

- (Blood circulation) อยู่แล้ว ไม่ว่าที่เอเอที่จำเพาะต่อแอนติบอดีเหล่านั้นจะเป็นชนิดที่สามารถถูกหลั่งออกมาในกระแสโลหิตหรือไม่ก็ตาม และ 2) การตรวจหาแอนติบอดีการประดิษฐ์นี้ต้องการเพียงการสังเคราะห์รีคอมมิแนนท์โปรตีนของยีนที่เราสนใจเพื่อใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายเสียค่าใช้จ่ายไม่สูงมากหากเปรียบเทียบกับวิธีการที่ต้องสังเคราะห์หรือซื้อโมโนโคลนอลแอนติบอดีเพื่อมาทำการโพรบหาตัวแอนติเจน
- 5 จากตัวอย่างที่ได้แสดงไว้ข้างต้น จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนให้เห็นถึงศักยภาพของกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้ในการประยุกต์ใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนในการตรวจค้นหาออโตแอนติบอดีซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถตรวจพบในซีรัมของผู้ป่วย ซึ่งกรรมวิธีนี้มีศักยภาพในการใช้กับโรคมะเร็งชนิดอื่นๆ ได้ด้วยหลักการเดียวกัน นอกจากนี้ กรรมวิธีตามการ
- 10 ประดิษฐ์นี้ยังอาจเป็นพื้นฐานในการนำไปต่อยอดเพื่อพัฒนาใช้กับข้อมูลจากฐานข้อมูลชนิดอื่นๆ สำหรับมะเร็ง เช่น ข้อมูลสปีส์ได้อีกด้วย

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ดังได้บรรยายไว้ในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์



เมื่อเปรียบเทียบกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้กับวิธี SEREX เดิม สิ่งที่แตกต่างกันคือ กรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้จะเป็นการหาแอนติบอดีต่อยีนที่ทราบว่ามีเกี่ยวข้องกับมะเร็ง จากข้อมูลการแสดงออกของยีนโดยไมโครอะเรย์ ซึ่งเป็นการนำข้อมูลที่มีอยู่แล้วจากเดิมใน ลักษณะของการแสดงออกของยีนบนเนื้อเยื่อมาปรับเปลี่ยนเป็นการหาแอนติบอดีต่อยีนเหล่านั้น

5 ในซีรัม ในขณะที่วิธี SEREX หรือ SERPA ต้องการเนื้อเยื่อมะเร็งจากผู้ป่วยมาใช้ในการสกัด อาร์เอ็นเอหรือโปรตีนเพื่อสร้างเป็นห้องสมุดซีดีเอ็นเอสำหรับการแสดงออกยีน (cDNA expression library) หรือเตรียมโปรตีนไลสเอต (protein lysate) ตามลำดับ เพื่อเป็นตัวแทนของ ยีนที่แสดงออกทั้งหมดในเนื้อเยื่อ ซึ่งจำเป็นที่ต้องได้เนื้อเยื่อที่มีคุณภาพและปริมาณที่เพียงพอ ในการสร้างห้องสมุดยีน หรือ สกัดโปรตีนที่ครอบคลุม นอกจากนี้ยังเป็นการตรวจสอบรูปแบบสุม

10 ที่ไม่สามารถเฉพาะเจาะจงไปยังกลุ่มที่สนใจได้

เมื่อพิจารณาในแง่ประสิทธิภาพโดยทั่วไปของการทำ SEREX พบว่าหากทำการ คัดเลือกห้องสมุดซีดีเอ็นเอสำหรับการแสดงออกยีนด้วยวิธีทางอิมมูโน จำนวน 10^5 ถึง 10^6 โคลน จะตรวจพบโคลนที่เป็นแอนติเจนโดยเฉลี่ยประมาณ 10 ถึง 20 โคลน อย่างไรก็ตาม เมื่อ นำโคลนที่ให้ผลบวกเหล่านี้มาทำการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบส จะพบว่ามีทั้งส่วนที่เป็นยีนที่

15 ทราบข้อมูล (known genes) และโปรตีนสมมติ (hypothetical protein) ทั้งที่มีความเกี่ยวข้อง และไม่มีความเกี่ยวข้องกับมะเร็งหรือเคยมีการตรวจพบว่าเป็นที่เอเอมาก่อนแล้ว ส่วนการทำ SERPA จากข้อมูลที่ผ่านมาการคัดเลือกด้วยวิธีทางอิมมูโน (immunoscreen) โปรตีนที่ผ่านการ แยกขนาดบน 2-D gel จะตรวจพบโปรตีนที่เป็นแอนติเจน ประมาณ 10 จุด และหากต้องการ ทราบว่าเป็นโปรตีนชนิดใดจะต้องผ่านขั้นตอนการหาลำดับกรดอะมิโนหรือการทำ

20 แมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ต้องการเครื่องมือพิเศษ ความ ชำนาญ และค่าใช้จ่ายที่สูง นอกจากนี้ หากต้องการตรวจหาแอนติบอดีต่อโปรตีนที่สนใจ ก็ จะต้องทำการโคลนและสร้างโปรตีนนั้นๆ ขึ้นมาเพื่อใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจหาแอนติบอดี ในซีรัมที่ต้องการตรวจต่อไป ในขณะที่เมื่อใช้กรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้ พบว่าการคัดเลือกด้วย วิธีทางอิมมูโนในส่วนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่เลือกมาศึกษา จำนวน 10 ตัวพบว่ามี 4 ตัวที่มี

25 ลักษณะการแสดงออกเป็นโปรตีนแอนติเจน โดยตรวจพบแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อโปรตีน 4 ตัวนี้ในซีรัมคนไขในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าในซีรัมคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ

ในแง่ของการใช้ประโยชน์กลุ่มของทีเอเอซึ่งประกอบด้วย B2M, KLK6, P53 และ UCK2 ที่ค้นพบดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นแอนติเจนเป้าหมายในการตรวจหาแอนติบอดีที่ จำเพาะต่อโปรตีนทั้ง 4 ตัวในลักษณะที่เป็นแอนติเจนพาเนล (antigen panel) ได้ เพื่อเพิ่มความ

30 ไวในการตรวจวินิจฉัยมะเร็งโพรงหลังจมูกได้

และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับหลักการใช้ประโยชน์จากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ ไมโครอะเรย์กับการทำงานด้านมะเร็งจากหนังสือ Microarray Technology and cancer gene profiling. ดังกล่าวยาวละเอียดไว้ในภูมิหลัง พบว่ากรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้มีข้อดีกว่าในแง่ที่

1) เป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อตัวทีเอเอ ซึ่งแอนติบอดีนี้จะมีการไหลเวียนอยู่ในกระแสโลหิต



กรณีมะเร็งโพรงหลังจมูกก็พบว่าการแสดงออกสูง และแอนติเจนชนิดนี้ยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีขึ้นในตัวคนไข้ได้ดังที่แสดงให้เห็นจากตัวอย่างนี้ ซึ่งสารชนิดนี้จะมีบทบาทในการเป็นเป้าหมายสำหรับการรักษาด้วยหรือไม่ต้องทำการศึกษาเพื่อยืนยันผลในอนาคต

- 5 โดยสรุปแล้วจากตัวอย่างนี้ได้พิสูจน์ให้เห็นว่ากรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้มีศักยภาพในการค้นพบอโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งตัวใหม่ๆ ได้จริง โดยการนำข้อมูลการแสดงออกของยีนจากฐานข้อมูลการแสดงออกของยีนมาประยุกต์กับเทคนิคทางอิมมูโนโลยี จากตัวอย่างข้างต้นพบว่าสามารถตรวจพบยีนที่มีการแสดงออกสูงผิดปกติที่มีคุณสมบัติเป็นที่เอเอได้จำนวน 4 จาก 10 ยีน ซึ่งสัดส่วนการค้นพบดังกล่าวเป็นสัดส่วนที่สูง และเมื่อเร็วๆ นี้ยังพบว่า
- 10 ออโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อ B2M ซึ่งเป็น 1 ใน 4 ของออโตแอนติบอดีที่ตรวจพบได้โดยกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้ ก็สามารถถูกตรวจพบว่ามีคุณสมบัติความเป็นที่เอเอในมะเร็งโพรงหลังจมูกด้วยวิธี SEREX เช่นเดียวกัน (Tong, Zhang และคณะ 2008) นับว่าผลดังกล่าวเป็นการยืนยันการใช้กรรมวิธีที่นำเสนอใหม่นี้ได้อีกทางหนึ่ง กรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้ยังทำให้สามารถตรวจพบว่าแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อ P53 KLK6 และ UCK2 มีความสัมพันธ์ทางสถิติ
- 15 กับผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกเป็นครั้งแรก ซึ่งเดิมในส่วนของความเป็นที่เอเอ นั้น P53 และ KLK6 ก็เคยพบรายงานว่ามีการแสดงออกเป็นที่เอเอในมะเร็งชนิดอื่นด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามในแง่ของการสร้างออโตแอนติบอดีต่อที่เอเอดังกล่าว พบว่าที่เอเอชนิดเดียวกันไม่จำเป็นที่จะต้องสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างออโตแอนติบอดีในมะเร็งทุกชนิดที่มีการแสดงออกของที่เอเอเหล่านั้นก็ได้ เช่น KLK6 ที่มีการแสดงออกเป็นที่เอเอในมะเร็งรังไข่ แต่การตรวจพบแอนติบอดีต่อ KLK6 ก็ไม่จำเป็นที่จะต้องมีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งรังไข่ อย่างที่ตรวจพบในมะเร็ง
- 20 โพรงหลังจมูก เป็นต้น ในส่วนของ UCK2 ถือว่าเป็นการรายงานครั้งแรกของทั้งการตรวจพบความสามารถในการแสดงออกเป็นที่เอเอในมะเร็งโพรงหลังจมูก และความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างการตรวจพบแอนติบอดีต่อ UCK2 กับการเป็นมะเร็งโพรงหลังจมูก ดังนั้นกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้จึงช่วยให้ค้นพบเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งตัวใหม่ๆ ซึ่ง
- 25 ในกรณีนี้คือแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อที่เอเอได้จริง

- นอกจากนี้ กรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้ก็ยังมีข้อดีคือเป็นการนำข้อมูลที่มีการศึกษาและรายงานอยู่แล้วมาใช้ให้เกิดประโยชน์ ซึ่งข้อมูลที่ได้มาก็เป็นข้อมูลสาธารณะและไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการทำไมโครอะเรย์เอง และยังเป็นการแปลงข้อมูลการแสดงออกของยีนที่มีความผิดปกติในเนื้อเยื่อมะเร็งมาเป็นข้อมูลการตรวจหาแอนติบอดีต่อยีนเหล่านั้นในซีรัมของผู้ป่วย ซึ่ง
- 30 หากพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเป็นมะเร็งก็นับว่าเป็นการค้นพบแอนติบอดีที่เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีศักยภาพสำหรับบ่งชี้โดยตรวจผ่านทางซีรัม (candidate serum marker) อีกชนิดหนึ่งซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลในรูปแบบยีน (gene marker) ที่ต้องทำการวิเคราะห์โดยการตัดชิ้นเนื้อแล้วก็จะถือว่าสะดวกกว่าและประหยัดกว่ามาก

ดังแสดงในรูปที่ 1x-4x โดยใช้วิธีการที่ได้อธิบายไว้ในขั้นตอนที่ 4 ตามกรรมวิธีในการประดิษฐ์
 นี้ จากนั้นจึงนำค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบสีของตัวอย่างตรวจในกลุ่มทดลองที่เป็นผู้ป่วย
 กลุ่ม NPC และกลุ่มควบคุมที่เป็นกลุ่มคนปกติมาทำการเปรียบเทียบกัน ทั้งนี้ พบว่าภายหลัง
 จากการแปลงค่าข้อมูลให้มีการแจกแจงแบบปรกติ (ใส่ค่า Log 10 สำหรับ B2M-NPC, B2M-
 5 control, KLK6-NPC และ KLK6-control หรือ ใส่ค่าสแควร์รูท 5 สำหรับ P53-NPC และ P53-
 control) ตามด้วยการทำการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่ม
 ข้อมูลด้วยสถิติที-เทส (t-test) ผลที่ได้ในการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน
 ทั้งหมด 10 ตัว พบการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ B2M, KLK6, P53 และ UCK2 ในกลุ่ม
 NPC ที่มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ดังที่แสดงในรูปที่ 5-8) ที่ค่าทาง
 10 สถิติระดับ < 0.001 สำหรับ B2M ที่ระดับ 0.001 สำหรับ KLK6 และ P53 และที่ระดับ 0.01
 สำหรับ UCK2 (ดังที่แสดงในรูปที่ 10) จากนั้นทำการหาค่าคutoffในการอ่านผลบวกและผล
 ลบของแอนติบอดีแต่ละตัว โดยนำค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบสีที่ได้จากกลุ่มควบคุมมาทำ
 การหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากนั้นทำการคำนวณค่าคutoffโดย
 ใช้ค่า ค่าเฉลี่ย + 2ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean+2SD) สำหรับการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ
 15 B2M, P53 และ UCK2 และสำหรับการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ KLK6 ใช้ คutoff ที่
 ค่าเฉลี่ย + ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean+SD) ดังจะเห็นได้จากผลที่แสดงในรูปที่ 13 โดยพบว่า
 ความถี่ในการตรวจพบแอนติบอดีต่อ B2M, KLK6, P53 และ UCK2 ในคนไข้มะเร็งโพรงหลัง
 จมูกจะอยู่ที่ 20.4%, 26.4%, 14.3% และ 25.6% ตามลำดับ ในขณะที่ความถี่ในการตรวจพบ
 แอนติบอดีต่อ B2M, KLK6, P53 และ UCK2 ในกลุ่มคนปกติจะอยู่ที่ 3.8%, 9.6%, 0% และ
 20 3.9% ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ $P < 0.05$ เมื่อวิเคราะห์ด้วยไคสแควร์
 เทสวิทยาเทสคอร์เร็กเตด (Chi-squares test with Yates corrected)

ผลการทดสอบหาแอนติบอดีจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนทั้ง 10 ตัวที่ถูกคัดเลือกมา
 ศึกษาความเป็นที่เอื้อในกลุ่มตัวอย่างตรวจ NPC และกลุ่มควบคุมขนาดเล็กขั้นต้นได้แสดงให้เห็นว่า
 แอนติบอดีจำเพาะต่อแอนติเจน 4 จาก 10 ตัวที่ค้นพบโดยกระบวนการที่เสนอมานี้ มี
 25 ลักษณะเป็นอินฟอร์เมทีฟแอนติบอดีมาร์เกอร์ (informative antibody marker) นั่นคือมี
 ศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในรูปแบบของแอนติบอดีในการบ่งชี้มะเร็งโพรงหลัง
 จมูกจากตัวอย่างซีรัมของผู้ที่ต้องการตรวจวินิจฉัยได้ หากได้ผ่านการทดสอบในตัวอย่างตรวจที่
 มีขนาดใหญ่มากกว่านี้

นอกจากโอกาสในการพัฒนาใช้ประโยชน์ในการตรวจหามะเร็งแล้ว การที่ทราบว่
 30 โปรตีนใดมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (antigenicity) ในระหว่างขั้นตอนของกรรมวิธีตามการ
 ประดิษฐ์นี้ยังอาจช่วยให้เกิดการค้นพบเป้าหมายใหม่เพื่อใช้ในการรักษามะเร็งได้อีกด้วย
 ตัวอย่างเช่น B2M ที่พบว่ามีแสดงออกสูงในเซลล์มะเร็งไต (renal cell carcinoma) นั้นต่อมา
 ได้มีรายงานการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) ต่อ B2M ในการยับยั้งการ
 เติบโตของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลอง (Nomura, Huang และคณะ 2007) สำหรับ B2M ใน

- โปรตีนทูเมอร์สับเพรสเซอร์ไฟว์ตีทรี (P53; tumor suppressor protein 53) (Agaoglu, Dizdar และคณะ 2004; Li, Zhang และคณะ 2007) ในแง่บทบาทหรือหน้าที่ (gene function) ที่อาจเกี่ยวข้องกับความเป็นมะเร็ง ยีนทั้ง 10 ตัว ในกลุ่มนี้จะประกอบด้วยยีนที่สร้างโปรตีนที่มีบทบาทต่างๆ กัน เช่น โปรตีนที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (oncoprotein) ได้แก่ STMN1 (Chen, Wang และคณะ 2003; Rana, Maples และคณะ 2008) โปรตีนที่ยับยั้งการเกิดมะเร็ง (tumor suppressor protein) ได้แก่ P53 และ CAV1 (Razani, Schlegel และคณะ 2001; Wiechen, Diatchenko และคณะ 2001; Goetz, Lajoie และคณะ 2008) โปรตีนที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ (cell cycle regulation protein) ได้แก่ CCNB1 (Kawamoto, Koizumi และคณะ 1997; Porter, Cukier และคณะ 2003) โปรตีนที่สนับสนุนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (invasiveness) ได้แก่ KLK6 และ MMP11 (Obiezu และ Diamandis 2005; Motrescu, Blaise และคณะ 2008) นอกจากนั้นก็มีโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดติดกันของเซลล์ (cell-cell adhesion) ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์กับการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง ได้แก่ CLDN1 (Zhang, Yao และคณะ 2008) โปรตีนของสารนอกเซลล์ (extracellular matrix) ได้แก่ FMOD (Mayr, Bund และคณะ 2005; Mikaelsson, Danesh-Manesh และคณะ 2005) โปรตีนในขบวนการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของแอนติเจน (antigen processing and presentation) ได้แก่ B2M (Li, Zhang และคณะ 2007; Tong, Zhang และคณะ 2008) และ โปรตีนในขบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ (nucleotide biosynthesis) ได้แก่ UCK2 (Hasegawa, Futagami และคณะ 2002; Murata, Endo และคณะ 2004; Davidsson, Andersson และคณะ 2007) โดยสรุปแล้วรายชื่อของยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในมะเร็งโพรงหลังจมูกที่นำมาศึกษาความเป็นที่เอเอ็มมีรายชื่อดัง
- 20 รายละเอียดที่แสดงไว้ในรูปที่ 9

เมื่อคัดเลือกยีนเพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลการค้นหาคำอธิบายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งได้แล้ว ก็นำข้อมูลดังกล่าวเข้าสู่ขั้นตอนที่ 2-4 ตามกรรมวิธีในการประดิษฐ์นี้ นั่นคือภายหลังจากการโคลนยีนและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีนที่มีการแสดงออกสูงผิดปกติทั้ง 10 ตัว ซึ่งผ่านขั้นตอนการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอเพื่อยืนยันลำดับเบสของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด และการวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอตเพื่อยืนยันขนาดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแล้ว จึงได้ทำการตรวจหาแอนติบอดีจำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกเปรียบเทียบกับในคนปกติ พบว่าในการตรวจสอบกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิด ภายหลังจากขั้นตอนการเติมสับสเตรทสี ผลที่ได้จากการโพรบด้วยซีรัมแต่ละตัวก็จะเกิดเป็นแถบสีม่วง โดยให้ความเข้มของแถบสี (band intensity) ที่ต่างๆ กันไปในแต่ละซีรัม (ดังแสดงในรูปที่ 30 1ก- 4ก) โดยที่ความเข้มของแถบสีที่เป็นผลลบจะมีลักษณะเป็นแถบสีที่เจือจางหรือมองไม่เห็น แถบสี ในขณะที่ผลบวกจะเห็นเป็นแถบสีม่วงเข้ม อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ได้จะออกมาในลักษณะเชิงกึ่งปริมาณ (semi quantitative) จึงได้ทำการประยุกต์การอ่านผลจากแบบเชิงคุณภาพ (qualitative) ซึ่งปกติใช้การพิจารณาจากสีที่เกิดจากปฏิกิริยา (โดยให้แถบสีม่วงเข้มเป็นผลบวก แถบสีจางเป็นผลลบ) มาแปลงให้ได้เป็นตัวเลขเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบสี

- ควบคุมมาทำการเปรียบเทียบการกระจายของข้อมูลและหาค่าเฉลี่ยเพื่อตรวจสอบค่าความแตกต่างทางสถิติระหว่างตัวอย่างตรวจทั้งสองกลุ่ม สำหรับแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนตัวที่ถูกตรวจพบที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมจะถูกนำมาทำการหาค่าความไว (sensitivity) และค่าความจำเพาะ (specificity) ของแอนติบอดีนั้นๆ
- 5 ต่อ โดยนำค่าเปอร์เซ็นต์ของความเข้มข้นจากกลุ่มควบคุมมาหาค่าเฉลี่ย (mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) เพื่อใช้ในการคำนวณค่าคัทออฟ (cut off) ของแต่ละแอนติบอดีนั้นๆ เพื่อสรุปว่าแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดใดที่เป็นอินโฟร์เมติกออโตแอนติบอดี (informatic autoantibody) คือ มีศักยภาพสำหรับการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งในซีรัม
- 10 ตัวอย่างการนำกรรมวิธีตามรายละเอียดการประดิษฐ์นี้ไปประยุกต์ใช้ในการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งชนิดออโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อที่เอเอของเซลล์มะเร็ง
- ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของกรรมวิธีตามที่เสนอไว้ในรายละเอียดการประดิษฐ์นี้โดยใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนจากฐานข้อมูลของโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก (NPC; Nasopharyngeal carcinoma) เป็นตัวแทนของโรคมะเร็งอื่นๆ (cancer model) ในการค้นหา
- 15 เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งชนิดออโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อที่เอเอของเซลล์มะเร็งรวมทั้งได้เปรียบเทียบให้เห็นถึงประสิทธิภาพของกรรมวิธีกับวิธีดั้งเดิม ดังรายละเอียดต่อไปนี้
- ในขั้นตอนแรกได้ทำการศึกษาด้านข้อมูลการแสดงออกของยีนทั้งในฐานข้อมูลสาธารณะและในวารสารที่มีการตีพิมพ์มาก่อน เพื่อคัดเลือกยีนที่ต้องการทดสอบความเป็นที่เอเอ และทำการค้นหาออโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อที่เอเอของเซลล์มะเร็งโพรงหลังจมูกต่อ ทั้งนี้
- 20 เนื่องจากมะเร็งโพรงหลังจมูกที่นำมาใช้ในการศึกษานี้มีฐานข้อมูลอยู่ค่อนข้างน้อย รายชื่อของยีนที่เลือกมาส่วนใหญ่จึงมาจากข้อมูลของทีมผู้ประดิษฐ์เอง (Sriuranpong, Mutirangura และคณะ 2004) โดยได้ทำการสุ่มเลือกยีนทั้งหมดจำนวน 10 ยีน แบ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกสูงผิดปกติในเซลล์ระยะที่เรียกว่าเมตาพลาเซีย (metaplasia) หรือ ดิสพลาเซีย (dysplasia) ซึ่ง
- 25 เป็นเซลล์เนื้อเยื่อโพรงหลังจมูกที่เริ่มมีการแบ่งตัวผิดปกติแต่ยังไม่ถึงขั้นพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งจำนวน 2 ยีน คือ คาลิเครอินซิก (KLK6; kallikrein 6) และคาวิโอลินวัน (CAV1; caveolin 1) ตามด้วยยีนที่มีการแสดงออกสูงในเนื้อเยื่อมะเร็งโพรงหลังจมูก (malignant cells) จำนวน 2 ยีน คือ สตัทมินวัน (STMN1; stathmin 1) และ ยูรีดีน-ซีสทีนไคเนสทู (UCK2; uridine-cytidine kinase 2) และยีนที่มีการแสดงออกสูงทั้งในระยะเมตาพลาเซีย หรือ ดิสพลาเซีย และในเนื้อเยื่อ
- 30 มะเร็งโพรงหลังจมูก หรือระยะที่พัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งแล้วจำนวน 4 ยีน คือ ไซคลินบีวัน (CCNB1; cyclin B1), คลอดินวัน (CLDN1; claudin1), ไฟโบรโมดูลิน (FMOD; fibromodulin) และเมทริกซ์เมทัลโลโปรติเอสอีเลเวน (MMP11; matrix metalloproteinase-11) นอกจากนี้ ยังมียีนที่มีการศึกษาว่ามีการแสดงออกสูงผิดปกติทั้งในระดับยีนและโปรตีนในเนื้อเยื่อมะเร็งของมะเร็งโพรงหลังจมูกอีก 2 ยีน คือ เบต้า-ทู ไมโครโกลบูลิน (B2M; beta-2 microglobulin) และ



ที่จะทำการบล็อกการจับแบบไม่จำเพาะ (non-specific binding) บนเมมเบรน ด้วย 5% นม (milk) ในบัฟเฟอร์ทีบีเอส (TBS) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเมมเบรนจะถูกนำมาประกบในดีคาร์-โพรบ อินคิวเบชัน แมนิโฟลด์ (Deca-Probe incubation manifold) (Hoefer, Amersham Bioscience) เพื่อแบ่งช่องสำหรับโพรบด้วยซีรัมต่างๆ กัน จากนั้นจึงทำการโพรบด้วยซีรัมจากคนไข้หรือคนปกติที่ถูกเจือจางในบัฟเฟอร์สำหรับการเจือจาง (diluting buffer) ที่ 1:100 หรือ 1:200 เพื่อตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนนั้นๆ ในซีรัม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ภายหลังจากการล้างส่วนเกินที่ไม่ได้จับกับโปรตีนบนเมมเบรนออก แอนติบอดีที่จับอยู่อย่างจำเพาะกับโปรตีนบนเมมเบรนจะถูกตรวจพบโดยใช้แอนติบอดีลำดับที่สอง (secondary antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีชนิดไอจีจีของคน (anti human IgG) ที่มีเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP; alkaline phosphatase) ติดฉลากอยู่ที่ความเจือจาง 1:5000 ใน 2% นมในบัฟเฟอร์ทีบีเอส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นขั้นตอนการล้างจะทำการเติมสับสเตรทสี (color substrate) ของแอลคาไลน์ฟอสฟาเตส คือ BCIP/NBT ลงไปทำปฏิกิริยาประมาณ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และอ่านผลหลังจากหยุดปฏิกิริยาด้วยบัฟเฟอร์สำหรับหยุดปฏิกิริยา (stop buffer) ซึ่งผลบวก (positive) จะปรากฏในลักษณะเป็นแถบสีม่วงที่ตำแหน่งตามขนาดของรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดนั้นๆ โดยในแต่ละการทดลอง 1 แผ่น จะประกอบด้วยมาร์คเกอร์สำหรับบอกน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight marker) 1 เลน ที่เหลือจะเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีนในสารสกัดหยาบโปรตีนจากการทำให้เซลล์แตกที่โพรบด้วยซีรัมต่างๆ กัน

4. การคำนวณและแปลความหมายจากความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างการตรวจพบแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนนั้นๆ ในตัวอย่างตรวจซีรัมกับการเป็นมะเร็งเพื่อหาออโตแอนติบอดีที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งในซีรัม

ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนที่ผ่านขั้นตอนการทำให้เกิดสีแล้วจะถูกนำมาสแกนและอ่านค่าความเข้มของแถบสีที่เกิดจากการโพรบด้วยซีรัมแต่ละซีรัมโดยใช้โปรแกรม Quantity One (Biorad) จากนั้นจะนำค่าความเข้มของแถบสี (band intensity) ที่ได้จากการโพรบด้วยซีรัมต่างๆ มาใช้ในการคำนวณค่าทางสถิติ เนื่องจากเทคโนโลยีที่ใช้ไม่สามารถจะทำการทดสอบซีรัมทุกตัวในคราวเดียวกันหรือบนเมมเบรนเดียวกันได้ทั้งหมด ดังนั้นเพื่อให้สามารถเปรียบเทียบค่าความเข้มระหว่างแต่ละซีรัมที่ไม่ได้ถูกทดสอบในคราวเดียวหรืออ่านค่าจากแผ่นเมมเบรนเดียวกันได้ จึงได้มีการบรรจุซีรัมอ้างอิงผลบวก (reference positive serum) ของแต่ละรีคอมบิแนนท์โปรตีนในทุกๆ เมมเบรนเพื่อใช้ค่าความเข้มของแถบสีที่ได้จากซีรัมอ้างอิงผลบวกเป็นค่าอ้างอิงซึ่งกำหนดให้มีค่าเท่ากับ 100% เสมอ โดยค่าที่เกิดจากซีรัมแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาแปลงเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของความเข้มแถบสี (percent intensity) ด้วยการเปรียบเทียบกับค่าความเข้มของแถบสีที่อ่านได้จากการโพรบโดยใช้ซีรัมอ้างอิงผลบวก จากนั้นจึงทำการนำค่าเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแถบสีที่ได้จากตัวอย่างตรวจในกลุ่มทดลองที่เป็นโรคมะเร็งและกลุ่ม

sequence) ทางด้าน 5' และ 3' ของยีนที่ประมวลรหัสเป็นโปรตีนของแต่ละยีนเป็นไพรเมอร์และใช้ซีดีเอ็นเอ (cDNA) ที่เตรียมจากอาร์เอ็นเออ้างอิงของมนุษย์ (Reference human RNA) เป็นแม่พิมพ์ (template) จากนั้นทำการโคลนผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกยีน ซึ่งเป็นพลาสมิด (plasmid) ที่มีส่วนของประมวลรหัสเป็นเปปไทด์ที่สามารถตรวจจับได้ด้วยแอนติบอดีจำเพาะหรือ อีพิโทปแท็ก (epitope tag) ติดอยู่ อาทิเช่น 6-ฮิสทีดิน (6-Histidine) เพื่อสร้างเป็นรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ซึ่งอีพิโทปแท็กนี้จะมีประโยชน์ในการติดตามการเคลื่อนที่ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใดๆ ที่สร้างจากรีคอมบิแนนท์พลาสมิดนี้ได้ จากนั้นจึงทำการตรวจสอบลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequence) ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด เพื่อยืนยันว่าพลาสมิดที่ได้มียีนประมวลรหัสโปรตีนที่ต้องการ โดยการนำลำดับเบสของดีเอ็นเอที่โคลนได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของยีนที่ต้องการบนฐานข้อมูล (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) รวมถึงตรวจสอบว่าลำดับเบสที่ประมวลรหัสเป็นยีน (coding sequence) ถูกโคลนเข้าไปในกรอบอ่านรหัส (reading frame) เดียวกันกับอีพิโทปแท็กหรือไม่

เมื่อรีคอมบิแนนท์พลาสมิดแต่ละตัวผ่านการตรวจลำดับดีเอ็นเอและได้ผลการยืนยันว่ามีลำดับดีเอ็นเอที่ถูกต้องแล้ว จะถูกนำมาทรานสฟอร์มเข้าสู่ *E.coli* และจะถูกกระตุ้นการแสดงออกยีนเป็นรีคอมบิแนนท์โปรตีน ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้เหล่านี้จะถูกนำมาตรวจสอบขนาด โดยการสกัดโปรตีนจาก *E.coli* ด้วยบัฟเฟอร์ที่ทำให้เซลล์แตก (lysis buffer) จากนั้นสารสกัดโปรตีนที่สกัดได้จาก *E.coli* (สารสกัดหยาบของ *E.coli* ที่ผ่านการทำให้เซลล์แตก) จะถูกนำมาแยกขนาดโปรตีนโดยวิธีเอสดีเอส-เพจ (SDS-PAGE; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) โปรตีนที่ถูกแยกตามขนาดดังกล่าวจะถูกเคลื่อนย้ายด้วยกระแสไฟฟ้ามาอยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (nitrocellulose membrane) ด้วยวิธีการเคลื่อนย้ายด้วยเวสเทิร์นบลอต (Western blot transfer) ตามด้วยการโพรบ (probe) หาดำแหน่งของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณจากการคำนวณแล้วนั้น โดยการโพรบด้วยแอนติบอดีต่ออีพิโทปแท็กดังกล่าว

3. การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดในซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็ง และกลุ่มควบคุมด้วยวิธีวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต

รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ผ่านการยืนยันทั้งในระดับลำดับเบสของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดและน้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนท์โปรตีนตามข้อ 2 แล้ว จะถูกนำมาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนเหล่านั้นในซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็งเปรียบเทียบกับในซีรัมของคนปกติ โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดในรูปของสารสกัดหยาบของ *E.coli* ที่ผ่านการทำให้เซลล์แตกจะถูกนำมาแยกขนาดด้วยเอสดีเอส-เพจ โดยรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดจะใช้สารสกัดหยาบโปรตีนจากการทำให้เซลล์แตกในปริมาณต่างๆ กันไป ขึ้นกับปริมาณสัดส่วนการแสดงออกยีนของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดใน *E.coli* จากนั้นโปรตีนทั้งหมดจะถูกเคลื่อนย้ายด้วยวิธีการเคลื่อนย้ายด้วยเวสเทิร์นบลอตให้ไปอยู่บนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนก่อน

- รูปที่ 10 ข้อมูลแสดงความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ B2M KLK6 P53 และ UCK2 ในกลุ่มคนไข้มะเร็งโพรงหลังจมูก (NPC) และ คนปกติ (C)
- รูปที่ 11 ข้อมูลแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การตรวจพบแอนติบอดีต่อ B2M KLK6 P53 และ UCK2 ในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูก (NPC) และ คนปกติ (control)

5 การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

- การประดิษฐ์นี้ใช้แนวทางการนำข้อมูลการแสดงออกของยีนจากฐานข้อมูล โดยเฉพาะฐานข้อมูลจากการทำดีเอ็นเอไมโครอะเรย์ และ/หรือ โปรตีโอมิกส์ มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการตรวจกรองทางภูมิคุ้มกันวิทยาในการค้นหาอโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งที่มีศักยภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง โดยอาศัยหลักการที่ว่ากลไกที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้โปรตีนปกติมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปเป็นที่เอเอก็คือการแสดงออกของยีนในระดับที่สูงผิดปกติ ซึ่งที่เอเอที่เปลี่ยนแปลงไปก็จะสามารถส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยสร้างอโตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ผิดปกติ นั้นๆ ขึ้นมาได้ ด้วยหลักการดังกล่าวยีนที่มีการแสดงออกสูงผิดปกติในเซลล์มะเร็งตามที่มีรายงานในฐานข้อมูลไมโครอะเรย์หรือวารสารที่ได้รับการตีพิมพ์จะมีโอกาสแปรเปลี่ยนการ
- 10 แสดงออกของทีเอเอ และสามารถตรวจพบอโตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอเหล่านั้นในซีรัมของผู้ป่วยได้ ซึ่งอโตแอนติบอดีดังกล่าวจะมีศักยภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งจากซีรัมผู้ป่วยในอนาคต

- กรรมวิธีการตรวจหาอโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็ง โดยการประยุกต์ใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนร่วมกับเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา เพื่อใช้เป็นสารบ่งชี้มะเร็ง ตาม
- 20 รายละเอียดการประดิษฐ์นี้ มีขั้นตอน ดังนี้

1. การคัดเลือกยีนที่ต้องการทดสอบความเป็นทีเอเอจากฐานข้อมูลการแสดงออกของยีน

- ทำการคัดเลือกยีนที่มีการแสดงออกสูงผิดปกติจากฐานข้อมูลการแสดงออกของยีนสาธารณะและในวารสารที่มีการตีพิมพ์มาก่อน โดยฐานข้อมูลการแสดงออกอาจเป็นฐานข้อมูล
- 25 ดีเอ็นเอไมโครอะเรย์ และ/หรือ ฐานข้อมูลโปรตีโอมิกส์ ฐานข้อมูลใดฐานข้อมูลหนึ่ง หรือ ทั้งสองฐานข้อมูลพร้อมๆ กัน โดยทำการสุ่มเลือกยีนมาจำนวนหนึ่งซึ่งอาจเป็นยีนที่มีลักษณะการแสดงออกที่สูงผิดปกติในระยะใดระยะหนึ่งของมะเร็งหรือในสับไทป์ (subtype) ต่างๆ ของมะเร็งแต่ละชนิด

2. การโคลนยีนที่คัดเลือกมาเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกยีน (expression vector) เพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน

30

ขั้นตอนนี้เริ่มจากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนที่ประมวลรหัส (encode) เป็นโปรตีน (coding sequence) ที่ต้องการ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR; polymerase chain reaction) โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ที่จำเพาะต่อลำดับเบส (DNA

- ด้วยเวสเทิร์นบลอต เพื่อการตรวจหาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ P53 ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก และกลุ่มควบคุม โดย M=เครื่องหมายโมเลกุล, P=ตัวควบคุมบวก, N=ตัวควบคุมลบ (ข) ค่าความเข้มของแถบสีที่เกิดจากปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาาระหว่างรีคอมบิแนนท์ P53 กับซีรัมจากผู้ป่วยและคนปกติ หลังทำการสแกนเมมเบรนและแปลงค่าให้อยู่ในรูปเปอร์เซ็นต์ของค่าอ้างอิงตัวควบคุมบวก
- รูปที่ 4 ภาพแสดงผลการทำวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต เพื่อตรวจหาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ UCK2 ในซีรัมผู้ป่วยและคนปกติ (ก) ตัวอย่างเมมเบรนแสดงผลวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต เพื่อการตรวจหาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ UCK2 ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก และกลุ่มควบคุม โดย M=เครื่องหมายโมเลกุล, P=ตัวควบคุมบวก, N= ตัวควบคุมลบ (ข) ค่าความเข้มของแถบสีที่เกิดจากปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาาระหว่างรีคอมบิแนนท์ UCK2 กับซีรัมจากผู้ป่วยและคนปกติ หลังทำการสแกนเมมเบรนและแปลงค่าให้อยู่ในรูปเปอร์เซ็นต์ของค่าอ้างอิงตัวควบคุมบวก
- รูปที่ 5 กราฟแสดงถึงการวัดค่าความกระจายของข้อมูลแอนติบอดีต่อ B2M ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก (B2M_NPC) และซีรัมกลุ่มควบคุม (B2M_C) ที่มีการแปลงค่าด้วย Log 10 และมีการแจกแจงแบบปกติ โดยกราฟซ้ายเป็นกราฟการกระจายของข้อมูลแบบสแคทเทอร์พล็อต (Scatter plot) กราฟขวาเป็นกราฟการกระจายข้อมูลแบบบ็อกซ์พล็อต (Box Plot)
- รูปที่ 6 กราฟแสดงถึงการวัดค่าความกระจายของข้อมูลแอนติบอดีต่อ KLK6 ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก (KLK6_NPC) และซีรัมกลุ่มควบคุม (KLK6_C) ที่มีการแปลงค่าด้วย Log 10 และมีการแจกแจงแบบปกติ โดยกราฟซ้ายเป็นกราฟการกระจายของข้อมูลแบบสแคทเทอร์พล็อต กราฟขวาเป็นกราฟการกระจายข้อมูลแบบบ็อกซ์พล็อต
- รูปที่ 7 กราฟแสดงถึงการวัดค่าความกระจายของข้อมูลแอนติบอดีต่อ P53 ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก (P53_NPC) และซีรัมกลุ่มควบคุม (P53_C) ที่มีการแปลงค่าด้วยสแควร์รูท 5 (square root 5) และมีการแจกแจงแบบปกติ โดยกราฟซ้ายเป็นกราฟการกระจายของข้อมูลแบบสแคทเทอร์พล็อต กราฟขวาเป็นกราฟการกระจายข้อมูลแบบบ็อกซ์พล็อต
- รูปที่ 8 กราฟแสดงถึงการวัดค่าความกระจายของข้อมูลแอนติบอดีต่อ UCK2 ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก (UCK2_NPC) และซีรัมกลุ่มควบคุม (UCK2_C) ซึ่งเป็นข้อมูลจริงไม่มีการแปลงค่า เนื่องจากมีการแจกแจงแบบปกติโดยธรรมชาติของข้อมูล โดยกราฟซ้ายเป็นกราฟการกระจายของข้อมูลแบบสแคทเทอร์พล็อต กราฟขวาเป็นกราฟการกระจายข้อมูลแบบบ็อกซ์พล็อต
- รูปที่ 9 รายชื่อของยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในมะเร็งโพรงหลังจมูกที่นำมาศึกษาความเป็นที่เอเอ



การประดิษฐ์นี้นำเสนอกรรมวิธีการตรวจหาแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็ง โดยการต่อยอดการประยุกต์ใช้ข้อมูลบนฐานข้อมูลไมโครอาร์เรย์หรือข้อมูลการแสดงออกของยีนที่มีการรายงานออกมาหรือถูกบันทึกไว้ในฐานข้อมูลต่างๆ มาใช้ในการตรวจหาแอนติบอดี ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็ง ร่วมกับการต่อยอดวิธี SEREX

5 เดิม โดยดัดแปลงการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลบนชิ้นเนื้อมาเป็นการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลด้วยซีรัม (serum marker) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน การคัดเลือกยีนที่ต้องการทดสอบความเป็นที่เอื้อจากฐานข้อมูลการแสดงออกของยีน การโคลนยีนที่คัดเลือกมาเข้าสู่เวกเตอร์สำหรับการแสดงออกยีนเพื่อสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน การตรวจหาแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนแต่ละชนิดในซีรัมจากผู้ป่วยมะเร็ง และกลุ่มควบคุมโดยวิธีวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต

10 (Western blot analysis) และการคำนวณและแปลความหมายจากความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างการตรวจพบแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีนนั้นๆ ในตัวอย่างตรวจซีรัมกับการเป็นมะเร็ง เพื่อหาแอนติบอดีที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็ง ในซีรัม ซึ่งกรรมวิธีตามการประดิษฐ์นี้จะเป็นทางเลือกหนึ่งในการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

15 คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต เพื่อตรวจหาการตอบสนองของแอนติบอดี (antibody reactivity) ต่อ B2M ในซีรัมผู้ป่วยและคนปกติ (ก) ตัวอย่างเมมเบรนแสดงผลวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต เพื่อการตรวจหาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ B2M ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก (NPC; Nasopharyngeal carcinoma) และกลุ่มควบคุม โดย M=เครื่องหมายโมเลกุล (marker), P=ตัวควบคุมบวก (positive control), N=ตัวควบคุมลบ (negative control) (ข) ค่าความเข้มของแถบ

20 สี (band intensity) ที่เกิดจากปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาาระหว่างรีคอมบิแนนท์ (recombinant) B2M กับซีรัมจากผู้ป่วยและคนปกติ หลังทำการสแกนเมมเบรนและแปลงค่าให้อยู่ในรูปเปอร์เซ็นต์ของค่าอ้างอิงตัวควบคุมบวก (reference positive control)

รูปที่ 2 ภาพแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต เพื่อตรวจหาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ KLK6 ในซีรัมผู้ป่วยและคนปกติ (ก) ตัวอย่างเมมเบรนแสดงผลวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต เพื่อการตรวจหาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ KLK6

30 ในซีรัมผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงหลังจมูก และกลุ่มควบคุม โดย M=เครื่องหมายโมเลกุล, P=ตัวควบคุมบวก, N=ตัวควบคุมลบ (ข) ค่าความเข้มของแถบสีที่เกิดจากปฏิกิริยาทางอิมมูโนวิทยาาระหว่างรีคอมบิแนนท์ KLK6 กับซีรัมจากผู้ป่วยและคนปกติ หลังทำการสแกนเมมเบรนและแปลงค่าให้อยู่ในรูปเปอร์เซ็นต์ของค่าอ้างอิงตัวควบคุมบวก

รูปที่ 3 ภาพแสดงผลการทำวิเคราะห์ด้วยเวสเทิร์นบลอต เพื่อตรวจหาการตอบสนองของแอนติบอดีต่อ P53 ในซีรัมผู้ป่วยและคนปกติ (ก) ตัวอย่างเมมเบรนแสดงผลวิเคราะห์

การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งที่มีศักยภาพสำหรับการตรวจวินิจฉัยมะเร็งในอนาคต

- ด้วยข้อจำกัดของวิธีการต่างๆ ที่เคยมีรายงานแล้วดังกล่าวข้างต้น ในการประดิษฐ์นี้จึงได้พัฒนาต่อยอดหลักการเบื้องต้นในการใช้ประโยชน์จากข้อมูลการแสดงออกของยีนโดยเฉพาะ
- 5 ข้อมูลไมโครอะเรย์ที่รายงานไว้ในหนังสือ Microarray Technology and cancer gene profiling ดังกล่าวยละเอียดข้างต้น เพื่อสร้างกรรมวิธีใหม่ในการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งที่มีศักยภาพในการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพในอนาคต โดยที่ผู้รับการตรวจวินิจฉัยได้รับความบาดเจ็บน้อย และสะดวกสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งมากขึ้น

- จากความรู้เกี่ยวกับการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอโตแอนติบอดีที่เอ่อด้วยวิธี
- 10 SEREX ดังเดิม ซึ่งเป็นการตรวจหาที่ค่อนข้างไร้ทิศทางกับความรู้เกี่ยวกับการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล และการใช้ประโยชน์จากข้อมูลไมโครอะเรย์ตามหลักการที่เคยมีผู้นำเสนอแล้ว ซึ่งยังมีข้อจำกัดในการค้นหาเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลชนิดที่เอ่อที่ต้องหลั่งออกมาในซีรัม การประดิษฐ์นี้ได้พัฒนาต่อยอดความรู้ใน 2 ส่วนดังกล่าวมาเป็นการนำเสนอกรรมวิธีใหม่ตามรายละเอียดในการประดิษฐ์นี้ โดยใช้แนวคิดที่จะนำข้อมูลการแสดงออกของยีนจาก
- 15 ฐานข้อมูล (database) ที่มีอยู่มากมายและสามารถเข้าถึงได้โดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย โดยเฉพาะฐานข้อมูลจากการทำดีเอ็นเอไมโครอะเรย์ และ/หรือ โปรตีโอมิกส์ มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการตรวจกรองทางภูมิคุ้มกันวิทยา (serological screening method) ในการค้นหาอโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็ง เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งที่มีศักยภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง โดยอาศัยหลักการสำคัญที่ว่ากลไกที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้โปรตีนปกติมีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติไปเป็นที่เอ่อก็คือการแสดงออก
- 20 ของยีนในระดับที่สูงผิดปกติ ซึ่งที่เอ่อที่เปลี่ยนแปลงไปก็จะสามารถส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ของผู้ป่วยสร้างอโตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่ผิดปกตินั้นๆ ขึ้นมาได้ ซึ่งด้วยหลักการดังกล่าวยีนที่มีการแสดงออกสูงผิดปกติในเซลล์มะเร็งตามที่มียารายงานในฐานข้อมูลไมโครอะเรย์หรือวารสารที่ได้รับการตีพิมพ์จะมีโอกาสแปรเปลี่ยนการแสดงออกของ
- 25 ที่เอ่อและสามารถตรวจพบอโตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อที่เอ่อเหล่านั้นในซีรัมของผู้ป่วยได้ ซึ่งอโตแอนติบอดีดังกล่าวจะมีศักยภาพในการวินิจฉัยโรคมะเร็งจากซีรัมผู้ป่วยในอนาคต

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

- การประดิษฐ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนากรรมวิธีการตรวจหาอโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็ง โดยการประยุกต์ใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนร่วมกับเทคนิคทาง
- 30 อิมมูโนวิทยา ซึ่งช่วยให้สามารถค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งที่มีศักยภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็ง คนไข้ได้รับความบาดเจ็บน้อย และสะดวกสำหรับการใช้งานกับการตรวจวินิจฉัยโรคมะเร็งมากขึ้น โดยสามารถตรวจหาอโตแอนติบอดีที่ค้นพบดังกล่าวได้จากซีรัมของผู้ที่ต้องการตรวจวินิจฉัยได้โดยตรง

การติดตามการรักษา หรือ การเฝ้าระวังการกลับมาเป็นใหม่ของมะเร็งได้ นอกจากนั้นยังสามารถเป็นข้อมูลในการสืบหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งตัวใหม่ๆ ซึ่งอาจมีประโยชน์ทั้งในแง่การตรวจหาหรือเป็นเป้าหมาย (target) สำหรับการรักษาด้วยยีน (gene therapy) ได้อีกด้วย

- 5 ปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับข้อมูลการแสดงออกของยีนในมะเร็งชนิดต่างๆ โดยเทคนิค ดีเอ็นเอไมโครอะเรย์ (DNA microarray) หรือ โปรตีนอะเรย์ (Protein array) จำนวนมาก อย่างไรก็ตาม สำหรับในประเทศกำลังพัฒนานั้น การลงทุนทำไมโครอะเรย์อาจเป็นการลงทุนที่ค่อนข้างสูงและต้องอาศัยเทคโนโลยีที่มีราคาแพง อีกทั้งยังต้องมีการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อของผู้ป่วยเพื่อการตรวจ ซึ่งเมื่อเทียบกับการเจาะเลือดเพื่อตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็ง
- 10 โดยตรวจผ่านทางซีรัม ได้แก่ ทีเอเอ หรือ ออโตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอดังกล่าวมาแล้ว จะเห็นว่าวิธีหลังจะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก ประหยัด และ บอบช้ำน้อยกว่า (less invasive) การตัดชิ้นเนื้อ

- ที่ผ่านมาได้มีการกล่าวถึงหลักการกว้างๆ ในการใช้ประโยชน์จากฐานข้อมูลดีเอ็นเอไมโครอะเรย์เพื่อการทำงานด้านมะเร็งไว้ในหนังสือ Microarray Technology and cancer gene
- 15 profiling ปี ค.ศ. 2007 หน้า 74-85 เรื่อง "Microarrays for cancer diagnosis and classification" โดยมีส่วนหนึ่งที่กล่าวถึงการประยุกต์ใช้ฐานข้อมูลดีเอ็นเอไมโครอะเรย์ในการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งในซีรัม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (1) การเลือกยีนที่สนใจจากฐานข้อมูลการแสดงออกของยีน (2) การยืนยันการแสดงออกของยีนที่เลือกมาในตัวอย่างตรวจเนื้อเยื่อโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่แบบย้อนกลับ (RT-PCR; Reverse Transcription
- 20 Polymerase Chain Reaction) (3) การบ่งชี้เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็ง แบ่งแนวทางการทำงานเป็นสองแนวทาง คือ วิธีอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry) และวิธีอีไลซ่า (ELISA; Enzyme- Linked Immunosorbent Assay) หรือ แอนติบอดีอะเรย์ (Antibody array) โดยในกรณีที่แอนติบอดีที่จำเพาะต่อยีนเหล่านั้นมีการผลิตไว้ใช้หรือมีจำหน่ายอยู่แล้วก็สามารถนำมาโพรบ (probe) กับตัวอย่างตรวจเนื้อเยื่อเพื่อตรวจปริมาณการแสดงออกในระดับโปรตีน
- 25 โดยวิธีอิมมูโนพยาธิวิทยาได้ อย่างไรก็ตาม สำหรับการตรวจกรองวินิจฉัยมะเร็ง การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งในซีรัมจะมีความสำคัญมากกว่าการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลจากสิ่งส่งตรวจที่เป็นเนื้อเยื่อ เนื่องจากมีขั้นตอนการเก็บตัวอย่างตรวจที่ง่าย สะดวก ปลอดภัย และประหยัด อีกทั้งสามารถพัฒนาให้มีลักษณะเป็นการตรวจคัดกรองแบบที่มีความรวดเร็วสูง (High-throughput screening) ได้โดยการใช้เทคนิคอีไลซ่า หรือ แอนติบอดีอะเรย์
- 30 หลักการที่กล่าวมาข้างต้นจะสามารถประยุกต์ใช้ได้เฉพาะกับการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งในรูปแบบของทีเอเอที่สามารถถูกหลั่งออกมาในซีรัมได้เท่านั้น จึงจะสามารถทำการตรวจวินิจฉัยผ่านทางซีรัมได้ ซึ่งการทำงานในลักษณะดังกล่าวอาจเป็นข้อจำกัดในการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งตัวใหม่ๆ เนื่องจากไม่จำเป็นที่ทีเอเอทุกชนิดจะต้องถูกหลั่งออกมาในซีรัม ดังนั้น โดยสรุปแล้ววิธีการตามหลักการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดใน



(cDNA expression library) ที่สร้างขึ้นมาจากเนื้อเยื่อมะเร็งด้วยวิธีของผู้ป่วยมะเร็ง เพื่อหาโคลนที่มีคุณสมบัติเป็นทีเอเอ คือ สามารถทำปฏิกิริยา (reactive) กับซีรัมผู้ป่วยได้โดยไม่ทำปฏิกิริยากับซีรัมจากคนปกติ หรือที่รู้จักกันในชื่อของวิธี SEREX (Serological screening of recombinant cDNA expression library) (Scanlan 2005) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (1) ตัดเก็บเนื้อเยื่อมะเร็งหรือเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อมะเร็ง (2) สกัดเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) จากเนื้อเยื่อมะเร็งเพื่อสร้างห้องสมุดการแสดงออกของยีน (cDNA Expression Library) (3) ตรวจสอบห้องสมุดการแสดงออก (Expression library) ด้วยซีรัมผู้ป่วยเพื่อค้นหาโคลนที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีในซีรัมผู้ป่วยหรือโคลนที่ให้ผลบวก (Positive clone) (4) วิเคราะห์ลำดับเบสของโคลนที่ให้ผลบวก เพื่อค้นหายีนที่ทำหน้าที่สร้างโคลนที่ให้ผลบวกนั้นๆ (5) ตรวจสอบแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอนั้นๆ ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งและซีรัมจากกลุ่มควบคุม (6) คำนวณและแปลความหมายค่าความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างการตรวจพบแอนติบอดีต่อทีเอเอนั้นๆ ในตัวอย่างตรวจซีรัมกับการเป็นมะเร็ง นอกจากนี้วิธี SEREX ยังมีการประยุกต์ใช้โปรตีโอมิกส์ (proteomics) แยกโปรตีนชนิดต่างๆ ที่แสดงออกอยู่บนเนื้อเยื่อมะเร็งโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ 2 มิติ (2-Dimension gel electrophoresis) ตามด้วยการตรวจสอบโปรตีนเหล่านั้นด้วยซีรัมคนไข้มะเร็ง เพื่อค้นหาโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นทีเอเอ โดยวิธีที่เรียกว่า SERPA (Serological proteome analysis) (Gunawardana และ Diamandis 2007)

อย่างไรก็ตาม หลังจากการค้นพบทีเอเอด้วยวิธีดังกล่าวแล้ว ทีเอเอเหล่านี้จะยังไม่สามารถใช้ประโยชน์ในทางคลินิกได้ทันที เนื่องจากทีเอเอ หรือ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอเหล่านี้ถูกค้นพบ (identified) บนพื้นฐานความจำเพาะของแอนติเจนกับแอนติบอดีเท่านั้น ดังนั้นการที่ทีเอเอหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอเหล่านี้ จะมีบทบาทหรือมีความสัมพันธ์กับการตรวจพบ (detection) การวินิจฉัย (diagnosis) การบอกระยะ (staging) หรือ พยาธิสภาพ (pathology) ของโรคมะเร็งหรือไม่ อย่างไรนั้น ต้องอาศัยการตรวจสอบในกลุ่มตัวอย่างขนาดใหญ่ (large scale) และมีความหลากหลายของระยะหรือชนิดของมะเร็งก่อน ดังนั้น หากมีระบบการจัดการหรือกรรมวิธีที่จะสามารถช่วยเพิ่มหลักการหรือประสิทธิภาพในการค้นหาทีเอเอ หรือ แอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอที่มีความสัมพันธ์กับมะเร็งหรือลักษณะทางคลินิกที่ต่างกันของเนื้อเยื่อมะเร็งได้อย่างเป็นระบบ ก็น่าจะช่วยให้สามารถค้นพบทีเอเอหรือแอนติบอดีที่มีประโยชน์ใช้ในทางคลินิกได้รวดเร็วมากขึ้น

ภายหลังจากที่โครงการถอดรหัสพันธุกรรมมนุษย์หรือ Human Genome Project ได้เสร็จสมบูรณ์ลงในปี ค.ศ. 2003 ข้อมูลทางพันธุกรรมจำนวนมหาศาลที่ได้จากโครงการ รวมถึงความก้าวหน้าของเทคโนโลยีทางด้านจีโนม ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาชีววิทยาโมเลกุลของเซลล์มะเร็งในลักษณะต่างๆ กันไป เช่น การศึกษาการใช้สโนปส์ หรือ SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) ในการทำนายความเสี่ยงของการเกิดโรคมะเร็ง หรือ การศึกษาถึงการใช้อัตราการแสดงออกของกลุ่มยีน (gene expression profile) เพื่อประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยหรือ จำแนกชนิดของเนื้องอกหรือเซลล์มะเร็ง ซึ่งอาจนำมาซึ่งการพัฒนาการวางแผนการรักษา

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

กรรมวิธีการตรวจหาอโตแอนติบอดี (autoantibody) ที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งโดยการประยุกต์ใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนร่วมกับเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา

5 สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

เทคโนโลยีชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการตรวจหาอโตแอนติบอดีที่ตอบสนองต่อเซลล์มะเร็งโดยการประยุกต์ใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนร่วมกับเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- ปัจจุบันโรคมะเร็งยังคงเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญทั้งในประเทศไทยและภูมิภาคอื่นทั่วโลก สาเหตุใหญ่เนื่องมาจากการขาดแคลนเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหามะเร็งระยะต้นที่ถูกต้องแม่นยำ รวมถึงการรักษาที่ยังขาดประสิทธิภาพในการกำจัดเซลล์มะเร็งในระยะแพร่กระจายสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนา การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็ง (tumor marker) ในรูปแบบแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับมะเร็ง (TAA; Tumor associated antigen) หรืออโตแอนติบอดี (autoantibody) ในซีรัมของผู้ป่วยก็นับว่าเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายน้อย เมื่อเทียบกับการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งในตัวอย่างตรวจชนิดอื่นๆ

- ทีเอเอ (TAA) คือ โปรตีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติบนเซลล์มะเร็งโดยอาจจะผิดปกติในเชิงคุณภาพ เช่น การกลายพันธุ์ (mutation) หรือในเชิงปริมาณ เช่น การแสดงออกมากเกินไปผิดปกติ (overexpression) ซึ่งโปรตีนที่มีความผิดปกติเหล่านี้จะสามารถกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ของผู้ป่วยมะเร็งผลิตอโตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอที่แสดงออกโดยเซลล์มะเร็งนั้นได้ (Li, Miles และคณะ 2004) ปัจจุบันพบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอเหล่านี้สามารถถูกตรวจพบได้ในซีรัมผู้ป่วยมะเร็งหลากหลายชนิด อีกทั้งการศึกษาที่ผ่านมายังแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำแอนติบอดีจำเพาะต่อทีเอเอเหล่านี้ไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับบ่งชี้มะเร็งโดยตรวจผ่านทางซีรัม (serum tumor marker) เพื่อการตรวจหา พยากรณ์ หรือ ติดตามผลการรักษาได้ในมะเร็งหลายๆ ชนิดอีกด้วย (Lu, Goodell และคณะ 2008)

- อย่างไรก็ดี ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาบ่งชี้ว่าการที่จะนำอโตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอมาใช้เพื่อประโยชน์ในการวินิจฉัยหรือตัดสินใจในการรักษาให้ได้ผลดีนั้น น่าจะเป็นการตรวจหาแอนติบอดีต่อทีเอเอหลายๆ ตัวประกอบกัน เพื่อช่วยเพิ่มความไวหรือความจำเพาะในการตรวจมะเร็งชนิดนั้นๆ (Zhang, Casiano และคณะ 2003) ซึ่งในปัจจุบันเทคนิคการค้นหาทีเอเอตัวใหม่ๆ เพื่อนำทีเอเอหรืออโตแอนติบอดีที่จำเพาะต่อทีเอเอเหล่านั้นมาเป็นตัวเลือกเพิ่มในการตรวจวินิจฉัยนั้นมีอยู่หลายวิธี อาทิเช่น การตรวจกรองห้องสมุดการแสดงออกของยีน