(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2010 年 10 月 7 日 (07.10.2010)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2010/111892 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/574 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2010/000406

(22) 国际申请日: 2010 年 3 月 30 日 (30.03.2010)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
200910133415.5 2009 年 3 月 31 日 (31.03.2009) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **浙江大学 (ZHEJIANG UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路 268 号浙江大学华家池校区浙江加州国际纳米技术研究院 303 室, Zhejiang 310029 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **林标扬 (LIN, Biaoyang)** [CN/CN]; 中国浙江省杭州市凯旋路 268 号浙江大学华家池校区浙江加州国际纳米技术研究院 303 室, Zhejiang 310029 (CN)。

(74) 代理人: **中国专利代理（香港）有限公司 (CHINA PATENT AGENT (H.K.) LTD.)**; 中国香港特别行政区湾仔港湾道 23 号鹰君中心 22 号楼, Hong Kong (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

WO 2010/111892 A1

(54) Title: USE OF ANGPTL3 AS A DIAGNOSTIC MARKER FOR OVARIAN CANCER

(54) 发明名称 : ANGPTL3 作为卵巢癌的诊断标记物的用途

(57) Abstract: The invention provides methods for diagnosis of ovarian cancer and increasing accuracy of sample classification by detecting ANGPTL3 content in samples from the subjects, and kits for performing the above methods.

(57) 摘要:

本发明提供了根据检测受试者样本中的 ANGPTL3 含量来诊断卵巢癌和提高样本分类准确性的方法，以及实施上述方法的试剂盒。

ANGPTL3 作为卵巢癌的诊断标记物的用途

技术领域

本发明属于生物医学技术领域。具体地说，本发明涉及一种提高样本分类准确性的方法、以及一种用于检测样本中 ANGPTL3 蛋白的试剂盒。

背景技术

上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer, EOC)在所有女性癌症死亡原因中排名第五位。在我国卵巢恶性肿瘤的发病率在女性常见恶性肿瘤中所占的百分率为 2.4－5.6%。 其发病在妇科恶性肿瘤中仅次于宫颈癌，居第二位。近年来其发病呈上升趋势。在妇女生殖道癌瘤中，卵巢癌是造成死亡原因最高的一种肿瘤。美国癌症学会预计美国 2008 年将会新增 21650 个卵巢癌病例，同时大约有 15520 例病患将死于该疾病(www.cancer.org)。EOC 的高死亡率都是发生在起始阶段，因为大部分妇女在诊断时已是晚期(stage III/IV)，其中 15-20%的病人有 5 年的存活率（1）。相比较而言，被准确诊断为 stage I 的小部分病人，超过 90%有 5 年的存活率（2）。当前 EOC 检测的候选策略是建立在生物化学肿瘤标志物的基础之上，例如 CA125 和通过超声或者卵巢的多普勒显像得到的生物物理标记物。不幸的是，利用这些策略进行早期 EOC 检测的阳性预测值(PPV)一致性小于 10%（3，4）。通过利用 CA125 复杂算法(complex longitudinal algorithms)（5-7）、串联测试(sequential testing)（8,9）和全新生物标记物（10）的应用，在对上皮性卵巢癌(EOC)早期诊断中得到了一定的提高。所以，现在仍非常需要继续发展新的血液循环系统中的生物标志物对卵巢癌进行早期诊断。

发明内容

本发明部分地基于以下发现：卵巢癌患者血清中的 ANGPTL3 含量明显低于健康受试者血清中的 ANGPTL3 含量，并且具有统计学显著性，可用作卵巢癌的诊断标志物。

因此，本发明提供了以下实施方案。

[实施方案 1] 一种诊断受试者中的卵巢癌的方法，包括:
检测来自受试者的样本中的 ANGPTL3 含量，
对所述 ANGPTL3 含量进行分析，和
根据分析结果确定所述受试者是否患有卵巢癌。

[实施方案 2] 一种提高样本分类准确性的方法，包括:
检测所述样本中的 ANGPTL3 含量，
对所述 ANGPTL3 含量进行分析，和
根据所述分析结果，对样本进行分类。

[实施方案 3] 一种对受试者的卵巢癌进行诊断、预后评估、治疗效果监测或病程监测的方法，包括: 检测受试者血液样本中 ANGPTL3 的表达。

[实施方案 4] 实施方案 1-3 之任一项的方法，其中所述样本选自由尿液、脑脊液、唾液和眼泪所构成的组。

[实施方案 5] 实施方案 1-3 之任一项的方法，其中所述样本为血液样本。

[实施方案 6] 实施方案 1-3 之任一项的方法，其中所述样本为血清样本。

[实施方案 7] 实施方案 1-6 之任一项的方法，其中所述检测采用 ELISA 或定量 Western blot 进行。

[实施方案 8] 实施方案 1-7 之任一项的方法，其中所述检测采用 ANGPTL3 的特异结合剂进行。

[实施方案 9] 实施方案 8 的方法，其中所述 ANGPTL3 的特异结合剂为 ANGPTL3 的抗体或其 ANGPTL3 结合片段。

[实施方案 10] 实施方案 8 的方法，其中所述 ANGPTL3 的抗体为单克隆抗体。

[实施方案 11] 实施方案 8 的方法，其中所述 ANGPTL3 的抗体为多克隆抗体。

[实施方案 12] 实施方案 1-11 之任一项的方法，其中所述分析包括绘制 ROC 曲线，其中以 ANGPTL3 为变量，根据不同的阈值绘制出 ROC 曲线，并计算曲线下面积 AUC，并且按照期望的灵敏度和特异性进行判断。

[实施方案 13] 实施方案 1-11 之任一项的方法，其中所述分析包

括将所述 ANGPTL3 含量与来自健康受试者的参比值进行比较，如果明显低于所述参比值则确定所述受试者患有卵巢癌。

[实施方案 14] 用于实施实施方案 1-13 之任一项的方法的试剂盒，其包含：ANGPTL3 的特异结合剂。

[实施方案 15] 实施方案 14 的试剂盒，还包含：能够结合 ANGPTL3 的标记抗体。

[实施方案 16] 实施方案 14-15 之任一项的试剂盒，其中所述 ANGPTL3 的特异结合剂为 ANGPTL3 的抗体或其 ANGPTL3 结合片段。

[实施方案 17] 实施方案 16 的试剂盒，其中所述 ANGPTL3 的抗体为单克隆抗体。

[实施方案 18] 实施方案 16 的试剂盒，其中所述 ANGPTL3 的抗体为多克隆抗体。

[实施方案 19] 实施方案 15-18 之任一项的试剂盒，其中所述标记抗体被辣根过氧化物酶或者荧光标记。

[实施方案 20] 实施方案 14-19 之任一项的试剂盒，还包含：

包含已知量 ANGPTL3 溶液的标准样；以及

用于检测的抗体标记物，其可以与抗体结合形成偶联物。

[实施方案 21] 实施方案 20 的试剂盒，其中所述抗体标记物为辣根过氧化物酶或者荧光物质。

[实施方案 22] 实施方案 14－21 之任一项的试剂盒，还包含：

任选的抗体偶联物（antibody conjugates);

任选的选自由显色剂、酶抑制剂、缓冲液、稳定剂、稀释剂、洗涤试剂构成的组的辅助试剂；和

任选的说明书。

[实施方案 23] 实施方案 14-22 之任一项的试剂盒，其中所述 ANGPTL3 的特异结合剂被固定于固相载体上。

[实施方案 24] ANGPTL3 的特异结合剂在制备用于诊断卵巢癌的试剂中的用途。

[实施方案 25] 实施方案 24 的用途，其中所述 ANGPTL3 的特异结合剂为 ANGPTL3 的抗体或其 ANGPTL3 结合片段。

[实施方案 26] 实施方案 25 的用途，其中所述 ANGPTL3 的抗体为单克隆抗体。

[实施方案 27] 实施方案 25 的用途，其中所述 ANGPTL3 的抗体为多克隆抗体。

[实施方案 28] ANGPTL3 作为卵巢癌诊断标志物的用途。

[实施方案 29] 一种提高样本分类准确性的方法，其包括:

测定样本中 ANGPTL3 的含量，和 ANGPTL3 的含量在时间上的变化;

以 ANGPTL3 含量在时间上的变化为变量，根据不同的阈值对癌症诊断的灵敏度和特异性绘制出 ROC 曲线，并计算曲线下面积 AUC;

按照 AUC 值、灵敏度和特异性对样本进行分类。

[实施方案 30] 一种提高样本分类准确性的方法，其包括:

测定样本中 ANGPTL3 和任一在卵巢癌中高表达蛋白的含量，以及它们各自的含量在时间上的变化;

以 ANGPTL3 和该高表达蛋白含量的比值在时间上的变化为变量，根据不同的阈值对癌症诊断的灵敏度和特异性绘制出 ROC 曲线，并计算曲线下面积 AUC;

按照 AUC 值、灵敏度和特异性对样本进行分类。

研究表明，采用本发明的方法及试剂盒对个体的样本中蛋白 ANGPTL3 进行联合检测，可以有效提高癌症诊断的灵敏度、特异性和准确率，并且可以推广至许多疾病的诊断、预后评估、治疗效果评估及病程监测。

附图说明

图 1 是一幅柱状图，显示了在健康志愿者血清(N1-N10)和卵巢癌患者血清样品 (C1-C10)中 ANGPTL3 的表达水平的比较，T-检验具有统计学显著性 (T-test, P=0.0009, tail 1, type 3)。横坐标为样品 ID（C = 癌症，N = 正常）；纵坐标为浓度，单位为纳克每毫升（柱形图加标准误差的 error bar）；标题为人血管生成素样蛋白 3(卵巢癌 vs 正常血清)。

具体实施方式

术语

本文所用的术语“ANGPTL3”是指血管生成素样蛋白 3

(angiopoietin-like protein 3，简称 ANGPTL3)，其含义是本领域公知的。ANGPTL3 是分泌蛋白的血管生成素样家族的成员(11)。它具有血管生成素的特征性结构，包括信号肽、N-末端无规卷曲结构域以及 C-末端纤维蛋白原(FBN)-样结构域。ANGPTL3 可能在血管生成的调节中发挥作用(11)。ANGPTL3 是脂类代谢的调节物(12)，但是它在癌症中的作用还没有被研究。

本文中使用的术语“受试者”，指任意哺乳动物，例如，小鼠、大鼠、兔子、狗、牛，特别是灵长类动物，如人。在本发明的某些优选实施方式中，“受试者”是人。在本文中，术语“受试者”和“个体”有时可互换使用。

本文中使用的术语“血液样本”，指来自受试者的血液的样本，例如全血、血浆或者血清样本。

本文中使用的术语“ANGPTL3 的特异结合剂”，指能够特异结合 ANGPTL3 的试剂，例如 ANGPTL3 的抗体、结合配体（如 Aptmer）等。

本文中使用的术语“特异结合”指本发明的特异结合剂专一性地结合 ANGPTL3 抗原。例如，通常情况下，ANGPTL3 抗体结合 ANGPTL3 抗原的亲和力是结合 ANGPTL3 抗原之外的非特异抗原（例如，BSA、酪蛋白）的亲和力的至少 2 倍。

ANGPTL3 抗体的“ANGPTL3 结合片段”是指 ANGPTL3 抗体的一个或多个片段，其保留结合 ANGPTL3 抗原的能力，例如 Fab、$F(ab')_2$、Fv 或单链 Fv 片段。已经表明通过全长抗体的片段可以实施抗体的抗原结合功能。抗体的“ANGPTL3 结合片段”包括(i)Fab 片段，其是由 V_L、V_H、C_L 和 C_{H1} 结构域组成的单价片段；（ii）$F(ab')_2$ 片段，其是含有在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab 片段的二价片段；（iii）由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的 Fd 片段；(iv)由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段，（v）dAb 片段(Ward 等人，(1989)Nature 341: 544-546)，其由 V_H 结构域组成；和（vi）分离的互补决定区（CDR）。此外，尽管 FV 片段的两个结构域 VL 和 VH 由不同的基因编码，它们可以经重组方法通过合成的接头连接，所述接头使得 VL 和 VH 成为一条蛋白质链，其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子（称作单链 Fv(scFv);见，例如，Bird 等人(1988)Science242: 423-426；和 Huston 等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883)。

文中所用术语“单克隆抗体”指单一分子成分的抗体分子的制备物。单克隆抗体成分显示出对特定表位的单一结合特异性和亲和性。因此，术语“单克隆抗体”指显示出单一结合特异性的抗体。在一个实施方案中，通过杂交瘤产生人单克隆抗体，所述杂交瘤包括从转基因非人动物，例如，转基因小鼠中获得的、与永生化细胞融合的 B 细胞，所述动物的基因组包含人重链转基因和轻链转基因。抗体的制备是本领域公知的，本领域技术人员可以容易地制备 ANGPTL3 的抗体。

文中所用术语“标记抗体”指通过标记分子进行标记的抗体，例如由荧光团、化学发光物质、辣根过氧化物酶等标记的抗体。

本文所用的术语“任选”(optional, optionally)表示“可有可无”或“非必需”等含义。例如，“任选的携带工具”是指可以有该携带工具，也可以没有该携带工具。这可以由本领域技术人员根据情况进行选择。

试剂盒

在一个优选实施方案中，本发明的 ELISA 使用试剂盒完成，这样可以实现快捷操作，从而避免常规实验检测的繁琐。本发明的优选的 ELISA 试剂盒包括 ANGPTL3 检测试剂盒。为提高疾病诊断的灵敏度、特异性和准确率，优选使用 ANGPTL3 检测试剂盒，其可以分别或同时测得两组检测结果，以达到快捷功效。本发明的一种特别优选的 ANGPTL3 ELISA 检测试剂盒购自 Immuno-Biological Laboratories Co. Ltd..

在一个优选实施方案中，本发明的 ANGPTL3 检测试剂盒至少包含:

（1）能够结合 ANGPTL3 的抗体；以及

（2）当 ANGPTL3 结合于（1）中限定的抗体时，能够结合于 ANGPTL3 的标记抗体。

上述试剂盒还可包含:

（3）由含有已知量 ANGPTL3 的溶液组成的标准样，该标准样可以来源于基因工程菌表达、动物或人的体液；以及

（4）用于检测的抗体标记物，例如，作为报告方法的酶标签比如辣根过氧化物酶，或者荧光标记，其可以与抗体结合形成偶联物。

更优选地，试剂盒还可进一步包括下述物品中的至少之一：（5）携带工具，其空间划分为可以收容一种或多种容器、96 孔板或板条等

的限定空间，该容器例如是药瓶、试管和类似物，每样容器都可含有一个单独的用于本发明方法的组分；（6）辅助试剂，比如，显色剂、酶抑制剂、缓冲液、稳定剂、稀释剂、洗涤试剂以及类似物；（7）说明书，其可以写在瓶子、试管和类似物上，或者写在一张单独的纸上，或者在容器的外部或内部；也可以是多媒体的形式，比如 CD、电脑光盘、录像等等。

优选抗体可以固定于固相载体上，形成捕获抗体。捕获抗体在操作上特别方便。

所含抗体包括任何能够结合 ANGPTL3 的抗体片段，并且可以是重组体、嵌合抗体、人源化抗体和鼠源性抗体。所述抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体，优选单克隆抗体。

优选抗体偶联物能够用 ELISA 阅读机，比如，酶标仪进行光度测定。

样本

本发明所用样本可以包含多种形式，比如全血、血浆、血清、尿液、脑脊液、唾液、或眼泪。其中优选血清。

样本制备可根据普通方法比如离心等进行，例如，参见如下文献：Young, D. S. & Bermes, E. W. "Specimen collection and processing"in Tietz Textbook of Clinical Chemistry 2nd Edition" Eds. Burtis, C. A. & Ashwood, E. R., Saunders (1994); Methods in Enzymology, H. Van Vunakis and J. J. Langone (Eds), 1981, 72(B); Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, P Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, R. J. Burden and P. H. Van Knippenberg (Eds), Elsevier, 1985; Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, T. Chard, ibid, 3rd Edition, 1987; Methods in Enzymology, H. Van Vunakis and J. J. Langone (Eds) 1981, 74(C)。

检测方法

本发明可以使用 ELISA 或其它蛋白定量技术对个体的样本进行蛋白 ANGPTL3 的检测。优选地，可以采用 ANGPTL3 的特异结合剂，例如 ANGPTL3 的抗体进行检测。在一个优选实施方式中，ANGPTL3 的抗体被固定在固相载体上，例如作为捕获抗体使用。

酶联免疫吸附剂测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）

是分子生物学领域常用的蛋白质含量分析方法，其可用于测定抗原，也可用于测定抗体。根据试剂的来源、样本的性状以及检测的具体条件，本发明可以采用多种不同类型，比如：双抗体夹心法、双位点一步法、间接法测抗体、竞争法、捕获法测 IgM 抗体、以及应用亲和素和生物素的 ELISA 等。定量 Western blot 也是分子生物学领域常用的蛋白质含量分析方法。

还可以采用通过化学方法测定 ANGPTL3 酶的活性程度的定量分析如明胶原位酶谱（gelatin zymography)或荧光法检测。

ROC 曲线

在用 ELISA 检测出样本中 ANGPTL3 的浓度后，可用数学分析方法对测得的样本中 ANGPTL3 浓度进行统计学处理，在此基础上获得具有样本分类意义的分级标准。这样的数学方法优选由计算机完成，比如用这些数据绘制 ROC 曲线，从而对个体的样本进行分类。例如，可以将个体分为癌症或健康，治疗反应好和坏，预测存活期长和短等。

ROC 曲线全称为受试者工作特征曲线（receiver operator characteristic curve），又称为接收者操作特性曲线，主要用于临床生化诊断试验。ROC 曲线是反映真阳性率（灵敏度，又称敏感性，sensitivity）和假阳性率（1-特异性，specificity）连续变量的综合指标，是用构图法揭示灵敏度和特异性的相互关系。它通过设定一系列不同的分界值（阈值或临界值，cut-off value，是划分诊断试验结果正常与异常的界值）作为连续变量，从而计算出一系列灵敏度和特异性，再以灵敏度为纵坐标、1-特异性为横坐标绘制曲线，曲线下面积（AUC）越大，诊断准确性越高。在 ROC 曲线上，最靠近坐标图左上方的点为灵敏度和特异性均较高的临界值。ROC 曲线 AUC 值在 1.0 和 0.5 之间。在 AUC > 0.5 的情况下，AUC 越接近于 1，说明诊断效果越好。AUC 在 0.5 ~ 0.7 时有较低准确性，AUC 在 0.7 ~ 0.9 时有一定准确性，AUC 在 0.9 以上时有较高准确性。

ROC 曲线的评价方法与传统的评价方法不同，根据实际情况，允许有中间状态，可以把试验结果分为多个有序分类，比如：正常、大致正常、可疑、大致异常和异常五个等级。

上述有序分类，对于疾病的诊断而言，可分为：阴性、不确定、阳性。进一步地，对于癌症诊断而言，可分为：癌症、健康。

在一个实施方式中，本发明提高样本分类准确性的方法，可以包括如下步骤：

（1）分别测定样本中蛋白 ANGPTL3 的含量；

（2）以 ANGPTL3 蛋白含量的比值为变量，根据不同的阈值对癌症诊断的灵敏度和特异性绘制出 ROC 曲线，并计算曲线下面积 AUC；以及

（3）按照期望的灵敏度和特异性，对测定样本进行分类（癌症或健康）。

ROC 曲线的绘制可以使用现有技术中的软件或系统，比如：MedCalc 9.2.0.1 医学统计软件、SPSS 9.0、ROCPOWER.SAS、DESIGNROC.FOR、MULTIREADER_POWER.SAS、CREATE_ROC.SAS、GB STAT V10.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, MD, USA)等等。

卵巢癌的诊断、预后评估、治疗效果监测或病程监测

本发明还提供了一种用于卵巢癌的诊断、预后评估、治疗效果监测或病程监测的联合测试试剂盒，其至少包含：（1）能够结合 ANGPTL3 的抗体；以及（2）当 ANGPTL3 结合于（1）中限定的抗体时，能够结合于 ANGPTL3 的标记抗体。

在一个优选实施方式中，本发明提供了一种对受试者的卵巢癌进行诊断、预后评估、治疗效果监测或病程监测的方法，包括：检测受试者血液样本中 ANGPTL3 的表达量和 ANGPTL3 的含量在时间上的变化（如，不同癌症发展时期，治疗前和治疗后等）。本发明还提供了一种提高样本分类准确性的方法，其包括：测定样本中 ANGPTL3 的含量，和 ANGPTL3 的含量在时间上的变化（如，不同癌症发展时期，治疗前和治疗后等）；以 ANGPTL3 蛋白含量在时间上的变化为变量，根据不同的阈值对癌症诊断的灵敏度和特异性绘制出 ROC 曲线，并计算曲线下面积 AUC；按照 AUC 值、灵敏度和特异性对样本进行分类。例如，可以将个体分为癌症或健康，治疗反应好和坏，预测存活期长和短等。在一个优选实施方式中，例如，可以将 ANGPTL3 含量与来自健康受试者的参比值进行比较，如果明显低于所述参比值则确定所述受试者患有卵巢癌。在另一个优选实施方式中，进一步结合 ANGPTL3 的低表达和任一在卵巢癌中高表达的蛋白的联合检测，计算他们的比

值的差异，并以比值在时间上的变化为变量，根据不同的阈值对癌症诊断的灵敏度和特异性绘制出 ROC 曲线，并计算曲线下面积 AUC，进而对样本进行分类。

此处所用的术语“在卵巢癌中高表达蛋白”是指该蛋白在卵巢癌患者中的表达量显著高于正常受试者。“在卵巢癌中高表达的蛋白”的实例包括: CA125, Mesothelin (Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, Onda M: Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. Clin Cancer Res 2006, 12(2):447-453.)， HE4, M-CSF, osteopontin, kallikrein(s), 和可溶性 EGF 受体(soluble EGF receptor, Bast RC, Jr., Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z et al: New tumor markers: CA125 and beyond. Int J Gynecol Cancer 2005, 15 Suppl 3:274-281.)。

以下结合具体实施例，对本发明作进一步说明。应当理解，以下实施例仅用于说明本发明而不以任何形式用于限定本发明的范围。

实施例 1

以下以个体的血清为样本进行卵巢癌诊断为例，对本发明作进一步详细说明。

样本的采集

收集卵巢癌患者的术前血清样本和年龄匹配的(34 – 82 岁范围)的健康女性的血清用作对照。在静脉穿刺取血的 2 小时内，通过离心收集血清，并将等分样品储存在-80 °C 直至使用。

测 ANGPTL3 含量

ELISA 分析—运用了 Immuno-Biological Laboratories Co. Ltd.开发的人血管生成素样蛋白 3 (ANGPTL3)ELISA 试剂盒(cat # 27409)。ELISA 分析可根据生产商的说明书操作。 利用 Dynamic Microsystems 公司开发的 GB STAT 统计包来分析 ROC 曲线。

并且使用 Bio-Rad 680 型酶标仪（美国）进行 ELISA 操作，包括:

1、取出冷藏储存的试剂盒，放置，恢复温度至室温(20-25℃)。计算要检测的标本总数和质控数。每个标本需要一个抗原包被孔。每次

实验都要做阳性对照、阴性对照和校准品。确定需要的微孔数量。当板条温度至室温时，打开板条的保护袋，拿出抗原包被的微孔板条。本次实验不需要使用的试剂条应放入这个可重新密封的袋子，密封，重新存放在 2-8℃。

2、依次在微孔板上加入 20 μL 的标准液、对照液和血清样本。此过程务必在三十分钟内完成。

3、在每个微孔中加入 100 μL 的捕获液，用移液器在孔中反复吹打进行混匀。

4、用微孔板盖盖好板，在室温下(18-25℃)进行温育 55－65 分钟。

5、按下述步骤手工洗板 3 次:

A、剧烈摇动并倒掉板中的液体;

B、在孔中加满洗液。保证孔中无残余气泡。

C、再重复前两步骤两次。

D、摇动并去除孔中的洗液。把板翻转，在纸巾上轻拍，以便能拍干所有洗液。观察微孔板，确保无残留的洗液。

6、在酶标抗体复合物的瓶子里加入 7 mL 的再生缓冲液，存放于室温下待用。

7、按照同样的次序把稀释好的酶复合物加 100 μL 到微孔板上

8、用微孔板盖盖好板，在室温下（18-28℃）进行温育 55－65 分钟。

9、配制底物，在底物缓冲液中加入一片底物固体，30-60 分钟后溶解，强烈摇晃，使溶液完全混合。

10、按照步骤 5 中 A 到 D 的方法进行洗板。

11、以同样的速度和次序把底物液加 100 μL 到每孔中。

12、微孔板在室温下(18-28℃)进行温育 55－65 分钟。

13、以同样的速度和次序在每个孔中加入 100 μL 的终止液。加了终止液后应轻轻敲打微孔板，确保样品全部混匀。

14、设置酶标仪的检测波长在 405 nm 处。检测每个孔的 OD 值。应在加了终止液的 15 钟之内进行读数。

15、用一线性校准曲线“Y=mx+b”来分析 ANGPTL3 的结果。

16、通过标准曲线来读出血清样本和对照液中 ANGPTL3 的浓度。

结果

经上述步骤，得到的检测结果如表 1 所示。

表 1. ANGPTL3 在正常人群和卵巢癌病人血清中的表达

样品	浓度 （ng/ml)
c1	25.06
c2	111.86
c3	14.21
c4	75.69
c5	343.33
c6	412.04
c7	64.84
c8	93.78
c9	28.68
c10	129.94
n1	419.28
n2	260.14
n3	549.48
n4	307.16
n5	415.66
n6	278.23
n7	701.38
n8	90.16
n9	357.79
n10	451.83

*C 代表癌症样品，N 代表正常样品

由表 1 可以看出，ANGPTL3 的浓度与卵巢癌症状有密切的相关性，即卵巢癌患者血清中 ANGPTL3 蛋白的含量明显低于健康志愿者血清中的含量。

我们发现，与所述 10 个正常个体相比，所述 10 个卵巢癌血清样本中血管生成素样蛋白 3 (ANGPTL3)的表达量更低 (T-test, P=0.0009,

tail 1, type 3) (图 1)。

结果表明 ANGPTL3 的浓度与卵巢癌症状有密切的相关性，

本文中所涉及的参考文献，包括专利文件、学术论文、出版物等，均以引用的方式将其全部内容包括在本文中。

应当理解，在不偏离本发明的精神和范围的情况下，本领域的普通技术人员可以在形式和细节上对其做出各种改变和改进，而这些均被认为落入了本发明的保护范围。

参考文献

[1] Greenlee, R. T., Hill-Harmon, M. B., Murray, T., Thun, M., Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001, *51*, 15-36.

[2] Young, R. C., Walton, L. A., Ellenberg, S. S., Homesley, H. D., *et al.*, Adjuvant therapy in stage I and stage II epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med* 1990, *322*, 1021-1027.

[3] van Nagell, J. R., Jr., DePriest, P. D., Reedy, M. B., Gallion, H. H., *et al.*, The efficacy of transvaginal sonographic screening in asymptomatic women at risk for ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2000, *77*, 350-356.

[4] Kyrgiou, M., Tsoumpou, I., Martin-Hirsch, P., Arbyn, M., *et al.*, Ovarian cancer screening. *Anticancer Res* 2006, *26*, 4793-4801.

[5] Skates, S. J., Xu, F. J., Yu, Y. H., Sjovall, K., *et al.*, Toward an optimal algorithm for ovarian cancer screening with longitudinal tumor markers. *Cancer* 1995, *76*, 2004-2010.

[6] Zhang, Z., Barnhill, S. D., Zhang, H., Xu, F., *et al.*, Combination of multiple serum markers using an artificial neural network to improve specificity in discriminating malignant from benign pelvic masses. *Gynecol Oncol* 1999, *73*, 56-61.

[7] McIntosh, M. W., Urban, N., Karlan, B., Generating longitudinal screening algorithms using novel biomarkers for disease. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, *11*, 159-166.

[8] Berek, J. S., Bast, R. C., Jr., Ovarian cancer screening. The use of serial complementary tumor markers to improve sensitivity and specificity for early detection. *Cancer* 1995, *76*, 2092-2096.

[9] Jacobs, I. J., Skates, S. J., MacDonald, N., Menon, U., *et al.*, Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet* 1999, *353*, 1207-1210.

[10] Kim, J. H., Skates, S. J., Uede, T., Wong, K. K., *et al.*, Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *Jama*

2002, *287*, 1671-1679.

[11] Hato, T., Tabata, M., Oike, Y., The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 2008, 18, 6-14.

[12] Koishi, R., Ando, Y., Ono, M., Shimamura, M., et al., Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nat Genet* 2002, 30, 151-157.

权 利 要 求

1. 一种诊断受试者中的卵巢癌的方法，包括:
检测来自受试者的样本中的 ANGPTL3 含量，
对所述 ANGPTL3 含量进行分析，和
根据分析结果确定所述受试者是否患有卵巢癌。

2. 一种提高样本分类准确性的方法，包括:
检测所述样本中的 ANGPTL3 含量，
对所述 ANGPTL3 含量进行分析，和
根据所述分析结果，对样本进行分类。

3. 一种对受试者的卵巢癌进行诊断、预后评估、治疗效果监测或病程监测的方法，包括: 检测受试者血液样本中 ANGPTL3 的表达。

4. 权利要求 1-3 之任一项的方法，其中所述样本选自由尿液、脑脊液、唾液和眼泪所构成的组。

5. 权利要求 1-3 之任一项的方法，其中所述样本为血液样本。

6. 权利要求 1-3 之任一项的方法，其中所述样本为血清样本。

7. 权利要求 1-6 之任一项的方法，其中所述检测采用 ELISA 或定量 Western blot 进行。

8. 权利要求 1-7 之任一项的方法，其中所述检测采用 ANGPTL3 的特异结合剂进行。

9. 权利要求 8 的方法，其中所述 ANGPTL3 的特异结合剂为 ANGPTL3 的抗体或其 ANGPTL3 结合片段。

10. 权利要求 8 的方法，其中所述 ANGPTL3 的抗体为单克隆抗体。

11. 权利要求 8 的方法，其中所述 ANGPTL3 的抗体为多克隆抗体。

12. 权利要求 1-11 之任一项的方法，其中所述分析包括绘制 ROC 曲线，其中以 ANGPTL3 为变量，根据不同的阈值绘制出 ROC 曲线，并计算曲线下面积 AUC，并且按照期望的灵敏度和特异性进行判断。

13. 权利要求 1-11 之任一项的方法，其中所述分析包括将所述 ANGPTL3 含量与来自健康受试者的参比值进行比较，如果明显低于所述参比值则确定所述受试者患有卵巢癌。

14. 用于实施权利要求 1-13 之任一项的方法的试剂盒，其包含: ANGPTL3 的特异结合剂。

15. 权利要求 14 的试剂盒，还包含：能够结合 ANGPTL3 的标记抗体。

16. 权利要求 14-15 之任一项的试剂盒，其中所述 ANGPTL3 的特异结合剂为 ANGPTL3 的抗体或其 ANGPTL3 结合片段。

17. 权利要求 16 的试剂盒，其中所述 ANGPTL3 的抗体为单克隆抗体。

18. 权利要求 16 的试剂盒，其中所述 ANGPTL3 的抗体为多克隆抗体。

19. 权利要求 15-18 之任一项的试剂盒，其中所述标记抗体被辣根过氧化物酶或者荧光标记。

20. 权利要求 14-19 之任一项的试剂盒，还包含：

包含已知量 ANGPTL3 溶液的标准样；以及

用于检测的抗体标记物，其可以与抗体结合形成偶联物。

21. 权利要求 20 的试剂盒，其中所述抗体标记物为辣根过氧化物酶或者荧光物质。

22. 权利要求 14－21 之任一项的试剂盒，还包含：

任选的抗体偶联物；

任选的选自由显色剂、酶抑制剂、缓冲液、稳定剂、稀释剂、洗涤试剂构成的组的辅助试剂；和

任选的说明书。

23. 权利要求 14-22 之任一项的试剂盒，其中所述 ANGPTL3 的特异结合剂被固定于固相载体上。

24. ANGPTL3 的特异结合剂在制备用于诊断卵巢癌的试剂中的用途。

25. 权利要求 24 的用途，其中所述 ANGPTL3 的特异结合剂为 ANGPTL3 的抗体或其 ANGPTL3 结合片段。

26. 权利要求 25 的用途，其中所述 ANGPTL3 的抗体为单克隆抗体。

27. 权利要求 25 的用途，其中所述 ANGPTL3 的抗体为多克隆抗体。

28. ANGPTL3 作为卵巢癌诊断标志物的用途。

29. 一种提高样本分类准确性的方法，其包括：

测定样本中 ANGPTL3 的含量，和 ANGPTL3 的含量在时间上的变化；

以 ANGPTL3 含量在时间上的变化为变量，根据不同的阈值对癌症诊断的灵敏度和特异性绘制出 ROC 曲线，并计算曲线下面积 AUC；

按照 AUC 值、灵敏度和特异性对样本进行分类。

30. 一种提高样本分类准确性的方法，其包括：

测定样本中 ANGPTL3 和任一在卵巢癌中高表达蛋白的含量，以及它们各自的含量在时间上的变化；

以 ANGPTL3 和该高表达蛋白含量的比值在时间上的变化为变量，根据不同的阈值对癌症诊断的灵敏度和特异性绘制出 ROC 曲线，并计算曲线下面积 AUC；

按照 AUC 值、灵敏度和特异性对样本进行分类。

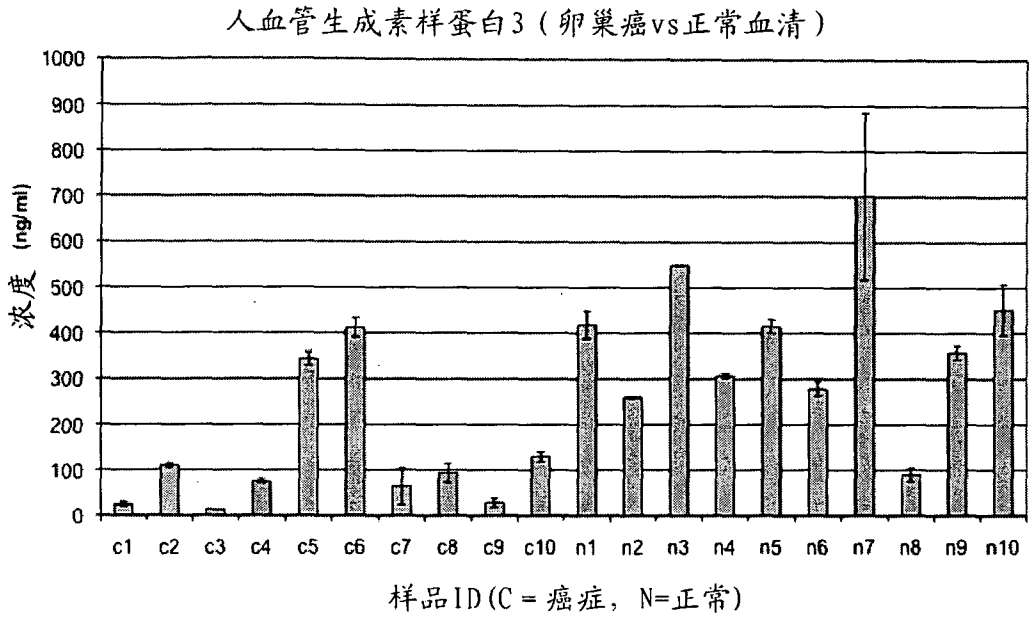

人血管生成素样蛋白3（卵巢癌vs正常血清）
浓度 (ng/ml)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
c1 c2 c3 c4 c5 c6 c7 c8 c9 c10 n1 n2 n3 n4 n5 n6 n7 n8 n9 n10
样品ID(C = 癌症, N=正常)

图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2010/000406

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI、EPODOC、CNPAT、CNKI、ISI WEB OF KNOWLEDGE: ANGPTL3, angiopoietin-like protein 3, ovarian cancer, ovarian carcinoma, classification, antibody, ROC, AUC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1615440 A (GENENTECH, INC.) 11 May 2005 (11.05.2005) See claims 28-29, pages 5, 17-18, 28, 32-33 of description.	2, 4-11, 14-23
Y		12, 29
X	WO 2008073300 A2 (LEXICON PHARMACEUTICALS, INC.) 19 June 2008 (19.06.2008) See claims 1 and 69, paragraphs 178, 188, 197-198 of description.	2, 4-11, 14-23
Y		12, 29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 June 2010 (10.06.2010)	**08 Jul. 2010 (08.07.2010)**
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer TIAN, Tian Telephone No. (86-10)62411042

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2010/000406

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

I: Claims1, 3, 4-23 (partially), 24-28, 30 refer to methods for diagnosis of ovarian cancer by detecting ANGPTL3 content in samples, kits for performing the above methods, uses of specific binding agents of ANGPTL3 for manufacturing diagnotic reagent for ovarian cancer, as well as use of ANGPTL3 as a diagnotic marker.

II: Claims2, 4-23 (partially), 29 refer to methods for increasing accuracy of sample classification by detecting ANGPTL3 content in samples, and kits for performing the said methods.

(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2010/000406

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	McIntosh MW et al., Combining CA125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma, Gynecologic Oncology, 01 Oct. 2004, Vol. 95, No. 1, pages 9-15.	12, 29
Y	Visintin Irene et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. Clinical Cancer Research, 15 Feb. 2008, Vol. 14, No. 4, pages 1065-1072.	12, 29
PX	Biaoyang Lin et al. Deep depletion of abundant serum proteins reveals low-abundant proteins as potential biomarkers for human ovarian cancer. Proteomics Clinical Applications, 09 July 2009, Vol. 3, pages 853-861.	1-11, 13-28
PY		12, 29-30
PY	CN 101587125 A (Biaoyang Lin) 25 Nov. 2009 (25.11.2009) See abstract, claim 4, pages 6-7 of description.	12, 29-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2010/000406

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1615440A	11.05.2005	WO 03044172 A2	30.05.2003
		US 2003215451 A1	20.11.2003
		AU 2002348286 A1	10.06.2003
		EP 1451578 A2	01.09.2004
		NO 20042410 A	09.06.2004
		JP 2005521643T T	21.07.2005
		ZA 200403070 A	29.06.2005
		MX PA04004609 A	01.09.2004
		KR 20050044485 A	12.05.2005
		NZ 532852 A	31.08.2006
		US 2007134250 A1	14.06.2007
		US 7267819 B2	11.09.2007
		AU 2002348286B B2	03.04.2008
		US 2009098117 A1	16.04.2009
WO 2008073300 A2	19.06.2008	US 2008177045 A1	24.07.2008
		TW 200846364 A	01.12.2008
		IN KOLNP200902345E E	10.07.2009
		AU 2007332855 A1	19.06.2008
		KR 20090088925 A	20.08.2009
		NO 20092215 A	19.08.2009
		CA 2672049 A1	19.06.2008
		EP 2121751 A2	25.11.2009
		WO 2008073300 A3	23.12.2009
		MX PA09006082 A	31.08.2009
		ES 2059456T T3	16.11.1994
		JP 2762358B2 B2	04.06.1998
CN 101587125 A	25.11.2009	WO 2009140805 A1	26.11.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2010/000406

Continuation of Box No. III:

The same or corresponding technical feature between the two groups of inventions is ANGPTL3. However, ANGPTL3 (i.e. angiopoietin-like protein 3) is a well-known protein in the art. Thus the same or corresponding feature can not be considered as a special technical feature which makes contribution over the prior art. In conclusion, the above two inventions are not be linked by a single general inventive concept. The application, hence does not meet the requirements of unity of invention as defined in Rules 13.1 PCT.

Continuation of Classification of subject matter:

G01N 33/574 (2006.01) i
G01N 33/536 (2006.01) i
G01N 33/577 (2006.01) i
G01N 33/68 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/000406

A. 主题的分类

见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

WPI、EPODOC、CNPAT、CNKI、ISI WEB OF KNOWLEDGE：血管生成素样蛋白 3、卵巢癌、分类、抗体、ANGPTL3、angiopoietin-like protein 3、ovarian cancer、ovarian carcinoma、classification、antibody、ROC、AUC

C. 相关文件

类　型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 1615440 A（杰南技术公司）11. 5 月 2005（11.05.2005） 参见权利要求 28-29、说明书第 5、17-18、28、32-33 页	2、4-11、14-23
Y		12、29
X	WO 2008073300 A2（LEXICON PHARMACEUTICALS, INC.） 19. 6 月 2008（19.06.2008） 参见权利要求 1 和 69、说明书第 178、188、197-198 段	2、4-11、14-23
Y		12、29
Y	McIntosh MW et al., Combining CA125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma, Gynecologic Oncology, 01. 10 月 2004，第 95 卷第 1 期，第 9-15 页	12、29

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
10.6 月 2010（10.06.2010）	**08.7 月 2010 (08.07.2010)**
ISA/CN 的名称和邮寄地址： 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号：　(86-10)62019451	受权官员 田甜 电话号码：(86-10) **62411042**

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2010/000406

第II栏　某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第 1 页第 2 项)

根据条约第 17 条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏　缺乏发明单一性的意见(续第 1 页第 3 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

I：权利要求 1、3、4-23（部分）、24-28、30，涉及通过检测样本中 ANGPTL3 含量来诊断卵巢癌的方法、实施该方法的试剂盒、ANGPTL3 的特异结合剂在制备卵巢癌诊断试剂中的用途，以及 ANGPTL3 作为卵巢癌诊断标志物的用途；

II：权利要求 2、4-23（部分）、29，涉及通过检测样本中的 ANGPTL3 含量来提高样本分类准确性的方法以及实施该方法的试剂盒。 （继续参见附加页）

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. ☒ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明： ☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

C(续). 相关文件

类　型	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	Visintin Irene et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. Clinical Cancer Research, 15.2 月 2008，第 14 卷第 4 期，第 1065-1072 页	12、29
PX	Biaoyang Lin et al. Deep depletion of abundant serum proteins reveals low-abundant proteins as potential biomarkers for human ovarian cancer. Proteomics Clinical Applications, 09.7 月 2009，第 3 卷，第 853-861 页	1-11、13-28
PY		12、29-30
PY	CN 101587125 A（林标扬）25. 11 月 2009（25.11.2009） 参见摘要、权利要求 4、说明书第 6-7 页	12、29-30

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2010/000406

检索报告中引用的专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1615440A	11.05.2005	WO 03044172 A2	30.05.2003
		US 2003215451 A1	20.11.2003
		AU 2002348286 A1	10.06.2003
		EP 1451578 A2	01.09.2004
		NO 20042410 A	09.06.2004
		JP 2005521643T T	21.07.2005
		ZA 200403070 A	29.06.2005
		MX PA04004609 A	01.09.2004
		KR 20050044485 A	12.05.2005
		NZ 532852 A	31.08.2006
		US 2007134250 A1	14.06.2007
		US 7267819 B2	11.09.2007
		AU 2002348286B B2	03.04.2008
		US 2009098117 A1	16.04.2009
WO 2008073300 A2	19.06.2008	US 2008177045 A1	24.07.2008
		TW 200846364 A	01.12.2008
		IN KOLNP200902345E E	10.07.2009
		AU 2007332855 A1	19.06.2008
		KR 20090088925 A	20.08.2009
		NO 20092215 A	19.08.2009
		CA 2672049 A1	19.06.2008
		EP 2121751 A2	25.11.2009
		WO 2008073300 A3	23.12.2009
		MX PA09006082 A	31.08.2009
		ES 2059456T T3	16.11.1994
		JP 2762358B2 B2	04.06.1998
CN 101587125 A	25.11.2009	WO 2009140805 A1	26.11.2009

续第 III 栏：

上述两组发明之间相同或相应的技术特征为 ANGPTL3，而该蛋白为本领域中公知的蛋白，即血管生成素样蛋白 3，因此该相同或相应的技术特征不是体现本发明对现有技术做出贡献的特定技术特征，从而上述两组发明不属于一个总的发明构思，因而不满足单一性的要求，不符合 PCT 实施细则 13.1 的规定

续主题的分类：

G01N 33/574 (2006.01) i

G01N 33/536 (2006.01) i

G01N 33/577 (2006.01) i

G01N 33/68 (2006.01) i