

卵巢癌生物标记及其应用

技术领域

本发明关于生物标记、方法及检验套组，用于辨识及筛检卵巢癌以及监控卵巢癌之治疗。

5 背景技术

卵巢癌是全球妇女常见的癌症之一，在已开发国家具有高盛行率，且其发生率与死亡率仍持续上升。无疑地，若能早期侦测卵巢癌，可提供最好之治愈机会，提高病人之存活率。超音波虽可看到疑似肿瘤的影像，但无法区辨是否为卵巢癌，且灵敏度不高，也受限于设备，难以推动大规模筛检。目前已报导的卵巢癌标记包括 CA-125（癌抗原 125，cancer antigen 125）和 HE4（副睾蛋白 4，epididymis protein 4），但主要还是作预后的指标，至于作为卵巢癌筛检，尤其是检测早期卵巢癌，效果仍不佳。

CA-125 是妇产科范围内最广泛应用的肿瘤指标，但第 I 期的卵巢癌只有约 50-60%的病人会出现 CA-125 表现量异常。此外，其他恶性肿瘤，例如，子宫颈癌和乳癌等癌症，或是怀孕期间、子宫内膜异位、骨盆腔炎等，也都会提高 CA-125 的水平。因此，CA-125 对卵巢癌专一性并不佳。再者，有约 20%的卵巢癌病患只能侦测到少量，甚至完全无法测到 CA-125 的表现（Moore RG. *et al.*, Curr Opin. Oncol. Sep.22(5):492-7. 2010）。

HE4 基因位于染色体 20，蛋白质结构由四个双硫键组成，最早是从男性副睾中被鉴定出来（Hellström I. *et al.*, CANCER RESEARCH 63, 3695 - 3700, July 1, 2003），在其他正常组织也有此蛋白的表现，例如，在气管和唾液腺中基因表现量最高。虽然目前对于 HE4 的功能还不清楚，但近年来将 HE4 用于检测卵巢癌，发现比 CA-125 较少出现伪阳性的情况，也较能区辨子宫内膜异位和恶性卵巢肿瘤，以及在部分未表现 CA-125 指标的卵巢癌病患中，可侦测到血液中的 HE4 的含量上升（Rosen DG. *et al.*,

Gynecologic Oncology, November 2005 Volume 99, Issue 2, p255-526)。然而，即便如此，研究指出，HE4 在血液中的含量只在病灶明显经手术诊断为卵巢癌的病患才会明显上升，所以，HE4 主要还是作预后的指标，难以作为卵巢癌筛检及早期诊断的有效标记。

5 卵巢癌种类复杂，至少包括子宫内膜型（endometrioid）卵巢癌、亮细胞型（clear cell）卵巢癌、浆液型（serous）卵巢癌、黏液型（mucinous）卵巢癌、及其他类型卵巢癌，例如，卵巢癌肉瘤（ovarian carcinosarcoma）、卵巢未成熟畸胎瘤（Immature teratoma）、卵巢黏液及颗粒型癌（ovarian mucinous and granulosa tumor）、及转移性卵巢癌（Krukenberg，卵巢克鲁根勃氏瘤）等。目前为止，并无有效的生物标记可用以广泛性检测出不同
10 种类的卵巢癌，也无针对早期卵巢癌检测的有效生物标记。

因此，仍有需要提出一种卵巢癌的生物标记，可用于广泛性的卵巢癌筛检，尤其是针对早期卵巢癌检测。

发明内容

15 本发明不可预期地发现，于卵巢癌病患中，其血浆蛋白补体成分 3（complement component 3; C3）发生活化反应，产生一大小约 40 kDa 之胜肽片段，此片段可专一地于不同型态的卵巢癌病患血浆中测得，尤其在早期也可测得，但在没有卵巢癌个体中则无法或几乎无法测得。此外，在恶化的卵巢癌病患测得此片段的含量提升。因此，该切割型态之 C3 蛋白，
20 可做为专一的分子标记，用于诊断卵巢癌，特别是早期诊断，亦可用于监控患有卵巢癌病患之卵巢癌之进展，或评估卵巢癌疗法之治疗有效性。

在一方面，本发明提供一种侦测卵巢癌之方法，包含：

- (a) 提供来自待测个体之生物样本；
- (b) 检测该来自待测个体之生物样本之切割型补体成分 3（C3）多
25 胜肽的含量，获得切割型 C3 多胜肽检测量；
- (c) 比较该切割型 C3 多胜肽检测量与来自正常个体之切割型 C3 多胜肽正常量，获得比较结果；以及

(d) 根据该比较结果判断该待测个体罹患卵巢癌之可能性，其中如该比较结果显示切割型 C3 多胜肽检测量高于切割型 C3 多胜肽正常量，则判断该待测个体患有卵巢癌或有罹患卵巢癌之风险。

在另一方面，本发明提供一种监控卵巢癌病患之卵巢癌发展之方法，
5 该方法包含：

(a) 于第一时间点，提供源自该病患之第一生物样本；

(b) 于第二时间点，提供源自该病患之第二生物样本，其中该第二时间点系晚于第一时间点；

(c) 检测第一生物样本中之切割型 C3 多胜肽的含量，获得切割型 C3
10 多胜肽第一检测量，以及检测第二生物样本中之切割型 C3 多胜肽的含量，获得切割型 C3 多胜肽第二检测量；

(d) 比较切割型 C3 多胜肽第一检测量与切割型 C3 多胜肽第二检测量，获得比较结果；以及

(e) 基于该比较结果，判断该病患中之卵巢癌进程，其中如该比较结果
15 显示切割型 C3 多胜肽第二检测量高于切割型 C3 多胜肽第一检测量，则表示卵巢癌进展中。

在部分具体实施例中，根据本发明之方法，该病患系接受卵巢癌治疗中，以及该第一生物样本及第二生物样本系取自于治疗之前或治疗之后，或治疗期间。

20 在部分具体实施例中，本发明之方法进一步包含评估该卵巢癌治疗对于该病患之疗效，其中如经治疗后、或于治疗期间，该切割型 C3 多胜肽的含量呈现降低趋势，则代表该治疗对于该病患有效。

在部分具体实施例中，该切割型 C3 多胜肽系 C3 阿法 (α) 链片段 2。

在部分具体实施例中，该切割型 C3 多胜肽系具有对应于 SEQ ID NO:
25 1 的 C3 蛋白之位置 1321 至位置 1663 的氨基酸序列。

在部分具体实施例中，该切割型 C3 多胜肽系具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的胜肽片段。

在部分具体实施例中，本发明之检测步骤系由质谱分析或免疫分析法进行。

在部分具体实施例中，本发明之检测步骤系由免疫分析法进行，该免疫分析法使用专一性结合至切割型 C3 多胜肽之抗体。

- 5 在部分具体实施例中，本发明之方法使用的生物样本为体液样本、组织样本、或生物检体样本。

在部分具体实施例中，本发明之方法使用的生物样本体液样本，系选自由血液样本（如血浆样本、肝素化血浆样本、EDTA-血浆样本、血清样本）、尿液样本、及腹水样本所组成之群组。

- 10 在部分具体实施例中，本发明之方法可检测的卵巢癌可为子宫内膜型（endometrioid）卵巢癌、亮细胞型（clear cell）卵巢癌、浆液型（serous）卵巢癌、黏液型（mucinous）卵巢癌、及其他类型卵巢癌，例如，卵巢癌肉瘤（ovarian carcinosarcoma）、卵巢未成熟畸胎瘤（Immature teratoma）、卵巢黏液及颗粒型癌（ovarian mucinous and granulosa tumor）、及转移性卵
15 巢癌（Krukenberg，卵巢克鲁根勃氏瘤）等。

在部分具体实施例中，本发明之方法可检测第 I 期卵巢癌、第 II 期卵巢癌、第 III 期卵巢癌及第 IV 期卵巢癌。

- 在另一方面，本发明提供一种可辨识切割型 C3 多胜肽之试剂的用途，其系用于诊断卵巢癌或监控卵巢癌发展，或用于制备供诊断卵巢癌或监控
20 卵巢癌发展之试剂或套组。

本发明之一种或多种具体实施例之详细说明，皆于以下说明叙述之。本发明之其他特征或优点将可藉由以下详细说明各种具体实施例及所附之申请专利范围得以明晰。

附图说明

- 25 欲说明本发明，图式具体实施例如下。然而，应理解到，本发明未局限于所示之较佳具体实施例。在图式中：

图 1 显示源自卵巢癌病患（P，patient）及正常个体（N，normal）之

血浆样本之西方墨点分析，系使用抗切割型补体成分 3 (C3) 蛋白之抗体。将源自受测试个体之血浆样本中之蛋白，于还原状态进行电泳。左边的数字，代表分子量 (kDa)，是分子重量标记之位置。箭头系指补体成分 3 蛋白之约 40 kDa 的胜肽片段。

- 5 图 2 显示卵巢癌病患在不同时间点之血浆样本之西方墨点分析，其中编号 1 是卵巢癌病患在第一时间点的血浆样本分析结果，编号 2 是同一名病患在接受化疗后约一年回诊的血浆样本分析结果，显示切割型 C3 蛋白含量增加，该病患经进一步确认病情恶化，已发生癌症转移；编号 3 是正常个体的血浆样本分析结果，显示未测得切割型 C3 蛋白。

10 具体实施方式

为了提供一清晰且便于了解本发明之方式，部分术语系首先进行定义。其他定义亦于详细说明中有说明。除非另有定义，本文中所有技术及科学性术语，具有与属于本发明领域具有技艺者所习知之相同意义。

- 15 本文所用之术语“一 (a)”及“一 (an)”系指一种或一种以上（即至少一种）符合文义之物体。举例，“一种组件”意旨一种组件或多于一种组件。

- 20 本文所用之“多胜肽”或“蛋白”乙词系指透过胜肽键相连之由胺基酸残基所组成之聚合物。“蛋白”乙词一般系指分子量相对较大（胺基酸残基较多）之聚合物（如含有高于 500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、或 1500 个胺基酸残基）。“多胜肽”或“胜肽”乙词一般系分子量相对较小（胺基酸残基较少）之聚合物（如含有至多达 500、400、300、或更少的胺基酸残基）。胺基酸可以本领域所习知之三个字母或一个字母表示。

- 25 本文所述之“约”或“近似”乙词系指对于该领域具有通常技艺者，可接受之变动程度，其根据所述之内容有可能会有不同程度之不同。一般而言，“约”或“近似”可能系指一数值具有所述数值 $\pm 10\%$ 之范围。

本文所述之“对象”、“个体”、及“病患”等词，于此可交换替用，

系指任何哺乳动物个体，其适用于诊断、预后、治疗或疗程，具体而言系指人类。其他个体可包含牛、狗、猫、天竺鼠、兔子、大鼠、小鼠、马等。

本文所述之“诊断”乙词，一般包含判定一个体是否有可能患有疾病、病症或丧失功能。此领域具有技艺者通常基于一种或多于一种指针（如一种标记，出现与否、或其的含量，可做为疾病、疾患或丧失功能之有无或严重程度的指标）以做出诊断。本领域可以理解的是，诊断并非指以 100% 准确度确定特定疾病的存在或不存在，而是指在受试者中存在某种疾病的可能性增加。

此处所使用的“治疗”乙词是指为了治愈、愈合、减轻、舒缓、改变、矫正、改善、改进或影响该疾病、该疾病的症状、该疾病引起的残疾或罹患该疾病的倾向的目的，而将一或多种活性成分施用或投与至患有该疾病、该疾病的症状或有罹患该疾病的倾向的个体。

此处所使用的“正常个体”或“对照个体”可交互使用，是指健康正常未罹患所指疾病（如卵巢癌）之个体，可以是指单一正常个体或一群正常个体之族群。

本文所述之“不正常之量”乙词意旨对于一指标而言，相较于没有目标疾病（如卵巢癌）之个体或一参考量或一对照量，具有增加之量。具体而言，对于检验者而言，所测得之不正常的量，系相较于参考量或对照量，高于 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或 100%。参考量或对照量可为来自正常个体或对照样本（如不含有目标疾病之组织或细胞）中的生物标记所测得之量。此领域可运用习知检测及统计方法，经由分析正常个体族群的样本的标记检测量，获得正常量的数值范围。

本文所用者，生物标记是一种特征（如蛋白、基因、基因表现），其可藉由客观地测量及评估，以作为正常或不正常生物性反应、疾病、治病过程、或对于治疗之反应、或介入治疗之指标。标记可包含该特征、或该特征之模式、或集合之存在与否，该特征可为一特定生物反应之指标。该生物标记之测量，可为增加或减少，以代表特定生物性事件或过程。标记主要用于诊断及预后之目的。然而，其亦可用于治疗、监控、药物筛选及

其他本文所述之目的，包含评估癌症疗法之有效性。

本文所述之生物样本可藉由任何本文所述之方法分析，所分析之样本类型可为任何从受诊断之个体中所取得之样本，包含源自血液、尿液、或腹水之样本。典型地，血液样本可为全血或其部分，如血清或血浆、肝素
5 化或 EDTA 处理后之样本，以避免凝血。此外，该生物样本可为组织样本或生物检体。

本发明主要（其中至少一部分）发现一种新颖之可信赖的卵巢癌生物标记，即切割型 C3 多胜肽。经以下实例证实，该生物标记专一性地显著存在于各种阶段及各种细胞态样的卵巢癌病患的血液样本中，但患有其它
10 癌症种类或其他疾病的个体之血液样本，则未检出此生物标记。因此，本文所述之卵巢癌侦测方法，可辨识个体具有、疑似患有、或有罹患卵巢癌之风险。本文所述之侦测方法可供任何个体（如女性人类个体），特别是进行初期、常规筛检，以筛检出患有卵巢癌之病患，或可能有进展中（progressing）卵巢癌之风险之病患。

15 I. 切割型 C3 多胜肽可作为新颖的卵巢癌生物标记

补体成分 3（C3）为一种血浆糖蛋白，是免疫系统的成员之一，具有约 187 kDa 之分子量，为补体系统中含量最多的成分。补体系统活化时，C3 可被转化酶裂解为三个片段，包括一个较大的 C3 贝塔（ β ）片段，以及二段较小的 C3 阿法（ α ）片段，包括 C3 α 链片段 1（C3 α chain fragment
20 1）及 C3 α 链片段 2（C3 α chain fragment 2）。具体而言，人类 C3 蛋白包含全长氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示（1663 氨基酸），裂解后的 C3 β 片段为位置 23 至位置 667 的氨基酸序列的多胜肽片段，C3 α 链片段 1 为位置 749 至位置 954 的氨基酸序列的多胜肽片段，以及 C3 α 链片段 2 为位置 1321 至位置 1663 的氨基酸序列的多胜肽片段（约 C3 全长之 C 端约具
25 342 个氨基酸的胜肽片段）。

如本文所述，本发明系关于切割型 C3 多胜肽之存在及量与卵巢癌之出现及发展有关连。本文所用之“切割型 C3 多胜肽”乙词或类似用语（如“切割型态之 C3”）系指 C3 全长裂解后的 C3 α 链片段 2。具体而言，本

- 文所用之切割型 C3 多胜肽系指人类 C3 α 链片段 2, 位于人类 C3 多胜肽之 C 端约具 342 个氨基酸的胜肽片段, 分子量约为 40 kDa, 又更具体而言, 系具有对应于 SEQ ID NO: 1 的 C3 蛋白之位置 1321 至位置 1663 的氨基酸序列的多胜肽片段, 其系在 SEQ ID NO: 1 的 C3 蛋白之位置 1320 的 Arg (R) 与位置 1321 的 Ser (S) 之间发生水解切割而产生。更特定而言, 本文所用之切割型 C3 多胜肽系具有 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的多胜肽片段。可以理解的是, 多胜肽可以具有有限数量的变化或修饰, 其可以在与其活性或功能无关的多胜肽的某一部分内进行, 且仍然导致具有可接受程度的等同或类似的生物活性或功能。
- 根据本发明之切割型 C3 多胜肽可藉由传统方法制备, 如重组技术, 使用适用之宿主细胞 (如大肠杆菌、酵母菌、哺乳动物、昆虫或无细胞之宿主系统) 或合成方式。于部分实例中, 切割型 C3 多胜肽与天然存在者, 于至少转译后修饰 (像是醮化) 部分不同。该切割型 C3 多胜肽可与一医药可接受试剂 (如: 自然界中不会与切割型 C3 多胜肽共同存在之载剂, 或非自然存在之载剂, 或如免疫佐剂) 混合, 以形成一组合物, 用于如医药用途或如诱导抗体产生。

II. 侦测切割型 C3 多胜肽及测量其量之方法

- 可藉由任何常规技术以测定生物样本中切割型 C3 多胜肽之存在及量。于部分具体实施例中, 切割型 C3 多胜肽之存在及/或量, 可藉由质谱分析测定, 其可以高敏感性及再现性之直接测量该分析物。许多不同之质谱分析方法可被使用。质谱分析的例子包含, 但不限于, 介质辅助雷射脱附离子化/时差测距 (MALDI-TOF)、表面增强激光脱附离子化/时差测距 (SELDI-TOF)、液相色谱法-质谱联用 (LC-MS)、液相色谱法串联式质谱仪 (LC-MS-MS)、及电喷洒离子化质谱 (ESI-MS)。一部分之该方法之实例为串联式质谱仪 (MS/MS), 其牵涉多个步骤以进行质量选择或分析, 通常藉由部分片段化型态分开。

在其他具体实施例中, 切割型 C3 多胜肽的存在及/或量可藉由免疫分析方法判定。免疫分析法之实例包含, 但不限于西方墨点分析 (还原态或

变性电泳)、酵素连结免疫吸附法(ELISA)、放射免疫法(RIA)、放射免疫沉淀法(RIPA)、免疫荧光法(IFA)及电化学荧光法(ECL)。

在部分实例中,切割型 C3 多胜肽之存在及/或量,可藉由使用可专一地辨识切割型 C3 多胜肽的试剂,例如,抗体,予以检测。

5 (i) 专一性结合至切割型 C3 多胜肽之抗体

本文所述之“抗体”乙词系指一种完整的免疫球蛋白,或其片段,以及包含一种含有抗原结合域或抗原结合片段之多胜肽,其可专一地与特定抗原结合。该术语包含但不限于单株的、单专一性的、多株的、多专一性的、人化的、人类的、单股的、嵌合的、合成的、重组的、突变的及杂合的抗体。可根据该领域所习知方法以制备适用的抗体。该抗体可能非自然存在者(如不经过人工方式,即不会于自然界中产生)。

完好的或完整的抗体,包含两股重链,及两股轻链。每一个重链系由可变区(V_H)及第一、第二及第三恒定区(C_{H1} 、 C_{H2} 及 C_{H3})所组成,且每一个轻链系由一个可变区(V_L)及一个恒定区(C_L)所组成。

15 “抗原结合域(antigen-binding domain)”或“抗原结合片段(antigen-binding fragment)”乙词系指整个抗体分子之部分或区域,其负责与抗原结合。可被抗体所专一地结合或辨识之抗原的一部分,称作“抗原决定基(或抗原表位,epitope)”。一抗原结合域可包含重链可变区(V_H)及轻链可变区(V_L);然而,其并不一定要包含两者。该于两股链中之可变区域典型地含有三个高可变性区域,称作互补决定区域(complementarity determining regions; CDRs)。该三个 CDRs 系由框架区域(framework regions; FRs)所隔开,该 FRs 较 CDRs 更为高度保守。重链及轻链之恒定区与抗原结合无关,但存在着不同功能子(effector)之功用。抗体之分类系基于其重链之恒定区之氨基酸序列以分类。5 种主要抗体类型或同型为 IgG、IgM、IgA、IgD 及 IgE,其分别以重链之恒定区之 γ 、 μ 、 α 、 δ 及 ϵ 定义之。抗体之抗原结合片段之实例,包含:(1)一 Fab 片段,一具有 V_L 、 V_H 、 C_L 及 C_{H1} 域之单价片段;(2)一 $F(ab')_2$ 片段,一具有两个 Fab 片段之二价片段,系透过双硫键于桥接区进行连结,即 Fab 之双体;(3)

一具有 V_L 及 V_H 域之 F_v 片段之单股抗体；(4)一单离的互补决定区(CDR)；
(5) 一单股的 F_v (scFv)，一单股多胜肽链，系由 V_H 域及 V_L 域所组成，
其透过胜肽连接符连结；及(6) 一种(scFv)₂ 包含三个胜肽链；两个 V_H 域
藉由胜肽连接符及双硫键与两个 V_L 域结合。

- 5 “人类抗体(human antibody)”乙词包含具有可变的及恒定区之抗体，
本质上对应于，或衍生自人类生殖系(germline)的免疫球蛋白序列。本
发明之人类抗体，然而，可包含非编码人类生殖系免疫球蛋白序列之胺基
酸残基(如藉由随机或体外特定位置突变所诱导之突变，或藉由体内之体
突变)，例如于 CDRs 中。具体而言，该人类抗体可具有至少 1、2、3、4、
10 5 或更多位置以胺基酸残基替换，其非编码人类生殖系免疫球蛋白序列。

于部分具体实施例中，被应用于本文所述之任何方法之抗体，为可专
一性结合至切割型 C3 多胜肽结合之抗体，例如，可专一性结合至具有 SEQ
ID NO:2 序列之切割型 C3 多胜肽。

- 一种抗体其可“专一性”辨认一目标(如切割型 C3 多胜肽)系为该
15 领域所熟知之术语，且用于判断该专一性辨认之方法亦是该领域所习知
的。若一分子与特定目标抗原(而不与其他目标)之反应或关联更为频繁、
更为快速、更长时间及/或更高的亲和性，则该分子被称作具有“专一性辨
认”的能力。特定而言，若一抗体与其目标抗原(与其他物质相较)之结
合，具有更高亲和性、倾向、更快速、及/或更长时间，则该抗体对于标靶
20 抗原有“专一性辨认”的能力。例如，一抗体可专一地(或优选地)与切
割型 C3 多胜肽或其抗原决定基结合，则代表该抗体与其之标靶抗原(相
较于其与其他抗原结合、，如全长的 C3，或于相同抗原中之其他抗原决定
基)具有更高之亲和性、倾向、更快速、及/或更长时间之结合能力。应可
被理解的是，“专一性结合”或“优选结合”并非一定要独占式结合(虽
25 然可包括独占式结合)。一般而言，但非必要，提及结合系指优选地结合。

在具体实施例中，用于本文所述方法之抗体，系可专一性辨认切割型
C3 多胜肽之抗体，例如，可专一性辨认 SEQ ID NO:2 之多胜肽之抗体。
更特定而言，本文所述抗体可专一性辨认切割型 C3 多胜肽系指抗体可专

一性结合至切割型 C3 多胜肽中的抗原决定基 (epitope, 抗原表位), 以致于在待测的生物样本中, 该抗体可藉由习知的免疫分析方法 (如, 西方墨点法, 例如, 经由分子量大小的判断), 区辨出是否存在切割型 C3 多胜肽, 或测得切割型 C3 多胜肽的含量。又在某些实例中, 本发明之可专一性辨
5 认切割型 C3 多胜肽之抗体可专一性辨认切割型 C3 多胜肽之 N 端单一氨基酸残基, 例如, SEQ ID NO: 2 的 N 端的丝胺酸 (S), 故该抗体不会与全长的 C3 蛋白结合, 并可用以区辨出是否存在切割型 C3 多胜肽, 或进一步测得切割型 C3 多胜肽的含量。

任何本文所述之抗体, 皆属于本发明之范畴。

10 (ii) 抗体制备

本文所述之抗体可与切割型 C3 结合, 其可藉由该领域所习知之任何方法制备。请参阅, 如 Harlow and Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York。

于部分具体实施例中, 本文所述之抗体可为多株抗体, 可依例行多株
15 抗体制备方法获得。具体而言, 将从人类血清纯化的切割型 C3 或以遗传工程制得之重组胜肽作为抗原, 可加入载体蛋白, 如牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 或钥孔虫咸血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH), 以增加其免疫原性。将抗原 (或与载体蛋白混合者) 注射于动物 (如兔子) 体内诱发免疫反应, 可追加免疫, 例如, 每两周免疫一次, 共
20 免疫约 2-5 次。后续先以酵素免疫分析法检测, 确保免疫后血清效价大于 1:4000 即可进行全部采血。采血后, 待血液凝固, 离心取上清液, 即可取得含对抗切割型 C3 之多株抗体的抗血清。较佳地, 可将抗血清予以纯化, 例如, 利用亲和性层析法 (蛋白 A/G) 进行免疫球蛋白 (Ig) 的纯化, 更进一步以硫酸铵沉淀即可得到含有目标专一性的抗体, 也可搭配结
25 合离子交换管柱层析去除沉淀中的杂质。

于部分具体实施例中, 抗体专一地与一标靶抗原 (如切割型态之 C3, 如 SEQ ID NO:2) 结合, 可藉由习知融合瘤技术而制备。全长标靶抗原或其片段, 可视需要地与载体蛋白 (如 KLH) 结合, 以用于致免疫宿主主动

物，以产生可与该抗原结合之抗体。宿主动物之免疫时程及路径，一般皆与已建立的及常规用于刺激抗体生成及产生之技术相同（本文进一步说明）。一般技术用于生产小鼠、人化的、及人类抗体，皆为该领域所习知者，且于本文所描述。应考虑的是，任何哺乳动物个体，包含人类或产生
5 抗体之细胞，可被操作以作为生产哺乳动物包含人类之融合瘤细胞株之基础。一般而言，该宿主动物以腹腔、肌肉、口服、皮下、足底、及/或皮内的方式，接种一定量之免疫原，包含本文所述者。

使用一般体细胞杂和技术（Kohler, B. and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497 或修改自 Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381 (1982)），可自
10 淋巴球及不死的骨髓瘤细胞以制备融合瘤。可取得之骨髓瘤细胞系，包含但不限于，X63-Ag8.653 及该等源自 Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA 之细胞，皆可用于杂合。一般而言，该技术涉及使用融合剂以融合骨髓瘤细胞及淋巴细胞，该融合剂诸如聚乙二醇、或藉由电力方式，皆为该领域具有技艺者所熟知者。经融合后，将细胞自融合培
15 养基中分离出来，并置于选择性生长培养基中培养，像是次黄嘌呤-氨嘌呤-胸苷（hypoxanthine-aminopterin-thymidine; HAT）培养基，以排出非融合之亲代细胞。任何本文所述之培养基，可添加或不添加血清，可被用于培养融合瘤，其可分泌出单株抗体。该等融合瘤经增殖及继代，如需要，可将上清液以常规免疫方法步骤（如放射免疫分析、酵素免疫分析、或荧
20 光免疫分析）进行分析抗免疫原之活性。

融合瘤可做为抗体之来源，其包含所有衍生物，亲代融合瘤之子代细胞，可产生单株抗体，其可与切割的 C3 结合。可产生该等抗体之融合瘤可使用习知方式于体外或体内进行培养。该单株抗体可从培养基或体液中
25 分离出来，藉由传统免疫球蛋白纯化步骤，像是硫酸铵沉淀、胶体电泳、透析、层析法、及超过滤，如果适用的话。若出现不欲之活性，则可将之移除，例如藉由将该制备物，以一由免疫原所制备之吸收物作用，该免疫原系贴附于一固相，并将所欲之抗体从该免疫原上洗提或释放出来。使用目标抗原或与蛋白连结之含有目标胺基酸序列之片段，免疫一宿主动物，以获得产制之抗体（如单株抗体）；其中该抗原系对于免疫物种具有免疫

原性，如钥孔虫戚血蓝蛋白、血清白蛋白、牛的甲状腺球蛋白、或使用双功能或衍生剂之豆胰蛋白酶抑制子，例如马来酰亚胺基苯甲酸磺基琥珀酰亚胺酯（透过与半胱氨酸残基连结）、N-羟基丁二酰亚胺（透过离胺酸残基）、戊二醛、丁二酸酐、SOCl₂、或 R₁N=C=NR，其中 R 及 R₁ 为不同之烷基。

若需要，感兴趣（如以融合瘤所生产）之抗体（如单株或多株）可进行定序，且该多核苷酸序列可被选殖至一载体中，用于表现或增殖。编码感兴趣抗体之序列可被维持于宿主细胞之载体中，且该宿主细胞可被增殖并冷冻以供未来使用。可选择地，该多核苷酸序列可被用于进行基因改造成“人化（humanize）”抗体或改善其亲和性（亲合性成熟度）、或其他抗体之特征。例如，若该抗体用于临床试验中，且对人类进行治疗时，该恒定区可被改造以成为更与人类恒定区相似，以避免免疫反应。另外可能经由基因改造该抗体序列，以获得对于目标抗原更高亲和性，及侦测切割 C3 更高之效率。对于该领域具有技艺者，应可理解的是，可对该抗体进行一种或多种多核苷酸之改变，且仍可维持其与目标抗原之结合专一性。

于其他具体实施例中，完整的人类抗体可使用市售可得小鼠以制备，其经改造可表现专一的人类免疫球蛋白。该转殖基因动物系设计用于产生更多所欲（如完整人类抗体）、或更强的免疫反应，亦可用于生成成人化或人类抗体（humanized or human antibodies）。该技术之实例为 Amgen, Inc. (Fremont, Calif.) 之 Xenomouse^{RTM}，及 Medarex, Inc. (Princeton, N.J.) 之 HuMAb-Mouse^{RTM} 及 TC MouseTM。于另一种可能，该等抗体可藉由噬菌体表现或酵母菌技术以制备。请参阅，如，美国专利号 5,565,332；5,580,717；5,733,743 及 6,265,150；及 Winter et al., (1994) Annu. Rev. Immunol. 12:433-455。此外，噬菌体表现技术（McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-553），源自未免疫之贡献者之免疫球蛋白可变区（V）基因群，被用于产生人类抗体，及体外之抗体片段。

完整抗体（全长抗体）之抗原结合片段可藉由常规方法制备。例如，F(ab')₂ 片段可藉由胃蛋白酶水解抗体分子以制备，以及 Fab 片段可藉由还原 F(ab')₂ 片段之双硫键以生成。

基因工程抗体，像是人化抗体、嵌合型抗体、单链抗体、及双特异性抗体，可藉由如传统重组技术制备。于一实例中，可分离一编码单株抗体（对目标抗原具专一性）之 DNA，并使用常规步骤定序（如藉由使用寡核苷酸探针，其可专一的与编码单株抗体之重链及轻链之基因结合）。该融合瘤细胞可做为该等 DNA 之较佳来源。一旦分离后，该 DNA 可被置入一个或多个表现载体中，接着将其转染至宿主细胞，像是大肠杆菌细胞、猿的 COS 细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞、或骨髓瘤细胞，其不会产生免疫球蛋白，以从该等重组宿主细胞中取得合成之单株抗体。请参阅，如 PCT 专利公开号 WO 87/04462。该 DNA 可接着被修饰，例如，藉由取代方式，将编码人类重链及轻链恒定区之序列，置换成同源的鼠序列，Morrison et al., (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851，或藉由共价结合方式，将编码免疫球蛋白之序列，全部或部分之编码序列与一非免疫球蛋白多胜肽之序列连结。于此种方式中，基因工程改造之抗体，像是“嵌合的”或“融合的”抗体，可被制备，且可与目标抗原具专一性结合。

涉及制备“嵌合型抗体（chimeric antibodies）”之技术，皆为该领域所习知者。请参阅如 Morrison et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851; Neuberger et al. (1984) Nature 312, 604; 及 Takeda et al. (1984) Nature 314:452。

用于构筑人化抗体之方法，亦为该领域所熟知者。请参阅，如 Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033 (1989)。于一实例中，亲代非人类抗体之 V_H 及 V_L 可变区系以该领域所熟知方法进行三维分子模型分析。接着，框架氨基酸残基被预测对于形成正确 CDR 结构是重要的，使用相同分子模型分析以辨识出该等框架氨基酸残基。同时，人类 V_H 及 V_L 链具有之氨基酸序列，与该等亲代非人类抗体系属同源；该人类氨基酸序列系以亲代 V_H 及 V_L 序列作为搜寻字，从各种抗体基因数据库中所找出。接着挑选人类 V_H 及 V_L 接受器基因。

位于所挑选之人类接受器基因中之 CDR 区，可将之以亲代非人类抗体之 CDR 区或其功能性变异体置换。当必需时，位于亲代链之框架区中之残基被预测为重要的，系用于与该 CDR 区交互作用（请参阅前述），可

被用于取代于人类接受器基因中之对应的残基。

一单链抗体可藉由重组技术制备，藉由将编码重链可变区之核苷酸序列，与一编码轻链可变区之核苷酸序列连结。较佳地，一具弯折性之连接符可被加入该两个可变区域间。或是，于（美国专利号 4,946,778 及
5 4,704,692）所述之产生单股抗体之技术亦可被用于产生一噬菌体或酵母菌 scFv 库及 scFv 聚落，其对于切割的 C3 具专一性，且可藉由常规方式从该数据库中找到。阳性聚落可接着进一步筛选以找出该等与切割 C3 结合者。

从该领域所习知方法、及本文所述之方法以制得之抗体，可藉由该领域所习知方法以确认其特性。例如，一种方法系用于辨识与抗原结合之抗原决定基，或“抗原决定基图谱”。于该领域中有许多不同已知方法可用于定位及分析蛋白上抗原决定基之位置，包含将抗体抗原复合体结晶结构之解析、竞争式分析、基因片段表现分析、及合成胜肽分析，例如，如
10 Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999 第 11 章所述者。于另一样本中，抗原决定基图谱可被用于决定抗体结合之序列。该抗原决定基可为一线性抗原决定基，例如，包含于一单股延伸之胺基酸中、或藉由三维的胺基酸交互作用以形成之构型抗原决定基，其可能不需包含于单股延伸支中（线性序列之主要结构）。可分离或合成（如重组地）不同长度之胜肽（如至少 4-6 个胺基酸长度），及可用一抗体以进行结合分析。于
20 另一实例中，该可被抗体结合之抗原决定基，可藉由使用重迭之胜肽（衍生自目标抗原序列），于一系统性筛选中以判定，以决定抗体结合位置。根据基因片段表现分析，该开放式阅读框架编码目标抗原系经随机片段化，或藉由特定基因构筑以片段化，且所表现之抗原片段的反应性可使用
25 抗体以测试判定之。该基因片段可能，例如，藉由 PCR 以制备之，接着于放射性胺基酸环境中，进行体外转录及转译成蛋白。抗体与已被放射性标记之抗原片段之结合与否，可藉由免疫沉淀法及胶体电泳判定。部分抗原决定基亦可使用展现于噬菌体颗粒表面之随机胜肽序列之大型数据库（噬菌体库）中以辨识。此外，一个已分析之重迭胜肽片段数据库，可于

一简单的结合试验中，用于测试该测试抗体之结合情形。于另一实例中，抗原结合域之突变，可施行功能区切换试验及丙胺酸筛选突变法以辨识所需、足够、即/或必须之残基，以供抗原决定基结合。例如，功能区切换试验可使用目标抗原之一突变以施行，其中一切割的 C3 多胜肽之各种片段，系以一相近、但非抗原性不同之蛋白序列以取代（置换）之。藉由分析与该突变 C3 结合之抗体，则可评估与特定抗原片段结合之抗体的重要性。与所欲之抗原决定基结合之抗体可藉由抗原决定基定位图谱以辨识。

III. 新颖卵巢癌标记于诊断及预后之应用

如本文所述，经蛋白酶分解后之切割型 C3 多胜肽，被发现与卵巢癌之出现及进展有关系。因此，本文所述之用于筛检卵巢癌病患的方法、监控卵巢癌进展、及评估卵巢癌治疗效果之方法，可使用切割型 C3 多胜肽作为一可信赖之生物标记。如上所述，本文所述之侦测方法可被用作一种初步的筛检方法，供任何女性个体以检测其是否可能患有卵巢癌（尤其是早期卵巢癌）。

藉由该方法所分析之个体，可为任何女性哺乳动物个体，像是人类个体。于部分实例，该个体可具有一种或多种与卵巢癌相关之症状。于其他实例中，该个体可能具有患有发展成卵巢癌之风险。于另一实例中，该个体为无症状的。于再一实例中，本文所述之诊断方法可被用作常规筛检方法，以供健康女性个体，如超过 20、35、40、45、50 或 55 岁之女性检测，以监控潜在之卵巢癌风险或发展。

为了进行本文所述之方法，将取自一有需要之个体之生物样本（如一人人类病患其不具有任何卵巢癌之症状、或一人人类病患具有、疑似有、或患有卵巢癌之风险）侦测、或测量该样本中切割型 C3 多胜肽，或其之量，系透过任何该领域所习知方法，像是该等本文所述者，如质谱分析及免疫分析。生物样本可为生物性液体样本，像是血液样本，如血浆或血清样本。切割的 C3 可为量化的或质化的方式侦测。任何该领域之有效方法，以测量标记之存在与否、量、或活性，皆包含于本发明中。对于该领域具有通常技艺者具有能力可判定何种方法最适用于测量特定标记。

于一具体实施例中，从须进行测试之个体中取得之样本，测试切割型 C3 多胜肽之存在与否。若切割型 C3 多胜肽可于源自须测试之个体之样本中测得，则代表该个体被诊断为罹患卵巢癌或具有罹患卵巢癌之风险。

于部分具体实施例中，源自候选个体之样本中切割型 C3 多胜肽之量，
5 可藉由与一标准值比较，以判断是否该候选个体具有或患有卵巢癌之风险。该标准值代表对照组样本中切割型 C3 多胜肽之量。该对照样本可取自一个体（如一女性个体），其不具有卵巢癌。此外，该对照组样本可取自多个该等个体之混合物。可选择地，该等对照组个体与候选个体于，如
10 年龄、性别、及/或种族背景相符。较佳地，该对照组样本及该候选个体之生物样本为同一种类之样本。于部分具体实施例中，若该切割型 C3 多胜肽被测得、或切割型 C3 多胜肽之量较标准值高（如高于标准值约 10%或更多），则该候选个体可能被诊断为具有、疑似有、或患有卵巢癌之风险。于部分实例中，使用常规方法，如该等本文所述者，于对照组样本之切割型 C3 多胜肽的量系于对照组样本中无法测得的（标准值系为 0，低于侦
15 测极限）。于此例子中，使用相同方法侦测源自一个体之生物样本中，具有切割型 C3 多胜肽，系指该个体具有、疑似有、或患有卵巢癌之风险。

本发明之方法专一性且广泛性辨识多种型态的卵巢癌，以及不同阶段的卵巢癌，但患有其它癌症种类或其他疾病的个体之血液样本，则未检出此生物标记；且可以血液样本进行检测，无须复杂仪器，对受测者接受度
20 高，适合用于大规模筛检，有助于早期诊断及持续追踪病况。

本文所述之卵巢癌包括但不限于子宫内膜型（endometrioid）卵巢癌、亮细胞型（clear cell）卵巢癌、浆液型（serous）卵巢癌、黏液型（mucinous）卵巢、及其他类型卵巢癌，例如，卵巢癌肉瘤（ovarian carcinosarcoma）、卵巢未成熟畸胎瘤（Immature teratoma）、卵巢黏液及颗粒型癌（ovarian
25 mucinous and granulosa tumor）及转移性卵巢癌（Krukenberg，卵巢克鲁根勃氏瘤）。

本文所述之卵巢癌包括第 I 期卵巢癌、第 II 期卵巢癌、第 III 期卵巢癌及第 IV 期卵巢癌。各阶段卵巢癌的症状如表 1 所述。

表 1：各阶段卵巢癌的症状。

各阶段卵巢癌	症状
第I期卵巢癌	病变局限于单侧或双侧卵巢。 可依照腹水中是否含有恶性细胞及肿瘤的囊膜是否完整，再细分为第Ia期、第Ib期及第Ic期。
第II期卵巢癌	癌症不限于卵巢，已侵犯到其他骨盆腔的组织。 可依照肿瘤是否侵犯到子宫、输卵管或其他骨盆腔组织，再细分第IIa期、第IIb期、第IIc期。
第III期卵巢癌	肿瘤不仅限于单侧或双侧卵巢，已侵犯到腹腔内、腹股沟淋巴结或肝脏表层转移。 可依照肿瘤是否扩散到腹腔、腹腔中肿瘤的大小与是否扩散到骨盆和腹股沟淋巴结，再细分为IIIa、IIIb、IIIc。
第IV期卵巢癌	肿瘤生长侵入卵巢中且有远处器官的转移，例如，转移到胸腔或肝脏。

于部分具体实施例中，源自候选个体（如卵巢癌病患）之多个样本中，其切割型 C3 多胜肽的量可藉由测量，以判定疾病之进展。例如，至少两个生物样本（如血清样本或血浆样本）可自候选个体中，于不同时间点取得。切割型 C3 多胜肽的量，于该至少两个生物样本中，可藉由本文所述进行测量。若观察到该切割型 C3 多胜肽的趋势，随着时间（如于较晚获得之样本中之切割型 C3 多胜肽的量，相较于较早获得之样本为高时）呈现增加的，该个体被诊断具有、疑似有或有罹患卵巢癌之风险。若该个体为卵巢癌病患，则切割型 C3 多胜肽的量呈现增加的趋势时，则代表卵巢癌进展（恶化）中。

当一个体如人类病患，被诊断为具有、疑似有或患有卵巢癌风险后，该个体可进行进一步之检验（如常规物理检测，包含影像法，如 X 光摄像、核磁共振成像（MRI）、或超音波或以手术进行活组织检验）以确认疾病之发生及/或判定卵巢癌之时期及种类。

于部分具体实施例中，本文所述之方法可进一步包含治疗该卵巢癌病患达到至少舒缓与该疾病有关之症状。该治疗可为任何传统抗卵巢癌疗法，包含放射疗法、化学疗法及外科手术。示例性抗卵巢癌化学疗法药剂

包含但不限于，阿糖胞苷（ARA-C）、思亭（bevacizumab）、扑类恶（bleomycin）、卡铂（carboplatin）、顺铂（cisplatin）、佳铂帝（carboplatin）、癌德星（cyclophosphamide）、医百幸（etoposide, VP-16）、克癌易（docetaxel）、艾霉素（doxorubicin）、健择（gemcitabine）、5-氟尿嘧啶（5-FU）、好克癌
5 （ifosfamide）、尼拉帕尼（Niraparib）、奥拉帕尼（Olaparib）、汰癌胜（paclitaxel）、磷酸瑞卡帕布（Rucaparib）、太莫西芬（Tamoxifene）、癌康定（topotecan）、敏毕瘤（vinblastine）及敏克瘤（vincristine）。

于另一具体实施例中，于此提供之方法，用于评估于卵巢癌病患中所施予之卵巢癌治疗之效力。例如，可从进行卵巢癌治疗之卵巢癌病患，于
10 治疗期间，收集多个生物样本。若经治疗期间，该切割型 C3 多胜肽的量呈现减少的趋势，即切割型 C3 多胜肽的量于较晚获得之生物样本中之量，相较于较早获得之生物样本之切割型 C3 多胜肽的量低的话，则代表该治疗对于卵巢癌病患是有效的。相反的，若该切割型 C3 多胜肽的量，经治疗期间，仍维持或甚至增加，则代表该治疗对于该病患无效或病情恶化。

15 此处所使用的“较低”、“减少的”、“降低的”的量或类似用语，是指低于所欲比较的量（如治疗前的标记检测量），其降低的程度具有一般此领域所认可之统计上之意义。在特定具体实施例中，此降低程度可以是相较于治疗前的标记检测量达 20%或以上的降低，30%或以上的降低，40%或以上的降低，50%或以上的降低，60%或以上的降低，70%或以上的降低，
20 80%或以上的降低，或 90%或以上的降低。

此处所使用的“较高”、“增加的”、“提高的”的量或类似用语，是指高于所欲比较的量（如治疗前的标记检测量），其提高的程度具有一般此领域所认可之统计上之意义。在特定具体实施例中，此提高程度可以是相较于所欲比较的量达 20%或以上的增加，30%或以上的增加，40%或以上的
25 增加，50%或以上的增加，60%或以上的增加，70%或以上的增加，80%或以上的增加，或 90%或以上的增加。

若一卵巢癌疗法被认为对于一卵巢癌病患无效时，则可调整治疗策略，如增加药剂量、治疗频率、或改变更适合之疗法。

IV.活体外诊断套组

本发明亦提供施行该方法之套组，其包含本文所述之可专一性辨识切割型 C3 多胜肽的试剂（如抗体）。该套组可进一步包含供使用该套组之说明，侦测此处所述之切割型态 C3 多胜肽之存在或含量，藉此侦测卵巢癌，
5 及亦可用于监控卵巢癌进展、或评估于卵巢癌病患所施用之治疗效果。

V. 抗切割型态 C3 多胜肽之抗体于侦测卵巢癌之用途

本文所述之任何抗体，其可专一地辨认切割型态 C3 多胜肽，用于侦测卵巢癌。例如，该抗体可共轭于可测得之标记（如该领域所习知之体内显像剂）结合，用于诊断之目的。较佳地，该抗体系用于活体外分析来自
10 待测个体的样本，以免疫分析方法，如西方墨点分析、酵素连结免疫吸附法（ELISA）、放射免疫法（RIA）、放射免疫沉淀法（RIPA）、免疫荧光法（IFA）及电化学荧光法（ECL），测定样本中是否存在切割型 C3 多胜肽或测定其含量判定。

以本文所述之诊断方法或治疗方法所治疗之个体可为一女性哺乳动物，较佳地为一人类女性个体。哺乳动物包含，但不限于农场动物、运动
15 动物、宠物、灵长类、马、狗、猫、小鼠及大鼠。一个需要该治疗之人类个体，可能为一患有卵巢癌之人类病患、疑似患有卵巢癌之人类病患、或患有卵巢癌风险之人类病患。该病患可藉由常规医疗方式或本文所述之诊断方法以辨识。

20 本文所用之“有效量”系指每一个活性物质之量，可于该个体上赋予疗效，无论是单独使用或与一种或多种其他活性物质合并使用。有效量可能会有所不同，须由该领域具有技艺者判断，根据需施予时之特定情况、情况之严重性、个别病患参数，包含年龄、生理状况、大小、性别及重量、治疗时程、（如果有的话）并行疗法的本质、特定施予路径及其他医疗人
25 员之知识及专业内判断之可能因素。该等因素对于该领域具有通常技艺者而言为习知的，且可引入而无须进一步常规实验。一般较佳地为，使用个别组成或其组合物之最大剂量，即为根据明智的医学判断之最高安全剂量。应可理解的是，该领域中具有通常技艺者，然而，一病患可能基于医

疗理由、生理反应或其他可能的理由，坚持使用较低剂量或可忍受剂量。

根据经验考虑，像是半衰期，一般认为影响剂量之决定。例如，与人类免疫系统兼容的抗体，像是人化的抗体、或完全的人类抗体，可以延长抗体之半衰期，及避免该抗体被宿主免疫系统所攻击。施予的频率可根据治疗期间判定及调整，一般而言，如非必须，可根据治疗及/或抑制，及/或改善卵巢癌以调整施予频率。此外，持续性释放之抗切割的 C3 配方亦可适用之。用于维持释放之各种不同配方及装置，皆为该领域所习知的。

根据施予路径，结合的抗体可与适用之医药可接受载剂混合，以形成适合的配方。可注射型之组合物可能含有不同的载剂，像是植物油、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、乙醇、及多元醇（甘油、丙二醇、液态聚乙二醇及其类似物）。为了静脉注射，可藉由点滴方式施予水溶的抗体，系藉由注入含有抗体及生理可接受赋形剂之医药配方。生理可接受之赋形剂可包含，例如 5%葡萄糖、0.9% 生理食盐水、Ringer's 溶液或其他适用之赋形剂。肌肉内用之配方，如一灭菌配方，其抗体为适用可溶之盐类，可藉由施予医药赋形剂（如供注射用水、0.9%生理食盐水、或 5%葡萄糖溶液）以溶解。

不须进一步详述，吾人相信该领域具有通常技艺者，可基于以上说明，可应用本发明至其最完整之延伸范围。因此，以下特定具体实施例仅用于阐述，而非意欲以任何方式来限制本发明之可用范围。所有本文所引用之文献，皆以引用之目的或参考文献方式引用于本文中。

实施例：卵巢癌病患中之补体成分 3 之特定的蛋白分解片段

首先，透过修饰的二维胶体电泳系统，吾人发现来自部分卵巢癌病患之血浆中，检测出补体成分 3（C3 蛋白）之特定片段。透过 LC-MS/MS 分析其胰蛋白酶水解产物，我们发现该片段具分子量约 40 kDa。该等数据显示该 C3 蛋白的特定片段可能为蛋白分解过程之产物。进一步分析氨基酸序列，得知该 C3 蛋白的特定片段是人类 C3 α 链片段 2，是一段在相对于全长人类 C3 蛋白 SEQ ID NO: 1 的 1320 位置与 1321 位置之间切出的 C 端片段，具有 SEQ ID NO:2 之氨基酸序列。

接着，进行西方墨点法，以进一步了解该等蛋白片段之特性。

抗体制备

本发明多株抗体制备方式包含下列步骤：将纯化的人类切割型 C3 多胜肽片段或重组蛋白作为抗原，抗原纯度达 95%以上。为增加抗原之免疫原性，可将胜肽交联到适当的载体蛋白上，通常为牛血清白蛋白（bovine serum albumin, BSA）或钥孔虫戚血蓝蛋白（keyhole limpet hemocyanin, KLH）。将抗原注入一兔子体内诱发免疫反应，使不同的抗原表位（epitopes）分别诱导 B 细胞分泌很多不同的免疫球蛋白（抗体，antibodies）。每两周免疫一次，共免疫 5 次。后续先以酵素免疫分析法检测，确保免疫后血清效价大于 1:4000 即可进行全部采血。待血液凝固后，离心取上清液，即得抗血清。随后此正确抗体分子之纯化，即利用亲和性层析法（蛋白 A/G）进行免疫球蛋白（Ig）的纯化，以硫酸铵沉淀即可得到含有目标专一性的抗体。可搭配结合离子交换管柱层析去除沉淀中的杂质。

西方墨点分析

将收集自人类个体之血浆样本中之蛋白与 6X Laemmli 样本缓冲液混合，该缓冲液含有 120 mM Tris-HCl、pH 6.8、2% SDS (w/v) 及 10% 蔗糖 (w/v)。于部分样本，另外加入 1% 之 2-巯基乙醇。经过电泳分离，使用标准技术将蛋白转移至 Immobilon PVDF 膜（Millipore Corp.）上。将点墨后之膜以阻断缓冲液（含有 1% 山羊血清）进行阻断，于室温作用 1 小时，接着以兔抗补体成分 3 抗体作用。经三次以 Tris 缓冲之生理食盐水（含有 0.1% Tween 20）清洗后，将膜以过氧化酶结合之山羊抗兔 IgG（Sigma-Aldrich）作用。化学荧光系使用 LAS-4000（Fujifilm, 日本）侦测。

结果

西方墨点分析显示，于卵巢癌病患样本中侦测到一特定的补体成分 3 之片段（切割型 C3 多胜肽片段），约 40 kDa 大小。如图 1 所示，来自卵巢癌病患之样本可检测到切割型 C3 多胜肽片段，但来自正常个体之样本

则未测出。因此，该切割型 C3 多胜肽片段可被作为一卵巢癌之诊断指标（特异性地出现在卵巢癌患者血浆样本中，但在正常个体的血浆中则未检出）。

为确认此切割型 C3 多胜肽片段对于卵巢癌之专一性，取用患有其它癌症种类或其他疾病的人类个体之血浆样本，进行西方墨点分析。结果如表 2 所示。

表 2：取用患有其它癌症种类或其他疾病的人类个体之血浆样本，以抗切割型态之 C3 抗体进行西方墨点分析之结果

样本	总数量	阳性数量	阳性百分比
肝癌（hepatocellular carcinoma, HCC）	6	0	0%
胃癌（gastric cancer）	6	0	0%
口腔癌（oral cancer）	6	0	0%
大肠癌（colon cancer）	8	0	0%
子宫内膜癌（endometrial cancer）	6	0	0%
糖尿病（diabetics mellitus）	8	0	0%
心衰竭（heart failure）	7	0	0%
正常个体	26	0	0%

结果显示，其它癌症种类或其他疾病的人类个体之血浆样本，均未检出切割型 C3 多胜肽片段之存在（检出率为零）。

相较之下，取用患有不同卵巢癌期别的人类个体之血浆样本，进行西方墨点分析。结果如表 3 所示。

表 3：取用患有不同卵巢癌期别的人类个体之血浆样本，以抗切割型态之 C3 抗体进行西方墨点分析之结果

样本	阳性数量	总数量	阳性百分比
卵巢癌I期	13	15	86.7%
卵巢癌II期	2	3	66.7%
卵巢癌III期	6	8	75.0%
卵巢癌IV期	1	2	50.0%
	22	28	78.6%

结果显示，切割型 C3 多胜肽片段与卵巢癌有显著关联性，在不区分卵巢癌期数的病患中，总数 28 名病患中有 22 名病患检出切割型 C3 多胜

肽片段，阳性百分比高达 78.6%，检出率将近八成，故可作为卵巢癌的指标；特别是初期（I 期）阳性百分比高达 86.7%，检出率接近九成，这是现有检测技术都无法达到的高检出率，对于卵巢癌的早期诊断及筛检有极大帮助。

- 5 我们进一步分析卵巢癌病患的型态，分析切割型 C3 多胜肽片段之生物标记是否广泛性地存在于不同型态的卵巢癌病患中。结果如表 4 所示。

表 4：取用患有不同卵巢癌类型的人类个体之血浆样本，以抗切割型态之 C3 抗体进行西方墨点分析之结果

样本	阳性数量	总数量	阳性百分比
子宫内膜型（endometrioid）	6	7	85.7%
亮细胞型（clear cell）	6	6	100%
浆液型（serous）	7	12	58.3%
黏液型（mucinous）	1	2	50.0%
其它	8	11	72.7%
卵巢癌肉瘤 （ovarian carcinosarcoma）			
卵巢未成熟畸胎瘤 （Immature teratoma）			
卵巢浆液及颗粒型癌 （ ovarian Seromucinous and granulosa tumor）			
转移性卵巢癌 （Krukenberg, 卵巢克鲁根勃氏瘤）			
	28	38	73.7%

- 结果显示，切割型 C3 多胜肽片段对于不同型态的卵巢癌有显著关联
10 性，表示可经由检测切割型 C3 多胜肽片段，广泛地筛检出多种型态的卵巢癌，尤其对于目前检测率极低的亮细胞型卵巢癌，高达 100.0%的检出率，对于卵巢癌的早期诊断及筛检有极大帮助。

- 此外，图2显示卵巢癌病患在不同时间点之血浆样本之西方墨点分析，其中编号 1 是卵巢癌病患在第一时间点的血浆样本分析结果，编号 2 是同
15 一名病患在接受化疗后约一年回诊的血浆样本分析结果，显示切割型 C3 蛋白含量增加，该病患经进一步确认病情恶化，已发生癌症转移；编号 3

是正常个体的血浆样本分析结果,显示未测得切割型 C3 蛋白。结果显示,切割型 C3 多胜肽片段可作为监测卵巢癌治疗效果的指标,含量增加表示卵巢癌可能恶化。

吾人证实约 40 kDa 之切割型 C3 多胜肽片段系特异性地存在于卵巢癌病患中,可作为筛检卵巢癌之生物标记,也可作为监测卵巢癌治疗效果的指标。因此,本发明首次提出一种卵巢癌筛检技术,其可专一性地辨识患有卵巢癌、疑似患有卵巢癌、或可能患有卵巢癌风险之病患,可作为于早期(即于任何症状发生前)或经治疗后的预后指标。本发明之技术可发展出针对卵巢癌的检验试剂,以切割型 C3 蛋白作为卵巢癌之筛检及追踪治疗后病况之生物标记。相较于先前技术,本发明之技术大幅提高卵巢癌检出率,不但可广泛性辨识各种类型的卵巢癌,也可辨识各种期别的卵巢癌,特别是早期检出率相当高(可接近九成),且伪阳性低(其他种类的癌症或病症的病患样本未检出切割型 C3 多胜肽片段之存在),是卵巢癌筛检的重大突破,又可从个体之血液样本以简单的蛋白测量方式完成检测,属于非侵入式的检验,病患接受度高,适合发展大规模的早期筛检;另一方面,亦可作为监测卵巢癌治疗效果的指标,可持续追踪患者病况,以便对治疗效果不佳的患者,能及时调整治疗方案,避免或推迟恶化。

序列信息

补体成分 3 (智人) -全长 (SEQ ID NO: 1)

```

20  MGPTSGPSLL LLLLTHLPLA LGSPMYSIIT PNILRLESEE TMVLEAHDAQ GDVPVTVTVH 60
    DFPGKKLVLS SEKTVLTPAT NHMGNVFTTI PANREFKSEK GRNKFVTVQA TFGTQVVEKV 120
    VLVSLQSGYL FIQTDKTIYT PGSTVLYRIF TVNHKLLPVG RTVMVNIENP EGIPVKQDSL 180
    SSQNQLGVLP LSWDIPELVN MGQWKIRAYY ENSPQQVFST EFEVKEYVLP SFEVIVEPTE 240
    KFYIYNEKG LEVTITARFL YGKKVEGTAF VIFGIQDGEQ RISLPESLKR IPIEDGSGEV 300
25  VLSRKVLLDG VQNPRADLV GKSLYVSATV ILHSGSDMVQ AERSGIPIVT SPYQIHFTKT 360
    PKYFKPGMPF DLMVFVTNPD GSPAYRVPVA VQGEDTVQSL TQGDGVAKLS INTHPSQKPL 420
    SITVRTKKQE LSEAEQATRT MQALPYSTVG NSNNYLHLSV LRTEL RPGET LNVNFLLRMD 480
    RAHEAKIRYY TYLIMNKGRL LKAGRQVREP GQDLVVLPLS ITTDFIPSFR LVAYYTLIGA 540
    SGQREVVADS VWVDVKDSCV GSLVVKSGQS EDRQPVPGQQ MTLKIEGDHG ARVVLVAVDK 600
  
```

	GVFVLNKKNK	LTQSKIWDVV	EKADIGCTPG	SGKDYAGVFS	DAGLTFTSSS	GQQTAAQRAEL	660
	QCPQPAARRR	RSVQLTEKRM	DKVGKYPKEL	RKCCEDGMRE	NPMRFSCQRR	TRFISLGEAC	720
	KKVFLDCCNY	ITELRRQHAR	ASHLGLARSN	LDEDIIAEEN	IVSRSEFPES	WLWNVEDLKE	780
	PPKNGISTKL	MNIFLKDSIT	TWEILAVSMS	DKKGICVADP	FEVTVMQDFF	IDLRLPYSVV	840
5	RNEQVEIRAV	LYNYRQNQEL	KVRVELLHNP	AFCSLATTKR	RHQQTVTIPP	KSSLSVPYVI	900
	VPLKTGLQEV	EVKAAVYHHF	ISDGVKSLK	VVPEGIRMNK	TVAVRTLDP	RLGREGVQKE	960
	DIPPADLSDQ	VPDTESETRI	LLQGTPVAQM	TEDAVIDAERL	KHLIVTPSGC	GEQNMIGMTP	1020
	TVIAVHYLDE	TEQWEKFGLE	KRQGALELIK	KGYTQQLAFR	QPSSAFAAFV	KRAPSTWLTA	1080
	YVVKVFLSLV	NLIAIDSQVL	CGAVKWLILE	KQKPDGVFQE	DAPVIHQEMI	GGLRNNNEKD	1140
10	MALTAFVLIS	LQEAKDICEE	QVNSLPGSIT	KAGDFLEANY	MNLQRSYTVA	IAGYALAQMG	1200
	RLKGPLLKNF	LTTAKDKNRW	EDPGKQLYNV	EATSYALLAL	LQLKDFDFVP	PVVRWLNEQR	1260
	YYGGGYGSTQ	ATFMVFAQAL	QYQKDAPDHQ	ELNLDVSLQL	PSRSSKITHR	IHWESASLLR	1320
	SEETKENEGF	TVTAEGKGQG	TLSVVTMYHA	KAKDQLTCNK	FDLKVTIKPA	PETEKRPQDA	1380
	KNTMILEICT	RYRGDQDATM	SILDISMMTG	FAPDTDDLKQ	LANGVDRYIS	KYELDKAFSD	1440
15	RNTLIIYLDK	VSHSEDDCLA	FKVHQYFNVE	LIQPGAVKVY	AYYNLEESCT	RFYHPEKEDG	1500
	KLNLKCRDEL	CRCAEENCFI	QKSDDKVILE	ERLDKACEPG	VDYVYKTRLV	KVQLSNDFDE	1560
	YIMAIEQTIK	SGSDEVQVGQ	QRTFISPIKC	REALKLEEK	HYLMWGLSSD	FWGEKPNLSY	1620
	IIGKDTWVEH	WPEEDECQDE	ENQKQCQDLG	AFTESMVVFG	CPN		1663
20	补体成分 3 (智人) C3 α 链片段 2 (1321-1663 a.a.) (SEQ ID NO: 2)						
	SEETKENEGF	TVTAEGKGQG	TLSVVTMYHA	KAKDQLTCNK	FDLKVTIKPA	PETEKRPQDA	
	KNTMILEICT	RYRGDQDATM	SILDISMMTG	FAPDTDDLKQ	LANGVDRYIS	KYELDKAFSD	
	RNTLIIYLDK	VSHSEDDCLA	FKVHQYFNVE	LIQPGAVKVY	AYYNLEESCT	RFYHPEKEDG	
	KLNLKCRDEL	CRCAEENCFI	QKSDDKVILE	ERLDKACEPG	VDYVYKTRLV	KVQLSNDFDE	
25	YIMAIEQTIK	SGSDEVQVGQ	QRTFISPIKC	REALKLEEK	HYLMWGLSSD	FWGEKPNLSY	
	IIGKDTWVEH	WPEEDECQDE	ENQKQCQDLG	AFTESMVVFG	CPN		

30	补体成分 3 (智人) C3 α 链片段 1 (749-954 a.a.) (SEQ ID NO: 3)						
	SNLDEIIAE	ENIVSRSEFP	ESWLWNVED	LKEPPKNGIS	TKLMNIFLKD	SITTWEILAV	
	SMSDKKGICV	ADPFEVTVMQ	DDFIDLRLP	YSVVRNEQVE	IRAVLYNYRQ	NQELKVRVEL	
	LHNPAFCSLA	TTKRRHQQT	V	TIPPKSSLS	VPYVIVPLKT	GLQEVEVKAA	VYHHFISDGV

RKSLKVVPEG IRMNKTVAVR TLDPERLGR

补体成分 3 (智人) C3 β 片段 (23-667 a.a.) (SEQ ID NO: 4)

SPMYSIITPN ILRLESEETM VLEAHDAQGD VPVTVTVHDF PGKKLVLSSE KTVLTPATNH
MGNVTFTIPA NREFKSEKGR NKFVTVQATF GTQVVEKVVL VSLQSGYLF I QTDKTIYTPG
5 STVLYRIFTV NHKLLPVGRT VMVNIENPEG IPVKQDSLSS QNQLGVLPLS WDIPELVNMG
QWKIRAYYEN SPQQVFSTEF EVKEYVLPSF EVIVEPTEKF YYYINEKGLE VTITARFLYG
KKVEGTAFVI FGIQDGEQRI SLPESLKRIP IEDGSGEVVL SRKVLLDGVQ NPRAEDLVGK
SLYVSATVIL HSGSDMVQAE RSGIPIVTSP YQIHFTKTPK YFKPGMPFDL MVFVTNPDGS
PAYRVPVAVQ GEDTVQSLTQ GDGVAKLSIN THPSQKPLSI TVRTKKQELS EAEQATRMTQ
10 ALPYSTVGNS NNYLHLSVLR TELRPGETLN VNFLLRMDRA HEAKIRYYTY LIMNKGRLK
AGRQVREPGQ DLVVLPLSIT TDFIPSFRLV AYYTLIGASG QREVVADSVW VDVKDSCVGS
LVVKSGQSED RQPVPGQMT LKIEGDHGAR VVLVAVDKGV FVLNKKNKLT QSKIWDVVEK
ADIGCTPGSG KDYAGVFSDA GLTFTSSSGQ QTAQRAELQC PQPAA