



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105755112 B

(45)授权公告日 2019.06.07

(21)申请号 201511009181.5

(22)申请日 2011.07.14

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105755112 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(30)优先权数据
2010903140 2010.07.14 AU

(62)分案原申请数据
201180034158.5 2011.07.14

(73)专利权人 视觉科技生物私人有限公司
地址 澳大利亚维多利亚州

(72)发明人 利亚·简·科斯格罗夫
布鲁斯·塔博尔
安东尼·W·伯吉斯
埃都阿德·柯林斯·尼斯

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 武晶晶 郑霞

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6886(2018.01)
G01N 33/574(2006.01)

(56)对比文件
CN 103140760 B,2016.01.27,
EP 2145190 A1,2010.01.20,
WO 2009126543 A1,2009.10.15,
WO 2009037572 A2,2009.03.26,
审查员 吕小蒙

权利要求书2页 说明书31页
序列表14页 附图11页

(54)发明名称

结肠直肠癌的诊断

(57)摘要

本发明涉及结肠直肠癌的诊断。本发明提供一种用于诊断或检测受试者体内的结肠直肠癌的方法,该方法包括测定选自IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK、IL-13、DKK-3、EpCam、MIP1 β 、TGF β 1以及TIMP-1的生物标志物的存在和/或水平。本发明还涉及包括用于测定这些生物标志物的存在和/或水平的试剂的诊断试剂盒以及检测或诊断结肠直肠癌的方法。

1. 至少三种化合物的组合在制造用于诊断或检测受试者体内的结肠直肠癌的组合物或系统中的用途,所述至少三种化合物结合至少三种生物标志物,其中每种化合物独立地结合选自M2PK、IGFBP2、EpCAM、IL-8、MAC2BP、IL-13、DKK-3、MIP1 β 、TGF β 1以及TIMP-1的单个生物标志物,其中所述M2PK为肿瘤M2丙酮酸激酶;

其中所述至少三种化合物能够确定来自所述受试者的样品中所述至少三种生物标志物的存在和/或水平,

其中所述生物标志物的存在和/或水平指示了结肠直肠癌;并且

其中所述至少三种化合物与M2PK、IGFBP2和DKK-3不以同一生物标志物组合的方式结合。

2. 至少三种化合物的组合在制造用于诊断或检测受试者体内的结肠直肠癌的组合物或系统中的用途,所述至少三种化合物结合至少三种生物标志物,其中每种化合物独立地结合选自M2PK、IGFBP2和EpCAM的单个生物标志物,其中所述M2PK为肿瘤M2丙酮酸激酶;

其中所述至少三种化合物能够确定来自所述受试者的样品中所述至少三种生物标志物的存在和/或水平,且

其中所述生物标志物的存在和/或水平指示了结肠直肠癌。

3. 至少三种化合物的组合在制造用于诊断或检测受试者体内的结肠直肠癌的组合物或系统中的用途,所述至少三种化合物结合至少三种生物标志物,其中每种化合物独立地结合选自M2PK、IGFBP2和IL-8的单个生物标志物,其中所述M2PK为肿瘤M2丙酮酸激酶;

其中所述至少三种化合物能够确定来自所述受试者的样品中所述至少三种生物标志物的存在和/或水平,且

其中所述生物标志物的存在和/或水平指示了结肠直肠癌。

4. 如权利要求1、2或3所述的用途,其中所述系统被用于进行ELISA测定。

5. 如权利要求1所述的用途,所述用途包括检测选自以下的至少一种另外的生物标志物的存在和/或表达水平:IGF-I、IGF-II、IGF-BP2、双调蛋白、VEGFA、VEGFD、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、TIMP-2、ENA-78、MCP-1、IFN- γ 、IL-10、IL-1 β 、IL-4、IL-6、M65、OPN和VEGFpan。

6. 如权利要求2或3所述的用途,所述用途包括检测选自以下的至少一种另外的生物标志物的存在和/或表达水平:IGF-I、IGF-II、IGF-BP2、双调蛋白、VEGFA、VEGFD、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2、ENA-78、MCP-1、MIP-1 β 、IFN- γ 、IL-10、IL-13、IL-1 β 、IL-4、IL-8、IL-6、MAC2BP、M65、OPN、DKK-3、TGF β -1和VEGFpan,

其中所述至少三种化合物与M2PK、IGFBP2和DKK-3不以同一生物标志物组合的方式结合。

7. 如权利要求1、2或3所述的用途,其中该组合物或系统以至少50%的灵敏度诊断或检测结肠直肠癌。

8. 如权利要求1、2或3所述的用途,其中该组合物或系统以至少66%的灵敏度诊断或检测结肠直肠癌。

9. 如权利要求1、2或3所述的用途,其中该组合物或系统以至少77%的灵敏度诊断或检测结肠直肠癌。

10. 如权利要求1、2或3所述的用途,其中该组合物或系统以至少50%的灵敏度和至少

95%的特异性诊断或检测杜克斯A期结肠直肠癌。

11.如权利要求1、2或3所述的用途,其中该组合物或系统以至少60%的灵敏度和至少80%的特异性诊断或检测杜克斯A期结肠直肠癌。

12.如权利要求1、2或3所述的用途,其中该组合物或系统以至少50%的灵敏度和至少90%的特异性诊断或检测杜克斯A期结肠直肠癌。

13.如权利要求1、2或3所述的用途,其中该化合物是一种抗体。

14.如权利要求1、2或3所述的用途,其中该化合物结合至一种固相支持体。

15.如权利要求1、2或3所述的用途,其中该化合物被可检测地标记。

16.如权利要求1、2或3所述的用途,其中将所述生物标志物的存在和/或水平与一种对照进行比较,且其中该样品中与该对照不同的一种存在和/或水平指示了结肠直肠癌。

17.如权利要求1、2或3所述的用途,其中该样品是血液、血浆、血清、尿液、血小板、巨核细胞或排泄物。

结肠直肠癌的诊断

[0001] 本申请是申请日为2011年07月14日,申请号为201180034158.5,发明名称为“结肠直肠癌的诊断”的申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及测定用于检测或诊断结肠直肠癌的生物标志物的存在和/或水平。本发明还涉及包括用于测定这些生物标志物的存在和/或水平的试剂的诊断试剂盒和检测或诊断结肠直肠癌的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 结肠直肠癌(又称为结肠癌或肠癌)是世界范围内第二大最常见的癌症病因。存在近百万结肠直肠癌病例的年发病率,其中年死亡率约500,000(澳大利亚的癌症:概述,2008(Cancer in Australia:an overview,2008))。不幸的是,30%至50%的患者在就诊时具有隐性或显性转移并且一旦肿瘤已经转移预后是非常不良的,具有小于10%的五年存活率(Etzioni等人,2003)。相比之下,当该肿瘤仍是局部性时就诊的患者中的大于90%将在5年之后仍然活着并且被认为是可以治愈的。结肠直肠病变的早期检测将因此显著减少结肠癌的影响(Etzioni等人,2003)。

[0005] 目前用于诊断结肠直肠癌广泛使用的筛选测定是排泄物隐血试验(FOBT)、柔性乙状结肠镜检查 and 结肠镜检查(Lieberman,2010)。FOBT具有相对低的特异性而导致高假阳性率。所有阳性FOBT因此必须接着用结肠镜检查。采样由个体在家完成并且要求至少两个连续排泄物样品待分析以便达到最佳灵敏度。该FOBT的一些变体还要求在采样之前饮食限制。FOBT对于未渗透进肠的早期癌性病变也缺乏灵敏度并且如上所述,这些是治疗最成功的病变。

[0006] 虽然FOBT筛选确实引起由于结肠直肠癌的死亡率的降低,但是它受制于低依从率(30%-40%),该低依从率最可能是由于该试验的令人不快的性质,这限制了它作为筛选工具的有用性。结肠镜检查是现行金标准并且具有大于90%的特异性,但是它是侵入性的并且昂贵的且具有小但有限的并发症风险(每1000程序2.1)(Levin,2004)。研制快速、特异、便宜的基于血液的测定将克服其它筛选试验中常见的依从性问题(Tonus,2006;Hundt等人,2007)并且将更容易被接受作为大的筛选测定的部分。

[0007] 发明概述

[0008] 诸位发明人研究了超过60种与结肠直肠癌有关的生物标志物,但是发现这些生物标志物没有一个能单独适合作为一种诊断试验。出人意料地,据发现测定受试者的样品中至少两种与结肠直肠癌有关的生物标志物的存在和/或水平允许检测或诊断在任何疾病阶段的结肠直肠癌。测定至少两种生物标志物的存在和/或水平有利地提供一种至少在灵敏度和特异性方面与该FOBT相媲美的诊断试验。

[0009] 因此,在一个方面中,本发明提供一种用于诊断或检测受试者体内的结肠直肠癌的方法,该方法包括:

[0010] i) 测定该受试者的样品中的选自IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK、IL-13、DKK-3、

EpCam、MIP1 β 、TGF β 1以及TIMP-1的至少两种生物标志物的存在和/或水平，

[0011] 其中这两种生物标志物的存在和/或水平指示了结肠直肠癌。

[0012] 在一个实施方案中，该方法包括测定选自M2PK、EpCam、IL-13、DKK-3、IL-8以及IGFBP2的两种生物标志物的存在和/或水平。

[0013] 在另一个实施方案中，该方法包括测定这些生物标志物中的至少三种的存在和/或表达水平。

[0014] 在一个实施方案中，这三个生物标志物是选自M2PK、EpCam、IL-13、DKK-3、IL-8、IGFBP2、MIP1 β 、TGF β 1以及MAC2BP。

[0015] 在一个具体的实施方案中，该方法包括测定三种生物标志物的存在和/或水平，其中这三种生物标志物是：

[0016] i) DKK-3、M2PK以及IGFBP2；

[0017] ii) M2PK、IGFBP2以及EpCAM；

[0018] iii) M2PK、MIP-1 β 以及TGF β 1；或

[0019] iv) IL-8、IL-13和MAC2BP。

[0020] 在另一个实施方案中，该方法包括测定这些生物标志物中的至少四种的存在和/或表达水平。

[0021] 在一个具体的实施方案中，该方法包括测定四种生物标志物的存在和/或水平，其中这四种生物标志物是：

[0022] i) DKK-3、M2PK、MAC2BP以及IGFBP2；

[0023] ii) IL-8、IL-13、MAC2BP以及EpCam；

[0024] iii) DKK3、M2PK、TGF β 1以及TIMP-1；

[0025] iv) M2PK、MIP-1 β 、IL-13以及TIMP-1；或

[0026] v) IL-8、MAC2BP、IGFBP2以及EpCam。

[0027] 在又一个实施方案中，该方法包括测定这些生物标志物中的至少五种的存在和/或水平。

[0028] 在一个具体的实施方案中，这五种生物标志物是IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK以及IL-13。

[0029] 在另一个实施方案中，该方法包括测定这些生物标志物中的至少六种的存在和/或水平。

[0030] 在另一个实施方案中，该方法包括测定这些生物标志物中的至少七种的存在和/或水平。

[0031] 在一个具体的实施方案中，这七种生物标志物是：

[0032] i) IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK、IL-13、DKK-3以及TGF β 1；或

[0033] ii) IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK、IL-13、EpCam以及MIP-1 β 。

[0034] 在又一个实施方案中，该方法包括测定这些生物标志物中的至少八种的存在和/或水平。

[0035] 在一个实施方案中，该方法包括测定这些生物标志物中的至少九种的存在和/或水平。

[0036] 在又一个实施方案中，该方法包括测定这些生物标志物中的至少十种的存在和/

或水平。

[0037] 在另一个实施方案中,该方法包括测定如在表7至18的任一者中提供的生物标志物的组合的存在和/或水平。

[0038] 在另一个实施方案中,该方法包括检测选自以下的至少一种另外的生物标志物的存在和/或水平:IGF-I、IGF-II、IGF-BP2、双调蛋白、VEGFA、VEGFD、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2、ENA-78、MCP-1、MIP-1 β 、IFN- γ 、IL-10、IL-13、IL-1 β 、IL-4、IL-8、IL-6、MAC2BP、肿瘤M2丙酮酸激酶、M65、OPN、DKK-3、EpCam、TGF β -1以及VEGFpan。

[0039] 在一个实施方案中,该方法以至少50%的灵敏度诊断或检测结肠直肠癌。

[0040] 在另一个实施方案中,该方法以至少66%的灵敏度诊断或检测结肠直肠癌。

[0041] 在又一个实施方案中,该方法以至少77%的灵敏度诊断或检测结肠直肠癌。

[0042] 在一个实施方案中,该方法以至少75%的特异性诊断或检测结肠直肠癌。

[0043] 在一个实施方案中,该方法以至少80%的特异性诊断或检测结肠直肠癌。

[0044] 在另一个实施方案中,该方法以至少90%的特异性诊断或检测结肠直肠癌。

[0045] 在又一个实施方案中,该方法以至少95%的特异性诊断或检测结肠直肠癌。

[0046] 在另一个实施方案中,该方法以至少50%的灵敏度和至少95%的特异性诊断或检测杜克斯A期结肠直肠癌。

[0047] 在又一个实施方案中,该方法以至少60%的灵敏度和至少80%的特异性诊断或检测杜克斯A期结肠直肠癌。

[0048] 在另一个实施方案中,该方法以至少50%的灵敏度和至少90%的特异性诊断或检测杜克斯A期结肠直肠癌。

[0049] 技术人员将会理解杜克斯A期对应于TNM分类T1、N0、M0和T2、N0、M0。

[0050] 因此在一个实施方案中,该方法以至少50%的灵敏度和至少95%的特异性诊断或检测TNM分类T1、N0、M0或T2、N0、M0结肠直肠癌。

[0051] 在又另一个实施方案中,该方法以至少60%的灵敏度和至少80%的特异性诊断或检测TNM分类T1、N0、M0或T2、N0、M0结肠直肠癌。

[0052] 在另一个实施方案中,该方法以至少50%的灵敏度和至少90%的特异性诊断或检测TNM分类T1、N0、M0或T2、N0、M0结肠直肠癌。

[0053] 用于检测多肽的任何适合的技术可以用于本发明的方法中。在一个实施方案中,该方法包括使该样品与结合一种生物标志物多肽的至少一种化合物接触。可替代地,该方法包括通过质谱分析法检测这些多肽。

[0054] 在一个具体实施方案中,该化合物被可检测地标记。

[0055] 在另一个实施方案中,该化合物是一种抗体。

[0056] 在一个实施方案中,该化合物被结合至固相支持体。

[0057] 在本发明的方法中,测定该生物标志物的存在和/或水平可以包括测定编码该生物标志物的一种多核苷酸(如一种生物标志物基因转录物)的存在和/或水平。因此,在一个实施方案中,这些生物标志物是多核苷酸。

[0058] 在本发明的方法的又另一实施方案中,该方法包括:

[0059] i) 测定该受试者的样品中的这些生物标志物的存在和/或水平;以及

[0060] ii) 将这些生物标志物的存在和/或水平与一种对照进行比较,其中该样品中与该

对照不同的一种存在和/或水平指示了结肠直肠癌。

[0061] 在一个实施方案中,该样品包括血液、血浆、血清、尿液、血小板、巨核细胞(megakaryocytes)或排泄物。

[0062] 在另一个方面中,本发明提供一种治疗方法,该方法包括:

[0063] (i) 根据本发明的方法诊断或检测结肠直肠癌;以及

[0064] (ii) 给予或推荐一种用于治疗结肠直肠癌的治疗剂。

[0065] 在又另一个方面中,本发明提供一种用于监测受试者体内的结肠直肠癌的治疗功效的方法,该方法包括针对结肠直肠癌治疗该受试者并且然后检测该受试者的样品中的选自IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK、IL-13、DKK-3、EpCam、MIP1 β 、TGF β 1以及TIMP-1的至少两种生物标志物的存在和/或水平,其中当与治疗之前相比在治疗之后这些多肽的缺乏和/或表达水平的减少指示了有效治疗。

[0066] 在另一个方面中,本发明提供一种用于诊断或检测结肠直肠癌的至少两种化合物的阵列,其中这些化合物各自结合选自IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK、IL-13、DKK-3、EpCam、MIP1 β 、TGF β 1以及TIMP-1的一种不同的生物标志物多肽。

[0067] 在又另一个方面中,本发明提供一种用于诊断或检测受试者体内的结肠直肠癌的试剂盒,该试剂盒包括各自结合选自IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK、IL-13、DKK-3、EpCam、MIP1 β 、TGF β 1以及TIMP-1的一种不同生物标志物多肽的两种化合物。

[0068] 贯穿本说明书,“包含(comprise)”一词或其变化形式(例如“包含了(comprises)”或“包含着(comprising)”)应被理解为意指包括所陈述的要素、完整的事物或步骤、或者多个要素、多个完整的事物或多个步骤的群组,但不排除任何其他要素、完整的事物或步骤、或者多个要素、多个完整的事物或多个步骤的群组。

[0069] 如将是显而易见的,本发明的一个方面的优选特点和特征可以应用于本发明的许多其他方面。

[0070] 通过以下非限制性实例并且参考这些附图在下文中描述本发明。

附图说明

[0071] 图1.在研究3中使用逻辑回归模型发现46种潜在蛋白质生物标志物的一种最优组合,从而产生一组七个生物标志物并且被图解为一个ROC曲线(黑色曲线)。使用“逐一剔除法”交叉验证评估这个“组”在独立数据上的性能(灰色曲线)。在筛选试验中关注的80%和90%特异性工作点绘制垂直线。在表5中给出性能统计。

[0072] 图2.通过每个阶段的ROC曲线图解一种七个生物标志物的模型从正常受试者中鉴定处于每个杜克斯分期(Dukes Stage)的结肠直肠癌患者的性能。研究3a.的A(红色)-A期、B(绿色)-B期、C(蓝色)-C期和D(黑色)D期。在表6中给出性能特征。

[0073] 图3.当对来自研究4(又称为重新测量的研究3)的生物标志物结果进行成对建模时,共有5对(选自以上10种生物标志物的清单的可能的45种组合中)可以显示在处于95%的特异性时产生高于52%的灵敏度。这些成对生物标志物组合的性能被图解为ROC曲线(n=5曲线)。在表7中给出性能特征。

[0074] 图4.从研究4数据生成的在处于95%特异性时具有至少50%的灵敏度的3个生物标志物的模型的一个实例。存在968种可能的3至10个生物标志物的组合并且那些组合的近

似一半显示出在处于90%特异性时至少50%灵敏度的性能。

[0075] 图5.图解从研究4数据生成的在处于95%特异性时具有至少50%的灵敏度的3至10个生物标志物的所有组合的ROC曲线(n=来自可能的968个模型中的485个交叉验证曲线)。

[0076] 图6.最佳的485个模型中每个生物标志物的频率。这些BM表示在处于95%特异性时给出至少50%的灵敏度的所有血清模型。所有10个生物标志物在这些有用模型中的高表现度证实了我们选择的这10个生物标志物的一致性。

[0077] 图7.从研究4数据生成的一种5个生物标志物的模型被图解为ROC曲线(黑色)和交叉验证ROC曲线(灰色)。当包括疾病的所有阶段并且当交叉验证给出64%的灵敏度时这个模型显示在处于95%特异性时68%的灵敏度。包括的生物标志物是[IL-8、IGFBP2、Mac2BP、DKK-3和M2PK]。

[0078] 图8.从研究4数据生成的一种6个生物标志物的模型被图解为ROC曲线(黑色)和交叉验证ROC曲线(灰色)。当包括疾病的所有阶段并且当交叉验证给出67%的灵敏度时这个模型显示在处于95%的特异性时77%的灵敏度。包括的生物标志物是[IL-8、IGFBP2、Mac2BP、DKK-3、TGFβ1&M2PK]。

[0079] 图9.示出从研究3a数据生成的两个可替代的七个生物标志物的模型。一个针对高特异性进行了优化(黑色/新)并且示出针对曲线下面积进行了优化的一个替代方案或模型(灰色/旧)。处于90%特异性时该新模型的灵敏度是72%并且该较旧模型的灵敏度是77%。包括的生物标志物是如下:

[0080] 新:IL8、IGFBP2、s90MAC2BP、M2PK、DKK-3、IL-13&TGFβ,

[0081] 旧:IL8、IGFBP2、s90MAC2BP、M2PK、EpCAM、IL13&MIP-1b。

[0082] 图10.从研究4数据生成的一种七个生物标志物的模型被图解为ROC曲线(黑色)和交叉验证ROC曲线(灰色)。这种模型显示在处于95%的特异性时84%的灵敏度。包括的生物标志物是[M2PK血清、IL8血浆、TGFβ1血清、IGFBP2血浆、Mac2BP血清、TIMP1血浆和Dkk3血浆]。

[0083] 图11.图解了示出针对每个杜克斯分期的一种3个生物标志物的模型的性能的交叉验证ROC曲线。这一数据证实了用于检测在疾病进展的不同阶段的癌症的三个生物标志物(DKK-3、M2PK和IGFBP2)的选择的有效性。该数据表明如果在A期使用这三个生物标志物,该试验仍将实现在处于95%特异性时64%的显著灵敏度,这可与在晚期疾病时实现的灵敏度(79%)相匹敌。换言之该三生物标志物组将发现允许早期检测的早期疾病状态。包括的生物标志物是Dkk3、M2PK和、IGFBP2。

[0084] 序列表的略语表

[0085] SEQ ID NO:1-IL-8的氨基酸序列

[0086] SEQ ID NO:2-IGFBP2的氨基酸序列

[0087] SEQ ID NO:3-MAC2BP的氨基酸序列

[0088] SEQ ID NO:4-M2PK变体1的氨基酸序列

[0089] SEQ ID NO:5-M2PK变体2的氨基酸序列

[0090] SEQ ID NO:6-M2PK变体3的氨基酸序列

[0091] SEQ ID NO:7-IL-13的氨基酸序列

- [0092] SEQ ID NO:8-DKK-3变体1的氨基酸序列
[0093] SEQ ID NO:9-DKK-3变体2的氨基酸序列
[0094] SEQ ID NO:10-DKK-3变体3的氨基酸序列
[0095] SEQ ID NO:11-EpCam的氨基酸序列
[0096] SEQ ID NO:12-MIP-1 β 的氨基酸序列
[0097] SEQ ID NO:13-TGF β 1的氨基酸序列
[0098] SEQ ID NO:14-TIMP-1的氨基酸序列

具体实施方式

[0099] 一般技术和定义

[0100] 除非另外确切地定义,否则在此所用的所有技术和科学术语应当被认为具有如由本领域(例如在细胞培养、分子遗传学、免疫学、免疫组织化学、蛋白质化学和生物化学中)的普通技术人员普遍理解的相同意义。

[0101] 除非另外指明,否则本发明中使用的重组蛋白、细胞培养和免疫技术是本领域的普通技术人员熟知的标准程序。在以下来源中的文献中描述和解释这类技术,如J.Perbal,分子克隆的实用指南,约翰威利父子出版社(1984)(J.Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning,John Wiley and Sons(1984)),J.Sambrook等人,分子克隆:实验室手册,第三版,冷泉港实验室出版社(2001)(J.Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3rd edn,Cold Spring Harbour Laboratory Press(2001)),R.Scopes,蛋白质纯化-原理和实践,第三版,施普林格出版社(1994)(R.Scopes,Protein Purification-Principals and Practice,3rd edn,Springer(1994)),T.A.Brown(编辑),分子生物学精要:实用方法,卷1和卷2,IRL出版社(1991)(T.A.Brown(editor),Essential Molecular Biology:A Practical Approach,Volumes 1and 2,IRL Press(1991)),D.M.Glover和B.D.Hames(编辑),DNA克隆:实用方法,卷1至卷4,IRL出版社(1995和1996)(D.M.Glover and B.D.Hames(editors),DNA Cloning:A Practical Approach,Volumes 1-4,IRL Press(1995and 1996))和F.M.Ausubel等人(编辑),分子生物学实验指南,Greene Pub.联合公司和威立-国际科学出版社(1988,包括直到目前的所有更新)(F.M.Ausubel et al.(editors),Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience),Ed Harlow和David Lane(编辑)抗体:实验室手册,冷泉港实验室出版社(1988)(Ed Harlow and David Lane(editors)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbour Laboratory,(1988))以及J.E.Coligan等人(编辑)免疫学实验室指南,约翰威利父子出版社(包括直到目前的所有更新)(J.E.Coligan et al.(editors)Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons)。

[0102] 如在此所使用的术语“结肠直肠癌”(还可以称为“结肠癌”、“肠癌”或“直肠癌”)是指起源于内衬大肠和/或直肠的上皮细胞的所有形式的癌症。

[0103] 如在此所使用的“生物标志物”是指由受试者产生的有助于将患有结肠直肠癌的受试者与正常或健康的受试者进行区分的任何分子,如一个基因、基因转录物(例如mRNA)、肽或蛋白质或其片段。

[0104] 如在此所使用的术语“诊断(diagnosis)”及其变体(如,但不限于,“进行诊断

(diagnose)”“被诊断 (diagnosed)”或“诊断的 (diagnosing)”) 不应当被限于临床状态的初步诊断,而应当被认为包括复发性疾病的诊断。

[0105] 如在此所使用的术语“受试者”是指可能患结肠直肠癌的任何动物并且包括动物如哺乳动物 (例如人) 或非人哺乳动物 (如猫和狗)、实验室动物 (如小鼠、大鼠、兔或豚鼠) 和家畜动物。在一个优选实施方案中,该受试者是人类。

[0106] 该“样品”可以是任何适合的类型并且可以是指 (例如) 其中可以检测生物标志物的存在或水平的一种材料。优选地,从该受试者得到该样品这样使得可以在体外进行生物标志物的存在和/或水平的检测。可替代地,可以在体内检测生物标志物的存在和/或水平。可以如直接从该源得到的使用该样品或在至少一步的 (部分) 纯化之后使用。可以在不会干扰本发明的方法的任何方便的培养基中制备该样品。典型地,该样品是一种水溶液、生物流体、细胞或组织。优选地,该样品是血液、血浆、血清、尿液、血小板、巨核细胞或排泄物。预处理可以涉及 (例如) 从血液制备血浆、稀释黏性流体等等。处理的方法可以涉及过滤、蒸馏、分离、浓缩、干扰组分的失活和试剂的添加。在试验之前生物样品的选择和预处理是本领域熟知的并且不需要进一步描述。

[0107] 如在此所使用的术语“治疗的 (treating)”、“进行治疗 (treat)”或“治疗 (treatment)”包括给予足以减少或延迟结肠直肠癌的发病或进展或足以减少或消除结肠直肠癌的至少一种症状的治疗有效量的一种化合物。

[0108] 生物标志物

[0109] 本发明人显示了测定受试者的样品中的至少两个生物标志物的存在和/或水平允许以可比得上或大于用FOBT实现的特异性和灵敏度的特异性和灵敏度检测或诊断结肠直肠癌,在杜克斯A期的早期检测或者在一些晚期 (如杜克斯B期或C期或D期)。在本发明的这些方法中有用的这至少两种生物标志物是选自IL-8 (白细胞介素-8)、IGFBP2 (胰岛素样生长因子结合蛋白-2)、MAC2BP (MAC2-结合蛋白;血清蛋白90K)、M2PK (肌肉丙酮酸激酶2,丙酮酸激酶3)、IL-13 (白细胞介素-13)、DKK-3 (dickkopf同系物,3)、EpCAM (上皮细胞黏附分子)、MIP1 β (巨噬细胞炎性蛋白1 β 、CCL4、MIP1 β)、TGF β 1 (转化生长因子 β 1,TGF β 1) 和TIMP-1 (金属蛋白酶1的组织抑制剂)。提及这些生物标志物的任一者包括提及所有多肽和多核苷酸变体,如由本领域的普通技术人员已知的亚型和转录物变体。在表1中提供每个这些生物标志物中的代表性序列的NCBI登录号。

[0110] 表1. 代表性生物标志物序列的NCBI登录号。

[0111]

生物标志物	代表性 NCBI 登录号
IL-8	NM 000584.2 (SEQ ID NO:1)
IGFBP2	NM 000597.2 (SEQ ID NO:2)
MAC2BP	NM 005567.3 (SEQ ID NO:3)
M2PK	NM_002654.3; NM_182470.1; NM_182471.1 (SEQ ID NOs:4-6)
IL-13	NM 002188.2 (SEQ ID NO:7)

[0112]

DKK-3	NM_015881.5; NM_013253; NM_001018057.1 (SEQ ID NOs:8-10)
EpCam	NM_002354.2 (SEQ ID NO:11)
MIP1 β	NM_002984.2 (SEQ ID NO:12)
TGF β 1	NM_000660.4 (SEQ ID NO:13)
TIMP-1	NM_003254.2 (SEQ ID NO:14)

[0113] 检测或诊断结肠直肠癌

[0114] 从前述描述应当清楚的是本发明的诊断方法可以涉及一定程度的量化以便测定患者样品中的生物标志物的水平。通过包括适当的对照样品来容易地提供这种量化。

[0115] 在一个实施方案中,本发明的方法中包括内部对照。一种优选的内部对照是取自一个或多个健康个体的一种或多种样品。

[0116] 在本上下文中,术语“健康个体”应当被认为是指已知没有患结肠直肠癌的一个个体,这种知识是源自该个体的临床数据,包括但不限于与在此描述的不同的一种诊断测定。

[0117] 正如对本领域的普通技术人员将是已知的,当进行的每个测定中不包括内部对照时,该对照可以源自自己确定的数据集。

[0118] 涉及这些对照受试者的数据优选地选自下组,该组由以下各项组成:

[0119] 1.包括对已知患有结肠直肠癌的一个典型受试者群体的生物标志物的存在或表达水平的测量的一个数据集;

[0120] 2.包括对被测试的该受试者的生物标志物的存在和/或水平的测量的一个数据集,其中已经在以前进行过所述测量,例如当已知该受试者健康时或,在患有结肠直肠癌的受试者的情况下,当该受试者被诊断或在疾病进展的早期阶段时。

[0121] 3.包括对一个健康个体或一个健康个体的群体的生物标志物的存在或水平的测量的一个数据集;以及

[0122] 4.包括对一个正常个体或一个正常个体的群体的生物标志物的存在或水平的测量的一个数据集。

[0123] 在本上下文中,关于已知患有结肠直肠癌的受试者的术语“典型群体”应当被认为是被诊断患有结肠直肠癌的受试者的群体或样品,该群体或样品是结肠直肠癌患者范围的代表。这不应被认为是要求该群体中的形态学或临床病理学参数的严格正态分布,因为在这样一种分布中一些变化是可允许的。优选地,“典型群体”将显示处于疾病进展的不同阶段的一系列的结肠直肠癌。特别优选的是“典型群体”显示出如在此描述的一组受试者的表达特征。

[0124] 术语“正常个体”应当被认为是指样品中未表达生物标志物或以低水平表达生物标志物的一个个体。正如对于本领域的普通技术人员将是已知的,从该群体的一个足够大的样品得到的数据将归一化,从而允许生成用于测定具体生物标志物的平均水平的一个数据集。

[0125] 基于在此提供的传授,本领域的普通技术人员无需过度的试验而能够容易地测定用于在本发明的任何诊断测定中比较的基线。

[0126] 结合一种生物标志物的化合物当用于诊断时可以被连接至一种诊断剂(如一种可检测的标记物)以便允许容易地检测在体外或在体内的结合事件。适合的标记物包括放射

性同位素、染料标志物或用于检测和/或定位靶分子的其它成像试剂。连接至一种可检测的标记物的化合物可以与适合的体内成像技术一起使用,如(例如)放射学、荧光检查、核磁共振成像(MRI)、CAT扫描、正电子发射断层摄影术(PET)、计算机化断层摄影术等。

[0127] 本发明的诊断方法能够以至少可与FOBT相匹敌或大于FOBE的灵敏度和特异性诊断或检测结肠直肠癌。正如本领域的普通技术人员将会理解,灵敏度是指诊断测试中被正确地鉴定为患有结肠直肠癌的实际阳性的比例。特异性测量被正确地鉴定为没有患结肠直肠癌的阴性的比例。在一个实施方案中,本发明的这些方法能够以至少50%、60%或66%、或至少77%、80%、83%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、或至少93%的灵敏度诊断或检测结肠直肠癌。在另一个实施方案中,本发明的这些方法能够以至少80%、或至少85%或至少90%、或至少95%的灵敏度诊断或检测结肠直肠癌。

[0128] 在一个实施方案中,本发明的这些方法能够以至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%或至少95%的特异性诊断或检测结肠直肠癌。

[0129] 有利地,本发明的这些方法能够以大于该FOBT的灵敏度检测在所有这些杜克斯分期的结肠直肠癌。在杜克斯A期中,肿瘤已经渗透进入但没有贯穿肠壁。在杜克斯B期中,肿瘤已经渗透贯穿肠壁但还不涉及任何淋巴结。在杜克斯C期中,癌症涉及区域淋巴结。在杜克斯D期中,存在远处转移(例如)至肝或肺。在一个实施方案中,本发明的这些方法能够以至少80%的灵敏度诊断或检测处于任何杜克斯分期的结肠直肠癌。

[0130] 正如本领域的普通技术人员已知,存在本领域已知的用于分期癌症的其它系统。一个实例是由美国癌症联合会使用的恶性肿瘤的TMN分类(TNM)(AJCC:结肠和直肠,Edge等人编辑;AJCC癌症分期手册,第七版。纽约,NY:施普林格出版社,2010,143-164页(AJCC:Colon and rectum,in Edge et al.,eds;AJCC Cancer Staging Manual,7th ed.New York,NY:Springer,2010,pp:143-164))。另一个实例是修正的Astler-Coller分类(MAC)。

[0131] 因此,本领域的普通技术人员应当认识到这些杜克斯分期对应于某些TNM分类。例如,杜克斯A期对应于T1、T2、N0和M0;杜克斯B期对应于T3、T4a、T4b、N0以及M0;并且杜克斯C期对应于i) T1-T2、N1/N1c、M0;ii) T1、N2a以及M0;iii) T3-T4a、N1/N1c以及M0;iv) T2-T3、N2a以及M0;v) T1-T2、N2b以及M0;vi) T4a、N2a以及M0;vii) T3-T4a、N2b以及M0;以及viii) T4b、N1-N2以及M0。因此,本领域的普通技术人员将会理解提及如在此使用的杜克斯分期包括提及如本领域已知的该对应TNM分类。

[0132] 蛋白检测技术

[0133] 在一个实施方案中,在一种患者样品中检测生物标志物多肽,其中该样品中的该多肽的存在和/或水平指示了结肠直肠癌。例如,该方法可以包括使源自该受试者的一种生物样品与一种能够结合至生物标志物多肽的化合物接触,并且检测该化合物与该生物标志物多肽之间的复合物的形成。如在此所使用的术语“生物标志物多肽”包括生物标志物多肽的片段,包括(例如)该生物标志物多肽的免疫原片段和表位。

[0134] 在一个实施方案中,结合该生物标志物的化合物是一种抗体。

[0135] 如在此所使用的术语“抗体”包括能够结合一种表位决定簇的完整分子和包含其片段或由其片段组成的分子(例如,Fab、F(ab')₂、Fv和scFv)和工程化的变体(包括双抗体、三抗体、微抗体以及单域抗体)。因此,抗体可以作为完整的免疫球蛋白存在或作为呈多种形式的修饰存在。

[0136] 在另一个实施方案中,在患者样品中检测一种针对生物标志物多肽的抗体,其中该样品中的该抗体的存在和/或水平指示了结肠直肠癌。

[0137] 在此思考的优选检测系统包括用于检测从人类受试者分离的生物样品中的蛋白或抗体的任何已知测定,例如,SDS/PAGE、等电聚焦、2维凝胶电泳(包括SDS/PAGE和等电聚焦)、免疫测定、流式细胞计量术(例如荧光激活的细胞分选(FACS))、使用一种抗体或非抗体化合物(例如,一种小分子(例如该蛋白的一种化学化合物、激动剂、拮抗剂、别构调节物、竞争性抑制剂或非竞争性抑制剂))的基于检测的系统。根据这些实施方案,可以以适合于蛋白检测的任何标准固相或溶液相测定形式使用该抗体或小分子。本发明清楚地包括光学或荧光检测,例如,使用质谱分析法、MALDI-TOF、生物传感器技术、渐消光纤(evanescent fiber optics)或荧光共振能量转移。还考虑适合在大量样品的高通量筛选中使用的测定系统,例如,高通量光谱共振法(例如,MALDI-TOF、电喷射MS或纳米电喷射MS)。另一种适合的蛋白检测技术涉及多重反应监测(MRM)在LC-MS(LC/MRM-MS)中的使用(Anderson和Hunter,2006)。

[0138] 免疫测定形式是特别适合的,例如,选自下组的免疫测定形式,该组由以下各项组成:免疫印迹、蛋白质印迹、斑点印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定。使用荧光共振能量转移(FRET)、同位素编码亲和标记物(ICAT)、基质辅助激光解析/电离飞行时间(MALDI-TOF)、电喷射离子化作用(ESI)、生物传感器技术、渐消光纤技术或蛋白质芯片技术的修改免疫测定也是有用的。

[0139] 核酸检测技术

[0140] 可以使用允许定性和/或定量评定样品中的生物标志物多核苷酸的水平的任何适合的技术。如在此所使用的术语“核酸分子”或“多核苷酸”是指一种寡核苷酸、多核苷酸或其任何片段。

[0141] 可以通过参考一种标准对照或在健康组织中发现的对照水平进行比较。例如,可以通过RNA印迹法和/或RT-PCR测定转录基因的水平。随着定量(实时)PCR的出现,可以通过使用针对所关注基因的适当引物实现基因表达的定量分析。可以在基因阵列上对该核酸进行标记和杂交,在这种情况下该基因浓度将与该阵列中生成的放射性或荧光信号的强度成正比。

[0142] 用于直接测序核苷酸序列的方法对于本领域的普通技术人员是熟知的并且可以在(例如)Ausubel等人编辑,精编分子生物学实验指南,第3版,威利出版社,(1995)(Ausubel et al.,eds.,Short Protocols in Molecular Biology,3rd ed.,Wiley,(1995))和Sambrook等人,分子克隆,第3版,冷泉港实验室出版社,(2001)(Sambrook et al.,Molecular Cloning,3rd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,(2001))中发现。可以通过任何适合的方法进行测序,例如,双脱氧测序法、化学测序或其变化。直接测序具有测定具体序列的任何碱基对中的变化的优点。

[0143] 可以用于进行本发明的其它PCR方法包括基于杂交的PCR检测系统、TaqMan测定(US 5,962,233)和分子信标测定(US 5,925,517)。

[0144] 可以从用于测试的该样品分离核酸。适合的方法对于本领域的普通技术人员将是已知的。例如,可以使用常规程序(如由QIAGEN技术公司提供的)从待分析的样品分离RNA。然后使用逆转录酶将这种RNA逆转录成DNA并且然后可以使用特异性引物通过PCR技术将所

关注的DNA分子扩增。

[0145] 还可以对患者样品直接进行诊断程序。杂交或扩增测定,例如,DNA或RNA印迹分析、免疫组织化学、单链构象多态性分析(SSCP)和PCR分析是在这方面有用的技术。如果需要,可以将靶核酸或探针核酸固定至一种固相支持体,如微量滴定板、薄膜、聚苯乙烯珠、玻片或其它固相。

[0146] 试剂盒

[0147] 本发明提供用于诊断或检测结肠直肠癌的试剂盒。如上所讨论的,这类试剂盒可以适合于检测核酸种类,或可替代地可以用于检测多肽基因产物。

[0148] 对于多肽的检测,抗体将最典型地被用作试剂盒的组分。然而,能够特异性地结合至一种生物标志物基因产物的任何试剂将是在本发明的这个方面中有用的。这些试剂盒的其它组分将典型地包括标记物、第二抗体、底物(如果该基因是一种酶)、抑制剂、辅助因子和对照基因产物制剂以便允许使用者量化表达水平和/或评定该诊断试验是否正确地运行。基于酶联免疫吸附测定(ELISA)的测试和竞争性ELISA测试是可以使用试剂盒组分由本领域的普通技术人员容易地进行的特别适合的测定。

[0149] 可任选地,该试剂盒进一步包括用于检测一种抗体结合至一种生物标志物多肽的工具。这类工具包括一种报道分子,例如,一种酶(如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶)、一种染料、一种放射性同位素、一种发光基团、一种荧光基团、生物素或一种胶体微粒(如胶体金或硒)。优选地这样一种报道分子直接连接至该抗体。

[0150] 在又一个实施方案中,试剂盒可以另外包括一种参比样品。在一个实施方案中,参比样品包括一种由抗体检测的多肽。优选地,该多肽具有已知浓度。这样一种多肽特别用作一种标准。因此,可以使用在此描述的一种诊断测定检测这样一种多肽的各种已知浓度。

[0151] 对于核酸的检测,这类试剂盒可以包括包含一种寡核苷酸探针的一个第一容器,如一个小瓶或塑料管或微量滴定板。这些试剂盒可任选地包括装有引物的一个第二容器。该探针可以是可与DNA杂交的,该DNA的表达的改变是与结肠直肠癌相关并且这些引物对扩增这种DNA是有用的。还可以(例如)使用阵列研发包括一种固定于固相支持体的寡核苷酸探针的试剂盒(参见期刊增刊21(1)自然遗传学,1999(see supplement of issue 21(1) Nature Genetics,1999))。

[0152] 对于核酸的PCR扩增,与如在此描述的一种生物标志物基因的至少一个部分互补的核酸引物可以包括于试剂盒中。这组引物典型地包括能够特异性扩增DNA的至少两种寡核苷酸,优选地是四种寡核苷酸。可以包括将允许定量PCR测定的荧光标记的寡核苷酸(例如,TaqMan化学,分子信标(Molecular Beacons))。还将包括用于扩增该DNA的适合的酶。

[0153] 出于比较或验证的目的可以包括对照核酸。这类对照可以或者是从健康组织或从健康个体分离的RNA/DNA,或者是mRNA水平不受结肠直肠癌影响的管家基因,如 β -肌动蛋白或GAPDH。

[0154] 回归算法和统计

[0155] 为了研发适合用于诊断或检测结肠直肠癌的一组生物标志物,诸位发明人在一种统计模型中分析了众多生物标志物。一个测试的性能中的这种改善有时称为“样本内(in-sample)”性能。一个测试的公正评价要求它的评定使用样本外(out-of-sample)受试者,即

没有包括于初始预测模型的构建中的受试者。这是通过使用交叉验证评定该测试的性能实现。

[0156] 针对统计显著性的测试包括线性和非线性回归,包括ANOVA、克-瓦氏 (Kruskal-Wallis)、威尔科克森 (Wilcoxon)、曼-惠特尼 (Mann-Whitney) 和优势比、贝叶斯 (Baysian) 概率算法。然而随着测量的生物标志物的数量增加,总体上可以更方便地使用一种更尖端技术,仅举几例如随机森林 (Random Forests)、简单逻辑、贝叶斯网 (Bayes Net)。

[0157] 例如,可以采用贝叶斯概率。在这种情况下可以使用一种10-倍交叉验证来评价所讨论的这些模型的“样本外”性能。对于在考虑中的生物标志物的每个组合,可以将该数据随机地分成10个子样本,每个具有类似比例的健康受试者和处于疾病的每个阶段的受试者。进而,可以排除每个子样本,并且可以使用剩余90%的受试者构建逻辑模型。然后可以使用这种模型针对该排除的子样本来评估癌症的概率,从而提供“样本外”性能的评估。通过针对剩余9个子样品重复这样,可以从该研究数据本身评估“样本外”性能。然后将这些样品外预测的概率与这些受试者的实际疾病状况进行比较以便创建一种受试者操作特征 (Receiver Operating Characteristic, ROC) 曲线,从该曲线可以评估处于95%特异性的交叉验证灵敏度。

[0158] 使用交叉验证 (或任何其它方法) 的“样本外”性能的每个评估,虽然无偏差,但对它具有一种可变性要素。因此模型的秩评定 (基于生物标志物组合) 可以仅指示这类模型的相对性能。然而能够被用于大量组合中以生成如通过“样本外”性能评估证实的一种诊断试验的一组生物标志物几乎肯定地在它本身内包括将经受重复评估的生物标志物组合。

[0159] 许多不同组合可以作为诊断试验,这些试验证明是有用和有成本效益的并且对于给定特异性具有可接受的灵敏度。作为一个实例,考虑这五个生物标志物: IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK和DKK-3。使患有癌症的受试者与健康对照区分开的一种模型可以是如下:

$$[0160] \quad \log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_{IL8} C_{IL8} + \beta_{IGFBP2} C_{IGFBP2} + \beta_{MAC2BP} C_{MAC2BP} + \beta_{M2PK} C_{M2PK} + \beta_{DKK3} C_{DKK3}$$

[0161] 这里p表示个人患有结肠直肠癌的概率。每个C_i是个人的血浆 (或血清) 中的浓度生物标志物i的对数。每个beta (β) 是在藉以测量这一生物标志物的这些浓度单位下施加至该生物标志物的系数—β₀是“偏置距”或“截距”。这种线性逻辑模型对于在此呈现的所有结果是常见的,但是远非可以对一种生物标志物浓度的组合建模以预测癌症的概率的唯一方式。

[0162] 将同样可适用的其它线性或非线性逻辑算法包括随机森林 (Random Forest)、ANOVA、t检验、费舍尔分析 (Fisher analysis)、支持向量机 (Support Vector Machine)、微阵列数据的线性模型 (LIMMA) 和/或微阵列数据的有效性分析 (SAM)、最佳优先 (Best First)、贪心分段 (Greedy Stepwise)、朴素贝叶斯 (Naive Bayes)、线性正向选择 (Linear Forward Selection)、分散搜索 (Scatter Search)、线性判别式分析 (LDA)、逐步逻辑回归 (Stepwise Logistic Regression)、受试者操作特性和分类树 (CT)。

[0163] 因此,根据本说明书的传授,本领域的普通技术人员将认识到可以通过选择如在此描述的这些生物标志物的不同组合来调节用于诊断结肠直肠癌的测试的灵敏度和特异性。

[0164] 基于知识的系统

[0165] 从在此的讨论将显而易见,用于实施一种算法的基于知识的计算机软件和硬件也形成本发明的部分。这类计算机软件和/或硬件对于进行根据本发明的诊断或检测结肠直肠癌的方法是有用的。因此,本发明还提供编程以实施一种算法的软件或硬件,该算法经由一种多变量分析处理通过进行本发明的方法而得到的数据以便提供疾病评分并且根据与预定值相比的疾病评分的结果来提供或允许诊断或检测结肠直肠癌和/或确定结肠直肠癌的进展或状况或确定结肠直肠癌是否已经进展或确定受试者是否正在对结肠直肠癌的治疗起响应。

[0166] 在一个实例中,本发明的方法可以被用于与病理学服务相关的现有的基于知识的体系结构或平台。例如,来自在此所描述的方法的结果经由一种通信网络(例如,互联网)被传送至一种处理系统,在该处理系统中一种算法被存储并且用于生成一种预测的后概率值,该值翻译为疾病概率或者复发或转移的风险或者对于治疗的反应性的评分,然后将这种评分以一种诊断或预测报告的形式转发至最终用户。

[0167] 因此本发明的方法可以是呈一种试剂盒或基于计算机的系统的形式,其包括检测这些生物标志物的浓度所必需的试剂和有助于测定和传送报告至临床医师的计算机硬件和/或软件。

[0168] 本发明的测定允许整合至现有或新开发的病理学体系结构或平台系统中。例如,本发明思考一种允许用户确定一个受试者有关结肠直肠癌的状况的方法,该方法包括:

[0169] (a) 在一种容易得到的样品中接收呈至少两种选自以下的生物标志物的水平的形式的数据:IL-8、IGFBP2、MAC2BP、M2PK、IL-13、DKK-3、EpCam、MIP1 B、TGFβ1和TIMP-1,可任选地与结肠直肠癌的另一种标志物组合;

[0170] (b) 经由多变量分析(例如,回归分析)处理该受试者数据以便提供一种疾病评分;

[0171] (c) 根据与预定值比较的疾病评分的结果确定该受试者的状况;以及

[0172] (d) 经由该通信网络将该受试者的状况的指示传输至该用户,提及该多变量分析包括进行该多变量分析功能的一种算法。

[0173] 在一个实施方案中,可以通过从患者取得血液样品并且测定如在此所描述的这些生物标志物的任何一个或多个的存在和/或水平来进行本发明的用于诊断或检测结肠直肠癌的方法。如果希望,可以(例如)在一种生物芯片上进行这些测量这样使得可以使用单一分析来测量多个生物标志物的存在和/或水平。然后将这种分析的结果输入到使它们经受线性回归分析的一种计算机程序中。该计算机还可以包括关于对照值或预期范围的信息,或该临床医师、护士、医疗负责人或全科医师可以输入这类数据。这种分析然后将提供患有结肠直肠癌的一种评分或可能性。如果针对该患者进行了第二测试,该回归分析可以指示该评分的变化,从而指示该患者的疾病已经进展或恶化。

[0174] 实例

[0175] 材料和方法

[0176] 患者样品

[0177] 从正在一些医院接受治疗的一组结肠直肠癌患者(杜克斯A期至D期)取得一批血浆和血清样品并且进行处理。

[0178] 还从一组约50个65岁以上的健康志愿者和一组15个50岁以上的健康志愿者采集血液并且进行处理。

[0179] 用略有不同的生物标志物开展四个独立研究。研究1着眼于52个癌症样品和50个对照,研究2着眼于55个癌症样品和53个对照,研究3和研究4着眼于96个癌症样品和50个对照。在研究2、3和4中这些患者是跨杜克斯分期年龄和性别相匹配的,概要统计参见表2。

[0180] 表2. 在研究2、3和4中使用的正常志愿者和结肠直肠癌患者的特征。

[0181]

	对照	癌症
	n= 50	n= 96
性别		
男性	25	48
女性	25	48
平均年龄(yr)	68	68
杜克斯分期		
A		22

[0182]

B		30
C		30
D		14
肿瘤部位		
结肠		73
直肠		17
未知的		6
近端 (包括盲肠、升结肠、肝曲结肠和横结肠)		43
远端 (包括脾曲、降结肠、乙状结肠和直肠)		47

[0183] 生物标志物分析

[0184] 用商用试剂盒和源抗体 (DSL、R&D Duoset、Calbiotech、Millipore、Abnova、Genway、Peviva、Schebo、Bender) 以及使用ELISA或Luminex测定进行生物标志物的分析。

[0185] 统计评估和组生物标志物建模

[0186] 使用统计软件包Prism和“R”分析每个测定的结果。使用非参数曼-惠特尼t检验 (non-parametric Mann-Whitney t-test) 评估标志物的单独性能并且生成个体受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 曲线。

[0187] 使用逻辑回归和相关建模策略来发现使对照和结肠直肠癌患者最佳区分开来的生物标志物的组合。用相同样品/等分试样进行四个独立研究。以下给出这些研究中的每一个的结果。

[0188] 研究1、2和3的结果

[0189] 在表3中列出研究1和2以及3中选择的待测量的生物标志物。呈粗体的生物标志物是那些从每个研究被鉴定为有希望的 (即, 与来自对照的样品相比它们在来自结肠直肠癌患者的样品中显著不同和/或它们在使结肠直肠癌与对照区分开来的结合生物标志物的组中被鉴定)。

[0190] 表3. 研究中分析的生物标志物。

[0191]

研究 1	研究 2	研究 3
IGF-I	IGF-BP2	IGF-BP2 (DSL)
IGF-II	IGF-II	IGF-II
IGF-BP2	IGF-BP3	IFNg
IGF-BP3	Her2	TNF α
BTC	VegFA	IL-10
双调蛋白	VegFC	IL-6
VegFA	VegFD	GM-CSF
VegFC	TIMP-1	IL-12
VegFD	TIMP-2	IL-13
MMP-2	MMP-1	IL-8
MMP-7	MMP-2	IL-4
MMP-9	MMP-3	IL-2
TIMP-2	MMP-7	IL-1b
Her2	MMP-8	MMP-1
	MMP-12	MMP-2
	MMP-13	MMP-3
	ENA-78	MMP-7
	MCP-1	MMP-8
	MIP-1β	MMP-9
	GM-CSF	ENA-78
	IFN-γ	MIP-1 α
	IL-10	MIP-1β
	IL-12	MCP-1
	IL-13	Mac-2BP
	IL-1β	TIMP-1
	IL-2	TIMP-2
	IL-4	Gro- α
	IL-6	肿瘤 M2 丙酮酸激酶
	IL-8	M30-apoptosense
	TNF- α	M65
	Cripto	Trail-R2
		P-钙黏着蛋白
		OPN
		Dkk-3
		EpCam
		TGFβ1
		REG IV
		CEA
		DcR3
		CA19.9
		双调蛋白
		CEACAM6
		VegFapan
		VegFA165b

[0192]

		脊椎蛋白-2
		存活蛋白

[0193] 统计评估和组生物标志物建模

[0194] 为了发现使对照和结肠直肠癌患者最佳区分开来的生物标志物的组合,采用使用贝叶斯信息标准 (Bayesian Information Criteria) 的正向变量选择以对于对数似然值进行罚分从而防止过拟合。为了评估该组生物标志物在一个独立数据集上的可能性能,使用“N倍 (N-Fold)”或“留一法 (leave-one-out)”交叉验证。在这一程序中每次排除一个观测数据而应用整个模型拟合算法于这些剩余的观测数据。

[0195] 然后使用所得到的模型来评估被排除的观测数据是一个病例的概率。针对该数据集中的每个观测数据重复这样。以此方式每个观测数据进而作为模型构建算法的一个独立测试。然后可以将所得到的由病例和对照 (各具有一个“独立预测的”病例概率) 组成的数据集与该初始模型进行比较。从众多生物标志物选择和对它们适当加权的能力允许一种搜索策略,该搜索策略在该ROC曲线上优化所关注区域中的性能。特异性差的代价是大量不必要的结肠镜检查。

[0196] 在研究3中,评估48个潜在生物标志物以便选择一组候选的结肠直肠癌生物标志物,在板 (plates) 内使用区组随机化以便避免偏差。从这一48个的列表中只有42个显示了可测量的水平。如由t检验评定,14个生物标志物各自显示出对照与CRC之间的显著性差异; (IGFII、IGFBP2、IL-8、IL-6、MMP-1、MMP-7、s90/Mac2BP、M2PK、EpCam、TIMP-1 (血清和血浆)、M65、OPN、TGFβ1、VEGFpan)。

[0197] 正如所预期的,没有一个具有能单独用作一种生物标志物的足够的灵敏度或特异性 (未示出)。然而,使用多种建模策略 (包括使用对数值),发现了一些不同组的生物标志物,这些组超过了FOBT的性能,尤其是对于早期至晚期疾病。

[0198] 图1示出了包括IL8 (血清)、IL-13 (血清)、EpCAM (血浆)、M2PK (血浆)、IGFBP2 (血清) 和Mac2BP (血清) 的一个7生物标志物组的结果,并且将该组进行交叉验证以便预测它对独立样本的性能。

[0199] 这一7生物标志物模型,该模型至少在概念上被描述为

$$[0200] \quad \log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_{IL8} C_{IL8} + \beta_{IGFBP2} C_{IGFBP2} + \beta_{M2PK} C_{M2PK} + \beta_{EpCAM} C_{EpCAM} + \beta_{Mac2BP} C_{Mac2BP}$$

[0201] 在高特异性时提供了良好性能并且在交叉验证下是稳健的。在表4中列出了据评估对于血浆中的这种生物标志物组合给出最佳模型的这些系数。在表5中提供性能统计。这种性能超过了针对FOBT引用的性能 (灵敏度65.8%, 特异性95%) (Morikawa等人, 2005)。

[0202] 表4. 该生物标志物组合的系数。

[0203]

生物标志物	…中测量的	浓度单位	系数
截距	NA	NA	-37.74
IL-8	血清	pg/mL	1.07
IL-13	血清	pg/mL	-0.28
EpCAM	血浆	pg/mL	-0.33

M2PK	血浆	单位/mL	1.40
IGFBP2	血清	ng/mL	1.99
Mac2BP	血清	ng/mL	2.39
MIP1 β	血清	Pg/ml	-1.19

[0204] 表5. 该7生物标志物模型的性能和交叉验证。

[0205]

	模型评估	交叉验证
ROC曲线下面积 (AUC)	0.91	0.86
处于80%特异性时的灵敏度	0.84	0.78
处于90%特异性时的灵敏度	0.81	0.69

[0206] 这种模型还被分别应用于结肠直肠癌的每个阶段的患者 (杜克斯A期、B期、C期、D期) 并且在每个阶段内显示效果一样良好 (图2)。这些AUC是0.88至0.93并且可以几乎一样好地区分结肠直肠癌的所有阶段。该模型显示出对于C期处于90%特异性时的最高灵敏度为90%并且对于B期处于90%特异性时的最低灵敏度为73% (表6)。

[0207] 表6. 依据杜克斯分期的模型的性能

[0208]

	A期	B期	C期	D期
ROC曲线下面积 (AUC)	0.89	0.88	0.93	0.91
处于80%特异性时的灵敏度	0.82	0.77	0.90	0.93
处于90%特异性时的灵敏度	0.77	0.73	0.90	0.86

[0209] 研究4 (又称为“重新测量的研究3”)

[0210] 在研究4中, 重新测量了与研究3相同的组中的10个生物标志物。从96个结肠直肠癌患者和50个正常受试者 (对照) 收集血液。在这个研究中重点在于10个生物标志物, 即IGFBP2、IL8、IL13、Mac2BP、M2PK、Dkk3、EpCam、TGF β 1、TIMP-1、MIP1 β 。如上述所描述的进行测定。测量这些生物标志物中的每一个的血清和血浆水平并且与对照值进行比较。

[0211] 当进行成对 (两个生物标志物) 建模时, 共有5对 (选自以上10个生物标志物的清单的可能的45种组合中) 可以显示在处于95%的特异性时产生高于52%的灵敏度。参见表7和图3。

[0212] 表7. 通过交叉验证产生有用筛选试验的生物标志物对。

[0213]

生物标志物1	生物标志物2	处于 95%特异性时评估的样本内 (测试) 灵敏度	处于 95%特异性时评估的样本外 (交叉验证) 灵敏度
M2PK	EpCAM	58.3%	58.3%
M2PK	IL13	56.3%	57.3%
Dkk3	M2PK	55.2%	55.2%
M2PK	IL8	60.4%	54.2%
M2PK	IGFBP2	58.3%	52.1%

[0214] 在分析这些指定的生物标志物中的三至十个的组合中, 存在968个可能的组合。这些3个与10个生物标志物之间的968个组合由以下各项组成: 3个标志物的120个组合; 4个标志物的210个组合; 5个标志物的252个组合; 6个标志物的210个组合; 7个标志物的120个组

合;8个标志物的45个组合;9个标志物的10个组合以及包括所有10个生物标志物的单一组合。当使用一种线性逻辑模型对它们建模并且然后经由10倍交叉验证测试时,这些968个组合的约一半处于95%特异性时具有50%的灵敏度,参见图4,其示出一个三生物标志物组合的结果。这些组合中的一半以上将具有90%的特异性和50%的灵敏度。

[0215] 图5示出基于这些生物标志物中的3个至10个的所有可能的组合的总计可能的968个模型中的用于测试的所有485个评估的样本外(10倍交叉验证的)ROC曲线。注意这些485个ROC曲线的许多单独部分是重合的,由于每个水平部分表示一个对照并且每个垂直部分表示一个病例。在这种情况下这些组合中的50.1%超过了50%灵敏度,95%特异性,最佳评估的“样本外”性能是处于95%特异性时76%的灵敏度。重复该交叉验证将选择一组不同的模型—由于随机采样,任何一个组合的灵敏度处于95%特异性时可能以10%变化—但是产生类似比例的有用的“有用筛选试验”。单个模型的精确验证要求重复的试验和更大的样本量。

[0216] 图6示出具有50%灵敏度,95%特异性的这485个组合中的有多少个组合包括任何给定的生物标志物。在最顶端,所选择的“有用的”组合中的432个包括M2PK。在最低端所选择的“有用的”组合中的227个包括MIP1 β 。所有10个生物标志物在“有用的”模型中的高表现度显示了这10个生物标志物的选择的一致性和自互补性。

[0217] 图7至图11展示了针对5个至7个生物标志物的组合的这一最后研究(研究4)的一些结果,包括其中这些样品或者是来自血浆簇或者是来自血清簇的一种模型。图11展示了在该疾病进展的不同阶段的选择三个生物标志物(DKK-3、M2PK和IGFBP2)的有效性。该数据表明如果在A期使用这三个生物标志物,处于95%特异性时该试验仍将实现64%的显著灵敏度,这可与处于晚期疾病时实现的灵敏度(79%)相匹敌。换言之该三生物标志物组将发现允许早期检测的早期疾病状态。

[0218] 表8至16列出不同生物标志物组集的多个组合的结果。取决于使用的线性回归和组对照以及其它因素(如样本偏差和测定试剂盒技术),实际数字或这些标志物的顺序可能存在变化。无论如何,这些组合中的许多处于高特异性时将实现良好的选择性以便有用于诊断或检测处于疾病进展的任何阶段的结肠直肠癌。

[0219] 表8. 在血清中处于95%特异性时等于或超过50%灵敏度的三个生物标志物的组合。

[0220]

BM1	BM2	BM3	处于 95%特异性时的 测试灵敏度	处于 95%特异性时的 交叉验证灵敏度
Dkk3	M2PK	IGFBP2	72.9%	70.8%
Dkk3	M2PK	IL8	62.5%	61.5%
M2PK	IL13	IGFBP2	65.6%	61.5%
M2PK	IGFBP2	EpCAM	63.5%	61.5%
M2PK	IL8	IGFBP2	65.6%	60.4%
M2PK	IL8	IL13	61.5%	58.3%
M2PK	MIP1 β	IL13	55.2%	57.3%
M2PK	IL8	Mac2BP	59.4%	57.3%
M2PK	MIP1 β	TGF β 1	57.3%	56.3%
M2PK	IL8	EpCAM	64.6%	56.3%
Dkk3	M2PK	IL13	59.4%	55.2%
Dkk3	M2PK	EpCAM	56.3%	55.2%
M2PK	MIP1 β	EpCAM	59.4%	55.2%
M2PK	IL8	TGF β 1	58.3%	55.2%
M2PK	IL8	TIMP1	57.3%	55.2%
TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	54.2%	55.2%
M2PK	Mac2BP	IGFBP2	58.3%	54.2%
Dkk3	IL8	Mac2BP	55.2%	53.1%
M2PK	MIP1 β	Mac2BP	52.1%	53.1%
M2PK	MIP1 β	IGFBP2	57.3%	53.1%
M2PK	TIMP1	EpCAM	58.3%	53.1%
M2PK	MIP1 β	IL8	56.3%	52.1%
M2PK	IL13	TIMP1	58.3%	52.1%
Dkk3	M2PK	Mac2BP	57.3%	51.0%
Dkk3	M2PK	TIMP1	55.2%	51.0%
M2PK	IL13	Mac2BP	58.3%	51.0%
M2PK	TGF β 1	IGFBP2	52.1%	51.0%
M2PK	TGF β 1	TIMP1	57.3%	51.0%
M2PK	TGF β 1	Mac2BP	56.3%	50.0%
IL8	IL13	Mac2BP	61.5%	50.0%
IL8	TGF β 1	Mac2BP	53.1%	50.0%
M2PK	MIP1 β	TIMP1	49.0%	49.0%
M2PK	TGF β	EpCAM	49.0%	47.9%
IL8	IL13	IGFBP2	49.0%	47.9%
IL8	Mac2BP	IGFBP2	57.3%	47.9%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	55.2%	46.9%
TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	46.9%	46.9%
Dkk3	Mac2BP	IGFBP2	49.0%	45.8%
M2PK	IL13	EpCAM	50.0%	45.8%
IL8	Mac2BP	TIMP1	52.1%	45.8%
IL13	Mac2BP	IGFBP2	45.8%	44.8%

[0221]	Dkk3	IL8	TGFβ1	41.7%	43.8%
	MIP1β	IL8	Mac2BP	42.7%	43.8%
	MIP1β	IL8	EpCAM	44.8%	43.8%
	IL8	TGFβ1	EpCAM	46.9%	43.8%
	Dkk3	IL8	EpCAM	51.0%	42.7%
	IL8	IGFBP2	EpCAM	43.8%	42.7%
	M2PK	Mac2BP	TIMP1	51.0%	41.7%

[0222] 表9. 在血清中处于95%特异性时等于或超过50%灵敏度的包括DKK-3的四个生物标志物的组合。

[0223]

BM1	BM2	BM3	BM4	处于 95%特异性时的测试灵敏度	处于 95% 特异性时的交叉验证灵敏度
Dkk3	M2PK	Mac2BP	IGFBP2	68.8%	69.8%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	71.9%	68.8%
Dkk3	M2PK	IL8	EpCAM	70.8%	67.7%
Dkk3	M2PK	TGFβ1	Mac2BP	67.7%	65.6%
Dkk3	M2PK	IL8	IGFBP2	69.8%	64.6%
Dkk3	M2PK	IL8	Mac2BP	69.8%	63.5%
Dkk3	M2PK	MIP1β	TGFβ1	65.6%	61.5%
Dkk3	M2PK	IL8	TIMP1	68.8%	61.5%
Dkk3	M2PK	IL13	IGFBP2	63.5%	61.5%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	59.4%	60.4%
Dkk3	M2PK	IGFBP2	EpCAM	68.8%	60.4%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IGFBP2	69.8%	59.4%
Dkk3	M2PK	TGFβ1	IGFBP2	61.5%	59.4%
Dkk3	M2PK	IL13	Mac2BP	56.3%	58.3%
Dkk3	M2PK	TGFβ1	TIMP1	65.6%	58.3%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL13	57.3%	57.3%
Dkk3	IL8	Mac2BP	IGFBP2	62.5%	56.3%
Dkk3	M2PK	IL8	TGFβ1	65.6%	55.2%
Dkk3	M2PK	IL13	TIMP1	57.3%	55.2%
Dkk3	M2PK	Mac2BP	TIMP1	57.3%	55.2%
Dkk3	M2PK	MIP1β	Mac2BP	57.3%	54.2%
Dkk3	IL8	IL13	Mac2BP	61.5%	54.2%
Dkk3	M2PK	TGFβ1	EpCAM	61.5%	53.1%
Dkk3	M2PK	IGFBP2	TIMP1	61.5%	53.1%
Dkk3	M2PK	IL13	TGFβ1	63.5%	52.1%
Dkk3	M2PK	TIMP1	EpCAM	56.3%	52.1%
Dkk3	IL8	Mac2BP	TIMP1	57.3%	52.1%
Dkk3	M2PK	MIP1β	EpCAM	60.4%	51.0%
Dkk3	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	59.4%	51.0%

[0224] 表10. 在血清中处于95%特异性时等于或超过50%灵敏度的包括M2PK的四个生物标志物的组合。

[0225]

BM1	BM2	BM3	BM4	处于 95%特异性时的测试灵敏度	处于 95% 特异性时的交叉验证灵敏度
M2PK	IL8	Mac2BP	TIMP1	63.5%	65.6%
M2PK	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	70.8%	65.6%
M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	66.7%	64.6%
M2PK	IL8	TGFβ1	Mac2BP	65.6%	64.6%
M2PK	MIP1β	IL13	IGFBP2	64.6%	62.5%
M2PK	IL8	IL13	TIMP1	64.6%	62.5%
M2PK	IL8	IL13	EpCAM	65.6%	62.5%
M2PK	IL13	Mac2BP	IGFBP2	69.8%	62.5%
M2PK	MIP1β	IL8	IL13	63.5%	61.5%
M2PK	IL8	Mac2BP	EpCAM	65.6%	61.5%
M2PK	IL13	IGFBP2	EpCAM	69.8%	61.5%
M2PK	MIP1β	IL8	TGFβ1	58.3%	58.3%
M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	67.7%	58.3%
M2PK	IL8	Mac2BP	IGFBP2	61.5%	58.3%
M2PK	IL8	IGFBP2	EpCAM	64.6%	58.3%
M2PK	IL13	TGFβ1	IGFBP2	64.6%	58.3%
M2PK	IL13	TGFβ1	EpCAM	62.5%	58.3%
M2PK	IL13	IGFBP2	TIMP1	62.5%	58.3%
M2PK	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	62.5%	58.3%
M2PK	TGFβ1	IGFBP2	EpCAM	61.5%	58.3%
M2PK	MIP1β	IL13	TIMP1	57.3%	57.3%
M2PK	MIP1β	TGFβ1	TIMP1	58.3%	57.3%
M2PK	MIP1β	IGFBP2	EpCAM	65.6%	57.3%
M2PK	MIP1β	IL8	Mac2BP	54.2%	56.3%
M2PK	IL8	IL13	TGFβ1	64.6%	56.3%
M2PK	IL8	TIMP1	EpCAM	62.5%	56.3%
M2PK	IL13	Mac2BP	TIMP1	57.3%	56.3%
M2PK	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	60.4%	56.3%
M2PK	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	63.5%	56.3%
M2PK	MIP1β	IL8	TIMP1	57.3%	55.2%
M2PK	IL8	TGFβ1	TIMP1	57.3%	55.2%
M2PK	MIP1β	IL13	Mac2BP	57.3%	54.2%
M2PK	MIP1β	IL8	EpCAM	62.5%	53.1%
M2PK	MIP1β	TIMP1	EpCAM	59.4%	52.1%
M2PK	IL13	TGFβ1	TIMP1	64.6%	52.1%
M2PK	IL13	Mac2BP	EpCAM	51.0%	52.1%
M2PK	MIP1β	IL13	TGFβ1	57.3%	51.0%
M2PK	MIP1β	Mac2BP	IGFBP2	57.3%	51.0%
M2PK	TGFβ1	Mac2BP	EpCAM	52.1%	51.0%
M2PK	TGFβ1	TIMP1	EpCAM	59.4%	51.0%
M2PK	MIP1β	IL8	IGFBP2	52.1%	50.0%
M2PK	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	52.1%	50.0%
M2PK	MIP1β	TGFβ1	Mac2BP	63.5%	49.0%
M2PK	MIP1β	IL13	EpCAM	50.0%	47.9%

[0226]

M2PK	MIP1 β	TGF β 1	EpCAM	53.1%	47.9%
M2PK	IL13	TGF β 1	Mac2BP	60.4%	46.9%
M2PK	MIP1 β	TGF β 1	IGFBP2	49.0%	44.8%

[0227]

表 11. 在血清中处于 95% 特异性时等于或超过 50% 灵敏度的五个生物标志物的组合。

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	处于 95% 特异性的测试灵敏度	处于 95% 特异性时的交叉验证灵敏度
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	74.0%	70.8%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TIMP1	71.9%	70.8%
M2PK	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	69.8%	70.8%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	71.9%	69.8%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IGFBP2	EpCAM	71.9%	69.8%
Dkk3	M2PK	IL8	IGFBP2	EpCAM	78.1%	69.8%
Dkk3	M2PK	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	68.8%	69.8%
M2PK	MIP1B	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	69.8%	68.8%
Dkk3	M2PK	IL8	TGFβ1	Mac2BP	70.8%	67.7%
Dkk3	M2PK	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	70.8%	67.7%
M2PK	MIP1B	IL8	IL13	Mac2BP	66.7%	67.7%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	70.8%	66.7%
Dkk3	M2PK	IL13	TGFβ1	IGFBP2	68.8%	66.7%
Dkk3	M2PK	IL13	IGFBP2	EpCAM	66.7%	66.7%
M2PK	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	71.9%	66.7%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFβ1	69.8%	65.6%
Dkk3	M2PK	IL8	Mac2BP	TIMP1	67.7%	65.6%
Dkk3	M2PK	TGFβ1	Mac2BP	EpCAM	66.7%	65.6%
M2PK	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	71.9%	65.6%
M2PK	IL8	IL13	TGFβ1	IGFBP2	66.7%	65.6%
M2PK	IL8	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	64.6%	65.6%
M2PK	IL8	TGFβ1	Mac2BP	EpCAM	69.8%	65.6%
Dkk3	M2PK	MIP1B	IL8	IGFBP2	66.7%	64.6%
Dkk3	M2PK	MIP1B	Mac2BP	IGFBP2	70.8%	64.6%
M2PK	MIP1B	IL8	IL13	TIMP1	65.6%	64.6%

[0228]

M2PK	MIP1B	IL8	TGFβ1	Mac2BP	65.6%	64.6%
M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	EpCAM	76.0%	64.6%
M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	EpCAM	72.9%	64.6%
M2PK	IL8	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	64.6%	64.6%
M2PK	IL8	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	71.9%	64.6%
Dkk3	M2PK	IL13	TGFβ1	TIMP1	68.8%	63.5%
Dkk3	M2PK	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	67.7%	63.5%
M2PK	MIP1B	IL13	IGFBP2	EpCAM	67.7%	63.5%
M2PK	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	66.7%	63.5%
M2PK	IL13	TGFβ1	IGFBP2	EpCAM	70.8%	63.5%
Dkk3	M2PK	MIP1B	IL13	TGFβ1	69.8%	62.5%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	EpCAM	65.6%	62.5%
Dkk3	M2PK	IL8	TGFβ1	IGFBP2	70.8%	62.5%
Dkk3	M2PK	IL8	Mac2BP	IGFBP2	69.8%	62.5%
Dkk3	M2PK	IL13	TGFβ1	Mac2BP	68.8%	62.5%
Dkk3	M2PK	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	60%	62.5%
Dkk3	M2PK	TGFβ1	TIMP1	EpCAM	67.7%	62.5%
M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	64.6%	62.5%
M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	66.7%	62.5%
M2PK	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	60%	62.5%
Dkk3	M2PK	MIP1B	IL13	IGFBP2	63.5%	61.5%
Dkk3	M2PK	IL8	TGFβ1	TIMP1	64.6%	61.5%

表 12.在血清中处于 95%特异性时等于或超过 50%灵敏度的七个生物标志物的组合。

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	处于 95%特 异性时的测 试灵敏度	处于 95%特 异性时的测 验灵敏度	处于 95%特 异性时的交叉 验证灵敏度
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--------------------------	--------------------------	----------------------------

[0229]

Dkk3	M2PK	IL8	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	78%	56%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	76%	64%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	73%	69%
Dkk3	M2PK	IL8	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	72%	68%
Dkk3	M2PK	IL8	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	71%	62%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	70%	64%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	70%	67%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	69%	66%
M2PK	MIP1 β	IL8	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	69%	55%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	67%	68%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	67%	64%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	65%	59%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	65%	52%
Dkk3	M2PK	IL8	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	64%	56%
Dkk3	M2PK	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	64%	57%
M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	64%	50%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	63%	55%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	TGF β 1	IGFBP2	EpCAM	63%	58%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	63%	53%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	63%	59%
M2PK	MIP1 β	IL8	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	63%	59%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	62%	51%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	62%	56%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	62%	39%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGF β 1	TIMP1	EpCAM	62%	43%
Dkk3	M2PK	IL8	TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	62%	50%
Dkk3	MIP1 β	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	62%	55%
Dkk3	MIP1 β	IL8	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	62%	47%
M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	62%	56%

[0230]

M2PK	IL8	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	62%	49%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFβ1	IGFBP2	EpCAM	60%	56%
Dkk3	M2PK	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	60%	55%
M2PK	MIP1β	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	60%	53%

表 13.具有 60%与 52%之间的灵敏度的七个生物标志物的组合。

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	处于 95%特 异性时的测 试灵敏度	处于 95%特 异性时的交叉 验证灵敏度
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	EpCAM	59%	54%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	IGFBP2	EpCAM	59%	52%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	TGFβ1	IGFBP2	TIMP1	59%	52%
Dkk3	M2PK	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	59%	47%
Dkk3	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	59%	52%
Dkk3	MIP1β	IL8	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	59%	45%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	58%	41%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	TGFβ1	TIMP1	EpCAM	58%	50%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	58%	55%
Dkk3	MIP1β	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	58%	50%
Dkk3	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	58%	52%
M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	58%	52%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	IGFBP2	57%	49%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TIMP1	EpCAM	57%	48%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	57%	51%
Dkk3	M2PK	MIP1β	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	57%	46%
Dkk3	M2PK	MIP1β	TGFβ1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	57%	49%
Dkk3	M2PK	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	57%	49%

[0231]

Dkk3	MIP1 β	IL8	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	57%	50%
M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	TIMP1	EpCAM	57%	43%
M2PK	IL8	IL13	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	57%	52%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	56%	47%
Dkk3	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	56%	48%
MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	56%	54%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	TGF β 1	Mac2BP	EpCAM	55%	35%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	55%	44%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	EpCAM	55%	35%
Dkk3	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	55%	50%
Dkk3	IL8	IL13	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	55%	54%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	Mac2BP	EpCAM	54%	49%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	54%	39%
Dkk3	M2PK	IL13	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	54%	42%
Dkk3	IL8	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	54%	51%
M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	IGFBP2	EpCAM	54%	3.7%
M2PK	MIP1 β	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	54%	41%
M2PK	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	54%	43%
MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	54%	42%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	53%	52%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	53%	42%
M2PK	MIP1 β	IL8	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	53%	34%
M2PK	MIP1 β	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	53%	45%
	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	53%	51%
MIP1 β	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	53%	39%
MIP1 β	IL8	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	53%	51%

表 14. 具有<53%的灵敏度的七个生物标志物的组合。

[0232]

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	处于 95% 特异性时的测试灵敏度	处于 95% 特异性时的交叉验证灵敏度
M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	EpCAM	52%	42%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL13	TGF β 1	IGFBP2	EpCAM	51%	41%
Dkk3	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	TIMP1	EpCAM	51%	35%
M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	51%	38%
M2PK	MIP1 β	IL8	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	51%	30%
M2PK	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	51%	37%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	TIMP1	50%	48%
Dkk3	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	50%	41%
Dkk3	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	50%	42%
M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	50%	49%
M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	50%	35%
MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	50%	39%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL13	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	49%	44%
Dkk3	MIP1 β	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	EpCAM	49%	33%
M2PK	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	49%	43%
Dkk3	M2PK	MIP1 β	IL13	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48%	43%
Dkk3	MIP1 β	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48%	38%
Dkk3	MIP1 β	IL8	TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48%	40%
Dkk3	MIP1 β	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	48%	31%
Dkk3	IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48%	38%
M2PK	MIP1 β	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48%	33%
M2PK	MIP1 β	IL13	TGF β 1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	48%	45%
M2PK	MIP1 β	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	48%	37%
M2PK	MIP1 β	IL13	TGF β 1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	47%	41%
IL8	IL13	TGF β 1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	47%	40%

[0233]

Dkk3	MIP1β	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	46%	42%
M2PK	MIP1β	IL8	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	46%	30%
Dkk3	M2PK	MIP1β	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	45%	37%
Dkk3	M2PK	IL13	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	45%	41%
Dkk3	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	IGFBP2	EpCAM	45%	33%
Dkk3	MIP1β	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	44%	40%
Dkk3	MIP1β	IL8	TGFβ1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	44%	43%
Dkk3	MIP1β	IL13	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	44%	43%
MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	44%	28%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL13	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	43%	31%
Dkk3	MIP1β	IL13	TGFβ1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	42%	40%
MIP1β	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	42%	31%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL13	TGFβ1	Mac2BP	EpCAM	41%	23%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL13	TGFβ1	TIMP1	EpCAM	41%	33%
Dkk3	MIP1β	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	41%	41%
Dkk3	MIP1β	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	41%	39%
Dkk3	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	41%	37%
M2PK	MIP1β	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	32%	27%

表 15. 在血浆和血清样品中的九个生物标志物的组合处于 95% 特异性时的灵敏度。

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	BM8	BM9	血浆	血清
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	73%	7.7%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	73%	7.7%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	54%	72%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	58%	74%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	74%	70%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	71%	78%

[0234]

Dkk3	M2PK	MIP1β	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	57%	72%
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	67%	76%
Dkk3	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	54%	55%
M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	58%	69%

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	BM8	BM9	BM10	血浆	血清
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	70%	55%
Dkk3	M2PK	MIP1β	IL8	IL13	TGFβ1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	73%	68%

表 16. 在血浆和血清样品中的十个生物标志物的组合处于 95% 特异性时的灵敏度。

[0235] 本领域的技术人员将了解,在不脱离概括描述的本发明的范围的情况下,可对这些具体实施方案中所示的本发明作出众多的变化和/或修改。因此,这些现有实施方案在所

有方面都被视为是说明性的而不是限制性的。

[0236] 在此讨论的和/或引用的所有出版物通过引用以其全文结合在此。

[0237] 本申请要求AU 2010903140的优先权,该申请的全部内容通过引用结合在此。

[0238] 已包括在本说明书中的对于多个文献、行为、材料、装置、物品等的任何讨论仅出于为本发明提供一个背景的目的。它不应被视为承认任何或所有这些内容构成现有技术基础的一部分或是与本发明有关的领域中的常见一般知识,因为它在本申请的各项权利要求的优先权日之前就存在。

[0239] 参考文献

[0240] Anderson和Hunter (2006) 分子细胞蛋白质组学,5:573-588。

[0241] 澳大利亚的癌症,概述 (2008) AIHW (澳大利亚健康福利机构) & AACR (澳大拉西亚癌症登记协会), 癌序列号46, Cat.No: CAN 42, Canberra: AIHW。

[0242] Etzioni等人 (2003) 自然评论癌症,3:243-252。

[0243] Hundt等人 (2007) 癌症流行病学:生物标志物及预防,16:1935-1953。

[0244] Kimmel (1987) 酶学方法,152:507-511。

[0245] Kwoh等人 (1989) 美国国家科学院院刊86:1173-1177。

[0246] Levin (2004) 胃肠病学,127:1841-1844。

[0247] Lieberman (2010) 胃肠病学,138:2115-2126。

[0248] Morikawa等人 (2005) 胃肠病学,129:422-428。

[0249] Notomi等人 (2000) 核酸研究28:E63。

[0250] Tonus (2006) 世界胃肠病学杂志,12:7007-7011。

[0251] Wahl和Berger (1987) 酶学方法,152:399-407。

[0252] Walker等人 (1992a) 美国国家科学院院刊89:392-396。

[0253] Walker等人 (1992b) 核酸研究20:1691-1696。

序列表

<110> 联邦科学与工业研究中心
 <120> 结肠直肠癌的诊断
 <130> 510961
 <150> AU 2010903140
 <151> 2010-07-14
 <160> 14
 <170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 1

Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ile Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu
 20 25 30
 Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe
 35 40 45
 Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr
 50 55 60
 Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala
 85 90 95
 Glu Asn Ser

[0001]

<210> 2
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 2

Met Leu Pro Arg Val Gly Cys Pro Ala Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15
 Leu Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Ser Gly
 20 25 30
 Gly Gly Gly Gly Ala Arg Ala Glu Val Leu Phe Arg Cys Pro Pro Cys
 35 40 45
 Thr Pro Glu Arg Leu Ala Ala Cys Gly Pro Pro Pro Val Ala Pro Pro
 50 55 60
 Ala Ala Val Ala Ala Val Ala Gly Gly Ala Arg Met Pro Cys Ala Glu
 65 70 75 80
 Leu Val Arg Glu Pro Gly Cys Gly Cys Cys Ser Val Cys Ala Arg Leu
 85 90 95
 Glu Gly Glu Ala Cys Gly Val Tyr Thr Pro Arg Cys Gly Gln Gly Leu
 100 105 110
 Arg Cys Tyr Pro His Pro Gly Ser Glu Leu Pro Leu Gln Ala Leu Val
 115 120 125
 Met Gly Glu Gly Thr Cys Glu Lys Arg Arg Asp Ala Glu Tyr Gly Ala

130	135	140
Ser Pro Glu Gln Val Ala Asp Asn Gly Asp Asp His Ser Glu Gly Gly		
145	150	155
Leu Val Glu Asn His Val Asp Ser Thr Met Asn Met Leu Gly Gly Gly		160
	165	170
Gly Ser Ala Gly Arg Lys Pro Leu Lys Ser Gly Met Lys Glu Leu Ala		175
	180	185
Val Phe Arg Glu Lys Val Thr Glu Gln His Arg Gln Met Gly Lys Gly		190
	195	200
Gly Lys His His Leu Gly Leu Glu Glu Pro Lys Lys Leu Arg Pro Pro		205
	210	215
Pro Ala Arg Thr Pro Cys Gln Gln Glu Leu Asp Gln Val Leu Glu Arg		220
225	230	235
Ile Ser Thr Met Arg Leu Pro Asp Glu Arg Gly Pro Leu Glu His Leu		240
	245	250
Tyr Ser Leu His Ile Pro Asn Cys Asp Lys His Gly Leu Tyr Asn Leu		255
	260	265
Lys Gln Cys Lys Met Ser Leu Asn Gly Gln Arg Gly Glu Cys Trp Cys		270
	275	280
Val Asn Pro Asn Thr Gly Lys Leu Ile Gln Gly Ala Pro Thr Ile Arg		285
	290	295
Gly Asp Pro Glu Cys His Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Gln Glu Ala Arg		300
305	310	315
Gly Val His Thr Gln Arg Met Gln		320
	325	

[0002]

<210> 3
 <211> 585
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 3

Met Thr Pro Pro Arg Leu Phe Trp Val Trp Leu Leu Val Ala Gly Thr		
1	5	10
Gln Gly Val Asn Asp Gly Asp Met Arg Leu Ala Asp Gly Gly Ala Thr		15
	20	25
Asn Gln Gly Arg Val Glu Ile Phe Tyr Arg Gly Gln Trp Gly Thr Val		30
	35	40
Cys Asp Asn Leu Trp Asp Leu Thr Asp Ala Ser Val Val Cys Arg Ala		45
	50	55
Leu Gly Phe Glu Asn Ala Thr Gln Ala Leu Gly Arg Ala Ala Phe Gly		60
65	70	75
Gln Gly Ser Gly Pro Ile Met Leu Asp Glu Val Gln Cys Thr Gly Thr		80
	85	90
Glu Ala Ser Leu Ala Asp Cys Lys Ser Leu Gly Trp Leu Lys Ser Asn		95
	100	105
Cys Arg His Glu Arg Asp Ala Gly Val Val Cys Thr Asn Glu Thr Arg		110
	115	120
Ser Thr His Thr Leu Asp Leu Ser Arg Glu Leu Ser Glu Ala Leu Gly		125
	130	135
Gln Ile Phe Asp Ser Gln Arg Gly Cys Asp Leu Ser Ile Ser Val Asn		140
145	150	155
		160

[0003]

Val	Gln	Gly	Glu	Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Cys	Gly	His	Thr	Val	Ile	Leu	165	170	175
Thr	Ala	Asn	Leu	Glu	Ala	Gln	Ala	Leu	Trp	Lys	Glu	Pro	Gly	Ser	Asn	180	185	190
Val	Thr	Met	Ser	Val	Asp	Ala	Glu	Cys	Val	Pro	Met	Val	Arg	Asp	Leu	195	200	205
Leu	Arg	Tyr	Phe	Tyr	Ser	Arg	Arg	Ile	Asp	Ile	Thr	Leu	Ser	Ser	Val	210	215	220
Lys	Cys	Phe	His	Lys	Leu	Ala	Ser	Ala	Tyr	Gly	Ala	Arg	Gln	Leu	Gln	225	230	235
Gly	Tyr	Cys	Ala	Ser	Leu	Phe	Ala	Ile	Leu	Leu	Pro	Gln	Asp	Pro	Ser	245	250	255
Phe	Gln	Met	Pro	Leu	Asp	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Asp	260	265	270
Ala	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Cys	Leu	Gln	Phe	Leu	Ala	Trp	Asn	Phe	Glu	275	280	285
Ala	Leu	Thr	Gln	Ala	Glu	Ala	Trp	Pro	Ser	Val	Pro	Thr	Asp	Leu	Leu	290	295	300
Gln	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Ser	Asp	Leu	Ala	Val	Pro	Ser	Glu	Leu	Ala	305	310	315
Leu	Leu	Lys	Ala	Val	Asp	Thr	Trp	Ser	Trp	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	His	325	330	335
Glu	Glu	Val	Glu	Gly	Leu	Val	Glu	Lys	Ile	Arg	Phe	Pro	Met	Met	Leu	340	345	350
Pro	Glu	Glu	Leu	Phe	Glu	Leu	Gln	Phe	Asn	Leu	Ser	Leu	Tyr	Trp	Ser	355	360	365
His	Glu	Ala	Leu	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Phe	His	370	375	380
Thr	Val	Pro	Phe	Gln	Leu	Leu	Ala	Arg	Tyr	Lys	Gly	Leu	Asn	Leu	Thr	385	390	395
Glu	Asp	Thr	Tyr	Lys	Pro	Arg	Ile	Tyr	Thr	Ser	Pro	Thr	Trp	Ser	Ala	405	410	415
Phe	Val	Thr	Asp	Ser	Ser	Trp	Ser	Ala	Arg	Lys	Ser	Gln	Leu	Val	Tyr	420	425	430
Gln	Ser	Arg	Arg	Gly	Pro	Leu	Val	Lys	Tyr	Ser	Ser	Asp	Tyr	Phe	Gln	435	440	445
Ala	Pro	Ser	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Gln	Ser	Phe	Gln	Thr	Pro	450	455	460
Gln	His	Pro	Ser	Phe	Leu	Phe	Gln	Asp	Lys	Arg	Val	Ser	Trp	Ser	Leu	465	470	475
Val	Tyr	Leu	Pro	Thr	Ile	Gln	Ser	Cys	Trp	Asn	Tyr	Gly	Phe	Ser	Cys	485	490	495
Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Leu	Thr	Lys	Ser	Gly	Gly	Ser	500	505	510
Asp	Arg	Thr	Ile	Ala	Tyr	Glu	Asn	Lys	Ala	Leu	Met	Leu	Cys	Glu	Gly	515	520	525
Leu	Phe	Val	Ala	Asp	Val	Thr	Asp	Phe	Glu	Gly	Trp	Lys	Ala	Ala	Ile	530	535	540
Pro	Ser	Ala	Leu	Asp	Thr	Asn	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Ser	Phe	Pro	545	550	555
Cys	Pro	Ala	Gly	His	Phe	Asn	Gly	Phe	Arg	Thr	Val	Ile	Arg	Pro	Phe	560		

					565				570						575	
	Tyr	Leu	Thr	Asn	Ser	Ser	Gly	Val	Asp							
				580					585							
	<210>	4														
	<211>	531														
	<212>	PRT														
	<213>	智人														
	<400>	4														
	Met	Ser	Lys	Pro	His	Ser	Glu	Ala	Gly	Thr	Ala	Phe	Ile	Gln	Thr	Gln
	1				5					10					15	
	Gln	Leu	His	Ala	Ala	Met	Ala	Asp	Thr	Phe	Leu	Glu	His	Met	Cys	Arg
				20					25					30		
	Leu	Asp	Ile	Asp	Ser	Pro	Pro	Ile	Thr	Ala	Arg	Asn	Thr	Gly	Ile	Ile
			35					40					45			
	Cys	Thr	Ile	Gly	Pro	Ala	Ser	Arg	Ser	Val	Glu	Thr	Leu	Lys	Glu	Met
		50					55					60				
	Ile	Lys	Ser	Gly	Met	Asn	Val	Ala	Arg	Leu	Asn	Phe	Ser	His	Gly	Thr
	65					70					75					80
	His	Glu	Tyr	His	Ala	Glu	Thr	Ile	Lys	Asn	Val	Arg	Thr	Ala	Thr	Glu
					85					90					95	
	Ser	Phe	Ala	Ser	Asp	Pro	Ile	Leu	Tyr	Arg	Pro	Val	Ala	Val	Ala	Leu
				100					105					110		
	Asp	Thr	Lys	Gly	Pro	Glu	Ile	Arg	Thr	Gly	Leu	Ile	Lys	Gly	Ser	Gly
			115					120					125			
[0004]	Thr	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Lys	Lys	Gly	Ala	Thr	Leu	Lys	Ile	Thr	Leu
		130					135					140				
	Asp	Asn	Ala	Tyr	Met	Glu	Lys	Cys	Asp	Glu	Asn	Ile	Leu	Trp	Leu	Asp
	145					150					155					160
	Tyr	Lys	Asn	Ile	Cys	Lys	Val	Val	Glu	Val	Gly	Ser	Lys	Ile	Tyr	Val
					165					170						175
	Asp	Asp	Gly	Leu	Ile	Ser	Leu	Gln	Val	Lys	Gln	Lys	Gly	Ala	Asp	Phe
			180						185					190		
	Leu	Val	Thr	Glu	Val	Glu	Asn	Gly	Gly	Ser	Leu	Gly	Ser	Lys	Lys	Gly
			195					200					205			
	Val	Asn	Leu	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Asp	Leu	Pro	Ala	Val	Ser	Glu	Lys
		210					215					220				
	Asp	Ile	Gln	Asp	Leu	Lys	Phe	Gly	Val	Glu	Gln	Asp	Val	Asp	Met	Val
	225					230					235					240
	Phe	Ala	Ser	Phe	Ile	Arg	Lys	Ala	Ser	Asp	Val	His	Glu	Val	Arg	Lys
					245					250					255	
	Val	Leu	Gly	Glu	Lys	Gly	Lys	Asn	Ile	Lys	Ile	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu
			260						265					270		
	Asn	His	Glu	Gly	Val	Arg	Arg	Phe	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp
			275					280					285			
	Gly	Ile	Met	Val	Ala	Arg	Gly	Asp	Leu	Gly	Ile	Glu	Ile	Pro	Ala	Glu
		290					295					300				
	Lys	Val	Phe	Leu	Ala	Gln	Lys	Met	Met	Ile	Gly	Arg	Cys	Asn	Arg	Ala
	305					310					315					320
	Gly	Lys	Pro	Val	Ile	Cys	Ala	Thr	Gln	Met	Leu	Glu	Ser	Met	Ile	Lys
					325					330						335

Lys Pro Arg Pro Thr Arg Ala Glu Gly Ser Asp Val Ala Asn Ala Val
 340 345 350
 Leu Asp Gly Ala Asp Cys Ile Met Leu Ser Gly Glu Thr Ala Lys Gly
 355 360 365
 Asp Tyr Pro Leu Glu Ala Val Arg Met Gln His Leu Ile Ala Arg Glu
 370 375 380
 Ala Glu Ala Ala Ile Tyr His Leu Gln Leu Phe Glu Glu Leu Arg Arg
 385 390 395 400
 Leu Ala Pro Ile Thr Ser Asp Pro Thr Glu Ala Thr Ala Val Gly Ala
 405 410 415
 Val Glu Ala Ser Phe Lys Cys Cys Ser Gly Ala Ile Ile Val Leu Thr
 420 425 430
 Lys Ser Gly Arg Ser Ala His Gln Val Ala Arg Tyr Arg Pro Arg Ala
 435 440 445
 Pro Ile Ile Ala Val Thr Arg Asn Pro Gln Thr Ala Arg Gln Ala His
 450 455 460
 Leu Tyr Arg Gly Ile Phe Pro Val Leu Cys Lys Asp Pro Val Gln Glu
 465 470 475 480
 Ala Trp Ala Glu Asp Val Asp Leu Arg Val Asn Phe Ala Met Asn Val
 485 490 495
 Gly Lys Ala Arg Gly Phe Phe Lys Lys Gly Asp Val Val Ile Val Leu
 500 505 510
 Thr Gly Trp Arg Pro Gly Ser Gly Phe Thr Asn Thr Met Arg Val Val
 515 520 525
 Pro Val Pro
 530

[0005]

<210> 5
 <211> 531
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 5
 Met Ser Lys Pro His Ser Glu Ala Gly Thr Ala Phe Ile Gln Thr Gln
 1 5 10 15
 Gln Leu His Ala Ala Met Ala Asp Thr Phe Leu Glu His Met Cys Arg
 20 25 30
 Leu Asp Ile Asp Ser Pro Pro Ile Thr Ala Arg Asn Thr Gly Ile Ile
 35 40 45
 Cys Thr Ile Gly Pro Ala Ser Arg Ser Val Glu Thr Leu Lys Glu Met
 50 55 60
 Ile Lys Ser Gly Met Asn Val Ala Arg Leu Asn Phe Ser His Gly Thr
 65 70 75 80
 His Glu Tyr His Ala Glu Thr Ile Lys Asn Val Arg Thr Ala Thr Glu
 85 90 95
 Ser Phe Ala Ser Asp Pro Ile Leu Tyr Arg Pro Val Ala Val Ala Leu
 100 105 110
 Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Gly Leu Ile Lys Gly Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Glu Val Glu Leu Lys Lys Gly Ala Thr Leu Lys Ile Thr Leu
 130 135 140
 Asp Asn Ala Tyr Met Glu Lys Cys Asp Glu Asn Ile Leu Trp Leu Asp

145	150	155	160
Tyr Lys Asn Ile Cys Lys Val Val Glu Val Gly Ser Lys Ile Tyr Val			
165	170	175	
Asp Asp Gly Leu Ile Ser Leu Gln Val Lys Gln Lys Gly Ala Asp Phe			
180	185	190	
Leu Val Thr Glu Val Glu Asn Gly Gly Ser Leu Gly Ser Lys Lys Gly			
195	200	205	
Val Asn Leu Pro Gly Ala Ala Val Asp Leu Pro Ala Val Ser Glu Lys			
210	215	220	
Asp Ile Gln Asp Leu Lys Phe Gly Val Glu Gln Asp Val Asp Met Val			
225	230	235	240
Phe Ala Ser Phe Ile Arg Lys Ala Ser Asp Val His Glu Val Arg Lys			
245	250	255	
Val Leu Gly Glu Lys Gly Lys Asn Ile Lys Ile Ile Ser Lys Ile Glu			
260	265	270	
Asn His Glu Gly Val Arg Arg Phe Asp Glu Ile Leu Glu Ala Ser Asp			
275	280	285	
Gly Ile Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Ile Glu Ile Pro Ala Glu			
290	295	300	
Lys Val Phe Leu Ala Gln Lys Met Met Ile Gly Arg Cys Asn Arg Ala			
305	310	315	320
Gly Lys Pro Val Ile Cys Ala Thr Gln Met Leu Glu Ser Met Ile Lys			
325	330	335	
Lys Pro Arg Pro Thr Arg Ala Glu Gly Ser Asp Val Ala Asn Ala Val			
340	345	350	
[0006] Leu Asp Gly Ala Asp Cys Ile Met Leu Ser Gly Glu Thr Ala Lys Gly			
355	360	365	
Asp Tyr Pro Leu Glu Ala Val Arg Met Gln His Leu Ile Ala Arg Glu			
370	375	380	
Ala Glu Ala Ala Met Phe His Arg Lys Leu Phe Glu Glu Leu Val Arg			
385	390	395	400
Ala Ser Ser His Ser Thr Asp Leu Met Glu Ala Met Ala Met Gly Ser			
405	410	415	
Val Glu Ala Ser Tyr Lys Cys Leu Ala Ala Ala Leu Ile Val Leu Thr			
420	425	430	
Glu Ser Gly Arg Ser Ala His Gln Val Ala Arg Tyr Arg Pro Arg Ala			
435	440	445	
Pro Ile Ile Ala Val Thr Arg Asn Pro Gln Thr Ala Arg Gln Ala His			
450	455	460	
Leu Tyr Arg Gly Ile Phe Pro Val Leu Cys Lys Asp Pro Val Gln Glu			
465	470	475	480
Ala Trp Ala Glu Asp Val Asp Leu Arg Val Asn Phe Ala Met Asn Val			
485	490	495	
Gly Lys Ala Arg Gly Phe Phe Lys Lys Gly Asp Val Val Ile Val Leu			
500	505	510	
Thr Gly Trp Arg Pro Gly Ser Gly Phe Thr Asn Thr Met Arg Val Val			
515	520	525	
Pro Val Pro			
530			

<210> 6

<211> 531
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 6
 Met Ser Lys Pro His Ser Glu Ala Gly Thr Ala Phe Ile Gln Thr Gln
 1 5 10 15
 Gln Leu His Ala Ala Met Ala Asp Thr Phe Leu Glu His Met Cys Arg
 20 25 30
 Leu Asp Ile Asp Ser Pro Pro Ile Thr Ala Arg Asn Thr Gly Ile Ile
 35 40 45
 Cys Thr Ile Gly Pro Ala Ser Arg Ser Val Glu Thr Leu Lys Glu Met
 50 55 60
 Ile Lys Ser Gly Met Asn Val Ala Arg Leu Asn Phe Ser His Gly Thr
 65 70 75 80
 His Glu Tyr His Ala Glu Thr Ile Lys Asn Val Arg Thr Ala Thr Glu
 85 90 95
 Ser Phe Ala Ser Asp Pro Ile Leu Tyr Arg Pro Val Ala Val Ala Leu
 100 105 110
 Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Gly Leu Ile Lys Gly Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Glu Val Glu Leu Lys Lys Gly Ala Thr Leu Lys Ile Thr Leu
 130 135 140
 Asp Asn Ala Tyr Met Glu Lys Cys Asp Glu Asn Ile Leu Trp Leu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Lys Asn Ile Cys Lys Val Val Glu Val Gly Ser Lys Ile Tyr Val
 165 170 175
 Asp Asp Gly Leu Ile Ser Leu Gln Val Lys Gln Lys Gly Ala Asp Phe
 180 185 190
 Leu Val Thr Glu Val Glu Asn Gly Gly Ser Leu Gly Ser Lys Lys Gly
 195 200 205
 Val Asn Leu Pro Gly Ala Ala Val Asp Leu Pro Ala Val Ser Glu Lys
 210 215 220
 Asp Ile Gln Asp Leu Lys Phe Gly Val Glu Gln Asp Val Asp Met Val
 225 230 235 240
 Phe Ala Ser Phe Ile Arg Lys Ala Ser Asp Val His Glu Val Arg Lys
 245 250 255
 Val Leu Gly Glu Lys Gly Lys Asn Ile Lys Ile Ile Ser Lys Ile Glu
 260 265 270
 Asn His Glu Gly Val Arg Arg Phe Asp Glu Ile Leu Glu Ala Ser Asp
 275 280 285
 Gly Ile Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Ile Glu Ile Pro Ala Glu
 290 295 300
 Lys Val Phe Leu Ala Gln Lys Met Met Ile Gly Arg Cys Asn Arg Ala
 305 310 315 320
 Gly Lys Pro Val Ile Cys Ala Thr Gln Met Leu Glu Ser Met Ile Lys
 325 330 335
 Lys Pro Arg Pro Thr Arg Ala Glu Gly Ser Asp Val Ala Asn Ala Val
 340 345 350
 Leu Asp Gly Ala Asp Cys Ile Met Leu Ser Gly Glu Thr Ala Lys Gly
 355 360 365
 Asp Tyr Pro Leu Glu Ala Val Arg Met Gln His Leu Ile Ala Arg Glu

[0007]

370 375 380
 Ala Glu Ala Ala Met Phe His Arg Lys Leu Phe Glu Glu Leu Val Arg
 385 390 395 400
 Ala Ser Ser His Ser Thr Asp Leu Met Glu Ala Met Ala Met Gly Ser
 405 410 415
 Val Glu Ala Ser Tyr Lys Cys Leu Ala Ala Ala Leu Ile Val Leu Thr
 420 425 430
 Glu Ser Gly Arg Ser Ala His Gln Val Ala Arg Tyr Arg Pro Arg Ala
 435 440 445
 Pro Ile Ile Ala Val Thr Arg Asn Pro Gln Thr Ala Arg Gln Ala His
 450 455 460
 Leu Tyr Arg Gly Ile Phe Pro Val Leu Cys Lys Asp Pro Val Gln Glu
 465 470 475 480
 Ala Trp Ala Glu Asp Val Asp Leu Arg Val Asn Phe Ala Met Asn Val
 485 490 495
 Gly Lys Ala Arg Gly Phe Phe Lys Lys Gly Asp Val Val Ile Val Leu
 500 505 510
 Thr Gly Trp Arg Pro Gly Ser Gly Phe Thr Asn Thr Met Arg Val Val
 515 520 525
 Pro Val Pro
 530

<210> 7
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 7

[0008]

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
 20 25 30
 Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
 35 40 45
 Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
 50 55 60
 Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
 85 90 95
 Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
 100 105 110
 Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
 115 120 125
 Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
 130 135 140
 Phe Asn
 145

<210> 8
 <211> 350
 <212> PRT

<213> 智人
 <400> 8
 Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
 20 25 30
 Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
 35 40 45
 Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Met Glu Asp Thr Gln His Lys
 50 55 60
 Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
 85 90 95
 Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
 100 105 110
 Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe
 115 120 125
 Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
 130 135 140
 His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
 145 150 155 160
 Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
 165 170 175
 Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
 180 185 190
 Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
 195 200 205
 Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
 210 215 220
 Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
 225 230 235 240
 Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu
 245 250 255
 Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu
 260 265 270
 Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe
 275 280 285
 Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val
 290 295 300
 Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu
 305 310 315 320
 Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Arg Glu
 325 330 335
 Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile
 340 345 350
 [0009]
 <210> 9
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 9
 Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
 20 25 30
 Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
 35 40 45
 Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Met Glu Asp Thr Gln His Lys
 50 55 60
 Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
 85 90 95
 Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
 100 105 110
 Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe
 115 120 125
 Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
 130 135 140
 His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
 145 150 155 160
 Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
 165 170 175
 Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
 180 185 190
 [0010] Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
 195 200 205
 Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
 210 215 220
 Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
 225 230 235 240
 Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu
 245 250 255
 Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu
 260 265 270
 Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe
 275 280 285
 Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val
 290 295 300
 Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu
 305 310 315 320
 Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Arg Glu
 325 330 335
 Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile
 340 345 350

 <210> 10
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 10

[0011]

Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
 20 25 30
 Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
 35 40 45
 Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Met Glu Asp Thr Gln His Lys
 50 55 60
 Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
 85 90 95
 Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
 100 105 110
 Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe
 115 120 125
 Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
 130 135 140
 His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
 145 150 155 160
 Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
 165 170 175
 Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
 180 185 190
 Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
 195 200 205
 Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
 210 215 220
 Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
 225 230 235 240
 Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu
 245 250 255
 Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu
 260 265 270
 Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe
 275 280 285
 Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val
 290 295 300
 Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu
 305 310 315 320
 Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Arg Glu
 325 330 335
 Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile
 340 345 350

<210> 11

<211> 314

<212> PRT

<213> 智人

<400> 11

Met Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala

	1		5		10		15									
	Thr	Ala	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln	Glu	Glu	Cys	Val	Cys	Glu	Asn	Tyr
			20					25						30		
	Lys	Leu	Ala	Val	Asn	Cys	Phe	Val	Asn	Asn	Asn	Arg	Gln	Cys	Gln	Cys
		35						40					45			
	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Lys	Leu	Ala	Ala
		50					55					60				
	Lys	Cys	Leu	Val	Met	Lys	Ala	Glu	Met	Asn	Gly	Ser	Lys	Leu	Gly	Arg
	65					70					75				80	
	Arg	Ala	Lys	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Gln	Asn	Asn	Asp	Gly	Leu	Tyr	Asp
				85						90					95	
	Pro	Asp	Cys	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Lys	Gln	Cys	Asn	Gly
			100						105					110		
	Thr	Ser	Met	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp
		115						120					125			
	Lys	Asp	Thr	Glu	Ile	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Tyr	Trp	Ile
		130					135					140				
	Ile	Ile	Glu	Leu	Lys	His	Lys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Lys
	145					150					155					160
	Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu
				165						170					175	
	Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile	Thr
			180							185				190		
	Ile	Asp	Leu	Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Val	Asp
		195						200					205			
[0012]	Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Gly	Glu	Ser
		210						215					220			
	Leu	Phe	His	Ser	Lys	Lys	Met	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu
	225					230					235				240	
	Asp	Leu	Asp	Pro	Gly	Gln	Thr	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Val	Asp	Glu	Lys	Ala
				245						250				255		
	Pro	Glu	Phe	Ser	Met	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Val	Ile
			260							265				270		
	Val	Val	Val	Val	Ile	Ala	Val	Val	Ala	Gly	Ile	Val	Val	Leu	Val	Ile
			275							280				285		
	Ser	Arg	Lys	Lys	Arg	Met	Ala	Lys	Tyr	Glu	Lys	Ala	Glu	Ile	Lys	Glu
		290					295					300				
	Met	Gly	Glu	Met	His	Arg	Glu	Leu	Asn	Ala						
	305					310										
	<210>	12														
	<211>	92														
	<212>	PRT														
	<213>	智人														
	<400>	12														
	Met	Lys	Leu	Cys	Val	Thr	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Met	Leu	Val	Ala	Ala
	1				5					10					15	
	Phe	Cys	Ser	Pro	Ala	Leu	Ser	Ala	Pro	Met	Gly	Ser	Asp	Pro	Pro	Thr
			20							25				30		
	Ala	Cys	Cys	Phe	Ser	Tyr	Thr	Ala	Arg	Lys	Leu	Pro	Arg	Asn	Phe	Val
			35						40					45		

Val Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser Ser Leu Cys Ser Gln Pro Ala Val Val
 50 55 60
 Phe Gln Thr Lys Arg Ser Lys Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser
 65 70 75 80
 Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr Asp Leu Glu Leu Asn
 85 90

<210> 13
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 13

Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Arg Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr
 20 25 30
 Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala
 35 40 45
 Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser
 50 55 60
 Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu
 85 90 95
 Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu
 100 105 110
 Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr
 115 120 125
 His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
 130 135 140
 Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Leu
 145 150 155 160
 Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser Asn
 165 170 175
 Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp Ser
 180 185 190
 Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp Leu
 195 200 205
 Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr
 225 230 235 240
 Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg Pro
 245 250 255
 Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu Gln
 260 265 270
 Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser
 275 280 285
 Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys
 290 295 300
 Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn

[0013]

	305		310		315		320
	Phe Cys Leu Gly	Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr					
		325		330		335	
	Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala						
		340		345		350	
	Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr						
		355		360		365	
	Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val						
		370		375		380	
	Arg Ser Cys Lys Cys Ser						
	385		390				
	<210>	14					
	<211>	207					
	<212>	PRT					
	<213>	智人					
	<400>	14					
	Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Leu Trp						
	1		5		10		15
	Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro Pro His Pro Gln						
		20		25		30	
[0014]	Thr Ala Phe Cys Asn Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala Lys Phe Val Gly						
		35		40		45	
	Thr Pro Glu Val Asn Gln Thr Thr Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Ile Lys						
		50		55		60	
	Met Thr Lys Met Tyr Lys Gly Phe Gln Ala Leu Gly Asp Ala Ala Asp						
	65		70		75		80
	Ile Arg Phe Val Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val Cys Gly Tyr Phe						
		85		90		95	
	His Arg Ser His Asn Arg Ser Glu Glu Phe Leu Ile Ala Gly Lys Leu						
		100		105		110	
	Gln Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe Val Ala Pro Trp						
		115		120		125	
	Asn Ser Leu Ser Leu Ala Gln Arg Arg Gly Phe Thr Lys Thr Tyr Thr						
		130		135		140	
	Val Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Leu Ser Ile Pro Cys						
		145		150		155	
	Lys Leu Gln Ser Gly Thr His Cys Leu Trp Thr Asp Gln Leu Leu Gln						
		165		170		175	
	Gly Ser Glu Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala Cys Leu Pro Arg						
		180		185		190	
	Glu Pro Gly Leu Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Ser Gln Ile Ala						
		195		200		205	

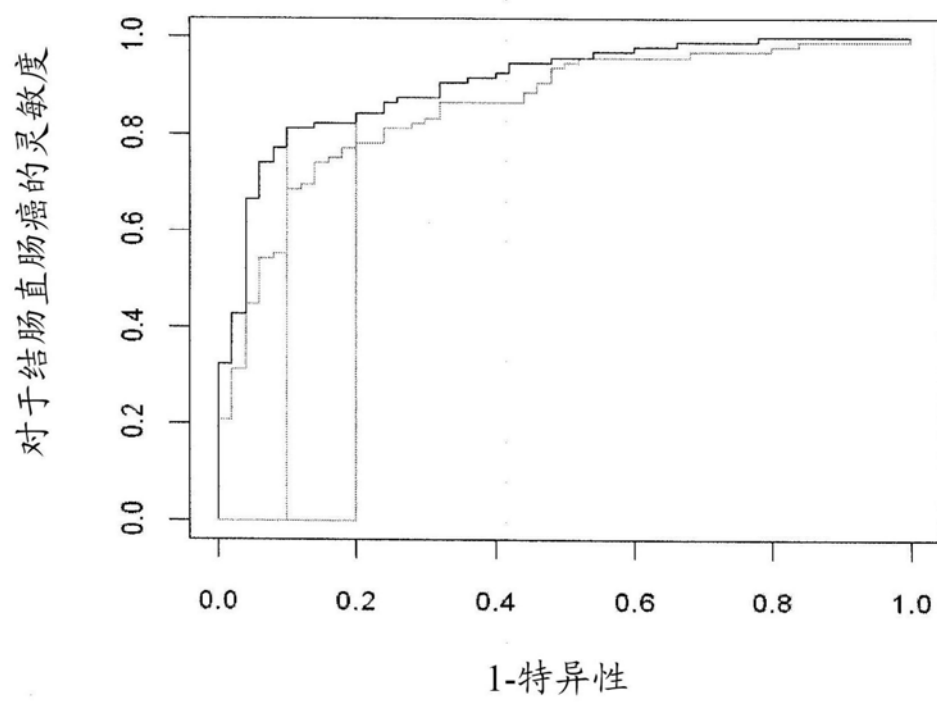


图1

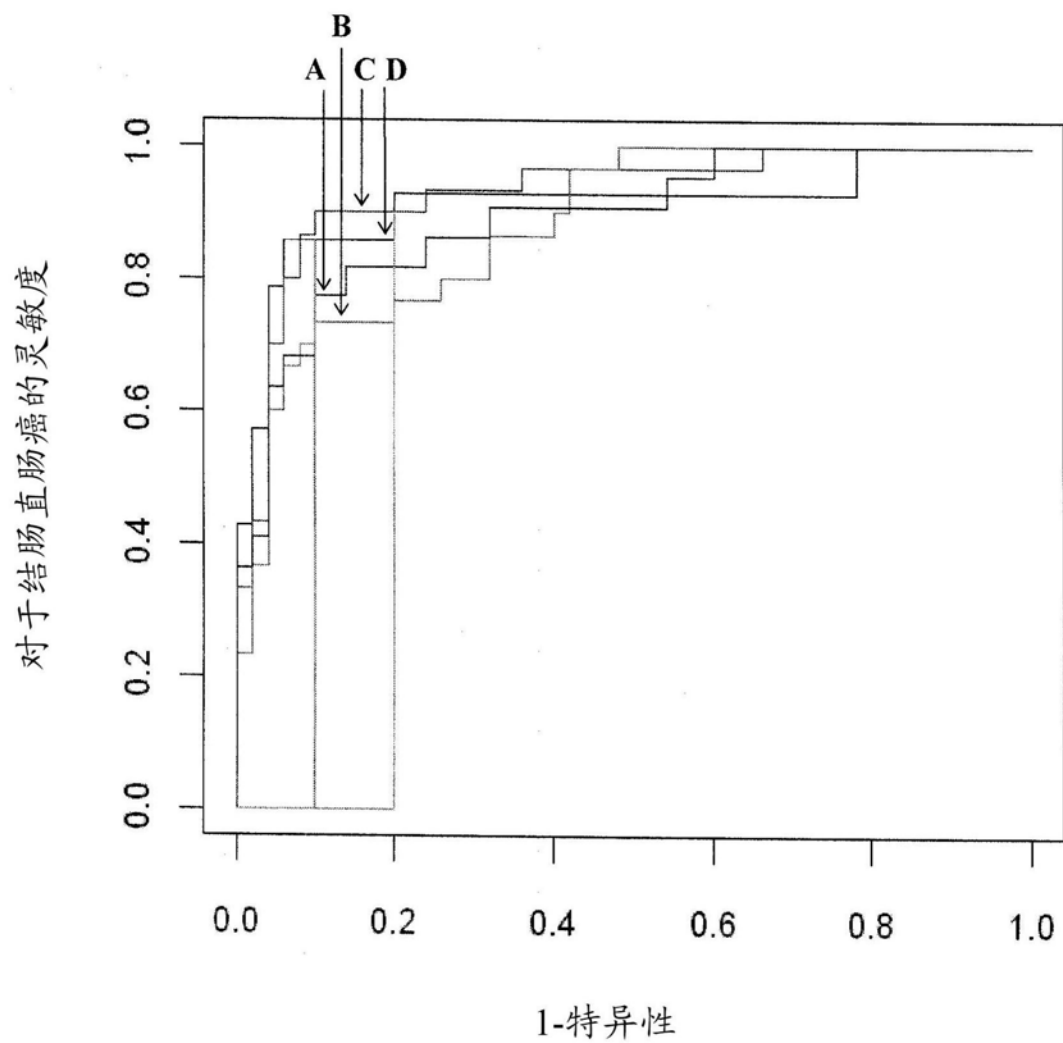


图2

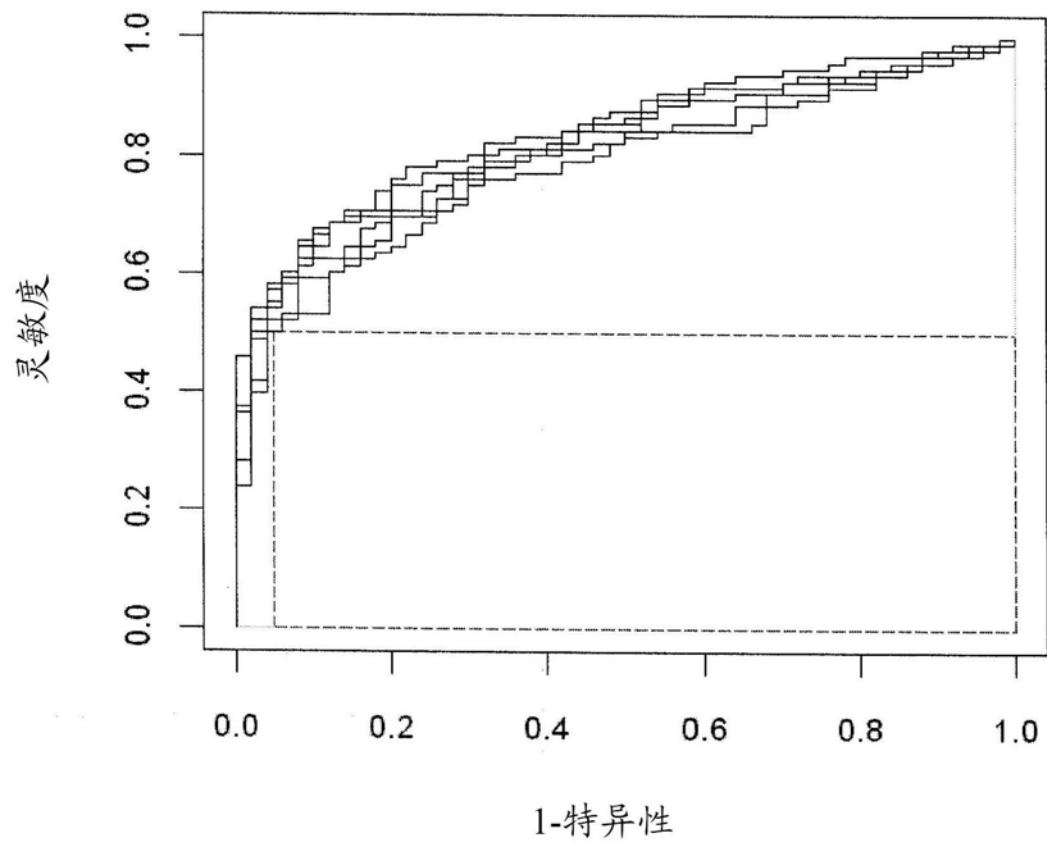


图3

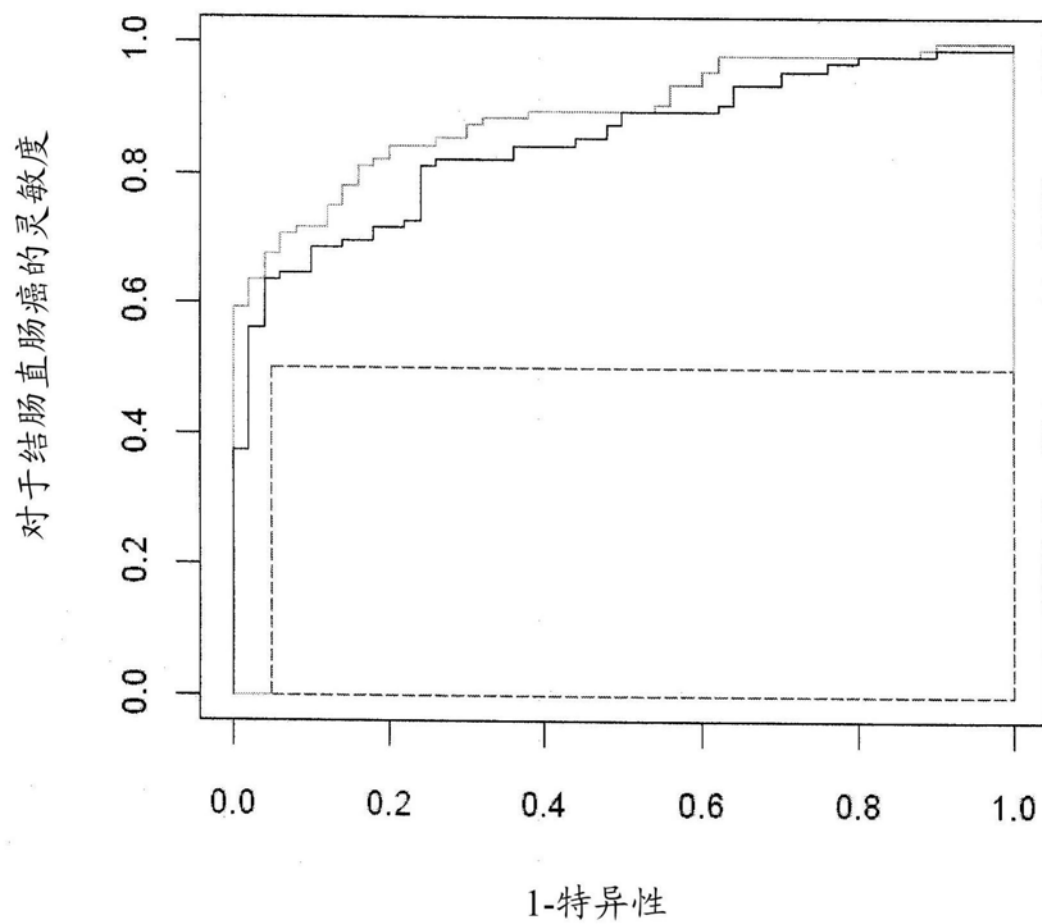


图4

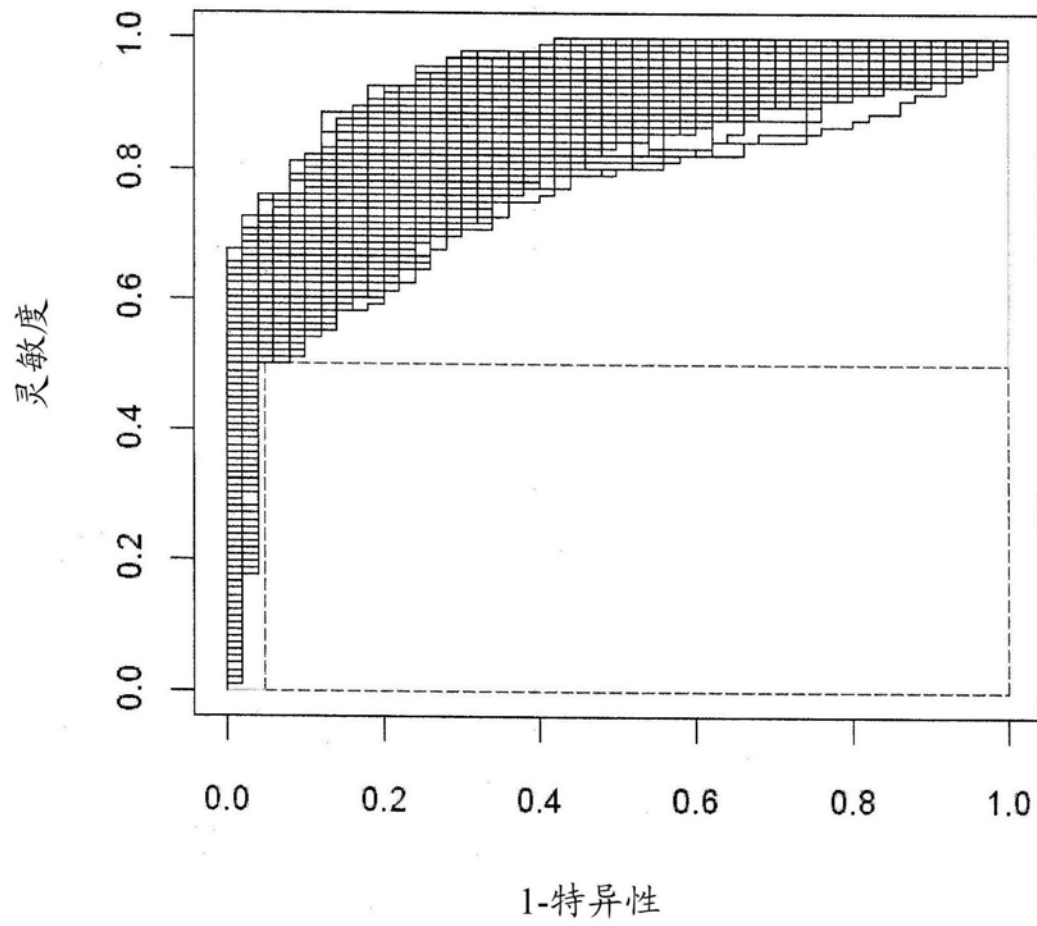
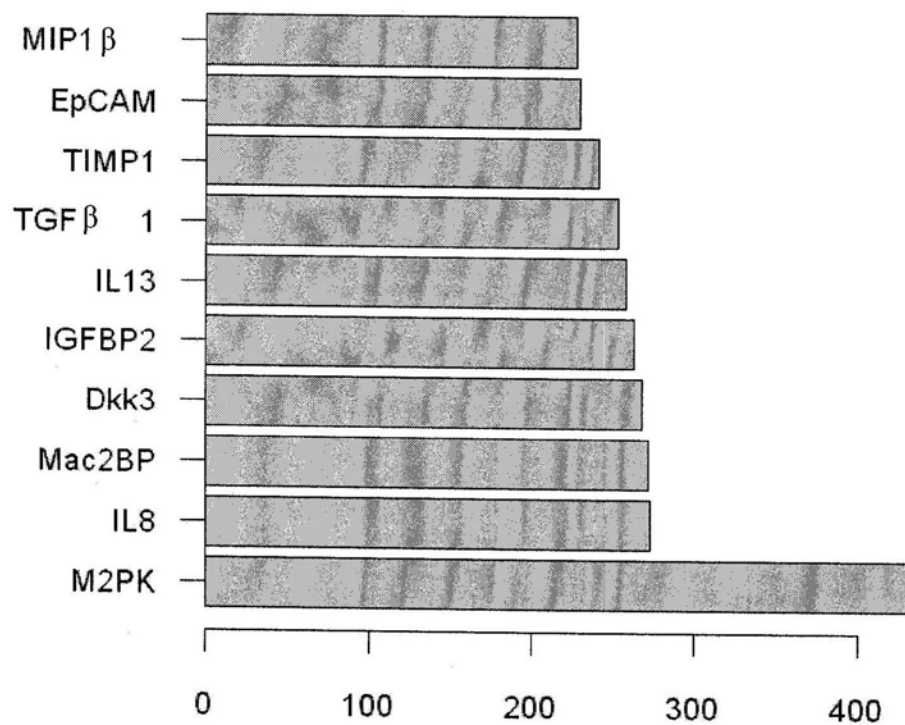


图5



每个生物标志物在其中出现的“有用的”血清模型（485个中的）

图6

重新测量的研究3(血浆): 5BM模型(黑色); 交叉验证(灰色)。BMs:IL8、IGFBP2、Mac2BP、Dkk3&M2PK

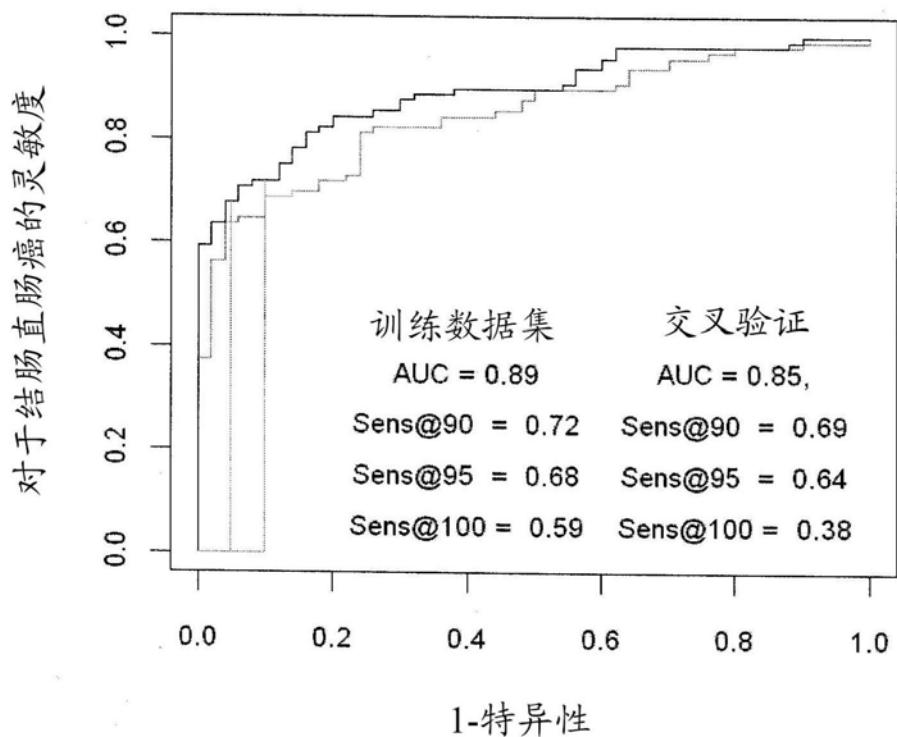


图7

重新测量的研究3(血浆): 6BM模型(黑色); 交叉验证(灰色)。BMs:M2PK、IL8、TGF β 1、Dkk3、Mac2BP&IGFBP2

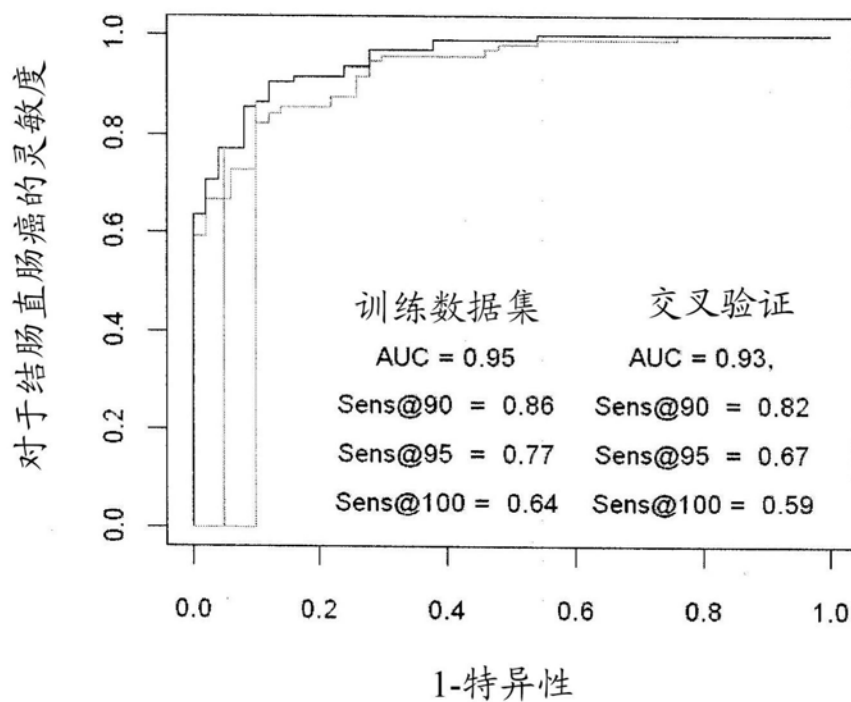


图8

在高特异性下优化的7BM模型(黑色); 旧模型(灰色) 新BMs:
IL8、IGFBP2、s90.MAC2.BP、M2_PK、Dkk3、IL13 & TGF β 。
旧BMs: IL8、IGFBP2、s90.MAC2.BP、M2_PK、EpCAM、IL13
& MIP1b

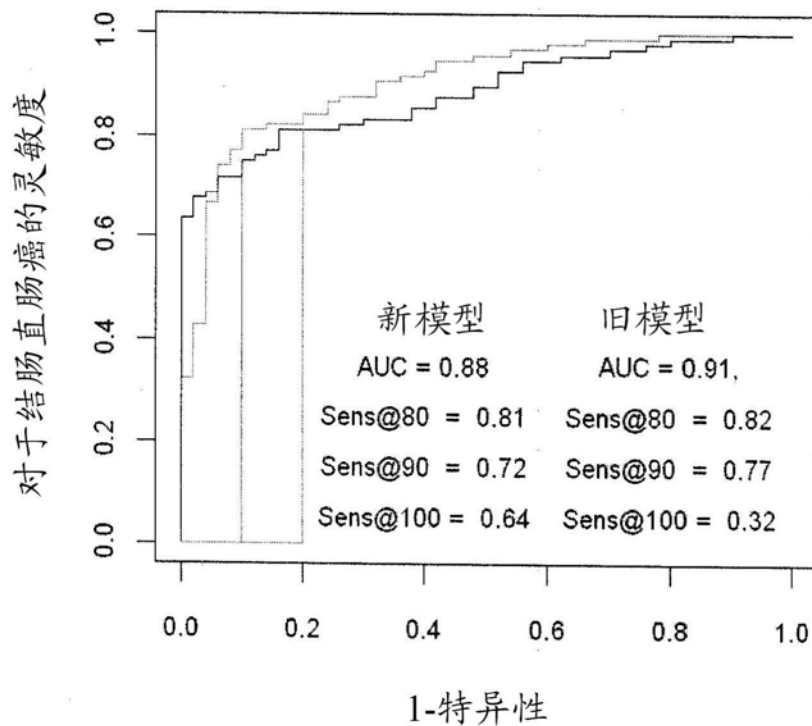


图9

重新测量的研究3(血浆&血清): 7BM模型(黑色); X-验证 (灰色)
(GBMs:M2PK.S、IL8.P、TGF β 1.S、IGFBP2.P、Mac2BP.S、TIMP1.P
& Dkk)

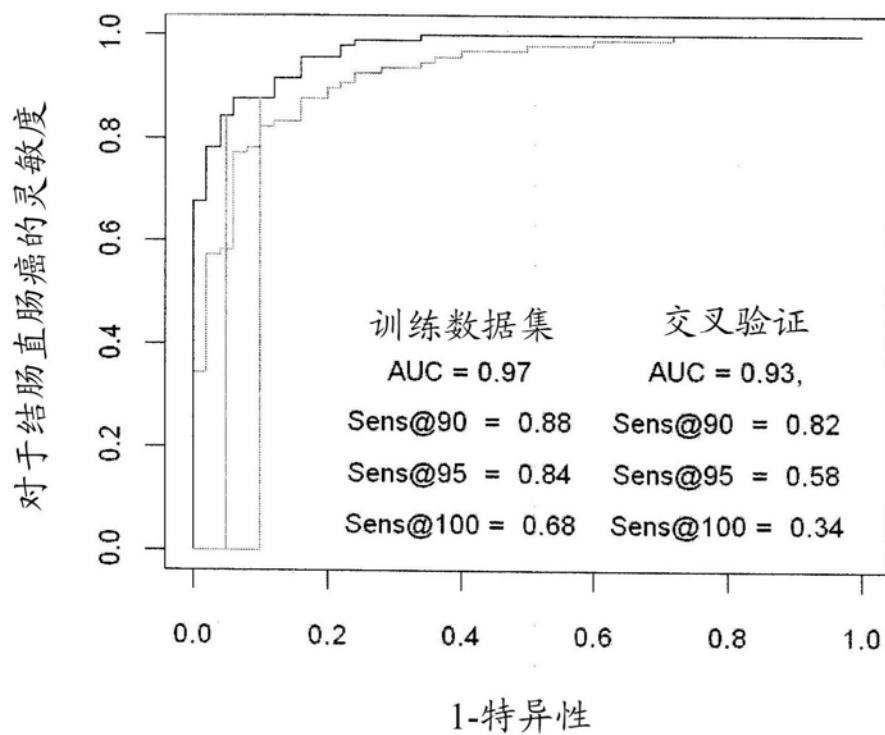


图10

3生物标志物模型的依据分期的交叉验证ROV曲线。

生物标志物: Dkk3、M2PK以及IGFBP2

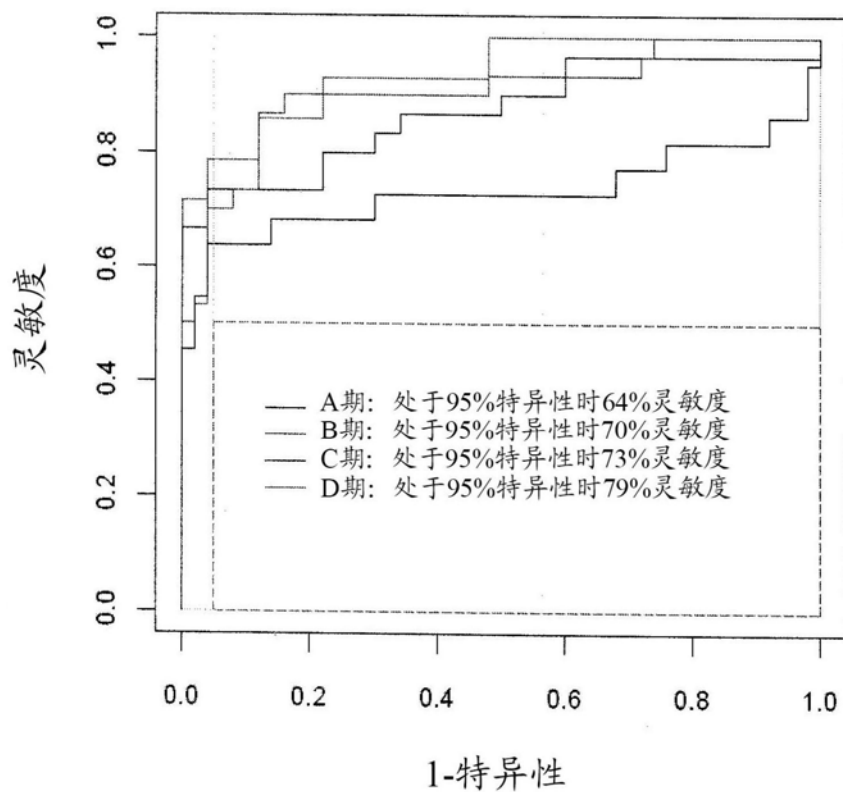


图11