

(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6月3日 (03.06.2010)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2010/060282 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2009/001339
- (22) 国际申请日: 2009年11月27日 (27.11.2009)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200810182038.X 2008年11月27日 (27.11.2008) 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大道268号浙江大学华家池校区, 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大道268号浙江大学华家池校区, 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, 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, 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))。

(54) Title: APPLICATION OF MMP-9 AS DIAGNOSTIC MARKER FOR OVARIAN CARCINOMA

(54) 发明名称: MM9 作为卵巢癌的诊断标记物的用途

(57) Abstract: A diagnostic method for ovarian carcinoma in objects tested is provided. The method includes: measuring the amount of MMP-9 in samples from the objects tested; analyzing the amount of MMP-9; and based on the results, determining whether the objects suffer from ovarian carcinoma. A kit for diagnosing ovarian carcinoma is provided also.

(57) 摘要:

本发明提供了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 MMP-9 含量, 对所述 MMP-9 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。本发明还提供了用于卵巢癌诊断的试剂盒。

WO 2010/060282 A1

MMP9 作为卵巢癌的诊断标记物的用途

相关申请的交叉援引

本申请要求 2008 年 11 月 27 日提交的申请号为 200810182038.X 的中国发明专利申请的优先权，在此通过援引将该专利申请的全部内容并入本文。

技术领域

[0001] 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 MMP-9 蛋白的试剂盒。

背景技术

[0002] 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。美国癌症学会预计 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% 只 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循环生物标志物对卵巢癌进行早期诊断。

发明内容

[0003] 本发明部分地基于以下发现：卵巢癌患者血清中的 MMP-9 含量明显高于健康受试者血清中的 MMP-9 含量，并且具有统计学显著性，可用作卵巢癌的诊断标志物。

[0004] 因此, 本发明提供了以下实施方案。

[0005] [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 MMP-9 含量,

对所述 MMP-9 含量进行分析, 和

5 根据分析结果确定所述受试者是否患有卵巢癌。

[0006] [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 MMP-9 含量,

对所述 MMP-9 含量进行分析, 和

根据所述分析结果, 对样本进行分类。

10 [0007] [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 MMP-9 的表达。

[0008] [实施方案 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。

15 [0009] [实施方案 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。

[0010] [实施方案 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。

20 [0011] [实施方案 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。

[0012] [实施方案 8] 权利要求 1-7 之任一项的方法, 其中所述检测采用 MMP-9 的特异结合剂进行。

[0013] [实施方案 9] 权利要求 8 的方法, 其中所述 MMP-9 的特异结合剂为 MMP-9 的抗体或其 MMP-9 结合片段。

25 [0014] [实施方案 10] 权利要求 8 的方法, 其中所述 MMP-9 的抗体为单克隆抗体。

[0015] [实施方案 11] 权利要求 8 的方法, 其中所述 MMP-9 的抗体为多克隆抗体。

30 [0016] [实施方案 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 MMP-9 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。

[0017] [实施方案 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 MMP-9 含量与来自健康受试者的参比值进行比较, 如果明显高于所述参比值则确定所述受试者患有卵巢癌。

5 [0018] [实施方案 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: MMP-9 的特异结合剂。

[0019] [实施方案 15] 权利要求 14 的试剂盒, 还包含: 能够结合 MMP-9 的标记抗体。

[0020] [实施方案 16] 权利要求 14-15 之任一项的试剂盒, 其中所述 MMP-9 的特异结合剂为 MMP-9 的抗体或其 MMP-9 结合片段。

10 [0021] [实施方案 17] 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述 MMP-9 的抗体为单克隆抗体。

[0022] [实施方案 18] 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述 MMP-9 的抗体为多克隆抗体。

15 [0023] [实施方案 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。

[0024] [实施方案 20] 权利要求 14-19 之任一项的试剂盒, 还包含:

包含已知量 MMP-9 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。

20 [0025] [实施方案 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。

[0026] [实施方案 22] 权利要求 14-21 之任一项的试剂盒, 还包含:

任选的携带工具, 其空间任选地被划分为限定空间的组分;

25 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。

[0027] [实施方案 23] 权利要求 14-22 之任一项的试剂盒, 其中所述 MMP-9 的特异结合剂被固定于固相载体上。

30 [0028] [实施方案 24] MMP-9 的特异结合剂在制备用于诊断卵巢癌的试剂中的用途。

[0029] [实施方案 25] 权利要求 24 的用途, 其中所述 MMP-9

的特异结合剂为 MMP-9 的抗体或其 MMP-9 结合片段。

[0030] [实施方案 26] 权利要求 25 的用途，其中所述 MMP-9 的抗体为单克隆抗体。

5 [0031] [实施方案 27] 权利要求 25 的用途，其中所述 MMP-9 的抗体为多克隆抗体。

[0032] [实施方案 28] MMP-9 作为卵巢癌诊断标志物的用途。

[0033] [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 MMP-9 的含量，和 MMP-9 的含量在时间上的变化；

10 以 MMP-9 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。

[0034] 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 MMP-9 进行联合检测，可以有效提高癌症诊断的灵敏度、特异性和
15 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

[0035] 图 1 是对患者血清样本进行 MMP-9 检测的 ROC 曲线界面。
20 其中，specificity 是指特异性，sensitivity 是指灵敏度。

具体实施方式

术语

[0036] 本文所用的术语“MMP-9”是指基质金属蛋白酶-9(Matrix
25 Metalloproteinase-9)，其含义是本领域公知的。

[0037] 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。

30 [0038] 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。

[0039] 本文中使用的术语“MMP-9 的特异结合剂”，指能够特异

结合 MMP-9 的试剂，例如 MMP-9 的抗体、结合配体（如 Aptmer）等。

[0040] 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 MMP-9 抗原。例如，通常情况下，MMP-9 抗体结合 MMP-9 抗原的亲合力是结合 MMP-9 抗原之外的非特异抗原（例如，BSA、酪蛋白）的亲合力的至少 2 倍。

[0041] MMP-9 抗体的“MMP-9 结合片段”是指 MMP-9 抗体的一个或多个片段，其保留结合 MMP-9 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“MMP-9 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)（在此通过援引将其全部内容并入本文），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)(在此通过援引将其全部内容并入本文)。

[0042] 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 MMP-9 的抗体。

[0043] 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。

[0044] 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

[0045] 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 MMP-9 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 MMP-9 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。

[0046] 在一个优选实施方案中，本发明的 MMP-9 检测试剂盒至少包含：

- 10 (1) 能够结合 MMP-9 的抗体；以及
- (2) 当 MMP-9 结合于 (1) 中限定的抗体时，能够结合于 MMP-9 的标记抗体。

上述试剂盒还可包含：

- 15 (3) 由含有已知量 MMP-9 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。

[0047] 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、
25 电脑光盘、录像等等。

[0048] 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。

[0049] 所含抗体包括任何能够结合 MMP-9 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。
30

[0050] 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

[0051] 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。

[0052] 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) (在此通过援引将以上文献的全部内容并入本文)。

15 检测方法

[0053] 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 MMP-9 的检测。优选地，可以采用 MMP-9 的特异结合剂，例如 MMP-9 的抗体进行检测。在一个优选实施方式中，MMP-9 的抗体被固定在固相载体上，例如作为捕获抗体使用。

20 [0054] 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、
25 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。

[0055] 还可以采用通过化学方法测定 MMP-9 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

30 [0056] 在用 ELISA 检测出样本中 MMP-9 的浓度后，可用数学分析方法对测得的样本中 MMP-9 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。

[0057] 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
5 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，从而计算出的一系列灵敏度和特异性，再以灵敏度
10 为纵坐标、1-特异性为横坐标绘制的曲线，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
15 以上时有较高准确性。

[0058] 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。

[0059] 上述有序分类，对于疾病的诊断而言，可分为：阴性、不
20 确定、阳性。进一步地，对于癌症诊断而言，可分为：癌症、健康。

[0060] 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 MMP-9 的含量；

(2) 以 MMP-9 蛋白含量的比值为变量，根据不同的阈值对癌症
25 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)。

[0061] ROC 曲线的绘制可以使用现有技术中的软件或系统，比
30 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

[0062] 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
5 MMP-9 的抗体；以及（2）当 MMP-9 结合于（1）中限定的抗体时，能够结合于 MMP-9 的标记抗体。

[0063] 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：
10 检测受试者血液样本中 MMP-9 的表达量和 MMP-9 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 MMP-9 的含量，和 MMP-9 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 MMP-9 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
15 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 MMP-9 含量与来自健康受试者的参比值进行比较，如果明显高于所述参比值则确定所述受试者患有卵巢癌。

20 [0064] 以下结合具体实施例，对本发明作进一步说明。应理解，以下实施例仅用于说明本发明而不用于限定本发明的范围。

实施例 1

[0065] 以下以个体的血清为样本进行卵巢癌诊断为例，对本发明
25 作进一步详细说明。

样本的采集

[0066] 在浙江大学医学院一附院随机采取 37 例 50-60 岁卵巢癌患者的血清 1 mL；作为阳性对照，另采取 12 例 50-60 岁健康志愿者的正常血样 1 mL，进行 MMP-9 浓度测试。

测 MMP-9 含量

30 [0067] ELISA 分析—运用了 R&D Systems 公司开发的定量 MMP-9 免疫测定试剂盒(cat # DMP900)。该 ELISA 试剂盒主要是用来

测定血清样品总的 MMP-9(92 kDa pro-and 82 kDa active forms)。ELISA 分析可根据说明书操作。利用 MMP-9 验证的血清样品都是由中国遗传资源库和国家人口计生委科学技术研究所(IRB 批准)的肿瘤库所提供。利用 Dynamic Microsystems 公司开发的 GB STAT 统计包来分析 ROC 5 曲线。

[0068] 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°C)。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 10 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°C。

2、依次在微孔板上加入 20 μ L 的标准液、对照液和血清样本。此 15 过程务必在三十分钟内完成。

3、在每个微孔中加入 100 μ L 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°C)进行温育 55 - 65 分钟。

5、按下述步骤手工洗板 3 次:

20 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、再重复前两步两次。

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

25 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 μ L 到微孔板上

8、用微孔板盖盖好板, 在室温下(18-28°C)进行温育 55 - 65 分钟。

30 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 $^{\circ}\text{C}$)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。

5 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 MMP-9 的结果。

16、通过标准曲线来读出血清样本和对照液中 MMP-9 的浓度。

结果

10 [0069] 经上述步骤，得到的检测结果如表 1 所示。

[0070] 由表 1 可以看出，MMP-9 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 MMP-9 蛋白的含量明显高于健康志愿者血清中的含量。

ROC 曲线绘制

15 [0071] 使用 GB STAT V10.0 (Dynamic Microsystems, Inc. Silver Spring, MD USA)系统，以 MMP-9 蛋白含量为变量，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；绘制出 ROC 曲线并计算曲线下面积 (AUC)，如图 1 所示。

[0072] 我们最近对 37 个卵巢癌病人和 12 个正常对照，用免疫酶
20 标的办法对 MMP9 在诊断卵巢癌的敏感性和精确性作了一个分析，发现它的敏感率为 87%、特异性为 83%、精确率为 86%，这些指标都超过了目前卵巢癌的诊断标记物 CA125，尤其在特异性方面，远远超过了 CA125。因此我们认为 MMP9 作为卵巢癌的诊断标记物具有很大的开发价值。

25 [0073] 我们利用 R & D Systems 公司开发的 MMP-9 免疫测定试剂盒，比较了 37 个卵巢癌病人和 12 个正常个体的血清表达情况。正常个体血清平均表达水平是 1.68 \pm 30.06，而卵巢癌病人的平均表达水平为 72.77 \pm 72.17。TTest P value 是 1.02837E-05。

[0074] MMP-9 的 ROC 曲线分析结果如图 1 所示。

30 [0075] 图 1 显示，ROC 曲线的 AUC 为 0.92。当 MMP-9 浓度的阈值为 27.46 (ng/mL) 时，诊断卵巢癌的敏感率为 87%、特异性为 83%、精确率为 86%。

表 1. MMP9 在卵巢癌病人和正常人血清中的表达水平的比较	
诊断	ng/ml
卵巢癌	159.83
卵巢癌	-2.51
卵巢癌	63.17
卵巢癌	50.49
卵巢癌	52.19
卵巢癌	16.11
卵巢癌	18.13
卵巢癌	45.00
卵巢癌	85.57
卵巢癌	37.68
卵巢癌	356.36
卵巢癌	55.48
卵巢癌	59.32
卵巢癌	31.56
卵巢癌	37.24
卵巢癌	30.93
卵巢癌	22.79
卵巢癌	29.80
卵巢癌	43.43
卵巢癌	296.61
卵巢癌	93.84
卵巢癌	70.81
卵巢癌	86.14
卵巢癌	63.30
卵巢癌	63.74
卵巢癌	174.97
卵巢癌	52.83
卵巢癌	72.32

卵巢癌	74.09
卵巢癌	9.42
卵巢癌	148.16
卵巢癌	32.57
卵巢癌	62.54
卵巢癌	65.10
卵巢癌	35.92
卵巢癌	46.64
卵巢癌	28.79
正常	-69.19
正常	-12.35
正常	2.70
正常	-8.88
正常	48.28
正常	31.75
正常	27.46
正常	23.87
正常	3.36
正常	-13.11
正常	-4.84
正常	-8.88

[0076] 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，其效果与逐一声明将这些参考文献的全部内容通过援引加入本文相同。

- 5 [0077] 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.
- 5 [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
10 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
15 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.
- 20 [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
25 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
30 as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. Jama 2002, 287, 1671-1679.

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 MMP-9 含量，
5 对所述 MMP-9 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 MMP-9 含量，
对所述 MMP-9 含量进行分析，和
10 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 MMP-9 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。
- 15 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 MMP-9 的
20 特异结合剂进行。
9. 权利要求 8 的方法，其中所述 MMP-9 的特异结合剂为 MMP-9
的抗体或其 MMP-9 结合片段。
10. 权利要求 8 的方法，其中所述 MMP-9 的抗体为单克隆抗体。
11. 权利要求 8 的方法，其中所述 MMP-9 的抗体为多克隆抗体。
- 25 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 MMP-9 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
MMP-9 含量与来自健康受试者的参比值进行比较，如果明显高于所述
30 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：
MMP-9 的特异结合剂。

15. 权利要求 14 的试剂盒, 还包含: 能够结合 MMP-9 的标记抗体。

16. 权利要求 14-15 之任一项的试剂盒, 其中所述 MMP-9 的特异结合剂为 MMP-9 的抗体或其 MMP-9 结合片段。

5 17. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述 MMP-9 的抗体为单克隆抗体。

18. 权利要求 16 的试剂盒, 其中所述 MMP-9 的抗体为多克隆抗体。

10 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 MMP-9 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。

15 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:

任选的携带工具, 其空间任选地被划分为限定空间的组分;

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

20 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 MMP-9 的特异结合剂被固定于固相载体上。

24. MMP-9 的特异结合剂在制备用于诊断卵巢癌的试剂中的用途。

25 25. 权利要求 24 的用途, 其中所述 MMP-9 的特异结合剂为 MMP-9 的抗体或其 MMP-9 结合片段。

26. 权利要求 25 的用途, 其中所述 MMP-9 的抗体为单克隆抗体。

27. 权利要求 25 的用途, 其中所述 MMP-9 的抗体为多克隆抗体。

28. MMP-9 作为卵巢癌诊断标志物的用途。

30 29. 一种提高样本分类准确性的方法, 其包括:

测定样本中 MMP-9 的含量, 和 MMP-9 的含量在时间上的变化;

以 MMP-9 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。

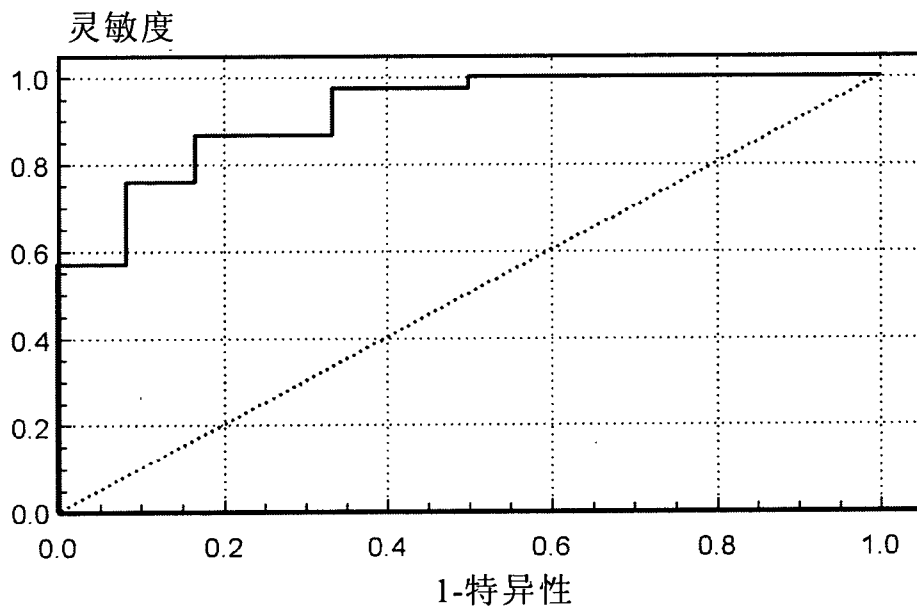


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001339

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/574(2006.01)j

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: G01N33, C12Q1, A61P35

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)

CNKI&CNPAT&WPI&EPODOC&ISI: ovarian, cancer, carcinoma, tumor, neoplasia, MMP, matrixmetalloproteinase, matrix metalloproteinase, gelatinase B, 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	LI, Daocheng et al. "The clinical significance of MMP-9 protein expression in epithelial ovarian carcinoma", The Practical Journal of cancer, Jan.2008(01.2008), Vol.23, No.1, Pages 1-2,14	1,4,8-11,13,24-28
Y		2,5-7,12,29
X	ZHANG, Xiangning et al. "Change and significance of MMP-9 and VEGF in serum of patients suffered from ovarian cancer", Shandong Medicine, 2004, Vol.44, No.24, Pages 6-7	14-23
Y		3,5-7
Y	WO9700449A(ABERDEEN UNIVERSITY)03 Jan.1997(03.01.1997), Abstract, Pages 3-8,12-14	3
Y	CHEN, Weizhong et al. "Receiver operating characteristic curves to determine the optimal operating point and doubtable value interval", Modern Preventive Medicine, 2005, Vol.32, No.7, Pages 729-731	2,12,29

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

22 Feb.2010(22.02.2010)

Date of mailing of the international search report

11 Mar. 2010 (11.03.2010)

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

SHI,Jianping

Telephone No. (86-10)62085675

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/001339

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YAN, Hui et al. "Expression of VEGF and MMP-9 in the epithelial ovarian carcinoma and its significance", Hei Longjiang Medical Journal, Feb.2008(02.2008), Vol. 32, No.2, Pages 89-91	1,4,8-11,13,24-28
Y		2,5-7,12,29
A	WO03048734A(ON-COMEDX, INC)12 Jun.2003(12.06.2003), The whole document	1-29
A	WO2007059313A(CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION et al.) 24 May 2007(24.05.2007), The whole document	1-29
A	US6811995B(CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION)02 Nov.2004 (02.11.2004), The whole document	1-29
A	HU, Xiaoxia et al. " Inhibitory effects of antisense MMP-9 oligodeoxynucleotides on invasiveness and adherence of ovarian cancer cells", Clin J. Oncol, Sep.2006(09.2006), Vol.28, No.9, Pages 662-665	1-29
A	Barbara Schmalfeldt et al. "Increased expression of matrix metalloproteinases(MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer", Clinical cancer research, Aug.2001(08.2001), Vol.7, Pages 2396-2404	1-29
A	Aparna A. Kamat et al. "The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer", Clin. Cancer Res., 15 Mar.2006(15.03.2006), Vol.12, No.6, Pages 1707-1714	1-29

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2009/001339

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO9700449A	03.01.1997	AU6012696A	15.01.1997
WO03048734A	12.06.2003	AU2002362055A	17.06.2003
		US2005032063A	10.02.2005
WO2007059313A	24.05.2007	CA2629793A	24.05.2007
		AU2006315348A	24.05.2007
		EP1938105A	02.07.2008
		CN101346629A	14.01.2009
		JP2009515556T	16.04.2009
		US2009215102A	27.08.2009
US6811995B	02.11.2004	WO9741441A	06.11.1997
		CA2252648A	06.11.1997
		AU2681997A	19.11.1997
		EP0900381A	10.03.1999
		US6037138A	14.03.2000
		JP2000510949T	22.08.2000
		AU6187801A	18.10.2001
		US2003215900A	20.11.2003
		EP1418434A	12.05.2004
		AU775537B	05.08.2004
		JP2006311860A	16.11.2006
US2007015227A	18.01.2007		
		EP2060917A	20.05.2009

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2009/001339

A. 主题的分类		
G01N33/574 (2006.01) i		
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: G01N33, C12Q1, A61P35		
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))		
CNKI&CNPAT: 卵巢癌, 癌, 肿瘤, 金属蛋白酶, 明胶酶 B, 胶原酶 B, MMP, ROC, AUC WPI&EPODOC&ISI: ovarian, cancer, carcinoma, tumor, neoplasia, MMP, matrixmetalloproteinase, matrix metalloproteinase, ggelatinase B, 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	李道成 等 “MMP-9 在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义”, 实用癌症杂志, 1 月 2008 (01.2008), Vol.23, No.1, 第 1-2,14 页	1,4,8-11,13,24-28
Y		2,5-7,12,29
X	张向宁 等 “卵巢癌患者血清 MMP-9、VEGF 的变化及意义”, 山东医药, 2004 年, Vol.44, No.24, 第 6-7 页	14-23
Y		3,5-7
Y	WO9700449A(ABERDEEN UNIVERSITY) 03.1 月 1997 (03.01.1997), 摘要, 说明书第 3-8、12-14 页	3
Y	陈卫中 等 “用 ROC 曲线确定最佳临界点和可疑值范围”, 现代预防医学, 2005 年, Vol.32, No.7, 第 729-731 页	2,12,29
X	闫慧 等 “血管内皮生长因子与 MMP-9 在上皮性卵巢癌中的表达及意义”, 黑龙江医学, 2 月 2008(02.2008), Vol. 32, No.2, 第 89-91 页	1,4,8-11,13,24-28
Y		2,5-7,12,29
A	WO03048734A(ON-COMEDX, INC) 12.6 月 2003 (12.06.2003), 全文	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 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 22.2 月 2010 (22.02.2010)		国际检索报告邮寄日期 11.3 月 2010 (11.03.2010)
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		授权官员 石剑平 电话号码: (86-10) 62085675

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
A	WO2007059313A (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION et al.) 24.5 月 2007 (24.05.2007), 全文	1-29
A	US6811995B (CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION) 02.11 月 2004 (02.11.2004), 全文	1-29
A	胡晓霞 等 “基质金属蛋白酶-9 反义管核苷酸对卵巢癌细胞侵袭黏附能力的影响”, 中华肿瘤杂志, 9 月 2006 (09.2006), Vol.28, No.9, 第 662-665 页	1-29
A	Barbara Schmalfeldt 等 “Increased expression of matrix metalloproteinases(MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer”, Clinical cancer research, 8 月 2001 (08.2001), Vol.7, 第 2396-2404 页	1-29
A	Aparna A. Kamat 等 “The clinical relevance of stromal matrix metalloproteinase expression in ovarian cancer”, Clin Cancer Res., 15.3 月 2006 (15.03.2006), Vol.12, No.6, 第 1707-1714 页	1-29

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2009/001339

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO9700449A	03.01.1997	AU6012696A	15.01.1997
WO03048734A	12.06.2003	AU2002362055A	17.06.2003
		US2005032063A	10.02.2005
WO2007059313A	24.05.2007	CA2629793A	24.05.2007
		AU2006315348A	24.05.2007
		EP1938105A	02.07.2008
		CN101346629A	14.01.2009
		JP2009515556T	16.04.2009
		US2009215102A	27.08.2009
US6811995B	02.11.2004	WO9741441A	06.11.1997
		CA2252648A	06.11.1997
		AU2681997A	19.11.1997
		EP0900381A	10.03.1999
		US6037138A	14.03.2000
		JP2000510949T	22.08.2000
		AU6187801A	18.10.2001
		US2003215900A	20.11.2003
		EP1418434A	12.05.2004
		AU775537B	05.08.2004
		JP2006311860A	16.11.2006
		US2007015227A	18.01.2007
		EP2060917A	20.05.2009