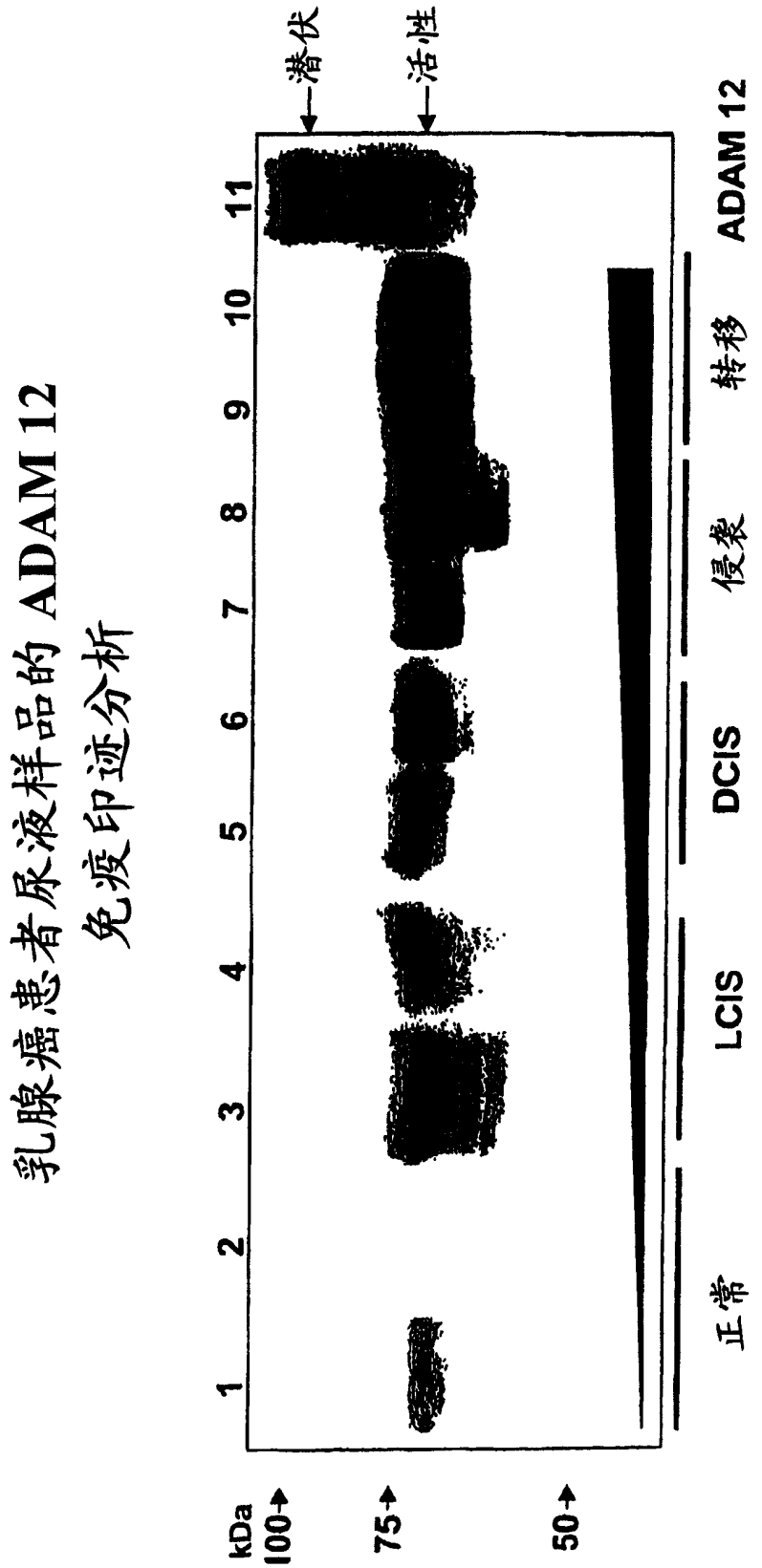

乳腺癌患者尿液样品的 ADAM 12
免疫印迹分析
潜伏
活性
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
kDa
100
75
50
正常
LCIS
DCIS
侵袭
转移
ADAM 12

图 2

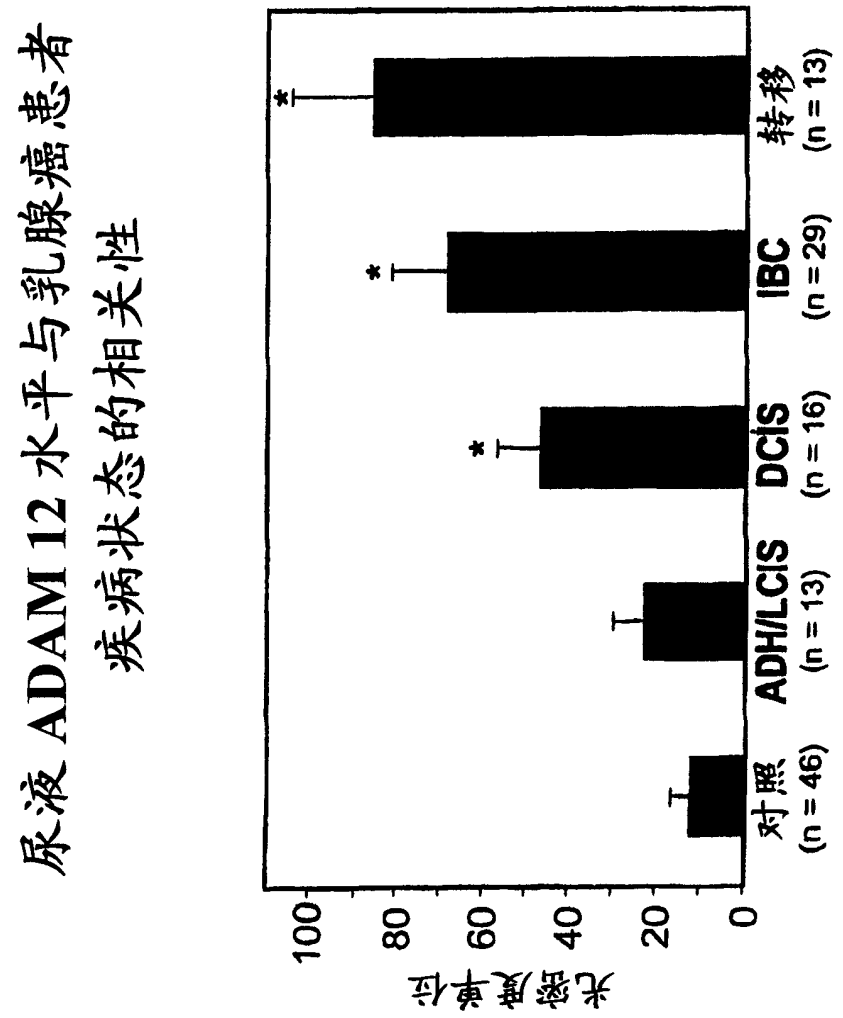

尿液 ADAM 12 水平与乳腺癌患者
疾病状态的相关性
光密度单位
0
20
40
60
80
100
对照
(n = 46)
ADH/LCIS
(n = 13)
DCIS
(n = 16)
IBC
(n = 29)
转移
(n = 13)
疾病状态
*

图 3

乳腺癌患者尿液样品的 ADAM 12 免疫印迹分析

所分析的尿液样品总数	117
年龄、性别相当的正常对照	46
ADAM 12 阳性	7 (15%)
乳腺癌	71
ADAM 12 阳性	67 (94%)

图 4

MAARPLPVSPARALLLALAGALLAPCEARGVSLWNQGRADEVVS

ASVRSGDLWIPVKSFDSKNHPEVLNIRLQRESKELIINLERNEGLIASSFTETHYLQD

GTDVSLARNYTVILGHCYYHGHVRGYSDSAVSLSTCSGLRGLIVFENESYVLEPMKSA

TNRYKLFPAKKLKSVRGSCGSHHNTPNLAAKNVFPPPSQTWARRHKRETLKATKYVEL

VIVADNREFQRQGKDLEKVKQRLIEIANHVDKFYRPLNIRIVLVGVEVWNDMDKCSVS

QDPFTSLHEFLDWRKMKLLPRKSHDNAQLVSGVYFQGTTIGMAPIMSMCTADQSGGIV

MDHSDNPLGAAVTLAHELGHNFGMNHDTLDRGCSCQMAVEKGGCIMNASTGYPFPMVF

SSCSRKDLETSLEKGMGVCLFNLPEVRESFGGQKCGNRFVEEGEECDCGEPEECMNRC

CNATTCTLKPDAVCAHGLCCEDCQLKPAGTACRDSSNSCDLPEFCTGASPHCPANVYL

HDGHSCQDVDGYCYNGICQTHEQQCVTLWGPGAKPAPGICFERVNSAGDPYGNCGKVS

KSSFAKCEMRDAKCGKIQCQGGASRPVIGTNAVSIETNIPLQQGGRILCRGTHVYLGD

DMPDPGLVLAGTKCADGKICLNRQCQNISVFGVHECAMQCHGRGVCNNRKNCHCEAHW

APPFCDKFGFGGSTDSGPIRQADNQGLTIGILVTILCLLAAGFVVYLKRKTLIRLLFT

NKKTTIEKLRCVRPSRPPRGFQPCQAHLGHLGKGLMRKPPDSYPPKDNPRRLLQCQNV

DISRPLNGLNVPQPQSTQRVLPPLHRAPRAPSVPARPLPAKPALRQAQGTCKPNPPQK

PLPADPLARTTRLTHALARTPGQWETGLRLAPLRPAPQYPHQVPRSTHTAYIK (SEQ ID NO:1)

图 5

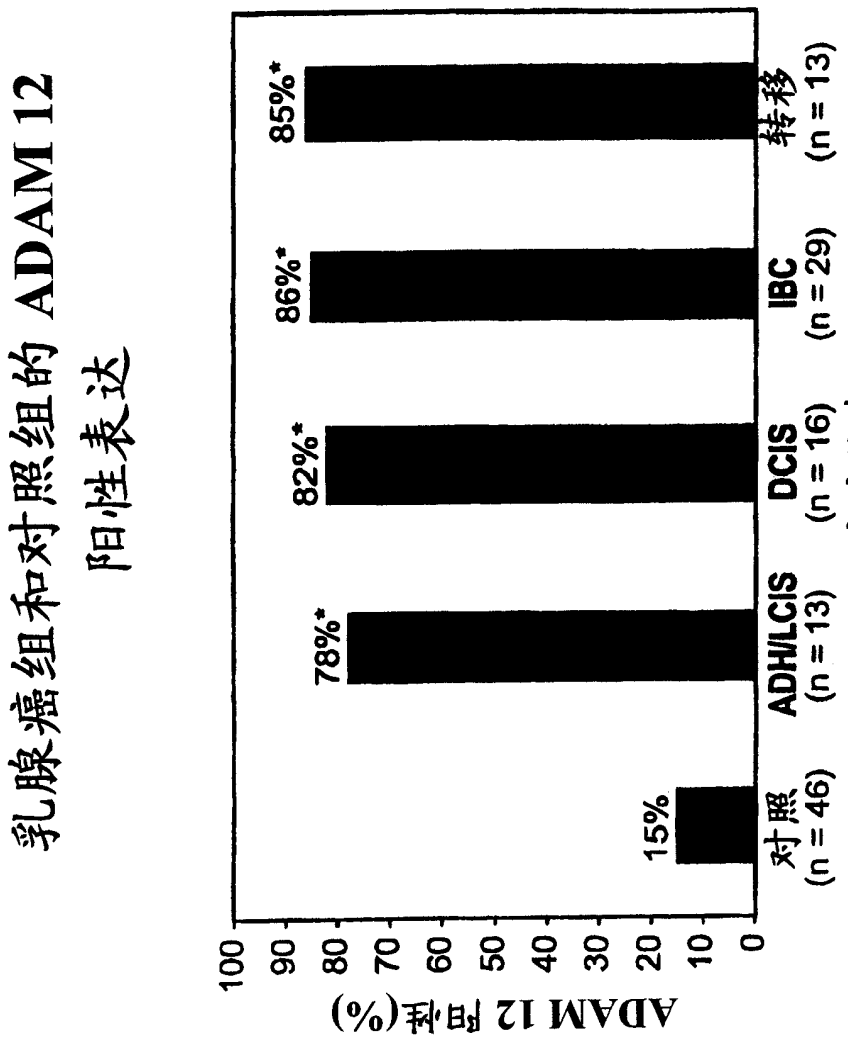

乳腺癌组和对照组的 ADAM 12
阳性表达
ADAM 12 阳性(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
15%
78%*
82%*
86%*
85%*
对照 (n = 46)
ADH/LCIS (n = 13)
DCIS (n = 16)
IBC (n = 29)
转移 (n = 13)
疾病状态

图 6

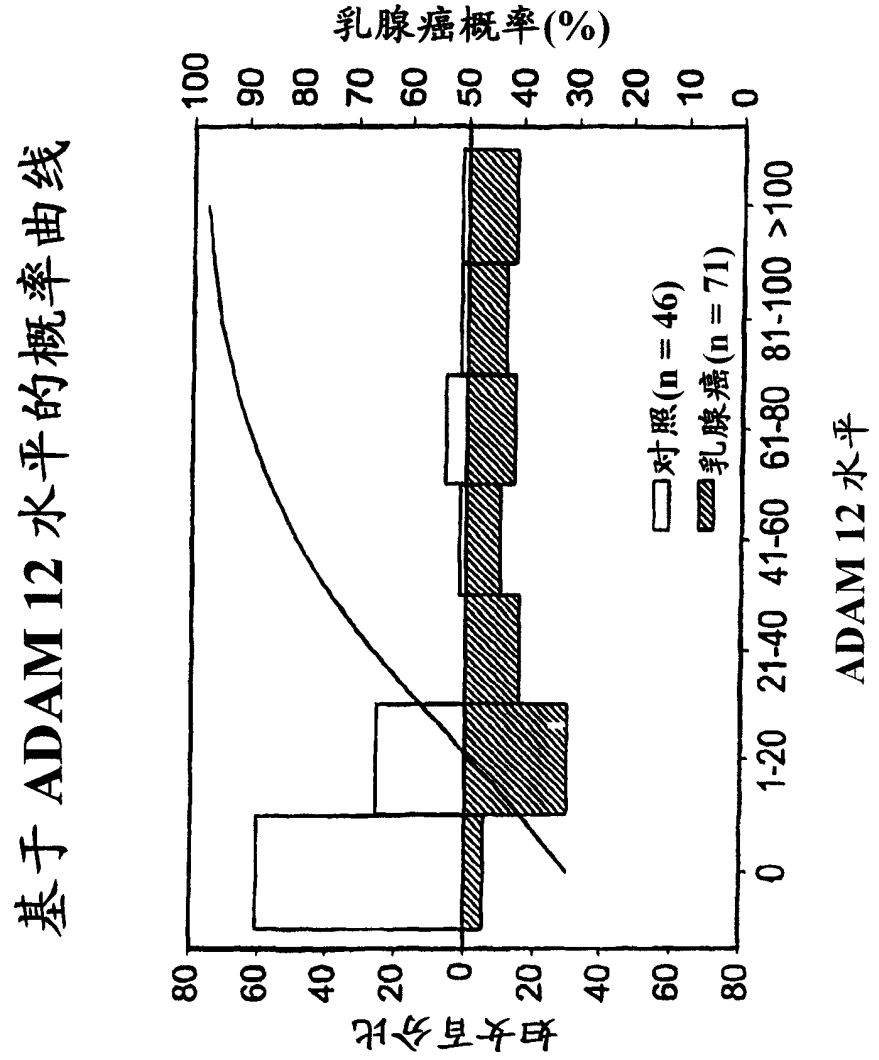

基于 ADAM 12 水平的概率曲线
乳腺癌概率(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
对照(n = 46)
乳腺癌(n = 71)
0
1-20
21-40
41-60
61-80
81-100
>100
ADAM 12 水平
80
60
40
20
0
20
40
60
80
相关百分比

图 7