(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105823877 B
(45)授权公告日 2022.02.25

(21)申请号 201510890662.5
(22)申请日 2006.06.21
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105823877 A
(43)申请公布日 2016.08.03
(30)优先权数据
60/693,324 2005.06.22 US
(62)分案原申请数据
200680029695.X 2006.06.21
(73)专利权人 约翰·霍普金斯大学
地址 美国马里兰州
专利权人 艾思彼拉妇女保健公司
(72)发明人 Z·张 D·W·尚 E·T·冯
Z·王 F·张
(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
代理人 程伟
(51)Int.Cl.
*G01N 33/574*(2006.01)
审查员 陈伟潘

权利要求书1页 说明书26页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

卵巢癌的生物标记:CTAP3-相关蛋白质

(57)摘要

本发明涉及卵巢癌的生物标记:CTAP3-相关蛋白质。具体是提供一种以蛋白质为基础的生物标记,该生物标记用于鉴定病患卵巢癌状态。特别地,本发明的生物标记用于将受试对象的样本分类为卵巢癌或非卵巢癌。该生物标记可通过SELDI质谱法侦测。

CN 105823877 B

1.一种鉴定受试对象卵巢癌状态的生物标记组合物，其包括CTAP3、CA125、ApoA1、beta 2-微球蛋白及转铁蛋白。

2.如权利要求1所述的生物标记组合物，其中该卵巢癌状态选自受试对象患癌的风险，疾病的存在或不存在，疾病的阶段及疾病治疗的效果。

3.如权利要求1所述的生物标记组合物，进一步包括转甲状腺素蛋白。

4.如权利要求1所述的生物标记组合物，是使用生物晶片阵列测定。

5.如权利要求4所述的生物标记组合物，其中该生物晶片阵列是蛋白质晶片阵列。

6.如权利要求4所述的生物标记组合物，其中该生物晶片阵列是核酸阵列。

7.如权利要求1所述的生物标记组合物，其中至少一种生物标记结合至附着于该生物晶片上的捕捉剂。

8.如权利要求1所述的生物标记组合物，是通过SELDI测定。

9.如权利要求1所述的生物标记组合物，是通过免疫检测法测定。

10.一种套组，其包括：

(a)捕捉剂组合物，各捕捉剂结合存在于权利要求1所述的生物标记组合物的生物标记，及

(b)包含权利要求1或3所述的生物标记组合物的容器。

11.如权利要求10所述的套组，其中捕捉剂是SELDI探针。

12.如权利要求10所述的套组，进一步包括结合CA125的捕捉剂。

13.如权利要求12所述的套组，进一步包括结合转甲状腺素蛋白的捕捉剂及/或结合beta 2-微球蛋白的捕捉剂。

14.如权利要求10所述的套组，其中该捕捉剂是抗体。

15.如权利要求10所述的套组，进一步包括该捕捉剂附着于或可附着的MS探针。

16.如权利要求10所述的套组，其中该捕捉剂是固定的金属螯合物。

17.如权利要求10所述的套组，进一步包括清洗溶液，在洗涤后相对于其它生物标记其选择性地保留结合捕捉剂的生物标记。

18.如权利要求12所述的套组，进一步包括使用该捕捉剂侦测该生物标记的指导说明。

19.如权利要求12所述的套组，进一步包括使用该套组侦测卵巢癌状态的书面指导说明。

20.如权利要求19所述的套组，其中该指导说明提供使用该捕捉剂与测试样本接触以及测定一种或多种由该捕捉剂保留的生物标记。

21.一种制造的物件，其包括捕捉剂的组合物及固体基质，其中该捕捉剂结合于该固体基质上，且各捕捉剂结合存在于权利要求1或3所述的生物标记组合物的生物标记。

# 卵巢癌的生物标记:CTAP3-相关蛋白质

[0001] 本申请是中国专利申请号为200680029695.X,发明名称为“卵巢癌的生物标记:CTAP3-相关蛋白质”,申请日为2006年6月21日的进入中国的PCT专利申请的分案申请。

## 技术领域

[0002] 本发明提供一种对于侦测卵巢癌来说重要的生物标记。识别该标记是通过使用SELDI分析法区别卵巢癌患者与健康个体的血清蛋白图谱。本发明使该生物标记相关于系统及方法,其中该生物标记应用于鉴定卵巢癌状态。本发明亦识别一种为已知的CTAP3蛋白质的生物标记。

## 背景技术

[0003] 在发达国家中卵巢癌是最致命的妇产科恶性肿瘤的一种。每年仅仅在美国约有23,000位妇女被诊断为患有该疾病,并且有接近14,000位妇女因此死亡。(Jamal,A.,et al.,CA Cancer J.Clin,2002;52:23-47)。尽管癌症治疗有进展,但在过去二十年卵巢癌的死亡率本质上持续不变(同上)。对于产生对应于疾病确诊后所处阶段的陡峭的存活坡度来说,疾病的早期侦测仍为提高卵巢癌病患病患长期存活的最重要因素。

[0004] 于晚期所诊断出的卵巢癌的低微治愈性,伴随确诊过程的花费与风险,及其在一般人群中相对低的流行程度共同造成于一般人群卵巢癌筛选测试的敏感度与特异性的极度迫切需求。

[0005] 对适合于癌症的早期侦测与诊断的肿瘤标记的识别具有提高病患临床结果的巨大前景。于症状表现不清或无症状,或存在物理检查相对无法达到的肿瘤的病患,则尤为重要。尽管在早期侦测上已付出相当多努力,但仍未发展出有效的筛选测试(Paley PJ.,Curr Opin Oncol,2001;13(5):399-402),并且妇女一般在诊断时表现出扩散性疾病。(Ozols RF,et al.,Epithelial ovarian cancer.In:Hoskins WJ,Perez CA,Young RC,editors.Principles and Practice of Gynecologic Oncology.3rd ed.Philadelphia:Lippincott,Williams and Wilkins;2000.p.981-1057)。

[0006] 最具特征性的肿瘤标记,CA125,于大至30-40％第I阶段的卵巢癌呈阴性,且其水平于多种良性疾病中提高。(Meyer T,et al.,Br J Cancer,2000;82(9):1535-8;Buamah P.,J Surg Oncol,2000;75(4):264-5;Tuxen MK,et al.,Cancer Treat Rev,1995;21(3):215-45)。其作为对以人群为基础的卵巢癌早期侦测与诊断的筛选工具的应用被其低敏感度和特异性所牵制(MacDonld ND,et al.,Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,1999;82(2):155-7;Jacobs I,et al.,Hum Reprod,1989;4(1)1-12;Shih I-M,et al.,Tumor markers)。尽管盆骨与最近的阴道超声波检查法已用于筛选高风险病患,但没有一种技术具有足够适用于一般人群的敏感度和特异性(MacDonld ND,et al.,如前)。最近使用CA125与额外肿瘤标记组合的成果(Woolas RP XF,et al.,J Natl Cancer Inst,1993;85(21):1748-51;Woolas RP,et al.,Gynecol Oncol,1995;59(1):111-6;Zhang Z et al.,Gynecol Oncol,1999;73():56-61;Zhang Z,et al.,Use of Multipe Markers to

Detect Stage I Epithelial ovarian cancers:Neural Network Analysis Improves Performance.American Society of Clinical Oncology 2001;Annual Meeting,Abstract)于癌症模型的纵向风险(Skate SJ,et al.,Cancer,1995;76(10Suppl):2004-10),以及与超声作为第二线测试(Jacobs I DA,et al.,Br Med J,1993;306(6884):1030-34;Menon U TA,et al.,British Journal of Obstericas and Gynecology,2000;107(2);165-69)已显示提高总体试验特异性的有希望结果,其对如卵巢癌这种具有相对低的流行性的疾病来说很关键。

[0007] 由于对后期卵巢癌预后的不乐观,一般一致认为一位医生会接受一项最小阳性预告值为10%的测试。(Bast,R.C.et al.,Cancer Treatment and Research,2002;107:61-97)。将其扩展至一般群体,则一个一般性筛选测试将需要大于70%的敏感度与99.6%的特异性。目前,没有任何一种现存的血清学标记,如CA125、CA72-4、或M-CSF单独实现这样的成果。(Bast,R.C.,et al.,Int J Biol Markers,1998;13:179-87)。

[0008] 因此,目前的关键需求为一种新血清学标记,其单独或与其它标记或诊断形式的组合实现早期侦测卵巢癌所需敏感度与特异性。(Bast RC,et al.,Early detection of ovavian cancer:promise and reality.Ovarian cancer:ISIS Medical Media Ltd.,Oxford,UK;2001.in press)。在缺少可接受的筛选测试的情况下,早期侦测仍为提高卵巢癌病患长期存活的最关键因素。

[0009] 因此,有必要得到一种确定病患卵巢癌状态的可靠与精确的方法,其结果可随后用于处理受试对象的治疗。

## 发明内容

[0010] 据发现CTAP3于卵巢癌病患血清中为上调。由此,作为生物标记而言,CTAP3的水平有助于确定一个受试对象的卵巢癌。同样地,作为生物标记而言,CTAP3相关蛋白质有助于确定一个受试对象的卵巢癌。

[0011] 本发明提供一种通过测量一种或多种特异的生物标记来确定卵巢癌状态的敏感且快速的方法及套组,特异的生物标记例如:CTAP-3相关分子,如CTAP3。病患样本中该生物标记的测定提供信息以供诊断医生将其与一个人类癌症的可信诊断或阴性诊断(例如,正常或非疾病)关联化。该标记以它的分子量与已知的蛋白质身分为特征。可通过使用多种分级技术从同一样本的其它蛋白质中分辨出该标记,例如层析分离与质谱法的耦合、利用固定抗体的蛋白质捕捉或是通过传统免疫检测法。在优选具体例中,分辨方法包括表面增强激光解析/电离(「SELDI」)质谱法,其中质谱法探针的表面包括可结合该标记的吸收剂。

[0012] 本发明提供一种鉴定受试对象卵巢癌状态的方法,其包括测定至少一种包含来自该受试对象的生物样本中的CTAP3相关蛋白质的生物标记,例如CTAP3;及(b)将该测定结果与卵巢癌状汰关联化。在某些方法中,该测量步骤包括侦测该样本中该生物标记的存在与否。在其它方法中,该测量步骤包括计量该样本中该标记的含量。在另一些方法中,该测定步骤包括鉴定样本中生物标记的类型。

[0013] 本发明亦有关于多个方法,其中测定步骤包括:提供一个受试对象的血液样本或者是一个血液衍生物;通过阴离子交换树脂将样本中蛋白质分級(fractionating),并从包括与该蛋白质生物标记结合的捕捉剂的基质表面的该些分级收集含有CTAP3相关肽的分

级，该CTAP3相关肽如CTAP3。血液衍生物为，例如，血清或血浆。在优选具体例中，基质为包括IMAC铜表面的SELDI探针，其中蛋白质生物标记由SELDI侦测。在其它具体例中，基质为SELDI探针，其包括与例如CTAP3结合的生物特异性亲和剂，其中蛋白质生物标记由SELDI侦测。在其它具体例中，基质为微滴定盘，其包括与CTAP3结合的生物特异性亲和剂，且该蛋白质生物标记由免疫检测法侦测。

[0014] 在某些具体例中，该方法进一步包括基于通过该方法所确定的状态而处理受试对象的治疗。例如，若本发明方法的结果为不确定或有必要进行状态再确认时，医生可安排更多测试。另外，若该状态表明手术为合适，医生可为病患手术排期。此外，若结果显示治疗成功，则不必要进一步处理。

[0015] 本发明亦提供于受试对象处理后，也就是治疗后，再次测定CTAP3相关生物标记的这类方法。于这些实例中，接着依据得到的结果重复及/或改变处理受试对象的治疗的步骤。在进一步具体例中，将该测量关联疾病进程。

[0016] 术语「卵巢癌状态」是指病患疾病的状态。卵巢癌状态的类型的实例包含，但不局限于，受试对象患癌的风险，疾病的存在或或不存在，病患疾病的阶段及疾病治疗的效果。其它状态与每一状态的程度在本领域为已知。

[0017] 在某些优选具体例中，鉴定卵巢癌状态的方法进一步包括测定及关联卵巢癌状态与至少一个选自下列所组成的组群：CA125、转铁蛋白、结合珠蛋白、ApoA1、转甲状腺素蛋白、ITIH4内部片段、beta 2-微球蛋白、海帕西啶(hepcidin)、波斯塔停(prostatin)、骨桥素、嗜酸性粒细胞(esoinophil)衍生神经毒素、瘦素、催乳素、IGF-II、血红蛋白及其修饰形式。

[0018] 在其它优选具体例中，鉴定卵巢癌状的方法进一步包括测定及关联卵巢癌状态与至少一个选自下列所组成的组群：CA125II、CA15-3、CA19-9、CA72-4、CA 195、肿瘤相关胰蛋白胰抑制剂(TATI)、CEA、胎盘碱性磷酸酶(PLAP)、唾液酸(Sialyl)TN、半乳糖转移酶、巨噬细胞集落激激因子(M-CSF,CSF-1)、溶血磷脂酸(LPA)、表皮生长因子受体胞外段的110KD成分(p110EGFR)、组织激肽释放酶原，如激肽释放酶6和激肽释放酶10(NES-1)、丝氨酸蛋白水解酶(prostasin)、HE4、肌酸激酶B(CKB)、LASA、HER-2/neu、尿促性腺激素肽、Dianon NB 70/K、组织肽抗体(TPA)、SMRP、骨桥素和结合珠蛋白、瘦素、催乳素、类胰岛素生长因子I以及类胰岛素生长因子II。

[0019] 在一具体例中，本发明提供的方法，其包括与测定来自受试对象的生物样本CA125或CA125II结合同时测定CTAP3标记，并将该成套的测量与卵巢癌状态关联化。我们发现相比于任一种标记的单独测定，CTAP3结合或组合CA125的测定可提供增强的结果(例如增强区别或者侦测)。

[0020] 在另一具体例中，本发明提供的方法，其包括测定来自受试对象的生物样本的CTAP3标记，以及将该测定与卵巢癌状态关联化，其中该状态为界限(borderline)卵巢癌相对于侵入式卵巢癌。我们发现CTAP3能在界限卵巢癌与侵入式卵巢癌间作出区别。

[0021] 本发明的CTAP3相关生物标记以一个或多个态样为特征。尤其是，在一种态样中，该生物标记特征为于本文所明确指示的条件下的分子量，特别是指由质谱分析得到的。在其它态样中，该生物标记的特征可为其光谱识别标志的特点，例如该生物标记的谱峰尺寸(包括区域)与/或形状，该特点包括相邻峰的临近度，尺寸，形状等。又在另外的态样中，该

标记的特征为亲和性结合特性，尤其是于特定情况下结合至IMAC铜吸附剂的能力，然而，其它金属，如镍，亦可使用。在优选具体例中，本发明的标记可以这些态样的每一个为特征，也就是分子量、质谱识别标志及IMAC-Cu吸收剂结合。

[0022] 就本文所述标记的质量值来说，考虑波谱仪的质量精确度为所揭示的分子量值的约+/-0.15百分比之内。另外，对这些已认知精确度变化的仪器，所确定的质谱可于约400至1000m/dm的分辨率限区范围内变化，其中m为质量，dm为0.5峰高处的质谱峰宽度。与质谱仪及其操作相关的这些质量精确度与分辨率变化会反映在提及生物标记I质量时使用术语「约」上。这些质量精确度与分辨率变化是预计中的，因此有关于本文所提及的生物标记的术语「约」包括由于受试对象的性别，基因型与/或种族及特定癌症或起源或其阶段而可能存在的标记的变形。

[0023] 本发明进一步提供一种鉴定受试对象卵巢癌状态的方法，其包括(a)测定来自受试对象的样本的CTAP3生物标记，及(b)将该测定与卵巢癌状态关联化。在某些方法中，该测定步骤包括侦测该样本中该生物标记是否存在(存在或是不存在)。在其它方法中，该测定步骤包括计量该样本中该生物标记含量。

[0024] 诊断测试的精确度以接收对象工作特征曲线(ROC曲线)为特征。ROC是诊断测试中不同可能性切点的真阳性率相对假阳性率的图示。一条ROC曲线显示了敏感度与特异性间的关是。也就是，敏感度的增加将伴随特异性的减少。曲线沿着左轴且随后与ROC空间顶部边缘越接近，测试越精确。相反地，曲线越靠近ROC图45度对角线，测试越不精确。ROC曲线下区域为测试的精确度的度量工具。测试的精确度取决于该测试能将待测群中分成患有及未患有所讨论的疾病的程度。曲线下的区域(是指「AUC」)为1时表示为理想的测试，而该区域为0.5则表示为较无用处的测试。因此，本发明的生物标记与诊断方法具有大于0.5的AUC，优选的测试具有大于0.6的AUC，最优选的测试具有大于0.7的AUC。

[0025] 测定生物标记的优选方法包含使用生物晶片阵列。适用于本发明的生物晶片阵列包含蛋白质与核酸阵列。一种或多种生物标记被捕捉于生物晶片阵列上并且通过激光电离侦测标记的分子量。对该标记的分析是通过，例如该标记的分子量相对于依照总离子电流标准化的阀值强度。优选地，使用对数变换来降低峰强度范围从而限制侦测到标记的数量。

[0026] 在本发明的一种优选方法中，将生物标识的测定与卵巢癌状况关联化的步骤是通过软件分类演算实现。优选地，从生物晶片阵列上固定的对象样本获得数据，将所述生物晶片阵列通过激光电离并侦测质量/电荷比率的信号强度；及将数据转换成计算机可读取形式；然后，根据用户输入参数执行用以分类数据的演算，作为侦测表明标记存在于卵巢癌病患中却于无癌症的受试对象内不存在的信号。

[0027] 优选的生物晶片表面为例如离子性、阴离子性、由固定的镍离子组成者、由阴、阳离子的混合物所组成者、由一种或多种抗体所组成者、单链或者双链核酸、蛋白质、肽或其片段、氨基酸探针、或者噬菌体展示库(phage display libraries)所组成。

[0028] 在其它优选方法中一种或多种标记是使用激光解析/电离质谱法而测量，其包括提供适合用于质谱仪的含有吸附剂附着的探针，及使受试对象样本与吸附剂接触，然后，从探针上解析与电离该标记，并用质谱仪侦测该去电离/电离的标记。

[0029] 优选地，激光解析/电离质谱法包括：提供包括吸附剂附着于其上的基质；使受试对象样本与吸附剂接触；将基质放置于适合用于质谱仪的含有吸附剂附着的探针上，及从

探针上解析和电离该标记，并用质谱仪侦测该去电离/电离的标记。

[0030] 吸附剂例如可为疏水、亲水、离子、或者金属敖合吸附剂，如镍或者抗体、单或双链寡核苷酸、氨基酸、蛋白质、肽或其片段。

[0031] 本发明的方法可在经得起所述方法试验的任何类型的病患样本中进行，如血液、血清和血浆。

[0032] 本发明亦提供了套组，其包括(a)一种结合CTAP3相关生物标记的捕捉剂；及(b)包含该生物标记的容器。在优选具体例中，该捕捉剂结合该生物标记。该捕捉剂可为任何种类的反应剂，该反应剂优选为SELDI探针。该捕捉剂亦可结合本文所揭露的其它已知生物标记。在某些优选具体例中，套组进一步包括了可与第一捕捉剂未结合的生物标记结合的第二捕捉剂。

[0033] 在本发明的某些套组中，捕捉剂包括了「固定的金属敖合物」(immobilized metal chelate,IMAC)。

[0034] 在本发明的某些套组中进一步包括清洗溶液，在洗涤后相对于其它生物标记其选择性地保留结合到捕捉剂的生物标记。

[0035] 本发明亦提供套组，其包括(a)结合CTAP3-相关生物标记的第一捕捉剂，及(b)使用该捕捉剂测定生物标记的指导说明。在某些这类套组中，该捕捉剂包括抗体。另外，某些套组进一步包含了该捕捉剂附着于或可附着的MS探针。在一些套组中，该捕捉剂包括IMAC。该套组亦可包含清洗溶液，在洗涤后相对于其它生物标记其选择性地保留结合捕捉剂的生物标记。优选地，该套组包括使用该套组来确定卵巢癌状态的书面指导说明，与提供使该捕捉剂与测试样本接触以及测定一种或多种由该捕捉剂保留的生物标记的指导说明。

[0036] 该套组亦提供了一种捕捉剂，其为一抗体、单或双链寡核苷酸、氨基酸、蛋白质、肽或者其片段。使用该套组测量蛋白质生物标记，是通过质谱法或者如ELISA的免疫检测法。

[0037] 亦提供用于侦测卵巢癌与/或用于为进一步诊断检测试验产生的纯化蛋白质。纯化的蛋白质包含，例如，纯化CTAP3肽。本发明亦提供进一步包括可侦测标签的该纯化蛋白质。

[0038] 在另一具体例中，非侵入性医疗成像技术，如阴道超声、正电子放射断层成像(PET)或者单光子放射断层(SPECT)成像于侦测癌症，冠心病和脑疾病尤为有效。多普勒超声、PET和SPECT成像显示了器官与组织的化学功能，而其它成像技术-如X射线、CT和MRI主要显示了结构。超声波流、PET和SPECT成像的使用对于鉴定与监控疾病发展，例如卵巢癌，日益有用，。

[0039] 于本文所述的CTAP3相关生物标记，或其片段可用于前文所述PET与SPECT成像应用。以合适的跟踪剩余物修饰PET或者SPECT应用后，与肿瘤蛋白质反应的CTAP3相关生物标记可用于成像卵巢癌病患体内生物标记的沉积。

[0040] 本发明的其它态样将于下文中描述。

## 附图说明

[0041] 图1A至图1E显示了CTAP3标记的质谱。该标记的质谱峰以一竖线于图中标示。

[0042] 图2显示了血小板碱性蛋白前体(PPBP)的氨基酸序列(SEQ ID NO:5)(Swiss Prot Accession No.:P02775)。CTAP3是包括PPBP的44-128氨基酸残基的85氨基酸的蛋白质

## 具体实施方式

[0043] 1.引言

[0044] 生物标记是一种有机分子,与另一种表现形状态(例如非疾病)相比,其差异性地存在于取自一种表现形状态(例如患有该疾病)的一个受试对象的样本。当于不同组群中一种生物标记的平均或中值表达水平的计算具有统计上显著意义时,该生物标记是差异性地存在于不同的表现形状态间。于其他测试中,计算统计上显著意义的通常测试包括T检定(t-test)、ANOVA、Kruskal-Wallis、Wilcoxon、Mann-Whitney及比数比。单独或组合的生物标记提供了对受试对象属于一种或其它表现型状态的相对风险的测定。因此,生物标志對于疾病(诊断)、药物的治疗效果(治疗诊断学)及药物毒性为有用的标志。

[0045] 2.卵巢癌的生物标记

[0046] 2.1生物标记

[0047] 本发明提供以多肽为基础的生物标记,亦即CTAP3相关蛋白质(也称作「CATP-III相关蛋白质」),其差异性地存在于患卵巢癌的受试对象中,尤其是卵巢癌相对于正常态(非卵巢癌)。生物标记以通过质谱法测得的质荷比、以飞行时间质谱法的质谱峰形、及它们于吸附剂表面的结合特性为特征。这些特征提供一种确定一种特定侦测到的生物分子是否为本发明的生物标记的方法。这些特征显示了该生物分子的固有特性但并非作为区分该生物分子的局限。在一个态样中,本发明提供该生物标记的分离形式。

[0048] 该生物标记通过使用来自Ciphergen Biosystems,Inc.(Fremont,CA)(“Ciphergen”)的蛋白质晶片(ProteinChip)阵列以SELID技术而发现。收集被诊断为卵巢癌及正常的受试对象的血清样本。通过阴离子交换层析法将该样本分级。将分级后的样本涂于SELDI生物晶片上,且样本中多肽的光谱经Ciphergen PCS 4000质谱仪以飞行时间质谱法产生。将得到的光谱以Ciphergen Express™ Data Manager Software和Biomarker Wizard及Ciphergen Biosystems公司的Biomarker Pattern Software分析。每个组的质谱通过散布图分析。以Mann-Whitney测试分析来比较卵巢癌与控制组的散布图中每一个蛋白质群集,且选取于两组中具有显著差异($p<0.0001$)的蛋白质。该方法详细描述于下文实施例段落。

[0049] 本发明提供生物标记,其为这里所提到的CTAP3相关蛋白质或CTAP3相关生物标记。该CTAP3生物标记包括包含由血小板碱性蛋白前体(PPBP)及其片段衍生得到的氨基酸序列的肽与多肽。

[0050] 在特定具体例中,本发明提供了CTAP3生物标记。CTAP3是一种从PPBP(SwissProt02775)衍生得到的85氨基酸的蛋白质。CTAP3可由购自例如Chemicon International(目录1484P)(www.chemicon.com,Temecula,CA)的抗体所识别。CTAP3是一种血小板碱性蛋白前体的片段,并由SEQ ID NO:5的44-128氨基酸所组成。

[0051] 「蛋白质晶片(ProteinChip)检测法」的列是指于其中发现生物标记的层析分级、生物标记所结合的晶片类型、及清洗条件,于下文中讨论。

[0052] 表1

[0053]

| 标记 | P 值 | 于卵巢癌的上调或下调 | ProteinChip® 检测法 |
|---|---|---|---|
| CTAP3(M9313.9)(预测质量：9293) | <0.0001 | 上调 | IMAC-Cu<br>100 mM 磷酸钠，pH 7.0 |

[0054] 本发明的生物标记以如同通过质谱法所测得的质荷比为特征。生物标记的质荷比提供于表1「M」后。由此，例如CTAP具有测量到的质荷比为9313.9。这个质荷比是通过Ciphergen Biosystems,Inc.PBS II质谱仪上所产生的质谱确定。该仪器具有质量精确度约为+/-0.15百分比。另外，该仪器具有质量分辨率约为400至1000m/dm，其中m为质量及dm为于0.5峰高处的质谱峰宽度。该生物标记的质荷比由Biomarker Wizard™软件(Ciphergen Biocystems,Inc.)确定。Biomarker Wizard，通过群集所有由PBS II确定的分析光谱的相同峰的质荷比、取群集内极大与极小的质荷比并除以二而指派一个质荷比给该生物标记。因此，所提供的质量反映出这些说明。

[0055] 本发明的生物标记进一步以其质谱峰的形状与/或位置为特征。于图1A至图1E中显示表示该生物标记谱峰的波谱，图1A至图1E内质谱是由SELDI分析所产生，且其显示了不同于表1列出的数值的质量值。那些不同的质量值是归因于分析工具内部校正的差异。

[0056] 本发明的生物标记进一步以其结合层析表面的特性为特征。以pH7磷酸钠冲洗后，CTAP3结合至IMAC-Cu。

[0057] 本发明的生物标记的身分已确定并显示于表1。该测定方法于下文实施例中描述。

[0058] 侦测该生物标记的优选生物来源是血清。然而，在其它具体例中，可于血浆或尿液中侦测到该生物标记。

[0059] 本发明的生物标记是一种多肽。因此，本发明提供了以分离形式存在的该多肽。该生物标记可从生物液体，如尿液或者血清中分离。其可通过任何基于其质量和结合特性的本领域已知方法分离。例如，能将包括该多肽的样品进行如本文所描述的层析分级，并通过如丙烯酰胺凝胶电泳来进行进一步的分离。该生物标记身分的知识亦允许其通过免疫亲和层析而分离。

[0060] 已证明本发明的一种生物标记CTAP3于数种类别中为差异性地存在。这可从下列样本的比较中发现：早期卵巢癌相对健康控制，早期卵巢癌相对术后无癌(治疗前后患者的一系列样品)，及早期卵巢癌相对于不论是卵巢癌或非卵巢癌的良性疾病。

[0061] 3.生物标记与蛋白质的不同形式

[0062] 蛋白质通常以多个不同的形式存在于一样本中。这些形式可由翻译前、后的修饰的任一或两者一同产生。翻译前修饰形式包括等位基因变体、剪接变体与RNA编辑形式。翻译后修饰形式包括由蛋白质裂解(例如信号序列的裂解或母蛋白质的片段)、糖基化、磷酸化、脂化、氧化、甲基化、半胱胺酸化、磺化及乙酰化产生的形式。

[0063] 因此，本发明提供于此所所述的生物标记「CTAP3相关蛋白质」或「CTAP3相关生物标记」。该CTAP3生物标记包括包含由血小板碱性蛋白前体(PPBP)及其片段衍生得到的氨基酸序列的肽与蛋白质。具示范性的CTAP3相关生物标记包括文献中的B TG1、Beta TG、Beta 血小板球蛋白、趋化因子(CXC区域)配合体7、结缔组织激肽III、CXC趋化因子配合体7、CXCL7、LA PF4、LDGF、低亲和性血小板因子IV、MDGF、NAP3L1、亲核激肽2、PBP、血小板碱性蛋

白质前体、前血小板碱性蛋白、SCYB7、可诱导小分子细胞因子B7、可诱导小分子细胞因子亚科B成员7、TC1、TC2、TGB、TGB1、THBGB、THBGB1、凝血调节肽1(Thrombocidin1)、凝血调节肽2(Thrombocidin2)及血小板球蛋白beta 1。表2显示了具示范性的CTAP3相关分子与每一个分子所含有的PPBP氨基酸残基。

[0064] 表2:示范性的CTAP3相关分子

[0065]

| 肽名 | PBPP氨基酸残基(SEQ ID NO:5) |
|---|---|
| 噬菌体衍生生长因子(MDGF) | 1-128 |
| 可诱导小分子细胞因子B7(CXCL7) | 1-128 |
| 白血球衍生生长因子(LDGF) | 1-128 |
| 血小板碱性蛋白质(成熟态) | 35-128 |
| 缔组织激肽III(CTAP3) | 44-128 |
| 结缔组织激肽3a(CTAP3a) | 44-124 |
| TC-2 | 44-126 |
| Beta-血小板球蛋白 | 48-128 |
| TC-1 | 59-126 |
| 亲核激肽2 | 55-128 |
| 亲核激肽2 | 59-124 |
| 亲核激肽2 | 59-121 |
| 低亲和性血小板因子IV(LA-PF4) | 59-128 |
| 趋化因子_CXC | 60-122 |

[0066] 于侦测与测定样品中的蛋白质时,区分蛋白质中不同形式的能力取决于差异的性质以及所使用的侦测或测定方法。例如,使用单株抗体的免疫检测法,将侦测到含有该表位(eptiope)的蛋白质的所有形式而将无法区分它们。然而,利用二抗体直接针对蛋白质上不同表位的夹心免疫检测法将会侦测所有包含该二种表位的蛋白质形式而不会侦测仅含有其中一种表位的那些形式。在诊断检测法中,当使用特定方法侦测得到的蛋白质形式与不论其为任何特定形式,其同样为良好的生物标记,则无法区别其不同形态所造成的影响很小。然而,当蛋白质的一种特定形态(或一种特定形态的亚群)是比以一种特定方法侦测得到的不同形态的集合体较好的生物标记时,该检测法的强度将受到影响。在此种情况下,采用一种能区别蛋白质不同形式且能特异地侦测与测定该所需蛋白质形式的检测法是有用的。区别一种分析物的不同形式或特异地侦测一种分析物的特定形式是指「分辨」该分析物。

[0067] 质谱法是一种分辨蛋白质的不同形式特别有效的方法,因为不同的形式通常具有可由质谱法分辨的不同质量。因此,若对于某一疾病,蛋白质的某一种形式相对其它形式是较好的生物标记,在传统免疫检测法无法区分各形式且无法特异地侦测该有效的生物标记时,质谱法可特异地侦测和测定该有效形式。

[0068] 一种有用的方法结合了质谱法与免疫检测法。首先,使用一种生物特异性捕捉剂(例如能辨识该生物标记及它的其它形式的抗体、适体或亲和体)捕捉感兴趣的生物标记。优选地,将生物特异性捕捉剂结合至固相,例如珠子、盘、膜或阵列。洗去未结合的物质后,通过质谱法侦测与/或测定所捕捉的分析物。(此方法亦会捕捉到结合至该蛋白质、或可由

抗体所识别的蛋白质相互作用物,其自身可做为生物标记。)各式的质谱法可用于侦测蛋白质形式,其包括激光解析法,例如传统MALDI或者SELDI与电喷射电离。

[0069] 因此,当本文提到侦测一个特定蛋白质或测定一特定蛋白质的量时,其意指在有或是没有分辨蛋白质的多种形式下侦测与测定蛋白质。例如,「测定CTAP3」的步骤包含以不区分多种蛋白质形式的手段(如某些免疫检测法)测定CTAP3,以及以可于其它形态中区分一些形态或测定该蛋白质的一种特定形态的手段测定CTAP3。相比而言,当需要测定蛋白质的一种特定形式或是多种形式时,例如,CTAP3的特定形式,可指定该种特定形式(多种型式)。例如,「测定M9313.9」其含义为以可于其它形式的CTAP3中区分M9313.9的方法来测定CTAP3。

[0070] 4.卵巢癌生物标记的侦测

[0071] 本发明的生物标记可通过任何适当的方法侦测到。为达目的可使用的侦测范例包含光学方法、电化学方法(电位测定法及电流滴定法(amperometry)技术)、原子力显微镜与射频方法,例如多极共振波谱。除显微镜方法的外,共焦与非共焦光学方法的例子为可侦测荧光、冷光、化学冷光、吸光率、反射率、透光率和双折射或折射率(例如表面等离子共振、椭圆偏光法、共鸣镜法、光栅耦合波导法或干涉测量)。

[0072] 在一个具体实例中,通过生物晶片的方法分析样品。生物晶片一般包括固体基质与供捕捉剂附着(亦称作吸附剂或亲和剂)的一个平面。通常,生物晶片的表面包括多个可定址位置,各自具有一种捕捉剂结合于在那里。

[0073] 蛋白质生物晶片是指适合捕捉多肽的生物晶片。许多蛋白质生物晶片已记述于本技术领域。这些包括,例如Ciphergen Biosysem,Inc.(Fremont,CA)、Zyomyx(Hayward,CA)、Invitrogen(Carlsbad,CA)、Biacore(Uppsala,Sweden)及Procognia(Berkshire,UK)等公司生产的蛋白质生物晶片。这些蛋白质生物晶片的实施例揭露于以下专利或已公开的专利申请中:美国专利6,255,047号(Hutchens&Yip)、美国专利6,537,749号(Kuimelis and Wagner)、美国专利6,329,209号(Wagner et al.)、PCT国际公开第WO 00/56934号(Englert et al.)、PCT国际公开第WO 03/048768号(Boutell et al.)及美国专利5,242,828号(Bergstrom et al.)。

[0074] 4.1通过质谱法侦测

[0075] 在一个优选具体例中,本发明的生物标记是通过质谱法侦测,质谱法为一种操作质谱仪以侦测气相离子的方法。质谱仪的实例是飞行时间式、扇形磁场式、四极滤质器式、离子阱式、离子回旋共振式、扇形静电分析式及这些的混合。

[0076] 在更佳的具体实例中,该质谱仪为激光解析/电离质谱仪。于激光解析/电离质谱法中,将分析物置于质谱法探针的表面,一种适合接合质谱仪的探针界面装置并把分析物呈现于电离能量下以电离及传入质谱仪内。激光解析质谱仪利用激光能,典型为紫外线激光,但亦可从红外线激光,以从表面释出分析物,以及挥发并使它们电离然后使它们可为质谱仪的离子光学仪器所用。通过LDI的蛋白质分析可采用MALDI或SELDI的形式。

[0077] 于单一TOF仪器内激光解析/电离典型地是以线抽取模式执行。串联质谱仪可使用直角抽取模式。

[0078] 4.1.1.SELDI

[0079] 本发明所使用的一种优选质量光谱测定技术是「表面增强激光解析电离」或「

SELDI」,例如,记述于美国专利5,719,060号与6,255,047号,皆属于Hutchens与Yip。这是指一种解析/电离气相离子光谱法(例如,质谱法),于其中分析物(于此指一种或多种生物标记)是经捕捉于SELDI质谱法探针表面。

[0080] SELDI亦被称为「亲和捕捉质谱法」或者「表面增强亲和捕捉」(“SEAC”)。该方法包括探针的使用,该探针于其表面上具有一种物质,能通过该物质与分析物之间的非共价亲和作用(吸附)捕捉该分析物。该物质的各式称呼为「吸附物」、「捕捉剂」、「亲和剂」或者「结合基团」。此等探针可称为「亲和捕捉探针」以及具有「吸附表面」。该捕捉剂可为任何能结合分析物的物质。该捕捉剂通过物理吸着或化学吸着而粘附于探针表面。在某些具体实例中,该探针具有已附着于该探针表面的捕捉剂。在其它具体实例中,该探针经预先活化且其包含一种能结合捕捉剂的反应基团,例如通过反应形成共价或配位键。环氧化物和酰基咪唑为共价结合多肽捕捉剂时的有用反应基团,例如为抗体或细胞受体。次氮基三乙酸(nitrilotriacetic acid)和亚氨基二乙酸是作为能与金属离子结合的螯合剂的有用反应基团,该金属离子非共价地与含组氨酸肽反应。吸附物一般分为层析吸附剂与生物特异性吸附剂。

[0081] 「层析吸附剂」是指一种通常用于层析的吸附剂材料。层析吸附剂包含,例如离子交换材料、金属螯合剂(例如次氮基三乙酸和亚氨基二乙酸)、固定金属螯合物、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(如核苷酸、氨基酸、简单糖和脂肪酸)及混合形吸附剂(如疏水吸引/静电排斥吸附物)。

[0082] 「生物特异性吸附剂」是指一种包括生物分子的吸附剂,该生物分子例如为核酸分子(如适体)、多肽、多糖、脂质、类固醇或这些的共轭物(如糖蛋白、脂蛋白、糖脂、核酸(如DNA)-蛋白质共轭物)。在某些实例中,该生物特异性吸附剂可为大分子结构,如多蛋白复合物、生物膜或病毒。生物特异性吸附剂的实例是抗体、受体蛋白质和核酸。生物特异性吸收剂通常比层析吸附剂对目标分析物具有更高的特异性。更进一步用于SELDI的吸附剂的实例可于美国专利6,225,047号中查到。「生物选择性吸附剂」是指与分析物结合亲和性为至少$10^{-8}$M的吸附剂。

[0083] 由Ciphergen Biosystems,Inc.生产的蛋白质生物晶片包括多个具有层析或生物特异性吸附剂于可定址位置附着于其上的表面。Ciphergen的ProteinChip®阵列包括NP20(亲水性);H4和H50(疏水性);SAX-2,Q-10(阴离子交换);WCX-2与CM-10(阳离子交换);IMAC-3、IMAC-30和IMAC-50(金属螯合);及PS-10、PS-20(反应表面具有醯基咪唑、环氧化物)和PG-20(通过酰基咪唑耦合的蛋白质G)。疏水蛋白质晶片(ProteinChip)阵列含有异丙基或壬基苯氧基-聚(乙二醇)异丁烯酸盐官能基。阴离子交换蛋白质晶片(ProteinChip)阵列含四级铵官能团。阳离子交换蛋白质晶片(ProteinChip)含有羧酸功能团。固定金属螯合蛋白质晶片(ProteinChip)阵列含有次氮基三乙酸官能团(IMAC3和IMAC30)或者O-异丁烯酰基-N,N-二-羧甲基酪氨酸官能团(IMAC 50),其可通过螯合吸附过渡金属如铜、镍、锌和镓。预先激活的蛋白质晶片(ProteinChip)阵列含有酰基咪唑或环氧化物官能团,其能与蛋白质上的基团通过共价键相互作用。

[0084] 这些生物晶片更进一步记述于:美国专利6,579,719号(Hutchens and Yip,“Retentate Chromatography,”June 17,2003)、美国专利6,897,072号(Rich et al.,“Probes for a Gas Phase Ion Spectrometer,”May 24,2005)、美国专利6,555,813号

(Beecher et al.,“Sample Holder with Hydrophobic Coating for Gas Phase Mas Spectrometer,”April 29,2003)、美国专利公开案号U.S.2003-0032043 A1号(Pohl and Papanu,)Latex Based Adsorbent Chip,)July 16,2002)、及PCT国际公开案WO 03/040700号(Um et al.,“Hydrophobic Surface Chip,”May 15,2003)、美国专利公开案U.S.2003-0218130 A1号(Boschetti et al.,“Biochips With Surfaces Coated With Polysaccharide-Based Hydrogels,”April 14,2003)及美国专利7,045,366号(Huang et al.,“Photocrosslinked Hydrogel Blend Surface Coatings,”May 16,2006).

[0085] 通常具有吸附剂表面的探针与样品接触一段充分的时间以允许可能存在于样品中的生物标记结合至吸附剂。在培养一段时间后,清洗该基质以除去未结合的物质。可使用任何适合的清洗溶液,优选使用水性溶液。通过调整清洗的力度可控制分子保持结合的程度。清洗溶液的洗脱特性取决于,例如,pH、离子强度、疏水性、混乱度、清洁剂强度及温度。除非该探针同时具有SEAC与SEND性质(如同本文所述),接着施加能量吸收分子至具有该已结合生物标记的基质上。

[0086] 在另一方法中,生物标记可由结合于固相的免疫吸附剂捕捉,其中该吸附剂具有与该生物标记结合的抗体。清洗吸附剂以除去未结合物质后,从固相洗脱出该生物标记并通过将其施加于结合该生物标记的SELDI生物晶片而侦测,并以SELDI分析。

[0087] 通过气相离子光谱仪,如飞行时间质谱仪侦测结合于基质上的生物标记。通过离子源,如激光电离该生物反应标记,产生的离子由离子光学装置收集,然后通过质量分析器分散并分析通过的离子。然后侦测器将侦测到的离子资讯转换为质荷比。生物标记的侦测通常包包括信号强度的侦测。因此,生物标记的量与质量皆可被测定。

[0088] 4.1.2.SEND

[0089] 另一种激光解析质谱法称为表面增强完整解析(“SEND”)。SEND包括使用多种包括可化学地结合到探针表面(“SEND探针”)的能量吸收分子的探针。短语「能量吸收分子」(EAM)表示能从激光解析/电离源吸收能量,然后贡献于与其接触的分析物分子的解析与电离的分析物分子。该EAM范畴包括用于MALDI的分子,常常是指「基质,」并且以肉桂酸衍生物、芥子酸(SPA)、氰氧-羟基-肉桂酸(CHCA)和二羟基苯甲酸、阿魏酸和羟苯乙酮衍生物作为例证。在一些具体例中,该能量吸收分子合并于一种线性或交联的聚合物中,如聚甲基丙烯酸酯。例如,该组合物能为α-氰基-4-异丁烯酰基氧基肉桂酸和丙烯酸酯的共聚物。在另一具体例中,该组合物为α-氰基-4-异丁烯酰基氧基肉桂酸、丙烯酸脂和3-(三-乙氧基)甲硅烷基丙基异丁烯酸盐的共聚物。在其它具体例中,该组合物为α-氰基-4-异丁烯酰基氧基肉桂酸和十八烷基酰异丁烯酸盐(“C18SEND”)的共聚物。SEND更进一步记述于美国专利6,124,137号及PCT国际公开案WO 03/64594号(Kitagawa,“Monomers And Polymers Having Energy Absorbing Moieties Of Use In Desorption/Ionization Of Analytes,”August 7,2003)。

[0090] SEAC/SEND是一种激光解析质谱法的变体,其中捕捉剂与能量吸收分子皆附着于出现样品的表面。因此SEAC/SEND探针允许通过亲和捕捉捕捉分析物而不需藉用外界基质电离/解析。该C18SEND生物晶片是一种SEAC/SEND的变体,其包括作为捕捉剂的C18基团以及作为能量吸收基团的CHCA基团(moiety)。

[0091] 4.1.3.SEPAR

[0092] 另外一种LDI的变体被称为表面增强光不稳定附着与释放(“SEPAR”)。SEPAR包括使用含有附着于该表面的基团的探针,该基团可共价结合分析物且随后通过暴露于光下打断基团内光不稳定键而释放分析物,例如激光光束(参阅美国专利5,719,060号)。依照本发明,SEPAR与其它形式的SELDI适合于侦测生物标记形态。

[0093] 4.1.4.MALDI

[0094] MALDI是一种用于例如蛋白质与核酸的生物分子分析物的传统激光解析/电离方法。在一种MALDI方法中,样品与基质混合并直接沉淀于MALDI芯片。然而,如血清和尿液的生物样品的复杂性使此方法于无事先分级样品情况下不太理想。因此,在某些具体实例中,生物标记优选地首先是由耦合于一固体支持物如一树脂(如于一离心柱内)的生物特异性(如一抗体)或层析性材料捕捉。结合本发明的生物标记的特异亲和性材料已于上文中描述。由亲和性材料纯化后,洗脱出本发明的生物标记并以MALDI侦测。

[0095] 在另一质谱法法中,该生物标记首先于具有结合该生物标记的层析性质的层析树脂上捕捉。在实施例中,其可包括多种方法。例如,于阳离子交换树脂如CM Ceramic HyperD F树脂上捕捉生物标记,清洗树脂,洗脱生物标记并以MALDI侦测。另外,于应用阳离子交换树脂前可先通过阴离子交换树脂分级该样品。另外,其可通过阴离子交换树脂分级并直接以MALDI侦测。在又一方法中,可于含有与生物标记结合的抗体的免疫层析树脂上捕捉该生物标记,清洗树脂以除去未结合材料,从树脂上洗脱该生物标记并以MALDI或SELDI侦测洗脱出的生物标记。

[0096] 4.1.5质谱法中电离的其它形式

[0097] 在另一方法中,生物标记是以LC-MS或者LC-LC-MS侦测得到。这包括到以一次或二次通过液体层析分辨样品中的蛋白质,接着应用质谱法,通常为电喷雾离子化。

[0098] 4.1.6数据分析

[0099] 通过飞行时间质谱法对被分析物的分析会产生飞行时间光谱。最终分析的飞行时间光谱通常并不反映样本对电离能的单一脉冲信号,而是许多脉冲的信号和。这将降低杂讯并增加动态范围。随后对该时间飞行数据进行数据处理。在Ciphergen的ProteinChip®软件中,数据处理通常包括TOF至M/Z转换以产生质谱、减算基线以消除仪器偏差及高频杂讯过滤以降低高频杂讯。

[0100] 由解析与侦测生物标记所产生的数据可于一种可编程的数字电脑上分析。该电脑程式分析数据并指明侦测到的生物标记的数量,及视需要指出对每一侦测到的生物标记的信号强度与测定分子量。数据分析的步骤包括确定生物标记的信号强度并移除偏离预测的统计分布的数据。例如,可通过计算相对某些参考物的每一个谱峰的高度标准化观测到的峰值。

[0101] 电脑可转换结果数据为多种显示格式。可显示标准光谱,但于一种有用的格式中,从光谱角度来看,仅仅保留峰高和质量资讯,产生更清晰的画面并使分子量几乎相等的生物标记更容易被观测到。在另一有用格式中,比较二个或更多光谱,以方便地突显独特的生物标记及于样品中上调或下调的生物标记。利用任何一种所述的这些格式,人们可容易地确定特定生物标记是否存在于样本中。

[0102] 分析通常包括表示来自分析物的信号的谱峰的识别。谱峰的选择可通过直接观察,但也可使用软件,如Ciphergen的ProteinChip®软件套件的一部分可自动侦测谱峰。

一般而言，该软件得运作是通过识别具有信号-杂讯比高于所选阀值得信号，以及于该谱峰信号的中心标记该谱峰的质量。于一有效的应用，比较多个光谱以识别于某一选定百分比的质谱内存在的相等谱峰。该软件的一种版本群集所有于一个指定质量范围内各式质谱的谱峰，并于所有临近该质量(M/Z)群集的中点为所有谱峰指派一个质量(M/Z)。

[0103] 用于分析数据的软件包含应用演算于信号分析的演算编码，以确定该信号表示的谱峰信号是否对应本发明的生物标记。该软件亦可通过分类支干或ANN分析处理关于观察到的生物标记谱峰的数据，以确定于检查中指示特定临床参数的状态的生物标记的谱峰或其多个谱峰的结合是否存在。数据的分析对于不论直接或间接地从样品质量光谱分析获得的多种参数可能是「关键的」。这些参数包含，但不局限于，一个或多个谱峰的存在或不存在、一个谱峰或一群谱峰的形状、一个或多个谱峰的高度、一个或多个谱峰的对数高度以及于峰高数据的其它算术演算。

[0104] 4.1.7.SELDI侦测卵巢癌生物标记的常用方案

[0105] 一种侦测本发明的生物标记优选方案于下文描述。用于测试的样本，例如血清，优选地为于SELDI分析的前预先经过分级。这使该样本简单化并提高了敏感度。一种优选预先分级的方法包括使样本接触阴离子交换层析材料，例如Q HyperD(BioSepra,SA)。然后已结合的材料通过使用于pH 9,pH7,pH5,pH4,pH3的缓冲液的分步pH洗脱，以及有机清洗。收集含有该生物标记的多个分级。CTAP3于有机洗液分级发现，其亦可于pH4的分级发现。

[0106] 然后用于测试的样本(优选预分级)接触一种包括IMAC-Cu生物晶片的亲和捕捉探针。以缓冲液清洗该探针，该缓冲剂可于洗去未结合分子同时保留该生物标记。适合各生物标记的清洗液为于表1内所识别的缓冲液。通过激光解析/电离质谱法侦测该生物标记。

[0107] 另外，若可取得辨识CTAP3的生物标记的抗体，可将其附着于一种探针表面，如一预激活PS10或者PS20蛋白质晶片阵列(Ciphergen Biosystem,Inc.)。这些抗体能从样品中将生物标记捕捉到探针表面。然后可通过如激光解析/电离质谱法测得生物标记。

[0108] 4.2.通过免疫检测法进行侦测

[0109] 在本发明另一具体例中，本发明的生物标记通过一种异于质谱法或其它借助该生物标记质量的方法测定。于这种非借助质量的一个具体例中，本发明的生物标记通过免疫检测法测定。免疫检测法需要生物特异性的捕捉剂，例如抗体以捕捉该生物标记。抗体可由本领域已知的方法制造，例如用该生物标记免疫动物。该生物标记可基于其结合特征而从样本中分离。另外，若已经知道多肽生物标记的氨基酸序列，可合成该多肽并藉其由本领域已知的方法产生抗体。

[0110] 本发明考虑传统免疫包括，例如，夹心免疫检测法包括ELISA或者基于萤光的免疫检测法，以及其它酵素免疫检测法。浊度法是一种于液相实施的检测法，其中抗体是于溶液中。而抗体与抗原的结合使得所测定的吸光度产生变化。在基于SELDI的免疫检测法中，生物标记的生物特异性捕捉剂附着于MS探针表面，例如预激活蛋白质晶片(ProteinChip)阵列。生物标记通过该反应剂特异性地捕捉于该生物晶片上，并以质谱法侦测捕捉的生物标记。

[0111] 5.受试对象卵巢癌状态的确定

[0112] 本发明的生物标记可用于诊断测试中以估定受试对象的卵巢癌状态，例如，诊断卵巢癌。短语「卵巢癌状态」包含任何可鉴别的疾病表现，包括非疾病。例如，卵巢癌状态包

含，但不局限于疾病的存在或不存在(例如，卵巢癌相对非卵巢癌)、患病的风险、疾病的阶段、疾病的进程(例如，随时间疾病的加剧或好转)及疾病治疗的效果或反应。

[0113] 将测试结果与卵巢癌状态关联化包括对该结果应用某一类演算以得到该状态。该分类演算可简单至确定所测定的CTAP3相关蛋白质含量，例如CTAP3，是否高于或低于一特定反折(cut-off)数值。使用多种生物标记时，分类算法可为一种线性回归公式。另外，该分类算法可为任何数个本文所述的学习算法的结果。

[0114] 于复合分类演算情况下，则需要使用电脑进行数据上的演算，由此确定其分类，例如，可编程的数字电脑。于任一个情况，该状态可记录于切实的媒介，例如，以电脑的可读格式如一记忆驱动或磁盘或仅仅打印于纸上。其结果亦可于电脑屏幕中呈现。

[0115] 5.1单一生物标记

[0116] 本发明的生物标记可用于诊断测试以估定受试对象卵巢癌状态，例如，诊断卵巢癌。短语「卵巢癌状态」包含任何可鉴别的疾病表现，包括非疾病。例如，疾病状况包括但不局限于疾病的存在或不存在(例如，卵巢癌相对非卵巢癌)、患病的风险、疾病的阶段、疾病的进程(例如，随时间疾病的恶化或好转)及疾病治疗的效果或反应。基于这个状态，可指明进一步程序，包含附加的诊断测试或治疗程序或食物疗法。

[0117] 正确预测状态的诊断测试力度通常通过测试该检测法的敏感度、该检测法的特异性或接收对象工作特征(「ROC」)曲线下的面积而测定。敏感度为一个测试预测为阳性时真阳性百分比，而特异性为一个测试预测为阴性时真阴性百分比。一条ROC曲线将一个测试的敏感度提供作为1-特异性的函数。ROC曲线下区域越大，一个测试的预测值则越有力。测量一个测试的有用性其它测定为阳性预测值与阴性预测值。阳性预测值为测试为阳性且确实为阳性的人的百分比。阴性预测值为测试阴性且确实为阴性的人的百分比。

[0118] 本发明的生物标记显示了至少$P<0.05$、$P<10^{-2}$、$P<10^{-3}$、$P<10^{-4}$或$P<10^{-5}$的不同卵巢癌状态的统计差异。单独利用这些生物标记或者它们组合的诊断测试显示至少75％、至少80％、至少85％、至少90％、至少95％、至少98％及约100％的敏感度和特异性。

[0119] CTAP3差异性地存在于卵巢癌中，由此，在确定卵巢癌状态时，每一个单独有助益。该方法包括，首先，使用本文所述侦测方法测定受试对象样品中所选定生物标记，例如，于一SELDI生物晶片上捕捉后以质谱法侦测，其次，将该测定值与一个诊断量或是一个能区分卵巢癌阴性状况与卵巢癌阳性状况的反折作比较。诊断量表明当高于或低于其时，将受试对象分类为患有特定卵巢癌状态的一种生物标记的测定量。例如，若与正常比较该生物标记于卵巢癌中为上调，则高于诊断反折的测定量作出为卵巢癌的诊断。另外，若该生物标记于卵巢癌中为下调，则低于诊断分界的测定量作出为卵巢癌的诊断。由于为本领域已知技术，通过调整检测法中使用的特定诊断反折，可依照诊断者偏好的增强诊断检测法的敏感度或特异性。该特定诊断反折可通过，例如，测定来自多个具有不同卵巢癌状态的受试对象的具有统计上显著意义数目的样本的生物标记含量，如同本文所实施的，并取可满足该诊断者所要求的特异性与敏感度水平的分界而确定。

[0120] 5.2.生物标记的组合

[0121] 当单独的生物标记为有用的诊断生物标记，可发现多个生物标记的组合可提供比单一的生物标记单独于一种特定状态下更大的预测值。特别地，于样品中侦测多种生物标记可增加该测试的敏感度与特异性。至少二种生物标记、优选地至少三种或更多种生物标

记的组合，有时称作「生物标记图谱(profile)」或「生物标记指纹」。因此，CTAP3相关蛋白质，例如CTAP3，可结合其它卵巢癌或子宫内膜癌的生物标记，以提高诊断测试的敏感度及/或特异性。

[0122] 特别地，卵巢癌状态的诊断测试包括CTAP3的测定，以及任何下列已识别于表3中的卵巢癌生物标记(包含恰当位置的修饰形式)，其相比于一种CTAP3相关蛋白质的单独测定来说，例如CTAP3，具有更强的预测能力。

[0123] 表3

[0124]

| 标记 | 评论(于癌症中上或下调) |
| --- | --- |
| 转铁蛋白 | 下调；79 kD，于镍附着的 IMAC 蛋白质晶片(ProteinChip)阵列侦测。<br>WO 03/057014 |
| 结合珠蛋白祖蛋白片段 | 上调；9.2 kD，于镍附着的 IMAC 蛋白质晶片(ProteinChip)阵列侦测。<br>WO 03/057014 |
| 载脂蛋白 A1(ApoA1) | 下调；预测质量 28078.62 D；于 IMAC 或 H50 蛋白晶片(ProteinChip)阵列侦测。<br>WO 2004/013609 |
| 转甲状腺素蛋白和转甲状腺素蛋白 delta N 10 | 下调；预测质量分别为 13761 D 及 12887 D；于 Q10 蛋白晶片(ProteinChip)阵列侦测。<br>WO 2004/013609 |
| ITIH4 内部片段 | 上调；于其他片段中：MNFRPGVLSSRQLGLPGPPDVPDHAAYHPF(SEQ ID NO:1)’一种人类间-aplha 胰蛋白酶抑制物延伸氨基酸660-689的片段、重链H4；预测质量：3273.72 D；于IMAC 蛋白晶片(ProteinChip) |

[0125]

| | |
|---|---|
| | 阵列侦测<br>WO 2004/013609 及 WO 2005/098447 |
| Beta 2-微球蛋白 | 上调；于 IMAC-Cu 蛋白晶片(ProteinChip) 阵列侦测为 11.7 KD<br>于 2005 年 6 月 24 日申请的美国临时申请案 60/693,679, |
| 海帕西啶及其修饰形式 | 上调； 于 SELDI 侦测-与 ITIH4 片段共沉淀。<br>海帕西啶-25 (SEQ ID NO:2): DTHFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT<br>海帕西啶-24 (SEQ ID NO: 3):THFPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT<br>海帕西啶-22 (SEQ ID NO: 6): FPICIFCCGCCHRSKCGMCCKT<br>海帕西啶-20 (SEQ ID NO: 4): ICIFCCGCCHRSKCGMCCKT |
| 结合珠蛋白 alpha | 上调；于铜附着的 IMAC 蛋白晶片(ProteinChip)阵列侦测为 11，600 D 至 11,700 D<br>WO 02/100242 |
| 波斯塔停 | 上调;<br>USP 6，846，642 |
| 骨桥素 | 上调;<br>尿液内-糖基化—US 2005-0009120 A1<br>血清内—US 2005-0214826 |
| 嗜酸性粒细胞衍生神经毒素 | 尿液内上调。于 WCX2 蛋白晶片阵列侦测糖基化为 17.4 Kda<br>WO 2005-0009120 A1 |
| 瘦素 | 下调;<br>US 2005-0214826 |
| 催乳素 | 上调; |

[0126]

| | |
|---|---|
| | US 2005-0214826 |
| IGF-II | 下调;<br>US 2005-0214826 |
| 血红蛋白(alpha-血红蛋白,<br>beta-血红蛋白) | 上调;<br>WO 2006-019906 |
| CA 125 | 上调 |

[0127] 于日本群组的样本研究中发现,海帕西啶、ApoA1、β2微球蛋白和CTAP-3的组合是一种特别有效的诊断组合。卵巢癌的诊断通常包括CA125的测量,因为该生物标记的水平伴随卵巢癌而增加。因此,在确定卵巢癌状态时,CA125的水平能与上述标记的任何组合相关联。CA125尤其用于作为进行卵巢癌测试的妇女以CA125测试为常规病情检查部分。

[0128] 其它可与CTAP3组合的生物标记包含,但不局限于CA125 II、CA15-3、CA19-9、CA72-4、CA 195、肿瘤相关胰蛋白酶抑制剂(TATI)、CEA、胎盘碱性磷酸酶(PLAP)、唾液酸TN、半乳糖转移酶、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF,CSF-1)、溶血磷脂酸(LPA)、表皮生长因子受体胞外段的110kD成分(p110EGFR)、组织激肽释放酶,例如激肽释放酶6及激肽释放酶10(NES-1)、丝氨酸蛋白水解酶(prostasin)、HE4、激氨酸激酶B(CKB)、LASA、HER-2/neu、尿液促性腺激素肽、Dianon NB 70/K、组织肽抗原(TPA)、SMRP,骨桥素、及结合珠蛋白、瘦素、催乳素、类胰岛素生长因子I或II。

[0129] 5.3.确定患病的风险

[0130] 在一具体例中,本发明提供确定受试对象患病风险的方法。生物标记含量或模式(pattern)是多种风险状况的特征,例如,高,中或低。患病的风险的确定是通过测定相关的生物标记或多个生物标记,随后可对其进行分类演算或将其与相关于特定风险水平的生物标记的参考量或/与模式作比较。

[0131] 5.4.确定疾病的阶段

[0132] 在一具体例中,本发明提供确定受试对象疾病阶段的方法。该疾病每一阶段具有一种生物标记的特征性含量或一组生物标记(一种模式)的相对含量。疾病阶段的确定是通过测定相关生物标记,随后可对其进行分类演算或将其与相关于特定风险水平的生物标记的参考量或/模式作比较。

[0133] 5.5.确定疾病的进展(加剧/好转)

[0134] 在一具体例中,本发明提供确定受试对象疾病进展的方法。疾病进展是指随时间推移疾病状态的变化,包含疾病加剧(恶化)与疾病好转(改善)。该生物标记的含量或相对含量(例如,模式)随着时间推移而变化。例如,CTAP3随疾病增加。因此,这些生物标记的趋势,随时间增加或降低不论是朝着疾病或是非疾病都表明疾病的进展。因此,该方法包括在至少二个不同的时间点测定受试对象的一种或多种生物标记,例如,第一时间和第二时间,以及若有含量的变化则比较含量的变化。疾病的进展基于这些比较而确定。

[0135] 5.6.报告状态

[0136] 本发明的另一个具体例关于对例如技术人员、医生或病患传达检测结果或诊断或二者。在某些具体例中,电脑用于将检测结果或诊断或二者传达给有意方,如医生及其病

患。在一些具体例中，于一个与该结果或诊断将传达的国家或权限不同的国家或权限中进行该检测或是分析该检测结果。

[0137] 在本发明的一优选具体例中，基于经测试的受试对象中差异性存在的CTAP3相关蛋白质的诊断在诊断一完成尽速传达给病患。该诊断可由治疗受试对象的医生传达于受试对象。另外，该诊断可通过电子邮件传送或通过电话传达给经测试的受试对象。电脑可用于以电子邮件或电话传达该诊断。在某些具体例中，使用熟悉电信的技术人员所熟知的电脑硬体与软件的组合，可产生并自动将含有诊断测试结果的资讯传达于受试对象。保健取向的通信系统的实例已描述于美国专利号6,283,761，然而，本发明并不局限于使用该特定通信系统的方法。在本发明的某些具体例中，该方法的所有或一些步骤，包含样品检测、疾病诊断，及检测结果或诊断的传达，这可于不同(例如外国的)权限中实行。

[0138] 5.7.病患处理

[0139] 在某些鉴定卵巢癌状态的方法的具体例中，该方法进一步包括基于该状态而处理病患的治疗。这种处理包含医生或临床医生于确定卵巢癌状态后的行动。例如，若医生作出卵巢癌诊断，随之可进行某种食物疗法治疗，例如可能接着开方或投予治疗剂。另外，非卵巢癌或非卵巢癌诊断将可伴随更进一步的测试以确定该病患可能遭受的一种特定疾病。同样的，若诊断测试对卵巢癌状态作出不确定结果，则可进行进一步的测试。

[0140] 本发明的另一个具体例关于对例如技术人员、医生或病患传达检测结果或诊断或二者。在某些具体例中，电脑用于将检测结果或诊断或二者传达给有意方，如医生及其病患。在一些具体例中，于一个与该结果或诊断将传达的国家或权限不同的国家或权限中进行该检测法或是分析该检测结果。

[0141] 在本发明的一优选具体例中，基于经测试的受试对象中差异性存在的生物标记的诊断在诊断一完成尽速传达给病患。该诊断可由治疗受试对象的医生传达于受试对象。另外，该诊断可通过电子邮件传送或通过电话传达给经测试的受试对象。电脑可用于以电子邮件或电话传达该诊断。在某些具体例中，使用熟悉电信的技术人员所熟知的电脑硬体与软件的组合，可产生并自动将含有诊断测试结果的资讯传达(通信)于受试对象。保健取向的通信系统的实例已描述于美国专利号6,283,761，然而，本发明并不局限于使用该特定通信系统的方法。在本发明的某些具体例中，该方法的所有或一些步骤，包含样品检测、疾病诊断，及检测结果或诊断的传达，这可于不同(例如外国的)权限中实行。

[0142] 5.8.确定制药药物疗效

[0143] 在另一具体例中，本发明提供确定制药药物疗效的方法。这些方法适用于实施该药物的临床试验与监控对于该药物病患的进程。治疗与临床试验包括于一特别食物疗法中投予该药物。该食物疗法可包括该药物的单一剂量或是一段时间该药物的多个剂量。医生或临床研究者于投予过程中监控该药物对于病患或受试对象的效果。若该药物对于病症具有药物影响，则本发明的生物标记含量或相对量(例如，模式或图谱)会朝非疾病图谱变化。因此，可追踪于治疗过程中受试对象体内这些生物标记量的进展。因此，该方法包括测定于接受药物治疗的受试对象体内一种或多种生物标记，以及将这些生物标记量与受试对象的疾病状态关联化。该方法的一具体例包括于一药物治疗过程的至少二个不同时间点上测定一种或多种生物标记的水平，例如，第一时间和第二时间(第一次或是第二次)，以及若有变化，则比较生物标记量的变化。例如，于投药前后或者于投药期间的二个不同时间点测定一

种或多种生物标记。治疗效果基于这些比较而确定。若治疗为有效，则一种或多种该生物标记将趋于正常，而若治疗无效，该生物标记则趋于疾病迹象。

[0144] 6.鉴定卵巢癌状态的分类演算的产生

[0145] 在一些具体例中，光谱(例如质谱或飞行时间谱)中使用如「已知样本」的样本产生得到的数据，可用来「训练」分类模型。「已知样本」是一种已预分类的样本。由光谱衍生并用于形成分类模型的数据称作「训练数据组」。一旦被训练，该分类模式可识别由使用未知样本所产生的光谱所衍生的数据的模式。然后，该分类模型可用于将未知样本归类。这将适用于，例如预测一种特定生物样本是否与某种生物病症(例如，疾病相对非疾病)相关。

[0146] 用于形成分类模型的训练数据组可包括原始数据或预处理数据。在一些具体例中，原始数据可直接由飞行时间谱或质谱中得到，且其随后可视需要地如上述般进行「预处理」。

[0147] 可使用任何适合的统计分类(或「学习」)方法形成分类模式，其试图基于存在于数据中的目标参数将数据本体分离归类。分类方法可为监督或无监督。监督或无监督分类过程的实例记述于Jain,"Statistical Pattern Recognition:A Review",IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence,Vol.22,No.1,January 2000,其所教导的内容并入本文参考。

[0148] 于监督分类中，将包含已知类别的样本的训练数据呈现于学习机制，其学习一组或多组定义各已知类别的关系。然后可将新数据应用于该学习机制，其随后使用所学习到的关系分类该新数据。监督样本过程的实例包含线性回归过程(例如，多元线性回归(MLR)、偏最小二乘回归(PLS)及主成分回归(PCR))、二进制判定树(例如，递归分化过程，如CART-分类和回归树)、人工神经网络，例如反向传播网络、辨别分析(例如，贝叶斯分类器或费希尔分析)、逻辑分类器及支援向量分析器(支援向量机)。

[0149] 优选监督分类方法是递归分化过程。递归分化过程利用递归分化树将从未知样本衍生的光谱分类。进一步关于递归分化过程的描述提供于美国专利申请号2002 0138208 A1,Paulse et al.,"Methods for analyzing mass spectra."。

[0150] 在另一些具体例中，所建构的分类模型可使用无监督学习方法形成。无监督分类试图基于训练数据组的相似处学习分类，而不用预分类光谱，其中由该光谱衍生训练数据组。无监督学习方法包括群集分析(cluster analysis)。群集分析尝试将数据分成「群集」或群组，其理想应为所具有的每一成分彼此非常相似，并且与其他群集的成分非常不相似。随后利用某些用于测定数据项间的距离的距离度量来测定相似性，及群集彼此靠近的数据项。群集技术包含MacQueen的K-平均演算法同Kohonen的自组织映射(Self-Organizing Map)演算。

[0151] 声称可把生物资讯分类的学习演算法已描述于，例如在PCT国际公开号WO 01/31580(Barnhill et al.,"Methods and devices for indentifying patterns in biological systems and methods of use thereof")、美国专利申请号No.2002 0193950 A1(Gavin et al.,"Method or analyzing mass spectra")、美国专利申请号2003 0004402 A1(Hitt et al.,"Process for discrimination between biological states based on hidden patterns from biological data")、及美国专利申请号2003 0055615A1(Zhang and Zhang,"Systems and methods for processing biological

expression data")。

[0152] 可于任何合适的数字计算机上形成与使用该分类模型。适合的数字计算机包括微型、小型或大型计算机，其利用任何标准或特殊化操作系统，例如基于Unix、Windows™或Linux™的操作系统。所使用的数字计算机可完全与产生感兴趣的光谱的质谱仪分离，或可与质谱仪耦合。

[0153] 依照本发明的具体例的训练数据组与分类模式可通过由数字计算机执行或使用的计算机编码而具体化。该计算机编码能储存于任何合适的计算机可读取介质，其包含光碟或磁碟、记忆棒，磁带等等，并可由任何一种合适的计算机编程语言包括C、C++、visual basic等编写。

[0154] 上述的学习演算法适用于发展已发现的生物标记的分类演算或发现卵巢癌的新生物标记。因此，该分类演算法通过提供单独或组合使用生物标记的诊断值(如反折点)而形成诊断测试的基础。

[0155] 7.物质的组合物

[0156] 在另一态样，本发明提供基于本发明的生物标记的物质组合物。

[0157] 在一具体例中，本发明提供本发明的生物标记的纯化型式。纯化的生物标记可作为抗原以制备抗体。纯化的生物标记亦可作为检测过程的标准物。于此，一种「纯化的生物标记」是一种已由其他蛋白质及肽并/或发现该生物标记的生物样本的其他物质中单离出的生物标记。可使用任何本领域已知技术纯化生物标记，包括但不局限于，机械分离(例如，离心)、硫酸铵沉淀、透析(包括大小排阻透析)、大小排阻层析、亲和层析、阴离子交换层析、阳离子交换层析及金属螯合层析。这些方法可以任何适当的规模进行，例如，于层析柱内，或生物晶片上。

[0158] 在另一具体例中，本发明提供一种生物特异性捕捉剂，可视需要地为纯化形式，其特异地结合本发明的生物标记。在一具体例中，该生物特异性捕捉剂是一种抗体。这类组合物适用于在例如诊断的侦测检测法中侦测该生物标记。

[0159] 在另一具体例中，本发明提供一物件，其包括一种结合本发明生物标记的生物特异性捕捉剂，其中该剂结合于固相上。例如，本发明预计一种装置，其包括衍生具有该生物特异性捕捉剂的珠、晶片、膜、石块(monolith)，或微滴定盘。此等物件用于生物标记侦测检测法。

[0160] 在另一具体例中，本发明提供一种组合物，其包括结合至本发明生物标记的一种生物特异性捕捉剂，如抗体，该组合物视需要地为纯化形式。这种组合物适用于纯化该生物标记或可应用于侦测该生物标记的检测法。

[0161] 在另一具体例中，本发明提供一种物件，其包括一种固体基质，其中一种吸附剂附着于该固体基质上，吸附剂例如层析吸附剂或生物特异性捕捉剂，本发明的生物标记可进一步结合于其上。在一个具体例中，该物件是一种质谱法的生物晶片或探针，例如一SELDI探针。此等物件用于纯化或侦测该生物标记。

[0162] 8.侦测卵巢癌生物标记的套组

[0163] 在另外一态样，本发明提供多种鉴定卵巢癌状态的套组，其用于侦测根据本发明的生物标记。在一具体例中，该套组包括固体支援物，例如晶片、微滴定盘或珠或树脂，具有附着于其上的捕捉剂，该捕捉剂结合本发明的生物标记。因此，举例来说，本发明的套组可

包括SELDI质谱法的探针，例如ProteniChip®阵列。若是生物特异性捕捉剂，该套组可包括具反应表面的固体支援物，及含有该生物特异性捕捉剂的容器。

[0164] 该套组亦可包括一种清洗溶液或配制该清洗溶液的指导说明，其中该捕捉剂和清洗溶液的组合允许捕捉一种或多种生物标记于固体支援物上以供后续通过如质谱法侦测。该套组可包含一种以上的吸附剂，每一种于不同固体支援物上。

[0165] 在更进一步的具体例中，该套组能包括标签或分離的夾頁形式的适合操作参数的指导说明。例如，该指导说明可告知顾客关于如何收集样本，如何清洗探针或将侦测的特定生物探针。

[0166] 在另一些具体例中，该套组可包括一个或多个具有作为校正标准物使用的生物标记样本的容器。

[0167] 9.确定制药药物的疗效

[0168] 在另一具体例中，本发明提供确定制药药物疗效的方法。这些方法适用于实施该药物的临床试验与监控对于该药物病患的进程。治疗与临床试验包括于一特别食物疗法中投予该药物。该食物疗法可包括该药物的单一剂量或是一段时间该药物的多个剂量。医生或临床研究者于投予过程中监控该药物对于病患或受试对象的效果。若该药物对于病症具有药物影响，则本发明的生物标记含量或相对量(例如，模式或图谱)会朝非疾病图谱变化。因此，可追踪于治疗过程中受试对象体内这些生物标记量的进展。因此，该方法包括测定于接受药物治疗的受试对象体内一种或多种生物标记，以及将这些生物标记量与受试对象的疾病状态关联化。该方法的一具体例包括于一药物治疗过程的至少二个不同时间点上测定一种或多种生物标记的水平，例如，第一时间和第二时间(第一次或是第二次)，以及若有变化，则比较生物标记量的变化。例如，于投药前后或者于投药期间的二个不同时间点测定一种或多种生物标记。治疗效果基于这些比较而确定。若治疗为有效，则一种或多种该生物标记将趋于正常，而若治疗无效，该生物标记则趋于疾病迹象。

[0169] 10.卵巢癌生物标记于筛选检测的使用及治疗卵巢癌的方法

[0170] 本发明的方法亦有其他应用。例如，该生物标记可用于筛选调整活体外或活体内生物标记表达的化合物，该化合物随后用于治疗或预防病患的卵巢癌。在另一实例中，该生物标记可用于监控对卵巢癌的治疗的反应。在另一实例中，该生物标记可用于遗传学以确定受试对象是否具患卵巢癌的风险。

[0171] 因此，举例来说，本发明的套组可包括含有疏水功能的一种固体基质，如蛋白质生物晶片(如Ciphergen H50蛋白质晶片(ProteinChip)阵列，例如蛋白质晶片(ProteinChip)阵列)以及清洗该基质的醋酸钠缓冲液，同时提供测定于该晶片上的本发明的生物标记及使用该测定来诊断卵巢癌的指导说明。

[0172] 可通过识别可与一种或多种CTAP3相关蛋白质反应的化合物而初步筛选出适用于治疗测试的化合物。举例来说，筛选可包含重组表达一种CTAP3相关蛋白质，例如CTAP3、纯化该生物标记，以及附着该生物标记于基质上。然后这些测试化合物可与基质接触，通常于水性条件下，接着测定测试化合物与生物标记间的相互作用，例如测量洗脱率作为盐溶液浓度的函数。某些蛋白质可辩识并裂解CTAP3相关蛋白质，于这种情况中，可通过于标准检测试法中监控一种或多种生物标记的分解而侦测到这些蛋白质，例如通过蛋白质凝胶电泳。

[0173] 在一个相关具体例中，可测定一种测试化合物其可抑制一种或多种CTAP3相关蛋白质活性的能力。熟习本领域技术人员将知道用于测定一种特定生物标记的活性的那些技术将极度取决于生物标记的功能与性质。例如，若可可取得恰当的基质且若基质的浓度或反应产物出现可容易测定时，可测试生物标记的酶活性。可通过测定测试化合物的存在或不存在情况下的催化速率以确定潜在治疗测试化合物去抑制或增强一种指定的生物标记活性的能力。测试化合物干扰CTAP3相关蛋白质的非酶(例如，结构上的)功能或活性的能力亦可被测得。例如，可于测试化合物存在或不存在情况下由光谱法监测含有CTAP3相关蛋白质的其中之一的多蛋白复合物的自身装配。另外，若该生物标记是一种转录的非酶增强子，可通过测定活体外或体内该测试化合物存在或不存在条件下该生物标记依赖转录的水平而识别出一种干扰该生物标记的能力而增强转录的测试化合物。

[0174] 可将能调整CTAP3相关蛋白质活性的测试化合物投予患有卵巢癌或其他癌症或存在卵巢癌或其他癌症风险的病患。例如，若于活体内该特定生物标记的活性阻止卵巢癌蛋白质的累积，则投予增加一种特定生物标记活性的测试化合物可降低病患患有卵巢癌风险，。相反地，若该生物活性的增强至少部分导致卵巢癌的发作的话，则投予降低一种特定生物标记活性的测试化合物可降低病患卵巢癌风险。

[0175] 在另一种态样中，本发明提供一种识别出适于治疗失调的化合物的方法，该失调例如与CTAP 3的修饰形式的水平升高相关的卵巢癌。例如，在一具体例中，可筛选细胞萃取物或表达库以选出催化完整长度的CTAP3裂解而形成CTAP3的截断形式的化合物。在这类筛选检测法的具体例中，可通过附着一种荧光物于CTAP3而侦测CTAP3的裂解，其中该荧光物于CTAP3未裂解时保持淬火而于该蛋白裂解时则发光。另外，一种完整长度CTAP3的变体，其经修饰而使得在氨基酸X和Y间的酰胺键不可裂解，可将其用于选择性结合或「困住」可于活体内该位置裂解完整长度CTAP3的细胞蛋白酶。筛选与识别蛋白酶及其目标物的方法已于科学文献中完整记录，例如，于Lopez-Ottin et al.(Nature Reviews,3:509-519(2002))。

[0176] 在另一具体例中，本发明提供一种治疗或降低疾病进程或可能性的方法，例如，卵巢癌，其与截断CTAP3的水平增加相关。例如，于识别一种或多种可裂解完整长度CTAP3的蛋白质后，可筛选组合库以选出抑制该已识别蛋白质的裂解活性的化合物。筛选化学库以选出该化合的方法为本领域已知技术。参阅，如，Lopez-Ottin et al.(2002)。另外，可基于CTAP3结构明智地设计抑制性化合物。

[0177] N端截断的CTAP3被认为减少CTAP3的蛋白酶抑制活性。参阅，如Abrahamson et al.(Biochem.J.273:621-626(1991))。因此，给予截断CTAP3完整CTAP3作用的化合物可能可用于治疗病症，例如卵巢癌，其与截断形式的CTAP3相关。因此，在进一步的具体例中，本发明提供识别增强截断CTAP3对其目标蛋白酶的亲和性的化合物的方法。例如，化合物可通过其给予CTAP3完整长度CTAP3蛋白酶的抑制活性能力而筛选。能调整CTAP3的抑制活性或与CTAP3反应的分子的活性的测试化合物可随后于活体内测试其减缓或停止受试对象体内卵巢癌进程的能力。本领域具有通常技术者能理解上述例示的利用CTAP3的方法可应用于任何本文所述的CTAP3相关蛋白质。

[0178] 于临床阶段，筛选一种测试化合物包含在受试对象接受测试化合物前与后从受试对象获得样本。可测定与分析于样本中一种或多种CTAP3相关蛋白质的水平，例如CTAP3，以确定在接受测试化合物后该生物标记水平是否变化。该样本可通过本文所述的质谱法分

析,或该样本可通过任何恰当的已知技术分析。例如,CTAP3相关蛋白质水平可直接通过使用特异地结合该生物标记的放射性或荧光标记抗体的西方墨点法测定。另外,可测定编码一种或多种生物标记的mRNA的水平变化,并将其与于投与受试对象一种给定测试化合物关联。在进一步的具体例中,一种或多种生物标记表达水平的变化可通过活体外方法与材料测得。例如,可将表达或能表达一种或多种CTAP3相关蛋白质的人类组织培养细胞与测试化合物接触。经测试化合物治疗的受试对象将被常规地检查任何治疗可导致的生理影响。特别地,该测试化合物将以其于受试对象降低疾病可能性的能力而评估。另外,若将该测试化合物被投予给于之前已诊断为卵巢癌的受试对象,则将以其减缓或停止疾病进程的能力而筛选测试化合物。

[0179] 11.实施例

[0180] 11.1.实施例1:卵巢癌生物标记的发现

[0181] 实施例1

[0182] 图谱化方法(Profiling methods):

[0183] 血清分级:混合25ul上清液与37.5ul变性缓冲液(U9:9M尿素,2%CHAPS,50mM Tris pH 9.0),于4度震动30分钟。加入37.5ul的50mM Tris(pH 9)使总体积为100ul。于每一样品,将50%悬浊状的100ul的Q Ceramic HyperD 20阴离子交换树脂先以100ul 50mM Tris(pH 9)其次使用U1缓冲液(U9以1:9稀释于50mM Tris pH 9)三次平衡。将100ul变性血清施加于树脂上并允许在4度30分钟使之结合。收集未结合物质并于树脂中加入75ul清洗缓冲液1(50mM Tris-HCl+0.1%OGP+50mM氯化钠,pH9)。于MicroMix上搅动该树脂10分钟。收集该洗液并与将其与未结合物质组合(流动通过;分级1)。使用二次各分装液为75ul的pH7,5,4,3清洗缓冲液及有机溶液以分步pH梯度收集多个分级。每次在MicroMix上搅动该树脂10分钟。总共收集为六个分级。以下为各缓冲溶液:清洗缓冲液2:50mM HEPES+0.1%OGP+50mM氯化钠(pH7);清洗缓冲液3:100mM醋酸钠+0.1%OGP+50mM氯化钠(pH5);清洗缓冲液4:100mM醋酸钠+0.1%OGP+50mM氯化钠(pH4);清洗缓冲液5:50mM柠檬酸钠+0.1%OGP+50mM氯化钠(pH3);清洗缓冲液6:33.3%2-丙醇/16.7%乙腈/0.1%三氟醋酸。于Tecan Aquurius 96(Tecan)及MicroMix摇动器(DPC)上实行分级。于每一样本列(column)的一个孔洞中以同样的方式处理控制组的合并(pooled)人类血清(Intergen)样本。

[0184] 晶片结合:

[0185] 首先用20ul不同缓冲液调节20ul的每一个分级的pH值,然后结合于IMAC及CM10蛋白晶片阵列上。于IMAC阵列,以铜覆各点位置并冲洗及平衡。分级1及2与20ul IMAC结合缓冲液(含有500mM钠化钠的100mM磷酸钠pH7.0)混合;分级3-6与100mM Tris HCl pH10混合。于CM10,分级1,2及3与20ul 100mM醋酸混合;分级4,5及6与20ul CM10结合缓冲液(100mM醋酸钠,pH4.0)混合。允许于室温下反应120分钟以发生结合。然后,生物晶片以150ul结合缓冲液清洗两次,然后以200ul水清洗两次。使用的基质为SPA(于一管中加入400ul 50%乙腈及0.5%TFA,混合5分钟)。每一点内放入1ul基质二次。使用Tecan Aquurius 96(Tecan)及MicroMix摇动器(DPC)来实施晶片结合。

[0186] 数据的获得与分析:

[0187] 通过使用CiphergenExpress软体版本3.0由PCS4000仪器读取蛋白晶片(ProteinChip)阵列。使用胰岛素和免疫球蛋白标准物每周监控该仪器的运作。每一晶片于

二激光能量上读取，低与高。组织光谱并减去基线。通过一组校正物于外部校正光谱。接着将该光谱标准化为总离子电流，这是根据以下参数：于含有SPA的晶片，低能量初始质量为2000M/Z；高能量初始质量为10000M/Z。于群集谱峰，信号杂讯比设置为3。

[0188] 实施例2：卵巢癌标记的层析检测法

[0189] 加入50ul 50％悬浊的IDA-Ni(II)珠(Biosepra IMAC Hypercel，附着0.1M硫酸镍)于96孔过滤盘。转移IDA-Ni浆液至塑胶烧杯并在分注时用手或放于低速磁性搅拌盘以保持该浆液混合良好。使用大孔径吸量管吸头(tip)来分注珠子。

[0190] 清洗珠子三次，每次使用200ul 0.02％(w/v)Triton X100PBS(2X)。取5ul血清+7.2ul 9M尿素2％(w/v)CHAPS 50mM Tris HCl pH9于v型底部的96孔盘内，在室温下震动2分钟。

[0191] 使用含有蛋白抑制剂的混合物(Roche，无EDTA，每50ml加1片)的150ul 0.02(w/v)Triton X100PBS(2X)来稀释。

[0192] 加至IDA-Ni盘中，室温下在MicroMix摇动器上摇动30分钟(设定：15，6，30)。

[0193] 于真空器歧管上真空过滤。

[0194] 用200ul 0.02％TX100 PBS(2X)清洗盘八次，无混合。

[0195] 以Kimwipe轻轻吸干过滤盘底部(记住要干燥过滤膜边缘)。

[0196] 以75ul 10mM咪唑、1M尿素、0.1％(w/v)CHAPS、0.3M氯化钾、100mM Tris-HCl pH7.5洗脱四次，每次混合10分钟(15，6，10)，真空过滤并收集于0.45ml v底96孔盘。

[0197] IMAC30晶片在生物处理器中结合：

[0198] 于每一孔洞内加入50ul的50mM硫酸铜($CuSO_4$)。于Micromix上摇动10分钟(15，5，10)。

[0199] 清空孔洞。加入150ul水并清空孔洞。

[0200] 加入50ul的50mM醋酸钠(NaOAc)pH4于每孔洞内。摇动5分钟。

[0201] 清空孔洞。加入150ul水并清空孔洞。

[0202] 以200ul 1M尿素、0.1％CHAPS、0.3M氯化钾、100mM Tris HCl pH7.5平衡二次。

[0203] 每次于Micromix(15，5，5)摇动5分钟。

[0204] 于Micromix上以低速混合洗脱盘1分钟。

[0205] 将40ul洗出液加入于IMAC30-Cu晶片上的150ul(最终咪唑2.1mM)的1M尿素、0.1％CHAPS、0.3M氯化钾、100mM Tris HCl pH7.5。以胶带封住并在室温下震动60分钟(15，5，60)。

[0206] 以200ul 1M尿素、0.1％(w/v)CHAPS、0.3M氯化钾、50Mm TrisHCl pH7.5清洗一次，混合5分钟。

[0207] 以200ul水清洗二次，每次混合1分钟。

[0208] 加入两次1ul芥子酸。1管SPA+200ul ACN+200ul 1％TFA。

[0209] 使用低强度激光读取晶片。聚焦于14KDa。

[0210] 于生物处理器中Q10晶片的结合：

[0211] 以200ul 0.1M磷酸钠缓冲液pH7.5平衡二次。每次摇动5分钟(15，5，5)。

[0212] 于Micromix上以低速混合洗脱盘1分钟。

[0213] 将40ul洗出液加入于Q10晶片上的150ul(最终咪唑2.1mM)的0.1M磷酸钠缓冲液

pH7.5。以胶带封住并在室温下震动60分钟(15,5,60)。

[0214] 以200ul 0.1M磷酸钠pH7.5清洗2次,每次混合5分钟。

[0215] 以200ul水清洗一次,混合1分钟。

[0216] 加入二次1ul芥子酸。1管SPA+200ulACN+200ul 1%TFA。

[0217] 使用低及高强度激光读取晶片。聚焦于14KDa。

[0218] IDA-Ni珠的制备:

[0219] 于量筒内量取100ml IMAC Hypercel(Biosepra)填充凝胶。

[0220] 转移至一个过滤单元(0.45um醋酸纤维素)。用500ml水清洗珠子。

[0221] 转移填充珠至500ml圆底瓶。

[0222] 将100ml 0.1M硫酸镍($NiSO_4$)加至珠子并于室温于旋转器混合2小时。

[0223] 以1000ml水于过滤单元内清洗珠子。

[0224] 以500ml 2x PBS pH7.2清洗

[0225] 将IDA-Cu珠悬浮于2X PBS pH7.2中,呈50%浆液存储于4℃

[0226] 材料与试剂:

[0227] IMAC Hypercel(Biosepra)

[0228] 1-200ul的大孔径吸量管吸头(VWR53503-612)

[0229] $NiSO_4 \cdot 7H_2O$

[0230] PBS pH7.2,10x(GIBCO,稀释至2x)

[0231] 尿素

[0232] CHAPS(配备溶于水中10%(w/v)CHAPS的库存溶液)

[0233] Tris base(用以制备U9CHAPS TrisHCl pH9)

[0234] HCl,用以调整Tris base的pH

[0235] Triton X100(制备溶于水的1%(w/v)TX100的库存溶液,以2x PBS稀释至0.02%)

[0236] 完整蛋白酶抑制剂的混合片,无EDTA(Roche,1 873 580)

[0237] Silent Screen 96孔过滤盘,Loprodyne模1.2uM洞(Nalge Nunc,256065)

[0238] 96孔盘用的真空歧管

[0239] 咪唑

[0240] KCl

[0241] 1M Tris HCl pH7.5(Invitrogen)

[0242] $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

[0243] 醋酸钠及醋酸(用以制备50mM醋酸钠缓冲液pH4)

[0244] 磷酸二氢钠及磷酸一氢钠(用以制备0.1M磷酸钠缓冲液pH7.5)

[0245] 芥子酸(Ciphergen Biosystems)

[0246] 乙腈

[0247] TFA

[0248] IMAC30晶片

[0249] Q10晶片

[0250] 应理解本文所述的实施例及具体例仅作说明意图,根据它们所做的多种修饰及改动将视为已教导熟知本领域技术的人员,且包含于本申请的精神与范围及附加专利范围的

范畴内。于本文所述的所有的专利，公开本及专利申请案都完整地并入本文以作为参考资料。

序列表

<110> 约翰·霍普金斯大学
赛弗吉生物系统公司
<120> 卵巢癌的生物标记：CTAP3-相关蛋白质

<130> 63631CN (71699)

<140> CN 200680029695.X
<141> 2008-02-14

<150> PCT/US2006/024269
<151> 2006-06-21

<150> 60/693,324
<151> 2005-06-22

<160> 6

<170> 专利申请软件版本3.5

<210> 1
<211> 30
<212> 蛋白质序列
<213> 人类

<400> 1

[0001]

| Met | Asn | Phe | Arg | Pro | Gly | Val | Leu | Ser | Ser | Arg | Gln | Leu | Gly | Leu | Pro |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

| Gly | Pro | Pro | Asp | Val | Pro | Asp | His | Ala | Ala | Tyr | His | Pro | Phe |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | |

<210> 2
<211> 25
<212> 蛋白质序列
<213> 人类

<400> 2

| Asp | Thr | His | Phe | Pro | Ile | Cys | Ile | Phe | Cys | Cys | Gly | Cys | Cys | His | Arg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

| Ser | Lys | Cys | Gly | Met | Cys | Cys | Lys | Thr |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 20 | | | | | 25 | |

<210> 3
<211> 24
<212> 蛋白质序列
<213> 人类

<400> 3

| Thr | His | Phe | Pro | Ile | Cys | Ile | Phe | Cys | Cys | Gly | Cys | Cys | His | Arg | Ser |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

Lys Cys Gly Met Cys Cys Lys Thr
20

<210> 4
<211> 20
<212> 蛋白质序列
<213> 人类

<400> 4
Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys Gly Met
1 5 10 15

Cys Cys Lys Thr
20

<210> 5
<211> 128
<212> 蛋白质序列
<213> 人类

<400> 5
Met Ser Leu Arg Leu Asp Thr Thr Pro Ser Cys Asn Ser Ala Arg Pro
1 5 10 15

[0002]

Leu His Ala Leu Gln Val Leu Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Thr Ala
20 25 30

Leu Ala Ser Ser Thr Lys Gly Gln Thr Lys Arg Asn Leu Ala Lys Gly
35 40 45

Lys Glu Glu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met
50 55 60

Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu
65 70 75 80

Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala
85 90 95

Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg
100 105 110

Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp
115 120 125

<210> 6
<211> 22
<212> 蛋白质序列
<213> 人类

[0003]

<400> 6
Phe Pro Ile Cys Ile Phe Cys Cys Gly Cys Cys His Arg Ser Lys Cys
1 5 10 15

Gly Met Cys Cys Lys Thr
20

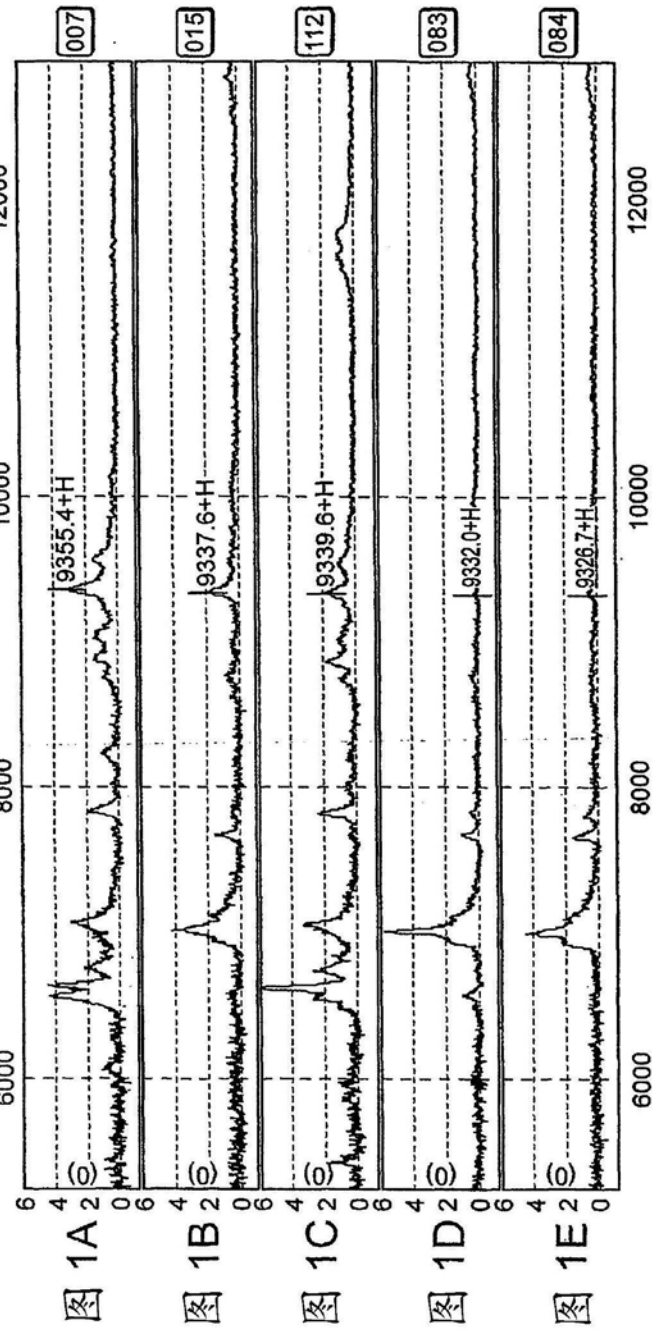



图 1A 图 1B 图 1C 图 1D 图 1E

```
                                                                  60
MSLRLDTTPS CNSARPLHAL QVLLLLSLLL TALASSTKGQ TKRNLAKGKE ESLDSDLYAE
                                                                 120
LRCMCIKTTS GIHPKNIQSL EVIGKGTHCN QVEVIATLKD GRKICLDPDA PRIKKIVQKK

LAGDESAD
```

图2