



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105899673 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(21)申请号 201480055603.X

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2014.08.08

代理人 刘辛 彭昶

(30)优先权数据

61/863671 2013.08.08 US

61/865750 2013.08.14 US

(51)Int.Cl.

G12Q 1/68(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.04.08

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/050267 2014.08.08

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/021346 EN 2015.02.12

(71)申请人 纽约州州立大学研究基金会

地址 美国纽约州

(72)发明人 K.R.什罗耶

L.F.埃斯科巴-霍尤斯 E.I.陈

权利要求书2页 说明书18页

序列表2页 附图20页

(54)发明名称

作为子宫颈癌和存活期的生物标记物的角蛋白

(57)摘要

本公开提供检测和分析获自试验受试者的样品中的KRT4和KRT17表达的方法。本公开涉及鉴定患有子宫颈癌或子宫颈非癌性病变的哺乳动物受试者的方法与试剂盒。本公开进一步提供了通过测定样品中的KRT17表达水平来确定患有子宫颈癌的受试者的存活期可能性或治疗效果的方法与试剂盒。

1. 鉴定患有子宫颈癌的哺乳动物受试者的方法,包括获得来自受试者的样品,并检测获自所述受试者的处理过的样品中的KRT4和/或KRT17表达,其中处理过的样品中降低的KRT4表达水平或提高的KRT17表达水平将所述受试者鉴定为患有子宫颈癌。

2. 权利要求1的方法,进一步包括处理所述样品。

3. 权利要求2的方法,其中所述处理样品包括切割所述样品以分离细胞,在包含脲的裂解液中裂解所述分离的细胞,从裂解液中分离所述蛋白,在包含胰蛋白酶的消化溶液中消化分离的蛋白,并使所得混合物离心为肽。

4. 权利要求1的方法,其中所述样品选自:全血、组织、淋巴结或其组合。

5. 权利要求4的方法,其中所述样品是肿瘤活检样品或福尔马林固定石蜡包埋组织样品。

6. 权利要求1的方法,其中通过选自以下的方法测定样品中KRT4和/或KRT17表达的水平:采用免疫组织化学、免疫荧光测定、蛋白印迹法或ELISA的个体肿瘤活检样本或组织微阵列。

7. 权利要求1的方法,其中基于检测KRT4或KRT17 mRNA的水平来测量KRT4和/或KRT17表达的水平。

8. 权利要求1的方法,其中所述子宫颈癌是鳞状细胞癌。

9. 权利要求1的方法,其中基于比较样品中KRT4或KRT17表达水平与对照水平来确定所述降低的KRT4表达水平和/或所述提高的KRT17表达水平。

10. 权利要求9的方法,其中由受试者的健康组织、或由来自其它受试者的健康或癌性组织建立所述对照水平。

11. 权利要求10的方法,其中所述健康组织是鳞状粘膜。

12. 权利要求1的方法,其中所述提高的KRT17表达水平通过在所述样品中大于50%的细胞中存在KRT17表达来指示。

13. 权利要求1的方法,其中所述降低的KRT4表达水平通过在所述样品中小于10%的细胞中存在KRT4表达来指示。

14. 用于鉴定患有子宫颈癌的哺乳动物受试者的试剂盒,包括描述如权利要求1-13任一项所述的使用方法的说明书。

15. 确定患有子宫颈癌的受试者的存活期可能性的方法,包括检测获自受试者的样品中的KRT17表达水平,其中在样品中提高的KRT17表达水平将所述受试者鉴定为具有降低的存活期可能性。

16. 权利要求15的方法,其中所述提高的KRT17表达水平通过所述样品的免疫组织化学染色来测定。

17. 权利要求16的方法,进一步包括将所述样品通过免疫组织化学染色测定的KRT17表达水平与获自具有已知子宫颈癌存活时间的其它受试者的癌性组织样品的KRT17表达水平进行比较。

18. 权利要求16的方法,其中通过在所述样品中的大于50%的细胞中存在KRT17表达来指示所述提高的KRT17表达水平。

19. 权利要求18的方法,其中通过在所述样品中的大于52%的细胞中存在KRT17表达来指示所述提高的KRT17表达水平。

20. 权利要求15的方法,其中在样品中的所述提高的KRT17表达水平将所述受试者鉴定为具有自癌症阳性诊断之日起存活期超出50个月的降低的可能性。

21. 权利要求15的方法,其中在样品中的所述提高的KRT17表达水平将所述受试者鉴定为具有自癌症阳性诊断之日起存活期超出120个月的降低的可能性。

22. 用于确定患有子宫颈癌的受试者的存活期可能性的试剂盒,包括描述如权利要求15-21任一项所述的使用方法的说明书。

作为子宫颈癌和存活期的生物标记物的角蛋白

[0001] 本申请要求2013年8月8日提交的美国临时申请号61/863,671和2013年8月14日提交的美国临时申请号61/865,750的权益,其全部内容经此引用并入本文。

[0002] 关于联邦资助研究的声明

本公开在美国国立卫生研究院授予的基金号码AI091175和CA140084的政府支持下进行。政府在本公开中具有某些权利。

技术领域

[0003] 本公开涉及诊断宫颈异常的方法,所述宫颈异常表明在受试者中存在子宫颈癌或存在癌前期病变。本公开进一步提供了分析受试者体内的角蛋白4和角蛋白17的蛋白表达水平以确定在受试者体内存在子宫颈癌或存在癌前期病变的方法。本公开进一步涉及分析受试者体内的角蛋白17以预测患者的预后和存活期的方法。

[0004] 发明背景

子宫颈癌是全球妇女死亡的第二主要原因,但是在大多数工业化国家是癌症死亡率的不太常见的原因,主要是因为子宫颈癌筛查细胞学(即“巴氏试验”)的成功。在美国,在2012年报道了12,200例新诊断病例和4,200例癌症死亡。参见Siegel R等人,CA:A Cancer Journal for Clinicians.2012;62:10-29。此外,三百万宫颈细胞学标本具有异常的细胞学发现,需要通过阴道镜进一步评估。参见Schiffman M等人,JNCI.2011;103:368-83。尽管高危型人乳头瘤病毒(HPV)检测广泛用于提高子宫颈癌筛查的准确性,阳性检测结果对进行未明确意义的非典型鳞状细胞(ASC-US)或低度鳞状上皮内病变(LSIL)的细胞学诊断的患者体内潜在的高度鳞状上皮内病变(HSIL)或鳞状细胞癌具有不佳的特异性,因为大多数HPV感染是短暂的,不太可能导致恶性转化。参见Wright TCJ.J Fam Pract.2009;58:S3-7。由于各种技术问题(例如染色的特异性)或导致假阴性或假阳性诊断的诊断挑战(例如缺少独特的生物标记物),HSIL的组织学分类也可能会有问题。虽然p16^{INK4a}/Ki-67双染色法和其它生物标记物可能提供客观依据来支持HSIL和鳞状细胞癌的组织学诊断,但大多数在高比例的LSIL中表达。参见例如Samarawardana P等人,Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol.2011;19:514-8;Yamazaki T等人,Pathobiology.2006;73:176-82;和Masoudi H等人,Histopathology.2006;49:542-5。

[0005] 因此,仍然存在对以下的重要的临床需要:(i)鉴定新的子宫颈癌生物标记物,其能够在组织活检中改善HSIL/鳞状细胞癌相对正常/LSIL的检测的特异性;(ii)集中资源治疗最有可能从阴道镜和后续的治疗干预中获益的患者;(iii)以及避免过度治疗可能仅具有短暂HPV感染的患者。参见Narayan K.Int.J.Gynecol.Cancer.2005;15:573-82。此外,鳞状细胞癌患者中预后指标的验证可以改善他们的临床管理和治疗效果。例如,在临床实践中,大多数鳞状细胞癌患者接受根治性子宫切除术,并且根据肿瘤分期还可能接受术后化疗和放疗。但是,这些患者的治疗效果明显不同。参见例如Schwarz JK等人,JAMA.2007;298:2289-95;和Eifel PJ等人,J.Clin.Oncol.2004;22:872-80。

[0006] 鉴于上述缺点,本公开鉴定和验证了用于HSIL与鳞状细胞癌的生物标记物,其包

括,例如角蛋白4(KRT4)和角蛋白17(KRT17),并进一步表征KRT17为宫颈鳞状细胞癌患者的预后生物标记物。

[0007] 发明概述

本公开表明,角蛋白4(KRT4)和角蛋白17(KRT17)是指示受试者体内存在子宫颈癌或存在癌前病变的用于诊断子宫颈癌和诊断宫颈异常的预测性生物标记物。

[0008] 在本公开的一个方面,KRT4被验证为用于诊断宫颈鳞状细胞癌和高度鳞状上皮内病变(HSIL)的临床生物标记物。在某些实施方案中,当与正常对照样品、参比样品和/或低度鳞状上皮内病变(LSIL)相比时,在患有宫颈鳞状细胞癌和HSIL的受试者体内KRT4的表达降低。

[0009] 在本公开的另一方面,KRT17被鉴定为用于诊断患有或可能患有宫颈鳞状细胞癌的受试者的临床生物标记物。在某些实施方案中,当与正常对照样品或参比样品和/或低度鳞状上皮内病变(LSIL)相比时,在患有宫颈鳞状细胞癌和HSIL的受试者体内KRT17表达水平显著提高。在另一个实施方案中,在正常鳞状粘膜或表征为具有LSIL的受试者中,KRT17表达不存在或以可忽略水平测得,这表明在此类受试者体内不存在宫颈鳞状细胞癌或其癌前病变。

[0010] 综上所述,本公开表明,KRT4表达的丧失或降低和/或KRT17表达的提高是子宫颈癌进展中的一个关键事件。在本发明的方法中结合这一发现以鉴定患有子宫颈癌或其癌前病变的受试者。

[0011] 在本公开的一个方面,相对于非癌性对照样品或LSIL样品,在鳞状细胞癌样品中已经观察到KRT17表达水平的显著提高,这已经与存活期的降低的几率和/或负面治疗效果相关联。因此,在本公开的某些实施方案中,当在获自受试者的样品中检测到提高水平的KRT17表达时,与不具有相对于正常鳞状粘膜或对照样品KRT17表达提高的诊断患有子宫颈癌的受试者相比,该受试者可能具有存活期的降低的可能性和/或负面的治疗效果。

[0012] 附图概述

图1:基于质谱法的生物标记物发现与基于免疫组织化学的生物标记物验证的实验设计。A.设计用于各诊断类别的组织微阵列。具体而言,正常:非癌性外宫颈鳞状粘膜,LSIL:低度鳞状上皮内病变,HSIL:高度鳞状上皮内病变,SCC:鳞状细胞癌。B.基于基因本体分类的由福尔马林固定石蜡包埋的存档宫颈组织鉴定的蛋白的亚细胞定位。显示了各亚细胞类别的蛋白百分比。

[0013] 图2:鳞状细胞癌中的角蛋白4表达检测。A.在代表性病例中的角蛋白4(KRT4)免疫组织化学染色。正常:非癌性外宫颈鳞状粘膜,LSIL:低度鳞状上皮内病变,HSIL:高度鳞状上皮内病变,SCC:鳞状细胞癌。比例尺条表示50微米。B.基于PathSQ免疫组织化学评分的各诊断类别中的KRT4表达数据,所述评分基于具有强染色的阳性细胞的百分比(n =每个诊断类别25-27个病例)。平均值(粗虚线)和中值(实线)。* $p > 0.001$,根据Kruskal-Wallis和Wilcoxon秩和检验。

[0014] 图3:高度鳞状上皮内病变与鳞状细胞癌中的角蛋白17检测。正常:非癌性外宫颈鳞状粘膜,LSIL:低度鳞状上皮内病变,HSIL:高度鳞状上皮内病变,SCC:鳞状细胞癌。A.在来自各诊断类别的代表性病例中的角蛋白17(KRT17)免疫组织化学染色。比例尺条表示50微米。B.基于PathSQ免疫组织化学评分的各诊断类别中的KRT17表达数据,通过表现出强染

色的阳性细胞百分比测定($n =$ 每个诊断类别25-27个病例)。平均值(粗虚线)和中值(实线)。* $p > 0.05$,根据Kruskal-Wallis和Wilcoxon秩和检验。

[0015] 图4:角蛋白17表达与非癌性病理的关联。A.在获自患有以下疾病的受试者的样品中未观察到KRT17表达的统计学显著变化:不成熟鳞状上皮化生、成熟鳞状上皮化生、炎症(宫颈炎)、伤口愈合(活检部位改变)或单纯疱疹病毒感染。平均值(粗虚线)和中值(实线)。* $p > 0.001$,根据Kruskal-Wallis。B.在不成熟鳞状上皮化生(左侧)、成熟鳞状上皮化生(右侧)和宫颈内储备细胞(底部)中检测KRT17表达。十七例宫颈内粘膜储备细胞样品中的十二例对KRT17染色呈阳性。比例尺条表示20微米。C.角蛋白17表达与鳞状细胞癌(SCC)中高危型HPV类型之间的关联。(左侧)鳞状细胞癌病例($n = 25$)中高危型HPV类型的百分比。样品的54%和28%分别对HPV16型或18型为阳性。四个样品表现出双重HPV感染,包括HPV16和其它高危型HPV。一个病例具有单独的HPV39。通过多重PCR和毛细管电泳进行高危型HPV分型。(右侧)鳞状细胞癌($n = 25$)中KRT17 PathSQ免疫组织化学定量的箱型图。平均值(粗虚线)和中值(实线)。根据Kruskal-Wallis检验未检测到统计学显著差异($p > 0.05$)。

[0016] 图5:具有高或低KRT17(K17)表达的诊断为鳞状细胞癌的患者总体存活的Kaplan-Meier曲线。A.显示了具有高KRT17vs低KRT17 ImageJ得分的65例鳞状细胞癌病例的结果,表明了当患者表现出低KRT17表达时患者存活期超出5年(60个月)和10年(120个月)的更高可能性。B.显示了具有高KRT17vs低KRT17 PathSQ得分的65例鳞状细胞癌病例的结果,,披露了当患者表现出低KRT17表达时患者存活期超出5年(60个月)和10年(120个月)的更高可能性。C.在具有低(左侧)或高(右侧)KRT17表达的代表性鳞状细胞癌病例中KRT17的免疫组织化学染色。在20X放大倍数下摄取图像。比例尺条表示100微米。

[0017] 图6:角蛋白17表达与癌症分期、分级、淋巴结状态和原发性与转移性组织部位的相关性。鳞状细胞癌($n = 65$)中KRT17 PathSQ免疫组织化学定量的箱型图。A.评估不同分期的癌症中的KRT17表达。T1:局限于子宫的宫颈癌,T2:肿瘤侵犯超出子宫,但尚未到达骨盆壁或到达阴道的下三分之一($n = 4$),T3:肿瘤扩展至骨盆壁和/或涉及阴道的下三分之一和/或造成肾盂积水或无功能肾($n = 18$)。AJCC分期(16)。B.评估不同组织学分级的癌症中的KRT17表达。G1:高分化(低分级);G2:中度分化;G3:低分化。C.评估具有不同淋巴结状态的癌症中的KRT17表达。N0:淋巴结阴性;N1:区域(骨盆)淋巴结转移。九个病例未进行评估。D.评估来自相同受试者的匹配的原发性和转移性肿瘤中的KRT17表达。平均值(粗虚线)和中值(实线)。根据Wilcoxon秩和检验未检测到统计学显著差异($p > 0.05$)。

[0018] 图7:KRT17作为子宫颈癌中患者结果的预后指标验证,与肿瘤分期无关。A.具有低和高K17表达的宫颈鳞状细胞癌中角蛋白17(K17)的代表性苏木精与伊红(H&E)和免疫组织化学(IHC)染色。两种代表性样品为相同分期和肿瘤分级。比例尺条,100微米。B-E.通过PathSQ法对高和低K17样品(B)的IHC评分,来自切割的福尔马林固定石蜡包埋鳞状细胞癌的角蛋白17(KRT17)mRNA水平的相对表达(C),根据肿瘤分期,通过PathSQ法的IHC得分(D);T1+T2:癌症被限制在子宫颈,而T3+T4表示扩展超出子宫颈的癌症。E.根据肿瘤分级,通过PathSQ法的IHC得分(D)。等级G1是高分化肿瘤;G2:中度分化;并且G3表示低分化肿瘤。箱型图中的水平虚线表示平均值,而实线表示中值。框符代表四分位数间距,须形线代表第2.5和第97.5百分位数。黑色圆圈代表来自Mann-Whitney U检验的离群样品。*** $p < 0.001$ 。F-H.描述通过原发性肿瘤中K17 IHC状态分层的子宫颈癌患者(鳞状细胞癌)总体存活可能性的

Kaplan-Meier曲线,低(≤ 50 PathSQ得分)或高(≥ 50 PathSQ得分)K17。所有病例(F)并在分期T1+T2中:癌症被限制在子宫颈(G),而T3+T4表示扩展超出子宫颈的癌症(H)。采用时序检验计算p值。I.使用Cox比例风险模型通过K17状态分层的子宫颈癌患者失败的风险。J.子宫颈癌细胞系(例如SiHa、Caski、C-33A、HT-3、ME-180和HeLa)中K17的相对内源性表达。

[0019] 图8:角蛋白17下调(knockdown)诱发细胞周期停滞和降低的细胞尺寸。A.在通过比色法与分析技术测定用阴性对照物siRNA或抗KRT17的siRNA转染后SiHa和CaSki细胞的细胞增殖。与使用阴性对照物siRNA或shRNA的KRT17表达相比,在具有通过siRNA(B)或shRNA(E)下调的KRT17的SiHa和CaSki细胞中的G1期细胞群。C-D.与阴性对照物siRNA相比,在具有通过抗KRT17的siRNA下调的KRT17的SiHa和CaSki细胞中的有丝分裂后G1A细胞群(C)和KRT17 RNA定量(D)。F.与阴性对照物shRNA相比,在具有通过shRNA下调的KRT17的SiHa与CaSki细胞中通过流式细胞仪分析经前向散射(FSC)测定的细胞尺寸测量结果。G.与阴性对照物shRNA相比,在具有通过shRNA下调的KRT17的SiHa和CaSki细胞中与衰老相关的 β -半乳糖苷酶的定量。H.在用人KRT17转染后在C-33A细胞(即缺乏内源性KRT17的细胞)中的G1期细胞群。

[0020] 图9:角蛋白17下调与细胞核p27^{KIP1}积累相关。A-C.用阴性对照物siRNA或抗KRT17的siRNA转染的SiHa和CaSki细胞中的p27^{KIP1}、phospho-pRb、p130和细胞周期蛋白A(cyclin A)的代表性蛋白印迹(A)和相对表达定量(B-C)。D.在用阴性对照物siRNA或抗KRT17的siRNA转染的细胞中在免疫荧光染色后细胞核p27^{KIP1}阳性细胞的定量。E-F.在获自用阴性对照物shRNA或抗KRT17的shRNA稳定转染的SiHa与CaSki细胞的胞质(顶部)和细胞核(底部)细胞组分中p27^{KIP1}的代表性蛋白印迹(E)和相对表达定量(F)。G.在用阴性对照物shRNA或抗KRT17的shRNA转染的SiHa和CaSki细胞中使用phospho-Histone H3(Ser 10)抗体(p-p27^{KIP1}Ser10)的phospho-p27^{KIP1}和CDK2的代表性蛋白印迹检测。H.在用阴性对照物shRNA或抗KRT17的shRNA转染的细胞中p27^{KIP1}(CDKN1B)mRNA的相对表达水平。I.用阴性对照物shRNA或抗KRT17的shRNA转染的SiHa和CaSki细胞通过RT-定量PCR(RT-qPCR)获得的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂的相对基因表达。J.在用阴性对照物shRNA或抗KRT17的shRNA转染的CaSki细胞中的p21^{CIP1/WAF1}和p53表达的代表性蛋白印迹检测。定量数据表示为平均值 \pm 标准偏差。通过T检验法或Mann-Whitney U进行统计学分析。* $p < 0.05$,** $p < 0.01$ 和*** $p < 0.001$ 。

[0021] 表1:病例的人口统计学与临床特征。a低度鳞状上皮内病变,b高度鳞状上皮内病变,c鳞状细胞癌,和d按照AJCC癌症分期手册和Annals of surgical oncology 17(6), 1471-1474的肿瘤临床分期。

[0022] 表2:角蛋白4和17受试者工作曲线分析和根据PathSQ评分的不同诊断类别之间的错误分类比率结果。a曲线下面积,b置信区间,c阳性预测值,d阴性预测值,e鳞状细胞癌,f高度鳞状上皮内病变,g低度鳞状上皮内病变。

[0023] 发明详述

迄今为止,宫颈高度鳞状上皮内病变(HSIL)和鳞状细胞癌(SCC)的诊断标记物(例如免疫组织化学标记物)略微提高了诊断准确性,并且没有预后价值。相反,本公开鉴定、表征和验证了两种新型生物标记物,即KRT4和KRT17,其提高了对宫颈HSIL和鳞状细胞癌的诊断和预后准确性。

[0024] 诊断方法

本公开的一个方面描述了使用角蛋白4(KRT4)和/或角蛋白17(KRT17或K17)作为宫颈高度鳞状上皮内病变(HSIL)和鳞状细胞癌(SCC)的生物标记物的方法。在本文中,由获自各诊断类别(即非癌性外宫颈鳞状粘膜、低度鳞状上皮内病变(LSIL)、HSIL和SCC)的福尔马林固定石蜡包埋样品的显微切割组织切片鉴定KRT4和KRT17,并通过基于质谱的鸟枪法蛋白质组学进行评估。所述数据显示,KRT4和KRT17表现出跨越SCC诊断类别的在表达方面的至少两倍的差异,并具有指示疾病进展的蛋白质表达谱。因此,本公开表明,可以测量KRT4和/或KRT17表达作为非癌性鳞状粘膜向SCC的进展的指标。例如,KRT17表达由正常组织向LSIL、LSIL向HSIL和HSIL向鳞状细胞癌逐渐提高。在另一实例中,在由正常组织向鳞状细胞癌的进程中,KRT4表达降低。

[0025] 鉴于上述情况,选择KRT4和KRT17以便通过组织微阵列的免疫组织化学分析供进一步验证作为诊断性生物标记物。这些免疫组织化学研究清楚地表明,与正常外宫颈鳞状粘膜和LSIL相比,KRT17表达在HSIL和鳞状细胞癌中显著提高。类似地,本文中提供的免疫组织化学研究证实,与其它诊断类别(即非癌性外宫颈鳞状粘膜、低度鳞状上皮内病变(LSIL)、HSIL)相比,KRT4表达在鳞状细胞癌中显著降低。

[0026] 本公开的一个实施方案提供了诊断患有鳞状细胞癌的受试者的方法,其包括获得来自受试者的样品,并检测样品中KRT17表达的水平。由此在该样品中提高的KRT17表达水平鉴定该受试者为患有宫颈鳞状细胞癌。

[0027] 在本公开的又一实施方案中,测量KRT4表达作为非癌性鳞状粘膜向SCC进展的指标。因此,本公开的一个实施方案提供用于诊断患有鳞状细胞癌的受试者的方法,其包括获得来自受试者的样品,并检测样品中KRT4表达的水平。由此在该样品中降低的KRT17表达水平鉴定该受试者为患有宫颈鳞状细胞癌。

[0028] 在某些实施方案中,生物样品获自相关受试者。按照本方法可以使用的生物样品可以通过本领域普通技术人员已知的多种手段来收集。用于本方法的样品收集技术的非限制性实例包括:细针抽吸、手术切除、内窥镜活检、切除活检、切开式活检、细针活检、打孔活检、刮取活检和皮肤活检。此外,可以由癌症或肿瘤组织或其它体液样品如全血(或其血浆或血清组分)或淋巴组织来检测KRT4和/或KRT17表达水平。在某些实施方案中,获自受试者的样品直接使用,而不进行任何初步处理或加工,如福尔马林固定、冷冻、或石蜡包埋。在一个特定实施方案中,生物样品可以获自受试者并通过福尔马林处理并将福尔马林固定的样品包埋在石蜡中来进行处理。在某些实施方案中,样品在使用前可以储存。

[0029] 在获得合适的生物样品后,样品中KRT4和/或KRT17表达的水平可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术来测定。在本公开的某些实施方案中,KRT17表达水平可以通过选自以下的方法来测量:免疫组织化学法(IHC)、q-RT-PCR、Northern印迹法、蛋白印迹法、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、微阵列分析或RT-PCR。

[0030] 在一个特定实施方案中,对福尔马林固定、石蜡包埋样品进行KRT4和/或KRT17的免疫组织化学分析。这里,来自苏木精和伊红染色的组织切片的正常宫颈粘膜、LSIL、HSIL和鳞状细胞癌通过激光捕获显微镜切割,收集来自各诊断类别(即非癌性外宫颈鳞状粘膜、LSIL、HSIL和SCC)的细胞。福尔马林固定、石蜡包埋的组织随后在含有蛋白酶混合物(protease cocktails)的50mM碳酸氢铵中孵育以促进蛋白交联的逆向过程。该样品随后可

以通过在脲中的均质化来进一步处理。该蛋白浓度随后可以通过本领域普通技术人员已知的任何合适的方法来测定。

[0031] 在一个特定实施方案中,经由组织微阵列进行KRT4和/或KRT17蛋白检测。例如,含有正常宫颈粘膜、LSIL、HSIL或鳞状细胞癌的组织可以获自石蜡块并置入组织微阵列块。在某些实施方案中,组织样品的其它来源可以用作对照样品,包括但不限于商业组织微阵列样品,如获自HISTO-Array™的那些。用于本方法的组织微阵列切片随后可以处理,即在二甲苯中脱石蜡和用醇再水化。

[0032] 在某些实施方案中,样品通过以下方法进一步处理:用柠檬酸盐缓冲液孵育,施加过氧化氢以阻断内源性过氧化物酶,或通过用血清处理该样品以阻断非特异性结合(例如牛、人、驴或马血清)。该样品用抗KRT4和/或KRT17的初级抗体进一步孵育。可以使用抗KRT4或KRT17抗原的任何抗体,包括但不限于小鼠单克隆-[E3]抗人KRT17抗体、小鼠单克隆-[6B10]抗人KRT4抗体、抗人KRT4或KRT17的多克隆抗体,抗哺乳动物KRT4或KRT17蛋白结构域或其表位的单克隆抗体或多克隆抗体。在某些实施方案中,在用初级抗体孵育后,通过使用生物素化次级抗体通过间接抗生物素蛋白-生物素基免疫过氧化物酶法处理该样品,显影,并用苏木精复染。切片可以随后用于分析KRT4和/或KRT17表达。

[0033] 在某些实施方案中,通过PathSQ法(一种人工半定量评分系统)定量角蛋白表达,该方法定量不知晓相应临床数据的强染色细胞的百分比。在又一实施方案中,切片可以通过使用DAB-苏木精(DAB-H)颜色去卷积插件的National Institutes of Health ImageJ 1.46——基于Java的图像处理软件(参见Schneider CA等人,Nat methods.(2012)9:671-5)和/或通过人工半定量评分系统(其定量不知晓相应临床数据的强阳性染色细胞的百分比(PathSQ))来评分。

[0034] 在又一实施方案中,可以使用逆转录酶PCR(RT-PCR)或定量RT-PCR来测定KRT4和/或KRT17表达。更具体而言,可以通过使用Trizol试剂从样品中提取全部RNA。随后可以使用本领域普通技术人员已知的方法进行逆转录酶-PCR。例如,可以使用1微克RNA作为cDNA合成的模板,随后cDNA模板可以与KRT17或KRT4的基因特异性引物(即正向5'-3'引物序列和反向3'-5'序列)混合。还可以加入用于检测的探针序列(例如Taqman或SYBR Green)。随后可以对各样品进行实时定量PCR,获得的数据可以归一化至对照物或正常样品中所示KRT4或KRT17表达水平的对照水平。参见例如Schmittgen和Livak,Nature protocols(2008)3:1101-1108。

[0035] 在本公开的一个实施方案中,将样品中KRT4和/或KRT17的量与正常细胞或非癌性细胞中存在的KRT4和/或KRT17的标准量相比,或与对照样品中KRT4和/或KRT17的量相比。可以通过本领域技术人员已知的任何方法进行该比较。在一个特定实施方案中,指示患有SCC的受试者的KRT17表达量包括但不限于与对照样品相比提高5-10%、10-20%,或与对照样品相比提高至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%或更高,或相对于对照样品表现出的KRT17表达量提高至少0.25倍、0.5倍、1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、11倍或更高。在某些特定实施方案中,符合鳞状细胞癌的角蛋白17表达值通过样品中的8%,或5%至10%的细胞中的KRT17染色例示。

[0036] 在又一实施方案中,指示患有SCC的受试者的KRT4表达量包括但不限于与对照样品相比表达降低5-10%、10-20%,或与对照样品相比时KRT4表达降低至少20%、30%、

40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%或更多,或相对于对照样品表现出的KRT4表达量降低至少0.25倍、0.5倍、1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、11倍或更多。在某些实施方案中,指示鳞状细胞癌的角蛋白4表达水平通过样品中存在的 $\leq 6\%$ 或1%至7%的细胞中存在KRT4染色例示。

[0037] 预后方法

鉴于角蛋白17作为鳞状细胞癌和/或SCC疾病进展的生物标记物的效用,进一步表征了KRT17的作用。本公开显示,在几种人子宫颈癌细胞系(即SiHa、CaSki、C-33A、HT-3、ME-180和HeLa)中的细胞增殖和生长与KRT17表达极为相关。参见图8。更具体而言,本公开的图8A提供了人子宫颈癌细胞系(例如SiHa、CaSki)中KRT17的表达导致细胞增殖增加,如与其中通过RNA干扰抑制KRT17表达的细胞样品相比在其中表达KRT17的培养物中发现的细胞数量显著增加所证明的那样。此外,图8B-E显示,KRT17的表达促进细胞周期进程,而在人子宫颈癌细胞系中KRT17的下调(knockdown)在G1期诱导细胞周期停滞。

[0038] 鉴于上述情况,在细胞表达KRT17方面分析细胞生长,并与人子宫颈癌细胞系进行比较,由此通过针对KRT17的短发夹RNA来抑制KRT17表达。参见图8F。细胞生长数据清楚地表明,表达KRT17的细胞明显比未表达KRT17或表达正常水平的KRT17的细胞更大。本文中提供的数据进一步表明,角蛋白17表达与核p27Kip1(一种蛋白质,当在细胞核中存在时抑制CDK2,这会导致细胞周期停滞)的减少相关。参见图9。综上所述,本公开第一次显示KRT17在子宫颈癌进展中的新的作用,由此使得本公开的发明人阐明KRT17在确定治疗效果和患者存活方面的作用。

[0039] 本公开进一步提供了KRT17表达水平与患有鳞状细胞癌的受试者的不良存活期相关。更具体而言,本文中提供的数据表明,与未表现出KRT17表达提高的诊断患有子宫颈癌的受试者相比,在诊断患有鳞状细胞癌的受试者体内提高的KRT17表达指示受试者将具有存活期的降低的可能性和/或负面的治疗效果。参见例如图5-7。

[0040] 鉴于上述情况,本公开的一个方面提供了确定患有子宫颈癌的受试者存活期的可能性的方法,其包括获得来自受试者的样品,并检测样品中KRT17表达的水平;以及任选地,通过将KRT17表达水平与获自其它受试者和/或对照样品的癌性样品中的KRT17表达水平进行比较来进一步评估获得的样品中的KRT17表达水平。

[0041] 在某些实施方案中,生物样品获自相关受试者,即诊断为HSIL或SCC的受试者或患者。按照本方法可以使用的生物样品可以通过本领域普通技术人员已知的各种手段来收集。样品收集技术的非限制性实例包括:细针抽吸、手术切除、内窥镜活检、切除活检、切开式活检、细针活检、打孔活检、刮取活检和皮肤活检。此外,可以由癌症或肿瘤组织或由其它体液样品如全血(或其血浆或血清组分)或淋巴组织来检测KRT17表达。在某些实施方案中,获自受试者的样品直接使用,而不进行任何初步处理或加工,如福尔马林固定、冷冻、或石蜡包埋。在一个特定实施方案中,生物样品可以获自受试者并通过福尔马林处理并将福尔马林固定的样品包埋在石蜡中来进行处理,并在通过本方法进行评估之前储存。

[0042] 在某些实施方案中,在获得合适的生物样品后,样品中KRT17的表达水平可以使用本领域普通技术人员已知的各种技术来测定。在本公开的特定实施方案中,KRT17表达水平可以通过选自以下的方法来测量:免疫组织化学法(IHC)、显微镜法、q-RT-PCR、Northern印迹法、蛋白印迹法、酶联免疫吸附测定法(ELISA)、微阵列分析或RT-PCR。

[0043] 在一个特定实施方案中,对福尔马林固定、石蜡包埋样品进行KRT17的免疫组织化学分析。这里,来自苏木精和伊红染色的组织切片的HSIL和/或鳞状细胞癌样品可以过激光捕获显微镜切割。福尔马林固定、石蜡包埋的组织样品随后在含有蛋白酶混合物(protease cocktails)的50mM碳酸氢铵中孵育以促进蛋白交联的逆向过程。该样品随后可以通过在脲中均质化来进一步处理。KRT17的蛋白浓度随后可以通过本领域普通技术人员已知的任何合适的方法来测定。

[0044] 在一个特定实施方案中,经由组织微阵列进行KRT17蛋白检测。例如,含有HSIL或鳞状细胞癌的组织可以获自石蜡块并置入组织微阵列块。在某些实施方案中,组织样品的其它来源可以用作对样品,包括但不限于商业组织微阵列样品,如获自HISTO-Array™的那些,具有已知KRT17表达水平的非癌性粘膜组织或SCC组织样品。用于本方法的组织微阵列切片可以随后处理,即在二甲苯中脱石蜡和用醇再水化。

[0045] 在某些实施方案中,样品随后可以通过以下方法进一步处理:用柠檬酸盐缓冲液孵育,施加过氧化氢以阻断内源性过氧化物酶,或通过用血清处理该样品以封闭非特异性结合(例如牛、人、驴或马血清)。该样品可以随后用抗KRT17的初级抗体进一步孵育。可以使用抗KRT17抗原的任何抗体,包括但不限于小鼠单克隆-[E3]抗人KRT17抗体、抗人KRT17的多克隆抗体、抗哺乳动物KRT17蛋白结构域或其表位的单克隆抗体或多克隆抗体。在某些实施方案中,在用初级抗体孵育后,通过使用生物素化次级抗体的间接抗生物素蛋白-生物素基免疫过氧化物酶法处理该样品,显影,并用苏木精复染。切片可以随后使用显微镜法分析KRT17表达(例如荧光显微镜法或光学显微镜法)。

[0046] 在某些实施方案中,通过PathSQ法(一种人工半定量评分系统)定量角蛋白表达,该方法定量不知晓相应临床数据的强染色细胞的百分比。在又一实施方案中,切片可以通过使用DAB-苏木精(DAB-H)颜色去卷积插件的National Institutes of Health ImageJ 1.46——基于Java的图像处理软件(参见Schneider CA等人,Nat methods.(2012)9:671-5)来评分。

[0047] 在一个实施方案中,可以使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)来测定KRT17表达。例如,将KRT17特异性单克隆抗体添加到微量滴定条或板的孔中。将获自相关受试者的测试样品、含有正常KRT17蛋白表达水平的对照物SSC样品、没有表现出KRT17表达的非癌性对照样品提供至孔中。随后孵育该样品以使KRT17蛋白抗原结合固定的(捕获)KRT17抗体。随后用缓冲溶液对样品施以洗涤,并随后通过结合第一次孵育过程中捕获的KRT17蛋白用能够结合的检测抗体进行处理。在某些实施方案中,在除去过量检测抗体后,加入标记抗体(例如抗兔IgG-HRP),其结合该检测抗体以完成复合物形成。在第三次孵育和洗涤以除去所有过量的标记抗体后,加入底物溶液,其通过结合的酶起作用以产生颜色。该着色产物的强度与原始样品中存在的总KRT17蛋白浓度直接成比例。样品中存在的KRT17蛋白的量随后可以通过以下方法测定:读取样品的吸光度并与对照孔进行比较,使用本领域普通技术人员已知的软件相对于对照KRT17表达水平对吸光度进行绘图。

[0048] 在又一实施方案中,可以使用逆转录酶PCR(RT-PCR)或定量RT-PCR来测定KRT17表达。更具体而言,可以通过使用Trizol试剂从样品中提取全部RNA。随后可以使用本领域普通技术人员已知的方法进行逆转录酶-PCR。例如,RNA可以用作cDNA合成的模板,cDNA模板可以随后与KRT17的基因特异性引物(即正向5'-3'引物序列和反向3'-5'序列)混合。还可

以加入用于检测的探针序列(例如Taqman或SYBR Green)。随后可以对各样品进行实时定量PCR,获得的数据可以归一化至对照物或正常样品中所示KRT17的对照水平。参见例如Schmittgen和Livak,Nature protocols(2008)3:1101-1108。

[0049] 在一个特定实施方案中,可以通过使用DAB-苏木精(DAB-H)颜色去卷积插件的National Institutes of Health ImageJ 1.46(参见Schneider CA等人,Nat methods.(2012)9:671-5)基于Java的图像处理软件(参见Ruifrok AC,Johnston DA.Anal Quant Cytol Histol.(2001)23:291-9)和/或通过人工半定量评分系统(其定量不知晓相应临床数据的强阳性染色细胞的百分比(PathSQ))对封装在切片上并用KRT17抗体染色的样品进行分析和评分。

[0050] 在优选实施方案中,通过测定患者子集的ImageJ得分和/或PathSQ得分并参照Cox比例风险回归模型根据最低赤池信息量准则选择适当的KRT17表达水平来测定样品中的KRT17表达水平。在其它实施方案中,低KRT17表达水平通过少于样品中存在的细胞的50%中存在KRT17染色例示。在又一实施方案中,通过少于存在于样品中的细胞的52%或少于样品中存在的细胞的52.5%中存在KRT染色来指示低KRT17表达水平。相反,通过在样品中至少50%的细胞中存在KRT17染色来指示受试者体内的高KRT17表达水平(其符合低的超出5年的存活几率)。在某些实施方案中,受试者体内的高KRT17表达水平构成了样品中大于52%或大于52.5%的细胞对KRT17蛋白染色阳性的样品。

[0051] 综上所述,本公开提供了通过分析样品中的KRT17表达水平并确定KRT17水平在测试样品中是否高度过表达来测定已经诊断患有SCC和/或HSIL的受试者的存活期可能性的方法。由此,鳞状细胞癌中的高KRT17表达水平将受试者鉴定为具有导致宫颈癌死亡率的最大风险。

[0052] 术语

本公开中所用的术语“肽”或“蛋白”是指通过 α -氨基与相邻氨基酸残基的羧基之间的肽键彼此连接的一线性系列氨基酸残基。在一个实施方案中,该蛋白是角蛋白17(KRT17)。在又一实施方案中,该蛋白是角蛋白4(KRT4)。

[0053] 本文中所述的术语“核酸”是指一种或多种任意类型的核苷酸碱基,包括单链或双链形式。在本公开的一个方面,核酸是DNA,在另一方面,核酸是RNA。在实施本公开的方法时,通过本发明的方法分析的核酸(例如KRT4或KRT17 RNA)源于一种或多种样品。

[0054] 本文中所述的术语“角蛋白17”、“K17”或“KRT17”是指人角蛋白,角蛋白,位于17号染色体上的II型细胞骨架4基因,如登录号NG_008625所示,或其产物,其编码I型中间丝链角蛋白17。包含在KRT17的所指含义中的是如登录号NM_000422中所示的角蛋白17cDNA序列的mRNA转录体,以及由此翻译的蛋白,包括例如登录号NP_000413中所示的角蛋白,1型细胞骨架蛋白,17,或其同系物。

[0055] 本文中所述的术语“角蛋白4”、“K4”或“KRT4”是指人角蛋白,位于12号染色体上的II型细胞骨架4基因,如登录号NG_007380.1中所示,或其产物,其编码在粘膜上皮细胞的分化层中表达的II型中间丝链。包括在KRT4的所指含义中的是如登录号NM_0002272中所示的角蛋白4cDNA序列的mRNA转录体,以及由此翻译的蛋白,例如,如登录号NP_002263中所示的角蛋白,II型细胞骨架蛋白,4,或其同系物。

[0056] 本文中所述的短语“受试者”、“试验对象”或“患者”是指任何哺乳动物。在一个实

施方案中,该受试者是癌症诊断(例如鳞状细胞癌)的候选人或患有子宫颈癌或存在癌前病变如HSIL或LSIL的个体。在某些实施方案中,该受试者已经被诊断患有SCC,并且该受试者是治疗其的候选人。本公开的方法可以对存在发展为癌症或已经诊断患有癌症的风险的任何哺乳动物受试者实施。特别地,本文中描述的方法在对人类实施时最有用。

[0057] 本公开中使用的“生物样品”、“测试样品”或“样品”可以以本领域技术人员已知的任何方式获得。样品可以衍生自受试者的任何部分,包括全血、组织、淋巴结或其组合。在某些实施方案中,该样品是从受试者提取的组织活检、新鲜组织或活组织。在其它实施方案中,该样品在用于公开的方法之前经过处理。例如,从受试者分离的福尔马林固定、石蜡包埋的组织样品可用于本公开的方法,因为福尔马林固定和石蜡包埋对组织学保存和临床组织样本的诊断有益,并且福尔马林固定石蜡包埋的组织与新鲜或冷冻组织相比更易于大量获得。

[0058] 本文中所用的“对照样品”、“非癌性样品”或“正常样品”是并未表现出提高的KRT17和/或降低的KRT4水平的样品。在某些实施方案中,对照样品不含有癌细胞(例如良性组织成分,包括但不限于正常鳞状粘膜、外宫颈鳞状粘膜基质细胞、淋巴细胞和其它良性粘膜组织成分)。在另一实施方案中,对照物或正常样品是来自良性或癌组织的样品,其没有表现出提高的KRT17表达水平。用于本公开的对照样品的非限制性实例包括非癌性组织提取物、由受试者提取的手术切缘、已知具有正常或降低的KRT17水平的分离的细胞、或获自其它健康个体的样品。在一个方面,本公开的对照样品是获自相关受试者的良性组织。

[0059] 术语“增加”或“更大”或“提高”指的是至少超过在对照样品中鉴定(如KRT4或KRT17表达)、测量或分析的实体的相对量。非限制性实例包括但不限于超出对照样品5-10%、10-20%的提高,或超出对照样品至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%或更大的提高,或相对于对照样品中分析的实体提高至少0.25倍、0.5倍、1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、11倍或更大。

[0060] 术语“减少”或“降低”指的是至少小于在对照样品中鉴定、测量或分析的实体的相对量。非限制性实例包括但不限于与对照样品相比降低5-10%、10-20%,或与对照样品相比时降低至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%或更多,或相对于对照样品中分析的实体降低至少0.25倍、0.5倍、1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、11倍或更多。

[0061] 本公开中所用的“KRT4表达水平降低”应当是指存在于细胞、有机体或样品中的KRT4蛋白或其肽片段、或RNA的量与KRT4表达的对照或正常水平相比降低。在某些特定实施方案中,指示鳞状细胞癌的角蛋白4表达水平降低通过样品中存在的细胞的 $\leq 6\%$ 或 1% 至 7% 中存在KRT4表达例示。

[0062] 本公开中所用的“KRT17表达水平提高”应当是指存在于细胞、有机体或样品中的KRT17蛋白或其肽片段、或RNA的量与KRT17表达的对照或正常水平相比提高。在某些特定实施方案中,符合鳞状细胞癌的角蛋白17表达水平提高通过样品中存在的细胞的 $\geq 8\%$ 或 5% 至 10% 中存在KRT17表达例示。在又一实施方案中,指示较少患者存活期的KRT17表达水平提高通过样品中至少50%的细胞中、或在KRT17染色阳性的样品中大于52%或大于52.5%的细胞中存在KRT17染色来指示。

实施例

[0063] 实施例1.材料与方法

受试者(患者)样品.进行的研究包括分析124个福尔马林固定石蜡包埋的手术组织块(表1)。所有手术组织块获自自1989至2011接收护理的受试者(患者)。选择标准为(i)具有正常外宫颈鳞状上皮或不显著的正常外宫颈鳞状粘膜(正常外宫颈鳞状粘膜)、LSIL(CIN1)、HSIL(CIN2/3)、原发性宫颈鳞状细胞癌的病理诊断的病例,(ii)受试者在诊断时的年龄 ≥ 18 岁。诊断患有其它解剖部位(即在子宫颈外部)的癌症的受试者被排除在该研究外。在所有病例中,通过检查苏木精和伊红(H&E)染色的切片以确认诊断组织(如最初报道的那样)显示在剩余组织块中来进行组织学检查。初始分类为CIN1的病例重新分类为LSIL,并且报道为CIN2或CIN3的病例被分类为HSIL。所有其它病例如最初报道的那样分类,不修正初始诊断。残留组织不足的病例被排除在研究之外。鳞状细胞癌通过以下分类:(i)按照Edge SB和Compton CC. *Annals of surgical oncology*. (2010)17:1471-4的临床分期,(ii)肿瘤分级和(iii)淋巴结状态(表1)。每个受试者的存活数据获自Stony Brook University Cancer Registry。

[0064] 细胞培养.人宫颈癌细胞系SiHa、CaSki、C-33A、HT-3、ME-180和HeLa获自American Type Culture Collection(ATCC,Manassas,VA,USA)并如推荐那样用含有10%胎牛血清(Sigma-Aldrich,St Louis,MO,USA)的RPMI1640、DMEM或McCoy's 5A培养基(Gibco-Life Technologies)进行培养。细胞在37°C下在含有5%CO₂的加湿气氛中生长。每48小时更换培养基。

[0065] 样品制备.来自所有诊断类别的总计22个福尔马林固定石蜡包埋组织样品用于蛋白质组学分析。或由UMass Memorial Medical Center提供独立的74个福尔马林固定石蜡包埋手术组织块。来自苏木精与伊红染色的组织切片的正常宫颈粘膜、LSIL、HSIL和鳞状细胞癌通过激光捕获显微镜(Zeiss P.A.L.M.)切割,由每个诊断类别收集540,000至650,000个细胞。切割的组织由各个诊断类别汇集以便均质化(图1)。福尔马林固定、石蜡包埋的组织首先在含有蛋白酶混合物(Roche,Branford,CT,USA)的50mM碳酸氢铵中在65°C下孵育3小时以促进蛋白交联的逆向过程。随后,组织在含有Invitrosol™(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)和RapiGest™(Waters Corporation,Milford,MA)(17)的在50mM碳酸氢铵(pH 7)中的4M脲中均质化。该蛋白浓度使用EZQ蛋白测定(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)来确定。

[0066] 胰蛋白酶消化.10微克组织裂解物在50mM碳酸氢铵中稀释用于胰蛋白酶消化。测序级改性胰蛋白酶(Promega,Fitchburg,WI)以1:30酶/蛋白的比例与2毫摩尔CaCl₂一起添加到各样品中并在37°C下孵育16小时。在消化后,所有反应用90%的甲酸(2%最终)酸化以停止蛋白酶解。随后,样品在14,000rpm下离心30分钟以除去不溶性材料。收集可溶性肽混合物用于液相色谱-串联质谱分析。

[0067] 多维色谱和串联质谱法.将肽混合物加压装载到首先用3厘米的5微米强阳离子交换材料(Partisphere SCX,Whatman)并随后用3厘米的10微米C18反相(RP)粒子(Aqua,Phenomenex,CA,USA)填充的250微米内径(i.d.)熔融石英毛细管上。装载并洗涤过的微毛细管经由2微米过滤的联合(filtered union)(UpChurch Scientific)连接至100微米内径的柱,其已经用P-2000CO₂激光拉出器(Sutter Instrument,Novato,CA,USA)拉至5微米内

径,随后用13厘米的3微米C18RP粒子(Aqua,Phenomenex,CA,USA)填充并在5%乙腈、0.1%甲酸(缓冲液A)中平衡。该分体柱(split-column)随后与纳米液相色谱法Eskigent高性能液相色谱泵配接安装。通道2的流速对有机梯度设定在300nl/min。通道1的流速对盐脉冲设定在0.5微升/分钟。进行全自动化13步色谱运行。使用三种不同的洗脱缓冲液:5%乙腈,0.1%甲酸(缓冲液A);98%乙腈,0.1%甲酸(缓冲液B);和0.5 M乙酸铵,5%乙腈,0.1%甲酸(缓冲液C)。以此类色谱事件顺序,通过增加盐的步骤(提高缓冲液C中的浓度)和随后的有机梯度(提高缓冲液B中的浓度)将肽序贯地从SCX树脂洗脱到RP树脂中。最后的色谱法步骤由使用100%缓冲液C的高盐洗涤和随后的乙腈梯度组成。施加2.5千伏远端电压将洗脱的肽直接电喷雾到装有纳米液相色谱法电喷雾电离源(Thermo Finnigan,San Jose,CA,USA)的LTQ-Orbitrap XL质谱仪中。通过Orbitrap并随后进行由LTQ以数据依赖方式对选自全质谱光谱(在35%碰撞能量下)的第一、第二、第三和第四强离子依次生成的五个串联质谱事件,在400至2000m/z范围内对肽记录完整的质谱光谱。质谱仪扫描功能和高性能液相色谱法溶剂梯度通过Xcalibur数据系统(Thermo Finnigan,San Jose,CA,USA)来控制。

[0068] 串联质谱数据集的数据库检索和解释。来自三次相同试验的光谱从用于数据分析的各个类别进行合并。串联质谱从原始文件中提取,对手动验证的数据集预先训练的多元分类器用于去除低品质串联质谱。剩余的光谱对含有69,711个以FASTA格式序列形式从UniProtKB(参见UniProtConsortium.Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource(UniProt).Nucleic Acids Res.2012;40:D71-5)下载的蛋白质序列和124种共同的污染物蛋白(总计69,835序列条目)的人蛋白质数据库进行检索。为了计算置信水平和假阳性率,使用追加至目标数据库的含有69,835个蛋白质的反向序列的的诱饵数据库(参见Elias JE和Gygi SP.Nat.Methods.2007;4:207-14)和SEQUEST算法(参见Eng JK等人,Analytical Chemistry.1995;67:1426-36;和Ashburner M等人,Nature Genet.2000;25:25-9)以便从合并数据库中寻找最佳匹配序列。在Linux操作系统下运行的Intel Xeon X5450X/3.0 PROC处理器集群上使用Integrated Proteomics Pipeline(IP2,Integrated Proteomics Applications,San Diego,CA,USA)进行SEQUEST检索。肽质量检索容许量设定为50ppm。考虑了无差异的修改。对数据库检索没有施加酶裂解条件,因此无论其胰蛋白酶状态如何,检索空间包括其理论质量落在50ppm质量容许量窗口内的所有候选酶。

[0069] 在Scaffold软件(参见Lundgren DH等人,Curr Protoc Bioinformatics.(2009)第13章:第13-3单元)中使用SEQUEST定义参数、互相关分数(XCorr)和互相关分数的归一化差值(DeltaCN)来评估肽/光谱匹配的有效性。检索结果通过电荷状态(+1,+2和+3)和胰蛋白酶状态(完全-、半-和非胰蛋白酶)来分组,得到9个不同的子组。在每个子组中,获得对(a)直接和(b)诱饵数据库命中的XCorr和DeltaCN值的分布,并且这两个子集通过二次判别分析来分离。两种分布中的离群点(例如具有极低Xcorr但是极高DeltaCN的匹配)被丢弃。直接和诱饵子集的充分分离通常是不可能的;因此,设定判别分数以使得根据接受的诱饵数据库肽的数量确定1%的假阳性率。对各个数据子集独立地进行该程序,获得与胰蛋白酶状态或电荷状态无关的假阳性率。此外,要求七个氨基酸残基的最小序列长度,并且除非指定,最终名单上的各蛋白得到至少两种独立的肽鉴定的支持。这些附加要求,尤其是后者,导致消除了大部分诱饵数据库和假阳性命中,因为这些倾向于压倒性地呈现为被单一肽匹

配鉴定的蛋白。在最后的过滤步骤后,误鉴定率降低至低于1%。通过Scaffold软件(Proteome Software, Inc. Portland, OR)进行全局归一化。Gene Ontology(参见Ashburner M等人, Nature Genet. (2000)25:25-9)用于确定鉴定的蛋白的亚细胞定位。

[0070] 通过免疫组织化学分析的诊断验证。为了验证蛋白质组谱数据,构建每种诊断类别25-27个病例的组织微阵列(图1)。各病例含有最多三个核心复制,除了12个LSIL病例之外,其由于病灶尺寸小而仅含有一个核心。检查切片并在玻璃切片上标记含有正常宫颈粘膜、LSIL、HSIL和鳞状细胞癌的区域。组织的三毫米穿孔用作样品,其随后从石蜡块的相应区域取出并置入组织微阵列块。此外,购买来自HISTO-Array™组织阵列(IMGENEX, San Diego, CA, USA)的含有40个另外的鳞状细胞癌病例的商业组织微阵列。在60°C下孵育1小时后,组织微阵列切片在二甲苯中脱蜡并用梯度醇再水化。在Decloaking隔室中在柠檬酸盐缓冲液(20毫摩尔, pH 6.0)中在120°C下进行抗原复原10分钟。通过施加3%过氧化氢5分钟来阻断内源性过氧化物酶。切片随后在5%马血清中封闭。所用初级抗体是:小鼠单克隆-[E3]抗人KRT17抗体(ab75123, Abcam, Cambridge, MA, USA; 4°C过夜)和小鼠单克隆-[6B10]抗人KRT4抗体(vp-c399, Vector Laboratories, Burlingame, CA; 1:150 1小时, 室温)。在用初级抗体孵育后,通过间接抗生物素蛋白-生物素-基免疫过氧化物酶法使用生物素化马次级抗体(R.T.U. Vectastain Universal Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)处理该切片,在3,3'-二氨基联苯胺(DAB)(K3468, Dako, Carpinteria, CA, USA)中显影,并用苏木精进行复染。对所有病例使用针对不相关的抗原生成的相同浓度的子类匹配小鼠免疫球蛋白代替初级抗体进行阴性对照。切片通过一种手工半定量评分系统PathSQ评分,该方法定量不知晓相应临床数据的强染色细胞的百分比。

[0071] 角蛋白蛋白质表达的评分。通过使用DAB-苏木精(DAB-H)颜色去卷积插件(参见Ruifrok AC, Johnston DA. Anal Quant Cytol Histol. (2001)23:291-9, 其内容经此引用并入本文)的National Institutes of Health ImageJ 1.46(参见Schneider CA等人, Nat methods. (2012)9:671-5, 其内容经此引用并入本文)基于Java的图像处理软件和通过人工半定量评分系统(其定量不知晓相应临床数据的强阳性染色细胞的百分比(PathSQ))对切片进行评分。

[0072] RT-PCR和qRT-PCR。按照制造商的方法使用Trizol试剂(Invitrogen)提取全部RNA。用Reverse Transcription System(Promega, Madison, WI)进行逆转录酶PCR。在所有情况下,使用1微克RNA作为cDNA合成的模板,cDNA模板与KRT17、CDKN2A(p16^{INK4a})、CDKN2B(p15^{INK4b})、CDKN2C(p18^{INK4c})、CDKN2D(p19^{INK4d})、CDKN1A(p21^{CIP1/WAF1})、CDKN1B(p27^{KIP1})、COPS5(JAB1)、GAPDH、β-肌动蛋白和18S的基因特异性引物混合。根据检测系统使用Taqman 2×universal PCR Master Mix或SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)。Applied Biosystems 7500实时PCR机器用于qRT-PCR并编程为:95°C, 10分钟; 95°C, 15秒; 60°C, 1分钟并重复40个周期。如Schmittgen和Livak, Nature protocols(2008)3:1101-1108中所述,通过各个别样品中的表达水平将数据归一化,其内容经此引用并入本文。

[0073] 通过ImageJ和PathSQ评分子宫颈癌中高/低K17表达的分类。为了显示总体存活期的Kaplan-Meier曲线,根据通过ImageJ和PathSQ测得的KRT17(K17)的表达水平,将SCC病例进一步分为两组,高K17水平vs. 低K17水平。根据来自Cox比例风险回归模型的最低赤池信息量准则(AIC)选择两种评分方法的最佳分界点。在ImageJ评分中的163(病例总数的第74

百分位)和PathSQ评分的52.5%(病例总数的第64百分位)的数据驱动分界点用于将患者分类为两组。高K17水平(高K17),ImageJ评分 ≥ 163 或PathSQ评分 $\geq 52.5\%$,和低K17水平(低K17) < 163 或 $< 53\%$,分别为ImageJ和PathSQ评分。事实上,ImageJ评分的161-165区间(分别为第72-第75百分位)或52-53区间(分别为第63和第65百分位)中的任何分界点对Cox比例风险模型而言导致相同的AIC值。该Cox比例风险模型的中点,163和52.5%(报道为 $> 50\%$)用于SCC患者中的总存活期的Kaplan-Meier曲线。时序检验用于比较具有高K17水平和低K17水平的SCC患者之间的总体存活期。通过Kaplan-Meier评估和时序检验来研究总体存活期与其它SCC因素(年龄、分期、分级和淋巴结状态)之间的关联。基于Cox比例风险回归模型计算危险比(HR)和95%CI。统计学显著性设定在0.05,使用SAS 9.3(SAS Institute, Inc., Cary, NC)和SigmaPlot 11(Systat Software, San Jose, CA)进行分析。

[0074] 在某些实施方案中,免疫组织化学分析的测量单位是每个核心,并且所有核心的平均PathSQ评分用于统计学分析。通过Kruskal-Wallis或Wilcoxon秩和检验确定诊断类别之间的评分差异。计算接受者操作曲线和曲线下面积以便根据逻辑回归模型评估生物标记物辨别不同诊断类别的潜力。使用尤登指数确定来自接受者操作曲线的最佳分界值。参见 Youden WJ. *Cancer*. (1950)3:32-5,其内容经此引用并入本文。对于角蛋白4(KRT4),所得接受者操作曲线中的最佳分界值对应于阳性细胞的 $\geq 6\%$,而对于角蛋白17(KRT17),所得接受者操作曲线中的最佳分界值对PathSQ评分对应于阳性细胞的 $\geq 8\%$ 。相应于最佳分界值计算敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和误分类率。皮尔逊相关系数用于评价KRT17表达和其它定量变量(如患者年龄和组织储存时间)之间的相关性。由手术至死亡或未次随访(如果还在世的话)的时间来定义总存活期。通过单变量Cox比例风险模型评估KRT17表达和总存活期之间的关联。证实了Cox比例风险模型的假设。

[0075] 小干扰RNA和短发夹RNA.对于瞬时转染,ON-TARGETplus Human KRT17(3872)小干扰RNA(siRNA)-4种siRNA的SMART池(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)用于下调KRT17表达(siKRT17)。下列KRT17siRNA序列用于下调KRT17表达:

(5'-3')AGAAAGAACCGGUGACCAC(SEQ ID NO:1),

CGUCAGGUGCGUACCAUUG(SEQ ID NO:2),GGUCCAGGAUGGCAAGGUC(SEQ ID NO:3),GGAGAGGAUGCCCACCUGA(SEQ ID NO:4)。ON-TARGETplus非靶向对照siRNA(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)用作RNA干扰对照物(阴性siRNA)。按照标准方法使用Oligofectamine™ 2000(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)将siRNA转染到癌细胞中。为了稳定下调KRT17,三种GIPZ慢病毒shRNA(GE Dharmacon Lafayette, CO, USA)用于筛选最佳下调效率。下列KRT shRNA序列用于下调KRT17表达:(5'-3')sh1-TCTTGACTGAGTCAGGTG(SEQ ID NO:5)、sh2-TCTTTCTTGACTGAGTCA(SEQ ID NO:6)和sh3-CTGTCTCAAACCTGGTGCG(SEQ ID NO:7)。阴性GIPZ慢病毒shRNA对照物用作阴性shRNA。遵循制造商方法进行慢病毒生产。在癌细胞转导后,以10微克/毫升选择细胞,并对各细胞系生产稳定克隆。

[0076] 细胞增殖、细胞周期分析和衰老检测.瞬时转染后二十四小时,SiHa和CaSki细胞以4000细胞/孔在96孔板中接种。通过在培养基中孵育10微升WST-1(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)2小时并读取450和630纳米处的吸光度在第1、3和5天来进行细胞增殖测定。由630纳米处的吸光度减去450纳米处的吸光度来计算细胞增殖速率。进行

细胞数吸光度曲线以计算每孔的细胞。使用碘化丙啶和吖啶橙染色通过流式细胞计量术进行细胞周期分析。分别在瞬时和稳定转染后三天或两周,收获细胞并以 $0.5-1 \times 10^6$ 细胞/毫升重新悬浮在含有0.02毫克/毫升RNase H(Invitrogen)和0.05毫克/毫升碘化丙啶(Sigma-Aldrich)的改性Krishan缓冲液中。用Modfit LT软件第3版(Verity Software House, Topsham, ME, USA)计算结果。对于吖啶橙,如前所述进行细胞周期染色和分析(Darzynkiewicz等人,1980;El-Naggar,2004)。在Stony Brook University在Research Flow Cytometry core在FACSCalibur™(Becton Dickinson)中分析所有样品。衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(Cell Signaling, Danvers, MA, USA#9860)用于按照制造商指南测定衰老细胞的百分比。

[0077] 血清饥饿释放、环己酰亚胺追踪和细霉菌B治疗。对于蛋白稳定性分析,在50%汇合下将细胞接种到60毫米培养皿中,血清饥饿48小时。在血清饥饿后,细胞用含有20%FBS和40微克/毫升的环己酰亚胺(CHX,目录号239764;Calbiochem)的DMEM重新刺激。在指定时间点处,制备全细胞提取物并进行蛋白印迹试验。

[0078] 蛋白印迹法和核内蛋白的提取。用RIPA(Sigma-Aldrich)缓冲液收集全细胞蛋白样品并随后超声处理。核内和细胞质蛋白通过NE-PER™蛋白提取试剂(Pierce)按照制造商的指南提取。蛋白浓度通过BCA蛋白测定法(Pierce)测定。将等量的样品装载到十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移至聚偏二氟乙烯膜。该膜用TBS/0.5%Tween-20中的5%脱脂乳(TBS-T)在室温下封闭30分钟,随后用以下探测:小鼠抗角蛋白17抗体(Cat#sc-101461, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、小鼠抗人p27^{KIP1}抗体(Cat#610242, BD transduction Labs)、兔抗人pRB抗体(Cat#9313S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、兔抗-细胞周期蛋白D1(Cat#2978S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、兔抗-SKP2(Cat#2652P, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、兔抗-phospho p27^{KIP1}Ser10(Cat#sc-12939-R, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、小鼠抗-JAB1(Cat#sc-13157, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、小鼠抗-HPV16 E6/18E6(Cat#sc-460, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、小鼠抗-HPV16 E7(Cat#sc-6981, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、兔抗-细胞周期蛋白A(Cat#sc-751, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、小鼠抗-RNF123(KPC1)(Cat#sc-101122, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、兔抗-UBE3A(Cat#AP2154B ABGENT, San Diego, CA, USA)、兔抗-p130(Cat#sc-317, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、兔抗-phospho角蛋白17Ser44(Cat#3519S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、兔抗-细胞角蛋白17(Cat#ab109725, Abcam, Cambridge, MA, USA)、小鼠抗-p53抗体(Cat#sc-126, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、小鼠抗人p21抗体(Cat#2946, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)、小鼠抗-GAPDH抗体(Cat#sc-365062, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、小鼠抗人 α -微管蛋白抗体(Cat#05-829, Millipore, Temecula, CA, USA)、小鼠抗-核纤层蛋白B1(Cat#ab90576, Abcam, Cambridge, MA, USA),在4°C下过夜。山羊抗-兔和抗-小鼠以及兔抗-山羊辣根过氧化物酶-缀合次级抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)以1:5000使用。用SuperSignal West Pico化学发光底物(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)检测辣根过氧化物酶活性并在UVP生物成像系统(Upland, CA, USA)中显现。使用ImageJ软件(National Institute of Health, Bethesda, MA, USA)定

量表达水平,并如图9中所示归一化至加载对照物。

[0079] 实施例2.生物标记物发现和候选选择

通过激光捕获显微切割处理来自22个福尔马林固定石蜡包埋组织(包括正常宫颈粘膜、LSIL、HSIL和鳞状细胞癌)的病灶性上皮细胞以进行蛋白质组学分析。将收集自各类别的多个患者的细胞汇集以鉴定蛋白质丰度方面最稳健和一致的差异。使用质谱兼容性裂解缓冲液从福尔马林固定石蜡包埋组织中提取蛋白并用高分辨率质谱仪LTQ-OrbitrapXL进行分析。使用本领域普通技术人员已知的2D液相色谱-串联质谱分析法,我们以1%的误发现率鉴定了1750种蛋白,并使用频谱计数法导出了这些类别中这些蛋白的相对定量(数据未显示)。参见Liu H等人,Anal Chem.(2004)76:4193-201。为了通过鸟枪蛋白质组学分析检查福尔马林固定石蜡包埋组织的全面采样,我们通过基因本体数据库(Gene Ontology database)评估了鉴定的蛋白的细胞定位,并显示了由支持分析福尔马林固定石蜡包埋组织的效用的多种范围的亚细胞位置鉴定这些蛋白(图1b)。为了选择候选生物标记物,我们首先在诊断类别中基于频谱计数选择具有至少两倍差异的蛋白,并进一步通过选择指示疾病进展的蛋白表达谱缩小这一名单的范围。根据这些标准,选择两种候选生物标记物KRT17和KRT4用于进一步验证。这两种蛋白在正常向鳞状细胞癌的进展中显示了相反的趋势。KRT17由正常向LSIL、HSIL和向鳞状细胞癌中显示提高的表达,而KRT4在正常向鳞状细胞癌的进展中显示降低的表达(数据未显示)。

[0080] 实施例3.作为诊断标记物的角蛋白4和角蛋白17

为了确定KRT4和KRT17在一种或多种诊断类别中的诊断价值,在来自四个诊断类别的归档患者组织的组织微阵列上对KRT4和KRT17进行免疫组织化学染色:正常、LSIL、HSIL、鳞状细胞癌。免疫染色切片通过PathSQ评分,其定量强阳性染色细胞的百分比。对KRT4的免疫组织化学分析显示了在正常、LSIL和在一些HSIL中的细胞质表达,但在鳞状细胞癌中显著降低(图2A-B)。KRT4的损失具有68%的敏感性(95%CI:46-85%) and 61%的特异性(95%CI:49-72%)以便区分鳞状细胞癌与其它诊断类别(表2)。表2中包括阳性预测值、阴性预测值和接受者操作曲线模型的曲线下面积以及误分类率。按照PathSQ分界值($\geq 6\%$ 的阳性细胞),84%的正常病例、44%的LSIL、55%的HSIL和32%的鳞状细胞癌病例对KRT4为阳性。

[0081] 与KRT4中看到的相比,KRT17免疫组织化学染色证明了细胞质表达的相反模式;在大多数HSIL和鳞状细胞癌中检测到KRT17,但在正常鳞状粘膜(包括外宫颈鳞状粘膜)和LSIL中通常以可忽略的水平检测到(图3a-b)。KRT17具有94%的敏感性(95%CI:73-94%) and 86%的特异性(95%CI:73-94%)以便区分正常粘膜/LSI与HSIL/鳞状细胞癌(表2)。表2中包括阳性预测值、阴性预测值、曲线下面积以及误分类率。基于PathSQ分界值($\geq 8\%$ 的阳性细胞),所有正常病例是阴性的,27%的LSIL病例是阳性的,并且96%的HSIL病例和92%的鳞状细胞癌病例是阳性的。因此,我们的研究结果表明,KRT17表达可以以高敏感性和特异性区分具有恶性病变的患者(HSIL或鳞状细胞癌)与具有非恶性瞬时感染(LSIL)的患者或具有正常宫颈粘膜的健康个体。

[0082] 接下来,检查了与疾病无关的参数,包括患者年龄和组织的储存时间,以确定是否任何因素影响KRT17作为用于HSIL与鳞状细胞癌病例的生物标记物的可靠性。在KRT17表达与患者年龄或组织储存长度之间没有发现显著的相关性(分别地, $r=0.02$ 和 $r=-0.40$, p 值 >0.05)。此外,在具有宫颈炎、成熟鳞状上皮化生、活检部位变化(伤口愈合)或单纯疱疹病

毒感染的病例中没有发现KRT17表达的统计学显著变化(图4A)。但是,在未成熟鳞状上皮化生中(图4A-B)和在宫颈内储备细胞中检测到KRT17。由具有宫颈内粘膜的17个病例中,70%(12/17)在储备细胞中具有阳性染色。最后,在KRT17表达与鳞状细胞癌患者中不同的高危型HPV类型之间没有统计学上的显著相关性(图4C)。

[0083] 实施例4.角蛋白17作为患者存活期的预后生物标记物

鉴于KRT17区分高度病变与正常粘膜和LSIL的高敏感性和特异性,进一步检查了另外的鳞状细胞癌病例,以确定是否KRT17对患者存活期具有预后价值。基于Cox比例风险模型,KRT17表达与鳞状细胞癌患者中降低的总体存活期显著相关($p=0.009$)。Cox比例风险模型的中点,在 $\geq 50\%$ 的肿瘤细胞中的强染色用作阈值以分离用于Kaplan-Meier曲线中总体患者存活期的鳞状细胞癌病例(图5)。

[0084] 具有低KRT17表达的鳞状细胞癌患者的五年存活率估计为96.97%(95%CI:80.37-99.57%)。相反,具有高KRT17表达的鳞状细胞癌患者的五年存活率估计为64.31%(95%CI:39.2-81.21%)。在鳞状细胞癌患者的十年存活率中观察到类似趋势。具有低KRT17表达的鳞状细胞癌患者的十年存活率估计为96.97%(95%CI:80.37-99.57%),但是具有高KRT17表达的鳞状细胞癌患者的十年存活率估计为52.61%(95%CI:28.33-72.11%)。尽管KRT17表达与总体患者存活期相关,KRT17表达与肿瘤分期、病理分级或淋巴结状态并不显著相关(图6-7)。总而言之,本文中提供的数据表明,高KRT17表达与鳞状细胞癌患者的不良总体存活期相关(风险比=14.76,95%CI 1.87-116.58, $p=0.01$,图5)。

[0085] 为了进一步验证KRT17作为患者存活期和/或治疗效果的预后生物标记物的用途,从UMass Memorial Medical Center的档案收藏中回顾性地选择另外的74个福尔马林固定石蜡包埋手术组织块,符合Stony Brook Medicine的IRB批准的规程。选择标准是:(i)具有原发性宫颈鳞状细胞癌(SCC)的病理诊断的病例,和(ii)诊断时患者年龄大于18岁。在其它解剖部位诊断患有癌症的患者被排除在研究之外。通过临床分期和肿瘤分级将SCC分类。存活期数据获自UMass Memorial Cancer Registry。

[0086] 使用频率和百分比描述分类数据。使用平均值 \pm 标准偏差或标准误差来描述连续数据。两组的平均值之间的统计学显著性用学生t检验或Mann-Whitney U检验来确定。多个组的平均值的统计学比较使用单向ANOVA或Kruskal-Wallis ANOVA通过秩来确定。进行总体存活期分析以验证角蛋白17的表达水平与临床结果之间的关系。采用Kaplan-Meier法生成图7中显示的存活期曲线。使用时序检验测试角蛋白17表达组的存活期函数的分布。如上文定义的那样检测角蛋白17表达组,以检查在低角蛋白17患者(PathSQ <50)与高角蛋白17(PathSQ ≥ 50)分界组之间在总体存活率方面的任何差异。通过使用Cox比例风险模型进行多变量分析。该模型进一步检验了在调节被认为是总体存活率的关键预后决定指标的潜在混杂因素(如癌症的分期)时在总体存活期方面的任何差异。使用SAS 9.3(SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)和SigmaPlot 11(Systat Software, San Jose, CA, USA)进行所有分析。对于统计学显著性,设定在 $P < 0.05(\alpha)$, power(1- β)在 ≥ 0.8 。

[0087] 表1:病例的人口统计学和临床特征

	生物标记物 发现 (n= 22)	诊断验证 (n = 102)	存活期 分析 (n = 65)
诊断时的年龄 x̄ (Min-Max)	37 (19-60)	39 (19-78)	51 (28-78)
组织学 诊断类别			
正常宫颈黏膜	总计	25	
LSIL ^a		25	
HSIL ^b	22	27	
SCC ^c		25	65
临床分期 ^d			
II			43
III			4
IIII			18
肿瘤分级			
低等级 - G1			36
高等级 - G2 和 G3			29
淋巴结状态			
阴性 - N0			31
阳性 - N1			25
未评估 - NX			9

表2.按照PathSQ评分在不同诊断类别之间的角蛋白4和17接受者操作曲线分析和错误分类比率结果

标记物	分组	评分	AUC ^e (95% CI)	敏感性 (95% CI)	特异性 (95% CI)	PPV ^f (95% CI)	NPV ^g (95% CI)	错误率 (95% CI)
KRT4	SCC ^c (n = 25)	PathSQ	66 (55-77)	68 (46-85)	61 (49-72)	36 (23-52)	85 (72-93)	37 (27-47)
	vs 其它 (n = 77)							
KRT17	HSIL ^b +SCC (n = 52)	PathSQ	96 (92-99)	94 (83-98)	86 (73-94)	87 (75-94)	93 (82-98)	9 (4-17)
	vs 正常 +LSIL ^a (n = 50)							

[0001]

序列表

- <110> 纽约州立大学研究基金会
 <120> 作为子宫颈癌和存活期的生物标记物的角蛋白
 <130> 30354
 <150> 61/863, 671
 <151> 2013-08-08
 <150> 61/865, 750
 <151> 2013-08-14
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 针对人KRT17 mRNA转录的短干扰RNA分子
 <400> 1
 agaaagaacc ggugaccac 19
 <210> 2
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 针对人KRT17 mRNA转录的短干扰RNA分子
 <400> 2
 cgucaggugc guaccuug 19
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 针对人KRT17 mRNA转录的短干扰RNA分子
 <400> 3
 gguccaggau ggcaagguc 19
 <210> 4
 <211> 19

[0002]

<212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 针对人KRT17 mRNA转录的短干扰RNA分子

<400> 4
 ggagaggaug cccaccuga 19

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于下调人KRT17表达的短发夹RNA分子

<400> 5
 tcttgactg agtcaggtg 19

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于下调人KRT17表达的短发夹RNA分子

<400> 6
 tctttcttgt actgagtca 19

<210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用于下调人KRT17表达的短发夹RNA分子

<400> 7
 ctgtctcaaa cttggtgcg 19

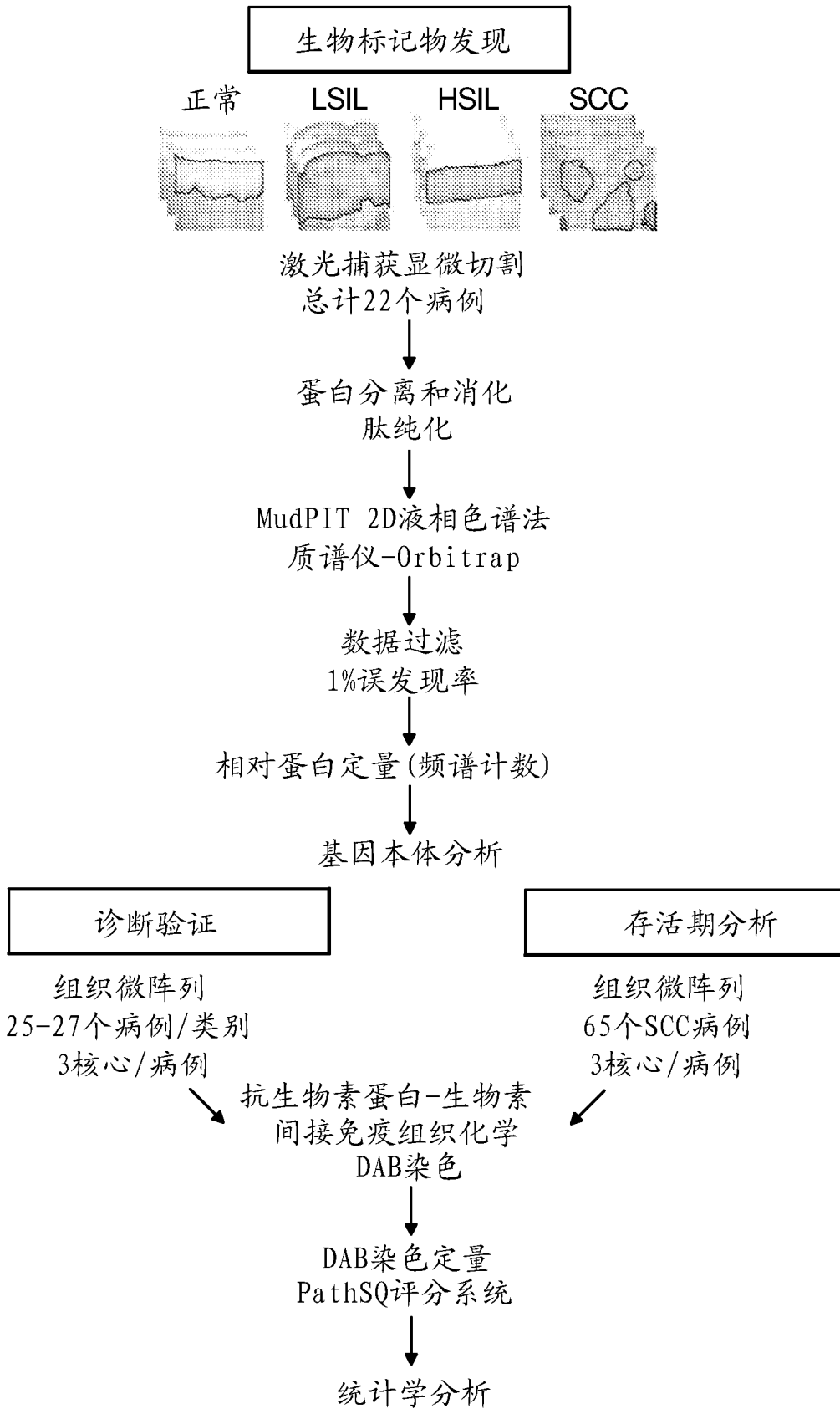


图 1A

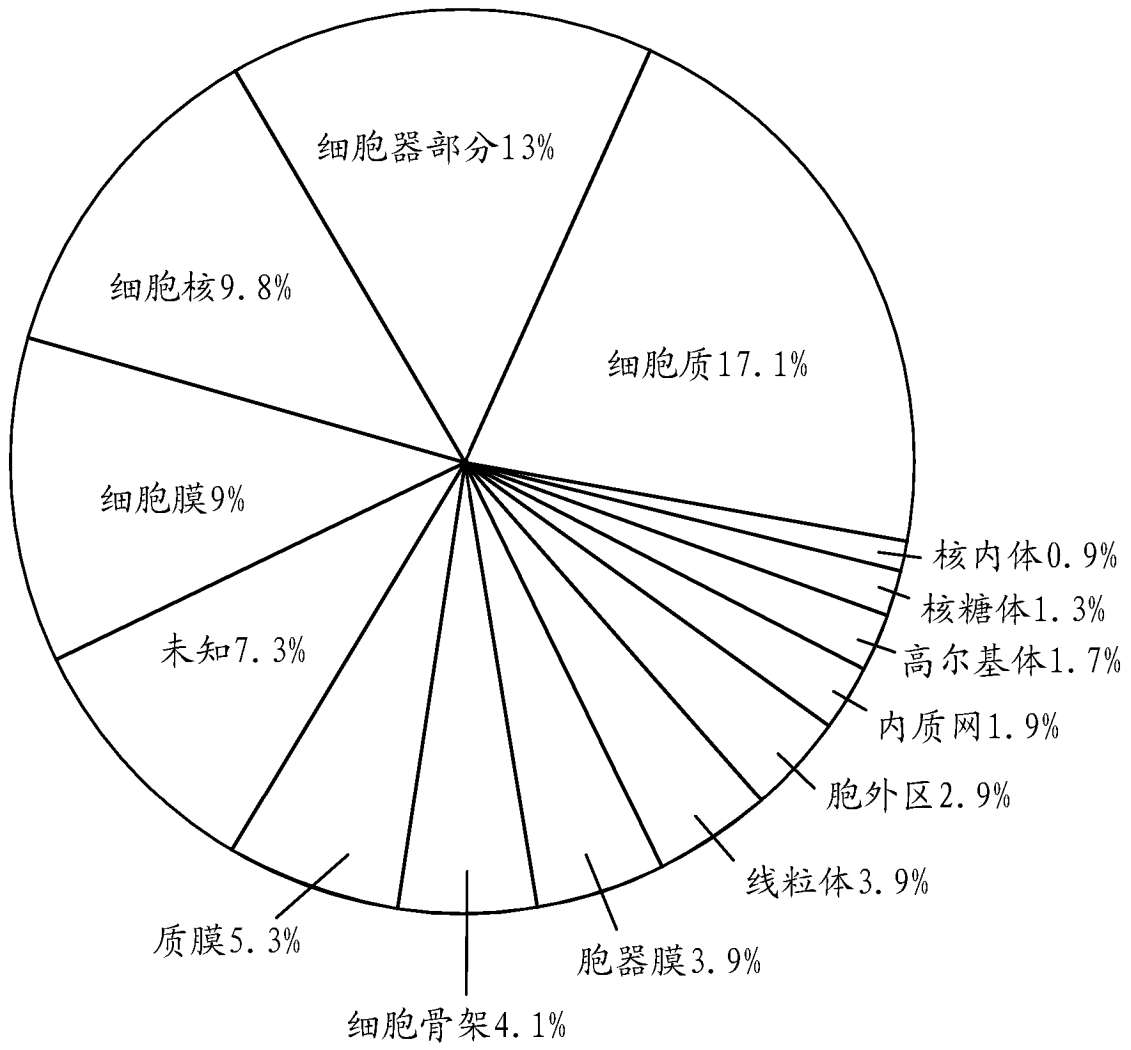


图 1B

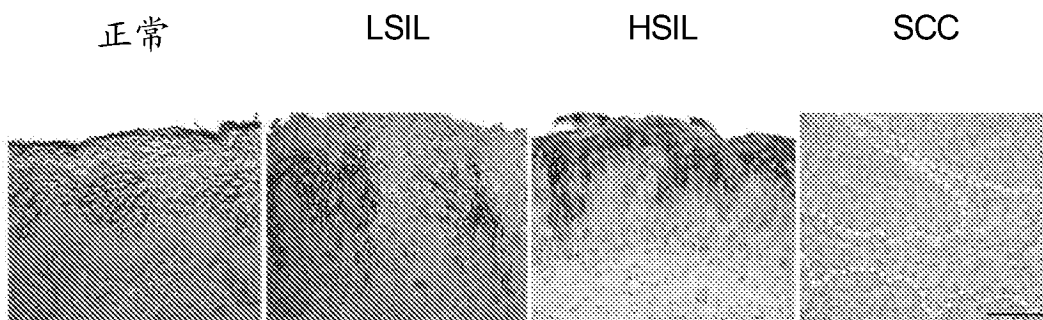


图 2A

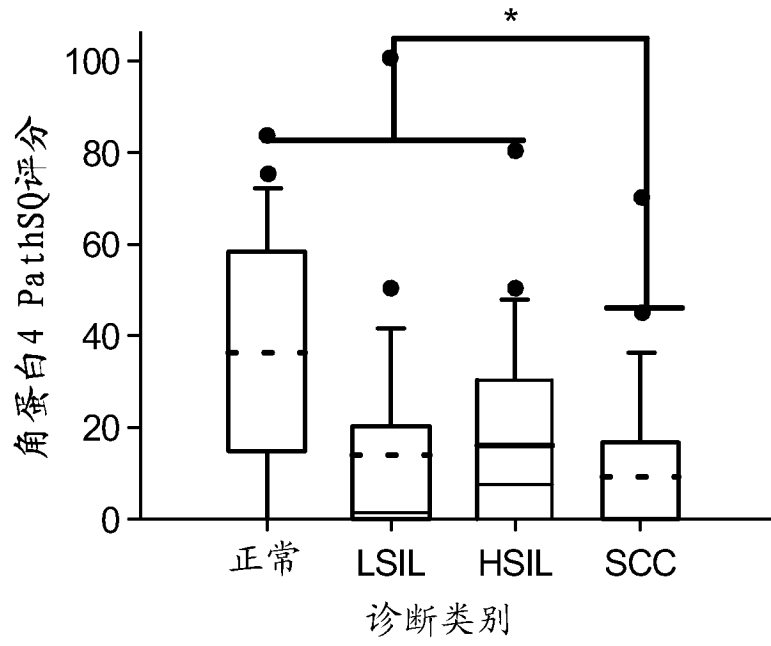


图 2B

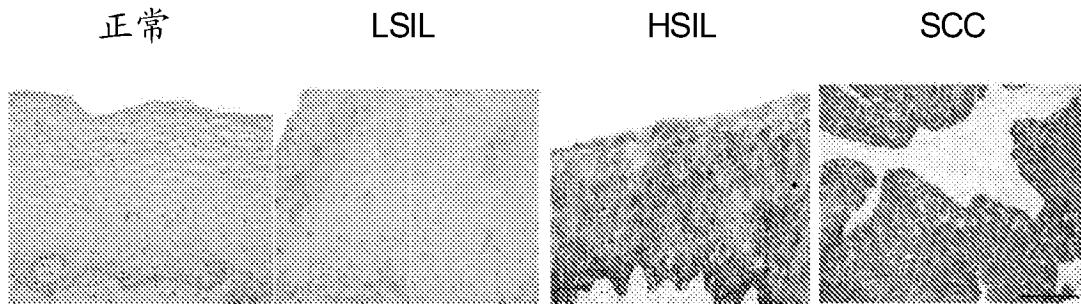


图 3A

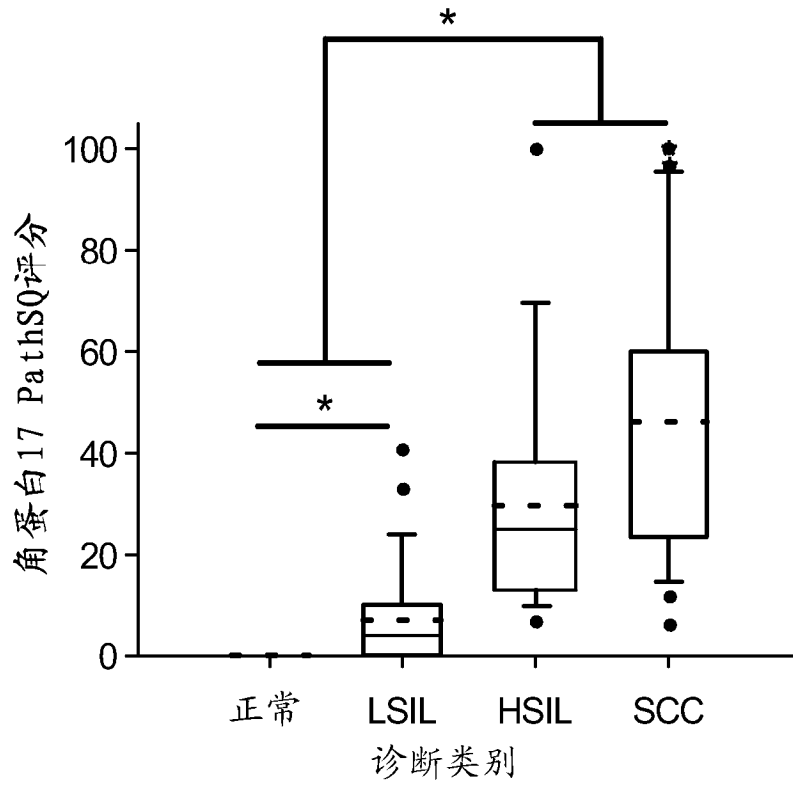


图 3B

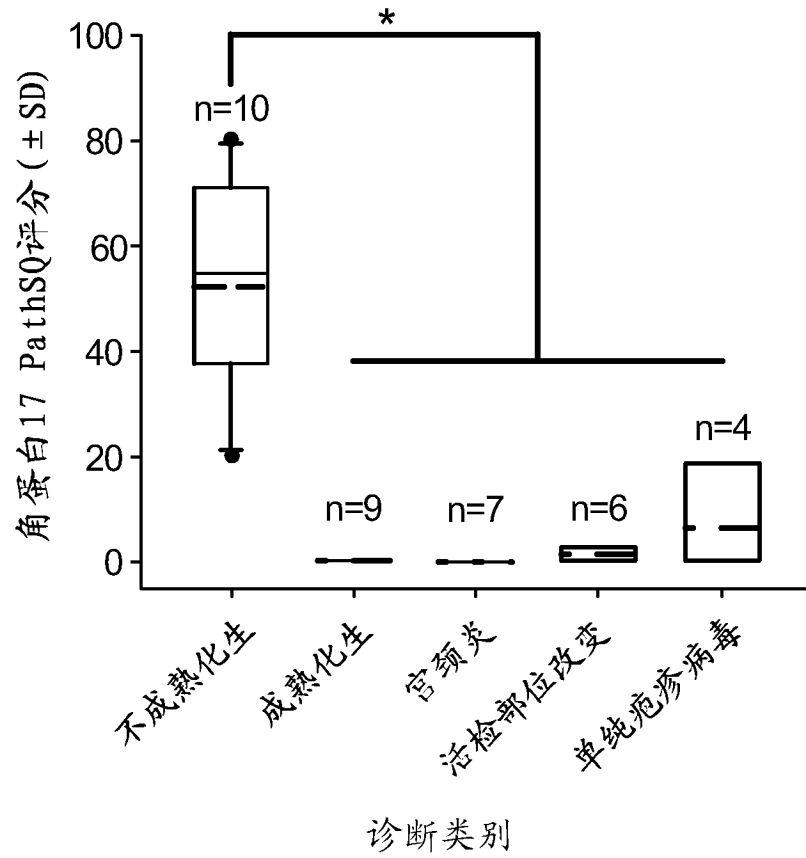


图 4A

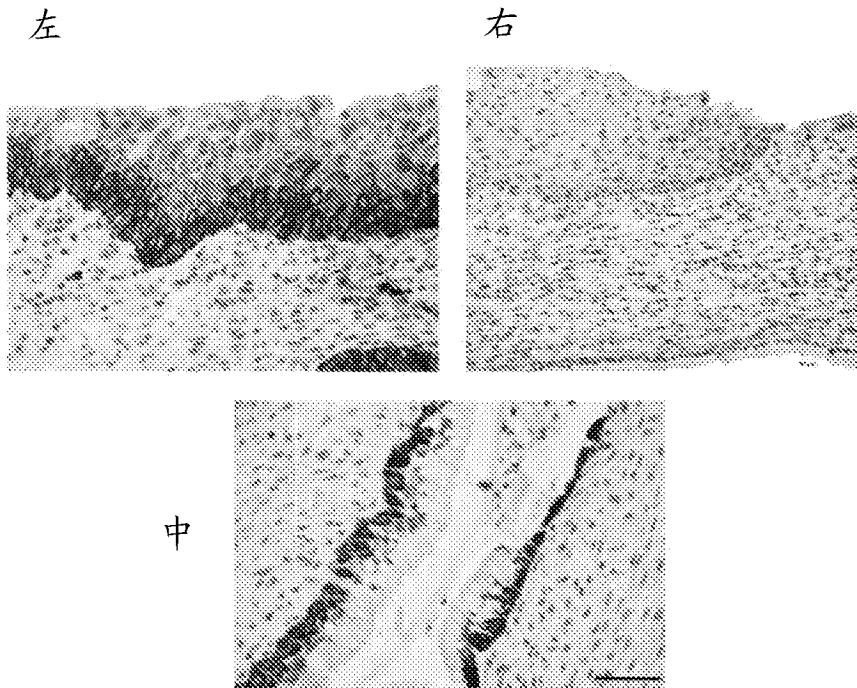


图 4B

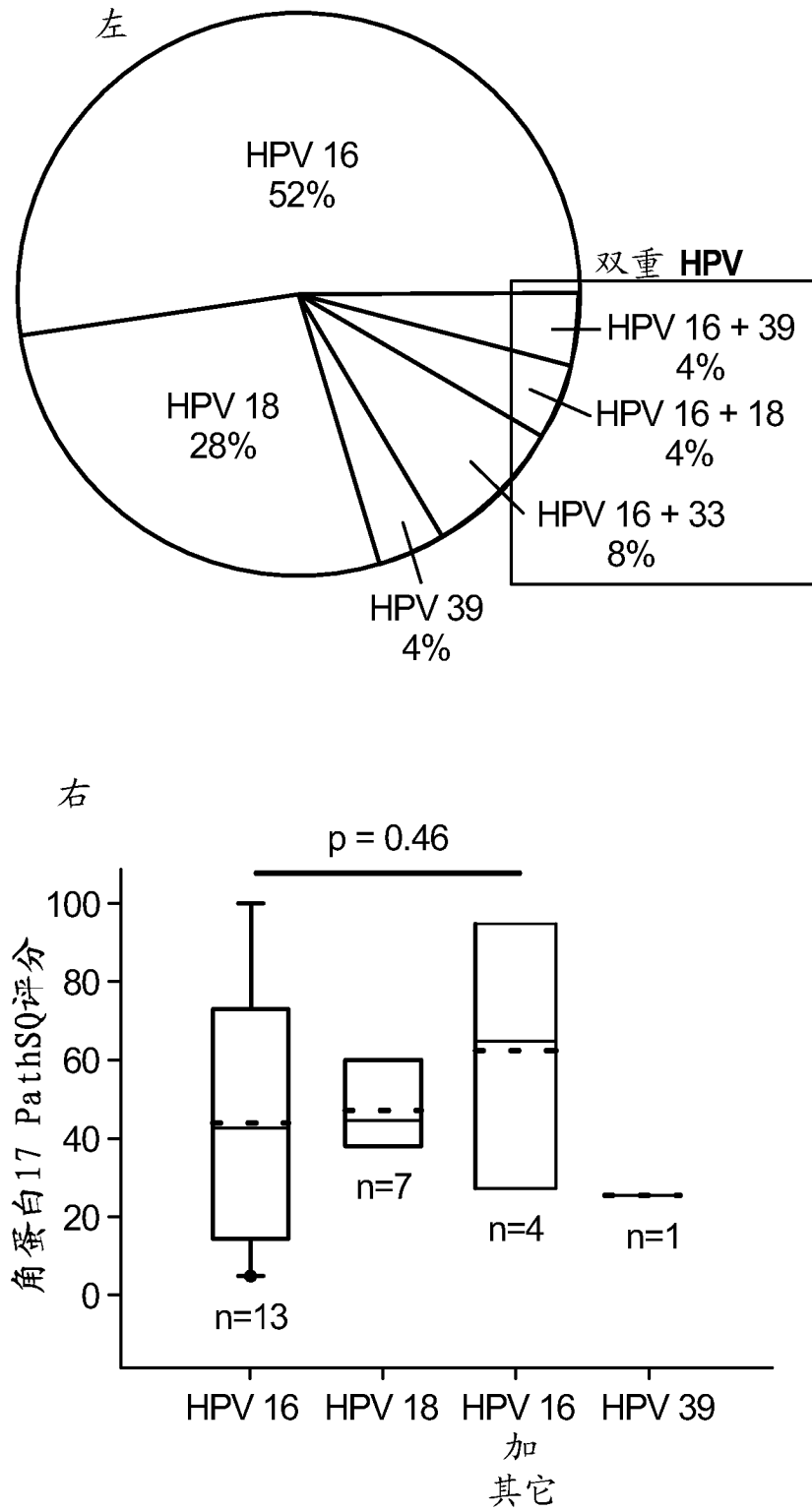


图 4C

采用处于风险的受试者数量的产品极限存活期评估

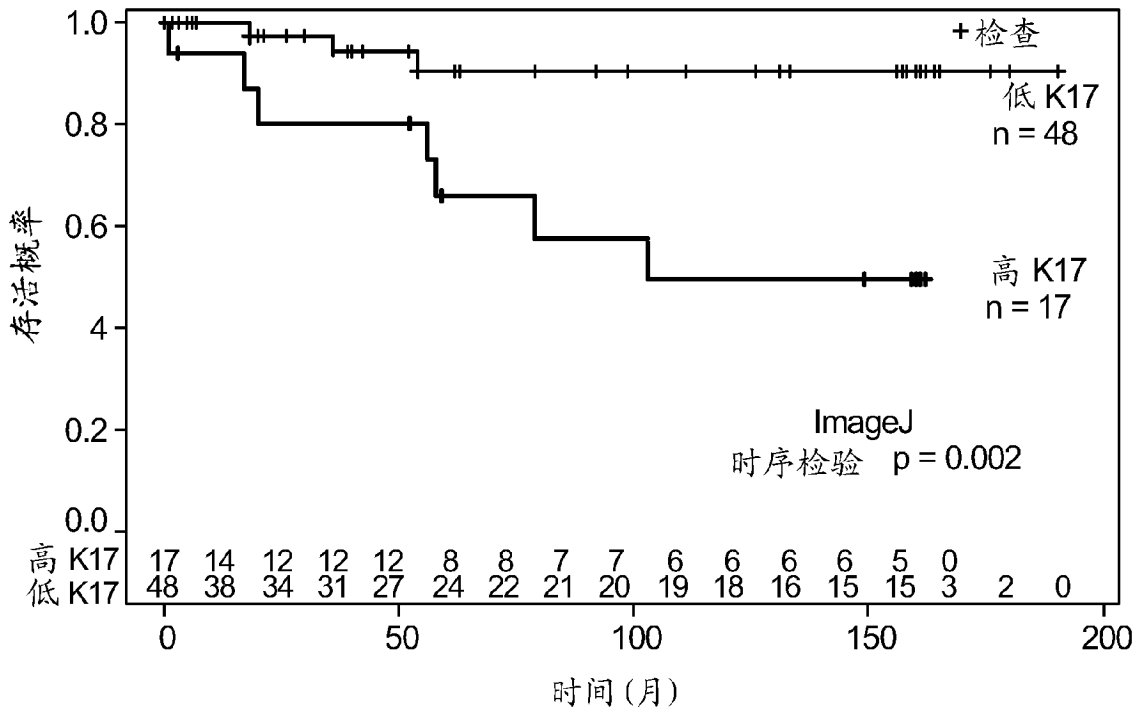


图 5A

采用处于风险的受试者数量的产品极限存活期评估

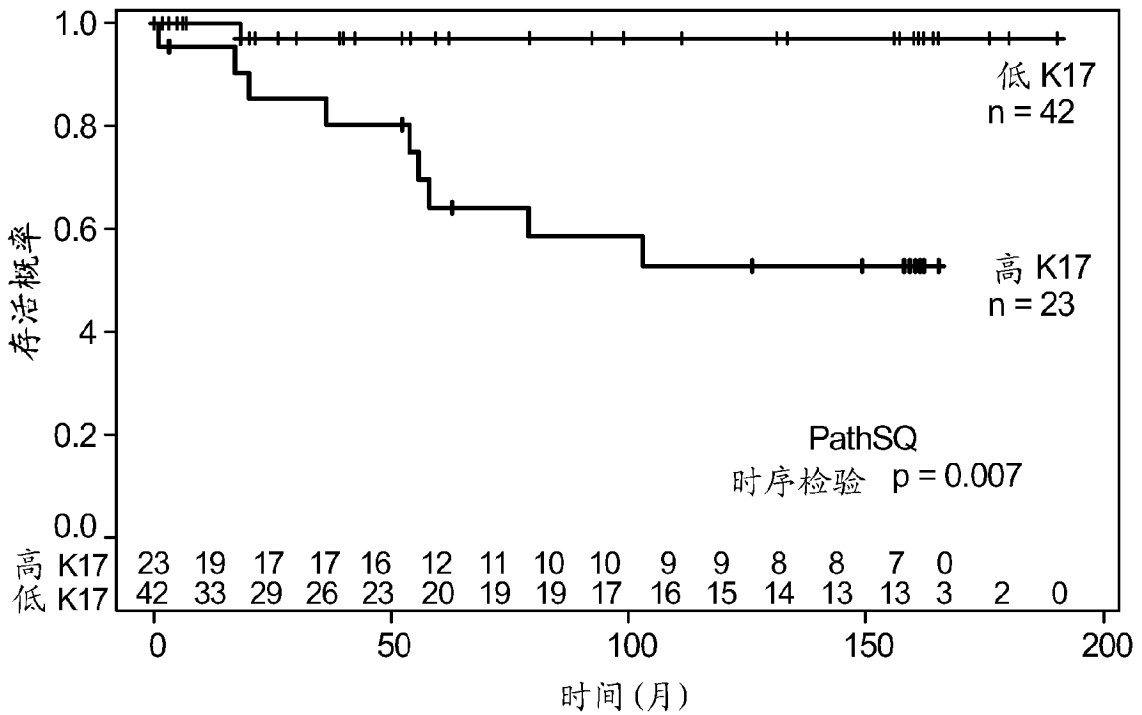


图 5B

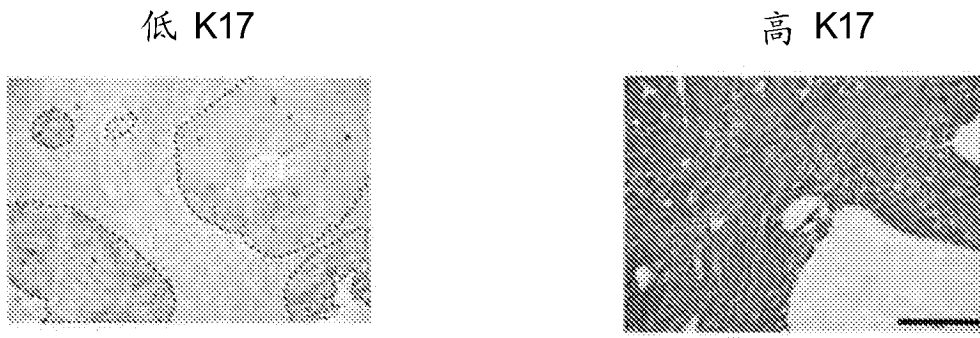


图 5C

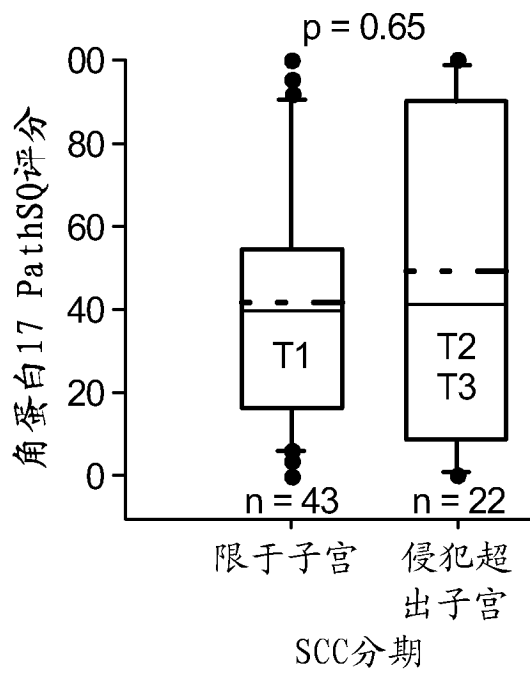


图 6A

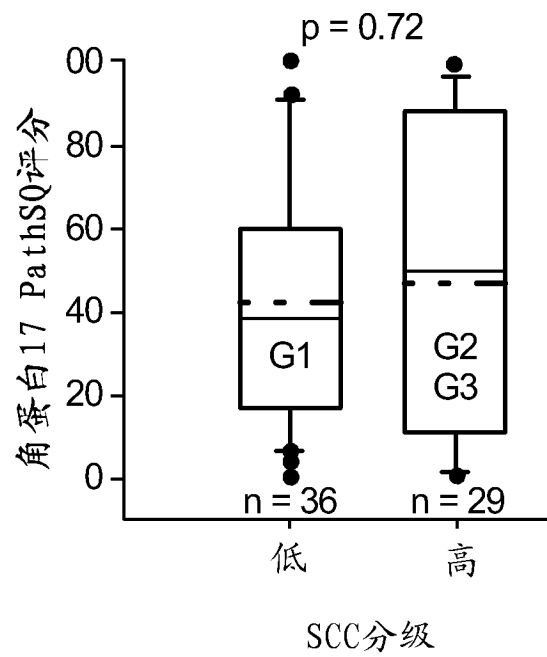


图 6B

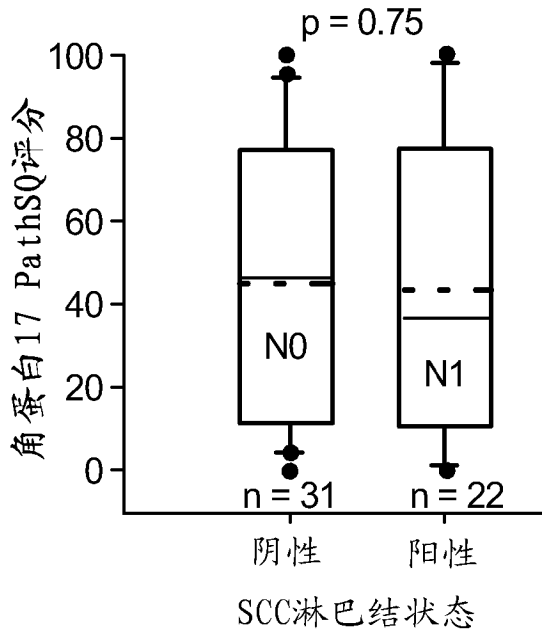


图 6C

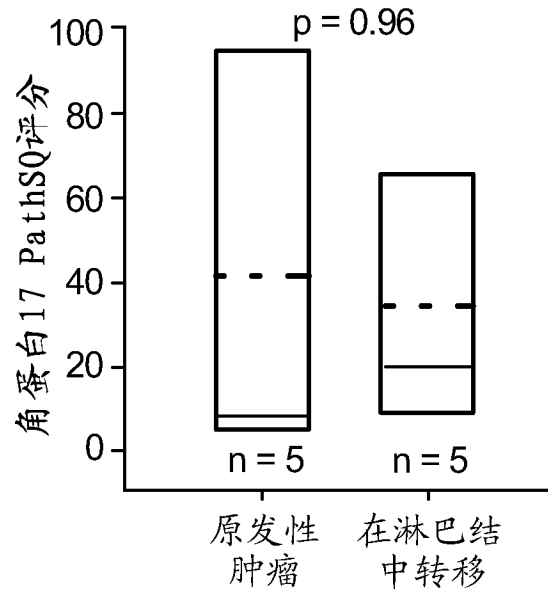


图 6D

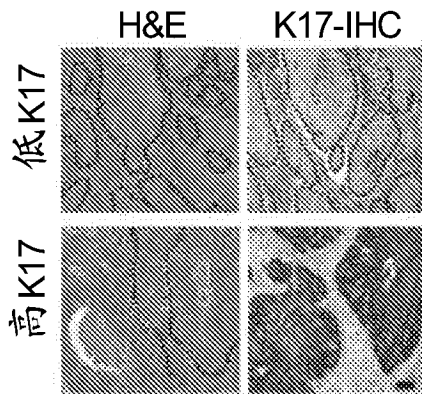


图 7A

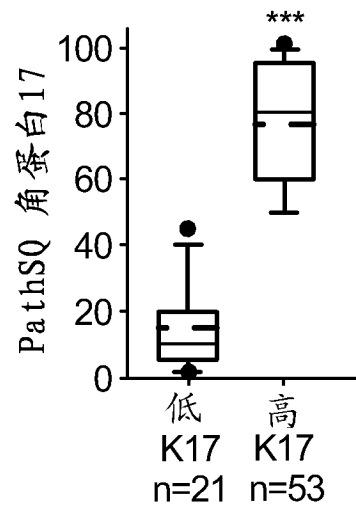


图 7B

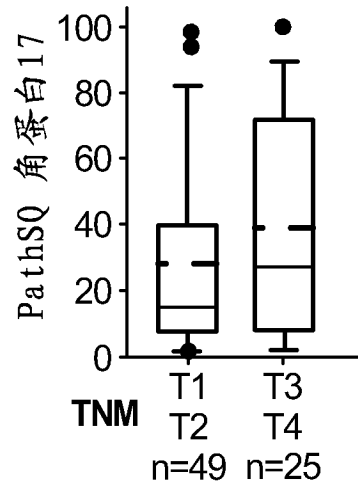
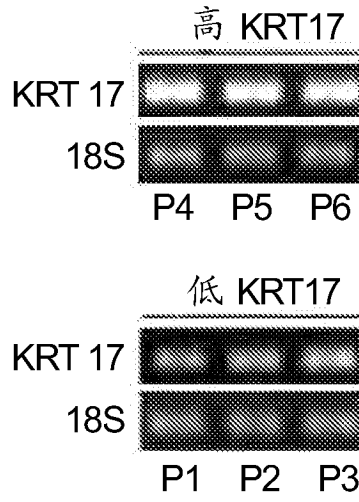
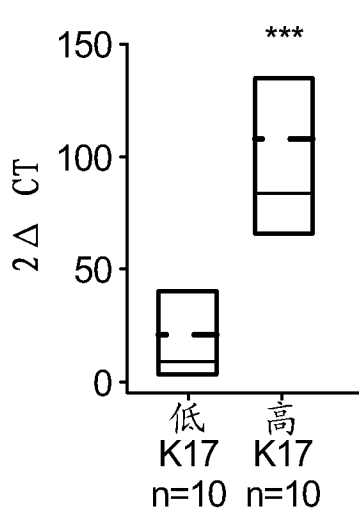


图 7C

图 7D

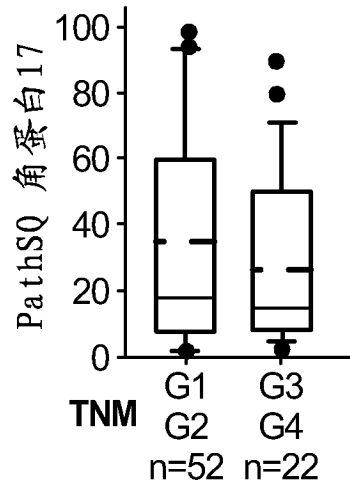


图 7E

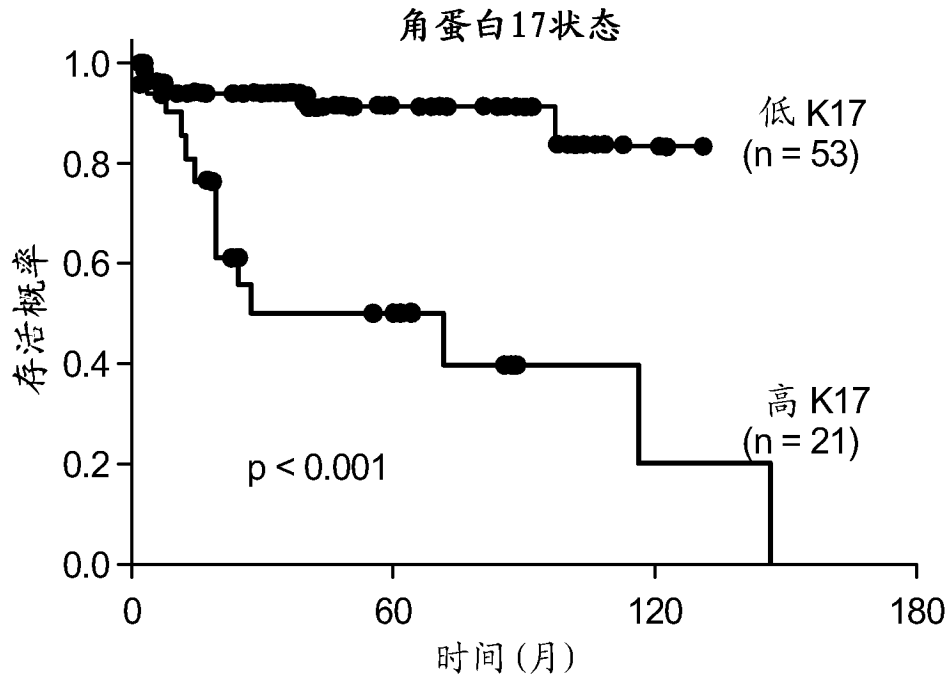


图 7F

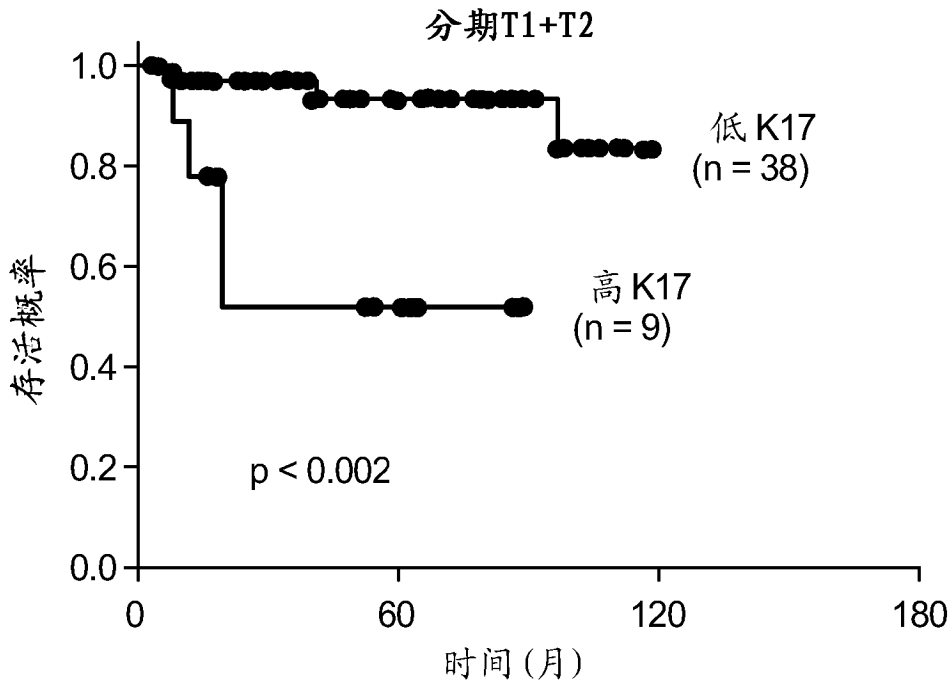


图 7G

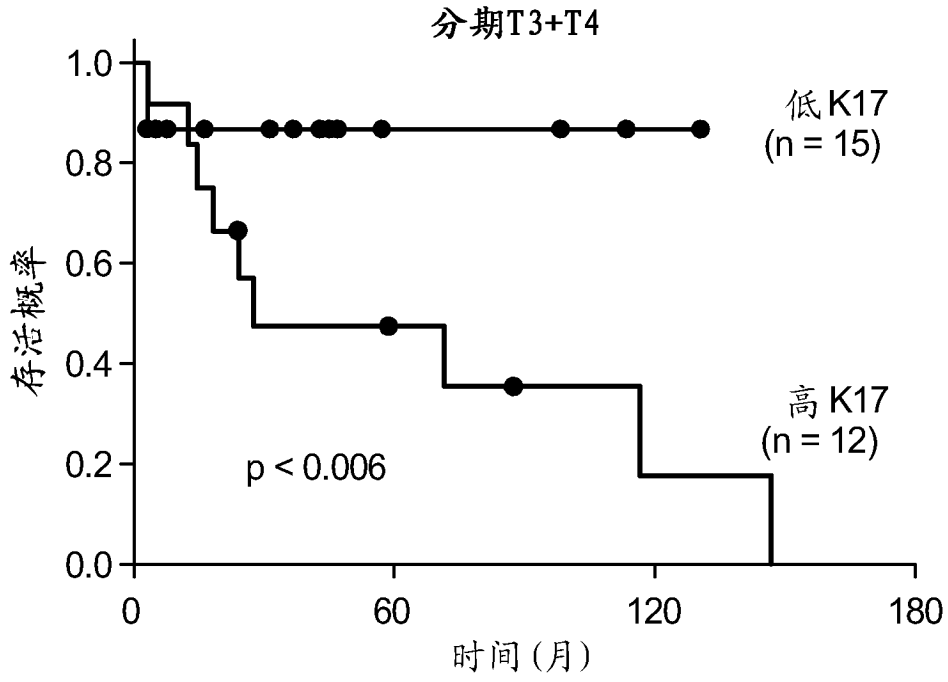


图 7H

变量	Wald- χ^2	p=值	HR ^a	95% CI ⁰
角蛋白17状态	5.287	0.021**	4.065	1.230-13.43
临床分期 ^c (T1, T2, T3, T4)	2.467	0.116	1.558	0.896-2.708
临床分期 ^c (T1+T2, T3+T4)	1.511	0.219	1.907	0.681-5.336

图 7I

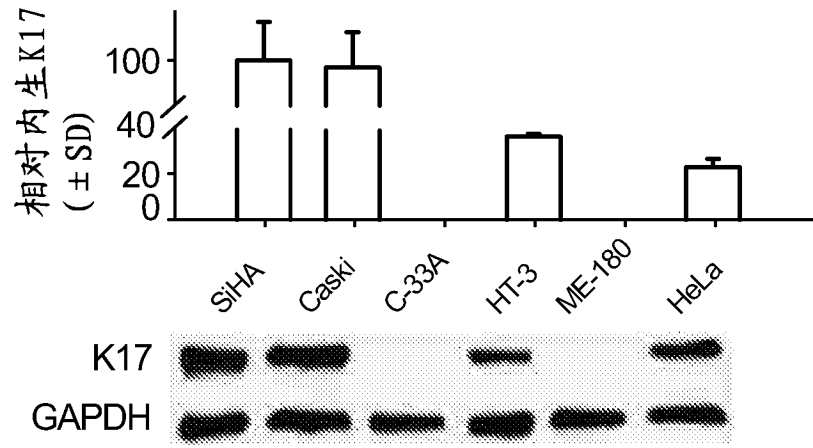


图 7J

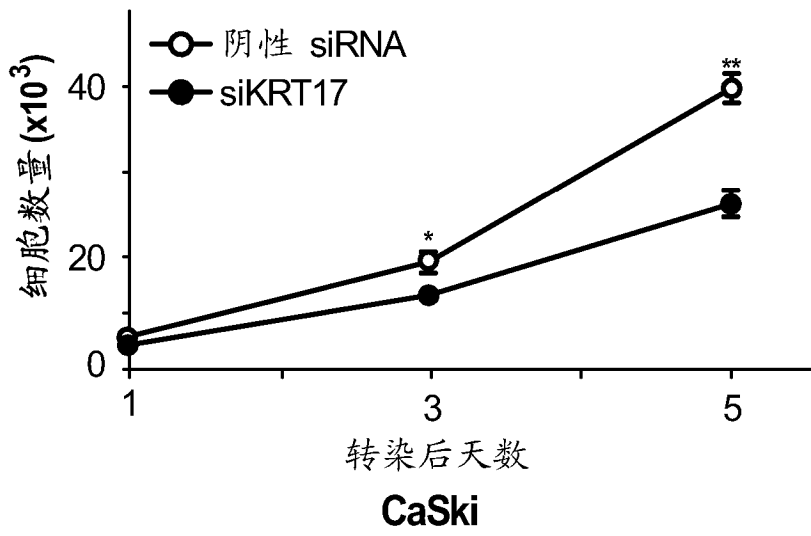
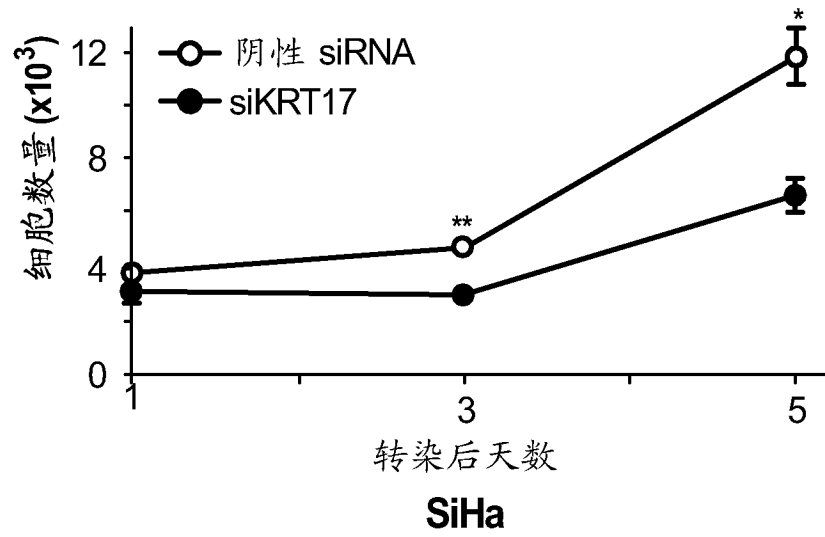


图 8A

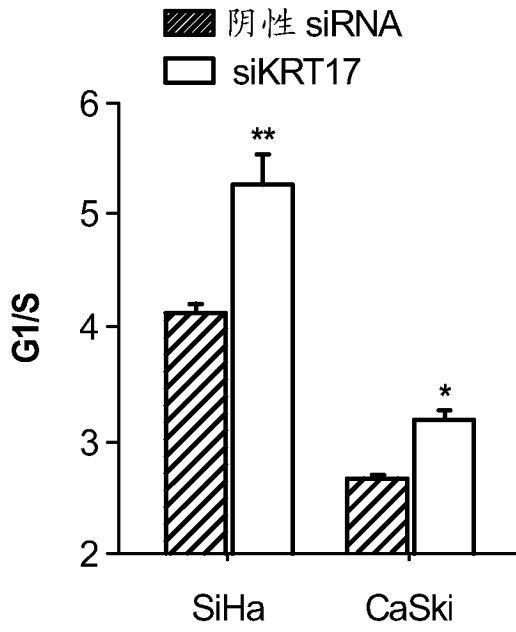


图 8B

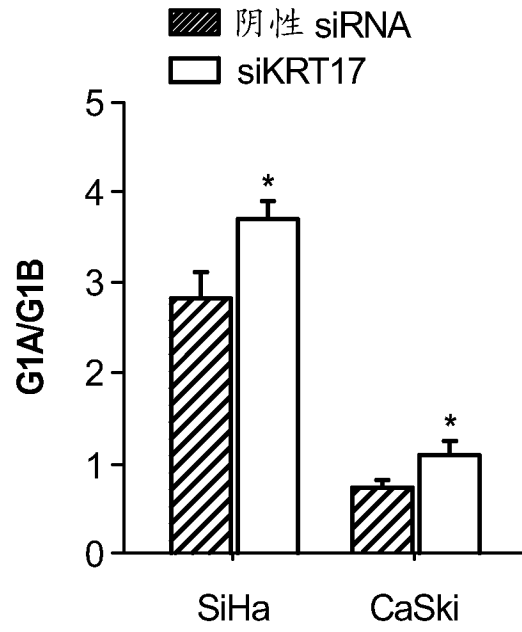


图 8C

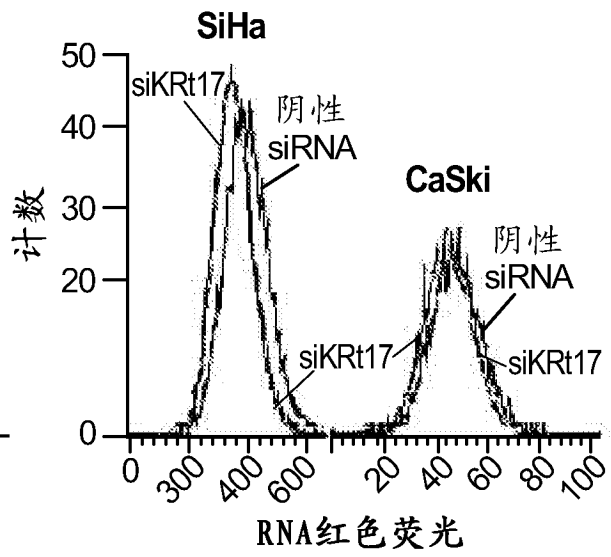
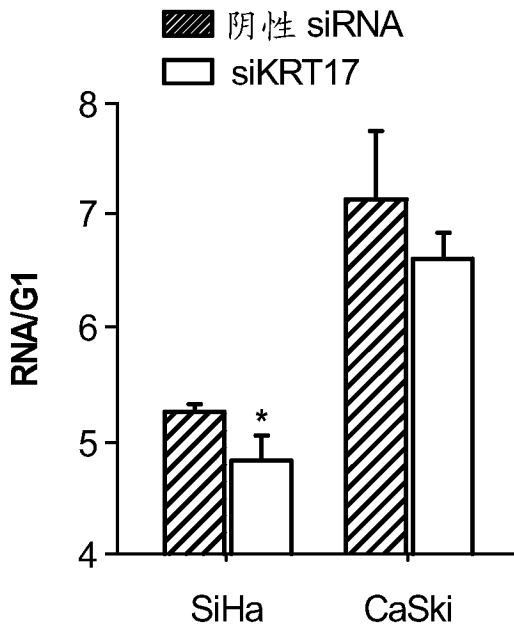


图 8D

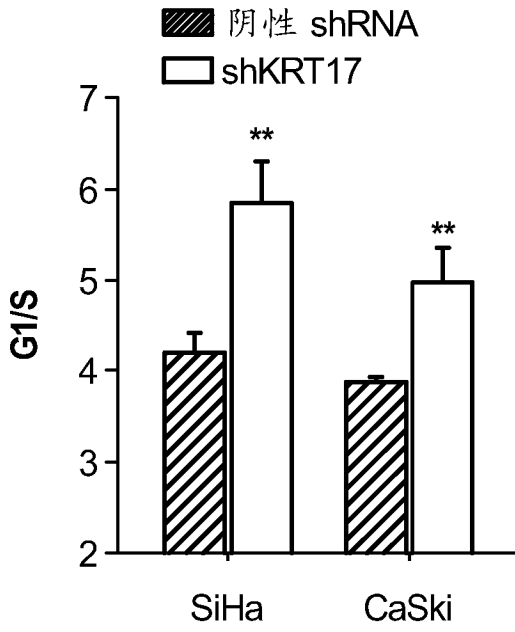


图 8E

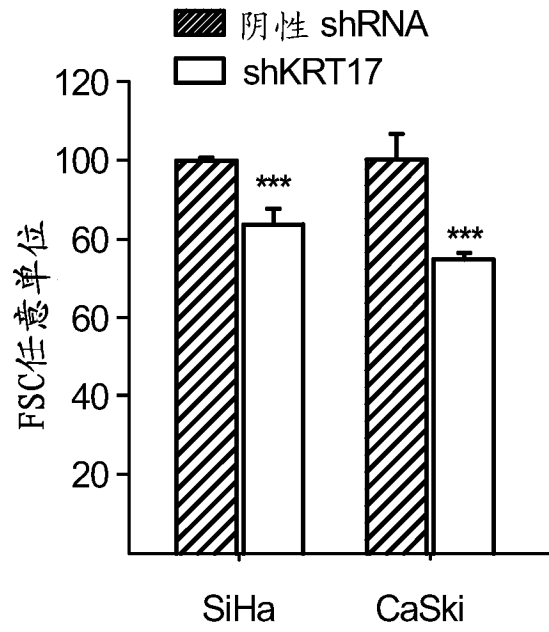


图 8F

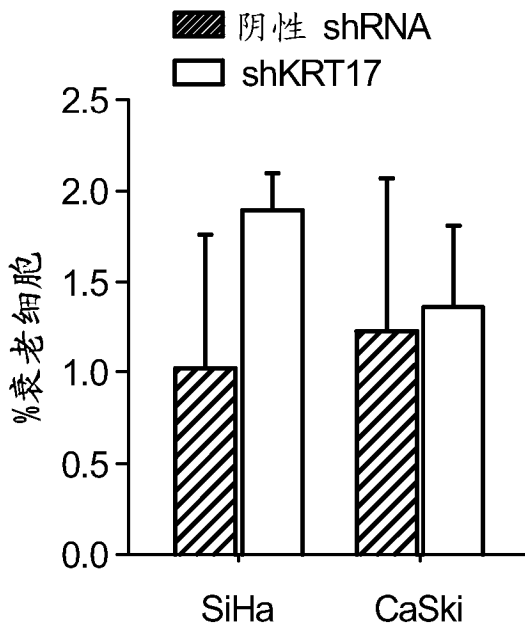


图 8G

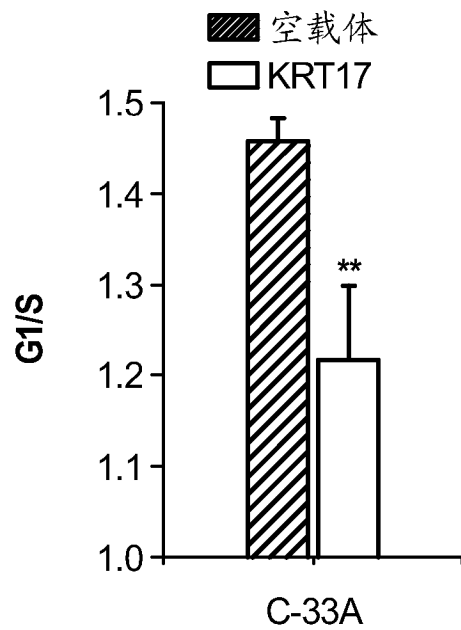


图 8H

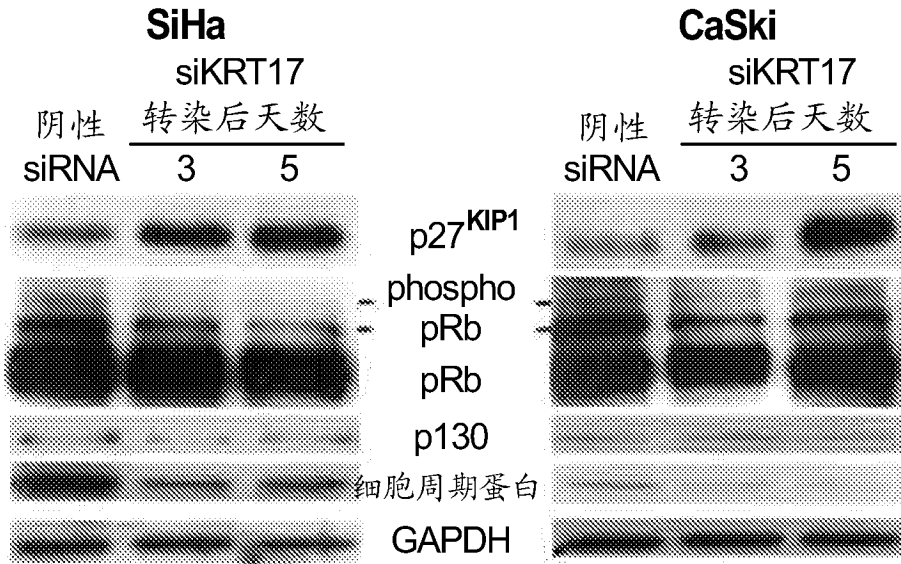


图 9A

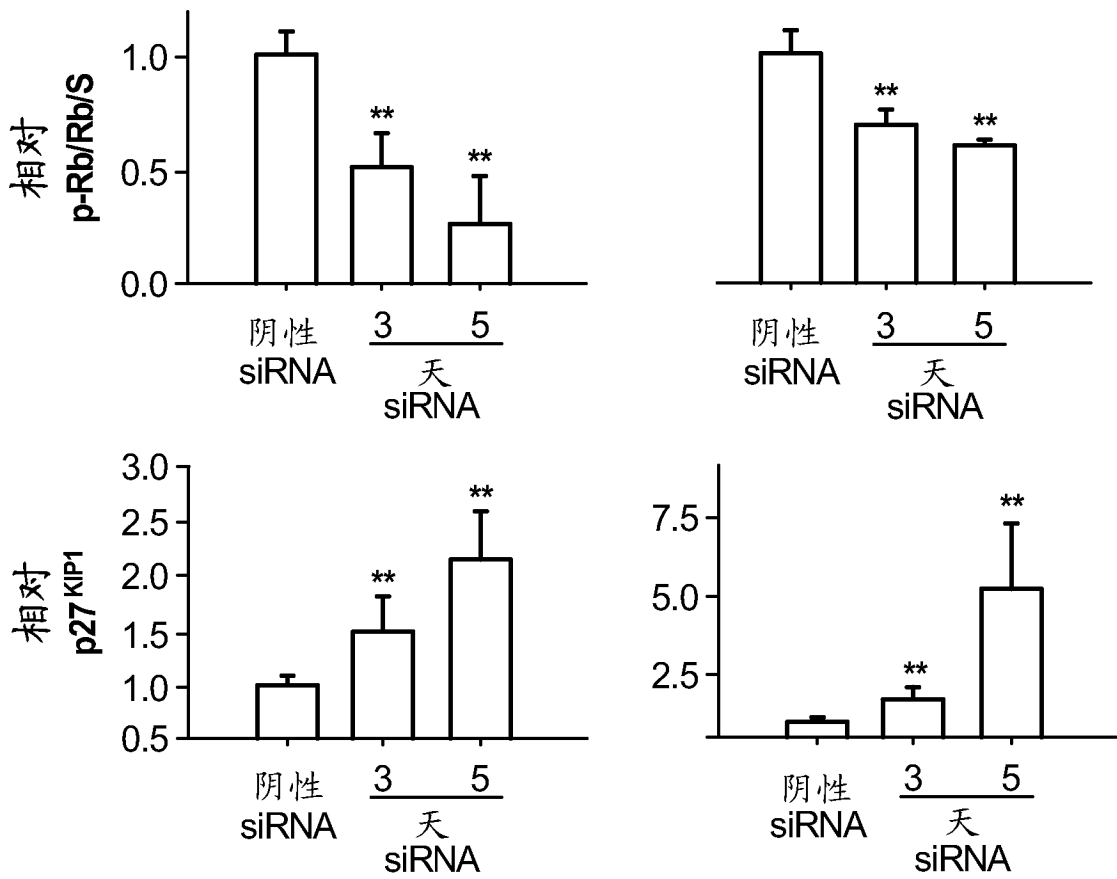


图 9B

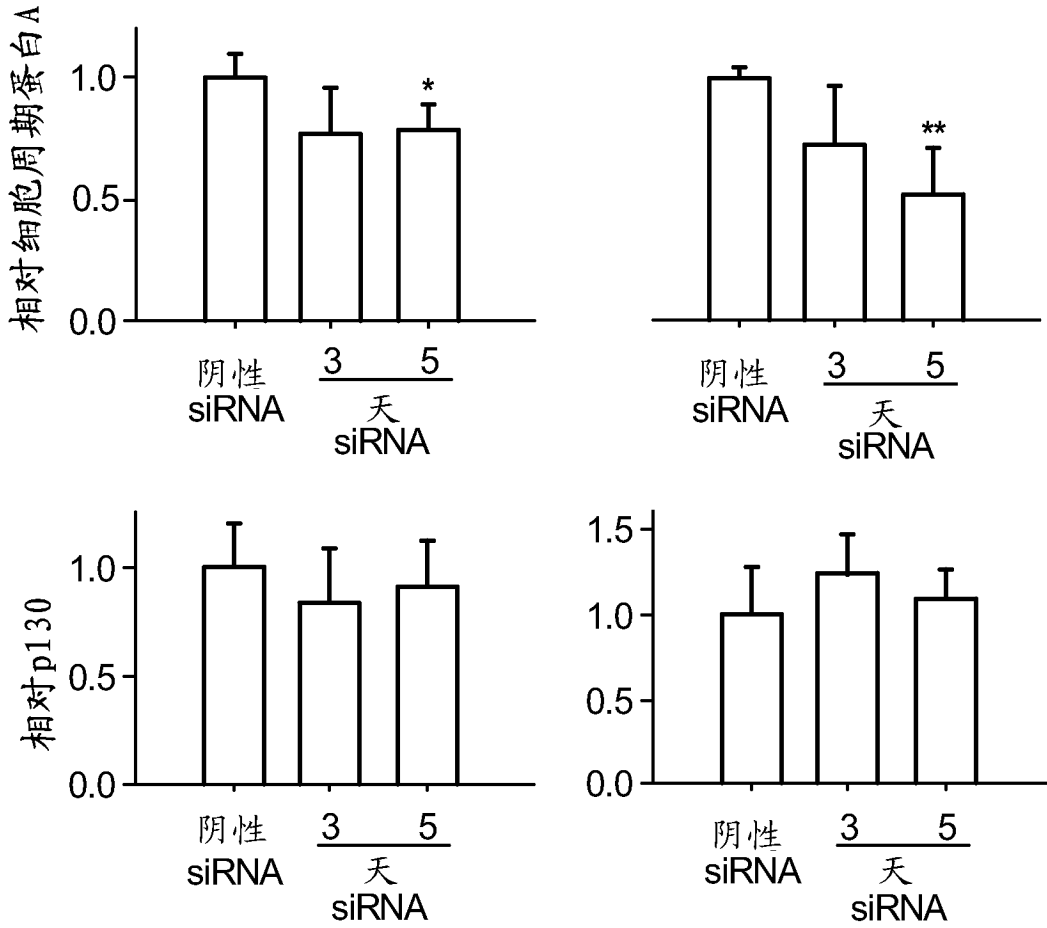


图 9C

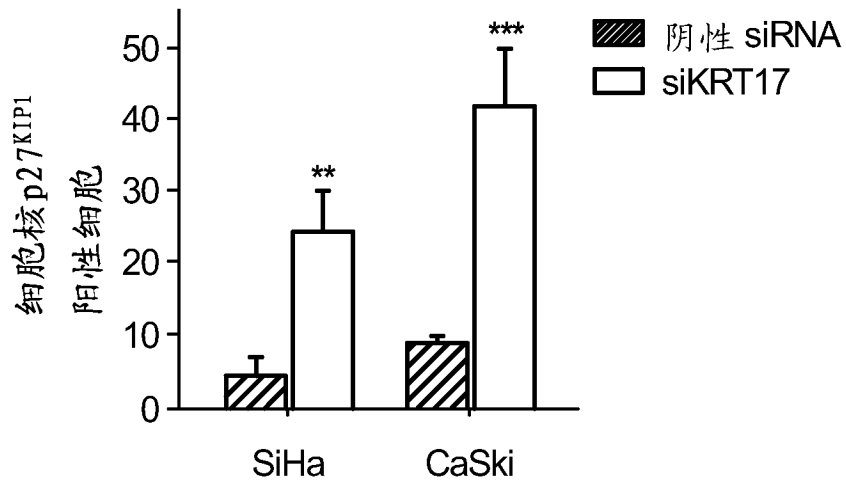


图 9D

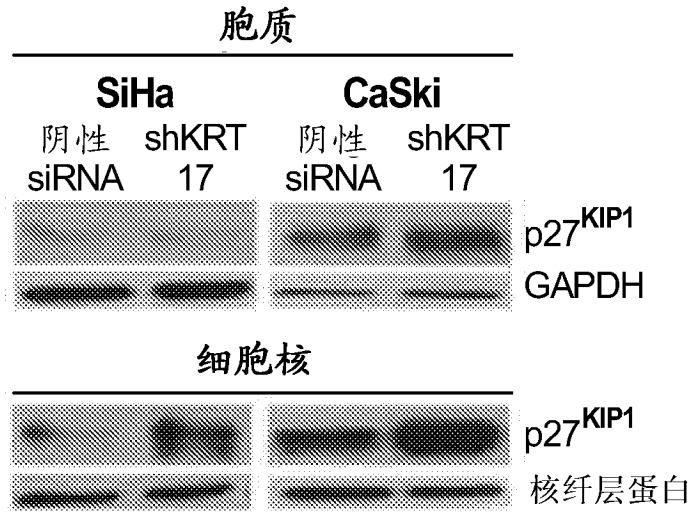


图 9E

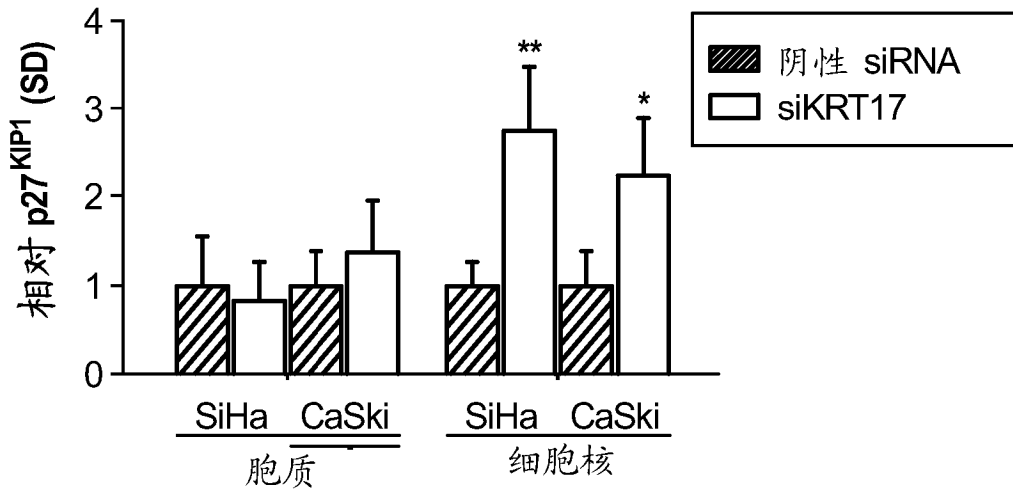


图 9F

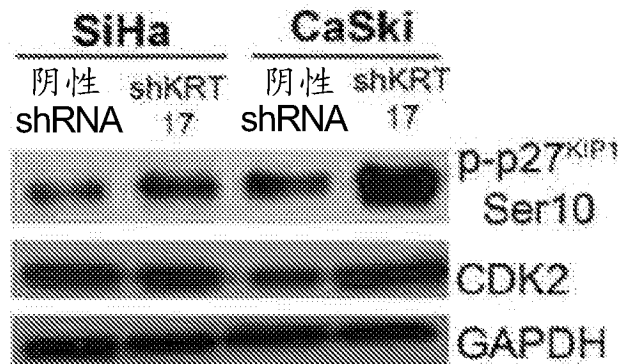


图 9G

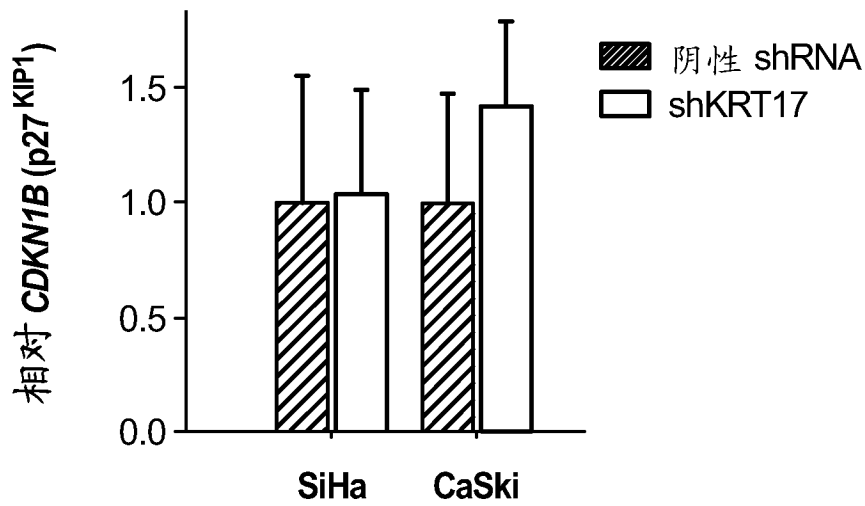


图 9H

基因符号	蛋白符号	SiHa		CaSki	
		倍数变化	T检验	倍数变化	T检验
		shKRT17/ 阴性 KRT17	p值	shKRT17/ 阴性 KRT17	p值
CDKN2A	P16NK4A	0.5102	0.06	1.1607	0.45
CDKN2B	P15NK4B	1.1681	0.52	1.0090	0.97
CDKN2C	P18NK4C	3.4362	0.38	0.9299	0.72
CDKN2D	P19NK4D	0.6271	0.05	1.2764	0.16
CDKN1A	P21CIP/WAF1	0.5102	0.05	1.1607	0.02

图 9I

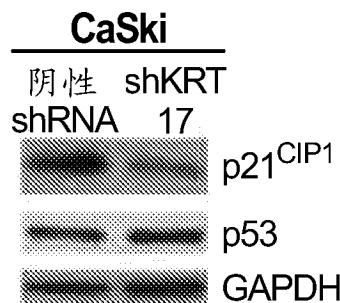


图 9J