

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03809631.5

A61K 38/00

C07K 2/00

C07K 4/00

C07K 5/00

C07K 7/00

C07K 14/00

C07K 16/00

[43] 公开日 2005 年 8 月 3 日

[11] 公开号 CN 1649613A

[22] 申请日 2003. 4. 7 [21] 申请号 03809631. 5

[30] 优先权

[32] 2002. 4. 8 [33] US [31] 60/370,239

[86] 国际申请 PCT/US2003/010489 2003. 4. 7

[87] 国际公布 WO2003/086445 英 2003. 10. 23

[85] 进入国家阶段日期 2004. 10. 29

[71] 申请人 赛弗根生物系统股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 香港中文大学

[72] 发明人 T-T·伊普 T·C·W·波恩

P·约翰逊 V·F·伊普

C·L·伊普 A·T·C·钱

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 程 泳

C07K 17/00G01N 33/48G01N 33/00G01N 24/00

G01N 33/53

权利要求书 7 页 说明书 25 页 附图 2 页

[54] 发明名称 肝细胞癌血清生物标记

[57] 摘要

某些生物标记和生物标记组合可用于在患者中鉴定肝细胞癌状态。利用这些生物标记和组合的诊断方法可以区分例如肝细胞癌和慢性肝病。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 鉴定个体中肝细胞癌状态的方法，包括对来自所述个体生物样品的蛋白质的诊断水平进行分析，所述蛋白质选自

(A) I-M1, I-M2, I-M3, I-M4, I-M5, I-M6, I-M7, I-M8, I-M9, I-M10, I-M11, I-M12, I-M13, I-M14, I-M15, I-M16, I-M17, I-M18, I-M19, I-M20, I-M21, I-M22, I-M23, I-M24, I-M25, I-M26, I-M27, I-M28, I-M29, I-M30, I-M31, I-M32, I-M33, I-M34, I-M35, I-M36, I-M37, I-M38, I-M39, I-M40, I-M41, I-M42, I-M43, I-M44, I-M45, I-M46, I-M47, I-M48, I-M49, I-M50, I-M51, I-M52, I-M53, I-M54, I-M55, I-M56, I-M57, I-M58, I-M59, I-M60, I-M61, I-M61, I-M62, I-M63, I-M64, I-M65, I-M66, I-M67, I-M68, I-M69, I-M70, I-M71, I-M72, I-M73, I-M74, I-M75, I-M76, I-M77, I-M79, I-M80, I-M81, I-M82, I-M83, I-M84, I-M85, I-M86, I-M87, I-M88, I-M89, I-M90, I-M91, I-M92, I-M93, I-M94, I-M95, I-M96, I-M97, I-M98, I-M99, I-M100

和/或

(B) W-M1, W-M2, W-M3, W-M4, W-M5, W-M6, W-M7, W-M8, W-M9, W-M10, W-M11, W-M12, W-M13, W-M14, W-M15, W-M16, W-M17, W-M18, W-M19, W-M20, W-M21, W-M22, W-M23, W-M24, W-M25, W-M26, W-M27, W-M28, W-M29, W-M30, W-M31, W-M32, W-M33, W-M34, W-M35, W-M36, W-M37, W-M38, W-M39, W-M40, W-M41, W-M42, W-M43, W-M44, W-M45, W-M46, W-M47, W-M48, W-M49, W-M50, W-M51, W-M52, W-M53, W-M54, W-M55, W-M56, W-M57, W-M58, W-M59, W-M60, W-M61, W-M61, W-M62, W-M63, W-M64, W-M65, W-M66, W-M67, W-M68, W-M69, W-M70, W-M71, W-M72, W-M73, W-M74, W-M75, W-M76, W-M77, W-M79, W-M80, W-M81, W-M82, W-M83, W-M84, W-M85, W-M86, W-M87, W-M88, W-M89, W-M90, W-M91, W-M92, W-M93, W-M94, W-M95, W-M96, W-M97, W-M98, W-M99, W-M100,

其中所述水平高于标准。

2. 权利要求 1 的鉴定患者肝细胞癌状态的方法，其中所述蛋白质选自

(A) I-M1, I-M3, I-M4, I-M5, I-M6, I-M7, I-M9, I-M11, I-M12, I-M13, I-M18, I-M19, I-M20, I-M21, I-M22, I-M23, I-M25, I-M26, I-M28, I-M32, I-M34, I-M36, I-M37, I-M41, I-M44, I-M46, I-M47, I-M52, I-M53, I-M64, I-M68, I-M69, I-M77, I-M79, I-M81, I-M84, I-M87, I-M88, I-M89, 和 I-M92

和/或

(B) W-M1, W-M2, W-M3, W-M4, W-M5, W-M7, W-M9, W-M10, W-M11, W-M12, W-M13, W-M14, W-M15, W-M16, W-M17, W-M18, W-M19, W-M20, W-M21, W-M22, W-M23, W-M25, W-M26, W-M27, W-M30, W-M31, W-M33, W-M34, W-M35, W-M36, W-M39, W-M40, W-M41, W-M43, W-M44, W-M46, W-M47, W-M48, W-M49, W-M50, W-M52, W-M53, W-M54, W-M55, W-M58, W-M60, W-M62, W-M63, W-M70, W-M71, W-M73, W-M76, W-M78, W-M84, W-M86, W-M88, W-M89, W-M90, W-M93, W-M95, W-M96, W-M98, 和 W-M100.

3. 权利要求 2 的方法, 其中所述蛋白质为 I-M 13、I-M18、I-M19、W-M2 或 W-M23。

4. 确定患者中肝细胞癌风险的方法, 包括

(A) 提供来自该患者的生物样品的质谱分析产生的图谱, 和

(B) 从该图谱提取数据, 并将此数据进行模式识别分析, 其中所述模式识别分析输入了至少一个选自下列的峰:

(i) I-M1, I-M3, I-M4, I-M5, I-M6, I-M7, I-M9, I-M11, I-M12, I-M13, I-M18, I-M19, I-M20, I-M21, I-M22, I-M23, I-M25, I-M26, I-M28, I-M32, I-M34, I-M36, I-M37, I-M41, I-M44, I-M46, I-M47, I-M52, I-M53, I-M64, I-M68, I-M69, I-M77, I-M79, I-M81, I-M84, I-M87, I-M88, I-M89, 和 I-M92,

和/或

(ii) W-M1, W-M2, W-M3, W-M4, W-M5, W-M7, W-M9, W-M10, W-M11, W-M12, W-M13, W-M14, W-M15, W-M16, W-M17, W-M18, W-M19, W-M20, W-M21, W-M22,

W-M23, W-M25, W-M26, W-M27, W-M30, W-M31,
 W-M33, W-M34, W-M35, W-M36, W-M39, W-M40,
 W-M41, W-M43, W-M44, W-M46, W-M47, W-M48,
 W-M49, W-M50, W-M52, W-M53, W-M54, W-M55,
 W-M58, W-M60, W-M62, W-M63, W-M70, W-M71,
 W-M73, W-M76, W-M78, W-M84, W-M86, W-M88,
 W-M89, W-M90, W-M93, W-M95, W-M96, W-M98, 和
 W-M100.

5. 权利要求 4 的方法, 其中所述模式识别输入了选自下列的一对峰:

(A) I-M13 和 I-M25, I-M13 和 I-M7, I-M25 和 I-M46, I-M37 和 I-M77, I-M5 和 I-M36, 和/或

(B) W-M14 和 W-M98, W-M21 和 W-M46, W-M11 和 W-M52, W-M16 和 W-M89, W-M1 和 W-M46, W-M21 和 W-M76, W-M11 和 W-M33, W-M13 和 W-M18, W-M2 和 W-M46, W-M33 和 W-M54, W-M2 和 W-M46, W-M16 和 W-M46, W-M11 和 W-M5.

6. 权利要求 4 的方法, 其中所述模式识别分析输入了选自下列的三峰:

(A) I-M1, I-M4 和 I-M36; I-M5, I-M7 和 I-M19; I-M7, I-M19 和 I-M46; I-M9, I-M34 和 I-M52; I-M7, I-M18 和 I-M47; I-M11, I-M13 和 I-M36; I-M9, I-M77 和 I-M84; 和 I-M18, I-M22 和 I-M79, 和/或

(B) W-M21, W-M22 和 W-M35; W-M7, W-M21 和 W-M46; W-M13, W-M14 和 W-M98; W-M14, W-M54 和 W-M70; W-M11, W-M33 和 W-M46; W-M17, W-M36 和 W-M98; W-M19, W-M21 和 W-M22; W-M14, W-M15, W-M54; W-M55, W-M58 和 W-M98; W-M11, W-M14 和 W-M98; W-M1, W-M33 和 W-M46; W-M40, W-M46 和 W-M49; W-M15, W-M21 和 W-M22; W-M14, W-M36 和 W-M98; W-M5, W-M11 和 W-M54; W-M14, W-M22 和 W-M25; W-M14, W-M58 和 W-M98; W-M5, W-M14 和 W-M89; W-M7, W-M14 和 W-M89; W-M14, W-M21 和 W-M98; W-M11, W-M58 和 W-M71;

W-M14, W-M25 和 W-M54; W-M14, W-M60 和 W-M89; W-M21, W-M46 和 W-M100.

7. 权利要求 4 的方法, 其中所述模式识别分析输入了选自下列的峰组合:

(A) I-M11, I-M13, I-M19 和 I-M89; I-M13, I-M19, I-M22 和 I-M26; I-M1, I-M5, I-M36 和 I-M41; I-M19, I-M33, I-M44 和 I-M46; I-M3, I-M18, I-M68 和 I-M81; I-M3, I-M12, I-M34 和 I-M81; I-M12, I-M13, I-M32 和 I-M37; I-M18, I-M44, I-M46 和 I-M79; I-M7, I-M13, I-M21 和 I-M23; I-M3, I-M18, I-M77 和 I-M92; I-M12, I-M13, I-M77 和 I-M87; I-M6, I-M13, I-M34 和 I-M81; I-M8, I-M19, I-M53, I-M64, I-M69; I-M4, I-M18, I-M28, I-M47 和 I-M88; 和 I-M1, I-M4, I-M18, I-M36, I-M41 和 I-M47, 和/或

(B) W-M25, W-M55, W-M62 和 W-M98; W-M7, W-M14, W-M17 和 W-M89; W-M17, W-M31, W-M93 和 W-M98; W-M11, W-M19, W-M46 和 W-M50; W-M4, W-M33, W-M55 和 W-M98; W-M5, W-M11, W-M36 和 W-M54; W-M16, W-M36, W-M43 和 W-M46; W-M11, W-M41, W-M54 和 W-M73; W-M5, W-M11, W-M52 和 W-M89; W-M4, W-M14, 58 和 W-M89; W-M2, W-M12, W-M14, W-M89; W-M5, W-M11, W-M20 和 W-M40; W-M21, W-M46, W-M70 和 W-M88; W-M21, W-M33, W-M34 和 W-M46; W-M17, W-M20, W-M40 和 W-M58; W-M17, W-M33, W-M52 和 W-M98; W-M3, W-M7, W-M21 和 W-M46; W-M10, W-M22, W-M30 和 W-M95; W-M1, W-M46, W-M54 和 W-M70; W-M11, W-M14, W-M25 和 W-M54; W-M11, W-M33, W-M46 和 W-M90; W-M11, W-M14, W-M54 和 W-M89; W-M7, W-M18, W-M21 和 W-M22; W-M17, W-M20, W-M52 和 W-M98; W-M2, W-M15, W-M19, W-M22 和 W-M55; W-M17, W-M19, W-M26, W-M47 和 W-M98; W-M9, W-M11, W-M27, W-M46 和 W-M78; W-M5, W-M11, W-M33, W-M46 和 W-M53; W-M2, W-M9, W-M15, W-M19 和 W-M89; W-M5, W-M11, W-M52,

W-M89 和 W-M96; W-M16, W-M25, W-M40, W-M52 和 W-M89;
 W-M14, W-M15, W-M21, W-M22 和 W-M89; W-M5, W-M13, W-M16,
 W-M20 和 W-M98; W-M9, W-M23, W-M26, W-M40 和 W-M89;
 W-M20, W-M27, W-M30, W-M35, W-M40 和 W-M70; W-M13, W-M26,
 W-M39, W-M44, W-M63 和 W-M98; W-M5, W-M13, W-M35, W-M39,
 W-M86 和 W-M89; 和 W-M3, W-M18, W-M21, W-M22, W-M48, 和
 W-M84.

8. 用于检测和诊断肝细胞癌的试剂盒, 包括

(A) 附于基质上的吸附剂, 其保留一个或者多个选自下列的生物标记:

(i) I-M1, I-M2, I-M3, I-M4, I-M5, I-M6, I-M7, I-M8, I-M9, I-M10, I-M11, I-M12, I-M13, I-M14, I-M15, I-M16, I-M17, I-M18, I-M19, I-M20, I-M21, I-M22, I-M23, I-M24, I-M25, I-M26, I-M27, I-M28, I-M29, I-M30, I-M31, I-M32, I-M33, I-M34, I-M35, I-M36, I-M37, I-M38, I-M39, I-M40, I-M41, I-M42, I-M43, I-M44, I-M45, I-M46, I-M47, I-M48, I-M49, I-M50, I-M51, I-M52, I-M53, I-M54, I-M55, I-M56, I-M57, I-M58, I-M59, I-M60, I-M61, I-M61, I-M62, I-M63, I-M64, I-M65, I-M66, I-M67, I-M68, I-M69, I-M70, I-M71, I-M72, I-M73, I-M74, I-M75, I-M76, I-M77, I-M79, I-M80, I-M81, I-M82, I-M83, I-M84, I-M85, I-M86, I-M87, I-M88, I-M89, I-M90, I-M91, I-M92, I-M93, I-M94, I-M95, I-M96, I-M97, I-M98, I-M99, I-M100

或

(ii) W-M1, W-M2, W-M3, W-M4, W-M5, W-M6, W-M7, W-M8, W-M9, W-M10, W-M11, W-M12, W-M13, W-M14, W-M15, W-M16, W-M17, W-M18, W-M19, W-M20, W-M21, W-M22, W-M23, W-M24, W-M25, W-M26, W-M27, W-M28, W-M29, W-M30, W-M31, W-M32, W-M33, W-M34, W-M35, W-M36, W-M37, W-M38, W-M39, W-M40, W-M41, W-M42, W-M43, W-M44, W-M45, W-M46, W-M47, W-M48, W-M49, W-M50, W-M51, W-M52, W-M53, W-M54, W-M55, W-M56,

W-M57, W-M58, W-M59, W-M60, W-M61, W-M61, W-M62, W-M63,
W-M64, W-M65, W-M66, W-M67, W-M68, W-M69, W-M70, W-M71,
W-M72, W-M73, W-M74, W-M75, W-M76, W-M77, W-M79, W-M80,
W-M81, W-M82, W-M83, W-M84, W-M85, W-M86, W-M87, W-M88,
W-M89, W-M90, W-M91, W-M92, W-M93, W-M94, W-M95, W-M96,
W-M97, W-M98, W-M99, W-M100,

(B) 检测所述生物标记的说明书, 教导了将样品与所述吸附剂接触并检测被所述吸附剂保留的生物标记。

9. 权利要求 8 的试剂盒, 进一步包括清洗溶液或者制备清洗溶液的说明书。

10. 权利要求 8 的试剂盒, 其中所述基质为 SELDI 探针, 该探针包括 (i) 通过螯合作用吸附过渡金属离子的官能团, 或 (ii) 允许阳离子交换的官能团。

11. 用于鉴定个体肝细胞癌状态的软件, 包括对提取自图谱的数据进行分析的算法, 所述图谱由取自该个体的生物样品经质谱分析产生, 其中所述的数据与一个或多个选自下列的生物标记有关:

(ii) I-M1, I-M2, I-M3, I-M4, I-M5, I-M6, I-M7, I-M8, I-M9, I-M10,
I-M11, I-M12, I-M13, I-M14, I-M15, I-M16, I-M17, I-M18, I-M19, I-M20,
I-M21, I-M22, I-M23, I-M24, I-M25, I-M26, I-M27, I-M28, I-M29, I-M30,
I-M31, I-M32, I-M33, I-M34, I-M35, I-M36, I-M37, I-M38, I-M39, I-M40,
I-M41, I-M42, I-M43, I-M44, I-M45, I-M46, I-M47, I-M48, I-M49, I-M50,
I-M51, I-M52, I-M53, I-M54, I-M55, I-M56, I-M57, I-M58, I-M59, I-M60,
I-M61, I-M61, I-M62, I-M63, I-M64, I-M65, I-M66, I-M67, I-M68, I-M69,
I-M70, I-M71, I-M72, I-M73, I-M74, I-M75, I-M76, I-M77, I-M79, I-M80,
I-M81, I-M82, I-M83, I-M84, I-M85, I-M86, I-M87, I-M88, I-M89, I-M90,
I-M91, I-M92, I-M93, I-M94, I-M95, I-M96, I-M97, I-M98, I-M99, I-M100

或

(ii) W-M1, W-M2, W-M3, W-M4, W-M5, W-M6, W-M7, W-M8, W-M9, W-M10, W-M11, W-M12, W-M13, W-M14, W-M15, W-M16, W-M17, W-M18, W-M19, W-M20, W-M21, W-M22, W-M23, W-M24, W-M25, W-M26, W-M27, W-M28, W-M29, W-M30, W-M31, W-M32, W-M33, W-M34, W-M35, W-M36, W-M37, W-M38, W-M39, W-M40, W-M41, W-M42, W-M43, W-M44, W-M45, W-M46, W-M47, W-M48, W-M49, W-M50, W-M51, W-M52, W-M53, W-M54, W-M55, W-M56, W-M57, W-M58, W-M59, W-M60, W-M61, W-M61, W-M62, W-M63, W-M64, W-M65, W-M66, W-M67, W-M68, W-M69, W-M70, W-M71, W-M72, W-M73, W-M74, W-M75, W-M76, W-M77, W-M79, W-M80, W-M81, W-M82, W-M83, W-M84, W-M85, W-M86, W-M87, W-M88, W-M89, W-M90, W-M91, W-M92, W-M93, W-M94, W-M95, W-M96, W-M97, W-M98, W-M99, W-M100.

12. 权利要求 11 的软件，其中所述算法执行模式识别分析，所述模式识别分析输入了与至少一个所述生物标记有关的数据。

13. 权利要求 12 的软件，其中所述算法包括分类树分析，所述分析输入了与至少一个所述生物标记有关的数据。

14. 权利要求 12 的软件，其中所述算法包括神经网络分析，所述分析输入了与至少一个所述生物标记有关的数据。

肝细胞癌血清生物标记

本申请基于美国临时申请 No. 60/370,239, 该申请于 2002 年 4 月 8 日提出, 此处引用其作为参考。

发明背景

本发明一般涉及肝细胞癌 (HCC) 血清生物标记领域。更确切的说, 本发明涉及能够将 HCC 与其他病症 (比如慢性肝脏疾病和肝硬化) 区分开来的血清生物标记。

HCC 位居全球最常见癌症的第八位, 是男性最常见的恶性肿瘤, 发病率为每年一百万新发病例。该疾病每年导致约一百万人死亡, 死亡主要发生在不发达和发展中国家。在美国, 5 年 (1992-1996) 总生存率为 5% [El-Serag 等, *Hepatology* 33: 62-65 (2001)]。与病毒 (例如乙型肝炎病毒, 丙型肝炎病毒) 感染、酒精性肝损伤和 aflatoxin B 暴露有关的肝脏功能紊乱通常导致恶变。事实上, 全世界 80% 的 HCC 在病因学角度与乙型肝炎病毒 (HBV) 有关, 据估计, 在美国非亚洲裔 HCC 病例中, 每 4 例 HCC 中有 1 例与 HBV 有关。目前, 尚无标准治疗, 预后不佳。

传统的 HCC 生物标记是甲胎蛋白 (AFP)。

然而, 慢性肝病患者也具有升高的血清 AFP 水平。由于 HCC 一般出现在同时患有慢性肝脏疾病的患者身上, 因此单独的 AFP 水平不是理想的生物标记, 而且其癌症预测值仅在 40% 范围内。对 AFP 同种型的定量分析能够将诊断值增加到 75%, 但是非常费时、费力。另外, 约有 20% 的 HCC 患者 AFP 水平非常低, 低于 20ng/ml。p53 蛋白质和各种醛脱氢酶同种型都曾被作为可能的标记来检测, 然而, 没有一个具有与 AFP 同样高的预测值。

活组织检查可以用来诊断 HCC, 但是由于这是一个侵入性手段而不尽人意。其他用作诊断 HCC 的方法包括超声和计算机 X 射线断层摄影

(CT)扫描。小于 2cm 的 HCC 结节中，仅有 25 - 28% 可以在动脉造影过程中，经超声和 CT 扫描检出。

十分需要有一个生物标记或者生物标记组合，其不仅能够鉴定 HCC，而且还可以将 HCC 与慢性肝脏疾病 (CLD) 和其他病症区分开来。然而，有关 HCC 诊断的文献尚未公开这样的生物标记或生物标记的组合。

发明概要

依照本发明，生物标记及其组合用于鉴定 HCC。该方法成功的将 HCC 与 CLD 区分开来。在一个实施方案中，用于确诊某个体肝细胞癌状态的方法包含分析来自该个体的生物样品中蛋白质的诊断水平，该蛋白质选自 (A) 组

I-M1, I-M2, I-M3, I-M4, I-M5, I-M6, I-M7, I-M8, I-M9, I-M10,
I-M11, I-M12, I-M13, I-M14, I-M15, I-M16, I-M17, I-M18, I-M19, I-M20,
I-M21, I-M22, I-M23, I-M24, I-M25, I-M26, I-M27, I-M28, I-M29, I-M30,
I-M31, I-M32, I-M33, I-M34, I-M35, I-M36, I-M37, I-M38, I-M39, I-M40,
I-M41, I-M42, I-M43, I-M44, I-M45, I-M46, I-M47, I-M48, I-M49, I-M50,
I-M51, I-M52, I-M53, I-M54, I-M55, I-M56, I-M57, I-M58, I-M59, I-M60,
I-M61, I-M61, I-M62, I-M63, I-M64, I-M65, I-M66, I-M67, I-M68, I-M69,
I-M70, I-M71, I-M72, I-M73, I-M74, I-M75, I-M76, I-M77, I-M79, I-M80,
I-M81, I-M82, I-M83, I-M84, I-M85, I-M86, I-M87, I-M88, I-M89, I-M90,
I-M91, I-M92, I-M93, I-M94, I-M95, I-M96, I-M97, I-M98, I-M99, I-M100

和/或 (B) 组

W-M1, W-M2, W-M3, W-M4, W-M5, W-M6, W-M7, W-M8, W-M9,
W-M10, W-M11, W-M12, W-M13, W-M14, W-M15, W-M16, W-M17,
W-M18, W-M19, W-M20, W-M21, W-M22, W-M23, W-M24, W-M25,
W-M26, W-M27, W-M28, W-M29, W-M30, W-M31, W-M32, W-M33,
W-M34, W-M35, W-M36, W-M37, W-M38, W-M39, W-M40, W-M41,
W-M42, W-M43, W-M44, W-M45, W-M46, W-M47, W-M48, W-M49,
W-M50, W-M51, W-M52, W-M53, W-M54, W-M55, W-M56, W-M57,
W-M58, W-M59, W-M60, W-M61, W-M61, W-M62, W-M63, W-M64,
W-M65, W-M66, W-M67, W-M68, W-M69, W-M70, W-M71, W-M72,
W-M73, W-M74, W-M75, W-M76, W-M77, W-M79, W-M80, W-M81,

W-M82, W-M83, W-M84, W-M85, W-M86, W-M87, W-M88, W-M89,
W-M90, W-M91, W-M92, W-M93, W-M94, W-M95, W-M96, W-M97,
W-M98, W-M99, W-M100,

其中该生物标记在 HCC 个体和 CLD 个体中呈现差异。

优选地, 该蛋白质选自

(A) I-M1, I-M3, I-M4, I-M5, I-M6, I-M7, I-M9, I-M11, I-M12, I-M13,
I-M18, I-M19, I-M20, I-M21, I-M22, I-M23, I-M25, I-M26, I-M28, I-M32,
I-M34, I-M36, I-M37, I-M41, I-M44, I-M46, I-M47, I-M52, I-M53, I-M64,
I-M68, I-M69, I-M77, I-M79, I-M81, I-M84, I-M87, I-M88, I-M89, 和
I-M92

和/或

(B) W-M1, W-M2, W-M3, W-M4, W-M5, W-M7, W-M9, W-M10,
W-M11, W-M12, W-M13, W-M14, W-M15, W-M16, W-M17, W-M18,
W-M19, W-M20, W-M21, W-M22, W-M23, W-M25, W-M26, W-M27,
W-M30, W-M31, W-M33, W-M34, W-M35, W-M36, W-M39, W-M40,
W-M41, W-M43, W-M44, W-M46, W-M47, W-M48, W-M49, W-M50,
W-M52, W-M53, W-M54, W-M55, W-M58, W-M60, W-M62, W-M63,
W-M70, W-M71, W-M73, W-M76, W-M78, W-M84, W-M86, W-M88,
W-M89, W-M90, W-M93, W-M95, W-M96, W-M98, 和 W-M100.

自身能够鉴定 HCC 的生物标记包括 I-M 13、I-M 18、I-M 19、W-M2
和 W-M23 蛋白质生物标记。

本发明还提供一种确定患者罹患肝细胞癌风险的方法, 该方法包
括 (A) 对上述病人生物学样品进行质谱分析从而提供图谱, 所述质谱
分析包括表征 (profiling) 在化学衍生化的亲和表面上的特性, 和 (B)
将所述图谱进行输入 (keyed) 了至少一个峰的模式识别分析, 此峰选
自

(i) I-M1, I-M3, I-M4, I-M5, I-M6, I-M7, I-M9, I-M11, I-M12, I-M13, I-M18, I-M19, I-M20, I-M21, I-M22, I-M23, I-M25, I-M26, I-M28, I-M32, I-M34, I-M36, I-M37, I-M41, I-M44, I-M46, I-M47, I-M52, I-M53, I-M64, I-M68, I-M69, I-M77, I-M79, I-M81, I-M84, I-M87, I-M88, I-M89, 和 I-M92
和/或

(ii) W-M1, W-M2, W-M3, W-M4, W-M5, W-M7, W-M9, W-M10, W-M11, W-M12, W-M13, W-M14, W-M15, W-M16, W-M17, W-M18, W-M19, W-M20, W-M21, W-M22, W-M23, W-M25, W-M26, W-M27, W-M30, W-M31, W-M33, W-M34, W-M35, W-M36, W-M39, W-M40, W-M41, W-M43, W-M44, W-M46, W-M47, W-M48, W-M49, W-M50, W-M52, W-M53, W-M54, W-M55, W-M58, W-M60, W-M62, W-M63, W-M70, W-M71, W-M73, W-M76, W-M78, W-M84, W-M86, W-M88, W-M89, W-M90, W-M93, W-M95, W-M96, W-M98, 和 W-M100.

模式识别分析可以例如输入了一对峰，选自

(A) I-M13 和 I-M25, I-M13 和 I-M7, I-M25 和 I-M46, I-M37 和 I-M77, I-M5 和 I-M36

和/或

(B) W-M14 和 W-M98, W-M21 和 W-M46, W-M11 和 W-M52, W-M16 和 W-M89, W-M1 和 W-M46, W-M21 和 W-M76, W-M11 和 W-M33, W-M13 和 W-M18, W-M2 和 W-M46, W-M33 和 W-M54, W-M2 和 W-M46, W-M16 和 W-M46, W-M11 和 W-M5.

作为选择，模式识别分析可以输入 3 个峰，选自

(A) I-M1, I-M4 和 I-M36; I-M5, I-M7 和 I-M19; I-M7, I-M19 和 I-M46; I-M9, I-M34 和 I-M52; I-M7, I-M18 和 I-M47; I-M11, I-M13 和 I-M36; I-M9, I-M77 和 I-M84; 和 I-M18, I-M22 和 I-M79

和/或

(B) W-M21, W-M22 和 W-M35; W-M7, W-M21 和 W-M46; W-M13, W-M14 和 W-M98; W-M14, W-M54 和 W-M70; W-M11, W-M33 和 W-M46; W-M17, W-M36 和 W-M98; W-M19, W-M21 和 W-M22; W-M14, W-M15, W-M54; W-M55, W-M58 和 W-M98; W-M11, W-M14 和 W-M98; W-M1, W-M33 和 W-M46; W-M40, W-M46 和 W-M49; W-M15, W-M21 和 W-M22; W-M14, W-M36 和 W-M98; W-M5, W-M11 和 W-M54; W-M14, W-M22 和 W-M25; W-M14, W-M58 和 W-M98; W-M5, W-M14 和 W-M89; W-M7, W-M14 和 W-M89; W-M14, W-M21 和 W-M98; W-M11, W-M58 和 W-M71; W-M14, W-M25 和 W-M54; W-M14, W-M60 和 W-M89; W-M21, W-M46 和 W-M100.

在其他实施方案中，模式识别分析可以输入由三个以上峰组成的组合，尤其是由 4 个、5 个或 6 个峰组成的组合，该组合选自

(A) I-M11, I-M13, I-M19 和 I-M89; I-M13, I-M19, I-M22 和 I-M26; I-M1, I-M5, I-M36 和 I-M41; I-M19, I-M33, I-M44 和 I-M46; I-M3, I-M18, I-M68 和 I-M81; I-M3, I-M12, I-M34 和 I-M81; I-M12, I-M13, I-M32 和 I-M37; I-M18, I-M44, I-M46 和 I-M79; I-M7, I-M13, I-M21 和 I-M23; I-M3, I-M18, I-M77 和 I-M92; I-M12, I-M13, I-M77 和 I-M87; I-M6, I-M13, I-M34 和 I-M81; I-M8, I-M19, I-M53, I-M64, I-M69; I-M4, I-M18, I-M28, I-M47 和 I-M88; 和 I-M1, I-M4, I-M18, I-M36, I-M41 和 I-M47

和/或

(B) W-M25, W-M55, W-M62 和 W-M98; W-M7, W-M14, W-M17 和 W-M89; W-M17, W-M31, W-M93 和 W-M98; W-M11, W-M19, W-M46 和 W-M50; W-M4, W-M33, W-M55 和 W-M98; W-M5, W-M11, W-M36 和 W-M54; W-M16, W-M36, W-M43 和 W-M46; W-M11, W-M41, W-M54 和 W-M73; W-M5, W-M11, W-M52 和 W-M89; W-M4, W-M14, 58 和 W-M89; W-M2, W-M12, W-M14, W-M89; W-M5,

W-M11, W-M20 和 W-M40; W-M21, W-M46, W-M70 和 W-M88;
W-M21, W-M33, W-M34 和 W-M46; W-M17, W-M20, W-M40 和
W-M58; W-M17, W-M33, W-M52 和 W-M98; W-M3, W-M7, W-M21
和 W-M46; W-M10, W-M22, W-M30 和 W-M95; W-M1, W-M46,
W-M54 和 W-M70; W-M11, W-M14, W-M25 和 W-M54; W-M11,
W-M33, W-M46 和 W-M90; W-M11, W-M14, W-M54 和 W-M89;
W-M7, W-M18, W-M21 和 W-M22; W-M17, W-M20, W-M52 和
W-M98; W-M2, W-M15, W-M19, W-M22 和 W-M55; W-M17, W-M19,
W-M26, W-M47 和 W-M98; W-M9, W-M11, W-M27, W-M46 和
W-M78; W-M5, W-M11, W-M33, W-M46 和 W-M53; W-M2, W-M9,
W-M15, W-M19 和 W-M89; W-M5, W-M11, W-M52, W-M89 和
W-M96; W-M16, W-M25, W-M40, W-M52 和 W-M89; W-M14, W-M15,
W-M21, W-M22 和 W-M89; W-M5, W-M13, W-M16, W-M20 和
W-M98; W-M9, W-M23, W-M26, W-M40 和 W-M89; W-M20, W-M27,
W-M30, W-M35, W-M40 和 W-M70; W-M13, W-M26, W-M39, W-M44,
W-M63 和 W-M98; W-M5, W-M13, W-M35, W-M39, W-M86 和
W-M89; 和 W-M3, W-M18, W-M21, W-M22, W-M48, 和 W-M84.

在每种情况中，生物标记在 HCC 个体和 CLD 个体中呈现差异。

本发明还涉及用于检测和诊断 HCC 的试剂盒。

本发明中的试剂盒包括，例如，(i) 吸附于基质上的吸附剂，具有图 1 或图 2 中一种或多种生物标记，和 (ii) 检测生物标记的说明书，其教导了将样品与吸附剂接触来检测生物并检测由吸附剂保留的生物标记。本发明的试剂盒可以更进一步包括清洗溶液和/或制备清洗溶液的说明书。

本发明还提供用于鉴定个体肝细胞癌状态的软件，包括对取自图谱的数据进行分析的算法，所述图谱由对个体生物学样品作质谱分析产生，其中所述数据与一个或多个选自 (i) 组

I-M1, I-M2, I-M3, I-M4, I-M5, I-M6, I-M7, I-M8, I-M9, I-M10,
 I-M11, I-M12, I-M13, I-M14, I-M15, I-M16, I-M17, I-M18, I-M19, I-M20,
 I-M21, I-M22, I-M23, I-M24, I-M25, I-M26, I-M27, I-M28, I-M29, I-M30,
 I-M31, I-M32, I-M33, I-M34, I-M35, I-M36, I-M37, I-M38, I-M39, I-M40,
 I-M41, I-M42, I-M43, I-M44, I-M45, I-M46, I-M47, I-M48, I-M49, I-M50,
 I-M51, I-M52, I-M53, I-M54, I-M55, I-M56, I-M57, I-M58, I-M59, I-M60,
 I-M61, I-M61, I-M62, I-M63, I-M64, I-M65, I-M66, I-M67, I-M68, I-M69,
 I-M70, I-M71, I-M72, I-M73, I-M74, I-M75, I-M76, I-M77, I-M79, I-M80,
 I-M81, I-M82, I-M83, I-M84, I-M85, I-M86, I-M87, I-M88, I-M89, I-M90,
 I-M91, I-M92, I-M93, I-M94, I-M95, I-M96, I-M97, I-M98, I-M99, I-M100
 或选自 (ii) 组

W-M1, W-M2, W-M3, W-M4, W-M5, W-M6, W-M7, W-M8, W-M9,
 W-M10, W-M11, W-M12, W-M13, W-M14, W-M15, W-M16, W-M17,
 W-M18, W-M19, W-M20, W-M21, W-M22, W-M23, W-M24, W-M25,
 W-M26, W-M27, W-M28, W-M29, W-M30, W-M31, W-M32, W-M33,
 W-M34, W-M35, W-M36, W-M37, W-M38, W-M39, W-M40, W-M41,
 W-M42, W-M43, W-M44, W-M45, W-M46, W-M47, W-M48, W-M49,
 W-M50, W-M51, W-M52, W-M53, W-M54, W-M55, W-M56, W-M57,
 W-M58, W-M59, W-M60, W-M61, W-M61, W-M62, W-M63, W-M64,
 W-M65, W-M66, W-M67, W-M68, W-M69, W-M70, W-M71, W-M72,
 W-M73, W-M74, W-M75, W-M76, W-M77, W-M79, W-M80, W-M81,
 W-M82, W-M83, W-M84, W-M85, W-M86, W-M87, W-M88, W-M89,
 W-M90, W-M91, W-M92, W-M93, W-M94, W-M95, W-M96, W-M97,
 W-M98, W-M99, W-M100,

的生物标记有关。

该算法可以执行输入了与至少一个生物标记有关的数据的模式识别分析。作为选择，该算法可以包括输入了与至少一个生物标记有关的数据的分类树分析。在另一个实施方案中，该算法包括输入了与至少一个生物标记有关的数据的人工神经网络分析。

图表简要描述

图 1 为使用 IMAC3Cu ProteinChip[®]array 形式鉴定的前 100 个生

物标记列表，按照 student t-检验中的 p 值排序。

图 2 为使用 WCX ProteinChip®array 形式鉴定的前 100 个生物标记列表，按照 student t-检验中的 p 值排序。

优选方案详细描述

根据本发明，一系列与 HCC 有关的生物标记被发现。在本文中，生物标记为有机生物分子，尤其是与 CLD 个体相比，在来自 HCC 个体的生物样品中呈现差异的多肽或者蛋白质。与来自未患 HCC 的 CLD 患者的生物样品相比，如果来自 HCC 患者的生物样品中，某生物标记存在水平升高或降低，则该标记在取自 HCC 和 CLD 患者的样品中呈现差异。更特别的是，生物标记是以通过气相离子光谱分析测定的表观分子量为特征的多肽，并且与 CLD 个体相比，其水平在 HCC 个体样品中升高或者降低。如果生物标记在一个样品中的含量与其在另一个样品中的含量具有统计学显著性差异，则该生物标记在两个样品中呈现差异。

本发明中的生物标记可用于评定个体的肝细胞癌状态。在本文中“肝细胞癌状态”包括：出现或未出现疾病、发展疾病的风险、疾病阶段和疾病治疗效果。可在此状态基础上指导进一步的程序，包括诊断性检验或治疗性程序或方案，例如内窥镜检查、活组织检查、外科手术、化学治疗、免疫治疗和放射治疗。尤其特别的是，本发明中的生物标记可以鉴定 HCC，并且成功的将其与 CLD 区分。在某些例子中，单个生物标记即可鉴定 HCC，预测成功率至少达到 85%，然而，在其他例子中，使用生物标记组合以获得不低于 85% 的预测准确率。因此，生物标记及其组合可以用于确定患者 HCC 风险。

在某些例子中，单个生物标记鉴定 HCC 的灵敏度和特异性至少达到 85%，然而，在其他例子中，使用生物标记组合或多个生物标记以获得不低于 85% 的灵敏度和特异性。因此，生物标记及其组合可以用于确定个体或者患者的肝细胞癌状态。

依照本发明，生物标记出现在血清中。然而，依照本发明，使用的生物学样品不必是血清。因此，尽管优选血清样品，用于确定肝细胞癌状态的生物学样品可以是血清、血浆或全血样品。

所有生物标记以分子量为特征，图 1 和图 2 提供了本发明中生物标记列表。这些图表分别列出使用此处描述的 Cu(II) IMAC3 和 WCX2 ProteinChip®阵列方案，用 p 值进行统计学测定的前 100 个生物标记。在每个图中，第一列数据是生物标记的标识符。因此，图 1 中第一行涉及生物标记 I-M 1，第二行涉及生物标记 I-M 2，依此类推（“I-M”表示生物标记使用 IMAC 芯片鉴定）。相似的，图 2 中第一行涉及生物标记 W-M 1，第二行涉及生物标记 W-M 2，依此类推（“W-M”表示生物标记使用 WCX2 芯片鉴定）。图中第二列数据是生物标记的道尔顿分子量，用气相离子光谱分析测定。图中最后一列字母表示此处描述的方案中生物标记洗脱的级分；即，“A”洗脱的生物标记是第一级分，“B”洗脱的生物标记是第二级分，依此类推。

生物标记洗脱的各个级分都与其等电点 (pI) 相关，在较高 pH 洗脱的生物标记具有较高的 pI，在较低 pH 洗脱的生物标记具有较低的 pI。

在本说明书中，对于该发明给定的生物标记，用质量和亲和力表征该生物标记，使得每个人都能够按照此处的教导得到该生物标记并对其进行测量。如果需要，任何一个生物标记都可以进行测序以得到其氨基酸序列，但在本发明实践过程中，实施这一步骤不是必需的。

例如，某生物标记能用许多酶（如胰蛋白酶和 V8 蛋白酶）作肽图谱，消化片段的分子量可以用来进行数据库检索，检索出与各种酶产生的消化片段分子量一致的序列。作为选择，如果该生物标记不在已知数据库内，可以以其 N 末端氨基酸序列为基础制作简并探针，在由最初检测到此生物标记的样品所制作的基因文库或 cDNA 文库中，使用该简并探针进行筛查。对阳性克隆进行鉴定和扩增，并使用广为人知的方法对阳性克隆的重组序列进行亚克隆。最后，蛋白质生物标记可以使用蛋白质梯度测序法 (protein ladder sequencing) 进行测序。将分子片段化后，把得到的片段进行酶切，或者使用其他方法，顺次去除片段末端的单个氨基酸，从而得到蛋白质梯度。然后使用质谱对梯度进行分析，通过梯度片段之间的质量差鉴定从分子末端去除的氨基酸。

依照本发明，血清生物标记是通过比较新诊断的 HCC 和 CLD 两组

个体血清样品的质量图谱而确定的。

个体依照标准化临床标准诊断。HCC 个体通过组织学证实，CLD 个体被采集血清后，对各种 HCC 体征随访至少 18 个月以排除无症状 HCC 个体。

采集各组个体的血清，使用 Q Ceramic HyperDF 离子交换树脂 (Biosepra, Ciperger Biosystems, Inc.) 进行分级，血清按照不同的洗脱 pH 被分为 6 个级分。A 级分包括直流物 (flow through) 加上 pH9 的洗脱物，B 级分包括 pH7 的洗脱物，C 级分包括 pH5 的洗脱物，D 级分包括 pH4 的洗脱物，E 级分包括 pH3 的洗脱物，F 级分包括异丙醇/乙腈 TFA 洗脱物。

各级分都被稀释并应用于 Cu(II) (IMAC3) 或 WCX2 ProteinChip® 阵列。这些芯片阵列都由 Ciperger Biosystems, Inc. (Fremont, CA) 制造。

Cu(II) IMAC3 是“固定金属亲和捕获 (immobilized metal affinity-capture)”芯片，其次氨基三乙酸表面具有高度的铜结合能力，从而对具有金属结合残基的蛋白质进行亲和捕获。

咪唑可以用在结合和清洗溶液当中，来缓和蛋白质结合，包括非特异性蛋白质结合。在清洗溶液中增加咪唑浓度，可减少靶蛋白结合。这是通过使用核黄素 (0.02wt%) 为光敏引发剂，将 5-甲基酰氨基-2-(N, N-二羧甲基氨基) 戊酸 (7.5wt%) 和 N, N'-亚甲基-双叉丙烯酰胺 (0.4wt%) 进行光聚合所致。将单体溶液置于芯片基质上，经照射进行光聚合，芯片遂对 Cu(II) 具有活性。

WCX2 是弱阳离子交换芯片，具有结合带正电荷蛋白质的羧酸表面。WCX2 表面带负电荷的羧酸基团与靶蛋白暴露的正电荷相互作用。增加清洗缓冲液的盐浓度或 pH 将降低靶蛋白结合。

洗脱级分加至芯片后，孵育芯片使洗脱液中的多肽通过亲和相互作用与芯片上的位点结合。孵育后，清洗每个芯片阵列以去除非特异性结合多肽以及缓冲液杂质。

随后，芯片经过干燥，加以能量吸收分子或基质以便于在质谱仪

中解吸附和离子化。

在质谱仪中，保留的多肽在 ProteinChip® Reader 中经激光解吸附和离子化从芯片阵列上洗脱，ProteinChip® Reader 整合有 ProteinChip® 软件和个人电脑，对捕获在芯片阵列上的蛋白质进行分析。ProteinChip® Reader 的离子光学和激光光学技术可检测从低于 1000 Da 的小肽到高于 300 KDa 的蛋白质，并以飞行时间为基础计算质量。飞行时间 (TOF) 质谱检测离子化多肽并精确测量其质量。

对从各组获得的质量图谱进行散点分析 (scatter plot analysis)，来消除组间差异 (run-to-run variation)。将在 HCC 和 CLD 中具有相同模式的散点图上的蛋白质簇作为潜在生物标记消除，即在两种病症中都升高或降低的蛋白质簇。对剩余多肽，要进一步分析它们精确区分 HCC 和 CLD 的能力。使用 student t-test 对 HCC 和 CLD 组散点中每个蛋白质簇进行比较，选择在两组间具有显著性差异 ($p < 0.001$) 的蛋白质簇。

由于分子量得自散点分析，以及质谱仪对分子量分辨能力的限制，图 1 和图 2 中给出的“绝对”分子量值实际上代表近似分子量。因此，生物标记的给定分子量应该解释为质量范围的中点。图中所给出的“绝对”值的变化范围不大于 $\pm 0.15\%$ (I-M1 为 8840 到 8867)，通常不多于 $\pm 0.10\%$ (I-M1 为 8844 到 8863)，往往低至 $\pm 0.05\%$ (I-M1 为 8850 到 8858 Da)。

在备选实施方案中，使用一种被称为“微阵列显著分析” (Significant Analysis of Microarray, SAM) 的蛋白质滤除方法来鉴定潜在的生物标记。该蛋白质滤除方法执行的是原本为 cDNA/寡核苷酸微阵列分析而开发的 SAM 算法。Tusher 等, “Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response”, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 98: 5116-21 (2001)。在分组鉴定的情况下，使用 SAM 比较肿瘤组 (40 例 HCC 病例) 和对照组 (20 例 AFP $< 500\text{ng/ml}$ 的 CLD 病例) 之间标准化的 \log_{10} 蛋白质组数据，并且确定在中值假显著值 (median false significant value) < 0.000005 时

具有显著性差异的蛋白质组特征。对照组定义为“1”，肿瘤组定义为“2”。选择“两类未匹配数据”为数据类型。执行总共1000次置换。

在血清样品中总共发现2384个蛋白质组特征：使用IMAC3 copper ProteinChip Array发现了1087个，使用WCX2 ProteinChip Array发现了1297个。适用于蛋白质滤除法的SAM用来搜索在HCC和CLD病例间具有显著性差异的血清蛋白质/多肽。设定中值假显著值 < 0.000005 ，79个蛋白质组特征被确认为在HCC血清中显著性升高，160个蛋白质组特征显著性降低。因此，总共发现239个潜在的鉴定HCC的血清学标记。表1列出显著性升高和显著性降低的各自前5个蛋白质组特征。

表1 用于区分HCC和CLD的前五个显著高的蛋白质组特征和前五个显著低的蛋白质组特征

蛋白质组特征 (M/Z 值)	所用的蛋白质 芯片阵列	阴离子交换 级分编号	HCC 病例的 平均强度 (相对于 CLD 病例)	p-值
8944 I-M38	IMAC3 铜	6	2	2×10^{-9}
4568 I-M25	IMAC3 铜	2	1.8	1×10^{-7}
8930 I-M4	IMAC3 铜	2	1.6	8×10^{-8}
9117 I-M21	IMAC3 铜	1	1.6	1×10^{-7}
9327 I-M65	IMAC3 铜	1	1.6	1×10^{-6}
5175 W-M26	WCX2	2	0.7	2×10^{-5}
14042 I-M56	IMAC3 铜	2-6	0.6	1×10^{-7}
14044 W-M59	WCX2	2-6	0.5	1×10^{-5}
47434 I-M18	IMAC3 铜	3	0.5	5×10^{-5}
8811 W-M14	WCX2	5	0.4	2×10^{-5}

使用两种方法来测定是否一个潜在的生物标记对于评定 HCC 具有预测价值。在第一种途径中，采用 Biomarker Pattern Software[®] (Ciphergen Biosystems, Fremont, CA) 来测定是否一个潜在的生物标记对于评定肝细胞癌具有预测价值。Biomarker Pattern Software[®] 实施一个混杂的多变量分析程序，从 SELDI 蛋白质图谱中识别隐藏的相关关系和模式。

第二种方法使用人工神经网络 (ANN) 分析。也就是说，开发包括差异蛋白质组特征的 ANN 模型，计算区分 HCC 和 CLD 的诊断分值。ANN 算法采用人工智能来进行分类、模式识别和预测，如 Poon 等, *Oncology* 61: 275-83 (2001) 和 Xu 等, *Cancer Res.* 62: 3493-7 (2002) 中所描述。ANN 模型由组织成层的处理原件 (神经元) 组成。从训练数据组中，ANN 模型能够“学习”输入变量与结果之间的交联模式，并且将这种模式应用于新的案例中。使用 EasyNN (version 8.1, Stephen Wolstenholme, Cheshire, UK) 开发 ANN 模式。

发展方法为前馈型，网络使用 back-propagation 进行训练。学习速率和要素都由软件自动优化。ANN 包括 3 层，一个输入层、一个隐蔽层和一个输出层。在中间隐蔽层有 7 个节点。

用作 ANN 模型发展的输入变量是显著性蛋白质组特征的相对水平，而输出变量则是每个病例的诊断分值 (范围 0-1.0000)。

在训练 ANN 模型过程中，对于 CLD 病例和 HCC 病例，诊断分值分别定义为 0.0000 和 1.0000。

随着 ANN 模型的发展，实行 10 倍交叉确认 (10-fold cross validation) 计算每个 HCC 病例和 CLD 病例的 ANN 诊断分值。

交叉确认分析 (Cross validation analysis) 显示，由数据组训练而来的 ANNs 的灵敏度和精确度分别为 92.5% 和 90%。

此外，ANNs 将所有 AFP 未确认的 HCC 病例分类为 AFP 水平低于 500ng/mL。另外，一个 AFP 为 903 ng/mL 的预先未知的 CLD 病例，三个预先未知的分别收集于 AFP > 500ng/mL 的 HCC 病例、AFP < 500ng/mL 的 HCC 病例、以及 CLD 病例的血清样品，都被 ANNs 正确分类。从由 WCX2

芯片确认的生物标记也得到相似结果。通过计算在不同 ANN 诊断分值截取值处的用于区分 HCC 病例和 CLD 病例的测试的灵敏性和特异性, 构建接收器 - 算子特征 (Receiver-operator characteristic) (ROC) 曲线。

HCC 病例的诊断分值 (0.8985 ± 0.2689) 显著高于 ($p < 0.0005$, Mann-Whitney test) CLD 病例诊断分值 (0.1647 ± 0.3091)。ROC 曲线分析显示, 无论血清 AFP 水平如何, ANN 诊断分值都可用于区别 HCC 和 CLD 病例。对于所有病例, ROC 曲线下面积为 0.934 (95% CI: $0.871-0.996$, $p < 0.0005$), 然而对于具有非诊断性血清 AFP 水平 (< 500 ng/mL) 的病例, 该区域面积为 0.966 (95% CI: $0.917-1.015$, $p < 0.0005$)。ANN 诊断分值截取值为 0.5000 时, 灵敏性和特异性分别为 93% (40 个病例中 37 个, SE 为 4%) 和 90% (20 个对照病例中 18 个, SE 为 7%)。对于具有非诊断性血清 AFP 水平的 HCC 病例, 95% HCC 病例 (22 个病例中 21 个, SE 为 5%) 被正确分类。

作为选择, 使用分类树确认具有最高预测价值的生物标记和生物标记组合。在这种方法中, 使用由 MathSoft, Inc. (Cambridge, MA) 销售的统计软件包 S-plus (版本 4.5) 将潜在生物标记的样品数据进行标准分类树发展。

除了分析蛋白质组特征的预测值, 还可以通过双路分级聚类分析获得经 SAM 确认的蛋白质组特征有关的附加信息。分析前, 每个显著蛋白质组特征的中值强度被标准化为等于 1, 然后, 所有标准化强度数据被减去 1。在此数据处理后, 当强度数据大于中值强度时为正, 小于中值强度时为负。使用 Eisen 等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 14863-8 (1998) 描述的 Cluster 和 TreeView, 将经加工的显著蛋白质组特征和血清样品数据进行双路分级聚类分析。使用 Pearson 相关法 (非居中) 计算距离, 进行完整的联结聚类。

大多数 AFP 低于 500 ng/mL 的 CLD 典型病例 (20 个病例中 19 个), 以及一个具有高血清 AFP 的病例被聚类在一起以组成一个特别的群体。HCC 病例大体上聚类在一起。他们组成一个具有 17 个病例的主要子群和几个较小子群。

为了测定这个 HCC 子群是否具有升高的血清 AFP 水平，使用 Mann-Whitney test 比较这个 HCC 子群与其他 HCC 病例之间的血清 AFP 水平。

HCC 主要子群的血清 AFP 水平显著较高 ($p = 0.05$)。所以，本结果证明，不需知道血清 AFP 水平，具有升高的 AFP 的 HCC 亚型可以在血清蛋白质组特性的基础上得到鉴定。因此，全面的血清蛋白质组特性可以将 HCC 分为几个亚型。

由 IMAC 芯片鉴定的 1087 个蛋白质簇中，student t-检验分析鉴定 137 个具有统计学差异 ($p < 0.0001$)，而 ANN 分析鉴定了 151 个蛋白质簇为潜在的生物标记，鉴定了没有通过 t-检验分析鉴定的生物标记。这些附加的生物标记中，有些继而显示在 HCC 检测中具有显著值。

根据本描述鉴定的生物标记和生物标记的组合可以用于确定病人的 HCC 风险。尤其是，生物标记或生物标记的组合能够以高预测成功率将 HCC 患者与 CLD 患者区分开来，即，大于至少 85%，优选大于至少 90%，更优选高于 95%。

根据本描述鉴定的生物标记和生物标记的组合可以用于确认个体的肝细胞癌状态。尤其是，生物标记或生物标记的组合能够以高灵敏度和特异性将肝细胞癌患者与正常患者区分开来，即，大于至少 85%，优选大于至少 90%，更优选高于 95%。

因此，依照本发明的一个方面，检测生物标记来诊断肝细胞癌状态需要将来自个体的样品与基质（例如 SELDI 探针）接触，基质上有吸附剂，接触条件允许生物标记和吸附剂之间结合，接着使用气相离子光谱分析（例如质谱）检测结合到吸附剂上的生物标记。其他可以在此使用的检测方法包括光学方法、电化学方法（电压分析和电流分析技术）、原子力显微镜和无线电频率方法（例如，多级共振光谱术）。除了显微镜，光学方法（包括共聚焦和非共聚焦）的例子为荧光、发光、化学发光、吸光率、反射系数、透射系数和双折射或折射率（例如表面胞质团共振、椭圆偏光法、共振镜像方法、光栅波导方法或干涉测量法）检测法。

一方面，本发明中的标记使用涉及利用气相离子光谱仪检测气相离子的气相离子光谱法进行检测。气相离子光谱仪是检测气相离子的仪器。气相离子光谱仪包含提供气相离子的离子源。气相离子光谱仪包括例如质谱仪、离子迁移光谱仪和总离子流测量装置。

“质谱仪”指测量可转化为气相离子的质量-电荷比的参数的气相离子光谱仪。质谱仪通常包括离子源和质量分析器。质谱仪实施例有飞行时间、磁力部分、四级滤波器、离子阱、离子回旋加速器共振，静电部分分析器及其组合。“质谱分析”指使用质谱仪检测气相离子。“激光解吸质谱仪”指将激光作为对分析物解吸、挥发和离子化手段的质谱仪。

“质量分析器”指质谱仪的组成部分，包括测量可转化为气相离子的质量-电荷比的参数的手段。在飞行时间质谱仪中，质量分析器包括离子光学部件、飞行管和离子检测器。

“离子源”指气相离子光谱仪中提供气相离子的部件。在一个实施方案中，离子源通过解吸附/离子化过程提供离子。这些实施方案通常包括探针界面，其在位置上参与探针与离子化能量源（如激光解吸附/离子化源）的互相交流，同时使其在大气压或低于大气压下参与与气相离子光谱仪检测器的通讯。

将分析物从固相解吸附/离子化的离子化能的形式包括，例如：（1）激光能；（2）快原子（用于快原子轰击）；（3）放射性核 β 衰变产生的高能粒子（用于等离子体解吸附）；和（4）产生二级离子的一级离子（用于二级质谱分析）。

用于固相分析物的离子化能形式优选是激光（用于激光解吸附/离子化），尤其是氮激光、Nd-Yag激光和其他脉冲激光源。“流量”指被研究图像每单位面积传递的激光能。一般，样品置于与探针界面接洽的探针表面，探针表面在离子化能控制下。离子化能将分析物分子从表面解吸附为气相并且将其离子化。

用于分析物的其他离子化能形式包括，例如：（1）电离气相中性物的电子；（2）诱导气相、固相或液相中性物产生电离的强电场；和

(3) 使用电离粒子或电场与中性化学物的组合的源, 诱导固相、气相和液相中性物产生化学电离。

本发明优选的质谱技术为 Surface Enhanced Laser Desorption and Ionization (SELDI), 例如 Hutchens 和 Yip 的美国专利 No. 5, 719, 060 和 No. 6, 225, 047 所描述的, 其中将分析物 (此处为一个或多个生物标记) 呈递给能量源的探针表面在分析物分子解吸附/离子化中起积极作用。在这里, “探针” 指接合到探针界面、并且将分析物呈递给离子化能以离子化和将其传入气相离子光谱仪 (例如质谱仪) 的装置。探针一般包括柔软或刚硬的固相基质, 该基质具有将分析物呈递给离子化能量源的样品呈递表面。

SELDI 的一个版本称为 “Surface-Enhanced Affinity Capture” 或 “SEAC”, 涉及使用包含化学选择性表面的探针 (“SELDI 探针”)。

“化学选择性表面” 结合有吸附剂 (也称为 “结合部分” 或 “捕获试剂”) 或能结合捕获试剂 (例如, 通过反应形成共价键或配位共价键) 的反应部分。

此处 “反应部分” 一词表示能够结合捕获试剂的化学部分。环氧化物和 carbodiimidazole 是与例如抗体或细胞受体等多肽捕获试剂共价结合的有用的反应部分。次氨基乙酸和亚氨基二乙酸是有用的反应部分, 作为螯合剂, 与非共价结合含组氨酸肽段的金属离子结合。“反应表面” 是反应部分结合的表面。“吸附剂” 或 “捕获试剂” 是能够与本发明中生物标记结合的任何物质。依照本发明, 适用于 SELDI 的吸附剂描述于前述美国专利 No. 6, 225, 047。

吸附剂的一种类型是 “色谱吸附剂”, 一般是用于色谱分析的物质。色谱吸附剂包括, 例如, 离子交换物质、金属螯合剂、固定金属螯合剂、疏水相互作用吸附剂、亲水相互作用吸附剂、染料、简单生物分子 (例如核苷酸、氨基酸、单糖和脂肪酸) 和混合模式吸附剂 (例如疏水吸引/静电排斥吸附剂)。“生物特异性吸附剂” 是另一类包含生物分子的吸附剂, 例如, 包含核苷酸、核酸分子、氨基酸、多肽、多糖、脂、类固醇或其缓合物 (例如糖蛋白、脂蛋白和糖脂)。在某些实例中,

生物特异性吸附剂可以是大分子，诸如多蛋白复合物、生物膜或病毒。示例性的生物特异性吸附剂是抗体、受体蛋白和核酸。

对于靶分析物，生物特异性吸附剂一般比色谱吸附剂具有更高的特异性。

SELDI 的另一个版本是 Surface-Enhanced Neat Desorption (SEND)，涉及使用包含化学结合于探针表面的能量吸收分子的探针 (“SEND 探针”)。“能量吸收分子 (EAM)”一词表示能够从激光解吸附离子化源吸收能量，然后在与分析物分子接触中促进其解吸附和离子化。EAM 类包括应用于 MALDI 的分子，常指“基质”，以肉桂酸衍生物、芥子酸 (SPA)、氰基-羟基-肉桂酸 (CHCA)、二羟基苯甲酸、阿魏酸和羟基乙酰苯酮衍生物为例。此类也包括应用于 SELDI 的能量吸收分子，举例见 2002 年 2 月 25 日申请的 U. S. 5,719,060 和 U. S. 60/351,971 (Kitagawa)。

SELDI 的另一个版本称为 Surface-Enhanced Photolabile Attachment and Release (SEPAR)，涉及使用探针，探针表面附有可共价结合分析物的部分，暴露于光源 (如激光) 后，通过断裂光不稳定键释放分析物。举例见 U. S. 5,719,060。依照本发明，SEPAR 和其他形式的 SELDI 适用于检测生物标记或者生物标记特性。

依照本发明，对生物标记的检测可以通过使用某些选择性条件 (例如，吸附剂或清洗溶液) 得到加强。“清洗溶液”一词指用来影响或改进分析物对吸附表面的吸附，和/或从表面去除未结合物质的试剂，一般为溶液。清洗溶液的洗脱特征依赖于诸如 pH、离子强度、疏水性、无序性程度、去垢剂强度和温度等条件。

依照本发明一个方面，样品使用“生物芯片”方法进行分析，“生物芯片”这个术语表示附有捕获试剂 (吸附剂) 的固相基质，一般具有平面表面。通常，生物芯片表面包含大量设定的位置，每个位置都结合有捕获试剂。生物芯片可以接合探针界面，从而在气相离子光谱分析，优选质谱分析中起到探针的作用。作为选择，本发明中的生物芯片能够装在另一个基质上，构成能够插入分光光度仪的探针。

用来捕获本发明的生物标记的多种生物芯片可以通过商业来源获得,例如 CIPHERGEN Biosystems (Fremont, CA), Perkin Elmer (Packard BioScience Company (Meriden CT), Zyomyx (Hayward, CA)和 Phyllos (Lexington, MA)。这些生物芯片的例子描述于前述美国专利 No. 6,225,047 和 No. 6,329,209 (Wagner 等),以及 PCT 出版物 WO 99/51773 (Kuimelis 和 Wagner)和 WO 00/56934 (Englert 等)。

更明确的, CIPHERGEN Biosystems 生产的生物芯片显现为条带形式的铝制基质,基质表面的设定位置上附以色谱或生物特异性吸附剂。条带表面以二氧化硅包被。

CIPHERGEN ProteinChip[®]阵列的示例是 H4、SAX-2、WCX-2 和 IMAC-3 生物芯片,包含水凝胶形式的功能化交联聚合物,物理地或者通过硅烷共价附着于生物芯片表面。H4 生物芯片具有异丙基官能团,用于疏水结合。SAX-2 生物芯片具有季铵官能团,用于阴离子交换。WCX-2 生物芯片具有羧酸官能团,用于阳离子交换。IMAC-3 生物芯片具有次氨基乙酸官能团,通过螯合作用吸附过渡金属离子,例如 Cu^{++} 和 Ni^{++} 。这些固定金属离子继而通过配位共价键吸附生物标记。因而, CIPHERGEN's IMAC Protein Chip[®]阵列连同反应部分一起出售,在加入金属溶液时,反应部分成为吸附剂。

与上述原理一致,带有吸附剂的基质与含有血清的样品接触足够长的时间,使可能存在的生物标记与吸附剂结合。在本发明的一个实施方案中,不止一种带有吸附剂的基质用来与生物样品接触。例如,一个样品可以应用于 WCX 和 IMAC 芯片。

这种技术可以允许对癌症状态进行更加确定的评价。经过孵育阶段后,清洗基质以去除未结合物质。可以使用任何适宜的清洗溶液,优选使用水溶液。

然后将能量吸收分子加至结合生物标记的基质上。如文中所指出,能量吸收分子是从诸如激光的能量源吸收能量,继而帮助生物标记从基质解吸附的分子。示例性的能量吸收分子包括,如上文所述,肉桂酸衍生物、芥子酸和二羟基苯甲酸。优选芥子酸。

结合于基质的生物标记在气相离子光谱仪中检测，例如飞行时间质谱仪。生物标记被离子源（例如激光）离子化，产生的离子被离子光学装置收集，然后由质量分析器将经过的离子分散、分析。检测器随后将检测到的离子信息转换为质量-电荷比。生物标记的检测一般涉及信号强度检测。因此，生物标记的数量和质量都可以得到测定。

生物标记解吸附和检测产生的数据可以利用可编程的数字计算机进行分析。计算机程序对数据进行分析，以显示检测到的标记数量，还可以显示每个检测到的标记的信号强度和确定的分子量。数据分析可以包括测定生物标记信号强度、去除偏离预先确定的统计学分布的数据。例如，观察到的峰可以通过计算每个峰相对于参照的峰高度进行归一化。参照可以是由设备和设置为零刻度的化学物（例如能量吸收分子）产生的背景噪音。

计算机能够将产生的数据转化为不同显示形式。可以显示标准图谱，但是在一种有用的形式中，仅仅保留图谱中的峰高和质量信息，以产生更清楚的图像，可以轻易辨认具有几乎相同的分子量的生物标记。在另一种有用的形式中，将两个或两个以上图谱进行比较，方便的突出样品之间特有的峰和上调或下调的生物标记。使用任何形式，都能容易的确定某个特定生物标记是否出现在样品中。

用于分析数据的软件可以包括应用某个算法的编码，应用算法分析信号，来确定一个信号是否代表一个与本发明生物标记相应的信号峰。该软件同样可以将有关观测到的生物标记峰送交分类树或ANN分析，来确定其中是否出现指示肝细胞癌状态的生物标记峰或生物标记峰的组合。数据分析可以输入直接或者间接的从样品质谱分析获得的多种参数。

这些参数包括但是并不受限于出现或缺少一个或多个峰、单个峰或一组峰的形状、一个或多个峰的高度、一个或多个峰高的对数，以及其他对于峰高数据的算法操作。

另一方面，本发明提供检测本发明生物标记的试剂盒，以帮助诊断肝细胞癌状态。试剂盒对来自正常个体和肝细胞癌个体的样品表现出

差异的生物标记和生物标记的组合进行筛查。

在一个实施方案中，试剂盒包括带有适于结合本发明中生物标记的吸附剂的基质，以及清洗溶液或制作清洗溶液的说明书，其中吸附剂和清洗溶液联合允许使用气相离子光谱法（例如质谱）检测生物标记。试剂盒可以包括一种以上吸附剂，每种在不同的基质上呈现。

在另一个实施方案中，本发明的试剂盒可以包括第一基质和第二基质，第一基质包括其上的吸附剂，并且定位到第二基质上，形成可以插入气相离子光谱仪（例如质谱）的探针。另一个实施方案中，本发明的试剂盒可以包含能够插入分光光度计的单个基质。

在一个更深入的实施方案中，这样一个试剂盒可以包括以标签或者单独插入物形式的说明书，提供适宜的操作参数。例如，此说明书可以告诉用户如何采集样品或者如何清洗探针。在另一个实施方案中，试剂盒可以包括一个或者多个装有生物标记样品的容器，作为标准用于校正。

在优选的实施方案中，通过检测生物标记来诊断个体肝细胞癌，需要将其上带有吸附剂的基质与来自于个体或病人的样品（优选血清）在允许生物标记与吸附剂结合的条件下接触，然后由气相离子光谱法（优选 SELDI）检测与吸附剂结合的生物标记。生物标记被离子源（例如激光）离子化。产生的离子被离子光学装置收集并且向离子检测器加速。撞击检测器的离子产生电势能，被数字捕获模拟信号的高速时间阵列记录装置数字化。Ciphergen 的 ProteinChips[®]采用模拟-数字转换器（ADC）实现这一过程。ADC 将检测器在常规时间间隔的输出整合为时间依赖的二进制信号。时间间隔一般长为 1 到 4 纳秒。此外，最终分析的飞行时间图谱一般不代表样品离子化能量单个脉冲得到的信号，而是许多脉冲信号的总和。这样能减少噪声并增加动力学范围。于是对这些飞行时间数据进行数据处理。在 Ciphergen 的 ProteinChip[®]软件中，数据处理一般包括 TOF 到 M/Z 转换、基线减除和高频率噪声滤除。因此，生物标记的数量和质量都可以确定。

对生物标记的检测可以通过使用某些选择性条件得到加强，例如

吸附剂或清洗溶液。在一个实施方案中，在检测样品中生物标记的方法里，使用与发现生物标记相同或者相近的选择性条件。例如，固定金属亲和捕获芯片（例如 Cu(II) IMAC3）和弱阳离子交换芯片（例如 WCX2）芯片为用于生物标记检测的优选的吸附剂。

其他吸附剂仍然可以使用，只要它们具有适合结合生物标记的结合特征。

尤其，具有了关于此处确定的生物标记的信息，就可以使用多种方法去识别本发明中两个、三个和更多生物标记的组合模式。这些方法获取关于出现哪些峰及其强度的原始资料，并对一个样品提供肝细胞癌与正常的鉴别诊断。

因此，本发明的步骤可以分为学习阶段和分类阶段。在学习阶段，将学习算法应用于数据组，该数据组包括预定分类的不同类成员，例如，来自于多个诊断为癌症样品的数据和来自于多数阴性诊断样品的数据。

数据分析方法包括但是不限制于人工神经网络、support vector machines、遗传学算法和自组装图和分类及回归树分析。这些方法描述于例如 WO 01/31579，2001年5月3日（Barnhill等）；WO 02/06829，2002年1月24日（Hitt等）和 WO 02/42733，2002年5月30日（Paulse等）。学习算法产生分类算法。把能够将一个未知样品划分到两类之一的数据元件输入分类器，例如特定的标记和特定标记的强度（通常为其组合）。分类器最终用作诊断测试。

无论免费软件还是专有软件，都可用来分析数据中的这些模式，并且可以根据任何预定的成功标准作出额外的模式。这些本身对于肝细胞癌和 CLD 的鉴别诊断具有预见性的生物标记，不需要模式识别软件来分析数据。

以下实施例用于说明，而非限制性的。

实施例 1. 患者群体

在患者同意下，向 40 名 HCC 病人和 21 名慢性肝脏疾病病人采集凝集血样品，在化验前保存于 -70℃。HCC 患者系根据标准化临床标准诊断。所有 HCC 病例均经过组织学证实。在 HCC 病例中，18 名血清 AFP

水平 > 500 ng/ml, 22 名血清 AFP 水平 < 500 ng/ml。使用来自于 20 例 CLD 且 AFP < 500 ng/ml 的血清样品作为对照组。对于所有 CLD 患者的任意 HCC 体征随访至少 18 个月, 以排除无症状 HCC 个体。在此研究中, 同样对一个来自于 CLD 患者、AFP 水平 > 500 ng/mL (905 ng/mL) 的血清样品进行分析。除了单独分析每个血清样品外, 将来自 HCC 病人、AFP > 500ng/ml 的血清样品, 以及来自 HCC 病人、AFP < 500ng/ml 的血清样品分别被集中为样品 HCCP1 和 HCCP2, 来自对照组的血清样品被集中为样品 CLDP1。样品的血清 AFP 水平使用微粒 (microparticle) EIA (MEIA, Abbott Laboratories, Chicago, USA) 进行测定。

实施例 2. 血清分级

缓冲液:

1. U9 (9M 脲, 2% CHAPS, 50mM Tris-HCl pH9)
2. U1 (1 M 脲, 0.22% CHAPS, 50mM Tris-HCl pH9)
3. 清洗缓冲液 1: 50mM Tris-HCl, 含有 0.1% 正辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷 (OGP), pH9
4. 清洗缓冲液 2: 100mM 磷酸钠, 含有 0.1% OGP, pH7
5. 清洗缓冲液 3: 100mM 醋酸钠, 含有 0.1% OGP, pH5
6. 清洗缓冲液 4: 100mM 醋酸钠, 含有 0.1% OGP, pH4
7. 清洗缓冲液 5: 50mM 柠檬酸钠, 含有 0.1% OGP, pH3
8. 清洗缓冲液 6: 33.3% 异丙醇/16.7% 乙腈/0.1% 三氟乙酸水溶液

阴离子交换分级可以看作是双向聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (2D PAGE) 当中第一向等电聚焦的类似技术。

这两种技术都基于其等电点 (pI) 值而分离蛋白质。将 30ul U9 缓冲液加入置于管中的 20 ul 血清当中, 于 4℃ 混和 20 分钟。离子交换树脂 (Q Ceramic HyperDF 离子交换树脂, Biosepra SA, France) 用 5 倍床体积的 50mM Tris-HCl, pH9 冲洗 3 次, 以 50% 的悬浊液保存。在 Biomek 2000 Automation Workstation (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 上, 将 96 孔滤板 (96 孔 Silent Screen 滤板, Loprodyne 膜, 0.45 微米孔径, Nalge Nunc International, USA) 的每个孔加以 125ul 离

子交换树脂（50%悬浊液），用150 μ L U1缓冲液清洗3次并真空干燥。把经尿素处理的血清转移到各孔的离子交换树脂上。血清管用50 μ L U1缓冲液漂洗，也转移到滤板内相应孔。滤板在平面摇床上，于4 $^{\circ}$ C混和30分钟。直流级分被真空泵收集于96孔板内（第1级分）。随后，给滤板各孔加入100 μ L清洗缓冲液1，于室温混和10分钟。

洗脱液收集到同一个96孔板中（第1级分）。依次用清洗缓冲液2、3、4、5和6将滤板中的树脂各清洗2次，每次100 μ L。每份洗脱液（总体积为200 μ L）收集于96孔板中（第2、3、4、5和6级分）。

实施例3. 分级血清的 SELDI 分析

ProteinChip[®] Arrays 装配在96孔生物处理器内。缓冲液输送和样品孵育在 Biomek 2000 Automation Workstation 上进行。每个血清级分以双样本在 IMAC3（装载有铜）和 WCX2 ProteinChip[®] Arrays 上分析。不同的 ProteinChip 表面（第二维）帮助识别非常低丰度的蛋白质。IMAC3 铜和 WCX2 ProteinChip 表面根据其物理化学性质优先保留不同的蛋白质基因。

IMAC3 铜和 WCX2 阵列（Ciphergen Biosystems Inc, Fremont, CA）使用150 μ L结合缓冲液（对于 IMAC3: 100mM 磷酸钠+ 0.5M NaCl pH7, 对于 WCX2: 100mM 醋酸钠 pH4）平衡2次。每个血清级分使用相应的结合缓冲液稀释（对于 IMAC3, 1/5 稀释, 对于 WCX2, 1/10 稀释），并将100 μ L加样于每个 ProteinChip[®] 阵列。在平面摇床上于室温条件下孵育30分钟。

每个阵列使用相应的结合缓冲液150 μ L洗涤3次，再用水漂洗2次。ProteinChip[®] 阵列在空气中干燥。芥子酸基质（准备于50%乙腈和0.5%三氟乙酸中）加于每个阵列。

ProteinChip[®] 阵列在 ProteinChip[®] PBSII Reader（Ciphergen Biosystems Inc.）上读取，以测量蛋白质峰（Ciphergen）的质量和强度。每个阵列平均总共253次激光轰击。使用 ProteinChip[®] PBSII Reader 进行质谱分析（第三维）可视为2D PAGE中第二向分离（SDS-PAGE）的具有更高分辨率的替代物。这两种技术都在蛋白质分子量基础上将其

分离。每个质量范围从 0 到 200kDa 的阵列平均 235 次激光轰击。对所有的质量图谱进行归一化，使其具有相同的总离子流。峰强度的 CV 低于 15%（制造商信息）。共有的蛋白质峰被 ProteinChip® 软件的 Biomarker Wizard™ 功能挑出（Ciphergen）。

	MW	级分		MW	级分
1	8854	B	51	56202	B
2	8882	B	52	75119	B
3	8924	B	53	10429	C
4	8939	B	54	8928	F
5	8990	B	55	11895	F
6	9055	B	56	14041	F
7	9077	B	57	14133	F
8	9126	B	58	28054	F
9	9146	B	59	56323	F
10	14030	B	60	160595	F
11	14133	B	61	4487	A
12	14230	B	62	4519	A
13	4780	C	63	4644	A
14	14033	C	64	9175	A
15	14137	C	65	9324	A
16	14227	C	66	9360	A
17	28229	C	67	2531	B
18	47362	C	68	10428	B
19	94604	C	69	13869	B
20	160334	C	70	4759	C
21	9116	A	71	56145	C
22	17854	A	72	10422	E
23	3670	B	73	11719	E
24	4458	B	74	13724	E
25	4562	B	75	30180	E
26	5697	B	76	4348	F
27	14537	B	77	4461	F
28	14958	B	78	8125	F
29	28047	B	79	11670	F
30	28225	B	80	28236	F
31	28935	B	81	2756	A
32	37775	B	82	9158	A
33	8922	C	83	9452	A
34	28056	C	84	4087	B
35	95664	C	85	4494	B
36	6863	E	86	4667	B
37	8924	E	87	107432	B
38	8942	F	88	4247	E
39	11589	F	89	4458	E
40	11722	F	90	5052	E
41	3046	A	91	7959	E
42	9016	A	92	8131	E
43	9132	A	93	22988	E
44	9271	A	94	100079	E
45	9307	A	95	107154	E
46	53912	A	96	197871	E
47	5059	B	97	4618	F
48	8908	B	98	11514	F
49	14461	B	99	56709	F
50	14646	B	100	124054	F

图 1

	MW	级分		FMW	级分
1	14025	B	51	4119	E
2	14129	B	52	8677	E
3	28027	B	53	11674	E
4	14020	C	54	22977	E
5	14127	C	55	28024	E
6	28036	C	56	4642	F
7	13838	D	57	4689	F
8	14023	D	58	8883	F
9	14061	D	59	14048	F
10	4345	E	60	14158	F
11	4458	E	61	4086	B
12	4661	E	62	5052	B
13	4783	E	63	5278	B
14	8798	E	64	5399	B
15	4368	F	65	8802	B
16	4479	F	66	9350	B
17	5084	F	67	14343	B
18	5099	F	68	21666	B
19	11565	F	69	28843	B
20	28036	F	70	9275	C
21	5169	B	71	28998	C
22	8924	B	72	160811	C
23	14233	B	73	6871	D
24	28202	B	74	8681	D
25	8132	C	75	29178	D
26	4783	D	76	11508	E
27	13728	D	77	4280	F
28	22981	D	78	9442	F
29	28032	D	79	11692	F
30	28214	D	80	56227	F
31	47269	D	81	53860	A
32	4530	E	82	2532	B
33	4423	F	83	4699	B
34	4806	F	84	5092	B
35	4820	F	85	7283	B
36	8823	F	86	10703	B
37	9031	F	87	11134	B
38	11516	F	88	11669	B
39	11740	F	89	7756	C
40	28232	F	90	51322	C
41	4331	B	91	56058	C
42	5506	B	92	95080	C
43	5697	B	93	38942	D
44	28681	B	94	94601	D
45	4777	C	95	4944	E
46	8921	C	96	5055	E
47	47249	C	97	13721	E
48	13930	D	98	23185	E
49	146449	D	99	9656	F
50	160370	D	100	28754	F

图 2

专利名称(译)	肝细胞癌血清生物标记		
公开(公告)号	CN1649613A	公开(公告)日	2005-08-03
申请号	CN03809631.5	申请日	2003-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	赛弗根生物系统股份有限公司 香港中文大学		
申请(专利权)人(译)	赛弗根生物系统股份有限公司 香港中文大学		
当前申请(专利权)人(译)	赛弗根生物系统股份有限公司 香港中文大学		
[标]发明人	TCW波恩 P约翰逊 VF伊普 CL伊普 ATC钱		
发明人	T·T·伊普 T·C·W·波恩 P·约翰逊 V·F·伊普 C·L·伊普 A·T·C·钱		
IPC分类号	G01N27/62 C07K1/04 G01N33/574 G01N37/00 A61K38/00 C07K2/00 C07K4/00 C07K5/00 C07K7/00 C07K14/00 C07K16/00 C07K17/00 G01N33/48 G01N33/00 G01N24/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K1/047 G01N33/57438		
代理人(译)	程泳		
优先权	60/370239 2002-04-08 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

某些生物标记和生物标记组合可用于在患者中鉴定肝细胞癌状态。利用这些生物标记和组合的诊断方法可以区分例如肝细胞癌和慢性肝病。

	MW	组分		MW	组分
1	8854	B	51	56202	B
2	8852	B	52	78119	B
3	8924	B	53	10429	C
4	8939	B	54	8328	B
5	8935	B	55	11898	F
6	9055	B	56	14041	F
7	9077	B	57	14133	F
8	9128	B	58	28054	F
9	9148	B	59	58523	F
10	14030	B	60	160595	F
11	14133	B	61	4487	A
12	14230	B	62	4619	A
13	4780	C	63	4644	A
14	14035	C	64	9176	A
15	14137	C	65	9324	A
16	14227	C	66	9380	A
17	28229	C	67	2531	A
18	47362	C	68	10428	B
19	94604	C	69	13569	B
20	160334	C	70	4759	C
21	9119	A	71	56148	C
22	17854	A	72	10425	E
23	3670	B	73	11719	E
24	4658	B	74	13724	E
25	4562	B	75	30180	E
26	5697	B	76	4348	E
27	14537	B	77	4461	F
28	14558	B	78	8126	F
29	28047	B	79	11670	F
30	28225	B	80	28236	F
31	28535	B	81	2756	F
32	37775	B	82	9153	A
33	4552	B	83	9452	A
34	28056	C	84	4087	A
35	95664	E	85	4494	B
36	8863	B	86	4817	B
37	8924	E	87	107432	B
38	8939	F	88	4517	E
39	11569	F	89	4456	E
40	11722	F	90	5052	E
41	30744	F	91	7917	E
42	9016	A	92	8131	E
43	9132	A	93	22866	E
44	9271	A	94	100079	E
45	9302	A	95	19784	E
46	53902	B	96	11514	F
47	5059	B	97	4618	F
48	8939	B	98	11514	F
49	14461	B	99	56709	F
50	14646	B	100	124054	F

图 1